

## 활성화된 렫트 비만세포와 마우스 소양증에 대한 한약재로 조성된 WSY-1075의 항염증 및 항소양 효과

황성연<sup>1,2#</sup>, 이승호<sup>1</sup>, 이가위<sup>1</sup>, 김장호<sup>3</sup>, 장선일<sup>4</sup>, 김안나<sup>1,5</sup> 김홍준<sup>1\*</sup>

1 : 우석대학교 한의과대학 방제학교실, 2 : 한국전통의학연구소, 3 : 호남지역사업평가원,  
4 : 전주대학교 보건관리학과, 5 : 한국한의학연구원 정보개발운영그룹

### Anti-inflammatory and Anti-Pruritic Effects of WSY-1075 composited with Medicinal Plants on the Activated Rat Peritoneal Mast cells and Mouse Pruritus

Sung Yeoun Hwang<sup>1,2#</sup>, Seung Ho Lee<sup>1</sup>, Chia Wei Lee<sup>1</sup>, Jang Ho Kim<sup>3</sup>,  
Seon Il Jang<sup>4</sup>, An Na Kim<sup>1,5</sup>, Hong Jun Kim<sup>1\*</sup>

1 : Department of Oriental Medical Prescription, Woosuk University, Wanju-gun 565-701,  
2 : Korea Bio Medical Science Institute,  
3 : Honam institute for Regional Program,  
4 : Department of Healthcare & Science, Jeonju University,  
5 : Informatics Development & Management Group, Korea Institute of Oriental Medicine

#### ABSTRACT

**Objectives** : This study was to evaluate the anti-inflammatory and anti-pruritic effects of WSY-1075 composited with Corni Fructus, Angelica gigantis Radix, Lycii Fructus, Ginseng Radix, Cervi parvum Cornu and Cinnamomi Cortex in rat peritoneal mast cells (RPMCs) and scratching mouse model.

**Methods** : WSY-1075 was prepared by extracting with 30% ethanol. In the present study, we investigated the effect of WSY-1075 on the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and histamine in rat peritoneal mast cells (RPMCs) activated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) plus calcium ionophore A23187, and on the scratching behavior in mice treated with prurigenes.

**Results** : WSY-1075 was not cytotoxic effect in used all concentration, PMA plus A23187 treatment significantly increased TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 production compared with media control in RPMCs. However, TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  and IL-6 production increased by PMA plus A23187 treatment were significantly inhibited by WSY-1075 (200  $\mu$ g/mL and 400  $\mu$ g/mL). WSY-1075 also inhibited the histamine release from RPMCs stimulated by compound 48/80, which promotes histamine release. Moreover, WSY-1075 administration had an inhibitory effects on the scratching behavior induced by pruritogen (compound 48/80, histamine, serotonin and substance P) in ICR mice.

**Conclusion** : These results suggest that WSY-1075 administration (200 mg/kg or 400 mg/kg) has the anti-inflammatory and anti-pruritic effects on the activated rat peritoneal mast cell and mouse pruritus. WSY-1075 has a potential use as a composition of medicinal plants for treatment against inflammation- and pruritus-related disease.

**Key words** : WSY-1075, GongJin-Dan(拱辰丹), Rat mast cells, Anti-inflammation, Anti-pruritus

\*교신저자 : 김홍준, 전북 완주군 삼례읍 후정리 우석대학교 한의과대학 방제학교실  
· Tel : 063-290-1131 · E-mail : kimboncho@woosuuk.ac.kr

#제1저자 : 황성연, 서울시 종로구 신문로 2가 1-160 프라임타워 1층 한국전통의학연구소  
· Tel : 02-3443-9252 · E-mail : kbmsi2009@gmail.com  
· 접수 : 2013년 6월 20일 · 수정 : 2013년 7월 10일 · 채택 : 2013년 7월 18일

## 서론

WSY-1075는 공진단(拱辰丹)을 모방으로 면역조절을 목적으로 가감한 처방으로 공진단은 송(宋)대 왕구(王堯)가 저술한 『시재백일선방(是齋百一選方)』<sup>1)</sup>에서 최초로 수록되어진 것으로 보여지며 이후 『동의보감(東醫寶鑑)』<sup>2)</sup>을 비롯한 다수의 의서에서 활용된 장부허손(臟腑虛損)을 예방하고 치료하는 것을 목적으로 활용된 처방이다. 공진단은 녹용(鹿茸, *Cervi parvum Cornu*), 산수유(山茱萸, *Corni Fructus*), 당귀(當歸, *Angelica gigantis Radix*), 사향(麝香, *Moschus*)의 네 가지 약재로 구성되어 있으나 고가의 약재의 사용과 일부 약재의 진위 논란 등으로 다른 대체 약물을 가감하거나 흑원(黑元)과 같이 단순화하여 동일 목적으로 사용되어진 처방이 활용되어지고 있다. WSY-1075는 진위에 문제가 되는 사향을 제외하고 구기자(枸杞子, *Lycii Fructus*), 홍삼(紅蔘, *Ginseng Radix*), 육계(肉桂, *Cinnamomi Cortex*)의 세가지 약물을 더하여 구성되었다.

염증은 생체조직의 물리·화학적 손상뿐만 아니라 병원 미생물의 감염에 의해서 생체의 면역반응과정에서 나타나는 일련의 현상으로 초기에 비만세포(mast cells)가 활성화되어 히스타민(histamine)과 같은 아민(amine) 계열의 염증매개물이 형성되며 이어서 혈관 내외의 혈장성분이 활성화한 단백질 가수분해효소에 의한 연쇄반응에서 염증성 사이토카인들이 생성되면서 T 세포 매개 지연형 과민반응(delayed type hypersensitivity reactions)을 유발한다<sup>3-5)</sup>.

