

Original Article / 원저

紫草가 HaCaT 세포의 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향

강상훈 · 김경준

가천대학교 한의과대학 안이비인후피부과 교실

Effects of *Lithospermum erythrorhizon* on the cytokine gene expression in human keratinocytes

Sang-Hoon Kang · Gyung-Jun Kim

Department of Ophthalmology, Otolaryngology and Dermatology,
College of Oriental Medicine, Gachon University

Abstract

Objective : *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) is a major pathogenic bacteria for acne vulgaris. This study was performed to evaluate the effects of *Lithospermum erythrorhizon* extracts on the inflammatory cytokines gene expression by *P. acnes* in human keratinocytes, HaCaT cell line.

Methods : Anti-bacterial activity and cytotoxicity of LE extracts was analyzed by agar plate culture and XTT assay. The cytokines gene expressions were assessed by real time RT-PCR for IL-8, MCP-1 and TNF- α . During the cell culture and treatments, amounts of secreted TNF- α were measured by ELISA. Translocation of transcription factor NF- κ B from cytoplasm into nucleus was observed by immunocytochemistry and confocal microscopy.

Results : There were no anti-bacterial effects and cytotoxicity as high as 1,000 μ g/ml of LE extracts in XTT assay. Transcription levels of inflammatory cytokines, IL-8, MCP-1 and TNF- α were increased by *P. acnes* in HaCaT. LE extracts decreased the upregulated gene transcription levels. However, amounts of secreted TNF- α were similar in HaCaT cells with *P. acnes* and LE extracts. Translocation of NF- κ B into nucleus by *P. acnes* was significantly inhibited by LE extracts.

Conclusions : From the results of this study, LE extracts have anti-inflammatory effects on HaCaT cells by *P. acnes* that decreased the mRNA expressions of IL-8, MCP-1 and TNF- α . This anti-inflammatory effects of LE extracts could provide the potential of therapeutic substance for acne vulgaris.

Key words : *Propionibacterium acnes*; acne vulgaris; LE extracts; human keratinocytes; anti-inflammatory effects

© 2013 the Society of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal 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.

1. 서 론

여드름은 모피지선단위(pilosebaceous unit)의 만성 염증성 질환으로서 여드름의 병리학적 기전은 비염증성 병변과 염증성 병변으로 대별된다¹⁾. 비염증성 병변은 면포(comedo)를 일컫는데 면포란 여드름이 발생하는 피지샘성 모낭(sebaceous hair follicle) 내에 각질, 피지, 세균이 차 있는 상태로 IL-1 α 의 증가, 5 α -reductase type 1의 증가, 리놀레산 감소 등으로 인한 모낭누두부와 피지샘 도관부의 각화이상, 피지샘 도관각질층의 부적절한 박리에 의해 일어난다. 이러한 면포의 생성은 여드름의 염증성 병변을 유발하는 요인이 된다^{2,3)}.

여드름의 염증성 병변은 주로 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)의 증식으로 인한 각질세포의 반응에 의해 나타난다⁴⁾. *P. acnes*의 LPS는 피부 각질세포에서 TNF- α , IL-8, MCP-1 등의 생성을 증가시키며 이들의 작용으로 단핵구 세포의 Prostaglandin 합성, 주화성인자(chemotactic factor)의 유리 증가 등 다양한 염증반응이 유발된다²⁾. 이러한 반응과정에서 IL-1, IL-6, TNF- α , GSF, MCF 등이 생성되며, Neutrophil, Eosinophil 등의 granulocyte가 활성화된다⁵⁾.

세포내 cytokine 발현을 조절하는 transcription factor로는 NF- κ B와 JAK-STAT 등이 알려져 있는데 이들은 리보솜에서 생성된 후 핵내로 유입되어 유전자 발현을 촉진하므로 이들의 작용을 억제하는 것은 여드름을 치료하는 중요한 수단이 될 수 있다⁶⁾.

여드름은 한의학적으로 面疱, 肺風粉刺, 瘰癧, 粉刺, 瘰, 面嗣, 面皰, 皰疱, 嗣面 등의 범주에 속하는데^{7,21,22)} 肺熱血熱, 脾胃積熱, 熱毒熾盛, 血瘀痰凝, 陰虛血熱, 衝任不調 등의 원인으로 발생하며 치료는 淸肺胃, 淸熱解毒, 淸熱涼血滋陰, 健脾化痰利濕淸熱, 淸熱

化濕通腑, 活血去瘀하는 방법을 위주로 하여 치료한다⁸⁾. 이러한 여드름이 발생하는 기전은 다양하나 임상에서 흔히 보는 血熱型 面疱에 대해 淸熱涼血法이 일반적으로 사용된다. 紫草는 淸熱藥 중 淸熱涼血藥에 속하며 性은 寒, 無毒하고 味는 甘하다¹⁰⁾. 紫草는 肝, 心經에 歸經하는데 性味가 甘寒質潤하고 淸潤시키는 效能이 있어 血分에 들어가 涼血活血, 解毒透疹, 淸熱利濕, 泄火通便하여 血熱型 面疱에 응용되는 本草이다⁹⁾. 최근 연구 결과, 紫草는 항염작용 및 TNF- α , iNOS 생성 억제효과를 타나냈으며¹¹⁾, 아토피성 피부염을 억제하고¹²⁾ 비만세포의 알러지 염증반응을 억제하였다¹³⁾. 따라서 淸熱涼血藥으로서 血熱型 面疱에 사용되는 紫草의 항호르몬활성과 항염, 항균작용^{9,14)}은 호르몬 분비와 *P. acnes*로 인해 유발되는 여드름 치료에 응용될 수 있을 것으로 판단되었다.

각질세포(keratinocyte)는 표피세포의 약 95%를 차지하는 주요구성성분으로서 표피의 각질층을 생성할 뿐만 아니라 여러 cytokine들을 생산하며 염증반응과 면역반응에도 관여한다¹⁾. 이러한 각질세포의 체외모델 연구들에서 피부암 유래의 각질세포주인 HaCaT(Human Keratinocyte cell line) 세포주가 사용되고 있다. 근래에 보고된 硫黃, 如意金黃散, 顛倒散 등의 여드름에 대한 연구들에서도 HaCaT 세포주가 사용된 바 있다¹⁵⁻¹⁷⁾.

