

柴胡가 OVA로 유발된 BALB/c mice의 알레르기성 비염 모델에 미치는 영향

임정민 · 허 준 · 이성엽 · 김재현 · 이비나 · 민주희 · 김은영 · 정혁상 · 손영주*

경희대학교 한의과대학 해부학교실

Effects of Bupleuri Radix on OVA-induced Allergic Rhinitis Model of BALB/c mice

Jeong-Min Lim, Jun Heo, SungYub Lee, Jae-Hyun Kim, Bina Lee, Ju-Hee Min,
Eun-Young Kim, Hyuk-Sang Jung, Youngjoo Sohn*

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Allergic rhinitis is a growing tendency to increase. Following this tendency, allergic rhinitis is lively studied also in Korean oriental medicine. Bupleuri Radix (BR) has been used for many inflammatory diseases, but experimental backgrounds are not enough to treat allergic rhinitis. So in this study, effects of BR on OVA-induced allergic rhinitis model of BALB/c mice were examined. Thirty two BALB/c mice are equally divided into four groups; control group, OVA group, OVA+BR group, OVA+Cet group. The OVA, OVA+BR and OVA+Cet groups were induced allergic rhinitis by sensitizing to OVA. And then saline solution included BR (10.6 mg/kg body weight) was administered to the OVA+BR group orally. The number of nasal rubbing and nasal sneezing was evaluated for 10 days and later serological and histological changes were analyzed. Serological analysis included the serum levels of cytokines and chemokines (IL-4, IL-5, IL-12, MCP-1, MIP-2), total IgE and OVA-specific IgE levels in serum. Histological analysis included thickness of nasal septum, eosinophil counts changes of nasal mucosa, infiltration of eosinophil in nasal mucosa and histological changes of nasal mucosa. The number of nasal rubbing and nasal sneezing was significantly decreased in the OVA+BR group. The serum levels of IL-4, IL-5, MCP-1, MIP-2 were significantly decreased in the OVA+BR group but the serum levels of IL-1 β had not significance. Total IgE and OVA-specific IgE levels in serum were decreased in the OVA+BR group, but total IgE levels in serum had only significance. Thickness of nasal septum, eosinophil counts of nasal mucosa and infiltration of eosinophil in nasal mucosa were significantly decreased in the OVA+BR group. From the results of this study, we think that BR has an effect on improvement of allergic rhinitis by improving nasal rubbing and nasal sneezing, reducing histological changes of nasal mucosa and infiltration of eosinophil in nasal mucosa, inhibiting increasing of the serum levels of cytokines, chemokines and total IgE.

keywords : Bupleuri Radix, Allergic Rhinitis, BALB/c mice

서 론

알레르기의 어원은 그리스어의 'allos(변하다)'와 'ergo(작용, 능력)'을 합친 것¹⁾으로 먼지나 꽃가루, 동물의 털과 같은 인체에 무해한 환경물질에 대해서 부적절한 면역과민반응을 보이는 것을 말한다²⁾.

알레르기 반응은 관여하는 항체의 종류에 따라 I~IV형 알레르기로 구분이 되는데³⁾, 그 중 I형 알레르기 반응은 항원과의 접촉 후 즉시 급성염증반응을 야기하므로 즉시형 과민반응이라고도

하며⁴⁾ 알레르기성 비염을 야기한다.

알레르기성 비염의 임상적인 증상으로는 재채기, 콧물, 코막힘의 3대 특징을 지니며, 이외에도 안구 및 비인두의 소양감과 분비물 등이 동반된다⁵⁾. 혈액학적 특징으로는 호산성 백혈구, 림프구 등의 출현과 더불어 cytokine, chemokine, 효소 등 여러 종류의 염증과 관련된 단백질의 증가가 있다⁶⁾. 조직학적으로는 코 점막에 호산성 백혈구가 주로 침윤이 되어 창백한 부종상을 띠는 것이 특징이다⁷⁾.

알레르기성 비염은 전체 인구의 10~50 %에서 발생하며, 아시

* Corresponding author

Youngjoo Sohn, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, Korea

E-mail : youngjoos@khu.ac.kr ·Tel : +82-2-961-9449

Received : 2015/09/15 ·Revised : 2015/10/29 ·Accepted : 2015/11/12

© The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.12.29.6.467

Available online at http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm

아에서는 성인의 10~40 %, 소아의 10~46 %에서 나타난다⁸⁾. 알레르기성 비염 진료환자가 2008년부터 5년간 연평균 6.6 % 증가하였다는 보고⁹⁾와 같이 최근에는 그 유병률이 증가하는 추세에 있으며, 한의학적으로도 알레르기성 비염에 대하여 활발히 연구되고 있다. 알레르기성 비염과 관련하여 防風通聖散¹⁰⁾, 加味桂枝湯¹¹⁾, 蒼甘薑味辛夏仁湯¹²⁾, 補中益氣湯¹³⁾, 去痰補肺湯¹⁴⁾ 등의 처방들에 대한 실험연구가 진행된 바 있으며, 單味에 있어서는 防風¹⁵⁾, 黃芪¹⁶⁾, 楡根皮¹⁷⁾ 등의 약재가 연구를 통해 알레르기성 비염에의 활용 가능성을 제시한 바 있다.