비만세포는 즉시형 과민반응(immediate hypersensitivity reactions)을 야기할 뿐만 아니라 질병원(pathogen)에 대한 면역반응뿐만 아니라 T 세포 매개 장애(T cell-mediated disorders)를 유발할 수 있는 중요한 면역효과 세포이다<sup>3)</sup>. 활성화된 비만세포는 알레르기성 질환을 비롯한 각종 인체 질환에서 급성 및 만성 염증질환을 일으키는데 있어 핵심적으로 참여한다<sup>4)</sup>. 이와 같이 활성화된 비만세포는 histamine과 같은 가려움 유발물질(pruritogen)을 방출<sup>6,7)</sup>할 뿐만 아니라 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1)과 IL-6 등 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)을 생산(7-9)하여 T 세포를 비롯한 탐식세포를 자극하여 더 많은 염증성 사이토카인의 생성을 촉진하여 염증을 악화시키는 원인이 된다<sup>3,8)</sup>. 이러한 비만세포 유래 염증성 사이토카인은 가려움 유발 물질과 함께 작용하여 소양증을 더욱 촉진시켜 피부 장벽을 붕괴시키는 원인이 된다<sup>10-12)</sup>.

소양증은 아토피 피부질환을 비롯한 피부습진(eczema) 등 피부에서 주로 나타나지만, 신체 전반에 걸친 전신 질환이 있는 경우에도 나타날 수 있으며, 피부를 긁거나 문지르고 싶은 충동을 일으키는 불쾌한 감각이라고 할 수 있다<sup>13,14)</sup>. 소양증을 야기하는 핵심세포인 비만세포는 histamine, compound 48/80, serotonin 및 substance P와 같은 자극원에 의해 활성화 되면, 심한 소양증이 유발되어 피부장벽을 붕괴시켜 염증반응을 더욱 악화시킨다<sup>10)</sup>. 일반적으로 정상적인 사람의 경우 소양증이 야기되면 긁으면 해소되나, 아토피 피부질환의 경우 긁으면 긁을수록 더욱더 심한 소양증을 야기하여 피부의 병소를 악화시키는 원인<sup>13)</sup>이 되기 때문에 이를 해소할 필요성이 있다. 일반적으로 소양증과 염증을 완화시키는데 사용되는 약물은 항히스타민과 스테로이드 제제를 들 수 있는데, 장기

적으로 복용 또는 피부에 도포할 경우 부작용이 일어날 수 있다<sup>15)</sup>. 따라서 소양증과 염증을 효과적으로 제어할 수 있고 부작용이 최소화된 약물의 개발이 필요하다.

따라서 본 연구는 山茱萸(*Corni Fructus*), 當歸(*Angelica gigantis Radix*), 枸杞子(*Lycii Fructus*), 鹿茸(*Ginseng Radix*), 紅蔘(*Cervi parvum Cornu*), 肉桂(*Cinnamomi Cortex*) 등 한약재로 조성된 WSY-1075을 대상으로 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 calcium ionophore A23187로 자극하여 활성화된 랫트 복강 비만세포(rat peritoneal mast cells, RPMCs)의 전 염증성 사이토카인의 생성 및 가려움 유발물질(pruritogen)로 처리된 마우스의 소양증 억제에 대한 효과를 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 등 ELISA kit은 R&D Systems사(Minneapolis, USA)로부터 구입하였으며, histamine ELISA kit 는 Bertin Pharma 사(Guillemin, Franc)로부터 구입하였다. Compound 48/80, histamine, serotonin, substance P, percoll, compound 48/80, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), calcium ionophore A23187, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), penicillin/streptomycin, hematoxylin & eosin, toluidine blue와 기타 시약은 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

#### 2) 실험동물

무균환경에서 사육된 10주령의 수컷 Sprague Dawley 랫트는 중앙실험동물(주)(서울시, 대한민국)에서 구입하였고, 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 낮과 밤의 주기를 12시간씩 하였고, 온도(20-22℃)와 습도(50-60%)는 일정하게 유지하였으며, 실험동물위원회에 규정에 준하여 실험하였다.

#### 3) WSY-1075 조성물

WSY-1075 조성 약물의 구성은 山茱萸, 當歸, 枸杞子, 鹿茸, 紅蔘, 肉桂로 Table 1과 같다. 이들 약물은 울산 광명당 제약(울산, 대한민국)으로부터 구입하여, 우석대학교 한의과대학 방제학교실에서 동정한 후 그 표본은 방제학교실의 표본실에 보관하였다.

Table 1. Composition of WSY-1075

Drug name	Crude drug name	Scientific name	%
山茱萸	Corni Fructus	<i>Cornus officinalis</i>	25
當歸	Angelica gigantis Radix	<i>Angelica gigas</i>	25
枸杞子	Lycii Fructus	<i>Lycium chinense</i>	25
紅蔘	Ginseng Radix	<i>Panax ginseng</i>	10
鹿茸	Cervi parvum Cornu	<i>Cervus elaphus</i>	10
肉桂	Cinnamomi Cortex	<i>Cinnamomum cassia</i>	5

## 2. 방법

### 1) WST-1075 조성물의 추출

Table 1과 같이 조성된 WSY-1075을 1,000g 계량하여 30% 에탄올(10 L)에 넣어 25℃에서 하루 동안 상온 추출하였다. 추출액은 0.45 µm syringe filter (Advantec, Japan)를 통해 여과하고 여액을 60 ℃이하에서 감압농축 (Model, EYELA ROTARY EVAPORATOR NE-2001, JAPAN)한 후 동결건조(Model, ILSHIN Freeze Dryer FD8508, KOREA)하여 건조엑스 249.5 g(평균수득율 24.95 %) 을 얻어 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 2) MTT assay

RPMCs 세포 생존율은 MTT assay 방법에 의해 측정하였다. 요약하면, RPMCs ( $5 \times 10^5$ /mL) 세포를 24 well 배양용기에 접종하고 상기와 같이 여러 가지 농도로 DLE를 처리한 후에 PMA 및 A23187를 자극한 후 12시간 후에 MTT 용액 (5 mg/mL)을 주입하고 4시간동안 37℃에서 방치한 후 상층액을 제거하고 formazan 산물을 DMSO로 용해하여 96 well plate로 옮겨 540 nm ELISA reader (Molecular Devices, USA)로 흡광도를 측정하였다.

