

아토피피부염 동물 병태 모델에서 淸華湯의 면역조절작용에 관한 연구

유현숙¹ · 김선빈² · 송향희³ · 지중구⁴ · 박지원¹ · 김동희¹ *

A Study on the Immune Modulation of Chunghwatang(CHT) in Atopic Dermatitis Animal Models

Yoo Heon-Sook¹ · Gim Seon-Bin² · Song Hyang-Hee³ · Ji Joong-Gu⁴ · Bak Ji Won¹ · Kim Dong-Hee¹ *

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

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

³Dept. of Health Skincare, Byuksung College

⁴Dept. of Oriental health care, Joongbu University

Objectives : The aim of this study was to investigate the effect of Chunghwatang (CHT) for atopic dermatitis.

Methods : CHT, a verified anti-oxidant and anti-inflammatory effect, was treated in atopic dermatitis animal model to investigate cytokine levels and immunoglobulin production.

Results : Clinical skin index was 47.1%, suggesting significant efficacy of CHT in atopic dermatitis treatment.

Serum IL-4, IL-6, IL-13, TNF- α and histamine productions were significantly decreased to 52.3%, 61.8%, 68.0%, 37.4%, and 46.6%, respectively. The production of IL-5 was decreased to 33.3%. The increase of Immunoglobulin IgG1 production along with IgE through the interaction of IgE and IL-4 induced by IL-4 and IL-13 were measured as 20.7% and 23.4%, respectively.

Conclusions : The results above, along with the in vitro test results, strongly supports the CHT samples as effective immunomodulator in AD treatments, suggesting its use in clinical practice and basic information for EBM.

Key words : CHT(Chunghwatang), atopic dermatitis, cytokine, immunoglobulin

I. 서 론

아토피피부염(Atopic dermatitis - AD)은 양방, 한방 및 민간요법 등의 다양한 치료법이 시행

되고 있음에도 불구하고 복잡한 기전으로 인하여 아직 정확한 치료 방법이 없는 실정이다¹⁾. 국내의 AD 유병률은 진단 기준 및 방법에 따라 차이가 나타나지만, 여전히 우리 사회에서 5-10%를 차지하는 질환으로 국가적 차원에서 해결해야 할 공중보건 문제로 인식되고 있다²⁻³⁾.

* 교신저자 : 김동희 대전대학교 병리학교실

E-mail: dhkim@dju.kr

투고일 : 2012년 7월10일 수정일 : 2012년 8월 3일

게재일 : 2012년 8월13일

현재 사용되는 치료제로는 부신피질 호르몬제, 항히스타민제, 인터페론감마, 사이모펜틴 등이

사용되어 유의성 있는 치료 효과를 보이나¹⁾, 일부 환자들에게는 치료 반응이 적거나 과민 반응 및 신독성, 간독성 등으로 인한 부작용이 문제시 되고 있다^{1,4)}.

따라서 이에 대한 보완책으로 최근 생약 추출물 및 생약복합제의 효능 평가가 활발하게 이루어지고 있는데, 이 등⁵⁾은 6가지 생약복합제가 AD를 유발시킨 BALB/c 마우스 모델에서 혈중 IgE 수치를 감소시키고, 면역억제제인 엘리텔 크립의 효능보다 우수함을 보고하였으며, 양 등⁶⁾은 3가지 복합된 생약추출물이 AD를 유발시킨 NC/Nga 마우스 모델에서 혈중 IgE 및 관련 사이토카인 분비를 조절하여 AD 증상 완화 효과가 있음을 보고한 바가 있다. 또한 천연물을 원료로 한 신약 및 기존의 치료제에 천연물을 배합한 형태의 보습제나 국소도포제 등의 개발이 활성화되고, 다양한 천연물의 항염증, 항산화, 항균 및 소양감 억제 작용 등이 많은 연구 결과를 통하여 보고되고 있다⁷⁾.

천연물에 대한 연구와 더불어 한의학에서도 내치⁸⁻¹⁰⁾, 외치¹¹⁾, 내외치 겸용 등¹²⁻¹⁴⁾의 연구가 다양하게 이루어지고 있다. 특히 김¹⁵⁾은 in vitro 실험에서六一散, 荊芥連翹湯, 四物湯 등을 기본방으로 한 淸華湯이 세포독성, 산화적 손상 및 염증 인자들에 대하여 유의성이 높음을 선행 연구 결과로 보고한 바가 있다.

