

Original Article / 원저

Ovalbumin으로 유발된 아토피피부염 모델 마우스에 대한 복합한약추출물 경구투여의 효과

김경진 · 김경준

가천대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과

Oral Administration Effects of Herbal Extracts on Atopic Dermatitis in Balb/c Mice Sensitized by Ovalbumin

Kyung-Jin Kim · Gyung-Jun Kim

Department of Ophthalmology, Otolaryngology and Dermatology, College of Korean Medicine, Gachon University

Abstract

Objective: This study was to evaluate whether herbal mixture (HM-A : *Houttuynia cordata Thunberg*, *Rubus coreanus*, *Rehmannia glutinosa*, *Prunus yedoensis*, HM-B : *Houttuynia cordata Thunberg*, *Rubus coreanus*, *Rehmannia glutinosa*, *Angelica gigas nakai*) suppresses the development of atopic dermatitis in Balb/c mice sensitized by ovalbumin.

Methods: Mice were sensitized by intraperitoneal injection of ovalbumin plus aluminum hydroxide hydrate, followed by epicutaneous sensitization for 6 weeks. After induced atopic dermatitis, HM-A and HM-B were orally administrated for two weeks(once a two days) as a 50 mg/kg concentration. After all mice were sacrificed at the end of the experiment, skin and blood were harvested.

Results: Oral administration group was reduced the infiltration of eosinophils, mast cells and total T cells on the skin areas as well as blood analysis. Also, cutaneous expression of IL-4,13,17 decreased. Blood IgE level was decreased.

Conclusion: These drugs could be potential candidates for the atopic dermatitis.

Key word ; Atopic dermatitis; *Houttuynia cordata Thunberg*; *Rubus coreanus*; *Rehmannia glutinosa*; *Prunus yedoensis*; *Angelica gigas nakai*; Ovalbumin; Balb/c Mice

© 2014 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I. 緒論

아토피피부염은 외부 요인에 의해 체내 염증반응과 면역반응의 과잉발현으로 나타난다고 알려져 있다. 아토피피부염이 유발될 경우 eosinophil과 neutrophil 및 비만세포 같은 염증 관련 세포가 병변부위에서 관찰된다^{1,2)}. 이와 함께 비만세포로부터 생성되는 IgE가 급격히 증가한다. 또한 T세포의 이상증식이 나타나는데, 이 과정에서 제2형 보조 T세포의 활성화 및 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-13이 증가하여 면역반응을 증폭시킨다³⁻⁵⁾. 이러한 병리기전을 바탕으로, 염증 및 면역 억제를 통한 아토피피부염 치료제를 개발하기 위한 연구가 늘어나는 추세이다.

최근에 어성초(*Houttuynia cordata Thunberg*)^{6,7)}, 복분자(*Rubus coreanus*)⁸⁻¹⁰⁾, 생지황(*Rehmania glutinosa*)^{11,12)}, 화피(*Prunus yedoensis*)¹³⁾, 당귀(*Angelica gigas nakai*)^{14,15)}는 염증세포의 활성을 조절하고, 관련 cytokine 유전자 발현을 억제하는 항염 및 항산화의 효과가 있는 것으로 보고되었다. 아토피피부염도 염증세포의 조절과 관련된 피부 염증질환이므로, 아토피피부염의 염증 및 면역 발현을 억제할 수 있을 것으로 추정하였다.

한의학에서는 아토피피부염을 奶癬, 胎癬, 胎癩瘡, 濕瘡에 속한다고 보며 일반적으로 내선이라고 부르고 있다. 주요 발생원인을 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고 清熱, 養血, 除濕, 祛風, 涼血 등의 치법을 제시하고 있다¹⁶⁾. 본초학적으로 어성초는 祛風清熱除濕, 복분자는 補陰養血, 생지황은 涼血養血, 화피는 清熱燥濕透疹, 당귀는 補血活血하므로¹⁷⁾ 내선 치료에 사용가능하다.

이상의 이론과 실험적 근거를 바탕으로 두 개의 복합처방인 HM-A(어성초, 복분자, 생지황, 화피)와 HM-B(어성초, 복분자, 생지황, 당귀)를 구성하였다.

그리고 Ovalbumin(OVA)으로 아토피피부염을 유발한 Balb/c 마우스에 두 종류의 복합한약추출물을 투여하여, 질환과 관련된 지표의 변화를 확인함으로써 아토피피부염 치료의 유효성을 확인하여 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 어성초(*Houttuynia cordata Thunberg*), 복분자(*Rubus coreanus*), 생지황(*Rehmannia glutinosa*), 화피(*Prunus yedoensis*), 당귀(*Angelica gigas nakai*)는 음니허브주(Korea)에서 구입하여 100g 정량 후 80 % 에탄올 1L에 30분 동안 sonication하였다(82-8510EDTH, Branson, USA). 3 mm 여과지(Whatman, England)를 이용하여 감압하여 여과한 후, 여과된 에탄올 추출물은 감압농축기(N-1001S-W, Eylea, Japan)를 이용하여 농축한 후, 동결건조하였다(Freeze-dryer, Matsushita, Japan). 수율은 화피 7.65 %, 어성초 11 %, 복분자 11.5 %, 생지황 16.75 % 그리고 당귀 38 %였다. 얻은 분말은 HM-A(어성초, 복분자, 생지황, 화피), HM-B(어성초, 복분자, 생지황, 당귀)로 나누어 각각 동을로 배합하여 3차 증류수에 200 mg/ml로 녹인 후 stock으로 사용하였다.

