

## rSj26 또는 화학 항원 유도 아토피 피부염 마우스 모델에서 가감보중익기탕의 면역 매개물 조절 및 상처치료 효과

허정훈, 송한나, 장선일<sup>#\*</sup>

전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부 건강관리전공

### Effects of Gagambojungikgi-tang on the Immune Mediators Regulation and Wound Healing in the rSj26 or Chemical Antigen induced Atopic Dermatitis Model Mice

Jung Hun Heo, Han Na Song, Seon Il Jang<sup>#\*</sup>

School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeonju University

#### ABSTRACT

**Objectives :** The aim of this study was to investigate the effects of Gagambojungikgi-tang (GBT), a Korean herbal medicine, on the immune mediators, T cell proliferation and wound healing in the recombinant Sj26 (rSj26) antigen induced atopic dermatitis(AD) model mice.

**Methods :** GBT is the water extracts prepared from mixture of Ginseng Radix, Astragali Radix, Angelicae gigantis Radix, Atractylodes Rhizoma alba, Aurantii nobilis Pericarpium, Glycyrrhizae Radix, Artemisia iwaiyomogi Herba, Scutellaria Radix, Lonicera japonica Flos. This is a modified prescription of Bojungikgi-tang, which has been used for the treatment of indigestion, and immunological disease in east-asian countries. GBT was orally administered or externally applied at difference doses. The levels of immune mediators [(IgE, IgG1, prostaglandin E2 (PGE2), Th1/Th2 cytokines), T cell proliferation, and wound healing in the rSj26 or chemical antigen induced AD model BALB/c were investigated.

**Results :** GBT dose-dependently suppressed the release of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (Th1 cytokines), IL-4, IL-10 (Th2 cytokines), PGE2 (inflammatory mediators) and T cell proliferation. But GBT increased the production of IFN- $\gamma$  (Th1 cytokine). Furthermore, A wound healing effect of GBT was similar to external application of dexamethasone.

**Conclusions :** These results suggest that GBT suppresses the inflammatory mediators and regulates the Th1/Th2 cytokines, and promotes the wound healing. Therefore, these properties may contribute to the strong anti-AD effect of GBT.

---

**Key words :** *Gagambojungikgi-tang*, rSj26 antigen, Chemical antigen, Atopic dermatitis (AD), Th1/Th2 cytokines, Prostaglandin E2, Wound healing

## 서론

아토피 피부염(atopic dermatitis, AD)은 면역학적, 유전적, 약리 및 생리학적, 그리고 환경적 등 다인자적 요인(poly-factors)에 의해 발병되며, 병인과 발병 기전(etiology and pathogenesis)은 감염, 스트레스, 계절과 기후 변화, 자극 및 알러젠(allergen) 등에 의해 호전과 악화가 반복적으로 나타난다. AD는 만성적인 염증성 피부질환(chronically relapsing inflammatory skin disease)으로 영·유아부터 성인에까지 광범위하게 유발되며<sup>1-4)</sup>, IgE 매개 감작(IgE-mediated sensitization)에 의한 외인성 형태(extrinsic form, 70-80%)와 비IgE 매개 감작(non-IgE-mediated sensitization)에 의한 내인성 형태(intrinsic form, 20-30%) 등 2가지 형태로 분류되는 것으로 알려졌다<sup>5)</sup>.

산업사회 이전의 AD 유병율은 영·유아시기에 3%에 지나지 않았으나, 1960년을 기점으로 산업화가 가속된 선진국에서는 2000년대에 접어들면서 그 유병율이 15-30% 이상으로 크게 증가되었고, 성인의 경우에서도 2-3% 이상이 넘을 정도로 매우 빠른 속도로 증가하고 있어 인류가 해결해야 할 중요한 난치성 피부질환으로 인식되고 있다<sup>6-8)</sup>. 또한 아토피 피부염이 계속적으로 진행되면, 천식(asthma) 및 비염(rhinitis)과 같은 알레르기성 질환으로 발전된다. 이러한 AD의 면역학적 특징은 IgE의 매개 유무에 따라 다를 수 있으나, 항상 호산구증가증(eosinophilia)과 밀접한 관련이 있다<sup>7)</sup>. 더불어 피부 호밍 수용체(skin homing receptor)를 발현하는 memory T세포와 피부 림프구 관련 항원(cutaneous lymphocyte-associated antigen, CLA)은 Th2 사이토카인을 과잉생산하는데, IL-5뿐만 아니라 IgE 생산에 isotype switching을 유도하는 것으로 알려진 IL-4와 IL-13의 생산을 촉진하여 호산구의 발달 및 생존에 영양을 주는 것으로 보고되었다. CLA<sup>+</sup> T세포는 Th2세포의 기능을 억제하여 interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ , Th1 cytokine)을 비정상적으로 매우 적게 생산하는 것으로 알려져 있다<sup>1-4)</sup>. 그러나 지금까지 정확한 AD의 병인 기전은 알려지지 않았고, 치료할 수 있는 약제도 개발되지 않았다.

