

아토피 피부염을 유발한 마우스에서 백선피지부자복합방의 항염증 효과

심부용^{1#}, 김성환², 김동희^{1*}

1 : 대전대학교 한의과대학 병리학교실, 2 : 중부대학교 식품영양학과

Anti-inflammatory effect of Baecksunpijibujabokhap-bang in Atopic dermatitis model mice

Boo-Yong Sim^{1#}, Sung-Hwan Kim², Dong-Hee Kim^{1*}

1 : Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University,
2 : Dept. of Food&Nutrition, Joongbu University

ABSTRACT

Objectives : In order to investigate the efficacy of BJBB on atopic dermatitis, various anti-inflammatory factors were studied.

Methods : *In-vitro*, inflammatory mediators, such as MTT and nitric oxide were detected after the addition of LPS with or without BJBB in Raw 264,7 cells. *In-vivo*, in order to verify the effectiveness of BJBB in atopic dermatitis animal model, its role in inflammation factors and histological changes were observed in NC/Nga mice.

Results : BJBB showed cell viability of 100% or higher in all concentration in Raw 264,7 cells, BJBB inhibited LPS-induced productions of inflammatory mediators nitric oxide in RAW 264,7cells. BJBB treated group showed significant decrease in the expression of IL-1b, IL-6 and TNF-a by 40%, 80% and 44% respectively. Also the group showed decrease in the transcription of IL-1b, IL-6 and TNF-a mRNA in spleen by 41%, 93% and 39% respectively. BJBB treated group showed significant decrease in WBC, neutrophil, lymphocyte and monocytes immune cell ratio in blood by 54%, 63%, 57% and 86% respectively. BJBB treated group showed decrease in the expression of IgG by 39% respectively. Also, infiltration of adipocytes into skin was suppressed and the thickness of epidermis and dermis were relatively decreased in the BJBB treated group.

Conclusion : BJBB has an anti-inflammatory effects in NC/Nga mouse. Thus, these results suggested a beneficial effect of BJBB in treatment with Atopic dermatitis and inflammatory.

Key words : Atopic dermatitis, anti-inflammation, NC/Nga, DNCB, BJBB

서론

염증반응은 생체나 조직에서 물리적 작용이나, 세균감염, 화학적 물질 등의 기질적 변화를 가져오는 생체 반응으로서, 조직의 혈관확장에 의한 발열과 부종, 조직손상, 세포증식 등을 특징으로 하는 생체 반응이다¹⁾.

피부에서의 염증은 매우 다양한 의미를 가진다. 아토피성 피부질환, 여드름성 피부 질환 그리고 민감성 피부질환의 생리학적 기본 기전은 염증 반응의 과정을 거치게 되는데, 그 중 대표적인 질환이 아토피 피부염(Atopic Dermatitis, AD)이다. AD는 가려움과 염증을 수반하는 만성 염증성 질환으

로, 환자의 대부분은 혈액 내 IgE 수치가 상승되는 것이 특징이며, 이러한 염증반응에서 활성화된 대식세포는 nitric oxide (NO), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1, IL-6 등을 방출하는 것이 특징이다.

그러나 AD의 치료제로 사용되어지는 항히스타민 처리는 아토피 피부염 환자에게서 가려움증을 억제하기에 충분하지 못하며, 스테로이드의 적용은 잦은 부작용 때문에 장기적으로 이용할 수 없기 때문에 천연물로부터 새로운 물질을 개발하려는 연구가 필요하다^{2,3)}.

한의학계에서도 기존의 한의서에서 AD와 유사한 병증 중심의 약물과 처방을 중심으로 실험에서 객관적 효능을 검증하

*교신저자 : 김동희, 대전광역시 동구 대학로 62 대전대학교 한의과대학
· Tel : 042-280-2623 · FAX : 042-280-2624 · E-mail : dhkim@dju.kr

#제1저자 : 심부용, 대전광역시 동구 대학로 62 대전대학교 한의과대학
· Tel : 042-280-2828 · FAX : 042-280-2624 · E-mail : boyish3@naver.com
· 접수 : 2014년 4월 25일 · 수정 : 2014년 5월 11일 · 채택 : 2014년 5월 14일

고자 많은 연구가 이루어져 왔으며 임상 역시 특화된 병원을 중심으로 한의학적 치료를 통하여 유의성 있는 치료 효과를 보고함으로써 AD의 기초 및 임상에서 근본적인 치료를 위한 많은 노력이 이루어져 왔다.

본 연구에서는 현재 임상에서 활용되고 있는 白鮮皮地膚子複合方의 AD 개선 효과를 실험적으로 입증하여 임상에서의 활용성을 제고함과 동시에 항 후 보다 효과적인 한의학적 치료제 개발을 위한 기초적 자료를 제공하고자 하였다. 실험은 AD를 유발시킨 NC/Nga 마우스에 투여한 후 세포 및 혈청 등에서 염증성 인자에 미치는 영향, 염증 유전자 발현량, 조직학적 변화 등을 검색하였다.

