

Medicinal Herb Extracts Attenuate 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene-induced Development of Atopic Dermatitis-like Skin Lesions

Moon Hee Lee^{1,2}, Min Ho Han^{1,2}, Jung Jeh Yoon¹, Myung Kyu Song³, Min Ju Kim³, Su Hyun Hong¹, Byung Tae Choi⁴, Byung Woo Kim^{2,5}, Hye Jin Hwang^{2,6} and Yung Hyun Choi^{1,2*}

¹Department of Biochemistry, Dongeui University College of Korean Medicine, Busan 614-052, Korea

²Anti-Aging Research Center & Blue-Bio Industry RIC, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

³Lioele Cosmetic Co., LTD, Busan 609-813, Korea

⁴Division of Meridian and Structural Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, Yangsan 626-870, Korea

⁵Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

⁶Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

Received May 12, 2014 / Revised June 24, 2014 / Accepted June 25, 2014

The present study was designed to investigate whether ethanol extracts of *Sophora flavescens* (GS), *Glycyrrhiza uralensis* (GC), *Dictamnus dasycarpus* (BSP), and their mixtures (GGB-1, -2, -3, and -4) inhibit 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB)-induced atopic dermatitis (AD) in a mouse model. DNCB was topically applied on the dorsal surface of Balb/c mice to induce AD-like skin lesions. The pathological phenotypes of AD, such as erythema, ear thickness, edema, scabs, and discharge, were significantly decreased in the GGB (DNCB + GS:GC:BSP = 3:1:1 mixture)-1-treated groups compared with the other treated groups. The weight of the spleen in immune organs was significantly decreased in the GGB-1-treated groups, whereas the weight of the liver in a control group was similar to that of the groups treated with the samples. Furthermore, toluidine blue staining analysis, a method used to specifically identify mast cells, showed that mast cell infiltration into the dermis of the GGB-1-treated group was significantly decreased. The immunoglobulin E concentration was lower in the GGB-1-treated group. In addition, the levels of inflammatory cytokines (interferon- γ , interleukin-1, 4, 5, 6, and 13, 1 β , and tumor necrosis factor- α) were also significantly reduced in the GGB-1-treated group. Taken together, these results suggest that a mixture of GS, GC, and BSP in a proportion of 3:1:1 (GGB-1) may contribute to the relief of AD symptoms and may be considered an excellent candidate for an AD therapeutic drug.

Key words : Atopic dermatitis, cytokine, IgE, mast cell, medicinal herbal extract

서 론

아토피(atopy)는 유아기에서 아토피 피부염(atopic dermatitis)성 습진의 형태로 시작하여 호흡기 아토피 질환인 천식 혹은 알레르기 비염으로 진행되는 만성 알레르기성 질환이다 [3, 5, 7]. 아토피 피부염의 발병과 진행은 유전적인 요인과 환경적인 요인에 영향을 받으며, 다양한 외인성 인자들이 손상된 인체 장벽을 통하여 쉽게 침투하여 질병의 개시와 악화에 중요한 영향을 미치는 점을 감안하면 선천면역이 그 특성상 이러한 질환들의 병인에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다 [11, 15, 30, 31].

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

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.

아토피 피부염에는 T 림프구, 항원에 특이적인 immunoglobulin E (IgE)를 발현하는 수지상세포(dendritic cell), T helper cell type 1 (Th1) 세포와 Th2 세포에서 발현하는 cytokine 등의 여러 인자들이 관여하게 된다[14]. Th1 세포는 interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- γ , tumour necrosis factor (TNF) 등을 분비하여 대식세포(macrophage)를 활성화시키며, Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 등의 cytokine을 분비하여 IgE 생성을 증가시키고 비만세포(mast cell)와 호산구(eosinophil) 분화를 유도시킴으로써 과민반응을 유발한다 [14, 21, 24]. 정상적인 상태에서는 Th1과 Th2 세포간의 상호작용으로 균형을 이루면서 면역반응을 유지하지만, 아토피성 피부염에서는 Th2가 다량의 염증성 cytokine을 분비시키고 혈중 IgE의 상승을 유발함으로써 염증반응을 더욱 촉진시키게 된다. 또한, Th2 세포의 반응을 억제하는 역할을 하는 IFN- γ 를 생산하는 능력은 저하되고, Th1 세포의 활성을 억제하는 IL-4는 증가하여 Th1 세포의 증식이 억제되어 결국 세포매개성 면역의 저하를 가져오게 된다[19]. 결과적으로 아토피 피부염의 발병에는 Th2 세포에 의한 면역 반응이 우세하게 나타나게

되는데, Th2 세포와 Tc 세포는 granzyme B를 발현하여 피부 염증 반응에 관여하게 된다[33].

현재까지 아토피 피부염에 대한 치료 대책은 부신피질 호르몬제, 항히스타민제, 항생제 등과 같은 화학적 약물이 많이 이용되고 있으며, 스킨 케어는 주로 스테로이드 외용제나 타크로림스 연고가 이용되고 있으나 장기간 이용할 경우 치료약에 대한 저항성, 피부 수축과 일과성 자극감, 그리고 그에 따른 증상의 심화 및 재발 등의 부작용이 많이 발생되며 근본적인 치료가 이루어지지 않는 단점이 있다[1, 8, 28]. 이에 따라 치료 효과는 높으면서 부작용이 적은 치료제를 개발하기 위하여 천연물이나 전통 약제를 이용하고자 하는 시도가 끊임없이 이루어지고 있다[9, 16].

한의학(韓醫學)에서 아토피 피부염은 침음(浸淫), 침음창(浸淫瘡), 유선(乳癬), 내선(奶癬), 태렴창(胎癩瘡) 등과 유사하며[10, 21, 23, 27], 오겸(吳謙)의 “의종금감(醫宗金鑑)”에서는 내선(奶癬)을 태렴창(胎癩瘡)이라 하여 가려워 백설(白屑)이 일어나는 건렴(乾癢)과 가려움이 심하여 황수(黃水)가 침음(浸淫)하여 퍼져가는 습렴(濕癢)으로 나누어 설명하여 오늘날 아토피 피부염과 가장 유사하게 표현하고 있다[4, 17].

