

## 택사 (澤瀉, *Alismatis Rhizoma*) 추출물이 RBL-2H3 비만세포와 OVA/alum 감각 생쥐의 알레르기 염증 반응에 미치는 영향

송지현 · 이진화 · 김은진 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

### Abstract

#### The Effects of *Alismatis Rhizoma* Extract on Allergic Inflammation in RBL-2H3 Mast Cells and OVA/alum-Sensitized Mice

Song Ji Hyun · Lee Jin Hwa · Kim Eun Jin · Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Korean Medicine, Daejeon University

#### Objectives

*Alismatis Rhizoma* has been known to suppress inflammation and allergic reaction. However, the cellular target of *Alismatis Rhizoma* and its mechanism of action remain unclear. This study was designed to examine the effect of *Alismatis Rhizoma* extract (ALC) on the RBL-2H3 mast cells *in vitro* and on the OVA/alum sensitized mice *ex vivo*.

#### Methods

In the study, RBL-2H3 mast cells were cultured in minimal essential medium (MEM) for 24 hours, and treated separately with cyclosporin A and varying doses of ALC, and then stimulated with Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50 ng/ml) and Ionomycin (0.5  $\mu$ M). The levels of IL-13, IL-4 were measured by ELISA analysis. The mRNA levels of IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, GM-CSF, TNF- $\alpha$  were analyzed with Real-time PCR. Also, manifestations of MAPKs transcription factors and NF- $\kappa$ B p65 translocation were analyzed by western blotting *in vitro*. Subsequently, for *ex vivo* experiment, we induced allergic inflammation on Balb/c mice by OVA/alum and administered ALC orally. And we measured serum OVA-specific IgE level and IL-4, IL-13 in the splenocyte culture supernatant by ELISA analysis.

#### Results

ALC was shown to suppress mRNA expression of IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , and to inhibit the IL-13, IL-4 production. Also ALC reduced an activation of mast cells specific signal MAPKs transcription factors and NF- $\kappa$ B p65 from the western blot analysis in *in vitro* experiment. In *ex vivo*, ALC oral administration decreased the level of OVA-specific IgE in serum, and IL-4, IL-13 in the splenocyte culture supernatant.

#### Conclusions

ALC is shown to reduce inflammation and allergic response by suppressing Th2 cytokines through the regulation of transcription factors MAPKs and NF- $\kappa$ B p65 in mast cells. Administration of ALC suppressed OVA-specific IgE in ovalbumin allergy model through the inhibition of Th2 cytokine. In conclusion, ALC can be considered as an effective treatment for allergic diseases such as atopic dermatitis.

**Key words:** 澤瀉 (*Alismatis Rhizoma*), RBL-2H3 mast cell, Th2 cytokines, OVA/alum, Anti-allergic effect

Received: July 3, 2018 • Revised: August 9, 2018 • Accepted: August 9, 2018

Corresponding Author: Kim Yun Hee

Dr. Kim's Kids clinic (pediatrics of Korean medicine), 150 Gyeryong-ro, Yuseong-gu, Daejeon, Republic of Korea

Tel: +82-42-826-7726 / Fax: +82-826-7729

E-mail: unia67@dju.ac.kr

© The Association of Pediatrics of Korean Medicine. All rights reserved. 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.

## I. Introduction

알레르기 질환은 아토피 소인이 있는 소아에서 나타나는데, 아토피피부염으로 시작되어 연령이 증가함에 따라 원인과 표적기관이 변화하면서 천식이나 알레르기 비염 등 각종 알레르기 질환이 순차적으로 나타나게 되고 이를 '알레르기 행진'이라고 부른다<sup>1)</sup>. 아토피피부염은 영·유아기에 볼 수 있는 가장 흔한 만성 재발성 피부질환으로, 다른 알레르기 질환과 마찬가지로 유전, 환경과 면역학적 요인이 복합적으로 관여하여 발생하며 홍반, 부종, 소양증, 삼출, 가피, 인설 등의 특징적인 소견을 보인다<sup>2)</sup>. 한의학에서 아토피피부염은 소아 때 발생하는 癩疾로 胎癩, 濕疹, 奶癩 등의 범주에 속하며<sup>3,4)</sup> 진행 양상에 따라 급성기, 아급성기, 만성기로 나누어 주요 증상의 차이를 보인다. 급성 아토피피부염 환자에서는 濕熱이 우세하여 극렬한 소양감과 함께 병변 부위의 홍반, 구진, 삼출, 가피, 부종, 소파흔, 찰상 혹은 동반된 피부감염 증상이 관찰된다. 아급성기에는 脾虛濕盛하여 발적, 수양성 분비물이 적고, 홍반, 구진, 태선화와 피부건조증 등을 볼 수 있다. 만성 아토피피부염 환자에서는 陰虛血燥하여 피부건조증을 중심으로 피부가 비후해지고 주름이 깊어지며 색소가 침착되는 증상을 보인다<sup>5,6)</sup>.

택사(澤瀉, *Alismatis Rhizoma*)는 택사과(Alismataceae)에 속한 질경이택사 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep.의 2년생 塊莖을 건조한 것으로, 겨울에 잎이 마르면 수염뿌리와 粗皮를 제거하고 건조하여 사용한다<sup>7)</sup>. 《東醫寶鑑》<sup>8)</sup>에서 약성이 寒하고 味는 甘하며, 利小便과 清濕熱의 작용을 통해 小便不利·水腫脹滿·泄瀉尿少·熱淋澀痛·痰飲眩暈을 치료하는 것으로 기록되어 있다. 腎經의 열을 瀉下하고 膀胱經의 濕을 利하여 利水滲濕하고 泄熱하는 약물로 濕熱이 內蘊된 症에 活用할 수 있다<sup>7)</sup>. 소아에서 흔히 볼 수 있는 濕熱형 아토피피부염에 택사가 배합된 五苓散<sup>9)</sup>, 清熱利濕湯<sup>10)</sup> 등의 탕약이 효과가 있다고 보고되었다. 택사의 생리활성 작용에 대한 연구는 다양하게 진행되어 *in vitro* 실험에서 항암효과<sup>11)</sup>, 항산화효과<sup>12)</sup>, 항당뇨효과<sup>13)</sup>, 항비만효과<sup>14)</sup> 등에 대한 보고가 있었다. 또한, 택사 에탄올 추출물을 통한 항염증효과<sup>15-17)</sup>, 항아토피효과<sup>18)</sup>와 항알레르기효과<sup>19)</sup>에 대한 연구들이 발표되어 항염증 및 항아토피효과가 있음을 일부 밝혔으나 아직 택사가 Th2 cytokine 발현에 미치는 영향과 신호전달 기전에 대한 연구는

접하지 못하였다. Th2의 면역반응 증가는 여러 알레르기 질환에서 특징적으로 나타나는데, Th2 면역반응으로 과잉 생산된 Th2 cytokine은 염증 경로를 활성화하고 알레르겐 감작을 유도, 혈액 호산구증가증 유발, 혈청 IgE 수치를 증가시킨다<sup>20)</sup>. 이처럼 Th2 경로는 알레르기 염증 반응을 이해하고 치료하기 위한 핵심적인 경로이다.

이에 저자는 택사 추출물을 Rat basophilic leukemia cell line (RBL-2H3) 비만세포에 처리하여 ELISA를 통해 IL-13, IL-4 단백질 생성을 분석하였고, Real-time PCR을 통해 IL-13, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하였으며 western-blot으로 MAPKs의 인산화와 전사 인자 NF- $\kappa$ B p65 translocation에 미치는 영향을 분석하였다. 또한, OVA/alum 감작 생쥐의 OVA-specific IgE와 IL-13, IL-4의 생성을 분석하여 알레르기 염증 반응 억제에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. Materials and Methods

### 1. 재료

#### 1) 시약 및 기기

##### (1) 시약

본 실험에서 사용한 시약 중 Ethyl alcohol, Methyl alcohol은 Merck Millipore (Billerica, MA, U.S.A.), Minimal essential medium (MEM), Fetal bovine serum (FBS), Antibiotics (penicillin, streptomycin), Trypsin-EDTA은 Gibco-BRL (U.S.A.) 제품을, Ovalbumin (OVA), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), Collagenase A, Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Ionomycin, Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Diethyl pyrocarbonate (DEPC), Chloroform, DNase type I, Nonidet P-40, RPMI-1640 배양액, Ethidium bromide (EtBr), Magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>), Aluminium hydroxide (Al(OH)<sub>3</sub>), Polyacrylamide, Isopropanol, Ethanol, Ovalbumin는 Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였다. Trizol은 Ambion사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, Moloey murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, RNAzol<sup>B</sup>는 Tel-Test사 (U.S.A.)

