

## 大黃, 黃芩, 黃柏 복합 추출물의 항균, 항염 및 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구

손대범 · 송성필 · 황치환 · 홍석훈 · 황충연  
원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

### A Study on the Anti-microbial Activity, Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of mixture of *Rheum coreanum* *Scutellaria* *baikalensis* *Phellodendron amurense*

Dae-beom Son · Seong-pil Song · Chi-hwan Hwang · Seok-hoon Hong · Chung-yeon Hwang

Herbal mixture water extract of (*Rheum coreanum*, *Scutellaria baikalensis*, *Phellodendron amurense*), which exhibit several beneficial effects including acne and skin diseases, was tested for anti-microbial activity and anti-inflammation effects. The herbal mixture extract showed antimicrobial activity against *Staphylococcus epidermis* and *Propionibacterium acne*. The growth of *Staphylococcus epidermis* and *Propionibacterium acne* was inhibited completely by addition of 1.0% of the extract. Also in the present study we examined the mixture extract on compound 48/80 induced allergy and LPS induced cyclooxygenase-2(COX-2) gene expression in RAW264.7 macrophage. The results indicated the ear swelling and histamine release induced by compound 48/80 were dose-dependently reduced, ranging 18-36% and 10-61%, respectively. Furthermore the extract inhibited the expression of LPS-induced COX-2 proteins and mRNAs without an appreciable cytotoxic effects on RAW264.7 cells. The cytotoxicity of the extract using MTT assay showed the cytotoxicity of 6% and 13% against L929 cell line. Based on these results, it is concluded that the herbal mixture water extract can be applied to the acne and skin diseases therapy.

**Key words** : Anti-microbial activity, Anti-inflammation effect, Skin disease, Herbal mixture extract

### 서론

한의학에서 免疫은 <素問·通評虛實論><sup>1)</sup>에 ‘邪氣盛即實, 正氣奪即虛’라 하였고 <素問·刺法論><sup>1)</sup>에서 ‘正氣存內, 邪不可干’이라 하여 正氣는 장부의 기능 활동을 정상적으로 유지케 함으로써 病邪에 대해

교신저자: 황충연, 원광대학교 부속광주한방병원  
안이비인후과학교실  
(Tel: 062-670-6434 E-mail: hwangida@wonkwang.ac.kr)

抗病力을 갖는 抵抗力을, 邪氣는 질병을 일으키는 각종의 발병요인을 말하는 것으로 이러한 正邪間의 相爭으로 설명할 수 있다<sup>2)</sup>. 炎症反應은 正邪鬪爭의 결과로 체내에 나타나는 病理的 現象중의 하나로, 疾病의 發生 및 進行은 正邪抗爭의 과정이다<sup>3,4)</sup>. 炎症의 局所症狀는 發赤, 發熱, 疼痛, 腫脹을 특징으로 하는데 한의학에서는 炎症을 대개 火와 熱의 개념으로 보고 있다<sup>5)</sup>.

大黃은 苦寒無毒하고 瀉火解毒 清利濕熱의 효과가 있어 實熱便秘, 積滯腹痛, 腸癰, 濕熱黃疸에 쓰이는 약제이며<sup>6)</sup> 黃芩은 性寒無毒하고 清熱燥濕 瀉火解毒하는 효과가 있어 瀉實火 除濕熱하는 작용을 하여 外瘍內癰 및 外科 五官科의 熱毒證에 多用하는 약제이고<sup>6)</sup> 黃柏은 苦寒無毒하고 清熱燥濕 瀉火解毒, 清退虛熱 등의 효능이 있어 瘡瘍腫毒, 濕疹, 火傷 등에 쓰이는 약제로<sup>6)</sup> 모두 清熱燥濕 瀉火解毒하는 작용이 있어 항균 및 항염의 작용이 있는 약이다.

免疫이란 다양한 體液性 인자들과 세포들로 구성된 免疫系가 力動的 相互作用을 통하여 개체를 방어하고 유지하는 일련의 生命現象이라 할 수 있다<sup>7)</sup>. 炎症은 손상에 대한 살아있는 조직의 반응으로 염증반응은 면역계를 동원하는 생체의 방어와 치유에 핵심적인 역할을 하고 있을 뿐 아니라 많은 질병의 병리발생에 관련되어 있는 대단히 중요한 과정이다. 염증을 일으키는 원인은 무수히 많으나 세균, 진균, 바이러스와 같은 생물성 원인도 그 중 하나이다<sup>7)</sup>.

일반적인 피부 상재균 중 피부에 염증을 유발할 수 있는 균주로서 *Staphylococcus aureus*와 병원성이 낮지만 천지방성 이상성 진균으로 정상피부의 모낭 주위에서 발견되는 *Malassezia furfur*, 여드름 유발에 관여하는 *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermis* 등을 들 수 있다<sup>8-11)</sup>. 따라서 염증의 치료 및 예방을 위해서 원인균에 대한 항균작용을 갖는 약제가 일반적으로 사용되고 있다.

최근의 항균력을 지닌 한약에 대한 연구와 면역반응에 대한 연구를 살펴보면 홍<sup>12)</sup>은 淸上防風湯加

味로, 노<sup>13)</sup>는 苦蔘추출물로 *P. acnes*에 대한 항균효과를, 조<sup>14)</sup>는 淸上防風湯 및 구성약물로 *S. aureus*에 대한 항균효과를, 김<sup>15)</sup>은 大蒜으로 *C. albicans*에 대한 항균효과를, 박<sup>16)</sup>은 94종의 한약추출물로 6종의 균주에 미치는 항균효과를 연구하였고 이<sup>17)</sup> 등의 消風散加味の 항알레르기 효과에 관한 실험적 연구, 정<sup>18)</sup> 등의 메밀 추출물의 항알레르기 반응에 대한 실험적 연구, 양<sup>19)</sup> 등의 葛根湯과 加味葛根湯의 항알레르기 및 消炎, 解熱, 鎮痛作用에 대한 실험적 연구 등이 있다.

저자는 苦寒無毒하고 瀉火解毒 清熱燥濕의 효능이 있어<sup>6,20)</sup> 內服藥과 外用藥으로 피부과 질환에 多用하는 大黃, 黃柏, 黃芩을 이용하여 각종 피부의 염증성 질환 및 여드름의 원인균으로 알려진 *S. aureus*, *M. furfur*, *P. acnes*, *S. epidermis*에 대한 항균력을 평가하고, Compound 48/80으로 알레르기를 유도한 후 히스타민의 방출량과 비만세포의 부유량을 비교하고 수동 피부 과민(Passive Cutaneous Anaphylaxis)반응을 유도하여 항알레르기 효과를 검증하고 cyclooxygenase -2 활성에 미치는 영향 및 세포독성 정도를 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 사용균주

본 실험에서 사용한 균주는 *Staphylococcus epidermis* KCTC 1917, *Staphylococcus aureus* KCTC 1928, *Malassezia furfur* KCTC 7743, *Propionibacterium acnes* KCTC 3320으로서 한국유전자은행에서 분양 받아 사용하였다.

### 2. 실험동물

본 실험에 사용된 동물은 대한실험동물센터(대전)

에서 구입한 Sprague-Dawley계 흰쥐 및 ICR계 생쥐를 실험에 사용할 때까지 온도 22±2℃, 상대습도 55±5%로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 사육하였다.

3. 시약 및 배지

compound 48/80, anti-dinitrophenyl(DNP) IgE, DNP-Human serum albumin(HSA), metrizamide 및 o-phthalaldehyde(OPA)는 Sigma사 제품을 사용하였다. α-minimal essential medium, Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Fetal bovine serum은 Gibco BRL사 제품을 사용하였다.

항균성 실험에 사용된 배지 중 nutrient broth, yeast-malt broth는 Difco(USA)에서 Actinomyces broth는 BBL(USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 사용된 시약은 Duksan(korea)에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial experiments

Strains	Media
Staphylococcus epidermis KCTC 1917	Nutrient broth
Malassezia furfur KCTC 7743	Yeast-malt broth
Propionibacterium acnes KCTC 3320	Actinomyces broth
Staphylococcus aureus KCTC 1928	Nutrient broth

Table 2. Composition of Nutrient broth(NB).

Components	contents
Beef extracts	3.0g
Peptone	5.0g
Distilled water	1L
pH	6.8±0.2

Table 3. Composition of Yeast-malt broth(YMB).

Components	contents
Yeast extracts	3.0g
Malt extracts	3.0g
Peptone	5.0g
Dextrose	10.0g
Olive oil	1%
Distilled water	1L
pH	6.2±0.2

Table 4. Composition of actinomyces broth.

Components	contents
Potassium phosphate	15.0g
Ammonium sulfate	1.0g
Magnesium sulfate	0.2g
Calcium chloride	0.01g
Infusion broth	25.0g
Dextrose	5.0g
L-cysteine · HCl	1.0g
Pancreatic digest of casein	4.0g
Yeast extract	5.0g
Soluble starch	10.0g
Distilled water	1L
pH	6.9±0.2

4. 사용 원료

샘플 조성은 다음과 같다. 大黃, 黃柏, 黃芩(이하 S3)은 각각 100g을 사용하였다.

Table 5. Prescription of Herb-med.

