

Phosphodiesterase 4와 7에 대한 억제 기전을 갖는 아토피 억제 물질의 탐색

윤원호¹ · 이경호^{2*}

¹서일대학교 식품생명과학과, ²중근당

Screening of Anti-atopic Herbs Having Phosphodiesterase 4 and 7 Inhibition

Won Ho Yoon¹ and Keyong Ho Lee^{2*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Seoil University, Seoul 131-702, Korea

²Chong Kun Dang Pharm., Yongin-city, 446-916 Korea

Abstract – The aim of this study is to explore the potent phosphodiesterase 4 and 7 inhibitor from various herbal medicines for atopy treatment. In this study, 51 kinds of each herbal medicine, which were extracted with ethanol, was carried out the screening of PDE 4 and 7 inhibition using enzyme inhibitory assay. Of these, 8 species of herbal medicines, *Rubus coreanus*, *Duchesnea chrysantha*, *Alisma orientale*, *Rehmannia glutinosa*, *Angelica dahurica*, *Thuja orientalis*, *Astragalus membranaceus* and *Perilla frutescens* were screened as potential inhibitor against PDE 4 and 7. Among 8 species, *Duchesnea chrysantha* showed potent anti-atopic effect on DNCB- induced atopic model. *Duchesnea chrysantha* extract decreased serum IgE and histamine release significantly.

Key words – Phosphodiesterase 4, Phosphodiesterase 7, Atopy, *Duchesnea chrysantha*

Cyclic nucleotide phosphodiesterase(PDE)는 cAMP나 cGMP의 3', 5'-cyclic phosphate 잔기를 가수분해하는 효소이다. 체내에서의 cAMP나 cGMP는 adenylyl 및 guanylyl cyclase을 통한 합성과 PDE를 통한 분해에 의해서 농도가 조절된다.^{1,2)} 현재 알려진 PDE의 종류는 11개의 계열로 분류되고 있으며, 이들 11가지의 종류에 따라서 다양한 질병과 관련이 있는 것으로 알려져 있어, 이 효소에 대한 특이적 저해기능에 의해서 심혈관 질환, 천식, 성기능장애, 염증, 우울증 등과 같은 다양한 질환의 치료제가 개발되고 있다.^{3,4)} cAMP 특이적 PDE 계열은 PDE 4, 7 및 8가 있다. PDE 4는 cyclic AMP(cAMP) 분해 효소로서 호산구, 호중구, 대식세포, T세포 등의 염증세포와 각질세포, 섬유모세포에도 존재한다. PDE 4를 억제하면 사이토카인의 생성 및 분비 억제, IgE의 생성 억제, 히스타민의 생성 억제 등을 통해 항염증 작용이 있을 것으로 알려져 있다. PDE 4 저해와 관련된 질환으로는 우울증(depression), 알츠하이머(Alzheimer's disease), 정신분열증(schizophrenia) 등이 있고 관련 개발 약물로는 Rolipram, Roflumilast 및 Cilomilast 등이 있으며,⁵⁻⁷⁾

개발 중인 PDE 4 억제제로는 CC-10004, AWD-12-281, AN2728이 있다. 특히 AN2728(5-(4-Cyanophenoxy)-2, 3-dihydro-1-hydroxy-2,1-benzoxaborole)은 말초혈액 단핵구 세포에서의 TNF- α , IFN- γ 의 분비를 억제하는 것으로 알려져 있으며 현재 국소도포용 제제로 개발되어 건선 환자를 대상으로 임상 2상 연구 중에 있다.⁸⁾ PDE 7은 cAMP에 특이도를 가지는 효소이며 PDE 7A와 PDE 7B가 알려져 있다. 이중 PDE 7A는 주로 비장, 림프절, 백혈구에 발현되는 것으로 알려져 있다. Smith 등⁹⁾은 실험을 통해 PDE 7 억제제가 사람의 단핵구, T세포, 폐의 대식세포에서 TNF- α 의 분비를 억제함을 보고하였다. 최근 Kadoshima- Yamaoka 등¹⁰⁾은 PDE 7A 억제제인 ASB16165(1-Cyclohexyl-N-[6-(4-hydroxy-1-piperidinyl)-3-pyridinyl]-3-methyl-1H-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxamide monohydrate)를 개발하여 이 제제를 국소 도포하였을 경우 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)에 의해 유발된 쥐의 귀 염증이 호전됨을 확인하였다. 이를 통해 PDE 7A 억제제가 건선의 국소 치료에 쓰일 수 있는 가능성을 확인하였다. PDE 7 저해와 관련된 질환과 약물로는 염증질환(Inflammation)과 골다공증(osteoporosis)이 있으며, 개발 중인 골다공증 약물로는 BRL-

