

한방 입욕제 조성물이 MC/9 mast cell에서의 Th2 cytokine 발현에 미치는 영향

장문희^{**†} · 최재송^{**†} · 최애련^{**} · 안택원^{**†}

대전대학교 한의과대학 사상체질외학과^{*}
대구한의대학교 한의과대학 사상체질외학과^{**}
대전대학교 온천의학연구[†]

Abstract

Effects of Korean Herbal Bathing Extracts Composition on Th2 Cytokine Production in MC/9 Mast Cells

Moon-Hee Jang^{**†}, Jae-Song Choi^{**†}, Ae-Ryun Choi^{**}, and Taek-Won Ahn^{**†}

^{*}Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College Oriental Medicine, Daejeon Univ.

^{**}Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College Oriental Medicine, Daegu Haany Univ.

[†]Hot Spring Medicine Laboratory, College Oriental Medicine, Daejeon Univ.

Objectives

The purpose of this study is to investigate the effects of korean herbal bathing extracts composition 1 and composition 2 on Th2 cytokine production in MC/9 mast cells.

Methods

The effects of composition 1, 2 was analyzed by ELISA and Real-time PCR in MC/9 mast cells. Levels of IL-5, IL-13 were measured using enzyme-linked immunosorbent assays(ELISA). mRNA levels of IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 were analyzed with Real-time PCR.

Results

Composition 1, 2 inhibited the IL-5, IL-13 production significantly(p<.001) in comparison to PI-control group at concentration of 100 μ g/mL, 200 μ g/mL. Composition 1, 2 inhibited the IL-4, IL-5, IL-13 mRNA expression significantly in comparison to PI-control group at concentration of 100 μ g/mL, 200 μ g/mL. Composition 1 inhibited the IL-6 mRNA expression significantly in comparison to PI-control group at concentration of 200 μ g/ml. Composition 2 inhibited the IL-6 mRNA expression significantly in comparison to PI-control group at concentration of 100 μ g/mL, 200 μ g/mL.

Conclusions

These results indicate that composition 1, 2 has the effect of decreasing the Th2 cytokine production in the MC/9 mast cell.

Key Words: Korean Herbal Bathing Extracts Composition, Cytokine, MC/9 Mast Cell, Atopic Dermatitis.

Received August 7, 2012 Revised August 11, 2012 Accepted September 17, 2012

Corresponding Author Taek-Won Ahn

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, Dae-jeon Univ Cheonan Oriental Medical Center,
Dujeong-dong 621, Seobuk-gu, Cheonan-si, Chungcheongnam-do, Korea.
Tel : +82-41-521-7535 Fax : +82-41-521-7007 E-mail : twahn@dju.kr

© The Society of Sasang Constitutional Medicine.
All rights reserved. This is an open access article
distributed under the terms of the Creative
Commons attribution Non-commercial License
(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/)

I. 緒論

아토피 피부염은 피부 건조증, 소양감을 주소로 하는 대표적인 알레르기성 질환으로 환경적인 요소와 유전적인 소인이 모두 관여하는 복합적인 질환으로 알려져 있다¹. 주로 유, 소아의 유병율이 높다고 알려져 있으며 최근 성인에게도 꾸준히 증가하여 많은 사람이 아토피 피부염으로 고통을 받고 있다².

아토피 피부염의 발병 기전은 면역학적 측면에서 mast cell, T세포 등과 같은 세포들과 cytokine, immunoglobulin 등과 같은 인자들이 관련 되어 있다고 알려져 있으며 Th2 매개 cytokine 간의 불균형, IgE 증가, mast cell의 증가나 활성화 등이 기전으로 알려져 있다³.

현재까지 알려진 아토피 피부염에 대한 치료 방법은 스테로이드제나 항히스타민제의 도포나 복용, 면역억제제가 사용되고 있으나 이는 증상을 완화하고 피부의 염증을 가라 앉히는 '대증요법'의 역할을 수행하며 장기간 사용시 부작용과 역시 값의 상승을 일으키고 있다^{4,5}. 이에 아토피 피부염 치료에 대한 보조요법으로서 입욕 요법이 하나의 대안으로 여러 입욕 제품이 개발되었으며 다양한 한약재를 가감한 연구가 현재 활발히 진행되고 있다^{6,7}.

한방 입욕제란 여러 가지 자연 식물에서 추출한 한방성분을 주성분으로 하는 입욕제를 말한다. 예로부터 사람들은 쑥, 창포, 녹차, 어성초 등의 한약재를 사용하는 목욕을 즐겼으며 이러한 약물 목욕이 질병 예방과 치료효과를 얻는 장수 건강법으로 알려져 왔다. 이에 입욕제는 단순히 감각, 운동 후의 피로 회복만을 위한 것이 아니라기보다는 의학적, 약리적으로도 효과가 인정되며 온열 효과 및 각종 치료를 보조하는 제품에 이용되고 있다⁸⁻¹⁰.

『東醫壽世保元』¹¹에서 아토피 피부염에 관하여 직접 언급한 부분은 찾아 볼 수 없으며 한의학에서 아토피 피부염은 화열이 치성하여 발생하는 일종의 급성 열성 피부질환으로 정의할 수 있다¹².

각종 피부 질환에 효능이 있다^{13,14}고 알려진 약재

중 少陰人 要藥에 속하는 당귀, 고령피, 작약, 백출, 인삼, 인진, 소목, 울금, 황기와 少陽人 要藥에 속하는 금은화, 삼백초, 박하, 어성초, 산두근, 고삼, 목단피, 조구등, 우방자와 太陰人 要藥에 속하는 창이자, 백선피, 석창포, 상백피, 포공영, 비파엽, 산약 25가지의 입욕제 한약추출물을 선정하여 MC/9 mast cell을 이용하여 세포 독성 및 IL-5, IL-13 단백질 생성을 조절할 수 있는지를 분석하여 25가지의 입욕제 한약추출물 중 IL-5, IL-13 단백질 생성량을 대조군에 비하여 유의성 있게 억제 시킨 당귀, 황기, 산약, 비파엽, 포공영을 입욕제 조성물로 선정하여 각각 20%의 비율로 조합한 조성물 1번과 각각 10%, 10%, 10%, 35%, 35%의 비율로 조합한 조성물 2번으로 IL-5, IL-13 단백질 생성 및 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 mRNA 유전자 발현을 조절할 수 있는지 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 재료

1) 세포 배양 및 약물

(1) 세포배양

본 실험에 사용된 MC/9 murine mast cell(ATCC, USA)을 10% fetal bovine serum, 10% T-stim(BD Biosciences, USA), 0.05mM 2-mercaptoethanol and 2mM L-glutamine(Sigma-Aldrich, USA) 및 100 µg/ml streptomycin(Gibco, USA)이 함유된 DMEM 배지에 부유시켜 37°C, 5% CO₂, 95% 대기에서 배양하였다. 세포는 주 2~3회씩 계대 배양하였다.