최근에는 알려진 한방처방 약물의 효과를 극대화하기 위해서 효능연구가 잘된 한약재를 加味 또는 加減하여 연구가 진행되고 있다<sup>9,10)</sup>. 전 연구에서 저자들은 염증매개물질을 효과적으로 억제시키는 물질을 찾고자 보중익기탕 구성약물 중 승마(*Cimicifugae Rhizoma*)와 시호(*Bupleuri Radix*)를 제거하고 한인진

(*Artemisia iwayomogi* Herba)과 황금(*Scutellaria baicalenensis*)을 첨가하여 가감보중익기탕을 제조하여 pro-inflammatory cytokine들을 설치류 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 조사한 바 있다<sup>10)</sup>. 그러나 아토피성 피부질환 모델 동물에서 그 효능에 대한 연구보고는 없는 실정이다.

본 연구는 Hsu 등<sup>11)</sup>의 방법에 준하여 BALB/c 마우스를 대상으로 인간의 아토피 피부질환과 유사한 모델 마우스를 만드는 방법을 확립하고 가감보중익기탕을 경구 투여한 후 AD의 면역학적 특징을 조사하였으며, 화학 알러젠을 이용하여 피부 병변을 일으키고 상처치료에 대한 가감보중익기탕의 효과를 조사하고 논의하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 재료

Dinitrofluorobenzene(DNFB)와 trimellitic anhydride (TMA), *Schistosoma japonica* 으로부터 얻은 재조합 *E. coli glutathione-S-transferase*(rSj26), avidin-alkaline phosphatase, p-nitrophenylphosphate, disodium 등은 Sigma사(ST Louis, MO)로부터 구입하였다. RPMI 1640, streptomycin/penicillin, glutamine, 우태이혈청(FBS)는 Gibco/BRL사(Grand Island, NY, U.S.A)로부터 구입하였으며, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$ 와 PGE2 immunoassay kits는 R&D사(Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. 96 well immuno plate는 Nunc사(Denmark)로부터 구입하였고, Rat anti-mouse IgE MoAb, biotin-conjugated monoclonal rat anti-mouse IgE MoAb와 rat anti-mouse IgG MoAb는 PharMingen사로부터 구입하였으며, aluminium hydroxide (Amphogel, Wyeth Pharmaceuticals)로부터 구입하였다.

### 2. 가감보중익기탕의 구성 약물

가감보중익기탕의 구성 약물은 인삼(*Ginseng Radix*), 황기(*Astragali Radix*), 당귀(*Angelicae gigantis Radix*), 백출(*Atractylodes Rhizoma alba*), 진피(*Aurantii nobilis Pericarpium*), 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 한인진(*Artemisia iwayomogi* Herba), 황금(*Scutellaria Radix*), 금은화(*Lonicera japonica Flos*) 등 9가지 한약재를 Table 1과 같이 조합하였다. 증거 표본은 원광대학교 방제학교실 표본실에 보관하고 있다.

Table 1. Composition of Gagambojungikgi-tang

Drug name	Compositional amount (g)	
	Gagambojungikgi-tang	
Ginseng Radix	6.0	
Astragali Radix	8.0	
Angelicae gigantis Radix	6.0	
Atractylodes Rhizoma alba	6.0	
Aurantii nobilis Pericarpium	6.0	
Glycyrrhizae Radix	2.0	
Artemisiae iwayomogii Herba	2.0	
Scutellariae Radix	2.0	
Total amounts	38.0	

### 3. 추출물의 제조

잘 건조된 구성약물 380 g을 1,000 ml의 증류수가 들어있는 약탕기에 주입하고 100°C에서 2시간 동안 가열한 후 추출물을 얻었다. 추출물은 3,000 rpm으로 10분간 원심시켜 상층액만 주의 깊게 취하여 0.45 µm 필터로 여과한 후 -70°C에서 동결건조하여 84 g을 얻은 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 4. 동물사육

6주령의 암컷 BALB/c계 마우스는 중앙동물실험실(서울)사로부터 구입하였다. 마우스는 스트레스를 해소하기 위해 1주일간 낮과 밤의 주기를 12시간씩 고정하여 사료(중앙동물실험실)와 멸균 물을 공급하면서 사육한 후 실험에 사용하였다.

### 5. 면역(immunization)

rSj26 항원 면역에 의한 AD 모델마우스 생산은 Hsu 등<sup>11)</sup>의 방법에 준하여 실험했다. 요약하면 rSj26 항원은 4 mg의 aluminium hydroxide (Amphogel, Wyeth Pharmaceuticals) 용액에 30 µg의 rSj26를 주입한 후 잘 교반하여 제조한 후에 7주령의 암컷 BALB/c계 마우스 복강에 주사기를 이용하여 주입하였다. 대조군과 각 실험군에 사용된 마우스는 각각 5마리를 배정하여 실험하였다. 대조군은 aluminium hydroxide 용액에 30 µg의 ovalbumin을 주입하여 대조액을 만든 후 마우스 복강에 주입하였다. 면역 후 21일에 boost한 다음 1주일 후에 심장으로 부터 혈액을 얻어 실온에 1시간 동안 방치하여 혈액을 응고 시켰다. 응고된 혈액은 3,000 rpm으로 20분간 원

심하여 혈청을 얻었다. 혈청은 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 6. 피부상처 치료효과 실험

