

간 각질 세포 및 마우스 비장 세포를 이용한 방풍통성산의 항알러지 효능 연구

정수진 · 이미영 · 서창섭 · 신현규*

한국한의학연구원 한약연구본부 한약방제연구그룹

In vitro Anti-allergic Effects of Bangpungdongseong-san in Human Keratinocytes and Primary Mouse Splenocytes

Soo-Jin Jeong, Mee-Young Lee, Chang-Seob Seo, Hyeun-Kyoo Shin*

Herbal Medicine Formulation Research Group, Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine

Bangpungdongseong-san(BPTSS, Fangfengtongsheng-san in Chinese) is a traditional herbal formula comprising 18 medicinal herbs. In the present study, we performed the simultaneous analysis for four compounds of BPTSS and examined anti-allergic effects in human keratinocytes and mouse splenocytes. The column for separation of four compounds was used Luna C18 column and maintained at 40°C. The mobile phase for gradient elution consisted of two solvent systems. The analysis was carried out at a flow rate of 1.0 mL/min with PDA detection at 254 and 280 nm. To evaluate production and expression of Th2 chemokines, ELISA and RT-PCR were conducted in tumor necrosis factor (TNF)- α and interferon (IFN)- γ -stimulated HaCaT cells with or without BPTSS or silymarin, a positive control for skin inflammation. To measure Th2 cytokines, primary mouse splenocytes were treated with BPTSS and performed ELISA for interleukin (IL)-4, 5, 13. Calibration curves were acquired with $r^2 > 0.9999$. The contents of geniposide, liquiritin, baicalin, and glycyrrhizin in BPTSS were 5.06 mg/g, 7.33 mg/g, 27.56 mg/g, and 7.81 mg/g, respectively. BPTSS reduced TARC and RANTES production and mRNA expression in TNF- α and IFN- γ -treated HaCaT cells. BPTSS inhibited IL-4, 5, and 13 production in mouse splenocytes. Our data will be a helpful information to upgrade quality control and anti-allergic effects of BPTSS.

keywords : Bangpungdongseong-san, Allergy, Th2 chemokine, Th2 cytokine

서 론

경제 발전 및 문명의 서구화로 인한 생활환경 및 식생활의 변화로 인하여, 전 세계적으로 알러지 질환의 발병률이 급격하게 증가하는 추세이다. 이 중 가장 대표적인 것이 아토피성 피부염(atopic dermatitis)과 천식(asthma)으로 재발률이 매우 높은 것으로 알려져 있다¹⁾. 특히 알러지 질환 중 소아 환자의 50~70%가 아토피성 피부염에서 시작하여 천식이나 알러지성 비염으로 진행되어 이에 대한 치료법 구축이 시급한 실정이다²⁾. 현재 사용되고 있는 대부분의 알러지 질환 약물들은 일시적인 증상 완화제로서는 효능이 있으나, 여러 가지 부작용이 동반되며 매년 건수가 증가하고 있음이 보고되었다³⁾. 이들 문제점 해결을 위하여 최근에는 천연물을 이용한 의약품 개발 연구가 꾸준히 증가하고 있으며, 한약을 이용한 연구도

이에 포함된다. 최근 일본에서 소청룡탕, 시령산 등 한약 처방의 항 천식 효능 및 스테로이드 감량 효과 등을 보고 하였으며, 이는 알러지 질환 치료 약물 개발에 한약의 유용성을 제시하였다⁴⁾.

방풍통성산(防風通聖散; Bangpungdongseong-san, Fangfengtongsheng-san in Chinese and Bofu-tsusho-san in Japanese)은 한국과 일본에서 많이 사용되고 있는 한약 처방 중 하나이며, 송대(1172년)의 「선명론방(宣明論方)」에 처음 수록되었다. 방풍통성산은 활석(滑石), 감초(甘草), 석고(石膏), 황금(黃芩), 길경(桔梗), 방풍(防風), 적작약(赤芍藥), 천궁(川芎), 당귀(當歸), 대황(大黃), 마황(麻黃), 박하(薄荷), 연교(連翹), 망초(芒硝), 형개(荊芥), 백출(白朮), 치자(梔子), 생강(生薑)의 18 가지 한약재로 구성된다. 본 처방은 풍열(風熱)의 응성(壅盛)으로 표리(表裏)가 함께 실(實)하여 중한장열(憎寒壯熱) 하고, 두목혼현(頭目昏眩), 목적정통(目赤睛痛),

