

加味四物湯의 항염증 효능에 관한 연구

박지원¹ · 김선빈² · 김은아² · 전지애² · 이기무³ · 김동희¹ *

Study of KMSMT on anti-inflammatory effect

Bak Ji-Won¹ · Gim Seon-Bin² · Kim Eun-A² · Jun Ji-Ae² · Lee Ki-Moo³ · Kim Dong-Hee¹ *

¹Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

²Traditional and Biomedical Research Center(TBRC), Daejeon University

³Doori Cosmetics

In order to investigate the possibility of Kamisamultang(KMSMT) as therapeutic for the treatment of atopic dermatitis(AD), cytotoxicity, anti-oxidant activity, modulatory and suppression activities of KMSMT were tested. 90% or higher cell viability was observed in all tested groups from 25 to 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ using Raw 264.7 cells. KMSMT showed dose-dependent DPPH scavenging activity, with more than 80% scavenging activities at 400 and 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations. KMSMT showed dose-dependent suppression activity of reactive oxygen species(ROS) production, especially at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 42.6%. KMSMT decreased nitric oxide(NO) production activity dose dependently, especially at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 30.9%. IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α production rate were decreased by 45.7%, 15.5%, 8.9%, 16.5% respectively when Raw 264.7 cells were treated with LPS and with KMSMT of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. However, only IL-1 β and MCP-1 showed significant changes.

The results above strongly suggest the modulatory and suppressive effect of KMSMT. The results above indicate that KMSMT significantly reduces the effect of oxidative and inflammatory cytokines. The use of KMSMT in atopic dermatitis can be widely suggested.

Key words : KMSMT(Kamisamultang), atopic dermatitis, oxidative damages, inflammation

I. 서론

생체 내의 free radical은 반응성이 강하고 여러 생체물질과 쉽게 화학반응을 일으켜 세포에 손상 및 염증을 유발하며, 고혈압, 동맥경화, 심부전, 류마티스 관절염, 알레르기, 암, 노화 등에 영향을 준다¹⁾. 대표적으로 활성 질소종(reactive nitrogen species, RNS)과 활성 산소

종(reactive oxygen species, ROS)이 있는데, RNS에는 nitric oxide (NO), nitrogen dioxide (NO₂), nitrous acid (HNO₂), peroxyxynitrite (ONOO⁻) 등이 있고, ROS에는 superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) 등이 있다²⁾. 특히 이러한 활성 산소종이 과다하게 생성되거나 생체의 친산화성물질과 항산화물질의 활성균형이 무너지게 되면 산화적 스트레스를 일으킨다³⁻⁴⁾.

높은 산화적 스트레스와 활성산소의 과다는 아

* 교신저자 : 김동희, 대전대 한의과대학 병리학교실
투고일 : 2011년12월23일 수정일 : 2012년 2월6일
확정일 : 2012년 2월6일

토피피부염에 있어서도 염증 반응을 촉진시키므로⁵⁾, 아토피피부염과 관련한 실험적 연구에서는 항산화 및 항염증 평가를 기초로 하게 된다. 아토피피부염의 발생은 병소의 염증성 사이토카인의 발현에서 시작되며, 비만세포로부터 분비되는 TNF- α 와 IL-1 β 는 혈관 내피 세포에서 adhesion 분자의 발현을 유도하여 면역 세포들을 병소로 모으는 역할을 한다⁶⁾.

일반적으로 염증반응 뿐만 아니라 발암, 심장병, 노화 등의 문제를 억제하기 위해 항산화제를 사용하며⁷⁻¹⁰⁾, 특히 경제성과 우수한 항산화성으로 인하여 BHT (butylated hydroxy toluene), BHA (butylated hydroxy anisole), PG (propyl gallate), TBHQ (tertiary butylhydroquinone) 등의 항산화제가 널리 사용되고 있다.

그러나 이 같은 합성 항산화제를 장기간 섭취 시 간, 폐, 신장, 위장, 순환계 등에 심각한 독성을 일으키는 것으로 알려져 있어^{11,12)}, 독성과 부작용이 적은 허브나 약용식물 등을 이용한 항산화제 및 항아토피치료제의 개발이 요구된다.

가미사물탕(KMSMT)의 기본방인 四物湯은宋代 陳¹³⁾의 <太平惠民和劑局方>에 최초로 수록된 이래 血病의 대표적 처방으로 알려져 있다. 일반적으로 血과 관련된 일체의 질병을 치료에 사용되나, 임상에서 原方만으로 사용되는 경우는 극히 드물고 병증에 따라 다양하게 가감되어 활용되고 있다¹⁴⁾. 이¹⁵⁾의 四君子湯과 四物湯의 효능에 관한 연구경향 분석에 의하면 四物湯은 항암효과, 뇌신경 및 월경 이상과 관련된 연구와 더불어 염증 억제 효능에 관한 연구가 보고된 바가 있다. 아울러 염증을 일으키는 산화적 스트레스로부터 세포 보호나 염증억제 및 피부질환 치료 효과는 四物湯의 보혈기능으로부터 유래한 것이라고 기술하고 있다.