DNFB와 TMA에 처리에 의한 피부병변 유도 실험은 Hopkins 등<sup>12)</sup>이 제시한 방법을 변형하여 수행했다. 8주령의 BALB/c계 마우스의 등쪽 털을 안과용 가위로 주의 깊게 제거한 후 제모제(한국양행, 서울)를 도포한 후 30°C 물을 이용하여 털을 완전히 제거 하였다. 등쪽 털이 제거된 마우스는 주사기 바늘로 50회 스크래치하여 상처를 유발하고 그 속에 마리당 각각 50 µl의 DNFB와 TMA를 바르고 피부병변을 유발하였다. 약물은 마우스 체중 1 kg당 100-500 mg을 DNFB와 TMA를 바르기 전 3일 전부터 하루에 1회 경구투여 하였고, DNFB와 TMA로 피부상처를 유발 한 후에는 10일 동안 하루에 1회 경구투여와 약물을 상처에 도포하였다. 약물이 함유된 크림은 올리브오일과 이멀시파인웍스(아산케미컬)을 주입하여 제조하였다. 이때 대조군은 약물이 함유되지 않은 크림베이스만 도포하였다. 또한 비교 약물은 dexamethasone을 사용하였다. 최종적으로 실험이 종료된 후 digital camera로 촬영한 후 피부병변은 피부 부종과 종창의 정도에 따라 다음과 같이 판정하였다.

- 0점 : 피부 병변이 없는 정상인 상태
- 1점 : 홍반(erythema)과 찰상(excoriation)이 있는 상태
- 2점 : 홍반과 부종(edema)이 동반된 상태
- 3점 : 홍반, 부종과 종창(tumor)이 혼적적인 상태
- 4점 : 종창, 농포(pustule), 구진(papule)이 뚜렷한 상태
- 5점 : 종창, 농포와 결절(nodule)이 매우 심한 상태

### 7. 혈청에서 rSj26 특이 IgE 와 IgG 정량

혈청내 rSj26 특이 IgE, IgG1와 IgG1의 정량은 ELISA법으로 측정하였다. Nunc high binding plate는 코팅완충액(0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.2)에 rSj26을 5 µg/ml의 농도로 희석한 후 4°C에서 24시간 방치한 다음 3회 세척하고 3%(wt/vol) BSA-PBS를 주입하고 2시간 동안 블로킹하였다. 혈청은 IgG를 측정하기 위해서 gelatin 완충액을 이용하여 1 : 100으로 희석하였고, IgE를 측정하기 위해서 1 : 10으로 희석하였다. 혈청과 rSj26 항원은 4°C 상태에서 12시간 이상 방치한 후

0.05% gelatin 용액에 biotin-conjugated monoclonal rat anti-mouse IgE MoAb 또는 rat anti-mouse IgG MoAb을 주입하고 실온에서 1시간 동안 방치했다. 그 후 Avidin-alkaline phosphatase (1 : 1,000)를 주입하고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 6회 세척하여 phosphatase 기질인 p-nitrophenylphosphate, disodium을 첨가하고 발색시켜 405 nm에서 microplate reader(Molecular Devices)로 흡광도를 측정하였다.

## 7. T 세포 증식 측정

비장세포는 rSj26 항원으로 면역시킨 후 3주 후에 비장으로부터 얻었다. 단일 세포 부유액은 유리섬유관을 통과시키고 PBS로 2회 원심 세척한 후 세포 증식 실험에 사용하였다. 세포는 streptomycin(100 µg/mL), penicillin(100 U/mL), glutamine(5 mM)과 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지에 부유시키고 well 당  $1 \times 10^5$  세포의 농도로 flat-bottom 96well 배양 plate에 옮겨 48시간 배양 한 후에 1 µCi of [<sup>3</sup>H] TdR,를 주입하고 다시 24시간 배양한 다음 세포 수확기로 세포를 얻었다.

Thymidine incorporation은 liquid scintillation counter(Beckman)로 측정하였다.

## 8. 사이토카인 및 PGE<sub>2</sub> 측정

혈청의 사이토카인과 PGE<sub>2</sub>는 ELISA법으로 측정하였다. TNF-α, IL-1β, IL-4, IL-5, IL-13, IFN-γ와 PGE<sub>2</sub>량은 각 immunoassay kit에 제시한 R&D사의 방법에 준하여 측정하였다.

## 9. 통계처리

모든 실험 값은 평균±표준오차로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 한계는  $P < 0.05$ 로 정하였다.

# 결 과

## 1. rSj26 항원 면역에 의한 혈청내 IgE와 IgGs의 변화

약물을 투여하기 전 AD 모델을 만들기 위해서 BALB/c계 마우스를 대상으로 rSj26 항원을 면역하였다. 면역 후 4주까지 주별로 꼬리로부터 혈액을

취하여 rSj26 특이 항체를 분석한 결과 Fig. 1과 같이 2주 후에 rSj26에 대한 특이 항체를 발견할 수 있었다. 면역 후 시일이 지날 수록 IgE, IgG1과 IgG2 항체가 크게 증가함을 알 수 있었다. 특히 4주에 항체의 양이 가장 높게 나타났다. 따라서 다음 실험부터는 같은 방법으로 rSj26 항원을 면역함과 동시에 약물을 농도별로 투여하고 약물의 효과를 측정하였다.

