

# 甘松香 (감송향)이 아토피樣 (양) 피부염에 미치는 영향

민들레 · 박은정

원광대학교 한의과대학 소아과학교실

## Abstract

### Effects of Nardostachys Jatamansi on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions

Min Deul Le · Park Eun Jung

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

#### Objectives

NJ is being used to treat inflammatory diseases in Korea. In this study, we attempted to evaluate the effects of NJ on atopic dermatitis (AD)-like lesions and mast cell-mediated allergy inflammation in vivo and in vitro.

#### Methods and Results

We investigated to ascertain the pharmacological effects of NJ on 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced allergic reactions under in vivo conditions. Additionally, to find possible explanations for the anti-inflammatory mechanisms of NJ, we evaluated the regulatory effects of NJ on the level of inflammatory mediators in phorbol 12-myristate 13-acetate plus calcium ionophore A23187 (PMACI)-stimulated human mast cells (HMC-1).

#### Conclusions

NJ inhibited the production of the inflammatory cytokines (IgE, IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$ ) significantly in vivo and in vitro.

**Key words** : Nardostachys Jatamansi, Atopic dermatitis, Inflammatory cytokine, Human mast cells-1

## I. Introduction

甘松香 (學名 : 甘松 *Nardostachys chinensis* Batal., 넙은잎감송 *N. jatamansi* DC.)은 敗醬科에 속한 多年生矮小草本인 감송향 혹은 넙은잎감송의 根莖 및 根을 건조한 것으로, 辛, 甘, 溫 無毒하고 脾, 胃 二經에 작용한다. 芳香性으로 理氣止痛, 開鬱醒脾 등의 효능이 있어 脾胃虛寒으로 인한 氣滯胸悶, 脘腹脹痛, 食慾不振

등의 병증을 치료한다<sup>1-6)</sup>.

아토피 (Atopy)는 다양한 원인이 복잡하게 연관되어 완화와 재발이 반복되는 난치성 만성 질환으로<sup>7,8)</sup>, 심한 소양증과 함께 紅斑, 浮腫, 滲出, 부스럼딱지, 鱗屑 등과 같은 전형적인 피부증상을 특징으로 한다<sup>9)</sup>. 한의학에서 아토피피부염은 浸淫, 浸淫瘡, 乳癬, 奶癬, 胎斂瘡 등의 범주에 해당하고<sup>10-12)</sup>, 濕熱俱盛型, 脾虛濕盛型, 血虛風燥型으로 변증하며<sup>13)</sup>, 면역학적 병인으로

Received: April 13, 2012 • Revised: May 19, 2012 • Accepted: May 21, 2012

Corresponding Author: Park Eun Jung

Department of Pediatrics, Wonkwang University Jeonju Oriental Medicine Hospital, 59

Garyeonsan-ro, Deokjin-gu, Jeonju, Jeollabuk-do 561-851, Republic of Korea

Tel: +82-63-270-1019

Fax: +82-63-270-1594

E-mail: ejpark@wonkwang.ac.kr

© The Association of Korean Oriental Pediatrics. 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/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

T림프구의 활성화, 랑게르한스 세포의 자극 증가, 사이토카인 체계의 이상, 세포매개성 면역의 감소, IgE의 증가 등이 있다<sup>14,15)</sup>.

甘松香 (감송향)은 여러 논문에서 급성 취장염을 포함한 염증 반응 억제에 유의한 효과를 입증<sup>16-19)</sup>하였으나, 감송향이 아토피성 피부염에 미치는 영향에 대해서는 아직 연구가 진행되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 화학물질인 DNFB 처치로 atopic dermatitis (AD)-like lesions이 유발된 Balb/c mice를 이용한 in vivo 실험에서 감송향을 경구 투여하여 등 부위의 외관상의 호전효과와 등 피부 조직과 혈액 serum을 이용하여 조직 내 IgE, 혈청 내 IL-6를 측정하였고, 또한 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 calcium ionophore A23187로 자극한 사람 비만세포 주 (HMC-1)를 이용하여 아토피피부염에서의 염증 반응과 연관시켜 inflammatory cytokine (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ )을 확인하여 감송향이 아토피피부염에 미치는 영향에 대해 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. Materials and methods

### 1. 材料

#### 1) 약재

약재는 원광대학교 한의과대학 부속 전주한방병원 약재실에서 구입하였다.

#### 2) 실험 동물

5주령, 19-20 g의 수컷 Balb/c mice는 Da-Mool science (Daejeon, Korea)에서 구입했다. 이들은 원광대학교 약학대학 내 22 $\pm$ 1 °C의 기온과 55 $\pm$ 1%의 습도가 유지된 laminar air-flow room에서 cage 당 6-7마리가 사육되었다.

#### 3) 시약

phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), calcium ionophore A23187 (A23187), avidin peroxidase, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2, 4-dinitrofluorobenzene (DNFB)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입했다. Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM)는 Gibco BRL (Grand Island, NY)에서, Fetal bovine serum (FBS)은 JR Scientific, Inc. (Woodland, CA, USA)에서 구입했

으며, anti-human TNF- $\alpha$ /IL-6/IL-8, recombinant TNF- $\alpha$ /IL-6/IL-8, biotinylated TNF- $\alpha$ /IL-6/IL-8, anti-mouse IgE, recombinant IgE and biotinylated IgE는 Pharmingen (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

#### 4) 세포배양

Human mast cell line (HMC-1)은 IMDM (100 unit/ml, penicillin, 100  $\mu$ g/ml, streptomycin, 10% heat-inactivated FBS)에서 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 습도 95%의 환경에서 배양하였다.

#### 5) 甘松香 추출 및 동결건조

건조 상태의 감송향 (NJ)을 증류수와 함께 약 3시간 정도 달여 여과한 후 동결 건조하여 4 °C에서 보관하였다. 시료를 증류액에 용해시킨 후 0.22  $\mu$ m 필터로 여과하여 실험에 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) DNFB에 의하여 유발된 피부염

실험 전에 Balb/c mice의 등 피부를 제모한 후, acetone-olive oil (3:1)에 혼합된 0.15% DNFB 100  $\mu$ l를 1주간 3회, 총 5주간 Balb/c mice의 등 부위에 도포하였다.

### 2) 실험군의 조성 및 약물 투여

실험은 총 네 군 (Control군, DNFB군, 감송향 1 g/kg군, 감송향 0.1 g/kg군)으로 설정하여 각 군마다 5마리씩 진행되었으며, NJ는 경구 투여하였다.

