

Original Article / 원저

# 알레르기 후기 반응 염증 억제효과에 관한 淸肌散의 실험적 연구

조석용<sup>1)</sup> · 강민서<sup>1)</sup> · 김용민<sup>2)</sup> · 김희택<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 세명대학교 한의과대학 안이비인후피부과학 교실, <sup>2)</sup> 세명대학교 한방바이오융합과학부

## An Experimental Study on the Anti-inflammatory Effects of Cheonggisang Extract in Allergic Late Inflammation

*Suk-Yong Jo<sup>1)</sup> · Min-Seo Kang<sup>1)</sup> · Yong-Min Kim<sup>2)</sup> · Hee-Taek Kim<sup>1)</sup>*

<sup>1)</sup> Dept. of Oriental Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, College of Korean medicine, Semyung University

<sup>2)</sup> School of Oriental Medicine and Bio Convergence Sciences, Semyung University

### Abstract

**Objectives** : Allergic diseases have a various symptoms of hyperresponsiveness and recently hyperresponsive reaction in the chronic phase is reported as the important mechanisms. Cheonggisang(CGS) is used in oriental clinics for curing various skin diseases due to effect of controlling of pruritus. There have been studies on the anti-allergic effect and anti-inflammatory effect of CGS, but there had no study of anti-allergic effects in allergic late inflammation of CGS, so we aimed to find out the effects of CGS in allergic late inflammation in our study.

**Methods** : To investigate the anti-allergy effect and anti-inflammatory effect of CGS, RAW 264.7 macrophage cells and CSG water-extracts were used. Cytotoxic effect of CSG was examined by MIT assay, an oxidative product of NO was measured in the culture medium by the Griess reagent assay. The level of prostaglandin E2(PGE2) was measured by competitive enzyme-linked immunoassay. Cytokine(PGE2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) was measured by Bio-Plex suspension assay system and quantitative multiplexed cytokine/chemokine assay.

**Results** : We investigated that there was no cytotoxic effect of CGS water-extract at any levels of concentration on RAW 264,7 macrophage cells by MIT assay. CGS water-extracts significantly suppressed the levels of the inflammatory mediators such as NO and PGE2, cytokine of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  at the level of 400  $\mu\text{g/ml}$  CGS concentration. But there was no significant effect on IL-6 production suppression.

© 2016 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Conclusions** : These results suggest that CSG water-extract has and anti-inflammatory effects in allergic reaction. These properties may contribute to the allergic diseases and inflammatory related disease care.

**Key words** : Cheonggisang; Anti-Allergic; Anti-Inflammatory; cytokine; NO; IL-1 $\beta$

## I. 서 론

알레르기(Allergy)는 인체 면역반응의 일종으로 인체 외부에서 내부로 들어온 어떤 물질에 대해 면역체계가 지나치게 반응을 보이는 것으로 동일 인자에 재노출 시 다양한 과반응(hyperresponsiveness)의 증상을 나타내어 유해하게 작용하는 것으로<sup>1,2)</sup> 천식, 알레르기 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 접촉성 피부염 등이 알레르기 질환에 속한다<sup>3)</sup>. 흡인성 항원과 접촉성 항원이 주된 원인으로 생활방식 및 온도와 습도 등의 기후 변화와 같은 환경적 요인과 유전적 소인 등이 중요한 유발인자로 작용한다고 알려져 있으며<sup>4)</sup>, 산업화된 국가일수록 급격하게 증가하고 있는 추세이다<sup>3,5)</sup>.

알레르기 반응은 자극 물질에 의해 비만세포에서 유리된 히스타민을 비롯한 다양한 화학적 매개물질이 말초혈관의 투과성 항진과 확장작용, 기관지 평활근에 대한 확장작용, 점막 표면에 대한 선세포의 분비 항진작용 등을 일으켜 발생한다<sup>6)</sup>. 알레르기 면역 반응의 과정은 항원이 최초로 인식되는 감각과 항원 노출 후 수 분~1시간 이내에 발생하는 조기반응, 조기반응이 사라지고 수 시간 이내에 발생하는 후기반응으로 나뉜다<sup>7,8)</sup>. 이 중 후기반응은 조기반응 후 T cell, 호염구, 호산구로 이루어진 염증세포들의 유입에 의한 염증반응과 염증세포에서 분비되는 매개 물질에 의한 만성 염증 반응으로 이해되고 있으며, 초기반응에 비하여 그 증상이 더 강하고 오래 지속된다<sup>6,8)</sup>. 알레르기 질환의 치료수단으로써 항히스타민제 및 스테로이드제, 면역억제제 등이 사용되고 있는데<sup>9)</sup>, 이러한

