

清肌消毒湯이 아토피피부염 염증 관련 인자에 미치는 영향

김혜림¹ · 김선빈² · 윤미영³ · 이기무⁴ · 김동희^{1*}

Effect of CST on atopic dermatitis related inflammatory cytokines

Kim Hye-Rim¹ · Gim Seon-Bin² · Yun Mi-Young³ · Lee Ki-Moo⁴ · Kim Dong-Hee^{1*}

¹Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

²Traditional and Biomedical Research Center(TBRC), Daejeon University

³Dept. of beauty science, Kwangju Women's University

⁴Doori Cosmetics

In vitro tests were performed using CST to investigate its role on oxidative damages and inflammatory cytokines. 90% or higher cell viability was observed in CST treated groups from 25 to 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ using Raw 264.7 cells. CST showed dose-dependent DPPH scavenging activity, with 91.3% and 92.2% scavenging activities at 400 and 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations, respectively. CST showed dose-dependent suppression activity of ROS production, especially at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 41.3%. CST decreased NO production activity, with significant decrease of 16.2% and 33.5% at 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations, respectively. IL-1 β , IL-6, MCP-1 production rate were significantly decreased by 30.0%, 27.2%, 22.1% when Raw 264.7 cells were treated with LPS and with CST of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Also, TNF- α production rate was decreased by 28.6%. The results above indicated therapeutic effect of CST on the AD through anti-oxidative and immune modulatory effect. Various blending of drug substances with CST should be clinically tested.

Key words : CST(Chunggisodoktang), atopic dermatitis, oxidative damages, inflammation

I. 서론

아토피피부염(AD)은 심한 소양감을 동반하는 만성 재발성 피부 염증 질환으로, 기관지 천식, 알레르기성 비염으로 이어질 수 있는 알레르기 질환군으로 인식되고 있다^{1,2)}.

발병 원인으로는 유전, 면역 및 환경적 요인 등

으로 인한 피부 장벽기능의 이상이 주 요인으로 제시되고 있으며²⁾, 그 밖에 감염, 모유 수유 감소, 생활방식의 서구화, 정서적 요인 등이 있다^{1,3)}. 특히 최근 환경오염과 정신적 스트레스 등이 심해지면서 전 세계적으로 유병률이 증가하고 있으며, 국내에서는 소아는 10-20%, 성인은 2-4%의 유병률을 보인다⁴⁾.

이에 대한 일반적 치료방법으로는 스테로이드 제, cyclosporin과 국소 cal- cineurin inhibitor, 항히스타민제, 자외선 치료 등이 시도되고 있으나²⁾, 치료 효과와 더불어 다양한 부작용 및 후유

* 교신저자 : 김동희, 대전대 한의과대학 병리학교실
투고일 : 2011년 12월23일 수정일 : 2012년1월31일
확정일 : 2012년 2월10일

증¹⁵⁾이 발현되어 보다 안전하면서도 근본적인 치료제 개발에 많은 연구비가 투입되고 있다.

최근 한의학에서도 보다 효과적인 AD 치료제 개발을 위하여 과거 의서에서 기술된 ‘奶癬’을 비롯한 다양한 피부 증상에 활용되었던 처방을 중심으로 항염증 및 항알레르기 효능을 평가하는 실험 및 임상적 연구⁶⁻¹⁰⁾가 시도되고 있다.

아토피피부염은 기본적으로 염증성 질환이라는 점에서 항염증과 직접 관련된 인자들에 대한 연구와 더불어 간접적으로 병리적 유관성을 가진 인자들에 대한 연구⁶⁻¹²⁾가 주를 이루고 있는데, 대표적 기본 검색이 산화적 손상과 염증 세포에서의 사이토카인 변화에 대한 검색이다.

활성산소종 (reactive oxygen species ; ROS)은 산화적 손상을 일으키고 염증 반응을 악화시키며^{13,14)}, 산화질소 (nitric oxide ; NO)의 과도한 생성은 조직 손상 및 염증 질환의 원인이 되는 물질로 작용한다¹⁵⁾. 특히 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 활성화된 대식세포에서 분비되는 주요 사이토카인으로 염증 촉진 및 조직 손상을 일으켜^{16,17)} 염증 반응과 관련하여 주로 검색되는 요소이다.

본 시료인 淸肌消毒湯은 荊芥連翹湯에 生地黃, 魚腥草, 紫草, 石膏를 가미한 처방으로 현재 임상에서 發疹과 소양증이 심한 피부 및 알레르기 질환에 다용되고 있다.

본 시료의 기본방인 荊芥連翹湯은 萬病回春¹⁸⁾에 수록된 처방으로서 淸熱, 祛濕, 和血, 解毒의 효능으로 최근 血虛, 血熱, 血毒 등의 병리 현상으로 인한 급만성 염증 및 알레르기 질환에 활용되고 있다. 이와 관련된 연구로 朴¹⁹⁾은 荊芥連翹湯加味方の 아토피피부염 病態 모델에서의 免疫調節能에 관한 研究를, 姜²⁰⁾은 아토피피부염 동물 병태 모델에서의 荊芥連翹湯의 면역조절작용을, 黃²¹⁾은 荊芥連翹湯加味醱酵方の 항아토피피부염 기전에 관한 실험적 연구를, 朴²²⁾은 荊芥連翹湯醱酵方이 아토피피부염 유발 인자 및 NC/Nga mouse 동물병태에 미치는 영향을 각각 보고한 바가 있다.

