

滋陰降火湯의 알레르기성 炎症反應抑制 效果

김유경, 김홍준, 김우성, 박형진, 문구, 김동웅, 원진희

원광대학교 한의과대학 비계내과학교실

Inhibitory Effect of *Jaumganghwa-tang* on Allergic Inflammatory Reaction

Yu-Kyung Kim, Hong-Joon Kim, Woo-Sung Kim, Hyoung-Jin Park,
Goo Moon, Dong-Woung Kim, Jin-Hee Won

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Object : This study investigates *Jaumganghwa-tang*(JGT) has been used for the purpose of prevention and treatment of allergic inflammatory diseases. This study was to investigate the biological effects of JGT.

Methods : Cytotoxicity and inflammatory cytokines secretion with human mast cells(HMC-1) were examined. HMC-1 cells were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and calcium ionophore A23187. JGT by itself had no effect on cytotoxicity of HMC-1. The effects of JGT on the secretion of tumor necrosis factor-alpha(TNF- α) and interleukin(IL)-6 from HMC-1 were evaluated with enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA).

Result : It was found that JGT inhibited PMA plus A23187-induced TNF- α and IL-6 secretion. JGT also inhibited the NF- κ B(p50) expression.

Conclusion : These results suggest that JGT inhibits the secretion of inflammatory cytokines in HMC-1 cells through blockade of NF- κ B activation. Taken together, these effects support a role for JGT as a therapeutic agent in treatment of allergic inflammatory diseases such as asthma.

Key Words: *Jaumganghwa-tang*(JGT), human mast cells(HMC-1), TNF- α , NF- κ B

1. 緒 論

喘息은 여러 가지 자극에 의한 氣道の 過敏性을 특징으로 하는 疾患으로, 자극에 의해 氣道內 炎症反應과 氣道の 광범위한 협착을 일으키고 이로 인한 임상증상이 자연적 또는 치료에 의해 호전되는 可逆

性을 지니고 있다. 최근 기도내 염증 반응에 대한 연구가 활발히 진행되어 기도 내 염증이 호산구, 비만세포, T 세포 등에 의한 것으로 밝혀지고 있다.

喘息은 한의학에서 哮喘의 범주에 속하는 질환으로, 喘은 呼吸急促을 哮는 喉中有聲을 뜻하며 呼吸困難 喘鳴有聲한 증상을 나타내는 만성호흡기질환을 의미한다. 그 원인으로 寒冷說, 心因說, 痰因說, 素因說, 感染說, 過敏性 反應, 肺腎의 呼吸機能障礙 등이 있다. 특히 張*은 夙根이라 하여 특수하게 내재된 소인을 가진 사람이 寒冷을 만나거나 疲勞 혹은 勞力을 할 때 哮喘證이 發한다고 주장하였으니 현대의학

· 접수 : 2004년 3월 24일 · 채택 : 2004년 4월 16일
· 교신저자 : 김유경, 원광대학교 광주한방병원 3내과
(Tel. 062-670-6527 Fax. 062-670-6529, E-mail :
kyklis76@hanmail.net)

의 알레르기 천식의 개념과 유사하다고 볼 수 있다.

滋陰降火湯은 龔⁵의 《萬病回春》에 처음으로 언급된 처방으로 陰虛火動으로 야기된 睡中盜汗, 午後發熱, 咳嗽痰盛, 咯唾血, ... , 將成勞瘵를 치료한다고 하였다. 근래 임상에서는 급만성 기관지염, 상기도염, 폐결핵, 기타 기관지천식 등에 유용하게 사용되고 있으며⁶, 실험적 연구로는 滋陰降火湯과 滋陰降火湯加味方이 실험적으로 손상된 肺에 유의성 있는 효과가 있음을 趙⁷와 鄭⁸이 보고한 바 있다.

본 연구에서 滋陰降火湯의 염증성 세포활성화물질에 대한 효과를 규명하기 위하여 비만세포활성화 물질인 calcium ionophore A23187과 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)로 인간 비만세포주인 human mast cell-1 (HMC-1)을 자극하여 세포활성물질인 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)와 interleukin(IL)-6의 분비에 미치는 영향과, 세포활성물질의 발현을 조절하는 대표적인 전사인자인 nuclear factor kappa B(NF- κ B)의 발현에 미치는 영향을 실험하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

(1) 藥材

본 실험에 사용한 약재는 圓光大學校 光州韓方病院에서 구입한 후 精選하여 실험에 사용하였다. 처방내용은《東醫寶鑑》에 의거하였으며 1貼의 분량은 Table 1과 같다.

