대한한의학 방제학회지 제21권 1호
Herbal Formula Science (HFS)
2013:21(1):131-141
pISSN 1229-1218

Official Journal of The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study
Available at http://www.ompak.okdanche.com HFS

Original Article / 원저

加減拱辰丹 (WSY-1075)의 접촉성 피부염 유발 모델동물에 대한 개선효과

황성연[1,2]·이가위[1]·이승호[1]·김홍준[1*]

1:우석대학교 한의과대학 방제학교실, 2:한국전통의학연구소

The Ameliorative Effects of Gagam-GongJin-dan (WSY-1075) in Contact Dermatitis-induced Animal Model

Sung Yeoun Hwang[1,2] · Chia Wei Lee[1] · Seung Ho Lee[1] · Hong Jun Kim[1*]

1:Department of Korean Medical Prescription, Woosuk University,
2:Korea Bio Medical Science Institute

ABSTRACT

Objectives : This study was performed to assess the ameliorative effects of Gagam-GongJin-dan (WSY-1075) composited with Corni Fructus, Angelica gigantis Radix, Lycii Fructus, Ginseng Radix, Cervi parvum Cornu and Cinnamomi Cortex in contact dermatitis animal model.

Methods : WSY-1075 was orally administrated the various concentrations (50-400 mg/kg, body weight/day) with one time per day for 10 days from 4 days after DNFB sensitization. We investigated ameliorative effects of WST-1075 on the scratching behavior, skin clinical serverity and inflammatory mediators in 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced contact dermatitis mice.

Results : The orally administration of WSY-1075 (400 mg/kg) inhibited the scratching behavior induced by sensitization and challenge with DNFB. WSY-1075 (200 mg/kg or 400 mg/kg) administration also reduced the skin damage, inflammatory mediators, mast cell infiltration induced by DNFB. Moreover, WSY-1075 (above 200 mg/kg) administration inhibited the serum levels of IgE and IL-4 in DNFB-induced contact dermatitis mice.

ⓒ 2013 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study
This is an open access journal which permits unresticted access via the internet (URL, http://www.ompak.okdanche.com.) non-commercial use, dist ribution, reproduction and providing the original work is properly cited.

Conclusions : These results suggest that WSY-1075 administration (200 mg/kg or 400 mg/kg) has the ameliorative effects on the scratching behavior, the clinical signs, mast cell infiltration and inflammatory mediators in DNFB-induced contact dermatitis animal model mice.

Keyword : WSY-1075, Contact dermatitis, Scratching behavior, Ameliorative effects, GongJin-dan (拱辰丹)

Ⅰ. 서 론

공진단(拱辰丹)은 송대(宋代)의 『시제백일선방(是齊百一選方)』[1]에 최초 수록된 이후 동의보감(東醫寶鑑)[2] 등의 후대 의서에서 다수 인용되었고 현대에서 한의학적인 수승화강(水升火降)의 이론에 입각하여 장부의 허손을 예방하고 치료하는 것을 목적으로 활용되는 처방이다[3]. 공진단은 助陽補精하는 鹿茸, 養血潤燥하는 當歸, 固精强陰·助陽收澁하는 山茱萸, 開竅하는 麝香의 4가지 약물로 구성되어 있으나 사향 등은 가격적인 문제나 진위 등의 논란으로 인하여 목향이나 침향과 같은 대체약물로 이루어진 처방이 활용되며 동의보감 내에서도 흑원(黑元)과 같은 동일 효능의 구성이 변화된 처방이 활용되는 것을 볼 수 있다. 이에 항산화 작용이나 면역기능 조절에 우수하다고 알려진 세가지 약물을 가감하여 새로운 가감공진단(加減拱辰丹)(이후 WSY-1075)처방을 만들었다.

알레르기성 질환(allergic disease)은 아나필락시스(anaphylaxis), 천식(asthma), 비염(rhinitis) 및 피부습진(eczema) 등을 유발할 수 있는데, 전 세계적으로 22%가 알레르기성 질환에 노출되어있어 인류의 건강을 크게 훼손하고 있다[4,5]. 이러한 알레르기성 질환이 폭발적으로 증가하는 이유는 환경오염, 식생활 및 생활환경의 변화로 인한 알레르겐(allergen)의 증가요인을 둘 수 있다[6]. 알레르겐에 감작(sensitization)되어 일어날 수 있는 피부습진은 접촉성 피부염(contact dermatitis), 아토피피부염(atopic dermatitis), 지루성피부염(seborrheic dermatitis) 및 건조피부염(xerotic dermatitis) 등 습진(eczema)을 비롯한 두드러기(urticaria)을 대표적으로 들 수 있다[7-10]. 피부에 알레르겐이 감작되면, 피부발진과 가려움을 통해 염증반응이 가속되어 아토피 피부염이 유발될 수 있는데, 계속적으로 피부와 호흡기에 알레르겐이 감작되면 천식을 비롯한 알레르기성 비염 등 호흡기 질환이 발생될 수 있으며, 안구주위에 전이되어 알레르기성 결막염을 야기할 수 있다[12-14].