柴胡는 미나리과(산형과 : Umbelliferae)에 속한 多年生 草本인 시호(*Bupleurum chinense* DC.)의 根으로, 생약명은 *Bupleuri Radix*이다¹⁸⁾. 柴胡 뿌리는 saikosaponin a, c, d, e, α -spinasterol, bupleurmol, 지방유, 다당류 등의 성분으로 구성되며¹⁹⁾, 현대 약리학적으로도 柴胡는 해열작용, 진통, 진해 작용, 항균, 항바이러스 작용, 소염작용, 면역증강작용 등을 나타낸다¹⁹⁾. 본초학에서는 發散 風熱藥 계통에 분류된 약재로 性은 微寒하고 味는 苦하며, 肝膽經에 歸經하고 和解退熱, 疏肝解鬱, 升舉陽氣의 효능이 있다²⁰⁾. 半表半裏의 邪氣를 없애는데 좋은 효과가 있어 感冒發熱, 寒熱往來, 胸脅脹痛 등을 치료하는 少陽의 要藥이 되고, 外感 후에 表邪가 未解하여 나타나는 발열에도 양호한 退熱작용이 있으며, 肝氣를 調達케 하여 月經不調 등의 부인과 질환에도 광범위하게 사용되며, 氣虛下陷하여 나타나는 子宮脫垂, 脫肛 등에도 응용한다¹⁸⁾.

柴胡의 효능과 약리작용에 대하여 각종 연구들이 진행되었고, 실제로 감기²¹⁾, 기관지염²²⁾, 간염²³⁾, 여러 가지 열병 등 염증성 질환에 응용되고 있지만¹⁹⁾ 알레르기성 비염에 柴胡의 응용은 드물다. 그간 진행된 연구들에서도 알레르기성 비염에 대한 柴胡의 유효성에 있어서 견해의 차이를 보이고 있는데, 柴胡가 함유된 柴平湯의 항알레르기 효과로 알레르기성 비염에 柴平湯의 응용을 시사한 연구결과²⁴⁾가 있는 반면에 柴胡가 알레르기성 비염에 대하여 큰 영향을 끼치지 못한다는 연구결과²⁵⁾도 있으나 후자의 연구는 약제의 용량과 시료 성분의 추출 방법에서 본 연구와 차이가 있었던 점이 고려되어야 할 것이다. 柴胡의 효능과 약리학적 작용을 종합하여 고려하면 알레르기성 비염 치료에 있어서 柴胡가 유효성이 있을 것이라고 판단되어 지는 바, 저자는 현재까지 알레르기성 비염에서 柴胡의 역할에 대한 일지된 견해가 미흡하므로 좀 더 명확한 연구가 필요하다고 생각하여 연구를 진행하였다.

이에 본 연구에서는 알레르기성 비염 병태 모델을 BALB/c mice로 유도하여 柴胡가 행동지표와 여러 혈액학적 지표의 변화 및 조직학적 변화에 어떤 영향을 끼치는지 관찰한 결과 柴胡가 알레르기성 비염에 유의한 효과가 있다는 결론을 도출하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

Chicken egg albumin(OVA), aluminum hydroxide는 Sigma-aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며,

interleukin-4(IL-4), interleukin-5(IL-5), interleukin-12(IL-12), monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1), macrophage inflammatory protein-2(MIP-2) 등 cytokine/chemokine magnetic bead panel kit는 Millipore(Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. Purified rat anti-mouse immunoglobulin E(IgE), recombinant IL-6와 IL-8, biotinylated IL-6와 IL-8, 그리고 anti-human IL-6와 IL-8 등은 BD Biosciences(San Jose, San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

2) 시료의 준비

본 실험에서 사용된 柴胡는 함소아 제약(Seoul, Korea)에서 제공받았으며, 경희대학교 한의과대학 본초학교실 부영민 교수로부터 감별 받았다. 柴胡의 약재 표본(A055)은 서울 경희대학교 한의과대학의 해부학교실에 보관해 놓았다. 柴胡 250 g을 3 L 등근 플라스크에 넣고, 3,000 mL의 증류수와 함께 냉각기가 부착된 전탕기에서 2 시간 동안 가열하였다. 추출액은 Whatman filter paper no. 3(Whatman, Maidstone, Kent, UK)를 사용하여 여과시킨 후 여과액을 rotary vacuum evaporator(N-1200, EYELA, Tokyo, Japan)에서 감압 농축한 후 동결건조하여 7.95 %의 수득율을 얻었다.

2. 방법

1) 동물

6 주령 암컷 BALB/c mice는 나라바이오텍(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 동물관리와 모든 실험과정은 경희대학교 동물실험 윤리위원회의 가이드라인(KHUASP(SE)-13-006)에 따라서 수행되었다. 사육실의 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 하고, 습도는 50-60 %로 일정하게 유지하였으며, 낮과 밤의 주기는 각각 12 시간(lights on from 07:00 to 19:00)으로 하였고, 물과 사료는 자유롭게 먹도록 하였다.

2) 알레르기성 비염 모델 유발 및 군의 분류

6 주령의 암컷 BALB/c mice를 일주일 간 안정시킨 후 0, 7, 14 일째에 250 μg 의 chicken egg albumin(OVA, Sigma)와 10 mg의 aluminum hydroxide(Alum, Sigma)를 phosphate buffered saline(PBS) 1 mL에 혼합한 다음 200 μL 를 복강 투여하여 항체생성을 유도하였다. 14 일째 투여 후 일주일 뒤인 21 일째부터 10 일 동안 매일 PBS에 녹인 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 OVA를 20 μL 를 비강으로 투여하고 2분 동안 약의 흡수를 기다린 뒤 알레르기성 비염의 행동증상인 코를 긁는(nasal rubbing) 시간과 재채기(sneezing) 횟수를 10 분 동안 측정하였다. 행동관찰일 10 일 동안 대조군(Control 군, n=8)과 OVA 유발군(OVA 군, n=8)은 생리식염수를 경구 투여하였고, 柴胡투여군(BR 군, n=8)은 BR 물 추출물 10.6 mg/kg을, 양성대조군(Cetirizine 군, n=8)은 cetirizine (Korean Drug Co., Seoul, Korea) 10 mg/kg을 생리식염수 100 μL 에 녹여 행동실험 시작 1 시간 전에 0.1 mL 씩 경구 투여하였다.

마지막 행동 관찰일인 30 일째까지 행동변화를 관찰하였으며 마지막 관찰 3 시간 후에 sodium pentobarbital(Hanlim Pharmaceuticals, Yong-in, Korea) 40 mg/kg을 복강 투여한 후 마취하에, 심장천자를 통하여 혈액을 채취하였으며, 코 점막 및 조직을 취하였다(Fig. 1).