(2) 試藥

세포배양액 Iscove's Modifide Dulbecco's Media(IMDM)은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), avidin-peroxidase, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenz thiazoline-6-sulfonic acid), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -diphenyl tetrazolium bromide(MTT)와 다른 시약들은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Anti-human TNF- α /IL-6

Table 1. Prescription contents of *Jaeumganghwa-tang* Per Pack

本草名	生藥名	分量(g)
白芍藥	Paeoniae Radix	5.2
當歸	Angelicae gigantis Radix	4.8
熟地黃	Rehmanniae Radix	4.0
麥門冬	Lirioipis Tuber	4.0
白朮	Atractylis Rhizoma	4.0
生地黃	Rehmanniae Radix	3.2
陳皮	Aurantii nobilis Pericarpium	2.8
知母 鹽水炒	Anemarrhenae Rhizoma	2.0
黃柏 鹽水炒	Phellodendri Cortex	2.0
甘草	Glycyrrhizae Radix	2.0
生薑	Zingiberis Rhizoma	6.0
大棗	Zizyphi inermis Fructus	4.0
Total	amount	44

항체, biotinylated anti-human TNF- α /IL-6 항체, 그리고 재조합 human TNF- α /IL-6는 R&D Systems와 Pharmingen(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

2. 方法

(1) 滋陰降火湯 엑스(extract) 조제

실험에 사용할 滋陰降火湯 엑스 제조를 위해 1貼 분량인 44g을 증류수에 넣고, 3시간 정도 끓인 다음, 여과한 후 동결 건조하였다. 엑스는 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 엑스의 수율은 약 43%이었다. 엑스 분말은 phosphate-buffered saline(PBS)에 녹여 0.22 μ m 여과지로 여과하여 실험에 사용하였다.

(2) HMC-1 세포 배양

사람의 비만세포주인 HMC-1 세포는 IMDM 배양액에서 배양하였다. IMDM은 100U/ml의 penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 50nM mercaptoethanol과 10% fetal bovine serum(FBS)를 포함했으며 37℃, 5% CO₂와 95% 습도가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 세포는 50nM PMA와 1 μ M A23187로 자극하기 전에 30분간 滋陰降火湯 엑스를 농도별로 전처리 하여 37℃에서 8시간 배양하였다.

(3) MTT

세포 생존율을 조사하기 위하여 MTT 정량을 실시하였는데, HMC-1 세포 (5 \times 10⁵cells) 500 μ l를 4-well plate에 seeding하여 1.0mg/ml 농도의 滋陰降火湯으

로 처리한 군과 처리하지 않은 군을 8시간 배양하고, 8시간 배양 후 새로운 배양액으로 바꿔 주고 500 μ g/ml 농도의 MTT 용액을 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 배양하였다. 원심 분리하여 얻은 formazan에 disodiumsulfoxide(DMSO)를 첨가하여 잘 녹인 후 96-well plate에 넣은 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 滋陰降火湯을 처리하지 않은 군을 100%로 하여 滋陰降火湯을 처리한 군의 생존율을 환산하였다.

(4) 세포활성물질 정량

세포활성물질인 TNF- α 와 IL-6의 분비는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법으로 측정하였다. 즉 HMC-1 세포를 10% FBS가 첨가된 IMDM으로 배양하고 PMA(50nM)와 A23187(1 μ M)을 실험군과 대조군에 처리한 후, 8시간동안 배양하였다. 배양액은 원심분리하여 -75 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 96-well plate에 1차 capture 항체 (1 μ g/ml)를 100 μ 씩 넣어 코팅하고, 0.05% tween-20이 첨가된 PBS(PBS-tween)로 세정한 다음 1% BSA, 5% sucrose, 0.05% NaN₃가 포함된 PBS로 1시간 동안 blocking하였다. Blocking이 끝나면 PBS-tween으로 세정하고, 준비해둔 시료와 함께 농도를 알고 있는 재조합 세포활성물질을 100 μ 를 넣어 2시간 방치한 후, 다시 2시간 후에 PBS-tween으로 세정하고 2차 detection 항체 (0.5-1 μ g/ml)를 100 μ 를 넣어서 1시간 동안 방치한 다음 well을 PBS-tween으로 세정하고 avidin-peroxidase를 넣어 30분간 반응시켰다. 30분 후 PBS-tween으로 세정하고 기질인 azinobis93- ethylbenzothiazoline-6-sulphonate(ABTS)를 첨가하여 발색반응이 일어나면 405nm 파장에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 농도를 알고 있는 재조합 세포활성물질을 이용하여 시료의 농도를 결정하였다.

