

# 加味生料四物湯의 抗炎症효과와 止痒膏의 아토피피부염 손상 및 止痒 효과에 미치는 영향

김정진 · 양성완<sup>1</sup> · 손낙원<sup>2</sup> · 안규석\*

경희대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 서울 서초구 뉴코아한의원, 2: 경희대학교 동서의학대학원 동서신경과학교실

## Anti-inflammatory action by Gamisangryosamul-tang and The effect of Ziyang-Go on atopic dermatitis-like lesion and pruritus in NC/Nga mice

Jeong Jin Kim, Sung Wan Yang<sup>1</sup>, Nak Won Son<sup>2</sup>, Kyoo Seok Ahn\*

Department of Pathology, School of Oriental Medicine, Kyunghee University, 1: Newcore OM Clinic, Seoul, 2: Department of East-West Neuroscience, Graduate School of East-West medicine, Kyunghee University

This research was performed to examine an anti-inflammatory effects of Gamisangryosamul-Tang(GSS) and anti-pruritus effects of Ziyang-Go(Salve). This study was processed by three experiments; Experiment 1: Inhibitory activity of GSS extract on the degranulation of mast cell and histamine release in plasma induced by compound 48/80 i.p. injection after the pretreatment of GSS extract i.p. injection in Sprague-Dawley rats. Experiment 2: Anti-inflammatory effect of GSS extract on macrophage raw 264.7 cells treated by LPS 250 ppm (before 2 hours). Experiment 3: Measurement of passive cutaneous anaphylaxis and atopic dermatitis using NC/Nga mice. GSS extract inhibited histamine release by 70% compared to compound 48/80 treated control group and histologically significantly reduced (P<0.01) the degranulation of mast cell in SD rats. In GSS extract treated group, the expression of TNF- $\alpha$  in macrophage cell showed the remarkable inhibitory effect about 62% (P<0.01) compared to LPS treated control group. The expression of IL-6 appeared more effective by 46% than the LPS treated control group and by 6% compared to hydrocortison treated group. Comparing with steroid (0.05% prednisolon) ointment, Ziyang-Go treated group showed the significant(30%) recovery on skin response index in atopic dermatitis like anaphylaxis mice(NC/Nga). Finally, in scratching behavioral tests of NC/Nga mice for three weeks, Ziyang-Go treated group significantly (P<0.05) suppressed the pruritus on the face, neck, ears and dorsal skin than inbred NC/Nga mice. However, the change of IgE and IFN- $\gamma$  from the spleen cell of NC/Nga mice was not significantly different between the oral intake of GSS extract group and of saline intaked control group. Summary and Conclusion: This study demons trates that Ziyang-go have the equal anti-pruritus effect to steroid ointment and GSS extract have the notable immunologic activity on inflammatory in vivo and in vitro model. Advanced experiment of this study will be required for more reliable information about the correlation between the lymphokine (i.e. IgE) and the anti-allergic effects of GSS.

Key words : Gamisangryosamul-tang(加味生料四物湯) and Ziyang-Go, anti-inflammatory, anti-pruritus, NC/Nga mice

### 서 론

아토피 피부염은 유전적 소인을 가진 만성 재발성 습진성 질환으로 아토피 가족력을 가진 아이들에게서 가장 흔하게 발병

되는 질병으로 산업국가에서 증가되고 있는 추세이다<sup>1)</sup>. 최근 보고에 따르면, CD4 양성 T 세포가 제 1형 T 세포 (Th1)와 제 2형 T세포 (Th2)로 활성화되는 것이 알려졌다<sup>2)</sup>, 제 1형 T세포는 interferon-gamm (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-2 (IL-2)를 주로 분비하여 지연형 과민반응에 관여하고, 제 2형 T세포는 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13을 주로 분비하며 체액성 면역반응을 강화하는데 그중 Ig E-Ig G1 isotype swtching이

\* 교신저자 : 안규석, 서울시 동대문구 회기동1, 경희대학교 한의과대학  
· E-mail : ahnks@khu.ac.kr Tel : 02-961-0335  
· 접수 : 2003/02/04 · 수정 : 2003/03/06 · 채택 : 2003/03/28

포함된다<sup>3)</sup>. IL-4는 제 1형 T 세포의 기능을 억제하고 IFN- $\gamma$ 는 제 2형 T세포의 기능을 억제하여 서로 길항적인 조절 역할을 하고 있다<sup>4,5)</sup>. 아토피 피부염은 Ig E 합성이 증가하는 특징을 가지며 환자의 말초혈액에서 채취한 T세포와 급성기의 피부에 침습한 세포들을 분석하면 IL-4, IL-5가 높은 수준으로 존재하되 IFN- $\gamma$ 는 적은 양으로 존재하는데 아토피 피부염의 초기에는 제 2형 T 세포가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 한의학에서는 아토피성 피부염을 奶癬, 胎癬, 胎敏瘡 등으로 표현하며 隋代 <諸病源候論·小兒雜病諸候·癬候>중 小兒의 面部에 癬皮가 甲錯되고 乾燥하게 되는 것은 乳癬이라 하여 嬰兒濕疹과 類似한 것으로 보았으며<sup>7)</sup>, 吳가 奶癬을 胎敏瘡이라 하여 乾敏과 濕敏으로 나누어 설명하였다<sup>8)</sup>. 일반적으로 아토피 피부염의 피부 상태는 한의학적으로 風熱, 燥熱, 濕熱의 皮膚炎 양상을 띠는데, 이는 吳가 말하는 癬瘡의 症狀과 類似하다고 볼 수 있다. 加味生料四物湯의 원방이 되는 四物湯은 造血, 혈류개선, 물질대사의 촉진, 면역기능의 증가, 消炎, 抗癌, 鎮痛, 鎮痙 등의 작용이 있다고 밝혀져 있다<sup>9,10)</sup>. 止痒膏의 처방내용은 <醫宗金鑑>에 나오는 外用劑 약물과<sup>8)</sup> 임상에서 유의성있게 쓰여진 약물들로 구성되었다. 따라서 본 연구에서는 임상연구에서 효과가 인정되었으며 清熱, 涼血, 祛風 효과가 있는 加味生料四物湯 추출물의 항염증효과와 清濕熱, 涼血, 解毒 효과가 있는 止痒膏의 피부염에 대한 지양효과를 관찰하기 위하여, SD계 흰쥐에 한약물을 전처리한 후 compound48/80에 의한 비만세포의 탈과립 및 histamine 분비 억제 효과, NC/Nga mouse의 아토피양 피부염과 비장세포에서의 IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  등의 lymphokine assay 및) raw 264.7 macrophage cell의 LPS에 대한 항염증효과로 나누어 진행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 동물

체중 220-250g의 Sprague-Dawley 흰쥐 수컷과 5주령 NC/Nga mouse를 사용하였다. 사육 조건은 온도 21-23°C, 습도 40-60%, 조명 12시간 명암으로 유지 시켰다. 모든 실험 동물은 실험실 환경에서 1주일 적응시킨 후 사용하였으며, 실험동물은 각 군 당 6마리로 배정하여 수행하였다.