재료 및 방법

1. 약재

본 실험에 사용한 백선피지부자복합방(Baeksunpibujabokhap-bang 이하 BJBB로 표기)의 구성 약재들은 (주)음니허브에서 구입 하였고, 대전대학교 TBRC에서 정선 후 사용 하였으며, 그 내용과 분량(1첩)은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The prescription of BJBB

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight(g)
白鮮皮	Dictamn Radicis Cortex	20
地膚子	Kochiae Fructus	20
夜交藤	Polygonum multiflorum Thunb	16
豨薟草	Siegesbeckia glabrescens	12
蒼耳子	Xanthii Fructus	12
枳實	Ponciri Fructus	12
艾葉	Artemisiae Argyi Herba	8
桃仁	Persicae Semen	8
山查	Crataegi Fructus	8
甘草	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	8
Total amount		124

2. 동물 및 사료

실험동물인 수컷 4주령의 NC/Nga Mice(16~22g)는 (주)오리엔트바이오에서 공급 받아 실험 당일까지 고형사료(주)퓨리나)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2℃, 습도 55 ± 15%, 12시간-12시간(light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 대전대학교 동물 실험 윤리 위원회의 승인(동물사용 윤리위원회 승인 번호 - DJUARB 2013-028)을 받아 동물윤리 준칙에 의거하여 실험 하였다.

3. 시약 및 기기

사용된 시약은 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), cell

viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.), Mouse IgG ELISA kit (eBioscience CO., USA), total RNA prep kit (Intronbio., Korea)을 사용하였으며, 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), Flow cytometry system (BD Biosciences immunocytometry systems., U.S.A.), PCR machine (Thermal Dynamic., U.S.A) 등을 사용하였다.

4. 시료 추출

BJBB 2첩에 80% 주정(C₂H₅OH) 1200 ml을 넣고 3시간 동안 환류추출 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator 에서 감압 농축 하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 분말 20.5 g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고(-80℃)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

5. 세포 배양

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 동결된 Raw 264.7 세포를 50 ml 튜브에 옮기고 PBS 9 ml을 넣어 세포를 부유시킨 뒤 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 제거하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 ml을 넣어 부유시켜 세포배양기 (37℃, 5% CO₂) 에서 배양 하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상 으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다.

6. 세포독성 측정

Raw 264.7 세포는 96 well plate에 2×10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 새로운 배양액으로 교체 한 후 BJBB를 각각 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μl의 WST solution을 첨가하여 세포배양기 (37℃, 5% CO₂)에서 30분 간 반응 시켰다. 반응 후 450 nm에서 ELISA reader기를 이용하여 흡광도의 변화를 측정한 후 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

7. Nitric oxide(NO) 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitric oxide 농도를 griess reagent system을 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 세포를 96 well plate에 2×10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후 새로운 배양액으로 교체 하였고 BJBB를 각각 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도와 LPS 1 μg/ml의 농도를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer와 N2 buffer를 각각 10분간 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

8. 피부염 유도 및 시료 처리

7주령이 된 NC/Nga 마우스의 등 부위를 제모한 후 24시간 방치하였다. 1% DNCB 용액 (아세톤 : 올리브 오일 = 3:1) 200 μ l를 등 부위에 2주간 도포하고, 그 이후부터는 1주일에 3번씩 0.1% DNCB용액 150 μ l를 4주간 등 부위에 도포하였다. 실험은 4개의 군으로 나누었으며 매일 1회, 오후 2시에 정상군, 대조군에는 증류수를, 양성대조군인 dexamethasone (이하, Dexa) 투여군과 BJBB 투여군은 각각 200 μ l (200 mg/kg) 씩 투여하였다. 실험이 진행되는 동안 자유 식이를 하였다.

9. 혈청 내 사이토카인 및 면역 글로블린 생성량, 혈액 내 면역세포 측정

실험 종료 후 ether로 마취한 상태에서 심장 천자법을 이용하여 채혈한 다음 6,500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 가지고 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 custom-made 6-plex cytokine Milliplex panel을 이용하여 Luminex로 측정하였으며, IgG 생성량 측정은 ELISA kit를 이용하여 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈액 내 면역세포 측정은 실험 종료 후 채혈한 전혈을 서울의과학 연구소에 분석 의뢰 하였다.

10. RNA 분리 및 realtime PCR 분석

비장조직에서 발현된 mRNA를 측정하기 위해 RT-PCR을 시행하였다. 분리한 비장 조직을 동결시킨 뒤 total RNA prep kit을 이용하여 RNA를 추출하였다. 역전사 반응은 추출한 RNA를 RT premix kit의 mixture를 사용하여 first-strand cDNA를 합성하였으며 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다. RT-PCR은 DNA polymerase 1U/tube에 250 mM dNTPs mix, RT buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 30 mM KCl, 1.5 mM MHCl₂)를 포함한 mixture에 각 샘플과 primer를 넣고 PCR을 시행하였다. 사용된 primer는 아래와 같다(Table 2). 1% agarose gel에 전기영동 후 유전자발현의 여부를 UV로 촬영하여 각 그룹별로 band를 확인하고, RNA 발현을 나타내었다.

