

아토피 피부염 외치치료제 처방 개발을 위한 실험적 연구

김건우^{1#}, 박지원¹, 심부용¹, 김동희^{1,2*}

1 : 대전대학교 한의과대학 병리학교실, 2 : 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구센터

An experimental study for the development of prescription on atopic dermatitis

Gun Woo Kim^{1#}, Ji Won Bak¹, Boo-Yong Sim¹, Dong Hee Kim^{1,2*}

1 : Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

2 : Traditional and Biomedical Research Center(TBRC), Daejeon University

ABSTRACT

Objectives : Atotang was composed of 10 kinds of traditional medicinal herb. This research was performed to examine biological effects of Atotang for the development of prescription on atopic dermatitis.

Methods : Atotang was extracted with 80% EtOH. Free radical scavenging assay has tested for anti-oxidative activity as well as the contents of total polyphenol. We observed the production of ROS, nitric oxide(NO) and the inflammatory cytokines such as interleukin-1beta(IL- β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), Prostaglandin E2(PGE₂) in Raw 264.7 cells stimulated by LPS. We used Disc diffusion method to investigate antibacterial activity on *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermis*.

Result : Content of total phenolic compound of Atotang was 36.3 mg/g ext. DPPH and ABTS scavenging activities were 77% and 46% at 200 ug/ml respectively, showing dose-dependent increase. The amounts of ROS and NO in RAW 264.7 cells were decreased by 30% and 19% at 200 ug/ml, respectively, showing dose-dependent decrease. The production of IL-1beta, IL-6 and TNF- α in RAW 264.7 cells were decreased dose-dependently by 81%, 67%, and 20% at 200 ug/ml, respectively. Atotang was reduced LPS-stimulated production of PGE₂ by 33%. Atotang on *C. albicans*, *S. aureus* and *S. epidermis* was selected by a disc diffusion method and inhibition effect of the Atotang on the growth of *S. epidermis* was the greatest.

Conclusion : The results indicated that Atotang showed biological activities showing anti-oxidant, anti-inflammatory and antibacterial effects. Based on these results, it is concluded that Atotang can be applied to the prescription on atopic dermatitis.

Key words : anti-oxidant effect, anti-inflammatory effect, antibacterial effect, atopic dermatitis

서론

아토피는 고대 그리스어인 'a-topos'가 어원으로 피부의 만성적인 염증성 질환으로 피부 건조증 및 가려움증이 주 증상이며¹⁾, 그 외 홍반, 피부균열, 염증진행과 가피형성 등의 증상이 장기간 동안 회복, 재 발생이 반복되는 만성-소모성 질환으로 가족력과 관련이 있다²⁾. 2000년대 접어들면서 그 유병률이 매우 빠른 속도로 증가하고 있어 인류가 해결해야 할 중요한 난치성 피부질환으로 인식되고 있다³⁾. 아토피 피부염

은 환경적요인 뿐만 아니라 면역학적 요인도 작용하는데, 특히 IgE 수치의 증가와 helper T cell의 침윤이 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고^{3,4)}되고 있다. 또한 피부장벽의 손상도 아토피 피부염을 악화시키는 요인으로 알려져 있는데, 손상의 원인 및 아토피 피부염의 발생요인 중 산화적 손상과의 관련성이 제기³⁾되고 있다. 또한 아토피 환자의 피부에서 포도상구균과 같은 세균이나 바이러스 등에 의해 피부염증이 악화^{3,5)}된다는 보고도 있다. 주로 사용되는 약물로는 항히스

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

#제1저자 : 김건우, 대전광역시 동구 대학로 62번지, 대전대학교 한의과대학
· Tel : 042-280-2828 · FAX : 042-280-2624 · E-mail : gunwoo1980@hanmail.net
· 접수 : 2014년 6월 30일 · 수정 : 2014년 7월 16일 · 채택 : 2014년 7월 16일

타민제, 스테로이드제, cyclosporin, DNA 합성 저해제 등 다양한 약물이 임상에서 사용⁶⁾되고 있으나, 이들을 장기간 사용했을 때 각종 부작용이 문제되고 있어 새로운 치료법에 대한 필요성이 증가³⁾되고 천연물로부터 기능성 물질을 찾아내려고 하는 노력들이 다양하게 이루어지고 있다⁷⁾.

한약재 50여 종을 가지고 아토피 관련 실험을 통해 선택된 10가지 약물을 조합하여 아토피 외치 치료용으로 개발하고자 아토탕을 만들었으며, 본 연구에서는 아토탕에 대한 항염 및 항산화, 항균 작용에 대한 효과를 연구하였다. 항산화작용을 검증하기 위해 폴리페놀 함량 측정, DPPH 소거능 검사, ABTS 소거능 검사 및 ROS 생성에 미치는 영향을 조사하였고, 항염증 효과를 보기 위해 RAW 264.7 세포에서 NO 생성 억제능, 사이토카인 생성량 측정, Prostaglandin E2 생성량을 측정하였다. 또한, 항균작용을 보기 위해 디스크확산법을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 아토탕의 구성 약재들은 (주)옴니허브(Daegu, Korea)에서 구입하였고, 대전대학교 지역혁신센터 난치성 면역질환의 동서생명의학연구소(TBRC)에서 정선 후 사용하였다. 그 내용과 분량(1첩)은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Composition of Component

