

## 생약재 추출물의 아토피 완화효과

양희진 · 박계원 · 김현석<sup>1</sup> · 조수묵<sup>2</sup> · 박기문\*

성균관대학교 식품생명공학과, <sup>1</sup>(주)성균바이오텍, <sup>2</sup>국립농업과학원 기능성식품과

### Effect of Anti-atopic Allergic Reaction in Response to Oriental Herb Extracts

Hee-Jin Yang, Kye Won Park, Hyun-Suck Kim<sup>1</sup>, Soo-Muk Cho<sup>2</sup>, and Ki-Moon Park\*

Department of Food Science and Biotechnology, Sungkyunkwan University

<sup>1</sup>Sungkyun Biotech, Co., Ltd.

<sup>2</sup>Department of agro-Food Resources, National Academy of Agricultural Science

**Abstract** The *in vivo* and *in vitro* effects of oriental herb extracts of *Cassia obtusifolia*, *Taraxacum platycarpum* and *Ulmus macrocarpa* on anti-atopic allergic reaction were evaluated in this study. A mixture of these extracts exhibited more potent anti-allergic activities in human mast cells than those from individual extracts. The herbal mixture significantly inhibited the release of compound 48/80-induced  $\beta$ -hexosaminidase release in the human mast cell line, HMC-1. The mixture also suppressed the production of PMA and A23187-induced inflammatory cytokines in HMC-1 cells. To further investigate the *in vivo* effects of the herbal mixture, a *Dermatophagoides farinae* (DF)-induced atopic dermatitis mouse model was utilized. Oral administration of the herbal mixture significantly decreased the ear thickness and swelling in DF treated NC/Nga mice in a dose dependent manner. Furthermore, serum levels of IgE and interleukin-4 (IL-4) were significantly decreased, whereas interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) levels were increased in the mixture administrated groups when compared to the control. Taken together, our data indicate the possibility of using a mixture of the oriental herb extract to relieve symptoms of atopic dermatitis.

**Key words:** *Cassia obtusifolia*, *Taraxacum platycarpum*, *Ulmus macrocarpa*, anti-atopic allergic reaction

## 서 론

아토피 피부염은 만성적인 염증성 피부질환으로 가려움과 각질형성, 홍반 등을 나타내며 여러 요인에 의해 일시적인 증세의 호전과 악화가 반복되는 재발성 질병으로 천식과 알레르기성 비염과도 연관되어 있다(1). 이것은 산업의 발달로 인해 증가되어진 공해물질에 노출 증가 및 가족 구성원 수의 감소, 생활방식에 따른 항원의 노출 감소, 모체의 노령화, 서구적인 식이 섭취 증가, 히스타민이 포함된 음식물의 섭취, 유전적인 요인 등의 여러 가지 요인으로 인해 최근 아토피 피부염의 유병률은 계속 증가하는 추세에 있다(2,4).

아토피 피부염은 완치가 어렵고 개인 삶의 질에 큰 영향을 미치는 질병이기 때문에 치료방법의 초점이 증상의 완화와 개선에 맞추어져 있다. 현재 가장 많이 사용되는 치료법으로는 항히스타민제와 국소 스테로이드제의 처방과 함께 원인이 될 수 있는 물질을 파악하여 주변 환경으로부터 제거하는 방법을 사용하고 있

지만 약품의 장기간 사용에 따른 부작용이 문제점으로 지적되고 있다(5,6). 즉, 항히스타민제는 장기간 사용할 경우 내성이 생기거나 저혈압, 피부염, 소화기장애와 여러 가지 과민반응을 일으킬 수 있고(7), 스테로이드제의 경우 고혈압, 심부전, 피부위축, 피부염 등의 심각한 부작용을 초래할 수 있다(8).

일반적으로 피부 및 호흡기, 림프관 등 생체 내 결합조직에 널리 분포하고 있는 비만세포(mast cell)에 의해 제 1형 알레르기 반응이 일어나는 것으로 알려져 있다(9,10). 항원이 인체를 자극하여 B cell과 Th2 cell 간의 상호작용에 의해 항체인 IgE를 생성, 분비하고, 분비된 IgE는 비만세포 표면에 있는 IgE 수용체에 결합하여 감작이 일어난다. 항원이 인체에 재침투하여 비만세포 표면의 IgE에 결합하면서 비만세포가 활성화되어 탈과립이 유도되고 histamine 같은 세포내 과립물질과 염증성 cytokine 등 여러 가지 화학적 매개물질이 생성되어 세포 밖으로 분비된다. 이때 분비된 여러 화학적 알레르기 매개물질로 인해 알레르기 증상들이 나타난다(11,12).

현재 아토피 피부염에 대한 연구는 염증에 관련된 histamine의 분비 억제나 염증성 cytokine들의 발현 억제 등에 관하여 이루어지고 있는데 이들 염증성 관련 물질의 분비 억제에 생약재나 식품 소재와 같은 천연물을 이용한 방법들이 제시되어지고 있다(13-20).

