

ORIGINAL ARTICLE

DNCB로 유도한 아토피 유사 피부염에 지모 추출물이 미치는 영향

장유미^{1),2)} · 김용웅³⁾ · 김미려⁴⁾ · 임혜선¹⁾ · 박건혁^{1), 5)*}

¹⁾한국한의학연구원 한약자원연구센터, ²⁾대구한의대학교 한의학과, ³⁾대구한의대학교 제약공학과, ⁴⁾대구한의대학교 한의예과, ⁵⁾과학기술연합대학원대학교(UST) 한의융합의학전공

Effects of *Anemarrhena asphodeloides* Extract on Atopic-Dermatitis like Skin Lesions in DNCB-induced Balb/c Mice

Yumi Jang^{1),2)}, Yong-Ung Kim³⁾, Mi Ryeo Kim⁴⁾, Hye-Sun Lim¹⁾, Gunhyuk Park^{1)*}

¹⁾Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Naju 58245, Korea

²⁾College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Korea

³⁾Department of Pharmaceutical Engineering, College of Biomedical Science, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Korea

⁴⁾Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Korea

⁵⁾University of Science & Technology (UST), Korean Convergence Medicine Major, Campus of Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 34113, Korea

Abstract

Under constant environmental pollution, the incidence of Atopic Dermatitis (AD) caused by air pollutants and allergens has increased. AD is an allergy inflammatory skin disease characterized by pruritus, eczema, and skin dryness. In herbal medicine, *Anemarrhena asphodeloides* (*Anemarrhena* Rhizoma; AR) has been utilized to treat Alzheimer's disease, osteoporosis, hypertension, and inflammation. The purpose of study evaluated the effect of AR in a mouse model of 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)-induced AD-like skin lesions. After acclimatization for 5 days, the mice (6-week-old, male Balb/c) were divided into five groups (n=6/group): NC (normal control), DNCB (control), Dex (5 mg·kg⁻¹, p.o.), AR100 (100 mg·kg⁻¹, p.o.), and AR300 (300 mg·kg⁻¹, p.o.). On days 1 and 3, 1% DNCB was applied to the skin and ears. After 4 days, 0.5% DNCB was applied once every 2 days for 2 weeks. Then, skin and ears eczema area and severity index (EASI); skin nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), and prostaglandin E2 (PGE2) levels; and plasma immunoglobulin E (IgE) levels were examined. The AR groups showed lower EASI, skin and ear thickness, mast cell count, and IgE levels than the control groups. Moreover, AR reduced iNOS, COX-2, and PGE2 levels. Therefore, AR possesses anti-inflammatory properties and can improve skin damage, indicating its therapeutic potential against AD.

Key words : Atopic dermatitis, *Anemarrhena asphodeloides*, DNCB, Balb/c mice

1. 서론

농촌의 산업화, 도시화가 진행됨에 따라 환경오염의

가속화로 폼알데하이드(CH₂O), 황화수소(H₂S), 이산화질소(NO₂) 등의 대기오염물질이 증가하고 있으며, 이는 알레르기성 질환의 원인 물질로 작용한다. 인체는

Received 21 December, 2022; Revised 5 January, 2023;

Accepted 10 January, 2023

*Corresponding author : Gunhyuk Park, Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Naju 58245, Korea

Phone : +82-61-338-7112

E-mail : parkgunhyuk@gmail.com

© The Korean Environmental Sciences Society. 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.

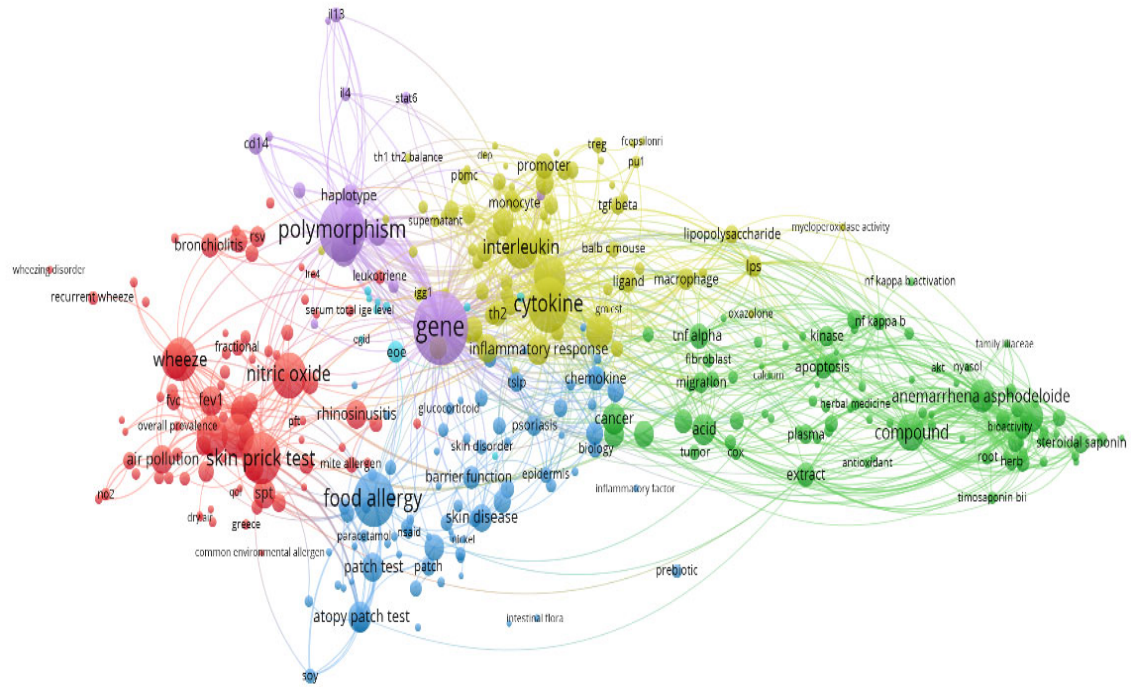


Fig. 1. Correlation Graph of atopy and *Anemarrhenae Rhizoma*.