*교신저자(E-mail): keyho625@hotmail.com
(Tel): +82-10-8474-5787

50481이 있다.⁹⁾

생약(生藥 Crude drugs)은 의약품의 일종으로 인체에 유익한 동식물의 본체, 뿌리, 줄기 등 천연으로 산출되는 자연물을 날로 또는 일차 가공하여 약으로 사용하는 것으로 단일 성분의 화합물로 된 의약품과는 달리 많은 종류의 성분이 혼재하고 있어 그 효과가 복합적이고 상대적으로 부작용이 적다고 알려져 있고,¹²⁾ 그 활성성분은 항산화, 항암, 항균 등 다양한 생리활성이 보고되고 있다.¹³⁻¹⁶⁾ 특히, 인체의 면역 시스템 중 보체계(complement system)나 면역 관련 cytokine의 조절을 통해 생체방어 시스템을 강화하는데 많은 영향을 준다.

본 연구에서는 이러한 항염증이 있을 것으로 알려져 있는 51종의 생약으로부터 phosphodiesterase 4와 7에 저해 효과를 나타내는 생약을 선별하였고, 또한 아토피 동물 모델을 이용하여 아토피 피부 염증에 대한 효과를 측정하였다.

재료 및 방법

재료 - 이 실험에 사용한 생약재들은 충북체천의 약초상에서 구입하여 공주대학교 이기형 교수의 감정 후 사용하였으며, 공주대학교에 보관되어 있다(No. 12-04-03).

추출 및 시료 제조 - 생약재들을 각각 200 g에 에탄올 2 L를 넣고 2시간 동안 환류 추출하였고, 추출한 용액을 감압 농축기로 농축한 후 동결건조기로 건조하였다. PDE 저해 활성 시험의 경우는 실험 전 모든 시료는 최종 DMSO의 농도가 2%가 되도록 희석하여 사용하였고, 아토피 피부염 동물 시험의 경우는 건조엑스를 경구 투여 액체로 정제수에 현탁하여 사용 하였다.

실험 동물 - 실험동물은 8주령 수컷 BALB/c mice(23±3 g)로, 중앙실험동물(주)에서 공급받아 실험동물 사육장에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험 기간 중 고형 사료와 물은 자유로이 섭취시켰으며 사육실의 온도(22±2°C), 상대습도(60±5%)와 명암은 12시간 주기를 유지하였다. 실험 시작일 하루 전 실험동물의 귀 하단 부분에서 꼬리 상단 부분까지 등 부위 전체를 마우스 제모용 클리퍼로 털을 제거한 후에 크림형 제모제를 발라 피부가 깨끗이 드러나도록 잔털을 완전히 제거하였다. 이 동물실험은 공주대학교 동물실험윤리위원회의 사전 심의를 받아 동물실험윤리위원회의 규정에 따라 수행되었다.

Fluorescence Polarization Phosphodiesterase 4 저해 활성 - PDE 4의 저해 활성은 Redondo 등의 방법¹⁶⁾을 이용하여 측정하였다. 재조합 단백질로 PDE 4B2 및 PDE 4D3을 각각 0.05 unit을 1 nM fluorescein adenosine 3',5'-cyclic phosphate와 함께 96-well black half-area plate에 넣고, 40 µl의 buffer(50 mM Tris/HCl pH 7.4, 6 mM MgCl₂, 0.03 mM CaCl₂)을 가하여 상온에서 60분간 반응하였다. 반

응 후에 60 µl의 IMAP 용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 0.05% NaN₃, and 0.1% phosphate-free BSA)을 첨가하여 상온에서 1시간 동안 정치시킨 후에 Tecan Ultra Evolution reader(Tecan, Vienna, VA, USA)을 이용하여 활성을 측정하였다.

Radiometric Phosphodiesterase 7 저해 활성 - PDE 7의 저해 활성은 Redondo 등의 방법¹⁶⁾을 이용하여 측정하였다. 재조합 단백질로 PDE 7A1 및 PDE 7B를 각각 0.02 unit 및 0.5 unit을 96-well Flexiplate에 넣고, 5 nCi의 [³H]cAMP 효소를 첨가하여 100 µl의 buffer(50 mM Tris/HCl pH 7.4, 6 mM MgCl₂, 0.03 mM CaCl₂)을 가하여 30°C에서 20분간 반응하였다. 반응 후에 50 µl의 yttrium silicate beads 용액(약 1 mg/well)을 첨가하여 1시간 동안 교반하면서 추가 반응을 하였다. 반응 완료 후, 30분간 정치하여 beads을 가라앉힌 후에 beads에 결합되어 있는 [³H]AMP의 양을 Microbeta Trilux reader(PerkinElmer, Shelton, CT, USA)을 이용하여 활성을 측정하였다.