약물들은 장기간 사용 시 내성과 부작용이 발생하는 단점이 있어 만형자<sup>10)</sup>, 방풍<sup>11)</sup>, 발효 울금<sup>12)</sup>, 玉屏風散 翳耑子散<sup>13)</sup>과 같이 한약재나 한방 처방을 이용한 치료제 개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

淸肌散은 元代 危亦林的 『世醫得效方』<sup>14)</sup>에 처음 수록된 처방으로 『東醫寶鑑』<sup>15)</sup>에서는 “治隱疹, 或赤或白, 癢痒”이라 하여 癩疹에 사용된 이래 다양한 피부질환에 사용되었다<sup>16)</sup>. 淸肌散에 대하여 박<sup>17)</sup>은 淸肌散과 그 加減方을 이용하여 mice에서의 serotonin, histamine 등을 이용하여 항알레르기 효능을, 구<sup>18)</sup>는 淸肌散이 Th2 면역반응을 조절하며 NF- $\kappa$ B 활성을 억제하여 항염 및 아토피 피부염에 대한 억제 효과를, 이<sup>19)</sup>는 淸肌散 加味方이 항산화와 염증성 사이토카인에 미치는 영향을, 안 등<sup>20-22)</sup>은 아토피 동물모델에 미치는 영향을, 구<sup>23)</sup>는 淸肌散 加味方을 이용하여 아토피 피부염 환자에 대한 치험례를 보고하였다. 이러한 연구들에 의해 淸肌散의 항염 작용에 대한 유의성이 알려진 바 있으나, 淸肌散 단독으로 알레르기 후기 반응에서 염증 억제에 대한 연구는 이루어지지 않았다.

이에 본 연구에서는 淸肌散의 알레르기 후기 반응에 관한 효능을 확인하고자 lipopolysaccharide(LPS)로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 淸肌散 추출물 농도에 따른 NO와 Prostaglandin E2의 생성 변화를 측정하였고, cytokine의 변화를 관찰하여 약간의 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

## II. 실험 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 처방 구성 및 시료 제조

Corresponding author : Hee-Taek Kim, Semyung University Oriental Medicine Hospital, 66, Semyeong-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea  
(Tel:043-649-1817, E-mail:kht8725c@naver.com)

• Received 2016/7/1 • Revised 2016/8/9 • Accepted 2016/8/16

淸肌散(Cheonggisgan, 이하는 CGS)의 구성 약물을 (주)HMAX(제천, 한국)에서 구입하여 사용하였다 (Table 1). 淸肌散 2첩 분량에 해당하는 128g을 3차 증류수 2L와 혼합하여 100℃로 4시간 동안 열수 추출하였으며, 여과지로 여과한 추출액을 rotary evaporator를 이용하여 100 ml 까지 농축하고 -80℃로 동결하였다. 농축한 동결액을 freezing dryer system (Labconco, USA)을 이용하여 7일간 동결 건조 하였다(수율 약 15%).

## 2) 세포 배양

실험에 사용된 mouse 대식세포는 RAW 264.7 cell line (ATCC, USA)을 분양받아 사용하였다. RAW 264.7 cells은 37℃, 5% CO2 조건에서 10% Fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml) 및 streptomycin (100 µg/ml) 등이 포함된 DMEM 배지로 배양되었다.

배양세포들은 75 cm<sup>2</sup> flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을

PBS 용액으로 씻어준 뒤 50 ml flask 당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin을 버리고 37℃에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기 (50 ml culture flask)에 옮겨 1:2 split ratio로 CO2 배양기에서 배양하였다.

## 2. 실험방법

### 1) MTT assay

세포독성 유발 효과를 알아보기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay 방법을 사용하여 측정하였다. 96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well의 cell을 100 µl씩 넣고 37℃, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1x PBS 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료를 농도별로 각 well에 처리하고 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS에 녹인 1 µg/ml MTT (Sigma, USA)를 100 µl씩 각 well에 처리하여 알루미늄 호일로 차광시킨 뒤 2시간동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 µl 처리하고 37℃에서 2시간 방치한 다음 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 다음과 같은 공식으로 계산되었다.

$$\text{Viability(\%)} = 100 \times \text{AT/AC}$$

AT : absorbance of tested extract solution

AC : absorbance of control

### 2) NO assay

96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well의 cell을 100 µl씩 넣고 37℃, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기에서 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화 시켰다. 안정화 시킨 세포에 lipopolysaccharide (LPS) 1 µg/ml와 淸肌散 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 동안 37℃, 5%

