

# 비만세포에서 淸金降火湯의 염증성 세포활성물질 분비 억제 효과

최영수\* · 문 구 · 김동웅 · 한세희 · 원진희

원광대학교 한의과대학 비계내과학교실

## Inhibitory Effect of Inflammatory Cytokines Secretion of Cheonggeumganghwa-tang in Mast cell

Young Soo Choi\*, Goo Moon, Dong Woung Kim, Se Hee Han, Jin Hee Won

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

Cheonggeumganghwa-tang(CGT) has been used for the purpose of prevention and treatment of bronchial asthma and allergic asthma in Korea. To investigate the biological effect of CGT, the author examined cytotoxicity and inflammatory cytokines secretion with human mast cell line, HMC-1. HMC-1 was stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and calcium ionophore A23187. CGT by itself had no effect on viability of HMC-1. The effects of CGT on the secretion of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin (IL)-6 from HMC-1 were evaluated with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). CGT (1 mg/ml) inhibited PMA plus A23187 -induced TNF- $\alpha$  and IL-6 secretion, by 93.86  $\pm$  2.05%, 68.69  $\pm$  2.86%, respectively. CGT also inhibited the NF- $\kappa$ B (p50) expression. Taken together, these results suggest that CGT inhibit the production of inflammatory cytokines in HMC-1 cells through blockade of NF- $\kappa$ B activation.

Key words : Cheonggeumganghwa-tang(淸金降火湯), TNF- $\alpha$ , IL-6, NF- $\kappa$ B

### 서 론

기관지천식은 다양한 자극에 대한 기관지의 반응성 증가를 특징으로 하는 기도질환으로 발작적인 호흡곤란, 기침, 천명음 등의 소견을 보인다. 임상적으로는 가변적인 기도폐색의 증상을 보이고, 병태생리학적으로는 기도의 과민성이 존재한다. 병리학적으로는 기도의 염증성 반응을 나타내는데, 활성화된 폐 비만세포로부터 다양한 세포활성물질(cytokines)들이 분비되며, 특히 알레르기성 염증반응 유발에 중요한 세포활성물질이 천식의 병리조직에서 발견된다<sup>1,2)</sup>.

韓醫學에서 喘息은 呼吸急促, 喘鳴有聲을 主症으로 하는 哮喘證의 범주에 속하는 만성호흡기질환이다<sup>3)</sup>. 그러므로 발작성 호흡곤란, 천명, 기침을 주증상으로 하는 알레르기 천식도 哮喘

證의 범주에 속할 수 있다. 哮喘證에 대한 원인으로는 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 등을 꼽을 수 있다<sup>4)</sup>. 韓醫學에서 기관지천식에 대한 연구로는 瀉白散<sup>12)</sup>이 염증성 세포활성물질 분비억제에 효과가 있으며, 加味蘇子降氣湯<sup>13)</sup>, 麥門冬湯加味<sup>14)</sup>, 加味解表二陳湯<sup>15)</sup>, 加味清上補下湯<sup>16)</sup>이 알러지 천식 치료에 효과가 있는 것으로 보고되었다.

淸金降火湯은 龔信의 《古今醫鑑》에 처음 수록된 處方으로 “治肺胃鬱火嗽, 痰少, 面赤, 脈數”<sup>5)</sup>, “治火嗽 能瀉肺胃之火 火降則痰少 嗽止”<sup>6)</sup>, “治肺胃痰火”<sup>7)</sup>의 효능이 있다<sup>8)</sup>. 최근에는 辛<sup>9)</sup>, 南<sup>10)</sup>, 尹<sup>11)</sup> 등의 실험적 연구에 의하여 淸金降火湯이 肺水腫이나 肺損傷에 효과가 있음이 보고되었다.

이에 저자는 淸金降火湯이 기관지 천식에서 염증성 세포활성물질 분비에 영향을 줄 수 있을 것으로 사료되어 비만세포 활성화 물질로 알려진 calcium ionophore A23187과 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)로 인간 비만세포주인 human mast cell-1 (HMC-1) 세포를 자극한 후, 염증 유발과 관련성이 많은 세포활성물질인 tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ),

