

淸肌散의 iNOS 발현과 NO 생성 억제가 NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염에 미치는 영향

안상현 · 김호현¹ · 김진택*

동국대학교 한의과대학 해부학교실, 1:세명대학교 한의과대학 생리학교실

Cheonggi-san Inhibits Atopy Dermatitis in NC/Nga Mouse through Regulation of iNOS mRNA Expression & NO production

Sang Hyun Ahn, Ho Hyun Kim¹, Jin Taek Kim*

Department of Anatomy, Oriental Medicine College, Dongguk University,
1: Department of Physiology, Oriental Medicine College, Semyung University

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) are important inflammation enzyme and severe up-nitric oxide (NO) production by this enzyme has been intricate with pathogenesis of atopy dermatitis. The present study was designed in order to determine whether Cheonggi-san could inhibit atopy dermatitis through modulation of iNOS mRNA expression and NO production. We found that iNOS mRNA expression and NO production in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide dose-dependantly decreased by Cheonggi-san extract treatment (0.5 - 2.0 mg/ml). The distribution of iNOS positive reacted cell in NC/Nga mice with atopy dermatitis were decreased by Cheonggi-san extract treatment (2.5 ml/kg/day) and apoptosis were increased. These data likely indicate that Cheonggi-san may act as inflammatory regulator for atopy dermatitis and may be possible to develop useful agent for chemoprevention of NO intricate inflammatory diseases.

Key words : Cheonggi-san, Atopy dermatitis, iNOS, NO, NC/Nga mice

서론

산화스트레스는 활성산소종/활성질소종(reactive oxygen species, ROS/reactive nitrogen species, RNS)의 발생과 항산화 방어제(antioxydant defence system)간에 심각한 불균형을 초래되는 상황을 말한다. 산화질소(Nitric oxide, NO)의 소모가 동반된 산화반응은 이차적인 산화(oxidation), 질소화(nitration) 및 nitrosation/nitrosylation 물질을 생성하고 이러한 이차적인 nitrated species는 독특한 염증성 세포 신호 전달성을 나타낸다¹⁻³. 염증성 산화물에 의한 산화, 질소화스트레스는 내피세포 기능성 장애⁴, 고혈압⁵, 동맥경화⁶, 허혈/재관류 손상⁷ 및 염증반응⁸의 병리기전을 주도한다.

다양한 염증성 자극은 큰포식세포내 inducible nitric oxide

synthase(iNOS)를 발현시켜 L-arginine과 산소분자로부터 많은 양의 NO 생성을 촉진시킨다⁹. 최근에는 iNOS의 전사인자인 NF-κB/Rel의 활성을 억제하여 NO 생성을 저해함으로써 항염증 효과를 유도하는 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 특히 *Cirisium rhinoceros*⁹, *Curcuma longa*¹⁰, *Rosmarinus officinalis*¹¹ 등과 같이 한약에서 NO 생성 조절제를 찾기 위한 많은 연구가 진행되고 있다.

아토피 피부염에서는 각질층내 ceramide 감소로 인한 sphingosine 저하가 protein kinase C(PKC) 활성을 유도하고¹², 그 결과 IκB protein이 인산화되어 분해됨으로서 유리된 전사인자 NF-κB가 핵으로 들어가 target 유전자의 NF-κB binding site에 결합하여 iNOS 발현에 의한 NO 생성이 증가되어 염증반응이 유도된다고 보고되었다^{13,14}.

아토피 피부염의 한의학적 범주로는 胎熱¹⁵, 乳癰¹⁶, 奶癰¹⁷, 胎癩¹⁸ 등에 해당하며, 그 병인병기를 稟性不耐 濕熱內蘊한 상태에서 다시 風濕熱邪의 浸淫을 받아 內外邪氣가 相搏하여 肌膚

* 교신저자 : 김진택, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학

· E-mail : omakjt@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2648

· 접수 : 2007/07/05 · 채택 : 2007/07/25

에 발생하는 것으로 보았다¹⁹⁾. 아토피 피부염에 대한 한의학적 內治法으로 증상의 발현양상, 病因病機, 발병시기에 따라 다양한 처방이 사용되고 있다¹⁹⁾. 그 중에서도 清肌散은 荊防敗毒散에 天麻, 蟬退, 薄荷를 加味한 처방으로 元代 危亦林的 『世醫得效方』²⁰⁾에 처음 수록된 이래 表鬱로 인해 열 발산이 원활하지 않아 발생하는 피부질환에 사용되었다²¹⁾. 清肌散 이전 연구로 진통, 진정, 해열, 항염증, 항histamine 작용²²⁾, 항알레르기 효과²³⁾, 대식세포의 탐식능 증가와 혈관투과성 감소를 통한 과민반응 억제 효과²⁴⁾ 등이 보고되었다.

