

除濕胃苓湯加味方이 NC/Nga mice의 아토피 발진 억제에 미치는 실험적 연구

나동규·김윤희·한재경·김윤희*

Effect of Jeseupwiryongtang-Kamibang(JWRTK) on atopic dermatitis-like skin lesions induced in NC/Nga mice by mite antigen stimulation

Na Dong Kyu, Kim Yun-hee, Han Jae-kyung, Kim Yun-hee
Dept. of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

Objective We wished to examine closely effect that Kami-JeSeubUilYeongTang 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.

Result and Conclusion Kami-jeseupwiryongtang(JWRTK) 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 Jeseupwiryongtang-Kamibang(JWRTK) medicines

Th1 cell and Th2 cell observe to be shifted by secretion amount of IL-4 and IFN- γ by Jeseupwiryongtang-Kamibang(JWRTK) medicines could know that Jeseupwiryongtang-Kamibang(JWRTK) medicines can use usefully in allergy autoimmune disease.

Key words. Jeseupwiryongtang-Kamibang(JWRTK), Th1 cell and Th2 cell, IL-4 and IFN- γ , eotaxin 2, CCR3, TARC

I. 緒 論

아토피 피부염은 악화와 호전을 반복하며 소양증이 있는 습진을 주 병변으로 하는 질환으로 홍반, 삼출, 가피, 인설 등의 증상을 나타내며 환자의 대부분은 아토피 소인을 가진다. 현재까지 정확한 병인은 모르지만 면역학적 기능 이상과 함

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

게 유전적, 환경적요인, 피부장벽의 기능 이상 등이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데^{1,2)} 韓醫學的으로는 그 原因을 風熱, 血熱, 血虛, 脾胃濕熱 등으로 보고있으며 胎熱, 胎癩, 浸淫瘡, 胎斂瘡, 奶癩, 濕疹, 濕瘡, 四彎風 등의 範疇에 해당한다고 할 수 있다³⁻⁵⁾.

除濕胃苓湯은 六科證治準繩⁶⁾에 기재된 처방으로 除濕健脾, 利水하는 효능이 있어 腸胃水濕으로 인한 嘔吐, 泄瀉 질환에 다용하였으며 현재 임상에서는 瀉火行水宜, 祛濕斂瘡散 涼血清熱, 健脾化濕 의 효능이 있는 蒼朮, 木通, 梔子, 防風을 가미하여 脾虛水濕으로 미란, 삼출, 소양이 심하고 便溏 등의 증상을 동반한 아토피피부염 치료에 이용되고 있는 처방이다.

과거 아토피피부염의 발병률은 약 1% 정도였으나 최근에는 발병률이 10~15% 정도로 급격히 증가했으며⁷⁾ 국내 연구에서도 1995년부터 2000년 까지 5년간 유병률이 15.3%에서 17%로 증가하고 있는 것으로 나타났다⁸⁾. 따라서 이에 대한 다양한 연구가 필요한 실정이며 한의학계에서도 문헌고찰 및 진단, 치료 등에 대한 다양한 연구⁹⁻¹¹⁾가 이루어지고 있다. 최근에는 임상에서 다용하는 처방을 중심으로 한약이 아토피 피부염 환자의 면역 기전에 미치는 영향에 대한 연구가 활발해져서, 仙方敗毒湯¹²⁾, 加味當歸陰子¹³⁾, 連翹散¹⁴⁾ 內消和中湯加味方¹⁵⁾, 升麻葛根湯¹⁶⁾, 加味清心蓮子湯¹⁷⁾ 등의 실험적 연구가 보고되었으나 除濕胃苓湯加味方에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다. 이에 저자는 除濕胃苓湯加味方이 아토피 발진 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 in vitro에서 NC/Nga 생쥐의 비장세포를 분리하여 FACS 분석과 real-time PCR를 이용하여 세포독성, 활성 B세포, T세포 및 eotaxin 2, CCR3, TARC 등의 케모카인과 IL-4, IL-2, IL-10 등의 사이토카인 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-dimethylthiazol-2,5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfo phenyl- 2H-tetrazolium(MTS), 2,7,-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), complete adjuvent, 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 Sigma사 (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 vaccum evaporator(Büchi 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 mice (15-20g)는 Charles River Japan (Yokohama, Japan)사에서 공급받았다. 동물은 실험당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2℃, humidity 55±15%, 12시간(light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) Reagent