Herb	Latin Name	Weight (g)
苦蔘	Sophorae Radix	6
蕎麥	Fagopyri Semen	6
白鮮皮	Dictamni Radicis Cortex	6
蛇梅	Duchesneae Herba	8
沙參	Adenophorae Radix	6
松津	Terebinthinae Oleum	6
魚腥草	Houttuyniae Herba	8
烏梅	Mume Fructus	6
紫草	Lithospermi Radix	8
地膚子	Kochiae Fructus	6
Total		66

2) 세포

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행에서 구입하였다

3) 시약 및 기기

Lipopolysaccharide(LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)는 Sigma-Aldrich사(st. Louis, MO, USA)에서, Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), Fetal Bovine Serum(FBS), Penicillin 및 Streptomycin은 Hyclone사(Logan, Ut, USA)에서, Cell viability assay kit은 Daeillab sevice사(Seoul, Korea)에서, Nitric Oxide detection kit은 Intron Biotechnology사(Suwon, Korea)에서 구입하였다. Cytokine Milliplex Map

Immunoassay kit은 Millipore사(Bellerica, MA, USA)에서, HNO₃(Duksan, Korea), As, Pb, Hg, Cd standard solution(SCP Science, Canada), Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Merck, Germany), gallic acid(Sigma-Aldrich, USA), sodium carbonate (Sigma-Aldrich, USA), Nutrient Broth와 Nutrient Agar는 DIFCO사(MD, USA), 종이 디스크(Whatman, England)를 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan), CO₂ incubator (SANYO, Japan), Freeze dryer (IIShin, Korea), ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A), Luminex (Millipore, U.S.A.), Flow cytometry system(BD Biosciences immunocytometry systems, U.S.A.)를 이용하였으며, ICP(Shimadzu, Co., Japan), 수은분석기 (TELEDYNE Leeman Labs, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 제조

아토탕 1첩을 80% 에탄올 1 l 에 넣고, 3시간 동안 환류 추출 하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압, 농축하여 동결 건조한 후 완전 건조된 조성물을 냉동 보관하여 사용하였다.

2) 안정성 검사

(1) 중금속 검사

납, 비소, 카드뮴 분석의 경우 조성물 0.5 g을 극초단파 시료전처리장치 전용용기에 넣고 질산 10 ml을 넣은 후, 용기를 후드 안에 정치시켜 발생 가스를 제거하고 극초단파 시료전처리장치를 사용하여 분해하였다. 분해가 끝난 다음 분해액을 여과지로 여과하여 용량플라스크에 넣고 물을 넣어 적절하게 표준액의 농도범위로 희석하여 검액으로 하였다. 따로 질산 10 ml를 극초단파 시료전처리장치 전용용기에 넣어 검액 조제와 같은 방법으로 조작하여 공시험액으로 사용하였다. 준비된 검액, 표준액 및 공시험액을 가지고 유도결합플라즈마 분광계(ICP)를 이용하여 검량선을 작성하고 공시험액으로 보정하여 검액을 측정하였다. 수은 분석의 경우 조성물 50 mg을 정확하게 달아 특별한 전처리 과정 없이 수은 분석기를 이용하여 측정하였다.

(2) 세포 독성 측정

Raw 264.7 세포는 96 well plate에 10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 실험을 하기 전에 새로운 배양액으로 교체하였고, 아토탕 25, 50, 100, 200, 400, 800 µg/ml의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 µl의 WST solution을 첨가하여 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

3) 항산화 활성 측정

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약을 이용하는 방

법으로 측정하였다. 아토탕 1 ml에 50% Foiln-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 ml를 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 반응용액에 Na_2CO_3 포화용액 1 mL와 7.5 ml 증류수를 차례로 혼합하여 30분간 정치시킨 뒤, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 이용하여 작성한 검량선에 따라 함량을 구하였으며 측정단위로는 GAE(Gallic acid equivalent)/g를 사용하였다.

(2) DPPH radical 소거능 측정

자유라디칼 소거 활성 시험은 안정한 자유라디칼 DPPH를 사용하는 방법으로 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 μl 와 아토탕 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 100 μl 씩 각각 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료액 대신 물을 넣어 보정 값을 얻었다. 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

(3) ABTS radical 소거능 측정

ABTS assay 방법은 기존에 보고된 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다. ABTS 용액은 7.4 mM ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid))와 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온 ($\text{ABTS} \cdot^+$)을 형성시킨 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 1.5 이하가 나오도록 희석하고, 희석된 $\text{ABTS} \cdot^+$ 용액 150 μl 와 아토탕 5 μl 를 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 734nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 증류수를 대조군으로 하여 대조군에 대한 ABTS 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다.

$$\text{소거율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

(4) 세포내 ROS 활성 측정

Raw 264.7 세포 내에서 reactive oxygen speies (ROS)를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하였다. 12well plate에 Raw 264.7 세포를 1.5×10^5 cells/well이 되게 분주하였다. 24시간 동안 배양 한 후, 아토탕 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하여, 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하여 모은 세포를 차가운 PBS로 2회 세척한 후, DCF-DA 10 μM 이 되도록 첨가하여 15분 동안 빛이 차단된 37°C에서 염색하였다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400 μl 를 부유시켜 유세포 분석기 (Flow cytometer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA)를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

