

脾虛蘊濕方이 NC/Nga 아토피피부염 생쥐 모델의 피부 및 면역학적 변화에 미치는 영향

김정환 · 최정준 · 구영선¹ · 노성수² · 김동희*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 내과학교실, 2: 본초학교실

Suppression of DNCB-induced Dermatitis in NC/Nga Murine Model by Biheoonsupbang

Jung Hwan Kim, Jeong June Choi, Young Sun Koo¹, Seong Soo Roh², Dong Hee Kim*

Department of Pathology, 1: Department of Internal Medicine, 2: Laboratory of Herbology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease characterized by inflammatory cell infiltration in the skin. This study was performed to assess the therapeutic effects of BHOSB on the DNCB-induced dermatitis in NC/Nga mice, characterized by the onset of AD along with an increase the number of inflammatory cells and dysregulation of inflammatory mediators including cytokines and chemokines. BHOSB administration significantly reduced clinical dermatitis severity including pruritus, edema, eczematous and erythema. Histological findings indicated that the thickening of epidermis/dermis and dermal infiltration of inflammatory cells including mast cells were dramatically reduced. The suppression of dermatitis by BHOSB was accompanied by a decrease in the number of CD11b⁺/Gr-1⁺ immune cells in skin but not CD3⁺/CCR3⁺ cells. However, the number of CD3⁺ cells was increased in BHOSB administrated NC/Nga mice. Oral administration of BHOSB significantly reduced the level of IL-6, TNF- α and eotaxin 2 mRNA in skin. These data suggest that BHOSB may be effective therapeutic agents for the treatment of AD.

Key words : Biheoonsupbang, atopic dermatitis, NC/Nga mice, immune modulation, granulocyte, cytokines

서 론

아토피피부염(atopic dermatitis)은 소양증을 동반하는 만성 염증 피부질환으로써, 소아의 10~20%가 이 질환으로 고통 받고 있으며, 산업화가 진행되면서 발병율이 증가하고 있다^{1,2)}.

이는 면역학적으로 다양한 세포들에 의해 발병되는 알러지 질환으로 알려져 있는데³⁾, 특히 Th2 세포는 이와 관련된 중요한 세포로, 이 세포가 발현하는 IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인들은 Th1 세포의 증식 및 분화를 억제시킴으로써 Th1/Th2 세포들의 불균형을 초래하는 방식으로 알러지 반응을 유도하여 아토피 피부염을 유발하는 것으로 보고되고 있다⁴⁾. B 세포 또한 아토피 피부염에서 중요한 역할을 담당하게 되는데 주로 Th2 세포들이 발현하는 사이토카인들에 의해 IgE의 발현량이 증가하면서 아토피

피 피부염을 심화시킨다⁵⁾.

최근에는 선천면역을 담당하는 다양한 세포들도 아토피피부염에서 매우 중요한 역할을 한다는 것이 보고되고 있다. 대부분 과립구에 속하는 호산구, 호염구, 비만세포들은 아토피 피부염이 발병하게 되면 피부로 침윤되어 다양한 병변을 일으키게 된다^{6,7)}. 피부로 침윤된 호산구는 IL-4나 IL-13과 같은 사이토카인을 분비하게 되는데, 이들 물질은 Th2 세포들을 활성화시키는 역할을 한다⁸⁾. 또한 호산구는 류코트리엔(leukotrien)과 같은 알러지 유발물질을 분비하는데, 이 물질은 면역 반응을 증폭시키며 다양한 케모카인들의 분비를 촉진하는 역할을 한다⁹⁾. 이 밖에 비만세포와 호염구는 Fc ϵ RI를 세포 표면에 발현하고 있는데, 이것은 항체와 결합된 IgE와 친화성이 강한 수용체이다¹⁰⁾. Fc ϵ RI는 IgE와 결합된 후 세포신호 전달을 통해 비만세포를 활성화시키면 이들 세포는 히스타민 또는 류코트리엔 B4를 분비함으로써 가려움, 홍반 등의 반응을 유도하게 됨으로써¹¹⁾ 최근 선천면역계의 조절을 통해 아토피피부염을 치료하려는 연구가 심도있게 이루어

* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학

· E-mail : djkim@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2623

· 접수 : 2007/05/25 · 채택 : 2007/06/11

어지고 있다¹²⁾.

