

아토피樣 피부염 NC/Nga생쥐에서 加減消毒飲의 투여가 피부염에 미치는 영향

송현지 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

Effects of Kakamsodokum (KKSDU) on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions in NC/Nga Mouse

Song Hyun Jee, Han Jae Kyung, Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dae Jeon University

Objectives

The purpose of this study is to investigate the effect of Kakamsodokum (KKSDU) on atopic dermatitis in an in-vitro experiment using an NC/Nga atopic dermatitis mouse, which has histological and clinical similarities to the condition in humans.

Methods

We evaluated IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-10 mRNA, CD4+/IFN- γ +, and CD4+CD25+foxp3+ in B and T cells of NC/Nga atopic dermatitis mouse by real-time PCR and intracellular staining in vitro.

Results

KKSDU medicines suppressed IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β mRNA and increased IL-10 mRNA in B cells. CD4+/IFN- γ and CD4+CD25+foxp3+ in T cells were increased by KKSDU.

Conclusions

KKSDU on atopic dermatitis might be very effective to the atopic dermatitis treatment.

Key words : Atopic dermatitis, Kakamsodokum, NC/Nga mouse

■투 고 : 2009년 3월 24일, 수 정 : 2009년 4월 15일, 채 택 : 2009년 4월 20일

■교신저자 : 송현지, 대전광역시 서구 삼천동 1137번지 202호

(Tel : 010-2417-8292, E-mail : misshani@hanmail.net)

I. 緒 論

아토피 피부염은 흔히 태열이라고 부르는 유아 습진으로 시작되며, 만성, 재발성 경과를 보이는 만성피부염으로¹⁾, 산업화와 함께 유병률이 높아지고 있는 대표적 질환 중의 하나이다. 현재 전 세계적으로 10~20% 정도의 유병률을 보이며²⁾ 특히 우리나라의 경우, 초등학교 24%, 중학생의 13% 정도가 이환되어 있다고 보고되고 있다³⁾.

韓醫學에서 아토피 피부염은 胎熱, 胎蘚, 浸淫瘡, 胎斂瘡, 奶癬, 濕疹, 四彎風 등의 범주로 보고, 그 원인이 風熱, 濕熱, 血虛風燥, 血熱, 濕熱溫燥 등에 있다하여 淸熱利濕, 祛風止癢, 滋陰養血 등의 치료방법이 주로 사용된다⁴⁾.

加減消毒飲은 《晴崗醫鑑》⁵⁾에 수록된 처방으로, 傷寒溫病과 時令感冒, 瘡疹의 질환에 사용되는 升麻葛根湯⁶⁾에 荊芥, 防風, 薄荷, 牛蒡子, 連翹, 石膏, 黃芩을 가하여⁵⁾ 風熱毒과 濕熱이 表部에 鬱滯되어 나타나는 피부질환을 다스릴 목적으로 作方되었다.

加減消毒飲의 효과에 대한 실험적 연구는 아직 접하지 못했으나 升麻葛根湯의 항균, 항염증, 해열작용 및 항히스타민 효과에 대한 실험적 연구들이 보고되어 있어⁷⁻⁹⁾ 加減消毒飲 또한 항알러지 효과가 있을 것으로 기대된다.

이러한 배경으로 본 연구에서는 加減消毒飲이 아토피樣 피부염에 미치는 영향에 대해 실험적으로 규명하고자 하였다.

먼저 human fibroblast cells (hFCs) 배양 후 KKSDU를 처리하여 세포독성을 확인하였고 *in vitro*에서 NC/Nga 생쥐의 비장세포를 분리하여 알레르기 반응이 유발된 비장 B세포에 KKSDU를 처리한 후 관련 cytokine의 유전자 발현을 real-time PCR을 이용하여 분석하였다. 그리고

IFN- γ 및 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ Treg cell을 비장 CD4⁺ T 세포의 세포내염색을 통해 분석한 결과, 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 시약 및 기기

(1) 시약

시약은 diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, 적혈구 용혈액 (ACK lysis solution), DMEM 배양액, dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), Sulforhodamin B(SRB), 2-isopropanol, sodium dodecyl sulfate(SDS), PMA, ionomycin, FK506, antibiotics는 Sigma사 (USA) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (Logan, USA) 제품을, anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-CCR3-PE, anti-B220-PE, anti-CD8-FITC, anti-B220-FITC, anti-CD49b-FITC, anti-CD40 mAb, rmIL-4, rmIL-10, BD Cytotfix/Cytoperm plus kit, anti-CD3 mAb, anti-foxp3-PE, anti-IFN- γ -PE, anti-CD28 mAb등은 Pharmingen사 (Torreyana, USA) 제품을, CD4⁺ T cell isolation kit와 B cell isolation kit는 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) 제품을, IL-4, IFN- γ , IL-5, IL-13 ELISA kit는 BioSource사 (California, USA) 제품을, IgE, IgG1 ELISA kit는 SHIBAYAGI사 (Shibukawa, Japan) 제품을, anti-mouse CCR3 mAb와 anti-mouse CD4 mAb는 Santa-Cruz사 (California, USA) 제품을,

LSAB kit는 DAKO사 (Glostrup, Denmark) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, USA), deep-freezer (Sanyo, Japan), 자동혈구추정기 (MS9-5, France), Quantitative Real-Time RT-PCR (Applied Biosystems, USA), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, USA), plate shaker (Lab-Line, USA), VarioMACS (Bergisch Gladbach, Germany), FACScalibur (BD, USA) 및 ELISA reader (Molecular Devices, USA) 등을 사용하였다.