따라서 본 연구에서는 한의학의 본초학(本草學)적 이론에 근거하여, 아토피 피부염에 개선효과가 있을 것으로 보이는 청열(淸熱) 및 조습(燥濕) 효능을 가진 고삼(苦參)과 백선피(白鮮皮)에 윤폐(潤肺), 양기(養氣) 및 조화제약(調和諸藥)의 효능이 있으며 정신을 안정시키고 모든 맥(脈)의 순환을 이롭게 하며, 피부를 재생시키는 효과도 겸하고 있는 감초(甘草)[25, 26]를 배합함으로써, 스트레스에 민감한 아토피 피부염 증상에 단일 약물로서의 효과 뿐 아니라 복합 처리 시 상승효과를 볼 수 있을 것으로 기대되어 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB)로 유도된 동물모델을 활용하여 아토피 피부염 억제 활성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

시료

본 실험에서 사용한 한약재인 고삼(*Sophora flavescens*), 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fischer), 백선피(*Dictamnus dasycarpus* Turcz)는 대한생약(주)(Busan, Republic of Korea)에서 파쇄된 상태로 구입하였다. 각 약재는 1 kg을 주정(Duksan Pure Chemicals Co., Ansan, Republic of Korea)을 이용하여 추출하였다. 추출 시 초음파 기기에 30분씩 총 4번을 반복하여 추출하였으며, 추출된 용매를 rotary evaporator (Eyela A-1000, Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축시킨 후 증류수를 이용하여 100 mg/ml의 농도로 stock solution을 만든 후 적정 농도로 실험동물에 투여하였다. 각각의 한약재에 대한 수율은 10.35%, 20.65% 및 12.76%로 나타났다.

실험동물

본 실험에서 사용한 5주령의 Balb/c 암컷마우스는 샘타코(주)(Osan, Republic of Korea)에서 공급받았으며 1주일간 동물실험실 적응 과정을 거친 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12시간 주야 12시간 교대로 150~300 Lux의 환경에서 마우스용 케이지에 8~9마리씩 수용하여 사육하면서 멸균 증류수와 고형사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

아토피 피부염 유발

아토피 피부염 유발을 위하여 6주령 마우스(n=6)의 등을 귀 하단에서부터 제모하고 24시간 방치 후 1% 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB, acetone:olive oil =3:1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액 200 µl를 제모 부위에 도포하고, 3일 후 2차 도포하였다. 1차 도포 후 7일부터는 이를 간격으로 0.4% DNCB 용액 200 µl를 실험이 종료될 때까지 동일한 부위에 고르게 도포하여 아토피 피부염이 지속되도록 하였다(Fig. 1) [29, 32].

약물 투여

0.4% DNCB 용액을 3회 도포 후 충분한 아토피 염증반응이 일어났을 때 양성대조군으로 5 mg/ml의 dexamethasone (Sigma-Aldrich)과 고삼(GS), 감초(GC) 및 백선피(BSP)의 단일 추출물과 다양한 조합으로 구성된 복합 추출물(GGB, Table 1)을 이를 간격으로 300 mg/kg의 양으로 10회 경구투여 후 등 부분과 귀의 염증반응 및 손상완화 정도를 비교하였다 (Table 1).

아토피 증상의 관찰 및 체중, 장기 무게의 측정

실험 시작과 함께 Balb/c 마우스 등 피부 조직의 외형적 변화(홍반, 가려움, 건조피부, 부종, 짓무름 및 태선화 등)를 3주 동안 관찰하였다. 또한 실험의 시작과 함께 마우스 등 피부 조직의 변화 유무를 관찰하면서 체중과 귀 두께 변화를 측정하였다. 체중은 electric balance (Precisa, Dietikon, Swiss)를 사용하여 측정하였고, 귀 두께는 vernier calipers (Mitutoyo)

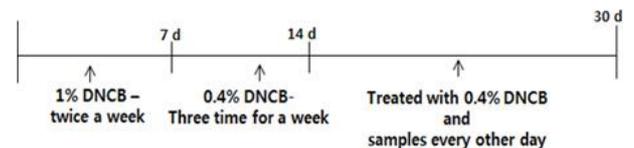


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental protocol. One percentage of DNCB was freshly dissolved in acetone:olive oil (3:1) and topically applied on the shaved area of dorsal surface of experimental groups (n = 6) except normal group (n = 6) twice for a week, and five weeks at two-day intervals application of 200 µl DNCB solution (0.4%) for subsequent four weeks.

Table 1. Experimental grouping

Group ID	Treatment	Dosage (mg/kg)
Normal	Distilled Water	
DNCB	DNCB + Distilled Water	
Dexamethasone	DNCB + Dexamethasone	5
GS	DNCB + <i>Sophora flavescens</i> extract	300
GC	DNCB + <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer extract	300
BSP	DNCB + <i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz extract	300
GGB-1	DNCB + GS:GC:BSP = 3:1:1 mixture	300
GGB-2	DNCB + GS:GC:BSP = 2:2:1 mixture	300
GGB-3	DNCB + GS:GC:BSP = 1:3:1 mixture	300
GGB-4	DNCB + GS:GC:BSP = 1:1:1 mixture	300

Normal (n=8); DNCB (n=8); Dexamethasone (n=8); GS, GC, BSP, GGB-1, -2, -3 (n=8); GGB-4 (n=9).

toyo Co., Kanagawa, Japan)를 사용하여 삼일 간격으로 측정하였다. 또한 실험 종료일에 마우스를 희생시킨 다음 비장과 간을 적출하여 그 무게를 측정하였다.

혈청 IgE 측정

실험 종료일에 마우스를 희생시킨 후 즉시 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하여 3,000 rpm, 4°C에서 20분 동안 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 내 IgE의 수준을 비교하기 위하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate에 IgE를 잡을 수 있는 포획 항체를 coating buffer (0.1 M Na₂CO₃, pH 9.5)와 함께 4°C에서 반응시켰다. 24시간 후, 5% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)로 상온에서 1시간 동안 blocking 과정을 거친 후, 플라즈마 샘플을 20배 희석하여 100 µl의 부피로 2시간 동안 실온에 반응시켰다. 그 후 IgE를 인지하는 2차 항체를 넣은 다음 기질인 100 µl의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Sigma-Aldrich) 용액을 첨가하여 15분간 반응시킨 후, 50 µl의 stop 용액(1M H₃PO₄)을 넣어 반응을 종료시키고 ELISA reader (450 nm, Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA)로 측정하였다.