(2) 입욕제 조성물 후보 약물

본 실험에서 사용한 한약재는 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입 정선하여 사용하였다(Table 1).

Table 1. Korean Herbal Bathing Extracts

	Herb	Scientific Name
1	금은화	<i>Lonicera japonica</i> Thunberg
2	창이자	<i>Xanthium strumarium</i> Linne
3	당귀	<i>Angelica gigas</i> Nakai
4	삼백초	<i>Saururus chinensis</i> Baill
5	박하	<i>Mentha arvensis</i> Linne var
6	어성초	<i>Houttuynia cordata</i> Thunberg
7	산두근	<i>Sopbora tonkinensis</i> Gapnep
8	고련피	<i>Melia azedarach</i> Linne var
9	작약	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas
10	고삼	<i>Sopbora flavescens</i> Aiton
11	백선피	<i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz
12	목단피	<i>Paeonia suffruticosa</i> Andrews
13	석창포	<i>Acoris gramineus</i> Solander
14	백출	<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi
15	상백피	<i>Morus alba</i> Linne
16	인삼	<i>Panax schinseng</i> C. A. Meyer
17	포공영	<i>Taraxacum platycarpum</i> H. Dahlstedt
18	인진	<i>Artemisia capillaris</i> Thunberg
19	비파엽	<i>Eriobotrya japonica</i> Lindley
20	조구등	<i>Uncaria sinensis</i> (Oli.) Havil
21	우방자	<i>Arctium lappa</i> Linne
22	소목	<i>Caesalpinia sappan</i> Linne
23	울금	<i>Curcuma longa</i> Linne
24	황기	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge
25	산약	<i>Dioscorea batatas</i> Decaisne

(3) 입욕제 조성물 추출물 분리 및 조합

입욕제 조성물인 당귀, 황기, 산약, 포공영, 비파엽을 각각 100g씩 증류수 1,300 mL를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 각각의 입욕제 추출물을 냉동 보관 (-84°C)하면서 당귀, 황기, 산약, 포공영, 비파엽을 각각 20%의 비율로 조합하여 1번 조성물, 각각 10%, 10%, 10%, 35%, 35%의 비율로 조합하여 2번 조성물이라 하였다(Table 2).

Table 2. Korean Herbal Bathing Extracts Composition

Herb	Scientific Name	composition 1	composition 2
		Rate (%)	Rate (%)
당귀	<i>Angelica gigas</i> Nakai	20	10
황기	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	20	10
산약	<i>Dioscorea batatas</i> Decaisne	20	10
포공영	<i>Taraxacum platycarpum</i> H. Dahlstedt	20	35
비파엽	<i>Eriobotrya japonica</i> Lindley	20	35

2) 시약 및 기기

(1) 시약

Dulbecco's Minimal essential medium(DMEM), Fetal bovine serum(FBS), Trypsin-EDTA, Antibiotics(penicillin, streptomycin)는 Gibco-BRL(USA) 제품을 사용하였고, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(D-PBS), Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), Ionomycin, Phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), Diethyl pyrocarbonate(DEPC), Chloroform, Isopropanol, Ethanol, magnesium chloride(MgCl₂), 2-mercaptoethanol는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였다. Trizol은 Ambion사(USA) 제품을, EZ-Cytox kit는 Daeil Lab. co.(Korea) 제품을, Deoxynucleoside triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(USA) 제품을 사용하였다. SYBR master mix는 Applied Biosystems사(USA) 제품을 사용하였으며, IL-5 ELISA kit는 BD bioscience사(USA) 제품을, IL-13 ELISA kit는 Biosource사(USA) 제품을 사용하였고, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

(2) 기기

기기는 열탕추출기 DWT-1800T(대웅, Korea), 감압 증류장치 B-480(Buchi Labortechnik AG, Switzerland), 동결 건조기 EYELA FDU-540(Tokyo, Japan), CO₂ 배양기(Forma scientific Co., USA), 원심분리기(한일과학, Korea), plate shaker(Lab-Line, USA), spectrophotometer(Shimadzu, Japan), Bio-freezer(Sanyo, Japan), Quantitative

Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA), ELISA leader(Molecular Devices, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 세포독성 측정

세포독성방법은 EZ-Cytox assay¹⁵법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. MC9 mast cell은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후 25가지의 한약 추출물(최종 농도 50, 100, 200, 400 µg/mL)을 48 시간 동안 처리하였다. 배양종료 6시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 µL씩 각 well에 가하고 실험 종료 시까지 배양하였다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA LEADER에서 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) ELISA 측정

(1) 25가지 입욕제 한약 추출물 ELISA 측정

MC9 mast cell을 48-well plate에 4×10^5 /mL로 250 µL씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 무처리한 군은 정상군(Normal)으로 사용하였으며, PMA(50 ng/mL)와 Ionomycin(0.5 µM)만으로 자극한 군은 대조군(PI-control)으로 사용하였다. 배양 후 25가지의 한약 추출물(50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL)로 각 well에 처리하고 1시간 후에 PMA(50 ng/mL)와 Ionomycin(0.5 µM)으로 자극한 뒤 16시간 후에 상층액을 얻어 실험군으로 사용하였다.

Mouse IL-5와 IL-13 ELISA kit 를 사용하여 제조사의 지시에 따라 코팅 antibody를 microwell에 100 µL씩 분주하고 4°C에서 16시간 두었다. 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200 µL씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상층액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상층액을 100 µL씩 넣었다. 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 µL씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서

배양하였다. microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100 µL씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. stop solution을 각 well에 50 µL씩 넣고 Microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 측정하였다.