(5) Western blotting

세포를 모아 PBS로 세정한 다음, 1% Igapel-630 lysis buffer를 넣고 세포를 용해한다. 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후 15,000 rpm으로 원심 분리한 다음, 상층액을 bicinchoninic acid(BCA) 용액으로 정량 한다. 정량된 단백질 50 μ g을 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동한 후, 4 $^{\circ}$ C에서

nitrocellulose membrane에 전이시키고, 그 membrane을 0.1% PBS-tween에 용해한 5% skim milk로 1시간 동안 blocking 하였다. PBS-tween으로 가볍게 세정한 후 membrane은 p50 1차 항체로 1시간 동안 반응시켰다. PBS-tween으로 1시간 동안 세정하고 2차 항체를 처리하여 30분 동안 반응시켰다. 그 후 1시간 동안 PBS-tween으로 세정한 후 X-ray 필름에 감광시켰다.

(6) 통계분석

모든 결과는 평균값 \pm 표준오차로 나타내었고, 평균값은 세 번 이상의 독립된 실험을 통하여 구하였다. 그룹간의 평균값 비교를 위해서 Student's t-test를 실시하였다. 통계적 유의성을 위한 유의수준은 p<0.05로 판정하였다.

III. 實驗成績

1. 滋陰降火湯의 세포 독성 관찰

滋陰降火湯에 의한 세포 생존율을 관찰하기 위하여 HMC-1 세포에서 MTT 정량을 시행하였다. 1.0mg/ml 농도의 滋陰降火湯을 8시간 단독 처리하여 배양한 군의 세포생존율을 관찰한 결과로, 滋陰降火湯은 HMC-1 세포에 대해 유의성 있게 세포 독성이 없다는 것을 확인했다(Fig.1).

2. 滋陰降火湯의 HMC-1 세포로부터의 염증성 세포활성물질 분비 조절 효과

滋陰降火湯의 알레르기성 염증 반응 조절 효과를 관찰하기 위해 HMC-1 세포를 PMA와 A23187로 자극한 후, 대표적 염증성 세포활성물질인 TNF- α 와 IL-6의 분비량을 비교 분석했다. ELISA 방법으로 TNF- α 와 IL-6의 분비량을 정량한 결과 PMA와 A23187로 자극한 대조군 (1.14 \pm 0.03ng/ml)에 비하여 滋陰降火湯 0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml를 전 처리한 군의 경우 TNF- α 는 각각 1.26 \pm 0.09ng/ml, 0.61 \pm 0.03ng/ml, 0.82 \pm 0.04ng/ml이 분비됐다. 특히 0.5mg/ml 처리군과 1.0mg/ml 처리군의 경우 대조군과 비교하였을 때 유의성 있는 조절 효과를 나타냈다

($P < 0.001$)(Fig. 2).

IL-6의 경우는 PMA와 A23187로 자극한 대조군 ($10.29 \pm 0.61 \text{ ng/ml}$)에 비하여 滋陰降火湯을 각각 0.1 mg/ml , 0.5 mg/ml , 1.0 mg/ml 를 전 처리한 군에서 $10.14 \pm 1.12 \text{ ng/ml}$, $9.40 \pm 0.98 \text{ ng/ml}$ 과 $7.82 \pm 0.41 \text{ ng/ml}$ 의 분비량을 보였다. 滋陰降火湯 1.0 mg/ml 처리군의 경우 $P < 0.05$ 의 유의수준을 나타냈다 (Fig. 3).

다음은 滋陰降火湯의 처리 시간에 따른 변화를 분석 실험하기 위하여 滋陰降火湯을 PMA와 A23187 자극 4 시간과 1시간 전처리 군과 PMA와 A23187 자극 1시간과 4시간 후처리 군으로 나누어, TNF- α 의 분비량을 분석하였다. TNF- α 의 억제경향이 가장 높았던 滋陰降火湯 0.5 mg/ml 를 각각의 시간에 투여하였을 경우 자극 전 1시간 약물 처리에서는 TNF- α 유도에 높은 억제 작용을 보였으나 滋陰降火湯 자극 4시간 전 약물 처리군과 자극 4시간과 1시간 후 약물처리 군에 있어서는 억제작용을 나타내지 않았다 (Fig. 4).

3. 滋陰降火湯의 NF- κ B (p50) 발현 조절 효과

滋陰降火湯의 활성화된 비만세포로부터의 TNF- α 와 IL-6의 분비 조절 기전을 알아보기 위해 세포질 내에서 NF- κ B의 단백질 발현량의 변화를 분석하였다. 그 결과 PMA와 A23187로 자극된 HMC-1 세포에서 증가된 p50의 발현이 滋陰降火湯 전처리에 의해 억제됐다. 이런 결과는 滋陰降火湯이 NF- κ B의 발현 조절을 통해 이들 세포활성물질들의 분비를 억제 시킴을 의미한다(Fig. 5).

IV. 考 察

천식은 기도의 과민성을 특징으로 하는 질환으로 여러 가지 자극에 의해 기도 점막에 염증반응을 일으키고 기관지 평활근을 수축시켜 기도폐색을 일으키게 되는데 이러한 기도 폐색은 자연적으로 혹은 치료에 의해 회복되는 가역성을 갖고 있는 질환으로 인식되고 있다⁹.