본 연구는 청기산의 iNOS 생성 조절을 통한 항염증효과가 아토피 피부염에 미치는 영향을 조사하였는데, lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 RAW 264.7 macrophages에서 청기산 추출물 농도에 따른 iNOS mRNA 발현과 NO의 생성 변화를 측정하였고, 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에서 iNOS 생성의 면역조직학적 변화를 관찰하였다. 아울러 apoptosis 유발 변화도 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물과 아토피 피부염의 유발

대한실험동물센터에서 분양 받은 태령 6주된 NC/Nga계 암컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 20 g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 대조군, 아토피 피부염 유발군(AD군), 아토피 피부염 유발 후 청기산 투여군(CG스군)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다. 아토피 피부염은 우선 생쥐 등쪽 부위 피부를 면도한 다음 cellophane tape(3 M, USA) 5회 첩포를 통해 각질층(stratum corneum)의 최상부(desquamation)를 제거하였다. 그런 다음 계면활성제(surfactant)의 하나인 5% sodium dodecyl sulfate(SDS : Sigma, USA) 1 ml을 면봉으로 20회 문질러서 각질층의 lipid lamella를 제거한 후 D. pteronyssinus crude extract solution(10 mg/ml, Woongbee meditech, Korea) 25 µl을 3주 동안 주 3회씩 도포하였다.

2. 세포주와 세포배양

실험에 사용한 마우스의 RAW 264.7 macrophages는 Korean Cell Line Bank(KCLB; Korea)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% Fetal Bovine Serum(Sigma, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Sigma)를 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다.

3. 청기산의 제조, 투여 및 첨가

청기산(Cheonggi-san) 2첩을 증류수 500 ml에 넣고 2시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml으로 감압·농축하여 CG스군에 D. pteronyssinus crude extract solution 처리 시작 후 3주 동안 2.5 ml/kg/day 량으로 구강투여 하였다. In vitro에 사용되는 청기산의 추출은 감압·농축

후 동결 건조하여 사용하였고, MTT assay 결과 청기산 추출물 10 mg/ml까지는 세포생존률의 변화가 일어나지 않아 0.5, 1.0, 1.5 그리고 2.0 mg/ml를 첨가량으로 결정하였다.

Table 1. The amount and composition of Cheonggi-san

Herb	Scientific Name	Amount(g)
荊芥	<i>Nepetae Herba</i>	4 g
防風	<i>Ledebouneillae Radix</i>	4 g
人蔘	<i>Ginseng Radix alba</i>	4 g
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	4 g
前胡	<i>Anthrisci Radix</i>	4 g
羌活	<i>Angelicae Koreanae Radix</i>	4 g
獨活	<i>Araliae Cordatae Radix</i>	4 g
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4 g
赤茯苓	<i>Hoelen rubra</i>	4 g
桔梗	<i>Platycody Radix</i>	4 g
枳殼	<i>Aurantii Fructus</i>	4 g
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4 g
天麻	<i>Gastrodiae Rhizoma</i>	4 g
薄荷	<i>Mentae Folium</i>	4 g
蟬退	<i>Cicadae Periostracum</i>	4 g
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	6 g
Total amount		66 g

4. iNOS mRNA 발현 측정

염증효소인 iNOS mRNA 발현 양상을 조사하기 위해 역전사중합효소연쇄반응법(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. RAW 264.7 macrophages - 5×10⁵ cells/well을 6 well에 plating 하고 12시간 후에 lipopolysaccharide(1 µg/ml)를 2시간 처리하여 iNOS mRNA 발현을 유도한 후 청기산 추출물 0.5, 1.0, 1.5 그리고 2.0 mg/ml을 농도별로 첨가하여 24시간동안 배양하였다. 배양한 후 수거한 RNA를 trizol reagent(Sigma)를 사용하여 추출하고 UV-spectrophotometer로 순도와 농도를 측정하였다. RT-PCR kit(Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 iNOS primer(sense, 5'-AGA CTG GAT TTG GCT GGT CCC TCC-3'; antisense, 5'-AGA ACT GAG GGT ACA TGCT GGA GCC-3')를 PCR machine으로 반응시켰다. PCR 산물은 1-2% agarose gel 상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 β-actin(sense, 5'-GGA GAA GAT CTG GCA CCA CACC-3'; antisense, 5'-CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GCT GG-3')의 증폭을 동시에 실시하였다.

5. Nitrite Assay

Nitrite assay를 통해 NO 생성량을 측정하였는데, 12시간 배양된 RAW 264.7 macrophages - 5 × 10⁵ cells/well에 LPS(1 µg/ml) 2시간 처리 후 청기산 추출물을 농도별(0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/ml)로 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양액 상층액 50 µl에 Greiss reagent(Sigma) 50 µl을 가하여 5분간 실온에서 반응시킨 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품으로 아질산나트륨(NaNO₂)을 사용하여 표준용량곡선을 작성하고, 질소산화물(nitric oxide, NO²) 생성을 산출하였다.