혈청 cytokine의 측정

실험동물의 심장으로부터 채취한 혈액을 원심분리 한 후 혈청 내의 cytokine (IL-4, 5, 6, 13, 1β, IFN-γ 및 TNF-α)의 농도는 ELISA kit (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI, USA)를 이용해 측정하였다. 이를 위하여 시료를 96 well plate에 phosphate buffered saline (PBS)로 180배 희석한 포획 항체를 100 µl씩 분주하여 실온에서 overnight 반응시킨 후, block buffer 300 µl을 분주하여 최소 1시간 실온에서 반응시켰다. 그 후 reagent diluent로 희석한 각 샘플과 표준액을 100 µl씩 분주한 후, 실온에서 2시간 반응시키고, streptavidin-horseradish peroxidase (HRP)를 working diluent로 희석하여 100 µl씩 각 well에 분주하여 실온에 20분 반응시킨 후, 기질용액을 100 µl씩 분주하고 다시 실온에 20분간 반응시켰다. 각 단계는

0.05% PBS-Tween으로 세척하였으며 발색 후 2 N H₂SO₄를 50 µl씩 넣고 반응을 정지시켰다. 동일한 과정을 통하여 purified cytokine을 표준으로 하여 ELISA reader (450 nm)로 측정하였다.

조직병리학적 관찰

실험 종료 후 마우스를 희생시킨 다음 등과 귀 조직을 떼어 내어 10% 중성 formaldehyde로 24시간 고정하였다. 적출한 피부조직은 식염수로 수세한 후 optimal cutting temperature (OCT) compound로 동결 조직절편을 만들어 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 또한 비만세포의 양적 변화 관찰을 위하여 toluidine blue (TB) 염색을 추가적으로 실시하였다. 염색한 조직은 광학현미경을 이용하여 조직변화 및 비만세포의 침윤 정도를 관찰하였다.

통계처리

실험결과와 모든 분석은 각 그룹의 측정값을 mean ± S.D.로 요약하였으며, student's t-test로 분석하여 p-value가 0.05 이하일 경우 유의성을 인정하였다.

결과 및 고찰

아토피 증상에 대한 한약재 추출물의 효과

DNCB 용액으로 마우스의 등과 귀 피부에 아토피 피부염을 충분히 유발시킨 후 DNCB 용액을 도포하면서 시료를 경구 투여하여 마우스의 등과 귀 피부에 나타난 아토피 증상 변화를 관찰하여 실험의 설계가 적절히 이루어졌는지를 조사하였다. 외상 병변에서, 정상군의 피부 상태는 깨끗하였고 DNCB 처리군에서는 전형적인 아토피 피부염 유발에 동반[29, 32]되는 홍반, 부종, 인설, 가피 및 태선화 등의 다양한 아토피 증상이 뚜렷하게 나타났으며, 양성대조군인 dexamethasone 처리군과, 감초(GC) 및 백선피(BSP) 처리군을 제외한 한약재 추출물군에서는 DNCB군에 비해 아토피 증상이 유의적으로 완화된 것을 육안으로 관찰 할 수 있었다(Fig. 2). 특히, 단일 추출물

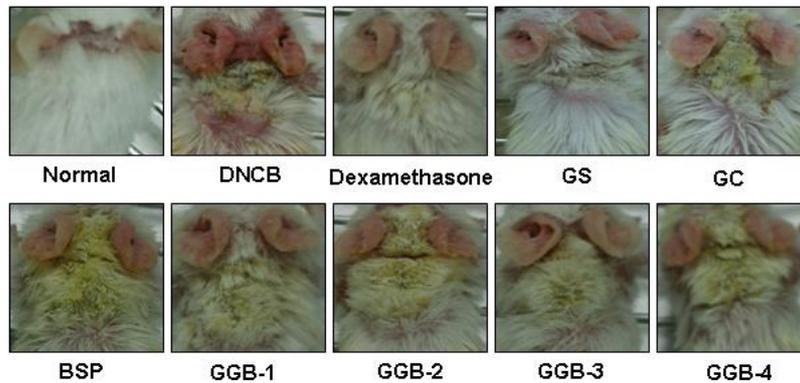


Fig. 2. Effects of medicinal herb extracts and their mixtures on development of AD-like skin lesions in DNCB-treated Balb/c mice. The dorsal skin of mice were shaved and were sensitized by DNCB; Normal, acetone-olive oil (3:1) alone; DNCB, 1% DNCB in acetone-olive oil (3:1); dexamethasone, administration with 5 mg/kg of dexamethasone; GS, administration with 300 mg/ml of *S. flavescens* extract; GC, administration with 300 mg/mL of *G. uralensis* Fischer extract; BSP, administration with 300 mg/kg of *D. dasycarpus* Turcz extract; GGB-1, administration with 300 mg/kg of GS:GC:BSP =3:1:1 mixture; GGB-2, administration with 300 mg/kg of GS:GC:BSP =2:2:1 mixture; GGB-3, administration with 300 mg/kg of GS:GC:BSP =1:2:1 mixture; GGB-4, administration with 300 mg/kg of GS:GC:BSP =1:1:1 mixture.

인 고삼(GS)과 고삼, 감초 및 백선피가 3:1:1로 혼합된 복합 추출물인 GGB-1 처리군에서 완화효과가 더욱 뚜렷하게 관찰되었다.

체중변화에 대한 한약재 추출물의 효과

실험 시작일부터 종료일까지 마우스의 체중을 3 일에 한번씩 측정하였다. 실험을 진행하는 동안 정상군의 체중은 꾸준한 증가를 보였고, DNCB 처리군은 정상군에 비해 현저하게 체중이 감소하였으며, 이는 아토피 피부염에 의한 스트레스에 의한 결과로 생각되어진다. 반면, 고삼(GS)과 복합 추출물(GGB-1, -2, -3 및 -4) 처리군은 DNCB 처리군에 비해 체중 감소가 크지 않았고, 체중의 증감 폭이 적게 나타났다(Fig. 3).

