

Original Article

DNCB로 유도된 아토피 피부염에 대한 당귀 추출물과 *Bacillus polyfermenticus* KJS-2의 효과

류덕현¹, 오사랑, 정태성², 류덕선^{3*}

¹대전대학교 한의과대학 안이비인후피부과, ²주웰빙테인먼트, ³순천향대학교 의료과학대학 임상병리학과

The Effect of *Angelica gigas* Nakai Extract and *Bacillus Polyfermenticus* KJS-2 on Atopic Dermatitis induced by DNCB in mice

Deok-Hyun Ryu¹, Sa-Rang Oh, Tae-Sung Jung², Deok-Seon Ryu^{3*}

¹Dept. of Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology,
College of Oriental Medicine, Dae-jeon University

²Wellbeingtainment Co., Ltd

³Dept. of Biomedical Laboratory Science, Soonchunhyang University

Objectives: The purpose of this study was to investigate the effects of *Angelica gigas* Nakai extract (AGNE) and *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (BP2) on atopic dermatitis (AD) induced by 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB) in mice.

Methods: In the experiment, we divided mice into four groups: a control group, a DNCB group, an AGNE group, and an AGNE+BP2 group. Then we examined the changes in scratching frequency, clinical aspects on dorsum skin, immunoglobulin (IgE), cytokines (TNF- α , IL-6) and expression of COX-2.

Results: From the experiment, the scratching frequency was significantly dropped in AGNE group and AGNE+BP2 group. Clinical observations of dorsum skin, there were a severe keratotic lesion and drop of dead skin cell in DNCB group, but symptoms of AD were decreased 39.6% in AGNE group and 49.6% in AGNE+BP2 group during 3 weeks. IgE, TNF- α and IL-6 were decreased significantly in both AGNE and AGNE+BP2 group. Expression of COX-2 was also decreased significantly in both groups.

Conclusions: In conclusion, these data suggest that AGNE can decrease symptoms of AD and BP2 makes AGNE more effective. So AGNE can be useful herbal therapy for AD.

Key Words : *Angelica gigas* Nakai extract (AGNE); *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (BP2);
2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB); Atopic dermatitis (AD)

서론

아토피 피부염(Atopic dermatitis, AD)은 만성 염 증성 피부 질환으로 습진성 피부병변과 극심한 가려 움증을 특징으로 한다¹⁾. 이 질환은 영유아기에 흔히 발생하며 전세계적으로 10-20% 정도의 유병률을 보

이고 있는데, 우리나라 유병률도 15.3%에서 17%로 증가하고 있는 추세이다. 아토피 피부염의 발생에는 유전학적 소인, 환경적 요인, 면역학적 요인 등 여러 가지 인자간의 상호작용이 관여한다²⁾.

아토피 피부염은 한의학에서는 胎熱, 奶癩, 小兒 濕疹, 胎斂瘡, 四彎風 등에 속하며³⁾ 박 등의 문헌연

• Received : 18 July 2017 • Revised : 9 August 2017 • Accepted : 9 August 2017
• Correspondence to : 류덕선(Deok-Seon Ryu)
(31538) 충남 아산시 신창면 순천향로 22 임상병리학과(의료과학관 1114호)
Tel : +82-41-530-3093, Fax : +82-41-530-3085, E-mail : duckssun@naver.com

구에서는 그 병인병기를 稟性不耐 濕熱內蘊한 상태에서 다시 風濕熱邪의 침입으로 內外邪氣가 相搏하여 피부에 발생하는 것으로 보았고⁴⁾, 증상의 특징에 따라 변증을 한 후 각 변증에 따른 치료법을 적용한다⁵⁾.

양방에서는 아토피 피부염의 빠른 증상 개선을 목적으로 항히스타민제와 스테로이드제를 위주로 사용하고 있지만 장기간 사용 시 부작용을 야기할 수 있기 때문에⁶⁾, 치료효과는 높으면서 부작용은 적은 천연약물에 대한 관심이 높아지고 있으며 다양한 한방 치료제에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다⁷⁾.

방약합편의 피부외과 처방에서 다빈도로 쓰이는 약물에는 當歸, 川芎, 芍藥, 甘草 등이 있는데⁴⁾, 그 중 當歸(*Angelica gigas* Nakai)는 繖形科에 속하는 다년생 초본의 뿌리로 性은 溫無毒, 味는 甘辛苦하고, 歸經은 心, 肝, 脾經의 三經이며, 補血和血, 養血潤燥, 活血舒筋하는 기능으로⁸⁾ 혈액을 보충시켜주는 효과가 있어 빈혈이나 부인병 등에 대한 보혈제로 처방된다⁹⁾. 함유성분으로는 coumarin계의 decursin, decursinol angelate와 nodakenin, umbelliferon, β -sitosterol 등이 알려져 있고¹⁰⁾, 현재까지 당귀에 관한 연구에 의하면 미백 및 자외선 차단 효과¹¹⁾, 항염증 효과¹²⁾, 항산화 및 항혈전 효과¹³⁾가 있었다는 보고가 있으나 아직까지 당귀 단미로 아토피 피부염 개선에 관한 연구보고는 찾을 수 없었다.

또한 최근의 연구에서 아토피 피부염 환자 중에서 음식물 알레르기에 반응성이 있는 환자가 70-80%에 달한다는 연구가 있었고¹⁴⁾, 한의학적으로 아토피 피부염을 뜻하는 胎熱은 外科正宗에 “奶癩因兒在胎中, 母食五辛, 父餐灸轉, 遺熱與兒.”라 하여 식이성향원과 밀접한 관련이 있으며 태생기에는 태반을 통해 모친이 먹은 음식물에 감작되어 태아에게 전해지는 것으로 정의된다¹⁵⁾. *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (BP2)는 간균으로, 포자를 생성함으로써 섭취 시 소화관에 작용하여 다양한 소화효소를 분비하고 유산과 비타민을 생성하는 것으로 알려져 있다. 대사산물로 macrolactin 화합물을 생성하는데 이 화합물은 항진균 효과, 항바이러스 효과, 항암 효과 등

의 활성을 갖는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾.

이에 저자는 본 연구에서 DNCB로 아토피 피부염을 유도한 생쥐에서 참당귀 추출물(AGNE)과 BP2를 투여하여 관찰한 후 아토피 피부염 증상의 개선효과에 대한 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

연구대상 및 방법

1. 재료

1) 시료

본 실험에 사용한 當歸(*Angelica gigas* Nakai)는 繖形科에 속한 참당귀의 뿌리로 진부GAP당귀영농조합법인에서 세절된 형태로 구매하여 사용하였다. *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (BP2)는 ㈜아미코젠에서 파우더 형태로 구입하여 사용하였다.