본 처방과 관련된 연구로는 박 등¹⁶⁾의 ‘荊芥連翹湯과 加味荊芥連翹湯이 消炎·鎮痛 및 抗알레르기에 미치는 영향, 정 등¹⁷⁾의 ‘四物湯加味方の 항산화 활성에 대한 실험적 연구’, 김 등¹⁸⁾의 ‘解毒四物湯의 抗炎效果 및 免疫反應에 관한 연구’, 윤 등¹⁹⁾의 ‘四物湯加味方이 염증 치료 및 예방에 미치는 영향에 대한 연구’, 김 등²⁰⁾의 ‘加味生料四物湯의 抗炎症 효과와 止痒膏의 아토피피부염 손상 및 止痒 효과에 미치는 영향’ 등이 보고된 바 있다.

그 밖에도 민간요법이나 자연치유법 등의 다양한 치료법이 있지만, 이 역시 체질에 따른 부작용으로 인한 증세 악화 우려가 있는 만큼¹⁾ 전문가의 진단을 통한 근본적인 치료와 동시에 자연 치

유력을 증가시킬 수 있는 치료법이 요구되고 있는 실정이다.

이에 저자는 김 등¹⁵⁾의 선행 연구와 기본방인 荊芥連翹湯의 관련 연구¹⁶⁻²⁰⁾를 바탕으로 in vivo 실험을 통해 본 시료의 면역학적 인자들에 대한 검색 등을 확인함으로써, 현재 임상에서 실제 활용되고 있는 淸華湯의 AD 치료제로서 임상적 활용을 제고하고자 하였다.

II. 실험

1. 재료

1) 동물

실험 동물인 수컷 6주령의 NC/Nga 생쥐는 중앙실험동물에서 공급 받아 실험 당일까지 고품사료(항생제 무첨가 삼양사료 Co., Korea)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2°C, 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 2011-011)을 받았다.

2) 약물

본 실험에 사용한 淸華湯의 구성 약재들은 대전대학교 난치성면역질환의 동서생명의학연구소센터(TBRC)에서 구입하여 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of Chunghwatang

Herbal name	Scientific name	Amount(g)
滑石	Talcum	8
玄參	Scrophulariae Radix	8
金銀花	Lonicerae Flos	8
牛蒡子	Arctii Fructus	8

生地黃	Rehmanniae Radix	8
當歸	Angelicae Gigantis Radix	8
山楂肉	Crataegi Fructus	8
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	8
黃芩	Scutellariae Radix	4
梔子	Gardeniae Fructus	4
荊芥	Schizonepetae Spica	4
連翹	Forsythiae Fructus	4
防風	Saposhnikovia Radix	4
甘草	Glycyrrhizae Radix	4
樺皮	Betulae Platyphyllae Cortex	10
榆根皮	Ulmii Pumilae Cortex	10
秦艽	Gentianae Macrophyllae Radix	5
薄荷	Menthae Herba	5
浮萍草	Spirodela Herba	2
石膏	Gypsum	4
Total		124

3) 시약

실험에 사용된 시약 중 acetone, olive oil, paraformaldehyde, dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), dexamethasone 등은 Sigma(USA)사 제품을 사용하였고, Trizol은 Invitrogen(USA)사 제품을, 2, 4, 6-trinitrochloro-benzene(TNCB)는 동아제약(Korea) 제품을, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent assay) kit는 Millipore(USA)사 제품을, histamine ELISA kit는 Biosource(USA)사 제품을, IgG1 ELISA kit는 Bethyl Laboratories(USA)사 제품을, IgE ELISA kit는 Shibayagi(Japan)사 제품을 구입하

여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 autoclave, deep-freezer(Nihon Co, Japan), clean bench, water bath, vortex mixer, heating block, ice flaker machine(Icematic Co, Italy), 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 추출

시료 추출 방법은 淸華湯 2첩을 한약 유출기에 넣고, 증류수 1200 ml과 같이 혼합하여 3시간 열탕하여 추출한 후 흡입 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축한 후 동결 건조하여 淸華湯 분말(이하 CHT라 칭함) 26.8 g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고(-80°C)에서 보관하면서, 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 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 : 올리브 오일 = 3 : 1) 200 μ l를 등 부위에 도포하고, 4일 후 0.4% TNCB 용액 150 μ l를 다시 도포하였으며, 2일 후 부터는 1주일에 3번씩 0.4% TNCB 용액 150 μ l를 3주간 등 부위에 도포하였다. 실험은 4개의 군(각 6수)으로 나누었으며 정상군, 대조군에는 증류수를, 양성 대조군인 dexamethasone(이하, Dexa) 투여군은 100 mg/kg 농도로, 실험군인 CHT 투여군은 5.4 mg/25g/day 농도로 3주간 경구 투여 하였다.

3) 관능 평가

약물 처리 후 3주, 4주, 5주 때에 아토피성 피

부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가 방법으로 관능평가를 실시하였다. 평가 항목은 홍반(Erythema), 가려움과 건조 피부(Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종(Edema & Hematoma), 긁무름(Excoriation), 태선화(Lichenification) 등으로 5가지이다. 각각의 항목은 없음(0), 약함(1), 중증도(2), 심함(3)으로 채점하였다.

