

加味羌活散이 NC/Nga mice의 아토피 발진 억제에 미치는 실험적 연구

김윤희 · 한재경 · 김윤희*

Effect of Kami-KangHwalSan on atopic dermatitis-like skin lesions induced in NC/Nga mice by mite antigen stimulation

Kim Yun-hee, Han Jae-kyung, Kim Yun-hee

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Objective We wished to examine closely effect that Kami-KangHwalSan medicines used to atopy dermatitis disease patient get in atopy eruption control experimentally

Materials and Methods Atopic dermatitis (AD) usually develops in patients with an individual or family history of allergic diseases, and is characterized by chronic relapsing inflammation seen specially in childhood, association with IgE hyperproduction and precipitation by environmental factors. However, the exact etiology of AD has been unclear. To further explore the pathogenesis and treatment of AD, a suitable animal model is required. We found that skin lesions, which were clinically and histologically very similar to human AD, mite antigen-induced dermatitis on the face, neck, ears and dorsal skin of inbred NC/Nga mice

Results and Conclusion Kami-KangHwalSan medicines controlled CD3+/CD69+, CD4+/CD25+, B220+/IgE+, and B220+/CD23+ revelation that an experiment that motive allergy immune reponse because an in vitro experiment stimulates splenocytes of a NC/Nga mouse same time by PWM, and interleukin-4, eotaxin 2, CCR3, TARC mRNA outturn that bear in splenocytes decreased remarkably by Kami-KangHwalSan medicines.

Th1 cell and Th2 cell observe to be shifted by secretion amount of IL-4 and IFN- γ by Kami-KangHwalSan medicines could know that Kami-KangHwalSan medicines can use usefully in allergy autoimmune disease

Key words Kami-KangHwalSan, Th1 cell and Th2 cell, IL-4, 10 and IFN- γ , eotaxin 2, CCR3, TARC

I. 緒論

아토피 피부염은 주로 유소아기에 발병이 시작하는 만성 재발성 피부질환으로 홍반, 삼출, 가피, 인설 등의 증상을 나타내며 환자의 대부분은 아토피 소인을 가진다. 현재 까지 아토피 피부염

의 정확한 병인은 규명되지 않았으나 항원에 반응하는 비만세포에서 유리된 화학 매체에 의해 표적기관인 피부에 알레르기성 염증이 발생하며 염증반응의 증상 발현에 T세포와 cytokine의 활성이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 따라서 아토피 피부염의 치료를 위해 알레르기 면역반응 조절 대한 연구가 이루어지고 있으며, 한의학계에서도 임상에서 다루는 처방의 아토피 피부염의 면역조절 효과에 대한 실험적 연구

* 대전대학교 한의과대학 소아과학교실
교신저자 · 김윤희 · E-mail unia67@dju.ac.kr
채택일 2007년 6월 10일

들²⁻⁵⁾이 진행되고 있다. 저자는 아토피 피부염 환자에게 임상에서 사용하는 加味羌活散⁶⁾의 아토피 발진 억제 효능을 실험적으로 규명해보고자 in vitro에서 NC/Nga 생쥐의 비장세포를 분리하여 FACS 분석과 real-time PCR를 이용하여 세포독성, B세포, T세포 활성, chemokine과 cytokine 변화를 측정하였다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate (DEPC), 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2,5-carboxymethoxyphenyl)-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), complete adjuvant, chloroform, collagenase, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구 용혈액(RBC lysis solution), ethidium bromide(EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, lamide, magnesium chloride(MgCl₂)는 Sigma 사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (Logan, U.S.A.) 제품을, anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-Gr1-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD25-PE, anti-CD28-PE, anti-CD11b-FITC, anti-IgE-FITC anti-B220-PE, anti-CD69-FITC, propidium iodide(PI)와 RNase는 Pharmingen사(Torreyana, U.S.A.) 제품을, rhIL-1 β , rhTNF- α 는 R & D system사 (Minneapolis, U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기(대웅, Korea), rotary vacuum evaporator(Buchi

B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator(Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench(Vision scientific Co., Korea), autoclave(Sanyo, Japan), micro-pipet(Gilson, France), water bath(Vision scientific Co., Korea), vortex mixer(Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge(Sigma, U.S.A.), deep-freezer(Sanyo, Japan), thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, U.S.A.), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.) 및 ELISA reader(Molecular Devices, U.S.A.) 등을 사용하였다.