천식의 증상은 발작적인 기침, 호흡곤란 및 천명이 전형적인 3대 증상으로 이러한 증증보다는 지속적인

만성 기침, 흉부 압박감, 인후의 이물감 같은 단순한 증상만을 호소하는 경우가 더 많다¹⁰. 이러한 천식발작을 일으키는 원인을 살펴보면 외인성의 흡입 알레르겐에 의한 과민 반응, 호흡기 감염, 일상의 스트레스에 대한 심인성 생리 반응, 공기오염 등을 들고 있으며 그 외 반사, 자율신경계 이상, 유전적 소인, 내분비 이상 등이 있으나 그 중 알레르기 반응이 가장 중요한 원인을 차지하고 있다¹¹.

천식의 병리 소견은 기도 상피층 탈락, 배세포 증식, 활성화된 호산구의 상피층 및 점막하 조직침윤, 기관지 분비물 내 호산구 증가, 비만세포 증가, 림프구 증가, 상피세포 기저막층의 비후, 점막하 분비선 증식, 기관지 근육의 비후 및 증식 등을 특징으로 하는 기도의 만성 염증소견을 나타낸다¹².

哮喘이란 호흡기의 痰氣로 인한 痰喘이 심한 증상으로 기관지천식, 천식성 기관지염, 폐기종과 심장성 천식 등을 포괄한다¹³. 喘은 呼吸急促하여 促促氣急, 噶噶痰聲, 張口擡肩, 搖身拒肚 하는 것을 이르며, 哮는 喉中有聲響으로 與喘相類, 但不似喘, 開口出氣之多이라 하였다¹⁴. 그 원인으로 가장 많이 제시된 것이 痰으로 인하여 발생한다는 痰因說인데¹⁵, 巢¹⁶, 朱¹⁷, 龔¹⁸, 樓¹⁹ 등이 이를 주장하였고, 李²⁰, 王²¹ 등이 偏食을, 朱²²가 驚恐을, 葉²³이 外感 등을 각각 제시하고 있다. 특히 張²⁴은 夙根이라 하여 특수하게 내재된 소인을 가진 사람이 寒冷을 만나거나 疲勞 혹은 勞力을 할 때 哮喘證이 發한다고 주장하였으니 현대의학의 알레르기 천식의 개념과 유사하다고 볼 수 있다. 哮喘의 치료는 實喘과 虛喘으로 나누어 치료하는데 實喘에는 風寒, 痰濁 등의 病邪除去를 위주로 하고, 虛喘에는 肺虛, 腎虧 등의 扶正을 위주로 한다²⁵.

滋陰降火湯은 龔의 《萬病回春》에 최초로 수록된 처방으로 陰虛火動, 發熱咳嗽, 吐痰喘急, 盜汗口乾, 咯唾血에 사용한다고 하였다. 許²⁶는 《東醫寶鑑》“咳嗽”門에서 夜嗽, 痰喘에서 滋陰降火湯을 언급하였으며, 임상에서 陰虛火動으로 인한 호흡기질환에 활용되고 있다. 陰虛火動이란 腎精不足으로 困하여 虛火가 炎上하는 것을 腎水가 능히 制火하지 못하여 야기되는 것으로, 火克金하게 되어 咳嗽, 吐痰하고, 盜汗, 遺精

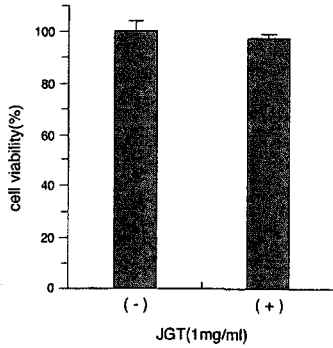


Fig. 1. Effect of JGT (1 mg/ml) on the cell viability in HMC-1 cells.

Cell viability was evaluated by MTT assay 8 h after JGT treatment in HMC-1 cells. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments.

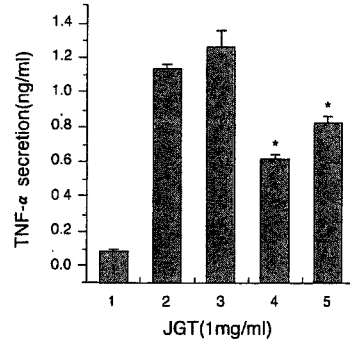


Fig. 2. Effect of JGT on the TNF- α inhibition in PMA plus A23187-stimulated HMC-1 cells.