본 연구에서는 다양한 염증 반응에 효과를 나타내는 紫草 추출물이 여드름의 병태에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 인간의 각질세포주인 HaCaT 세포주의 염증 관련 cytokine 유전자 발현을 측정하였다. 紫草가 *P. acnes*에 의해 유발된 HaCaT 세포주의 염증 모델에서 IL-8, MCP-1, TNF- α 등의 유전자 발현에 미치는 영향과 NF- κ B의 이동에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

교신저자 : 김경준, 인천광역시 남동구 구월동 1200-1번지
가천대학교 부속 길한방병원 안이비인후과
(Tel : 032-468-0330, E-mail : kkjo215@hanmail.net)

• 접수 2013/1/18 • 수정 2013/2/7 • 채택 2013/2/14

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 균주와 세포주

실험에 사용한 인간 각질세포주인 HaCaT (Human Keratinocyte cell line) 세포주는 아산병원 생명과학 연구소에서, 혐기성 균주인 여드름 유발균주 *P. acnes* (KCTC 3314)와 피부상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (KCTC 1917)는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양받아 사용하였다.

2) 시약

紫草 추출물은 국가지정연구소재은행인 동물생리활성물질자원은행(진주, 경상대학교)에서 70% 에탄올로 추출한 후 동결건조한 상태로 공급받아 100% DMSO로 용해하여 사용하였다. *P. acnes*는 생물자원센터(KCTC, Korea)에서 분양받아 일정 기간 동안 혐기성 조건에서 배양한 후, 95°C에서 5분간 가열하여 살균하고 동결 건조하여 사용하였다. 동결 건조한 100 mg의 분말을 칭량하여 10 ml의 증류수로 용해하여 세포에 100 µg/ml의 농도로 처리하였다. 세포 독성을 확인하기 위하여 XTT Reagent (Welgene Inc, Korea)를 사용하였다. 각각의 면역 반응 유발물질들이 처리된 세포들에서 total RNA는 Trizol reagent (Invitrogen, Germany)를 사용하여 분리하였으며, cytokine 유전자들의 발현 양상을 확인하기 위한 real-time RT-PCR primers는 Table 1에 나타낸 염기서열로 합성하였으며, Master mix는 SYBR Fast qPCR kit ABI prism (KAPA biosystems, USA) 제품을 사용하였다. *P. acnes* 처리 후 HaCaT 세포주에서 유리된 TNF-α 양을 측정하기 위한 ELISA kit은 Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) Human, ELISA kit, pink-one (Koma Biotech, Korea) 제품을 사용하였다. 항균 실험을 위한 Erythromycin은 Sigma (USA)에서 구입하였다.

2. 방법

1) 세포 배양 및 독성 실험

HaCaT 세포주는 DMEM에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin을 첨가한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다. 배양액은 2일 마다 교환해 주었으며, 계대배양은 배양 중인 세포들이 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 각 세포주의 기본 배지로 수세한 후 새로운 플라스크에 분주하였다. 계대배양 과정에서는 10% FBS 조건을 유지하였다. *P. acnes*는 혐기성 조건 및 37°C incubator에서 72시간 동안 배양하였다.

紫草 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 96-well plate에 HaCaT 세포주를 일정량(1×10^4 /ml)을 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 초기 배양 후 紫草를 각각 (0, 1, 10, 100, 1000 µg/ml)의 농도로 처리하여 48 시간동안 추가 배양하였다. 추가 배양 후 XTT 시약을 각 well에 첨가하고, 2시간 동안 incubator에서 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도 측정하여 증식된 세포의 수를 비교하여 세포 독성 결과를 확인하였다.

2) 항균 효능 측정

紫草의 항균 능력을 평가하기 위해 paper disk diffusion test를 시행하였다. 혈액 한천 배지 및 Müller-Hinton 배지에 피부상재균인 *Staphylococcus epidermidis*와 여드름 유발균인 *P. acnes* 균주를 각각 접종하고, 멸균된 8 mm paper disk를 올려놓은 후, 그 위에 1, 10, 100, 1000 µg/ml 농도의 紫草 추출물을 50 µg/disk로 처리하였다. 처리한 시료가 배지에 모두 흡수되도록 실온에서 10분간 정치시킨 다음 호기성 또는 혐기성 조건의 37°C incubator에서 배양하였다. 양성대조군으로 100 µg/ml 농도의 erythromycin을 이용하여 억제환의 직경이 10 mm 이상인 경우에 항균 효능이 있는 것으로 판정하였다.

3) *P. acnes* 및 紫草 추출물의 처리

사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 HaCaT 세포주를 6-well plate에 각각의 세포주를 일정량 ($2 \times 10^5/ml$) 접종한 후에 여드름 유발 균주인 *P. acnes*의 동결건조 분말을 증류수에 100 $\mu g/ml$ 의 농도로 용해하여 처리하였다. 처리 농도는 기존의 연구 결과들과 세포 독성 실험 결과를 참고하였다. 紫草 추출물의 처리 농도는 세포 독성 실험 결과에서 대조군에 비해 90% 이상의 증식율을 나타낸 100 $\mu g/ml$ 의 농도로 처리하였다.

4) 사이토카인 유전자 발현 양상 분석

① 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 (Real time RT-PCR)

각각의 시료에서 추출된 total RNA의 양은 spectrophotometer로 정량하였으며, 그 상태는 2% agarose gel 전기영동 후 18s와 28s rRNA band를 전기영동을 통해 관찰하였다. 추출한 total RNA 1 μg 을 72°C에서 5분간 변성시킨 후, reverse transcription mixture (5X PrimeScript™ Buffer, PrimeScript™ RT Enzyme Mix I, 50 μM Oligo dT Primer, 100 μM Random 6 mers, RNase Free dH2O)에 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 RNA에 대한 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다. 합성된 cDNA 2 μl 와 각각의 유전자에 대한 primers (Table 1)를 SYBR Fast qPCR kit (KAPA biosystems, USA)와 혼합한 후, Taq polymerase 활성의 최적화를 위해서 50°C에서 2분간, 초기 변성 (denaturation)은 95°C에서 10분간 수행한 후에, 증폭을 위해 95°C에서 15초, 60°C에서 1분의 주기를 40회 반복 시행하였다. 사용된 primer들은 Genebank database를 기준으로 Primer3 프로그램을 이용하여 제작하였다. cytokine mRNA 발현양은 GAPDH 유전자를 내부대조군(internal control)으로 사용하여 보정을 실시하여 각각의 유전자 발현 양상을 정량적으로 비교하였다. PCR 최종산물을 2% agarose gel 상

에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후 관찰하였으며, SYBR green을 이용한 real time PCR의 신뢰성을 확인하기 위해 melting curve 분석과 단계적 희석(serial dilution) 시료를 이용하여 PCR efficiency를 확인하였다(Fig. 1).