Table 2. The Sequences of Primers

Primer	F/R	Sequences
IL-1 β	F	GTT GAC GGA CCC CAA AAG AT
	R	AAG GTC CAC GGG AAA GAC AC
IL-6	F	CCT ACC CCA ATT TCC AAT GC
	R	CGC ACT AGG TTT GCC GAG TA
TNF- α	F	CTA CTC CTC AGA GCC CCC AG
	R	AGG CAA CCT GAC CAC TCT CC

11. 조직처리 및 H&E 염색

배부의 피부를 떼어내어 각 실험군 별로 적출한 조직은 10% 중성 포르말린에 48시간 고정하여 고정이 완료된 조직들을 흐르는 수돗물에서 12시간 수세한 뒤 조직 내의 고정액을 완전 제거하였다. 조직의 탈수를 위해 60%에서부터 100% 알코올에 이르기까지 농도 상승 순으로 탈수하고, xylene에 투명과정을 거친 다음 파라핀 블록을 제작 하였다. 제작된 블록은 박편절단기 (microtome)를 이용해 3~4 μ m 두께로 절편을 만들어 탈 파라핀 및 함수과정을 거친 다음 hematoxyline 과 eosin (H&E) 염색을 각 각 실시하여 광학 현미경상에서 관찰 및 사진 촬영 하였다.

12. 통계처리

실험 결과는 실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test를 사용하여 통계처리 하였으며 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 세포 독성

RAW 264.7 세포주 세포 생존율을 측정된 결과, 대조군을 $100.0 \pm 1.0\%$ 로 나타냈을 때 BJBB 투여군 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 $112.1 \pm 3.9\%$, $111.6 \pm 1.3\%$, $103.0 \pm 4.1\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 1).

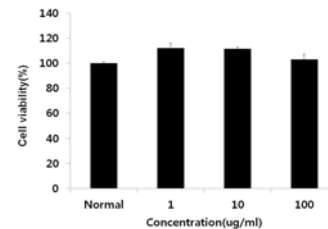


Fig. 1. Cell viability of BJBB extracts in Raw 264.7 cells. The results were expressed as mean \pm S.D.

2. Nitric oxide (NO)의 생성 억제능에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 BJBB 추출물의 NO 생성량을 측정된 결과, 대조군을 $100.0 \pm 3.1\%$ 로 나타냈을 때 BJBB 투여군은 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 $98.4 \pm 4.3\%$, $97.6 \pm 3.4\%$, $77.1 \pm 4.7\%$ 로 나타났으며, 대조군에 비하여 100 μ g/ml 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 2).

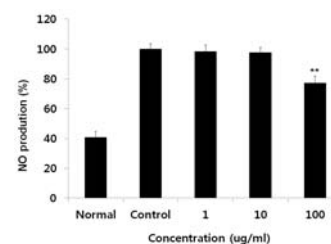


Fig. 2. Effects of BJBB extracts on LPS-induced nitric oxide (NO)

production in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of BJBB extract and LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 24hr. The amount of nitric oxide in supernatant was measured using Griess reagent. The results were expressed as mean \pm S.D (Significance of results, ** : $p < 0.01$).

3. 혈청 내 사이토카인에 미치는 영향

BJBB가 아토피피부염이 유발된 NC/Nga 마우스에서 혈청 내 사이토카인에 미치는 영향을 알아보기 위해 조사한 결과, IL-1 β 는 대조군이 15.4 ± 1.4 MFI에 비하여 BJBB 투여군은 9.2 ± 1.1 MFI로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었으며, IL-6 역시 대조군이 447.8 ± 10.4 MFI에 비하여 BJBB 투여군은 74.8 ± 7.2 MFI로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타 내었다. TNF- α 는 대조군이 101.9 ± 8.8 MFI에 비하여 BJBB 투여군은 57.2 ± 3.4 MFI로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 3).

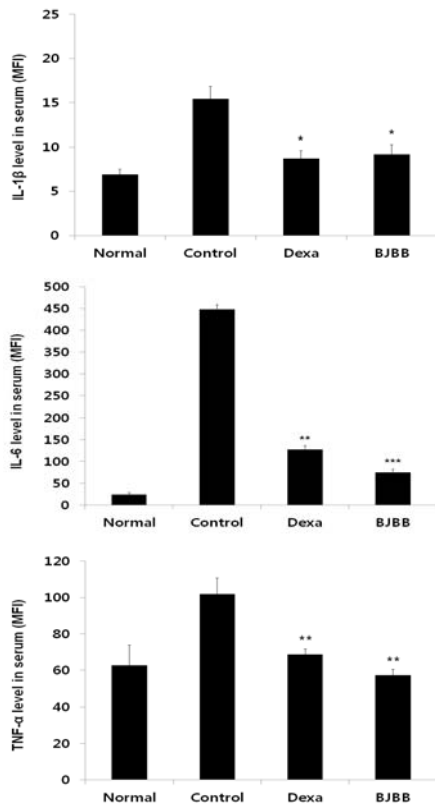


Fig. 3. Effects of BJBB on the level of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the serum of DNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The results were expressed as mean \pm S.D (Significance of results, *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

