

## Balb/c 마우스에서 Ovalbumin 면역반응에 대한 加減拱辰丹 추출물의 억제효과

김홍준<sup>1</sup>, 황성연<sup>1,5</sup>, 목지예<sup>2</sup>, 황병순<sup>3</sup>, 정승일<sup>3</sup>, 장선일<sup>2,4\*</sup>

1: 우석대학교 한의과대학 본초방제학교실 2: 전주대학교 아토피·건강전문연구소 3: 전주생물소재연구소  
4: 전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부 5: 한국전통의학연구소

### *Gagam-Gongjin-dan* Extract Attenuates Immune Responses to Ovalbumin in Balb/c Mice

Hong-Jun Kim<sup>1</sup>, Sung-yeoun Hwang<sup>1,5</sup>, Ji Ye Mok<sup>2</sup>, Byung-Soon Hwang<sup>3</sup>,  
Seung-Il Jeong<sup>3</sup>, Seon-Il Jang<sup>2,4\*</sup>

1: Department of Oriental Medical Prescription, College of Oriental Medicine, Woosuk University 2: Atopy & Health Research Institute, Jeonju University 3: Jeonju Biomaterials Institute 4: School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeonju University 5: Korea Bio Medical Science Institute

#### ABSTRACT

**Objectives** : *Gagam-Gongjin-dan* (GGD) composited with *Cervi parvum Cornu*, *Corni Fructus*, *Angelica gigantis Radix*, *Lycii Fructus*, *Dioscoreae Rhizoma*, *Citri Pericarpium*, *Gastrodiae Rhizoma*, *Agastachis Herba*, *Cassiae cortex*, *Scutellariae Radix*, *Schisandrae Fructus* has been traditionally used for chronic diseases or weakness after illness in oriental countries. However, little is known about the effects of methanol extract of GGD on immune responses to ovalbumin (OVA) plus alum. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effects of GGD on immune responses to ovalbumin plus alum in Balb/c mice.

**Methods** : In this study, the extract of GGD was prepared by extracting with methanol for 7 days. The extract was freeze-dried following filtration through vacuum distillation system. Mice were orally administrated with or without GGD extract of different doses (50–200 mg/kg/day) for 30 days. We examined the effects of GGD extract on the serum levels of total IgE, OVA-specific IgE, IgG1, IgG2a, and CTACK/CCL27 production and CCR10 expression in lymph node cells and body weight change and foot pad swelling responses in ovalbumin treated Balb/c.

**Results** : The oral administration of GGD dose-dependently reduced the serum levels of total IgE, OVA-specific immunoglobulin (IgE, IgG1 and IgG2b) and CTACK/CCL27 production in ovalbumin treated BALB/c mice. The levels of CCR10 expression from lymph node cells of OVA treated mice were markedly suppressed by treatment with GGD in a concentration dependent manner. Furthermore, foot pad swelling responses were also markedly suppressed by GGD. However, body weight were significantly increased dose dependently by GGD treatment.

**Conclusions** : These results suggest that GGD treatment suppresses immune responses to ovalbumin, and these properties may contribute to allergic disease care.

**Key words** : Ovalbumin, *Gagam-Gongjin-dan*, OVA-specific immunoglobulin, CTACK/CCL27, CCR10

\* 교신저자 : 장선일, 전북 전주시 완산구 효자동3가 1200번지 전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부  
· Tel : 063-220-3124 · E-mail : sonjjang@jj.ac.kr  
· 접수 : 2009년 11월 22일 · 수정 : 2009년 12월 14일 · 채택 : 2009년 12월 21일

## 서론

拱辰丹은 元末 危亦林的 《世醫得效方·虛損篇》<sup>1)</sup>에 최초로 수록된 처방으로 《東醫寶鑑》<sup>2)</sup>에는 肝虛藥이라 하여 助陽補精하는 鹿茸, 養血潤燥하는 當歸, 固精強陰·助陽收澁하는 山茱萸, 開竅하는 麝香의 4가지 약물로 구성하여 先天의 氣를 補하고 水升火降을 순조롭게 하여 心身を 補益함으로써 장부의 虛損에 대한 예방 및 치료를 하는 방제로 볼 수 있다.

拱辰丹에 대한 실험적 연구로는 張<sup>3)</sup>은 혈청 thyroxine, cortisol, testosterone 및 혈중 hemoglobin의 함량 변화를 통하여 공진단의 強精補氣하는 효능이 우수하다고 보고하였고 김<sup>4)</sup>은 Rosette 형성세포수, 적혈구응집소, 적혈구용혈소가, 혈청 중 testosterone 농도변화 등을 통하여 공진단이 면역반응, 항피로 및 내분비 기능에 효과가 있다고 보고하였다. 그리고 정<sup>5)</sup>과 황<sup>6)</sup>은 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 실험모델과 A $\beta$ 로 유도된 Alzheimer's disease 생체 실험모델에서 拱辰丹이 효과가 있다고 보고하였다. 또 최<sup>7)</sup>는 공진단의 성분분석 및 항산화작용을 분석하여 공진단의 성분이 항산화 및 항노화작용이 있는 아미노산과 무기질 성분이 많이 있음을 밝혀내었다.

최근에 사향의 진위에 대한 논란으로 대체품이나 다른 처방에 대한 개발의 필요성이 제기되고 있다. 이에 《동의보감》을 보면 공진단과 같은 조문에 黑元이라는 처방이 당귀와 녹용만으로 사향을 사용하지 않더라도 공진단과 같은 의미의 약효를 낼 수 있다는 데 착안하여 기존의 공진단에 약물을 가감하여 새로운 처방의 조합을 만들었다. 약물은 한약재 중 면역기능향상에 우수하거나 항산화효과 등이 우수한 약물로 선정하였다.

알레르기성 과민 반응은 체내에 이물질이 침입했을 때, 즉 병원균, 기생충, 바이러스 등의 이종단백질 항원이 체내에서 면역세포와 과민하게 반응하는 면역학적 현상을 말하는데, 주로 혈청 내 IgE항체의 증가와 함께 일련의 Th2 세포의 편향을 유도하여 Th2 사이토카인(IL-4, IL-5, IL13)의 유도와 케모카인(TARC/CCL17, MDC/CCL22, CTACK/CCL27)의 생산이 증가된다<sup>13-20</sup>. 특히 Th2 케모카인은 말초혈액 또는 림프질의 면역세포에 작용하여 염증 부위로 침윤을 야기하는 화학주성(chemotaxis)을 촉진하는데, CTACK/CCL27는 CCR10에 특이하게 결합하여 화학주성을 일으킨다고 최근에 보고되었다<sup>13-20</sup>.

