

# 荊芥連翹湯醱酵方이 NC/Nga mouse 동물병태에 미치는 영향

박응호<sup>1</sup> · 유지현<sup>1</sup> · 김선빈<sup>1</sup> · 이용구<sup>2</sup> · 김동희<sup>1</sup> \*

## Effect of Hyunggaeyunkyotangbalhyobang (HYBH) on Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice Model

Park Eung-Ho<sup>1</sup> · Yoo Ji-Hyun<sup>1</sup> · Gim Seon-Bin<sup>1</sup> · Lee Yong-Koo<sup>2</sup> · Kim Dong-Hee<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup>Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Hyehe Hospital, Daejeon University

Various related factors and tissue changes in vitro and in vivo were observed to investigate the efficacy of HYBH on atopic dermatitis. The results are described below. HYBH improved the atopic dermatitis symptoms by naked eye examination, and significantly decreased dermatitis clinical index at 14 weeks. HYBH significantly decreased CD4+/CD45+, CD4+, CD8+, CD3+/CD69+ immune cell ratios in PBMC by 28%, 16%, 30%, 26% and 22% respectively. HYBH significantly decreased CD11b+/Gr-1+, CD3 immune cell ratios in dorsal skin by 35.3% and 67.5% respectively. HYBH significantly decreased the expression of IL-4 and IFN- $\gamma$  in spleen by 23% and 15% respectively. HYBH significantly decreased the production rate of IL-5, IL-13 and histamine in serum by 17%, 23%, and 8.8% respectively and increased IL-17 production by 17%. HYBH significantly decreased immunoglobulins IgG1 and IgE production in serum. The results above indicated that treatment of HYBH improved atopic dermatitis symptoms by anti-oxidant activity and immune modulation activity as a clinical evidence. Also, different fermentation conditions using various microbial strains should be accumulated as the clinical evidence for broad application in the future.

key words : Hyunggaeyunkyotangbalhyobang (HYBH), atopic dermatitis, NC/Nga, fermentation, immune cells, cytokines

### I. 緒 論

아토피피부염은 소양증, 전형적인 피부병변과 더불어 아토피 병력을 보이는 가족력을 특징으로 하는 만성 염증성 피부 질환이다<sup>1,2)</sup>.

현재까지 아토피피부염은 환경적인 요소와 유

전적인 소인이 모두 관여하는 복합적인 질환으로 알려져 있으나 아직 정확한 발병 원인은 밝혀지지 않았으며, 단순포진이나 중두증과 같은 바이러스 감염에 대한 취약성과 특정 미생물 항원에 대한 지연형 면역 반응의 감소, IgE의 생산 증가, 접촉 알레르겐에 대한 감수성 감소, 분역 촉진제와 항원에 대한 임파구의 반응 감소, 과립구와 단핵구의 화학주성 감소 등 여러 가지 면역학적인 이상 소견들이 보고되어 왔다<sup>3)</sup>.

\* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3, 대전대학교 한의과대학, E-mail : dhkim@dju.kr  
접수일 : 2011년1월10일 게재확정일 : 2011년2월8일

아토피피부염에서 매우 중요한 역할을 담당하는 세포들은 대부분 백혈구 과립구에 속하는 eosinophil, basophil, mast cell들로 이들은 아토피피부염이 발병하게 되면 피부로 침윤되어 다양한 병변을 일으키게 된다<sup>4-6)</sup>. Eosinophil은 leukotrien과 같은 알레르기 유발 물질을 분비하여 면역 반응을 증폭시키며, 다양한 케모카인들의 분비를 촉진하는 역할을 한다<sup>5)</sup>. 이 밖에 basophil, mast cell은 세포 표면에 IgE와 친화성이 강한 FcεRI를 발현하고 있으며<sup>4)</sup>, FcεRI가 IgE와 결합된 후 세포신호 전달을 통해 mast cell을 활성화시켜 histamine 또는 leukotren B4를 분비하여 가려움, 홍반 등의 반응을 유도한다<sup>7)</sup>.

최근에는 면역학적 기전뿐만 아니라 피부장벽의 손상도 아토피피부염 악화의 주요한 요인으로 대두되고 있다. 표피 중에서도 가장 바깥에 존재하는 각질층은 각질형성세포로부터 형성되며, 분화가 완결된 각질 세포와 그를 둘러싼 지질층으로 구성되어 있다. 각질형성세포는 천연보습인자와 세포 간 지방질 (세라마이드, 콜레스테롤, 지방산)을 생성하면서 각질층을 형성하여 피부장벽 기능을 손상시킴으로써, 항원이나 자극성 물질 등의 피부투과성을 높여 피부 면역반응을 유발시킨다<sup>8,9)</sup>.

이러한 면역학적 기전을 바탕으로 현재 대부분의 아토피피부염 질환 치료는 cytokine 생산을 억제하는 스테로이드제로 prednisone 및 dexamethasone이나, 천연물에서 분리된 cyclosporin A, tacrolimus (FK 506) 및 sirolimus가 사용되고 있으며, 면역억제제로 pimecrolimus가 이용되고 있다. 그러나 스테로이드제는 장기간 투여할 경우 피부의 위축이나 소아 환자에서 성장 지연의 가능성 등의 여러 가지 부작용이 문제시 되고 있으며, 스테로이드를 함유하지 않는 pimecrolimus를 이용한 치료법 역시 피부에 도포 하였을 때 홍반, 가려움, 건조 피부, 부종과 혈종, 짓무름, 그리고 태선화 등의 부작용과 면역력의 약화가 단점으로 나타나고 있다<sup>10-12)</sup>.

이렇듯 전체적으로 높은 발생 빈도를 나타내고, 점차 증가 추세에 있으면서도 근본적인 치료가 어렵다는 점에서 치료법에 대한 다양한 접근이 이루어지고 있다.

최근에는 식품의 제3의 물결이라는 醱酵에 대한 관심이 증가되면서 한의학에서는 새로운 약재 개발의 한 방법인 醱酵韓藥에 대한 관심이 증가하고 있다. 醱酵韓藥은 장내 미생물의 분해과정 없이도 약리성분을 흡수 가능하게 만든 약으로 유효 처방 및 한약재를 유산균 등 우수한 균주로 醱酵시킨 후 이를 여과시켜 만드는 것이다<sup>13)</sup>. 韓藥을 醱酵시키면 장내에서 흡수될 수 없는 배당체 성분에서 비배당체로의 생물전환이 가능하며<sup>14)</sup>, 약리성분의 체내 흡수율 및 생체 이용률이 강화된다. 또한 색과 맛의 개성이 가능하고 농약 및 독성물질의 감소하며 약리작용이 활성화하는 장점이 보고<sup>15)</sup>되고 있다. 특히 醱酵韓藥의 제형, 맛, 향기의 변환으로 인하여 한약의 복용이 어려운 아이들에게도 접근이 용이한 장점이 있다<sup>15)</sup>.

醱酵는 매우 유용한 친환경 가공 기술로서 장류, 요구르트, 술 등의 식품에서 널리 사용되었을 뿐만 아니라 한의학에서도 한약의 효능을 변화시키거나, 독성을 제거하기 위한 수처법의 하나로 사용되어 왔다<sup>16)</sup>. 그러나 과거에는 醱酵한약이 자연 상태에서 이루어졌다면, 최근에는 과학의 발달로 인하여 표준화된 醱酵 균주를 표준화된 환경안에서 醱酵시킴으로써 다양한 효능 변화를 유도하고 있다.

