

주성분 분석을 이용한 펄스형 전자기장 자극을 통해 DNCB로 유발된 아토피성 피부염의 개선 효과 분석

이지영¹ · 김준영¹ · 이예린¹ · 김고은² · 이용흠^{1*} · 양세정^{1*}

¹연세대학교 보건과학대학 의공학과, ²고려대학교 안산병원 피부과

Evaluation of Anti-Inflammatory Effect of Pulsed Electromagnetic Field on DNCB-Induced Atopic Dermatitis Using Principal Component Analysis

Jiyoung Lee¹, Jun-Young Kim¹, Yerin Lee¹, Ko Eun Kim², Yongheum Lee^{1*}, and Sejung Yang^{1*}

¹Department of Biomedical Engineering, Yonsei University

²Department of Dermatology, Korea University Ansan Hospital, Korea University

(Manuscript received 1 April 2021 ; revised 15 June 2021 ; accepted 21 June 2021)

Abstract: Atopic dermatitis (AD), a chronic inflammatory skin disease, is characterized by itchy and age-dependent lesions. Previous studies have shown that pulsed electromagnetic field (PEMF) significantly improved chronic ulcers and ununited fractures, providing an evidence for the application of PEMF in resolving inflammation caused by AD. This study investigated the anti-inflammatory effect of PEMF on DNCB-induced AD in animal models. Five male hairless mice (6 weeks old) per group were assigned to a normal group, a sham group, and two PEMF groups (15Hz, 75Hz). Mice were treated with 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) to induce uniform AD among all groups excluding a normal group. To examine the inflammatory progress and the improvement of AD after the PEMF stimulation, images are taken with various cameras for non-invasive evaluation and the results are expressed using principal component analysis (PCA) for visualization. The results of this study demonstrated that PEMF effectively improved skin lesions without the use of drugs.

Key words: Pulsed electromagnetic field, DNCB, Atopic dermatitis, Principal component analysis

1. 서 론

아토피성 피부염은 만성 염증성 피부질환으로, 주로 영유아기에 시작되어 가려움증과 연령에 따라 다른 병변 분포를

보이는 것을 특징으로 한다. 이 질병은 환자의 유전적인 소인과 환경적 요인, 환자의 면역학적 이상과 피부 보호막의 이상 등 여러 원인이 복합적으로 작용하여 나타난다. 최근 들어 환경 요인의 연관성에 대해 많은 연구가 발표되고 있다. 농촌의 도시화, 산업화로 인한 인스턴트식품 섭취의 증가, 실내외 공해에 의한 알레르기 물질의 증가 등이 아토피성 피부염 발병과 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다[1-3].

아토피성 피부염의 대표적인 증상인 심한 가려움증은 외부의 자극이나 알레르기 유발 물질에 대한 매우 민감한 반응으로 인해 나타난다. 가려움증으로 인해 피부를 긁고, 피부의 물리적 손상으로 염증반응이 유도되어 다시 가려움증이 재발하는 악순환이 반복된다. 아토피성 피부염의 치료 원칙은 증상의 발현과 악화를 예방하고, 이 ‘긁기-가려움증’ 순환(scratch-itch cycle)을 끊어내는 것이다[4]. 충분한 보습

*Corresponding Author : Yongheum Lee
Department of Biomedical Engineering, Yonsei University,
Wonju, 26493, Republic of Korea
Tel: +82-33-760-2863

E-mail: koaim@yonsei.ac.kr

*Corresponding Author : Sejung Yang
Department of Biomedical Engineering, Yonsei University,
Wonju, 26493, Republic of Korea
Tel: +82-33-760-2459

E-mail: syang@yonsei.ac.kr

본 연구는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행하였음(No. 2019R1F1A1058971).

과 원인 알레르겐 회피, 경구 항히스타민제, 스테로이드제나 면역조절제의 복용 및 국소 스테로이드제나 칼시뉴린 억제제 도포가 기존의 치료였다면, 최근에는 생물학적 제제의 도입으로 보다 좋은 치료효과를 기대할 수 있게 되었다[5-7]. 그러나 장기간 약물 사용으로 인한 부작용 및 약제 내성으로 인한 시간에 따른 호전도 감소, 소아에서의 약물 안전성 문제 등을 고려하였을 때, 아토피성 피부염에서 안전하고 비침습적인 새로운 치료 방법들이 개발될 필요가 있다.