### 3) 사이토카인 측정

HMC-1 세포에 여러 농도의 NJ를 PMA와 A23187 자극 1시간 전에 전처리하였다. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 IL-6, IL-8 및 TNF- $\alpha$ 의 배양 상층액의 protein levels을 측정하였다. 먼저 IL-6, IL-8 및 TNF- $\alpha$ 를 측정하기 위하여 96-well ELISA plates (Nunc, Denmark)에 이중으로 sandwich ELISA를 수행하였다. 그리고 pH가 7.4인 phosphate-buffered saline (PBS)에 1.0mg/ml로 mouse anti-human IL-6, IL-8 및 TNF- $\alpha$  monoclonal antibodies를 100ml씩 각 plate를 코팅하였다. 4 °C에서 하룻밤을 배양한 후 PBS containing 0.05% Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 세척하였다. 1시간 동안 PBS containing 1% BSA, 5% sucrose, 0.05% NaN<sub>3</sub>를 처리하고 그 후에 다시 세척하였다. 그

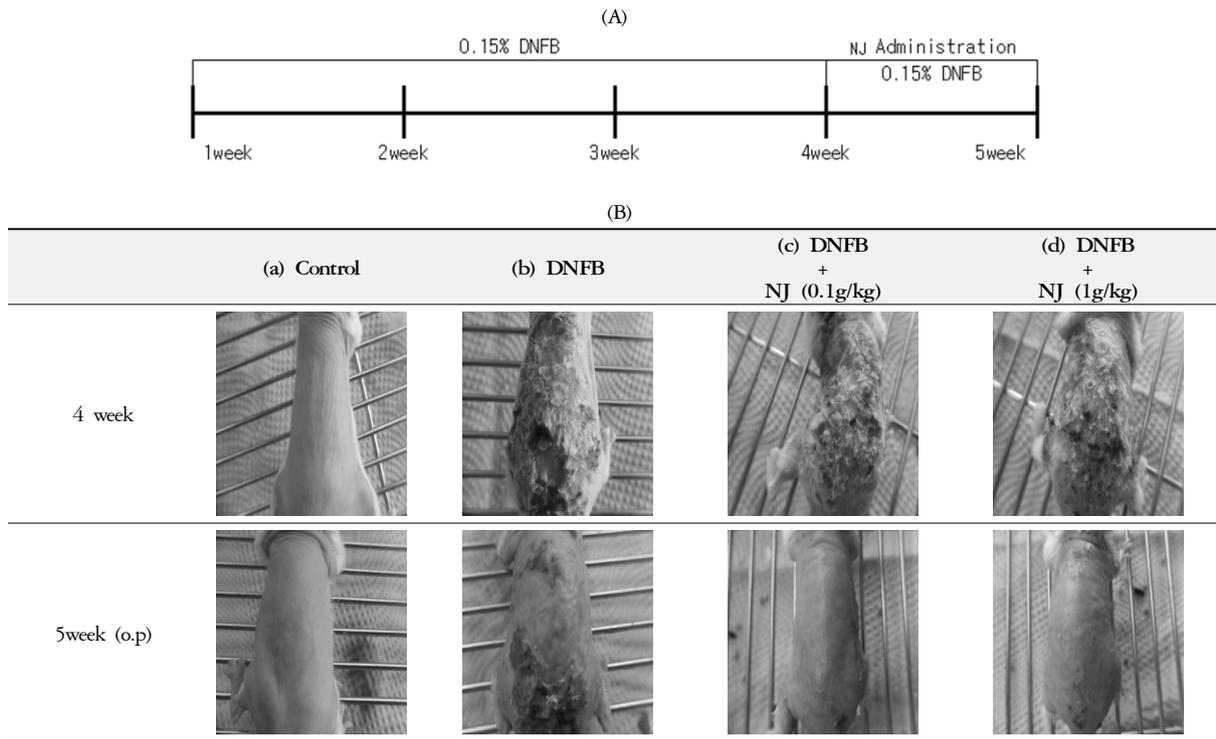


Fig. 1. The effect of NJ on the DNFB-induced dermatitis

The Balb/c mice were sensitized with 100  $\mu$ l of 0.15% DNFB in acetone-olive oil (3:1) or control (acetone:olive oil=3:1) applied to the dorsal skin twice each week for a total period of 5 weeks. After 4 weeks, NJ (0.1 g/kg or 1 g/kg) was orally administered 1 week prior to the end of the experiment. (This photograph of mouse was taken the after treatment completion.)

- (a) Control; acetone : olive oil (3:1) treated.
- (b) DNFB; DNFB+D.W. treated.
- (c) DNFB+NJ 0.1 g/kg; DNFB+NJ 0.1 g/kg treated.
- (d) DNFB+NJ 1 g/kg; DNFB+NJ 1 g/kg treated.

리고 샘플과 recombinant IL-6, IL-8 및 TNF- $\alpha$ 를 standards로 첨가하고 37  $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 plates를 세척하고 avidin-peroxidase를 첨가하고 37  $^{\circ}$ C에서 30분을 더 배양하였다. 마지막으로 세척을 한 후 ABTS substrate (Sigma)를 첨가하였다. 발색현상을 405 nm에서 automated microplate ELISA reader를 이용하여 측정하였고 recombinant human IL-6, IL-8 및 TNF- $\alpha$ 의 각각 희석농도로 standard curve를 설정하였다.

4) 세포독성실험 (MTT assay)

NJ의 농도에 따른 세포 생존력을 측정하기 위해 MTT colorimetric assay를 수행했다. 500  $\mu$ l의 HMC-1 cells ( $5 \times 10^5$  cells/well)을 NJ 처리 또는 비처리 후 8시간동안 배양하였다. MTT 용액 (500  $\mu$ g/mL)을 첨가해 37  $^{\circ}$ C에서 4시간동안 다시 배양한 후, DMSO로 crystalized MTT (formazan)를 녹인 다음 540 nm에서 ELISA reader로 분석하였다.

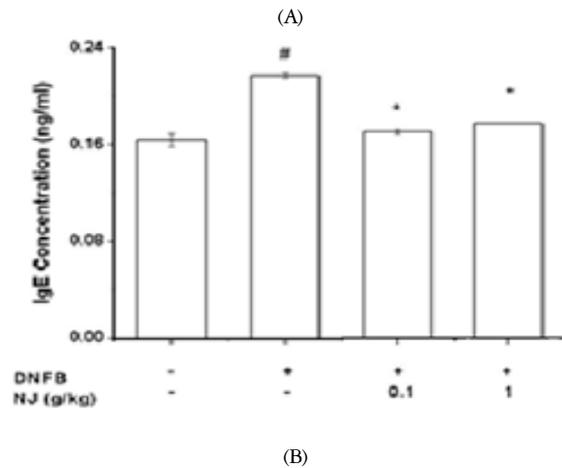
5) 통계학적 처리

최소 3회에 걸친 실험 데이터를 종합하여 결과는 mean  $\pm$  S.E.M.으로 표시했고 independent t-test를 실시해 유의성을 검증하였으며, 유의수준은  $P < 0.05$ 로 정의하였다.

