

석고가미복합방이 Anti-CD40과 rIL-4로 유도된 생쥐의 B 세포에서 싸이토카인 생성 및 면역글로블린 E에 미치는 효과

최문석·김수명*·남궁옥**·김동희***

Effects of Seokgokamibokhaphang(SGBHB) on anti-CD40-and recombinant IL-4-induced cytokine production and immunoglobulin E and histamine release in highly purified mouse B cells

Moon-Suk Choi, Su-Myung Kim*, Uk Namgung**, Dong-Hee Kim***

*** Dept. of Pathology, Collage of Oriental Medicine, Daejeon Univ.

* Dept. of Anatomy, Collage of Oriental Medicine, Daejeon Univ.

** Dept. of Neurophysiology, Collage of Oriental Medicine, Daejeon Univ.

In the present study, we examined anti-allergic effect of SGBHB in cultured B cells. B cells were prepared from isolated murine splenocytes and activated by co-treatment of anti-CD40 monoclonal antibody and recombinant IL-4 allergens. Anti-allergic effects of SGBHB in activated B cells were determined by measuring B cell surface activated molecules (CD23+ and CD11a+), and expression levels of IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IgE, and HRF. The major findings are summarized as follows. 1. SGBHB treatment did not produce significant cytotoxic effects on mouse lung fibroblast cells. 2. SGBHB produced significant inhibitory effect on the expression of B cell surface activated molecules (CD23+ and CD11a) in activated B cells. 3. SGBHB treatment significantly inhibited expression levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α mRNAs in activated B cells. IL-6 protein levels were significantly decreased by 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of SGBHB treatment, and TNF- α protein levels were decreased compared to the control group, but statistically insignificant. 4. SGBHB treatment significantly increased IL-10 at both mRNA and protein levels in activated B cells. 5. SGBHB treatment significantly inhibited levels of IgE production. Thus, the present data suggest that SGBHB has an anti-allergic effect on activated B cells by controlling immune responses, and further implicates the possibility on clinical application as a therapeutic agent.

I. 緒 論

*** 대전대학교 한의과대학 병리학교실

* 대전대학교 한의과대학 해부학교실

** 대전대학교 신경생리학교실

· 교신저자 : 김동희 · E-mail : dhkim@dju.ac.kr

· 채택일 : 2004년 10월 14일.

최근 외래 진료 환자 중 5위를 차지하고 있는 난치성 면역 질환은 크게 외인성 항원에 의한 아토피 피부염, 기관지 천식 등과 내인성 항원에 의해 자가면역으로 유도되는 류마치스성 관절염, 홍

만성 낭창 및 건선 등으로 대별된다¹⁾.

과민 면역 반응과 자가 면역 반응은 모두 면역 세포들이 병변 발생 부위로 이동하여, 원하지 않는 면역 반응을 생성하는 것인데, 이러한 면역 세포의 이동에는 chemokine과 면역 세포의 homing에 관여하는 integrin, cell adhesion molecule, selectin 등이 관여하고 있다^{1,2)}.

현재 사용되고 있는 과민성 면역 질환 치료제는 스테로이드나 tacrolimus 같은 비특이적 면역 억제제 및 항히스타민제 같은 대증적 증상 완화제가 다용되고 있는데³⁾, 모두 다양한 부작용으로 인하여 장기간 사용이 어렵고, 효과 역시 일시적이어서 근본적으로 치료할 수 있는 새로운 치료법 개발이 절실히 요구되는 상황이다.

한의학에서 면역이란 용어는 『免疫類方』에서 문자로 처음 제시되었으나⁴⁾, 이전에 이미『素問·刺法論』⁵⁾에서 “余聞五疫之疾 皆相染易 無問大小 病狀相異 不施治療 如何可得不相移移者? 岐伯曰 不傷染者 精氣存內, 邪不可干”이라 하여 疫의 병기를 正邪間의 相爭으로 기술하였고, 이 후 대부분 서양 의학의 면역적 개념인 ‘자기’와 ‘비자기’를 ‘正氣’와 ‘邪氣’로, 체내 면역 반응을 ‘正邪相爭’의 과정으로 해석하였다.

아토피 피부염을 비롯한 다양한 면역성 피부 질환 역시 이에 준하여 병인 및 병기를 해석하고 있으며, 임상에서 활용되는 치료 처방 역시 清熱祛風 처방을 중심으로 祛邪法과 扶正法을 적절히 조합시킨 攻補併用 처방이 다용되고 있다^{6,7)}.

한의학에서는 아토피 피부염은 內癬, 胎風, 胎赤, 胎癬, 乳癬, 浸淫瘡, 四彎風 등의 범주에 속하며^{6,7)}, 현대 중국에서는 영아습진 이라고도 부른다.

이에 대한 연구로 朴⁸⁾은 아토피 피부염의 東西醫學的文獻考察을, 尹⁹⁾은 아토피 皮膚炎 患者의 韓醫學的인 臨床類型分類에 대하여 각각 보고한 바가 있으며, 실험적 연구로 朴 등^{10,11)}은 아토피성 염증 동물 모델을 이용하여 in vitro에서 유효성이 입증된 약제의 항알러지 효과를 규명한 바가 있으나, 아직 뚜렷한 효과를 나타내는 처방과 약물은 검색되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 기존의 연구 방법에서 탈피하여 현재 임상에서 실제 清熱祛風解毒之劑로

사용되고 있는 석고가미복합방(SGBHB)을 시료로 선택하여, 이에 대한 기전적 연구를 통하여 evidence-based medicine (EBM)을 확보함과 동시에 향후 이를 중심으로 다양한 처방을 개발하고자 하였다.

실험은 생쥐의 비장에서 B 세포를 분리하여 알러지 반응을 유도한 후 B 세포의 표면 활성 인자 (CD23 과 CD11a), IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α 및 IgE 발현 등을 검색하였다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 動物

실험 동물은 한국화학연구소에서 공급받은 웅성 4주령의 Balb/C 생쥐로 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22 \pm 2 $^{\circ}$ C를 계속 유지하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 藥材

本 實驗에 사용한 石膏加味複合方(SGBHB)은 대전대학교부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 구성과 용량은 아래 방법에 기술하였다.

3) 試藥 및 機器

Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), magnesium chloride(MgCl₂), DMEM, collagenase A, DNase type I, 적혈구용 혈액, trichloroacetic acid는 Sigma사(U.S.A) 제품을, antibiotics, trypsin- 0.2% EDTA는 Gibco사(U.S.A) 제품을, rabbit complement lyophilised는 Serotec사(U.K) 제품을, antibody Avidin-HRP conjugated는 Biosource사(U.S.A) 제품을, Taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, 역전사효소 (moloney Murine Leukemia Virus Reverse

Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(Madison, U.S.A) 제품을, RNAzolB는 Tel-Test사(U.S.A) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사(Logan, U.S.A) 제품을, 유세포 형광 분석에 사용된 phycoerythrin (PE)-anti-rat conjugate Ig, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD23, anti-IgE, anti-CD40, anti-B220-FITC는 Pharmingen사(Torreyana, U.S.A) 제품을, 3H-thymidine, Sephadex G-10은 Amersham Pharmacia사(Buckinghamshire, UK) 제품을, rmIL-4는 R&D 사 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 Rotary evaporator(Büchi B-480, Switzerland), Freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), bright microscope(Nikon, Japan), inverted microscope(Nikon, Japan), flow cytometry(Becton Dickinson, U.S.A), spectrophotometer(Shimadzu, Japan), ELISA LEADER (Molecular devices, U.S.A), CO2 incubator(Napco, Germany), imager II photo-system(Bioneer, Korea), centrikon(Sigma, U.S.A), bio-freezer(Sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system(MWG, Germany), ice-maker (Vision, Korea), Sephadex G-10 column(Amersham Pharmacia, U.S.A) 및 homogenizer(OMNI, U.S.A) 등의 것을 사용하였다.