전보(21,22)에서 환경호르몬의 해독작용과 면역조절 등의 효과가 있는 생약 소재들의 아토피 피부염 증세의 경감 기능성과 생약재의 단독 또는 혼합사용에 따른 상승효과를 측정하고자 예비

\*Corresponding author: Ki-Moon Park, Department of Food Science and Biotechnology, Sungkyunkwan University, Suwon, Gyeonggi 440-746, Korea

Tel: 82-31-290-7806

Fax: 82-31-290-7816

E-mail: pkm1001@skku.edu

Received October 20, 2009; revised November 3, 2009;

accepted November 4, 2009

실험으로 선발된 결명자, 유근피, 포공령과 이들을 조합한 추출물을 사용하여 *in vitro* 및 아토피가 유발된 실험동물에서 아토피 피부염의 증상 완화에 미치는 효과를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

생약제인 결명자(*Cassia obtusifolia*) 및 유근피(*Ulmus macrocarpa*), 포공령(*Taraxacum platycarpum*)은 2008년 9월경 경동시장에서 국내산으로 구입하여 사용하였으며 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), compound 48/80, *p*-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide, Ionophore A23187 및 기타시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 것을 사용하였다. 또한 세포배양에 사용된 IMDM 배지와 FBS 및 세포배양용 시약은 WelGENE사(Dague, Korea), 세포배양용품은 BD Biosciences(San Jose, CA, USA)사의 제품을 사용하였다.

### 시료의 제조

결명자 및 유근피, 포공령을 각각 500 g씩 세절한 후 70% 에탄올 10 L를 첨가하고 40°C에서 48시간 동안 환류 추출하였다. 추출액은 여과 후 40°C에서 감압농축 및 동결건조하여 실험에 사용하였고, 3가지의 추출물을 동량으로 혼합하여 추출 혼합물(oriental herb extract mixture, OHEM)을 제조하여 사용하였다.

### 세포배양 및 $\beta$ -hexosaminidase 측정

Human 유래 비만세포인 human mast cell line-1(HMC-1)은 경희대학교 한의학대학에서 분양받아 사용하였다. HMC-1은 10% FBS 및 1% penicillin-streptomycin이 포함된 IMDM 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하고 원심분리하여 2×10<sup>6</sup> cell/mL 농도로 각 추출물과 함께 tyrode's buffer(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>, 1.1mM MgCl<sub>2</sub>, 11.9mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6mM glucose, pH 7.2)에 섞어 48 well plate에 분주하였다. 30분간 37°C에서 배양한 후 compound 48/80을 6  $\mu$ g/mL 농도로 첨가하고 다시 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 48 well plate를 10분간 ice bath에서 반응을 종결시키고 원심분리하여 세포를 가라앉힌 후 상등액을 얻었다. 상등액 30  $\mu$ L를 96 well plate로 옮겨 기질인 1 mM의 *p*-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide 30  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 한 시간 반응시킨 후 120  $\mu$ L의 stop solution(sodium bicarbonate, pH 10.2)로 반응을 종료시켰다. 흡광도는 microplate reader를 사용하여 405 nm에서 측정하였고  $\beta$ -hexosaminidase의 분비량은 다음의 식을 사용하여 산출하였다.

$$\text{분비량(\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

A: 대조구 흡광도 B: 시료 처리구 흡광도

### Cytokine의 분비 억제 효과 측정

HMC-1을 IMDM 배지에 3×10<sup>6</sup> cell/mL 농도로 24 well plate에 분주한 후 추출물과 혼합물을 100  $\mu$ g/mL 농도로 첨가하여 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 배양된 dish에 40 nM의 PMA와 1  $\mu$ M의 ionophore A23187을 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 배양한 후 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액으로부터 염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8의 함량을 sandwich enzyme linked immunosorbent assay방법을 이용하여 Quantikine

kit(R&D systems, Minneapolis, MN, USA)로 정량하였다.

### 실험동물

5주령의 웅성 NC/Nga 마우스(SLC Inc., Shizuoka, Japan)를 중앙실험동물(주)로부터 구입하여 온도 24±1°C, 습도 55±5%를 유지하면서 1주일간 적응 사육한 후 실험에 사용하였으며 사료와 물은 자유급식을 원칙으로 하였다.