본 실험에 사용한 加味除濕胃苓湯의 구성은 『中醫臟腑病學』¹⁸⁾에 준하였으며, 사용한 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입, 정선하여 사용하였고, 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Jeseupwiryongtang -Kamibang(JWRTK)의 처방구성

韓藥名	生藥名	用量(g)
白茯苓	Poria	15
蒼朮	Atractylopis Radix	10
白朮	Atractylopis Macrocephalae Radix	10
厚朴	Magnoliae Radix	10
梔子	Gardeniae Fructus	10
防風	Ledeboutiellae Radix	10
豬苓	Polyporus	10
澤瀉	Alismatis Radix	10
木通	Akebiae Caulis	10
滑石	Talcum	10
陳皮	Citri Pericarpium	10
甘草	Glycyrrhizae Radix	6
Total amount		121

4) JWRTK 추출물 분리

JWRTK 242g에 각각 증류수 2,000ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치(Rotary

evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 JWRTK 추출물(23.4g)을 냉동 보관(-84℃)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 세포독성 검사

(1) Mouse Lung Fibroblast cells (mLFCs) 배양
Balb/c 생쥐의 정상 lung fibroblast 세포는 BALB/c 생쥐의 정상 폐 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube(15ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 DMEM {containing collagenase A(5mg/ml, BM, Indianapolis, IN, U.S.A.)와 DNase type I (0.15mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillinm 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 assay법¹⁹⁾을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFCs 세포는 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후 JWRTK 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 가

하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 45회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100 μ l/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker(Lab-Line, U.S.A.)에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA LEADER(molecular devices, U.S.A.)에서 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

(1) Spontaneous dermatitis in NC/Nga mice

Conventional한 상태에서 사육하고 IgE hyperproduction이 된 18주령의 NC/Nga 생쥐를 선별하여 눈에서 capillary 관을 이용하여 100 μ l의 혈액을 채혈하였다. 채혈된 혈액에서 혈장을 분리하여 IgE 함량을 측정하여 50 μ g/ml 이상되고, 피부에 발진이 나타난 NC/Nga mice를 선택하여 실험에 사용하였다.

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

① PBMC와 비장세포 분리

선별된 atopic dermatitis-like skin NC/Nga mice에서 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 회수하였다. 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 \times 10⁵ 세포/well로 분주하였다.

② FACS analysis in PBMC and splenocytes

cultured

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mice에서 분리한 PBMC와 비장세포를 24 well plate에 5 \times 10⁵ 세포/well로 분주하고 pokeweed mitogen (PWM)을 10 μ g/ml과 加味除濕胃苓湯加味 추출물(100 μ g/ml)등을 가하여 48시간 동안 동시배양 하였다. 배양 종료 후 PBMC와 비장세포를 인산완충생리식염수로 2회 수세하였고, 4 $^{\circ}$ C에서 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 유세포 형광분석기 (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

① 배양된 비장세포에서 RNA 분리

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mice에서 분리한 비장세포를 24 well plate에 2 \times 10⁶ 세포/well로 분주하고 pokeweed mitogen (PWM)을 10 μ g/ml과 除濕胃苓湯加味方 추출물(100 μ g/ml)등을 가하여 4시간 동안 동시배양 하였다. 배양 종료 후 배양상층액을 제거한 후 RNAzolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 분쇄한다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 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 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75 $^{\circ}$ C에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

⑥ 역전사-중합효소 연쇄반응

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

⑦ 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'
eotaxin2	LEFT	ctgtgaccatcccctcatct
	RIGHT	cttatggcccttcttggtga
TARC	LEFT	cccatgaagacctcacctc
	RIGHT	actctcggcctacattggtg
CCR3	LEFT	ccggaactgtgacttttgct
	RIGHT	cctctggatagcgaggactg

IL-10	LEFT	aagcagccttcgagaaaaga
	RIGHT	tgggaagtgggtgcagttat 5'
IL-4	Forward	ACAGGAGAAGGGACGCCA T 3' 5'
	Reverse	GAAGCCCTACAGACGAGC TCA 3'
interferon- γ	Forward	5'TCAAGTGGCATAGATGT GGAAGAA 3' 5'
	Reverse	TGGCTCTGCAGGATTTTC ATG 3'
IL-2	Forward	5' atgcccaacaaagcagagac 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 2min at 50 $^{\circ}$ C, 10min 94 $^{\circ}$ C, 그리고 40 cycles을 0.15min at 95 $^{\circ}$ C, 1 min at 60 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. JWRTK 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)를 측정하였다.

