

# 수종한약재가 anti-human IgE 유발 알러지 모델에 미치는 영향

조성익·김동희·이용훈\*\*·박종오\*

## Effect of selected herbs (Polygoni Multiflori Radix, Diospyros kaki, Ilite) on anti-human IgE allergic model.

Sung-Ik Jo, Dong-Hee Kim, Young-Heun Lee\*, Jong-O Park  
Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon Univ.  
\* Pharmacodesign (Co. Ltd.)

We observed the efficacy of natural herbs and mixture in treating atopic dermatitis using anti-human IgE treated Human HMC-I cell model.

We selected three herbs, Cynonchum witfordii, Diospyros kaki, Ilite which were used to treat skin disease in Traditional Korea Medicine. Using Human HMC-I cell treated with anti-human IgE, we investigate in vitro whether each herb effects on IL-4, IL-13, TNF-a expression and TNF-a, Histamine secretion value. The results show the possibility that the mixture of three herbs may be better in improving atopic dermatitis condition.

### I. 서 론

아토피(Atopy)란 현대의학적으로 알레르기성 습진, IgE 피부염(IgE dermatitis), 굴측부(flexural) 습진, 유아습진, 태열 등을 포함하는 개념으로써, 내인성 습진 분류 형태 중의 하나이다. 병인병리는 유전학적 측면, 알레르기 및 면역학적 측면, 약리 생리학적 측면, 병리조직학적 측면에서 접근하고 있으나 근본적인 원인은 아직 밝혀지지 않고 있으며, 따라서 근본적 치료법보다는 스테로이드

제, 항히스타민제 등을 주로 사용하는 대증치료와 함께 면역조절제, 항생제 등이 더불어 사용되기도 한다<sup>23)</sup>.

아토피의 한의학적 범주에 해당하는 병명은 내선, 영아습진, 태렴창, 습진, 혈풍창 등이 있다. 한의학적 변증은 발현양상, 병인병기, 발병시기 등으로 분류하고 있으며, 발현양상에 따라서는 습증과 건증으로, 병인병기에 따라서는 급성기와 만성기로, 급성기는 풍습편성형, 열중우습형, 습중우열형으로, 만성기는 비허습열 내온형, 음상혈조 습련형으로, 발병시기에 따라서는 영아기, 아동기, 성인기로 구분하여 치료하고 있다. 주된 치료방법은 청열조습 및 보간신음, 윤조보혈등의 방법이 다용되었으며, 내복약 처방 중에서 감초, 생지황, 복령, 당귀, 금은화, 고삼, 선세, 진피, 목통, 백선피, 방풍

\* 대전대학교 한의과대학 한방병리학교실

\*\* (주) 파마코디자인

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

· 채택일 : 2004년 10월 12일.

등의 순으로 다용되었다<sup>3)</sup>.

최근에 김등은 가미생료사물탕을 이용하여 비만 세포의 탈과립 및 histamine 분비 억제효과, NC/Nga mouse의 아토피양 피부염 손상 및 비장 세포에서의 IL-4, IL-5, and IFN- $\gamma$  assay, raw 264.7 macrophage cell의 LPS에 대한 항염증효과를 실험하여 주목할만한 연구한 결과를 발표하였다<sup>1)</sup>.

한편, 외치법을 이용한 연구도 많은 관심을 받고 있는데, 아토피의 한의학적 외치법으로는 습부, 세제, 산제, 고제, 유제, 연훈법 등이 사용되고 있는데, 임상에서는 대체로 연고제가 많이 사용되고 있다<sup>2)</sup>.

국외에서는 오래전부터 한의학적 방법을 이용한 아토피질환의 치료법 개발에 대한 관심이 고조되고 있었으나<sup>20)</sup>, 한편으로는 한의학적 방법을 이용한 아토피 질환의 치료법 개발을 위해서는 과학적 접근방법과 임상적인 효용성을 동시에 추구해야 한다는 주장이 설득력을 얻고 있다<sup>22)</sup>.

본 실험은 임상적으로 피부질환에 사용되어온 백하수오, 시엽과 최근에 해독제로써 주목받고 있는 일라이트<sup>8,15)</sup>가 인간의 HMC-I 셀을 anti-human IgE를 통해 알러지를 유발시킨 모델에서의 항알러지 효과를 검증하기 위해 수행되었다.

