

# 加味消風散이 염증 및 아토피피부염 동물병태에 미치는 영향

이해진 · 심부용 · 박지원 · 김동희\*

대전대학교 난치성면역질환의 동서생명의학연구소센터

## Effect of Gami-sopungsan on Inflammation and DNCB-induced Dermatitis in NC/Nga in Mice

Hae Jin Lee, Boo Yong Sim, Ji Won Bak, Dong Hee Kim\*

*Traditional and Biomedical Research Center(TBRC), Daejeon University*

Gami-Sopungsan (GS) is one of the traditional Korean remedy. We investigated the anti-inflammation and anti-atopic dermatitis (AD) effect of GS. No cytotoxicity of GS was observed in the range of 1~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  on Raw 264.7 cells. The inflammatory response of Raw 264.7 cells was induced by lipopolysaccharide (LPS), followed by GS treatment at indicated concentrations (0, 1, 10 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). At 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration, GS showed inhibitory effect on LPS-induced nitric oxide production by 20%. Production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  was decreased by approximately 56%, 36% and 79%, respectively upon GS treatment at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . 200 mg/kg of GS was orally administered to NC/Nga mice, where AD was induced by 1-chloro 2,4-dinitrobenzene. There were no significant difference between GS treated group and the control group on body weight and food intake changes during growth. The back skin of GS group showed decrease in erythema, pruritus, dry skin, edema, excoriation, erosion and lichenification level through naked eye observations. In addition, leukocyte infiltration and the thickness of epidermis were significantly decreased in the skin tissues (back and ear). The serum IgE levels were decreased by 28.8% in the GS treated group. The GS treated group showed remarkable inhibition of IL-4 (83%), IL-5 (95%), IL-6 (62%) and TNF- $\alpha$  (84%) in serum, indicating that GS has similar or higher efficacy than those of the dexamethasone treated group. From the results above, we conclude that GS has significant anti-inflammation and anti-AD effects on Raw 264.7 cells and NC/Nga mice. The results should provide fundamental and valuable data for the research on natural products being developed against atopic dermatitis.

Key words : Atopic dermatitis, inflammation, NO, cytokine, NC/Nga mice

### 서 론

아토피피부염 (atopic dermatitis, AD)은 만성 피부질환으로 유전적인 요소와 감염이나 음식알레르기 또는 공기의 항원과 같은 환경적인 요소가 복합적으로 작용하며<sup>1,2)</sup>, 심한 가려움증과 습진을 동반하는 재발성 질환이다<sup>3,4)</sup>. 주로 미국, 프랑스 등 선진국에서 발병률이 높으며, 국내에서도 유아와 소아에게서 높은 발병률을 보이고 있다<sup>5)</sup>. 최근 들어 이 질환의 급격한 증가는 유전적

\* To whom correspondence should be addressed at : Dong-Hee Kim,  
Traditional and Biomedical Research Center (TBRC), Daejeon University,  
Daejeon 300-716, Republic of Korea

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

· Received : 2014/01/07 · Revised : 2014/02/06 · Accepted : 2014/02/12

소인만으로는 설명이 어렵고 산업화, 주거 형태, 식습관의 서구화 및 핵가족화 등 환경적 요인의 중요성이 특히 강조되고 있으며, 이러한 다양한 원인에 노출될 위험도 증가하고 있는 실정이다<sup>6,7)</sup>.

아토피피부염 환자들은 특정 항원에 감작되면, 인체 내에서 여러 인자들을 생산하고 조절하게 된다. 염증반응에서 대표적으로 작용하는 대식세포 (Macrophage)가 외부 인자에 감염되면 NO 및 다양한 사이토카인을 생산하는데, 분비된 사이토카인은 염증에 관여하는 면역세포를 활성화 시킨다. 특히 아토피피부염 환자에서는 특징적으로 Immunoglobulin E (IgE)의 생산을 유도하고 IgE-수용체의 발현을 상승 시키게 된다. 과도한 IgE의 생산은 IgE-의존 히스타민 반응에 의해 비만세포를 자극하여 과도한 히스타민 방출을 유도한다. 히스타민은 심한 가려움증을 유발하며, 환자들의 긁는 행위로 인하여 2차적 감염이 일어나 더 심한

염증과 아토피피부염으로 발전하게 된다<sup>3,4,8</sup>). 또한 대식세포, 호산구, 각질형성세포, T 림프구 등과 같은 여러 면역세포를 자극하여 염증성 사이토카인의 생산을 지속적으로 유도함으로써 만성적인 단계로 가는 악순환이 지속된다<sup>8</sup>). 악화되는 기전 역시 매우 복잡함에 따라 현재 치료법 역시 대증치료에 지나지 않아 기존 치료법과 더불어 대체치료법 또는 천연물질에 기원한 유효성분에 대한 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있다<sup>9</sup>).

消風散은 동의보감<sup>10</sup>)에 수재된 처방으로 풍열로 인한 다양한 피부질환에 활용되는데, 접촉성피부염<sup>11</sup>), 지루성피부염<sup>12</sup>), 비염<sup>13</sup>), 항염증과 항산화<sup>14</sup>)에 관련된 실험적 연구가 보고된 바가 있다. 본 시료는 기본방에 백선피, 지부자, 형개, 박하를 가미하였는데, 가미한 약물 중 백선피는 항염증 효능<sup>15</sup>)이, 지부자는 간 손상 억제효능<sup>16</sup>)과 소양감과 흥반 완화효능<sup>17</sup>)이, 형개는 항산화 활성<sup>18</sup>)과 미백효능<sup>19</sup>)이 보고되었으며, 박하는 항균효능<sup>20</sup>)과 항알레르기<sup>21</sup>) 및 항산화<sup>22</sup>) 효능이 보고된 바가 있다.