본 시료의 기본방인 荊芥連翹湯은 萬病回春<sup>17)</sup>에 최초로 수제된 처방으로, 구성 약물과 본 처방에 대한 많은 실험 연구<sup>18-27)</sup>와 임상보고<sup>28)</sup>가 있다. 특히 강<sup>18)</sup>은 아토피피부염이 유발된 생쥐에서 나타나는 荊芥連翹湯의 피부염 개선 효과는 면역조절 물질인 사이토카인 케모카인의 발현 감소를 통하여 호산구의 분화 및 피부로의 침윤을 억제하는 면역조절능에 기인한 것으로 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 이미 임상에서 다양한 염증성 질환에 활용 범위가 넓고, 실험적으로 객관적 효능이 규명된 荊芥連翹湯을 醱酵하여 효

능을 평가하고자 하였다. 醱酵는 이미 한약 醱酵를 위해 산업화되어 있는 EM생명과학원 EM균을 제공 받아 실험실에서 직접 醱酵하였다. 실험은 강<sup>40)</sup>의 실험 방법과 유사한 방법으로 in vitro에서 세포독성 및 항산화 효과를 검색하였으며, in vivo에서는 아토피피부염 병태 모델인 NC/Nga 생쥐에 TNCB를 이용하여 피부염을 유발한 후 관련 면역 관련 인자 및 조직학적 변화를 분석하였다.

## II. 實 驗

### 1. 재료

#### 1) 동물

실험동물인 수컷 6주령의 NC/Nga Mice는 중앙실험동물에서 공급 받아 실험 당일까지 고품사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co., Korea)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2℃, 습도 55 ± 15%, 12시간-12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 대전대학교 동물실험윤리위원회 (IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인 (승인번호: DJUARB 2010-002)을 받았다.

#### 2) 약물

본 실험에 사용한 荊芥連翹湯醱酵方 (Hyunggaeyunkyotangbalhyobang ; 이하 HYBH)의 구성 약재들은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량 (1첩)은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. The Prescription of HYBH (1첩)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
當歸	Angelicae Gigantis Radix	3
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	3
川芎	Cnidii Rhizoma	3
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat	3
黃連	Coptidis Rhizoma	3
黃芩	Scutellariae Radix	3
黃柏	Phellodendri Cortex	3
梔子	Gardeniae Fructus	3
連翹	Forsythiae Fructus	3
防風	Saposhnikovia Radix	3
薄荷	Menthae Herba	3
荊芥	Schizonepetae Spica	3
甘草	Glycyrrhizae Radix	3
枳殼	Aurantii Fructus	3
柴胡	Bupleuri Radix	4
白芷	Angelicae Dahuricae Radix	5
桔梗	Platycodi Radix	5
Total mount		56

#### 3) 시약

실험에 사용된 시약 중 collagenase, RBC lysis solution, acetone, olive oil, acetic acid, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), dexamethasone 등은 Sigma (USA)사 제품을 사용하였고, 2,4,6- trinitrochlorobenzene (TNCB)는 동아제약 (Korea) 제품을, fetal bovine serum (FBS), DMEM, RPMI-1640, antibiotics는 Gibco (USA)사 제품을, anti-CD4-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-CD8-PE, anti-B220-PE, anti-Gr-1-PE, anti-CD3-PE, anti-CD45-PE은 BD-Pharmingen (USA)사 제품을, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, histamine, IFN-γ ELISA kit는 Biosource (USA)사 제품을, IgG1, IgE ELISA kit는 Shibayagi (Japan)사 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

#### 4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 醱酵약탕기 (EM생명

과학연구원, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), microwave oven (LG, Korea), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), CO2 incubator (Forma scientific Co., USA), autoclave, deep-freezer (Sanyo Co., Japan), clean bench, water bath, vortex mixer, ice-maker (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-line Co., USA), flow cytometer (Becton Dickinson, USA), centrifuge (Hanil Co., Korea), ELISA reader (Molecular Devices, Co., USA) 등을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 시료 추출

HYBH 반제 분량을 약재 500 g에 물 5 l를 기준으로 하여 70°C에서 10시간 동안 약재를 불린 다음, 발효수 (EM선육균) 200 ml를 넣고 72시간 동안 40°C에서 醱酵한 후 1시간 30분 동안 끓여서 불활성화 시켰다. 추출액을 필터 한 후 여과하여 증류장치로 농축하였다. 농축액을 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 다음 얻어진 분말 59 g을 냉동 보관 (-80°C) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

### 2) 피부염 유도 및 시료 처리

7 주령이 된 NC/Nga 생쥐의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후 제모가 끝나면 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 1% TNCB 용액 (아세톤 : 올리브오일 = 3 : 1) 200  $\mu$ l를 등 부위에 도포하고, 4일 후 0.2% TNCB 용액 150  $\mu$ l를 다시 도포하였으며, 2일 후부터는 1주일에 2번씩 0.2% TNCB 용액 150  $\mu$ l를 4주간 등 부위에 도포하였다. 실험은 4개의 군으로 나누었으며 정상군, 대조군에는 증류수를, 양성대조군인 dexamethasone (이하, dexam) 투여군은 0.5 mg/kg 농도로, 실험군인 HYBH 투여군은 4.9 mg/25 g/day 농도로 6주간 경구 투여 하였다.

### 3) 관능 평가

약물 처리 후 2주, 4주, 6주 때에 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가 방법으로 관능평가를 실시하였다. 평가 항목은 홍반 (Erythema), 가려움과 건조 피부 (Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종 (Edema & Hematoma), 긁힘 (Excoriation), 태선화 (Lichenification) 등으로 5가지이다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였다.

### 4) 면역세포 분리

실험 종료 후 TNCB로 유발된 NC/Nga 생쥐에서 일정량의 배부 피부 조직을 잘게 chopping 한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37°C shaker (140 rpm, 20min.) 배양기에서 배양하여 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이들 세포들에 ACK 용액 (8.3 g NH<sub>4</sub>Cl, 1 g KHCO<sub>3</sub> in 1 L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 cell strainer를 통과시킨 세포를 유세포 분석에 사용하였다. PBMC는 심장 채혈 후 ACK 용액을 넣어 적혈구를 용해시키고 2번 세척한 후 cell strainer를 통과 시켜 얻은 세포를 유세포 분석에 사용하였다.

### 5) 형광 유세포 분석

분리한 세포를  $5 \times 10^5$  cells/ml 농도로 조정 한 후 4°C에서 면역형광염색을 실시하였다. 각각에 anti-CD4-FITC, anti-CD69-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-CD8-PE, anti-B220-PE, anti-Gr-1-PE, anti-CD3-PE, anti-CD45-PE를 넣고 30분간 얼음에서 반응시킨 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세하고 flow cytometry로 분석하였다.

### 6) 혈청 내 사이토카인 및 면역 글로불린 생성량 측정

실험 종료 후 ethyl ether로 마취한 상태에서 심장 천자법을 이용하여 채혈한 다음 6,500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다.

IL-5, IL-13, IL-17, histamine 농도는 ELISA kit를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 각 well에 혈청을 50  $\mu$ l씩 분주하고 biotin-conjugated antibody를 50  $\mu$ l씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 37°C에서 반응시키고 washing buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 이를 다시 100  $\mu$ l의 streptavidin-HRP working solution을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 washing buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 100  $\mu$ l의 stabilized chromogen을 가하여 암소에서 30분간 방치한 후 100  $\mu$ l의 stop 용액을 처리하고 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

IgG1과 IgE 생성량의 측정은 ELISA kit를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 항체를 coating 완충 용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight 하였다. 각 well을 3회 washing 완충 용액으로 세척한 후 혈청 (100배 희석)을 100  $\mu$ l씩 분주하였다. 이를 1시간 동안 실온에서 방치하고 washing 완충 용액으로 2회 세척한 다음, avidin-HRP conjugated antibody 100  $\mu$ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다.

여기에 TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 다음 50  $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) CD3/CD28에 의해 활성화된 비장세포 내 사이토카인 생성량 측정

실험 종료 후 비장세포 (1 x 10<sup>5</sup> cells/well)를 anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml), anti -CD3 (1  $\mu$ g/ml) 항체가 coating된 96-well plate에서 48시간 동안 배양한 후 배양액을 취하여 ELISA kit를 이용하여 IL-4, IFN- $\gamma$ 를 측정하였다. 측정 방법은 혈청 내 사이토카인 및 면역 글로불린 측정 방법과 동일하다.

8) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean  $\pm$

standard error (S.E.)로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석법을 이용하여 결정하였다.