Cells were pre-treated with JGT for 30 min and then challenged with PMA plus A23187 for 8 h. TNF- α concentrations were measured from cell supernatants using ELISA method. Values are mean \pm SEM of duplicate determinations from three separate experiments. Line 1; control, Line 2; PAM+A23187, Line 3; JGT(0.1mg/ml)+ PAM+A23187, Line 4; JGT(0.5mg/ml) + PAM+A23187, Line 5; JGT(1.0mg/ml)+PAM+A23187
* $P < 0.001$: significantly different from the stimulated group.

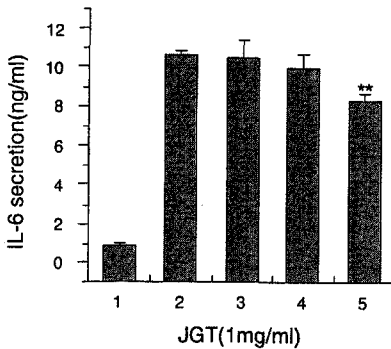


Fig. 3. Effect of JGT on the IL-6 inhibition in PMA plus A23187-stimulated HMC-1 cells.

Cells were pre-treated with JGT for 30 min and then challenged with PMA plus A23187 for 8 h. IL-6 concentrations were measured from cell supernatants using ELISA method. Values are mean \pm SEM of duplicate determinations from three separate experiments. Line 1; control, Line 2; PAM+A23187, Line 3; JGT(0.1mg/ml)+PAM+A23187, Line 4; JGT(0.5mg/ml) + PAM+A23187, Line 5; JGT(1.0mg/ml)+PAM+A23187
** $P < 0.05$: significantly different from the stimulated group.

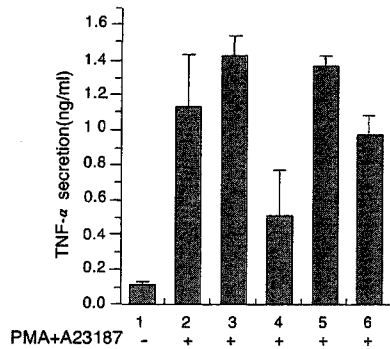


Fig. 4. Time-dependent effect of JGT (0.5mg/ml) on TNF- α secretion in PMA plus A23187-stimulated HMC-1 cells.

Cells were pre-treated or after-treated with JGT for 4 h, 1 h and challenged with PMA plus A23187 for 8 h. Line 1; control, Line 2; PMA+A23187, Line 3; pre-treated with JGT for 4 h before stimulation, Line 4; pre-treated with JGT for 1 h before stimulation, Line 5; treated with JGT after 1 h stimulation, Line 6; treated with JGT after 4 h stimulation.

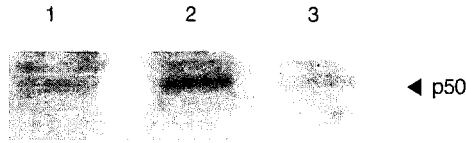


Fig. 5. Effect of JGT on the expression of p50 protein in HMC-1 cells.

Cells were stimulated with medium or JGT and then challenged with PMA plus A23187 for 1 h. Expression of p50 was assayed by Western blot analysis. Lane 1, control ; lane 2, PMA plus A23187 ; lane 3, JGT (1mg/ml) plus PMA plus A23187.

嗜臥, 午後發熱 등 여러 증상들이 나타난다²⁴.

滋陰降火湯은 血虛 陰虛로 인한 火動에 기본방인 知栝四物湯에 川芎을 去하고, 麥門冬, 生地黃을 加하여 滋陰清肺作用을 強化시키고 白朮, 陳皮, 甘草를 加하여 理氣健脾시킴으로써 滋陰之劑의 厚重한 滋味를 잘 흡수할 수 있도록 하였다⁴. 滋陰降火湯의 구성약물의 효능을 보면, 白芍藥은 耗散한 肺氣를 收斂하고 理를 견고히 하며, 當歸는 抑火, 滋血하고, 熟地黃은 滋陰生陽한다. 黃栝과 知母는 陰虛로 인한 相火를 抑制하며, 生地黃은 瀉心, 補肺하고 麥門冬은 潤肺 除煩 祛痰 止咳 효능이 있으며, 白朮은 補脾 燥濕 祛痰하고, 陳皮는 健脾 祛痰 行氣하며 甘草는 諸藥을 協化한다²⁴. 따라서 滋陰降火湯은 알레르기성 천식, 기관지 천식 및 여러 기관지 질환을 치료하는데 유용하게 활용할 수 있는 방제이다.

