

## 淸華湯의 항산화 및 항염증 효능

김진우<sup>1</sup> · 김선빈<sup>2</sup> · 오정민<sup>2</sup> · 윤미영<sup>3</sup> · 이기무<sup>4</sup> · 김동희<sup>1</sup> \*

### Effect of CHT in anti-oxidative and anti-inflammatory related factors

Kim Jin-Woo<sup>1</sup> · Gim Seon-Bin<sup>2</sup> · Oh Jeong-Min<sup>2</sup> · Yun Mi-Young<sup>3</sup> · Lee Ki-Moo<sup>4</sup> · Kim Dong-Hee<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup>Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

<sup>2</sup>Traditional and Biomedical Research Center(TBRC), Daejeon University

<sup>3</sup>Dept. of beauty science, Kwangju Women's University

<sup>4</sup>Doori Cosmetics

To investigate the clinical aspects of CHT in atopic dermatitis (AD) treatments, the effect of CHT in anti-oxidative and anti-inflammatory cytokines were tested. 100% or higher cell viability was observed in all tested groups from 25 to 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  using Raw 264.7 cells. CHT showed dose-dependent DPPH scavenging activity, with more than 90% scavenging activities at 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentrations. CHT showed dose-dependent suppression activity of ROS production, especially at 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of 37.5%. CHT decreased NO production activity, with significant decrease of 33.2% at 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  production rate were decreased by approximately 25% when Raw 264.7 cells were treated with LPS and with CHT of 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Also, IL-1 $\beta$  production rate was decreased by 25% at 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The results above indicate that CHT significantly reduces the effect of oxidative and inflammatory cytokines. The use of CHT in dermatitis can be widely suggested.

Key words : oriental medicine, atopic dermatitis, oxidative damages, inflammation

## I. 서론

염증(inflammation)은 發赤, 發熱, 腫脹, 疼痛 등이 주 증상으로, 혈관 투과성 항진과 과립구 및 대식세포와 같은 세포의 침윤이 특징적으로 이루어진다<sup>1,2)</sup>. 특히 대식세포는 동물 체내 모든 조직에서 분포하는 면역세포로서 세균이나 이물질을 탐식 제거하는 과정에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$

등의 염증 매개 물질들을 분비하여 초기 염증 반응에 주요 역할을 담당한다<sup>3,4)</sup>. 또한 염증 반응을 유발시키는 매개 물질로 활성산소(free radicals), 산화질소(nitric oxide, NO), prostaglandin 등이 있는데<sup>5)</sup>, 활성산소는 체내의 DNA, RNA, 단백질, 지질 등과 반응하여 염증이거나 암, 노화 등을 유발시키는 것으로 알려져 있다<sup>6,7)</sup>.

산화질소 또한 원래 염증성 또는 항염증성의 기능을 동시에 가지나 생체 내의 과도한 분비는 오히려 세포독성을 일으켜 세포 파괴, 혈관 확장 등의 염증 반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>8,9)</sup>.

\* 교신저자 : 김동희, 대전대 한의과대학 병리학교실  
투고일 : 2011년12월23일 수정일 : 2012년 1월11일  
확정일 : 2012년 1월13일

아토피피부염 역시 이러한 염증과 관련된 병리적 메커니즘을 중심으로 증상이 심화되거나 악화되는 특징이 있어, 한의학 임상에서는 기본적인 辨證施治 방식과 더불어 體表에서 나타난 소양과 염증을 치료하는 다양한 약물 가감이 이루어진다<sup>10,11)</sup>.

최근 진행된 실험적 연구 역시 염증 기전 관련 인자와 더불어 면역학적 조절능에 대한 연구<sup>12-17)</sup>가 주를 이루고 있으며, 특히 EBM (Evidence based medicine) 구축을 위한 임상 활용방에 대한 객관적 규명 역시 활발하게 이루어지고 있다.

본 시료인 ‘淸華湯(Chunghwatang)’은 六一散, 荊芥連翹湯, 四物湯 등을 基本方으로 祛風清熱, 瀉火解毒, 涼血滋陰 효능이 있는 약물을 가미하여 瘙癢感을 主訴症으로 하는 다양한 피부 질환에 활용되는 임상 처방이다.

