

삼황세제 가미방 외용이 NC/Nga 마우스의 아토피 피부염에 대한 효과

황충연¹⁾ · 박민철¹⁾ · 홍석훈¹⁾ · 주현아¹⁾ · 조현우²⁾ · 정수영²⁾ · 조정희²⁾

¹⁾ 원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과학 교실

²⁾ 전라남도 한방산업진흥원

The External Use Effects of Samwhangsejegami Extract on Atopic dermatitis of NC/Nga mice

*Chung-Yeon Hwang · Min-Cheol Park · Seok-Hoon Hong · Hyun-A Joo · Hyun-Woo Cho ·
Soo-Young Jung · Jeong-Hee Cho*

Objectives : In this study, Samhwangsaejaegami extract was tested to prove its anti-atopic dermatitis effect on NC/Nga mice.

Methods : In order to evaluate the external use effects of Samhwangsaejae extract on anti-atopic dermatitis, the expression of filaggrin, serine palmitoyltransferase(SPT), and COX-2 were analyzed. In vivo study, clinical skin severity score, IgE, IL-4, IL-5 and IL-6 level were analyzed through NC/Nga atopic mice model after 12 weeks external treatment.

Results : In vitro study results showed the reduction in the expression of filaggrin, SPT, and COX-2. In vivo study results demonstrated the significant reduction in clinical skin severity score, IgE, IL-4, IL-5, IL-6 expression level.

Conclusions : These results showed Samhwangsaejaegami extract can be a promising candidate for anti-atopic dermatitis treatment.

Key words : Samhwangsaejaegami extract(SHSJGE), filaggrin, serine palmitoyltransferase(SPT), COX-2, IgE

1. 서 론

아토피 피부염은 주로 영유아기에 시작하는 가
려움을 동반하는 만성 재발성 습진질환으로 연령
에 따라 특징적인 병변의 분포와 양상을 보인다.

교신저자 : 황충연, 원광대학교 부속광주한방병원
안이비인후피부과학 교실(Tel : 062-670-6434,
E-mail : hwangida@wonkwang.ac.kr)
• 접수 2012/1/6 • 수정 2012/2/8 • 채택 2012/2/15

아토피 피부염의 임상 양상은 매우 다양하며 특이한 검사소견이 없어 임상양상을 종합한 한국인 아토피 피부염 진단 기준에 따라 진단한다¹⁾.

아토피 피부염은 전 세계적으로 증가 추세에 있는데 최근 우리나라에서도 알레르기 질환의 급증과 함께 증가하고 있으며 대개 유소아기에 발병하나 청소년, 성인에 서도 발병율이 증가하며 중증화되는 경향을 보이고 있다²⁾.

아토피 피부염은 비정상적인 피부혈관 반응이나 면역학적 반응을 동반하고 홍반, 부종, 심한 소양증, 삼출, 부스럼딱지와 인설을 특징으로 하는 염증성 피부질환이다^{3,4)}.

韓醫學에서는 아토피 피부염을 奶癬, 胎癬, 胎敏瘡 등으로 표현하였는데 隨代 巢⁵⁾는 《諸病源候論. 小兒雜病諸候. 癬候》에서 小兒의 面部에 癬皮가 甲錯되고 乾燥하게 되는 것을 乳癬이라 하여 嬰兒濕疹과 유사한 것으로 보았다. 清代 吳⁶⁾는 《醫宗金鑑. 外科心法要訣. 嬰兒部》에서 아토피 피부염에 대해 胎敏瘡이라 하고 그 중 嬰兒 頭面이나 눈썹 끝에 나타나는 것을 奶癬이라 하였는데 癢痒과 鱗屑이 있고 형태는 奶疥와도 같다 하였다. 이는 모두 胎中風熱이 원인이라 하였으며 증상에 따라 피부가 마른 풀과 같은 모양이면 乾敏, 粟粒狀으로 매우 가렵고 누른 진물이 온몸에 두루 있으면 濕敏이라 하였다⁷⁻¹⁰⁾.

아토피 피부염의 한의학적 원인으로는 風熱, 血熱, 血虛, 脾胃運化機能 失調에 의한 胎火濕熱, 風濕熱의 侵入 등을 들 수 있으며, 이외에도 기온의 변화, 음식물, 불규칙한 수유습관, 의복 마찰, 寒冷의 변화 등의 자극이 관여 된다. 주로 임신 중에 五辛炙燔를 섭취함으로써 아기에게 열이 전해져 생후에 風熱 邪氣를 감수하여 발생하거나 혹은 稟性不耐하여 脾胃不和하니 濕熱이 內生하여 발생한다고 하였다. 또한 이외에도 消化不良, 食物過敏, 衣服摩擦 등의 자극에 의해서도 발생된다고 보았다¹¹⁾.