2) 동물

본 실험에서 사용한 7주령의 암컷 Balb/c 마우스는 오리엔트(Korea)에서 공급 받았으며, 1주일간 동물실 적응과정을 거친 후 실험에 사용하였다. 경희대 한의과대학 동물실의 사육환경은 온도 24 ± 2 °C, 습도 40~60 %, 주야 12시간 교대로 150~300 Lux의 환경에서 마우스용 케이지에 4마리씩 수용하여 사육하였으며, 멸균 증류수와 고형 사료를 자유롭게 섭취할 수

교신저자 : 김경준, 인천광역시 남동구 구월1동 독점로 29번길
가천대학교 부속 길한방병원 (Tel : 032-468-0330,
Fax : 032-468-4033, E-mail : kkjo215@gachon.ac.kr)
• 접수 2014/7/8 • 수정 2014/8/7 • 채택 2014/8/14

있도록 하였다. 본 실험은 경희대학교 한의과대학의 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하여 설계, 수행되었다.

3) 시약 및 항체

아토피피부염을 유발하기 위한 OVA과 Aluminum hydroxide hydrate (Alu)는 sigma(USA) 제품을 사용하였으며, 조직염색을 위한 hematoxilin과 eosin 그리고 toluidine blue 또한 sigma 제품을 사용하였고, 전체 T세포를 염색하기 위한 CD3 항체는 Thermo scientific(USA)에서 구입하였다. Real-time PCR에 사용한 primer는 코스모진텍(Korea)에서 제작하였으며, SYBR green 시약은 Roche(Switzerland)사의 제품을 사용하였고, 혈액내의 IgE를 측정하기 위한 ELISA kit는 Becton & Dickinson(USA) 제품을 구입하여 측정하였다.

2. 방법

1) 아토피피부염 동물모델

7주령의 암컷 Balb/c 마우스에 OVA 20 μ g과 Alu 4mg을 saline에 혼합하여 일주일에 한번씩 3주간 복강

에 투여하여 아토피피부염 감작을 유도하였다. OVA 복강투여 3주 후 OVA 100 μ g과 Alu 20mg 혼합물을 제모한 등 피부에 1×1 cm patch로 3주 동안 주 3회 감작시켜 국소부위에 피부염을 유도하였다. 아토피피부염 유도 후 HM-A와 HM-B 혼합한약추출물은 patch 감작 1주 후부터 2주 동안 2일에 한번씩 50mg/kg의 농도로 경구투여 하였다. 실험이 끝난 후 심장의 혈액을 채혈하고, 등 피부를 적출하였다(Fig. 1).

동물군은 아토피피부염을 유도하지 않는 정상군 (Normal group; N=4), 아토피피부염을 유발한 대조군 (OVA group; N=4), 복합한약추출물을 경구투여한 실험군 (HM-A group, HM-B group; 각 N=4) 이렇게 네 개의 군으로 나누어 실험하였다.

2) 조직병리학적 평가

적출한 피부조직은 saline으로 씻어낸 후 OCT compound로 동결조직절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색 및 비만세포를 염색하는 toluidine blue 염색을 하였다. 염색한 조직은 광학현미경의 400배율하에서 염증세포 침윤 및 비만세포의 증감 정도를 관찰하였다. 비만세포 및 염증세포의 침윤 정도는 1000배율하의 5 field/N의 High power

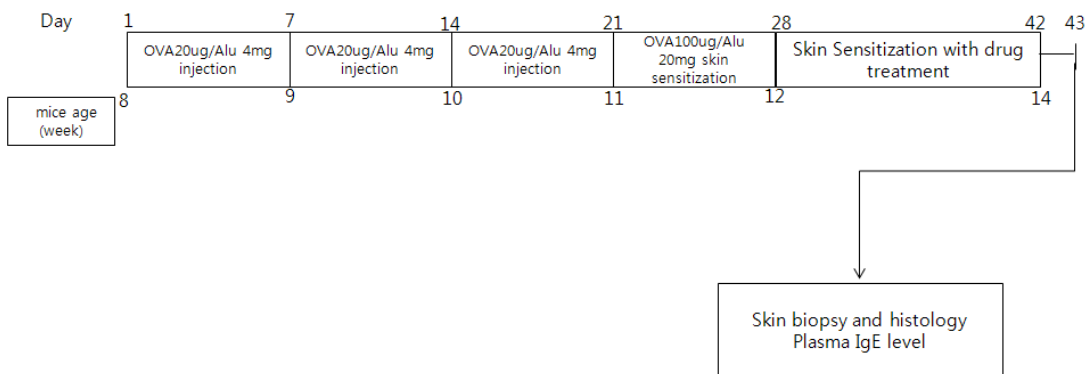


Fig. 1. General schematic diagram of studies. Female Balb/c mice were intraperitoneally sensitized with OVA(20 μ g) plus Alu(4 mg) three times weekly and then sensitized with OVA(100 μ g) plus Alu(20 mg) applied in 100 μ l to a sterile patch for 3weeks period. HM-A and HM-B were orally administrated(50 mg/kg concentration) once a two days from 28 to 42 days.

fields (HPFs)를 계수하여 cells/HPFs 로 나타내었다.

3) 혈구 분석

실험이 끝난 후 rompum(바이엘코리아, Korea)과 zoletil(비박코리아, Korea)으로 마취하여 개복한 후 1 ml 주사기를 이용하여 심장에서 채혈한 후, EDTA tube(Becton Dickinson Vacutainer system, USA)에 모아서 자동혈액분석기 HEMAVET 950(Drew Scientific, UK)를 이용하여 전체 WBC를 검사하였다.

