

蒲公英이 MC/9 mast cell에서의 Th2 cytokine 발현에 미치는 영향

장문희* · 최재송* · 배나영* · 안택원*

대전대학교 한의과대학 사상체질의학과*
대전대학교 온천의학연구소†

Abstract

Effects of TAM (*Taraxacum mongolicum*) on Th2 Cytokine Production in MC/9 Mast Cells

Moon-Hee Jang, Jae-Song Choi, Na-Young Bae, Teak-Won Ahn

Dept. of Sasang Constitutional Medicine College Oriental Medicine, Daejeon Univ.*

Hot Spring Medicine Laboratory, College Oriental Medicine, Daejeon Univ.†

1. Objective

The purpose of this study is to investigate the effects of TAM (*Taraxacum mongolicum*) on Th2 cytokine production in MC/9 mast cells.

2. Methods

The effects of TAM was analyzed by ELISA and Real-time PCR in MC/9 mast cells. Levels of IL-5, IL-13 were measured using enzyme-linked immunosorbent assays(ELISA). mRNA levels of IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 were analyzed with Real-time PCR.

3. Results

- 1) TAM inhibited the IL-4 production significantly in comparison to PI-control group at concentration of 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml.
- 2) TAM inhibited the IL-13 production significantly in comparison to PI-control group at concentration of 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml.
- 3) TAM inhibited the IL-4 mRNA expression significantly in comparison to PI-control group at concentration of 100 μ g/ml.
- 4) TAM inhibited the IL-5 mRNA expression significantly in comparison to PI-control group at concentration of 50 μ g/ml, 100 μ g/ml.
- 5) TAM inhibited the IL-6 mRNA expression significantly in comparison to PI-control group at concentration of 100 μ g/ml.
- 6) TAM inhibited the IL-13 mRNA expression significantly in comparison to PI-control group at concentration of 100 μ g/ml.

4. Conclusions

These results indicate that TAM (*Taraxacum mongolicum*) has the effect of decreasing the Th2 cytokine production in the MC/9 mast cell.

Key Words : TAM (*Taraxacum mongolicum*), Cytokine, MC/9 Mast Cell, Atopic Dermatitis.

아산시청 연구용역사업으로 진행함.

• 접수일 2012년 02월 09일; 심사일 2012년 02월 10일;
승인일 2012년 03월 07일

• 교신저자 : 안택원
충남 천안시 두정동 621번지 대전대부속천안한방병원 대전대학교
한의과대학 사상체질과
Tel : +82-41-521-7535 Fax : +82-41-521-7007

E-mail : twahn@dju.kr

• The Society of Sasang Constitutional Medicine. All rights reserved.
This is an open access article distributed under the terms of the
Creative Commons attribution Non-commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>)

I. 緒論

아토피 피부염은 알레르기 비염, 기관지 천식과 더불어 가장 대표적인 알레르기성 질환으로 피부 건조증, 소양감을 주소로 하는 만성적으로 재발하는 염증성 피부질환이다¹⁾. 주로 어린이에서는 10~30%의 유병률을 보이며 어른에서는 1~3%의 유병률을 보인다고 알려져 있으며, 최근 유·소아의 유병률이 2~3배 증가함과 동시에 성인에게도 꾸준히 증가하여 많은 사람이 아토피 피부염으로 고통을 받고 있다^{2,3)}.

아토피 피부염은 환경적인 요소와 유전적인 소인이 모두 관여하는 복합적인 질환으로 알려져 있으며 발병 기전은 불확실 하지만 면역학적 측면에서 보면 mast cell, T세포, 랑게르한스세포, 호산구 등과 같은 여러 세포들과 cytokine, immunoglobulin 등과 같은 인자들이 관련되어 있다고 알려져 있다⁴⁾. CD4+ T세포와 CD8+ T세포 비율의 증가와 Th2 매개 cytokine 간의 불균형, IgE 증가, mast cell의 증가나 활성화 등이 기전으로 알려져 있다^{5,6)}.

한의학에서 아토피 피부염은 奶癬, 胎癬, 乳癬, 浸淫瘡, 胎熱 등과 증상 면에서 가장 유사하며 치료법은 양상에 따라 濕熱型, 血熱型, 濕阻型, 血燥型으로 나누어서 치료한다⁷⁾.

蒲公英(*Taraxacum mongolicum*, TAM)은 국화과(Compositae)에 속한 다년생 초본인 민들레의 쏙초로 性은 寒하고 味는 苦甘하며 肝胃經으로 入하며, 清熱解毒, 消腫散結, 利尿通淋의 효능을 가지고 있어 疔瘡腫毒, 乳癰, 瘰癧, 目赤, 咽痛, 肺癰, 腸癰, 濕熱黃疸, 熱淋澀痛 등을 치료한다. 熱毒을 解毒하고 癰腫을 消腫케 하여 外科의 각종 熱毒, 癰腫과 기타 熱毒으로 인한 證에 상용하는 요약이 된다⁸⁾.

蒲公英은 東醫四象新編의 四象人要藥 중 太陰人要藥에 속해 있는 약물이며 太陰人의 肝大한 특징으로 吸聚之氣가 왕성하여 안으로 모으는 기운이 많아 제대로 나가지 못하고 내부에 울체됨으로써 생기는 열증인 肝受熱裏熱病證에 사용될 수 있다.

이 병증에는 瘡瘍腫毒 성향으로 나타나는 陽毒燥澀證이 포함되며 몸에 반점이 돋는 등의 피부에 열이 심한 것으로 표현 되는 것을 이 병증에서 볼 수 있다⁹⁾.