4. 비장조직에서의 유전자 발현량 측정

BJBB 투여 종료 후에 비장 조직에서 유전자 발현량을 측정 한 결과, IL-1 β 는 대조군을 $100.0 \pm 10.2\%$ 로 나타내었을 때 BJBB 투여군은 $59.1 \pm 8.3\%$ 로 나타나, 대조군에 비하여 감소를 나타내었으며, IL-6는 대조군을 $100.0 \pm 5.4\%$ 로 나타 내었을 때 BJBB 투여군은 $7.3 \pm 3.3\%$, TNF- α 는 대조군을 $100.0 \pm 10.5\%$ 로 나타내었을 때 BJBB 투여군은 $61.2 \pm 5.9\%$

로 나타나, 모든 유전자 발현량이 대조군에 비하여 감소를 나타내었다(Fig. 4).

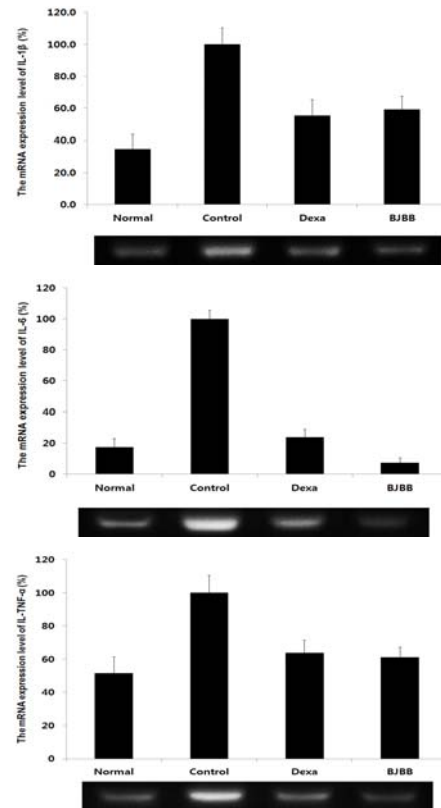


Fig. 4. The level of IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNA in spleen from DNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The results were expressed as mean \pm S.D.

5. 혈액 내 면역세포에 미치는 영향

BJBB 투여 종료 후에 혈액 내 면역세포를 측정 한 결과, 백혈구는 대조군이 $7.10 \pm 2.19 (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l})$ 에 비하여 BJBB 투여군은 $3.30 \pm 0.49 (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l})$ 로 나타났으며, 호중구는 대조군이 $0.51 \pm 0.06 (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l})$ 으로 나타났으며, BJBB 투여군은 $0.19 \pm 0.02 (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l})$ 로 나타났다. 림프구는 대조군이 $2.67 \pm 0.16 (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l})$ 에 비하여 BJBB 투여군은 $1.14 \pm 0.04 (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l})$ 로 나타났으며, 단핵구는 대조군이 $1.30 \pm 0.14 (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l})$ 에 비하여 BJBB 투여군은 $0.18 \pm 0.04 (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l})$ 로 나타나 대조군에 비하여 모두 감소를 나타내었다(Fig. 5).

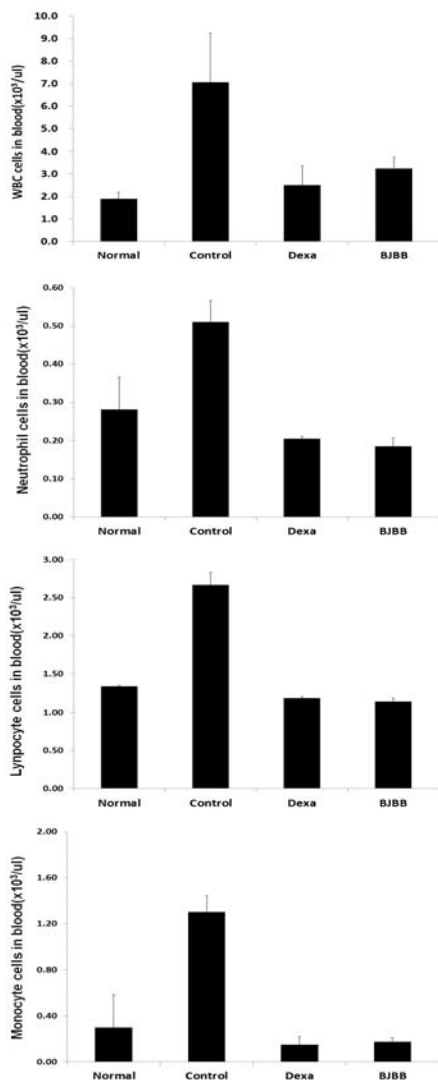


Fig. 5. Effects of BJBB on the level of WBC, neutrophil, lymphocyte, monocyte in the blood of DNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The results were represent the mean ± S.D.

