

加味敗毒散 경구 투여에 의한 Nc/Nga 생쥐의 아토피 피부염 억제 작용

진가현 · 진미림 · 최정목¹ · 윤미영 · 김동희*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1:대전 보건대학교

Suppression of Spontaneous Dermatitis in Nc/Nga Atopic Model by Gamipaidok-san, a Traditional Herbal Medicine

Ga Hyun Jin, Mi Rim Jin, Jeung Mok Choi¹, Mi Young Yun, Dong Hee Kim*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University 1: Mortuary science, Daejeon Health science College

Atopic dermatitis(AD) is a chronic inflammatory skin disease, which requires safe and effective medicinal therapy. Over production of Th2 cytokines and chemokines as well as IgE, which are mediated by highly activated immune cells, have been considered as pathologic factors in this disease. We found that Gamipaidok-san(GPDS), which is a traditional herbal medicine clinically prescribing for atopic dermatitis patients in the hospital, has suppressive effects on the development of DNCB induced dermatitis in Nc/Nga atopic model. Oral administration of GPDS at the concentration of 250 mg/Kg for 12 weeks significantly suppressed the clinical severity of the dermatitis including prurities, edema, eczematous and dryness. Histological examination revealed that thickness of dermis and epidermis were considerably reduced, and the number of infiltrated inflammatory immune cells including mast cells, CCR3+, and CD4+ T cells were decreased in the affected skin and ear, and consistantly, the number of CD3+/CCR3+ cells in lymph nodes were decreased. The levels of Th2 cytokines produced by activated splenocyte from atopic mice were also down-regulated by GPDS. Furthermore, the serum levels of IgE were considerably reduced, which accompanied by a decrease in the number of B220+IgE+ B cells in the lymph nodes. Taken together, these results suggested that oral administration of GPDS, a traditional herbal medicine, has suppressive effects on atopic dermatitis of Nc/Nga mouse by the modulation of the immune system, therefore GPDS has potential as a natural therapeutic for treatment of atopic dermatitis.

Key words : Gamipaidok-san(GPDS), atopic dermatitis, Nc/Nga mice, cytokine, CCR3, IgE, immune modulation

서 론

아토피란 Coca와 Cooke가 처음 사용한 용어로, 주위 환경의 단백질(항원)에 따라 말단 장기의 과민 반응이 다르게 나타나는 것을 말하며, 오늘날에는 항원 자극으로 IgE가 생산되는 천식과 아토피성 습진까지 포함하는 제 1형 과민 반응을 통칭한다¹⁾.

이 중 아토피 피부염은 우리나라 인구 중 10~20%로 추산될 정도로 아주 흔한 질환으로, 세계적으로 도시화가 진행되면서 유아와 어린이들에서 발병율이 급속도로 증가하고 있어 국가적 의

료 문제로 대두되고 있다.

아토피 피부염 치료를 위하여 현재 사용되고 있는 치료제들을 살펴보면 바르는 연고제로서 glucocorticoid와 calcinulin 저해제인 FK-506(tacrolimus)가 다용되고 있으며, 항생제나 항진균제가 2차 감염을 막기 위해 사용되고 있다. 전신 투여 경우에는 항히스타민제, 스테로이드 제제, 사이클로스포린, DNA 합성 저해제(antimetabolite) 등이 사용되고 있으나, 다양한 부작용으로 인하여 안전하면서도 우수한 효능을 가진 새로운 치료제의 개발이 요구되고 있다^{2,3)}.

한의학에서 아토피 피부염과 관련된 기술은 주로 소아과, 피부과 영역에서 찾아볼 수 있으며, 奶癬, 胎熱, 胎風, 胎赤, 胎癬瘡, 乳癬, 浸淫瘡, 四彎風 및 胎敏瘡 등이 증상 및 병리면에서 유사한

* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학

· E-mail : djkim@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2623

· 접수 : 2006/06/07 · 수정 : 2006/07/14 · 채택 : 2006/08/04

범주로 인식되고 있다^{4,7}. 특히 아토피 피부염과 같은 뜻으로 胎熱이 많이 언급되고 있지만, 이는 출생 후 2개월부터 1년 사이에 두부 또는 면부의 습진으로, 아토피 피부염 전체의 의미보다는 영아습진과 유사하다고 볼 수 있다. 그러나 한의학에서는 전반적으로 태열의 원인을 아토피의 주원인으로 보고 이에 대한 다양한 치료와 접근이 이루어지고 있다. 이에 대한 최근의 실험적 연구를 살펴보면, 상기한 유사 범주에 나타난 증상들의 활용 처방과 단일 약물을 시료로 Th2 세포 활성 관련인자, cytokine, chemokine 등을 중심으로 한 분자생물학적인 연구⁸⁻¹⁰와 동물 병태 모델을 통한 효능 검색¹¹⁻¹³이 주를 이룬다. 이 밖에 사상체질별 치료법과 임상상 변화에 대한 임상 연구^{14,15}도 활발하게 이루어짐으로써, 아토피 피부염에 대한 다양하고 심도 있는 접근이 이루어지고 있다.

본 시료의 기본방인 人蔘敗毒散은 독감, 유행성감기, 小兒驚風, 급성기관지염, 폐렴 초기, 급성 화농성 질환 등과 더불어 熱毒으로 인한 隱疹, 피부소양 등에 응용되는 처방¹⁶이다. 이와 관련된 연구로 심¹⁷은 人蔘敗毒散과 加味人蔘敗毒散이 진통, 해열 및 손상간에 미치는 영향을, 김 등^{18,19}은 人蔘敗毒散이 통증과 급성신부전증에 미치는 영향을, 정 등^{20,21}은 連翹敗毒散이 진통, 소염, 해열 및 기관지 상피세포의 TARC 분비에 미치는 영향을 각각 보고한 바가 있다. 또한 권²²은 본 연구와 유사하게 連翹敗毒散加味方이 DNCB로 유발된 알러지성 접촉피부염에 미치는 영향을 보고한 바가 있으며, 김²³은 본 시료의 항알러지, 항염증 작용을 in vitro에서 규명한 바가 있다.

