

아토피 피부염 유사 NC/Nga 마우스 모델에서 아토베리의 항산화 및 항염증효과

목지에¹ · 박광현² · 유 철³ · 조정근⁴ · 장선일^{1,4*}

1: 전주대학교 아토피·건강전문연구소, 2: 전북대학교 의학전문대학원 생화학교실, 3: 전북대학교 고창흑분자진홍사업단, 4: 전주대학교 대체의학대학

Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Atoberry in Atopic Dermatitis-like NC/Nga Mouse Model

Ji Ye Mok¹, Kwang-Hyun Park², Cheol Ryu³, Jung Keun Cho⁴, Seon Il Jang^{1,4*}

1: Jeonju University Atopy & Health Research Institute, 2: Department of Biochemistry, Chonbuk National University Medical School, 3: Gochang Black Raspberry Industry Promotion Agency, Chonbuk National University Medical School, 4: School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeonju University

Oxidative stress has been implicated in cutaneous damage in various inflammatory skin diseases, including atopic dermatitis (AD). Atoberry is the herb medicine extract which is composed with *Spirodela* Herba, *Xanthii Fructus*, *Houttuyniae Herba*, *Taraxaci Herba*, *Retinervis Luffae Fructus*, *Platycodi Radix*, and *Scutellariae Radix*. In this study, we investigated the antioxidant and anti-inflammatory effects of Atoberry in AD-like skin lesion NC/Nga mice. Murine AD-like skin lesions were made by painting *Dermatophagoides farinse* (*Df*) extract. Atoberry significantly increased electron donating ability (DPPH), nitrite scavenging (NO) and superoxide dismutase (SOD) activities in dose dependant. Topically applied Atoberry significantly reduced clinical severity score, ear thickness and histological grade in AD-like skin lesion NC/Nga mice. In addition, the serum levels of IgE, NO and prostaglandin E2 were significantly reduced by Atoberry. Futhermore, skin tissue levels of SOD, catalase and glutathione peroxidase (GPx) were significantly reduced by Atoberry. These results demonstrate that topical application of Atoberry may be improve the AD-like skin lesion by antioxidant and anti-inflammatory effects.

Key words : atopic dermatitis, *Dermatophagoides farinse* (*Df*), atoberry, IgE, antioxidant, anti-inflammation

서 론

아토피 피부염(atopic dermatitis, AD)은 만성적인 염증성 피부질환으로 영·유아부터 성인에 이르기까지 광범위하게 유발되며, IgE 매개 감각(IgE-mediated sensitization)에 의한 외인성 형태(extrinsic form, 유병율 : 70-80%)와 비 IgE 매개 감각(non-IgE-mediated sensitization)에 의한 내인성 형태(intrinsic form, 유병율 : 20-30%) 등 2가지 형태로 분류되는 것으로 알려져 있다^{1,2}. 외인성 AD는 아토피 피부염에서 피부 호밍 수용체(skin homing receptor)를 발현하는 memory T 세포와

cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)은 Th2 사이토카인을 과잉생산하는데, IL-5 뿐만 아니라 IgE 생산에 isotype switching을 유도하는 것으로 알려진 interleukin-4 (IL-4)와 IL-13의 생산을 촉진하여 호산구의 발달 및 생존에 영양을 주는 것으로 보고되었으며, CLA⁺ T 세포는 Th2 세포의 기능을 억제하여 interferon- γ (IFN- γ)와 같은 Th1 cytokine을 매우 적게 생산하는 것으로 알려져 있다³.

일산화질소(nitric oxide, NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 생체가 아토피 피부염과 같이 염증상태에 빠지게 되면 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 많은 양의 NO를 생산한다⁴. 더불어 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를

* 교신저자 : 장선일, 전주시 완산구 효자동 3가, 전주대학교 대체의학대학

· E-mail : sonjjang@jj.ac.kr, · Tel : 063-220-3124

· 접수 : 2010/03/20 · 수정 : 2010/03/31 · 채택 : 2010/04/13

prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 적은양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 과량의 prostanoid는 NO와 비슷하게 활성화된 대식세포에서 COX-2의 발현이 촉진되어 많은 양의 prostaglandin E2 (PGE₂)를 생산하게 된다⁵). 이렇게 생성된 NO와 PGE₂와 같은 염증 촉진 매개물은 아토피 피부염을 더욱 악화시키는 것으로 알려져져있다^{6,7}).

또한 생체에서 AD와 같이 염증반응이 진행되면, NO와 PGE₂ 뿐만 아니라 superoxide anion (O₂⁻), 과산화수소(H₂O₂) 등 일련의 반응산소 중간물질(reactive oxygen species, ROS)이 대량 생산되어 산화적 스트레스가 가중되어 염증반응을 더욱 촉진시킨다⁸). 따라서 산화적 스트레스로부터 생체의 항상성을 유지하기 위해 필요한 superoxide dismutase, (SOD), catalase, glutathione peroxidase, GPx) 등 생체 효소가 계속적으로 활성화되는데, 결과적으로 생체내의 항산화효소가 고갈되면서 염증반응이 심화되어 질병을 악화시키는 것으로 알려졌다⁹).

아토피는 부평초(Spirodela Herba), 창이자(Xanthii Fructus), 어성초(Houttuyniae Herba), 포공영(Taraxaci Herba), 수세미(Retinervus Luffae Fructus), 길경(Platycodi Radix) 및 황금(Scutellariae Radix) 등 7가지 천연 추출물로 참살이모악골영농조합법인에서 제조한 아토피 케어제품이다.