III. 實驗成績

1. NC/Nga 생쥐의 피부염 지수에 미치는 영향

7주령의 NC/Nga 생쥐를 제모한 후 TNCB를 4주간 도포하여 피부염을 유발시키면서 실험군인 HYBH를 6주간 경구 투여하였다. Fig. 18은 10주, 12주, 14주의 피부염 유발 정도와 개선 정도를 나타내주는 사진으로, 대조군에서 홍반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등의 증상이 확인되었고, HYBH 투여군이 대조군에 비해서 홍반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등의 증상이 현저하게 떨어졌음을 확인할 수 있다 (Fig. 1). 피부염 지수는 아토피 피부염을 유발한 후 최종 6주 후에 피부염의 심화 정도를 관능적 방법에 의하여 측정된 결과로, 대조군은 7.67  $\pm$  1.21, Dexa 투여군은 3.33  $\pm$  1.03, HYBH 투여군은 3.67  $\pm$  1.03으로 대조군에 비해 모두 유의적인 (\*\*p<0.01) 감소를 나타내었다 (Fig. 2).

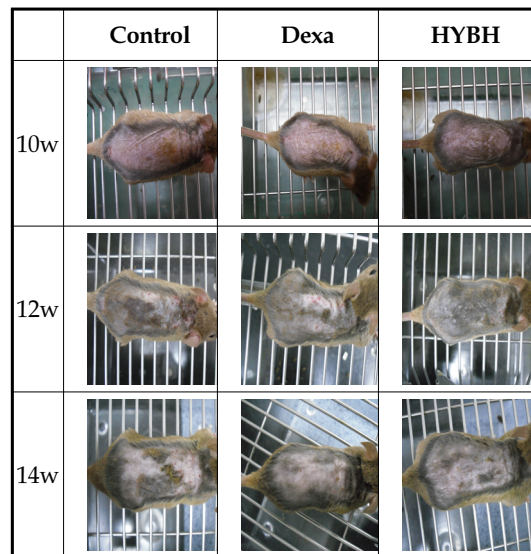


Fig. 1. Comparison of skin manifestation in NC/Nga mice between control and

experimental group. Atopic dermatitis was induced by TNCB treatment in the dorsal skin.

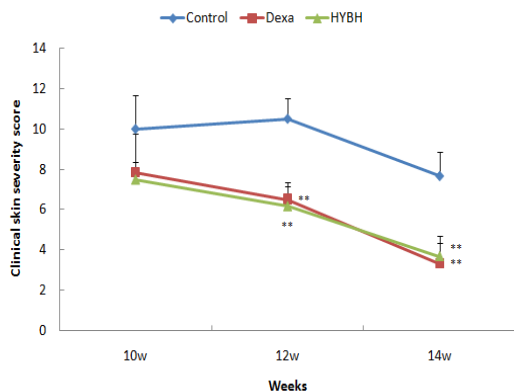


Fig. 2. Effects of HYBH on clinical skin features and severity in TNCB-induced NC/Nga mice. Clinical skin index of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe) for each of five signs and symptoms (Erythema, Pruritus & Dry skin, Edema & Hematoma, Excoriation, Lichenification) ; Symptoms were evaluated by skin dryness, eruption and wound on the three parts of the body; ear, face and back. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*\*p<0.01).

2. PBMC 내 면역세포 변화에 미치는 영향

1) CD4+/CD45+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은  $4.73 \pm 0.31$  (%), 대조군은  $14.19 \pm 0.42$  (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.01) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은  $9.14 \pm 0.74$  (%), HYBH 투여군은  $10.29 \pm 0.83$  (%)로 나타나, 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*p<0.001) 감소하였다 (Fig. 3).

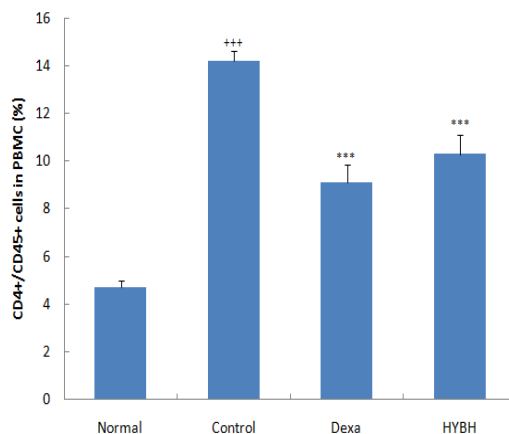


Fig. 3. Effect of HYBH on CD4+/CD45+ cell rate of PBMC in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-CD4 and anti-CD45 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*\*p<0.001).

2) B220+/CD23+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은  $14.30 \pm 1.60$  (%), 대조군은  $31.80 \pm 1.90$  (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은  $25.20 \pm 1.40$  (%), HYBH 투여군은  $27.15 \pm 1.25$  (%)로 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*p<0.01, \*p<0.05) 감소하였다 (Fig. 4).

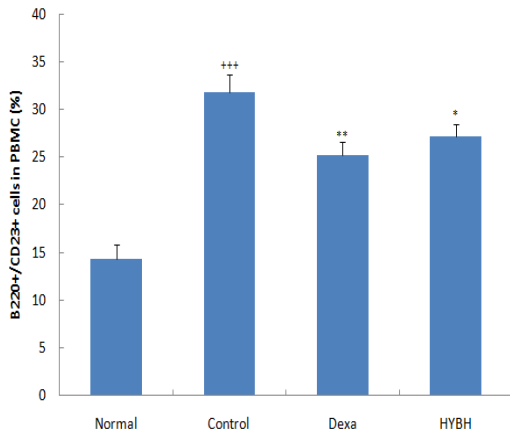


Fig. 4. Effect of HYBH on B220+/CD23+ cell rate of PBMC in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-B220 and anti-CD2CDand positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*\*p<0.01, \*p<0.05).

3) CD4+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은  $9.28 \pm 1.63$  (%), 대조군은  $15.61 \pm 0.60$  (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+ +p<0.01) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은  $8.60 \pm 1.00$  (%), HYBH 투여군은  $10.85 \pm 1.15$  (%)로 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*p<0.001, \*\*p<0.01) 감소하였다 (Fig. 5).

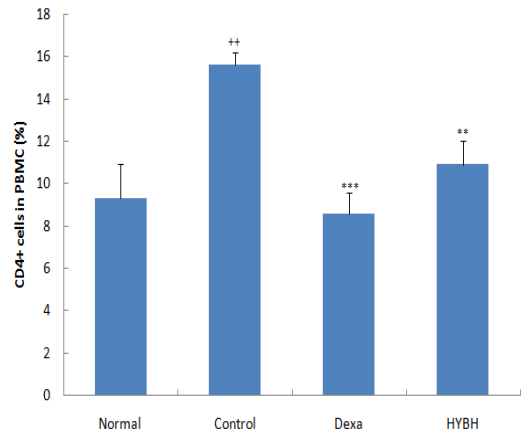


Fig. 5. Effect of HYBH on CD4+ cell rate of PBMC in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-CD4 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+ +p<0.01). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*\*p<0.001, \*\*p<0.01).

4) CD8+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은  $6.00 \pm 0.44$  (%), 대조군은  $9.14 \pm 0.76$  (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+ +p<0.01) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은  $6.80 \pm 0.70$  (%), HYBH 투여군은  $6.65 \pm 0.65$  (%)로 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*p<0.05) 감소하였다 (Fig. 6).

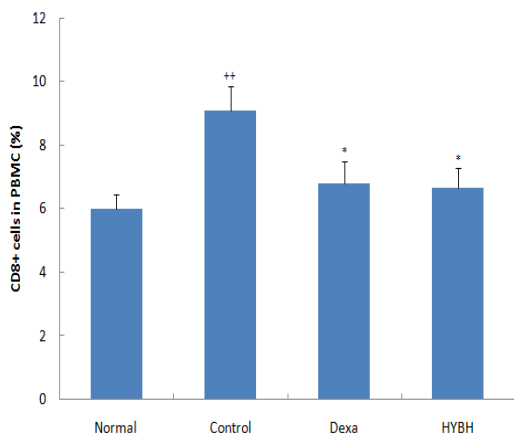


Fig. 6. Effect of HYBH on CD8+ cell rate of PBMC in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-CD8 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ( $++p<0.01$ ). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ( $*p<0.05$ ).

