

清熱湯의 생물전환을 통한 항아토피피부염 效能 研究

강현숙¹ · 김승형² · 김선빈¹ · 김수명³ · 김동희¹ *

Effect of Cheongyeoltang (CYT) using Bioconversion on Atopic Dermatitis

Kang Hyun-Suk¹ · Kim Seung-Hyung² · Gim Seon-Bin¹ · Kim Soo-Myung³ · Kim Dong-Hee¹ *

¹Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

²Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University

³Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Daejeon University

In order to improve efficacy of oriental medicines and to study the application of fermented oriental medicine in clinicals, the efficacy of CYT and CYTBH on atopic dermatitis were evaluated. The results and conclusions are as follows.

CYT and CYTBH significantly improved the atopic dermatitis symptoms in NC/Nga mice by naked eye evaluation and significantly decreased clinical index in both groups. CYT and CYTBH both decreased the cell numbers of CD3+, CD11b+Gr-1+ cells in dorsal skin. Of the cells, CYT significantly decreased CD11b+Gr-1+ cells whereas CYTBH significantly decreased all immune cells.

CYT and CYTBH both decreased the production rate of IL-4 and IFN- γ activated by CD3/CD28. In the case of CYTBH, significant decrease in all cases was observed. CYT and CYTBH decreased the production rate of IL-5, IL-13 and IL-17 in serum. Significant decrease of IL-5 in the case of CYT and IL-5 and IL-13 in the case of CYTBH were observed. CYT and CYTBH significantly decreased transcription of IL-5 mRNA and IL-13 mRNA in skin. Significant decrease in IgG1 and IgE immunoglobulins in serum were observed in both groups. Significant decrease was only observed in the case of CYTBH. Both CYT and CYTBH significantly decreased the secretion of histamine. Both CYT and CYTBH suppressed erythema, hemorrhage, edema, excoriation, erosion of skin tissues of NC/Nga mice resulting in the decrease of thickness of epidermis. Significant decrease of infiltration of obese cells was also observed.

The results above indicated that both CYT and CYTBH had significant efficacy in the treatment of atopic dermatitis through immune modulation. Animal studies showed that CYTBH had superior activity than that of CYT suggesting further and continuous studies on the changes in ingredients or absorption improvement by fermentation should follow.

Key words : Cheongyeoltang (CYT), Cheongyeoltangbalhyobang (CYTBH), Atopy, NC/Nga, fermentation, immune cells

I. 緒 論

“아토피”란 선천적으로 음식물이나 흡입성 물질에 대한 과민반응으로 기관지 천식, 알레르기성 비염 등 알레르기성 행진이 나타나는 경향을 일컬었으나, 최근에 이런 모든 현상이 알레르기 기전이 의해 발생된다는 것이 알려지면서 “알레르기”라는 용어로 사용되고 있다¹⁾.

아토피 피부염의 정확한 병리는 아직까지 완전하게 이해되고 있지 않으나 유전적 소인과 함께 면역학적, 비면역학적 기전이 관여하는 것으로 보고되고 있다²⁾.

아토피 피부염의 대부분을 차지하는 외인성 아토피 피부염은 IgE와 연관된 면역기전에 의해 발생되는데, 특정 알레르겐에 대한 즉시형 면역반응보다 T 세포 이상에 의한 지연형 면역반응이 관여한다는 보고들이 많다³⁾.

현재 전체 인구의 10-20%에서 발병되고, 유병율도 점차 증가 추세에 있으며, 장기간의 치료에 따른 부작용 및 사회에 대한 적응도가 문제시 되고 있다. 이는 진행 상태에 따라 급성, 아급성 혹은 만성피부 병변으로 나누어지며, 진단은 특징적인 임상 양상에 의존하여 내려진다. 일반적으로 소아기 때 호전되며, 사춘기 때 다소 악화되었다가, 많은 경우에 30 세경에 자연 치유된다⁴⁾. 그러나 보고에 따라서는 반수 이상이 30세 이후에도 지속된다는 통계도 있으며⁵⁾, 10년 전에 비해 7세 이상 연장아의 유병률이 증가하였을 뿐 아니라 중증환자의 구성비도 높아진 것으로 조사되었다. 이는 아토피 피부염이 일반적으로 연령이 증가할수록 유병률이 감소하고 대부분 경한 경과를 갖는 질환으로 알려졌던 것과는 달리, 성장하면서도 지속되거나 심해지는 경향을 보여 주는 것으로 조기 진단과 적극적인 치료가 필요함을 시사해주고 있다⁶⁾.

현재 아토피 피부염의 치료제로 항히스타민제, 스테로이드제, cyclosporin, DNA합성 저해제

(antimetabolite) 등 다양한 약물이 임상에서 사용되고 있으나 이들의 장기 사용은 내성 증가와 다양한 부작용으로 인해 질병에 대한 근본적인 치료 약물의 개발이 요구되고 있는 실정이다⁷⁾.

이런 의학적인 문제 해결을 위하여 한의학계에서도 치료를 위한 특화된 접근이 이루어지고 있으며, 다양한 처방이나 약물을 중심으로 실험 및 임상에서 객관적 효능을 보고⁸⁻¹²⁾하고 있다. 특히 최근에는 아토피 피부염의 치료 기간이 장기적으로 이루어지고, 약물의 안전성이 사회적으로 문제시 되고 있어^{13,14)} 이에 대한 보완책으로 醱酵 한약에 대한 연구가 심도 있게 진행되고 있다. 이미 한약에서 淡豆豉, 半夏, 陳皮, 神麴 등의 수종의 약재에서 수치의 일환으로 醱酵이 이루어져왔다는 점에서 醱酵을 통한 한약 제형 변화는 여러 가지 긍정적인 가능성을 제시해주고 있다. 따라서 醱酵 한약의 유용성에 관한 연구는 기존 湯劑에 비하여 증강된 효과와 더불어 다양한 장점에 대한 결과를 제시해 줄 것으로 보인다.

본 시료인 淸熱湯은 黃連解毒湯의 가미방으로 熱盛으로 인한 증상에 활용되고 있으며, 피부과에서는 發赤과 瘙癢이 심한 實證 피부 병증에 활용되고 있는 임상방이다. 기본방인 黃連解毒湯과 구성 약물 대부분은 이미 抗炎, 抗酸化, 항아토피 효능이 실험적으로 규명된 바가 있어¹⁵⁻²⁶⁾ 임상에서 활용 범위가 매우 넓은 처방이라 할 수 있다.

이에 저자는 한약의 효율성 개선과 더불어 임상 활용을 위한 醱酵 한약의 효능 규명을 위하여, 淸熱湯과 淸熱湯을 EM선육균으로 醱酵시킨 淸熱湯醱酵方의 抗酸化 작용과 항아토피 피부염에 미치는 영향을 실험적으로 비교 규명하고자 하였다.

실험은 TNCB 항원으로 유발된 NC/Nga atopic dermatitis 생쥐에 양성대조군 dexamethasone, 淸熱湯과 淸熱湯醱酵方 추출물을 경구 투여하여 관능평가, IgE, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IFN- γ , histamine 그리고 IgG1의 혈청 내 농도를 측정하였다. 또 피부조직 세포 내 형광 유세포 분석 및 등 피부 조직에서

* 교신저자 : 김동희, 대전대학교 한의과대학 병리학교실.
E-mail : dhkim@dju.kr
접수일 : 2011년1월10일 게재확정일 : 2011년2월8일

real-time PCR을 이용한 IL-5와 IL-13 mRNA 유전자 발현 분석을 측정하였으며, 마지막으로 등 피부를 염색하여 조직의 염증, 세포침윤 등을 관찰하였다.