아토피 피부염 동물 시험 - 실험동물은 군당 10마리를 사용하였다. 아토피 유발 시약인 DNCB(Junsei Chemical Co., Ltd)를 1%와 0.5%의 농도가 되도록 용매(acetone:olive oil =4:1 혼합)에 용해하여 제조하였다. 8주령 수컷 Balb/c 마우스의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후 제모 과정에서 발생할 수 있는 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 24시간 후 마우스 마리당 1% DNCB 100 µl를 4일간 연속으로 등 부분과 양쪽 귀 뒤쪽에 도포하여 아토피피부염을 유발하였다. DNCB 도포를 멈추고 3일 경과 후, 0.5% DNCB 100 µl를 주 3회 2주 동안 동일한 부위에 고르게 도포하여 아토피피부염이 지속되도록 하였다. 시료는 아토피 피부염 유발이 완료된 시점으로부터 매일 1회 30일간 경구투여(500 mg/kg)하였다.¹⁷⁾

혈청 IgE 농도 측정 - 실험 종료일에 실험동물로부터 주사기로 심장에서 채혈한 후 5,000 rpm, 4°C에서 3분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 실험에 사용하기 전까지 -70°C 냉동고에서 보관하였다. Balb/c 마우스의 혈청에서의 IgE 농도는 enzyme-linked immunosorbent assay kit (Shibayagi, Gunma, Japan)를 사용하여 측정하였다. 각 96 well plates에 마우스에서 취한 혈청 5 µl와 dilution buffer 45 µl를 혼합하여 각각의 well에 50 µl를 분주하고 실온에서 shaker에 올려 2시간 동안 방치한 후 washing buffer solution으로 5분씩 3회 세척하였다. 다시 Biotin-conjugated anti-IgE antibody를 넣고 2시간 실온에 방치한 후에 다시 3회 세척하였다. HRP-conjugated avidin 50 µl를 넣고 실온에서 shaker에 올려 1시간 방치한 후 다시 세척하였다. Chromogenic substrate reagent(TMB) 50 µl를 넣고 5분간 방치한 후 50 µl의 stop solution을 넣고 ELISA reader(PerkinElmer, Shelton, CT, USA)에서 흡광도(450 nm)를 측정하였다.

히스타민 정량 - 흰쥐 복강에 30 ml 정도의 Tyrode 완충 용액 B(137 mM NaCl, 5.3 mM glucose, 12 mM NaHCO₃, 2.7 mM KCl, 0.3 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)를 주입하고 복부를 90초 정도 마사지 한 후 복막을 조심스럽게 열어서 파스퇴르 피펫으로 복강 내 세포가 함유된 Tyrode 완충용액 B를 수거하였다. 150×g, 10분 동안 원심 분리하여 세포를 침전시키고 침전된 세포에 Tyrode 완충용액 B를 가하여 percoll density gradient법으로 비만세포만을 얻었다. 분리된 비만세포는 alcian blue염색에서 95% 이상, trypan blue염색에서 97% 이상의 경우 실험에 사용하였다. 정제된 비만세포에 0.1% FBS를 포함하는 Tyrode 완충용액 A(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.1 mM, MgCl₂, 11.9 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 5.6 mM, glucose, pH 7.4)를 가하고 조심스럽게 피펫팅하여 2×10⁵ 세포씩 분주한 다음 37°C에서 20분 동안 배양하고 시료를 37°C에서 20분 동안 처리한 다음 compound 48/80(5 µg/ml)을 30분 동안 처리하였다. 반응 종료 후 400×g에서 원심 분리하여 상등액과 세포를 분리하였다. 히스타민 정량은 ophthaldialdehyde (OPA) spectro-fluorometry 방법으로 438 nm에서 측정하였다.

통계학적 처리 - 모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검정은 Student's *t*-test로 처리하였다.

결과 및 고찰

Phosphodiesterase 저해 활성 - 생약 추출물로부터 phosphodiesterase 4 및 7 활성 저해물질의 탐색을 위하여 51종의 약용식물의 에탄올 추출물에 대하여 효능을 검색하였다. PDE 4B2에 대하여 효능이 강한 생약재 순서로는 *Rubus coreanus*, *Duchesnea chrysantha*, *Alisma orientale*, *Rehmannia glutinosa*, *Angelica dahurica*, *Thuja orientalis*,

