

## 약용식물 추출물의 아토피성 피부염에 대한 항염증 및 항알레르기 효과 (제 2 보)

랑문정<sup>†</sup>

배재대학교 분자과학부

(2013년 2월 26일 접수; 2013년 3월 24일 수정; 2013년 3월 25일 채택)

### Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Herbal Extracts on Atopic Dermatitis ( Part II )

Moon-Jeong Rang<sup>†</sup>

*Division of Molecular Science, Pai Chai University,  
14, Yeonja-1-Gil, Seo-Gu, Daejeon, 302-735, Korea*

*(Received February 26, 2013 ; Revised March 24, 2013 ; Accepted March 25, 2013)*

**요약** ; 아토피성 피부염은 만성 재발성 염증성 피부질환으로 피부장벽기능의 이상과 환경유발인자에 대한 피부과민성과 연관되어 있다. 이전의 연구에서는 아토피성피부염에 효과적인 약용식물 추출물을 발굴하기 위하여 노회, 자화지정, 석류, 석곡 추출물들의 세포독성, 항산화, 항염, 항알레르기 효과를 검토하였다. 본 연구에서는 지질다당류로 활성화시킨 대식세포 RAW26.7 에 대한 약용식물 추출물들의 항염작용을 보다 상세하게 검토하여 항염작용의 근본적인 분자기전을 확인하고자 하였다. 역전사중합효소연쇄반응분석(reverse transcription polymerase chain reaction analysis) 결과, 석류, 석곡, 노회는 염증성 사이토카인인 IL-6와 IL-1 $\beta$  유전자발현을 현저하게 억제시켰으며 자화지정은 영향이 없었다. 형질주입과 발광효소분석(transfection and luciferase analysis) 결과, 약용식물 모두가 전사 핵인자 카파비(NF- $\kappa$ B)의 활성화를 억제시켰다. 웨스턴 블롯 분석(western blot analysis) 결과, 노회는 JNK MAP 인산화효소의 활성화를 차단하였지만 p38 MAP 인산화효소의 활성화는 차단하지 못하였다. 반면에 자화지정, 석류, 석곡은 JNK MAP 인산화효소뿐만 아니라 p38 MAP 인산화효소의 활성화도 차단하였다. 이들 실험결과들은 노회, 자화지정, 석류, 석곡은 항염효과를 가지고 있으며 따라서 아토피성 피부염의 증상을 경감 또는 완화시키는 잠재력이 있음을 보여 준다.

주제어 ; 아토피성 피부염, 노회, 자화지정, 석류, 석곡

**Abstract** ; Atopic dermatitis is a chronic, relapsing inflammatory skin disease associated with dysfunction of skin barrier and cutaneous hyper-reactivity to environmental triggers. In the previous study, cytotoxicity, antioxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities were investigated for various herbal extracts such as *Aloe vera L.* (AV), *Viola mandshurica W. Becker* (VM), *Punica granatum L.* (PG), and *Dendrobium nobile L.* (DN) in order to develop effective therapeutic herbal extracts for atopic dermatitis. In this study, anti-inflammatory activities of these

<sup>†</sup>주저자 (E-mail ; mjrang@pcu.ac.kr)

herb extracts in lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage RAW264.7 cells were further examined to find the underlying molecular mechanisms. The RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) analysis showed that PG, DN and AV inhibited effectively the gene expression of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-1 $\beta$  in LPS-stimulated macrophages, while VM did not. The transfection and luciferase analysis exhibited that all herbal extracts hindered the activation of transcription nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B). The western blot analysis indicated that AV blocked the activation of only JNK MAP (c-Jun N-terminal kinase mitogen-activated protein) kinase not p38 MAP kinase, while VM, PG and DN did not show the activation of both JNK and p38 MAP kinases. These results suggest that AV, VM, PG, and DN have anti-inflammatory activities and thus have the potential to reduce and alleviate the symptoms of atopic dermatitis.

*Keywords ; atopic dermatitis, Aloe vera L. , Viola mandshurica W. Becker , Punica granatum L. , Dendrobium nobile L.*

## 1. 서론

아토피 질환(atopic diseases)은 아토피성 피부염(피부), 천식(기관지), 알레르기성 비염(코), 알레르기성 결막염(눈) 등과 같이 발병원인을 명확하게 알 수 없는 다양한 질환들을 통틀어서 일컫는 용어이다. 이들 가운데 아토피성 피부염(atopic dermatitis) 또는 아토피성 습진(atopic eczema)이라고 불리는 피부질환은 일반적으로 유아 및 소아에게 발생하는 만성 및 재발성 질환으로 심한 가려움(소양증, pruritus)과 피부습진 등 증상이 여러 가지 원인에 의해 악화, 완화, 재발 등의 악순환이 계속된다 [1-3]. 습진(eczema)은 임상적으로 가려움증, 홍반, 비늘(인설, scale)과 군집된 구진(papule), 수포(blisters)를 보이고, 조직학적으로는 표재성 피부염으로서 표피에는 해면화(spongiosis)를 동반하고, 진피에는 혈관주변에 염증세포가 침윤된 염증성 피부반응을 보이는 피부 질환군을 통칭하는 용어이다. 일반적으로 피부염과 습진을 동의어로 사용하고 있으나, 피부염은 피부의 모든 염증성 질환을 지칭하는 용어로 피부염이 습진보다 광범위한 의미가 있다 [4].