이에 본 연구에서는 加味消風散의 객관적 효능 규명을 위한 기초연구로 *in vitro*에서 독성검사, nitric oxide (NO), IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  생성량을 측정하였고, *in vivo*에서는 아토피 병태 모델인 DNCB (1-chloro 2,4-dinitrobenzene) 유도 NC/Nga 마우스를 통해 관능평가와 더불어 혈청에서 IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ , immunoglobulin E (IgE) 생성량 및 조직병리학적 관찰을 통하여 객관적인 효능을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에 사용한 약재는 옴니허브 (Hallym Farm, Daegu, Korea)에서 구입 하였으며, 대전대학교 RIC 난치성면역질환의 동서생명의학연구소센터 (TBRC, traditional and biomedical research center)에서 확인 정선 후 사용하였다. 사용된 시약은 isopropanol (Sigma Co., U.S.A.), gel red (Sigma Co., U.S.A.), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS : Welgene, Korea), ether (Sigma Co., U.S.A.), dulbecco's modified eagle's medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), dimethyl sulfoxide (DMSO : Sigma Co., U.S.A.), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), streptomycin (Hyclone Co., U.S.A.), agarose (FMC Co., U.S.A.), anti-biotic (Gibco BRL Co., U.S.A.), formaldehyde (Sigma Co., U.S.A.), trypan blue (Sigma Co., U.S.A.), ethanol (Merck Co., Germany), mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.), total RNA purification kit (GeneAll, Korea)을 사용하였다. 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan), homogenizer (OMNI Co., U.S.A.), plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices

Co., U.S.A.), Light Microscope (Carl Zeiss, Co., Germany), micro meter caliper ((주)정도비엔피, Korea)등을 사용하였다. 마우스는 수컷 NC/Nga (4주령)로 중앙실험동물 (Korea)에서 구입 하였으며, 사료는 일반 사료 (㈜푸리나, Korea)를 구입하여 사용 하였다.

### 2. 방법

#### 1) 약재 추출

加味消風散 (Gami-Sopungsan 이하 GS로 지칭)을 구성하는 약재들의 1첩 분량을 80% 에탄올 1.5L에서 2시간 동안 80 ℃로 환류추출한 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 18.6 g의 분말을 얻었다. 본 연구에서 사용한 GS의 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. The prescription of the GS used in this study

Herbal name	Latin name	Dosage (g)
防 風	Saposhnikoviae Radix	9
苦 參	Sophorae Radix	9
牛 蒡 子	Arctii Semen	9
知 母	Anemarrhenae Rhizoma	9
當 歸	Angelicae Gigantis Radix	6
蟬 退	Cicadidae Periostracum	6
蒼 朮	Atractylodis Rhizoma	4
木 通	Akebiae Caulis	4
生 地 黃	Rehmanniae Radix Crudus	12
甘 草	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	3
石 膏	Gypsum Fibrosum	18
白 鮮 皮	Dictamni Radicis Cortex	6
地 膚 子	Kochiae Fructus	6
荊 芥	Schizonepetae Spica	6
薄 荷	Menthae Herba	6
Total amount		113

#### 2) 세포배양

본 연구에서는 Raw 264.7 세포 (murine macrophage cell line)를 사용하였다. 이 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% antibiotics (A/A)로 조성된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)으로 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 본 연구에서는 계대배양 횟수가 3회 이상이 된 후 사용하였다.

#### 3) 세포 생존율 측정

Raw 264.7 세포는 96 well plate에 2×10<sup>4</sup> cells/well씩 분주하였고, 24시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양한 후, GS를 각각 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μl의 WST (water soluble tetrazolium salts) solution을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

#### 4) Raw 264.7 세포에서 nitric oxide (NO) 측정

NO는 griess reagent system을 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 세포는 96 well plate에 2×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하였고, 24 시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양한 후, GS를 각각 1, 10, 100

( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 농도로 처리하고, LPS  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer  $50 \mu\text{l}$ 를 각 well에 처리하여 10분간 상온에서 반응 한 후, N2 buffer  $50 \mu\text{l}$ 를 각 well에 처리하고 10분간 반응시켰다. 반응 후  $540 \text{ nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

5) Raw 264.7 세포에서 사이토카인 측정

세포 내에서 염증성 사이토카인을 측정하기 위하여 luminex를 사용하였다. 12 well plate에 Raw 264.7 세포를  $2 \times 10^5$  cells/well로 분주하였고, 24시간 동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 배양한 후, GS를 각각 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 농도로 처리하고, LPS  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 원심분리 후 상청액으로 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  생성량을 측정하였다.

6) NC/Nga 마우스의 아토피 유도 및 GS의 투여

NC/Nga 마우스는 자발적 아토피성 피부염 병인 유발 모델로 잘 알려져 있고, 아토피피부염의 병인과 밝히는데 뿐만 아니라 치료제 개발을 위한 연구에 널리 이용 된다<sup>23,24</sup>. 수컷 NC/Nga mouse (4주령)는 1주간의 순화기간을 거친 후 5주령에 실험에 사용하였다. 사육실의 환경 조성은 온도는  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 하였고, 상대습도는  $55 \pm 10\%$ 로 하였으며, 조명주기는 12시간 (07:00-19:00)으로 하였다. 마우스는 목부터 꼬리가 시작되는 부분까지 제모를 하였고, 그룹은 Normal, Control, GS 200 mg 투여군, Dexamethasone (dexamethasone으로 약물 대조군으로 사용하였음) 처리군으로 각 그룹 당 7마리씩 분류하였으며, 투여량은  $\text{mg}/\text{kg}/\text{body weight}$ 로 하였다. DNCB는 acetone과 olive oil을 3:1의 비율로 혼합한 용액 (AOO)에 1%가 되게 녹여서 매일  $200 \mu\text{l}$ 씩 실험 종료일까지 처리하여 아토피성 피부염을 유발시켰으며, dexamethasone은  $5 \text{ mg}/\text{kg}$ 으로  $200 \mu\text{l}$ 씩 처리하였다. 투여기간은 3주차부터 (15일) 4주 동안 오전에 매일 1회  $200 \text{ mg}/\text{kg}$ 으로  $200 \mu\text{l}$ 씩 경구투여 하였다(Fig. 1). 본 연구에서의 모든 동물실험은 대전대학교 동물실험윤리위원회 (승인번호, DJUAR2013-007)의 승인 하에 수행 되었다.