아토피에 대한 한의학적 연구로 尹¹²⁾은 아토피 피부염 환자의 한의학적 임상분류에 대한 연구를 보고하였다. 단일 한약제에 대한 실험적 연구로는 金¹³⁾은 桑葉이, 韓¹⁴⁾은 牛蒡子가, 金¹⁵⁾은 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향을 보고 하였으며, 처방에 대한 연구로는 朴¹⁶⁾은 連翹散, 朴¹⁷⁾은 柴胡清肝湯을 시료로 면역조절 작용을 통한 항아토피 효과를 규명하였다. 삼황세제는 대황, 황백, 황금, 고삼으로 구성되어 있으며 清熱, 止痒, 收澁, 일체급성피부병 및 癰病, 紅腫, 癩痒, 出水者 등에 외용적으로 활용하는 경험방으로 중의외과학¹⁸⁾등에 소개되고 있다. 저자는 삼황세제에 금은화, 연교, 마치현을 가미하여 항아토피 효과를 규명하기 위하여 in vitro 실험으로 항염증, 피부 장벽강화 효과를 보았고, NC/Nga mice를 이용한 in vivo 실험에서 피부손상도 및 면역학적 인자를 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

(1) 동물

웅성(雄性) 6주령의 30 g 내외의 NC/Nga atopic mice를 중앙실험동물에서 공급받아 실험당일까지 고형사료와 물을 공급하고 실온 22±2℃, 상대습도 50~65%, 조도 200 lux(8시 점등, 20시 소등)를 계속 유지하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

(2) 약물

본 실험에 사용한 삼황세제 가미 추출물(SHSJGE)은 전라남도한방산업진흥원에서 추출 및 동결건조한 것을 공급받아 사용하였다. 처방내용과 구성은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of SHSJGE

Herbal Name	Scientific Name	Dose (g)
대 황	<i>Rhei Radix et Rhizoma</i>	120
황 금	<i>Scutellariae Radix</i>	120
황 백	<i>Phellodendri Cortex</i>	120
고 삼	<i>Scophorae Flavescentis Radix</i>	120
금은화	<i>Lonicerae Flos</i>	120
연 교	<i>Forsythiae Fructus</i>	120
마치현	<i>Portulaca olerscea</i>	120
Total Amount		840

(3) 시약 및 기기

① 시약

본 실험에 사용된 시약으로 diethyl pyrocarbonate (DEPC), NH₄Cl, KHCO₃, Na₂ EDTA, complete adjuvant, chloroform, collagenase IV, RPMI-1640, isopropanol, 적혈구용혈액(ACK lysis solution), ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), Dulbecco's minimum essential medium(DMEM), formaldehyde, magnesium chloride(MgCl₂), agarose 는 Sigma 사(U.S.A.) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Gibco BRL사(U.S.A.) 제품을, RNase inhibitor, Taq polymerase, random primer, dNTP, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase 는 promega 사(U.S.A.) 제품을, IL-4, 5, 6, IFN- γ 의 ELISA kit는 BD(U.S.A.)사 제품을, IgE, IgM, IgG1의 ELISA kit는 고마바이오텍(Korea) 제품을, RNAzolB는 invitrogen 사(Carlsbad, CA, U.S.A.) 제품을 사용하였고, 그 외 사용된 시약은 Duksan(korea)에서 구입하여 사용하였다.

② 기기

CO₂ incubator, deep-freezer(Sanyo Co., Japan), vortex, plate shaker, Clean bench, ELISA reader(bio TEK, U.S.A.), autoclave, water bath,

boiling water extractor, ice-maker(Vision scientific Co., Korea), micro pipet(Gilson, France), Gene Amp PCR system 2400(perkin Elmer, U.S.A.)를 사용하였다.

2. 방법

(1) 삼황세제가미방의 추출 및 농축

열수 추출은 삼황세제가미방 각 원료 120 g씩 840 g을 정칭하여 5배인 4.2L의 증류수로 3시간 동안 추출한 후 추출액을 다른 용기에 따라두고 다시 3.5L의 증류수를 가한 후 3시간 동안 추출한 후 여과하여 1차 따라 둔 추출액과 합쳐 농축시킨 후 동결 건조하여 150 g의 시료를 수득하여 실험에 사용하였다(수득률 18%).

알코올 추출은 삼황세제가미방 각 원료 120 g씩을 정칭하여 5L의 에탄올(EtOH)을 이용하여 3시간 동안 70°C로 2회 반복하여 추출한 후 여과하여 농축한 후 동결건조시켜 85 g 시료를 수득하여 사용하였다(수득률 10.5%).

(2) 세포주 배양

실험에 사용한 각질형성세포주(Human kerationocyte HaCaT cell line)는 DMEM 배지에 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-streptomycin(Gibco Co., U.S.A.)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하여 사용함. 세포를 75 mm plate에 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양하였다.