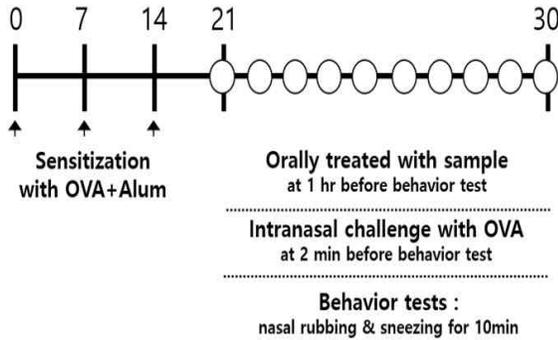


Fig. 1. Experimental protocol for mouse sensitization and drug treatment. OVA, OVA+BR and OVA+Cet groups were sensitized by intraperitoneal injection with 50 mg of OVA and 2 mg of Alum on days 0, 7 and 14, then received daily intranasal OVA from day 21-30. In addition to sensitization and intranasal challenge, selected groups of mice were treated with BR (OVA+BR group: 10.6 mg/kg body weight) or cetirizine hydrochloride (OVA+Cet group: 10 mg/kg body weight), 1 h before intranasal OVA challenge. Control group was sensitized and challenged with saline. Clinical symptoms were evaluated for 10 minutes after intranasal OVA challenge from day 21-30.

3) 혈중 cytokine 측정

Mouse cytokine/chemokine magnetic bead panel kit(Millipore, Germany)를 이용하여 IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, MCP-1, MIP-2를 정량하였다. 각각의 plate에 200 μ L의 wash buffer를 넣고 실온에서 10 분 동안 수세한 후 적당한 well에 standard 25 μ L를, sample을 넣을 well에는 assay buffer 25 μ L를 넣었다. 그리고 serum matrix solution 25 μ L를 standard와 background well에 넣고, 희석한 혈청 25 μ L를 sample well에 넣어 잘 섞어준 후 각 well에 잘 섞어준 bead 25 μ L 넣어주었다. 이 plate를 포일로 잘 싸아 실온에서 2 시간 반응시킨 후 wash buffer로 2 회 수세하였다. detection antibody 25 μ L를 넣고 실온에서 1 시간 반응시킨 후 streptavidin-phycoerythrin을 넣어 준 후 실온에서 30 분간 잘 섞어주었다. 이를 다시 wash buffer로 2 회 수세한 후 sheath fluid 150 μ L를 넣어 준 후 5 분 동안 잘 섞어주었다. 이 plate를 Luminex 200 TM(Madison, WI, USA)을 이용하여 분석하였다.

4) 혈액 중 총 IgE와 OVA 특이적 IgE의 정량 분석

각 실험군의 BALB/c mice에서 심장천자를 통하여 혈액을 채취하여 원심분리를 통해 적혈구를 버리고 혈청을 획득하여 ELISA 방법을 이용하여 혈청 내 존재하는 총 IgE와 OVA 특이적 IgE를 측정하였다. 총 IgE는 capture anti-body인 purified anti-mouse IgE를 coating buffer (PBS, pH 7.4)에 희석하여 Nunc plate에 100 μ L를 넣은 다음 4 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 코팅하였다. PBST(PBS+0.05 % tween 20)로 3회 수세 후 blocking buffer(PBS+1 % BSA)로 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 PBST로 3 회 수세 후 25 배 희석된 혈청과, standard(500 ng/mL-7.8 ng/mL)이 되게 첨가하였다. PBST로 3 회 수세 후 detection antibody인 biotinylated anti-mouse IgE를 blocking buffer로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBST로 6번 수세하였다. 다시 plate를 Avidin peroxidase(1 mg/mL) 1/400로

희석하여 실온에서 30 분간 반응시킨 후 6 회 수세한 후 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(TMB) substrate(BD OPTEDIA substrate Reagent A : BD OPTEDIA substrate Reagent B=1:1)를 희석하여 실온에서 반응시켰다. 20 분 후 2NH₂SO₄로 반응을 정지 시킨 후 405 nm에서 O.D값을 측정하였다. OVA 특이적 IgE는 mouse anti-OVA-IgE ELISA kit(Biovender, Brno, czech republic)를 이용하여 측정하였다.

5) 조직학적 분석

행동 관찰 10 일째에 4 %, 10 % paraformaldehyde로 관류 고정을 하고 BALB/c mice의 머리를 분리하여 비강 주변의 근육을 제거한 후, 동일 고정액으로 4 $^{\circ}$ C에서 하루를 보관하였다. 이후 10 % EDTA 용액에 14 일 동안 탈회한 다음에 파라핀에 포매하여 5 μ m 두께로 연속절편 하였다. 절편은 xylene으로 탈파라핀하고, ethanol로 함유한 후 hematoxylin-eosin으로 염색하여 디지털 광학현미경(DP70, Olympus, Tokyo, Japan)으로 영상화하였다. 코 점막의 두께 및 호산성 백혈구(eosinophil)의 침윤 정도는 400 배로 확대된 이미지에서 각 군의 코 절편으로부터 코중격의 점막 부위에서 측정하였으며, 호산성 백혈구는 세포질 내의 eosin 염색된 granule을 기준으로 확인하였다.

6) 통계 분석

측정값은 평균 \pm 표준오차(mean \pm S.E.M.)로 표기하였다. 실험결과는 통계 프로그램 GraphPad Prism software(GraphPad Software Inc, CA, USA)를 사용하여 약물의 농도에 따른 지표의 발현수치를 비교할 경우 one-way ANOVA로 실시하였고, 유의수준 P value < 0.05인 경우 유의성이 있다고 평가하였고 Dunnett's multiple comparison test로 사후 검증 하였다.