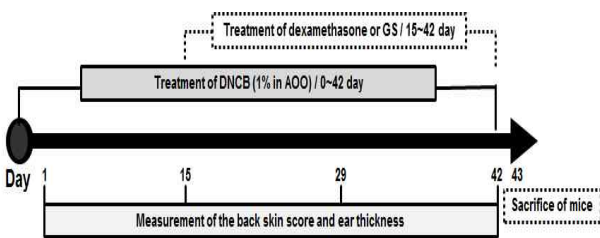


Fig. 1. Induction of atopic dermatitis in NC/Nga mice.

7) NC/Nga 마우스의 식이섭취량과 체중의 변화 측정

NC/Nga 마우스의 체중의 변화 측정은 주 1회로 월요일 오전 10시에 측정하였다. 식이섭취량은 100 g의 사료를 각 그룹에 주고, 월요일, 수요일, 금요일에 남은 사료를 측정하여 총 섭취한 사료의 양을 측정하였으며, 총 섭취한 양을 마우스의 마리수와 섭취한 일수로 나누어 각각의 마우스의 1일 섭취량을 계산하였다.

8) NC/Nga 마우스의 관능평가

NC/Nga 마우스의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가방법을 이용하였다. 관능평가 항목은 식품의약품안전처에서 제시하는 5가지의 기준으로 홍반 (erythema), 가려움과 건조피부 (pruritus & dry skin), 부종과 혈종 (edema & excoriation), 짓무름 (erosion), 그리고 태선화 (Lichenification)로 나누어진다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하고 있으며, 결과는 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총합으로 나타냈으며, 동물실험의 경력이 있는 3인 이상이 판단하였다. 따라서 최소 0점에서, 최고 15점 사이의 점수를 얻을 수 있으며 일반적으로 DNCB를 이용해 피부염을 유발하였을 때, 육안 상 아토피피부염의 유발이 가장 큰 상태를 약 13~15점으로 판단하였다.

9) NC/Nga 마우스의 귀 두께 측정

NC/Nga 마우스의 귀 두께 변화의 측정은 3, 5, 7주차 월요일 오전 10시에 측정하였다. 측정부위는 점을 찍어서 표시하여 매 주 같은 부위를 micro meter caliper를 이용하여 측정하였다.

10) NC/Nga 마우스의 혈청 IgE와 사이토카인 생성량 측정

혈청 내에서 IL-6, TNF- $\alpha$  생성량을 측정하기 위하여 luminex를 사용하였으며, IL-4, IL-5와 혈청 IgE를 측정하기 위하여 ELISA를 사용하였다. 혈액을 채취하여 30분간 상온에서 굳혔으며, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하여 IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ , IgE를 측정하였다.

11) 조직학적 검사

실험동물의 피부조직은 동물의 희생 후, 등의 환부를 중심으로  $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$  넓이로 생검하여 10% 포르말린 용액에 고정하였으며, 조직염색을 하기 전까지  $4^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. (주)바이오텍스틱 (Korea)에 Hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 의뢰하였으며, 광학현미경 상에서 피부의 전반적인 상태와 피부 조직 및 귀 조직의 부종을 중심으로 현미경을 사용하여  $\times 200$ ,  $\times 100$ 으로 관찰하였다.

12) 통계처리

실험 결과는 unpaired student's T-test를 사용하여 통계처리하였으며,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  및  $p < 0.001$  수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결 과

1. 세포독성에 미치는 영향

Raw 264.7 세포에서 세포독성을 확인한 결과 대조군을 100%로 하였을 때, GS 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 처리군은 모두 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 2).

2. Nitric oxide 생성에 미치는 영향

Raw 264.7 세포에서 NO 생성 감소율을 확인한 결과, 대조군을 100%로 하였을 때, GS  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 처리군은 감소를 나타내지 않았으나, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 처리군은 3.6%의 감소를 나타냈으며, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 처리군은 20.4% (\*\* $p < 0.01$ )의 유의성 있는 감소를 나타냈다(Fig. 3).

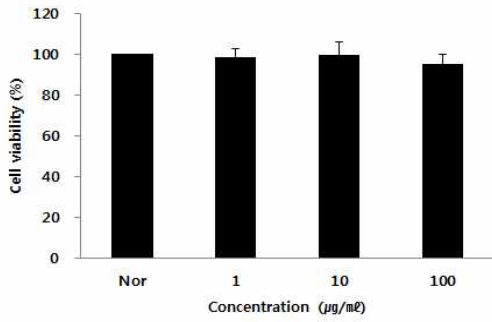


Fig. 2. The cell viability of the GS in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 µg/ml of the GS for 24hr. Cell viability was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments.

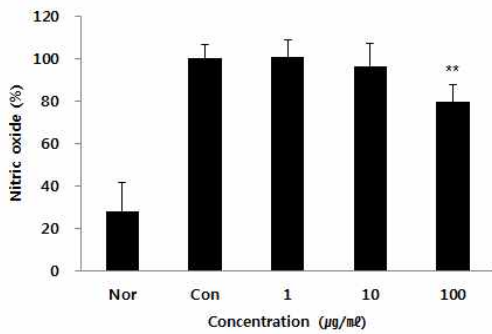


Fig. 3. The NO production of the GS in Raw 264.7 cells. Cells were treated with 1, 10 and 100 (µg/ml) of the GS and LPS (1 µg/ml) for 24hr. The amount of nitrate in supernatant was measured using Griess reagent. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments (Significance of results, \*\*p<0.01).

### 3. IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량에 미치는 영향

Raw 264.7 세포에서 GS의 농도에 따른 IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량 감소를 확인한 결과, IL-1β 생성량은 대조군이 20.1 pg/ml일 때 1 µg/ml 농도 처리군에서 16.0 pg/ml로 나타났으며, 10 µg/ml 농도 처리군에서 10.8 pg/ml (\*p<0.05), 100 µg/ml 농도 처리군에서 8.9 pg/ml (\*\*p<0.01)의 유의성 있는 감소를 나타냈다 (Fig. 4A). IL-6 생성량의 경우 대조군이 6912.0 pg/ml일 때, 1 µg/ml 농도 처리군에서 5675.7 pg/ml (\*\*p<0.01), 10 µg/ml 농도 처리군에서 5227.3 pg/ml (\*\*p<0.01), 100 µg/ml 농도 처리군에서 4416.8 pg/ml (\*\*p<0.01)의 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 나타냈다 (Fig. 4B). TNF-α 생성량의 경우 대조군이 7969.1 pg/ml일 때, 1 µg/ml 농도 처리군에서 7617.6 pg/ml로 나타났으며, 10 µg/ml 농도 처리군에서 5644.7 pg/ml (\*p<0.05), 100 µg/ml 농도 처리군에서 1696.3 pg/ml (\*\*p<0.01)의 유의성 있는 감소를 나타냈다(Fig. 4C).

