

천연물 유래 Th2 케모카인 억제제 발굴에 의한 새로운 아토피 피부염 치료기술 개발 : 아토피 피부염 모델 NC/Nga 마우스에서 고삼 추출액의 억제 효과

정승일¹, 최병민², 윤용갑³, 이장원⁴, 장선일^{4,5}

¹전주생물소재연구소, ²원광대학교 의과대학 생화학 교실, ³원광대학교 한의과대학 방제학교실, ⁴전주대학교 아토피·건강전문연구소, ⁵전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부

ABSTRACT

A Noble Therapeutic Approach of Atopic dermatitis by Development of Th2 Chemokine Inhibitors from Natural Products : Inhibitory Effect of *Sophora flavescens* Extract in Atopic Dermatitis Model mice, NC/Nga

Seung-Il Jeong¹, Byung-Min Choi², Young-Gab Yun³, Jang-Won Lee⁴, Seon-Il Jang^{4,5}

¹Jeonju Biomaterials Institute

²Department of Biochemistry, School of Medicine, Wonkwang University

³Department of Oriental Medical Prescription, Wonkwang University

⁴Jeonju University Atopy & Health Research Institute

⁵School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeonju University

We investigated the inhibitory effect of an oral administration of a *Sophora flavescens* Aiton ethanol extract (SFE) on the development of atopic dermatitis (AD) by using NC/Nga model mice. The induction of atopic dermatitis-like lesion was conducted by the removal of the back

•교신저자 : 장선일

•전주시 완산구 효자동 3가 1200 전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부

•Tel : 063-220-3124 Fax : 063-220-2054 E-mail : sonjjang@jj.ac.kr

•접수 : 2009/ 05/ 28 1차 수정 : 2009/ 06/ 08 2차 수정 : 2009/ 06/ 09 채택 : 2009/ 06/ 10

hairs and topical application of a mite antigen (*Dermatophagoides farinae*, *Df*) on to the back skin twice a week for 8 weeks. SFE was orally administered at a different doses (100–400 mg/kg). Atopic dermatitis-like skin lesions were evaluated by dermatitis scores, skin histology and immunological parameters (serum levels of IgE, TARC/CCL17, MDC/CCL22, and CTACK/CCL27). Oral administration of SFE significantly inhibited the clinical sign of *Df*-induced atopic dermatitis, including dermatitis score and leukocyte infiltration. Moreover, SFE suppressed significantly the serum IgE and Th2 chemokine (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and CTACK/CCL27) levels in a concentration dependent manner. These results suggest that oral administration of SFE could reduce significantly the clinical signs and Th2 chemokines in *Df*-induced atopic dermatitis model mice. Therefore, SFE may be effective substances for the management of AD in human.

Key word : *Sophora flavescens*, Atopic dermatitis, Th2 chemokines, NC/Nga mouse

1. 서 론

아토피 피부염(atopic dermatitis, AD)은 면역학적, 유전학적, 약리 및 생리학적인, 그리고 환경 등 다인자적 요인(poly-factors)에 의해 발병되는 피부 습진(eczema)의 일종이다^{1,2)}. AD는 감염, 스트레스, 계절과 기후 변화, 자극 및 알러젠(allergen) 등에 의해 호전과 악화가 반복적으로 일어나는 만성적인 염증성 피부질환(chronically relapsing inflammatory skin disease)으로 영·유아부터 성인에까지 광범위하게 유발되며¹⁻⁴⁾, IgE 매개 감작(IgE-mediated sensitization)에 의한 외인성 형태(extrinsic form, 70-80%)와 비 IgE 매개 감작(non-IgE-mediated sensitization)에 의한 내인성 형태(intrinsic form, 20-30%) 등 2가지 형태로 구분 된다⁵⁾.

AD는 여러 가지 경로를 거쳐 면역 및 염증 반응을 활성화 하는 복잡한 특징을 나타내는 피부질

환으로 감수성을 가지는 유전자 사이의 복잡한 상호작용, 환자의 환경, 피부장벽기능의 결함, 전신적 또는 국부적으로 면역반응을 야기 한다^{1,6,7)}. 일반적으로 AD의 임상적 특징은 심한 가려움으로 인한 피부 장벽의 붕괴, 염증, 혈청내 IgE의 증가, 염증부위에 호산구(eosinophil)의 침윤 및 Th2 세포의 편향된 발달을 들 수 있다^{2,3,6)}.

케모카인(chemokine)은 저분자 단백질로 알려진 화학주성(chemoattractants)을 나타내며 superfamily로 알려졌다⁸⁾. 즉, 단백질의 구조와 기능에 따라 C, CC, CXC 및 CX3C 등 4가지 subfamily로 나눌 수 있는데, 이들 케모카인은 염증부위에 백혈구를 침윤시켜 염증반응을 더욱 유발 한다⁹⁾.

