

Ovalbumin으로 유발된 아토피피부염 마우스 모델에서 자감초탕(炙甘草湯)의 항알레르기 효과

노현민¹ · 박승구¹ · 김원정² · 조은희^{3,4} · 기현희^{5,6} · 김대기⁵ · 박민철^{1,4*}

1: 원광대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과, 2: 원광대학교 한방피부과학연구소, 3: 원광대학교 한의과대학 침구과,
4: 원광대학교 한국전통의학연구소, 5: 전북대학교 의과대학 및 의과학연구소, 6: 원광대학교 약학대학 한약학과 및 원광한약연구소

Anti-allergic Effects of Jagamcho-tang in Ovalbumin-induced Atopic Dermatitis Mouse Model

Hyeon-Min Noh¹, Sung-gu Park¹, Wonjeong Kim², Eun-Hee Jo^{3,4}, Hyeon-Hui Ki^{5,6}, Dae-Ki Kim⁵, Min-Cheol Park^{1,4*}

1: Department of Korean Medical Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, Wonkwang University,

2: Traditional Korean Medical Dermatology Institute, Wonkwang University,

3: Department of Acupuncture and Moxibustion, Wonkwang University, 4: Traditional Korean Medicine Institute, Wonkwang University,

5: Department of Medicine, Chonbuk National University & Medical Science Institute

6: Department of Korean Medicine, Wonkwang University & Wonkwang Korean Medicine Institute

Activated T helper 2 (Th2) immune function is hallmark of various allergic diseases. We investigated the anti-allergic effect of Jagamcho-tang extract(JE) on ovalbumin(OVA)-induced atopic dermatitis mice model and OVA-stimulated splenocytes isolated from the mice. Mice were intraperitoneally injected OVA/alum solution 2 times at interval of 14 days, followed by oral administration of JE for 7 days. After administration, mice were subcutaneously injected with OVA in ear. JE treatment reduced ear swelling and infiltration of inflammatory cells in ear. Serum levels of interleukin(IL)-4 and immunoglobulins, such as total-IgE and OVA-specific IgE, were decreased in JE treated group. Furthermore, JE treatment decreased OVA-induced Th2-associated cytokines like IL-4, IL-5 and IL-13 mRNA levels in splenocytes. In conclusion, JE reduced allergic immune response via IgE production and Th2 response in OVA-sensitized mice, suggesting that JE could be useful prescription for allergic diseases including atopic dermatitis.

keywords : Jagamcho-tang(炙甘草湯), Atopic dermatitis, Allergy, T helper 2, Immunoglobulin E

서 론

아토피 피부염(Atopic Dermatitis, AD)은 대표적인 알레르기 성 질환 중 하나로 심한 소양감을 동반하는 만성 재발성 피부병이다. AD는 급성기에는 Th2 편재 면역 반응을, 만성기에는 Th2에서 Th1으로 변화하는 양상을 보인다. 알레르겐, 피부건조, 긁는 행위 등으로 인한 피부장벽손상은 다량의 TSLP(Thymic stromal lymphopoietin)방출을 유발하며 이로 인해 Th2 cytokine(IL-4, 5, 13)이 과량 생산된다. 과잉 생산된 Th2 cytokine은 필라그린 유전자 발현을 저해하여 피부 장벽을 손상시키며, B cell을 자극하여 알레르겐에 대한 면역글로블린 E(IgE)를 생성한다. 증가된 IgE는 Th2 편재 세포 면역 반응에 관여하여 피부염을 유발 및 악화시키

고, 일부 IgE는 자가반응(auto-reactivity)을 나타내어 AD의 발생 및 중증도에 기여한다. 이처럼 Th2경로는 AD를 이해하고 치료법을 개발하기 위한 핵심적인 표적경로이다¹⁾.

뇌와 면역 체계는 신체의 두 가지 주요 적응 시스템으로 면역 반응이 일어나는 동안 상호 영향을 미치며 이는 항상성 유지에 필수적이다. 중추 신경계는 뇌하수체를 통한 신경 내분비 체액 유출과 말초 조직의 교감 신경계, 부교감 신경계(콜린성) 및 펩티드성/감각 신경 분포를 통한 직접적인 연결을 통해 면역 시스템에 영향을 미친다. 따라서 순환 호르몬 또는 국소적으로 방출된 신경 전달 물질과 신경 펩티드는 항원 제시, 사이토카인 및 항체 분비, Th1 또는 Th2 반응의 선택, 림프구 활성화와 같은 주요 면역 기능을 조절한다. 면역 반응 중에 방출되는 IL-1, IL-6 및 종양 괴사

* Corresponding author

Min Cheol Park, Department of Korean Medical Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 460 Iksandaero, Iksan, Republic of Korea

E-mail : spinx11@wku.ac.kr · Tel : +82-63-859-2821

Received : 2017/06/23 · Revised : 2017/08/24 · Accepted : 2017/10/19

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2017.10.31.5.277>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

인자(TNF)와 같은 특정 사이토카인은 스트레스 시스템의 중심 구성 요소를 활성화시키고 신경 전달 물질 네트워크 활동을 변화시키며 발열, 졸음, 피로, 식욕 부진 및 성욕 감소를 유발한다²⁾. 따라서 비정상적인 면역계의 활성화는 피로를 유발시킬 수 있다. 대표적인 알레르기 질환 중 하나인 AD도 마찬가지로 Th2 편재 면역반응과 함께 각종 염증증상을 보이며 피로를 동반하기도 한다.

한의학적으로 AD는 奶癬, 胎癬, 胎斂瘡, 濕疹, 濕瘡, 四彎風, 淫瘡 등의 범주에서 볼 수 있다. 원인으로는 선천적으로 稟性不耐하여 內로는 胎火濕熱이 蘊積하고 外로는 風熱之邪가 侵襲하여 肌膚에 蘊積한 所治³⁾라고 언급하고 있는데, 이는 내부적인 면역기능 저하, 비정상적인 면역 과활성, 염증반응간의 연관관계를 서술하는 것으로 해석할 수 있다.