가미된 生地黃, 魚腥草, 紫草, 石膏는 본초학적

으로 각각 淸熱解毒, 解毒透疹, 淸熱瀉火의 효능²³⁾을 지니고 있어 荊芥連翹湯의 구성 약물과의 상승 효과를 기대할 수 있다. 본 실험과 관련된 이들의 실험적 연구로 김²⁴⁾은 生地黃이 염증 관련 단백질발현에 미치는 영향을, 鄭²⁵⁾은 아토피성 피부염 유발 NC/Nga mice 동물 모델에 있어 三白草, 魚腥草, 紫草로 구성된 복합 처방의 항아토피 작용을, 徐²⁶⁾는 魚腥草즙 발효제품의 항산화 및 항알레르기 활성에 관한 연구를, 김²⁷⁾은 紫草 추출물의 식이공급이 아토피 동물모델 NC/Nga mice 피부의 세라마이드 함량 및 천연 보습 인자의 함량에 미치는 영향을 보고 하였으며, 임²⁸⁾은 石膏의 생쥐 비장세포 인터루킨-4 분비에 미치는 효과를 보고한 바가 있어 가미 약물들의 항염증 및 항알레르기 효능이 규명된 바가 있다.

이에 저자는 이미 임상에서 아토피피부염에 활용되고 있는 淸肌消毒湯의 객관적 효능 규명을 통하여 임상적 활용을 제고하기 위하여 기본적인 염증 관련 인자와 더불어 항산화 효과를 검색하였다.

II. 실험

1. 재료

1) 약물

본 실험에 사용한 淸肌消毒湯 (Chunggisodoktang ; 이하 CST)의 구성 약재들은 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구센터 (TBRC)에서 구입하여 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량 (1첩)은 다음과 같다.

Table 1. The Composition of Chunggisodoktang (CST)

한약명	생약명	용량 (g)
荊芥	Schizonepetae Spica	4
連翹	Forsythiae Fructus	4
防風	Saposhnikovia Radix	4
柴胡	Bupleuri Radix	4
枳殼	Aurantii Fructus	4
黃芩	Scutellariae Radix	4
梔子	Gardeniae Fructus	4
白芷	Angelicae Dahuricae Radix	4
桔梗	Platycodi Radix	4
生地黃	Rehmanniae Radix	4
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4
川芎	Cnidii Rhizoma	4
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	4
石膏	Gypsum	28
魚腥草	Houttuyniae Herba	10
紫草	Lithospermi Radix	10
Total		100

2) 시약

실험에 사용된 시약 중 trypan-EDTA, acetic acid, tris-base, tris-HCl, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) 등은 Sigma (USA)사 제품을, MTT assay kit (EZ CyTox)는 Daeil Lab Service (Korea)사 제품을, NO assay kit는 인트론 바이오 (Korea)사 제품을, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α , IFN- γ Milliplex panel (IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α)은 Millipore (USA)사 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

3) 기기

본 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (EYELA Co, Japan), CO₂

incubator (Sanyo Co, Japan), autoclave, deep-freezer (Nihon Co, Japan), clean bench, water bath, vortex mixer, heating block, Ice Flaker Machine (Icematic Co, Italy), plate shaker (Lab-line Co, USA), flow cytometer (Becton Dickinson, USA), centrifuge (Hanil Co, Korea), 48well microchamber (Neuroprobe, Gaithersburg, MD, USA), ELISA reader (Molecular Devices, Co, USA), Luminex (Millipore, Co, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 제조

시료 추출 방법은 CST 2침을 한약 유출기에 넣고, 증류수 1,200 ml과 같이 혼합하여 3시간 열탕하여 추출한 후 흡입 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 CST를 분리한 후, 다시 동결 건조기에서 24시간 동결 건조하여 분말 19.9 g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80℃)에서 보관하면서, 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) 세포독성 측정

CST의 세포독성 여부를 확인하기 위해 Raw 264.7 세포를 이용하여 세포독성을 확인하였다. Raw 264.7 세포는 1 × 10⁴ cells/100 μ l의 농도로 96 well plate에 분주한 다음 CST를 25, 50, 100, 200 μ g/ml 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μ l의 WST solution을 첨가하고 37℃, 5% CO₂ 배양기에 30분 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 wave length 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 항산화 활성 측정

(1) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 측정

150 mM DPPH/EtOH 150 μ l에 CST를 25, 50, 100, 200, 400, 800 μ g/ml 농도로 희석하여

100 μ l씩 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 ELISA reader를 이용하여 wave length 517 nm에서 흡광도를 측정한 후 아래의 방법으로 계산하였다.

$$\text{DPPH 소거능 (\%)} = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{CST투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

(2) 세포내 reactive oxygen species (ROS) 활성 측정

Raw 264.7 세포 내에서 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 이용하였다. 48 well plate에 Raw 264.7 세포를 2×10^5 /well/400 μ l씩 첨가하고 LPS 1 μ g/ml 및 CST 50, 100, 200 μ g/ml 농도를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCF-DA 10 μ M을 처리하여 15분 동안 빛이 차단된 상온에서 배양한 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400 μ l를 부유시켜 유세포 분석기(Flow cytometer)를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 ROS를 측정하였다.