현재 아토피피부염의 약물 치료는 항히스타민제, 스테로이드제, FK506, cyclosporin 등이 임상에서 주로 사용되고 있으나, 항히스타민제의 경우 가려움의 증상을 개선시켜주나 근본적인 치료를 할 수 없다¹³⁾. 또한 스테로이드제, FK506, cyclosporin과 같은 약물 역시 신체의 전반적인 면역체계를 약화시키며 장기 복용을 할 경우 내성 증가와 더불어 심각한 부작용을 초래하는 등 질병에 대한 근본적인 치료를 할 수 없는 단점이 있어¹⁴⁾, 안전하면서도 근본적으로 치료할 수 있는 약물 개발이 요구되고 있다.

본 시료인 脾虛蘊濕方은 平胃散加味方으로 祛風除濕藥이 가미되어 현재 임상에서 체내 습담이 많으면서 피부병이 호발되는 경우에 다용되고 있다. 한의학에서 피부병 치료에 있어 燥濕을 변증하는 것은 매우 중요한 사항인데, 바로 이 燥濕을 조정하는 것이 오장육부중 脾臟이다^{15,16)}. 음식 및 七情의 문제로 인하여 脾臟의 運化機能이 상실되면 체내 燥濕의 변화로 다양한 병리적 상태가 유도되는데, 특히 피부과 질환은 이와 많은 연관성이 있음은 기초 및 임상에서 이미 증명된 바가 있다¹⁷⁻¹⁹⁾.

따라서 본 실험에서는 현재 임상에서 피부과 질환에 활용되고 있는 脾虛蘊濕方(BHOSB)의 아토피피부염 개선 효과를 객관적으로 검증하여 EBM(Evidence Based Medicine)을 구축하고, 이를 기초적 자료로 활용하여 다양한 치료 처방을 개발하고자 dinitrochloro- benzene (DNCB)로 아토피피부염 증상을 유도시킨 NC/Nga 생쥐에서 피부 병리 반응, 피부내 세포들의 변화 및 사이토카인 변화 등을 검색하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약물

본 실험에 사용한 脾虛蘊濕方(BHOSB)의 구성 약재들은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. The compositions of Biheoonsupbang(BHOSB -2첩 분량)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
장출	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	10
백출	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	10
후박	<i>Magnoliae Cortex</i>	10
복령	<i>Poria</i>	15
사인	<i>Amomi Semen</i>	4
초외이인	<i>Coicis Semen</i>	30
황백	<i>Phellodendri Cortex</i>	10
차전자	<i>Plantaginis Semen</i>	10
백선피	<i>Dictamni Radix</i>	15
지부자	<i>Kochiae Fructus</i>	20
대복피	<i>Arecae Pericarpium</i>	10
진피	<i>Citri unshiu Pericarpium</i>	4
계내금	<i>Stomachicum Galli Corium</i>	4
Total amount		152

2) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 dinitrochlorobenzene(DNCB),

diethylpyrocarbonate(DEPC), 3-4, 5-dimethyl-thiazol-2, 5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), chloroform, collagenase, trichloroacetic acid, trypsin-EDTA, 아세트산, tris-base, 아세톤, 올리브오일, 에탄올, DNase-1, dNTPs, RNase inhibitor, tris-HCl, isopropanol, paraformaldehyde, 적혈구 용혈액, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde 등은 Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (U.S.A.) 제품을, anti-CD3-FITC, anti-CCR3-PE, anti-CD11b-FITC, anti-Gr-1-PE는 Pharmingen사 (U.S.A.) 제품을, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

3) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), 전자레인지 (LG, Korea), 감압증류기 (Büchi B-480, Switzerland), 동결건조기 (EYELA FDU-540, Co., Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), 무균대 (Vision scientific Co., Korea), 멸균기 (Sanyo, Co., Japan), micro-pipet (Gilson, Co., France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), 흡광분광기 (Shimadzu, Co., Japan), 원심분리기 (한일, Co., Korea), deep-freezer (Sanyo, Co., Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Co., Germany), 제빙기 (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, Co., U.S.A.), plate shaker (Lab-Line, Co., U.S.A.), flow cytometer (Molecular Devices, Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices, Co., U.S.A.), 위상차현광현미경 (Nikon, Japan) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

비허운습방(BHOSB) 4첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여, 이를 감압증류장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하였다. 농축액을 다시 동결건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 26.0 g을 냉동 보관 (-80℃) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 피부염 유도 및 시료 처리

NC/Nga 생쥐 (11주령)의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후 제모가 끝나면 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 그 뒤 1% DNCB용액 (아세톤 : 올리브오일 = 3 : 1) 200 μl를 등 부위에 도포하였고, 4일 후부터 1주일에 2~3번씩 0.2% DNCB용액 150 μl를 4주 동안 등 부위에 도포하여 피부염을 유발시켰다. 피부염이 충분히 유발되어 등 부위의 가피가 모두 벗겨지고, 이 부위에 새로운 피부염이 형성되면서 긁는 행동이 심화되면 DNCB 처리를 중단하고, 관능평가를 실시하였다.