따라서 본 연구에서는 임상 활용을 위한 신규 처방 개발을 위하여, 김²³의 연구 결과를 바탕으로 人蔘敗毒散에 수종의 약물을 가감한 加味敗毒散(GPDS)을 시료로 NC/Nga 생쥐에 DNCB로 피부염을 유발한 뒤, 피부염 발생 정도와 관련된 사이토카인 및 면역 세포군에 미치는 영향을 검색하고자 하였다.

실 험

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 加味敗毒散(GPDS)의 구성 약물은 대전대 학교 부속 한방병원에서 구입한 후 사용하였고, 처방 1첩(貼)의 내용과 분량은 Table 1에 표시하였다.

2) 시약

본 실험에 사용된 시약중 Therapeutic trial of dinitrochlorobenzene (DNCB), 3-4,5-dimethyl-thiazol-2, 5-carboxymethoxyphenyl-2, 4-sulfophenyl-2H-tetrazolim (MTS), complete adjuvant, chloroform, collagenase, trichloroacetic acid, trypsin-EDTA, SRB, acetic acid, tris-base, acetone, olive oil, ethanol, DNase-1, dNTPs, RNase inhibitor, tris-HCL, misopropanol, RPMI-1640 배양액, isopropanol, paraformaldehyde, 적혈구 용혈액 (RBC lysis solution), ethidium bromide (EtBr), citrate buffer, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, lamide, magnesium

chloride (MgCl₂)는 Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 우태 아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (U.S.A.) 제품을, anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD19-FITC, anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-IgE-FITC anti-B220-PE, rat anti-mouse CD4 mAb, rat anti-mouse CCR3 mAb (53-6.7; Becton Dickinson, Mountain View, CA), LSAB kit (ScyTek, U.S.A.), PE-conjugated goat anti-rat IgG (PharMingen, U.S.A.), Tris-buffered saline, Tween 20 (TBST; Dako, Carpinteria, CA)와 RNase는 Pharmingen사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

Table 1. Herb composition of GPDS

韓藥名	生藥名	用量(g)
형 개	<i>Schizonepetae herba</i>	4
방 풍	<i>Ledebourieliae radix</i>	4
강 활	<i>Notopterygil rhizoma</i>	4
시 호	<i>Bupleuri radix</i>	4
전 호	<i>Peucedani radix</i>	4
지 각	<i>Aurantii fructus</i>	4
길 경	<i>Platycodi radix</i>	4
천 궁	<i>Cnidii rhizoma</i>	4
적복령	<i>Poria</i>	4
박 하	<i>Menthae herba</i>	4
승 마	<i>Cimicifugae rhizoma</i>	4
선 태	<i>Cicadae periostacum</i>	4
고 삼	<i>Sophorae radix</i>	2
감 초	<i>Glycyrrhizae radix</i>	3
인 통	<i>Lonicerae flos</i>	4
삼백초	<i>Saururi herba seu rhizoma</i>	4
어성초	<i>Houttuyniae herba</i>	4
유근피	<i>Ulmus davidiana</i>	4
갈 근	<i>Puerariae radix</i>	4
지 실	<i>Aurantii immaturus fructus</i>	4
총 합		96

3) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), Microwave oven (LG, Korea), rotary vaccum evaporator, vaccum pump (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, Co., France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, U.S.A.), deep-freezer (Sanyo, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, U.S.A.), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), flow cytometer, ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A.), Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, U.S.A), 형광위상차현미경 (contrast fluorescence microscope, Nikon, Japan)등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 조제

GPDS 2점 분량에 각각 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출 기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여, 이를 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하였다. 농축액을 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 20.8 g을 냉동 보관 (-80°C)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 세포독성 측정

(1) Mouse Lung Fibroblast cells (mLFCs) 배양

BALB/c 생쥐의 폐 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. Tube에 다시 DMEM (containing collagenase A (5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, U.S.A.)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics(penicillinm 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml))를 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하여 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 D-PBS로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에서 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC 세포를 분리한 후 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵ cells/ml 농도로 96 well plate에 분주하였다.

(2) SRB assay

세포 독성 측정 방법은 SRB assay법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFCs 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후 GPDS 추출물 (최종 농도 400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액으로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 µl를 가하고 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 이를 다시 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 µl/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4.5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 µl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, U.S.A.)에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고, ELISA reader (Molecular devices, U.S.A.) 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 피부염 유도 및 시료 처리

8 주령이 된 NC/Nga 생쥐의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후 제모가 끝나면 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 그리고 1% DNCB 용액 (아세톤:올리브오일=3:1) 200 µl를 등 부위에 도포하였고, 4일 후, 1 주일에 2-3 번씩 0.2% DNCB 용액 150 µl를 등 부위에 도포하였다. 이렇게 5주 처리한 다음 피부염이 충분히 유발되어 등 부위의 가피가 모두 벗겨지고, 이 부위에 새로운 피부염이 형성되면서 긁는 행동이 심화되면 DNCB 처리를 중단하고, 관능 평가를 실시하였다.

4) 관능평가

DNCB는 8주부터 12까지 도포하여 피부염을 발생시키고, 대조군에는 생리식염수를, 실험군에는 GPDS를 250 mg/Kg의 농도로 12주간 (8주에서 20주까지) 경구 투여하였다. 약물 처리 4주

간격으로, 관능 평가를 실시하였는데 NC/Nga 생쥐의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하였다²⁴⁾. 육안 평가 결과는 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타내었다. 평가 항목은 홍반 (erythema), 가려움과 건조 피부 (Pruritus & Dry Skin), 부종과 혈종 (Edema & escoriation), 짓무름 (Erosion), 그리고 태선화 (Lichenification)로 나누었다. 이 각각의 항목은 없음 (0) 약함 (1) 중증도 (2) 심함 (3)으로 채점하였다. 일반적으로 DNCB를 이용해 피부염을 유발할 경우, 약 12-13점이면 피부염이 최고조에 달했다고 판단하고 있다.