2) 동물

수컷 7 주령의 SPF(specific pathogen-free) NC/Nga mouse (15 ~ 20 g)는 Charles River Japan (Yokohama, Japan)사에서 공급받았고, 실험을 위하여 conventional한 조건에서 수컷 NC/Nga 생쥐를 18 주령까지 사육하였다. 동물은 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2 °C, 습도 55±15 %, 12 시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물

(1) 加減消毒飲 조제

본 실험에 사용한 加減消毒飲의 구성은 《晴崗醫鑑》⁵⁾에 준하였으며, 사용한 약재들은 대전대학교 둔산한방병원에서 구입 정선하여 사용하였고, 1 첵의 내용과 분량은 다음과 같다 (Table 1).

(2) 加減消毒飲 추출물 분리

KKSDU 2 첵 분량에 증류수 2,000 ml를 가

Table 1. Composition of Kakamsodokum(KKSDU)

Herbal Name	Scientific Name	Amount (g)
葛 根	Puerariae Radix	8
連 翹	Forsythiae Fructus	6
牛蒡子	Arctii Fructus	4
石 膏	Gypsum Fibrosum	4
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	4
防 風	Saposhnikoviae Radix	4
升 麻	Cimicifugae Rhizoma	4
黃 芩	Scutellariae Radix	4
荊 芥	Schizonepetae Herba	4
薄 荷	Menthae Herba	2
甘 草	Glycyrrhizae Radix	2
Total		46

하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (rotary vaccum evaporator)로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기 (freeze dryer)를 이용하여 완전 건조한 KKSDU 추출물 11.6 g을 냉동 보관 (-84 °C)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포독성 측정

(1) Human fibroblast cells(hFCs) 배양

사람피부조직을 cool D-PBS로 3 회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5 분간 원심분리하고, tube에 DMEM {containing collagenase A (5 mg/ml), DNase type I (0.15 mg/ml), antibiotics (penicillin 10^4 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 μ g/ml)}을 넣고 37 °C CO₂ 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수로 약 2 회 1,500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM -10 % FBS에 1 주일 동안 배양하였다. 1 주일 후 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA로 hFCs 세포를 분리하여 DMEM-5 % FBS 배양액에 10^5 cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

(2) 세포독성 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법¹⁰⁾을 일부 변형하여 실험에 사용하였다. hFCs 세포는 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 1 시간 배양한 후 KKSDU 추출물(최종 농도 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1 mg/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml)을 48 시간 동안 처리하였고 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액으로 2 회 세척하였다. 96 well plate의 각 well에 50 % TCA(trichloroacetic acid) 50 μ l를 가하고 1 시간 동안 4 °C에 방치한 후

증류수로 5 회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB (0.4 %/1 % acetic acid) 용액을 100 μ l/well로 가하고 실온에서 30 분간 염색하였으며 0.1% acetic acid 용액으로 약 45 회 세척한 다음, 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 μ l/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA reader 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) *In vitro* : Splenic T & B cells culture in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse

(1) Spontaneous dermatitis in NC/Nga mouse

Conventional한 상태에서 사육한 18 주령의 NC/Nga 생쥐의 눈에서 capillary 관을 이용하여 100 μ l의 혈액을 채혈하여 이 중 IgE 함량이 50 μ g/ml 이상이고 피부에 발진이 나타난 NC/Nga 생쥐를 선택하여 실험에 사용하였다. 이를 atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐라 하였다.

(2) Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의

비장에서 T 세포와 B 세포의 분리 및 배양
NC/Nga 생쥐의 비장을 적출한 후, 100 mesh 로 분쇄하고 2,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 여기에 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1l of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5 분 동안 처리하여 적혈구를 제거하였다. 그리고 비장세포를 2 %의 FBS가 함유된 PBS (PBS/FBS)에 1×10^8 /ml로 현탁시키고 normal rat serum을 5 % 되게 첨가하여 4 °C에서 15 분간 blocking한 후, T 세포 분리는 biotinylated antibody cocktail for lineage {CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , CD235a (glycophorin A)} (CD4⁺ T Cell Isolation Kit)를 가하였고, B

세포 분리는 biotinylated antibody cocktail for lineage {CD43 (Ly-48), CD4 (L3T4), Ter-119} (B Cell Isolation Kit)를 가하여 각각 4 °C에서 15 분간 반응시켰다. 각각의 세포를 PBS/FBS로 세척하여 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 로 현탁하였고, 20 μl 의 anti-biotin microbeads를 가하여 다시 4 °C에서 15 분간 반응시켰다. 이 세포를 magnetic column (CS column, Milteny Biotech)을 이용하여 PBS로 세척하여 준비해둔 varioMACS에 장치하고, magnetic bead가 표지된 세포를 통과시켰다. PBS로 column을 충분히 세척한 다음 column을 통과한 부유액을 원심분리하여 lineage 음성인 T 세포와 B 세포를 각각 수집하였다.

