

白何首烏, 柿葉, 일라이트 조성물의 Atopy 병태모델 치료효과

박종오^{1,3} · 조성익¹ · 이용훈² · 조은진^{2*}

1: 대전대학교 한의과대학 병리학교실, 2: (주) 파마코디자인, 3: 맑은몸한의원

Improving Effect on Aatopic Dermatitis with Treatment of Selected Herbs ; *Polygoni Multiflori Radix, Diospyros Kaki, ilite* and its Mixture in NCNga Mice

Jong Oh Park^{1,3}, Sung Ik Jo¹, Young Heun Lee², Eun-Jin Jo^{2*}

1: College of Oriental Medicine Daejeon University, 2: Pharmacodesign(Co. Ltd.), 3: PurebodyClinic

We observed the efficacy of natural herbs and mixture in treating atopic dermatitis using anti-human IgE treated Human HMC-I cell and NCNga mice model. First, 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- α expression and TNF- α , Histamine secretion value. Finally, we conducted study whether the mixture of the selected herbs is more effective than each herb which consist the mixture and control group. The results show that the mixture is better in improving atopic dermatitis condition.

Key words : Aatopic Dermatitis, *Polygoni Multiflori Radix, Diospyros Kaki, ilite*, NCNga Mice

서론

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 생리학적인 측면, 병리조직학적 측면에서 접근하고 있으나 근본적인 원인은 아직 밝혀지지 않고 있으며, 따라서 근본적 치료법보다는 스테로이드제, 항히스타민제 등을 주로 사용하는 대증치료와 함께 면역조절제, 항생제 등이 더불어 사용되기도 한다²⁾.

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 등의 순으로 다용되었다³⁾.

최근에 김 등은 가미생료사물탕을 이용하여 비만세포의 탈과립 및 histamine 분비 억제효과, NC/Nga mouse의 아토피양 피부염 손상 및 비장세포에서의 IL-4, IL-5, and IFN- γ assay, raw 264.7 macrophage cell의 LPS에 대한 항염증효과를 실험하여 주목할만한 연구한 결과를 발표하였다¹⁾. 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 있다²⁾.

국외에서는 오래전부터 한의학적 방법을 이용한 아토피질환의 치료법 개발에 대한 관심이 고조되고 있었으나²⁰⁾, 한편으로는 한의학적 방법을 이용한 아토피 질환의 치료법 개발을 위해서는 과학적 접근방법과 임상적인 효용성을 동시에 추구해야 한다는 주장이 설득력을 얻고 있다²¹⁾. 본 실험은 개발되어 사용되고 있는 백하수오, 시엽, 일라이트의 복합 연고제가 인간의 HMC-I 세포를 anti-human IgE를 통해 알러지를 유발시킨 모델에서의 실험효과

* 교신저자 : 조은진, 대전시 유성구 구성동 KAIST HTVC 4113호

· E-mail : eunjinn@pharmacodesign.com · Tel : 042-861-9646

· 접수 : 2004/11/26 · 수정 : 2004/12/29 · 채택 : 2005/01/27

및 아토피 치료제로의 개발가능성을 검증하기 위해 수행되었다.

실험방법

1. in vitro

1) 실험 개요

인간의 HMC-I 세포를 anti-human IgE를 통해 알러지를 유발시킨 후 시엽, 하수오, 일라이트의 단일 약재로 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 약재(10ug/ml, 100ug/ml)를 공동배양하였다. 단독배양과 공동배양은 10%FBS, DMEM 배지에 CO₂를 5% 농도로 일정하게 유지하면서 37℃에서 48시간 동안 실시하였다.

