

초오(草烏)는 미나리아재비과에 속한 다년생 초본인 늦겨갓가락나물 및 동속근연식물의 덩이뿌리를 건조한 것이다. 性味는 辛苦 熱 有大毒하고 心肝腎脾經으로 歸經한다. 거풍제습, 온경지통의 효능으로 풍한습비, 관절동통, 심복냉통, 癰瘡 등에 사용한다⁸⁾. 초오에 대한 기존 연구는 주로 독성과 관련된 실험적인 연구가 대부분이며, 임상적으로는 관절염⁹⁾이나 진통효과¹⁰⁾와 초오약침의 안전성에 관한 연구¹¹⁾가 있었으나 피부 질환에 초오 단일제제를 이용한 연구는 없었다.

저자는 風寒이나 濕熱이 원인이 되어 반복, 재발하는 만성피부질환에 초오가 배합된 天麥湯을 임상적으로 다용하고 있으며 실제 선행연구결과 유효한 효과를 검증할 수 있었다¹²⁾. 天麥湯의 효과에서 초오를 주목하게 되었고 풍습사가 원인이 된 급만성 아토피 피부염 환자에게 단방이나 제제로 응용되려면 초오 단일제제가 실험적으로 의미가 있는지와 효과가 있다면 어떠한 기전을 바탕으로 나타나는지에 대한 분석의 필요성이 있었다.

이에 저자는 초오에 대한 선행연구로 실험을 통한 약리기전과 효능을 확인하고, 아토피 피부염의 치료 제제로서의 가능성을 탐색해 보고자 본 연구에 임하여 몇 가지 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 材料

1) 약재

실험에 사용된 초오 (Aconiti Ciliare Tuber)는 광명생약(부산, 한국)에서 규격품을 구입, 정선하여 사용하였다.

2) 세포

RBL-2H3 세포는 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받아서 사용하였다.

3) 시약

본 실험에 사용된 phorbol 12-myristate (PMA), calcium ionophore A23187, 3-(4,5-dimethylthiazol-

2-yl)-2, 5-diphenyltriazolium bromide (MTT)와 p-nitro-phenyl-N-β-D-glucosaminide는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)로부터, Dulbecco's Modified Eagle' Medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS)는 HyClone사 (Logan, UT)로부터, TNF ELISA kit, IL-4 ELISA, kit INF-γ ELISA kit와 anti-COX-2 monoclonal antibody는 BD Biosciences사 (Frankline Lakes, NJ)에서, anti-NF-κB (p65), IκB-α, β-actin, p38, ERK, JNK와 phosphorylated-p38, -ERK, -JNK polyclonal antibody는 Cell Signaling Technology사 (Beverly MA)에서, anti-COX-1 monoclonal antibody는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, CA)에서, phosphatase labeled affinity purified antibody to rabbit IgG와 BCIP/NBT phosphatase substrate는 KBL사 (Gaithersburg, MD)에서 구입하여 사용하였다.

2. 方法

1) 검액의 조제 및 투여

초오 200g을 round flask에 넣고 증류수 2,000 ml를 가하여 3시간 동안 가열추출 하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 분리하고 0.2 mm 여과지에 여과하여 rotary evaporator로 200 ml가 되도록 감압 농축한 후 냉동건조하여 40 g의 파우더를 얻어 -20℃에서 보관하였다. 실험직전에 생리식염수나 PBS (phosphate buffered saline)에 녹여 0.2μm syringe filtering 후 희석하여 사용하였다.

2) 세포 배양

RBL-2H3 세포는 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양받았으며 세포의 배양을 위하여 10% heat-inactivated fetal bovine serum과 100 U/ml penicillin 및 100 μg/ml streptomycin을 포함한 DMEM에서 37℃, 5% CO₂의 조건 하에 배양했다.

3) MTT assay

RBL-2H3 세포를 2×10⁵ cells/well의 농도가 되도록 24 well plate에 분주하여 24시간 동안 안정화 시킨 후, 초오를 농도별 (0, 1.0 및 2.0 mg/ml)로 처리한 후 1시간 동안 반응시켰다. 배양액을 제거한 후 5.0 mg

/ml MTT solution을 200 μ l씩 각 well에 처리한 후, 4시간동안 37°C incubator에서 반응시키고, MTT solution을 제거한다. 그 후, DMSO를 200 μ l씩 분주하여 well에 생성된 formazin이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 모두 녹인 후 96 well plate에 100 μ l씩 옮긴 후 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) β -hexosaminidase activity

β -hexosaminidase의 activity는 Schwartz 등¹³⁻¹⁴⁾의 방법에 의하여 측정하였다. RBL-2H3 세포를 3×10^5 cell/well의 농도로 24 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 extracellular buffer로 2번 세척한 다음 각 well 당 extracellular buffer와 초오 (0, 1.0 및 2.0 mg/ml)를 처리한 후 1시간 30분 동안 반응시켰다. 이후 50 nM PMA와 1 μ M A23187을 사용하여 세포를 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 동안 자극시킨 후, ice에서 10분간 incubation 시켜 반응을 종결시켰다. 각 well의 상정액 20 μ l를 96 well plate에 옮기고, 또한 0.1% triton X-100 1 ml를 세포가 부착되어 있는 24 well plate에 첨가하여 pellet을 녹인 후 96 well plate에 20 μ l 넣는다. 96 well plate에 substrate buffer (4-p-Nitrophenyl-N-acetyl-D-glucosaminidase 1 mM, sodium citrate 0.05 M, pH 5) 100 μ l를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 암조건으로 1시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝나면 0.1 M carbonate buffer (pH 10.5)를 첨가한다. microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 대조군과 실험군의 흡광도 값을 이용하여 다음 식에 의해 β -hexosaminidase release (%)를 산출하였다.

$$\beta\text{-hexosaminidase release (\%)} = \frac{A_{405} \text{ of sup.}}{A_{405} \text{ of sup.} + A_{405} \text{ of pellet}} \times 100$$

위의 식에서 A₄₀₅는 405 nm에서 측정된 대조군 및 실험군 각각의 흡광도 값이고, sup.는 supernatant (상정액)를 의미한다.