The articles were searched keywords such as atopy, *Anemarrhenae Rhizoma*, *Anemarrhena Asphodeloides* and the correlation between AD and AR was analyzed using VOSviewer.

이런 원인 물질이 피부에 1차 접촉은 면역반응을 통해 보호 메커니즘으로 작용하지만, 지속적인 면역반응은 염증, 부종 등에 의해 피부 장벽 손상이 야기시켜 아토피 피부염과 같은 염증성 피부질환의 발병 혹은 악화시키기도 한다(Lee et al., 2011).

아토피 피부염(Atopic Dermatitis, AD)은 재발성의 알레르기성 피부 염증 질환으로 소양감, 습진, 홍반, 피부 건조, 각질, 인설 등의 증상이 있으며, 어린이의 15~20% 어른의 7~10%에게 발병되는 세계적으로 흔한 질환 중 하나이다(Lee et al., 2020). AD의 원인은 명확하게 밝혀지진 않았으나 환경적, 유전적 그리고 면역학적 3가지 요인 중 2가지 이상이 복합적으로 작용하여 발병한다고 알려져 있다(Lee et al., 2020). 또한, AD는 IgE, 비만 세포, 히스타민, 케모카인 및 IL-4, IL-5, TNF- α 와 같은 사이토카인 등과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며, 수분량 감소, 피부 표면 pH 증가, 급격한 각질층 탈락 등과 같은 피부 장벽 변

화에 영향을 받기도 한다(Puar et al., 2021).

한의학에서 AD는 풍열(風熱, wind-heat), 습열(濕熱, dampness-heat), 열독(熱毒, heat toxin), 혈열(血熱, blood heat), 비허습성(脾虛濕盛, spleen deficiency and dampness), 음허(陰虛, yin deficiency)를 원인으로 보고 있으며, 내선(奶癬, infantile eczema), 태열(胎熱, fetal heat), 태선(胎癬, lichen), 습진(濕疹, eczema), 습창(濕瘡, legs eczema), 사만풍(四彎風, four bended wind) 등의 범주에서 속한다고 한다(Kim et al., 2009). 한의학에서의 AD의 범주인 태열은 피부 내 열(熱, heat)이 축적되어 열(熱, heat)과 화(火, fire)의 교란이 일어나 면역학적 변화로 인해 혈류의 흐름 증가 및 여러 염증 세포 이주 촉진으로 발생한 과도한 면역 반응이 열성 증상으로 발병된 것으로 사료된다(Aum et al., 2016).

지모(학명: *Anemarrhena asphodeloides*, 생약명: *Anemarrhenae Rhizoma*; AR)는 백합과에 속하

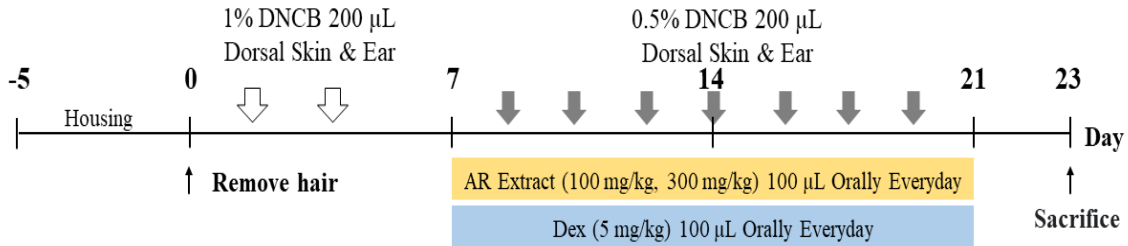


Fig. 2. Treatment of Anemarrhenae Rhizoma and Dexamethasone in DNCB-induced Balb/c mice.

For sensitization, 200 μ L of 1% DNCB solution was applied to dorsal skin and ears of mice on days 1 and 3. After 4 days, 200 μ L application of 0.5% DNCB solution was challenged once per 2 days and 100 μ L of AR extract (100 and 300 mg/kg) and Dexamethasone (5mg/kg) was orally treated everyday for 2 weeks.

는 다년생 초본 식물로 한국, 중국 일본에서 뿌리줄기 부위가 약재로 쓰여 왔으며, 주성분은 steroidal saponins, flavonoids, lignans, polysaccharides로 구성되어 있다(Wang et al., 2014; Ji et al., 2019). 『동의보감』탕액편 초부에 따르면, 지모는 성질이 차갑고 평하며 독이 없고 맛은 쓰며 음기(陰氣, yin qi)를 보하고 심과 폐를 적셔 기운을 내려 신과 위의 열을 낮춰 열학을 치료하고 기침, 갈증, 가래를 없애는데 사용된다고 서술되어 있다(Heo., 2009). 이외에도 『금유방』에서는 심장과 폐장을 촉촉하게 만들어 비기를 길러주고 골증열, 기침과 변갈을 치료한다고 서술되어있다. 현재까지 보고된 연구에 따르면, 항산화 작용, 항균 작용, 항염 작용 등이 있으며, 수면 장애, 알츠하이머병, 당뇨, 암, 기관지천식 등을 치료한다고 보고 되어있다(Wang et al., 2014). 특히 AR은 LPS로 자극한 마크로파지 세포의 TLRs 신호전달경로 활성화가 억제되어 IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 등 다양한 사이토카인의 발현을 감소시키며 p38, I κ B α 신호전달경로 활성화가 억제되어 사이토카인의 활성이 감소된다고 발표되었다(Chai et al., 2013; Ji et al., 2019).