(2) 약재 처치

HMCs (5×10⁴ cells)를 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지에서 다양한 농도의 후보 약재와 anti-human IgE(10ug/ml)를 처리하여 co-culture시킴(37℃, 5% CO₂ concentration 48h). HMCs에 섞인 Methyl-3[H] thymidine는 Duclos et al.에 의해 제시된 방식으로 측정되었다. 간단하게 설명하면, 방사성물질로 라벨링된 Methyl-3[H]thymidine(1 Ci per well)을 48시간 배양된 후보약재나 후보약재+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 × 10⁶) cells을 다양한 농도의 후보약재와 anti-human IgE(10ug/ml)를 처리한 후 배양하였다(37℃, 5% CO₂ concentration 4h). Total cellular RNA를 HMCs로부터 분리해내고, RNA의 순도는 A260:A280 ratio의 근거하여 확인 한 후 RNA의 integrity를 아가로스 젤 전기영동으로 확인하였음. PCR 조건은 다음과 같다. Follows: 94℃, 5 min; followed by 30 amplification cycles (94℃, 1 min; 57℃ for the optimal annealing temperature for cytokines as described elsewhere, 1 min; 72℃, 1 min). Final extension은 72℃ for 10 min 이며 동량

의 PCR 결과물이 ethidium bromide염색에 의해 확인되었다.

(4) Analyses of TNF-α secretion

cell-free 상등액은 앞서 언급한 조건에서 안정적으로 배양된, 감작된 HMCs와 감작되지 않은 HMCs로부터 수거되었다. 상등액속의 TNF-α의 농도는 ELISA(Endogen, Woburn, MA)를 이용하여 측정하였다.

2. in vivo

1) 실험 개요

아토피성 피부염 발현쥐(NCNga Mouse)를 대상으로 7주간 하수오, 시엽, 일라이트 및 하수오+일라이트+시엽의 조성물(1:1:1)을 소량의 경구투여 및 피부도포 등으로 아토피성 피부염에 대한 개선효과 정도를 알아보았다.

2) 실험 방법

(1) Serum IgE and IL-6 elevation and development of dermatitis in NCNga atopy dermatitis model mice

NCNga atopy dermatitis 생쥐는 6주령 암컷(female)을 구입(Japan SLC, Shizuoka, Japan)하여 23±2℃ (housed), 55±15% (humidity), 12시간-12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 후 실험을 시작하였다. 혈청중 IgE 량은 8주, 10주, 12주, 15주에 생쥐의 눈에서 capillary tube를 이용하여 약 100 μl의 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하여 IgE 량을 측정하였다. 15주째 NCNga 생쥐를 ethyl ether로 마취한 후 심장천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리한 후 혈청중 IL6, IL13을 ELISA kit방법으로 정량하였다. 그리고 혈청중 immunoglobulins인 IgG2a의 량은 Mab-Based Mouse Ig isotyping kit (PharMingen, San Diego, Calif)로 측정하였다.

(2) Continuous feeding of KTM(단일한약재 및 조성물) and rubbed neck skin in NCNga atopy dermatitis model mice.

한약추출물(KTM)은 8주령 NCNga 생쥐에 6주간 주3회(월, 수, 금) 경구투여 (75mg/kg)와 목 부위에 피부도포(10mg/day)를 하였다.

(3) RT-PCR on facial skin biopsy of atopic dermatitis-like skin lesions in NCNga mice

NCNga 생쥐의 얼굴(facial)부위를 전모한 뒤 피부조직을 떼어내어 피부조직(0.1g)과 RNAsolB 500 μl를 넣고 용해될 때까지 분쇄한다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μl의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

① RT-PCR

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μg을 75℃에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μl 10 mM dNTPs

mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT (200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

② cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in germany)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), cyclooxygenase-2, 그리고 NOS-II 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/ μ l)와 antisense primer (20 pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5 mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 μ l Taq polymerase (5 U/ μ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μ l 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5분, denaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5분, annealing; 55 $^{\circ}$ C, 1분, elongation; 72 $^{\circ}$ C, 1분을 25 cycles한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

(4) Cell cultured on facial and neck skin biopsy of atopic dermatitis-like skin lesions in NCNga mice

NCNga 생쥐의 얼굴(facial)과 목 부위를 전모한 뒤 피부조직을 각각 1g씩 떼어내어 DMEM 배양액으로 수세한 후 chopping 한 후 10% FBS- DMEM으로 Petri-dish에서 7일간 배양한 후 배양상층액을 제거하고 fresh한 10% FBS-DMEM으로 교체하였다. 다시 7일간 배양하여 배양상층액을 분리하여 배양액내의 IL-4, IL13 분비량 유출량을 ELISA kit으로 측정하였다.