### NC/Nga 마우스 피부염 유도 및 생약재 추출혼합물 투여

NC/Nga 마우스의 귀에 아토피 피부염을 유발시키고자 테이프를 사용하여 귀의 털을 제거한 후 진드기 추출물(DF, 연세대학병원)을 항원으로 사용하여 8주간 2일 간격으로 한번 씩 양쪽 귀에 5 mg/mL의 농도로 10  $\mu$ L씩 도포하였으며 DF 도포 전에 vernier calipers를 사용하여 마우스의 귀 두께를 측정하였다. 실험군 별로 각 7마리씩 임의배치 하였으며 정상군(NC)과 DF 처리한 대조군(PC), DF처리와 동시에 추출 혼합물을 농도별로 투여 받는 실험군(1.67, 16.7, 167 mg/kg/day, respectively)으로 나누어 수행하였다. 투여군의 처리 농도는 성인(60 kg)이 추출혼합물을 하루에 100 mg, 1 g, 10 g씩 섭취하는 것을 기준으로 하여 설정하였다. 추출혼합물은 PBS에 녹여 각 군별로 체중에 맞는 농도로 매일 동일한 시간에 경구투여 하였고 정상군 및 대조군은 시료군과 동일한 양의 PBS를 투여하였다.

### NC/Nga 마우스 혈중 IgE와 cytokine 분석 및 조직학적 관찰

IgE 함량 및 귀 조직의 histopathology를 관찰하기 위해 실험 종료 후 혈액 채취와 귀조직을 적출하였다. 혈액으로부터 혈청을 분리하여 sandwich ELISA kit를 사용하여 마우스 혈액 중 IgE(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)와 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4(R&D systems, Minneapolis, MN, USA)의 농도를 측정하였다. 또한 귀 조직은 10% formaldehyde에 48시간 고정 후, 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조한 후 hematoxylin-eosin 염색을 하여 조직을 관찰하였다.

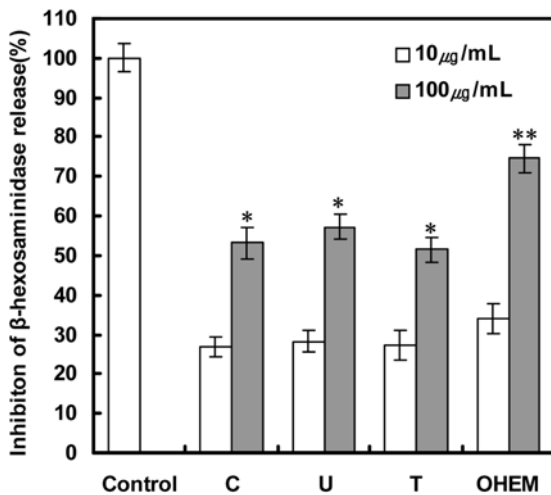
### 통계분석

모든 실험 결과는 3회 반복실험을 하였으며 평균과 표준편차로 나타내었고 실험군 간의 통계분석은 one-way ANOVA로 각 군 간의 평균치에 대한 유의성 검정을 하였으며, 통계적 유의성 검정은 신뢰구간  $p < 0.05$  수준에서 분석하였다.

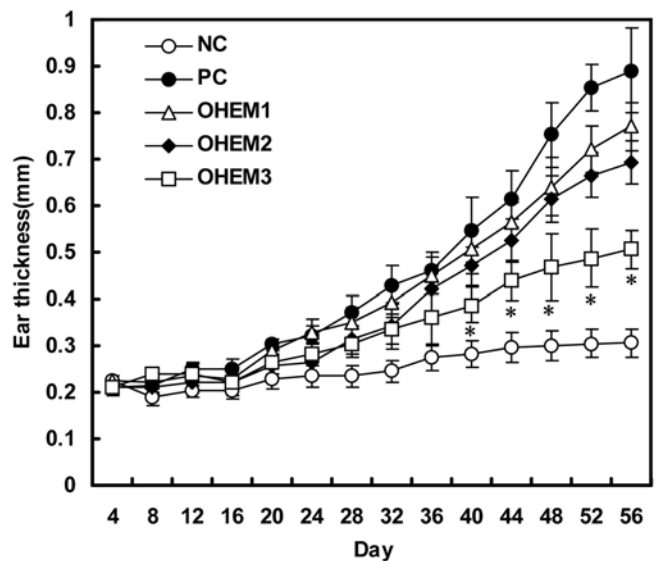
## 결과 및 고찰

### HMC-1에서의 탈 과립 억제 효과

$\beta$ -hexosaminidase는 비만세포나 basophil의 histamine이 저장된 과립 내에 존재하고 있으며 탈 과립시에 histamine과 함께 세포 밖으로 분비되는 물질로  $\beta$ -hexosaminidase의 정량은 비만세포에서 탈 과립의 지표로 이용되어진다(13,23). 본 실험에서는 비만세포의 이러한 메커니즘을 이용하여 인체 내에서의 알레르기 저감 효과 확인을 위해 인체유래의 비만세포인 HMC-1 세포주를 사용하여 실험하였다. HMC-1에 대한 시료의 세포독성을 MTT assay로 확인한 결과, 각 추출물의 처리농도 100  $\mu$ g/mL 수준에서 세포독성이 나타나지 않는 것으로 관찰되어 100  $\mu$ g/mL의 시료처리 농도로 탈 과립 억제효과를 측정하였다. 또한 예비실험을 통하여 항산화력이 높은 생약재 중  $\beta$ -hexosaminidase 분비 억제능력이 50% 이상인 결명자 및 유근피, 포공령을 선발하였으며 이들의 추출물을 동일 비율로 혼합하여 탈 과립 억제효과를 측정할 결