### 3) RPMCs 분리 및 약물처리

건강한 수컷 Sprague Dawley 랫트로부터 복강비만세포 (rat peritoneal mast cells, RPMCs)의 분리는 Martynova 등<sup>16)</sup>의 방법에 따라 분리하였다. 요약하면, 에테르(ether)로 마취시킨 다음 calcium-free HEPES-Tyrode buffer(10 mM Hepes, 113 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.13 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM glucose, pH 7.4) 10 mL를 복강에 주입시켜 약 90초간 복강을 부드럽게 마사지한 후 복강을 주의 깊게 열어 Pasteur pipette을 사용하여 세포 부유액을 취하고 percoll density gradient법으로 RPMCs를 얻었다. 특별히 본 실험 목적에 따라 충분한 세포를 확보하기 위해서 5-10마리 랫트에서 얻은 복강비만세포를 혼합하여 사용하였다. 여러 가지 농도의 WSY-1075 추출물은 RPMCs ( $5 \times 10^5$ )에 2시간 동안 전 처리한 후 PMA와 A23187로 동시에 자극하여 전염증성 사이토카인 측정과 compound 48/80으로 자극하여 히스타민 측정에 사용하였다.

### 4) RPMCs에서 히스타민 방출량의 측정

랫복강비만세포(RPMCs,  $5 \times 10^5$  cells/mL)는 여러 가지 농도의 WSY-1075 추출물을 37℃에서 10분간 전 처리한 다음 compound 48/80 (0.5 µg/mL)으로 자극하여 30분간 방치 반응을 중지시키기 위하여 배양튜브를 빙수에 넣어 충분히 냉각시킨 후 1,200 rpm으로 15분간 원심침전시키고 상층액을 얻었다. 상층액으로부터 히스타민을 측정하였다. 요약하면, anti-histamine antibody (ab)를 활용하여 상기와 같이 얻은 상층액 시료에 반응시키고, anti-histamine ab에 특이적으로 작용하는 기질효소가 부착된 2차 항체를 주입한 후 발색시켜 R&D사가 제공하는 histamine ELISA 방법에 준하여 측정하고 정량하였다.

### 5) 사이토카인

RPMCs로부터 사이토카인의 측정은 WSY-1075 (25-400 µg/mL)를 2시간동안 전 처리한 후 PMA (30 ng/mL)와 A23187 (10 µM)로 동시에 자극한 다음 12시간 후에 세포상층액으로부터 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  와 IL-6를 측정하였다. 즉, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  와 IL-6 등은 anti-mouse TNF- $\alpha$ , anti-mouse IL-1 $\beta$ , anti-mouse IL-6 등 항체를 사용하여 각각에 특이적으로 작용하는 ELISA kit (R&D Systems)을 사용하여 측정하고 정량하였다. 요약하면, 세포상층액 또는 5배 희석 혈청 100 µL을 각각의 항체가 코팅된 plate에 주입하고 반응시킨 후 잘 세척한 다음 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체를 주입하고 반응시킨 후 발색 기질을 주입하고 반응시켜 ELISA reader로 측정하였으며, 각 물질에 대한 정량은 각각의 물질을 농도별로 처리하여 반응시켜 표준 곡선을 정하고 세포상층액 또는 혈청에 함유된 물질의 양을 계산하였다.

### 6) 추출물 처리 및 소양증 유발 시험

스트레스가 해소된 ICR 마우스는 실험군당 5마리의 마우스를 각각 투명 아크릴 케이지(20×26×13 cm)에 한 마리씩 넣고, 안정을 위해 30분 동안 동일한 실험환경에 방치하였다. 그 후 대조군은 생리식염수를 경구투여 하였고, 실험군은 WSY-1075 (25-400 mg/kg)을 경구투여하고 60분 후에 compound 48/80 (50 µg/site), histamine (100 µg/site), serotonin (100 µg/site) 또는 substance P (100 µg/site)의 농도로 100 µL씩 마우스 등의 양쪽 어깨 사이 높이에 피하주사 하였다. 소양증 유발물질을 주사한 마우스는 곧바로 Mihara<sup>17)</sup>의 방법을 따라 micro-camera (ONCCTV, 서울, 대한민국)를 사용하여 60분 동안 녹화하였으며, 뒷발로 소양증 유발물질이 주입된 부위를 긁는 횟수를 이중맹검법으로 계수하여 평가하였다. 각 유발물질에 따른 실험은 각각 다른 날에 진행되었으며 매 실험에 사용된 마우스는 1회 사용되었다.

### 7) 통계처리

모든 실험값은 평균±표준편차(mean ± SD)로 표시했으며, 통계분석은 SPSS 프로그램을 활용하여 ANOVA와 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 한계는 p<0.05로 정하였다.