(2) 입욕제 조성물의 비율에 따른 ELISA 측정

MC9 mast cell을 48-well plate에 4×10^5 /mL로 250 µL씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 무처리한 군은 정상군(Normal)으로 사용하였으며, PMA(50 ng/mL)와 Ionomycin(0.5 µM)만으로 자극한 군은 대조군(PI-control)으로 사용하였다. 배양 후 Cyclosporin A(이하 CsA, 10 µg/mL)와 입욕제 조성물 1번(100 µg/mL, 200 µg/mL)과 입욕제 조성물 2번(100 µg/mL, 200 µg/mL)로 각 well에 처리하고 1시간 후에 PMA(50 ng/mL)와 Ionomycin(0.5 µM)으로 자극한 뒤 16시간 후에 상층액을 얻어 각각 양성대조군과 실험군으로 사용하였다.

Mouse IL-5와 IL-13 ELISA kit 를 사용하여 제조사의 지시에 따라 코팅 antibody를 microwell에 100 µL씩 분주하고 4°C에서 16시간 두었다. 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200 µL씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상층액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상층액을 100 µL씩 넣었다. 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 µL씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100 µL씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. stop solution을 각 well에 50 µL씩 넣고 Microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 측정하였다.

3) Real-time PCR

(1) RNA 추출

MC9 mast cell을 6-well plate에 2.5×10^5 /mL로 2 mL씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 무처리한 군은

정상군(Normal)으로 사용하였으며, PMA(50 ng/mL)와 Ionomycin(0.5 μ M)만으로 자극한 군은 대조군(PI-control)으로 사용하였다. 배양 후 Cyclosporin A(10 μ g/mL)와 입욕제 조성물 1번(100 μ g/mL, 200 μ g/mL)과 입욕제 조성물 2번(100 μ g/mL, 200 μ g/mL)로 각 well에 처리하고 1시간 후에 PMA(50 ng/mL)와 Ionomycin(0.5 μ M)으로 자극한 뒤 6시간 후에 세포를 얻어 각각 양성대조군과 실험군으로 사용하였다.

세포에 Trizol 시약을 1 mL넣고 eptube에 넣은 후 클로로포름을 100 μ L 넣었다. 얼음에 17분 동안 두고 13000 rpm으로 15분 동안 원심분리 한다. 층이 분리되면 eptube에 상층액을 옮겨 담고, 동량으로 이소프로판올을 넣어 얼음에 10분 정도 두었다가 13000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 80% 에탄올로 세척하고 13000 rpm으로 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 완전히 제거하고 투명해질 때까지 말린 후 DEPC water로 cell의 양에 따라 20~30 μ L 넣어 녹였다.

(2) RT-PCR

역전사 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μ L 10 mM dNTPs mix, 1 μ L random sequence hexanucleotides(25 pmole/25 μ L), RNA inhibitor로서 1 μ L RNase inhibitor(20 U/ μ L), 1 μ L 100 mM DTT, 4.5 μ L 5 \times RT buffe(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ L의 M-MLV RT(200 U/ μ L)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ L가 되도록 하였다. 이 20 μ L의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction에 사용하였다.

(3) cDNA PCR

Real time quantitative RT-PCR은 Applied Biosystems

7500 Fast Real-Time PCR system를 이용하여 수행하였다. 사용된 primers는 아래와 같다(Table 3).

유전자 발현은 Taqman PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard를 G3PDH를 사용하였으며, primer의 최종 농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 2 min at 50 $^{\circ}$ C, 10 min 94 $^{\circ}$ C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95 $^{\circ}$ C, 1 min at 60 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. Target group의 RQ는 Quantitative PCR로 아래와 같이 측정하였다.

$y = x(1+e)^n$, $x =$ starting quantity, $y =$ yield, $n =$ number of cycles, $e =$ efficiency

Real time PCR은 ELISA 결과에 대한 확인 실험 차원에서 시행한 것으로 1회의 실험을 통하여 확인하였다.

Table 3. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
*IL-5	Forward	5'-AGCCTAACCCCTGTTGGAGGT-3'
	Reverse	5'-GTGATCGGCTTTTCTTGAGC-3'
IL-13	Forward	5'-GAAGAATGGCCTGTACACTCA-3'
	Reverse	5'-TTTCCGGTTTCTAGTTTGACAG-3'

*IL: interleukin

4) 통계처리

각 실험군 결과 값은 unpaired student's t-test 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, $p < 0.05$ 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다(*** : $p < 0.001$).

III. 結果

1. 세포독성

입욕제 한약추출물의 MC/9 mast cell 세포독성을 측정된 결과 울금이 200 μ g/mL에서 400 μ g/mL까지의 농도에서 세포 독성이 나타났으며 소목이 50 μ g/mL에서 400 μ g/mL까지의 모든 농도에서 세포 독성이 나타