귀 두께 변화에 대한 한약재 추출물의 효과

DNCB에 의해 아토피 피부염이 유발된 마우스에서 한약재 추출물의 아토피성 피부염의 완화 효과를 확인하기 위하여 10 회에 걸쳐 한약재 단일 추출물과 복합 추출물을 DNCB와 함께 동시에 처리하여 귀 두께를 관찰하였다. 귀 두께는 선행 보고의 결과[29,32]에서와 유사하게 DNCB 처리군이 정상군에

비해 유의적으로 매우 두꺼워졌지만, 감초(GC)와 백선피(BSP)를 제외한 한약재 추출물 처리군은 DNCB 처리군에 비하여 유의적으로 얇아짐을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 각 시료군의 귀 두께를 정상군의 귀 두께와 비교하였을 때, DNCB 처리군의 귀 두께는 2.4배 정도 두꺼워졌으나, 복합 추출물 GGB-1 처리군에서는 1.7 정도의 값을 나타냈으며 양성대조군인 dexamethasone 처리군에 비하여 효과적인 결과를 보였다. 또한 GGB-4 처리군과 고삼(GS) 처리군에서도 dexamethasone 처리군과 유사한 값을 나타내어 고삼 단일 추출물과 복합 추출물 GGB-1 및 -4가 아토피 피부염 억제에 비교적 유의적인 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다. 특히 복합 추출물 GGB-1은 한약재 단일 추출물의 함량에 비해 각각의 한약재 단일 추출물의 함량이 낮음에 비하여 더 효과적이거나 유사한 결과를 나타내어 한약재 단일 추출물보다 아토피 피부염을 억제하는데 더 효과적인 시료임을 알 수 있었다.

장기무게의 변화

아토피 피부염의 반응은 면역기관 내 다양한 반응을 유도하며, 이러한 반응은 일차적으로 면역기관의 무게에 영향을 줄

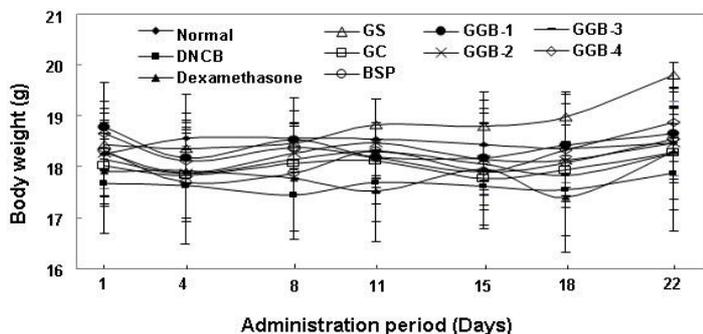


Fig. 3. Effect of medicinal herbs extracts and their mixtures on changes of body weight in DNCB-applied Balb/c mice. The mean body weight of the mice was measured using an electric scale. Data are expressed as mean ± S.D. of three independent experiments.

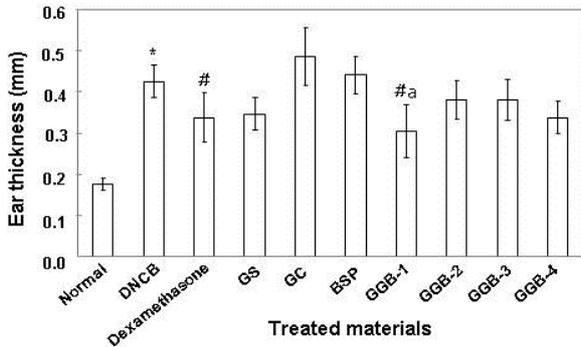


Fig. 4. Effects medicinal herbs extracts and their mixtures on the ear thickness in DNCB-applied Balb/c mice. Ear thickness was measured with a micrometer. Each value represents the mean \pm S.D. of three independent experiments (* $p < 0.05$ as compared with normal group; # $p < 0.05$ as compared with DNCP group; ^a $p < 0.05$ as compared with GS group).

수 있다. 특히 비장은 1차와 2차 림프기관의 특성을 모두 나타내며, 적혈구를 여과하는 적비수(red pulp)와 체액성 면역과 세포성 면역 활성을 나타내는 백비수(white pulp)로 구성되어 있으며, 면역반응에서 또 다른 중요한 기관이다[20]. 또한, 비장은 B 세포 발생의 최종단계가 진행되는 곳이며, 동시에 혈액에서 유래된 항원에 반응하는 특화된 기관으로서 기능을 갖는다[2]. 따라서 한약재 추출물이 DNCB에 의해서 유도된 아토피 피부염이 발생한 마우스의 면역장기에 미치는 영향을 관찰하기 위해 비장(spleen)의 무게를 측정하였으며, 아울러 한약재 추출물의 독성 여부를 평가하기 위하여 간(liver)의 무게를 측정하였다. Fig. 5A 및 5B의 결과에서 알 수 있듯이, DNCB 처리군의 비장무게는 정상군에 비하여 유의적으로 2배 가까이 증가하였다. 그러나 고삼(GS) 처리군과 복합 추출물 GGB-1 처리군에서는 DNCB 처리군 보다 급격히 무게가 감소하여 거의 정상군 수준으로 회복되었다. 또한 한약재의 독성을 평가하기 위하여 측정된 간의 무게는 DNCB 처리군을 제외한, 한약재를 처리한 모든 실험군에서 유의적인 변화를 볼 수 없었다(Fig. 5C). 이 결과를 통하여 독성이 없는 농도 하에서 고삼(GS) 추출물과 복합 추출물 GGB-1이 아토피 피부염에 효과적인 시료임을 알 수 있었다.

조직 병리학적 변화

한약재 추출물이 아토피 피부염에 미치는 조직병리학적 영향을 관찰하기 위하여 마우스의 귀 조직에 대한 변화를 관찰하였다. Fig. 6A의 결과에 나타났듯이, 선행 보고에서처럼 DNCB 처리군은 염증반응, 부종 및 표피과다형성 등의 아토피성 피부염의 증상이 정상군에 비하여 유의적으로 증가하였다. 그러나 고삼(GS) 처리군과 복합 추출물 GGB-1 처리군에서는 이러한 증상이 감소되었음을 알 수 있었다. 특히 복합 추출물 GGB-1 처리군에서는 고삼(GS) 처리군과 비교하여 유의적으

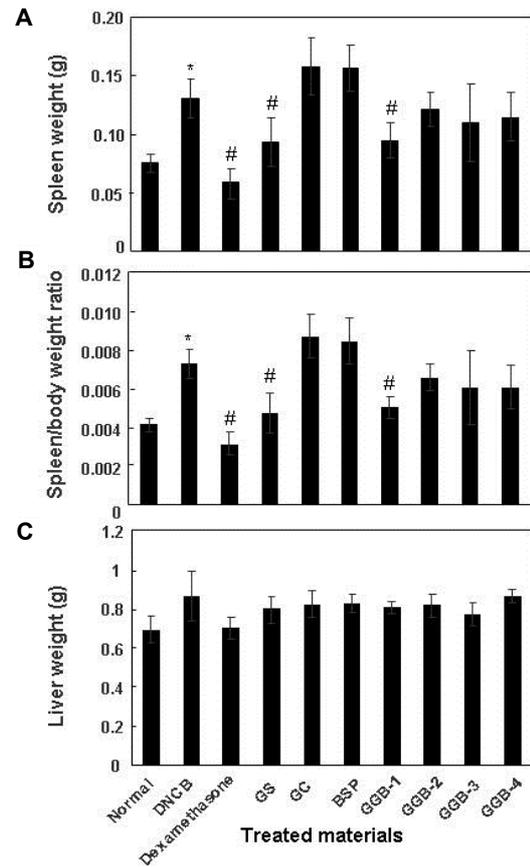


Fig. 5. Effects medicinal herbs extracts and their mixtures on the weigh of spleen and liver in DNCB-applied Balb/c mice. (A) Spleen weight (B) spleen/body weight ratio (C) liver weight. Each value represents the mean \pm S.D. of three independent experiments (* $p < 0.05$ as compared with normal group; # $p < 0.05$ as compared with DNCP group).