5) 조직 검사

실험 종료 후에, 왼쪽 귀 끝부분, 등쪽 목부분의 피부, 림프절을 떼어내어 10% para-formaldehyde에서 2 hr. 동안 고정하였다. 그 조직을 파라핀으로 포맷하였고, 5µm 부분의 두께로 block을 만들었다. 조직 부분은 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils/ eosinophil 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline /eosin (H&E) 염색과 비만세포 (mast cells)를 염색하는 toluidine 염색을 시행하였다. 면역화학 조직염색 (immuno histochemical stains)은 상기한 바와 같이 block을 만들고, 여기에 rat anti-mouse CD4 mAb (RM4-5; PharMingen, San Diego, CA), rat anti-mouse CCR3 mAb (53-6.7; Becton Dickinson, Mountain View, CA) 항체를 사용하였다. 조직 절편을 4 µm 두께로 세절한 후 probe-on plus slide (Fisher Scientific, U.S.A)에 부착시켜 건조시켰다. 그리고 탈파라핀 (Deparaffinized) 후 함수시키고 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)를 이용해 microwave oven에 15분간 전처리 하였다. 조직내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H₂O₂에 10분간 처리한 후, 조직내의 항원과 비특이적 단백질결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질질을 차단시켰다. 그리고 일차 단일 항체에 1시간 동안 부착시킨 다음 완충액으로 수세하였다. 이후 LSAB kit (ScyTek, U.S.A)를 이용하여 PE-conjugated goat anti-rat IgG (PharMingen)에 30분간 반응시켰다. 3회 Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST; Dako, Carpinteria, CA)으로 수세한 후 잘 건조하였다. 현미경은 형광위상차현미경 (Contrast fluoroseince microscope, Nikon, Japan)을 사용하여 x100 배율로 관찰하였다.

6) 혈액중의 면역글로블린 측정

시료 투여 시점인 8주와 12주, 16주, 그리고 20주에 생쥐의 눈에서 capillary tube를 이용하여 약 100 µl의 혈액을 채혈한 후 원심분리기 6,500 rpm에서 20분간 원심분리한 후 30 µl의 혈청을 분리하였다. 혈청은 취하여 실험에 이용할 때 까지 -70°C에 냉동 보관하였다. 혈청내 IgE, IgG, IgM 측정은 Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, U.S.A)와 ELISA kit (R&D system)를 사용하였다. 각 항체 (antibody)를 coating 완충 용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight 하였다. 각 well을 3회 washing 완충 용액으로 세척한 후 폐포 세척액과 혈청 (100배 희석)을 100 µl씩 분주하였다. 이를 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 washing 완충 용액으로

2회 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리하고 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 비장 세포 배양액의 사이토카인 측정

Spleen cell (2 x 10⁶/mL)을 anti-CD28 (1 μ g/mL)과 anti-CD3 (1 μ g/mL)으로 24-well Costar 접시 (Corning Inc, Cambridge, Mass)에서 coating하여 48시간 동안 동시 배양 한 후, IL-4, IL-5, IL-13 및 IFN- γ 생성량을 ELISA kit로 측정하였다.

8) 비장과 림프절의 형광 유세포 분석

DNCB로 발진을 유도한 NC/Nga 생쥐에 GPDS (250mg/kg)를 투여하여 20주에서 실험을 종료한 후 실험 동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 spleen, draining lymph node (DLN)를 분리하여 총 면역세포수를 측정하였다. DNCB로 발진을 유도한 NC/Nga 생쥐 20주 후 비장과 림프절을 각각 적출하여 100 mesh로 각각의 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1,700 rpm)하였다. 이를 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 이들 세포에 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1L of demineralized water + 0.1mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 측정된 spleen, lymph node cell를 5 x 10⁵ 세포로 조정한 후 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-CD3e, FITC-anti-CCR5, PE-anti-Gr-1 FITC-anti-CD11b, PE-anti-Gr-1을 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3e+/CCR3+, CCR3+, CD19+, B220+/IgE+ 세포수를 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

9) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석법을 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

1. 세포독성에 미치는 영향

GPDS 추출물을 Balb/c 생쥐로부터 분리한 폐 fibroblast에 48 시간 동안 1, 10, 50, 100, 200, 400 μ g/ml 농도로 처리하고 세포독성을 측정한 결과, 생존율이 각각 100 ± 5.2, 99.5 ± 4.6, 97.4 ± 5.3, 98.6 ± 4.8, 94.6 ± 2.6, 92.3 ± 3.5, 90.5 ± 4.6 %로 나타나 모든 농도에서 유의성 있는 감소는 나타나지 않았다. 이 같은 결과는 기존의 결과와 비교하여 볼 때 GPDS가 세포독성을 나타내지 않는다는 것을 의미한다(Fig. 1).

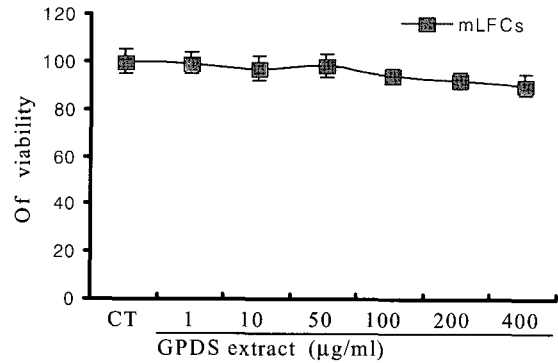


Fig. 1. Effects of GPDS on the viability of mouse lung fibroblast. Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) were cultured with various concentration of GPDS extract for 48 hr and the cell viability was measured by SRB method. The results were presented by the mean ± S.E (N=6).

2. Nc/Nga 생쥐에서 유발된 아토피 피부염 억제 효과

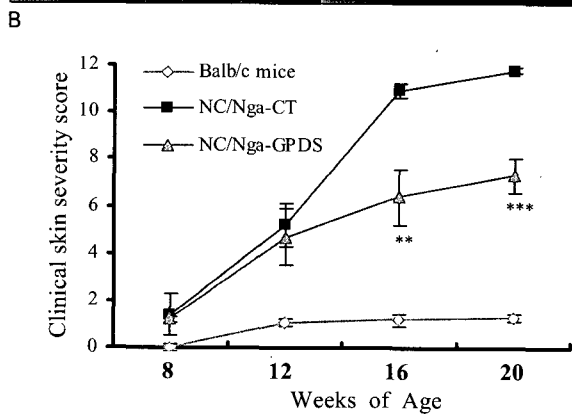
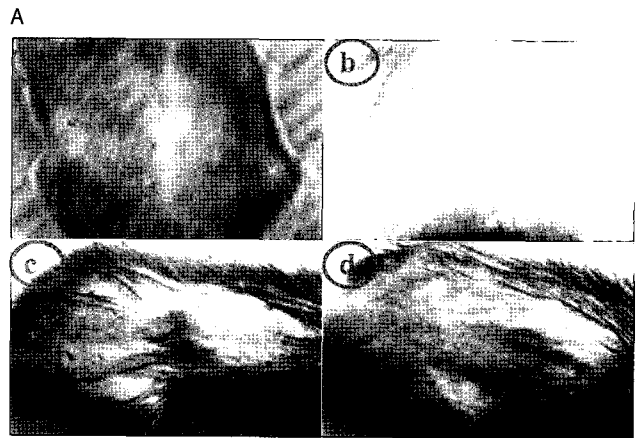