炙甘草湯은 “傷寒脈結代 心動悸 炙甘草湯主之⁴⁾”라 하여 益心氣, 補心血, 養心陰, 通心陽, 正氣醒而血脈復하는 효능이 있어 氣虛血少로 인하여 나타나는 心의 動悸와 結代한 脈象을 치료하는 方劑⁴⁾이다. 汗出而悶 脈結心悸의 虛勞, 眞陰損傷으로 인한 呃逆, 肝陽偏亢으로 인한 頭目不清 등에 활용⁴⁾하며 최근에는 각종 심장질환, 교감신경긴장증, 고혈압 등에 임상적으로 활용⁴⁾하고 있으며, 세균성 신경염 및 면역염증질환에도 유효^{5,6)}하다는 보고가 있다. 이에 저자들은 면역계 이상, 염증 증상, 피로와의 연관성에 착안하여 임상적으로 피로와 염증성질환을 동반한 환자군에 炙甘草湯이 유의미한 결과를 얻을 수 있을 것으로 보았다. 이에 炙甘草湯이 AD를 비롯한 알레르기 질환에 대한 개선 효과를 나타내는지 여부를 객관적으로 검증하기 위하여 Ovalbumin으로 감작된 아토피피부염 마우스 모델에 炙甘草湯 추출물(JE)을 투여하여 알레르기 피부반응 완화, 조직의 형태학적 분석에서 염증세포의 침윤 감소, Th2 면역반응에 대한 지표인 Th2 사이토카인 IL-4의 혈중 농도 감소, 알레르겐과의 교차결합으로 인한 비만 세포의 탈과립, 다양한 염증성 매개체 분비 및 알레르기 반응을 유발하는 IgE 감소 여부를 확인하여 유효한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

알레르기 모델 구축을 위한 Ovalbumin은 sigma-Aldrich(St Louis, MO)에서 구입하였으며, aluminum hydroxide(Alum)는 Thermo Scientific(Cramlington, UK)에서 구입하였다. 혈청 내 IL-4사이토카인과 총 IgE 측정을 위한 ELISA kit를 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입하였고, OVA-specific IgE를 분석하기 위한 ELISA kit는 BioLegend(San Diego, CA USA) 제품을 사용하였다. 비장세포의 세포독성을 확인하기 위한 세포배양액 내 Lactate dehydrogenase(LDH) 분석은 Promega(madison, wisconsin, USA) 제품을 사용하였으며, Trizol reagent와 cDNA 합성 kit는 Takara Bio Inc.(Takara Bio Inc, Japan)에서 구입하였다.

2. 추출물(JE) 제조

炙甘草湯은 生地黄 16 麥門冬 8 炙甘草 麻子仁 4 桂枝 生薑 大棗 3 阿膠 2 人蔘 1g/ 1첩을 기준으로 총 20첩 분량(680g)을 사용하여 제조하였다. 물 6500cc에 넣고 100°C로 끓여서 3000cc로 농축하였으며, 동결 건조하여 69.8 g의 분말을 얻었다.

3. 동물모델 및 추출물 투여

OVA를 실험동물에 감작시켜 알레르기 모델을 유발하기 위해 BALB/c계 암컷 6주령을 Samtako(Osan, Korea)에서 공급받았다. 온도는 22±2 °C, 습도는 55±10 %, 조명주기는 12시간으로 유지되는 실험동물 사육장에서 2주 동안 마우스를 적응시켰다. 8주령이 된 실험동물을 난괴법에 의하여 5마리씩 정상군(Normal), OVA 감작군(OVA), OVA 감작+ JE 75mg/kg 투여군(OVA+JE 75), OVA 감작+JE 150mg/kg(OVA+JE 150) 투여군, OVA 감작+Dexamethasone 0.5 mg/kg 투여군(OVA+Dexa)으로 나누었다. OVA 감작 유발은 OVA 20µg과 alum 1mg을 phosphate buffered saline에 희석하여 1차 복강주사 한 후, 14일이 지나고 다시 OVA/alum 용액을 2차 복강주사 하였다. 각 시료는 2차 복강주사한 날에서부터 7일간 정수에 혼탁하여 1일 1회 경구투여하였다. 본 동물실험은 전북대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 윤리 규정 및 지침을 준수하였다.(승인번호 CBNU 2017-0002).

4. 알레르기 피부반응 분석

감작된 알레르겐 OVA에 대한 피부 반응을 측정하기 위해 OVA를 1 mg/mL PBS에 용해하여 각 실험동물의 귀 조직에 20 µL 씩 피내 주사하였다. 알레르겐 노출 후 시간에 따른 부종 및 염증 정도를 측정하기 위해 Thickness gage(Mitutoyo, Tokyo, Japan)를 이용하여 각 실험동물의 귀 조직의 피부 두께를 분석하였다.

5. 조직학적 검사

알레르겐의 피부 노출에 의하여 유도되는 염증 반응을 확인하기 위하여 Hematoxylin & Eosin 염색법으로 형태학적 분석을 실시하였다. 실험 종료 후 실험동물의 귀 조직을 4% 포르말데히드에 고정하고, 저농도에서부터 고농도 에탄올 용액으로 단계적인 탈수 과정을 거친 뒤 파라핀 블록을 제작하였다. 각 조직 블록을 4 µm의 두께로 박절하여 슬라이드에 조직 절편을 붙인 후, 각 조직 슬라이드를 xylene으로 탈파라핀을 한 뒤에 함수시켰다. Hematoxylin 시액을 슬라이드에 1분, Eosin 시액은 3분 처리하여 염색하였으며, 염색이 끝나고 탈수시켜 봉입하고 광학현미경(CX21, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용해 관찰하였다.