* Corresponding author

Hyeun-Kyoo Shin, Herbal Medicine Formulation Research Group, Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseongdae-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 305-811, Republic of Korea

·E-mail : hkshin@kiom.re.kr ·Tel : +82-42-868-9464

·Received : 2014/11/07 ·Revised : 2015/01/30 ·Accepted : 2015/02/22

© 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.2015.04.29.2.168>

Available online at http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13

구고구건(口苦口乾), 인후불리(咽喉不利), 흉격비민(胸膈痞悶), 해구천만(咳嘔喘滿), 체타조점(涕唾稠粘), 대변비결(大便秘結), 소변적삼(小便赤澁), 창양종독(瘡癩腫毒), 장풍치루(腸風痔漏), 단반은진(丹斑癰疹) 등을 치료하며, 소풍해표(疏風解表), 사열통변(瀉熱通便) 등의 효능이 있다⁵⁾. 현재 방풍통성산은 살사라진이라는 제품명으로 시판되고 있으며, 비만 환자 치료에 널리 사용되어 지고 있다⁶⁾. 방풍통성산의 약리효능과 관련된 현대 과학적 연구의 결과로는 항비만 활성을 비롯하여, 항동맥경화, 항고혈압, 항알러지성 비염 효능이 보고되었다⁷⁻¹⁰⁾.

본 연구에서는 방풍통성산의 품질 관리를 위하여 표준화를 실시하였다. 방풍통성산을 구성하는 한약재의 분석 대상 성분 12가지를 선정하고, 광다이오드어레이(photodiode array, PDA)가 결합된 고성능액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 성분들의 동시 분석을 실시하였다. 주요성분인 치자의 geniposide, 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin 및 황금의 baicalin만이 검출되어 이 결과를 제시하고자 한다. 또한 김 등의 논문¹⁰⁾에서 제시한 방풍통성산의 항알러지성 비염에 대한 효능 결과와 관련하여, 본 연구에서는 항알러지성 질환 중 특히 알러지성 피부염과 천식에 대한 효능을 검색하고자 하였다. 각질 세포와 비장 세포를 이용하여, Th2 케모카인 및 사이토카인 생산에 대한 영향을 측정하였으며, 특히 각질 세포의 연구에서는 알러지성 피부염 (아토피성 피부염) 효능 약물로 알려진 silymarin을 positive control로 사용하였다¹¹⁾.

재료 및 방법

1. 약재

본 실험에 사용된 방풍통성산의 구성 한약재는 ㈜음니허브 (Youngcheon, Korea)와 ㈜HMAX(Jecheon, Korea)에서 구입하여 동국대학교 이재현 교수(Gyeongju, Korea)로부터 감별을 받은 후 사용하였으며, 각각의 구성 한약재들의 표본(2008-KE-23-1~KE-23-18)은 한국한의학연구원 한약방제연구그룹에 보관하였다.

2. 방풍통성산 추출물 및 검액의 조제

방풍통성산의 구성 한약재를 Table 1과 같이 무게 비율로 배합한 시료 약 10.0 kg을 추출기(Cosmos 660; Kyungseo Machine Co., Incheon, Korea)에 넣고, 물을 시료의 10배로 첨가하여 10 0°C에서 2시간 전탕한 후 동결건조하여 17.7%의 수율로 추출물 1.7 kg을 얻었다. HPLC 분석을 위해 동결 건조된 추출물 200 mg을 정확히 측정 후 물을 넣어 20 ml로 맞춘 후 혼합하였다. Baicalin의 정량 분석을 위하여, 검액을 다시 증류수로 2.5배 희석하고, SmartPor GHP syringe filter(0.2 µm, Woongki, Seoul, Korea)로 여과하여 검액으로 하였다.