따라서 본 연구는 부평초, 창이자, 어성초, 포공영, 수세미, 길경 및 황금 등 7가지 복합 생약 추출물로 조성된 아토피를 대상으로 항산화 능력을 측정한 후 집먼지 진드기(*Dermatophagoides farinae*, Df) 항원을 이용하여 NC/Nga 마우스를 대상으로 인간과 유사한 아토피 피부염을 유발하고 상기 복합 추출물을 경구 투여하여 피부병 스코어(skin dermatitis scores), 피부조직(skin histology), 혈청내 IgE, NO 및 PGE₂를 측정하였고, 귀조직의 SOD, catalase 및 GPx 등 항산화 효소의 활성을 조사한 결과 매우 흥미 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

집먼지 진드기(*Dermatophagoides farinae*, Df) 항원은 연세대학교 알레르기연구소(서울)로부터 구입하였다. IgE ELISA kit는 Shibayagi사(일본)로부터 구입하였으며, Prostaglandin E2 (PGE₂) assay kit는 R&D System사(MN, USA)로부터 구입하였다. Nitric oxide (NO) colorimetric assay kit는 Biovision사(CA, USA)로부터 구입하였으며, superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase (GPx) 등의 assay kit는 Calbiochem사(CA, USA)로부터 구입하였다. Paraformaldehyde, hematoxylin, eosin과 기타 reagent급 시약은 Sigma-Aldrich Chemical사(Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

2) 추출물의 제조

잘 건조된 부평초(Spirodela Herba), 창이자(Xanthii Fructus), 어성초(Houttuyniae Herba), 포공영(Taraxaci Herba),

수세미(Retinervus Luffae Fructus), 길경(Platycodi Radix) 및 황금(Scutellariae Radix)은 참살이모악골영농조합법인(전북 완주군)으로부터 구입하여, 같은 양으로 배합된 7가지 복합약제 300 g을 1,000 ml의 메탄올이 들어있는 비이커에 넣고 밀봉하여 1주일간 방치하였다. 그 후 0.45 μm 필터를 이용하여 여과하고 농축기(Eyela, 일본)로 농축한 후 -70℃에서 동결기(본디로, 일신랩)에서 건조하여 38 g을 얻은 후 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 복합추출물은 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, USA)에 녹여 사용하였으며, 마우스 귀에 도포할 때는 아세트과 올리브오일 1:1 혼합액에 추출물을 용해하여 사용하였다.

3) 실험동물

7주령의 수컷 NC/Nga 마우스는 중앙실험동물(주)(서울)로부터 구입하여 1주간 낮과 밤의 주기를 12시간씩 고정하여 사료(중앙실험동물(주))와 멸균 물을 공급하면서 사육한 후 실험에 사용하였다. 동물실험은 전주대학교동물윤리위원회의 규정에 의거하여 수행하였다.

2. 방법

1) 추출물의 전자공여능(DPPH 라디칼 소거능)

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma, USA) 라디칼 소거능은 Blois의 방법¹⁰)으로 측정하였다. 시료를 MeOH로 녹여 최종 농도가 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml, 400 μg/ml, 800 μg/ml가 되도록 1.5 ml tube에 넣고 0.3 mM DPPH 500 μl를 넣어 총 양이 1 ml가 되도록 하였다. 실온에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader(Bio-Tek, USA)로 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타냈다.

DPPH 라디칼 소거능 = 100 - {(시료첨가군의 흡광도/무첨가군 흡광도) × 100}

2) 추출물의 SOD 활성 측정

Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정은 Marklund 등의 방법¹¹)으로 측정하였다. 일정농도의 시료 0.2 ml, Tris-HCl buffer[50 mM Tris(hydroxymethyl) aminomethane + 10 mM EDTA, pH 8.5] 3 ml, 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml을 첨가하여 25℃에서 10분간 반응시키고 1 N HCl 1 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 420 nm에서 UV/VIS spectrophotometer(Bekman, Germany)를 사용하여 흡광도를 측정하였으며 SOD 유사활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

SOD 유사활성능 (%) = 100 - {(시료첨가군의 흡광도/무첨가군 흡광도) × 100}

3) 추출물의 아질산염 (nitrite) 소거능

Gray와 Dugan의 방법¹²)에 따라 일정 농도의 시료 1 ml에 1 mM NaNO₂ 용액 1 ml를 가한 뒤 0.1 N HCl과 0.2 M citrate buffer를 이용하여 각각 pH 1.2, 3.0 및 6.0으로 보정한 다음 총 부피를 10 ml로 하였다. 이 용액을 37℃에서 1시간 반응시킨 다음 각 반응액 1 ml를 취하여 2% acetic acid 3 ml와 30% acetic acid 용액으로 용해한 Griess reagent(1% sulfanilic acid : 1%

naphthylamine = 1 : 1) 0.4 ml를 가하고 잘 혼합하여 실온에서 15 분간 방치한 후 ELISA reader(Bio-Tek, USA)로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거능은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

아질산염 소거능 (%) = $100 - \left\{ \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군 흡광도}} \times 100 \right\}$

4) AD 유사 피부병변 유도

Df 항원 면역에 의한 AD 유도는 Matsuoka 등¹³⁾의 방법을 약간 변형하여 실험했다. 요약하면, 8주령의 NC/Nga 마우스의 왼쪽과 오른쪽 귀를 테이프로 강하게 붙였다 떼어내는 방법으로 잔털을 완전히 제거한 다음 마우스 당 Df 항원 20 µl(10 mg/ml)를 1주에 2회씩 4주간 도포하였다. 대조군과 각 실험군에 사용된 마우스는 각각 5마리를 배정하여 실험하였다. 대조군은 생리식염수만 도포하였으며, 실험군은 복합추출물의 농도를 20-100 mg/kg(마우스 체중)으로 하여 귀에 도포하였다. 마지막으로 Df 항원으로 면역과 동시에 약물을 투여한 다음 24시간 후에 간문맥으로부터 혈액을 얻어 4℃에서 12시간 동안 방치하여 혈액을 응고시켰다. 응고된 혈액은 3,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청은 -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

