

가미미후등식장탕이 DNCB 유도 아토피 피부염 동물모델에 미치는 효과

송대욱¹, 민가을², 홍수연¹, 임서은¹, 허정¹, 손영주¹, 정혁상¹
¹경희대학교 한의과대학 해부학교실, ²대전대학교 한의과대학 병리학교실

Effects of KMS on the DNCB induced animal Model of Atopic Dermatitis

Dea-Uk Song¹, Ga-Yul Min², SooYeon Hong¹,
Seo-Eun Lim¹, Jung Huh¹, Youngjoo Sohn¹, Hyuk-Sang Jung¹

¹Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

²Department of pathology, college of oriental Medicine, Daejeon University

Objectives: The purpose of this study is to examine the effect of water and fermentation extracts of KMS (Kami-Mihudeongsikjang-tang) on AD (atopic dermatitis). Additionally, by applying the fermentation extracts of KMS at the first sensitization and latency period, I investigated whether it could prevent AD.

Methods: In this study, to test the effect and preventive efficacy of KMSs on AD. DNCB-induced BALB/c mice of AD model was used. Through histological observation, epidermis and dermis thickness, the infiltration of eosinophils and mast cells in epidermis and dermis were examined. We measured the serum level of IgE and IL-6, TNF-alpha, and the expressions of NF- κ B and MAPK protein. In order to examine the effect of KMSs on keratinocyte, HaCaT cells were treated TNF-alpha and IFN-gamma to induce an inflammatory response. The KMSs were applied at various concentration in the experimental group. We investigated TARC expression.

Results: The treatment groups were reduced epidermis and dermis thickness, inhibited the infiltration of eosinophils and mast cells, reduced the serum level of IL-6. Moreover, sfKMS group reduced serum level of TNF-alpha, inhibited the protein expressions of NF- κ B and the phosphorylation of ERK, JNK and p38. Especially sfKMS-pre group were reduced the serum level of IgE, show significant inhibition on the protein expression of NF- κ B and the phosphorylation of ERK, JNK and p38. In the experiment on HaCaT cells, sfKMS group were reduced expression of TARC.

Conclusions: These result suggest that wKMS and sfKMS was effective in the treatment on AD, and sfKMS would prevent AD.

Key Words : atopic dermatitis, prevention of atopic dermatitis, fermentation extract, Mihudeongsikjang-tang

• Received : 13 February 2019

• Revised : 12 March 2019

• Accepted : 12 March 2019

• Correspondence to : 정혁상(Hyuk-Sang Jung)

경희대학교 한의과대학 해부학교실, 서울특별시 동대문구 경희대로 26, 경희대학교 한의과대학 해부학교실

Tel : +82-2-961-9449, Fax : +82-2-961-9449, E-mail: jhs@khu.ac.kr

서론

아토피(atopy)의 개념은 원인을 알 수 없다는 뜻의 그리스어 'atopia'에서 유래하였으며, 1923년 Coca와 Cooke에 의해서 알레르기성 과민반응 현상으로 소개되었다¹⁾. 알레르기 질환에서 아토피 피부염(atopic dermatitis: AD)은 습진과 가려움증을 특징으로 한다. 2015년 보고에 의하면 AD는 세계적으로 아동의 15~20%, 성인의 1~3%까지 영향을 주고 있으며, 발생률은 과거 수십 년간 산업화된 국가에서 2~3배 증가하였다²⁾.

미후등식장탕(彌猴藤植腸湯)은 태양인 내촉소장병(太陽人 內觸小腸病)에서 열격(噎膈), 반위(反胃)를 치료하는 처방이다. 열격과 반위는 식도 질환에 의한 연하곤란의 증상을 그 병증으로 하고 있다. 『동의수세보원』 「장부론」에서는 위완(胃腕)과 설(舌), 이(耳), 두뇌(頭腦)와 피모(皮毛)를 모두 폐지당(肺之黨)으로 분류하였다. 「사상인 변증론」에서 태양인의 비율은 전체 인구에 대비 0.1%로 규정하고 있기 때문에 태양인 약물에 대한 연구는 다른 약물에 비하여 부족한 실정이다. 미후등식장탕은 식도와 관련된 질환에 활용해 볼 수 있으며, 동시에 폐지당의 관점에서 피부 질환에도 응용해 볼만한 가치가 있다고 생각한다. 이번 연구는 식도 질환에 사용하는 미후등식장탕이 AD에 대하여 미치는 효과를 살펴봄으로써 태양인 처방의 응용에 대하여 보다 폭 넓게 접근하는 계기가 될 것으로 생각된다.

가미미후등식장탕(Kami-Mihudeongsikjang-tang, KMS)은 미후등식장탕에 유근피, 황정, 단삼을 가미한 처방이다. 최근 아토피 피부염이 발생한 개의 dust mite allergen extract로 자극받은 peripheral blood mononuclear cells에 미후도를 처리하여 관찰한 실험에서, 미후도는 tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), interferon-gamma(IFN-gamma), interleukin 4(IL-4), IL-5 그리고 IL-13의 발현에 대하여 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다³⁾. KMS를 구성하는 약물 중 미후도를 제외하고 알레르기 질환 및 AD에 관련된 효능 및 기전의 연구는 매우 부족한 상태이다.

발효 음식과 음료는 문명이 발달하면서부터 생산되

고 소비되는 주된 식단에 해당한다. 발효는 원재료의 효소 작용과 미생물의 대사 작용에 의하여 음식 기질의 영양과 생체활성 특징을 건강에 유익한 결과를 주는 방식으로 변화시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다⁴⁾. 이에 따라 발효한약에 대한 관심이 커지고 있으며, 한국한의 연구소에서는 고체발효를 통한 주요 약재의 성분변화를 High performance liquid chromatography를 이용하여 관찰한 논문을 다수 발표하였다. 대표적으로 당귀의 지표성분인 nodakenin은 꿀 발효 추출물과 누룩 발효 추출물에서 발효를 하지 않은 추출물에 비해 유의적으로 증가하였으며, decursin은 발효를 하지 않은 추출물보다 누룩 발효 추출물에서 유의성있는 증가를 보였다⁵⁾.

본 연구에서는 AD를 유발한 동물모델에 대하여 KMS 물추출물과 발효추출물이 미치는 효과를 검증하기 위하여 피부조직 관찰하였다. 또한 기전의 차이를 알아보기 위하여 혈청 IgE와 cytokine의 농도변화, 핵내 염증 단백질의 발현 그리고 HaCaT 세포에서 chemokine의 발현을 조사하였다. AD의 발현은 위험요인이 되는 알레르겐에 감작되어 있는 상태에서 일어난다. 2~4세에 무해한 알레르겐에 감작된 아동은 청소년 시기에 이르기까지 감작된 상태로 남아있으며, 다른 알레르겐에 대한 추가 감작이 일어난다⁶⁾. 따라서 알레르기 질환에 대한 예방전략은 IgE 감작의 발생을 겨냥한 예방이 그 기본이 된다⁷⁾. 따라서 예방효과를 검증하기 위하여 발효추출물은 1차감작 전과 잠복기에 투여시킨 군과 2차감작으로 AD를 유발한 후에 투여한 군에 대하여 예방효과와 치료효과를 비교하였다. 위에서 제시한 실험을 통하여 유의미한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료의 제조 및 추출

실험에 사용된 본초는 현대약업사(서울, 동대문구)에서 구입하여 사용하였다. 가미미후등식장탕의 처방구성은 Table 1.과 같다.

