

桃仁의 아토피 피부염 모델 피부조직 및 혈청 내 염증매개물질 조절 효과

김상우[#], 홍수연, 권보근, 김명현, 김상배, 진대환, 최우찬, 손영주, 정혁상^{*}

경희대학교 한의과대학 해부학교실

Effect of Persicae Semen for Atopic Dermatitis Skin Tissue and Regulate to Inflammation Mediator in Serum

Sangwoo Kim[#], SooYeon Hong, Boguen Kwon, Myunghyun Kim, Sang-bae Kim
Dae-hwan Jin, Woochan Choi, Youngjoo Sohn, Hyuk-Sang Jung^{*}

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea,

ABSTRACT

Objective : The objective of this study was to demonstrate the effect of Persicae Semen (PS) in DNCB-induced atopic dermatitis mouse and HaCaT cell.

Methods : The BALB/c mice were divided into four groups. To develop atopic dermatitis, 200 μ l of 1 and 0.5% DNCB solution was put on the back of mice in the Control group, the PS-Low group and the PS-High group once a day. After application of DNCB, 200 μ l of the PS extract was also treated. The Normal group was given PBS. The mice dorsal skin was stained with Masson's trichrome, H&E, and toluidine blue to evaluate the thickness of the epidermis and dermis, infiltration of eosinophils and mast cells respectively. ELISA was applied to measure the serum level of IgE and IL-6. Toxicity of PS was measured by MTS assay in HaCaT cell. To investigate the effects of PS on HaCaT cells, cells were pre-treated with PS for 1h, and then stimulated with TNF- α and IFN- γ . After 24 hours, the expression of TARC was analyzed using RT-PCR.

Results : PS not only significantly diminished the thickness of the epidermis and dermis, but also reduced the infiltration of eosinophil and mast cell in skin lesion. PS also reduced the serum IgE and IL-6 level which played important roles in the atopic dermatitis. The expression of TARC was decreased significantly in TNF- α /IFN- γ stimulated HaCaT cell.

Conclusion : These results suggest that PS may be effective in alleviating the atopic dermatitis induced by DNCB and inflammation by TNF- α /IFN- γ .

Key words : Human keratinocyte, pro-inflammatory cytokine, Persicae Semen, inflammatory, Mast cell, Thymus and activation regulated chemokine

I. 서 론

아토피 피부염은 피부 과민반응과 관련된 만성 재발성 피부

질환으로 종종 천식과 알레르기 비염으로 이어지는 atopic march의 첫 단계가 되고¹⁾, 다양하고 복합적인 유전적 소인, 환경적 요인에 기인하여 피부장벽 기능 이상과 비정상적인 면역

*Corresponding author : Hyuk-Sang Jung, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

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

#First author : Sangwoo Kim, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

· Tel : +82-2-961-0327 · E-mail : quarry_man@naver.com

· Received : 03 June 2020 · Revised : 20 July 2020 · Accepted : 25 July 2020

반응이라는 2가지 주요한 병리 과정을 거쳐 증상이 발현된다^{2,3}. 현대 사회에서 가장 흔한 염증성 피부질환으로 발병률이 지난 30년 동안 2~3배 증가하여 삶의 질에 중대한 영향을 미치고 있다^{4,5}. OECD 회원국 대다수에서 소아는 10~20%, 성인은 1~3% 정도의 유병률을 보이고 있고, 국내의 유병률도 비슷하다⁶.

아토피 피부염은 특히 근래 들어 국내에서 성인 환자의 수가 증가하는 추세로⁶, 영유아기에 발병한 환자 중 약 70% 이상 정도는 성인기까지 아토피 피부염이 지속된다고 보고하고 있다. 19세 이상에서의 아토피 피부염 유병률이 2007년 2.3%에서 2015년은 3.4%로 증가하였으며, 이 중 성인 초기인 20대와 30대의 유병률이 매해 증가할 것으로 예상하고 있는데, 19~29세에서 보면 2007년 5.7%에서 2015년 10.7%로, 30~39세에서는 2007년 1.6%에서 2015년 1.7%로 증가했다고 보고하고 있다⁷. 우리나라 18세 이상 성인 중 아토피 피부염 연령별 발생 분포를 살펴보면 18~39세에서 50% 이상을 차지해 가장 높았으며, 40~59세에서 29.9%, 60세 이상은 20.1%로 나타났다. 지속적으로 증가 추세인 아토피 피부염은 증상 경험, 우울, 불안, 수면 장애 등 정신 질환이 있고 다른 피부병 환자보다 주의력결핍 과잉행동장애, 자폐 범주성 장애, 조현병 등 정신질환에 더 취약한 것으로 나타났다⁸.

한의학에서는 아토피 피부염이라는 병명은 없으나 頭面及遍身, 皮膚起粟疹, 浸淫成片, 或起白屑, 痂皮, 瘙癢無度的 증상으로 미루어 보건대 奶癬, 苔癬, 胎斂瘡, 濕疹, 濕瘡, 陰瘡 등의 병명으로 기술되어 있다⁹. 시기별로는 胎兒期에는 胎斂瘡, 胎癬, 胎熱로, 哺乳期 또는 嬰兒期에는 奶癬, 奶腥瘡, 乳癬으로, 성인기에는 異位性 皮膚炎으로 구별하기도 하였고, 발생하는 부위에 따라서 耳部에 발생하면 旋耳瘡, 四肢에 발생하면 四彎風 등 다양한 病名으로 지칭하였다^{10,11}. 치료에 있어서는 유아동기의 아토피 피부염을 胎熱, 濕熱, 脾虛風燥 등으로, 성인 아토피 피부염을 風濕蘊膚, 濕熱互結, 脾虛濕蘊, 血虛風燥 등으로 변증하여 그에 맞는 치법을 사용해 왔다¹².

한의학에서 아토피 피부염에 대한 연구는 여러 방면에 걸쳐 폭넓게 이루어지고 있다. 아토피 피부염에 관한 동·서의학적 고찰¹³, 아토피 피부염의 한의학적 변증에 대한 문헌적 고찰¹⁴ 등 문헌 연구를 바탕으로 최근에는 아토피 피부염 치료에 관한 사상의학적 임상연구¹⁵, 濕熱로 변증한 급성기 아토피 피부염 환자 치험 6례¹⁶ 등 임상연구와 함께 黃連解毒湯¹⁷, 大靑龍湯¹⁸ 등 처방과 관련된 실험적 연구가 활발하다. 반면, 단일 한약재와 관련된 실험 연구에서는 紫草¹⁹, 牛蒡子²⁰, 桑葉²¹, 枳實²², 沙蔘²³ 정도가 보고되고 있다.