(3) Quantitative real-time PCR in cultured B cells

① 배양된 비장 B 세포에서 RNA 분리

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장에서 분리한 B 세포를 24 well plate에 1×10^6 세포/well로 분주하여 KKSDU 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하고, 1 시간 후 anti-CD40 mAb (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 rmIL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 500 U/ml)를 6 시간동안 동시 배양하여 B 세포를 자극, 더욱 활성화시킨 후 이를 실험군으로 사용하였다. 그리고 어떠한 처리도 하지 않은 only B cells를 정상군으로 사용하였으며 anti-CD40 mAb (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 rmIL-4 (500 U/ml) 배양만 실시한 군을 대조군 (control, CT)으로, rmIL-10 (recombinant mouse interleukin-10, 50 ng/ml)을 처리하고 anti-CD40 mAb (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 rmIL-4 (500 U/ml)로 자극한 군을 양성대조군 (positive control, PC)으로 사용하였다. 배양 종료 후 배양 상층액을 제거하고 RNAzol^B 500 μl 를 넣어 용해될 때까지 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μl 를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치하고 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μl 의

상층액을 회수하여 2-propanol 200 μl 와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3 분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 μl 의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

② RT-PCR

Reverse transcription 반응은 준비된 total RNA 2 μg 을 DNase I (10 U/ μl) 2 U/tube를 37 °C heating block에서 30 분간 반응한 후 75 °C에서 10 분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μl 10 mM dNTPs mix, 1 μl random sequence hexanucleotides (25 pmole/25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor (20 U/ μl), 1 μl 100 mM DTT, 45 μl 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μl 의 M-MLV RT (200 U/ μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl 가 되도록 하였다. 이 20 μl 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 초간 원심침강시키고 37 °C heating block에서 60 분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 °C에서 5 분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

③ Quantitative real-time RT-PCR

Quantitative real-time RT-PCR은 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다.

사용된 mouse olionucleotid의 염기배열은 다음과 같다 (Table 2).

Table 2. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
GAPDH	Forward	5'-TGAAGCAGGCATCTGAGGG-3'
	Reverse	5'-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG-3'
IL-1 β	Forward	5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG3'
	Reverse	5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'
IL-6	Forward	5'-CCCATGAAGACCTTCACCTC-3'
	Reverse	5'-ACTCTCGGCCTACATTGGTG-3'
TNF- α	Forward	5'-TGGGAGGAAAGGGGTCTAAG-3'
	Reverse	5'-ACCTACGACGTGGGCTACAG-3'
IL-10	Forward	5'-AAGCAGCCTTGCAGAAAAGA-3'
	Reverse	5'-TGGGAAGTGGGTGCAGTTAT-3'
TGF- β 1	Forward	5'-TGGAGCAACATGTGGAAGCTC-3'
	Reverse	5'-CTGCCGTACAACCTCCAGTGA-3'

Cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard로 GAPDH를 사용하였고, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다.

Quantitative real-time RT-PCR의 조건은: pre-denaturation은 2 min at 50 °C, 10 min 94 °C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95 °C, 1 min at 60 °C에서 수행하였다. KKSUDU 단독투여군과 대조군은 internal standard로 GAPDH를 사용하였고 target group의 quantitative PCR은 $y = x(1+e)^n$ $x =$ starting quantity $y =$ yield $n =$ number of cycles $e =$ efficiency로 계산하여 RQ(relative quantitative)를 측정하였다.

(4) CD4⁺IFN- γ ⁺와 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ Treg cell의 intracellular staining 분석

18 주령 NC/Nga 생쥐의 비장에서 순수 분리한 CD4⁺ T세포를 미리 α -CD3/ α -CD28 Ab (1 μ g/ml)가 coating된 24 well plate에 분주하여 자극, 활성화 시킨 후 대조군 (control, CT)으로 사용하였으며, 분주 후 면역억제제인 cyclosporin A (CsA, 2 μ g/ml)와 KKSUDU 추출물 (100 μ g/ml)

을 가하고 48 시간 동안 동시 배양하여 각각 양성대조군 (positive control, PC)과 실험군으로 사용하였다. 또한 α -CD3/ α -CD28 Ab (1 μ g/ml)로 자극하지 않은 only CD4⁺ T세포는 정상군으로 사용하였다.

배양 종료 후 BD cytofix/cytoperm plus kit (with BD GolgiPlug, 555028)와 mouse CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ flow cytometry kit (from BioLegend)를 이용하여 각각 세포내염색을 통하여 CD4⁺IFN- γ ⁺세포와 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ Treg cell의 형광염색을 실시하였다. 반응 후 3 회 이상 인산 완충생리식염수로 수세한 후 형광유세포분석기로 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램으로 활성세포 (%) 비율을 산출하였다.