### 4. NC/Nga 마우스의 체중과 식이섭취량에 미치는 영향

NC/Nga 마우스의 체중과 식이섭취량의 변화에 대해 측정 한 결과 정상군은 체중은 서서히 증가하며 성장하는 것에 비하여 식이섭취량은 큰 변화가 나타나지 않았지만, 대조군의 경우 식이 섭취량에 비하여 비교적 체중의 증가가 나타나지 않았다 (Fig. 5A, B). GS 투여군의 경우 DNCB만 처리한 3주차까지는

대조군과 같은 경향을 보였으나 200 mg/kg으로 GS를 투여한 3주차 이후부터는 체중의 증가를 보이며 성장하였고, 5주차 이후부터는 유의한 체중의 증가 (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)를 나타냈다 (Fig. 5A). 식이섭취량의 경우 GS 투여군에서 4주차 이후부터는 정상군과 같은 경향을 나타냈으며, 7주차에서 유의성 있는 결과 (\*\*p<0.01)가 나타났다(Fig. 5B).

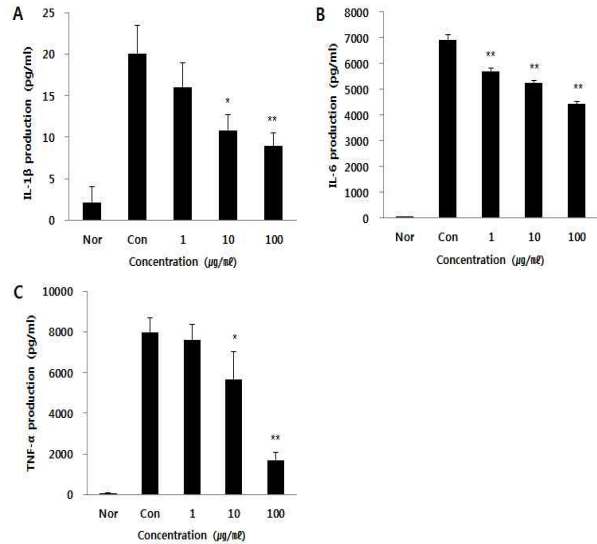


Fig. 4. Effect of the GS on LPS-induced IL-1β, IL-6 and TNF-α production in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 (µg/ml) of the GS in the presence of LPS (1 µg/ml) for 24hr. Cytokines were measured using a Luminex. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments (Significance of results, \*p<0.05, \*\*p<0.01).

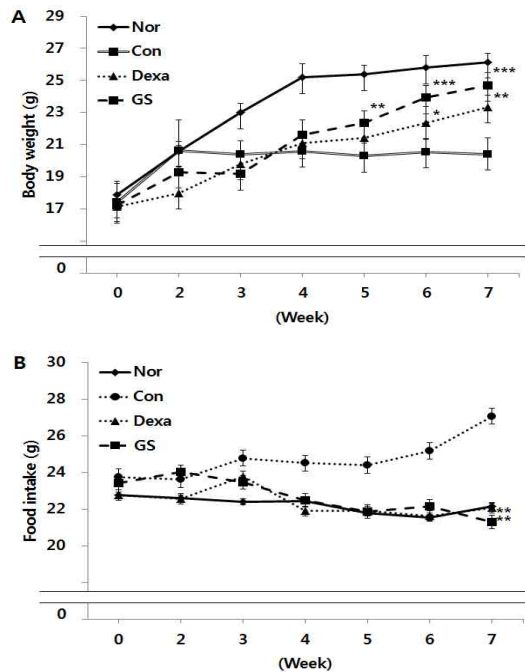


Fig. 5. Effect of the GS on change of body weight and food intake in DNCB-induced NC/Nga mice. The results were expressed as mean ± S.D. Nor, Normal; Con, DNCB treatment; Dexa, DNCB + Dexamethasone treatment; GS, DNCB + GS 200 mg/kg treatment. (Significance of results, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)

5. NC/Nga 마우스의 등 피부 염증 정도와 귀 부종에 미치는 영향

육안으로 관찰한 결과 대조군에 비하여 GS 투여군이 현저하게 회복되어 Dexamethasone 투여군과 유사한 회복을 나타냈다 (Fig. 6A-1, 2, 3, 4). NC/Nga 마우스의 관능평가를 확인한 결과 DNCB만 처리한 3주차에서는 모든 군들이 score가 평균적으로 15로 나타났으나, GS 투여군에서는 5주차부터 score의 감소 (\*\*p<0.01)를 나타냈으며, 7주차에는 6.8 (\*\*p<0.001)로 유의한 감소를 나타내어, 5.3인 Dexamethasone 투여군과 유사한 감소를 나타냈다(Fig. 6A). 마우스의 귀 부종은 7주차에서 정상군이 28.3 μm, 대조군이 52.5 μm로 나타났으며, GS 투여군은 38.0 μm (\*\*p<0.001), Dexamethasone 투여군은 38.3 μm (\*\*p<0.01)로 나타나 Dexamethasone 투여군보다 GS 투여군에서 조금 더 유의한 부종의 감소를 나타냈다(Fig. 6B).