4) Total Nitric oxide 생성 억제 효과 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 세포를 96 well plates에 1×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, CST 각각의 농도를 25, 50, 100, 200 μ g/ml로 처리하고, LPS 1 μ g/ml을 처리하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer를 50 μ l를 각 well에 처리한 후, 10분간 상온에서 암소 반응 후, N2 buffer 50 μ l를 각 well에 처리하고, 10분간 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

5) Raw 264.7 세포에서의 사이토카인 생성량 측정

6 well culture plates에 Raw 264.7 세포를 3×10^5 cells/ml로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, CST 각각의 농도를 25, 50, 100, 200 μ g/ml로 처리하고, LPS 1 μ g/ml을 처리하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포배양액을 수거하여 배양액에 함유된 IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α 를 custom-made 4-plex cytokine Milliplex panel을 이용하여 측정하였다. 분석은 Milliplex analyst를 통해 이루어 졌다.

3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error (S.E.)로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석법을 이용하여 결정하였다.

III. 실험 성적

1. Raw264.7 세포에 대한 세포독성

Raw 264.7 세포에서는 대조군의 세포생존율은 100 ± 0.0 (%)로 하였을 때, CST의 25, 50, 100, 200 (μ g/ml) 농도 투여군에서는 각각 115.2 ± 7.0 , 111.4 ± 4.7 , 90.8 ± 3.3 , 93.8 ± 6.6 (%)로 나타났다. (Fig. 1).

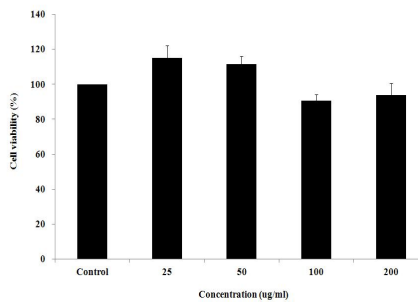


Fig. 1. Effects of CST on the viability of Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were cultured with various concentration of CST for 24 hours and the cell viability was measured by cytotoxicity assay. The result were presented by the mean \pm S.E. (n=4).

2. 항산화 활성

1) DPPH 소거능에 미치는 영향

DPPH의 소거 활성은 CST의 25, 50, 100, 200, 400, 800 ($\mu\text{g/ml}$) 농도 투여군에서 각각 20.9 ± 0.6 , 45.1 ± 0.9 , 62.5 ± 0.8 , 74.3 ± 3.8 , 91.3 ± 0.7 , 92.2 ± 0.2 (%)의 소거 활성 효과를 나타내었다 (Fig. 2).

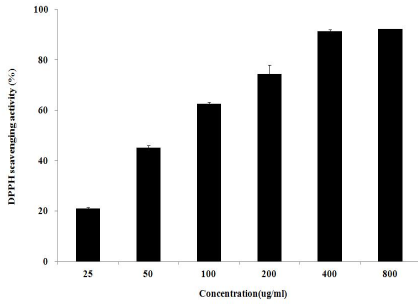


Fig. 2. Scavenging activity of CST. CST were reacted with DPPH for 30 minutes at 37°C , and the absorbance at 517 nm due to DPPH radical was determined. The result are the mean \pm S.E. (n=4).

2) ROS 생성에 미치는 영향

DCFH-DA 시약을 이용하여 Raw 264.7 세포내 생성되는 ROS 양을 측정된 결과, 대조군의 ROS 생성량이 100 (%) 일 때, CST의 50, 100, 200 ($\mu\text{g/ml}$) 농도 투여군에서는 대조군에 비하여 각각 77.0, 68.8, 58.7 (%) 로 감소하였다 (Fig. 3).

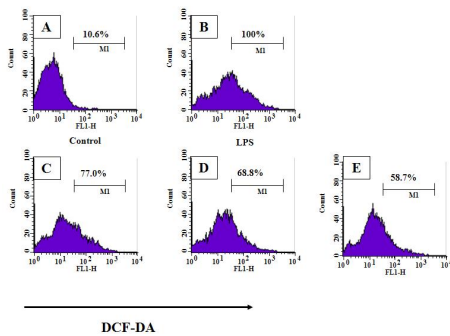


Fig. 3. Inhibitor effects of CST on the ROS production in Raw 264.7 cells. The Raw 264.7 cells were stimulated with LPS and treated with medium (Control, B), CST (50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$, C-E) for 24 hours. The ROS production was analysed following incubation with DCFH-DA by flow cytometry.

3. Total nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향

Griess Reagent System을 이용하여 Raw 264.7 세포내 생성되는 NO 양을 측정된 결과, 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+, $p < 0.05$) 증가를 나타내었고, 대조군의 NO 생성량이 100 (%) 일 때, CST의 25, 50, 100, 200 ($\mu\text{g/ml}$) 농도 투여군에서는 82.8 ± 10.7 , 83.4 ± 3.2 , 83.8 ± 0.9 , 66.5 ± 5.3 (%) 으로 50, 100, 200 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (*, $p < 0.05$), (**, $p < 0.01$) 감소를 나타내었다 (Fig. 4).