III. Results

1. 등 부위의 atopic dermatitis (AD)-like skin lesions의 호전 효과

5주간 지속적으로 DNFB를 도포한 Balb/c mice는 증상의 악화를 보였으며 DNFB의 도포와 함께 甘松香 (NJ)을 경구 투여한 Balb/c mice에서는 atopic dermatitis (AD)-like skin lesions을 억제하는 소견을 나타내었다 (Fig. 1A, 1B). 처치 종료 후 mice의 등 부위 사진에서는 DNFB 처치군의 염증양상이 심한 것이 보이며



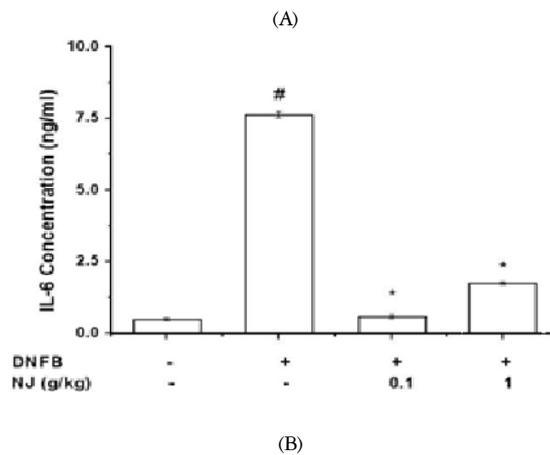
(B)

Treatment (g/kg)	Control	DNFB	DNFB+NJ 0.1	DNFB+NJ 1
Drug	-	-	NJ 0.1 g/kg	NJ 1 g/kg
IgE level (ng/ml)	0.1634±0.005	0.2170±0.002	0.1707±0.001	0.177±0

Fig. 2. The effect of NJ on the DNFB-induced the tissue total IgE levels in Balb/c mice

The tissue total IgE levels in the indicated groups were measured using ELISA method.

Values are the mean ± S.E.M. #P < 0.05, significantly different from the unstimulated cells. \*P < 0.05, significantly different from the control.



(B)

Treatment (g/kg)	Control	DNFB	DNFB +NJ 0.1	DNFB +NJ 1
Drug	-	-	NJ 0.1 g/kg	NJ 1 g/kg
IL-6 level (ng/ml)	0.489±0.05	7.627±0.11	0.583±0.06	1.741±0.06

Fig. 3. The effect of NJ on the DNFB-induced the serum total IL-6 levels in Balb/c mice

The serum total IL-6 levels in the indicated groups were measured using ELISA method.

Values are the mean ± S.E.M. #P < 0.05, significantly different from the unstimulated cells. \*P < 0.05, significantly different from the control.

DNFB+NJ 0.1 g/kg와 DNFB+NJ 1 g/kg 처치군에서 모두 염증 양상이 감소한 것을 볼 수 있다 (Fig 1B).

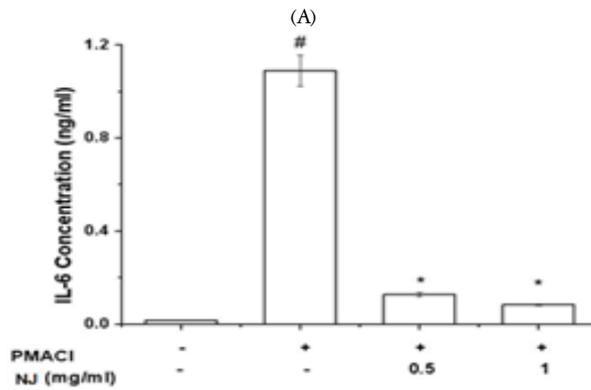
## 2. DNFB로 유발시킨 Balb/c mice의 조직내 IgE 수치 억제 효과

Balb/c mice에 DNFB 처치를 한 후 등 조직 표본을 채취하여 ELISA로 IgE 수치를 측정하였다. 정상군과 비교하여 DNFB 처치군의 조직내 IgE 수치가 증가하

였다. DNFB+NJ 0.1 g/kg 처치군과 DNFB+NJ 1 g/kg 처치군의 조직내 IgE 수치가 모두 유의성 있게 감소하였다. (Fig. 2A, 2B)

## 3. DNFB로 유발시킨 Balb/c mice의 혈청 내 IL-6 농도 변화

DNFB 감작에 의해 아토피피부염이 발생한 Balb/c mice에서 생성된 혈청 IL-6 농도를 ELISA로 측정하였

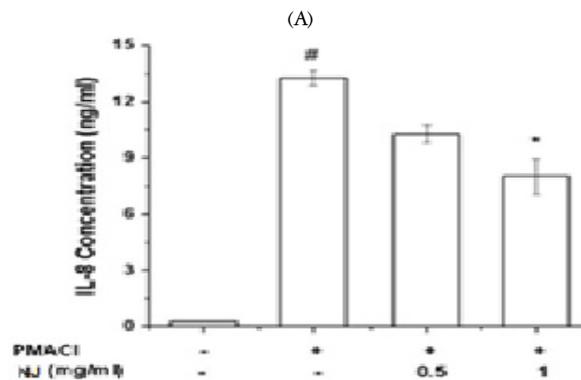


(B)

Treatment (mg/ml)	control	PMACI -stimulated	PMACI-stimulated +NJ 0.5	PMACI-stimulated +NJ 1
Drug	-	-	NJ 0.5 mg/ml	NJ 1 mg/ml
IL-6 level (ng/ml)	0.0167±0.0008	1.0903±0.06	0.127±0.008	0.084±0.002

Fig. 4. The effect of NJ on the IL-6 levels in PMACI-stimulated HMC-1 cells

Cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were pre-treated with NJ for 30 min and then stimulated PMACI (PMA; 50 nM, A23187; 1  $\mu$ M) for 8h. The levels of IL-6 were measured from cell supernatant using ELISA. All data were represented in the mean±S.E.M. of triplicate determinations from triplicate separate experiments (<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs. control; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs. PMACI alone).



