

DNFB에 의해 알레르기성 접촉성 피부염이 유도된 마우스에서 초석잠 추출물의 효과

이윤성¹ · 정선오² · 배현옥^{1,2*}

1: 원광대학교 식품산업융복합학과, 2: 원광대학교 의과대학 면역학교실

Effect of the Extract of *Stachys Affinis* on DNFB-induced Allergic Contact Dermatitis in Mice

Yun-seong Lee¹, Sun Oh Jeong², Hyun-Ock Pae^{1,2*}

1: Graduate School of Food Industry Convergence, Wonkwang University,

2: Department of Immunology, School of Medicine, Wonkwang University

This study aims to evaluate the anti-inflammatory effect of 80% ethanol extracts of *Stachys affinis* (MQ) on 1-fluoro-2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB) induced atopic dermatitis (AD) in Balb/c mice. AD-like allergic contact dermatitis was induced by challenge of DNFB on the ear after DNFB sensitization on the back sides of mice. MQ alleviated clinical severity in AD-like skin lesions. In addition, ear thickness of epidermis and penetration of inflammatory cells in AD-like skin lesions were decreased by topical application of MQ. The the serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-4 (IL-4) were measured in AD mice using ELISA kits. Levels of TNF- α and IL-4 in serum were significantly decreased by topical application of MQ. Therefore, this study could give a clinical basis that MQ could be a agent to prevent AD.

keywords : *Stachys affinis*, Atopic dermatitis, 1-fluoro-2,4-Dinitrofluorobenzene, Cytokines, Skin inflammation

서 론

아토피 피부염은 알레르기질환 중 대표적인 난치성 질환으로 지속적인 소양증을 일으키는 피부 표층의 염증을 뜻하며, 일반적으로 피부 건조, 가려움, 염증을 동반한 알레르기성 습진을 말한다^{1,2}. 아토피 피부염의 발병 원인은 아직 까지 명확히 규명되지 않았으나 유전적인 요인, 환경적인 요인 그리고 면역학적 이상 등 복합적인 요인들이 관여하는 것으로 알려져 있다^{3,4}. 정상적인 상태에서는 Th1 세포와 Th2 세포 간의 상호작용으로 균형을 이루면서 면역반응을 유지하지만 아토피 피부염에서는 T 림프구의 Th2 세포로의 전환이 촉진되어 증가된 Th2 세포가 많은 양의 염증성 cytokine을 분비 시키고 혈중 IgE의 상승을 가져오으로써, Th1 세포의 활성을 억제하는 IL-4는 더욱 증가하여 Th1 세포의 증식이 더욱 억제되어 결국 세포 매개성 면역의 저하를 가져오게 되어 염증반응을 더욱 촉진 시킨다⁵. 아토피 피부염의 경우 Th2 skewing reaction 위주의 발병 기전에 대한 연구가 주류를 이룬다⁶. 일반적으로 아토피성 피부염의 치료는 염증과 소양감의 조절, 2차 병변 발생의 방지를 목적으로 한다. 스테로이드 외용제가 보습제, 식이 조절, 항히스타민제, 항생제와 함께 흔히 사용 된다⁷. 항히스타민 처리는 아토피 피부염 환자에게서 가려움증을 억제하기에 충분하지 못하며, 스테로이드의 적용은 잦은 부작용 때문에 장기적으로 이용할 수 없기 때문에 천연물로부터 새로운 물질을 개발하려는 연구가 필요하다⁸.

초석잠(*Stachys affinis*)은 꿀풀과(labiata)로 중국, 일본 및 러시아 등에서 주로 재배되고 있다⁹. 1년생 본초로 뿌리는 가을에 지하에서 3~6 cm 정도로 자라는데 형태가 동충하초와 비슷하고 약효도 비슷하여 식물의 동충하초라 불린다¹⁰. 맛은 달며 풍을 쫓고 어혈, 적혈을 풀며 기를 내리게 하고 신체의 조화를 이루게 한다고 기록되어 있으며, 관절염과 신경통 등을 치유하고, 간을 좋게 하는 작용이 있어 황달을 낮게 한다고 알려져 있다¹¹. 또한, 초석잠의 탄수화물은 올리고당의 일종인 stachyose으로 인해 장내 유용균의 생육을 촉진하여 대장의 기능 촉진 및 장내 미생물 증식작

용으로 인한 면역력의 강화, 배변작용 개선 등의 작용을 가지는 것으로 알려져 있다¹².