6. IgG에 미치는 영향

BJBB 투여 종료 후에 혈청 내 IgG를 측정된 결과, 대조군은 4913.8 ± 141.2 (μg/ml), BJBB 투여군은 3012.4 ± 41.7 (μg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 6).

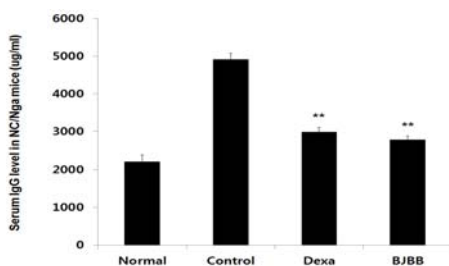


Fig. 6. Effects of BJBB on the level of IgG in the serum of DNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The results were expressed as mean ± S.D (Significance of results, ** : p < 0.01).

7. 조직변화에 미치는 영향

마우스의 등 피부조직에서 H&E 염색을 하여 200x로 측정하였다. 등 조직을 촬영한 결과 대조군에서는 정상군에 비하여 피부가 두꺼워졌고(Fig. 7-A, B 화살표), 세포의 침윤으로 인한 세포의 밀도가 높게 나타났다(Fig. 7-A, B 사각형). BJBB 투여군에서는 대조군에 비하여 피부의 두께가 약 1/4 정도 줄었으며, 세포 침윤으로 인한 세포의 밀도 또한 낮아짐을 보였다(Fig. 7-D 화살표, 사각형).

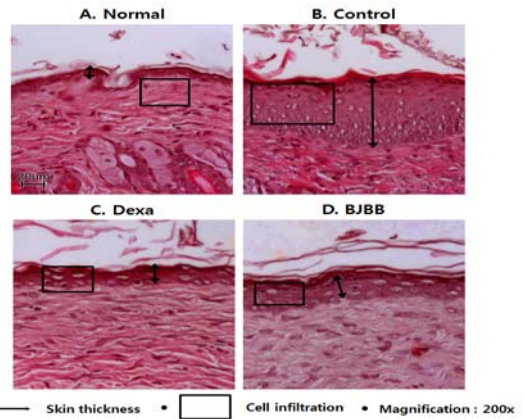


Fig. 7. Histologic examination of dorsal skin lesion in DNCB-induced NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of BJBB for 5 weeks. Paraffin sections were stained with hematoxylin & eosin. The panels were representative photomicrographs of each of these risk at light microscope (Zeiss, ×200).

고찰

염증은 어떤 자극에 대한 생체조직의 방어반응으로 작용할 뿐만 아니라, 많은 병리 생리학적인 조건에서 중요한 역할을 한다. 염증이 진행되는 동안 대식세포의 활성화가 과도하게 일어나게 되면 염증매개물질 분비를 통해 염증반응을 유도하게 된다. 염증에 의한 질환으로는 류마티스관절염, 패혈증, 죽상 동맥경화 등이 있으며, 대표적인 질환으로는 아토피 피부염(Atopic dermatitis, AD)이 있다. 최근 박 등⁶⁾의 ‘백선피의 iNOS발현과 염증성사이토카인의 생성에 미치는 영향’, 이운실⁷⁾의 ‘白鮮皮 추출물이 DNCB로 유발된 NC/Nga 마우스의 아토피 피부염에 미치는 영향’, 나상혁⁸⁾의 ‘지부자의 신생혈관 및 염증 매개 단백질 발현에 미치는 영향’ 등의 연구결과를 바탕으로 항염증에 효과를 보인 백선피와 지부자를 중심으로 약재들을 재구성한 BJBB의 AD 개선을 통한 항염증 효과를 실험적으로 입증하여 임상에서의 활용성을 제고함과 동시에 향후 보다 효과적인 한의학적 치료제 개발을 위한 기초적 자료를 제공하고자 하였다.

이에 본 연구에서는 세포를 이용한 독성평가 및 NO의 억제능 측정과 AD 병태 모델인 NC/Nga 마우스를 이용하여 혈청 내 사이토카인 및 면역글로불린 측정, 비장 조직에서의 유전자 발현, 혈청 내 면역세포에 미치는 영향, 조직변화 등을 통해 항염증에 미치는 영향을 확인하였다.

본 연구에 앞서 실험에 대한 안전성을 확인하기 위해 세포 독성을 평가한 결과, BJBB가 100% 이상의 세포 생존율을

나타내어 안전한 것으로 나타나 연구에 사용하게 되었다.