한의학에서 瘙癢症 병리는 風瘙癢, 風癢으로 불릴 정도로 實證에 있어서는 風邪와 연관이 있으며, 급·만성 모두에서 血熱과 血毒의 병리가 瘙癢症을 악화시키고 동시에 염증을 심화시키는 것으로 인식하고 있다. 따라서 發散風寒, 發散風熱, 祛風止濕, 清熱涼血, 清熱解毒瀉火, 利尿通淋, 清熱利濕, 消腫解毒 효능<sup>18)</sup>을 가진 약물로 구성된 본 방은 이러한 병리에 대하여 약물간의 상승 작용으로 유의성 있는 효과를 발휘할 수 있을 것으로 사료된다.

이에 본 실험에서는 보다 유의성 있는 치료 처방의 개발을 위한 기초 연구와 더불어 피부 질환에 활용되고 있는 임상 활용방에 대한 객관적 규명을 위하여 ‘淸華湯(Chunghwatang)’을 시료로 항산화 및 항염증 효능에 관련된 기본적인 실험을 진행하여 유의성을 평가하였다.

## II. 실험

### 1. 재료

#### 1) 약물

본 실험에 사용한 淸華湯 (Chunghwatang ; 이하 CHT)의 구성 약재들은 대전대학교 난치성면

역질환의 동서생명의학연구센터 (TBRC)에서 구입하여 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량 (1첩)은 다음과 같다.

Table 1.The Composition of Chunghwatang (CHT)

한약명	생약명	용량(g)
滑石	Talcum	8
玄參	Scrophulariae Radix	8
金銀花	Lonicerae Flos	8
牛蒡子	Arctii Fructus	8
生地黃	Rehmanniae Radix	8
當歸	Angelicae Gigantis Radix	8
山楂肉	Crataegi Fructus	8
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	8
黃芩	Scutellariae Radix	4
梔子	Gardeniae Fructus	4
荊芥	Schizonepetae Spica	4
連翹	Forsythiae Fructus	4
防風	Saposhnikovia Radix	4
甘草	Glycyrrhizae Radix	4
樺皮	Betulae Platyphyllae Cortex	10
榆根皮	Ulmi Pumilae Cortex	10
秦艽	Gentianae Macrophyllae Radix	5
薄荷	Menthae Herba	5
浮萍草	Spirodela Herba	2
石膏	Gypsum	4
Total		124

### 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- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  Milliplex panel (IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1,

TNF- $\alpha$ )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), CO<sub>2</sub> 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 CHT 2점을 한약 유출기에 넣고, 증류수 1200 ml과 같이 혼합하여 3시간 열탕하여 추출한 후 흡입 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 CHT를 분리한 후, 다시 동결 건조기에서 24시간 동결 건조하여 분말 26.8 g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80℃)에서 보관하면서, 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

### 2) 세포독성 측정

CHT의 세포독성 여부를 확인하기 위해 Raw 264.7 세포를 이용하여 세포독성을 확인하였다. Raw 264.7 세포는 1 × 10<sup>4</sup> cells/100  $\mu$ l의 농도로 96 well plate에 분주한 다음 CHT를 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/ml 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10  $\mu$ l의 WST solution을 첨가하고 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 30분 반응시킨 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  $\mu$ l에 CHT를 25, 50, 100, 200, 400, 800  $\mu$ g/ml 농도로 희석하여 100  $\mu$ l씩 첨가한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 이를 ELISA reader를 이용하여 wave length 517nm에서 흡광도를 측정된 후 아래의 방법으로 계산하였다.

DPPH 소거능 (%) =

$$\left( \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{CHT투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

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

Raw 264.7 세포 내에서 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 이용하였다. 48 well plate에 Raw 264.7 세포를 2 × 10<sup>5</sup>/well/400  $\mu$ l씩 첨가하고 LPS 1  $\mu$ g/ml 및 CHT 50, 100, 200  $\mu$ g/ml 농도를 처리한 후 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCF-DA 10  $\mu$ M을 처리하여 15분 동안 빛이 차단된 상온에서 배양한 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400  $\mu$ 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<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, CHT 각각의 농도를 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/ml로 처리하고, LPS 1  $\mu$ g/ml을 처리하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer를 50  $\mu$ l를 각 well에 처리한 후, 10분간 상온에서 암소반응

후, N2 buffer 50  $\mu$ l를 각 well에 처리하고, 10분간 반응시킨 후, 540nm에서 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  $3 \times 10^5$  cells/ml로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, CHT 각각의 농도를 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/ml로 처리하고, LPS 1  $\mu$ g/ml을 처리하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포배양액을 수거하여 배양액에 함유된 IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ 를 custom-made 4-plex cytokine Milliplex panel을 이용하여 측정하였다. 분석은 Milliplex analytst를 통해 이루어 졌다.