1) 가미미후등식장탕의 물추출

가미미후등식장탕의 물추출물(wKMS; water extract of KMS)은 준비된 약재 360g에 증류수 3.6L를 첨가하여 2시간 동안 끓여 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 3, Maidston, UK)로 여과한 다음 여과액을 rotary evaporator(N-1200, EYELA, Japan)에서 60℃로 감압 농축한 후 동결건조 하였다. 수득율은 12.08%이다.

Table 1. Composition of KMS.

Medical herbs	Scientific name	Dosage /1day/70kg
미후도 猕猴桃	<i>Actinidia Fructus</i>	32 g
미후등 猕猴桃藤	<i>Actinidia Ramulus</i>	16 g
모과 木瓜	<i>Chaenomeles Fructus</i>	16 g
포도근 葡萄根	<i>Vitaceae Radix</i>	24 g
노근 蘆根	<i>Phragmitis Rhizoma</i>	16 g
앵도육 櫻桃肉	<i>Pruni Semen</i>	8 g
오가피 五加皮	<i>Acanthopanax Cortex</i>	8 g
송화분 松花粉	<i>Pini Pollen</i>	8 g
저두강 枳頭糠	<i>Oryzae Testa</i>	8 g
유근피 榆根皮	<i>Ulmi Pumilae Cortex</i>	24 g
황정 黃精	<i>Rhizoma Polygonati</i>	24 g
단삼 丹參	<i>Salviae Miltiorrhizae Radix</i>	8 g
합계		192 g

2) 가미미후등식장탕의 발효추출

가미미후등식장탕의 발효추출물(sfKMS; fermentation extract of KMS)은 준비된 약재 720g에 온천수(Watarok, Jellanam-do, Korea) 5L를 첨가하여 한약용 약탕기(인월요업, 전라남도, 남원시)에서 2시간 30분

탕전하였다. 추가로 열을 가하지 않은 상태로 물의 온도가 50℃ 될 때까지 냉각시킨 후 납두균과 효모가 포함된 복합미생물을 이용한 발효추출물(Multistrain included *Bacillus natto* and *Saccharomyces cerevisiae*; Biotech, Chungcheongnam-do, Korea) 50mL를 투입하고 50±5℃를 유지하면서 48시간 숙성시켰다. 부직포로 1차 여과 후 100℃ 15분 멸균하고, 여과지(Whatman No. 3, Maidston, UK)로 2차 여과한 다음 여과액을 rotary evaporator(N-1200, EYELA, Japan)에서 60℃로 감압 농축한 후 동결건조하였다. 수득율은 11.17%이다.

2. KMS의 DNCB 유도 아토피 피부염 동물모델에 미치는 효과

1) 시약

2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)은 Sigma-Aldrich(Louis, MO, USA)에서, Mouse IgE, IL-6 ELISA kit는 BD bioscience(San Jose, CA, USA)에서 구입하였다. Western blot에 사용한 1차 항체 total-extracellular signal-regulated kinase(T-ERK, Cat No.4695), phospho-ERK(P-ERK, Cat No.4730), total-Jun N-terminal kinase(T-JNK, Cat No.9258), phospho-JNK(P-JNK, Cat No.4688), total-p38(T-p38, Cat No.9212), phospho-p38(P-p38, Cat No.4511), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF-κB, Cat No.8242)는 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며, NE-PER nuclear and cytoplasmic extract reagent kit는 Pierce (Rockford, IL, USA)에서 구입하였으며, horseradish peroxidase(HRP)-conjugated anti-IgG는 Jackson Immuno Research(West Grove, PA, USA)에서 구입하였다.

2) 실험 동물

생후 7주령 된 암컷 BALB/c mice는 Nara biotech(Seoul, Korea)에서 40마리 구입하였다. 실

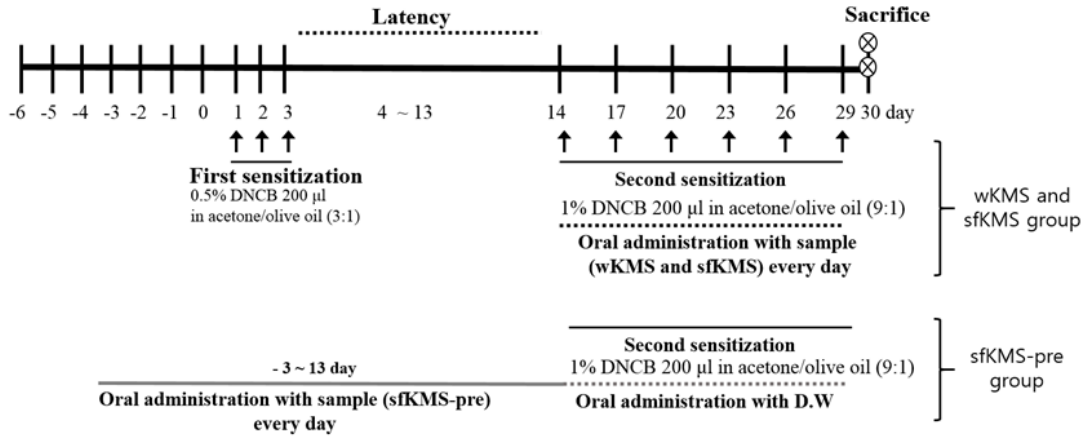


Fig. 1. Experimental schedule for induction of atopic dermatitis. All topical applications were applied to the dorsal skin. The normal group was treated with a PBS.

협 당일까지 고형사료(labanimal, Seoul, Korea)와 물을 공급하였으며, 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$ 로 조절된 동물 사육실에서 7일 동안 적응시켰다. 모든 동물실험은 경희대학교의 실험동물 관리와 사용 지침의 규정에 따라 수행하였다(KHUASP(SE)-16-075).

3) 실험군의 배정

총 40마리의 BALB/c mice는 정상군, 대조군, wKMS군, sfKMS군 그리고 sfKMS-pre군으로 나누어 각각 8마리씩 배정하였다. AD를 유발하지 않은 정상군(Normal), AD를 유발시킨 후 증류수만 0.2mL 투여한 대조군(Control) 그리고 AD를 유도하고 KMS를 투여한 실험군으로 분류하였다. 실험군은 다시 3개의 군으로 분류하였다. wKMS군은 2차감작 기간 동안(16일) 가미미후등식장탕의 물추출물인 wKMS 6.5mg/mice를 0.2mL의 증류수에 녹여 경구 투여하였으며, sfKMS군은 2차감작 기간 동안 가미미후등식장탕의 발효추출물인 sfKMS 6.0mg/mice를 0.2mL의 증류수에 녹여 경구 투여하였다. sfKMS-pre군은 2차감작 전에 1차감작 3일전부터 1차감작기간 그리고 잠복기 동안(16일) sfKMS 6.0mg/mice를 0.2mL의 증류수에 녹여 경구 투여하였으며 AD을 유도하는 2차감작 기간에는 증류수 0.2mL만 경구 투여하였다. 실험

동물에 투여한 약물의 농도는 성인 70kg 기준 1일 복용량 192g을 체중 대비로 환산하여 산출하였다.