3) 관능 평가

DNCB를 도포하여 피부염이 유발된 생쥐를 2개의 그룹으로 나누고, 대조군에는 생리식염수를, 실험군에는 BHOSB를 10.8 mg/25 g/day의 농도로 8주간 (12주령에서 20주령까지) 경구 투

여하였다. 약물 처리 후 4주 후 (16 주령)에 관능평가를 실시하였는데 NC/Nga 생쥐의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하였다. 육안평가 결과는 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총합으로 나타내었다. 평가 항목은 홍반 (Erythema), 가려움과 건조 피부 (Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종 (Edema & Escoriation), 진무를 (Erosion), 그리고 태선화 (Lichenification)로 나누었다. 이 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였다. 일반적으로 DNCB를 이용해 피부염을 유발할 경우, 약 12-13 점이면 피부염이 최고조에 달했다고 판단하고 있다.

4) 조직 검사

실험 종료 후에 왼쪽 귀 끝부분, 등 쪽 목 부분의 피부와 림프를 떼어내어 10% para- formaldehyde에서 24시간 동안 고정하였다. 그 조직을 파라핀으로 포매한 뒤, 5 µm 의 두께로 블록을 만들었다. 조직 부분을 사용하여 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils/ eosinophil 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline and eosin (H&E) 염색과 비만 세포 (mast cells)를 염색하는 toluidine 염색을 시행하여 면역세포들의 침윤을 관찰하였다.

5) 피부 조직에서 형광유세포 분석

16주 후 실험을 종료한 후 DNCB로 유발된 atopy dermatitis-like skin NC/Nga생쥐에서 등부의 일정량의 피부조직은 잘게 자른 후 1 mg/ml의 collagenase (2% FBS + RPMI1640)을 넣고 37°C 교반배양기 (180 rpm, 20 min.)에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이들 세포들을 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1 L of D.W. + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 측정된 피부조직 침윤세포의 수를 5 x 10⁵ 세포로 조정한 후 4°C에서 면역형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-CD3-FITC, anti-CCR3-PE, anti- CD11b-FITC, anti-Gr-1-PE를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3⁺, CCR3⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포수를 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대세포수 (absolute number)를 산출하였다.

6) Quantitative real time-PCR

NC/Nga 생쥐의 등 피부 조직을 떼어내어 피부조직 (0.1 g)과 RNazol 500 µl를 넣고 용해될 때까지 분쇄한 뒤 제조사의 지시에 따라 RNA를 분리하였다. 역전사 (reverse transcription) 반응은 total RNA (3 µg)에 2 Unit의 DNase I으로 genomic DNA를 제거한 뒤, 1 mM dNTPs mix, 1 µM random sequence hexanucleotides, 20 Unit RNase inhibitor, 4 mM DTT, Reaction buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.3], 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂)에 200 Unit의 M-MLV Reverse Transcriptase로 37°C에서 역전사 반응을 시켰다. Quantitative real time PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다. 실험에 사용된 프라

이머는 Table 2와 같다. 검출 형광 물질로는 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였으며 primer의 최종농도가 200 nM 이 되게 반응시켰다. Real time PCR의 조건은 다음과 같다; 50°C 에서 2분, 94°C에서 4분간 반응하여 pre-denaturation 시킨 뒤, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분간 반응하여 40회 반복 수행하였다. BHOSB 투여군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 표적 유전자의 발현을 표준화하였다.

$$y = x(1+e)^n$$

x : starting quantity

y : yield

n : number of cycles

e : efficiency로 계산하여 RQ (relative quantitative)를 측정하였다.

Table 2. Primers used for real time PCR.

Mouse IL-6	sence	5' tccagttgccttcttgggac 3'
	anti-sence	5' gtgtaattaagcctcgcacttg 3'
Mouse TNF-alpha	sence	5' tgggaggaaggggctctaag 3'
	anti-sence	5' acctacgacgtggctacag 3'
Mouse Eotaxin 2	sence	5' tcaagtggcatagatgtggaagaa 3'
	anti-sence	5' tggctctgcaggatttcatg 3'
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)	sence	5' tgcgctctagaaaaacctgcca 3'
	anti-sence	5' gccccaggctcaaagggtg 3'

3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 평균 ± 표준편차로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석법을 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

1. 아토피피부염 발생 억제 효과

NC/Nga 생쥐는 SPF (specific pathogen free) 조건하에서는 정상적인 상태를 유지하지만 일반적인 상황에서는 가려움으로 인한 긁기와 습진성 피부염의 증상이 나타나 홍반과 출혈을 일으키게 되어 부종, 진무를, 찰상, 피부 건조 등의 증상을 나타내어 사람의 아토피 피부염과 유사한 질병이 발병하는 질환 동물 모델이다^{20,21)}.