3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean  $\pm$  standard error (S.E.)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  $100 \pm 1.8$  (%)로 하였을 때, CHT의 25, 50, 100, 200 ( $\mu$ g/ml) 농도 투여군에서는 각각  $113.9 \pm 10.5$ ,  $116.6 \pm 8.5$ ,  $115.4 \pm 9.9$ ,  $102.9 \pm 11.2$  (%)로 나타났다 (Fig. 1).

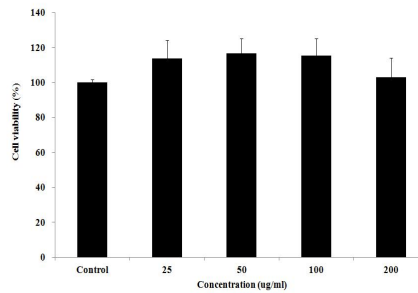


Fig. 1. Effects of CHT on the viability of Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were cultured with various concentration of CHT for 24 hr and the cell viability was measured by cytotoxicity assay. The result were presented by the mean  $\pm$  S.E.

2. 항산화 활성

1) DPPH 소거능에 미치는 영향

DPPH의 소거 활성은 CHT 25, 50, 100, 200, 400, 800 ( $\mu$ g/ml) 농도 투여군에서는 각각  $16.1 \pm 1.0$ ,  $39.1 \pm 1.1$ ,  $52.0 \pm 1.5$ ,  $71.0 \pm 5.6$ ,  $86.4 \pm 3.4$ ,  $91.4 \pm 1.0$  (%)의 소거 활성 효과를 나타내었다 (Fig. 2).

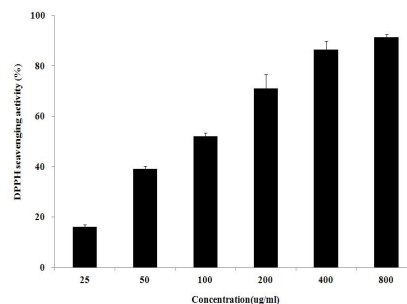


Fig. 2. Scavenging activity of CHT. CHT were reacted with DPPH for 30 minutes at 37 $^{\circ}$ C, and the absorbance at 517 nm due to DPPH radical was determined. The result are the mean  $\pm$  S.E.

2) ROS 생성에 미치는 영향

DCFH-DA 시약을 이용하여 Raw 264.7 세포 내 생성되는 ROS 양을 측정된 결과, 대조군의 ROS 생성량이 100 (%) 일 때, CHT의 50, 100, 200 (µg/ml) 농도 투여군에서는 대조군에 비하여 각각 77.8, 75.6, 62.5 (%) 로 감소하였다 (Fig. 3).

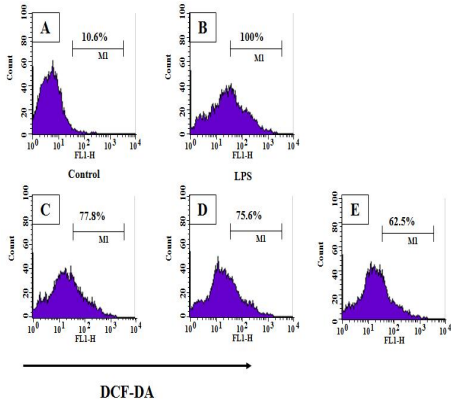


Fig. 3. Inhibitor effects of CHT on the ROS production in Raw 264.7 cells. The Raw 264.7 cells were stimulated with LPS and treated with medium (Control, B), CHT (50, 100, 200 µg/ml, C-E) for 24 hours. The ROS production was analysed following incubation with DCFH-DA by flow cytometry.