## 결 과

### 1. 비만세포 생존율에 미치는 WSY-1075 효과

본 연구는 WSY-1075가 RPMCs의 생존율에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1A과 같이 WSY-1075는 본 연구에서 사용한 모든 농도에서 세포독성이 없었다. RPMCs에 PMA와 A23187로 처리할 경우 약 78%로 정상군에 비해서 세포 생존율이 저하 되었으나(p<0.001), WSY-1075를 처리할 경우 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가 되었다(Fig. 1B). 특히 200 µg/mL과 400 µg/mL의 WSY-1075 농도에서는 93% 이상으로 세포 생존율이 증가 되었다(p<0.01).

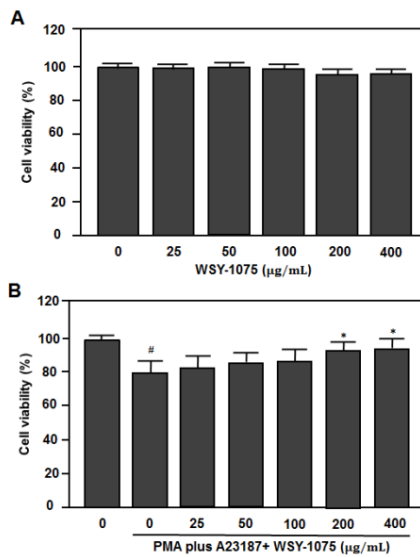


Fig. 1. Effect of WSY-1075 on viability of rat peritoneal mast cells RPMCs. RPMCs ( $5 \times 10^5$ /mL) were pre-treated with or without WSY-1075 at indicated concentrations for 2 h, and then stimulated with or without PMA (20 nM) plus A23187 (1 M) for 12 h. Cell viability were measured by MTT assay as described in the section of Materials and Methods. (A) Cells non-treated with PMA plus A23187. (B) Cells treated with PMA plus A23187. Values represent the means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. <sup>#</sup> $p < 0.01$  versus the non-treated control group. <sup>\*</sup> $p < 0.05$  versus control group treated with PMA plus A23187 alone.

## 2. 전염증성 사이토카인 생성 억제에 의한 WSY-1075의 효과

본 연구는 WSY-1075가 활성화된 RPMCs의 전염증성 사이토카인의 생성 억제에 대한 효과를 알아보기 위하여 RPMCs를 접종하고 WSY-1075 (25–400 µg/mL)를 2시간 전 처리한 다음 PMA와 A23187을 동시에 처리하고 12시간 배양 후 배양액에 측정된 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6양을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 PMA와 A23187를 처리한 대조군은 정상군에 비해서 TNF- $\alpha$  ( $995 \pm 97$  pg/mL), IL-1 $\beta$  ( $685 \pm 86$  pg/mL)와 IL-6 ( $361 \pm 83$  pg/mL)가 현저히 증가하였다( $p < 0.001$ ). WSY-1075의 농도를 mL 당 100 µg 이하로 처리하였을 때 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6가 약간 증가하는 경향이 있었지만 대조군과 유의한 차이는 없었다. 그러나 200 µg/mL과 400 µg/mL의 WSY-1075 농도 처리군에서는 TNF- $\alpha$ 가 각각  $670 \pm 87$  pg/mL( $p < 0.05$ )와  $495 \pm 58$  pg/mL( $p < 0.001$ )가 억제되었으며, IL-1 $\beta$ 는 각각  $458 \pm 73$  pg/mL( $p < 0.05$ )와  $401 \pm 109$  pg/mL( $p < 0.05$ )가 억제되었다. IL-6는 400 µg/mL의 WSY-1075 농도 처리군에서만  $181 \pm 61$  pg/mL( $p < 0.05$ )가 억제되는 효과가 있었다.

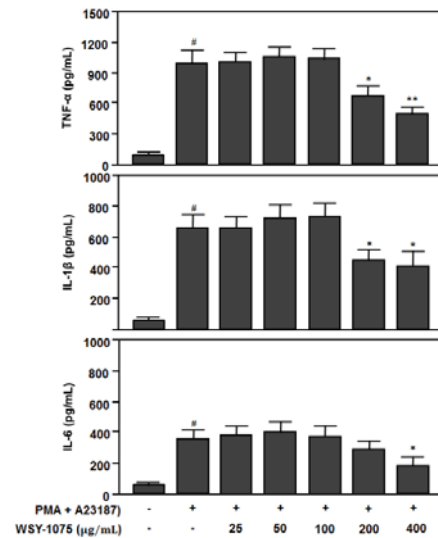


Fig. 2. Effect of WSY-1075 on PMA plus A23187-induced TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 production. RPMCs cells ( $5 \times 10^5$ /mL) were pre-treated with or without WSY-1075 at indicated concentrations for 2 h, and then stimulated with or without PMA (30 ng/mL) plus A23187 (10 µM) for 12 h. Cytokine concentrations were measured in cell supernatants using the ELISA method. Values represent the means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. <sup>#</sup> $p < 0.001$  versus the non-treated control group. <sup>\*</sup> $p < 0.05$  versus PMA plus A23187 alone group.

## 3. 히스타민 방출 억제에 대한 WSY-1075의 효과

한편 본 연구는 WSY-1075가 소양증 유발 핵심 물질인 histamine 방출에 대한 억제 영향을 알아보기 위하여 RPMCs를 접종하고 WSY-1075 (25–400 µg/mL)를 주입하고 37°C에서 10분간 전 처리한 다음 compound 48/80 (0.5 µg/mL)으로 자극하여 histamine의 양을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 RPMCs를 compound 48/80로 자극할 경우 histamine 방출량은  $68.5 \pm 7.8$  ng/mL으로 정상군에 비해서 현저히 증가하였다( $p < 0.001$ ). WSY-1075의 농도를 mL 당 100 µg 이하로 처리하였을 경우 대조군과 차이가 없었지만, 200 µg/mL과 400 µg/mL 처리군에서는 histamine 방출이 각각  $42.5 \pm 6.1$  ng/mL과  $39.8 \pm 6.7$  ng/mL으로 유의하게 억제되는 효과가 있었다( $p < 0.05$ ).