자기장 치료 중에서도 펄스형 시변 미약 전자기장(Pulsed Electromagnetic Field, PEMF)는 골절의 회복이나 당뇨, 정맥 저류 등으로 인한 만성 피부 궤양에 임상적으로 사용되어 온 치료 방법으로서, 진피의 콜라겐을 재생시키고 혈류를 증가시킨다는 연구들이 발표된 바 있다[8-10]. 또한, 생체 내 깊은 곳까지 자극을 줄 수 있는 비침습적인 방법으로 역치에 간섭을 최소한으로 하여 생체 내 자극을 효과적으로 전달할 수 있는 치료 라는 장점이 있다[11].

본 연구에서는 PEMF 치료 후 항염 및 조직 재생 효과를 확인하고 이를 주성분 분석(Principal Component Analysis, PCA)를 통하여 개선 정도를 분석하고자 하였다[12,13]. 이를 검증하기 위해 무모생쥐에 아토피성 피부염을 유발시키고 PEMF의 효과 여부에 대한 실험을 진행하였으며 이를 PCA 기법으로 평가하기 위해 주차 별로 영상을 촬영하여 분석을 진행하였다.

II. 재료 및 방법

아토피성 피부염에서 PEMF 자극에 의한 항염 및 피부 조직 재생 효과를 평가하기 위해 6채널 자기장 발생 코어를 갖는 시스템을 설계하였다. 본 연구에서는 15 Hz와 75 Hz (펄스폭: 30%)의 주파수와 자극강도는 15 mT의 단극성 자극으로 설정하였다. 기존의 세포실험과 동물실험 연구에서 100 Hz 이하 저주파영역에서 혈류개선과 염증완화의 효과를 보

였으므로 자극의 주파수를 15 Hz와 75 Hz로 설정하였다. 자극강도는 세포실험의 경우 5~10 mT를, 동물실험의 경우 약 30 mT를 사용했기에 평균값인 15 mT로 설정하였다.

실험에 사용된 동물은 무게 26~27 g인 6주령의 수컷 무모생쥐(hairless mouse, SKH1), 총 20마리(정상군: n=5, 대조군: n=5, PEMF 15Hz 실험군: n=5, PEMF 75Hz 실험군: n=5)를 사용하였다.

아토피성 피부염을 인위적으로 유발하는 DNCB 용액을 제조하기 위해 DNCB(2,4-Dinitrochlorobenzene, 23732-9) 결정을 구매하여 사용하였다[14,15]. AOO용액은 Olive Oil (Shinyo Chemical 912193)과 100% Acetone을 1:3 비율로 혼합하여 사용하였다. DNCB 결정을 AOO용액과 100% Acetone의 1:3 비율 용액에 희석하여 DNCB 용액을 제조하였다.

DNCB 반응으로 아토피성 피부염이 유발된 무모생쥐는 대조군과 실험군(PEMF 15 Hz, 75 Hz)으로 분류하였다. 정상군의 경우 AOO용액을 3~4일 간격으로 200 µl씩 경피 도포 하였고, 실험군과 대조군은 총 6주간 표본별 증상에 따라 DNCB 용액을 0.1%~1%로 농도를 조절하며 200 µl씩 경피 도포 하였다.

모든 케이지의 바닥에 6개의 PEMF 발생 코어를 곁고루 위치시킨 뒤, 실험군은 1주일간 총 8시간씩 매일 자극하고 대조군은 자극을 조사하지 않았다. 개선 정도의 영상 분석을 위해서 광학적 흔들림 보정장치(Optical Image Stabilizer, OIS) 기술이 탑재된 모듈에 RS IMX345 센서의 1,200만 화소 렌즈를 78도 화각으로 설정된 카메라와 OIS 기술이 적용된 모듈에 DRAM이 내장된 SAK2L4 센서의 1,200만 화소 렌즈를 77도 화각으로 설정된 카메라로 영상 촬영을 하였다. 모든 실험방법 및 실험과정은 연세대학교 동물실험 윤리위원회(IACUC, Yonsei Univ)의 승인(YWCI-202002-003-01)을 받은 후 진행하였다. 그림 1에 전체 실험의 모식도를 제공하였다.

