

연산호 추출물(MC-1)이 아토피피부염 유발 NC/Nga 생쥐의 혈액내 면역 관련 인자에 미치는 영향

최학주^{1,2#}, 심부용¹, 미야모토^{2*}

1 : 대전대학교 난치성면역질환 동서생명의학연구소, 2 : 큐슈대학교 약학부 약학연구원 천연물화학교실

Effects of Lobophytum crassum extract(MC-1) on Various Immunological Factors Related to Pathogenesis of Atopic Dermatitis in Dermatophagoides Pteronyssinus Treated NC/Nga mice

Hak-Joo Choi^{1,2#}, Boo-Yong Sim¹, Tomofumi Miyamoto^{2*}

1 : Traditional and Biomedical Research Center(TBRC), Daejeon University

2 : Department of Chemo-Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyusu University

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study was to confirm whether or not coral has a preventive effect on development of atopic dermatitis induced by house mite(dermatophagoides pteronyssinus) in NC/Nga mice.

Methods : This study was undertaken by using a reliable Atopic dermatitis mouse model demonstrating similar immune response. Lobophytum crassum was administered orally to NC/Nga mouse for 3 weeks. In order to verify the effectiveness of Lobophytum crassum in atopic dermatitis treatment, its role in immune factors were observed in NC/Nga mice.

Results : ALT, AST, BUN and creatine levels were all within in the normal ranges in MC-1 200 and 400 (mg/kg) treated groups, indicating no induced toxicity. MC-1 200 and 400 (mg/kg) groups decreased of atopic dermatitis skin manifestation in NC/Nga mouse of MC-1 200 and 400 (mg/kg) groups compared to that of the control group and decreased the ratio of WBC and lymphocyte in blood.

Also, MC-1 200 and 400 (mg/kg) groups significant decreased the ratio of CD4+, CD8+, CD11b+/Gr1+, B220/CD23 and CD4/CD25 immune cell ratio in ALN. Finally MC-1 200 and 400 (mg/kg) groups significantly increased the ratio of CD4+, CD8+, B220/CD23 and CD4/CD25 immune cells in DLN.

Conclusions : Theses results suggested that Lobophytum crassum has suppressive effects on aberrant and overactive immunological activities in dermatophagoides pteronyssinus-induced dermatitis mice of NC/Nga.

Key words : Atopic dermatitis, Dermatophagoides pteronyssinus, Immune, Lobophytum crassum(MC-1), NC/Nga

서론

아토피 피부염(Atopic Dermatitis, AD)는 면역 체계의 비 정상적인 활성화와 불균형에 의한 면역학적 요인과 도시화에 따른 환경적 요인이 원인으로 만성적이며 재발성이 높은 염증

성 피부 질환이며, 피부의 부스럼, 습진, 간지러움, 염증 반응을 통해 쉽게 AD를 진단할 수 있는 반면에 이를 유발하는 병리학적, 유전학적 메커니즘을 밝혀내기 위해 지속적인 연구가 다양하게 이루어지고 있다¹⁾. 최근 환경오염 및 생활환경의

*Corresponding author : Tomofumi Miyamoto, Department of Chemo-Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyusu University

· Tel : +81-92-642-6636 · E-mail : miyamoto@phar.kyushu_u.ac.jp

#First author : Hak-Joo Choi, Traditional and Biomedical Research Center(TBRC), Daejeon University

· Tel : +82-42-280-2830 · FAX : +82-42-280-2624 · E-mail : hjchoi@dju.kr

· Received : 28 December 2014 · Revised : 29 January 2015 · Accepted : 29 January 2015

변화로 아토피는 농촌이나 개발도상국에 비해 선진국에서 그 발병율이 크게 증가되고 있으며, 이는 면역계의 성장을 위해 세균을 포함한 외부 환경으로부터 자극이 필요하며 그렇지 못할 경우 면역계에 문제가 생겨 알레르기 등과 같은 질환이 발생한다는 hygiene hypothesis 가설과 일치한다²⁻⁴⁾. 따라서 AD는 민감성이 높은 특정 유전자, 환경, 피부외벽의 손상 정도, 면역적인 요인 등에 따른 복합적 면역 반응으로써 면역학적 요인의 개선은 아토피 치료에 있어 중요하다고 할 수 있다. 이에 따라 AD의 원인인 면역조절 치료약물 발굴이 활발히 이루어지고 있다. 그러나 현재 사용되고 있는 치료제들은 지속적인 연구를 통하여 과거에 비하여 부작용을 최소화시키며 상대적으로 보다 유의성 있는 약물들이 사용되고 있으나 여전히 다루어지는 부신피질호르몬제, 항히스타민제, 인터페론 감마(interferon gamma), 사이모펜틴(thymopentin) 등은 일부 환자들에게서 치료 반응이 적거나 과민반응 혹은 신장 및 간 독성 등의 부작용이 상존함으로써 이에 대한 보완적 연구가 요구되고 있다^{5,6)}.