蒲公英에 대한 연구로는 황¹⁰⁾의 蒲公英 물추출물의 항염효능에 관한 연구, 김 등¹¹⁾의 蒲公英 수추출물이 鎮痛, 抗炎작용에 미치는 영향, 노¹²⁾의 蒲公英의 염증성 사이토카인 발현 및 조절에 관한 연구 및 조¹³⁾의 蒲公英의 항알레르기에 관한 연구 등이 있다. 蒲公英의 항염 효능 및 항알레르기에 관한 연구가 지속적으로 이루어지고 있지만 알레르기성 접촉성 피부염과 같은 피부알레르기질환에 있어서 혈관 확장, 가려움 동반, 혈관 투과성 증가 등 직접적으로 증상을 유발시키는 물질인 히스타민을 분비하는 주요 세포인 mast cell을 이용한 蒲公英에 관한 연구는 현재 부족한 실정이다.

이에 저자는 蒲公英의 제 I 형 알레르기 반응에 속하는 아토피 피부염에 대한 효과를 실험적으로 확인하기 위하여 MC/9 mast cell을 이용하여 세포 독성 및 IL-5, IL-13 단백질 생성 및 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 mRNA 유전자 발현을 조절 할 수 있는지 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 재료

1) 세포 배양 및 약물

(1) 세포배양

본 실험에 사용된 MC/9 murine mast cell line(ATCC, USA)을 10% fetal bovine serum, 10% T-stim(BD Biosciences, USA), 0.05 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine(Sigma-Aldrich, USA) 및 100 µg/ml streptomycin(Gibco, USA)이 함유된 DMEM 배지에 부유시켜 37°C, 5% CO₂, 95% 대기에서 배양하였다. 세포는 주 2~3회씩 계대 배양하였다.

(2) 약물

본 실험에 사용한 蒲公英(*Taraxacum mongolicum*,

TAM)은 대전대학교 부속 한방병원에서 구입 정선하여 사용하였으며 원산지는 한국 경북 청송군 부남면이다.

(3) 蒲公英 추출물 분리

蒲公英 100 g에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 蒲公英 추출물 24.4 g을 냉동 보관(-84℃)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 시약 및 기기

(1) 시약

Dulbecco's Minimal essential medium(DMEM), Fetal bovine serum(FBS), Trypsin-EDTA, Antibiotics(penicillin, streptomycin)는 Gibco-BRL(USA) 제품을 사용하였고, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(D-PBS), Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), Ionomycin, Phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), Diethyl pyrocarbonate(DEPC), Chloroform, Isopropanol, Ethanol, magnesium chloride(MgCl₂), 2-mercaptoethanol는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였다. Trizol은 Ambion사(USA) 제품을, EZ-Cytox kit는 Daeil Lab. co.(Korea) 제품을, Deoxynucleoside triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(USA) 제품을 사용하였다. SYBR master mix는 Applied Biosystems사(USA) 제품을 사용하였으며, IL-5 ELISA kit는 BD bioscience사(USA) 제품을, IL-13 ELISA kit는 Biosource사(USA) 제품을 사용하였고, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

(2) 기기

機器는 열탕추출기 DWT-1800T(대웅, Korea), 감압 증류장치 B-480(Buchi Labortechnik AG, Switzerland), 동결 건조기 EYELA FDU-540(Tokyo, Japan), CO₂ 배양기(Forma scientific Co., USA), 원심분리기(한일과학,

Korea), plate shaker(Lab-Line, USA), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Bio-freezer(Sanyo, Japan), Quantitative Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA), ELISA leader(Molecular Devices, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 세포독성 측정

세포독성방법은 EZ-Cytox assay¹⁴⁾법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. MC/9 mast cell은 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 1 시간 배양한 후 蒲公英(최종 농도 50, 100, 200, 400 μg/ml)을 48 시간 동안 처리하였다. 배양 종료 6시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 μl씩 각 well에 가하고 실험 종료 시까지 배양하였다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA LEADER에서 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) ELISA 측정

MC/9 cell을 48-well plate에 4×10⁵/ml로 250 μl씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 무처리한 군은 정상군(Normal)으로 사용하였으며 PMA(50 ng/ml)와 Ionomycin(0.5 μM)만으로 자극한 군은 대조군(PI-control)으로 사용하였다. 배양 후 蒲公英을 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml로 각 well에 처리하고 1시간 후에 PMA(50 ng/ml)와 Ionomycin(0.5 μM)으로 자극한 뒤 16 시간 후에 상층액을 얻어 실험군으로 사용하였다.

Mouse IL-5, IL-13 ELISA kit 를 사용하여 제조사의 지시에 따라 코팅 antibody를 microwell에 100 μl씩 분주하고 4℃에서 16시간 두었다. 각 well을 wash buffer로 세척하고 Assay diluent를 200 μl씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상층액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상층액을 100 μl씩 넣었다. 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 warking detector를 만들어서 각 well에 100 μl씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100 μl씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. stop solution을 각 well에 50 μl

씩 넣고 Microplate spectrophotometer로 흡광도 450 nm로 측정하였다.

3) Real-time PCR

(1) RNA 추출

MC9 cell을 6-well plate에 2.5×10^5 /ml로 2 ml씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 무처리한 군은 정상군(Normal)으로 사용하였으며, PMA(50 ng/ml)와 Ionomycin(0.5 μ M)만으로 자극한 군은 대조군(PI-control)으로 사용하였다. 배양 후 Cyclosporin A(이하 CsA, 10 μ g/ml)와 蒲公英(50 μ g/ml, 100 μ g/ml)으로 처리하고 1시간 후에 PMA(50 ng/ml)와 Ionomycin(0.5 μ M)으로 자극한 뒤 6시간 후에 세포를 얻어 각각 양성대조군과 실험군으로 사용하였다.