2) 동물

실험동물은 웅성 4주령의 체중 18-20g BALB/c mice를 대한바이오링크 (충청도, 한국)에서 공급받아 대구한의대학교 한방산업대학의 clean cage에 약 7일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 온도는 23±2℃로 유지되었고, 습도는 55±10%로 하였으며, 조명은 12시간-12시간(night-day cycle)의 환경을 유지하였으며, 실험동물용 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물은 상수도로 실험기간 동안에 자유롭게 섭취하도록 공급하였다.

3) 아토피 피부염 유발 약물

Compound 48/80은 국소적 부위에 소양증을 유발하고 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB) 는 아토피 피부염을 유발하는 약물로서 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 본 실험에 사용된 DNCB는 아세트산과 올리브오일이 3:1로 혼합된 용액에 0.5%와 1%로 희석한 다음 사용되었다.

2. 방법

1) 시료의 제조

참당귀 뿌리는 깨끗이 세척하여, 80°C 열풍건조기에 수분함량이 10% 이하가 되도록 건조한 후, 건조물 4 kg에 95% 발효주정에탄올 20 L를 첨가하여 60°C에서 10시간 진탕 추출 후 추출액을 획득하였다. 추출액을 여과지로 여과 한 후, 여과액은 60°C에서 회전감압농축기(rotary vacuum evaporator, KNE, Australia)로 수분함량 85% 이하가 되도록 감압 농축 하여 상온에서 18시간 이상 방치하였다. 그 후, 침전된 물질들을 필터 여과 한 후, 여과액은 60°C에서 회전감압농축기로 수분함량 40%이하가 되도록 감압농축하여 최종 참당귀 추출물(*Angelica gigas* Nakai ethanol extract, AGNE) 355 g (yield rate : 8.8%)을 얻었다. AGNE는 상온에서 보관하면서 사용하였다. *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (BP2)는 유산균을 이용하여 효과를 확인한 논문을 참고하여 균수를 10⁷CFU로 설정하여 실험을 실시하였다¹⁷⁾.

2) AGNE의 주요성분 및 당분석

참당귀 뿌리에 있는 주성분인 decursin, decursinol angelate를 지표성분으로 설정하여, AGNE의 decursin 및 decursinol angelate의 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 또한 참당귀의 약리성분으로서 decursin 및 decursinol angelate와 같은 저분자 2차대사산물 외에도 다당체에 의한 면역증강활성에 대한 연구 등이 보고되고 있어¹⁸⁾ AGNE 샘플에도 페놀-황산 정량법으로 총당분석을 실시하였으며, 구성당분석은 중성당(neutral sugar-fructose, galactose, glucose, mannose)과 아미노당(amino sugar-galactosamine, glucosamine)분석 시료를 표준시약으로 사용하여 당류 성분도 확인하였다.

3) 가려움증 유발 방법

실험 시작 1시간 전에 실험동물을 행동 관찰실로 옮기고 약물을 투여한 후 안정시켰다. 약물 투여는 AGNE(20 mg/kg), AGNE(20 mg/kg)+BP2(10⁷CFU)은 PBS에 녹인 후 경구투여 하였으며 대조군에는

PBS를 경구투여 하였다. 경구투여 30분 후 실험 조건과 동일한 환경의 cage로 옮겨 30분간 적응시켜 주었다. 그 후, compound 48/80(50 µg/kg)을 피하 주사하였고, 주사한 직 후로부터 동일한 환경의 새로운 cage에서 10분 단위로 30분간 scratching frequency를 카운터기를 이용해 체크하였다.

4) 아토피 피부염 유발 방법

귀의 등 부위를 제모한 후, 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 1% DNCB 용액 150 µL를 등 부위에 도포하였고 4일동안 면역반응을 유발한 후, 3주 동안 0.5% DNCB 용액 150 µL를 등부위에 도포하여 접촉성 피부염을 유도하였다

5) 시료 투여 및 실험군 설정

각 군은 compound 48/80을 투여하기 전에 PBS를 투여한 정상군, compound 48/80을 투여한 대조군, 대조군에 AGNE(20 mg/kg)을 경구투여한 실험군, 대조군에 AGNE(20 mg/kg)+BP2(10⁷CFU)를 경구투여 한 실험군으로 나누었으며, AGNE, AGNE+BP2 실험군은 각 compound 48/80 투여 1시간전에 AGNE 및 AGNE+BP2를 경구투여 하였다. 또한 DNCB를 도포하지 않고 PBS만을 투여한 정상군, DNCB를 도포한 대조군, 대조군에 AGNE(20 mg/kg)를 경구투여한 실험군, 대조군에 AGNE(20 mg/kg) +BP2(10⁷CFU)를 경구투여한 실험군으로 나누었으며, AGNE, AGNE+BP2 실험군은 2주간 매일 일정한 시간에 경구투여를 실시하였다.

6) Dermatitis Severity 평가

약물 처리 후 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안평가법으로 관능평가를 실시하였다. 아토피 피부염 중증도 정도는 다음과 같은 the Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD) 지표에 근거하여 측정하였다(Table 1).

7) 혈청 내 면역글로불린 및 사이토카인 농도 측정 실험 종료일에 BALB/c 마우스를 CO₂로 마취시

Table 1. Intensity Criteria of SCORAD Index

Symptoms	Score
Erythema	
Edema / Papulation	0 : None
Oozing / Crusting	1 : Mild
Excoriation	2 : Moderate
Lichenification	3 : Severe
Dryness	(Maximum : 18)

켜서 복부를 개봉한 후 주사기를 이용하여 복대동맥에서 채혈 하였으며, 혈액은 해파린 처리 된 튜브에서 원심분리(5,000 rpm, 4°C, 3분)하여 혈청을 분리하였다. BALB/c 마우스의 혈청에서의 IgE의 농도는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 이용하여 측정하였다. 96well plate에 anti-mouse IgE (Pharmingen, CA, USA)를 PBS (pH 7.4) 로 희석하여 96well plate에 100 µL씩 각각 코팅한 다음, 4°C에서 12시간 동안 방치하였다. 이 plate를 0.05% tween이 함유된 PBS로 세정 후 1% BSA, 5% sucrose, 0.05% NaN₃를 함유한 PBS로 1시간동안 blocking을 실시하였다. Washing buffer를 이용하여 여러 번 세정한 다음 recombinant IgE 및 혈청을 첨가한 후 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 각 well을 다시 세정하고 biotinylated IgE (Pharmingen, CA, USA)를 첨가하여 이를 다시 2시간 동안 반응시켰다. Well을 세정한 다음 avidin peroxidase를 첨가하고 37°C에서 30분동안 반응시킨 후, 다시 well을 세정한 다음 기질인 ABTS 용액을 첨가하여, ELISA reader (Epoch2, BioTek, VT, USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