4) DNCB 유도 아토피 피부염 유발

본 실험에서는 아토피 피부염 모델을 제작을 위해 DNCB를 acetone과 olive oil이 3:1로 혼합된 용매에 0.5%로, acetone과 olive oil이 9:1로 혼합된 용매에 1%로 희석시켜 사용하였다. 7일 간 사육 환경에 적응시킨 BALB/c mice의 등 부위를 제모하고 피부의 미세 상처가 자연 치유되도록 24시간 방치하였다. 이후 AD를 유발하기 위하여 1차로 0.5% DNCB 용액 200 μL 를 하루에 한 번씩 3일(Day 1-3) 동안 등 부위에 도포하였다. 이후 10일 동안(Day 4-13) 아무 처리도 하지 않으며, 염증 유발을 확인한 후, 2차 감작은 16일 동안 3일에 한 번씩(Day 14~29, 총 6번) 1% DNCB 용액 200 μL 를 등 부위에 도포하였다(Fig. 1).

5) 조직학적 평가

KMS가 피부조직에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 조직학적으로 관찰, 분석하였다. 피부조직은 표피와 진피의 두께 그리고 eosinophil과 mast cell의 침윤을 관찰하였다. 피부 조직은 10% neutral buffered formalin(NBF)에서 24시간 고정 후 파라핀으로 포매

하여, microtome(ZEISS, Oberkochen, Germany)을 이용하여 5 μ m로 절편하였다. 절편한 조직은 xylene으로 탈파라핀을 시행하였고, 100, 95, 90, 80, 70% 에탄올을 이용하여 함수시키고 증류수로 세척한 후 hematoxylin/eosin과 toluidine염색을 시행하였다. 조직내 eosinophil의 침윤과 부종을 측정하기 위해 식도 조직과 피부조직을 hematoxylin으로 5분간 염색한 후, 흐르는 물에 10 분간 수세하였으며, eosin으로 30초간 염색을 하였다. 이후 조직은 70, 80, 90, 95, 100% 에탄올을 이용하여 탈수한 후, xylene으로 투명화과정을 거쳐 캐나다발삼(Junsei chemical Co., Japan)으로 봉입하였다. 피부조직의 eosinophil의 침윤은 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 400배율, 10개 시야에서 측정하였으며, 표피와 진피 조직의 두께는 광학현미경을 이용하여 피부조직을 100배율로 촬영한 후, image J software를 이용하여 두께를 측정하였다. 또한, 피부조직내 mast cell의 침윤을 관찰하기 위해 toluidine염색을 시행하였다. 탈파라핀, 함수 및 수세를 마친 피부조직을 toluidine blue용액에 2분간 염색한 후 증류수로 수세하였다. 이후 100% 에탄올로 탈수, xylene으로 투명화한 후 캐나다발삼으로 봉입하였다. 피부 조직 내 mast cell의 침윤은 광학현미경을 이용하여 100배 시야에서 관찰하였다.

6) 단백질 수준의 측정

DNCB로 유도된 피부조직에서 염증반응에 직접적으로 관여하는 대표적인 단백질인 mitogen-activated protein kinase(MAPK)와 NF- κ B의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위해서 western blot assay를 실시하였다.

MAPK의 발현을 분석하기 위해 피부 등 조직을 Lysis buffer(20mM HEPES(pH 7.5), 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.1M NaCl, 0.2mM DTT, 0.5mM Na₃VO₄, protease inhibitors cocktail)에 넣어 homogenizer를 이용하여 조직을 균질화 한 후 13,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분석에 사용하였다. NF- κ B의 발현을 분석하기 위해, 피부조직은 NE-PER nuclear and cytoplasmic extract reagent kit를 이용하여 매뉴얼에 따라 핵단

백질을 분리하였다. NF- κ B, T-ERK, P-ERK, T-p38과 P-p38의 발현을 분석하기 위해 30 μ g의 단백질을, T-JNK와 P-JNK의 발현을 분석하기 위해 50 μ g의 단백질을 10% polyacrylamide겔을 이용하여 분리한 후, nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 각 membrane은 antibody의 비특이적인 결합을 막기 위해 5% skim milk/ Tris buffered saline-Tween 20(TBST)를 이용하여 실온에서 1시간 동안 blocking한 후 TBST로 수세하였다. 각 항체를 1% BSA/TBST에 500배(NF- κ B, T-ERK, P-ERK) 또는 1,000배(T-JNK, P-JNK, T-p38, P-p38) 희석한 후 membrane과 함께 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 반응시켰다. 각 membrane들은 TBST로 15분간 3번 세척하고 HRP가 붙어있는 2차 항체와 함께 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 각각의 항체와 결합한 단백질들의 발현은 ECL kit(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 발색시킨 후 X-ray 필름으로 현상하였다.

7) 혈청 내 IgE 및 cytokine 측정

혈청 IgE와 cytokine 수준을 측정하기 위해 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 실시하였다. 마우스를 희생시킨 후 즉시 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 2,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 실험에 사용하기 전까지 -80 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다. 혈청에서의 IgE, IL-6 농도는 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. 두 개의 96well plate에 kit내에 있는 capture IgE와 capture IL-6를 coating한 후, sample과 dilution buffer를 혼합하여 각각의 well에 100 μ L씩을 분주하고 암실에서 2시간 동안 방치한 후 washing buffer solution으로 3번 세척하였다. 다시 detection IgE와 detection IL-6를 well에 넣고 1시간 암실에 방치한 후에 다시 5번 세척하였다. HRP-conjugated streptavidin을 넣고 암실에서 1시간 방치한 후 다시 7번 세척하였다. Chromogenic substrate인 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) substrate를 100 μ L씩 넣고 30 분간 방치한 후

50 μ L의 stop solution을 넣고 ELISA reader (570-450nm)에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 TNF-alpha는 Millipore Mouse Th17 Magnetic Bead Panel을 이용하여 측정하였다.

3. KMS의 HaCaT세포에 미치는 효과

1) 세포

HaCaT 세포는 피부면역 반응 유도에 주로 사용되는 인간 유래의 피부 각질 형성세포로, 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 본 실험에서는 HaCaT 세포에 TNF-alpha와 IFN-gamma를 처리하여 염증반응을 유도한 후 KMS의 효과를 확인하였다.

2) 시약

세포 배지인 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)은 Welgene(Daejeon, Korea)에서 구매하였다. Fetal bovine serum(FBS)은 Gibco(Gaithersburg, NY, USA)에서 구매하였고, Penicillin/Streptomycin은 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)에서 구매하였다. Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)는 Gibco(Gaithersburg, NY, USA)에서 구매하였다. TNF-alpha, IFN-gamma와 thymus and activation-regulated chemokine(TARC) ELISA kit는 R&D system (Minneapolis, MN, USA)에서 구매하였다. Reverse transcription kit는 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)에서 구매하였다. Taq polymerase는 Kapa Biosystems(Woburn, MA, USA)에서 구매하였다. PCR primers는 Genotech(Daejeon, Korea)에서 구매하였다.

3) 세포 배양

HaCaT 세포는 10% FBS와 1% Penicillin/Streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂조건의 배양기를 이용하여 배양하였다. 세포는 2~3일 간격으로 세포 밀집도가 90%에 도달했

을 때 계대배양하였다.

