

# 금은화의 NF-κB 활성 억제를 통한 iNOS 조절이 NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염에 미치는 영향

안상현 · 김호현<sup>1\*</sup>

동국대학교 한의과대학 해부학교실, 1: 세명대학교 한의과대학 생리학교실

## Lonicera Japonica Inhibits Atopy Dermatitis in NC/Nga Mouse through Regulation of iNOS by NF-κB Suppression

Sang Hyun Ahn, Ho Hyun Kim<sup>1\*</sup>

*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 *Lonicera japonica* could inhibit atopy dermatitis through modulation of iNOS by NF-κB suppression. We found that IKK mRNA and iNOS mRNA expression in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide dose-dependantly decreased by *Lonicera japonica* (0.4 - 1.0 mg/ml) and NO production decreased. The distribution of NF-κB p65 and iNOS positive reacted cell in NC/Nga mice with atopy dermatitis were decreased by *Lonicera japonica* (45 mg/kg/day) and apoptosis were increased. These data likely indicate that *Lonicera japonica* may act as inflammatory regulator for atopy dermatitis through iNOS modulation by NF-κB suppression and may be possible to develop useful agent for chemoprevention of NO intricate inflammatory diseases.

**Key words :** *Lonicera japonica*, atopy dermatitis, iNOS, NO, apoptosis, NC/Nga mice

### 서 론

아토피 피부염은 주로 유아와 소아에 발생하는 만성 혹은 재발성 피부염이다<sup>1)</sup>. 소양증이 심한 습진이 발생하며, 아토피 질환의 과거력이나 가족력이 있는 사람에게서 흔히 나타난다<sup>2)</sup>. 우리나라의 아토피 유병률이 2001년에 인구 1,000당 12명에서 2005년 91.4 명으로 7.6배 증가 하였으며<sup>3)</sup>, 또한 아토피 피부염 환자 중 9세 이하가 53.4%를 차지하는 것 초·중·고교생 765만 1000명의 5.7%인 43만 명의 학생이 아토피 피부염을 앓고 있는 것으로 드러났다. 이로 보고되었다<sup>4)</sup>. 특히 아토피 질환 통계에 따르면 아토피 피부염에서는 각질층 내 ceramide 감소로 인한 sphingosine 저하가 protein kinase C (PKC) 활성을 유도하여<sup>5)</sup>, IκB kinase (IKKα, β)에 활성에 의한 IκB protein의 serine

residue 인산화가 일어나며, 그 후 IκB protein은 ubiquitination 되어 26S proteasom에 의해서 분해 (degradation)되고 그 결과 유리된 전사인자 nuclear factor (NF)-κB가 핵으로 들어가 target 유전자의 NF-κB binding site에 결합하여 iNOS 발현에 의한 NO 생성이 증가되어 염증반응이 유도된다고 보고되었다<sup>6,7)</sup>.

아토피 피부염의 한의학적 범주로는 胎熱, 乳癬, 奶癬, 胎斂瘡 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에 발생하는 것으로 보았다. 아토피 피부염에 대한 한의학적 內治法으로 증상의 발현양상, 病因病機, 발병시기에 따라 다양한 처방이 사용되고 있다<sup>8)</sup>.

금은화 (*Lonicera japonica*)는 주로 涼散風熱, 擁腫精瘡, 喉痹, 丹毒, 熱血毒痢, 風血感冒, 溫炳發熱의 약효를 가지며 한방이나 민간에서 이뇨, 해독 화농증 및 피부부종의 세척제로 사용되어 왔으며, 특히 清血解毒에 유효하다고 기록 되어있다<sup>9)</sup>. 금은화의 성분으로는 iridoid 성분인 loganin, vogeloside,

\* 교신저자 : 김호현, 충북 제천시 세명로 세명대학교 한의과대학 생리학교실  
· E-mail : binbae@semyung.ac.kr, · Tel : 043-649-1343  
· 접수 : 2010/02/02 · 수정 : 2010/02/24 · 채택 : 2010/03/09

epi-vogeloside 및 tannin과 triterpenoids 등과 flavonoid 화합물인 lonicerin, leteolin, apigenin, quercetin, ochnaflavone, astragalín 및 이들의 배당체 등이 알려져 있고, 주요 약리작용으로는 항균작용<sup>10)</sup>, 항염증작용<sup>11,12)</sup> 등이 있으며, 임상적으로 편도선염, 후두염 등의 상기도 감염, 피부화농증이나 바이러스성 결막염, 인플루엔자, 폐렴 등의 치료에 사용한다고 보고되었다<sup>13)</sup>.