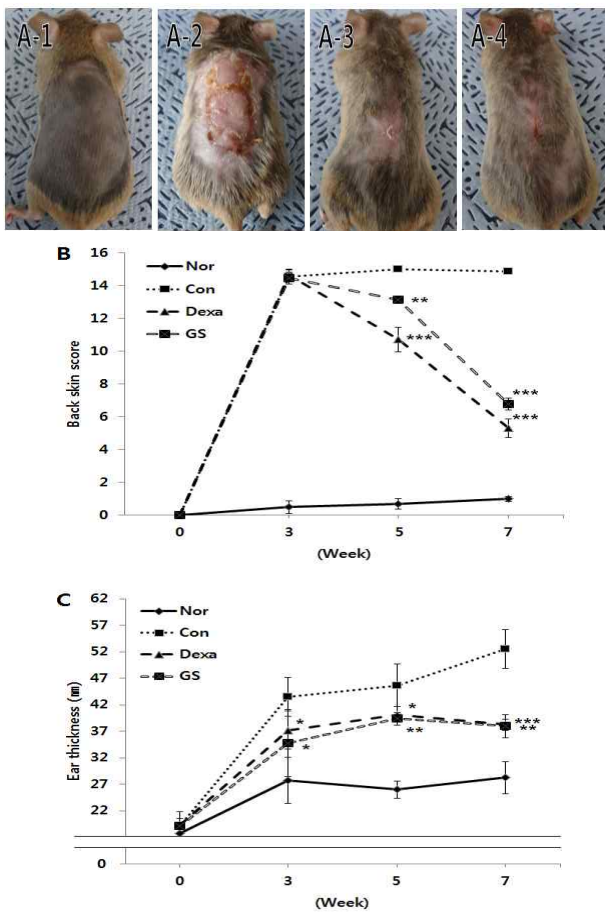


Fig. 6. The macroscopic photograph (A-1, 2, 3 and 4), the back skin score and the ear thickness of DNCB-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. The results were expressed as mean ± S.D. A-1, Normal; A-2, DNCB treatment; A-3, DNCB + 200 mg/kg treatment; A-4, DNCB + dexamethasone treatment. Nor, Normal; Con, DNCB treatment; GS, DNCB + GS 200 mg/kg treatment; Dexam, DNCB + Dexamethasone treatment. (Significance of results, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)

6. NC/Nga 마우스의 혈청 IgE와 사이토카인의 생성량에 미치는 영향

NC/Nga 마우스에서 GS의 혈청 IgE와 사이토카인 생성을 확인한 결과 대조군이 31.32 pg/ml일 때, IL-4 생성량은 GS 투여

군이 5.45 pg/ml (\*\*p<0.01), Dexamethasone 투여군이 7.07 pg/ml (\*\*p<0.01)로 감소를 나타냈으며(Fig. 7A), IL-5 생성량은 대조군이 145.56 pg/ml일 때, GS 투여군이 6.99 pg/ml (\*\*p<0.001), Dexamethasone 투여군이 40.53 pg/ml (\*\*p<0.01)의 감소를 나타냈다(Fig. 7B). IL-6 생성량은 대조군이 28.06 pg/ml일 때, GS 투여군이 9.13 pg/ml (\*p<0.05), Dexamethasone 투여군이 10.50 pg/ml (\*p<0.05)의 감소를 나타냈으며(Fig. 7C), TNF-α 생성량은 대조군이 88.50 μg/ml일 때, GS 투여군이 14.55 μg/ml (\*\*p<0.001), Dexamethasone 투여군이 13.90 μg/ml (\*\*p<0.001)의 감소를 나타냈다(Fig. 7D). 사이토카인의 종합적인 결과를 보면, GS 투여군이 상대적으로 Dexamethasone 투여군과 유사하게 감소됨을 확인할 수 있었으며, 모두 유의성 있는 결과를 나타냈다. 혈청 IgE 생성의 경우 대조군이 799.24 ng/ml GS 투여군은 568.89 ng/ml (\*p<0.05), Dexamethasone 투여군은 516.86 ng/ml (\*p<0.05)의 감소로 Dexamethasone 투여군 보다는 감소 정도가 낮았으나 이 역시 유의성 있는 감소를 나타냈다(Fig. 7E).

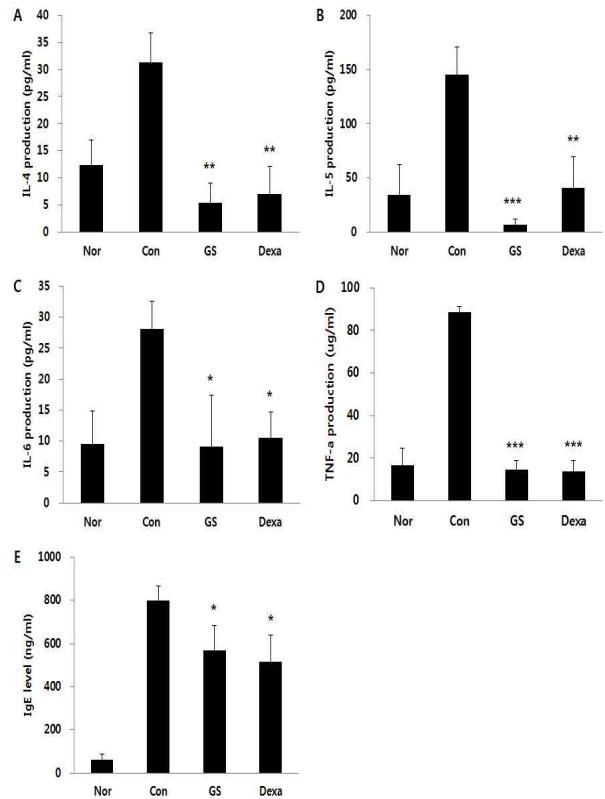


Fig. 7. Effect of the GS on production of cytokines and the IgE levels in serum of DNCB-induced NC/Nga. The blood was obtained from the heart of each mouse. IL-4, IL-5 and IgE content was measured using the ELISA. IL-6 and TNF-α content was measured using the Luminex. Each value represent the mean ± S.D. from 3 independent experiments. Nor, Normal; Con, DNCB treatment; Dexam, DNCB + Dexamethasone treatment; GS, DNCB + GS 200 mg/kg treatment. (Significance of results, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)

7. NC/Nga 마우스의 등과 귀 조직의 조직학적 관찰

H&E 염색을 한 등 조직의 경우 대조군은 표피가 두꺼워지며, 세포의 침윤과 부종이 나타났으나, GS 투여군에서는 Dexamethasone 투여군과 더불어 상대적으로 세포침윤이 적고 부종이 완화되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8A, B, C, D). H&E 염색을 한 귀 조

직에서 대조군은 부종으로 인하여 두꺼워 졌으며, 세포의 침윤이 나타난 반면, 상대적으로 GS 투여군의 경우 대조군에 비하여 부종과 세포의 침윤 정도가 완화되었고, Dexa 투여군과 유사한 정도로 부종의 감소가 나타났다(Fig. 8E, F, G, H).