6. iNOS의 면역조직화학

D. pteronyssinus crude extract solution 처리 시작 후 3주 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. D. pteronyssinus crude extract solution 처리부위에서 얻어진 피부를 10% NBF에 실온에서 24시간동안 고정한 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5 μ m 두께로 연속절편을 만들었다. 피부절편에서 iNOS 생성 변화를 관찰하기 위해 항 iNOS 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 우선 절편을 proteinase K(20 μ g/ml, DAKO, Denmark)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum(DAKO)에서 12시간 동안 반응시켜 비특이적 면역반응을 억제하였다. 그리고 1차 항체인 mouse anti mouse iNOS(1:100, Santa Cruz Biotech, USA)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰으며, biotinylated goat anti-mouse IgG(DAKO)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 24시간 link 하였다. Avidin biotin complex(DAKO)에 1시간동안 실온에서 반응시키고 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB, Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

7. TUNEL Method

청기산의 apoptosis 유도 증가를 조사하기 위해서 in situ apoptosis detection kit(Intergen, USA)를 이용한 TUNEL (terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labelling) 방법을 실시하였다. 먼저 조직 절편을 proteinase K에 5분간 처리한 다음 equilibration buffer에서 20초간 반응시켰다. 그런 다음 strength TdT enzyme(36 μ l TdT enzyme : 72 μ l reaction buffer)을 처리하여 37 $^{\circ}$ C의 humidified chamber에서 1시간 동안 반응시킨 후 strength stop/wash buffer에서 10분 동안 처리하였다. Anti-digoxigenin-peroxidase에 1시간 동안 반응시킨 후 DAB를 처리하였다. Methyl green에 대조염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

8. 영상분석과 통계처리

Relative intensity, 면역조직화학 그리고 TUNEL method 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2 (Optima Co., USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 영상분석 결과는 Sigma plot 2000 (Sigma)을 통한 Student t test로 유의성을 검증하였다.

결 과

1. iNOS 발현 억제

LPS 처리 후 청기산 추출물 처리된 RAW 264.7 macrophages에서 iNOS mRNA 발현은 LPS 처리군보다 감소하였는데, 0.5 mg/ml에서 7.3%, 1.0 mg/ml에서 8.5%, 1.5 mg/ml에서 15.0% 그리고 2.0 mg/ml에서 26.7%로 농도-의존적 감소를 보였다(Fig. 1).

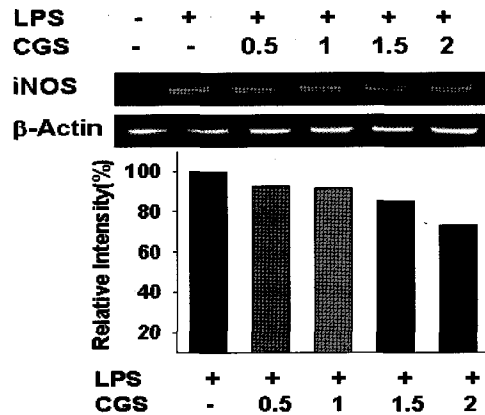


Fig. 1. Inhibition of LPS-induced iNOS mRNA expression by Cheonggi-san. The RAW 264.7 macrophages were treated with 1 μ g/ml of LPS for 2 hours prior to the addition of indicated concentrations(0.5 - 2.0 mg/ml) of Cheonggi-san, and the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced iNOS mRNA expression were dose-dependantly decreased in Cheonggi-san treated RAW 264.7 macrophages. Abbreviation, LPS, lipopolysaccharide; CGS, Cheonggi-san; iNOS, inducible nitric oxide synthase.

2. NO 생성 억제

LPS 처리된 RAW 264.7 macrophages에서 NO 생성은 421.25%(4.17 \pm 0.09 μ m/5 \times 10⁵ cells)로 증가한 반면, 청기산 추출물 처리된 RAW 264.7 macrophages에서는 유의성 있는 농도-의존적 감소를 보였다. 청기산 추출물 0.5 mg/ml 처리 시 30.22%(2.91 \pm 0.09 μ m/5 \times 10⁵ cells), 1.0 mg/ml 처리 시 40.05%(2.50 \pm 0.06 μ m/5 \times 10⁵ cells), 1.5 mg/ml 처리 시 55.40%(1.86 \pm 0.08 μ m/5 \times 10⁵ cells) 그리고 2.0 mg/ml 처리 시 60.19%(1.66 \pm 0.07 μ m/5 \times 10⁵ cells)로 감소하였다(Fig. 2).