2) 동물

암컷 7주령의 SPF NC/Nga 생쥐 (15-20g)는 Charles River Japan (Yokohama, Japan)사에서 공급받았다. 동물은 실험당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, humidity 55 \pm 15%, 12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) Reagent

본 실험에 사용한 加味羌活散의 구성은 『小兒集方』⁶⁾에 준하였으며, 사용한 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고 그 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Kami-KangHwalSan (이하 KKHS)의 처방구성

韓藥名	生藥名	用量(g)
羌活	Radix Osteric Koreani	10
前胡	Peucedani Radix	10
白茯苓	Poria	5
人參	Ginseng Radix	5
甘草	Glycyrrhizae Radix	5
川芎	Cnidii Rhizoma	5

枳 殼	Aurantii Fructus	5
天 麻	Gastrodiae Rhizoma	5
桔 梗	Platycodi Radix	5
薄 荷	Menthae Herba	2
蟬 蛻	Cicadae Periostracum	2
Total amount		59

4) KKHS 추출물 분리

KKHS 118g에 각각 증류수 2,000ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 KKHS 추출물(22.7g)을 냉동 보관(-84℃)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 세포독성 측정

(1) 세포 배양

Balb/c 생쥐의 정상 lung fibroblast 세포는 Balb/c 생쥐의 폐 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube(15ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심 분리하고, tube에 DMEM {containing collagenase A(5mg/ml, BM, Indianapolis, IN, U.S.A.)와 DNase type I(0.15mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin 104U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25µg/ml)}를 넣고 37℃ CO2 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수로 약 2회 1500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC 세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 105cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

(2) 세포독성 측정

세포독성방법은 SRB assay법⁷⁾을 약간 변형

하여 실험에 사용하였다. mLFCs 세포는 37℃, 5% CO2 배양기에서 1시간 배양한 후 KJSULT 추출물(최종 농도 200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액으로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50µl를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치하였다. 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4%/1% acetic acid) 용액을 100µl/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 45회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100µl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA LEADER에서 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) In vitro; PBMC and spenocytes cultured of NC/Nga-induced atopic dermatitis mice

(1) Spontaneous dermatitis in NC/Nga mice

Conventional한 상태에서 사육하고 IgE hyperproduction이 된 18주령의 NC/Nga 생쥐를 선별하여 눈에서 capillary 관을 이용하여 100 µl의 혈액을 채혈하였다. 채혈된 혈액에서 혈장을 분리하여 IgE 함량을 측정하여 50 µg/ml 이상된 생쥐, 그리고 피부에 발진이 있는 아토피 피부질환이 나타난 NC/Nga생쥐를 선택하였다.

(2) Atopic dermatitis-like skin NC/Nga생쥐의 PBMC와 비장세포 분리 및 배양

① PBMC와 비장세포 분리

선별된 atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐에서 혈액을 채혈한 후 비장을 적출하였다. 채혈한 혈액을 PBS로 10배 희석한 후 Hypaque-1077 (Sigma, USA)로 gradient를 만든 후 2000rpm에서 10분간 원심분리하여 buffy coat에서 PBMC세포를 분리하였다. 그리고 비장을 적출하여 100mesh에서 분쇄하여 비장세포를 얻어 2000rpm에서 5분간 원심분리로 세포를 회

수하였다. 여기에 ACK 용액 (8.3g NH₄Cl, 1g KHCO₃, in 1L of demineralized water + 0.1mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 분리하였다. 분리한 PBMC와 비장세포를 24 well plate에 10% FBS-DMEM 배양액에 5×10⁵ 세포/well로 분주하였다.

② FACS analysis in PBMC and splenocytes cultured

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga생쥐에서 분리한 PBMC와 비장세포를 24 well plate에 5×10⁵ 세포/well로 분주하고 pokeweed mitogen (PWM)을 10 µg/ml과 加味羌活散 추출물(100µg/ml)등을 가하여 48시간 동안 동시배양하였다. 배양 종료 후 PBMC와 비장세포를 인산완충생리식염수로 2회 수세하였고, 4℃에서 면역형광염색을 실시하였다. 각각에 phycoerythrin (PE)-anti-mouse CD3e, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-mouse CD69, anti-mouse CD4-FITC, anti-mouse B220-PE, anti-mouse IgE-FITC, 그리고 anti-mouse CD23-FITC등을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포형광분석기 (Cytometry, BD, USA)로 CD3e+/CD69+, CD3e+/CCR3+, CD3e+/CD45+, CD4+/CD45+, B220+/IgE+ 와 B220+/CD23+ 의 발현 세포수를 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램으로 활성세포(%) 비율을 산출하였다.