5) Enzyme-linked immunosorbent assay for inflammatory cytokines (TNF- α , IL-4)

초오에 의한 아토피 피부염 발현인자의 차단을 확인하기 위해 RBL-2H3 세포를 6 well plate에 5×10^5

cells/well의 농도로 분주한 후 24시간 배양한 다음, 초오를 농도별 (0, 1.0 및 2.0 mg/ml)로 세포에 처리하였다. 1시간 동안 배양한 후 50 nM PMA와 1 μ M A23187을 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 처리하고, 8시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상정액을 분리하여 5,000 rpm에서 3분간 원심분리하고, 분리된 상정액을 -20°C에 보관하였다. TNF- α , IL-4 ELISA set를 사용하여 manufacture's protocol에 따라 실험을 실시하였다. Color development는 450 nm에서 흡광도를 측정하여 각 cytokine의 누출량을 확인하였다.

6) Total RNA 분리 및 RT-PCR

Total RNA는 Trizol법으로 분리하였다. 세포에 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 첨가하여 용해시킨다. Chloroform 0.2 ml을 첨가하여 잘 혼합한 후, 실온에서 2-3분간 반응시킨다. 반응이 끝난 샘플은 4°C, 14,000 rpm, 20분간 원심 분리한 후, 그 상정액을 멸균된 새 microtube로 옮긴다. 상정액과 동량의 isopropanol을 첨가하고, 잘 혼합한 후, 실온에서 15분간 침전시킨다. 침전이 끝난 샘플은 4°C, 14,000 rpm, 20분간 원심 분리한 후, 그 상정액을 버린다. 샘플에 75 % ethanol 0.5 ml을 첨가하여 4°C, 7,500 rpm, 5분간 원심 분리한 후 상정액을 완전히 제거하였다. RNA pellet은 실온에서 자연 건조시켜, RNase free water에 현탁하였다. 분리된 total RNA는 -70°C에서 보관하였다.

분광 광도계 (Spectrophotometer, BioPhotometer, Eppendorf)를 사용하여 total RNA량을 측정하였다. 역전사효소인 M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, 합성된 cDNA를 PCR template로 하여 PCR amplification을 실시하였다.

PCR amplification은 PCR machine (ASTEC PC802)을 사용하였다. 10 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl, 250 μ M dNTP, 1 unit of Taq polymerase가 첨가되어 있는 PCR PreMix (Bioneer, Korea)에 3 μ g의 RNA으로 합성된 각각의 cDNA template와 Table 1.에 표기한 primers를 첨가하고, distilled water로 PCR mixture 최종 volume이 20 μ l가 되게 하였다. PCR amplification 조건은 다음과 같다. 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 95°C에서

40초 denaturation, 53°C에서 50초 annealation, 72°C에서 40초 extension의 반응을 1 cycle로 하여, 28 cycles를 반응시켰다. 그 후, 72°C에서 7분간 post-extension 시켰다.

PCR 후 증폭된 산물은 0.5% agarose gel을 이용하여 0.5× TBE buffer에서 전기영동을 실시하였고, 전기영동이 끝난 gel을 EtBr (Ethidium Bromide)에 염색하여 UV에서 증폭산물을 확인하였다. GAPDH를 internal control로 사용하였다<Table 1>.

<Table 1> Oligonucleotide primers used for RT-PCR in this study.

Targer gene	Name of Primer	Oligonucleotide sequences (5' to 3' direction)	Expected size	Accession number
TNF-α	TNF-3F TNF-3R	CGTCTACTCCTCAGAGCCC TCCACTCAGGCATCGACATT	226 bp	NM012675
IL-4	IL4-1F IL4-1R	AACACTTTGAACCAGGTCAC AGTGCAGGACTGCAAGTATT	330 bp	X16058
COX-1	COX1-2F COX-1R	ACTGGTCTGCCTCAACACCA CAAGGGTGAGACCCCAAGTT	223 bp	S67721
COX-2	COX2-6F COX2-6R	TGACCAGAGCAGAGAGATGA CATAAGGCCTTTCAAGGAGA	250 bp	S67722
GAPDH	GAPDH-2F GAPDH-2R	GGCCAAAAGGGTCATCATCT GTGATGGCATGGACTGTGGT	201 bp	NM017008

7) Western blot analysis

1× PBS buffer를 이용하여 세포를 세척한 후, scraper로 세포를 모은다. 모아진 세포에 lysis buffer를 첨가하여 현탁한 후, 세포로부터 protein extraction을 한다. Protein extracts를 Bradford법으로 정량한 후, 동량의 protein 샘플들을 10% SDS gel을 이용하여 전기 영동하였다. 전기영동 후, SDS gel의 bands를 nitrocellulose membrane에 transfer하고, transfer된 blots는 5% 탈지유를 이용하여 blocking시켰다. 1차 Antibody인 NF-κB (p65), IκB-α, β-actin, p38, ERK, JNK, phosphorylated-p38, -ERK, -JNK polyclonal Antibody, monoclonal Antibody를 각 blots에 첨가하여 4°C에서 반응시킨 후, 2차 Antibody를 첨가하여 실온에서 반응시켰다. 반응이 끝나면 AP (BCIP/NBT phosphatase substrate) system을 이용하여 각 blots의 band를 확인하였다.

8) Protein extracts 준비

1× PBS buffer를 이용하여 세포를 2번 세척한 후, scraper로 세포를 모은다. 모아진 세포에 protein extraction solution(PRO-PREP, Intron, Korea) 200 μl 첨가한 후 현탁하고, ice에서 30분간 반응시킨다. 반응이 끝나면 4°C, 14,000 rpm, 20분간 원심 분리한 후, cytoplasmic protein이 함유되어 있는 상정액을 멸균된 새 microtube로 옮긴다. 남아 있는 pellet에 nuclear protein extraction buffer 100 μl를 첨가하여 현탁시킨 후, ice에서 30 분간 반응시킨다. 반응이 끝나면 4°C, 14,000 rpm, 20분간 원심 분리한 후, nuclear protein이 함유되어 있는 상정액을 멸균된 새 microtube로 옮긴다.

9) 통계처리

成績은 평균치±표준오차로 나타내었고 평균치간의 有意性은 Student's *t*-test를 이용하여 檢定하였으며 *P* 값이 0.05 미만일 때 有意한 것으로 判定하였다. 통계 처리는 sigma plot 9.0을 사용하였다.