면역반응에 있어, 식품의 부작용은 특정 음식물이나 첨가물에 의해 알레르기 반응으로 나타나는데, 특정 물질에 대한 항체를 생산함으로써 과민반응을 더욱 향상시킨다. 특히 ovalbumin (OVA)은 마우스와 랫트에 감작(sensitization)하면, 혈청 내 IgE와 Th2 사이토카인이 매우 높게 증가되는데, 천식과 아토피 피부염과 유사한 알레르기성 질환을 유발 한다<sup>21-24</sup>. OVA에 감작되면, 혈청 내 항체뿐만 아니라 호산구(eosinophils)의 침윤이 높게 일어나고<sup>21</sup>, 비만세포(mast cell)와 호염구에서 Fc $\epsilon$ R1와 매우 강력한 결합에 의하여 알레르기성 질환을 유발하는

것으로 알려졌다. 이와 같이 OVA 항원에 의해 증가된 IgE와 Th2 사이토카인은 기관지 천식, 알레르기성 고초열과 아토피 피부염 등 환경성 질환의 핵심 지표로 알려져 있다<sup>21-24</sup>. 따라서 OVA 유도 알레르기 마우스 모델에서 약물을 평가하는 것이 매우 중요하다 할 수 있다.

따라서 본 연구는 BALB/c계 마우스를 대상으로 OVA에 의해 유도된 혈청 내 항체와 CTACK/CCL27의 생산, 발 부종반응(footpad swelling response) 및 림프절 세포의 CCR10의 발현에 미치는 加減拱辰丹의 효과를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

Chicken egg albumin (ovalbumin), aluminium hydroxide, NH4Cl는 Sigma-Ardrich사(St Louis, MO)로부터 구입하였다. Total IgE, OVA-specific IgE, IgG1, IgG2a 등 ELISA kits는 Shibayagi사(Japan)로부터 구입하였고, CTACK/CCL27 ELISA kit와 Anti mouse CCR10-PE conjugated antibody는 R&D사(Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다.

#### 2) 약물의 추출

가감공진단 약물의 선정은 공진단 기본처방에 사향을 빼고 면역활성이 우수한 약물을 중심으로 선정하였다. 실험에 사용한 녹용·산수유·당귀·구기자·산약·진피·천마·배초향·계피·홍삼·오미자·황금은 울산시 소재 약제상(광명당)에서 구입하여 우석대학교 한의과대학 본 초방제학교실에서 동정하였다. 약물의 구성은 Table 1과 같으며, 구성 약물 1,000 g를 분말로 제조하여 증류수(4L)로 3시간 동안 추출기로 열수 추출하였다. 추출물은 0.45  $\mu$ m 필터를 사용하여 여과한 후 동결건조기(Model, EYELA FDU-2100, Japan)에서 건조하여 227 g을 회수한 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

Table 1. Oriental Herbal Medicine Composition of *Gagam-Gongjin-dan* (GGD)

Drug name	Crude drug name	Scientific name	%
鹿茸	Cervi parvum Cornu	<i>Cervus nippon</i>	20
山茱萸	Corni Fructus	<i>Cornus officinalis</i>	20
當歸	Angelica gigantis Radix	<i>Angelica gigas</i>	20
枸杞子	Lycii Fructus	<i>Lycium chinense</i>	10
山藥	Dioscoreae Rhizoma	<i>Dioscorea japonica</i>	10
陳皮	Citri Pericarpium	<i>Citrus unshiu</i>	10
天麻	Gastrodiae Rhizoma	<i>Gastrodia elata</i>	2
藿香	Agastachis Herba	<i>Agastache rugosa</i>	2
桂皮	Cassiae cortex	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	2
黃芩	Scutellariae Radix	<i>Scutellaria baicalensis</i>	2
五味子	Schisandrae Fructus	<i>Schisandra chinensis</i>	2

### 3) 실험동물

무균환경에서 사육된 7주령의 암컷 BALB/c계 마우스는 중앙동물실험실(서울)사로부터 구입하였다. 마우스는 1주일간 스트레스를 해소하기 위해 1주일간 낮과 밤의 주기를 12시간씩 고정하여 사료(중앙동물실험실)와 멸균 물을 공급하면서 사육한 후 실험동물위원회의 실험 규정에 준하여 실험에 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) OVA 감작

마우스 등쪽 털을 안가용 가위로 주의 깊게 자르고 제모크림을 바르고 25℃ 물을 이용하여 털을 제거한 후 400 mg/mL OVA를 용액을 제조하고 감작일에 Spergel 등<sup>25)</sup>의 방법을 변형하여 Fig. 1과 같은 프로그램에 의하여 100 µL OVA를 복강에 주사하였고 2주 후에 같은 방법으로 복강에 주사하여 1주일간 방치 후 20 µL OVA (500 µg/mL)을 왼쪽 발에 주사하여 공격한 후 발두께, 혈청 내 항체, 림프절, 세포독성 등을 검사하였다.

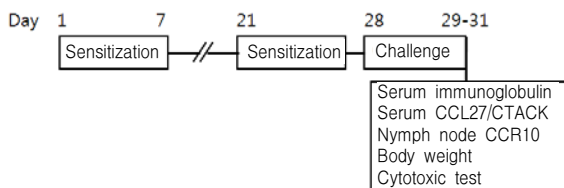


Fig. 1. Schematic diagram of sensitization protocol

Mice were sensitized on abdominal cavity with 100 µl of 400 µg OVA or saline on day 0. Two week later, 100 µl of 400 µg OVA or saline was reapplied to the same site. On day 28, left foot were challenged with 20 µl of 500 µg/mL OVA and right ears were applied with 20 µl of saline. Control group received only filtered water for 29 or 31 days and experimental groups received the different dose of GGD (50~200 mg/kg body weight).

