

葛根解肌湯加味方과 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염에 미치는 영향

황치환·윤채성·송승현·원영호·황충연
원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

Effects of *Galgeunhaegitang-gamibang* Administration along with *Samhwangseze-gamibang* on Atopic Dermatitis of NC/Nga Mice

Chi-Hwan Hwang ·Chae-Sung Yun ·Seung-Hyeon Song ·Young-Ho Weon ·Chung-Yeon Hwang

Objectives : *Galgeunhaegitang-gamibang*(GH) and *Samhwangseze-gamibang*(SG) has been known that they are helpful for treatment of atopic dermatitis clinically, but there is no report about the effect of GH and SG. So, author aimed to investigate the effects of GH and SG on atopic dermatitis of NC/Nga mice.

Methods : NC/Nga mice were divide into three group : normal, control, and experimental group. Atopic dermatitis was induced in the control and experimental group by spreading DNCB. Then GH was orally administered three times in a week for 8 weeks to the experimental group and SG was spreaded two times in a day for 8 weeks to the experimental group, while the control group was given normal saline. We observed changes of clinical skin severity score, serum IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IgM, IgG1, IFN- γ and so on. We used one-way ANOVA test statistically($p < 0.01$).

Results : Clinical skin severities of experiment group in 13 and 16weeks were significantly decreased by 48% and 55% compared to the control group. Serum IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IgM, IgG1 levels of experimental group were significantly decreased compared to the control group. Serum IFN- γ level of the experimental group was significantly increased against control group. mRNA expression levels of IL-4, IL-5, IL-6 and CCR3 in the skin tissues of experimental group were significantly decreased compared to the control group. In contrary, IFN- γ mRNA expression level were increased compared to the control group. Histological observation of the ear and skin tissues showed that the extents of inflammation and infiltrated immune cells in the epidermis and dermis of experimental group were highly deminished compared to the control group. Judging from that IL-1 β , TNF- α , IL-6 expression of gene, the effects of inflammatory cytokine revelation were significantly decreased compared to the control group. In the model inducing COX-2 activity in RAW 264.7 cell, COX-2 activity was significantly inhibited depending on the density of GH compared to the control serum. According to cell multiplication, examination of cell toxicity showed that GH is safe at the density of 10, 50, 100mg/l and even 1000mg/l.

Conclusion : Accordin to the above results, it is considered that GH and SG is effective treatment for the atopic dermatitis.

Key words : Galgeunhaegitang-gamibang, Samhwangseze-gamibang, External treatment, Atopic dermatitis, NC/Nga mice

1. 緒 論

아토피는 알레르기 반응을 일으키게 하는 면역 물질을 쉽게 형성함으로써 천식, 알레르기성 비염, 아토피피부염 등을 잘 일으키는 유전적 경향을 말한다¹⁾.

한의학적으로는 奶癬, 胎癬, 胎敏瘡, 濕疹, 濕瘡, 四彎風, 浸瘡 등의 병명으로 표현되며²⁾ 隋代巢³⁾는 소아의 면부에 癬皮가 甲錯되고 건조하게 되는 것은 乳癬이라 하여 영아습진과 유사한 것으로 보았으며 清代吳⁴⁾는 奶癬을 胎敏瘡이라 하여 乾敏과 濕敏으로 나누어 설명했다.

葛根解肌湯은 1984년 東武李濟馬의 《東醫壽世保元·肝受熱裏熱病》에서 陽明病 目疼 鼻乾 不得臥者 및 陽毒面赤斑 斑如金紋 咽喉痛 唾膿血 등을 치료할 목적으로 입방된 처방⁵⁾으로 龔信의 《古今醫方》에 수록된 葛根解肌湯의 변방이다. 본 실험에서 사용한 葛根解肌湯加味方은 李濟馬의 葛根解肌湯에 清熱解毒하는 蒲公英, 滋陰潤肺하는 麥門冬, 肺熱을 치료하는 桑白皮, 發表散寒·祛風勝濕하는 藁本을 첨가하여 사용하여 피부질환에 응용하고자 하였다.

三黃洗劑加味方을 본 실험에 외용제로 사용하였는데, 三黃洗劑加味方은 外傷科學에서 각종 無滲出性 皮膚炎과 滲出性 皮膚癢痒症에 사용되는 三黃洗劑⁶⁾에 清熱解毒하는 金銀花, 連翹, 馬齒莧을 넣은 外用劑이다.

최근 아토피피부염에 관계된 연구로 金⁷⁾은 아토피피부염의 최신지견, 金⁸⁾은 알레르기 및 면역학적 관점에서의 아토피피부염을, 실험적 연구로는

金 등⁹⁾은 桑葉이 아토피피부염에 미치는 영향, 金¹⁰⁾은 紫草가 아토피피부염에 미치는 영향을 규명한 바가 있다. 李¹¹⁾는 升麻胃風湯에 의한 아토피성 알레르기 반응 억제에 대한 연구를 하였다.

이와 같이 아토피피부염에 대한 다양한 한의학적 접근이 시도되었으나, 葛根解肌湯加味方과 三黃洗劑加味方 병용이 아토피피부염에 미치는 영향에 대한 연구는 접하지 못하였다.

저자는 葛根解肌湯加味方과 三黃洗劑加味方의 병용치료 연구로 NC/Nga mice 병태 모델을 이용, 다양한 면역학적 기전을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 재료

가. 동물

웅성(雄性) 6주령 30g내외의 Balb/c계 mice인 NC/Nga atopic dermatitis model mice(NC/Nga atopic mice)를 중앙실험동물에서 공급받아 실험당일까지 고품사료와 물을 공급하고 실온 22±2℃, 상대습도 50~65%, 조도 200 lux(8시 점등, 20시 소등)를 계속 유지하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

나. 약물

본 실험에 사용한 葛根解肌湯加味方(GH)과 三黃洗劑加味方(SG)의 약제는 원광대학교 광주한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 葛根解肌湯加味方 1첩 및 三黃洗劑加味方의 내용과 구성은 다음과 같다(Table 1, 2).

교신저자: 황충연,
원광대학교 부속광주한방병원 안이비인후피부과학교실
(Tel : 062-670-6434,
E-mail : hwangida@wonkwang.ac.kr)

• 접수 2008/06/11 • 수정 2008/07/21 • 채택 2008/08/04

* 이 연구는 2007년 원광대학교 교비지원으로 이뤄졌습니다.

Table 1. Prescription of GH.

韓藥名 (Herbal Name)	生藥名 (Scientific Name)	用量 (Dose)(g)
蒲公英	<i>Herba Taraxaci</i>	20
葛根	<i>Radix Puerariae</i>	12
升麻	<i>Rhizoma Cimicifugae</i>	8
黃芩	<i>Radix Scutellariae</i>	4
杏仁	<i>Semen Armeniacae Amarum</i>	4
酸棗仁炒	<i>Semen Ziziphi Spinosae</i>	4
桔梗	<i>Radix Platycodi</i>	4
白芷	<i>Radix Angelicae Dhuricae</i>	4
麥門冬	<i>Radix Ophiopogonis</i>	4
桑白皮	<i>Cortex mori Radicis</i>	4
大黃	<i>Rhei Rhizoma</i>	4
藜蘆	<i>Rhizoma Ligustici</i>	4
總量	Total Amount	76

Table 2. Prescription of SG.

韓藥名 (Herbal Name)	生藥名 (Scientific Name)	用量 (Dose)(g)
大黃	<i>Rhei Rhizoma</i>	120
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	120
黃柏	<i>Phellodendri Cortex</i>	120
苦參	<i>Sophorae Radix</i>	120
金銀花	<i>Lonicera japonica Thunb</i>	120
連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	120
馬齒莧	<i>Portulaca oleracea</i>	120
總量	Total Amount	840

2. 방법

1) 시료 제조

葛根解肌湯加味方(GH) 1첩(76g)에 증류수 1L를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 전탕 후 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류 장치로 농축하여 600ml을 얻었다. 이 농축액을 개체당 1 ml(10mg)을 주 3회 경구 투여 하였다.

외치방인 三黃洗劑加味方(SG)은 840g에 증류수 3000ml를 가하여 약한 불로 3시간 전탕한 후, 증류하여 1.5L로 만들어 분무기에 넣어 사용하였다.

2) 약물 투여 및 염증 유발

NC/Nga 실험군은 葛根解肌湯加味方(GH)을 8주간 주 3회(월, 수, 금) 경구투여(250mg/kg) 하였으며, 외용제인 SG는 매일 2회 등부위를 충분히 적실 정도로 분무하였다. NC/Nga 대조군은 생리식염수를 葛根解肌湯加味方(GH)과 같은 용량, 용법으로 경구투여하였으며, 외용제 또한 생리식염수를 실험군과 같은 방법으로 도포하였다.