5) 피부병변의 평가

피부상태는 0주째부터 1주 간격으로 4주 동안 사진을 찍어 조사하였다. 피부의 건조상태(dryness)와 스킨링(scaling) 그리고 미란(erosion), 상처(excoriation), 출혈 등을 체크하여 병변이 없는 상태를 0점(none), 가벼운 상태를 1점(mild), 중간 상태를 2점(moderate), 심한상태를 3점(severe)을 주었고, 총점으로 평가하였다. 귀의 두께는 digital caliper (Mitutoyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

6) 피부조직

실험 과정에 따라 대조군과 실험군을 대상으로 희생시키고, 피부조직 약 5x5 mm 를 적출하여 클립을 이용하여 편평하게 유지하고 4% paraformaldehyde(pH 7.4)로 고정하였다. 일련의 과정을 통하여 파라핀 블록을 제작한 후 5 µm 간격으로 피부조직을 종단면으로 절편 하였다. 조직학적 검사와 백혈구 침윤을 검사하기 위해 hematoxylin & eosin 또는 Congo red로 염색하여 저배율(40배)에서 관찰하고 확대하면서 200배 현미경 시야에서 사진을 찍어 제시하였고, 백혈구의 침윤을 확인하기 위해 400배 현미경 시야에서 검경하였다(Olympus, 일본).

7) 혈청 내 IgE, NO 및 PGE₂의 측정

혈청 내 Df 항원에 대한 IgE의 정량은 ELISA법으로 측정하였다. 먼저 혈청 내 IgE 총량은 혈청을 25배 희석하여 각 well에 주입하고 Shibayagi사가 제공하는 표준시료를 주입하여 제조회사에서 제시하는 방법에 준하여 측정하였다. 혈청 내 염증 매개물인 NO와 PGE₂ 함량을 측정하기 위해 NO는 Biovision사가 제공하는 assay kit와 측정 방법에 따라 수행하였다. PGE₂는 R&D System사가 제공하는 ELISA assay kit와 방법에 따라 각각 측정하였다. 요약하면, 혈청을 10배 또는 25배 희석하여 각 well에 주입하고 R&D System사가 제공하는 표준시료를 주입하여 제조회사에서 제시하는 방법에 준하여 측정하였다.

8) SOD, catalase 및 GPx 측정

SOD, catalase 및 GPx 활성의 측정은 Calbiochem사(CA, USA)가 제공하는 assay kit를 사용하여 회사가 제공하는 방법에 준하여 수행하였다. 앞서 준비된 조직 용출 시료를 대상으로 Biorad사(CA, USA)가 제공하는 단백질 assay kit를 활용하여 단백질을 정량 하였다. 그 후 Calbiochem사가 제공하는 방법대로 수행하여 Multiple spectrophotometer (Molecular Devise, CA USA)을 활용하여 SOD (450 nm), catalase (540 nm) 및 GPx (340 nm)의 활성을 측정하였다. SOD의 활성은 ml당 Unit로, catalase는 ml/min 당 nM로, GPx는 ml/min 당 nM로 각각 계산하였다.

9) 통계

모든 실험값은 평균±표준오차로 표시하였으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리하였다. 유의성 한계는 P<0.05로 정하였다.

결 과

1. 아토피의 항산화 효과

아토피의 항산화에 대한 효과를 알아보기 위해서 DPPH 라디칼, NO 및 SOD 를 측정하였다. 먼저 아토피의 DPPH 라디칼 소거능을 알아보기 위해 합성 항산화제로 잘 알려진 butylated hydroxy toluene(BHT)와 비교하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 아토피의 DPPH 라디칼 소거능은 농도에 의존적으로 증가했으며, 200 µg/ml의 농도에서 BHT와 유사한 효과가 있었고, 400 µg/ml과 800 µg/ml에서는 BHT보다 우수한 효과가 있었다. 또한 아토피를 대상으로 NO의 소거능을 측정한 결과 Fig. 1과 같이 아토피의 농도가 증가할수록 NO 소거능력이 증가하였다. SOD의 경우 Fig. 1과 같이 아토피의 농도에 의존적으로 그 활성이 증가하였다.

2. 아토피 도포에 따른 피부병변과 귀 부종 개선 효과

NC/Nga(8주령) 마우스를 대상으로 3일간은 Df 항원 없이 0-2.0%의 아토피만 20 µl 씩 양쪽 귀에 도포한 후 약물이 귀 부종에 미치는 영향을 조사한 결과 약물 자체가 귀 부종에 영향을 주지 않는다는 사실을 확인한 후, 1주일에 2회 씩 4주간 Df 항원을 털이 제거된 양쪽 귀에 1주일에 2회 도포 하였다. 대조군은 아세톤과 올리브오일 1:1 혼합액 20 µl을 각각 양쪽 귀에 도포하였고, 0.5-2.0%의 아토피는 아세톤과 올리브오일 1:1 혼합액에 용해하여 각각의 약물을 1일에 1회씩 4주간 도포하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 아토피의 농도에 의존적으로 피부 병변이 개선됨을 확인하였다. Df만 도포한 양성대조군의 피부 병변은 2주경과 후 부터 나타나 시간이 지날수록 악화되었다. 0.5% 도포군에서는 3주까지 피부 병변이 개선되지 않았지만, 4주에는 유의하게 (p<0.05) 개선이 되었고 1.0%와 2.0% 도포군에서는 2주경과 후 부터 유의하게 피부 병변이 개선되었다(p<0.5, p<0.01). 또한 귀의 부종에 미치는 추출물의 효과를 알아보기 위해 귀의 두께를 측정하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 피부병변의 개선과 유사하게 귀의 부종이 농도에 의존적으로 개선되는 효과가 있었다.