2. 方法

1) 試料 製造

교맥(Fagopyrum esculentum Moench) 17 g, 송진(Oleum Terebinthinae) 22.5g, 석고(Gypsum Fibrosum) 15 g, 죽염(Bamboo salt) 25 g을 물 1,200 CC에 넣고 약한 물이 없어질 때까지 다린 후, 여기에 다시 매실 엑기스주 2.7 L를 부어 혼합하고, 이를 여과지로 여과한 후 감압 증류장치(Rotary evaporator, Büchi B-480, Switzerland)로 농축하였다. 농축된 시료를 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조된 SGBHB(17.2 g)을 얻어 냉동(-84℃) 보관

하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 細胞 培養

(1) 생쥐의 lung fibroblast 세포 분리 및 배양¹²⁾
 생쥐의 정상 lung fibroblast cells(mLFCs)는 Balb/C 생쥐의 폐 조직을 차가운 D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube(15 ml)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리하였다. Tube에 DMEM(containing collagenase A(5 mg/ml, BM, USA)와 DNase type I(0.15 mg/ml, Sigma, USA), antibiotics (penicillin 10⁴ U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml))를 넣고 37℃의 CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양하고, 배양 후 인산완충 생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10 % FBS에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA로 mLFCs를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

(2) 생쥐 B-cells 분리 및 배양¹³⁾

Balb/C 생쥐의 비장을 분리, 비장세포를 채취한 후 2,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포를 회수하였다. 여기에 적혈구용혈액 2 ml를 넣고 37℃ 항온 수조에 5분간 방치한 후 이를 다시 10 ml의 D-PBS를 첨가하여 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 분리한 비장세포에 J1J10, GK1.5.3, M1/70 배양 상층액(1 ml/10⁸cells)을 처리한 후 얼음에서 30분간 반응시켰다(Table 1). 반응 후 2회 D-PBS로 수세하고 여기에 rabbit complement lyophilised (Serotec., U.K) 0.5 ml를 처리한 후 37℃ 항온 수조에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 다시 5회 complete medium으로 수세하고 Sephadex G-10 column(Amersham Pharmacia, USA)에 통과시켜 B-cells를 분리하였다. B-cells 함량을 측정하기 위하여 α-B220-FITC를 이용하여 유세포형광분석기로 분석하였다(Fig. 1).

Table 1. Monoclonal antibody used for immunofluorescence staining

Immune cell types	Markers	Monoclonal antibody
T cells	Thy1.2	J1J10
helper T cells	Thy1.2	GK1.5.3
Macrophages	CD4	M1/70

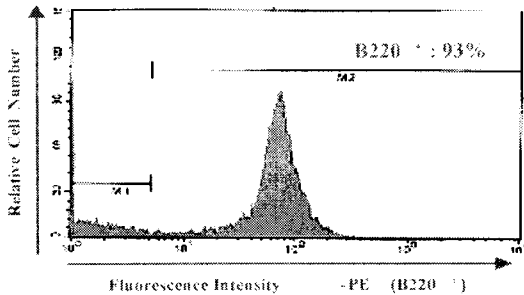


Fig. 1. Purity of B-cells isolated in Balb/C spleen cells.

The splenic cells obtained from Balb/C mice were dissociated by RBC lysis solution. α -thy1.2 (J1J10, GK1.5.3, M1/70) complement was added and then B-cells were collected by sephadex G10 column.

3) 細胞毒性 測定

세포독성 측정은 MCB assay법¹⁴⁾을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFCs를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후 SGBHB를 각각 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml 농도로 희석하여 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액(PBS)으로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 μ l를 가하고 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 이 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 MCB(0.4 %/1 % acetic acid) 용액을 100 μ l/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100

μ l/well로 용해시켰다. 이 plate를 다시 plate shaker(Lab-Line, U.S.A)에서 3.5 speed로 5분간 shaking 후 ELISA READER (Molecular devices, U.S.A) 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 생쥐 B 細胞의 流細胞 螢光分析

생쥐 B 세포를 24 well plate에 2×10^6 세포/well로 분주하고 anti-CD40 mAb(500 ng/ml)과 rmIL-4(500 U/ml), 그리고 100 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도의 SGBHB를 가하여 68시간 배양 후, 이를 인산완충생리식염(3 % 우태아혈청, 0.1 % NaN₃)으로 2회 수세하여 4°C에서 면역 형광 염색을 실시하였다. 각각의 세포수를 2×10^5 세포로 조정 한 후 phycoerythrin (PE)-anti-mouse B220, PE-anti-CD11a, FITC-anti-mouse CD19, 그리고 fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD23-FITC 등을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometer로 CD23⁺/B220⁺, 그리고 CD11a⁺/CD19⁺의 발현을 분석하였다. 분석 프로그램은 CellQuest 프로그램 (Becton Dickinson, USA)으로 CD23⁺/B220⁺, CD11a⁺/CD19⁺의 비율 (gated, %)을 산출하였다.

5) IL-6, IL-10, TNF- α 및 IgE 生成量 測定

생쥐 B-cell을 분리하여 96 well plate의 각 well에 2×10^5 세포씩 분주하고, 여기에 100 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도의 SGBHB를 처리한 뒤, 1시간 후 anti-CD40 mAb (500 ng/ml)과 rmIL-4(recombinant mouse interleukin-4, 500U/ml, Pharmingen, U.S.A)를 각각 10일과 48시간 동안 동시 배양하였다.

양성 대조군으로는 rmIL-10 (recombinant mouse interleukin-10, 50 ng/ml, Endogen)을 사용하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 회수하여 ELISA에 사용하였다.

IL-6, IL-10, TNF- α 에 대한 ELISA(Enzyme-linked immuno-sorbent assay)는 48시간 후에, IgE 분비량은 10일 배양 후 측정하였다. 각 항체를 coating 완충 용액에 희석하여

microwell에 coating하고 4°C에서 overnight한 후 각 well을 3회 washing 완충 용액으로 세척하고 B-cells 배양 상층액을 100 μ l씩 분주하였다. 이를 다시 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 세척 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리하고 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 統計處理

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error of mean (SEM)로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

III. 實驗成績

1. mLFCs에 대한 細胞毒性

생쥐의 폐세포를 분리하여 배양한 후 세포독성을 특정한 결과, 대조군(세포생존율을 100%)에 비해 SGBHB 200 μ g/ml 농도 투여군은 85.4 \pm 5.1로 나타났고, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml 및 1 μ g/ml 농도 투여군에서는 각각 91.3 \pm 4.6, 95.7 \pm 5.6, 95.4 \pm 7.4과 97.6 \pm 6.5 %로 나타나 mLFCs에서는 세포독성이 나타나지 않았다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Cytotoxic Effect of SGBHB Extract on Mouse Lung Fibroblast Cells (mLFCs)

Drug	Dose (μ g/ml)	% of Control Data
		mLFCs
Control	0	100 \pm 5.7
	1	97.6 \pm 6.5
	10	95.4 \pm 7.4
	50	95.7 \pm 5.6
SGBHB	100	91.3 \pm 4.6
	200	85.4 \pm 5.1

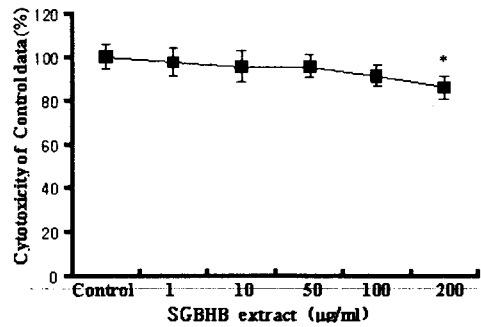


Fig. 2. Cytotoxicity effects of SGBHB on mouse lung fibroblast cells (mLFCs).

mLFCs were pretreated with various concentrations of SGBHB. The data (% cytotoxicity of SGBH-treated cells to non-treated control cells) in the Figure are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between SGBHB-treated and untreated control groups were analyzed using Student's paired test (*p < 0.05).