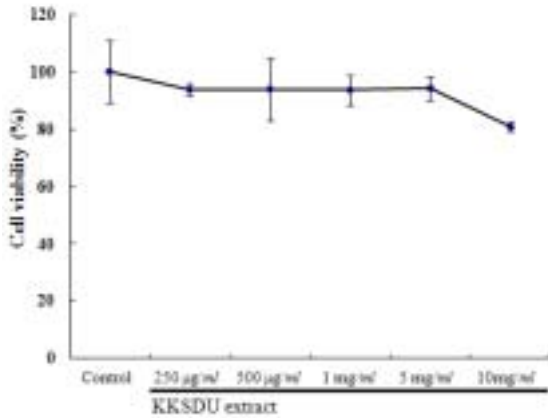


Fig.1. Cytotoxicity effects of KKSDU extract on human fibroblast cells(hFCs). hFCs were pretreated with various concentration KKSDU extract. The results are expressed the mean \pm S.E (N=6).

III. 成 績

1. 加減消毒飲의 세포독성

KKSDU 추출물의 세포독성을 측정한 결과, 5 mg/ml 이하에서는 세포생존률 80 % 이상으로 세포독성이 거의 나타나지 않았다 (Fig.1).

2. In vitro : Splenic T & B cells culture in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse

1) B 세포에서 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α mRNA 유전자 발현

Only B cells (정상군)의 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일 때 각각 0.795, 0.109, 0.491이었고, KKSDU 처리군 (실험군)은 대조군의 RQ값이 1 일 때 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α mRNA 유전자 발현이 0.801, 0.809, 그리고 0.584로 유전자 발현이 억제되었고, 특히 TNF- α mRNA 유전자 발현은 현저하게 감소하였다. 또한 양성

대조군 (PC)에서는 대조군의 RQ값이 1 일 때 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α mRNA 유전자 발현이 0.233, 0.546, 그리고 0.375로 억제되었다 (Fig.2).

2) B 세포에서 IL-10과 TGF- β mRNA 유전자 발현

Only B cells (정상군)의 IL-10과 TGF- β mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일 때 각각 0.593과 0.816이었고, KKSDU 처리군 (실험군)에서는 IL-10과 TGF- β mRNA 유전자 발현이 1.498과 0.798로, IL-10 mRNA 유전자 발현은 대조군보다 증가하였고, TGF- β 유전자 발현은 억제되었다. 또한 양성대조군 (PC)의 유전자 발현은 0.815과 0.473으로 대조군에 비하여 모두 억제되었다 (Fig.3).

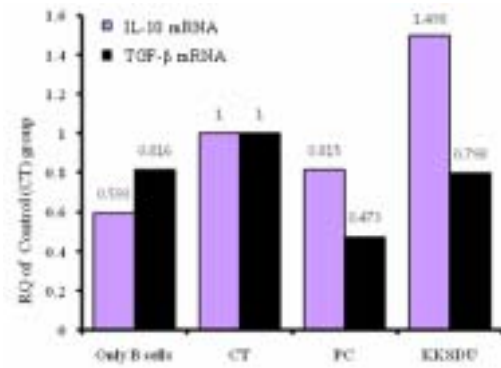


Fig.2 Effects of KKSDU extract on IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNA expression by KKSDU extract plus anti-CD40mAb/rmIL-4-stimulated murine splenic B cells.

Isolated B cells from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse were either stimulated with anti-CD40mAb (500 μ g/ml)/rmIL-4 (500 U/ml) or treated with KKSDU extract (100 μ g/ml). B cells were not treated (normal; only B cells), co-cultured with anti-CD40mAb/rmIL-4 (CT), anti-CD40mAb/rmIL-4 plus rmIL-10 (PC), and anti-CD40mAb/rmIL-4 plus KKSDU extract (KKSDU) for 4hrs. IL-1 β , IL-6, and TNF- α mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-1 β , IL-6, and TNF- α mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real-time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

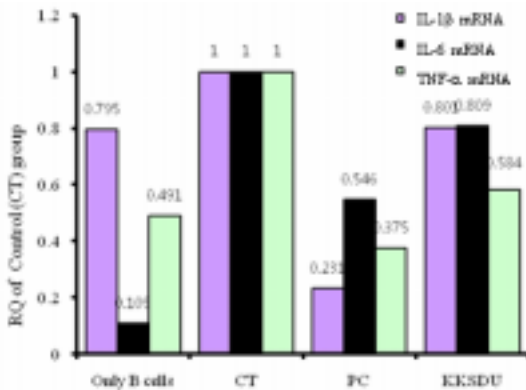


Fig.3 Effects of KKSDU extract on IL-10, and TGF- β mRNA expression by KKSDU extract plus anti-CD40mAb/rmIL-4-stimulated murine splenic B cells.