Fig. 2. Effects of GPDS on clinical skin features and severity in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. (A) Comparison of skin manifestation in NC/Nga mice between control and experimental group. Atopic dermatitis was induced by DNCB treatment in the dorsal skin. a before the treatment of DNCB, b: DNCB treatment for 1 weeks, c: DNCB treatment for 4 weeks, d: DNCB treatment for 4 weeks with oral administration of (B) Clinical severity score of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe) for each of five signs and symptoms (itch, erythema/hemorrhage, edema, excoriation/erosion and scaling/dryness). Symptoms were evaluated by skin dryness, eruption and wound on the three parts of the body: ear, face and head, and back. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT mice group by t-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

NC/Nga 생쥐는 1957년에 Kondo²⁵⁾에 의하여 구축된 동물 모델로서, SPF (specific pathogen free) 조건하에서는 정상적으로 건강한 상태를 유지 하지만, 일반적인 환경에서는 8 주령부터 가려움으로 인한 긁기(scratching behavior)와 습진성 피부염 증상을 나타낸다. 사람에서의 아토피 피부염과 유사하게 CD4+ T 세포와 호산구, 비만 세포들이 피부염 부위로 침윤되며 IL-4, IL-5, IL-13등을 다량 발현하여 Th2 면역 반응을 유도한다. IL-4와 관련되어 IgE의 혈중 농도가 증가되며, Th2 키모카인의 발현 또한 증가되어 17-20 주령에 피부염은 최고에 이른다. 피부 병소는 부종, 출혈, 각질화를 특징으로 하며 귀, 등, 목 주위에서 가장 흔하게 관찰된다. GPDS의 아토피 피부염 억제 작용을 조사하기 위하여 Nc/Nga 생쥐를 이용하였다. DNCB를 제모한 피부에 도포하여 피부염을 유발하였으며, 대조군에는 생리식염수를, 실험군에는 GPDS를 매일 250 mg/Kg의 농도로 경구 투여하며 피부염 지수를 측정하였다. Fig. 2는 8 주령이 된 NC/Nga 생쥐의 등 부위를 깨끗하게 제모한 사진이며, (a)는 제모한 후 DNCB 용액을 1주간 도포한 후 사진 (b)으로 가피가 모두 벗겨지고 피부 염증이 나타나기 시작하였다. DNCB를 4주간 도포한 결과 심한 피부염 (c) 긁는 행동이 심화되었다. 이에 반해 GPDS를 8주부터 12주간 경구 투여한 결과 실험군은 (d) 대조군에 비하여 피부염 등이 현저히 줄어든 상태를 볼 수 있다. 또한 GPDS를 8주부터 20주까지 투여하면서 4주마다 피부염의 심화 정도를 관능적 방법에 의하여 측정하였는데(Fig. 2B), GPDS를 투여한 군에서는 피부의 가려움과 건조, 부종, 혈종, 짓무름, 태선화 등으로 측정된 피부염의 심화 정도가 현저히 줄어들어 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 GPDS 경구 투여가 Nc/Nga 생쥐에서 발생하는 피부염을 효과적으로 저해할 수 있다는 것을 결론적으로 보여주고 있다.

3. GPDS의 피부와 귀 조직 변화에 관한 효과

GPDS의 피부염 억제 작용이 피부 조직에서의 세포 병변 저해에 기인한 것인지를 조사하기 위하여 실험 종료 후 피부와 귀의 일부를 절단한 후 H&E 염색과 toluidine 염색을 하여 관찰하였다. Fig. 4의 A와 B는 H&E 염색을 한 대조군의 피부 조직 (A)은 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, 백혈구의 침윤도 관찰되었다. 이에 비해 GPDS 투여군 (B)에서는 상대적으로 대조군에 비하여 epidermis와 dermis의 두께가 현저하게 줄었고, 백혈구의 침윤이 현저히 감소하여 부종이 발생하지 않았다. Fig. 3의 C와 D는 비만세포(mast cell)를 염색하는 toluidine 염색으로, 대조군(C)은 dermis 주변에 비만세포(화살표)가 많이 침윤된 것을 알 수 있다. 그러나 GPDS 투여군 (D)에서는 그림에서 나타난 바와 같이 대조군에 비하여 비만세포를 거의 관찰할 수 없었다(Fig. 3, upper). 귀의 조직 염색에서도 피부에서와 같이 GPDS 투여군에서 백혈구와 비만세포의 침윤이 현저히 감소된 것을 확인 할 수 있었다(Fig 3, lower). 키모카인은 면역세포에서 분비되는 작은 분자의 단백질로 주된 기능은 면역세포들이 염증 부위로 유입되는 것을 조절한다²⁶⁾ CCR3는 eotaxin에 대한 수용체로서 활성화된 T 세포 및 비만 세포, 호산

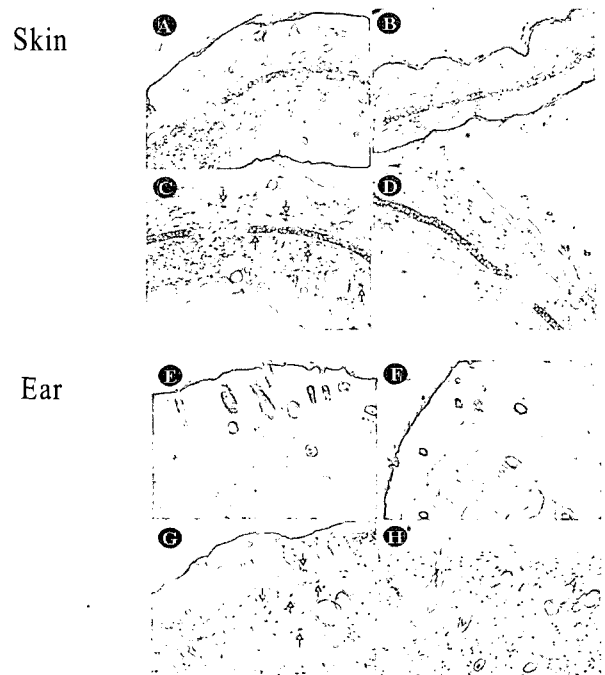


Fig. 3. Histologic examination of skin and ear lesion in DNCB-induced dermatitis model of Nc/Nga mice. The animals were administrated with saline (control,) or GPDS (250 mg/kg) for 8 weeks. Skin and ear biopsy was stained with hematoxylin and eosin (H&E) and toluidine blue (A, C, E, G; control, B, D, F, H; GPDS) for examining inflammatory cells and mast cell (C, G, arrow), respectively. Bright microscopy (Nikon, Japan, original magnification, x100).