3. HPLC 분석

Geniposide, liquiritin, baicalin 및 glycyrrhizin 4종의 표준품은 모두 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)로부터 구입하였으며, 각 표준품의 순도는 98% 이상이였다. HPLC

분석을 위한 methanol, acetonitrile 및 water는 J.T. Baker(Philipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, glacial acetic acid는 특급시약으로 Junsei(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 방풍통성산 내 주요 구성 성분의 함량을 분석하기 위하여 LC-20A 시스템(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)을 사용하였으며, 데이터 분석은 LCsolution software(Version 1.24)를 이용하여 처리하였다. 4종 성분의 분리를 위해 Phenomenex사의 Luna C18(5 µm, 4.6×250 mm, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였고, 칼럼온도는 40°C로 유지하였다. 이동상은 1.0% acetic acid가 함유된 water (A)와 1.0% acetic acid가 함유된 acetonitrile (B)을 사용하여 다음과 같이 흘려주었다: (A)/(B)=95/5 (0 min) → (A)/(B)=30/70 (40 min) → (A)/(B)= 0/100 (45 min; hold for 5 min) → (A)/(B)= 95/5 (55 min; hold for 15 min). 유속은 1.0 ml/min으로 흘려주었으며 주입량은 10 µl로 하였고, 검출파장은 190-400 nm에서 하였다.

4. HaCaT 세포 배양 및 세포독성 평가

HaCaT 세포는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)로부터 분양 받아 사용하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum이 포함된 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 실시하였다.

세포독성 평가를 위하여 96 well microplate에 1×10³ cells/well의 농도로 세포를 분주하여, 방풍통성산을 농도별(0, 10, 20, 50, 100, 200, 500 µg/ml)로 처리하여 24 시간 배양하였다. Cell counting kit(CCK)-8 solution을 10 µl씩 첨가하여 4 시간 동안 반응시킨 다음, microplate reader(Benchmark Plus, Bio-Rad, MN, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 대조군과 비교를 통해 상대적인 세포 생존율(% of control)을 계산하였다.

5. 마우스 비장세포 분리 및 배양

8-10 주령의 수컷 BALB/c 생쥐 (Orient Bio, Seongnam, Korea)를 경추탈골하여 희생한 후 비장을 적출하였다. 비장으로부터 단일 세포를 분리한 후 RBC lysis buffer(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 적혈구를 제거하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum, 25 mM HEPES, 2 mM glutamine, 100 unit/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin(Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA)을 함유하는 RPMI 1640 배지에 부유하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 실시하였다.

6. Th2 케모카인 및 사이토카인 분비 측정

Tumor necrosis factor(TNF)-α와 interferon(IFN)-γ으로 자극한 HaCaT 세포에 방풍통성산을 처리한 후 배양 상등액을 수거하였다. Th2 케모카인(thymus and activation regulated chemokine; TARC, regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted ;RANTES) 측정 키트 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 배양액 중 포함된 함량을 측정하였다.

마우스 비장세포를 *p*-hydroxycinnamic acid methyl ester로 1시간 전처리한 다음 concanavalin A(Con A; 1 μ g/mL)로 3일간 자극한 세포에 방풍통성산을 처리한 다음 배양 상등액을 수거하였다. Th2 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13) 측정 키트(BioSource International, Camarillo, CA, USA)를 사용하여 생성량의 변화를 측정하였다.

7. Th2 케모카인 발현 분석

TNF- α 와 IFN- γ 로 자극한 HaCaT 세포에 방풍통성산을 처리한 세포로부터 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. iScript cDNA Synthesis kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 실험에 사용된 primer 염기서열은 Table 2와 같으며, PCR의 조건은 94 $^{\circ}$ C 30초, 64 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분 30초를 1 cycle로 총 25회 반응시키고, 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 DNA 합성을 연장시킨 후 1.5% agarose gel 상에서 전기 영동하여 발현을 확인하였다.

8. 통계처리

실험결과와 통계처리는 Graphpad Instat Ver. 3.10(Graphpad software, Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 각 군 간의 차이는 Dunnet's test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 사후검정을 실시하였다.

Table 1. Composition of Bangpungtongseong-san (BPTSS)