아토피 피부염은 1-chloro 2,4-dinitrobenzene (DNCB)을 이용하여 유발하였다. 먼저 NC/Nga 마우스의 등부위를 깨끗이 제모한 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 실험 4일 전 1% DNCB용액(acetone:olive oil=3:1) 200μl를 등부위에 도포하고 실험 시작일부터 종료일까지 8주간 일주일에 2번 0.2% DNCB용액 150μl를 등부위에 도포하였다.

3) 피부 손상 정도 측정

NC/Nga 마우스의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하였다. 육안평가 결과는 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타낸다. 평가항목은 홍반, 찰상, 부종과 혈종, 짓무름, 그리고 태선화로 나누어진다. 이 각각의 항목은 없음(0), 약함(1), 중증도(2), 심함(3)으로 나누어서 채점하였다.

4) 혈청내 IgE, IL-4, 5, 6, IFN-γ, IgM, IgG1 정량화

혈청내 IgE와 IL-6의 량은 8주, 10주, 13주, 16주에 생쥐의 눈에서 capillary tube를 이용하여 약 100μl의 혈액을 채혈한 후 원심분리기로 혈청을 분리하여 IgE 량을 ELISA Kit로 측정하였다. 실험에 사용된 16주령의 NC/Nga 생쥐를 ethyl ether로 마취한 후 심장 천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리한 후 혈청 중 IL-4, 5, INF-γ, IgM, IgG1 량을 ELISA kit로 정량하였다.

5) 피부 조직에 대한 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain reaction ; 역전사-중합효소 연쇄반응) 분석

① 피부 조직에서 RNA 분리

NC/Nga 생쥐의 등 부위를 제모한 뒤 피부 조직을 떼어내어 피부 조직(0.1g)과 RNAzolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 13,000rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000rpm에서 원심 분리한 후 70% 에탄올로 수세하고 5분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC로 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 65 $^{\circ}$ C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

② RT-PCR

RT 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 65 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 μ l 10mM dNTPs, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25pmole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20U/ μ l), 1 μ l 100mM DTT, 4.5 μ l 5X RT buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂) 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 원심 침강하여 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 PCR에 사용하였다.

③ cDNA PCR

PCR은 GeneAmp PCR system 2400을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β

-actin, IL-4, IL-5, IL-6, CCR3, IFN- γ 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer (20pmol/ μ l)와 antisense primer (20pmol/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5mM dNTPs, 4 μ l 10xPCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂), 0.18 μ l Taq polymerase (5U/ μ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 40 μ l가 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5분, denaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5분, annealing; 55 $^{\circ}$ C, 1분, elongation; 72 $^{\circ}$ C, 1분을 25cycle한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR product는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

④ 피부 세포내 IL-6 정량

NC/Nga 생쥐의 등 부위를 제모한 뒤 피부 조직을 1g 떼어내어 DMEM 배양액으로 수세하여 미세조각으로 잘게 썬 후 10% FBS-DMEM으로 Petri-dish에서 7일간 배양하였다. 이 후 배양 상층액을 제거하고 다시 10% FBS-DMEM으로 교체하였다. 이를 7일간 배양하여 배양 상층액을 분리한 후 배양액내의 IL-6 분비량을 ELISA kit로 측정하였다.

6) 항염증 실험 및 세포독성 실험

① 독성실험에 대한 L₉₂₉ 세포 배양

생쥐 섬유모세포의 일종인 L₉₂₉ 세포주를 사용하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 100unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DEME) 배지를 사용하며, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂로 조성된 배양기 내에서 배양하며, 배양액은 3일마다 교환하였다. 배양된 세포는 1 \times trypsin-EDTA로 부유시킨 후 0.4% trypan blue로 염색하여 혈구계측기(Hemocytometer)로 세포수를 계산하였다. 세포독성 시험은 배양된 세포를 96 well plate에 5 \times 10³

cell/well이 되도록 세포 부유액을 120 μ 씩 분주하여 배양한 후 실험에 사용하였다.

② 葛根解肌湯加味方の 처리농도 및 시간별 처리 추출한 한약물을 처리 당일 FBS가 첨가되지 않은 DMEM에 희석하여 처리농도별로 사용하였다. 처리농도는 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000mg/l로 처리하고, 처리시간은 24시간으로 실시하였다.

③ MTT 정량

Mosmann (25)의 방법에 따라 배양한 세포주를 각각 5×10^3 cell/ml이 되도록 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 이들 세포를 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000mg/l 농도의 葛根解肌湯加味方(GH)이 포함된 배양액에서 24시간 배양 후 MTT 200 μ /ml가 포함된 배양액을 well 당 200 μ 씩 넣은 후 다시 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 DMSO를 100 μ /well씩을 넣어 5분간 실온에 방치하며 Formazan을 용해한 후 microplate Reader로 흡광동570nm에서 측정하였다.

④ 항염증실험에 대한 RAW 264.7 배양

대식세포주인 RAW 264.7(monocyte)는 Korean Cell Line Bank(KCLB)에서 구입하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 100unit/ml의 penicillin/ streptomycin을 1% 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DEME) 배지를 사용하며, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

⑤ Western Blot of COX-2

RAW 264.7(1×10^6 cell)를 60mm plate에서 배양한 후 LPS(1 μ g/ml)를 처리한 후 葛根解肌湯加味方(GH) 10, 50, 100mg/l 을 24시간 처리하였다. 24시간 처리 후 배양액을 제거하고 세포를 lysis buffer(RIPA buffer)에 protease inhibitors(10 μ g/ml Leupeptin, 1 mM AEBSF, 10 μ g/ml, Aprotinin, 10 μ g/ml Pepstatin A)와 phosphatase inhibitor(Na₃VO₄)

처리하고, cell scraper로 세포를 모은 후, 얼음에서 30분간 반응 후, 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm에서 원심분리하여, 상층액을 따서 BCA 방법으로 단백질 정량을 하였다. 10% SDS-PAGE gel에 각 샘플 30 μ g의 단백질을 전기영동하였다. 전기영동 후 NC membrane에 transfer하였다. transfer된 NC membrane에 primary antibody COX-2 (No-160116, Cayman Chem.)로 12시간 incubation하였다. secondary Ab (1:2000)로 2시간 동안 incubation한다. ECL 방법으로 COX-2 band를 detection하였다.

⑥ 역전사중합연쇄반응 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction ; RT-PCR)

역전사중합연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)은 역전사 kit(promega, Madison USA)와 중합연쇄반응 kit(Pre-mix, 한국생공, 대덕)를 이용하여 실시하였다. 즉 rapid guanidium isothiocyanate 방법으로 마우스 대식세포주로부터 추출한 0.5 μ g의 total RNA를 역전사반응액 (0.1 μ g; oligo (dT)₁₅, reverse transcription buffer, 5mM MgCl₂, 1mM dNTP mixture, 10unit; rRNase ribonuclease inhibitor, 10 units; AMV reverse transcriptase) 과 혼합하여 42 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA 1 μ (0.01 μ g), cytokine 혹은 β -actin primers 각각 1 μ (25pg), 그리고 중합연쇄반응액 (Premix, 한국생공, 대덕; 1unit; thermostable DNA polymerase, 0.25mM dNTP, 50mM Tris-HCl (pH 9.0), 40mM KCl, 1.5mM MgCl₂) 17 μ 을 혼합한 후 Perkin elmer (GeneAmp PCR system 2400)를 이용하여 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 62 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 30회 반복 실시하여 증폭된 cDNA는 1.2% agarose gel에서 전기영동하였다. Cytokine의 mRNA/ β -actin mRNA 양은 ethidium bromide 로 염색한 band density를 Fluor-STM Imager

(Bio-Rad, Munchen, Germany)로 측정하여 정량하였다.

7) 조직 병리 검사

실험 종료 후에, 왼쪽 귀 끝부분과 등쪽 피부를 떼어 내어 10% paraformaldehyde에서 24시간 동안 포르말린에 고정하였다. 24시간 후 30%, 50%, 70%, 90%, 95%, 100% ethanol에 차례로 조직을 담아서 탈수를 하였다. xylene 처리 후 파라핀에 조직을 담아서 24시간 동안 52°C incubater에 보관하여 잔여 xylene이 모두 증발하도록 하였다. 조직을 임베딩 틀에 고정하여 파라핀이 충분히 굳은 후에 조직을 5µm로 절편하여 슬라이드 글라스에 붙여서 37°C에서 24시간 동안 두어 조직이 슬라이드 글라스에 완전히 접착되도록 하였다. 슬라이드 글라스를 xylene에 담귀 파라핀을 녹인 후, ethanol로 재수화시켜 hematoxylin-eosin(H&E) 염색을 실시하였다.