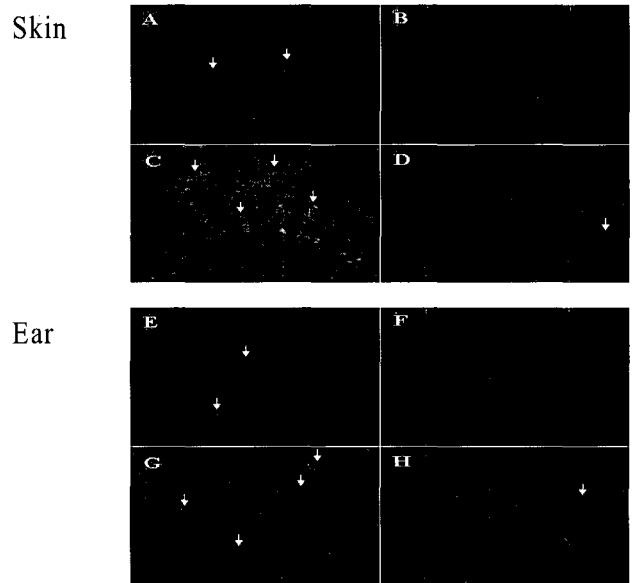


Fig. 4. Immunohistochemical staining of dorsal skin and ear of DNCB-induced dermatitis in NC/Nga mice. Following 8 weeks administration of GPDS, mouse dorsal skin biopsy were stained with PE-rat anti-mouse CD4 mAb (A, B, E, F) and PE-rat anti-mouse CCR3mAb (C, D, G, H), respectively.

구에 발현되어 피부 병소로의 면역세포의 침윤을 유도하고 과도한 면역 반응을 통하여 조직 손상을 유발하는 것이 알려져 있다²⁷⁾. 피부와 귀 조직에서 CCR3와 CD4의 발현을 면역형광법으로 조사한 결과, 대조군에서 CD4와 CCR3가 현저히 증가한 반면,

GPDS를 투여한 실험군에서는 그 발현이 매우 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). CCR3의 발현 감소가 면역체계에서 이들을 발현하는 세포수에 대한 변화와 관련된 것인지를 조사하기 위하여, 비장과 림프절에서 CCR3를 발현하는 세포수를 유세포 분석법에 의하여 측정하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 CCR3를 발현하는 세포수는 비장에서는 유의적 변화를 관찰할 수 없었으나, 림프절에서는 유의적으로 감소한 것을 확인하였으며, CCR3를 발현하는 CD3e+ 세포도 림프절에서 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 이상의 결과는 GPDS의 경구 투여가 CCR3를 발현하는 염증 세포수 및 활성을 전신적으로 감소시켜 피부로의 유입을 억제함으로써 피부염을 억제하는 작용을 나타낸다는 것을 추측하게 한다.

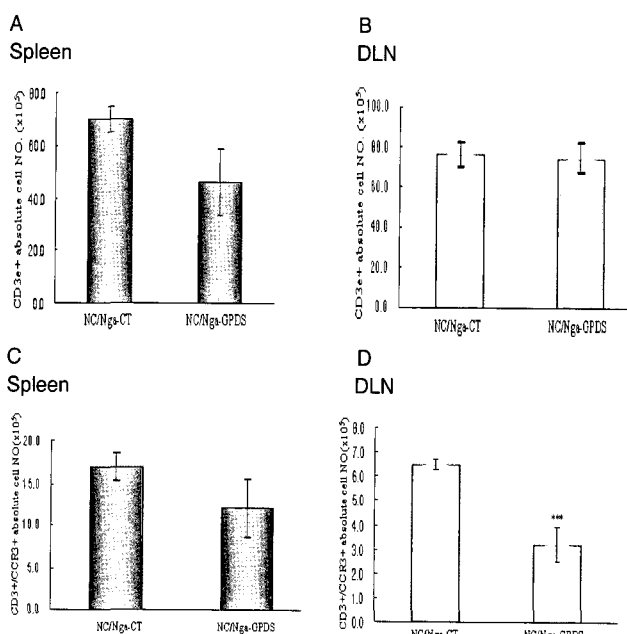


Fig. 5. Effect of GPDS on absolute CCR3+ cell and CD3+/CCR3+ T cells number in DNCB-induced dermatitis model of Nc/Nga mice following administration with saline (control) or GPDS (250 mg/kg) for 8 weeks. At the end of the experiment, spleen and lymph node (LN) were removed and both CCR3+ cells (A, B) and CD3e+/CCR3+ T cell number (C, D) were measured by flow cytometry. Each value represents the mean SE of four mice. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT (control) mice group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

5. GPDS의 알러지 관련성 사이토카인 생성에 관한 효과

아토피 피부염은 Th2 면역세포의 활성이 우세한 질환으로 알려져 있다²⁸⁾. 피부염 발생 단계에서 IL-4, IL-5, IL-13과 같은 Th2 사이토카인이 증가되어 아토피 피부염 진행을 유도하는 것으로 알려져 있는데, IL-4와 IL-13은 IgE의 발현을 증가시키며, 증가된 IgE는 비만 세포 및 호산구와 호중구 (basophil)의 탈과립화 (degranulation)를 유발하여 히스타민과 같은 염증성 물질의 분비를 매개한다. T 세포에서 분비되는 IL-5는 호산구 활성화인자로서 피부의 염증 반응에 기여하며, IFN-g와 같은 Th1 사이토카인은 발병 초기에는 그 발현이 감소되어 있지만 질환의 후반기에는 그 발현이 증가되어 병적 상태를 심화시키는 것으로 알려졌다²⁸⁻³⁰⁾. GPDS의 경구 투여가 Th2 사이토카인의 발현에 어떠한