본 연구는 금은화의 NF-κB 활성 억제제를 통한 iNOS 생성 조절이 아토피 피부염에 미치는 영향을 조사하였는데, lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 RAW 264.7 macrophages에서 금은화 추출물 농도에 따른 IKK mRNA와 iNOS mRNA 발현 그리고 NO의 생성 변화를 조사하였고, 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에서 NF-κB 활성화와 iNOS 생성 변화를 면역조직학적으로 관찰하였다. 아울러 apoptosis 유발 변화도 확인하였다.

## 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 금은화 투여군 (LT군)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다. 아토피 피부염은 우선 생쥐 등쪽 부위 피부를 면도한 다음 cellophane tape (3M, USA) 5회 첩포를 통해 각질층 (stratum corneum)의 최상부 (desquamation)를 제거하였다. 그런 다음 계면활성제의 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% CO<sub>2</sub> 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. 금은화 추출물의 제조와 투여

금은화를 증류수 500 ml에 넣고 2시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 감압·농축 후 동결 건조하여 추출물 (수득률 31%)을 얻었다. LT군에 D. pteronyssinus crude extract solution 처리 시작 후 3주 동안 45 ml/kg/day 량으로 구강투여 하였다.

### 4. RT-PCR

NF-κB 활성화에 관여하는 IKK (IκB kinase), 염증효소인 induce nitric oxide synthase (iNOS)의 mRNA 발현 양상을 조사하기 위해 역전사중합효소연쇄반응법 (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. RAW 264.7 macrophages - 5×10<sup>5</sup> cells/well을 6 well에 plating 하고 12시간 후에 lipopolysaccharide (1 μg/ml)를 2시간 처리하여 IKK와 iNOS mRNA 발현을 유도한 후 금은화 추출물 0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml을 농도별로 첨가하여 24시간동안 배양하였다. 배양한 후 수거한 RNA를 trizol reagent (Sigma)를 사용하여 추출하고 다음 fluorometer (Introgen, USA)로 RNA를 정량하였다. RT-PCR kit (Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 IKK primer (sense, 5' CCA CCC AGT TCC ACA AGT CT 3'; antisense, 5' CCT CCA CTG CGA ATA GCT TC 3')와 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 gel상에서 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 × 10<sup>5</sup> cells/well에 LPS (1 μg/ml) 2시간 처리 후 금은화 추출물을 농도별 (0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml)로 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양액 상층액 50 μl에 Greiss reagent (Sigma) 50 μl을 가하여 5분간 실온에서 반응시킨 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품으로 아질산나트륨 (NaNO<sub>2</sub>)을 사용하여 표준용량곡선을 작성하고, 질소산화물 (nitric oxide, NO<sub>2</sub>) 생성을 산출하였다.

### 6. 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 처리부위 피부를 10% NBF에 실온에서 24시간 동안 고정한 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5 μm 두께로 연속절편을 만들었다. 피부절편내 NF-κB 활성화와 iNOS 생성 변화를 관찰하기 위해 항 NF-κB와 항 iNOS 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 우선 절편을 proteinase K (20 μg/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 NF-κB p65 (1:500, Santa Cruz Biotech, USA) mouse anti mouse iNOS (1:100, Santa Cruz Biotech)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안

반응시켰으며, biotinylated goat anti-mouse IgG (DAKO)에 4°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

금은화의 apoptosis 유도 변화를 조사하기 위해서 in situ apoptosis detection kit (Intergen, USA)를 이용한 terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labelling (TUNEL) 방법을 실시하였다. 먼저 조직 절편을 proteinase K에 5분간 처리한 다음 equilibration buffer에서 20초간 반응시켰다. 그런 다음 strength TdT enzyme (36 µl TdT enzyme : 72 µl reaction buffer)을 처리하여 37°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. 유의성은 ANOVA test (SPSS17, SPSS, USA)를 통해 확인하였고, Scheffe로 사후검증 하였다.