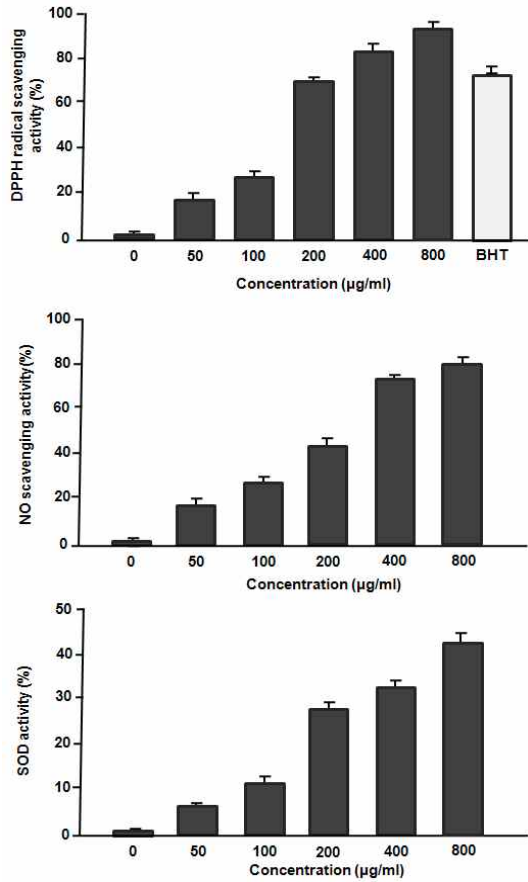


Fig. 1. Effects of Atoberry on SOD activity, DPPH and NO scavenging activity. Values are shown as mean±S.D. of 3 replicates.

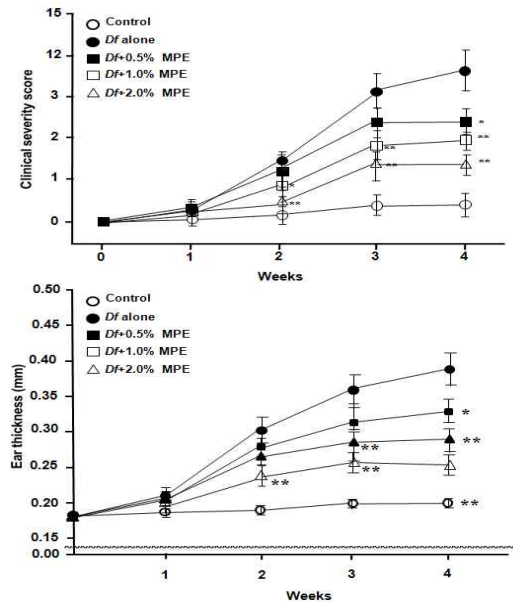


Fig. 2. Changes of the total clinical severity score by topical Atoberry treatment. *Df* antigen application on the ears of NC/Nga mice for 4 weeks induced the AD-like skin lesions. (A) Topical application of Atoberry significantly lowered the total clinical severity scores provoked by *Df*. (B) Ear thickness was measured using a dial caliper every week. Topical Atoberry treatment significantly reduced the ear thickness. Values are shown as mean±S.D. of the changes in the thickness of both ears of five mice of each group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the *Df* alone group.

3. 아토페리 도포에 따른 피부조직 개선효과

한편 아토페리가 *Df* 항원으로 유도된 NC/Nga 마우스의 피부조직에 미치는 영향을 알아보기 위해서 4주간 추출물과 *Df* 항원을 처리한 후 24시간에 마우스를 희생시키고 귀 조직을 적출하여 관찰하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 대조군에 비해서 *Df* 항원만 처리된 실험군에서는 백혈구가 매우 많이 침윤되어 염증반응이 매우 심하게 진행됨을 알 수 있었다. 그러나 *Df* 항원과 아토페리로 도포된 실험군에서는 농도에 의존적으로 백혈구 침윤상태가 완화됨을 확인할 수 있었고 귀 조직이 대조군과 유사하게 현저히 개선됨을 확인할 수 있었다.

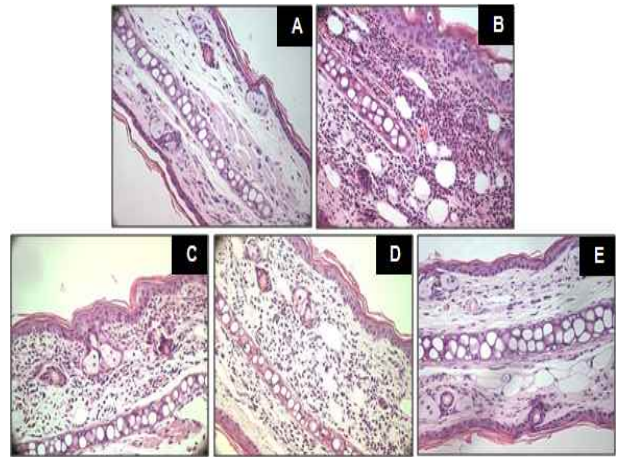


Fig. 3. Effects of Atoberry treatment on histological changes. *Df* antigen application on the ears of NC/Nga mice for 4 weeks induced the AD-like skin lesions. Skin tissues were obtained from *Df* antigen-induced and control mice on 28 days. Skin tissues (5 µm) were stained with hematoxylin & eosin. Original magnification x200 for all photos. (A) Control, (B) *Df* alone, (C) 0.5% Atoberry, (D) 1.0% Atoberry, and (E) 2.0% Atoberry.