② 효소결합 면역흡착 분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)

각각의 시료에서 배양액으로 유리된 TNF- α 를 측정하기 위해 실험 과정에서 배양액을 수확하여 측정 전까지 -70°C에서 보관하였다. 일차적으로 TNF- α 에 대한 mouse monoclonal antibody가 도포되어 있는 96-well plate에 시료를 처리하기 전에 비특이적인 반응을 억제하기 위해 0.05% Tween-20이 포함된 PBS를 사용하여 2번 수세하였다. 제조사의 사용방법에 따라 negative control과 positive control 그리고 시료를 96-well plate에 1시간 동안 처리하였으며, 발색 반응 결과를 Genios ELISA reader (Tecan, Switzerland)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 TNF- α 농도는 흡광도에 대한 표준농도곡선을 이용하여 계산하였다.

5) 면역형광 세포화학염색법

(Immunofluorescent cytochemistry)

각각의 시료에서 세포질 내에서 활성화된 NF- κB 의 핵 내부로의 이동(translocation) 여부를 알아보기 위해 mouse monoclonal NF- κB p65(F-6) antibody (Santacruz, sc-8008)를 1차 항체로 사용하고, 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG rhodamine-conjugate antibody (Invitrogen, USA)를 사용하여 공초점 현미경(Confocal microscope; Zeiss, Germany)을 통하여 관찰하였다. 관찰된 형광이미지를 세포질과 핵질로 구분하여 NF- κB 의 intensity를 Zeiss image analysing program으로 정량화하여 비교하였다.

3. 통계적 검증

통계적 분석은 SPSS 17.0 program을 이용하였고,

각각의 유전자 발현 양상과 TNF- α 의 분비량에 대한 비교는 One-way ANOVA test를 시행하였다. 사후

검증으로 Turkey test를 사용하여 비교하였으며 통계학적인 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

Table 1. Primers of Various Cytokines for Real-time RT-PCR

Name of genes (GeneBank No.)		Primer sequences (5'---3')	Product size (bp)	Melting Tm ($^{\circ}$ C)
IL-8 (NM_000584.2)	F	GAATGGGTTTGCTAGAATGTGATA	129	76
	R	CAGACTAGGGTTGCCAGATTTAAC		
MCP-1 (NM_002982)	F	ACTCTCGCCTCCAGCATGAA	72	81
	R	CAGACTAGGGTTGCCAGATTTAAC		
TNF- α (NM_000594.2)	F	CATGTTGTAGCAAACCCTCAAG	150	85
	R	GAAGAGGACCTGGGAGTAGATG		
GAPDH (NM_002046.3)	F	ACTGCCAACGTGTCAGTGGT	320	85
	R	TGGTCCAGGGGTCTTACTCC		

Abbreviation

IL-8: interleukin-8, MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, TNF- α : tumor necrosis factor- α , GAPDH: glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase.

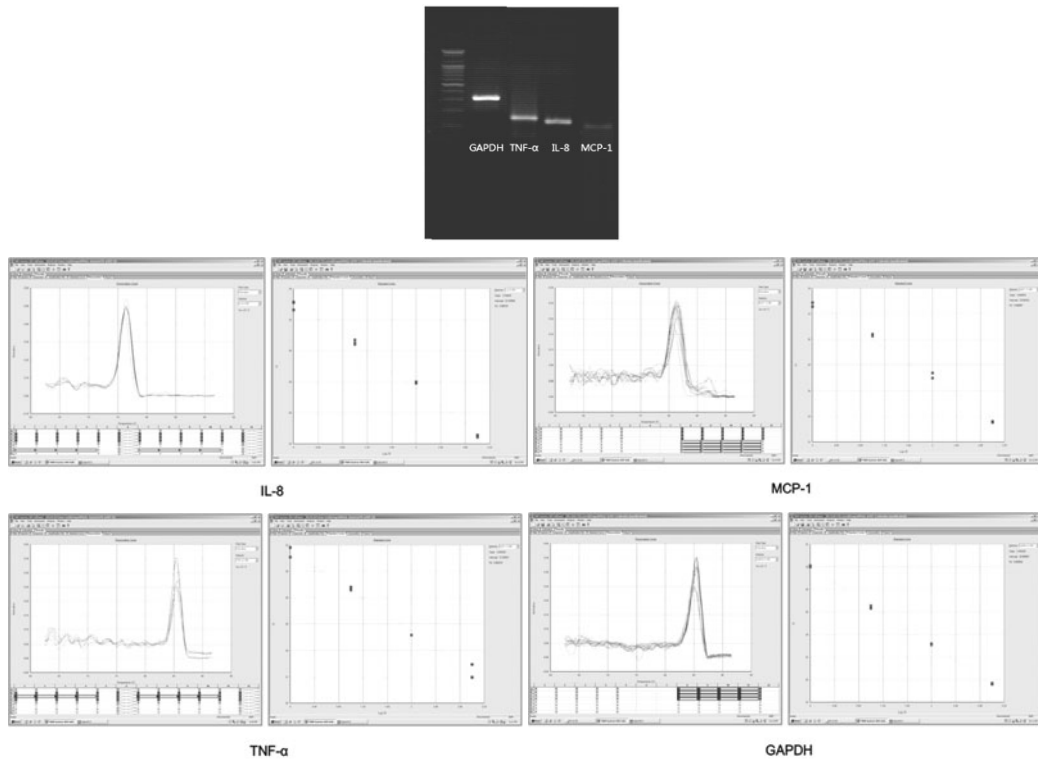


Fig. 1. Evaluation of real time RT-PCR products and efficiency by agarose gel electrophoresis, melting curve analysis and standard curve analysis with serial diluted sample.

III. 결 과

1. *P. acnes*에 대한 紫草 추출물의 항균 효능

紫草 추출물이 여드름 유발균주인 *P. acnes*에 대하여 항균 효능을 나타내는지를 알아보기 위해 디스크 확산법을 이용하였다. 보관 중인 *P. acnes*를 접종하고, 72시간 동안 배양한 후에 디스크 주위에 형성된 억제대를 관찰하였다. 항생제인 erythromycin에서는 억제대의 직경이 10 mm 이상으로 관찰되었으나, 열수 紫草 추출물과 에탄올 紫草 추출물을 처리한 두 가지 처리군의 모든 농도에서 억제대가 관찰되지 않았다 (Fig. 2).

