

# 祛風燥濕解毒方이 접촉성피부염 유발 NC/Nga 생쥐의 면역 관련 인자에 미치는 영향

배은영 · 김동희\*

대전대학교 한의과대학 병리학교실

## Effect of Geopungjeseupbang on Contact Dermatitis induced by DNCB

Eun Young Bae, Dong Hee Kim\*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

NC/Nga mice with contact dermatitis induced using DNCB were applied with GJHB(祛風燥濕解毒方), and its influence on the expressions of IgE, immune related cytokines, and immunoglobulins were tested. The results were obtained as follows ; GJHB significantly reduced the production of IgE compared to the control. GJHB significantly reduced the amount of IL-4 within the suspension of spleen cells, but significantly induced the production of IFN-γ, compared to the control. GJHB significantly reduced the production of IL-6 and TNF-α in the serum compared to the control. GJHB significantly suppressed the concentration of IgM, IgG2a, IgG2b in the serum. However, no significant decrease of IgG1 was observed. From the results above, GJHB suppressed the intermediate factors during the hypersensitive immune response as well as suppressing the generation of inflammation related cytokines. Therefore, anti-allergic effect of GJHB on the contact dermatitis through immune modulation was confirmed.

Key words : NC/Nga, contact dermatitis, GJHB(祛風燥濕解毒方), cytokines, immunoglobulins

### 서론

현대 사회의 산업화, 공업화에 따라 환경오염 물질들이 급증하고 있으며 이에 따른 과민성 면역 질환은 해마다 증가하고 있다. 선진국들을 비롯한 국내에서도 이러한 과민성 면역질환은 심각한 문제로 대두되어 있으며, 우리나라 인구의 약 12~20% 정도가 각종 과민성 면역 질환에 반응을 보이고 있는 실정이다.

면역 반응은 세균 감염 등에 대한 방어의 중요한 기능을 하지만 과도하게 일어날 경우 조직 손상이나 질병을 일으킬 수 있으며, 과도한 면역 반응에 의하여 야기되는 질환을 과민성 질환(hypersensitivity diseases)이라 한다<sup>1)</sup>. 接觸性皮膚炎은 세포매개성 면역반응인 제 IV형 지연형 과민반응의 하나로 외부 항원에 감작된 T 림프구에 의해 매개되는 습진성 피부질환이다<sup>2)</sup>. 接觸性皮膚炎을 일으키는 알레르겐은 대부분 화학물질이며, 그 자체

는 불안정한 항원으로 합텐 (hapten)이라 불리우며, 이 합텐은 먼저 피부를 침투하여 표피에서 매개 단백질과 결합하며, 완전한 항원이 된 다음 항원제시세포인 랑게르한스세포 (Langerhan's cell)와 접촉하게 되고, 이 세포는 T 림프구에 항원을 전달하게 된다<sup>3-5)</sup>. 랑게르한스세포는 정상 포유동물 표피에서 class II MHC 항원과 Fc 수용체, C3 수용체에 의해 인식되는 세포막 항원 등을 포함하고 있다. 본 실험에서 사용한 dinitrochlorbenzene (DNCB)는 대표적인 합텐으로 작용하는 화합물로 동물의 피부에 바르고 1~2주 후에 다시 같은 장소에 바르면 24시간 이내에 발적(erythma) 및 종창(induration)이 생긴다<sup>6)</sup>.

接觸性皮膚炎의 치료제로 azelastine, cyclosporin A, disodium cromoglycate, ketotifen, tranilast 등이 사용되고 있으나<sup>7-9)</sup> 스테로이드제는 장기간 투여할 경우 피부의 위축 등의 부작용이 문제되고 있어 여러 가지 새로운 약제의 개발이 시도되고 있으며, 특히 천연물 유래의 민간약 및 천연물을 이용한 항알레르기 물질의 탐색과 개발에 많은 연구가 진행되고 있다<sup>10-12)</sup>.

한의학에서 피부병은 타 질병과 마찬가지로 整體疾病의 일

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

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

· 접수 : 2007/11/02 · 채택 : 2007/11/27

부분으로, 비록 피부에서 병증은 발생되지만 내부 장부와 밀접한 관계를 지니고 있다<sup>13,14</sup>. 病因은 크게 内外因으로 나눌수 있는데, 内因으로는 七情所傷, 飲食不節, 勞倦所傷 및 체내 臟腑 기능 실조로 인한 内生 六淫 발생이 주 요인이고, 外因으로는 六淫이 단독 혹은 서로 錯雜 轉化하여 발생한다<sup>13-16</sup>. 특히 急性時에는 濕熱이 互結하여 피부를 熏蒸하고 이로 인한 內風이 발생하면서 심한 瘙癢症을 중심으로 다양한 피부 질환이 발생한다<sup>15,16</sup>. 따라서 實證 및 急性期에는 清熱利濕祛風 작용이 있는 처방과 약물이 다용되는데, 이는 역대 의가들의 피부병 病機에 대한 이론과 이에 대한 치료 처방에 잘 나타나 있다.

接觸性皮膚炎은 한의학에서 ‘漆瘡’ ‘膏藥風’ ‘馬桶癬’의 범주에 속하는 심한 소양증이 동반되는 것으로 기술되어 있다. 이에 대한 치료법은 주로 實證型 病症을 동반한다는 점에서 상기한 바와 같이 清熱利濕祛風 처방을 중심으로 涼血解毒 처방이 병용된다<sup>17-19</sup>.