산호는 《東醫寶鑑》⁷⁾에 性平, 味甘, 無毒. 鎮心止驚, 明目去目翳, 止鼻衄, 製法同上. 生大海海底, 有枝幹如樹狀, 色紅潤, 漁人網得之 이라고 기록되어 있으며, 본 실험에서 사용한 연산호는 산호의 일종이다.

최근 Chao⁸⁾ 등과 Nguyen⁹⁾ 등의 연구 결과에 따르면 연산호 추출물이 HepG2 세포에서 TNF- α , NF- κ B, iNOS, COX-2 등의 염증 매개물을 억제 시킨다는 연구 결과를 발표한 바 있다.

이에 본 연구에서는 Chao⁸⁾ 등과 Nguyen⁹⁾ 등의 연구결과에 준하여 연산호 추출물의 면역조절에 대한 효능을 알아보기 위해 집먼지 진드기 분말로 AD를 유발한 생쥐에 경구 투여한 후 AD에 대한 면역 효과를 확인하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 연산호 (Lobophytum, crassum 이하, MC-1)은 오키나와에서 채취하였다.

2. 동물 및 사료

실험동물인 수컷 6주령의 NC/Nga 생쥐 (24~27 g)는 (주)중앙실험동물에서 공급 받아 실험 당일까지 고형사료 (주)퓨리나와 물을 충분히 공급하고 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 15\%$, 12시간-12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 모든 실험동물은 동물보호법 13조 및 대전대학교 동물실험 윤리위원회 규정에 따라 관리하였다.

3. 시약 및 기기

실험에 사용된 시약 중 collagenase(sigma CO., USA), RBC lysis solution(sigma CO., USA), acetone(sigma CO., USA), olive oil(sigma CO., USA), trypan-EDTA(sigma CO., USA), acetic acid(sigma CO., USA), dulbecco's phosphate buffered

saline (D-PBS : Welgene., Korea), dexamethasone(sigma CO., USA), 2, 4, 6-trinitrochlorobenzene(Donga., Korea), anti-CD3-PE (BD-Pharmingen CO., USA), anti-CD4-FITC (BD-Pharmingen CO., USA), anti-CCR3-PE(BD-Pharmingen CO., USA), anti-B220-PE(BD-Pharmingen CO., USA), anti-CD8-FITC (BD-Pharmingen CO., USA), anti-B220-FITC (BD-Pharmingen CO., USA), anti-CD49b-FITC(BD-Pharmingen CO., USA), anti-CD11b-FITC(BD-Pharmingen CO., USA), anti-Gr-1-PE(BD-Pharmingen CO., USA)사 재품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다. 또한 기기는 homogenizer(OMNI CO., USA), Flow cytometry system(BD Biosciences CO., USA) 등을 사용하였다.

4. 시료 추출

연산호 51 kg을 분쇄한 후 n-hex 36 L에 넣고 추출하여 농축한 결과 767 g (수득율 1.5%)의 추출액을 얻었다. 얻어진 추출액은 실험에 따라 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

5. 피부염 유발 및 시료처리

7주령이 된 NC/Nga 생쥐의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후 제모가 끝나면 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 1% mite 용액 (아세톤 : 올리브 오일 = 3 : 1) 200 μ l를 등 부위에 도포하고, 4일 후 1% mite 용액 150 μ l를 다시 도포하였으며, 2일 후 부터는 1주일에 3번씩 1% mite 용액 150 μ l를 3주간 등 부위에 도포하였다. 실험은 각 군당 6마리씩 4개군으로 나누었으며 정상군, 대조군에는 증류수를, 실험군인 MC-1 투여군은 200 mg/kg, 400 mg/kg 농도로 3주간 경구 투여 하였다.

6. 간, 신장 기능 및 면역세포 생성량 검사

실험 종료 후, NC/Nga 생쥐에서 심장 천자법을 이용하여 채혈한 후 바이오톡스텍 (오창, Korea)에 의뢰하여 혈청으로는 간 기능 검사인 ALT, AST와 신장 기능 검사인 creatinine, BUN 검사를 실시하였다. 또한, 전혈로 백혈구, 림프구 생성량을 검사하였다.

7. 면역세포 분리

실험 종료 후 mite로 유발된 NC/Nga 생쥐에서 일정량의 배부 피부 조직을 잘게 chopping 한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37°C shaker (140 rpm, 20 min) 배양기에서 배양하여 상청액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이들 세포들에 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃ in 1 L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 cell strainer를 통과시킨 세포를 유세포 분석에 사용하였다.

8. 유세포 분석

분리한 세포를 5×10^5 cells/ml 농도로 조정후 4°C에서 면역형광염색을 실시하였다. 각각에 anti-CD4-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-CD69-FITC, anti-CD3-PE, anti-CD8-PE, anti-Gr-1-PE를 넣고 30분간 얼음에서 반응시킨 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세하고 flow cytometry로 분석하였다.