결 과

1. 염증효소 유전자 발현 억제

IKK mRNA 발현은 LPS 처리군에 비해 LPS 처리 후 금은화 추출물이 처리된 RAW 264.7 macrophages에서 감소하였는데, 0.4 mg/ml에서 4.9%, 0.6 mg/ml에서 28.3%, 0.8 mg/ml에서 48.3% 그리고 1.0 mg/ml에서 48.4%로 농도-의존적 감소를 보였다. 또한 iNOS mRNA 발현도 LPS 단독 처리군보다 LPS 처리 후 금은화 추출물 처리된 RAW 264.7 macrophages에서 감소하였는데, 0.4 mg/ml에서 8.9%, 0.6 mg/ml에서 25.7%, 0.8 mg/ml에서 33.3% 그리고 1.0 mg/ml에서 40.2%로 농도-의존적 감소를 보였다(Fig. 1).

2. NO 생성 억제

LPS 처리된 RAW 264.7 macrophages에서 NO 생성은 605% (4.65±0.09 µm/5×10<sup>5</sup> cells)로 증가한 반면, 금은화 추출물 처리된 RAW 264.7 macrophages에서는 유의성 있는 농도-의존적 감소를 보였다. 금은화 추출물 0.4 mg/ml 처리 시 58% (1.94±0.11 µm/5×10<sup>5</sup> cells), 0.6 mg/ml 처리 시 72% (1.28±0.07 µm/5×10<sup>5</sup> cells), 0.8 mg/ml 처리 시 79% (0.97±0.04 µm/5×10<sup>5</sup> cells) 그리고 1.0 mg/ml 처리 시 83% (0.80±0.05 µm/5×10<sup>5</sup> cells)로 감소하였다(Fig. 2).

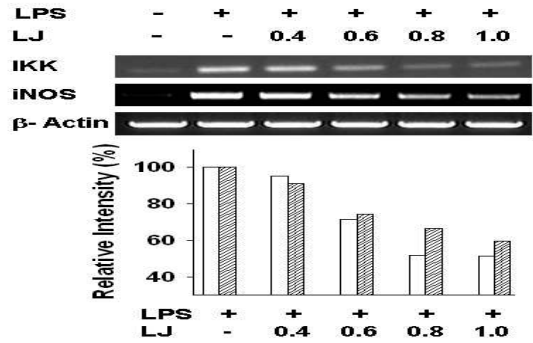


Fig. 1. Inhibition of LPS-induced IKK and iNOS mRNA expression by LJ. The RAW 264.7 macrophages were treated with 1 µg/ml of LPS for 2 hours prior to the addition of indicated concentrations (0.4 - 1.0 mg/ml) of LJ and the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced IKK and iNOS mRNA expression were dose-dependantly decreased in LJ treated RAW 264.7 macrophages. Abbreviation. LPS, lipopolysaccharide; LJ, Lonicera japonica; IKK, IκB kinase; iNOS, inducible nitric oxide synthase.

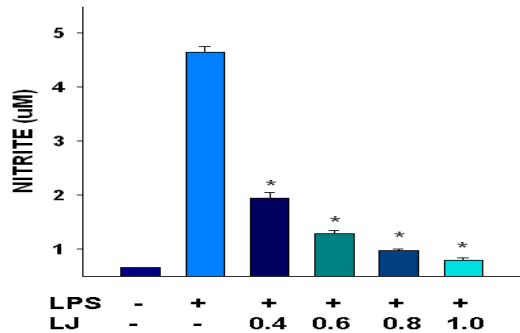


Fig. 2. Inhibition of LPS-induced NO production by LJ. The cell were treated with 1 µg/ml of LPS for 2 hours prior to the addition of indicated concentrations (0.4 - 1.0 mg/ml) of LJ and the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced NO production were dose-dependantly decreased in LJ treated RAW 264.7 macrophages. Abbreviation. \*, P < 0.05 compared with LPS alone.

