

加味升麻葛根湯이 면역반응에 미치는 실험적 연구

이준희* · 박재현** · 강윤호***

I. 서론

면역과민반응(immune hypersensitivity)은 항원에 대한 인체의 여러 면역반응들이 異常 亢進되어 결과적으로 염증반응을 비롯한 각종 조직손상 등이 초래되는 과정이며⁶⁾, allergy성 접촉피부염은 T 세포 hypersensitivity의 전형적인 형태이고 염증반응이 비교적 늦게 나타나는 지연형과민반응(delayed type hypersensitivity reactions ; DTH)에 속한다.^{3,6,30,31,36)}

Allergy성 접촉피부염은 allergen에 접촉된 부위의 습진성 피부질환을 특징으로 하며^{1,5,6,8,9)}, Langerhans 세포가 hapten-carrier conjugates를 T 세포에 제공하여 IL-2를 비롯한 많은 cytokine의 방출을 유발하므로써 나타나는데, 이들 cytokine들은 작동세포의 보강, 염증유발 및 세포독성 등의 작용을 발휘한다.^{5,30,31,36)} 그 결과 국부에 염증반응이 야기되며, 원인물질에 따라 특정 부위에 發赤, 搔痒, 發疹, 腫脹, 丘疹 등의 濕疹狀 변화를 일으키는데, 한의학에서는 斑疹, 癩疹, 斑瘡, 面遊風, 漆瘡, 膏藥風 등의 범주에 속한다.^{11,12,18,22,23,25,26)}

Allergy성 접촉피부염의 치료에는 항histamine 제, 부신피질호르몬제, 면역억제제 등의 대증

요법과 회피요법이 주로 사용되고 있으나^{6,7,32,35)}, 이러한 방법은 효능과 부작용 등에서 치료에 한계가 있는 실정이다.

升麻葛根湯은 <閻氏小兒方論>²⁶⁾에 “瘡疹已發或未發方”이라 하여 최초로 수록된 處方이며, 瘡疹 등에 사용되어 온 要方이다. 李²⁵⁾는 斑과 疹이 火因屬으로서 外感斑疹에 本方을 사용한다 하였고, 趙²⁷⁾는 解肌透疹劑로서 皮膚炎에 효능이 있다고 하였다.

升麻葛根湯에 대한 실험 연구로는 姜¹⁵⁾이 thpphoid vaccine에 의한 해열작용과 histamine 유발 혈관투과성 반응의 감소 효과를 보고하였으며, 趙²⁰⁾는 tetracycline-HCL과 병용 투여 시에 抗茵 및 抗炎症 효과가 있음을 보고하였고, 金¹⁹⁾은 histamine으로 유발된 면역반응으로 항 histamine 효과가 있음을 보고한 바 있다. 한편 權¹⁶⁾은 清熱解毒 解表透疹의 효능이 있는 連翹敗毒散加味方으로 allergy성 접촉피부염에 대하여 면역억제효과가 있음을 보고한 바 있다.

이에 저자는 解肌透疹하는 효능^{2,27)}이 있는 升麻葛根湯이 allergy성 접촉피부염에 면역억제 효과를 나타낼 것으로 사료되어, 清熱解毒하는 金銀花, 清熱消腫解毒하는 樺皮 등, 그리고 養血潤燥의 효능을 지닌 四物湯을 合方한 加味升麻葛根湯을 DNCB감작에 의하여 allergy성 접촉피부염이 유발된 흰쥐에 투여하여, 면역억제효과를 면역학적인 방법으로 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

* 부산동래제일한방병원

** 경산대학교 한의과대학 내과학 교실

*** 동국대학교 한의과대학 내과학 교실

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

대한실험동물센터에서 분양받은 대령 4주된 BALB/C계 생쥐 암컷을 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 20g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 정상군, DNCB 처리군, DNCB 처리 후 加味升麻葛根湯 추출물 投與群(GMSG군)으로 나눈 후, 다시 DNCB 처리 후 시간의 경과에 따라 24, 48 그리고 72시간으로 세분시켰으며 각각에 5마리씩 배정하였다. 한편 Contact hypersensitivity assay(ear paint test)를 위해 각 군에 별도로 10마리씩 배정하여 실험하였다.

2) 약재

본 실험에서 사용된 加味升麻葛根湯은 동국대학교 한방병원에서 조제된 것으로 1첩의 분량은 다음과 같다.

Table 1. The amount and composition of Gamiseungmagalgeuntang Extract.

漢藥名	生藥名	중량(g)
葛根	<i>Puerarine Radix</i>	8
白芍藥	<i>Paeoniae Radix alba</i>	4
升麻	<i>Cimicifuge Rhizoma</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
山查	<i>Crataegii Fructus</i>	6
樺皮	<i>Betula Platyphyllae Cortex</i>	8
金根花	<i>Lonicerae Flos</i>	8
玄參	<i>Scrophulariae Radix</i>	6
牛蒡子	<i>Arctii Fructus</i>	4
荊芥	<i>Schizonepetae Herba</i>	4
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	2
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
川芎	<i>Chudii Rhizoma</i>	2
총중량		64

2. 방법

1) DNCB의 제조

본 실험에서 사용된 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB: Sigma, USA)은 acetone과 olive oil이 4:1로 혼합된 용액에 5%로 희석한 다음 사용되었다.

2) DNCB 도포에 의한 Allergy성 접촉피부염의 유발

DNCB처리군과 GMSG군에 5% DNCB 25 μ l를 면도된 오른쪽 위쪽 살부위복부 2cm²에 도포하여 1차 감작시켰다. 1차 감작 이후 14일째 되었을 때 생쥐 오른쪽 복부에 2.5% DNCB 4 μ l를 도포하여 2차 감작시켰다.