Table 1. The Amount and Composition of Cheonggisgan

韓藥名 (Herbal Name)	生藥名(Scientific Name)	用量 (Dose)(g)
羌活	<i>Angelicae Koreanae Radix</i>	4
獨活	<i>Araliae Cordatae Radix</i>	4
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	4
前胡	<i>Anthrisci Radix</i>	4
枳殼	<i>Auranti Fructus</i>	4
桔梗	<i>Platycody Radix</i>	4
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4
赤茯苓	<i>Hoelen rubra</i>	4
人蔘	<i>Ginseng Radix alba</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
荊芥	<i>Nepetae Herba</i>	4
防風	<i>Ledebouriellae Radix</i>	4
天麻	<i>Gastrodiae Rhizoma</i>	4
薄荷	<i>Mentae Folium</i>	4
蟬退	<i>Cicadae Periostracum</i>	4
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	4
合計		64

CO2가 공급되는 배양기에서 배양한 후 세포배양 상등액 60  $\mu$ l을 채취하여 여기에 Griess 시약 100  $\mu$ l을 혼합하여 15분 동안 반응시킨 뒤 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) PGE2 생성 측정

PGE2의 측정은 commercial competitive enzyme immunoassay kit를 R&D systems (Minneapolis, USA)에서 구입하여 사용하였다. RAW 264.7 세포에 淸肌散과 1  $\mu$ g/ml의 LPS를 처리하여 24시간 배양한 후 세포 배양 상등액을 수거하여 PGE2 측정에 사용하였다. 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96 well plate에 각각의 배양액을 100  $\mu$ l씩 loading하고 여기에 primary antibody solution 50  $\mu$ l와 PGE2 conjugate 50  $\mu$ l씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. 기질용액을 200  $\mu$ l씩 처리하여 5~20 분간 반응시킨 후, 50  $\mu$ l의 stop solution을 처리하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4) Cytokine 생성 측정

96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 cell을 100  $\mu$ l씩 넣고 37°C, 5% CO2가 공급되는 배양기에서 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화 시켰다. 안정화 시킨 세포에 LPS 1  $\mu$ g/ml와 淸肌散 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상등액을 채취하여 Bio-Plex Suspension Assay System을 이용, Quantitative Multiplexed Cytokine/Chemokine Assay를 실시하여 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$  생성량을 측정하였다.

### 5) 통계 분석

실험결과는 SPSS Window program(Ver. 12.0)을 이용하였으며, 모든 측정값은 평균값  $\pm$  표준편차 (Mean  $\pm$  SD)로 나타내었고, 대조군과 각 실험군과의 평균차이는 Student's t-test로 분석하여 p-value가 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## III. 실험성적

### 1. 세포독성에 미치는 영향

淸肌散의 농도가 세포내에서 독성을 일으키는지 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 정상군의 생존율을  $100 \pm 12.85\%$ 로 계산하였을 때 모든 농도에서 세포독성이 없음을 확인하였다(Table 2, Fig. 1).

Table 2. The Cytotoxic Effect of Cheonggisan (CGS) Water-Extract on RAW 264.7 Macrophage Cells by MTT Assay

Concentration ( $\mu$ g/ml)	Cell Viability (% of control)
Normal	100 $\pm$ 12.85
50	98.35 $\pm$ 15.24
100	97.46 $\pm$ 10.31
200	99.91 $\pm$ 11.50
400	101.03 $\pm$ 12.82

Values are the mean  $\pm$  SD of the three independent experiments.

Normal : not treated with CGS

50 : Treated with CGS (50  $\mu$ g/ml)

100 : Treated with CGS (100  $\mu$ g/ml)

200 : Treated with CGS (200  $\mu$ g/ml)

400 : Treated with CGS (400  $\mu$ g/ml)

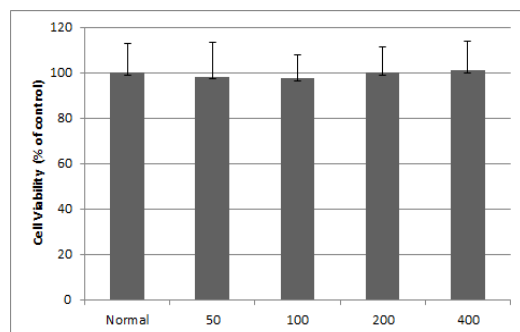


Fig. 1. The cytotoxic effect of Cheonggisan (CGS) water-extract on RAW 264.7 macrophage cells by MTT assay. Values are the mean  $\pm$  SD of the three independent experiments. Normal : not treated with CGS; 50-400 : treated with CGS (50, 100, 200 and 400  $\mu$ g/ml)

## 2. NO 생성에 미치는 영향

淸肌散이 마우스 대식세포의 NO 생성에 미치는 영향을 관찰하였다. LPS로 유도된 NO의 생성율을  $100 \pm 2.42\%$ 로 계산하였을 때 淸肌散 200  $\mu\text{g/ml}$ , 400  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 군에서 LPS 단독 처리한 군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다(Table 3, Fig. 2).