6. 혈중 총 IgE 및 OVA-specific IgE 분석

실험동물의 혈액 내 지표를 분석하고자 효소면역분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay)으로 면역글로불린 IgE와 OVA-specific IgE를 측정하였다. 23G의 syringe로 실험동물로부터 혈액을 채취하고 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 총 IgE는 Mouse IgE ELISA Set(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로, OVA-specific한 IgE는 Mouse OVA specific IgE ELISA Kit(BioLegend, San Diego, CA USA)를 사용하여 분석하였다.

7. 혈중 IL-4 사이토카인 분석

위의 실험방법으로 분리된 혈청에서 Mouse ELISA kit(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 IL-4 사이토카인 함량을 분석하였다. plate에 capture antibody를 coating buffer(0.1 M sodium Carbonate, PH9.5)에 희석시켜 sealing tape으로 밀봉하여 4 °C에서 하룻밤동안 부착시켰다. 200 µL의 assay diluent를 각 well에 분주하여 1시간 동안 plate shaker에서 blocking 하고 농도별 IL-4 표준액과 혈청을 각 well에 100 µL씩 분주하고 다시 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응이 끝나고 detection antibody solution을 100 µL씩 분주하여 1시간, 그 후 Avidin-HRP solution을 30분 반응시켰다. 마지막 세척 과정을 제외한 각 단계 사이의 모든 plate의 세척은 wash buffer(0.05 % PBS-Tween 20)를 이용하여 4회 실시하였다. 최종 세척은 wash buffer를 이용하여 5회 실시하였으며, 세척이 끝나고 발색을 위해 100 µL의 TMB substrate를 각 well에 분주하고 20분 동안 반응시켰다. stop solution(2NH₂SO₄)을 100 µL 분주하여 반응을 종료시킨 후 microplate reader(zeniyth 200rt, Anthos, Salzburg, Austria)를 이용하여 450 nm 파장의 흡광도를 측정하여 IL-4의 함량을 분석하였다.

8. 비장세포 분리

비장세포의 생체의 배양을 위해 OVA에 감염된 실험동물로부터 비장을 적출하였다. 비장을 분쇄하여 100 µm cell strainer(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에 통과시킨 후, 단일 세포로 부유시켰다. 세포 부유액 1mL와 Histopaque®-1119 (sigma-Aldrich, St Louis, MO) 3mL를 혼합하여 1600rpm에서 20분 동안 원심분리하여 적혈구를 제거하여 비장세포를 분리하였다. 분리된 비장세포는 RPMI(HyClone Laboratories)배지에 10%의 fetal bovine serum(HyClone Laboratories, Logan, UT, USA) 및 antibiotics(welgene, gyeongsan, korea)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂의 incubator에서 배양하였다.

9. 세포독성 평가 (Lactate dehydrogenase assay)

시료의 비장세포에 대한 독성을 평가하기 위하여 CytoTox96 ®Non-Radioactive cytotoxicity Assay kit(Promega, madison, wisconsin, USA)를 이용하여 세포배양액에서 Lactate dehydrogenase(LDH)를 분석하였다. 48 well plate에 1x10⁶ cells/mL의 비장세포를 분주하고, JE 시료를 25, 50, 100, 200, 400, 800µg/mL의 다양한 농도로 세포에 처리하였다. 세포를 24시간 동안 배양한 후 각 well의 세포배양액을 수집하여 30분 동안 기질용액과 반응시켰다. 반응을 종료시키기 위해 stop solution을 분주하고 490nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

10. RNA 추출 및 Real-time PCR

비장세포를 6 well plate에 1x10⁶cells/mL로 분주한 후, JE를 50, 100, 200µg/mL의 농도로 각각 처리하였다. 1시간 후 감염된 항원인 OVA를 100 µg/mL로 처리한 후 24시간 동안 배양하고 각 well 당 1mL의 trizol 용액(Ambion, Austin, TX, USA)으로 RNA

를 수집하였다. chloroform 200 µL과 섞어 12000rpm, 4°C에서 원심분리하여 상층액을 취하였다. 분리한 상층액에 2-propanol 500 µL과 혼합한 후 다시 12000 rpm, 4 °C에서 10분간 원심분리해 펠릿을 침전시킨 후 75% 에탄올에 세척하고 건조시켰다. 건조된 펠릿을 RNase free water에 녹여 spectrophotometer로 총 RNA를 정량하였으며, 2µg의 RNA를 Prime Script™ II 1st strand cDNA Synthesis kit(Takarabioinc, Otsu, Shiga, Japan)로 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR은 StepOne™Real-Time PCR system(Applied Bio system)으로 comparative CT method로 PCR을 수행하여 mRNA 발현 수준을 비교하였다. PCR의 조건은 95 °C에서 초기 변성 후, 95 °C에서 15초, 60 °C에서 1분의 조건으로 40 cycles로 수행하였다. PCR시 GAPDH 유전자로 각 샘플의 RNA양을 보정하였으며, 각 유전자 검출을 위한 프라이머의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. List of primers for real-time RT-PCR.

Gene		Sequences	Size(bp)
IL-4	sense	ATGGGTCTCAACCCCGAGCTA	142
	anti-sense	TGCATGGCGTCCCTTCTCCT	
IL-5	sense	TGAAGGCCAGCGCTGAAGAC	142
	anti-sense	GCGGACAGCTGTGTCAAGGTC	
IL-13	sense	ATGAGTCTGCAGTATCCCG	194
	anti-sense	CCGTGGCAGACAGGAGTGTT	
GAPDH	sense	CATGGCCTCCGTGTTC	152
	anti-sense	CCTGGTCCTCAGTGTAGC	

11. 통계분석

모든 실험 결과는 평균치(mean)와 표준오차(standard error, SE)로 표시하였다. 유의성은 GraphPad Prism software(version 5.0)를 이용해 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 하였으며, 사후검정방법으로 Tukey's test를 수행하여 P<0.05 수준으로 확인하였다.