5) CD3+/CD69+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은  $3.80 \pm 0.67$  (%), 대조군은  $7.20 \pm 0.70$  (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ( $++p<0.01$ ) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은  $4.80 \pm 1.10$  (%), HYBH 투여군은  $5.62 \pm 0.24$  (%)로 HYBH 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $*p<0.05$ ) 감소하였다 (Fig. 7).

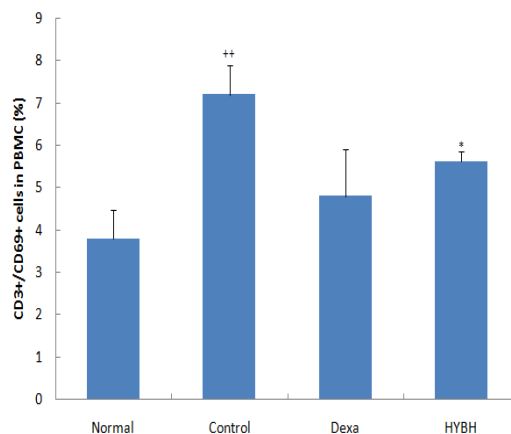


Fig. 7. Effect of HYBH on CD3+/CD69+ cell rate of PBMC in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-CD3 and anti-CD69 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ( $++p<0.01$ ). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ( $*p<0.05$ ).

3. Dorsal Skin내 면역세포 변화에 미치는 영향

1) CD3+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은  $36.45 \pm 2.95$  (%), 대조군은  $63.10 \pm 1.50$  (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ( $+++p<0.001$ ) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은  $35.55 \pm 5.15$  (%), HYBH 투여군은  $20.50 \pm 1.00$  (%)로 나타나, 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $***p<0.001$ ) 감소하였다 (Fig. 8).



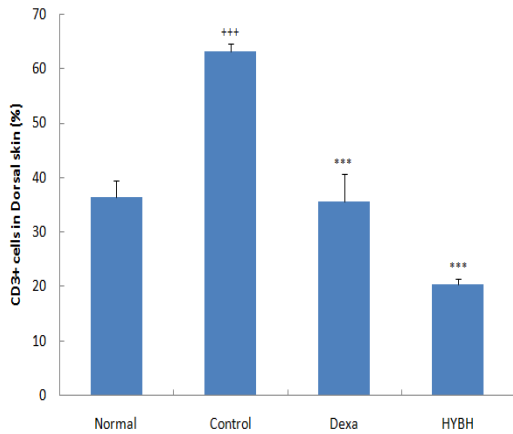


Fig. 8. Effect of HYBH on CD3+ cell rate of dorsal skin in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from Dorsal skin stained with anti-CD3 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

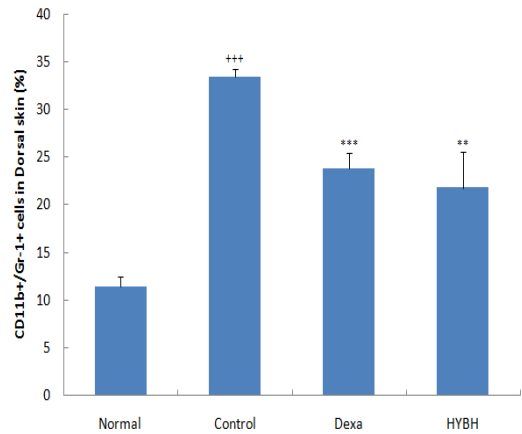


Fig. 9. Effect of HYBH on CD11b+/Gr-1+ cell rate of dorsal skin in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from Dorsal skin stained with anti-CD11b and anti-Gr-1 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

2) CD11b+/Gr-1+ 세포 비율에 미치는 영향 정상군은  $11.45 \pm 0.95$  (%), 대조군은  $33.35 \pm 0.85$  (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은  $23.75 \pm 1.65$  (%), HYBH 투여군은  $21.75 \pm 3.75$  (%)로 나타나, 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001) 감소하였다 (Fig. 9).

4. CD3/CD28로 활성화된 비장세포 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-4 생성량에 미치는 영향 정상군은  $288.9 \pm 39.4$  (pg/ml), 대조군은  $511.1 \pm 13.6$  (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은  $285.6 \pm 25.6$  (pg/ml), HYBH 투여군은  $394.9 \pm 38.6$  (pg/ml)로 나타나, 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001) 감소하였다 (Fig. 10).

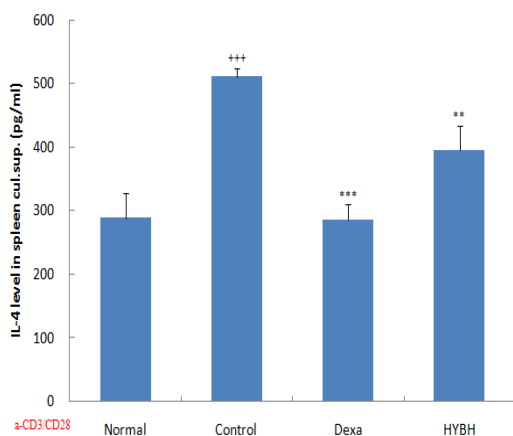


Fig. 10. Effect of HYBH on the level of IL-4 in splenocytes of NC/Nga mice. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IL-4 in the culture supernatant were determined using commercially available ELISA kit. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01).

## 2) IFN- $\gamma$ 생성량에 미치는 영향

정상군은  $419.4 \pm 58.7$  (pg/ml), 대조군은  $785.6 \pm 9.9$  (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은  $355.1 \pm 45.5$  (pg/ml), HYBH 투여군은  $670.3 \pm 28.4$  (pg/ml)로 나타나, 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01) 감소하였다 (Fig. 11).

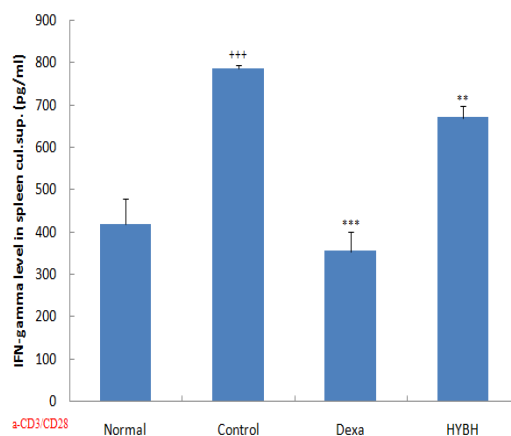


Fig. 11. Effect of HYBH on the level of IFN- $\gamma$  in splenocytes of NC/Nga mice. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IFN- $\gamma$  in the culture supernatant were determined using commercially available ELISA kit. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01).

## 5. 혈청 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

### 1) IL-5 생성량에 미치는 영향

정상군은  $54.0 \pm 8.3$  (pg/ml), 대조군은  $168.3 \pm 6.0$  (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은  $138.7 \pm 14.4$  (pg/ml), HYBH 투여군은  $140.6 \pm 4.7$  (pg/ml)로 나타나, HYBH 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*p<0.01) 감소하였다 (Fig. 12).

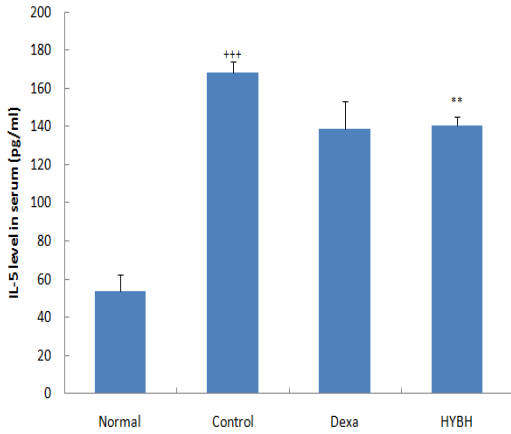


Fig. 12. Effect of HYBH on the level of IL-5 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IL-5 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*\*p<0.01).