(B)

Treatment (mg/ml)	Control	PMACI -stimulated	PMACI -stimulated +NJ 0.5	PMACI -stimulated +NJ 1
Drug	-	-	NJ 0.5 mg/ml	NJ 1 mg/ml
IL-8 level (ng/ml)	0.294±0.01	13.2787±0.46	10.278±0.46	8.033±0.934

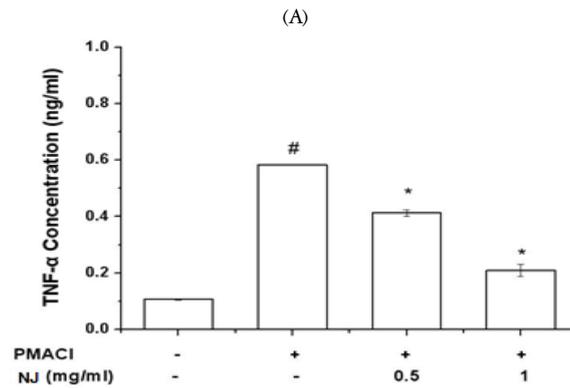
Fig. 5. The effect of NJ on the IL-8 levels in PMACI-stimulated HMC-1 cells

Cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were pre-treated with NJ for 30 min and then stimulated PMACI for 8 h. The levels of IL-8 were measured from cell supernatant using ELISA. All data were represented in the mean±S.E.M. of triplicate determinations from triplicate separate experiments (<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs. control; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs. PMACI alone).

다. 정상군과 비교하여 DNFB 처치군의 혈청 내 IL-6 수치가 증가하였다. DNFB+NJ 0.1 g/kg 처치군과 DNFB+NJ 1 g/kg 처치군의 혈청 내 IL-6 수치가 모두 유의성 있게 감소하였다. (Fig. 3A, 3B)

4. HMC-1에서 PMACI (PMA+A23187) 자극 후, 감송향을 처리하여 IL-6 방출농도 측정

IL-6 생성 조절에 NJ의 효과를 측정하기 위하여 HMC-1 세포에 PMA와 A23187를 8시간 동안 자극하고 상층액을 ELISA 방법으로 분석하였다. PMA (0.05  $\mu$ M)와 A23187 (1  $\mu$ M)를 HMC-1 세포에 처리하면 IL-6 생성이 증가되었다. PMA와 A23187로 인해 증가된 IL-6는 NJ (0.5, 1 mg/ml,  $P < 0.05$ )에 의해 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 4A, 4B).

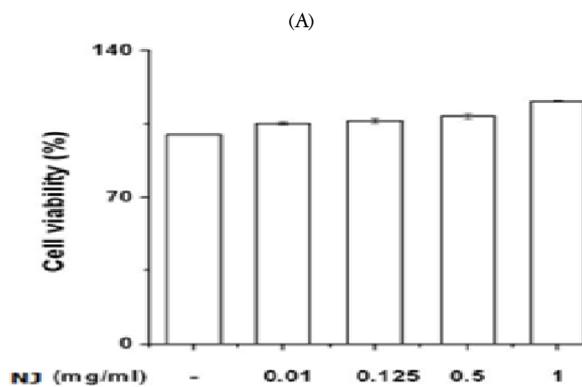


(B)

Treatment (mg/ml)	Control	PMACI -stimulated	PMACI -stimulated +NJ 0.5	PMACI -stimulated +NJ 1
Drug	-	-	NJ 0.5 mg/ml	NJ 1 mg/ml
TNF-α level (ng/ml)	0.106±0.001	0.583±0.001	0.413±0.02	0.21±0.01

Fig. 6. The effect of NJ on the TNF-α levels in PMACI-stimulated HMC-1 cells

Cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were pre-treated with NJ for 30 min and then stimulated PMACI for 8 h. The levels of TNF-α were measured from cell supernatant using ELISA. All data were represented in the mean±S.E.M. of triplicate determinations from triplicate separate experiments (<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs. control; \* $P < 0.05$  vs. PMACI alone).



(B)

Treatment (mg/ml)	Control	NJ 0.01	NJ 0.125	NJ 0.5	NJ 1
Cell viability (%)	100	105.396	106.498	108.62	115.7588

Fig. 7. The effects of NJ on cell viability

HMC-1 cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were incubated with NJ (0.01-1 mg/ml) for 8 h. Cell viability was evaluated by MTT colorimetric assay. All data were represented in the mean±S.E.M. of triplicate determinations from triplicate separate experiments.

5. HMC-1에서 PMACI (PMA+A23187) 자극 후, 감송향을 처리하여 IL-8 방출농도 측정

IL-8 생성 조절에 NJ의 효과를 측정하기 위하여 HMC-1 세포에 PMA와 A23187를 8시간 동안 자극하고 상층액을 ELISA 방법으로 분석하였다. PMA (0.05 μM)와 A23187 (1 μM)를 HMC-1 세포에 처리하면 IL-8 생성이 증가되었다. PMA와 A23187로 인해 증가된 IL-8는 NJ (1 mg/ml,  $P < 0.05$ )에 의해 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 5A, 5B).

6. HMC-1에서 PMACI (PMA+A23187) 자극 후, 감송향을 처리하여 TNF-α 방출농도 측정

TNF-α 생성 조절에 NJ의 효과를 측정하기 위하여 HMC-1 세포에 PMA와 A23187를 8시간 동안 자극하고 상층액을 ELISA 방법으로 분석하였다. PMA (0.05 μM)와 A23187 (1 μM)를 HMC-1 세포에 처리하면 TNF-α 생성이 증가되었다. PMA와 A23187로 인해 증가된 TNF-α는 NJ (0.5, 1 mg/ml,  $P < 0.05$ )에 의해 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 6A, 6B).

### 7. HMC-1에 농도별 감송향 처리 후 세포내 독성 및 사멸 여부

비만세포에서 감송향추출물의 독성을 알아보기 위해 MTT 측정 방법으로 세포독성을 관찰하였다. 감송향 추출물을 HMC-1에 0.01, 0.125, 0.5, 1 mg/ml의 농도로 처리해 8시간 반응시켜 독성을 확인하였다. 그 결과 감송향 추출물 1 mg/ml의 농도에서도 세포독성을 보이지 않았고, 감송향을 처리하지 않은 그룹보다 생존률이 더 높게 나타났으며, 세포 증식 효과가 보였다 (Fig. 7A, 7B).

## IV. Discussion

최근 들어서 아토피피부염은 전세계적으로 증가추세를 보이며 특히 소아의 발병률은 성인에 비해 훨씬 높은 것으로 알려져 있다<sup>20</sup>. 과거 발병률은 1% 정도였으나 현재 전 세계적으로 10~20% 정도의 유병률을 보이고 있고<sup>21</sup>, 대한 소아알레르기 호흡기학회에서 1995년과 2000년에 시행한 전국역학조사에서는 우리나라의 유병률도 15.3%에서 17%로 증가하고 있는 추세로 나타났다<sup>21</sup>.