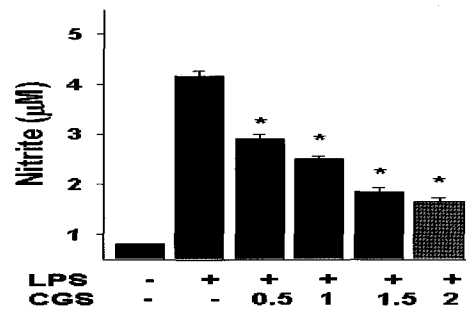


Fig. 2. Inhibition of LPS-induced NO production by Cheonggi-san. The cell were treated with 1 μ g/ml of LPS for 2 hours prior to the addition of indicated concentrations(0.5 - 2.0 mg/ml) of Cheonggi-san, and the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced NO production were dose-dependantly decreased in Cheonggi-san treated RAW 264.7 macrophages. Abbreviation, *, P < 0.05 compared with LPS alone.

3. 아토피 피부염에서 iNOS 생성 억제

피부염 유발 부위의 진피 유두에서 증가되어 관찰되는 iNOS 양성반응은 세포질에서 강하게 나타났으며, AD군에 비해 CGS군에서 iNOS 양성반응세포의 분포가 감소된 것으로 관찰되었다. AD군은 대조군(370.25 \pm 28.81/100,000 pixel)에 비해 733.36% 증가한 3085.50 \pm 77.79/100,000 pixel로 관찰되었다. 이에 반해 CGS군에서는 AD군에 비해 64.92% 감소한 1082.25 \pm 51.56/100,000 pixel로 관찰되었다(Fig. 3).

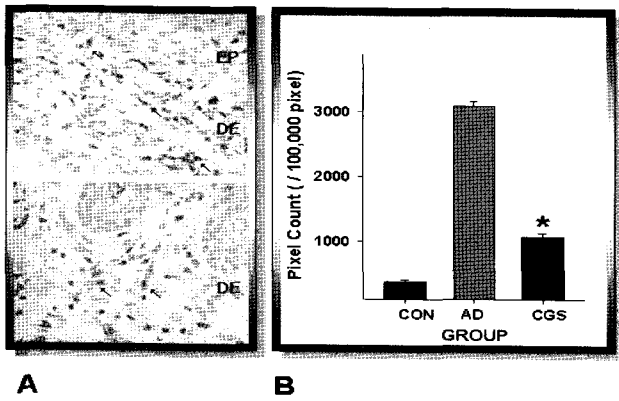


Fig. 3. Inhibition of iNOS in NC/Nga mouse with atopy dermatitis by Cheonggi-san. A. Morphological changes(upper, atopy dermatitis elicited mouse; lower, Cheonggi-san treated mouse after atopy dermatitis elicitation; iNOS immunohistochemistry, x400). The distribution of iNOS positive reacted cell(arrow) in Cheonggi-san treated mouse were decreased. B. Image analysis for iNOS positive reaction. Abbreviation. EP, epidermis; DE, dermis; CON, No treated mice; AD, atopy dermatitis elicited mice; CGS, Cheonggi-san(25 ml/kg/day) treated mice after atopy dermatitis elicitation; *, P < 0.05 compared with AD.

4. 아토피 피부염에서 Apoptosis 유도 증가

피부염 유발 부위의 진피 유두에서 일어나는 Apoptosis는 AD군에서도 증가하지만 CGS군에서는 더 큰 증가폭을 보였다. 이런 apoptosis는 주로 핵에서 강한 양성반응을 보였다. AD군은 대조군(191.75±9.181/100,000 pixel)에 비해 222.43% 증가한 618.25±41.72/100,000 pixel로 관찰되었다. 이에 반해 CGS군에서는 AD군에 비해 138.82% 증가한 1476.50±62.47/100,000 pixel로 관찰되었다(Fig. 4).

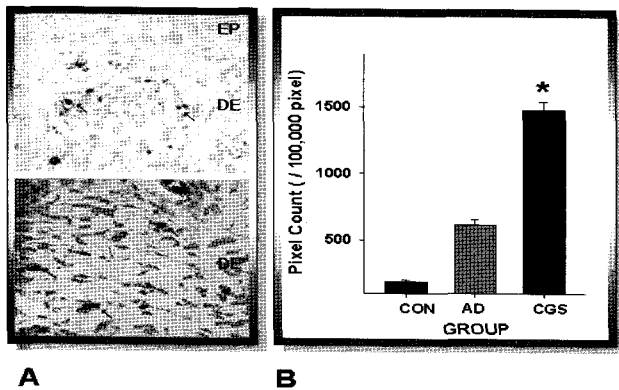


Fig. 4. Increase of apoptosis in NC/Nga mouse with atopy dermatitis by Cheonggi-san. A. Morphological changes(upper, atopy dermatitis elicited mouse; lower, Cheonggi-san treated mouse after atopy dermatitis elicitation; TUNEL method, x400). The distribution of apoptotic cell(arrow) in Cheonggi-san treated mouse were increased. B. Image analysis for apoptosis. Abbreviation same as Fig. 3.