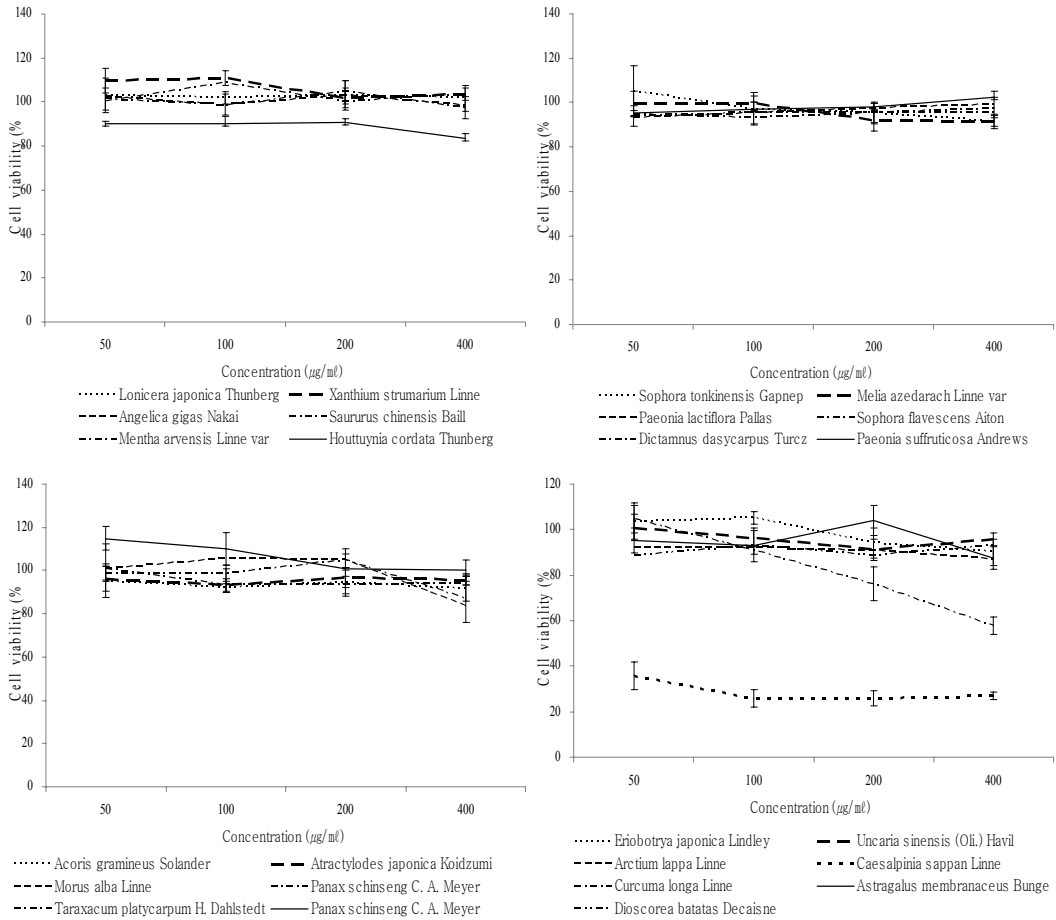


Fig. 1. Cytotoxicity effects of Korean herbal bathing extracts in MC/9 mast cells. MC/9 mast cells were pretreated with various concentration Korean herbal bathing extracts. The results represent the mean±S.E.

났다. 다른 23가지의 한약추출물에서는 세포 독성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 1).

2. ELISA analysis

1) 25가지 입욕제 한약추출물의 IL-5, IL-13 단백질 생성

IL-5, IL-13 단백질 생성량은 25가지 입욕제 한약추출물 중 당귀, 황기, 산약, 포공영, 비파엽에서 대조군에 비하여 유의성 있게 억제 하였다(Fig. 2).

2) 입욕제 조성물의 비율에 따른 IL-5, IL-13 단백질 생성

IL-5 단백질 생성량은 정상군은 105±1.8 (pg/mL)이며 대조군은 1947±42.4 (pg/mL)으로 증가하였으며 양성대조군은 121±10.3 (pg/mL)으로 대조군에 비하여 유의성있게 (p<.001) 억제하였다.

실험군인 입욕제 조성물 1번은 100 µg/mL 농도에서 876±142.8 (pg/mL), 200 µg/mL 농도에서 683±173.3 (pg/mL)으로 대조군에 비하여 유의성있게 (p<.001) 억제 하였다. 입욕제 조성물 2번은 100 µg/mL 농도에서

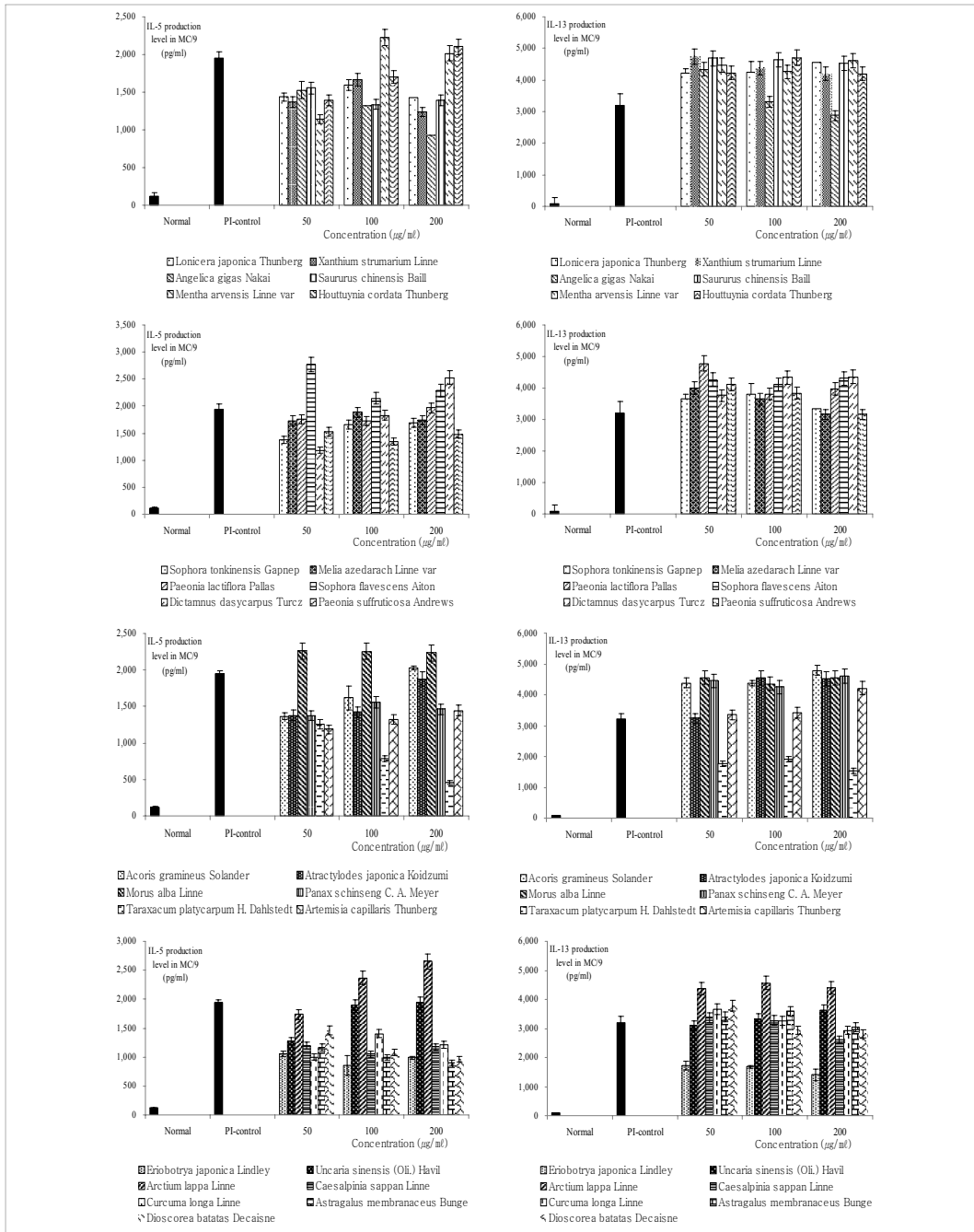


Fig. 2. Effects of Korean herbal bathing extracts on IL-5, IL-13 production. MC/9 mast cells were pretreated with Korean herbal bathing extracts (50, 100, 200 µg/ml), and then stimulated with PI. IL-5, IL-13 production levels were measured by ELISA. The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with PI-control group.