Isolated B cells from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse were either stimulated with anti-CD40mAb (500 μ g/ml)/rmIL-4 (500 U/ml) or treated with KKSDU extract (100 μ g/ml). B cells were not treated (normal; only B cells), co-cultured with anti-CD40mAb/rmIL-4 (CT), anti-CD40mAb/rmIL-4 plus rmIL-10 (PC), and anti-CD40mAb/rmIL-4 plus KKSDU extract (KKSDU) for 4hrs. IL-10, and TGF- β mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-10, and TGF- β mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real-time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

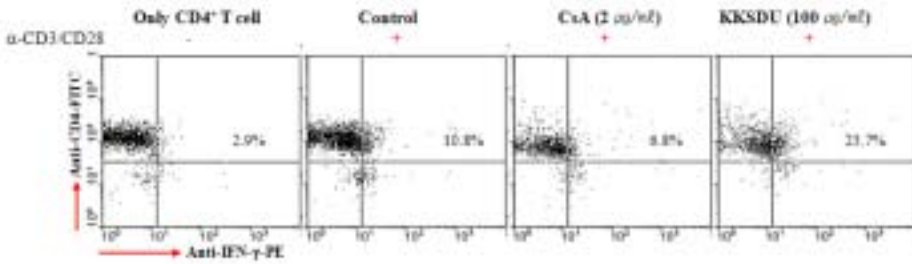


Fig.4 Effects of KKSDU extract on IFN- γ + intracellular staining analysis by α -CD3/ α -CD28-stimulated murine CD4+ T cells.

Isolated CD4⁺ T cells from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with α -CD3/ α -CD28 (1 μ g/ml) or treated with KKSDU extract (100 μ g/ml). CD4⁺ T cells were not treated (normal; only CD4⁺ T cells), co-cultured with α -CD3/ α -CD28 (1 μ g/ml) (Control), and with α -CD3/ α -CD28 (1 μ g/ml) plus CsA (2 μ g/ml) (CsA), and with α -CD3/ α -CD28 (1 μ g/ml) plus KKSDU extract (100 μ g/ml) (KKSDU) for 24 hrs. After a 24-hours stimulation, 0.6 μ g/ml monensin (GolgiStop; BD Pharmingen) was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled anti-CD4. After fixation in Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen), cells were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer (BD Pharmingen), stained with PE-labeled anti-IFN- γ mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FacsCalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

3) CD4+ T세포에서 CD4+/IFN- γ + intracellular staining

α -CD3/ α -CD28로 자극하지 않은 only CD4⁺ T 세포군의 CD4⁺/IFN- γ ⁺는 2.9%이었고, anti-CD3/anti-CD28로 자극한 대조군의 CD4⁺/IFN- γ ⁺는 10.8%이었다. 양성대조군으로 CsA를 α -CD3/ α -CD28와 동시 배양한 CsA 처리군의 CD4⁺/IFN- γ ⁺는 6.8%이었고, 실험군으로 KKSDU를 α -CD3/ α -CD28와 동시 배양한 KKSDU 처리군의 CD4⁺/IFN- γ ⁺는 23.7%로 대조군에 비하여 증가하였다 (Fig.4).

4) CD4+ T세포에서 CD4+CD25+foxp3+ intracellular staining

α -CD3/ α -CD28로 자극하지 않은 only CD4⁺ T 세포군의 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺는 1.3%이었고, α -CD3/ α -CD28로 자극한 대조군의 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺는 5.16%이었다. 양성대조군으로 CsA를 α -CD3/ α -CD28와 동시 배양한 CsA

처리군의 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺는 3.1%로 대조군에 비하여 감소하였다. KKSDU 처리군의 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺는 20.3%로 대조군에 비하여 증가하였다 (Fig.5).

IV. 考 察

아토피란 알레르기 반응을 일으키게 하는 면역 물질인 IgE를 쉽게 형성하는 경향을 가지며, 특정 질환 군인 천식, 고초열, 알레르기성 비염, 아토피 피부염을 잘 일으키는 유전적 경향을 보이는 경우를 말한다¹¹⁾. 아토피 피부염은 이러한 아토피성 체질을 가진 사람에서 발생하는 만성 피부염으로 자각 증상으로 심한 소양감을 특징으로 하는데 발병 시기에 따라 특징적인 병변의 분포와 양상을 보이고 때로 알레르기성 비염, 천식 등 다른 아토피 질환의

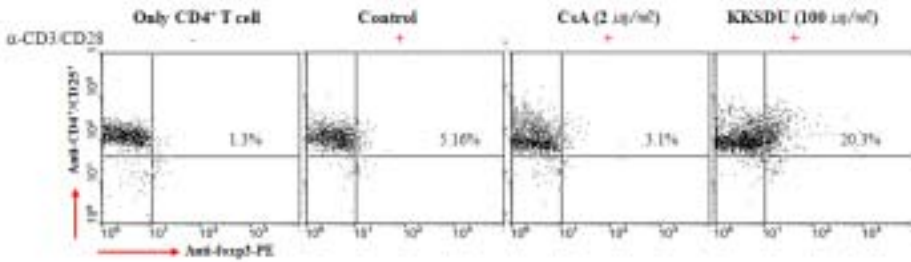


Fig.5 Effects of KKSDU extract on CD4+CD25+foxp3+ intracellular staining analysis by α -CD3/ α -CD28-stimulated murine NC/Nga CD4+ T cells.