桃仁은 장미과(Rosaceae) 식물인 복사나무 *Prunus persica* (L.) Batsch 또는 산복사나무 *P. davidiana* (Carr.) Franch의 성숙한 과실에서 과육, 씨앗, 껍질을 제거하고 種仁만 취하여 건조한 것(Persicae Semen)이다²⁴. 성분은 amygdalin을 약 1.5%, emulsin을 약 3%, 정유를 약 0.4%, fat을 약 45% 함유하고, fat은 주로 oleic acid와 glyceric acid이다²⁵. 본초학에서는 活血祛瘀藥 계통으로 분류되며 味는 苦甘하며 性은 平하고 質潤하여 心, 肝, 大腸으로 들어가 活血祛瘀, 潤腸通便의 효능이 있다. 肝經血分에 들어가 破瘀行血에 常用하는 要藥이 되어 經閉, 痛經, 癥瘕痞塊, 跌撲損傷 등 모든 瘀血阻滯로 인한 證을 치료하며, 腸癰이나 肺癰에는 活血消癰의 효과가 있고,

味苦性降하여 降氣止咳의 효능이 있다²⁶. 현대약리학적으로 桃仁은 항혈전 작용²⁷을 비롯한 항암 작용²⁸, 항염 작용²⁹ 등이 보고되었다. 桃仁의 주성분 중 하나인 amygdalin은 관절염³⁰, 지방간³¹ 등에서 항염 효과가 있으며, 유방암³² 등에서 항암 효과가 있다고 보고되었다.

피부염과 관련하여 桃仁은 《本草思辨錄》에서는 「桃仁, 桃有主膚毛爲肺果, 主攻瘀血而爲肝藥, 兼疏膚膜之瘀,」이라고 기재되어 있고³³, 《本草綱目》에서 李暉는 「除皮膚血熱燥癢, 行皮膚凝聚之血,」라고 하였다³⁴. 桃仁이 들어간 처방으로는 《東醫寶鑑》에서 「治燥證, 皮膚拆裂, 手足爪甲枯燥, 搔之屑起, 血出痛楚,」으로 기재된 生血潤膚飲³⁵과 腎臟風瘡痒痛에 사용하는 活血驅風散³⁵이 대표적이고, 生血潤膚飲의 경우에는 항알러지 효과³⁶와 아토피 피부염에 대한 임상 효과³⁷에 대한 연구결과가 보고되었다. 최근 연구에 의하면 桃仁 추출 성분이 알러지 염증을 억제하고³⁸, 주성분인 amygdalin은 피부각질형성세포(keratinocyte cell)에 대한 면역조절 효과가 보고되어³⁹, 이상의 내용을 고려하면 桃仁이 아토피 피부염에서 염증을 완화할 수 있는 가능성이 있을 것으로 판단하였다.

이에 저자는 BALB/c mice 피부에 DNCB 도포로 유발된 아토피 피부염 모델에 대하여 桃仁 투여시 표피와 진피의 두께 변화, 호산구와 비만세포의 침윤도, IgE와 IL-6의 수치 변화를 조사하고, TNF- α 와 IFN- γ 로 염증을 유도한 HaCaT 세포에서 桃仁 처리시 TARC 발현도를 확인하여 유의한 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

桃仁은 옴니허브(Daegu, Korea)에서 구매하였다. HaCaT cell은 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, Penicillin-streptomycin (P/S), fetal bovine serum (FBS), Dullbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)은 Gibco (CA, USA)에서, TNF- α (#285-IF), IFN- γ (#210-TA)는 R&D System (MN, USA)에서 구입하였다. PCR primers는 Genotech (Daejeon, Korea)에서 구입하였다. Western blot, Antibodies인 phosphorylation (P)-extracellular signal-regulated kinase (ERK), ERK, P-P38, P38, P-Jun N-terminal kinase (JNK), Jun N-terminal kinase (JNK)는 Cell Signaling (MA, USA)에서 구입하였다. ECL 용액 (RPN2106)은 GE Life Sciences (MA, USA)로부터 구매하였다. DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene), protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail은 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구입하였고, RNAiso Plus (Trizol)은 Takara Bio (Dalian, China)에서 구입하였다. SuperScript II reverse transcriptase는 Invitrogen (Carlsbad, CA)에서 구입하였다. Kapa Taq PCR kit는 KAPA Bio (Massachusetts, USA)에서 구입하였다. 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS)는 Promega (Madison, USA)에서 구입하였다. Enzyme-linked-immunosorbent assay

仁을 농도별로 처리 하고 24시간 동안 반응시킨다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) solution을 20 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양 후 Microplate Photometer reader기에서 490 nm로 측정하였다.

9. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

桃仁이 피부에 미치는 영향을 분석하기 위해서, HaCaT cell을 HaCaT cell을 6 well plate에 1×10^6 cells/well로 분주하고 24시간 안정화 후 桃仁을 각 농도 별(50, 100, 200 μ g/ml)로 처리하였다. 약물 처리 24시간 후 HaCaT cell을

Trizol을 이용하여 RNA를 추출한 후 SuperScript II reverse transcriptase를 사용하여 cDNA 합성하였다. PCR은 Kapa Taq PCR kit를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. PCR은 Table 1에 기재한 조건에 따라 실험을 진행하였다.

10. 통계처리

모든 실험 결과는 Mean \pm SEM 값으로 나타냈으며, Graph Pad PRISM Software (Version 5.01, Graphpad Software, Inc., CA, USA)를 사용하여 one-way ANOVA로 분석하고 Dunnett's multiple comparison test를 이용하여 사후 검정하였다. p 값이 0.05 이하인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

Table 1. Primer Sequences and PCR Conditions

Primer name	Primer sequence	Annealing Tmperature ($^{\circ}$ C)	cycle	Accession Number
TARC / CCL17	Forward 5'-ACTGCTCCAGGGATGCCATCGTTT-3' Reverse 5'-ACAAGGGGATGGGATCTCCCTCACTG-3'	60 $^{\circ}$ C	44	NM_002987.3
GAPDH	Forward 5' -CGTCTAGAAAAACCTGCCAA-3' Reverse 5' -TGAAGTCAAAGGAGACCACC-3'	50 $^{\circ}$ C	30	NM_001256799.3

Abbreviations : TARC / CCL17, Thymus-and activation-regulated chemokine; GAPDH, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase.