3) 加味升麻葛根湯 추출물의 제조와 투여

加味升麻葛根湯 2첩 분량을 증류수 2000ml에 넣고 2시간동안 전탕한 후 원심분리하여 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator로 100ml로 농축하였다. 농축된 加味升麻葛根湯 추출액은 GMSG군에 DNCB 처리 후 매일 3.3 ml/kg씩 음용투여하였다.

4) Contact hypersensitivity assay

1차 감작된 DNCB처리군과 GMSG군에서 contact hypersensitivity assay를 실시하기 위해 생쥐 오른쪽 귀에 2.5% DNCB 4 μ l를 도포하여 2차 감작시켰다. 2차 감작 후 24, 48 그리고 72시간에 오른쪽 귀의 두께를 dial thickness cage(Mitutoyo, JAPAN)로 측정 한 후 Ear swelling 평균값을 구하여 각각의 차이를 비교하였다.

5) 피부와 주변림프절의 조직표본 제작

DNCB 처리군과 GMSG군을 DNCB의 2차 감작 후 24, 48 그리고 72시간에 경추탈구로 희생시켰다. DNCB 도포부위에서 얻어진 피부절편과 림프절은 10% 中性 포르말린용액에 실은

에서 24시간동안 고정한 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5 μ m 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 Hematoxyline과 Eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다.

6) 피부내 비만세포 분포변화의 관찰

2차 감작 후 DNCB처리군과 GMSG군 피부의 진피층에 나타나는 비만세포의 분포 변화를 관찰하기 위해서 5 μ m의 연속절편을 Luna's method에 의거하여 aldehyde fuchsin에 30분간 염색한 다음 Weigert's iron hematoxylin과 methyl orange solution에 각 각 1분, 5분동안 대조염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

7) 피부내 CD11b와 VCAM-1 분포변화 관찰

2차 감작 후 DNCB처리군과 GMSG군 피부의 진피층에 나타나는 CD11b와 vascular cell adhesion molecular-1(VCAM-1)의 분포 변화를 관찰하기 위해서 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 0.05% pepsin이 포함된 0.01N HCl 용액(pH2.0)에 5분동안의 proteolysis 과정을 거친 후 1:500으로 희석된 normal goat serum(DAKO, Denmark)에 30분동안 반응시킨 다음 1:500으로 희석된 1차 항체인 rat anti-mouse CD11b(CR3; Serotec, England)와 rat anti-mouse CD106(VCAM-1; Serotec, England)에 실온에서 24시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 1:250으로 희석된 2차 항체인 biotinylated goat anti-rat IgG(Vector, USA)에 12시간동안 반응시킨 후 ABC에 30분간 반응시킨 후 DAB로 발색하고 Hematoxylin에 대조 염색한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

8) 림프절내 T 세포의 분포변화 관찰

2차 감작 후 DNCB처리군과 GMSG군 림프절의 T 세포의 분포변화를 관찰하기 위해서 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 조직절편을 0.05% pepsin이 포함된 0.01N HCl 용액(pH2.0)에 5분동안의 proteolysis 과정을 거친 후 1:500으로

로 희석된 normal rabbit serum(NRS; Vector, USA)에 30분동안 반응시킨 후 수세하고 1:500으로 희석한 1차 항체인 rat anti-mouse CD4(L3T4; Caltag, USA), rat anti-mouse CD8(Ly-2; Caltag, USA) 그리고 rat anti-mouse CD25R(IL-2 receptor; Caltag, USA)에 실온에서 24시간동안 반응시킨 후 수세하였다. 그런 다음 1:250으로 희석된 2차 항체인 biotinylated rabbit anti-rat IgG(Vector, USA)에 실온에서 12시간동안 반응시킨 후 수세하고 ABC에 30분간 반응시켰다. 통상적인 방법으로 DAB로 발색하고 Hematoxylin에 대조 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

9) 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과의 통계처리와 유의성 검정은 Sigma Plot program 5.0(Sigma, USA)에 의해서 처리되었다.

III. 실험성적

1. Contact hypersensitivity assay

DNCB 처리군에서는 2차감작 후 24시간이 경과했을 때 오른쪽 귀의 두께는 $326 \pm 3 \mu\text{m}$ 로 2차 감작전의 $307 \pm 3 \mu\text{m}$ 에 비해 증가된 양상을 보였으며 이러한 증가는 48시간이 되었을 때 $335 \pm 4 \mu\text{m}$ 으로 가장 높은 증가를 보이는 것으로 관찰되었다. 그러나 이러한 증가도 72시간이 되었을 때에는 오히려 $328 \pm 4 \mu\text{m}$ 으로 약간 감소되는 경향성을 보였으나, 여전히 2차 감작 전 귀두께에 비해서는 월등히 증가된 것으로 나타났다.

한편 GMSG군은 실험기간동안 DNCB 처리군에 비해서는 유의성 있는 감소경향을 전 실험기간 동안 관찰할 수 있었다. 2차 감작 후 GMSG군의 귀의 두께는 24시간에 $313 \pm 3 \mu\text{m}$, 48시간에는 $323 \pm 4 \mu\text{m}$ 그리고 72시간에는 $320 \pm 2 \mu\text{m}$ 로 측정되었다.

Table 3. The inhibition Effect of Ear swelling in Mouse administered Gamiseunggaltang(GMSG) Extract after secondary sensitization by 2.5% DNCB painting. The mean of Ear swelling began to increase and reach a peak at hour-48 after secondary sensitization. The increase of Ear swelling in Mouse treated with GMSG Extract noticeably mitigated than DNCB painted group for experimental period and this inhibition had probability in $P < 0.05$ of student T test.

group	Initiation	24	48	72 hrs
DNCB	307.4±2.5	325.7±3.1	335.3±3.5	327.7±4.2
GMSG	306.8±1.7	313.3±2.5*	323.3±4.1*	319.7±1.5*

Abbreviation> $M \pm S.D$: Mean \pm standard Deviation, DNCB : DNCB painted group, GMSG : Gamiseunggaltang Extracts administered group after DNCB painting., * : $P < 0.05$ compared with DNCB.