결 과

1. 실험동물의 체중에 미치는 영향

약물(JE)에 의한 몸무게 변화를 측정하여 동물에 미치는 영향이 있는 경우를 확인하기 위하여 몸무게의 변화를 관찰하였다. JE는 마우스의 체중 변화에 영향을 주지 않았다(Fig. 1).

2. 알레르기 피부반응 측정

피부조직에 알레르겐을 노출시켰을 때 유도되는 알레르기 피부반응에 대하여 JE에 의한 억제 효과를 확인하기 위해 실험동물의 귀 조직에 오발부민(OVA)용액을 피내주사하여 시간별로 조직의 부종을 측정하였다. 정상군(Normal)은 시간의 변화에 따라 조직의 두께에 유의한 차이를 보이지 않았으나, OVA감작군(OVA-sensitized)군은 OVA 용액 주사 후 조직의 두께가 현저하게 증가하였다. JE 75 mg/kg 투여군(JE 75)에서는 OVA감작군과 모든 시간대에 유의한 차이를 보이지 않았으나 JE 150 mg/kg 투여군(JE 150)에서는 주사 후 6시간 췌에 0.35±0.020 mm를 나타내어 OVA감작군

0.42±0.014 mm과 비교해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

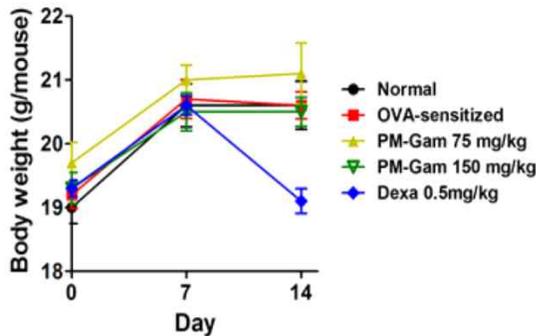


Fig. 1. Effect of JE on body weight change in OVA-sensitized mice. Normal, normal group; OVA-sensitized, OVA sensitization+distilled water group; JE 75, OVA sensitization+JE 75 mg/kg treated group; JE 150, OVA sensitization+JE 150 mg/kg extract treated group; Dexa, OVA sensitization+dexamethasone 0.5 mg/kg treated group. Values are shown as mean ± SE (n=5).

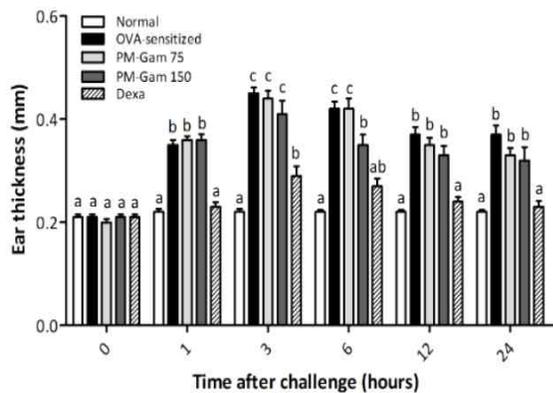


Fig. 2. Effect of JE on allergic skin reaction in OVA-sensitized mice. Allergic skin response at indicated times were measured using a thickness gage. Normal, normal group; OVA-sensitized, OVA sensitization+distilled water group; JE 75, OVA sensitization+JE 75 mg/kg treated group; JE 150, OVA sensitization+JE 150 mg/kg extract treated group; Dexa, OVA sensitization+dexamethasone 0.5 mg/kg treated group. Values are shown as mean ± SE (n=5). Values with different Letters in a column are significantly different at $P < 0.05$ by Tukey's test.

3. 형태학적 변화 분석

OVA 감작마우스에서 JE가 알레르겐 노출에 의한 피부의 조직 병리학적 형태에 미치는 영향을 알아보기 위해 OVA를 피내주사한 귀 조직을 hematoxylin and eosin (HE)염색을 실시하였다. Normal군에 비해 OVA-sensitized군에서는 염증에 의한 부종과 면역세포의 침윤이 현저하게 증가하여 알레르기성 염증반응이 심화된 상태를 보여주었다. JE 75에서는 이러한 피부조직의 형태학적 변화가 OVA-sensitized군과 유의한 차이가 없었으나, JE 150에서는 실험동물의 귀 조직 내에 면역세포의 밀집도가 감소하여 염증반응이 개선되었음을 확인하였다(Fig. 3).

4. 혈청 내 IL-4 사이토카인에 미치는 영향

알레르기에서 활성화 되어있는 Th2 면역반응에 대한 JE의 효

능을 알아보기 위해 Th2 사이토카인 IL-4의 혈청 농도를 분석하였다. 실험동물을 희생시킨 후 혈액에서 혈청을 분리하여 IL-4 사이토카인을 측정된 결과, Normal군에서는 IL-4가 검출되지 않았다. 그에 비해 OVA-sensitized군에서는 10.27±8.01pg/ml로 유의하게 혈청 내 IL-4가 증가하였다. JE 75군에서는 0.27±0.16, JE 150군은 0.09±0.09 pg/ml로 JE 저농도 및 고농도 투여군 모두에서 현저하게 감소하였다. Dexa군에서 0.04±0.04pg/ml를 나타내어 JE가 효과적으로 혈 중 IL-4를 감소시킴을 보여주었다(Table 2).