Thymus & activation-regulated chemokine (TARC/CCL17), macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) 및 cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK/CCL27) 등은 대표적인 Th2 케모카인으로

로 염증부위로 Th2 세포의 이동과 침윤을 유도하는 것으로 알려졌다^{3,10}. TARC/CCL17과 MDC/CCL22는 CC chemokine receptor 4(CCR4)을 경유하여 작용하는 반면, CTACK/CCL27는 CCR10을 경유하여 그 효과를 나타낸다¹¹⁻¹⁴. 특히 AD 환자의 혈청에 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27 등 케모카인이 매우 높은 양으로 검출되어 AD와 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 최근에 알려졌다¹⁵.

NC/Nga은 DBA/2 계열의 마우스로 X 선 조사에 대한 높은 감수성과 난백 알부민 주사에 의한 과민성 쇼크(anaphylactic shock)의 높은 감수성 등 면역생리학적인 특징을 가지고 있으며, 화학항원(chemical antigen)과 집먼지 진드기(house dust mite)와 같은 생물학적 항원(biological antigen)등으로 인간의 AD와 유사한 피부질환을 유발 시킬 수 있어 AD의 병인 및 치료 약물의 평가에 많이 활용되고 있다^{16,17}.

한편, 고삼(*Sophora flavescens* Aiton)은 콩과에 속하는 여러해살이풀로 한국, 일본과 중국에 널리 분포한다. 고삼은 설사(diarrhea), 위장출혈(gastrointestinal hemorrhage) 및 습진에 활용되어온 약용식물^{18,19}로 최근에는 quinolizidine alkaloids, flavonoids와 같은 주요 약리작용을 하는 물질이 분리되어 연구되고 있다²⁰⁻²⁴. 그러나 이러한 성분이 함유되어 있는 고삼 추출물을 이용한 AD 연구는 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 집먼지 진드기(*Dermatophagoides farinae*, *Df*) 항원을 이용하여 NC/Nga 마우스를 대상으로 인간과 유사한 AD를 유발한 후 고삼추출물을 경구 투여하여 피부질환 스코어(skin dermatitis scores), 피부조직(skin histology), 혈청내 IgE와 Th2 케모카인(TARC/CCL17, MDC/CCL22, CTACK/CCL27)을 조사한 결과 매우 흥미 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 재료

집먼지 진드기(*Dermatophagoides farinae*, *Df*) 항원 Biostir AD는 Biostir사(일본)로부터 구입하였으며, IgE ELISA kit는 Shibayagi사(일본)로부터 구입하였다. 마우스 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27 ELISA kits는 R&D사(Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. Haematoxylin, eosin과 Congo red 그리고 기타 시약은 Sigma사(ST Louis, MO)로부터 구입하였다.

2. 추출물의 제조

잘 건조된 고삼 300 g를 1,000 ml의 에탄올이 들어있는 비이커에 주입하고 밀봉하여 1주일간 방치한 후 0.45 μ m 필터를 이용하여 여과 한 후 농축기(Eyela, 일본)로 농축한 후 -70°C에서 동결기(본디로, 일심랩)에서 건조하여 50 g을 얻은 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. 동물사육

5주령의 수컷 NC/Nga 마우스는 중앙동물실험실(서울)사로부터 구입하여 1주간 specific pathogen-free (SPF) 상태에서 낮과 밤의 주기를 12시간씩 고정하여 사료(중앙동물실험실)와 멸균 물을 공급하면서 사육한 후 실험에 사용하였다.

4. 면 역

Df 항원 면역에 의한 AD 유도는 Matsuoka 등¹⁶과 Yamamoto²⁵ 등의 방법을 약간 변형하여 설계한 후 실험했다(Fig. 1). 요약하면, 6주령의 NC/Nga 마우스의 등쪽털을 안과용가위로 주의 깊게 제거한 후 제모제(한국양행, 서울)를 도포한 후 30°C 물을 이용하여 털을 완전히 제거한 다음 제모 크림에 의해 파괴된 큐티클층에 마우스당 *Df* 항원 연고(100 mg)를 도포하였다. 두 번째부터 큐

티클충을 파괴하기 위하여 도포 부위에 4% SDS를 분무한 후 2시간 동안 완전히 건조한 후 같은 양의 항원을 1주일에 2회로 8주간 도포하였다. 대조군과 각 실험군에 사용된 마우스는 각각 5마리를 배정하여 실험하였다. 대조군은 4% SDS를 분무만 하였고, 생리식염수를 1일에 1회 경구 투여하였다. 실험군은 100-400 mg/kg의 고삼 에탄올

추출물(*Sophora flavescens* Aiton ethanol extract, SFE)를 1일에 1회씩 8주간 투여하였다. 마지막으로 *Df* 항원으로 면역과 동시에 약물을 투여한 다음 5시간 후에 심장으로부터 혈액을 얻어 실온에 1시간 동안 방치하여 혈액을 응고 시켰다. 응고된 혈액은 3,000 rpm으로 20분간 원심하여 혈청을 얻었다. 혈청은 -70°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