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 清熱湯과 清熱湯醱酵方(Cheongyeoltang, 이하 CYT, Cheongyeoltangbalhyobang, 이하 CYTBH)의 구성 약제들은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량(1첩)은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of CYT and CYTBH (1첩)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
金銀花	Lonicerae Flos	8
石膏	Gypsum	8
黃連	Coptidis Rhizoma	4
黃芩	Scutellariae Radix	4
黃柏	Phellodendri Cortex	4
梔子	Gardeniae Fructus	4
升麻	Cimicifugae Rhizoma	4
玄參	Scrophulariae Radix	4
Total mount		40

3) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 collagenase, RNAzolB, RBC lysis solution, acetone, olive oil, diethyl pyrocarbonate (DEPC), trypsin-EDTA, acetic acid, tris-base, tris-HCl, paraformaldehyde, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), dexamethasone, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) 등은 Sigma (USA)사 제품을 사용하였고, 2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB)는 동아제약 (Korea) 제품을, anti-CD11b-FITC, anti-Gr-1-PE, anti-CD3-PE는 (USA)사 제품을, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, Histamine, IFN-γELISA 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 열탕추출기 (대웅, Korea), 醱酵藥湯器 (EM생명과학연구원, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), microwave oven (LG, Korea), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), autoclave, deep-freezer (Sanyo Co., Japan), clean bench, water bath, vortex mixer, heating block, ice-maker (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-line Co., USA), centrifuge (Hanil Co., Korea), homogenizer (OMNI Co., USA), flow cytometer (Becton Dickinson, USA), Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA), ELISA reader (Bio-Tek Instruments, VT, USA), fluorescence contrast microscope (Nikon, Japan) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

CYT 3점 분량에 증류수 1,500 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출한 후 얻은 추출액을 다시 여과하여, 이를 감압 증류 장치로 농축하였다. 농축액을 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 다음 얻어진 분말 11.9 g을 냉동 보관(-80°C) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다. 발효 처방인 CYTBH는 CYT 반제 분량을 약재 500 g에 물 5 l를 기준으로 하여 70°C에서 10시간 동안 약재를 불린 다음, 醱酵水(EM선속균) 200 ml를 넣고 72시간 동안 40°C에서 醱酵한 후 1시간 30분 동안 끓여서 불활성화 시켰다. 추출액을 필터 한 후 여과하여 증류장치로 농축하였으며, 농축액을 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 다음 얻어진 분말 96.1 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 μ l를 등 부위에 도포하고, 4일 후 0.2% TNCB 용액 150 μ l를 다시 도포하였으며, 2일 후부터는 1주일에 2번씩 0.2% TNCB 용액 150 μ l를 4주간 등 부위에 도포하였다. 실험은 4개의 군으로 나누었으며 정상군, 대조군에는 증류수를, 양성대조군인 dexamethasone 투여군은 0.5 mg/kg 농도로, 실험군인 CYT와 CYTBH 투여군은 각각 3.3 mg/25 g/day, 4.0 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 평가법으로 관능평가를 실시하였다. 평가 항목은 홍반(Erythema), 가려움과 건조 피부(Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종(Edema & Hematoma),

긁무름(Excoriation), 태선화(Lichenification) 등 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, 20 min.) 배양기에서 배양하여 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이들 세포들에 ACK 용액(8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃ in 1L 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.

5) 형광 유세포 분석

분리한 세포를 5 × 10⁵ cells/ml의 농도로 조정한 후 4°C에서 면역형광염색을 실시하였다. 각각에 anti-CD11b -FITC, anti-Gr-1-PE, anti-CD3-PE를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세하고 flow cytometry를 이용하여 측정하고 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 μ l씩 분주하고 biotin-conjugated antibody를 50 μ l씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 37°C에서 반응시키고 washing buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 이를 다시 100 μ l의 streptavidin-HRP working solution을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 washing buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 100 μ l의

stabilized chromogen을 가하여 암소에서 30분간 방치한 후 100 μ 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 μ l씩 분주하였다. 이를 1시간 동안 실온에서 방치하고 washing 완충 용액으로 2회 세척한 다음, avidin-HRP conjugated antibody 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 다음 50 μ 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 10⁵ cells/well을 anti-CD28 1 μ g/ml, anti-CD3 1 μ g/ml 항체가 coating된 96-well plate에서 48시간 동안 배양한 후 배양액을 취하여 ELISA kit를 이용하여 IL-4, IFN- γ 를 측정하였다. 측정 방법은 혈청 내 사이토카인 및 면역 글로불린 측정 방법과 동일하다.

8) 배부 피부 조직에서 Quantitative real-time-PCR 측정

(1) NC/Nga 생쥐의 배부 피부조직에서 RNA 분리

NC/Nga 생쥐의 배부 피부조직을 적출하여 각각에 RNAzolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 homogenizer로 분쇄하였다. 이 조직분쇄 혼합부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15 초간 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 3 분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(2) Quantitative real time PCR

Quantitative real time PCR은 7500 Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다. Mouse Olionucleotid의 염기배열은 다음과 같다 (Table 2).

Table 2. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
GAPDH	Probe-VIC	5'-6-FAM-AACAGCCCAGAATAATG A A T A A A G T T C CTCAATGTGAC-TAMRA-3'
IL-5	Forward	5' AGCCTAACCCGTGTGGAGGT 3'
	Reverse	5' GTGATCGGCTTTTCTTGAGC 3'
IL-13	Forward	5' ATGCCCAACAAAGCAGAGAC 3'
	Reverse	5' TGAGAGAACCAGGGAGCTGT 3'

Cytokine 유전자 발현은 SYBR® Green PCR Master mix를 사용하였고, internal standard는 GAPDH로 Taqman probe를 사용하였으며, primer의 최종 농도는 200 nM이 되게 반응시켰다. IL-5와 IL-13 mRNA 유전자 발현량 분석은 배부 피부조직에서 cDNA를 합성하여 분석하였다. Quantitative real time PCR의 조건은 다음과 같다; 50°C에서 2분, 94°C에서 10분간 반응하여 pre-denaturation 시킨 뒤, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분간 반응하여 40회 반복 수행하였다. 실험약물 투여군의 대조군은 internal standard로 GAPDH를 사용하여 IL-5와 IL-13의 상대정량값 (RQ)을 측정하였다. RQ (relative quantitative)값은 아래와 같이 측정하였다.

$$y = x(1 + e)^n$$

x = starting quantity y = yield n = number of cycles
e = efficiency

9) 조직 검사

실험 종료 후에, 배부의 피부를 떼어내어 10% formaldehyde에서 24시간 고정하였다. 고정이 끝난 조직을 파라핀으로 포매하였고, 5 μm 두께로 block을 만들었다. 이를 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils / eosinophils 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline / eosin (H&E) 염색과 비만세포 (mast cells)를 염색하는 toluidine blue 염색을 실시하여 조직 내 비만세포의 침윤을 관찰하였다.

3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± 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 CYT와 CYTBH를 6주간 구강 투여하였다. Fig. 22 은 10주, 12주, 14주의 피부염 유발 정도와 개선 정도를 나타내주는 사진으로, CYT와 CYTBH 투여군이 대조군에 비해서 피부염 유발 정도가 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 ± 1.21, Dexa 투여군은 3.33 ± 1.03, CYT 투여군은 3.00 ± 0.89, CYTBH 투여군은 2.17 ± 0.75 로 대조군에 비해 모두 유의적인 (**p<0.01) 감소를 나타내었다 (Fig. 2).

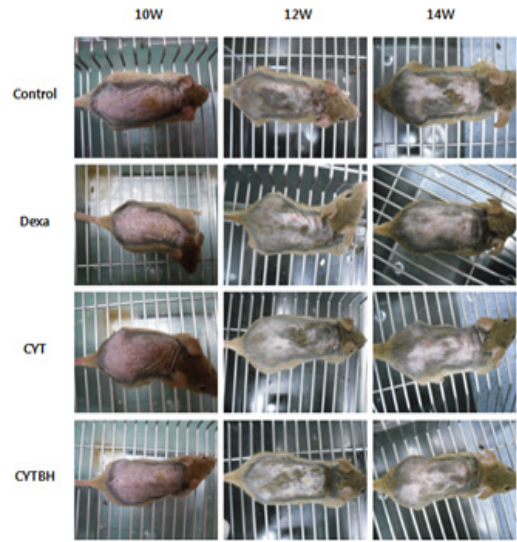


Fig. 1. Comparison of skin manifestation in NC/Nga mice between control and experimental group. Atopic dermatitis was induced by TNCB treatment in the dorsal skin.