Herb	Scientific Name	Dose(g)
大黃	Rheum coreanum	100 g
黃柏	Phellodendron amurense	100 g
黃金	Scutellaria baikalensis	100 g
total		300 g

5. 추출 및 샘플 제조

본 실험에 사용된 한약재는 원광대학교 광주한방병원에서 구입하였으며 건조된 상태였다.

샘플의 제조는 중탕가열을 통한 열수 추출법을 사용하였으며 이때의 추출 조건은 90℃, 90분이었다. 추출된 물질은 원심분리기(Hanil, Korea)를 이용 8,000rpm에서 10분 동안 2회 행하여 이물질 제거하였으며 0.45µm 여과지(ADVANTEC, USA)로 필터한 후 rotary evaporator(EYELA, Japan)를 이용하여 농축하였다. 그 후 농축액을 동결건조기(Ishim, Korea)를 이용 분말을 회수, 4℃ 냉장고에 보관하면서 실험을 행하였다. 실험에 사용 시 샘플내의 미생물을 완전 제거하기 위해 autoclave(121℃, 15분)에서 멸균을 행

하였다.

## 6. Agar diffusion법에 의한 S3의 항균활성 측정

항균활성 검사는 Agar diffusion법을 이용하였으며 사용된 방법은 다음과 같다. 각기 균이 성장할 수 있는 고체 배지를 제조하고 그 위에 미생물 배양액 100 $\mu$ l를 도말하였다. 10분 동안 배지의 표면을 건조한 후, 배지위에 직경 10mm의 paper disk를 올려놓고 추출 샘플을 10%, 1%(w/v)로 희석한 용액 50 $\mu$ l씩을 적용하였다. 37 $^{\circ}$ C로 고정된 배양조에서 보관하면서 paper disk 주위에서 미생물이 성장하지 않는 clear zone의 직경을 확인하여 항균활성을 비교하였다.

## 7. 균에 대한 S3의 성장억제효과

한약 추출 분말을 함유한 배지(1.0%, 0.5%, 0.1%, w/v)를 제조한 후 여드름 균인 *Propionibacterium acnes*와 피부에 염증을 일으키는 주요균인 *Staphylococcus aureus* 배양액을 액체 배지에  $1 \times 10^5$ ~ $1 \times 10^6$ CFU/ml가 되게 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 진탕배양하면서 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 증류수로 적정 희석하여 600nm에서 OD값을 측정하여 균의 성장을 확인하였다.

## 8. 귀 부종 반응 실험 방법

Compound 48/80 비투여군(control), Compound 48/80 투여군(C48/80), 그리고 S3 투여군은 S3 100mg/ml 도포군, S3 10mg/ml 도포군, S3 1mg/ml 도포군으로 군을 나누어서 각 군당 생쥐 3마리씩 사용하였다.

Compound 48/80을 0.5%의 비율로 생리식염수에 무균적으로 희석하였다. S3을 100mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml의 농도로 희석하여 생쥐의 귀 등쪽면과 안쪽면 모두 약간 흘러내릴 정도로 충분한 양을 발라주었다. 한약제 도포 40분 후, ether로 마취한 생쥐의 양쪽 귀 등쪽면에 microsyringe를 사용하여 희석한 Compound 48/80을 20 $\mu$ l씩(100 $\mu$ g/site) 각각 피내주사를 실시하

였다. control군은 Compound 48/80 대신에 생리식염수를 20 $\mu$ l 피내주사하였다. 주사 40분 후 다시 ether로 마취하여 digimatic micrometer(Mitutoyo, Japan)를 이용하여 귀 두께를 측정하였다.

## 9. Alcian blue-NFR 염색 방법

귀 두께 측정 후 바로 귀를 절단하여 10% paraformaldehyde에 귀조직을 담아서 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 24시간 후 30%, 50%, 70%, 90%, 95%, 100% ethanol에 차례로 귀조직을 담아서 탈수를 하였다. xylene 처리 후 파라핀에 조직을 담아서 24시간 동안 52 $^{\circ}$ C incubator에 보관하여 잔여 xylene이 모두 증발하도록 하였다. 귀조직을 임베딩 틀에 고정하여 파라핀이 충분히 굳은 후에 조직을 8 $\mu$ m로 절편하여 슬라이드 글라스에 붙여서 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 두어 조직이 슬라이드 글라스에 완전히 접착되도록 하였다. 슬라이드 글라스를 xylene에 담귀 파라핀을 녹인 후에 100%, 95%, 90%, 70%, 50%, 30%의 ethanol로 재수화시켜 염색을 실시하였다. 먼저 alcian blue로 40분 염색 후 증류수로 세척하고 NFR(nuclear fast red)로 2분 염색하여 증류수로 세척 후 커버글라스를 덮어서 현미경으로 관찰하였다.

## 10. 흰쥐 복강 비만세포(Rat Peritoneal Mast Cells, RPMC)의 분리

Kanemoto 등<sup>21)</sup>의 방법에 따라 분리하였다. 즉 흰쥐를 에테르로 마취시킨 후 Tyrode buffer B (137mM NaCl, 12mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.7mM KCl, 0.3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 5.6mM dextrose, 0.1% bovine serum albumin) 20ml를 복강 내에 주입하고 복벽을 마사지 하였다. 복벽 중앙선을 절개하고 pasteur pipette으로 복강 세척액을 채취하여 원심 분리 (150Xg, 10분)하였다. 상층액을 제거한 후 비만세포 부유액을 Tyrode buffer B에 재부유시켰다. 세포 부유액 중 비만세포는 Yurt 등<sup>22)</sup>의 방법으로 정제하였다. 즉 Tyrode buffer B 1ml에 재부유시킨 비

만세포 부유액을 22.5% metrizamide(0.225g/ml) (density 1.120g/ml; Sigma) 2ml에 가하여 원심분리(400Xg, 15분)하였다. 원층액과 metrizamide의 접촉면에 남아있는 세포는 수집하여 제거하고, Tyrode buffer B 1ml에 재부유시킨 후 이 과정을 반복하여 비만세포는 toluidine blue 염색으로 확인 시. 순도 95%가 되도록 하였다.

### 11. 복강 비만세포(RPMC)에서의 히스타민 (Histamine) 유리실험

비만세포 현탁액( $1 \times 10^6$  cells/ml)은 Compound 48/80을 처리하기 전 안정을 위해서 37도씨에서 10분간 안정화시킨 후, S3을 0.01, 0.1, 1mg/ml 처리 후 20분간 배양하고, Compound 48/80( $5 \mu\text{g/ml}$ )처리 후 15분 배양하였다. 히스타민 유리반응은 튜브를 얼음에 넣어서 반응을 중지하고, 4°C, 400×g 5분동안 원심분리하여 상층액과 pellet로 분리하였다.

히스타민은 Shore 등<sup>23)</sup>방법에 따라 정량하였다. 즉 에펜들프 튜브에 시료  $500 \mu\text{l}$ 를 취하여 0.1M HCl  $450 \mu\text{l}$ 와 60% 과염소산 용액  $50 \mu\text{l}$ 를 혼합한 후 원심분리 400×g, 20분간 하였다. 그 상층액을  $800 \mu\text{l}$ 를 취해 5M NaOH 용액  $500 \mu\text{l}$ , 증류수 3ml, n-butanol 10ml 및 NaCl 1.2g을 혼합한 시험관에 넣고 진탕 후 원심분리 500×g, 10분간 하였다. Butanol층 8ml를 취해 0.1M HCl 3ml, n-heptane 10ml를 가하여 진탕 후 원심분리 500×g, 10분간 하였다. 여기에서 얻어진 수층 2ml 에 1M NaOH 용액  $400 \mu\text{l}$ 와 1% o-phthalaldehyde 용액  $100 \mu\text{l}$ 를 가하고 37°C 항온수조에서 3분간 반응시켰다. 3M HCl 용액  $200 \mu\text{l}$ 를 가한 다음  $\lambda_{ex} = 353\text{nm}$ ,  $\lambda_{em} = 438\text{nm}$  에서 spectrofluorometer로 상대형광강도를 측정하여 정량하였다.

히스타민 방출 억제율은 다음의 방식으로 계산한다.

% inhibition

$$= \left\{ \frac{\text{S3이 처리 안된 비만세포의 히스타민 유리 측정값} - \text{S3이 처리된 비만세포의 히스타민 유리 측정값}}{\text{S3이 처리 안된 비만세포의 히스타민 유리 측정값}} \right\} \times 100$$

### 12. Rat에서의 Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA, 수동 피부 과민) 실험

Kawabata 등<sup>24)</sup>의 방법에 따라 실험하였다. 즉 ICR 계 생쥐의 등쪽 털을 제모 후, anti-DNP IgE 100ng을 생쥐의 등에 3부위에 피내주사하여 감작시켰다. 주사한 부위는 유성펜으로 표시하였다. 48시간 후에 anti-DNP IgE로 감작시킨 비만 세포를 DNP-HSA로 탈감작시키기 1 시간 전에 S3을 1, 10, 100mg/ml 피부에 도포하여 처리하였다. 꼬리 정맥에 DNP-HSA(1 mg/ml in PBS)와 Evan blue(4%) 16mg을 1:1( $200 \mu\text{l}$ )로 혼합하여 주사하여 항원 항체 반응을 야기시키고, 30분 후에 치사시켰다. Evans Blue로 염색된 처음 표시한 피부 부위 적출하여 1M KOH 1ml를 가하여 37°C로 20시간 incubation시켜 조직을 완전히 용해하였다. 1.2N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.7ml를 가하여 용액을 중화시킨 후 3.3ml의 acetone을 가하고 교반하여 조직을 침전시켰다.