결 과

1. 행동지표에서 코를 긁는 시간 변화

OVA로 유도된 알레르기성 비염 BALB/c mice에 매일 OVA 20 μ L를 비강으로 투여하고 2 분 동안 약의 흡수를 기다린 뒤 10 분 동안 코를 긁는 시간을 측정하는 방식으로 각각 하루 동안 코를 긁는 시간(Fig. 2A)와 10 일 동안 총 코를 긁는 시간(Fig. 2B)에 대한 측정 결과를 얻었다. OVA 유발군의 코를 긁는 시간은 생리식염수를 경구 투여한 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(P < 0.01). 柴胡투여군과 cetirizine을 경구 투여한 양성대조군의 코를 긁는 시간은 OVA 유발군에 비해 유의하게 감소하였다(P < 0.01).

2. 행동지표에서 재채기 횟수 변화

OVA로 유도된 알레르기성 비염 BALB/c mice에 매일 OVA 20 μ L를 비강으로 투여하고 2 분 동안 약의 흡수를 기다린 뒤 10 분 동안 재채기 횟수를 측정하는 방식으로 각각 하루 동안 재채기 횟수(Fig. 2C)와 10 일 동안 총 재채기 횟수(Fig. 2D)에 대한 측정 결과를 얻었다. OVA 유발군의 재채기 횟수는 생리식염수를 경구 투여한 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(P < 0.01). 柴胡투여군과 cetirizine을 경구 투여한 양성대조군의 재채기 횟수는 OVA 유발군에 비해 유의하게 감소하였다(P < 0.01).

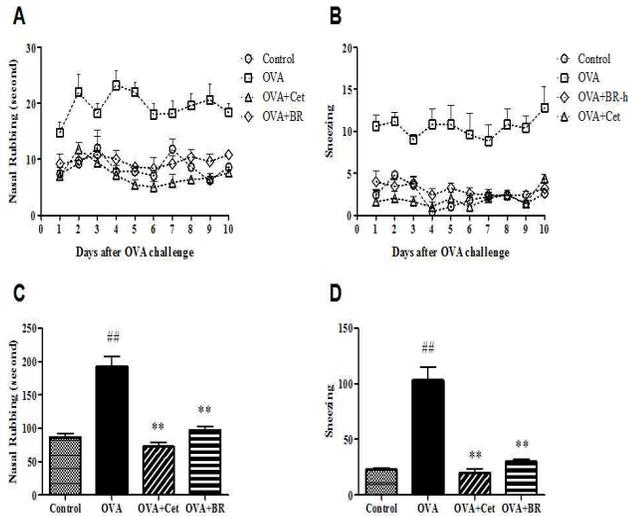


Fig. 2. The nasal rubbing symptom score of OVA-induced allergic rhinitis mouse. The time of rubbing were measured for 10 min after the last intranasal challenge. (A) The time of nasal rubbing for each day. (B) Total time of rubbing for 10 days. Data are expressed as the mean \pm standard error. ##P < 0.01, significantly different from the Control group. **P < 0.01, significantly different from the OVA group. The nasal sneezing symptom score of OVA-induced allergic rhinitis mouse. The number of sneezing were measured for 10 min after the last intranasal challenge. (C) The number of nasal rubbing for each day. (D) Total number of sneezing for 10 days. Data are expressed as the mean \pm standard error. ##P < 0.01, significantly different from the Control group. **P < 0.01, significantly different from the OVA group.

3. 혈중 cytokine 변화

알레르기성 비염 모델에서 혈중 cytokine의 농도에 관한 柴胡의 영향을 알아보기 위해 mouse cytokine/chemokine magnetic bead panel kit를 이용하여 알레르기성 비염 모델의 혈중에 존재하는 IL-4, IL-5, IL-12, MCP-1, MIP-2의 농도를 측정하였다(Fig. 3). OVA로 자극된 OVA 유발군은 대조군에 비해 각 혈중 cytokine의 농도가 유의하게 증가하였다(IL-4, IL-5, MCP-1, MIP-2 : P < 0.01, IL-12 : P < 0.05). 柴胡투여군에서는 IL-4, IL-5, IL-12, MCP-1, MIP-2의 농도가 OVA 유발군에 비하여 유의하게 감소하였다(P < 0.05). Cetirizine을 경구 투여한 양성대조군에서는 OVA 유발군과 비교하여 MCP-1과 MIP-2의 농도는 유의하게 감소하였으나(P < 0.01) IL-4, IL-5의 농도는 오히려 증가하였고 IL-12의 농도 변화에 있어서는 감소 경향만 있었을 뿐 통계적 의미가 없었다.

4. 혈액 중 총 IgE와 OVA 특이적 IgE의 농도 변화

알레르기성 비염 모델에서 혈액 중 총 IgE와 OVA 특이적 IgE의 농도에 관한 柴胡의 영향을 알아보기 위해 ELISA 방법을 이용하여 각 농도를 측정하였다(Fig. 3). OVA로 자극된 OVA 유발군은 혈액 중 총 IgE와 OVA 특이적 IgE의 농도 모두에 있어서 대조군에 비해 3 배 정도 증가되는 통계적 유의성을 가졌다(P < 0.01). Cetirizine을 경구 투여한 양성대조군에서는 혈액 중 총 IgE와 OVA 특이적 IgE의 농도 모두에서 유의적으로 감소되는 결과를 보였다(P < 0.01). 柴胡투여군에서는 혈액 중 총 IgE에서는 유의적으

로 감소되었으나(P < 0.05), OVA 특이적 IgE의 농도에 있어서는 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않았다.