TNF- α 와 IL-6의 농도는 ELISA kit (BD Biosciences, CA, USA)를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 각 well에 혈청 50 µL씩 분주하고 biotin-conjugated antibody (Pharmingen, CA, USA)를 50 µL씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 37°C에서 반응시키고 washing buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 이를 다시 100 µL의 streptavidin-HRP working solution을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 washing buffer를 이용하여 4회 세척하였

다. 100 µL의 stabilized chromogen을 가하여 암소에서 30분간 방치한 후 100 µL의 stop 용액을 처리하고 ELISA reader (Epoch2, BioTek, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) Western blot을 통한 단백질의 발현 측정

COX-2의 활성을 확인하기 위하여 DNCB 유도 동물 모델의 피부조직을 채취하여 lysis buffer (pH7.4 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mg/mL aprotinin, 10 mg/mL leupeptin, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 및 1 mM DTT)를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 BCA protein assay kit (Thermo, Waltham, MA, USA)를 사용하여 정량하였으며, 20 µL의 단백질을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고 PVDF membrane (Merck, Billerica, MA, USA)에 옮겼다. Membrane은 1차 항체 항COX-2 (Cell signaling, Danvers, MA, USA)와 항 β -actin (Santa cruz, Dalla, TX, USA)과 반응시키고 TBS-T로 10분간 3회 세척 후 membrane을 2차 항체 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA)로 1시간 반응시켰다. 항체들에 대한 발현 분석은 horseradish peroxidase-linked (HRP) 이차 항체에 의해 발현되는 enhanced chemiluminescence (ECL)을 이용하였으며, Imaging system (Davinch K, Korea)을 이용하여 비교 분석하였다.

3. 통계처리

실험 결과는 mean \pm standard error mean (S.E.M)으로 나타내었고, 유의성 검정은 One way analysis of variance (ANOVA)로 수행하였으며, 통계적 검정은 Student-Newman-Keuls test를 사용하였으며, P 값이 0.05 이하를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. AGNE의 주요성분 및 당분석

다음과 같이 HPLC 크로마토그램의 분석결과를 보면 표준품의 경우, 7.2분, 7.5분에 decursin 과 decursinol angelate 피크가 형성되었으며(Fig. 1A), AGNE 샘플의 경우, 표준품과 동일한 분석시간대와 동일한 스펙트럼의 decursin 및 decursinol angelate 피크가 분석되었다(Fig. 1B). 그 결과, AGNE의 decursin 및 decursinol angelate의 함량은 각 34.11%, 14.98% 였다(Table 2). 총 당분석 결과 총다당체 성

분 함량은 46.72% 였고, 그 외 단당류로서 glucose 성분이 2,475 µg/g으로 가장 많이 함유되어 있었으며, galactose와 mannose가 각각 53.5 µg/g, fructose 2.7 µg/g, 아미노당으로서 glucosamine 11.3 µg/g, galactosamine 8.8 µg/g이 함유되어 있었다(Table 3).

2. 가려움증 조절에 미치는 영향

compound 48/80 단독 처리군은 정상군(9.75± 3.04)과 비교 시 몸을 긁는 횟수(scratching frequency)

Table 2. Contents of Decursin, Decursinol Angelate, and Polysaccharides from AGNE

%	Decursin	Decursinol angelate	Polysaccharides
AGNE	34.11	14.98	46.72

Table 3. Contents of a Simple Sugar and Amino Sugar from AGNE

µg/g	Glucose	Galactose	Mannose	Fructose	Glucosamine	Galatosamine
AGNE	2475.0	53.3	53.3	2.7	11.3	8.8

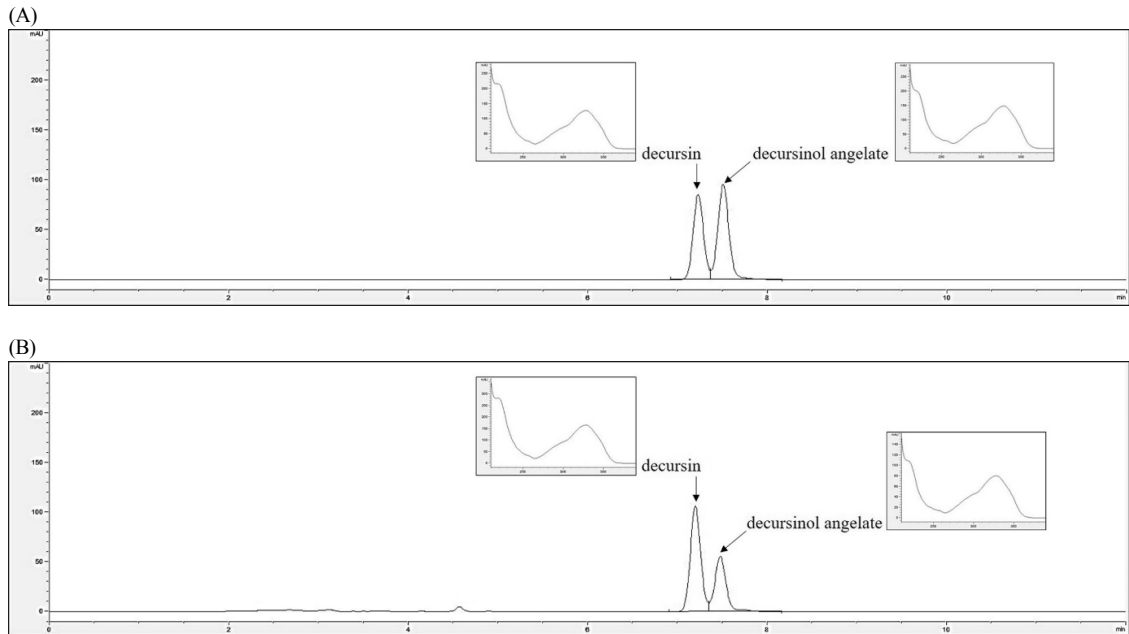


Fig. 1. Representative high-performance liquid chromatography profile (A) Decursin and decursinol angelate of standard materials (B) AGNE sample.