Herbal medicine	Scientific name	Supplier	Source	Amount (g)
Talcum	<i>Talcum</i>	HMAX	China	6.375
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	HMAX	China	4.5
Gypsum Fibrosum	<i>Gypsum</i>	HMAX	China	2.625
Scutellariae Radix	<i>Scutellaria baicalensis</i>	HMAX	Jeongseon, Korea	2.625
Platycodi Radix	<i>Platycodon grandiflorum</i>	Omnierb	Yeongcheon, Korea	2.625
Saposhnikoviae Radix	<i>Ledebouria seseloides</i>	HMAX	China	1.6875
Cnidii Rhizoma	<i>Cnidium officinale</i>	Omnierb	Yeongcheon, Korea	1.6875
Angelicae Gigantis Radix	<i>Angelica gigas</i>	Omnierb	Pyeongchang, Korea	1.6875
Paeoniae Radix	<i>Paeonia lactiflora</i>	Omnierb	Hwasun, Korea	1.6875
Rhei Rhizoma	<i>Rheum undulatum</i>	HMAX	China	1.6875
Ephedrae Herba	<i>Ephedra sinica</i>	HMAX	China	1.6875
Menthae Herba	<i>Mentha pulegium</i>	Omnierb	China	1.6875
Forsythiae Fructus	<i>Forsythia koreana</i>	HMAX	China	1.6875
Natrii Sulfas	<i>Erigeron canadensis</i>	HMAX	China	1.6875
Schizonepetae Spica	<i>Schizonepeta tenuifolia</i>	Omnierb	China	1.3125
Atractylodis Rhizoma Alba	<i>Atractylodes japonica</i>	HMAX	China	1.31
Gardeniae Fructus	<i>Gardenia jasminoides</i>	Omnierb	Muju, Korea	1.3
Zingiberis Rhizoma Crudus	<i>Zingiber officinale</i>	Omnierb	Yeongcheon, Korea	6.25
				44.125

Table 2. Sequences of the oligonucleotide primers used for PCR amplification

Target	Primer sequences
TARC	
sense	5'-ACT GCT CCA GGG ATG CCA TCG TTT TT-3'
antisense	5'-ACA AGG GGA TGG GAT CTC CCT CAC TG-3'
RANTES	
sense	5'-CCC CGT GCC GAG ATC AAG GAG TAT TT-3'
antisense	5'-CGT CCA GCC TGG GGA AGG TTT TTG TA-3'
GAPDH	
sense	5'-GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT-3'
antisense	5'-AAG GGT CAT CAT CTC TGC CC-3'

결 과

1. HPLC 동시분석 결과

HPLC-PDA를 이용하여 방풍통성산을 구성하는 18종의 생약 중 치자의 geniposide, 황금의 baicalin 및 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin 등 4종의 성분에 대하여 동시 분석조건을 설정하였다. 설정된 최적의 HPLC-PDA 분석법을 이용하여 4종의 성분들을 35분 이내에 분리능 5.79이상으로 양호한 분리가 이루어졌으며, 검량선 작성 결과 상관계수 값이 0.9999 이상으로 우수한 직선성을 나타내었다. 검액에서 각 성분의 peak는 표준용액에서의 표준품 peak의 retention time과 UV 흡수 파장을 통해 비교 확인하였으며, geniposide, liquiritin, baicalin 및 glycyrrhizin 등 4종의 성분은 14.1분, 17.3분, 22.5분 및 31.7분에 각각 검출되었다(Fig. 1). 확립된 분석법을 이용하여 치자의 geniposide, 황금의 baicalin 및 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin 등 4종에 대하여 방풍통성산 추출물을 동시 분석한 결과 5.06–27.56 mg/g으로 검출되었으며, 그 중 황금의 주요 성분인 baicalin이 27.56 mg/g으로 다른 성분에 비해 많이 함유되어 있음을 확인하였다(Table 3).

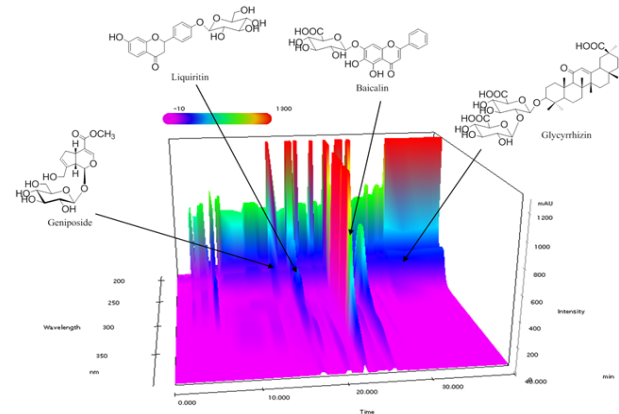


Fig. 1. Three-dimensional chromatogram of Bangpungtongseong-san (BPTSS) by HPLC-PDA.