III. 결 과

1. 桃仁 도포에 의한 표피 및 진피 조직의 두께 변화

桃仁 투여가 아토피 피부염 유발 모델 피부 조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험 종료 후 적절한 피부조직에 Masson's trichrome 염색을 실시하여 표피 및 진피의 두께를 확인하고(Figure 2A), 100 \times 배의 비율로 3 시야를 측정하였다(Figure 2B, 2C). 확인 결과 표피와 진피 두께 모두가 Normal군에 대비해 Control군에서 유의하게 증가하였고, Control군에 대비하여 농도 의존적으로 감소하여 고농도인 PS-High군에서 유의한(*p < 0.05) 효과를 보였다.

2. 桃仁이 피부조직 내 호산구 침윤에 미치는 영향

피부 조직에 H&E 염색을 실시한 후 조직 내부 호산구 침윤을 확인한 결과 Normal군에 비해 Control군에서 현저히 증가하였다. 桃仁을 농도별로 투여하였을 때 호산구 침윤도는 Control군 대비 농도 의존적으로 감소하는 패턴을 보였으며 PS-High군에서 유의한(*p < 0.05) 효과가 보이는 것을 확인하였다(Figure 3).

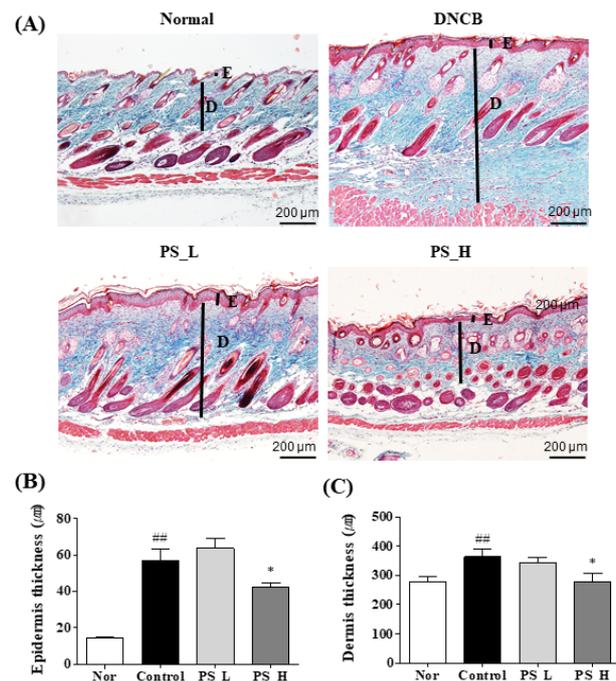


Figure 2. The effects of PS on epidermis and dermis thickness in DNCB-induced BALB/c mice.

(A) The thicknesses of the epidermis and dermis were measured by Masson trichrome staining of skin sections (magnification: 100 \times , scale bar: 200 μ m). (B) Measurement of epidermal thickness. (C) Measurement of dermal thickness. The data represent the mean \pm SEM. #p < 0.01 normal vs. control and *p < 0.05 control vs. PS.

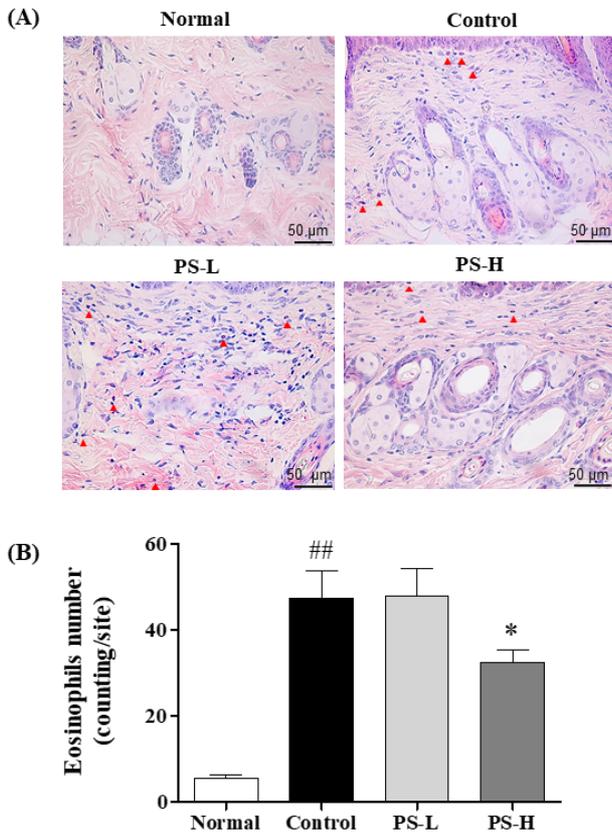


Figure 3. The effect of PS on eosinophil infiltration in DNCB-induced BALB/c mice. (A) The infiltration of eosinophils (red arrow heads) in dermis lesions was measured by the H&E staining of skin sections (magnification: 400×, scale bar: 50 μm). (B) The infiltration of eosinophils was counted in ten sites. The data represent the mean ± SEM. ##p < 0.01 ##p < 0.01 normal vs. control and *p < 0.05 control vs. PS.

3. 桃仁이 피부조직 내 비만세포 침윤에 미치는 영향

아토피 피부염을 유도하였을 때 등 피부조직 내 비만세포가 증가하는데 이는 Toluidine blue 염색을 실시하여 확인 가능하다. 동물을 희생 후 적출한 피부조직에 Toluidine blue 염색을 진행하여 비만세포 침윤 정도를 관찰한 결과, Control군에서 Normal군에 비해 비만세포의 침윤 정도가 높았고, 桃仁을 도포하였을 때 Control군에 비하여 저농도인 PS-L군, 고농도인 PS-H군 모두에서 유의하게(**p < 0.01) 감소하였다(Figure 4).