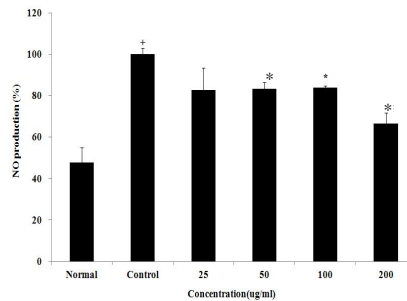


Fig. 4. Inhibition of LPS-induced NO production by CST in Raw 264.7 cells. The Raw 264.7 cells were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) and treated with medium, CST (25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours. The results were represented by the mean \pm S.E. (n=4). Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+, $p < 0.05$). Statistically significant

value was calculated by compared with control group by student's t-test (*, p<0.05), (**, p<0.01).

4. 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-1β 생성량에 미치는 영향

Raw 264.7 세포의 사이토카인 생성량을 측정 한 결과, 정상군은 6.1 ± 1.1 (%), 대조군은 100.0 ± 2.1 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++, p<0.001) 증가를 나타내었고, CST의 50, 100, 200 (μg/ml) 농도 투여군에서는 각각 105.0 ± 5.0, 95.0 ± 5.0, 70.0 ± 5.0 (%)으로 나타나 200 (μg/ml) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (*, p<0.05) 감소를 나타내었다 (Fig. 5).

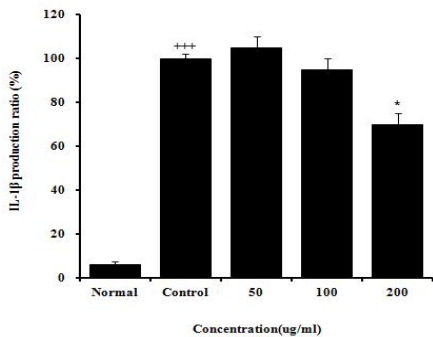


Fig. 5. Effects of CST on IL-1β release by LPS in Raw 264.7 cells. The levels of IL-1β were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The result were presented by the mean ± S.E. (n=4). Statistically significant value was calculated by compared with normal 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).

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

Raw 264.7 세포의 사이토카인 생성량을 측정 한 결과, 정상군은 7.0 ± 6.9 (%), 대조군은

100.0 ± 1.0 (%)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (++, p<0.01) 증가를 나타내었고, CST의 50, 100, 200 (μg/ml) 농도 투여군에서는 각각 89.1 ± 0.5, 73.9 ± 11.9, 72.8 ± 0.2 (%)로 나타나 50, 200 (μg/ml) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (**, p<0.01, ***, p<0.001) 감소를 나타내었다 (Fig. 6).

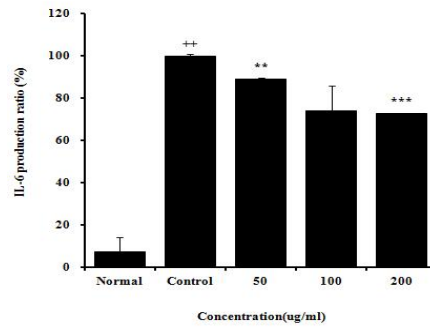


Fig. 6. Effects of CST on IL-6 release by LPS in Raw 264.7 cells. The levels of IL-6 were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The result were presented by the mean ± S.E. (n=4). Statistically significant value was calculated by compared with normal 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, ***, p<0.001).

3) MCP-1 생성량에 미치는 영향

Raw 264.7 세포의 사이토카인 생성량을 측정 한 결과, 정상군은 1.2 ± 0.2 (%), 대조군은 100.0 ± 0.5 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++, p<0.001) 증가를 나타내었고, CST의 50, 100, 200 (μg/ml) 농도 투여군에서는 각각 89.5 ± 3.4, 82.4 ± 6.2, 77.9 ± 4.3 (%)으로 나타나 200 (μg/ml) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (*, p<0.05) 감소를 나타내었다 (Fig. 7).

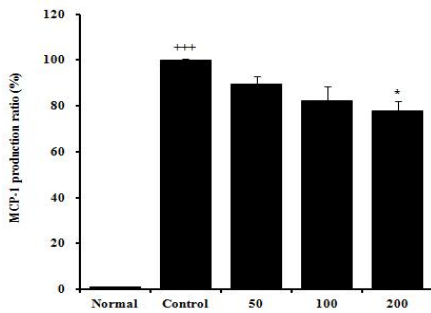


Fig. 7. Effects of CST on MCP-1 release by LPS in Raw 264.7 cells. The levels of MCP-1 were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The result were presented by the mean \pm S.E. (n=4). Statistically significant value was calculated by compared with normal 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) TNF- α 생성량에 미치는 영향

Raw 264.7 세포의 사이토카인 생성량을 측정 한 결과, 정상군은 10.9 \pm 2.1 (%), 대조군은 100.0 \pm 0.1 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++, p<0.001) 증가를 나타내었고, CST의 50, 100, 200 (μ g/ml) 농도 투여군에서는 각각 101.1 \pm 8.5, 87.8 \pm 9.0, 71.4 \pm 11.5 (%)로 감소하였고, 대조군에 비하여 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 8).