4) 혈액 내 IgE level 측정

먼저 심장에서 채혈한 혈액은 EDTA tube에 담아서 2000 rpm으로 10분간 원심분리 후 상층액만 분리하여 실험 전까지는 -20 °C에 보관해 두었다. 실험방법은 먼저 ELISA plate에 IgE를 잡을 수 있는 capture antibody를 coating buffer와 함께 4 °C에서 하루 동안 보관하였다. 다음날, 5 % fetal bovine serum(FBS)에서 1시간 동안 blocking과정을 거친 후, plasma 샘플을 20배 희석하여 100 μl의 부피로 2시간동안 실온에 반응시킨다. 그 후 IgE를 인지하는 2차 항체를 넣고 substrate인 100 μl의 Tetramethylbenzidine(TMB) solution을 넣고 15분간 반응시킨 후, 50 μl의 stop solution을 넣었다. 실험결과는 ELISA reader기의 450 nm의 filter에서 값을 측정하였다.

5) 면역조직학적 검사

등 피부 조직에서 CD3 antibody를 이용하여 전체 T세포의 발현변화를 면역염색법을 통해 확인하였다. 먼저 피부조직은 동결절편을 만든 후 염색 전 상온에서 30분간 건조시킨 후 4 % paraformaldehyde(PFA)에 조직을 고정시켰다. 이어서 5 % bovine serum albumin(BSA)로 blocking하여 CD3 1차 항체를 반응시킨 후, CD3를 인지하는 2차 항체를 반응한 후 DAB 시약(Vector Lab, USA)을 사용하여 발색시켰다.

6) Real-time PCR

Real-time PCR을 하기 위해 먼저 동물 피부조직에서 RNA를 분리하였다. RNA분리 방법은 피부조직을 1ml RNA lysis 용액을 넣고 균질기(IKA laboratory, Korea)로 잘 파쇄한 후 RNA 분리 kit(Intron, Korea)를 사용하여 얻었다. 분리한 RNA의 1μg을 cDNA로 만들기 위해 Oligomer와 65°C에서 5분간 반응 시킨 후, dNTP, Reverse-transcription enzyme을 다시 더하여 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다.

Real-time PCR은 이중DNA에 특이적으로 결합하는 SYBR green 형광 dye를 사용하여 Lightcycle-96 (Roche, Switzerland)기계를 이용하여 실험을 수행하였다. 염료는 cDNA 2μl, SYBR green 10μl, Primer sense 0.5μl, Primer antisense 0.5μl, 증류수 7μl로 모두 20μl의 부피가 되도록 준비하였다. PCR은 총 45 cycle을 돌리며, 결과는 house keeping gene인 GAPDH로 target gene(IL-4, IL-13, IL-17)을 보정한 ratio를 수치화하였다. 각 Primer의 sequence는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Sequences of the Oligonucleotide Used in Real-time PCR.

Primer Name	Sequence
IL-4	5'-AAGAACACCACAGAGAGTGAGCTC-3' 3'-TTTCAGTGTGGACTTGGACTC-5'
IL-13	5'-AGCATGGTATGGAGTGTGGACCTG-3' 3'-CAGTTCCTTTGTGTAGCTGAGCAG-5'
IFN-γ	5'-GCCATCAGCAACAACATAAGCGTC-3' 3'-CCACTCGGATGAGCTCATTGAATC-5'
IL-17A	5'-AGCAAGAGATCCTGGTCCTGAA-3' 3'-CATCTTCTCGACCCTGAAAGTGA-5'

7) 통계분석

실험결과와 모든 측정값은 평균±표준오차로 요약하였으며, student t- test method로 분석하여 p < 0.05에서 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

Ⅲ. 結 果

1. 염증 세포 침윤에 미치는 영향

전체적인 염증 세포의 침윤 정도를 확인하기 위하여 H&E 염색법을 시행한 결과, Normal군에 비해 OVA군에서 확연히 염증세포의 침윤정도가 증가하였다. HM-A군과 HM-B군에서는 OVA군에 비해 감소하였다(Fig. 2).

2. 비만 세포에 미치는 영향

비만세포는 OVA군에서 Normal군에 비해 유의성 있게 증가하였으며, HM-A, HM-B군에서 모두 비만 세포의 발현이 억제되었다. HM-A군에서는 비만세포가 유의성있게 감소하였다(Fig. 3).

3. 염증성 WBC에 미치는 영향

아토피피부염 환자의 혈액 내에서 다량 발견되는 Eosinophil의 수치는 Normal군에 비해 OVA군은 두

배 이상 증가하였고, HM-A군과 HM-B군은 OVA군에 비해 감소하였다. 특히 HM-A군은 Normal군과 비슷한 수준의 감소를 나타내었다. 염증 반응 시 증가하는 Neutrophil, Lymphocyte 및 Monocyte 수치 역시 HM-A와 HM-B군에서 감소하였다. 하지만 전체 WBC level은 OVA군에서 Normal군에 비하여 증가

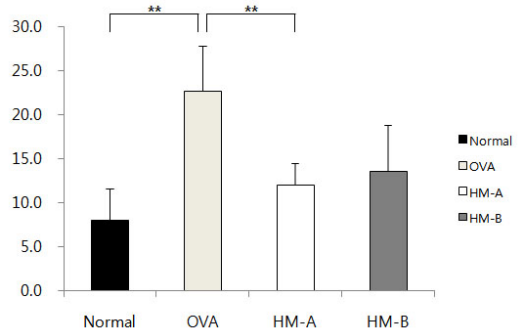


Fig. 3-1. Comparison of mast cells of the skin from toluidine stained sites. The columns and the error bars represent means \pm SEMs (n=4). **p<0.01.