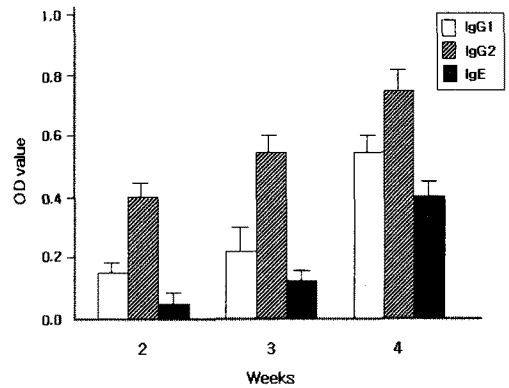


Fig. 1. rSj26-specific antibody production

Mice were immunized with 30 µg of rSj26, and were boosted 3 weeks later. Serum was collected weekly for 4 consecutive week. rSj26-specific antibodies were analysed using an ELISA assay. Serum was diluted 1:100 and 1:10 for IgG and IgE measurement, respectively. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice.

## 2. rSj26 특이 항체 생산에 대한 가감보증억기탕의 효과

rSj26 항원 면역과 동시에 가감보증억기탕을 농도별(100-500 mg/kg, 체중)로 4주 동안 하루에 1회 경구투여하고 혈청으로부터 rSj26 특이 항체를 분석한 결과 Fig. 2와 같다. 약물의 농도가 증가할수록 IgE, IgG1, IgG2의 농도가 현저히 감소됨을 알 수 있었다. 특히 IgE의 경우 500 mg 투여군에서 그 감소의 폭이 가장 뚜렷하였다. 따라서 가감보증억기탕은 rSj26 항원 면역에 의한 아토피성 피부염에서 특이적으로 나타나는 IgE의 생성을 억제하는데 농도 의존적으로 뚜렷한 효과가 있었다.

## 3. Th1 사이토카인의 생성에 미치는 가감보증억기탕의 효과

rSj26 항원 면역과 동시에 약물을 농도별(100-500

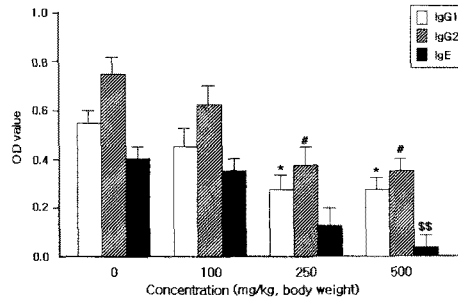


Fig. 2. Effects of Gagambojungkigi-tang(GBT) on rSj26-specific antibody production at 4 weeks

Mice were immunized with 30 µg of rSj26, and were administrated with or without GBT water extract (100-500 mg/kg, body weight) for 4 week. Mice were boosted 3 weeks later. Mice were boosted 21 days after the first immunization. Serum was collected at 4 weeks. rSj26-specific antibodies were analysed using an ELISA assay. Serum was diluted 1:100 and 1:10 for IgG and IgE measurement, respectively. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice. \*, #, \*P<0.05 and \*\*P<0.01 indicate significant differences with GBT untreated control group.

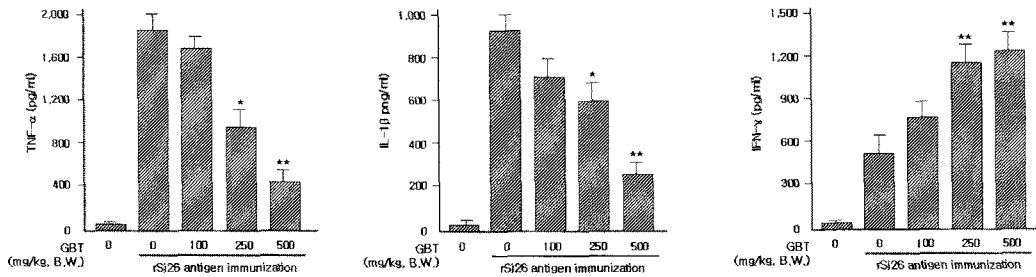


Fig. 3. Effects of Gagambojungkigi-tang (GBT) on TNF-α, IL-1β, and IFN-γ (Th1 cytokines) production in rSj26-immunized atopic dermatitis model mice

Mice were immunized with 30 µg of rSj26, and were administrated with or without GBT water extract (100-500 mg/kg, body weight) for 4 week. Mice were boosted 3 weeks later. Mice were boosted 21 days after the first immunization. Serum was collected at 4 weeks. Th1 cytokines were analysed using an ELISA assay. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice. \*P<0.05 and \*\*P<0.01 indicate significant differences with GBT untreated control group(rSj26-antigen immunization alone).