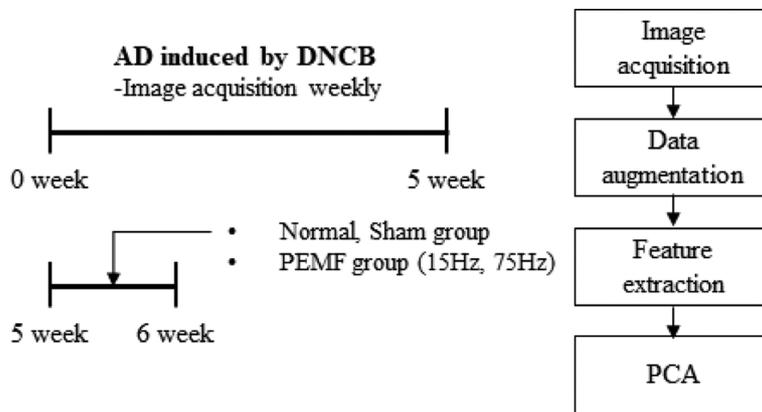


그림 1. 본 실험의 모식도
Fig. 1. Experimental design diagram

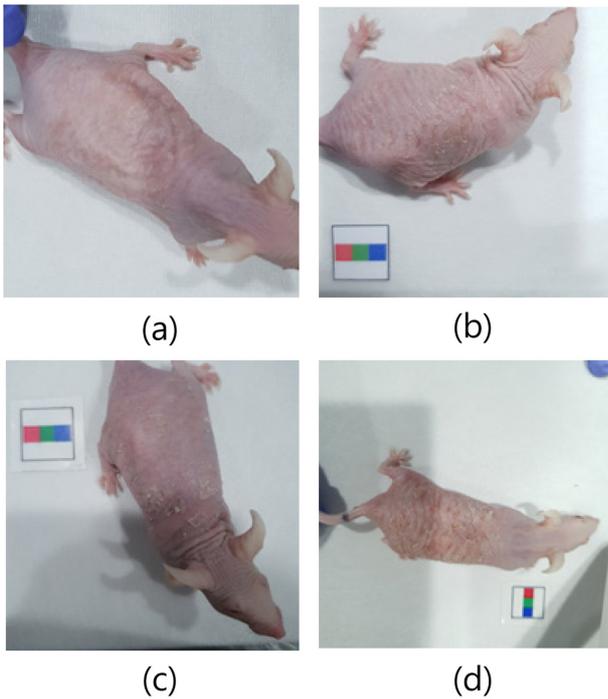


그림 2. DNCB로 유발된 아토피성 피부염 반응 실험 시 촬영된 영상, (a)-(d) SAK2L4 센서 카메라로 촬영된 1, 3, 4, 5주차 영상
 Fig. 2. Images of DNCB-induced atopic dermatitis response experiment, (a)-(d) Week 1, 3, 4, 5 images taken with SAK2L4 sensor camera

본 연구에서 2주차, 6주차 영상은 RS IMX345 센서 카메라로, 1, 3, 4, 5주차 영상은 SAK2L4 센서 카메라로 촬영되었다. 각 주차 별 촬영된 무모생쥐 영상에서 2, 6주차 영상의 경우 푸른 빛이 도는 것을 발견하였고, 이는 영상 분석 시 문제점이 될 수 있으므로 아토피의 진행 정도를 확인할 시에는 제외하였다.

PCA는 데이터의 주성분 벡터를 찾아 데이터 차원을 축소하는 기법이다[16]. 아토피성 피부염의 발생 시 피부의 색이 변화한다는 점에서 착안하여 촬영된 영상의 R 성분, G 성분, B 성분 채널별 평균치를 이용해 PCA 분석을 진행하였다. 3개의 특성이 있으므로 2차원으로 차원 축소하여 판단하였다.

데이터의 양을 늘리기 위해 3024×3024 화소 크기의 영상을 256×256 화소 크기로 자른 후 아토피성 피부염 영역이 보이는 영역을 선택하여 총 579장의 데이터를 생성하였다.