## II. 실험 방법

in vitro

### 1. 실험 개요

인간의 HMC-I 셀을 anti-human IgE를 통해 알러지를 유발시킨 후 시엽, 하수오, 일라이트의 단일 약제로 대조군비교하여 항알러지 효능을 검증하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) Cell culture

HMC cell을 전배양한 후 생약 또는 광물의 반응 기전을 알아보기 위해 HMC 단독배양, HMC와 anti-human IgE(10ug/ml) 공동배양, HMC와 anti-human IgE(10ug/ml) 및 후보 약제(10ug/ml,

100ug/ml)를 공동배양하였다. 단독배양과 공동배양은 10%FBS, DMEM 배지에 CO<sub>2</sub>를5% 농도로 일정하게 유지하면서 37°C에서 48시간 동안 실시하였다.

#### 2) 약제 처치

HMCs ( $5 \times 10^4$  cells)를 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지에서 다양한 농도의 후보 약제와 anti-human IgE(10ug/ml)를 처리하여 co-culture 시킴(37°C, 5% CO<sub>2</sub> concentration 48h). HMCs에 섞인 Methyl-3[H] thymidine는 Duclos et al.에 의해 제시된 방식으로 측정되었다. 간단하게 설명하면, 방사성물질로 라벨링된 Methyl-<sup>3</sup>H]thymidine(1 Ci per well)을 48시간 배양된 후보약제나 후보약제+anti-human IgE의 co-cultures에 첨가했다. 44시간 이후 96-well plates 배양세포를 3H-thymidine (Amersham Pharmacia Biotech, UK, specific radioactivity 5.0 Ci/mmol)로서 4시간 동안 라벨링하여 (final concentration 0.5 Ci), 증식된 HMCs의 DNA 안으로 incorporation시켰다. 각 샘플들은 Skatron Instruments Cell Harvester로 수거하였다. 증류수로 헹군 후 glass fiber filter papers (Skatron, Lier, Norway)상에서 수집했다. DNA를 포함하는 고분자량 물질이 함유된 Filter disc를 scintillation minivials에 옮긴 다음 Ready Safe scintillation fluid (Beckman Instruments, Fullerton, CA)를 첨가했다. 혼합된 물질의 방사성은 매 분 Beckman LS5000CE scintillation spectrometer를 사용하여 측정되었다.

#### 3) Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

10% FBS를 첨가한 DMEM 배지, 24-well plates에서 배양한 HMCs ( $2 \times 10^6$ ) cells을 다양한 농도의 후보약제와 anti-human IgE(10ug/ml)를 처리한 후 배양하였다((37°C, 5% CO<sub>2</sub> concentration 4h). Total cellular RNA을 HMCs로부터 분리해내고, RNA의 순도는 A260:A280 ratio의 근거하여 확인 한 후 RNA의 integrity를 아가로즈 겔 전기영동으로 확인하였음. PCR 조건은

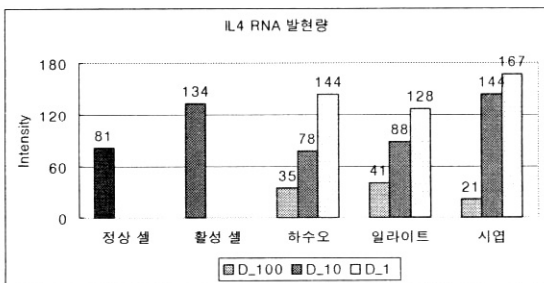
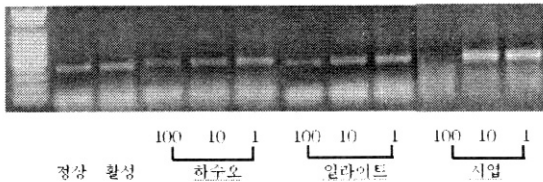
다음과 같다. Follows: 94°C, 5 min; followed by 30 amplification cycles (94°C, 1 min; 57°C for the optimal annealing temperature for cytokines as described elsewhere, 1 min; 72°C, 1 min). Final extension은 72°C for 10 min 이며 동량의 PCR 결과물이 ethidium bromide염색에 의해 확인되었다.