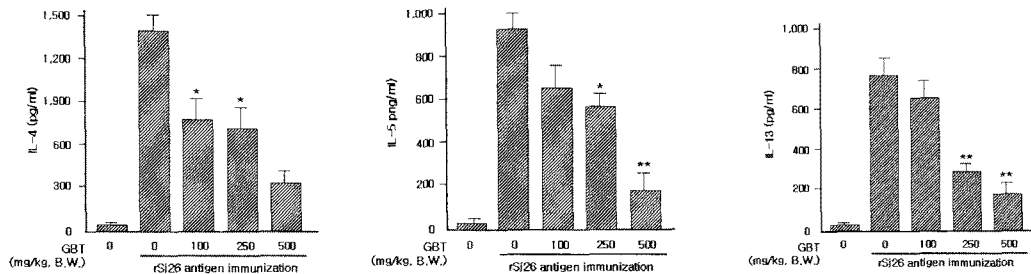


Fig. 4. Effects of Gagambojungkigi-tang (GBT) on IL-4, IL-5, and IL-13 (Th2 cytokines) production in rSj26-immunized atopic dermatitis model mice

Mice were immunized with 30 µg of rSj26, and were administrated with or without GBT water extract (100-500 mg/kg, body weight) for 4 week. Mice were boosted 3 weeks later. Mice were boosted 21 days after the first immunization. Serum was collected at 4 weeks. Th2 cytokines were analysed using an ELISA assay. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice. \*P<0.05 and \*\*P<0.01 indicate significant differences with GBT untreated control group (rSj26-antigen immunization alone).

mg/kg, 체중)로 4주 동안 하루에 1회 경구투여하고 혈청으로부터 Th1 사이토카인의 생성에 미치는 가감보중익기탕의 효과를 조사하였다. Fig. 3과 같이 Th1 사이토카인이면서 pro-inflammatory 사이토카인으로 알려진 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 생성에 미치는 가감보중익기탕의 효과는 농도에 의존적으로 유의하게 감소되었다(P<0.05, P<0.01). 그러나 Th1 사이토카인 중 IFN- $\gamma$ 의 경우 농도에 의존적으로 증가하였고, 250과 500 mg 투여군에서는 그 증가가 뚜렷하였다(P<0.01).

**4. rSj26 면역에 의한 아토피성 피부질환 모델 마우스에서 Th2 사이토카인의 생성에 미치는 가감보중익기탕의 효과**

rSj26 항원 면역과 동시에 약물을 농도별(100-500 mg/kg, 체중)로 4주 동안 하루에 1회 경구투여하고 혈청으로부터 Th2 사이토카인의 생성에 미치는 가감보중익기탕의 효과를 조사하였다. Fig. 4와 같이 Th2 사이토카인으로 알려진 IL-4, IL-5와 IL-13의 생성에 미치는 가감보중익기탕의 효과는 농도에 의존적으로 모두 유의하게 감소되었다(P<0.05, P<0.01).

**5. rSj26 면역에 의한 아토피성 피부질환 모델 마우스에서 PGE2 생성에 미치는 가감보중익기탕의 효과**

rSj26 항원 면역과 동시에 약물을 농도별 (100-500mg/kg, 체중)로 4주 동안 하루에 1회 경구투여하

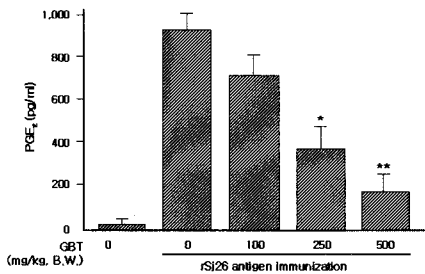


Fig. 5. Effects of Gagambojungki-tang(GBT) on the splenocyte proliferation in rSj26-immunized atopic dermatitis model mice

Mice were immunized with 30  $\mu$ g of rSj26, and were administrated with or without GBT water extract (100-500 mg/kg, body weight) for 4 week. Mice were boosted 3 weeks later. Mice were boosted 21 days after the first immunization. Serum was collected at 4 weeks. PGE2 was analysed using an ELISA assay. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. from 5 mice. \*P<0.05 and \*\*P<0.01 indicate significant differences with GBT untreated control group(rSj26-antigen immunization alone).

고 혈청으로부터 강력한 염증 매개물질로 알려진 PGE2의 생성에 미치는 가감보중익기탕의 효과를 조사하였다. Fig. 5와 같이 가감보중익기탕 농도에 의존적으로 유의하게 감소되었다(200 mg/kg=P<0.05, 500 mg/kg=P<0.01). 따라서 가감보중익기탕은 rSj26 항원 면역에 의한 AD 모델동물에서 강력한 염증매개 물질인 PGE2를 효과적으로 감소시키는 효과가 있었다.

**6. rSj26 면역에 의한 아토피성 피부질환 모델 마우스의 비장세포 증식에 미치는 가감보중익기탕의 효과**

rSj26 항원 면역과 동시에 약물을 농도별(100-500 mg/kg, 체중)로 4주 동안 하루에 1회 경구투여한 후 후경골탈추법으로 즉시 시킨 후 비장세포를 분리하여 세포증식에 미치는 가감보중익기탕의 효과를 조사하였다. 그 결과 Fig. 6과 같이 가감보중익기탕 농도에 의존적으로 유의하게 세포증식능이 감소되었다(200 mg/kg=P<0.05, 500 mg/kg=P<0.01).