세포에 Trizol 시약을 1 ml 넣고 eptube에 넣은 후 클로로포름을 100 μ l 넣었다. 얼음에 17분 동안 두고 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하였다. 층이 분리되면 eptube에 상층액을 옮겨 담고, 동량으로 이소프로판올을 넣어 얼음에 10분 정도 두었다가 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 80% 에탄올로 세척하고 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 완전히 제거하고 투명해질 때까지 말린 후 DEPC water로 cell의 양에 따라 20~30 μ l 넣어 용해시켰다.

(2) RT-PCR

역전사 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor(20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후

합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

(3) cDNA PCR

Real time quantitative RT-PCR은 Applied Biosystems 7,500 Fast Real-Time PCR system를 이용하여 수행하였다. 사용된 primers는 아래와 같다(Table 1).

유전자 발현은 Taqman PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard를 G3PDH를 사용하였으며, primer의 최종 농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 2min at 50 $^{\circ}$ C, 10min 94 $^{\circ}$ C, 그리고 40cycles을 0.15min at 95 $^{\circ}$ C, 1 min at 60 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. Target group의 RQ는 Quantitative PCR로 아래와 같이 측정하였다.

$$y = x(1+e)^n$$

x = starting quantity

y = yield

n = number of cycles

e = efficiency

Table 1. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
IL-4	Forward	5'-CCTCACAGCAACGAAGAACA-3'
	Reverse	5'-TGCAGCTCCATGAGAACA-3'
IL-5	Forward	5'-AGCCTAACCCTGTTGGAGGT-3'
	Reverse	5'-GTGATCGGCTTTTCTTGAGC-3'
IL-6	Forward	5'-GCTGGAGTCACAGAAGGAGTGGC-3'
	Reverse	5'-GGCATAACGCACTAGGTTTGCCG-3'
IL-13	Forward	5'-GAAGAATGGCCTGTTACACTCA-3'
	Reverse	5'-TTTCCGGTTTCTAGTTTGACAG-3'

IL: interleukin

4) 통계처리

각 실험군 결과 값은 unpaired student's T-test 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, p<0.05 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001)

Fig. 1. Cytotoxicity effects of TAM in MC/9 mast cells.

MC/9 mast cells were pretreated with various concentration TAM. The results represent the mean±S.E. (* : p<0.05).

TAM : *Taraxacum mongolicum*

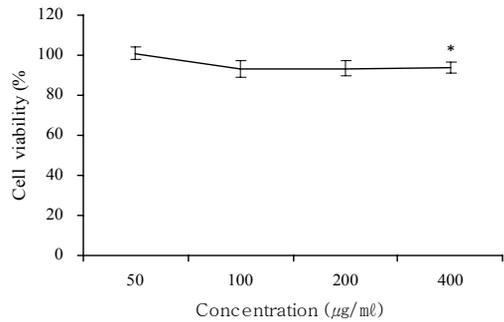


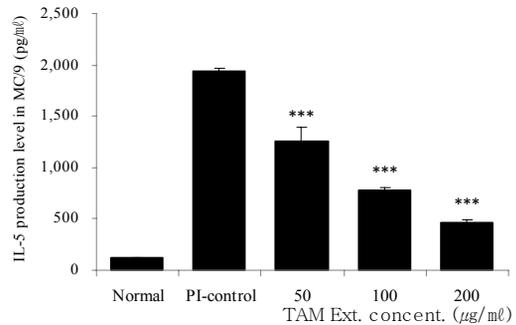
Fig. 2. Effects of TAM on IL-5 production.

MC/9 mast cells were pretreated with TAM(50, 100, 200 µg/ml), and then stimulated with PI. IL-5 production levels were measured by ELISA. The results represent the mean±S.E. Statistically significant value was calculated by compared with PI-control group by student's T-test. (***) : p<0.001).

TAM : *Taraxacum mongolicum*

Normal : MC/9 mast cell with no treatment

PI-control : MC/9 mast cell with PMA(50 ng/ml), Ionomycin(0.5 µM)



Ⅲ. 成績

1. 세포 독성

TAM의 MC/9 mast cell의 세포독성을 측정하는 결과, 50 µg/ml에서 400 µg/ml까지의 모든 농도에서 세포독성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 1).

2. ELISA analysis

TAM이 mast cell에서 IL-5, IL-13 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, MC/9 세포에 다양한 농도의 TAM을 처리한 후 PMA-Ionomycin(이하 PI)로 자극 한 후 ELISA로 IL-5와 IL-13의 생성량을 측정하였다.

1) IL-5 단백질 생성

IL-5 생성량은 정상군은 121±6.0 (pg/ml)이었고, 대조군은 1946.6±24.5 (pg/ml)로 정상군에 비하여 약 16 배 정도 증가하였다. 실험군의 IL-5 생성량은 50 µg/ml

에서는 1259.2±137.5 (pg/ml)으로 대조군에 비하여 약 1.55배 정도 유의성 있게 (p<0.001) 억제 하였고, 100 µg/ml에서는 784.8±22.6 (pg/ml)으로 대조군에 비하여 약 2.48배 정도 유의성 있게 (p<0.001) 억제 하였고, 200 µg/ml에서는 459.2±26.0 (pg/ml)으로 대조군에 비하여 약 4.24배 정도 유의성 있게 (p<0.001) 억제하였다(Fig. 2).