3. 아토피 피부염 유발 생쥐내 NF-κB p65 활성화와 iNOS 생성 억제

핵과 핵막주변 세포질에서 양성반응을 보이는 NF-κB p65 양성반응세포는 아토피 피부염 유발 부위 후 진피 유두에서 증가된 양성으로 관찰되었는데, 금은화 추출물이 처리된 LT군에서는 NF-κB p65 양성반응세포 분포가 AD군에 비해 적은 것으로 관찰되었다. 영상분석 결과 AD군이 대조군 (258±27/100,000 pixel)에 비해 1438% 증가한 3968±117/100,000 pixel로 관찰된 반면, LT군에서는 AD군에 비해 40% 적은 2395±125/100,000 pixel로 관찰되었다(Fig. 3A). 또한 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 iNOS 양성반응세포의 분포 증가도 아토피 피부염 유발 부위 후 진피 유두에서 관찰되었는데, LT군은 AD군에 비해 낮은 폭의 증가를 보였다. 영상분석 결과 AD군은 대조군 (380±22/100,000 pixel)에 비해 742% 증가한 3198±186/100,000 pixel로 관찰된 반면, LT군에서는 AD군에 비해 62% 적은 1222±74/100,000 pixel로 관찰되었다(Fig. 3B, C).

4. 아토피 피부염에서 Apoptosis 유도 증가

핵에서 강한 TUNEL 양성반응을 보이는 apoptotic 세포는 피부염 유발 진피 유두에서 관찰되었으며, apoptotic 세포의 분

포는 대조군에 비해 AD군에서 증가하였으며, LT군은 AD군보다 더 큰 폭의 증가를 보였다. 영상분석 결과 TUNEL 양성반응은 AD군이 대조군 (181±13/100,000 pixel)에 비해 252% 증가한 638±51/100,000 pixel로 관찰되었고, LT군은 AD군보다 162% 증가한 1671±75/100,000 pixel로 관찰되었다(Fig. 4).

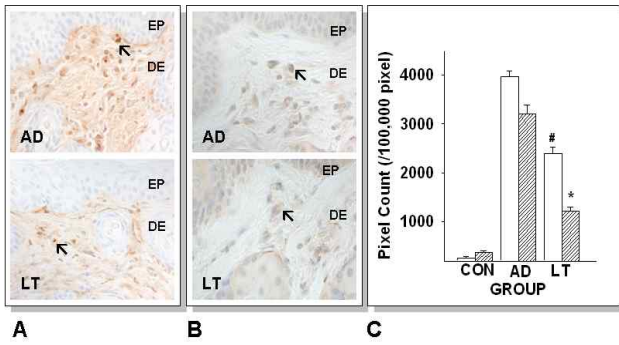


Fig. 3. Inhibition of NF-κB p65 and iNOS in NC/Nga mouse with atopy dermatitis by LJ (The photography of CON was not shown). A. NF-κB p65 immunohistochemistry (x400). The distribution of NF-κB p65 positive reacted cell (arrow) in dermal papilla of LT were decreased. B. iNOS immunohistochemistry (x1000). The distribution of iNOS positive reacted cell (arrow) in dermal papilla of LT were decreased. C. Image analysis for NF-κB p65 (□) and iNOS (▨) positive reaction. Abbreviation. EP, epidermis; DE, dermis; CON, No treated mice; AD, atopy dermatitis elicited mice; LT, Lonicera japonica extract (45 mg/kg/day) treated mice after atopy dermatitis elicitation; # or \*, P < 0.05 compared with AD.