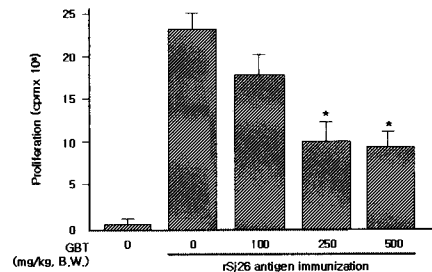


Fig. 6. Effects of Gagambojungki-tang(GBT) on the splenocyte proliferation in rSj26-immunized atopic dermatitis model mice

Mice were immunized with 30  $\mu$ g of rSj26, and were administrated with or without GBT water extract (100-500 mg/kg, body weight) for 4 week. Spleens were obtained from rSj26-immunized and control mice. Single cell populations were prepared by passing tissue through glass wool. Cells (1  $\times$  10<sup>5</sup>/well) were cultured in 96-well, flat-bottom, tissue-culture plate for 3 days. During the last 24 h of culture, cells were pulsed with 1  $\mu$ Ci of [<sup>3</sup>H] TdR, and then thymidine incorporation was measured in a liquid scintillation counter. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. from 5 mice. \*P<0.05 and \*\*P<0.01 indicate significant differences with GBT untreated control group(rSj26-antigen immunization alone).

**7. 화학항원 유도 피부상처 치료에 미치는 가감보중익기탕의 효과**

Hsu 등<sup>11)</sup>에 의해 확립된 아토피성 피부염 모델은 인간의 AD 환자에서 발견되는 면역학적 특징과 매

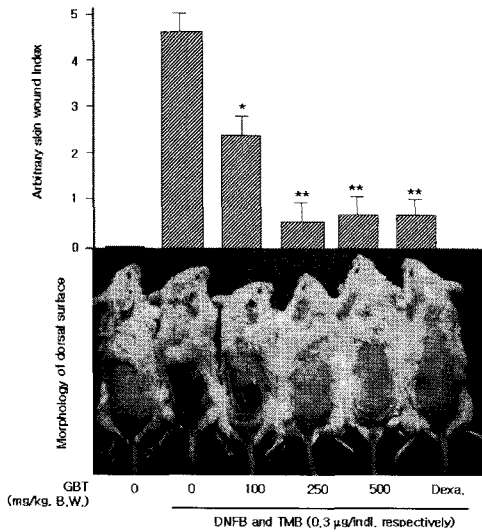


Fig. 7. Effects of Gagambojunggi-tang(GBT) on wound healing in the Chemical-induced skin disease model mice

Mice were administrated and pasted with or without GBT water extract(100-500 mg/kg, body weight) for 10days week. Arbitrary skin wound index was analysed using an digital camera photographs. Each column represents the mean±S.D. from 5mice. \*P<0.05 and \*\*P<0.01 indicate significant differences with GBT untreated control group (DNFB and TMA).

우 유사한 것으로 보고되었다. 그러나 AD 환자에 나타나는 피부조직에는 변화가 있으나 외적인 피부병변은 나타나지 않는 것으로 알려졌다. 그러므로 본 연구에서는 이러한 단점을 극복하기 위해서 DNFB와 TMA로 피부병변을 유도하여 가감보중익기탕을 10일간 1회씩 약물의 농도별로 경구투여하고 약물 크림도 하루에 1회씩 도포한 후 피부병변 치료효과를 조사하였다. 그 결과 Fig. 7과 같이 DNFB와 TMA로 유발된 피부질환은 skin wound index가 4이상으로 종창, 농포, 구진 및 결절 상태가 유도된 반면, 가감보중익기탕을 투여하고 도포한 실험군에서는 피부병변 치료에 매우 효과적이었다. 특히 250과 500 mg/kg 투여군에서는 피부병변 치료에 효과적인 것으로 알려진 dexamethasone과 유사한 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

## 고찰

보중익기탕은 한국, 중국, 일본을 비롯한 동양권에서 중기하함(中氣下陷)의 병리 및 비위질환(脾胃疾患)에 광범위하게 활용되어 왔는데, 특히 심신평로, 위하

수, 자궁출혈, 탈항, 만성장염, 폐결핵, 늑막염을 비롯한 암 등 치료에 사용해왔다<sup>13-17)</sup>. 보중익기탕은 항염<sup>18)</sup>, 면역 및 항알레르기<sup>19)</sup>, 항스트레스<sup>20)</sup>, 허약증 개선, 근육홍분<sup>21,22)</sup>, 및 항관절염<sup>23)</sup> 등 다양한 효과가 있는 것으로 보고되었다. 전 연구에서 저자들도 보중익기탕 구성약물의 가용성 추출물을 활용하여 RAW 264.7 대식세포에서 분비되는 염증 매개물질의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 염증 매개물질을 효과적으로 억제하는 효과를 보고하였다<sup>10,24)</sup>. 또한 전 연구에서 저자들은 보중익기탕의 효과를 극대화하기 위하여 승마와 시호 대신에 염증매개물 억제에 효과가 있는 것으로 알려진 한인진(*Artemisia iuxayomogi* Herba)과 황금(*Scutellaria baicalensis*)을 첨가하여 가용성 추출물을 얻고 관절염 모델동물에서 가감보중익기탕의 효능을 보고한 바 있다<sup>24)</sup>. 그러나 AD에 대한 가감보중익기탕의 효능은 알려진 바 없다. 따라서 본 연구는 가감보중익기탕이 AD에 대한 효능을 검증하기 위해서 먼저 Hsu 등<sup>11)</sup>의 방법에 준하여 rSJ26 항원을 면역하고 AD에서 가장 특징적으로 나타나는 혈청내 rSJ26 특이 항체를 분석하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 혈청에 IgE가 면역한 후 2주부터 검출되었고 4주째 그 양이 현저히 증가됨을 확인한 후 AD의 세포면역학적 특징과 피부병변에 대한 치료효과를 조사한 결과 매우 흥미로운 자료를 얻었다.