4) 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-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α 농도는 custom-made 6-plex cytokine Milliplex panel을, histamine 농도는 ELISA kit를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. Well에 혈청 25 μ l씩 분주하고 assay buffer 및 matrix buffer, antibody-immobilized beads를 각 25 μ l씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 실온에서 반응시키고 washing buffer를 이용하여 2회 세척하였다. 이를 다시 25 μ l의 detection antibody를 가하여 1시간 동안 실온에서 암소 반응시키고 추가로 25 μ l의 Streptavidin-Phycoerythrin을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 washing buffer를 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 PBS를 150 μ l 넣고 5분간 shaking한 후 Luminex를 이용하여 측정하였다.

IgG1과 IgE 생성량의 측정은 ELISA kit을 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 substrate를 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 다음 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450

nm에서 흡광도를 측정하였다.

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. NC/Nga 생쥐의 피부염 지수에 미치는 영향
7주령의 NC/Nga 생쥐를 제모한 후 TNCB를 3주간 도포하여 피부염을 유발시키면서 실험군인 CHT를 3주간 도포하였다. 다음은 11주, 12주, 13주의 피부염 유발 정도와 개선 정도를 나타내주는 사진으로, 대조군에서는 홍반, 건조, 부종, 혈종, 긁무름, 태선화 등의 증상이 확인되었고, CHT 투여군이 대조군에 비해서 이들의 증상이 현저하게 개선됨을 확인할 수 있다(Fig. 1).

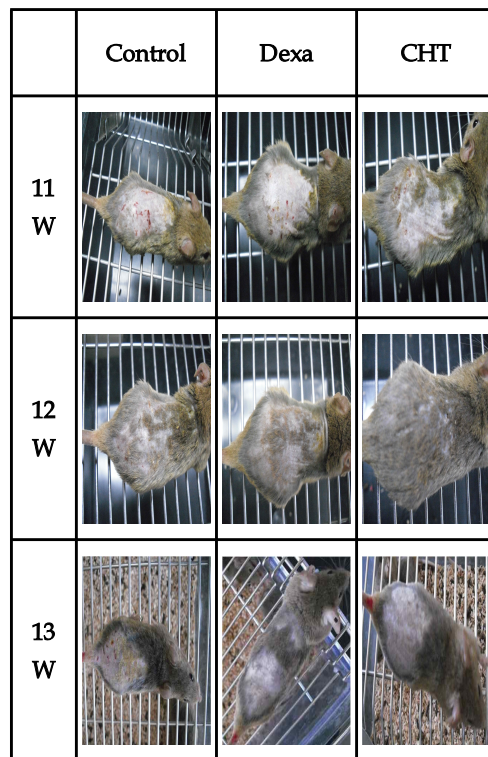


Fig. 1. Comparison of skin manifestation in NC/Nga mice between control and experimental group.

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

피부염 지수는 아토피 피부염을 유발한 후 최종 3주 후에 피부염의 심화 정도를 관능적 방법에 의하여 측정된 결과로, 대조군은 7.0 ± 0.4, Dexa 투여군은 2.4 ± 0.5, CHT 투여군은 3.7 ± 0.4로 나타나 대조군에 비해 모두 유의적인 감소를(***, p<0.001) 나타내었다(Fig. 2).

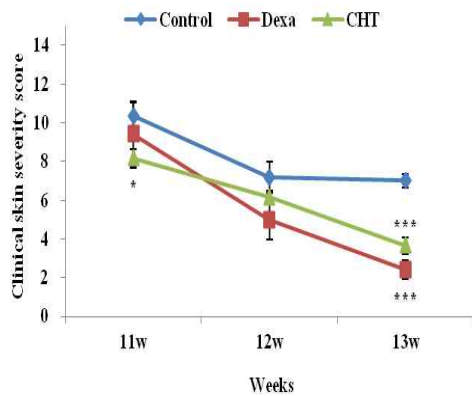
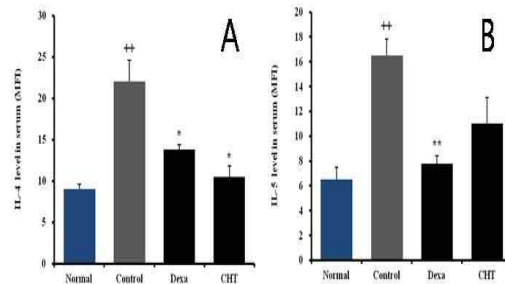


Fig. 2. Effects of CHT on clinical skin features and severity in TNCB-induced NC/Nga mice.

Clinical skin index of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0(none), 1(mild), 2(moderate), 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 ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with Control group by student's t-test(*, p<0.05, ***, p<0.001).