2) IL-13 단백질 생성

IL-13 생성량은 정상군은 90±3.9 (pg/ml)이었고, 대조군은 3211.0±112.1 (pg/ml)로 정상군에 비하여 약 35.68배 정도 증가하였다. 실험군의 IL-13 생성량은 50 µg/ml에서는 1773.6±38.0 (pg/ml)으로 대조군에 비하여 약 1.81배 정도 유의성 있게 (p<0.001) 억제 하였고, 100 µg/ml에서는 1918.2±104.0 (pg/ml)으로 대조군에 비하여 약 1.67배 정도 유의성 있게 (p<0.001) 억제 하였고, 200 µg/ml에서는 1537.3±70.4 (pg/ml)으로 대

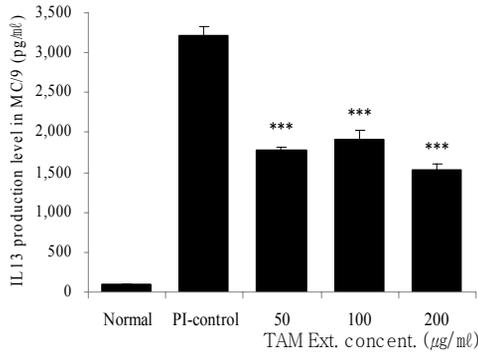


Fig. 3. Effects of TAM on IL-13 production.

MC/9 mast cells were pretreated with TAM(50, 100, 200 µg/ml), and then stimulated with PI. IL-13 production levels were measured by ELISA. The results represent the mean±S.E. Statistically significant value was calculated by compared with PI-control group by student's T-test. (***) : p<0.001).

TAM : *Taraxacum mongolicum*

Normal : MC/9 mast cell with no treatment

PI-control : MC/9 mast cell with PMA(50 ng/ml), Ionomycin(0.5 µM)

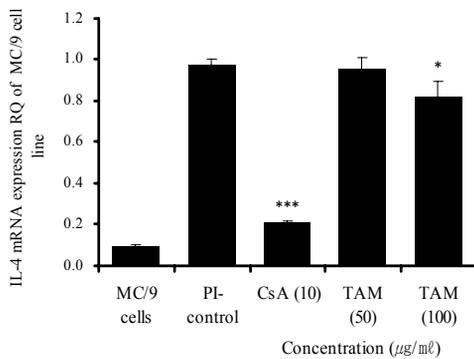


Fig. 4. Effects of TAM on IL-4 mRNA expression.

MC/9 mast cells were pretreated with CsA(10 µg/ml) or TAM(50, 100 µg/ml), and then stimulated with PI. IL-4 mRNA expression was analyzed by Real-time PCR. The results represent the mean±S.E. Statistically significant value was calculated by compared with PI-control group by student's T-test. (* : p<0.05).

TAM : *Taraxacum mongolicum*

MC/9 cell : MC/9 mast cell with no treatment

PI-control : MC/9 mast cell with PMA(50 ng/ml), Ionomycin(0.5 µM)

CsA : MC/9 mast cell with Cyclosporin A(10 µg/ml)

조군에 비하여 약 2.09배 정도 유의성 있게 (p<0.001) 억제하였다(Fig. 3).

3. Real-time PCR analysis

TAM이 mast cell에서 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 MC/9 세포에 CsA와 다양한 농도의 TAM을 처리한 후 PI로 자극하여 Real-time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석하였다.

1) IL-4 mRNA 유전자 발현

IL-4 mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.095±0.007 이었고, 대조군은 0.979±0.021으로 정상군에 비하여 약 10.31배 정도 유전자 발현 증가가 나타났다. 양성대조군은 0.208±0.007로 대조군에 비하여 약 4.71배 정

도 유의성 있게 (p<0.001) 억제하였다. 실험군의 IL-4 mRNA 유전자 발현은 50 µg/ml에서는 0.955±0.058으로 대조군과 차이가 나타나지 않았으며, 100 µg/ml에서는 0.822±0.075으로 대조군에 비하여 약 1.19배 정도 유의성 있게 (p<0.05) 억제하였다(Fig. 4).

2) IL-5 mRNA 유전자 발현

IL-5 mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.209±0.022 이었고, 대조군은 1.062±0.062으로 정상군에 비하여 약 5.08배 정도 유전자 발현 증가가 나타났다. 양성대조군은 0.388±0.024로 대조군에 비하여 약 2.74배 정도 유의성 있게 (p<0.001) 억제하였다. 실험군의 IL-5 mRNA 유전자 발현은 50 µg/ml에서는 0.823±0.057으로 약 1.29배 정도 유의성 있게 (p<0.01) 억제하였으며, 100 µg/ml에서는 0.673±0.076으로 대조군에 비하

Fig. 5. Effects of TAM on IL-5 mRNA expression.

MC/9 mast cells were pretreated with CsA(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or TAM(50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and then stimulated with PI. IL-5 mRNA expression was analyzed by Real-time PCR. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with PI-control group by student's T-test. (** : $p < 0.01$).

TAM : *Taraxacum mongolicum*

MC/9 cell : MC/9 mast cell with no treatment

PI-control : MC/9 mast cell with PMA(50 ng/ml), Ionomycin(0.5 μM)

CsA : MC/9 mast cell with Cyclosporin A(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

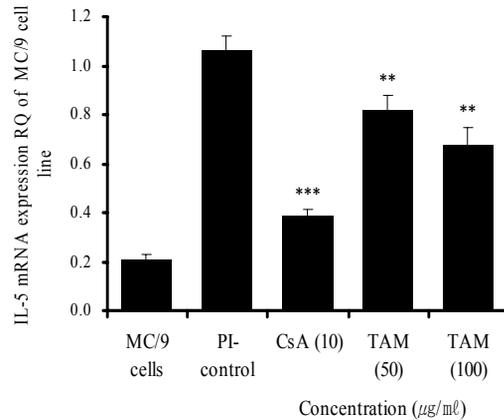


Fig. 6. Effects of TAM on IL-6 mRNA expression.