가 유의적으로 증가하였다(119.4 ± 7.28 , $p < 0.05$). AGNE를 단독으로 투여한 실험군에서는 소양증 유발 모델보다 유의적인 가려움증 횟수 감소 현상 (50.6 ± 1.72 , $p < 0.05$)을 보였으며, AGNE+BP2 투여군에서도 소양증 유발 모델보다 유의적인 가려움증 횟수 감소현상을 확인할 수 있었다(56.2 ± 3.28 , $p < 0.05$). AGNE 단독투여군과 AGNE+BP2 투여군의 유의적인 차이는 없는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

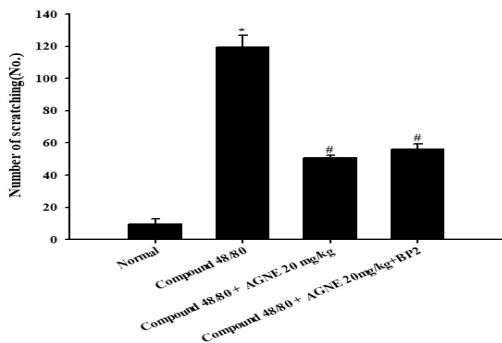


Fig. 2. The effect of AGNE and AGNE+BP2 on scratching behavior induced by compound 48/80 in ICR mice. AGNE(20 mg/kg), AGNE(20 mg/kg)+BP2(10^7 CFU) administered orally on the scratching behavior induced by compound 48/80 (50 μ g/mouse, s.c.) in mice. AGNE and AGNE+BP2 significantly inhibited the compound 48/80-induced scratching behavior than DNCB group. Each datum represents the means \pm S.E.M. of three independent experiments. (* $p < 0.05$ vs. normal group, # $p < 0.05$ vs. compound 48/80-treated group).

3. 등 피부의 육안적 관찰조건

DNCB 처리에 의하여 모든 대조군을 제외한 DNCB, AGNE, AGNE+BP2 그룹에서 심한 상처와 진주름에 의한 피부염 유발 현상을 확인하였다. 그 후, 일주일 간격으로 각 그룹의 피부상태를 육안으로 관찰할 결과, 대조군은 시간이 지날수록 각질의 각화와 탈락의 현상이 심한 반면, AGNE(20 mg/kg) 및 AGNE(20 mg/kg)+BP2(10^7 CFU)을 투여한 실험군에서는 아토피 피부염의 증상이 현저하게 감소되는 것을 육안으로 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). 이를

SCORAD index 기준에 의한 수치 평가에서 대조군 (0주차: 9 ± 0.548 , 2주차: 10 ± 1.069)에 비해 AGNE (20 mg/kg)(0주차: 9 ± 0.775 , 2주차: 5.429 ± 0.649) 및 AGNE+BP2(0주차: 8.8 ± 0.735 , 2주차: 4.429 ± 0.782) 실험군에서 각각 2주동안 39.6와 49.6%이상의 감소 현상을 검증할 수 있었다(Fig. 3B).

4. IgE에 미치는 영향

대조군에서 혈청 내 IgE의 생성량은 증가하였으나(0.396 ± 0.018 ng/mL, $P < 0.05$), AGNE(20 mg/kg) 및 AGNE(20 mg/kg)+BP2(10^7 CFU)의 투여군에서는 IgE 양이 유의적으로 감소되었다(0.317 ± 0.014 , 0.269 ± 0.000 ng/mL, $P < 0.05$). AGNE 단독 투여군과 AGNE+BP2 투여군의 IgE 생성 비교 결과, AGNE 단독투여군보다 AGNE+BP2 복합소재에 의하여 유의적인 저하효과가 나타났다. AGNE(20 mg/kg)와 AGNE(20 mg/kg)+BP2(10^7 CFU)투여군의 억제율은 각각 19.95%와 32.07%를 나타내었다(Fig. 4).

5. TNF- α 에 미치는 영향

정상군에 비해 대조군에서 TNF- α 의 생성은 증가하였으나(2.15 ± 0.13 ng/mL, $P < 0.05$), AGNE(20 mg/kg)와 AGNE(20 mg/kg)+BP2(10^7 CFU)에 의하여 유의적으로 억제(1.51 ± 0.03 , 1.72 ± 0.02 ng/mL, $P < 0.05$) 되었으며, 대조군에 비하여 TNF- α 생성 저하율은 각 29.70%와 19.97%로 나타났다(Fig. 5A).

6. IL-6에 미치는 영향

AGNE와 AGNE+BP2의 IL-6 억제 효과를 확인한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 IL-6의 생성은 증가하였으나(1.19 ± 0.05 ng/mL, $P < 0.05$), AGNE(20 mg/kg)와 AGNE(20 mg/kg)+BP2(10^7 CFU)에 의하여 유의적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다(0.57 ± 0.013 , 0.52 ± 0.00 ng/mL, $P < 0.05$). DNCB군에 비하여 IL-6 생성 저하율은 각 51.76%와 56.69%로 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5B).