본 실험에서는 생쥐의 등 피부를 제모하고, DNCB를 1주일간 도포하여 피부염을 유발시킨 결과 가피가 모두 벗겨지고 피부염증이 나타나기 시작하였다(Fig. 1A-a and 1A-b). 반면 BHOSB를 매일 10.8 mg/25 g/day의 농도로 경구 투여한 실험군은 대조군에 비해 긁는 행동이 상대적으로 감소하면서 피부염이 현저히 감소하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 1A-c and 1A-d). 아토피 피부염에 대한 관능 평가에서는 12점까지 증가하였던 피부지수가 약물 투여 후 소양, 건조, 부종, 혈종, 진무를, 태선화 등의 증상이 개선되면서 4점으로 현저하게 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1B). 양성대조군으로는 현재 아토피 피부염의 치료제로

사용하고 있는 cyclosporin A (CsA)를 투여군에서는 4.3의 피부 지수를 나타냄으로써, BHOSB가 NC/Nga 생쥐에서 자발적으로 발생한 아토피 피부염을 개선시키는 효과가 있음을 시사하였다.

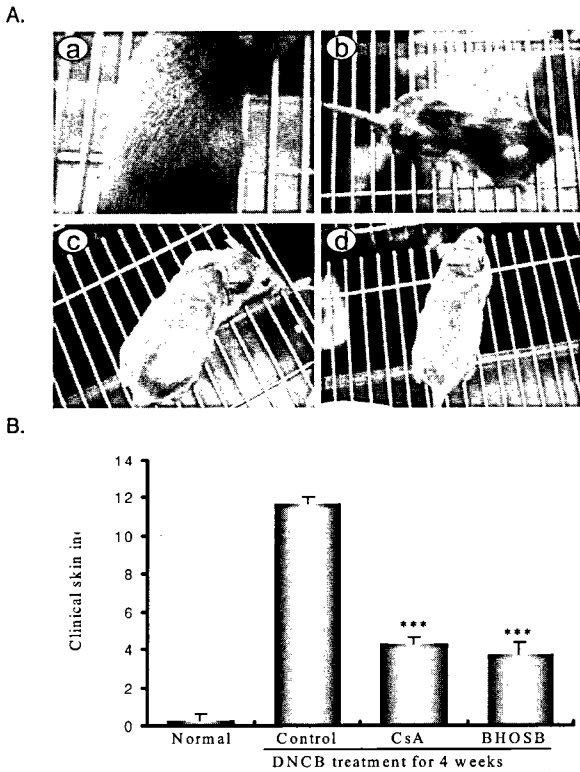


Fig. 1. Effects of BHOSB on clinical skin features and severity in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. (A) Comparison of skin manifestation in NC/Nga mice between control and experimental group. Atopic dermatitis was induced by DNCB treatment in the dorsal skin. a: before the treatment of DNCB, b: DNCB treatment for 1 weeks, c: DNCB treatment for 4 weeks, d: DNCB treatment for 4 weeks with oral administration of BHOSB. (B) Clinical skin index of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe) for each of five signs and symptoms (itch, erythema/hemorrhage, edema, excoriation/erosion and scaling/dryness). Statistically significant values are calculated by comparing with control group by t-test (***) $p < 0.001$.

2. 피부와 귀의 조직 변화에 미치는 영향

아토피 피부염의 특징 중 하나는 T 세포, 비만세포, 호산구와 같은 면역 세포들이 피부에 침윤되어 있으며 epidermis와 dermis가 두꺼워지고 출혈 등이 나타나는 것이다²². BHOSB이 피부조직에 면역세포들의 침윤을 막음으로써 아토피 피부염의 증상을 완화시켰는지 확인해 보기 위하여 피부와 귀 조직을 hematoxylin and eosin (H&E)과 toluidine blue로 염색하였다. 조직을 H&E 염색하게 되면 DNCB를 처리한 경우 대조군(Fig. 2A and 2B-a)에 비해 피부와 귀 조직에 백혈구의 침윤이 나타나면서 epidermis와 dermis 부분이 두꺼워진다 (Fig. 2A and 2B- b). 반면 8주 동안 BHOSB를 투여한 실험군에서는 epidermis/dermis의 두께가 감소하고 면역세포들의 침윤이 대조군에 비해 크게 감소한 것을 볼 수 있었다 (Fig. 2A and 2B- d). Toluidine blue 염색에서는 대조군에서 증가하였던 비만세포 (화살표)의 수가 BHOSB에 의해 많이 감소한 것을 볼 수 있었다(Fig. 2A and 2B-e-h).