2. 혈청 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향
 혈청 내 IL-4 사이토카인을 측정된 결과, 정상군은 9.0 ± 0.6(MFI), 대조군은 22.0 ± 2.7(MFI)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는(++ , p<0.01) 증가를 나타내었으며, Dexa 투여군은 13.8 ± 0.6(MFI), CHT 투여군은 10.5 ± 1.3(MFI)으로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게(*, p<0.05) 감소하였다(Fig. 3A). IL-5 사이토카인은 정상군이 6.5 ± 1.0(MFI), 대조군이 16.5 ± 1.3(MFI), Dexa 투여군이 7.8 ± 0.6(MFI), CHT 투여군이 11.0 ± 2.1(MFI)로 나타나, Dexa 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게(**, p<0.01) 감소하였다(Fig. 3B). IL-6 사이토카인은 정상군이 104.5 ± 9.0(MFI), 대조군이 448.3 ± 26.9(MFI), Dexa 투여군은 168.5 ± 12.9(MFI), CHT 투여군은 171.2 ± 10.2(MFI)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게(***, p<0.001) 감소하였다(Fig. 3C). 마지막으로 IL-13 사이토카인은 정상군이 36.0 ± 5.2(MFI), 대조군이 85.1 ± 9.9(MFI), Dexa 투여군이 65.3 ± 6.5(MFI), CHT 투여군이 27.2 ± 1.9(MFI)로 나타나, CHT 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게(**, p<0.01) 감소하였다(Fig. 3D).

혈청 내 TNF-α 생성량 역시 정상군이 58.8 ± 5.1(MFI), 대조군이 66.8 ± 8.2(MFI)로 나타나, 대조군에서 정상군에 비하여 증가하였으며, Dexa 투여군은 57.5 ± 2.7(MFI), CHT 투여군은 41.8 ± 3.7(MFI)로 나타나, CHT 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게(*, p<0.05) 감소하였다(Fig. 3E).



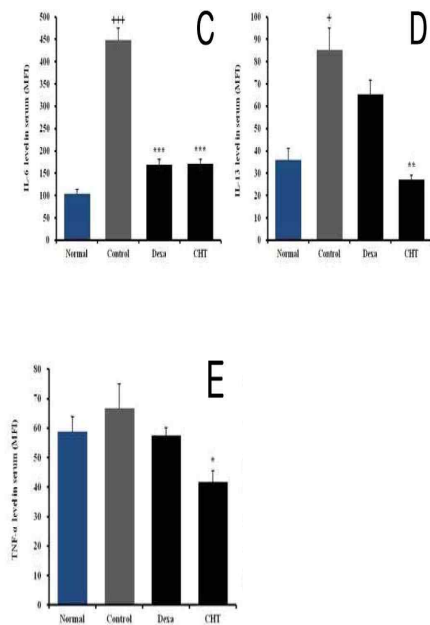


Fig. 3. Effects of CHT on the level of IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 & TNF- α in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice.

The levels of IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 & TNF- α were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay(FMIA) kit. The results were 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(*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

3. Histamine 생성량에 미치는 영향

혈청 내 histamine의 생성량을 측정한 결과, 정상군은 35.7 ± 4.8 (ng/ml), 대조군은 78.1 ± 5.0 (ng/ml)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는(++ , $p < 0.01$) 증가를 나타내었다. 이에 비해 Dexa 투여군은 40.3 ± 4.6 (ng/

ml), CHT 투여군은 41.7 ± 3.4 (ng/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게(**, $p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 4).

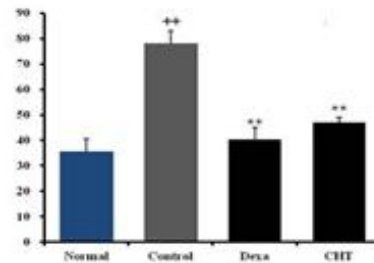


Fig. 4. Effects of CHT on the level of histamine in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice.

The levels of histamine were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay(FMIA) kit. The results were 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(**, $p < 0.01$).

4. 혈청 내 IgE 및 IgG1 생성량에 미치는 영향
 혈청 내 IgE를 측정한 결과, 정상군은 447.6 ± 48.4 (ng/ml), 대조군은 726.4 ± 22.3 으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는(++ , $p < 0.01$) 증가를 나타내었다. 이에 비해 Dexa 투여군 513.4 ± 23.5 , CHT 투여군은 556.3 ± 13.3 으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게(***, $p < 0.001$) 감소하였다(Fig. 5A). IgG1은 정상군이 3088.2 ± 228.6 (μ g/ml), 대조군이 4833.7 ± 153.5 , Dexa 투여군이 3798.9 ± 41.7 , CHT 투여군이 3833.3 ± 126.6 으로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게(**, $p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 5B).