Refrigerated centrifuge로 2°C에서 400Xg에서 25분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상층액을 Katayama 등<sup>25)</sup>의 방법에 따라 spectrofluorometer로 620nm에서 흡광도를 측정함으로써 조직내의 Evans Blue의 양을 정량하였다.

### 13. 세포배양

#### 13-1 항염증실험

대식세포주인 RAW 264.7(monocyte)은 Korean Cell Line Bank(KCLB)로 구입하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 100unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 Dulbecco's Modified

Eagle's Medium(DEME) 배지를 사용하며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### 13-2 세포독성실험

생쥐 섬유모세포의 일종인 L929 세포주를 사용하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 100unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DEME) 배지를 사용하며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>로 조정된 배양기내에서 배양하며, 배양액은 3일마다 교환한다. 배양된 세포는 1×trypsin-EDTA로 부유시킨 후 0.4% trypan blue로 염색하여 혈구계측기(Hemocytometer)로 세포수를 계산한다. 세포독성 시험은 배양된 세포를 96 well plate에 5×10<sup>3</sup> cell/well이 되도록 세포 부유액을 120 µl씩 분주하여 배양한 후 실험에 사용한다.

### 14. Western Blot of COX-2

RAW 264.7(1×10<sup>6</sup> cell)을 60mm plate에서 배양한 후 LPS(1µg/ml)를 처리한 후 S3 50, 100, 200ppm을 24시간 처리한다. 24시간 처리 후 배양액을 제거하고 세포를 lysis bufer(RIPA buffer)에 protease inhibitors(10 µg/ml Leupeptin, 1 mM AEBSF, 10 µg/ml, Aprotinin, 10 µg/ml Pepstatin A)와 phosphatase inhibitor(Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)에 처리하고, cell scraper로 세포를 모은 후, 얼음에서 30분간 반응 후, 4°C, 12000rpm에서 원심분리하여, 상층액을 따서 BCA 방법으로 단백질 정량을 한다. 10% SDS-PAGE gel에 각 샘플 30µg의 단백질을 전기영동한다. 전기영동 후 NC membrane에 transfer한다. transfer된 NC membrane에 primary antibody COX-2 (No-160116, Cayman Chem.)로 12시간 incubation한다. secondary Ab (1:2000)로 1시간 30 분-2 시간 동안 incubation 한다. ECL 방법으로 COX-2 band를 detection한다.

### 15. S3 처리농도 및 시간별 처리

추출한 한약물을 처리 당일 FBS가 첨가되지 않은

DMEM과 DMEM에 희석하여 처리농도별로 사용한다. 처리농도는 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm로 처리하고, 처리시간은 24시간으로 실시하였다.

### 16. MTT 정량

Mosmann<sup>20</sup>의 방법에 따라 배양한 세포주를 각각 5×10<sup>3</sup> cell/ml이 되도록 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 이들 세포를 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm 농도의 S3이 포함된 배양액에서 24시간 배양 후 MTT 200µl/ml 가 포함된 배양액을 well 당 200µl씩 넣은 후 다시 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 DMSO를 100µl/well씩을 넣어 5분간 실온에 방치하며 Formazan을 용해한 후 microplate Reader로 흡광도 570 nm에서 측정한다.

### 17. 통계학적 분석

통계학적 유의성 검정은 one-way ANOVA (Analysis of Variance) 방법을 사용하였으며, 유의수준 p<0.05 의 범위내에서 그 결과들은 평균에 대한 표준 편차로 나타낸다.

## 실험결과

### 1. Agar diffusion법에 의한 항균성 검사

여드름 균 및 염증 세균에 대한 S3의 항균력을 측정하기 위해 한천평판법(agar diffusion method)을 사용하였다. 지수성장기의 중간단계에서 있는 미생물 배양액 100µl를 한천배지에 도말하고 10분 동안 표면을 건조시켰다. 그 후 paper disk를 위치시키고 S3 1%, 10% 용액 50µl를 각각 흡수 시킨 후 37°C에서 12~24시간 배양 후, 그 저지환을 측정하였다. *Staphylococcus epidermis* (KCTC 1917), *Staphylococcus aureus* (KCTC 1928), *Malassezia furfur* (KCTC 7743),

*Propionibacterium acnes* (KCTC 3320)를 이용하여 항균활성 검증결과 Fig. 1.과 같다. S3 추출물을 1% 첨가하였을 시 여드름과 관련된 세균 중 *Staphylococcus epidermis*, *Propionibacterium acnes*에서 10~11mm 정도의 저해환을 나타냈으며 *Malassezia furfur*에 대한 항균성은 관찰되지 않았다. S3을 10% 첨가 시 *S. epidermis* 및 *P. acnes*에 대한 저지환의 크기가 증가하였으며 17~18mm 정도로 높은 항균활성을 나타냈다. 그렇지만 고농도에서도 *M. furfur*에 대한 저지환이 관찰되지 않았으며 이로부터 S3이 이 균에 대해서는 항균효과가 없다는 것을 알 수 있었다. 피부 염증 세균인 *Staphylococcus aureus*의 경우 10% 농도 첨가 시 저지환의 크기는 14mm로 관찰되었는데 이는 S3이 이 균에 대해 비교적 높은 항균효과를 나타낸다는 것을 의미한다. 각 균주에 대한 저지환의 직경을 측정하여 Table 6.에 나타내었다.

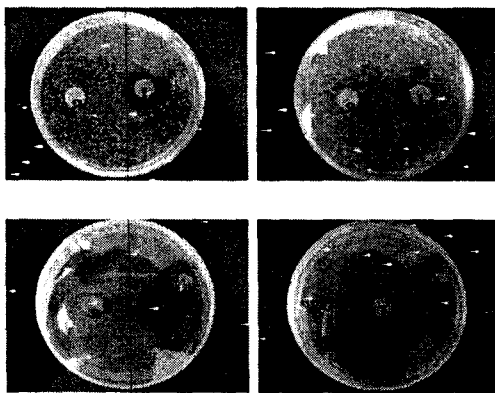


Fig. 1. Antimicrobial activity of S3 extracts against various microbials.  
A: *S. epidermis* B: *M. furfur* C: *P. acnes* D: *S. aureus*  
a. 1% S3 extracts b.10% S3 extracts.

Table 6. Antimicrobial activity of 10% S3 extracts against various microbials.

Strains	Clear zone
<i>S. epidermis</i>	18±0.5
<i>M. furfur</i>	-
<i>P. acnes</i>	17±0.5
<i>S. aureus</i>	14±0.5

## 2. S3이 *P. acnes*의 성장에 미치는 영향

일반적으로 *P. acnes*가 여드름을 유발하는 대표적인 균이라고 알려져 있으며 다양한 물질들을 사용하여 여드름의 치료 및 예방에 적용하고 있지만 항균활성에 대한 객관적인 자료들이 미비한 실정이다. 본 실험에서 S3을 이용하여 agar diffusion법을 통해 S3의 *P. acnes*에 대한 항균활성을 실험한 결과 항균활성이 나타났으므로 이를 직접 배양배지에 적용 균의 성장에 미치는 S3의 영향을 알아보려고 하였다.

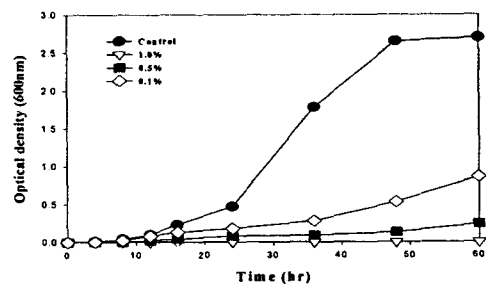


Fig. 2. Effects of S3 extracts for *P. acnes* growth with various concentration.

Fig. 2는 S3이 *P. acnes*의 성장에 미치는 영향을 시간대별로 OD값을 측정 조사한 것이다. 그림에 보듯이 S3을 0.1%~1.0%(w/v)까지 *P. acnes* 배양배지에 첨가하여  $1 \times 10^5$ cfu/ml가 되게 균을 접종하였다. S3을 함유하고 있지 않은 배지의 경우 균의 유도기는 14시간이었으며 그 후 급격한 균체량의 증가를 나타내는 대수 증식기에 들어갔다. 48시간이 지난 후 균은 정지기에 들어감을 관찰할 수 있었다. 그렇지만 S3 0.1%(w/v)를 첨가한 배지의 경우 38시간까지 유도기에 있었으며 점차적인 균체량 증가를 보였으며 그 후로 균체 증가속도가 빨라짐을 확인할 수 있었다. 그렇지만 급격한 균의 증가가 관찰되지 않았으므로 S3이 균의 성장을 0.1% 정도의 농도에서 억제하고 있다고 생각된다. 0.5% S3 첨가 배지 또한 균의 성장이 관찰되었지만 60시간 배양 후

OD값이 0.25정도로서 S3을 첨가하지 않은 배양배지의 12시간 정도와 비슷한 균체량이 관찰되었다. 이는 0.5% 이하의 조건에서 S3은 *P. acnes*의 성장을 대부분 저해한다는 것을 보여주고 있다. 또한 S3 1.0%를 함유한 배지의 경우 60시간 배양 동안 균의 성장이 전혀 관찰되지 않았다. 이는 S3 1.0%이상의 조건에서 *P. acnes*의 성장을 완전 억제한다는 것을 의미하며 S3이 *P. acnes*의 성장 억제물질로 사용가능하다는 것을 보여주고 있다.