심한 가려움을 동반하는 습진의 일종인 아토피 피부염은 유전적 원인과 환경적 원인으로 인해 발병한다. 아토피 피부염이 발병한 사람의 80~90%가 아토피질환의 가족력이 있다는 것은 아토피 피부염의 원인중 유전적 요소가 중요하다는 것으로 보여 준다. 그리고 식생활, 주거환경 등의 환경적 원인은 외부 알레르기유발 물질이

공기, 음식, 접촉 등에 의해 피부에 과민한 면역 반응을 일으킨다. 아토피 피부염의 발병 및 악화인자는 음식물, 땀, 세균, 진드기, 접촉항원, 기후환경인자, 스트레스 등 여러 가지가 있으며 개 개인의 유전적인 특성 때문에 다양한 환경인자에 대한 알레르기 반응의 발생 정도가 개개인에 따라 다르다 [2]. 아토피 피부염은 유전적 원인에 의한 피부장벽 기능이상과 비정상적인 피부면역반응과 환경적 원인인 실내외의 각종 알레르기 유발물질이 복합적으로 작용하여 발생하는 다인자성 질환(multifactorial disease)이라고 볼 수 있다 [5].

아토피 피부염이 유전의 영향을 많이 받는 질환이지만 유전자의 변화가 나타나기에는 너무 짧은 시간인 최근 20~30년 사이에 아토피 피부염 환자가 급격하게 증가한 것은 방아쇠 이론으로 설명할 수 있다. 즉, 과거에는 유전적 원인을 가진 경우라도 아토피 피부염을 발병시키는 환경적 원인 인자가 미미하여 아토피 피부염의 발병이 미미하였으나, 현대 산업화 과정에서 환경의 변화로 인해 환경적 원인 인자가 증가함에 따라 아토피 피부염의 발병이 증가한 것이다. 유전적 소인이 있다는 것은 총알이 장전되어 있는 상태로 비유할 수 있는데 총알이 장전되어 있더라도 방아쇠를 당기지 않으면 총알이 발사되지는 않는다. 최근의 환경변화로 항원 및 위험요인에 높은 농도로 빈번하게 노출되는 상황이 방아쇠를 당기는 역할을 해서 유전적 소인이 있는 사람에서 아토피 피부염이 많이 발생하고 있다고 볼 수 있는

것이다 [6].

아토피 피부염의 임상적 증상들의 직접적인 원인은 알레르기 유발 물질에 대한 피부 방어 및 보호 기능이 약화되거나 피부 면역반응이 과민하게 발생하기 때문이다. 첫째 원인은 각질형성세포의 기능이상으로 피부의 각질층의 구조적 결함에 의해 수분유지기능과 피부장벽기능이 저하되고 정상피부에서는 침투가 어려운 세균 및 이물질이 피부에 침투하여 자극 및 알레르기 반응이 쉽게 일어나는 것이다. 둘째 원인은 피부 면역학적 과민반응으로, 아토피 피부염이 발생한 경우에 나타나는 여러 가지 면역학적 이상 현상은 면역글로브린(IgE)의 합성 증가, 다양한 항원들에 대한 면역글로브린의 증가, B 림프구와 단핵구의 IgE 수용체의 발현 증가, 비만세포/호염구에 의한 히스타민 분비 증가, 지연형 과민반응 증가, 호산구(eosinophil)의 증가, 제 2 형 보조 T 림프구(Th2 lymphocyte)에 의한 인터루킨 IL-4, IL-5, IL-13의 분비 증가, 제 1 형 보조 T 림프구(Th1 lymphocyte)에 의한 인터페론 INF- $\gamma$ 의 분비 감소 등 다양하고 복잡한 양상을 보이고 있다 [7-11]. 그리고 면역학적 과민반응의 의해 나타나는 다양한 염증반응 사이토카인들 중 일부는 각질형성세포의 기능 이상을 초래하는 데, 이는 피부장벽의 기능 이상이 염증반응을 유도하고, 유도된 염증반응이 다시 피부장벽 기능 이상을 유도하는 순환과정에 의해 아토피 피부염이 악화되는 것이다 [12].

최근에는 필라그린(filaggrin)을 중심으로 아토피 피부염의 피부장벽기능 이상의 원인을 규명하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다 [13-17]. 필라그린은 피부표피의 각질층 바로 밑에 있는 과립층의 과립세포내부에 존재하는 케라토히아린 과립(keratohyaline granule)의 구성성분이며 이 필라그린은 케라틴 필라멘트로 응집되는 성질로 인해 피부의 가장 바깥층인 각질층을 형성하여 피부장벽기능을 하게 된다. 또한, 필라그린의 일부는 분해되어 각질층에서 아미노산 형태로도 존재하는 데 이들 아미노산은 천연보습인자로서 각질층에 보습작용을 하게 된다. 그리고 필라그린의 분해산물인 각종 유기산들이 표피의 pH를 산성으로 유지시키고 항균작용을 하게 된다. 필라그린의 유전자의 기능결함 돌연변이(loss-of-function mutation) 또는, 다른 원인에 의한 필라그린 발현의 감소는 각질층의 구조적 결함을 초래함으로써 피부장벽기능과 수분유지

능이 저하된다. 또한, 유기산 감소에 의한 표피 pH의 상승은 황색 포도상구균의 활발한 증식을 유도하는 데 이 포도상구균의 구조단백질이 면역반응과 염증반응을 촉발한다.