4) 항염증 효능 측정

(1) Total Nitric oxide 생성 억제 효과 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 cells은 96well plates에 10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후, 아토탕 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 각각 처리하여, 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. N1 buffer를 50 μl 를 각 well에 처리한 후, 10분간 상온에서 암소 반응 후, N2 buffer 50 μl 를 각 well에 처리하고, 10분간 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

(2) 사이토카인 생성량 측정

Raw 264.7 cells을 12 well plates에 1.5×10^5 cells/ml이 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 후, 아토탕 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였다. 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양한 후 세포배양액을 수거하여 배양액에 함유된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 custom-made 4-plex cytokine Milliplex panel을 이용하여 측정하였다. 분석은 Milliplex analyst를 통해 이루어 졌다.

(3) PGE₂ 생성량 측정

Raw 264.7 cells을 12 well plates에 1.5×10^5 cells/ml이 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 후, 아토탕 50, 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)과 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 세포 배양액을 수거하여 일정량의 상등액을 취해 PGE₂ kit을 사용하여 PGE₂ 측정하였다.

5) 항균활성 측정 (디스크 확산법)

Candida albicans, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*를 대상으로 디스크 확산법을 시행하였다. Nutrient broth 액체배지에서 30 °C, 24시간 배양한 균주를 0.5 McFarland 탁도(530 nm)로 맞추어 균 농도가 1.5×10^6 CFU/ml 되도록 제조하였다. 균액을 pour plating 방법으로 NA (Nutrient agar) 배지에 고르게 도말한 후 DMSO에 녹인 항균제를 각각 0.1, 0.2, 0.4 mg의 농도로 6 mm 종이 디스크에 투여하였다. 균을 접종한 배지를 30 °C에서 48시간 배양한 후 균의 생장이 억제된 크기를 보았다.

6) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 세 번 이상의 반복된 실험 결과를 평균 \pm S.D. 값으로 나타내었고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석법을 이용하여 통계처리 하였다. p values가 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 보았다.

결 과

1. 중금속 함량

아토탕의 중금속 함량을 측정한 결과, 납의 경우 검출되지 않았고, 그 외 중금속의 경우 기준치 이하로 검출되었다 (Table 2).

Table 2. Content of Pb, As, Cd and Hg in Component.

	Pb	As	Cd	Hg
Permissive density (mg/kg)	5	3	0,3	0,2
Component	N.D. ¹⁾	0,35	0,01	0,002

¹⁾ N.D. : Not detected.

2. 세포독성

Raw 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 대조군을 $100 \pm 7.3\%$ 로 나타냈을 때, 아토탕 25, 50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 $103.8 \pm 12.5\%$, $101.6 \pm 11.2\%$, $93.6 \pm 13.9\%$, $91.1 \pm 6.0\%$, $90.6 \pm 8.0\%$, $86.4 \pm 13.2\%$ 의 세포 생존율을 나타내었고 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 실험을 진행하였다(Fig. 1).

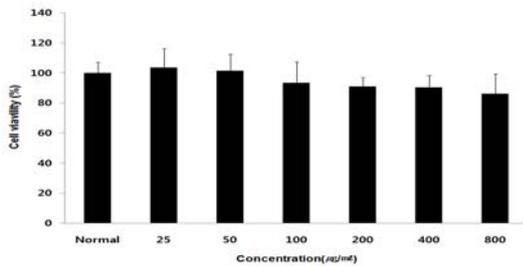


Fig. 1. Effects of Atotang on the cell viability of RAW 264.7 cells. Cells were treated with 25, 50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/ml}$ of Atotang for 24hr. Cell viability was determined using the WST assay. The results are expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with 0 $\mu\text{g/ml}$.

3. 항산화능에 미치는 영향

1) 총 폴리페놀 함량

아토탕에 존재하는 총 폴리페놀 함량을 gallic acid를 표준 물질로 하여 측정된 결과, Table 3과 같이 36,3 mg/g의 폴리페놀 함량을 나타냈다(Table 3).

Table 3. Total phenolic contents of Atotang.

Sample	Total phenolics(mg GAE/g ext.) ¹⁾
Atotang	36.26 \pm 0.85

¹⁾ Total phenolic contents was expressed as milligram of gallic acid equivalent (GAE) per gram of extract.

2) ABTS radical 소거능에 미치는 영향

아토탕의 ABTS 소거율을 측정된 결과, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 각각의 농도에서 $12.4 \pm 3.0\%$, $23.3 \pm 2.3\%$, $46.2 \pm 3.3\%$ 로 나타났으며 농도 의존적으로 라디칼 소거능이 증가함을 나타내었다(Fig. 2).