4) TARC의 발현량 분석

HaCaT세포에서 KMS의 항염 효과를 검증하기 위하여, 6-well plate에 HaCaT 세포를 1 \times 10⁶ cell/well로 분주하고 24시간 동안 안정화 후 대조군과 실험군에 TNF-alpha와 IFN-gamma를 각각 10ng/mL씩 처리하여 24시간 동안 염증반응을 유도하였으며, 실험군은 wKMS 또는 sfKMS를 농도별로 처리하였다. 24시간 후 배양액을 4,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 원심분리시켜 상층액을 TARC 분석에 사용하였다. TARC는 ELISA kit를 이용하여 측정하였고, 모든 실험방법은 Kit 내 제공되는 표준 시료를 사용하였으며, 제조회사에서 제시하는 방법에 따라 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5) TARC 의 유전자 발현 RT-PCR 분석

반응을 종료한 세포는 DPBS로 3회 수세한 후 수확하여 Trizol(TAKARA BIO, Otsu, Japan)을 사용하여 RNA를 추출하고 SuperScript II reverse transcriptase kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. PCR 증폭 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 pre-denaturation, 95 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 denaturation, 57.5 $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 extension하였다. cycle은 42cycle로 진행하였으며, primer sequence는 sense 5'-ACT GCT CCA GGG ATG CCA TCG TTT TT-3', anti-sense 5'-ACA AGG GGA TGG GAT CTC CCT CAC TG-3'로 제작하여 사용하였다. PCR증폭의 결과를 확인하기 위해, 합성물을 1.5% agarose gel에 전기영동 시킨 후, N α BI gel doc을 사용하여 TARC의 발현량을 확인하였다.

4. 통계처리

각 data는 Mean \pm SEM 값으로 표시하였으며, analysis of variance(ANOVA)로 분석하고 Dunnett's multiple comparison test를 이용하여 유의성을 검정

하였다. p 값이 0.05 이하인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다. 통계 프로그램은 GraphPad Prism software(Ver. 5.01, GraphPad Software Inc, CA, USA)를 사용하였다.

실험결과

1. KMS의 피부조직 두께 변화에 미치는 효과

H&E 염색을 한 대조군의 피부 조직은 epidermis 및 dermis가 부종으로 두께가 정상군에 비하여 유의하게 증가 되었다(p<0.01). 반면 모든 실험군에서는 대조군에 비해 epidermis와 dermis의 두께가 감소하였다.

wKMS군의 epidermis와 dermis의 두께는 대조군에 비해 유의적으로(epidermis: p<0.05, dermis: p<0.05)감소하였다.

sfKMS군의 epidermis의 두께는 대조군에 대해 유의

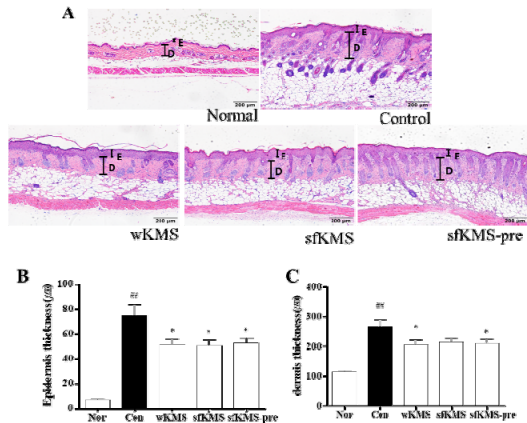


Fig. 2. The effects of KMSs on epidermis and dermis thickness change in dorsal skin tissue of DNCB-induced BALB/c mice. (A) The thicknesses of epidermis and dermis were identified by H&E staining at magnification 100× (scale bar 200µm). (B) Measurement of epidermis thickness. (C) Data of dermis thickness. Each data represents the mean ± SEM. ##p < 0.01 compared with normal and *p < 0.05 compared with control. E: epidermis; D: dermis. KMS, kami-Mihudeongsikjang-tang. DNCB, 2,4-dinitrochlorobenzene.

하게(p<0.05)감소하였고, dermis의 두께는 감소하였으나 대조군과 비교하여 유의하지 않았다(p=0.06).

sfKMS-pre군의 epidermis와 dermis의 두께는 대조군에 비해 유의적으로(epidermis: p<0.05, dermis: p<0.05) 감소하였다(Fig. 2).

2. KMS의 피부조직 내 mast cell 침윤에 미치는 효과

Toluidine blue 염색을 한 대조군의 피부 조직에는 mast cell 침윤이 정상군에 비하여 유의성있게(p<0.01) 증가하였다. 반면 실험군에서는 wKMS군, sfKMS군 그리고 sfKMS-pre군 모두 대조군에 비해 mast cell 침윤이 유의하게(p<0.01) 감소하였다(Fig. 3).

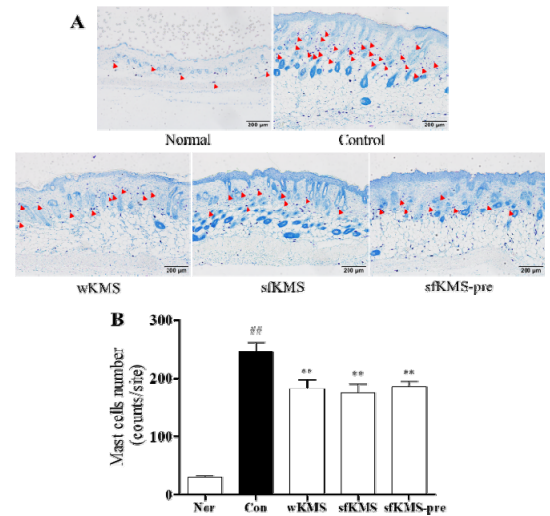


Fig. 3. The effects of KMSs on mast cell infiltration in dorsal skin tissue of DNCB-induced BALB/c mice. (A) The infiltration of mast cell in epidermis and dermis lesions were examined by toluidine blue staining of skin section (magnification: 100×, scale bar: 200µm). (B) The number of mast cell. The infiltration of mast cell in three sites was counted. Each data represents the mean ± SEM. ##p < 0.01 compared with normal and **p < 0.01 compared with control. KMS, kami-Mihudeongsikjang-tang. DNCB, 2,4-dinitrochlorobenzene.

3. KMS의 피부조직 내 eosinophil 침윤에 미치는 효과

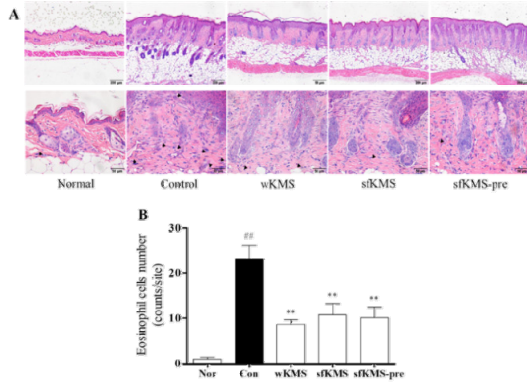


Fig. 4. The effects of KMSs on eosinophil infiltration in dorsal skin tissue of DNCB-induced BALB/c mice. (A) The infiltration of eosinophil in epidermis and dermis lesions were examined by H&E staining of skin section (magnification: 100' and 400', scale bar: 200 μ m and 50 μ m). (B) The number of eosinophil. The infiltration of eosinophil in six sites was counted. Each data represents the mean \pm SEM. ## $p < 0.01$ compared with normal and ** $p < 0.01$ compared with control. KMS, kami-Mihudeongsikjang-tang. DNCB, 2,4-dinitrochlorobenzene.

H&E 염색을 한 대조군의 피부 조직에는 eosinophil의 침윤이 유의하게 증가하였다($p < 0.01$). 반면 실험군에서는 wKMS군, sfKMS군 그리고 sfKMS-pre군 모두 대조군에 비해 eosinophil의 침윤에 대하여 유의성있는($p < 0.01$) 감소효과를 나타내었다(Fig. 4).

4. KMS의 피부조직 내 NF- κ B 및 MAPK 활성화에 미치는 영향

대조군에서 NF- κ B 발현 농도는 정상군에 비해 유의하게($p < 0.01$) 증가 하였다.