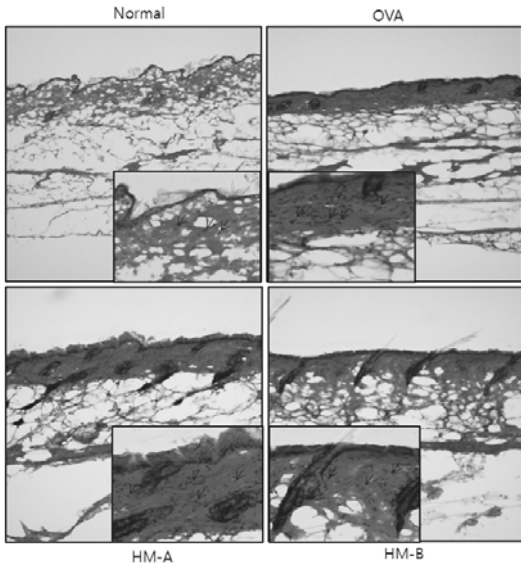


Fig. 2. Comparison of inflammation cells of the skin from H&E stained sites. Inflammatory cells infiltration are indicated arrows.

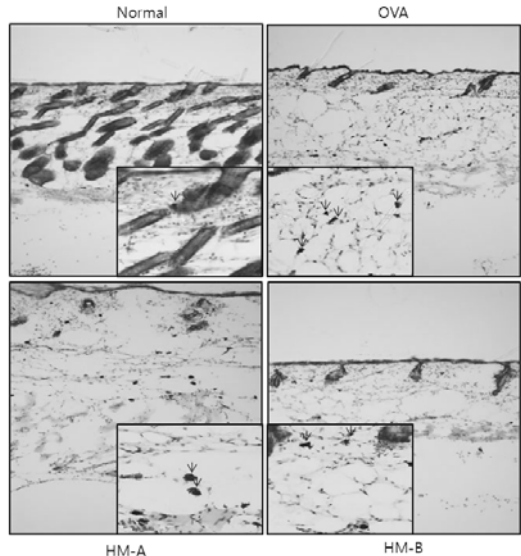


Fig. 3-2. Comparison of mast cells of the skin from toluidine stained sites. Mast cells are indicated arrows.

하였으나, 약물투여로 감소를 보이지는 않았다(Fig. 4).

4. IgE level에 미치는 영향

Normal군에 비해 OVA군에서 IgE level은 증가하였고, HM-A와 HM-B군에서 감소하는 결과를 확인하였다. HM-A군이 더 효과적이었다(Fig. 5).

5. CD3 세포 발현에 미치는 영향

CD3항체를 이용한 면역염색법으로 전체 T세포의 변화를 관찰한 결과, Normal군에 비해 OVA군에서 CD3의 발현이 증가하였고, HM-A와 HM-B군에서는 발현 정도가 낮아졌다. HM-A군이 HM-B군보다 전체 T세포를 줄이는데 효과적이었다(Fig. 6).

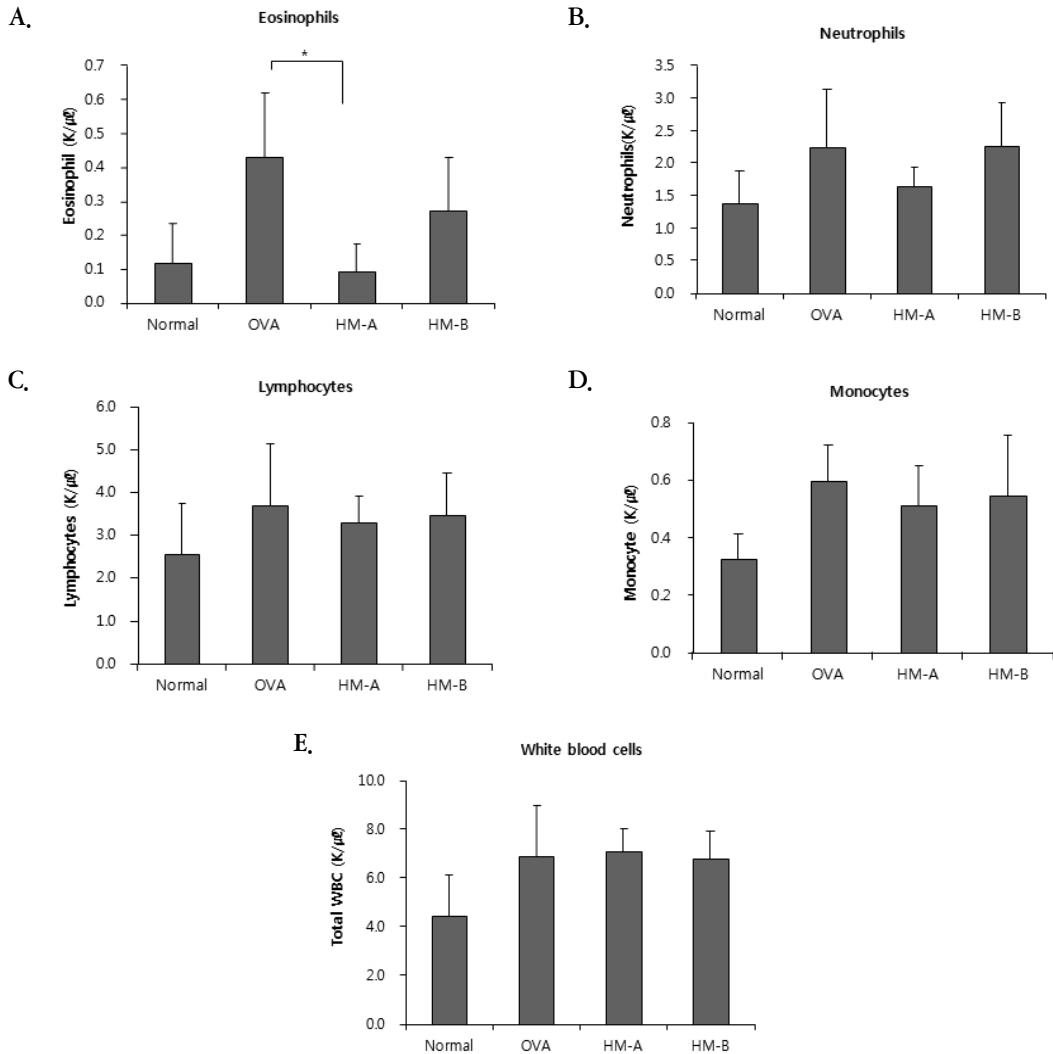


Fig. 4. blood analysis : Eosinophils, Neutrophils, Lymphocyte, Monocytes, WBCs. Blood were analysed using HEMAVET blood analysis system, The columns and the error bars represent means±SEMs(n=4). *p<0.05.