\* 교신저자 : 최영수, 광주시 남구 주월동 543-8 원광대학교 광주한방병원

· E-mail : kyklis76@hanmail.net, · Tel : 062-670-6527

· 접수 : 2004/03/17 · 수정 : 2004/04/28 · 채택 : 2004/05/29

interleukin (IL)-6의 분비와 발현을 유도하여 淸金降火湯의 염증성 세포 활성물질 분비 조절 효과를 실험하였다. 또한 세포활성물질 발현을 조절하는 대표적인 전사인자인 NF-κB의 발현에 미치는 영향을 실험하여 淸金降火湯의 항염증 효과 기전을 규명하는데 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 원광대학교 광주한방병원에서 구입한 후 정선하여 실험에 사용하였다. 처방내용은 《東醫寶鑑》<sup>6)</sup>에 의거하였으며 1첩의 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription contents of Cheonggeumganghwa-tang Per Pack

本草名	生藥名	學名	分量(g)
陳皮	Percarpium citri nobilis	Citrus unshiu MARCOR.	6
杏仁	Semen armeniacae	Prunus armeniaca var. ansu MAXIM.	6
赤茯苓	Poria	Poria cocos WOLF.	4
半夏	Tuber pinelliae	Pinellia ternata BREIT.	4
桔梗	Radix platycodi	Platycodon grandiflorum JACQ.	4
貝母	Bulbus fritillariae	Fritillaria ussuriensis MAXIM.	4
前胡	Radix peucedani	Peucedanum decursivum MAXIM.	4
瓜蒌仁	Semen trichosanthis	Trichosanthes kirilowii MAXIM.	4
黃芩	Radix scutellariae	Scutellaria baicalensis GEORGI.	4
石膏	Gypsum fibrosum		4
枳殼	Fructus ponciri	Poncirus trifoliata (L.)RAF.	3.2
甘草	Radix glycyrrhizae	Glycyrrhiza uralensis FISCH.	1.2
生薑	Rhizoma zingiberis	Zingiber officinale ROSC.	4
Total	amount		52.4

#### 2) 시약

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

#### 1) 淸金降火湯 엑스(extract) 조절

실험에 사용할 淸金降火湯 엑스 제조를 위해 1첩 분량인 52.4 g을 증류수에 넣고, 3시간 정도 끓인 다음, 여과한 후 동결 건조하였다. 엑스는 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 엑스의 수율은 약 20%이었다. 엑스 분말은 PBS(phosphate-buffered saline)에 녹여 0.22 μm 여과지로 여과하여 실험에 사용하였다.

#### 2) HMC-1 세포 배양

사람의 비만세포주인 HMC-1 세포는 IMDM 배양액에서 배

양하였다. IMDM은 100 U/ml의 penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 50nM mercaptoethanol과 10% fetal bovine serum(FBS)이 포함돼 있으며 37℃, 5% CO<sub>2</sub>와 95% 습도가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 세포는 50 nM PMA와 1 μM A23187로 자극하기 전에 30분간 淸金降火湯 엑스를 농도별로 전처리하여 37℃에서 8시간 배양하였다.

#### 3) MTT

세포 생존율을 조사하기 위하여 MTT를 실시하였다. HMC-1 세포 (5×10<sup>5</sup>cells) 500 μl를 4-well plate에 seeding하여 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml 농도의 淸金降火湯으로 처리한 군과 처리하지 않은 군을 8시간 배양하고, 8시간 배양 후 새로운 배양액으로 바꿔 주고 500 μg/ml 농도의 MTT 용액을 첨가한 후 37℃에서 4시간 배양하였다. 원심 분리하여 얻은 formazan에 disodiumsulfoxide (DMSO)를 첨가하여 잘 녹인 후 96-well plates에 넣은 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 淸金降火湯을 처리하지 않은 군을 100%로 하여 淸金降火湯을 처리한 군의 생존력을 환산하였다.

#### 4) 세포활성물질 정량

세포활성물질인 TNF-α와 IL-6의 분비는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 측정하였다<sup>17)</sup>. 즉 HMC-1 세포를 10% FBS 가 첨가된 IMDM으로 배양하고 PMA (50 nM)와 A23187 (1 μM)을 실험 군과 대조군에 처리한 후, 8시간 동안 배양하였다. 배양액은 원심분리하여 -75℃에 보관하였다. 96-well plate에 1차 capture 항체 (1 μg/ml)를 100 μl씩 넣어 코팅하고, 0.05% tween-20이 첨가된 PBS (PBS-tween)로 세정한 다음 1% BSA, 5% sucrose, 0.05% NaN<sub>3</sub>가 포함된 PBS로 1시간 동안 blocking하였다. Blocking이 끝나면 PBS-tween으로 세정하고, 준비해둔 시료와 함께 농도를 알고 있는 재조합 세포활성물질을 100 μl를 넣어 2시간 방치한 후, 다시 2시간 후에 PBS-tween으로 세정하고 2차 detection 항체 (0.5-1 μg/ml)를 100 μl를 넣어서 1시간 동안 방치한 다음 well을 PBS-tween으로 세정하고 avidin-peroxidase를 넣어 30분간 반응시켰다. 30분 후 PBS-tween으로 세정하고 기질인 ABTS를 첨가하여 발색반응이 일어나면 405 nm 파장에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 농도를 알고 있는 재조합 세포활성물질을 이용하여 시료의 농도를 결정하였다.