결 과

1. in vitro

1) IL4의 RT-PCR 결과



정상 세포 100 10 1 100 10 1 100 10 1
 활성 세포 하수오 일라이트 시엽

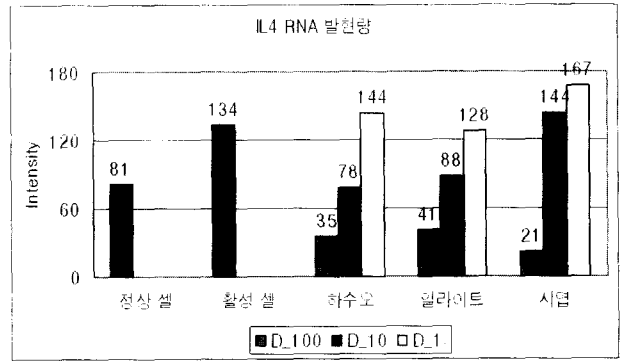
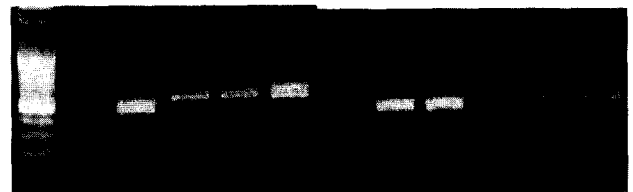


Fig. 1. IL4 mRNA expression levels of normal HMC cell, Anti-IgE activation HMC cell and herbal extract treated HMC cell(Dasage 1, 10 and 100 mg/kg after anti-IgE)

2) IL6의 RT-PCR 결과



100 10 1 100 10 1 100 10 1
 정상 세포 활성 세포 하수오 일라이트 시엽

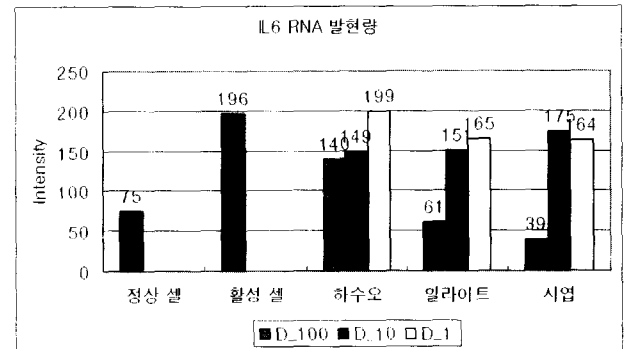


Fig. 2. IL6 mRNA expression levels of normal HMC cell, Anti-IgE activation HMC cell and herbal extract treated HMC cell(Dasage 1, 10 and 100 mg/kg after anti-IgE)

3) TNF- α 의 RT-PCR 결과



100 10 1 100 10 1 100 10 1
 정상 세포 활성 세포 하수오 일라이트 시엽

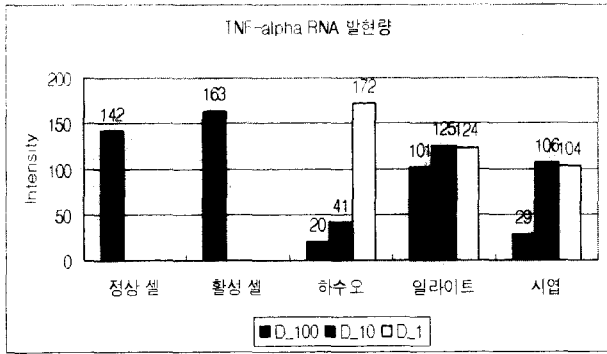


Fig. 3. TNF- α mRNA expression levels of normal HMC cell, Anti-IgE activation HMC cell and herbal extract treated HMC cell(Dasage 1, 10 and 100 mg/kg after anti-IgE)

Table 1. TNF- α mRNA expression levels of normal HMC cell, Anti-IgE activation HMC cell and herbal extract treated HMC cell(Dasage 1, 10 and 100 mg/kg after anti-IgE)

유전자	IL-4			IL-6			TNF- α		
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
시엽	21	144	167	39	175	164	29	106	104

4) TNF- α 단백질 정량 분석

HMC-1 세포주에 anti-IgE와 후보약재들을 48시간 동시배양 한 후 TNF- α ELISA(Endogen, Woburn, MA)로 TNF- α 분비량을 측정 한 결과 mRNA 유전자 발현실험과 거의 일치하는 결과를 얻었다.