### 2) 약물의 처리와 체중의 측정

스트레스가 해소된 8주령의 BALB/c계 마우스를 5마리씩 분주하여 OVA로 감작하기 1시간 전부터 실험 종료 시까지 대조군과 실험군은 각각 생리식염수와 약물(50~400 mg/kg 체중)을 하루에 1회씩 경구투여 하였다. 약물이 투여되는 기간 동안 체중의 변화를 보기 위해서 실험 시작일로부터 종료까지 약물 투여 전에 개체하였다.

### 3) 발 부종의 측정

마우스 발 부종의 측정은 OVA로 2회 감작된 마우스를 대상으로 28일에 OVA를 왼쪽 발에 공격한 다음 8시간 후에 디지털 두께 측정기(Model 7326, Japan)로 측정하였다. 발의 부종(footpad swelling response, FRS)은 다음과 같이 계산한 후 %로 표현하였다.

$$\text{FRS (\%)} = \frac{(\text{공격 8시간 후 발의 두께} - \text{공격 전 발의 두께}) \times 100}{\text{공격 전 발의 두께}}$$

### 4) 혈청의 OVA 특이 IgE, IgG1, IgG2a 및 CTACK/CCL27 측정

혈청 내 IgE와 OVA 특이 IgE의 정량은 ELISA법으로 측정하였다. 요약하면 anti-mouse IgE, anti-IgG1과 anti-IgG2a는 코팅완충액(0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.2)을 이용하여 high binding immunoplate에 well 당 100 µl을 주입하고 4℃에서 24시간 방치한 다음 0.1% Tween 20이 포함되어 있는 PBS로 3회 세척하고 3% (wt/vol) BSA-PBS를 주입하고 2시간 동안 블로킹하였다. 혈청은 1:10으로 희석하여 주입한 후 4℃ 상태에서 12시간 이상 방치한 후 0.05% gelatin 용액에 biotin-conjugated monoclonal rat anti-mouse IgE 또는 OVA specific rat anti-mouse IgE mAb을 주입하고 실온에서 1시간 동안 방치했다. 발색은 avidin-alkaline phosphatase (1:1,000)를 주입하고 실온에서 1시간동안 반응시킨 다음 6회 세척하여 phosphatase 기질인 p-nitrophenylphosphate, disodium을 첨가하고 발색시켜 405 nm에서 microplate reader (Molecular Devices)로 흡광도를 측정하였다. 혈청 내CTACK/CCL27의 측정은 R&D사가 제시하는 방법에 준하였다.

### 5) 복강 대식세포의 세포독성 평가

OVA로 감작과 공격된 마우스에 Brewer's thioglycollate broth를 마리당 2 ml씩 복강 내로 주사기를 이용하여 주입하고 3일 후 생쥐를 후경골탈출법으로 죽사시킨 다음 heparin (5 U/ml)이 첨가된 HBSS 10 ml를 복강에 주입하고 복강을 잘 마사지 하였다. 마사지 후 26케이지 10 ml용 주사기를 이용하여 복강으로 유입된 세포를 얻은 후 2회 원심 세척하였다. 분리된 세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유시켜 배양접시에 접종한 후 37℃와 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기에서 2시간 동안 방치하였다. 그 후 대식세포의 다른 세포를 제거하기 위해 냉각 HBSS를 이용하여 3회 반복 세척하였다. 부착된 생쥐 복강 대식세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에 접종한 후 약물(50~400mg/ml)을 처리하고 24시간 동안 배양한 다음 MTT방법으로 세포생존율을 평가하였다. 요약하면 1 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT 용액을 첨가하고 다시 4시간 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해 완충액(50% n,n-dimethylformamide)을 포함하는 20% SDS 용액, pH 4.7)을 첨가함으로써 용해했다. Formazan의 양은 570 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다.

### 6) Flow cytometry에 의한 CCR10의 발현

OVA 공격 후 48시간에 각 대조군과 실험군의 마우스를 경추탈출법에 의해 죽사시킨 후 목, 사지 및 장내 림

프절을 적출한 후 슬라이드 글래스를 이용하여 단일세포 부유액을 제조한 후 세포부유액을 40 μm의 나일론 매쉬에 통과 시킨 후 Ficoll-hypaque을 활용하여 밀도구배법으로 림프구를 분리하였다. 분리된 림프구는 HBSS용액으로 3회 원심세척한 후 PE가 부착된 anti-mouse CCR10 항체를 주입하고 1시간 동안 방치 후 2% paraformaldehyde 용액을 주입하여 고정한 후 Flow cytometry (FACS, BD)를 활용하여 형광강도를 측정하여 CCR10의 발현을 측정하였다.

7) 통계처리

모든 실험값은 평균±표준오차로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's *t*-test로 처리했으며, 유의성 한계는  $p < 0.05$ 로 정하였다.

결 과

1. OVA 감작된 마우스에서 加減拱辰丹의 효과

OVA로 감작되고 加減拱辰丹이 투여된 마우스의 체중의 변화를 알아보기 위하여 스트레스가 해소된 8주령의 BALB/c계 마우스를 대상으로 실험시작일로부터 종료일까지 3일 간격으로 약물을 투여하기 전에 체중을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 아무런 약물과 OVA로 감작되지 않은 음성대조군은 정상적인 성장을 보인 반면, OVA로 감작된 양성대조군의 경우 21일까지는 음성대조군에 비해 체중의 증가량은 감소되었으나 두 번째 감작한 21일 이후에는 체중의 감량이 현저했다. 그러나 加減拱辰丹이 투여된 실험군의 경우 50 mg/kg 투여군을 제외하고 100 mg/kg 투여군과 200 mg/kg 투여군에서는 21일 감작 후 체중의 증가가 음성대조군과 비슷하게 증가했다( $p < 0.05$ 와  $p < 0.01$ ). 이러한 결과는 加減拱辰丹의 투여

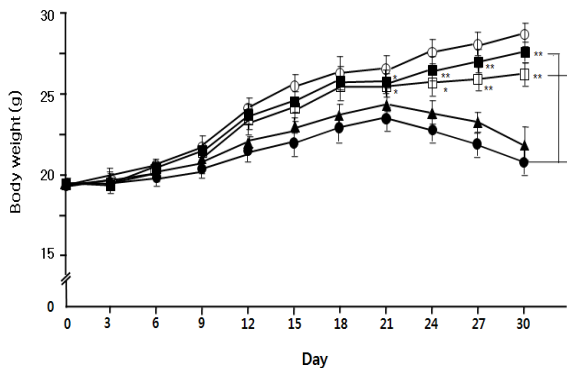


Fig. 2. Effects of *Gagam-Gongjin-dan* (GGD) on body weight change in OVA-sensitized mice

Mice were sensitized as described in Fig. 1 and kept in pathogen-free environment. Body weight was measured 0 day and every 3 days for 30 days. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus control group treated with OVA alone.