**Fig. 1. Inhibitory effect of herb extracts on  $\beta$ -hexosaminidase release in compound 48/80-induced HMC-1 cells.** The cells were preincubated with herb extracts (10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) before stimulation with compound 48/80; C, *Cassia obtusifolia*; U, *Ulmus macrocarpa*; T, *Taraxacum platycarpum*; OHEM, oriental herb extract mixture. Each value represents the mean $\pm$ SD,  $n=7$ . \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , significantly different from the control value



**Fig. 2. Effect of the oral administration of the OHEM on the increase of ear thickness in NC/Nga mice induced by mite extract.** NC (non-treated), PC (DF-allergen only), OHEM1 (1.67 mg/kg/day), OHEM2 (16.7 mg/kg/day), OHEM3 (167 mg/kg/day). Each value represents the mean $\pm$ SD,  $n=7$ . \* $p<0.05$ , significantly different from the control value

과 저해 효과가 우수하게 나타나 추출복합물(OHEM)은 동일 비율로 혼합, 사용하였다(data not shown).

Fig. 1은 compound 48/80로 HMC-1의 탈 과립을 유도하고 여기에 각 추출물과 OHEM을 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하였을 때의 결과를 나타낸 것이다. 추출물의 처리 농도가 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 였을 때 결명자 및 유근피, 포공령은  $\beta$ -hexosaminidase 분비를 각각 26.8, 28.2, 27.3% 저해하였고, 추출물의 처리농도가 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가함에 따라 각각 53.3, 57.3, 51.5%로 저해율이 증가하는 것으로 측정되었다. OHEM은 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서는 34%, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서는 74.6%로 가장 높은  $\beta$ -hexosaminidase 분비 저해율을 나타내 각각의 추출물이 단독적으로 나타내는 저해율과는 유의적 차이가 있는 것으로 측정되었다( $p<0.05$ ).

**HMC-1에서의 cytokines 분비 억제 효과**

HMC-1을 PMA와 A23187로 자극하여 이것으로부터 분비되는 염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$  및 IL-6, IL-8의 분비에 OHEM이 미치는 영향을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 즉, HMC-1 세포의 TNF- $\alpha$  분비량은 포공령을 제외한 모든 처리군이 PMA와 A23187로 자극되어진 양성대조군에 비해 20% 이상의 분비 저해 효과를 나타내었으며, IL-6의 분비량 측정에서는 모든 처리군에서 분비저해 효과가 있는 것으로 측정되었다. 특히 포공령과 OHEM이 30%에 가까운 저해효과를 보여주었고 IL-8은 OHEM만이 분비 저해 효과를 보여주었다. Human mast cell은 자극을 받게 되

면 TNF- $\alpha$  및 IL-6, IL-8 등의 cytokine을 방출하게 되고 이렇게 방출된 cytokine은 염증성 피부이상을 일으키는데 중요한 역할을 한다(24). 약간의 염증성 cytokine 분비 저해 효과가 나타나기는 하지만 OHEM의 경우에는 정량한 모든 cytokine의 분비를 저해하는 것으로 나타났고, 저해정도도 다른 추출물에 비해 동등 이상으로 나타났다.  $\beta$ -hexosaminidase 분비 저해율과 마찬가지로 OHEM의 cytokine 분비 저해 능력은 항원 자극에 의한 염증성 피부염에 저감효과를 기대할 수 있는 소재로 생각되어 진다.