피부장벽 기능이상과 과민성면역반응에 의한 아토피 피부염을 적극적으로 치료하기 위해서는 피부의 보습 및 장벽기능 유지 또는 회복, 그리고 면역기능 억제 및 조절 등을 목적으로 개개인 특성과 증상의 정도에 따라 선택적으로 다양한 방법과 성분이 사용되어 왔다. 증상이 심한 아토피 피부염치료의 일차 치료제로는 항염효과가 있는 국소 코티코스테로이드(topical corticosteroids) 제제를 사용할 수 있으나 부작용 등으로 장기간 사용이 불가하다 [18]. 국소 코티코스테로이드 제제를 계속 써도 효과가 없을 때나 부작용이 문제될 때에 사용하는 이차 치료약제는 국소 칼시뉴린 억제제(topical calcineurin inhibitors ; TCIs)인 Tacrolimus (1%크림)와 Pimecrolimus (0.03%크림, 0.1%크림) 두 종류가 있다. 이들 TCIs는 부작용없이 아토피 피부염을 효과적으로 치료한다고 되어 있으나 작용기전상 발암가능성이 있다는 문제점이 있다 [19]. 증상이 심한 아토피 피부염치료를 위하여 일차 및 이차 치료제를 사용하면서 보조적인 치료제로 통상 보습제를 함께 사용한다. 그리고 예방 또는 경미한 아토피 피부염 증상의 개선 목적으로는 보습제, 유사 세라마이드(pseudoceramide) [20,21], 감마 리놀렌산을 다량 함유하고 있는 식물성 오일, 그리고 항알레르기/항염/염증완화/항히스타민/항균효과가 있는 식물 추출물을 함유한 제제들을 국소 도포한다 [22,23]. 최근에 미국 FDA에서 아토피 피부염치료용 'medical device'로 승인된 비스테로이드성 장벽크림(nonsteroidal barrier cream ; Atopiclair, Mimyx, Epiceram)들은 보습제(히아루론산), 항염제(감초산, N-팔미토일에탄올아민), 지질(중성지방, 스쿠알란, 인지질, 파이토스테롤, 콜레스테롤), 세라마이드, 유리지방산 등을 함유하고 있어 피부장벽기능을 회복시키고 약간의 항염작용을 통해 아토피 피부염의 증상 완화에 사용되고 있다 [24]

저자에 의한 이전 연구에서는[25] 아토피 피부염 증상완화에 효과적인 약용식물 추출물을 발굴하기 위하여 의학서에 기록된 한약재에 관련한 문헌조사를 통해 선정된 한약재 120종을 1, 2차 스크리닝 실험을 통해 노회(蘆薈, Aloe vera L., AV), 자화지정(紫花地丁, Viola mandshurica

W. Becker, VM), 석류(石榴, *Punica granatum* L., PG), 석곡(石斛, *Dendrobium nobile* L., DN) 등 4 종의 약재를 선정하였고 이들 약용식물 추출물에 대하여, 세포독성과 항산화, 항염증, 항알레르기 등의 효능을 *in vitro* 및 *in vivo* test 방법으로 평가하였다. 특히 항염효능에 있어서 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 활성화된 대식세포(macrophage)에 대한 약용식물 추출물의 nitric oxide(NO) 생성억제 실험결과, 노회, 석류, 석곡, 자화지정 및 혼합추출물 모두 농도 의존적으로 LPS에 의한 NO 생성을 억제하였다. 특히, 노회 및 석곡의 경우는 LPS에 의한 NO 생성을 거의 100% 억제 하는 효과를 나타내었다. 대식세포에 대한 TNF- $\alpha$  생성억제 실험결과, 노회, 석곡, 자화지정은 TNF- $\alpha$  생성억제효과가 큰 것으로 나타났으며 석류의 경우는 그 효과가 적었다. 특히 노회의 경우는 NO 및 TNF- $\alpha$  생성 모두를 가장 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

면역세포중의 하나인 대식세포는 LPS 같은 외부항원에 의해 자극시 NO, 종양괴사인자(tumor necrosis factor alpha : TNF- $\alpha$ ), 인터루킨 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 인터루킨 6 (IL-6)와 같은 염증유발 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)들이 분비된다. LPS는 대식세포의 toll-like receptor (TLR) 4에 작용하여 핵인자 카파 비(nuclear factor  $\kappa$  B : NF- $\kappa$ B)와 미토젠활성 단백질인산화효소(mitogen-activated protein kinase : MAPK)가 활성화되면서 사이토카인관련 유전자의 발현을 통해 염증매개물질들이 생산되어 분비된다 [26]. 본 연구에서는 노회, 석류, 석곡, 자화지정 등 네 가지 약용식물 추출물에 대하여 신호전달체계 활성화 억제기전을 확인하는 실험을 통해 그 적용가능성을 보다 상세하게 검토하여 아토피 피부염의 증상을 개선 완화할 수 있는 약용식물 추출물 소재를 개발하고자 한다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약

본 실험에 사용된 약용식물인 노회, 자화지정, 석류, 석곡은 국내 약초시장인 경동시장에서 구입하였다. 시약류는 분석시약급을 사용하였다

### 2.2. 기기

본 시험에 사용된 기기는 감압농축기 (EYELA,

Japan), UV spectrophotometer (Shimadzu, Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Jeotech, Korea)이었다.

### 2.3. 약용 식물 추출

약용식물 각각 100 g을 파쇄한 다음 99.5 %의 에탄올과 1:5(W/V)로 섞어 상온에서 72 시간 동안 냉침한 후에 추출물을 여과지(Whatmann No. 2)로 여과한 다음 감압농축기로 45 °C에서 농축하여 용매를 완전히 제거한 시료를 얻었다.

### 2.4. Cell Culture

Macrophage RAW 264.7 cell(ATCC, USA)은 배양액을 37 °C에서 5 % CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양액으로는 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, USA)배지에 10 % fetal bovine serum (Gibco), 100-units/mL penicillin (Gibco), 100 ng/ml streptomycin (Gibco), 0.25 g/mL amphotericin B (Gibco), 1X non-essential amino acids solution (Gibco)을 첨가하였다.

### 2.5. 항염증효과 실험

대식세포 (macrophage)인 RAW 264.7 세포를 Dulbecco's modified Eagle's medium으로 배양한다. 대식세포 활성을 위해서는 LPS (lipopolysaccharide ; E. coli B0111:B4; Sigma, USA)를 이용한다. 대식세포는 알레르기성 염증반응을 매개하는 중요한 면역관련세포로서 LPS와 같은 외부항원 자극시 염증성 사이토카인 유전자 발현과 NF- $\kappa$ B와 MAPK 같은 신호전달체계를 활성화시킴으로서 이후의 염증반응을 매개함이 잘 알려져 있다.