* Normal : MC/9 mast cell with no treatment

† PI-control : MC/9 mast cell with PMA(50 ng/ml), Ionomycin(0.5 µM)

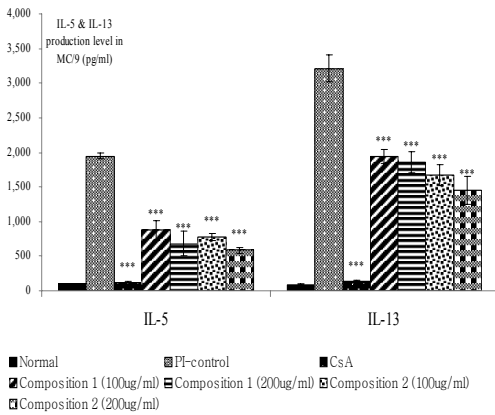


Fig. 3. Effects of korean herbal bathing extracts composition on IL-5, IL-13 production. MC/9 mast cells were pretreated with CsA(10 μ g/mL) or korean herbal bathing extracts composition 1, 2(100, 200 μ g/mL), and then stimulated with PI. IL-5, IL-13 production levels were measured by ELISA. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with PI-control group by student's t-test(*** : $p < .001$).
 * Normal : MC/9 mast cell with no treatment
 † PI-control : MC/9 mast cell with PMA(50 ng/mL), Ionomycin(0.5 μ M)
 ‡ PI-CsA : MC/9 mast cell with Cyclosporin A(10 μ g/mL)

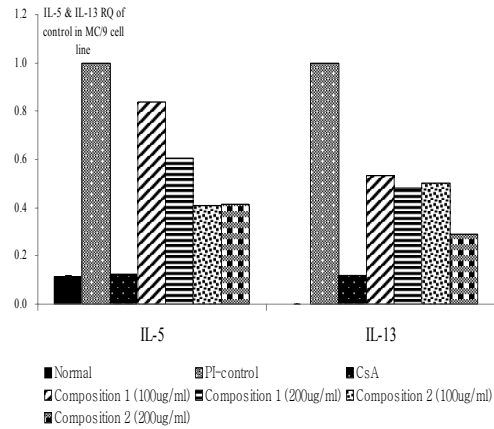


Fig. 4. Effects of korean herbal bathing extracts composition on IL-5, IL-13 mRNA expression. MC/9 mast cells were pretreated with CsA(10 μ g/mL) or korean herbal bathing extracts composition 1, 2(100, 200 μ g/mL), and then stimulated with PI. IL-5, IL-13 mRNA expression was analyzed by Real-time PCR. Statistically significant value was calculated by compared with PI-control group.
 * Normal : MC/9 mast cell with no treatment
 † PI-control : MC/9 mast cell with PMA(50 ng/mL), Ionomycin(0.5 μ M)
 ‡ PI-CsA : MC/9 mast cell with Cyclosporin A(10 μ g/mL)

774 \pm 50.9 (pg/mL), 200 μ g/mL 농도에서 585 \pm 43.5 (pg/mL)으로 대조군에 비하여 유의성있게 ($p < .001$) 억제하였다.

IL-13 단백질 생성량은 정상군은 90.3 \pm 6.79 (pg/mL)이며 대조군은 3211 \pm 194.0 (pg/mL)으로 증가하였으며 양성대조군은 137.8 \pm 6.0 (pg/mL)으로 대조군에 비하여 유의성있게 ($p < .001$) 억제하였다.

실험군인 입욕제 조성물 1번은 100 μ g/mL 농도에서 1938 \pm 103.9 (pg/mL), 200 μ g/mL 농도에서 1857 \pm 157.7 (pg/mL)으로 대조군에 비하여 유의성있게 ($p < .001$) 억제하였다. 입욕제 조성물 2번은 100 μ g/mL 농도에서 1674 \pm 156.9 (pg/mL), 200 μ g/mL 농도에서 1449 \pm 197.0 (pg/mL)으로 대조군에 비하여 유의성있게 ($p < .001$) 억제하였다.

IL-5, IL-13 단백질 생성량은 입욕제 조성물 1번, 2번 모두 모든 농도에서 대조군에 비하여 유의성있게

($p < .001$) 억제하였다(Fig. 3).

3. Real-time PCR analysis

1) 입욕제 조성물의 비율에 따른 IL-5, IL-13 mRNA 유전자 발현

IL-5 mRNA 유전자 발현은 정상군이 0.113이며 대조군이 1일 때 양성대조군은 0.123으로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제 하였다.

실험군인 입욕제 조성물 1번은 100 μ g/mL 농도에서 0.836, 200 μ g/mL 농도에서 0.604으로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제 하였다. 입욕제 조성물 2번은 100 μ g/mL 농도에서 0.409, 200 μ g/mL 농도에서 0.413으로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제 하였다.

IL-13 mRNA 유전자 발현은 정상군이 0.0012이며

대조군이 1일 때 양성대조군은 0.118으로 대조군에 비하여 유의성있게 억제하였다.

실험군인 입욕제 조성물 1번은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 0.531, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 0.479으로 대조군에 비하여 유의성있게 억제하였다. 입욕제 조성물 2번은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 0.504, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 0.291으로 대조군에 비하여 유의성있게 억제하였다.

IL-5, IL-13 mRNA 유전자 발현은 입욕제 조성물 1번, 2번 모두 모든 농도에서 대조군에 비하여 유의성있게 억제하였다(Fig. 4).

2) 입욕제 조성물의 비율에 따른 IL-4, IL-6 mRNA 유전자 발현

IL-4 mRNA 유전자 발현은 정상군이 0.001이며 대조군이 1일 때 양성대조군은 0.021으로 대조군에 비하여 유의성있게 억제하였다.

실험군인 입욕제 조성물 1번은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 0.896, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 0.797으로 대조군에 비하여 유의성있게 억제하였다. 입욕제 조성물 2번은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 0.471, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 0.456으로 대조군에 비하여 유의성있게 억제하였다.