(3) 삼황세제 가미 추출물 cell 처리방법

시료 처리 전에 배지를 제거한 후 PBS 로 세척하여 배지 내 serum 성분을 제거한 다음 FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지를 넣어주었다. 시료는 열수 추출물과 EtOH 추출물이며 시료를 각각 DW로 1%의 추출물 stock을 만들어 최종 농도

가 0.01, 0.05, 0.1, 0.5%가 되도록 처리하여 CO₂ 배양기에 24시간 배양하였다. 대조군은 상기와 동일한 배지에서 시험 물질을 첨가하지 않은 상태로 배양한 것을 이용하였다.

(4) 세포 생존능력 시험(Cell viability test)

세포 생존능력 시험은 cell counting assay를 이용하여 진행하였다. 삼황세계 가미 추출물 시료를 처리하여 24시간 배양 후 처리된 배지와 시약을 제거하였다. 200 μ l의 TE(Trypsin-EDTA) buffer를 처리한 후 incubator에서 2-3분 동안 방치하였다. 1.8 ml의 PBS를 첨가한 후 세포를 plate에서 떨어뜨린 후 10 μ l의 Trypan blue와 10 μ l의 세포액을 잘 섞은 후 실온에서 3-4분 동안 반응시켰다. Hemacytometer에 cover glass를 올려놓은 후 hemacytometer와 cover glass사이의 틈에 반응물을 10 μ l 취하여 주입한 후 현미경을 이용하여 염색되지 않은 세포와 염색된 세포를 counting 하였다.

(5) Filaggrin 과 SPT

(serine palmitoyltransferase) 발현 분석

우선 Filaggrin의 발현을 평가하기 위하여 상기의 방법으로 배양 및 시험한 세포로부터 트리졸(Trizol, invitrogen CO., USA)을 이용하여 total RNA를 추출한 다음, one step RNA PCR kit(AMV)(Takara Bio Inc., Otsu, Japan)에서 제공되는 방법에 준하여 reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) 분석을 시행하였다. PCR amplification은 GeneAmp[®] PCR System 2700(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 94°C에서 30초 동안 denaturation을 시킨 후, 60°C에서 30초 동안 annealing을 하고, 72°C에서 75초 동안 extension이 되도록 하였다. 이때 amplification products는 filaggrin과 β -액틴(actin)이 각기 약 400bp와

300bp이다. 이때, 프라이머(primer)로는 filaggrindp 대한 프라이머(Bioneer Corp., Daejeon, Korea, 5'-GGTAGATAGATCTGGACACTCAGGG-3')를 사용하였으며, internal control으로는 β -액틴을 이용하여 발현량을 비교하였다. 또한 SPT의 발현을 분석하기 위하여 SPT의 mRNA level은 Dorfman과 Lichtenstein의 방법에 따라 RT-PCR로 분석하였다. 상기의 방법으로 배양 및 시험한 세포로부터 트리졸을 이용하여 total RNA를 추출하고, First strand cDNA synthesis kit (Fermentas, Hanover, MD, USA)에서 제공되는 방법에 준하여 cDNA를 합성하였다. RT PCR은 1 μ l template, 10 μ l PCR master mix(Qiagen, Valencia, CA, USA), 1 μ l β -actin과 7 μ l 증류수로 총 부피를 20 μ l로 한 PCR mix로 PCR을 수행 하였다. 그때의 조건은 denature(95°C, 15초), annealing, extension(60°C, 60초)으로 45cycle을 수행하였으며 mRNA의 양은 comparative CT method를 이용하여 각각의 template의 변이에 기인하는 증폭양을 normalization하였고, 또한 house keeping gene인 β -actin을 각 유전자의 기준으로 정하여 정량을 유도해 내었고, 대조시료에서의 각 유전자를 calibrator로 정하여 정량을 하였다.

(6) 삼황세계 가미 추출물 도포 및 염증 유발

아토피 피부염은 1-chloro 2,4-dinitrobenzene (DNCB)을 이용하여 유발하였다. 먼저 NC/Nga mice의 등 부위를 깨끗이 제모한 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 실험 4일 전 1% DNCB용액(acetone:olive oil=3:1) 200 μ l를 등 부위에 도포하고 실험 시작일 부터 종료일까지 12주간 일주일에 2번 0.2% DNCB용액 150 μ l를 등 부위에 도포하여 염증을 유발하였다.

NC/Nga mice 실험군은 삼황세계 추출물 각각

1%, 3%, 5%농도로 군을 나누었으며 NC/Nga mice 실험군 각각은 삼황세제 열수 추출물을 12주간 매일 오전 9시, 오후 5시에 등 부위를 충분히 적실 정도로 도포하였다. NC/Nga mice 대조군은 생리식염수를 추출물과 같은 용량, 용법으로 도포하였다.