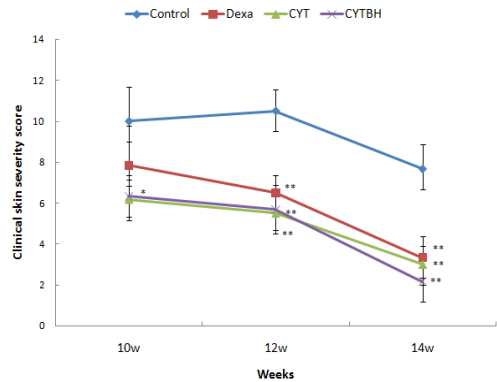


Fig. 2. Effects of CYT and CYTBH on clinical skin features and severity in TNCB-induced NC/Nga mice. Clinical skin index of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe) for each of five signs and symptoms (Erythema, rinitis & Dry 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 <0.05, ** p <0.01).

2. 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 나타내었고, Dexa 투여군은 35.55 \pm 5.15 (%), CYT 투여군은 53.90 \pm 5.40 (%), CYTBH 투여군은 29.90 \pm 4.30 (%)로 나타나 Dexa 투여군과 CYTBH 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 (** p <0.001) 감소하였다 (Fig. 3).

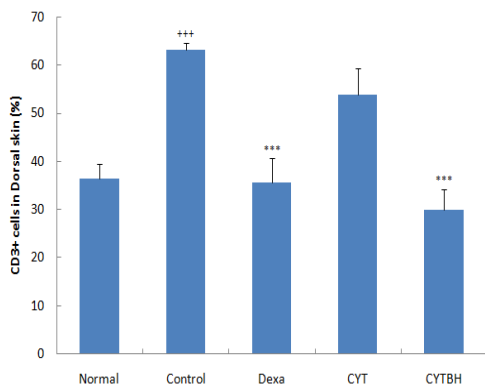


Fig. 3. Effects of CYT and CYTBH on CD3+ cell rate of dorsal skin in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of CYT and CYTBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from Dorsal skin stained with anti-CD3 and positively stained cells 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 <0.001).

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 있게 (+++ p <0.001) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은 23.75 \pm 1.65 (%), CYT 투여군은 30.60 \pm 0.50 (%), CYTBH 투여군은 21.55 \pm 2.85 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (** p <0.001, ** p <0.01) 감소하였다 (Fig. 4).

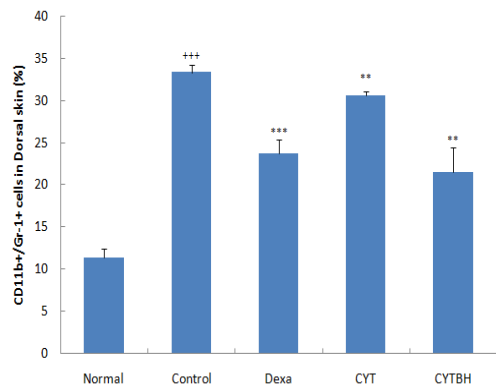


Fig. 4. Effects of CYT and CYTBH on CD11b+/Gr-1+ cell rate of dorsal skin in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of CYT and CYTBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from Dorsal skin stained with anti-CD11b and anti-Gr-1 and 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).

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

1) IL-4 생성량에 미치는 영향

정상군은 288.9 ± 39.4 (pg/ml), 대조군은 511.1 ± 13.6 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 285.6 ± 25.6 (pg/ml), CYT 투여군은 284.5 ± 17.6 (pg/ml), CYTBH 투여군은 388.9 ± 16.7 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.01, ***p<0.001) 감소하였다 (Fig. 5).

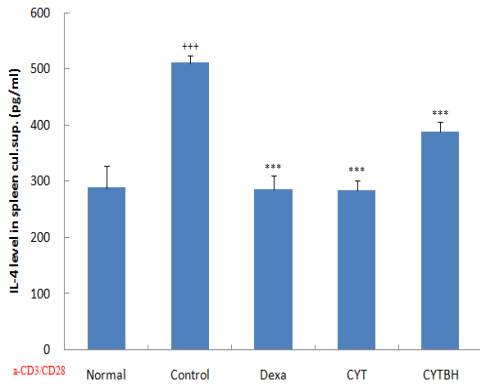


Fig. 5. Effects of CYT and CYTBH on the level of IL-4 in splenocytes of NC/Nga mice. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IL-4 in the culture supernatant were determined using commercially available ELISA kit. The results represent the mean ± 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) IFN-γ 생성량에 미치는 영향

정상군은 419.4 ± 58.7 (pg/ml), 대조군은 785.6 ± 9.9 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 355.1 ± 45.5 (pg/ml), CYT 투여군은 679.6 ± 69.3 (pg/ml), CYTBH 투여군은 683.9 ± 37.0 (pg/ml)로 나타나, Dexa 투여군과 CYTBH 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.01, ***p<0.001) 감소하였다 (Fig. 6).

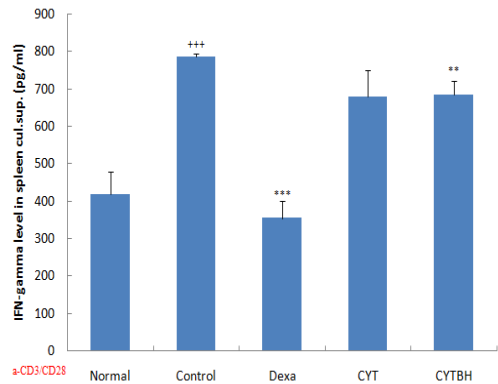


Fig. 6. Effects of CYT and CYTBH on the level of IFN-γ in splenocytes of NC/Nga mice. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IFN-γ in the culture supernatant were determined using commercially available ELISA kit. The results represent the mean ± 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).

4. 혈청 내 사이토카인 및 히스타민 생성량에 미치는 영향

1) IL-5 생성량에 미치는 영향

정상군은 54.0 ± 8.3 (pg/ml), 대조군은 168.3 ± 6.0 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의

성 있는 ($+++p<0.001$) 증가를 나타내었다. Dexamethasone 투여군은 138.7 ± 14.4 (pg/ml), CYT 투여군은 144.0 ± 6.4 (pg/ml), CYTBH 투여군은 138.1 ± 3.5 (pg/ml)로 나타나, CYT 투여군과 CYTBH 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 ($**p<0.01$, $***p<0.001$) 감소하였다 (Fig. 7).

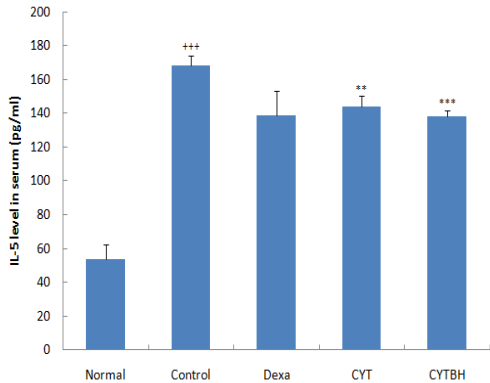


Fig. 7. Effects of CYT and CYTBH on the level of IL-5 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IL-5 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with 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 ($**p<0.01$, $***p<0.001$).

2) IL-13 생성량에 미치는 영향

정상군은 210.3 ± 5.0 (pg/ml), 대조군은 368.0 ± 22.2 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+++p<0.001$) 증가를 나타내었다. Dexamethasone 투여군은 292.6 ± 8.6 (pg/ml), CYT 투여군은 343.5 ± 38.9 (pg/ml), CYTBH 투여군은 266.6 ± 21.0 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 Dexamethasone 투여군과 CYTBH 투여군에서 유의성 있게 ($**p<0.01$) 감소하였다 (Fig. 8).

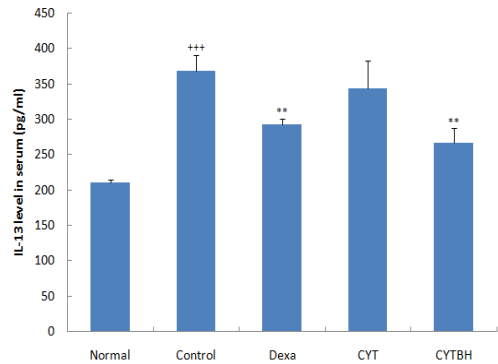


Fig. 8. Effects of CYT and CYTBH on the level of IL-13 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IL-13 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared 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 ($**p<0.01$).