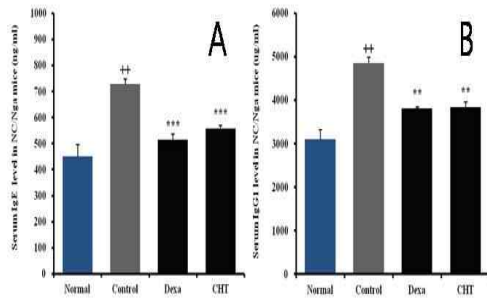


Fig. 5. Effects of CHT on the level of IgE & IgG1 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice.

The levels of IgE & IgG1 were determined using a commercially available ELISA kit. The results were 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).

IV. 고 찰

한의학에서 아토피피부염(AD)은 癢痒感, 紅斑, 浮腫, 滲出, 鱗屑 등의 발현 증상에 준해 濕疹, 奶癬, 浸淫瘡, 胎熱, 血風瘡, 四蠻風 등의 범주에 속하는 염증성 피부질환으로 인식되고 있다²¹⁻²³. 따라서 AD 치료제 개발 및 임상 활용을 위한 다양한 실험적 연구에서 염증 관련 인자 억제 효능에 관한 연구가 꾸준히 이루어져 왔다.

산화적 스트레스와 활성산소의 과다 등은 염증 반응으로 촉진시키는 인자로²⁴⁻²⁶, 박 등²⁷은 加味四物湯이 활성산소종 및 산화질소 생성을 억제시키고 염증 매개인자의 생성을 감소시킴으로써 항아토피 치료제로서의 활용도를 제고할 수 있음을 제시하였고, 김 등²⁸은 ‘淸肌消毒湯’, 정 등²⁹은 ‘石紫解肌湯’, 김 등¹⁵은 ‘淸華湯’의 항산화 및 항염증 효능을 실험적으로 규명함으로써

AD 치료 처방 개발을 위한 기초 자료 제공과 더불어 피부 질환에 활용되는 임상 활용방에 대한 객관적이고 과학적인 규명을 진행한 바 있다.

면역학적으로 AD는 T 세포의 불균형^{30,31} 및 혈중 IgE 증가³²가 보고 되고 있다. T 세포는 Th1 세포와 Th2 세포의 길항작용에 의해 면역 조절을 하게 되는데, AD는 Th1과 Th2의 균형이 깨져 Th2 세포로 크게 기울어져 일어난다.

Th2 세포는 다양한 사이토카인과 케모카인 인자들을 생성하여 AD의 진행을 유도하는데, Th2 세포에서 발현된 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 등의 사이토카인은 B 림프구의 생성과 분화를 유도하며³³. 특히 IL-4와 IL-13은 B 세포에서 IgE를 생성하도록 유도하고, IL-5는 호산구를 활성화시켜 염증을 일으킨다³⁴.

최근 한의학에서는 이와 같은 면역학적 기전을 바탕으로 단일약물, 고서에 기재된 처방들의 효능 평가와 더불어 임상적으로 활용되는 AD 치료제의 효능평가를 실험적으로 규명하고자 하는 노력이 지속적으로 이루어지고 있다.

본 연구에서도 NC/Nga 생쥐를 이용하여 이미 선행 연구로 항산화 및 항염증 효능이 검증된 淸華湯을 시료로 하여 배부 피부 및 혈청에서의 사이토카인과 면역글로블린의 변화 및 조직학적 변화 등을 검색하여 본 시료의 AD 치료제로서의 EBM을 제시하고자 하였다.

淸華湯의 구성 및 본초학적 효능은 앞서 보고한¹⁵ 바와 같이 淸熱凉血, 淸熱燥濕, 發散風寒, 淸熱解毒瀉火, 發散風熱, 祛風止濕, 利尿通淋, 淸熱利濕, 消腫解毒 등의 효능이 있는 玄麥, 赤芍藥, 黃芩, 荊芥, 防風, 金銀花, 連翹, 梔子, 牛蒡子, 浮萍草, 薄荷, 秦艽, 滑石, 樺皮, 柳根皮 등으로 구성되어 있다.

AD의 가장 핵심적 증상으로 가려움증을 들 수 있으며, 가려움증과 긁는 행위는 AD 환자의 피부 병변을 악화시키는 악순환적 요소이다. 따라서 AD 치료제의 소양감 조절 작용은 중요하며 가려움증을 개선시킴으로써 AD 증상 완화 등의 치료적 효과를 기대해 볼 수 있다.