본 시료는 當歸, 生地黃, 川芎, 赤芍藥으로 구성된 四物湯에 피부과 질환에서 사용되는 浮萍草, 金銀花, 蒼耳子, 黃芩, 白蒺藜, 蟬蛻를 가미한 처방이다. 구성 개별 약물의 항산화·항염·항아토피 연구¹⁶⁻²⁷⁾가 이미 보고된 바 있어, 四物湯과 가미된 약물간의 상승 작용을 통하여 임상

에서 아토피피부염에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

이에 저자는 임상적 활용을 위한 기초 자료를 제공하고자 새로 작방된 加味四物湯을 시료로 세포독성과 항산화 효능 및 LPS에 의한 세포 염증 반응 억제 효과를 검색하였다.

II. 실험

1. 재료

1) 약물

본 실험에 사용한 加味四物湯(Kamisamultang ; 이하 KMSMT)의 구성 약제들은 대전대학교 난치성면역질환의 동서생명의 학연구센터 (TBRC)에서 구입하여 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량 (1첩)은 다음과 같다.

Table 1. The Composition of KMSMT

한약명	생약명	용량(g)
當歸	Angelicae Gigantis Radix	6
生地黃	Rehmanniae Radix	6
川芎	Cnidii Rhizoma	6
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	6
浮萍草	Spirodela Herba	12
金銀花	Lonicerae Flos	12
蒼耳子	Xanthii Fructus	2
黃芩	Scutellariae Radix	2
白蒺藜	Tribuli Fructus	2
蟬蛻	Cicadae Periostracum	2
Total		56

2) 시약

실험에 사용된 시약 중 trypan-EDTA, acetic acid, tris-base, tris-HCl, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) 등은 Sigma (USA)사 제품을, MTT assay kit (EZ CyTox)는 Daeil Lab Service (Korea)사 제품을, NO assay kit는 인트론 바이오 (Korea)사 제품을, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α , IFN- γ Milliplex panel (IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α)은 Millipore (USA)사 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

3) 기기

본 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (EYELA Co, Japan), CO₂ incubator (Sanyo Co, Japan), autoclave, deep-freezer (Nihon Co, Japan), clean bench, water bath, vortex mixer, heating block, Ice Flaker Machine (Icematic Co, Italy), plate shaker (Lab-line Co, USA), flow cytometer (Becton Dickinson, USA), centrifuge (Hanil Co, Korea), 48well microchamber (Neuroprobe, Gaithersburg, MD, USA), ELISA reader (Molecular Devices, Co, USA), Luminex (Millipore, Co, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 제조

시료 추출 방법은 KMSMT 3첩을 한약 유출기에 넣고, 증류수 1200 ml과 같이 혼합하여 3시간 열탕하여 추출한 후 흡입 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 KMSMT를 분리한 후, 다시 동결 건조기에서 24시간 동결 건조하여 분말 21.3 g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80℃)에서 보관하면서, 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석

하여 사용하였다.

2) 세포독성 측정

KMSMT의 세포독성 여부를 확인하기 위해 Raw 264.7 세포를 이용하여 세포독성을 확인하였다. Raw 264.7 세포는 1 × 10⁴ cells/100 μ l의 농도로 96 well plate에 분주한 다음 KMSMT을 25, 50, 100, 200 μ g/ml 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μ l의 WST solution을 첨가하고 37℃, 5% CO₂ 배양기에 30분 반응 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 wave length 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 항산화 활성 측정

(1) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 측정

150 mM DPPH/EtOH 150 μ l에 KMSMT을 25, 50, 100, 200, 400, 800 μ g/ml 농도로 희석하여 100 μ l씩 첨가한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 이를 ELISA reader를 이용하여 wave length 517nm에서 흡광도를 측정한 후 아래의 방법으로 계산하였다.

$$\text{DPPH 소거능 (\%)} = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{KMSMT 투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

(2) 세포내 reactive oxygen species (ROS) 활성 측정

Raw 264.7 세포 내에서 reactive oxygen speies (ROS)를 측정하기 위하여 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 이용하였다. 48 well plate에 Raw 264.7 세포를 2 × 10⁵/well/400 μ l씩 첨가하고 LPS 1 μ g/ml 및 KMSMT 50, 100, 200 μ g/ml 농도를 처리한 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCF-DA 10 μ M을 처리하여 15분 동안 빛이 차단된 상온에서 배양한 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상청액을 제거하고 다시

PBS 400 μ l를 부유시켜 유세포 분석기(Flow cytometer)를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 ROS를 측정하였다.