이러한 알레르기성 질환의 면역학적 특징은 type 2 helper T (Th2) 세포와 같은 협조유도 세포의 편향된 발달을 비롯한 비만세포(mast cells)의 과도한 활성화 등 면역불균형(immune disorder)에 의한 급성 및 만성 염증반응(acute/chronic inflammatory response)을 일으키기 때문이다[4,7-9]. 또한 알레르겐에 의해 활성화된 비만세포는 T 세포를 활성화시켜 아토피 피부염을 비롯한 급성 및 만성 염증질환을 일으키는데 있어 핵심적으로 참여한다[11-13]. 비만세포가 활성화되면, 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)의 생성뿐만 아니라 histamine과 같은 가려움 유발물질(pruritogen)을 방출한다[12,13]. 이와 같이 비만세포 유래 염증성 사이토카인은 염증반응을 더욱 촉진시키는 동시에 histamine과 같은 물질을 방출함으로써 가려움증을 더욱 촉진시켜 피부장벽을 붕괴시키는 원인이 된다[6]. 그러므로 부작용 없이 가려움 완화 및 염증 매개물을 조절할 수 있는 물질을 발굴한다면, 각종 알레르기성 질환을 제어하는데 효과적일 것으로 판단되어 한약처방을 이용해 접촉성 피부염[15]이나 아토피 피부염[16]에서 면역 관련 인자에 대한 영향이 보고되어졌다.

따라서 본 연구는 山茱萸(Corni Fructus), 當歸(Angelica gigantis Radix), 枸杞子(Lycii Fructus),

*교신저자 : 김홍준, 전북 완주군 삼례읍 후정리 우석대학교 한의과대학 205호
· Tel : 063-290-1131
· E-mail : kimboncho@woosuuk.ac.kr
•접수 2013/05/30 •수정 2013/06/10 •채택 2013/06/12

鹿茸(Ginseng Radix), 紅蔘(Cervi parvum Cornu), 肉桂(Cinnamomi Cortex) 등 한약제로 조성된 WSY-1075의 면역조절능을 알아보고자, 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)로 유도한 접촉성 피부염 모델 마우스에서 WSY-1075을 투여한 후 가려움 완화작용과 더불어 면역세포의 활성정도를 판별하기 위해서 비만세포의 침윤정도의 조직학적 분석과 IgE와 IL-4 생성 조절에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

Immunoglobulin E (IgE)와 Interleukin-1 (IL-1) ELISA kit은 R&D Systems사(Minneapolis, USA)로부터 구입하였다. 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), hematoxylin & eosin (H&E), toluidine blue와 기타 시약은 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

2) WSY-1075 조성물

WSY-1075 조성 약물의 구성은 山茱萸, 當歸, 枸杞子, 鹿茸, 紅蔘, 肉桂로 표 1과 같다. 이들 약물은 울산광명단제약(울산, 대한민국)으로부터 구입하여, 우석대학교 한의과대학 방제학교실에서 동정한 후 그 표본은 방제학교실의 표본실에 보관하였다.

3) 실험동물

무균환경에서 사육된 7주령의 수컷 Balb/c 마우스는 중앙실험동물(주)(서울시, 대한민국)에서 구입하였고, 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 낮과 밤의 주기를 12시간씩 하였고, 온도(20-22℃)와 습도(50-60%)는 일정하게 유지하였으며, 실험동물위원회의 규정에 준하여 실험하였다.

2. 방법

1) WST-1075 조성물의 추출

표 1과 같이 조성된 WSY-1075을 1,000g 계량하여 30% 에탄올(10 L)에 넣어 25℃에서 하루 동안 상온 추출하였다. 추출액은 0.45 μm syringe filter (Advantec, Japan)를 통해 여과하고 여액을 60 ℃이하에서 감압농축 (Model, EYELA ROTARY EVAPORATOR NE-2001, JAPAN)한 후 동결건조(Model, ILSHIN Freeze Dryer FD8508, KOREA)하여 건조엑스 249.5 g(평균수득율 24.95 %) 을 얻어 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) DNFB 유도 접촉성 피부염 모델

DNFB 유도 접촉성 피부염 모델 동물을 확립하기 위한 모든 실험 과정은 Fig. 1과 같이 acetone과 olive 오일을 3:1로 제조한 용매에 0.15% DNFB를 제조하여 1일과 4일에 각각 등쪽 피부(100 μL)에 감작하였다. 두 번째 감작일인 4일부터 대조군은 생리식염수 만 복강에 하루에 한번 실험 종료일까지 경구투여 하였고, 실험군은 WSY-1075 조성물(50-400 mg/kg)을 하루에 한번 실험 종료일인 13일까지 주사하였다. 첫 번째 감작일로부터 7일, 10일과 13일에 3일 간격으로 0.2% DNFB를 감작시킨 부위에 같은 용량으로 공격(challenge)을 하였다.

Table 1. Composition of WSY-1075

Drug name	Crude drug name	Scientific name	%
山茱萸	Corni Fructus	*Cornus officinalis*	25
當 歸	Angelica gigantis Radix	*Angelica gigas*	25
枸杞子	Lycii Fructus	*Lycium chinense*	25
紅 蔘	Ginseng Radix	*Panax ginseng*	10
鹿 茸	Cervi parvum Cornu	*Cervus elaphus*	10
桂 皮	Cinnamomi Cortex	*Cinnamomum cassia*	5

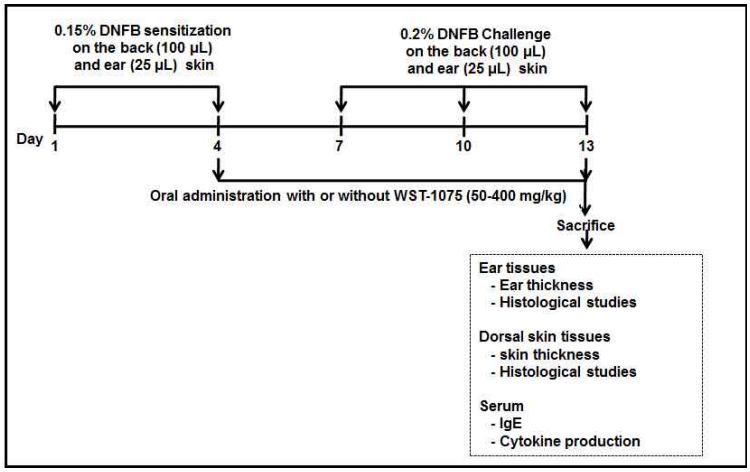

Fig. 1. Schematic diagram of experimental protocol. Mice were sensitized on skin with and without 25 μl (ear skin) or 100 μl (dorsal skin) of 0.15 % DNFB on day 1 and 4. WSY-1075 was orally administrated the various concentrations (50-400 mg/kg, body weight/day) with one time per day for 10 days from 4 days after DNFB sensitization. Mice were challenged on ear and dorsal skin with and without 25 μL or 100 μl of 0.2% DNFB on day 7, 10 and 13.