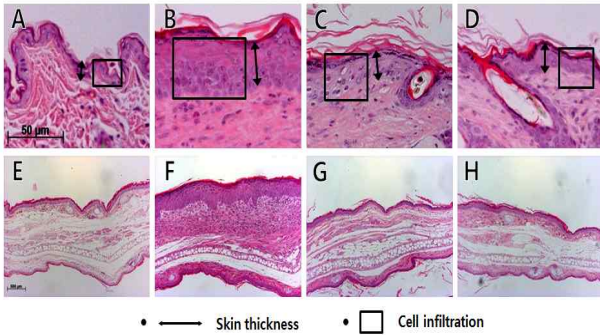


Fig. 8. The histological features (H&E staining) of the back skin tissue (A, B, C and D, magnification, x200) and changes in the ear thickness (E, F, G, and H, magnification, x100) of DNCB-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. A and E, Normal; B and F, DNCB treatment; C and G, DNCB + 200 mg/kg treatment; D and H, DNCB + dexamethasone treatment.

## 고찰

최근 염증을 동반한 아토피성 질환들이 지속적으로 증가하고 있으며, 염증과 알레르기에 관련된 세포 내 분자들을 대상으로 하는 천연물 치료제 개발에 대한 연구의 중요성이 대두되고 있다<sup>25</sup>. 본 연구에서는 가미소풍산 (GS)을 시료로 하여 먼저 대식세포에서 병원과 연관된 염증성 사이토카인 억제효능을 확인한 후, 이를 바탕으로 동물병태모델에서 아토피피부염과 그에 수반되는 염증 완화 효능을 확인하였다. 먼저 마우스 유래 대식세포주를 대상으로 시료의 세포독성을 확인한 결과 독성을 나타내지 않았으며, 기존의 한약 및 한방처방의 세포독성 결과와의 비교 면에서도 안전한 것으로 평가되었다(Fig. 2).

염증 반응에서 항원을 인지한 대식세포는 항원을 처리하고 제시하는 기능을 함과 동시에 NO를 생성해 내고, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 와 같은 사이토카인들을 방출한다<sup>26,27</sup>. NO는 생리학과 병리학적인 관점에서 중요한 세포내 신호분자로써 작용하여 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하거나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 한다. 그러나 염증으로 인한 높은 수준에서의 NO 생산은 조직 및 신경의 손상을 일으키고, 유전자를 변이시키며, 혈관 투과성을 증가시켜 부종을 일으키는데<sup>26</sup>, GS가 이러한 NO를 대식세포주에서 감소시킨 결과는, 동물병태 모델에서 나타난 조직 손상 및 부종 완화 결과와도 상호 연관성이 있을 것으로 추측된다(Fig. 3).

선행연구에 따르면 아토피피부염은 초기와 만성 단계에 차이가 있으며, 초기에는 Th1에서 유래된 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인으로 인하여 염증활성이 일어나는 것 뿐만 아니라, Th2에서 유래된 IL-4, IL-5와 같은 사이토카인이 높게 검출되며, 단계가 진행될수록 Th1, Th2에서 유래된 사이토카인이 점차

증가하여 병인을 진행시킨다고 보고되어져 있다<sup>28</sup>. 각각의 사이토카인 중 IL-1 $\beta$ 는 대식세포를 활성화시키고, 림프구 및 호중구의 내피세포 접착을 향진시키며, 케모카인의 생성을 유도하여 염증 부위에 염증세포의 침윤을 상승시킨다<sup>29</sup>. 또한 TNF- $\alpha$ 는 염증 반응 초기에 해당 부위로 호중구를 유도하며, 급성 염증반응을 일으키고 악화시키는 인자이며<sup>30</sup>, IL-6는 B림프구의 분화와 성장을 증가시키고 알레르기성 질병을 포함하여 염증을 만성적인 단계로 발달시킨다<sup>31</sup>. GS가 대식세포주에서 염증성 사이토카인을 모두 감소시킨 결과는 아토피병태모델에서 대표적으로 검출되는 IL-4와 IL-5와 같은 사이토카인의 감소와도 연관성이 있을 것으로 사료된다, 따라서 이러한 결과를 토대로 실질적인 아토피피부염에서의 염증과 알레르기 억제 효과를 확인하기 위하여 아토피피부염 병태 모델인 DNCB에 유도된 NC/Nga 마우스에 대한 GS의 효능을 평가하였다.

이전의 몇몇 연구 결과에서 아토피 병태 모델의 경우 DNCB를 처리하는 동안 식이 섭취량의 증가에 비하여 체중의 증가가 나타나지 않는 것에 대하여 염증과 소양감이 마우스의 성장에 영향을 미치고 것이라고 제시하고 있다<sup>9,32</sup>. 본 연구결과에서도 지속적으로 병태를 유발한 그룹에서는 식이 섭취량에 따른 체중의 증가가 나타나지 않았고, 이는 선행연구와 부합되는 결과로써, GS를 투여하였을 때, 점차 정상군과 유사한 경향을 나타냈으므로 GS가 치료적 결과로써 간접적으로 상대적 체중증가를 나타낸 것으로 추측된다(Fig. 5). 또한 관능 평가에서 score가 큰 폭으로 감소되었고(Fig. 6A-1, 2, 3, 4, B), 귀 부종 측정에서도 현저한 감소를 나타냈는데(Fig. 6C), 특히 귀 부종의 변화는 대식세포에서 NO와 염증성 사이토카인의 감소 결과와 상호 연관성이 있는 것으로 여겨지나 좀 더 세부적인 실험이 뒷받침 되어야 할 것으로 판단된다.