영향을 나타내는지를 조사하기 위하여, 비장 세포를 anti-CD3와 anti-CD28을 coating해 놓은 96 well plate에 분주하여 배양한 후 배양 상층액에서 IL-4, IL-5, IL-13의 생성량을 측정된 결과(Fig. 6), IL-4의 경우 대조군은 185 ± 48 pg/ml로 나타난 반면, GPDS 투여군은 120 ± 65 pg/ml로 나타나 유의성은 나타나지 않았으나, 대조군에 비하여 35.2%의 감소 경향을 나타내었다. 동시에 IL-5, IL-13과 같은 Th2 사이토카인의 생성량을 측정된 결과, 대조군은 2,451 ± 211 pg/ml로 나타난 반면, GPDS 투여군은 1,395 ± 175 pg/ml (p<0.01)로 나타나 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 6B). 또한 IL-13 생성량을 측정된 결과 대조군은 3,784 ± 362 pg/ml로 나타난 반면, GPDS 투여군은 1,964 ± 454 pg/ml (p<0.01)로 나타나 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 6C). Th1 사이토카인인 IFN-γ 생성량 측정에서는 대조군이 1,457 ± 240 pg/ml로 나타난 반면, GPDS 투여군은 2,158 ± 458 pg/ml로 나타났으나 유의성 있는 차이는 보이지 않았으나 48.1% 증가하였다. 이러한 결과는 GPDS의 경구 투여가 면역 세포에서 과도하게 발현되는 Th2 사이토카인의 생성을 억제할 수 있으며 이를 통하여 피부염의 발생을 저해한다는 것을 의미한다.

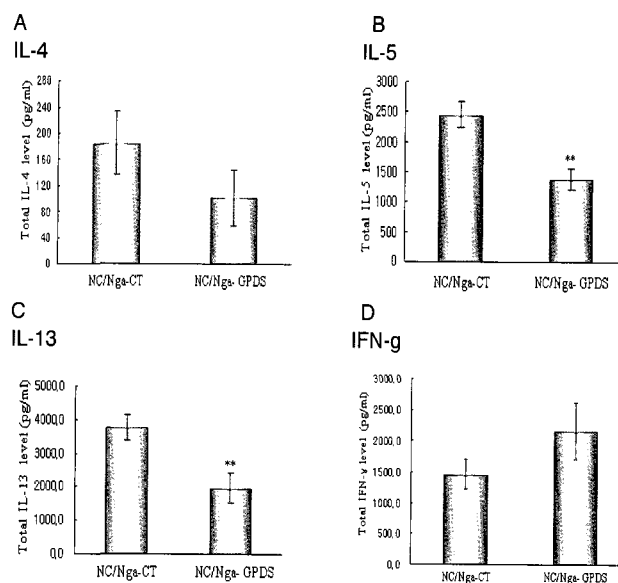


Fig. 6. Effects of GPDS on the production of allergy-related cytokines in splenocytes of DNCB-induced dermatitis model of mice. The splenocytes was obtained from mice administrated with saline (control) or GPDS for 8 week, and the cells were stimulated with anti-CD3 (1 mg/ml) plus anti-CD28 (1 mg/ml) antibody for 48 hrs. The levels of IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C) and IFN-g (D) in the culture supernatant were measured using commercially available ELISA kit, respectively. The values represent the mean SE of four mice. Statistically significant value compared with NC/Nga mice group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

6. GPDS의 혈중 면역글로블린에 관한 효과

B 세포는 다양한 항원에 대하여 면역글로블린 (Ig)을 생산하는 면역 반응을 수행한다. 특히 IgE는 아토피 피부염 환자의 70% 이상에서 현저히 증가하여 있으며, IgE 수용체를 발현하는 염증 세포와 결합한 후, 탈과립화를 통하여 히스타민과 같은 염증성 매개 물질을 방출하게 한다^{31,32)}. 이러한 반응은 연속적인 다양한 면역 활성을 통하여 피부염을 심화시키므로 IgE는 아토피

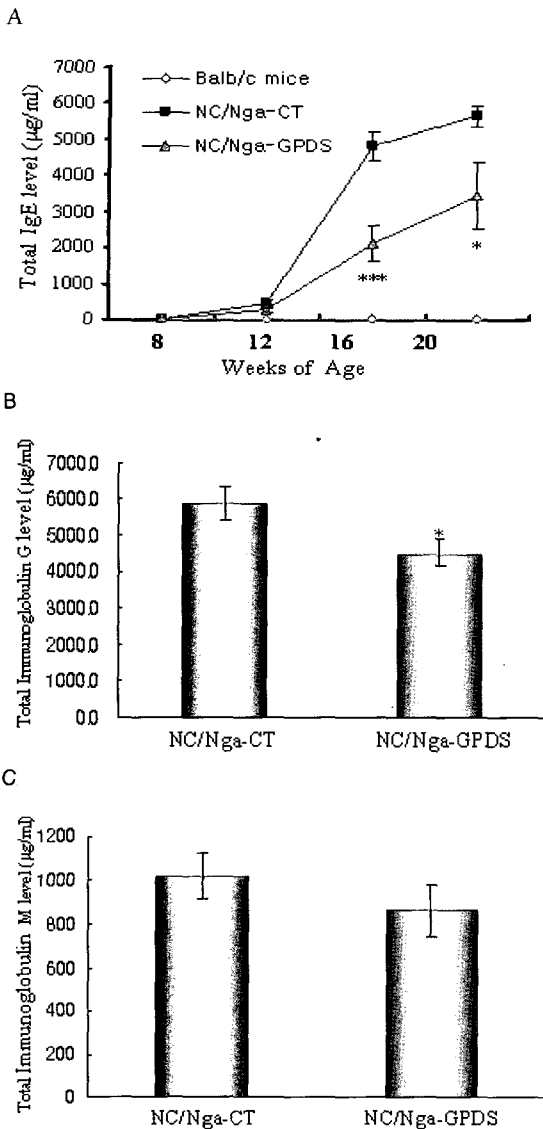


Fig. 7. Effects of GPDS on the serum levels of IgE(A), IgG (B) and IgM (C) in DNCB-induced dermatitis model of Nc/Nga mice. The animals were administrated with GPDS or saline for 8 weeks. Serum levels of IgE were measured by sandwich ELISA at indicated time points. Each point represents the mean SE of four mice. Statistically significant value compared with NC/Nga mice group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