가 OVA 감작에 따른 체중의 감소를 회복시키는 효과가 있다는 것을 제시해주었다.

2. 加減拱辰丹의 세포독성 효과

加減拱辰丹 투여가 세포독성에 미치는 효과를 알아보기 위해서 OVA로 감작과 공격된 마우스에 Brewer's thioglycollate broth를 마리당 2 mL씩 복강 내로 주사기를 이용하여 주입하고 3일 후 마우스를 경추탈골법으로 죽사시킨 다음 heparin이 첨가된 HBSS 10 mL를 복강에 주입하고 복강을 잘 마사지하여 탐식세포를 페트리접시 부착방식에 의하여 분리한 후 加減拱辰丹을 24시간 처리한 다음 MTT assay 방법으로 세포 독성을 평가하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 加減拱辰丹(50~200 μg/mL)을 처리한 결과 세포의 생존율에 아무런 영향을 주지 않았다. 따라서 본 실험에서 사용된 加減拱辰丹의 약물 농도에서는 세포에 독성은 없는 것으로 평가되었다.

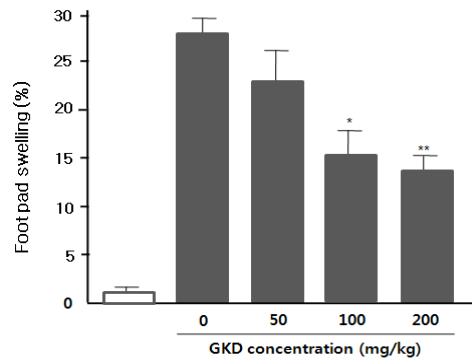


Fig. 3. Effects of *Gagam-Gongjin-dan* (GGD) on cytotoxicity of peritoneal macrophages

Peritoneal macrophages were isolated as described in materials and methods. Cells ( $5 \times 10^5$ /well plate) were treated with or without each extract at indicated concentrations for 24 h, and then incubated for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice.

3. OVA 감작된 마우스에서 加減拱辰丹의 발 부종 억제 효과

加減拱辰丹 투여가 발 부종에 미치는 효과를 알아보기 위해서 OVA로 감작된 28일째 각 실험군의 마우스 왼쪽 발의 두께를 측정된 후에 20 μL OVA (500 μg/mL)을 마우스 왼쪽 발에 주사하고 8시간 후에 두께를 측정하여 발 부종률을 계산하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 음성대조군의 경우 부종에 효과가 없었지만, OVA로 감작되고 공격된 양성대조군에서는 발 부종이 현저히 증가한 반면, 加減拱辰丹의 투여군은 농도에 의존적으로 부종이 감소되었다. 특히 100 mg/kg 투여군( $p < 0.05$ )과 200 mg/kg 투여군 ( $p < 0.01$ )에서는 그 효과가 유의하였다.

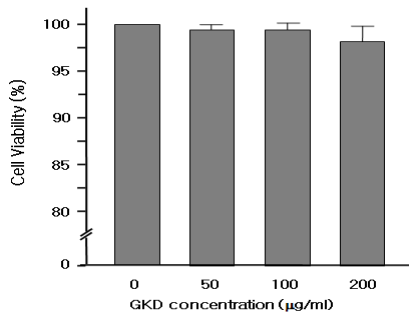


Fig. 4. Effects of *Gagam-Gongjin-dan* (GGD) on OVA specific footpad swelling responses (FRS) following OVA challenge in the footpad of BALB/c mice

Mice were orally administrated with or without GGD of different doses (50~200 mg/kg) for 28 days. FRS were analyzed as described in materials and methods. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. from 5 mice. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 versus control group treated with OVA alone.

#### 4. OVA 감작된 마우스에서 加減拱辰丹이 OVA 특이항체 생산에 미치는 영향

加減拱辰丹 투여가 혈청 내 항체 생산에 미치는 효과를 알아보기 위해서 OVA로 감작된 30일째 각 실험군의 마우스를 대상으로 혈청을 분리한 다음 총 IgE와 OVA 특이 IgE, IgG1 및 IgG2a의 항체를 ELISA법으로 측정하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 IgE의 총량은 음성대조군에 비해서 양성대조군에서 현저히 증가되었지만, 加減拱辰丹을 투여한 실험군에서는 농도에 의존적으로 감소하였다.

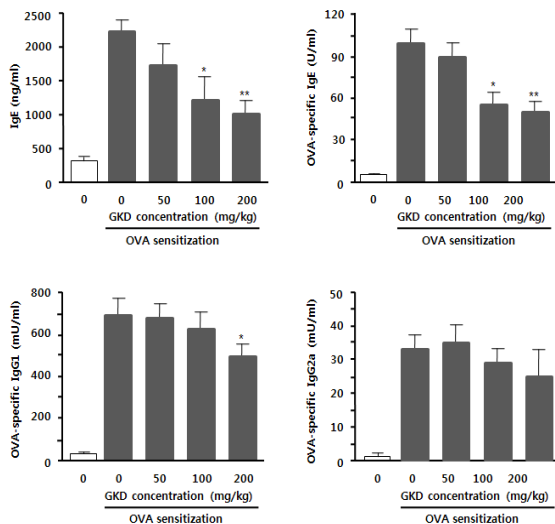


Fig. 5. Effects of *Gagam-Gongjin-dan* (GGD) on total IgE, OVA-specific IgE, IgG1 and IgG2a production following OVA challenge

Mice were orally administrated with or without GGD of different doses (50~200 mg/kg) for 30 days. Serum was collected at 2 days after OVA challenge. Total IgE, OVA-specific IgE, IgG1 and IgG2a production was analysed using an ELISA assay. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. from 5 mice. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 versus control group challenged with OVA alone.