Table 3. Contents of marker compounds in Bangpungtongseong-san (BPTSS) by HPLC (n=3)

Compound	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Source
Geniposide	5.06	0.02	0.31	Gardenia jasminoides
Liquiritin	7.33	0.01	0.20	Glycyrrhiza uralensis
Baicalin	27.56	0.20	0.74	Scutellaria baicalensis
Glycyrrhizin	7.81	0.20	0.20	Glycyrrhiza uralensis

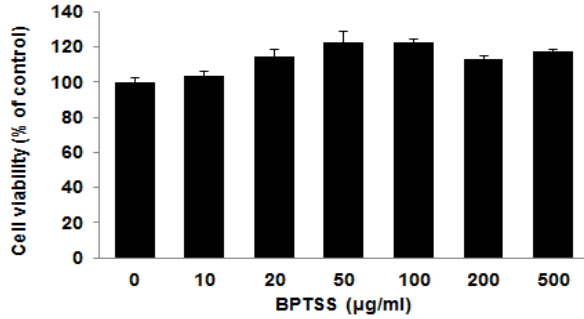


Fig. 2. Cytotoxicity of Bangpungdongseong-san (BPTSS) in HaCaT cells. Cells were seeded into 96-well plates and treated with various concentrations of BPTSS (0, 10, 20, 50, 100, 200 or 500 µg/ml) for 24 h. Cell viability was assessed using a CCK-8 assay. The values were expressed as mean ± S.D of three independent experiments.

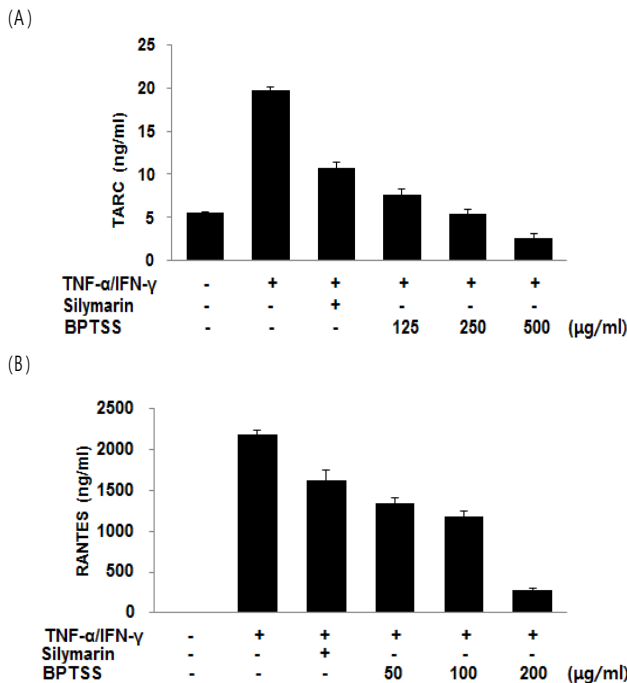


Fig. 3. Effects of Bangpungdongseong-san (BPTSS) on TNF-α and IFN-γ-stimulated productions of chemokines in HaCaT cells. Productions of TARC (A) and RANTES (B) were measured using the culture supernatant from cells co-treated with BPTSS (0, 125, 250 or 500 µg/ml), and TNF-α and IFN-γ (each 10 ng/ml, TI) for 24 h. Silymarin (6.25, 12.5, or 25 µg/ml) was used as a positive control. Values were expressed as mean ± SEM of three independent experiments.

2. 방풍통성산의 항알러지 효능

방풍통성산의 Th2 케모카인 생성에 대한 효과를 확인하기 위하여 인간 상피 세포주인 HaCaT을 이용하였다. 다양한 농도(0, 10, 20, 50, 100, 200 or 500 µg/ml)의 방풍통성산을 24 시간 동안 세포에 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 최고 농도인 500 µg/ml 처리 시에도 세포 독성이 관찰되지 않았다(Fig. 2). 방풍통성산이 상피 세포의 Th2 케모카인 생산에 미치는 영향을 연구하기 위하여, HaCaT 세포에 TNF-α와 IFN-γ를 처리하여 케모카인 생산을 유도하고, 다양한 농도(0, 125, 250, or 250 µg/mL)의 방풍통성산을 처리하였다. 방풍통성산은 TNF-α와 IFN-γ에 의한 TARC와 RANTES

의 분비를 농도 의존적으로 억제시키는 경향을 나타내었다(Fig. 3). 이와 함께 방풍통성산 처리 시 TNF-α와 IFN-γ에 의하여 유도된 TARC 및 RANTES mRNA 발현을 감소시켰다(Fig. 4).