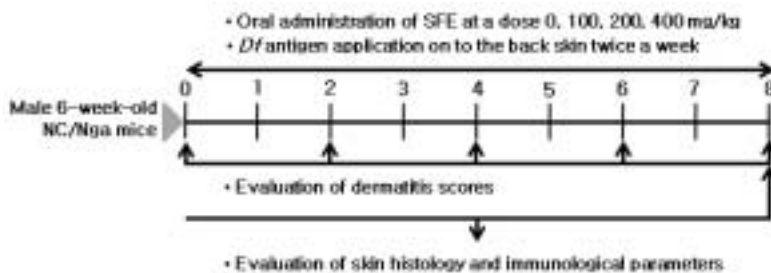


Fig. 1. Schedule for immunization of NC/Nga mice with the *Df* antigen and administration of the SFE extract.

5. 피부병변의 평가

피부상태는 0주째부터 2주 간격으로 8주 동안 사진을 찍어 조사하였다. 피부의 건조상태(dryness)와 스킨링(scaling) 그리고 미란(erosion), 긁은 상처(excoriation), 출혈 등을 체크하여 병변이 없는 상태를 0점(none), 가벼운 상태를 1점(mild), 중간상태를 2점(moderate), 심한상태를 3점(severe)을 주어 피부 병변을 평가 하였다.

6. 혈청내 IgE와 Th2 케모카인의 측정

혈청내 *Df* 항원에 대한 IgE와 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27의 정량은 ELISA법으로 측정하였다. 먼저 혈청내 IgE 총량은 혈청을 25배 희석하여 각 well에 주입하고 Shibayagi사가 제공하는 표준시료를 주입하여 제조사에서 제시하는 방법에 준하여 측정하였다. 그리고 혈청내 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27의 정량은 혈청은 10배로 희석하여 각 well에 주입하고 R&D사가 제공하는 표준

시료를 주입하여 제조회사에서 제시하는 방법에 따라 측정하였다.

7. 피부조직

실험 과정에 따라 대조군과 실험군을 대상으로 희생시키고, 피부조직을 약 10x10 mm를 적출하여 클립을 이용하여 평평하게 유지하고 4% paraformaldehyde(pH 7.4)로 고정하고 일련의 과정을 통하여 파라핀 블록을 제작한 후 5 μm 간격으로 피부조직을 종단면으로 절편 하였다. 조직학적 검사와 백혈구 침윤을 검사하기 위해서 hematoxylin & eosin 또는 Congo red로 염색하여 저배율(x40)에서 관찰하고 확대하면서 x200 현미경 시야에서 사진을 찍어 제시하였고, 백혈구의 침윤을 확인하기 위해서 x400 현미경 시야에서 검정하였다(Olympus, 일본).

8. 통 계

모든 실험값은 평균 \pm 표준오차로 표시했으며, 통

계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 한계는 $P < 0.05$ 로 정하였다.

III. 결 과

1. NC/Nga 마우스의 피부병변에 미치는 SFE의 효과

NC/Nga(6주령) 마우스를 대상으로 8주간 Df 항원 연고를 털이 제거된 등쪽 피부에 마리당 100 mg을 1주일에 2번씩 도포하여 AD을 유도하였다. 정상 대조군은 베이스 연고만 도포(100 mg/마리) 하였으며 약물을 투여하지 않았다. 양성 대조군은 Df 항원 연고만 도포하고 생리식염수만 투여하였다. 실험군은 하루에 1회씩 마리당 100-400 mg/kg의 SFE를 투여하면서 Df 항원 연고를 동시에 도포하였다. 실험기간동안 피부병변의 변화를 알아보기 위해서 연고 도포 후 2주간격으로 0주째부터 2주 간격으로 8주 동안 사진을 찍어 조사하였다. 그 결과 정상대조군에 있어서 피부병변의 변화는 경미한 변화가 있었으나, Df 항원 연고도포된 양성대조군은 4주째부터 피부병변이 증가되었고 8주까지 그 정도가 심각하게 증가되었으나, SFE 약물이 투여된 실험군에서는 농도에 의존적으로 피부병변이 개선되는 효과가 있었다. 특히 200-400 mg/kg가 투여된 실험군에서는 4주째부터 억제하는 효과가 매우 뚜렷하였다($p < 0.05$, $p < 0.01$).