로 귀 조직의 팽창이 감소됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 6B). 또한, 염증반응으로 인한 비만세포의 침윤에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 TB 염색을 시행한 후 염색된 비만세포의 침윤 상태를 관찰하였다. 그 결과, DNCB 처리군은 정상군에 비하여 침윤된 비만세포가 유의적으로 증가하였음을 알 수 있었으며, 고삼(GS)과 복합 추출물 처리군에서 침윤된 비만세포의 수가 전체적으로 감소되었다(Fig. 7A). 특히, 복합 추출물 GGB-1은 고삼(GS) 처리군에 비하여 유의적으로 비만세포의 침윤이 억제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 7B). 즉 복합 추출물 GGB-1은 DNCB로 유발된 마우스의 아토피성 피부염의 귀 조직 팽창과 비만세포 침윤의 억제에 가장 효과적임을 알 수 있었다.

혈청 내 IgE 농도의 변화

DNBC에 의해 아토피성 피부염이 유발된 마우스의 혈청 내 IgE 농도에 한약재 단일 추출물과 복합 추출물이 미치는

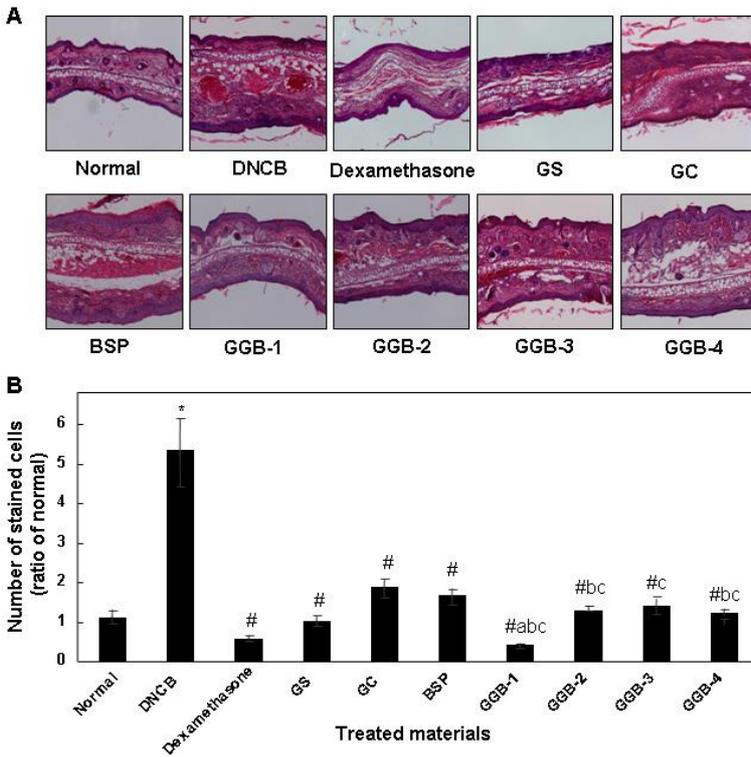


Fig. 6. Effects herbs extracts and their mixtures on the pathological changes of ear. The ear was fixed with 10% formaldehyde, embedded in paraffin, and then sections were made. The skin sections were stained with HE staining. (A) The slide sections of ear tissue were stained with HE and observed at the original magnification 100x. (B) In each slide, ten fields were randomly chosen and the thickness of ear tissue was measured under a light microscope. Each value represents the mean \pm S.D. of three independent experiments (* $p < 0.05$ as compared with normal group; # $p < 0.05$ as compared with DNCP group; ^a $p < 0.05$ as compared with GS group; ^b $p < 0.05$ as compared with GC group; ^c $p < 0.05$ as compared with BSP group).

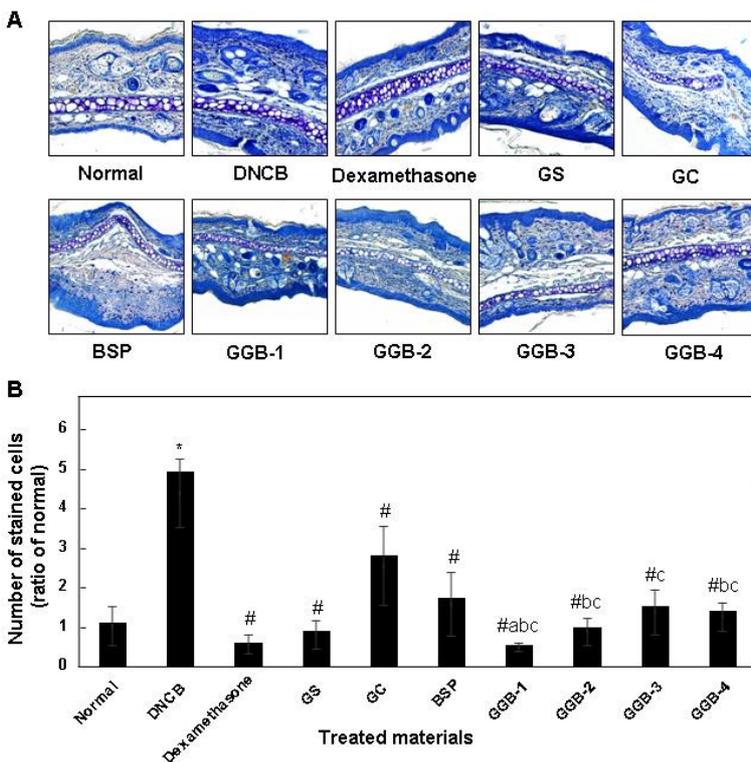


Fig. 7. Effects herbs extracts and their mixtures on the mast cell infiltration. The ear was fixed with 10% formaldehyde, embedded in paraffin, and then sections were made. The skin sections were stained with TB staining. (A) The slide sections of ear tissue were stained with TB observed at 100x magnification. Mast cells were stained the purple color in the dermis of ear tissue. (B) In each slide, ten fields were randomly chosen and the number of mast cells was counted under a light microscope. Each value represents the mean \pm S.D. of three independent experiments (* $p < 0.05$ as compared with normal group; # $p < 0.05$ as compared with DNCP group; ^a $p < 0.05$ as compared with GS group; ^b $p < 0.05$ as compared with GC group; ^c $p < 0.05$ as compared with BSP group).