4. 桃仁이 혈청 IgE와 cytokine 생성에 미치는 영향

桃仁을 투여함으로써 혈청 IgE와 cytokine 생성이 변화하였는지 확인하였다. 대표적인 면역학적 지표인 IgE와 IL-6 수치를 측정하기 위하여 실험을 종료한 후 채취한 마우스 혈액

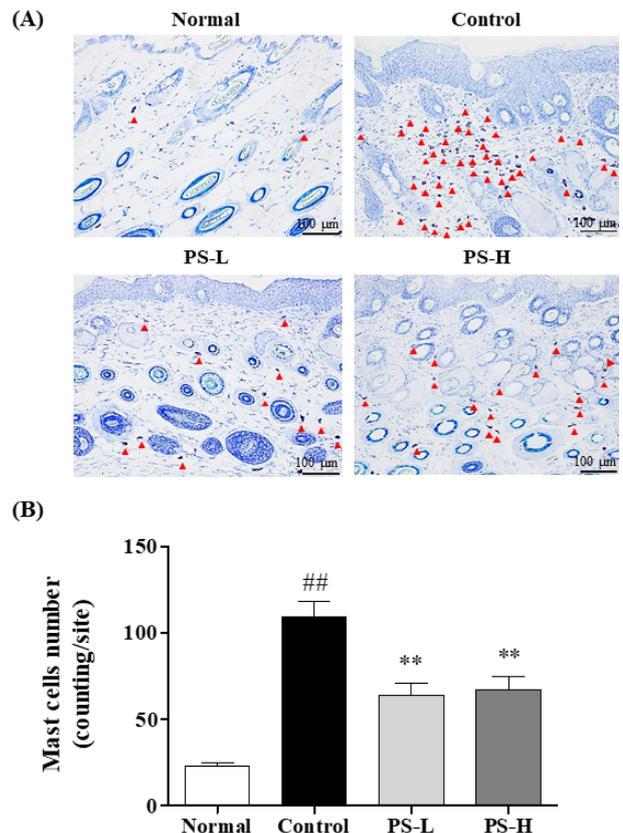


Figure 4. The effect of PS on mast cell infiltration in DNCB-induced BALB/c mice. (A) The infiltration of mast cells (red arrow heads) in the dermis was measured by the toluidine blue staining of skin sections (magnification: 200×, scale bar: 100 μm). (B) The infiltration of mast cells was counted in three sites. The data represent the mean ± SEM. ##p < 0.01 normal vs. control and **p < 0.01 control vs. PS.

으로부터 분리한 혈장을 사용하여 ELISA assay를 진행하였다(Figure 5). IgE 수치는 Normal군에 대비하여 Control군에서 유의하게 증가 하였으며, 桃仁을 투여한 군에서는 농도 의존적으로 감소하는 패턴을 보이며 특히 고농도인 PS-H군에서 유의한 효과(*p < 0.05)를 보였다. IL-6 수치도 IgE와 마찬가지로 Normal군에 비해 Control군에서 급격히 증가하였고, 桃仁을 투여하였을 때는 Control군과 대비해 IL-6의 수치가 농도 의존적으로 감소했으며 고농도인 PS-H군에서 유의성(*p < 0.05)을 가졌다.

5. 桃仁이 HaCaT cell 생존율에 미치는 영향

MTS assay를 통하여 HaCaT cell에서 桃仁의 세포 독성을 측정하였다. 桃仁을 0~400 μg/ml까지 처리한 결과 최고농도인 400 μg/ml까지 HaCaT cell에서 100%의 생존율을 나타내며 독성을 보이지 않았다(Figure 6).

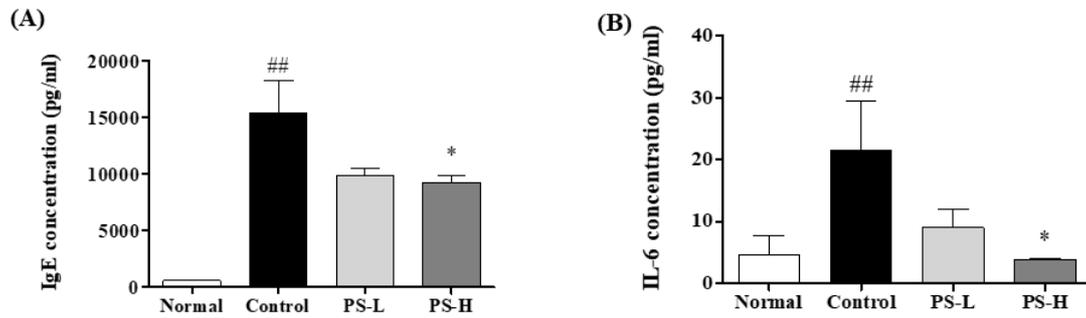


Figure 5. The effect of PS on serum IgE and IL-6 level DNCB-induced in BALB/c mice. (A, B) The concentration of total IgE and IL-6 in the serum was determined by ELISA. The data represent the mean \pm SEM. ^{##} $p < 0.01$ normal vs. control and ^{*} $p < 0.05$ control vs. PS.

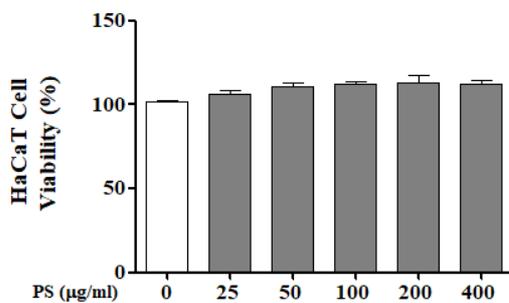


Figure 6. Cytotoxicity of PS in HaCaT cells. HaCaT cells were used in MTS assay at 24 hours after being treated with various concentrations of PS. Data represent the means \pm SEM of three independent experiments.

6. 桃仁이 HaCaT cell에서 TARC 유전자 발현에 미치는 영향

HaCaT cell에 TNF- α 와 IFN- γ 를 처리한 뒤 염증성 피부 질환에서 중요한 케모카인으로 알려진⁴⁰⁾ TARC를 유발하여 桃仁의 효과를 확인하고자 RT-PCR을 진행하였다. 그 결과 Figure 7과 같이 Normal과 비교하였을 때, 桃仁을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 한 군에서 유의한 효과(^{*} $p < 0.05$)를 보였으며, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 군에서는 매우 유의한 효과(^{**} $p < 0.01$)를 나타내었다.

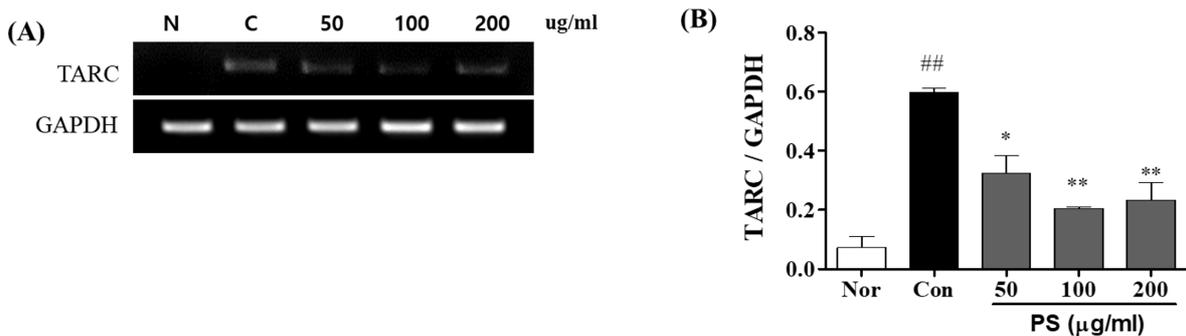


Figure 7. Effects of PS on mRNA expression in TNF- α /IFN- γ stimulated HaCaT cells. (A) The degree of TARC expression was examined by RT-PCR. (B) mRNA expression was measured using Image J software. Each data represents the mean SEM. ^{##} $p < 0.01$ normal vs. control and ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ control vs. PS.