고찰

산화질소는 작고 비교적 불안정하고 독성이 있는 free radical 중의 하나로서, 대사되면서 세포독성의 radical로 전환되어 조직손상을 유발하는데, 생성된 NO는 O²의 반응으로 peroxynitrite(ONOO-)을 생성하여²⁵⁾ LDL과 VLDL를 oxidation 시켜 세포막지질을 peroxidation 시키며²⁶⁾, thiol기, SH기를

oxidation하여 세포독성을 유발한다²⁷⁾. 또한 단백질인 tyrosine에 nitration을 시켜 3-nitrotyrosine을 형성하여 cytochrome p450을 억제하거나, protein phosphorylation을 억제하고 DNA 합성을 관여하는 효소계를 억제하는 독성효과가 있다²⁸⁾. 산화질소는 신경전달, 혈압조절 및 혈소판응집억제, 종양세포나 세포내 기생생물에 대한 숙주 면역계의 방어기능과 체내의 염증반응 외에도 패혈증 등의 여러 가지 질환에 관여하는 것으로 알려졌다^{1-3,6)}, 최근에는 *Cudrania tricuspidata*²⁹⁾, *Cyrenus rotundus*³⁰⁾, *Melia azedarach*³¹⁾, *Lonicera japonica*³²⁾, *Scrophularia ningpoensis*³³⁾ 등의 한약제에서 NO 생성 조절제를 찾으려는 많은 연구가 진행 중이다.

NO는 중성구와 큰포식세포를 포함하는 염증성 세포에서 미량 생산된다. 큰포식세포는 inducible NOS(NOS2)를 포함하고 있고, 중성구는 기본적으로 constitutive NOS(NOS1)를 발현하며, 염증성 반응이 있을 때 NOS2를 발현한다. 큰포식세포에서 유래된 NO는 L-arginine 의존적인 병원균 제거능력을 나타내고 면역조절 역할을 한다³⁴⁾. NO에 매개된 세포유해작용에 분자생물학적 기전은 주로 Fe-S-NO 유도체를 불활성화 시키기 위한 enzyme 4Fe-4S center의 산화, ribonucleotide reductase의 불활성화에 의한 DNA 합성 저하 또는 단백질 합성의 일반적인 저하로 설명된다^{35,36)}. 다양한 급성 또는 만성 염증반응시 NO의 생성은 증가되어 조직 손상에 기여하며, 조직내 NOS 발현과 NO²/NO³가 다양한 염증성 질환 시 증가되어 있다^{36,37)}.

본 연구는 청기산 추출물의 iNOS 발현과 NO 생성 억제를 조사하기 위해 RAW 264.7 macrophages에 LPS를 처리하였는데, LPS 처리 후 RAW 264.7 macrophages에서의 iNOS 발현은 증가하지만, 청기산 추출물 처리시 iNOS 발현은 감소되었다. 이는 청기산 추출물이 NF-κB 활성을 억제한 결과로서, 청기산 추출물은 IκB kinase(IKK) 활성을 감소시키고 이는 NF-κB/Rel의 억제자인 IκB의 인산화 유도 감소로 이어져 NF-κB/Rel는 불활성상태 남겨 되어 생쥐 iNOS 유전자의 TATA box 앞쪽 55bp와 917bp 위치의 NF-κB /Rel 결합부위^{13,38)}에 결합하여 전사 유도해야 할 NF-κB/Rel 감소에 의해 iNOS 발현 감소가 유도된 것으로 사료된다. 이러한 iNOS 생성 감소는 L-arginine을 전구물질로 이용한 NO 생성⁸⁾에 영향을 미쳐 RAW 264.7 macrophage에서의 NO 생성을 감소로 이어지는데, 본 연구에서도 농도-의존적 NO 생성 감소가 측정되었다.

아토피피부염 치료에 사용되고 있는 清肌散은 『世醫得效方』²⁰⁾에서 “治風寒暑濕外搏. 肌膚發爲癩疹 遍身搔癢 或赤或白 口苦咽乾 或作寒熱”이라 하여 風寒暑濕의 邪氣가 肌膚에 울체된 피부질환을 치료하기 위해 입방된 이래 『東醫寶鑑』³⁹⁾에 인용되어 『濟衆新編』⁴⁰⁾, 『方藥合編』⁴¹⁾, 『漢方外科學』⁴²⁾에 수록되어 현재까지 활용중인 처방이다. 구성약물의 효능을 살펴보면 人蔘은 大補元氣, 固脫生津, 安神하고 生薑은 解表散寒, 甘草는 解毒, 調和諸藥하며 柴胡는 和解退熱, 疎肝解鬱하고 前胡는 降氣祛痰, 宣散風熱한다. 羌活은 散表寒, 祛風濕하고 獨活은 祛風除濕, 解表止痛하며 桔梗은 宣肺祛痰, 枳殼은 破氣, 行痰, 消積하고 川芎은 活血行氣, 祛風止痛한다. 赤茯苓은 行水, 利濕熱하고 荊芥