제품을 사용하였다. Deoxynucleoside triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사 (Japan) 제품을 사용하였고, EZ-Cytox kit는 Daeil Lab사 (Korea) 제품을, primary antibody (pERK 1/2, ERK 1/2, pp38, p38, pJNK, JNK, NF- $\kappa$ B p65)는 Santa-Cruz사 (California, U.S.A.) 제품을 사용하였다. SYBR master mix는 Applied Biosystems사 (U.S.A.) 제품을, ECL-Hybond film은 Amersham사 (U.S.A.) 제품을, IL-4, IL-13 ELISA kit는 R&D system사 (MN 55413 U.S.A.) 제품을 사용하였으며 OVA-IgE ELISA kit는 Chondrex사 (U.S.A.) 제품을 사용하였다. 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

## (2) 기기

본 실험에서는 열탕 추출기 (DWT-1800T, Korea), 감압 증류장치 (BÜCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기 (EYELA FDU-540, Japan), 원심분리기 (한일과학, Korea), CO<sub>2</sub> 배양기 (Forma scientific Co., U.S.A.), Bio-freezer (Sanyo, Japan), Spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), Quantitative Real-time PCR (Applied Biosystems, U.S.A.), ELISA READER (Molecular Devices, U.S.A.)의 기기를 사용하였다.

## 2) 동물

Balb/c 생쥐는 수컷 평균 21 g의 6 주령으로 중앙실험동물 (주)에서 공급받았다. 동물은 실험 당일까지 물과 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)를 충분히 공급하고 습도 55 ± 15%, 온도 22 ± 2 °C, 12 시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1 주일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험에 앞서 대전대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC)의 승인 (승인번호: DJU-ARB-2017 -E020)을 받았다.

## 3) 세포 배양 및 약물 분리

### (1) 세포 배양

본 실험에 사용한 RBL-2H3 비만세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구매하였고, MEM에 15% FBS와 penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml를 첨가하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

### (2) 시료 조제

본 실험에서 사용한 텍사 (*Alismatis Rhizoma*)는 대전대학교 둔산한방병원 약제과에서 구매, 정선하여 사용하였다.

### (3) 텍사 추출물 분리

텍사 분말 500 g에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2 시간 동안 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고 다시 동결 건조기를 이용하여 완전히 건조한 텍사 추출물 (*Alismatis Rhizoma* extract, 이하 ALC)을 냉동 보관 (-84 °C) 한 후 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) *In vitro*

#### (1) 세포독성 측정

##### ① RBL-2H3 세포주 배양

RBL-2H3 비만세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 96-well plate에 분주하였다.

##### ② 세포독성 (cytotoxicity) 측정

세포독성 측정 방법은 EZ-Cytox assay법<sup>21)</sup>을 변형하여 실험에 사용하였다. RBL-2H3 비만세포는 1 시간 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후 ALC (50, 100, 200, 400, 800 µg/ml)를 48 시간 동안 처리하였다. 배양을 종료하기 6 시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 µl씩 각 well (n=6)에 가하고 실험 종료 시까지 배양하였다. 이 plate를 plate shaker에서 5 분간 3.5 speed로 shaking 한 후 ELISA READER 450 nm에서 흡광도를 측정했다.

### (2) ELISA 측정

RBL-2H3 비만세포를 48-well plate에 4×10<sup>5</sup> cells/ml로 250 µl씩 분주하고 24 시간 동안 배양한 후에 무처리한 군은 정상군 (Only cells)으로, PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5 µM)으로 자극한 군은 대조군 (PI\_CTL)으로 하였다. 배양 후 Cyclosporin A (이하 CsA, 10 µg/ml)와 ALC (100, 200, 400 µg/ml)를 각 well에 처리하고 1 시간 후 PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5 µM)으로 자극하고 24 시간 후에 상층액을 얻었다. CsA로 처리한 군을 양성대조군 (PI + CsA), ALC로 처리한 군을 실험군 (PI + ALC\_100, 200, 400)으로 하였다.

#### 4 The Effects of *Alismatis Rhizoma* Extract on Allergic Inflammation in RBL-2H3 Mast Cells and OVA/alum-Sensitized Mice

Rat IL-13, IL-4 ELISA kit를 사용하여 코팅 antibody를 microwell에 100  $\mu$ l씩 분주하고 16 시간 동안 4  $^{\circ}$ C에 두었다. 각 well을 wash buffer로 세척한 후 assay diluent를 200  $\mu$ l씩 넣어 1 시간 동안 well을 막고 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상층액을 20배 희석한 후에 microplate를 세척하고 각 상층액과 표준품을 100  $\mu$ l씩 넣었다. 2 시간 동안 well을 막고 실온에서 배양하였다. Microplate를 세척하고 working detector를 만들어 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣고 well을 1 시간 동안 막은 후 실온에서 배양하였다. Microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣고 어두운 곳에서 30 분 동안 실온으로 배양하였다. 각 well에 Stop solution을 50  $\mu$ l씩 넣고 microplate spectrophotometer 흡광도 450 nm로 측정하였다.

#### (3) Real-time PCR

RBL-2H3 비만세포를  $2.5 \times 10^5$  cells/ml로 6-well plate에 2 ml씩 분주하고 24 시간 동안 배양한 후에 무처리한 군은 정상군 (Only cells)으로 하였으며, PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5  $\mu$ M)으로 자극한 군은 대조군 (PI\_CTL)으로 하였다. 배양 후 각 well에 CsA (10  $\mu$ g/ml)와 ALC (50, 100  $\mu$ g/ml)를 처리하고 1 시간 후에 PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5  $\mu$ M)으로 자극한 다음 6 시간 후에 세포를 얻었다. CsA로 처리한 군을 양성대조군 (PI + CsA), ALC로 처리한 군을 실험군 (PI + ALC\_50, 100)으로 하였다. 세포에 Trizol을 1 ml 넣고 eppendorf tube에 넣은 후 chloroform을 100  $\mu$ l 넣었다. 그 후 얼음에 17 분 동안 두고 15 분 동안 13,000 rpm

으로 원심분리 하였다. 층이 분리되면 상층액을 eppendorf tube에 옮겨 담고, Isopropanol을 동량으로 넣어 얼음에 10 분 정도 두었다가 15 분 동안 13,000 rpm으로 원심분리 하였다. 이때 상층액은 버리고 80% 에탄올로 세척한 뒤 10 분 동안 13,000 rpm으로 원심분리 하였다. 상층액을 완전하게 제거하고 투명해질 때까지 말린 후에 cell의 양에 따라 DEPC water로 20~30  $\mu$ l를 넣어 녹였다. 원심분리기로 액을 모아서 5 분 동안 75  $^{\circ}$ C로 데워진 전기가열장치에 두었다가 재빨리 얼음으로 옮겼다. 일부는 RNA를 정량하고 나머지는 정량한 양을 계산해서 만들어 놓은 cDNA cocktail에 넣고 1 시간 동안 37  $^{\circ}$ C에 두고 5 분 동안 95  $^{\circ}$ C로 데워진 전기 가열장치에 두었다가 얼음으로 옮겨서 cDNA를 합성하였다. IL-13, IL-4,  $\beta$ -actin primer를 적정 농도로 각각 희석해 넣고 cDNA와 SYBR Green을 넣은 후 Real-time PCR을 95  $^{\circ}$ C 3 분 실행 후 95  $^{\circ}$ C 15 초, 60  $^{\circ}$ C 15 초, 72  $^{\circ}$ C 20 초로 40회 실행하였다.

#### (4) MAPKs의 인산화 수준과 전사 인자 NF- $\kappa$ B p65 translocation 확인

RBL-2H3 비만세포를  $4 \times 10^5$  cells/ml로 100 $\times$ 20 mm plate에 10 ml씩 분주하고 24 시간 동안 배양한 후에 무처리한 군은 정상군 (Only cells), PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5  $\mu$ M)으로 자극한 군은 대조군 (PI\_CTL)으로 하였다. 배양 후 CsA (10  $\mu$ g/ml)와 ALC (50, 100  $\mu$ g/ml)로 처리하고 1 시간 후에 PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5  $\mu$ M)으로 자극한 다음 6 시간 후에 cool PBS로 세척, scraper로 세포를 얻고 원심 분리하여 상층

Table 1. Rat Primer Sequence for Real-Time PCR Analysis

Target gene	Primer	Sequences
rat IL-4	Forward	5'-ACCTTGCTGTACCCCTGTTCTGC-3'
	Reverse	5'-GTTGTGAGCGTGGACTCATTCACG-3'
rat IL-5	Forward	5'-TGCTTCTGTGCTTGAACGTTCTAAC-3'
	Reverse	5'-TTCCTTTTTGTCCGTC AATGTATTTTC-3'
rat IL-6	Forward	5'-ACCCAGAGCGTATCATCCTTCAC-3'
	Reverse	5'-TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC-3'
rat IL-13	Forward	5'-CAGTTGCAATGCCATCCACA -3'
	Reverse	5'-AGCCACATCCGAGGCCITTT-3'
rat TNF- $\alpha$	Forward	5'-AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC-3'
	Reverse	5'-TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'
rat GM-CSF	Forward	5'-GGCCCTGGAAGCATGTAGAT-3'
	Reverse	5'-GGTAGTGGCTGGCTATCATG-3'
rat $\beta$ -actin	Forward	5'-AAGTCCCTCACCCCTCCAAAAG-3'
	Reverse	5'-AAGCAATGCTGTACCTTCCC-3'

액을 버렸다. CsA로 처리한 군을 양성대조군 (PI + CsA), ALC로 처리한 군은 실험군 (PI + ALC\_50, 100)으로 하였다.