### 3. S3이 *S.aureus*의 성장에 미치는 영향

*S. aureus*는 아토피 피부염에서 흔히 집락을 형성하고 아토피 피부염의 중증도와 관계가 있다고 보고되고 있으므로 일반적으로 화학적인 살균제뿐만 아니라 항생제를 사용하여 그 균체수를 줄이거나 사멸시키는데 초점이 맞추어져 있다. 그렇지만 대부분 항생제에 대한 내성과 화학적 살균제의 세포독성 때문에 새로운 형태의 항 미생물제가 필요한 실정이다. 그러므로 본 실험에서 S3을 이용하여 상기 균에 대한 항균 효과를 알아보려고 하였다.

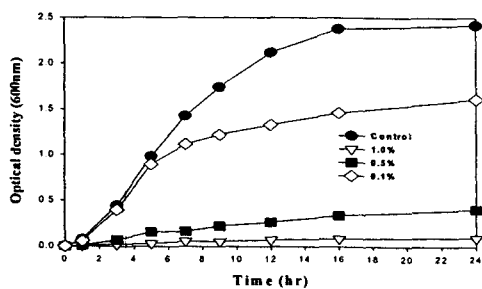


Fig. 3. Effects of S3 extracts for *S.aureus* growth with various concentration.

Fig. 3은 S3이 *S. aureus*의 성장에 미치는 영향을 시간대별로 OD값을 측정하여 조사한 것이다. *S. aureus*는 실험에 사용한 다른 미생물에 비해 성장속도가 빠르다는 것을 알 수 있으며  $1 \times 10^6$  cfu/ml 접종 시 1시간 유도기를 거쳐 12시간 후 까지 대수 증식

기를 나타냈다. S3은 *S. aureus*에 대해 저해능을 가지고 있다고 여겨지는데 S3을 0.1% 함유한 배지의 경우 초기 미생물 성장은 S3을 함유하지 않은 배지에서의 성장과 비슷하지만 시간의 경과에 따라 미생물 총균체량에 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 또한 0.5% 이상 S3 추출물이 함유된 배지의 경우 *S. aureus*의 성장이 대부분 억제되어 균 성장이 느리며 급격한 균체량 증가를 보이지 않았다. 1% 첨가시에도 0.5% S3추출물 첨가 배지에서의 균 성장과 비슷한 형태를 보였는데 뚜렷한 균의 증가를 관찰할 수 없었다. 농도의 증가에 따라 균 성장이 감소되는 것으로 미루어 보아 S3이 *S. aureus*를 억제하는 능력이 있으며 억제하기 위해서는 필요한 최소 농도는 1.0% 이상이라고 생각된다.

### 4. 귀 부종 반응 실험 결과

생리식염수를 투여한 control군이  $0.145 \pm 0.008$ mm, Compound 48/80만 투여한 C48/80군이  $0.405 \pm 0.073$ mm의 귀두께를 나타내었다. Compound 48/80에 의해 유발된 귀부종에 대한 S3의 농도별 억제효과를 digimatic micrometer로 측정된 결과, S3 100mg/ml 도포군이  $0.311 \pm 0.024$ mm, S3 10mg/ml 도포군이  $0.301 \pm 0.028$ mm, S3 1mg/ml 도포군이  $0.375 \pm 0.045$ mm를 각각 나타내었다(Table 7., Fig. 4). 귀부종에 대한 농도별 억제효과를 백분율로 환산하면 S3 100mg/ml가 36.15%, S3 10mg/ml가 40.00%, S3 1mg/ml가 18.46%의 억제효과를 각각 나타내었다(Table 7.).

Table 7. Effect of topical application of S3 on ear swelling response in mice.

	control	S3 100mg/ml	S3 10mg/ml	S3 1mg/ml	C48/80
귀두께 (mm)	$0.145 \pm 0.008$	$0.311 \pm 0.024$	$0.301 \pm 0.028$	$0.375 \pm 0.045$	$0.405 \pm 0.073$
억제율 (%)	-	36.15	40.00	18.46	-



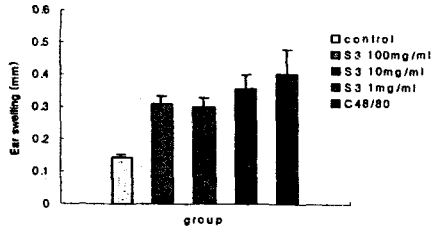


Fig. 4. Effect of S3 on compound 48/80 induced ear swelling response in mice.

5. 귀조직 염색 결과

모든 생쥐의 귀를 주사부위에서 절제하여 조직검사를 실시한 결과, control군에 비하여 C48/80군의 비만세포의 수가 다소 많았으며 S3 100mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml 도포군에서는 C48/80군에 비하여 비만세포의 수가 감소하는 경향을 보였다. 또한 alcian blue에 의해 염색되는 비만세포 세포질의 과립이 S3 도포군에서 더 크게 관찰되는 것으로 보아 S3가 Compound 48/80에 의해 유발되는 비만세포의 탈과립을 억제하였다고 생각된다(Fig. 5).

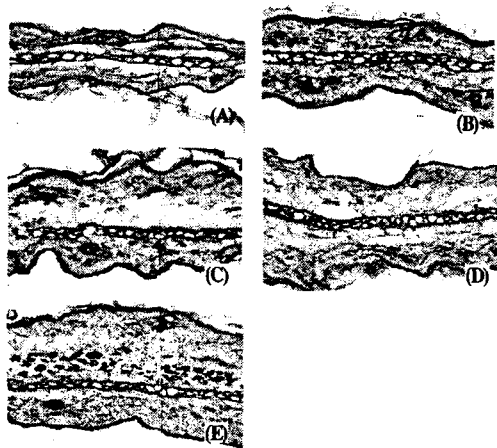


Fig. 5. The photographs of alcian blue and nuclear fast red stained ear tissue undergone ear swelling response by normal saline in S3 untreated mice (A) and compound 48/80 in S3 100mg/ml treated mice (B), S3 10mg/ml treated mice (C), S3 1mg/ml treated mice (D) and S3 untreated mice (E).

6. 비만세포의 히스타민 유리에 미치는 S3의 효과

흰쥐의 복강 비만세포에 미치는 S3의 효과를 검토하기 위하여 Compound 48/80을 투여하기 20분 전에 S3을 0.01, 0.1, 1mg/ml의 농도로 처리하였다. Table 8. 에서와 같이 S3은 비만세포에서 Compound 48/80에 의한 히스타민의 유리를 농도 의존적으로 억제하였으며, 1mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다. 농도별 히스타민 억제율은 0.01, 0.1mg/ml에서는 10%, 28%의 억제 효과를 나타내었으며, 1mg/ml에서는 61%의 억제율이 나타났다(Fig. 6).

Table 8. Effects S3 on compound 48/80-induced histamine release from RPMC. Each datum represents the mean±S.E. of three independent experiments.

S3 treatment (mg/ml)	Compound 48/80 (5µg/ml)	Amount of histamine (µg/ml)
None (saline)	+	0.428±0.023
0.01	+	0.388±0.025
0.1	+	0.308±0.021
1	+	0.169±0.015

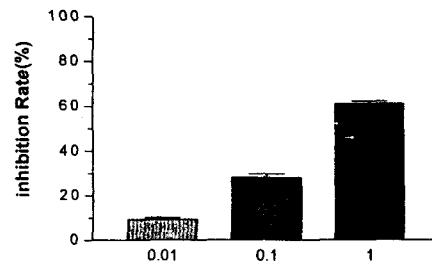


Fig. 6. The effect of S3 on compound 48/80-mediated histamine release from RPMC. Each data point represents the mean±S.E. of three experiment.

7. 수동 피부 아나필락시(PCA) 반응에 대한 S3의 효과

PCA 반응에 미치는 S3의 효과를 검토하기 위하여 DNP-HSA와 Evans blue의 혼합액을 투여하기 1시간 전에 S3을 1, 10, 100mg/ml의 농도로 피부에 도포

하여 처리하였다. Table 9. 에서와 같이 수동 피부 아나팔락시 반응은 S3 농도 의존적으로 억제 되었으며, 특히 100mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다.

Table 9. Effect of S3 on the 48 hr PCA. Each datum represents the mean±S.E. of three independent experiments.

S3 treatment (mg/ml)	Anti-DNP IgE plus DNP-HSA	Amount of dye (µg/site)
None (saline)	+	3.397±0.294
1	+	2.169±0.205
10	+	1.516±0.159
100	+	0.919±0.098

### 8. RAW 264.7 세포에서 COX-2의 발현에 대한 S3의 효과

LPS(1µg/ml)를 사용하여 대식세포주인 RAW 264.7(1×10<sup>6</sup> cell)의 COX-2 활성을 유도한 모델에서 S3을 50, 100, 200ppm 농도로 24시간 처리하여 COX-2 발현 정도를 Western Blot 수행하여 분석하였다. LPS 단독 처리군에 비해 S3을 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. Fig. 7.에서 같이 100ppm을 처리한 군에서 25% 정도 발현 억제 효과가 나타남을 확인하였고, 200ppm에서는 30%정도의 COX-2 발현 억제 효과가 있는 것으로 나타났었다.