③ Quantitative real-time-PCR in splenocytes cultured

㉠ 배양된 비장세포에서 RNA 분리

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga생쥐에서 분리한 비장세포를 24 well plate에 2×10⁶ 세포/well로 분주하고 pokeweed mitogen (PWM)을 10 µg/ml과 加味羌活散 추출물(100 µg/ml)등을 가하여 4시간 동안 동시배양 하였다. 배양 종료 후 배양상층액을 제거한 후 RNAzolB 500 µl를 넣고 용해될 때까지 분쇄

한다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 µl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 µl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 µl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

㉡ 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 2 µg을 DNase I (10U/µl) 2U/tube를 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 µl 10 mM dNTPs mix, 1 µl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 µl), RNA inhibitor로서 1 µl RNase inhibitor (20 U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5 µl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1µl의 M-MLV RT (200 U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다. 이 20 µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37℃ heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

㉢ Real Time Quantitative RT-PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다. 사용된 primers는 다음과 같다(Table 2).

Table 2. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
G3PDH	Forward	TGAAGCAGGCATCTGAGG 5' G 3'
	Reverse	CGAAGGTGGAAGAGTGGG 5' AG 3'
eotaxin 2	LEFT	ctgtgaccatccccctcatct
	RIGHT	cttatggccttcttgggtga
TARC	LEFT	cccatgaagaccttcacctc
	RIGHT	actctcggcctacattgggtg
CCR3	LEFT	cccgaactgtgacttttct
	RIGHT	cctctggatagcgaggactg
IL-10	LEFT	aagcagccttgcaaaaaga
	RIGHT	tgggaagtgggtgcagttat
IL-4	Forward	ACAGGAGAAGGGACGCCAT 5' 3'
	Reverse	GAAGCCCTACAGACGAGCT 5' CA 3'
interferon- γ	Forward	5'TCAAGTGGCATAGATGT GGAAGAA 3'
	Reverse	TGGCTCTGCAGGATTTTC 5' ATG 3'
IL-2	Forward	5' atgccaacaagcagagac 3
	Reverse	5' tgagagaaccaggagctgt 3'

사이토카인 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard를 G3PDH를 사용하였고, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은: pre-denaturation은 2 min at 50 °C, 10 min 94 °C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95 °C, 1 min at 60 °C에서 수행하였다. KJSULT 투여군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 target group의 Quantitative PCR

$$y = x(1 + e)^{-n}$$

x = starting quantity

y = yield

n = number of cycles

e = efficiency

로 계산하여 RQ (relative quantitative)을 측정하였다.

3. 統計處理

실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 分析方法을 利用하여 決定하였다.

III. 成績

1. KKHS의 세포독성 측정

1) 세포독성

KKHS 추출물의 세포독성을 측정한 결과, Fig.1에서 보듯이 농도가 1에서 100 μ g/ml까지는 거의 세포독성이 나타나지 않았지만, 100 μ g/ml과 200 μ g/ml에서는 각각 87.4 \pm 2.8과 84.4 \pm 1.8로 유의성 있는 감소를 나타내었지만 (p<0.05, p<0.01), KKHS 추출물의 세포독성은 관찰되지 않았다.

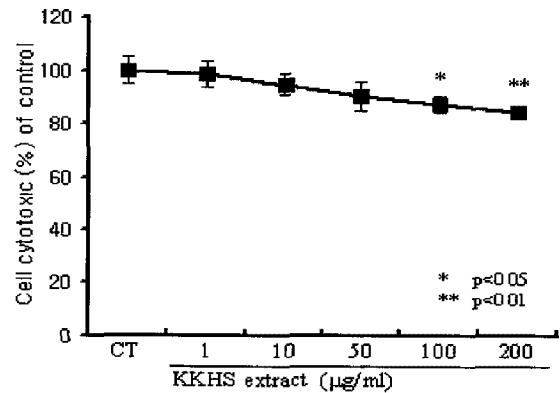


Fig.1 Cytotoxicity effects of KKHS extract on mouse lung fibroblast cells (mLFCs).

Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) were pretreated with various concentration KKHS (Kam-KangHwalSan) extract. The results are expressed the mean± S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Statistically significant value compared

with control group data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

In vitro; PBMC and splenocytes culture of NC/Nga- induced dermatitis atopy mice

2. FACS analysis in PBMC and splenocytes cultured

1) CD3+/CD69+ & CD4+/CD45+ 활성 T 세포수에 미치는 영향

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 PBMC와 비장세포를 PWM으로 자극하여 활성화시킨 후 KKHS 추출물에 의하여 억제되는지를 관찰한 결과이다, Fig.2A에서는 CD3e+/CD69+ 인 활성 T세포수를 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군이 10배 이상 활성세포가 증가를 하였고 KKHS 추출물과 동시배양해서는 PBMC에서 유의성 있는 CD3e+/CD69+ 인 활성 T세포 억제를 관찰할 수 있었다 ($p < 0.001$). 그리고 Fig.2B에서는 CD4+/CD25+ 인 활성 T세포수를 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군이 현저하게 활성 T세포가 증가를 하였고, KKHS 추출물과 동시배양해서는 PBMC와 비장세포에서 유의성 있는 활성 T세포 억제를 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$).

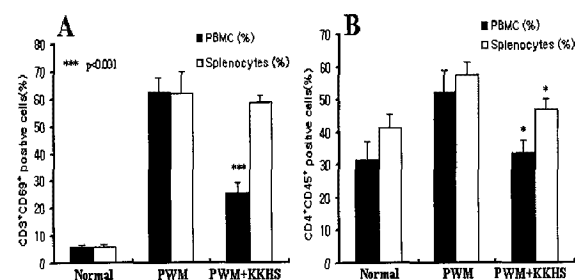


Fig.2 Inhibitory effect of KKHS extract on CD3+/CD69+ & CD4+/CD45+ positive cells by KKHS extract plus PWM-stimulated murine PBMCs, and splenocytes.

Isolated PBMC, and splenocytes from atopy dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with PWM (10 $\mu\text{g/ml}$) or treated with KKHS extract (100 $\mu\text{g/ml}$)

plus KKHS extract. PBMC and splenocytes were not treated (normal; only cells), co-cultured with PWM (Control), and with PWM plus KKHS extract for 48hrs. After 48h, the cells were harvested, and assayed for CD3e+/CD69+ and CD4+/CD25+ positive cells by flow cytometry, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Statistically significant value compared with control group data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

2) B220+/IgE+ & B220+/CD23+ 활성 B세포수에 미치는 영향

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 PBMC와 비장세포를 PWM으로 자극하여 활성화시킨 후 KKHS 추출물에 의하여 억제되는지를 관찰한 결과이다, Fig.3A에서는 B22+/IgE+ 인 활성 B세포수를 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군이 3배 이상 활성 B세포가 증가를 하였고 KKHS 추출물과 동시배양해서는 PBMC와 비장세포 모두에서 차이가 없었다. 그리고 Fig.3B에서 B220+/CD23+ 인 활성 B세포수를 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군이 활성 B세포가 증가를 하였고, KKHS 추출물과 동시배양에서는 비장세포에서 유의성 있는 활성세포 억제를 관찰할 수 있었다 ($p < 0.01$).

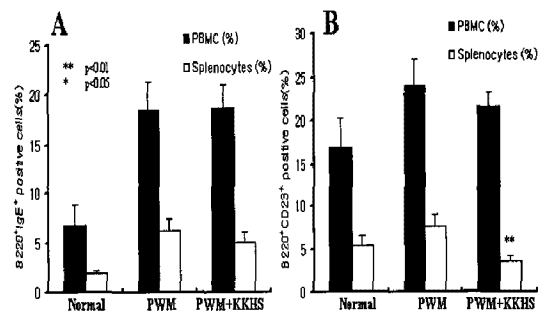


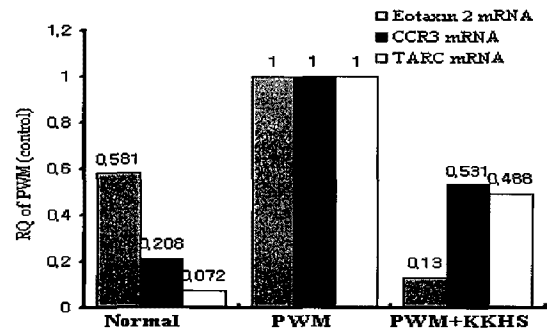
Fig.3 Inhibitory effect of KKHS extract on B220+/IgE+ & B220+/CD23+ positive cells by KKHS extract plus PWM-stimulated murine PBMCs, and splenocytes.