그러나 현재까지는 마크로파지에서의 항염증 작용에 관한 연구만 되어 있을 뿐, 아토피피부염과 같은 염증성 피부질환의 예방, 완화 및 염증 매개체의 조절에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구는 DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene)로 유도한 동물 모델에서 아토피 피부염 유사 피부 병인에 대한 AR의 유효성을 검증함으로써 염증 억제 기전을 밝히는데 목적을 두었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene), olive oil, acetone, Phosphate Buffer Saline (PBS), protease inhibitor cocktail, tween 20, dexamethasone (Dex) 등은 Sigma Aldrich사(St.Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 또한, AR이 실험동물의 혈청 내 IgE의 변화를 미치는 영향을 확인하기 위해 BioLegend사의 IgE ELISA kit (432401)를 구입하였고 AR이 피부 내 염증성 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인하고자 Abcam사(Cambridge, UK)의 Mouse iNOS ELISA Kit (ab253219)와 Mouse COX2 ELISA Kit (ab210574)를 구입하였다. Mouse PGE2 / Prostaglandin E2 (Competitive EIA) ELISA Kit (LS-F28519)는 LSBio사(Seattle, USA)에서 구입하였다. 그리고 지모 추출물은 한국한의학연구원 한약표준자원은행에서 공급받았으며(KIOM-3-20-0058), 추출물은 지모 1kg에 10배의 증류수를 넣고 3시간 환류 추출(수득률; 37.92%)하였다.

2.2. 동물 모델

6주령 수컷 Balb/c 마우스 (19-21 g)을 두얼바이오텍(seoul, Korea)을 통해 공급받았으며, 온도, 습도, 명암 주기는 자동으로 조절되도록 하였고 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 실험은 한국한의학연구원 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(승인 번호: 21-099). 본 실험에서 아토피 피부염 유발은 기존의 실험 방법을 약간 변형하여 진행하였으며 아토피

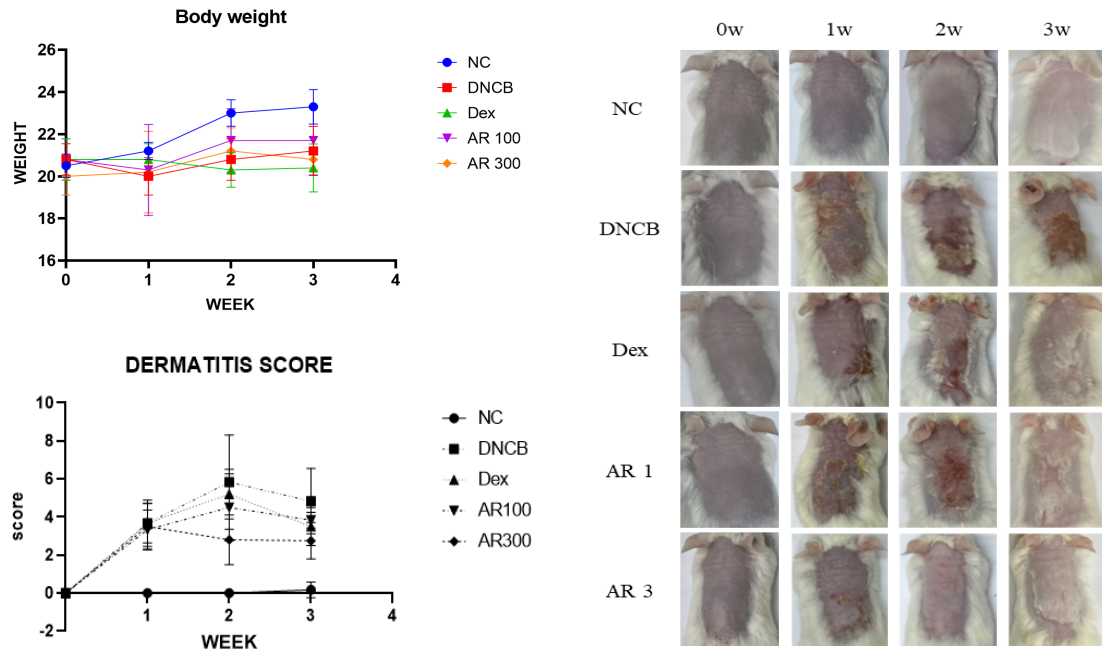


Fig. 3. Effects of AR on the development of AD, which was induced using a DNCB solution in Balb/c Mice.

The DNCB solution was administered to Balb /c mice to establish an atopic dermatitis animal model. The mice were divided into 5 groups as NC group (vehicle treated mice distilled water), DNCB group (DNCB plus vehicle treated mice), Dex group (DNCB plus Dexamethasone treated mice, 5 mg/kg), AR100 group (DNCB plus AR extract treated mice, 100 mg/kg) and AR300 group (DNCB plus AR extract treated mice, 300 mg/kg).