9. 육안적 평가

9주령의 NC/Nga 생쥐를 제모한 후 mite를 3주간 도포하여 피부염을 유발시키면서 실험군인 MC-1을 3주간 경구 투여하였다. 경구 투여를 진행하는 13주령과 15주령 때에 NC/Nga 생쥐를 그룹별로 사진 촬영하였다.

10. 통계처리

실험 결과는 실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test 및 ANOVA를 사용하여 통계처리 하였으며 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 간 기능 검사

간 기능 측정의 지표 성분인 ALT를 측정한 결과, 정상군은 54.2 ± 20.1 U/L, 대조군은 59.3 ± 19.9 U/L, MC-1 200 mg/kg 투여군은 68.4 ± 3.3 U/L, MC-1 400 mg/kg 투여군은 64.7 ± 14.8 U/L로 나타났다. 또한 AST는 정상군이 80.8 ± 16.8 U/L, 대조군은 83.2 ± 4.6 U/L, MC-1 200 mg/kg 투여군은 89.9 ± 7.9 U/L, MC-1 400 mg/kg 투여군은 101.9 ± 12.3 U/L로 나타나, 간 기능 검사에서 정상군과 비교하여 큰 차이를 나타내지 않아 안전한 것으로 나타났다(Fig. 1).

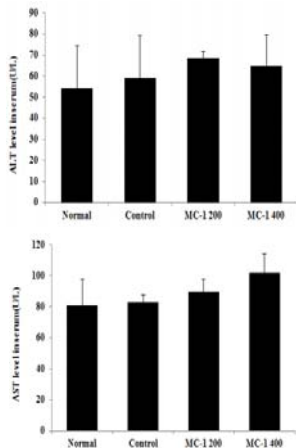


Fig. 1. Effects of MC-1 200 and 400 (mg/kg) on ALT or AST of serum in mite-induced dermatitis models of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of MC-1 (200 mg/kg, 400 mg/kg) for 3 weeks. The result were presented by the mean ± S.D.

2. 신장 기능 검사

신장 기능 측정의 지표 성분인 BUN을 측정한 결과, 정상군

은 31.9 ± 2.1 mg/dl, 대조군은 30.7 ± 0.7 mg/dl, MC-1 200 mg/kg 투여군은 26.4 ± 1.0 mg/dl, MC-1 400 mg/kg 투여군은 27.3 ± 0.4 mg/dl로 나타났다. 또한 creatinine은 정상군이 0.37 ± 0.03 mg/dl, 대조군은 0.29 ± 0.07 mg/dl, MC-1 200 mg/kg 투여군은 0.31 ± 0.03 mg/dl, MC-1 400 mg/kg 투여군은 0.35 ± 0.03 mg/dl로 나타나, 신장 기능 검사에서 정상군과 비교하여 큰 차이를 나타내지 않아 안전한 것으로 나타났다(Fig. 2).

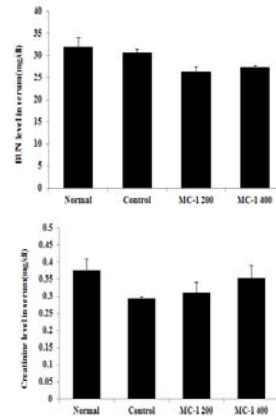


Fig. 2. Effect of MC-1 200 and 400 (mg/kg) on the BUN or creatinine of serum in mite-induced dermatitis models of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of MC-1 (200 mg/kg, 400 mg/kg) for 3 weeks. The result were presented by the mean ± S.D.

3. 혈액 내 면역세포에 미치는 영향

MC-1 200 mg/kg과 400 mg/kg 투여 종료 후에 혈액 내 백혈구를 측정한 결과, 대조군은 6.6 ± 1.2 ($\times 10^3$ cells/ μ l)을 나타낸 반면, MC-1 200 mg/kg 투여군은 5.6 ± 1.0 ($\times 10^3$ cells/ μ l), MC-1 400 mg/kg 투여군은 4.5 ± 0.5 ($\times 10^3$ cells/ μ l)로 나타나, 대조군에 비하여 감소를 나타내었으며, 림프구를 측정한 결과, 대조군은 $79.3 \pm 2.7\%$, MC-1 200 mg/kg 투여군은 $69.4 \pm 0.5\%$, MC-1 400 mg/kg 투여군은 $65.5 \pm 1.3\%$ 으로 나타나, 대조군에 비하여 모든 투여군에서 유의성 있는 ($p < 0.001$, $p < 0.01$) 감소를 나타내었다(Fig. 3).