Table 2. TNF- α expression levels of normal HMC cell, Anti-IgE activation HMC cell and herbal extract treated HMC cell

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	

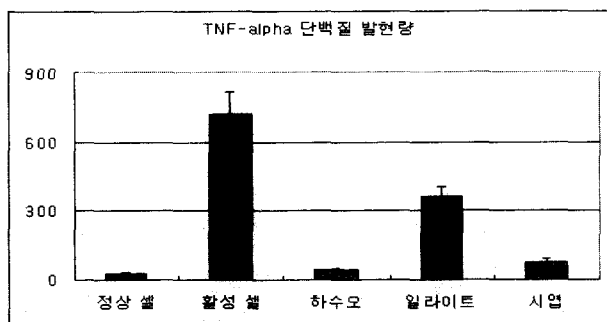


Fig. 4. TNF- α expression levels of normal HMC cell, Anti-IgE activation HMC cell and herbal extract treated HMC cell

5) Histamine 단백질 정량 분석

Table 3. Histamine expression levels of normal HMC cell, Anti-IgE activation HMC cell and herbal extract treated HMC cell

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		

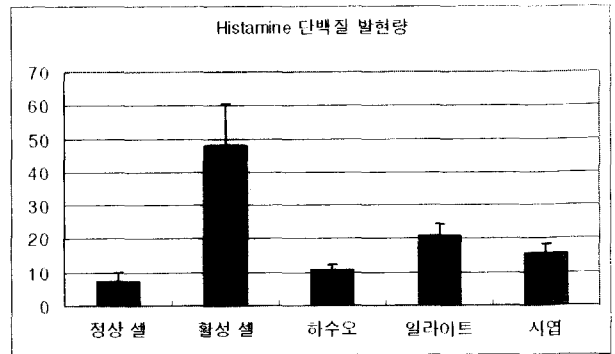


Fig. 5. Histamine expression levels of normal HMC cell, Anti-IgE activation HMC cell and herbal extract treated HMC cell

2. in vivo

1) 혈청내 알러지 관련 유전자 발현량

(1) Serum IgE Level

Table 4. Serum IgE expression levels(8 week, 10 week, 12 week and 15 week) of herbal extract treated groups during 7weeks (from 8 week to 15 week)

한약재	8주차		10주차		12주차		15주차	
	평균	표준편차	평균	표준편차	평균	표준편차	평균	표준편차
대조군	621.6	60.2	948.8	78.6	1169	163.2	1778	178
하수오	457.6	131.3	811.6	142.3	1320.7	161.7	1509	281
시엽	296.2	64.3	347.1	151.8	309.9	42.9	867	260
일라이트	381.9	87.7	617.2	71.9	688.7	183.2	1361	306
조성물	318.2	55.7	932.7	273	882.5	178	1165	300

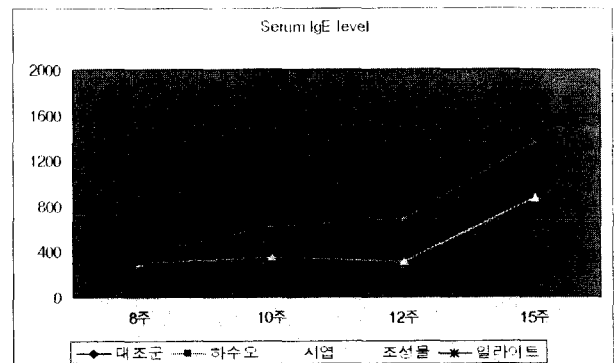


Fig. 6. Serum IgE expression levels(8 week, 10 week, 12 week and 15 week) of herbal extract treated groups during 7weeks (from 8 week to 15 week)

(2) Serum IL6 Level

Table 5. Serum IL6 expression levels of herbal extract treated groups during 7weeks (from 8 week to 15 week)

한약재	평균	표준편차	95% 유의수준
대조군	19.2	1.6	
하수오	7.8	1.6	유의
시엽	5.2	1.1	유의
일라이트	3.5	1.1	유의
조성물	7.6	2.7	유의