Astragalus membranaceus 및 *Perilla frutescens* 순으로 나타났다. PDE 4D3에 대하여 효능이 강한 생약재 순서로는 *Rehmannia glutinosa*, *Alisma orientale*, *Duchesnea chrysantha*, *Rubus coreanus*, *Angelica dahurica*, *Thuja orientalis*, *Perilla frutescens* 및 *Astragalus membranaceus* 순으로 나타났다. PDE 7A1에 대하여 효능이 강한 생약재 순서로는 *Rehmannia glutinosa*, *Alisma orientale*, *Angelica dahurica*, *Duchesnea chrysantha*, *Astragalus membranaceus*, *Rubus coreanus* 및 *Perilla frutescens* 순으로 나타났다. PDE 7B에 대하여 효능이 강한 생약재 순서로는 *Alisma orientale*, *Rehmannia glutinosa*, *Angelica dahurica*, *Duchesnea chrysantha*, *Astragalus membranaceus*, *Rubus coreanus* 및 *Perilla frutescens* 순으로 나타났다. PDE 4와 PDE 7에 대하여 비특이적으로 강한 효능을 나타내는 생약재로는 *Alisma orientale*, *Duchesnea chrysantha* 및 *Rehmannia glutinosa*로 나타났다. PDE 4에만 특이적인 효능을 나타낸 생약재로는 *Thuja orientalis*로 PDE 4B2 및 PDE 4D3에 각각 201 µg/ml 및 104 µg/ml의 IC₅₀ 값을 나타내었다(Table I).

혈청 IgE 저해 효과 - DNCB의 감각과 공격에 의해 아토피피부염 동물모델을 제작하였고, PDE 4와 PDE7에 대하여 활성을 나타내는 8종(*Alisma orientale*, *Angelica dahurica*, *Astragalus membranaceus*, *Thuja orientalis*, *Duchesnea chrysantha*, *Perilla frutescens*, *Rehmannia glutinosa* 및 *Rubus coreanus*)의 생약재 추출물에 대하여 아토피 억제 효능을 측정하였다. 8종 생약재 추출물의 투여 의한 효능은 마우스의 혈청으로 부터 IgE 농도를 ELISA로 측정하였다. 정상군에서의 IgE의 농도는 280.5±43.6 ng/ml 이었고, 아토피군에서는 1325±55.7 ng/ml로 정상군에 비해 약 4.7배 증가하였다. *Alisma orientale*, *Angelica dahurica*,

Table I. IC₅₀(µg/ml) of each extract from various herbal medicines against different phosphodiesterases

No.	Scientific name	Use part	PDE 4B2	PDE 4D3	PDE 7A1	PDE 7B
1	<i>Aconitum jaluense</i> (초오)	root	>500	>500	>500	>500
2	<i>Akebia quinata</i> (목통)	stem	>500	>500	>500	>500
3	<i>Alisma orientale</i> (택사)	root	22	25	34	30
4	<i>Angelica dahurica</i> (백지)	root	105	89	34	54
5	<i>Angelica tenuissima</i> (고분)	root	>500	>500	>500	>500
6	<i>Aralia continentalis</i> (독활)	root	>500	>500	>500	>500
7	<i>Arisaema amurense</i> (남성)	root	>500	>500	>500	>500
8	<i>Astragalus membranaceus</i> (황기)	root	406	400	108	210
9	<i>Atractylodes lancea</i> (창출)	root, stem	>500	>500	>500	>500
10	<i>Thuja orientalis</i> (측백엽)	leaf	201	104	>500	>500
11	<i>Benincasa hispida</i> (동과자)	seed	>500	>500	>500	>500
12	<i>Sasa japonica</i> (죽엽)	leaf	>500	>500	>500	>500
13	<i>Carthamus tinctorius</i> (홍화자)	fruit	>500	>500	>500	>500