- ① Whole cell lysate: Lysis buffer {RIPA buffer 980  $\mu$ l + protease inhibitor cocktail lysis solution (100 $\times$ ) 10  $\mu$ l + PMSF (100 mM) 10  $\mu$ l} 1000  $\mu$ l로 15~20 분 동안 얼음에서 배양한 후 상층액을 얻었다.
- ② Nuclear extract lysate: Nuclear extract kit를 사용해 hypotonic buffer를 넣고 15 분 동안 얼음에서 배양한 뒤 원심 분리하여 상층액 (cytoplasmic fraction)을 모았다.

튜브에 남아있는 핵에 Complete lysis buffer를 넣고 30 초 동안 얼음에서 배양한 후에 원심 분리하여 상층액 (nuclear fraction)을 얻었다. 얻은 단백질은 BCA 단백질 정량법으로 정량했다. 10% SDS-PAGE gel을 만들어 running buffer를 채운 뒤 pre-running을 20 분 동안 시켰다. 그 사이에 loading buffer로 단백질을 희석하고 5 분 동안 끓여 단백질이 꼬인 것을 풀어주었다. gel의 첫 번째 칸은 빈칸으로 띄우고 두 번째 칸에는 단백질 마커를 넣었다. 그 다음 칸부터 샘플을 넣고 120 V로 내렸다. 다 내린 gel을 크기에 맞게 자른 후 transfer buffer에 20 분 동안 담가 놓고, 그 사이에 gel의 크기에 맞게 membrane을 자르고 transfer buffer에 미리 담가 두었다. 스테인리스 용기에 transfer buffer로 가득 채우고 얼음을 넣은 후 90 분 동안 150 V로 membrane으로 이동시켰다. Membrane을 크기에 맞게 자르고 1 시간 동안 5% skin milk (TBS/T buffer)로 blocking 해주었다. Primary antibody (pp38, p38, pJNK, JNK, pERK 1/2, ERK 1/2, NF- $\kappa$ B p65,  $\beta$ -actin, YY-1)로 4  $^{\circ}$ C에서 하루 동안 반응시키고 다음 날 secondary antibody를 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 암실에서 ECL detection 용액을 사용해 필름에 옮기고 현상용액에 담가 현상한 뒤 고정액에 고정해 건조했다. 결과에 대한 band densities는  $\beta$ -actin과 YY-1과 비교하여 Image-Rab densitometer로 측정 분석하였다.

## 2) *Ex vivo*

### (1) OVA-specific IgE 측정

알레르기 염증 반응은 IgE에 의해 매개되므로 ALC가 Th1/Th2 cytokine 평형 조절을 통해 OVA-specific

IgE의 생성을 억제할 수 있는지 관찰하고자 하였다. 6 주령의 Balb/c 수컷 (평균 21 g)을 19 주령까지 약물 처리 없이 사육한 것을 정상군 (Only cells), 6 주령의 Balb/c 수컷에 ovalbumin 50  $\mu$ g을 Al(OH)<sub>3</sub> 200  $\mu$ g에 흡착 (이하 OVA/alum)하여 Balb/c에 실험 시작 0, 2, 6, 10, 13 주에 복강 주사하여 IgE 생성을 유도한 것을 대조군 (OVA\_CTL)으로 하였으며, 13 주간 OVA/alum을 복강 주사하고 ALC 200 mg/kg을 매일 오전 11시에 1회씩 경구 투여한 것을 실험군 (OVA\_ALC)으로 설정하였다. 2 주와 14 주에 혈액 중의 OVA-specific IgE를 ELISA로 측정하였다. 19 주령의 Balb/c 수컷은 평균 25 g이었으며 각 군별로 5 마리씩, 총 15 마리의 개체가 실험에 이용되었다.

### (2) Th2 cytokine IL-4, IL-13 측정

6 주령의 Balb/c 수컷을 19 주령까지 약물 처리 없이 사육하여 비장 세포를 분리한 것을 무처리군 (Only cells)으로 하였고, 비장 세포를 분리한 후 96-well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well 분주하고 OVA 10  $\mu$ g/ml 농도로 처리한 것을 정상군 (Normal)으로 하였다. 6 주령의 Balb/c 수컷에 OVA/alum을 0, 2, 6, 10, 13 주에 복강 주사하고 비장 세포를 분리, OVA 10  $\mu$ g/ml 농도로 재 자극한 것을 대조군 (OVA\_CTL)으로 하였고, OVA/alum을 복강 주사하고 ALC 200 mg/kg을 매일 오전 11시에 1회씩 경구 투여한 19 주령의 Balb/c 수컷의 비장 세포를 분리, OVA 10  $\mu$ g/ml로 재 자극한 것을 실험군 (OVA\_ALC)으로 설정하였다. 48 시간 동안 배양한 후 배양 상층액에서 분리된 IL-13과 IL-4의 생산량을 ELISA로 측정하였다.

## 3. 통계 처리

실험 집단 간 수치 데이터는 각 실험군 결과값은 mean  $\pm$  standard deviation (SD)으로 나타내었고, 동물실험에서는 SPSS 11.0 software (IBM-SPSS Inc. Chicago, IL)를 이용해 일원 배치분산 분석 (One-way analysis of variance; ANOVA) 후에 Duncan's multiple comparison tests (DMRT)로 유의성을 검증하였으며, 세포실험에서는 독립표본 T-검정 (independent samples T-test)을 이용해 유의성을 검증하였다. p 값이 0.05, 0.01 혹은 0.001 미만인 경우로 나누어 각 경우에 유의적 차이가 있는 것으로 판정하였다.

### III. Results

#### 1. *In vitro*

##### 1) 세포독성 측정

ALC의 세포독성을 측정한 결과 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 측정 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1).

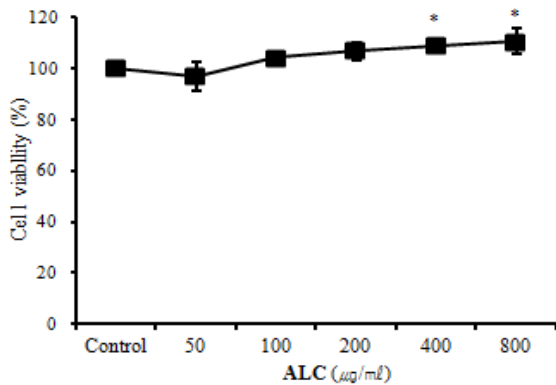


Fig. 1. Cytotoxic effects of ALC on RBL-2H3 mast cells  
RBL-2H3 cells were pretreated with various concentration ALC. The results were expressed the mean  $\pm$  S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T-test (\*  $p < 0.05$  versus the control group).

##### 2) ELISA analysis

ALC가 비만세포에서 IL-4, IL-13의 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위해, RBL-2H3 비만세포에 CsA와 ALC (100  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$ , 400  $\mu\text{g/ml}$ )를 처리한 뒤 PMA (50  $\text{ng/ml}$ )와 Ionomycin (0.5  $\mu\text{M}$ ) (이하 PI)으로 자극한 뒤, 24 시간 후에 ELISA로 IL-4, IL-13 생성량을 측정하였다.

##### (1) IL-4 단백질 생성

IL-4 생산량은 정상군은  $188.909 \pm 14.27 \text{ pg/ml}$ 이었고, PI만으로 처리한 대조군은  $358.627 \pm 50.66 \text{ pg/ml}$ 로 정상군에 비해 증가하였으며, CsA 처리 뒤 PI로 자극한 양성대조군은  $196.296 \pm 21.47 \text{ pg/ml}$ 로 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다 ( $p < 0.01$ ). ALC 처리 후 PI로 자극한 실험군의 IL-4 생산량은 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서는  $283.811 \pm 6.20 \text{ pg/ml}$  ( $p < 0.05$ ), 200  $\mu\text{g/ml}$ 는  $219.478 \pm 15.03 \text{ pg/ml}$  ( $p < 0.05$ ), 400  $\mu\text{g/ml}$ 는  $188.774 \pm 19.79 \text{ pg/ml}$  ( $p < 0.01$ )로 모두 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 2).

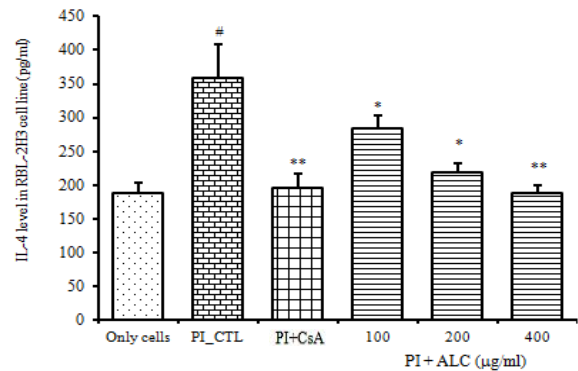


Fig. 2. Suppressive effects of ALC on IL-4 production

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or ALC (100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 hour, and then stimulated with PI for 24 hours. IL-4 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=6) (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus the PI\_CTL group, #  $P < 0.005$  versus the normal group).