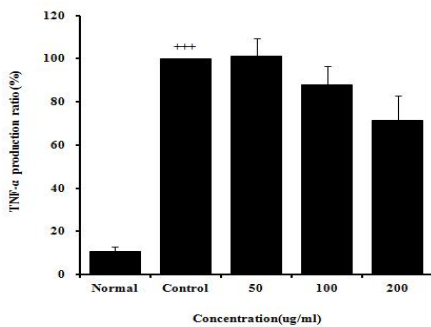


Fig. 8. Effects of CST on TNF- α release by

LPS in Raw 264.7 cells. The levels of TNF- α were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The result were presented by the mean \pm S.E. (n=4). Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++, p<0.001).

IV. 고찰

아토피피부염은 일반적으로 유아와 소아에 발생하는 만성 재발성 피부염으로 정의될 수 있으며²⁹⁾, 한의학적으로는 瘙癢感, 紅斑, 浮腫, 滲出物, 鱗屑, 痂皮 등의 증상 및 발현 시기에 준하여^{30,31)} 濕疹, 奶癬, 浸淫瘡, 胎熱, 血風瘡, 四彎風, 旋耳瘡 등의 범주로 설명하고 있다³²⁻³⁶⁾.

병인으로는 유전적 요인^{37,38)}, 면역학적 요인³⁹⁻⁴²⁾, 환경적 요인^{43,44)}이 아토피피부염의 주 원인으로 제시되고 있으며, 한의학적으로는 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 등에 기인한다고 보고 있다⁴⁵⁾. 그 밖에 스트레스 등의 심리적 요인, 약리적 요인, 표피 투과장벽과 항균장벽 기능 이상이 중요한 원인으로 함께 제시되고 있으며²⁾, 치료제 개발을 위해 항염증 및 면역학적 조절을 바탕으로 다양한 실험적 접근이 이루어지고 있다.

본 실험은 임상에서 활용도가 높은 荊芥連翹湯에 본초학적으로 清熱解毒, 解毒透疹, 清熱瀉火의 효능을 가진²⁰⁾ 生地黃, 魚腥草, 紫草, 石膏를 가미한 清肌消毒湯(CST)을 시료로 하여 염증 관련 인자에 대한 검색을 통하여 염증 및 면역학적 측면에서 객관적으로 효능을 검증하고자 하였다.

기본방인 荊芥連翹湯은 荊芥, 連翹, 防風, 柴胡, 枳殼, 黃芩, 梔子, 白芷, 桔梗, 生地黃, 當歸, 川芎, 赤芍藥으로 구성된 처방으로 임상에서 활용 빈도 및 치료 영역이 많은 처방이다. 이와 관련된 실험 연구로는 먼저 姜²⁰⁾은 NC/ Nga 생쥐를 이용한 동물 실험을 통해 DLN 및 배부 피부, PBMC, 혈청 내 면역세포 비율을 검색하여 면역 조절작용이 있음을 보고하였고, 朴¹⁹⁾의 연구에서

는 荊芥連翹湯에 면역학적 효능이 규명되어 있는 地膚子, 白鮮皮, 蟬蛻, 牡丹皮, 馬齒莧을 가미한 荊芥連翹湯加味方的 아토피피부염 개선효과를 객관적으로 검증하기 위하여 다양한 면역 관련 인자 및 조직학적 변화를 검색하였으며, 黃²¹⁾은 발효 한약에 주목하여 荊芥連翹湯加味方を 발효시킨 시료의 항산화 효능 평가 및 면역 조절 작용을 통한 아토피피부염 개선 효과를 검증하였다.

가미약물인 生地黃, 魚腥草, 紫草 및 石膏와 관련된 실험적 보고로 김²⁴⁾은 生地黃이 염증 관련 단백질 발현에 미치는 영향을, 鄭²⁵⁾은 아토피성 피부염 유발 NC/Nga mice 동물 모델에 있어 三白草, 魚腥草, 紫草로 구성된 복합 처방의 항아토피 작용을, 徐²⁶⁾는 魚腥草즙 발효제품의 항산화 및 항알레르기 활성에 관한 연구를, 이 등⁴⁶⁾은 발효 魚腥草 물추출물의 마우스 대식세포 항염활성 연구를, 盧 등⁴⁷⁾은 魚腥草 抽出물의 항알레르기 효과에 관한 研究를, 김 등⁴⁸⁾은 어성초 추출물 첨가가 마우스 면역능 증진에 미치는 영향을, 김²⁷⁾은 紫草 추출물의 식이공급이 아토피 동물모델 NC/Nga mice 피부의 세라마이드 함량 및 천연 보습인자의 함량에 미치는 영향을, 김 등⁴⁹⁾은 紫草 추출물 극성 성분의 피부 보습 증진 및 아토피 피부염 호전 효과를, 김 등⁵⁰⁾은 桑葉, 牛蒡子, 紫草가 항알레르기 염증 반응에 미치는 영향을, 金⁵¹⁾은 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향을, 주⁵²⁾는 紫草 뿌리의 함유성분 및 아토피피부염 관련 연구현황을, 임²⁸⁾은 石膏의 생쥐 비장 세포 인터루킨-4 분비에 미치는 효과를, 최⁵³⁾는 石膏加味複合方이 Anti-CD40과 rIL-4로 유도된 생쥐의 B세포에서 싸이토카인 생성 및 면역글로블린 E에 미치는 효과를 각각 보고한 바가 있어, 이들 통해 구성 약물 각각에서 항염증 및 면역 조절작용 등을 통한 항아토피피부염 효능을 확인할 수 있었다.