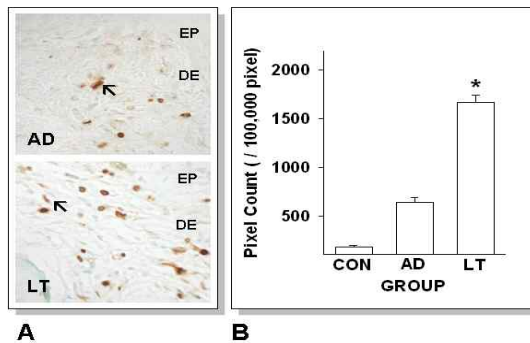


Fig. 4. Increase of apoptosis in NC/Nga mouse with atopy dermatitis by LJ (The photography of CON was not shown). A. TUNEL method (x400). The distribution of apoptotic cell (arrow) in LT were increased than AD. B. Image analysis for apoptosis. Abbreviation same as Fig. 3.

## 고 찰

활성산소종/활성질소종 (reactive oxygen species, ROS/reactive nitrogen species, RNS)의 발생과 항산화 방어제 (antioxydant defence system)간에 심각한 불균형이 초래된 산화 스트레스에서 산화질소 (Nitric oxide, NO)의 소모가 동반된 산화반응은 이차적인 산화 (oxidation), 질소화 (nitration) 및 nitrosation/nitrosylation 물질을 생성한다. 이러한 이차적인 nitrated species는 독특한 염증성 세포 신호 전달성을 나타낸다<sup>6,14,15</sup>. 염증성 산화물에 의한 산화, 질소화스트레스는 내피세포 기능성 장애, 고혈압, 동맥경화, 허혈/재관류 손상 및 염증반응의 병리기전을 주도 한다. 최근에는 iNOS의 전사인자인 NF-κ

B/Rel의 활성을 억제하여 NO 생성을 저해함으로써 항염증효과를 유도하는 연구가 활발하게 이루어지고 있으며<sup>7</sup>, 특히 *Cirsium rhinoceros*<sup>16</sup>, *Curcuma longa*<sup>17</sup>, *Rosmarinus officinalis*<sup>18</sup>, *Cudrania tricuspidata*<sup>19</sup>, *Cyperus rotundus*<sup>20</sup>, *Melia azedarach*<sup>21</sup>, *Scrophularia ningpoensis*<sup>22</sup> 등의 한약재에서 NO 생성 조절제를 찾으려는 많은 연구가 진행 중이다.

아토피 피부염의 한의학적 범주에 해당하는 병명은 奶癬, 嬰兒濕疹, 胎敏瘡, 濕疹, 浸淫瘡, 異位性皮膚炎, 血風瘡, 四彎風 등이 있고<sup>8</sup>, 원인으로는 정서적, 환경적, 음식물, 유전적 요인이稟성이 약한데 濕熱이 內蘊한 상태에서 다시 風濕熱邪의 浸淫을 받아 內外邪氣가 相搏하여 肌膚에 발생한다고 본다<sup>23</sup>.

發現樣에 따라 濕症과 乾症으로, 病因病機에 따라 급성기와 만성기로 분류하는데 급성기는 濕熱型에 해당하며 風濕偏盛型, 熱重于濕型, 濕重于熱型으로, 만성기는 脾虛濕熱 內蘊型, 陰傷血燥 濕戀型으로 나눈다<sup>24</sup>. 이 중 급성기는 주로 風濕熱 挾感의 양상에 따라 증상이 발현하여 風濕熱 浸淫肌膚證이 나타나 발병이 급하고 홍반, 구진, 수포, 구포진, 미란, 결가 등이 각처에 범발하여 대칭분포하며 극렬한 소양을 특징으로 함으로<sup>25</sup> 급성기 아토피 피부염에서 소양증과 발진 등의 치료에 대한 접근은 風濕熱을 조절하는 방법에서 고려해 볼 수 있을 것이다.