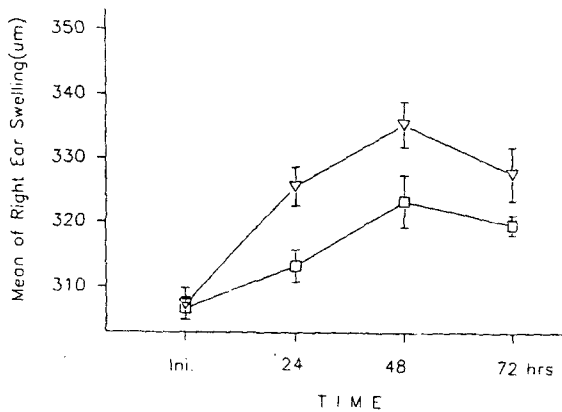


Fig. 1 The inhibition Effect of Ear swelling in Mouse administered GMSG Extract after secondary sensitization by 2.5% DNCB painting. The mean of Ear swelling began to increase and reach a peak at hour-48 after secondary sensitization. The increase of Ear swelling in mouse treated with GMSG Extract significantly mitigated than DNCB painted group for experimental period.

Abbreviation> ∇ : DNCB painted group,
 \square : Gamiseunggaltang Extracts administered group

2. 피부 진피내 미세환경 변화

1) 비만세포의 분포변화

DNCB 처리군에서 나타나는 비만세포의 분포 변화는 DNCB 2차 감작 후 시간이 경과할수록 표피쪽 진피에서 수가 증가하는 것으로 관찰되었고 그 형태는 주로 degranulated type(Fig. 5)으로 나타났다.(Fig. 2) 이러한 degranulated type의 비만세포는 48시간에서 많이 관찰되었다. 이러한 GMSG군도 DNCB 처리군과 같이 DNCB 2차 감작 후 시간의 경과에 따른 증가 경향은 유사하였지만 DNCB 처리군보다는 적은 수였다.(Fig. 3) 특히 GMSG군에서는 degranulated type보다는 granulated type(Fig. 4)의 비만세포가 많이 관찰되었다.

2) 피부상피내 VCAM-1 분포 변화

DNCB 처리군과 GMSG군에서의 DNCB 2차 감작 후 48시간의 VCAM-1 양성반응세포의 분포 차이를 피부상피에서 관찰하였다. 우선 DNCB 처리군에서는 VCAM-1 양성 반응세포가 정상군에 비해 증가된 양상으로 나타났다.(Fig. 6) 반면에 GMSG군에서는 VCAM-1 양성반응

세포가 일부 피부상피세포에서 나타났지만, DNCB 처리군보다는 그 수가 훨씬 적었다.(Fig. 7)

3) 피부내 CD11b 분포 변화

DNCB 2차 감작 후 48시간이 지난 후 DNCB 처리군과 GMSG군에서의 CD11b 양성 반응세포의 분포 차이를 관찰하였다. 우선 DNCB 처리군에서는 CD11b 양성반응세포가 진피층에서 나타났으며 그 수는 정상군에 비해 증가된 것으로 나타났다(Fig. 8). 반면에 GMSG군에서는 CD11b 양성반응세포가 일부 진피층에서 나타났지만, 그 수는 거의 정상군과 비슷하였다(Fig. 9).

3. DNCB 도포 피부 주변 림프절의 T 세포와 IL-2R의 변화

1) T 세포의 변화

주변 림프절에서 DNCB 처리군과 GMSG군에서의 DNCB 2차 감작 후 48시간의 도움 T 세포의 분포 차이를 관찰하였다. 우선 DNCB 처리군에서 CD4 양성반응세포는 수질부(medulla)에서 많은 수가 나타났으며 세포질부분의 비율이 커져 있는 림프아세포(lymphoblast)의 세포형태로 관찰되었다.(Fig. 10) 그리고 CD4 양성반응성도 정상군에 비해 증가된 양상으로 나타났다. 그러나 GMSG군에서는 DNCB 처리군에 비해 적은 수의 CD4 양성반응의 림프아세포가 수질부에서 관찰되었으며 또한 CD4 양성반응성도 낮은 것으로 관찰되었다(Fig. 11).

한편 두군의 세포독성 T 세포의 분포는 도움 T 세포의 경향성과 일치하였으며 두 군에서 반응성의 차이도 관찰되지 않았다(Fig. 12, 13).

2) IL-2R의 변화

주변 림프절에서 DNCB 처리군과 GMSG군에서의 DNCB 2차 감작 후 48시간의 IL-2R

의 분포 차이를 관찰하였다. 우선 DNCB 처리군에서 CD25R 양성반응이 수질부에서 많이 나타났으며, 양성 반응성도 정상군보다는 강하게 나타났다.(Fig. 14) 그러나 GMSG군에서는 DNCB 처리군에 비해 적은 CD25R 양성반응을 수질부에서 보였으며 또한 CD25R의 양성반응성도 낮은 것으로 관찰되었다.(Fig. 15)