$$\text{억제율 (\%)} = (a-b)/a \times 100$$

a 는 淸金降火湯을 처리하지 않은 군에서 분비된 세포활성물질 농도  
b 는 淸金降火湯을 처리한 군에서 분비된 세포활성물질 농도

#### 5) Western blotting

세포를 모아 PBS로 세정한 다음, 1% Igapel-630 lysis buffer를 넣고 세포를 용해한다. 4℃에서 1시간 반응시킨 후 15,000 rpm으로 원심 분리한 다음, 상층액을 BCA 용액으로 정량한다. 정량된 단백질 50 μg을 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동한 후, 4℃에서 nitrocellulose membrane에 전이시키고, 그 membrane을 0.1% PBS-tween에 용해한 5% skim milk로 1시간 동안 blocking하였

다. PBS-tween으로 가볍게 세정한 후 membrane은 p50 일차 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±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.

실험성적

1. 淸金降火湯의 세포 독성 관찰

淸金降火湯의 세포독성 유무를 관찰하기 위하여 HMC-1 세포에서 MTT를 실시하였다. Fig. 1은 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml 농도의 淸金降火湯을 8시간 단독 처리하여 배양한 군의 세포 생존율을 나타낸 것이다. 淸金降火湯은 HMC-1 세포에 대한 세포 독성이 없음이 확인됐다.

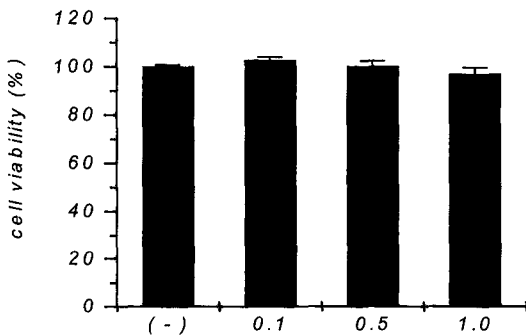


Fig. 1. Effect of CGT on the cell viability in HMC-1 cells. Cell viability was evaluated by MTT assay 8 h after CGT treatment in HMC-1 cells. Data represent the mean ± SEM of three independent experiments.

2. 淸金降火湯의 HMC-1 세포로부터의 염증성 세포활성물질 분비 조절 효과

HMC-1 세포를 PMA와 A23187로 자극하여 TNF-α와 IL-6의 분비량을 증가시킨 후, 淸金降火湯의 염증성 세포활성물질 분비 조절 효과를 분석하였다. 먼저 HMC-1 세포에 淸金降火湯을 30분 동안 전처리한 후, PMA와 A23187로 8시간동안 자극하여 ELISA 방법으로 TNF-α (Fig. 2)와 IL-6 (Fig. 3)를 정량하였다. 그 결과 PMA와 A23187로 자극한 대조군에 비해 淸金降火湯 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml를 전처리한 군의 경우 TNF-α는 각각 38.23 ± 2.674%, 60.29 ± 1.53%, 93.86 ± 2.05%의 억제율을 보였다 (P<0.001). IL-6의 억제율은 각각 3.41 ± 1.23%와 43.98 ± 7.64% (P<0.05), 68.69 ± 2.86% (P<0.001)로 관찰됐다.

淸金降火湯의 처리 시간에 대한 관련성을 실험하기 위하여 PMA와 A23187로 자극하기 4시간, 1시간전 淸金降火湯 전처리군과 PMA와 A23187 자극 후 1시간과 4시간 淸金降火湯 투여 처리군으로 나눠 실험하였다. 억제율이 가장 높았던 淸金降火湯 1.0 mg/ml를 각각의 시간에 투여하여 TNF-α를 정량하였다. 자극

전 4시간과 1시간 약물 처리에서는 TNF-α 유도에 높은 억제 작용을 보였으나 자극 후 약물 처리군에 있어서는 억제작용을 보이지 않았다 (Fig. 4).