2. 생쥐 B 細胞에서 CD23+/B220+ 發顯에 미치는 影響

생쥐의 비장에서 B 세포를 분리하여 anti-CD40과 rIL-4로 자극하고, SGBHB를 처리하여 68시간 배양한 후 B 세포 표면 분자인 CD23(FC ϵ RI)의 발현 억제 효과를 유세포 분석기로 측정된 결과, 무처리한 B 세포의 CD23+/B220+ 세포 발현은 11.9 %로 나타났고, anti-CD40과 rIL-4로 자극한 대조군의 세포 발현은 20.4 %로 나타났으며, anti-CD40과 rIL-4로 자극하고 SGBHB 100 μ g/ml, 10 μ g/ml과 동시 배양한 실험군의 세포 발현은 각각 14.3 %와 19.8 %로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 3).

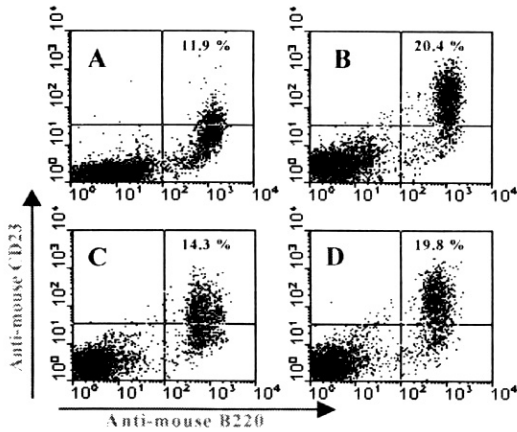


Fig. 3. Inhibitory effects of SGBHB extract on CD23+/B220+ expression in murine splenic B cells.

Mouse B cells prepared from healthy Balb/C mice were treated with both anti-CD40 monoclonal antibody and recombinant IL-4 (500 U/ml) in the presence of SGBHB (C: 100 µg/ml, D: 10 µg/ml) or the absence of SGBHB (B). Untreated B cells (A) were used as a control. Cells were incubated for 68 hr, harvested, and assayed for CD23+/B220+ expression by flow cytometry.

3. 생쥐 B 세포에서 CD11a+/CD19+ 발현에 미치는 영향

생쥐의 비장에서 B 세포를 분리하여 anti-CD40 과 rIL-4로 자극하고 SGBHB를 처리하여 68시간 배양한 후 B 세포 표면분자인 CD11a (B cells activation marker)의 발현 억제 효과를 유세포 분석기로 측정한 결과, 무처리한 B 세포의 CD11a+/CD19+의 세포 발현은 1.8 %이었고, anti-CD40과 rIL-4로 자극한 대조군의 세포 발현은 12.5 %이었으며, anti-CD40과 rIL-4로 자극하고 SGBHB 100 µg/ml, 10 µg/ml과 동시에 배양한 실험군의 세포 발현은 각각 8.1 %와 10.8 %로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 4).

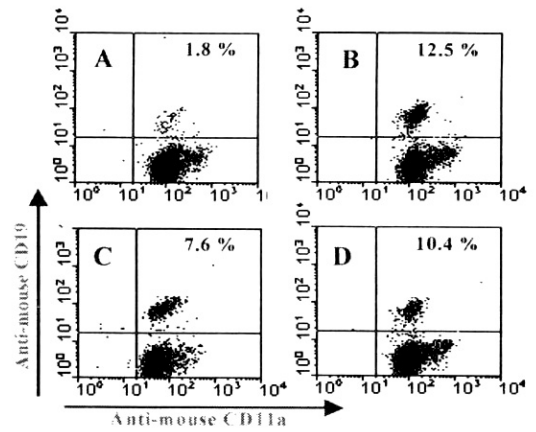


Fig. 4. Inhibitory effects of SGBHB extract on CD11a+/CD19+ expression in murine splenic B cells.

Mouse B cells prepared from healthy Balb/C mice were treated with both anti-CD40 monoclonal antibody and recombinant IL-4 (500 U/ml) in the absence (B) or the presence of SGBHB (C: 100 µg/ml, D: 10 µg/ml). Untreated B cells (A) were used as a control. Cells were incubated for 68 hr, harvested, and assayed for CD11a+/CD19+ expression by flow cytometry.

4. 생쥐 B 세포에서 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향

1) IL-1β mRNA 유전자 발현에 미치는 영향

무처리(media) B 세포의 IL-1β mRNA 유전자 발현은 Ht 값이 45로 나타난 반면, anti-CD40 mAb와 rIL-4로 동시에 자극한 대조군의 Ht 값은 96으로 나타났으며, SGBHB 100, 10 그리고 1 µg/ml 농도 처리군은 각각 55, 66, 64로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 5).

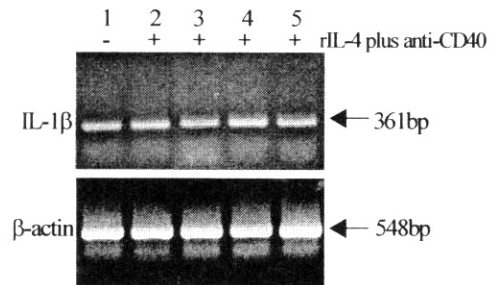


Fig. 5. Inhibitory effects of SGBHB extract on IL-1 β mRNA expression in murine splenic B cells.

Splenic B cells prepared from healthy Balb/C mice were treated with both anti-CD40 monoclonal antibody (mAb; 500 ng/ml) and recombinant IL-4 (rIL-4; 500 U/ml) in the presence of SGBHB or the absence of SGBHB. Cells were incubated for 6 hr, harvested, and used for RNA preparation for RT-PCR. Amplified IL-1 β PCR products were analyzed on 1.2% agarose gel. Lane 1: Untreated control, Lane 2: mAb + rIL-4, Lane 3: mAb + rIL-4 + 100 μ g/ml SGBHB, Lane 4: mAb + rIL-4 + 10 μ g/ml SGBHB, Lane 5: mAb + rIL-4 + 1 μ g/ml SGBHB. β -actin RT-PCR was used as an internal loading control.

2) IL-6 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향

무처리(media) B 세포의 IL-6 mRNA 유전자 발현은 Ht 값이 35로 나타난 반면, anti-CD40 mAb와 rIL-4로 동시 자극한 대조군의 Ht 값은 68로 나타났으며, SGBHB 100, 10 그리고 1 μ g/ml 농도 처리군은 IL-1 β 유전자 발현이 각각 30, 42, 53으로 나타나 농도 의존적으로 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 6).

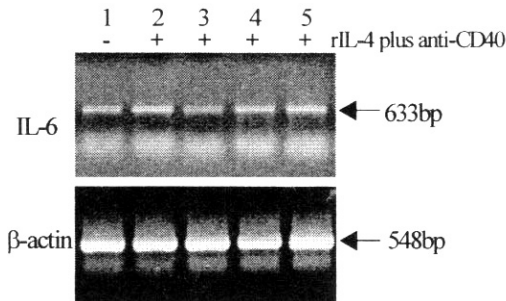


Fig. 6. Inhibitory effects of SGBHB extract on IL-6 mRNA expression in murine splenic B cells.