8) 통계학적 분석

통계학적 유의성 검정은 one-way ANOVA (Analysis of Variance) 방법을 사용하였으며, 유의 수준 p (0.01) 의 범위내에서 그 결과들은 평균에 대한 표준 편차로 나타내었다.

III. 實驗結果

1. 피부 손상 정도에 미치는 영향

葛根解肌湯加味方(GH)을 경구투여하고, 三黃洗劑加味方(SG) 분무를 8주령부터 실시하여 NC/Nga mice의 피부손상정도를 관찰한 결과, NC/Nga 생쥐가 자연적으로 피부염으로 유발된 conventional 조건에서는 10주 이후 피부 발진이 유발되었고, 실험기간 동안에 실험군은 대조군에 비하여 피부손상정도가 적은 것을 알 수 있었다(Fig. 1. A).

Conventional 조건에서는 8주부터 16주까지 2, 3, 3주(10, 13, 16주) 간격으로 피부 손상정도를 측정한 결과 대조군은 10주에 4.50 ± 1.20 , 13주에 6.83 ± 1.40 로 급격한 증가를 나타내었으며, 실험 종료 전 16주령은 9.50 ± 1.20 로 나타났다. 이에 반해 실험군은 10주까지는 대조군과 약간 감소한 2.50 ± 0.90 로 관찰되었고, 13주와 16주에는 각각 3.50 ± 1.20 와 4.20 ± 1.10 으로 나타나 대조군에 비하여 현저한 피부손상정도지표(Clinical skin severity score) 감소를 나타냈다(Fig. 1. B).

2. 혈청 중 IgE와 IL-6 발현에 미치는 영향

IgE 생성량은 대조군의 8주와 10주에서 각각 4.40 ± 0.81 , $52.90 \pm 3.54 \text{ng/ml}$ 로 나타났고, 실험군은 각각 3.88 ± 0.42 , $34.62 \pm 4.74 \text{ng/ml}$ 로 나타냈다.

대조군의 13주와 16주에서는 각각 304.04 ± 24.86 , $390.00 \pm 34.12 \text{ng/ml}$ 로 나타났고, 실험군은 각각 106.80 ± 14.36 , $134.00 \pm 15.12 \text{ng/ml}$ 로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있게(p < 0.01) 감소했다(Fig. 2.).

IL-6 수준은 대조군의 8주와 10주에서 각각 79.00 ± 5.05 , $293.20 \pm 17.75 \text{pg/ml}$ 로 나타났고, 실험군은 각각 76.00 ± 6.86 , $148.60 \pm 19.27 \text{pg/ml}$ 로 나타나 12주에 대조군에 비하여 IL-6 수지가 크게 감소되었다.

대조군의 13주와 16주에서 각각 712.40 ± 19.06 , $782.20 \pm 46.93 \text{pg/ml}$ 로 나타났고, 실험군은 각각 242.80 ± 39.33 , $296.40 \pm 42.58 \text{pg/ml}$ 로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있는(p < 0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 2.).

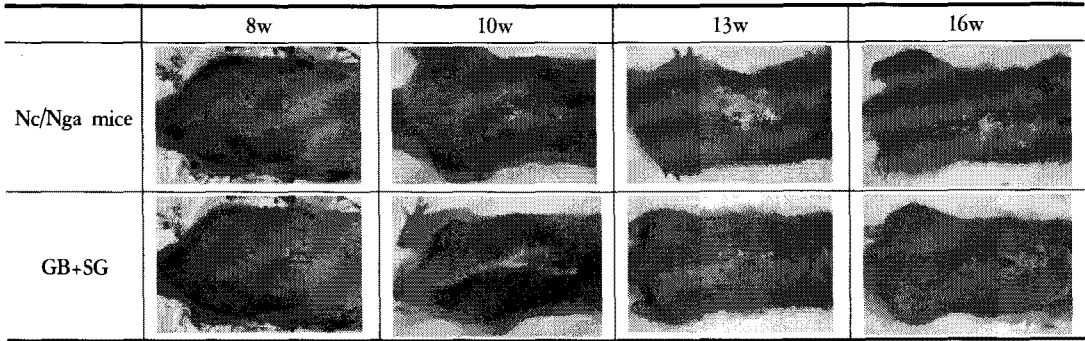


Fig. 1. A. Clinical skin features of dermatitis in NC/Nga atopic mice.

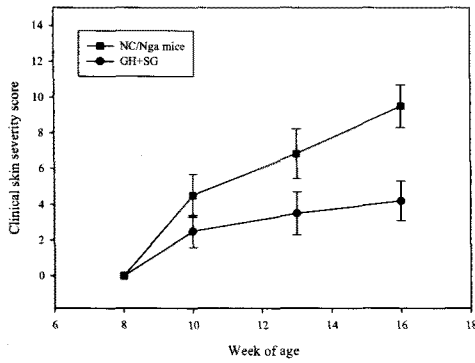


Fig. 1. B. Clinical skin features of dermatitis in NC/Nga mice.

3. 혈청 중 IL-4, IL-5 발현에 미치는 영향

IL-4 수준은 최종 16주령에서 정상군은 $14.20 \pm 1.48 \text{pg/ml}$ 로, 대조군은 $73.00 \pm 4.53 \text{pg/ml}$ 로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였고, 실험군은 $35.00 \pm 4.58 \text{pg/ml}$ 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 3. A).

IL-5 수준은 최종 16주령에서 정상군은 $45.20 \pm 5.45 \text{pg/ml}$, 대조군은 $244.20 \pm 18.47 \text{pg/ml}$ 로 나타난 반면, 실험군은 $131.00 \pm 6.78 \text{pg/ml}$ 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 3. B).

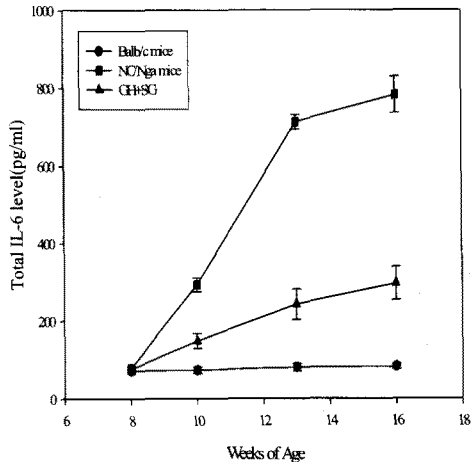
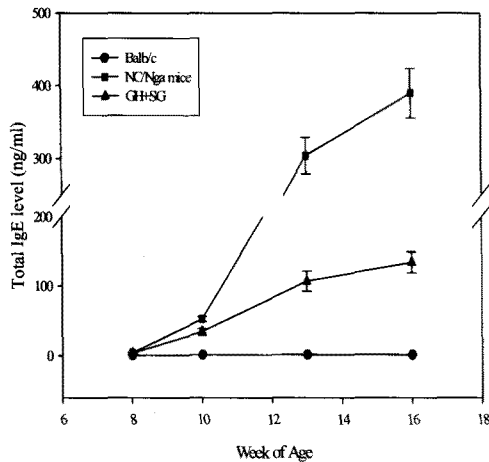


Fig. 2. Serum IgE and IL-6 elevation and development of dermatitis in NC/Nga mice.

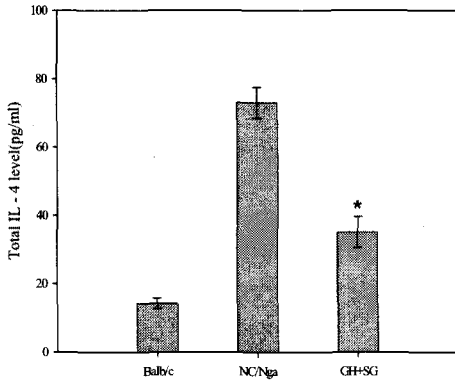


Fig. 3. A. Serum IL-4 elevation and development of dermatitis in NC/Nga mice.

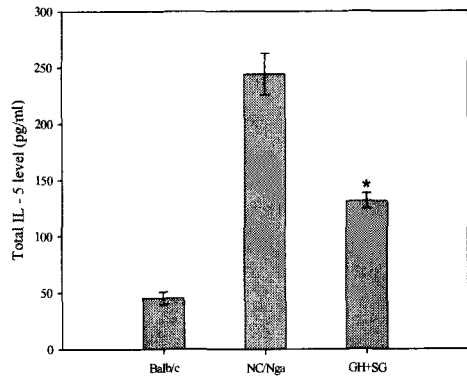


Fig. 3. B. Serum IL-5 elevation and development of dermatitis in NC/Nga mice.