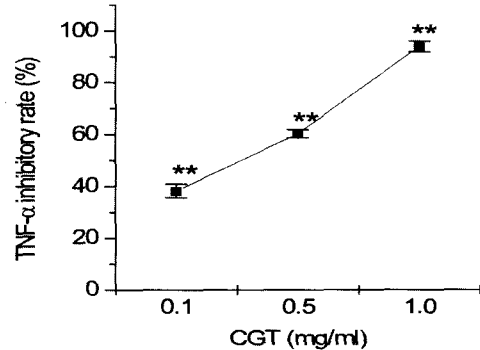


Fig. 2. Effect of CGT on the TNF-α inhibition in PMA plus A23187-stimulated HMC-1 cells. Cells were pretreated with CGT for 30 min and then challenged with PMA plus A23187 for 8 h. TNF-α concentrations were measured from cell supernatants using ELISA method. Values are mean ± SEM of duplicate determinations from three separate experiments. \*\*P<0.001 : significantly different from the stimulated group.

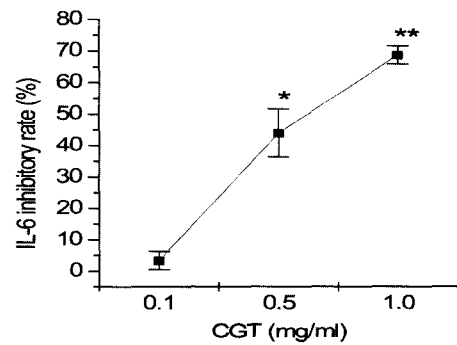


Fig. 3. Effect of CGT on the IL-6 inhibition in PMA plus A23187-stimulated HMC-1 cells. Cells were pretreated with CGT for 30 min and then challenged with PMA plus A23187 for 8 h. IL-6 concentrations were measured from cell supernatants using ELISA method. Values are mean ± SEM of duplicate determinations from three separate experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.001 : significantly different from the stimulated group.

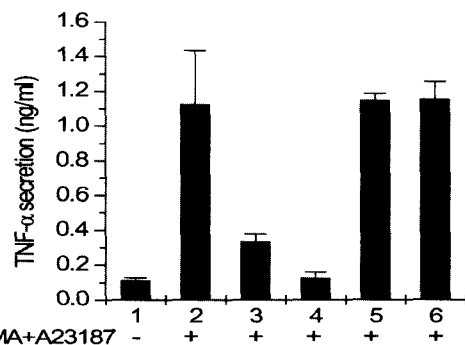


Fig. 4. Time dependent effect of CGT (1 mg/ml) on TNF-α secretion in PMA plus A23187-stimulated HMC-1 cells. Cells were pretreated or after-treated with CGT for 4 h, 1 h and challenged with PMA plus A23187 for 8 h. Line 1: control, Line 2: PMA+A23187, Line 3: pretreated with CGT for 4 h, Line 4: pretreated with CGT for 1 h, Line 5: after 1 h treated with CGT, Line 6: after 4 h treated with CGT.

3. 淸金降火湯의 NF-κB (p50) 발현 조절 효과

淸金降火湯의 활성화된 비만세포로부터의 TNF-α와 IL-6의 분비 조절 기전을 알아보기 위해 HMC-1 세포에 淸金降火湯을 처리한 후, PMA와 A23187로 1시간동안 자극하여 세포질 내에

서 NF-κB의 단백질 발현량의 변화를 Western blotting으로 분석하였다. 그 결과 PMA와 A23187로 자극된 HMC-1 세포에서 증가된 p50의 발현이 淸金降火湯 전처리에 의해 억제되었다 (Fig. 5). 이런 결과는 淸金降火湯이 NF-κB의 발현 억제를 통해 이들 세포활성물질들의 분비를 억제시킴을 의미한다.

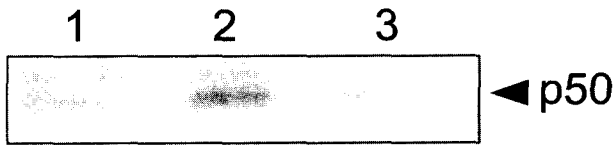


Fig. 5 Effect of CGT on the expression of 50 in HMC-1 cells by Western blotting. Cells were stimulated with medium or CGT and then challenged with PMA plus A23187 for 1 h. Expression of p50 was assayed by Western blot analysis. Lane 1, control ; lane 2, PMA plus A23187 ; lane 3, CGT (1 mg/ml) plus PMA plus A23187.