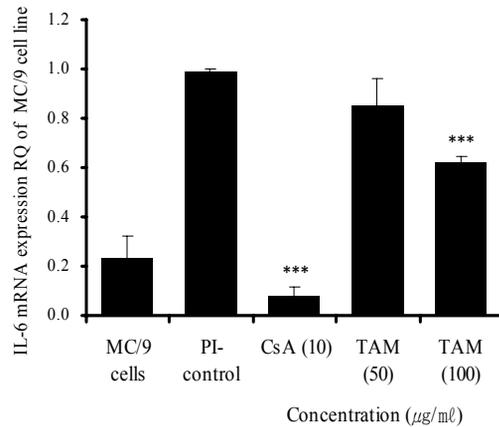
MC/9 mast cells were pretreated with CsA(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or TAM(50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and then stimulated with PI. IL-6 mRNA expression was analyzed by Real-time PCR. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with PI-control group by student's T-test. (***) : $p < 0.001$).

TAM : *Taraxacum mongolicum*

MC/9 cell : MC/9 mast cell with no treatment

PI-control : MC/9 mast cell with PMA(50 ng/ml), Ionomycin(0.5 μM)

CsA : MC/9 mast cell with Cyclosporin A(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)



여 약 1.58배 정도 유의성 있게 ($p < 0.01$) 억제하였다 (Fig. 5).

3) IL-6 mRNA 유전자 발현

IL-6 mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.235 ± 0.088 이었고, 대조군은 0.989 ± 0.011 으로 정상군에 비하여 약 4.21배 정도 유전자 발현 증가가 나타났다. 양성대조군은 0.079 ± 0.034 로 대조군에 비하여 약 12.52배 정도 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제하였다. 실험군의 IL-6 mRNA 유전자 발현은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 0.855 ± 0.110 으로 대조군과 차이가 나타나지 않았으며, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 0.618 ± 0.031 으로 대조군에 비하여 약 1.60배 정

도 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제하였다(Fig. 6).

4) IL-13 mRNA 유전자 발현

IL-13 mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.180 ± 0.036 이었고, 대조군은 1.052 ± 0.052 으로 정상군에 비하여 약 5.84배 정도 유전자 발현 증가가 나타났다. 양성대조군은 0.130 ± 0.057 로 대조군에 비하여 약 8.09배 정도 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제하였다. 실험군의 IL-13 mRNA 유전자 발현은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 0.852 ± 0.104 으로 대조군과 차이가 나타나지 않았으며, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 0.628 ± 0.047 으로 대조군에 비하여 약 1.68배 정도 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제하였다(Fig. 7).

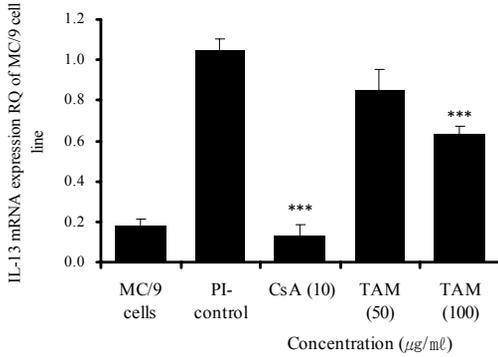


Fig. 7. Effects of TAM on IL-13 mRNA expression.

MC/9 mast cells were pretreated with CsA(10 µg/ml) or TAM(50, 100 µg/ml), and then stimulated with PI. IL-13 mRNA expression was analyzed by Real-time PCR. The results represent the mean±S.E. Statistically significant value was calculated by compared with PI-control group by student's T-test. (***) : p<0.001).

TAM : *Taraxacum mongolicum*

MC/9 cell : MC/9 mast cell with no treatment

PI-control : MC/9 mast cell with PMA(50 ng/ml), Ionomycin(0.5 µM)

CsA : MC/9 mast cell with Cyclosporin A(10 µg/ml)

IV. 考察

제 I 형 알레르기 반응에 속하는 아토피 피부염은 주로 영유아기에 시작하여 특징적인 피부 분포와 소양감을 가지며 호전과 악화를 반복하는 만성 재발성 피부염이다¹⁵⁾. 아토피 피부염은 환경적 요소와 유전적 소인이 모두 관여하는 복합적 질환으로 대기오염, 모유 수유 감소, 항생제 사용의 증가로 인한 항원에 대한 노출의 증가, 주거 환경 변화, 교육 수준의 증가, 정신적 스트레스 등이 최근 아토피 피부염의 발생률의 증가에 영향을 미치는 것으로 보고 있다¹⁶⁾. 주로 어린이에서는 10~30%의 유병률을 보이며 어른에서는 1~3%의 유병률을 보인다고 알려져 있으며, 최근 유·소아의 유병률이 2~3배 증가함과 동시에 성인에게도 꾸준히 증가하여 많은 사람이 아토피 피부염으로 고통을 받고 있다^{2,3)}. 아토피 피부염은 오랜 기간 치료를 필요로 하며 완치가 어렵고 주로 노출된 부위에 발생하여 삶의 질을 많이 저하시키고 있다¹⁷⁾.

현재까지 알려진 아토피 피부염에 대한 치료 방법은 스테로이드제나 항히스타민제의 도포나 복용, 면역억제제가 사용되고 있다. 그러나 이러한 치료제는 증상을 완화하고 피부의 염증을 가라앉히는 '대증요법'의 역할을 수행하며 실제로는 염증을 치료하는 것이 아닌 억제하는 작용을 하며 반복되는 질환의 경과에 따른 장기간 사용 시 부작용과 역시 값의 상승으로 인하여 새로운 대체 약물에 대한 관심이 증가하고 있

는 추세이다^{18,19)}.

한의학에서 아토피 피부염은 奶癬, 胎癬, 乳癬, 浸淫瘡, 胎熱 등과 증상 면에서 가장 유사하며 風熱, 濕熱, 血虛生風, 脾胃氣虛 등이 주요 병인이 되며 양상에 따라 濕熱型, 血熱型, 濕阻型, 血燥型으로 나누어서 清熱解毒, 活血祛風, 健脾化濕, 養血潤膚 등의 치법이 사용 된다⁷⁾.