방풍통성산의 Th2 사이토카인 분비 억제 효과를 확인하기 위하여, BALB/c 마우스로부터 분리한 비장 세포를 사용하였다. 비장 세포에 방풍통성산(0, 50, or 100 µg/ml)을 24 시간 동안 처리한 다음 ELISA 법에 의하여 IL-4와 IL-5의 함량 변화를 측정하였다. 그 결과, 방풍통성산은 IL-4와 IL-5의 분비량을 감소시키는 경향이 있었다(Fig. 5).

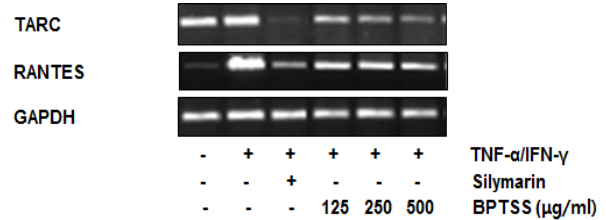


Fig. 4. Effect of Bangpungdongseong-san (BPTSS) on TNF-α and IFN-γ-stimulated chemokine expression at the mRNA level in HaCaT cells. RT-PCR was performed to determine the mRNA expression levels of TARC, RANTES, and GAPDH.

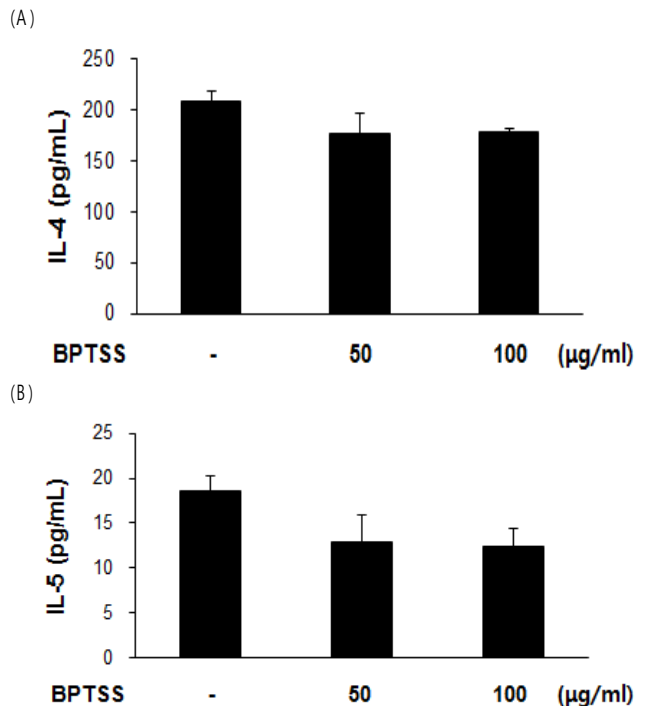


Fig. 5. Effect of Bangpungdongseong-san (BPTSS) on Th2-type cytokine production in ConA-stimulated splenocytes. Productions of IL-4 (A) and IL-5 (B) were measured using the culture supernatant from cells treated in the presence (50 or 100 µg/ml) or absence of BPTSS, and the cytokine levels were measured with ELISAs. Values were expressed as mean ± SEM of three independent experiments.

고찰

알러지 질환은 알러지 유발 물질이 항원이 되어 체내에 침입하

였을 때 유전적 요인 또는 면역력 약화 등으로 인하여 나타나는 면역계의 과민반응이다¹²⁾. 한의학에서 알러지의 원인은 폐, 비장, 신장 등 장기의 기능 약화로 인하여 정기(正氣)가 허하여 발생된다고 하였다. 특히 고전 한의서에서 아토피성 피부염은 선(癩), 태선(苔癬), 태렴창(胎癢瘡), 습진(濕疹), 습창(濕瘡), 음창(陰瘡) 등으로 언급되었으며¹³⁾, 풍열 혹은 혈열, 식적 등이 원인으로 비위의 운화기능 저하로 생기는 내부 습열과 외부 풍습열이 기부에 온조되어 형성된 것으로 설명되었다¹⁴⁾. 한약 처방을 이용하여 이와 같은 증상들에 대한 치료가 이루어지고 있으며, 임 등¹⁵⁾은 생혈윤부음(生血潤膚飲)의 아토피 피부염 치료에 대한 예비 임상 결과를 발표하기도 하였다.