마우스의 혈청에서는 염증과 밀접한 관련이 있는 Th1에서 유래되는 사이토카인인 IL-6, TNF- $\alpha$ 와 아토피성 질환에서 밀접한 관련이 있는 Th2에서 유래된 사이토카인인 IL-4, IL-5를 측정하였다. IL-5는 호산구의 형성과 분화를 유도하고, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ 의 분비를 유도하여 염증을 촉진시키며, 이때 분화된 호산구는 알레르기 질환과 염증질환에 영향을 미치게 되는데, 혈관으로부터 염증부위로 이동을 하여 IL-4, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인을 생산하고, 호산구의 과립인 MBP에 의해 비만세포를 활성화시키게 되어 히스타민, TNF- $\alpha$ , IL-8과 같은 물질을 분하게 한다<sup>33</sup>. IL-4와 IL-6는 B림프구의 분화, 성장, 활성화를 증가시켜 IgE의 생산을 유도한다. IgE는 아토피피부염의 중요한 지표로써 높은 수준의 IgE 생산은 비만세포나 호염구를 지속적으로 자극하여, IgE 수용체인 Fc $\epsilon$ RI의 발현을 상승 시키며, IgE-의존 히스타민반응에 의하여 히스타민 및 여러 염증인자들을 방출시켜 심한 가려움증을 유발하게 된다<sup>8,34,35</sup>.

본 연구 결과 마우스 혈청에서의 IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$  생성량이 현저한 감소를 나타냈으며 (Fig. 7A, B, C, D), 결과에 따르면 염증과 알레르기에 영향을 미치는 사이토카인들의 감소로 대식세포와 같은 면역세포들이 조직으로 이동하는 것을 감소시켜 부종을 완화하고, 염증 부위에 염증세포의 침윤을 감소시킨

것으로 판단된다. 또한 IgE 생성량도 유의성 있는 감소를 나타내었는데(Fig. 7E), 이 결과는 IgE의 감소를 통해 비만세포로부터 방출되는 히스타민을 감소시키게 되어 아토피피부염으로 인한 가려움증을 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 아울러 혈청에서의 IL-4와 IL-5의 감소는 IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ 과 같은 사이토카인의 생성을 감소시키고, IgE의 생산을 감소시킨다는 선행 연구결과<sup>33-36)</sup>와도 부합되어 GS를 임상에 활용하는 데에 있어서 의미 있는 결과라고 판단된다. 최종적으로 조직학적 검사에서 GS를 투여한 마우스의 등과 귀 조직에서 염증세포의 침윤과 부종이 현저히 감소되는 것을 확인할 수 있어 (Fig. 8), 항 후 조직학적으로 IHC와 같은 정밀한 분석을 통하여 침윤된 염증세포의 종류와 빈도에 대한 분석이 보다 면밀하게 이루어져야 할 것으로 보인다. 이상의 대식세포주에서의 염증성 사이토카인 감소, 동물병태 마우스에서의 육안, 혈청 및 조직학적 검사의 유의적인 결과는 본 시료의 면역조절능에 대한 객관적인 근거자료로써 제시할 수 있을 것으로 보인다. 그러나 본 시료가 소풍산 원방과의 효능 및 기전적 측면에서 어떠한 차이가 있는지에 대한 객관적 결과는 확인할 수 없어 동일 조건하의 심도 있는 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구는 加味消風散의 임상적 활용을 위한 기초연구로써 *in vitro*와 *in vivo* 아토피피부염 동물병태 모델에서 항염증과 항아토피 실험을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 적용 농도 결정을 위한 Raw 264.7 세포에 대한 생존율 측정에서 GS 1-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 처리군에서 세포독성이 나타나지 않았다. *In vitro*에서 NO의 생성량은 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 처리군에서 모두 유의한 감소를 나타냈으며, 염증의 지표가 되는 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ 는 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 GS 투여군 모두 농도의존적으로 유의성 있는 감소를 나타내었다. 전 임상단계의 결과인 동물실험에서 체중과 식이섭취량은 GS 투여군에서 정상군에 가까운 회복을 나타냈고, 관능평가 분석에서는 종합적인 score가 15에서 6.8로 유의한 감소를 나타냈으며, 또한 혈청에서의 IgE의 생성량 역시 GS 투여군에서 현저하게 감소하였다. 마지막으로 조직학적 검사에서도 대조군에 대하여 GS 투여군에서 염증세포의 침윤과 부종이 현저히 감소하여 유의한 결과가 나타남으로써 면역조절능에 의한 항염증 및 항아토피피부염 효능이 실험적으로 입증되었다.

## 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것입니다.

## References

1. Tanaka, K., Miyake, Y., Kiyohara, C. Environmental factors

and allergic disorders. *Allergol. Int.* 56: 363-396, 2007.

2. Morar, N., Willis-Owen, S.A., Moffatt, M.F. The genetics of atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118: 24-34, 2006.

3. Leung, D.Y. and Bieber, T. Atopic dermatitis. *Lancet.* 361: 51-160, 2003.

4. Sicherer, S.H. and Leung, D.Y. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 121: 1351-1358, 2008.

5. Park, Y.M. Epidemiologic Study and Risk Factors of Atopic Dermatitis. *The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease.* 21(2):74-77, 2011.

6. James, J.M., Kagey-Sobotka, A., Sampson, H.A. Patients with severe atopic dermatitis have activated circulating basophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91(6):1155-1162, 1993.

7. Burks, A.W., James, J.M., Hiege, I.A., Wilson, G., Wheeler, J.G., Jones, S.M. Atopic dermatitis and food hypersensitivity reactions. *J. Pediatr.* 132(1):132-136, 1998.

8. Natalija Novak, Thomas Bieber, Donald, Y.M., Leung, M.D. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112: 128-139, 2003.

9. Im, L.R., Ahn, J.Y., Kim, J.H., Xin, M.G., Kwon, S.U., Kim, Y.K., Kim, D.K., Lee, Y.M. Inhibitory Effect of Kyungohkgo in the Development of 2,4-Dinitrochlorobenzene-induced Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. *Arch. Pharm. Res.* 34: 317-321, 2011.