본 시료인 祛風燥濕解毒方(GJHB)은 實證性 피부 질환에 상용<sup>20</sup>되는 白鮮皮, 地膚子, 苦參 등을 중심으로 祛風, 清熱, 利濕, 解毒 작용이 있는 5종의 약물을 배합하여 처방한 처방이다. 이미 구성 약물 모두가 실험, 임상 및 민간에서 다양한 피부염에 활용되고 있어, 이들의 병용은 보다 유의성 있는 피부 염증 억제 작용을 나타낼 것으로 사료된다.

이에 본 연구에서는 이를 시료로 DNCB로 유발된 Nc/Nga mouse 모델을 통하여 接觸性皮膚炎 억제 효과를 면역 관련 인자들을 중심으로 검색하여 객관적인 효능을 검증하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약물

본 실험에 사용한 祛風燥濕解毒方 (GJHB)의 구성 약재들은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. The compositions of GJHB

韓藥名	生藥名	用量 (g)
白鮮皮	<i>Dictamnii Radix</i>	15
苦參	<i>Sophorae Flavescentis Radix</i>	15
地膚子	<i>Kochiae Fructus</i>	15
蒼耳子	<i>Xanthii Fructus</i>	15
蛇床子	<i>Torilidis Fructus</i>	15
黃柏	<i>Phellodendri Cortex</i>	15
蒼朮	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	15
生大黃	<i>Rhei Radix Et Rhizoma</i>	8
Total amount		113

#### 2) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 Diethyl pyrocarbonate (DEPC), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 3-4, 5-dimethylthiazol-2, 5-carboxy methoxyphenyl-2, 4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), antibody biotin-conjugated, antibody Avidin-HRP conjugated, TMB,

EtOH, magnesium chloride 등은 Sigma 사 (U.S.A) 제품을, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa 사 (Japan) 제품을, CsA (cyclosporin A)는 중의 제약 제품을, RNase inhibitor는 Promega 사 (Madison, U.S.A) 제품을, 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, U.S.A) 제품을, DMED은 Gibco 사 (Gaithersburg, MD, U.S.A) 제품을, RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, U.S.A) 제품을, IL-6, TNF- $\alpha$  ELISA kit는 Biosource 사 제품을, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM kit는 Endogen 사 제품을, IL-4, INF- $\gamma$  kit는 R & D system 사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

#### 3) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), microwave oven (LG, Korea), rotary vacuum evaporator, vacuum pump (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Co., Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Co., Japan), micro-pipet (Gilson, Co., France), water bath (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line, Co., U.S.A), vortex mixer, heating block (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Co., Japan), centrifuge (한일, Korea), deep-freezer (Sanyo, Co., Japan), plate shaker (Lab-Line, U.S.A), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), ELISA reader (Molecular Devices, Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 시료 추출

祛風燥濕解毒方 (GJHB) 2첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여, 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator, Büchi B-480, Switzerland)로 농축하였다. 농축액을 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 16.0 g을 냉동 보관 (-80℃) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

#### 2) 피부염 유도 및 시료 처리

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  $\mu$ l를 등 부위에 도포하였고, 4일 후부터, 1 주일에 2-3 번씩 0.2% DNCB 용액 150  $\mu$ l를 등 부위에 도포하였다 (12주부터 16주). 실험은 3개의 그룹으로 나누고, 대조군에는 생리식염수를, 양성대조군에는 CsA를 복강투여를, 실험군에는 GJHB를 6.7 mg/25 g/day의 농도로 8주간 경구 투여하였다.

#### 3) 채혈 및 IgE 측정

NC/Nga 생쥐가 8주, 12주, 그리고 16주에 생쥐의 눈에서 capillary 관을 이용하여 약 100  $\mu$ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기 6,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 30  $\mu$ l의 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 취하여 -70℃에 냉동 보관하였다. 시험 종료 후 NC/Nga 생쥐의 혈청내 IgE 농도 측정은 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, USA)

로 IgE 수준을 측정하였다. 각 well에 NC/Nga 생쥐에서 8주, 12주, 그리고 16주에 채혈한 혈청 5  $\mu$ l (1/10 dilution)와 dilution buffer 45  $\mu$ l를 혼합하여 각 well에 분주하고, 2 시간 동안 25  $^{\circ}$ C 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody biotin-IgE conjugated를 넣고 2시간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100  $\mu$ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100  $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 비장세포내 IL-4, IFN- $\gamma$  생성량 분석

실험 종료 후 비장세포( $1 \times 10^5$ /well)를 anti-CD28 (1  $\mu$ g/mL) (Pharmingen)과 anti-CD3 (1  $\mu$ g/mL) 항체가 96-well Costar 접시 (Corning Inc, Cambridge, Mass)에서 coating된 plate에서 48 시간 동안 동시 배양하였다. 비장세포내 IL-4, IFN- $\gamma$  생성량은 ELISA kit(R&D system, U.S.A)로 측정하였다. 각 well에 DNCB로 유발된 NC/Nga 생쥐의 비장세포 배양 상층액 100  $\mu$ l씩 분주하고, 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 30분간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100  $\mu$ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하여 암소에서 30 분간 방치하고, 여기에 100  $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 혈액내 염증 사이토카인 분석