는 發表, 透疹, 散風, 利血하며 防風은 解表祛風, 勝濕, 止痛하고 天麻는 平肝息風, 薄荷는 宣散風熱, 透疹하고 蟬蛻는 疏散風熱, 透疹止痒의 효능을 가지고 있다⁴³⁾. 즉 피부의 風熱毒을 제거하는 荊防敗毒散에 祛風止痒하는 天麻, 蟬蛻를 배오하여 癢痒을 진정시키는 작용을 강화하였다. 그 중에서도 人蔘은 虛弱한 것을 保養하는 의미보다는 邪氣를 外出하는 正氣를 도와주는 扶正祛邪하는 뜻이 있으므로, 正氣를 보강하여 衛氣작용을 강하게 함으로써 병이 치유된 뒤에도 다시 반복하여 감염되는 것을 막아준다⁴⁴⁾.

『素問』 「評熱病論」⁴⁵⁾에서 “邪氣所溼 其氣必虛”라 하여 正氣가 허하여 邪氣가 침입한다는 한의학 이론은 알레르기성 질환의 면역력 저하로 인한 발병과 일맥상통한다. 扶正祛邪하는 인삼이 포함되어 肌膚에 울체된 邪氣를 풀어줄 수 있는 滿肌散은 稟性不耐하여 內外邪氣가 肌膚에 울체되어 발생하는¹⁹⁾ 아토피 피부염에 유용한 내복약으로 생각된다.

본 실험에서는 인위적으로 아토피 피부염을 유발하기 위해 자발적으로 아토피 유사 피부염을 일으킨다고 보고^{46,47)} 된 Nc/Nga 생쥐를 이용하였다. 우선 지질방어막을 제거하기 Christophers와 Mrowietz(1995)⁴⁸⁾의 방법으로 각질층의 상부의 desquamation을 제거한 다음 Minehiro 등(2002)⁴⁹⁾의 방법으로 계면활성제인 SDS(sodium lauryl sulfate)을 도포하여 각질층내 지질을 제거하였다. 그런 다음 아토피 유발원으로 보고된⁵⁰⁾ D. pteronyssinus 처리하여 실제 유발되는 아토피 피부염과 유사한 상황을 만들었다. 각질층의 지질은 단지 세포사이의 구조적 결합(Cohesion) 뿐만 아니라 피부장벽의 기능적 조절자로서의 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다⁵¹⁾. 특히 Ceramide의 결핍에 의한 장벽손상으로 인한 아토피 피부염과 건선이 대표적 피부질환이다^{52,53)}. 아토피 피부염 유발시 각질층내 ceramide 감소로 인한 PKC 활성이 유도되며, 이는 피부 상피 기저층에서의 세포분열 증가를 일으킨다⁵⁴⁾. 이는 TNF- α , IL-1 β 등의 proinflammatory cytokine 분비 증가에 의한 전사인자 NF- κ B/Rel의 활성을 유도하여^{14,55)} 염증효소 iNOS 생성 증가에 의한 산화적 스트레스를 증가시키고, 그 결과 염증에 의한 조직 손상을 일으킨다^{26,28,56)}.

본 연구에서도 iNOS의 변화를 iNOS 항체를 이용한 면역조직화학으로 조사하였는데, 아토피 유사 피부염이 심한 피부 진피 유두에서는 iNOS 양성반응세포의 분포가 급격하게 증가된 양상을 보였다. 그러나 청기산 처리군에서 iNOS 양성반응세포의 분포가 감소한 것으로 관찰되었다.

한편 NF- κ B/Rel의 활성은 anti-apoptotic 기능을 갖는 다양한 protein들의 발현을 조절하는데, I κ B protein의 degradation을 유발시켜 antiapoptotic 유전자 발현을 유도한다고 보고되었다⁵⁷⁾. 본 실험에서도 진피유두에서 세포자기살해 증가가 관찰되지 않았으나, 청기산 처리군에서 apoptotic 세포의 분포가 증가된 것으로 관찰되었다.

이상의 결과로 염증효소 iNOS 발현 억제와 NO 생성 저해능을 가진 청기산의 처리는 NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염에서 iNOS 생성 억제함으로써 산화적 스트레스에 의한 피부손상을 완화시키고, 또한 염증관여세포의 세포자기살해를 유도함으로써 항염증작용에도 기여하는 것으로 생각된다. 아울러 우수한 항산

화효능을 가진 청기산은 다양한 NO 관련 염증성 질환의 치료제로서의 사용가능성이 인정되는 바이며, 전사인자 NF- κ B 활성억제에 관한 추가 연구의 필요성이 기대된다.