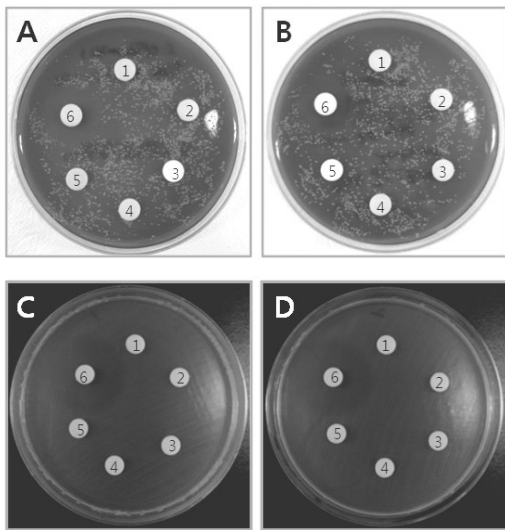
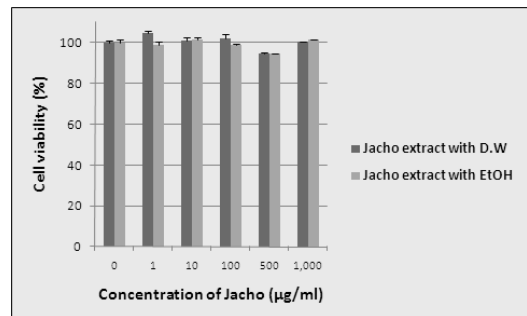


Fig. 2. Antibacterial activity of Jacho extracts against *P. acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. A and B: *S. epidermidis* culture in blood agar plate with Jacho extracts. C and D: *P. acnes* culture in Müller-Hinton agar plate with Jacho extracts. A and C: Jacho extracts with distilled water. B and D: Jacho extracts with ethanol. Concentration of Jacho extracts were 0, 1, 10, 100, 1000 µg/ml in disk 1, 2, 3, 4, 5, respectively. Erythromycin (100 µg/ml) in disk 6 was used as a positive control.

2) HaCaT에 대한 紫草 추출물의 세포 독성

인간 각질 세포주인 HaCaT를 각 well당 1×10^4 개의 세포를 넣은 후 세포의 부착 및 안정을 위해 24시간 동안 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 다양한 농도의 紫草 추출물(0, 1, 10, 100, 500, 1,000 µg/ml)을 각각 48시간 동안 처리하였다. 처리한 모든 농도에서 紫草 추출물의 세포독성은 관찰되지 않았다(Fig. 3).



Concentrations of Jacho extracts (µg/ml)	Cell viability (%)	
	Jacho extracts with D.W.	Jacho extracts with EtOH
0	100 ± 2.3	100 ± 5.0
1	104.7 ± 3.1	99.0 ± 3.8
10	101.1 ± 4.4	101.7 ± 2.1
100	102.0 ± 5.7	98.9 ± 1.7
500	94.9 ± 0.1	94.6 ± 0.1
1,000	100.7 ± 0.1	101.7 ± 0.1

Fig. 3. Cytotoxic effects of Jacho extracts with distilled water and ethanol on HaCaT cells. Data are presented by mean ± S.D.

3) 紫草 추출물 처리에 따른 HaCaT의 형태학적 변화

인간 각질세포인 HaCaT 세포주에 紫草 추출물과 *P. acnes*를 각각 0, 12, 24, 48시간 동안 처리하였을 때 세포의 형태학적인 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4).

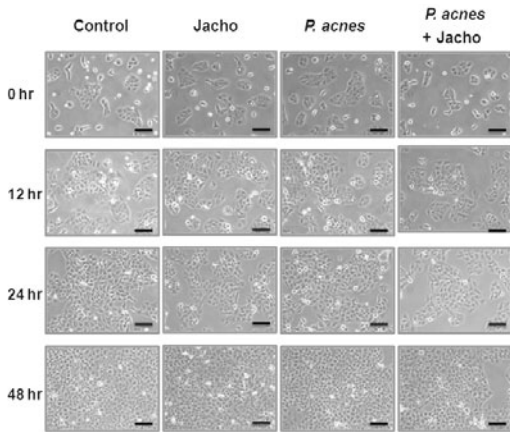
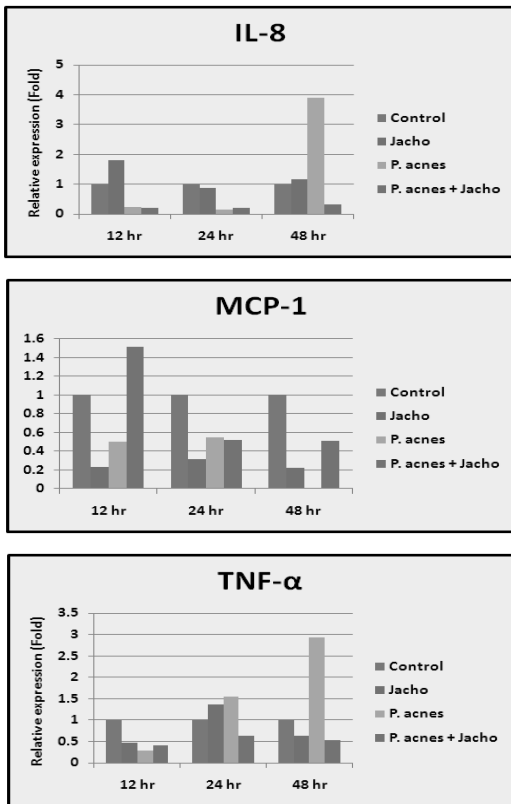


Fig. 4. Morphological features of HaCaT cells after treatments of Jacho extracts and *P. acnes* ($\times 200$). Scale bars represented $100 \mu\text{m}$.

4) HaCaT의 염증성 사이토카인 mRNA 발현에 미치는 영향

염증성 사이토카인인 $\text{TNF-}\alpha$, IL-8, MCP-1의 mRNA 발현 양상을 real-time RT-PCR 방법으로 분석한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 여드름 유발균을 처리하였을 때 증가되는 $\text{TNF-}\alpha$ 와 IL-8 mRNA가 紫草 추출물을 동시에 처리한 경우에 24시간과 48시간 처리군에서 감소됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 그러나 MCP-1 mRNA는 여드름 유발균과 紫草 추출물을 동시에 처리한 경우에 그 발현양이 12시간에 비해 24 시간에는 감소하였지만 48시간까지는 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 5).