Table I. Continued

No.	Scientific name	Use part	PDE 4B2	PDE 4D3	PDE 7A1	PDE 7B
14	<i>Cnidium officinale</i> (천궁)	root	>500	>500	>500	>500
15	<i>Cirsium japonicum</i> (대계근)	root	>500	>500	>500	>500
16	<i>Cyperus rotundus</i> (향부자)	root, stem	>500	>500	>500	>500
17	<i>Cotoneaster dammeri</i> (백자단)	seed	>500	>500	>500	>500
18	<i>Cynanchum wilfordii</i> (백하수오)	root	>500	>500	>500	>500
18	<i>Cornus officinalis</i> (산수유)	fruit	>500	>500	>500	>500
19	<i>Crataegus pinnatifida</i> (산사)	fruit	>500	>500	>500	>500
20	<i>Duchesnea chrysantha</i> (뱀딸기)	root	21	32	56	103
21	<i>Fagopyrum esculentum</i> (교맥)	seed	>500	>500	>500	>500
22	<i>Oldenlandia diffusa</i> (백화사설초)	aerial part	>500	>500	>500	>500
23	<i>Gardenia jasminoides</i> (치자)	fruit	>500	>500	>500	>500
24	<i>Glycine max</i> (흑두)	seed	>500	>500	>500	>500
25	<i>Lyonia ovalifolia</i> (남축)	leaf, stem, fruit	>500	>500	>500	>500
26	<i>Lycopus coreanus</i> (택란)	aerial part	>500	>500	>500	>500
27	<i>Lonicera japonica</i> (인동)	leaf, stem	>500	>500	>500	>500
28	<i>Millettia velutina</i> (용모애두)	leaf, stem	>500	>500	>500	>500
29	<i>Triticum aestivum</i> (신곡)	aerial part	>500	>500	>500	>500
30	<i>Cucumis melo</i> (과채)	fruit	>500	>500	>500	>500
31	<i>Perilla frutescens</i> (소엽)	leaf	409	307	201	300
32	<i>Morus alba</i> (상지)	stem	>500	>500	>500	>500
33	<i>Paeonia lactiflora</i> (작약)	root	>500	>500	>500	>500
34	<i>Pinus densiflora</i> (송화)	flower	>500	>500	>500	>500
35	<i>Prunus humillia</i> (옥리인)	seed	>500	>500	>500	>500
36	<i>Pinus thunbergii</i> (송절)	stem	>500	>500	>500	>500
37	<i>Polygonum aviculare</i> (편축)	aerial part	>500	>500	>500	>500
38	<i>Polygonatum odoratum</i> (옥죽)	root, stem	>500	>500	>500	>500
39	<i>Peucedani radix</i> (전호)	root	>500	>500	>500	>500
40	<i>Pyrus pyrifolia</i> (돌배나무)	root	>500	>500	>500	>500
41	<i>Rehmannia glutinosa</i> (지황)	root	25	18	21	38
42	<i>Rubus coreanus</i> (복분자)	fruit	12	67	127	251
43	<i>Selaginella tamariscina</i> (권백)	aerial part	>500	>500	>500	>500
44	<i>Santalum album</i> (백단향)	stem	>500	>500	>500	>500
45	<i>Siegesbeckia pubescens</i> (희렴)	aerial part	>500	>500	>500	>500
46	<i>Stranvaesia davidiana</i> (홍자귀)	leaf	>500	>500	>500	>500
47	<i>Vitis vinifera</i> (포도등)	aerial part	>500	>500	>500	>500
48	<i>Vitis vinifera</i> (포도근)	root	>500	>500	>500	>500
49	<i>Zingiber officinale</i> (건강)	root	>500	>500	>500	>500
50	<i>Zizyphus jujuba</i> (대추)	fruit	>500	>500	>500	>500
51	<i>Zephyranthes candida</i> (흰꽃나도사프란)	whole plant	>500	>500	>500	>500

IC₅₀ of IBMX (positive control) on PDE 4B2, PDE 4D3, PDE 7A1 and PDE 7B were 57 ng/ml, 50 ng/ml, 20 ng/ml, and 17 ng/ml.

Table II. Effect of herbal extracts (500 mg/kg) having inhibitory activity against PDE 4 and 7 on the total serum IgE level in DNCB-induced atopic model

Group	IgE (ng/ml)	Inhibition rate (%)
Normal	280.5±43.6	-
Atopy	1325.1±55.7	-
<i>Alisma orientale</i>	1113.5±45.8	16
<i>Angelica dahurica</i>	745.5±67.3	44
<i>Astragalus membranaceus</i>	1240.5±35.1	6
<i>Thuja orientalis</i>	1304.5±24.9	2
<i>Duchesnea chrysantha</i>	325.1±23.5	75
<i>Perilla frutescens</i>	1102.3±45.5	17
<i>Rehmannia glutinosa</i>	1004.3±39.5	24
<i>Rubus coreanus</i>	520.1±45.9	61

Inhibition rate of 8 mg/kg of Acrivastine (positive control) was 50%.

Table III. Effect of herbal extracts (500 mg/kg) having inhibitory activity against PDE 4 and 7 on the compound 48/80-mediated histamine release from mouse peritoneal mast cells

Group	Histamine (ng/ml)	Inhibition rate (%)
Normal	13±4	-
Atopy	87±16	-
<i>Alisma orientale</i>	76±11	13
<i>Angelica dahurica</i>	74±13	15
<i>Astragalus membranaceus</i>	80±10	8
<i>Thuja orientalis</i>	81±8	7
<i>Duchesnea chrysantha</i>	43±12	51
<i>Perilla frutescens</i>	67±14	23
<i>Rehmannia glutinosa</i>	71±15	18
<i>Rubus coreanus</i>	50±12	43

Astragalus membranaceus, *Thuja orientalis*, *Duchesnea chrysantha*, *Perilla frutescens*, *Rehmannia glutinosa* 및 *Rubus coreanus* 추출물 경구 투여에 의한 혈청 중의 IgE 농도는 각각 1113.5±45.8 ng/ml, 745.5±67.3 ng/ml, 1240.5±35.1 ng/ml, 1304.5±24.9 ng/ml, 325.1±23.5 ng/ml, 1102.3±45.5 ng/ml, 1004.3±39.5 ng/ml 및 520.1±45.9 ng/ml로 나타났다. 경구 투여에 의하여 IgE 저해 효과가 가장 우수한 생약재 추출물로는 *Duchesnea chrysantha*로 75%의 저해 효과를 나타내었다. PDE 4와 PDE 7에 비특이적으로 강한 효과를 나타내었던 *Alisma orientale*와 *Rehmannia glutinosa*는 각각 16%와 24%의 IgE 저해 효과를 나타내었고, PDE 4에 특이적으로 효과를 나타내었던 *Thuja orientalis*는 2%의 IgE

저해 효과를 나타내었다.