3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

III. 成績

1. JWRTK의 세포독성 검사

1) 세포독성

JWRTK 추출물의 세포독성을 측정한 결과, 1에서 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 거의 세포독성이 나타나지 않았지만, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 85.4 \pm 2.8로 유의성 있는 감소를 나타내었지만 ($p < 0.05$), JWRTK 추출물의 세포독성은 관찰되지 않았다 (Fig 1).

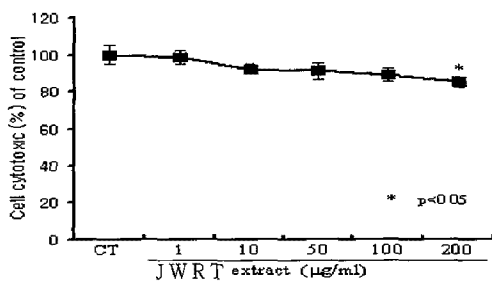


Fig. 1. Cytotoxicity effects of JWRTK extract on mouse lung fibroblast cells(mLFCs).

Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) were pretreated with various concentration JWRTK (Jeseupwiryongtang-Kamibang) extract. The results are expressed the mean \pm 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 ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

2) In vitro, PBMC and splenocytes culture of NC/Nga-mice

(1) FACS analysis in PBMC and splenocytes cultured

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

CD3e+/CD69+ 인 활성화 T세포수를 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군이 10배 이상 활성화

포가 증가를 하였고 JWRTK 추출물과 동시배양해서는 약간 감소를 나타내었고(Fig.2A) CD4+/CD25+ 인 활성화 T세포수를 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군이 현저하게 활성화 T세포가 증가 하였으며, JWRTK 추출물 동시배양 실험군에서는 PBMC에서 유의성 있는 활성화 T세포 억제를 관찰할 수 있었다 ($p < 0.001$). 그러나 비장세포에서는 차이가 없었다(Fig.2B).

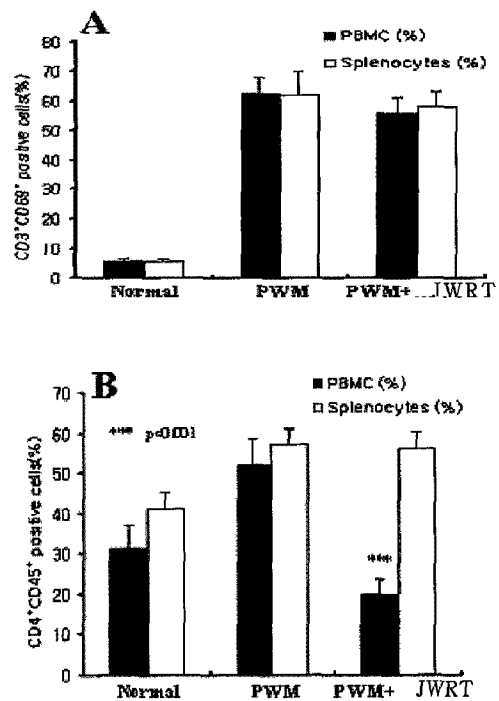


Fig. 2. Inhibitory effect of JWRTK extract on CD3+/CD69+ & CD4+/CD45+ positive cells by JWRTK extract plus PWM-stimulated murine PBMCs, and splenocytes.

Isolated PBMC, and splenocytes from NC/Nga atopic dermatitis model mice were either stimulated with PWM (10 $\mu\text{g/ml}$) or treated with JWRTK extract (100 $\mu\text{g/ml}$) plus JWRTK extract. PBMC and splenocytes were not treated (normal, only cells), co-cultured with PWM (Control), and with PWM plus JWRTK 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 B 세포수에 미치는 영향

B220+/IgE+ 인 활성 B세포수를 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군이 3배 이상 활성 B세포가 증가를 하였고 JWRTK 추출물과 동시배양 실험군에서는 PBMC와 비장세포 모두에서 유의성 있는 감소를 나타내었으며 (p<0.01)(Fig.3A), B220+/CD23+ 인 활성 B세포수를 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군이 활성 B세포가 증가를 하였고, JWRTK 추출물과 동시배양 실험군에서는 비장세포에서 유의성 있는 활성세포 억제를 관찰할 수 있었다 (p<0.01)(Fig.3B)