3) IL-17 생성량에 미치는 영향

정상군은 235.0 ± 19.4 (pg/ml), 대조군은 719.0 ± 60.3 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+++p<0.001$) 증가를 나타내었다. Dexamethasone 투여군은 524.7 ± 68.5 (pg/ml), CYT 투여군은 601.3 ± 45.3 (pg/ml), CYTBH 투여군은 576.8 ± 89.7 (pg/ml)로 나타나, Dexamethasone 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 ($*p<0.05$) 감소하였다 (Fig. 9).

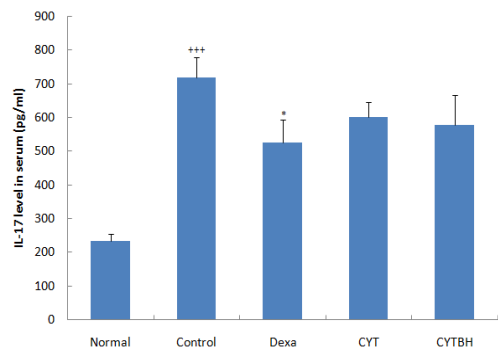


Fig. 9. Effects of CYT and CYTBH on the level of IL-17 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IL-17 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared 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).

4) Histamine 분비량에 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), CYT 투여군은 89.9 \pm 0.5 (ng/ml), CYTBH 투여군은 65.7 \pm 5.7 (ng/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 CYT 투여군과 CYTBH 투여군에서 유의성 있게 (**p<0.001) 감소하였다 (Fig. 10).

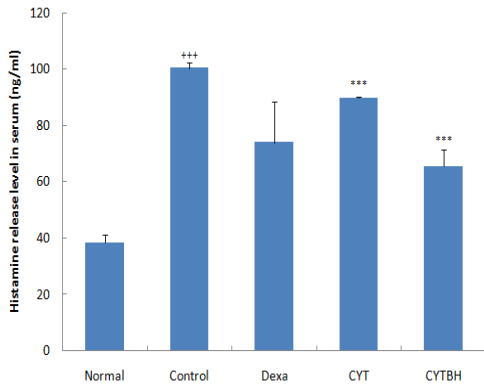


Fig. 10. Effects of CYT and CYTBH on the level of histamine in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of histamine were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was

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<0.001).

5. 피부에서의 사이토카인 mRNA 발현에 미치는 영향

1) IL-5 mRNA 발현에 미치는 영향

IL-5 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1.103 \pm 0.103일 때, 정상군은 0.673 \pm 0.076으로 나타나, 정상군에 비하여 유의성 있게 (+p<0.01) 증가하였다. Dexa 투여군은 0.797 \pm 0.049, CYT 투여군은 0.780 \pm 0.036, CYTBH 투여군은 0.724 \pm 0.046으로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.01) 감소하였다 (Fig. 11).

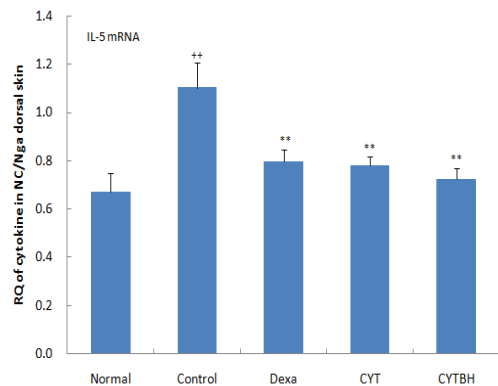


Fig. 11. Effects of CYT and CYTBH extract on the level of IL-5 mRNA in the dorsal skin of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Skin was obtained by biopsy and used for preparing total RNA. Isolated RNAs were analyzed by Real Time-PCR using gene specific oligomers. The results represent 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<0.01).

2) IL-13 mRNA 발현에 미치는 영향

IL-13 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1.060 ± 0.060일 때, 정상군은 0.809 ± 0.040으로 나타나, 정상군에 비하여 유의성 있게 (+ + p<0.01) 증가하였다. Dexa 투여군은 0.721 ± 0.027, CYT 투여군은 0.756 ± 0.090, CYTBH 투여군은 0.863 ± 0.038로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 (***p<0.001, **p<0.01) 감소하였다 (Fig. 12).

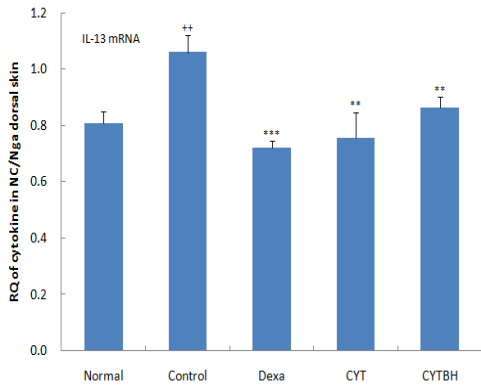


Fig. 12. Effects of CYT and CYTBH extract on the level of IL-13 mRNA in the dorsal skin of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Skin was obtained by biopsy and used for preparing total RNA. Isolated RNAs were analyzed by Real Time-PCR using gene specific oligomers. The results represent the mean ± 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).

6. 혈청 내 immunoglobulin 생성량에 미치는 영향

1) IgG1 생성량에 미치는 영향

정상군은 967.4 ± 28.6 (μg/ml), 대조군은 3040.0 ± 69.5 (μg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+ + + p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 2728.0 ± 71.1 (μg/ml), CYT 투여군은 2730.0 ± 94.1 (μg/ml), CYTBH 투여군은 2860.0 ± 49.9 (μg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.01, *p<0.05) 감소하였다 (Fig. 13)

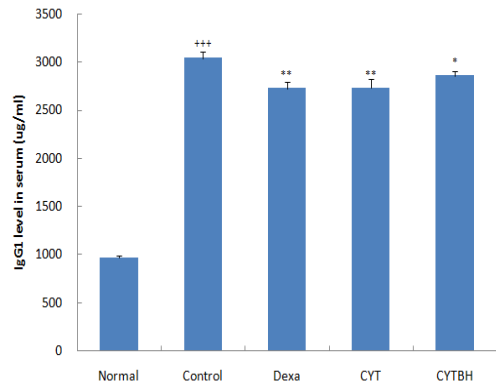


Fig. 13. Effects of CYT and CYTBH on the level of IgG1 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IgG1 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with 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) IgE 생성량에 미치는 영향

최종 14주에는 정상군이 473.5 ± 5.0 (ng/ml), 대조군은 505.7 ± 7.4 (ng/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+ + p<0.01) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 416.2 ± 14.6 (ng/ml), CYT 투여군은 493.1 ± 17.7 (ng/ml), CYTBH 투여군은 382.2 ± 31.8 (ng/ml)로 나타나, 대조

군에 비하여 Dexa 투여군과 CYTBH 투여군에서 유의성 있게 (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$) 감소하였다 (Fig. 14).

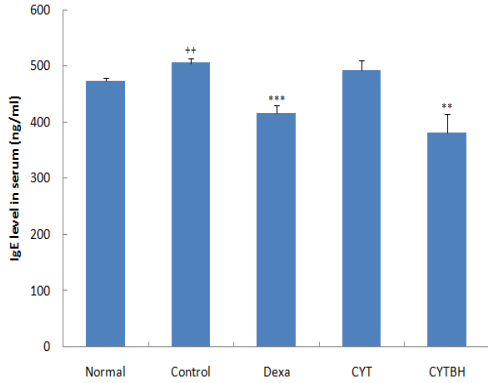


Fig. 14. Effects of CYT and CYTBH on the level of IgE in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IgE were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with 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 (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$).