10. Jun, H. Donguibogam. Yeo-gang Republic. p 57, Korea.

11. Park, S.J., Lee, S.G., Baek, J.H., Byun, S.H. and Kim, S.C. Effect of Sopung-san on contact hypersensitivity induced by repeat elicitation of DNCB. *Korean J. Oriental Physiology & pathology.* 20(3):623-628, 2006.

12. Min, H.B., Lim, J.H., Hwang, S.I., Jee, S.Y., Lee, S.H. A clinical report seborrheic dermatitis. *J. Kor. Oriental Med. Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology.* 18(3):142-147, 2005.

13. Im, G.M., Jeong, H.W., Kim, H.S., Jeong, W.Y. Oriental Medical Approach on the Allergic Disease. *J. Kor oriental physiology & pathology.* 16(5):831-839, 2002.

14. Seo, H.S. The Experimental Study on Anti-inflammation and Anti-oxidation of Sopungdojeok-tang (Xiaofengdaoichi-tang) and Samulsopungsan (Siwuxiaofeng-san). *J. Kor. pharmacopuncture institute.* 13(1):79-85, 2010.

15. Park, J.S., Shin, T.Y., Kim, D.K., Lee, J.H. The Effects of Dictamni Radicis Cortex on the iNOS Expression and Proinflammatory Cytokines Production. *Kor. J. Pharmacogn.* 42(4):348-353, 2001.

16. Kim, N.Y., Lee, J.S., Park, M.J., Lee, K.H., Kim, S.H., Choi, J.W., Park, H.J. The Hepatoprotective Effect of Active Compounds of Kochiae fructus on D-Galactosamine-Intoxicated Rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33(8):1286-1293, 2004.
17. Kim, J.S., Han, J.B., Whang, W.W., Min, B.I. Effects of Kochiae Gructus on Histamine-induced Itch, Erythema and Wheal Responses in Normal Healthy Adults. *J. Korean Oriental Med.* 242(1):133-140, 2003.
18. Yang, H.Y., Baek lim, Y.T., Park, S.H., Kee, J.H., Lee, S.C. Effects of Far-Infrared Irradiation on the Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of Extracts from *Schizonepeta tenuifolia*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42(9):1357-1362, 2013.
19. Hwang, E.Y., Kim, D.H., Hwang, J.Y., Kim, H.J., Park, T.S., Lee, I.S., Son, J.H. A Study on the Depigmenting Effect of *Carthamus tinctorius* Seed, *Cyperus rotundus* and *Schizonepeta tenuifolia* Extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44(1):76-81, 2012.
20. Lee, S.E., Park, C.G., Cha, M.S., Kim, J.K., Seong, N.S., Bang, K.H., Bang, J.K. Antimicrobial activity of essential oils from *Mentha arvensis* L. var. *piperascens* Malivaud and *Agastathe rugosa* O. Kuntze on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Korean J. Med. Crop Sci.* 10(3):206-211, 2002.
21. Shin, T.Y., Kim, D.K. Antiallergic Anctivity of *Menthae Herba*. *Kor. J. Pharmacogn.* 29(3):248-253, 1998.
22. Lee, S.E., Han, H.S., Jang, I.B., Kim, G.S., Shin, Y.S., Son, Y.D., Park, C.B., Seong, N.S. *Korean J. Med. Crop Sci.* 13(6):255-260, 2005.
23. Matsumoto, M., Ra, C., Kawamoto, K., Sato, H., Itakura, A., Sawada, J., Ushio, H., Suto, H., Mitsuishi, K., Hikasa, Y., Matsuda, H. IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis. *J. Immunol.* 162: 1056-1063, 1999.
24. 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: 70-75, 1999.
25. Hoffman, E.S., Smith, R.E., Renaud, B.C. Jr. From the analyst's couch: TLR-targeted therapeutics. *Nature review drug discovery.* 4(11):879-880, 2005.
26. Yun, K.J., Kim, J.Y., Kim, J.B., Lee, K.W., Jeong, S.Y., Park, H.J., Jung, H.J., Cho, Y.W., Yun, K.J., Lee, K.T. Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF- $\kappa$ B inactivation in Raw 264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *Int. Immunophar.* 8: 431-441, 2008.
27. Baugh, J.A., Bucala, R. Mechanisms for modulating TNF- $\alpha$  in immune and inflammatory disease. *Current opinion in drug discovery and development.* 4: 635-650, 2001.
28. Lee, D.J., Cho, I.Y., Jang, S.I. Anti-allergy Effect of Ethanol Extract from *Duchesnea chrysantha*. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 26(6):902-907, 2012.
29. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. *Immunology sixth edition.* London, Mosby. 119, 128, 441, 2002.
30. Zhang, Y., Ramos, B.F., Jakschik, B.A. Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science.* 258: 1957-1959, 1992.
31. Gabay, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy.* 8: 1-3, 2006.
32. van Triel, J.J., Arts, J.H., Muijsers, H., Kuper, C.F. Allergic inflammation in the upper respiratory tract of the rat upon repeated inhalation exposure to the contact allergen dinitrochlorobenzene (DNCB). *Toxicology.* 269: 73-80, 2010.
33. Bradding, P., Feather, I.H., Wilson, S., Bardin, P.G., Heusser, C.H., Holgate, S.T. and Howarth, P.H. Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation. *J. Immunol.* 151(7):3853-3865, 1993.
34. Sasakawa, T., Higashi, Y., Sakuma, S., Hirayama, Y., Sasakawa, Y., Goto, T., Matsumoto, M., Matsuda, H. Atopic dermatitis-like skin lesions induced by topical application of mite antigens in NC/Nga mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 126: 239-247, 2001.
35. Budde, I.K., Heer, P.G., Natter, S., Natter, S., van der Zee, J.D., Valenta, R., Aalberse, R.C. Studies on the association between immunoglobulin E autoreactivity and immunoglobulin E-dependent histamine-releasing factors. *Immunol.* 107: 243-251, 2002.
36. Tepper, R.I., Levinson, D.A., Stanger, B.Z., Campos-Torres, J., Abbas, A.K., Leder, P. IL-4 induces allergic-like inflammatory disease and alters T cell development in transgenic mice. *Cell.* 62(3):457-467, 1990.