### 고찰

喘息은 여러 가지 자극에 대한 기도의 과민성을 그 특징으로 하는 질환이며, 기도의 광범위한 협착에 의한 임상증상이 자연히 혹은 치료에 의해 가역적으로 호전되는 질환으로 인식되고 있다. 기관지천식은 발작적인 호흡곤란, 천명, 기침, 라음을 특징으로 하며 최근에는 천재, 임상적으로는 가역적인 기도폐색의 증상을 보이고, 둘째, 병태생리학적으로는 기도의 과민성이 존재하고, 셋째, 병리학적으로는 기도의 염증성 반응을 보이는 질환이라고 정의하고 있다<sup>2)</sup>. 韓醫學에서 기관지천식은 呼吸急促, 喘鳴有聲을 主症으로 하는 哮喘證에 해당되며, 그 원인으로는 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 등을 꼽을 수 있다<sup>3,4,18)</sup>. 哮喘에 대해 巢<sup>19)</sup>는 “呷嗽者 猶是欬也 其胸膈痰飲多者”라 하여 哮喘을 언급하였고, 王<sup>20)</sup>은 “哮喘與喘相類 但不似喘 開口出氣之多”라 하여 哮와 喘을 구분하였다. 吳<sup>21)</sup>는 호흡이 급속한 것을 喘이라하고 喉中에 聲響이 있는 것을 哮喘이라고 하였고, 葉<sup>22)</sup>은 哮와 喘은 그 증상의 경중, 완급이 서로 같지 않다고 하여, 대개 哮喘에는 喘症을 겸하고 있으나, 喘症에는 哮症을 겸하지 않는다고 하였으며, 또한 哮喘이 발생하면 항시 喘症이 동시에 나타난다고 하였다. 그러나 근래에는 일반적으로 哮와 喘을 구분하지 않고, 哮喘이라 하여 喘鳴有聲, 呼吸急促한 것을 특징으로 하는 증후군이라 인식하고 있다<sup>3,4,18)</sup>. 哮喘證에 대한 치료는 대체적으로 병세가 완만하고, 숨이 차서 호흡이 계속되지 못하며, 吸氣가 빠르고, 움직이면 호흡곤란이 가중되고, 語聲에 힘이 없으며, 脈은 微弱 또는 無力한 虛證과 병세가 급박하고, 호흡은 深長하며 여유가 있고, 呼出이 빠르고, 흡이 거칠고 크며, 脈數하고 有力한 實證으로 분류하고, 그 원인에 따라 다시 虛證의 경우는 肺虛, 腎虛 등으로 구분하며, 實證의 경우는 風痰, 痰濁 등으로 구분하여 치료한다<sup>3,4)</sup>.

淸金降火湯은 巢信의 《古今醫鑑》에 처음으로 수록된 處方으로 面赤, 有聲, 痰少, 脈數한 肺胃鬱火의 咳嗽를 다스린다. 이 병증은 腎水가 焦枯하여 邪火가 肺에 獨炎하기 때문에 有聲無痰의 乾咳가 일어나는 것이며, 胃中의 積滯之火가 肺金으로 上侵하여 痰稠하므로 鬻기가 어렵게 된 것으로 本方은 肺胃의 火

를 瀉하여 痰을 제거하고 咳嗽를 그치게 한다<sup>5,7,8)</sup>. 本方의 構成藥物을 살펴보면, 半夏·陳皮·赤茯苓·甘草는 二陳湯之劑로 痰飲을 치료하는 대표적 약물이며, 前胡·瓜蒌仁·貝母·桔梗·杏仁·生薑은 止咳定喘化痰시키고, 枳殼은 行氣寬中하며, 黃芩과 石膏는 각각 肺와 胃의 火를 瀉한다<sup>23,24)</sup>. 최근에는 淸金降火湯은 폐, 기관지 계통의 질병에 다양하게 응용되고 있으며, 이에 대한 실험적 연구로는 辛<sup>9)</sup>의 淸金降火湯이 Paraquat로 유발시킨 白鼠의 肺水腫에 미치는 영향, 南<sup>10)</sup>의 淸金降火湯이 흡연으로 인한 白鼠의 肺損傷에 미치는 영향, 尹<sup>11)</sup>의 淸金降火湯과 人蔘瀉肺湯의 효능에 대한 실험적 연구가 보고되었다.