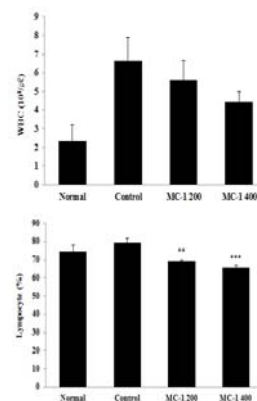


Fig. 3. Effect of MC-1 200 and 400 (mg/kg) on the level of WBC and lymphocyte in the blood of mite-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of MC-1 (200 mg/kg and 400 mg/kg) for 3 weeks. The results were represent the mean ± S.D. (Significance of results, $p < 0.001$, $p < 0.01$)

4. 육안적 관찰 평가

7주령의 NC/Nga 생쥐를 제모한 후 mite를 3주간 도포하여 피부염을 유발시키면서 실험군인 MC-1을 3주간 경구 투여하였다. Fig. 4는 13주, 15주의 피부염 유발 정도와 개선 정도를 나타내주는 사진으로, 대조군에서 흥반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등의 증상이 확인되었고, MC-1 투여군이 대조군에 비해서 흥반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등의 증상이 현저하게 떨어졌음을 확인할 수 있다(Fig. 4).

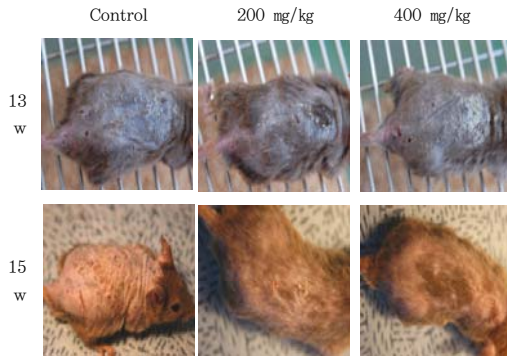


Fig. 4. Comparison of skin manifestation in NC/Nga mice between control and experimental group. Atopic dermatitis was induced by mite treatment in the dorsal skin.

5. Axillary lymph node(ALN) 내 면역세포 변화에 미치는 영향

MC-1 200 mg/kg과 400 mg/kg 투여 종료 후 ALN 내 CD4+ 면역세포를 측정된 결과, 대조군은 $14.3 \pm 0.8 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 200 mg/kg 투여군은 $12.5 \pm 3.7 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 400 mg/kg 투여군은 $6.3 \pm 1.1 (\times 10^5 \text{ cells})$ 로 나타나, 대조군에 비하여 MC-1 400 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 ($***p < 0.001$) 감소를 나타내었으며, CD8+ 면역세포를 측정된 결과, 대조군은 $10.5 \pm 1.8 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 200 mg/kg 투여군은 $6.9 \pm 3.0 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 400 mg/kg 투여군은 $3.5 \pm 0.7 (\times 10^5 \text{ cells})$ 로 나타나, 대조군에 비하여 MC-1 400 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 ($**p < 0.01$) 감소를 나타내었다. 또한, CD11b+/Gr-1+ 면역세포를 측정된 결과, 대조군은 $8.6 \pm 0.5 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 200 mg/kg 투여군은 $4.7 \pm 1.8 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 400 mg/kg 투여군은 $2.7 \pm 0.6 (\times 10^5 \text{ cells})$ 로 나타나, 대조군에 비하여 모든 투여군에서 유의성 있는 ($***p < 0.001, *p < 0.05$) 감소를 나타내었으며, B220+/CD23+ 면역세포를 측정된 결과, 대조군은 $19.4 \pm 1.3 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 200 mg/kg 투여군은 $9.8 \pm 1.4 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 400 mg/kg 투여군은 $4.3 \pm 0.9 (\times 10^5 \text{ cells})$ 로 나타나, 대조군에 비하여 모든 투여군에서 유의성 있는 ($***p < 0.001$) 감소를 나타내었다. CD4+/CD25+ 면역세포를 측정된 결과, 대조군은 $16.4 \pm 3.4 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 200 mg/kg 투여군은 $16.8 \pm 4.8 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 400 mg/kg 투여군은 $7.5 \pm 1.6 (\times 10^5 \text{ cells})$ 로 나타나, 대조군에 비하여 MC-1 400 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 ($*p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 5).