Hanifin and Rajka의 진단기준에 따르면 주증상으로 소양증, 특징적 발진모양과 호발부위, 만성적 경과, 아토피 (천식, 알레르기성 비염, 아토피피부염)의 개인 및 가족력과 부증상으로 피부 건조증, 어린선, 제1형 피부 반응, 반복되는 결막염, 눈 주위 색소침착, 백색 비강진, 환경이나 감정요인에 의한 악화소견, 구순염, 손이나 발의 비특이적 습진 병변 등의 임상적 증상이나 경향성을 위주로 진단하거나 발생 시기나 연령적 특징에 따라 유아기, 소아기, 성인기로 구분하기도 한다<sup>22</sup>.

서양의학에서는 아토피피부염의 치료로 우선 악화 요인 회피 및 제거, 피부 보습요법, 광선요법 등의 보존적인 치료요법이 있으며, 국소 스테로이드제제의 사용, 비스테로이드성 국소 도포용 면역억제제, anti-histamine, 혹은 아토피피부염 환자의 경우 농가진, 절두증, 봉와직염, 단순포진, 전염성 연속증, 백선 등의 2차 감염을 대비해 항생제, 항진균제, 항바이러스제 등이 쓰이기도 한다<sup>23</sup>. 그러나 각종 부작용으로 인해 효과적이고 안전한 천연물 치료제에 대한 요구가 증가하고 있으며<sup>24,25</sup>, 이에 따라 치료효과가 높고 부작용이 적은 치료제를 천연물이나 한약에서 찾고자 하는 시도가 끊임없이 이루어지고 있다<sup>26,27</sup>.

한의학에서 아토피피부염은 浸淫, 浸淫瘡, 乳癬, 奶癬, 胎斂瘡 등으로 불리며<sup>10-12</sup>, 吳謙의 <醫宗金鑑>에서는 奶癬을 胎斂瘡이라 하여 가려워 白屑이 일어나는 乾斂과 가려움이甚하여 黃水가 浸淫하여 퍼져가는 濕斂으로 나누어 說明하여 오늘날 아토피피부염과 가장 類似하게 表現하고 있다<sup>28</sup>. 아토피피부염을 크게 濕熱俱盛型, 脾虛濕盛型, 血虛風燥型으로 변증 분류하는데<sup>13</sup>, 한의학적으로 아토피피부염의 병리기전은 體質的으로 脾胃氣虛 때문에 濕熱의 邪氣를 感受하기 쉽게 되어 胃의 痰飲이 일어나고 脾胃의 건전한 기능이 손상을 입은 體質虛弱한 소아가 外部의 영향을 받아 腠理에 濕熱症을 일으킨다고 보고 있다. 또한 先天的으로 虛寒하며 脾의 건전한 運行機能을 상실한 사람에게 風熱邪가 皮膚에 浸潤해서 발생되고 발작을 반복해서 치유되지 않으면 결국 脾虛血燥로 되어 피부의 영양실조를 일으킨다고 보았다<sup>29</sup>.

감송향의 성분은 valeranone, nardosonone, nardostachone, 1-aristilene-2-one, patchouli alcohol, pinene, oleanolic acid, b-sitosterol 등을 함유하였고<sup>4-6,30</sup>, 감송향의 효능에 관한 연구는 대부분 신경계와 관련된 연구로서 뿌리 및 근경 (Nardostachyis rhizoma) 추출물의 진정효과<sup>31</sup>, 신경세포 분화와 관련된 보고<sup>32-35</sup>, 급성 체장염 억제<sup>16,17,36</sup>, 항산화 및 항스트레스 작용<sup>37,38</sup>, 항박테리아, 항진균작용<sup>39</sup>, 염증 및 면역에 관한 보고<sup>18,19</sup>, 항우울, 학습과 기억향상, 뇌경색에 대한 보호, 간 보호, 기관지이완효과, HL-60 세포의 세포 자멸사 및 분화에 미치는 영향 등에 대한 다양한 보고들이 있다<sup>40-45</sup>.

저자는 항염증 반응에 유의한 효과를 나타내고 脾胃二經에 작용하여 脾胃虛寒으로 인한 氣滯胸悶, 脘腹脹痛, 食慾不振 등을 치료하는 감송향이 아토피피부염에 미치는 영향을 연구하기 위해, DNFB 처치로 AD-like lesions이 유발된 Balb/c mice를 이용한 in vivo 실험과 HMC-1을 이용한 in vitro 실험을 시행하였다.

DNFB (Dinitrofluorobenzene)는 지연형 접촉성 피부염을 일으키는 대표적인 물질로 DNFB의 반복 노출시 CD4+ 및 CD8+ T세포 매개성 염증세포의 침윤 (infiltration)에 의한 피부 부종과 피부 조직의 비후가 초래되는 것으로 알려져 있으며, DNFB 유발 접촉성 피부염 동물모델은 현재 가장 널리 이용되고 있는 allergy 동물 모델 중 하나이다<sup>46,47</sup>. 이 등<sup>48</sup>은 淸血潤膚湯, 김 등<sup>49</sup>은 當歸飲子加味方과 外治方 병용, 홍 등<sup>50</sup>은 溫淸飲과 三黃洗劑加味方 병용, 송 등<sup>51</sup>은 當歸飲子和 三黃洗劑加味方

병용, 백 등<sup>52)</sup>은 단삼을 활용하여 본 논문과 유사한 실험방법을 통해 아토피피부염을 관찰한 연구 결과를 보고한 바 있다.

본 연구에서는 甘松香 (NJ)의 지속적인 경구투여가 DNFB 유발성 Balb/c mice의 AD-like skin lesions을 호전시키는 것을 관찰할 수 있었다. DNFB+NJ 1 g/kg 처치군보다 DNFB+NJ 0.1 g/kg 처치군의 염증 양상이 더 호전된 모습을 나타내었다.

아토피성 피부질환은 고혈청 IgE 농도, 환경 항원에 대한 특이 IgE 농도 증가와 조직과 말초 혈액의 호산구 증가와 관련이 있어<sup>53-55)</sup>, IgE 매개 염증 반응이 병리기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>56)</sup>. 즉 IgE는 아토피질환의 발생에 중요한 결정인자로서 T세포를 활성화시킨다<sup>57)</sup>.

본 연구에서는 Balb/c mice에 DNFB 처치를 한 후 등 조직 표본을 채취하여 ELISA로 IgE 수치를 측정하였다. 정상군과 비교하여 DNFB 처치군의 조직내 IgE 수치가 증가한 반면 DNFB+NJ 처치군에서는 조직내 IgE 수치가 모두 유의성 있게 감소하였다.