#### 2.5.1. 사이토카인유전자 발현억제 실험

대식세포를 LPS로 자극시 발현되는 사이토카인인 인터루킨 IL-6, IL-1 $\beta$ 의 유전자발현을 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction ; RT-PCR)으로 측정하여 약용식물 추출물에 의한 염증성 사이토카인 유전자 발현억제효과를 평가하였다. 즉 RAW 264.7 세포에 다양한 농도의 약용식물 추출물을 30분간 전처리한 다음, LPS (0.5  $\mu$ g/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양액을 수거하여 total RNA는 Easy-blue (Intron, Daejeon, Korea)를 이용하여 추출하였고, UV spectrophotometer를 이용하여 260/280 nm에서

정량하였다. Total RNA는 RT-PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 GAPDH, IL-6, IL-1 $\beta$  primer (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이후, 1.2% agarose gel에 전기영동한 후 densitometer로 발현양을 확인하였다 [27, 28].

### 2.5.2. NF- $\kappa$ B 활성화 억제 실험

NF- $\kappa$ B luciferase reporter 유전자를 대식세포에 transient transfection처리한 후 대식세포가 LPS에 의해 세포내의 NF- $\kappa$ B가 활성화되면 luciferase에 의해 발광되는 원리를 이용하여 NF- $\kappa$ B의 활성화 정도를 확인하였다. Transient transfection처리된 RAW 264.7 세포에 10 ppm의 약용식물 추출물을 전처리한 후 30분간 배양하고 LPS (0.1  $\mu$ g/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 약용식물 추출물의 NF- $\kappa$ B 활성화 억제 효과는 luciferase assay system (Promega, USA)를 이용하여 측정하였다 [29].

### 2.5.3. MAPK 활성화 억제 실험

대식세포가 LPS에 의해 세포내 MAPK가 활성화되는 정도를 웨스턴 블롯 분석(western blot analysis)으로 확인하였다. 즉 RAW 264.7 세포에 각각 10 ppm, 100 ppm의 약용식물 추출물을 전처리한 후 30분간 배양하고 LPS (0.1  $\mu$ g/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양액을 수거하여 완충식염수와 lysis buffer로 처리한 후 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후 단백질을 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane)에 transfer 하였다. 이 멤브레인을 blocking buffer로 처리시킨 후, 각 검증 단백질에 대한 항체 anti-JNK와 anti-p38(Intron, Daejeon, Korea)를 가하여 반응시켰다. 그리고 enhanced chemiluminescence detection kit (Intron, Daejeon, Korea)으로 반응 발광시킨 후 X-ray film에 감광시켰다 [30,31].

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 사이토카인 유전자발현억제 실험결과

대식세포는 알레르기염증반응을 매개하는 중요한 면역세포로서 LPS같은 외부항원 자극시 염증반응을 유도하는 다양한 염증 매개성 사이토카인

의 유전자발현이 현저히 증가하는 것으로 알려져 있다. Fig. 1, 2, 3, 4는 대식세포가 LPS로 자극시 발현되는 염증성 사이토카인인 인터루킨 IL-6과 IL-1 $\beta$ 의 유전자발현에 대한 약용식물 추출물(석류, 석곡, 자화지정, 노회)들에 의한 억제효과를 RT-PCR 방법으로 평가한 결과를 보여 준다.

Fig. 1, 2, 3, 4에서 볼 수 있듯이 약용식물 추출물의 처리농도 0.01%, 0.001% 조건하에서 나는 사이토카인 유전자발현 억제효과는 석류, 석곡, 노회에서는 억제효과가 확실하게 나타났으나 자화지정에서는 억제효과가 거의 나타나지 않았다. 이전의 연구에서는[32] LPS에 의한 NO 생성을 억제하는 효과는 노회(AV), 석류(PG), 석곡(DN), 자화지정(VM) 모두 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였고 LPS에 의한 TNF- $\alpha$  생성억제효과는 노회, 석곡, 자화지정은 효과가 큰 것

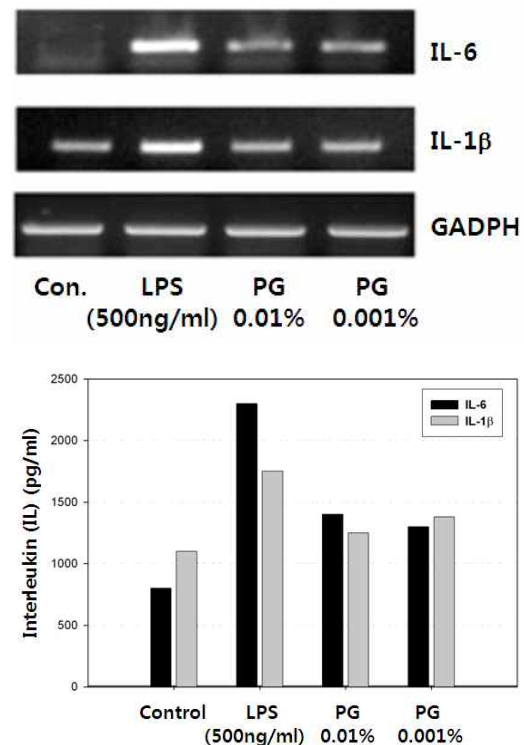


Fig. 1. Inhibitory effect of medicinal herb extract on gene expression of inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 $\beta$ ) in macrophage RAW264.7 cells. Medicinal herb extract ; Punica granatum L. (PG).