4) Total Nitric oxide 생성 억제 효과 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 세포를 96 well plates에 1×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후, KMSMT 각각의 농도를 25, 50, 100, 200 μ g/ml로 처리하고, LPS 1 μ g/ml을 처리하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer를 50 μ l를 각 well에 처리한 후, 10분간 상온에서 암소 반응 후, N2 buffer 50 μ l를 각 well에 처리하고, 10분간 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

5) Raw 264.7 세포에서의 사이토카인 생성량 측정

6 well culture plates에 Raw 264.7 세포를 3×10^5 cells/ml로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후, KMSMT 각각의 농도를 25, 50, 100, 200 μ g/ml로 처리하고, LPS 1 μ g/ml을 처리하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포배양액을 수거하여 배양액에 함유된 IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF-a를 custom-made 4-plex cytokine Milliplex panel을 이용하여 측정하였다. 분석은 Milliplex analyst를 통해 이루어 졌다.

3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard deviation (S.D.)로 기록하였고, 유의성 검증은 Student 's t-test 분석법을 이용하여 결정하였다.

III. 실험 성적

1. Raw264.7 세포에 대한 세포독성

Raw 264.7 세포에서 대조군의 세포생존율은

100 ± 0.0 (%)로 하였을 때, KMSMT의 25, 50, 100, 200 (μ g/ml) 농도 투여군에서는 각각 94.3 ± 3.9 , 112.6 ± 6.6 , 131.9 ± 2.6 , 120.4 ± 5.8 (%)로 나타났다 (Fig. 1).

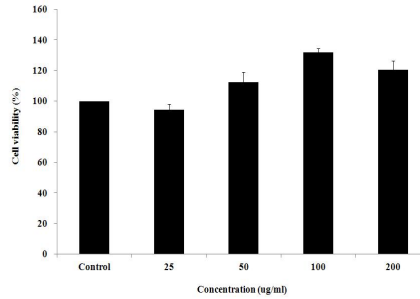


Fig. 1. Effects of KMSMT on the viability of Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were cultured with various concentration of KMSMT for 24 hr and the cell viability was measured by cytotoxicity assay. The result were presented by the mean \pm S.D.

2. 항산화 활성

1) DPPH 소거능에 미치는 영향

DPPH의 소거 활성은 KMSMT의 25, 50, 100, 200, 400, 800 (μ g/ml) 농도투여군에서는 각각 20.9 ± 0.8 , 41.4 ± 1.3 , 55.8 ± 3.4 , 65.0 ± 1.3 , 88.2 ± 0.9 , 89.8 ± 0.1 (%)의 소거 활성 효과를 나타내었다 (Fig. 2).

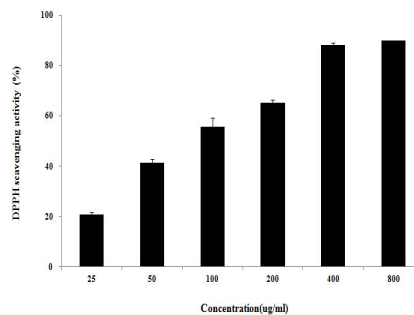


Fig. 2. Scavenging activity of KMSMT. KMSMT were reacted with DPPH for 30 minutes at 37°C, and the absorbance at 517 nm due to DPPH radical was determined. The result are the mean ± S.D.

2) ROS 생성에 미치는 영향

DCFH-DA 시약을 이용하여 Raw 264.7 세포 내 생성되는 ROS 양을 측정한 결과, 대조군의 ROS 생성량이 100 (%) 일 때, KMSMT의 50, 100, 200 (µg/ml) 농도 투여군에서는 대조군에 비하여 각각 75.9, 65.1, 57.4 (%) 로 감소하였다 (Fig. 3).

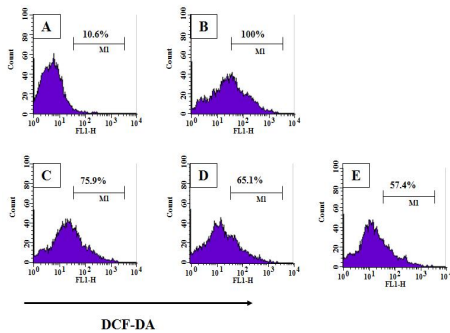


Fig. 3. Inhibitor effects of KMSMT on the ROS production in Raw 264.7 cells. The Raw 264.7 cells were stimulated with LPS and treated with medium (Control, B), KMSMT (50, 100, 200 µg/ml, C-E) for 24 hours. The ROS production was analysed following incubation with DCFH-DA by flow cytometry.