실험 적정 투여량과 안전성을 확인하기 위한 Raw 264.7 cells에 대한 세포독성에서는 25, 50, 100, 200 ($\mu\text{g/ml}$) 농도 처리군에서 모두 90% 이상의 세포 생존율을 나타내어 세포독성이

없는 것으로 확인되었다 (Fig. 1).

산소를 이용하는 모든 생물체는 정상적인 대사 과정에서 산화적 스트레스의 원인이 되는 O₂- (singlet oxygen), H₂O₂ (hydrogen peroxide), ·OH (hydroxyl radical) 등과 같은 ROS (reactive oxygen species)를 생성하며, 이러한 ROS는 반응성이 매우 커서 생체 내에서 자동 산화 반응의 개시, 지질 과산화 등의 생체에 손상을 초래하는 산화적 스트레스를 유발하고, 염증 반응에 관여한다^{54,55)}. 또 인체의 산화 손상의 지표가 되는 항산화 효소, DNA, 단백질, 지질 등의 손상 지표는 아토피 및 천식과 같은 호흡기 질환의 염증 증상에 의해 증가되는 등 산화적 스트레스의 증가는 알레르기 염증 반응에 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다^{56,57)}.

본 실험에서는 산화적 손상에 대한 본 시료의 효능을 평가하기 위해 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical 소거 활성과 ROS (reactive oxygen species) 생성량 및 NO (nitric oxide) 생성량을 측정하였다.

DPPH는 보라색을 띠는 비교적 안정한 free radical로 항산화 활성을 가진 물질과 만나면서 탈색되는 것으로⁵⁸⁾, 본 실험에서는 25, 50, 100, 200, 400, 800 ($\mu\text{g/ml}$) 농도 처리군에서 농도의존적으로 소거 활성을 나타내었으며, 특히 400 ($\mu\text{g/ml}$)과 800 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도에서 각각 91.3%, 92.2%의 높은 소거능을 나타내었다 (Fig. 2).

또 세포내의 DNA, RNA, 단백질 등에 작용하여 산화적 스트레스를 유발시키고 염증 반응을 더욱 악화시키는 ROS^{13,14)} 생성율에서는 50, 100, 200 ($\mu\text{g/ml}$) 농도 처리군에서 농도 의존적 억제 효과를 나타내었으며, 특히 200 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도에서 41.3 % 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 3).

세포 사이의 작용을 매개하는 물질로 스트레스나 환경적 요인 등에 의해 과도하게 생성되어 조직 손상을 일으키는 물질인 NO⁵⁹⁾ 생성에서는 100, 200 ($\mu\text{g/ml}$) 농도 처리군에서 유의성 있는 NO 생성 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 4).

대식세포는 외부로부터 자극에 의해 활성화되

어 세균이나 이물질을 탐식· 제거하는 과정에서 여러 가지 사이토카인을 분비하여 면역 활성을 조절한다. 그 중 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 활성화된 대식세포로부터 생성되는 주요 사이토카인으로 알려져 있다⁶⁰. LPS (lipopolysaccharide)는 그람 음성 세균의 세포벽을 구성하는 물질로, 단구세포 또는 대식세포는 미량의 LPS에 의해 활성화되어 염증성 사이토카인을 분비한다. 또 다량의 NO는 정상세포를 죽이고 염증을 유도하여 급성 또는 만성 염증 질환의 원인이 되는 물질로 작용한다¹⁵.

아토피피부염 염증 반응과 관련한 사이토카인 및 케모카인의 생성량을 확인하기 위해 대식세포주인 Raw 264.7 cells에 시료의 농도별로 LPS (lipo- polysaccharide)를 처리한 결과 대조군에 비해 200 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 IL-1 β 는 30.0%, IL-6는 27.2%, MCP-1은 22.1%의 유의성 있는 생성 억제 효과를 나타내었으며, TNF- α 는 28.6%의 생성 억제 효과를 나타내었으나 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 5-8).

IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 단핵구와 대식세포에 의해 주로 생산되며 염증 촉진 작용 및 조직 손상을 일으키는데^{16,17}, IL-1이나 TNF- α 는 혈관 내피세포를 자극하여 T세포, B세포, 호산구, 호염구, 중성구 등 면역세포들의 침윤을 가속화시키는 역할을 하며⁶¹, TNF- α 는 염증성 케모카인인 MCP-1의 분비를 증가시킨다⁶².

이상의 결과로 보아 淸肌消毒湯(CST)의 산화적 손상에 대한 항산화 효능 및 Raw 264.7 세포에서의 염증성 사이토카인 발현 억제에 유의성이 있음이 확인되어, 추후 기본 검색을 떠나 보다 다양한 인자 및 구성 약물에 대한 개별적인 검색에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

아토피피부염에 임상적으로 활용되고 있는 淸肌消毒湯(CST)의 항염증 효능을 객관적으로 규명하기 위하여 산화적 손상 및 염증 관련 인자들

의 변화를 in vitro 실험을 통해 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

CST는 Raw 264.7 세포에 대한 세포독성에서 25, 50, 100, 200 ($\mu\text{g/ml}$) 농도 처리군에서 모두 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었다.