Cytokine은 세포 사이의 연락을 담당하는 물질로서, 알러지 질환과 알러지 염증반응에 있어 병인학적으로 중심적인 역할을 담당하고 있다. 이러한 cytokine들 중에서 활성화된 비만세포에서 분비되는 cytokine들은 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13 등이 있다<sup>58,59)</sup>.

이 중 IL-6는 숙주 방어에 중심적인 역할을 하는 다기능 cytokine으로, 림프계 세포와 골수성 림프계 세포인 T세포, 대식세포, B세포, 섬유아세포, 내피세포 등에서 생성되며, acute phase reaction, immune response, nerve cell function 등에 다양한 역할을 하고, 면역반응과 세포손상에 대한 숙주의 반응을 조절하며, 면역반응에 관여하는 세포의 성장과 분화에 관여한다<sup>60)</sup>.

본 실험에서 DNFB 감각에 의해 아토피피부염이 발생한 Balb/c mice에서 생성된 혈청 IL-6 농도를 ELISA로 측정된 결과 정상군과 비교하여 DNFB 처치군의 혈청 내 IL-6 수치가 증가한 반면 DNFB+NJ 처치군의 혈청 내 IL-6 수치가 유의성 있게 감소하였다. HMC-1 Cell에서의 실험에서도 PMA plus A23187로 stimulation한 control 군에서 IL-6의 분비가 현저하게 증가되었고, 감송향의 처리에 의해서 증가된 IL-6의 분비가 유의하게 억제되었다.

IL-8은 폴리펩타이드성의 주화성 세포활성물질(chemotactic cytokine)인데, 주로 2차 매개단백질(secondary mediator)로 작용하여 염증세포(neutrophils,

macrophage, T lymphocytes)들을 활성화하고, 그들을 염증부위로 유인하는 화학적 유인인자(chemokines)의 작용을 가지고 있으며, IL-8에 의해 생성된 염증세포(neutrophils, macrophage, T lymphocytes)는 아토피피부염 환자들에서도 발견되었다<sup>61,62)</sup>.

HMC-1 Cell에서의 실험결과 감송향이 PMA plus A23187로 stimulation한 control군에서의 IL-8 분비가 현저하게 증가되었고, 감송향의 의해 증가된 IL-8 분비가 유의하게 억제되었다.

TNF- $\alpha$ 는 면역반응 초기에 분비되는 전 염증기 cytokine으로, inflammatory function에 주요한 중개자 역할을 하는데, 천식이나 류마티스 관절염 등의 여러 질환에서 염증반응의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>63)</sup>.

본 연구에서 감송향이 TNF- $\alpha$  생산에 미치는 영향을 관찰하기 위해 HMC-1 Cell에서의 실험결과 PMA plus A23187로 stimulation한 control군에서의 TNF- $\alpha$  분비가 현저하게 증가되었고, 감송향에 의해 PMA plus A23187로 유발된 TNF- $\alpha$ 의 분비가 유의하게 억제되었다.

또한 MTT 측정 방법으로 세포독성을 관찰한 결과, 감송향 추출물은 1 mg/ml의 농도에서도 세포독성을 보이지 않았고 감송향을 처리하지 않은 그룹보다 생존률이 더 높게 나타났다.

이상의 결과로 감송향은 DNFB 및 PMA plus A23187에 의한 알러지 염증을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 따라서 甘松香은 아토피성 알레르기 상태에서 비만세포에서 분비되는 IgE, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ 를 효과적으로 조절함으로써 아토피성 알레르기 질환에 대한 임상적 응용범위의 확대에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는, in vivo에서 아토피様 피부염 개선 효과는 감송향 저용량 투여군이 더 좋은 것으로 나타났으며 in vitro에서 inflammatory cytokines 농도 감소 효과는 감송향 투여량에 농도 의존적으로 향상되는 결과를 나타내었다. 따라서 감송향 투여의 적정 용량에 대해서는 이를 바탕으로 한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. Conclusion

Balb/c mice를 이용한 아토피성 알레르기반응 실험 모델에서 甘松香의 효과를 비교 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 甘松香 (NJ)의 지속적인 경구투여가 DNFB 유발성 Balb/c mice의 atopic dermatitis (AD)-like skin lesion/s 을 호전시켰다.
2. 甘松香 (NJ) (0.1, 1 g/kg)은 DNFB로 유발시킨 Balb/c mice의 조직내 IgE 수치를 유의성 있게 억제 하였다.
3. 甘松香 (NJ) (0.1, 1 g/kg)은 DNFB로 유발시킨 Balb/c mice의 혈청 내 IL-6 수치를 유의성 있게 억제하였다.
4. 甘松香 (NJ) (0.5, 1 mg/ml)은 PMA와 A23187로 자극된 HMC-1 세포로부터 IL-6의 분비를 유의성 있게 억제하였다.
5. 甘松香 (NJ) (1 mg/ml)은 PMA와 A23187로 자극된 HMC-1 세포로부터 IL-8의 분비를 유의성 있게 억제하였다.
6. 甘松香 (NJ) (0.5, 1 mg/ml)은 PMA와 A23187로 자극된 HMC-1 세포로부터 TNF- $\alpha$ 의 분비를 유의성 있게 억제하였다.
7. 甘松香은 HMC-1에 전 처리한 결과 0.01, 0.125, 0.5, 1 mg/ml에서 비처리군에 비해 세포 생존률이 더 높게 나타났다. 특히 1 mg/ml에서 세포 생존률이 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과로 甘松香은 아토피성 알레르기 상태에서 비만세포에서 분비되는 염증성 cytokine들을 효과적으로 조절함으로써 아토피성 알레르기 질환에 대한 임상적 응용범위의 확대에 기여할 수 있을 것으로 사료 된다.

## VI. Acknowledgement

이 논문은 2012학년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨.