3. Total Nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향

Griess Reagent System을 이용하여 Raw 264.7 세포내 생성되는 NO 양을 측정한 결과, 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (++, p<0.01) 증가를 나타내었고, 대조군의 NO 생성량이 100 (%) 일 때, KMSMT의 25, 50, 100, 200 (µg/ml) 농도 투여군에서는 98.0 ± 6.4, 94.5 ± 2.4, 86.9 ± 0.6, 69.1 ± 2.1 (%) 로

200 (µg/ml) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (*, p<0.05) 감소를 나타내었다 (Fig. 4).

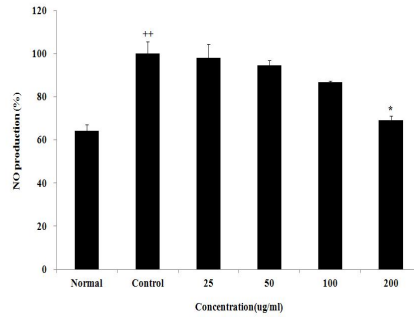


Fig. 4. Inhibition of LPS-induced NO production by KMSMT in RAW 264.7 cells. The Raw 264.7 cells were stimulated with LPS (1 µg/ml) and treated with medium, KMSMT (25, 50, 100, 200 µg/ml) for 24 hours. The results were represented by the mean ± S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (++, p<0.01). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (*, p<0.05).

4. 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-1β 생성량에 미치는 영향

Raw 264.7 세포의 사이토카인 생성량을 측정한 결과, 정상군은 6.1 ± 1.1 (%), 대조군은 100.0 ± 2.1 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++, p<0.001) 증가를 나타내었고, KMSMT의 50, 100, 200 (µg/ml) 농도 투여군에서는 87.5 ± 12.5, 62.5 ± 12.5, 54.3 ± 1.8 (%)로 200 (µg/ml) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (***, p<0.001) 감소를 나타내었다 (Fig. 5).

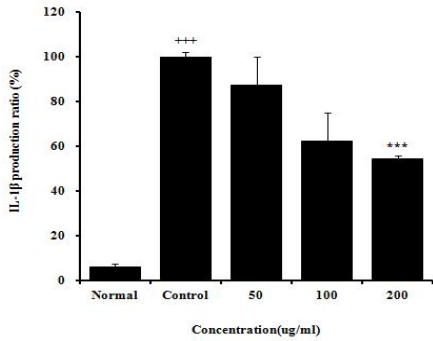


Fig. 5. Effects of KMSMT on IL-1β release by LPS in Raw 264.7 cells. The levels of IL-1β were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The result were presented by the mean ± S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++, p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (***, p<0.001).

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

Raw 264.7 세포의 사이토카인 생성량을 측정 한 결과, 정상군은 7.0 ± 6.9 (%), 대조군은 100.0 ± 1.0 (%)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (++, p<0.01) 증가를 나타내었고, KMSMT의 50, 100, 200 (μg/ml) 농도 투여군에서는 104.4 ± 6.0, 91.0 ± 1.0, 84.5 ± 4.5 (%)로 100 (μg/ml) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (*, p<0.05) 감소를 나타내었다 (Fig. 6).

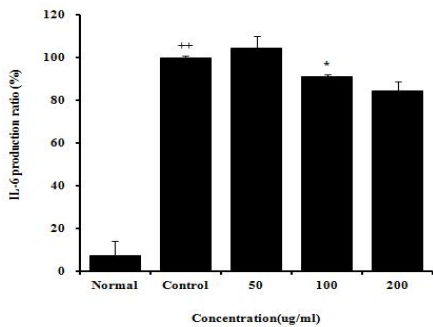


Fig. 6. Effects of KMSMT on IL-6 release by LPS in Raw 264.7 cells. The levels of IL-6 were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The result were presented by the mean ± S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++, p<0.01). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (*, p<0.05).

3) MCP-1 생성량에 미치는 영향

Raw 264.7 세포의 사이토카인 생성량을 측정 한 결과, 정상군은 1.2 ± 0.2 (%), 대조군은 100.0 ± 0.5 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++, p<0.001) 증가를 나타내었고, KMSMT의 50, 100, 200 (μg/ml) 농도 투여군에서는 102.8 ± 1.4, 95.6 ± 5.6, 91.1 ± 0.4 (%)로 200 (μg/ml) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (**, p<0.01) 감소를 나타내었다 (Fig. 7).