2. NC/Nga 마우스의 피부조직 및 백혈구 침윤에 미치는 SFE의 효과

SFE가 Df 항원으로 면역된 Nc/Nga 마우스의 피부조직과 백혈구 침윤에 미치는 영향을 알아보기 위하여 항원과 약물이 8주간 투여된 마우스를 대상으로 피부조직학적 검사를 수행하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 정상대조군은 피부조직의 변화가 없었지만, Df 항원으로 면역된 마우스의 피부조직은 극세포증(acanthosis), 각질증식증(hyperkeratosis),

상처 및 출혈 수준이 매우 심각했다. 그러나 SFE가 투여된 실험군에서는 피부조직 병변이 농도에 의존적으로 현저히 개선되었다. 특히 200-400 mg/kg가 투여된 실험군에서 그 효과가 뚜렷하였다. 또한 백혈구 침윤에 미치는 SFE의 효과를 알아보기 위해서 Congo red로 조직을 염색하여 400배 현미경 시야에서 검정한 결과 Fig. 4와 같이 정상대조군에서는 백혈구의 변화가 없었지만, Df 항원으로 면역된 양성대조군에서는 단핵구(mononuclear cells)가 $835.54 \pm 120.52/\text{mm}$, 비만세포(mast cells)가 $238.67 \pm 42.36/\text{mm}$, 호산구(eosinophils)가 $315.02 \pm 43.90/\text{mm}$ 그리고 호중구(neutrophils)가 $291 \pm 32.51/\text{mm}$ 로 백혈구 침윤이 현저히 증가했으나, SFE가 투여된 실험군에서는 농도에 의존적으로 단핵구, 비만세포, 호산구 그리고 호중구 등 백혈구 침윤이 현저히 억제되었다($p < 0.05$, $p < 0.01$).

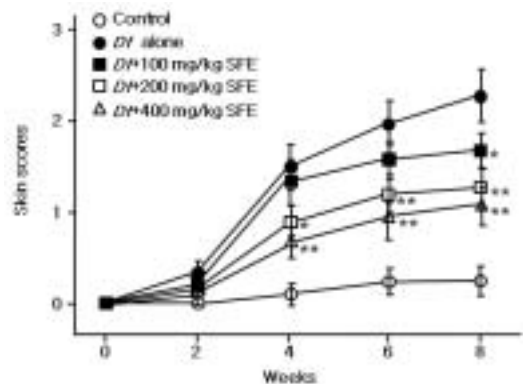


Fig. 2. Effects of *Sophora flavescens* ethanol extracts (SFE) on clinical scores of skin symptoms in NC/Nga mice.

Control group was applied 100 mg of ointment base per mouse and Df groups were applied 100 mg of Df containing ointment per mouse. Mice (five mice in each group) were administrated with or without SFE (100-400 mg/kg, body weight) for 8 weeks. Clinical scores were measured every 2 weeks. Each value represents the mean and SD from 5 mice. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ indicate significant differences with Df alone group.

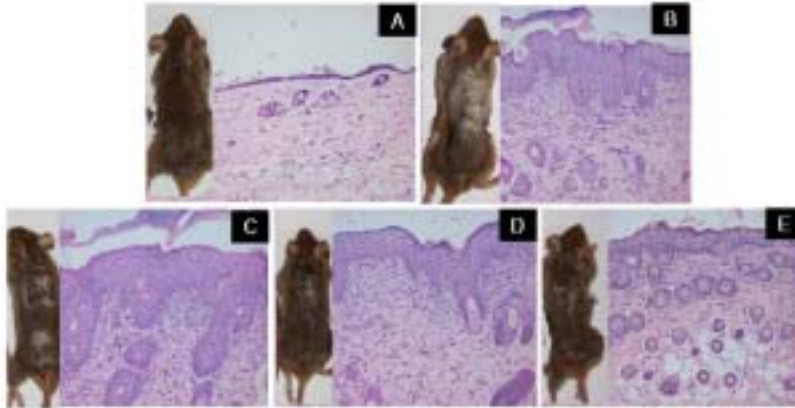


Fig. 3. Effects of *Sophora flavescens* ethanol extracts (SFE) on histological changes of skins in NC/Nga mice.

Control group was applied 100 mg of ointment base per mouse and experimental groups were applied 100 mg of ointment per mouse. Mice (five mice in each group) were administrated with or without SFE (100-400 mg/kg, body weight) for 8 weeks. Skin tissues were obtained from *Df* antigen-immunized and control mice on 8 week. Skin tissues (5 μ m) were stained with hematoxylin & eosin. Original magnification \times 200 for all photos.

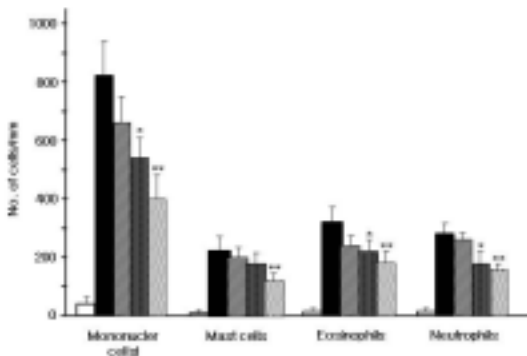


Fig. 4. Effects of *Sophora flavescens* ethanol extracts (SFE) on leukocyte infiltrations of skins in NC/Nga mice.