(7) 피부 손상도 측정

NC/Nga mice의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하였다. 육안평가 결과는 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타내었으며 평가항목은 홍반(erythema), 가려움과 건조피부(Pruritus & Dry Skin), 부종과 혈종(Edema & Excoriation), 미란(Erosion), 그리고 태선화(Lichenification)로 나누어졌다. 이 각각의 항목은 없음(0), 약함(1), 중증도(2), 심함(3)으로 나누어서 채점하였다.

(8) 혈청내 IgE 정량화

혈청내 IgE 량은 2주, 3주, 5주, 8주, 12주에 생쥐의 눈에서 capillary tube를 이용하여 약 100 μ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기로 혈청을 분리하여 IgE 량을 ELISA kit로 측정하였다.

(9) 혈청내 IL-4, 5, 6 정량화

SHSJGE 도포 12주 후 NC/Nga 생쥐를 ethyl ether로 마취한 후 심장 천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리한 후 혈청 중 IL-4, 5, 6량을 ELISA kit로 정량하였다.

3. 통계 처리

통계학적 유의성 검정은 one-way ANOVA (Analysis of Variance) 방법을 사용하였으며, 유의수준 $p < 0.01$ 의 범위내에서 그 결과들은 평균에 대한 표준 편차로 나타내었습니다.

III. 결과 및 고찰

1. 삼황세제 가미 추출물의 In vitro 검사

(1) 세포 생존능력(Cell Viability) 분석

삼황세제 가미 추출물이 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 두 가지 추출물을 농도를 다르게 처리하여 세포의 생존능력을 확인하였다. H₂O와 EtOH을 이용하여 추출한 추출물을 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5%를 처리하였을 때 세포 생존능력을 분석한 결과, Fig. 1과 같이 H₂O로 추출한 추출물은 농도가 증가하여도 세포가 사멸되지 않고 잘 살아 있는 것을 확인하였다. 가장 높은 농도인 0.5%인 경우에만 약 10%정도 생존력이 감소하는 것을 확인하였다.

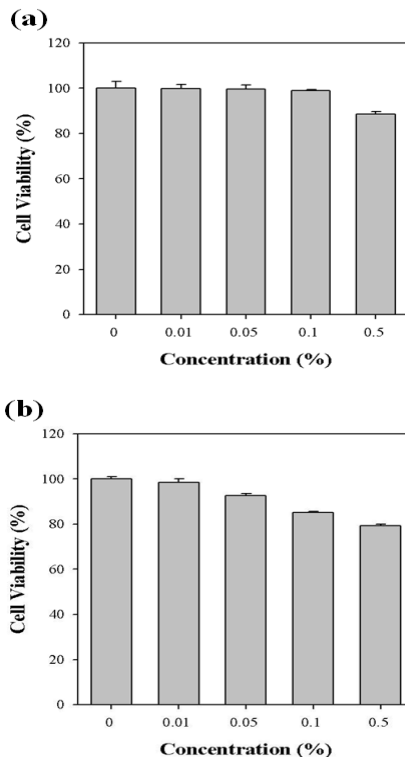


Fig. 1. Effect of Samwhangsejegami extracts on cell viability [(a) H₂O extract, (b) EtOH extract]

EtOH을 이용한 삼황세제 가미 추출물의 경우에는 추출물의 농도가 증가할수록 세포의 생존력이 조금씩 감소하는 경향을 보였으며, 가장 높은 농도인 0.5%에서는 약 20%정도 생존력이 감소하였으나 세포의 성장에 많은 영향을 주지 않음을 확인하였다(Fig. 1).

(2) 추출물이 피부 장벽 조절 인자에 미치는 영향

삼황세제 가미 추출물이 피부 장벽 기능 조절인자에 미치는 영향을 알아보기 위해서 filaggrin과 SPT의 발현량을 reverse transcriptase PCR로 분석하였다.

Fig. 2에서 알 수 있는 바와 같이, H₂O를 이용한 추출물을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5%로 처리하였을 때에 농도 의존적으로 filaggrin의 발현양이 증가되는 것을 확인할 수 있었으며 이로부터 H₂O를 이용한 추출물은 0.01-0.05%의 비교적 낮은 농도로 처리하였을 때에도 효능을 나타내었으며 농도가 높아질수록 많이 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 SPT의 발현양 역시 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였고 이 또한 0.5%로의 높은 농도에서 발현양이 가장 높은 것을 확인하였다.