Isolated CD4⁺ T cells from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse were either stimulated with α -CD3/ α -CD28 (1 μ g/ml) or treated with KKSDU extract (100 μ g/ml). CD4⁺ T cells were not treated (normal; only CD4⁺ T cells), co-cultured with α -CD3/ α -CD28 (1 μ g/ml) (Control), and with α -CD3/ α -CD28 (1 μ g/ml) plus CsA (2 μ g/ml) (CsA), and with α -CD3/ α -CD28 (1 μ g/ml) plus KKSDU extract (100 μ g/ml) (KKSDU) for 24 hrs. After a 48-hours stimulation, 0.6 μ l/ml monensin (GolgiStop; BD Pharmingen) was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled anti-CD4 and Cychrom5.5-labeled anti-CD25. After fixation in Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen), cells were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer (BD PharMingen), stained with PE-labeled anti-foxp3 mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

과거력이나 가족력을 동반하는 것으로 알려져 있다¹⁾.

아토피 피부염 환자의 유병율은 점차 증가하고 있는 추세로, 국내의 경우 아토피 피부염의 발생률은 피부과 외래환자의 8.6%를 차지하고, 전국 초등학교의 24.9%, 중학생의 12.8%가 아토피 피부염을 진단받았으며, 6 ~ 12세 사이의 아토피 유병률이 1995년 15.3%에서 2000년 17%로 증가한 것으로 나타났다¹²⁾.

이러한 유병률의 증가는 질병자체의 만성화와 재발, 인구구조의 변화, 많은 알레르겐에의 노출, 약화요인의 증가 및 질병자체에 대한 일반인들의 인식 증가 때문으로 추측된다¹³⁾.

아토피 피부염은 일반적으로 IgE 합성의 증가와 호산구 증가증이 나타나는데, 면역학적 연구에 의하면 이 질환은 IL-4, IL-5와 같은 Th2 cytokine이 증가하고 Th1 cytokine인 IFN- γ 의 분비가 감소하는 것과 관련이 있는 것으로 보고되었다¹⁴⁾.

T 세포는 면역반응을 하는 동안 분비하는

cytokine에 따라 Th1 세포와 Th2 세포로 분류된다. Th1 세포는 IFN- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , lymphotoxin 등을 분비하며 세균감염에 있어서 방어적 기능을 담당하고 지연형과민 반응에 관여한다¹⁵⁾. 가장 핵심적인 Th1 cytokine인 IFN- γ 는 대식세포의 포식작용을 촉진하며 CD8 T 세포가 강력한 cytotoxic cell로 분화하도록 유도하고 그 외에 다른 cytokine과 협조하여 염증성 백혈구를 활성화시킨다. 미경험의 T helper cell이 활성화되어 Th1 세포로 분화하는데 영향을 주는 주요 cytokine은 인간의 경우 IL-12와 IFN- α 이다. 세균에 감염되면 세균이 합성한 endotoxin은 대식세포를 활성화시켜 IL-12를 유도하고 바이러스에 감염된 세포는 IFN- α 를 합성함으로써 T helper 세포가 Th1 세포로 분화하게 하고 더 많은 IFN- γ 를 합성하게 한다. 따라서 세균감염이 빈번한 환경에서는 Th1 cytokine 패턴이 만성염증과 조직손상 및 자가면역질환에 우세하게 나타난다¹⁶⁾. 한편 Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13을 분

비하며 알러지 반응과 천식과 같은 만성적인 기관지 염증 및 기도과민반응과 깊은 관련이 있다. IL-4는 B 세포로 하여금 IgE를 생산하도록 촉진하고 IL-13은 IL-4와 비슷한 기능을 하면서 기관지과민반응을 유도하며 IL-5는 호산구를 활성화하여 천식 등에서 지속적인 염증을 일으킨다. 따라서 그간 아토피 피부염은 Th2 cytokine이 지나치게 분비하기 때문에 Th2 세포가 병리적으로 중요한 역할을 하는 것으로 이해되었다¹⁷⁾. 한편 만성 아토피 피부염환자의 피부조직을 분석하면, 급성의 아토피 피부염에서 IL-4, IL-5, IL-13의 양이 증가하여 전형적인 Th2 반응이 보이는 것과는 달리, 2차 감염으로 인해 IL-12와 IFN- γ 의 양이 증가하는 Th1 패턴이 나타난다. 그리고 아토피 피부염은 일반적으로 IgE 농도가 높아서 흡입성 또는 음식항원에 대해 즉각적인 반응을 보이지만 일부 아토피 피부염환자들은 IgE도 정상 범위에 있으면서 항원에 대한 과민반응과 무관한 유형이 있다¹⁸⁾.

이처럼 아토피 피부염의 면역학적인 측면은 기관지 천식이나 알러지 비염과 같은 다른 아토피질환에 비해 매우 복잡한 양상을 가진다. 그러나 아직 아토피 피부염의 병인은 정확히 밝혀지지 않았으며 최근 면역학적인 측면에서 많은 연구가 이루어지고 있다¹⁹⁾.