6. Cytokine 발현에 미치는 영향

Normal군에 비해 OVA군에서 cytokine이 증가하였고, HM-A와 HM-B군에서 모두 감소하는 결과를 확인하였다. IL-4의 경우 HM-B군에서, IL-13의 경우 HM-A군에서 Normal군보다 더 낮은 발현정도를 나타내었다(Fig. 7).

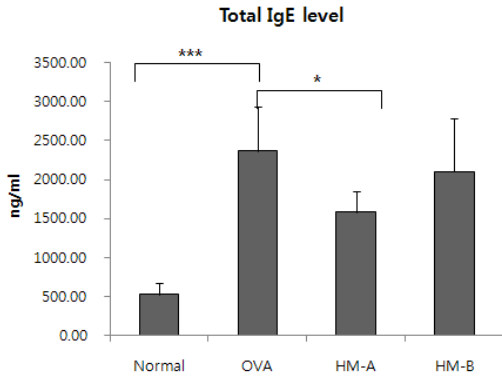


Fig. 5. Plasma IgE-specific antibody level. Total IgE level was determined by ELISA. The columns and the error bars represent means \pm SEMs(n=4). *p<0.05, ***p<0.001.

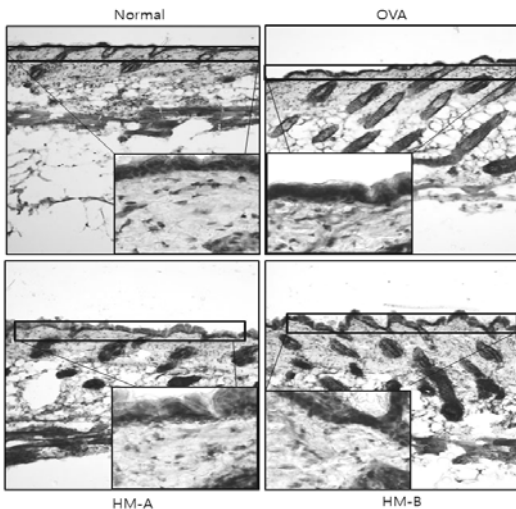


Fig. 6. Comparison of CD3(total T cells) of the skin. Magnification: large box, X100, small box, X400. Positive cell stain brown.

IV. 考 察

아토피피부염은 allergens에 지속적으로 노출되어 발병하는 염증질환으로 영유아에서는 10-20%, 성인에서는 1-3% 가량이 겪고 있으며¹⁸⁾, 치료되었더라도 외부항원 노출 시 재발되는 질병으로 지속적인 관리가 필요하다. 아토피피부염을 유발하는 외부항원들은 집먼지진드기, 환경오염물질, 화학성분이 포함된 가공 음식 및 생활필수품 등이 있으며, 산업화가 가속화되면서 외부항원들에 지속적으로 노출됨으로써 아토피피부염의 발병율이 증가하는 추세이다¹⁹⁾. 서양의학에서는 steroid성 약물에 의한 치료가 대부분이며 이 외에 보습 및 외부 항원 차단 노력 등의 방법을 시행하고 있다²⁰⁾.

아토피피부염은 외부 요인에 의해 체내 염증반응과 면역반응의 과잉발현으로 나타난다고 알려져 있다¹⁻²⁾. 따라서 염증 및 면역 억제를 통한 아토피피부염 치료제를 개발하기 위한 연구가 전 세계적으로 늘어나는 추세이다. 최근에 여성초, 복분자, 생지황, 화피, 당귀는 염증세포의 활성을 조절하고, 관련 cytokine 유전자 발현을 억제하는 항염항산화항암항스트레스 등의 효과가 있는 것으로 보고되었다.

여성초의 효능은 清熱解毒, 消癰排膿, 利尿通淋하여, 피부의 열성 염증 질환에 응용한다. 비만세포나 Th2 면역 반응에서 염증 매개인자 억제를 통한 항염증효과를 가지는 것으로 보고되었다^{6,7)}.

복분자의 효능은 益腎, 固精, 縮尿하여 주로 비뇨생식기 질환에 사용되어왔다. 최근 염증성 cytokine 생성 억제를 통한 항염증작용⁸⁾이 확인된 것 외에도 생리활성⁹⁾과 면역활성 증진¹⁰⁾ 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

생지황의 효능은 清熱生津, 涼血止血하여 피부의 열성 질환과 건조성 질환 등에 응용한다. 최근 연구에서, 혈관신생인자 단백질 발현 감소 및 조절을 통하여 신생혈관 억제에 관여하며¹¹⁾, NO생성 저해를 통한 항염증효과¹²⁾를 가지고 있는 것이 확인되었다.