Table 3. The Effect of Cheonggisán (CGS) Water-Extract on NO Production of RAW 264.7 Macrophage Cells

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	NO production (% of control)
Control	100 $\pm$ 2.42
LPS + 50	101.80 $\pm$ 2.96
LPS + 100	98.89 $\pm$ 3.24
LPS + 200	80.31 $\pm$ 1.99*
LPS + 400	71.27 $\pm$ 2.58*

Values are the mean  $\pm$  SD of the three independent experiments.

Control : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 50 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (50  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 100 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (100  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 200 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (200  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 400 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (400  $\mu\text{g/ml}$ )

\* p < 0.05 compared with control

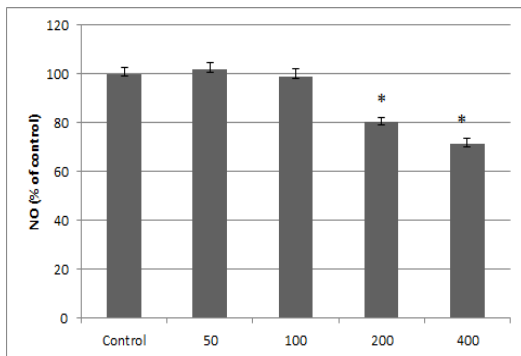


Fig. 2. The effect of Cheonggisán (CGS) water-extract on NO production of RAW 264.7 macrophage cells. Values are the mean  $\pm$  SD of the three independent experiments. Control : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ); 50–400 : treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (50, 100, 200 and 400  $\mu\text{g/ml}$ ).

\* p < 0.05 compared with control.

## 3. Prostaglandin E2 생성에 미치는 영향

淸肌散이 마우스 대식세포의 Prostaglandin E2(이하 PEG<sub>2</sub>) 생성에 미치는 영향을 관찰하였다. LPS로 유도된 PEG<sub>2</sub>의 생성율을  $100 \pm 1.10\%$ 로 계산하였을 때 淸肌散 400  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 군에서 LPS 단독

Table 4. The Effect of Cheonggisán (CGS) Water-Extract on PGE<sub>2</sub> Production of RAW 264.7 Macrophage Cells

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	PGE <sub>2</sub> production (% of control)
Control	100 $\pm$ 1.10
LPS + 50	100.78 $\pm$ 1.47
LPS + 100	97.54 $\pm$ 1.33
LPS + 200	91.67 $\pm$ 2.83
LPS + 400	82.82 $\pm$ 1.45*

Values are the mean  $\pm$  SD of the three independent experiments.

Control : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 50 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (50  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 100 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (100  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 200 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (200  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 400 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (400  $\mu\text{g/ml}$ )

\* p < 0.05 compared with control

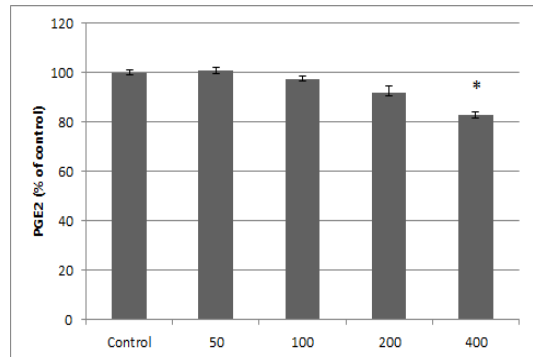


Fig. 3. The effect of Cheonggisán (CGS) water-extract on PGE<sub>2</sub> production of RAW 264.7 macrophage cells. Values are the mean  $\pm$  SD of the three independent experiments. Control : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ); 50–400 : treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (50, 100, 200 and 400  $\mu\text{g/ml}$ ).

\* p < 0.05 compared with control.

처리한 군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다(Table 4, Fig. 3).

#### 4. IL-1 $\beta$ 생성에 미치는 영향

淸肌散이 마우스 대식세포의 IL-1 $\beta$  생성에 미치는 영향을 관찰하였다. LPS로 유도된 IL-1 $\beta$ 의 생성율을  $100 \pm 7.14\%$ 로 계산하였을 때 淸肌散 400  $\mu\text{g/ml}$  농도

Table 5. The Effect of Cheonggisan (CGS) Water-Extract on Interleukin-1 $\beta$  Production of RAW 264.7 Macrophage Cells

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	IL-1 $\beta$ production (% of control)
Control	100 $\pm$ 7.14
LPS + 50	101.65 $\pm$ 6.28
LPS + 100	98.75 $\pm$ 10.49
LPS + 200	95.36 $\pm$ 5.83
LPS + 400	73.92 $\pm$ 4.27*

Values are the mean  $\pm$  SD of the three independent experiments.