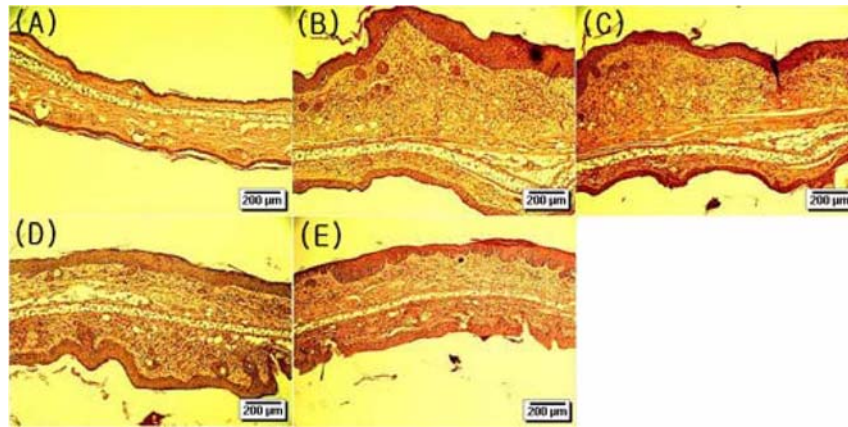
**생약제 복합추출물이 NC/Nga 마우스 귀의 부종에 미치는 효과**

NC/Nga 마우스는 일반적인 환경에서 피부의 표피 통과수분의 손실과 비정상적인 피부 전도율을 증가시키고 세라미드 대사를 손상시켜 피부장벽 이상을 나타냄으로서 피부염을 자발적으로 유발한다(25). Fig. 2는 NC/Nga 마우스에 진드기 추출물(DF)을 도포한 후 8주 동안 마우스의 귀두께를 측정된 결과이다. 대조군의 경우 실험 개시 20일경부터 부종 증세가 나타나기 시작하여 귀의 두께가 점차 두꺼워지는 것으로 나타났으며, 36일 이후부터 급격한 발진증상이 나타나 육안으로도 귀의 발진 관찰이 가능하였다. 이 결과는 Gao 등(14), Sagawa 등(19)의 연구결과와는 유사한 경향을 보여주었지만 항원처리 1주일경부터 귀의 두께가 증가하는 결과(15)도 있어 환경적인 요인에 따라 발진이 나타나는 시기에도 차이가 있는 것으로 생각되어진다. 마우스의 귀

**Table 1. Effect of OHEM on PMA and A23187 induced cytokine secretion from HMC-1**

|                       | NC             | PC             | C               | U               | T               | OHEM            |
|-----------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| TNF- $\alpha$ (ng/mL) | 1.2 $\pm$ 0.3  | 33.2 $\pm$ 3.9 | 24.8 $\pm$ 3.7  | 23.3 $\pm$ 2.1* | 30.1 $\pm$ 2.5  | 24.9 $\pm$ 1.2* |
| IL-6 (pg/mL)          | 23.8 $\pm$ 2.4 | 795 $\pm$ 21.3 | 639 $\pm$ 17.3* | 606 $\pm$ 13.3* | 552 $\pm$ 26.9* | 555 $\pm$ 17.2* |
| IL-8 (ng/mL)          | 1.8 $\pm$ 0.6  | 27.2 $\pm$ 3.4 | 27.4 $\pm$ 2.6  | 24.4 $\pm$ 3.1  | 22.1 $\pm$ 2.3  | 21.1 $\pm$ 2.1* |

NC, non-treated control cell; PC, treated with PMA and A23187; C, *Cassia obtusifolia*; U, *Ulmus macrocarpa*; T, *Taraxacum platycarpum*; OHEM, oriental herb extract mixture. Cytokine levels in supernatant were measured using ELISA method. Each data represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments. \* $p<0.05$ , significantly different from the control value



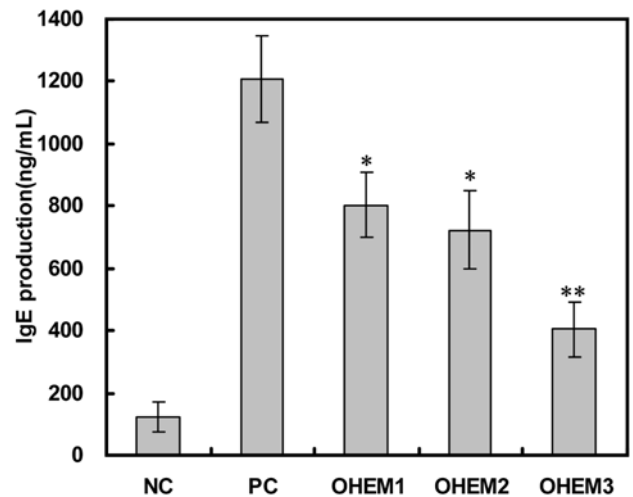
**Fig. 3. Histological features of skin lesions stained with Hematoxylin & eosin.** A, Negative control (non-treated); B, Positive control (DF-allergen only); C, DF+OHEM1 (1.67 mg/kg/day); D, DF+OHEM2 (16.7 mg/kg/day); E, DF+OHEM3 (167 mg/kg/day)

두께 또한 OHEM의 투여농도에 따라 약간의 차이는 있지만 28일 경부터 부종 현상이 측정되었고 36일 경 이후에는 167 mg/kg 투여군을 제외한 다른 OHEM 투여군도 귀의 두께가 점차 증가하는 것으로 관찰되었다. OHEM의 투여 농도가 증가함에 따라 NC/Nga 마우스 귀의 발진 시기가 대조군에 비해 늦어지고 귀 두께가 두꺼워지는 것이 억제되는 것으로 측정되었다.