실험군은 대조군에 비해 NF- κ B의 발현이 감소하였으며, sfKMS-pre군은 대조군에 비하여 유의성있게($p < 0.01$) 발현을 억제하였다.

NF- κ B의 활성화 과정에 관계되는 MAPK인산화를

추가적으로 확인 하였다(Fig. 5). 대조군은 정상군에 비해 P-ERK1/2, P-JNK, P-p38의 활성이 증가 하였으며, P-ERK와 P-p38의 발현은 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다.

실험군에서 P-ERK의 발현은 대조군과 비슷하거나 감소하였다. wKMS군은 대조군과 비교하면 P-ERK의 발현억제 효과는 보이지 않았으며, sfKMS군은 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성을 보이지는 않았고, sfKMS-pre군은 대조군에 비하여 유의하게($p < 0.01$) 감소하였다.

P-JNK의 발현에 대하여 실험군에서는 대조군에 비하여 그 발현이 감소하였다. wKMS군의 P-JNK의 발현억제는 대조군과 비교하여 유의적이지 않았으나, sfKMS군과 sfKMS-pre군에서는 유의성을 보였다($p < 0.01$).

실험군은 대조군에 비하여 P-p38의 발현이 증가하

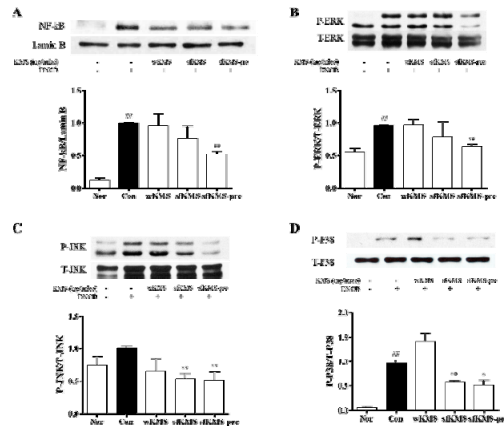


Fig. 5. The effects of KMS on NF- κ B and MAPKs expressions was investigated by western blot. (A) The level of NF- κ B (B) P-ERK, (C) P-JNK, (D) P-P38 expressions were examined by western blot. The expression level were measured by image J. Each data represents the mean SEM. ## $p < 0.01$ compared with normal and ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with control. KMS, kami-Mihudeongsikjang-tang. NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells.. MAPK, Mitogen-activated protein kinase. ERK, extracellular signal-regulated kinase. T-ERK, total-ERK. P-ERK, phospho-ERK. T-JNK, total-JNK. P-JNK, phospho-JNK. T-p38, total-p38. P-p38, phospho-p38.

거나 감소하였다. wKMS군은 대조군에 비하여 P-p38의 발현이 증가하였으며, sfKMS군은 대조군에 비하여 유의하게($p < 0.01$) 감소하였고, sfKMS-pre군의 발현 억제 효과도 유의하였다($p < 0.05$).

5. KMS의 혈청 IgE와 cytokine 생성량에 미치는 영향

KMS 투여가 혈청 IgE와 cytokine의 농도를 변화시키는지 확인하기 위해 IgE, IL-6, TNF-alpha의 수치를 추가적으로 살펴보았다(Fig. 6).

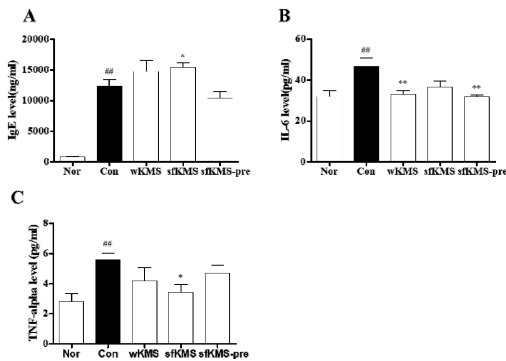


Fig. 6. The effects of KMSs on IgE and cytokines level in serum of DNCB-induced BALB/c mice. (A) The data of serum IgE (B) IL-6 (C) TNF-alpha. Each data represents the mean \pm SEM. ## $p < 0.01$ compared with normal and ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with control. KMS, kami-Mihudeongsikjang-tang. IgE, immunoglobulin E. IL-6, interleukin 6, TNF-alpha, tumor necrosis factor-alpha.

대조군은 정상군에 비하여 혈청 IgE, IL-6, TNF-alpha의 농도는 유의하게(IgE: $p < 0.01$, IL-6: $p < 0.01$, TNF-alpha: $p < 0.05$) 증가하였다.

IgE의 농도는 실험군에서 대조군에 비하여 증가하거나 감소하였다. wKMS, sfKMS군은 대조군에 비하여 IgE의 농도가 증가하였다. sfKMS-pre군은 대조군에 비하여 IgE 농도가 감소하였으나 유의성은 없었다.

IL-6의 농도는 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있는(wKMS: $p < 0.01$, sfKMS-pre: $p < 0.01$) 감소효과를 나타내었다.

대조군이 정상군에 비하여 유의성있는 증가를 나타낸 TNF-alpha의 농도는 모든 실험군에서 감소경향을 보였으며 sfKMS군은 유의성($p < 0.05$)있는 감소효과를 나타내었다.

6. KMS의 HaCaT세포에서 TARC 분비에 미치는 영향

TARC는 염증성 피부 병변 부위로 T helper 2 (Th2) 세포를 모으는데 중요한 역할을 한다. KMS가 TARC의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다(Fig. 7). 정상군에 비해 TNF-alpha/IFN-gamma를 처리한 대조군에서는 TARC의 발현이 유의적으로($p < 0.01$) 증가하였다.

wKMS군은 대조군에 비해 TARC의 분비에 대하여 의미있는 영향을 미치지 않았으나, 50, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서 감소하는 경향을 보였다.

sfKMS군은 대조군에 비해 TARC의 발현은 감소하는 경향을 보였으며, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군의 감소효과를 유의성을 나타내었다($p < 0.05$).

HaCaT 세포에 TNF-alpha/IFN-gamma의 자극제를 처리한 뒤 KMS가 TARC 유전자 발현에 미치는 영향을 확인해 보았다(Fig. 7). 정상군에 비해 대조군

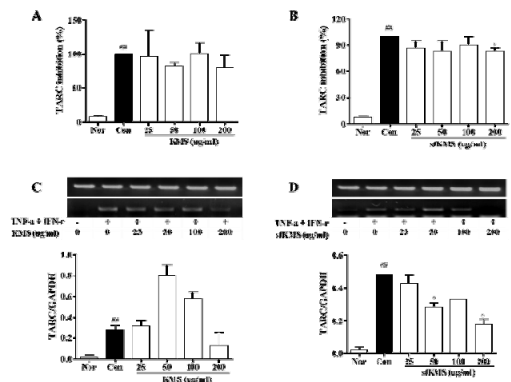


Fig. 7. The effects of KMS and sfKMS on TARC expressions. (A-B) ELISA, (C, D) RT-PCR. Each data represents the mean SEM. ## $p < 0.01$ compared with normal and * $p < 0.05$ compared with control. KMS, kami-Mihudeongsikjang-tang. TARC, thymus and activation-regulated chemokine. RT-PCR, Reverse transcription polymerase chain reaction.