Isolated PBMC, and splenocytes from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with PWM (10 μ g/ml) or treated with KKHS extract (100 μ g/ml) plus KKHS extract. PBMC and splenocytes were not treated (normal; only cells), co-cultured with PWM (Control), and with PWM plus KKHS extract for 48hrs. After 48h, the cells were harvested, and assayed for B220+/IgE+ and B220+/CD23+ positive cells by flow cytometry, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

3. Real-time-PCR analysis on Atopy dermatitis-like skin NC/Nga mouse

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장세포를 PWM으로 자극하여 활성화 시킨 후 KKHS 추출물에 의하여 Eotaxin 2, CCR3, 그리고 TARC mRNA 유전자 발현억제 되는지를 관찰한 결과로 대조군에 대한 KKHS 추출물 처리군의 상대정량(RQ)값으로 분석하였다. Fig.4에서 보듯 무처리군 (정상군)의 eotaxin 2, CCR3, 그리고 TARC mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1 일때 각각 0.581, 0.208, 0.072이었고, PWM과 KKHS 추출물과 동시배양한 실험군은 대조군의 RQ값이 1 일때 eotaxin 2, CCR3, 그리고 TARC mRNA 유전자 발현이 0.166, 0.619, 그리고 0.203으로 eotaxin 2 유전자 발현은 현저하게 억제되었고, CCR3와 TARC mRNA 유전자 발현은 45-55%이상 감소를 나타내었다.

Fig.4 Effects of KKHS extract on eotaxin 2, CCR3 and TARC mRNA expression by KKHS extract plus PWM-stimulated murine splenocytes.



Isolated splenocytes from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with PWM (10 μ g/ml) or treated with KKHS extract (100 μ g/ml) plus KKHS extract. Splenocytes were not treated (normal; only cells), co-cultured with PWM (Control), and with PWM plus KKHS extract for 4hrs. Eotaxin 2, CCR3, and TARC mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Eotaxin 2, CCR3, and TARC mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

1) NC/Nga 생쥐의 비장세포에서 IL-4와 IL-2 mRNA 유전자 발현 분석

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장세포를 PWM으로 자극하여 활성화 시킨 후 KKHS 추출물에 의하여 Th2세포에서 분비되는 IL-4와 IL-2 mRNA 유전자 발현이 억제 되는지를 관찰한 결과로 대조군에 대한 KKHS 추출물 처리군의 상대정량 (RQ) 값으로 분석하였다. Fig.5에서 보듯 무처리군 (정상군)의 IL-4,와 IL-2 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1

일때 각각 0.01 과 0.415이었고, PWM과 KKHS 추출물과 동시배양한 실험군은 대조군의 RQ값이 1 일때 IL-4,와 IL-2 mRNA 유전자 발현이 0.45,와 0.311로 IL-4와 IL-2 모두 유전자 발현은 현저하게 억제되었다.

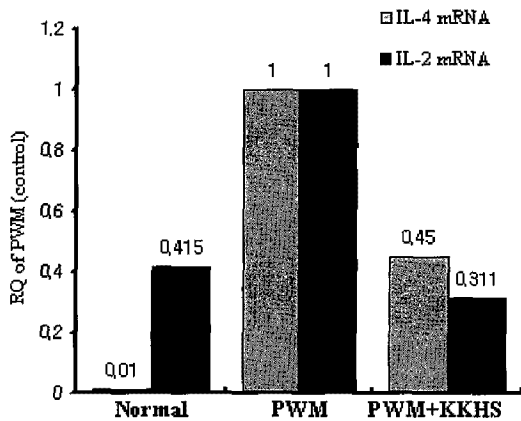


Fig.5 Effects of KKHS extract on IL-4, and IL-2 mRNA expression by KKHS extract plus PWM-stimulated murine splenocytes.

Isolated splenocytes from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with PWM (10 μ g/ml) or treated with KKHS extract (100 μ g/ml) plus KKHS extract. Splenocytes were not treated (normal, only cells), co-cultured with PWM (Control), and with PWM plus KKHS extract for 4hrs. IL-4, and IL-2 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-4, and IL-2 mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

2) NC/Nga 생쥐의 비장세포에서 IFN- γ 와 IL-10 mRNA 유전자 발현 분석

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장세포를 PWM으로 자극하여 활성화 시킨 후 KKHS 추출물에 의하여 Th1세포에서 분비되는 IFN- γ ,와 IL-10 mRNA 유전자 발현이 증가 되는지를 대조군에 대한 KKHS 추출물 처리군의 상대정량 (RQ) 값으로 분석하였다. Fig.6에서 보듯 무처리군 (정상군)의 IFN- γ 와 IL-10 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때 각각 0.01 과 0.05로 유전자가 발현이 일어나지 않고, PWM과 KKHS 추출물과 동시배양한 실험군은 대조군의 RQ값이 1 일때 IFN- γ 와 IL-10 mRNA 유전자 발현이 1.978와 2.467으로 IFN- γ 와 IL-10 모두 2배이상 증가되었다.