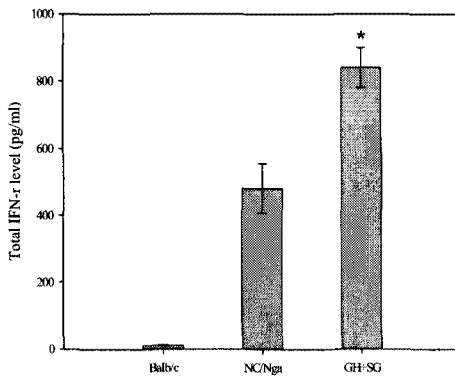


Fig. 4. Serum IFN-γ in NC/Nga mice.

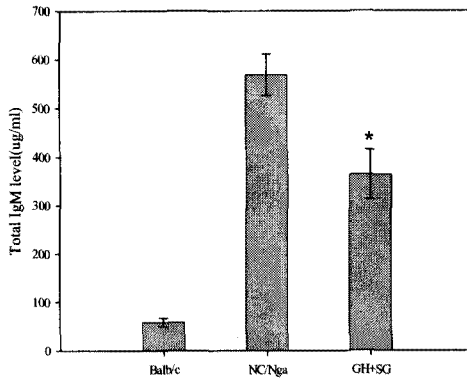


Fig. 5. Immunoglobulin M in NC/Nga mice.

4. 혈청 중 IFN-γ 발현에 미치는 영향

혈청 중 IFN-γ 수준은 최종 16주령 정상군에서는 $11.20 \pm 1.30 \text{ pg/ml}$, 대조군에서 $481.60 \pm 74.28 \text{ pg/ml}$, 실험군에서 $839.80 \pm 59.44 \text{ pg/ml}$ 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.01$) 증가를 나타냈다(Fig. 4).

5. 혈청 중 IgM 발현에 미치는 영향

IgM 수준은 최종 16주령에서 정상군은 $58.40 \pm 8.85 \text{ ug/ml}$, 대조군은 $568.60 \pm 42.82 \text{ ug/ml}$ 로 나타난

반면, 실험군은 $364.20 \pm 50.91 \text{ ug/ml}$ 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 5).

6. 혈청 중 IgG1 발현에 미치는 영향

IgG1 수준은 최종 16주령 정상군에서 $583.60 \pm 38.81 \text{ ug/ml}$ 으로 나타났고, 대조군에서 $3,533.00 \pm 215.62 \text{ ug/ml}$ 로 나타났다. 이에 비해 실험군에서는 $1,873.40 \pm 87.58 \text{ ug/ml}$ 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 6).

7. Dorsal skin lesion에서 IL-4, IL-5, IFN- γ 및 CCR3 발현에 미치는 영향

IL-4 mRNA 발현량(IF)은 정상군이 1 (Index Fold, IF), 대조군이 2.20 (IF)로 나타났으며, 이에 반해 실험군은 1.50 (IF)으로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 7).

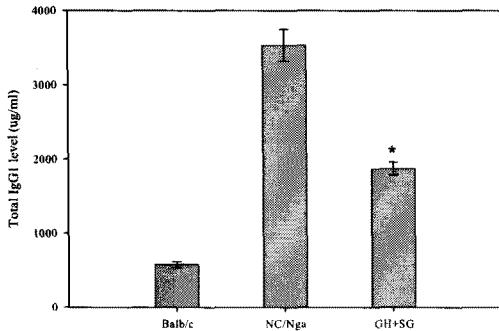


Fig. 6. Immunoglobulin G1 in NC/Nga mice.

IFN- γ mRNA 발현은 정상군이 1 (IF), 대조군이 1.20 (IF)로 나타났고, 실험군이 4.70 (IF)으로 나타나 대조군에 비하여 현저히 증가하였다(Fig. 8).

IL-5 mRNA 발현은 정상군이 1 (IF), 대조군이 1.82 (IF)로 나타났고, 실험군이 1.15 (IF)으로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 9).

Chemokine인 CCR3 mRNA 발현은 정상군이 1 (IF), 대조군이 1.72 (IF)로 나타났고, 실험군이 0.89 (IF)으로 나타나 대조군에 비하여 현저히 감소하였다(Fig. 10).

8. NC/Nga dermatitis skin lesion에서의 IL-6 발현에 미치는 영향

IL-6 수치는 정상군이 $6.66 \pm 0.81 \text{ pg/ml}$, 대조군이 $60.42 \pm 3.8 \text{ pg/ml}$ 로 나타났고, 실험군이 38.56

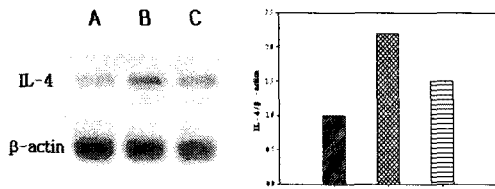


Fig. 7. IL-4 RT-PCR on dorsal biopsy of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Normal group skin (A), Control group skin (B), Experimental group skin (c).

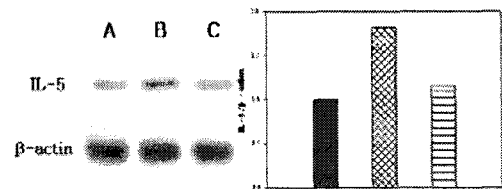


Fig. 9. IL-5 RT-PCR on dorsal biopsy of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Normal group skin (A), Control group skin (B), Experimental group skin (c).

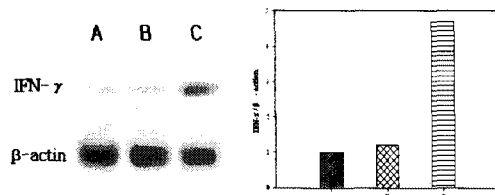


Fig. 8. IFN- γ RT-PCR on dorsal biopsy of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Normal group skin (A), Control group skin (B), Experimental group skin (c).

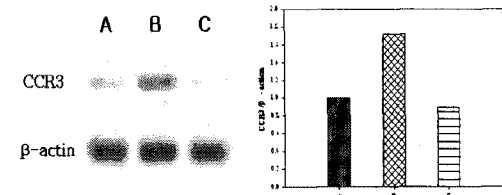


Fig. 10. CCR3 RT-PCR on dorsal biopsy of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Normal group skin (A), Control group skin (B), Experimental group skin (c).

$\pm 6.0\text{pg/ml}$ 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 11).

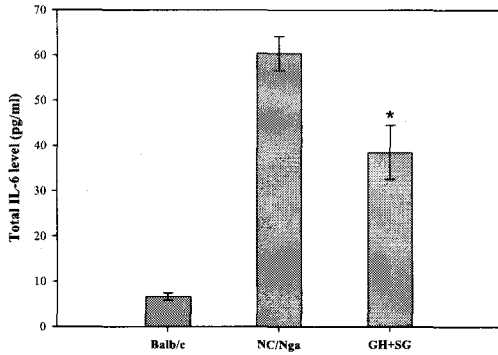


Fig. 11. Culture supernatant IL-6 production in dorsal skin biopsy of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice.

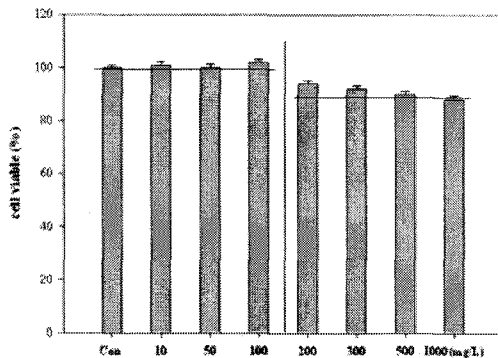


Fig. 12. Cell viability is assessed by the MTT assay for L929 cell line pretreated for 24h with GH. The data are presented as the arithmetic mean percent of the control \pm S.D.

9. MTT 정량에 의한 세포생존률 측정

MTT 정량방법을 이용하여 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000mg/l 농도의 葛根解肌湯加味方을 포함한 배양액에서 L929 세포를 24시간 배양 후 세포생존률을 측정하여 대조군과 비교하였다(Fig.

12). 葛根解肌湯加味方이 10, 50, 100mg/l 농도에서는 세포생존률이 대조군에 비해 변화가 없었으며, 500mg/l 과 1000mg/l 에서는 세포생존률이 대조군에 비해 10, 12%정도 감소하였다. 이는 葛根解肌湯加味方이 L929 세포에 1000mg/l 농도에서도 세포 독성이 나타내지 않는다고 볼 수 있다.