한의학적으로 아토피 피부염과 일치하는 병명은 없으나 隨代의 《諸病源候論·小兒染病諸侯·癬候》²⁰⁾에서 “小兒面上 癬皮如甲錯起 乾燥 謂之乳癬. 言兒飲乳 乳汁漬汚兒面 變生此證”이라 하여 유사한 증상이 언급되어있고, 明代의 《外科正宗·奶癬》²¹⁾에서는 “奶癬因兒在胎中 母食五辛父餐炙燻 遺熱與兒. 頭面遍身發爲奶癬 流脂成片 睡臥不安 瘙痒不絕”이라하여 奶癬이 胎熱로 발생하는 것이라 하였다. 그 외에도 많은 문헌에서 아토피 피부염

의 증상을 표현하고 있는데, 종합해보면 奶癬, 胎癬, 胎斂瘡, 濕疹, 濕瘡, 四彎風, 浸淫瘡 등의 범주에 속하는 것으로 볼 수 있다⁴⁾.

원인 및 치료 방법에 있어 《實用中醫外科學》²²⁾에서는 奶癬을 嬰兒濕疹에 귀속시켰고 기전을 “先天不足 稟賦不耐 脾失健運 濕熱內生 復感風濕熱邪 蘊積肌膚而成”이라 하여, 養血, 祛風, 清火, 潛鎮하는 處方을 응용하였으며, 《中醫兒科學》²³⁾에서는 辨證을 濕熱型, 血熱型, 濕阻型, 血燥型으로 4분하여 각각 清熱利濕, 涼血清熱利濕, 健脾除濕, 養血祛風 清熱化濕으로 세분하여 치료하였다. 또한 공 등²⁴⁾은 증상에 따라 급성, 아급성, 만성으로 나누어 한방적 변증을 제시했는데, 급성기에는 風濕熱이 우세하여, 분비물이 많고 피부가 붉으며 발병이 급격하고 열감, 수포, 농양, 구진 등의 증상을 나타내므로 清熱利濕하고, 아급성기에는 脾虛濕盛하여 발적, 수양성 분비물은 적고 홍반, 구진, 낙설이 나타나므로 健脾除濕하며, 만성기에는 陰虛血燥하여 피부가 비후해지고 태선화되므로 滋陰養血潤燥하는 治法을 사용한다고 하였다.

加減消毒飲은 《晴崗醫鑑》에 수록된 처방이며 升麻葛根湯의 변방으로⁵⁾ 升麻葛根湯은 宋代 錢의 《小兒藥證直訣》²⁵⁾에 최초로 수록되어 傷寒溫病과 時令感冒, 瘡疹의 질환에 사용되어온 要方이며 解肌透疹의 升麻 葛根, 補血의 芍藥, 清熱 解毒의 甘草로 구성되어 있다⁶⁾. 方中の 升麻 葛根은 모두 辛甘微寒한 약물로 능히 疏散風熱于表 할 뿐만 아니라 능히 解毒透疹하고 二藥이 合하여 諸毒을 解하고 升陽散火하니 諸腫毒을 發散하며 透斑하여 主藥이 되고 芍藥은 甘草와 合하여 止痛하며 甘草는 和胃溫胃하고 和諸藥한다²⁶⁾. 加減消毒飲은 이러한 升麻葛根湯에 解表祛風 除濕透疹하는 荊芥, 防風과 疏散風熱 消腫透疹하는

薄荷, 牛蒡子, 清熱解毒 消腫散結의 連翹, 清熱解肌의 石膏, 除濕熱, 治癰腫疔瘡하는 黃芩을 가하여 清熱 透疹 除濕 發斑의 효능을 더욱 강화시킨 처방이다^{5,27)}. 따라서 加減消毒飲은 風熱毒과 濕熱이 表部에 울체되어 皮膚赤爛 搔癢하는 風熱斑疹을 치료하며⁵⁾ 이는 임상에서 발적, 구진, 홍반, 삼출, 부종, 소양 등의 증상을 보이는 濕熱型的 아토피 피부염 치료에 적합할 것으로 생각된다.

이러한 배경으로 임상에서 아토피 피부염 치료에 쓰이고 있는 加減消毒飲을 투여하여 아토피 피부염 치료에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

본 연구의 결과를 살펴보면, KKSDU 추출물의 세포독성을 측정한 결과 5 mg/ml 이하에서 세포독성이 나타나지 않아(Fig.1), 100 μ g/ml에서 실험을 수행하였다. 또한 *in vitro* 실험에서 KKSDU 추출물에 의해 NC/Nga 아토피발진 생쥐의 B 세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , 그리고 TGF- β mRNA 유전자 발현을 분석한 결과, 대조군에 비해 현저하게 유전자 발현이 억제되었으며 염증억제 cytokine인 IL-10 mRNA는 대조군보다 증가하였다(Fig.2, 3). 이는 KKSDU 추출물이 알러젠에 의한 알레르기 반응에 반드시 수반되는 B 세포의 활성화, 분화를 선택적으로 억제하여 초기 알레르기 반응을 효과적으로 억제하는 것으로 생각된다.