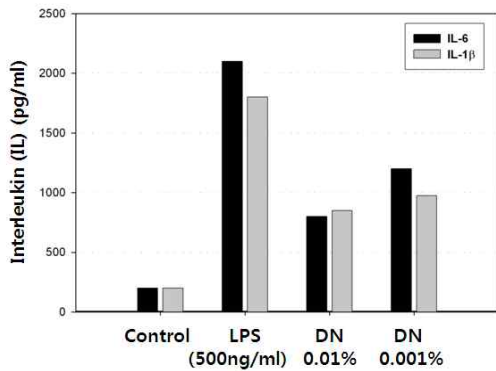
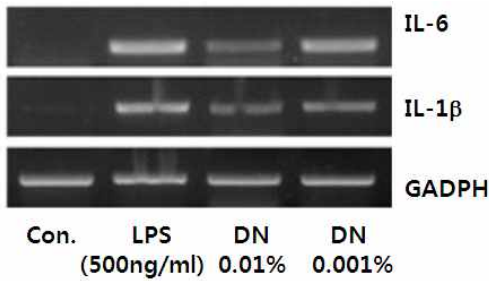


Fig. 2. Inhibitory effect of medicinal herb extract on gene expression of inflammatory cytokines (IL-6, IL-1β) in macrophage RAW264.7 cells. Medicinal herb extract ; *Dendrobium nobile* L. (DN).

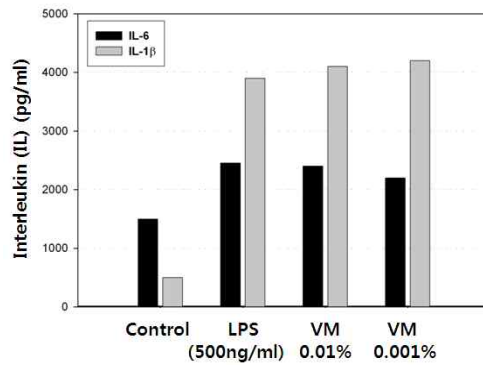
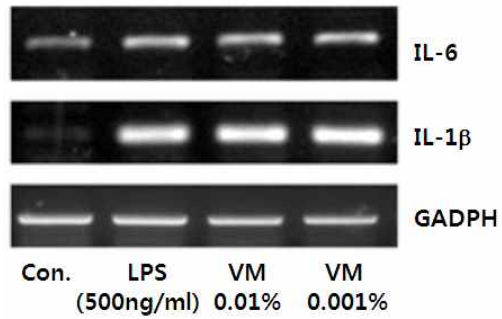


Fig. 3. Inhibitory effect of medicinal herb extract on gene expression of inflammatory cytokines (IL-6, IL-1β) in macrophage RAW264.7 cells. Medicinal herb extract ; *Viola mandshurica* W. Becker (VM).

로 나타났으며 석류의 경우는 그 효과가 적었다. 특히 노회의 경우는 NO 및 TNF-α 생성 모두를 가장 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 본 실험에서도 노회가 가장 효과적으로 인터루킨 IL-6과 IL-1β의 유전자발현을 억제하는 것으로 나타났다. 하지만 Fig. 4에서 노회의 처리농도가 0.001%인 경우는 IL-1β 유전자발현이 오히려 약간 증가하고 처리농도가 0.01%인 경우는 IL-1β 유전자발현이 급격하게 감소하는 것을 보여준다. 노회의 polysaccharide성분이 대식세포 등 면역세포를 활성화시켜 다양한 염증성 사이토카인을 분비한다는 보고도 있어 [33,34] 노회는 농도에 따라 염증성 사이토카인 분비를 활성화 또는 억제하는 것으로 판단된다. 자화지정의 경우 이전의 연구에서[35] NO 생성을 효과적으로 억제하지 못하였으며 IL-6과 IL-1β의 유전자발현을 제대로 억제하지 못하였다 (Fig. 3).

### 3.2. NF-κB 활성화 억제 실험결과

대식세포는 LPS 등과 같은 외부 항원에 의해 자극을 받으면 NF-κB와 같은 세포내 신호전달 체계를 경유하여 염증성 사이토카인 분비를 활성화한다고 한다. 즉 전사인자(transcription factor)인 NF-κB는 정상상태에서는 세포질내에서 억제 분자 Iκ-Ba와 결합된 불활성형으로 존재하며 외부 자극요인에 의해 Iκ-Ba가 인산화(phosphorylation)되면서 NF-κB로부터 분리되면, Iκ-Ba-free NF-κB가 핵안으로 이동하여 염증성 사이토카인의 생성을 유도한다 [36-38] Fig. 5를 보면 LPS 처리전에 비해 처리후 RLU가 약 5배정도 증가하여, 대식세포는 LPS로 자극시 NF-κB 신호전달체계를 통해 활성화됨을 명확하게 나타낸다. 석류(PG), 석곡(DN), 자화지정(VM), 노회(AV) 등의 약용식물 추출물로 각각

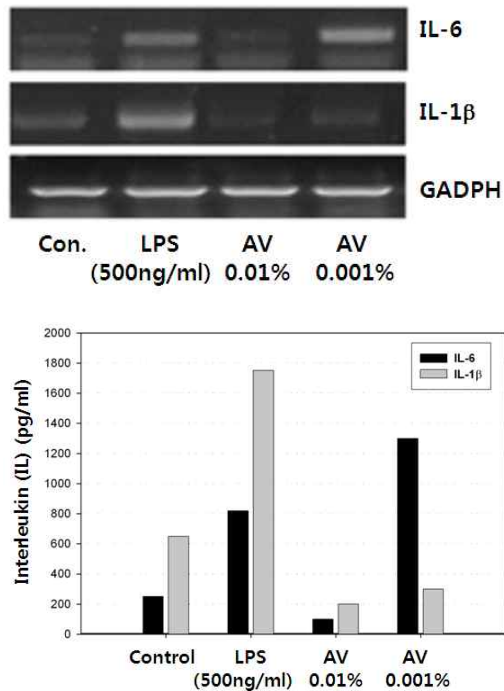


Fig. 4. Inhibitory effect of medicinal herb extract on gene expression of inflammatory cytokines (IL-6, IL-1β) in macrophage RAW264.7 cells. Medicinal herb extract ; Aloe vera L. (AV).