H₂O 추출물 뿐만 아니라 EtOH 추출물을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5%로 처리하였을 때 역시 농도 의존적으로 filaggrin과 SPT의 발현양이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 EtOH 추출물의 경우에는 H₂O 추출물에 비하여 cell viability가 약 10% 정도 떨어지긴 하지만, 추출물로 인한 피부 장벽 조절인자의 발현 양상에는 좋은 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

(3) 피부 항염증 반응 인자에 미치는 영향

삼황세제 가미 추출물이 피부 항염증 반응 인자에 미치는 영향을 알아보기 위해서 COX-2의 발현과 AP-1의 발현을 western blotting으로 분석하였다.

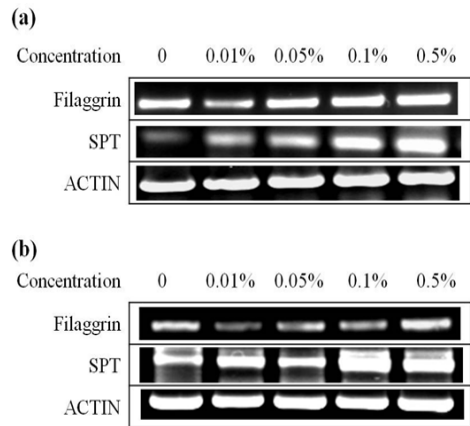


Fig. 2. Effect of extracts on skin barrier factor expression [(a) H₂O extract, (b) EtOH extract]

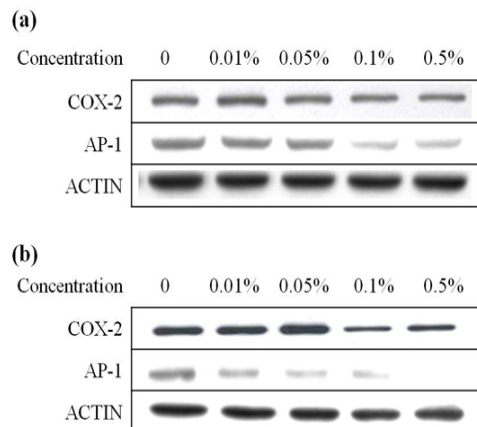


Fig. 3. Effect of extracts on inflammation factors expression [(a) H₂O extract, (b) EtOH extract]

Fig. 3에서 알 수 있는 바와 같이, H₂O 추출물을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5%로 처리하였을 때에 농도 의존적으로 COX-2의 발현이 약간 감소함을 확인하였고, AP-1 역시 농도가 증가함에 따라 그 발현양이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 EtOH 추출물의 경우에도 0.01, 0.05, 0.1, 0.5%로 처리하였을 때에 농도 의존적으로 COX-2의 발현이 감소하는 것을 확인하였고 H₂O 추출물의 경우에 비해서 더 많이 감소하는 것을 확인하였으며, AP-1도 농도가 증가함에 따라 확연히 감소하는 것을 확인할

수 있었다. 이와 같은 결과로 삼황세제 가미 추출물은 피부 장벽 조절인자인 *filaggrin*과 *SPT*의 양을 증가시켜 줌으로써 피부의 수분 유지 기능을 유지시켜주는 기능을 강화함과 동시에 추출물이 피부 항염증 반응 인자를 증가시켜 피부의 염증을 유발을 억제 할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 3).

2. 삼황세제 가미 추출물의 *in vivo* 동물 실험을 통한 항아토피 효능 검증

(1) 피부 손상도에 미치는 영향

염증 유발된 NC/Nga mice는 모든 군에서 1주부터 피부발진이 나타났으며 2주에 피부발진이 선명하게 보였다. Fig. 4와 같이 처리군에서는 3주 이후로 추출물 도포에 의해 피부발진이 조금씩 회복되어 감을 파악할 수 있었다. 5주 이후로 제모를 하여 자세한 피부발진들을 확인 시 의견상 대조군에 비해 추출물 도포군에서 상당히 많이 완화됨을 확인 할 수 있었고 특히 삼황세제 추출물의

농도가 높아짐에 따라 피부발진 회복력은 더욱 뛰어났다. Fig. 5와 같이 피부손상정도지표(Clinical skin severity score) 역시 대조군 9.8 보다 추출물 처리군(1%, 3%, 5%) 모두 5.1, 4.5, 4.1로 감소함을 볼 수 있었다. 8주 및 12주에는 대조군의 피부 손상정도가 더욱 심해지는 반면(8주 12.2, 12주 13.5) 추출물은 거의 피부발진 및 손상정도가 정상으로 회복(12주; 1% 3.2, 3% 2.4, 5% 1.4)되어 추출물의 아토피 유발에 의한 피부손상에 효과가 우수함을 확인 할 수 있었다.