본 연구에서는 인간 피부 상피세포와 마우스 비장세포를 사용하여 방풍통성산의 항알러지 효능을 검색하였으며, 이에 앞서 방풍통성산의 품질 관리를 위한 성분 동시 분석을 실시하였다. 이들 구성 성분들에 대한 HPLC 분석 결과가 이전의 여러 논문¹⁶⁻¹⁸⁾에서 발표된 바 있으며, 이들을 참고하여 분석하였다. 그 결과 구성 한약인 치자의 geniposide가 5.06 mg/g, 황금의 baicalin이 27.56 mg/g, 그리고 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin이 각각 7.33 mg/g, 7.81 mg/g으로 검출되었다.

면역 반응에서 Th2 세포는 immunoglobulin E(IgE) 생산을 촉진하는 역할을 하여 알러지 반응에 주요 역할을 한다¹⁹⁾. 아토피 피부염과 같은 염증성 피부 질환은 Th2 케모카인과 관련이 있다. 피부 상피 세포에 TNF- α , IFN- γ 등의 자극으로 생성된 TARC, RANTES와 같은 케모카인들은 c-c chemokine receptor type 4(CCR4)-positive Th2 세포에 결합하여 이들을 염증 조직으로 유도한다²⁰⁾. 본 연구 결과 방풍통성산은 TNF- α 와 IFN- γ 에 의한 TARC와 RANTES의 분비를 억제시키는 경향이 있음을 확인하였다. 또한 방풍통성산은 TNF- α 와 IFN- γ 에 의하여 유도된 TARC 및 RANTES mRNA 발현을 감소시켰다. Positive control로 사용된 silymarin¹¹⁾의 효능과 비교하였을 때, 케모카인의 분비 억제 효능은 방풍통성산이 우수하였으나, mRNA 발현 감소에 대해서는 silymarin이 더 우수하였다.

이와 같은 결과는 방풍통성산은 한약 복합 처방인 반면 silymarin은 단일 성분인 차이점으로 인한 것으로 사료되며, 향후 처방의 효능을 동등한 기준에서 비교하기 위한 대조군의 확보가 필요할 것으로 생각된다. Th2 사이토카인은 천식의 병리생리학적 측면에서 필수 인자이다. 이들 중 IL-4와 IL-13은 IgE의 B 세포로의 전환, 점액 과다분비, 호산구의 폐 침투 등에 중요한 역할을 한다²¹⁾. 호산구는 염증 매개인자 분비를 유도하는 IL-5에 의하여 활성화 된다²²⁾. 본 연구의 결과 방풍통성산은 마우스 비장 세포에서 Th2 사이토카인인 IL-4와 IL-13의 분비량의 감소를 확인하였다.

이상의 결과들은 방풍통성산이 Th2 케모카인 및 사이토카인 분비 억제시키는 경향이 있으며, 향후 아토피 피부염과 천식 특이적 실험 모델을 활용한 추가 실험을 통하여 보다 확실한 효능 검증이 필요할 것으로 사료된다.

현재까지 성분 동시분석에서 확인한 4가지 성분의 항알러지 또는 항알러지성 피부염 효능에 대해 발표된 논문은 없으며, 이들 성분들 중 항알러지 효능에 대한 활성 성분(active compound)을 확인하기 위한 추가 실험이 요구된다.

결 론

본 연구는 한약 처방 방풍통성산을 대상으로 품질관리를 위한 HPLC 동시 분석과 *in vitro* 항알러지 효과를 다음과 같이 확인하였다.

HPLC 분석 결과 방풍통성산의 구성 한약인 치자의 geniposide가 5.06 mg/g, 황금의 baicalin이 27.56 mg/g, 그리고 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin이 각각 7.33 mg/g, 7.81 mg/g으로 검출되었다.

방풍통성산은 피부 상피 세포의 TARC와 RANTES 분비 및 발현 억제 효과를 나타내었다.

방풍통성산은 마우스 비장 세포의 Th2 IL-4, 5, 13의 분비 억제 효과를 나타내었다.