3. Total Nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향

Griess Reagent System을 이용하여 Raw 264.7 세포내 생성되는 NO 양을 측정된 결과, 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+, p<0.05) 증가를 나타내었고, 대조군의 NO 생성량이 100 (%) 일 때, CHT의 25, 50, 100, 200 (µg/ml) 농도 투여군에서는 98.2 ± 7.1, 66.8 ± 2.9, 72.3 ± 9.8, 67.3 ± 5.6 (%) 으로 나타나 50 (µg/ml) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*, p<0.01) 감소를 나타내었다 (Fig. 4).

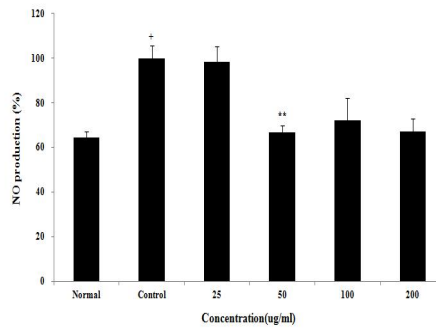


Fig. 4. Inhibition of LPS-induced NO production by CHT in RAW 264.7 cells. The Raw 264.7 cells were stimulated with LPS (1 µg/ml) and treated with medium, CHT (25, 50, 100, 200 µg/ml) for 24 hours. The results were represented by the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared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

4. 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-1β 생성량에 미치는 영향

Raw 264.7 세포의 사이토카인 생성량을 측정된 결과, 정상군은 6.1 ± 1.1 (%), 대조군은 100.0 ± 2.1 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++, p<0.001) 증가를 나타내었고, CHT의 50, 100 (µg/ml) 농도 투여군에서는 82.5 ± 7.5, 75.0 ± 10.0 (%)으로 감소하였고, 대조군에 비하여 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 5).

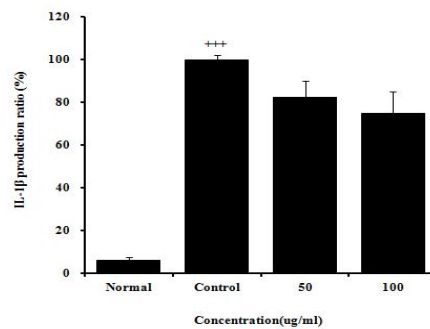


Fig. 5. Effects of CHT on IL-1β release by

LPS in Raw 264.7 cells. The levels of IL-1 $\beta$  were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The result were presented by the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal 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  $\pm$  6.9 (%), 대조군은 100.0  $\pm$  1.0 (%)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (++,  $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었고, CHT의 50, 100, 200 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 농도 투여군에서는 96.5  $\pm$  1.7, 93.6  $\pm$  8.6, 76.1  $\pm$  2.5 (%)로 200 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*,  $p < 0.01$ ) 감소를 나타내었다 (Fig. 6).

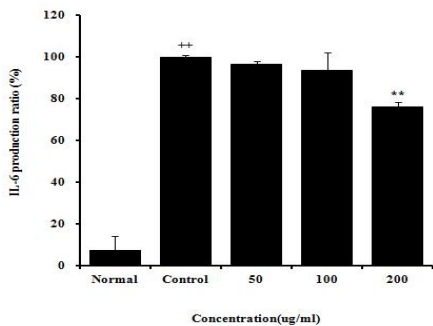


Fig. 6. Effects of CHT on IL-6 release by LPS in Raw 264.7 cells. The levels of IL-6 were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The result were presented by the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal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

3) MCP-1 생성량에 미치는 영향

Raw 264.7 세포의 사이토카인 생성량을 측정 한 결과, 정상군은 1.2  $\pm$  0.2 (%), 대조군은 100.0  $\pm$  0.5 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++,  $p < 0.001$ ) 증가를 나타내었고, CHT의 50, 100, 200 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 농도 투여군에서는 108.9  $\pm$  0.9, 100.5  $\pm$  2.0, 75.6  $\pm$  5.1 (%)로 200 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*,  $p < 0.05$ ) 감소를 나타내었다 (Fig. 7).

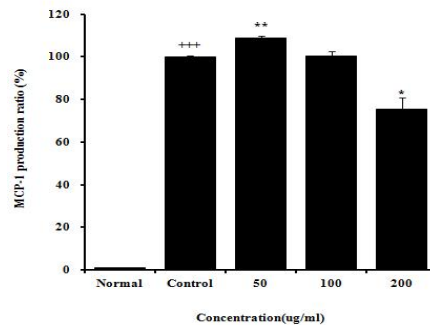


Fig. 7. Effects of CHT on MCP-1 release by LPS in Raw 264.7 cells. The levels of MCP-1 were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The result were presented by the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++,  $p < 0.001$ ). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ ).