Legend for figures

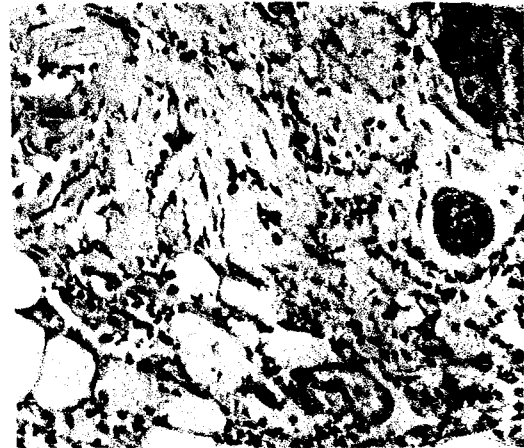


Fig. 2 The degranulated type of mast cell. Luna's method. $\times 1000$

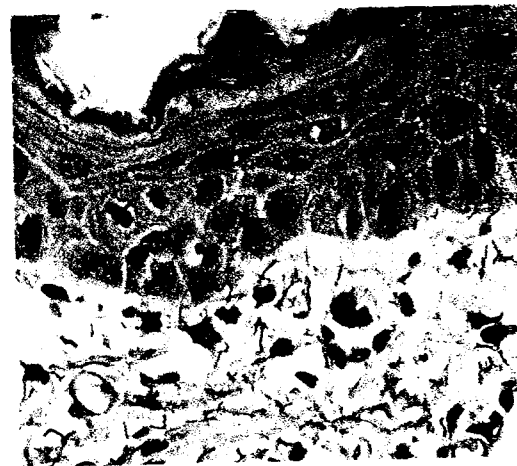


Fig. 3 The distribution of mast cell in mouse at hour-48 after secondary sensitization by DNCB painting. Luna's method. $\times 200$



Fig. 4 The distribution of mast cell in mouse at hour-48 after secondary sensitization by DNCB painting with daily MSG treatment. Luna's method. $\times 200$



Fig. 5 The granulated type of mast cell. Luna's method. $\times 1000$

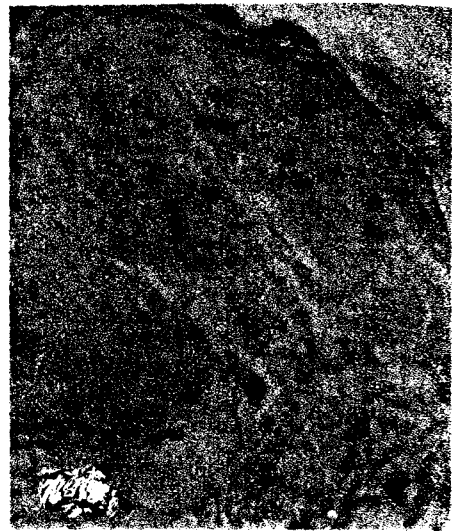


Fig. 6 The distribution of VCAM-1 in murin epidermis at hour-48 after secondary sensitization by DNCB painting. immunostain. $\times 400$



Fig. 7 The distribution of VCAM-1 in murin epidermis at hour-48 after secondary sensitization by DNCB painting with daily MSG treatment. immunostain. $\times 400$

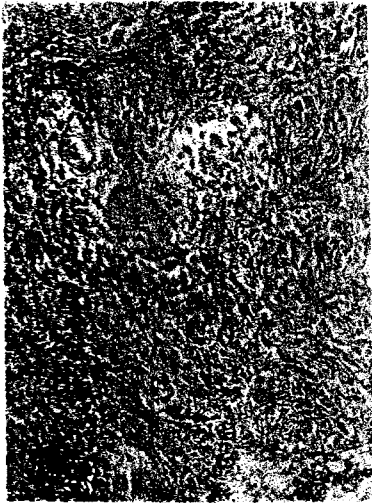


Fig. 8 The distribution of CD11b positive reacted cell in murin dermis at hour-48 after secondary sensitization by DNCB painting, immunostain. ×400

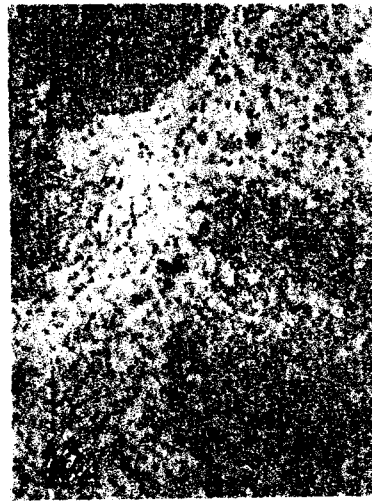


Fig. 10 The distribution of CD4 positive reacted cell in murin lymph node at hour-48 after secondary sensitization by DNCB painting, immunostain. ×400



Fig. 9 The distribution of CD11b positive reacted cell in murin dermis at hour-48 after secondary sensitization by DNCB painting with daily GSMG treatment, immunostain. ×400



Fig. 11 The distribution of CD4 positive reacted cell in murin lymph node at hour-48 after secondary sensitization by DNCB painting with daily GSMG treatment, immunostain. ×400

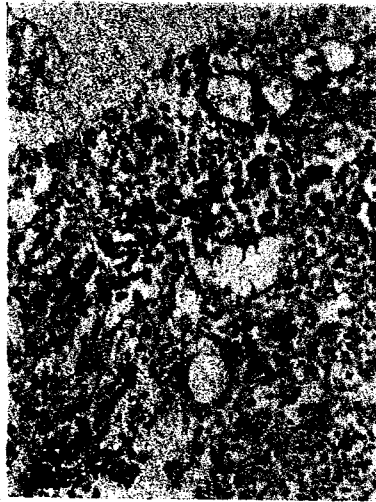


Fig. 12 The distribution of CD8 positive reacted cell in murin lymph node at hour-48 after secondary sensitization by DNCB painting. immunostain. $\times 400$