10. RAW 264.7 세포에서 염증성 Cytokine 발현도에 대한 葛根解肌湯加味方 의 효과

염증반응의 중요한 cytokine들인 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 발현도를 분석하기 위해서 마우스 대식세포주 RAW 264.7에 葛根解肌湯加味方을 10, 50, 100mg/l 으로 LPS(0.1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극하기 30분 전에 처리하고 20시간 배양하였다(Fig. 13). 배양 후 RNA를 분리한 후 이를 이용하여 cDNA를 합성하여 LPS에 의해 생성된 cytokine의 측정하기 위해서 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 결과 IL-1 β 은 House keeping gene인 β -actin의 양과 비교 측정시 Table 3. 에서 같이 葛根解肌湯加味方(GH)을 10, 50, 100mg/l 의 처리하였을때 IL-1 β 의 발현량이 LPS에 비해 63.9%, 51%, 47.2%으로 나타나 葛根解肌湯加味方의 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. TNF- α 은 House keeping gene인 β -actin의 양과 비교 측정시 Table 4. 에서 같이 葛根解肌湯加味方(GH)을 10, 50, 100mg/l 의 처리하였을때 TNF- α 의 발현량이 LPS에 비해 86.8%, 77.5%, 69.7%으로 나타나 葛根解肌湯加味方의 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. IL-6은 House keeping gene인 β -actin의 양과 비교 측정시 Table 5. 에서 같이 葛根解肌湯加味方을 10, 50, 100mg/l 의 처리하였을때 IL-6의 발현량이 LPS에 비해 80%, 66%, 56.2%으로 나타나 葛根解肌湯加味方 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다.

Table 3. The Effect of GH against The IL-1 β Gene Expression.

LPS(0.1 μ g/ml)	+	+	+	+
GH mg/l	0	10	50	100
IL-1 β / β -actin(%)	100	63.9	51	47.2

Table 4. The Effect of GH against The TNF- α Gene Expression.

LPS(0.1 μ g/ml)	+	+	+	+
GH mg/l	0	10	50	100
TNF- α / β -actin(%)	100	86.8	77.5	69.7

Table 5. The Effect of GH against The IL-6 Gene Expression.

LPS(0.1 μ g/ml)	+	+	+	+
GH mg/l	0	10	50	100
IL-6/ β -actin(%)	100	80	66	56.2

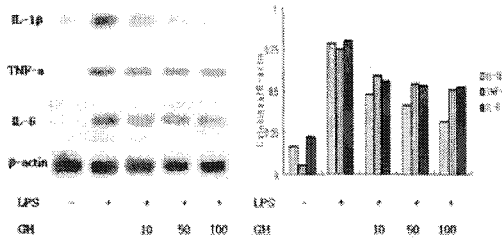


Fig. 13. LPS-induced expression of IL-1 β , TNF- α and IL-6 mRNA is inhibited by GH in RAW 264.7 cells.

11. RAW 264.7 세포에서 COX-2의 발현에 대한 葛根解肌湯加味方の 효과

LPS(1 μ g/ml)를 사용하여 대식세포주인 RAW 264.7(1×10^6 cell)의 COX-2 활성을 유도한 모델에서 葛根解肌湯加味方を 10, 50, 100mg/l 농도로 24시간 처리하여 COX-2 발현 정도를 Western

Blot 수행하여 분석하였다. LPS 단독 처리군에 비해 葛根解肌湯加味方 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. Fig. 14.에서 같이 10, 50mg/l 을 처리한 군에서 35, 45% 정도 발현 억제 효과가 나타남을 확인하였고, 100mg/l 에서는 50%정도의 COX-2 발현 억제 효과가 있는 것으로 나타났다 (Fig. 14).

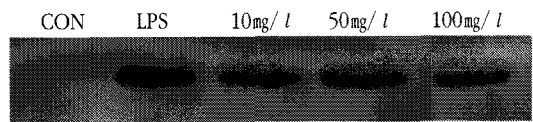


Fig. 14. Effects on COX-2 expression from LPS-induced RAW 264.7 cells(Western blot). The same amount of protein(30 μ g) was loaded in each lane.

12. NC/Nga dermatitis ear & skin lesion의 조직 검사

NC/Nga mice 정상군의 귀 조직에서는 epidermis, dermis, 그리고 cartilage가 뚜렷하게 관찰되었으나, 대조군은 epidermis이 두꺼워져 있고, dermis에는 collagen의 부종이 있고, fibroblast의 증식 및 혈관의 확장이 관찰되었다.

실험군에서는 대조군에 비하여 epidermis와 dermis의 두께가 다소 줄어들었고, epidermis의 keratinization도 심하지 않은 것으로 관찰되었다 (Fig. 15).

NC/Nga mice 정상군의 피부 조직에서는 epidermis, dermis, 그리고 basement membrane 이 관찰되나, 대조군에서는 epidermis가 전반적으로 확장되었으며, dermis의 부종이 심하고 염증세포의 침윤이 관찰되었다.

반면, 실험군은 대조군에 비하여 epidermis의 각화와 dermis의 부종이 심하지 않고, 염증세포의

침윤도 덜 관찰되었다(Fig. 16).

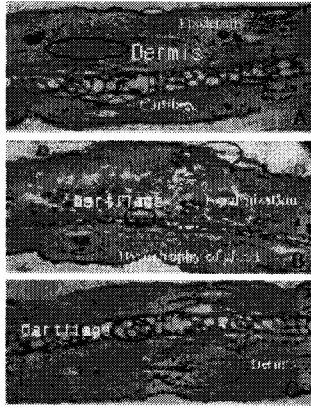


Fig. 15. Histologic features of ear lesion in NC/Nga mice.

- A : ear tissues from normal group.
- B : ear tissues from control group.
- C : ear tissues from experimental group.
- * The optical microscope : 400 magnifications

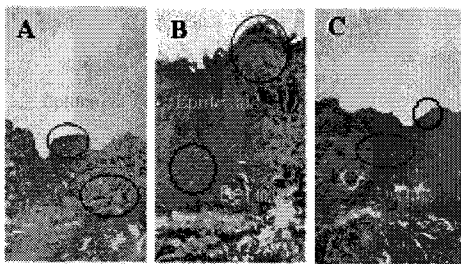


Fig. 16. Histologic features of skin lesion in NC/Nga mice.

- A : skin tissues from normal group.
- B : skin tissues from control group.
- C : skin tissues from experimental group.
- * The optical microscope : 400 magnifications

IV. 考 察

아토피피부염은 만성적으로 재발하는 흔한 습진성 병변으로 가족력 및 특징적인 피부 분포와 소양감을 특징으로 하며, 감염이나 알레르겐, 약제

등 자극원에 대한 면역학적인 과민반응이 기본적인 병태 생리이다¹²⁾.

최근 연구결과에 따르면 10년 전과 비교하여 7세 이상 연령아의 유병률이 증가하였을 뿐만 아니라 중증도 검사에서도 중증 환자의 구성비가 높아졌다^{13,14)}. 그 이유로는 공해 물질에의 노출 증가, 가족 수의 감소 및 감염에의 노출 감소, 애완동물의 증가, 모체의 노령화, 더욱 다양해진 식이 등이 거론되고 있다¹⁵⁾.

아토피피부염의 특징적인 증상은 심한 소양증으로 대부분의 임상 양상은 긁거나 문지른 결과에 의해 발생한다. 소양증은 낮 뿐만 아니라 밤에는 더욱 심하여 수면장애를 일으킨다¹⁶⁾.

한의학에서의 奶癬, 胎癬, 胎敏瘡, 胎敏瘡, 濕疹, 四癩風, 淫瘡 등이 아토피피부염의 범주에 속한다¹⁷⁾.

隋·巢元方の《諸病源候論·小兒雜病諸候·癬候》³⁾에서 “小兒面上癬皮如甲錯起乾燥, 謂之乳癬, 言兒飲乳, 乳汁潰汚兒面, 變生此症”, 《醫宗金鑑》⁴⁾에서 “乾痒白屑濕淫水, 熱極紅暈類火丹, 此證初生頭頂, 或生尾端, 又名, 奶癬. 痒起白屑, 形如疥癬, 由服中血熱, 落草受風 鑽線, 此即乾敏瘡, 有誤用湯火洗皮膚起粟粟 癢痒無度, 黃水津淫, 延及遍身, 即成濕敏瘡.” 이라 하였다. 《瘍醫大全》¹⁸⁾에서 “與兒生後頭面遍身發爲奶癬流脂成片腫臥不安癢痒不絕.” 라고 기술하여 오늘날 아토피피부염의 증상에 대해 자세히 기술하고 있다.

한의학적으로는 風熱, 血熱, 血虛, 脾胃運化機能失調에 의한 胎火濕熱, 風濕熱의 침입 등을 아토피피부염의 원인으로 보고 치료에 임하고 있다^{19,20)}.