유발 시약인 DNCB를 1%와 0.5%의 농도로 용매 (acetone : olive oil = 3 : 1)에 녹여 사용하였다(Choi et al., 2018; Lee et al., 2020). 5일 동안의 안정화 기간 후 마우스 등의 털을 제모하고 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치 후 1% DNCB 200 μ L를 도포한 다음, 2일 후 1번 더 도포하였다. 4일 경과 후 0.5% DNCB 200 μ L를 2일에 한번 씩 2주 동안 도포하였다. Dex군과 AR군은 식염수에 용해한 Dex 5 mg/kg, AR 100 또는 300 mg/kg 농도로 2주 동안 매일 경구 투여하였다. 23일째 되는 날에 alfaxan과 rompun 혼합 용액을 200 μ L씩 투여해 마취시킨 뒤 마우스를 희생시켰다. 실험 전과정 상의 방법과 절차를 도식화하면 Fig. 2와 같다.

2.3. 아토피 피부염 중증도 평가 및 조직면역학적 분석

AR의 DNCB로 유도한 AD 동물 모델의 피부와 귀에 미치는 영향을 확인하기 위해 제모한 날의 기준으로 매

주 피부 사진을 촬영하였으며 EASI (Eczema Area and Severity Index)로 피부의 변화를 측정하였다(Park et al., 2020). 중증도 정도는 가려움(pruritus/itching), 홍반/혈종(erythema/hemorrhage), 부종(edema), 찰상/미란(excoriation/erosion), 각질/건조(scaling/dryness) 정도에 따라 0(없음), 1(경미), 2(보통), 3(심각)으로 구분하여 각 점수의 합으로 평가하였다. 피부와 귀 조직은 4% paraformaldehyde로 24시간 상온에서 고정 후 4 μ m로 절단하였다. 조직은 H&E (hematoxylin & eosin) 용액 또는 toluidine blue 용액으로 염색 후 fluorescence microscope (Olympus microscope system BX53; Olympus, Tokyo, Japan)를 사용해 무작위로 4곳을 촬영하였으며 Image J software (Bethesda, MD, USA)를 활용하여 피부, 귀 두께 측정, mast cells의 수를 측정하였다.

2.4. 혈청 내 IgE 발현량 측정

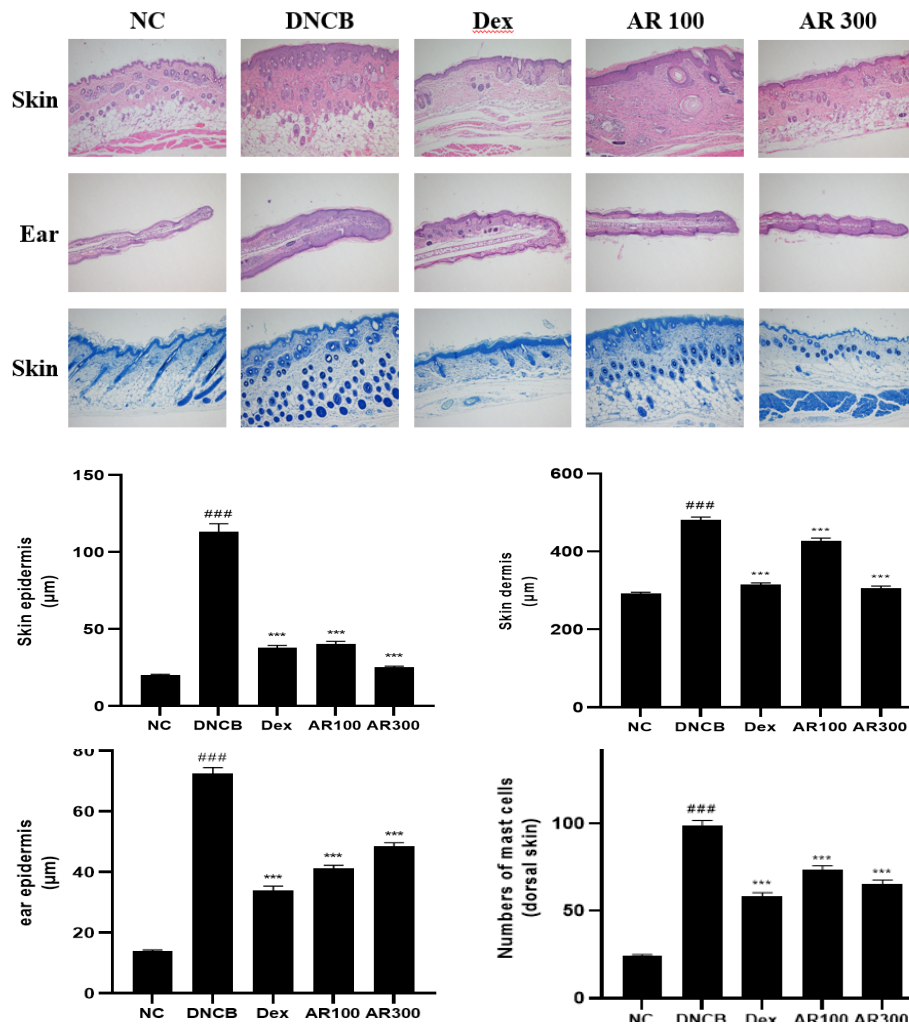


Fig. 4. Histopathological feature of DNCB-induced AD Balb/c mice.

The skin and ear tissue were fixed in 4% paraformaldehyde for 24h at room temperature and cut into 4μm thickness. The histological features of the skin and ear were stained with H&E (hematoxylin & eosin) and Toluidine blue to estimate epidermal inflammation and mast cell infiltration. ^{###}p < 0.0001 compared with the control group; ^{***}p < 0.0001 compared with the DNCB-treated group.