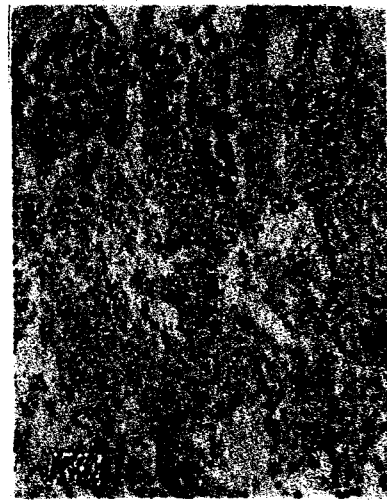


Fig. 14 The distribution of CD25R positive reacted cell in murin lymph node at hour-48 after secondary sensitization by DNCB painting. immunostain. $\times 400$



Fig. 13 The distribution of CD8 positive reacted cell in murin lymph node at hour-48 after secondary sensitization by DNCB painting with daily GMSG treatment. immunostain. $\times 400$

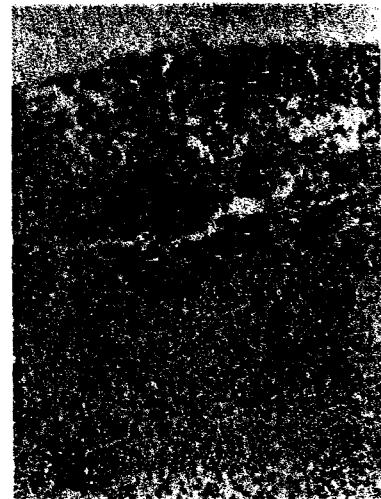


Fig. 15 The distribution of CD25R positive reacted cell in murin lymph node at hour-48 after secondary sensitization by DNCB painting with daily GMSG treatment. immunostain. $\times 400$

IV. 고찰

피부에는 림프구와 밀접한 관계를 가지는 항원전달세포인 Langerhans 세포와 피부의 면역기능에 관여하는 여러 가지 cytokines을 분비하는 각질형성세포가 있으며, 이들 세포와 주변의 림프절을 포함하여 skin associated lymphoid tissue(SALT)라고 하여 피부는 단순히 우리 몸을 보호하는 보호막 뿐만 아니라 하나의 총체적인 면역기관으로 간주되고 있다⁶⁾.

Allergy성 접촉피부염은 습진성 피부염의 일종으로, 항원 접촉시 수시간에서 72시간 정도 비교적 늦게 반응이 나타나므로 지연형과민반응이라 하고, 이 반응의 중추적인 세포는 T 세포로서 세포매개형(cell-mediated immunity, CMI)과민반응이라고도 한다^{3,5,6,8,9,30,31)}.

Allergy성 접촉피부염의 발생기전은 1차 감작단계와 2차 유발단계로 구성되는데, 먼저 표피의 allergen(lipid soluble hapten, low molecular weight)은 hapten carrier protein conjugates를 형성하게 되고 이들은 Langerhans 세포의 pinocytosis에 의하여 endosome을 형성하게 된다. Endosome은 MHC II를 가진 소포와 융합하게 되고, 이들 peptide-MHC II complex가 세포표면에 표현되어져 CD4⁺ T 세포(T_H)가 인지하게 된다. T 세포의 TCR이 MHC/peptide complex를 인지하여 IL-2를 비롯한 IFN- γ , TNF- β 등의 cytokine이 방출되고, 이들에 의해 CD4⁺ T 세포(T_H, T_{dth})와 CD8⁺ T 세포(T_c)의 면역 활성이 일어나게 된다. 감작된 T_{dth}는 순환계를 거쳐 내피세포복귀수용체(endothelial homing receptors)에 의하여 원래의 특정 항원노출지역으로 이주하게 되는 것이 감작단계라고 한다^{6,31,33,36,37,41)}.

유발단계는 allergen에 재노출되었을 때 이들 T_{dth}(memory T cell)세포가 Langerhans 세포에 의하여 항원을 제공받아 cytokine이 분비되고 각질형성세포(keratinocyte)표면에 표면 부착배위자(surface leukocyte adhesion ligand,

ICAM-1, VCAM-1)를 생성하여 결국 monocyte/macrophage 계열이 혈관 밖으로 빠져 나오게 된다. 이러한 일련의 반응을 거치면서 염증반응은 증폭이 되어 많은 백혈구가 병변부의 표피와 진피에 침윤하게 되며, 조직손상을 야기시켜 allergy성 접촉피부염을 유도하게 된다^{6,31,33,36,37,41)}.

Allergy성 접촉피부염은 대부분 유기화합물로 인하여 유발되며 옷나무, 고무, 금속, 향료 그리고 화장품 등도 원인 물질이 될 수 있다. 그 증상으로는 원인물질에 따라 發赤 搔癢 發疹 腫脹 丘疹 등의 경미한 변화와, 심할 경우 수포 미란 및 궤양 등의 습진상 변화를 일으킬 수 있다^{1,6,8,9,11,30)}.

Allergy성 접촉피부염의 치료제로는 항 histamine제, 부신피질호르몬제 등이 주로 사용되며, 근래에는 면역억제제가 이용되고 있다. 항 histamine제는 일시적으로 소양감을 완화시킬 수는 있으나 근본적인 치료제로는 부적합하며, 부신피질호르몬제는 급성신부전 등을 야기시킬 수 있으며, 장기 투여시에는 뇌하수체와 부신의 기능이 억제되어 체액 및 전해질의 균형장애, 과혈당증 및 당뇨, 결핵과 같은 이환성의 증가, 출혈성 궤양, 특징적인 근병증, 행동장애, 골다공증 등이 나타날 수 있어서 역시 근본적인 치료제로는 부적절한 것으로 알려져 있다. 근래에는 cyclosporine, FK506 등과 같은 면역억제제가 사용되고 있는데, 이들은 T_H 세포로부터 IL-2의 생성을 신속히 억제하며, 또한 IL-1에 대한 helper/inducer T 세포의 반응성을 감소시켜 과민반응의 치료에 효과적인 면은 있으나, 환자의 25~70%에서 신독성이 나타나고 있으며, 간독성 및 고혈압이 유발될 수 있고, 뇌전이가 잘 일어나는 악성림프종이 발생할 수 있어서 사용에 한계가 있는 실정이다^{7,9,32,38,41,43)}.