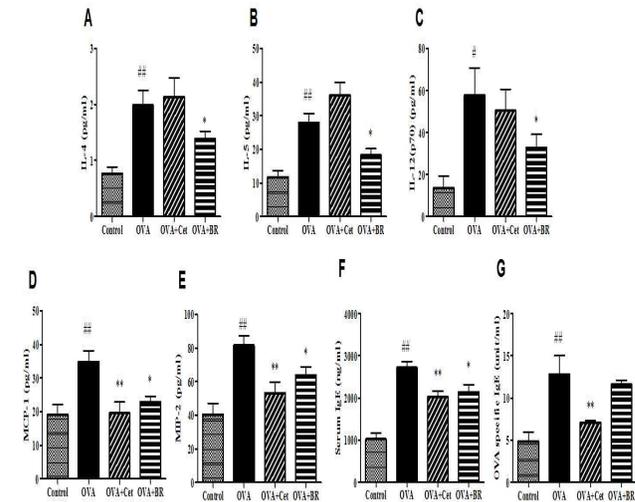


Fig. 3. Effects of BR on the serum levels of cytokines in allergic rhinitis model. The concentrations of IL-4 (A), IL-5 (B), IL-12 (C), MCP-1 (D) and MIP-2 (E) in the sera of allergic rhinitis model were measured by mouse cytokine/chemokine magnetic bead panel kits. Independent experiments were performed (n=8) and the columns and error bars represent the mean \pm standard error. #P < 0.05 and ##P < 0.01, significantly different from the Control group. *P < 0.05 and **P < 0.01, significantly different from the OVA group. Effect of BR on IgE and OVA-specific IgE levels in serum of the allergic rhinitis model. (F) Total serum IgE levels. (G) OVA-specific IgE levels in serum. Total IgE and OVA-specific IgE were measured by ELISA method. The Columns and error bars represent the mean \pm standard error. ##P < 0.01, significantly different from the Control group. *P < 0.05 and **P < 0.01, significantly different from the OVA group.

5. 코 점막의 조직학적 변화

채취한 비강 조직은 hematoxylin-eosin으로 염색하여 코 점막의 조직학적 변화 및 호산성 백혈구의 침윤 정도를 분석하였다. 염색된 코 점막은 400 배율로 확대하여 관찰하였고, 각 사진의 사각상자는 1000 배율로 더 확대하였다. 화살표들은 호산성 백혈구의 침윤을 나타낸다. OVA 유발군에서 호산성 백혈구의 증가로 인한 코 염증이 증가하였고, 비중격의 상피 두께가 현저하게 증가하였다(Fig. 4A).

6. 코 점막의 두께 및 호산성 백혈구의 침윤 정도 변화

알레르기성 비염 모델의 비강 조직에서 호산성 백혈구의 침윤에 있어서 柴胡가 미치는 영향을 파악하기 위하여 각 그룹(대조군, OVA 유발군, 柴胡투여군, 양성대조군)의 비강 점막에서 호산성 백혈구 수(Figure 4B)를 측정하였다. OVA 유발군의 호산성 백혈구 수는 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다(P < 0.01). 柴胡투여군과 cetirizine을 경구 투여한 양성대조군은 둘 다 OVA 유발군과 비교하여 유의하게 감소하였다(P < 0.01).

비강 점막에서 비중격의 두께(Fig. 4C)를 측정한 결과 OVA 유발군은 대조군과 비교하여 유의하게 두꺼워졌다(P < 0.01). 柴胡투여군과 cetirizine을 경구 투여한 양성대조군은 OVA 유발군과 비

교하여 통계적으로 유의하게 감소하는 결과를 나타내었다 (OVA+Cet : $P < 0.01$, OVA+BR : $P < 0.05$).

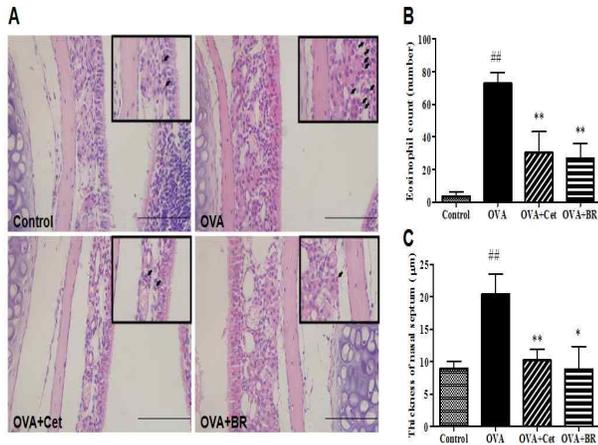


Fig. 4. The histological changes of nasal mucosa and infiltration of eosinophil in allergic rhinitis model. (A) The nasal tissues were stained with hematoxylin and eosin staining (magnification 400x, square in each figure 1000x). The arrows denote infiltration of eosinophil. There is clearly increased nasal inflammation with eosinophilia and epithelial thickness of nasal septum significantly increased in OVA mice. Bar=100µm. Effects of BR on the infiltration of eosinophil into nasal tissues of allergic rhinitis model. (B) Eosinophil counts in the nasal mucosa of each group. (C) Thickness of nasal septum in nasal mucosa. The Columns and error bars represent the mean \pm standard error. ### $P < 0.01$, significantly different from the Control group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, significantly different from the OVA group.

고찰

본 연구에서는 柴胡가 알레르기성 비염에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 OVA로 알레르기성 비염을 유도한 암컷 BALB/c mice를 모델로 사용하여 OVA를 통해 항원을 감작시킨 후 행동지표검사, 혈액검사, 조직검사를 시행한 후 결과를 분석하였다.