Abbreviations. Only cells (normal group): Non treated group, PI\_CTL (control group): PI treatment, PI + CsA (positive control group): PI treatment with 10  $\mu\text{g/ml}$  CsA, PI + ALC: PI treatment with ALC

##### (2) IL-13 단백질 생성

IL-13 생산량은 정상군은  $510.295 \pm 51.53 \text{ pg/ml}$ 이었고, 대조군은  $868.854 \pm 103.19 \text{ pg/ml}$ 로 정상군에 비해 증가하였다. 양성대조군은  $496.789 \pm 50.04 \text{ pg/ml}$ 로 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다 ( $p < 0.05$ ). 실험군의 IL-13 생산량은 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서는  $747.413 \pm 27.42 \text{ pg/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$ 는  $690.425 \pm 78.98 \text{ pg/ml}$ 로, 400  $\mu\text{g/ml}$ 는  $531.823 \pm 114.14 \text{ pg/ml}$ 로 모든 농도에서 대조군에 비하여 억제되었으나 200  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.05$ )와 400  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.05$ )에서만 각각 유의성 있는 감소를 보였다 (Fig. 3).

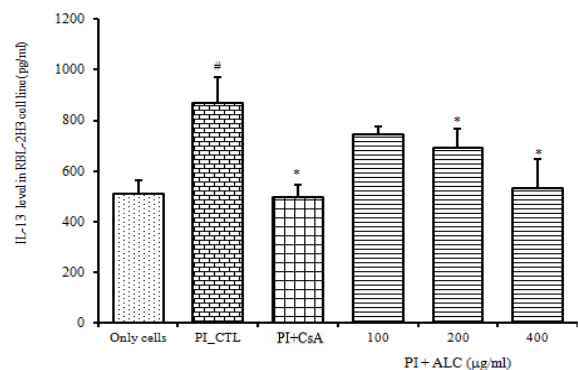


Fig. 3. Suppressive effects of ALC on IL-13 production

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or ALC (100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 hour, and then stimulated with PI for 24 hours. IL-13 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=6) (\*  $p < 0.05$  versus the PI\_CTL group, #  $P < 0.005$  versus the normal group).

Abbreviations as same Fig. 2.

### 3) Real-time PCR analysis

ALC가 비만세포에서 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ , GM-CSF mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, RBL-2H3 비만세포에 CsA와 ALC (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리한 후 PI로 자극하고 6 시간 후 Real-time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석하였다.

#### (1) IL-4 mRNA 유전자 발현

IL-4 mRNA 유전자 발현은 정상군은  $0.585 \pm 0.138$  이었고, PI만으로 자극한 대조군은  $1.113 \pm 0.113$ 으로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군인 CsA 처리군은  $0.513 \pm 0.113$ 으로 대조군에 비하여 유전자 발현이 억제되었다 ( $p < 0.01$ ). ALC 처리 후 PI로 자극한 실험군의 IL-4 mRNA 유전자 발현은 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는  $0.691 \pm 0.053$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는  $0.967 \pm 0.011$ 로 모두 대조군에 비하여 억제되었으나 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서만 유의성 있는 감소를 보였다 ( $p < 0.01$ ) (Fig. 4A).

#### (2) IL-5 mRNA 유전자 발현

IL-5 mRNA 유전자 발현은 정상군은  $0.162 \pm 0.054$  이었고, 대조군은  $0.939 \pm 0.062$ 로 정상군에 비해 유전자 발현 증가가 나타났다. 양성대조군은  $0.221 \pm 0.106$ 으로 대조군에 비해 유전자 발현이 억제되었다 ( $p < 0.001$ ). ALC 실험군의 IL-5 mRNA 유전자 발현은

100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는  $0.475 \pm 0.034$  ( $p < 0.001$ ), 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 는  $0.722 \pm 0.075$  ( $p < 0.05$ )로 모두 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다 (Fig. 4B).

#### (3) IL-6 mRNA 유전자 발현

IL-6 mRNA 유전자 발현은 정상군은  $0.200 \pm 0.055$  이었고, 대조군은  $1.144 \pm 0.144$ 로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은  $0.311 \pm 0.034$ 로 대조군에 비하여 유전자 발현이 억제되었다 ( $p < 0.001$ ). ALC 실험군의 IL-6 mRNA 유전자 발현은 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는  $0.473 \pm 0.051$  ( $p < 0.001$ ), 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 는  $0.713 \pm 0.046$  ( $p < 0.01$ )로 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 보였다 (Fig. 5A).

#### (4) IL-13 mRNA 유전자 발현

IL-13 mRNA 유전자 발현은 정상군은  $0.371 \pm 0.045$ 이었고, 대조군은  $0.959 \pm 0.041$ 로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은  $0.402 \pm 0.014$ 로 대조군에 비하여 유전자 발현이 억제되었다 ( $p < 0.001$ ). ALC 실험군의 IL-13 mRNA 유전자 발현은 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는  $0.644 \pm 0.127$ 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.05$ ) 억제되었으며, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는  $0.882 \pm 0.016$ 으로 대조군에 비하여 억제되었으나 유의성은 없었다 (Fig. 5B).

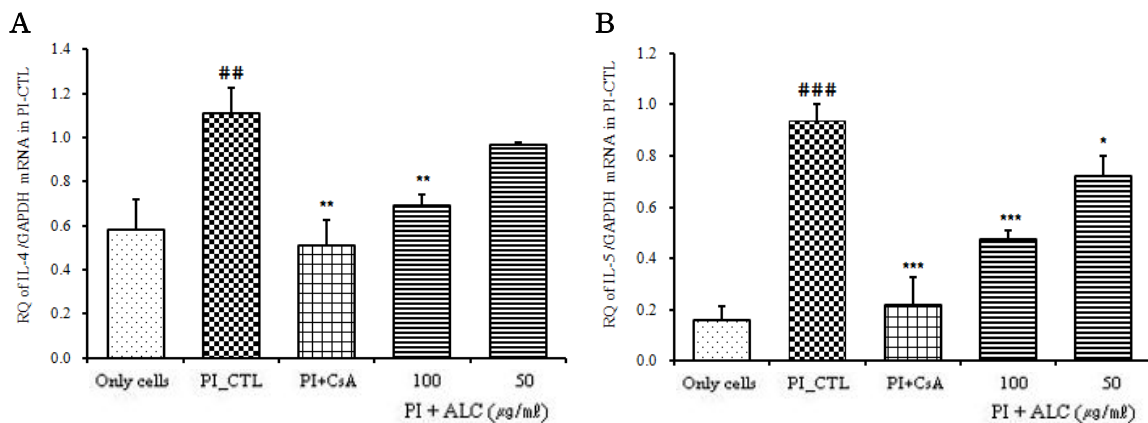


Fig. 4. Suppressive effects of ALC on IL-4 and IL-5 mRNA expression

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or ALC (100, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. The expression of IL-4 and IL-5 mRNA was analyzed by real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred to as the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=6) (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  versus the PI\_CTL group, ##  $P < 0.001$ , ###  $P < 0.0001$  versus the normal group).

Abbreviations as same Fig. 2.

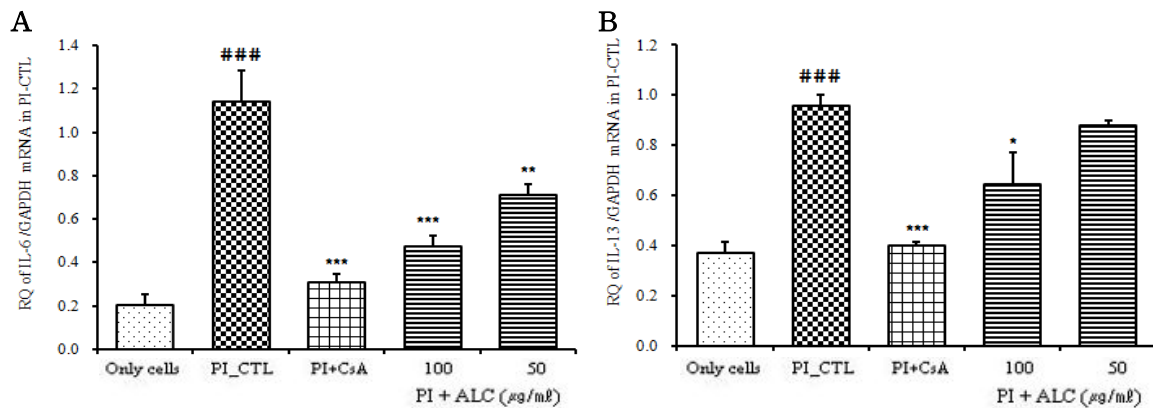


Fig. 5. Suppressive effects of ALC on IL-6 and IL-13 mRNA expression

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or ALC (100, 50 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. The expression of IL-6 and IL-13 mRNA was analyzed by real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred to as the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Values are expressed as mean ± S.E.M (n=6) (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 versus the PI\_CTL group, ### P<0.0001 versus the normal group).