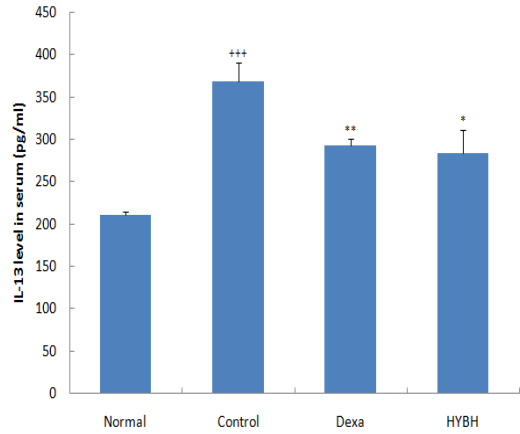


Fig. 13. Effect of HYBH on the level of IL-13 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IL-13 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*\*p<0.01, \*p<0.05).

2) IL-13 생성량에 미치는 영향

정상군은 210.3  $\pm$  5.0 (pg/ml), 대조군은 368.0  $\pm$  22.2 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 292.6  $\pm$  8.6 (pg/ml), HYBH 투여군은 283.4  $\pm$  27.8 (pg/ml)로 나타나, 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*p<0.01, \*p<0.05) 감소하였다 (Fig. 13).

3) IL-17 생성량에 미치는 영향

정상군은 235.0  $\pm$  19.4 (pg/ml), 대조군은 719.0  $\pm$  60.3 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 524.7  $\pm$  68.5 (pg/ml), HYBH 투여군은 596.2  $\pm$  108.9 (pg/ml)로 나타나, Dexa 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*p<0.05) 감소하였다 (Fig. 14).

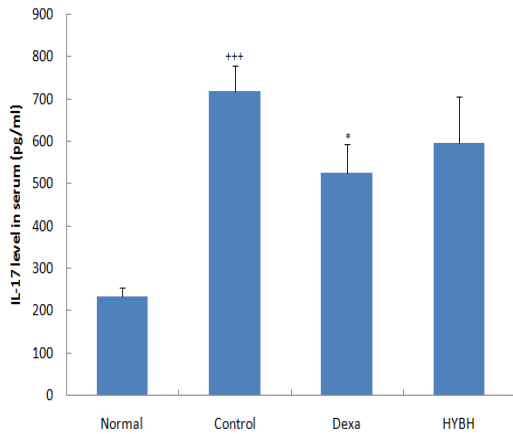


Fig. 14. Effect of HYBH on the level of IL-17 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IL-17 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*p<0.05).

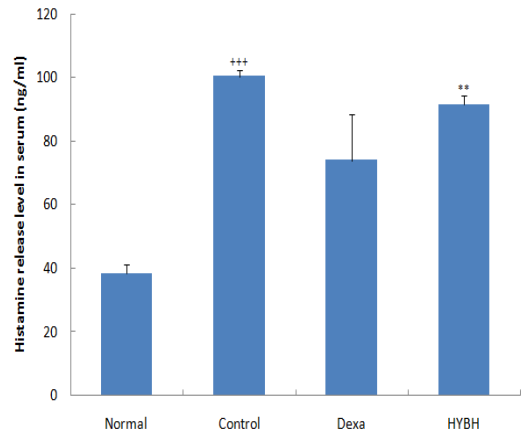


Fig. 15. Effect of HYBH on the level of histamine in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of histamine were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*\*p<0.01).

4) Histamine 생성량에 미치는 영향

정상군은  $38.5 \pm 2.9$  (ng/ml), 대조군은  $100.5 \pm 1.9$  (ng/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은  $74.1 \pm 14.6$  (ng/ml), HYBH 투여군은  $91.6 \pm 3.0$  (ng/ml)로 나타나, HYBH 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*p<0.01) 감소하였다 (Fig. 15).

6. 혈청 내 immunoglobulin 생성량에 미치는 영향

1) IgE 생성량에 미치는 영향

최종 14주에는 정상군이  $473.5 \pm 5.0$  (ng/ml), 대조군은  $505.7 \pm 7.4$  (ng/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+p<0.01) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은  $416.2 \pm 14.6$  (ng/ml), HYBH 투여군은  $488.4 \pm 0.6$  (ng/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01) 감소하였다 (Fig. 16)

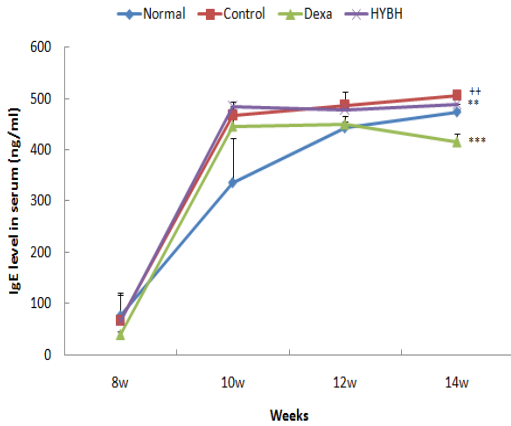


Fig. 16. Effect of HYBH on the level of IgE in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IgE were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+ + p<0.01). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*\*p<0.001, \*\*p<0.01).

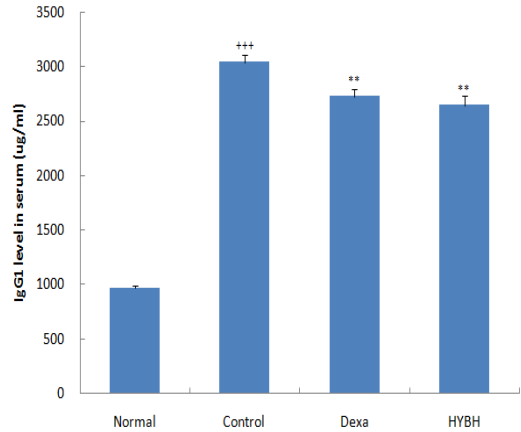


Fig. 17. Effect of HYBH on the level of IgG1 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IgG1 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+ + + p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*\*p<0.01)

#### 2) IgG1 생성량에 미치는 영향

정상군은  $967.4 \pm 28.6$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), 대조군은  $3040.0 \pm 69.5$  ( $\mu\text{g/ml}$ )으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+ + + p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은  $2728.0 \pm 71.1$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), HYBH 투여군은  $2648.0 \pm 81.7$  ( $\mu\text{g/ml}$ )로 나타나, 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*p<0.01) 감소하였다 (Fig. 17).

### IV. 考 察

아토피피부염은 재발이 잦고 만성으로 경과하는 흔한 염증성 피부질환으로, 피부 소양증에 대한 역치가 낮아 심한 소양감과 이로 인한 2차적인 습진이 형성되며<sup>1,2,29)</sup>, 홍반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등이 특징적으로 나타난다<sup>30)</sup>.

아직까지 아토피피부염의 정확한 원인을 규명하지 못하고 있으나, 유전적인 가족력과 음식섭취 등으로 인한 생활·환경의 영향, 손상된 피부층을 통해 유입된 항원 물질에 대한 면역반응에 따른 혈중 IgE 항체의 수준 증가 등으로<sup>1,31)</sup> 알려져 있다. 특히 아토피피부염 환자에서 항생단백 반응 (antimicrobial peptidic response)과 FLG (filaggrin gene) 발현을 하향 조절하여 epidermal barrier의 기능을 악화시켜 나타나는

복합적 질환으로 인식되고 있다<sup>32,33</sup>).

아토피피부염은 대개 5세 이전에 90%가 발병하며 일반적으로 나이가 증가할수록 유병율이 감소한다고 알려졌으나, 인구 대비 전체적인 유병율은 점차 증가하는 추세를 보이고 있으며, 임상 증상 또한 중증화되고 만성화되는 경향을 보이고 있어<sup>34</sup>) 이에 대한 관심이 높아지고 있다.