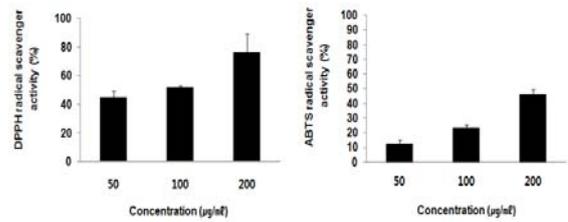


Fig. 2. DPPH and ABTS free radical scavenging activity of Atotang. The extract was incubated with DPPH solution at 37°C for 30 mins and ABTS solution at RT for 10 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517nm for DPPH and at 734nm for ABTS. The results are expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

3) ROS 생성에 미치는 영향

아토탕의 ROS 생성 저해 활성은 대조군을 $100.0 \pm 12.1\%$ 로 나타냈을 때, 정상군은 $44.3 \pm 6.8\%$ 으로 나타났으며, 아토탕 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 $90.9 \pm 4.5\%$, $74.2 \pm 6.5\%$, $69.9 \pm 5.0\%$ 로 나타나, 대조군에 비하여 100과 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의성 있는 (**, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$) 감소를 나타내었다(Fig. 3).

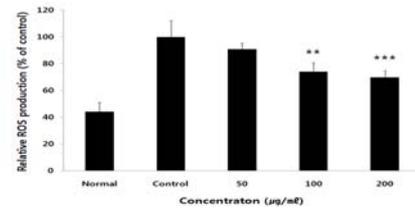


Fig. 3. Effects of Atotang on the ROS production in Raw 264.7 cells. The Raw 264.7 cells were stimulated with LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) and treated with Atotang(50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours. The ROS production was analysed following incubation with DCFH-DA by flow cytometry. The results were represented by the mean \pm S.D. Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (**, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

4. 항염증 효능에 미치는 영향

1) Total Nitric oxide 생성에 미치는 영향

아토탕의 NO 생성량은 대조군을 $100.0 \pm 3.1\%$ 로 나타냈을 때, 정상군은 $23.0 \pm 4.9\%$ 로 나타났으며, 아토탕 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 $98.9 \pm 2.2\%$, $81.3 \pm 1.2\%$, $81.0 \pm 1.5\%$ 로 나타나 농도 의존적으로 감소를 했으며, 대조군에 비하여 100과 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의성 있는 (***, $p < 0.001$) 감소를 나타내었다(Fig. 4).

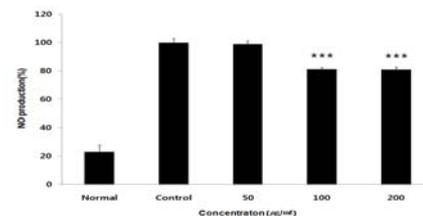


Fig. 4. Effects of Atotang on LPS-induced NO production in Raw 264.7 cells. Cells were stimulated with LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) and treated with Atotang (50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) for 24hr. The results were represented by the mean \pm S.D. Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (***, $p < 0.001$).

2) IL-1 β 생성량에 미치는 영향

아토탕의 IL-1 β 생성량은 대조군에서 32.3 \pm 4.5 (pg/ml), 정상군에서 4.2 \pm 5.5 (pg/ml)를 생성하였으며, 아토탕 50, 100, 200 μ g/ml 농도에서 각각 27.6 \pm 2.2 (pg/ml), 26.8 \pm 2.2 (pg/ml), 25.5 \pm 5.2 (pg/ml)를 생성하여 농도 의존적으로 감소를 하였으나, 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 5).

3) IL-6 생성량에 미치는 영향

아토탕의 IL-6 생성량은 대조군에서 61212.3 \pm 11624.3 (pg/ml), 정상군에서 2.6 \pm 1.2 (pg/ml)를 생성하였으며, 아토탕 50, 100, 200 μ g/ml 농도에서 각각 41988.1 \pm 9350.6 (pg/ml), 40712.5 \pm 3954.0 (pg/ml), 19880.6 \pm 9089.6 (pg/ml)를 생성하여 농도 의존적으로 감소를 했으며, 대조군에 비하여 100과 200 μ g/ml의 농도에서 유의성 있는 (*, p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 5).

4) TNF- α 생성량에 미치는 영향

아토탕의 TNF- α 생성량은 대조군에서 6055.3 \pm 1230.3 (pg/ml), 정상군에서 128.5 \pm 14.5 (pg/ml)를 생성하였으며, 아토탕 50, 100, 200 μ g/ml 농도에서 각각 5828.6 \pm 903.1 (pg/ml), 5724.8 \pm 630.5 (pg/ml), 4819.6 \pm 631.5 (pg/ml)를 생성하여 농도 의존적으로 감소를 하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 5).

5) PGE₂ 생성량에 미치는 영향

아토탕의 PGE₂ 생성량은 대조군에서 943.7 \pm 100.4 (pg/ml), 정상군에서 386.8 \pm 170.6 (pg/ml)를 생성하였으며, 아토탕 50, 100, 200 μ g/ml 농도에서 각각 906.7 \pm 91.0 (pg/ml), 644.9 \pm 91.3 (pg/ml), 631.9 \pm 84.8 (pg/ml)를 생성하여 농도 의존적으로 감소를 하였고, 대조군에 비하여 100과 200 μ g/ml의 농도에서 유의성 있는 (***, p<0.001) 감소를 나타내었다(Fig. 5).