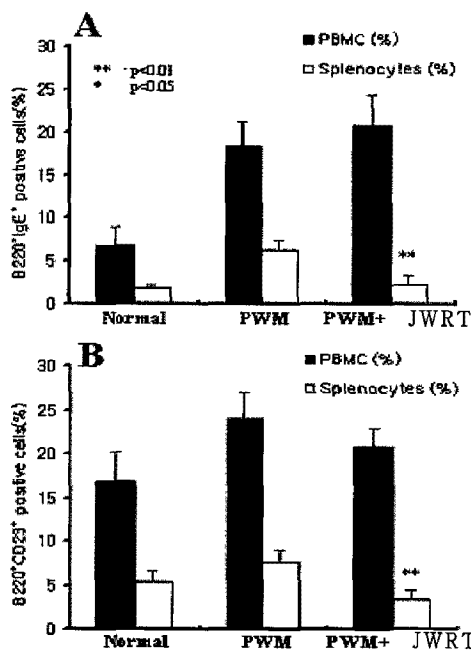


Fig. 3. Inhibitory effect of JWRTK extract on B220+/IgE+ & B220+/CD23+ positive cells by JWRTK extract plus

PWM-stimulated murine PBMCs, and splenocytes.

Isolated PBMC, and splenocytes from NC/Nga atopic dermatitis model mice were either stimulated with PWM (10µg/ml) or treated with JWRTK extract (100µg/ml) plus JWRTK extract. PBMC and splenocytes were not treated (normal, only cells), co-cultured with PWM (Control), and with PWM plus JWRTK 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).

2. Real-time-PCR analysis on NC/Nga atopic dermatitis model mice

1) NC/Nga mice의 비장세포에서 Eotaxin 2, CCR3, TARC mRNA 유전자 발현 분석

정상군의 eotaxin 2, CCR3, 그리고 TARC mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때 각각 0.581, 0.208, 0.072이었고, PWM과 JWRTK 추출물과 동시배양한 실험군은 대조군의 RQ값이 1 일때 eotaxin 2, CCR3, 그리고 TARC mRNA 유전자 발현이 0.166, 0.619, 그리고 0.203으로 eotaxin 2와 TARC 유전자 발현은 현저하게 억제되었고, CCR3 mRNA 유전자 발현은 35%이상 감소를 나타내었다(Fig.4).

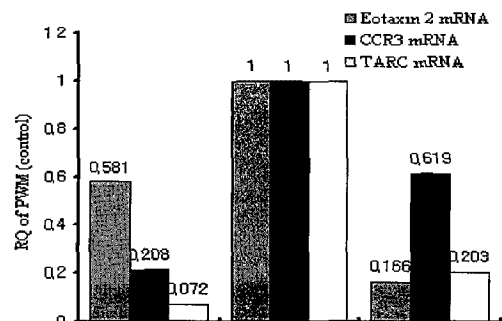


Fig. 4. Effects of JWRTK extract on eotaxin 2, CCR3 and TARC mRNA expression by JWRTK extract plus PWM-stimulated murine splenocytes.

Isolated splenocytes from NC/Nga atopic dermatitis model mice were either stimulated with PWM (10 $\mu\text{g/ml}$) or treated with JWRTK extract (100 $\mu\text{g/ml}$) plus JWRTK extract. Splenocytes were not treated (normal; only cells), co-cultured with PWM (Control), and with PWM plus JWRTK 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.

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

정상군의 IL-4,와 IL-2 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때 각각 0.01 과 0.415이 었고, PWM과 JWRTK 추출물과 동시배양한 실험군은 대조군의 RQ값이 1 일때 IL-4,와 IL-2 mRNA 유전자 발현이 0.336,와 0.46로 IL-4와 IL-2 모두 유전자 발현은 현저하게 억제되었다 (Fig.5)

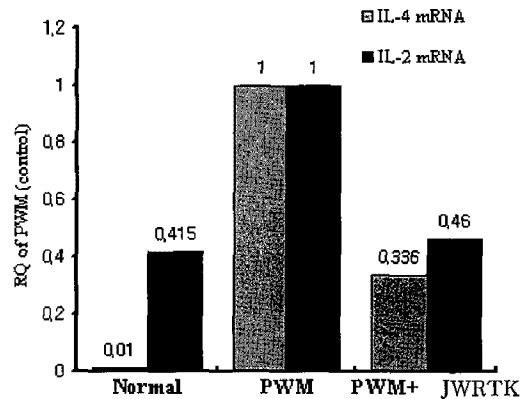


Fig. 5. Effects of JWRTK extract on IL-4, and IL-2 mRNA expression by JWRTK extract plus PWM-stimulated murine splenocytes.