피부염의 중요한 병리 인자로 알려져 있다³³⁾. GPDS가 IgE의 발현에 어떠한 영향을 나타내는지 조사하기 위하여 NC/Nga 생쥐의 눈에서 8주, 12주, 16주, 그리고 20주에 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하여 IgE 생성량을 측정하였다. Fig. 7는 혈청 IgE 수치의 변화로 대조군에서는 8주에 7.6 ± 5.6 (pg/ml), 12주에 439 ± 105.7 (pg/ml), 16주에 $4,811 \pm 405.5$ (pg/ml), 20주에 $5,645 \pm 305$ (pg/ml)로 나타나 12주 이후 IgE 수치가 10배 이상 증가하였다. 이에 비해 GPDS 투여군에서는 8주에 12.4 ± 5.1 (pg/ml), 12주에 283.5 ± 111.8 (pg/ml), 16주에 $2,102 \pm 485$ (µg/ml) ($p<0.001$), 20주에 $3,438 \pm 930$ (pg/ml) ($p<0.05$)로 나타났다 (Fig. 7. A). 실험 종료시에 IgG의 혈액 중의 농도를 측정된 결과 대조군은 5494 ± 478 µg/ml로 나타난 반면, GPDS 투여군은 4512 ± 365 /ml로 나타나 유의성 있는 감소 ($p<0.05$)를 나타내었다(B). 그러나 IgM은

유의적인 변화를 나타내지 않았다(C). 이를 바탕으로 GPDS의 경구 투여가 IgE를 생성하는 세포수에 어떠한 영향을 나타내는지 유세포 분석으로 측정하였는데, 비장에서 CD19+ B cell의 total absolute number는 대조군이 102.2 ± 0.7 ($\times 10^5$), GPDS 투여군이 69.0 ± 25.7 ($\times 10^5$)로 나타나 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 반면 DLN에서는 대조군이 57.2 ± 5.2 ($\times 10^4$), GPDS 투여군이 35.2 ± 0.9 ($\times 10^4$)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p<0.001$) 감소를 나타내었다 (Fig 7B). IgE를 생성하는 B 세포수에는 어떠한 영향을 나타내는지 조사하기 위하여 비장에서의 B220+/IgE+ B cell의 총 면역세포수를 측정된 결과, 대조군이 18.1 ± 2.9 ($\times 10^5$), GPDS 투여군이 14.4 ± 5.1 ($\times 10^5$)로 나타나 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 반면 DLN에서는 대조군이 2.9 ± 0.3 ($\times 10^4$), GPDS 투여군이 1.3 ± 0.2 ($\times 10^4$)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p<0.001$) 감소를 나타내었다 (Fig. 7D). 이러한 결과는 GPDS가 B 세포에 작용하여 IgE의 생산을 직접적으로 저해하거나 또는 림프절에서 IgE를 생산하는 B 세포수 감소를 통하여 아토피 피부염의 중요 병리 인자인 IgE에 대한 생성 억제 작용을 나타낼 것이라고 사료되어지며, IgE를 매개로한 면역 반응을 통하여 피부염 저해 작용을 나타낼 것이라는 것을 의미한다.

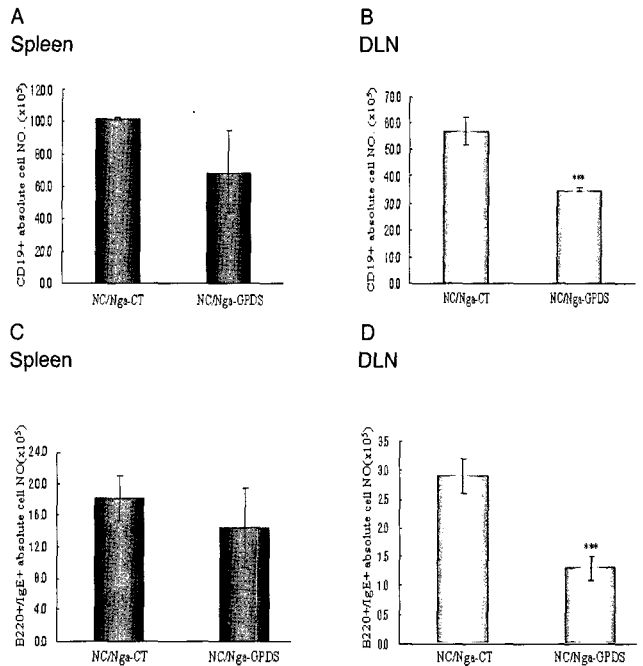


Fig 8. Effect of GPDS extract on CD19+ and B220+ IgE producing B cell number in DNCB-induced dermatitis model of Nc/Nga mice following administration of saline (control) or GPDS (250 mg/kg) for 8 weeks. At the end of the experiment, spleen and lymph node (LN) were removed and absolute CD19+ or B220+ IgE producing B cell number were measured by flow cytometry. Each value represents the mean SE of four mice. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT (control) mice group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

결론

임상 활용을 위한 신규 처방 개발을 위하여, 人蔘敗毒散에

수종의 약물을 가감한 加味敗毒散(GPDS)을 시료로 NC/Nga 생쥐에 DNCB로 피부염을 유발한 뒤, 피부염 발생 정도와 관련된 사이토카인 및 면역 세포군에 미치는 영향을 검색하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