현재까지 滋陰降火湯에 대한 실험적 연구로는 鄭²⁵의 滋陰降火湯의 解熱 鎮痛 抗痙攣 및 O₂로 중독된 백서 폐손상에 미치는 영향, 趙²⁶의 滋陰降火湯 및 滋陰降火湯加味方이 실험적 폐손상과 止血에 미치는 영향에 대한 실험이 보고되어 있다. 그러나 滋陰降火湯이 천식에 미치는 영향에 대한 실험적 연구가 이루어진 바가 없기에, 저자는 본 연구에서 滋陰降火湯이 천식의 중요한 기전이 되는 알레르기 염증 억제 반응에 유의한 효과가 있기에 보고하는 바이다.

천식은 알레르겐, 비만세포 및 IgE가 관여하여 분비되는 화학매개체의 직접적인 악리작용에 의해서

또 화학매체와 사이토카인, 부착인자 (adhesion molecule)가 관여하여 기관지로 모여온 염증세포에 의해서 발병하는 기도의 만성 알레르기 염증성 질환으로 이해되고 있다.

임상적으로 알레르기성 천식환자의 기관지 폐포 세척액과 정상군의 기관지 폐포 세척액을 비교하였을 때 천식환자의 기관지 폐포 세척액에서 호산구, 비만세포, 화학매체 등이 일관되게 증가되어 있다²⁶. 또한 활성화된 폐비만세포로부터 다양한 세포활성물질들이 분비되며, 특히 알레르기성 염증반응의 유발에 중요한 세포활성물질들이 천식의 병리 조직에서 발견된다. 특히 염증 유발과 관련성이 많은 세포활성물질 (cytokines)인 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin (IL)-4, IL-6 및 IL-8의 농도가 기관지 천식 환자에서 유의성 있게 높음을 알 수 있다²⁷.

그 발병 기전은 항원이 기도 내에 들어오면 식세포와 협조 T림프구의 도움으로 B 림프구로부터 IgE 같은 항원 특이적 항체가 만들어 진다. 이 항원 특이적 항체는 비만세포, 호염기구 등의 표면 수용체에 달라 붙은 후 동일한 항원에 노출된 경우 이 세포들이 활성화되고 세포내의 여러 가지 화학 전달물질들이 세포 밖으로 유리된다. 이렇게 생성된 세포활성물질이 표적조직 및 표적세포에 작용하여 피부, 점막 등에서 국소성, 전신적으로 다양한 임상 증상이 나타난다²⁸. 비만세포는 기관지의 점막 하 또는 점막 표면에서 발견되며, 비만세포막에 존재하는 고친화성의 IgE수용체(FcεRI)를 통해서 활성화된다. IgE 수용체에 결합되어 있는 IgE항체가 항원에 의하여 가교를 형성하면 비만세포가 활성화되고 그 결과 탈과립이 일어나 화학적 매개물질이 방출된다. 히스타민, PGD₂, LTC₄ 및 키닌류가 방출되어 기관지 평활근 수축, 점액분비의 항진, 혈관확장과 투과성 항진을 일으키며 신경 말단을 자극하여 즉시형 천식 반응이 일어난다²⁹. 비만 세포는 이러한 초기 반응에만 국한되어 작용하는 것이 아니라 후기 기관지 염증 반응에도 관련되어 있다. 즉 비만세포에서 생성되어 분비되는 TNF-α는 혈관내피세포에 유착인자의 발현을 야기하여 백혈구를 축적시켜 염증 반응을 야기한다.

또한 비만세포에서 생산되는 IL-4, IL-6 및 IL-13 등은 Th 2 세포의 반응을 증가시켜, 결국 IgE의 생산을 증가시킴으로써 만성 염증 반응에 기여하게 된다¹¹.

TNF- α 는 조직 손상을 유발하고 염증의 중요한 개시인자로 알려져 있다¹². TNF- α 는 혈관내피세포에 새로운 표면 부착인자의 발현을 유도하여 백혈구 즉 호중구, 단핵구, 림프구를 축적시켜 염증 반응을 야기한다. 또한 단핵구 및 다른 형태의 세포에 작용하여 케모카인(chemokine)을 분비하게 한다¹³. 또한 Brown-Norway rats에서 TNF- α 의 흡입은 기도과민반응을 증가시키며 사람에게 대해서도 같은 경향을 보였다¹⁴. IL-6는 염증 반응이 일어나는 동안 강력한 매개자 역할을 하는 세포활성물질로, 천식 환자에서 정상인보다 증가되어 있는 것을 알 수 있다¹⁵. IL-6는 IL-1 및 TNF- α 에 의해 단핵 식균세포, 혈관내피세포, 섬유아세포 등에서 생성된다¹⁶. TNF- α 와 IL-6의 발현은 전사인자 NF- κ B 활성 의존적이다. NF- κ B는 목표 유전자의 promoter 부위에 존재하는 DNA에 부착하여 TNF- α 와 IL-6를 포함한 염증성 세포활성물질의 전사를 개시하는데 관여한다. 대부분 NF- κ B는 이량체이며 Rel A (p65)와 NF- κ B1 (p50) 또는 NF- κ B2 (p52)로 구성돼 있다¹⁶.