특히 100 mg/kg 투여군( $p$ <0.05)과 200 mg/kg 투여군( $p$ <0.01)은 그 감소효과가 유의하였다. OVA 특이 IgE의 경우도 총 IgE의 결과와 매우 비슷하게 그 양이 현저히 감소하였고, OVA 특이 IgG1은 200 mg/kg 투여군에서만 감소하였다( $p$ <0.05). 그러나 IgG2a는 加減拱辰丹 투여군 모두에서 큰 영향을 미치지 못하였다. 이러한 결과는 加減拱辰丹 투여가 과민반응 유도지표로 알려진 IgE의 생산량을 감소시키는데 효과가 있다는 것을 나타내 주었다.

#### 5. OVA 감작된 마우스에서 加減拱辰丹이 CTACK/CCL27 케모카인 생산에 미치는 영향

加減拱辰丹 투여가 혈청 내 CTACK/CCL27 케모카인 생산에 미치는 효과를 알아보기 위해서 OVA로 감작된 29일째 각 실험군의 마우스를 대상으로 혈청을 분리한 다음 CTACK/CCL27 케모카인을 ELISA법으로 측정하였다. 그 결과 Fig. 6과 같이 음성대조군에 비해서 양성대조군에서 현저히 증가되었지만, 加減拱辰丹을 투여한 실험군에서는 농도에 의존적으로 감소하였다. 특히 100 mg/kg 투여군( $p$ <0.05)과 200 mg/kg 투여군( $p$ <0.01)은 그 감소효과가 유의하였다. 이러한 결과는 염증반응에 관여하는 면역세포의 화학주성을 약화시키는데 加減拱辰丹의 효과가 있다는 것을 나타내 주었다.

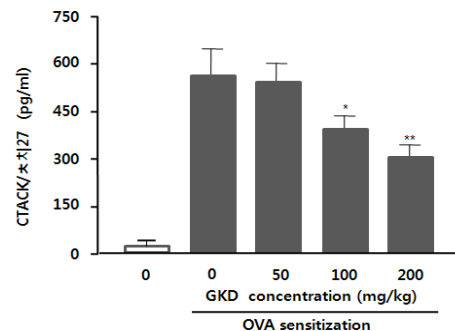


Fig. 6. Effects of *Gagam-Gongjin-dan* (GGD) on CTACK/CCL27 production following OVA challenge

Mice were orally administrated with or without GGD of different doses (50~200 mg/kg) for 29 days. Serum was collected at 1 day after OVA challenge. CTACK/CCL27 production was analysed using an ELISA assay. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. from 5 mice. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 versus control group challenged with OVA alone.

#### 6. OVA 감작된 마우스에서 加減拱辰丹이 CCR10 발현에 미치는 영향

마지막으로 우리는 加減拱辰丹 투여가 림프질의 면역 세포에서 발현되는 CTACK/CCL27 케모카인 특이 수용체인 CCR10의 발현을 flow cytometry법으로 측정하였다. 그 결과 Fig. 7과 같이 OVA 단독 감작군인 양성대조군에서 CCR10의 발현이 현저히 증가되었지만, 加減拱辰丹

을 투여한 실험군에서는 농도에 의존적으로 감소하였다. 특히 100 mg/kg 투여군( $p < 0.05$ )과 200 mg/kg 투여군( $p < 0.01$ )은 그 감소효과가 유의하였다. 이러한 CCR10 발현 억제 결과는 Fig. 6에서 보여준 CTACK/CCL27 케모카인 생산량의 감소와 밀접한 관계가 있는 것을 나타내 주며, 加減拱辰丹이 OVA 감작에 따른 염증반응을 효과적으로 억제시킨다는 것을 제시해 주었다.

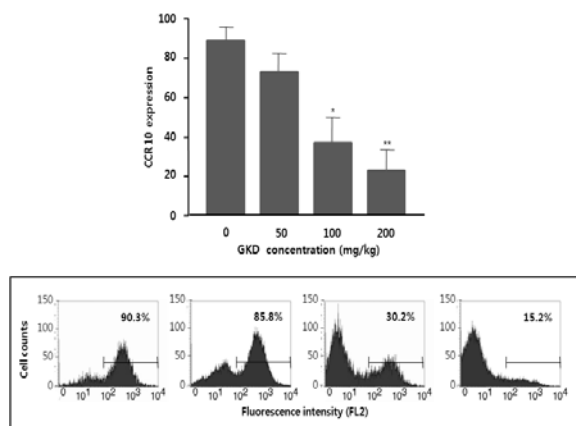


Fig. 7. Effects of *Gagam-Gongjin-dan* (GGD) on CCR10 expression following OVA challenge

Mice were orally administrated with or without GGD of different doses (50–200 mg/kg) for 29 days. Lymphatic cells was isolated at 1 day after OVA challenge. CCR10 expression was analysed using flow cytometry as described in materials and methods. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. from 5 mice. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus control group challenged with OVA alone.

## 고찰

危亦林的《世醫得效方·虛損편》<sup>1)</sup>에 최초로 수록된 拱辰丹은 先天의 氣를 補하고 水升火降을 순조롭게 하여 心身을 補益함으로써 장부의 虛損에 대한 예방 및 치료를 하는 방제이다. 《동의보감》<sup>2)</sup>에는 肝虛藥으로 되어 있으며 “拱辰丹 凡男子方當壯年而眞氣猶怯此乃稟賦素弱非虛而然借燥之藥尤宜速戒滋益之方羣品稍衆藥力細微難見功效但固天元一氣使水升火降則五藏自和百病不生此方主之 鹿茸酥炙當歸山茱萸各四兩麝香五錢另研右爲末酒麪糊和丸 梧子大溫酒或鹽湯下七十丸至百丸”이라 하여 그 효능과 조제방법을 《세의득효방》을 인용하여 기록하고 있다.

공진단에 대한 실험적 연구로 張<sup>3)</sup>은 혈청 Thyroxine, cortisol, testosterone 및 혈중 hemoglobin의 함량 변화를 통하여 공진단의 強精補氣하는 효능이 우수하다고 보고하였고 김<sup>4)</sup>은 Rosette 형성세포수, 적혈수용집소가, 적혈구용혈소가, 혈청 중 testosterone 농도변화 등을 통하여 공진단이 면역반응, 항피로 및 내분비 기능에 효과가 있다고 보고하였다. 그리고 정<sup>5)</sup>과 황<sup>6)</sup>은 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 실험모델과 A $\beta$ 로 유도된 Alzheimer's disease 생체 실험모델에서 공진단이 효과가 있다고 보고하였다. 또 최<sup>7)</sup>는 공진단의 성분분석 및 항산화작용을 분석하여 공

진단의 성분이 항산화 및 항노화작용이 있는 아미노산과 무기질 성분이 많이 있음을 밝혀내었다.