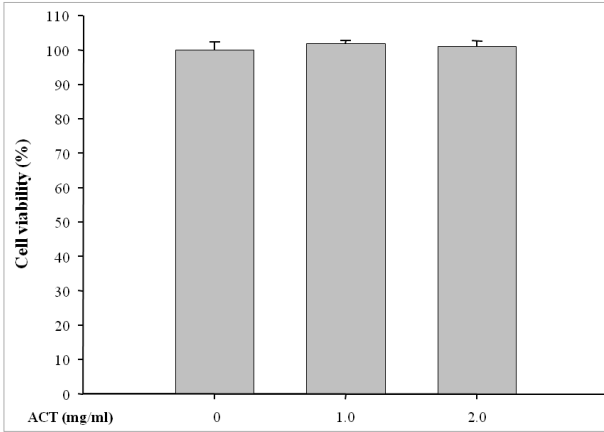
Ⅲ. 結 果

1. 세포 생존율에 미치는 영향

RBL-2H3 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 MMT assay를 실시하였다. 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서의 세포 생존율은 100 ± 1.15이었으며, 초오 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml의 농도를 처리한 세포에서 각각 101.85 ± 0.47, 101.17 ± 0.76의 생존율을 나타내었으나 有意성 있는 변화는 없었다<Figure 1>.

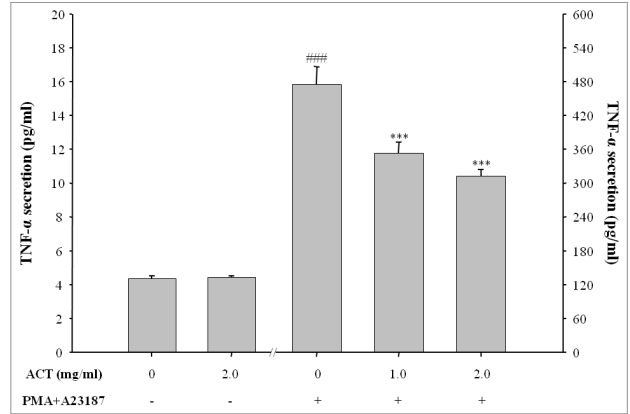
2. 세포의 탈과립에 미치는 영향

β-hexosaminidase의 누출량은 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 4.73 ± 0.18%였으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에서 8.37 ± 0.32%로 현저히 증가 (*P*<0.005)하였으며, 자극 전 초오를 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml의 농도로 처리한 세포에서는 각각 7.11 ± 0.32%, 6.04 ± 0.17%로 有意성 (*P*<0.05, *P*<0.005) 있는 감소를 보였다<Figure 2>.

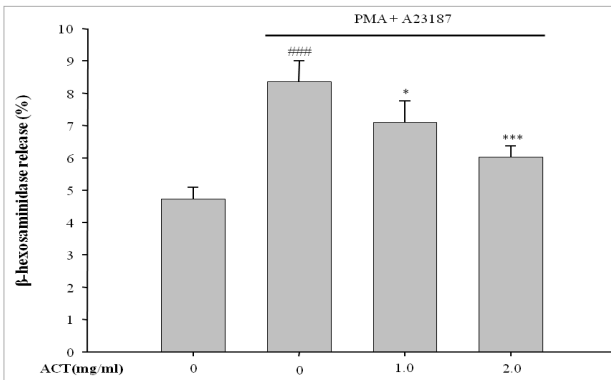


〈Figure 1〉 Effect of ACT on cell viability in RBL-2H3 cells. Cells viability was evaluated by MTT assay. Data represent the mean \pm SEM (Std. Err.) of 3 independent experiments.

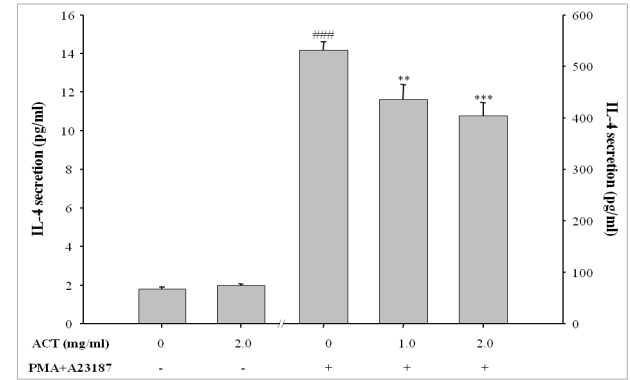
ACT : Aconiti Ciliare Tuber



〈Figure 3〉 Effect of ACT on TNF- α secretion from RBL-2H3 cells. TNF- α concentration was measured from cell supernatants using ELISA method. Each column represents as the mean \pm SEM (Std. Err.) from 4 wells. ### P<0.005; significant as compared to unstimulated group, *** P<0.005; significant as compared to stimulated group by Scheffe's multiple comparison.



〈Figure 2〉 Effect of ACT on β -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells. Cells were treated with the indicated concentration of ACT. β -hexosaminidase release into represented as mean \pm SEM (Std. Err.) of 3 independent samples. ### P<0.005; significant as compared to unstimulated group, * P<0.05, *** P<0.005; significant as compared to stimulated group by Scheffe's multiple comparison.



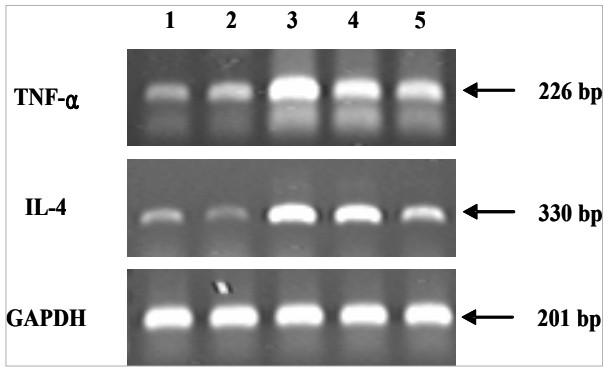
〈Figure 4〉 Effect of ACT on IL-4 secretion from RBL-2H3 cells. IL-4 concentration was measured from cell supernatants using ELISA method. Each column represents as the mean \pm SEM (Std. Err.) from 4 wells. ### P<0.005; significant as compared to unstimulated group, ** P<0.01, *** P<0.005; significant as compared to stimulated group by Scheffe's multiple comparison.