4) TNF- $\alpha$  생성량에 미치는 영향

Raw 264.7 세포의 사이토카인 생성량을 측정 한 결과, 정상군은 10.9  $\pm$  2.1 (%), 대조군은 100.0  $\pm$  0.1 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++,  $p < 0.001$ ) 증가를 나타내었고, CHT의 50, 100, 200 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 농도 투여군에서는 95.5  $\pm$  0.5, 91.5  $\pm$  4.5, 73.5  $\pm$  8.5 (%)로 50, 200 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*,  $p < 0.01$ , \*,  $p < 0.05$ ) 감소를 나타내었다 (Fig. 8).

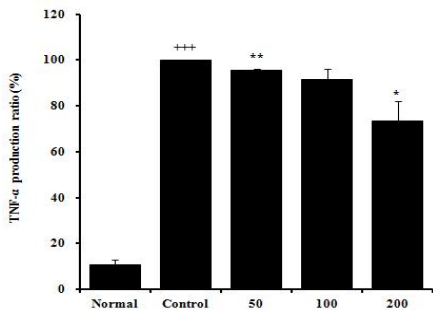


Fig. 8. Effects of CHT on TNF- $\alpha$  release by LPS in Raw 264.7 cells. The levels of TNF- $\alpha$  were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The result were presented by the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by 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 (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ ).

#### IV. 고찰

염증 반응은 조직 손상 또는 세균 감염 등에 의해 발생하는 것으로, 생체 조직이 다양한 원인에 의해 손상 받았을 때 손상된 부분을 정상화 시키고자 하는 면역 반응의 일부분이다<sup>2)</sup>.

염증 증상으로는 발열, 피로, 식욕 감퇴 등의 전신 증상과 발적, 발열, 종창, 동통 등의 국소 증상이 있는데, 병리조직학적으로는 혈관 투과성 항진과 과립구 및 대식세포와 같은 세포의 침윤이 특징이다<sup>19,20)</sup>. 특히 대식세포는 식균작용이 있기 때문에 항원을 잡아먹을 수 있어 자연면역에서 중요한 기능을 나타내며, 획득면역반응에서도 T cell에 항원을 보여주는 (antigen presentation) 작용을 한다. 이는 여러 가지 물질을 세포 밖으로 분비하는 대표적인 분비세포로서, 약 50 가지 이상의 활성이 있는 물질을 분비하는데, 이들은 염증반응의 조절에서 중요한 역할을 하며,

다른 면역세포의 작용을 조절하는 cytokine을 분비하기도 한다<sup>3,4)</sup>.

더불어 염증 반응을 유발시키는 매개 물질로는 활성산소, 산화질소, prostaglandin 등이 있다<sup>5)</sup>. 활성산소는 호흡을 하는 대부분의 생물에서 필수적으로 생성되는 부산물로 외부로부터 침입한 바이러스나 세균으로부터 몸을 보호하기도 하지만, 그 수가 많아지면 정상세포까지 공격하여 알러지성 질환 및 염증 반응을 일으키게 된다<sup>21,22)</sup>.

산화질소는 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능 등의 역할을 조절하며, L-arginine의 산화 반응에 의해 생성된다<sup>23-25)</sup>. 산화 반응을 촉매하는 NO synthase (NOS)는 nNOS (neural NOS), eNOS (endothelial NOS), iNOS (inducible NOS)의 NOS isozyme이 존재하며, 특히 iNOS의 경우 interleukin, interferon, LPS와 같은 염증성 자극에 의해 조절 된다<sup>26)</sup>.

Prostaglandin은 국소적으로 활성화 되는 물질로 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase (COX) 효소의 작용에 의해 합성되며, 2종류의 isoform인 COX-1과 COX-2 중 COX-2는 사이토카인 등의 여러 염증 자극에 대한 반응으로 나타나기 때문에 COX-2를 선택적으로 억제하는 약물들은 이에 따른 염증을 줄일 수 있다<sup>27,28)</sup>.