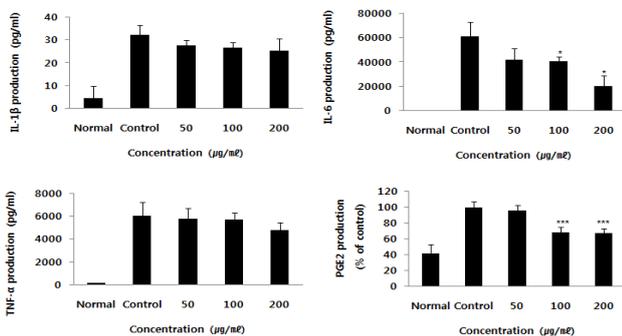
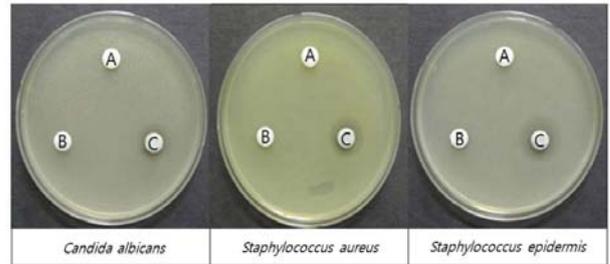


Fig. 5. Effects of Atotang on LPS-induced IL-1 β , IL-6, TNF- α and PGE₂ production in Raw 264.7 cells. Cells were stimulated with LPS(1 μ g/ml) and treated with Atotang(50, 100, 200 μ g/ml) for 24hr. The results were represented by the mean \pm S.D. Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test(*, p<0.01, ***, p<0.001).

5. 항균 작용에 미치는 영향

아토탕의 항균 활성은 각각 0.1, 0.2, 0.4 mg의 농도로

희석한 후 *C. albicans*, *S. aureus*, *S. epidermis*를 대상으로 디스크 확산법을 시행하였다. 그 결과 0.4 mg의 농도에서 *C. albicans*, *S. aureus*, *S. epidermis* 모든 균주에 항균 활성을 나타내었다. *S. epidermis*에서 7 mm 정도의 항균활성을 보여 가장 높았으며, 다음으로 *S. aureus*와 *C. albicans*에서 5와 3 mm의 항균활성을 나타내었다(Fig. 6).



Strains	Zone	Atotang(mg)	Zone diameter(mm)
<i>Candida albicans</i>	C	0.4	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	C	0.4	5
<i>Staphylococcus epidermis</i>	C	0.4	7

Fig. 6. Antibacterial activity of Atotang from *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermis*. A : 0.1 mg, B : 0.2 mg, C : 0.4 mg

고찰

아토피 피부염은 1933년 Wise와 Sulzberger에 의해 처음 제안된 질환⁸⁾으로 유소아기부터 주로 발생⁹⁾하는 만성적 재발성의 염증성 피부질환¹⁰⁻¹²⁾으로, 현재까지 정확한 원인과 발병기전이 밝혀져 있지 않으나, 유전적, 환경적, 면역학적, 심리적, 약리적 및 표피장벽기능 이상의 복합적인 결과^{13,14)}로 나타난다. 또한, 여러 종류의 세균과 진균에 대한 감염증은 아토피 피부염의 병인기전에서 중요한 역할을 하는데, *S. aureus*은 아토피피부염 환자의 피부감염의 가장 흔한 원인균으로서, 환자의 증상 정도와 피부에 형성된 균수와 상관관계가 있다¹⁵⁾. *S. aureus*는 특히 화상부위에 침입해 전신적으로 퍼져나가 맹장염, 담낭염, 골수염 등의 원인이 되기도 하고 인체의 여러 염증질환에 작용하는 중요한 미생물중 하나인 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 세균 못지 않게 정상 피부에 존재하는 진균도 아토피 피부염의 발생에 영향을 주는 것으로 알려져 있는데, 피부를 뚫고 침투하여 면역반응을 유발할 수 있으며, 이러한 반응이 아토피 피부염의 악화 인자로 작용할 수 있다. 아토피 피부염의 경우에는 집먼지진드기 보다 오히려 진균의 일종인 *C. albicans*가 알레르기 유발물질로 더 강력하게 작용한다는 연구 결과도 보고¹⁷⁾되어 있다.

아토피 피부염의 치료는 주로 염증과 소양감의 조절, 2차 병변의 발생방지를 목적으로 스테로이드제나 항히스타민제가 사용되고 있지만, 약물의 지속적인 사용 시 심각한 문제를 일으킬 수 있으며 피부 부작용뿐 아니라 전신적 부작용의 발생 우려가 커 새로운 아토피 피부염 치료제의 개발이 절실히 필요하며, 치료제의 개발과 관련된 재료로 부작용이 적은 천연물이 사용⁷⁾되어 지고 있다. 천연물을 원료로 한 신약 및 기존의 치료제에 천연물을 배합한 형태의 개발이 활성화되고, 다

양한 천연물의 항염증, 항산화, 항균 및 소양감 억제 작용 등의 많은 연구 결과가 보고¹⁸⁾되고 있다.