3. TNF- α ELISA assay

TNF- α 의 분비량은 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 4.37 ± 0.08 pg/ml였으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에는 474.85 ± 15.81 pg/ml로 현저히 증가($P<0.005$)하였으며, 자극 전 초오를 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml의 농도로 처리한 세포에서는 각각 353.28 ± 9.75 pg/ml, 312.40 ± 5.88 pg/ml로 유의성 ($P<0.005$) 있는 감소를 보였다<Figure 3>.

4. IL-4 ELISA assay

IL-4의 분비량은 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 1.81 ± 0.05 pg/ml였으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에는 531.39 ± 9.45 pg/ml로 현저히 증가 ($P<0.005$)하였으며, 자극 전 초오를 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml의 농도로 처리한 세포에서는 각각 435.95 ± 16.52 pg/ml, 404.15 ± 14.66 pg/ml로 유의성 ($P<0.01$, $P<0.005$) 있는 감소를 보였다<Figure 4>.



〈Figure 5〉 Effects of ACT on the PMA plus A23187-induced inflammatory cytokines (TNF- α and IL-4) mRNA expression in RBL-2H3 cells. Levels of TNF- α , IL-4, and GAPDH mRNA were assayed by RT-PCR. GAPDH was used as internal control gene.

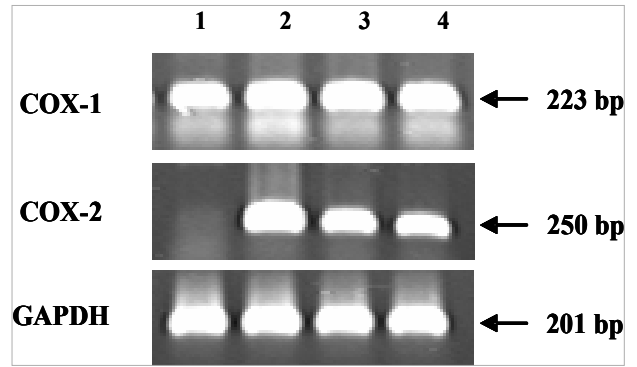
ACT cytokines RT-PCR : 10h stimulation
 lane 1, untreated
 lane 2, only treated Med. (2.0 mg/ml)
 lane 3, control (treated stimulus)
 lane 4, ACT 1.0 mg/ml + stimulus
 lane 5, ACT 2.0 mg/ml + stimulus
 〈PCR condition〉
 TNF- α : Tm = 52 $^{\circ}$ C, 40 cycles
 IL-4, GAPDH : Tm = 52 $^{\circ}$ C, 28 cycles

5. Pro-inflammatory cytokines mRNA expression에 미치는 영향

초오의 pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-4) mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 초오를 각 농도별로 (1.0, 2.0 mg/ml) RBL-2H3 세포에 1 시간동안 전 처리하고, PMA와 A23187을 첨가하여 10 시간동안 반응시킨다. 각각의 cytokine은 PMA와 A23187에 의해 mRNA 발현이 상당히 증가되었으나(Lane 3), 초오를 전 처리한 실험군에서는 mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Lane 4, 5)〈Figure 5〉.

6. COX-2 mRNA expression에 미치는 영향

초오의 COX-1, COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 앞선 TNF- α , IL-4 mRNA expression의 결과와 동일하게 COX-2 또한 PMA와 A23187에 의해 mRNA expression이 상당히 증가되었으나 (Lane 2), 초오 1.0, 2.0 mg/ml을 전 처리한 실험군에서는 mRNA expression이 초오 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다



〈Figure 6〉 Effects of ACT on the PMA plus A23187-induced COX-1 and COX-2 mRNA expression in RBL-2H3 cells. Levels of COX-1, COX-2, and GAPDH mRNA were assayed by RT-PCR. GAPDH was used as internal control gene.

ACT cytokines RT-PCR : 4h stimulation
 lane 1, untreated
 lane 2, control (treated stimulus)
 lane 3, ACT 1.0 mg/ml + stimulus
 lane 4, ACT 2.0 mg/ml + stimulus
 〈PCR condition〉
 Tm = 55 $^{\circ}$ C, 30 cycles

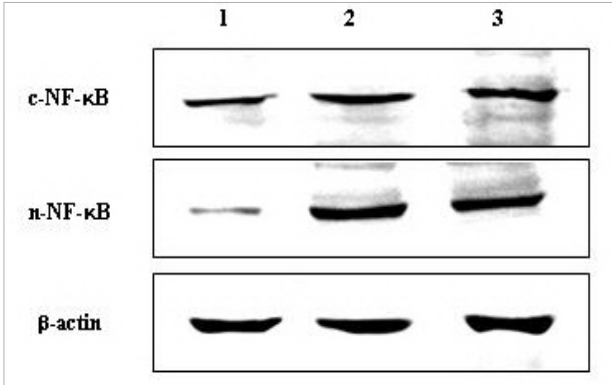
(Lane 3, 4). 그러나 COX-1에서는 mRNA expression의 차이를 확인할 수 없었다〈Figure 6〉.

7. NF- κ B (p65) activation에 미치는 영향

초오의 NF- κ B (p65) activation에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Western blot analysis를 실시하였다. 초오 2.0 mg/ml을 RBL-2H3 세포에 1 시간동안 전 처리하고, PMA와 A23187을 첨가하여 3 시간동안 반응시킨다. Nuclear extract에서는 PMA와 A23187에 의해 NF- κ B (p65) activation이 확연하게 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Lane 2). 그러나 초오 2.0 mg/ml을 전 처리한 실험군에서는 NF- κ B (p65) activation이 감소하였다. 반면, cytoplasmic extract에서는 NF- κ B (p65) activation의 차이를 확인할 수 없었다. 따라서 초오에 의해 NF- κ B (p65)의 핵 내 이동이 감소되었음을 알 수 있었다〈Figure 7〉.