Isolated splenocytes from NC/Nga atopic dermatitis model mice were either stimulated with PWM (10 $\mu\text{g/ml}$) or treated with JWRTK extract (100 $\mu\text{g/ml}$) plus JWRTK extract. Splenocytes were not treated (normal; only cells), co-cultured with PWM (Control), and with PWM plus JWRTK 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.

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

정상군의 IFN- γ 와 IL-10 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때 각각 0.01 과 0.05로 유전자가 발현이 일어나지 않고, PWM과 JWRTK 추출물과 동시배양한 실험군은 대조군

의 RQ값이 1일때 IFN- γ 와 IL-10 mRNA 유전자 발현이 2.23,와 2.097으로 IFN- γ 와 IL-10 모두 2배이상 유전자 발현이 현저하게 증가되었다(Fig.6).

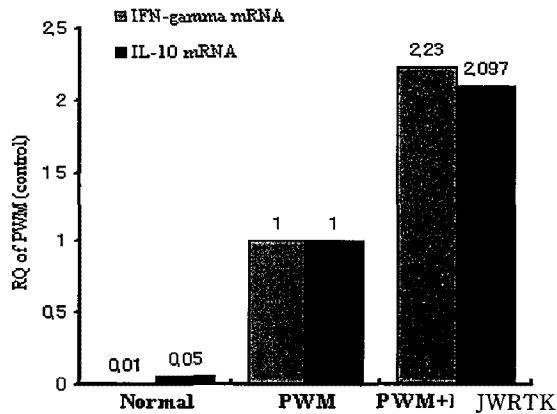


Fig. 6. Effects of JWRTK extract on IFN- γ , and IL-10 mRNA expression by JWRTK extract plus PWM-stimulated murine splenocytes.

Isolated splenocytes from NC/Nga atopic dermatitis model mice were either stimulated with PWM (10 μ g/ml) or treated with JWRTK extract (100 μ g/ml) plus JWRTK extract. Splenocytes were not treated (normal; only cells), co-cultured with PWM (Control), and with PWM plus JWRTK 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

아토피는 알레르기 반응을 일으키게 하는 면역물질을 쉽게 형성함으로써 천식, 고초열, 알레르기성 비염, 아토피피부염 등을 잘 일으키는 유전적 경향을 말한다²⁾. 아토피 피부염은 전세계적으로 10~20% 정도의 유병률을 보이고 있으며 우리나라 유병률도 1995년 15.3%에서 2000년 17%로 증가하고 있는 추세이다⁸⁾. 아토피 피부염은 대개 아토피의 첫 증상으로 나타나는데 주로 5세 이전에 90% 정도가 발병한다고 알려져 있으며 유전적, 면역학적 요인 이외에 환경적, 정신적 요인 등이 악화요인으로 작용한다고 알려져 있다^{2,20)}.

아토피피부염은 IgE 항체와 연관이 되어 있는 외인성 아토피피부염과 IgE 항원과는 무관한 내인성 아토피피부염으로 구분할 수 있는데 외인성 아토피피부염이 약 70~80%를 차지하고 있다. 외인성 아토피 피부염은 면역계 발달 과정 중 비정상적 성숙으로 인해 Th1과 Th2세포의 생체내 균형의 이상으로 발생한다²¹⁾.

Th1 세포는 IFN- γ , IL-12와 같은 Th type 1 cytokine을 생산하여 박테리아 감염과 같은 intracellular pathogen에 대항하는 면역반응에 관여하는데 이들의 과도한 발현은 자가면역질환을 초래한다. Th2 세포는 IL-4, 5, 9, 10, 13 등과 같은 Th type 2 cytokine을 생산하여 기생충과 같은 extracellular parasite의 감염에 대항하고, B 세포와 함께 체액성 면역반응에 관여하는데²²⁾, 이들의 과도한 발현은 알레르기 질환을 초래할 수 있다. 또한, 각각의 cytokine은 Th1, Th2 세포의 증식과 분화를 조절하는데 Th type 1 cytokine은 Th1 세포의 분화를 유도하고 Th2 세포의 증식과 분화는 억제하며, Th type 2 cytokine은 Th2 세포의 증식과 분화를 유도하고 Th1 세포의 분화를 억제한다. 이 균형이 깨어지게 되면 Th1/Th2 불균형으로 인한 여러 가지 면역질환을 겪게 되며²³⁾. 알레르기 질환은 그 균형이 Th2 쪽으로 치우친 결과로 유발된 면역질환 중의 하나이다. 따라서 알레르기 발생과 조절에 있어 가장 중요한 세포는 Th2 세포로, 알레르기