알레르기 반응은 최초로 감작되었을 때의 반응과 추후에 다시 항원에 노출되었을 때의 초기 반응과 후기 반응으로 특징지어진다²⁶. 최초의 감작반응 즉, 초기 감작(early sensitization)은 인체가 알레르기 항원에 접촉 시 항원이 항원제시세포에 의해 처리되어 1형 Helper T(Th1)세포보다 2형 Helper T(Th2)세포에 우세하게 정보를 전달하면 활성화된 Th2세포에서 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 등의 cytokine을 방출하여 B세포와의 상호작용을 통해 specific IgE가 생성되고 specific IgE가 비만세포 표면의 수용체에 부착된다³. 이렇게 초기 감작이 일어난 후 다시 알레르기 항원을 접촉하게 되면 수 분 이내에 초기 반응(early reaction)이 일어나는데, 가장 중요한 과정은 비만세포의 탈과립화(degranulation)²⁶이다. 항원자극에 의한 specific IgE와 비만세포막의 고친화성 IgE 수용체(FcεR1)의 교차연결을 통해 활성화된 비만세포에서는 초기 반응의 증상을 유발하는 히스타민, 류코트리엔, 프로스타글란딘(PG) 등 다양한 염증매개물질들을 분비한다²⁷. 이 때 이러한 염증매개물질에 의해 감각신경말단의 자극²⁸과 비강 내 혈관 확장²⁹, 혈관투과성의 증가³⁰가 일어나고 이로 인해 비루(rhinorrhea), 재채기(sneezing), 가려

움증(pruritis)이 나타난다. 따라서 재채기 횟수와 코를 긁는 시간의 증감으로 초기 반응의 활성화 정도를 확인할 수 있다고 판단하였다. 이에 본 연구에서 초기 반응에 의해 나타나는 알레르기성 비염의 행동증상인 재채기, 가려움증에 대한 실험을 시행하였다. 그 결과 OVA로 알레르기성 비염을 유도한 BALB/c mice에 다시 OVA를 접촉시킨 이후에 柴胡투여군에서 재채기 횟수와 코를 긁는 시간이 유의하게 감소되었다. 이는 柴胡가 알레르기성 비염의 초기 반응을 억제하여 그에 따른 재채기, 가려움증 등을 개선하는 효과가 있는 것으로 해석된다.

후기 반응(late reaction)은 항원에 접촉되어 초기 반응이 일어난 후 4~8 시간 뒤에 나타난다²⁶. T세포와 비만세포에서 분비되는 다양한 cytokine과 chemokine을 포함하는 다른 합성물의 분비가 이루어지는데, 이는 후기 반응을 촉진하는 핵심적인 역할을 한다. 또한 호산성 백혈구, 호염기성 백혈구, 비만세포, 단핵구 등의 염증세포의 동원에 의해 이들이 분비하는 다양한 매개물질(히스타민, 류코트리엔 등)들이 지속적으로 비루, 재채기, 가려움증을 발생시키고, 특히 18~24 시간 동안 지속되는 비폐색이 후기반응의 주 증상이 된다³¹. 후기 반응이 활성화 될수록 T세포와 비만세포에서 분비된 cytokine과 chemokine의 혈중 농도가 증가하므로 본 연구에서는 cytokine과 chemokine의 혈액 지표를 통하여 柴胡가 알레르기성 비염의 후기 반응에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하였다.

IL-4의 혈중 농도 증가는 알레르기성 비염의 감작과 반응을 강화시켜 더 강력한 알레르기 작용을 발현하므로 IL-4는 알레르기 반응의 중요 지표로서 사용된다³¹. IL-5는 가장 중요한 호산성 백혈구 조절인자로서³¹, 알레르기 반응에서 IL-5의 증가가 뚜렷하게 나타날수록 호산성 백혈구를 중심으로 한 후기 반응을 심화시킨다. MCP-1은 단핵구 화학주성 물질로서, 알레르기성 비염 시 비강에서의 후기 호산구증다증에 중요한 역할을 한다³². MIP-2는 호중성 백혈구에 대한 주화성 인자로 작용하여³³, 호중성 백혈구의 항원항체복합물의 포식작용의 결과인 '고름'을 생성한다³¹. IL-12는 전염증성 사이토카인(알레르기 반응을 촉진하는 화학매개물질)으로서 작용한다.

본 연구에서 柴胡투여군에서 IL-4, IL-5, IL-12, MCP-1, MIP-2의 혈중 농도가 유의하게 감소되었다. 알레르기성 비염의 악화에 관여하는 IL-4, IL-5, MCP-1, MIP-2의 혈중 농도가 유의하게 감소된 점은 柴胡가 T세포와 비만세포, 호산성 백혈구, 호중성 백혈구, 단핵구 등이 복합적으로 관여하는 알레르기성 비염의 초기와 후기 반응을 완화시킬 수 있다는 가능성을 제시한다. 다만 IL-12의 유의한 감소는 Th2형 세포의 상호조절을 의미하여 알레르기성 비염의 악화로 해석될 수 있으나³⁴, 사이토카인 간 복잡한 상호작용을 고려하면 IL-12의 혈중 농도 한 가지만으로 판단하기 어렵다고 생각된다.

혈액 중 총 IgE와 특이적 IgE의 농도는 알레르기 질환의 진단에 있어서 기초적인 검사 방법이 된다³⁵. 혈액 중 특이적 IgE의 농도는 원인이 되는 항원에 대한 감작 반응으로 인해 증가하여³⁶ 혈액 중 총 IgE의 농도 단독으로 알레르기를 구분하기 어려운 경우에³⁶ 알레르기 판단지표로서 상호보완적인 관계를 지닌다. 본 연구에서 柴胡투여군에서 혈액 중 총 IgE의 농도는 유의하게 감소된 반

면 OVA 특이적 IgE의 농도는 유의하지 않은 감소를 나타냈다. 이는 柴胡가 OVA 특이적 항원에 대한 감작 반응을 줄여 직접적인 항알레르기 효과를 갖는다고보다 항원에 감작된 이후의 면역반응에 일련의 영향을 줌으로써 다른 면역세포에 의한 IgE의 생산을 줄여 혈액 중 IgE와 면역세포들의 비특이적 반응을 억제하는 것으로 사료된다.