Control group was applied 100 mg of ointment base per mouse and experimental groups were applied 100 mg of ointment per mouse. Mice (five mice in each group) were administrated with or without SFE (100-400 mg/kg, body weight) for 8 weeks. Skin tissues were obtained from *Df* antigen-immunized and control mice on 8 week. Skin tissues (5 μ m) were stained with Congo red. Leukocyte infiltrations were measured on \times 400 microscope view. Each value represents the mean and SD from 5 mice. * p <0.05 and ** p <0.01 indicate significant differences with *Df* alone group.

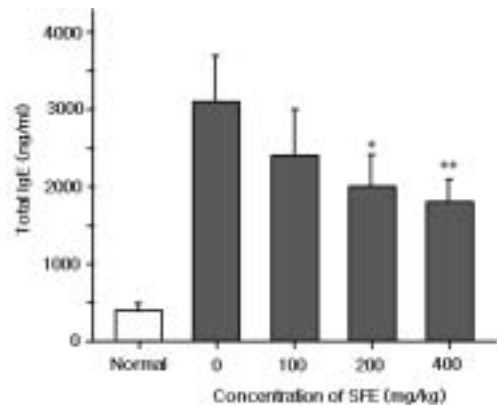


Fig. 5. Effects of *Sophora flavescens* ethanol extracts (SFE) on serum IgE productions in NC/Nga mice.

Control group was applied 100 mg of ointment base per mouse and experimental groups were applied 100 mg of ointment per mouse. Mice (five mice in each group) were administrated with or without SFE (100-400 mg/kg, body weight) for 8 weeks. Sera were obtained from *Df* antigen-immunized and control mice on 8 week. Serum IgE were measured using IgE ELISA assay kit. Each value represents the mean and SD from 5 mice. * p <0.05 and ** p <0.01 indicate significant differences with *Df* alone group.

3. NC/Nga 마우스의 혈청 IgE 생산량에 미치는 SFE의 효과

SFE가 *Df* 항원으로 면역된 Nc/Nga 마우스의 혈청 IgE에 미치는 영향을 알아보기 위하여 항원과 약물이 8주간 투여된 마우스를 대상으로 혈청을 얻고 ELISA assay kit를 이용하여 IgE 항체의 양을 조사하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 정상대조군의 혈청 IgE량은 베이스 수준이었지만, *Df* 항원으로 면역된 양성대조군은 3,095.57±330.06/ml로 현저히 증가되었다. 그러나 SFE가 처리된 실험군은 농도에 의존적으로 혈청 IgE의 생산량이 현저히 억제되었다. 200-400 mg/kg가 투여된 실험군에서 그 효과가 뚜렷하였다.

4. NC/Nga 마우스의 혈청 Th2 케모카인 생산량에 미치는 SFE의 효과

한편 SFE가 *Df* 항원으로 면역된 Nc/Nga 마우

스에서 백혈구의 이동에 결정적으로 영향을 미치는 Th2 케모카인의 영향을 알아보기 위해서 항원과 약물이 8주간 투여된 마우스를 대상으로 TARC/CCL17, MDC/CCL22 그리고 CTACK/CCL27에 특이적인 ELISA assay kit를 이용하여 혈청내 Th2 케모카인의 양을 측정하였다. 그 결과 *Df* 항원으로 면역된 양성대조군은 TARC/CCL17, MDC/CCL22 그리고 CTACK/CCL27의 양이 각각 3,250.80±530.20 pg/ml, 2,330.32±420.05 pg/ml, 930.05±180.15 pg/ml로 측정되어 정상대조군에 비해 현저히 높았으나, SFE가 투여된 실험군에서는 TARC/CCL17(Fig. 6A)과 CTACK/CCL27(Fig. 6C)은 농도에 의존적으로 억제되었으며, 그 효과는 200-400 mg/ml 실험군에서 현저했다($p < 0.05$, $p < 0.01$). 더욱이 Fig. 6B와 같이 MDC/CCL22는 100-400 mg/ml 까지 억제하는 효과가 뚜렷했다($p < 0.05$, $p < 0.01$).

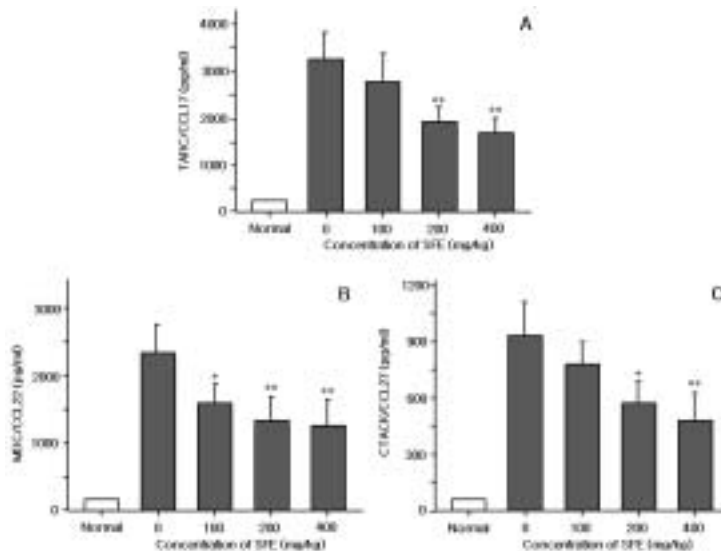


Fig. 6. Effects of *Sophora flavescens* ethanol extracts (SFE) on serum Th2 chemokines in NC/Nga mice.