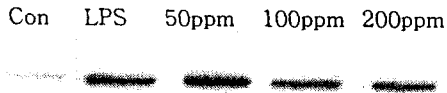


Fig. 7. Effects on COX-2 expression from LPS-induced RAW 264.7 cells(Western blot). The same amount of protein(30µg) was loaded in each lane.

### 9.MTT 정량에 의한 세포생존률 측정

MTT 정량방법을 이용하여 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000ppm 농도의 S3을 포함한 배양액에서 L929

세포를 24시간 배양 후 세포증식률을 측정하여 대조군과 비교하였다(Fig. 8). S3이 100ppm농도에서는 세포증식률이 대조군에 비해 3%로 증가되었고, 200ppm에서는 7% 증가됨을 확인하였다. 500ppm과 1000ppm에서는 세포생존률이 대조군에 비해 6, 13% 이하로 감소하였다. 이는 S3이 L929 세포에 500ppm 농도 이상에서 세포 독성이 유발됨을 알 수 있었다.

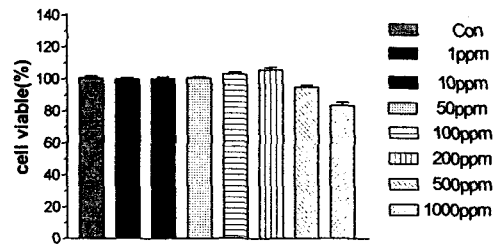


Fig. 8. Cell viability as assessed by the MTT assay for L929 cell line pretreated for 24h with S3. The data are presented as the arithmetic mean percent of the control ± S.D.

## 고 찰

· 免疫이란 다양한 體液性 인자들과 세포들로 구성된 免疫系가 力動的 相互作用을 통하여 개체를 방어하고 유지하는 일련의 生命現象이라 할 수 있다<sup>27</sup>.

炎症은 “균의 감염, 열, 외상, 항원, 항체반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어기전”이라고 정의하고 있으며 염증이라는 용어가 “불같은 상태”라는 어원에서 유래한 것과 같이 염증이 발생한 부위는 발적, 발열, 동통, 종창, 기능장애와 같은 염증의 5대 징후가 발생된다. 이러한 염증을 병리조직학적으로 볼때에는 혈관투과성 항진과 과립구 및 대식세포와 같은 세포의 침윤이 커다란 특징이라고 할수 있다<sup>27</sup>.

한의학에서 免疫은 <黃帝內經><sup>1)</sup>에 ‘邪氣盛即實, 正氣奪即虛’, ‘正氣存內, 邪不可干’이라 하여 正氣는 장부조직기관의 기능활동을 정상적으로 유지케 함

으로써 病邪에 대해 항병력을 갖는 저항력을, 邪氣는 인체를 발병케 하는 각종의 發病要因을 말하는 것으로 이러한 正邪間的 相爭으로 설명할 수 있다<sup>2)</sup>. 炎症反應은 正邪鬪爭의 결과로 체내에 나타나는 病理的 현상중의 하나로, 疾病의 發生 및 進行은 正邪抗爭의 과정이다<sup>34)</sup>. 또한 <諸病源候論><sup>28)</sup>에 ‘漆有毒, 人有稟性畏毒, 但見漆, 便中其毒, 亦有性者耐者, 終日燒者, 境不爲害也’라 하였고 <證治要訣><sup>29)</sup>에 ‘有人一不可食 鷄肉及 獐魚等物 才食即丹隨發’이라 하여 면역과민반응과 유사한 내용이 언급되어 있다.

화농성 염증질환은 한의학적으로 瘡瘍, 癰疽 등의 병증에서 찾아볼 수 있는데 그 중 현대의학의 아토피 피부염의 범주에 속하는 것으로 奶癬을 찾아볼 수 있다. 奶癬은 明 陳實功의 <外科正宗·奶癬><sup>30)</sup>에서 “頭面遍身發爲奶癬, 流滋成片, 睡臥不安, 瘙痒不絕”이라 한데서 찾아볼 수 있고 胎癬, 胎斂瘡, 濕疹, 濕瘡, 四彎風, 淫瘡 등으로 표현되어져 왔다.

韓醫學的으로 아토피 피부염의 病因病機는 稟性不耐 濕熱內蘊한 상태에서 다시 風熱濕邪의 侵淫을 받아서 內外邪氣가 相搏하여 肌膚에 발생하는 것이며<sup>31)</sup> 근래에는 急慢性으로 나누어 病因을 분류하고 있는데<sup>32-34)</sup> 急性은 濕熱이 위주가 되고 항상 夾有外風한다<sup>31)</sup>. 風은 陽邪이므로 輕揚하여 쉽게 皮毛腠理에 侵襲하고 頭面上肢에서 그 증상이 심하게 나타나므로 傷于風者 上先受之한다. 風者 善行而數變 去來急快 流注不定하므로 全身에 범발하게 된다. 濕은 陰邪이므로 粘滯 彌慢 重濁하여 흔히 腠理에 侵襲하여 水濕內蘊하게 되어서 水疱 糜爛 滲出液 등이 발생한다. 風濕은 모두 夾熱蘊結하기 쉬우므로 皮膚潮紅 灼熱 作痒 疼痛하므로 熱微作痒 熱甚則痛하게 된다<sup>31)</sup>. 慢性은 血虛風燥, 濕熱蘊燥가 원인이 되어 反復發作 長期不愈 極烈瘙痒하여 睡眠不安 長期不愈 極烈瘙痒하며, 陰血毀損 生風生燥 膚失所養하여 皮膚乾燥 肥厚 脫屑 등을 형성하게 된다. 즉 病因은 濕熱風邪를 벗어나지 않는다. 濕은 脾主濕하므로 脾失健運하여 飲食失道하면 濕存內生하게 된다. 熱은 心主火 心主血脈하므로 心緒煩擾하고 神態不寧하여

心經에 有火하게 되어 血熱內生하게 된다. 風은 流水日久 傷陰耗血하거나 혹은 濕熱內蘊한 상태에서 반복적으로 外風을 맞거나 辛辣香燥之物을 過食하여 血燥生風하게 된다<sup>31)</sup>.

그 治療로는 急性期는 風濕偏盛型, 熱重于濕型, 濕重于熱型으로 나누어 보며 그 治療는 清熱利濕破風止痒한다. 慢性期는 脾虛濕熱內蘊型과 陰傷血燥型으로 나누니 그 치료는 健脾除濕 또는 滋陰養血 除濕止痒한다<sup>31)</sup>.

그 治療法에 대한 기존의 연구를 살펴보면 손, 구 등의 기존의 처방을 사용한 치험례<sup>35,36)</sup>가 있었고 고 등의 민간요법에 대한 연구<sup>37)</sup>가 있었고, 최 등의 단식요법으로 치료한 치험례<sup>38)</sup> 그리고 박, 심 등의 중의 외치법에 대한 고찰<sup>39,40)</sup> 등이 있었으나 최근 다용되고 있는 외치법에 사용되어지는 한약재에 대한 실험적인 연구가 부족함을 알 수 있다.

그래서 아토피 및 피부과 질환에 효과가 있을 것이라고 여겨지는 항균, 항염, 항알레르기 효과가 있는 한약재에 대한 실험적 연구를 살펴보았다. 한약재의 항균효과에 관한 연구는 홍<sup>12)</sup>의 淸上防風湯加味, 노<sup>13)</sup>의 苦蔘추출물의 *P. acnes*에 대한 항균효과, 조<sup>14)</sup>의 淸上防風湯 및 구성약물의 *S. aureus*에 대한 항균효과, 김<sup>15)</sup>의 大蒜의 *C. albicans*에 대한 항균효과, 박<sup>16)</sup>의 94종의 한약추출물의 6종의 균주에 대한 항균효과 등이 있었고 항염효과에 대한 연구는 枳實<sup>41)</sup>, 獨活<sup>42)</sup>, 蒲公英<sup>43)</sup>, 蛇床子<sup>44)</sup>, 斑蝥<sup>45)</sup>, 加味芷貝散<sup>46)</sup>, 靈仙除痛陰<sup>47)</sup>, 黃芪內托散<sup>48)</sup>, 升麻葛根湯加味方<sup>49)</sup>, 龍膽瀉肝湯加味方<sup>50)</sup> 등 한약재 및 기존처방의 항염증작용에 대한 논문이 있었고 항알레르기 효과에 관한 연구는 이 등의 消風散加味の 항알레르기 효과에 관한 실험적 연구<sup>17)</sup>, 정 등의 메밀 추출물의 항알레르기 반응에 대한 실험적 연구<sup>18)</sup>, 양 등의 葛根湯과 加味葛根湯의 항알레르기 및 消炎, 解熱, 鎮痛作用에 대한 실험적 연구<sup>19)</sup> 노 등의 數種의 韓藥추출물이 항알레르기 반응에 미치는 영향<sup>51)</sup>등이 있었으나 이러한 세가지 효과를 동시에 검증한 실험 논문은 없었다.