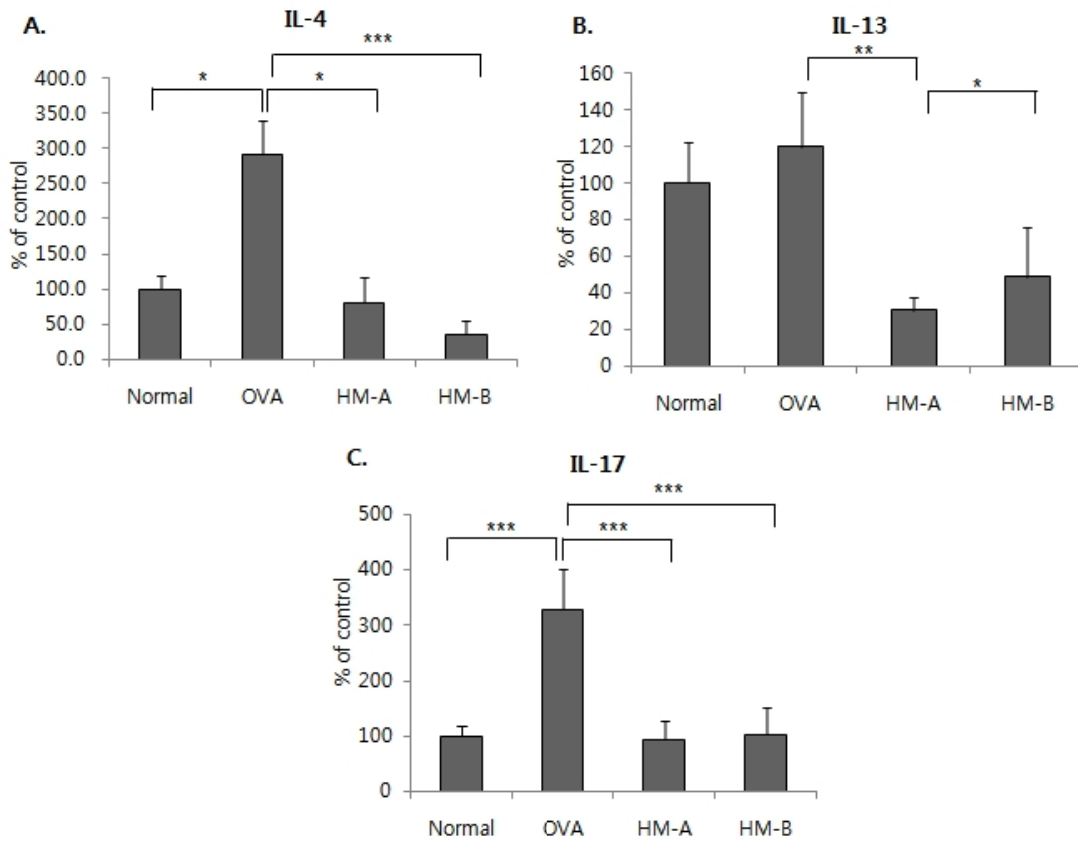


Fig. 7. The mRNA expression of different cytokines. IL-4, IL-13 and IL-17 mRNA expression levels decreased in HM-A and HM-B group. The columns and the error bars represent means \pm SEMs(n=4). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

화피의 효능은 清肺熱, 透疹하여, 피부와 호흡기의 열성 염증 질환에 응용한다. 항염증효과에 대한 최근 연구로 NO와 PGE2의 분비를 억제하고, iNOS와 COX-2의 발현을 감소시키며, NF- κ B의 활성을 억제 하는 것으로 보고된 바 있다¹³⁾.

당귀의 효능은 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸하여 건조성 피부 질환에 응용한다. 항염증작용¹⁴⁾과 항암 및 항스트레스 등의 생리 활성 증진 효과¹⁵⁾가 확인되었다.

한의학에서는 아토피피부염을 奶癬, 胎癬, 胎癩瘡, 濕瘡에 속한다고 보며, 주요 발생원인을 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고 清熱, 養血, 除濕, 祛風, 涼血 등의

치법을 제시하고 있어서¹⁶⁾, 상기한 한약재가 내선의 치료에 사용될 수 있다.

이상의 한의학적 이론과 실험적 근거를 바탕으로 두 개의 복합처방인 HM-A(어성초, 복분자, 생지황, 화피)와 HM-B(어성초, 복분자, 생지황, 당귀)를 구성 하여 아토피피부염 실험을 계획하게 되었다.

아토피피부염 실험을 위한 동물 모델은 피부자극 모델, 식이유도 모델, 환경유도 모델, OVA 피부감작 모델로 나눌 수 있으며, 일반적으로는 피부자극 모델 과 OVA 피부감작 모델을 많이 사용하고 있다. 피부 자극 모델은 화학물질 dinitrochlorobenzene(DNCB) 또는 picryl chloride(PiCl) 를 이용하여 아토피피부염

을 유발하는데, 이는 비교적 빠른 기간 안에 피부염을 유발할 수 있으며 피부 변화를 눈으로 확인할 수 있다. 이에 반해, OVA 피부감작 모델은 화학물질 피부 자극 모델에 비해 상대적으로 유발하는데 걸리는 시간이 비교적 길며 실제 피부염 증상은 눈으로 확인하기 어렵다²¹⁻²³⁾.

실험에서 사용한 OVA 피부감작 모델은 화학성분을 사용하여 아토피피부염을 유발시키는 방법보다는 상대적으로 유발 기간이 같다. 피부염 유도 후 눈으로 확인 가능한 특이한 피부병변은 확인 할 수 없었으나, 실험 종료 후 혈액 분석 결과 알레르기 반응 마커인 eosinophil이 유효하게 증가하였으며, 그 외의 조직병리학적 특징의 변화가 관찰되었다. 그러므로 아토피 피부염 실험에 적합한 동물 실험 모델이라 할 수 있다.

피부조직에 염증 세포의 침윤 정도를 확인하기 위하여 H&E 염색법을 시행한 결과 아토피피부염을 유발한 경우 확연히 증가하였다. 또한 약물 투여로 약간 감소하였는데, 이는 약물의 경구투여가 피부조직의 염증세포 조절에도 영향을 미친다는 것을 의미한다.