4) Analyses of TNF- $\alpha$  secretion

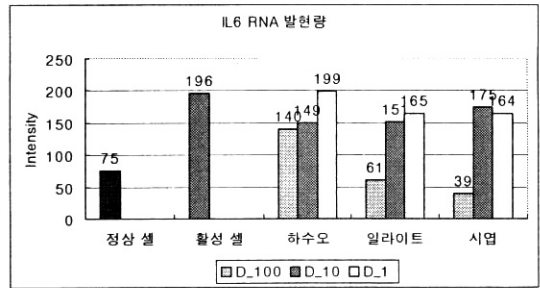
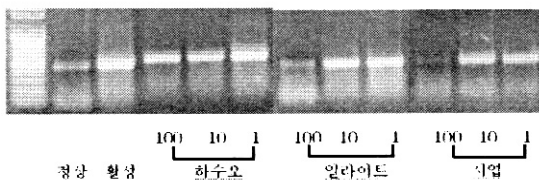
cell-free 상등액은 앞서 언급한 조건에서 안정적으로 배양된, 감각된 HMCs와 감각되지 않은 HMCs로부터 수거되었다. 상등액속의 TNF- $\alpha$ 의 농도는 ELISA(Endogen, Woburn, MA)를 이용하여 측정하였다.

III. 결 과

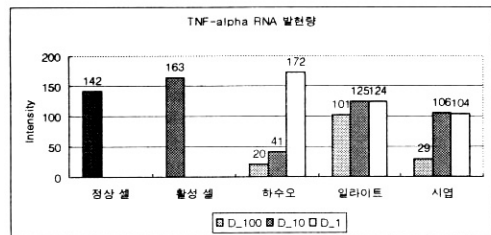
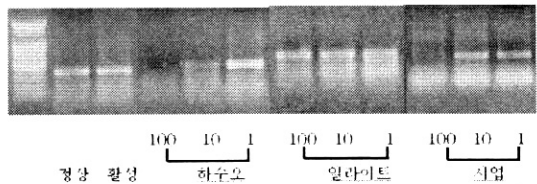
1. IL4의 RT-PCR 결과



2. IL6의 RT-PCR 결과



3. TNF- $\alpha$ 의 RT-PCR 결과



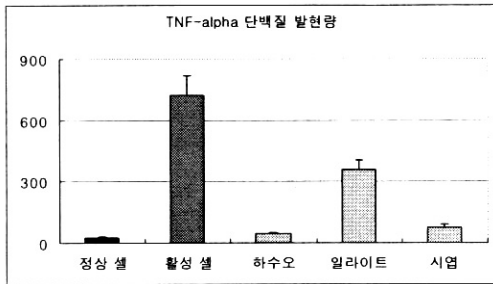
유전자	IL-4			IL-6			TNF- $\alpha$		
용량	100	10	1	100	10	1	100	10	1
정상 셀	81			75			142		
활성 셀	134			196			163		
하수오	35	78	144	140	149	199	20	41	172
일라이트	41	88	128	61	151	165	101	125	124
시업	21	144	167	39	175	164	29	106	104

4. TNF- $\alpha$  단백질 정량 분석

HMC-1 세포주에 anti-IgE와 후보약재들을 48 시간 동시배양한 후 TNF- $\alpha$  ELISA(Endogen, Woburn, MA)로 TNF- $\alpha$  분비량을 측정한 결과 mRNA 유전자 발현실험과 거의 일치하는 결과를 얻었다.

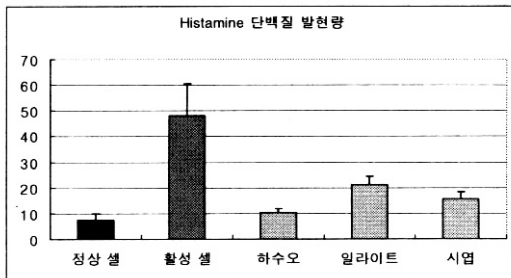
선택, 하수오, 마황, 일라이트와 소청룡탕이 활성화 cell에 비교하여 TNF- $\alpha$  분비량이 현저하게 줄어 있음을 알 수 있었다.(통계적으로 1% 유의 수준 하에서 유의함)

한약재 이름	발현량 평균	편차	신뢰구간	유의정도 (95%)	유의정도 (99%)
정상 셀	26	4.5			
활성 셀	720	96	531.84(하한)		
하수오	45	7.8	60.288(상한)	유의	유의
일라이트	356	49	452.04(상한)	유의	
시엽	78	13.7	104.852(상한)	유의	유의