히스타민 억제 효과 - 생약재 추출물의 아토피 억제효과가 비만세포 탈과립의 억제효과인지를 검토하기 위하여 마우스의 복강비만세포를 분리하여 히스타민 유리 억제효과를 검토하였다. 정상 복강비만세포를 compound 48/80으로 처리하였을 때 87±16 ng/ml로 정상군 대비 약 6.7배 히스타민 유리가 증가하였다. 8종 생약재 추출물의 투여 의한 히스타민 유리 억제 효과는 다음과 같았다. *Alisma orientale*, *Angelica dahurica*, *Astragalus membranaceus*, *Thuja orientalis*, *Duchesnea chrysantha*, *Perilla frutescens*, *Rehmannia glutinosa* 및 *Rubus coreanus* 추출물 경구 투여에 의한 히스타민 농도는 각각 767±11 ng/ml, 74±13 ng/ml, 80±10 ng/ml, 81±8 ng/ml, 43±12 ng/ml, 67±14 ng/ml, 71±15 ng/ml 및 50±12 ng/ml로 나타났다. 히스타민 유리 억제 효과가 가장 우수한 생약재 추출물로는 *Duchesnea chrysantha*로 51%의 억제 효과를 나타내었다. PDE 4와 PDE 7에 비특이적으로 강한 효과를 나타내었던 *Alisma orientale*와 *Rehmannia glutinosa*는 각각 13%와 18%의 히스타민 유리 억제 효과를 나타내었고, PDE 4에 특이적으로 효과를 나타내었던 *Thuja orientalis*는 7%의 히스타민 유리 억제 효과를 나타내었다.

결론

PDE 4와 PDE 7은 pro-inflammation에 대한 억제를 위한 주요한 타겟 중의 하나이다. 천연물 소재로는 이에 대한 효능을 나타내는 탐색이 이루어진 적이 없었다. 천연물의 경우는 천연물이 가지고 있는 고유의 특성상 여러 종류의 flavonoid, flavone, alkaloid 및 phenol 화합물이 다량 함유되어 있고 일반적으로 항염증 효과를 갖는 것으로 알려져 있다. 아토피 피부염은 T 림프구, 비만세포 및 호산구와 같은 면역세포의 침윤과 활성이 매우 중요하다고 알려져 왔다. 즉 아토피 피부염의 발병 메카니즘은 매우 복잡하지만 주로 아토피 유발 항원이 생체내에 들어오면 T 림프구에 의하여 IL-4이 생성되고 이 사이토카인에 의하여 IgE 생성이 증가된다. 생성된 IgE가 비만세포의 표면에 존재하는 IgE 수용체(FcεRI)와 결합함으로써 감작되어 있다가 재차 항원에 노출되었을 때 비만세포에서 히스타민을 포함한 염증물질의 분비가 야기되고 이로 인해 피부에 가려움증 등의 아토피 증상이 생기는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ 문헌 및 고서를 통하여 임상적으로 항염증 효과가 있다고 알려져 있는 생약재 중에서 51종에 대하여 염증 억제 타겟 단백질인 PDE 4와 PDE 7에 대한 탐색 결과, 51종중에 8종이 500 µg/ml 이하에 IC₅₀ 값을 나타내었다. PDE 억제 효능을 나타내는 8종의 생약재에 대하여 아토피 동물 모델에서 항아토피 효과를 측정된 결과, 혈중 IgE 및 히스타민 유리 억제 효과가