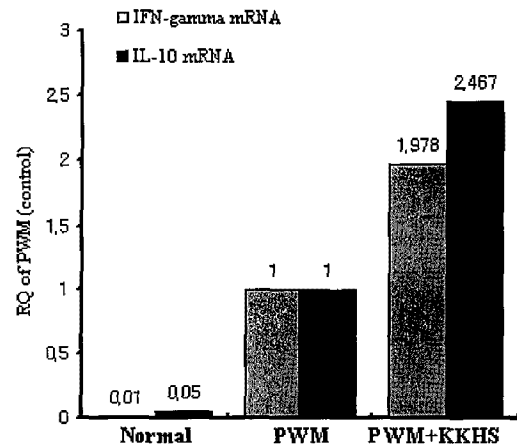


Fig.6 Effects of KKHS extract on IFN- γ , and IL-10 mRNA expression by KKHS extract plus PWM-stimulated murine splenocytes.

Isolated splenocytes from atopy dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with PWM (10 μ g/ml) or treated with KKHS extract (100 μ g/ml) plus KKHS extract. Splenocytes were not treated (normal, only cells), co-cultured with PWM (Control), and with PWM plus KKHS extract for 4hrs IFN- γ , and IL-10 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed.

IFN- γ , and IL-10 mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

IV. 考 察

강한 즉시형 과민반응이 발생될 소인을 지닌 개체를 아토피라고 부르며 아토피 피부염은 대개 아토피의 첫 증상으로 나타나는데 주로 5세 이전에 90% 정도가 발병한다고 알려져 있다^{8,9)}. 과거 발병률은 1% 정도였으나 현재 전세계적으로 10~20% 정도의 유병률¹⁰⁾을 보이고 있고 지난 30년간 발생률이 2~3배 정도 증가했다.

아토피피부염은 IgE와의 연관 유무에 따라 외인성과 내인성으로 구분할 수 있는데, 외인성이 전체 아토피피부염의 약 70~80% 정도를 차지한다. 외인성 아토피 피부염의 경우 혈중 호산구 뿐만 아니라 IgE의 증가소견이 나타나는데 이물질들의 증가는 Th type 2 cytokine과 Th2 림프구에 의해 촉진된다¹¹⁾. Th2 세포는 IL-4, 5, 9, 10, 13 등과 같은 Th type 2 cytokine을 생산하는데, 그 싸이토카인은 B 세포의 IgE생산과 호산구의 활성화, 염증반응 및 Th2 세포의 증식과 분화를 유도하고 Th1 세포의 분화를 억제한다¹²⁾. Th1 세포는 IFN- γ , IL-12와 같은 Th type 1 cytokine을 생산하며 그 싸이토카인은 Th1 세포의 분화는 유도하고 Th2 세포의 분화는 억제한다. 이 균형이 깨어지게 되면 Th1/Th2 불균형으로 인한 여러 가지 면역질환을 겪게 되며¹³⁾ 알레르기 질환은 그 균형이 Th2 쪽으로 치우친 결과로 유발된 면역질환 중의 하나이다.

Th type 2 cytokine 중 IL-4는 B세포의 증식과 IgE 생산을 자극하며 Th2 림프구의 성장 및 분화인자를 자극함으로써 IgE와 호산구 매개성 염증반응의 주된 역할을 담당한다고 할 수 있으며 IL-2는 T림프구 의존적 면역반응의 크기를 결정하고 NK 세포의 성장 및 세포용해성 기능을 증진시키고 항체생산을 위한 자극으로서 사람의 B림프구에 작용한다¹¹⁾.

Th type 1 cytokine인 IL-10은 대식세포에 의한 cytokine 즉 TNF, IL-1, chemokine, IL-12의 생성을 억제하고 T림프구 활성화에 있어 대식세포의 부수적 기능을 저해하며¹¹⁾ Th2 세포의 cytokine 생성을 저해하여 알레르기성 염증반응을 억제하는 것으로 알려져 있어 면역 조절과, 염증 반응 사이의 균형을 조절하는데 중요하다¹⁴⁾. IFN- γ 는 Th1 림프구의 분화를 촉진시키는 반면에 Th2 림프구의 증식을 억제하며 세포성 및 체액성 면역반응을 증진시키는 것으로 알려져 있다¹¹⁾.

또한 아토피피부염에서 싸이토카인과 함께 염증세포 침윤의 중요한 역할을 하는 것으로 케모카인이 있는데 이 중 MCP-4, eotaxin, RANTES 등이 아토피피부염 병변에서 흔히 증가되어 있으며 이들의 작용에 의해 호산구의 피부로의 이동이 유도되며 CCR4를 가지고 있는 Th2 세포의 피부로의 이동은 TARC에 의해 일어나게 되어 피부의 염증 반응이 발생하게 된다¹⁰⁾.