실험 종료 후 ethyl ether로 마취하여 심장천자법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 IL-6와 TNF-alpha 농도 측정은 DNCB로 유발된 NC/Nga 생쥐의 실험 종료 후에 enzyme-linked immuno-sorbent assay kit(ELISA, Biosource, USA)로 생산량을 측정하였다. 각 well에 NC/Nga 생쥐의 혈청 100  $\mu$ l (1/100 dilution)씩 분주하고, 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100  $\mu$ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하여 암소에서 30 분간 방치한 후 50  $\mu$ l의 stop 용액을 처리하고 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 혈청내 immunoglobulin isotype량 ELISA 측정

총 IgG1, IgG2a, IgG2b 그리고 IgM의 혈청내 농도 측정은 실험 종료 후에enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, USA)로 생산량을 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100  $\mu$ l (1/200 dilution)씩 분주하고, 12 시간 동안 4 $^{\circ}$ C 냉장실에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 30분간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100  $\mu$ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100  $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 통계처리

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

결 과

1. IgE 생성량에 미치는 영향

IgE의 생성량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NC/Nga 생쥐의 눈에서 8주, 12주, 16주에 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하여 IgE 생성량을 측정하였다. Fig. 1은 혈청 IgE 수치의 변화로 정상군에서는 8주에 25.6  $\pm$  6.2 (ng/ml), 12주에 53.5  $\pm$  12.1 (ng/ml), 16주에 72.0  $\pm$  20.1 (ng/ml), 대조군에서는 8주에 35.2  $\pm$  2.0 (ng/ml), 12주에 214.3  $\pm$  4.4 ng/ml, 16주에 217.3  $\pm$  6.8 (ng/ml)로 나타나 12주 이후 6배 이상의 IgE 수치가 증가하였고, 양성대조군인 CsA에서는 8주에 43.1  $\pm$  1.9 (ng/ml), 12주에 114.3  $\pm$  18.1 (ng/ml), 16주에 115.2  $\pm$  4.9 (ng/ml)로 나타내었다. 이에 비해 GJHB 투여군에서는 8주에 64.1  $\pm$  6.9 (ng/ml), 12주에 189.2  $\pm$  8.9 (ng/ml), 16주에 188.2  $\pm$  12.6 (ng/ml)로 나타나, 12주 이후부터 유의적인 (\*p<0.05) 감소 효과를 나타내었다.

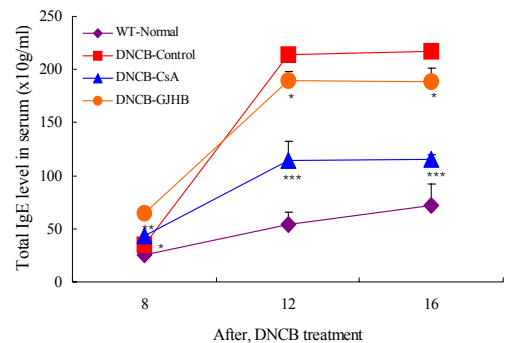


Fig. 1. Effect of GJHB on the serum levels of IgE in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. The animals were administrated with normal (◆), control (■), CsA (▲), GJHB (6.7 mg/25 g/day, ○) for 8 weeks. Serum levels of IgE were measured by sandwich ELISA at indicated time points. Each point represents the mean  $\pm$  SE. Statistically significant value compared with NC/Nga mice group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

2. IL-4 생성량에 미치는 영향

CD3/CD28로 활성화된 비장세포내 IL-4 생성량은 정상군이 351.7  $\pm$  18.1 (pg/ml), 대조군이 1042.5  $\pm$  15.5 (pg/ml), CsA 투여군이 904.3  $\pm$  2.7 (pg/ml), GJHB 투여군이 460.2  $\pm$  0.3 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*\*p<0.001) 감소 효과를 나타내었다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Effect of GJHB Extract on the Level of IL-4 in the Spleen of DNCB-induced NC/Nga Mice

	Normal	Control	CsA	GJHB
IL-4 (pg/ml)	351.7 $\pm$ 18.1	1042.5 $\pm$ 15.5	904.3 $\pm$ 2.7***	460.2 $\pm$ 0.3***

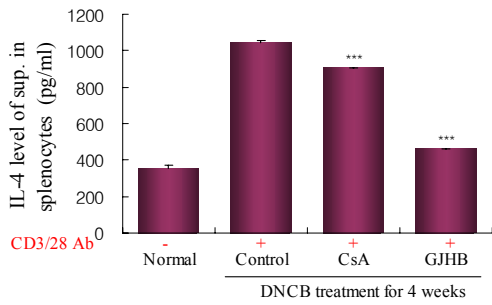


Fig. 2. Effects of GJHB on IL-4 production in the culture supernatant of CD3/ CD28-stimulated splenocytes. Splenocytes were stimulated with anti- CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IL-4 were in the culture supernatant determined using commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

3. IFN- $\gamma$  생성량에 미치는 영향

CD3/CD28로 활성화된 비장세포내 IFN- $\gamma$  생성량은 정상군이 170.9  $\pm$  23.0 (pg/ml), 대조군이 326.1  $\pm$  8.9 (pg/ml), CsA 투여군이 294.0  $\pm$  2.2 (pg/ml), GJHB 투여군이 542.4  $\pm$  11.2 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*\*p<0.001) 증가를 나타내었다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Effect of GJHB Extract on the Level of IFN- $\gamma$  in the Spleen of DNCB-induced NC/Nga Mice