4. 아토페리 도포에 따른 혈청 IgE 생산 억제 효과

마지막으로 우리는 아토페리가 *Df* 항원으로 유도된 NC/Nga 마우스의 혈청 IgE에 미치는 영향을 알아보기 위하여 4주간 추출물과 *Df* 항원을 처리하였고, 최종 도포 24시간 후에 마우스를 에테르로 마취하고 복강을 절개하여 간문맥으로부터 혈액을 얻어 응고시킨 후 혈청을 분리하였고, 혈청 내 IgE 생산량을 ELISA assay kit를 이용하여 측정하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 대조군의 혈청 내 IgE의 양은 베이스 수준이었지만, *Df* 항원만 도포된 실험군은 IgE의 양이 증가된 반면, 1.0% 아토페리 ($p < 0.05$)와 2.0% 아토페리 ($p < 0.01$)가 도포된 실험군에서는 IgE의 생산량이 현저히 줄어들었다.

5. 아토페리 도포에 따른 NO와 PGE₂ 생산 억제 효과

아토페리가 *Df* 항원으로 유도된 NC/Nga 마우스 혈청의 NO와 PGE₂ 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 NO는 Biovision사가 제공하는 assay kit와 측정 방법에 따라 수행하였고, PGE₂는 R&D System사가 제공하는 ELISA assay kit와 방법에 따라 측정하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 대조군 혈청의 NO와 PGE₂는 베이스 수준이었지만, *Df* 항원만 도포된 실험군에서는 NO와 PGE₂가 현저히 증가되었다. 그러나 아토페리가 도포된 실험

험군에서는 농도에 의존적으로 감소되었다. 특히 1.0% 아토페리 ($p < 0.05$)와 2.0% 아토페리 ($p < 0.01$)가 도포된 실험군에서는 유의하게 NO와 PGE₂의 생산량이 현저히 줄어들었다.

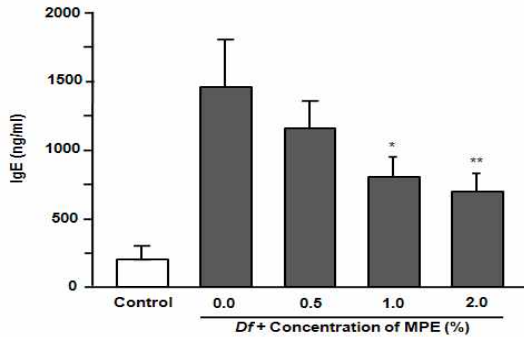


Fig. 4. Effects of Atoberry on serum IgE production in NC/Nga mice. *Df* antigen application on the ears of NC/Nga mice for 4 weeks induced the AD-like skin lesions. Sera were obtained from *Df* antigen-induced and control mice on 8 week. Serum levels of IgE were measured using IgE ELISA assay kit. Values are shown as mean±S.D. of the changes in the serum IgE. *= $p < 0.05$ and **= $p < 0.01$ compared with the *Df* alone group.

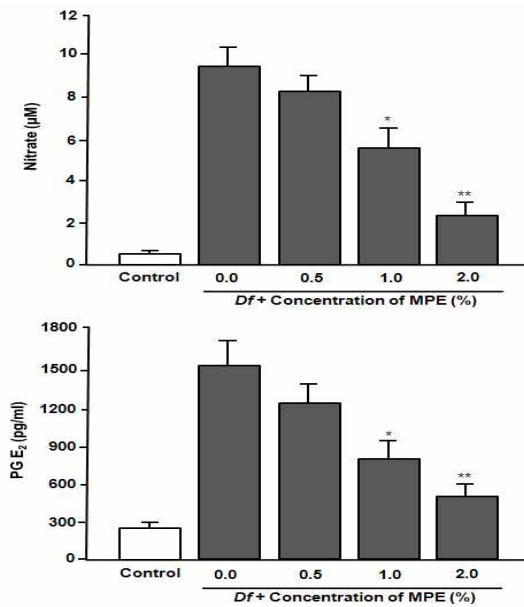


Fig. 5. Effects of Atoberry on NO and PGE₂ production in NC/Nga mice. *Df* antigen application on the ears of NC/Nga mice for 4 weeks induced the AD-like skin lesions. Sera were obtained from *Df* antigen-induced and control mice on 8 week. Serum levels of NO and PGE₂ were measured using NO assay kit and PGE₂ ELISA assay kit, respectively. Values are shown as mean±S.D. of the changes in the serum IgE. *= $p < 0.05$ and **= $p < 0.01$ compared with the *Df* alone group.

5. 아토페리 도포에 따른 귀조직의 항산화 효소 활성 복원 효과
아토페리 도포가 AD-유사 NC/Nga 모델 마우스에서 항산화 효소로 잘 알려진 SOD, catalase 및 GPx 등의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험이 종료된 마우스의 귀 조직을 적출한 후 안과용 가위로 조직을 세절한 다음 tissue lysis 완충액과 초음파분쇄기를 활용하여 조직 용출액을 제조하고 단백질 정량 후 효소 활성을 측정 하였다.