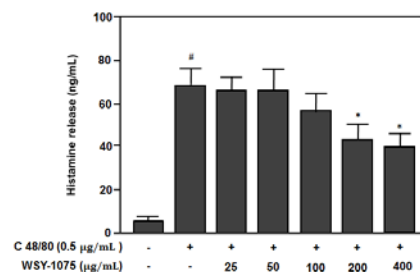


Fig. 3. Inhibitory effect of WSY-1075 on histamine release from RPMCs activated with compound 48/80 (C 48/80). RPMCs cells ( $5 \times 10^5$ /mL) were pre-treated with or without WSY-1075 at indicated concentrations for 2 h, and then stimulated with or without C 48/80 (0.5 µg/mL). Histamine assay was performed by ELISA method on supernatant from RPMCs. Values represent the means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. <sup>#</sup> $p < 0.001$  versus the non-treated control group. <sup>\*</sup> $p < 0.05$  versus C 48/80 alone group.

### 3. 소양증 억제에 대한 WSY-1075의 효과

본 연구는 WSY-1075가 소양증 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 WSY-1075 (25-400 µg/mL)을 ICR 마우스에 경구투여하고 1시간 후에 가려움 유발물질을 마우스 등의 양쪽 어깨 사이 높이에 피하주사 하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 정상군에 비해 compound 48/80은 222.7±17.2회, 히스타민은 80.3±5.1회, 세로토닌은 113.4±6.7회 및 물질 P는 106.7±7.2회로 긁는 횟수가 현저히 증가하였다(p<0.001). WSY-1075의 농도를 mL 당 100 µg 이하로 처리하였을 때 긁는 횟수가 약간 증가하는 경향이 있었지만 대조군과 유의한 차이는 없었다. 그러나 200 µg/mL과 400 µg/mL의 WSY-1075 농도 처리군은 히스타민에 의해 유도되는 긁는 횟수가 각각 64.2±16.5와 60.2±19.1로 유의하게 줄어들었다(p<0.01). Compound 48/80, 세로토닌 및 물질 P에 의해 유도되는 긁는 횟수는 400 µg/mL의 WSY-1075 처리농도에서 각각 123.2±16.3, 62.1±15.2 및 56.8±3.8로 유의하게 억제되었다(p<0.05).

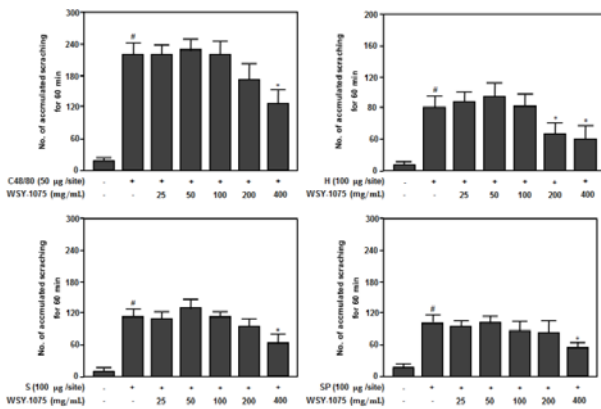


Fig. 4. Anti-pruritic effects of WSY-1075 on the scratching behavior induced by compound 48/80 (C 48/80), histamine (H), serotonin (S) or substance P (SP) in ICR mice. WSY-1075 (25-400 mg/kg) was administered orally 1 hour before the pruritogen injection and then 50 µg/site C 48/80, 100 µg/site H, 100 µg/site S or 100 µg/site SP was injected into rostral back. The scratching of the injected site by the hind paw was counted for 60 min. Values represent the means ± S.E. of 5 individuals. #p<0.001 versus normal control group, \*p<0.05 versus C 48/80, H, S or SP alone group.

## 고찰

WSY-1075 처방은 임상에서 활용되고 있는 공진단(拱辰丹) 처방을 가감하여 구성되었다. 공진단(拱辰丹)은 『東醫寶鑑』<sup>2)</sup>에서는 『世醫得效方』의 원문을 재인용하여 肝虛藥으로 되어 있으며 助陽補精하는 鹿茸, 養血潤燥하는 當歸, 固精強陰: 助陽收澁하는 山茱萸, 開竅하는 麝香的 4가지 약물로 구성된 처방으로 先天의 氣를 補하고 水升火降을 순조롭게 하여 心身을 補益함으로서 장부의 虛損에 대한 예방 및 치료를 하는 처방으로 소개하고 있으나 원출전은 세의득효방보다 앞선 宋代의 王堯가 저술한 『시재백일선방(是齋百一選方)』으로 『是齋百一選方』 《卷之十八·第二十六門》에는 “夫方當壯年而真氣猶怯此乃稟賦素弱 非虛衰而然也 僭燥之藥尤宜速戒 勿謂厥逆便云陰

多 如斯治之 不惟不能愈疾 大病自此生矣 滋益之方 群品稍眾 藥力難見功效 但固天元一氣 使水升火降 則五臟自和 百病自去 此方主之 行在孫方 葛丞相婦人少年時服之果效 鹿茸酥 炙去毛皮用 山茱萸 新好 有肉紅潤者 川當歸 洗去土 各四兩 麝香 半兩別研 上三件為末 入麝香拌勻 酒煮 面糊為丸 如梧桐子大 每服一百粒 或五十粒 溫酒 鹽湯下”라 기록<sup>1)</sup>하고 있어 전반적인 내용은 『東醫寶鑑』의 내용과 비슷한 것으로 보여지며 신체의 부족 증상을 보충하는 처방으로 소개하고 있다.