활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)은 한 개 이상의 부대전자를 가진 불안정한 화합물을 총칭하는 것으로 세포막을 공격하여 신호전달체계를 망가뜨리고 면역력을 떨어뜨리며, 때론 외부에서 박테리아나 곰팡이가 침입했을 때 백혈구로부터 병원체를 방어하는 작용³⁾을 한다. Niwa 등에 따르면, 아토피 피부염 환자의 각질층에는 활성산소에 의해 손상된 단백질들이 정상인에 비해 크게 증가되며 활성산소 제거효과의 활성도 크게 감소해 있다는 연구 결과¹⁹⁾가 있다. 또한, Omato 등에 따르면, 아토피 피부염이 걸린 아동에서 활성산소로 인한 내부적 손상에 대한 보고²⁰⁾도 있다. 그 외에도 Taniuchi 등에 의하면, 아토피 피부염 환자의 혈청에 NO 유도체의 농도가 증가되어 있고, 피부염이 개선되면 혈청 내 NO의 농도도 감소한다고 보고²¹⁾된 바 있다.

본 처방에 사용되는 구성 약물 중 류 등은 고삼의 EtOAc 분획물이 항산화 효능²²⁾을, 송은 고삼의 중요 성분이 IgE 생산을 억제하여 면역조절효과²³⁾를, 이 등은 사매 에탄올 추출물에 대한 항산화 및 항염증 효능²⁴⁾을, 조는 백선피의 항염 효능²⁵⁾을 나타내는 것을 보였다. 또한, 나 등은 지부자 추출물이 혈관신생억제 및 항산화, 항염증 효과²⁶⁾를, 서 등은 오매 추출물이 NF- κ B 조절을 통해 항염 효과²⁷⁾를, 이 등은 어성초 물추출물의 항염 효능²⁸⁾을, 민은 사삼의 항산화 효과²⁹⁾를 보였다.

본 연구에서는 아토피 질환의 염증을 개선시킬 수 있는 대체 치료제와 새로운 신규소재를 발굴하고자 항염, 항산화 및 항균력을 연구하여 아토피 피부염의 염증개선원리를 이해하고자 하였다.

실험에 앞서 약물의 안정성을 확보하기 위해 중금속 함량을 측정된 결과, 비소, 카드뮴, 수은의 경우 기준치 이하로 검출되었고 납은 검출되지 않았다. 아토피의 총 폴리페놀 함량은 36.3 (mg GAE/g ext.)을 나타냈으며, DPPH와 ABTS free radical에 대한 소거능이 농도 의존적으로 증가했고, ROS 생성 저해 활성에 미치는 영향이 유의한 감소를 보여 항산화 효능이 있음을 알 수 있었다. 페놀성 화합물은 식물의 대표적인 2차 대사산물로 다양한 생리활성에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 항산화 활성은 페놀성 화합물의 종류나 함량이 미치는 영향이 큰 것으로 알려져 있고³⁰⁾, 특히 항산화 작용과 관련하여 최근 생체 내에서의 산소 자유 라디칼 반응이 생체조직의 노화나 질병과 관련이 있는 것으로 보고³¹⁾되어 졌다. DPPH는 비교적 안정한 free radical로서 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고, 간편하고 비용이 저렴한 항산화 실험법으로 널리 쓰이고 있다. ABTS 항산화 측정법은 DPPH와 같은 라디칼 소거법에 의한 항산화능 측정법이며, 화학반응을 통해 free radical이 유발된 용액에 시료를 넣어 항산화를 측정한다³²⁾. Reactive oxygen species(ROS)는 생체 내에서 지속적으로 생성이 되지만 적절하게 제어되지 않으면 축적되어 단백질, 지질, 핵산 등에 손상을 야기시키며, 질병의 원인이 되기도 한다³¹⁾.

또한 아토피 질환의 염증 개선 효과를 검증하고자 RAW 264.7 세포 배양액 내 NO 생성량과 염증 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α) 및 염증인자인 PGE₂ 등의 생성량을 측정하였다. IL-1 β 와 TNF- α 는 주로 대식세포에서

분비되고, T세포와 B세포의 기능을 증가시키며, NO와 PGE₂의 생성을 촉진한다. NO는 혈관의 긴장, 혈소판 기능, 신경 전달, 면역 기능에서 중요한 역할을 하며, NO의 과생산은 지속적인 염증과 조직 손상에 관련되어 있다. 또한, PGE₂는 통증과 염증에 관여되며, 세포보호, 신장 혈류량과 기능 유지, 그리고 신체의 평형 유지 등에 매우 중요한 역할을 한다. IL-6은 IL-1과 TNF- α 에 의해 분비가 촉진되는 급성 조절 단백질이며 주요한 염증성 사이토카인이다³³⁾.

RAW 264.7 세포에서 NO 생성량을 측정한 결과 아토피 치료군은 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다. RAW 264.7 세포에서 IL-1 β 생성량을 측정한 결과 정상군보다 대조군이 증가했으며 아토피 치료시 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소는 하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 또한 IL-6의 경우 정상군보다 대조군이 증가했으며 아토피 치료시 대조군에 비해 유의성 있는(* p<0.01) 감소를 나타내었다. TNF- α 의 경우 정상군보다 대조군이 증가했으며 아토피 치료시 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소는 하였다. RAW 264.7 세포에서 PGE₂ 생성량을 측정한 결과 정상군보다 대조군이 증가했으며 아토피 치료시 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다.