IL-8	Jacho	<i>P. acnes</i>	<i>P. acnes</i> + Jacho
12 hr	1.80	0.24	0.21
24 hr	0.87	0.15	0.21
48 hr	1.18	3.89	0.32

MCP-1	Jacho	<i>P. acnes</i>	<i>P. acnes</i> + Jacho
12 hr	0.23	0.51	1.51
24 hr	0.31	0.55	0.52
48 hr	0.23	0.01	0.52

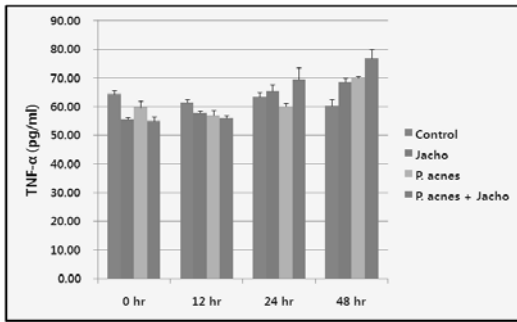
TNF- α	Jacho	<i>P. acnes</i>	<i>P. acnes</i> + Jacho
12 hr	0.47	0.29	0.41
24 hr	1.37	1.54	0.63
48 hr	0.63	2.94	0.53

Fig. 5. Quantitative analysis of IL-8, MCP-1 and $\text{TNF-}\alpha$ mRNA expressions by real time RT-PCR in HaCaT cells after treatments of Jacho extracts and *P. acnes*.

Abbreviation : same as Table 1

5) HaCaT에서 *P. acnes*에 의한 TNF- α 유리에 미치는 영향

인간 각질세포인 HaCaT 세포주에 여드름을 유발한다고 알려져 있는 균주인 *P. acnes*와 紫草 추출물을 처리한 후 TNF- α 의 배양액으로의 유리 양상을 ELISA 방법으로 분석하였다. 전체 시료들에서 TNF- α 유리 양상은 55.14 pg/ml에서 86.17 pg/ml로 다소 차이가 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 6).



	Control	Jacho	<i>P. acnes</i>	<i>P. acnes</i> + Jacho
0 hr	64.38±1.32	55.64±0.72	59.79±2.15	55.14±1.39
12 hr	61.51±1.02	57.75±0.71	57.08±1.75	56.04±1.07
24 hr	63.60±1.38	65.39±2.30	60.00±1.18	69.31±4.35
48 hr	60.25±2.37	68.77±1.17	69.91±0.84	76.80±3.18

Fig. 6. Secretion of TNF- α from HaCaT cells after treatments of Jacho extracts and *P. acnes*. Data are presented by mean±S.D.

6) HaCaT의 NF- κ B 핵내이동에 미치는 영향

염증 관련 사이토카인 mRNA의 발현을 조절하는 전사 인자인 NF- κ B의 활성화 양상을 confocal microscopy 방법으로 분석하였다. 대조군에서 NF- κ B의 핵내로의 이동은 45.46%로 관찰되었는데, *P. acnes* 처리에 의해 NF- κ B의 핵내로의 이동이 75.34%로 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig 7). 이러한 *P. acnes* 처리에 의한 NF- κ B의 이동 양상은 紫草 추출물을 동시에 처리한 경우에 통계적으로 유의하게 핵내로의 이동이 억제되는 것을 관찰하였다

(Fig. 7). 이러한 NF- κ B의 핵내이동 양상을 정량적으로 분석하였다(Fig. 8).

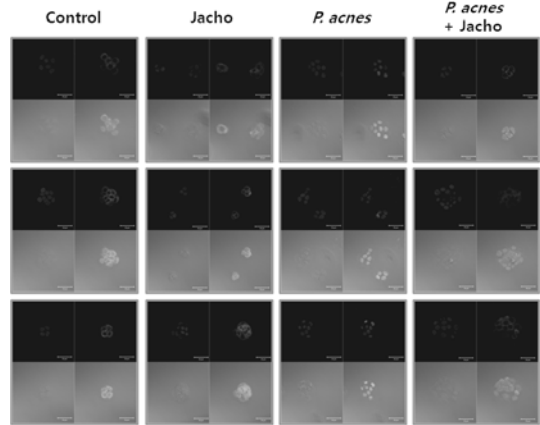
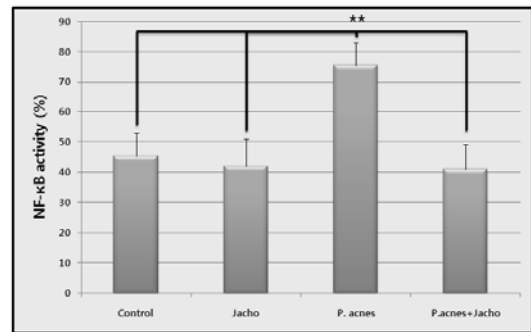


Fig. 7. Immunocytochemical analysis of translocation of NF- κ B from the cytoplasm into the nucleus by confocal microscopy in HaCaT cells after treatments of Jacho extracts and *P. acnes*. Nucleus and NF- κ B were stained with DAPI (blue color) and rhodamine-conjugate antibody (red color), respectively. Scale bars represented 50 μ m.



	Control	Jacho	<i>P. acnes</i>	<i>P. acnes</i> + Jacho
NF- κ B translocation (%)	45.46±7.58	41.89±9.00	75.34±7.85	41.02±8.10

Fig. 8. Quantitative analysis of translocation of NF- κ B from the cytoplasm into the nucleus in HaCaT cells after treatments of Jacho extracts and *P. acnes*. Data are presented by mean±S.D. Double asterisks (**) indicate statistically significant differences ($P < 0.01$).

Ⅳ. 고 찰

紫草(Lithospermi radix)는 紫草科(지치과; Borraginaceae)에 속한 多年生 本草인 지치(Lithospermum erythrorhizon Sieb. et Zucc)의 뿌리를 건조한 것으로 해열작용, 항염작용, 항균작용, 강심작용, 항종양작용, 피임작용 등의 약리작용을 나타낸다^{9,10}.

최근에는 紫草의 주성분인 시코닌(Shikonin)이 인간 각질세포, 인간 소교세포, 인간 유방암세포, 생쥐의 대식세포 등에서 NF- κ B, AP-1, MAPK, Akt 등의 여러 가지 유전자의 전사 활성화에 관련된 인자들의 활성을 조절하여 iNOS, NO, pro-inflammatory cytokine 등 염증 반응과 관련 있는 물질들의 유전자 발현을 조절하는 것으로 많은 연구들에서 보고된 바 있다¹⁸⁻²⁰.