### 2. 檢液製造 및 투여

加味生料四物湯은 3000 ml의 round flask에 약재 204.1 g을 2000 ml의 증류수에 넣어 관류 냉각장치에서 2시간 동안 가열, 전탕하여 추출한 용액을 rotary evaporator에서 감압 농축한 후 동결건조하여 31 g의 엑기스산을 얻었다. 止痒膏은 알로에, 바세린을 각 250 g씩을 기제로 하고 처방약물들을 전탕후 동결건조된 약물 3 g을 혼합하여 만들었다. Anaphylactic shock를 유발하는 Compound 48/80은 생리식염수(0.9% NaCl)로 희석하여 사용하였다. 약물 구강투여는 실험동물의 체중 100 g당 가미생료사물탕 103 mg을 증류수에 녹여 경구 투여하였다. 복강 주사는 실험동물의 체중 100 g당 가미생료사물탕 10.3 mg을 생리식염수에

녹여 복강 주사하였다. Compound 48/80은 실험동물의 체중 100 g당 0.5 mg을 생리 식염수에 녹여 복강주사 하였다.

Table 1. Contents of Gamisangryosamul-tang

韓藥名	生藥名	重量
生地黃	Rehmanniae Recens Radix	4g
赤芍藥	Paeoniae Radix	4g
當歸	Angelica Gigantis Radix	2g
川芎	Cnidii Rhizoma	2g
防風	Saposhnikoviae Radix	2g
黃芩	Scutellariae Radix	4g
蟬蛻	Cicadidae Periostracum	1.5g
薄荷	Mentae Herba	1g
山楂	Crataegi Fructus	4g
稻稈	Oryza sativa	3g
梔子	Gardeniae Fructus	4g
桔梗	Platycodi Radix	4g
총량		30g

Table 2. Contents of Ziyang-go

韓藥名	生藥名	重量
寒水石	Glauherite Na <sub>2</sub> Ca(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	20g
烏賊骨	Sepia esculenta	20g
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	20g
黃柏	Pellodendri Radix	20g
檳榔	Arecae Semen	20g
甘草	Glycyrrhizae Radix	10g
生地黃	Rehmanniae Recens Radix	30g
牛角方	Bos taurus domesticus	30g
稻稈	Oryza sativa	20g
黃連	Coptidis Rhizoma	10g
黃芩	Scutellariae Radix	10g
樺皮	Prunus sargentii	15g
卷柏	Selaginellae Herba	20g
益母草	Leonuri Herba	20g
地骨皮	Lycii Cortex Radicis	15g
總量		30g

### 3. Sprague-Dawley rat에서 비만세포의 탈과립 억제와 히스타민 유리 억제 유발

Compound 48/80에 의한 anaphylactic shock유발과<sup>11)</sup> 그에 대한 가미생료사물탕에 대한 효과를 알아보기 위하여 실시하였다.

#### 1) 비만 세포의 탈과립 억제 유발

가미생료사물탕의 투여는 compound 48/80 (1mg/ml)을 복강주사하기 24, 12 및 1시간 전에 각각 1회씩 복강주사하였으며, compound 48/80 주사 15분 경과 후 동물을 경추 탈구법으로 도살한 후, 복벽 증양선을 절개하였다. 절개한 복강에 메탄올을 주입하여 10분 고정 후 장간막 채취를 하였다. 채취한 장간막을 흐르는 물에 수세한 후 0.25% toluidine blue로 염색 후 붓입하여 관찰하였다. 정상군은 생리 식염수만을, 대조군은 compound48/80만을, 실험군은 가미생료사물탕(103mg/100g)을 복강주사 한 후에 compound48/80을 복강 주사하였다.

#### 2) Histamine 유리 억제 유발

가미생료사물탕을 복강주사한 후 compound48/80을 injection하였다. 15분 경과후에 채혈하여 EDTA tube에 넣고

900g, 4℃에서 centrifuge하였다. 혈장만을 분리한 다음 ELISA kit(BECKMAN culture company)를 이용하여 histamine을 정량하였다. 실험군은 비만 세포의 탈과립 억제 효과를 알아보기 위한 실험군과 동일하게 하였다.

4. NC/Nga mouse<sup>12)</sup>에서 scratching behavior와 skin score 관찰

8주 경과후 일반 환경에서 사람의 아토피 피부염과 유사한 질병을 유발하는 NC/Nga mouse<sup>13,14)</sup>를 이용하여 지양고와 가미생료사물탕의 효과를 알아보기 위하여 실험하였다. 연구는 일주일에 6일간 피부에 직접 발랐으며 가미생료사물탕은 경구투여하였다. 정상군은 증류수 0.5 ml을 경구 투여하였고 대조군은 steroid 연고를 바른 후 증류수 0.5 ml을 경구 투여하였으며, 지양고를 도포하고 증류수 0.5 ml을 경구 투여한 군, 지양고를 도포하고 가미생료사물탕을 경구 투여한 군으로 분류하였다.

1) Behavior<sup>16)</sup> 관찰

11주 경과 후 6주 동안 각 군에서 mouse가 20분 동안 다리를 긁는 회수를 일주일에 3번씩 관찰하여 기록하였다(단, 활는 행위는 제외하였다.)