아토피가 아토피 피부염 환자의 증상을 악화시켜 염증을 유발할 수 있는 균주 *S. aureus*, 알레르기 유발물질에 강력하게 작용하는 균주 *C. albicans*, 여드름 유발에 관여하는 *S. epidermis*의 감염을 억제하는지를 확인하기 위하여 항균 활성을 측정하였는데, *S. epidermis*, *S. aureus*, *C. albicans* 균주 순으로 성장을 억제시켰다.

이와 같이 아토피는 항산화, 항염증 및 항균 효능을 나타냈으며 아토피에 대한 치료제로 사용될 수 있다고 생각한다. 추후 기본 검색을 떠나 보다 다양한 인자 및 구성 약물에 대한 개별적인 검색에 대한 심도 있는 연구가 필요하며, 또한 여드름이나 각종 다양한 염증성, 알레르기성 피부과 질환에 임상적으로 광범위한 활용 가치가 있을 것으로 사료되고 작용 기전에 대한 연구가 지속되어야 할 것이라 사료된다.

결론

아토피 피부염 외치치료제 처방의 개발과 관련하여 아토피의 효능을 규명하기 위하여 산화적 손상 및 염증 관련 인자들의 변화, 항균에 대한 효과를 *in vitro* 실험을 통해 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 아토피의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과, 36.3 mg/g으로 나타났다.
2. 아토피의 DPPH와 ABTS의 소거활성은 농도 의존적으로 소거 활성을 나타냈으며, 특히 200 μ g/ml의 농도에서 각각 76.6%와 46.2%의 높은 소거능을 나타내었다.
3. 아토피는 ROS 생성율을 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소시켰으며, 특히 100과 200 μ g/ml의 농도에서 각각 25.8%와 30.1%의 유의적인 감소를 보였다.

4. 아토탕은 NO 생성을 대조군에 비해 감소시켰으며, 특히 100과 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 18.7%와 19.0%의 유의적인 감소를 보였다.
5. 아토탕은 LPS 처리한 RAW 264.7 세포에서 대조군에 비해 IL-1b 생성이 특히 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 21.2% 감소를 보였다.
6. 아토탕은 LPS 처리한 RAW 264.7 세포에서 대조군에 비해 IL-6 생성이 특히 100과 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 33.5%와 67.5%의 유의적인 감소를 보였다.
7. 아토탕은 LPS 처리한 RAW 264.7 세포에서 대조군에 비해 TNF- α 생성이 특히 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 20.4% 감소를 보였다.
8. 아토탕은 LPS 처리한 RAW 264.7 세포에서 대조군에 비해 PGE₂ 생성이 특히 100과 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 31.7%와 33.0%의 유의적인 감소를 보였다.
9. 아토탕은 디스크 확산법에서 0.4 mg의 농도에서 *S. epidermis*, *S. aureus*, *C. albicans* 순으로 항균효과가 나타났다.

위 결과를 종합해 보면, 아토탕은 항산화능이 있고, 면역 조절 작용에 의한 아토피 피부염 염증 개선 효과와 항균 효과가 객관적을 규명되어, 향후 다양한 임상에서의 활용이 제고 될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지정 대전대학교 난치성 면역 질환 의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것입니다.

References

1. Yang GS. A study on antibiotic effect of aroma oils on the growth of *Staphylococcus aureus* existing in the skin of the atopic dermatitis. Chonnam National University. 2007.
2. Lee GH. How aroma oil affects animal model with atopic dermatitis by DNCB on anti-inflammatory and immune. Daejeon University. 2010.
3. Cho SE. Anti-oxidative, anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *chamaecyparis obtusa* leaves extracts for atopic dermatitis. Konkuk University. 2011.
4. Kim JJ, Yang SW, Son NW, Ahn KS. Anti-inflammatory action by gamisangryosamul-tang and the effect of ziyang-go on atopic dermatitis-like lesion and pruritus in NC/Nga mice. Korean J Orient Physiol Pathol. 2003 ; 17(2) : 428-35.
5. Kwon HJ, Kim YJ, Jang SH, Bae BK, Youn HY, Lee HW. Stimulatory effect of staphylococcal protein A on inflammatory response in human HaCaT keratinocytes. Korean J Microbiol. 2011 ; 47(4) : 348-55.
6. Kwon HY. The anti-atopic effects of flavonol content from *Ginkgo biloba* leaves on NC/Nga murine model with mast cell and DNCB-induced atopy. Daejeon University. 2012.
7. Park DB, Han JK, Kim YH. Effect of Yanghyeuljeseuptang on immunological factors in spleen and draining lymph node of atopic dermatitis induced NC/Nga mouse by dinitrochlorobenzene. Res inst Korean Med. 2007 ; 16(2) : 251-65.
8. Yu JS. The effects of lonicerae flos, forsythiae flutuos and hwangryunhaedok decoction pharmacopuncture on atopic dermatitis in NC/Nga mice. Woosuk University. 2012.
9. Sim BY, Ji JG, Lee WY, Kim SJ, Kim HY, Lee JY, Kim DH. Experimental research of baechsunpijibujabokhap-banng on atopic dermatitis treatment. Res inst Korean Med. 2014 ; 22(2) : 67-79.
10. Bang CK, Choi JJ, Eom DM, Kim DH. The effects of BGG on various immunological factors related to pathogenesis of allergic dermatitis in NC/Nga mice induced by der-f. Res inst Korean Med. 2007 ; 16(2) : 147-69.
11. Jung JH. Anti-inflammatory effects of herbal mixture(*Rubus coreanus*, *Rehmanniae Radix*, *Houttuynia cordata*, *Betulae cortex*) on acute atopic dermatitis mice. Kyungwon University. 2010.
12. Ko HY, Kim DH. Study on combination of external gosamgamibang and internal chenggihaedok-san for the treatment of atopic dermatitis. Korea J Orient Physiol Pathol. 2009 ; 23(6) : 1282-91.
13. Kim TH. Alleviation of atopic dermatitis symptoms by extracts of *camellia sinensis*. Gyeongsang National University. 2013.
14. Lee IH, Lee SH, Lee IS, Park YK, Chung DK, Choue RW. Effects of probiotic extracts of kimchi on immune function in NC/Nga mice. Korean J Food Sci Technol. 2008 ; 40(1) : 82-7.
15. Jo YR, Kang SM. *Lactococcus lactis* culture methods for the enhanced depression of inducers in atopic diseases. Korean J Microbiol Biotechnol. 2012 ; 40(4) : 310-8.
16. Kim JM, Oh HC, Song SP, Kim NK, Hwang CY. Study on the anti-microbial activity, anti-inflammatory and anti-allergic effects of several herb-extract. Korean J Orient Physiol