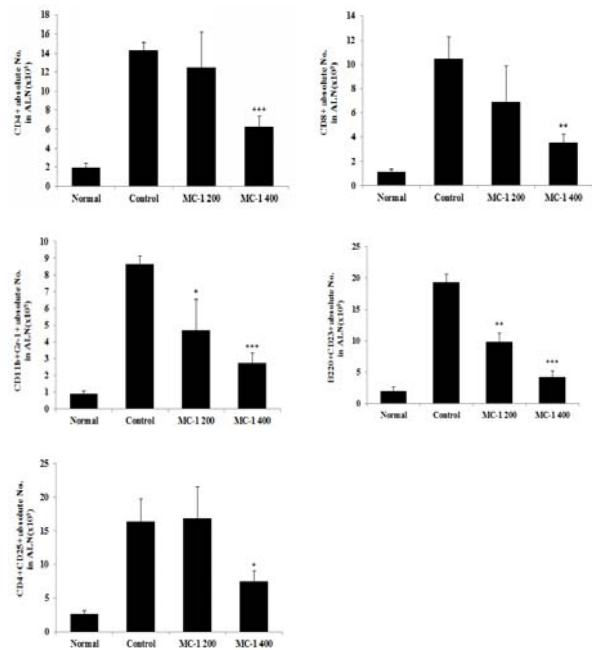


Fig. 5. Effect of MC-1 200 and 400 (mg/kg) on CD4+, CD8+, CD11b+/Gr-1+, B220+/CD23+, CD4+/CD25+ cell count of ALN in mite-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of MC-1 (200mg/kg and 400mg/kg) for 3 weeks. The results were represent the mean \pm S.D. (Significance of results, $***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05$)

6. Draining lymph node(DLN) 내 면역세포 변화에 미치는 영향

MC-1 200 mg/kg과 400 mg/kg 투여 종료 후에 DLN 내 CD4+ 면역세포를 측정된 결과, 대조군은 $3.1 \pm 0.9 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 200 mg/kg 투여군은 $11.5 \pm 2.5 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 400 mg/kg 투여군은 $9.7 \pm 2.1 (\times 10^5 \text{ cells})$ 로 나타나, 대조군에 비하여 모든 투여군에서 유의성 있는 ($**p < 0.01$) 증가를 나타내었으며, CD8+ 면역세포를 측정된 결과, 대조군은 $1.1 \pm 0.4 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 200 mg/kg 투여군은 $5.6 \pm 1.9 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 400 mg/kg 투여군은 $4.3 \pm 0.8 (\times 10^5 \text{ cells})$ 로 나타나, 대조군에 비하여 모든 투여군에서 유의성 있는 ($*p < 0.01, *p < 0.05$) 증가를 나타내었다. B220+/CD23+ 면역세포를 측정된 결과, 대조군은 $4.0 \pm 1.5 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 200 mg/kg 투여군은 $13.2 \pm 0.2 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 400 mg/kg 투여군은 $14. \pm 4.6 (\times 10^5 \text{ cells})$ 로 나타나, 대조군에 비하여 모든 투여군에서 유의성 있는 ($***p < 0.001, *p < 0.05$) 증가를 나타내었으며, CD4+/CD25+ 면역세포를 측정된 결과, 대조군은 $3.8 \pm 1.5 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 200 mg/kg 투여군은 $17.2 \pm 4.9 (\times 10^5 \text{ cells})$, MC-1 400 mg/kg 투여군은 $15.8 \pm 4.8 (\times 10^5 \text{ cells})$ 로 나타나, 대조군에 비하여 모든 투여군에서 유의성 있는 ($**p < 0.01, *p < 0.05$) 증가를 나타내었다(Fig. 6).

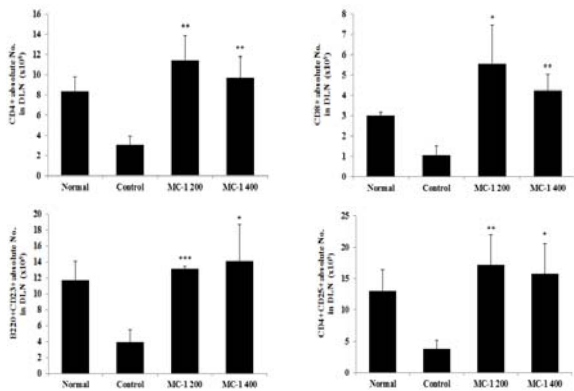


Fig. 6. Effect of MC-1 200 and 400 (mg/kg) on CD4+, CD8+, B220+/CD23+, CD4+/CD25+ cell count of DLN in mite-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of MC-1 (200mg/kg, 400mg/kg) for 3 weeks. The results were represent the mean \pm S.D. (Significance of results, *** p (0.001), ** p (0.01), * p (0.05))

고찰

AD의 한의학적 범주는 『素問·玉機 眞藏論篇』¹⁰⁾에서 “浸淫”이라고 기록된 이후로, 문헌 중에 다양하게 나타나는 데 정확히 일치하는 한의학적 병명은 없는 관계로 현재까지 乳癬, 嬰兒濕疹, 胎熱症, 胎癩, 浸淫瘡, 胎斂瘡, 奶癬, 濕疹, 四彎風 등으로 혼용되어 사용되고 있다¹¹⁾. AD의 발생 원인은 주로 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 인하여 虛實錯雜의 복잡한 병기를 형성함으로써 병인, 병기에 따라 辨證施治가 이루어지고 있으며¹²⁻¹⁵⁾, 특히 ‘肺主皮毛’, ‘脾主濕’, ‘諸痛痒瘡 皆屬於心’ 등의 이론에 준하여 이들 장부 기능 회복과 2차적 병리적 과정 중에 발생한 독성 물질 제거를 목표로 다양한 임상적 연구가 진행되고 있다¹⁶⁾. 아울러 보다 유의성 있는 치료제 개발을 위한 실험 연구들이 동물 병태 모델을 이용하여 활발히 진행된 결과, 현재 수종의 단일 약제¹⁷⁻²⁰⁾의 항아토피 효능이 객관적으로 규명된 바가 있다.