기관지 천식은 알레르겐, 비만세포 및 IgE가 관여하여 분비되는 화학매체의 직접적인 악리작용에 의해서, 또한 화학매체와 세포활성물질, 유착분자가 관여하여 기관지로 모여온 염증세포에 의해서 발병하는 기도의 만성 알레르기 염증성 질환으로 기도 상피세포의 탈락, 평활근의 비후와 증대, 점액질과 점액분비세포의 증가, 부종이 관찰된다<sup>25)</sup>. 천식의 만성 기도 염증은 Th2 림프구와 호산구, 대식세포, 그리고 비만세포가 기도벽에 침착하는 특성이 있다<sup>26)</sup>. 알레르기성 천식환자의 기관지 폐포 세척액과 정상군의 기관지 폐포 세척액을 비교하였을 때 천식환자의 기관지 폐포 세척액에서 호산구, 대식세포들이 일관되게 증가되었다<sup>27,28)</sup>. 비만세포는 폐, 코점막, 장점막에 주로 존재하는 점막형 비만세포와 피부, 점막하 조직 등 결합조직에 많이 분포하는 결합조직형 비만세포로 구분할 수 있다. 점막형 비만세포는 기도점막에 많이 분포하고 있으며, 천식발생에 영향을 미친다. 점막형 비만세포에서는 다양한 세포활성물질(cytokines)들을 보관하고 있어 알레르기 반응 초기에 비만세포가 활성화되면서 대량의 세포활성물질이 즉시 분비된다<sup>25,29)</sup>. 특히 염증 유발과 관련성이 많은 세포활성물질인 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin (IL)-4, IL-6 및 IL-8의 농도가 기관지 천식 환자에서 유의성 있게 높게 나타난다<sup>30)</sup>. TNF-α는 조직 손상을 유발하고 염증의 중요한 개시인자로 알려져 있다<sup>31)</sup>. TNF-α는 혈관내피세포의 표면 부착인자 (adhesion molecule)의 발현을 유도하여 백혈구를 염증병소로 모이게 한다. 또한 단핵구 등의 세포에 작용하여 케모카인(chemokine)을 합성케 하며, 염증성 백혈구를 활성화시켜 미생물을 죽이도록 한다. IL-6는 염증 반응이 일어나는 동안 강력한 매개자 역할을 하는 세포활성물질이다<sup>32)</sup>. IL-6는 IL-1 및 TNF-α에 의해 단핵식균세포, 혈관내피세포, 섬유아세포, 일부 활성화된 T cell 등에서 생성된다<sup>33)</sup>. TNF-α와 IL-6의 발현은 전사인자 nuclear factor-κB (NF-κB)에 활성 의존적이다<sup>34,36)</sup>. 대부분 NF-κB는 이량체이며 Rel A (p65) 와 NF-κB1 (p50) 또는 NF-κB2 (p52)로 구성돼 있다<sup>37,38)</sup>. NF-κB는 목표 유전자의 promoter 부위에 존재하는 DNA에 부착하여 TNF-α와 IL-6를 포함한 염증성 세포활성물질의 전사를 개시하는데 관여한다<sup>39,41)</sup>. 이 외에도 NF-κB는 또한 염증에 관련된 다양한 유전자를 조절하는 세포활성물질들 (IL-1, IL-8, G-CSF 및 GM-CSF), 여러 세포접착인자들 (intracellular adhesion molecule, endothelial leukocyte adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1 등), MHC 유전자와 여러 효소들 (nitric oxide synthase, cyclo-

oxygenase, superoxide dismutase 등)도 조절하는 인자이다<sup>42)</sup>.

A23187과 PMA는 비만세포를 활성화시키는 대표적인 물질이다. 칼슘 ionophore인 A23187은 세포내 칼슘의 농도를 증가시키는 물질로 세포내 칼슘의 증가는 비만세포를 활성화시켜 세포활성물질을 분비시키는 신호전달 병리이다. PMA는 protein kinase C에 직접 작용하는 분열 촉진제로서 비만세포를 활성화시켜 다량의 세포활성물질을 분비케 한다.