결 론

청기산 추출물은 LPS로 자극된 RAW 264.7 macrophages에서 iNOS 발현과 NO의 생성을 농도-의존적(0.5 - 2.0 mg/ml)으로 감소시켰다. 청기산 처리 후 아토피 유사 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐 진피 유두에서 iNOS 양성반응세포의 분포도 감소하였고, apoptosis 유도는 증가되었다.

참고 문헌

1. Floyd, R.A. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic Biol Med.* 26(9-10):1346-1355, 1999.
2. Eiserich, J.P., Baldus, S., Brennan, M.L., Ma, W., Zhang, C., Tousson, A., Castro, L., Luscis, A.J., Nauseef, W.M., White, C.R., Freeman, B.A. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science.* 296(5577):2391-2394, 2002.
3. Lim, D.G., Sweeney, S., Bloodsworth, A., White, C.R., Chumley, P.H., Krishna, N.R., Schopfer, F., O'Donnell, V.B., Eiserich, J.P., Freeman, B.A. Nitrolinoleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: synthesis, characterization, and vasomotor activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(25):15941-15946, 2002.
4. Guzik, T.J., West, N.E., Black, E., McDonald, D., Ratnatunga, C., Pillai, R., Channon, K.M. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res.* 86(9):E85-90, 2000.
5. Panza, J.A., Quyyumi, A.A., Brush, J.E. Jr, Epstein, S.E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 323(1):22-27, 1990.
6. Kojda, G., Harrison, D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 43(3):562-571, 1999.
7. Muller, M.J., Vollmar, B., Friedl, H.P., Menger, M.D. Xanthine oxidase and superoxide radicals in portal triad crossclamping-induced microvascular reperfusion injury of the liver. *Free Radic Biol Med.* 21(2):189-197, 1996.
8. Hibbs, J.B. Jr, Taintor, R.R., Vavrin, Z. Macrophage

- cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235(4787):473-476, 1987.
9. Min-Hsiung Pan, Ching-Shu Lai, Ying-Jan Wang, Chi-Tang Ho. Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TRA-induced tumor promotion in mice. *Biochem Pharmacol* 72: 1293-1303, 2006.
 10. Min-Hsiung Pan, Shoei-Yn Lin-shiau, Jen-Kun Lin. Comparative Studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and Its Hydrogenated metabolites through down-regulation of I κ B kinase and NF- κ B activation in macrophages. *Biochem Pharmacol* 60: 1665-1676, 2000.
 11. Ai-Hsiang LO, Yu-Chih Liang, Shoei-Yn Lin-Shiau, Chi-Tang Ho, Jen-Kun Lin. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating NF- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 23(6):983-991, 2002.
 12. Andrea, H., Thomas, K., Josef, P., Konrad, S. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1485: 63-99, 2000.
 13. Xie, Q.W., Kashiwabara, Y., Nathan, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 269(7):4705-4708, 1994.
 14. Baeuerle, P.A. I κ B-NF- κ B structure: at the interface of inflammation control. *Cell*. 95: 729-731, 1998.
 15. 차관배, 김윤식, 설인찬. 아토피피부염에 관한 문헌적 고찰. 대전대학교 한의학연구소 논문집, 14(2):113-126, 2005.
 16. 丁光迪. 諸病源候論校注. 北京, 人民衛生出版社, pp 1411-1412, 1994.
 17. 陳實功. 外科正宗. 北京, 中醫古籍出版社, p 242, 261, 1999.
 18. 吳謙. 醫宗金監. 北京, 人民衛生出版社, p 443, 1982.
 19. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연. 아토피피부염의 동서의학적 문헌 고찰. 대한안아비인후과피부과학회지 15(1):226-252, 2002.
 20. 危亦林. 世醫得效方. 上海, 上海科學技術出版社, p 962, 1997.
 21. 이종대. 새로 보는 빈용 202처방. 서울, 도서출판 정담, p 758, 2005.
 22. 김혜정, 채병윤. 清肌散의 효능에 관한 실험적 연구. 대한한방외과학회지 3(1):25-39, 1990.
 23. 김영신. 清肌散 및 清肌散加味方的 항알레르기 및 면역반응에 대한 실험적 연구. 경희대학교 박사논문, 1990.
 24. 박은정, 김양귀. 清肌散과 加減清肌散이 마우스의 항알레르기 및 면역반응에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지 12(1): 183-210, 1998.
 25. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87(4):1620-1624. 1990.
 26. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 288(2):481-487, 1991.
 27. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*. 266(7):4244-4250, 1991.
 28. Villa, L.M., Salas, E., Darley-Usmar, V.M., Radomski, M.W., Moncada, S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91(26):12383-12387, 1994.
 29. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Yun, Y.G., Kwon, T.O., Chung, H.T. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon-and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol*. 35: 21-28, 2000.
 30. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Kwon, T.O., Yun, Y.G., Kim, N.Y., Chung, H.T. Inhibitory effects of methanol extracts of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophages cell line, RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol*. 76: 59-64, 2001.
 31. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extractes from *Melia azedarach*. *Eur. J. Pharmacol*. 406: 301-309, 2000.
 32. 이동언, 이재령, 김영우, 권영규, 변성희, 신상우, 서성일, 권택규, 변준석, 김상찬. 금은화 및 금은화전초가 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도된 NO의 생성, iNOS, COX-2 및 cytokine에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 19(2):481-489, 2005.
 33. 변성희, 양재하, 김상찬. 현삼매탄을 추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 nitric oxide 생성에 미치는 영향. 대한본초학회지 20(2):7-16, 2005.
 34. Tan, C.M., Xenoyannis, S., Feldman, R.D. Oxidant stress enhances adenylyl cyclase activation. *Circ Res*. 77(4):710- 717, 1995.
 35. Nussler, A.K., Billiar, T.R. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol*. 54(2):171-178, 1993.
 36. Stuehr, D.J., Marletta, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82(22):7738-7742, 1985.
 37. Belvisi, M., Barnes, P.J., Larkin, S., Yacoub, M., Tadjkarimi, S., Williams, T.J., Mitchell, J.A. Nitric oxide synthase activity is elevated in inflammatory lung disease in humans. *Eur J Pharmacol*. 283(1-3):255-258, 1995.