는 항체의 isotype을 IgM 또는 IgG에서 IgE로 바꾸어주는 Th2 세포가 활성화되면서 시작되며, Th2 세포가 생산하는 Th type 2 cytokine에 의해서 B 세포의 IgE 생산, 호산구의 활성화, 염증 반응 등이 나타나게 된다²⁴⁾. Th type 2 cytokine 중 IL-4 및 IL-13은 B세포의 동형전환을 유발하여 IgE 생산을 증가시키고 Th2 사이토카인을 감소시키며 IL-5는 호산구를 동원하고 IL-10은 Th2세포의 발달을 억제하는 INF- γ 의 생산을 억제시키게 된다. 또한 IL-10은 T세포, B세포, 대식세포에서 생성되는데 호산구의 증식과 활성화를 억제시켜 알레르기성 염증반응을 감소시키며 단핵성 신세포와 세포성 염증반응을 저해하며²⁵⁾ B세포를 자극하여 인체 구조조직합합원복합체 class II 항원 발현의 증가를 유도하기도 하고²⁶⁾ 단핵구 표면에서는 MHC class II 항원 발현을 억제하여 T세포의 활성능을 억제하며 IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8과 IL-12의 분비를 억제한다²⁷⁾. 따라서 IL-10의 생산량은 면역 조절과, 염증 반응 사이의 균형을 조절하는데 중요하다²¹⁾. 또한 아토피피부염에서 사이토카인과 함께 염증세포 침윤의 중요한 역할을 하는 것으로 케모카인이 있는데 이중 MCP-4, eotaxin, RANTES 등이 아토피피부염 병변에서 흔히 증가되어 있으며 이들은 호산구와 Th2 세포의 화학주성과 밀접한 관계가 있고 CCR4를 가지고 있는 Th2 세포의 피부로의 이동은 TARC에 의해 일어나게 되어 피부이상을 초래할 수 있다⁸⁾.

韓醫學적으로 아토피피부염은 명확히 일치된 병명은 없으나 문헌을 고찰하여 볼 때 胎熱, 胎癩, 浸淫瘡, 胎斂瘡, 奶癩, 濕疹, 濕瘡, 四彎風 등의 범주에 속한다고 볼 수 있다³⁻⁵⁾. 원인은 대개 胎熱로 보았는데 『醫學入門』²⁸⁾에는 “胎熱, 因母食熱”이라 하였으며 『六科準繩』⁶⁾에는 “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 생긴다고 파악하였고 明代의 『古今醫統秘方大全』²⁹⁾에는 태열이 誤腹溫劑 或 熱藥이라 하여宋代부터 靑代대에 이르기까지 대부분의 문헌에서 원인을 母受時氣邪毒 或 外感風濕熱, 過食迅速藥物誤腹溫劑로 보

았다⁵⁾. 治療에 있어서는 木通散⁶⁾ 清胃散³⁰⁾ 등을 사용한다고 하였으며 『醫宗金鑑』³¹⁾에서는 乾濕을 나누어 치료를 달리하였다. 현대의 치료법을 보면 『實用中醫外科學』³²⁾에서 奶癩을 嬰兒濕疹에 귀속시켰고 “先天不足 稟賦不耐 脾失健運 濕熱內生 復感風濕熱邪 蘊積肌膚而成”이라 보아, 養血, 祛風, 清火, 潛鎮하는 處方을 응용하였으며, 『中醫兒科學』³³⁾에서는 辨證을 濕熱型, 血熱型, 濕阻型, 血燥型으로 구분하여 각각 清熱利濕, 涼血清熱利濕, 健脾除濕, 養血祛風 清熱化濕하는 치료법을 이용한다고 하였다.

除濕胃苓湯加味方¹⁸⁾은 健脾益氣 하는 白朮, 甘草 利水滲濕의 효능이 있는 白茯苓, 豬苓, 澤瀉 理氣燥濕 하는 厚朴, 陳皮로 구성되어 腸胃의 水濕을 제거하는 효능이 있는 除濕胃苓湯에 瀉火行水宜, 祛濕斂瘡散 涼血清熱, 健脾化濕의 효능이 있는 蒼朮, 木通, 滑石, 防風³⁴⁾을 가미하여 氣陰이 損傷되거나 濕熱이 蘊蓄 발생하는 삼출, 미란, 소양증 등의 피부 질환에 이용되는 처방이다.