본 실험에 사용한 연산호 후토티타케(Lobophytum crassum)의 핵산 추출물(이하, MC-1)은 lithophynol Ac, cembranoid C, denticulatolide를 주성분으로 cembrane diterpene의 혼합물이며 이들 cembrane diterpene은 in vitro 실험을 통해 NO생성을 억제하고 in vivo의 Oxazolone 유발 생쥐의 귀부종을 억제하는 효과를 나타냈다^{21,22)}.

지금까지 연산호에 대한 연구로는 Nguyen²³⁾ 등의 새로운 스테롤에 대한 연구와 Azizur Rahman²⁴⁾ 등의 단백질 합성에 대한 연구가 있었으며, Chao⁸⁾ 등과 Nguyen⁹⁾ 등이 간암 세포인 HepG2 세포에서 연산호 추출물에 대한 항염증 효과를 밝혀낸 바 있으나 아직 면역 및 AD에 연구 결과 보고된 바 없다.

우선 사회적으로 문제시 되고 있는 안전성 확인을 위해 실험 종료 후 NC/Nga 생쥐의 혈액으로 ALT, AST, BUN, Cr 수치를 확인한 결과 정상군 범위에서 큰 차이를 나타내지 않았다. 이 같은 결과만으로 안전성을 확보하기는 어렵지만 이미 복용 후 평가된 최종 결과인 만큼 간독성과 신독성 측면에서는 어느 정도 안전한 것으로 인정되었다.

소양감은 AD의 가장 핵심적 증상으로 급·만성기 모두에

서 나타나며 긁는 행위로 인해 찰상, 이차감염(농가진, 단순 포진) 등과 같은 이차적인 피부증상 악화를 초래할 수 있기 때문에 AD 치료에 있어서 중요시되는 항목이다²⁵⁾. 본 연구에서는 MC-1이 AD가 유발된 NC/Nga 생쥐에 대한 효과를 알아보기 위해 육안적 평가를 실시한 결과, 피부개선 효과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 MC-1이 소양감뿐만 아니라 긁는 행위로 인한 이차적인 피부증상 악화를 완화할 수 있음을 시사하고 있고, 본 결과가 효능 평가의 최종 결과인 만큼 본 시료가 AD에 효과적임을 알 수 있다.

백혈구는 외부로부터 침입한 세균이나 이물질을 분해하는 역할을 지니는데, 염증이 발생되면 백혈구의 수가 증가하게 된다²⁶⁾. 또한, 면역세포는 생성 후 일정기간이 지나면 자연스럽게 세포사멸에 의해 소멸되어야 하는데 아토피 환자에게서는 사이토카인 등에 의해 면역세포의 세포사멸이 억제되어서 림프구가 증가되어 AD 등의 질환이 일어나게 된다⁵⁾. MC-1이 AD가 유발된 NC/Nga 생쥐에서 혈액 내 면역세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 조사한 결과, 백혈구 수는 대조군에 비하여 감소를 나타내었으며, 림프구는 유의성 있는 감소를 나타내었다.

T세포는 면역반응을 결정하는 가장 중요한 세포이며, 항체를 생산하는 B세포에 작용하여 항체를 생산하고 대식세포에 작용하여 대식세포를 활성화시키고²⁷⁾, T 세포의 membrane molecule로 CD(cluster of differentiation) isotype 들은 T 세포 수용체(T cell receptor; TCR)에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달하며 T 세포의 결정표지인자이다²⁸⁾. 면역반응의 조절에 관여하는 Th cell은 세포표면에 TCR 외에 CD4 분자를 가지고 있으며, 직접 다른 세포를 죽이는 기능을 가지고 있는 Tc cell은 CD8 분자를 가지고 있다. 특히 Arnold²⁹⁾ 등은 알러지성 질환 환자의 말초혈액 내 CD3+, CD4+, CD8+ 세포의 증가를 보고하였고, Borgonovo³⁰⁾ 등은 항원 노출 후 수 시간 내 CD4+ T세포들이 target 기관으로 이동하여 알러지성 염증을 유발한다고 보고하였다.

또한, Gr-1은 과립구의 표지자이며 CD11b는 순환 호산구의 표면에 발현하여 내피에 발현된 후 표적장기로 유입되어 염증 반응 및 면역학적 반응, 상처치유, 응고, 세포성장 및 분화 등에 기여하게 되며, B세포의 표면에 발현되는 분자인 B220 (CD45)는 사람에게에는 존재하지 않지만, 생쥐의 B 세포 표면에 존재하는 B 세포 마커이며, CD23은 비만세포, 호중구, 호산구 등의 표면 분자이다³¹⁾.