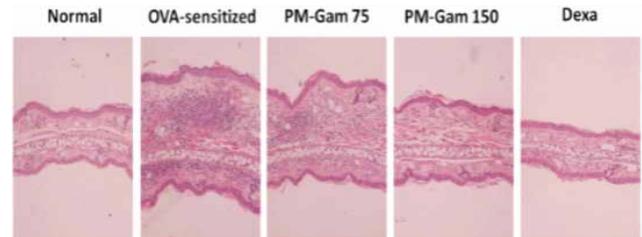


Fig. 3. Effect of JE on histological feature of ear's skin in OVA-sensitized mice. Ear's skin was stained with hematoxylin and eosin reagent and observed by optical microscope. Original magnification: x400. Normal, normal group; OVA-sensitized, OVA sensitization+distilled water group; JE 75, OVA sensitization+JE 75 mg/kg treated group; JE 150, OVA sensitization+JE 150 mg/kg extract treated group; Dexa, OVA sensitization+dexamethasone 0.5 mg/kg treated group.

Table 2. Effect of JE on serum IL-4 levels in OVA-sensitized mice.

Groups ¹⁾	IL-4(pg/ml)
Normal	ND ^{2)a}
OVA-sensitized	10.27±3.58 ^{3)b}
JE 75	0.27±0.16 ^a
JE 150	0.09±0.09 ^a
Dexa	0.04±0.04 ^a

1) Normal, normal group; OVA-sensitized, OVA sensitization+distilled water group; JE 75, OVA sensitization+JE 75 mg/kg treated group; JE 150, OVA sensitization+JE 150 mg/kg extract treated group; Dexa, OVA sensitization+dexamethasone 0.5 mg/kg treated group. 2) ND, Not detectable. 3) Values are shown as mean ± SE (n=5). Values with different Letters in a column are significantly different at $P < 0.05$ by Tukey's test.

5. 혈청 내 Total IgE 및 OVA-specific IgE 분석

많은 알레르기 질환에서 면역글로불린 IgE의 증가를 나타내며, IgE는 비만세포 표면에 부착되어 알레르겐과의 교차결합으로 비만세포의 탈과립을 유발한다. 탈과립으로 인해 histamine, tryptase, leukotrienes, prostaglandins 등의 다양한 염증성 매개체가 분비되고 이 매개체가 알레르기의 즉시형 반응 및 후기 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다⁷⁾. JE가 혈청 내 IgE에 미치는 영향을 알아보기 위해 마우스의 혈청 내에서 Total IgE 및 OVA-specific IgE를 분석하였다. Total IgE는 Normal군에서 7.06±1.25ng/ml였으며, OVA-sensitized군에서는 108.86±14.06ng/ml로 약 15배 증가함으로써 현저한 차이를 보였다. JE 75에서는 77.06±7.01, JE 150에서는 65.74±7.31 ng/ml로 JE 투여가 Total IgE의 형성을 농도 의존적으로 억제하는 것으로 확인하였다. OVA-specific IgE의 농도는 Normal군에서는 검출되지 않았으며, OVA-sensitized군에서는 3.39±0.80ng/ml로 유의하게 증가하였다. JE 75군에서는 1.18±0.19ng/ml, JE 150군에서는 1.09±0.33ng/ml로 OVA-sensitized군에 비하여 유의하게 감소하였다(Table 3).

Table 3. Effect of JE on total IgE and OVA-specific IgE levels of serum in OVA-sensitized mice.

Groups ¹⁾	Total IgE ²⁾ (ng/ml)	OVA-specific IgE ²⁾ (ng/ml)
Normal	7.06±1.25 ^{3)a}	ND ^{4)a}
OVA-sensitized	108.86±14.06 ^c	3.39±0.80 ^c
JE 75	77.06±7.01 ^{bc}	3.12±0.49 ^c
JE 150	65.74±7.31 ^b	1.18±0.19 ^{ab}
Dexa	60.26±14.20 ^b	1.09±0.33 ^{ab}

1) Normal, normal group; OVA-sensitized, OVA sensitization+distilled water group; JE 75, OVA sensitization+JE extract 75 mg/kg treated group; JE 150, OVA sensitization+JE 150 mg/kg extract treated group; Dexa, OVA sensitization+dexamethasone 0.5 mg/kg treated group. 2) Total IgE, Total of antigen-nonspecific IgE; OVA-specific IgE, antigen(OVA)-specific IgE. 3) Values are shown as mean ± SE (n=5). Values with different Letters in a column are significantly different at P < 0.05 by Tukey's test. 4) ND, Not detectable.

6. 비장세포의 세포독성 평가

비장세포의 생체의 배양실험을 위해 JE가 비장세포의 세포독성에 미치는 영향을 평가하고자 세포배양액으로 방출되는 LDH의 양을 측정하였다. JE을 다양한 농도로 비장세포에 처리하고 24시간 동안 배양한 결과, JE은 800µg/ml까지 LDH의 양이 무처리군과 비교해 유의한 차이가 없어 세포독성을 나타내지 않는 것으로 확인하였다(Fig. 4).

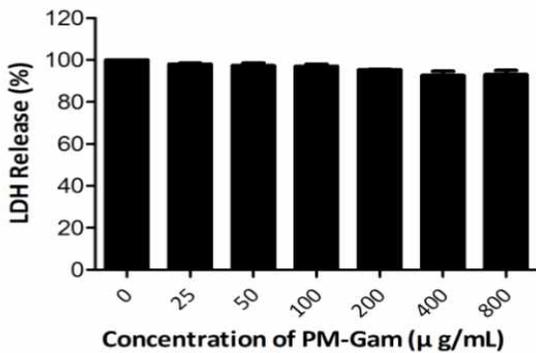


Fig. 4. Effect of JE on cytotoxicity of splenocytes isolated from OVA-sensitized mice. Cells were treated with various doses (25, 50, 100, 200, 400, 800 µg/ml) of JE and incubated 24 h. LDH release was analyzed using CytoTox96® Non-radioactive cytotoxicity Assay kit in culture supernatants. Values are shown as mean ± SE of independent three experiments.