8. I κ B- α degradation에 미치는 영향

초오의 I κ B- α degradation에 미치는 영향을 알아보기 위하여 cytoplasmic extract를 이용하여 Western



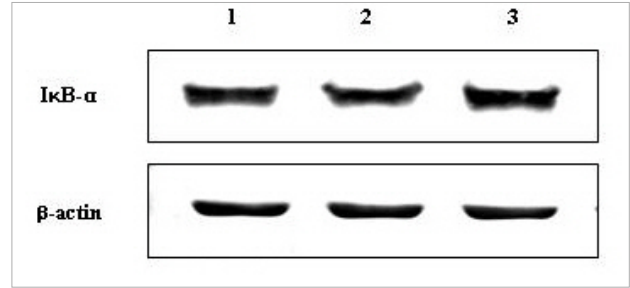
〈Figure 7〉 Effects of ACT on the activation of NF- κ B (p65) in RBL-2H3 cells. The cell extract were assayed Western blot analysis for NF- κ B (p65) in cytoplasmic (c-NF- κ B) and nuclear extracts (n-NF- κ B).

ACT NF- κ B Western blotting : 3h stimulation
 lane 1, untreated
 lane 2, control (treated stimulus)
 lane 3, ACT 2,0 mg/ml + stimulus
 c-NF- κ B : cytoplasmic extract
 n-NF- κ B : nuclear extract

blot analysis를 실시하였다. 초오 2.0 mg/ml을 RBL-2H3 세포에 1 시간동안 전 처리하고, PMA와 A23187을 첨가하여 30분 동안 반응시킨다. PMA와 A23187에 의해 cytoplasm에서 I κ B- α degradation이 일어난 것을 확인할 수 있었다 (Lane 2). 그러나 초오 2.0 mg/ml을 전 처리한 실험군에서는 I κ B- α degradation이 감소하였다 (Lane 3)〈Figure 8〉.

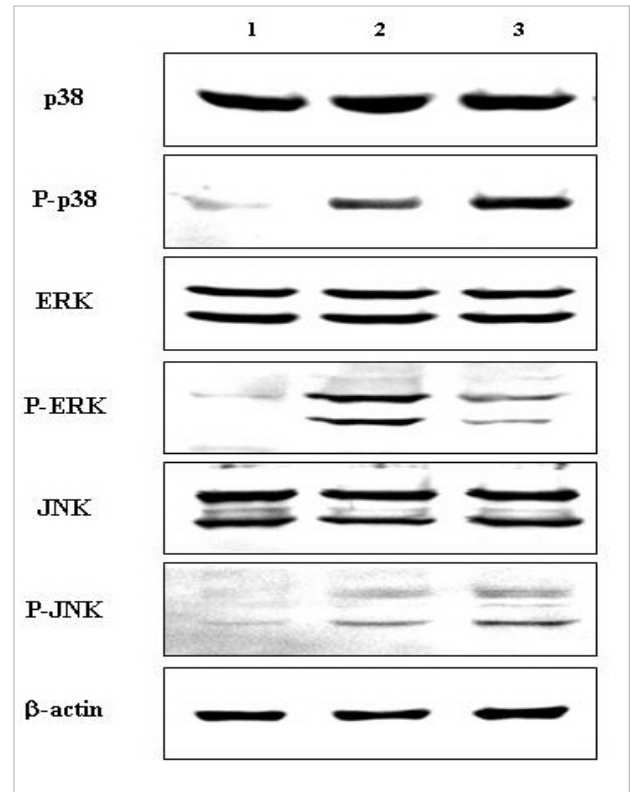
9. MAPKs 신호전달체계에 미치는 영향

초오의 inflammatory cytokines 발현에 미치는 영향에 관한 메커니즘을 알아보기 위하여 Western blot analysis로 MAPKs 활성을 확인하였다. 초오 2.0 mg/ml을 RBL-2H3 세포에 1 시간동안 전 처리하고, PMA와 A23187을 첨가하여 2시간동안 반응시킨다. 초오에 의해 phosphorylation-ERK MAPK 활성이 감소된 것을 확인하였으나, p38과 JNK MAPKs에서는 감소를 확인할 수 없었다〈Figure 9〉.



〈Figure 8〉 Effects of ACT on the degradation of I κ B- α in RBL-2H3 cells. The cell extract were assayed Western blot analysis for I κ B- α in cytoplasmic extract.

ACT I κ B- α Western blotting : 30min stimulation
 lane 1, untreated
 lane 2, control (treated stimulus)
 lane 3, ACT 2,0 mg/ml + stimulus



〈Figure 9〉 Effects of ACT on the activation of ERK MAPK on RBL-2H3 cells. The cell extract were assayed Western blot analysis for the phosphorylation of p38, JNK, and ERK.

ACT MAPKs Western blotting : 2h stimulation
 lane 1, untreated
 lane 2, control (treated stimulus)
 lane 3, ACT 2,0 mg/ml + stimulus

IV. 고찰

아토피 피부염은 濕熱型, 血熱型, 濕阻型, 血燥型으로 구분하고 清熱利濕, 健脾利濕, 祛風清熱, 養血潤燥, 涼血 등 다양한 변증분류에 따른 치법으로 세분하여 치료하고 있다^{15,16}. 그러나 만성화, 재발화 될수록 증상은 더욱 다양하게 나타나서 임상적으로 뚜렷한 변증으로 구별할 수 없는 경우가 많으며 이럴 경우 다양한 처방들이 적용되고 있다^{7,17}.

초오는 味辛 性熱 大毒한데 祛風 散寒止痛 消腫潰堅 祛腐의 효능이 있고¹⁸ 『藥譜』에 草烏頭라는 명칭으로 최초로 수재되었으며 『聖濟總錄』에 草烏라는 이름으로 최초로 처방되었다¹⁹. 초오의 독성에 대해서는 기존 연구에서 임상용량의 경우 뚜렷한 독성변화가 없었으며²⁰, 『실용독성중약학』에서는 초오의 중독제량을 6-9g으로 설명하고 있다²¹.

문헌적으로 피부질환에 초오를 사용한 경우는 『世醫得效方』²²에서 癬에 胡粉散으로 胡粉, 乳香과 함께 쓰이거나 『外科正宗』²³의 回陽玉龍膏 등에서 볼 수 있다. 초오의 임상경험방중 天麥湯은 만성기에 특발성으로 나타나는 풍한습에 의한 소양과 삼출, 홍반 등의 증세를 보이는 아토피 피부염 환자들에게 투약하여 유효한 효과를 체득하였으며 실험을 통해서도 유의한 반응이 나타나는 것을 인지하였다¹².