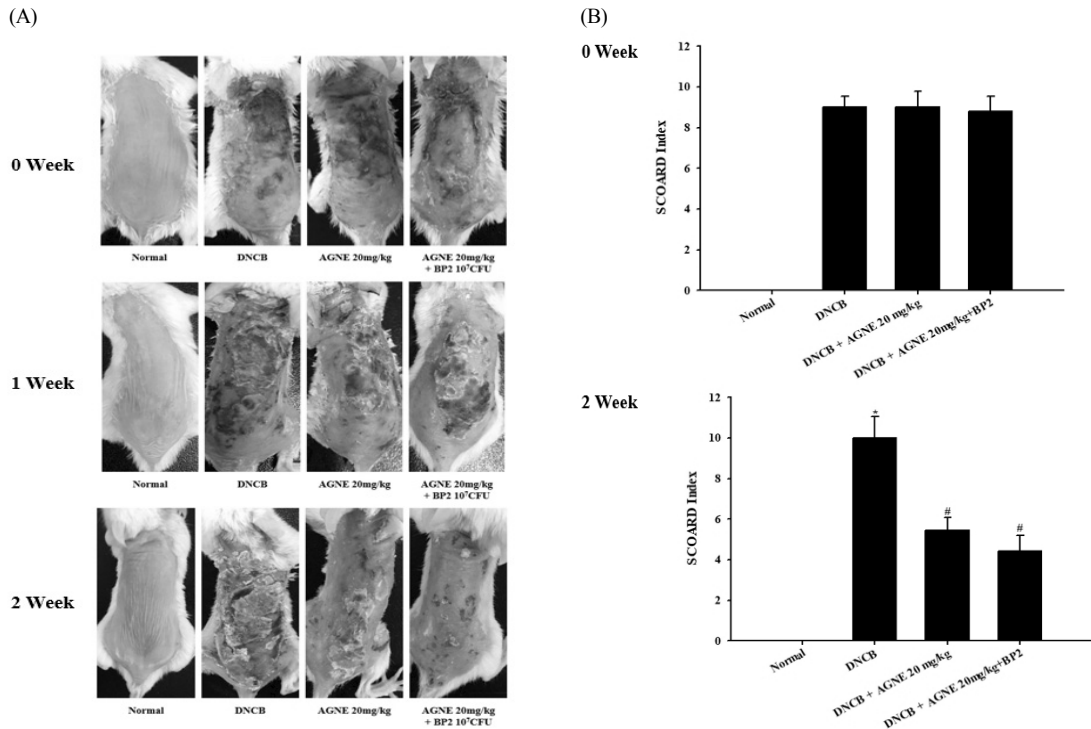


Fig. 3. The effect of AGNE and AGNE+BP2 on the DNCB-induced atopic dermatitis. The BALB/c mice (n=6) were sensitized with 150 μ L of 0.5% DNCB in acetone-olive oil(3:1) or vehicle applied to the dorsal skin twice each week for a total period of 3 weeks. After 2 weeks, AGNE(20 mg/kg) and AGNE(20 mg/kg)+BP2(10⁷ CFU) was orally administered 1 week prior to the end of the experiment, (A) Comparison of skin manifestation in all groups for 3weeks (B) SCORAD index of all groups in 0week and 2 weeks, (* p <0.05 vs. normal group, # p <0.05 vs. compound 48/80-treated group).

7. COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

정상군에 비해 대조군에서 COX-2의 발현량은 증가하였으나(1.22±0.02 ng/mL, p <0.05), AGNE(20 mg/kg)과 AGNE(20 mg/kg)+BP2(10⁷ CFU)의 투여군에서는 COX-2의 발현량이 유의적으로 감소됨(0.93±0.023, 0.89±0.025 ng/mL, p <0.05)을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

고찰

아토피 피부염은 심한 가려움증과 함께 홍반, 삼출, 인설, 가피, 태선화 등의 증상을 가지며, 영유아에서 많고 일부에서는 성인기까지 진행되는 만성 재

발성 질환이다¹⁹⁾. 이 질환은 유전학적 소인, 환경적 요인, 면역학적 요인, 약리학적 이상 등과 같이 여러 인자들이 상호작용하여 발생한다³⁾. 현재까지 치료제로는 대부분 항히스타민제, 스테로이드제 및 보습제 등 단순히 증상완화를 목적으로 하는 치료제에 의존해 왔으나 치료를 중단할 경우 대다수의 환자들에서 재발과 악화를 야기하였다²⁰⁾. 특히 항히스타민제는 아토피 피부염 증상을 일시적으로 진정시키는 작용이 강하긴 하나 근본적인 치료제로는 적절하지 않고, 스테로이드제는 장기간 투여 시 간독성, 부신기능부전증, 당뇨병, 고혈압, 소화성궤양, 여드름, 성장장애 등의 부작용이 우려된다²¹⁾.

아토피 피부염은 한의학적으로 胎熱, 胎癩, 浸淫

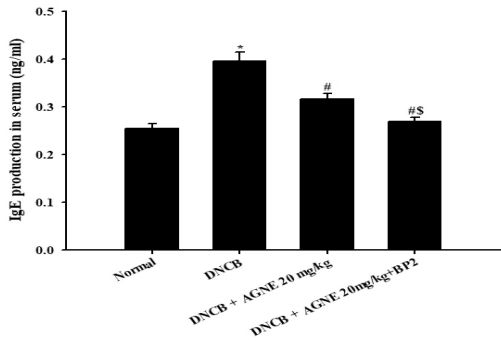


Fig. 4. The effect of AGNE and AGNE+BP2 on the DNCB-induced IgE level in serum from mice. Blood samples were collected and then the levels of serum IgE in the indicated groups were measured using ELISA method. AGNE and AGNE+BP2 significantly inhibited the DNCB-induced IgE level in serum. Each datum represents the means \pm S.E.M. of three independent experiments (* p <0.05 vs. normal group, # p <0.05 vs. DNCB-treated group, § p <0.05 vs. DNCB+AGNE 20 mg/kg-treated group).

瘡, 胎斂瘡, 奶癬, 濕疹 등의 범주에 속한다고 할 수 있다²²⁾. 그 원인으로서는 風熱, 脾胃濕熱, 血熱, 血虛 등이 있는데, 曹²³⁾는 “此因在胎, 母受時氣邪毒, 或外感風熱, 誤服湯劑, 食五辛薑麵過多 … 名曰胎熱” 이라 하여 외부 환경과 음식을 원인으로 보았고, 王²⁴⁾은 “兒在胎中 母多驚駭 或食熱毒之物”이라 하여 정

신적인 요인을 증시하였으며, 曹²⁵⁾는 “小兒體有風熱 脾肺不利 或濕邪搏於皮膚壅滯 血氣皮頑厚則變諸癬” 이라 하여 선천적인 소인과 장부기능의 실조로 생긴다고 보았다.

이에 저자는 이상의 한양방적 원인들 중 아토피 피부염의 발생이 脾胃를 중심으로 한 장부기능이 실조되어 면역력이 저하되기 때문으로 생각하여 당귀의 補血和血, 養血潤燥, 活血舒筋하는 작용 및 현재까지의 연구로 알려진 항염증 효과와 BP2 유산균의 위장장애 치료 효능이 아토피 피부염 치료에 유의한 작용을 할 것이라 판단하여 당귀추출물과 BP2가 아토피피부염에 미치는 개선 효과를 관찰하고자 하였다.

현재까지 당귀에 관한 연구에 의하면 미백 및 자외선 차단 효과¹¹⁾, 항염증 효과¹²⁾, 항산화 및 항혈전 효과¹³⁾가 있었다는 보고가 있다. 특히 당귀로부터 분리한 에탄올 NO, COX-2, TNF- α 등의 염증반응 매개물질을 효과적으로 억제시킴으로써 항염증 치료제로써의 가능성이 입증되었다²⁶⁾. 또한 당귀는 혈류 개선 효과가 있어 노화방지, 주름 개선 및 조직 재생에 효과가 있는 것으로 알려져¹¹⁾ 혈액순환의 관점에서 아토피 피부염의 치료에도 중요한 의미를 가질 것으로 사료된다.