공진단 원방을 통한 연구로는 張<sup>18)</sup>은 혈청성분의 함량 변화를 통하여 공진단의 強精補氣하는 효능이 우수하다고 보고 하였다. 그리고 정<sup>19)</sup>과 황<sup>20)</sup>은 Alzheimer's disease에서 拱辰丹이 효과가 있다고 보고하였다. 또 최<sup>21)</sup>는 항산화 및 항노화 작용이 있는 아미노산과 무기질 성분이 많이 있음을 밝혀 내었다. 외에 김<sup>22)</sup>은 가미공진단처방이 Balb/c 마우스에서 Ovalbumin 면역반응에 대해 억제효과가 있음을 밝혔고 다른 논문<sup>23)</sup>에서는 Acetaminophen 유도 마우스 간손상에 대한 加減拱辰丹 추출물의 간보호효과를 관찰하여 보고한 바 있다. WSY-1075는 이러한 공진단 처방에 한의학적인 사용과 실험적 근거를 바탕으로 하여 사향을 제외하고 기존에 면역기능의 조절이나 항산화효과가 있다고 알려진 구기자, 홍삼, 육계로 처방을 구성하였다.

구기자는 茄科(가지과; Solanaceae)에 속한 蔓生灌木인 구기자나무 *Lycium chinense* Mill. 또는 寧夏枸杞 *L. barbarum* L.의 성숙한 과실을 건조한 것으로 滋補肝腎, 益精明目, 潤肺하는 효능으로 혈당강하<sup>24)</sup>, 항산화<sup>24,25)</sup> 등의 효과를 나타내고<sup>26)</sup>, 홍삼은 인삼을 가공한 것으로 홍삼의 성분들이 원기회복, 자양강장, 항암, 항염증효과가 있다고 알려져 있으며<sup>26,27)</sup>, 육계는 樟科(녹나무과; Lauraceae)에 속한 상록 교목인 肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl의 樹皮를 건조한 것으로 補元陽, 暖脾胃, 除積冷, 通血脈하는 효능으로 혈액순환을 촉진하고 건위작용이 있으며 면역억제, 항종양, 항산화 효과가 있다<sup>26)</sup>.

비만세포는 A23187, PMA, histamine과 compound 48/80과 같은 자극원에 의해 활성화 되면, TNF-α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8 및 TGF-β와 같은 사이토카인을 분비하여 염증반응을 촉진<sup>28-31)</sup>할 뿐만 아니라 histamine과 같은 가려움 유발물질을 방출하여<sup>4-6,32)</sup> 소양증이 촉진되어 피부 장벽을 붕괴시켜 염증반응을 더욱 악화시킨다<sup>10)</sup>. 그러므로 알레르기반응을 억제하기 위해서는 비만세포의 활성을 차단하는 물질이 필요하다.

본 연구는 한약재로 조성된 WSY-1075의 면역능 조절 효능을 평가하기 위해서 먼저 랫트의 복강 비만세포인 RPMCs를 대상으로 세포독성에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 본 실험에서 사용한 WSY-1075의 모든 농도에서 세포 독성이 없었을 뿐만 아니라 mL 당 800 µg의 고농도에서도 세포 독성이 없었다(자료는 제시하지 않았음). 일반적으로 비만세포에 PAM와 A23187로 자극하면, 세포독성이 발생할 수 있는데, 본 연구에서 사용한 PAM와 A23187의 농도에서는 평균 78%정도 세포생존율을 보였다. 그러나 200 µg/mL과 400 µg/mL의 WSY-1075 농도에서 PAM와 A23187에 의해 유도되는 세포 독성을 제거하는 효과가 있었다. 또한 PMA와 A23187로 자극된 RPMCs에서 전연성 사이토카인의 생성 및 히스타민의 방출을 억제하는 효과가 있었다. 더욱이 가려움

유발물질로 유도된 소양증을 억제하는 효과가 있음을 본 연구에서 밝혔다.

인간 유래 비만 세포주인 HMC-1세포주는 IL-3, IL-4, IL-6 및 TNF- $\alpha$  와 같은 즉시형 과민반응을 유도하는 사이토카인을 생성하여 면역반응에 참여하는 효과세포로 작용한다<sup>32,33</sup>. 반면 설치류의 비만세포 세포주에서는 IL-3을 비롯한 TNF- $\alpha$  와 IL-1 $\beta$  는 효과적으로 생산하지만, IL-6와 IL-4의 경우는 HMC-1에 비해 소량 생산하는 것으로 알려졌다<sup>34</sup>. 본 연구에서는 이와 같은 문헌적 근거를 바탕으로 렫트의 1차 비만세포인 RPMCs을 대상으로 PMA와 A23187로 동시에 자극하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6의 생성량을 조사하였다. 그 결과 TNF- $\alpha$  와 IL-1 $\beta$  는 비교적 많은 양이 유도되었고, IL-6는 이들 사이토카인에 비해서 상대적으로 적은 양이 유도되었다. 그러므로 본 연구는 활성화된 RPMCs에서 이들 사이토카인의 생성에 미치는 WSY-1075의 효과를 조사하였다. 그 결과 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도에서는 약간 증가하는 경향을 보였지만, 대조군과 큰 차이는 없었다. 그러나 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 WSY-1075 농도에서는 효과적으로 이들 사이토카인을 억제하는 효과가 있었다. 또한 compound 48/80으로 활성화된 RPMCs에서 WSY-1075의 농도에 의존적으로 히스타민이 억제되는 효과가 있었다. 이러한 결과는 활성화된 RPMCs에서 염증관련 물질을 억제하는 WSY-1075의 농도는 최소한 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이라는 것을 알 수 있었다.