최근 아토피피부염에 관계된 연구로 金⁷⁾은 아토피피부염의 최신지견, 金⁸⁾은 알레르기 및 면역학적 관점에서의 아토피피부염을, 尹²¹⁾은 아토피피부염 환자의 한의학적 임상유형분류에 대한 연구를, 李 등²²⁾ 성인 아토피피부염 환자에서 삶의 질

평가의 임상적 유용성을 연구하였다. 실험적 연구로는 金 등⁹⁾은 桑葉이 아토피피부염에 미치는 영향, 金¹⁰⁾은 紫草가 아토피피부염에 미치는 영향을 규명한 바가 있다. 尹 등²³⁾은 加味清心連子湯이 NC/Nga mice의 아토피양 피부염에 미치는 영향을, 李¹¹⁾는 升麻胃風湯에 의한 아토피성 알레르기 반응 억제에 대한 연구를 하였다.

내복약으로 사용된 葛根解肌湯加味方은 李濟馬의 葛根解肌湯에 蒲公英, 麥門冬, 桑白皮, 藁本을 첨가하여 사용하였다. 葛根解肌湯은 1984년 東武 李濟馬의 《東醫壽世保元·肝受熱裏熱病》에서 陽明病 目疼 鼻乾 不得臥者 및 陽毒面赤斑 斑如金紋 咽喉痛 唾膿血 등을 치료할 목적으로 입방된 처방으로 수록된 처방⁵⁾으로 龔信의 《古今醫方》에 수록된 葛根解肌湯의 변방이다.

본 실험에 내복약으로 사용된 葛根解肌湯加味方に 가미한 약제들의 효능과 주치를 살펴보면,

蒲公英은 苦甘寒無毒하여 清熱解毒, 消腫散結, 利濕通淋 등의 효능이 있어 癰腫瘡瘍, 乳癰, 腸癰, 喉痺, 目赤腫痛, 濕熱黃疸, 熱淋 등의 병증을 치료한다.

麥門冬은 甘微苦微寒無毒하고 滋陰潤肺, 益胃生津, 清心除煩, 潤腸 등의 효능이 있어 燥咳, 陰虛勞嗽, 胃陰不足, 內熱消渴, 心煩失眠, 腸燥便秘 등의 병증을 치료한다.

桑白皮는 甘寒無毒하고 瀉肺平喘, 利水消腫 등의 효능이 있어 肺熱咳喘, 面目浮腫, 水腫實證, 腳氣, 小便不利 등의 병증을 치료한다.

藁本은 辛溫無毒하고 發表散寒, 祛風勝濕, 止痛 등의 효능이 있어 外感風寒, 頭痛, 顛頂頭痛, 風濕痺痛, 肢節疼痛 등의 병증을 치료한다²⁴⁾.

葛根解肌湯에 대한 연구로는 우²⁵⁾의 葛根解肌湯이 마우스의 면역반응에 미치는 영향, 이²⁶⁾의 太陰人 葛根解肌湯의 효능에 관한 實驗的 研究, 박²⁷⁾의

葛根解肌湯의 Th1/Th2 사이토카인 조절에 대한 영향, 한 등²⁸⁾의 太陰人 葛根解肌湯이 면역반응 및 NK세포 활성화에 미치는 영향, 박 등²⁹⁾의 太陰人 葛根解肌湯과 元持常의 葛根解肌湯이 면역반응에 미치는 영향 등이 있다.

외용제로 사용된 三黃洗劑는 《外傷科學》에서 각종 無滲出性 皮膚炎과 滲出性 皮膚癢痒症등에 사용되는 처방으로⁶⁾ 大黃, 黃柏, 黃芩, 苦參으로 구성되어 있으며 이후에도 黃水瘡, 赤白遊風, 乳發 등의 병증에 外治藥으로 다용되는 처방이다³⁰⁾. 본 실험에서 사용한 三黃洗劑加味方은 三黃洗劑에 清熱解毒하는 金銀花, 連翹, 馬齒莧을 가미하여 만든 처방이다.

본 실험에 외용제로 사용된 三黃洗劑加味方に 가미한 약제들의 효능과 주치를 살펴보면,

金銀花는 甘寒無毒하고 清熱解毒, 涼血止痢, 散風熱 등의 효능이 있어 外癰內癰, 熱毒瀉痢, 外感風熱, 溫病初期 등의 병증을 치료한다.

連翹는 苦微寒無毒하고 清熱解毒, 消癰散結 등의 효능이 있어 外感風熱, 溫病初期, 外癰內癰, 瘰癧, 痰核, 喉痺 등의 병증을 치료한다.

馬齒莧은 酸寒無毒하고 清熱解毒, 涼血消腫, 通淋 등의 효능이 있어 濕熱瀉痢, 熱毒癰腫, 赤白帶下, 崩漏, 血淋, 熱淋 등의 병증을 치료한다²⁴⁾.

원³¹⁾의 三黃洗劑加味方(三黃洗劑 加 紫草, 五倍子, 明礬, 花椒, 甘草)의 항균, 항염 및 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구 결과에 따르면, 三黃洗劑加味方(三黃洗劑 加 紫草, 五倍子, 明礬, 花椒, 甘草)은 *S. epidermis*, *P. acnes*, *M. furfur*, *S. aureus*에 대해 높은 항균활성을 나타내었고, 히스타민 분비량을 농도의존적으로 감소시켰다.

아토피피부염의 병리기전은 비만세포의 탈과립과 혈중 histamine의 유리, 특히 최근에는 Th1, Th2세포에서 분비되는 면역조절 cytokine간의 불

균형 및 과도한 IgE 생산을 질환의 핵심기전으로 이해하는 바탕에서 이루어지고 있다^{32,33}.

그 중 CD4+T세포의 역할이 중요한 것으로 알려져 있다. CD4+T세포는 생성하는 cytokine의 종류에 따라 Th1과 Th2로 분류하고 있다. 급성 아토피피부염 환자의 CD4+T세포는 Th2로 전환된 소견을 보이고 있어서 이때 분비되는 cytokine은 IL-4,5,10,13 및 16의 양이 많고 IFN- γ 는 상대적으로 적게 나타난다. 아토피피부염 환자의 말초혈액 단핵구를 시험관내에서 자극하면 정상인에 비해 IL-4의 생산은 많아지고 IFN- γ 는 덜 생산된다. 이러한 현상으로 아토피피부염 환자의 말초혈액 단핵구를 시험관내에서 배양하였을 때 IgE의 생산이 증가하는 이유를 설명할 수 있을 것이다. 아토피피부염 환자의 말초혈액 내 CLA+(Cutaneous Lymphocytes associated Antigen) T세포에 의한 IL-13도 증가되었다. 이러한 사실로 미루어 일부 T세포는 피부에 진입하기 전에 이미 Th2 cytokine을 생산하도록 예정되어 있는 것으로 생각되고 있다. 그러나 일단 피부에 도달하면 그곳의 환경항원, 세균항원, 상피항원 등의 미세 환경으로 인해 급성 아토피피부염에서는 Th2형의 cytokine이 자가 증폭되어 발생하는 것으로 생각된다.

만성 아토피피부염 병변에 침윤되는 염증세포들은 주로 대식세포, 호산구 같은 속발반응에 관여하는 세포들로 구성되며 이들은 아토피피부염의 급성기에 존재하던 세포들에서 생성된 IL-1과 TNF- α 같은 cytokine의 직접적 영향으로 피부에 침투한 것으로 생각된다. 만성 아토피피부염 병변의 주 cytokine은 IL-4, IL-5, IFN- γ , IL-12, GM-CSF, Chemokine(macrophage infiltration protein-1a, IL-8, eotaxin)등이며, 침윤된 T세포는 Th2 cytokine의 성향이 약해지면서 Th1과 Th2형 cytokine이 함께 존재하게 된다³⁴.

실험동물인 NC/Nga mice는 일반적인 환경에서 사람의 아토피피부염과 매우 유사한 증상인 가려움, 심한 피부염증, 체중 감소를 나타내는 실험동물 모델로 conventional condition에서 12주 이후 혈청 중 IgE 수준이 정상 100배 까지 기록되고 아토피성 피부염의 피부 장해가 동반 된다³⁵. 또한 현재까지 보고된 생쥐 모델 중에는 NC/Nga mice가 가장 많이 연구가 되어있고, 인체 아토피피부염과 가장 유사한 모델로 평가되고 있다³⁶.

본 실험은 葛根解肌湯加味方과 三黃洗劑加味方を 이용하여 in vivo 실험으로 아토피 유발 모델인 NC/Nga mice에 대해 아토피 유발 억제 및 항알레르기 효과를 알아보고, in vitro 실험으로 RAW264.7세포에서 葛根解肌湯加味方の 농도에 따른 염증성 cytokine의 발현도를 분석하였다.