韓醫學的으로 아토피피부염은 명확히 일치된 병명은 없으나 역대분헌의 胎熱, 胎癩, 小兒濕疹, 浸淫瘡, 胎斂瘡, 奶癩, 四彎風에 해당한다고 볼 수 있다¹⁵⁻¹⁷⁾. 『六科準繩』¹⁸⁾에서는 “兒在胎中母多驚悸或因食熱毒之物”이라 하여 母體의 攝生不節制로 인해 胎熱이 생기거나 胎中受熱하여 생기고 眼閉目赤, 眼胞浮腫, 神困 등의 증상을 보인다고 하였으며 치료에 있어 母體가 辛辣한 음식이나 酒麵厚味 등을 피하고 약을 복용한 뒤 授乳를 통해 전달될 수 있도록 하였으며 차가운 약을 쓰지 않도록 하였다. 『東醫寶鑑』¹⁹⁾에서도 역시 胎熱이 원인이라고 하였고 증상으로 便秘, 面赤, 眼閉 등이 나타난다고 하였고 『壽世保元』

²⁰⁾에도 胎熱이 원인이며 面赤, 身熱, 小便不通 증상이 나타난다고 하였고 치료에 있어서는 冷藥 사용시 口吐而成大患의 우려가 있다고 하였다

加味羌活散⁶⁾은 健脾益氣 하는 人蔘, 甘草 利水滲濕의 효능이 있는 白茯苓 清熱透疹시키는 蟬蛻, 薄荷 理氣燥濕하는 枳殼, 桔梗 祛風의 효능이 있는 羌活, 前胡, 川芎, 天麻²¹⁾로 조성되어 外感症狀이 동반된 피부 질환에 이용되는 처방이다.

본 실험의 결과를 살펴보면, In vitro 실험에서 정상 생쥐의 폐세포를 분리하여 加味羌活散 추출물의 세포독성을 SRB 법⁷⁾을 약간 변형하여 측정 한 결과, 200 μ g/ml 농도에서 약간의 세포독성을 보였고, 100 μ g/ml 이하에서는 세포독성이 관찰 되지 않았다. 加味羌活散 추출물이 NC/Nga 생쥐의 면역세포의 알레르기 면역반응을 억제하는지를 알아보고자, 48시간동안 加味羌活散 추출물 100 μ g/ml과 PWM을 동시배양한 후 FACS와 real-time PCR로 분석하였다 FACS 분석결과 활성화 T세포 반응은 CD3+/CD69+와 CD4+/CD25+의 활성화세포수가 대조군에 비하여 加味羌活散 처리군이 감소를 나타내었다. 이는 加味羌活散이 면역활성 T세포의 증식 및 분화를 억제하는 것으로 나타났다. 그리고 B 세포에서 분비되어 비만세포, 호산구세포, 호중구세포 등의 표면분자인 CD23과 결합하여 히스타민이나 염증인자 등을 분비하게 하는 B220+/IgE+와 B220+/CD23+인 총세포수를 관찰한 결과에서 加味羌活散 투여군이 대조군에 비하여 현저하게 감소하여 加味羌活散이 B 세포 분화를 효과적으로 조절하는 것을 알 수 있었다. 이는 加味羌活散 추출물이 알리젠에 의한 알레르기 반응에 반드시 수반되는 B세포의 활성화, 분화, 그리고 IgE 생성을 선택적으로 억제하여 초기 알레르기 반응을 효과적으로 억제하는 것으로 생각된다 NC/Nga 아토피발진 생쥐에서 분리한 비장면역세포를 PWM으로 자극한 후 加味羌活散 추출물을 처리하여 알레르기 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 real-time PCR로 RQ값을 관찰하였다. 그 결과 비만세포, 호산구세포와 관련있는

eotaxin 2, CCR3, 그리고 TARC mRNA 유전자 발현은 加味羌活散 추출물을 처리한 군이 대조군에 비하여 현저하게 감소를 나타내었고, Th2 세포에서 분비하는 IL-4 mRNA 유전자 발현도 감소를 나타내었다. 또한 Th1에서 분비하는 IFN- γ 와 IL-10은 加味羌活散 추출물 처리군이 대조군에 비하여 2배 이상 증가를 나타내었다. 이상의 실험결과로 볼 때 加味羌活散 추출물은 면역세포의 알레르기 반응으로의 분화를 억제하고 관련 유전자 발현을 선택적으로 조절함으로써 항알레르기의 효과를 보이는 것으로 생각된다.