본 실험의 결과를 살펴보면, In vitro 실험에서 정상 생쥐의 폐세포를 분리하여 除濕胃苓湯加味方 추출물의 세포독성을 SRB 법¹⁹⁾을 약간 변형하여 측정된 결과, 200 μ g/ml 농도에서 약간의 세포독성을 보였고, 100 μ g/ml 이하에서는 세포독성이 관찰 되지 않았다. 除濕胃苓湯加味方 추출물이 NC/Nga 생쥐의 면역세포의 알레르기 면역반응을 억제하는지를 알아보기 위하여, 48시간동안 除濕胃苓湯加味方 추출물 100 μ g/ml과 PWM을 동시배양한 후 FACS와 real-time PCR로 분석하였다. FACS 분석결과 활성화 T 세포 반응은 CD3+/CD69+ 와 CD4+/CD25+ 의 활성화세포수가 대조군에 비하여 除濕胃苓湯加味方 처리군이 감소를 나타내었다. 이는 除濕胃苓湯加味方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 除濕胃苓湯加味方 투여군이 대

조균에 비하여 현저하게 감소하여 除濕胃筴湯加味方이 B 세포 분화를 효과적으로 조절하는 것을 알 수 있었다. 이는 除濕胃筴湯加味方 추출물이 알러젠에 의한 알레르기 반응에 반드시 수반되는 B세포의 활성화, 분화, 그리고 IgE 생성을 선택적으로 억제하여 초기 알레르기 반응을 효과적으로 억제하는 것으로 생각된다. NC/Nga 아토피 발진 생쥐에서 분리한 비장면역세포를 PWM으로 자극한 후 除濕胃筴湯加味方 추출물을 처리하여 알레르기 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 real-time PCR로 RQ값을 관찰하였다. 그 결과 비장세포, 호산구세포와 관련있는 eotaxin 2, CCR3, 그리고 TARC mRNA 유전자 발현은 除濕胃筴湯加味方 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 除濕胃筴湯加味方 추출물 처리군이 대조군에 비하여 2배 이상 증가를 나타내었다. 이상의 실험결과로 볼 때 除濕胃筴湯加味方 추출물은 면역세포의 알레르기 반응으로의 분화를 억제하고 관련 유전자 발현을 선택적으로 조절함으로써 항알레르기의 효과를 보이는 것으로 사료된다.

V. 結 論

除濕胃筴湯加味方이 아토피 발진 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 NC/Nga mice의 비장세포를 분리하여 세포독성, 활성 B세포, T세포 및 eotaxin 2, CCR3, TARC 등의 케모카인과 IL-4, IL-2, IL-10 등의 싸이토카인 변화를 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 除濕胃筴湯加味方은 활성 T 세포 표면분자인 CD3+/CD69+와 CD4+/CD25+의 발현을 유의성 있게 억제하였다.
2. 除濕胃筴湯加味方은 활성 B 세포 표면분자

인 B220+/IgE+와 B220+/CD23+의 발현을 유의성 있게 억제하였다.

3. 除濕胃筴湯加味方은 비장세포에서 eotaxin 2, CCR3, TARC, IL-4, IL-2의 유전자 발현을 억제하였다.
4. 除濕胃筴湯加味方은 비장세포에서 eotaxin 2, CCR3, TARC, IL-4, IL-2 mRNA의 유전자 발현을 억제하였다.
5. 除濕胃筴湯加味方은 비장세포에서 IFN- γ 와 IL-10 mRNA의 유전자 발현을 증가시켰다.

이상의 결과는 除濕胃筴湯加味方 자체의 in vivo 상태에서의 약리작용에 대한 후속연구 및 처방의 구성 단미약물들과 면역조절 및 항알러지 효과의 상관성에 대한 추가적인 연구의 필요성을 제시하고 있으며, 除濕胃筴湯加味方의 면역조절 및 항알레르기 효능은 아토피 피부염의 치료에 유효하게 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 최유성 외: 아토피 피부염에서 임상적 중증도에 따른 임상 및 검사실 소견에 관한 연구, 대한피부과학회지, 44(7):pp. 824~829, 2006.
2. 에카자와 센로우: 소아 피부과학, 서울, 고려의학, pp. 23~30, 2005.
3. 공남미, 지선영 : 아토피피부염의 양·한방적 고찰, 대한외관과학회지, 12:241-253, 1999.
4. 정규만 : 알레르기와 한방, 서울, 제일각, pp. 101~108, 1985.
5. 차관배, 김윤식, 설인찬 : 아토피피부염에 관한 문헌적 고찰, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 14(2):113~126, 2005.
6. 유준기, 전찬일: 소아집방·六科證治準繩,