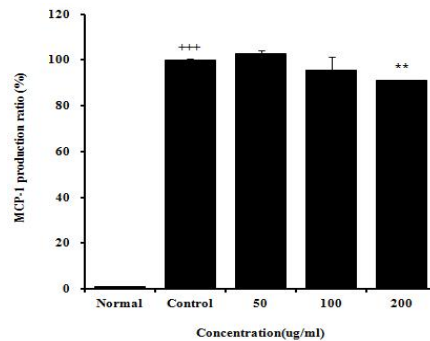


Fig. 7. Effects of KMSMT on MCP-1 release by LPS in Raw 264.7 cells. The levels of MCP-1 were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The result were presented by the mean ± S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++, p<0.001). Statistically

significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (**, p<0.01).

4) TNF-α 생성량에 미치는 영향

Raw 264.7 세포의 사이토카인 생성량을 측정 한 결과, 정상군은 10.9 ± 2.1 (%), 대조군은 100.0 ± 0.1 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++, p<0.001) 증가를 나타내었고, KMSMT의 50, 100, 200 (μg/ml) 농도 투여군에서는 94.2 ± 3.3, 92.7 ± 2.7, 83.5 ± 8.0 (%)으로 감소하였고, 대조군에 비하여 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 8).

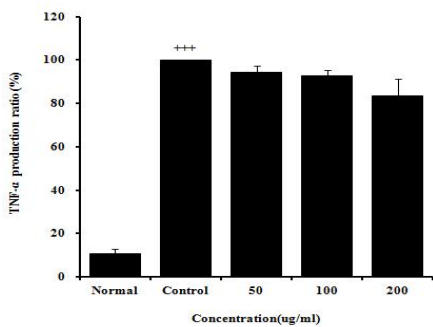


Fig. 8. Effects of KMSMT on TNF-α release by LPS in Raw 264.7 cells. The levels of TNF-α were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The result were presented by the mean ± S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++, p<0.001).

IV. 고찰

아토피피부염은 만성 염증성 피부질환으로^{28,29)} 산화적 스트레스 및 활성산소의 과다 등은 염증 반응을 촉진시킨다⁵⁾. 활성산소 과다에 따른 산화적 스트레스 유발은 세포의 기능과 세포막의 통합성을 붕괴시켜 세포사멸을 초래하는데³⁰⁾, 산화적 스트레스는 신체에서의 활성 산소종

(reactive oxygen species, ROS)과 활성 질소종 (reactive nitrogen species, RNS) 등 pro-oxidant의 농도와 신체의 항산화방어체계 사이의 불균형이 일어나 pro-oxidant의 농도가 우세해진 상태를 뜻한다³¹⁾.

활성산소는 외부로부터 침입한 바이러스나 세균으로부터 몸을 보호하는 역할을 하지만 체내에 그 수가 지나치게 많아지면 정상세포까지 공격하여 알러지성 질환 및 염증 반응을 일으키므로^{32,33)}, 치료 약물의 항산화능에 대한 평가는 염증 및 아토피피부염의 선행 연구에 필수적인 부분이다.

아토피피부염의 피부염증 반응은 사이토카인과 케모카인의 국소적인 발현에 의해 진행되며 각질 형성세포, 비만세포, 수지상세포 등의 세포들로부터 분비되는 TNF-α와 IL-1과 같은 사이토카인이 혈관 내피세포의 수용체에 결합하여 세포의 신호전달 경로를 활성화시키고 혈관내피세포 유착분자의 발현을 유도한다^{6,34)}. 이로 인해 염증세포가 혈관 내피세포와 반응하여 활성화, 유착되는 과정을 거쳐 피부로 유출된다³⁴⁾.

즉 세균을 비롯한 외부 이물질이 체내로 침입하면 조직 또는 혈액에 존재하는 대식세포가 인식하여 탐식작용을 하여 면역 반응을 일으키는 데, 이 과정에서 CD4+ T 세포는 IFN-γ, TNF-α, IL-6 등과 같은 Th1 사이토카인을 생성하고 대식세포의 반응을 활성화시켜 염증 반응을 촉진한다³⁵⁾.

KMSMT은 원방에서 조혈, 혈류개선, 물질대사의 촉진, 면역기능의 증가, 消炎, 抗癌, 鎮痛, 鎮痙 등의 작용이 있음이 밝혀져 있으며^{36,37)}, 當歸, 生地黃, 川芎, 赤芍藥으로 구성된 四物湯을 白芍藥 대신 赤芍藥으로 처방하였다. 이³⁸⁾의 『東醫寶鑑』 中 白芍藥과 赤芍藥이 主藥으로 配伍된 方劑의 活用に 대한 比較研究에 따르면 補血, 補陰, 補精하는 개념이 필요한 精門, 神門, 津液門, 肝臟門, 腎臟門에는 白芍藥이 사용되고 赤芍藥은 사용되지 않아 白芍藥은 補하는 효능이 있고, 赤芍藥은 補하는 효능이 없음이 확인되었다.