*Duchesnea chrysantha*이 PDE 억제 효능을 나타낸 8종중에서 가장 우수한 효능을 나타내었다. 본 실험을 통하여 선별된 8종의 생약재 중에서 아토피에 효능이 있다고 이미 보고된 것은 *Alisma orientale*, *Angelica dahurica*, *Astragalus membranaceus*, *Duchesnea chrysantha*, *Rehmannia glutinosa* 및 *Rubus coreanus*의 6종의 생약재이다. *Alisma orientale*의 70% 에탄올 추출물에서 hapten-induced dermatitis NC/Nga 마우스 모델에서 항아토피 효과를 보고되었고,¹⁹⁾ *Angelica dahurica*의 70% 에탄올 추출물에서 dust mite extract 유발 atopic dermatitis 모델에서 아토피 효과가 보고되었다.²⁰⁾ 본 연구에서 동물시험에서 가장 항아토피 효과가 우수했던 *Duchesnea chrysantha*의 경우는 Lee 등²¹⁾의 연구결과가 유사하게 혈청 IgE 및 히스타민 유리 억제 효과를 나타내었다. Kim 등²²⁾의 연구에서는 *Rehmannia glutinosa*의 메탄올 추출물을 약침의 방법으로 아토피 동물 모델에서 약침의 방법으로 혈청 중의 IgE 및 IL-2 및 IL-4의 억제 효과를 측정하였다. 그 밖에 *Rubus coreanus*의 물 추출물에서 항아토피 효과 및 *Astragalus membranaceus*의 염증에 의한 부종 억제 효과가 보고되었다.^{23,24)} 이와 같이 보고된 항아토피 효과를 나타내는 생약재의 경우 PDE 억제 효과는 보고된 적이 없었으나, 본 연구 결과를 바탕으로 PDE 4 및 PDE 7 억제에 의한 항아토피 효과에 대한 잠재적 가능성이 있는 결과라고 판단이 된다. 아토피의 경우, 기전이 복잡하여 PDE 효소 억제에 의한 아토피 치료 기전을 설명하기는 어려우나, 건선의 국소 치료에 있어서 PDE 4와 PDE 7의 억제제가 임상 연구 중으로 IgE 및 히스타민 억제 효능을 가지고 있는 등 치료제로써의 가능성이 있다고 할 수 있다.²⁵⁾ 따라서 본 연구에서 확인 한 바와 같이 PDE 4 및 PDE 7의 억제 효능을 갖는 물질이 아토피 동물에서도 IgE 및 히스타민 유리 억제 효과를 나타내는 것으로 보아 PDE 4 및 PDE 7 억제제의 항아토피 및 알러지 약물로 잠재적 가능성이 있으며, 천연물 소재의 경우는 *Duchesnea chrysantha* 등과 같이 PDE 억제 이외에 소재가 같은 다성분 혼합물이라는 특징상 항산화 및 항염증 등의 여러 가지 생리활성에 의하여 복합적으로 활성을 나타내는 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2014년도 서일대학교 학술연구비에 의해 연구되었습니다.

인용문헌

- Francis, S. H., Turko, I. V. and Corbin, J. D. (2001) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **65**: 1-52.
- Houslay, M. D. (2001) PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **69**: 249-315.
- Boswell-Smith, V., Spina, D. and Page, C. P. (2006) Phosphodiesterase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* **147** Suppl 1: S252-257.
- Ahn, B. O., Ko, K. H., Oh, T. Y., Cho, H., Kim, W.B., Lee, K. J., Cho, S. W. and Hahm, K. B. (2001) Efficacy of use of colonoscopy in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in rats: the evaluation of the effects of antioxidant by colonoscopy. *Int. J. Colorectal. Dis.* **16**: 174-181.
- Li, Y. F., Huang, Y., Amsdell, S. L., Xiao, L., O'Donnell, J. M. and Zhang, H. T. (2009) Antidepressant and anxiolytic-like effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram on behavior depend on cyclic AMP response element binding protein-mediated neurogenesis in the hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **34**: 2404-2419.
- Field, S. K. (2011) Roflumilast, a novel phosphodiesterase 4 inhibitor, for COPD patients with a history of exacerbations. *Clin. Med. Insights Circ. Respir. Pulm. Med.* **5**: 57-70.
- Cheung, Y. F., Kan, Z., Garrett-Engele, P., Gall, I., Murdoch, H., Baillie, G. S., Camargo, L. M., Johnson, J. M., Houslay, M. D. and Castle, J. C. (2007) PDE4B5, a novel, super-short, brain-specific cAMP phosphodiesterase-4 variant whose isoform-specifying N-terminal region is identical to that of cAMP phosphodiesterase-4D6 (PDE4D6). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **322**: 600-609.
- Akama, T., Baker, S. J., Zhang, Y. K., Hernandez, V., Zhou, H., Sanders, V., Freund, Y., Kimura, R., Maples, K. R. and Plattner, J. J. (2009) Discovery and structure-activity study of a novel benzoxaborole anti-inflammatory agent (AN2728) for the potential topical treatment of psoriasis and atopic dermatitis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**: 2129-2132.
- Smith, S. J., Cieslinski, L. B., Newton, R., Donnelly, L. E., Fenwick, P. S., Nicholson, A. G., Barnes, P. J., Barnette, M. S. and Giembycz, M. A. (2004) Discovery of BRL 50481 [3-(N,N-dimethylsulfonamido)-4-methyl-nitrobenzene], a selective inhibitor of phosphodiesterase 7: in vitro studies in human monocytes, lung macrophages, and CD8+ T-lymphocytes. *Mol. Pharmacol.* **66**: 1679-1689.
- Kadoshima-Yamaoka, K., Goto, M., Murakawa, M., Yoshioka, R., Tanaka, Y., Inoue, H., Murafuji, H., Kanki, S., Hayashi, Y., Nagahira, K., Ogata, A., Nakatsuka, T. and Fukuda, Y. (2009) ASB16165, a phosphodiesterase 7A inhibitor, reduces cutaneous TNF alpha level and ameliorates skin edema in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation model in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **613**: 163-166.
- Park, J. C. (2011) The integrated dictionary of herb medicine, oriental medicine and functional food. Purunhangbok, Seoul.
- Park, Y. M., Kim, S. J., Jo, K. H., Yang, E. J. and Jung, S. T. (2006) Anticariogenic and antioxidant activities from medic-