蒲公英(*Taraxacum mongolicum*, TAM)은 국화과(Compositae)에 속한 다년생 초본인 민들레의 풀로 清熱解毒, 消腫散結, 利尿通淋의 효능을 가지고 있으며⁸⁾ 『新修本草』²⁰⁾에서는 “蒲公英, 味甘, 平, 無毒. 主婦人乳癰腫, 水煮汁飲之, 及封之, 立消.”라고 처음 기록된 이래 『本草綱目』²¹⁾에는 “민들레즙을 계속 마시면 머리카락이 검어지고胃와 뼈이 튼튼해진다.”라고 하였으며 『本草正義』²²⁾에서는 “蒲公英의 성질이 清涼하여 炎毒, 紅腫, 瘡腫, 癰瘍의 치료에 내복과 외용이 모두 가능하며 그 효과가 대단히 크다.” 라고 蒲公英에 관한 문헌 기록들이 있다.

四象醫學에서 보는 아토피 피부염은 火熱이 熾盛하여 발생하는 일종의 급성 열성 피부질환으로서 『東醫壽世保元』⁹⁾에서 아토피 피부염에 관하여 직접적으로 언급한 부분은 찾을 수 없지만 少陽人 胃受熱裏熱病論, 太陰人 肝受熱裏熱病論의 陽毒發斑과 유사한 개념으로 볼 수 있다.

太陰人 要藥에 속해 있는 蒲公英은 太陰人의

肝大한 특징으로 氣液의 吸聚之氣가 왕성하여 안으로 모으는 기운이 많아 제대로 나가지 못하고 내부에 울체됨으로써 생기는 열증인 太陰人 肝受熱裏熱病證에 사용될 수 있다. 肝熱에 의해 여러 갈래로 일어나는 병증을 내용에 따라 계통적으로 묶어 본다면 먼저 瘡瘍腫毒 성향으로 나타나는 병증군(陽毒燥澁證)이 있고, 肝熱로 인한 肺燥의 현상이 본격화되는 肝燥熱證이 있으며, 말기적 병증에 해당하는 陰血耗竭의 부류가 있다. 아토피 피부염과 유사한 陽毒證의 대표적인 증상으로는 얼굴에 비단에 놓아진 무늬처럼 붉은 반점들이 생기거나, 얼굴이 불그레하고 눈이 충혈되며, 전신에 반점이 생기는 등의 열적 증상들을 볼 수 있다.

『東醫壽世保元』⁹⁾에서의 陽毒證의 치법은 葛根解肌湯 등을 복용하여 肝熱을 해소하여 氣液의 과도한 吸聚之氣를 풀어 呼散之氣를 발휘하도록 하여 保命之主를 유지하도록 하는 것에 있다. 이처럼 약물 사용에 관하여 『東醫壽世保元』⁹⁾에서 내복약이 아닌 외용약으로써의 사용에 대해서는 쉽게 찾아 볼 수가 없다. 따라서 외용약의 사용이 체질별 保命之主를 유지하는 것에 도움을 줄 수 있는 것인가에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

아토피 피부염은 면역학적 양상이 복잡하고 다양하게 나타난다. 아토피 피부염은 T세포가 항체 형성에 관여하고 아토피 피부염 병변에 helper T세포가 주로 침윤된다²⁾. 아토피 피부염이 진행되게 되면 T세포의 활성화가 일어나고 helper T세포로 변화된다. 변화된 helper T세포는 발현되는 cytokine에 따라 Th1과 Th2 세포로 분화하는데, 급성기 아토피 피부염에서는 Th2 세포가 우세하게 나타난다. 급성기 아토피 피부염에서 Th2 면역 반응이 우세한 이유는 IL-4 수용체 유전자의 다형성과 같은 유전적 요인이 관여하고 항원 노출 시 증가되는 cytokine이나 항원 전달 세포들이 Th2 면역 반응을 우세하게 나타내는데 기여하기 때문이라고 알려져 있다²³⁾.

Th1 세포는 IL-2, IFN- γ , TNF 등을 생산하여 대식세포를 활성화시켜 지연형 면역반응을 유발하며 Th2

세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13과 같은 cytokine을 분비하게 되고 이 cytokine들은 B 세포의 isotype switching을 유도하여 IgE 합성을 증가시키고 호산구 같은 면역 세포를 피부로 끌어오는 역할을 한다²⁴⁾. 또한 mast cell 표면상에 있는 고친화성 IgE 수용체(Fc ϵ RI)에 과발현된 IgE가 결합하여 감각된 상태가 되고 그 상태에서 다시 항원에 노출되게 되면 mast cell을 활성화시켜 히스타민, 류코트리엔 등의 화학전달물질과 IL-4, IL-5 등의 cytokine을 분비하여 I형 과민반응을 유발하게 된다²⁵⁾.

I형 과민반응은 초기 수초 이내에 시작되는 즉시형 반응과 8~12시간이 소요되는 후기 반응으로 나눌 수 있다. 즉시형 반응은 mast cell로부터 히스타민, 프로스타글라딘, 그리고 이미 생성됐거나 혹은 바로 생성된 매개물질들의 활성화에 의해서 일어나며 이들 매개물질들이 혈관 투과성을 증가시키고 평활근을 수축시킨다. 후기반응은 활성화된 mast cell이 류코트리엔, 케모카인, 그리고 cytokine 등들의 매개물질을 합성하고 분비하는 것에 의해 유도된다. 이런 매개물들은 호산구와 Th2 세포를 포함한 백혈구를 염증 장소로 집합시켜 염증 반응을 지속시킨다²⁶⁾.