염증은 인체에 생기는 가장 흔한 질환으로, 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등과 같은 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상 부위를 회복 재생하려는 방어적 반응으로^{9,10)} 염증을 일으키는 원인은 다양함과 동시에 염증의 종류 및 경과도 다양하나 세균에 의한 것이 가장 많다⁹⁾. 염증이 유발되는 기전은 세포가 세균에 함유되어 있는 LPS 등의 자극에 의해, COX-2를 발현하여 NO, PGE₂의 염증 증대물질이나 IL-1, TNF- α , IL-6 같은 염증성 cytokine이 분비된다¹¹⁾. 염증성 매개체중 NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능, 혈관확장, 항균작용 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{12,13)}. 대식세포가 LPS로 자극될 때는 iNOS가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 되는데, 과량 생산되면, 정상조직에도 과도한 면역반응과 염증 반응을 일으키게 된다¹²⁾. 본 실험에서는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 BJBB를 처리하여 NO 생성 억제능을 확인한 결과, 대조군에 비하여 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성 있는 NO 생성 저해 효능이 나타났다.

이와 같은 *in-vitro*의 실험 결과를 바탕으로 *in-vivo* 실험을 위해 NC/Nga 마우스에 DNCB를 처리하여 AD를 유발시킨 후 4주간 BJBB를 200 μl (200 mg/kg) 씩 경구 투여하였다.

IL-1 β 는 interleukin 중에서 주요 염증유발 사이토카인의 하나로 대식세포, 호중구, 상피세포, 내피세포에 의해 생산되며 LPS와 같은 박테리아 산물이나 TNF- α 와 같은 다른 사이토카인에 의해서 유도된다¹⁴⁾. 외부 감염이나 염증이 발생하였을 때 국소적으로 생산되며, 과도한 IL-1 β 의 생성은 감염성 질환이나 자가 면역질환 등을 유발하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 본 실험에서 혈청 내 IL-1 β 사이토카인은 대조군에 비하여 BJBB 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.

IL-6은 염증 반응시 분비되는 친염증성 사이토카인으로, helper T세포, 대식세포, 비만세포, 중성구, 상피세포, 섬유아세포 등에서 분비되어 면역반응, 조혈, 염증을 조절 한다¹³⁾. 본 실험에서 혈청 내 IL-6 사이토카인은 대조군에 비하여 BJBB 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.

TNF- α 는 중요한 염증성 전구 cytokine으로서, 주로 자극된 대식세포에서 분비되지만 섬유아세포, T세포, B세포, 내피세포 및 상피세포에서도 분비되어 급성 염증반응에서 주요 역할을 한다. 또한, IL-1과 유사한 기능으로 서로의 생산을 유도하고, 생체 내에서 상승작용을 일으킨다고 보고 되어있다¹⁶⁾. 본 실험에서 혈청 내 TNF- α 사이토카인은 대조군에 비하여 BJBB 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.

비장은 오른쪽 복강 상부에 위치한 커다란 알 모양의 2차 면역기관으로 혈액 내 항원에 대한 면역반응을 시작하는데 중대한 역할을 한다. 림프절은 국소 조직으로부터 유입되는 항원을 포획하는데 전문화되어 있는 반면, 비장은 혈액을 여과하기 때문에 이 과정에 혈액 내 항원을 포획하는데 전문화되어 있다고 할 수 있다¹⁷⁻¹⁹⁾. 본 실험에서는 비장 조직에서의 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험 종료 후 비장 조직을 적출하여 사이토카인을 측정하였다. 그 결과, IL-1 β , IL-6, TNF- α 에서 모두 대조군에 비하여 BJBB 투여군에서 감소를 나타내었다.

BJBB가 아토피피부염이 유발된 NC/Nga 마우스에서 혈액 내 면역세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 조사한 결과, 백

혈구는 외부로부터 침입한 세균이나 이물질을 분해하는 역할을 지니는데, 염증이 발현되면 백혈구의 수가 증가하게 된다. 본 실험에서 백혈구 수는 대조군에 비하여 BJBB 투여군은 감소를 나타내었으며, 호중구는 혈액에 가장 많이 존재하는 과립성 백혈구로 항균, 항박테리아의 중요한 역할을 지니고 있지만, 류마티스 관절염 같은 염증성 질병에서 조직 파괴를 매개하기도 하므로, 호중구의 양이 과할 경우 염증반응을 유발하여 아토피 피부염 증상이 악화될 수 있다. 본 실험에서 호중구는 대조군에 비하여 BJBB 투여군에서 감소를 나타내었다.

면역세포는 생성 후 일정기간이 지나면 자연스럽게 세포사멸에 의해 소멸되어야 하는데 아토피 환자에게는 사이토카인 등에 의해 면역세포의 세포사멸이 억제되어서 림프구가 증가되어 아토피 피부염 등의 질환이 일어나게 된다. 본 실험에서 림프구는 대조군에 비하여 BJBB 투여군에서 감소를 나타내었으며, 감염부위나 알러지에서 포식기능을 갖는 백혈구로 조직으로 들어가 큰포식세포가 되기 전에 일시적으로 혈류를 순환시키는 단핵구는 대조군에 비하여 BJBB 투여군에서 감소를 나타내었다.