본 연구에서는 滋陰降火湯의 알레르기성 염증반응 조절 효과를 규명하기 위하여 사람의 비만세포주인 HMC-1 세포를 PMA와 calcium ionophore A23187로 자극하여 분비되는 염증성 세포활성물질에 대한 자음강화탕의 효과를 연구하였다.

칼슘 ionophore인 A23187은 세포내 칼슘의 농도를 증가시키는 물질로 세포내 칼슘의 증가는 비만세포를 활성화시켜 세포활성물질을 분비시키는 물질이다. PMA는 protein kinase C에 직접 작용하는 분열 촉진제로서 비만세포를 활성화시켜 다량의 세포활성물질을 분비케 한다.

滋陰降火湯에 의한 세포 생존율을 MTT 정량 분석법으로 측정하였는데, 滋陰降火湯은 HMC-1 세포에 유의하게 독성이 없음을 관찰하였다(Fig.1).

알레르기성 염증 반응 조절 효과를 관찰하기 위해 ELISA 방법으로 滋陰降火湯을 전처리한 비만세포로

부터 TNF- α 와 IL-6의 분비량을 측정하였다. 그 결과 PMA와 A23187로 자극한 HMC-1 세포에서는 TNF- α 와 IL-6의 현저한 증가율을 보인 반면, TNF- α 의 경우 滋陰降火湯 0.5mg/ml을 처리한 실험군에서 49.57%, IL-6의 경우 滋陰降火湯 1.0mg/ml을 처리한 실험군에서 25.07%의 억제율을 보였다(Fig 2,3). 이런 결과는 滋陰降火湯이 자극된 비만세포에서 분비되는 염증성 세포활성물질인 TNF- α 와 IL-6생성을 조절하는 효과가 있음을 의미한다. 하지만 滋陰降火湯이 세포내 칼슘의 농도를 조절하거나 PKC의 활성을 억제하는 효과가 있을 가능성을 배제할 수 없기 때문에 장차 이 부분에 대한 더욱 상세한 연구 검토가 필요할 것으로 사료된다.

滋陰降火湯의 처리 시간에 따른 변화를 분석한 실험에서, 자극 전 1시간 약물 처리에서는 TNF- α 유도에 높은 억제 작용을 보였으나 滋陰降火湯 4시간 전 처리 후 자극한 군과 자극 후 약물 처리군에 있어서는 억제작용을 나타내지 않았다(Fig 4). 滋陰降火湯은 처리시간에 따라 세포활성물질의 분비 억제 효과가 다르게 나타나 임상적 응용 때 유의할 필요가 있다고 사료되며, 향후 보다 상세한 연구가 필요하다.

세포활성물질 억제기전을 규명하기 위하여 NF- κ B의 단백질 발현량을 Western blotting을 통하여 확인한 바, 滋陰降火湯은 세포질 내의 NF- κ B의 활성을 억제함을 관찰하였다(Fig 5). 이런 결과는 임상적으로 알레르기성 천식 등의 치료에 효과적인 滋陰降火湯이 비만세포내 전사인자인 NF- κ B의 조절을 통하여 염증유발물질인 TNF- α 와 IL-6의 분비를 억제함으로써 항염 효과를 나타냄을 의미한다.

이번 연구 결과는 알레르기성 천식 등의 치료에 유효한 滋陰降火湯의 임상적 활용 근거를 제공하는 중요한 의미가 있을 것으로 생각된다.

V. 結論

저자는 본 연구에서 滋陰降火湯의 알레르기성 항염 효과를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 滋陰降火湯은 인간비만세포에 대한 유의성있는

세포 독성이 없었다.

2. 滋陰降火湯은 활성화된 인간비만세포로부터 TNF- α 의 생성을, 특히 0.5mg/ml 처리군과 1.0mg/ml 처리군의 경우 대조군과 비교하였을 때 현저한 억제 효과를 나타냈다.
3. 滋陰降火湯은 활성화된 인간비만세포로부터 IL-6의 생성을, 특히 1.0 mg/ml 처리군의 경우 현저한 억제 효과를 나타냈다.
4. 滋陰降火湯은 1시간 전 처리군에서 TNF- α 의 생성 억제 효과가 관찰되었다.
5. 滋陰降火湯은 활성화된 비만세포의 NF- κ B (p50) 단백질 발현을 조절 하여 염증성 세포활성물질들의 분비를 억제시켰다.

본 연구 결과가 滋陰降火湯의 알레르기성 염증반응에 대한 임상활용 근거를 제시할 수 있는 하나의 중요한 단서로 활용될 수 있을 거라고 사료된다.