7. 비장세포의 사이토카인 발현에 미치는 영향

면역시스템에서의 Th2 면역반응 증가는 다양한 알레르기 질환에서 특징적으로 나타난다. Th2 사이토카인 IL-4와 IL-13은 IgE 생산을 증가시키며, IL-5는 호산구성 염증 및 천식과 같은 기도과민반응과 관련 있는 것으로 알려져 있다⁸⁾. JE의 알레르기 피부반응 및 IgE 억제효과가 Th2 면역반응과 관련이 있는지 확인하기 위해 OVA에 감작된 마우스로부터 비장세포를 분리하여 배양하였다. JE을 전처리한 비장세포를 OVA로 자극시키고 세포를 수집하여 Th2 사이토카인의 mRNA 발현 수준을 확인하였다.

실험 결과, 무처리군(Ctl)에 비해 OVA처리군에서 현저하게 IL-4, IL-5 및 IL-13의 mRNA 발현이 증가하였다. IL-4는 15.7배, IL-5는 5.0배, IL-13는 8.0배 각각 증가하여 OVA에 반응하여 Th2 사이토카인 발현 수준이 증가함을 확인하였다. JE 100 µg/ml 처리군에서는 IL-4가 22.0 %, IL-5가 68.1 %, IL-13이 20.0 %가 감소

하였으며, JE 200 µg/ml 처리군에서는 IL-4, IL-5, IL-13이 각각 61.8, 93.1, 77.6 % 감소하여 유의적으로 억제되었다. dexamethasone처리군도 각각 89.2, 94.4, 95.5 %가 감소하여 현저하게 Th2 사이토카인을 억제함을 보여주었다(Fig. 5).

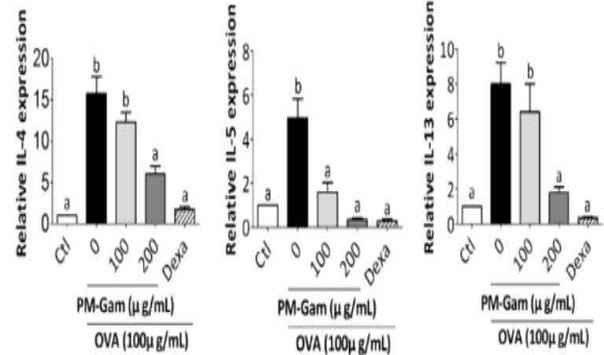


Fig. 5. Effect of JE on Th2 cytokine levels in splenocytes isolated from OVA-sensitized mice. Cells were treated with indicated doses (100, 200 µg/ml) of JE or Dexamethasone (Dexa, 1µM) in the presence or absence of OVA (100 µg/ml). mRNA expression of (A) IL-4, (B) IL-5 and (C) IL-13 was analyzed by real-time RT-PCR. Values with different Letters in a column are significantly different at P < 0.05 by Tukey's test.

고찰

아토피 피부염(Atopic dermatitis, AD)은 어린이의 25%와 성인의 10%에 영향을 미치는 만성 염증성 피부 질환으로 알레르기성 질환 중 하나이다⁹⁾.

현재 AD의 서양의학적 치료로는 피부 연화제, 습식 랩 요법, 비타민 D 보충제, 국소 칼시뉴린 저해제, 국소 코르티코스테로이드(Topical corticosteroids, TCS) 등이 있다. TCS는 효과적이지만 피부 위축 및 감염 감수성을 증가시킬 수 있어 신중하게 사용해야 하며, 광선 요법 및 전신 면역 억제 요법은 기존의 치료법에 불응하는 중증의 환자에게 적용될 수 있지만, 잠재적인 심각한 부작용을 유발할 수 있다.

전신 요법에 비해 AD의 병인 발생에 관여하는 경로인 Th2 축을 표적으로 하는 새로운 치료적 접근법은 더 효과적이고 덜 유해하다. Th2 면역 소인은 지속적인 소양증을 일으키는 피부 표층 염증인 AD의 가장 큰 위험 인자이며, 피부염 환자의 표식자 역할을 하는 혈청 내 IgE level을 높이는 데 영향을 미친다¹⁰⁾.

활성화 된 면역 체계는 피로감을 유발할 수 있는데, 면역계가 활성화되는 동안 면역 세포는 병원균에 대항하는 조절 분자인 염증 유발성 사이토카인과 염증억제성 사이토카인을 생산하고, 사이토카인은 중추신경계에 작용하여 피로를 포함한 행동 변화를 일으키기 때문이다¹¹⁾. 이처럼 피로는 면역학적 불균형으로 인해 발생할 수 있으며, 한의학적으로는 臟腑, 陰陽氣血, 上下 간의 불균형으로 인해 虛症이 유발되는 것에 해당한다¹²⁾. 면역계 활성화와 피로, 염증과의 연관성은 <醫宗金鑑> '虛者는 陰陽氣血精神骨髓津液不足이고, 損者는 外로는 皮脈筋骨 消損.¹³⁾ 만성 피부염인 AD의 병인으로 虛, 虛와 氣血不通, 虛와 風 등이 꼽히는 것¹⁴⁾ 등에서 찾아볼 수 있다.

저자들은 염증과 피로의 상관관계에 착안하여 아토피 피부염을

비롯한 알레르기성 질환에 만성적인 피로, 심폐기능의 저하, 심폐 부위의 진액자양분의 부족으로 인한 제반증상 및 면역염증질환에 주로 쓰이는 炙甘草湯이 유효할 것이라 생각하였으며 이를 규명하기 위한 실험을 진행하였다.