Abbreviations as same Fig. 2.

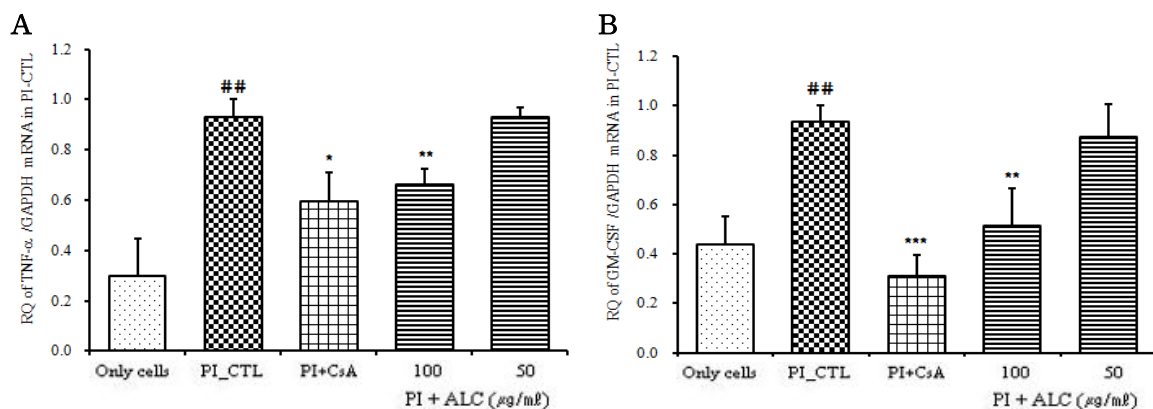


Fig. 6. Suppressive effects of ALC on TNF-α and GM-CSF mRNA expression

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or ALC (100, 50 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. The expression of TNF-α and GM-CSF mRNA was analyzed by real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred to as the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Values are expressed as mean ± S.E.M (n=6) (\* p<0.05, \*\* p<0.01, and \*\*\* p<0.001 versus the PI\_CTL group, ## P<0.001 versus the normal group).

Abbreviations as same Fig. 2.

(5) TNF-α mRNA 유전자 발현

TNF-α mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.303 ± 0.145이었고, 대조군은 0.929 ± 0.072로 정상군에 비해 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은 0.596 ± 0.115로 대조군에 비해 유전자 발현이 억제되었다 (p<0.05). ALC 실험군의 TNF-α mRNA 유전자 발현은 100 µg/ml에서는 0.661 ± 0.064로 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01) 억제되었으며, 50 µg/ml에서는 0.933 ± 0.036으로 대조군과 거의 차이가 나지 않았다 (Fig. 6A).

(6) GM-CSF 유전자 발현

GM-CSF mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.440 ± 0.115이었고, PI만으로 자극한 대조군은 0.938 ± 0.063으로 정상군에 비해 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군인 CsA 처리군은 0.312 ± 0.084로 대조군에 비해 유전자 발현이 억제되었다 (p<0.001). ALC 처리 후 PI로 자극한 실험군의 GM-CSF mRNA 유전자 발현은 100 µg/ml에서는 0.513 ± 0.155로 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01) 억제되었으며, 50 µg/ml에서는 0.876 ± 0.128로 대조군에 비해 억제되었으나 유의성은 없었다 (Fig. 6B).



#### 4) Western blot analysis

##### (1) MAPKs 인산화 신호기전

ALC가 MAPKs 신호전달계에 미치는 영향을 알아보기 위해 RBL-2H3 비만세포에 CsA와 ALC (50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ )를 처리한 후 PI로 자극한 뒤 MAPKs (ERK1/2, p38, JNK)에서의 인산화 수준을 western blot 으로 확인하였다. 무처리군인 정상군에 비하여 PI로 자극한 대조군에서 ERK1/2, p38, JNK의 단백질 발현이

증가되었다. CsA와 ALC (100, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) 모두 pERK1/2의 인산화를 억제하였고, 특히 50  $\mu\text{g/ml}$  ALC 처리군이 현저한 pERK1/2 인산화를 감소시켰다 (Fig. 7). 또한, CsA와 ALC (100, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) 모두 pp38의 인산화를 억제하였고, 특히 100  $\mu\text{g/ml}$  ALC 처리군은 양성대조군과 비슷한 수준으로 현저하게 pp38 인산화를 감소시켰다 (Fig. 8). CsA와 ALC (100, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) 모두 pJNK의 인산화를 50% 이상 억제하였다 (Fig. 9).

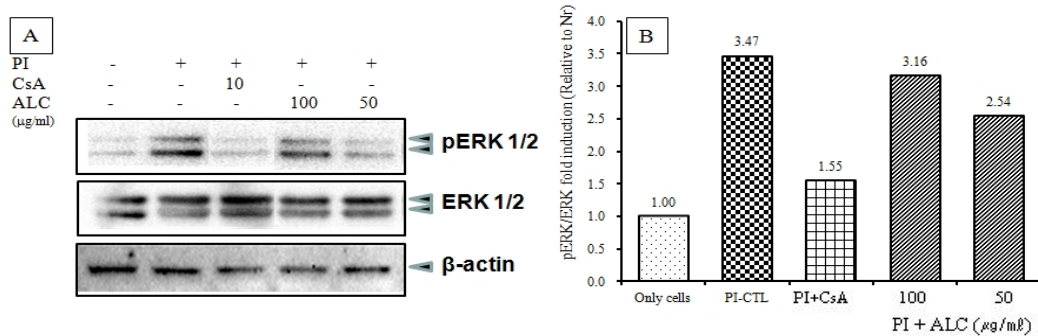


Fig. 7. Effects of ALC on ERK1/2 phosphorylation in PI-induced RBL-2H3 mast cells

RBL-2H3 mast cells were treated with ALC for 1 h, then treated with PI for 0.5 h. (A) The phosphorylation levels of ERK1/2 were analyzed by western blot.  $\beta$ -actin were used as internal controls for the nuclear proteins, and (B) relative amounts of each protein were determined by Image J. Abbreviations as same Fig. 2.

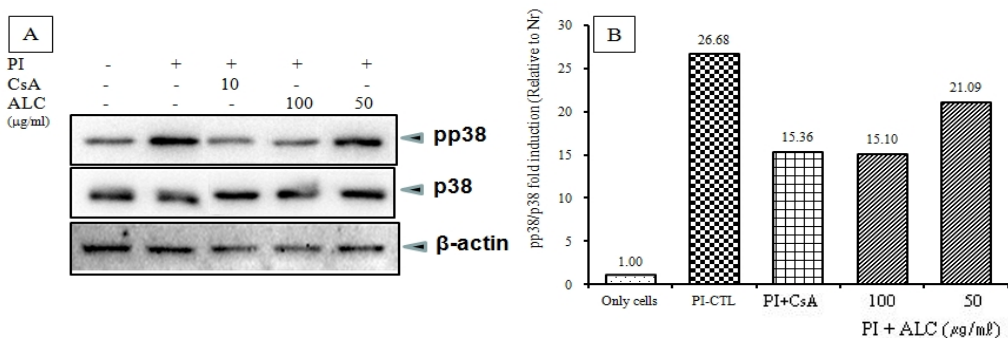


Fig. 8. Effects of ALC on p38 phosphorylation in PI-induced RBL-2H3 mast cells

RBL-2H3 mast cells were treated with ALC for 1 h, then treated with PI for 0.5 h. (A) The phosphorylation levels of p38 were analyzed by western blot.  $\beta$ -actin were used as internal controls for the nuclear proteins, and (B) relative amounts of each protein were determined by Image J. Abbreviations as same Fig. 2.

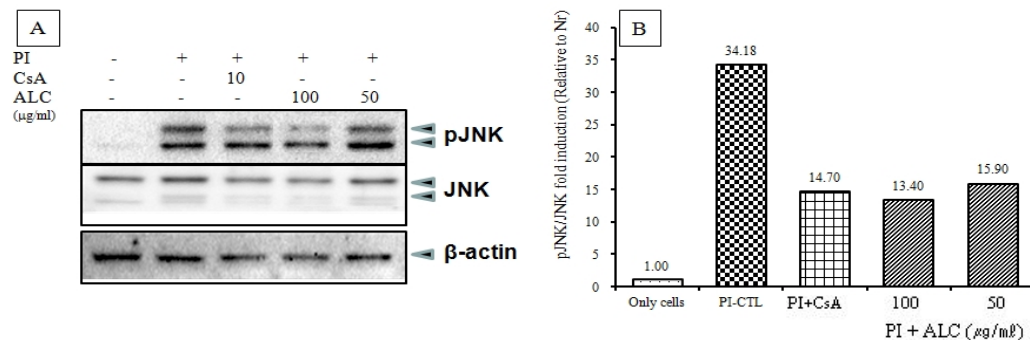


Fig. 9. Effects of ALC on JNK phosphorylation in PI-induced RBL-2H3 mast cells

RBL-2H3 mast cells were treated with ALC for 1 h, then treated with PI for 0.5 h. (A) The phosphorylation levels of JNK were analyzed by Western blot.  $\beta$ -actin were used as internal controls for the nuclear proteins, and (B) relative amounts of each protein were determined by Image J. Abbreviations as same Fig. 2.