	Normal	Control	CsA	GJHB
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	170.9 $\pm$ 23.0	326.1 $\pm$ 8.9	294.0 $\pm$ 2.2**	542.4 $\pm$ 11.2***

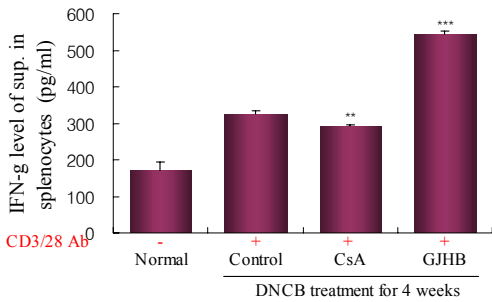


Fig. 3. Effects of GJHB on IFN- $\gamma$  production in the culture supernatant of CD3/ CD28-stimulated splenocytes. Splenocytes were stimulated with anti- CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IFN- $\gamma$  were in the culture supernatant determined using commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001).

5. 혈청내 IL-6 생성량에 미치는 영향

혈청내 IL-6 생성량은 정상군이 6.8  $\pm$  0.3 (pg/ml), 대조군이 113.6  $\pm$  4.9 (pg/ml), CsA 투여군이 80.7  $\pm$  6.2 (pg/ml), GJHB 투여군이 58.4  $\pm$  5.1 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*\*p<0.001) 감소 효과를 나타내었다(Table 4, Fig. 4).

6. 혈청내 TNF- $\alpha$  생성량에 미치는 영향

혈청내 TNF- $\alpha$  생성량은 정상군이 32.3  $\pm$  2.0 (pg/ml), 대조

군이 89.3  $\pm$  8.6 (pg/ml), CsA 투여군이 58.8  $\pm$  7.8 (pg/ml), GJHB 투여군이 48.3  $\pm$  4.4 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*p<0.01) 감소 효과를 나타내었다(Table 5, Fig. 5).

Table 4. Effect of GJHB Extract on the Levels of IL-6 in the Serum of DNCB-induced NC/Nga Mice

	Normal	Control	CsA	GJHB
IL-6 (pg/ml)	6.8 $\pm$ 0.3	113.6 $\pm$ 4.9	80.7 $\pm$ 6.2**	58.4 $\pm$ 5.1***

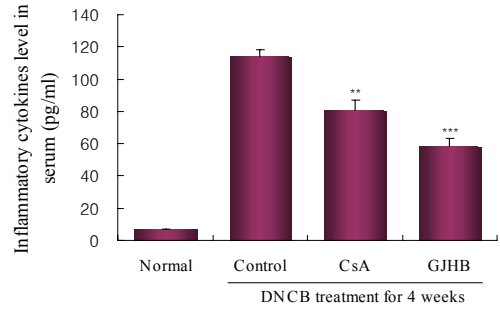


Fig. 4. Effect of GJHB Extract on the levels of IL-6 in the serum of DNCB-induced NC/Nga Mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IL-6 were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with CT by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001).

Table 5. Effect of GJHB Extract on the Levels of TNF- $\alpha$  in the Serum of DNCB- induced NC/Nga Mice

	Normal	Control	CsA	GJHB
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	32.3 $\pm$ 2.0	89.3 $\pm$ 8.6	58.8 $\pm$ 7.8*	48.3 $\pm$ 4.4**

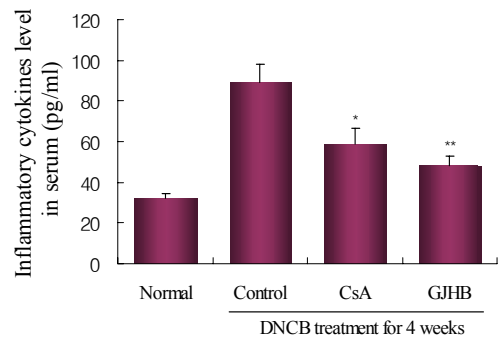


Fig. 5. Effect of GJHB Extract on the levels of TNF- $\alpha$  in the serum of DNCB-induced NC/Nga Mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of TNF- $\alpha$  were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with CT by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001).

7. 혈청내 immunoglobulin 생성량에 미치는 영향

1) IgG1 생성량에 미치는 영향

IgG1 혈중 농도는 정상군이 2645.0  $\pm$  85.2 ( $\mu$ g/ml), 대조군이 3774.0  $\pm$  76.4 ( $\mu$ g/ml), CsA 투여군이 3238.5  $\pm$  23.5 ( $\mu$ g/ml), GJHB 투여군이 3706.0  $\pm$  25.1 ( $\mu$ g/ml)로 나타났다(Table 6, Fig. 6).