먼저 본 실험에서는 7주령의 NC/Nga 생쥐가

AD 병변과 유사한 증상이 나타날 수 있도록 등 부위를 제모한 후 2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB)를 반복 도포하였다. 대조군에 대한 CHT 투여군의 AD 심화 정도를 관능적 방법에 의해 측정하였으며, 총체적인 실험 결과로 볼 수 있는 피부염 지수(clinical skin index)를 계산하였는데, 최종 3주 후에 CHT 투여군이 대조군에 비해 47.1%로 유의성 있게(***, $p < 0.001$) 감소하였음을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이 같은 피부염 지수는 홍반, 건조, 부종, 혈종, 짓무름, 태선화 등을 근거로 한다는 점에서 이들 증상에 본 시료가 유의성이 있음을 확인할 수 있었다.

다음으로 Th2 세포의 활성화로 증가하는 IL-4, IL-5, IL-13 생성량을 확인한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 각각 144.4%, 153.8%, 136.4%로 유의성 있게(+++, $p < 0.01$, +, $p < 0.05$) 증가하였으며, 대조군에 비해 CHT 투여군은 각각 52.3%, 33.3%, 68.0%로 감소하였음이 확인되었다(Fig. 3A, 3B, 3D). 특히 유의성 있는 결과를 나타낸 IL-4 및 IL-13 생성량 감소는 B세포의 IgE 생성 억제 결과로 이어지면서, 혈청 내 IgE 생성량이 대조군에 비해 23.4% 감소되어 유의성 있는(***, $p < 0.001$) 결과가 나타났다(Fig. 5A). Th2 세포의 활성화에 따라 IL-4, IL-5, IL-10과 같은 사이토카인이 증가하면서, IL-6의 분비도 증가하게 되는데(-), IL-6 생성량 역시 CHT 투여군에서 대조군에 비해 61.8% 유의성 있게(***, $p < 0.001$) 감소하였다(Fig. 3C). 이는 김 등15)의 in vitro 실험에서 본 시료가 LPS를 처리한 Raw 264.7 cells에서 IL-6 생성량을 감소시킴으로써 염증 억제 효과가 있다는 보고와 부합되는 결과이다.

혈청 내 IgE 생성량 감소는 IgE가 비만세포를 자극하여 염증물질과 함께 생성되는 histamine 생성량 감소 결과로 이어지는데, histamine은 즉시형 과민반응과 소양감을 유발하는 주요 매개체로, 두드러기나 천식 등의 알레르기성 질환 등에 주요한 작용을 하며 실제 이러한 환자들의 혈액에서 히스타민의 농도 증가가 관찰 된다^{35,36)}. 즉 IgE 생성량 감소와 더불어 histamine 생성량 감

소는 AD 치료제로서의 효과 검증에 객관적인 지표로 사용하는데, 본 실험에서도 혈청 내 histamine 생성량은 정상군에 비해 대조군에서 118.8% 증가하였으나 CHT 투여군은 대조군에 비해 46.6% 유의성 있게(**, $p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 4).

또 Th2 세포의 활성화로 인한 IL-4의 반응으로 IgE가 분비될 때 같이 증가하는 면역 글로블린인 IgG1은 바이러스에 대한 항체가 가장 많고, IgE와 마찬가지로 AD에 영향을 미친다고 보고된 바가 있다³⁷⁾. IgE 생성량과 마찬가지로 혈청에서 검색한 IgG1의 생성량은 정상군에 비해 대조군에서 56.5% 증가한 반면, CHT 투여군에서는 대조군에 비해 20.7% 유의성 있게(**, $p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 5B).

만성 염증성 반응과 관련된 TNF- α 는 활성화된 대식세포 등에서 분비되며, 대식세포는 염증 반응시에 TNF- α 와 함께 ROS(reactive oxygen species), IL-1 β , IL-6와 같은 사이토카인을 생산한다⁴⁰⁾. CHT 투여군은 혈청 내 IL-6 생성량 감소 결과와 마찬가지로 TNF- α 생성량도 대조군에 비해 37.4% 유의성 있게(*, $p < 0.05$) 감소시켰으며(Fig. 3E), 이 또한 김 등15)의 in vitro에서의 결과와 부합된다.

결과적으로 in vitro, in vivo 실험 모두에서 본 시료인 淸華湯의 직접적인 항아토피피부염 효능을 육안적, 임상적으로 확인할 수 있었고, 이와 관련된 병리적 면역 인자들의 억제능을 통하여 치료 기전을 객관적으로 증명함으로써 임상적 활용에 대한 과학적 근거를 제공하였다. 그러나 임상에서 활용되고 있는 한방 처방의 과학적 근거 제시는 대부분 기존의 연구 방식에 의해 이루어지고 있고, 본 연구의 목적이 EBM 구축을 위한 기초 자료 제공이라는 점에서 기전에 대한 결과는 한계가 있다. 또한 약물 구성 역시 한의학적인 이론에 의해 복잡하게 이루어져 있어 전체적인 약리적 효능을 규명하는 것 역시 어려운 점이 있다. 따라서 향후에는 다양한 효능을 가진 처방, 혹은 기존 실험 처방들의 상호 비교를 통한 기전 연구 내지, 효능을 나타내는 개별 약물들의 새로

은 조합에 대한 연구 등이 보완적으로 이루어져야 할 필요성이 있으며, 한의학적 병태 모델 개발에 대한 논의도 심도있게 이루어져야 할 것으로 보인다.