아토피피부염은 유소아기에 시작하여 성인기까지 다르게 나타나며, 재발과 악화를 반복하여, 증상의 조절은 가능하나 완치가 힘들다는 점이 더욱 문제시 되고 있다<sup>35</sup>). 시기에 따른 아토피피부염은 서로 그 양상이 섞여 있을 수 있는데<sup>6</sup>), 그 발병 양상에 따라 크게 급성기, 아급성기, 만성기로 나눌 수 있다. 급성기에는 소양증이 심한 홍반성 구진과 수포가 발생하며, 급으면 삼출성 병변이 발생하며 이차 감염이 흔히 일어나며, 아급성기에는 찰상, 홍반성 혹은 인설이 덮힌 구진과 판이 발생하고, 만성기에는 반복된 소파로 인해 태선화가 일어난다<sup>35</sup>).

아토피피부염의 급성과 만성 of 피부병변을 면역학적인 측면에서 살펴보면, 급성 피부병변에는 많은 수의 IL-4, IL-5, IL-13 mRNA 표현 세포가 존재하지만 IFN- $\gamma$ 이나 IL-12 mRNA 표현 세포는 적은 편이다. IL-4, IL-13은 B세포의 동형 전환 (isotype switching)을 유발하여 IgE 생산을 증가시키며, VCAM-1과 같은 혈관유착분자를 증가시켜 호산구 침윤을 증대시키고, Th1 사이토카인을 감소시키며, IL-5는 호산구의 발달, 활성화 및 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>36</sup>).

반대로 만성 태선화 피부 병변은 만성 염증반응에 의해 피부조직이 재형성되고, 표피층에 IgE 항체를 함유한 Langerhans cell과 inflammatory dendritic epidermal cell의 수적 증가를 특징으로 한다<sup>37</sup>). 반대로 만성기 병변에서는 매우 적은 수의 IL-4, IL-13 mRNA 표현세포가 존재하는 반면, IL-5, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-12 mRNA 표현세포는 급성기 병변에 비해서 상당히 증가하는 것으로 보고되고 있다. 만성기 염증반응이 지속 되려면 IL-5와 GM-CSF가 증가하여 호산구와

단핵구의 생존이 연장되어야 한다. 만성기 병변에서는 각질세포의 세포자멸사 (apoptosis)가 촉진되는데, 이러한 일련의 과정은 Th1 세포에서 분비된 IFN- $\gamma$ 에 의해 진행되며, 각질세포에 존재하고 있는 Fas에 의해 활성화된다. IFN- $\gamma$ 는 IL-12에 의해 생산이 촉진되어 대식세포를 활성화하고, CD8+ T세포가 cytotoxic T 세포로 분화하도록 유도하며, Th2 세포의 증식을 억제하고 Th1 세포의 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>36</sup>).

따라서 아토피피부염의 급성기에는 주로 Th2 cytokine이 염증 반응에 관여됨을 알 수 있으며<sup>37</sup>), 반면 만성 아토피피부염 병변에 침윤된 T 세포는 Th2형 사이토카인의 성향이 약해지면서 Th1과 Th2형 사이토카인이 함께 존재하게 된다<sup>38</sup>).

실험에 사용된 NC/Nga 생쥐는 아토피피부염의 실험 연구에 주로 사용되는 spontaneously developed dermatitis 모델<sup>39,40</sup>)로 면역병리학적이상이 사람에게서 발생하는 병변과 매우 유사하다. 그러나 발병 정도나 발병시기가 다양하고 자연 유발률이 50% 이하로 국내외적으로 아토피피부염 치료제 개발과 관련된 실험의 효능 평가를 위한 모델로는 재현성이 높지 않다는 단점이 있다<sup>41,42</sup>). 따라서 본 실험에서는 별도로 2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB)를 반복 적용하여 아토피피부염을 유발하였으며, 양성대조군으로는 각종 항 알레르기 제제 개발에 사용되며<sup>43,44</sup>), 사이토카인 생산을 억제하는 부신피질 스테로이드 가운데 아토피피부염에 가장 많이 이용되는 dexamethasone (Dexa)을 사용하였다<sup>45,46</sup>).

동물 병태 모델을 만들기 위하여 NC/Nga 생쥐의 등 피부에서 TNCB를 도포한 후 피부 변화를 관찰하였는데, NC/Nga 생쥐 등 피부 부위에 사람 아토피피부염과 같은 증상인 홍반 (Erythema), 가려움과 건조 피부 (Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종 (Edema & Hematoma), 짓무름 (Excoriation) 및 태선화 (Lichenification) 등이 나타난 것을 확인할 수

있었다 (Fig. 1 상단사진). 이러한 동물 병태 모델에 6주간 HYBH 투여한 후 육안적 변화를 살펴 대조군에 비하여 홍반, 짓무름, 부종, 혈종, 각화, 피부건조 증상 등이 현저하게 감소하여 개선되는 효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 1 하단사진). 또한 NC/Nga 생쥐의 clinical skin score에서도 양성대조군인 Dexa 투여군과 더불어 HYBH 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 2).

혈액 내 면역세포에 미치는 영향을 살펴보고자 PBMC 내 면역 세포의 비율을 조사하였다. CD4+/CD45+ 의 세포의 비율은 대조군과 비교하여 27.5% 감소한 것을 나타나 (Fig. 3), T 세포 활성화가 HYBH에 의하여 감소한 것으로 보인다. B220+/CD23+ 는 성숙한 B 세포를 나타내는 것으로<sup>47,48)</sup>, B220+/CD23+ 세포 비율은 대조군에서 정상군에 비해 122 % 유의성 있는 증가를 나타내었으며, HYBH 투여군에서는 대조군에 비하여 15.5% 감소하였다 (Fig. 4). CD4+ T 세포는 여러 종류의 사이토카인을 생산하여 B 세포의 항체 생산을 도와주고, 면역 반응의 행동세포를 활성화시키는 역할을 하며<sup>49,50)</sup>, CD8+ T 세포는 사이토카인의 생산보다는 세포 살해 활성 (cytotoxic activity)을 가지고 있는 altered self-cell을 제거하는 역할을 하는데<sup>51)</sup>, CD4+ 와 CD8+ 에서는 대조군과 비교하여 각각 30.1 %, 26.4 %의 감소하였고 (Fig. 5, 6), CD3+/CD69+ 세포는 대조군에 비해 22.2 % 감소함으로써(Fig. 7), HYBH가 병리적인 면역 활성을 억제하였음을 알 수 있었다. 결과적으로 PBMC의 면역세포 변화를 통해서 대조군은 아토피피부염이 심화되었고, HYBH는 심화된 아토피피부염을 개선시키면서 상대적으로 면역세포 비율이 감소된 것으로 추측된다.

CD3는 TCR과 T 세포 표면에서 하나의 복합체로 존재하는 여러 가지의 단백질로  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$  chain 이라고 불리는 다섯 가지의 단백질이 CD3을 이루고 있다. 이들은 T 세포의 항원 인식에서, 세포 내로 활성화 신호를 전달 (signal transduction)하는 기능을 가지고 있는 것으로

알려져 있는데<sup>52)</sup>, dorsal skin에서 CD3+ 의 세포 비율은 HYBH 투여군이 대조군에 비해 67.5%로 유의성 있게 감소하였고 (Fig. 8), 과립구를 나타내는 CD11b+/Gr-1+ 의 세포 비율은 HYBH 투여군이 대조군에 비해 34.8% 정도 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 9). 이 같은 전반적인 면역세포들의 변화는 본 시료가 염증 세포 활성화와 사이토카인의 생성 및 피부로의 침윤을 억제함으로써 만성적인 아토피피부염에 효과적임을 시사하고 있다.