Table 6. Effect of GJHB Extract on the Levels of IgG1 in the Serum of DNCB- induced NC/Nga Mice

	Normal	Control	CsA	GJHB
IgG1 (ug/ml)	2645.0 ± 85.2	3774.0 ± 76.4	3238.5 ± 23.5***	3706.0 ± 25.1

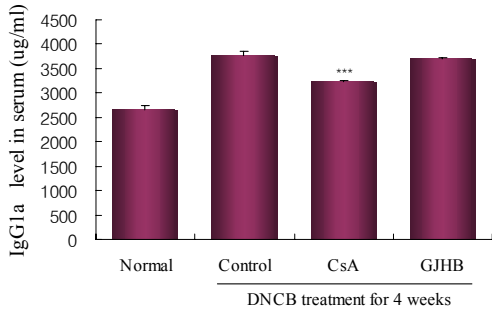


Fig. 6. Effect of GJHB extract on the levels of IgG1 in the serum of DNCB-induced NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgG1 were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001).

2) IgM 생성량에 미치는 영향

IgM 혈중 농도는 정상군이 647.0 ± 30.9 (ug/ml), 대조군이 929.5 ± 37.6 (ug/ml), CsA 투여군이 458.5 ± 56.5 (ug/ml), GJHB 투여군이 680.5 ± 12.8 (ug/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*\*p<0.001) 감소 효과를 나타내었다(Table 7, Fig. 7).

Table 7. Effect of GJHB Extract on the Levels of IgM in the Serum of DNCB- induced NC/Nga Mice

	Normal	Control	CsA	GJHB
IgM (ug/ml)	647.0 ± 30.9	929.5 ± 37.6	458.5 ± 56.5***	680.5 ± 12.8***

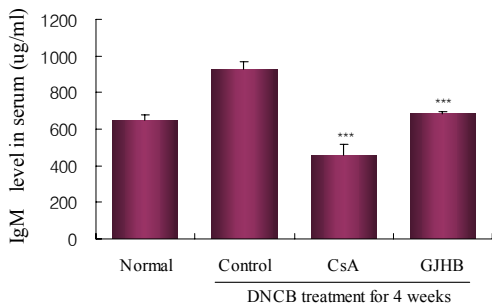


Fig. 7. Effect of GJHB extract on the levels of IgM in the serum of DNCB-induced NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgM were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001).

3) IgG2a 생성량에 미치는 영향

IgG2a 혈중 농도는 정상군이 1967 ± 55.9 (ug/ml), 대조군이 2694.5 ± 33.8 (ug/ml), CsA 투여군이 1473.0 ± 70.1 (ug/ml), GJHB 투여군이 2153.0 ± 36.7 (ug/ml)로 나타나, 대조군에 비하여

유의성 있는 (\*\*\*p<0.001) 감소 효과를 나타내었다(Table 8, Fig. 8).

Table 8. Effect of GJHB Extract on the Levels of IgG2a in the Serum of DNCB-induced NC/Nga Mice

	Normal	Control	CsA	GJHB
IgG2a (ug/ml)	1967.5 ± 55.9	2694.5 ± 33.8	1473.0 ± 70.1***	2153.0 ± 36.7***

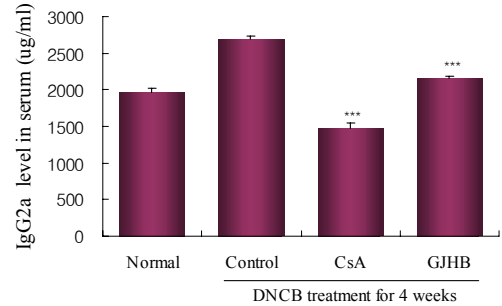


Fig. 8. Effect of GJHB extract on the levels of IgG2a in the serum of DNCB-induced NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgG2a were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001).

4) IgG2b 생성량에 미치는 영향

IgG2b 혈중 농도는 정상군이 6968.0 ± 46.1 (ug/ml), 대조군이 9284.5 ± 355.8 (ug/ml), CsA 투여군이 6191.5 ± 141.1 (ug/ml), GJHB 투여군이 6690.5 ± 501.6 (ug/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*p<0.01) 감소 효과를 나타내었다(Table 9, Fig. 9).

Table 9. Effect of GJHB Extract on the Levels of IgG2b in the Serum of DNCB- induced NC/Nga Mice

	Normal	Control	CsA	GJHB
IgG2b (ug/ml)	6968.0 ± 46.1	9284.5 ± 355.8	6191.5 ± 141.1***	7324.5 ± 287.6**

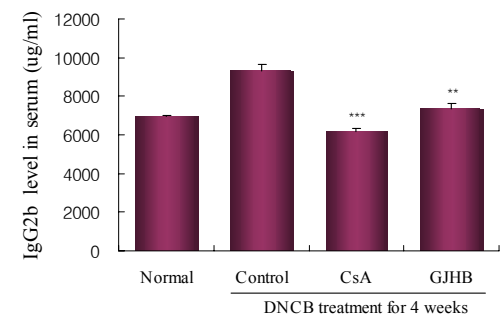


Fig. 9. Effect of GJHB extract on the levels of IgG2b in the serum of DNCB-induced NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgG2b were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001).

고찰

GJHB의 직접적인 임상 효과를 조사하기 위하여 먼저 실험

동물의 IgE의 발현을 측정하였다. 과민성 면역질환의 경우 IgE에 의해 매개되는 것으로 알려져 있어 NC/Nga 생쥐에 DNCB로 접촉성 피부염을 유발시킨 뒤 혈청을 분리하여 IgE 생성량을 측정하였다. 정상군에 비해 DNCB를 처리한 대조군에서 IgE 수치가 12주 이후 6배 이상 증가하였으며, 양성 대조군인 CsA와 GJHB 투여군에서는 대조군에 비해 IgE 생성량이 유의적으로 감소함으로써(Fig. 1), 치료 기전을 떠나 본 시료가 항알러지 작용이 있음을 입증해 주고 있다.