2) Skin score<sup>16)</sup> 측정

Skin dryness, eruption, erosion 정도를 ear, face, head and back에서 score를 기록하였다. 증상이 전혀 없는 경우를 0점, 아주 적게라도 피부염 증상이 있는 경우를 1점, 각 부위에 1/3정도가 피부염 증상이 있는 경우를 2점, 각 부위에 2/3정도에 피부염 증상이 있는 경우를 3점으로 하여 11주 경과 후 6주 동안 평가하였다.

3) Clinical feature in Nc/Nga mouse 관찰

16주령의 NC/Nga mouse를 군별로 digital camera로 촬영하여 발진, 염증 및 탈모의 정도를 관찰하였다.

5. NC/Nga mouse에서 Lymphokine 측정<sup>16)</sup>

1) Spleen cell 분리

17주령의 NC/Nga mouse에서 spleen을 떼내어 glass homogenizer로 spleen을 유리시킨 후, 2000 rpm, 4℃, 10분간 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 pellet을 ammonium chloride-sodium bicarbonate buffer로 적혈구를 제거하였다. Cell을 원심분리( 2000 rpm, 4℃, 10분)하고, 분리한 spleen cell을 culture medium으로 3번 washing하였다. Culture medium은 10% FBS(fetal bovine serum)가 함유된 RPMI-1640, L-glutamine(2mmol/L), β-mercaptoethanol(0.05mmol/L), penicillin( 100U/ml) , streptomycin( 100U/ml)을 사용하였다.

2) Lymphokine(IL-4, IL-5, IFN-γ) 측정

Spleen cell(2×10<sup>6</sup>)을 24 well plate에 anti-CD3(1μg/ml) + anti-CD28(1μg/ml)과 같이 넣은 후 48시간 incubation(5% CO<sub>2</sub>, 37℃)한 후, 이 medium을 2-site ELISA kit( Pharmingen)를 이용하여 IL-4, IL-5, IFN-γ를 정량하였다.

6. Raw 264.7 macrophage cell에서 cytokine의 측정

염증반응과 관련한 가미생료사물탕의 효과를 알아보기 위해

Raw 264.7 macrophage cell을 사용하였다. 정상군은 Raw 264.7 macrophage cell만 배양한 군, 대조군은 lipopolysaccharide (LPS)로 stimulation한 군, hydrocortisone을 전처리한 후 LPS로 stimulation 한 군, 가미생료사물탕을 전처리한 후 LPS로 stimulation한 군으로 분류하였다. Raw 264.7 macrophage cell을 10% FBS가 함유된 DMEM, penicillin (100U/ml), streptomycin (100U/ml)<sup>15)</sup>을 사용하였고 24 well plate에 2×10<sup>5</sup>을 배양하여 5% CO<sub>2</sub>, 37℃에서 배양하였다.

1) TNF-α, IL-6 assay<sup>16)</sup>

2×10<sup>5</sup>cell을 배양하여 overnight incubation한 후 medium을 갈아주었다. 약물은 stimulation 4시간 전에 가미생료사물탕과 hydrocortisone<sup>17)</sup>을 전처리 한 후 LPS(100ng/ml)<sup>18,19,20)</sup>로 1시간 동안 stimulation하였다. stimulation한 cell의 medium을 ELISA kit (Biosource)를 이용하여 assay하였다.

7. 統計處理

각 군간의 통계학적인 차이는 ANOVA로 분석하여 P<0.01의 값을 통계적으로 유의성이 있는 것으로 하였다.

실험성적

1. Sprague-Dawley rat의 비만 세포의 탈과립억제 효과

정상군의 비만세포 탈과립정도는 26.5±14.0%, compound 48/80만을 처리한 대조군은 99.5±3.3%, 가미생료사물탕을 처리한 후 compound 48/80을 처리한 군은 27.8±0.5%로 나타나 대조군에 비해 유의한(p < 0.01) 탈과립억제 효과를 보였다(Fig. 1, 2).

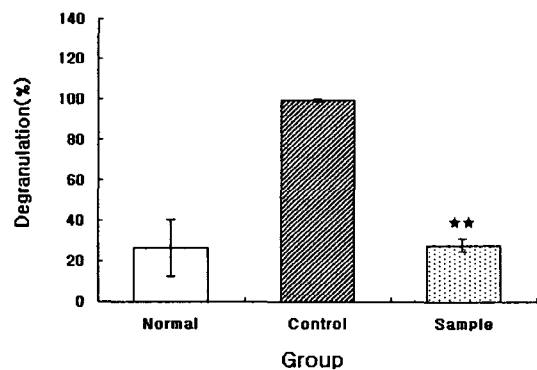


Fig. 1. Effects of Gamisangryosamul-tang on the degranulation of the mast cell from Sprague-dawley rat induced by compound 48/80. Data are means and standard errors. Asterisks denote results significantly different from the control group. ★★ p<0.01. Normal: treated with saline. Control: treated with compound 48/80. Sample: treated with Gamisangryosamul-Tang and compound 48/80

2. Sprague-Dawley rat의 비만 세포의 Histamine 유리 억제 효과

정상군은 71±26.4 nM, 대조군은 383±28.9 nM, 가미생료사물탕 전처리군은 116.1±35.4 nM로 나타나 대조군에 비하여 유의한 histamine 분비 억제효과(p < 0.01)를 보였으며 약 70% 정도의 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3).

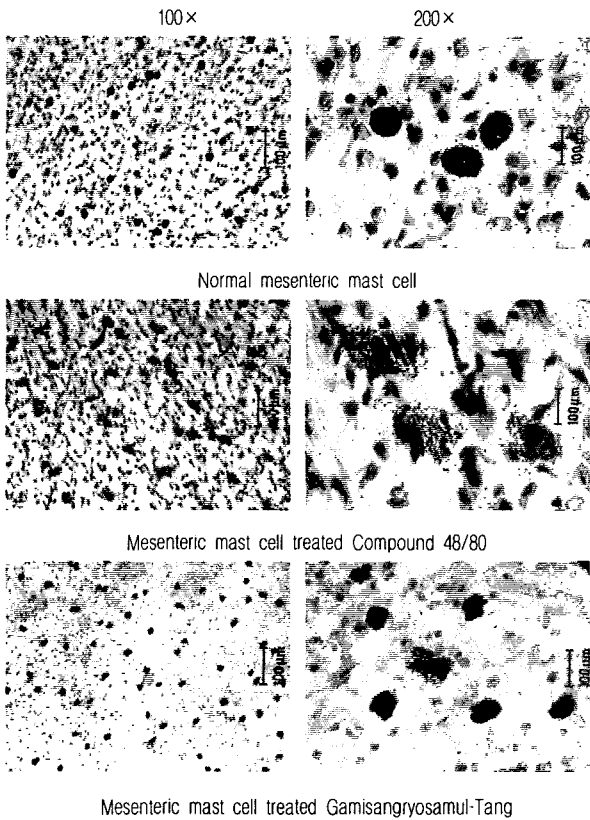


Fig. 2. Degranulation of mesenteric mast cells in Sprague-Dawley rat. Original magnifications:  $\times 100$  (left column),  $\times 200$  (right column)