Mast cell은 I형 과민반응에서 중요한 역할을 하며 주로 결합조직과 점막에 존재하면서 알레르기 염증 반응에 관여 한다²⁷⁾. 이 세포는 IgE-Fc ϵ RI 반응에 의해 과립 내의 화학매개체와 cytokine 등을 분비하면서 조직손상, 점막부종, 점액 분비 증가 등을 일으킨다²⁸⁾. IgE가 Fc ϵ RI에 결합하면 mast cell은 감각되고 항원들이 Fc ϵ RI에 결합된 IgE와 교차 결합되면 활성화가 시작되고 탈과립화가 진행된다. 탈과립화는 수초 내에 발생하며 즉시형 과민반응의 병리학적 반응을 담당하는 매개인자와 Th2 cytokine을 분비하고 이들은 알레르기 반응을 확장하는 역할을 한다^{29,30)}. Mast cell에서 생산되는 cytokine들은 계속해서 Th2 면역 반응을 확장하고 IgE의 생산을 증가시킴으로서 만성 알레르기 반응에 기여 한다³¹⁾. 그러므로 mast cell이 발현하는 cytokine을 조절할 수 있다면 알레르기 반응을 경감시키거나 알레르기 반응이 만성으로 확장되는 것을 억

제할 가능성이 있다.

현재 이와 관련된 알레르기 염증반응에 관한 연구로는 유근피 추출물과 生料四物湯을 이용하여 RBL-2H3 mast cell을 이용한 연구 등이 있다. 박 등³²⁾의 유근피 추출물을 이용한 RBL-2H3 mast cell을 이용한 연구에서 유근피를 0.5, 1, 2, 4, mg/ml로 처리한 세포에서 IL-4, TNF- α 생성의 유의한 감소를 보였으며, 유근피를 1, 2, 4 mg/ml로 처리한 세포에서 IL-3 mRNA, IL-4 mRNA, IL-5 mRNA, IL-13 mRNA 유전자 발현을 억제하는 것을 볼 수 있다. 또한 손³³⁾의 生料四物湯을 이용한 RBL-2H3 mast cell을 이용한 연구에서 生料四物湯을 50, 100, 200 μ g/ml로 처리한 세포에서 IL-4 단백질 생성량의 감소를, 200 μ g/ml로 처리한 세포에서 IL-13 단백질 생성량의 감소를 볼 수 있으며, 50, 100 μ g/ml로 처리한 세포에서 IL-4 mRNA, IL-13 mRNA 유전자 발현을 억제하는 것을 볼 수 있다.

본 연구에서는 蒲公英을 이용하여 ELISA와 Real-time PCR로 MC/9 mast cell을 이용하여 여기서 발현하는 cytokine을 조절할 수 있는지를 분석하여 이를 통해 蒲公英이 mast cell에서 어떤 신호전달 기전을 제어함으로써 활성이 억제되어 cytokine의 발현에 영향을 미치는지를 실험적으로 규명해 보고자 하였다.

실험 결과를 살펴보면 MC/9 mast cell을 배양하여 TAM의 세포 독성을 측정된 결과 50, 100, 200, 400 μ g/ml의 모든 농도에서 세포 독성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 1). 따라서 50, 100, 200 μ g/ml의 농도만 사용하여 아래의 연구를 진행하였다.

MC/9 mast cell을 24시간 배양한 다음 무처리한 군은 정상군, PI만으로 자극한 군은 대조군으로 사용하며 배양 후 TAM(50, 100, 200 μ g/ml)을 각각의 농도로 처리하고 1시간 후 PI로 자극 한 뒤 16시간 후 상층액을 얻어 실험군으로 사용하였다.

ELISA로 단백질 생성량을 측정된 결과 IL-5 단백질 생성량은 50, 100, 200 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었으며(Fig. 2), IL-13 단백질 생성량은 50, 100, 200 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비

하여 유의성 있게 억제되었다(Fig. 3).

MC/9 mast cell을 24시간 배양한 다음 무처리한 군은 정상군, PI만으로 자극한 군은 대조군으로 사용하며 배양 후 CsA와 TAM(50, 100 μ g/ml)을 각각의 농도로 처리하고 1시간 후 PI로 자극 한 뒤 6시간 후 세포를 얻어 각각 양성대조군과 실험군으로 사용하였다. 앞의 실험 결과에서 100 μ g/ml과 200 μ g/ml의 농도에서 비슷한 결과가 관찰되어 200 μ g/ml의 농도는 제외하고 50, 100 μ g/ml 농도의 TAM만 사용하였다. 여기서 사용한 CsA는 보조 T 세포에 작용하여 세포내 수용체 단백질 cyclophilin과 결합하여 IL-2의 생성을 억제하고 세포독성 림프구의 초기단계를 차단하여 면역효과를 나타내고 있는³⁴⁾ 칼슘의존성 T 세포의 신호전달 과정을 차단하는 면역억제제이다³⁵⁾.

Real-time PCR로 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 mRNA 유전자 발현을 측정된 결과 IL-4 mRNA 유전자 발현은 100 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비하여 억제되었으며(Fig. 4), IL-5 mRNA 유전자 발현은 50, 100 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비하여 억제되었으며(Fig. 5), IL-6 mRNA 유전자 발현은 100 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비하여 억제되었으며(Fig. 6), IL-13 mRNA 유전자 발현은 100 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비하여 억제되었다(Fig. 7).

이상의 결과를 통해 TAM은 활성화된 mast cell에서 발현하는 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13의 생성을 억제함으로써 알레르기 염증 반응을 효과적으로 조절한다고 할 수 있다. 이로써 TAM을 제 I형 알레르기 반응에 속하는 아토피 피부염에 적용이 가능할 것으로 판단되며, 향후 아토피 피부질환 모델을 이용하여 동물 실험 연구 및 임상 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結論

포공영 추출물이 MC/9 mast cell에서의 Th2 cytokine 발현에 미치는 영향을 실험적으로 규명하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. IL-5 단백질 생성은 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 억제되었다.
2. IL-13 단백질 생성은 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 억제되었다.
3. IL-4 mRNA 유전자 발현은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 억제되었다.
4. IL-5 mRNA 유전자 발현은 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 억제되었다.
5. IL-6 mRNA 유전자 발현은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 억제되었다.
6. IL-13 mRNA 유전자 발현은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 억제되었다.