만성아토피질환 동물에서 ALN은 중요한 역할을 하는 면역 기관으로 아토피 피부발진이 심화되면 ALN으로 Th2세포, 비만세포 등 면역염증 세포가 증가하게 되어 만성피부질환 동물의 피부발진을 계속 유지하고 악화시키는데 기여하게 된다³²⁾. 3주간의 경구 투여 종료 후 ALN 내 면역세포검사 결과, MC-1 200, 400 (mg/kg) 투여군은 대조군에 비하여 CD4+, CD8+, CD11b/Gr-1, B220/CD23, CD4/CD25 등에서 유의성 있는 감소를 나타내었으며, MC-1 400 mg/kg이 200 mg/kg에 비하여 더 나은 효과를 나타내었다.

마지막으로 면역 세포들을 피부조직으로 침윤되는 것을 막는 작용이 전체적인 면역세포 수를 조절해서 나타난 현상인지 알아보기 위하여 3주간의 경구 투여 종료 후 DLN 내 면역세포검사 결과, MC-1 200, 400 (mg/kg) 투여군은 대조군에 비하여 CD4+, CD8+, B220/CD23, CD4/CD25 등에서 유

의성 있는 증가를 나타내었으며, MC-1 200 mg/kg이 400 mg/kg에 비하여 더 나은 효과를 나타내었다.

위의 결과들을 종합해 볼 때, MC-1은 혈액 내 면역세포와 ALN 및 DLN 내 면역세포 등의 결과가 서로 부합되어, AD의 소양감과 피부 등의 개선 완화를 실험적으로 입증하였다. 이 같은 결과는 MC-1이 새로운 단일 약제로써 면역질환 개선에 도움을 줄 수 있을 것이라 사료된다.

결론

본 연구에서는 아토피 피부염을 유발한 생쥐에서 산호의 일종인 연산호 추출물을 통해 아토피 피부염 및 면역조절작용에 대해 객관적으로 검증하기 위하여, 집먼지 진드기로 활성화된 동물병태 모델에서 안전성 검사, 육안적 평가, 혈액 내 면역세포 생성량 및 ALN, DLN 내 면역세포 변화를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MC-1 200, 400 (mg/kg) 경구 투여 결과, 간 기능과 신장 기능 검사에서 독성을 유발하지 않아 안전한 것으로 나타났다.
2. MC-1 200, 400 (mg/kg) 경구 투여군은 육안적 평가에서 피부개선 효과를 나타내었다.
3. MC-1 200, 400 (mg/kg) 경구 투여군은 혈액 내 면역세포 생성량을 측정된 결과, 백혈구 생성량의 감소와 림프구 생성량을 유의성 있게 감소시켰다.
4. MC-1 200, 400 (mg/kg) 경구 투여군은 ALN 내 면역세포 변화를 측정된 결과, CD4+, CD8+, CD11b/Gr-1, B220/CD23, CD4/CD25에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.
5. MC-1 200, 400 (mg/kg) 경구 투여군은 DLN 내 면역세포 변화를 측정된 결과, CD4+, CD8+, B220/CD23, CD4/CD25에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가시켰다.

이상의 결과들로 보아 MC-1이 아토피 피부염의 주요 면역인자에 대한 효능이 실험적으로 규명되었다. 이와 같은 결과는 MC-1이 면역 치료의 단일 약제로서 효과가 검증되었다.