rSJ26 항원 면역과 동시에 가감보중익기탕을 농도별(100-500mg/kg, 체중)로 4주 동안 하루에 1회 경구투여하고 혈청으로부터 AD에 특징적으로 검출되는 IgE, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-13 및 PGE2 등이 약물의 농도가 증가될수록 억제 효과가 뚜렷하였다(Fig. 2-5). 그러나 Th1 사이토카인으로 알려진 IFN- $\gamma$ 는 가감보중익기탕 약물 농도가 높을수록 생산량이 증가하는 효과를 보였다(Fig. 3). IL-4는 Th2 사이토카인으로 B 세포에서 IgE의 생성에 결정적으로 역할을 하는 것으로 알려졌다<sup>1-5)</sup>. IL-5는 호산구의 활성화에 중요한 영향을 미치는 사이토카인으로 알려져 있고, IL-13은 IFN- $\gamma$ 의 생산을 억제하는 사이토카인으로 보고되었다. 또한 IFN- $\gamma$ 는 AD 환자의 혈청에 현저히 적은양이 검출되는 것으로 보고되었으며, 외부에서 IFN- $\gamma$ 의 투입은 AD를 완화하는데 활용되는 것으로 보고되었다. 따라서 rSJ26 항원 면역에 의한 아토피성 피부염 모델동물에서 가감보중익기탕 투여에 의해 이들 Th2 사이토카인을 현저하게 줄일 수 있는 효과는 이 약물이 AD 치료에 유용하게 활용될 수 있는 근거가 될 것으로 사료된다.

AD는 여러 가지 경로를 거쳐 면역 및 염증 반응

을 활성화 하는 복잡한 특징을 나타내는 피부질환으로 감수성을 가지는 유전자사이의 복잡한 상호작용, 환자의 환경, 피부장벽기능의 결함, 전신적 또는 국부적으로 면역반응을 야기하는 것으로 알려지고 있다.<sup>1,5,25)</sup> 이러한 AD는 IgE의 매개 유무에 따라 외인성 또는 내인성 형태로 분류할 수 있으며, 호산구증가증(eosinophilia)과 밀접한 관련이 있다<sup>21)</sup>. 외인성 AD는 AD에서 피부 호밍 수용체(skin homing receptor)를 발현하는 memory T세포와 피부 림프구 관련 항원(cutaneous lymphocyte-associated antigen, CLA)은 Th2 사이토카인을 과잉생산하는데, IL-5뿐만 아니라 IgE 생산에 isotype switching을 유도하는 것으로 알려진 IL-4와 IL-13의 생산을 촉진하여 호산구의 발달 및 생존에 영양을 주는 것으로 보고되었으며, CLA<sup>+</sup> T세포는 Th2세포의 기능을 억제하여 IFN- $\gamma$ 을 비정상적으로 매우 적게 생산하는 것으로 알려졌다. 따라서 본 연구결과로 볼 때 가감보중의기탕은 AD에 특징적으로 나타나는 분자들을 조절할 수 있는 효능이 있었다.

아토피성 피부질환은 면역질환으로 경피 수분 손실량(transdermal water loss)의 증가, 각질층의 수분량감소, 피부표면의 pH의 변화, 피부내 지질함량의 감소 등의 특징으로 환경적, 유전적, 면역학적 이상이 복합되어 발생하지만, T세포의 결함이 가장 핵심적인 발병원인인 것으로 알려졌다<sup>1-3)</sup>. 그러므로 본 연구는 rSj26 항원 면역과 동시에 약물을 농도별(100-500mg/kg, 체중)로 4주 동안 하루에 1회 경구 투여한 후 T세포증식에 미치는 가감보중의기탕의 효과를 조사하였다. 그 결과 Fig. 6과 같이 가감보중의기탕 농도에 의존적으로 유의하게 T세포의 증식이 감소되었다. 이러한 결과 가감보중의기탕은 AD 모델동물에서 T세포의 분화와 증식에 영향을 미치는 효과가 있음을 시사해주고 있다.

한편 Hsu 등<sup>11)</sup>에 의해 확립된 아토피성 피부염 모델은 인간의 AD 환자에서 발견되는 면역학적 특징과 매우 유사한 것으로 보고되었다. 그러나 AD 환자에 나타나는 피부조직에는 변화가 있으나 외적인 피부병변은 나타나지 않는 것으로 알려졌다. 최근 Hopkins 등<sup>12)</sup>은 사이토카인의 편향적 생산에 관련하여 화학 알러젠에 의한 세포 내외 단백질의 선택적 합텐화(haptenation) 연구 논문에서 INF- $\gamma$ 의 생산과 관련 있는 제1형 화학 알러젠과 IL-4, IL-4, IL-10, IL-13의 생산과 관련 있는 제2형 화학 알러젠을 구분하여 소개하고 그 기전을 설명하였다. 그러므로 본 연구에서는 이러한 단점을 극복하기 위해서