III. 결과 및 고찰

먼저 정상군 영상과 아토피군(대조군, PEMF 15 Hz 실험군, PEMF 75 Hz 실험군) 영상의 비교 분석을 하였다. RS IMX345 센서 카메라로 촬영한 2주차와 6주차 영상은 제

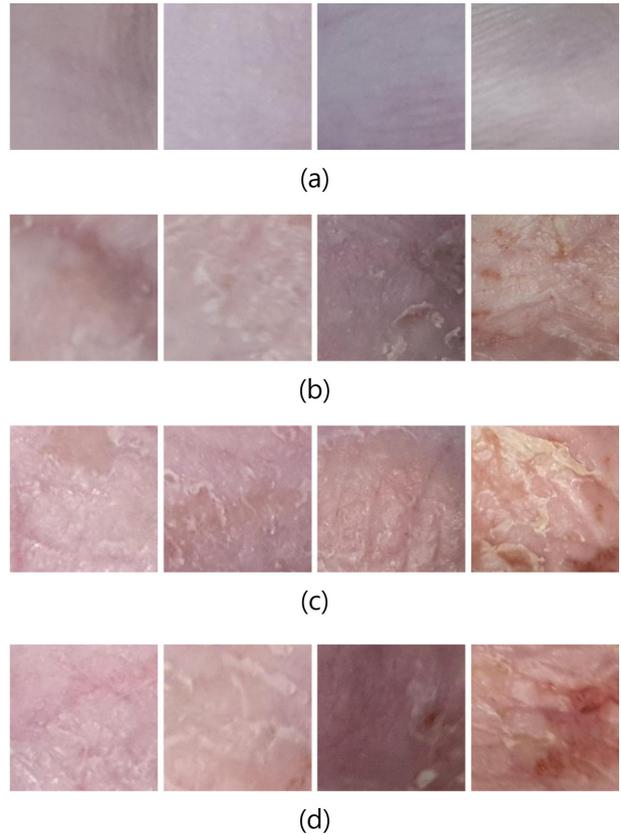


그림 3. PCA 데이터로 사용된 1, 3, 4, 5주차 아토피성 피부염 영상, (a) 정상군, (b) PEMF 15 Hz 실험군, (c) PEMF 75 Hz 실험군, (d) 대조군
 Fig. 3. Week 1, 3, 4, 5 atopic dermatitis image data used for PCA, (a) Normal group, (b) PEMF 15Hz group, (c) PEMF 75 Hz group, (d) Sham group

외하고 SAK2L4 센서 카메라로 촬영된 1, 3, 4, 5주차 영상 데이터만 사용하여 PCA 분석을 진행하였다. 원본 데이터에 대한 두 주성분의 설명력은 각각 95.4%, 4.3%이며 첫 번째 주성분의 영향력이 높은 것을 확인하였다. 각 변인들과 두 주성분과의 상관관계를 파악한 결과 첫 번째 주성분에서는 R, G, B 성분에 대하여 각각 -0.57, -0.59, -0.57이었고 두 번째 주성분에서는 각각 0.75, -0.09, -0.65로 나타났다. 첫 번째 주성분에서는 세 가지 변인에 대해 모두 비슷한 정도의 상관관계를 보였는데 이는 아토피성 피부염으로 인해 각질이 도드라지는 등 피부가 변화하면서 색이 변화한다는 특성으로 인한 결과로 보인다. 두 번째 주성분에서 가장 높은 상관관계를 보인 R성분의 경우 아토피성 피부염으로 인해 발생한 염증반응으로 피부가 붉어짐으로써 나타난 영향일 가능성이 높다.

그림 4를 통하여 1주차에서 5주차로 갈수록 경향성을 보이면서 정상군과 관계성이 멀어지는 것을 확인할 수 있다. 1주차와 3주차를 중증도(moderate) 아토피군이라고 하고 4