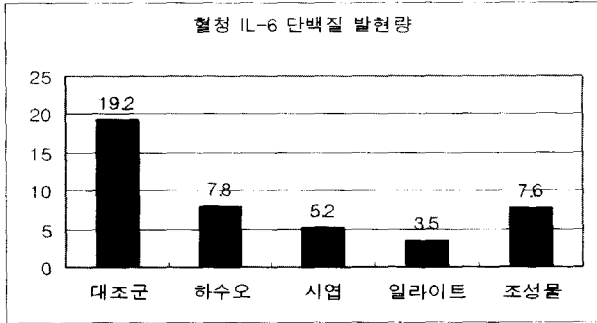


Fig. 7. Serum IL6 expression levels of herbal extract treated groups during 7weeks (from 8 week to 15 week)

(3) Serum IL13 Level (Table 6, Fig. 8)

Table 6. Serum IL13 expression levels of herbal extract treated groups during 7weeks (from 8 week to 15 week)

한약재	평균	표준편차	95% 유의수준
대조군	377.8	83.5	
하수오	160.7	4.8	유의
시엽	86.8	33.6	유의
일라이트	55.3	14.2	유의
조성물	314.1	82.6	

(4) Serum IgG2a Level (Table 7, Fig. 9)

Table 7. Serum IgG2a expression levels of herbal extract treated groups during 7weeks (from 8 week to 15 week)

한약재	평균	표준편차	95% 유의수준
대조군	4.25	0.51	
하수오	2.44	0.31	유의
시엽	1.87	0.29	유의
일라이트	2.04	0.23	유의
조성물	2.68	0.26	유의

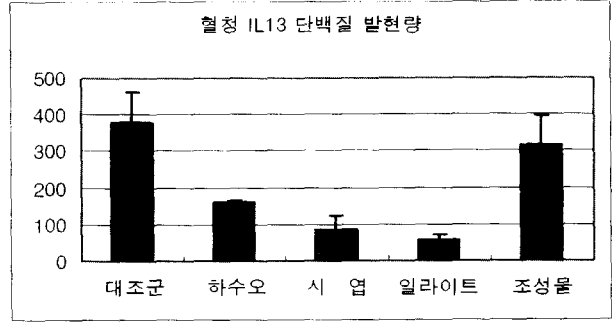


Fig. 8. Serum IL13 expression levels of herbal extract treated groups during 7weeks (from 8 week to 15 week)

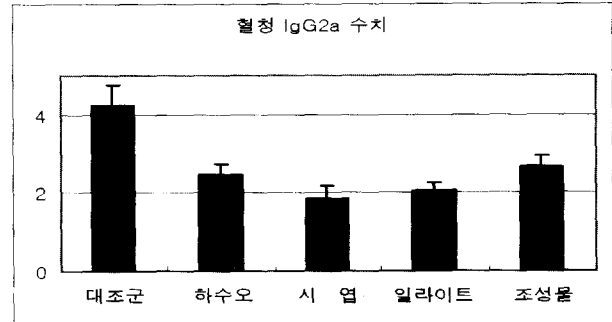


Fig. 9. Serum IgG2a expression levels of herbal extract treated groups during 7weeks (from 8 week to 15 week)

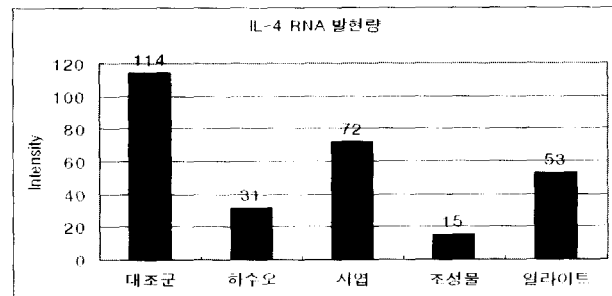
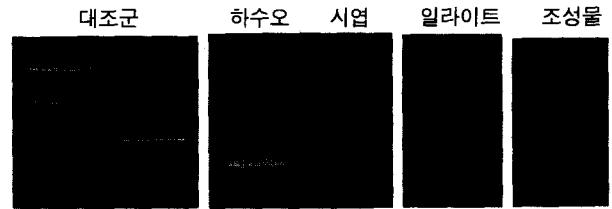