炙甘草湯은 金匱要略에서 기원한 처방으로, 桂枝去芍藥湯과 麥門冬湯에 生地黃, 阿膠, 麻子仁 등을 가한 구성으로 이루어져 있으며, <金匱要略> '治虛勞不足 汗出而悶 脈結 悸 行動如常 不出百日 危急者十一日死.', '治肺痿涎唾多 心中溫溫液液者¹⁵⁾.'라 기재되어 있다. 燥證이 심하고 피부가 건조하며 쉽게 피로하고, 手足煩熱 口乾 大便秘結이 나타나기 쉬우며, 숨이 뜨겁고, 心悸久進 혹은 脈結代, 不整脈과 숨이 찬 것을 호소하는 사람을 치료하는 것을 목표로 한다. 炙甘草湯은 주로 심장판막증, 심계항진증, 부정맥, 심내막염, 고혈압 등 각종 심장 관련 질환에 응용¹⁶⁾되며, 자갈초탕가미방으로 발작성심실상성빈맥(PSVT)를 치료한 레¹⁷⁾, 협심증에 의한 흉통 환자를 치료한 레¹⁸⁾ 등이 있다. 실험적으로 심박동수, 좌심실압, 수축기 심근능력, 심근효소 변화 등에서 유의성 있는 효과를 나타냈으며 허혈시 세포독성 억제, 혈청 중 T3 T4 FT4 함량의 하강작용¹⁹⁾, 소량의 NO 생성을 통해 과량의 NO에 의한 세포손상을 억제시키며⁴⁾, 면역세포와 뇌신경세포의 증식을 활성화하고 세포괴사를 억제하여 세포 생존율을 증가⁵⁾시킨 바가 있다. 따라서 炙甘草湯은 향후 NO에 의하여 세포손상이 유발되는 질환, 세균성 신경염 및 면역염증질환에 대한 치료제로도 응용될 수 있다.

면역시스템에서의 Th2 면역반응 증가는 다양한 알레르기 질환에서 특징적으로 나타난다. Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13은 여러 종류의 세포에서 염증 경로를 활성화시키고, 알레르겐 감작을 유도하며, 혈청 면역 글로블린E(IgE)수치를 증가시키고, 혈액 호산구증가를 유발하며, 피부 장벽 보존에 관여하는 중요 단백질인 필라그린(filaggrin, FLG)을 하향 조절하여 피부 장벽 구조와 기능을 손상시킨다. Th2 사이토카인 중 5q31 염색체에 위치하고 서로 밀접하게 연관되어있는 IL-4와 IL-13은 아토피성 질환(AD, 천식, 알레르기성 비염)의 발병 기전에 중요한 역할을 한다. 이들은 IL-4Rα를 통해 T 세포, B 세포, 대식세포에 영향을 미치는데, IL-4와 IL-13의 활성화는 Th2 분화, B 세포에서 IgE class 전환, 비만 세포 증가, 말초 혈액과 조직에서 IgE와 호산구 수치의 증가를 유도한다. Th2 세포 분화와 연관된 IL-4는 추후 염증반응에서 중요한 역할을 하며, 표피에서 IL-4가 과발현된 유전자조작 생쥐는 건조증, 염증성 피부 병변, 굵은 행동, 피부 감염과 IgE 상승을 보였다⁹⁾.

알레르기에서 활성화 되어있는 Th2 면역반응에 대한 JE의 효능을 알아보기 위해 혈청 내 사이토카인을 측정하였다. Th2 사이토카인 IL-4의 혈중 농도를 분석한 결과 혈청 내 IL-4가 유의하게 증가한 OVA-sensitized군에 비해 JE 저농도 및 고농도 투여군 모두에서 IL-4가 현저하게 감소하였다(Table 2). IgE는 비만세포 표면에 부착되어 알레르겐과 교차결합한 후 비만 세포의 탈과립을 유발하여 다양한 염증성 매개체를 분비시켜 알레르기의 즉시형 반응 및 후기 반응에 관여한다⁷⁾. JE 투여는 Total IgE의 형성을 농도의존적으로 억제하였으며, OVA-specific IgE의 농도도 유의하게 감소하였다(Table 3). 이러한 효과가 비장세포에서도 일어나는지 확인하기 위해 JE를 전처리한 비장세포를 OVA로 자극시키고 세포를 수

집하여 Th2 사이토카인의 mRNA 발현 수준을 확인하였다. 그 결과 OVA에 반응하여 증가된 Th2 사이토카인 발현이 유의적으로 억제(JE 100 µg/ml 처리군에서는 IL-4가 22.0 %, IL-5가 68.1 %, IL-13이 20.0 %가 감소, JE 200 µg/ml 처리군에서는 IL-4, IL-5, IL-13이 각각 61.8, 93.1, 77.6 % 감소)됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

피부조직에 알레르겐을 노출시켰을 때 유도되는 피부반응에 대한 효과를 확인하기 위해 실험동물의 귀 조직에 오발부민(OVA)용액을 피내주사하여 부종을 유발시킨 후 JE를 투여하여 귀 조직의 두께를 시간별로 측정하였다. JE 75 mg/kg 투여군(JE 75)에서는 유의한 차이를 보이지 않았으나 JE 150 mg/kg 투여군(JE 150)에서는 주사 후 6시간 째에 0.35±0.020 mm를 나타내어 OVA감작군 0.42±0.014 mm과 비교해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

피부의 조직병리학적 형태에 미치는 영향을 알아보기 위해 OVA를 피내주사한 귀 조직에 림프구 또는 호산구를 확인하는 hematoxylin and eosin (HE)염색²⁰⁾을 실시하였다. 염증에 의한 부종과 면역세포의 침윤이 현저하게 증가하여 알레르기성 염증반응이 심화된 OVA-sensitized군에 비해 JE 150에서는 실험동물의 귀 조직 내 면역세포의 밀집도가 감소하여 염증반응이 개선되었음을 확인하였다(Fig. 3).

실험에 대한 안전성을 확인하기 위해 약물(JE)에 의한 마우스의 몸무게 변화를 측정한 결과 JE는 체중 변화에 영향을 주지 않았으며(Fig. 1), 세포배양액으로 방출되는 LDH의 양을 측정하여 비장 세포의 세포독성에 미치는 영향을 평가한 결과, JE는 800µg/ml까지 LDH의 양이 무처리군과 비교해 유의한 차이가 없어 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 4).