아토피피부염에 효과가 있는 유산균의 항알러지

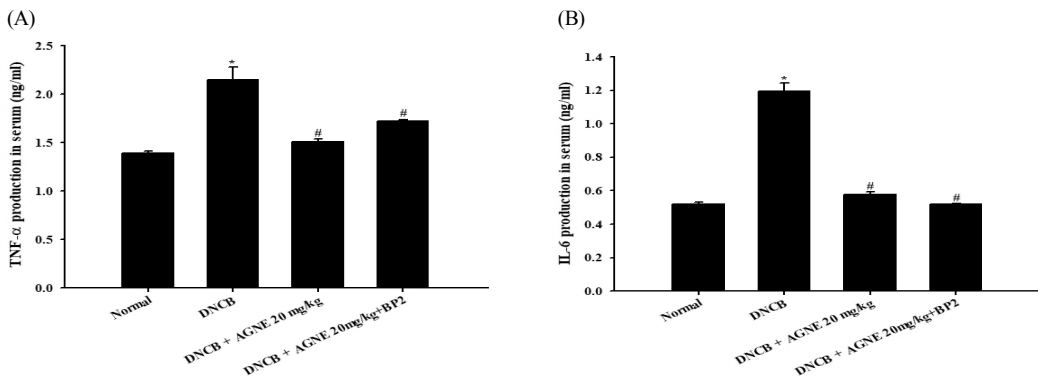


Fig. 5. The effect of AGNE and AGNE+BP2 on the DNCB-induced (A) TNF- α and (B) IL-6 levels in serum from mice. Blood samples were collected and then the levels of serum TNF- α and IL-6 in the indicated groups were measured using ELISA method. AGNE+BP2 significantly inhibited the DNCB-induced TNF- α and IL-6 level in serum. Each datum represents the means \pm S.E.M. of three independent experiments (* p <0.05 vs. normal group, # p <0.05 vs. DNCB-treated group).

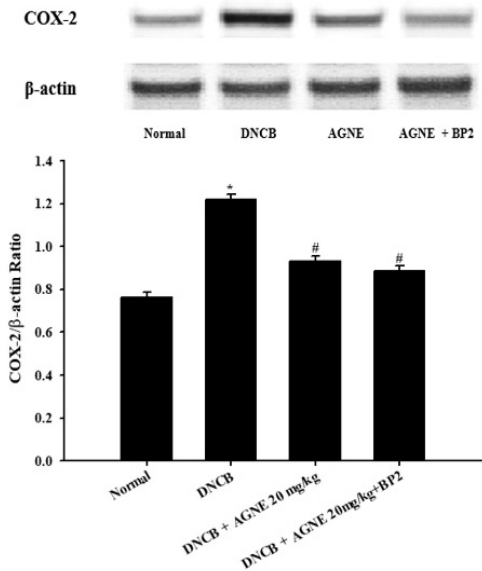


Fig. 6. The effect of AGNE and AGNE+BP2 on the DNCB-induced COX-2 levels in tissue from mice. Tissue samples were collected and then the levels of tissue COX-2 protein in the indicated groups were measured using Western blotting method. AGNE+BP2 significantly inhibited the DNCB-induced COX-2 level in tissue. Each datum represents the means \pm S.E.M. of three independent experiments (* p <0.05 vs. normal group, # p <0.05 vs. DNCB-treated group).

효과에 대해서는 항원 처리 및 제시 과정에서 장-연관 림프조직(gut-associated tissue)을 자극함으로써 면역계를 조절한다는 가설²⁷⁾과 경구투여된 유산균이 장에서 정착하여 서식하면서 우유 단백질 등 항원을 분해하여 면역력을 증강시키고 알러지 및 아토피 피부염의 발병을 완하시킨다는 가설이 있다²⁸⁾. *Bacillus polyfermenticus* KJS-2(BP2)는 *Bacillus polyfermenticus* n.SP.(Bispan®)로부터 새로운 morphology의 균으로서 분리되어 중균균협회에 등록(KCCM10769P)되었으며, 최근 아미코젠에서 식품미생물로서 상업화하여 사용되고 있다. BP2는 현재 프로바이오틱스로서의 인공위액에 대한 내성, 인공담즙산에 대한 내성 연구가 보고되었으며, 다양한 소화효소를 분비하며, 포자를 생성함으로써 섭취 시 소화에 매우 안정한 것으로 보고되고 있다²⁹⁾. 또한

비타민과 유산을 생성하며, 대사산물로 macrolactin A (MA), 7-O-malonyl macrolactin A (MMA), 등의 macrolactin 화합물을 생산하여, 이를 통한 항바이러스, 항균 효과 등을 나타내는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 실제로 아토피 피부염 환자에서 식이항원에 대한 알레르기 반응이 보고되고 있고¹⁴⁾ 현재로서는 본 논문이 AGNE와의 병용 투여이기는 하지만 BP2의 아토피 피부염에 대한 효과를 보는 최초의 연구로서 의미가 있다고 사료된다.

현재까지 아토피 피부염의 원인에 대해서는 정확히 밝혀진 바는 없으나 다양한 환경적인 요인³¹⁾과 면역학적 이상, 유전적인 요소³²⁾ 등이 관여되어 있다고 보고되었고, 면역학적 이상으로는 T림프구의 비정상적인 작용과 IgE의 증가, 사이토카인 체계의 이상 및 세포매개 면역의 감소 등이 아토피 피부염의 병리로 작용한다³³⁾. T림프구가 항체 형성에 관여하는데 아토피피부염 병변에는 보조 T림프구가 주로 침윤된다. 보조 T림프구는 그 기능에 따라 Th1 세포와 Th2세포로 구분되는데 급성기 아토피 피부염에서는 Th2세포가 우세하게 나타난다³⁴⁾. Th1세포는 macrophage를 활성화시키는 IL-2, IFN- γ , TNF 등을 생산하여 지연형 면역반응을 유발한다³⁵⁾. 반면에 Th2세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13을 생산하여 IgE 합성을 증가시키고 type 1 과민반응을 유발하는 비만세포와 호산구의 분화를 유도한다³⁶⁾. 실험 결과 DNCB 단독 처리군에서 혈청의 IgE는 생성량은 증가하였으나 AGNE 및 AGNE+BP2 투여군에서는 IgE 양이 유의적으로 감소되었고 억제율은 각각 19.95%와 32.07%를 나타내었다. 알레르기 및 염증 반응에는 대식세포와 비만세포가 주요한 역할을 하는데 이들 세포가 자극되면 TNF- α , interleukins, prostaglandins, nitric oxide 등의 물질들을 분비하게 되고 이 중 TNF- α 는 염증반응을 개시하는 역할을 하며 다양한 자극에 의해 분비된다³⁷⁾. 실험 결과 AGNE와 AGNE+BP2에 의하여 TNF- α 가 유의적으로 억제(1.51 \pm 0.03, 1.72 \pm 0.02 ng/mL, P <0.05) 되었으며, DNCB군에 비하여 TNF- α 생성 저하율은 각 29.70%와 19.97%로 나타났다. 또한 IL-6는 염증을

일으키는 주요한 cytokine으로 염증반응의 정도를 나타내는 지표로 이용되고 있는데³⁸⁾, IL-6 억제 효과를 확인한 결과 실험군에서 유의적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다(0.57 ± 0.013 , 0.52 ± 0.00 ng/mL, $P < 0.05$). DNCB군에 비하여 IL-6 생성 저하율은 각 51.76%와 56.69%로 현저한 생성저하율을 나타내었다.