白芍藥은 虛勞, 失血 등을 원인으로 하는 질환

을 치료하기 위하여 養血補陰의 효능으로 사용되었으며, 赤芍藥은 瘀血, 熱鬱, 痰火 등을 원인으로 하는 질환을 치료하기 위하여 清熱涼血, 活血祛瘀의 효능으로 사용되었음을 보고하였다. 또 癰疽門에서 白芍藥이 主藥으로 사용된 癰疽疾患은 주로 虛症에 해당하는 병증으로 허약한 상태에서 회복이 느린 경우로 養血補陰에 필요한 병증에 사용되고, 癰疽門과 諸瘡門은 赤芍藥이 가장 많은 빈도로 사용된 치료 영역으로 확인되었다. 癰疽와 瘡瘍의 병증은 實熱을 동반한 화농성, 염증성 질환이므로 赤芍藥의 清熱涼血하고 活血祛瘀止痛하며 消腫散腫하는 효능이 잘 발휘되는 치료 영역이라고 보고한 바 있기에 아토피 피부염 염증 치료제를 위한 처방으로 赤芍藥을 사용하였다.

추가적으로 가미된 浮萍草, 金銀花, 蒼耳子, 黃芩, 白蒺藜, 蟬蛻는 宣散風熱, 透疹, 清熱燥濕, 瀉火解毒 등의 효능으로 이미 임상에서 다양한 피부 질환에 대응되고 있으며, 실험적 연구를 통하여 抗酸化效果, DNCB로 유발된 접촉성피부염 억제, 아토피 피부염 유발 생쥐의 비장 세포 Th17의 세포분화 억제 등의 효능²⁰⁻²⁷이 규명된 바가 있어, 기본방인 사물탕과 더불어 상승적인 항염증 효과를 발휘할 수 있을 것으로 사료된다. 이²⁰는 浮萍草의 化學成分 및 抗酸化效果에 관한 연구를, 현²¹과 김²²은 金銀花(Lonicera japonica)추출물의 항산화 작용 연구와 金銀花 화장수가 DNCB로 유발된 접촉성피부염에 미치는 영향을, 김²³과 정²⁴은 蒼耳子 추출물이 아토피 피부염 유발 생쥐에 미치는 영향을, 오²⁵는 黃芩의 항산화 효과를, 박²⁶과 김²⁷은 蟬蛻가 항알레르기 효과에 미치는 영향 등을 보고하였다.

먼저 처방의 표준화에 대한 기초적 실험으로 살펴본 KMSMT의 25, 50, 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도에서 본 세포독성 평가에서는 모든 실험군에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타내서 본 시료의 안전성이 검증되었다 (Fig. 1).

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical 소거 활성에 있어서 KMSMT는 25, 50,

100, 200, 400, 800 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도에서 농도의존적인 소거 활성 효과를 나타내었으며, 400 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)과 800 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 80% 이상의 소거능이 확인되었다 (Fig. 2). Free radical은 세포에 손상을 주어 질병을 유발하고 DNA의 파괴, 돌연변이 및 세포독성 등에 영향을 주고 불포화지방산에서 지질과산화의 진행을 촉진하는 물질로 보고되어 있다^{39,40}. 또 liposome, deoxyribose 및 protein 등을 공격하여 산화를 유발시켜 인체의 노화와 동맥경화증, 류마티스 관절염, 만성염증, 암 등을 촉진시킨다⁴¹.

활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 및 singlet oxygen 등을 말하는데, 생체 내 산소가 화학적 성질로 인해 환원되는 과정 중 생성되며 반응성이 크기 때문에 생체를 구성하고 있는 단백질, 지질, 핵산 등과 반응하여 생체 분자의 활성을 저하시키거나 기능의 변화를 가져온다⁴². 활성 산소종의 과다 생성은 산화적 스트레스를 유발하고, 산화적 스트레스는 아토피 피부염의 염증 반응을 촉진시키게 된다³⁻⁵.

KMSMT의 50, 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 살펴본 ROS 생성율은 75.9%, 65.1%, 57.4%로 감소하여 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 42.6%의 ROS 생성 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 3).

산화질소 (nitric oxide, NO)는 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine로부터 생성되며⁴³⁻⁴⁵, 생성된 NO는 병리적인 혈관 확장이나 세포독성, 조직 손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다⁴⁶.