## References

1. Zhong Yao Da Ci Dian Pyeonchanwiwonhoe. Wanyeok Zhong Yao Da Ci Dian. Seoul: Jung Dam Publishing Co, 1997:53-7.
2. The Korean Federation of Science and Technology Societies. A study on the international of indigenous technology in Korea: herb medicines. 1997.
3. Shin MG. Imsangbonchohak. Seoul: Yeong Rim Sa Publishing Co, 2002:458-9.
4. Kim CM, Shin MG, Ahn DG, Lee GS. Zhong Yao Da Ci Dian, Vol. 1. Seoul: Jung Dam Publishing Co, 1998:74-7.
5. Hanuigwadaehak Bonchohak Pyeonchanwiwonhoe. Bonchohak. Seoul: Yeong Rim Sa Publishing Co, 2007:409-10.
6. Guo Jia Zhong Yi Yao Guan Li Ju Zhong Hua Ben Cao Bian Wei Hui. Zhong Hua Ben Cao, Vol. 7. Shanghai: Shang Hai Ke Xue Ji Shu Publishing Co, 1999:564-6.
7. Williams HC. Atopic dermatitis. Cambridge: Cambridge Univ Press, 2000:142-53.
8. Daniels J, Harper J. The Epidemiology of Atopic Dermatitis. Hosp Med. 2002;63(11):649-52.
9. Hong CY. Pediatrics. Seoul: Daehane Textbook, 2004:1016-9.
10. Hong WS. Jeonggyo Huang Di Nei Jing Su Wen. Seoul: Dong Yang Ui Hak Yeon Gu Won Press, 1985:72-80, 246-8.
11. Song SG. Jin Gui Yao Lue Guang Zhou Xiao Quan. Beijing: Ren Min Wei Sheng Publishing Co, 1994:221-5.
12. Chao YF. Chao Shi Zhu Bing Yuan Hou Lun. Seoul: Dae Sung Publishing Co, 1992:251-3.
13. Kwon MW, Lee HJ, Park EJ, Hwang WJ. The Clinical Study of Atopic Dermatitis and Eosinophil Cationic Protein in Atopic Dermatitis. J Korean Orient Med. 2000;14(2):121-32.
14. Cooper KD. Atopy Dermatitis: Recent Trends in Pathogenesis and Therapy. J Invest Dermatol. 1994; 102(1):28-137.
15. Hanifin JM, Chan SC. Diagnosis and Treatment of Atopic Dermatitis. Management of Atopic Dermatitis: Current Status and Future Possibilities. Dermatologic Ther. 1996;1(1):9-18.

16. Song JM. Inhibitory Effect of Nardostachys Chinensis BATAL. on Pancreatitis. Prof Grad School Orient Med Wonkwang Univ, 2009.
17. Bae GS, Park HJ, Kim DY, Song JM, Kim TH, Oh HJ, Yun KJ, Park RK, Lee JH, Shin BC, Sim HJ, Hong SP, Song HJ, Park SJ. Nardostachys Jatamansi Protects against Cerulein-induced Acute Pancreatitis. *Pancreas*. 2010;39(4):520-9.
18. O KW, Jeong JH, Cheong HC, Cho HB, Kim SB, Choe CM. Inhibitory Effects of Nardostachys Jatamansi on the Maturation of Dendritic Cells. *J Orient Obstet Gynecol*. 2010;23(3):14-25.
19. Bae GS, Seo SW, Kim MS, Park KC, Koo BS, Jung WS, Cho GH, Oh HC, Yun SW, Kim JJ, Kim SG, Hwang SY, Song HJ, Park SJ. Nardostachys Jatamansi Inhibits Lipopolysaccharide-induced Endotoxin Shock. *J Nat Med*. 2011;65(1):63-72.
20. O JW, Kim GE, Pyeon BY, Lee HL, Jeong JT, Hong SJ, Park GS, Lee SY, Song SU, Kim CH, An GM, Nam SY, Shon MH, Kim WK, Lee MH, Kwon BC, Choi SY, Lee SY, Lee HB, Lee SI, Lee JS. Nationwide Study for Epidemiological Change of Atopic Dermatitis in School Aged Children between 1995 and 2000 and Kindergarten Aged Children in 2003 in Korea. *Korean Acad Pediatr Allergy Respir Dis*. 2003;13(4):227-37.
21. Park YM. Advances in the Pathophysiology of Atopic Dermatitis. *Korean Acad Pediatr Allergy Respir Dis*. 2006;16(3):189-96.
22. Korean Dermatological Association. *Dermatology*. Seoul: Ryo Moon Gak Publishing Co, 1994:133-8.
23. The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease. *Pediatric allergy respiratory immunology*. Seoul: Koonja Publisher, 2005:145-73.
24. Lee JH, Kim KH, Kim MN, Kim JW, Ro YS, Park YL, Park CW, Lee KH, Lee AY, Cho SH, Choi JH. Report from ADRG: The Treatment Guideline of Korean Atopic Dermatitis. *Korean J Dermatol*. 2006;44(8): 907-13.
25. Cooper KD. New Therapeutic Approaches in Atopic Dermatitis. *Clin Rev Allergy*. 1993;11(4):543-59.
26. Koo J, Arain S. Traditional Chinese Medicine for the Treatment of Dermatologic Disorders. *Arch Dermatol*. 1998;134:1388-93.
27. Gao XK, Fuseda K, Shibata T, Tanaka H, Inagaki N, Nagai H. Kampo Medicines for Mite Antigen-induced Allergic Dermatitis in NC/Nga Mice. *Evid Based Complement alternat Med*. 2005;2(2):191-9.
28. Wu Q. *Yi Zong Jin Jian*, Vol. 3. Beijing: Ren Min Wei Sheng Publishing Co, 1982:443-4, 451-2.
29. Zhong DY. *Pibugwa Hanbangchiryo*. Busan: Il Jung Sa Publishing Co, 1991:68-71.
30. Jeong BR, Shin MG. *Dohaehyangyakdaesajeon*. Seoul: Yeong Rim Sa Publishing Co, 1990:932-4.
31. Bose BC, Gupta SS, Bhatnagar JN, Vijayvargiya R. Nardostachys Jatamansi DC: Its Sedative and Depressant Action as Estimated by Warburg Technique. *Indian J Med Sci*. 1957;11(10):803-7.
32. Salim S, Ahmad M, Zafar KS, Ahmad AS, Islam F. Protective Effect of Nardostachys Jatamansi in Rat Cerebral Ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003;74:481-6.
33. Liu JH, Yin F, Zheng XX. Nardostachys Chinensis Glycoside Induces Characteristics of Neuronal Differentiation in Rat Pheochromocytoma PC12 Cells. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(4):768-71.
34. Li P, Matsunaga K, Yamakuni T, Ohizumi Y. Nardosinone, the First Enhancer of Neurite Outgrowth-promoting Activity of Staurosporine and Dibutyryl Cyclic AMP in PC12D Cells. *Brain Res Dev Brain Res*. 2003;145(2):177-83.
35. Li P, Matsunaga K, Yamamoto K, Yoshikawa R, Kawashima K, Ohizumi Y. Nardosinone, a Novel Enhancer of Nerve Growth Factor in Neurite Outgrowth from PC12D Cells. *Neurosci Lett*. 1999;273(1):53-6.
36. Song MY, Bae UJ, Lee BH, Kwon KB, Seo EA, Park SJ, Kim MS, Song HJ, Kwon KS, Park JW, Ryu DG, Park BH. Nardostachys Jatamansi Extract Protects against Cytokine-induced  $\beta$ -cell Damage and Streptozotocin-induced Diabetes. *World J Gastroenterol*. 2010;16(26): 3249-57.
37. Lyle N, Gomes A, Sur T, Munshi S, Paul S, Chatterjee S, Bhattacharyya D. The role of antioxidant properties of Nardostachys Jatamansi in Alleviation of the Symptoms of the Chronic Fatigue Syndrome. *Behav Brain Res*. 2009;202(2):285-90.
38. Lyle N, Bhattacharyya D, Sur TK, Munshi S, Paul