7. 조직 변화에 미치는 영향

1) Hematoxylin and eosin 염색 변화

H&E 염색을 한 대조군의 배부 피부 조직은 정상군에 비하여 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, 백혈구의 침윤도 관찰된 반면 (Fig. 15B), Fig. 15C, 15D에서 나타난 바와 같이 CYT 투여군과 CYTBH 투여군은 epidermis와 dermis의 두께 및 백혈구의 침윤이 상대적으로 감소하였다. 그러나 CYT 투여군과 CYTBH 투여군과의 상대적인 비교에서는 큰 차이를 발견할 수 없었다 (Fig. 15C, 15D).

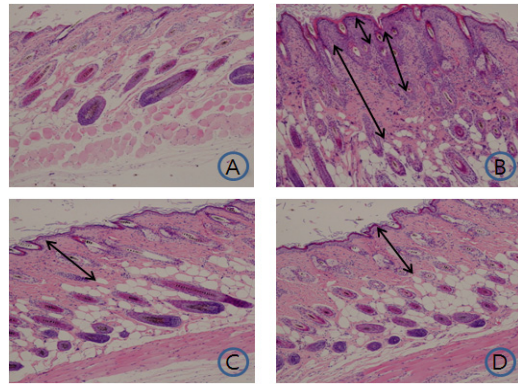


Fig. 15. Histologic examination of dorsal skin lesion in TNCB-induced NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of CYT for 6 weeks. Dorsal skin biopsies was stained with hematoxylin and eosin (H&E) (A; Normal, B; Control, C; CYT, D; CYTBH) for examining inflammatory cells. The stained tissues were observed by bright microscopy (Nikon, Japan, original magnification, x100).

2) Toluidine blue 염색 변화

세포질 내에 수많은 과립들의 존재는 비만세포를 구별하는 특징으로, 과립들은 황산화 글리코사미노글리칸인 히스타민을 포함하여 toluidine blue에 변색성을 나타내어 이를 확인하기 위하여 toluidine blue 염색을 실시하였다. 실험 종료 후 배부의 피부 일부를 채취하여 toluidine blue 염색을 한 결과 CYT 투여군과 CYTBH 투여군은 대조군에 비하여 비만세포의 침윤이 상대적으로 감소되었다 (Fig. 16C, 16D).

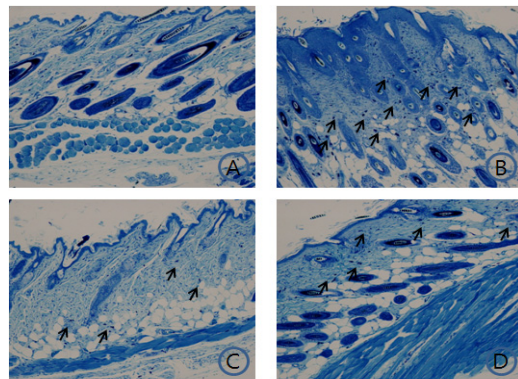


Fig. 16. Histologic examination of dorsal skin lesion in TNCB-induced NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of CYT for 6 weeks. Dorsal skin biopsies was stained with toluidine blue (A; Normal, B; Control, C; CYT, D; CYTBH) for examining mast cells. The stained tissues were observed by bright microscopy (Nikon, Japan, original magnification, x100).

IV. 考 察

최근 한약의 새로운 접근 방법으로 醱酵 한약이 주목을 받고 있으나 엄밀히 따지면 한약 醱酵는 이미 수치법의 일환으로 전통적으로 사용되어 왔다. 최근 한약 醱酵는 현대과학을 토대로 한약에 대한 연구가 활성화되면서, 한약의 약효를 개선하기 위한 방법의 하나로 제시되고 있다.

일례로 인삼의 대표적인 약효성분인 사포닌은 원함유 성분 그 자체로 흡수되는 성분은 거의 없으며, 소화관 서식 장내 세균총이 키프운드 K, 진세노사이드 Rh1 등으로 만들어 흡수되면 항암 작용, 항염증 작용 등의 약효를 나타낸다²⁷⁾. 주요 약리적 성분중 하나로 고가에 판매되고 있는 compound K도 *Thermus caldophilus* GK24 및 *Cladosporium fulvum* 균주로 醱酵시킴으로서 그 균이 분비하는 효소인 β -glucosidase 작용으로 ginsenosides Rb1, Rb2 및 Rc로부터 생성된다²⁸⁾. 대황 역시 세노사이드 A 등의 성분들이 소화관에서 장내 세균총의 도움을 받아 대사되어 레인안스톤(rhein-anthrone)이 되어 사하작용 등을 나타낸다²⁹⁾.

최근 醱酵 한약에 대한 연구로 김¹³⁾은 “한약의 효율성 개선을 위한 醱酵 한약의 유용성에 관한 연구”에서 醱酵라는 전통 기술과 효능성이 규명된 한약의 결합은 세계적인 경쟁력을 확보할 수 있으며, 이를 위해서는 다양한 방면에서의 개선점과 노력이 필요하다고 하였다. 또한 김¹⁴⁾은 “醱酵 한약의 연구 동향 연구”에서 醱酵 한약은 풍미, 약효, 안전성면에서 醱酵 전에 비하여 증가

되고, 부가적 효능이 증가한 경우도 있었으나, 보다 객관적 평가를 위해서는 醱酵 효소 추출 용매, 온도, 습도, 등의 醱酵 조건에 대한 연구가 선행되어야 함을 강조하였다.

단일 약물에 대한 연구로 손³⁰⁾은 버섯균사체로 醱酵시킨 茯苓과 厚朴의 항산화 및 항암 효과에서 자궁경부암세포와 대장암세포에서만 원재료인 茯苓과 厚朴이 醱酵 한약에 비하여 저해 활성이 높았을 뿐 모든 실험 부분에서 醱酵 한약이 보다 우수한 결과가 도출되었음을 보고하였으며, 정³¹⁾은 항균 활성이 우수한 黃蓮을 醱酵하여 항균, 항산화 활성, 세포독성 등에 대한 생리활성을 검색하고, 醱酵 후의 특성을 비교 분석하여 천연물 소재로서의 가능성을 검토한 바가 있다. 또한 이³²⁾는 “醱酵魚腥草 물추출물의 마우스 대식세포 항염활성 연구”에서 대식세포에 대하여 세포독성이 없으면서, LPS로 유발된 마우스 대식세포의 NO, IL-17, IP-10, Eotaxin 등의 생성을 유의성 있게 억제함을 증명하였다³³⁾.

최 등은 九蒸九爆 한약 혼합물 醱酵가 피부 노화에 미치는 영향에서 자우라디칼소거, 콜라겐생합성 촉진 효과 등에서 우수한 효능을 나타내어 효소화장품 원료로써 매우 유용성이 있음을 시사하였다. 박³⁴⁾은 “白芷와 醱酵白芷의 성분 및 항염 활성 비교”에서 COX-2 발현 및 iNOS 발현과 IL-3 발현에서 醱酵白芷 지용성 분획에서 가장 억제효과가 우수하였음을 검증하였다.

인체의 방어 기전인 면역체계는 T 세포의 활성화를 중심으로 이루어진다. 따라서 T 세포의 활성화에 관한 충분한 이해는 면역체계의 조절 과정을 파악하는데 도움이 되며, 많은 면역질환의 예방 및 치료제 개발의 자료가 되는데, T 세포(Naive CD4+ T cell)의 활성화는 T 세포 수용체 (TCR : T cell receptor)를 통한 매우 복잡한 신호 전달과정을 통하여 이루어지며, 이 과정에 참여하는 주요 인자는 수용체, 인산화 효소, adapter, effector, 전사조절인자 (transcription factor) 등이다³⁵⁾. 활성화된 CD4+ T세포는 보조 T세포(helper T cell, Th세포)로서 이들 Th세포