마우스로부터 얻은 피는 4℃에서 10분 동안 10,000 xg로 원심 분리하여 실험에 사용하기 전까지 획득한 혈청을 -80℃에서 보관하였다. 혈청에 IgE 정도는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Cat. # 432404)를 활용하여 매뉴얼에 따라 측정하였다. ELSIA 실시 전날 Coating buffer에 antibody를 1:200으로 희석해 96 well plate에 100 μL씩 담고 밀

봉 후 밤새 4℃에서 배양하였으며 Wash buffer를 이용해 4회 세척하였다. Assay diluent A를 200 μL씩 담고 상온에서 1시간 Blocking하였고 4회 Wash buffer로 세척하였으며 Assay diluent A에 표준 용액과 샘플을 1:100으로 희석 후 100 μL씩 담고 밀봉 후 2시간 동안 상온에서 배양해주었다. Wash buffer로 4회 세척하였고 Assay diluent A에 Detection antibody를 1:200

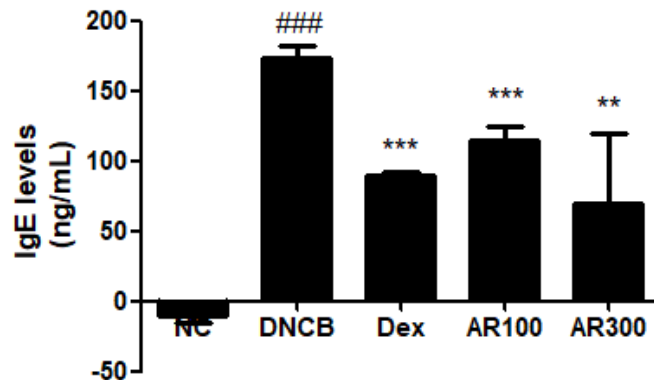


Fig. 5. IgE levels in plasma of DNCB-induced AD Balb/c mice.

The IgE levels was measured in plasma samples from NC group (normal control, vehicle-treated mice; distilled water), DNCB group (DNCB plus vehicle-treated mice), Dex group (DNCB plus Dexamethasone-treated mice, 5 mg/kg), AR100 group (DNCB plus AR extract-treated mice, 100 mg/kg) and AR300 group (DNCB plus AR extract-treated mice, 300 mg/kg). The IgE levels in plasma was analyzed using ELISA kit and ### $p < 0.0001$ compared with the control group; ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$ compared with the DNCB-treated group.

으로 희석 후 1시간동안 상온에서 반응시켰으며 Wash buffer로 4회 세척하였다. Avidin-HRP 용액을 Assay diluent A에 1:1,000으로 희석하여 30분동안 반응시켰고 5번 Wash buffer로 세척하였다. TMB Substrate 용액을 담고 빛 차단 후 20분 동안 배양하였고 Stop solution을 넣어 반응시킨 뒤 spectrophotometer (Versamax microplate reader, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 피부 조직 내 iNOS, COX-2, PGE2 발현량 측정

피부 조직 0.2 mg을 Lysis buffer 200 μ L를 사용하여 단백질을 획득했으며 mouse iNOS ELISA Kit (Cat. # ab253219), mouse COX-2 ELISA Kit (Cat. # ab210574), mouse PGE2 / Prostaglandin E2 ELISA Kit (Cat. # LS-F28519-GOS14)를 활용하여 매뉴얼에 따라 피부 내 iNOS, COX-2, PGE2의 발현량을 측정하였다. 96 well plate에 50 μ L씩 샘플과 표준 용액을 넣고 각 well에 50 μ L씩 Antibody cocktail을 넣고 밀봉 한 뒤 상온에서 1시간 흔들며 배양하였다. Wash buffer로 3회 세척하였고 TMB development solution을 100 μ L씩 담고 빛 차단 후 10분 동안 반응시켰으며 Stop solution을 100 μ L씩 넣어 반응시킨 뒤 spectrophotometer (Versamax microplate reader,

Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. 통계처리

p모든 측정값은 mean \pm S.E.M (standard error mean)으로 표시하였다. Dermatitis score 결과는 Mann-Whitney's U test를 이용하여 분석하고 실험 결과의 유의성 검정은 ANOVA (One way analysis of variance)로 검증하였으며 사후검정은 Dunnett's test를 이용하여 평균값의 유의성을 5% 미만 한계로 조사하였다. 통계처리는 Graphpad Prism 9.0 (San Diego, CA) 프로그램을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 실험동물의 체중 변화 및 피부 변화

아토피 유사 피부염 연구에서 자주 사용되는 피부 자극 물질인 DNCB를 도포하여 AD를 유발하였으며, AR이 실험동물에 독성 여부에 대한 확인을 위해 체중 변화를 측정된 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. AR 추출물과 dex을 투여 전인 1주차(Day 7)에는 NC군만 체중이 증가하였고 DNCB 처리한 나머지 군들은 체중이 일정하거나 감소한 것이 확인되었다. 하지만 2주차(Day 14)이후 NC군을 제외한 군의 체중이 유사하였으며 이는 통계적

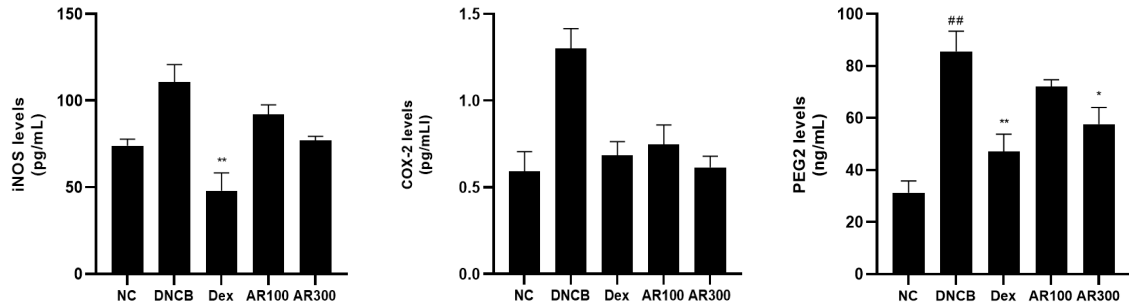


Fig. 6. iNOS, COX-2, PGE2 levels in skin of DNCB-induced AD Balb/c mice.