Splenic B cells prepared from healthy Balb/C mice were treated with both anti-CD40

monoclonal antibody (mAb; 500 ng/ml) and recombinant IL-4 (rIL-4; 500 U/ml) in the presence of SGBHB or the absence of SGBHB. Cells were incubated for 6 hr, harvested, and used for RT-PCR. Amplified IL-6 PCR products were analyzed on 1.2% agarose gel. Lane 1: Untreated control, Lane 2: mAb + rIL-4, Lane 3: mAb + rIL-4 + 100 μ g/ml SGBHB, Lane 4: mAb + rIL-4 + 10 μ g/ml SGBHB, Lane 5: mAb + rIL-4 + 1 μ g/ml SGBHB. β -actin RT-PCR was used as an internal loading control.

3) IL-10 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향

무처리(media) B 세포의 IL-10 mRNA 유전자 발현은 Ht 값이 25로 나타난 반면, anti-CD40 mAb와 rIL-4로 동시 자극한 대조군의 Ht 값은 57로 나타났으며, SGBHB 100, 10 그리고 1 μ g/ml 농도 처리군은 IL-10 유전자 발현이 각각 85, 62, 66으로 대조군에 비하여 증가하였다(Fig. 7).

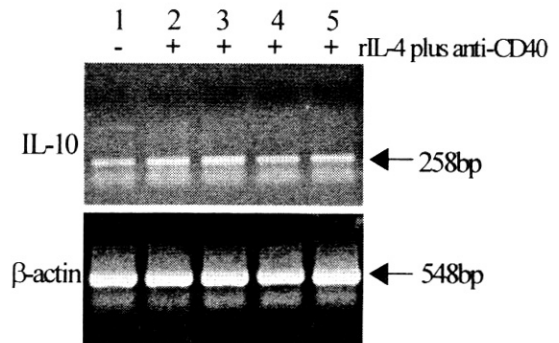


Fig. 7. Inhibitory effects of SGBHB extract on IL-10 mRNA expression in murine splenic B cells.

Splenic B cells prepared from healthy Balb/C mice were treated with both anti-CD40 monoclonal antibody (mAb; 500 ng/ml) and recombinant IL-4 (rIL-4; 500 U/ml) in the presence of SGBHB or the absence of SGBHB. Cells were incubated for 6 hr, harvested, and used for RNA preparation for RT-PCR. Amplified IL-10 PCR products were analyzed on

1.2% agarose gel. Lane 1: Untreated control, Lane 2: mAB + rIL-4, Lane 3: mAB + rIL-4 + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SGBHB, Lane 4: mAB + rIL-4 + 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SGBHB, Lane 5: mAB + rIL-4 + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SGBHB. β -actin RT-PCR was used as an internal loading control.

4) TNF- α mRNA 유전자 발현에 미치는 영향

무처리(media) B 세포의 TNF- α mRNA 유전자 발현은 Ht 값이 152로 나타난 반면, anti-CD40 mAb와 rIL-4로 동시 자극한 대조군의 Ht 값은 195로 나타났으며, SGBHB 100, 10 그리고 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군은 TNF- α 유전자 발현이 각각 164, 170, 187로 나타나 대조군에 비하여 농도 의 존적으로 감소하였다(Fig. 8).

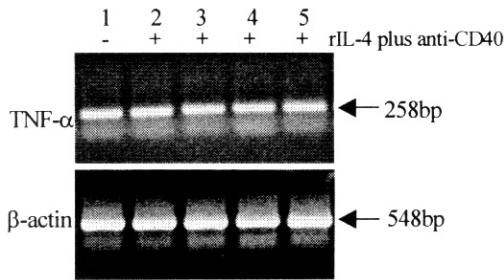


Fig. 8. Inhibitory effects of SGBHB extract on TNF- α mRNA expression in murine splenic B cells.

Splenic B cells prepared from healthy Balb/C mice were treated with both anti-CD40 monoclonal antibody (mAb; 500 ng/ml) and recombinant IL-4 (rIL-4; 500 U/ml) in the presence of SGBHB or the absence of SGBHB. Cells were incubated for 6 hr, harvested, and used for RNA preparation for RT-PCR. Amplified TNF- α PCR products were analyzed on 1.2% agarose gel. Lane 1: Untreated control, Lane 2: mAB + rIL-4, Lane 3: mAB + rIL-4 + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SGBHB, Lane 4: mAB + rIL-4 + 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SGBHB, Lane 5: mAB + rIL-4 + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SGBHB. β -actin RT-PCR was used as an internal loading control.

Table 3. Inhibitory Effect of SGBHB on Cytokines Expression in Murine Splenic B Cells

α -CD40	rIL-4	SGBHB ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Cytokines mRNA expression (Ht)			
			IL-1 β	IL-6	IL-10	TNF- α
RPMI1640	-	0	45	35	25	152
+	+	0	96	68	57	195
+	+	100	55	30	85	164
+	+	10	66	42	62	170
+	+	1	64	53	66	187

Splenic B cells prepared from healthy Balb/C mice were treated with both anti-CD40 monoclonal antibody (mAb; 500 ng/ml) and recombinant IL-4 (rIL-4; 500 U/ml) in the presence or absence of SGBHB. Cells were incubated for 6 hr, harvested, and used for RNA preparation for RT-PCR. Amplified RT-PCR products of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α were analyzed on 1.2% agarose gel. The DNA band intensity (in Ht values) was obtained by 1D-density program.

5. IL-6 생성량에 미치는 영향

B-cells 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 회수한 후 ELISA에 사용하였다. 실험군은 B 세포에 무처리한 RPMI1640 음성대조군, rIL-4 처리군, anti-CD40 처리군, anti-CD40과 rIL-4 병용 처리한 대조군, anti-CD40, rIL-4 및 rIL-10 병용 처리한 양성대조군, anti-CD40, rIL-4 및 SGBHB(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 병용 처리한 실험군으로 나누어 생성량을 측정 한 결과 각각 76.0 ± 14.0 , 370.1 ± 29.8 , 210.4 ± 36.5 , 198.5 ± 74.3 , 278.1 ± 55.4 , 342.2 ± 46.4 pg/ml로 나타났다(Table 4, Fig. 9).

Table 4. Effect of SGBHB Extract on IL-6 Production in Murine Splenic B-Cells

anti-CD40	rIL-4	rIL-10	SGBHB ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	IL-6 production (pg/ml)
			0	76.0 \pm 14.0
+	+	-	0	370.1 \pm 29.8
+	+	+	0	210.4 \pm 36.5**
+	+	-	100	198.5 \pm 74.3*
+	+	-	10	278.1 \pm 55.4
+	+	-	1	342.2 \pm 46.4

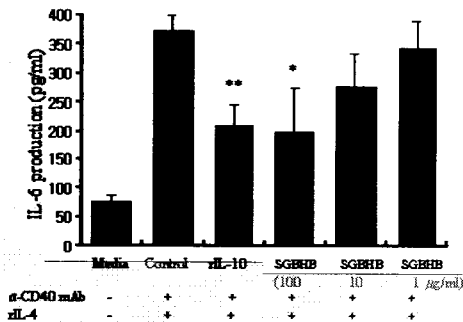


Fig. 9. Effect of SGBHB extract on IL-6 production in murine splenic B cells.