NC/Nga 마우스의 귀조직을 hematoxylin-eosin 염색하여 현미경으로 조직의 형태를 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 즉, 대조군과 정상군을 비교한 결과 귀의 두께가 3배 정도 차이가 나며, 정상군에 비해 혈관이 확장되어 있고 조직의 각질층 또한 확연히 두껍게 형성된 것을 확인할 수 있었다. 이것은 피부에 아토피가 발병하였을 때 비만세포가 침윤되어 분비된 TNF- $\alpha$  등이 각질 형성세포의 NF- $\kappa$ B를 활성화시켜 피부의 각질을 두껍게 형성하기 때문이며, NF- $\kappa$ B는 세포의 성장 및 분화에 관계된 전사활성인자로 다양한 면역과 염증반응에 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다(26). OHEM의 처리 농도가 증가할수록 조직의 외부 각질층은 두껍게 형성되었으나 대조군에 비해 혈관의 두께와 내부조직은 훨씬 안정된 형태를 보여주어 정상군과 유사한 형태를 나타내 항원에 의한 아토피 피부염에 OHEM이 조직학 형태에서도 조직 보호 유지에 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

#### 생약재 복합 추출물이 NC/Nga 마우스의 혈청 IgE 및 cytokine 분비에 미치는 영향

IgE의 과발현은 아토피 질환의 가장 대표적인 표식으로 B cell에서 생성되는 IgE는 IL-4와 Th2 cell에 의해서 생산이 더욱 촉진된다(27). 그러나 IL-4에 의해 촉진되는 IgE는 IFN- $\gamma$  같은 Th1 cytokine에 의해 저해되어지는 것으로 알려져 있다(28). 8주간의 실험 후 NC/Nga마우스의 혈청으로부터 IgE의 함량을 ELISA로 정량한 결과는 Fig. 4와 같다. 즉, DF처리를 받지 않은 정상군의 혈중 총 IgE의 농도는 122 ng/mL로 측정되었으나 DF 처리에 의해 자극받은 대조군의 경우에는 1,207 ng/mL로 항원에 의해 IgE의 생성이 촉진되는 것을 알 수 있었다. 항원(DF)의 처리에 의해 아토피 피부염이 유도된 NC/Nga 마우스의 혈중 IgE의 농도가 증가하는 것은 일반적인 결과이지만 Segawa 등(19)은 실험 8주째에 4,000 ng/mL 이상, Kang 등(15)은 12일째에 1,000 ng/mL, Kim 등(17)은 9주째에 500 ng/mL를 상회하는 수준으로 항원처리에 의한 증가 경향은 동일하지만 실험결과들 간의 차이가 큰 것으로 나타났다.



**Fig. 4. Effect of the oral administration of OHEM on serum IgE level in NC/Nga mice.** The concentration of total IgE in the serum was determined by sandwich ELISA. NC (non-treated), PC(DF-allergen only), OHEM1 (1.67 mg/kg/day), OHEM2 (16.7 mg/kg/day), OHEM3 (167 mg/kg/day). Each value represents the mean $\pm$ SD,  $n=7$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , significantly different from the control value

OHEM의 농도별 투여에 따른 결과는 1.67, 16.7, 167 mg/kg/day에서 각각 801, 723, 404 ng/mL의 IgE 농도를 나타내어 OHEM의 모든 실험군에서 혈청 중 IgE의 생성을 유의적으로 억제시키는 것으로 관찰되었다.

IgE와 연관되어 작용하는 TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$  및 IL-4의 마우스 혈청 중 함량을 측정된 결과는 Table 2에서 나타난 것과 같이 혈청 중 TNF- $\alpha$ 의 함량은 예상보다 낮은 수치였으며 대조군보다 낮은 함량이지만 유의적 차이는 나타나지 않았다. IFN- $\gamma$ 의 경우에는 대조군보다 OHEM의 투여가 IFN- $\gamma$ 의 분비를 증가시키는 것으로 측정되었으며 이 결과는 항원에 의한 IgE의 생성에 OHEM의 성분이 Th1 cell의 세포성 면역 조절에 영향을 미침으로서 생성이 증가되는 것으로 여겨진다.

그리고 IgE 생성을 촉진시키는 IL-4의 함량은 대조군에 비해 OHEM의 투여 농도가 높을수록 유의적으로 감소하는 것으로 측정되었다. 이것은 혼합추출물이 Th2 cell의 반응을 억제하는 것

**Table 2. Effect of the oral administration of the OHEM on serum cytokines level in NC/Nga mice induced by mite extract**

|                       | NC               | PC               | OHEM1            | OHEM2            | OHEM3            |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| TNF- $\alpha$ (pg/mL) | 292.4 $\pm$ 10.1 | 356.6 $\pm$ 14.1 | 310.0 $\pm$ 31.1 | 318.6 $\pm$ 24.1 | 320.0 $\pm$ 11.1 |
| IFN- $\gamma$ (pg/mL) | 18.3 $\pm$ 1.8   | 13.5 $\pm$ 1.9   | 21.7 $\pm$ 1.2*  | 22.3 $\pm$ 2.1*  | 22.6 $\pm$ 1.9*  |
| IL-4 (pg/mL)          | 15.2 $\pm$ 3.1   | 51.4 $\pm$ 12.1  | 39.8 $\pm$ 3.5   | 37.1 $\pm$ 2.6   | 22.3 $\pm$ 4.1*  |