한의학적으로 아토피피부염과 관련된 연구는 임상적으로 뿐만 아니라 실험적으로도 꾸준히 진행되고 있으며<sup>12-17 29-31)</sup>, 특히 많은 연구가들이 임상에서 주로 활용되는 처방 및 구성 약물에 대한 항산화 및 항염증 효능을 통해 항아토피 효능을 평가하고 있다.

본 시료인 '淸華湯(CHAT)'은六一散, 荊芥連翹湯, 四物湯 등을 基本方으로 瘙癢感을 主訴症으로 하는 다양한 피부 질환에 활용되는 처방이다. 이미 荊芥連翹湯, 四物湯은 本方 혹은 加減方이 염증과 관련된 다양한 인자들에 대하여 유의성이 있음이 실험적으로 규명<sup>32-35)</sup>된 바가 있다.

구성 약물의 본초학적 효능을 살펴보면 淸熱涼血 효능의 玄蓼, 赤芍藥, 淸熱燥濕 효능의 黃芩, 發散風寒 효능의 荊芥, 防風, 淸熱解毒瀉火 효능의 金銀花, 連翹, 梔子, 發散風熱 효능의 牛蒡子,

浮萍草, 薄荷, 祛風止濕 효능의 秦艽, 利尿通淋 효능의 滑石, 淸熱利濕 효능의 樺皮, 消腫解毒 효능의 柳根皮 등<sup>18)</sup>으로 구성되어 내부적으로는 血熱과 血毒의 병리를 개선하고 외부적으로는 체표를 열어 사기가 신속히 배출될 수 있는 효과를 발휘할 수 있을 것으로 사료된다.

항산화 및 염증 실험에 앞서 시료에 대한 세포 독성을 평가하였다. 실험 농도를 설정하기 위한 Raw 264.7 cell에 의한 세포독성 평가에서는 CHT는 25, 50, 100, 200 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 농도로 처리한 모든 실험군에서 100% 이상의 세포 생존율을 나타내어 본 시료의 안전성을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

항산화 효능 평가는 가장 기본적으로 사용되는 DPPH free radical 소거 활성과 ROS (reactive oxygen species) 생성량을 측정하였다.

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)는 안정한 자유 라디칼로 각 추출물에서 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거 활성을 기대할 수 있어, 일반적으로 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다<sup>36-37)</sup>.

ROS는 세포 내 산소 호흡 과정에 의해 생성되어 정상적일 때는 체내의 산화물질과 항산화 물질 사이의 균형이 유지되나 과도한 산화물질의 발생이나 항산화 물질이 감소될 경우 산화적 손상을 유발 한다<sup>38)</sup>.

활성산소와 염증과의 관계에 있어서도 활성산소에 의해 손상을 입은 대식세포가 TNF- $\alpha$ , IL-6, NO, PGE2 등의 염증 매개 물질을 분비하고 과도한 염증 상태에서 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증 반응을 촉진시킨다<sup>39,40)</sup>.

CHT는 DPPH 소거능 평가 및 ROS 생성율에서 농도 의존적 효과를 나타내었고, 특히 DPPH 소거능 평가에서는 800 ( $\mu\text{g/ml}$ )의 농도에서 90% 이상의 소거 활성 효과를, ROS 생성율에서는 200 ( $\mu\text{g/ml}$ )의 농도에서 37.5% 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 2, 3).

LPS (lipopolysaccharide)는 그람 음성균의 세

포 외막에 존재하며 대식세포에서 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 를 증가시켜 조직 손상을 유발 한다<sup>41)</sup>. 본 실험에서는 대식세포인 Raw 264.7 cells을 LPS로 자극하여 시료의 농도에 따른 NO 생성을 확인하였는데, 50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 농도에서 대조군에 비하여 33.2% 억제시키는 유의성을 나타내었다 (Fig. 4).

또한 본 시료가 LPS를 처리한 Raw 264.7 cells에서 분비되는 IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  생성량은 200  $\mu\text{g/ml}$  농도에서, IL-1 $\beta$  생성량은 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군에 비해 약 25% 내외로 감소되어 (Fig. 5-8), 본 시료의 염증 억제 효과를 객관적으로 확인할 수 있었다.