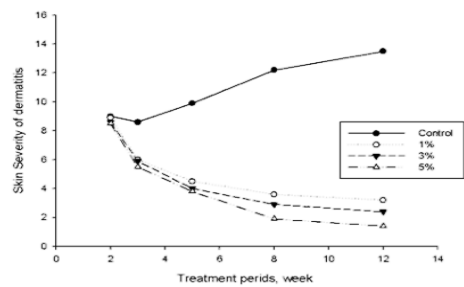


Fig. 5. Clinical skin severity of dermatitis in NC/Nga mice.

삼황세제 농도	아토피 유발	5 weeks	8 weeks	12 weeks
1%				
3%				
5%				

Fig. 4. Clinical skin features of dermatitis in NC/Nga atopy dermatitis model mice.

(2) 혈청 중 IgE 발현에 미치는 영향

혈청 중 IgE 생성량은 아토피 유발 대조군은 DNCB 투여 후, 0주와 2주 에서 3.90 ± 0.80 , 365.00 ± 4.54 ng/ml 로 측정되었으며, 추출물 처리군은 1%에서 각각 5.2 ± 0.42 , 375.60 ± 15.20 ng/ml, 3%에서 각각 4.5 ± 0.54 , 385.10 ± 12.10 ng/ml, 5%에서 각각 5.9 ± 0.64 , 368.20 ± 11.40 ng/ml 로 측정되었다.

DNCB 투여 후, 3주에서는 대조군은 각각 389.20 ± 11.50 , 추출물 처리군 1%에서는 315.00 ± 11.80 ng/ml 로 나타났고, 3%에서는 258.00 ± 18.10 ng/ml 로 나타났고, 5%에서는 245.00 ± 13.80 ng/ml 로 나타나 3주후부터 추출물 처리군에서 IgE가 유의성 있게 감소하기 시작함을 알 수 있었으며 8주와 12주 추출물 처리군 1%에서는 125.00 ± 15.60 ng/ml, 3%에서는 105.00 ± 11.35 , 5%에서는 85.00 ± 9.15 로 측정되어 모두 대조군에 비하여 유의성 있게(p < 0.01) 감소했다 추출물 처리군은 농도 의존적으로 IgE가 유의성 있게 감소함을 알 수 있었다(Fig. 6).

(3) 혈청 중 IL-4, IL-5, IL-6 발현에 미치는 영향

IL-4 수준은 최종 12주령에서 아토피 유발 대조군은 60.55 ± 4.12 pg/ml, 추출물 처리군은 1%에서

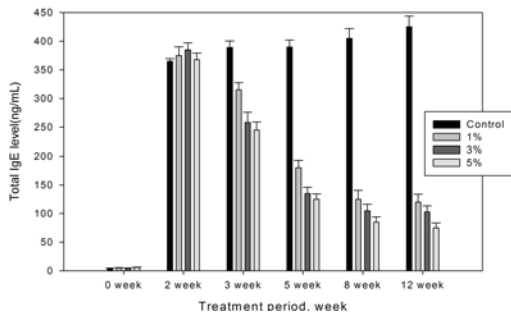


Fig. 6. Serum IgE level in NC/Nga atopy dermatitis model mice

45.35 ± 2.798 pg/ml, 3%에서 33.32 ± 3.51 pg/ml, 5%에서는 23.41 ± 3.11 pg/ml로 나타나 대조군에

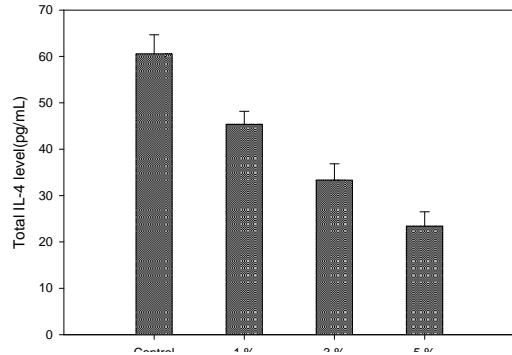


Fig. 7. Serum IL-4 level after treatment of dermatitis in NC/Nga mice.

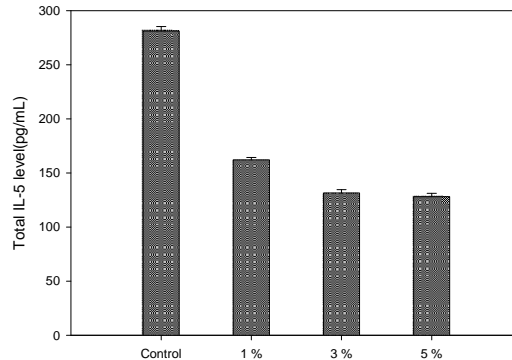


Fig. 8. Serum IL-5 level after treatment of dermatitis in NC/Nga mice.