Control : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 50 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (50  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 100 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (100  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 200 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (200  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 400 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (400  $\mu\text{g/ml}$ )

\* p < 0,05 compared with control

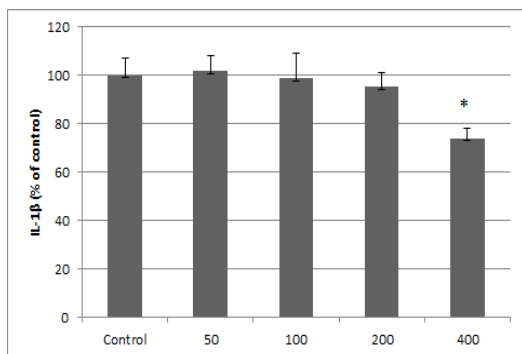


Fig. 4. The effect of Cheonggisan (CGS) water-extract on Interleukin-1 $\beta$  production of RAW 264.7 macrophage cells. Values are the mean  $\pm$  SD of the three independent experiments. Control : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ); 50-400 : treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (50, 100, 200 and 400  $\mu\text{g/ml}$ ).

\* p < 0,05 compared with control.

로 처리한 군에서 LPS 단독 처리한 군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다(Table 5, Fig. 4).

#### 5. IL-6 생성에 미치는 영향

淸肌散이 마우스 대식세포의 IL-6 생성에 미치는 영향을 관찰하였다. LPS로 유도된 IL-6의 생성율을

Table 6. The Effect of Cheonggisan (CGS) Water-Extract on Interleukin-6 Production of RAW 264.7 Macrophage Cells

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	IL-6 production (% of control)
Control	100 $\pm$ 1.83
LPS + 50	99.28 $\pm$ 1.33
LPS + 100	99.85 $\pm$ 1.69
LPS + 200	96.83 $\pm$ 0.86
LPS + 400	93.92 $\pm$ 2.33

Values are the mean  $\pm$  SD of the three independent experiments.

Control : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 50 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (50  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 100 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (100  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 200 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (200  $\mu\text{g/ml}$ )

LPS + 400 : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (400  $\mu\text{g/ml}$ )

\* p < 0,05 compared with control

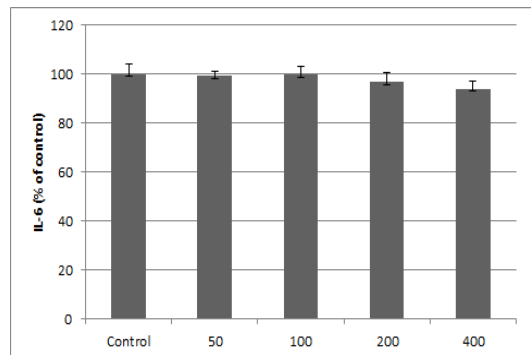


Fig. 5. The effect of Cheonggisan (CGS) water-extract on Interleukin-6 production of RAW 264.7 macrophage cells. Values are the mean  $\pm$  SD of the three independent experiments. Control : Treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ); 50-400 : treated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and CGS (50, 100, 200 and 400  $\mu\text{g/ml}$ ).

\* p < 0,05 compared with control.

100 ± 1.83%로 계산하였을 때 淸肌散을 처리한 모든 군에서 LPS 단독 처리한 군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타나지 않았다(Table 6, Fig. 5).

### 6. TNF-α 생성에 미치는 영향

淸肌散이 마우스 대식세포의 TNF-α 생성에 미치

Table 7. The Effect of Cheonggisgan (CGS) Water-Extract on Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) Production of RAW 264.7 Macrophage Cells

Concentration (μg/ml)	TNF-α production (% of control)
Control	100 ± 4.14
LPS + 50	97.31 ± 2.03
LPS + 100	89.74 ± 3.49
LPS + 200	84.17 ± 3.61
LPS + 400	79.40 ± 3.26*

Values are the mean ± SD of the three independent experiments.

Control : Treated with LPS (1 μg/ml)

LPS + 50 : Treated with LPS (1 μg/ml) and CGS (50 μg/ml)

LPS + 100 : Treated with LPS (1 μg/ml) and CGS (100 μg/ml)

LPS + 200 : Treated with LPS (1 μg/ml) and CGS (200 μg/ml)

LPS + 400 : Treated with LPS (1 μg/ml) and CGS (400 μg/ml)

\* p < 0,05 compared with control

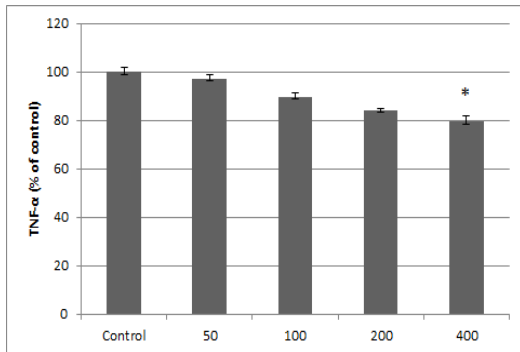


Fig. 6. The effect of Cheonggisgan (CGS) water-extract on Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) production of RAW 264.7 macrophage cells. Values are the mean ± SD of the three independent experiments. Control : Treated with LPS (1 μg/ml); 50-400 : treated with LPS (1 μg/ml) and CGS (50, 100, 200 and 400 μg/ml).