아토피피부염에서 면역학적 조절체계에서 가장 중요한 인자 중의 하나가 Th 림프구 (T-helper lymphocytes)의 활성 불균형에 기인하며<sup>53)</sup>, 불균형의 주요 원인은 Th1 세포보다 월등히 Th2 세포의 활성 증가를 유도하는 사이토카인이다. Th2 세포에서 분비되는 사이토카인 IL-4, IL-5, IL-13은 B 세포의 동형전환을 유발하여 IgE 항체 생산을 증가시킬 뿐만 아니라<sup>54)</sup>, histamine과 같은 cytotoxic 물질들의 농도가 증가하면서 각종 염증 반응들이 진행되며<sup>55)</sup>, Th1 세포에서 분비되는 사이토카인 IFN- $\gamma$ 를 감소시킨다<sup>54)</sup>. 반면에 Th1 세포는 IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF 등을 분비하여, Th2 세포의 활성 조절을 통해 지연형 과민반응을 조절한다<sup>56)</sup>.

따라서 염증 관련 사이토카인의 분비를 억제하는 약물 검색을 통해 아토피피부염 치료제 개발이 다각적으로 연구되어 오고 있는데, 최근 한의학적 실험 연구 역시 관련 사이토카인 생성 억제 효과에 대한 연구가 주를 이룬다.

본 연구에서는 anti-CD3/anti-CD28의 자극에 의해 비장세포의 IL-4와 IFN- $\gamma$ 의 생성량을 측정하였고, 혈청 내 IL-5, IL-13, IL-17, histamine 그리고 면역 글로블린 IgG1, IgE 생성량을 측정 하였다.

CD3/CD28로 활성화된 비장세포 내 IL-4의 생성량은 정상군에 비해 대조군에서 크게 증가한 반면, HYBH 투여군에서는 IL-4의 농도가 대조군에 비해 23% 감소하였고 (Fig. 10), IFN- $\gamma$  생성량을 측정한 결과 정상군은 대조군에 비해 87.3% 정도 크게 증가하였다 (Fig. 11).

이와 같이 본 실험에서 아토피피부염의 주요 원인인 Th1/Th2의 높은 비(ratio)에 기인한다는 점을 감안 한다면, Th2의 활성을 감소시키고, Th1의 활성을 증가시키는 것이 아토피피부염의 치료에 있어서 가장 바람직한 기전으로 보인다. 그러나 본 실험에서는 HYBH에 의해 낮아진 Th1/Th2의 비는 Th1보다 Th2 세포의 활성을 더 큰 폭으로의 감소시킨 것에 기인하는 것으로 보여, Th1 세포와 관련된 TNF- $\alpha$ , IL-2 등의 사이토카인과 IgM, IgG2a, IgG2b 등의 항체단백질에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

혈청에서 IL-5, IL-13의 변화에서 아울러 IL-5은 대조군에서 정상군에 비해 67.9%로 나타나 유의성 있게 증가하였고, 반면 대조군에 비해 HYBH 투여군은 16.5%로 나타나 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 12). IL-13은 대조군에서 정상군에 비해 42.9%로 나타나 유의성 있게 증가하였고, 대조군에 비해 HYBH 투여군은 23%로 나타나 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 13). 또한 최근 연구에서는 Th1, Th2 세포와 함께 Th17세포가 대표적인 사이토카인 IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-22를 발현함으로써<sup>57)</sup>, 아토피피부염, 건선, 관절염과 같은 다양한 자가면역 질환과 천식 등에 영향을 미친다는 연구 결과가 보고되었다<sup>57,58)</sup>. 특히 IL-17은 알레르기 면역반응을 유도하여 유지시키는데 중요한 역할을 하는데<sup>59)</sup>, 본 실험에서 HYBH 투여군은 대조군에 비해 혈청 내 IL-17 생성량을 17.1% 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 14). 또한 histamine은 대조군에서 정상군에 비해 161.0% 유의성 있게 증가하였으며, HYBH 투여군에서는 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 15).

혈청에서 면역글로블린의 생성량을 측정에서 IgE의 생성량은 실험 14주째 대조군에 비해 유의성 있게 감소되는 것이 확인할 수 있었고 (Fig. 16), IgG1의 생성량은 역시 HYBH 투여군에서 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 17).

강<sup>18)</sup>이 보고한 荊芥連翹湯과 비교 분석한 결과, 혈청 및 비장 세포 내 사이토카인에서 IL-4,

IL-5 그리고 IL-13은 HYBH 투여군은 23%, 17%, 23%로 감소되었고, 荊芥連翹湯은 31.4%, 82.1%, 83.7%로 감소한 것으로 나타나 Th2 세포에서 생성된 사이토카인을 荊芥連翹湯이 더 많은 감소를 보였다. CD3+ 세포 비율 및 IgE 생성량에 대한 비교 분석에서도 HYBH 투여군보다 荊芥連翹湯 투여군에서 더 많은 감소를 보였다. 또한 CD8+ 세포비율에서와 IFN- $\gamma$ 의 생성량의 결과에서 HYBH 투여군은 대조군에 비해 감소하는 결과와 달리 荊芥連翹湯에서는 대조군에 비해 증가하여 서로 상반된 결과를 나타내었고, 항산화능은 비교 분석 할 수 없었으나, 醱酵과정에서 많은 효소가 생산됨으로써 항산화 효과가 증가되어 과립구가 억제 되었을 것으로 판단된다.

두 시료의 결과를 종합하여 볼 때, 동일한 환경과 조건에서 실험이 진행 되지 않아 비교 평가할 수 없지만, 이와 관련된 사이토카인, 면역인자, 조직학적 변화를 분석한 결과 醱酵로 인한 뚜렷한 차이점을 발견할 수 없었다.

따라서 향 후 醱酵과정에 있어 추출용매, 온도, 습도, pH, 반응시간, 균주 등 변수에 따른 최적의 조건과 균주를 선별하여 이러한 점을 보완할 필요성이 있을 것이라 사료된다.

## V. 結 論

荊芥連翹湯醱酵方(HYBH)이 나타내는 아토피피부염 개선효과를 객관적으로 검증하기 위하여 다양한 면역 관련 인자, 임상지수에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

HYBH 처리군은 대조군에 비하여 육안적으로 아토피피부염을 개선시켰으며, 실험 14주에서 피부염 임상 지수를 유의성 있게 감소시켰다.

HYBH 처리군은 대조군에 비하여 PBMC 내 CD4+/CD45+, CD4+, CD8+, CD3+/CD69+, 면역세포 비율을 각각 28%, 16%, 30%, 26%, 22%로 유의성 있게 감소시켰다.



HYBH 처리군은 대조군에 비하여 dorsal skin에서 CD11b+/ Gr-1+, CD3+ 면역세포 비율을 각각 35.3 %, 67.5%로 유의성 있게 감소시켰다.

HYBH 처리군은 대조군에 비하여 비장 내 IL-4, IFN- $\gamma$ 의 발현을 각각 23%, 15% 유의성 있게 감소시켰다.

HYBH 처리군은 대조군에 비하여 혈청 내 IL-5, IL-13, histamine의 생성량을 각각 17%, 23%, 8.8% 유의성 있게 감소시켰으며, IL-17 생성량을 17% 감소시켰다.

HYBH 처리군은 대조군에 비하여 혈청 내 면역글로불린인 IgG1, IgE의 생성량을 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 HYBH의 항산화 작용 및 면역 조절 작용을 통한 아토피피부염의 개선 효과가 실험적으로 규명됨으로써 醱酵을 통하여 지속적인 임상 응용이 가능할 것으로 보이며, 추후 발효를 통한 구성 약물간의 상승작용에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것임.