(2) NF-κB p65 신호전달 기전

CsA와 ALC (100, 50 μg/ml) 모두 염증반응에서 중요한 전사 인자인 NF-κB p65의 세포질에서 핵으로의 이동을 확인한 결과 다소 감소하는 것을 볼 수 있었다. 특히 100 μg/ml ALC 처리군이 현저하게 NF-κB p65를 세포질에서 핵으로의 이동을 감소시켰다 (Fig. 10).

2. *Ex vivo*

1) OVA-specific IgE 측정

ALC가 Th2 cytokine IL-4를 조절하여 감작항원에 의해 유도된 Th2 면역반응에 미치는 영향을 관찰하기 위해 Balb/c 수컷에 OVA/alum을 복강 주사하여 IgE 생성을 유

도하고 ALC를 200 mg/kg 경구 투여한 뒤 2 주와 14 주에 혈액 중 OVA-specific IgE를 ELISA로 측정하였다.

측정한 결과 OVA-specific IgE 생산량은 정상군은 2 주와 14 주에서 각각 63.7 ± 18.7 ng/ml, 213 ± 50.9 ng/ml이었고, 대조군은 2 주와 14 주에서 각각 2822.5 ± 340.1 ng/ml, 7538 ± 254.1 ng/ml로 정상군에 비하여 약 44.3배, 35.3배 정도 증가하였다. 실험군의 OVA-specific IgE 생산량은 2 주와 14 주에서 각각 1106.6 ± 211.3 ng/ml, 4284.4 ± 697 ng/ml로 대조군에 비하여 약 2.5배, 1.7배 정도 감소하여 유의성 있는 (p<0.001) 억제를 보였다 (Fig. 11).

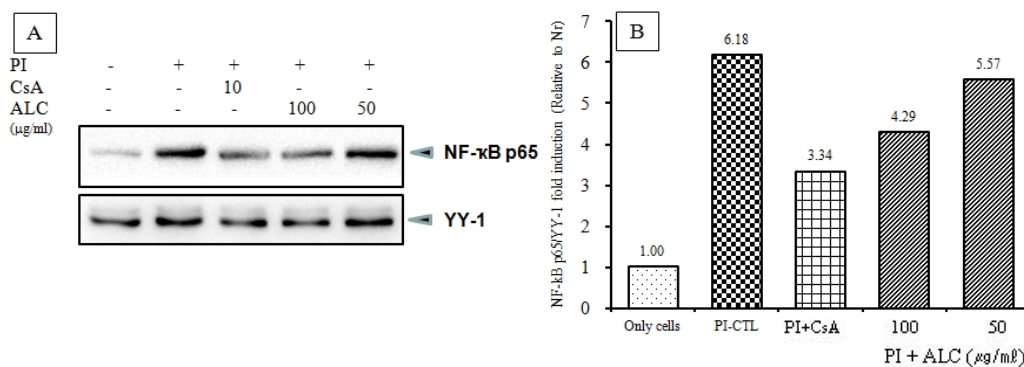


Fig. 10. Effects of ALC on the nuclear translocation of NF-κB p65 in PI-induced RBL-2H3 mast cells

RBL-2H3 mast cells were treated with ALC for 1 h, then treated with PI for 20 min. (A) Nuclear, cytosolic proteins were separated. Translocation of NF-κB p65 to the nucleus, as determined by Western blot analysis. YY-1 were used as internal controls for the cytosolic and nuclear proteins, and (B) relative amounts of each protein were determined by Image J.

Abbreviations as same Fig. 2.

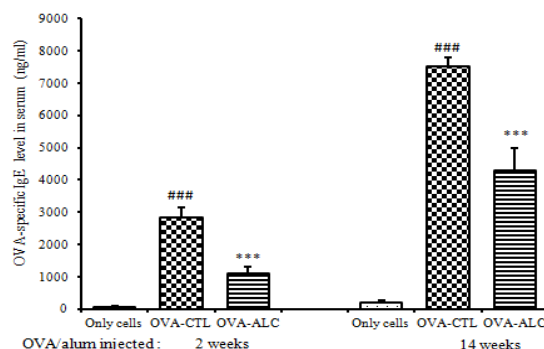


Fig. 11. Effects of ALC on OVA-specific IgE release in OVA challenged allergic mouse model

Mice were treated with the ALC extract (200 mg/kg) for 13 weeks. Balb/c mice were challenged with OVA as described in the Experimental section. Blood samples were collected after 2 weeks and 14 weeks for OVA-specific IgE measurement and serum was prepared. Values are expressed as mean ± S.E.M (n=5) (\*\*\*) p<0.001 versus the OVA-CTL group, ### P<0.0001 versus the only cells group).

Abbreviations. Only cells (normal group): Non treated group, OVA-CTL (control group): OVA/alum injected, OVA + ALC: OVA/alum injected with orally administration of ALC

## 2) Th2 cytokine 생성 억제 효과

ALC가 Th2 cytokine IL-4와 IL-13 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위해, OVA/alum을 복강 주사하고 ALC를 200 mg/kg 경구 투여한 Balb/c 수컷에서 비장 세포를 분리하여 OVA로 재 자극하고 48 시간 동안 배양한 뒤 배양 상층액에서 분비된 IL-4와 IL-13 생산량을 ELISA로 측정하였다.

### (1) IL-4 단백질 생성

비장 세포 배양 상층액내 IL-4 생산량은 정상군은  $4.27 \pm 1.98$  pg/ml이었고, 대조군은  $78.33 \pm 5.96$  pg/ml로 정상군에 비하여 약 18.3배 정도 증가하였다. 실험군의 IL-4 생산량은  $39.79 \pm 4.98$  pg/ml로 대조군에 비하여 약 1.9배 정도 감소하여 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 억제되었다 (Fig. 12A).

### (2) IL-13 단백질 생성

비장 세포 배양 상층액내 IL-13 생산량은 정상군은  $6.88 \pm 2.7$  pg/ml이었고, 대조군은  $45.1 \pm 4.71$  pg/ml로 정상군에 비해 약 6.5배 정도 증가하였다. 실험군의 IL-13 생산량은  $22.71 \pm 4.17$  pg/ml로 대조군에 비해 약 1.9배 정도 감소하여 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 억제를 보였다 (Fig. 12B).

## IV. Discussion

아토피피부염은 만성으로 악화와 호전을 반복하는 염증성 피부질환으로 특히 소아에게 호발하는 알레르기 질환이다<sup>2)</sup>. 최근 다른 알레르기 질환과 함께 국내의 적으로 유병률이 증가 추세를 보이는데<sup>22)</sup>, 2016년 국민건강통계에 의하면 우리나라 만 18세 이하 소아·청소년의 아토피피부염 의사 진단 경험률은 14.6%로 높은 비율을 차지하고 있다<sup>23)</sup>.

현재 아토피피부염의 일반적인 치료는 국소 스테로이드 및 국소 칼시뉴린 억제제 등의 국소 항염 치료로 병변을 소실시키고 항히스타민제 등의 사용으로 증상 경감을 기본 치료로 하고 있으며 중증의 경우 면역억제제, 광선치료 등이 이용되고 있다<sup>24)</sup>. 스테로이드제는 Th2 세포의 활성을 감소시키지만, 피부 장벽과 면역력을 약화시키고 세균 감염의 위험성을 높인다<sup>25)</sup>. 국내 아토피피부염 환아들을 대상으로 한 연구에서 67.5%의 부모가 스테로이드 사용에 거부감이 있었으며 이는 부작용에 대한 우려 및 과거 국소 스테로이드제의 사용 경험과 유의한 상관관계를 가졌다<sup>26)</sup>. 또한, 현재 항히스타민제도 광범위하게 사용되고 있지만, 히스타민은 피부 가려움증을 유발하는 여러 매개체 중의 하나로 가려움증에 항히스타민제가 반응이 없는 경우도 있다<sup>2)</sup>. 이에 따라 보다 우수하고 안전한 아토피피부염 치료에 대한 요구가 증가하고 있다.