Fig. 10. IL4 expression levels of herbal extract treated groups during 7weeks (from 8 week to 15 week) in Facial and neck skin

2) 앞면 피부조직과 목, 등쪽 피부조직의 알러지 관련 유전자 발현량

(1) IL4의 RT-PCR 결과 (Fig. 10)

(2) IL13의 단백질 발현량 (Table 8, Fig. 11)

Table 8. IL13 expression levels of herbal extract treated groups during 7weeks (from 8 week to 15 week) in Facial and neck skin

한약재	평균	표준편차	95% 유의수준
대조군	268.7	41.1	
하수오	150.1	2.9	유의
시엽	95.5	32.3	유의
일라이트	102.7	4.1	유의
조성물	134	31	유의

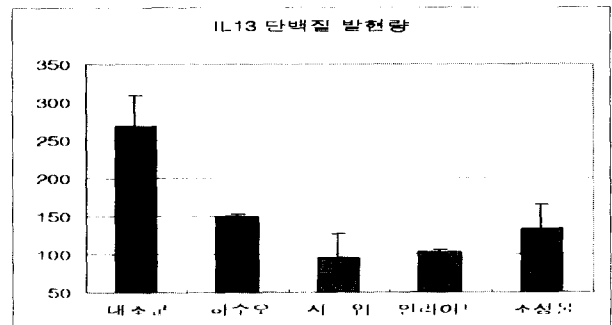


Fig. 11. IL13 expression levels of herbal extract treated groups during 7weeks (from 8 week to 15 week) in Facial and neck skin

3) 피부 사진 촬영

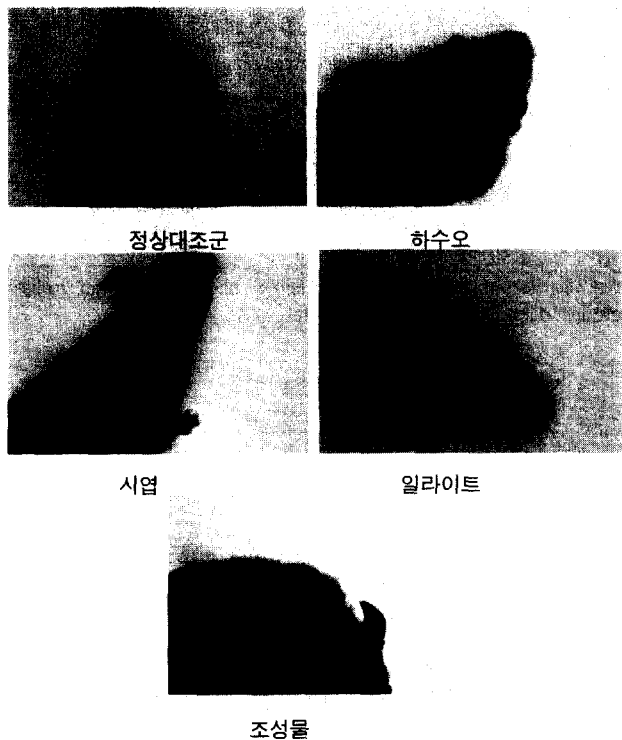


Fig. 12. Photographs of herbal extract treated groups during 7weeks (from 8 week to 15 week) in Facial and neck skin

고찰

시엽은 감나무의 잎으로써, 시엽의 주성분은 비타민 C, 플라보노이드 배당체, 탄닌, 페놀, 쿠마린, 다당류, 정유, 유기산 등이며 갈슘, 인, 철분, 단백질, 지방질 등을 많이 함유하고 있다¹¹⁾. 특히 항산화작용과 관련하여 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 이노제제로서도 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.^{9,19)} 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 있다³⁾. 일라이트(illite)의 화학조성은 (K,H₃O)Al₂(Si,Al)₄O₁₀(H₂O,OH)₂이다. 화학성분으로 백운모에 가까운 것도

있으나 비교적 SiO₂, MgO, H₂O가 많고, K₂O는 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^{8,15)}. 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^{6,18)}, 또한 관련된 Polymorphisms의 변화는 아토피와 천식의 발현과 밀접한 연관이 있음도 보고되었다¹²⁾. 또한 IL-4와 IL-6는 서로 긴밀한 상호의존성을 가진 cytokine들로서 알러지 항체에 의해서 동반발현되는 것으로 보고되었으며^{5,21)}, IL-6자체는 히스타민의 분비를 촉진하는 것이 밝혀졌다¹³⁾.