3) 가려움증 판정 실험

가려움증 실험은 마지막 DNFB로 공격한 후 즉시 Mihara[14]의 방법을 따라 micro-camera (ONCCTV, 서울, 대한민국)를 사용하여 60분 동안 녹화하였으며, 뒷발로 가려움증 유발물질이 주입된 부위를 긁는 횟수를 이중맹검법으로 계수하여 평가하였다. 각 유발물질에 따른 실험은 각각 다른 날에 진행되었으며 매 실험에 사용된 마우스는 1회 사용되었다.

4) 귀 부종과 피부조직 두께 측정 및 혈청 채취

마지막 공격 후 5시간 후에 귀 부종은 귀을 자르고 정밀저울로 무게를 측정하였으며, 등 피부조직의 두께는 digital caliper (Mitutoyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 혈액은 마우스의 간 문맥으로부터 얻고 원심분리기를 이용하여 혈청을 얻었다.

5) 피부병변의 평가

피부상태는 시작일로부터 1일 간격으로 최종일까지 사진을 찍어 조사하였다. 피부의 건조상태(dryness)와 스켈링(scaling) 그리고 미란(erosion), 찰과상(excoriation), 출혈 등을 체크하여 병변이 없는 상태를 0점(none), 가벼운 상태를 1점(mild), 중간 상태를 2점(moderate), 심한상태를 3점(severe)을 주었고 각 단계별로 총점수부여하여 평가하였다.

6) 피부조직

실험 과정에 따라 대조군과 실험군을 대상으로 희생시키고, 피부조직 약 5×5 mm를 적출하여 4% paraformaldehyde (pH 7.4)로 고정하고 일련의 과정을 통하여 파라핀 블록을 제작한 후, 5 μm 간격으로 피부조직을 종단면으로 절편하였다. 조직학적 검사와 백혈구 침윤을 검사하기 위해 H&E 또는 toluidine blue로 염색하고 저배율(×40)에서 관찰하고, 100배 현미경 시야에서 사진을 찍어 제시하였고, 백혈구의 침윤을 확인하기 위해 400배 현미경 시야에서 검경하였다(Leica, Wetzbre, Germany).

7) IgE와 IL-4의 측정

DNFB로 감작과 공격된 마우스의 IgE와 IL-4의 측정은 추출물 투여 종료 후 5시간에 혈액을 채취하고 혈청으로부터 측정하였다. IgE와 IL-4는 anti-mouse IgE와 anti-mouse IL-4 항체에 특이적으로 작용하는 ELISA kit을 사용하여 R&D Systems사가 제공하는 방법에

준하여 측정하고 정량하였다. 요약하면, 5배 희석 혈청 100 μL을 각각의 항체가 코팅된 plate에 주입하고 반응시킨 후 잘 세척한 다음 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체를 주입하고 반응시킨 후 발색 기질을 주입하고 반응시켜 ELISA reader (Molecular Devise, CA, USA)로 측정하였으며, 각 물질에 대한 정량은 각각의 물질을 농도별로 처리하여 반응시켜 표준곡선을 정하고 세포상층액 또는 혈청에 함유된 물질의 량을 계산하였다.

8) 통계처리

모든 실험값은 평균±표준오차(mean ± SE)로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 한계는 $p<0.05$ 수준에서 정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 접촉성 피부염 마우스에서 가려움증에 미치는 WSY-1075의 효과

본 실험은 DNFB로 유도한 접촉성 피부염 Balb/c 마우스 모델에서 WSY-1075 조성물이 피부가려움증에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 정상군에 비해서 대조군의 가려움증에 의한 긁는 회수는 232.5±22.5으로 매우 증가하였다($p<0.001$). WSY-1075 투여군은 50 mg/kg과 100 mg/kg 투여군에서는 약간 증가하는 경향이 있었고, 200 mg/kg 투여군은 긁는 횟수가 감소되는 경향이 있었다. 특히 400 mg/kg WSY-1075 투여군은 긁는 횟수가 127.5±20.7로 약 45% 감소되었다($p<0.05$). 그러므로 DNFB로 유도한 접촉성 피부염 Balb/c 마우스 모델에서 WSY-1075 조성물이 피부가려운증을 효과적으로 완화시킬 수 있는 농도는 400 mg/kg이었다.