이상의 결과를 통해 JE가 염증에 의한 부종과 면역세포의 침윤을 감소시키고 Th2 사이토카인의 과발현 억제를 통해 염증성 매개물질 분비, 비만 세포 탈과립 및 IgE의 생성을 감소시켜 면역이상으로 인한 알레르기 반응을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

결론

본 연구는 OVA로 감작된 아토피피부염 마우스 모델을 이용하여 항알레르기 효능을 가질 것으로 기대되는 炙甘草湯 추출물(JE)의 항알레르기 효능을 분석하였다. JE를 실험동물에게 투여하였을 때, OVA 피내주사 시 알레르기 피부반응이 완화되었고, 조직의 형태학적 분석에서도 염증세포의 침윤이 감소함을 보여주었다. 또한 IgE의 생성에 중요한 역할을 하는 IL-4의 혈 중 농도가 JE 투여에 의해 현저하게 감소하였으며, 총 IgE 및 OVA-specific IgE 또한 감소하였다. OVA에 감작된 마우스로부터 분리된 비장세포에서는 JE 처리에 의해 Th2 사이토카인 IL-4, IL-5, IL-13의 mRNA 수준이 감소하여 OVA에 의한 Th2 면역반응을 억제함을 확인하였다. 결론적으로 OVA를 감작시킨 실험동물 모델에서 JE의 투여가 Th2 사이토카인 생성을 억제하여 IgE 생산을 감소시킨 것으로 생각되며, 그에 따라 OVA에 대한 알레르기 염증반응도 개선시킨 것으로 보인다. 따라서, JE는 OVA가 감작된 in vivo 및 ex vivo 연구에서 항알레르기 효능을 보여주어 향후 알레르기 질환을 위한 유용한 처

방으로 이용할 수 있을 것으로 기대되며, 임상적으로는 피로와 염증을 동반한 AD 등의 알레르기성 질환에 대하여 유의미할 것으로 사료된다.

References

1. Furue M, Chiba T, Tsuji G, Ulzii D, Kido-Nakahara M, Nakahara T, et al. Atopic Dermatitis: Immune Deviation, Barrier Dysfunction, IgE Autoreactivity and New Therapies. *Allergol Int.* 2017;66(3):398-403.
2. De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al. Neuroendocrine Effects on Immune System. 2009;1-30.
3. Kim MJ, Lee SY. A Literature Study of Atopic Dermatitis for Children. *J Korean Oriental Med.* 2000;14(2):169-84.
4. Han SD. Effects of Jagamchotang on hyperthyroidism of Sodium Levothyroxine Induced Rats. Master's dissertation of Daegu Korean Medical University. 1994.
5. Na YH. Effects of Jagamchotang on the C6 glial Cell Injured by LPS Combined PMA. Master's dissertation of Wonkwang University. 2000.
6. Jeong HC. The Effects of Aqua-acupuncture Jagamchotang on Nitric Oxide Production in RAW 264.7 and C6-glial Cell. Doctor's dissertation of Wonkwang University. 2000.
7. Amin K. The Role of Mast Cells in Allergic Inflammation. *Respir Med.* 2012;106(1):9-14.
8. Barnes PJ. Th2 Cytokines and Asthma: an Introduction. *Respir Res.* 2001;2(2):64-5.
9. Matsunaga MC, Yamauchi PS. IL-4 and IL-13 Inhibition in Atopic Dermatitis. *J Drugs Dermatol.* 2016;15(8):925-9.
10. Moreno AS, McPhee R, Arruda LK, Howell MD. Targeting the T Helper 2 Inflammatory Axis in Atopic Dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;171(2):71-80.
11. Karshikoff B, Sundelin T, Lasselín J. Role of Inflammation in Human Fatigue: Relevance of Multidimensional Assessments and Potential Neuronal Mechanisms. *Front Immunol.* 2017;8:1-12.
12. Kwak KK, Cho JH, Son CG. Study on Chronic Fatigue Syndrome from Oriental Medicine Point of View. *Korean J Orient Int Med.* 2008;29(4):962-9.
13. Yi JH, Lee JH, Park SM, Kim YC, Lee JH, Woo HJ. Clinical Investigation and Follow-up Monitoring of Fatigue Patients Visiting the Oriental Medical Hospital. *J Korean Oriental Med.* 2000;21(4):55-63.
14. Kim EH, Lee BW, Kim EH. A Literal Study of the Main Symptoms of Atopic Dermatitis. *J of Korean Med Classics.* 2009;22(1):207-28.
15. Kim EH, Lee BW, Kim EH. A Literal Study of the Main Symptoms of Atopic Dermatitis. *J Orient Med Class.* 2009;22(1):207-28.
16. Yang NR, Kim MK, Choi DJ, Han CH. One Case of Bradyarrhythmia Treated with Jagamcho-tang(炙甘草湯) and Acupuncture. *J of int korean med.* 2010;183-9.
17. Lee TH, Lee JG, Yoon HS, Lee YG. One Case of PSVT(Paroxysmal Supraventricular Tachycardia) Patient Treated with Jagamcho-tang-gami(炙甘草湯加味). *J Int Korean Med.* 2002;73-8.
18. Kim CH, Kim HS, Hwang SR, Lee WC. A Case of Chest Pain Patient Diagnosed as Angina Pectoris and Treated with Jagamcho-tang(炙甘草湯). *J of Oriental Chr Dis.* 2000;6(1):127-32.
19. Lee RC, Jo NS, Jo D, Um SS, Kang SD, Lee CW, et al. Effects of Jagamchotang on the Cultured Rat Neonatal Myocardial Cells. *J of Oriental Physiology.* 1999;14(2):179-87.
20. Seung YC. A Study on the Immune Modulation of Chenggihaedok-tang (CGT) on the Atopic Dermatitis. Doctor's dissertation of Daejeon University. 2014.