최근 淸金降火湯은 알레르기성 천식이나 기관지 천식 등 폐기관지 계통의 질병에 다양하게 응용되고 있다. 이에 저자는 淸金降火湯이 염증성 세포물질에 영향을 줄 수 있을 것으로 사료되어 본 연구에서는 淸金降火湯의 생물학적 효과를 규명하기 위하여 사람의 비만세포주인 HMC-1 세포를 PMA와 calcium ionophore A23187로 자극하여 분비되는 염증성 세포활성물질에 대한 淸金降火湯의 효과를 실험하였다. 먼저 淸金降火湯의 세포독성을 알아보기 위해 MTT 분석법으로 측정하였고, 그 결과 淸金降火湯 단독으로는 HMC-1 세포에 독성을 나타내지 않았다. 淸金降火湯의 염증성 세포활성물질 분비 조절 효과를 알아보기 위해 PMA와 A23187로 자극한 HMC-1 세포에 ELISA 방법을 사용하여 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 분비량을 측정하였다. 淸金降火湯을 전처리한 후 이들 자극제에 의한 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 분비를 측정할 결과 淸金降火湯에 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다. 하지만 淸金降火湯이 세포내 칼슘의 농도를 조절하거나 PKC의 활성을 억제하는 효과가 있을 가능성을 배제할 수 없기 때문에 장차 이 부분에 대한 더욱 상세한 연구 검토가 필요하다. 淸金降火湯의 처리시간에 따른 세포활성물질의 억제 경향에서는 자극 1시간, 4시간 전 淸金降火湯 처리군에서 TNF- $\alpha$  분비를 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 자극 후 淸金降火湯 처리군에서는 PMA와 A23187만을 자극한 군과의 차이를 발견할 수 없었다.

세포활성물질 억제기전을 규명하기 위하여 NF- $\kappa$ B의 단백질 발현량을 Western blotting을 통하여 확인한 바, 淸金降火湯은 세포질 내의 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제함을 관찰하였다. 이런 결과는 임상적으로 알레르기성 천식 등의 치료에 효과적인 淸金降火湯이 비만세포내 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 조절을 통하여 염증유발물질인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 분비를 억제함으로써 항염 효과를 나타냄을 의미한다. 비만세포가 천식에서 염증반응을 개시하고 유지하는데 중요한 역할을 하는 IL-4, IL-5, IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 중요한 분비원이기<sup>43)</sup>, 이런 세포활성물질들의 분비는 NF- $\kappa$ B에 의해 조절되기 때문에 본 연구에서 확인한 淸金降火湯의 비만세포 매개성 염증성 세포활성물질들의 분비 및 NF- $\kappa$ B 조절 효과는 淸金降火湯의 임상적 활용 등을 위한 중요한 근거 자료가 될 것으로 사료된다.

## 결 론

저자는 본 연구에서 淸金降火湯의 항염 효과를 분석하는 실험을 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

淸金降火湯은 HMC-1 세포에서 세포 독성 없음이 확인됐다. 淸金降火湯은 HMC-1 세포에서 PMA와 A23187로 자극에 의한 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 분비를 농도 의존적으로 억제시켰다. HMC-1 세

포에서 PMA와 A23187로 자극 전 淸金降火湯 처리군에서는 TNF- $\alpha$  분비가 억제되는 것을 확인할 수 있었으나, 자극 후 淸金降火湯 처리군에서는 TNF- $\alpha$  분비 억제작용을 보이지 않았다. 淸金降火湯은 비만세포내 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 발현을 조절하여 이들 세포활성물질들의 분비를 억제시켰다.

이런 결과는 淸金降火湯이 비만세포에서 염증성 세포활성물질 분비를 억제함을 실험적으로 증명한 것으로, 임상 활용 및 응용에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 해리슨 내과학 편찬위원회 : 해리슨내과학 I, 서울, 도서출판 정담, pp. 1258-1264, 1997.
2. 서울대학교 의과대학편 : 呼吸器學, 서울, 서울대학교출판부, pp. 167-173, 1988.
3. 上海第一醫學院編 : 實用內科學, 北京, 人民衛生出版社, pp. 1148-1151, 1981.
4. 전국한의과대학 폐계내과학교실 : 동의폐계내과학, 서울, 한문문화사, pp. 178-189, 536, 2002.
5. 江克明, 包明憲 : 校正 方劑大辭典, 서울, 의성당, pp.1042-1043, 1991.
6. 許浚 : 精校 東醫寶鑑, 서울, 한미의학, pp. 749-750, 2001.
7. 謝觀東 : 東洋醫學大辭典, 서울, 고문사, p. 641, 1993.
8. 申載鏞 : 方藥合編解說, 서울, 성보사, p. 226, 1991.
9. 辛祖永 : 淸金降火湯이 Paraquat로 誘發시킨 白鼠의 肺水腫에 미치는 影響, 원광대박사학위논문, 1986.
10. 南文植 : 淸金降火湯이 吸煙으로 因한 白鼠의 肺損傷에 미치는 影響, 동의대석사학위논문, 1997.
11. 尹錫雲 : 淸金降火湯과 人蔘瀉肺湯의 效能에 關한 實驗的 研究, 경희대박사학위논문, 1991.
12. 李炳周 : 瀉白散의 肥滿細胞 炎症性 細胞活性物質 分泌 抑制 效果, 원광대석사학위논문, 2003.
13. 姜洛遠 : 加味蘇子降氣湯이 알레르기 喘息의 呼吸樣相 및 氣管組織에 미치는 影響, 동의대석사학위논문, 2000.
14. 徐暢焄 : 麥門冬湯加味方이 實驗的 알레르기 喘息에 미치는 影響, 동의대석사학위논문, 2000.
15. 金玟秀 : 加味解表二陳湯이 알레르기 喘息 白鼠의 呼吸樣相 및 氣管組織에 미치는 影響, 동의대석사학위논문, 2000.
16. 金鎮一 : 加味淸上補下湯이 알레르기 喘息 白鼠의 呼吸樣相과 氣管組織에 미치는 影響, 동의대석사학위논문, 2000.
17. Kim MS, Chae HJ, Shin TY, Kim HM, Kim HR. Estrogen regulates cytokine release in human mast cells. Immunopharm Immunot 2001 23(4):495-504.
18. 上海中醫學院編 : 中醫內科學, 上海, 商務印書館, pp.17-18, 1997.
19. 巢元方 : 巢氏諸病源候論, 서울, 大星文化社, pp.106-117, 1992.
20. 王肯堂 : 證治準繩, 北京, 人民衛生出版社, pp. 229-231, 1991.
21. 吳謙 : 醫宗金鑑(中), 서울, 大星文化社, pp. 390-391, 1991.
22. 葉天士臨證指南醫案, 上海, 上海科學技術出版社, pp.299-300, 1978.