의 TARC 발현이 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다.

wKMS군의 TARC 유전자 발현은 대조군과 비교하여 유의미한 결과를 보이지는 않았지만, 50, 100 μ g/mL 처리군에서 증가했던 TARC 유전자 발현이 200 μ g/mL 처리군에서 감소하는 경향을 보였다.

sfKMS군에서의 TARC 발현은 대조군에 비하여 감소하였으며, 50, 200 μ g/mL 처리군은 대조군에 비하여 유의하게($p < 0.05$) 감소하였다.

고 찰

이번 연구는 임상에서 보여준 KMS의 AD에 대한 효과에 대하여 실험적으로 연구하여 AD가 유발된 동물모델에서 표피와 진피의 조직의 과각화 및 부종의 완화, eosinophil과 mast cell의 침윤억제로 치료효과를 관찰하였다. 혈청 IgE와 염증성 cytokine의 농도 변화, NF- κ B 발현 그리고 MAPK의 인산화 억제 정도, 염증이 유도된 HaCaT 세포의 TARC 발현 정도를 측정하여 기전을 검증하였다. 또한 약물의 추출방법과 적용 기간에 차이를 두어 KMS의 AD에 대한 치료 및 예방효과를 살펴보았다.

AD의 임상상은 목이나 관절의 접히는 부위 등의 호발부위에 피부건조와 동반되는 급성 습진, 소양증이 특징이다⁸⁾. 이러한 AD의 임상증상은 피부병소에 나타나는 조직학적인 관찰을 통해 설명할 수 있다. 급성으로 구진이 발생한 피부병소는 현저한 표피의 세포내 부종(spongiosis)이 특징이며, 만성으로 태선화된 피부병소는 망상 피부 용기의 연장, 뚜렷한 과각화증 그리고 약간의 부종에 의한 진피의 비후가 특징이다⁹⁾. 이번 실험의 대조군은 정상군에 비하여 표피와 진피의 두께가 증가하였다. 실험군에서 표피의 두께는 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었으며, 진피의 두께도 감소하였다. 이 결과는 KMS가 AD의 병소에 나타나는 부종 및 피부각화증을 억제함을 의미한다. 부종 및 과각화 억제물의 경우 wKMS, sfKMS, sfKMS-pre 모든 군에서 비슷한 양상을 나타내었다.

급성 피부병소의 내에는 혈관주위의 단핵구, 대식세포와 함께 T cell의 침윤이 현저하게 나타나며,

eosinophil을 관찰되지만 basophil과 neutrophil은 드물게 나타난다. 또한 여러 단계의 탈과립화된 mast cell이 존재한다⁹⁾. Mast cell은 histamine, tryptase 다른 pro-inflammatory 매개물질을 분비함으로써 AD 환자들이 경험하는 가려움증과 피부 건조증을 유발한다¹⁰⁾. Mast cell은 한번 활성화되면 AD의 증상을 일으키는 몇 가지의 매개물질을 분비한다. 예를 들어, eosinophil cationic protein, eosinophil-derived neurotoxin과 major basic protein은 혈관투과성과 신경독성물질을 증가시킬 수 있다¹¹⁾. 더욱이, IL-4와 IL-13을 생산하여 각질형성세포(keratinocyte)와 섬유아세포(fibroblast)로부터 chemokine 생산 자극을 통해 eosinophil의 모집을 촉진한다. 이번 실험에서 H&E 염색을 한 대조군에서 eosinophil의 침윤이 관찰되었으며, toluidine blue의 염색으로 관찰한 결과 대조군에서는 진피에 mast cell의 침윤이 관찰되었다. 반면 모든 실험군에서는 eosinophil과 mast cell의 침윤이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 보였다. 이는 KMS가 eosinophil과 mast cell의 매개로 나타날 수 있는 AD의 부종이나 태선화와 같은 조직의 변화를 완화할 수 있으며, 가려움증 등의 임상증상을 개선시킬 수 있다는 것을 시사한다.

2003년 World Allergy Organization(WAO)에서는 아토피 또는 알레르기 질환을 IgE 감각과 연관된 질환으로 정의하였으며, AD는 IgE 매개의 병태생리와 연관된 질환으로 혈청에 특이성 IgE 항체가 나타나거나 skin-prick test에 양성을 가지고 있는 경우로 한정하였다¹²⁾. AD의 병리기전은 IgE와 eosinophil 증가를 나타내는 전신적인 Th2 세포의 불균형에 의한 것으로 일반적으로 받아들여지고 있다¹³⁾.

본래 AD의 발병 모델은 Th1과 Th2 세포매개의 불균형의 결과로 보았다¹⁴⁾. Mouse에서 Th 세포는 분비되는 cytokines에 패턴에 따라 크게 두 가지로 분류하였다¹⁵⁾. Th1 세포는 세포-매개 면역과 관련되며, Th2 세포는 IgE를 합성하여 체액성 면역에 관여한다고 보았다¹⁶⁾. Th2 세포는 알레르기 질환의 발병과 관련된 주요한 T helper cell 하위집합으로 제안되었다¹⁷⁾. 유전자 변형을 통하여 표피에 IL-4를 과발현 되도록

록 한 mouse는 소양증, 피부 염증세포의 증가, 피부 세균감염의 증가 그리고 IgE의 증가 등 AD의 특징이 발생되었다¹⁸⁾. 활성화된 Th2세포에서 생산된 IL-4는 B cell 반응과 IgE의 분비를 촉진한다. IgE 면역 복합체는 basophil과 mast cell에 있는 높은 결합력을 가진 IgE 수용체(FcεR1)에 결합하게 되면, basophil과 mast cell이 활성화되고 histamine, heparin과 serotonin 같은 cytokine과 염증매개물질을 분비하여 면역반응이 일어나게 된다¹⁹⁾. 이번 실험에서 대조군은 정상군에 비하여 IgE가 증가하였으며, 실험군에서는 IgE가 증가하거나 감소하였다. sfKMS-pre 군의 경우 IgE 발현을 억제하는 경향을 보였으나, 유의성은 관찰되지 않았다. 실험군에서 IgE의 발현을 효과적으로 감소시키지는 못하였으나, AD 피부병소에 mast cell은 대조군에 비하여 실험군에서 모두 유의성 있는 감소를 나타내었고 그 정도도 차이가 없었다. 이는 증가된 IgE와 알레르겐의 복합체가 결합될 수용체를 감소시켜 AD의 임상증상을 완화하는 효과를 나타낼 것으로 예상할 수 있다. KMS는 Th2 세포에 의한 B 세포의 활성화 및 IgE의 생산을 억제하지는 못하였지만, 다른 경로를 통하여 mast cell의 침윤을 억제하여 임상증상을 완화하는 것으로 생각된다.

IL-6는 섬유모세포, 대식세포, 수지상 세포, T림프구와 B 림프구, 내피세포, 교질세포와 각질세포와 같은 다수의 세포에 의해 생산되는 cytokine으로 다양한 외부자극에 대하여 반응한다. IL-6는 간세포에서 급성 단계의 반응 단백질 합성을 유도하며, B 세포를 형질세포로 분화하고, 단핵구를 대식세포로 분화하며, 조혈 줄기세포의 성장을 유도한다²⁰⁾. IL-6는 CD4+ T 세포가 활성화되어 있는 동안 IL-4 유전자 발현을 유도함으로써 Th2의 분화를 촉진하고, suppressor of cytokine signaling-1의 발현을 유도함으로써 IFN-gamma와 Th1의 분화를 억제한다²¹⁾. 실험군에서 wKMS, sfKMS, sfKMS-pre는 IL-6의 농도가 감소하였으며, wKMS와 sfKMS-pre군은 유의성 있는 감소효과를 보였다. 이는 KMS가 IL-6를 감소시키는 효과가 있으며 IL-6매개의 Th2와 관련된 면역반응을 억제할 수 있다는 것을 의미한다.