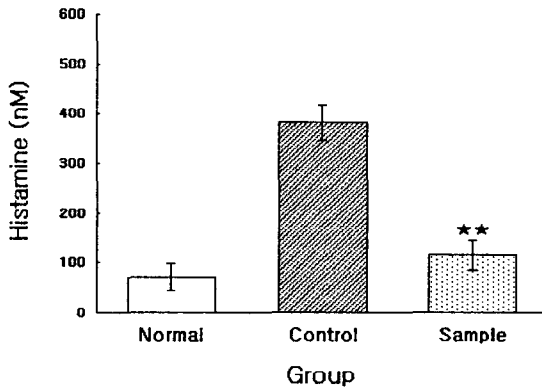


Fig. 3. Effects of Gamisangryosumul-tang on the histamine release from Sprague-dawley rat mast cell induced by compound 48/80. Data are means and standard errors. Asterisks denote results significantly different from control group. \*\*  $p < 0.01$ . Normal: treated with saline. Control: treated with compound 48/80. Sample: treated with Gamisangryosumul-tang and compound 48/80.

### 3. NC/Nga mouse의 Behavior 관찰 결과

30일간 NC/Nga mouse의 non-sterile군, steroid계통 피부염 고를 도포한 군, 지양고를 도포한 군의 실험결과를 비교해 본 결과, 지양고와 steroid를 도포한 후 일주일 되는 날부터 긁기행동 지수가 감소하였다(Fig. 4). 그 이후에도 steroid와 지양고는 긁기 행동지수에서 비슷한 효과를 나타냈다.

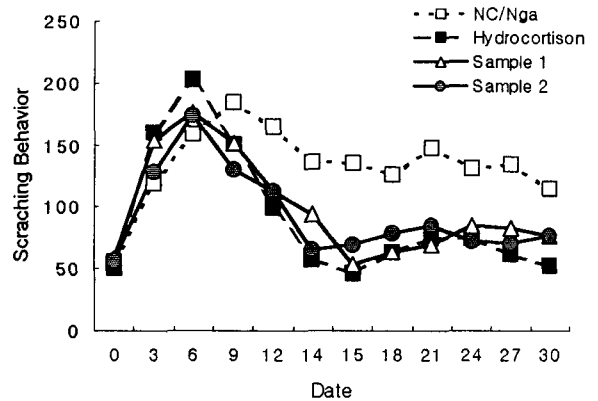


Fig. 4. Effects of Ziyang-Go and Gamisangryosumul-tang on the scratching behavior test in NC/Nga mouse. NC/Nga: non sterile condition. Hydrocortison: rubbed steroid over the back. Sample 1: rubbed Ziyang-Go over the back. Sample 2: administered Gamisangryosumul-Tang and rubbed Ziyang-Go over the back.

### 4. NC/Nga mouse의 Skin score 측정 결과

Non sterile condition에서 자란 mouse 군이  $4.1 \pm 0.2$ , steroid를 처리한 군이  $4.3 \pm 0.1$ , 지양고만 처리한 군이  $3.2 \pm 0.2$ , 가미생료사물탕과 지양고를 처리한 군이  $3.2 \pm 0.2$ 로 non-sterile 군과 steroid군은 피부염증 지수가 비슷한 반면, 지양고 도포군과 지양고를 도포하고 가미생료사물탕을 투여한 군은 대조군에 비해 피부염증 지수가 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있게 낮게 나왔다(Fig. 5). 따라서 지양고 도포군과 지양고를 도포하고 가미생료사물탕군을 투여한 군이 steroid군보다 약 25% 정도의 우수한 효과를 나타내었다.

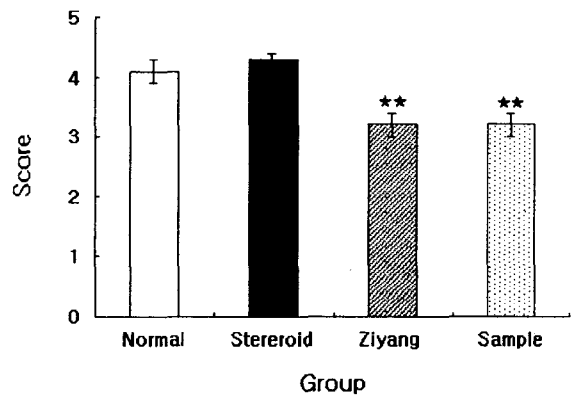


Fig. 5. Effects of Ziyang-Go and Gamisangryosumul-tang on clinical score of skin symptoms in the NC/Nga mouse. Data are means and standard deviations. Asterisks denote results significantly different from control group. \*\*  $p < 0.01$ . Normal: non sterile condition. Steroid: rubbed steroid over the back. Ziyang: rubbed Ziyang-Go over the back. Sample: administered Gamisangryosumul-tang and rubbed Ziyang-Go over the back

### 5. Clinical feature in NC/Nga mouse

NC/Nga mouse의 외견상 피부상태는 non-sterile군보다 steroid군이 좋지 않은 것을 확인하였다(Fig. 6). Steroid군은 steroid를 처리해 준 후 일주일 정도는 좋은 효과를 보였지만, 시

간이 경과할수록 탈모 증상과 염증이 더 많이 형성되었다. 반면 가미생료사물탕과 지양고를 처리한 군은 non-sterile condition 군, steroid군과 비교하였을 때 발진, 염증, 탈모 증상이 많이 완화된 것을 확인할 수 있었다.