2. 접촉성 피부염 마우스에서 임상 및 조직학적 변화에 대한 WSY-1075의 효과

본 실험은 DNFB로 유도한 피부 가려움증에 대한 WSY-1075의 완화 효과를 검증한 후 접촉성 피부염 Balb/c 마우스 모델에서 WSY-1075가 피부 증상의 임상 및 조직학적 변화에 대한 영향을 조사하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 정상군에 비해서 대조군의 마우스는 귀뿐만 아니라 등 피부 병변이 매우 심각하게 변하였고, 조직학적으로도 귀와 등 피부 병변이 심각하였다. 또한 50 mg/kg과 100 mg/kg의 WSY-1075 투여군에서도 대조군 마우스의 형태 및 조직학적 변화도 유사하였거나 심했다. 그러나 200 mg/kg 투여군에서는 형태와 조직학적으로 그 증상이 완화

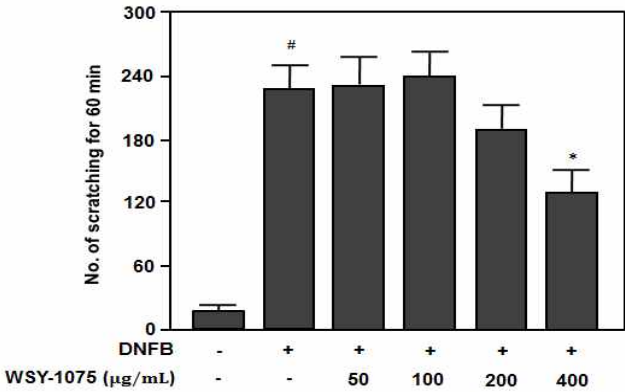

Fig. 2. The antipruritic effect of WSY-1075 on the scratching behavior induced by DNFB in Balb/c mice. As shown in figure 1, Mice were sensitized and challenged with DNFB, and administrated with WSY-1075. Scratching of skin site by the hind paw was counted for 60 min. Data are shown as the cumulative means±SE of 5 individual mice. #p<0.001compared with the normal group. *$p<0.05$ compared with DNFB alone group.

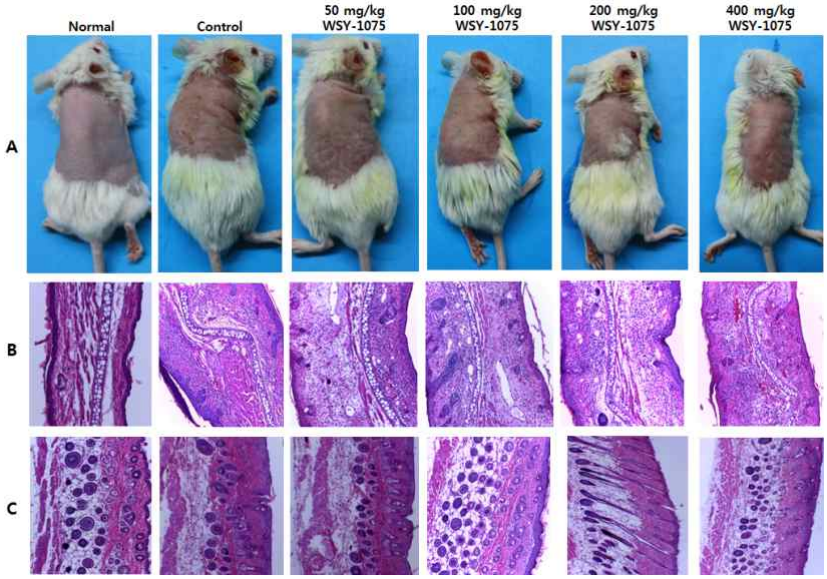

Fig. 3. Effects of WSY-1075 on DNFB-induced skin damage in Balb/c mice. As shown in figure 1, mice were sensitized and challenged with DNFB, and administrated with WSY-1075. (A) Mouse morphology, (B) Ear tissues stained with H&E and (C) Dorsal skin tissues stained with H&E . Magnification: ×100.

되는 경향이 있었으며, 400 mg/kg 투여군에서는 형태와 조직학적 증상이 현저히 완화되는 효과가 있었다.

이러한 결과를 바탕으로 DNFB로 유도한 접촉성 피부염 Balb/c 마우스 모델에서 WSY-1075 투여 효과를 좀더 자세히 조사하기 위해서 실험 종료일에 귀 부종, 표피두께 및 귀와 등 피부의 병변을 조사하였다. 그 결과 Fig 4와 같이 정상

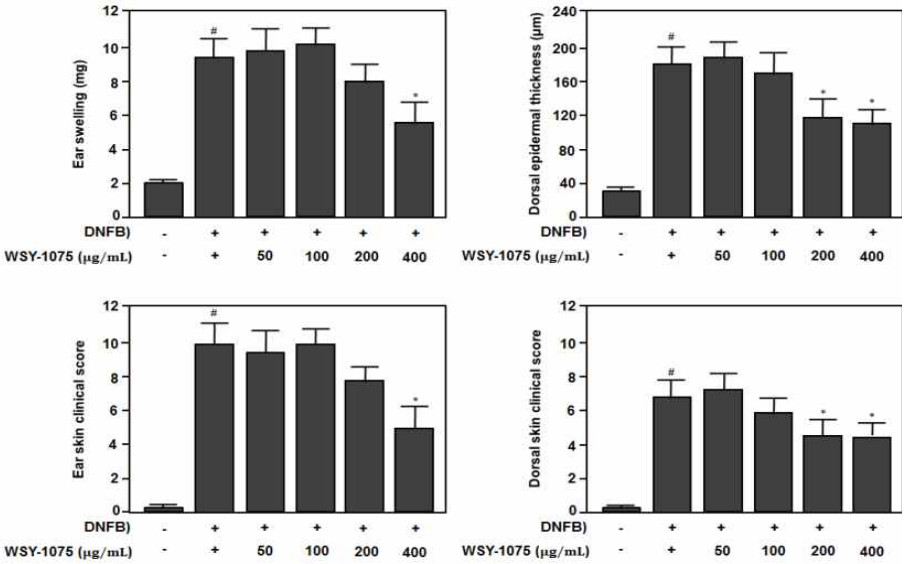

Fig. 4. Effects of WSY-1075 on DNFB-induced ear edema, dorsal skin thickness and skin clinnical score in Balb/c mice. As shown in figure 1, mice were sensitized and challenged with DNFB, and administrated with WSY-1075. Data are shown as the means±SE of 5 individual mice. #p<0.001compared with the normal group. *p<0.05 compared with DNFB alone group.