전체적인 실험이 가장 기본적인 염증 인자에 대한 검색으로 초점이 맞추어져 있어, 항 후 동물 실험과 다양한 관련 인자들에 검색을 통하여 보다 정확한 효능 기전에 대한 검색이 있어야 할 것으로 보인다. 아울러 구성 약물에 대한 개별적인 검색을 통하여 약물간의 상호 작용에 관련된 한의학적 이론에 대한 객관적인 규명이 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결론

아토피피부염 치료 처방의 개발을 위한 기초 연구와 더불어 피부 질환에 활용되고 있는 임상 활용방에 대한 객관적 규명을 위하여 '淸華湯 (CHT)'을 시료로 항산화 및 항염증 효능 관련 인자에 대한 검색을 진행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

CHT은 Raw 264.7 cells에 대한 세포독성에서 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$  농도 처리군에서 모두 100% 이상의 세포 생존율을 나타내었다.

CHT은 DPPH 소거 활성에서 농도 의존적으로 소거 활성을 나타내었으며, 800  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 90% 이상의 소거 활성 효과를 나타내었다.

CHT은 ROS 생성율을 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소시켰으며, 200  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 37.5% 억제 효과를 나타내었다.



CHT은 NO 생성율을 대조군에 비해 감소시켰으며, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 33.2%의 유의성 있는 감소를 나타내었다.

CHT은 LPS를 처리한 Raw 264.7 cells에서 대조군에 비해 IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  생성량을 200  $\mu\text{g/ml}$  농도에서, IL-1 $\beta$  생성량을 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 약 25% 내외로 감소시켰다.

CHT은 CD3로 활성화된 비장세포에서 IL-4, IL-6, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  생성량을 대조군에 비해 각각 40.6%, 31.6%, 40.9%, 27.5%, 57.4%로 유의성 있게 감소시켰으며, IL-5 생성량은 12..8% 감소하였다.

이상의 결과로 淸華湯(CHT)은 산화적 손상 및 염증 인자들에 대하여 유의성 있는 억제 효과가 객관적으로 검증됨으로써 피부 염증 질환에 보다 다양하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

<감사의 글>

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

VI. 참고문헌

1. 黃仁承 : 魚腥草 물추출물의 항염효능에 관한 연구, 경원대학교대학원, 2010.
2. 金義一 : 聖愈湯加減方の 炎症 病理 因子와 酸化力 損傷에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 2008.
3. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD : IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*, J Microbiol Biotechnol, 10:8-15, 2000.
4. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T : Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic

- mechanism of activated macrophages, J Immunol, 144:1425-1431, 1990.
5. Yun HJ, Heo SK, Lee YT, Park WH, Park SD : Anti-inflammatory Effect of *Evodia officinalis* DODE in Mouse Macrophage and Human Vascular Endothelial Cells, Kor J Herbology, 23(1):L29-38, 2008.
6. Takizawa, S : Free radical production in ischemic cerebrovascular disease, Nitroisoi, 40(4):319-321, 2003.
7. Vulin AI, Stanley FM : Oxidative stress activates the plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-)promoter through an AP-response element and cooperates with insulin for additive effects on PAI-transcription, J Biol Chem, 279:5172-5178, 2004.
8. Nathan C : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, FASEB J, 6(12):3051-3064, 1992.
9. Lowenstein CJ, Snyder SH : Nitric oxide, a novel biologic messenger, Cell, 70(5):705-707, 1992.
10. Lee EH, Lee SE, Lee SH. : 아토피피부염의 진단과 치료법의 최신지견, The Korean Society for Skin Barrier Research, 12(1):103-110, 2010.
11. 홍정효 : 아토피의 치료에 관한 양방과 한방, 민간요법과 자연치유법에 관한 고찰, 생태유아교육연구, 7(1):65-85, 2008.
12. 金善彬 : 排毒丸醱酵方이 아토피피부염의 免疫 調節因子 및 動物病態에 미치는 影響, 대전대학교대학원, 2011.
13. 姜蘭伊 : 아토피피부염 동물 병태 모델에서의 荊芥連翹湯의 면역조절작용, 대전대학교대학원, 2010.
14. 朴炳俊 : NC/Nga 아토피피부염 생쥐 모델에서의 養血潤膚湯의 效果, 대전대학교대학원, 2008.
15. 金正煥 : 脾虛蘊濕方の 아토피피부염 改善