선행연구를 바탕으로 天麥湯의 아토피 피부염에 대한 치료효과가 처방중 초오의 거풍습하는 효과에 기인했을 가능성과 이를 이용한 아토피 피부염 제제의 개발을 위해 초오를 대상으로 한 실험이 필요하였다. 이에 저자는 RBL-2H3 세포를 사용하여 세포독성과 생존율에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 β -hexosaminidase release, TNF- α 와 IL-4를 측정하여 비만 세포 활성화에 대한 초오의 영향을 관찰하였고 그 기전에 대해 살펴 보았다.

알레르기 질환은 조직 손상의 기전을 쉽게 이해할 수 있도록 Gell과 Coomb에 의해서 I-IV형으로 분류되어 사용되고 있다. I, II, III형은 항체가 관여하는 체액성 면역반응이며, 이 중 I형과 II형은 세포 표면에서 양성반응이 일어나고 III형은 세포 외액에서 일어난다. IV형은 주로 T 세포와 대식세포가 관여하는 세포매개 면역 반응으로 증상이 대체로 수일 후에 나타나는 지연형 반응이다¹. 이 중 제 I형 과민반응은 비만세포에 부착된 비만세포가 탈과립을 일으키며

histamine 등 일차 화학매체가 유리되어 발생하고, 이때 세포막이 활성화되면 류코트리엔 (leukotriene), 프로스타글란딘, 혈소판활성화인자 (PAF) 등의 이차화학매체가 분비되며, 다시 비만세포로부터 IL-3, IL-4, IL-5 등의 사이토카인이 분비된다. 알레르기 반응은 분비된 화학매체의 약리작용으로 신속히 일차 반응이 일어나고, 화학매체와 사이토카인의 작용으로 호산구 등의 염증 세포가 모여들고 이 세포들의 영향으로 알레르기 염증반응이 지속된다²⁴.

알레르기 질환의 발생에 중요한 역할을 하는 비만세포는 Ehrlich에 의해 처음 관찰, 명명된 이래 탈과립 유발 인자들과 억제인자들에 대한 연구를 통하여 아토피 피부염, 기관지 천식 및 알러지 비염 등 여러가지 알레르기 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 약물을 개발하는 연구에 많이 이용되고 있다²⁵.

MTT assay를 통해 RBL-2H3 세포의 생존율에 대해 살펴보면 아무런 처치를 하지 않은 세포 생존율을 100 ± 1.15 이었으며, 초오 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml의 농도를 처리한 세포에서 각각 101.85 ± 0.47 , 101.17 ± 0.76 의 생존율을 나타내었으나 유의성 있는 변화는 없어 초오 1.0-2.0 mg/ml의 농도에서는 세포 생존율에 영향을 미치지 않음을 알 수 있다<Figure 1>.

Histamine은 조직의 비만세포와 호염기구에서 합성되고 저장되며 여러 반응에 의해 분비된 후 혈류를 통하여 조직으로 확산되어 혈관 확장 및 혈관 투과성을 증가시키고, 말초신경계와 상호작용으로 급성 염증 반응에 많은 영향을 끼치는 것으로 알려져 있으며, β -hexosaminidase는 histamine과 함께 비만세포 내에 존재하는 효소로서 탈과립에 의해 histamine의 누출량과 비례하여 분비되는 것으로 알려져 있어^{26,27}, 비만세포의 탈과립을 간접적으로 측정하는데 유용한 지표로 이용되고 있다.

본 실험에서 β -hexosaminidase의 누출량은 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 $4.73 \pm 0.18\%$ 였으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에서 $8.37 \pm 0.32\%$ 로 현저히 증가 ($P < 0.005$)하였으며, 자극 전 초오를 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml의 농도로 처리한 세포에서는 각각 $7.11 \pm 0.32\%$, $6.04 \pm 0.17\%$ 로 유의성 ($P < 0.05$, $P < 0.005$) 있는 감소를 보였다. 따라서 초오가 비만세포의 탈과립을 억제하는 작용을 한다고 생각된다 <Figure 2>.

인간의 비만세포는 TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 등의 cytokine을 만들어 내는데, 이들 cytokine들은 neutrophil과 eosinophil을 모으는 역할을 하며, 염증반응을 일으키는데 중요한 역할을 담당한다. 이 중 TNF- α 는 전구염증인자로 비만세포와 대식세포 등에서 생성되어 많은 염증반응을 유발하는 인자로 알려져 있으며, 생체 내에서 단독으로 또는 다른 cytokine들과 협력 작용하여 몇몇 종양의 혈관을 손상시킴으로서 종양 괴사를 유발시키거나, 몇몇 바이러스 혹은 기생충에 의한 감염에 대해 숙주의 저항성을 유도시키기도 한다. 비만세포에서 유리된 TNF- α 는 국소의 혈관내피세포에 작용하여 ELAM-1의 발현 및 백혈구의 혈관 외 유주를 유도함으로써 알레르기의 국소 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다²⁸⁾.

본 실험에서 TNF- α 의 분비량은 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 4.37 ± 0.08 pg/ml였으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에는 474.85 ± 15.81 pg/ml로 현저히 증가 ($P < 0.005$)하였으며, 자극 전 초오를 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml의 농도로 처리한 세포에서는 각각 353.28 ± 9.75 pg/ml, 312.40 ± 5.88 pg/ml로 유의성 ($P < 0.005$) 있는 감소를 보였다. 그러므로 초오는 TNF- α 의 발현을 억제하여 염증반응을 억제하는 작용을 한다고 생각할 수 있다<Figure 3>.

또한 IL-4는 NK cell, mast cell, neutrophil과 eosinophil에서 분비되는 cytokine으로 알레르기 반응의 유발, B 세포의 분화와 증식, IgE의 생성 등에 관여하여 염증 반응 분비 물질로 천식 유발과 아토피의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. 본 실험에서 IL-4의 분비량은 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 1.81 ± 0.05 pg/ml였으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에는 531.39 ± 9.45 pg/ml로 현저히 증가 ($P < 0.005$)하였으며, 자극 전 초오를 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml의 농도로 처리한 세포에서는 각각 435.95 ± 16.52 pg/ml, 404.15 ± 14.66 pg/ml로 유의성 ($P < 0.01$, $P < 0.005$) 있는 감소를 보였다<Figure 4>.