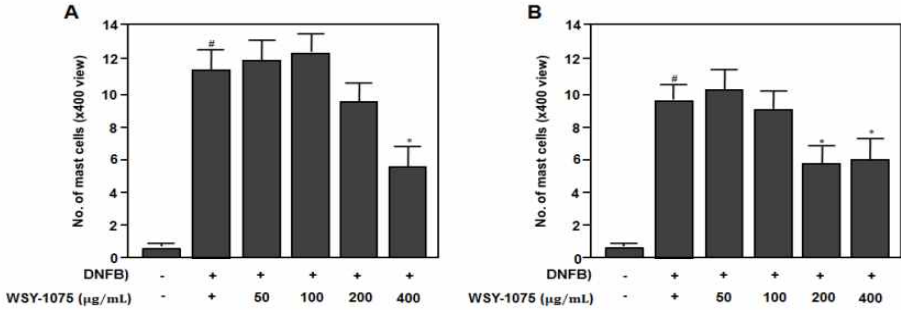

Fig. 5. Effects of WSY-1075 on DNFB-induced mast cell infiltration in Balb/c mice. As shown in figure 1, mice were sensitized and challenged with DNFB, and administrated with WSY-1075. Ear and dorsal skin tissues were stained with toluidine blue as described in the section of materials and methods. (A) Number of mast cell in ear tissue and (B) Number of mast cell in dorsal tissue Data are shown as the means±SE of 5 individual mice. #p<0.001compared with the normal group. *p<0.05 compared with DNFB alone group.

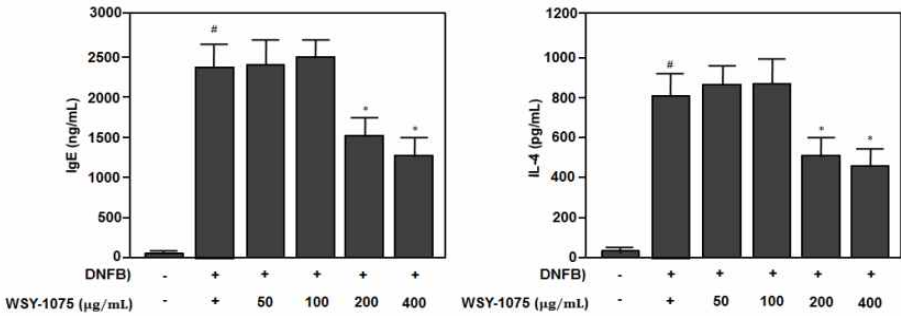

Fig. 6. Effects of WSY-1075 on DNFB-induced mast cell infiltration in Balb/c mice. As shown in figure 1, mice were sensitized and challenged with DNFB, and administrated with WSY-1075. Serum levels of IgE and IL-4 were measured by ELISA assay method. Data are shown as the means±SE of 5 individual mice. #p<0.001compared with the normal group. *p<0.05 compared with DNFB alone group.

군에 비해서 대조군의 마우스는 귀 부종(9.70±1.35 mg)과 등피부두께(180.1±20.1 μm) 뿐만 아니라 귀 병변(9.81±1.46점)과 등 피부병변(6.89±1.12점)이 매우 심각하였다. 또한 50 mg/kg과 100 mg/kg의 WSY-1075 투여군에서도 대조군 마우스의 귀 부종뿐만 아니라 등 피부 병변이 대조군과 유사하였거나 증상이 악화되는 경향이 있었다. 그러나 200 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 등 피부두께(120.1±9.85 μm)와 등 병변(4.75±0.81점)이 유의하게 완화되었고(p<0.05, 귀 부종과 두께는 완화되는 경향이 있었다. 특히 400 mg/kg 투여군에서는 귀 부종(5.71±1.23 mg)과 등 피부두께(109.8±21.3 μm) 뿐만 아니라 귀 병변(5.12±1.23점)과 등 피부 병변(4.53±0.81점)이 현저히 완화되는 효과가 있었다(p<0.05).

3. 접촉성 피부염 마우스에서 비만 침윤과 혈청의 과민반응 매개물에 대한 WSY-1075의 효과

본 실험은 DNFB로 유도한 피부 가려움증에 대한 WSY-1075의 완화 효과를 검증한 후 접촉성 피부염 Balb/c 마우스 모델에서 WSY-1075가 비만세포 침윤과 혈청 내 과민반응 매개물인 IgE와 IL-4의 생성 변화에 대한 영향을 조사하였다. 비만세포의 침윤은 귀와 등 피부조직을 toluidine blue로 염색한 후 H&E로 대조 염색하여 400배 현미경시야에서 검경하였다. 그 결과 Fig. 5과 같이 정상군에 비해서 대조군의 귀 조직과 등 피부조직내로 비만세포 침윤이 각각 11.51±1.25개와 9.62±0.91개로 매우 현저히 증가하였다(p<0.001). 또한 50 mg/kg과 100 mg/kg의 WSY-1075 투여군에서도 대조군 마우스의 귀와 등 피부조직에서

도 비만세포 침윤이 유사하였거나 약간 증가하였다. 그러나 200 mg/kg 투여군에서는 귀 조직이 아닌 등 피부조직의 비만세포 침윤은 5.71±1.13개로 유의하게 감소되었다($p<0.05$). 특히 400 mg/kg 투여군에서는 귀와 등 피부조직에서 비만세포 침윤이 각각 5.78±1.19개와 6.02±1.43개로 현저히 감소하는 효과가 있었다 ($p<0.05$).