38. Lowenstein, C.J., Alley, E.W., Raval, P., Snowman, A.M., Snyder, S.H., Russell, S.W., Murphy, W.J. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(20):9730-9734, 1993.
39. 허준. 對譯東醫寶鑑. 서울, 법민문화사, p 732, 1999.
40. 강명길. 濟衆新編. 서울, 행림서원, p 150, 151, 1971.
41. 황도연. 對譯證脈·方藥合編. 서울, 남산당, p 256, 257, 2002.
42. 채병윤. 한방외과학. 서울, 고문사, p 311, 312, 407, 1972.
43. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울, 도서출판 영림사, p 127, 128, 131, 136, 142, 149, 155, 260, 302, 351, 409, 458, 460, 504, 531, 540, 2000.
44. 윤용갑. 동의방제와 처방해설. 서울, 의성당, pp 583-586, 1998.
45. 王冰 編撰. 新編黃帝內經素問. 서울, 대성문화사, p 60, 105, 327, 1994.
46. Lee, H.S., Kim, S.K., Han, J.B., Choi, H.M., Park, J.H., Kim, E.C., Choi, M.S., An, H.J., Um, J.Y., Kim, H.M., Min, B.I. Inhibitory effects of *Rumex japonicus* Houutt. on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Br J Dermatol*. 155(1):33-38, 2006.
47. Takano, H., Yanagisawa, R., Inoue, K., Ichinose, T., Sadakane, K., Yoshikawa, T. Di-(2-ethylhexyl) phthalate enhances atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Environ Health Perspect*. 114(8):1266-1269, 2006.
48. Christophers, E., Mrowietz, U. The inflammatory infiltrate in psoriasis. *Clin. Dermatol*. 13: 131-135, 1995.
49. Minehiro, O., Takashi, Y., Hideoki, O. Detergent-induced epidermal barrier dysfunction and its prevention. *J. Dermatol. Sci*. 30: 173-179, 2002.
50. Halbert, A.R., Weston, W.L., Morelli, J.G. Atopic dermatitis: is it an allergic disease? *J Am Acad Dermatol*. 33(6):1008-1018, 1995.
51. Elias, P.M., Williams, M.L., Maloney, M.E., Bonifas, J.A., Brown, B.E., Grayson, S., Epstein, E.H. Stratum corneum lipids in disorders of cornification. *J. Clin. Invest*. 74: 1414-1421, 1984.
52. Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Mellesi, L., Ghidoni, R., Caputo, R. Abnormality of water barrier function in psoriasis. *Arch Dermatol*. 130: 452-456, 1994.
53. Paige, D.G., Morse-Fisher, N., Harper, J.I. Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramide in the hereditary ichthyoses. *Br. J. dermatol*. 131: 23-27, 1994.
54. Hunnum, Y.A., Bell, R.M. Function of sphingolipid breakdown production in cellular regulation. *Science*. 243: 500-507, 1989.
55. Baeuerle, P.A., Baltimore, D. NF- κ B - Ten years after. *Cell*. 87: 13-20, 1996.
56. Anggard, E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet*. 9: 1199-1206, 1994.
57. Wu, M.X., Ao, Z., Prasad, K.V., Wu, R., Schlossman, S.F. IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science*. 281(5379):998-1001, 1998.