영향을 분석하기 위하여 IgE의 농도를 측정하였다. 그 결과 DNCB 처리군은 정상군에 비하여 혈청 내 IgE의 농도가 선행 보고[29,32]에서처럼 급격하게 증가하였으나, 감초(GC) 처리군을 제외한 한약재 단일 추출물과 복합 추출물의 처리군에서

혈청 내의 IgE의 농도가 유의적으로 감소하였다. 특히, 고삼(GS)과 복합 추출물 GGB-1 처리군의 혈청 내 IgE 농도는 양성 대조군인 dexamethasone 처리군에 비해 30~40% 낮은 농도를 나타내었다(Fig. 8). 이러한 결과는 한약재 단일 추출물과 복합

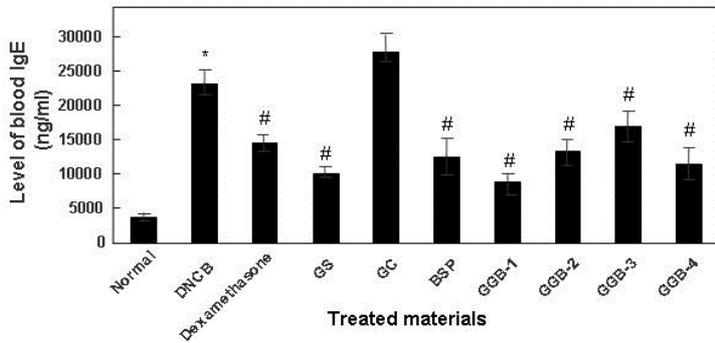


Fig. 8. Effects herbs extracts and their mixtures on the serum IgE levels in DNCB-applied Balb/c mice. Blood samples were collected from the mice after sacrifice, and serum samples were obtained by centrifugation. Total serum IgE levels of each group (n =6) were measured three times repeatedly by an ELISA kit following the manufacturer's instructions. Each value represents the mean ± S.D. of three independent experiments (* $p < 0.05$ as compared with normal group; # $p < 0.05$ as compared with DNCP group).

추출물이 혈청 내 IgE 농도를 유의적으로 감소시키는 효과가 있으며, 특히 고삼(GS)과 복합 추출물 GGB-1 처리군은 IgE의 농도 억제를 통하여 피부염의 증상을 완화시키는데 기여할 수 있음을 알 수 있었다.

혈청 내 cytokine 양의 변화

아토피 피부염은 외부 항원을 가장 먼저 인지하는 IgE가 항원을 인식하고 표피의 랑게르한스세포(Langerhans cell)가 항원을 림프구에 전달하여 면역반응을 유도함으로써 병변을 유발하게 된다[10]. 외부 항원을 삼킨 수지상 세포는 그 항원을 T 세포에 전달하고 T 세포는 IL-12, IL-18 및 IL-4와 같은 cytokine의 자극을 받게 되면 Th1 세포는 IFN- γ 를 분비하고, Th2 세포는 IL-4, IL-5 및 IL-13을 분비하며, Th0 세포는 Th1 과 Th2가 분비하는 모든 cytokine들을 분비한다. 아울러 Th1 세포는 내인성 인자에 대한 과민 반응용 IgE 항체를 만들며, Th2 cell은 외인성 인자에 대한 과민 반응 용 IgE 항체를 생산한다 [6, 13, 14]. 이에 따라 본 연구에서는 마우스의 혈장 내에 IFN- γ , IL-4, IL-5 및 IL-13과 같은 면역 관련 cytokine의 발현 정도

를 확인하였으며, 면역반응에 따른 염증 유발 인자들에 대한 cytokine의 변화를 측정하기 위하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 발현 정도를 측정함으로써 후보 한약재 및 복합 추출물의 cytokine 조절 능력이 아토피성 피부염 치료 및 예방 관련 연관성을 조사하였다. 혈장 내 면역 반응 관련 cytokine인 IFN- γ , IL-4, IL-5 및 IL-13의 발현 양을 측정된 결과 DNCB 처리군에서 정상군에 비하여 현저하게 증가되었으며, 감초(GC)를 제외한 고삼(GS) 및 백선피(BSP) 단일 처리군과 복합 추출물 처리군에서 DNCB군에 비하여 이들의 발현 양이 유의적으로 감소되었다(Fig. 9). 또한 이들 면역반응에 따른 염증반응과 관련된 혈장 내 cytokine인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 발현 변화를 측정 한 결과 면역반응과 관련된 cytokine의 결과와 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 10).

본 연구에서는 고삼(GS), 감초(GC), 백선피(BSP) 추출물 및 다양한 비율로 조성된 한약재 복합 추출물의 항아토피성 효능을 조사하였으며, 각각의 단일 추출물과 복합 추출물에서 항아토피성 조절제로서의 발굴 가능성이 있음을 확인하였다. 특히, 고삼(GS)과 감초(GC) 및 백선피(BSP) 추출물이 3:1:1로 혼