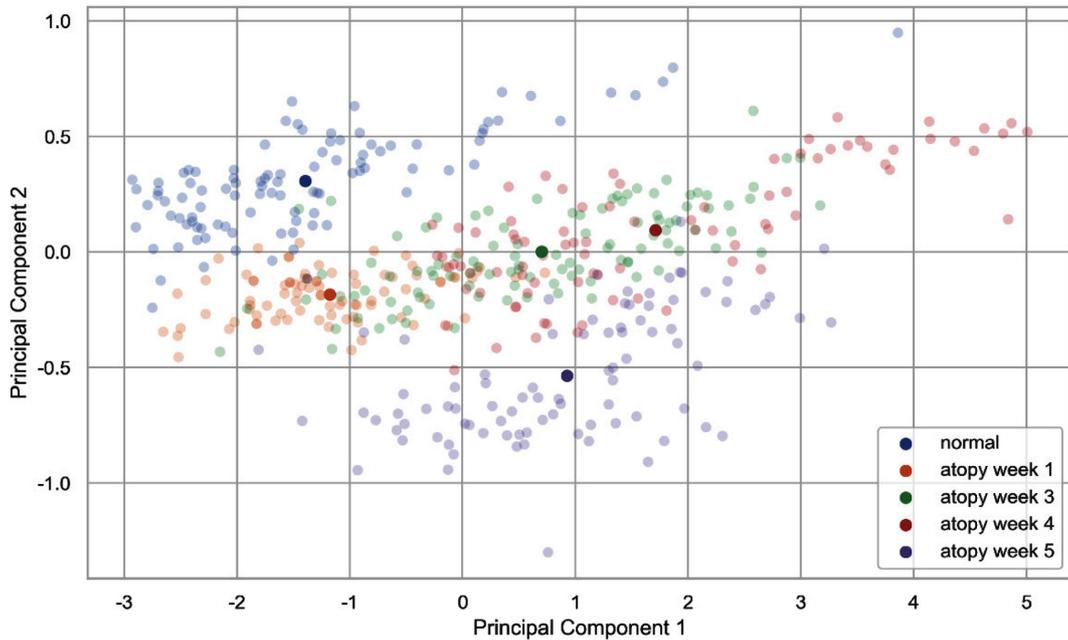


그림 4. SAK2L4 센서 카메라로 촬영된 데이터에 대한 주차 별 PCA와 평균값
 Fig. 4. PCA of data taken with SAK2L4 sensor camera, labeled by weeks

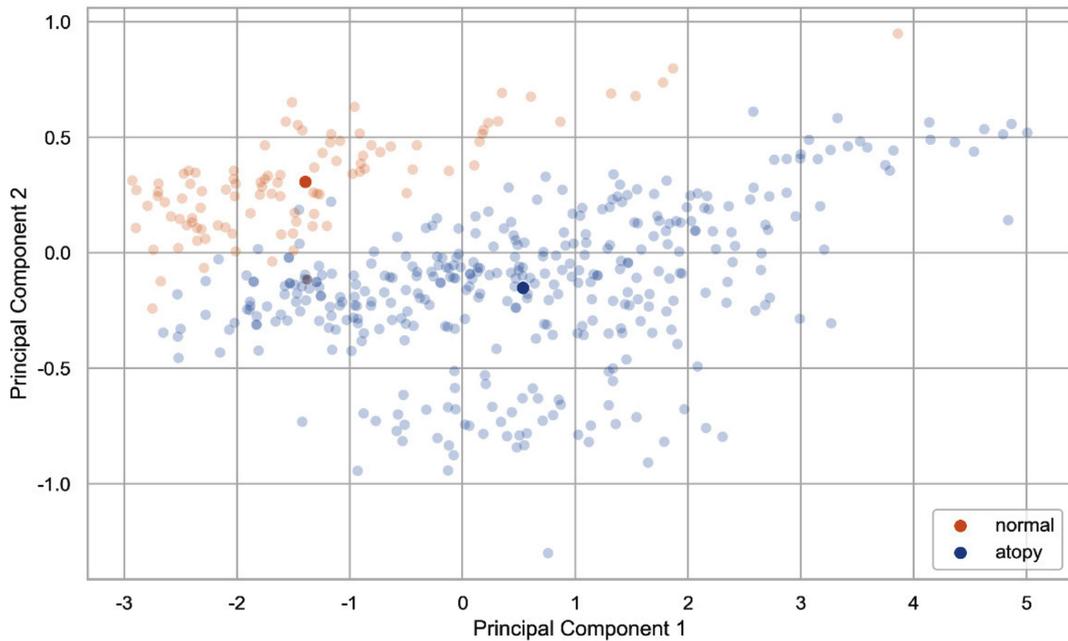
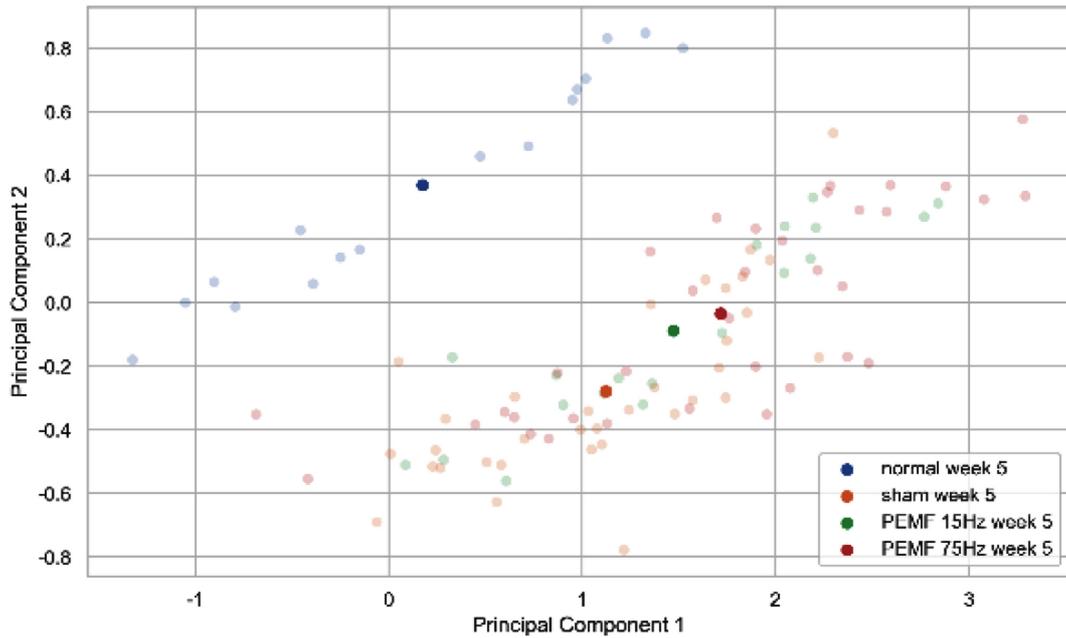