는 B세포의 항체 생산을 보조하고(Th2), 감염된 대식세포의 활성화를 돕는다(Th1). 이러한 작용은 직접 세포-세포 간 상호 결합에 의해서 또는 cytokine의 분비를 통해서 이루어진다³⁶⁾. Th 세포는 IL-2를 생산하고, 세포 주기의 G0 단계에서 G1단계로 들어가게 되어 세포 증식을 시작하게 되며³⁷⁾, 다음 단계는 분화(differentiation)로 세포의 기능이 결정 지워지는 단계이다. 즉, 활성화된 Th 세포는 그들이 분비하는 cytokine의 종류와 분비한 cytokine에 의한 면역 조절기능에 따라 Th1과 Th2, 두 종류의 효력 T세포(effector CD4+ T cell)로 분화하게 된다³⁸⁾. 이와는 달리 효력 Th2 세포는 IL-4, 5, 9, 10, 13 등과 같은 Th type 2 (anti-inflammatory cytokine)을 생산하여 기생충과 같은 extracellular parasite의 감염에 대항하고, B 세포와 함께 체액성 면역반응에 관여하는데³⁹⁾, 잘 알려져 있듯이 이들의 과다한 발현은 알레르기 질환을 초래 할 수 있다. 이처럼 Th1 세포가 생산하는 Th type 1 cytokine은 Th1 세포의 분화를 유도하는 반면 Th2 세포의 증식과 분화를 억제하며, 반대로 Th2 세포가 생산하는 Th type 2 cytokine은 Th2 세포의 증식과 분화를 유도하는 반면 Th1 세포의 분화를 억제하는 식으로 서로 상호견제를 통해 균형을 이루며 Th1과 Th2 면역반응을 조절하므로, 이 균형이 깨어지게 되면 Th1/Th2 불균형으로 인한 여러 가지 면역질환을 겪게 된다⁴⁰⁾. 알레르기 질환도 그 균형이 Th2 쪽으로 치우친 결과로 유발된 면역질환 중의 하나이다. 이렇듯 알레르기 발생과 조절에 있어 가장 중요한 세포는 Th2 세포로, 알레르기는 항체의 isotype을 IgM 또는 IgG에서 IgE로 바꾸어주는 Th2 세포가 활성화되면서 시작되며, Th2 세포가 생산하는 Th type 2 cytokine (IL-4, IL-5, IL-10)에 의해서 B 세포의 IgE 생산, 호산구의 활성화, 염증반응 등이 나타난다⁴¹⁾. 따라서 알레르기 질환이 Th1 세포와 Th2 세포의 균형이 깨어져 Th2 쪽으로 치우쳐서 유발되는 질환이라는 것에 근거해 볼 때, Th1 세포로의 분화를 주도하는 T-bet은 중요한 알레르기 반응조절제

로서의 역할을 수행하리라 생각되어 알레르기 치료제 개발에 있어 매우 흥미로운 대상으로 부각되고 있다⁴²⁾. 이와 같이 면역반응 제어에 있어서 Th 세포기능 조절의 중요성이 강조되고 있고, 특히 Th1/Th2 분화 및 cytokine의 균형과 알레르기 반응과의 밀접한 관계로 미루어 볼 때, 단순히 임상적 증상들을 완화시키는 일시적인 치료제 개발이 아닌, 보다 근본적인 요인에 초점을 맞춘 새로운 알레르기 치료제 개발이 Th 세포분화조절을 통하여 실현될 가능성이 있어, 앞으로 이 분야의 연구는 더욱 활성화 될 것으로 보인다.

아토피 피부염은 제1형 알레르기 반응기전에 의한 아토피 질환의 하나로 구분되면서도 다른 아토피 질환과는 달리 정확한 병인이 알려져 있지 않으며, 병인에 알레르기 기전이 얼마나 관여하는가에 대해서도 논란이 되고 있다. 아토피 피부염 환자의 약 80% 이상에서 혈청 IgE가 증가하는데, 대부분의 환자에서 음식물이나 대기 중 항원에 대한 특이 IgE 항체가 나타나고 즉시형 피부반응도 양성으로 나타나며, 일부 환자는 해당 음식물 섭취 후 피부염이 악화되며 호흡기를 통하여 대기 중 항원에 노출된 후 피부염이 악화되기도 한다. 그러나 검사소견에서 나타나는 특이 IgE 항체나 양성 피부반응의 대부분은 질환의 심한 정도, 범위와의 상관 관계와는 깊은 연관이 없다. 또한 아토피 피부염 환자는 세균, 바이러스, 진균 등의 피부감염이 정상인보다 흔하고, dinitrochlorobenzene (DNCB)과 같은 접촉성 항원에 대한 감각 기능이 저하되는 등 세포면역반응이 저하되어 있다⁴³⁾. 아토피성 피부염이 발병하면 피부의 과민반응과 소양증에 대한 역치의 감소로 인해서 피부를 긁게 되고, 긁는 자극과 염증반응은 피부의 각질 세포에서 cytokine을 분비시켜⁴⁴⁾ 염증 반응을 심화시키고, 각질층의 변형을 유도하며⁴⁵⁾, 면역세포를 활성화시킨다. 면역세포의 활성화는 IgE 생성증가와 항체 반응 증가를 유도하고 IgE 의존성 histamine 유리체의 활동성을 증가시켜 histamine분비를 촉진시킨다⁴⁶⁾. Histamine등은 호산구의 침윤을 유도하고⁴⁷⁾ 급성 과민반응과 소양감을 유발 한다⁴⁸⁾. 이와 같이

아토피 피부염은 종전까지는 IgE에 감각된 비만 세포가 histamine 등의 화학매체들을 분비시켜 부종, 붉은 반점 및 소양 등과 같은 증상들이 발생하는 것으로 설명해왔으나 이것만으로는 만성 염증 상태를 나타내는 이유와 아토피 피부염 환자에서 흔히 보는 세포매개성 면역기능의 저하를 충분히 설명할 수 없었다. 그렇지만 세포성 면역에서 중요한 위치를 차지하는 T림프절구 아형 또는 그와 관련된 cytokine이 면역체계에 관여한다는 사실이 규명된 다음부터는 이 부분에 대한 설명이 가능해졌고, 최근에는 세포면역을 담당하는 T세포 및 그 아형의 이상, 그로 인해 나타나는 cytokine의 불균형이 아토피 피부염을 일으키는 주요 기전이 된다고 설명하고 있다⁴⁹⁾.

본 실험에서는 NC/Nga 생쥐에 TNCB로 피부 발진을 유발시킨 후 清熱湯과 清熱湯醱酵方을 투여하여 피부 발진 및 활성화된 면역반응이 억제되는지를 관찰하였다. TNCB를 도포하지 않은 NC/Nga 생쥐보다 TNCB를 도포한 대조군 생쥐가 clinical skin score 값이나 혈청 IgE 수준이 증가되었고, 清熱湯과 清熱湯醱酵方의 투여군은 임상 증상이나 IgE 수준에 있어 상대적인 변화를 관찰할 수 있었으며, 특히 清熱湯醱酵方은 IgE 수준을 양성대조군과 더불어 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 2, 14). 혈청 중 IgG1 수치 측정에서도 정상군에 비하여 대조군에서 증가되었으나, 清熱湯과 清熱湯醱酵方 투여군에서는 모두 유의성 있게 감소함으로써 (Fig. 13), 清熱湯과 清熱湯醱酵方에 의해 B 세포의 항원에 대한 항체 생산의 분화가 억제됨을 추측할 수 있었다.

등 피부 조직에서 침윤된 염증세포 측정에서는 비만세포, 호산구 세포에서 발현되는 Gr-1+ 과 CD11b의 세포 비율은 清熱湯과 清熱湯醱酵方 투여로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소된 것을 관찰할 수 있었으며 (Fig. 4), CD3+ T세포의 세포 비율은 정상군에 비하여 대조군에서 현저하게 증가하였으나, 이 역시 清熱湯과 清熱湯醱酵方 투여군에서는 모두 감소하였으며, 清熱湯醱酵

方 투여군에서만 유의성있는 결과가 나타났다 (Fig. 3). 결과적으로 清熱湯과 清熱湯醱酵方에 의하여 Th2 세포와 호산구 세포, 호중구세포, 비만세포 들의 침윤이 억제될 수 있음을 알 수 있으며, Th1과 Th2 세포의 불균형으로 초래된 NC/Nga mouse에서 본 시료들에 의하여 면역 염증 반응이 억제되었음을 시사하고 있다.