韓醫學에서는 각종 피부질환에 淸熱, 解毒, 涼血, 瀉火, 利濕 등의 治法이 응용되고 있으며^{11,12,14,23,24,25)}, 升麻葛根湯은 宋·錢²⁶⁾의 <閻氏小兒方論>에 “瘡疹已發或未發方”이라 하여 최

초로 수록된 處方이며, 瘡疹 등에 사용되어 온 要方이다. 李²⁵⁾는 斑과 疹이 火因屬으로서 外感斑疹에 本方을 사용한다 하였고, 蔡¹³⁾는 “發斑 欲出不出 寒暄不時 人多疾疫”을 治한다고 하였으며, 趙 등^{2,10,12)}은 解肌透疹劑로서 피부염에 효능이 있다고 하였다.

本方劑에 대한 연구로서 姜¹⁵⁾은 typhoid vaccine에 의한 解熱효과와 histamine 유발 혈관투과성 반응이 감소된다는 실험적 연구가 있으며 趙²⁰⁾는 tetracycline-HCL과 병용 투여시에 抗菌 및 抗炎효과가 증대되었다고 하고, 金¹⁹⁾은 항 histamine에 대한 혈관투과성의 억제효과와 DNCB유발 피부 홍반크기 및 상태변화의 경감효과가 있다고 하였으며, 金¹⁷⁾은 綿羊赤血球(SRBC)에 의한足浮腫의 감소효과와 대식세포의 貪食能 증가효과를 보고하였다. 劉²⁴⁾에 의하면 한약물중에 清熱解毒劑, 去風除濕劑, 活血化癥劑 등이 면역억제 작용을 할 것이라 하였으며 升麻葛根湯 구성약물의 藥性은 清涼, 清熱, 解毒, 海表, 升散의 작용이 있으므로 면역억제적인 기능을 하여 風熱毒의 증상인 피부염증반응에 광범위하게 활용되어 질 수 있을 것으로 생각된다.

清熱解毒하는 면역억제적인 면, 항염효과적인 면, 항 histamine에 대한 효과 등의 점에 착안하여 清熱解毒하는 牛蒡子, 金銀花와 清熱消腫解毒하는 樺皮 등 그리고 養血潤燥의 효능을 지닌 四物湯을 合方한 加味升麻葛根湯이 allergy성 접촉피부염에 면역억제 효과 및 염증반응을 완화시켜줄 것으로 생각되어 본 연구를 시행하였다.

실험에서 DNCB를 도포하여 접촉성 피부염을 유발시키고, 생쥐의 오른쪽 귀의 swelling 정도를 측정하여 contact hypersensitivity를 조사하였다. DNCB 처리군이나, 약물투여군 모두 48시간에 가장 심한 것으로 나타났으며, 이는 각종 보고^{1,6,30,31,36)}와 거의 일치되고 있음을 보여주고 있다. 한편 약물처리군에서의 swelling 정도가 DNCB 처리군에 비하여 유의성있는 감소경향을 나타내어 加味升麻葛根湯

의 清熱, 解毒하는 효과가 접촉피부염에서 발생하는 swelling상태를 경감시키는 작용을 하는 것으로 생각된다.

피부의 외형적 형태변화를 관찰한 바 DNCB 처리군은 2차 감작 후 24시간이 경과되었을 때 도포부위에서 붉은 좁쌀 형태의 erythematous papule이 일부 나타나는 피부손상이 시작되었으며, 48시간이 경과되었을 때는 그 생성부위가 확산된 모양으로 관찰되었다. 한편 加味升麻葛根湯 投與群에서 나타난 피부손상 정도는 DNCB 처리군보다는 완화된 것으로 관찰되었다.

Mast cell의 분포변화는 DNCB 2차 감작 후 시간이 경과할수록 진피에서 수가 증가하는 것으로 관찰되었고 그 형태는 주로 degranulated type으로 나타났다. 그러나 加味升麻葛根湯 投與群에서는 DNCB 처리군보다는 적은 수가 나타났으며 특히 degranulated type보다는 granulated type의 비만세포가 많이 관찰되었다. allergy성 접촉피부염의 소양감 등의 증상이 비만세포가 탈과립화되어 염증관여물질(mediator)이 분비되어 림프구를 비롯한 염증관여세포의 혈관투과성을 증가시켜 발생하는 것으로 보고^{39,40,43)}된 바에 의하면, 加味升麻葛根湯이 mast cell의 탈과립현상을 억제시켜 염증관여물질의 절대적 양을 감소시키고 아울러 모세혈관의 직경이 적게 확장되게 하고, 혈관투과성을 억제하게 하여 염증반응이 약화된 것으로 사료된다.

피부상피내 VCAM-1과 CD11b 분포 변화는 DNCB 처리군에서는 VCAM-1, CD11b 양성 반응세포가 증가된 양상으로 피부상피세포에서 나타났다. 반면에 加味升麻葛根湯 投與群에서는 VCAM-1 양성반응세포가 일부 피부상피세포에서 나타났지만, DNCB 처리군보다는 그 수가 훨씬 적었고, phagocytosis를 하는 granulocytes와 monocytes의 표현분자인 CD11b가 감소한 것은 항원에 노출되어 염증반응이 진행될 때 이들 adhesion물질들이 증가된다는 사실로 미루어^{6,28,30,31,32,36)} 加味升麻葛根湯이 이들 물질의 활성을 억제시켜 염증관련세포의 이주 감소로

염증반응을 약화시켰을 것으로 사료된다.