\* p < 0,05 compared with control.

는 영향을 관찰하였다. LPS로 유도된 TNF-α의 생성율을 100 ± 4.14%로 계산하였을 때 淸肌散 400 μg/ml 처리한 군에서 LPS 단독 처리한 군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다(Table 7, Fig. 6).

## IV. 고 찰

알레르기 질환(Allergic disease)이란 자가면역질환(autoimmune disease) 및 교원병(collagen disease), 아나필락시스 쇼크(anaphylaxis shock), 천식, 알레르기 비염, 아토피 피부염 등을 포함하는 질환군으로<sup>3)</sup> 면역계의 방어기능이 무제한 항원에 응답하여 오히려 인체에 유해하게 작용하는 일련의 반응들을 말한다<sup>22)</sup>. 알레르기 질환은 유전적 소인 및 환경적 요인의 복합적인 작용으로 연령에 무관히 발병하며<sup>4)</sup> 산업화와 더불어 그 발병율이 급격히 증가하고 있다. 알레르기 반응은 일반적으로 혈청의 면역글로불린이 관여하는 즉시형 반응인 I, II, III형과 세포성 항체에 의한 지연형 반응인 IV형으로 나뉘는데<sup>2)</sup>, 이중 통상적으로 알레르기 질환으로 일컬어지는 유형은 I형으로 알레르기과 연관된 세포들에서 분비되는 각종 화학 매개물질들이 유발하는 직·간접적인 약리작용 및 이로 인해 야기되는 염증반응에 의한 것이며 아토피 피부염, 기관지 천식, 알레르기 비염 등이 이에 속한다<sup>24)</sup>.

한의학에서 알레르기와 정확히 일치하는 병명은 없지만, 알레르기 질환과 연관된 최초의 기록으로 神農氏의 말고기 섭취 후 皮膚 惡瘡를 앓은 사람에 대한 기록이 전해지며<sup>25)</sup>, 巢元方은 『諸病源候論』<sup>26)</sup>에서 “漆有毒，人有稟性畏漆，但見漆便中其毒，喜面痒然後胸臂脛膕皆悉癢……若火燒漆，其毒氣則癘，著人急重，亦有性自耐者，終日淺煮，竟不爲害也”，“人無問男女大小，有稟性不耐漆者，見漆及新漆者，便著漆毒”라 하여 사람에게 따라 특정 물질에 대하여 알레르기의 발생 여부에 차이가 있다고 하여 일찍이 알레르기 질환에 대해 인식하고 있었다고 볼 수 있다. 또한 『素問瘡

論』에서도 "衛氣之所在與邪氣相合則病作"이라 하여 위기는 면역기능과 같은 작용을 한다고 하여 表部에서 外邪에 대한 저항력을 나타내는 위기의 견고한 정도가 면역계 불균형으로 인한 알레르기 질환의 발병 여부로 이해되고 있다<sup>27)</sup>.

Nitric oxide (NO)는 여러 조직과 세포에서 Larginine으로부터 Nitric Oxide Synthase (NOS)에 의해 생성되며, 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>28)</sup>. NO를 생성하는 NOS는 세포질 내에 항상 미량으로 존재하는 constitutive form (cNOS)와 면역학적 변화에 의해 유도되는 inducible form (iNOS)으로 나눌 수 있으며, NO가 혈관 투과성을 증가시켜 부종을 일으키는 등 염증반응을 야기하거나 cyclooxygenase (COX)의 활성을 촉진시켜 prostaglandin 등의 합성을 촉진하여 다양한 급성 또는 만성 염증 반응을 심화시키는 것으로 알려져 있다<sup>31,32)</sup>.

Prostaglandin E2(PGE2)는 prostaglandin endoperoxide synthase인 COX-2에 의해 합성되는 염증물질로서 NO와 마찬가지로 다양한 염증질환의 병태생리에 기여하며<sup>31,32)</sup>, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )는 염증 반응 초기에 해당 부위로 호중구를 유도하며, 급성 염증 반응을 일으키고 악화시키는 인자이며<sup>33)</sup> 혈소판활성인자 및 arachidonic acid 대사물질들을 생성하여 후기반응을 일으키는 기전에서 주요역할을 하는 인자로 생각된다<sup>7)</sup>. IL-1 $\beta$ 는 대식세포를 활성화시키고 림프구 및 호중구의 내피세포 접착을 항진시키며, 케모카인의 생성을 유도하여 염증 부위에 염증세포의 침윤을 상승시킨다<sup>34)</sup>. 또한 IL-6는 B림프구의 분화와 성장을 증가시키고 알레르기성 질병을 포함하여 염증성 질환을 만성적인 단계로 발달시킨다<sup>35)</sup>.