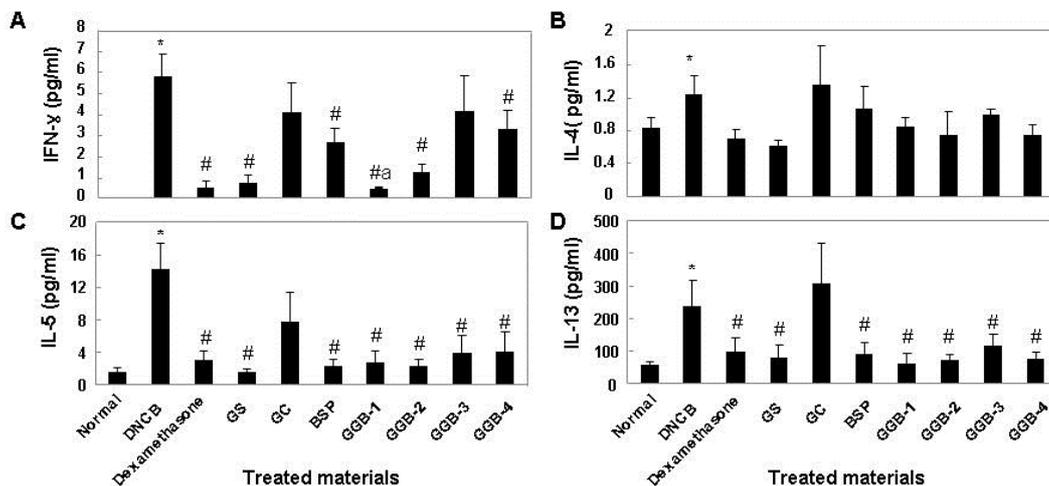


Fig. 9. Effects herbs extracts and their mixtures on the levels of IFN- γ (A), IL-4 (B), IL-5 (C) and IL-13 (D) for immunity in DNCB-applied Balb/c mice. The levels of inflammatory cytokines were measured from cell supernatant using ELISA. All data were represented in the mean ± S.D. of triplicate determinations from triplicate separate experiments (* $p < 0.05$ as compared with normal group; # $p < 0.05$ as compared with DNCP group; ^a $p < 0.05$ as compared with GS group).

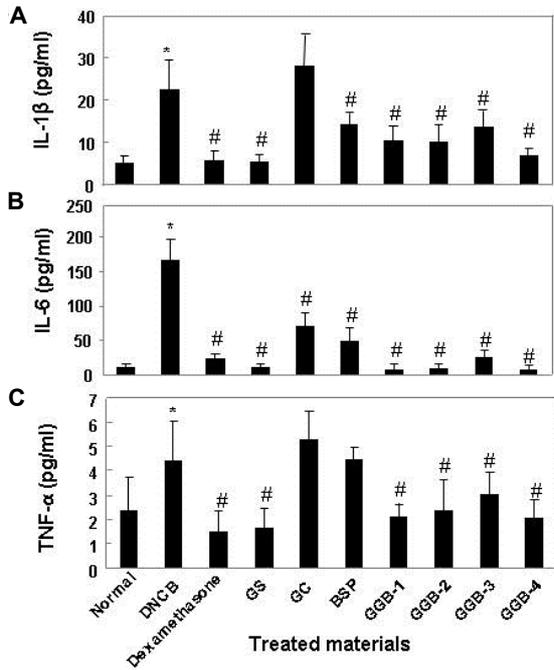


Fig. 10. Effects herbs extracts and their mixtures on the levels of IL-1β (A), IL-6 (B) and TNF-α (C) in DNCB-applied Balb/c mice. The levels of inflammatory cytokines were measured from cell supernatant using ELISA. All data were represented in the mean ± S.D. of triplicate determinations from triplicate separate experiments (* $p < 0.05$ as compared with normal group; # $p < 0.05$ as compared with DNCP group).

합된 복합 추출물인 GGB-1이 항아토피 관련 기능성 소재 개발에 보다 안정적이며 효과적일 수 있음을 제안하고자 한다.

감사의 글

본 결과는 교육과학기술부의 재원으로 지원을 받아 수행된 산학협력 선도대학(LINC, 2013-E-7229-010205) 육성사업 및 지식경제부·부산광역시 지원 지역혁신센터사업(RIC08-06-07) 동의대학교 블루바이오 소재개발 및 실용화 지원센터의 지원으로 이루어 졌습니다.

References

- Allerano, F. M., Wetworth, C. E. and Arana, A. 2007. Risk of lymphoma following exposure to calcineurin inhibitors and topical steroids in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* **127**, 808-816.
- Bohem, T. and Bleul, C. C. 2007. The evolutionary history of lymphoid organs. *Nat Immunol* **8**, 131-135.
- Cho, S. I., Kim, J. H., Chung, B. Y., Ahn, I. S., Kim, H. O., Park, C. W. and Lee, C. H. 2011. Quality of life in children and adolescents with atopic dermatitis. *Korean J Dermatol*

- 49**, 415-421.
- Choi, Y. Y., Kim, M. H., Km, C. J., Choi, Y. J. and Hwang, M. K. 2012. Anti-inflammatory effects of HC001 on atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *J Korean Orient Med Prescription* **20**, 41-49.
- Coca, A. F. and Cooke, R. A. 1923. On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. *J Immunol* **8**, 163-182.
- Ennis, M., Atkinson, G. and Pearce, F. L. 1979. The effect of alkaline earth cations on the release of histamine from rat peritoneal mast cells treated with compound 48/80 and peptide 401. *Br J Pharmacol* **65**, 395-402.
- Furue, M., Saeki, H., Furukawa, F., Hide, M., Ohtsuki, M., Katayama, I., Sasaki, R., Suto, H. and Takehara, K. 2009. Guidelines for management of atopic dermatitis. *J Dermatol* **36**, 563-77.
- Furue, M., Terao, H., Moroi, Y., Koga, T., Kubota, Y., Nakayama, J., Furukawa, F., Tanaka, Y., Katauama, I., Kinukawa, N., Nose, Y. and Urabe, K. 2004. Dosage and adverse effects of topical tacrolimus and steroids in daily management of atopic dermatitis. *J Dermatol* **31**, 277-283.
- Gao, X. K., Fuseda, K., Shibata, T., Tanaka, H., Inagaki, N. and Nagai, H. 2005. Kampo medicines for mite antigen-induced allergic dermatitis in NC/Nga mice. *Evid Based Complement Alternat Med* **2**, 191-199.
- Hwang, J. S., Kim, H. Y., Choi, E. J., Goo, J. H., Kweon, D. H. and Chung, D. K. 2010. Inhibition of atopic dermatitis by topical application of SNARE complex inhibitor in NC/Nga mice. *J Skin Barrier Res* **12**, 9-15.
- Ikoma, A., Rukwied, R., Stander, S., Steinhoff, M., Miyachi, Y., and Schmelz, M. 2003. Neuronal sensitization for histamine-induced itch in lesional skin of patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol* **139**, 1455-1458.
- Jang, S. N., Kim, K. R., Yun, M. Y. and Kang, S. M. 2009. The effect of γ -PGA on NC/Nga mice a mouse model for mite antigen-induced atopic dermatitis. *Korean J Microbiol Biotechnol* **37**, 53-63.
- Jones, L. A., Chin, L. T., Longo, D. L., and Kruisbeek, A. M. 1990. Peripheral clonal elimination of functional T cells. *Science* **250**, 1726-1729.
- Kang, J. S., Lee, K., Han, S. B., Ahn, J. M., Lee, H., Han, M. H., Yoon, Y. D., Yoon, W. K., Park, S. K. and Kim, H. M. 2006. Induction of atopic eczema/dermatitis syndrome-like skin lesions by repeated topical application of a crude extract of *Dermatophagoides pteronyssinus* in NC/Nga mice. *Int Immunopharmacol* **6**, 1616-1622.
- Koblenzer, C. S. 1999. Itching and the atopic skin. *J Allergy Clin Immunol* **104**, S109-S113.
- Koo, J. and Arain, S. 1998. Traditional Chinese medicine for the treatment of dermatologic disorders. *Arch Dermatol* **134**, 1388-1393.
- Kwon, M. W., Lee, H. J., Park, E. J. and Hwang, W. J. 2000. The clinical study of atopic dermatitis and eosinophil cationic protein in atopic dermatitis. *J Korean Orient Med* **14**, 121-132.
- Leung, D. Y. and Soter, N. A. 2001. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*