이러한 효과에 대한 기전을 분석하기 위해 초오의 pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-4) mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보려고 RT-PCR을 실시하였다. 초오를 각 농도별로 (1.0, 2.0 mg/ml) RBL-2H3 세포에 1시간동안 전 처리하고, PMA와 A23187을 첨가하여 10시간동안 반응시킨다. 각각의 cytokine은 PMA와 A23187에 의해 mRNA 발현이

상당히 증가되었으나, 초오를 전 처리한 실험군에서는 mRNA 발현이 초오의 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다<Figure 5>.

Prostaglandin은 arachidonic acid에서 유래해 염증과 면역반응을 비롯해 smooth muscle tone, vascular permeability, cellular proliferation 등에 작용하는 intercellular, intracellular messenger이다. Prostaglandin은 세균의 감염에서 유래한 LPS 혹은 외부 자극에 의해 세포막 지질 성분이 phospholipase A2에 의해 생성되는 arachidonic acid로부터 만들어 진다. 즉 arachidonic acid는 cyclooxygenase (COX) 효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE2와 PGI2는 혈관 투과성 항진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. COX는 I형과 II형의 2가지 isoform이 존재한다. I형 효소인 COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류조절, 혈소판 응집 등 인체의 정상적인 기능을 유지하는데 중요한 작용을 하는 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 II형인 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다^{30,31)}.

초오의 COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아 보려고 RT-PCR을 실시한 결과 앞선 TNF- α , IL-4 mRNA expression의 결과와 동일하게 COX-2 또한 PMA와 A23187에 의해 mRNA expression이 상당히 증가되었으나, 초오 1.0, 2.0 mg/ml을 전 처리한 실험군에서는 mRNA expression이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 COX-1에서는 mRNA expression의 차이를 확인할 수 없었다<Figure 6>.

만성 염증성 질환의 병태생리는 복잡하지만 각종 염증을 매개하는 물질을 합성하도록 유도하는 전사 인자의 활성이 필수적이다. 여러 가지 전사인자 중에서 nuclear factor-kappaB(NF- κ B)가 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NF- κ B는 1986년 Sen and Baltimore에 의해 B cell의 kappa light chain에서 발견된 transcriptional factor로 염증 반응, 면역 반응 등에 광범위하게 작용하며 특정 세포의 유전자 발현에 관여하는 전사 인자이다. NF- κ B는 LPS, cytokine, UV irradiation, growth factor, oxygen free radical, oxidative stress와 vital infaction 등의 자극에 의해 활성화된다. 정상적으로 NF- κ B는 내피세포와 백혈구 등 여러 세포의 세포질에 있는 inhibitory kappaB(I κ B)

단백질과 결합되어 있다. NF- κ B가 자극을 받았을 때 NF- κ B-I κ B 복합체는 인산화되고 I κ B 단백질은 핵내로 이동하여 유전자 발현의 조절 부위에 결합한 후 여러 염증성 매개체의 유전자 발현을 유도한다. 여러 염증 매개체로는 COX-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 암호화하는 유전자뿐만 아니라, IL-1, IL-2, IL-8과 TNF- α 등과 같은 염증성 사이토카인의 전사가 있다³²⁾. 따라서 NF- κ B의 활성 조절이 가능할 경우 만성과 급성 염증질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 본 연구결과 PMA와 A23187에 의해 NF- κ B (p65) activation이 확연하게 증가된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 초오 2.0 mg/ml을 전 처리한 실험군에서는 NF- κ B (p65) activation이 감소하였다. 반면, cytoplasmic extract에서는 NF- κ B (p65) activation의 차이를 확인할 수 없었다. 따라서 초오에 의해 NF- κ B (p65)의 핵 내 이동이 감소되었음을 알 수 있었다<Figure 7>. 또한 PMA와 A23187에 의해 cytoplasm에서 I κ B- α degradation이 일어났으나 초오 2.0 mg/ml을 전 처리한 실험군에서는 I κ B- α degradation이 감소하였다<Figure 8>.

생명체를 구성하는 각각의 세포들은 주어진 환경의 변화에 계속적으로 반응하는 동적인 것으로, 세포반응은 대부분의 경우 호르몬이나 사이토카인 등의 세포 밖 인자를 세포가 수용체를 통해 받아들여 그 정보를 핵으로 전하여 관련된 유전자를 발현시킴으로서 반응하게 된다. 이러한 세포 안에서 정보전달에 관여하는 대표적인 물질의 하나가 MAP kinase cascade이다. MAP kinase family는 mitogen-activated protein kinase(MAPK)/extracellular signal regulated protein kinase(ERK), c-Jun N-terminal Kinase(JNK)/stress-activated protein kinase(SAPK)와 p38, ERK5/BMK1 등으로 구성된다. 이중 MAPK는 세포분열 촉진인자에 의해 활성이 강하게 유도되는데 반해 JNK와 p38은 포유류에서 여러 가지 자외선, 산화스트레스, 엔도톡신 등 물리화학적인 스트레스에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다^{33,34)}.

초오의 inflammatory cytokines 발현에 미치는 영향에 관한 메커니즘을 알아보려고 Western blot analysis로 MAPKs 활성을 확인하였다. 초오 2.0 mg/ml을 RBL-2H3 세포에 1 시간동안 전 처리하고, PMA와 A23187을 첨가하여 2시간동안 반응시킨다. 초오에 의해 phosphorylation-ERK MAPK 활성을

억제시키는 것으로 평가되었으나, p38과 JNK MAPKs에서는 감소를 확인할 수 없었다<Figure 9>.

이상의 결과를 종합하여 살펴보면 세포 독성을 나타내지 않는 농도하에서 초오는 β -hexosaminidase의 누출을 감소시키고, TNF- α , IL-4의 생성과 분비를 저해시켰다. 또한 핵 내서의 NF- κ B (p65)의 protein 발현 정도를 억제시켰으며, 세포질 내에서 I κ B- α 의 degradation 및 ERK MAPK 활성을 감소시켰다. 그러므로 초오는 I κ B- α 의 degradation 억제를 통한 핵 내로의 NF- κ B (p65) translocation 조절기전으로 알레르기의 염증반응을 억제하는 작용을 하고 있다고 생각된다.