이에 저자는 苦寒無毒하여 瀉火解毒 清熱燥濕의 효능이 있어<sup>6,20)</sup> 內服藥과 外用藥으로 피부과 질환에 多用하는 大黃, 黃芩, 黃柏를 이용하여 항균, 항염, 항알레르기 효과를 평가하기 위해 본 실험을 시행하였다.

大黃은 苦寒無毒하고 瀉火解毒 清利濕熱의 효과가 있어 實熱便秘, 積滯腹痛, 腸癰, 濕熱黃疸에 쓰이는 약제로<sup>6)</sup> *senecioside*에 의한 瀉下作用<sup>52)</sup>, 항산화효과<sup>53)</sup>, 혈중지질양 감소효과<sup>54)</sup>, COX-2 활성 억제에 의한 항염증효과<sup>55)</sup> 등의 약리작용이 밝혀져 있다.

黃芩은 性寒無毒하고 清熱燥濕 瀉火解毒하는 효과가 있어 瀉實火 除濕熱하는 작용을 하여 外瘍內癰 및 外科 五官科의 熱毒證에 多用하는 약제로<sup>6)</sup> 최근 실험연구에 의해 *Bradykinin* 길항작용<sup>56)</sup>, 항 *Allergy*작용<sup>57)</sup>, 항산화 효능<sup>58)</sup>, 병원성 미생물에 대한 항균효과<sup>59)</sup> 등이 밝혀져 있다.

黃柏은 苦寒無毒하고 清熱燥濕, 瀉火解毒, 清退虛熱 등의 효능이 있어 瘡瘍腫毒, 濕疹, 火傷 등에 쓰이는 약제<sup>6)</sup>로 *berberine*의 혈압강하작용, 결핵균을 비롯한 일반 병원 미생물에 대한 항균작용, 해열작용, 요도의 염증치료 작용 등 여러 약리효과를 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>20,60,61)</sup>.

일반적인 피부 상재균중 피부에 염증을 유발할 수 있는 균주로서 *Staphylococcus aureus*와 병원성이 낮지만 친지방성 이상성 진균으로 정상피부의 모낭 주위에서 발견되는 *Malassezia furfur*, 여드름 유발에 관여하는 *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermis* 등을 들 수 있다<sup>8-11)</sup>. 그 중에서도 황색 포도상 구균인 *Staphylococcus aureus*는 그람 음성구균으로 건강인의 비강에서도 40-50% 검출되는 등 사람이 피부와 구강 이후 점막에 상재하는 균의 하나이지만 부상과 찰과상으로 인해 손상된 부위에 침입해 국소적으로 표피에서의 농가진, 모낭에서는 종기등을 유발시킨다<sup>62)</sup>. 모낭은 정상적으로 다양한 미생물총을 함유하고 있다. 가장 흔한 미생물로는 누두허부(*infrainfundibulum*)에는 혐기성 디프테리아 균인 *P. acnes*가 있으며, 상부인 말단누두부

(*acroinfundibulum*)에는 *Malassezia furfur*가 존재하고 모낭주위의 피부표면에는 호기성인 *Staphylococcus epidermis*가 존재한다<sup>63)</sup>.

여드름 균으로 잘알려진 *P. acnes*는 통성 혐기성 그람양성균으로 피지가 없이는 거의 발육할수 없는 호지성균이다. 따라서 *P. acnes*는 *lipid rich* 부위에 한정되어 있으며 피지가 많은 부분이 여드름의 호 발부위인 동시에 *P. acnes*이 균수가 많은 부위이기도 하다<sup>64)</sup>. *Malassezia furfur*는 사람 피부의 정상 상재균 중에 속하는 이형태성 호지성 효모균(*dimorphic lipophilic yeast*)이며 때로는 기회감염을 일으켜 전풍, *Malassezia* 모낭염, 지루성 피부염의 원인이 되며, 두피, 얼굴, 목 부위에 국한된 성인의 아토피 피부염을 악화시킨다.<sup>65,66)</sup>

본 연구에서는 大黃, 黃芩, 黃柏을 이용하여 아토피 및 피부에 염증을 유발할 수 있는 이 네가지 균주들에 대한 저해 작용 및 생육 특성을 파악하고자 하였다. *Staphylococcus epidermis* (KCTC 1917), *Staphylococcus aureus* (KCTC 1928), *Malassezia furfur* (KCTC 7743), *Propionibacterium acnes* (KCTC 3320)를 이용하여 항균활성 검증결과 S3을 1% 첨가하였을 시 *Staphylococcus epidermis*, *Propionibacterium acnes*에서 10~11mm 정도의 저해환을 나타냈으며 *Malassezia furfur*에 대한 항균성은 관찰되지 않았다. S3을 10% 첨가 시 *S. epidermis* 및 *P. acnes*에 대한 저지환의 크기가 증가하였으며 17~18mm정도로 높은 항균활성을 나타내었다. 그렇지만 고농도에서도 *M. furfur*에 대한 저지환이 관찰되지 않았으며 이로부터 S3이 이 균에 대해서는 항균효과가 없다는 것을 알 수 있었다. 피부 염증 세균인 *Staphylococcus aureus*의 경우 10% 농도 첨가 시 저지환의 크기는 14mm로 관찰되었는데 이는 S3이 이 균에 대해 비교적 높은 항균효과를 나타낸다는 것을 의미한다. 이는 이 추출물이 진균보다는 세균에 더 효과적이라는 것을 말해주고 있다. 또한 피부 여드름을 유발하는 대표적인 균주인 *P. acnes*의 성장을 0.1%(w/v)정도의 농도에서도 어느 정도 억제한다는 것은 이 추출물이

이 균에 대해 높은 항균성을 가지고 있다는 것을 말해주며 이 추출물을 세균성 여드름에 적용 시 효과를 기대할 수 있으리라 생각된다. 또한 아토피 피부염에서 대표적인 균주로 알려져 있는 *Staphylococcus aureus*의 경우에서 S3을 0.5% 이상의 농도로 처리 시에 균의 성장을 늦추어 준다는 것으로 미루어 보아 이 균에 대해서도 상대적으로 높은 항균성을 가지고는 있다고 생각된다. 본 실험에서 사용한 S3은 피부 염증 세균의 억제물질로서 적용 가능하다고 생각된다. 결론을 바탕으로 보았을 시 S3은 여드름 및 피부 염증 세균의 성장억제에 적용 가능하며 특히 *P. acnes* 및 *S. aureus*의 성장 억제에 효과적이라 여겨진다.

알레르기는 I-V형으로 분류된다<sup>67-70</sup>. 특히 제1형 알레르기는 비만세포와 Ig E항체가 중요한 역할을 하며 대부분 알레르기 질환은 제 1형으로 알레르기를 유발하는 알레르겐에 의하여 여러 가지 병적인 증상이 나타난다. 비만세포에 항원이 접촉되면 세포 표면 IgE 수용체의 상호결합(antigen-induced IgE receptor cross-linking)이 일어나며, 이를 통해 비만세포 활성화가 일어난다. 이러한 세포 활성화로 인해 비만세포 내에 이미 형성되어 있었거나 또는 새로 합성되는 여러 종류의 매개체들이 세포밖으로 방출된다<sup>71</sup>. 이때 비만세포로부터 방출되는 매개체에는 histamine, proteases, leukotrienes, prostaglandins 그리고 여러 종류의 cytokine 등이 포함된다<sup>72</sup>. 특히 histamin은 즉시형 알레르기 반응을 주도하며 비만세포로부터 생성되는 cytokine으로 interleukins-1,3,4, 5,6,10,13,16, TNF- $\alpha$ , nerve growth factor, 그리고 lymphotactin 등이 포함된다<sup>71,73,74</sup>. 이들은 Th-2형 면역반응 활성화, 염증매개, 세포성장촉진 및 세포주화반응매개 등 많은 역할을 수행하는데, GI tract에서는 체액분비촉진, 장연동 운동증가와 기도에서는 기관지 협착, 체액분비의 촉진과, 혈관에서는 모세혈관 확장과 투과성 증대가 되고 또한 2차적으로 chemokines, 염증세포의 삼출, 호산구에 의한 조직손상이 발생하여 각종 질병을 일으킨다. 이러한 병태

로 인해 알레르기성 피부질환은 피부의 만성 재발성 염증성 질환으로 아토피 소인을 갖는 사람에게 많이 발생하여 임상증상으로 강한 소양감, 발적 및 맥관부종, 피진의 형태도 습윤성, 건조성병변 및 태선화병변 등으로 다양하게 나타난다<sup>75-78</sup>.

본 실험에서는 마우스 귀 피내조직에 비만세포의 탈과립을 유도하여 히스타민을 방출시키는 물질인 Compound 48/80을 주사하여 히스타민에 의한 즉시형 과민반응을 인위적으로 유발시켜서 S3의 국소 도포에 의한 귀부종의 감소 효과와 조직검사를 통한 비만세포의 탈과립 정도를 알아보았다. Compound 48/80은 G-protein을 활성화<sup>79</sup>하고 지질이 중막 투과성을 증가시켜 비만세포로부터 화학적 매개물질의 유리를 촉발하는 인자가 될 수 있으며<sup>80</sup>, 결국 비만세포의 세포질 내로 칼슘 유입을 증가시켜 히스타민 등의 혈관 자동성 아민을 유리하게 된다. Fig. 5에서 control군에 비하여 C48/80군의 비만세포의 수가 다소 많았으며 S3 100mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml 도포군에서는 C48/80군에 비하여 비만세포의 수가 감소하는 경향을 보였다. 또한 alcian blue에 의해 염색되는 비만세포 세포질의 과립이 S3 도포군에서 더 크게 관찰되는 것으로 보아 S3가 Compound 48/80에 의해 유발되는 비만세포의 탈과립을 억제하였다고 생각된다. 이렇게 볼때 물질 S3은 피부에서 세포막의 유동성을 안정화시켜 비만세포의 탈과립을 조절하는 작용이 있을 것으로 생각된다.