후기 반응에서 핵심적으로 작용하는 cytokine과 chemokine의 분비는 호산성 백혈구와 T세포 및 호염기성 백혈구의 주화성 인자로 작용하며, 농도경사를 통해 호산성 백혈구 및 다른 염증세포들의 점막 투과성을 증가시켜 비강조직 내 침윤을 조장할 뿐만 아니라 코 점막에 침입한 호산성 백혈구의 생존을 연장시킨다³⁷⁾. 특히 호산성 백혈구는 알레르기 염증 반응 시에 특징적으로 나타나는 세포로서, 알레르기성 비염에서 후기 반응이 있을 때 비강세척액에서 많은 수의 호산성 백혈구가 관찰되며, 호산성 백혈구의 비강조직 내 침윤은 코 점막의 조직학적 변화를 일으켜 점막의 두께가 증가한다³⁸⁾. 따라서 코 점막의 조직학적 변화와 코 점막에서 호산성 백혈구의 수를 관찰하는 것은 후기 반응의 정도를 판단하는 근거가 될 수 있으므로, 본 연구에서는 비강 조직의 변화를 관찰하기 위해 코 점막의 두께와 호산성 백혈구의 침윤정도, 호산성 백혈구 수를 분석하였다. 그 결과 OVA 유발군에서 호산성 백혈구의 증가로 인한 침윤 활성화와 비증격의 상피 두께, 호산성 백혈구 수에 있어서 현저한 증가가 관찰되었으며 柴胡투여군에서는 OVA 유발군에 비하여 모든 지표가 유의하게 감소하였다. 이는 柴胡가 후기 반응 시에 주요하게 작용하는 호산성 백혈구의 동원과 코 점막으로의 침윤 반응을 억제하고, 호산성 백혈구의 생존도 억제함으로써 알레르기성 비염을 완화시키는 것으로 생각된다.

본 연구에서 柴胡가 알레르기성 비염 유발 모델의 초기 감작부터 초기 반응과 후기 반응에 이르기까지 전반적인 알레르기 반응을 유의하게 감소시킨다는 사실을 관찰하였기에 알레르기성 비염에 柴胡를 응용할 수 있는 가능성을 제시할 수 있게 되었다. 또한 혈액검사와 조직검사에서 cetirizine을 투여한 양성대조군보다 더 우수한 알레르기 반응의 억제를 보였기에, 추후 cetirizine의 대체약물로서의 가능성도 보여주었다. 그러나 본 연구의 행동지표검사, 혈액검사, 조직검사만으로는 분자 수준에서의 기전까지 규명하기에는 한계가 있으므로 이에 대한 추가적인 연구가 이루어진다면 알레르기성 비염에 柴胡를 응용하는데 있어서 과학적 근거를 마련할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 柴胡가 알레르기 염증 반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 BALB/c mice에 OVA로 유도된 알레르기성 비염 병태 모델의 행동지표(코를 긁는 시간, 재채기 횟수)와 cytokine과 chemokine(IL-4, IL-5, IL-12, MCP-1, MIP-2)의 혈중 농도, 혈중 총 IgE와 특이적 IgE의 농도, 코 점막의 두께, 호산성 백혈구 수의 변화 및 조직학적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

행동학적 관찰 결과, 柴胡는 재채기 횟수와 코를 긁는 시간을 유의하게 감소시켰다.

혈중 IL-4, IL-5, IL-12, MCP-1, MIP-2의 농도 변화를 통한 혈액학적 관찰 결과, 柴胡는 OVA로 유발된 IL-4, IL-5, IL-12, MCP-1, MIP-2의 증가를 유의하게 억제하였다.

혈중 총 IgE와 특이적 IgE의 농도 변화를 통한 혈액학적 관찰 결과, 柴胡는 총 IgE와 특이적 IgE를 감소시켰고, 총 IgE만 유의성이 있었다.

조직학적 관찰 결과, 柴胡는 코 점막의 두께 및 호산성 백혈구 수를 유의하게 감소시키며 호산성 백혈구의 침윤을 완화시켰다.

이상의 결과에서 柴胡는 알레르기성 비염 유발 모델에서 재채기와 가려움증을 개선하고 코 점막의 조직학적 변화 및 호산성 백혈구의 침윤을 완화하며 혈중 cytokine과 chemokine의 증가 및 혈중 총 IgE의 증가를 억제하는 효능을 보임으로써 알레르기 반응을 유의하게 감소시켰다. 이로서 본 연구가 柴胡를 알레르기성 비염에 활용하는 실험적 근거로서 의의를 갖는다고 생각된다.

References

1. Hakiwara, K. Immunology in my body. Seoul, R.K., Firforest Press. pp 97-124, 2006.
2. Lauralee Sherwood. Human Physiology, 4th edition. Seoul, R.K. Life Science Press. pp 431-448, 2011.
3. Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David Male. Immunology, 3th edition. Seoul, R.K., Koomonsa. pp 279-300, 1994.
4. Ahn, H.Y. Clinical Otolaryngology. Seoul, R.K., Koonja Press. pp 94-97, 1995.
5. Tada, T. Semantics of Immunology. Seoul, R.K., hanulbooks Press. 1998: 143-155, 1998.
6. Kim, S.T., Oh, S.C., Kim, C.W., Park, C., Jang, I.H., Cha, H.E., Hwang, Y.J. Expression of NF- κ B and I- κ B in Allergic Rhinitis. Kor. J. Otolaryngol 43: 1191-1195, 2000.
7. Kurt, J. Isselbacher. Harrison's Principle of Internal Medicine. Seoul, R.K., Jungdam Media. p 1764, 1997.
8. Pawankar, R. Allergic rhinitis and asthma: the link, the new ARIA classification and global approaches to treatment. Curr Opin Allergy Clin Immunol 4: 1-4, 2004.
9. Korean Health Insurance Institute of National Health Insurance Service. September in change of season, Rapid increase of Seasonal Allergic Rhinitis patients. 23, 2013(9).
10. Kim, H.J., Kim, Y.B., Park, O.S., Kim, K.S., Cha, J.H. The Effect of Bangpungtongsung-San on Model of Allergic Rhinitis. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 19(1):21-30, 2006.
11. Park, J.M., Sim, S.Y., Byun, H.S., Kim, K.J. The Study on the Anti-Allergic Rhinitis Effects of Gamigyeyitang (focus on histological changes). The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology &

- Dermatology 18(1):234-240, 2005.
12. Park, S.E., Hong, S.U. The Treatment Effect of Younggamgangmisinhayin-tang through Control of Th 2 cell Differentiation in Allergic Rhinitis. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 21(1):83-95, 2008.
 13. Kim, S.M., Sim, S.Y., Byun, H.S., Kim, K.J. The Effect of the Bojungikgi-tang in a Mouse Model of Allergic Rhinitis. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 18(3):26-36, 2005.
 14. Yang, H.Y., Kim, Y.B. The Effects of Gudambopae-Tang on Changes of Cytokines in Allergic Rhinitis Model. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 18(2):28-35, 2005.
 15. Jung, J.K., Park, Y.K. Effects of Saposhnikovia Radix on allergic responses in OVA-induced Allergic rhinitis mice. Kor. J. Herbology 27(5):85-91, 2012.
 16. Kang, H., Kim, Y.B., Ahn, K.S. Immuno Modulatory Effect of Astragali Radix on OVA Induced Allergic Mouse Model. Korean J. Oriental Physiology&Pathology 19(3):612-617, 2005.
 17. Park, S.B. Inhibitory effect of ulmus davidiana on β -hexosaminidase release and cytokine production in RBL-2H3. Doctor's degree, Dept. of Oriental Medicine, Graduate school, Dong Eui University. pp 42-47, 2011.
 18. Herbology editing commission of Oriental medicine college. Herbology. Seoul, R.K., Younglimsa Press. pp 186-187, 2007.
 19. Science Encyclopedia Press. Ingredient and Use of Medicinal plant. Seoul, R.K., ilwolbooks Press. pp 435-438, 1999.
 20. Kim, H.C. Oriental Pharmacology. Seoul, R.K., Jipmoon Press. pp 94-97, 2001.
 21. Lee, J.R. Clinical Study of Sihogyejitang. The J. of K.O.M.S 6(1):68-74, 1985.
 22. Lee, M.S. The effect of Shihogigiltang extract on the contractile force of the isolated Guinea pig trachea smooth muscle. Korean J. Orient.Imt. Med 13(1):34-45, 1992.
 23. Chiang, L.C., Ng, L.T., Liu, L.T., Shieh, D.E., Lin, C.C. Cytotoxicity and anti-hepatitis B virus activities of saikosaponins from Bupleurum species. Planta Med 69(8):705-709, 2003.
 24. Lee, S.J., Lee, J.Y., Jeong, G.M. Study on the effects of Sipyungtang and Sipyungtang-gamibang on the Anti-allergic effect. J Pediatr Korean Med 8(1):13-26, 1994.
 25. Kim, Y.B., Nam, H.J., Park, O.S., Kim, H.J., Kim, K.S., Cha, J.H. The Effects of Victicis Fructus & Bupleuri Radix on the Allergic rhinitis. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 19(2):40-49, 2006.
 26. Kim, W.H. Immunology. Chuncheon, R.K., Kangwon National University Press. pp 9-38, 97-105, 1993.
 26. Gomez, E., Corrado, O.J., Baldwin, D.L., Swanston, A.R., Davies, R.J. Direct in vivo evidence for mast cell degranulation during allergen-induced reactions in man. The Journal of allergy and clinical immunology 78: 637-645, 1986.
 27. Naclerio, R.M. Allergic rhinitis. The New England journal of medicine 325: 860-869, 1991.
 28. Undem, B.J., Taylor-Clark, T. Mechanisms underlying the neuronal-based symptoms of allergy. J Allergy Clin Immunol 133(6):1521-1534, 2014.
 29. Ader, R., Cohen, N., Felten, D. Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. Lancet 345(8942):99-103, 1995.
 30. Takeda, N., Kalubi, B., Abe, Y., Irifune, M., Ogino, S., Matsunga, T. Neurogenic inflammation in nasal allergy: histochemical and pharmacological studies in guinea pig. A review. Acta Otolaryngol Suppl 501: 21-24, 1993.
 31. Charles A Janeway. Immunobiology, 5th edition. Seoul, R.K., Life Science Press. pp 493-524, 714-718, 2002.
 32. Marcella, R., Croce, A., Moretti, A., Barbacane, R.C., Di Giocchino, M., Conti, P. Transcription and translation of the chemokines RANTES and MCP-1 in nasal polyps and mucosa in allergic and non-allergic rhinopathies. Immunol Lett 90(2-3):71-75, 2003.
 33. Yan, X.T., et al. Role of MIP-2 in neutrophil migration and tissue injury in the herpes simplex virus-1-infected cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 39(10):1854-1862, 1998.
 34. Paludan, S.R. Interleukin-4 and interferone-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. Scand J Immunol 48: 459-468, 1998.
 35. Steiss, J.O., Strohner, P., Zimmer, K.P., Lindemann, H. Reduction of the total IgE level by omalizumab in children and adolescents. J Asthma 45: 233-236, 2008.
 36. Jung, H.R. Clinical significance of serum IgE. Korean J Pediatrics 50(5):416-421, 2007.
 37. Lilly, C.M., Nakamura, H., Kesselman, H., Nagler-Anderson, C., Asano, K., Garcia-Zepeda, E.A., Rothenberg, M.E., Drazen, J.M., Luster, A.D. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. The Journal of clinical investigation 99: 1767-1773, 1997.

38. Bentley, A.M., Jacobson, M.R., Cumberworth, V., Barkans, J.R., Moqbel, R., Schwartz, L.B., Irani, A.M., Kay, A.B., Durham, S.R. Immunohistology of the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis: increases in activated eosinophils and epithelial mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 89: 877-883, 1992.