이상의 결과들은 방풍통성산의 품질관리를 위한 기초자료로 사용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 방풍통성산은 Th2 케모카인과 사이토카인의 생성 억제를 통하여 항알러지 효능을 나타내는 것이며, 이와 같은 결과는 향후 한약을 이용한 알러지 치료제 개발 연구의 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 ‘한약 처방의 과학적 근거 기반 구축 사업(K14030)’에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Korea National Institute of Health. Korea Health Statistics 2012: Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES V-3). 2012.
2. Kim, D.I., Yang, H.J., Park, Y.M., Rha, Y.H., Choung J.T., Pyun, B.Y. Clinical Manifestations Patterns of Allergic Disease in Korean Children under the Age of 6: Multi-center Study. *Kor J Pediatr* 51(5):640-645, 2008.
3. Korea Institute of Drug Safety & Risk Management, Drug Safety Information Reporting Trend 2013. No. 4. 2013.
4. Umesato, Y., Iikura, Y., Inui, H. Effect of "Shoseiryu-to" on asthmatic children and guinea PIG tracheal smooth muscle. *Acta Paediatr Jpn* 25(4):361-369, 1983.
5. The Korean Medicine Society for the Herbal Formula Study. Herbal Formula Prescription. Seoul, Younglim-sa. pp 263-264, 1999.
6. Choi, E.K., Ryu, E.K. Effects of Bang-Pung-Tong-Seung-San on obese patients. *J Kor Orient Assoc Study Obesity* 1(1):57-62, 2001.
7. Ohno, K., Chung, H.J., Maruyama, I., Tani, T. Bofutsushosan, a traditional Chinese formulation, prevents intimal thickening and vascular smooth muscle cell proliferation induced by balloon endothelial denudation in rats. *Biol*

- Pharm Bull 28(11):2162–2165, 2005.
8. Morimoto, Y., Sakata, M., Ohno, A., Maegawa, T., Tajima, S. Effects of Byakko-ka-ninjin-to, Bofu-tsusho-san and Gorei-san on blood glucose level, water intake and urine volume in KKAY mice. *Yakugaku zasshi* 122(2):163–168, 2002.
 9. Kim, H.J., Yoon, K.M., Im, E.Y., Byun, J.S., Kim, D.J., Kwak, M.A. Three Case Report of Bangpungtongsung-san Effect on Improvement of Hypertension Patients. *Kor J Orient Physiol & Pathol* 23(3):740–743, 2009.
 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. *J Kor Orient Med Ophthalmol & Otolaryngol & Dermatol* 19(1):21–30, 2006.
 11. Kang, J.S., Yoon, W.K., Han, M.H., Lee, H., Lee, C.W., Lee, K.H., Han, S.B., Lee, K., Yang, K.H., Park, S.K., Kim, H.M. Inhibition of atopic dermatitis by topical application of silymarin in NC/Nga mice. *Int Immunopharmacol* 8(10):1475–1480, 2008.
 12. Korean Society of Nursing Science. *The Great Encyclopedia of Nursing Science*. Min-jung Seo-gwan, 1996.
 13. Park, S.D., Yang, J.H., Kong, N.M. Oriental and Western Consideration of Atopic Dermatitis. *J Jeahan Orient Med Academy* 4(1):416–427, 2004.
 14. Jung, H.S., Lee, J.Y. A study on the alteration of general characteristics and therapeutic effect of GamiYeoldahansotang in patients with Atopic Dermatitis. *J Kor Orient Pediatr* 15(2):177–188, 2001.
 15. Lim, Y.K., Jung, J.A., Yun, C.S., Her, K.W., Lee, H., Kim, H.C., Kim, Y.R., Cho, Y.H., A Pilot Study of Herb Medication for Atopic Dermatitis. *J Kor Orient Pediatr* 20(3):129–141, 2006.
 16. Zhang, Q., Ye, M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice). *J Chromatogr A* 1216(11):1954–1969, 2009.
 17. Tong, L., Wan, M., Zhang, L., Zhu, Y., Sun, H., Bi, K. Simultaneous determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, oroxylin A and chrysin of *Radix scutellariae* extract in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 70: 6–12, 2012.
 18. Wu, X., Zhou, Y., Yin, F., Mao, C., Li, L., Cai, B., Lu, T. Quality control and producing areas differentiation of *Gardeniae Fructus* for eight bioactive constituents by HPLC–DAD–ESI/MS. *Phytomedicine* 21(4):551–559, 2014.
 19. Neis, M.M., Peters, B., Dreuw, A., Wenzel, J., Bieber, T., Mauch, C., Krieg, T., Stanzel, S., Heinrich, P.C., Merk, H.F., Bosio, A., Baron, J.M., Hermanns, H.M. Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 118(4):930–937, 2006.
 20. Saeki, H., Tamaki, K. Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases. *J Dermatol Sci* 43(2):75–84, 2006.
 21. Kips, J.C. Cytokines in asthma. *Eur Respir J Suppl* 18(34):24–33, 2001.
 22. Holgate, S.T. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 38(6):872–897, 2008.