TNF-α는 알러지성 관절염과 천식에 관여하는 주요한 요소로서 유전적 연관성이 확인되었으며¹⁰⁾, 특히 염증발현 과정 및 면역과정에 있어서 IL-4와는 함께 synergy 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다^{14,17)}. 한편 IL-13은 알러지를 유발하는 과정에서 IL-4와 밀접하게 연관되어 발현되는 것으로 알려져 있으며⁷⁾, 특정 세포에서는 receptor와 signal transduction을 공유하는 것으로 보고되었다¹⁶⁾.

본 실험은 크게 vitro 실험과 vivo 실험으로 나누어져 실행되었다. 먼저 vitro 실험은 인간의 HMC-1 세포를 anti-human IgE를 통해 알러지를 유발시킨 후 시엽, 하수오, 일라이트의 단일 약제로 대조군과 비교하여 항알러지 효능을 검증하였다. 실험결과 IL-4의 발현량은 대조군에 비하여 하수오, 일라이트, 시엽에서 모두 dose dependent하게 감소한 것을 확인할 있었다(Fig. 1). 또한 IL-6의 발현량도 모두 감소하였으나, 1μg/ml와 10μg/ml에서는 정상군에 비하여 발현량이 많았으며, 100μg/ml에서는 모두 대조군에 비하여 발현량이 낮았으며, 특히 일라이트와 시엽은 정상군보다 낮게 발현되었다(Fig. 2). IL-4와 IL-6가 서로 긴밀한 상호의존성을 가진 cytokine들임을 고려할 때에 하수오보다는 시엽과 일라이트에서 이들 상호간의 synergy효과를 억제하는 것으로 볼 수 있다. 또한 TNF-α의 경우, 주로 시엽과 하수오에서 발현량이 감소하는 것으로 나타났으며(100μg/ml), 특히 하수오는 10μg/ml에서도 높은 발현량의 감소를 나타내었다(Fig. 3). 이는 하수오가 IL-4와 IL-6를 억제하는 것보다는 TNF-α의 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-α 분비량을 측정 한 결과 mRNA 유전자 발현실험과 거의 일치하는 결과를 얻었으며(Table 2, Fig. 4), Histamine단백질 발현량에 대한 조사에서도 TNF-α 분비량을 측정 한 결과와 거의 동일한 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 5).

In vivo실험은 아토피성 피부염 발현쥐(NCNg Mouse)를 대상으로 7주간 하수오, 시엽, 일라이트 및 하수오+일라이트+시엽의 조성물(1:1:1)을 소량의 경구투여 및 피부도포 등의 방법으로 아토피성 피부염에 대한 개선효과 정도를 알아보았다. 먼저,

혈청내 IgE level은 시엽, 일라이트, 조성물, 하수오의 순으로 낮게 나타났다(Table 4). 또한 IgG2a level에서는 모두 대조군에 비하여 유의한 차이(95%유의수준)를 나타냈으며(Table 7), 그 중 시엽이 가장 낮게 나타났다. 또한 혈청내의 IL-6 level은 모두 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타냈으며(Table 5), IL-13의 경우는 조성물을 제외하고 모두 유의한 차이를 나타냈다(Table 6). 다음으로, 피부조직에서의 알러지 관련 유전자 발현량을 조사한 실험에서는 혈청실험과 다소 다른 경향을 나타냈음을 알 수 있었다. IL-6와 밀접하게 발현되는 IL-4의 발현량을 조사한 결과 모두 유의성 있게 감소되었으나, 조성물이 가장 높게 발현량을 감소시켰으며(Fig. 10), IL-13의 경우에도 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 발현량을 감소시켰다(Fig. 11). 또한 육안적인 소견상, 조성물로 처치를 받은 mouse가 가장 양호한 상태를 확인할 수 있었다(Fig. 12). 조성물의 경우 혈청검사에는 IL-13의 발현량을 유의성 있게 감소시키지 못했으나, 피부조직에서의 발현량은 유의성 있게 감소시켰음을 알 수 있었다. 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