- S, Chatterjee S, Gomes A. Stress Modulating Antioxidant Effect of Nardostachys Jatamansi. *Indian J Biochem biophys.* 2009;46(1):93-8.
39. Kumar VP, Chauhan NS, Padh H, Rajani M. Search for Antibacterial and Antifungal Agents from Selected Indian Medicinal Plants. *J Ethnopharmacol.* 2006; 107(2):182-8.
40. Dhingra D, Goyal PK. Inhibition of MAO and GABA: Probable Mechanisms for Antidepressant-like Activity of Nardostachys Jatamansi DC. in Mice. *Indian J Exp Biol.* 2008;46(4):212-8.
41. Joshi H, Parle M. Nardostachys Jatamansi Improves Learning and Memory in Mice. *J Med Food.* 2006; 9(1):113-8.
42. Salim S, Ahmad M, Zafar KS, Ahmad AS, Islam F. Protective Effect of Nardostachys Jatamansi in Rat Cerebral Ischemia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003;74(2):481-6.
43. Ali S, Ansari KA, Jafry MA, Kabeer H, Diwakar G. Nardostachys Jatamansi Protects against Liver Damage Induced by Thioacetamide in Rats. *J Ethnopharmacol.* 2000;71(3):359-63.
44. Gupta SS, Patel CB, Mathur VS. Effect of Nardostachys Jatamansi Fumes and Aerosols in Histamine-induced Bronchial Asthma in Guinea Pigs. *J Indian Med Assoc.* 1961;37:223-5.
45. Lee J. Effect of Nardostachys Chinensis on the Apoptosis and Differentiation of HL-60 Cells. *Prof Grad School Orient Med Wonkwang Univ,* 2008.
46. Bergstresser PR. Sensitization and Elicitation of Inflammation in Contact Dermatitis. *Immunol Ser.* 1989;46:219-45.
47. Kimber I, Pichowski JS, Betts CJ, Cumberbatch M, Basketter DA, Dearman RJ. Alternative Approaches to the Identification and Characterization of Chemical Allergens. *Toxicol In Vitro.* 2001;15(4-5):307-12.
48. Lee KK, Kim JJ, Jung HJ, Jung SK. Effects of Cheongyeolyunbu-tang on the DNFB - induced Allergic Dermatitis. *Korean J Orient Int Med.* 2008;29(3):730-41.
49. Kim SH, Choi JH, Kim JH, Park SY. Effect of Tang-gwi-eum-za- gagambang along with External Spray Therapy on the Spontaneously Occurring Atopic Dermatitis Development in NC/Nga Mouse. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2005;18(1):27-49.
50. Hong CH. Effects of Onchung-eum Administration along with Samhwangseze-gamibang on Treatment Atopic Dermatitis Development in NC/Nga Mice. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2007;21(3):679-87.
51. Song SP. Effects of Danggwieumja Administration along with Samhwangseje-gamibang on NC/Nga Atopic Mice. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2007;21(5):1210-8.
52. Baek YH. Salviae Miltiorrhizae Root Inhibits Atopic Dermatitis in the DNCB(dinitrochlorobenzene)-induced Atopic Dermatitis NC/Nga Mice. *Grad School Orient Med Kyungwon Univ,* 2006.
53. Robinson DS, Larché M, Durham SR. Tregs and Allergic Disease. *J Clin Invest.* 2004;114:1389-1397.
54. Corne J, Djukanovic R, Thomas L, Warner J, Botta L, Grandordy B, Gygax D, Heusser C, Patalano F, Richarson W, Kilchherr E, Staehelin T, Davis F, Gordon W, Sun L, Liou R, Wang G, Chang TW, Holgate S. The Effect of Intravenous Administration of a Chimeric Anti-IgE Antibody on Serum IgE Levels in Atopic Subjects: Efficacy, Safety, and Pharmacokinetics. *J Clin Invest.* 1997;99:879-87.
55. Ishizaka K. Regulation of IgE Synthesis. *Ann Rev Immunol.* 1984;2:159-82.
56. Barnes PJ. Corticosteroids, IgE, and Atopy. *J Clin Invest.* 2001;107:265-6.
57. Mackaness GB. Delayed Hypersensitivity and the Mechanism of Cellular Resistance to Infection. In: Amos B. *Progress in Immunology, First International Congress of Immunology.* New York: Academic press. 1971:413.
58. Moon PD, Na JJ, Jeong HJ, Hong SH, Kim SJ, Chae HJ, Kim HR, Choi JO, Lee SH, Shin JY, Kim HM. Inhibitory Effect of Gamibojungikaitang Extract on Mast cell-mediated Allergic Reaction in Murine Model. *J Pharm Pharm Sci.* 2005;8(1):94-101.
59. Moller A, Lippert U, Lessmann D, Kolde G, Hamann K, Welker P, Schadendorf D, Rosenbach T, Luger T, Czarnetzki BM. Human Mast Cells Produce IL-8. *J Immunol.* 1993;151(6):3261-6.
60. Ershler WB, Keller ET. Age-associated Increased Interleukin-6 Gene Expression, Late-life Diseases, and Frailty. *Annu Rev Med.* 2000;51:245-70.

## 24 Effects of Nardostachys Jatamansi on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions

61. Kim HM. *Immunity & Allergy*. Seoul: Shinil Books, 1998:159-73.
62. Choi IY, Koo HN, Lee SH, Shin JY, Chae HJ, Kim HR, Kim CH, Hong SH, Kim HM. Anti-inflammatory Activity of Korean Folk Medicine 'Sabeksan'. *Exp Mol Pathol*. 2005;78(3):257-62.
63. Stankiewicz W, Dabrowski MP, Chcialowski A, Plusa T. Cellular and Cytokine Immunoregulation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Bronchial Asthma. *Mediators Inflamm*. 2002;11(5): 307-12.