처리시 RLU가 모두 감소함을 보여 준다. 이는 석류, 석곡, 자화지정, 노회 등의 약용식물 추출물은 LPS에 의한 NF-κB 활성화를 효과적으로 억제함을 보여 주었다. 특히 석류와 석곡은 10ppm의 처리농도에서 각각 95%, 90%의 억제 효과는 나타냈고, 노회와 자화지정은 같은 농도로 처리시 각각 54%, 37%의 억제효과를 보여 석류와 석곡에 비해 NF-κB 활성억제능이 떨어지는 것으로 판단되었다 (Fig. 5).

**3.3. MAPK 활성억제 실험결과**

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 세포의 증식, 분화, 발생, 사멸 등 다양한 생물학적 반응에 관여하는 효소로서 중요한 기능을 한다 [39]. 대식세포는 LPS 등과 같은 외부 항원에 의해 자극을 받으면 MAPK와 같은 세포내 신호 전달체계를 경유하여 염증성 사이토카인 분비를

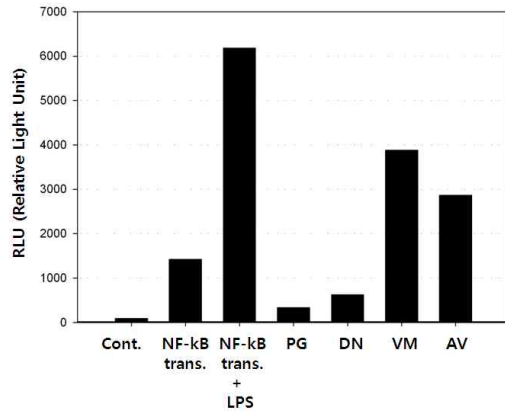


Fig. 5. Inhibitory effect of various medicinal herb extracts on activity of NF-κB in macrophage RAW264.7 cells. Medicinal herb extracts ; Aloe vera L. (AV), Punica granatum L. (PG), Dendrobium nobile L. (DN) and Viola mandshurica W. Becker (VM).

활성화한다고 한다. 다양한 MAPK 단백질인산화효소 중 JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38 MAP kinase가 염증성 사이토카인 분비에 관련된 신호전달체계에 중요한 역할을 하고 있다. 이들 MAPK들은 정상상태에서는 인산화되지 않은 불활성 상태에서는 세포질에 머물다 인산화에 의하여 활성화되면 핵으로 이동하면서 사이토카인 생성에 관여한다 [40, 41]. Fig. 6을 보면 노회 100 ppm으로 처리한 경우 JNK MAP kinase의 활성이 현저히 억제되었으나 p38 MAP kinase의 활성에는 영향이 없었다. 그리고 자화지정, 석류, 석곡은 JNK 및 p38 MAP kinase의 활성을 억제하지 못하였다. 이와 같이 약용식물 추출물들은 다양한 신호전달체계에 작용하여 항염 효능을 나타낸다 [42, 43].

석류, 석곡, 자화지정, 노회 등의 약용식물 추출물에 대한 NF-κB 활성억제 실험결과와 MAPK 활성억제 실험결과를 종합하면 석류, 석곡, 자화지정은 NF-κB 활성을 억제함으로써, 그리고 노회는 NF-κB과 JNK MAP kinase 활성을 억제함으로써 항염 효능을 나타낸다고 판단된다.



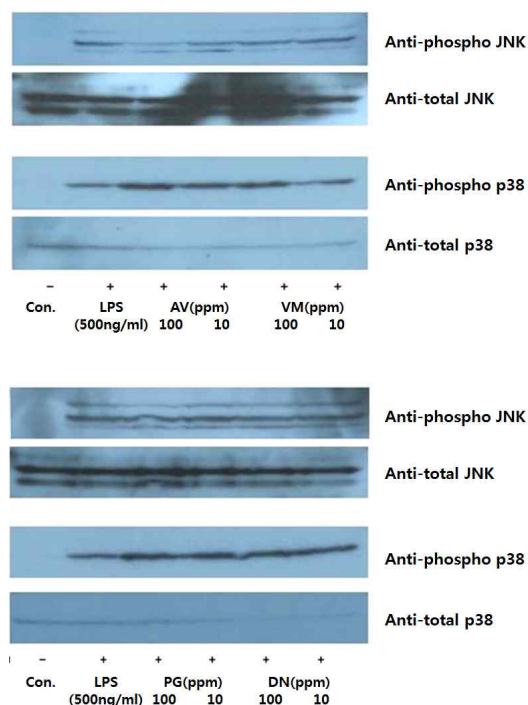


Fig. 6. Inhibitory effect of various medicinal herb extracts on activities of JNK and p38 MAPK in macrophage RAW264.7 cells. Medicinal herb extracts ; Aloe vera L. (AV), Punica granatum L. (PG), Dendrobium nobile L. (DN), Viola mandshurica W. Becker (VM).

#### 4. 결론

아토피 피부염증상완화에 효과적인 약용식물 추출물을 발굴하기 위해 노회, 자화지정, 석류, 석곡 등 4종의 약재에 대하여 대식세포를 lipopolysaccharide(LPS)로 자극시 염증성 사이토카인 IL-6 과 IL-1 $\beta$ 의 유전자발현 억제실험과 염증반응의 신호전달체계인 NF- $\kappa$ B 과 MAP kinase 활성 억제실험을 수행하였다.