葛根解肌湯加味方(GH)을 8주령부터 주 3회 경구 투여하고, 三黃洗劑加味方(SG) 분무를 8주령부터 일 2회 실시하여 8주부터 16주까지 2, 3, 3주(10, 13, 16주) 간격으로 NC/Nga mice의 피부 손상 정도를 측정하였다. 그 결과 대조군은 10주에 4.50 ± 0.90 , 13주에 6.83 ± 1.40 으로 급격한 증가를 나타내었으며, 실험 종료 전 16 주령은 9.50 ± 1.20 로 나타났다. 이에 반해 실험군은 10주까지는 대조군과 비교하여 약간 감소한 2.50 ± 0.90 로 관찰되었고, 13주와 16주에는 각각 3.50 ± 1.20 와 4.20 ± 1.10 으로 나타나 대조군에 비하여 현저한 피부손상정도지표(Clinical skin severity score) 감소를 나타냈다(Fig. 1. B).

葛根解肌湯加味方과 三黃洗劑加味方を 처리한 NC/Nga mice의 혈액에서 IgE 수치는 13주와 16주에서 대조군에 비하여 약 64.8%와 65.6%의 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타내었고, 혈중 IL-6 수치 역시 대조군에 비하여 16주에서 62.1%의 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 2).

혈중 IL-4 수치 또한 최종 16주령에서 NC/Nga 대조군에 비하여 52%(Fig. 3. A), IL-5 수치는

46.3%(Fig. 3, B)의 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타내었다.

정상인과 과민체질인 사람 사이에는 IgE의 생산에 있어 중요한 차이가 있다. 과민체질인 경우, 특정 항원에 대해 많은 양의 IgE가 생산되는데 비해 정상인에서는 일반적으로 다른 Ig 동종형(isotype), 즉 IgM과 IgG가 생산되며 IgE는 소량으로 생산된다. IgE 및 호산구 매개 면역반응은 Th2세포의 활성화에 의존적이다. 이러한 Th2세포는 IL-4와 IL-5, IL-10 등을 분비하는데 IL-4는 IgE의 생산에 필요하고 B세포가 전환되는 것을 자극하는 주된 cytokine이며, IgE 동종형 전환에 관여하고 호산구의 증가를 촉진한다. 또한 비만세포에 대한 성장인자이며, 본래의 T림프구로부터 Th2세포로의 발달을 증진시키고 Th2세포의 자가분비적 성장인자의 역할을 한다. IL-5는 호산구의 성장과 분화를 자극하고 성숙한 호산구로 하여금 기생충을 죽일 수 있도록 활성화시킨다. IL-6은 B세포 분화의 후기 단계에서 활성화된 B세포의 성장인자로서 작용한다. IL-10은 대식세포에 의한 cytokine(TNF, IL-1, chemokine, IL-12) 생성을 억제하며, T세포 활성화에 있어 대식세포의 부수적 기능을 저해한다³⁷⁾.

이로써 葛根解肌湯加味方이 Th2의 IL-4, IL-5, IL-6의 분비를 감소시키고 IgE의 생산도 줄어드는 것을 확인하였다. NC/Nga dermatitis skin lesion에서의 IL-4는 대조군에 비하여 약 31.8%(Fig. 7), IL-5는 대조군에 비하여 약 36.8%(Fig. 9), IL-6(Fig. 11) 발현도 유의성 있게 ($p < 0.01$) 감소하였다.

이와 더불어 피부 염증 부위에 만성으로 침윤이 일어나는 Th2세포, 호산구, 중성구 및 mast 세포 등에서 발현되는 CCR3 발현 또한 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 10).

본 실험에서 혈청 중 IFN- γ 수준은 대조군에 비하여 약 1.74배로 유의성 있는 ($p < 0.01$) 증가를 나타냈고(Fig. 4.), skin lesion의 발현 결과에서는,

IL-4 발현은 대조군에 비하여 약 31.8%(Fig. 7) 감소, IFN- γ 발현은 NC/Nga 대조군에 비하여 3.9배 증가(Fig. 8)하였다. IFN- γ 는 주된 대식세포 활성화인자이며, Th1에 의해 대식세포가 활성화 되도록 한다. 또한 CD4+T세포에서 Th1으로의 분화를 촉진시키며, Th2로의 증식을 억제한다. 결론적으로는 IgE의존성 호산구반응을 억제하면서, 대식세포염증반응을 증진하는 기능을 한다³⁷⁾.

알레르기는 항체의 기준 표본을 IgM 또는 IgG에서 IgE로 바꾸어주는 Th2 세포가 활성화되면서 시작되는데, 본 실험에서 IgE의 생산과 관련되는 IgM과 B세포 분화 중에 비례적으로 증가되는 IgG1의 면역 글로불린의 변화에서 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내어(Fig. 5, 6) IgE 발현 결과와 부합됨으로써, 葛根解肌湯加味方과 三黃洗劑加味方 병용이 Th2 세포 활성화 억제와 함께 IgE 생산에 관련된 B 세포 분화를 억제하는 작용에 대한 연구 결과를 얻을 수 있었다.

본 연구에서는 LPS($1 \mu\text{g/ml}$)를 사용하여 대식세포주인 RAW 264.7(1×10^6 cell)에서 葛根解肌湯加味方이 염증성 cytokine인 IL-1 β , TNF- α , IL-6 유전자 발현도를 RT-PCR 방법을 이용하여 확인하고자 하였다. IL-1 β , TNF- α , IL-6는 염증을 일으키는 주요한 cytokine으로 보고되고 있으며, 염증반응의 정도를 나타내는 지표로 이용되고 있다³⁸⁾.

葛根解肌湯加味方の 염증성 Cytokine 발현도에 대한 효과(Fig. 14)는 IL-1 β 는 葛根解肌湯加味方을 10, 50, 100mg/l의 처리시 LPS에 비해 63.9%, 51%, 47.2%으로 농도 의존적으로 억제되었으며(Table 3.), TNF- α 에서는 10, 50, 100mg/l의 처리시 LPS에 비해 86.8%, 77.5%, 69.7%으로 나타나 농도 의존적으로 억제되었으며(Table 4.), IL-6에서도 10, 50, 100mg/l의 처리시 LPS에 비해 80%, 66%, 56.2%으로 나타나 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다(Table 5.). 葛根解肌湯加味方이 LPS에 의해 비만세포에서 분비되는 cytokine들을 농도 의존적으로 감소시키는 효과

가 있는 것으로 사료된다.

IL-1 β 의 주된 기능은 자연면역에서의 숙주 염증 반응의 매개자 역할을 한다. IL-1 β 의 농도가 낮은 경우에는 내피세포에 작용하여 응집을 증진시키며 백혈구의 부착을 매개하는 표면분자의 발현을 증가시키고, 단핵구와 내피세포로 하여금 백혈구를 활성화시키는 chemokine을 합성하도록 한다. 다량으로 분비되는 경우, 혈류로 들어가 열을 발생시키고, cachexia를 유발시킨다³⁷⁾.

비만세포에서 분비되는 TNF- α 는 Th1세포의 증식을 억제하고, 비만세포의 탈과립 물질이 아토피피부염의 면역반응이 Th2형 반응으로 기울도록 하는 역할을 하는 것으로 생각되며, 실제로 아토피피부염의 환자의 혈청에는 TNF- α 가 증가되어 있고 이는 혈청의 히스타민 증가와 일치한다고 한다³⁹⁾.

LPS를 사용하여 대식세포주인 RAW264.7세포에서 COX-2의 발현에 대한 葛根解肌湯加味方의 효과도 살펴보았다. 葛根解肌湯加味方을 10, 50, 100mg/l 처리한 군에서는 대조군에 비해 35%, 45%, 50% 정도의 COX-2 발현 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. Cyclooxygenase는 두가지 형이 있는데 세포의 구성성분으로 되어있는 cyclooxygenase-1(COX-1)과 염증 매개 물질에 의해 유도되는 cyclooxygenase-2(COX-2)가 있다. COX-1은 주로 혈관 내피세포, 위 점막 및 신장 등에 존재하면서 위 점막 보호작용이나 신장 혈류를 조절하는 항상성 기능을 가지고 있다. 이에 비하여 COX-2는 염증 매개 물질에 의하여 생성된 후 염증부위에서 염증을 일으키고 유지시키는 작용을 한다⁴⁰⁾. 이로써 葛根解肌湯加味方은 COX-2의 발현을 억제함으로써 염증을 감소시키는 것으로 사료된다.

葛根解肌湯加味方의 세포독성을 검정하기 위해 MTT 정량법⁴¹⁾을 사용하여 측정하였는데, 葛根解肌湯加味方 10, 50, 100mg/l 농도에서는 세포생존률이 대조군에 비해 변화가 없었으며, 500mg/l 과

1000mg/l에서는 세포생존률이 대조군에 비해 10, 12%정도 감소하였다. 이를 통해 葛根解肌湯加味方이 L₉₂₉ 세포에 1000mg/l 농도에서도 세포 독성을 유발하지 않아 아토피치료에 사용함에 있어 안전한 약임을 알 수 있었다.