이는 초오의 거풍습하는 효능을 이용하여 아토피 피부염을 비롯한 급만성 알레르기성 피부질환에 사용할 수 있는 제제의 개발 가능성에 대한 실험적인 근거를 마련하였으며 본 실험결과를 바탕으로 한 추가적인 임상연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

초오의 β -hexosaminidase 누출량, TNF- α 와 IL-4의 발현에 미치는 영향에 관하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 초오 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml 의 농도에서 RBL-2H3 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다.
2. 초오는 RBL-2H3 세포에서 β -hexosaminidase의 누출량을 유의성 있게 감소시켰다.
3. 초오는 RBL-2H3 세포에서 TNF- α 의 발현을 유의성 있게 억제시켰다.
4. 초오는 RBL-2H3 세포에서 IL-4의 발현을 유의성 있게 억제시켰다.
5. 초오는 RBL-2H3 세포에서 COX-2 mRNA expression을 억제시켰다.
6. 초오는 RBL-2H3 세포에서 NF- κ B (p65) activation을 억제시켰다.
7. 초오는 RBL-2H3 세포에서 I κ B- α degradation을 억제시켰다.

8. 초오는 RBL-2H3 세포에서 ERK MAPK activation을 억제시켰다.

VI. 감사의 글

이 논문은 2009학년도 동의대학교 연구년 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- 홍창의. 소아과학. 서울:대한교과서주식회사. 1987:612-4.
- Lee HS, Kim JS, Pyun BY. Changes of the prevalence and the allergens of atopic dermatitis in children: from 1992 to 2002. *Pediatr Allergy Respir Dis Korea*. 2002;12:263-70.
- Finlay AY. Quality of life in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45:S64-6.
- 강석영. 알레르기 질환의 진단과 치료. 서울:일조각. 1995:241-52.
- Cooper KD. Atopic dermatitis: Recent trends in pathogenesis and therapy. *J Invest Dermatol*. 1994;102:128-37.
- 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海:上海科學技術出版社. 1994:461.
- 손병국, 최인화. 아토피피부염의 변증과 평가방법에 대한 고찰. *한방안이비인후피부과학회지*. 2008;21(3):150-65.
- 전국한의과대학공통교재 편찬위원회. 본초학. 서울:도서출판 영림사. 2004:647-50.
- 盧富來, 成樂箕. 生草烏와 法製草烏水鍼이 흰쥐의 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響. *대한침구학회지*. 1994;11(1):435-50.
- 金基鉉, 朴東錫. 鍼, 灸, 電鍼 및 草烏水鍼刺戟이 흰쥐 腦部位別 Catecholamine 含量에 미치는 影響. *경희한의대 논문집*. 1991;14(1):333-80.
- 姜秀一, 崔容泰. 藥鍼用 草烏抽出液의 安全性에 關한 實驗的 研究. *경희한의대논문집*. 1996;19(1):131-60.
- 김용현, 이승연, 김원일. 천막당이 항알러지 염증반응에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지*. 2008;22(1):95-102.
- Skehan P. Assays of cell growth and cytotoxicity. In: Studzinski, G.P. (Ed.), *Cell Growth and Apoptosis*. New York:Oxford University press. 1998:180.
- Schwartz LB, Austen KF, Wasserman SI. Immunologic release of β -hexosaminidase from purified rat serosal mast cells. *Journal of Immunology*. 1979;123:1445-50.
- 김미정, 이승연. 소아 아토피 피부염에 대한 문헌적 고찰. *대한한방소아과학회지*. 2000;14(1):167-82.
- 王伯岳, 江育仁. 중의아과학. 상해:상해과학기술출판사. 1984:203-4.
- 장지혜, 이준문, 이승연. 소아 아토피 피부염에 관한 임상적 고찰. *대한한방소아과학회지*. 2005;19(2):69-84.
- 강병수, 김영관. 임상배합본초학. 서울:영림사. 1994:173, 185, 201, 355, 406.
- 孫星衍. 神農本草經. 臺北:文光圖書有限公司. 1982:207, 300-1.
- 김윤경, 이제현, 송계용, 박성규, 김정숙. 임상투여용량에서 초오전탕액의 흰쥐에 대한 간독성연구. *대한한의학 방제학회지*. 2005;13(1):123-43.
- 楊芬明, 曾利純. 實用毒性中藥學. 北京:科學技術文獻出版社. 1992:192-200.
- 危亦林. 世醫得效方. 上海:第二軍醫大學出版社. 2006:708.
- 陳實功. 外科正宗. 北京:人民衛生出版社. 2007:46.
- 김형민. 면역과 알레르기. 서울:신일상사. 1998:234-41.
- Ehrlich P. Beitrage zur kenntnis der Anilinfarbung und ihrer Verwendung in drmikroskopischen Technik. *Arch Mikrock Anast*. 1877;13:263-77.
- Moon PD, Na JJ, Jeong HJ, Hong SH, Kim HR, Choi JO, Lee SH, Shin JY, Kim HM. Inhibitory effect of Gamibonjungikaitang extract on mast cell-mediated allergic reaction in murine Model. *J Pharm Pharm Sci*. 2005;8(1):94-101.
- Ennis M, Pearce FL, Weston PM. Some studies on the release of histamine from mast cells stimulated with polylysine. *Br. J. Pharmacol*. 1980;70:329-34.
- 이중달. 그림으로 설명한 병리학. 서울:고려의학. 1991:29.
- 정혜영. 생명과학·분자의학을 위한 사이토카인 분자생물학. 서울:월드사이언스. 2002:117-24.

30. 노민수, 허준용, 이창훈, 이우영, 이수환, 이정준. 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물 탐색. 약학회지. 1998;42:558-66.
31. Kim SN, Son SC, Lee SM, Kim CS, Yoo DG, Lee SK, Hur GM, Park JB, Jeon BH. Midazolam inhibits proinflammatory mediators in the lipopolysaccharide-activated macrophage. Anesthesiology. 2006;105:105-10.
32. Gang A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor- κ B as a target for cancer drug development. Leukemia. 2002;16(6):1053-68.
33. 유미현, 박은경, 김영훈, 이연아, 이상훈, 양형인, 홍승재, 백용현, 박동석, 한정수, 유명철, 김경수. 화피의 항염 효과에 관한 연구. 대한한의학회지. 2006;27(1):184-95.
34. 최인장. 세포운명과 세포기능을 조절하는 구조 정보 전달. 제6장 MAP 카이나제. 서울:월드사이언스. 2006:93-104.