쥐에서 CD4+ T 림프구는 활성화되었을 때 분비하는 림포카인의 종류에 따라 2가지로 분류된다. Th1 세포는 주로 IL-2와 IFN- γ 를 분비하고 지연형 과민반응을 매개한다. 반면에 Th2 세포는 주로 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13을 분비하고 제 1형 과민반응을 매개한다. IL-4는 B 세포에서 IgE의 생산을 유도하고, IL-5는 호산구증다증을 유발하며, IL-10은 지연형 과민반응을 억제한다고 알려져 있다. Th1과 Th2세포는 상호 작용을 통해 면역 균형을 유지하는데, 알레르기 환자들의 T 세포는 IFN- γ 를 생산하는 능력이 저하되어 있고, IL-4에 강한 반응성을 보여 Th2형 세포에 의한 면역반응이 우세한 것으로 알려져 있다. 그러나 피부발진이 일어난 아토피 질환에서는 만성이 되면 피부장벽 손상에 의한 2차 세균 (staphylococcus aureus) 감염이 일어나 IL-5 및 IFN- γ 에 의한 Th1 면역반응으로 IFN- γ 의 증가되는 양상을 나타낸다⁵⁰⁾.

NC/Nga mouse의 비장세포에서 mite와 anti-CD3/anti-CD28의 자극에 의하여 생산된 사이토카인에 대한 분석에서는 Th2 염증세포의 활성화로 분비량이 증가되는 IL-4와 Th1 cytokine을 유도하여 염증의 진행에 직접적인 영향을 미치는 IFN- γ 를 측정하였는데, 清熱湯과 清熱湯醱酵方 투여군에서 모두 대조군에 비해 감소하였으며 (Fig. 5, 6), 특히 清熱湯醱酵方 투여군은 모두 유의성 있는 감소를 나타내었다. 이 같은 결과는 NC/Nga mouse가 Th2의 면역질환 생쥐모델로, IL-4가 과잉으로 분비되어 IgE 생산이 촉진됨으로써 피부 발진을 심화시키는 기전을 나타낸다는 점에서 유의성 있는 결과로 보여진다.

아울러 혈청 중 IL-5, IL-13, IL-17의 수치는 정상군에 비하여 현저하게 증가된 대조군에 비하여 이 역시 淸熱湯과 淸熱湯醱酵方 투여군에서 모두 감소하였으며, 淸熱湯 투여군은 IL-5에, 淸熱湯醱酵方 투여군은 IL-5, IL-13에 각각 유의성 있는 결과를 나타내었다 (Fig. 7-9), 피부에서의 사이토카인 IL-5, IL-13의 mRNA 발현에서도 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내어 (Fig. 11, 12) 혈청의 결과와 부합되었다.

혈청내의 histamine 농도는 Fig. 10에 나타난 바와 같이 정상군에 비하여 2배 이상 증가된 대조군에 비하여 淸熱湯과 淸熱湯醱酵方 투여군 모두에서 통계학적으로 유의성 있게 감소하였으며, 양성대조군인 Dexa 투여군은 대조군에 비하여 현저히 감소하였으나 유의성은 없었다. 구성 약물 중 Kim 등은 황금 (*Scutellaria baicalensis*)에서 분리한 baicalein이 비만세포로부터 histamine의 유리를 억제하고, 그로 인한 혈관 확장이나 근육 수축반응들의 억제가 일어나 알레르기예 예방 효과가 있다고 보고한 바가 있다. 이 같은 결과는 IgE 결과 (Fig. 14)와 조직학적 변화에서 비만세포의 침윤 억제 결과 (Fig. 16)와 부합되어, 淸熱湯과 淸熱湯醱酵方 모두 IgE에 감작된 비만세포의 침윤을 억제하여 histamine 등의 화학매체들의 분비를 억제시킴으로써 다양한 임상 증상 발현을 억제한 것으로 사료된다.

NC/Nga 생쥐의 피부 조직의 변화에서는 피부의 erythema, hemorrhage, edema, excoriation, erosion 등의 변화가 억제되어 대조군에 비하여 epidermis의 두께가 현저하게 감소되었다 (Fig. 15). 그리고 등 피부 질환 조직에서 염증세포의 침윤, hypertrophy, hyperkeratosis가 감소하였으며, toluidine blue 염색으로 확인한 결과 비만세포 (mast cells)의 침윤도 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 16).

이상의 결과로 보아 淸熱湯과 淸熱湯醱酵方 모두 임상에서 나타나는 피부발진과 소양 등을 면역조절 반응을 통해 감소시켰지만, 특히 淸熱

湯醱酵方은 양성대조군과 비슷하게 IgE 생산을 감소시키는 결과를 나타내었다. 전체적으로 동물 실험에서 나타난 다양한 면역조절 인자에 대한 평가에서는 淸熱湯醱酵方이 淸熱湯 보다 더 효과적인 것으로 나타났다. 이 같은 결과가 발효에 의한 한약의 효율성 개선에 의한 것인지에 대하여서는 지표 성분 설정 후 PK (약물 동력학) 등의 연구를 통하여 밝히는 등 다각적이고 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

한약의 효율성 개선과 더불어 임상 활용을 위한 醱酵 한약의 효능 규명 일환으로 淸熱湯과 淸熱湯醱酵方の 항아토피 피부염 효능을 평가하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 淸熱湯과 淸熱湯醱酵方은 NC/Nga mouse 의 肉眼的인 皮膚 病變 評價에서 對照群에 비해 有意의으로 아토피피부염을 改善시킴으로써 임상지수를 모두 유의성 있게 감소시켰다.

2. 淸熱湯과 淸熱湯醱酵方은 배부 피부 내 CD3+, CD11b+ Gr-1+ 의 세포비율을 감소시켰으며, 이 중 淸熱湯은 CD11b+ Gr-1+ 에서, 淸熱湯醱酵方은 CD3+, CD11b+ Gr-1+ 모두에서 유의성 있게 감소시켰다.

3. 淸熱湯과 淸熱湯醱酵方은 CD3/CD28로活性化된 脾臟細胞에서 對照群에 비해 IL-4 生成量과 IFN- γ 生成量を 감소시켰으며, 淸熱湯醱酵方 투여군에서는 모두 유의성 있는 감소를 나타내었다.

4. 淸熱湯과 淸熱湯醱酵方은 血清 內 IL-5, IL-13, IL-17 생성량을 모두 감소시켰으며, 이 중 淸熱湯은 IL-5 생성량을, 淸熱湯醱酵方은 IL-5, IL-13 생성량을 유의성 있게 감소시켰다.

5. 淸熱湯과 淸熱湯醱酵方은 병소 피부 내

IL-5 mRNA, IL-13 mRNA 발현을 모두 유의성 있게 감소시켰다.

6. 清熱湯과 清熱湯醱酵方은 血清 內 면역글로불린인 IgG1, IgE 生成量を 감소시켰으며, 특히 清熱湯醱酵方은 IgG1, IgE 生成量 모두를 유의성 있게 감소시켰다.

7. 清熱湯과 清熱湯醱酵方은 histamine 분비량을 모두 유의성 있게 감소시켰다.

8. 清熱湯과 清熱湯醱酵方은 NC/Nga 생쥐의 피부 조직 내 erythema, hemorrhage, edema, excoriation, erosion 등의 역제를 통하여 epidermis의 두께를 감소시켰으며, 더불어 비만 세포의 침윤 역시 현저하게 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 清熱湯과 清熱湯醱酵方 모두 면역 조절작용을 통한 항아토피피부염 효능이 객관적으로 확인되었으며, 특히 동물 실험에서는 清熱湯醱酵方이 清熱湯보다 더 우수한 결과를 도출함으로써 향 후 발효를 통한 성분 변화나 흡수율의 차이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

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

参 考 文 獻

1. Martinez FD : Role of viral infections in the inception of asthma and allergies during childhood : Could they be protective? Thorax, 49:1189-91, 1994.
2. Woolcock AJ, Peat JK, Trevillon LM : Changing prevalence of allergies worldwide, Prog Allergy Clin Immunol, 3:167-71, 1995.