그림 5. SAK2L4 센서 카메라로 촬영된 데이터에 대한 아토피군과 정상군 PCA와 평균값
 Fig. 5. PCA of data taken with SAK2L4 sensor camera, labeled by AD group or normal group

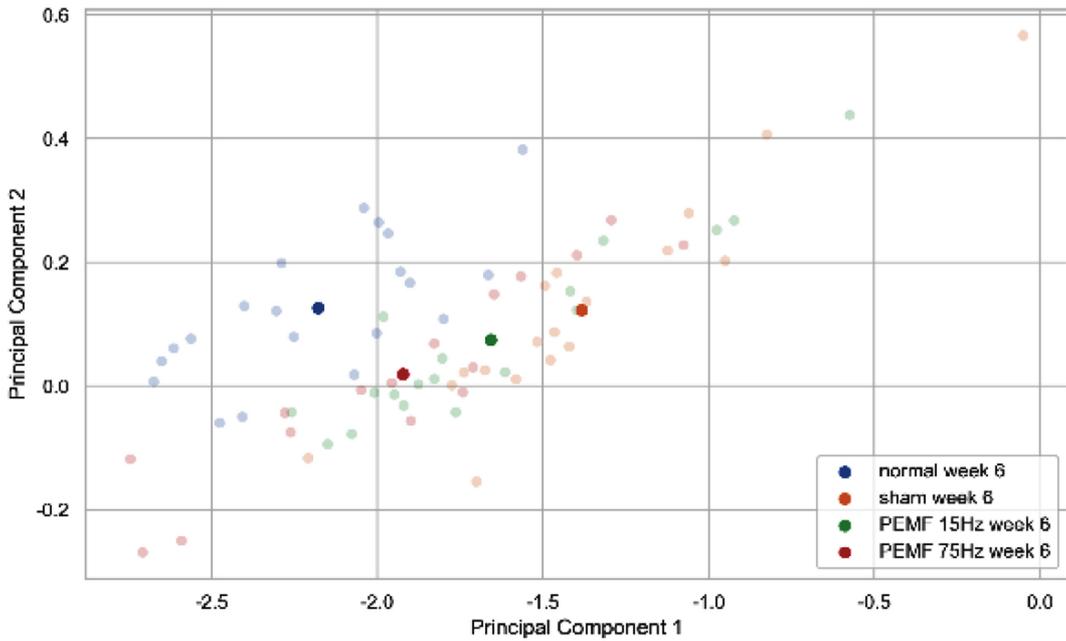
주차와 5주차를 중증(severe) 아토피군이라고 했을 때 중증도 아토피군의 평균값과 정상군의 평균값 사이의 기하학적 거리는 1.22이며 중증 아토피군의 평균값과 정상군의 평균값 사이의 기하학적 거리는 2.76이다. 즉, 주차를 거듭할수록 아토피의 발현 정도가 악화되는 것을 볼 수 있다. 또한 그림 5에서 위 데이터를 아토피군과 정상군으로만 나누었을