염증의 억제는 크게 phospholipase, lipoxigenase 및 cyclooxygenase (COX)의 저해제의 작용으로 나타낼 수 있다. Eicosanoids의 생합성 과정 중 나타나는 염증반응은 cyclooxygenase (COX)에 의해 진행되며 여러 가지 생체내 장기의 항상성 유지와 보호작용은 COX-1에 의해 일어나며, 염증성 및 유도성 효과들은 주로 COX-2에 의해 의한 것이다³⁹⁾. 이에 본 연구에서는 AGNE와 BP2의 COX-2 발현 억제 효과를 확인하고자 하였다. 그 결과 DNCB 단독 처리군에서 COX-2의 발현량은 증가하였으나, AGNE와 AGNE+BP2의 투여군에서는 COX-2의 발현량이 유의적으로 감소되었다. 이상의 결과로 보아 본 시료가 면역세포 활성화를 통해 염증 관련 사이토카인 생성을 억제하고 전사인자의 발현을 감소시켜 아토피 피부염의 증상을 경감시키는 것으로 사료된다.

가려움증 혹은 이로 인해 긁는 행위는 아토피 피부염 환자에서 전형적인 증상으로⁴⁰⁾ 반복적으로 긁는 행위는 피부 장벽을 붕괴시켜 증상을 더욱 악화시킨다. 본 연구에서 사용한 Compound 40/80은 국소적 부위에 소양증을 유발하는 약물로서 AGNE 단독 투여군과 AGNE와 BP2를 함께 투여한 군에서 소양증 유발 모델보다 유의적인 가려움증 횟수 감소 현상(50.6 ± 1.72 , 56.2 ± 3.28)을 보여 아토피 피부염의 핵심적인 증상인 가려움증 경감에 유효한 효과가 있었다. AGNE 단독 투여군 보다 AGNE와 BP2를 함께 투여한 군에서 감소율이 낮은 것은 국소 소양증 동물실험이 급성 소양증을 유발함과 동시에 단기적인 가려움증 횟수 관찰이 이루어지기 때문에, 유산균이 장에 정착하여 성장하여 효능을 확인하기까지 시간적인 문제가 있을 것으로 사료된다.

아토피 피부염의 대표적인 증상인 가려움이 지속되고 적절한 관리를 하지 않으면 삼출을 동반한 홍

반성 발진의 아급성 병변을 거쳐 가죽과 같이 두꺼워진 태선화된 만성 병변으로 진행된다²⁾. 따라서 본 실험에서는 DNCB 처리에 의하여 피부염을 유발시켜 심한 상처와 진무를 상태를 일주일 간격으로 육안으로 관찰한 결과, DNCB군은 시간이 지날수록 각질의 각화와 탈락의 현상이 심한 반면, AGNE 및 AGNE+BP2를 투여한 그룹에서는 아토피 피부염의 증상이 현저하게 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3A). 이를 SCORAD index 기준에 의한 수치 평가에서 DNCB군(0주차: 9 ± 0.548 , 2주차: 10 ± 1.069)에 비해 AGNE(0주차: 9 ± 0.775 , 2주차: 5.429 ± 0.649) 및 AGNE+BP2(0주차: 8.8 ± 0.735 , 2주차: 4.429 ± 0.782) 군에서 각각 3주동안 39.6%와 49.6%이상의 감소 현상을 검증할 수 있었다(Fig. 3B).

이상의 결과, 당기는 아토피피부염에 항염증 작용을 하여 증상 개선에 효과가 있음을 알 수 있었고, 특히 염증 반응을 일으키고 지속시키는 IgE 생성 억제 측면에서 BP2와 병용투여를 하였을 때 더 효과적인 것으로 나타났으므로 아토피피부염 치료에 광범위하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 이는 기존의 면역학적 작용 기전과 부합됨으로써, 본 시료의 면역 조절 작용을 통한 항알러지 효과가 인정되며, 향후 분자적인 수준에서의 기작 규명과 약물 독성 평가 등의 안전성에 관한 연구가 추가적으로 필요하다 사료된다. 그러나 면역 사이토카인의 결과에서는 AGNE 단독 투여군과 AGNE+BP2 병용투여군 간의 통계적인 유의성이 없으므로 추후에 면역학적 지표를 추가하고 실험약물의 농도를 다양하게 하여 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

1. AGNE의 decursin 및 decursinol angelate의 함량은 각 34.11%, 14.98%였고, 총다당체 성분 함량은 46.72%이며, 그 외 단당류로서 glucose 성분이 2,475 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 많이 함유되어 있었으며, galactose와 mannose가 각각 53.5 $\mu\text{g/g}$, fructose 2.7 $\mu\text{g/g}$, 아미노당으로서 glucosamine 11.3 $\mu\text{g/g}$,