- Pathol. 2006 ; 20(1) : 103-14.
17. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis. GoonJa publisher. NamDongHo. 2010. Available from : URL : http://dr_allergy.blog.me/30106658996
 18. Yoo HS. A study on the immune modulation of chunghwatang(CHAT) in Atopic dermatitis antimal models. Daejeon University. 2012.
 19. Niwa Y, Sumi H, Kawahira K, Terashima T, Nakamura T, Akamatsu H. Protein oxidative damage in the stratum corneum: evidence for a link between environmental oxidants and the changing prevalence and nature of atopic dermatitis in Japan. *Br J Dermatol.* 2003 ; 149(2) : 248-58.
 20. Omata N, Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Jiang M, Hiraoka M, Nambu M, Deguchi Y, Mayumi M. *Life Sci.* 2001 ; 69(2) : 223-8.
 21. Taniuchi S, Kojima T, Hara K, Yamamoto A, Sasai M, Takahashi H, Kobayashi Y. Increased serum nitrate levels in infants with atopie dermatitis. *Allergy.* 2001 ; 56 : 693-5.
 22. Ryu SY, Yang KS. Antioxidative activities of solvent fractions from *sophora flavescens*. *Journal of Pharmaceuticel Sciences Sookmyung Women's University.* 2006 ; 23 : 18-21.
 23. Song DA. Anti-atopic effect in Nc/Nga mouse by oxymatrine, matrine, trifolirhizin, kurarinone of *sophora flavescens solander ex aiton*. Konkuk University. 2010.
 24. Lee DJ, Jeon IH, Kim HS, Cho IY, Jang SI. Antioxidative and anti-inflammatory effect of ethanol extract from *duchesnea chrysantha*. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2012 ; 26(1) : 59-66.
 25. Jo GH. Effect of *paeoniae radix alba* or *dictamini radiceis cortex* application on atopic dermatitis like immune alterations in mice. Catholic University of Daegu. 2012.
 26. Na SH, Ko SG, Shin YC. Effects of *kochiae fructus* extracts on the expression of angiogenesis and inflammation related proteins. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2006 ; 20(3) : 557-62.
 27. Seo WS, Oh HN, Park WJ, Um SY, Lee DW, Kang SM. Study on the anti-inflammatory effect and mechanism of *prunus mume* extract regarding NF- κ B. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal.* 2014 ; 29(1) : 50-57.
 28. Lee SY, Lee YJ, Park WS. Anti-inflammatory effects of fermented *houltuyniae herba* water extract on LPS-induced mouse macrophage. *Kor J Herbology.* 2010 ; 25(3) ; 27-34.
 29. Min SH. A comparative study on the anti-oxidant effect of *adenophorae radix*, *codonopsis lanceolatae radix* and *glehniae radix cum rhizoma*. Kyungwon University. 2006.
 30. Lee KI, Kim SM. Antioxidative and antimicrobial activities of *Eriobotrya japonica* Lindl. leaf extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2009 ; 38(1) : 267-73.
 31. Jang TO, Yoo YH, Hwang YC, Kim HK, Woo HC. Total polyphenol content and antioxidative activities of mistletoe (*Viscum album*) extracts by supercritical carbon dioxide. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2010 ; 39(1) : 20-4.
 32. Hong SC, Jun JA, Kim DH. Effect of *Betulae Cortex* against oxidative stress. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2013 ; 27 : 391-9.
 33. Hong SM. Effect of *Kyejakjimotangkami* on osteoarthritis. Daejeon University. 2013.