위의 결과를 종합해 볼 때, 혈청 내 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성량이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소한 점과 비장조직에서의 유전자 발현에 미치는 결과 및 혈액 내 면역세포에 미치는 영향 등의 결과가 부합됨으로써 BJBB가 기본적으로 항염증 효과가 있는 것으로 사료된다.

면역글로블린은 B 세포에서 생산되며 IgG급 항체에서 항원에 재차 노출되면 switch recombination을 통한 isotype switching이 일어나 IgE급 항체로 유도되어 생산 된다²⁰⁻²³⁾. BJBB가 아토피피부염이 유발된 NC/Nga 마우스에서 혈액 내 면역글로블린 생성량에 미치는 영향을 알아보기 위해 조사한 결과 IgG의 생성량은 대조군에 비하여 BJBB 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었는데, 이 결과는 이전 연구인 BJBB의 항아토피 피부염 효능에 관한 실험적 연구²⁴⁾에서 IgE 생성량이 대조군에 비하여 57%의 유의성 있는 감소를 나타냈던 결과가 이번 실험을 통해 얻은 항염증 결과가 영향을 주었을 것으로 생각된다.

마지막으로 조직학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 H&E 염색을 실시한 결과 대조군은 등 조직을 촬영한 결과 피부가 두꺼워졌고, 세포의 침윤으로 인한 세포의 밀도가 높게 나타났다. BJBB에서는 피부의 두께가 약 1/4정도 줄었으며, 세포 침윤으로 인한 세포의 밀도 또한 낮아짐을 보였다.

이상의 혈액 및 조직학적 검사 결과와 항염증 검사 결과로 보아 본 실험에서 사용한 BJBB가 NO 생성 억제능을 통해 염증반응의 진정 효과가 있다고 기대가 되며, BJBB의 투여가 NC/Nga 마우스의 면역글로블린, 혈청 사이토카인, 비장 조직의 mRNA의 발현, 혈액 내 면역세포 및 조직학적 변화 등에서 AD의 원인인 T세포의 활성화를 진정시킴에 따라 사이토카인의 과 발현을 억제하고 염증성 매개물질의 생성량을 감소시켜 면역세포의 침윤을 막아 병리적 진행을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 따라서 현재 임상에서 활용되고 있는 BJBB가 EBM(Evidence-based medicine) 구축에 일조할 것으로 사료되는 바이다.

결론

본 연구에서는 아토피 피부염을 유발한 마우스에서 한약재로 조성된 白鮮皮地膚子複合方 (BJBB)의 항염증 효과를 객관적으로 검증하기 위하여, LPS로 활성화된 설치류 대식세포주인 Raw 264.7 세포에서 세포독성 및 NO 생성 억제능에 미치는 영향과 동물병태 모델에서 다양한 혈청 내 사이토카인 및 비장에서의 mRNA 발현량, 혈청 내 면역글로불린, 혈액 내 면역세포, 조직학적 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BJBB는 Raw 264.7 cell에 대한 세포 독성 평가에서 대조군에 비하여 100% 이상의 세포 생존율을 나타내며, Nitric oxide의 억제능에서도 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다.
2. BJBB 투여군은 대조군에 비하여 혈청 내 IL-1 β , IL-6, TNF- α 발현을 각각 40%, 80%, 44%로 유의성 있게 감소시켰다.
3. BJBB 투여군은 대조군에 비하여 비장 조직에서의 IL-1 β , IL-6, TNF- α 유전자 발현을 각각 41%, 93%, 39%로 감소시켰다.
4. BJBB 투여군은 대조군에 비하여 혈액 내 백혈구, 호중구, 림프구, 단핵구 면역세포 비율을 각각 54%, 63%, 57%, 86%로 감소시켰다.
5. BJBB 투여군은 대조군에 비하여 IgG 면역글로불린 생성량을 각각 39%로 유의성 있게 감소시켰다.
6. BJBB 투여군은 대조군에 비하여 비만 세포가 피부로 침윤되는 것을 억제 하였으며, epidermis와 dermis의 두께 역시 상대적으로 감소시켰다.

이상의 결과들로 보아 항염증 효능을 통한 AD 개선 효과가 실험적으로 규명되었다. 보다 구체적인 치료 기전은 향후 보다 심도있는 연구를 통하여 보완되어야 할 것으로 보이나 이 같은 전임상 단계의 결과는 임상 활용 제고와 더불어 향후 보다 유의성 있는 치료제 개발을 위한 기초적 자료로써 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명 의학연구 지역혁신 센터의 지원에 의한 것입니다.