본 실험에 사용한 淸肌散은 元代 危亦林的 『世醫得效方』<sup>14)</sup>에서 "治風寒暑濕外搏 肌膚發爲癩疹 遍身搔癢 或赤或白 口苦咽乾 或作寒熱"이라 하여 風寒暑濕의 邪氣가 肌膚에 울체되어 발생한 癩疹에 사용하

였으며, 『東醫寶鑑』<sup>15)</sup>에 인용된 이래 현재까지 급성기 피부 질환에 많이 활용되고 있는 처방이다<sup>16)</sup>.

이에 본 연구에서는 피부질환 급성기에 사용하는 淸肌散의 알레르기 후기반응에 관련된 염증 억제 효과를 확인하기 위하여 LPS로 자극된 RAW 264.7 macrophages에서 NO와 Prostaglandin E2의 생성변화를 측정하였고, cytokine인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등의 생성에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험에 사용된 淸肌散 추출물의 세포독성을 알아보기 위해 RAW 264.7 대식세포에 각각 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 MTT assay를 시행한 결과 모든 농도에서 세포독성은 관찰되지 않았다 (Table 2, Fig. 1).

淸肌散 추출물의 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 NO assay를 시행한 결과 200  $\mu\text{g/ml}$  및 400  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 군에서 LPS 단독 처리한 군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다 (Table 3, Fig. 2).

淸肌散 추출물의 Prostaglandin E2 생성에 미치는 영향을 실험한 결과 400  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 군에서 LPS 단독 처리한 군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다 (Table 4, Fig. 3).

淸肌散 추출물의 IL-1 $\beta$  생성에 미치는 영향을 실험한 결과 400  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 군에서 LPS 단독 처리한 군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다 (Table 5, Fig. 4).

淸肌散 추출물의 IL-6 생성에 미치는 영향을 실험한 결과 모든 농도에서 LPS 단독 처리한 군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타나지 않았다 (Table 6, Fig. 5).

淸肌散 추출물의 TNF- $\alpha$  생성에 미치는 영향을 실험한 결과 400  $\mu\text{g/ml}$  처리한 군에서 LPS 단독 처리한 군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다 (Table 7, Fig. 6).

본 연구를 통해 임상에서 피부질환의 급성기에 많이 활용되고 있는 淸肌散이 만성 염증반응에 중요한



역할을 하는 염증물질인 NO, PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제함을 확인할 수 있었지만 이에 대한 기전 연구 등 후속 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

알레르기 후기 염증반응에 있어 淸肌散의 염증억제 기전을 확인하기 위하여 LPS를 처리하여 염증을 유도한 RAW 264.7 대식세포에 淸肌散 추출물을 농도별로 처리하여 NO, Prostaglandin E<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 淸肌散 추출물은 모든 농도에서 세포독성이 없었다.
2. 淸肌散 추출물은 200, 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 NO의 생성을 억제하였다.
3. 淸肌散 추출물은 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 PGE<sub>2</sub> 생성을 감소시켰다.
4. 淸肌散 추출물은 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 IL-1 $\beta$  생성을 감소시켰다.
5. 淸肌散 추출물은 모든 농도에서 IL-6 생성을 감소시키지 못했다.
6. 淸肌散 추출물은 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 TNF- $\alpha$  생성을 감소시켰다.

## References

1. Seoul National University College of Medicine, Immunology. Seoul:Seoul National University publisher, 1987:188-97.
2. Jo MS, Han JK, Kim YH, Anti-allergic Effects of Chungshimbohyeoltang in RBL-2H3 Mast Cells and OVA/alum sensitized Mice, J