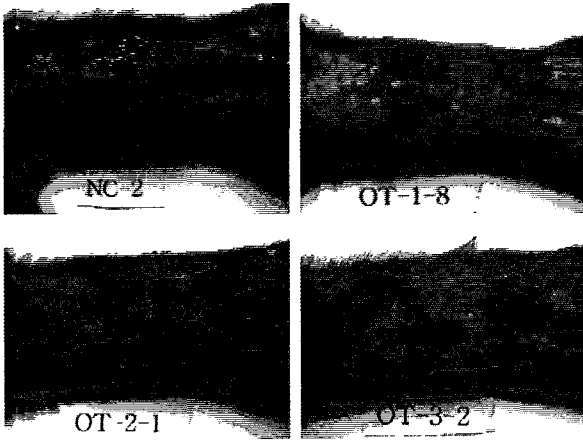


Fig. 6. Clinical feature of NC/Nga mouse after 15 weeks. NC: Non sterile condition. OT1: rubbed steroid over the back. OT2: rubbed Ziyang-Go over the back. OT3: administered Gamisangryosamul-Tang and rubbed Ziyang-Go over the back

6. Lymphokine assay

Spleen cell에서의 lymphokine양을 정량한 결과 편차가 매우 심하였으며, 통계학적으로 한약물에 대한 유의한 효과를 관찰할 수 없었다.

7. Raw 264.7 macrophage cell의 IL-6, TNF- $\alpha$  발현량

Raw 264.7 macrophage cell 에 LPS (100ng/ml)를 처리 후 pro-inflammatory factor인 IL-6 의 발현 정도에 가미생료사물탕이 미치는 영향을 ELISA로 측정된 결과, 정상군이 11.9 $\pm$ 0.9 pg/ml, LPS를 처리한 군이 66.5 $\pm$ 4.7 pg/ml, hydrocortisone을 처리한 군이 45.1 $\pm$ 2.8 pg/ml, 가미생료사물탕을 처리한 군은 41.8 $\pm$ 3.6 pg/ml으로 나타났다(Fig. 7).

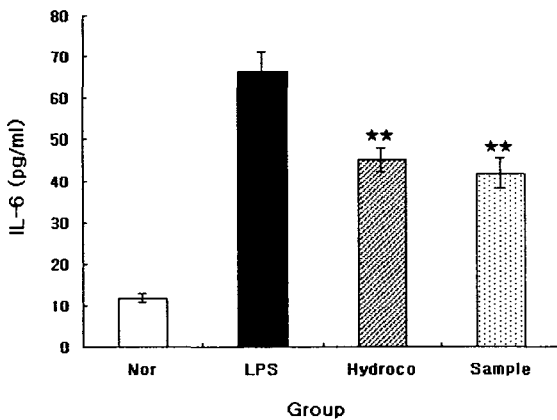


Fig. 7. Effects of Gamisangryosamul-Tang on interleukine(IL)-6 in Raw 264.7 cell. Data are means and standard deviations. Asterisks denote result significantly different from control group.  $\star\star$  p<0.01. Nor: normal. LPS: treated with lipopolysaccharide only. Hydroco: treated with LPS + hydrocortisone. Sample: treated with LPS + Gamisangryosamul-tang

이 결과에 따르면 염증반응에 관여하는 IL-6에 대하여 가미생료사물탕이 대조군에 비하여 약 37% 우수한 효능을 보였으며, hydrocortisone에 비해 7.5%의 효능을 보였다. Raw 264.7 cell 에 LPS (100ng/ml) 처리 후 pro-inflammatory factor인 TNF- $\alpha$ 의 발현 정도에 가미생료사물탕이 미치는 영향을 ELISA로 측정된 결과, 정상군이 148.2 $\pm$ 20.0 pg/ml, LPS를 처리한 군이 321.2 $\pm$ 7.3 pg/ml, hydrocortisone을 처리한 군이 185.7 $\pm$ 10.3 pg/ml, 가미생료사물탕을 처리한 군은 49.5 $\pm$ 5.4 pg/ml으로 나타났다(Fig. 8). 이 결과에 따르면 염증반응에 관여하는 TNF- $\alpha$ 에 대하여 가미생료사물탕이 대조군에 비하여 84.6%의 우수한 효능을 보였으며, hydrocortisone에 비해 73.3%의 우수한 효능을 보였다.

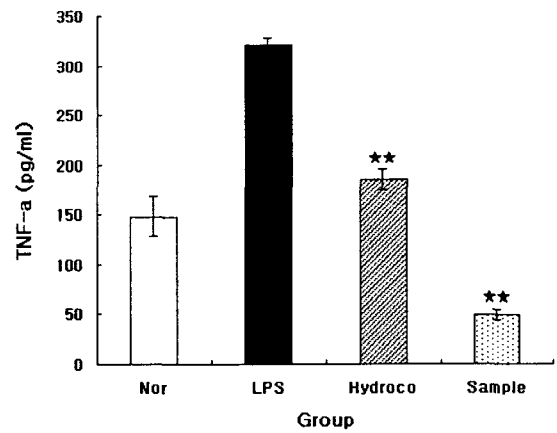


Fig. 8. Effects of Gamisangryosamul-tang on tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  in Raw 264.7 cell. Data are means and standard deviations. Asterisks denote result significantly different from control group.  $\star\star$  p<0.01. Nor: normal. LPS: treated with lipopolysaccharide, Hydroco: treated with LPS + hydrocortisone, Sample: treated with LPS + Gamisangryosamul-tang

고찰

아토피 피부염은 심한 소양증 및 전형적인 피부병변을 특징으로 하는 가장 흔한 소아의 알레르기성 피부질환인데 한의학적으로 奶癬, 胎癬, 胎皴瘡 등의 범주에 해당된다. 병인은 아직 정확히 밝혀지지 않았지만, 일반적으로 음식 알레르기, 집먼지 진드기, 스트레스, 공해 등이며<sup>21)</sup>, 최근 면역학이나 분자생물학의 발전으로 여러 가지 면역기능의 이상 현상이 관찰되었다. 현재 아토피 피부염의 병리는 IgE 합성과 피부염의 악화에 중요한 역할을 하는 cytokine과 화학적 매개체를 통한 제 2형 T세포의 과량 분화와 비만 세포의 활성화에 의한 것이라는 보고가 있지만<sup>22)</sup> 아직 정확한 병인론은 밝혀져 있지 않다<sup>23)</sup>. 아토피 피부염 환자의 혈청에서 IgE의 증가가 정상인보다 증가되어 있다는 보고가 있으며<sup>24,25,26)</sup>, 세포 매개성 면역도 감소되어 있고, 이에 따라 세포 면역을 담당하는 T 세포 및 그 아형의 이상이 아토피 피부염의 발병 기전에 중요한 역할을 한다는 보고가 있다<sup>27,28,29)</sup>. T 림프구 중 helper T 세포인 CD4+ T 세포는 Th1 세포와 Th2 세포로 존재를 하는데 이중 Th2 세포는 IgE 항체 생성 조절에 가장 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Th1 세포는 IFN- $\gamma$ , IL-2,