Control group was applied 100 mg of ointment base per mouse and experimental groups were applied 100 mg of ointment per mouse. Mice (five mice in each group) were administrated with or without SFE (100-400 mg/kg, body weight) for 8 weeks. Sera were obtained from *Df* antigen-immunized and control mice on 8 week. Serum levels of Th2 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and CTACK/CCL27) were measured using each ELISA assay kit. Each value represents the mean and SD from 5 mice. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ indicate significant differences with *Df* alone group.

IV. 고 찰

NC/Nga 마우스의 피부질환은 인간의 AD에서 나타나는 외견상 특징뿐만 아니라 면역학적 특징이 매우 유사한 것으로 보고되었다^{16,25}. 자연적으로 시간이 지남에 따라 AD가 유발되지만, 6주령의 어린 마우스에서는 AD현상이 없으나, 집먼지진드기(house dust mite)의 항원 Df을 피하에 주사하거나 피부에 도포하였을 때 민감하게 반응하여 AD가 가속화되는 것으로 알려졌다²⁵. 이러한 NC/Nga 마우스의 외관적인 특징은 가렵증(itching), 홍반(erythema)과 출혈(hemorrhage)을 시작으로 피부의 부종(edema), 표면의 진무름(superficial erosion), 심한 찰과(deep excoriation), 박리(scaling) 및 건조(dry) 그리고 발육저하(low growth) 등 시간이 지날수록 심각한 증상을 보이고, 면역학적 특징은 혈청내 IgE의 급격한 증가와 병변 부위의 호산구, 호염구, 비만세포, CD4⁺ Th2 세포, 대식세포 등의 급격한 증가 등의 병리현상이 인간의 AD에서 나타나는 일련의 알러지성 면역학적 특징과 유사하다^{16,25}.

AD는 Th2 세포의 편향된 발달에 의해 IL-4와 IL-5 등 Th2 사이토카인은 과량 생산하는 반면, IFN- γ 와 같은 Th1 사이카인의 생산은 억제 되는 것으로 알려졌다^{1,9,10}. 최근에 Th2 세포의 편향적 발달을 직접적으로 영향을 미치는 Th2 케모카인이 알려져 있는데, 그 대표적인 케모카인이 TARC/CCL17, MDC/CCL22, 그리고 CTACK/CCL2이다⁹⁻¹⁴.

Matsuda 등¹⁶)은 SPF 상태와 일반 환경에서 여러 세대를 교배하면서 사육하고 유지한 후 8주령의 NC/Nga 마우스를 일반적인 환경 조건에서 사육하면서 번식하면서 여러 세대에서 안면, 귀, 코, 목, 등 피부 상태를 임상적으로 관찰한 결과 인간의 AD 환자에서 보고된 임상적 특징과 비교 분석한 결과 SPF 상태에서는 AD 증세를 보이지 않았

지만, 일반 환경상태에서는 가렵증(itching), 홍반(erythema)과 출혈(hemorrhage)을 시작으로 피부의 부종(edema), 표면의 진무름(superficial erosion), 심한 찰과(deep excoriation), 박리(scaling) 및 건조(dry) 그리고 발육저하(low growth) 등 외관적 특징을 밝히고, 시간이 지날수록 심각한 증상을 보였으며, 17주령에는 AD의 최고조로 피부병변을 보인다고 보고하였다. 이와 같이 NC/Nga 마우스의 피부질환의 원인은 단순한 외부 병원체의 감염에 의한 것이라기보다는 공기 오염, 화학물질 또는 집먼지 진드기와 같은 알러젠에 노출되어 내부의 면역 교란에 의한 알러지성 피부질환으로 규명하였다^{16,17,25}.

본 연구에서 우리는 NC/Nga 마우스를 SPF상태로 유지하면서 Df 항원으로 유도된 AD NC/Nga 마우스에서 고삼 추출액인 SFE의 임상적 영향을 조사한 결과 SFE의 농도에 의존적으로 치료효과가 있었다. Fig. 2에서와 같이 6주령의 마우스를 대상으로 8주간 실험한 결과 피부 병변은 약간 증가했지만 뚜렷한 임상적 결과를 얻지 못했지만, Df 항원으로 면역된 양성대조군은 피부병변이 AD와 유사하였고 시간이 지날 수록 그 특징은 현저했다. 특히 실험 시작일로부터 8주째 마우스에서는 극세포증(acanthosis), 각질증식증(hyperkeratosis), 상처 및 출혈 수준이 3으로 매우 심각했다(Fig. 3). 더욱이 단핵구, 비만세포, 호산구와 호중구의 침윤이 현저히 높아졌으나, SFE가 투여된 실험군에서는 농도에 의존적으로 백혈구의 침윤이 현저히 억제되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 SFE의 투여는 임상적으로 AD를 크게 개선시킬 수 있는 약물로 평가되었다.