그리고 Th1에서 분비하는 IFN- γ 와 Treg cell인 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺를 CD4⁺ T 세포에서 intracellular 염색으로 측정한 결과, KKSDU 처리군에서 IFN- γ 와 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺이 대조군에 비하여 현저하게 증가하였다(Fig.4, 5). 이상의 실험결과는 KKSDU이 Treg cell의 증식을 유도하여 면역세포의 알레르기 반응으로의 분화를 억제하고 관련 유전자 발현을 선택적으로 조절하여 항알레르기의 효과가 있음을 나

타내는 것으로 생각된다.

이상의 결과로 KKSDU가 아토피 피부염의 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단되며 향후 아토피 피부염의 정확한 기전에 대한 연구와 실험적 보완 및 임상연구가 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

BMAC로 아토피樣 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에서 加減消毒飲이 피부염 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. KKSDU는 hFCs에서 5 mg/ml 이하에서 세포독성이 나타나지 않았다.
2. KKSDU는 NC/Nga생쥐의 B 세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , 그리고 TGF- β mRNA 유전자 발현을 억제하였고, IL-10 mRNA 유전자 발현을 증가시켰다.
3. KKSDU는 CD4⁺ T 세포에서 CD4⁺IFN- γ T 세포 수를 증가시켰다.
4. KKSDU는 CD4⁺ T 세포에서 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ Treg cell로의 분화를 증가시켰다.

參 考 文 獻

1. 안성구, 박병덕, 원진형, 성열오, 천승현. 개원의를 위한 아토피 피부염. 서울:퍼시픽출판사. 2007:25,35.
2. 박용민. 아토피피부염 병태생리에 대한 최신 지견. 소아알레르기 호흡기 학회지. 2006

- ;16(3):189-96.
3. 김정희. 아토피 피부염의 최신지견. 소아알레르기 및 호흡기학회지. 2004;14(1):12-23.
 4. 허인희, 홍성민, 엄유식, 변학성, 심성용, 김경준. 외치요법을 위주로 한 아토피 피부염 환자 증례. 한방안이비인후과피부과학회지. 2006;9(3):201-8.
 5. 金永勳. 晴崗醫鑑. 서울:성보사. 1984:361.
 6. 韓醫科大學 方劑學教授 共編著. 方劑學. 서울:영림사. 1999:92-3.
 7. 김홍배, 김원일, 이승연. 升麻葛根湯의 항히스타민 효과 및 IL-4와 GM-CSF 발현에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2006;20(2):69-83.
 8. 姜暲竣. 가미승마갈근탕의 효능에 관한 실험적 연구. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 1992.
 9. 趙貞實. 승마갈근탕과 Tetracycline-HCL의 병용투여시 항균 및 항염효과에 대한 연구. 중앙대학교 대학원 석사학위논문. 1983.
 10. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monk A, McMahon J, Visca D, Warren JT, Kennedy S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. J Natl Cancer Inst. 1990;82(13):1107-12.
 11. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피부과학. 서울:여문각. 2000:161.
 12. 김철홍, 이상일, 이수영, 최성연, 이준성, 김규연. 1995년과 2000년의 학동기와 2003년 학동전기 소아에서의 아토피 피부염의 역학적 변화에 관한 전국적인 연구. 소아알레르기 및 호흡기학회지. 2003;13(4) :227-37.
 13. 손정숙, 최인화. 아토피 피부염 환자 치험 1례. 대한한의학회지. 2001;22(4):151-7.
 14. Leung DYM. Pathogenesis of atopic dermatitis. J Allergy ClinImmunol. 1999;104:99-108.
 15. Mosmann TR, Coffman RI. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol. 1989;7:145-73.
 16. Kang K, Kubin M, Cooper KD, Lessin SR, Trinchieri G, Rook AH. IL-12 synthesis by human Langerhans cells. J Immunol, 1996; 156:1402-7.
 17. Wolkerstorfer A, Laan MP, Savelkoul HF, Neijens HJ, Mulder PG, Oudesluys-Murphy AM, Sukhai RN. Soluble E-selectin, other markers of inflammation and disease activity in children with atopic dermatitis. Br J Dermatol. 1998;138:431-5.
 18. Anjana Rao, Orly Avni. Molecular aspects of T-cell differentiation. British Medical Bulletin. 2000;56:969-84.
 19. Koide M, Furukawa F, Tokura Y, Shirahama S, Takigawa M. Evaluation of soluble cell adhesion molecules in atopic dermatitis. J Dermatol. 1997;24:88-93.
 20. 巢元方. 諸病源候論. 上海:集文書局. 1976: 505.
 21. 陳實功. 外科正宗. 上海:上海科學技術出版社. 1989:269,303.
 22. 고백화. 실용중의외과학. 상해:상해과학기술출판사. 1985:461-4.
 23. 王伯岳, 江育仁. 中醫兒科學. 上海:上海科學技術出版社. 1984:203-4.
 24. 공남미, 지선영. 아토피 피부염의 양한방적 고찰. 대한외관과학회지. 1999;12(1):241-52.
 25. 錢乙. 小兒藥證直訣. 북경:인민위생출판사. 1985:212-6.
 26. 윤길영. 동의방제학. 서울:고문사. 1980:48-51,64.
 27. 전국한의학대학교 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:영림사. 2000:196-7,578-80.