생체 면역 반응에는 수많은 면역세포와 염증세포, 각종 화학매개체들이 관여하며 이러한 아토피 피부염에 관여하는 주된 세포로는 T 림프구, B 림프구, 랑게르한스세포, 호산구 및 호중구 등이 있다<sup>21,22</sup>.

CD4+ T 세포는 활성화되었을 때 분비하는 사이토카인에 따라 Th1 세포와 Th2 세포로 분류된다. Th1 세포는 CCR5를 가지고 있으며, 주로 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ 를 분비하며, 지연형 과민반응을 매개하지만, Th2 세포는 CCR3, CCR4, CCR8를 가지고 있으며 IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13을 분비하여 즉시형과민반응, 체액성면역반응에 관여한다<sup>23-26</sup>. 이러한 Th1 세포와 Th2 세포는 상호길항작용을 통해 인체는 면역균형을 유지하게 된다<sup>24</sup>. IL-4는 주로 CD4+ 보조 T 림프구의 Th2 세포에 의해 생산되는 사이토카인으로 미감작 CD4+ 전구세포로부터 Th2 림프구의 분화를 유도하며, B 림프구에 의한 IgE 생산 자극, 그리고 IFN- $\gamma$  의존적 대식세포 기능을 억제시키는 작용을 한다<sup>27-29</sup>. 본 실험에서 비장세포 부유액내의 IL-4 생성량에 대한 검색에서는 정상군에 비해 CD3/CD28 항체로 활성화된 대조군에서는 IL-4 생성량이 증가하였으며, CsA와 GJHB 투여군에서는 대조군에 비해 IL-4 생성량이 감소함으로써(Table 2, Fig. 2), IL-4의 생성량 억제 효과를 나타내었다.

IFN- $\gamma$ 는 CD4+ 보조 T 림프구의 Th1 세포에 의해 생산되는 사이토카인으로 선천 면역반응과 세포매개 적응면역 반응 모두에서 대식세포를 활성화시키고, 지연형 면역반응을 매개한다<sup>30</sup>. 비장세포 부유액내의 IFN- $\gamma$  생성량에 대한 본 시료의 영향에서는 정상군에 비해 CD3/CD28 항체로 활성화시킨 대조군에서의 IFN- $\gamma$  생성량이 증가하였으며, CsA의 경우 대조군에 비해 약간 감소하였으나, GJHB 투여군에서는 대조군에 비해 더욱 증가하였다(Table 3, Fig. 3). 이같은 결과는 GJHB가 CsA와 달리 IFN- $\gamma$ 의 생성량을 증가시킴으로써 대식세포 등의 면역세포들을 활성화시켜 접촉성피부염을 조절한다는 것을 시사하고 있다.

IL-6는 활성화된 대식세포, 내피세포, 섬유아세포와 같은 여러 유형의 세포로부터 생산되는 사이토카인으로 선천 및 적응면역 모두에 작용하고, B 림프구의 성장에 관여하며 과민성 면역반응을 매개한다<sup>31</sup>. 혈청 내의 IL-6 생성량에 대한 실험에서는 정상군에 비해 DNCB로 접촉성피부염을 유발시킨 대조군의 혈청에서 IL-6 생성량이 증가하였으며, CsA와 GJHB 투여군에서는 대조군에 비해 IL-6 생성량이 감소함으로써(Table 4, Fig. 4), IL-6 생성량 억제 효과가 인정되었다.

TNF- $\alpha$ 는 대식세포에서 생성되며 감염 부위로 호중구 및 단핵구의 보충을 자극시키는 사이토카인으로 혈관 내피세포를 자극하여 새로운 부착 분자를 발현하게 하며, 표적세포의 세포자멸

사를 증진시킨다<sup>32</sup>. 혈청 내의 TNF- $\alpha$  생성량에 대한 실험에서는 정상군에 비해 DNCB로 접촉성피부염을 유발시킨 대조군의 혈청에서 TNF- $\alpha$  생성량이 증가하였으며, CsA와 GJHB 투여군에서 대조군에 비해 TNF- $\alpha$  생성량이 감소하였다(Table 5, Fig. 5). 결과적으로 본 시료인 GJHB가 IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  등의 사이토카인은 억제시키고, IFN- $\gamma$ 는 유도함으로써 실험적으로 기존의 이론에 부합되는 항알러지 작용이 인정되었다.

B 림프구는 혈액, 골수 및 비장, 임파절 등의 임파 조직에 분포하며, 체액성 면역반응에 관여한다<sup>33-35</sup>. 또한 B 림프구는 항체 생성의 전구 세포이며, Pre-B 림프구는 세포질 내에서 IgM을 합성하지만 세포밖으로 면역글로불린을 분비하지 않으며, 골수의 pre-B 림프구는 림프절과 비장으로 이동한 후 세포질의 일부가 없어지면서 pre-B 림프구 보다 크기가 작은 미성숙 B 림프구로 분화되고 대부분의 세포 표면에는 IgD가 표지자로 나타난다<sup>33</sup>. 미성숙 B 림프구 (Immature B cell)는 세포 표면에 보체 수용체와 IgG Fc 수용체로 확인할 수 있으며, 이 단계의 미성숙 B 림프구는 특이 항원에 노출된 후 성숙 B 림프구로 분화되며, 항원에 특이적인 항체를 형성하게 된다. 말초혈액에서 순환 림프구의 약 20-30%와 편도선과 비장의 림프구 중 약 50%는 B 림프구이다<sup>34</sup>.