Splenic B cells prepared from healthy Balb/c mice were treated with anti-CD40 monoclonal antibody (mAb; 500 ng/ml) and recombinant IL-4 (rIL-4; 500 U/ml) in the presence or absence of SGBHB (100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or anti-CD40 monoclonal antibody (mAb; 500 ng/ml), recombinant IL-4 (rIL-4; 500 U/ml) and rIL-10 (50 ng/ml). Levels of produced IL-6 were assayed by the ELISA. The data in the Figure are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between SGBHB-treated and untreated control groups were analyzed using Student's paired test (* p < 0.05, ** p < 0.05).

6. IL-10 생성량에 미치는 영향

B-cells 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm 에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수하여

ELISA에 사용하였다. 실험군은 B 세포에 무처리한 RPMI1640 음성대조군, rIL-4 처리군, anti-CD40 처리군, anti-CD40과 rIL-4 병용 처리한 대조군, anti-CD40, rIL-4 및 rIL-10 병용 처리한 양성대조군, anti-CD40, rIL-4 및 SGBHB(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 병용 처리한 실험군으로 나누어 생성량을 측정 한 결과 각각 32 \pm 6.4, 57 \pm 7.2, 176 \pm 32.3, 147 \pm 19.4, 110 \pm 25.1, 96 \pm 14.6 pg/ml 으로 나타났다(Table 5, Fig. 10).

Table 5. Effect of SGBHB Extract on IL-10 Production in Murine Splenic B-Cells

Anti-CD40	rIL-4	rIL-10	SGBHB ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	IL-10 production (pg/ml)
			0	32 \pm 6.4
+	+	-	0	57 \pm 7.2
+	+	+	0	176 \pm 32.3**
+	+	-	100	147 \pm 19.4**
+	+	-	10	110 \pm 25.1*
+	+	-	1	96 \pm 14.6*

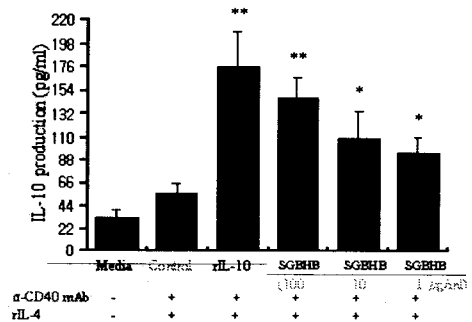


Fig. 10. Effect of SGBHB on IL-10 production in murine splenic B cells.

Splenic B cells prepared from healthy Balb/c mice. were treated with anti-CD40 monoclonal antibody (mAb; 500 ng/ml) and recombinant IL-4 (rIL-4; 500 U/ml) in the presence or absence of SGBHB (100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or anti-CD40 monoclonal antibody (mAb; 500 ng/ml), recombinant IL-4 (rIL-4; 500 U/ml) and

rmIL-10 (50 ng/ml). Levels of produced IL-10 were assayed by the ELISA. The data in the Figure are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between SGBHB-treated and untreated control groups were analyzed using Student's paired test (*p < 0.05, **p < 0.05).

7. TNF- α 生成量에 미치는 影響

B-cells 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm 에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수하여 ELISA에 사용하였다. 실험군은 B 세포에 무처리한 RPMI1640 음성대조군, rIL-4 처리군, anti-CD40 처리군, anti-CD40과 rIL-4 병용 처리한 대조군, anti-CD40, rIL-4 및 rIL-10 병용 처리한 양성대조군, anti-CD40, rIL-4 및 SGBHB(100 μ g/ml)을 병용 처리한 실험군으로 나누어 생성량을 측정 한 결과, 각각 680 \pm 56, 1687 \pm 220, 1250 \pm 187, 1368 \pm 156, 1451 \pm 178, 1604 \pm 169 pg/ml 로 나타났다(Table 6, Fig. 11).

Table 6. Effect of SGBHB Extract on TNF- α Production in Murine Splenic B-Cells

Anti-CD40	rIL-4	rIL-10	SGBHB (μ g/ml)	TNF- α production (pg/ml)
			0	680 \pm 56
+	+	-	0	1,687 \pm 220
+	+	+	0	1,250 \pm 187
+	+	-	100	1,368 \pm 156
+	+	-	10	1,451 \pm 178
+	+	-	1	1,604 \pm 169

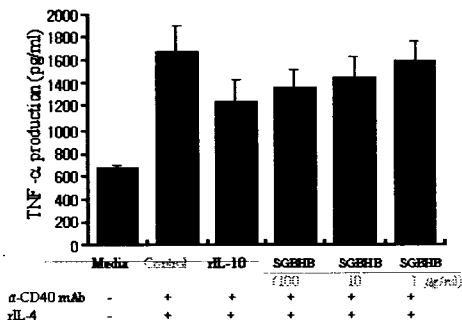


Fig. 11. Effect of SGBHB on TNF- α production in murine splenic B cells.

Splenic B cells prepared from healthy Balb/c mice were treated with anti-CD40 monoclonal antibody (mAb; 500 ng/ml) and recombinant IL-4 (rIL-4; 500 U/ml) in the presence or absence of SGBHB (100, 10, 1 μ g/ml) or anti-CD40 monoclonal antibody (mAb; 500 ng/ml), recombinant IL-4 (rIL-4; 500 U/ml) and rmIL-10 (50 ng/ml). Levels of produced TNF- α were assayed by the ELISA. The data in the Figure are expressed as the mean \pm SEM.

8. IgE 生成量에 미치는 影響

B 세포에 무처리한 RPMI1640 음성대조군, rIL-4 처리군, anti-CD40 처리군, anti-CD40과 rIL-4 병용 처리한 대조군, anti-CD40, rIL-4 및 rIL-10 병용 처리한 양성대조군, anti-CD40, rIL-4 및 SGBHB(100 μ g/ml)을 병용 처리한 실험군으로 나누어 ELISA leader로 생성량을 측정 한 결과, 각각 9.3 \pm 1.2, 27.3 \pm 3.4, 4.7 \pm 0.7, 5.9 \pm 1.2, 7.4 \pm 1.5, 15.5 \pm 2.6 ng/ml으로 나타났다(Table 7, Fig. 12).

Table 7. Inhibitory Effect of SGBHB Extract on IgE Production in Murine Splenic B-Cells

Anti-CD40	rIL-4	rmIL-10	SGBHB (μ g/ml)	IgE production (ng/ml)
			0	9.3 \pm 1.2
+	+	-	0	27.3 \pm 3.4
+	+	+	0	4.7 \pm 0.7***
+	+	-	100	5.9 \pm 1.2***
+	+	-	10	7.4 \pm 1.5***
+	+	-	1	15.5 \pm 2.6*

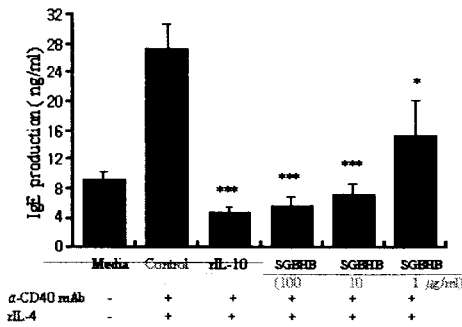


Fig. 12. Effects of SGBHB extract on IgE production in murine splenic B cells.

Splenic B cells prepared from healthy Balb/c mice were treated with anti-CD40 monoclonal antibody (mAb; 500 ng/ml) and recombinant IL-4 (rIL-4; 500 U/ml) in the presence or absence of SGBHB (100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$) or anti-CD40 monoclonal antibody (mAb; 500 ng/ml), recombinant IL-4 (rIL-4; 500 U/ml) and rIL-10 (50 ng/ml). Levels of produced IgE were assayed by the ELISA. The data in the Figure are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between SGBHB-treated and untreated control groups were analyzed using Student's paired test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

IV. 考 察

아토피성 피부염, 류마치스성 관절염, 기관지 천식 등 난치성 면역 질환은 세계적으로나 국내에서도 흔한 질환 중의 하나로, 외래 진료 환자 중 5위를 차지하고 있다.