IL-6 mRNA 유전자 발현은 정상군이 0.028이며 대조군이 1일 때 양성대조군은 0.358으로 대조군에 비하여 유의성있게 억제하였다.

실험군인 입욕제 조성물 1번은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 1.265으로 상승되었으며, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 0.805으로 대조군에 비하여 유의성있게 억제하였다. 입욕제 조성물 2번은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 0.688, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 0.474으로 대조군에 비하여 유의성있게 억제하였다.

IL-4, IL-6 mRNA 유전자 발현은 입욕제 조성물 1번은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 대조군에 비하여 유의성있게 억제하였고, 입욕제 조성물 2번은 모든 농도에서 대조군에 비하여 유의성있게 억제하였다(Fig. 5).

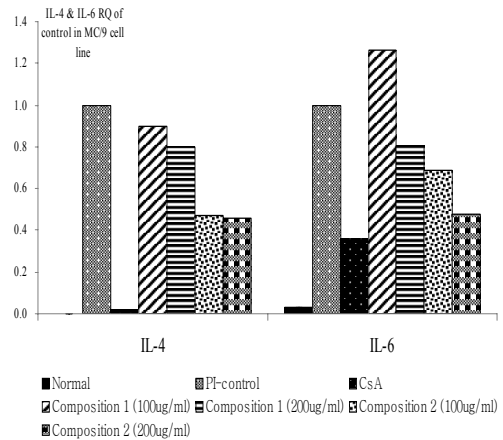


Fig. 5. Effects of Korean herbal bathing extracts composition on IL-4, IL-6 mRNA expression. MC/9 mast cells were pretreated with CsA(10 $\mu\text{g/mL}$) or Korean herbal bathing extracts composition 1, 2(100, 200 $\mu\text{g/mL}$), and then stimulated with PI. IL-4, IL-6 mRNA expression was analyzed by Real-time PCR. Statistically significant value was calculated by compared with PI-control group.

* Normal : MC/9 mast cell with no treatment
 † PI-control : MC/9 mast cell with PMA(50 ng/mL), Ionomycin(0.5 μM)
 ‡ PI-CsA : MC/9 mast cell with Cyclosporin A(10 $\mu\text{g/mL}$)

IV. 考察

아토피 피부염은 주로 유아기 혹은 소아기에 시작되는 만성적이고 재발성의 염증성 피부질환으로 소양증, 피부건조증, 특징적인 습진을 동반한다¹⁶. 주로 어린이에게서 10~30%의 유병률을 보이며 어른에게서는 1~3%의 유병률을 보인다고 알려져 있으며, 최근 생활양식의 변화, 산업의 급속한 발달 및 정신적 스트레스 등의 증가로 인하여 아토피 피부염의 발생률이 증가하고 있다고 한다^{2,17}.

한의학에서 아토피 피부염은 胎熱, 奶癬, 胎癬, 浸淫瘡 등과 증상 면에서 가장 유사하며 風熱, 濕熱, 血虛生風, 脾胃氣虛 등이 주요 병인이 된다¹². 『東醫壽世保元』¹¹에서 아토피 피부염에 관하여 직접 언

급한 부분은 찾아 볼 수 없지만 각 체질별로 분류 하였을 때 少陰人 腎受熱表熱病論, 少陽人 胃受熱裏熱病論, 太陰人 肝受熱裏熱病論 등에서 유사 증상들을 찾아 볼 수 있다.

少陰人 腎受熱表熱病證은 소음인의 腎大脾小한 특징으로 신국에서 비국으로 상승해야 될 陽氣가 과도해진 水穀寒氣로 인하여 올라가지 못하고 방광에 울축되어 외부로 열증이 발현되는 것을 말하며 鬱狂證과 亡陽證으로 나누어 볼 수 있다. 鬱狂證은 표에 邪氣가 울체하여 正氣가 邪氣에 대항하는 상태로 대표적인 증상으로는 열이 나고 땀이 나며 감모 증상이나 염증성 질환과 비슷한 열적 증상들을 볼 수 있다¹¹. 『東醫壽世保元』¹¹에서의 鬱狂證의 처방은 川芎桂枝湯, 芎歸香蘇散, 八物君子湯 등을 복용하여 울축된 것을 화해하여 升陽益氣하여 陽煖之氣를 발휘하도록 하여 保命之主를 유지하도록 하는 것에 있다¹¹.

少陽人 胃受熱裏熱病證은 소양인의 脾大腎小한 특징으로 大腸氣의 작용이 약해서 胃의 열기를 몰아내지 못하여 胃熱이 과도해지는 열증을 말하며 胸膈熱證, 消渴의 上消, 中消, 下消, 陰虛午熱證으로 나누어 볼 수 있다. 胸膈熱證의 대표적인 증상으로는 가슴이 답답하고 불편하며, 변비가 발생하고 입이 마르며 얼굴이 붉어지며 열이 나는 등의 열적 증상들을 대표적으로 볼 수 있다¹¹. 『東醫壽世保元』¹¹에서의 胸膈熱證의 처방은 地黃白虎湯, 陽毒白虎湯 등을 복용하여 胃熱을 해소하여 陰清之氣를 발휘하도록 하여 保命之主를 유지하도록 하는 것에 있다¹¹.

太陰人 肝受熱裏熱病證은 太陰人의 肝大脾小한 특징으로 氣液의 吸聚之氣가 왕성하여 안으로 모으는 기운이 많아 제대로 나가지 못하고 내부에 울체됨으로써 생기는 열증을 말하며 瘡瘍腫毒 성향으로 나타나는 陽毒燥澁證, 肝熱로 인한 肺燥의 현상이 본격화되는 肝燥熱證, 말기적 병증에 해당하는 陰血耗竭으로 나누어 볼 수 있다. 陽毒證의 대표적인 증상으로는 얼굴에 비단에 놓아진 무늬처럼 붉

은 반점들이 생기거나, 얼굴이 불그레하고 눈이 충혈되며, 전신에 반점이 생기는 등의 열적 증상들을 볼 수 있다¹¹. 『東醫壽世保元』¹¹에서의 陽毒證의 처방은 葛根解肌湯 등을 복용하여 肝熱을 해소하여 氣液의 과도한 吸聚之氣를 풀어 呼散之氣를 발휘하도록 하여 保命之主를 유지하도록 하는 것에 있다¹¹.