면역 글로불린은 항원과 결합된 B 림프구에 의해 생산되는 높은 수준의 특이성과 친화력을 갖는 일종의 당단백질로 기본적인 구조 단위는 두 개의 동일한 중쇄와 두 개의 동일한 경쇄로 구성된다<sup>34</sup>. 모든 개체들은 수백만의 각기 다른 항체를 가지고 있는데, 이들 각각은 독특한 항원-결합 부위를 갖는다<sup>36</sup>. B 림프구는 합성 면역글로불린의 종류에 따라 IgM, IgG, IgA, IgD와 IgE로 분류할 수 있다. 면역 반응에서 1차 반응에 관여하는 항체는 IgM과 IgD으로 세포의 표면에 결합하여 작용하는 표면항체로서 작용하며, IgG, IgE, IgA는 분비항체로 작용한다<sup>37</sup>. 각각의 B 림프구는 주로 한가지 종류의 면역글로불린을 합성하지만 항원에 다시 노출되거나 Th 세포의 영향으로 IgM을 생성하던 B 림프구가 IgG나 IgE를 형성하는 B 세포로 바뀔 수 있다<sup>36,37</sup>.

면역글로불린에 대한 영향에서는 먼저 혈청 내의 IgG1 생성량은 정상군에 비해 DNCB로 접촉성 피부염을 유발시킨 대조군의 혈청에서 IgG1 생성량이 증가하였으며, CsA 투여군의 경우 대조군에 비해 IgG1 생성량이 감소하였으나, GJHB 투여군에서는 대조군에 비해 아무런 영향이 없었다(Table 6, Fig. 6).

이와는 달리 GJHB가 혈청 내의 IgM 생성량에 미치는 영향에서는 정상군에 비해 DNCB로 접촉성 피부염을 유발시킨 대조군의 혈청에서 IgM 생성량이 증가하였으며, CsA와 GJHB 투여군에서는 대조군에 비해 IgM의 생성량이 감소하였다(Table 7, Fig. 7). 혈청 내의 IgG2a와 IgG2b 생성량 역시 대조군에 비하여 CsA와 GJHB 투여군에서 대조군에 비해 IgG2a (Table 8, Fig. 8)와 IgG2b (Table 9, Fig. 9) 생성량이 감소하였다. 이상의 결과로 보아 본 시료인 GJHB가 과민성 면역반응을 매개하는 IgE 외에 IgM, IgG2a, IgG2b의 생성량을 억제함으로써, 접촉성피부염에 유의적인 작용을 발휘함을 알 수 있다. 아울러 상기한 바와 같이 과민성 면역반응에 의해 생성되는 사이토카인인 IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  등의 활성을 억제시킴으로써, 알러지 염증 반응에 유의적

인 작용이 있음을 확인할 수 있었다.

## 결 론

祛風燥濕解毒方을 시료로 DNCB로 接觸性皮膚炎을 유발시킨 NC/Nga 생쥐를 이용하여 IgE, 면역 관련 사이토카인 및 면역 글로블린 생성량에 미치는 영향을 검색하여 다음과 같은 결론을 얻었다.祛風燥濕解毒方은 대조군에 비하여 유의성 있게 IgE 생성량을 억제하였다.祛風燥濕解毒方은 대조군에 비하여 비장세포 부유액내 IL-4 생성량을 유의성 있게 감소시킨 반면 IFN- $\gamma$  생성량은 유의성 있게 증가시켰다.祛風燥濕解毒方은 대조군에 비하여 혈청 내의 IL-6와 TNF- $\alpha$  생성량을 유의성있게 감소시켰다.祛風燥濕解毒方은 대조군에 비하여 혈청내 IgM, IgG2a, IgG2b 농도를 유의성 있게 억제시켰으며, IgG1은 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다.

이상의 결과로祛風燥濕解毒方은 과민성 면역반응에서 나타나는 다양한 매개 인자의 생성을 억제함과 동시에 염증 유발 사이토카인을 억제시킴으로서, 면역 조절작용에 의한 接觸性皮膚炎에 대한 항알러지 효능이 인정된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국산업기술평가원에서 지원하는 지역협력연구센터인 대전대학교 난치성면역질환의 동서생명의학연구센터(TBRC, RRC04700, 2005)의 지원에 의해 수행되었음을 밝히며 이에 감사합니다.

## 참고문헌

1. Jung, T.H. Immunology lecture, Kyungbuk Univ. pp 256-302, 1993.
2. Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. Immunology, 4th edition, Mosby, England, chaptor 25, 1996.
3. 은희철. 피부면역학. 서울대학교출판부, pp 27-34, 1999.
4. Andrew, B., Sam, T.H., Mark, C.U. Allergic and immunologic disease of the skin. J. Allergy Clin. Immunol. 111: 560-570, 2003.
5. Champion, R.H., Burton, J.L., Burns, D.A., et al., eds. Textbook of Dermatology. 6th ed. Oxford: Blackwell Science, pp 277-336, 1998.
6. Scalf, L.A., Shenefelt, P.D. Contact dermatitis: diagnosing and treating skin conditions in the elderly. Geriatrics. 62(6):14-19, 2007.
7. Yokozeki, H. Contact dermatitis Nippon Rinsho. 63: 131-135, 2005.
8. Lee, D.J., Eichenfield, L.F. Atopic, contact, and seborrheic dermatitis in adolescents. Adolesc Med. 12(2):269-283, 2001.
9. Resendiz Gomez, F., Orea Solano, M. Immunological mechanisms in contact dermatitis Rev Alerg Mex.