결 론

아토피성 피부염에 사용될 수 있는 한약재인 백하수오, 시엽 및 일라이트와 그 조성물을 재료로 하여 각 한약재 및 그 조성물의 in vitro와 in vivo 모델에서의 치료효과를 검증하고 제품의 개발의 가능성을 검증하여 보았다. 인간의 HMC-I 셀을 anti-human IgE를 통해 알러지를 유발시킨 in vitro 실험과 NCNga atopy dermatitis model mice를 이용한 in vivo 실험에서 각각의 한약재가 대조군에 비해서 유의성 있게 알러지 관련 사이토카인의 분비 및 생성을 억제하는 것으로 나타났으며, 특히 혈청검사보다 조직검사에서 조성물의 효능이 높게 나타난 것을 고려할 때에, 외용제의 개발 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. 김정진 외 : 가미생료사물탕의 항염증효과와 지양고의 아토피 피부염 손상 및 지양 효과에 미치는 영향, 동의생리병리학회지,17(2), 428-435, 2003.
2. 노진환 외 : 황연해독탕가감방 전탕액 도포로 치료한 하복부 피진 1례, 한의학회지21(3), 2000.
3. 박민철 외 : 아토피 피부염의 동서의학적 문헌 고찰, 안이비인후피부과학회지, 15(1), 226-252, 2002.
4. 이상인 외 : 한약임상응용, 성보사, 서울, 356,357, 1990.
5. Aoki, I. ; Aoki, A. ; Klinman, D.M. : Activation of IL-4 and IL-6 secreting cells by antigen, Cytokine, 7(8), pp.799-805, 1995.
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), pp.227-233, 2002.

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), pp.2213, 1993.
8. Du, Q. ; Sun, Z. ; Forsling, W. ; Tang, H. : Adsorption of Copper at Aqueous Illite Surfaces, Journal of colloid and interface science, 187(1), pp.232-242, 1997.
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), pp.1291-1297, 2003.
10. Gentile, D.A. ; Doyle, W.J. ; Zeevi, A. ; Howe-Adams, J. ; Trecki, J. ; Skoner, D.P. : Association between TNF- α and TGF- β genotypes in infants and parental history of allergic rhinitis and asthma, Human immunology, 65(4), pp.347-351, 2004.
11. Guang, C. ; Suixu, X. ; Yi, S. : Studies on the constituents of Diospyros kaki leaves(I) , CHINESE JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 10(4), pp.298-299, 2000.
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), pp.33-35, 1999.
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), pp.200-209, 2002.
14. Kumagai, N. ; Fukuda, K. ; Nishida, T. : Synergistic Effect of TNF- α and IL-4 on the Expression of Thymus- and Activation-Regulated Chemokine in Human Corneal Fibroblasts. Biochemical and biophysical research communications,279(1), pp.1-5, 2000.
15. Lackovic, K. ; Angove, M.J. ; Wells, J.D. ; Johnson, B.B. : Modeling the adsorption of Cd(II) onto Mulloorina illite and related clay minerals, Journal of colloid and interface science, 257(1), pp.31-40, 2003.
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), pp.122-126, 1995.
17. Marie, C. ; Pitton, C. ; Fitting, C. ; Cavaillon, J. : IL-10 and IL-4 synergize with TNF- α to induce IL-1 production by human neutrophils, Cytokine, 8(2), pp.147-151, 1996.
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), pp.1739-1744, 2002.
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), pp.111-115, 2000.
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), pp.13-17, 1992.
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), pp.329-336, 1994.
22. Yuan, R. ; Lin, Y. : Traditional Chinese medicine - an approach to scientific proof and clinical validation, *Pharmacology & therapeutics*, 86(2), pp.191-198, 2000.
23. Zuckerman, G.B.; Bielory, L. : Complementary and alternative medicine herbal therapies for atopic disorders, *The American journal of medicine*, 113(9), pp.47-51, 2002.