NC (non-treated), PC (DF-allergen only), OHEM1 (1.67 mg/kg/day), OHEM2 (16.7 mg/kg/day), OHEM3 (167 mg/kg/day). Cytokine levels in supernatant were measured using ELISA method. Each data represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments. \* $p$ <0.05, significantly different from the control value

으로 앞선 IFN- $\gamma$ 의 농도가 증가된 결과와 함께 Th1/Th2 균형을 유지시킬 수 있는 것으로 생각되어진다. 생약제 혼합물이 NC/Nga 마우스 귀의 부종과 혈청 IgE의 농도를 감소시키고, 항원에 의한 IL-4의 증가와 IFN- $\gamma$ 의 감소를 유전자 수준에서 억제하는 결과를 보여준 연구(14)는 본 실험의 결과와 마찬가지로 천연 생약제들이 Th2로 치우친 알레르기 반응의 Th1/Th2 균형을 수정할 수 있는 가능성을 뒷받침하여 준다.

이상의 결과로 항원인 진드기추출물에 의한 NC/Nga마우스의 IgE 과발현을 확인하였고 염증성 cytokine의 분비가 실제 아토피 염증 반응과의 관계가 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 OHEM이 항원에 의해 유도된 아토피 피부염을 혈청 중 IgE농도와 cytokine 농도 조절을 통해 증상 완화 효과를 나타내는 수 있는 물질임을 알 수 있었다.

## 요 약

결명자(*Cassia obtusifolia*) 및 포공영(*Taraxacum platycarpum*), 유근피(*Ulmus macrocarpa*)로 제조된 생약제 추출혼합물이 *in vitro*와 *in vivo*상에서 아토피 피부염에 미치는 영향을 실험하였다. HMC-1 cell을 이용하여 비만세포의  $\beta$ -hexosaminidase 방출량을 측정 한 결과, 단일 추출물보다 추출복합물이 탈과립을 억제하는 효과가 우수한 것으로 측정되었다. 그리고 HMC-1 cell에서 PMA와 A23187로 자극하였을 때 생성되는 염증성 cytokine의 분비에서도 추출혼합물의 저해 효과가 가장 높게 나타났다. 아토피 질환모델인 NC/Nga 마우스를 사용하여 생약제 추출혼합물의 아토피 저감효과를 측정 한 결과, 진드기 추출물에 의해 발진된 마우스의 귀두께 및 조직학적인 부종 관찰을 통해 생약제 추출혼합물 농도가 증가함에 따라 대조군에 비해 귀 두께 및 부종의 감소가 관찰되었다. 또한 마우스의 혈중 IgE 농도와 이와 관련된 cytokine의 농도를 측정 한 결과, 생약제 추출혼합물 투여농도가 증가함에 따라 IgE의 농도가 유의적으로 감소하였고, IgE의 과발현을 유도하는 IL-4의 분비 억제 및 IFN- $\gamma$ 의 분비가 증가되는 것으로 나타나 생약제 혼합추출물의 섭취가 아토피 피부염 증세 완화 효과에 도움이 되리라 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린2사업(과제번호: 20070301034009)의 지원에 의해 이루어진 연구의 일부이며 지원에 감사드립니다.

## 문 헌

- Na HJ, Moon PD, Lee HJ, Kim HR, Chae HJ, Shin T, Seo Y, Hong SH, Kim HM. Regulatory effect of atopic allergic reaction by *Carpopeltis affinis*. J. Ethnopharmacol. 101: 43-48 (2005)
- Choi JH, Park CW, Lee CH. A study of histamine content in food in Korea. Korean J. Dermatol. 45: 768-771 (2007)