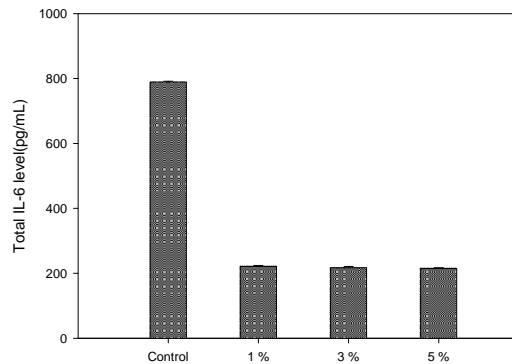


Fig. 9. Serum IL-6 level after treatment of dermatitis in NC/Nga mice.

비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타내었으며 추출물의 농도가 증가할수록 IL-4 감소량은 증가하였다(Fig. 7).

IL-5 수준은 최종 12주령에서 아토피 유발 대조군은 281.21 ± 4.12 pg/ml, 추출물 처리군은 1%에서 162.15 ± 2.25 pg/ml, 3%에서 131.54 ± 3.11 pg/ml, 5%에서는 128.11 ± 3.11 pg/ml로 나타나 IL-4 수준과 마찬가지로 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타내었으며 추출물의 농도가 증가할수록 IL-4 감소량 역시 증가하였다(Fig. 8).

IL-6 수준 또한 IL-4와 IL-5와 유사한 경향을 보였는데 최종 12주령에서 아토피 유발 대조군은 789.32 ± 2.15 pg/ml, 추출물 처리군은 1%에서 221.21 ± 3.21 pg/ml, 3%에서 217.25 ± 4.14 pg/ml, 5%에서는 215.22 ± 2.56 pg/ml로 나타나 아토피 유발 대조군에 비해 삼황세제 가미 추출물 처리군에서 급격한 감소를 보였다(Fig. 9).

실험동물인 NC/Nga 생쥐는 일반적인 환경에서 사람의 아토피 피부염과 매우 유사한 증상인 가려움, 심한 피부염증, 血腫, 체중 감소를 나타내는 실험동물 모델로 air-uncontrolled 상황(conventional NC/Nga mice)에서 12주 이후 혈청 중 IgE 수준이 정상의 100배 까지 기록되고 아토피성 피부염의 피부 장애가 동반 된다¹⁹⁾. 아토피 피부염은 IgE와 연관된 면역 기전에 의해 발생되는데, B 세포로부터 IgE의 생성을 유도하는 IL-4²⁰⁾, IgE의 생성을 촉진하는 IL-5²¹⁾, IgE의 생성을 증폭시키는 IL-6²²⁾ 등과 같은 면역인자와 깊은 관련이 있다. 아토피 피부염 환자들의 80% 이상에서 혈청 IgE의 수치가 증가되어 있으며²⁰⁻²³⁾, 이 수치는 대체적으로 아토피 피부염의 임상적 중증도와 비례하는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 삼황세제 가미 추출물을 이용한 아토피 유발 모델인 NC/Nga mice에 대해 아토피 유발 억제능을 검증한 것으로, 삼황세제 가미 추출물을 아토피 유발후부터 매일 2회 분무를 12주간 실험

시하였다. 실험결과 아토피 유발 대조군에 비하여 삼황세제 가미 추출물 도포군에서 현저한 피부손상정도지표(Clinical skin severity score) 감소를 나타냈다.

삼황세제 가미 추출물을 분무한 NC/Nga mice의 혈액에서 IgE 수치는 아토피 유발 대조군에 비하여 유의성 있게($p < 0.01$) 감소를 나타내었고, 혈중 IL-4, IL-5, IL-6 수치 역시 삼황세제 가미 추출물 도포군에서 모두 아토피 유발 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타냄으로써, 삼황세제 가미 추출물이 B 세포 분화에 수반되는 IgE, IL-6 발현과 Th2에서 분비되는 IL-4, IL-5 발현을 억제함을 확인하였다.

결과적으로 삼황세제 가미 추출물이 Th2 세포를 억제함으로써 IL-4과 IL-5 등의 염증 관련 사이토카인 생성을 억제하고 이로 인해 IgE 생성 역시 억제됨으로써 동물실험에서 나타난 바와 같은 유의성 있는 결과가 도출된 것으로 사료된다.