V. 結 論

加味羌活散이 아토피 발진 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 NC/Nga 생쥐의 비장세포를 분리하여 세포독성, B세포, T세포의 활성화 및 eotaxin 2, CCR3, TARC 등의 chemokine과 IL-4, IL-2, IL-10 등의 사이토카인 변화를 측정 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味羌活散은 활성화 T 세포 표면분자인 CD3+/CD69+와 CD4+/CD25+의 발현을 유의성 있게 억제하였다.
2. 加味羌活散은 활성화 B 세포 표면분자인 B220+/IgE+와 B220+/CD23+의 발현을 유의성 있게 억제하였다.
3. 加味羌活散은 비장세포에서 eotaxin 2, CCR3, TARC, IL-4, IL-2의 유전자 발현을 억제하였다.
4. 加味羌活散은 비장세포에서 IFN- γ 와 IL-10 mRNA의 유전자 발현을 증가시켰다.

이상의 결과로 加味羌活散의 면역조절 효과 및 항알레르기 효능이 아토피 피부염의 치료에 유효하게 활용할 수 있을 것으로 생각되며 향후 加味

羌活散 자체의 in vivo 상태에서의 약리작용에 대한 후속연구 및 처방의 구성 단위 약물들의 면역조절 및 항알러지 효과에 대한 추가적인 연구의 필요성을 제시하고 있다.

參考文獻

1. 이수중, 이준성, 이경수. 아토피성 천식 환자에서 특이적 면역요법이 말초혈액 단핵구의 IL-10과 IL-13 mRNA 발현에 미치는 영향. 소아알레르기 및 호흡기 1999; (1):41-55.
2. 김홍배, 김원일, 이승연. 升麻葛根湯의 항히스타민 효과 및 IL-4와 GM-CSF 발현에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2006; 20(2):69-83.
3. 박지수, 김윤희. 연교산이 NC/Nga 아토피 모델 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2005;20(1):55-65.
4. 유한정, 이진용, 김덕곤. 內消和中湯加味方이 아토피 피부염 환자의 혈중 Cytokine 분비에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2006;20(1):15-29.
5. 신동길, 김우연, 이진용, 김덕곤. 仙方敗毒湯이 아토피피부염환자 단핵세포의 Cytokine 분비능에 미치는 영향. 대한한방알레르기 및 면역학회 자료집. 2003;1:93-110.
6. 유준기, 전찬일. 소아집방·六科證治準繩, 서울:정담. 1993.133
7. Skehan P-Storeng R-Scudiero D-Monk A-McMahon J-Visca D-Warren JT-Kennedy S-Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. J Natl Cancer Inst 1990;82 (13):1107-1112.
8. 에카자와 셀로우. 소아 피부과학. 서울:고려의학. 2005:23-30.
9. 임정우, 문경상, 공도연, 편복양. 아토피피부염 환자의 발병과 치료에 대한 실태 조사 소아알레르기 및 호흡기 학회지. 2006;15 (1): 44-52.
10. 박용민. 아토피피부염 병태생리에 대한 최신 지견. 소아알레르기 호흡기. 2006;16 (3): 189-196.
11. 김광혁외. 세포분자 면역학. 서울: 정문각. 1998:298-330, 355.
12. Grogan JL. and Locksley RN. T helper cell differentiation. on again , off again. Current Opinion in Immunology. 2002;14 :366-372.
13. Inagaki N. and Nagai H. Drugs for the treatment of allergic diseases. Jpn J. Pharmacol. 2001;86:275-280.
14. 김정원. 알레르기 및 면역학적 관점에서의 아토피피부염. 대한피부과학회지. 2003;41(6).
15. 공남미, 지선영. 아토피피부염의 양한방적 고찰. 대한외관과학회지. 1999;12:241-253.
16. 정규만. 알레르기와 한방. 서울:제일각. 1985:101-108.
17. 차관배, 김윤식, 설인찬. 아토피피부염에 관한 문헌적 고찰. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2005;14(2):113-126.
18. 王肯堂. 六科準繩. 서울· 정보사. 1971. 2911-2913.
19. 許浚. 東醫寶鑑. 서울· 남산당. 1986:648.
20. 龔延賢. 壽世保元. 서울:속창덕서점. 1961:279.
21. 전국 한의과대학 본초학교수 공편. 본초학. 서울:영림사. 1998:142, 155, 351, 458, 460, 504.