IV. 고 찰

본 연구에서는 아토피 피부염에 대한 桃仁의 치료 효과를 실험적으로 연구하였다. DNCB에 의해 유도된 동물 아토피 모델에 桃仁을 투여하여 표피와 진피에서의 과각화, 호산구와 비만세포의 조직 침윤 정도, 혈청 IgE와 염증성 사이토카인 IL-6의 변화를 확인하였다. 또, TNF- α 와 IFN- γ 로 HaCaT 세포에 염증을 유도한 후 桃仁을 투여하여 TARC 발현 정도를 측정하였다. 연구 결과 桃仁은 아토피 피부염 동물모델의 표피와 진피의 두께를 줄이고, 조직 내 호산구와 비만세포의 침

윤을 완화시켰으며, 혈청 IgE와 염증성 사이토카인인 IL-6의 수준을 저하시켰다. 또한, HaCaT 세포에서의 TARC 발현을 유의하게 감소시켰다.

DNCB를 반복 도포한 BALB/c mice에서는 도포 부위에서 흉반과 부종, 피부 소양감 증가, 표피의 비후화, 진피에서 면역세포 침윤, 혈액 내 Th2 면역 반응 관련 수치의 증가가 나타나고, 이는 다른 동물 모델과 비교하여 인체에서의 아토피 피부염 양상과 가장 유사하다. 또, 증상의 재현성과 경제성 측면에서도 우수하여 아토피 피부염 동물 실험 모델로서 적합하다^{40,41)}.

아토피 피부염의 병리조직학적 양상은 급성기에서 해면화(spongiosis)와 수포형성(blister formation)이 특징적이다. 해면화는 표피에서 각질형성세포 사이에 조직액이 증가하여 세포간의 간격이 넓어진 상태를 의미한다. 일부에서 세포내의 부종이 나타나기도 한다⁴²⁾. 조금 더 지속적인 병태에서는 표피능선(reteridge)의 규칙적인 연장소견이 관찰되며 해면화 반응과 세포침윤은 비교적 경미한 양상을 띠게 된다. 시간이 지남에 따라 과다각화증과 유사각화증, 썩기모양의 고과립증 등이 발생하며 미세혈관의 증식 및 혈관벽이 두꺼워지는 소견 등 만성 단순태선과 유사한 양상을 보인다. 굵은 작용 때문에 표피층 각질세포의 괴사 및 가피, 미란, 궤양 등이 관찰되기도 한다⁴³⁾. 본 연구에서 桃仁 투여가 DNCB 유도 아토피 피부염 피부 조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Masson's trichrome 염색을 실시하였다. Masson's trichrome은 콜라겐의 섬유화를 확인하기 위해 사용하기도 하지만, 표피와 진피 그리고 하피의 구분을 명확하게 할 수 있어 종종 표피 및 진피의 두께 측정에 사용한다⁴⁵⁾. 그 결과 桃仁을 도포한 피부에서 Control군에 대비하여 표피와 진피의 두께가 농도 의존적으로 감소하였고 고농도인 PS-High군에서 유의한 효과를 보였다. 이는 桃仁이 염증성 부종과 피부 비후화를 호전시켜 아토피 피부염 염증 반응을 억제함을 의미한다.

선천성 면역세포 중 하나인 호산구는 그 수와 호산구 과립 단백질(eosinophil granule protein)의 수치가 아토피 피부염의 병변 및 말초 혈액 내에 증가되어 있어 아토피 피부염과 깊은 연관성을 가진 것으로 여겨진다⁴⁶⁾. 또, 피부 조직 내 침윤된 호산구의 수와 아토피 피부염의 중증도는 상관이 있는 것으로 알려져 있으며, 만성 아토피 피부염의 피부 병변에서 호산구가 증가되어 있어 아토피 피부염의 만성화에도 관여할 것으로 생각된다⁴⁷⁾. 호산구는 그 활성이 과립구-대식세포 집락 자극인자(granulocyte-macrophage colony stimulating factors, GM-CSF), IL-5, eotaxin에 의해서 유도되고⁴³⁾, 자극을 받으면 eosinophil cationic protein, eosinophil-derived neurotoxin, IL-1 β , IL-6, IL-31, CXCL1, CXCL8, CCL2, CCL18 및 CCL26 같은 다양한 사이토카인, 케모카인 등 염증성 매개 물질을 분비하여 아토피 피부염의 염증 반응에 관여하게 된다⁴⁷⁾. 본 실험에서는 桃仁 투여가 DNCB 유도 아토피 피부염 동물 피부 조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 H&E 염색을 실시하여 조직 내 호산구의 침윤을 관찰하였다. 그 결과 桃仁을 도포한 피부에서 Control군에 대비하여 호산구의 조직 침윤이 농도 의존적으로 감소하였고, 고농도인 PS-High군에서 유의한 효과를 보였다. 이는 桃仁이 호산구의 활성화를 감소시켜 아토피 피부염에서 염증 반응을 완화함을 의미한다.