- Korean Orient Pediatr, 2012;26(3):30-45.
3. Kim HS, Jeon IH, Mok JY, Kang HJ, Shin JH, Park YK, et al. Anti-Allergy and Anti-Pruritic Effects of Diospyros lotus L. Leaf Extract, Kor J Pharmacogn, 2013;44(1): 60-9.
4. Moon HB, Clinical features of allergic disease. 1st ed, Seoul:Ryo Moon Gak, 1995:2-11, 170-85.
5. Church MK, Caulfield JP. Mast cell and basophil functions. In: Holgate ST, Church MK, Allergy. 1st ed. London:Gower Medical Publishing, 1993:pp.5.1-5.12.
6. You JS, Kim SY, Kim SH, Shin TY. Antiallergic and Anti-inflammatory Effects of Perilla frutescens var. acuta, Kor J Pharmacogn, 2012;43(2):163-5.
7. Choe IH, Han SJ, Lee HG. New insight an late response of allergic inflammation, J Asthma Allergy Clin Immunol, 2003;23(4): 715-24.
8. Yeom YR, Jung HJ, Kim JJ, Jung SK. An Experimental Study on the Anti-inflammatory Effect of Taeumjowui-tang(Taiyintiaoweitang) in Allergic Late Inflammation, Korean J Orient Int Med, 2010;31(4):846-56.
9. Kim YM, Cudrania tricuspidata Suppresses Mast Cell-Mediated Allergic Response In Vitro and In Vivo, Yakhak Hoeji, 2012;56(1):26-34.
10. You JS, Chae BS, Kim DK, Cui X, Park JS, Lee JH, et al. Antiallergic and Anti-inflammatory Effects of the Viticis Fructus, Kor J Pharmacogn, 2013;44(3):286-90.
11. Jung JK, Park YK, Effects of Saposhnikovia Radix on allergic responses in OVA-induced Allergic rhinitis mice, Kor J Herbology,

- 2012;27(5):85-91.
12. Kim SB, Kang BH, Kwon HS, Kang JH. Antiinflammatory and Antiallergic Activity of Fermented Turmeric by *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203. *Korean J Microbiol Biotechnol*. 2011;39(3):266-73.
  13. Jung JK, Park YK. Anti-allergic effect of Okbyungpoongsan-Hap-Changjisan. *Kor J Herbology*. 2010;25(2):55-63.
  14. Wei YL. *Seuideukhyobang*. Shanghai:Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1997:962.
  15. Heo J. *Donguibogam*. Kyungnam:Donguibogam Publisher, 2010:731.
  16. Lee JD. *New edition Frequent 202 Korean herbal medicine prescriptions*. 1st ed. Seoul: Jungdam, 2005:758.
  17. Park EJ, Kim YG. Effects of Cheonggisn and Gagamcheonggisn on the anti-allergic and immune responses in mice. *J Korean Orient Pediatr*. 1998;12(1):183-210.
  18. Ku YH, Hong SU. Therapeutic Effects of Cheonggisn Extract on Th2 cell differentiation and NF- $\kappa$ B p65 activation. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2007;20(3):63-70.
  19. Lee YJ, Sim BY, Lee HJ, Bak JW, Kim DH. Effect of Gami-Chunggisn on Antioxidant and Pro-Inflammatory Cytokine. *Kor J Herbology*. 2014;29(4):69-76.
  20. Ahn SH, Kim HH, Kim JT. Cheonggi-san Inhibits Atopy Dermatitis in NC/Nga Mouse through Regulation of iNOS mRNA Expression & NO production. *Korean J Physiology & Pathology*. 2007;21(5):1092-8.
  21. Son DB, Seo ES, Yun CS, Kim NK, Hwang CY. Effects of Chunggi-san Administration along with Samhwangseze-gami bang on NC/Nga Atopic Mice. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2008;22(5):1168-77.
  22. Ku YH, Hong SU. Therapeutic Effects of Cheonggi-san Extract on NC/Nga Mice with Atopic Dermatitis-like Skin lesions. *J Korean Oriental Med*. 2008;29(1):179-91.
  23. Koo JS, Seo BI. A clinical study on a patient with atopic dermatitis. *Kor J Herbology*. 2014;29(4):9-12.
  24. Lee WG, Hong EG, Kim BH, Kim KS, Nam HJ, Kim YB. A Review of Experimental Study for Herbal Medicines of Anti-allergic Effects. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2012;25(3):34-55.
  25. Kang BS. *Korean medicine clinical treatment of allergic diseases*. Seoul:Seongbosa, 1988:23.
  26. Chao YF. *Jebyeongwonhuron*. Beijing:People's Medical Publishing House Co, 1983:18-20, 170-2.
  27. Luo HS, Ahn DK. *Immunology&Traditional Chinese medicine*. 2nd rev. ed. Seoul:The Open Books co, 1994:19-48.
  28. Garthwaite J. New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. *Mol. Cell Biochem*. 2010;334: 221-32.
  29. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357:593-615.
  30. De Cruz SJ, Kenyon NJ, Sandrock CE. Bench-to-bedside review: the role of nitric oxide in sepsis. *Expert Rev Respir Med*. 2009;3:511-21.
  31. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a

- therapeutic target. *Annual review of medicine*. 2002;53:35-57.
32. Rocca B, FitzGerald GA. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *International immunopharmacology*. 2002;2(5):603-30.
33. Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA. Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science*. 1992;258:1957-9.
34. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 6th ed. London: Mosby. 2002:119, 128, 441.
35. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy*. 2006;8(Suppl 2):S3.