Df 항원으로 유도된 AD 모델 NC/Nga 마우스에서 중요한 면역학적 특징은 의간의 외인성 인간의 AD와 유사하게 혈청내 높은 IgE가 검출된다는 사실은 잘 알려져 있다. 본 연구의 결과에서도 Df 항원으로 면역된 마우스의 혈청내 IgE가 매우 높은 양으로 검출되었으나, SFE를 투여한 결과

농도에 의존적으로 그 생산량이 크게 억제되었다 (Fig. 5).

한편 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27 등은 대표적인 Th2 케모카인으로 염증부위에 Th2 세포의 이동과 침윤을 유도한다. 특히 말초혈액단핵구(peripheral blood monocytes)에 의해 생산된 TARC/CCL17과 MDC/CCL22는 Th2 세포의 CCR4와 결합함으로써 염증부위로 이동하는 결정적인 화학주성(chemoattractant)을 야기하는 분자로 인간의 성인 AD환자의 혈청에 높은 양으로 검출될 뿐만 아니라 Th2 세포의 이동과 침윤을 가속화 시키는 중요한 케모카인이다¹¹⁻¹³. 특히 ovalbumin으로 자극된 환자의 경우 더욱더 많은 양이 검출되는 것으로 밝혀지고 있어 AD의 병인 규명에 중요한 표적 분자로 주목 받고 있다¹⁵. 또한 CTACK/CCL27는 CCR10을 경유하여 그 효과를 나타내는데^{14,15}, NC/Nga 마우스의 피부병변 부위인 표피의 기저층에서 중요하게 발현되는 현상이 밝혀졌다²⁶. 그러므로 CTACK/CCL27의 과도한 생산은 병변 부위의 심각한 염증반응을 유도하며, cutaneous lymphocyte-associated antigen(CLA) 양성 림프구의 이동을 매개하는 중요한 역할을 한다²⁷. 본 연구의 결과 *Df* 항원으로 면역된 마우스의 혈청의 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27 등은 정상대조군에 비해 현저히 높았으나, SFE가 투여된 실험군에서는 혈청내 이들 Th2 케모카인의 생산량이 약물의 농도에 따라 현저히 억제되었다(Fig. 6). 이러한 결과는 *Df* 항원으로 유도되는 Th2 세포의 이동과 침윤을 SFE가 효과적으로 억제하는 것으로 조사되었다. 그러나 CCR4와 CCR10의 발현에 미치는 고삼추출물의 영향과 신호전달 기전을 더 조사해야 확실한 AD 억제 약물로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

이상의 결과를 종합해볼 때 고삼 추출물인 SFE의 투여는 *Df* 항원 면역으로 유도된 AD 모델 NC/Nga 마우스의 임상적 피부 병변을 개선할 뿐만 아니라 단핵구, 비만세포, 호산구 및 호중구의

침윤을 억제하는데 효과가 있었다. 이러한 효과는 Th2 케모카인의 생산량을 억제시킴으로써 발휘할 수 있는 것으로 사료된다. 더욱이 AD의 가장 중요한 특징 중의 하나로 알려진, 혈청의 높은 IgE의 양을 SFE 투여로 현저히 억제 시킬 수 있는 결과를 얻었다. 따라서 고삼 추출물은 인간의 AD의 개선에 이용할 수 있는 효과적인 물질이라 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 NC/Nga 마우스를 대상으로 고삼(*Sophora flavescens* Aiton) 에탄올 추출물(SFE)을 경구투여 함으로써 아토피 피부염 발생의 억제 효과를 조사하였다. 마우스(6주령)를 대상으로 등쪽 털을 제거하고 8주간 집먼지 진드기(*Dermatophagoides farinae, Df*) 항원을 1주일에 2회씩 도포함으로 아토피 유사 피부염을 유도하였다. SFE는 100-400 mg/kg의 농도로 경구 투여하였다. 아토피 유사 피부염은 피부병변 스코어, 피부조직과 면역학적 파라미터(혈청 IgE, TARC/CCL17, MDC/CCL22과 CTACK/CCL27)를 조사하여 평가했다. SFE를 경구 투여한 결과 피부병변 스코어와 백혈구 침윤을 포함하는 *Df*-유도 아토피 피부염의 임상적 징후를 유의하게 억제하는 효과가 있었다. 더욱이 SFE 투여는 농도에 의존적으로 혈청 IgE와 Th2 케모카인(TARC/CCL17, MDC/CCL22, and CTACK/CCL27) 레벨을 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 SFE 경구투여가 *Df*-유도 아토피 피부염 모델 마우스에서 아토피 피부염의 임상적 징후와 Th2 케모카인을 유의하게 억제시킬 수 있는 것을 제시하였다. 따라서 SFE는 인간의 AD 관리에 효과적인 물질이라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부재원(교육인적자원부

학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2008-331-E00450).