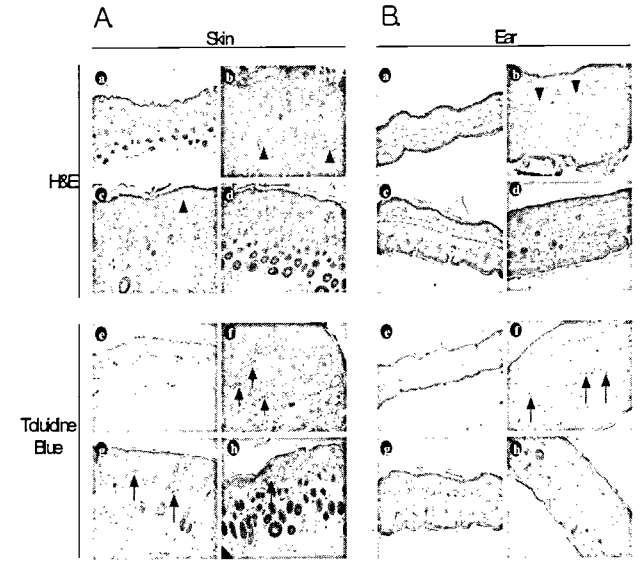


Fig. 2. Histologic examination of skin and ear lesion in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. The animals were administrated with saline (control) or BHOSB (10.8 mg/25 g/day) for 8 weeks. (A) Skin biopsy were stained with hematoxylin and eosin (H&E), and Toluidine blue. (a and e: normal, b and f: control, c and g: CsA, d and h: BHOSB). (B) Ear biopsy were stained with hematoxylin and eosin (H&E), and toluidine blue (a and e: normal, b and f: control, c and g: CsA, d and h: BHOSB). Arrowheads indicate inflammatory cells. Arrows indicate mast cells. The microscope original magnification was $\times 100$ (Nikon, Japan).

3. 배부(背部) 피부내 면역 세포수 변화에 미치는 영향

BHOSB가 피부내 면역세포에 미치는 영향을 알아보고자, 피부로부터 면역세포들을 분리한 뒤 분리된 세포들에 분포된 각 세포의 종류를 flow cytometry 분석을 통해 알아보았다. T 세포의 특이 발현 단백질인 CD3 항체²³를 사용하여 피부로 침윤된 T 세포의 양을 알아본 결과, 정상군은 $5.1 \pm 1.1 (x 10^4)$, 대조군은 $6.8 \pm 0.9 (x 10^4)$, CsA 투여군은 $8.2 \pm 1.2 (x 10^4)$, BHOSB 투여군은 $12.9 \pm 0.5 (x 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 약 2배 정도 증가하는 결과가 나왔다(Fig. 3A)(***) $p < 0.001$.

피부로 침윤된 CCR3⁺/CD3⁺ 세포에 대한 검사에서는 정상군이 $7 \pm 1.8 (x 10^4)$, 대조군이 $17.2 \pm 2.8 (x 10^4)$, CsA 투여군이 $8.2 \pm 2.3 (x 10^4)$, BHOSB 투여군이 $18.2 \pm 2.3 (x 10^4)$ 로 나타남으로써(Fig. 3B), BHOSB가 이들 세포에는 영향을 주지 않고 있음을 알 수 있었다.

과립구들은 세포표면에 CD11b⁺/Gr-1⁺를 발현하는 면역세포들로서, 선천면역계를 담당하고 있으며, 림프구들의 분화, 활성화에 영향을 미치고, 사이토카인 및 다양한 면역매개물질을 분비한다²⁴. 본 실험에서는 BHOSB가 이들 과립구에 미치는 영향을 알아보고자 피부로 침윤된 CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포의 수를 flow cytometry로 분석한 결과, 정상군은 $1.7 \pm 1.6 (x 10^4)$, 대조군은 $8.6 \pm 0.5 (x 10^4)$, CsA 투여군은 $1.2 \pm 0.8 (x 10^4)$, BHOSB 투여군은 $1.6 \pm 0.9 (x 10^4)$ 로 나타나, BHOSB를 투여한 NC/Nga 생쥐가 대조군에 비하여 유의성 있는 (***) $p < 0.001$ 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 3C). 이같은 결과는 BHOSB가 DNCB로 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga 생쥐에서 적응면역계보다는 선천면역계에 영향을 줌으로써 아토피 피부염을 개선시키고 있음을 보여주고 있다.