3. Von Mutius E, Martinez FD, Fritzsch C, Nicolai T, Reitmer P, Thiemann HH : Skin test reactivity and number of siblings. BMJ, 308:692-5, 1994.
4. William TS, David PH. The immune system. In : Elliott MJ, Charles ER, Elliot FE, N. FA, John WY, William WB, editors. Allergy. 4th ed. St. Louis : Mosby, pp.15-21, 1993.
5. Shaheen SD, Aaby P, Hall AJ, Barker DJP, Heyes CB, Shiell AW, et al. : Measles and atopy in Guinea-Bissau. Lancet, 347:1792-6, 1996.
6. Romanus V. The Swedish tuberculosis index 1991-94. Stockholm : The Swedish Institute for Infectious Disease Control and the Swedish Heart-Lung Foundation, 1996.
7. Lim KK, Su WPD, Schroeter AL, et al. : Cyclosporine in the treatment of dermatologic disease:an update. Mayo Clin Proc, pp.1182-1191, 1996.
8. 민영규. 消風散加減方과 外治方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. 동신대학교대학원, 2005.
9. 박민철. 柴胡清肝散 투여가 아토피 피부염을 유발한 동물모델의 각질층 기능 회복에 미치는 영향. 동국대학교대학원, 2004.
10. 권오성. 連翹敗毒散加味方이 DNCB로誘導된 생쥐의 Allergy性 接觸皮膚炎에 미치는 影響. 동국대학교대학원, 1997.
11. 김정진 외. 加味生科四物湯의 抗炎症 효과와 止痒膏의 아토피피부염 손상 및 止痒 효과에 미치는 영향. 대한동의병리학회지, 17(2):428-435, 2003.
12. 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.
13. 김상현. 한약의 효율성 개선을 위한 발효 한약 유용성에 관한 연구. 경기대학교대체

- 의학대학원, 2008.
14. 김용미. 발효한약의 연구동향 연구. 경원대학교대학원, 2009.
 15. 한화연. 金銀花의 항염증 作用에 관한 研究. 숙명여자대학교대학원, 1990.
 16. 배지현 외. 식중독 유발세균의 증식에 미치는 금은화 추출물의 항균효과. 한국식품과학회지, 37(4):642-647, 2005.
 17. 윤용갑 외. 금은화 수용성 추출물의 LPS 유도 염증매개물 억제 효과. 대한본초학회, 22(3):117-125, 2007.
 18. 최문석 외. 석고가미복합방이 Anti-CD40 과 rIL-4로 유도된 생쥐의 B 세포에서 싸이토카인 생성 및 면역글로블린 E에 미치는 효과. 13(2):131-146, 2004.
 19. 조은호 외. LPS에 의해 유발된 염증(炎症) 스트레스에 대한 황련(黃連)과 부자(附子)의 효과. 대한본초학회, 21(2):77-85, 2006.
 20. 윤광로 외. 황련의 항염증효과. 대한본초학회, 24(3):79-86, 2009.
 21. 양희정. 黃芩 발효 추출물이 면역에 미치는 영향. 경원대학교대학원, 2009.
 22. 이문조 외. 황금 열수추출물의 항산화 작용에 대한 연구. 생명과학회지, 10(3):236-240, 2000.
 23. 이문조 외. 황백 열수추출물의 항산화활성과 아질산염 소거작용에 관한 연구. 동의병리학회지, 13(1):112-118, 1999.
 24. 류용주 외. 치자추출물의 항균특성 및 안전성 검사. 농업생명과학연구, 38(4):11-19, 2004.
 25. 김정균 외. 천연한약재(목통, 삼릉, 치자) 추출물의 항산화효과 및 항균활성효과. 농업생명과학연구, 37(4):69-75, 2003.
 26. 백종천 외. 활성산소로 손상된 배양 NIH3T3 섬유모세포에 대한 현삼추출액의 항산화 효과. 한국인간·식물·환경학회지, 10(4):131-137, 2007.
 27. Yoshikawa K., S. Arihara, JD Wang, T. Narui and T. Okuyama. : Studies on absorption distribution, excretion and metabolism of Ginseng saponins. Comparison of the decomposition modes of ginsenoside Rb1 and Rb2 in the digestive tract of rats. Chem Pharm Bull, (39):1185-1188, 1991.
 28. Son, J. W., H. J. Kim, and D. K. Oh. : Ginsenoside Rd production from the major ginsenoside Rb(1) by beta-glucosidase from *Thermus caldophilus*. Biotechnol. Lett. 30:713-716, 2008.
 29. Mona Abdel Tawab, Ute Bahr, Michael Karas, Mario Wurglics and Manfred Schubert-Zsilavec. : DEGRADATION OF GINSENOSES IN HUMANS AFTER ORAL ADMINISTRATION. DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, (31): 1065-1071, 2003.
 30. 손미예. 버섯균사체로 발효시킨 복령과 후박의 항산화 및 항암효과. 식품산업과 영양, 12(2):51-57, 2007.
 31. 정운혜. 황련 발효추출물의 항균효과 및 항산화활성에 관한 연구. 중부대학교대학원, 2010.
 32. 이지영 외. 발효 魚腥草 물추출물의 마우스 대식세포 항염활성 연구. 대한본초학회지, 25(3):27-34, 2010.
 33. 최재환 외. 九蒸九炮 醱酵 韓藥 混合物이 皮膚 老化에 미치는 影響. 대한본초학회지, 24(4):101-106, 2009.
 34. 박경호. 白芷와 醱酵白芷의 성분 및 항염활성 비교. 경희대학교대학원, 2007.
 35. Akdis M, Akdis CA, Weigl L, Disch R, Blaser K : Skin-homing, CLA+ memory T cells are activated in atopic dermatitis and regulate IgE by an IL-13-dominated cytokine pattern: IgG4 counter-regulation by CLA- memory T cells, J

- Immunol. 159:4611-4619, 1997.
36. Foster PS, Martinez-Mozygemba M, Huston DP, Corry DB : Interleukin-4, -5, and -13 : emerging therapeutic targets in allergic disease, *Pharmacology & Therapeutics* 94:253-264, 2002.
 37. Friedlaender MH : The current and future therapy of allergic conjunctivitis, *Curr. Opin Ophthalmol.* 9:54-58, 1998.
 38. German JA, Harper MB : Environmental control of allergic disease, *Am. Fam. Physician* 66:421-426, 2002.
 39. Grogan JL, Locksley RN : T helper cell differentiation : on again, off again, *Current Opinion in Immunology* 14:366-372, 2002.
 40. nagaki N, Nagai H : Drugs for the treatment of allergic diseases, *J Pharmacol.* 86:275-280, 2001.
 41. Kay AB : Overview of allergy and allergic disease : with a view to the future, *Br. Med. Bull.* 56:843-864, 2000.
 42. Park LS, D. Friend, K. Grabstein, DL. Urdal : Characterization of the high-affinity cell-surface receptor for murine B-cell-stimulating factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:1669, 1987.
 43. Fujii Y, Takeuchi H, Sakuma S, Sengoku T, Takakura S. : Characterization of a 2,4-dinitrochlorobenzene-induced chronic dermatitis model in rats. *Skin Pharmacol Physiol.* 22(5):240-247, 2009.
 44. Ikezawa, Y., Nakazawa, M., Tamura, C., Takahashi, K., Minami, M. and Ikezawa, Z. : Cyclophosphamide decreases the number, percentage and the function of CD25+ CD4+ regulatory T cells, which suppress induction of contact hypersensitivity. *Journal of Dermatological Science.* 2005.
 45. Park, Y. M. : Advances in the pathophysiology of atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Respir Dis (Korea)*, 16, 2006.
 46. Budde, I. K., De Heer, P. G., Natter, S., Mahler, V., Zee, J. S., Valenta, R. and Alberse, R. C. : Studies on the association between immunoglobulin E autoreactivity and immunoglobulin E-dependent histamin-releasing factor. *Immunology.* 107, 2002.
 47. Sung, H. C., Lee, W. J., Lee, S. J. and Kim, D. W. : A study on the relationship of allergy-related laboratory findings with the clinical severity of atopic dermatitis. *Korean J. Dermatol.* 44, 2006.
 48. White, M. V. : The role of histamine in allergic disease. *J. Clinical Immunology,* 86, 1990.
 49. Novak N, Bieber T. : The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol,* 53(Suppl):S171-6, 2005.
 50. Donald Y.M. Leung : Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology,* 105:860-876, 2000.