여드름은 한의학적으로 面疱, 肺風粉刺, 瘰癧, 粉刺, 瘰, 面嗣, 面皰, 皰疱, 嗣面 등의 범주에 속하는데^{7,21,22} 肺熱血熱, 脾胃積熱, 熱毒熾盛, 血瘀痰凝, 陰虛血熱, 衝任不調 등의 원인으로 발생하며 치료는 淸肺胃, 淸熱解毒, 淸熱涼血滋陰, 健脾化痰利濕淸熱, 淸熱化濕通腑, 活血去瘀하는 방법을 위주로 하여 치료한다⁸.

최근에 여드름에 대해 처방 중심의 실험적 연구를 통해 肺經風熱로 인한 面疱에 加減枇杷淸肺飲²³이, 風熱毒으로 인한 面疱에 淸上防風湯²⁴이, 胃經風熱로 인한 面疱에 升麻胃風湯²⁵이, 血熱, 血瘀 및 衝任不調로 인한 面疱에 加味當歸芍藥散²⁶이, 瘀血性 面疱에 加味活血湯²⁷이 좋은 효과를 거둔 것으로 보고된 바 있다.

이러한 여드름이 발생하는 기전은 다양하나 임상에서 흔히 보는 血熱型 面疱에 대해 淸熱涼血法이 일반적으로 사용된다. 紫草는 淸熱藥 중 淸熱涼血藥에 속하며 性은 寒, 無毒하고 味는 甘하다¹⁰. 紫草는 肝, 心經에 歸經하고 血分의 熱을 없애서 血熱型 面疱에 응

용되는 本草이다⁹.

여드름의 정확한 원인은 밝혀져 있지 않으나 다양한 인자가 복합적으로 작용하여 여러 가지 임상증상을 나타낸다. 대표적으로 모낭벽의 과각화 및 비정상적인 탈락에 의한 면포형성(comedogenesis), 남성호르몬(androgen)에 의한 피지 분비(sebum production)의 증가, 박테리아(*P. acnes*)의 증식, 염증 유발, 피부장벽 기능의 이상, 유전적 요인, 환경적 요인, 모낭의 반응성 등이 제시되고 있다^{28,29}.

여드름의 치료는 피지분비 조절, 모낭과다각질화 교정, *P. acnes* 집락수 감소와 염증반응 억제를 기본 원칙으로 하는데 이 가운데 모낭과다각질화의 교정이 가장 중요하다¹. 경구 투약을 통한 전신 치료법으로 isotretinoin, 경구 항생제, 경구 retinoid (vitamin A 유도체), 경구 피임약, spironolactone 등을 사용하고, 국소 도포 치료법으로 면포 용해제, 각질 용해제, 항균제, 또는 sulfur, resorcinol, salicylic acid 등의 복합제제를 사용하고, 외과적 요법으로 압출(extraction), 화학적 필링(chemical peeling), 미세박피술(micro-dermabrasion) 그리고 광치료법 등을 사용한다. 이처럼 여드름에 대한 치료법은 아직 단일 치료법이 없으며 이러한 치료법에는 피부장벽의 약화로 인한 만성적인 피부염, 점막 및 피부 건조, 여드름 관련 균들에 대한 내성 등과 같은 부작용이 동반될 수 있다³⁰⁻³⁴.

여드름의 병리학적 기전은 비염증성 병변과 염증성 병변으로 대별되는데 비염증성 병변은 면포라는 기본적인 단위에서 시작된다². 면포는 피지샘성 모낭(sebaceous hair follicle) 내에 각질, 피지, 세균 등이 차 있는 상태로 개방면포와 폐쇄면포가 있다. 개방면포는 편평하거나 약간 융기된 구진의 형태로 나타나며 중앙에는 어두운 색의 각질로 채워진 구멍이 관찰된다. 이와 달리 폐쇄면포는 작은 구진의 형태로 구멍이 없으며 염증병변의 전구병변으로 작용하기 때문에 임상적으로 중요하다¹.

반면 염증성 여드름을 일으키는 과정에서는 혐기성

박테리아인 *P. acnes*의 증식이 주요한 요인으로 알려져 있다⁴⁾. *P. acnes*는 피부와 모낭 내에 존재하는 대표적인 상재균(skin flora)으로서 혐기성 그람양성 간균이며 호지성(lipophilic)으로 피지가 많은 부위에 주로 생육한다. McGinley³⁵⁾ 등은 신체 각 부위의 피지의 양과 *P. acnes*의 균수가 서로 관계되어 있음을 보였는데 피지의 양은 얼굴 부위에서 가장 많았고 *P. acnes*의 균수도 가장 높았다. 정제된 피지는 모낭의 공기순환을 차단하여 혐기성 세균인 *P. acnes*가 증식하기 좋은 환경을 만든다. 모낭 내에서 *P. acnes*는 지질분해효소(lipase)와 화학성인자(chemotactic factor) 등을 분비하여 유리지방산을 만들고 모낭주위로 다형핵백혈구를 끌어들이는다. 그리고 다형핵백혈구가 *P. acnes*를 포식하면 가수분해효소를 분비하여 모낭벽을 파괴하게 되고 모낭내용물이 진피내로 유출되어 염증반응과 이물반응이 일어나게 된다^{1,2)}.

각질세포에서 생성, 분비되는 cytokine들 중 TNF- α 는 염증반응의 시작을 유도하는 전염증성 cytokine으로서 그람음성세균 내독소 자극에 의해 단핵세포에서 합성이 촉진되며 혈관내피로의 백혈구의 유착을 증가시키고 Neutrophil, Eosinophil 및 Monocyte가 세균을 죽일 수 있도록 활성화시키고 또한 IL-1, IL-6, TNF- α 자체 및 chemokine의 생성을 자극한다³⁾. Chemokine은 화학주성을 유발하는 세포분비물질로서 CXC, CC, C 및 CX3C subfamily로 구분한다³⁶⁾. IL-8은 CXC Chemokine으로서 Neutrophil을 유도하고 활성화시키는 반면 MCP-1은 CC Chemokine으로서 Neutrophil을 제외한 Monocyte, Lymphocyte, Basophil, Eosinophil, NK세포 등을 유도하고 활성화시킨다³⁷⁾. 이러한 cytokine들이 면역과 염증반응에 조절기능을 나타내기 위해서는 특이성과 고도의 친화력을 갖춘 수용체와 결합한 후 신호전달 경로를 거쳐 신호를 표적세포의 핵으로 전달하게 되는데 cytokine의 신호전달 경로 중에서 NF- κ B와 JAK-STAT 등이 중요한 transcription factor로 알려져 있다^{1,6)}.