면역이란 생체가 자기와 비자기를 식별하여 외부로부터 침입하는 각종 미생물, 동종의 조직, 체내에 생긴 불필요한 산물들과 특이하게 반응하여 항체를 만들고 이것을 배제하여 개체의 정상상태와 항상성을 유지하는 현상이다. 이는 한의학에서 질병의 발생 및 전변과정을 正氣와 外邪 및 七情, 飲食, 痰飲, 瘀血등의 발병인자 간에 소장진퇴의 과정으로 설명하고 있는 것과 연관지어 생각할 수 있다. 즉 면역을 病邪로부터인체를 보호하는 正氣와 밀접한 상관성을 두고, 正氣不足은 곧 면역기능저하와 관련지어 설명할 수 있다. 또한 《黃帝內經·靈樞·營衛生成編》<sup>27)</sup>에서 “衛出於下焦”라 하였으니 衛氣의 근본이 되는 下焦 즉 肝腎을 보하는 것이 면역능력을 강하게 하는 것임을 유추할 수 있다. 즉 腎陽을 強壯케 하고 精血을 補益하며 筋骨을 強하게 하는 약물을 투여함으로써 면역기능의 증강을 유추해볼 수 있다.

최근에 사향의 진위에 대한 논란으로 대체품이나 다른 처방에 대한 개발의 필요성이 제기되고 있다. 이에 《동의보감》을 보면 공진단과 같은 조문에 黑元이라는 처방이 당귀와 녹용만으로 사향을 사용하지 않더라도 공진단과 같은 의미의 약효를 낼 수 있다는데 착안하여 肝腎을 補하는 기존의 공진단에 약물을 가감하여 12개의 약물로 구성된 새로운 처방의 조합을 만들고 이를 이용하여 면역력의 저하로 인한 과민반응에 대한 효과를 살펴보았다.

처방의 구성은 鹿茸·山茱萸·當歸·枸杞子·山藥·陳皮·天麻·藿香·桂皮·黃芩·五味子 등 11가지 약제로 그 주요 약제의 구성성분을 살펴보면 녹용은 16 종류의 아미노산이 함유되어 있는데, 그 중에서 proline, lysine, serine의 함량이 가장 높은 것으로 알려져 있다. 녹용의 상대에는 amine류가 다량 함유되어 있는데 그 중에서 spermine, spermidine, putrescine이 풍부하다. 녹용의 중대와 하대는 골화가 많이 진행된 상태이며 spermidine의 함량이 감소되어 있다. 이 외에도 collagen, estrone, proteolipid 등이 함유되어 있다. 산수유는 cornin, 즉 verbenalin, saponin, tannin, ursolic acid, tartaric acid, malic acid 및 vitamin A가 함유되어 있고, 종자의 지방유에는 palmitin acid, olein acid, linol acid 등이 함유되어 있다. 성분 중 코르닌은 신진대사에 활력을 향상 시켜 주며, 항당뇨효과가 추정되는 물질도 포함하고 있다. 당귀의 성분으로는 coumarine계 물질인 decursin, decursinol, nodakenetin, umbelliferon, nodakenin,  $\beta$ -sitosterol 등이며, 구기자에 함유된 성분은 carotenoid, cholin, meliscic acid, zeaxanthin, physalien (dipalmityl zeaxanthin), betaine,  $\beta$ -sitosterol, vitamin B1과 불포화지방산이 다량 함유되어 있다. 산약에는 뿌리줄기에는 Saponin, 점액, cholin, 진분(16%), glycoprotein과 유리amino산을 함유하며, 또한 abscisin II, polyphenol 산화효소, vitamin C (5mg%), 3,4-dihydroxy-phenyle-thylamine (dopamine)을 함유하고 점액 중에는 mannan과 phytin산이 함유되어 있고, 진피



의 주성분은 d-limonine이며 이 외에도 hesperidin, myoinositol, vitamin C 등이 함유되어 있으며, 또한 flavonoide 배당체가 많이 함유되어 있다<sup>27)</sup>. 각각의 약재는 면역계통이나 항산화능력이 우수한 것으로 알려져 있다<sup>3-7)</sup>.

알레르기성 과민반응(allergic hypersensitivity)은 즉시형 과민반응과 지연형 과민반응으로 분류되는데, 다양한 항원(antigen)들에 의해 동반된 형태로 유발될 수 있다<sup>8-12,21-25)</sup>. OVA와 같은 항원은 효과적으로 과민반응을 야기할 수 있는 물질로 알려져 있는데, 그 특징은 B세포의 활성화에 의한 혈청 내 IgE의 증가와 함께 T세포 매개에 의한 염증성 사이토카인은 물론 화학주성의 원인인 케모카인의 생산을 증가시키는 것으로 알려졌다<sup>14)</sup>. 특히 OVA는 alum과 함께 면역시킬 때 이러한 면역반응이 잘 유발되는데, 천식 및 피부습진을 야기하는 동물모델로 많이 활용되고 있다<sup>21,24)</sup>.

아토피 피부질환과 천식을 비롯한 알레르기 면역반응은 IgE에 의한 즉시형 면역반응(제1형)으로 표현되는데, histamine, prostaglandin 등 매개물에 이어서 후기에 나타나는 pro-inflammatory cytokines 및 chemokines과 같은 염증성 매개물이 대량 생산된다는 특징이 있다<sup>8-10)</sup>. 또한 즉시형 면역반응에서 생성된 물질은 이미 생성된 염증성 매개물질과 이들이 상호작용에 의해 혈관 투과성을 증가시킨다. 이어서 비만세포가 활성화되고 호산구를 비롯한 면역세포가 염증부위로 침윤되면서, leukotrine, pro-inflammatory cytokines 및 chemokines과 같은 매개물에 의해서 알레르기 반응으로 대표되는 Th2 세포가 활성화됨으로써 만성적 염증반응을 유발시키는 것으로 알려졌다<sup>17,19,20)</sup>.