- 효과에 관한 實驗的 研究, 대전대학교대학원, 2008.
16. 方瓚國 : 補陰祛風止痒湯이 아토피피부염을 誘導한 NC/Nga 생쥐 모델에서의 免疫調節 作用, 대전대학교대학원, 2008.
  17. 韓在敬 : 加味當歸飲子가 아토피 동물 모델에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 2005.
  18. 全國韓醫科大學 共同教材編纂委員會 : 本草學, 永林社, pp.159-160, pp.165-166, pp.177-178, pp.179-181, pp.181-182, pp.197-198, pp.201-203, pp.209-211, pp.218-220, pp.233-235, pp.235-236, pp.238-240, pp.242-244, pp.244-245, pp.310-311, pp.360-361, pp.414-415, pp.586-588, pp.632-634, p.735, p.741, 2004.
  19. 송계용, 지제근, 함의근 : 핵심 병리학, 서울, 고려의학, pp.62-94, 1998.
  20. 蔡琦源 : 금은화의 항염작용과 과골세포 형성 억제효과, 경희대학교대학원, 2008.
  21. Dunstan JA, Breckler L, Hale J, Lehmann H, Franklin P, Lyons G, et al. : Associations between antioxidant status, markers of oxidative stress and immune responses in allergic adults, *Clin Exp Allergy*, 36(8):993-1000, 2006.
  22. Bickers DR, Athar M : Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease, *Invest Dermatol*, 126:2565-2575, 2006.
  23. Liu RH, Hotchkiss JH : Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide. a review, *Mutat Res*, 339(2):73-89, 1995.
  24. Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, et al. : Isoforms of nitric oxide synthase Characterization and purification from different cell types, *Biochem Pharmacol*, 42(10):1849-1857, 1991.
  25. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG : Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochem J*, 357(Pt 3):593-615, 2001.
  26. Mizutani K, Ikeda K, Nishikata T, Yamori Y : Phytoestrogens attenuate oxidative DNA damage in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *J Hypertens*, 18(12):1833-1840, 2000.
  27. Marco E. Turini and Raymond N. DuBois : Cyclooxygenase-2: a therapeutic target, *Annu Rev Med*, 53:35-57, 2002.
  28. Rocca B, FitzGerald GA : Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response, *Int Immunopharmacol*, 2(5):603-630, 2002.
  29. 현미란, 박효진, 서근영, 박영현 : 금은화 (*Lonicera japonica*)추출물의 항산화 작용 연구, 순천향자연과학연구논문집, 14(2):163-168, 2008.
  30. 김계은 : 牛蒡子の 아토피피부염에 대한 효과, 경희대학교대학원, 2010.
  31. 余義珠 : 玄蓼이 NC/Nga mice에서 유발된 피부염에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 2007.
  32. 김동일 : 荊芥連翹湯과 加味荊芥連翹湯이 解熱鎮痛및 消炎作用에 미치는 影響, 경희대학교, 1986.
  33. 신소영 : 荊芥連翹湯과 加味荊芥連翹湯이 消炎·鎮痛 및 抗알레르기에 미치는 影響, 원광대학교 대학원, 1997.
  34. 총배윤 : 芫桂四物湯加減方이 항알레르기 반응에 미치는 영향, 동의대학교, 2009.
  35. 임창신 : 四物湯이 알러지 염증반응에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 2006.
  36. 김나영, 채현석, 이인숙, 김동수, 서강태, 박성진 : 더덕껍질의 일반성분 분석과 항산화 활성, 한국식품영양과학회지,

- 39(11):1627-1633, 2010.
37. Lee SG, Yu MH, Lee SP, Lee IS :  
Antioxidant activities and induction of  
apoptosis by methanol extracts from  
avocado, J Korean Soc Food Sci Nutr,  
37:269-275, 2008.
  38. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT :  
Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative  
stress to DNA and a risk factor for  
cancer, atherosclerosis and diabetics,  
Clin Chim Acta, 339(1-2):1-9, 2004.
  39. Hong SG, Kang BJ, Kang SM, Cho DW :  
Antioxidative effects of traditional  
Korean herbal medicine on  
AAPH-induced oxidative damage, Food  
Sci Biotechnology, 10:183-187, 2001.
  40. Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK :  
Inhibitory activity of plant extracts on  
nitric oxide synthesis in LPS-activated  
macrophage, Phytother Res,  
17(5):485-489, 2003.
  41. Morrison DC, Ryan JL : Endotoxins and  
disease mechanisms, Annual Review of  
Medicine, 38:417-432, 1987.