금은화의 性味는 寒, 無毒, 甘하며, 肺, 胃, 心으로 歸經하고 清熱解毒, 涼散風熱의 효능이 있어 癰腫疔瘡, 腫瘍, 喉痺, 丹毒, 疥癬, 楊梅惡瘡, 瘰癧, 熱毒血痢, 風熱感冒, 溫病發熱을 치료한다<sup>9</sup>. 금은화 약리작용에 관한 연구로는 금은화의 EtOAc 분획의 mutagen에 의한 돌연변이 생성억제<sup>26</sup>와 항산화효과<sup>27</sup>, 금은화의 tannin 성분의 HIV-1 RT 저해<sup>28</sup>, 금은화의 ochnaflavone 성분의 phospholipase A2 저해<sup>29</sup> 등이 보고되었다. 특히 금은화의 ochnaflavone을 비롯한 flavonoid 성분들은 NF-κB 활성 조절을 통하여 염증효소인 COX-2와 iNOS 생성을 억제함으로써 항염증능 있는 것으로 보고되었다<sup>30</sup>.

본 연구에서 금은화 추출물의 IKK mRNA와 iNOS mRNA 발현 그리고 NO 생성 억제를 조사하기 위해 RAW 264.7 macrophages에 LPS를 처리하였는데, LPS 처리 후 RAW 264.7 macrophages에서의 IKK mRNA와 iNOS mRNA 발현은 증가하지만, 금은화 추출물 처리 시 IKK mRNA와 iNOS mRNA 발현은 감소되었다. 이는 금은화 추출물이 IkB kinase (IKK) 생성 감소를 통해 IkB의 인산화를 억제함으로써 NF-κB/Rel 활성 억제를 유도하였다. 그 결과 생쥐 iNOS 유전자의 TATA box 앞쪽 55bp와 917bp 위치의 NF-κB /Rel 결합부위<sup>6,31</sup>에 결합하여 전사 유도해야 할 NF-κB/Rel가 감소되어 iNOS mRNA 발현 감소가 유도된 것으로 사료된다. 이러한 iNOS 생성 감소는 L-arginine을 전구물질로 이용한 NO 생성<sup>32</sup>에 영향을 미쳐 RAW 264.7 macrophage에서의 NO 생성을 감소로 이어지는데, 본 연구에서도 금은화 추출물에 의한 농도-의존적 NO 생성 감소가 측정되었다.

본 연구에서 인위적으로 아토피 피부염을 유발하기 위해 자발적으로 아토피 유사 피부염을 일으킨다고 보고<sup>33</sup>된 Nc/Nga 생쥐를 이용하였다. 우선 지질방어막을 제거하기 Christophers와 Mrowietz의 방법<sup>34</sup>으로 각질층의 상부의 desquamation을 제거

한 다음 Minehiro 들의 방법<sup>35)</sup>으로 계면활성제인 SDS (sodium lauryl sulfate)을 도포하여 각질층내 지질을 제거하였다. 지질방어막이 제거된 Nc/Nga 생쥐 피부에 아토피 유발원으로 보고된<sup>36)</sup> D. pteronyssinus 처리하여 실제 유발되는 아토피 피부염과 유사한 상황을 만들었다. 각질층내 ceramide 감소와 D. pteronyssinus 노출로 PKC 활성이 유도되어 상피 기저층에서의 세포분열 증가를 일으키며<sup>5,37,38)</sup>, 이는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  등의 proinflammatory cytokine 분비 증가에 의한 전사인자 NF- $\kappa$ B/Rel의 활성을 유도하여, 그 결과 염증효소 iNOS가 생성되어 과도한 산화적 스트레스에 의한 조직 손상이 일어난다<sup>39)</sup>. 본 연구에서도 NF- $\kappa$ B 활성과 iNOS 생성 변화를 항 NF- $\kappa$ B p65와 항 iNOS 항체를 이용한 면역조직화학으로 조사하였는데, 아토피 유사 피부염이 심한 피부 진피 유두에서는 NF- $\kappa$ B p65와 iNOS 양성반응세포의 분포가 급격하게 증가된 양상을 보였다. 이에 반해 금은화 처리군에서 NF- $\kappa$ B p65와 iNOS 양성반응세포의 분포가 적은 것으로 관찰되었다.