The iNOS, COX-2, PGE2 levels was measured in skin tissue samples from NC group (normal control, vehicle-treated mice; distilled water), DNCB group (DNCB plus vehicle-treated mice), Dex group (DNCB plus examethsone-treated mice, 5 mg/kg), AR100 group (DNCB plus AR extract-treated mice, 100 mg/kg) and AR300 group (DNCB plus AR extract-treated mice, 300 mg/kg). The iNOS, COX-2, PGE2 levels in skin was analyzed using ELISA kit and ##p < 0.001 compared with the control group; *p < 0.01 and **p < 0.001 compared with the DNCB-treated group.

으로 유의하게 체중 변화가 없었음이 확인되었다. 일반적으로 약물 주입 시 독성을 보이는 경우 실험동물의 체중에 영향을 미치며, 이를 통해 1차적 약물 독성 여부를 확인할 수 있다고 알려져 있다(Park et al., 2020). 본 연구를 통해 확인한 결과 AR은 체중이 변화를 보이지 않았으므로 독성을 보이지 않음으로 판단된다.

임상에서 AD 중증도 확인 시 주로 EASI 평가법을 사용하고 있으며, 비임상연구에서도 이를 활용하여 AD의 정도를 파악한다고 보고되어 있다(Lim et al., 2014). 따라서 우리는 각 실험군의 사진을 EASI 평가법으로 분석하였으며, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 DNCB 2회 처리한 DNCB군(3.67±0.49점) Dex군(3.67±0.42점), AR100군(3.33±0.42점), AR300군(3.50±0.50점)은 1주차에는 모두 증가한 것을 확인하였다. 약물 투여 7일차인 2주차에는 DNCB군(5.83±1.01점)에 비해 AR100군(4.50±0.72점)과 AR300군(2.80±0.58점)은 감소하였으나 Dex군(5.20±0.58점)은 DNCB군과 유사하게 거의 감소하지 않았다. 약물 투여 14일차인 3주차에는 DNCB군(4.83±0.70점)이 2주차에 비해 감소했으며 Dex군(3.50±0.45점), AR100군(3.83±0.17점), AR300군(2.75±0.48점) 모두 DNCB군에 비해 감소하였다. DNCB는 수지상 세포, T세포, B세포와 같은 면역세포를 자극해 염증성 사이토카인(인터루킨, 인터페론, TNF- α)을 과생산하여 면역 조절 장애를 일으키며, 이를 통해 피부장벽손상 등을 일으킨다고 알려져 있다(Milam et al., 2019). 따라서, AR투여군에서의

EASI score의 감소는 피부 장벽 손상을 억제할 뿐만 아니라, 면역조절을 조절 할 것이라 생각된다.

3.2. 조직면역학적 변화

Fig. 4는 피부 장벽 손상 정도를 확인하기 위해 피부와 귀 조직에서의 조직 면역학적 변화에 대한 결과이다. 피부 각질층의 두께는 NC군(20.16±0.55 μ m)에 비해 DNCB군(113.33±5.17 μ m)이 두꺼웠으며 Dex군(37.92±1.52 μ m), AR 100군(40.31±1.78 μ m), AR 300군(25.24±0.67 μ m)은 DNCB군에 비해 두께가 통계적으로 유의하게 감소하였다. 피부의 진피 두께는 NC군(292.16±3.23 μ m)에 비해 DNCB군(480.53±7.85 μ m)이 두꺼웠고 DNCB를 처리한 Dex군(311.17±4.85 μ m), AR100군(427.30±7.09 μ m), AR 300군(308.60±5.59 μ m)은 DNCB군에 비해 두께가 통계적으로 유의하게 감소한 것을 확인하였다. 각질층의 두께와 마찬가지로 AR이 고농도일수록 피부와 귀의 두께 감소에 더 효과적인 것이 확인되었다. 귀 각질층의 두께는 NC군(13.96±0.36 μ m)에 비해 DNCB군(72.53±2.00 μ m)에서 두꺼웠으며 DNCB를 처리한 Dex군(33.98±1.37 μ m), AR100군(41.23±1.02 μ m), AR 300군(48.41±1.30 μ m)은 DNCB군에 비해 두께가 통계적으로 유의하게 감소하였다. AD가 발병하면 각질 세포가 탈락되지 못해 쌓이면서 피부의 두께가 두꺼워지게 되어 pH 변화, 피부 수분 감소 등과 같은 피

부 장벽 기능의 이상이 유발된다(Park et al., 2020). DNCB로 인해 두꺼워진 피부와 귀 두께가 AR 투여군에서 감소된 것으로 확인되었으며, 이는 손상된 피부장벽 기능을 개선한다고 판단된다.

뿐만 아니라, 피부 내 비만세포는 NC군(24.24 ± 0.82 개) 비해 DNCB군(98.98 ± 2.90 개)에서 증가하였으며 Dex군(58.39 ± 2.05 개), AR100군(73.33 ± 2.56 개), AR 300군(65.50 ± 2.24 개)은 DNCB군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였다. 비만세포는 AD와 같은 염증 질환에서 매우 중요한 역할을 하는 면역 세포의 일종으로 히스타민, 사이토카인, 케모카인과 같은 염증 매개체의 조절에 관여한다(Park et al., 2020). DNCB로 아토피 피부염 유사 피부 병인을 유발시키면 피부 내 비만세포의 수와 같은 면역 세포가 증가하며 AR을 투여했을 때 피부 내 비만 세포가 감소한 것이 확인되었다. 이는 AR은 피부 내 면역 세포를 억제하는 것으로 판단된다.