V. 결 론

淸華湯(HT)을 시료로 NC/Nga 생쥐 모델을 통해 관련 사이토카인의 변화 및 면역글로블린 생성량 변화 등을 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. HT는 대조군에 비해 피부염 지수(clinical skin index)를 47.1% 유의성 있게 감소시켰다.

2. HT는 대조군에 비해 혈청 내 IL-4, IL-6, IL-13, TNF- α 생성량을 각각 52.3%, 61.8%, 68.0%, 37.4% 유의성 있게 감소시켰으며, IL-5 생성량은 33.3% 감소시켰다.

3. HT는 대조군에 비해 histamine 생성량을 46.6% 유의성 있게 감소시켰다.

4. HT는 대조군에 비해 혈청 내 면역글로블린인 IgE, IgG1 생성량을 각각 23.4%, 20.7% 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 동물 병태 모델에서의 실험 결과는 항산화 및 항염증 효능이 검증된 in vitro 실험 결과와 더불어 淸華湯의 아토피피부염에 대한 객관적인 효능을 제시해 주고 있어 임상 활용 제고와 더불어 EBM 기초적 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

<감사의 글>

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

참고문헌

1. 홍정호 : 아토피의 치료에 관한 양방과 한방, 민간요법과 자연치유법에 관한 고찰, 생태유아교육연구, 7(1):65-85, 2008.
2. 이정현 : 진찰과 설문조사를 통한 초등학생의 아토피피부염 유병률 및 위험요인 비교, 성균관대학교대학원, 2010.
3. 최원준 : 서울지역 영아 및 유아의 아토피피부염 유병률과 위험인자에 대한 조사, 한양대학교대학원, 2011.
4. 방숙현 : 소아, 청소년 아토피피부염에서 DPCP 면역요법의 치료효과, 이화여자대학교대학원, 2005.
5. 이금선, 정현미, 오세균, 정재훈, 강태진 : BALB/c 마우스에서 생약복합제의 아토피 치료 효능, 생약학회지, 43(1):59-65, 2012.
6. 양희진, 박계원, 김현석, 조수목, 박기문 : 생약재 추출물의 아토피 완화 효과, 한국식품과학회지, 42(1):109-114, 2010.
7. 손인평, 임운영, 김형미, 김민영, 석장미, 김영희 외 : 한국의 아토피피부염 환자에서 혼합생약추출물 함유 로션의 효능에 대한 예비연구, 천식 및 알레르기, 32(1):26-33, 2012.
8. 주영현, 원종현, 김지윤, 조광현, 민경업, 김규환 : NC/Nga 마우스에서의 아토피피부염 모델 개발 및 피부염 병변에 대한 다래 추출물의 효과, 대한피부과학회지, 47(10):1105-1112, 2009.
9. 정의령, 김운범 : 平胃散加味方이 아토피피부염을 유발한 NC/Nga mouse에 미치는 영향, 한방안이비인후피부과학회지, 24(2):16-27, 2011.
10. 박응호, 유지현, 김선빈, 이용구, 김동희 : 荊芥連翹湯醱酵方이 NC/Nga mouse 동물 병태에 미치는 영향, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 19(2):65-83, 2011.
11. 신상호, 김미보, 변석미, 이호섭, 박선규,