5. Histamine 단백질 정량 분석

한약재 이름	발현량 평균	편차	신뢰구간	유의정도 (95%)	유의정도 (99%)
정상 셀	7.4	2.4			
활성 셀	48	12.3	23.892(하한)		
하수오	10.5	1.6	13.636(상한)	유의	유의
일라이트	21	3.4	27.664(상한)		
시엽	15.7	2.5	20.6(상한)	유의	



IV. 고 찰

시엽은 감나무의 잎으로써, 시엽의 주성분은 비타민 C, 플라보노이드 배당체, 탄닌, 페놀, 쿠마린, 다당류, 정유, 유기산 등이며 칼슘, 인, 철분, 단백질, 지방질 등을 많이 함유하고 있다<sup>11)</sup>. 특히 항산화작용과 관련되어 최근에 주목받고 있는 비타민 C의 함량이 높아 비타민 C의 공급원으로 활용하기에 매우 적절한 식품으로, 단위 중량당 들어있는 비타민 C의 함량이 월등하게 높다. 특히 시엽에 들어 있는 비타민 C는 몸 속에서 비타민 C로 변화하는 프로비타민으로 열에 강해서 끓여도 잘 파괴되지 않으며 독성이나 부작용이 없는 이노제로서도 좋고 감기, 괴혈병, 각종 성인병의 예방과 치료에 효과가 좋을 뿐만 아니라 피부보호 작용이 강한 것으로 보고되었다. 또한 비타민 A와 P도 풍부한데 비타민 A와 P는 임파구의 면역력도 길러주는 것으로 밝혀져 있다<sup>9,19)</sup>

하수오의 주성분은 chrysophanal, emodin을 주로하는 anthraquinone, 또는 rhein, emodin, monomethyl-ether도 함유한다. 그 밖에 lecithin을 함유하며, 침출액중에는 부신피질 hormone양의 물질을 함유하고 있으며, 콜레스테롤 저하작용, 동맥경화의 완화, 항바이러스 작용이 보고되었으며, 전통적으로 심마진이나 피부소양증 등의 혈조로 인한 피부질환에 사용되어 왔다. 이는 하수오의 성분 중 부신피질 hormone양의 물질에 의한 항anaphylaxia작용에 의한 것으로 추정되나 정확한 기전은 밝혀지지 않고 있다<sup>4)</sup>.

일라이트(illite)의 화학조성은  $(K,H_3O)Al_2(Si,Al)_4O_{10}(H_2O,OH)_2$ 이다. 화학성분으로 백운모에 가까운 것도 있으나 비교적  $SiO_2$ ,  $MgO$ ,  $H_2O$ 가 많고,  $K_2O$ 는 적다. 수백운모(水白雲母) 등과 같은 계열의 광물로서 토상(土狀)광택이 있다. 화학성분이나 결정구조로 보아 독립된 광물이 아니고, 다른 성분을 포함하고 있는 혼합광물로 보기도 한다. 중금속 흡착과 유기물 분해, 탈취능력이 뛰어나 최근 건강제품의 재료로 다용되고 있다<sup>8,15)</sup>.

아토피와 관련된 면역반응에는 다양한 인자들이 관여하고 있지만, 실험적으로 몇가지 cytokine들이

중점적으로 연구되어 지고 있다. 그 중 IL-4는 atopic dermatitis와 천식에 있어서 과발현되는 것이 보고되었으며<sup>6,18)</sup>, 또한 관련된 Polymorphisms의 변화는 아토피와 천식의 발현과 밀접한 연관이 있음도 보고되었다<sup>12)</sup>. 또한 IL-4와 IL-6는 서로 긴밀한 상호의존성을 가진 cytokine들으로써 알러지 항체에 의해서 동반발현되는 것으로 보고되었으며<sup>5,21)</sup>, IL-6 자체는 히스타민의 분비를 촉진하는 것이 밝혀졌다<sup>13)</sup>.

TNF- $\alpha$ 는 알러지성 관절염과 천식에 관여하는 주요한 요소로써 유전적 연관성이 확인되었으며<sup>10)</sup>, 특히 염증발현 과정 및 면역과정에 있어서 IL-4와는 함께 synergy 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다<sup>14,17)</sup>. 한편 IL-13은 알러지를 유발하는 과정에서 IL-4와 밀접하게 연관되어 발현되는 것으로 알려져 있으며<sup>7)</sup>, 특정 세포에서는 receptor와 signal transduction을 공유하는 것으로 보고되었다<sup>16)</sup>.