參考文獻

1. 李珩九, 鄭昇杞. 동의폐계내과학. 서울: 민서출판사; 1990, p.162-3, 187-8, 196-201.
2. Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids for asthma. *New Engl J Med*. 1995; 332 : 868-75.
3. 丁鈺彪, 楊偉君. 支氣管哮喘的中醫防治. 上海中醫藥雜誌 1980 ; 제 6號 : p.38.
4. 張介賓. 景岳全書. 서울: 翰成社; 1973, p.367, 984.
5. 龔廷賢. 萬病回春. 서울: 杏林書院; 1975, p.204-5.
6. 조기호. 한방처방의 동서의학적 해석방법론. 서울: 고려의학; 1999, p.430.
7. 趙然鵬. 滋陰降火湯의 解熱 鎮痛 抗痙攣 및 O3로 中毒된 白鼠 肺損傷에 미치는 影響. 서울: 경희대학교 대학원; 1985.
8. 鄭熙才. 滋陰降火湯 및 滋陰降火湯加味方이 實驗的 肺損傷과 止血에 미치는 影響. 서울: 경희대학교 대학원; 1992.
9. 한용철. 임상호흡기학. 서울: 일조각; 1995, p.208.
10. 서울대학교 의과대학편. 전정관 호흡기학. 서울: 서울대학교출판부; 1994, p.231.
11. 전국한의과대학 폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울: 한문화사; 2002, p.178-89, 536.
12. 李中梓. 醫宗必讀. 台南: 종합출판사; 1976, p.354.
13. 吉村永星, 黃義玉, 鄭昇杞, 李珩九. 알레르기성 천식에 관한 문헌적 고찰. 대한한의학회지. 1990; 11(1):39-70.
14. 巢元方. 巢氏諸病源候論(권13,14). 서울: 大星文化社; 1992, p.106-7.
15. 朱震亨. 丹溪心法. 臺北: 五洲出版社; 1969, p.339.
16. 龔廷賢. 壽世保元. 臺北: 旋風出版社; 1974, p.156.
17. 樓英. 醫學綱目. 北京: 中國中醫藥出版社; 1996, p.598, 601-9.
18. 李梴. 醫學入門. 서울: 大星文化社; 1992, p.397-8.
19. 王肯堂. 證治準繩. 北京: 人民衛生出版社; 1991, p.220-31.
20. 朱瀟. 普濟方(3-3). 서울: 翰成社; 1982, p.1900.
21. 葉天士. 臨證指南醫案. 상해: 上海科學技術出版社; 1978, p.299-300.
22. 上海中醫學院編. 中醫內科學. 香港: 商務印書館; 1977, p.17-22.
23. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 한미의학; 2001, p.756, 761.
24. 申載鏞. 方藥合編解說. 서울: 성보사; 1991, p.127-8.
25. 윤용갑. 東醫方劑와 處方解說. 서울: 醫聖堂; 1998, p.184-5.
26. Wenzel SE, Fowler A, Schwartz LB. Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge: in vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with and without asthma. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:1002-8.
27. Stankiewicz W, Dabrowski MP, Chcialowski A, Plusa T. Cellular and cytokine immunoregulation in patients with chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Mediators Inflamm* 2002. Oct;11(5):307-12.
28. 강병수. 한방임상알레르기. 서울: 성보사; 1988, p.22, 64-9, 133-6.
29. 산태용. 알레르기와 한약. 서울: 신일상사; 2001, p.86.
30. 대한천식 및 알레르기학회. 천식과 알레르기 질환. 서울: 군자 출판사; 2002, p. 31-52, 87-91, 245-53, 279-91.
31. Kim HM, Lee YM. Role of TGF-beta 1 on the IgE-dependent anaphylaxis reaction. *J Immunol*. 1999; 162:4960-5.
32. Shah A, Church MK, Holgate ST. Tumour necrosis factor- α : A potential mediator of asthma. *Clin Exp Allergy*. 1995; 25:1038-44.

33. Thomas PS, Yates DH, Barnes PJ. Tumor necrosis factor- α increases airway responsiveness and sputum neutrophils in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152:76-80.
34. Gosset P, Tsicopoulos A, Wallaert B, Vannimenus C, Joseph M, Tonnel AB, Capron A. Increased secretion by tumor necrosis factor- α and interleukin- 6 by alveolar macrophages consecutive to the development of the late asthmatic reaction. *J Allergy Clin Immun.* 1991; 88:561-71.
35. Rollins BJ. Chemokines. *Blood.* 199; 90:909-28.
36. Kuprash DV, Udalova IA, Turetskaya RL, Rice NR, Nedospasov SA. Conserved kappa B element located downstream of the tumor necrosis factor alpha gene: distinct NF-kappa B binding pattern and enhancer activity in LPS activated murine macrophages. *Oncogene.* 1995; 11:97-106.