아토피 피부염의 일부는 IgE 항체와 비만세포와 관련된 면역 기전에 의해 발생된다. 항원이 유입되면 monocyte, macrophage, B세포 등이 항원제시세포(antigen presenting cell)에 의해서 처리된 후 HMC class II와 함께 T세포에 전달되고, T세포가 활성화되어 cytokine인 IL-4, IL-5 등을 유리시킨다. 이 cytokine은 B세포에 작용하여 IgE 항체를 생산 및 유리시키고 IgE 항체는 비만세포를 포함한 각종 세포 표면에 있는 Fc ϵ 수용체에 결합되어 IgE 수용체의 상호결합(antigen-induced IgE receptor cross linking)이 일어나고, 이어서

알레르겐에 노출되면 비만세포는 활성화된다¹¹⁾. 탈과립된 비만세포는 histamine, serotonin, prostaglandins, leukotrienes 등을 분비하고⁴⁷⁾, TNF- α , GM-CSF 등 염증성 cytokine과 IL-5, IL-6, IL-13 등 Th2 사이토카인을 합성하여 분비한다⁴⁸⁾. 실제로 아토피 피부염의 염증 부위에서 비만세포의 활성화가 과도하게 이루어진 것이 관찰되며⁴⁹⁾, 그 활성화도와 관련된 줄기세포 인자(stem cell factor)가 염증의 중증도와 연관이 있다고 보고된 바 있다⁵⁰⁾. 본 연구에서는 桃仁 투여가 DNCB 유도 아토피 피부염 피부 조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Toluidine blue 염색을 실시하여 조직 내 비만세포의 침윤을 관찰하였다. 그 결과 Control군에 대비하여 저농도인 PS-Low군과 고농도인 PS-High군 모두에서 비만세포의 조직 침윤이 유의하게 감소하였다. 이는 桃仁이 비만세포의 활성화를 감소시켜 아토피 피부염에서 염증 반응을 억제함을 의미한다.

아토피 피부염은 유전적 소인을 지닌 사람이 다양한 환경 요인에 노출되면서 발생하며, 특히 Th2 림프구에 의한 면역 반응이 유도됨으로써 알레르겐에 대한 특이 IgE가 만들어져 이를 통해 과민반응을 일으킨다고 알려져 있다⁴⁷⁾. 아토피 피부염 환자에게 볼 수 있는 특징적인 검사소견은 혈청 IgE의 증가이고, 이는 환자의 대략 80%에서 볼 수 있다⁵¹⁾. 아토피 피부염 환자는 유전적으로 결합이 있는 피부 장벽을 가지므로 보통 사람과 달리 병변이 없는 피부라도 정상적이지 않고 아토피 피부염 급성 반응은 랑게르한스 세포에 의해 매개된다⁵²⁾. 알레르겐에 노출되어 IgE와 랑게르한스세포에 있는 Fc ϵ 수용체가 결합하면 랑게르한스세포는 CD4+ T세포를 피부로 유도하는 IL-16과 단백질 화학주성 단백질을 생산하고 기억 Th2 세포를 활성화하며 항원을 T세포에 제시하여 민감화 시키고 림프절로 이동하여 naive T 세포 (Th0 세포)가 Th2 세포로 분화되도록 촉진한다. 병위로 이동한 단백질은 Inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC)로 분화하고 전구염증성 사이토카인인 IL-1, IL-6, TNF- α 를 분비한다. 민감화된 Th2 세포는 IL-4, 5, 13과 같은 사이토카인을 생산하며, 이들은 면역 글로블린 동종형을 IgE로 전환시켜 Th2 세포의 생존을 촉진하고, 전환된 IgE는 알레르겐 반응을 증폭시켜 양성 피드백(positive feedback) 고리를 형성한다. 이러한 Th2 면역반응과 면역반응의 증폭은 아토피 피부염의 초기 병변 생성에 중요한 역할을 한다⁴⁷⁾.

한편, IL-6는 nuclear factor of activated T cells (NFAT)가 매개하는 전사를 촉진하여 naive CD4+ T 세포가 effector Th2 세포로 분화하게 하며, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1의 발현을 상향 조절하여 Th1 세포 분화를 억제하는 작용을 함으로써 Th2 면역반응 유도에 일조한다⁵³⁾. 본 연구에서는 IgE와 IL-6 수치를 측정하기 위하여 실험을 종료한 후 채취한 마우스 혈액으로부터 분리한 혈장을 사용하여 ELISA assay를 진행하였다. 혈청 IgE와 IL-6 수치는 Normal군에 비해 Control군에서 유의하게 증가하여 염증 반응 지표 물질임을 확인하였고, 2가지 수치 모두 桃仁을 투여한 군에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보이며 고농도인 PS-High군에서 유의한 감소를 보였다. 따라서 桃仁 투여가 아토피 피부염에서 혈청 IgE과 IL-6 수치를 감소시켜 염증을 억제하는 효과가 있다고 생각된다.

HaCaT 세포는 표피의 대부분을 차지하는 각질형성세포로서,

다양한 염증성 사이토카인(cytokine)과 케모카인(chemokine)을 생성하여 피부의 면역 반응 실험에 주로 사용되고 있다⁵⁴⁾. 사람의 피부 각질형성세포주에 대해 桃仁 추출물이 미치는 세포 독성 효과를 알아보기 위해 0 ~ 400 mg/ml 농도 범위에서 MTS assay를 수행하였다. 추출물을 처리한 결과 400 mg/ml 농도까지 100% 생존율로 독성을 보이지 않았다. 이 결과를 바탕으로 본 실험에서는 세포 생존율에 영향을 주지 않고 반복 처리 및 처치기간을 고려하여 200 mg/ml 이하의 농도까지를 TARC 발현 억제능 검증의 최대 농도로 결정하였다.

Thymus and activation-regulated chemokine (TARC)는 T세포에 표현된 C-C chemokine receptor 4 (CCR 4)에 작용을 하여 Th2 세포의 염증 병소로의 이동과 침윤을 유도하는 역할을 하는 대표적인 Th2 케모카인이다⁵⁵⁾. TARC는 내피세포, 수지상세포, 각질형성세포를 포함한 다양한 세포가 생산하는 것으로 추정되고, 아토피 피부염에서 인테그린 의존적 부착과 T 세포의 혈관벽 통과를 유도하여 T 세포가 병터로 모이는 첫 번째 단계에서 작용하는 것으로 밝혀지기도 하였다⁵⁶⁾. TARC의 발현은 피부 병변 부위의 표피 기저층에서 매우 증가되어 있으며⁵⁷⁾, 혈청 TARC 수치는 아토피 피부염 환자에서 유의하게 상승되어 있고, 그 정도가 증상의 중증도와 비례하여⁵⁸⁾, 아토피 피부염의 중증도를 검사하는 실험실적 방법으로 사용되고 있다⁴⁷⁾. 더욱이 TARC의 농도는 전체 아토피 피부염의 약 80%를 차지하는 IgE 매개성 아토피 피부염에서 뿐만 아니라 나머지 약 20%를 차지하는 비 IgE 매개성 아토피 피부염에서도 질병의 진단 및 중증도 평가에 객관적인 지표로서 의미를 가진다⁵⁹⁾. 이번 연구에서는 PT-PCR로써 TARC의 발현을 조사하였다. Control군에서 Normal군에 비해 TARC의 mRNA 발현은 유의하게 증가하였으며, 桃仁을 투여한 군에서는 농도 의존적으로 유의한 감소 효과를 보였다. 따라서 桃仁 투여가 아토피 피부염에서 TARC의 mRNA 발현을 억제시켜 염증을 억제하는 효과가 있다고 보인다.