참고문헌

1. Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(6 Suppl):S118-27.
2. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet.* 2003;361(9352):151-60.
3. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2004;113(5):651-7.
4. Mohrenschlager M, Darsow U, Schnopp C, Ring J. Atopic eczema: what's new? *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2006;20(5):503-13.
5. Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(2):252-62.
6. Schultz-Larsen F, Hanifin JM. Epidemiology of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2002;22:1-24.
7. Ring J. Perspectives of atopic eczema in the third millennium. *Curr Probl Dermatol.* 1999;28:194-204.
8. Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol.* 1990;136(6):1229-33.
9. Power CA, Proudfoot AE. The chemokine system: novel broad-spectrum therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol.* 2001;1(4):417-24.
10. Pivarsci A, Homey B. Chemokine networks in atopic dermatitis: traffic signals of disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005;5(4):284-90
11. Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Nagakubo D, Nakayama T, Yoshie O, Kagami S, Shimazu K, Kadono T, Sugaya M, Komine M, Matsushima K, Tamaki K. CCL17 transgenic mice show an enhanced Th2-type response to both allergic and non-allergic stimuli. *Eur J Immunol.* 2006;36(8):2116-27.
12. Sebastiani S, Danelon G, Gerber B, Uguccioni M. CCL22-induced responses are powerfully enhanced by synergy inducing chemokines via CCR4: evidence for the involvement of first beta-strand of chemokine. *Eur J Immunol.* 2005;35(3):746-56.
13. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med.* 2001;194(10):1541-7.
14. Homey B, Alenius H, Müller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, McEvoy L, Lauerma AI, Assmann T, Bünenmann E, Lehto M, Wolff H, Yen D, Marxhausen H, To W, Sedgwick J, Ruzicka T, Lehmann P, Zlotnik A. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med.* 2002;8(2):157-65.
15. Nakazato J, Kishida M, Kuroiwa R, Fujiwara J, Shimoda M, Shinomiya N. Serum levels of Th2 chemokines, CCL17, CCL22, and CCL27, were the important markers of severity in infantile atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol.* 2008;19(7):605-13.
16. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, et al. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE-hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol.* 1997;9:461-6.
17. Suto H, Matsuda H, Mitsuishi K, Hira K, Uchida T, Unno T, et al. NC/Nga mice: a mouse model for atopic dermatitis. *Int Arch Allergy*

- Immunol. 1999;120:70-5.
18. Jung BS and Shin MK. Encyclopedia of illustrated Korean Natural drugs. Seoul:Young Lim Sa, 1989;707-8.
 19. Zu YP. Chinese Materia Medica, Hawood Academic Publishers, Amsterdam, 1998:149-55.
 20. Song JZ, Xu HX, Tian SJ, But PP. Determination of quinolizidine alkaloids in traditional Chinese herbal drugs by nonaqueous capillary electrophoresis. J Chromatogr A. 1999;857(1-2):303-11.
 21. Ding PL, Hou AJ, Chen DF. Three new isoprenylated flavonoids from the roots of *Sophora flavescens*. J Asian Nat Prod Res. 2005;7(3):237-43.
 22. Jung HJ, Kang SS, Woo JJ, Choi JS. A new lavandulylated flavonoid with free radical and ONOO⁻ scavenging activities from *Sophora flavescens*. Arch Pharm Res. 2005;28(12):1333-6.
 23. Kim JH, Ryu YB, Kang NS, Lee BW, Heo JS, Jeong IY, Park KH. Glycosidase inhibitory flavonoids from *Sophora flavescens*. Biol Pharm Bull. 2006;29(2):302-5.
 24. Lin TW, Huang YL, Wan ST, Shien BJ, Chen CC. Phenolic constituents of the roots of *Sophora flavescens*. Shen CC, J Nat Prod. 2006;69(8):1237-40.
 25. Yamamoto M, Haruna T, Yasui K, Takahashi H, Iduhara M, Takaki S, Deguchi M, Arimura A. A Novel Atopic Dermatitis Model Induced by Topical Application with Dermatophagoides Farinae Extract in NC/Nga Mice. Allergol Int. 2007;56(2):139-48.
 26. Vestergaard C, Yoneyama H, Murai M, Nakamura K, Tamaki K, Terashima Y, Imai T, Yoshie O, Irimura T, Mizutani H, Matsushima K. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. J Clin Invest. 1999;104(8):1097-105.
 27. Morales J, Homey B, Vicari AP, Hudak S, Oldham E, Hedrick J, Orozco R, Copeland NG, Jenkins NA, McEvoy LM, Zlotnik A. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(25):14470-5.