TNF- $\alpha$  등이, Th2 세포에서는 IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 등의 cytokine이 분비된다. Th1과 Th2세포는 상호작용을 하여 면역균형을 유지하는데 IL-4는 Th1 세포의 반응을 억제하고, IFN- $\gamma$ 는 Th2 세포의 반응을 억제한다. 그러나 아토피 피부염 환자에서는 이들 T 세포들의 분포가 불균형하여 IFN- $\gamma$ 가 감소되어 있고 IL-4가 증가하는 것으로 알려져 있다. 이 기전을 근거로 하여 아토피 피부염 치료를 위한 치료제 실험도 많이 행해지고 있다<sup>30,31,32,33</sup>. 최근 연구에 의하면 in vitro에서 아토피 피부염을 치료하기 위한 목적으로 macrophage나 bronchial cell에 cytokine이나 steroid를 투여하는 방법과 spleen에서 cell을 직접 isolation하여 약물의 효과를 알아보는 실험을 주로 행하고 있다. 특히 최근에 알려진 allergic mouse 모델인 NC/Nga mouse로 감염 추출액에 대한 아토피 피부염효과를 알아본 결과 이 추출액이 histamine 유리를 억제하고 dermatitis, scratching behavior, IgE, IL-4, IL-13을 억제하는 반면 IFN- $\gamma$ 에는 영향을 끼치지 않는 것이 보고되었다<sup>34</sup>. NC/Nga mice는 사람의 아토피 피부염을 연구하기 위한 좋은 동물 모델로<sup>35</sup> 1957년 나고야 대학의 Dr. Kondo에 의해 처음으로 확립된 inbred mice이다<sup>36</sup>. Specific pathogen free(SPF)상태에서는 건강한 상태를 유지하지만 non-sterile(NS) 상태에서는 8주 정도에 습진이 생겨나고, 17주 정도에 부종, 출혈, 부식, 건조, 탈모 증상들이 쥐의 목, 등, 귀, 얼굴에 나타난다. 또한 인간의 아토피 피부염에서 관찰되는 것과 마찬가지로 skin lesion에는 CD4+ T cell infiltration 및 macrophage, eosinophil, mast cell이 발견된다<sup>37</sup>. IgE는 8주부터 급격히 증가하여 16-18주엔 IgE의 농도가 최고에 달하며<sup>38</sup>, 증가된 IgE는 B cell, CD40 ligand, interleukine-4의 sensitivity를 증가시킨다. 반면 IgG는 12주까지 별다른 영향을 끼치지 않는다. NC/Nga mice에서의 증상들은 hyperkeratosis, acanthosis(표피비후), parakeratosis로 사람의 아토피 피부염 환자에게서 관찰되는 lichenifield 증상과 유사하다<sup>39</sup>. 그러므로 NC/Nga mice는 아토피 피부염에 대한 치료제를 개발하는데 있어서 좋은 동물 모델로 잘 알려져 있다.

현재는 이 아토피 피부염을 치료하기 위해서 국소적인 스테로이드 치료를 하고 있지만<sup>40,41</sup>, 대부분의 환자들은 이 스테로이드에 대해 만족하지 못하고 있으며, 한약물에 대한 아토피 피부염의 치료 효과도 아직 알려져 있지 않은 실정이다. 본 실험에서 anaphylaxis를 일으키기 위해 사용한 compound 48/80은 P-meth-oxy-N-methylphenethylamine의 저분자량의 polymer로 비만세포의 탈과립을 유도하는 인자들 가운데 가장 많이 사용되는 약제로서 비만세포의 세포질내로 칼슘이온의 유입을 증가시켜 vasoactive amine을 유리하는 물질이다. Compound 48/80로 anaphylactic shock를 일으킨 Sprague-Dawley rat에서 비만세포의 탈과립과 히스타민 유리억제 정도를 확인해본 결과 한약물을 전처리한 군이 compound48/80에 의한 anaphylactic shock를 억제한다는 것을 확인했다. 이는 가미생료사물탕이 비만세포의 탈과립과 vasoactive amine의 유리를 억제하는 인지질 대사<sup>42</sup>를 변형시키거나 또는 cromalyn sodium과 aminophylline의 작용기전과 같이 비만세포의 세포막에 작용하여 칼슘의 세포질내 유입을 억제, phosphodiesterase의 작용에 관여하여 비만세포 세포질내

의 cAMP가 증가되어 비만세포의 탈과립이 억제되는 것으로 판단된다<sup>43,44</sup>.