- inal herbs. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**: 284-293.
13. Lee, S. E., Seong, N. S., Bang, J. K., Park, C. G., Sung, J. S. and Song, J. (2003) Antioxidative activities of Korean medicinal plants. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **11**: 127-134.
 14. Park, S. Y. and Kim, J. W. (1992) Screening and Isolation of the Antitumor Agents from Medicinal Plants (I), *Kor. J. Pharmacogn.* **23**: 264-267.
 15. Kim, G. Y., Nam, K. W., Jang, S. J., Kim, J. E., Iim, J. S., Ahn, B. S., Kwun, D. S., Jung, H. W. and Cho, K. O. (2008) Antibacterial activities of medicinal herbs on *Salmonella* and *E. coli*. *Kor. J. Ori. Med. Physiol. Pathol.* **22**: 619-623.
 16. Redondo, M., Brea, J., Perez, D. I., Soteras, I., Val, C., Perez, C., Morales-García, J. A., Alonso-Gil, S., Paul-Fernandez, N., Martín-Alvarez, R., Cadavid, M. I., Loza, M. I., Perez-Castillo, A., Mengod, G., Campillo, N. E., Martínez, A. and Gil, C. (2012) Effect of phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. Discovery of a new chemically diverse family of compounds. *J. Med. Chem.* **55**: 3274-3284.
 17. Ahn, J. Y., Im, L. R., Kim, J. H., Park, J. H., Kim, D. K. and Lee, Y. M. (2009) Effects of *Rumex* Radix water extract on development of atopic dermatitis in Balb/c mice. *Kor. J. Pharmacogn.* **40**: 218-223.
 18. Park, Y. L. and Park, J. (2009) Pathogenesis of atopic dermatitis. *Korean J. Invest. Dermatol.* **14**: 67-72.
 19. Lee, J. H., Kwon, O. S., Jin, H. G., Woo, E. R., Kim, Y. S. and Kim, H. P. (2012) The rhizomes of *Alisma orientale* and alisol derivatives inhibit allergic response and experimental atopic dermatitis. *Biol. Pharm. Bull.* **35**: 1581-1587.
 20. Lee, H., Lee, J. K., Ha, H., Lee, M. Y., Seo, C. S. and Shin, H. K. (2012) *Angelica dahurica* Radix inhibits dust mite extract-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **2012**: 1-7.
 21. Lee, J. S., Kim, I. S., Ryu, J. S., Kim, J. H., Kim, J. S., Kim, D. H. and Yun, C. Y. (2012) The inhibitory effect of *Duchesnea chrysantha* extract on the development of atopic dermatitis-like lesions by regulating IgE and cytokine production in Nc/Nga mice. *Phytother. Res.* **26**: 284-290.
 22. Kim, M. C., Lee, C. H. and Yook, T. H. (2013) Effects of anti-inflammatory and *Rehmannia* radix pharmacopuncture on atopic dermatitis in NC/Nga mice. *J. Acupunct. Meridian Stud.* **6**: 98-109.
 23. Kim, H. H., Choi, P. H., Yoo, J. S., Jeon, H., Chae, B. S., Park, J. S., Kim, S. H. and Shin, T. Y. (2011) Ripe fruit of *Rubus coreanus* inhibits mast cell-mediated allergic inflammation. *Int. J. Mol. Med.* **29**: 303-310.
 24. Kogure, T., Tatsumi, T. and Oku, Y. (2011) Edematous erythema at the hands and feet probably caused by the traditional herb "radix astragali". *Integr. Med. Insights* **6**: 1-5.
 25. Roh, H. J., Bae, B. G. and Lee, J. H. (2009) Recent advances in topical therapy of psoriasis. *J. Korean Soc. Psoriasis* **6**: 1-6.
- (2014. 8. 17 접수; 2014. 9. 5 심사; 2014. 9. 15 게재확정)