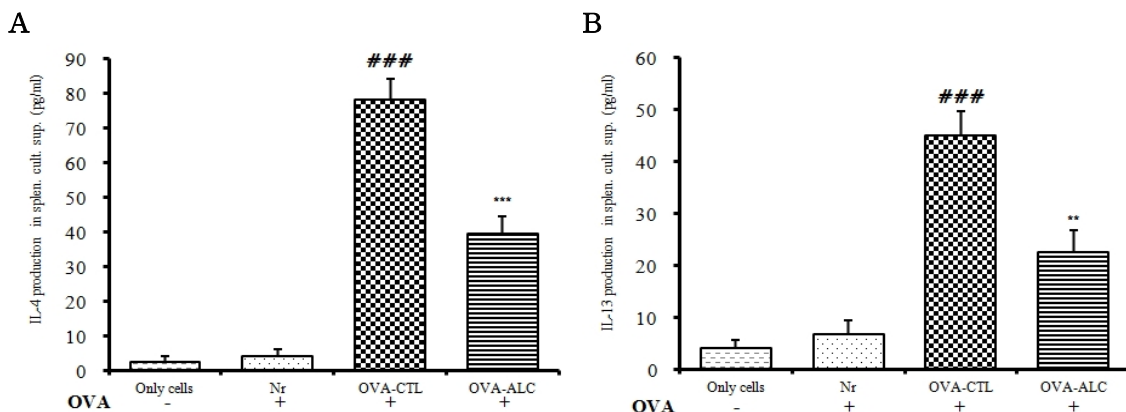


Fig. 12. Effects of ALC on IL-4 and IL-13 release in OVA challenged isolated splenocytes

Mice were treated with the ALC extract (200 mg/kg) for 13 weeks. Splenocytes from Balb/c mice were isolated following ovalbumin challenge *ex vivo* as described in the experimental section. Cultured splenocytes were then incubated with 10  $\mu$ g/ml OVA peptide or with saline (control) for 48 hours and IL-4 and IL-13 levels were measured in cell culture supernatant. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=5).

(\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus the OVA-CTL group, ###  $P < 0.0001$  versus the Normal group).

**Abbreviations.** Only cells: Non treated group, Nr (normal group): OVA coated, OVA-CTL (control group): OVA/alum injected and OVA coated, OVA + ALC: OVA/alum injected and OVA coated with orally administration of ALC

아토피피부염의 임상적인 특징은 소양감을 동반한 피부 장벽의 붕괴, 염증 부위의 호산구 침윤, Th1/Th2 세포의 균형변화 및 혈청 내 IgE의 증가 등이 있으며, T림프구와 수지상세포, Th1 세포와 Th2 세포에서 발현되는 cytokine 등이 관여하게 된다<sup>27,28)</sup>.

면역시스템에서 Th2의 면역반응 증가는 여러 알레르기 질환에서 특징적으로 나타난다. Th2 면역반응으로 과잉 생산된 IL-4, IL-5, IL-13 등의 Th2 cytokine은 염증 경로를 활성화하고, 알레르겐 감작을 유도하여, 혈액 호산구증가증을 유발하고, 혈청 IgE 수치를 증가시키며 피부 장벽 보존에 관여하는 중요 단백질인 필라그린 발현을 저해하여 피부 장벽 구조와 기능을 손상시킨다. 이처럼 Th2 경로는 아토피피부염을 이해하고 치료하기 위한 핵심적인 표적 경로이다<sup>20)</sup>.

본 실험에 쓰인 택사 (*Alismatis Rhizoma*, 澤瀉)는 腎經의 열을 瀉下하고 膀胱經의 濕을 利하여 利水滲濕하고 泄熱하는 약물로 濕熱이 內蘊되었거나 腎經의 火가 盛하여 나타난 症을 치료한다<sup>7)</sup>. 五苓散처럼 茯苓이나 猪苓과 배합하여 水濕停滯를 다스리거나, 龍膽瀉肝湯과 같이 滑石이나 車前子와 배합하여 清濕熱하며, 清泄腎火 작용으로 知柏地黃湯처럼 生地黃, 知母, 黃柏 등과 배합하여 相火偏旺을 치료하기도 한다<sup>29)</sup>.

아토피피부염은 진행 양상에 따라 급성기, 아급성기, 만성기로 나뉘며 주요 증상의 차이가 나타나는데 급성기에는 濕熱이 우세하여 병변 부위의 홍반, 부종, 삼출 등의 증상과 동반된 피부감염 증상이 관찰된다<sup>3,6)</sup>. 이러한 급성기의 습열형 아토피피부염에 택사가 배합된 五苓散<sup>9)</sup>, 清熱利濕湯<sup>10)</sup> 등을 통한 치료 효과가 보고되었으며, 택사 에탄올 추출물을 통한 항염증효과<sup>15-17)</sup>, 항아토피효과<sup>18)</sup>와 항알레르기효과<sup>19)</sup>에 대한 연구들이 발표되었지만, 아직 택사가 Th2 cytokine 발현에 미치는 영향과 신호전달 기전에 대한 연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는 RBL-2H3 비만세포에서 택사 추출물 (ALC)이 Th2 cytokine의 발현과 MAPKs의 인산화, 전사 인자 NF-κB p65 translocation에 미치는 영향을 알아보았고, OVA/alum 감작 마우스에서 IgE, IL-4, IL-13 생산 억제에 미치는 영향을 분석하여 ALC가 알레르기 염증 반응의 억제에 어떤 효과가 있는지 확인하였다. 실험에 앞서, ALC의 세포독성을 측정할 결과, 50, 100, 200, 400, 800 μg/ml의 모든 측정 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1).

비만세포는 세포질 내에 과립을 풍부하게 가지고

있는 세포로 주로 점막과 결합조직에 존재하면서 알레르기 염증반응에 관여한다<sup>30-32)</sup>. 비만세포는 특이 IgE-FcεRI (Fcε receptor type I) 반응에 의해 과립 내의 cytokine과 화학매개체 등을 분비하는데 여기에는 IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, TNF-α, GM-CSF 등이 포함된다. 이러한 cytokine을 분비함으로써 알레르기 염증의 초기 반응과 후기 반응을 일으키며 만성적으로 염증을 지속시키는 주요한 역할을 한다<sup>30-32)</sup>.

RBL-2H3 비만 세포에 CsA와 100, 200, 400 μg/ml 농도의 ALC를 처리한 후 PI로 자극한 후 ELISA로 IL-4와 IL-13의 생성량을 측정하였다. 실험 결과 IL-4는 모든 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었고 (Fig. 2), IL-13은 200, 400 μg/ml의 ALC 처리군에서 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 3). 50, 100 μg/ml 농도의 ALC 처리한 것을 Real-time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석한 결과, 모든 실험군에서 대조군에 비해 유의하게 억제된 IL-5, IL-6 (Fig. 4B, 5A)를 제외한 IL-4, IL-13, TNF-α, GM-CSF의 mRNA 유전자 발현은 100 μg/ml의 ALC 처리군에서만 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 4A, 5B, 6). 두 실험결과를 통해 ALC가 비만세포의 염증 cytokine 분비를 억제하여 Th1/Th2 세포 반응의 균형을 유지하여 알레르기 염증 반응 억제 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

택사의 인산화 신호전달 및 NF-κB p65 translocation 신호전달 기전을 알아보기 위해 western blot을 통해 MAPKs (ERK1/2, p38, JNK) 및 NF-κB p65 전사 인자의 단백질 발현을 관찰하였다. MAPK는 세포 외부로부터의 신호를 핵 속으로 전달하여 세포 성장 및 분화, 사멸을 조절하는 대표적인 염증 신호 전달체이다. 반응하는 기질 종류에 따라 ERK1/2, p38, JNK로 분류되며, 염증 반응이 나타나면 이들이 인산화 (pERK1/2, pp38, pJNK) 되면서 전사 인자인 NF-κB의 핵 내로의 이동을 촉진하고 염증성 cytokine들의 유전자를 작동시킨다. p38과 ERK1/2는 각각 IL-4, IL-13 생산에 중요한 신호가 되며, JNK는 T 세포 활성화에 관여하는 전사에 중요한 인자이다<sup>33)</sup>.

Western blot 실험 결과 pJNK, pERK1/2, pp38의 단백질 발현은 ALC (50, 100 μg/ml)를 투여한 모든 실험군에서 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 7, 8, 9). 특히 pp38은 100 μg/ml ALC 처리군에서, pERK1/2는 50 μg/ml ALC 처리군에서 현저한 감소를 보였고 pJNK는 100, 50 μg/ml ALC 처리군에서 50% 이상 억제되었다.

이러한 결과를 통해 ALC가 MAPKs 인자의 단백질 발현을 억제하여 MAPK 신호 전달계 기전을 방해하는 것을 알 수 있었다. NF-κB는 염증 신호 전달 전사 인자로서 여러 자극에 의해 핵 안으로 들어가 NF-κB binding site에 결합하여 염증 관련 유전자 등의 발현을 유도하는 역할을 한다<sup>34)</sup>. 본 실험에서 NF-κB p65 단백질 발현은 대조군에 비하여 ALC를 처리한 실험군에서 감소했으며 특히 100 μg/ml ALC 처리군에서 현저히 억제되었다 (Fig. 10). 이를 통해 ALC가 NF-κB의 핵 내로의 이동을 차단하여 염증성 cytokine 유발을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

이상의 *in vitro* 실험 결과, ALC는 비만세포에서 분비되는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF-α, GM-CSF의 생성을 유의하게 억제하고, MAPK 전사 전달계 및 NF-κB의 전사 인자의 활성을 방해함으로써 항염증효과를 가짐을 알 수 있었다.