IV. 결 론

삼황세제 가미 추출물의 항 아토피 효능을 검증하기 위하여 HaCaT cell에서 in vitro 실험과 NC/Nga mice에서 in vivo 실험을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 열수 추출물은 농도가 증가하여도 세포가 사멸되지 않고 잘 살아있으나 가장 높은 농도인 0.5%인 경우에만 약 10%정도 생존력이 감소하였다. EtOH 추출물은 추출물의 농도가 증가할수록 세포의 생존력이 조금씩 감소하는 경향을 보였으며, 가장 높은 농도인 0.5%에서는 약 20%정도 생존력이 감소하였다.
2. 삼황세제 가미 추출물 농도 의존적으로 filaggrin과 SPT의 발현량이 증가되어 삼황

- 세계 가미 추출물로 인한 피부 장벽 조절인자의 발현 양상에는 좋은 영향을 미치는 것을 확인하였다.
3. COX-2의 발현과 COX-2의 transcription factor중 하나인 AP-1의 발현이 추출물 농도 의존적으로 발현량이 감소하였다.
 4. 삼황세계 가미 추출물 도포군에서 피부손상 정도지표(Clinical skin severity score)아토피 유발 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 보였다
 5. 혈중 IgE, IL-4, IL-5, IL-6 수치 모두 아토피 유발 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 확인하여 삼황세계추출물이 Th2 세포를 억제함으로써 IL-4과 IL-5 등의 염증 관련 사이토카인 생성을 억제하고 이로 인해 IgE 생성 역시 억제함으로써 항아토피 효과를 나타냄을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 2010-2011년 보건복지부의 연구비지원에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

1. 대한피부과학회. 교과서편찬위원회편저. 제5판 피부과학. 서울:여문각. 2008:170.
2. 손정민, 김희택, 홍승욱. 제천 지역 소재 초등 학교 학생들의 아토피 피부염에 대한 설문조사 연구. 한방안이비인후피부과 학회지. 2009; 22(2):163-75.
3. 피부과학 원색도감 편찬위원회 편. 피부과학 원색도감. 서울:도서출판 정담. 1999:54-63.
4. 김정원. 아토피 피부염. 대한 한의사협회지. 1996;39(7):851-6.
5. 巢元方 編著. 巢氏諸病源候論. 大星文化社. 1992:251-3.
6. 吳謙. 醫宗金鑑(下). 北京:人民衛生出版社. 1982: 443.
7. 葛洪. 肘後備急方(四庫全書). 大星文化社. 1995: 478-9, 734.
8. 孫思邈. 備急千金要方. 大星文化社. 1989:408-9.
9. 龔廷賢. 增補萬病回春(下卷). 台北:大中國圖書公司. 1967:83.
10. 洪元植. 中國醫學史. 서울:東洋醫學研究院. 1984: 259.
11. 박민철, 김진만, 홍철희. 아토피 피부염의 동서의학적 문헌 고찰. 대한안이비인후피부과학회지. 2002;15(1):226-52.
12. 윤화정, 고우신. 아토피 피부염 환자의 韓醫學的인 臨床 類型分類에 대한 연구. 대한한의학회지. 2001;22(2):10-21.
13. 김기훈, 이진용, 김덕곤. 桑葉이 아토피 피부염에 미치는 영향. 경희의대 논문집. 2004;20(1): 37-45.
14. 한규철, 이진용, 김덕곤. 牛蒡子가 아토피 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2004; 18(2):107-17.
15. 김시혜, 정혁상, 조백건, 이진용, 김덕곤. 자초가 아토피 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2004;18(1):63-75.
16. 김윤희, 박지수, 강탁림. 연교산이 아토피 동물 모델에 미치는 영향. 동의생리학회지. 2006; 20(1):58-64.
17. 박민철, 최인화. 시호청간산 투여가 아토피 피부염을 유발한 동물모델의 각질층 기능회복에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2004;25(3): 137-48.
18. 고백강. 중의외과학. 북경:인민위생출판사. 1987: 469.
19. Masahiro Matsumoyo, Chisei Ra, Keiko

- Kawamoto, Hiroaki Sato, Atsuko Itakura, Junko Sawanda, Hiroko Ushio, Hajime Suto, Kouichi Mitsuishi, Yosiaki Hikasa, and Hiroshi Matsuda, IgE Hyperproduction Through Enhanced Tyrosine Phosphorylation of Janus Kinase 3 in NC/Nga Mice, a Model for Human Atopic Dermatitis, *The Journal of Immunology*, 1999;162:1056-63.
20. Renz, H, K Jujo, K. L. Bradley, J Domenico, E. W. Gelfand, and D. Y. M. Leung. Enhanced IL-4 Production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon- γ , *J. Invest. Dermatol*, 1992;99:403.
21. Kay, A B., S. Ying, V. Vamey, M. Gaga, S. R Durham, R. Moqbel, A. J. Wardlaw, and Q. Hamid, Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3(IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects, *J. Exp. Med*, 1991:173-5.
22. Nobuyuki Sudo, Xiao-Nian Yu, Chiharu Kubo. Dehydroepiandrosterone attenuates the spontaneous elevation of serum IgE level in NC/Nga mice, *Immunology Letters*, 2001;79:177-9.
23. Matsumoto M, Ra C, Kawamoto K, Sato H, Itakura A, Sawada J. IgE hypertention through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis, *J. Immunol*, 1999;162:1056-63.