23. 辛民教 : 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, pp. 175-177, 250-252, 254-255, 276-277, 308-309, 380-381, 384-385, 392-393, 556-557, 563-565, 635-637, 1986.
24. 김창민 외 : 中藥大辭典, 서울, 도서출판 정담, pp. 88-103, 476-479, 686-691, 797-803, 1960-1971, 2840-2849, 2987-2905, 4821, 4875-4879, 4883-4887, 5059-5064, 6104-6111, 6448-6459, 1997.
25. 대한 천식 및 알레르기학회 : 천식과 알레르기 질환, 군자출판사, pp. 244-248, 2002.
26. Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids for asthma. *New Engl J Med* 332:868-875, 1995.
27. Casale TB, Wood D, Richerson HB, Trapp S, Metzger WJ, Zala D, Hunninghake GW. Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with methacholine bronchial hyperresponsiveness. *J Clin Invest* 79:1197-1203, 1987.
28. Wenzel SE, Fowler A and 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* 137:1002-1008, 1988.
29. Smart SJ and Casale TB. *Bronchial asthma*. Totowa, NJ: Humana Press p.1-30, 1993.
30. Stankiewicz W, Dabrowski MP, Chcialowski A, Plusa T. Cellular and cytokine immunoregulation in patients with chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Mediators Inflamm* 11(5):307-312, 2002.
31. Kim HM and Lee YM. Role of TGF-beta 1 on the IgE- dependent anaphylaxis reaction. *J Immunol* 162:4960- 4965, 1999.
32. Erchler WB, Keller ET Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med* 51:245-270, 2000.
33. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 90:909-28, 1997.
34. Fiorini E, Marchisio PC, Scupoli MT, Poffe O, Tagliabue E, Brentegani M, Colombatti M, Santini F, Tridente G, Ramarli D. Adhesion of immature and mature T cells induces in human thymic epithelial cells (TEC) activation of IL-6 gene transcription factors (NF-kappa B and NF-IL6) and IL-6 gene expression: role of alpha 3beta1 and alpha6beta4 integrins. *Dev Immunol* 7(2-4):195-208, 2000.
35. Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kB-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kB. *Mol Cell Biol* 10:1498-1506
36. Rao A. NF-Atp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* 12:274-281, 1994.
37. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 10:404-455, 1994.
38. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kB in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12:141-179, 1994.
39. Kuprash DV, Udalova IA, Turetskaya RL, Rice NR and 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* 11:97-106, 1995.
40. Galien R, Evans HF, Garcia T Involvement of CCAAT/ enhancer -binding protein and nuclear factor-kappa B binding site in interleukin-6 promoter inhibition by estrogens. *Mol Endocrinol* 10:713-722, 1996.
41. Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P Regulation of TNF alpha transcription in macrophages. *Mol Cell Biol* 10:1498-1506, 1990.
42. Baeuerle PA, Baichwal VR. NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol* 65:111-137, 1997.
43. Bradding P, Holgate ST. The mast cell as a source of cytokines in asthma. *Ann N Y Acad Sci* 31:796:272-281, 1996.