References

1. Galli SJ, Gordon JR, Wershil BK, Mast cell cytokines in allergy and inflammation. Agents and Actions

- Supplements, 1993 ; 43 : 209-20.
2. Koblenzer CS. Itching and the Atopic Skin. J Allergy Clin Immunol, 1999 ; 104 : 109-13.
3. Mihara K, Kuratani K, Matusui T, Yokota K. Vital Role of the Itch-scratch Response in Development of Spontaneous Dermatitis in NC/Nga Mice. Br J Dermatol, 2004 ; 151(2) : 335-45.
4. Park MC. A literature study about comparison of Eastern-Western medicine on the Atopic dermatitis. Wonkwang Hanny University, 2001.
5. Kang HS. Comparative Study of Cheongyeoltang and Cheongyeoltangbalhyobang on Atopic Dermatitis. Daejeon Hanny University, 2010.
6. Park JS, Sin TY, Kim DK, Lee JH. The Effects of Dictamni Radicis Cortex on the iNOS Expression and Proinflammatory Cytokines Production. Kor J Pharmacogn, 2011 ; 42(4) : 348-53.
7. Lee YS. The rapeutic effects of Dictamni Radicis Cortex extracts on atopic dermatitis-like skin lesions of NC/Nga mouce induced by DNCB. Daejeon Hanny University, 2014.
8. Na SH. K,F protein expression of angiogenic and inflammatory mediators impact. Kyunghee Hanny University, 2006.
9. Margarete N, Thomas W. Innate immunity, allergy and atopic dermatitis. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 2010 ; 10(5) : 463-8.
11. Hong JH. A research Western medical science, The Korean traditional medicine, Local clinic and Naturopathy about Atopy. The Korean Society For Eco Early Childhood Education, 2008 ; 7(1) : 65-81.
12. Bang SH, Choi YW, Ham JH, Hwan GG. The Clinical Effect of Topical DPCP Therapy in the Treatment of Atopic Dermatitis in Children and Adolescents. Korean J Dermatol, 2004 ; 42(1) : 29-36.
13. Jung SY, Seo HS. The Effects of Samhwangseje on Anti-Inflammation in Raw 264.7 cell. J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2009 ; 22(1) : 108-19.
14. Tak MJ, Tak MR, Kang KH, Ko WS, Yoon HJ. The Inhibitory Effects of Yang Geouk San Hwa-Tang on LPS-stimulated inflammation in RAW264.7 macrophage cells. J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2010 ; 23(1) : 118-34.
15. Ryu IH, Cho HB, Kim SB, Seo YJ, Choi CM. The inhibitory effect of Picrasmae Lignum on inflammatory responses. J Orient Obstet Gynecol, 2011 ; 24(1) : 1-14.
16. Kim CS, Yoon JH, Park DH. The Effects of Exercise at Anaerobic Threshold Intensity on Production of NO, IL-1 beta and IFN-gamma in Young Males. J Korean Soc Living Environ Syst, 2012 ; 19(3) : 381-91.

17. Lee GS, Pena ID, Choi JY, Yoon SY, Choi JH, Kang TJ, Oh SK, Cheong JH. Effect of SPZZC, a composition of herb extracts, on atopic dermatitis in BALB/c and NC/Nga mouse. *Yakhak Hoeji*, 2008 ; 52(3) : 232-9.
18. Ha JC, Kim HD, Joo JW, Kim JO. Ultrastructural Localization of Antigenic Sites on *Vibrio vulnificus* and BALB/c Spleen Cells Applying the Protein A-Gold Technique. *J Korean Soc Microbiol*, 1989 ; 24(4) : 391-7.
19. Chung HT, Ha TY, Cung DK. Histological changes of mouse spleen and lymph node by cyclophosphamide. *J Korean Soc Microbiol*, 1978 ; 10 : 55-62.
20. Lee BG, Chu MK, Chung HK, Kim JD. Effect of Adaptagen- α on the Mouse Peritoneal Macrophages and Spleen Cells in Vivo. *J Korean Soc Microbiol*, 1978 ; 29(5) : 507-15.
21. Peter P. *The immune system*, 2nd rev. ed. U.S.A : Garland Science, 2009 : 30-1.
22. Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol*, 2002 ; 2 : 773-86.
23. Simpson EL. Atopic dermatitis: a review of topical treatment options. *Curr Med Res Opin*, 2010 ; 26(3) : 633-40.
24. Nagata N, Oshida T, Yoshida NL, Yuyama N, Sugita Y, Tsujimoto G, Katsunuma T, Akasawa A, Saito H. Analysis of highly expressed genes in monocytes from atopic dermatitis patients. *Int Arch Allergy Immunol*, 2003 ; 132 : 156-67.
25. Sim BY, Ji JG, Lee WY, Kim SJ, Kim HY, Lee JY, Kim DH. Experimental Research of Baecksunpijibujabokhap-banng (BJBB) on Atopic Dermatitis Treatment. *Res Inst Korean Med*, 2014 ; 22(2) : 67-79.