3.3. 혈청 내 IgE 발현량 분석

Fig. 5는 항알레르기 반응을 확인하기 위해, 실험동물의 혈청 내 IgE 발현량의 변화에 대한 결과이다. NC군에 비해 DNCB군(173.85 ± 7.93 ng/mL)의 IgE 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있으며 Dex군(89.33 ± 3.11 ng/mL), AR100군(114.90 ± 9.29 ng/mL), AR300군(70.17 ± 49.79 ng/mL)이 DNCB군에 비해 IgE 발현량이 감소하였다. IgE의 변화는 AR 투여군이 DNCB군에 비해 통계학적으로 유의미하게 감소한 것을 확인하였다. IgE는 AD에 알레르기 반응에 중요한 역할을 하며 AD 환자의 80% 이상이 IgE 수치가 증가하였다고 알려져 있다(Lim et al., 2014; Milam et al., 2019). B세포에서 생성된 IgE는 비만 세포 표면의 high-affinity IgE receptor과 결합해 비만세포 활성화시켜 히스타민의 발현시키므로 면역 반응에 중요 인자중 하나이다(Lee et al., 2020). DNCB로 자극한 동물 모델 혈청 내 IgE이 AR 투여군에서 감소한 것으로 보아 AR은 아토피 피부염에 면역 억제에 효과가 있을 것이라 판단된다.

3.4. 피부 조직 내 iNOS, COX-2, PGE2 발현량 변화

Fig. 6은 AR의 항염증 사이토카인 효과를 확인하기 위해 우리는 피부 내 iNOS, COX-2, PGE2의 발현량을 측정한 결과이다. iNOS는 NC군(73.99 ± 3.80 pg/mL)

에 비해 DNCB군(110.82 ± 9.96 pg/mL)이 증가하였고 Dex군(48.02 ± 10.25 pg/mL), AR100군(92.08 ± 5.49 pg/mL), AR300군(77.01 ± 2.47 pg/mL)은 DNCB군에 비해 감소하였다. COX-2 (Cyclooxygenase-2)는 NC군(0.59 ± 0.11 pg/mL)에 비해 DNCB군(1.30 ± 0.11 pg/mL)이 증가하였고 Dex군(0.68 ± 0.08 pg/mL), AR100군(0.75 ± 0.11 pg/mL), AR300군(0.61 ± 0.06 pg/mL)은 DNCB군에 비해 감소하였다. PGE2 (prostaglandin E2)는 역시 NC군(31.30 ± 4.47 ng/mL)에 비해 DNCB군(85.62 ± 7.77 ng/mL)이 증가하였고 Dex군(47.067 ± 6.69 ng/mL), AR100군(72.00 ± 2.67 ng/mL), AR300군(57.60 ± 6.40 ng/mL)은 DNCB군에 비해 감소하였다. iNOS, COX-2, PGE2의 변화는 모두 AR 투여군이 DNCB군에 비해 감소하였으나 AR 고농도군만 PGE2의 발현이 통계적으로 유의하게 감소하였다. 외부 자극에 의해 생체조직을 보호하는 반응인 염증 반응이 일어나면 iNOS, COX-2와 같은 염증성 단백질의 발현하여 NO (nitric oxide), PGE2 (prostaglandin E2), 사이토카인 등의 발현이 증가한다(Fan et al., 2021). DNCB로 유도한 AD로 인해 피부내 염증 반응이 유발되었고 이로 인해 iNOS, COX-2, PGE2의 발현이 증가되었으며 COX-2가 arachidonic acid를 prostaglandin으로 전환시키는 효소로 COX-2가 활성화되면 prostaglandin의 한 종류인 PGE2의 발현이 증가하게 되며 iNOS (inducible nitric oxide synthase)는 칼모둘린과 결합하여 NO의 발현을 증가시켜 면역 반응을 유발한다(Murakami and Ohigashi., 2007; Lee et al., 2020; Park et al., 2020). AR은 면역 반응을 유발하는 염증 매개 물질인 iNOS, COX-2, PGE2 모두 감소시킨 것이 확인되었으며 이는 AR이 염증 기전을 억제하는 것을 판단된다.

4. 결론

본 연구에서는 화를 낮추고 음기를 보강하며, 열을 낮추어 혈류의 흐름을 조절 및 면역 증진시킨다고 알려진 한약재인 AR가 아토피피부염 예방 또는 치료 약물로써 유효성 평가 실험을 수행하였다.

결론적으로 AR은 아토피 피부염 중증도, 피부와 귀에서의 각질층과 진피층의 두께변화 및 비만세포 수를 감소시켰다. 또한, 혈청 내 IgE양을 감소시켰으며, 피부 조직 내 염증성 사이카인인 iNOS, COX-2,

PGE2를 억제하는 것으로 보아 과도한 면역반응을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다. 이는 AR이 한의학에서 태열과 음허를 원인으로 하는 AD를 청열(淸熱, clear heat)작용 및 화를 낮춰 음기를 보하여 면역의 불균형으로 생긴 피부 내 열과 화를 낮춤으로써 염증세포의 교란 및 이로 인한 염증 반응을 개선한다고 판단된다. 이렇듯 면역 불균형을 개선함으로써 만성기관지염, 관절염 등의 치료 효과를 보인다는 기존의 임상적 근거와 면역 질환을 치료하는 한의학적 기전을 바탕으로 AR이 아토피피부염을 개선할 수 있다는 새로운 가능성을 확보하였다.