비만 세포는 천식 및 아토피피부염성 습진 등의 염증관련 질환에서 즉시형 알레르기반응에 관련된 염증 세포로서 알레르기 반응의 연쇄반응을 주도하는 핵심 염증세포이며, 비만세포의 점막에는 IgE와 결합할 수 있는 Fc 수용체를 포함하며 히스타민 등을 포함하고 있는 것이 특징이다^{24,25)}. 아토피피부염 유발로 확연히 증가된 비만세포가 두 복합한약추출물의 경구투여로 억제되었다. 약물의 경구투여가 알레르기 반응의 핵심 세포인 비만세포를 줄여, 동물의 실제 피부조직의 염증반응을 줄여준다는 것을 알 수 있다.

WBC 중에서 염증반응이 일어나면 제일 먼저 뚜렷하게 증가하는 염증세포가 Eosinophil이며, 아토피피부염 환자의 혈액 내에서 많이 발현된다. Eosinophil은 아토피피부염 유발로 정상군보다 2배 이상 증가하였고, 약물투여로 유효하게 감소하였다. 특히 HM-A군의 경우 Normal군 수준으로 감소하였다. 이 외에

Neutrophil, Lymphocyte 및 Monocyte 수치 역시 약물의 경구투여로 감소하였다.

IgE는 알레르기나 기생충감염환자에게서 고농도로 나타나는 면역글로불린으로 아토피피부염 환자 역시 고농도로 존재하는 것으로 알려져 있고, Eosinophil, Basophil 및 비만세포와 결합하여 세포를 감작하고 Allergen과 결합하여 탈과립이 생기면 히스타민과 같은 생리활성물질을 분비하게 된다²⁶⁾. 약물의 경구투여로 IgE level이 감소하였고, HM-A군은 유의성있게 감소하였다.

사람의 면역기능에 중요한 역할을 하는 T세포는 크게 제1형 T세포와 제2형 T세포로 나눌 수 있는데, 일반적으로 아토피피부염 환자들은 상대적으로 제1형 T세포의 level이 감소되어 있는 반면 제2형 세포는 증가해있는 것으로 확인된다²⁷⁾.

CD3 항체는 제1형, 제2형 전체 T세포를 인지 할 수 있는 항체로, 약물투여에 의한 전체 T세포의 감소 정도를 확인하기 위해 피부조직에서 CD3 면역염색법을 통해 변화를 살펴보았다. 그 결과 epidermal 부분에서 CD3의 발현정도의 변화를 확인할 수 있었는데, OVA군이 Normal군보다 확연히 CD3의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 약물을 경구투여하면 발현정도가 낮아졌으며, HM-A가 HM-B보다 전체 T세포를 줄이는데 효과적이었다. 이 결과, 아토피피부염 유발에 의해 전체 T세포가 증가한 것은 제2형 T세포가 급격히 증가한 결과라는 사실을 알 수 있으며, 약물치리에 의해 그 level이 Normal군과 유사한 수준으로 감소한다는 것을 알 수 있다.

아토피피부염 환자에서 증가하는 제2형 T세포와 관련된 제2형 cytokine들의 변화를 피부조직의 RNA를 분리하여 real-time PCR을 통해 발현정도를 비교하였다. 제1형 T세포와 관계된 대표적인 cytokine은 IFN- γ 가 있고, 제2형 T세포와 관련된 cytokine으로는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13이 있다. 또한 본 실험에서 사용한 IL-17의 경우 CD4 보조 T세포와 관련된 cytokine으로, CD4는 glycoprotein으로 보조 T

세포, macrophage, monocyte 및 dendritic cell의 표면에 발현하는 단백질이며 역시 inflammation과정에서 발현이 증가하는 것으로 알려진 cytokine이다^{28,29}.

제1형, 제2형 T세포를 조절하는 cytokine의 mRNA level을 모두 확인하지 않고 제2형 T세포를 조절하는 cytokine만 확인하였으나, 약물 투여로 IL-4, IL-13, IL-17 세 가지 모두 감소한 것은 약물투여가 효과적이라고 볼 수 있다. 또한 IgE level이 유효하게 감소한 것도, 약물투여로 IgE를 조절하는 제2형 cytokine이 감소한 결과이다.

아토피피부염 유발로 인해 증가하는 염증 인자들의 증감 정도를 살펴본 결과, 복합한약추출물의 경구투여로 염증 관련 세포수를 억제하고 T세포 활성화 및 IgE를 억제하여서 아토피피부염 치료에 유효할 것으로 판단한다.

V. 結 論

아토피피부염에 효과가 있을 것으로 기대되는 복합한약추출물 두 종류(HM-A: 어성초, 복분자, 생지황, 화피, HM-B: 어성초, 복분자, 생지황, 당귀)의 아토피피부염 억제효과를 조사하였다.

아토피피부염을 유발한 마우스에 복합한약추출물을 경구투여한 결과, 피부조직의 염증세포 침윤이 감소하였다. 염증 반응 시 피부조직에 증가하는 비만세포의 발현이 억제되었다.

염증 반응 시 혈액 내에 증가하는 Eosinophil, Neutrophil, Lymphocyte 및 Monocyte 수치가 감소하였다. Eosinophil은 유의성있게 감소하였다.

아토피피부염 환자에서 고농도로 관찰되는 IgE level이 유의성있게 감소하였다.

아토피피부염 유발로 증가한 전체 T세포가 감소하였다.

제2형 T세포를 조절하는 cytokine인 IL-4, IL-13,

IL-17 세 가지의 mRNA level이 모두 유의성있게 감소하였다.