- 51(3):116-118, 2004.
10. Tasaka, K. Antiallergic drugs. Drugs of Today, 22: 101-133, 1986.
11. Sakamoto, K., Nagai, H. and Koda, A. Role of hyaluronidase in immediate hypersensitivity reaction. Immunopharmacology 2: 139-146, 1980.
12. Kakegawa, H., Matsumoto, H. and Satoh, H. Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. Chem. Pharm. Bull. 33: 642-646, 1985.
13. 마소. 實用中醫皮膚病學. 上海中醫藥大學出版社, pp 8-37, 1997.
14. 王保方 외. 皮膚病中醫診療學. 人民衛生出版社, pp 11-28, 2000.
15. 中島一. 皮膚科의 韓方治療. 一中社, pp 27-34, 1991.
16. 范瑞强. 中西醫結合治療. 廣東人民出版社, pp 1-13, 202-204, 2005.
17. 吳軍 외. 中西醫結合皮膚性病手冊. 四川科學技術出版社, pp 254-255, 2007.
18. 万力生 외. 皮膚科中西醫結合診療技巧. 廣東科技出版社, pp 139-144, 2005.
19. 王元松 외. 皮膚科金方. 河北科學技術出版社, pp 1-17, 2003.
20. 전국한의과대학공동교재편찬위원회. 本草學. 永林社, p 225, 226, 362, 2007.
21. Kim, Y.R. Anti-allergic action of some crude drugs. PhD. Thesis, Chonnam National Univ. Korea 3: 123-129, 1992.
22. Hardy, R.R., Hayakawa, K. B cell development pathways. Annu Rev Immunol. 19: 595-621, 2001.
23. Corrigan, C.J., Hamid, Q., North, J., Barkans, J., Moqbel, R., Durhams, S., Gemou-Engesaeth, V., Kay, A.B. Peripheral Blood CD4 but not CD8 T-lymphocytes in patients with exacerbation of asthma transcribe and translate messenger RNA encoding cytokines which prolong eosinophil survival in the context of a Th2-type pattern. Effect of glucocorticoid therapy. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 12: 567, 1995.
24. Kasakura, S. A role for T-helper type 1 and 2 cytokines in the pathogenesis of various human diseases. Rinsho. Byori. 46: 915-921, 1998.
25. White, J.R., Imburgia, C., Dul, E., Appelbaum, E., O'Donnell, K., O'Shannessy, D.J., Brawner, M., Fornwald, J., Adamou, J., Elshourbagy, N.A., Kaiser, K., Foley, J.J., Schmidt, D.B., Johanson, K., Macphee, C., Moores, K., McNulty, D., Scott, G.F., Schleimer, R.P., Sarau, H.M. Cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine that binds to the CCR3 receptor and activates human eosinophils. J Leukoc Biol. 62: 667-675, 1997.
26. Erin, E.M., Williams, T.J., Barnes, P.J., Hansel, T.T. Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 1: 201-214, 2002.
27. Lebec, H., Kerdine, S., Gaspard, I., Pallardy, M. Principal cellular and molecular mechanisms of xenobiotic-induced

- hypersensitivity reactions *Ann Pharm Fr.* 57(6):429-434, 1999.
28. Akdis, C.A., Akdis, M., Simon, H.U., Blaser, K. Regulation of allergic inflammation by skin-homing T cells in allergic eczema. *Int Arch Allergy Immunol.* 118(2-4):140-144, 1999.
29. Maurer, D., Stingl, G. Immune mechanisms of atopic dermatitis *Wien Klin Wochenschr.* 105(22):635-640, 1993.
30. Romagnani, S. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol.* 98(4):279-285, 1992.
31. Corsini, E., Galli, C.L. Cytokines and irritant contact dermatitis. *Toxicol Lett.* 28: 102-103, 277-282, 1998.
32. Sebastiani, S., Albanesi, C., De, P.O., Puddu, P., Cavani, A., Girolomoni, G. The role of chemokines in allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 293(11):552-559, 2002.
33. Gilliam, A.C., Wood, G.S. Cutaneous lymphoid hyperplasias. *Semin Cutan Med Surg.* 19(2):133-141, 2000.
34. Asherson, G.L. B-cell depression of delayed and contact hypersensitivity. *Agents Actions Suppl.* 7: 143-147, 1980.
35. Turk, J.L., Katz, S.I. Dermatological allergy. *Clin Allergy.* 3: 619-628, 1973.
36. Dorshkind, K., Narayanan, R., Landreth, K.S. Regulatory cells and cytokines involved in primary B lymphocyte production. *Adv Exp Med Biol.* 323: 119-123, 1992.
37. Sancho, D., Gomez, M., Sanchez-Madrid, F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 26: 136-140, 2005.