參 考 文 獻

1. 전남대학교 의과대학 면역 및 알레르기학 편찬위원회. 면역 및 알레르기학. 전남대학교출판부, 2006.
2. Daniels J., et al. The epidemiology of atopic dermatitis. Hosp Med, 63(11):649-652, 2002.
3. Andrew B., et al. Allergic and immunologic disease of the skin. J

- Allergy Clin Immunol, 111:560-570, 2003.
4. 이승헌 외. 피부질환 아틀라스. 한미의학, 4:121-134, 2002.
5. 박용민. 아토피 피부염 병태생리에 대한 최신지견 소아알레르기 및 호흡기. 16(3):189-196, 2006.
6. 안성구. COMMON SKIN DISEASE. 퍼시픽출판사, p. 68. 2003.
7. 최치호. 아토피 피부염에서의 피부장벽기능 이상. 천식 및 알레르기, 20(5):693-695, 2000.
8. Fry L. An atlas of atopic eczema. Gunja Press, pp.121-129, 2007.
9. Yoon MY. Therapeutic effects of hydrolyzed preparation of Scutellanae radix extracts on atopic dermatitis of Nc/Nga mice induced by DNCB, ptryonyssinus, Woosuk university DS thesis 23-24, 2008.
10. Leung DY., et al. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis, J Am Acad Dermatol, 44:S1-S12, 2001.
11. Pastore S., et al. Pathogenetic mechanisms of atopic dermatitis, Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 48(6):497-504, 2000.
12. Mihm MC., et al. The structure of normal skin and the morphology of atopic eczema, J Invest Dermatol, 67(3):305-312, 1976.
13. 김상현. 한약의 효율성 개선을 위한 醱酵 한약 유용성에 관한연구. 경기대학교 대체의학대학원, 2008.
14. Bae EA., et al. Transformation of ginseng sapoinins to ginsenoside Rh2 by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants. Arch Pharm Res,

- 27:61-67, 2004.
15. 김용미. 醱酵한약의 연구동향 연구. 경원대학교대학원, 2009.
  16. 최재환 외. 구증구포 醱酵 한약 조합물이 피부 노화에 미치는 영향. 대한본초학회지, 24(4):101-106, 2009.
  17. 공정현. 增補 萬病回春(하권). 일중사, pp.12-14, 1994.
  18. 강란이. 아토피피부염 동물 병태 모델에서의 荊芥連翹湯의 면역조절작용. 대전대학교대학원, 2010.
  19. 김동일 외. 荊芥連翹湯과 加味荊芥連翹湯이 해열 진통 및 소염작용에 미치는 영향. 경희한의대논문집, 9:411-422, 1986.
  20. 유태섭 외. 荊芥連翹湯의 항알레르기작용에 대한 실험적 효과. 대한한방소아과학회지, 4(1):19-30, 1990.
  21. 박은정 외. 荊芥連翹湯과 加味荊芥連翹湯이 소염 진통 및 항알레르기에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지, 11(1):249-273, 1997.
  22. 오은영 외. 荊芥連翹湯 및 구성약물의 *Klebsiella pneumoniae*에 대한 항균효과에 관한 연구. 대한본초학회지, 18(2):109-119, 2003.
  23. 김민지 외. 荊芥連翹湯이 lipopolysaccharide로 유도된 nitric oxide의 생성 및 iNOS와 COX-2의 발현, cytokine에 미치는 영향. 동의생리병리학회지, 21(2):491-497, 2007.
  24. 지선영 외. 荊芥連翹湯추출물의 유전독성 평가. 대한본초학회지, 22(4):287-300, 2007.
  25. 안현주 외. 荊芥連翹湯추출물의 SD Rats에서 28일 경구반복투여 독성시험. 대한한의학방제학회지, 16(1):147-68, 2008.
  26. 김은희 외. 荊芥連翹湯추출물의 경구투여가 rat의 수태능 및 초기 배발생에 미치는 영향. 대한한의학방제학회지, 16(1):65-78, 2008.
  27. 박성희. 荊芥連翹湯加味方の 아토피피부염 병태 모델에서의 免疫調節能에 관한 研究. 대전대학교대학원, 2010.
  28. 이운심 외. 小兒 再發性 滲出性 中耳炎에 加味荊芥連翹湯이 中耳腔 滲出液 內 Immunoglobulin-G 亞型에 미치는 影響. 대한한방소아과학회지, 15(1):131-153, 2001.
  29. 김덕곤 외. 동의소아과학. 정담, p.660, 2002.
  30. 홍창의. 소아과학. 대한교과서주식회사, 1207-1211, 2005.
  31. Daniels, J., et al. The epidemiology of atopic dermatitis. Hosp Med, 63(11):649-652, 2002.
  32. Matsuda H., et al. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with hyperproduction in NC/Nga mouse. Int Immunol, 9:461-6, 1996.
  33. Morita E., et al. Fur mites induce dermatitis associated with IgE hyperproduction in an inbred strain of mice. NC/Kuj, J Dermatol Sci, 19:37-43, 1999.
  34. 김정희. 아토피피부염의 최신지견. 소아알레르기 및 호흡기, 14(1):12-23, 2004.
  35. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 개정 4판 피부과학. 여문각, pp.161-166, 2001.
  36. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS 저. 김광혁 외 옮김. 세포·분자 면역학. 서울: 정문각, 320-321, 1998.
  37. Qgawa H., et al. A speculative view of atopic dermatitis: barrier dysfunction in pathogenesis. J Dermatol Sci, 5:197-204, 1993.
  38. 김정원. 알레르기 및 면역학적 관점에서의 아토피피부염. 대한피부과학회지, 41(6):687-689, 2003.
  39. 이원구. 消疹止痒湯의 NC/Nga 생쥐에 유발된 아토피 피부염 抑制 效果와 免疫 調節 作用. 대전대학교대학원, 2008.

40. 김종수. 烏藥의 抗炎症 活性. 우석대학교 대학원, 2010.
41. 은영준. 葛根 추출물이 항산화에 미치는 영향. 경원대학교대학원, 2007.
42. 이옥희. 葛根 추출물이 흰쥐 혈액의 항산화계에 미치는 영향. 자연과학연구소논문지, 9(1):73-79, 2004.
43. Ohtsuka E., et al. Inhibitory effect of azelastine on allerg itch-associate dresponse in mice sensitized with mosquito salivary glands extract. J Pharmacol Sci. 91:263-6, 2003.
44. Shichinohe K., et al. Effect of M-711 on experiment alskin reactions induced by chemical mediators in rats. J Vet Med Sci, 58:419-23, 1996.
45. Ganir EM., et al. Treatment of atopic dermatitis in children: the importance of skin care and environmental control. Acta Paediatr Jpn, 38:702-4, 1996.
46. Matsumoto K., et al. Objective evaluation of the efficacy of daily topical applications of cosmetics bases using the hairless mouse model of atopicdermatitis. Skin Res Technol, 11:209-17, 2005.
47. Getahun, A., et al. IgE enhances antibody and T cell responses in vivo via CD23+ B cells. J Immunol, 175(3):1473-1482, 2005.
48. Li, Y.S., et al. Identification of the earliest B lineaga stage in mouse bone marrow, Immunity, 5(6):527-535, 1996.
49. Yawalkar N. : Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis. J. Invest Dermatol, 113:43-48, 1999.
50. Chen L. Early up-regulation of Th2 cytokines and late surge of Th1 cytokines in an atopic dermatitis model. Clin Exp Immunol, 138:375-387, 2004.
51. Hong S., et al. Antioxidative effects of traditional Korean herbal medicines on AAPH-induced oxidative damage. Food Sci Biotechnology, 10:183-187, 2001.
52. Clevers, H., et al. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. Annu Rev Immunol, 629-662, 1998.
53. Tomkinson a., et al. A murine IL-4 receptor antagonist that inhibits IL-4- and IL-13-induced responses prevents antigen- induced airway eosinophilia and airway hyperresponsi-veness. J Immunol, 166(9):5792- 5800, 2001.
54. Hino R., et al. Treatment with IFN- increases serum levels of Th1 chemokines and decreases those of Th2 chemokines in patients with mycosisfungoides. J Dermatol Sci 38:189-195, 2005.
55. Romagnani S. Immunologic influences on allergy and The Th1/Th2 balnace. J Allergt Clin Immunol, 113(3):395-400, 2004.
56. Lighvani AA., et al. T-bet is rapidly induced by interferone- gamma in Lymphoid and myeloid cells. Proc Natl Acad Sci USA, 98(26):15137-15142, 2001.
57. Nograles KE., et al. Th17 cytokines interukin (IL-17) and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratincyte-response pathways. Br J Dermatol, 159(5):1092-1102, 2008.
58. Tesmer LA., et al. Th17 cells in human disease. Immunol, 223:87-113, 2008.
59. Zelante T., et al. IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: what's new?. Eur J Immunol, 39(3):645-648, 2009.