본 실험은 인간의 HMC-I 셀을 anti-human IgE를 통해 알러지를 유발시킨 후 시엽, 하수오, 일라이트의 단일 약재로 대조군과 비교하여 항알러지 효능을 검증하였다. 실험결과 IL-4의 발현량은 대조군에 비하여 하수오, 일라이트, 시엽에서 모두 dose dependent하게 감소한 것을 확인할 있었다. 또한 IL-6의 발현량도 모두 감소하였으나, 1 $\mu$ g/ml와 10 $\mu$ g/ml에서는 정상군에 비하여 발현량이 많았으며, 100 $\mu$ g/ml에서는 모두 대조군에 비하여 발현량이 낮았으며, 특히 일라이트와 시엽은 정상군보다 낮게 발현되었다. IL-4와 IL-6가 서로 긴밀한 상호의존성을 가진 cytokine 들임을 고려할 때에 하수오보다는 시엽과 일라이트에서 이들 상호간의 synergy효과를 억제하는 것으로 볼 수 있다. 또한 TNF- $\alpha$ 의 경우, 주로 시엽과 하수오에서 발현량이 감소하는 것으로 나타났으며(100 $\mu$ g/ml), 특히 하수오는 10 $\mu$ g/ml에서도 높은 발현량의 감소를 나타내었다. 이는 하수오가 IL-4와 IL-6를 억제하는 것보다는 TNF- $\alpha$ 의 발현을 억제함으로써 아토피 등의 증상에 효과를 나타내는 것으로 해석할 수 있는 가능성을 제시한다. HMC-1 세포주에 anti-IgE와 하수오, 일라이트, 시엽을 48시간 동시배양한 후 TNF- $\alpha$  분비량

을 측정된 결과 mRNA 유전자 발현실험과 거의 일치하는 결과를 얻었으며, Histamine단백질 발현량에 대한 조사에서도 TNF- $\alpha$  분비량을 측정된 결과와 거의 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 본 실험에 사용된 백하수오, 시엽, 하수오 등의 항아토피 효과를 좀더 면밀히 검증하고, 아울러 혼합 연고제 등의 개발 가능성을 검증하기 위해서는 아토피성 피부염 발현쥐(NCNGa Mouse) 등의 동물 모델을 통해서 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

## V. 결 론

아토피성 피부염에 사용될 수 있는 한약재인 백하수오, 시엽 및 일라이트와 그 조성물을 재료로 하여 각 한약재의 in vitro 모델에서의 치료효과를 검증하고 제품의 개발의 가능성을 검증하여 보았다. 인간의 HMC-I 셀을 anti-human IgE를 통해 알러지를 유발시킨 in vitro 실험에서 각각의 한약재가 대조군에 비해서 유의성 있게 알러지 관련 사이토카인의 분비 및 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 이들 약물을 이용한 연고제와 같은 혼합 치료제의 개발을 위해서는 in vivo 실험 모델에서의 면밀한 실험이 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 김정진 외 : 가미생료사물탕의 항염증효과와 지양고의 아토피피부염 손상 및 지양 효과에 미치는 영향, 동의생리병리학회지, 17(2), 2003. 428-435)
2. 노진환 외 : 황연해독탕가감방 전탕액 도포로 치료한 하복부피진 1례, 한의학회지 21(3), 2000
3. 박민철 외 : 아토피 피부염의 동서의학적 문헌 고찰, 안이비인후피부과학회지, 15(1), 2002. 226-252
4. 이상인 외 : 한약임상응용, 정보사, 서울, 1990, 356,357
5. Aoki, I. ; Aoki, A. ; Klinman, D.M. :

Activation of IL-4 and IL-6 secreting cells by antigen, *Cytokine*, 7(8), 1995, pp.799-805.

6. Aragane, Y. ; Maeda, A. ; Matsushita, K. ; Ueno, K. ; Yudate, T. ; Kawada, A. ; Tezuk Yamazaki, F. : Overactivation of IL-4-induced activator protein-1 in atopic dermatitis, *Journal of dermatological science*, 28(3), 2002, pp.227-233.

7. Aversa, G. ; Punnonen, J. ; Cocks, B. G. ; Malefyt, R. W. : An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors, *The Journal of experimental medicine*, 178(6), 1993, pp.2213.