한편 NF- $\kappa$ B/Rel의 활성은 anti-apoptotic 기능을 갖는 다양한 protein들의 발현을 조절하는데, I $\kappa$ B protein의 degradation을 유발시켜 antiapoptotic 유전자 발현을 유도한다고 보고되었다<sup>40)</sup>. 본 실험에서도 진피유두에서 세포자기살해 증가가 관찰되지 않았으나, 금은화 처리군에서 apoptotic 세포의 분포가 증가된 것으로 관찰되었다.

이상의 결과로 전사인자 NF- $\kappa$ B 활성 억제제를 통한 염증효소 iNOS mRNA발현 억제와 NO 생성 저해능을 가진 금은화의 처리는 NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염에서 iNOS 생성 억제함으로서 산화적 스트레스에 의한 피부손상을 완화시키고, 염증관련 세포의 세포자기살해를 유도함으로써 항염증작용에 기여하는 것으로 생각되며, 다양한 NO 관련 염증성 질환의 치료제로서의 사용가능성이 인정된다. 향후 금은화 추출 성분에 대한 개별적 연구를 통해 NF- $\kappa$ B 활성 억제 기전 해석이 요구되는 바이다.

## 결 론

금은화 추출물은 LPS로 자극된 RAW 264.7 macrophages에서 IKK mRNA와 iNOS mRNA 발현 그리고 NO 생성을 농도-의존적 (0.4 - 1.0 mg/ml)으로 감소시켰다.

금은화 추출물은 아토피 유사 피부염 유발 NC/Nga 생쥐의 진피 유두에서 NF- $\kappa$ B p65와 iNOS 양성반응세포의 분포 감소와 apoptosis 증가를 유도하였다.

## 참고문헌

1. 김태윤. 아토피피부염 치료의 최신 경향. 소아알레르기 호흡기, 19(3):209-219, 2009.
2. 나영호, 최선희. 아토피 피부염의 발병과 관련된 위험인자. 소아알레르기 호흡기, 19(2):91-94, 2009.
3. 보건복지가족부. 2005 국민건강영양조사. 2005.
4. 국민건강보험공단 건강보험연구원. 2002-2007 환경성 질환

- 진료환자 분석. 2007.
5. 이현희. 아토피피부염과 피부장벽. 소아알레르기 호흡기, 19(2):95-105, 2009.
6. Aktan, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. Life Sci. 75(6):639-653, 2004.
7. Aktan, F., Hennessy, S., Roufogalis, B.D., Ammit, A.J. Gypenosides derived from Gynostemma pentaphyllum suppress NO synthesis in murine macrophages by inhibiting iNOS enzymatic activity and attenuating NF-kappaB-mediated iNOS protein expression. Nitric Oxide. 8(4):235-242, 2003.
8. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연. 아토피피부염의 동서의학적 문헌 고찰. 대한안이비인후피부과학회지 15(1):226-252, 2002.
9. 陳再民. 原說韓方醫藥大辭典 (中國藥學大典). 中國, 講談社, p 160, 1982.
10. 배지현, 김미순, 강은혜. 식중독 유발세균의 증식에 미치는 금은화 추출물의 항균효과. 한국식품과학회지 37(4):642-647, 2005.
11. Lee, J.H., Ko, W.S., Kim, Y.H., Kang, H.S., Kim, H.D., Choi, B.T. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from Lonicera japonica flower is related to inhibition of NF-kappaB activation through reducing I-kappaBalpha degradation in rat liver. Int J. Mol Med. 7(1):79-83, 2001.
12. Kwak, W.J., Han, C.K., Chang, H.W., Kim, H.P., Kang, S.S., Son, K.H. Loniceroside C, an Antiinflammatory Saponin from Lonicera japonica. Chem Pharm Bull. 51(3):333-335, 2003.
13. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울, 永林社, pp 198-199, 2004.
14. Eiserich, J.P., Baldus, S., Brennan, M.L., Ma, W., Zhang, C., Tousson, A., Castro, L., Lulis, A.J., Nauseef, W.M., White, C.R., Freeman, B.A. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. Science. 296(5577):2391-2394, 2002.
15. 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 BA. Nitrooleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: synthesis, characterization, and vasomotor activity. Proc Natl Acad Sci USA. 99(25):15941-15946, 2002.
16. 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.
17. 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 $\kappa$ B kinase and NF- $\kappa$ B