Mogbekeroluwa 등은 Leiden epidermal model(LEM)에 대한 실험연구를 통하여 TNF-alpha와 Th2 cytokine이 AD의 병변부위에 나타나는 변화를 일으키는 지 관찰하였다. TNF-alpha는 단독 또는 Th2 cytokine과 함께 elongation of very long chain fatty acid protein 1(ELOVL1)의 발현을 감소시켰으며, TNF-alpha는 long periodicity phase(LPP)의 반복 거리와 mid-transition temperature(MTT)를 감소시켰다. 또 TNF-alpha와 Th2 cytokine은 control LEM에 비하여 thymic stromal lymphopoietin(TSLP)의 분비량이 상당히 증가되었다는 사실을 발표했다²²⁾. ELOVL1은 long chain free fatty acid의 합성에 중요한 역할을 하며, 이의 감소는 표피의 투과성을 증가시키는 것으로 알려져 있으며²³⁾, van Smeden 등은 지방산슬이 짧아져 LPP가 짧아지며, 표피의 수분 손실이 증가함으로써 MTT가 감소하는 것이라고 하였다²⁴⁾. AD에서 붕괴된 장벽은 피부를 통한 알레르겐 또는 자극의 침투에 취약하게 만들며, 알레르겐과 자극에 대하여 진피에서 Th2 면역 반응이 일어난다는 가설이 있다. 각질세포는 TSLP를 분비함으로써 피부로 침입한 알레르겐에 대하여 반응하며, 수지상세포는 TSLP에 의하여 활성화하여 CD4+ T 세포의 확산과 분화를 통한 면역반응이 더 증가하게 한다²⁵⁾. 이번 실험에서 모든 실험군은 대조군에 비하여 TNF-alpha의 농도가 감소하였다. KMS가 TNF-alpha의 발현을 억제함으로써 피부 장벽 장애를 치료할 수 있는 가능성이 있다는 것을 보여주었다.

NF-κB는 TNF-alpha, IL-1과 Toll-like microbial pattern recognition receptor의 신호에 의하여 반응한다²⁶⁾. Rheumatoid arthritis환자에서 얻은 fibroblast-like synoviocyte에 대한 실험에서 proinflammatory cytokine과 chemokine의 생산이 NF-κB의존적이라는 실험보고가 있었으며²⁷⁾, 유사한 연구에서 인간 atherosclerotic plaque에서도 proinflammatory cytokine의 생산이 NF-κB의존적이라는 사실을 보여주었다²⁸⁾. 이번 실험에서 대조군은 정상군에 비하여 혈청 TNF-alpha의 농도

가 증가하였으며 NF- κ B의 발현 또한 증가하였다. 이는 NF- κ B의 활성화로 염증이 유지되는 상황이라는 것을 알 수 있다. 실험군에서는 대조군에 비하여 NF- κ B의 발현농도가 감소하였으며, 각군에서 감소의 정도는 차이가 있었다. 발효추출물은 물추출물에 비하여 특정 유효성분에 대하여 증가 되었다는 보고를 고려하여 살펴보면, wKMS군과 sfKMS군의 NF- κ B의 감소효과와의 차이는 특정 유효성분이 증가된 것으로 추측되며 투여 농도를 다르게 하여 결과를 살펴볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

MAPK는 인산화과정을 거쳐 NF- κ B 활성화와 관계한다²⁹⁾. 이번 실험에서 대조군은 정상군에 비하여 ERK, JNK 그리고 p38의 인산화 비율이 모두 증가하였다. 실험군에서는 wKMS군에서는 대조군에 비하여 ERK의 인산화에는 영향이 없었으며, JNK의 인산화는 억제하였으나 유의성이 없었으며, p38의 인산화율은 오히려 증가하였다. sfKMS군은 대조군에 비하여 ERK의 인산화는 억제하였으나 유의성은 없었으며, JNK와 p38의 인산화 비율에 대해서는 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈다. sfKMS-pre군에서는 ERK, JNK 그리고 p38의 인산화 비율이 대조군에 비하여 모두 유의성 있는 감소를 보였다. MAPK의 인산화 억제가 KMS의 발효추출물이 물추출물보다 좀 더 뚜렷한 것에 대하여 유효성분 추출량의 차이에 기인한 것인지에 대하여는 좀 더 연구되어야 할 과제이다.

TARC는 keratinocyte등에서 생산되는 CC chemokine의 하나이다³⁰⁾. TARC는 주로 Th2 세포 등에 발현되는 CC chemokine receptor type 4의 ligand이다³¹⁾. AD 환자로부터 피부 생검으로 얻은 keratinocyte에는 TARC가 발현되어 있음을 확인하였으며, 정상적인 keratinocytes에 대한 실험에서 IFN-gamma와 TNF-alpha의 자극에 의하여 TARC가 발현되는 것을 밝혔다³²⁾. Kakinuma 등은 TARC의 혈청농도는 AD환자에서 정상적인 사람에 비하여 유의성 있게 증가되어 있으며, 증상이 심해질수록 그 농도가 증가하고, 또한 혈청 TARC농도가 eosinophil의 수와 유의성 있는 상관관계가 있다고 보고하였다³³⁾. 이는 TARC가 Th2세포의 염증반응을

유도하여 AD의 증상을 일으키는데 관여한다는 것을 의미한다. 이번 실험에서는 TARC에 발현에 대하여 ELISA와 PT-PCR을 통하여 조사하였다. 대조군은 정상군에 비하여 TARC의 발현이 유의하게 증가하였다. TARC에 대한 ELISA와 RT-PCR의 분석 결과에 차이가 발견되었으며, TARC 발현과 관련된 하위 기전에 대한 연구가 추가되어야 할 것으로 생각된다. ELISA 분석으로 살펴본 TARC에 대한 실험에서 wKMS군에서는 유의미한 결과를 얻지 못하였으며, sfKMS군에서 200 μ g/ml처리군에서 발현억제에 대하여 유의성이 있는 감소효과를 나타내었다. RT-PCR로 분석한 TARC 발현에 대한 KMS의 효과를 살펴보면, wKMS군에서는 25, 50, 100 μ g/ml처리군은 TARC의 발현이 대조군에 비하여 증가하였으나, 200 μ g/ml처리군은 대조군에 비하여 감소하였다. sfKMS군은 처리 농도에 따라 차이는 있으나 TARC의 발현이 감소하는 경향을 보였으며, 50, 100, 200 μ g/ml처리군은 대조군에 비하여 유의성있는 감소가 있는 것으로 조사되었다. KMS의 물추출물은 200 μ g/ml에서 TARC의 억제 효능을 보였고, 발효추출물은 더 낮은 농도에서 그 억제 효능이 시작되었다. 이를 고려할 때 KMS의 발효추출물은 물추출물에 비해 TARC 발현을 억제하는 성분이 더 증가되었다는 것을 가정해 볼 수 있으나 추가연구가 필요할 것으로 생각된다.