8. Du, Q. ; Sun, Z. ; Forsling, W. ; Tang, H. : Adsorption of Copper at Aqueous Illite Surfaces, *Journal of colloid and interface science*, 187(1), 1997, pp.232-242.

9. Duan, J. ; Wang, X. ; Dong, Q. ; Fang, J.-n. ; Li, X. : Structural features of a pectic arabinogalactan with immunological activity from the leaves of *Diospyros kaki*, *arbohydrate research*, 338(12), 2003, pp.1291-1297.

10. Gentile, D.A. ; Doyle, W.J. ; Zeevi, A. ; Howe-Adams, J. ; Trecki, J. ; Skoner, D.P. : Association between TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  genotypes in infants and parental history of allergic rhinitis and asthma, *Human immunology*, 65(4), 2004, pp.347-351.

11. Guang, C. ; Suixu, X. ; Yi, S. : Studies on the constituents of *Diospyros kaki* leaves(I) , *CHINESE JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*, 10(4), 2000, pp.298-299.

12. Hook, S. ; Cheng, P. ; Holloway, J. ; Riley, G. ; Sawyer, G. ; Le Gros, G. ; Beasley, R. : Analysis of Two IL-4 Promoter Polymorphisms in a Cohort of Atopic and Asthmatic Subjects, *Experimental and clinical immunogenetics*, 16(1), 1999, pp.33-35.

13. Kikuchi, T. ; Ishida, S. ; Kinoshita, T. ; Sakuma, S. ; Sugawara, N. ; Yamashita, T. ; Koike, K. : IL-6 enhances IgE-dependent histamine release from human peripheral blood-derived cultured mast cells, *Cytokine*, 20(5), 2002, pp.200-209.

14. Kumagai, N. ; Fukuda, K. ; Nishida, T. : Synergistic Effect of TNF- $\alpha$  and IL-4 on the Expression of Thymus- and Activation-Regulated Chemokine in Human Corneal Fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 279(1), 2000, pp.1-5.

15. Lackovic, K. ; Angove, M.J. ; Wells, J.D. ; Johnson, B.B. : Modeling the adsorption of Cd(II) onto Muloorina illite and related clay minerals, *Journal of colloid and interface science*, 257(1), 2003, pp.31-40.

16. Lefort, S. ; Vita, N. ; Reeb, R. ; Caput, D. ; Ferrara, P. : IL-13 and IL-4 share signal transduction elements as well as receptor components in TF-1 cells, *FEBS letters*, 366(2/3), 1995, pp.122-126.

17. Marie, C. ; Pitton, C. ; Fitting, C. ; Cavillon, J. : IL-10 and IL-4 synergize with TNF- $\alpha$  to induce IL-1 production by human neutrophils, *Cytokine*, 8(2), 1996, pp.147-151.

18. Pala, P. ; Message, S. D. ; Johnston, S. L. ; Openshaw, P. J. M. : Increased aeroallergen-specific interleukin-4-producing T cells in asthmatic adults, *Clinical and experimental allergy, journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 32(12), 2002, pp.1739-1744.

19. Park, M.-H. ; Choi, C. ; Bae, M.-J. : Effect of Polyphenol Compounds from Persimmon Leaves (*Diospyros kaki* folium) on Allergic Contact Dermatitis, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 29(2), 2000, pp.111-115.

20. Sheehan, M.P. ; Rustin, M.H.A. ; Buckley, C. ; Harris, D.J. ; Ostlere, L. ; Dawson, A. ;

Atherton, D : Efficacy of traditional Chinese herbal therapy in adult atopic dermatitis, *The Lancet*, 340(8810), 1992, pp.13-17.

21. Shirai, A. ; Sierra, V. ; Kelly, C.I. ; Klinman, D.M. : Individual cells simultaneously produce both IL-4 and IL-6 in vivo, *Cytokine*, 6(3), 1994, pp.329-336.

22. Yuan, R. ; Lin, Y. : Traditional Chinese medicine - an approach to scientific proof and clinical validation, *Pharmacology & therapeutics*, 86(2), 2000, pp.191-198.

23. Zuckerman, G.B.; Bielory, L. : Complementary and alternative medicine herbal therapies for atopic disorders, *The American journal of medicine*, 113(9), 2002, pp.47-51.