마지막으로 혈청 내 IgE와 IL-4의 측정은 ELISA법으로 측정하였다. 그 결과 Fig. 6과 같이 정상군에 비해서 대조군의 IgE와 IL-4는 각각 2,401±245 ng/mL과 809±128 pg/mL로 현저히 증가하였다($p<0.001$). 또한 50 mg/kg과 100 mg/kg의 WSY-1075 투여군의 귀와 등 피부조직에서 비만세포 침윤이 대조군과 유사하거나 약간 증가하였다. 그러나 200 mg/kg와 400 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 IgE가 약 34%와 약 48% 감소하였고($p<0.05$), IL-4가 약 35%와 약 40%가 감소하는 효과가 있었다($p<0.01$).

Ⅳ. 고 찰

WSY-1075 처방은 면역조절을 목적으로 임상에서 활용되고 있는 공진단(拱辰丹)처방을 가감하여 구성되었다. 공진단(拱辰丹)은 『시재백일선방(是齋百一選方)』을 출전으로 하여 『보제방(普濟方)』, 『세의득효방(世醫得效方)』, 『동의보감(東醫寶鑑)』 등에 다수의 한의서에 응용되어온 처방으로 『是齋百一選方』 《卷之十八·第二十六門》에는 "夫方當壯年而真氣猶怯 此乃稟賦素弱 非虛衰而然也 僭燥之藥尤宜速戒 勿謂厥逆便云陰多 如斯治之 不惟不能愈疾 大病自此生矣 滋益之方 群品稍眾 藥力難見功效 但固天元一氣 使水升火降 則五臟自和 百病自去 此方主之 行在孫方葛丞相婦人少年時服之果效 鹿茸酥 炙去毛皮用 山茱萸 新好 有肉紅潤者 川當歸 洗去土 各四兩 麝香 半兩別研 上三件為末 入麝香拌勻 酒煮 面糊為丸 如梧桐子大 每服一百粒 或五十粒 溫酒 鹽湯下"라 기록[1]하고 있고, 『동의보감(東醫寶鑑)』[2]에는 肝虛藥으로 되어 있으며 助陽補精하는 鹿茸, 養血潤燥하는 當歸, 固精强陰·助陽收澁하는 山茱萸, 開竅하는 麝香의 4가지 약물로 구성된 처방으로 先天의 氣를 補하고 水升火降을 순조롭게 하여 心身을 補益함으로서 장부의 虛損에 대한 예방 및 치료를 하는 세의득효방의 내용을 재인용하여 기록하고 있다.

공진단 원방을 통한 연구로는 張[17]은 혈청성분의 함량 변화를 통하여 공진단의 强精補氣하는 효능이 우수하다고 보고하였고 김[18] 역시 혈청변화와 적혈구 응집소 등을 관찰하여 공진단이 면역반응, 항피로 및 내분비 기능에 효과가 있다고 보고하였다. 그리고 장[19]과 황[20]은 Alzheimer's disease에서 拱辰丹이 효과가 있다고 보고하였다. 또 최[21]는 항산화 및 항노화 작용이 있는 아미노산과 무기질 성분이 많이 있음을 밝혀내었다. 외에 김[22]은 가미공진단처방이 Balb/c 마우스에서 Ovalbumin 면역반응에 대해 억제효과가 입증을 밝혔고 다른 논문[23]에서는 Acetaminophen 유도 마우스 간손상에 대한 加減拱辰丹 추출물의 간보호효과를 관찰하여 보고한 바 있다. WSY-1075는 이러한 공진단 처방에 한의학적인 사용과 실험적 근거를 바탕으로 하여 사향을 제외하고 기존에 면역기능의 조절이나 항산화효과가 있다고 알려진 구기자, 홍삼, 육계로 처방을 구성하였다.

구기자는 茄科(가지과; Solanaceae)에 속한 蔓生灌木인 구기자나무 *Lycium chinense* Mill. 또는 寧夏枸杞 *L. barbarum* L.의 성숙한 과실을 건조한 것으로 滋補肝腎, 益精明目, 潤肺하는 효능으로 혈당강하[24], 간기능 개선[25], 항산화[24,26] 등의 효과를 나타내고[27], 홍삼은 인삼을 가공한 것으로 홍삼의 성분들이 원기회복. 자양강장, 항암, 항염증효과가 있다고 알려져 있으며[27,28], 육계는 樟科(녹나무과; Lauraceae)에 속한 상록교목인 肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl의 樹皮를 건조한 것으로 補元陽, 暖脾胃, 除積冷, 通血脈하는 효능으로 혈액순환을 촉진하고 건위작용이 있으며 면역억제, 항종양, 항산화 효과가 있다[27].

면역조절 효능을 평가하기 위해서 DNFB로 Balb/c 마우스 귀조직과 등 피부조직에 감작과 공격을 하여 접촉성 피부염을 유발하면서 WSY-

1075(50-400 mg/kg)을 투여하고 농도별로 그 효과를 평가하였다. DNFB는 아미노산의 아민류와 반응하여 dinitrophenyl (DNP) 아미노산을 생산하는데, DNP 아미노산은 생체에서 항원으로 작용한다. 생체의 피부에 DNFB가 감작되면, 협조유도 T 세포 중 Th1 세포를 편향적으로 활성화시켜 T 세포 매개 접촉성 피부염을 유발하는 것으로 알려져 있다[29-31]. 그 결과 DNFB에 의해서 유발된 가려움증, 피부병변, 비만세포 침윤 및 혈청 과민반응매개물을 조절하는데 있어서 50-100 mg/kg의 WSY-1075 농도에서는 대조군과 유사하거나 약간 증가시키는 경향이 있었지만, 200 mg/kg의 WSY-1075 투여군에서는 이들 증상을 억제하는 경향이 있을 뿐만 아니라 혈청 내 IgE와 IL-4의 생성을 억제하는 효과가 있었다. 특히 400 mg/kg의 WSY-1075 투여군에서는 DNFB가 유발하는 가려움증, 피부병변, 비만세포 침윤 및 혈청 내 IgE와 IL-4의 생성을 현저히 억제하는 효과가 있었다.