결과적으로 본 시료가 Th1 세포의 IFN- γ 생성 증가와 더불어 관련 면역세포 활성화를 통해 Th2 세포를 억제함으로써 IL-4, 5 등의 염증 관련 cytokine 생성을 억제하고 이로 인해 IgE 생성 역시 억제됨으로써 조직사진(Fig. 15, Fig. 16)에서 나타난 바와 같은 유의성 있는 결과가 도출된 것으로 사료된다. 이 같은 결과는 기존의 면역학적 작용 기전과 부합됨으로써, 본 시료의 아토피피부염 치료에 있어서 유의성이 인정된다. 임상적으로 내복약과 외용약을 병용하여 아토피피부염을 치료하는 경우가 많지만 이에 대한 연구는 부족하였다. 본 실험은 내복약과 외용약을 동시에 사용하였을 경우의 효과에 대해 알아보았지만, 내복약으로 사용한 葛根解肌湯加味方과 외용약으로 사용된 三黃洗劑加味方의 개별효능을 검증하지 못한 한계점이 있어 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 結 論

葛根解肌湯加味方과 三黃洗劑加味方의 아토피 치료 기전을 규명하고자, NC/Nga mice의 동물 병태 모델을 이용하여 다양한 면역 반응을 관찰하였던 바, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. NC/Nga mice의 피부 손상 정도는 13주와 16주에 실험군이 대조군에 비하여 각각 48%, 55% 감소하였다.
2. NC/Nga mice의 혈중 IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IgM 및 IgG1 수준은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, IFN- γ 수준은 유의성 있게 증가하였다.

3. NC/Nga mice의 피부 조직 배양에서 IL-4, IL-5, CCR3 유전자 발현은 실험군이 대조군에 비하여 현저히 감소하였고, IL-6 발현량은 유의성 있게 감소하였으며, IFN- γ 의 유전자 발현은 실험군이 대조군에 비하여 증가하였다.
4. NC/Nga mice의 귀등 피부 조직 변화에서는 표피와 진피의 염증 정도와 침윤된 염증 면역세포 등은 실험군이 대조군에 비하여 현저하게 감소되었다.
5. RAW 264.7에서 염증성 Cytokine인 IL-1 β , TNF- α , IL-6 유전자의 발현은 실험군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다.
6. RAW 264.7에서 항염증효과를 알아보기 위해 COX-2 활성을 유도한 실험에 의하면 실험군이 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제되었다.
7. 세포독성평가에서 L₉₂₉ 세포생존률은 10, 50, 100mg/l 농도에서 실험군이 대조군에 비해 변화가 없었으며, 1000mg/l 농도에서는 세포생존률이 12% 정도 감소하였다.

감사의 글

본 연구는 2007년 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었음.

參考文獻

1. 에카자와 센로우. 소아 피부과학. 서울:고려의학. 2005:23-30.
2. 조상현. 아토피피부염의 면역기전. 대한피부과학회 학술발표대회집. 2006;58(2):59.
3. 巢元方 編著. 巢氏諸病源候論. 고양:大星文化社. 1992:251-3.
4. 吳謙. 醫宗金鑑(下). 북경:인민위생출판사. 1982:443-4.

5. 김형태. 圖解東醫壽世保元講義. 서울:도서출판 여강. 1999:164.
6. 江克明, 包明蕙. 방제대사전. 서울:의성당. 1991:68.
7. 김정희. 아토피피부염의 최신지견. 소아알레르기 및 호흡기학회지. 2004;14(1):12-23.
8. 김정원. 알레르기 및 면역학적 관점에서의 아토피피부염. 대한피부과학회지. 2003;41(6):687-9.
9. 김기훈, 이진용, 김덕근. 桑葉이 아토피 피부염에 미치는 영향. 경희의학. 2004;20(1):37-45.
10. 김시혜. 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향. 경희대학교 석사학위논문. 2004.
11. 이동규. 升麻胃風湯에 의한 아토피성 알레르기 반응 억제. 원광대학교 석사학위논문. 2003.
12. Hanifin JM. Atopic dermatitis : broadening the perspective. J Am Acad Dermatol. 2004;51:23-4.
13. Shin NL, Kim SH, Cho SY, Whang KK, Hahm JH. The impact of childhood atopic dermatitis on their familier. Korean J Dermatol. 2000:494-9.
14. Finlay AY. Quality of life measurement in dermatology : a practical guide. Br J dermatol. 1997:305-14.
15. Banetson R, Rogers M. Childhood atopic eczema. Br Medicine J. 2002;1379-9.
16. 대한피부과학회. 피부과학(개정4판). 서울:여문각 2001:163.
17. 양재하, 박순달, 공남미. 아토피피부염의 양한방적 고찰. 제한동의학술원논문집. 1999;4(1):416-27.
18. 顧世澄. 瘍醫大全. 서울:태의사. 1961:279.
19. 顧觀光. 實用中醫外科學. 上海科學技術出版社. 1996:145.
20. 趙純修. 中醫皮膚病學. 北京:科學出版社. 1999:

- 110-2.
21. 윤화정. 아토피피부염 환자의 한의학적인 임상 유형분류에 대한 연구. 동의대학교 박사학위논문. 2001.
 22. 이희정, 박창욱, 이주희, 이광훈. 성인 아토피 피부염 환자에서 삶의 질 평가의 임상적 유용성. 대한피부과학회지. 2007;45(2):159-64.
 23. 윤지연, 한재경, 김윤희. 加味清心蓮子湯이 NC/Nga mice의 아토피양 피부염에 미치는 영향. 대전대학교 박사학위논문. 2007.
 24. 신민교. 임상본초학. 서울:영림사. 2000:247, 265,411,417,431,445,720.
 25. 우정순. 葛根解肌湯이 마우스의 면역반응에 미치는 영향. 한의학회지. 1990;11(2):180-201.
 26. 강세영, 윤지원, 김홍준, 심국진, 이성근, 이상관, 이종덕, 성장경. 한탄바이러스 감염증 환자에 대한 葛根解肌湯을 이용한 치험례. 동의생리병리학회지. 2004;18(1):289-93.
 27. 배진석, 김종한, 위통순. 丹毒發에 葛根解肌湯을 사용한 임상증례 2례. 동의병리학회지. 2001;15(4):571-3.
 28. 우정순. 太陰人 葛根解肌湯이 면역반응 및 NK세포 활성도에 미치는 영향. 한의학회지. 1990;11(2):180-201.
 29. 박성식, 고병희, 송일병. 太陰人 葛根解肌湯과 元持常의 葛根解肌湯이 면역반응에 미치는 영향. 사상의학회지. 1997;9(1):315-37.
 30. 楊思澍, 張樹生, 傅景華. 중의임상대전. 서울:의성당. 1993:864,886,900.
 31. 원영호. 三黃洗劑加味方의 항균, 항염 및 항알레르기효과에 대한 실험적 연구. 원광대학교석사학위논문. 2004.
 32. Cooper JD. Atopy dermatitis - Recent trends in pathogenesis and therapy. J Invest Dermatol. 1994;102:128-37.
 33. Mosman TR, Cherwinski HM, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol. 1986;136:2348-57.
 34. 김정원. 알레르기 및 면역학적 관점에서의 아토피피부염. 대한피부과학회지 2003;41(6):687-9.
 35. Masahiro Matsumoyo, Chisei Ra, Keiko Kawamoto, Hiroaki Sato, Atsuko Itakura, Junko Sawanda, Hiroko Ushio, Hajime Suto, Kouichi Mitsuishi, Yosiaki Hikasa, and Hiroshi Matsuda. IgE Hyperproduction Through Enhanced Tyrosine Phosphorylation of Janus Kinase 3 in NC/Nga Mice, a Model for Human Atopic Dermatitis. The Journal of Immunology. 1999;162:1056-63.
 36. 김규한. 아토피피부염의 동물모델. 대한피부과학회 춘계학술대회초록집. 2007;45(1):96.
 37. ABUL K, ABBS. 세포-분자 면역학. 서울:범문사. 1998:302-22.
 38. Baeuerle, P.A. The inducible transcription activator NF- κ B Regulation by distinct subunits. Biochim. Biophys. Acta. 1991:63-70.
 39. 殷熙哲. 피부면역학. 서울:서울대학교출판부. 1999:27-34.
 40. 김경환. 이우주의 약리학 강의(제4판). 서울:의학문화사, 1997:346.
 41. Wei Yang, Daniel Acosta. Cytotoxicity potential of surfactants mixtures evaluated by primary cultures of rabbit corneal epithelial cells. Toxicology letters. 1994:309-18.