또한 본 실험에서는 S3이 즉시형 알레르기 반응의 조절에 미치는 효과를 검토하기 위하여 in vivo 실험으로 비면역학적 자극제인 Compound 48/80에 의한 IgE 매개 수동 피부 아나필락시에 대한 효과를 실험하였다. 또 in vitro 실험으로 Compound 48/80에 의해 유도되는 복강비만세포로부터 히스타민 유리 조절에 미치는 효과를 실험하였다. S3은 비만세포로부터 Compound 48/80에 의한 히스타민의 유리를 농도 의존적으로 억제하였으며, 1mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다(Fig. 6.) 또한

PCA 반응에 미치는 S3의 효과는 Table 9. 에서와 같이 S3의 농도 의존적으로 억제되었으며, 특히 100mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다. 그러므로 S3은 히스타민 유리 억제와 PCA 반응에 효과를 나타냄으로써 비만 세포 매개 즉시형 알레르기 반응을 억제하는 성분이 함유되어 있을 것으로 생각된다.

Prostaglandin(PG)은 arachidonic acid에서 유래해 염증과 면역반응을 비롯해 smooth muscle tone, vascular permeability, cellular proliferation 등에 작용하는 intercellular, intercellular messenger이다. PG은 세포의 감염에서 유래한 LPS 혹은 외부자극에 의해 세포막 지질 성분인 phospholipase A2에 의해 생성되는 arachidonic acid로부터 만들어진다. 즉 arachidonic acid는 cyclooxygenase(COX)효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE2와 PGI2는 혈관투과성 항진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 관련이 가장 깊은 것으로 알려져 있다. 오래전부터 발열, 발적, 동통 등을 치료하는데 널리 사용되어온 aspirin이 이러한 PG을 합성하는데 핵심적인 작용을 하는 COX의 작용을 억제시키기 때문인 것에서 알 수 있듯이 염증 억제를 위해 COX의 활성을 억제시키고자 하는 시도가 활발히 이루어지고 있다. COX는 I형과 II형의 2가지 isoform이 존재한다. 이중 I형인 COX-1은 위장관보호, 신장의 혈류조절, 혈소판응집 등 우리몸의 정상적인 기능 유지에 중요한 작용을 하는, 대부분의 정상적인 조직에서 발생하는 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 II형인 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다. 따라서 항염증제와 항암제의 개발을 위해 COX-2의 활성을 억제시키는 물질의 탐색에 많은 연구자들이 힘을 쓰고 있다<sup>81-83)</sup>.

이에 LPS(1μg/ml)를 사용하여 대식세포주인 RAW 264.7(1×10<sup>6</sup> cell)의 COX-2 활성을 유도한 실험에서 COX-2는 LPS 단독 처리군에 비해 S3 처리군에서 S3농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. Fig 7.에서

같이 S3은 50ppm에서는 억제 효과가 없었으나 100, 200ppm 농도에서는 25-30% 정도의 COX-2 발현 억제 효과가 있는 것으로 생각된다. 이런 결과로 S3은 임상적으로도 염증질환의 치료 및 예방에 효과가 있을 것으로 사료된다.

S3의 안전성을 확인한 실험으로 세포독성평가는 S3이 100ppm농도에서는 세포독성률이 대조군에 비해 3%로 증가되었고, 100ppm에서는 7% 증가됨을 확인하였다(Fig. 8). 500ppm과 1000ppm에서는 세포생존률 대조군에 비해 6, 13%이하로 감소하였다. 이는 S3이 L929 세포에 500ppm 농도 이상에서 세포 독성을 유발됨을 알 수 있었다. 좀더 안전성을 확인하기 위해서는 경구 아급성 독성, 급성 독성 등의 in vivo 실험을 수행해야 할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합할 때 苦寒無毒하고 瀉火解毒 清熱燥濕의 효능이 있는 大黃, 黃芩, 黃柏 추출물은 항균력과 항염효과, 항알레르기효과를 모두 가지고 있는 것으로 평가되며 아토피나 각종 다양한 습진성, 알레르기성 피부과 질환에 외용 분무제나 로션, 연고제 등 임상적으로 광범위한 활용가치가 있을 것으로 사료되며 배합하여 효과를 더할 수 있는 한약제의 발견, 순수물질의 정제 및 성분 분석에 대한 연구가 지속되어야 할 것이라고 사료된다.

## 결론

大黃, 黃柏, 黃芩 전탕액(S3)이 다양한 피부과 질환의 원인균으로 알려진 *Staphylococcus aureus*, *Malassezia furfur*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermis*에 대한 항균력을 평가하고, Compound 48/80으로 알레르기를 유도한 후 히스타민의 방출량과 비만세포의 부유량을 비교하고 PCA반응을 유도하여 항알레르기 효과를 검증하고, COX-2 활성에 미치는 영향 및 세포독성 정도를 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. S3을 첨가하였을 시 농도 의존적으로 세균 중 *S. epidermis*, *P. acnes*에서 높은 항균활성을 나타내었다. 피부 염증 세균인 *S. aureus*의 경우 비교적 높은 항균효과를 나타내었다.
2. S3은 Compound 48/80에 의한 귀부종 및 히스타민방출량에 대해 농도 의존적으로 유의성 있는 억제효과를 나타내었다
3. 수동 피부 아나팔락시 반응은 S3 농도 의존적으로 억제 되었으며, 특히 100mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다.
4. COX-2 발현 정도를 분석한 결과 LPS 단독 처리군에 비해 S3 투여군이 S3 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다.
5. MIT 정량에 의한 세포생존율을 측정한 결과 S3이 L929 세포에 500ppm 농도 이상에서 세포 독성이 유발됨을 알 수 있었다.

### 참고 문헌

1. 金圭烈. 黃帝內經素問校注滙粹. 서울: 일지사. 1998: 上 379, 中 284-8.
2. 鄭遇悅. 韓方病理學. 이리: 서울공판사. 1983: 5-34.
3. Kim, E.J., Jin, H.K., Kim, K., Lee, H.Y., Lee, S.Y., Lee, K.R., Zee, O.P., Han, J.W. and Lee, H.W. Suppression by a sesquiterpene lactone from *Carpesium divaricatum* of inducible nitric oxide synthase by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Biochem. Pharmacol.* 2001; 61: 903-10.
4. 최승만, 김민주, 최영호, 안호정, 윤여표. *Propionibacterium acnes*에 대한 천연물의 항균효과 검색. *대한약학회지.* 1998; 42: 89-94.
5. 신연상. 유백피의 항염 및 조직재생에 대한 실험적 연구. *대한외과학회지.* 2001; 14(1): 129-53.
6. 신민교. 임상본초학. 영림사. 1997: 400, 405, 785.
7. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. *피부과학.*

- 서울. 2001: 161-6 461-4.
8. Peter G, Smith AL. Group A Streptococcal infections of the skin and pharynx. *N Engl J Med.* 1977; 297: 311-5.
9. Steele RW. Recurrent Staphylococcal infection in families. *Arch Dermatol.* 1980; 116: 189-96.
10. Leyden JJ, McGinley KJ, Cavalieri S. *Propionibacterium acnes* resistance to antibiotics in acne patients, *J. Am Acad Dermatol,* 1983; 8: 41-6.
11. 성준모, 박나영, 이신호. 여드름 원인균의 성장에 미치는 오미자와 솔잎의 효과 *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 2003; 31(1): 69-74.
12. 홍석훈, 노석선. 청상방풍탕가미가 면포에 미치는 영향. *대한안이비인후과학회지.* 2002; 15(1): 315-35.
13. 노현찬, 노석선. 고삼추출물이 모발성장 촉진 및 면포억제에 미치는 영향. *대한안이비인후과학회지.* 2002; 15(1): 96-126.
14. 조희창 외 3인. 청상방풍탕 및 구성약물의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균효과에 관한 연구. *본초학회지.* 2003; 18(2): 37-47.
15. 김희석 외 3인. 대산의 분획별 추출물에서 항균 활성 검색. *동의생리병리학회지.* 2002; 16(6): 1184-9.
16. 박수연 외 2인. 수종의 한약이 피부질환과 관련된 균주 6종에 미치는 항균력 및 목향이 염증기 전에 미치는 영향. *대한안이비인후과학회지.* 2004; 17(1): 104-22.
17. 이준성, 서형식, 노석선. 소풍상가미방의 항알레르기 효과에 관한 실험적 연구. 2001; 14(2): 9-19.
18. 정지영, 노석선. 메밀 추출물의 항알레르기 반응에 관한 실험적 연구. 2002; 15(1): 31-49.
19. 양태규, 김윤범, 채병윤. 갈근탕과 가미갈근탕의 항알레르기 및 소염 해열 진통작용에 대한 실험적 연구. 2002; 15(1): 76-95.