본 연구에서는 BALB/c mice 등 피부에 DNCB 도포로 유발된 아토피 피부염 모델에 대하여 표피와 진피의 두께, 호산구와 비만세포의 침윤도, 혈청 IgE와 IL-6의 수치 변화에서 桃仁이 조직학적, 혈액학적으로 염증 반응을 유의하게 감소시킨다는 사실과 HaCaT 세포에 TNF- α 와 IFN- γ 로 염증을 유도한 모델에 대하여 桃仁 투여가 TARC 발현을 억제하여 염증 반응을 유의성 있게 감소시킨다는 사실을 확인하였다. 이를 바탕으로 아토피 피부염 치료에 桃仁을 활용할 수 있는 근거가 마련되었다고 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 桃仁의 아토피 피부염에 대한 치료 효과를 연구하기 위하여 DNCB 유도 아토피 피부염 동물 모델에 대하여 표피와 진피의 두께, 호산구와 비만세포의 조직 침윤도, 혈청 IgE와 염증성 사이토카인 IL-6의 수치를 측정하고, TNF- α 와 IFN- γ 로 염증반응을 유도한 HaCaT 세포 모델에 대하여 TARC 발현을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 桃仁은 고농도 처리군에서 아토피 피부염 유도 생쥐 모델의 표피와 진피 두께를 유의하게 감소시켰다.
2. 桃仁은 고농도 처리군에서 아토피 피부염 유도 동물 모델의 피부 조직 내 호산구 침윤을 유의하게 감소시켰다.
3. 桃仁은 저농도 처리군과 고농도 처리군 모두에서 아토피 피부염 동물 모델의 피부 조직 내 비만세포 침윤을 유의하게 감소시켰다.
4. 桃仁은 고농도 처리군에서 아토피 피부염 유도 생쥐 모델의 혈청 IgE와 염증성 사이토카인 IL-6의 수치를 유의하게 감소시켰다.
5. 桃仁은 염증이 유도된 HaCaT 세포에서 TARC 발현을 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과에서 桃仁은 아토피 피부염 유발 동물 모델에서 피부의 과각화를 완화하며 염증성 면역 세포와 혈청 IgE 등의 발현을 억제하였다. 이러한 결과는 도인의 아토피 피부염의 임상적 적용 가능성에 대한 객관적 연구자료가 될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다. (No. 2020R1A2C2005836).

References

1. Leung DYM, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid OA. New insights into atopic dermatitis. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(5): 651-57.
2. Otsuka A, Nomura T, Rerknimitr P, Seidel JA, Honda T, Kabashima K. The interplay between genetic and environmental factors in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Immunological Reviews*. 2017;278(1): 246-62.
3. Yoon NY, Wang HY, Jun M, Jung M, Kim DH, Lee NR, et al. Simultaneous detection of barrier- and immune-related gene variations in patients with atopic dermatitis by reverse blot hybridization assay. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2018; 43(4):430-36.
4. Weidinger S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, Irvine AD. Atopic dermatitis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018;4.
5. Bieber T. Atopic Dermatitis. *Annals of Dermatology*. 2010;22(2):125-37.

6. KJ D. Textbook of Dermatology. Korean Medical Books, 2014:202-13.
7. Kim JY, Yang Y. Effects of Atopic Dermatitis on Suicidal Ideation, Plans and Attempts in Young Adult. Journal of Korean Academy of Community Health Nursing, 2017;28(4):504-12.
8. Kim KH, Park AY, Kim JS. Factors associated with atopic dermatitis in Korean adults: the Korean National Health and Nutrition Survey 2008. The Korean Journal of Rehabilitation Nursing, 2012; 15(2):83-90.
9. Yun Y-H, Choi I-H. A study on the development of traditional Korean medicine clinical practice guideline for atopic dermatitis. The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology, 2012;25(2):38-48.
10. Kim K, Kim N, Kim Y, Kim J, Park M, Park S. Text of Traditional Korean Dermatology & Surgery. Busan: Seonu, 2007:129-33.
11. S N. eBook of DERMATOLOGY. IBC planning company, 2006:489-538.
12. Lee M. Development of clinical practice guideline on Korean Medicine using evidence based medicine. Daejeon: Institute of Oriental Medicine, 2013:3-17.
13. Kim YH, Lee HC. 아토피 피부염에 관(關)한 동(東) 서의 학적(西醫學的) 고찰(考察). The Journal of Pediatrics of Korean Medicine, 1993;7(1):121-33.
14. Sohn K, Lee J, Jee S. A philological study on demonstration of atopic dermatitis. J East-West Med, 2009;34(4):15-24.
15. Gu D-M. A clinical study based on Sasang Consitutional Medicine on the treatment of atopic dermatitis. Journal of Sasang Constitutional Medicine, 2002;14(2):69-77.
16. Son B-K, Choi I-H. 6 Cases of Acute Lesion of Atopic Dermatitis Diagnosed as damp-heat type. The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology, 2007;20(2) :213-29.
17. Son SH, Ahn SH, Park S-Y, Kim K. Hwangnyeonhaedok-tang Extracts Ameliorates Atopic Dermatitis via Epidermal Lipid Barrier Regeneration in NC/Nga Mouse. The Journal of Pediatrics of Korean Medicine, 2018;32(3):90-99.
18. Kim J-E, Lee H-C, Kang E-J, Choi J-W, Kim J-H, Park S-Y, et al. Effects of Daecheonglyong-tang on Atopic Dermatitis Induced by DNCB in Mice. The Journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, 2019;32(3): 58-76.
19. Kim SH, Jung HS, Lee JY, Kim DG, Cho BG. Effect of Lithospermum erythrorhizon on the atopic dermatitis. The Journal of Pediatrics of Korean Medicine, 2004;18(1):63-75.
20. Lee JY, Kim DG, Han KC. Effects of Arctii Fructus on the Atopic dermatitis. The Journal of Pediatrics of Korean Medicine, 2004;18(2):107-17.
21. Kim K, Lee J, Kim D. Effects of Mori folium on the atopic dermatitis. J Kyung Hee Univ Med Cent, 2004;20(1):37-45.
22. Park JM, Chae JW. Effects of Aurantii Immaturus Fructus (AI) on atopic dermatitis (AD) induced by DNCB in mice. The Journal of Pediatrics of Korean Medicine, 2015;29(1):27-43.
23. Lim KM, Ko HJ, Choi JH, Park SY, Kim JH, Jung M. Effects of Adenophorae Radix (AR) on Atopic Dermatitis (AD) Induced by DNCB in Mice. The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology, 2017;30(3):31-45.
24. Committee NMUJTC. herbal medicine. Yeonglimsa, 2004:462-63.
25. JH H. Oriental medicine Pharmacology. EuiSeongDang, 2004:377-79.
26. HC K. Oriental medicine Pharmacology. Jibmoondang, 2017:336-37.
27. Wang N, Liu Q, Peng D, Wang L, Wang S. Experimental study on anti-thrombus effect of different extracts from Semen Persicae. Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese medicinal materials, 2002;25(6):414-15.
28. Fukuda T, Ito H, Mukainaka T, Tokuda H, Nishino H, Yoshida T. Anti-tumor promoting effect of glycosides from Prunus persica seeds. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2003;26(2):271-73.
29. Song M-Y, Kim H-J, Lee M-J. Neuroprotective Effect of Semen Persicae in Middle Cerebral Artery Occlusion Rats. J Korean Oriental Med, 2009; 30(2):117-26.
30. Hwang HJ, Lee HJ, Kim CJ, Shim I, Hahm DH. Inhibitory effect of amygdalin on lipopolysaccharide-inducible TNF-alpha and IL-1beta mRNA expression and carrageenan-induced rat arthritis. J Microbiol Biotechnol, 2008;18(10):1641-47.
31. Yang Y, Zhao J, Song X, Li L, Li F, Shang J, et al. Amygdalin reduces lipopolysaccharide-induced chronic liver injury in rats by down-regulating PI3K/AKT, JAK2/STAT3 and NF-κB signalling pathways. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2019;47(1):2688-97.
32. Lee HM, Moon A. Amygdalin regulates apoptosis and adhesion in Hs578T triple-negative breast cancer cells. Biomolecules & therapeutics, 2016; 24(1):62.
33. GS K. Rare medical book integration. Han Seong Sa, 1976:111-12.
34. SZ L. Bencao Gangmu. In Min Wi Saeng publishing Co, 2002:1742-44.