본 연구에서도 마우스에 OVA와 alum을 혼합하여 복강에 감각하고 발에 공격한 결과 음성대조군에 비해 염증성 면역반응이 효과적으로 유도되었다. 즉 발의 부종, 혈청 내 OVA 특이 IgE, IgG1과 IgG2a의 생산, CTACK/CCL27의 생산 및 CTACK/CCL27 ligand인 특이적 수용체 CCR10의 발현이 뚜렷이 증가하였다(Fig. 4~7). 또한 加減拱辰丹의 투여가 모델동물의 체중변화와 세포독성에 미치는 영향을 조사한 결과 본 실험에 사용한 모든 농도에서 그 영향이 없다는 것을 확인 하였다(Fig. 2). 따라서 OVA 유도 염증모델동물에서 加減拱辰丹의 투여는 체중의 변화와 세포독성 없이(Fig. 4) OVA가 유도하는 염증 매개물을 효과적으로 제거하는 효과를 증명하였다.

한편 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27 등은 대표적인 Th2 케모카인으로 염증부위에 Th2 세포의 이동과 침윤을 유도한다. 특히 말초혈액단핵구(peripheral blood monocytes)에 의해 생산된 TARC/CCL17과 MDC/CCL22는 Th2 세포의 CCR4와 결합함으로써 염증부위로 이동하는 결정적인 화학주성(chemoattractant)을 야기하는 분자로 인간의 성인 AD환자의 혈청에 높은 양으로 검출될 뿐만 아니라 Th2 세포의 이동과 침윤을 가속화시키는 중요한 케모카인이다<sup>11,12,17,28)</sup>. 특히 ovalbumin으로 자극된 환자의 경우 더욱더 많은 양이 검출되는 것으로

밝혀지고 있어 아토피 피부염의 병인 규명에 중요한 표적 분자로 주목 받고 있다<sup>9)</sup>. 또한 CTACK/CCL27은 CCR10을 경유하여 그 효과를 나타내는데<sup>13,14)</sup>, NC/Nga 마우스의 피부병변 부위인 표피의 기저층에서 중요하게 발현되는 현상이 밝혀졌다<sup>16)</sup>. 그러므로 CTACK/CCL27의 과도한 생산은 병변 부위의 심각한 염증반응을 유도하며, cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) 양성 림프구의 이동을 매개하는 중요한 역할을 한다<sup>15,16)</sup>. 본 연구의 결과 OVA로 감각된 마우스의 혈청의 CTACK/CCL27 등은 정상대조군에 비해 현저히 높았으나, 加減拱辰丹이 투여된 실험군에서는 혈청 내 CTACK/CCL27 케모카인의 생산량이 약물의 농도에 따라 현저히 억제되었다(Fig. 6). 또한 CTACK/CCL27과 특이적으로 결합하는 CCR10의 경우도 加減拱辰丹 투여에 의해서 그 발현이 현저히 억제되는 결과를 얻었다(Fig. 7). 이러한 결과는 OVA 항원으로 유도되는 염증성 면역반응을 加減拱辰丹 투여가 효과적으로 억제하는 것으로 조사되었다. 그러나 CTACK/CCL27과 CCR10의 발현에 미치는 加減拱辰丹의 추출물의 효과는 약물의 유효성분, 및 분자 신호 전달 기전을 더 조사해야 확실한 알레르기 개선 및 치료 약물로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

이상의 결과를 종합해볼 때 加減拱辰丹 추출물의 투여는 OVA 항원 감각된 알레르기성 모델마우스의 발 부종 개선효과와 과민반응으로 대표되는 IgE의 혈청학적 증가에 대한 억제 효과 및 염증부위로 면역세포를 이동하여 침윤시키는 데 결정적인 역할을 하는 CTACK/CCL27의 생산 억제효과는 물론 CTACK/CCL27과 특이적으로 결합하는 CCR10의 발현을 현저히 줄이는 효과가 있었다. 따라서 加減拱辰丹 추출물은 인간의 AD의 개선에 이용할 수 있는 효과적인 물질이라 사료된다.

## 결론

加減拱辰丹은 鹿茸·山茱萸·當歸·枸杞子·山藥·陳皮·天麻·藿香·桂皮·黃芩·五味子 등 11가지 약재로 구성된 처방으로 기존의 만성 및 허약체질에 활용될 수 있는 처방으로 ovalbumin (OVA)과 같은 과민반응에 대한 실험적 증명자료는 없는 실정이다. 그러므로 본 연구는 Balb/c 마우스를 대상으로 OVA와 alum으로 감각되고 공격하여 加減拱辰丹의 효과를 조사하였다.

加減拱辰丹의 추출은 7일간 메탄올을 주입한 후 가용화된 추출물을 진공감압기를 이용하여 농축한 후 동결건조하여 실험에 사용하였다. 약물의 투여는 매일 1회씩 경구투여하였다(50~200 mg/kg). OVA의 감각은 스트레스가 해소된 8주령의 마우스를 대상으로 실험군당 5마씩을 배정하여 복강에 OVA와 alum을 잘 교반한 후 주사하여 면역하였고 3주 후 다시 면역하였다. 1주 후에 OVA로 발에 공격하여 발부종의 측정, 혈청내 총 IgE, OVA 특이 IgE, IgG1 및 IgG2와 CTACK/CCL27의 생산량과

CCR10의 발현을 측정하였다.

그 결과 加減拱辰丹 추출물의 경구투여는 OVA가 유도하는 혈청내 총 IgE의 량을 농도 의존적으로 감소시켰을 뿐만 아니라 OVA 특이 IgE, IgG1 및 IgG2a를 효과적으로 억제하였고, 혈청내 CTACK/CCL27의 억제와 더불어 림프절의 면역세포에서 CCR10의 발현을 현저히 억제시키는 효과를 나타내었다. 또한 임상적으로 OVA가 유도하는 체중의 감소에 대한 증가효과를 보였을 뿐만 아니라 발의 부종에 대한 억제 효과가 있었다.

이러한 결과는 加減拱辰丹 추출물이 OVA 반응에 대한 면역억제 효과가 있다는 것을 제시해주었고, 알레르기 질환 케어에 유용한 물질로 활용될 가능성이 있음을 시사해주었다.