References

1. Park MH. Effect of probiotics is used commercially in the inflammatory response RAW 264,7 macrophages cell. Inje University, 2010.
2. Katayama I, Kohno Y, Akiyama K, Aihara M, Kondo N, Saeki H, Shoji S, Yamada H, Nakamura K. Japanese Society of Allergology. Japanese Guideline for Atopic Dermatitis. *Allergol Int*, 2014 ; 63(3) : 377-98.
3. Duncan CL, Simon SL. A review of psychosocial risk factors for pediatric atopy. *J Allergy(Cairo)*, 2012 ; 142(2) : 3-5.
4. Okada H, C Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol*, 2010 ; 160(1) : 1-9.
5. Sim BY, Ji JG, Lee WY, Kim SJ, Kim HY, Lee JY, Kim DH. Experimental Research of Baecksunpijibujabokhap-banng(BJBB) on Atopic Dermatitis Treatment. *Res inst Korean Med*, 2014 ; 22(2) : 67-79.
6. Eric L, Simpson. Atopic dermatitis: a review of topical treatment options. *Curr Med Res Opin*, 2010 ; 26(3) : 633-40.
7. Heo J. DongEuiBoGam, Seoul : BukKyongDang, 1983 : 1336.
8. Chao CH, Wen ZH, Wu YC, Yeh HC, Sheu JH. Cytotoxic and anti-inflammatory cembranoids from the soft coral *Lobophytum crassum*. *J Nat Prod*, 2008 ; 71(11) : 1819-24.
9. Thao NP, Luyen BT, Ngan NT, Song SB, Cuong NX, Nam NH, Kiem PV, Kim YH, Minh CV. New anti-inflammatory cembranoid diterpenoids from the Vietnamese soft coral *Lobophytum crassum*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013 ; 24(1) : 228-32.
10. Hong WS. The Yellow Emperor's Classic of Medicine. Seoul : Dongyang, 72-80.
11. Park MC, Kim JM, Hong CH, Hwang CY. A Literature Study about Comparison of Eastern-Western Medicine on Atopic dermatitis. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2002 ; 15(1) : 226-52.
12. Wáng FY. pifubing xingbing jianyi liaofa. Beijing : renmin junyi Chubanshe, 2005 : 212.
13. Liang ZP. pifubing. Bei jing : renmin junyi Chubanshe, 2007 : 109-33.
14. Wang MH. pifubing xingbing mingyi mi yan jueji. Beijing : renmin junyi Chubanshe, 2004 : 282-7.
15. Ke M. zhongyi pifuke linchuangshijian. Beijing : Guizhou kexue Chubanshe, 2002 : 202-10.
16. Kim SB, Choi HJ, Kim DH. Combinational treatment of oral hwangtogamibang and external spray on atopic dermatitis. *Res inst Korean Med*, 2008 ; 17(2) : 51-68.
17. Kim HW, Ryu JH, Jo SZ, Cheon WJ, Son YH, An WG, Cho SI. Effects of Sophorae Radix on skin condition in mice with contact dermatitis induced by Dinitrofluorobenzene. *Kor J Herbology*, 2013 ; 28(6) : 25-9.
18. Lee YS, Yoon JH, Kim BA, Park CI, Yoo WK, Cho JW, Kim MR. Effects of Horse oil on the DNCB-induced Contact Hypersensitivity in Balb/c

- Mice. *Kor J Herbology*. 2013 ; 28(4) : 77-81.
19. Jung WY, Jeong JM. Change of Antioxidative Activity at Different Harvest Time and Improvement of Atopic Dermatitis Effects for Persimmon Leaf Extract. *Kor J Herbology*. 2012 ; 27(1) : 41-9.
 20. Kim SC, Lee JR, Choi KI, Park SJ, Kwon YK, Byun SH. Effect of *Lonicerae Flos*-Skin on Contact Hypersensitivity induced by Repeat Elicitation of DNCB. *Kor J Herbology*. 2006 ; 21(1) : 9-15.
 21. Kapsok L. Itch in atopic dermatitis: from pathogenesis to treatment. *Allergy Asthma Respir Dis*. 2014 ; 2(1) : 8-15.
 22. Muro Y. Autoantibodies in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 2001 ; 25(1) : 171-8.
 23. Nguyen PT, Nguyen HN, Nguyen XC, Nguyen XN, Pham TT, Tran HQ, Nguyen TT, Phan VK, Chau VM, Kim YH. A New Sterol from the Soft Coral *Lobophytum crassum*. *Bulletin Korean Chem Soc*. 2003 ; 34(1) : 249-51.
 24. Azizur RM, Isa Y. Characterization of proteins from the matrix of spicules from the alcyonarian, *Lobophytum crassum*. *J Exp Mar Biol Ecol*. 2014 ; 321(1) : 71-82.
 25. Cho JH, Kim YB. The Effects of Yukmijhwang-tang on Atopic Dermatitis of NC/Nga Mouse. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2009 ; 22(1) : 120-32.
 26. Jeong JH. Anti-inflammatory effects of herbal mixture (*Rubuscoreanus*, *Rehmanniae Radix*, *Houttuynia cordata*, *Betulaecortex*) on acute atopic dermatitis mice. *Kyungwon University*. 2011.
 27. Hwang CH, Jeong HG, Koo YS, Kim DH. Effects of *Houttuyniae Herba* Complex Prescription on Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2007 ; 21(1) : 181-9.
 28. Jung HK. Study of immune toxicity mechanism of toxic compounds on immune system. *Chosun university*. 2007.
 29. Arnold V, Balkow S, Staats R, Matthys H, Luttmann W, Virchow JC. Increase in perforin-positive peripheral blood lymphocytes in extrinsic and intrinsic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 ; 161(1) : 182-6.
 30. Borgonovo B, Casorati G, Frittoli E, Gaffi D, Crimi E, Burastero SE. Recruitment of circulating allergen-specific T lymphocytes to the lung on allergen challenge in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 ; 100(5) : 669-78.
 31. Han YJ. Effects of Gamcho on immunocyte and cytokine production in asthma model mouse. *Daejeon University*. 2004.
 32. Jang SN. Immunomodulatory Effect of poly- γ -glutamic acid on biostir mite antigen cream-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Konkuk University*. 2009.