이처럼 사상의학에서 약물의 외용약으로써의 사용에 대해서는 소음인의 瘡 질환에 파두고를 붙이거나¹⁸, 소양인의 蛇頭瘡에 복어알 가루를 고약 위에 놓고 붙이거나¹¹, 태음인의 眼 질환에 명목산을 점안하는¹⁸ 등 외에는 쉽게 찾아 볼 수가 없으며 현재 외용약으로의 사용이 미미한 실정이다. 따라서 질병 치료에 있어서 외용약의 사용이 체질별 保命之主를 유지하는 것에 도움을 줄 수 있는 것인가에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

아토피 피부염의 발병 기전은 면역학적 측면에서 T세포가 항체 형성에 관여하고 아토피 피부염 병변에 helper T세포가 주로 침윤 되며 helper T세포는 발현되는 cytokine에 따라 Th1과 Th2로 분화된다. 급성기 아토피 피부염에서는 Th2 세포가 우세하게 나타나며 Th2 세포는 IL-5, IL-13과 같은 cytokine을 분비하게 되고 이 cytokine 들은 B 세포의 isotype switching을 유도하여 IgE 합성을 증가시키고 면역 세포를 피부로 끌어오는 역할을 한다. 또한 mast cell 표면에 있는 고친화성 IgE 수용체에 과발현된 IgE가 결합하여 감각된 상태가 되고 그 상태에서 다시 항원에 노출되게 되면 mast cell을 활성화시켜 히스타민, 류코트리엔 등의 화학전달물질과 cytokine 등을 분비하여 과민반응을 유발하게 된다¹⁹⁻²¹. Mast cell에서 생산되는 cytokine 들은 계속해서 Th2 면역 반응을 확장하고 IgE의 생산을 증가시킴으로서 만성 알레르기 반응에 기여를 한다. 따라서 mast cell이 발현하는 cytokine을 조절할 수 있다면 알레르기 반응을 경감시킬 수 있다²².

이러한 발병 기전을 가진 아토피 피부염에 대해 현재까지 알려진 치료 방법은 스테로이드제나 항히스타민제의 도포나 복용, 면역 억제제가 광범위하게 사용되고 있다. 하지만 스테로이드제는 급성 부신기능

부전증이나 소화장애 등의 부작용을, 항히스타민제는 진정 등의 부작용을, 면역 억제제는 약물 자체의 심각한 장기 독성 등의 부작용으로 장기간 치료 방법으로 사용하기에는 한계가 있다⁴⁵. 이에 아토피 피부염 치료에 대한 보조 요법으로서 입욕 요법이 하나의 대안으로 여러 입욕 제품이 개발되었으며 다양한 한약재를 가감한 연구가 현재 활발히 진행되고 있다^{6,7}.

입욕이란 물로 몸을 씻는 행위로 신체의 청결을 목적으로 하는 생활의 한 부분으로 목욕을 함으로 신체의 보온, 피로회복 등의 보건 위생적 측면의 효과 및 기분 전환, 휴식 등의 심리적인 효과를 함께 동반하는 생활의 한 부분이다. 입욕의 역사는 문헌에 기재된 바에 따라 삼국시대부터 기원된 것으로 알려져 있다. 삼국시대에 불교의 전래와 더불어 크게 성행되었으며 「三國史記」에 목욕과 온탕에 관한 내용이 등장하며 입욕제에 관한 내용은 고려시대에 충숙왕 기묘 후 8년 “목욕하는 비용으로 여러 가지 향이 10여 종이 나 되었으며...”라는 「高麗史」의 기록에서 향이 지금의 입욕 제임을 짐작할 수 있으며, 「宋史」와 「鷄林類事」에서도 고려 사람들이 탕약이라는 여러 가지 약재를 넣은 물에 목욕하는 풍속이 있었다는 기록이 남아 있다^{6,23}.

현재 한방 입욕제에 관한 이용한 연구로는 소목, 강활, 독활, 방풍, 위령선, 백지, 계지, 모과, 애엽과 소목, 강활, 독활, 방풍, 구척, 홍화, 당귀, 천궁의 두 군을 이용하여 알레르기성 접촉 피부염 및 외과적 창상 치유에 미치는 영향을 실험한 김 등²⁴의 연구와 두 군을 이용하여 항산화, 항노화, 미백효과에 미치는 영향을 실험한 정 등²⁵의 연구가 있다. 또한, 오⁶의 고장조를 이용한 입욕제 개발에 관한 연구도 있다.

본 연구에서는 25가지의 입욕제 한약추출물(Table I)을 이용하여 ELISA와 Real-time PCR로 MC/9 mast cell을 이용하여 여기서 발현하는 cytokine을 조절할 수 있는지를 분석하여 이를 통해 한방 입욕제가 mast cell에서 어떤 신호전달 기전을 제어함으로써 활성이 억제되어 cytokine의 발현에 영향을 미치는지를 실험적으로 규명해 보고자 하였다.

실험 결과를 살펴보면 MC/9 mast cell을 배양하여 25가지의 입욕제 한약추출물의 세포 독성을 측정된 결과 울금이 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 400 $\mu\text{g/mL}$ 까지의 농도에서 세포 독성이 나타났으며 소목이 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 400 $\mu\text{g/mL}$ 까지의 모든 농도에서 세포 독성이 나타났다. 다른 23가지의 한약추출물에서는 세포 독성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 1).

ELISA로 단백질 생성량을 측정한 결과 25가지 입욕제 한약추출물 중 당귀, 황기, 산약, 포공영, 비파엽의 5가지 한약추출물에서 IL-5, IL-13 단백질 생성량이 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다(Fig. 2).

당귀, 황기, 산약, 포공영, 비파엽을 5가지 입욕제 조성물로 선정하여 각각의 농도를 20%로 조합한 조성물 1번과 각각 10%, 10%, 10%, 35%, 35%의 비율로 조합한 조성물 2번으로 구성하였다(Table 2). ELISA로 단백질 생성량을 측정한 결과 조성물 1번, 2번의 IL-5, IL-13 단백질 생성량은 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었다(Fig. 3).

Real-time PCR로 유전자 발현을 측정한 결과 조성물 1번의 IL-4, IL-5, IL-13 mRNA 유전자 발현은 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었으며 IL-6 mRNA 유전자 발현은 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다. 조성물 2번의 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 mRNA 유전자 발현은 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다(Fig. 4)(Fig. 5).