전사조절인자의 활성을 나타내는 NF- κ B는

inhibitor인 I κ B protein에 결합되어 세포질에 머물러 있다가 세포가 TNF- α , IL-1 β , bacterial lipopolysaccharide, 활성산소, 방사선 등에 의해 자극을 받게 되면 세포내의 IKK complex가 활성화 되고 IKK complex에 의해 I κ B가 인산화 된 후 파괴됨에 따라 NF- κ B가 세포의 핵내로 이동하게 된다⁶⁾. 핵내로 이동한 NF- κ B는 염증유발과 자가면역질환 유발, 세포의 증식 및 사멸에 관련된 다양한 유전자의 전사를 촉진하는 것으로 알려져 있으며 실제로 많은 항염증제와 항암제가 NF- κ B의 활성을 억제함으로써 약효를 나타내는 것으로 알려져 있다³⁸⁾. NF- κ B는 활성화 되었을 때 핵내로 이동하여 NF- κ B의 결합부위를 가진 DNA에 특이적으로 결합하며 결합부위주변의 유전자 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다³⁹⁾.

紫草의 *P. acnes*에 대한 항균 효능을 측정한 결과, 열수 紫草 추출물과 에탄올 紫草 추출물을 처리한 두 가지 처리군의 모든 농도에서 억제대가 관찰되지 않았다(Fig. 2). 본 실험에서는 기존의 연구들에서 보고한 紫草의 항균 작용을 확인할 수 없었는데, 이는 항균 효과가 있는 것으로 알려진 시코닌 성분의 함량이 다소 낮았기 때문으로 생각된다. 그리고 紫草 전초를 이용하여 추출하는 것보다는 紫草의 뿌리만을 사용하여 추출하는 것이 시코닌 성분의 함량을 높일 수 있을 것이다. 또한 항균성물질을 추출할 때 추출온도와 에탄올 농도 그리고 pH변화에 따라서 紫草의 항균력이 차이가 생기므로⁴⁰⁾ 이에 대한 분석이 필요하리라 생각된다.

HaCaT 세포에 대한 紫草 추출물의 세포 독성은 1,000 μ g/ml 이하의 모든 농도에서 관찰되지 않았다(Fig. 3). 紫草 추출물 처리에 따른 HaCaT의 형태학적 변화를 관찰한 실험에서는 HaCaT 세포주에 紫草 추출물과 *P. acnes*를 각각 0, 12, 24, 48시간 동안 처리하였을 때 세포의 형태학적인 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4).

염증성 cytokine인 TNF- α , IL-8, MCP-1의 mRNA 발현 양상을 real-time RT-PCR 방법으로 분

석한 결과, 여드름 유발균을 처리하였을 때 증가되는 TNF- α 와 IL-8 mRNA가 紫草 추출물을 동시에 처리한 경우에 24시간과 48시간 처리군에서 감소됨을 관찰할 수 있었다. 그러나 MCP-1 mRNA는 여드름 유발균과 紫草 추출물을 동시에 처리한 경우에 유의성 있는 감소는 관찰되지 않았다(Fig. 5).

紫草 추출물은 *P. acnes*에 의해 유발된 염증 관련 cytokine인 IL-8, MCP-1, TNF- α 의 mRNA 발현을 억제하는 것으로 나타났으며, TNF- α 단백질의 발현에서도 유사한 영향을 미칠 것으로 예상하였다. 그러나 HaCaT 세포의 배양과정에서 배양액으로 유리된 TNF- α 단백질의 양을 ELISA 방법으로 측정한 결과, 각각의 시료들에서 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 6). 이러한 결과는 피부 각질세포에서 TNF- α 의 분비를 조절하는 기작이 관련이 있을 것으로 생각되며 TNF- α 의 HaCaT 세포 내에서의 생성과 분비에 대한 분석이 필요할 것으로 생각된다.

염증 관련 cytokine mRNA의 발현을 조절하는 NF- κ B의 활성화 양상을 confocal microscopy 방법으로 분석하였다. 비활성화 상태의 NF- κ B는 세포질에 존재하다가 활성화되면 핵내로 이동하게 되는데, *P. acnes*에 의해 핵내로 이동되어 활성화된 NF- κ B가 紫草 추출물 처리 시 통계적으로 유의하게 핵내로의 이동이 억제되는 것을 관찰하였다(Fig. 7). 이러한 NF- κ B의 핵내이동 양상을 정량적으로 분석한 결과 *P. acnes*로 처리한 군에서는 NF- κ B의 활성화도가 75.34%였으나 여드름 유발균과 紫草 추출물을 동시에 처리한 군에서는 NF- κ B의 활성화도가 41.02%로 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 8).

다양한 세포들에서 전사 활성 인자로 작용하는 NF- κ B는 *P. acnes*에 의해 세포질에서 핵으로 이동이 유발되는 것을 관찰하였으며, 이는 염증 관련 cytokine mRNA의 발현이 증가하는 것과 관련성을 가지고 있다. 본 실험에서는 紫草 추출물을 처리하였을 때 *P. acnes*에 의해 유발되는 전사 인자인 NF- κ B가 핵으로 이동하는 것이 억제되어 염증 관련

cytokine들의 mRNA 발현을 감소시키는 결과를 나타냈다.

이상의 결과를 통해 紫草는 인간의 각질세포에서 여드름 유발균에 의해 증가되는 염증성 cytokine들의 mRNA 발현 양을 감소시키는 효과와 NF- κ B의 세포질에서 핵으로의 이동을 억제하는 효과가 있어서 염증성 여드름 치료에 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

실험 결과 紫草는 염증성 여드름 치료에 응용될 수 있을 것으로 인정되었는데 紫草는 항염작용 외에 항호르몬활성을 갖고 있어서^{9,14} 항후 紫草가 갖는 항호르몬활성이 호르몬의 과잉분비로 유발되는 여드름에 미치는 영향에 대한 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

여드름 유발균인 *P. acnes*와 紫草 추출물을 인간 각질세포인 HaCaT 세포주에 처리하여 염증 관련 cytokine 유전자의 발현에 미치는 영향을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

HaCaT 세포주에 대한 紫草의 세포 독성 실험에서는 紫草 추출물 1,000 μ g/ml 이하의 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다. 紫草 추출물 처리에 따른 HaCaT의 형태학적 변화를 관찰한 실험에서는 HaCaT에 紫草 추출물과 *P. acnes*를 처리하였을 때 세포의 형태학적인 변화는 관찰되지 않았다.