35. Jun H, Donguibogam. BUBIN PUBLISHERS CO. 2011:847–76.
36. Kim H, Park J. Inhibitory effect of saingheylyunbooem on compound 48/80 stimulated allergic reaction. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2010;24(1):48–54.
37. Yu HY, Kim KB, Min SY, Kim JH. Case study of the effects of Saenghyeoryunbueum on atopic dermatitis. *The Journal of Pediatrics of Korean Medicine*. 2008;22(1):35–48.
38. Kim GJ, Choi HG, Kim JH, Kim SH, Kim JA, Lee SH. Anti-allergic inflammatory effects of cyanogenic and phenolic glycosides from the seed of *Prunus persica*. *Natural product communications*. 2013; 8(12):1934578X1300801221.
39. Baroni A, Paoletti I, Greco R, Satriano R, Ruocco E, Tufano M, et al. Immunomodulatory effects of a set of amygdalin analogues on human keratinocyte cells. *Experimental dermatology*. 2005;14(11): 854–59.
40. Vestergaard C, Yoneyama H, Murai M, Nakamura K, Tamaki K, Terashima Y, et al. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(8): 1097–105.
41. Yun J-W, Kim H, Kang H-J, Koh J-Y, Kim B-H. Comparative evaluation of animal models for atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Laboratory Animal Research*. 2008;24(1):59–66.
42. Lee KS, Jeong ES, Heo SH, Seo JH, Jeong DG, Choi YK. A novel model for human atopic dermatitis: application of repeated DNCB patch in BALB/c mice, in comparison with NC/Nga mice. *Laboratory Animal Research*. 2010;26(1):95–102.
43. Ahn S, Park B, Won J, Cheon S. *An Atlas of Atopic Eczema*. Seoul: Koonja publishing INC. 2007: 107–15.
44. GH K. *Color atlas of dermatopathology*. The Korean Society For Investigative Dermatology. 2017: 83–90.
45. Neutelings T, Nussgens BV, Liu Y, Tavella S, Ruggiu A, Cancedda R, et al. Skin physiology in microgravity: a 3-month stay aboard ISS induces dermal atrophy and affects cutaneous muscle and hair follicles cycling in mice. *npj Microgravity*. 2015;1:15002.
46. Simon D, Braathen LR, Simon HU. Eosinophils and atopic dermatitis. *Allergy*. 2004;59(6):561–70.
47. Kim JW LG. *Atopic dermatitis*. Gun Ja publishing Co. 2017:9–10, 12–13, 23–28, 37–40, 45–46, 71, 95–105.
48. Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(2):93–104.
49. Irani AMA, Sampson HA, Schwartz LB. Mast cells in atopic dermatitis. *Allergy*. 1989;44:31–34.
50. Kanbe T, Soma Y, Kawa Y, Kashima M, Mizoguchi M. Serum levels of soluble stem cell factor and soluble KIT are elevated in patients with atopic dermatitis and correlate with the disease severity. *British Journal of Dermatology*. 2001;144(6): 1148–53.
51. Leung DY BT. *Atopic dermatitis*. 2003;361: 151–60.
52. Alan DI PH, Albert CY. *Harper's Textbook of Pediatric Dermatology*. Wiley-Blackwell. 2011;161: 1–6.
53. Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular immunology*. 2002;39(9):531–36.
54. Hong SJ, Lee WJ, Jo EH, Ahn SH. The Effect of *Lactobacillus* Mixture Culture Fluid Extracts on Atopic Dermatitis Chemokine Expression of in HaCaT Cells. *Korean Journal of Acupuncture*. 2017;34(2):82–87.
55. Campbell J, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, et al. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature*. 1999;400(6746): 776.
56. Hijnen D, de Bruin-Weller M, Oosting B, Lebre C, de Jong E, Bruijnzeel-Koomen C, et al. Serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) levels in allergic diseases: TARC and CTACK are disease-specific markers for atopic dermatitis. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2004; 113(2):334–40.
57. 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. *Journal of Investigative Dermatology*. 2000; 115(4):640–46.
58. Shimada Y, Takehara K, Sato S. Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis. *Journal of dermatological science*. 2004;34(3):201–08.
59. Song TW, Kwon BC, Choi SY, Shin YH, Lee KE, Yang HS, et al. Increased serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) levels in children with atopic dermatitis. *Pediatric Allergy and Respiratory Disease*. 2005;15(3):250–56.