DNCB 도포 피부 주변 림프질의 T 세포의 분포 차이는 DNCB 처리군에 비해 加味升麻葛根湯 投與群에서 적은 수의 CD4 양성반응의 림프아세포가 수질부에서 관찰되었으며 또한 CD4 양성반응성도 낮은 것으로 관찰되었다. 그리고 두 군의 cytotoxic T 세포의 분포는 helper T 세포의 경향성과 일치하였으며 두 군에서 반응성의 차이도 관찰되지 않았다. IL-2R의 변화는 DNCB 처리군에 비하여 加味升麻葛根湯 投與群에서 적은 CD25R 양성반응을 수질부에서 보였으며 또한 CD25R의 양성반응성도 낮은 것으로 관찰되었다. IL-2는 T 세포에서 분비되고, T 세포를 활성화하여 T 세포 분열을 증가시킨다(*autocrine action*)^{21,29,34}. 그러나 본 실험에서는 이들의 반응성이 약화되는 것으로 나타났다. 지연형면역과민반응에서 주된 역할을 하는 림프구와 cytokine인 이들의 반응성의 감소는 加味升麻葛根湯이 T 세포의 활성화 및 IL-2 분비를 억제시켜 지연형면역과민반응을 약화시켰을 것으로 사료된다. 이에 T 세포 자체의 활성이 억제된 것인지, 또는 Langerhans 세포에서 T 세포로의 항원 제공이 억제되어 T 세포의 역할이 줄어든 것인지는 좀 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

Allergy성 접촉피부염에 加味升麻葛根湯을 투여하여 면역학적인 변화를 관찰한 바, 기저세포에서의 세포분열의 증가와, CD4⁺ T 세포 및 IL-2R의 감소, adhesion molecule의 감소등의 결과로 加味升麻葛根湯이 allergy성 접촉피부염증반응을 억제시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 加味升麻葛根湯이 allergy성 접촉피부염증반응에 안전한 면역 억제적인 효과와 치료효과가 인정되는 바 임상에서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료되며, 좀 더 심도깊은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

加味升麻葛根湯의 allergy성 접촉피부염에 대한 염증완화 및 면역억제효과를 관찰하기 위하여 DNCB감작으로 allergy성 접촉피부염이 유발된 생쥐에 加味升麻葛根湯 추출물을 음용 투여한 후 contact hypersensitivity assay와 비만세포, VCAM-1, 및 림프질의 T 세포 등의 변화를 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Contact hypersensitivity assay의 결과 加味升麻葛根湯 投與群은 DNCB 처리군에 비하여 ear swelling이 약하게 나타났다.
2. DNCB 처리군의 비만세포는 degranulated type으로 나타났으며, 加味升麻葛根湯 投與群에서는 granulated type이 많이 나타났다.
3. 피부상피에서 VCAM-1 양성반응성은 DNCB처리군에 비하여 加味升麻葛根湯 投與群에서 약하게 나타났으며, 피부진피내의 CD11b 양성반응세포도 DNCB처리군에 비하여 加味升麻葛根湯 投與群에서 적게 나타났다.
4. DNCB 처리군 림프절내 CD4, CD8, IL-2R에 양성반응 세포는 피질과 수질에서 증가하였으나 加味升麻葛根湯 投與群에서는 감소하였다.

참고문헌

1. 康晰榮 : 알레르기疾患의 診斷과 治療, 一潮閣, pp.253-264, 1993
2. 康舜洙, 盧昇鉉, 李尙仁 : 方劑學, 癸丑文化社, pp.61-62, 1984
3. 김세중 : 면역학, 고려의학, pp.133-145, 270-272, 1994
4. 金周德, 成仁華, 吳洋孝, 金英夫, 鄭善植, 鄭