CST는 DPPH 소거 활성에서 농도 의존적으로 소거 활성을 나타내었으며, 특히 400 ($\mu\text{g/ml}$)과 800 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도에서 각각 91.3%, 92.2%의 높은 소거능을 나타내었다.

CST는 ROS 생성율을 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소시켰으며, 특히 200 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도에서 41.3% 억제 효과를 나타내었다.

CST는 NO 생성율을 대조군에 비해 감소시켰으며, 특히 100, 200 ($\mu\text{g/ml}$) 농도 처리군에서 각각 16.2%, 33.5%로 유의성 있게 감소하였다.

CST는 LPS를 처리한 Raw 264.7 세포에서 대조군에 비해 200 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 IL-1 β , IL-6, MCP-1 생성율을 각각 30.0%, 27.2%, 22.1% 유의성 있게 감소시켰으며, TNF- α 생성율은 28.6% 감소하였다.

이상으로 淸肌消毒湯(CST)의 항산화 효능 및 면역 조절 작용에 의한 아토피피부염 염증 개선 효과가 객관적으로 규명되어, 향후 다양한 약물 가감을 통해 임상에서의 활용이 제고될 수 있을 것으로 기대된다.

<감사의 글>

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

VI. 참고문헌

1. 김태운 : 아토피피부염 치료의 최신 경향, 소아알레르기 호흡기, 19(3):209-219, 2009.
2. Eui Hyung Lee, et al. : 아토피피부염의 진단과 치료법의 최신지견, The Korean Society for Skin Barrier Research, 12(1):103-110, 2010.

3. 이남렬 : 아토피樣 피부염 NC/Nga 생쥐에서 滋陰除濕湯加減과 아토피 크립, 紫雲膏의 병용투여가 Th17 세포의 분화억제 및 피부염에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 2009.
4. 이해영 외 : 인천지역의 유치원 아동의 아토피피부염에 대한 역학적 특징, 대한피부과학회지, 47(2):164-171, 2009.
5. Zaki I, et al. : Treatment of severe atopic dermatitis in childhood with cyclosporin, Br J Dermatol., 135(Suppl 48):21-24, 1996.
6. 姜蘭伊 : 아토피피부염 동물 병태 모델에서의 荊芥連翹湯의 면역조절작용, 대전대학교대학원, 2010.
7. 김희열 : 生血潤膚飲의 항 Allergy 및 항염증 효과, 대구한의대학교 대학원, 2009.
8. 具英姬 : 淸肌散이 아토피피부염 동물 모델에 미치는 영향, 동국대학교, 2007.
9. 전종철 : 金水六君煎이 항알러지 염증 반응에 미치는 영향, 東義大學校 大學院, 2006.
10. 서정민 외 : 玄蓼淸肺飲이 항염 및 항알러지 작용에 관한 연구, 동의생리병리학회지, 16(1): 165-171, 2002.
11. 金萬友 : 淸心蓮子湯의 Th2 細胞 分化調節과 抗炎症 機轉을 통한 아토피 피부염治療效果에 관한 研究, 동국대학교, 2006.
12. 김형갑 : 葛根解肌湯의 항 Allergy 및 항염증 효과, 대구한의대학교 대학원, 2008.
13. Hur SK, et al. : Effect of the grapevine shoot extract on free radical scavenging activity and inhibition of pro-inflammatory mediator production in raw 264.7 macrophage, J Applied Pharmacology, 9:188-193, 2001.
14. 광지현 외 : 자색고구마 추출물의 항산화 효과 및 신경세포 보호효과, 농업생명과학연구지, 44(2):57-66, 2010.
15. Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system, J Neurochem, 59:1609-1623, 1992.
16. 金庠憲 : 桃仁湯이 血栓 및 炎症 病理 有關 因子에 미치는 影響, 대전대학교대학원, 2010.
17. 정성환 외 : 내독소에 의한 말초혈액 단핵구의 IL-1beta, IL-6, TNF-alpha와 TGF-beta 생성에 관한 연구, 결핵 및 호흡기질환, 45(4):846-858, 1998.
18. 公正현 : 增補 萬病回春(하권), 일중사, pp.12-14, 1994.
19. 朴性姬 : 荊芥連翹湯加味方의 아토피피부염 病態 모델에서의 免疫調節能에 관한 研究, 대전대학교대학원, 2010.
20. 姜蘭伊 : 아토피피부염 동물 병태 모델에서의 荊芥連翹湯의 면역조절작용, 대전대학교대학원, 2010.
21. 黃潤圭 : 荊芥連翹湯加味醱酵方의 항아토피피부염 기전에 관한 실험적 연구, 대전대학교대학원, 2011.
22. 朴應鎬 : 荊芥連翹湯醱酵方이 아토피피부염 유발인자 및 NC/Nga mouse 동물병태에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 2011.
23. 全國韓醫科大學 共同教材編纂委員會 : 本草學, 永林社, p.272, p.241, p202, 2004.
24. 金성범 : 生地黃이 혈관신생, 세포생존 및 염증관련 단백질발현에 미치는 영향, 暎園大學校 大學院, 2005
25. 鄭明我 : 아토피성 피부염 유발 NC/Nga mice 동물 모델에 있어 삼백초, 어성초, 자초로 구성된 복합처방의 항아토피 작용, 목포대학교대학원, 2010.
26. 徐榮局 : 어성초 즙 발효제품의 항산화 및 항알러르기 활성, 순천대학교대학원, 2005.
27. 김정민 : 자초추출물의 식이공급이 아토피 동물모델 NC/Nga mice 피부의 세라마이드 함량 및 천연 보습인자의 함량에 미치는 영향, 경희대학교대학원, 2006.
28. 임강현 외 : 석고의 생쥐 비장세포 인터루킨-4 분비에 미치는 효과, 한약응용학회, pp.28-29, 2002.