- Jang HS. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis. J. Korean Acad. Fam. Med. 23: 831-840 (2002)
- Taylor ML, Metcalfe DD. Mast cells in allergy and host defense. Allergy Asthma Proc. 22: 115-119 (2001)
- Lee JH, Kim KH, Kim MN, Kim JW, Ro YS, Park YL. The treatment guideline of Korean atopic dermatitis. Ann. Dermatol. 44: 907-913 (2006)
- Hamon M, Bourgoin S. Pharmacological profile of antidepressants: A likely basis for their efficacy and side effects? Eur. Neuropsychopharm. 549: 79-83 (2006)
- Scadding GK. Clinical assessment of antihistamines in rhinitis. Clin. Exp. Allergy 29: 77-81 (1999)
- Chun IK, Choi YS, Kim YP. Adverse effect of topical steroids. Ann. Dermatol. 20: 867-877 (1982)
- Gomes JC, Di Stasi LC, Sgarbosa F, Barata LE. Pharmacological evaluation of the inhibitory effect of extracts from *Anchieta salutaris* on the histamine release induced in the rat and the guinea pig. Int. Arch. Allergy Imm. 103: 188-193 (1994)
- Dombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, Koller BH, Kinet JP. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. Cell 75: 969-976 (1993)
- Metcalfe DD, Kaliner M, Donlon MA. The mast cell. Crit. Rev. Immunol. 3: 23-74 (1981)
- Church MK, Levi-Schaffer F. The human mast cell. J. Allergy Clin. Imm. 99: 155-160 (1997)
- Jeon JH, Kwon SC, Park D, Shin S, Jeong JH, Park SY, Hwang SY, Kim YB, Joo SS. Anti-allergic effects of white rose petal extract and anti-atopic properties of its hexane fraction. Arch. Pharm. Res. 32: 823-830 (2009)
- Gao XK, Fuseda K, Shibata T, Tanaka H, Inagaki N, Nagai H. Kampo medicines for mite antigen-induced allergic dermatitis in NC/Nga mice. Evid-Based Compl. Alt. 2: 191-199 (2005)
- Kang JS, Yoon WK, Han MH, Lee H, Lee CW, Lee KH, Han SB, Lee K, Yang KH, Park SK, Kim HM. Inhibition of atopic dermatitis by topical application of silymarin in NC/Nga mice. Int. Immunopharmacol. 8: 1475-1480 (2008)
- Na HJ, Moon PD, Ko SG, Lee HJ, Jung HA, Hong SH, Seo Y, Oh JM, Lee BH, Choi BW, Kim HM. Sargassum hemiphyllum inhibits atopic allergic reaction via the regulation of inflammatory mediators. J. Pharmacol. Sci. 97: 219-226 (2005)
- Kim EC, Lee HS, Kim SK, Choi MS, Lee S, Han JB, An HJ, Um JY, Kim HM, Lee NY, Bae H, Min BI. The bark of *Betula platyphylla* var. *japonica* inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. J. Ethnopharmacol. 116: 270-278 (2008)
- Choi SP, Kang MY, Koh HJ, Nam SH, Friedman M. Antiallergic activities of pigmented rice bran extracts in cell assays. J. Food Sci. 72: S719-S726 (2007)
- Segawa S, Kuroda H, Kaneko T, Watari J. Oral administration of a hop water extract ameliorates the development of dermatitis induced by the periodical topical application of a mite antigen in atopic dermatitis model NC/Nga mice. Biosci. Biotech. Bioch. 72: 974-981 (2008)
- Jiang J, Yamaguchi T, Funakushi N, Kuhara T, Fan PS, Ueki R, Suto H, Kase Y, Ikeda S, Ogawa H. Oral administration of Yokusansan inhibits the development of atopic dermatitis-like lesions in isolated NC/Nga mice. J. Dermatol. Sci. 56: 37-42 (2009)
- Park KM, Hwang JK, Shin KM, Kim HS, Song JH. Detoxicating effects of oriental herb extract mixtures on nicotine and dioxin.

- Korean J. Food Sci. Technol. 35: 980-987 (2003)
22. Hwang JK, Lee KJ, Yang HJ, Park KM. Protection and detoxification effects of oriental herb extract mixture on TCDD-Induced oxidative stress. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 37: 294-301 (2008)
23. Matsubara M, Masaki S, Ohmori K, Karasawa A, Hasegawa K. Differential regulation of IL-4 expression and degranulation by antiallergic olopatadine in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochem. Pharmacol.* 35: 497-503 (2004)
24. Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Asadullah K. Cytokine and anti-cytokine therapy in dermatology. *Expert Opin. Biol. Ther.* 3: 733-743 (2003)
25. Aioi A, Tonogaito H, Suto H, Hamada K, Ra CR, Ogawa H. Impairment of skin barrier function in NC/Nga Tnd mice as a possible model for atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 144: 12-18 (2001)
26. Ahn KS, Kim SK, Moon KY, Hahn BS, Kang SS, Kim YS. Screening of crude drugs for the inhibitory effect on NF- $\kappa$ B activation in transfectant HaCaT cells. *Korean J. Pharmacogn.* 34: 156-160 (2003)
27. Powrie F, Coffman RL. Cytokine regulation of T-cell function: Potential for therapeutic intervention. *Immunol. Today* 14: 270-27 (1993)
28. Rousset F, Robert J, Andary M, Bonnin JP, Souillet G, Chrétien I, Brière F, Pène J, De Vries JE. Shifts in interleukin-4 and interferon- $\gamma$  production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. *J. Allergy Clin. Immun.* 87: 58-69 (1991)