때 두 그룹 간의 차이가 가시적으로 나타났다.

다음은 5주차, 6주차 총 175장의 데이터를 얻어 진행하였다. 5주차의 경우 아토피가 가장 심하게 발현되었으며 6주차 영상의 경우 PEMF를 조사하여 아토피 치료가 되었으므로 이 두 데이터의 비교를 통해 아토피 치료 정도를 분석하였다.



(a)



(b)

그림 6. 5주차, 6주차 데이터를 이용한 아토피 치료 정도 PCA 결과와 평균값 비교, (a) 5주차 데이터와 각 그룹의 평균값, (b) 6주차 데이터와 각 그룹의 평균값

Fig. 6. PCA of progress of AD using week 5 and week 6 data, (a) week 5 data, (b) week 6 data

그림 6(a)에서 5주차 정상군을 제외한 나머지 그룹의 경우 정상군과 동떨어진 아토피성 피부염의 특성을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다. 그림 6(b)의 6주차 데이터에서는 75 Hz PEMF 실험군, 15 Hz PEMF 실험군, 대조군 순으로 정상군 그룹에 가까워진 것을 확인할 수 있었다. 이는 아토피성 피부

염이 완화되어 정상군의 특성을 보이는 것으로, 상기 순서대로 치료가 더 진행되었다고 판단할 수 있다.

DNCB 용액을 이용하여 지속적으로 아토피성 피부염을 발현시킬 경우 시간이 지날수록 피부염 정도가 악화되는 것을 PCA 분석을 통해 확인할 수 있다. 또한 이후 PEMF를 이

용하여 아토피성 피부염 치료를 진행할 경우 단기간 내에 피부염 정도가 개선되어 피부염을 발현시키지 않은 정상군의 무모생쥐와 밀접한 관계성을 가지는 것을 확인할 수 있다.

IV. 결 론

본 연구는 무모생쥐의 DNCB 반응으로 유발된 아토피성 피부염 모델에서 PEMF로 인한 피부염 치료 효과에 대해 진행하였다. 자기장을 통하여 약물 사용 없이 효과적인 피부염의 개선을 확인하였으며, 이는 피부 상처에서 알려진 조직 재생과 항염증 효과가 아토피성 피부염 모델에도 작용하였을 것으로 생각된다.

본 연구는 영상의 RGB 특성에 대하여 PCA 분석을 진행하여 아토피군과 정상군에 대한 관계성을 볼 수 있었다. 특히 R성분이 두 번째 주성분과 높은 상관관계를 보였는데 이는 아토피성 피부염의 증상 중 하나인 염증반응의 영향일 가능성이 높았다. 또한 PEMF를 이용하여 치료를 진행한 6주차 데이터와 5주차 데이터의 PCA 분석을 통해 아토피성 피부염의 효과 정도를 가지적으로 확인할 수 있었다.

기존에 쥐를 이용한 아토피성 피부염 모델에서는 피부 조직 검사, 면역조직화학 염색, 실시간 PCR 등을 사용하여 증상 개선을 확인하는 경우가 많았다[10]. 본 연구는 영상을 통한 비침습적 평가로 아토피성 피부염의 개선을 확인할 수 있다는 점 또한 의미가 있겠다. 하지만 촬영 장비가 다를 시에는 영상의 색이 달라져 같은 선상에서 비교할 수 없다는 점에서 한계가 있었다. 추후 연구에서 색의 항상성을 높일 수 있는 색 정규화 기법을 적용하여 성능을 높이고자 한다. 아토피성 피부염의 영상 특징을 단순히 분산을 극대화하는 PCA가 아닌 매니폴드 학습을 통해 차원 축소의 성능을 높이는 방법도 고려할 수 있다.