- galactosamine 8.8 μg/g이 함유되어 있었다.
2. AGNE 및 AGNE+BP2 투여군에서 모두 유의적인 가려움증 횡수 감소 현상이 있었으나 두 군간에 유의적인 차이는 없었다.
 3. 등 피부의 육안적 관찰 결과 대조군은 시간이 지날수록 각질의 각화와 탈락의 현상이 심한 반면, AGNE 및 AGNE+BP2 투여군에서는 아토피 피부염의 증상이 각각 3주동안 39.6%와 49.6% 감소하였다.
 4. AGNE 및 AGNE+BP2 투여군에서 IgE 억제율이 각 19.95%와 32.07%로 유의적으로 감소되었고 두 군간에 유의한 차이가 있었다.
 5. AGNE 및 AGNE+BP2 투여군에서 TNF-α 생성 저하율이 각 29.70%와 19.97%로 유의적인 억제 효과가 있었다.
 6. AGNE 및 AGNE+BP2 투여군에서 IL-6 생성 저하율이 각 51.76%와 56.69%로 나타났다.
 7. AGNE 및 AGNE+BP2 투여군에서는 COX-2의 발현량은 각 23.77%와 27.05%로 유의적으로 감소되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01133601)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2008;1483-94.
2. Park YM. Advances in the Pathophysiology of Atopic Dermatitis. *Pediatr Allergy Respir Dis.* 2006;16(3):189-96.
3. Cha KB, Kim YS, Seol IC. Literature study on Atopic dermatitis. *J Res Institute Korean Med Daejeon Univ.* 2005;14(2):113-26.
4. Park MC, Kim JM, Hong CH, Hwang CY. A literature study about the comparison of Oriental-Occidental medicine on the Atopic dermatitis. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2002;15(1):226-52.
5. Gong NM, Jee SY. A Literature Study about comparison of Eastern-Western medicine on the Atopic dermatitis. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 1999;12(1):241-53.
6. Chang IM. Treatise on asian herbal medicines. Seoul National Univ Press Inc. 2003;1:176-7.
7. An SH, Kim HH. Lonicera Japonica inhibits atopy dermatitis in NC/Nga mouse through regulation of INOS by NF-kB suppression. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2010;24(2): 278-83.
8. Lee SI. Phytology. Seoul:Suseowon. 1981:101-2.
9. Ahn KS, Sim WS, Kim HM, Han SB, Kim IH. Immunostimulating components from the root of *Angelica gigas* Nakai. *Korean J Pharmacogn.* 1996;27:254-61.
10. Ahn KS, Sim WS, Kim IH. Decursin a cytotoxic agent and protein kinase c activator from the root of *angelica gigas*. *Planta Med.* 1995;62:7-9.
11. Kim CH, Kwon MC, Han JG, Na CS, Kwak HG, Choi GP, et al. Skin-Whitening and UV-Protective Effects of *Angelica gigas* Nakai Extracts on Ultra High Pressure Extraction Process. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 2008; 16(4):255-60.
12. Jang SI, Kim HJ, Hwang KM, Pae HO, Yun YG, Chung HT, et al. Anti-Inflammatory Effect of Ethanol Extract of *Angelica uchiyamana* in Activated Murine RAW 264.7 macrophages. *Korean J Orient Med Prescription.* 2002;10(2):189-97.
13. Kim MY, Kwon OJ, Choo BK, Lee CW, Park EH, Kim HJ. The Effect of *Angelicae gigantis*

- radix according to Heat-process on Anti-Oxidant and Anti-Thrombotic. *Kor J Herbol.* 2016;31(3): 13-22.
14. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2004;113(5):651-7.
 15. Park MC, Kim JM, Hong CH, Hwang CY. A literature study about the comparison of Oriental-Occidental medicine on the Atopic dermatitis. *The Journal of Oriental Medical Surgery, Ophthalmology & Otolaryngology.* 2002;15(1):226-52.
 16. Kim BS. The effect of *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 and *Angelica gigas* Nakai ethanol extract on hyperlipidemia. Department of Pharmacy Graduate School Kyungshung University. 2015.
 17. Kang JS, Jun KD, Kim SW, Jo WS, Kwon JY, Moon KH. Antibacterial activities of *B. polyfermenticus* SCD against pathogenic bacteria and effects on animals and humans. *Yakhak hoeji.* 2004;48(1), 70-74
 18. Kim SA, Oh HK, Kim JY, Hong JW, Cho SI. A review of pharmacological effects of *Angelica gigas*, *Angelica sinensis*, *Angelica acutiloba* and their bioactive compounds, *J Korean Orient Med.* 2011;32(4):1-24
 19. Rho SS. *Full-color Dermatology.* Seoul: IBC design. 2006:499, 512-27.
 20. Park JM, Chae JW. Effects of *Aurantii Immaturus Fructus*(AI) on Atopic Dermatitis (AD) Induced by DNCB in Mice. *J Pediatr Korean Med.* 2016;29(1):27-43.
 21. Jung JY, Han KH. Common skin disease in Korea. Seoul: Emdi world. 2009:37-48.
 22. Gong NM, Jee SY. A Literature study about comparison of Eastern-Western medicine on the Atopic dermatitis. *J Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 1999;12(1):241-53.
 23. Jo SY. *Hwalyousimseo.* Shanghai: Daedongseokgook. 1933:2-8.
 24. Wang BD. *Yookgwajoonseung.* Seoul: Seongbosa. 1982:85-7.
 25. Jo HC. *Sungjechonglok.* Shinmoonong. 1978: 1439-40.
 26. Jang SI, Kim HJ, Hwang KM, Pae HO, Yun YG, Chung HT, et al. Anti-Inflammatory Effect of Ethanol Extract of *Angelica uchiyamana* in Activated Murin RAW 264,7 macrophages. *The Korean Journal of oriental medical prescription.* 2002;10(2):189-97.
 27. Gibson GR, Robertfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995;125: 1401-12.
 28. Jo EH, Kim TK, Hong SJ, Jung DY, Hwang SY, Ahn SH. The Case Study of *Lactobacillus* mixture culture fluid on Atopic dermatitis. *J Korean Med.* 2015;36(3):135-43.
 29. Kim KM, Kim MJ, Kim DH, Park YS, Kang JS. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 as a probiotic. *J Microbiol Biotechnol.* 2009;19:1013-8.
 30. Kim DH, Kang KR, Kim HY, Yoon SY, Kim CG, Tokutaro Y, et al, Structure determination of macrolactin compounds with antibacterial activites isolated from *bacillus polyfermenticus* KJS-2. *J Life Science.* 2010;1792-800.
 31. Kim HJ. Relation between atopic dermatitis and residential environment[Master's thesis]. Dept. of Housing & Interior Design of Yonsei Uni.; 2005.
 32. Yang JM. Genetics of atopic dermatitis. Update in dermatology for a dermatologist. 2003:6-9.
 33. Leung DYM. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J*

- Allergy Clin Immunol. 2000;105:860-76.
34. Morren Ma, Przybilla B, Bamelis M, Heykants B, Reynaers A, Degreef H. Atopic dermatitis: triggering factors. *J Am Acad Dermatol.* 1994;31:467-73.
 35. van Reijssen FC, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Kalthoff FS, Maggi E, Romagnani S, Westland JKT, et al. Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 Phenotype in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1992;90:184-93.
 36. Leung DYM, Sorter NA. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:S1-12.
 37. Bernnan FM, Maini RN, Feldmann M. Cytokine expression in chronic inflammatory disease. *Br Med Bull.* 1995;51(2):368-84.
 38. Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF- κ B Regulation by distinct subunits. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1072: 63-70.
 39. Golden BD, Abramson SB. Selective cyclooxygenase -2 inhibitor. *Rheumatic Disease Clinics of North America.* 1999;25:359-78.
 40. Walgren CF. Itch and atopic dermatitis: an overview. *J Dermatol.* 1999;26:770-9.
 41. Park MC, Choi IH. Analysis on the Dermatological Prescriptions in BangYakHapPyun. *J Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2003; 16(1):42-62.