LPS 로 자극된 대식세포에 대한 약용식물 추출물의 사이토카인 IL-6 과 IL-1 $\beta$ 의 유전자발현 억제 실험결과, 약용식물 추출물의 처리농도 0.01%, 0.001% 조건하에서 석류, 석곡, 노회는 사이토카인 유전자발현 억제효과가 확실하게 나

타났으나, 자화지정은 억제효과가 거의 나타나지 않았다.

LPS 로 자극된 대식세포에 대한 약용식물 추출물의 염증관련 신호전달체계 NF- $\kappa$ B 의 활성화 억제실험 결과, 석류, 석곡, 자화지정, 노회 모두 10ppm 의 처리농도에서 NF- $\kappa$ B 활성화를 효과적으로 억제함을 보여 주었다.

LPS 로 자극된 대식세포에 대한 약용식물 추출물의 염증관련 신호전달체계 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성화억제 실험결과, 노회 100 ppm 으로 처리한 경우 JNK MAP kinase 의 활성이 현저히 억제되었으나 p38 MAP kinase 의 활성에는 영향이 없었다. 그리고 자화지정, 석류, 석곡은 JNK 및 p38 MAP kinase 의 활성을 억제하지 못하였다.

석류, 석곡, 자화지정, 노회 등의 약용 식물 추출물에 대한 NF- $\kappa$ B 활성화억제 실험결과와 MAPK 활성화억제 실험결과를 종합하면, 석류, 석곡, 자화지정은 NF- $\kappa$ B 활성을 억제함으로써, 그리고 노회는 NF- $\kappa$ B 과 JNK MAP kinase 활성을 모두 억제함으로써 항염 효능을 나타낸다고 판단된다.

상기의 결과들에 의하면 노회, 석류, 석곡, 자화지정 추출물은 항염증의 효능을 가지고 있어 아토피 피부염의 증상을 개선 완화할 수 있는 약용 식물 추출물소재로서 활용할 수 있는 것으로 판단된다.

#### 감사의 글

본 연구는 충남대학교 김창덕 교수와 오비엠랩의 이민호 연구소장의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. K. Wolff, et al., "Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine", 7<sup>th</sup> ed., p.146, McGraw-Hill, New York (2008).
2. M. J. Rang, Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Herbal Extracts on Atopic Dermatitis (Part I), *J. of the Korean Oil Chemists' Soc.*, **28(1)**, 75 (2011).
3. Y. S. Kang, K. Y. Kyeong, M. J. Rang, D.



- H. Hwan, Y. K. Lee, W. K. Cho, S. K. Choi, and S. K. Han, "Science of Cosmetics and Health Care Product", vol 1, p. 325, Shinkwang Publisher, Seoul (2008).
4. Textbook Compilation Committee of Korean Dermatological Association, "Dermatology", 5<sup>th</sup> ed., p.165, Yeomungak, Seoul (2008).
  5. K. S. Li, ABCs of Atopic Dermatitis, *The Journal of Skin barrier Research*, **13(1)**, 28 (2011).
  6. H. J. Kwon, Is Atopic Dermatitis an Environmental Disease ?, *The Journal of Skin barrier Research*, **14(2)**, 28 (2012).
  7. M. J. Rang, Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Herbal Extracts on Atopic Dermatitis (Part I), *J. of the Korean Oil Chemists' Soc.*, **28(1)**, 75 (2011).
  8. S. Bonness and T. Bieber, Molecular Basis of Atopic Dermatitis, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **7**, 382 (2007).
  9. T. Bieber, Atopic Dermatitis, *N. Engl. J. Med.*, **358**, 1483 (2008).
  10. W. Abramovits, Atopic Dermatitis, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **53**, S86 (2005).
  11. N. Novak and T. Bieber, The Role of Dendritic Cell Subtypes in the Pathophysiology of Atopic Dermatitis, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **53**, S171 (2005).
  12. J. W. Cho, Current Opinions in Pathogenesis of Atopic Dermatitis : Skin Barrier, Inflammation, and Microbiome, *The Journal of Skin barrier Research*, **14(1)**, 55 (2012).
  13. S. J. Seo, Genetic Factors of Atopic Dermatitis, *The Journal of Skin barrier Research*, **14(2)**, 20 (2012).
  14. C. N. A. Palmer, et al., Common Loss-of-Function Variants of the Epidermal Barrier Protein Filaggrin are a Major Predisposing Factor for Atopic Dermatitis, *Nature Genetics*, **38(4)**, 441 (2006).
  15. G. M. O'Regan, A. Sandilands, W. H. Irwin Mclean, and A.D. Irvine, Filaggrin in Atopic Dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **122**, 689 (2008).
  16. A. Irvine, W. H. Irwin Mclean, and D. Leung, Filaggrin Mutations Associated with Skin and Allergic Diseases Atopic Dermatitis, *N. Engl. J. Med.*, **365**, 1315 (2011).
  17. M. A. McAller and A.D. Irvine, The Multifunctional Role of Filaggrin in Allergic Skin Disease, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **131**, 280 (2013).
  18. Y. L. Chung and S. H. Lee, Atopic Dermatitis, *The Journal of Skin barrier Research*, **3**, 40 (2001).
  19. J. R. Lee, Topical Treatment of Atopic Dermatitis, *The Journal of Skin barrier Research*, **14(1)**, 58 (2012).
  20. T. Horikawa and M. Ichihashi, Efficacy of Glycosphingolipid-containing Cream and Lotion on Atopic Dermatitis, *Fragrance Journal*, **14(10)**, 29 (1999)
  21. B. D. Park, J. K. Youm, S. K. Jeong, E. H. Choi, S. K. Ahn, and S. H. Lee, The Characterization of Molecular Organization of Multilamellar Emulsions Containing Pseudoceramide and Type III Synthetic Ceramide, *J. Invest. Dermatol.*, **121**, 794 (2003).
  22. H. Tagami, Treatment of the Atopic Dermatitis Skin and Skin Care, *Fragrance Journal*, **18(6)**, 13 (2003).
  23. H. Tamura and T. Kinokuni, Skin Care Ingredients for Atopic Dermatitis, *Fragrance Journal*, **18(6)**, 60 (2003).
  24. E. Simpson, Atopic Dermatitis: A Review of Topical Treatment Options, *Current Medical Research and Opinion*, **26(3)**, 633 (2010).
  25. M. J. Rang, Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Herbal Extracts on Atopic Dermatitis (Part I), *J. of the Korean Oil Chemists' Soc.*, **28(1)**, 75 (2011).
  26. H. W. Jung and Y. K. Park, Inhibitory Effect of *Coptidis Rhizoma* on LPS-induced Production of Nitric Oxide and TNF- $\alpha$  in Mouse Macrophages, *Kor. J.*