20. 신풍출판공사(편집). 중약대사전: 신풍출판공사. 1982: 158.
21. Kanemoto, T., Kasugai, T., Yamatodani, A., Ushio, H., Mochizuki, T.K., Kimura, M., Nishimura, M. and Kitamura, Y. Supernormal histamine release and normal cytotoxic activity of beige rat mast cells with giant granules. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1993; 100: 99-106.
22. Yurt, R.W., Leid, R.W. and Austen, K.F. Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J. Biol. chem.* 1977; 252: 518-21.
23. Shore, P.A., Burkhalter, A. and Cohn, V.H. A method for fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1959; 127: 182-6.
24. Kawabata, T. T. and Babcock, L. S. Measurement of murine ovalbumin-specific IgE by a rat basophil leukemia cell serotonin release assay. *J. Immunol. Method.* 1993; 162: 9-15.
25. Katayama, S., Shinoya, H. and Ohtake, S.) A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol. Immunol.* 1978; 22: 89-101.
26. Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983; 65: 55-63.
27. 박광균. 구강생화학 12장 면역과 염증: 군자출판사. 1999: 318-25.
28. 丁奎萬. 알레르기와 한방. 서울: 제일로. 1990: 101-8.
29. 戴思恭. 證治要訣. 傳方. 中醫免疫思想急成就. 중의잡지. 1884; 11(25): 56.
30. 진실공. 외과정종. 북경: 인민위생출판사. 1983: 269.
31. 박민철, 김진만, 홍철희 등. 아토피 피부염의 동서의학적 문헌 고찰. 대한안이비인후과학회지. 2002; 15(1): 226-52.
32. 양사수. 중의임상대전. 서울: 의성당. 1993: 889-91.
33. 신광호. 한의외치료법학. 서울: 대성의학사. 2000: 82-9, 501-4.
34. 고백화. 실용중의외과학. 상해: 상해고학기술출판사. 1985: 454-9, 461-4.
35. 손정숙, 최인화. 아토피 피부염 환자 치험 1례. 대한한의학회지. 2001;22(4): 151-7.
36. 구영희, 최인화. 만성 성인형 아토피 피부염의 한방 치험 3례. 대한안이비인후과학회지. 2002; 15(1): 140-50.
37. 고보경, 이현정, 김동재 등. 아토피피부염 환자의 민간요법에 관한 연구. 대한피부과 학회지. 2001; 39(1): 16-21.
38. 최규동, 변부형, 정찬호 아토피 피부염에 대한 단식치험 2례. 제한동의학술원 논문집. 4(1): 428-35.
39. 박혜선, 지선영, 구덕모 아토피 피부염의 중의 외치법 고찰. 대한외관과학회지. 2001; 14(1): 32-41.
40. 심성용, 김성범, 김경준. 만성 성인형 아토피 피부염의 외치 1례. 대한안이비인후과학회지. 2003; 16(1): 179-90.
41. 홍남두 외. 지실의 항염증 성분연구. 생약학회지. 1991.
42. 한병훈 외. 독활의 항염증 유효성분 *Continentalic acid*의 화학구조. 생약학회지. 1981.
43. 이은방 외. 포공영의 항위염작용. 생약학회지. 1993; 24(4): 313-8.
44. 이은방 외. 사상자의 항염증작용. 생약학회지. 1998; 29(4): 384-90.
45. 조충식 외. 반묘와 *Cantharidin*의 항염증효과에 대한 연구. 대전대학교 한의학 연구소 논문집. 1998; 6(2): 471-82.
46. 이한철. 가미지패산이 실험동물의 진통 소염, 해열 및 항균에 미치는 영향. 원광대학교 대학원.



- 1988.
47. 이봉주. 영선제통음이 염증 및 혈중 uric acid level에 미치는 영향. 동의 병리학회지. 1995; 12: 383-407.
48. 홍성진 외. 황기내탁산의 소염작용에 관한 실험적 연구. 2004; 17(2):1-11.
49. 송성필, 김진만 외. 승마갈근탕가미방이 소염작용에 미치는 영향. 2004;17(2): 12-30.
50. 최은규, 노석선. 용담사간탕가미방이 염증치료 및 예방에 미치는 영향에 대한 연구. 2004; 17(2): 39-47.
51. 노태석, 노석선. 수종의 한약 추출물이 항알레르기 반응에 미치는 영향. 2002; 15(1): 1-29.
52. Choi G. S. A comparative study on the effects and contents of the sennoside A,B, of Rhei rhizoma and processed Rhei rhizoma M.S. thesis, Sang Gi university. 1994.
53. Kim H.S. Protective effect of RU8 extracted from Rhubarb on the damage of gastric mucosa induced by oxygen radicals. M.S. thesis, university of Incheon. 1995.
54. 손영중 등. 대황이 고지혈증환자의 혈중 지질 및 효소활성에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1999; 14(1): 61-8.
55. 하해경 등. 종대황추출물의 COX-2활성 억제효과. 응용약물학회지. 2000; 8: 73-7.
56. 정성현, 최진재, 유경숙, 윤혜숙. 황금의 Bradykinin 길항작용. 생약학회지. 1991; 22(3): 215-9.
57. 전재홍, 강윤호. 황금 추출물이 DNCB로 유도된 생쥐의 Allergy성 접촉피부염에 미치는 영향. 동국한의학회연구소논문집. 1998; 7(1): 119-33.
58. 김성만 등. 황금약침액의 흰쥐 간세포내의 항산화 효능에 관한 연구. The Journal of Korea Acupuncture & Moxibustion Society. 1999; 16(1): 497-509.
59. 조성환, 김영록. 황금추출물의 항균특성. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2001; 30(5): 964-8.
60. 한국교육문화사 편집부. 동의대백과 사전: 한국 교육문화사. 1994: 1234.
61. 지형준. 본초에서 건강식품의 개발. 한국식품개발연구원. 1994; 7(3): 42.
62. 이견집 외6인. 진단미생물학(3판). 서울: 고려의학. 1999: 322-3, 359-74.
63. Marples PR, Leyden JJ, Stewart RN, Mills OH, Kligman AM. The skin microflora in acne vulgaris. J Invest Dermatol. 1974; 62: 37-41.
64. McGinley KJ et al: Regional variations in density of cutaneous propionibacteria: correlation of Propionobacterium acnes populations with sebaceous secretion, J Clin Microbiol. 1980; 12: 672-5.
65. Faergemann J. Pityrosporum species as a cause of allergy and infection. Allergy 1999; 54: 413-9.
66. Faergemann J. Pityrosporum yeasts-what's new? Mycoses 1997;40 (Suppl 1): 29-32.
67. 康秉秀. 한방임상 알레르기. 서울: 성보사. 1988: pp.196-201, 22-3, 61-8.
68. 서울대학교의과대학. 면역학. 서울대학교출판부. 1994: pp.135-42, 165, 167-9, 229, 234-41.
69. 김형민. 면역과 알레르기. 서울: 신일상사. 1988: 179-98.
70. ROITT, IVAN. M. 로이트 필수면역학. 서울: 고문사. 1991: pp. 227-30.
71. Metcalfe, D.D., Baram, D., Mekori, Y.A. Mast cells. Physiol. Rev. 1997; 77: 1033-79.
72. Okayama, Y., Petit-Frere, C., Kassel, O., Semper, A., Quint, D., Tunon-de-Lara, M.J. Bradding, P., Holgate, S.T., Church, M.K. Ig E-independent expression of mRNA for IL-4 and IL-5 HUMAN LUNG MAST CELLS. J. Immunol. 1995; 155: 1796-808.
73. Moller, A., Heng, B.M., Grutzkau, A., Lippert, U., Aragane, Y., Schwarz, T., Kruger-Krasagakes, S.

- Comparative cytokine gene expression: regulation and release by human mast cells. *Immunology* 1998; 93: 289-95.
74. Nilsson, G., Forsberg-Nilsson, K., Xiang, Z., Hallbook, F., Nilsson, K., Metcalfe, D.D. Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 2295-301.
75. Holgate, S.T., Robinson, C., and Church, M.K.. *Allergy, Principles and Practice*. 3rd ed, Mosby, St. Louis. 1988: pp. 135-6.
76. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. : *Cellular and Molecular Immunology*. 2nd ed, Saunders, Philadelphia. 1994: 279-92.
77. 허충림. *피부알레르기*. 서울. 경희의학. 1996; 12(2): 108-16.
78. *피부과학회. 피부과학*. 서울: 여문각. 1990: 1, 29-35.
79. Mousli, M.C., Bronner, C., Landry, Y., Bockaen, J. and Rouot, B. Direct activation of GTP-binding regulatory proteins (G proteins) by substance P and compound 48/80. *FEBS Lett.* 1990; 259: 260-2.
80. Tasaka, K., Mio, M. and Okamoto, M. Intracellular calcium release induced by histamine releasers and its inhibition by some antiallergic drugs. *Ann. Allergy.* 1986; 56: 464-9.
81. 서영준: 발암과정에 있어서 Cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암예방, *분자생물학뉴스* 2002; 13: 8-17, 213-347.
82. 노민수 외: 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. *약학회지*. 1998; 42: 558-66.
83. 문태철 외: 천연물로부터 Cyclooxygenase-2 저해제 검색, *약학회지*. 1998; 42: 214-9.