현재 한방 처방과 일부를 제외한 한약은 이미 임상적으로 안정성을 확보하고 있어, 양방과의 협진을 위해서는 이에 대한 과학, 기술적인 세분화된 연구로 evidence-based medicine (EBM)을 확보하는 것이 무엇보다도 중요하다.

면역 질환의 경우 한의학적인 치료법과 서의학적인 치료법을 병용할 경우 부작용을 줄이면서도 높은 효과를 보인다는 것은 여러 임상 및 연구 논

문을 통해 발표되어 왔으며¹⁶⁻¹⁸⁾, 특히 아토피성 피부염은 생쥐 모델 등 in vivo 효능 검증 시스템이 확립되어 다양한 실험적 연구가 진행되고 있다^{10,11)}.

본 시료인 석고가미복합방은 현재 임상에서 외치로 활용되는 처방으로 蕎麥, 竹鹽, 石膏, 松津 및 梅實 등으로 이루어졌는데, 이들 구성 약물의 효능을 살펴보면 다음과 같다.

蕎麥(모밀)은 12~15% 단백질이 함유되어 있고, 필수 아미노산 '라이신'을 다량 함유 (5~7%) 하고 있으며, 풍부한 양의 지방, 철, 인, 동, 아연 등의 무기질과 비타민 B1과 B2도 함유하고 있어, 성인병인 동맥경화, 고혈압, 당뇨병, 위장병 등의 예방과 치료 효과가 보고되었으며, 최근 식품으로써 풍부한 섬유질로 인해 변비, 다이어트 등에도 효과가 있는 것으로 인식되고 있으며¹⁹⁾, 특히 丁²⁰⁾은 抗알레르기 反應에 對한 研究를 보고한 바가 있다.

죽염은 살균 효과, 위궤양, 소화기에 대한 효과, 해독 작용에 대한 효과, 치은염에 대한 효과가 실험적으로 입증된 바가 있으며²¹⁾, 松津은 活血通絡, 消腫止痛 효능이 있으며, 황색포도상균과 대장간균에 대한 항균 작용과 결석에 대한 鎔石 작용에 대한 실험적 보고가 있으며²¹⁾, 石膏는 淸熱瀉火, 除煩止渴 작용으로 다양한 열성 질환과 더불어 癰疽, 瘡瘍 등의 피부병에도 응용된다^{21,22)}.

梅實은 利咽, 生津, 蕩腸止瀉, 利筋脈 작용으로 咽喉腫痛, 口渴, 瀉利, 筋骨疼痛을 治하며^{21,22)}, 폐암세포(A-549), 위암세포(KATOIII), 유선암세포(MCF-7), 난소암세포(SK-OV-3) 등의 암 증식 억제 효과, 알코올 분해효소(ADH)의 활성(活性) 증진을 통한 알콜 분해 효과, 피부 보습 효과 등이 실험적으로 입증되었다^{23,24)}.

개인에 따라 아토피(atopy)는 건초열(hay fever), 천식(asthma), 두드러기(urticaria), 만성 습진(chronic eczema, skin irritation), 혹은 음식 알러지와 같은 여러 가지 형태로 나타난다. 이러한 질환 모두 비만세포나 호염구에 의해 유발되는 즉시형 과민 반응의 종류들이다^{25,26)}.

조직 내 비만세포 및 이에 상응하는 순환계 내

의 호염구가 IgE-매개에 의한 자극을 받게 되면 면역계에서 가장 강력한 실행 기작 중의 한 반응이 일어난다. 이러한 세포들에 부착되어 있는 IgE 분자에 항원이 결합하면, 이 세포들로부터 다양한 종류의 매개 물질이 빠르게 분비됨으로써 총체적으로 혈관 투과성이 증가하며, 혈관의 확장과 기관지 및 내장 평활근의 수축, 그리고 국부 염증 등과 같은 반응이 일어난다²⁷⁻²⁹⁾. 이 반응은 항원의 공격이 있는 후, 수분 내에 급속하게 시작되기 때문에 이를 즉시형 과민반응(immediate hypersensitivity)이라 부른다.

강한 즉시형 과민 반응이 발생될 소인을 지닌 개체를 아토피성 체질(과민체질, atopy)이라고 부르는데, 최근 산업화와 음식 문화의 변화로 이러한 체질이 점차 증가 일로에 있어 사회적으로 문제가 되고 있다.

현재 사용되고 있는 과민성 면역 질환 치료제는 스테로이드나 tacrolimus 같은 비특이적 면역 억제제 및 항히스타민제 같은 대증적 증상 완화제가 다용되고 있는데³⁾, 모두 다양한 부작용으로 인하여 장기간 사용이 어렵고, 효과 역시 일시적인 경우가 많다.

따라서 최근 아토피 피부염을 비롯한 다양한 면역성 질환에 대한 보다 효과적이고 부작용이 적은 천연물에 대한 검색이 국내외적으로 활발하게 이루어지고 있다.

본 연구 역시 아토피 피부염에 대한 evidence-based medicine (EBM)을 확보하고, 다양한 치료 처방을 개발하기 위하여, 실제 임상에서 활용되고 있는 처방인 석고가미복합방(SGBHB)을 시료로 선택하였다. 본 연구에서 유의성 있는 결과가 도출되면 개별 약물에 대한 검색과 더불어, 이를 중심으로 신규 한방 아토피 처방을 개발하고자 한다.

먼저 실험에 앞서 본 시료의 세포독성을 평가하기 위하여 정상세포인 생쥐의 lung fibroblast cells(mLFCs)에 대한 세포독성을 평가하였는데, 가장 고농도인 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 85.4 \pm 5.1로 나타나 기존의 실험 결과와 비교하여 볼 때 세포독성이 없음을 알 수 있다(Table 3).

알레르기의 병리학적 작용 기전은 IgE 항체의

생성과 비만세포 감각의 단계, 항원 항체 반응과 탈과립의 단계, 비만세포에서 유리된 화학적 매개 물질에 의한 조직 상해의 단계 등 3단계로 나누어진다³⁰⁾. 이 반응은 피부, 기관지 점막, 비점막에 분포되어 있는 비만세포의 표면에 부착되어 있는 IgE와 항원이 반응하여 histamine과 같은 화학 전달 물질이 방출되어 평활근 수축, 점막의 부종 및 점액의 증가를 일으킴으로써 일어난다³¹⁾.

사람의 말초 혈액에 있는 과립세포 중의 호염구는 말초 혈액에 있을 때는 호염기구라고 부르지만 조직 중에서는 비만세포(mast cells)라고 부른다. 비만세포의 표면에는 IgE의 Fc 부분과 결합하는 receptor가 존재하고 있어, 항원이 인체에 들어온 후 IgE 항체의 생성과 비만세포 감각의 단계를 거쳐 비만세포에 포함하고 있는 heparin과 histamine 등을 유리함으로써 조직 상해를 일으킨다³²⁾. 비만세포는 세포막에 있는 고친화성의 IgE 수용체(Fc ϵ R II=CD23)를 통해서 활성화된다³³⁾.