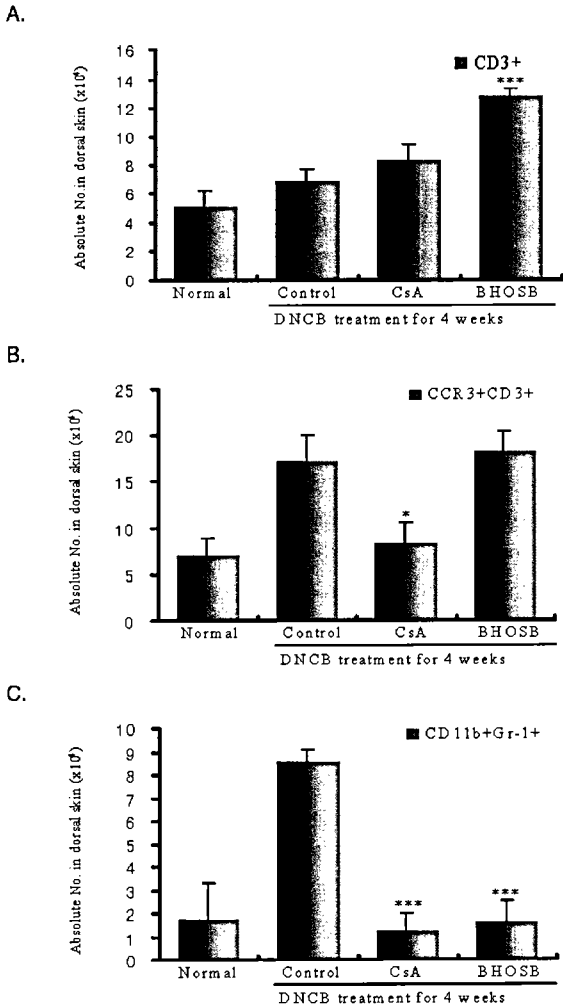


Fig. 3. Effect of BHOSB on the number of inflammatory cells in skin lesion of DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice were orally administrated with BHOSB (10.8 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice skin ($\times 10^4$) were removed and harvested immune cells. The cells were stained with (A) anti-CD3, (B) anti-CCR3 and CD3, or (C) anti-CD11b and anti-Gr-1, respectively. The absolute cell numbers were analyzed by flow cytometry. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant were calculated by comparing with the number of control mice group by student's t-test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

4. 사이토카인 생성량에 미치는 영향

IL-6, TNF- α 와 같은 사이토카인은 비만세포의 분화를 증가시키는 역할을 하며²⁵⁾, eotaxin 2와 케모카인은 비만세포를 염증 반응이 일어나는 피부 부위로 이끌어들여 세포 침윤이 일어나게 하는 물질이다²⁶⁾. 이렇듯 아토피 피부염에 있어서 이들 사이토카인은 과립구들의 분화 및 침윤에 영향을 주어 질환을 심화시킨다. 앞의 실험을 통해 BHOSB가 과립구가 피부로 침윤되는 것을 억제시킴을 알 수 있어, 본 실험에서는 피부에 존재하는 TNF- α , IL-6, eotaxin 2에 대한 quantitative RT-PCR을 수행하여 발현량을 비교하였다.

각 실험군 및 대조군의 생쥐 피부에서 RNA를 추출 한 뒤 각 유전자에 특이적으로 반응하는 primer를 사용하여 real time-PCR을 수행한 결과, TNF- α 는 정상군에 비해 대조군에서 7 배 정도 발현이 증가하고 있는 것을 볼 수 있었다. 반면 BHOSB

를 경구 투여한 생쥐의 경우 이 사이토카인의 양이 약 22% 정도 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4A). IL-6의 경우도 DNCB를 처리하여 피부염을 유발하게 되면, 정상군에 비해 약 50배 정도 사이토카인의 발현이 증가하게 되지만, BHOSB를 투여한 생쥐에서는 대조군에 비해 약 35% 정도의 발현 억제 효과를 볼 수 있었다(Fig. 4B).