紫草는 *P. acnes*에 의해 유발된 염증성 cytokine인 IL-8, MCP-1, TNF- α 등의 mRNA 발현 증가를 감소시키는 효과를 나타냈지만, HaCaT 세포주에서 유리되는 TNF- α 의 양에는 영향을 미치지 않았다.

紫草는 *P. acnes*로 자극한 HaCaT 세포주에서 NF- κ B의 세포질에서 핵으로의 이동을 유의성 있게 억제하는 효능을 나타냈다. 紫草에 의한 염증성 cytokine들의 mRNA 발현 감소 효과는 전사 인자인 NF- κ B

의 세포질에서 핵으로의 이동이 억제되는 것과 관련성이 있음을 확인하였다.

이상의 결과를 통해 紫草는 인간의 각질세포에서 여드름 유발균에 의해 증가된 염증성 cytokine들의 mRNA 발현 양을 감소시키는 효과와 NF- κ B의 세포질에서 핵으로의 이동을 억제하는 효과가 있어서 염증성 여드름 치료에 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

VI. 감사의 글

이 논문은 2013년도 가천대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

VII. 참고 문헌

1. Korean Dermatological Association Textbook Compilation Committee, 5th Edition Dermatology, Seoul:Ryo Moon Gak P. Co, 2008:446-54.
2. Jeong JY, Acne. Seoul:MD world, 2007:15, 32-5, 63-5, 142-58, 207-8, 201-2, 214, 517-38, 711-2, 812-25.
3. Cunliffe WJ, et al, Comedogenesis: some new aetiological, clinical and therapeutic strategies, Br J Dermatol, 2000;142:1084-91.
4. Vowels BR, Yang S, Leyden JJ, Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: Implications for chronic inflammatory acne. Infect Immunol, 1995;63:3158-65.
5. Gong TX, Recovery from All ailments, Seoul:Uiseongdang, 1993:271.
6. Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, et al, Signal-induced site specific phosphorylation targets I κ Ba to the ubiquitin proteasome pathway. Genes Dev, 1995;9:1586-97.
7. Wu KQ, Pathogens Dictionary, Tianjin:Gu-Ji Shu Dian, 1998:511.
8. Chen SD, Shi Shi Mi Lu, Beijing:Zhong Yi Gu Ji Publishing Inc, 1999:146.
9. Ge H, Handbook of Prescriptions for Emergencies, Beijing:Ren Min Wei Sheng Publishing Inc, 1996:196.
10. Lou Y, Yi Xue Gang Mu, Beijing:Zhong Yi Gu Ji Publishing Inc, 1999:506.
11. Park BG, Oriental Medicine Clinical forty years, Seoul:DaegwangMunhwasa, 1979:460-1.
12. Yang SJ, Effects of Hedyotis diffusa in patients with acne, Graduate School of Complementary Alternative Medicine Pochon CHA University Master's thesis, 2005.
13. Seo HS, Studies of the Effects of Gami-Shengmayuipung-tang on Acnes, The Journal of Korean Oriental Meidical Society, 2005;26(1):134-47.
14. Wu Q, Golden Mirror of Medicine, Taipei:Da Zhongguo Tu Shu Gong Si, 1973:125.
15. Rho SS, Full-color Dermatology, Seoul:IBC Design, 2006:737-41.
16. Chen SD, Dong Tian Ao Zhi Geka Hiroku, Seoul:Uiseongdang, 1993:112-3, 210-1.
17. Chen SG, Wai ke zheng zong, Beijing:Ren Min Wei Sheng Publishing Inc, 1964:255.
18. David JG, Dermatology an Illustrated Colour Text, Seoul:Koon Ja Publishing Inc, 2010:62-3.
19. Paul WE, Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine, Blood, 1991;77:1859-70.

20. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DY. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:178-89.
21. Sin MK. Clinical Traditional Herbalogy. Yeongnimsa, 2002:172-3, 242-3, 252-3, 247, 372-3, 400-1, 431, 756-7.
22. Leslie B. Cosmetic dermatology. Seoul: Jungdam Media, 2004:75-81.
23. Kim YG. Ear Acupuncture. Seoul: Myeongmundang, 1992:67.
24. Department of Dermatology, Seoul National University College of Medicine. Dermatology for Medical Students. Seoul:Korea Medical Book Publishing, 2001:203-7.
25. Ahn SG, Lee SH. The core dermatology. Seoul:Korea Medical Book Publishing, 1999:181-4.
26. College of Oriental Medicine Dermatology & Surgery Textbook Compilation Committee. Text of Traditional Korean Dermatology & Surgery. Busan:Sunwo, 2007:486-91.
27. Korean Dermatological Association Educate Publication Committee. Revised Fourth Edition Dermatology. Seoul:Ryo Moon Gak P. Co, 2001:461-6.
28. Hitoshi H. Diagnosis and treatment of skin diseases. Guangzhou:Seogwang Medical Bookstore, 1988:93.
29. Korean Dermatological Association Educate Publication Committee. Dermatology. Seoul:Ryo Moon Gack P. Co, 1987:220-4.
30. Borich L. Allergic rhinitis: Systemic inflammation and implications for management. *J Allergy Clin Immunol*. 2002:60-2.
31. Im HS. The Experimental study of Gagambipachungpe-Eum on Acne. Graduate school of Kyung Hee University Master's thesis, 2000.
32. Chrousos GP. Stress, chronic inflammation, and emotional and physical well-being: Concurrent effects and chronic sequelae. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106:S275-91.
33. Friedmann PS, Tan BB, Musaba E. Pathogenesis and management of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy*. 1995;25: 799-806.
34. Koreck AI, Csoma Z, Bodai L, Ignacz F, Kenderessy AS, Kadocsa E, et al. Rhinophototherapy: A new therapeutic tool for the management of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:541-7.
35. McGinley KJ, et al. Regional variation in cutaneous propionibacteria. Correlations of *P. acnes* populations with sebaceous secretion. *J Clin Microbiol*. 1980;12:672-5.
36. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997;90: 909-28.
37. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today*. 1999;20:245-57.
38. Dejardin E, Deregowski V, Chapelier M, Jacob N, Gielen J, Merville M, et al. Regulation of NF- κ B activation by I κ B related proteins in adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 1999;18:2567-77.
39. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Hayashi T, Munshi N, et al. NF- κ B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J. Biol. Chem*. 2002;277:16639-47.
40. Seong RG. Modern Acupuncture and Moxibustion. Seoul:Haengrim Publication, 1987:678.