KMS의 AD에 유발된 동물모델에 대한 실험결과로 볼 때 물추출물, 발효추출물 모두 치료효과를 가진 것으로 생각된다. 그러나 KMS의 물추출물과 발효추출물 사이에 성분이 전환되거나 추출량의 차이가 있어 그 기전에는 차이를 나타내었다. 또한 KMS의 발효추출물은 AD의 2차감작과 함께 투여한 경우와 2차감작 이전에 투여한 경우 모두 효과가 있었다. 그러므로 KMS 발효추출물은 1차 감작이후 2차감작이 있기 전의 면역 반응에도 과민성을 완화시킬 수 있는 가능성을 보여준 것으로 생각된다. 이는 KMS가 치료약물로서 그리고 예방약물로도 가치가 있다는 것을 시사한다.

결론

가미미후등식장탕의 AD에 대한 치료 및 예방 효과를 검증하기 위하여 DNCB 유도 AD 동물모델에 대하여, 피부조직관찰, 혈청 IgE와 cytokine 수준의 측정 및 염증관련 단백질의 발현을 측정하고, IFN-gamma와 TNF-alpha에 의해 염증반응이 유도된 HaCaT 세포의 TARC 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 가미미후등식장탕의 물추출물과 발효추출물은 AD의 피부 병소의 표피와 진피의 두께를 유의하게 감소시켰으며, eosinophil과 mast cell의 침윤에 대하여 유의성 있는 억제효과를 보였다. 또한 가미미후등식장탕 발효추출물은 2차감작전과 감작후 투여군에서 모두 유의한 감소효과를 보였다.
2. 가미미후등식장탕의 물추출물은 혈청 IgE의 농도가 증가하였으며, IL-6, TNF-alpha의 농도는 감소시켰다. NF- κ B의 발현에는 영향을 주지 않았고, ERK, JNK의 인산화는 억제하였으나 p38의 인산화는 증가시켰다. TARC의 발현에 대하여 25, 50, 100 μ g/mL 처리군에서는 그 발현이 증가하였으나, 200 μ g/mL 처리군에서는 감소되었다.
3. 가미미후등식장탕의 발효추출물은 IgE 농도는 증가시키고, IL-6, TNF-alpha의 농도는 감소시켰다. NF- κ B의 발현은 억제하는 경향을 보였으며, ERK, JNK 그리고 p38의 농도는 감소시켰다. TARC 발현을 감소시켰다.
4. 가미미후등식장탕의 발효추출물을 2차감작전에 투여한 결과, IgE, IL-6, 그리고 TNF-alpha의 농도는 감소시켰다. NF- κ B의 발현에 대하여 억제효과가 있었으며, ERK, JNK, p38의 인산화를 억제하였다. 이상의 결과로 가미미후등식장탕은 AD에 대하여 치료 또는 예방약물로 응용할 가치가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2017년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임

(NRF-2017R1D1A1B03028505).

참고문헌

1. Coca AF, Cooke RA. On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. *J Immunol.* 1923;8:163-182.
2. Nutten S. Atopic dermatitis : global epidemiology and risk factors. *Ann Nutr Metab.* 2015;66(1):8-16.
3. Lee YU, Park SH, Nam EH, Chung TH, Hwang CY. Modulatory effects of PG102 (*Actinidia arguta*) on inflammatory cytokine mRNA expression in canine atopic dermatitis. *Thai J Vet Med.* 2016;46(4):601-607.
4. Marco M, Heeney D, Binda S, Cifelli CJ, Cotter PD, Foligne B et al. . Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology.* 2017;44:94-102.
5. Um YR, Lee JH, Ma JY. Quantitative analysis of marker substances in Solid fermented *Angelicae Gigantis Radis* by HPLC. *Korean Journal of Oriental Medicine.* 2010;16(1):173-178.
6. Wickman M, Asarnoj A, Tillander H, Andersson N, Bergstrom A, Kull I, et al. Childhood-to-adolescence evolution of IgE antibodies to pollens and plant foods in the BAMSE cohort. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(2):580-582.
7. Westman M, Asarnoj A, Hamsten C, Wickman M, van Hage M. Windows of opportunity for tolerance induction for allergy by studying the evolution of allergic sensitization in birth cohorts. *Seminars in Immunology.* 2017;30:61-66.
8. Peng W, Novak N. Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clinical & Experimental Allergy.* 2015;45:566-574.
9. Bieber T. Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol.* 2010;22:125-137.
10. Kasutani K, Fujii E, Ohyama S, Adachi G,

- Hasegawa M, Kitamura H, Yamashita N. Anti-IL-31 receptor antibody is shown to be a potential therapeutic option for treating itch and dermatitis in mice. *Br J Pharmacol.* 2014;171:5049-5058.
11. Mu Z, Zhao Y, Liu X, Chang C, Zhang J. Molecular biology of atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2014;47:193-218.
 12. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:832-836.
 13. Ong PY, Leung DY. Immune dysregulation in atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2006;6:384-389.
 14. Leung DY, Boguniewicz M, Howell M, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2004;113:651-657.
 15. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136(7):2348-2357.
 16. Maggi E, Prete GD, Macchia D, Parronchi P, Tiri A, Chrétien I, et al. Profiles of lymphokine activities and helper function for IgE in human T cell clones. *Eur. J. Immunol.* 1988;18:1045-1052.
 17. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsiocopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T lymphocyte population in atopic asthma. *N. Engl. J. Med.* 1992;326:298-304.
 18. Chan LS, Robinson N, Xu L. Expression of interleukin-4 in the epidermis of transgenic mice results in a pruritic inflammatory skin disease: an experimental animal model to study atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2001;117:977-983.
 19. Pulendran B, Artis D. New paradigms in type 2 immunity. *Science.* 2012;337:431-435.
 20. Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: 10 years later. *Int. Rev. Immunol.* 1998;16:249-284.
 21. Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 2002;39(9):531-36.
 22. Danso MO, van Drongelen V, Mulder A, van Esch J, Scott H, van Smeden J, et al. TNF- α and Th2 Cytokines Induce Atopic Dermatitis - Like Features on Epidermal Differentiation Proteins and Stratum Corneum Lipids in Human Skin Equivalents. *Journal of Investigative Dermatology.* 2014;134:1941-1950.
 23. Cameron DJ, Tong Z, Yang Z, Kaminoh J, Kamiyah S, Chen H, et al. Essential role of Elovl4 in very long chain fatty acid synthesis, skin permeability barrier function, and neonatal survival. *Int J Biol Sci.* 2007;3:111-119.
 24. van Smeden J, Janssens M, Kaye EC, Caspers PJ, Lavrijsen AP. The importance of free fatty acid chain length for the skin barrier function in atopic eczema patients. *Exp Dermatol.* 2014;23:45-52.
 25. Zhu Z, Oh M-H, Yu J, Liu YJ, Zheng T. The Role of TSLP in IL-13-induced atopic march. *Sci Rep.* 2011;1:23.
 26. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:621-663.
 27. Aupperle K, Bennett B, Han Z, Boyle D, Manning A, Firestein G. NF- κ B regulation by I κ B kinase-2 in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Immunol* 2001;166:2705-2711.
 28. Monaco C, Andreacos E, Kiriakidis S, Mauri C, Bicknell C, Foxwell B, et al. Canonical pathway of nuclear factor κ B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic

- responses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:5634-5639.
29. Zhang YL, Dong C. MAPkinase signaling in immuneresponses. *Cell Mol Immunol.* 2005;2:20-27.
30. Vestergaard C, Yoneyama H, Murai M, Nakamura K, Tamaki K, Terashima Y, et al. Overexpression of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest.* 1999;104:1097-1105.
31. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptors expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med.* 1998;187:875-883.
32. Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, Larsen CG. A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J Invest Dermatol* 2000;115: 640-646.
33. Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, et al. Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107: 535-541.