호산구의 침윤과 밀접하게 관련되어 있는 eotaxin 2도 BHOSB가 투여된 생쥐에서 대조군에 비해 약 63% 정도로 발현이 현격하게 감소하고 있었다. 이 때 정상군은 대조군에 비해 23% 정도의 수준으로 발현되고 있었다. 양성대조군으로 사용하는 cyclosporin A의 경우 대조군에 비해 TNF- α 는 75%, IL-6는 43%, eotaxin 2는 66% 정도로 각각 발현이 낮아졌다(Fig. 4A-C). 이 결과들은 BHOSB가 IL-6, TNF- α , eotaxin 2와 같은 사이토카인 및 케모카인의 발현을 감소시킴으로써 과립구들의 분화 및 침윤을 억제하는 방식으로 아토피 피부염에 치료 효과를 나타내고 있는 것을 시사한다.

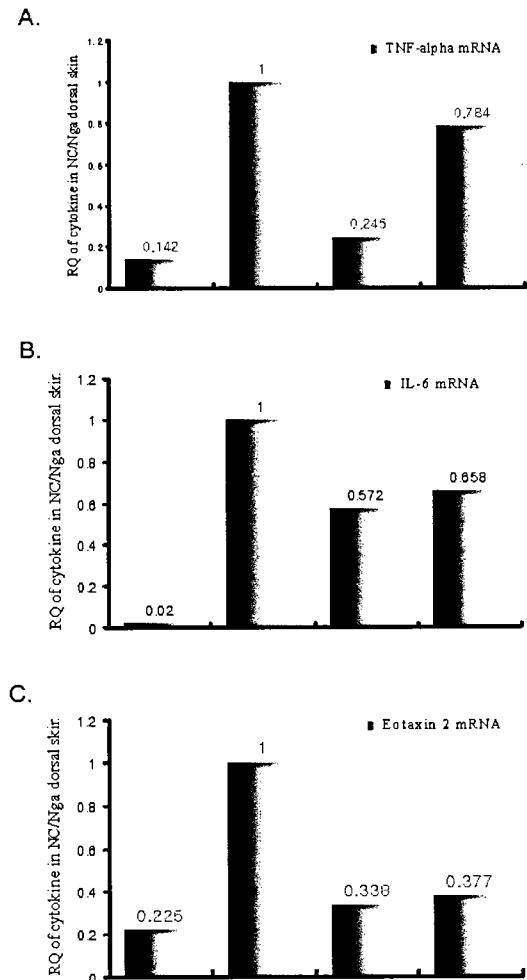


Fig. 4. Effect of BHOSB Extract on the mRNA level of cytokines in the skin of DNCB-induced NC/Nga Mice. Total RNAs from skin were isolated and analyzed the amount of (A) TNF- α , (B) IL-6 and (C) eotaxin2 mRNA with detection of SYBR green intensity by real time PCR. Relative quantitative was calculated by comparing fluorescence intensity of each group with that of control group.

결론

DNCB로 피부염을 유발한 NC/Nga 생쥐 모델을 통해 脾虛蘊濕方이 면역세포와 사이토카인에 미치는 영향을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

脾虛蘊濕方은 DNCB로 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐의 발진, 부종, 가려움, 홍반 등의 병변을 현저하게 감소시키는 것을 육안으로 관찰할 수 있었으며 관능 평가에 의한 피부지수도 대조군 (12점)에 비해 크게 감소한 4점을 나타냈다. 脾虛蘊濕方은 피부 및 귀 조직에 대한 H&E 염색과 toluidine blue 염색에서 대조군에 비하여 비만세포를 비롯한 면역세포들의 침윤이 억제되었으며, dermis/epidermis 부위역시 조직 부종이 현저히 감소하였다. 脾虛蘊濕方은 생쥐의 피부로 침윤되는 CCR3⁺/CD3⁺세포에는 변화를 미치지 못하였으나, CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포는 정상 상태와 같은 수준인 1.6 x 10⁴개로 유의성있게 감소시켰다. 脾虛蘊濕方은 피부에 존재하는 TNF- α , IL-6, eotaxin-2의 양을 RNA 수준에서 대조군에 비해 각각 22%, 35%, 63% 씩 발현량을 감소시켰다.

이상의 결과들은 脾虛蘊濕方이 T 세포의 침윤을 억제시키지 못하였으나, 과립구들의 침윤을 막고 TNF- α , IL-6, eotaxin 2와 같은 사이토카인의 발현을 감소시킴으로써, 피부염을 억제함을 시사하고 있다. 단 CD3⁺세포 증가 등은 차 후 심도있는 연구를 통하여 규명되어야 할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 한국산업기술평가원에서 지원하는 지역협력연구센터인 대전대학교 난치성면역질환의 동서생명의학연구센터 (TBRC, RRC04700, 2005)의 지원에 의해 수행되었음을 밝히며 이에 감사합니다.