향후 연구결과를 바탕으로 추가적인 분자생물학적 연구 및 생리활성기능 물질을 분석하는 연구 등 후속연구가 필요하다 생각되며, 이번 연구에서는 AR이 아토피피부염을 억제하는 1차적인 유효성을 가진다는 새로운 사실을 입증하였다. 뿐만 아니라, 의약품 또는 기능성 식품, 화장품 등 개발에 응용될 수 있는 유용한 기초 데이터로 제시할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 ‘지속가능한 한약표준자원 활용기술 개발’(KSN2021320) 사업 및 한국연구재단 ‘미활용 생물자원의 연구기반 구축 및 활성화 연구: 동물성 자원 중심’(NRF-2020R111A2073003)의 지원으로 수행되었다.

REFERENCE

- Aum, S. H., Ahn, S. H., Park, S. Y., Cheon, J. H., Kim, K. B., 2016, The Anti-inflammatory effects of hataedock taken douchi extracts on atopic dermatitis-like skin lesion of NC/Nga mouse, *J. Pediatr. Korean Med.*, 30, 01-09.
- Chai, O. H., Shon, D. H., Han, E. H., Kim, H. T., Song, C. H., 2013, Effects of *Anemarrhena asphodeloides* on IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis, compound 48/80-induced systemic anaphylaxis and mast cell activation, *Exp. Toxicol. Pathol.*, 64, 419-426.
- Choi, Y. Y., Kim, M. H., Lee, H., Jo, S. Y., Yang, W. M., 2018, (R)-(+)-pulegone suppresses allergic and inflammation responses on 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in mice model, *J. Dermatol. Sci.* 91, 292-300.
- Fan, P., Yang, Y., Liu, T., Huang, H., Chen, L., Kuang, Y., 2021, Anti-atopic effect of *Viola yedoensis* ethanol extract against 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin dysfunction, *J. Ethnopharmacol.*, 280, 114474.
- Heo, J., 2009, *Dongui-Bogam: Treasured Mirror of Eastern Medicine*. Namsandang Publishers Co, Seoul.
- Ji, K. Y., Kim, K. M., Kim, Y. H., Im, A. L., Lee, J. Y., Park, B., Na, M. K., Chae, S., 2019, The enhancing immune response and anti-inflammatory effects of *Anemarrhena asphodeloides* extract in RAW 264.7 cells, *Phytomedicine*, 59, 152789.
- Kim, E., Lee, B., Kim, H., 2009, A Literal study of the main symptoms of atopic dermatitis, *J. Korean Medical classics*, 22, 207-228.
- Lee, S. I., Kim, J., Han, Y., Ahn, K., 2011, A Proposal: atopic dermatitis organizer (ADO) guideline for children, *Asia Pac. Allergy*, 1, 53-63.
- Lee, Y., Choi, H. K., Ulrich N' deh, K. P., Choi, Y. J., Fan, M., Kim, E., Chung, K. H., An, J. H., 2020, Inhibitory effect of *Centella asiatica* extract on DNCB-Induced atopic dermatitis in HaCaT Cells and BALB/c Mice, *Nutrients*, 12, 400-411.
- Lim, H. S., Ha, H., Lee, H., Lee, J. K., Lee, M. Y., Shin, H. K., 2014, *Morus alba* L. suppresses the development of atopic dermatitis induced by the house dust mite in NC/Nga mice, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 139-143.
- Milam, E. C., Jacob, S. E., Coehn, D. E., 2019, Contact dermatitis in the patient with atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 7, 18-26.
- Murakami, A., Ohigashi, H., 2007, Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals, *Int. J. Cancer*, 121, 2357-2363.
- Park, J. H., Hwang, M. H., Cho, Y. R., Hong, S. S., Kang, J. S., Kim, W. H., Yang, S. H., Seo, D. H., Oh, J. S., Ahn, E. K., 2020, *Combretum quadrangulare* Extract Attenuates Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions through Modulation of MAPK Signaling in BALB/c Mice, *Molecules*, 25, 2003.
- Puar, N., Chovatiya, R., Paller, A. S., 2021, New treatments in atopic dermatitis, *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 126, 21-31.
- Wang, Y., Dan, Y., Yang, D., Hu, Y., Zhang, L., Zhang, C., Zhu, H., Cui, Z., Li, M., Liu, Y., 2014, The genus *Anemarrhena* Bunge: A review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology, *J. Ethnopharmacol.*, 153, 42-60.

-
- Researcher. Yu-Mi Jang
Herbal Medicine Resources Research Center, Korea
Institute of Oriental Medicine and College of Korean
Medicine, Daegu Haany University
dbale@kiom.re.kr
 - Professor. Yong-Ung Kim
Department of Pharmaceutical Engineering, College of
Biomedical Science, Daegu Haany University
ykim@dhu.ac.kr
 - Professor. Mi-Ryeo Kim
Department of Herbal Pharmacology, College of Korean
Medicine, Daegu Haany University
mrkim@dhu.ac.kr

-
- Senior researcher. Hye-Sun Lim
Herbal Medicine Resources Research Center, Korea
Institute of Oriental Medicine
qp1015@kiom.re.kr
 - Senior researcher and Professor. Gun-Hyuk Park
Herbal Medicine Resources Research Center, Korea
Institute of Oriental Medicine and University of Science
& Technology (UST), Korean Convergence Medicine
Major, Campus of Korea Institute of Oriental Medicine
parkgunhyuk@gmail.com