그 결과 *Df* 항원만을 처리한 양성대조군은 생리식염수만 처

리한 대조군에 비해서 SOD (Fig. 6A), catalase (Fig. 6B) 및 GPx (Fig. 6C)의 활성이 현저히 감소되었으나, 아토페리를 도포한 실험군에서는 농도에 의존적으로 항산화 효소의 활성이 복원되었다. 즉, SOD의 경우 *Df* 항원만을 처리한 양성대조군에 비해서 아토페리를 0.5% 도포한 실험군에서는 복원효과가 없었지만, 1.0%와 2.0% 실험군에서는 현저히 효소의 활성이 복원되는 효과가 있었다($p < 0.05$ 와 $p < 0.01$). 또한 catalase의 경우도 *Df* 항원만을 처리한 양성대조군에 비해 2.0%의 아토페리를 도포한 실험군에서 효소의 활성이 음성대조군과 유사하게 복원되는 효과가 있었다($p < 0.01$). 더욱이 GPx의 활성의 경우, *Df* 항원만을 처리한 양성대조군에 비해서 아토페리를 0.5% 도포한 실험군에서는 복원효과가 없었지만, 1.0%와 2.0% 실험군에서는 현저히 효소의 활성이 복원되는 효과가 있었다($p < 0.05$ 와 $p < 0.01$).

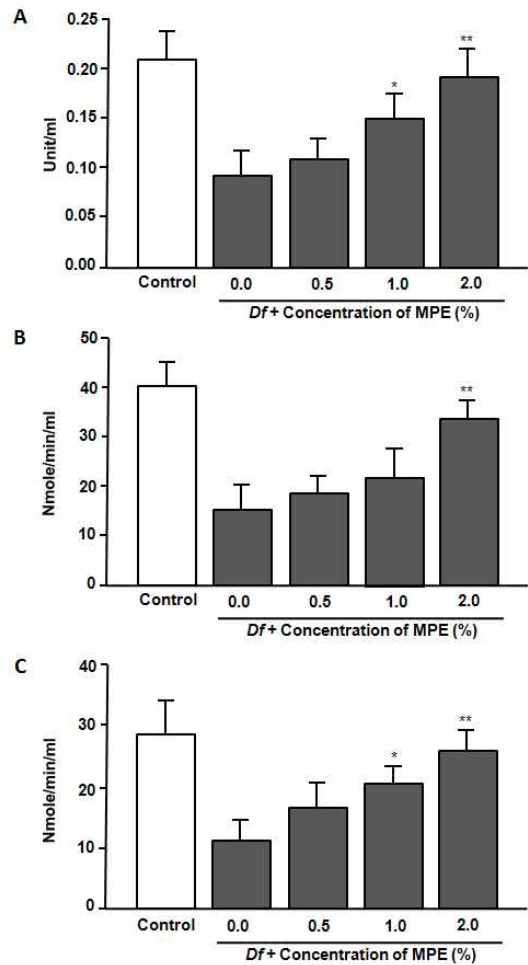


Fig. 6. Effects of Atoberry on antioxidant enzyme activity in NC/Nga mice. *Df* antigen application on the ears of NC/Nga mice for 4 weeks induced the AD-like skin lesions. (A) Superoxide dismutase (SOD), (B) catalase, and (C) glutathione peroxidase (GPx) was measured from the ear tissue extracts. Values are shown as mean±S.D. from 5 mice. *= $p < 0.05$ and **= $p < 0.01$ compared with the *Df* alone group.

고찰

본 연구는 부평초, 창이자, 어성초, 포공영, 수세미, 길경 및

황금 등 7가지 복합 생약 추출물로 조성된 아토피를 대상으로 항산화 능력을 측정된 후 *Df* 항원을 이용하여 NC/Nga 마우스를 대상으로 인간과 유사한 아토피 피부염을 유발하고 상기 복합 추출물을 경구 투여하여 피부병 스코어(skin dermatitis scores), 피부조직(skin histology), 혈청내 IgE, NO 및 PGE₂를 측정하였고, 귀조직의 SOD, catalase 및 GPx 등 항산화 효소의 활성을 조사하였다.

먼저 아토피 자체의 항산화 효과를 측정한 결과 아토피는 농도에 의존적으로 DPPH와 NO 소거능 능력과 SOD 활성이 증가되었다(Fig. 1). 이러한 아토피의 효과는 부평초, 창이자, 어성초, 포공영, 수세미, 길경 및 황금 등이 보여준 자유유리기 소거능력에 의한 결과라 사료 된다. 즉, DPPH와 NO의 소거능과 SOD의 활성에 있어서 아토피 조성물 중 포공영, 길경 및 수세미의 경우는 낮았지만, 부평초, 창이자, 어성초, 및 황금의 경우는 효과가 좋았고, 이들 성분이 모두 포함된 아토피는 각각의 약물보다 항산화 효과가 현저히 높은 것으로 보고되었다¹⁴⁾.

NC/Nga 마우스의 피부질환은 인간의 AD에서 나타나는 외견상 특징뿐만 아니라 면역학적 특징이 매우 유사한 것으로 보고되었다¹⁵⁾. 즉, NC/Nga 마우스를 대상으로 생물학적 또는 화학적 항원에 접촉되면, 가려움증, 홍반, 부종, 짓무름, 심한 갈라, 박리, 건조 그리고 발육저하 등이 시간이 지날수록 심각한 증상을 보이고, 혈청내 IgE의 급격한 증가와 병변 부위의 호산구, 호염구, 비만세포, CD4⁺ Th2 세포, 대식세포 등이 급격히 증가하는 병리현상이 나타난다. 따라서 NC/Nga 생쥐를 이용한 모델 동물은 AD의 병인과 기전 연구뿐만 아니라 약물개발에 많이 활용되고 있다^{15,16)}.