- Herbology*, **21(2)**, 165 (2006).
27. D. K. Choi, Y. S. Lee, K. M. Lee, K. H. Kim, M. J. Cho, C. D. Kim, and J. H. Lee, Effect of X-ray on the Expression of p53 in Human Skin Tissue Cultured in Vitro, *Korean Journal of Investigative Dermatology*, **14(2)**, 52 (2007).
  28. J. H. Lee, E.Y. Seo, E. K. Jeon, C. D. Kim, J. H. Lee, and H. J. Song, Identification of the Genes Differentially Expressed in the Keratinocytes by Treatment with 12-O Tetradecanoylphorbol-13-Acetate Using Suppression Subtractive Hybridization, *Korean Journal of Investigative Dermatology*, **14(1)**, 17 (2007).
  29. T. K. Means, R. P. Pavlovich, D. Roca, M. W. Vermeulen, and M. J. Fenton, Activation of TNF- $\alpha$  Transcription Utilizes Distinct MAP Kinase Pathways in Different Macrophage Populations, *J. Leukoc. Biol.*, **67**, 885 (2000).
  30. D. K. Choi, Y. S. Lee, K. M. Lee, K. H. Kim, M. J. Cho, C. D. Kim, and J. H. Lee, Effect of X-ray on the Expression of p53 in Human Skin Tissue Cultured in Vitro, *Korean Journal of Investigative Dermatology*, **14(2)**, 52 (2007)
  31. D. H. Kim, H. S. Yi, H. J. Yun, C. M. Cha, and S. D. Park, Anti-inflammatory Effect of Methanol Extract of Keum-Ryung-Ja-San in Mouse Macrophages, *Kor. J. Herbology*, **25(2)**, 89 (2010).
  32. M. J. Rang, Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Herbal Extracts on Atopic Dermatitis (Part I), *J. of the Korean Oil Chemists' Soc.*, **28(1)**, 75 (2011).
  33. M. Y. K. Leung, C. Liu, L. F. Zhu, Y. Z. Hui, B. Yu, and K. P. Fung, Chemical and Biological Characterization of a Polysaccharide Biological Response Modifier from Aloe vera L. var. chinensis (Haw.) Berg., *Glycobiology*, **14(6)**, 501 (2004).
  34. S. A. Im, S. T. Oh, S. G. Song, M. R. Kim, D. S. Kim, S. S. Woo, T. H. Jo, Y. I. Park, and C. K. Lee, Identification of Optimal Molecular Size of Modified Aloe Polysaccharides with Maximum Immunomodulatory Activity. *International Immunopharmacology*, **5**, 271 (2005).
  35. M. J. Rang, Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Herbal Extracts on Atopic Dermatitis (Part I), *J. of the Korean Oil Chemists' Soc.*, **28(1)**, 75 (2011).
  36. P. A. Baeuerle and T. Henkel, Function and Activation of NF-kappa B in the Immune System, *Annu. Rev. Immunol.*, 141 (1994).
  37. Y. Liang, Y. Zhou, and P. P. Shen, NF- $\kappa$ B and Its Regulation on the Immune System, *Cellular & Molecular Immunology*, **1(5)**, 343 (2004).
  38. J. Y. Huh, H. J. Cho. K. J. Park, and S. D. Park, Anti-inflammatory Effect of Rumex japonicus HOUTT. in RAW 264.7 Cells, *Kor. J. Herbology*, **27(4)**, 99 (2012).
  39. J. Y. Huh, H. J. Cho. K. J. Park, and S. D. Park, Anti-inflammatory Effect of Rumex japonicus HOUTT. in RAW 264.7 Cells, *Kor. J. Herbology*, **27(4)**, 99 (2012).
  40. M. S. Kim, J. S. Jeong, H. Y. Lee, Y. S. Ju, G. S. Bae, S. W. Seo, I. J. Cho, S. J. Park, and H. J. Song, Anti-oxidative Effects of Dendrobii Herba on Toxic Agent Induced Kidney Cell Injury, *Kor. J. Herbology*, **26(2)**, 51 (2011).
  41. C. Dinarello, Proinflammatory Cytokines, *Chest*, **118(2)**, 503 (2000).
  42. S. R. Chen, X. Z. Xu, Y. H. Wang, J. W. Chen, S. W. Xu, L. Q. Gu, and P. Q. Liu, Icariin Derivative Inhibits Inflammation Through Suppression of p38 Mitogen-activated Protein Kinase and Nuclear factor-kappa B Pathways. *Biol Pharm Bull.*, **33(8)**, 1307 (2010).
  43. S. Tang, X. Y. Shen, H. Q. Huang, S. W. Xu, Y. Yu, C. H. Zhou, S. R. Chen, K. Le, Y. H. Wang, and P. Q. Liu, Cryptotanshinone Suppressed Inflammatory Cytokines Secretion in RAW264.7 Macrophages Through inhibition of the NF- $\kappa$ B and MAPK Signaling Pathways. *Inflammation*. **34(2)**, 111 (2011).