즉 표면에 부착되어 있는 IgE 분자에 특정 항원이 결합하여 IgE가 교차 결합되면 반응이 유발되고, 특징적으로 비만세포와 호염구의 활성화가 시작된다. 항원에 처음 노출되었을 때 B 림프구가 IgE를 생산하며, IgE가 비만세포 및 호염구의 표면에 존재하는 특이 Fc 수용체와 결합하고, 결합한 IgE와 재차 침입한 항원과의 상호 작용이 일어나므로써 이 세포들이 활성화 되어 매개 물질들을 방출하는데, 이 중 일부는 비만세포 및 호염구의 세포질내 과립에 저장되어 있다. 즉시형 과민 반응의 임상 병리적인 증상은 이 분비된 매개 물질들의 작용으로 인해 발생된다³⁴⁾.

본 실험에서 생쥐 비장에서 B 세포를 분리한 후 여기에 SGBHB를 처리하여 B 세포 표면 분자인 CD23(FC ϵ RI)의 발현 억제 효과를 유세포 분석기로 측정된 결과, SGBHB 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 투여군의 세포 발현이 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소함으로써 본 시료가 IgE 수용체(Fc ϵ R II=CD23)를 통해서 활성화되는 비만세포의 활성을 억제함을 알 수 있다(Fig. 3).

또한 B 세포 표면 분자인 CD11a (B cells activation marker)에 미치는 영향에서도 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하여(Fig. 4),

CD23(FCεRI)의 발현 억제 효과와 부합되었다.

IgE는 제 I 형 즉시형 과민반응에서 reagin으로 작용한다. 이 IgE와 외부에서 재침입한 항원이 비만세포의 표면에서 결합하면 항원-항체반응이 일어나 항원은 파괴되는데, 이때 화학 전달 물질이 비만세포에서 나온다. 이 화학물질이 알레르기 증상을 일으키는 직접적인 원인 물질이 된다³⁵⁾.

다른 모든 항체 분자와 마찬가지로 B 림프구에 의해 생성되는 IgE는 비만세포 및 호염구의 세포 표면상에서 e 중쇄에 특이적이고, 고친화성이며, 상시 발현되는 FcεRI이라 불리는 Fc 수용체에 결합된다. IgE에 대한 이 수용체의 해리상수는 약 1×10^{-10} M인데, 이 결합은 리간드에 대한 어느 다른 Fc 수용체의 결합보다도 강하다. 혈액의 단핵구와 활성화된 호산구는 IgE에 의한 ADCC 반응을 일으킨다³⁶⁾.

서양의학에서는 아토피성 질환인 기관지 천식, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 담마진 등에서 혈청 IgE 측정은 큰 진단적 의미를 갖는데^{37,38)}, 본 실험에서 IgE ELISA kit로 측정된 IgE 생성량은 양성 대조군만큼 큰 폭으로 IgE 생성을 억제하지는 못하였으나 대조군에 비해 뚜렷한 억제효과가 나타났다(Table 7, Fig. 12).

IgE는 B-cell에서 산출되는 체액성 항체로, B-cell은 각 단계별로 다른 cytokine 들의 영향을 받아 분화되게 된다. 즉 IL-4, IL-10, TGF-β에 의하여 B-cell은 성숙되고 IgA+ 세포로 분화되며, IL-5에 의해 IgA+ 세포의 증식과 clonal expansion이 가속화되고, IL-6에 의해 IgA를 분비할 수 있는 혈장세포로 분화된다^{36,39)}.

정상인과 과민 체질인 사람 사이에는 IgE의 생산에 있어 중요한 차이가 있다. 과민 체질인 경우, 특정 항원에 대해 많은 양의 IgE가 생산되는데 비해 정상인에서는 일반적으로 다른 Ig 동종형(isotype), 즉 IgM과 IgG가 생산되며, IgE는 소량으로 생산된다. IgE 합성에는 유전, 항원에 대한 노출의 이력, 항원의 특성, 그리고, 보조 T 림프구 및 이들로부터 분비되는 사이토카인과 같은 4가지 요인에 의해 조절된다³⁹⁾.

B세포의 분화와 활성화 과정에서 조절되는 전사 인자중 하나가 NF-κB인데, 이는 anti-CD40과

rIL-4에 의하여 활성화되며. 생쥐 B 세포에서 발현되는 사이토카인중 TNF, IL-1β, IL-6의 발현이 NF-κB 전사 인자의 활성화에 의하여 증가되는 것으로 알려져 있다⁴⁰⁾.

이와는 달리 IL-10은 B 세포의 분화를 억제하는 것으로 알려져 있는데^{41,42)}, Liu 등⁴³⁾은 LPS로 유발된 B 세포 증식 과정 중 IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, 그리고 TGF-β의 유전자 발현은 증가하고, IL-10에 의하여 억제된다고 보고한 바가 있다.

이 밖에도 생쥐의 B세포에 rIL-4와 anti-CD40으로 동시 자극한 결과, IL-6 발현과 NF-κB의 DNA binding 활성이 증가되고, IL-1과 TNF-α의 유전자 발현이 유도되었다는 보고⁴⁴⁾와 재조합 HRF를 생쥐의 B세포에 자극한 결과 IL-2, IL-4, IL-5의 증가와, B세포의 MHC-II와 NF-κB의 발현을 증가시켜 IL-1, IL-6, TNF-α의 발현을 up-regulation 되었다는 보고⁴⁵⁾ 등이 있다.

본 실험 결과에서도 생쥐의 B 세포를 순수 분리하여 rIL-4와 anti-CD40으로 자극하여 B세포의 분화와 활성화를 유도한 후 SGBHB을 처리한 결과, IL-1β, IL-6, TNF-α의 유전자 발현은 감소하였고(Fig. 5, 6, 8), IL-10의 유전자 발현은 크게 증가함으로써(Fig. 7), 상기 이론에 준하는 유의성 있는 결과가 나타났다.

이상의 결과로 보아 石膏加味複合方은 정상 세포에 대한 세포독성이 나타나지 않고, 제 I 형 과민반응, 즉 알레르기 반응에 유의성 있는 억제 효과를 나타냄으로써 임상에서 아토피를 비롯한 알레르기 관련 질환의 기본 치료제로서의 응용이 기대되며, 구성 약물에 대한 기존의 결과로 볼 때 외치에 대한 연구 결과가 향후 기대된다.

V. 結 論

石膏加味複合方(SGBHB)의 항알레르기 작용을 알아보기 위하여 생쥐의 비장에서 B 세포를 분리하여 알러지 반응을 유도한 후 B 세포의 표면 활성 인자(CD23+, CD11a+), IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α 및 IgE 발현을 검색한 결과 다음과 같은

결과를 얻었다.

1. SGBHB는 mLFCs에 대하여 세포독성이 나타나지 않았다.
2. SGBHB는 B 세포의 활성 표면 분자인 CD23+과 CD11a+의 발현을 억제하였다.
3. SGBHB는 IL-1 β , IL-6 mRNA 유전자 발현을 농도 의존적으로 대조군에 비하여 감소시켰다.
4. SGBHB는 IL-10 mRNA 유전자 발현을 모든 실험 농도에서 대조군에 비하여 증가시킨 반면, TNF- α mRNA 유전자 발현은 감소시켰다.
5. SGBHB는 알러지 반응이 유도된 B 세포에서 IL-6 생성을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 유의성있게 억제하였고, TNF- α 생성은 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다.
6. SGBHB는 알러지 반응이 유도된 B 세포에서 IL-10 생성을 모든 실험 농도에서 대조군에 비하여 유의성있게 증가시켰다.
7. SGBHB는 알러지 반응이 유도된 B 세포에서 IgE 생성을 모든 실험 농도에서 대조군에 비하여 유의성있게 억제시켰다.

이상의 결과로 보아 SGBHB는 면역조절 작용에 의한 항알레르기 작용이 인정되어 임상에서 알레르기와 관련된 질환의 기본 치료제로서의 응용이 기대된다.