대식세포인 Raw 264.7 세포에 LPS (lipopolysaccharide)를 24시간 처리하면 NO의 생성을 확인할 수 있는데, KMSMT은 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시켰으며 특히 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 NO 생성율을 대조군에 비해 30.9% 유의성 있게 억제시켰다 (Fig. 4).

추가적으로 LPS와 같은 염증 자극물질에 의해 생성이 유도되는 염증매개물질의 변화를 살펴보았는데, IL-1 β 와 MCP-1의 생성량은 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 각각 45.7%, 8.9%의 유의성 있는

감소효과를 나타내었고 (Fig. 5, 7), IL-6와 TNF- α 의 생성량은 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 각각 15.5%, 16.5% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 6, 8).

결과적으로 KMSMT는 염증 반응에서 증가되는 염증 매개 인자의 생성을 감소시키는 것으로 보아 cytotoxic한 반응을 중화시키는 역할을 하며, 또한 KMSMT의 산화적 손상에 대한 유의성 있는 결과와 더불어 구성 약물에 대한 항산화 및 항알레르기 효과가 이미 실험적으로 검증된 바 있기에 임상에서의 항염 및 항아토피 치료제로써 활용도가 클 것으로 사료된다.

V. 결 론

가미사물탕(KMSMT)이 아토피피부염 치료제 로써의 가능성 및 효과를 살펴보기 위하여 세포 독성 및 항산화 효능 평가, 및 염증 반응 조절 및 억제 효과를 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

KMSMT은 Raw 264.7 cells에 대한 세포독성 에서 25, 50, 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도 처리군에서 모두 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었다.

KMSMT은 DPPH 소거 활성에서 농도 의존적 으로 소거 활성을 나타내었으며, 특히 400 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)와 800 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도에서 80% 이상의 소거 활성 효과를 나타내었다.

KMSMT은 ROS 생성율을 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소시켰으며, 특히 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도에서 42.6% 억제 효과를 나타내었다.

KMSMT은 NO 생성율을 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소시켰으며, 특히 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도 처리군에서 30.9%의 유의성 있는 감소가 나타났다.

KMSMT은 LPS를 처리한 Raw 264.7 cells의 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군에 비해 IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α 의 생성율을 각각 45.7%, 15.5%, 8.9%, 16.5% 감소시켰으나, IL-1 β 와 MCP-1에서만 유의성이 나타났다.

이상으로 KMSMT의 염증 반응 조절 및 억제 효과가 실험적으로 검증되었으며, 항 후 항염 및 항아토피 치료제로써의 효과가 기대된다.

<감사의 글>

본 연구는 지식경제부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것입니다.

VI. 참고문헌

1. Chung HY : Aging and Carcinogenic Mechanism Induced by Free Radicals, Kor J Gerontol, 2:1-11, 1992.
2. Halliwell B, et al. : Free radicals in Biology and Medicine (3rd ed), Oxford:Oxford University Press, pp.246-350, 1999.
3. 김유나 외 : 고추씨 물추출물이 고지방과 고콜레스테롤 식이 흰쥐의 항산화 효소활성 및 산화적 손상에 미치는 영향, 한국영양학회지, 44(4):284-291, 2011.
4. 광지현 외 : 자색고구마 추출물의 항산화 효과 및 신경세포 보호효과, 농업생명과학 연구, 44(2):57-66, 2010.
5. Kirkham P, et al. : Oxidized vitamin E and glutathione as markers of clinical status in asthma. Pharmacol Ther, 111(2):476-94, 2006.
6. 陳家賢 : 가미패독산의 NC/Nga 생쥐에서 발생된 아토피 피부염 억제 작용, 대전대학교대학원, 2006.
7. Fubini B, et al. : Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis, Free Radical Bio Med, 34:1507-1516, 2003.
8. Fang YZ, et al. : Free radicals, antioxidants and nutrition, Nutr Res, 18:872-879, 2002.