- activation in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 60: 1665-1676, 2000.
18. 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-κB in mouse macrophages. *Carcinogenesis.* 23(6):983-991, 2002.
  19. 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.
  20. 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.
  21. 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.
  22. 변성희, 양재하, 김상찬. 현삼메탄올 추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 TNF-α, IL-1β, IL-6 및 nitric oxide 생성에 미치는 영향. *대한본초학회지* 20(2):7-16, 2005.
  23. 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海科學技術出版社, 上海, pp 454-459, 461-464, 1985.
  24. 楊醫亞. 中醫學問答. 人民衛生出版社, 北京, pp 396-397, 1985.
  25. 楊思樹, 張樹生, 傅景華. 中醫臨床大全. 北京科學技術出版社, 北京, pp 888-890, 1991.
  26. Chung, K.C., Kwon, D.Y., Baek, S.H., Kim, S.H., Chang, H.W. Effect of *Lonicera Flos*'s ethyl acetate fraction on mutagenicity. *Yakhak Hoeji.* 32: 328-333, 1988.
  27. Choi, C.W., Jung, H.A., Kang, S.S., Choi, J.S. Antioxidant constituents and a new triterpenoid glycoside from *Flos Lonicerae*. *Arch Pharm Res.* 30(1):1-7, 2007.
  28. Chang, C.W., Lin, M.T., Lee, S.S., Liu, K.C., Hsu, F.L., Lin, J.Y. Differential inhibition of reverse transcriptase and cellular DNA polymerase-alpha activities by lignans isolated from Chinese herbs, *Phyllanthus myrtifolius* Moon, and tannins from *Lonicera japonica* Thunb and *Castanopsis hystrix*. *Antiviral Res.* 27(4):367-374, 1995.
  29. Chang, H.W., Baek, S.H., Chung, K.W., Son, K.H., Kim, H.P., Kang, S.S. Inactivation of phospholipase A2 by naturally occurring biflavonoid, ochnaflavone. *Biochem Biophys Res Commun.* 205(1):843-849, 1994.
  30. Suh, S.J., Chung, T.W., Son, M.J., Kim, S.H., Moon, T.C., Son, K.H., Kim, H.P., Chang, H.W., Kim, C.H. The naturally occurring biflavonoid, ochnaflavone, inhibits LPS-induced iNOS expression, which is mediated by ERK1/2 via NF-kappaB regulation, in RAW264.7 cells. *Arch Biochem Biophys.* 447(2):136-146, 2006.
  31. 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.
  32. Hibbs JB 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.
  33. 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* Houtt. on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Br J Dermatol.* 155(1):33-38, 2006.
  34. Christophers, E., Mrowietz, U. The inflammatory infiltrate in psoriasis. *Clin. Dermatol.* 13: 131-135, 1995.
  35. Minehiro, O., Takashi, Y., Hideoki, O. Detergent-induced epidermal barrier dysfunction and its prevention. *J. Dermatol. Sci.* 30: 173-179, 2002.
  36. 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.
  37. Hunnum, Y.A., Bell, R.M. Function of sphingolipid breakdown production in cellular regulation. *Science.* 243: 500-507, 1989.
  38. 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.
  39. Connelly, L., Palacios-Callender, M., Ameixa, C., Moncada, S., Hobbs, A.J. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol.* 166(6):3873-3881, 2001.
  40. Uwe, S. Anti-inflammatory interventions of NF-kappaB signaling: potential applications and risks. *Biochem Pharmacol.* 75(8):1567-1579, 2008.