29. 이지현 외 : 아토피피부염학회 보고서: 한국 아토피피부염의 치료지침, 대한피부과학회지, 44(8):907-913, 2006.
30. 홍창의 : 소아과학, 대한교과서(주), pp.1066-1067, 1994.
31. 河如泰 : 内外治 兼用法의 아토피 피부염 활용에 관한 실험적 연구, 대전대학교대학원, 2009.
32. 馬紹堯 : 實用中醫皮膚病學, 상해중의약대학출판사, pp.244-246, 1999.
33. 王保方 외 : 皮膚病中醫診療學, 인민위생출판사, pp.254-255, pp.310-311, pp.351-354, 2000.
34. 林俊華 외 : 皮膚性病科絕技, 과학기술문헌출판사, pp.131-133, 2002.
35. 劉建國 외 : 新編皮膚病驗方薈萃, 광동세계도서출판공사, p.229, 2003.
36. 謝 娟 외 : 皮膚病奇效良方, 인민군의출판사, pp.170-178, 2007.
37. Diepgen TL, et al. : Recent epidemiologic and genetic studies in atopic dermatitis, Acta Derm Venerol, 176:13-18, 1992.
38. Moore MM, et al. : Perinatal predictors of atopic dermatitis occurring in the first six months of life, Pediatrics, 133:468-474, 2004.
39. 김정원 : 알레르기 및 면역학적 관점에서 의 아토피피부염, 대한피부과학회지, 41(6):687-689, 2003.
40. Hamid Q, et al. : In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis, J Allergy Clin Immunol, 98:225-231, 1996.
41. Soumelis V, et al. : Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP, Nat Immunol, 3:673-680, 2002.
42. 서설 : 임상면역학, 고려의학, 121-132, 2009.
43. Hill PB, et al. : The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens, Vet Immunol Immunopathol, 81(3-4):169-186, 2001.
44. 이종태 외 : 소아 아토피 및 천식관련 입원과 대기 중 오존의 상관성 분석, 한국보건교육·건강증진학회 학술대회 발표논문집, pp.73-77, 2006.
45. 박성남 외 : 소풍산이 BALB/c Mouse를 이용한 Atopy 피부염 Model에 미치는 영향, 경희의학, 20(2):129-141, 2004.
46. 이지영 외 : 발효 魚腥草 물추출물의 마우스 대식세포 항염활성 연구, 대한분초학회지, 25(3):27-34, 2010.
47. 盧柄圭 외 : 魚腥草 抽出物の 항알레르기 효과에 관한 研究, 대한분초학회지, 13(2):77-89, 1998.
48. 김진 외 : 어성초 추출물 첨가가 마우스 면역능 증진에 미치는 영향, 한국식품영양학회지, 34(2):167-175, 2005.
49. 김영란 외 : 자초 추출물 극성 성분의 피부 보습 증진 및 아토피 피부염 호전 효과, 한국식품과학회지, 41(5):547-551, 2009.
50. 김선형 외 : 桑葉, 牛蒡子, 紫草가 항알러지 염증 반응에 미치는 영향, 경희의학, 21(1):71-79, 2005.
51. 金施慧 : 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향, 경희대학교대학원, 2004.
52. 주지훈 외 : 자초 뿌리의 함유성분 및 아토피피부염 관련 연구현황, 생약학회지, 41(2):73-88, 2010.
53. 최문석 외 : 석고가미복합방이 Anti-CD40 과 rIL-4로 유도된 생쥐의 B세포에서 싸이토카인 생성 및 면역글로블린 E에 미치는 효과, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 13(2):131-146, 2004.
54. Wu LL, et al. : Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics, Clin Chim Acta, 339(1-2):1-9, 2004.

55. 지상진 : 산화적 세포손상에 대한 화피추출물의 방어효과, 경희대학교대학원, 2009.
56. McCord, JM : Free radicals and inflammation, protection of synorial fluid by superoxide dismutase, Science, 185:529-531, 1974.
57. Bowler RP, et al. : Oxidative stress in allergic respiratory diseases, J Allergy Clin Immunol, 110:349-356, 2002.
58. 정성제 외 : 약용 식물 추출물의 항산화 활성 검색, J Korean Soc Appl Biol Chem, 47(1):135-140, 2004.
59. 장주리 외 : 도라지 부탄을 추출물의 항산화 및 nitric oxide 생성 저해 효과, 한국식품저장유통학회지, 18(1):65-71, 2011.
60. Munoz C, et al. : Interaction between cytokine, nutrition and infection, Nutr Res, 15:1815-1844.
61. Leung D.Y, et al. : Expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 in elicited late phase allergic reactions, J Clin Invest, 87(5):1805-1809, 1991.
62. Conti P, et al. : MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation, Allergy and Asthma Proceedings, 22(3):133-137, 2001.