본 연구에서 아토피가 아토피 개선 효과에 미치는 영향을 조사하기 위해 8주령의 수컷 NC/Nga 마우스를 대상으로 *Df* 항원으로 처리된 AD 유사 모델을 유도하여 아토피의 임상적 영향을 조사하였다. 그 결과 Fig. 2에 제시한 바와 같이 *Df* 항원만 도포할 경우 2주째부터 AD와 유사한 홍반과 출혈, 부종, 찰과상과 부식 그리고 박리와 건조 등 피부병변이 나타나 4주째는 그 증상이 뚜렷하게 나타났고, 단핵구, 비만세포, 호산구와 호중구의 침윤이 현저했다(Fig. 3). 그러나 아토피가 처리된 실험군에서는 농도에 의존적으로 피부병변을 현저히 억제하는 결과를 얻었다. 이러한 결과는 아토피의 처리가 임상적으로 AD를 크게 개선시킬 수 있는 효과가 있는 것으로 평가되었다.

또한 *Df* 항원으로 유도된 AD 모델 NC/Nga 마우스에서 중요한 면역학적 특징은 인간의 외인성 AD와 유사하게 혈청 내 높은 IgE가 검출된다는 사실은 잘 알려져 있다¹⁵⁾. 본 연구의 결과에서도 *Df* 항원으로 유도된 마우스의 혈청 내 IgE가 매우 높은 양으로 검출되었으나, 아토피를 처리한 결과 그 생산량이 크게 억제되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 아토피가 AD에서 나타나는 IgE의 생산량을 억제시키는 효과가 있음을 제시해 주었다. 그러나 아토피의 정확한 AD 개선에 대한 연구는 Th1/Th2 세포의 분화와 각각의 사이토카인 및 케모카인 등 면역학적 특징을 더 조사해야 할 필요성이 있다.

염증반응은 면역방어체계에 필수적이지만, 지속적으로 일어

나면 병리적 상태를 수반하여 생체에 치명적인 영향을 준다. 이러한 염증반응에 관여되는 핵심적인 분자는 NO와 PGE₂로 염증매개물이라 하는데, 이들 염증매개물질은 염증반응을 가속화시킴으로써 생체의 질환을 더욱 악화시킨다¹⁶⁻¹⁸⁾. 특히 건선(psoriasis)과 AD와 같은 만성적인 염증성 질환은 이러한 염증매개물이 높게 발현되어 있는 특징이 있다¹⁸⁾. 따라서 AD와 같은 만성적인 염증반응을 억제시키기 위해서는 NO와 PGE₂와 같은 염증매개물을 효과적으로 억제시키는 것이 필수적이다. 본 연구에서 아토피는 NO와 PGE₂를 효과적으로 억제시키는 것으로 조사되었다(Fig. 5). 이러한 아토피의 효과는 황금¹⁹⁾, 어성초²⁰⁾, 창이자²¹⁾ 등이 함유한 flavonoid계열²²⁾의 화합물에 의한 것으로 사료된다.

한편 산화적 스트레스로 알려진 반응산소 중간물(ROS)은 생물학적 대사과정에서 나타나는 정상적인 필수산물이지만, 세포 및 조직손상으로 이어져 생명체에 치명적인 영향을 주어 각종 염증성질환을 야기한다²¹⁻²⁴⁾. 생명활동에서 형성된 ROS는 생체에 존재하는 항산화물질과 효소에 의해서 제거되면서 생성되는 ROS와 항산화 물질 및 효소 간에 균형을 통한 정상적인 생명활동을 유지하지만, 체내에 항산화물질 및 효소의 생성이 감소되면서 각종 질환상태로 빠져들게 된다²⁴⁾. 특히 AD와 같은 피부질환은 체내에서 대량으로 발생하는 ROS로 인해서 더욱더 염증상태로 진행되어 결국 치명적인 조직 손상을 야기하여 피부장벽을 붕괴시킴으로써 알레르기를 유발하는 외부환경 요인에 노출되어 심각한 염증반응을 유도한다²⁵⁾. 그러므로 AD를 치료하거나 예방하기 위해서는 무엇보다도 대량으로 생산되는 ROS를 제거해야 할 필요성이 있다. 이러한 AD의 특징을 고려하여 *Df* 항원으로 유도된 AD 유사 NC/Nga 모델 마우스 귀 조직에 아토피를 도포하였다. *Df*에 의해 저하된 SOD, catalase 및 GPx 등 생체 항산화 효소의 활성이 아토피의 도포에 의해서 복원되었다(Fig. 6).

이상의 결과를 종합해볼 때, 부평초, 창이자, 어성초, 포공영, 수세미, 길경 및 황금 등 7가지 복합 생약 추출물로 조성된 아토피의 처리는 *Df* 항원으로 유도된 AD 모델 NC/Nga 마우스의 임상적 피부 병변을 개선할 뿐만 아니라 면역학적으로 핵심적 특징인 IgE의 생산을 효과적으로 억제하는 효과가 있었다. 더욱이 아토피는 NO와 PGE₂와 같은 염증매개물을 억제시킬 뿐만 아니라 *Df* 유도에 의해 고갈된 생체의 SOD, catalase 및 GPx 등 항산화 효소의 활성을 복원시키는 우수한 효과가 있었다. 따라서 아토피는 AD를 개선하는데 유용한 물질로 활용될 수 있는 효과적인 조성물이라 사료된다.