- 고우신, 윤화정 : 아토피 피부염의 외치법에 대한 고찰 : 국내 논문을 중심으로, 한방안이비인후피부과학회지, 21(2):80-93, 2008.
12. 김선빈, 최학주, 김동희 : 아토피 피부염에 대한 황토가미방과 外治方 兼用에 관한 研究, 대전대학교한의학연구소논문집, 17(2): 51-68, 2008.
13. 민영규, 최정화, 김종한, 박수연 : 消風散 加減方과 外治方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향, 한방안이비인후피부과학회지, 18(1):116-134, 2005.
14. 황치환, 윤채성, 송승현, 원영호, 황충연 : 葛根解肌湯加味方과 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염에 미치는 영향, 한방안이비인후피부과학회지, 21(2):1-18, 2008.
15. 김진우, 김선빈, 오정민, 윤미영, 이기무, 김동희 : 淸華湯의 항산화 및 항염증 효능, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 20(2): 29-39, 2012.
16. 박은정, 신소영 : 荊芥連翹湯과 加味荊芥連翹湯이 消炎·鎮痛 및 抗알레르기에 미치는 影響, 대한한방소아과학회지, 11(1): 249-273, 1997.
17. 정재중, 구선영, 고은비, 이정석, 김동일 : 四物湯加味方의 항산화 활성에 대한 실험적 연구, 대한한방부인과과학회지, 23(3): 26-37, 2010.
18. 김양호, 조한백 : 解毒四物湯의 抗炎效果 및 免疫反應에 關한 研究, 대한한방부인과과학회지, 21(2):166-183, 2008.
19. 윤찬호, 노석선 : 사물탕가미방이 염증치료 및 예방에 미치는 영향에 대한 연구, 대한안이비인후피부과학회지, 17(3):18-25, 2004.
20. 김정진, 양성완, 손낙원, 안규석 : 加味生料四物湯의 抗炎症 효과와 止痒膏의 아토피피부염 손상 및 止痒 효과에 미치는 영향, 동의생리병리학회지, 17(2):428-435, 2003.
21. 김덕곤 외 : 동의 소아과학, 정담, pp.660-664, 2002.
22. Sampson HA : Atopic dermatitis, Ann Allergy, 69(6):469-479, 1992.
23. 김태윤 : 아토피피부염 치료의 최신 경향, 소아알레르기 호흡기학회지, 19(3):209-219, 2009.
24. Tsukahara H : Biomarkers for oxidative stress: clinical application in pediatric medicine, Curr Med Chem, 14(3): 339-351, 2007.
25. Ciencewicki J, Trivedi S, Kleeberger SR : Oxidants and the pathogenesis of lung diseases, J Allergy Clin Immunol, 122(3):456-468, 2008.
26. Zeyrek D, Cakmak A, Atas A, Kocyigit A, Erel O : DNA damage in children with asthma bronchiale and its association with oxidative and antioxidative measurements, Pediatr Allergy Immunol, 20(4):370-376, 2009.
27. 박지원, 김선빈, 김은아, 전지애, 이기무, 김동희 : 加味四物湯의 항염증 효능에 관한 연구, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 20(2):17-27, 2012.
28. 김혜림, 김선빈, 윤미영, 이기무, 김동희 : 淸肌消毒湯이 아토피피부염 염증 관련 인자에 미치는 영향, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 20(2): 41-52, 2012.
29. 정대웅, 최학주, 김선빈, 이기무, 김동희 : 石紫解肌湯이 아토피피부염 유관 인자인 산화적 손상과 염증 인자에 미치는 영향, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 20(2): 53-65, 2012.
30. 박주희, 이광훈, 김진우, 노영석, 박천욱, 박원석 외 : 아토피피부염 환자에서 APDDR-0801 보습 제품의 치료 효능, 대한피부과학회지, 48(2):93-100, 2010.
31. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA,

- Schopf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, et al. : A role for Th1 and Th2 in the immunopathogenesis of atopic dermatitis, *Immunol Today*, 19(8): 359-361, 1998.
32. Renz H, Brodie C, Bradley K, Leung DY, Gelfand EW : Enhancement of IgE production by anti-CD40 antibody in atopic dermatitis, *J Allergy Clin Immunol*, 93(3):658-668, 1994.
33. Aversa G, Punnonen J, Cocks BG, de Waal Malefyt R, Vega F Jr, Zurawski SM, et al. : An interleukin 4(IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4(IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors, *J Exp Med* 178: 2213-2218, 1993.
34. 김정원 : 알레르기 및 면역학적 관점에서의 아토피피부염, *대한피부과학회지*, 41(6):687-689, 2003.
35. Wasserman SI : Mediators of immediate hypersensitivity, *J Allergy Clin Immunol*, 72(2):101-119, 1983.
36. White MV : The role of histamine in allergic disease, *J Allergy Clin Immunol*, 86:599-605, 1990.
37. 신길란, 김양원 : Chamomile German 오일도포가 아토피성 피부염을 가진 NC/Nga 생쥐모델의 혈청 IgE와 IgG1양 변동에 미치는 영향, *한국생활과학회지*, 18(2):501-507, 2009.
38. Chen L, Martinez O, Overbergh L, Mathieu C, Prabhakar BS, Chan LS : Early up-regulation of Th2 cytokines and late surge of Th1 cytokines in an atopic dermatitis model, *Clin Exp Immunol*, 138(3):375-387, 2004.
39. Yawalkar N, Uquccioni M, Scharer J, Braunwalder J, Karlen S, Dewald B, et al. : Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis, *J Invest Dermatol*, 113(1):43-48, 1999.
40. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP : Production of tumor necrosis factor-alpha interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P, *Neuropeptides*, 37(6): 355-361, 2003.