이상의 결과를 통해 당귀, 황기, 산약, 포공영, 비파엽이 각각의 농도를 20%로 조합한 조성물 1번과 각각 10%, 10%, 10%, 35%, 35%의 비율로 조합한 조성물 2번 모두 활성화된 mast cell에서 발현하는 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13의 생성을 억제함으로써 알레르기 염증 반응을 효과적으로 조절한다고 할 수 있다. 이로써 본 입욕제 조성물을 이용하여 아토피 피부염에 보조 치료로 적용이 가능할 것으로 판단되며, 향후 추가적인 임상 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結論

입욕제 조성물 1번(당귀 20%, 황기 20%, 산약 20%, 포공영 20%, 비파엽 20%)과 입욕제 조성물 2번(당귀 10%, 황기 10%, 산약 10%, 포공영 35%, 비파엽 35%)이 MC/9 mast cell에서의 Th2 cytokine 발현에 미치는 영향을 실험적으로 규명하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 입욕제 조성물 1번과 2번의 IL-5 단백질 생성은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 유의성있게 ($p < .001$) 억제되었다.
2. 입욕제 조성물 1번과 2번의 IL-13 단백질 생성은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 유의성있게 ($p < .001$) 억제되었다.
3. 입욕제 조성물 1번과 2번의 IL-4 mRNA 유전자 발현은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 유의성있게 억제되었다.
4. 입욕제 조성물 1번과 2번의 IL-5 mRNA 유전자 발현은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 유의성있게 억제되었다.
5. 입욕제 조성물 1번의 IL-6 mRNA 유전자 발현은 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 유의성있게 억제되었다.
6. 입욕제 조성물 2번의 IL-6 mRNA 유전자 발현은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 유의성있게 억제되었다.
7. 입욕제 조성물 1번과 2번의 IL-13 mRNA 유전자 발현은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 유의성있게 억제되었다.

VI. 감사의 글

이 논문은 2012년도 아산시청 연구용역 사업으로 지원받아 수행된 연구임. (연구과제 No.20110051)

VII. 參考文獻

1. Committee of publishing textbook Dermatology. Dermatology 5th Ed. seoul. Ryo Moon Gak. 2008: 170-171.
2. Park YL, Park J. Pathogenesis of Atopic Dermatitis. Korean Journal of Investigative Dermatology. 2007; 14(3):67-72. (Korean)
3. Sandstrom MH, Faergemann J. Prognosis and prognostic factors in adult patient with atopic dermatitis : a long-term follow-up questionnaire study. Br J Dermatol. 2004;150:103-110.
4. Robert Sidbury MD, Jon M. Hanifin MD. Old, New, And Emerging Therapies for Atopic Dermatitis. Dermatologic Clinics. 2000;18(1):1-11.
5. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. Immunol Today. 1992;13(4):136-142.
6. Oh PI. A study on the development of a tub system used by *Wuzenma latifolia*. Graduate school of Chosun University master's thesis. 2007:1-62. (Korean)
7. Han SH, Kim JS, Jung BK, Park SJ, Kim HW, Chae H et al. Effects of the korean Herbal Bathing Candidates on Skin Lesions in Mice Model. Korean Journal of Oriental Medicine. 2010;16(3):107-113. (Korean)
8. Lee JP, Lee JK, Jeong HJ, Oh JK. The Effects of Oriental Herbal Bathing on Fatigue Recovery and Alternation of Physiological Factors in Athletes. Korea Sport Research. 2005;16(5):831-840 (Korean)
9. Lee BK, Jun TY. Effective methods of fatigue recovery on the active old aged man. Sports Science . 1997;6(1):73-84. (Korean)
10. Kim SH, Jung H, Sin YC, GO SG. Research of Traditional Herbal Medicines for Anti-aging, Inhibition Effect of Wrinkle and Whitening Effect in the Skin. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2008;22(3):691-698. (Korean)

11. National federation of department of sasang constitutional medicine, colleges of oriental medicine. Sasang constitutional medicine. 2nd Ed. Seoul:Jipmoondang. 2004:289-291, 351, 697
12. Gu BH. Chinese medical traumatology in clinical practice .China:Shanghaikexuejishuchubanshe. 1985:280-282.
13. Committee of publishing textbook Korean Medicine. Herbalogy. Seoul:Younglim. 2005:177-717
14. Heo J. New translation of Donguibogam. Seoul:Bubin publishing. 2007:1949-2002.
15. Munetaka Ishiyama, Yoko Miyazono, Kazumi Sasamoto, Yosuke Ohkura and Keiyu Ueno. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*. 1997;44(7):1299-1305.
16. Akdis A, Akdis M, Blaser K. Immune regulation in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol*. 2002;12: 641-646.
17. Wollenberg A, Kraft S, Oppel T. Atopic dermatitis : pathogenetic mechanism. *Clin Exp Dermatol*. 2000; 25:530-534.
18. Won JS. New Compliation of Four constitutional Medicine. 1st. Seoul:Jungdam. 2002:114, 215
19. Leung DYM. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:99-108.
20. Aversa G, Punnonen, Cocks BG, de Waal Malefyt R, Vega F Jr, Zurawski SM, et al. An IL-4 mutant protein inhibits both IL-4 or IL-3-induced human IgG4 and IgE synthesis and B cell proliferation : support for common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. *J Exp Med*. 1993;178:2213-2218.
21. Toshiaki Kawakami, Stephen J. Galli. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2:773-786.
22. Taketomi Y, Murakami M. Lipid networks in mast cell biology. *Yakugaku Zasshi*. 2001;131(1):73-84.
23. Choi HJ, LEE YO. The Relationship between Bathing and Health Status. *Journal of Korean academy of nursing*. 2002;32(4):519-528. (Korean)
24. Kim JS, Han SH, Jung BK, Park SJ, Kim HW, Chae H et al. Effects of the Korean Herbal Bathing Candidates on Allergic Contact or Wound Induced Dermatitis Mice Model. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2010;24(3):484-489. (Korean)
25. Jung BK, Park SJ, Kim JS, HAN SH, Sohn KW, Yoon MY et al. Study on the Antioxidative and Whitening Effects of Bathing Aid SP1 and SP2. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2010;24(5): 837-842. (Korean)