- 44, S1-S12.
19. Lee, G. S., Jung, H. M., Oh, S. K., Cheong, J. H. and Kang, T. J. 2012. Effects of herbal complex on atopic dermatitis in BALB/c mice. *Korean J Pharmacogn* **43**, 59-65.
 20. Mebius, R. E. and Kraal, G. 2005. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* **5**, 606-616.
 21. Metcalfe, D. D., Kaliner, M. and Donlon, M. A. 1981. The mast cell. *Crit Rev Immunol* **3**, 23-74.
 22. Min, D. L. and Park, E. J. 2012. Effects of *Nardostachys jatamansi* on atopic dermatitis-like skin lesions. *J Korean Orient Pediatrics* **26**, 13-24.
 23. Min, D. L., Park, E. J. and Kang, K. H. 2013. Review of clinical and experimental studies on external application treatment for atopic dermatitis in the Korean literature. *J Korean Orient Pediatrics* **27**, 36-49.
 24. Miyajima, I., Dombrowicz, D., Martin, T. R., Ravetch, J. V., Kinet, J. P. and Galli, S. J. 1999. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaR III. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J Clin Invest* **99**, 901-914.
 25. Seo, B. I., Lee, J. H., Choi, H. Y., Kwon, H. L. and Boo, Y. M. 2004. Oriental herbal medicine, pp. 222-224, 1st ed., Yunglim Publishers, Seoul, Korea.
 26. Seo, B. I., Lee, J. H., Choi, H. Y., Kwon, H. L. and Boo, Y. M. 2004. Oriental herbal medicine, pp. 225-226, 1st ed., Yunglim Publishers, Seoul, Korea.
 27. Shin, S. H., Kim, M. B., Byun, S. M., Lee, H. S., Park, S. G., Ko, W. S. and Yoon, H. J. 2008. A review on external treatment for atopic dermatitis in Korean journals. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* **21**, 80-93.
 28. Smith, E. W. 1995. Four decades of topical corticosteroid assessment. *Curr Probl Dermatol* **22**, 124-131.
 29. Sun, M., Wang, S., Zhao, L., Zhao, H., Yao, W., Jin, W. and Wei, M. 2014. Suppression of 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis by extract of *Bacillus Calmette Guerin*. *Mol Med Rep* **9**, 689-694.
 30. Tobin, D., Nabarro, G., Baart de la Faille, H., van Vloten, W. A., van der Putte, S. C. and Schuurman, H. J. 1992. Increased number of immunoreactive nerve fibers in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* **90**, 613-622.
 31. Wahlgren, C. F. 1999. Itch and atopic dermatitis: an overview. *J Dermatol* **26**, 770-779.
 32. Yang, G., Lee, K., An, D. G., Lee, M. H., Ham, I. H. and Choi, H. Y. 2012. Effect of *Chrysanthemi borealis* flos on atopic dermatitis induced by 1-chloro 2,4-dinitrobenzene in NC/Nga mouse. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **34**, 413-418.
 33. Yawalkar, N., Schmid, S., Braathen, L. R. and Pichler, W. J. 2001. Perforin and granzyme B may contribute to skin inflammation in atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol* **144**, 1133-1139.

초록 : 한약재 단일 추출물 및 복합 추출물을 이용한 아토피성 피부염 억제 효과

이문희^{1,2} · 한민호^{1,2} · 윤정재¹ · 송명규³ · 김민주³ · 홍수현¹ · 최병태⁴ · 김병우^{2,5} · 황혜진^{2,6} · 최영현^{1,2*}

(¹동의대학교 한의과대학 생화학교실, ²동의대학교 항노화연구소 및 블루바이오소재개발센터, 동의대학교 자연생물과학대학, ³주리오엘리, ⁴부산대학교 한의학전문대학원 경락구조의학부, ⁵동의대학교 생명응용학과, ⁶동의대학교 식품영양학과)

본 연구에서는 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB)에 의해 유도된 아토피성 피부염 마우스 모델에서 고삼, 감초 및 백선피 추출물과 그들 복합 추출물(GGB)의 항아토피 효능을 평가하였다. 아토피성 피부염의 병리학적 형태인 홍반, 귀부종, 부종, 각질과 상처는 복합 추출물 중 고삼, 감초 및 백선피 추출물이 3:1:1로 혼합된 GGB-1 처리군에서 다른 시료 처리군들에 비하여 유의적인 억제 효능을 나타내었다. 또한 면역 기관인 비장의 무게도 GGB-1 처리군에서 감소하였고, 간의 무게는 정상군과 시료 처리군의 값이 유사한 결과를 나타내었다. 아울러 GGB-1 처리군에서 비만 세포의 침윤이 감소되었으며, 혈청 중 IgE의 농도 역시 GGB-1 처리군에서 가장 낮은 값을 보였다. 비록 단일 한약재와 그들의 혼합물 처리군에서는 면역 사이토카인(IFN- γ , IL- 1, 4, 5, 6, 13, 1 β and TNF- α)의 값이 유의적으로 감소되었으나, 여러 가지 결과들을 종합하여 볼 때 고삼, 감초 및 백선피 추출물이 3:1:1로 혼합된 복합 추출물인 GGB-1이 아토피성 피부염의 개선에 효과적인 약물로 판단된다.