가려움증은 접촉성 피부염뿐만 아니라 아토피 피부염의 주 증상일 뿐만 아니라 피부장벽을 붕괴시키는 원인으로 피부염증반응을 더욱 악화시킨다[6]. 본 연구에서 DNFB로 유발된 대조군의 피부 가려움증은 60분간 누적 긁는 횟수가 약 200회 이상이었는데, 200 mg/kg 이하의 WSY-1075 투여군에서는 긁는 횟수를 억제하는데 효과가 없었지만, 400 mg/kg의 WSY-1075 투여군에서는 약 45%로 가려움증을 완화시키는 효과가 있었다 (Fig. 2).

DNFB가 생체의 피부에 감작되면, 협조유도세포의 편향된 발달을 비롯한 비만세포의 과도한 활성화 등 면역불균형에 의한 급성 및 만성 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있다[32]. 그러므로 본 연구는 Balb/c 마우스 귀 조직과 등 피부조직에 DNFB로 감작과 공격을 통해 접촉성 피부염을 유발하면서 WSY-1075 조성물을 투여하여 피부 병변 및 피부 조직 내 비만세포의 침윤에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 DNFB에 의해서 유발된 귀 부종, 등 피부두께, 피부병변 그리고 비만세포의 침윤에 대해서 100 mg/kg의 WSY-1075 투여군에서는 약간 증가하는 경향이 있었으나, 400 mg/kg의 WSY-1075 투여군에서는 이들 증상과 비만세포침윤이 현저히 억제되는 효과가 있었다.

한편 혈청 내 IgE의 과도한 생성은 접촉성 피부염을 비롯한 아토피 피부염과 피부 과민반응의 전형적인 특징인데, 이러한 현상은 협조유도 T 세포의 활성에 의해 생산된 IL-4가 B 세포를 자극하여 IgE을 대량 생산하기 때문이다[4,9,33]. 따라서 본 연구는 DNFB로 유도된 접촉성 피부 모델 마우스에서 WSY-1075 투여에 따른 혈청의 IgE와 IL-4의 생성량을 조사하였다. 그 결과 Fig. 6과 같이 50 mg/kg과 100 mg/kg의 WSY-1075 투여군에서는 IgE와 IL-4의 생성량이 약간 증가하는 경향이 있었으나, 200 mg/kg과 400 mg/kg의 WSY-1075 투여군에서는 IgE와 IL-4의 생성량이 현저히 감소하는 효과를 보였다.

이상의 결과를 종합해보면, DNFB 유도접촉성 피부염 마우스 모델에서 피부가려움증, 귀부종, 피부병변, 비만세포 침윤 및 혈청의 IgE와 IL-4의 생성을 효과적으로 억제할 수 있는 WSY-1075의 투여농도는 최소한 200 mg/kg 이상 되어야 한다는 것을 제시해 주었다.

V. 결 론

山茱萸, 當歸, 枸杞子, 鹿茸, 紅蔘, 肉桂 등 한약재로 조성된 WSY-1075의 면역능 조절 효능을 평가하기 위해서 DNFB로 Balb/c 마우스 귀조직과 등 피부조직에 감작과 공격을 하여 접촉성 피부염을 유발하면서 WSY-1075(50-400 mg/kg)을 투여하고 농도별로 그 효과를 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DNFB로 유도된 가려움증 억제에 효과적인 WSY-1075의 농도는 400 mg/kg이었다.

2. DNFB로 유도된 귀의 부종과 임상학적 개선에 대한 WSY-1075 농도는 400 mg/kg이었고, 등 피부 두께와 임상학적 개선 농도는 200 mg/kg과 400 mg/kg 이었다.

3. DNFB로 유도된 귀조직의 비만세포의 침윤

억제 WSY-1075의 농도는 400 mg/kg이었고, 등 피부조직의 비만세포의 침윤억제 WSY-1075의 농도는 200 mg/kg과 400 mg/kg이었다.