이에 본 실험에서 사용한 두 복합한약추출물은 아토피피부염에 관련된 여러 면역 세포들의 level을 감소시키는 효과를 보여줬으며, 실제 아토피피부염 치료에 유효한 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 감사의 글

이 논문은 2014년도 가천대학교 교내연구비 지원에 의한 결과임.

Reference

1. Leiferman KM, Ackerman SJ, Sampson HA, Haugen HS, Venencie PY, Gleich GJ. Dermal deposition of eosinophil-granule major basic protein in atopic dermatitis: comparison with on chocerciasis. *N Engl J Med.* 1985;313(5):282-5.
2. Cheng JF, Ott NL, Peterson EA, George TJ, Hukee MJ, Gleich GJ, et al. Dermal eosinophils in atopic dermatitis undergo cytolytic degeneration. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99(5):683-92.
3. Jonathan M Spergel, Emiko Mizoguchi, Hans Oettgen, Atul K Bhan, and Raif S Geha. Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. *J Clin Invest.* 1999;103(8):1103-11.
4. Udo Herz, Rita Bunikowski, Harald Renz. Role of T cells in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998;115:179-90.
5. Nakazawa M, Sugi N, Kawaguchi H, Ishii N, Nakajima H, Minami M. Predominance of

- type cytokine-producing CD4+ and CD8+ cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99(5):673-82.
6. Lee JS, Kim IS, Kim JH, Kim JS, Kim DH, Yun CY. Suppressive effects of *Houttuynia cordata* Thunb (Saururaceae) extract on Th2 immune response. *J Ethnopharmacol*. 2008; 117(1):34-40.
 7. Lee HJ, Kim KJ. The Effects of *Houttuynia Herba* on the Mast Cell-mediated Inflammatory Responses. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2009;22(2):60-73.
 8. Yang HM, Lim SS, Lee YS, Shin HK, Oh YS, Kim JK. Comparison of the Anti-inflammatory Effects of the Extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. *Korean J Food Sci Technol*. 2007;39(3):342-7.
 9. Cha HS, Park MS, Park KM. Physiological activities of *Rubus coreanus* Miquel. *Korean J Food Sci Technol*. 2001;33:409-15.
 10. Kim DH, Park JH, Kim JH, Kim CH, You JH, Kwon MC, et al. Enhancement of Immune Activities of *Ephedrae Herba* and *Rubi Fructus* at Low Temperature Extraction. *Korean J Medicinal Crop Sci*. 2005;13(3):81-6.
 11. Kim SB, Kim KJ. The Effects of *Rehmannia glutinosa* on the Protein Expression Related to the Angiogenesis, Cell Survival and Inflammation. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2006;19(3):22-33.
 12. Seo HS. The Experimental Study on Anti-inflammation and Anti-oxidation of *Indigo Naturalis* and *Rehmanniae Radix*. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2008;21(3):104-10.
 13. Ryu MH, Park EK, Kim YH, Lee YA, Lee SH, Hong SJ, et al. Anti-inflammatory Effects of an Ethanolic Extract from *Betula Platyphylla*. *J Korean Oriental Med*. 2006; 27(1):184-95.
 14. Shin S, Joo SS, Park D, Jeon JH, Kim TK, Kim JS, et al. Ethanol extract of *Angelica gigas* inhibits croton oil-induced inflammation by suppressing the cyclooxygenase - prostaglandin pathway. *J Vet Sci*. 2010;11 (1):43-50.
 15. Kim JH, Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Song YK, Seong NS, et al. Effect of Aqueous Extracts from *Rubus coreanus* Miquel and *Angelica gigas* Nakai on Anti-tumor and Anti-stress activities in mice. *Korean J Medicinal Crop Sci*. 2006;11(4):206-11.
 16. National Oriental Medical School Dermatology & Surgery Textbook Editing Board. Text of Traditional Korean Dermatology & Surgery. Busan:Sun Wo Publisher. 2007:355-61.
 17. Nationwide College of Korean Oriental Medicine Joint Instruction Compilation Committee. *Bonchohak*, 4th ed. Seoul: Yeongrimsa. 1998:190, 630, 212, 578.
 18. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest*. 2004;113 (5):651-67.
 19. The Department of Dermatology of Seoul National University College of Medicine. *Dermatology for Medical Students*. Korea Medical Book, 2006:30.
 20. Lee HI, Han TY, Seo SJ, Kim DW, Kim MN, Kim MB, et al. Dermatologic Diseases Associated with Atopic Dermatitis in Koreans: Multicenter Study. *Korean J*

- Dermatol. 2010;48(3):191-7.
21. Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, Higa S, Wang W, Suemura M, et al. Persimmon leaf extract and astragalus inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(1 Pt 1):159-66.
 22. Park EJ, Park KC, Eo H, Seo J, Son M, Kim KH, et al. Suppression of spontaneous dermatitis in NC/Nga murine model by PG102 isolated from *actinidia arguta*. *J Invest Dermatol*. 2007;127(5):1154-60.
 23. Jonathan M Spergel. Epicutaneous Sensitization with Protein Antigen Induces Localized Allergic Dermatitis and Hyperresponsiveness to Methacholine after Single Exposure to Aerosolized Antigen in Mice. *J Clin Invest*. 1998;101(8):1614-22.
 24. Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2 Suppl):S486-94.
 25. Pulendran B, Ono SJ. A shot in the arm for mast cells. *Nat Med*. 2008;14(5):489-90.
 26. Fitzsimmons CM, McBeath R, Joseph S, Jones FM, Walter K, Hoffmann KF, et al. Factors affecting human IgE and IgG responses to allergen-like *Schistosoma mansoni* antigens: Molecular structure and patterns of in vivo exposure. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;142(1):40-50.
 27. Del Prete G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy*. 1992;47(5):450-5.
 28. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol*. 2002;71(1):1-8.
 29. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1123-32.