加味敗毒散은 생쥐의 폐로부터 분리한 fibroblast에 대하여 모든 실험 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. 加味敗毒散은 아토피 유발 Nc/Nga 생쥐의 발진, 부종, 가려움 및 짓무름 등의 피부염 증상을 대조군에 비하여 현저히 억제하였다. 加味敗毒散은 아토피 유발 Nc/Nga 생쥐의 피부 및 귀 조직에서 염증성 세포 및 비만세포의 침윤과 CCR3를 발현하는 세포를 대조군에 비하여 현저히 감소시켰으며, 림프절에서 CCR3를 발현하는 세포 수를 유의적으로 감소시켰다. 加味敗毒散은 IFN-g 같은 Th1 사이토카인에 대한 유의적 조절 작용을 관찰할 수 없었으나, IL-5와 IL-13와 같은 Th2 사이토카인의 생성은 대조군에 비하여 유의적으로 감소시켰다. 加味敗毒散은 IgE의 생성을 대조군에 비하여 유의적으로 저해하였으며, IgG의 생성에 대한 저해 작용을 나타냈으나, IgM에 대한 저해 작용은 없었다. 림프절에서 IgE를 생성하는 B 세포 (B220+/IgE+)의 수는 유의적으로 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 加味敗毒散은 CCR3+ 세포 활성화, Th2 사이토카인 및 IgE의 생성 억제 및 세포수의 조절 작용을 통하여 아토피 피부염을 저해하는 작용이 있음이 실험적으로 규명되어, 선택적 면역조절 작용을 나타내는 아토피 피부염 치료제로서 활용 가능성이 클 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국산업기술평가원에서 지원하는 지역혁신연구센터 과제인 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학 연구센터(TBRC, RRC04700, 2005)의 지원에 의해 수행되었음을 밝히며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Leung, D.Y. and Bieber, T. Atopic dermatitis. *Lancet*. 361:151-160, 2003.
2. Cooper, K.D. Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy. *J Invest Dermatol*. 102:128-137, 1994.
3. Leung, D.Y. Atopy dermatitis: new insight and opportunities for therapeutic intervention *J Allergy Clin Immunol* 105:860-867, 2000.
4. 이원문 외. 皮膚性病(手冊), 인민위생출판사, pp 193-199, 2004.
5. 장서현 외. 皮膚科卷, 학원출판사, pp 299-230, 2004.
6. 민수 외. 當代兒科常見病妙方, 인민군의출판사, p 567, 2003.
7. 장지례. 皮膚科手冊, 중의고적출판사, p 279, 2004.
8. 김성아. 消風導赤湯이 아토피 피부염의 항염증 효과와 각질층 ceramide 변화에 미치는 영향, 동신대학교 대학원 석사학위논문, 2005.
9. 진경선. 清上防風湯의 아토피성 알레르기 反應 調節 效果, 원광대학교 대학원 박사학위논문, 2004.
10. 김기훈. 桑葉이 아토피 피부염에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 2004.
11. 민영규. 消風散加減方과 外治方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향, 동신대학교 대학원 박사학위논문, 2005.
12. 김윤희. 황금추출물이 NC/nga mouse에서 아토피질환 개선에 미치는 영향, 대구대학교 대학원 석사학위논문, 2006.
13. 박민철. 柴胡清肝散 투여가 아토피 피부염을 유발한 동물모델의 각질층 기능회복에 미치는 영향, 동국대학교 대학원 석사학위논문, 2004.
14. 정환수. 加味熱多寒少湯 투여후 아토피 피부염 환자의 임상상 변화에 대한 연구, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 2002.
15. 윤화정. 아토피 皮膚炎 患者의 韓醫學的인 臨床類型分類에 대한 研究, 동의대학교 대학원 석사학위논문, 2006.
16. 신재용. 방약합편해설, 전통의학연구소, p 113, 2000.
17. 신재연. 人參敗毒散과 加味人參敗毒散의 鎮痛,解熱 및 白鼠 損傷肝에 미치는 影響, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1983.
18. 김태희. 人參敗毒散이 Microcrystalline sodium urate로 誘發된 흰쥐의 痛風에 미치는 影響, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1989.
19. 김철중. 補中益氣湯 및 人參敗毒散이 Gentamicin Sulfate로 誘發된 白鼠의 急性 腎不全에 미치는 影響, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1983.
20. 정진탁. 連翹敗毒散의 抗菌作用에 對한 實驗的 研究, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1976.
21. 이경화. 連翹敗毒散이 사람 기관지 상피세포의 TARC 분비에 미치는 효과, 세명대학교 대학원 석사학위논문, 2004.
22. 권오성. 連翹敗毒散加味方이 DNCB로 誘發된 생쥐의 Allergy性 接觸皮膚炎에 미치는 影響, 동국대학교 대학원 박사학위논문, 1997.
23. 김대남. Gamipaidoksan possesses antiallergic and anti-inflammatory activities, 대전대학교 대학원 석사학위논문, 2006.
24. Japanese Dermatological Association: Criteria for the Diagnosis of Atopy Dermatitis *J. Dermatol* 22:966-967, 1995.
25. Kondo, K., nagami, t. and tadokoro, S. Differences in hematopoietic death among inbred strain of mice: In Comparative cellular and species radiosensitivity *P. Bond and S. Sugawara, editoys. Igakurshoin Tokyo Japan* P20 1:70-75, 1969.
26. Suto, H., Matsuda, H., Mitsuishi, K., Hira, K., Uchida, T., Unno, T., Ogawa, H., Ra, C. NC/Nga mice: a mouse model for atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 120 Suppl, 1999.
27. Yawalkar, N., Uguccioni, M., Schärer, J., et al. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis *J Invest Dermatol* 113:43-48, 1999.
28. Kakinuma, T., Nakamura, K., Wakugawa, M., et al. Tumor necrosis factor- α and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: serum thymus and activation-regulated

- chemokine level is closely related with disease activity J Allergy Clin Immunol 107:535-541, 2001.
29. Grewe, M., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Schopf, E., Thepen, T., Langeveld-Wildschut, A.G., Ruzicka, T. Krutmann A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. Immunol Today. 19:359-361, 1998.
 30. Hamid, Q., Bonguniewicz, M., Leung, D.Y. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis J Clin Invest 94:870-876, 1994.
 31. Matsumoto, M., watanabe, G.P., geba, J., Sperl, m., Tsudzuki, J., et al. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in Nc/Nga mice. Int Immunol 9:461-468, 1997.
 32. van Bever, H.P. Recent advances in the pathogenesis of atopic dermatitis Eur J pediatr 151:870-873, 1992.
 33. Ogawa, M., Berger, P.A., Mcintyre, O.R., Clendenning, W.E., Ishizaka, K. IgE in atopic dermatitis. Arch Dermatol; 103:575-588, 1971.