4. DNFB로 유도된 혈청의 IgE와 IL-4의 생성에 유의한 WSY-1075 농도는 200 mg/kg과 400 mg/kg 이었다.

이상의 결과를 종합해보면, FB 유도접촉성 피부염 마우스 모델에서 피부가려움증, 귀부종, 피부병변, 비만세포 침윤 및 혈청의 IgE와 IL-4의 생성을 효과적으로 억제할 수 있는 WSY-1075의 투여농도는 최소한 200 mg/kg 이상되어야한다는 것을 제시해 주었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지가족부의 한의약산업육성 제품화지원 연구개발사업 연구비(F110004)의 지원받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 王璆. 是齋百一選方. 上海科學出版社. 1991. Available from:URL:http://jicheng.tw/jcw/book/%E6%98%AF%E9%BD%8B%E7%99%BE%E4%B8%80%E9%81%B8%E6%96%B9/24. Accessed Jun 10, 2013)
2. 許浚. 新對譯東醫寶鑑. 서울:법인문화사. 2007:1251.
3. 성기문, 허래경, 송봉근. 공진단이 MCAO모델 흰쥐에서 gliosis 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2009;30:674-84.
4. Kay AB. Overview of allergy and allergic diseases: with a view to the future. Br Med Bull. 2000;56:843-64.
5. Warner JO, Kaliner MA, Crisci CD, Del Giacco S, Frew AJ, Liu GH, Maspero J, Moon HB, Nakagawa T, Potter PC, Rosenwasser LJ, Singh AB, Valovirta E, Van Cauwenberge P. Allergy practice worldwide: a report by the World Allergy Organization Specialty and Training Council. Int Arch Allergy Immunol. 2006;139:166-74.
6. Takai T, Ikeda S. Barrier dysfunction caused by environmental proteases in the pathogenesis of allergic diseases. Allergol Int. 2011;60:25-35.
7. Spergel JM. Epidemiology of atopic dermatitis and atopic march in children. Immunol Allergy Clin North Am. 2010;30:269-80.
8. Hon KL, Yong V, Leung TF. Research statistics in atopic eczema: what disease is this? Ital J Pediatr. 2012;38:26.
9. Boguniewicz M, Leung DY. Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications. J Allergy Clin Immunol. 2010;125:4-13.
10. Vitaliti G, Morselli I, Di Stefano V, Lanzafame A, La Rosa M. Leonardi S. Urticaria and anaphilaxis in a child after inhalation of lentils vapours: a case report and literature review. Ital J Pediatr. 2012;38:71.
11. Nakae S, Suto H, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell-derived TNF. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:6467-72.
12. Galli SJ. New concepts about the mast cell. N Engl J Med. 1993;328:257-65.
13. Mekori YA. Metcalfe DD. Mast cells in innate immunity. Immunol Rev. 2000;173:131-40.
14. Mihara K, Kuratani K, Matsui T, Nakamura M, Yokota K. Vital role of the itch-scratch response in development of spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. Br J Dermatol. 2004;151:335-45.
15. 배은영, 김동희. 거풍조습해독방(祛風燥濕解毒方)이 접촉성피부염 유발 NC/Nga 생쥐의 면역관련 인자에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21:1491-8.
16. 이병웅, 김선빈, 송향희. 아토피피부염 동물 병태모델에서 석자해기탕(石紫解肌湯)의 면역조절

작용에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2012;26:446-54.
17. 장용훈. 拱辰丹이 强精補氣作用에 미치는 영향. 대구한의과대학 대학원. 1989.
18. 김장현. 拱辰丹이 면역반응, 항피로 및 내분비 기능에 미치는 영향. 경희대학교대학원. 1990.
19. 장하정, 성우용, 이승현, 손지형, 한승혜, 정효창. 공진단(拱辰丹)이 알츠하이머형 치매 환자에게 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2004;15:141-8.
20. 정대규, 황선미. 공진단(拱辰丹)이 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 병태(病態)모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2004;15:103-18.
21. 최금희, 박치상. 공진단(拱辰丹)의 성분 분석 및 항산화(抗酸化) 작용에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2007;22:51-63.
22. 김홍준, 황성연, 목지예, 황병순, 정승일, 장선일. Balb/c 마우스에서 Ovalbumin 면역반응에 대한 加減拱辰丹 추출물의 억제효과. 대한본초학회지. 2009;24:127-35.
23. 김홍준, 목지예, 박광현, 정승일, 황병순, 황성연, 조정근, 장선일. Acetaminophen 유도 마우스 간 손상에 대한 加減拱辰丹 추출물의 간보호 효과. 대한본초학회지. 2010;25:149-57.
24. 김옥경. 구기자 분획물이 Streptozotocin으로 유발 된 당뇨 흰쥐에 대한 항당뇨 및 항산화작용에 미치는 효과. 생약학회지. 2009;40:128-36.
25. 강금석, 권륜희, 김인덕. LPS로 유도된 급성 간독성에 대한 구기자 추출물의 보호 효과. 약학회지 . 2007;51:296-300.
26. 조영제, 천성숙, 차원섭. 구기자(Lycii fructus) 추출물의 항산화와 항고혈압 효과. 한국식품영양과학회지. 2005;34:1308-13.
27. 주영승. 증보운곡본초학. 전주:도서출판 우석. 2013:(上)779-782, (下)1194-1204, 1346-1349.
28. 박영철, 임정대, 김종봉, 이선동. 홍삼의 약리와 독성 기전에 대한 고찰. 大韓韓醫學會誌. 2012;33:200-30.
29. Kitagaki H, Fujisawa S, Watanabe K, Hayakawa K, Shiohara T. Immediate-type hypersensitivity response followed by a late reaction is induced by repeated epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice. J Invest Dermatol. 1995;105:749-55.
30. Nagai H, Matsuo A, Hiyama H, Inagaki N, Kawada K. Immunoglobulin E production in mice by means of contact sensitization with a simple chemical, hapten. J Allergy Clin Immunol. 1997;100:S39-S44.
31. Takeshita K, Yamasaki T, Akira S, Gantner F, Bacon KB. Essential role of MHC II-independent $CD4^+$ T cells, IL-4 and STAT6 in contact hypersensitivity induced by fluorescein isothiocyanate in the mouse. Int Immunol. 2004;16:685-95.
32. Casset A, Braun JJ. Relationships between indoor allergens, sensitization, and allergic asthma and rhinitis symptoms. Rev Mal Respir. 2010;27:913-20.
33. Lee SJ, Oh SG, Seo SW, Ahn HJ, Geum D, Cho JJ, Park CS. Oral administration of Astragalus membranaceus inhibits the development of DNFB-induced dermatitis in NC/Nga mice. Biol Pharm Bull. 2007;30:1468-71.