## 감사의 글

이 논문은 2009학년도 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음

## 참고문헌

1. 危亦林. 世醫得效方. 도서출판 醫聖堂. 1990 ; 271.
2. 許浚. 新對譯東醫寶鑑. 범인문화사. 2007 ; 1251.
3. 장용훈. 拱辰丹이 強精補氣作用에 미치는 영향. 대구한의과대학 대학원. 1989.
4. 김장현. 拱辰丹이 면역반응, 항피로 및 내분비기능에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1990.
5. 장하정, 성우용, 이승현, 손지형, 한승혜, 정효창. 공진단(拱辰丹)이 알츠하이머형 치매 환자에게 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2004 ; 15(2) : 141-8.
6. 정대규, 황선미. 공진단(拱辰丹)이 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 병태(病態)모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2004 ; 15(2) : 103-618.
7. 최금희, 박치상. 공진단(拱辰丹)의 성분 분석 및 항산화(抗酸化) 작용에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2007 ; 22(2) : 51-63.
8. Grabbe S, Schwarz T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. Immunol. Today. 1998 ; 19 : 37-44.
9. Kim JY, Choi SP, La SJ, Seo JS, Kim KK, Nam SH, Kwon BS. Constitutive expression of 4-1BB on T cells enhances CD4(+) T cell responses. Exp Mol Med. 2003 ; 35 : 509-17.
10. Piguet PF, Grau GE, Vassalli P. Subcutaneous perfusion of tumor necrosis factor induces local proliferation of fibroblasts, capillaries, and epidermal cells, or massive tissue necrosis. Am J Pathol. 1990 ; 136 : 103-10.
11. Kondo S, Pastor S, Fujisawa H, Shivji GM, McKenzie RC, Dinarello CA, Sauder DN. Interleukin-1 receptor antagonist suppresses contact hypersensitivity. J Invest Dermatol. 1995 ; 105 : 334-8.
12. Wang B, Esche C, Mamelak A, Freed I, Watanabe H, Sauder DN. Cytokine knockouts in contact hypersensitivity research. Cytokine Growth Factor Rev. 2003 ; 14 : 381-9.
13. Sebastiani S, Danelon G, Gerber B, Uguccioni M. CCL22-induced responses are powerfully enhanced by synergy inducing chemokines via CCR4: evidence for the involvement of first beta-strand of chemokine. Eur J Immunol. 2005 ; 35(3) : 746-56.
14. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. J Exp Med. 2001 ; 194(10) : 1541-7.
15. Homey B, Alenius H, Müller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, McEvoy L, Lauerma AI, Assmann T, Bünemann E, Lehto M, Wolff H, Yen D, Marxhausen H, To W, Sedgwick J, Ruzicka T, Lehmann P, Zlotnik A. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. Nat Med. 2002 ; 8(2) : 157-65.
16. Nakazato J, Kishida M, Kuroiwa R, Fujiwara J, Shimoda M, Shinomiya N. Serum levels of Th2 chemokines, CCL17, CCL22, and CCL27, were the important markers of severity in infantile atopic dermatitis. Pediatr Allergy Immunol. 2008 ; 19(7) : 605-613.
17. Morales J, Homey B, Vicari AP, Hudak S, Oldham E, Hedrick J, Orozco R, Copeland NG, Jenkins NA, McEvoy LM, Zlotnik A. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1999 ; 96(25) : 14470-5.
18. Kaneko M, Kishihara K, Kawakita T, Nakamura T, Takimoto H, Nomoto K. Suppression of IgE production in ssiontreated with a traditional Chinese medicine, bu-zhong-yi-qi-tang (Japanese name: hochu-ekki-to). Immunopharmacology. 1997 ; 36(1) : 79-85.
19. Nakada T, Watanabe K, Matsumoto T, Santa K, Triizuka K, Hanawa T. Effect of orally administered Hochu-ekki-to, a Japanese herbal medicine, on contact hypersensitivity caused by repeated application of antigen. Int Immunopharmacol. 2002 ; 2(7) : 901-11.
20. Gao XK, Fuseda K, Shibata T, Tanaka H, Inagaki



- N, Nagai H. Kampo Medicines for Mite Antigen-Induced Allergic Dermatitis in NC/Nga Mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2005 ; 2(2) : 191-9.
21. Yanase Y, Hiragun T, Uchida K, Ishii K, Oomizu S, Suzuki H, Mihara S, Iwamoto K, Matsuo H, Onishi N, Kameyoshi Y, Hide M. Peritoneal injection of fucoidan suppresses the increase of plasma IgE induced by OVA-sensitization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 ; 387(3) : 435-9.
  22. Kimura M, Sasada T, Kanai M, Kawai Y, Yoshida Y, Hayashi E, Iwata S, Takabayashi A. Preventive effect of a traditional herbal medicine, Hochu-ekki-to, on immunosuppression induced by surgical stress. *Surg Today.* 2008 ; 38(4) : 316-22.
  23. Kralovec JA, Power MR, Liu F, Maydanski E, Ewart HS, Watson LV, Barrow CJ, Lin TJ. An aqueous *Chlorella* extract inhibits IL-5 production by mast cells in vitro and reduces ovalbumin-induced eosinophil infiltration in the airway in mice in vivo. *Int Immunopharmacol.* 2005 ; 5(4) : 689-98.
  24. Oh SW, Pae CI, Lee DK, Jones F, Chiang GK, Kim HO, Moon SH, Cao B, Ogbu C, Jeong KW, Koza G, Nakanishi H, Kahn M, Chi EY, Henderson WR Jr. Tryptase inhibition blocks airway inflammation in a mouse asthma model. *J Immunol.* 2002 ; 168(4) : 1992-2000.
  25. Spergel JM, Mizoguchi E, Brewer JP, Martin TR, Bhan AK, Geha RS. Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest.* 1998 ; 101(8) : 1614-22.
  26. 河北醫學院 校釋. 靈樞經校釋. 人民衛生出版社. 1982 : 237-8.
  27. 全國韓醫科大學 本草學공동교재편찬위원회 編. 本草學. 永林社. 2007 : 390, 580, 589, 630, 654, 687.
  28. Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Nagakubo D, Nakayama T, Yoshie O, Kagami S, Shimazu K, Kadono T, Sugaya M, Komine M, Matsushima K, Tamaki K. CCL17 transgenic mice show an enhanced Th2-type response to both allergic and non-allergic stimuli. *Eur J Immunol.* 2006 ; 36(8) : 2116-27.