- 서울, 정담, p. 133, 1993.
7. 양준모: 아토피 피부염의 유전체 연구, 천식 및 알레르기, 23(1):5-15, 2003.
 8. 박용민: 아토피 피부염 병태생리에 대한 최신 지견, 소아알레르기 호흡기, 16(3): 189~196, 2006.
 9. 김진일, 정규만 아토피 피부염에 관한 동서의학적 고찰, 대한한방소아과학회지 8. 75~80, 1994.
 10. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연 : 아토피 피부염의 동서의학적 문헌고찰. 대한안이비인후피부과학회지, 15(1):226~252, 2002
 11. 김미정, 이승연 : 소아아토피피부염에 대한 문헌적 고찰(최근 중의잡지를 중심으로), 대한한방소아과학회지, 14(2):169~184 2000.
 12. 신동길, 김우연. 이진용. 김덕곤 : 仙方敗毒湯이 아토피피부염환자 단핵세포의 Cytokine 분비능에 미치는 영향, 대한한방알레르기 및 면역학회 자료집, 1:93~110, 2003.
 13. 한재경, 김윤희 : 加味當歸陰子가 아토피 동물모델에 미치는 영향, 대한한방소아과학회지, 19(1):35~52, 2005
 14. 박지수, 김윤희 · 연교산이 NC/Nga 아토피 모델 생쥐의 면역반응에 미치는 영향, 동의생리병리학회지, 20(1):55~65, 2005.
 15. 유한정, 이진용, 김덕곤 : 內消和中湯加味方이 아토피 피부염 환자의 혈중 Cytokine 분비에 미치는 영향, 대한한방소아과학회지, 20(1):15~29, 2006
 16. 김홍배, 김원일, 이승연 : 升麻葛根湯의 항히스타민 효과 및 IL-4와 GM-CSF 발현에 미치는 영향, 대한한방소아과학회지, 20(2):69~83, 2006.
 17. 윤지연, 한재경, 김윤희 : 加味清心蓮子湯이 NC/Nga mice의 아토피樣 피부염에 미치는 영향, 대전대학교대학원 한의학과 소아과학 박사학위논문, 2007
 18. 김기풍, 주덕영·中醫臟腑病學, 북경, 중국 의약과학기술출판사, 193, 1999.
 19. 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, 82(13):1107~1112, 1990.
 20. 임정우, 문경상, 공도연, 편복양: 아토피 피부염 환자의 발병과 치료에 대한 실태 조사 소아알레르기 및 호흡기 학회지, 15(1):44~52, 2006.
 21. 김정원. 알레르기 및 면역학적 관점에서의 아토피피부염, 대한피부과학회지, 41(6), 2003.
 22. Grogan JL. and Locksley RN. T helper cell differentiation : on again , off again. Current Opinion in Immunology 14:366~372, 2002.
 23. Inagaki N. and Nagai H. Drugs for the treatment of allergic diseases. Jpn J. Pharmacol. 86:275~280, 2001.
 24. Kay AB. Overview of allergy and allergic disease . with a view to the future. Br. Med. Bull. 56:843~864, 2000.
 25. 이수중, 이준성, 이경수: 아토피성 천식 환자에서 특이적 면역요법이 말초혈액 단핵구의 IL-10과 IL-13 mRNA 발현에 미치는 영향, 소아알레르기 및 호흡기, 9(1):41~55, 1999.
 26. Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mossmann TR, Moore KW, Howard M. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. J Exp Med, 172 : 1625~1631, 1990.
 27. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, De Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by

- human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, 174 :1209~1220, 1991.
28. 李挺: 醫學入門, 서울, 翰成社, PP. 699~721, 1984.
 29. 서춘보: 古今醫統秘方大全, 서울, 금강출판사, 1982.
 30. 薛鑑: 保嬰全書, 영북, 신문풍출판공사, pp. 5697~5670, 1978.
 31. 誤廉의: 醫宗金鑑, 북경, 인민위생출판사, pp. 443~444, 1982.
 32. 고백화 : 실용중의외과학, 상해, 상해과학기술출판사, pp. 461~464, 1985.
 33. 王伯岳, 江育仁 : 中醫兒科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp. 203~204, 1984.
 34. 전국 한의과대학 본초학교수 공편: 본초학, 서울, 영림사, pp. 167, 289, 291, 302, 304, 315, 347, 536, 540, 1998.