영상 분석법 외에도 추후 PEMF 파라미터를 다양화함으로써 아토피성 피부염의 치료를 더욱 효과적으로 할 수 있는 방법을 개발하고자 한다. PEMF의 각 파라미터가 조직에 미치는 영향을 평가하는 한 방법으로써 영상 분석을 사용하고, 침습적 평가와 비교하여 영상 분석법이 효과적인지 평가할 필요가 있다. 아토피성 피부염의 더 많은 데이터 수집과 추가 연구를 통해 더욱 정확한 분석 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

References

- [1] Leung DY. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000;105(5):860-876.
- [2] Zeiger RS, Heller S. The development and prediction of atopy in high-risk children: follow-up at age seven years in a prospective randomized study of combined maternal and infant food allergen avoidance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1995;95(6):1179-1190.
- [3] Gupta RS, Springston EE, Warriar MR, Smith B, Kumar R, Pongracic J, Holl JL. The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics*. 2011;128(1):e9-e17.
- [4] Flöistrup H, Swartz J, Bergström A, Alm JS, Scheynius A, Van Hage M, Waser M, Braun-Fahrlander C, Schram-Bijkerk D, Huber M. Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;117(1):59-66.
- [5] Van Cauwenberge P, Bachert C, Passalacqua G, Bousquet J, Canonica G, Durham S, Fokkens W, Howarth P, Lund V, Malling HJ. Consensus statement* on the treatment of allergic rhinitis. *Allergy*. 2000;55(2):116-134.
- [6] Milgrom H, Fick Jr RB, Su JQ, Reimann JD, Bush RK, Watrous ML, Metzger WJ. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(26):1966-1973.
- [7] Watson WT, Becker AB, Simons FER. Treatment of allergic rhinitis with intranasal corticosteroids in patients with mild asthma: effect on lower airway responsiveness. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1993;91(1):97-101.
- [8] Callaghan MJ, Chang EI, Seiser N, Aarabi S, Ghali S, Kinucan ER, Simon BJ, Gurtner GC. Pulsed electromagnetic fields accelerate normal and diabetic wound healing by increasing endogenous FGF-2 release. *Plastic and reconstructive surgery*. 2008;121(1):130-141.
- [9] Choi HM, Cheing AK, Ng GY, Cheing GL. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) on the tensile biomechanical properties of diabetic wounds at different phases of healing. *PloS one*. 2018;13(1):e0191074.
- [10] Lee Y, Choi HK, N'deh KPU, Choi Y-J, Fan M, Kim E-K, Chung K-H, An JH. Inhibitory effect of *Centella asiatica* extract on DNCB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and BALB/c mice. *Nutrients*. 2020;12(2):411.
- [11] Bassett CaL, Mitchell SN, Gaston SR. Pulsing electromagnetic field treatment in ununited fractures and failed arthrodeses. *Jama*. 1982;247(5):623-628.
- [12] Gossling HR, Bernstein RA, Abbott J. Treatment of ununited tibial fractures: a comparison of surgery and pulsed electromagnetic fields (PEMF). *Orthopedics*. 1992;15(6):711-719.
- [13] Bassett CaL. Fundamental and practical aspects of therapeutic uses of pulsed electromagnetic fields (PEMFs). *Crit Rev Biomed Eng*. 1989;17(5):451-529.
- [14] Uehara M, Sawai T. A longitudinal study of contact sensitivity in patients with atopic dermatitis. *Archives of dermatology*. 1989;125(3):366-368.
- [15] Matsumoto K, Mizukoshi K, Oyobikawa M, Ohshima H, Tagami H. Establishment of an atopic dermatitis-like skin model in a hairless mouse by repeated elicitation of contact hypersensitivity that enables to conduct functional analyses of the stratum corneum with various non-invasive biophysical instruments. *Skin Research and Technology*. 2004;10(2):122-129.
- [16] Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal component analysis. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*. 1987;2(1-3):37-52.