參考文獻

1. 전국의과대학교수 역 : 오늘의 진단과 치료, 도서출판 한우리, pp.846-874, pp.132-134, 1999.
2. 김광혁 외 : 세포분자면역학(제3판), pp.29-40, 정문각, 1998.
3. 전국의과대학교수 편 : Katzung's 임상약리학, 도서출판한우리 pp.1049-1068, 1998.
4. 심승항 : 중의여면역, 절강중의학원보, 14(2), P.6, 1990.
5. 왕기 외 : 황제내경소문금석, 정보사, p. 412, 1979.
6. 김정진 : 加味生料四物湯의 抗炎症效果와 止

痒膏의 아토피 皮膚炎 損傷 및 止痒效果에 미치는 影響, 경희대학교 박사학위논문, 2002.

7. 동서의학융합연구회 : 임상동서의학, pp. 432-436, 도서출판영림사, 1997.
8. 朴珉徹 : 아토피 皮膚염의 東西醫學的 文獻考察, 원광대학교 석사학위논문, 2002.
9. 尹華廷 : 아토피 皮膚炎 患者의 韓醫學的인 臨床類型分類에 대한 研究, 東義大學校 석사학위논문, 2001.
10. 박성남 : 消風散이 BALB/c mouse를 이용한 Atopy 皮膚염 Model에 미치는 영향, 경희대학교 박사학위논문, 2003.
11. 박응식 : 아토피 皮膚염을 유발한 동물모델에서 消風清營湯加味方이 각질층 기능회복에 미치는 영향, 東國大學校 석사학위논문, 2004.
12. Smith JE, Anderson JG, Lewis CW, Murad YM. Cytotoxic fungal spores in the indoor atmosphere of the damp domestic environment. *FEMS Microbiol Lett.*, 15:79(1-3):337-43, 1992 Dec.
13. Chan, V. W.-F., F. Meng, P. Soriano, A. L. DeFranco, and C. A. Lowell. Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity* 7:69, 1997.
14. Papazisis KT, Geromichalos GD, Dimitriadis KA, Kortsaris AH. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Immunol Methods*, 27:208(2):151-8, 1997.
15. Hyung Sik Kang, Min Ju Lee, Hyunkeun Song, Seung Hyun Han, Yong Man Kim, Joo Young Im, and Inpyo Choi. Molecular Identification of IgE-Dependent Histamine-Releasing Factor as a B Cell Growth Factor. *The Journal of Immunology*, 166: 6545-6554, 2001.
16. 강연이 : 韓醫學의 抗腫瘍 免疫治療에 關한 研究(1990年 以後 發表된 實驗論文을 中心으로), 대전대학교 박사학위논문, 2003.
17. 양성완 : 수중 한약 처방이 아토피 皮膚염

- 환자의 SCORAD 및 Cytokine 변화에 미치는 영향, 경희대학교 박사학위논문, 2994.
18. 정규만 : 알레르기와 한방, 서울, 도서출판 제일로, pp.15-49, 1990.
 19. 沈浩欽 : 메밀의 성분과 Instant 막국수의 식품營養學의 特性, 강원대학교 석사학위논문, 1992.
 20. 丁志榮 : 메밀(蕎麥) 抽出物의 抗알레르기 反應에 對한 實驗的 研究, 대전대학교 석사학위논문, 2002.
 21. 중화본초편집위 : 중화본초, 상해과학기술출판사, 상해, 1:296-301, 4:91, 1999.
 22. 전국한의과대학 본초학교실 : 본초학, 영림사, p.160, p.615, 1991.
 23. 松本雄齊 : (신비의)매실건장법, 서울, 국일문학사, 1994.
 24. 鄭鍾喜 : 오매 추출물이 위암 및 대장암 세포주의 증식에 미치는 영향, 계명대학교 석사학위논문, 2000.
 25. 도영민 : 아토피란 무엇인가(아토피의 실상과 배독법의 이해), 서울, 마이크로, 2003.
 26. Bronfeldt KE, Raines EW, Graves LM, Skinner MP, Krebs EG, Rose R : Platelet-derived growth factor, Distinct signal transduction pathways associated with migration versus proliferation. *Ann. N. Y. Acad Sci.* 766:416-430, 1995.
 27. Chun Kung, Matthew L. Thomas : Recent advances in lymphocyte signaling and regulation, *Frotiers in Bioscience* 2, d207-221, 1997.
 28. Williamson JR, cooper RH, Joseph SK, Thomas AP : Inositol triphosphate and diacylglycerol as intracellular messengers in liver. *Am. J. Physiol.* 248:C203-C216, 1985.
 29. Blank U, Ra C, Miller L, White K, Metzger H, Kinet JP: Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE Receptor, *Nature*, 337:187-189, 1989.
 30. Kinet JP : The high-affinity receptor for IgE. *Curr. Opin, Immunol.* 1989-1990:2:449-505.
 31. Alber G, Miller L, Jelsema CL, Varin-Blank N, Metzger H : Structure -function relationships in the mast cell high affinity receptor for IgE, Role of the cytoplasmic domains and fo the b subunit, *J. Biol. Chem.*, 266:22613-22620, 1991.
 32. Reth M : Antigen receptor tail clue. *Nature*, 338:282-284, 1989.
 33. Jouvin MH, Numerof RP, Kinet JP: Signal transduction through the conserved motifs of high affinity IgE receptor FcεRI, *Seminars in immunol*, 7:29-35, 1995.
 34. Cambier JC: New nomenclature for the Reth motif(or ARH1/TAM/ ARAM/YXXL). *Immuol. today*, 16:110, 1995.
 35. Kihara H, Siraganian RP : Src homology 2 domains of Syk and Lyn bind to tyrosine-phosphorylated subunits of the high affinity IgE receptor, *J. Biol. Chem.* 269: 22427-22432, 1994.
 36. Baniyashi, M., Eshhar, Z and Rivnay, B. Relationships between epitopes on IgE recognized by defined monoclonal antibodies and by the Fcε receptor on basophils. *J. Immunol*, 136: 588-593, 1986.
 37. 조상현 : 아토피 환자에서 IgE 항체 자연생성능과 조절기전에 관한 연구, 서울대학교 박사학위논문, 1993.
 38. 윤성필 : 달맞이꽃종자유가 아토피 피부염 환자의 임상 양상과 혈청 IFN-γ 및 IgE에 미치는 영향, 인하대학교 석사학위논문, 1998.
 39. Ishizaka, T., Ishizaka, K., Conrad, D. H. and Foese, A. A new concept of triggering mechanism of igE-mediated histamine release. *J. Allergy Clin. Immunol.* 61: 320-330, 1978.
 40. Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V, Hauser C. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-α, and contact sensitizers. *J Immunol*, 166:3837-45, 2001.
 41. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop,

J. and Enk, A. H., Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 192: 1213-1222, 2000.

42. deWaalMalefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G. and de Vries, J. E., Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174: 1209-1220, 1991.

43. Liu N, Ohnishi N, Ni L, Akira S, Bacon KB. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. *Nat Immunol*, 4(7):687-93, 2003.

44. Laderach, D., Compagno, D., Danos, O., Vainchenker, W. and Galy, A. RNA interference shows critical requirement for NF κ B p50 in the production of IL-12 by human dendritic cells. *J. Immunol.* 171:1750- 1757, 2003.

45. Iciek, L. A., Delphin, S. A. and Stavnezer, J. CD40 cross-linking induces IgE germline transcripts in B cells via activation of NF- κ B. *J. Immunol*, 158: 4769-4779, 1997.