9. Giles GI, et al. : Hypothesis: The role of reactive sulfur species in oxidative stress, *Free Radical Bio Med*, 31:1279-1283, 2001.
10. Moini G, et al. : Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid, *Toxicol Appl Pharm*, 182:84-90, 2002.
11. Barene AL : Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *J Am Oil Chem Soc*, 52:59-63, 1975.
12. Choe SY, et al. : Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxy anisole (BHA), *Korean J Food Sci Technol*, 14:283-288, 1982.
13. 陳師文 : 太平惠民和劑局方, 臺北, 施風出版社, p.4, 1975.
14. 林垠美 외 : 四物湯 및 四物湯 藥物構成에 따른 實驗的 研究, *경희한의대논문집*, 21(1):409-432, 1998.
15. 이수진 : 사군자탕과 사물탕의 효능에 관한 연구경향 분석, *대전대학교 한의학연구소 논문집*, 20(1):175-182, 2011.
16. 서영남 : 당귀의 감별 및 항산화 효능, *조선대학교대학원*, 2004.
17. 이경환 : 生地黃과 熟地黃의 흰쥐 신장에 서의 항산화 효과, *동신대학교대학원*, 2003
18. 허혜영 : 천궁 추출물이 고지혈 유발 흰쥐에서 지질 및 항산화활성에 미치는 영향, *신라대학교대학원*, 2010.
19. 김공민 : 작약 추출물의 아토피 피부염 효과, *조선대학교대학원*, 2011.
20. 이효은 : 浮萍草의 化學成分 및 抗酸化效果에 관한 연구, *부산대학교대학원*, 1995.
21. 현미란 : 금은화(Lonicera japonica)추출물의 항산화 작용 연구, *순천향자연과학연구*, 14(2):163-167, 2008.
22. 김상찬 외 : 금은화 화장수가 DNCB로 유발된 접촉성피부염에 미치는 영향, *대한분초학회지*, 21(1):9-15, 2006.
23. 김금란 외 : 창이자 추출물이 아토피 피부염 유발 생쥐의 비장 세포 Th17의 세포분화 억제에 따른 아토피 피부 상태에 미치는 영향, *KSBB Journal*, 24(4):383-392, 2009.
24. 정은희 : 창이자 추출물이 아토피 유도 마우스에 있어서 미치는 영향, *건국대학교대학원*, 2007.
25. 오원우 : 黃芩의 항산화 효과, *동신대학교대학원*, 2004.
26. 박병모 : 선태가 抗 알레르기의 작용에 미치는 영향, *경희대학교대학원*, 1993.
27. 김경완 : 蟬蛻의 抗炎效果에 대한 實驗的 研究, *원광대학교대학원*, 2011.
28. 김덕곤 외 : 동의 소아과학, 정담, pp.660-664, 2002.
29. Sampson HA : Atopic dermatitis, *Ann Allergy*, 69(6):469-479, 1992.
30. Fiers W, et al. : More than one way to die: apoptosis and necrosis and reactive oxygen damage, *Oncogene*, 18:7719-7730, 1999.
31. Spector A : Oxidative stress and disease, *J Ocul Pharmacol Ther*, 16(2):193-201, 2000.
32. Dunstan JA, et al. : Associations between antioxidant status, markers of oxidative stress and immune responses in allergic adults, *Clin Exp Allergy*, 36(8):993-1000, 2006.
33. Bickers DR, et al. : Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease, *Invest Dermatol*, 126:2565-2575, 2006.
34. 김태운 : 아토피피부염 치료의 최신 경향, *소아알레르기 호흡기*, 19(3):209-219, 2009.
35. 蔡琦源 : 금은화의 항염작용과 파골세포

- 형성 억제 효과, 경희대학교대학원, 2008.
36. 謝遠明 外 : 中藥方劑現代研究及臨床應用, 陝西科學技術出版社, pp.165-198, 1989.
 37. 안희덕 : 四物湯의 항암제 부작용 억제에 관한 실험적 연구, 동의병리학회지, 10:341-359, 1995.
 38. 이치웅 : 『東醫寶鑑』 中 白芍藥과 赤芍藥이 主藥으로 配伍된 方劑의 活用に 대한 比較研究, 상지대학교대학원, 2011.
 39. Bloknina O, et al. : Antioxidants, oxidantive damage and oxygen deprivation stress, Ann Bot, 91:179-194, 1990.
 40. Hochestein P, et al. : The vature of oxidant and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer, Mutat Res, 202:363-375, 1988.
 41. 정희록 외 : 어성초 추출물의 항산화 및 신경세포 보호효과, 한국식품저장유통학회, 17(5):720-726, 2010.
 42. 조은영 : 楡根皮 추출물의 활성종 억제 및 염증 촉진 인자 제어 효과, 동국대학교대학원, 2008.
 43. Liu RH, et al. : Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide. a review, Mutat Res, 339(2):73-89, 1995.
 44. Forstermann U, et al. : Isoforms of nitric oxide synthase Characterization and purification from different cell types, Biochem Pharmacol, 42(10): 1849-1857, 1991.
 45. Alderton WK, et al. : Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, Biochem J, 357(Pt 3):593-615, 2001.
 46. Shanmugam N, et al. : Molecular mechanism of high glucose-induced cyclooxygenase-2 expression in monocyte, Diabetes, 53(3):795-802, 2004.