DNFB와 TMA를 혼용하여 피부병변을 유도한 후 가감보중의기탕을 농도별로 10일 동안 1회 경구 투여와 피부에 도포하면서 약물의 효과를 조사한 결과 Fig. 7과 같이 DNFB와 TMA로 유발된 피부질환은 skin wound index가 4이상으로 중창, 농포, 구진 및 결절 상태가 유도된 반면, 가감보중의기탕을 투여하고 도포한 실험군에서는 피부병변 치료에 매우 효과적이었다. 특히 250과 500mg/kg 투여군에서는 피부병변 치료에 효과적인 것으로 알려진 dexamethasone과 유사한 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 앞으로 이러한 보중의기탕의 상처치료효과에 대한 기전연구가 필요할 것이다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 가감보중의기탕은 rSj26 항원 면역으로 AD 모델 마우스 혈청에서 IgE, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-13 및 PGE2를 효과적으로 억제하였으며, Th1 사이토카인으로 알지코 아토피 치료에 유용하게 활용할 수 있는 IFN- $\gamma$ 를 유도하는데 효과가 있었다. 더불어 가감보중의기탕은 DNFB와 TMA로 유발된 피부병변에 대한 상처 치료에 매우 좋은 효과가 있었다. 따라서 AD 치료에 대한 가감보중의기탕의 약물기전을 밝힌다면, AD 환자에 적용할 수 있을 것이라 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 전주대학교 2008년도 교비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고논문

1. Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 ; 112(6 Suppl) : S118-127.
2. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet.* 2003 ; 361(9352) : 151-160.
3. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2004 ; 113(5) : 651-657.
4. Mohrenschlager M, Darsow U, Schnopp C, Ring J. Atopic eczema: what's new? *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2006 ; 20(5) : 503-513.
5. Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol.*



2003 ; 112(2) : 252-262.

6. Novak, N, and Bieber, T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003 ; 112 : 252-262.

7. Schultz-Larsen F, Hanifin JM. Epidemiology of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2002 ; 22 : 1-24.

8. Ring J. Perspectives of atopic eczema in the third millennium. *Curr Probl Dermatol.* 1999 ; 28 : 194-204.

9. 이병주, 김동희, 이효정, 김성훈. 加味補中益氣湯의 항암활성 및 항전이효과에 관한 연구. *동의생리병리학회지.* 2003 ; 17 : 765-770.

10. 장선일, 김형진, 김용준, 배현옥, 정헌택, 정옥삼, 김운철, 윤용갑. 가감보중익기탕의 LPS 유도 염증성 매개물질에 대한 억제 효과. 2003 ; 17 : 804-809.

11. Hsu CH, Chua KY, Huang SK, Chiang IP, Hsieh KH. Glutathione S-transferase induces murine dermatitis that resembles human allergic dermatitis. *Adv Exp Med Biol.* 1996 ; 409 : 33-37.

12. Hopkins JE, Naisbitt DJ, Kitteringham NR, Deaman RJ, Kimber I, Park BK. Selective haptenation of cellular or extracellular protein by chemical allergens: association with cytokine polarization. *Chem Res Toxicol.* 2005 ; 18(2) : 375-381.

13. 李東垣. 東垣醫集-內外傷辨惑論. 北京 : 人民衛生出版社. 1993 : 18.

14. 李東垣. 東垣醫集-脾胃論. 北京 : 人民衛生出版社. 1993 : 81.

15. 韓醫科大學方劑學教授. 方劑學. 서울 : 永林社. 1990 : 279-282, .

16. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 1998 : 299-318.

17. 裘沛然. 中醫歷代名方集成. 上海 : 上海辭書出版社. 1994 : 16-20.

18. 金秀鎭. 補中益氣湯 및 少陰人 補中益氣湯이 S-180에 대한 항종양효과와 Cyclophospamide에 의한 부작용에 미치는 영향. 대전대학교대학원 석사학위논문. 1993.

19. 李承龍. 補中益氣湯 및 補中益氣湯 加味方이 흰쥐의 알레르기 천식에 미치는 영향. 東義大學校大學院 博士學位論文. 1999.

20. 金泰燁. 補中益氣湯의 항스트레스효과에 대한 실험적 연구. 경희대학교대학원 석사학위논문. 1990.

21. 安光武. 少陰人 補中益氣湯과 後世方 補中益氣湯이 陽虛病證에 미치는 影響. 경희대학교대학원 석사학위논문. 1995.

22. 尹用甲. 補中益氣湯 및 加減方이 家兔의 적출자궁, 장 및 혈관운동에 미치는 영향. 圓光大學校大學院 博士學位論文. 1988.

23. Miyasaka N, and Hirata Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci.* 1997 ; 61, 2073-2081.

24. 장선일, 김형진, 김용준, 배현옥, 정헌택, 윤용갑, 정옥삼, 김운철. 加減補中益氣湯의 lipopolysaccharide와 interferon- $\gamma$ 에 의해 유도되는 염증성 매개물에 대한 억제 효과. *대한한의학방제학회지.* 2003 ; 11 : 115-128.

25. Nomura I, Gao B, Boguniewicz M, Darst MA, Travers JB, Leung DY. Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 ; 112, 1195-1202.