VI. 參考文獻

1. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피부과학 제5판. 서울:여문각. 2008:170-171.
2. Park YL, Park J. Pathogenesis of Atopic Dermatitis. Korean Journal of Investigative Dermatology. 2007;14(3):67-72.(Korean)
3. Lee HR. Atopic Dermatitis. The Journal of Korean Oriental Pediatrics. 2000;43(9):1161-1167.(Korean)
4. Sandstrom MH, Faergemann J. Prognosis and prognostic factors in adult patient with atopic dermatitis : a long-term follow-up questionnaire study. Br J Dermatol. 2004;150:103-110.
5. Patrick D. Does atopic dermatitis result from cytokine dysregulation?. J invest Dermatol. 1994;92:44-47.
6. Horsmanheimo L, Harvima IT, Jarvikallio A, Harvima RJ, Naukkarinen A, Horsmanheimo M. Mast cells are one major source of interleukin-4 in atopic dermatitis. Br J Dermatol. 1994;131:348-353.
7. 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海科學技術出版社. 1985:280-282.
8. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울:영림사. 2005:245-247.
9. 전국한의과대학 사상의학교실. 사상의학. 서울:집문당. 2005:289-291, 351.
10. Hwang GJ. Anti-inflammatory Effect of Taraxaci Herba Water Extract on Lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 Macrophages. Graduate school of Kyungwon University master's thesis. 2011:1-29. (Korean)
11. Kim SK, Song HJ. Effects of Herba Taraxaci Extract on the Antialgesia and Antiinflammatory. The Journal of Won Kwang Oriental Medicine. 1992;23:152-161. (Korean)
12. Noh KH. Inhibitory effect of Taraxaci Herba Extract(THE) on pro-inflammatory mediatory. Graduate school of Daegu Haany University master's thesis. 2009:1-32.(Korean)
13. Jo JH. The study of Taraxici Herba on the Anti-allergic Effects. Graduate school of Dongeui University doctor's thesis. 2007:1-33.(Korean)
14. Munetaka Ishiyama, Yoko Miyazono, Kazumi Sasamoto, Yosuke Ohkura and Keiyu Ueno. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. Talanta. 1997;44(7):1299-1305.
15. Akdis A, Akdis M, Blaser K. Immune regulation in atopic dermatitis. Curr Opin Immunol. 2002;12:641-646.
16. Wollenberg A, Kraft S, Oppel T. Atopic dermatitis : pathogenetic mechanism. Clin Exp Dermatol. 2000;25:530-534.
17. Finlay AY. Quality of life in atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol. 2001;45:64-66.
18. Robert Sidbury MD, Jon M. Hanifin MD. Old, New, And Emerging Therapies for Atopic Dermatitis. Dermatologic Clinics. 2000;18(1):1-11.
19. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. Immunol Today. 1992;13(4):136-142.
20. 尙志鈞 輯校. 新修本草. 合肥:安徽科學技術

- 出版社. 1981:292-295.
21. 陳貴延 主編. 本草綱目 通釋. 北京:學苑出版社. 1992:1374-1378.
 22. 張山雷 原著. 安世永, 金純一 編譯. 本草正義. 서울:청홍출판사. 2009:340.
 23. Leung DYM. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:99-108.
 24. Aversa G, Punnonen, Cocks BG, de Waal Malefyt R, Vega F Jr, Zurawski SM, Zurawski G, de Vries JE. An IL-4 mutant protein inhibits both IL-4 or IL-3-induced human IgG4 and IgE synthesis and B cell proliferation : support for common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. *J Exp Med.* 1993;178:2213-2218.
 25. Toshiaki Kawakami, Stephen J. Galli. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nature Reviews Immunology.* 2002;2:773-786.
 26. Chang TW, Shiung YY. Anti IgE as a mast cell-stabilizing therapeutic agent. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2006;117(6):1203-1212.
 27. Katx HR, Stevens RL, Austen KF. Heterogeneity of mammalian mast cells differentiates in vivo and in vitro. *J Allergy Clin Immunol.* 1985;76:250-259.
 28. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. 최신면역학입문 3판. Seoul:E public. 2009:205-212.
 29. Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (FcεRI) : from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:931-972.
 30. Marquardt DL, Wasserman SI. Modulation of rat serosal mast cell biochemistry by in vivo dexamethasone administration. *J Immunol.* 1983;131:934-939.
 31. Taketomi Y, Murakami M. Lipid networks in mast cell biology. *Yakugaku Zasshi.* 2001;131(1):73-84.
 32. Park SB, Kang KH, Yoon HJ, Ko WS. Inhibitory effect of *Ulmus davidiana* on β-hexosaminidase release and cytokine production in RBL-2H3 cells. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology.* 2011;24(1):86-95. (Korean)
 33. Son MJ. Suppressive effect of SangRyoSaMulTang on activated of RBL-2H3 mast cells. Graduate school of Daejeon University master's thesis. 2011:1-29.(Korean)
 34. Bennett, W.M. and Noeman, D.J. Action and toxicity of cyclosporin. *Annu. Rev. Med.* 1986;37:215-224. (Korean)
 35. Lee JS, Yun SJ, Lee JB, Kim SJ, Won YH, Lee SC. The Efficacy of Cyclosporin in Patients with Atopic Dermatitis. *Korean Journal of dermatology.* 2008; 46(2):224-230.(Korean)