In vivo에서 가미생료사물탕과 지양고의 효과를 알아보기 위해 실험한 동물 모델인 NC/Nga mouse는 11주 경에 습진과 발진 등이 나타나 이때부터 연고와 약물들을 사용하였다. 30일간 지양고를 피부 도포 하였고, 7일 중 6일 동안 가미생료사물탕을 구강 투여하여 스테로이드계통의 피부연고와 비교 실험한 결과, 가미생료사물탕이 피부 염증반응지수에 유의하게 효과가 있었으며, 굵기 행동지수에 있어서 지양고는 스테로이드 계통 피부연고와 비슷한 수준의 효능을 나타내었다. 또한 피부염증에 대한 임상 결과를 보면 non-sterile condition군보다 steroid군이 외견상 피부상태가 좋지 않은 것을 확인할 수 있다. Steroid군은 steroid를 처리해 준 후 일주일 정도는 좋은 효과를 보였지만 시간이 경과할수록 탈모 증상과 염증이 더 많이 형성되었다. 반면 한약재를 처리한 군은 non-sterile condition군, steroid군과 비교하였을 때 발진, 염증, 탈모 증상이 많이 완화된 것을 확인할 수 있었다. 이는 가미생료사물탕과 지양고가 steroid보다 아토피 피부염에 더 효과적임을 시사한다. NC/Nga mice는 Th2-specific chemokines 및 cytokine 일부를 과잉으로 생산한다. 그러나 spleen cell에서의 lymphokine의 변화는 편차가 너무 심하였고, 통계학적으로 한약물에 의한 유의한 변화가 없었다. 이는 Kotani 등이 연구한 persimmon leaf extract의 결과와는 다른 양상을 나타내었는데, Kotani의 연구결과는 cytokine중 IL-4, IL-13은 감소하는 경향을 나타내었으며, 반면 IFN- $\gamma$ 에는 영향을 끼치지 않았다. 그러나 가미생료사물탕과 지양고로 실험한 결과, 굵기 행동지수와 피부염증 반응지수에서만 효과를 나타낸 것을 보면, 이 한약물이 비록 cytokine을 생성하는 T cell에는 직접적인 영향을 끼치지 않지만, 이외의 피부증상과 가려움증을 완화시키는 역할을 하는 물질이 함유되어 있을 것으로 생각된다.

TNF- $\alpha$ 는 inflammatory function에 주요한 증개자로서, in vivo에서 tumor necrosis를 일으키고 in vitro에서는 cytolytic activity를 보여준다. Interleukin 6 (IL-6)는 acute phase reaction, immune response, nerve cell function 등에 다양한 역할을 하는 cytokine으로서, 다른 cytokine이나 lipopolysaccharides(LPS), antigenic stimulation에 의해 증가된다. Raw 264.7 macrophage cell에 LPS(100ng/ml) 처리 후 pro-inflammatory factor인 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 발현 정도에 가미생료사물탕이 미치는 영향을 ELISA로 측정한 결과, TNF- $\alpha$ 와 IL-6에서 방어적인 기여도가 있는 것으로 밝혀졌다. TNF- $\alpha$ , IL-6의 발현 정도는 정상군에 비해 LPS 처리군이 230%, 600%의 증가를 보였으며, hydrocortisone군은 40%, 30%, 약재 처리군은 80%, 40%의 protective effect가 있었다. 특히 TNF- $\alpha$ 는 기존에 positive control로 많이 쓰이는 anti-inflammatory chemical인 hydrocortisone보다 월등하게 감소되었다. 이는 한약재가 inflammatory and immunological process에 어느 정도 관여되어 있으며, inflammation 과정에서 증가되는 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 생성을 감소시키는 것으로 보아 cytotoxic한 반응을 증화시키는 역할을 한다고 사려된다.

이러한 실험결과를 정리하면 지양고 및 가미생료사물탕은

표면적으로 스테로이드 계통 피부연고에 비하여 동등하거나 그 이상의 우수한 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다. 이는 가미생료사물탕에 compound 48/80을 중화하거나, 비만세포의 탈과립, 히스타민의 유리를 억제하는 물질이 함유되어 있음을 시사한다. 그러나 아토피 피부염의 대부분 환자에서 IgE 항체의 생산이 증가되어 있으며, 서양 의학적으로 IgE 매개접촉 과민반응이 병리기전에서 매우 중요한 것으로 알려져 있는 점을 감안할 때 한약물의 작용기전에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 사려된다.

## 결론

加味生料四物湯 추출물의 항염증효과 및 止痒膏의 피부염손상 및 지양효과를 관찰하기 위하여 SD 흰쥐에 가미생료사물탕을 전처리한 후 compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립 및 histamine 분비 억제효과, NC/Nga mouse의 아토피양 피부염손상 및 비장세포에서의 IL-4, IL-5, and IFN- $\gamma$  assay, raw 264.7 macrophage cell의 LPS에 대한 항염증효과를 실험한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

加味生料四物湯은 compound 48/80에 의하여 항진된 histamine의 분비를 약 70% 억제하는 것으로 관찰되었으며, 조직학적으로 mast cell의 탈과립 또한 현저하게 감소( $P < 0.01$ )시키는 효과가 있었고, 염증반응과 관련된 TNF- $\alpha$ 에 대하여는 加味生料四物湯이 대조군에 비하여 약 62% ( $P < 0.01$ ), hydrocortison에 비하여 약 46% 우수한 효능을 보였으며, IL-6에 대하여는 加味生料四物湯이 대조군에 비하여 약 29%, hydrocortison에 비하여 약 6% 우수한 효능을 보였으며, 止痒膏을 30일간 NC/Nga mouse에 피부도포하여 steroid계통 피부연고와 비교실험한 결과, 피부염증반응지수에 있어서 steroid계통 피부연고에 비하여 약 35%의 효능을 나타내었으며, 긁기행동지수에 있어서도 steroid계통 피부연고와 비슷한 수준의 효능을 나타내었다. NC/Nga mouse 비장세포에서 분리한 IFN- $\gamma$ 와 IgE의 변화를 관찰한 바, 결과의 편차가 매우 심하여 통계학적으로 유의한 변화가 없었다.

이러한 실험결과를 정리하면 加味生料四物湯 및 止痒膏은 steroid계통 피부연고에 비하여 동등 내지 그 이상의 우수한 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다.