택사가 Th2 cytokine IL-4를 조절하여 Th2 면역반응에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 OVA/alum 감작 생쥐에서 실험 2 주, 14 주에 OVA-specific IgE의 생성을 ELISA로 측정된 결과, ALC 처리군의 OVA-specific IgE 생성이 대조군에 비해 현저하게 감소되었다 (Fig. 11). 13 주 후에 비장 세포를 분리하여 OVA로 재 자극 후 48 시간 동안 배양한 뒤, 배양 상층액에서 분비된 IL-4와 IL-13 생성량을 ELISA로 측정된 결과, ALC 처리군이 IL-4와 IL-13 생성을 대조군에 비해 유의하게 억제하였다 (Fig. 12).

이를 통해 ALC가 OVA-specific IgE를 조절하고, IL-4와 IL-13 생성을 억제하여 감작항원에 의해 유도된 Th2 면역반응을 제어함으로써 Th1/Th2 면역균형에 기여할 것으로 생각된다.

이상 *in vitro*와 *ex vivo* 실험 결과를 통해 택사가 Th2 cytokine의 과발현을 억제하여 비만세포 탈과립, IgE의 생성 및 염증성 매개물질 분비를 감소시켜 면역 이상으로 인한 알레르기 반응을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

이로써 임상에서 택사가 아토피피부염을 비롯한 알레르기 질환에 적용이 가능할 것으로 판단되며, 특히 홍반, 부종, 구진, 삼출 등을 주요 증상으로 하는 급성 아토피피부염에 활용해 볼 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 향후 *in vivo* 실험을 통해 아토피피부염에서의 임상적 효과를 확인하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. Conclusion

택사 추출물이 RBL-2H3 비만세포에서 Th2 cytokine과 전사 인자의 발현, 그리고 OVA/alum 감작 생쥐에서 OVA-specific IgE와 Th2 cytokine의 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

### 1. *In vitro*에서 택사 추출물이 RBL-2H3 비만세포에 미치는 효과

- 1) 생쥐 비만세포주에서 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다.
- 2) IL-4와 IL-13 단백질 생성을 억제하였다.
- 3) IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF-α, GM-CSF mRNA 유전자 발현을 억제하였다.
- 4) pERK1/2, pp38, pJNK 및 NF-κB p65 발현을 억제하였다.

### 2. *Ex vivo*에서 택사 추출물이 OVA/alum 감작 생쥐에 미치는 효과

- 1) OVA-specific IgE의 생성을 감소시켰다.
- 2) Th2 cytokine IL-4와 IL-13의 생성을 억제하였다.

## References

1. Pediatric Allergy, Immunology & Pulmonology. Korean academy of pediatric allergy and respiratory disease. Seoul: Ryo Moon Gak. 2013:51-92.
2. Ahn HS, Shin HY. Hong Changui Pediatrics 11th edition. Seoul: Mirae N. 2016:1241-2.
3. Ma SY. Hyeondae Chinese medicine dermatology & venereology. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine. 2001:153-60.
4. Cha KB, Kim YS, Seol IC. Literatual study on atopic dermatitis. J Daejeon Univ Institut Korean Med. 2005;14(2):113-26.
5. Korea Institute of Oriental Medicine. Atopic dermatitis Korean medicine clinical practice guideline. Seoul: Elsevier Korea L.L.C. 2015:30.
6. Hong NM, Jee SY. A literature study about comparison of Eastern-Western medicine on the atopic dermatitis.

14 The Effects of *Alismatis Rhizoma* Extract on Allergic Inflammation in RBL-2H3 Mast Cells and OVA/alum-Sensitized Mice

- J Orient Med Surg Ophthalmol Otolaryngol. 1999; 12(1):241-53.
7. Ju YS. Ungok Herbology. Jeonju: Woosuk Press. 2013: 714-7.
  8. Heo J. Donguibogam. Seoul: Ryo Gang. 1994:2727.
  9. Choi IH, Kim SH, Kim YC, Yun YH. The effect of TJ-15 plus TJ-17 on atopic dermatitis: a pilot study based on the principle of pattern identification. J Altern Complement Med. 2012;18(6):576-82.
  10. Choi IH. Non-comparative study for the observation of clinical efficacy and safety of Cheungyeolyiseup-tang and Hwangbaek external dressings on dampness-heat pattern atopic dermatitis. J Korean Orient Med. 2008; 29(5):41-51.
  11. Huang YT, Huang DM, Chueh SC, Teng CM, Guh JH. Alisol B acetate, a triterpene from *Alismatis rhizoma*, induces Bax nuclear translocation and apoptosis in human hormone-resistant prostate cancer PC-3 cells. Cancer Lett. 2006;231(2):270-8.
  12. Kim SE, Rhyu DY, Yokozawa T, Park JC. Antioxidant effect of *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* and its main component. Korean J Pharmacogn. 2007;38(4): 372-5.
  13. Lin HR. Triterpenes from *Alisma orientalis* act as farnesoid X receptor agonists. Bioorg Med Chem Lett. 2012;22 (14):4787-92.
  14. Park YJ, Kim MS, Kim HR, Kim JM, Hwang JK, Yang SH, Kim HJ, Lee DS, Oh H, Kim YC, Ryu DG, Lee YR, Kwon KB. Ethanol extract of *Alismatis rhizome* inhibits adipocyte differentiation of OP9 cells. Evid Based Complement Alternat Med. 2014:415097.
  15. Matsuda H, Kageura T, Toguchida I, Murakami T, Kishi A, Yoshikawa M. Effects of sesquiterpenes and triterpenes from the rhizome of *Alisma orientale* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: absolute stereostructures of alismaketones-B 23-acetate and -C 23-acetate. Bioorg Med Chem Lett. 1999;9(21):3081-6.
  16. Han CW, Kwun MJ, Kim KH, Choi JY, Oh SR, Ahn KS, Joo M. Ethanol extract of *Alismatis Rhizoma* reduces acute lung inflammation by suppressing NF- $\kappa$ B and activating Nrf2. J Ethnopharmacol. 2013;146(1):402-10.
  17. Kim NY, Kang TH, Pae HO, Choi BM, Chung HT, Myung SW, Kim YC. *In vitro* inducible nitric oxide synthesis inhibitors from *Alismatis Rhizoma*. Biol Pharm Bull. 1999;22(10):1147-9.
  18. Lee JH, Kwon OS, Jin HG, Woo ER, Kim YS, Kim HP. The rhizomes of *Alisma orientale* and alisol derivatives inhibit allergic response and experimental atopic dermatitis. Biol Pharm Bull. 2012;35(9):1581-7.
  19. Kubo M, Matsuda H, Tomohiro N, Yoshikawa M. Studies on *Alismatis rhizoma*. I. Anti-allergic effects of methanol extract and six terpene components from *Alismatis rhizoma* (dried rhizome of *Alisma orientale*). Biol Pharm Bull. 1997;20(5):511-6.
  20. Matsunaga MC, Yamauchi PS. IL-4 and IL-13 inhibition in atopic dermatitis. J Drugs Dermatol. 2016;15(8): 925-9.
  21. Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. Talanta. 1997;44(7):1299-305.
  22. Kim KH, Park AY, Kim JS. Factors associated with atopic dermatitis in Korean adults: The Korean national health and nutrition survey 2008. Korean J Rehabil Nurs. 2012;15(2):83-90.
  23. Korea Health Statistics 2016: Korea national health and nutrition examination survey (KNHANES VII-1). Available from: [https://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/sub04/sub04\\_03.do?classType=7](https://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/sub04/sub04_03.do?classType=7).
  24. Katayama I, Aihara M, Ohya Y, Saeki H, Shimojo N, Shoji S, Taniguchi M, Yamada H, Japanese Society of Allergology. Japanese guidelines for atopic dermatitis 2017. Allergol Int. 2017;66(2):230-47.
  25. Guglielmetti S, Dart JK, Calder V. Atopic keratoconjunctivitis and atopic dermatitis. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2010;10(5):478-85.
  26. Lee JY, Her Y, Kim CW, Kim SS. Topical corticosteroid phobia among parents of children with atopic eczema in Korea. Ann Dermatol. 2015;27(5):499-506.
  27. Novak N, Bieber T, Leung DY. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2003;112(6 Suppl):S128-39.
  28. Kim MA, Son HU, Nam DY, Cha YS, Shin YK, Choi YH, Lee SH. Inhibitory effect of *Angelica keiskei* extract in an atopic dermatitis animal model. Korean J Food

- Preserv. 2012;19(5):792-8.
29. Shin MG. Clinical traditional herbalogy. Seoul: Yeong Lim. 2000:657-8.
30. Park JH, Lee MS, Kim NI, Haw CR. Plasma histamine levels in patients with atopic dermatitis. Korean J Dermatol. 1999;37(11):1553-9.
31. Erb KJ. Helminths, allergic disorders and IgE-mediated immune responses: where do we stand?. Eur J Immunol. 2007;37(5):1170-3.
32. de Mora F, Puigdemont A, Torres R. The role of mast cells in atopy: what can we learn from canine models? a thorough review of the biology of mast cells in canine and human systems. Br J Dermatol. 2006;155(6):1109-23.
33. Rho HS, Park YK, Bae HS. Effects of *Tribuli Fructus* extract on inflammatory responses in IgE-stimulated RBL-2H3 mast cells. Kor J Herbology. 2017;32(2):107-14.
34. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. Cell. 1996;87(1):13-20.