참고문헌

- Sampson, H.A. Atopic dermatitis. *Ann Allergy* 69(6): 469-479, 1992.
- Daniels, J. and Harper, J. The epidemiology of atopic dermatitis. *Hosp Med* 63(11):649-652, 2002.
- Holden, C.A. and WE, P. Atopic dermatitis Blackwell Science, Oxford, 1998.
- Meagher, L.J., Wines, N.Y. and Cooper, A.J. Atopic dermatitis: review of immunopathogenesis and advances in immunosuppressive therapy. *Australas J Dermatol* 43(4):247-254, 2002.
- Leung, D.Y. and Soter, N.A. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 44(1 Suppl):S1-S12, 2001.
- Pastore, S., Mascia, F., Giustizieri, M.L., Giannetti, A. and Girolomoni, G. Pathogenetic mechanisms of atopic dermatitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48(6):497-504, 2000.
- Mihm, M.C. Jr., Soter, N.A., Dvorak, H.F. and Austen, K.F. The structure of normal skin and the morphology of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 67(3):305-312, 1976.
- Schmid-Grendelmeier, P., Altnauer, F., Fischer, B., Bizer, C., Straumann, A., Menz, G., Blaser, K., Wuthrich, B. and Simon, H.U. Eosinophils express functional IL-13 in eosinophilic inflammatory diseases. *J Immunol* 169(2):1021-1027, 2002.
- Bandeira-Melo, C., Bozza, P.T. and Weller, P.F. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allergy Clin Immunol* 109(3):393-400, 2002.
- Williams, H.C. Clinical practice. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 352(22):2314-2324, 2005.
- Kitaura, J., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Chung, S., Kawakami, Y., Leitges, M., Wu, D., Lowell, C.A. and Kawakami, T. IgE and IgE⁺ Ag-mediated mast cell migration in an autocrine/paracrine fashion. *Blood* 105(8):3222-3229, 2005.
- Plotz, S.G., Simon, H.U., Darsow, U., Simon, D., Vassina, E., Yousefi, S., Hein, R., Smith, T., Behrendt, H. and Ring, J. Use of an anti-interleukin-5 antibody in the hypereosinophilic syndrome with eosinophilic dermatitis. *N Engl J Med* 349(24):2334-2339, 2003.
- Leung, D.Y. and Bieber, T. Atopic dermatitis. *Lancet* 361(9352):151-160, 2003.
- Cooper, K.D. Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy. *J Invest Dermatol* 102(1):128-137, 1994.
- 한방병리학교재편찬위원회. 한방병리학, 한의문회사, pp 52-57, 2007.
- 대한동의생리학회. 동의생리학회지, 일지사, p 332, 337, 2005.
- 張志禮. 張志禮皮膚病臨床經驗輯要, 中國醫藥科技出版社, p 15, 23, 43, 2002.
- 王保方 外. 皮膚病中醫診斷學, 人民衛生出版社, p 23, 24, 2000.
- 朴俊華. 皮膚性病科節技, 科學技術文獻出版社, p 2, 33, 42, 80, 2002.
- Vestergaard, C., Yoneyama, H. and Matsushima, K. The NC/Nga mouse: a model for atopic dermatitis. *Mol Med Today* 6(5):209-210, 2000.
- Heishi, M., Imai, Y., Katayama, H., Hashida, R., Ito, M., Shinagawa, A. and Sugita, Y. Gene expression analysis of atopic dermatitis-like skin lesions induced in NC/Nga mice by mite antigen stimulation under specific pathogen-free conditions. *Int Arch Allergy Immunol* 132(4):355-363, 2003.
- Robert, C. and Kupper, T.S. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med* 341(24):1817-1828, 1999.
- Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T. and Terhorst, C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 6: 629-662, 1988.
- Silny, W. [Atopic dermatitis. IV. Granulocyte chemotaxis]. *Przegl Dermatol* 70(5-6):475-480, 1983.

25. Hu, Z.Q., Kobayashi, K., Zenda, N. and Shimamura, T. Tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-6-triggered mast cell development from mouse spleen cells. *Blood* 89(2):526-533, 1997.
26. Yawalkar, N., Ugucioni, M., Scharer, J., Braunwalder, J., Karlen, S., Dewald, B., Braathen, L.R. and Baggiolini, M. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 113(1):43-48, 1999.