- 憲澤, 趙良子, 崔哲淳, 河大有, 夏潤文, 韓
薰 : ESSENTIAL IMMUNOLOGY, Ivan
M. Roit, 고문사, pp.246-248, 1991
5. 대한미생물학회 : 의학미생물학, 제2판, 서
홍출판사, pp.250-273, 1997
 6. 대한피부과학회 : 피부과학 개정3판, 麗文
閣, pp.53-69, 123-132, 1994
 7. 서울대학교 의과대학교 약리학 교실 : 약리학,
고려의학, p.780, pp.708-709, 1994
 8. 안성구, 이승현, 박윤기 : 흔히보는 피부질
환, 고려의학, pp.13-18, 1993
 9. 이기영 : 알레르기의 진료, 서울, 한국의학
사, pp.313-315, 502-526, 1992
 10. 李尙仁 監修 : 天真處方解說, 成輔社, p.378,
1987
 11. 蔡炳允 : 皮膚科 韓方治療, 一中社,
pp.35-43, 1991
 12. 蔡炳允 : 韓方外科, 高文社, p.268, 288,
292, 306, 311, 1989
 13. 蔡仁植·孟華燮 共譯 : 醫方集解, 大成文化
社, pp.129-131. 1984
 14. 許 浚 : 東醫寶鑑, 南山堂, p.540, 1981
 15. 姜暲堧 : 加味升麻葛根湯의 效能에 關한
實驗的 研究, 慶熙大學校 碩士學位 論文,
1992
 16. 權五成 : 連翹敗毒散加味方이 DNCB로 誘
導된 생쥐의 Allergy성 接觸皮膚炎에 미치
는 影響, 東國大學校 博士學位論文, 1996
 17. 金南權 : 升麻葛根湯加味方이 마우스의 抗
ALLERGY 및 免疫反應에 미치는 影響,
圓光大學校 碩士學位論文, 1994
 18. 金中鎬 : 消風散과 加味消風散이 免疫反應
및 알레르기에 미치는 影響, 大韓韓方外官
科學會誌, 4(1):1-22, 1991
 19. 金賢兒 : 升麻葛根湯 및 升麻葛根湯合四物
湯의 抗 Histamine 投與에 關한 研究, 東
國大學校 碩士學位論文, 1993
 20. 趙貞實 : 升麻葛根湯과 Tetracycline-HCL
의 併用投與時 抗菌 및 抗炎效果에 關한
研究, 中央大學校 碩士學位論文, 1983
 21. 하대유 : Lymphokine을 중심으로 면역반
응 조절에 대하여, Medical Postgraduates,
5(19):232-246, 1991
 22. 上海中醫學院 : 中醫外科學, 香港, 商務印
書館, pp.105-108, 1981
 23. 梁勇才 : 實用皮膚病診療全書, 學苑出版社,
pp.558-562, 1996
 24. 劉正才 외 : 中醫免疫, 重慶出版社, p.69,
1983
 25. 李 挺 : 醫學入門, 大成文化社, p.372,
1989
 26. 錢 乙 : 小兒藥證直訣, 人民衛生出版社,
pp.110-111, 1991
 27. 趙蘊坤 等 編譯 : 中醫方劑病症圖解, 山西科
學技術出版社, pp.20-21, 169-171, 1991
 28. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman,
Jordan S. Pober : Cellular & Molecular
Immunology, 2nd Ed, W. B. Saunders
Company, pp.279-293, p.431, 1994
 29. Angus W. Thomson : The Cytokine
Handbook, Academic Press, p.83. pp.
92-97, 1991
 30. Daniel P. Stites : Basic & Clinical
Immunology, 8th ed, Appleton & Lange,
pp.363-365, 1994
 31. Eli Benjamini, Geoffrey Sunshine, Sidney
Leskowitz: Immunology A Short Course,
3rd ed, Wiley-Liss, Inc., pp.299-306, 1996
 32. A. I. Lauerma, B.D. Stein, B. Homey,
C.H. Lee, E. Bloom, H.I. Maibach :
Topical FK506 : suppression of allergic
and irritant contact dermatitis in the
guinea pig, Arch. Dermatol. Res.,
286:337-340, 1994
 33. C.U. Brand, T.Hunziker, A. Limat, L.R.
Braathen : Large increase of Langerhans
cells in human skin lymph derived from
irritant contact dermatitis, British Journal
of Dermatology, 128:184-188, 1993
 34. Daniel N. Sauder and Saveria Pastore:

- Cytokines in Contact Dermatitis, *American Journal of Contact Dermatitis* 4(4): 215-224, 1993
35. Ik Jo and Won Houh : Cyclosporin modulates DNCB contact hypersensitivity reaction in guinea pigs, *Korea J. Dermat*, 23(2):204-207, 1985
 36. Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David Male : *Immunology*, 4th Ed, pp. 25.1-25.11, 1996
 37. J.L. Rees, P.S. Friedmann, J.N.S. Matthews : The influence of area of application on sensitization by dinitrochlorobenzene, *British Foun. Dermatol*, 122:29-31, 1990
 38. J. John Cohen : Glucocorticoids. *Encyclo. Immunol.*, Academic press Inc., pp616-617, 1992
 39. K. Gregory Moore and Arthur M. Dannenberg Jr : Immediate and Delayed (Late phase) Dermal Contact Sensitivity Reactions in Guinea Pigs. Passive Transfer by IgG1 Antibodies, Initiation by Mast Cell Dergranulation, and Suppression by Soybean Proteinase Inhibitor, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 101:72-81, 1993
 40. M.R. Holiday, R.J. Dearman, I. Kimber, J.W. Coleman : Sensitization of mice to chemical allergens modulates the responsiveness of isolated mast cells to IgE-dependent activation, *Immunology*, 78:508-510, 1993
 41. Monte S. Meltzer : Role of Macrophages and Dendritic Cells in Contact Dermatitis, *Am. J. Contact Dermatitis*, 5(2):76-83, 1994
 42. Smith, K. L. : Interleukin-2; inception, impact and implications, *Science*, 240:1169, 1988
 43. T. Tachibana, KI Toda, F. Furukawa, S. Taniguchi, S. Imamura : Histamine metabolism in delayed type hypersensitivity-Comparative analysis with cellular infiltrates, *Arch Dermatol Res*, 282:217-222, 1990

ABSTRACT

The Effects of Gamiseungmagalgeuntang on Allergic contact dermatitis induced by DNCB in Mice

In order to study the effects of an immunosuppression and a mitigation of inflammation of Gamiseungmagalgeuntang(GMSG) on the allergic contact dermatitis, contact hypersensitivity assay, mast cell, VCAM-1, and T cell of the lymph node in mice induced allergic contact dermatitis by the contacts-sensitizing DNCB were observed after oral administration of GMSG extract.

The results of this study were as follows ;

1. Ear swelling in contact hypersensitivity assay was decreased in the GMSG group as compared with DNCB group.
2. It was investigated that mast cells were appeared degranulated type in DNCB group and a number of granulated type was more GMSG group than DNCB group.
3. VCAM-1 expression in epidermis and CD11b positive cell in dermis were decreased in the GMSG group as compared with DNCB group.
4. In the lymph node ,the distribution of CD4, CD8, IL-2R positive cell were decreased at the cortex and medula in the GMSG group as compared with DNCB group.