한편, 활성화된 비만세포는 histamine, serotonin 또는 substance P와 같은 소양증 매개물질을 분비한다<sup>35</sup>. 이러한 물질들은 소양증을 유발하는데, 아토피 피부염 등 알레르기성 피부질환 환자에서 흔히 발견되는 소양증과 유사한 증상을 유발한다. 이들 물질에 대한 가려움 유발 모델동물은 주로 ICR, ddY, NC/Nga, hairless 등의 마우스가 사용되고 있는데<sup>36</sup>, 본 연구는 ICR 마우스를 선택하여 WSY-1075을 1시간 전에 경구투여한 후 compound 48/80, 히스타민, 세로토닌 또는 물질 P를 등쪽 피하에 주사하여 60분 동안 뒷발로 긁는 누적 횟수를 조사하였다. 그 결과 200 mg/kg 또는 400 mg/kg의 WSY-1075 농도에서 소양증을 억제하는 효과가 있었다. 이와 같이 소양증을 완화시키는 WSY-1075의 농도는 200 mg/kg이상 경구투여할 때 효과를 볼 수 있는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해볼 때 WSY-1075는 세포독성이 없을 뿐만 아니라 PMA와 A2317 처리에 의한 세포 손상을 보호하는 효과가 있었다. 또한 WSY-1075는 PMA와 A2317 또는 compound 48/80으로 활성화된 RPMCs의 전염증성 사이토카인뿐만 아니라 가려움 유발 매개물질인 histamine 방출에 대한 억제 효과가 있었다. 특히 compound 48/80, 히스타민, 세로토닌 또는 물질 P로 유도한 ICR 마우스에서 WSY-1075는 가려움증을 완화시킬 수 있는 물질임을 확인할 수 있었다. 따라서 WSY-1075는 인체의 면역능 조절에 관여하고 있음을 확인할 수 있었다.

## 결론

본 연구는 山茱萸, 當歸, 枸杞子, 鹿茸, 紅蔘, 肉桂 등 한약재로 조성된 WSY-1075의 면역조절에 대한 효과를 조사하

여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. WSY-1075는 세포독성이 없었고, PMA와 A23187에 의한 세포손상을 보호하는 효과가 있었다.
2. WSY-1075는 PMA와 A23187에 의해 활성화된 RPMCs에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6을 억제하는 효과가 있었다.
3. WSY-1075는 compound 48/80에 의해 활성화된 RPMCs에서 히스타민을 방출 억제 효과가 있었다.
4. WSY-1075는 compound 48/80, 히스타민, 세로토닌 또는 물질 P로 유도한 ICR 마우스의 소양증을 억제하는 효과가 있었다.

위와 같이 WSY-1075는 RPMCs의 활성화에 따른 염증 매개물의 억제와 마우스 소양증 완화에 효과적인 한약조성물로, 효과적인 경구투여 농도는 200 mg/kg 이상인 것으로 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지가족부의 한의약산업육성 제품화지원 연구개발사업 연구비(F110004)의 지원받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## Reference

1. Wang Gu, Sijaebaekilseonbang, Shanghai : Publishing house of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 1991 : 280.
2. Heo Joon(writing), translating department of oriental medical books(translator), New translation printed side by side with original Donguibogam, Seoul : Beopinmoonhwasa, 2007 : 1251.
3. Nakae S, Suto H, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ. Mast cells enhance T cell activation: Importance of mast cell-derived TNF. Proc Natl Acad Sci USA, 2005 ; 102 : 6467-72.
4. Sismanopoulos N, Delivanis DA, Alysandratos KD, Angelidou A, Therianou A, Kalogeromitros D, Theoharides TC. Mast cells in allergic and inflammatory diseases. Curr Pharm Des, 2012 ; 18 : 2261-77.
5. Leung DY. Immunologic basis of chronic allergic diseases: clinical messages from the laboratory bench, Pediatr Res, 1997 ; 42 : 559-68.
6. Galli SJ. New concepts about the mast cell. N Engl J Med, 1993 ; 328 : 257-65.
7. Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cells in innate immunity. Immunol Rev, 2000 ; 173 : 131-40.