## 참고문헌

1. Williams H, Robertson C, Stewart A, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson R, et al. Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the international study of asthma and allergies in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 103:125-38, 1999
2. Mosmann TR, Cherwinski K, Bond MW, et al. Two types of murine helperT cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357, 1986
3. Cooper KD. Atopy dermatitis-Recent trends in pathogenesis

- and therapy. *J Invest Dermatol* 102:128-137, 1994.
4. Maggi E, Parronchi P, manetti R, et al. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 148:2142-2147, 1992.
5. Holden CA. Atopic dermatitis-messenger, second messengers and cytokines. *Clin Exp Dermatol* 18:201-207, 1993.
6. Singh VK, Mehrotra S, Agarwal SS, The Paradigm of Th1 and Th2 Cytokines. *Immunologic Research* 20:147-161, 1999.
7. 巢元方, 諸病源候論, 上海, 集文書局, p505, 1965.
8. 吳謙, 醫宗金鑑(下), 人民衛生出版社, p443-444, 1982.
9. 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, pp165-198, 1989.
10. 안희덕, 四物湯의 항암제 부작용 억제에 관한 실험적 연구, 동의병리학회지, 10:341-359, 1995.
11. 상백피가 compound 48/80에 의하여 유도된 anaphylatic shock와 비만 세포의 히스타민 유리에 미치는 영향. 대한해부학회지 24(2):193-203, 1991.
12. Kotani, Matsumoto, Fujita, et al. Persimmon leaf extract and astragalol inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J Allergy Clin Immunol* 106(1):159-166, 2000.
13. Christian V, Hiroyuki Y, Konji M. The NC/Nga mouse: a model for atopic dermatitis. *Molecular Medicine Today* 6:209-210, 2000.
14. Christian V, Hiroyuki, Masako M, et al. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J. Clin. Invest.* 104:1097-1105, 1999.
15. Michael MN, Clifford JB, Andrew JL, George MM. Brief hypoxia differentially regulates LPS-induced IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  gene transcription in RAW 264.7 cells 278:1289-1296, 2000.
16. Dong W, Azcona-Olivera JI, Brooks KH, Linz JE, Pestka JJ. Elevated gene expression and production of interleukines 2, 4, 5 and 6 during exposure to vomitoxin(deoxynivalenol) and cycloheximidw in the EL-4 thymoma. *Toxicology and Applied Pharmacology* 147:282-290, 1994.
17. Atsushi K, Naoto M, Yoshita I, et al. Production of adrenomedullin in macrophage cell line and peritoneal macrophage. *J Biol Chem.* 273(27):16730-16738, 1998.
18. Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, and Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, TNF- $\alpha$ , and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 95:1669-1675, 1995.
19. Kunkel SL, Spengler M, May MA, Spengler R, Larrick and Remick D. Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J Biol Chem*

- 263:5380-5384, 1998.
20. Matuschak GM, Mattingly ME, Tredway TL, and Lechner AJ. Liver-lung interactions during E. coli endotoxemia. TNF- $\alpha$ :leukotriene axis. *AM J Respir Crit Care Med* 149:41-49, 1994.
  21. 나와 유키에, 아토피성 피부염, 지식산업사, 서울, pp 15-16
  22. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA, Schopf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, et al. A role for Th1 and Th2 cells in immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 198;18:359-61.
  23. Bos JD, Wierenga EA, Smitt HS. Immune dysregulation in atopic eczema. *Arch Dermatol* 128:1509-1511, 1992.
  24. 강승주, 김선훈, 이유신. 아토피 피부염 환자의 말초혈액 T 림프구 아형과 혈청내 IgE에 관한 연구. *대피지* 25:169-175, 1987.
  25. Jones HE, Inouye JC, McGerity JL et al. Atopic disease and serum immunoglobulin-E. *Br J Dermatol* 92:17-15, 1972.
  26. 구상완, 김윤찬, 김수찬. 아토피 피부염 환자의 단자시험과 혈청 IgE 성적에 관한 연구. *대피지* 2;20:753-757, 1995.
  27. Hanifin JM, Lobitz WC. Newer concepts of atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 113:663-670, 1977.
  28. Lever R, Turbin M, Sanderson A et al. Immunophenotyping of the autaneous infiltrate and of the mononuclear cells in the peripheral blood in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 89:4-7, 1987.
  29. 김선훈, 이유신. 아토피 피부염 환자의 말초혈액 및 병소조직의 T 세포 및 T 아형의 정량적 측정. *대피지* 25:309-317, 1987.
  30. 김진우. 아토피 피부염 환자에서의  $\gamma$  IFN- $\gamma$  치료. 서울, 알레르기학회지 16(3):286-90, 1996.
  31. 노건웅, 이우길. 아토피 피부염의 감마 인터페론 치료. 서울. 소아알레르기 및 호흡기 학회지 7(2):239-247, 1998.
  32. 안필수, 방형동, 정진호, 김규환, 박경찬, 윤재일. 아토피 피부염에서의 재조합 감마 인터페론의 치료효과. 서울. 소아알레르기 및 호흡기 학회지 16(3):291-298, 1996.
  33. Kotani M, Fujita A, Tanaka T. Inhibitory effects of persimmon leaf extract on allergic reaction in human basophilic leukemia cells and mice. *J JPN Soc Nutr Food Sci* 52:147-51, 1999.
  34. Kotani, Matsumoto, Fujita, et al. Persimmon leaf extract and astragalin inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J Allergy Clin Immunol* 106(1):159-166, 2000.
  35. Rudikoff, D. and Lebwohl, M. Atopic dermatitis. *Lancet* 351:1715-1721, 1998.
  36. Kohara Y, Tanabe K, Matsuoka K, Kanda N, Matsuda H, Karasuyama H, Yonekawa H. A major determinant quantitative-trait locus responsible for atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice is located on Chromosome 9. *Immunogenetics*. Feb;53(1):15-21, 2001.
  37. Sudo N, Yu X, Kubo C. Dehydroepiandrosterone attenuates the spontaneous elevation of serum IgE level in NC/Nga mice. *Immunology Letters*. Dec 3;79(3):177-9, 2001.
  38. Matsuda, H. et al. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immuno* 9:461-466, 1997.
  39. Vestergaard, C. et al. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J. Clin. invest.* 104:1097-1105, 1999.
  40. Leung DYM. Atopic dermatitis: immunology and treatment with immunomodulators. *Clin Exp Immunol* 107:25-31, 1997.
  41. Graham-Brown RA. Therapeutics in atopic dermatitis. *Adv Dermatol*. 13:3-31, 1997.
  42. Sullivan TJ, Parket CW. Possible role of arachidonic acid and its metabolites in mediator release from mast cell. *J Immunol* 122:431-436, 1979.
  43. 두홍서, 박병건, 김정수, 이무삼. 상백피가 백서복강 비만세포에 미치는 영향에 관한 세포형태학적 연구. *대한해부학회지*. 20:81-89, 1987.
  44. Theorides TC, Sieghart W, Greengard P, Douglas WW. Antiallergic drug cromolyn may inhibit histamine secretion by regulating phosphorylation of a mast cell protein. *Science* 207:80-82, 1980.