결론

산화적 스트레스는 아토피 피부염(atopic dermatitis, AD)와 같은 여러 가지 염증성 피부질환에 있어 표피손상을 더욱 악화시키는 것으로 알려져 있다. 아토피는 부평초, 창이자, 어성초, 포공영, 수세미, 길경 및 황금 등 7가지 복합 생약 추출물로 조성된 추출물이다. 본 연구에서 우리는 AD 유사 피부병변을 유도한 NC/Nga 마우스를 대상으로 아토피의 항산화력과 항염증효과

를 조사하였다. AD 유사 피부병변 모델은 집먼지 진드기 (*Dermatophagoides farinae*, Df) 추출액으로 유도하였다. 먼저 아토피 베리 자체의 항산화력을 측정할 결과 농도에 의존적으로 DPPH와 NO을 소거하는 능력이 증가되었고, SOD의 활성을 증가시켰다. 아토피베리를 귀조직에 도포한 결과 임상적 증후와 귀 두께 등 조직학적 측면에서 개선되는 효과가 있었다. 또한 혈청 IgE의 생산량을 억제시킬 뿐만 아니라 NO 및 PGE₂ 등 염증매개물을 억제시키는 효과가 있었다. 더욱이 귀 조직에서 SOD, catalase 및 GPx 등을 대조군과 유사하게 복원시키는 효과가 있었다. 따라서 아토피베리는 AD를 개선하는데 유용한 물질로 활용될 수 있는 효과적인 조성물이라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 참살이모악골영농조합법인의 지원을 받아 연구되었다.

참고문헌

- Novak, N., Bieber, T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 112: 252-262, 2003.
- Schultz-Larsen, F., Hanifin, J.M. Epidemiology of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 22: 1-24, 2002.
- Leung, D.Y., Boguniewicz, M., Howell, M.D., Nomura, I., Hamid, Q.A. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 113: 651-657, 2004.
- Choi, B.M, Pae, H.O., Jang, S.I., Kim, Y.M., Chung, H.T. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol.* 35: 116-126, 2002
- Veale, D., Rogers, S., Fitzgerald, O. Immunolocalization of adhesion molecules in psoriatic arthritis, psoriatic and normal skin. *Br. J. Dermatol.*, 132: 32-38, 1995.
- Bruch-Gerharz, D., Fehsel, K., Suschek, C., Michel, G., Ruzicka, T., Kolb-Bachofen, V. A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J. Exp. Med.* 184: 2007-2012, 1996.
- Bruch-Gerharz, D., Ruzicka, T., Kolb-Bachofen, V. Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease - a review. *J. Invest. Dermatol.* 110: 1-7, 1998.
- Briganti, S., Picardo, M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What' new. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 17: 663-669, 2003.
- Zhao, J., Lahiri-Chatterjee, M., Sharma, Y., Agarwal, R. Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin. *Carcinogenesis.* 21: 811-816, 2000.
- Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200, 1958.
- Marklund, S., Marklund, G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 47: 468-474, 1975.
- Gray, J.I., Dugan, J.R.L. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. *J Food Sci.* 40: 981-985, 1975.
- Matsuda, H., Watanabe, N., Geba, G.P., Sperl, J., Tsudzuki, M., Hiroi, J., Matsumoto, M., Ushio, H., Saito, S., Askenase, P.W., Ra, C. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE-hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol.* 9: 461-466, 1997.
- 장선일, 목지에, 박광현. 아토피 피부염의 예방 또는 치료를 위한 조성물. 특허청, 10-2010-0010506, 2010.
- Yamamoto, M., Haruna, T. Yasui, K., Takahashi, H., Iduhara, M., Takaki, S., Deguchi, M., Arimura, A. A Novel Atopic Dermatitis Model Induced by Topical Application with *Dermatophagoides farinae* Extract in NC/Nga Mice. *Allergol Int.* 56: 139-148, 2007.
- Gallin, J.I., Snyderman, R. Overview. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 3rd ed. (Gallin JI, Snyderman R, eds.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1-4, 1999.
- Tinker, A.C., Wallace, A.V. Selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase: potential agents for the treatment of inflammatory diseases? *Curr Top Med Chem* 6: 77-92, 2006.
- Iversen, L., Kragballe, K., Ziboh, V.A. Significance of leukotriene-A4 hydrolase in the pathogenesis of psoriasis. *Skin Pharmacol.* 10: 169-177, 1997.
- Kim, E.H., Shim, B., Kang, S., Jeong, G., Lee, J.S., Yu, Y.B., Chun, M. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* extract via suppression of immune modulators and MAP kinase signaling molecules. *J Ethnopharmacol.* 126: 320-331, 2009.
- Kim, G.S., Kim, D.H., Lim, J.J., Lee, J.J., Han, D.Y., Lee, W.M., Jung, W.C., Min, W.G., Won, C.G., Rhee, M.H., Lee, H.J., Kim, S. Biological and antibacterial activities of the natural herb *Houttuynia cordata* water extract against the intracellular bacterial pathogen salmonella within the RAW 264.7 macrophage. *Biol Pharm Bull.* 31: 2012-2017, 2008.
- Kim, I.T., Park, Y.M., Won, J.H., Jung, H.J., Park, H.J., Choi, J.W., Lee, K.T. Methanol extract of *Xanthium strumarium* L. possesses anti-inflammatory and anti-nociceptive activities. *Biol Pharm Bull.* 28: 94-100, 2005.

22. Lim, H., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P. Effects of anti-inflammatory biflavonoid, ginkgetin, on chronic skin inflammation. *Biol Pharm Bull.* 29: 1046-1049, 2006.
23. Zimmerman, J.J. Redox/radical repertoire rapport: Pathophysiology and therapeutics. *Acta Anaesthesiol Scand.* 42: 1-3, 1998.
24. Tsukahara, H. Pathophysiological roles of nitric oxide in inflammatory diseases. In: Morikawa A, editor. *Pediatric Asthma and Other Allergic Diseases.* Gunma: JOMO NEWSPAPER; pp 145-152, 2002.
25. Tsukahara, H., Shibata, R., Ohshima, Y., Todoroki, Y., Sato, S., Ohta, N., Hiraoka, M., Yoshida, A., Nishima, S., Mayumi, M. Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sci.* 72: 2509-2516, 2003.