8. Aoki R, Kawamura T, Goshima F, Ogawa Y, Nakae S, Nakao A, Moriishi K, Nishiyama Y, Shimada S. Mast Cells Play a Key Role in Host Defense against Herpes Simplex Virus Infection through TNF- $\alpha$  and IL-6 Production, *J Invest Dermatol*, 2013 : in press.
9. Choi IY, Kim SJ, Kim MC, Kim HL, Shin HJ, Kang TH, Jeong HJ, Shim JS, Kim JH, Yang DC, Hong SH, Kim HM, Um JY. Inhibitory effects of the transgenic Panax ginsengs on phorbol ester plus A23187-induced IL-6 production and cyclooxygenase-2 via suppression of NF- $\kappa$  B and MAPKs in HMC-1, *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2011 ; 33 : 205-10.
10. Takai T, Ikeda S. Barrier dysfunction caused by environmental proteases in the pathogenesis of allergic diseases, *Allergol Int*, 2011 ; 60 : 25-35.
11. Spergel JM. Epidemiology of atopic dermatitis and atopic march in children, *Immunol Allergy Clin North Am*, 2010 ; 30 : 269-80.
12. Kay AB. Overview of allergy and allergic diseases: with a view to the future, *Br Med Bull*, 2000 ; 56 : 843-64.
13. Metz M, Grundmann S, Ständer S. Pruritus: an overview of current concepts, *Vet Dermatol*, 2011 ; 22 : 121-31.
14. Pfaar O, Raap U, Holz M, Hörmann K, Klimek L. Pathophysiology of itching and sneezing in allergic rhinitis, *Swiss Med Wkly*, 2009 ; 139 : 35-40.
15. Lasić D, Cvitanović MZ, Uglešić B, Višić V, Hlevnjak I. Exanthema medicamentosum as a side effect of promazine, *Psychiatr Danub*, 2011 ; 23 : 194-71.
16. Martynova MG, Bystrova OA, Moiseeva OM, Evdonin AL, Kondratov KA, Medvedeva ND. The presence of ANP in rat peritoneal mast cells, *Cell Res*, 2005 ; 15 : 811-6.
17. Mihara K, Kuratani K, Matsui T, Nakamura M, Yokota K. Vital role of the itch-scratch response in development of spontaneous dermatitis in NC/Nga mice, *Br J Dermatol*, 2004 ; 151 : 335-45.
18. Chang YH. (The)experimental study on the effect of Kongjindan on the Kangeongboki action in rats, Daegu Haany University, 1989.
19. Jung HC, Jang HJ, Sung WY, Lee SH, Son JH, Han SH. A study of Gongjin-dan in patients with mild Dementia of Alzheimer type, *J Orient Neuropsychiatry*, 2004 ; 15(2) : 141-8.
20. Hwang SM, Chung DK. The Effects of KongJin-Dan(KJD) on the Alzheimer's Disease Model Induced by CT105, *J Orient Neuropsychiatry*, 2004 ; 15(2) : 103-18.
21. Choi KH, Park CS. An analysis of the Gongjindan's ingredients and its efficacy on anti-oxidation, *Korea J Herbology*, 2007 ; 22(2) : 51-63.
22. Kim HJ, Hwang SY, Mok JY, Hwang BS, Jeong SI, Jang SI. Gagam-Gongjin-dan Extract Attenuates Immune Responses to Ovalbumin Balb/c Mice, *Kor J Herbology*, 2009 ; 24(4) : 127-35.
23. Kim HJ, Mok JY, Park KH, Jeong SI, Hwang BS, Hwang SY, Cho JK, Jang SI. Hepatoprotective Effect of Gagam-GongJin-dan extract against Acetaminophen-Induced Liver Injury in Mice, *Kor J Herbology*, 2010 ; 25(3) : 149-57.
24. Kim OK. Antidiabetic and Antioxidative Effect of Lycii fructus in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *Kor J Pharmacogn*, 2009 ; 40(2) : 128-36.
25. Cho YJ, Chun SS, Cha WS, Park JH, Lee KH, Kim JH, Kwon HJ, Yoon SO. Antioxidative and Antihypertensive Effects of Lycii fructus Extracts, *J Kor Soc Food Sci Nutr*, 2005 ; 34(9) : 1308-13.
26. Ju YS. JeungBo-Ungokherbology, Jeonju : Woosuk Press, 2013 : (上)779-82, (下)1194-204, 1346-49.
27. Park YC, Lim JD, Kim JB, Lee SD. Review of Red Ginseng in terms of Mechanisms for Pharmacodynamics and Toxicity, *J Kor Orient med*, 2012 ; 33(3) : 200-30.
28. Oh YC, Kang OH, Kim SB, Mun SH, Park CB, Kim YG, Kim YI, Lee YS, Han SH, Keum JH, Shin DW, Ma JY, Kwon DY. Anti-inflammatory effect of sinomenine by inhibition of pro-inflammatory mediators in PMA plus A23187-stimulated HMC-1 Cells, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2012 ; 16 : 1184-91.
29. Kim SJ, Jeong HJ, Yi BJ, Kang TH, An NH, Lee EH, Yang DC, Kim HM, Hong SH, Um JY. Transgenic Panax ginseng inhibits the production of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 as well as COX-2 expression in human mast cells, *Am J Chin Med*, 2007 ; 35 : 329-39.
30. Ganeshan K, Johnston LK, Bryce PJ. TGF- $\beta$  1 Limits the Onset of Innate Lung Inflammation by Promoting Mast Cell-Derived IL-6, *J Immunol*, 2013 ; 190 : 5731-8.
31. Möller A, Henz BM, Grützkau A, Lippert U, Aragane Y, Schwarz T, Krüger-Krasagakes S. Comparative cytokine gene expression: regulation and release by human mast cells, *Immunology*, 1998 ; 93(2) : 289-95.
32. Hosoda M, Yamaya M, Suzuki T, Yamada N, Kamanakam M, Sekizawa K, Butterfield JH, Watanabe T, Nishimura H, Sasaki H. Effects of rhinovirus infection on histamine and cytokine production by cell lines from human mast cells and basophils, *J Immunol*, 2002 ; 169 : 1482-91.
33. Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth

- PH, Holgate ST. Interleukin -4, -5, -6 and tumour necrosis factor- $\alpha$  in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *J Respir Cell Mol Biol*, 1994 ; 10 : 471-80.
34. Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, Hanley-Hyde J, Nordan RP, Paul WE. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or calcium ionophores. *Nature*, 1989 ; 339 : 64-7.
35. Benyon RC, Robinson C, Church MK. Differential release of histamine and eicosanoids from human skin mast cells activated by IgE-dependent and non-immunological stimuli. *Br J Pharmacol*, 1989 ; 97 : 898-904.
36. Takubo M, Ueda Y, Yatsuzuka R, Jiang S, Fujii Y, Kamei C. Characteristics of scratching behavior induced by some chemical mediators in hairless mice. *J Pharmacol Sci*, 2006 ; 100 : 285-8.