따라서 본 연구에서는 1-fluoro-2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB) 으로 아토피성 피부염의 하나인 알레르기성 접촉성 피부염을 유도한 동물모델에서 초석잠 추출물이 예방 효과에 대해 연구를 진행하였으며, 이를 확인하기 위해 추출물에 대한 분석과 귀 두께 변화와 같은 육안적 평가, 염증성 사이토카인 측정을 통하여 효과를 검증하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 추출물의 제조

본 실험에 사용된 초석잠(*Stachys affinis*)은 천안에서 2월에 수확한 것으로, 열풍 건조 후 분쇄한 분말 (70 g)을 10배 (v/w)에 해당하는 80% 에탄올 수용액을 가하여 80°C에서 2시간 30분 동안 단회 환류냉각 추출한 추출물을 qualitative filter paper (ADVANTECH, Tokyo, Japan)로 여과하여 여액을 감압 농축기 (rotary evaporator, EYELA, N-1000, Tokyo, Japan)를 사용하여 농축하고, 농축액을 ultra-low temperature freezer (NuAire, NU-6625D36, USA)에서 48시간 동결시킨 후 동결건조 (PVTFD-10R, Ilshin Lab Co. Ltd., Yangju, Korea) 하여 초석잠 에탄올 추출물 8.61 g (12.3%)을 수득 하였다.

2) 실험동물

본 실험에서 사용한 실험동물은 5주령 수컷 Balb/c mice를 샘타코(Osan, Korea)에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. Balb/c mice의 평균 무게는 19.48 ± 0.74 g으로 시료를 매일 2~3회 도포 하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 실내온도는 23 ± 2°C, 실내습도는 50 ~ 60%를 유지하였다. 본 동물실험은 원광대학교 동물실험가이드(Guide for Animal Experimentation)를 준수하여 시행되었으며, 원광대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 시행하였다 (Approval

* Corresponding author

Hyun-Ock Pae, Department of Immunology, School of Medicine, Wonkwang University, 460 Iksandaero, Iksan, Jeonbuk 54538, Republic of Korea

E-mail : hopae@wku.ac.kr Tel : +82-63-850-6925

Received : 2021/11/08 Revised : 2022/01/14 Accepted : 2022/02/24

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2022.02.36.1.23

Available online at https://kmpath.jams.or.kr & http://jppkm.org

NO. WKU21-42).

3) 군 구성

실험동물은 5개 군으로 분류되었으며 아무 처리도 하지 않은 정상군(CON), 오른쪽 귀에 DNFB를 도포하고 증류수(distilled water, DW)를 도포한 대조군 (DNFB), 오른쪽 귀에 DNFB를 도포하고 Betamethasone (0.61 mg/kg) 도포군 (BMC), 오른쪽 귀에 DNFB를 도포하고 초석잠 추출물 45 mg/mL 도포군(MQ300), 오른쪽 귀에 DNFB를 도포하고 초석잠 추출물 100 mg/mL 도포군 (MQ500) 으로 분류하였다 (Table 1). 군 구성 마리수의 산정은 3R의 원칙에 준하여 통계적 의미를 가리는 최소수를 사용하였다. 각 군별로 시료를 1% carboxymethyl cellulose (CMC) 에 용해하여 1일 20µL 씩 2~3회씩 도포 하였다.

Table 1. Experimental design for animal study to investigate atopic dermatitis effects of MQ

Group	Left	Right	Material	Dose	n	
1	CON	Normal	Normal	-	5	
2	DNFB	Normal	0.3% DNFB	vehicle (1% CMC)	-	5
3	BMC	Normal	0.3% DNFB	Betamethasone	0.61 mg/kg	5
4	MQ300	Normal	0.3% DNFB	MQ (1% CMC)	45 mg/mL	5
5	MQ500	Normal	0.3% DNFB	MQ (1% CMC)	100 mg/mL	5

2. 방법

1) 세포 생존률

한국세포주은행에서 분양받은 RAW264.7 대식세포주를 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기 (Thermo scientific, Waltham, USA) 에서 배양하였다. 초석잠 추출물의 세포 독성 여부를 확인하기 위해 배양한 RAW264.7을 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] MTT 방법으로 측정하였다. MTT 방법은 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법을 실시하였다. 배양한 세포주를 각각 1×10⁶ cell/well이 되도록 48 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 이들 세포를 1, 10, 100 µg/mL 농도의 시료추출물이 첨가된 배양액에서 24시간 배양 후 MTT 용액 1 mg/mL 용액을 well 당 300 µL씩 넣고 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 DMSO 100 µL 씩 넣고 15분간 실온에 방치하며 formazan을 용해한 후 ELISA reader로 발색도를 흡광도 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2) DNFB 제조 및 아토피 피부염 유발

Balb/c mice를 일주일간 순화 후 등(back) 부위를 제모하여 3일간 적응시켰다. DNFB (Sigma, St. Louis, USA) 시약은 acetone : olive oil (4:1) 안에 0.5% DNFB를 희석시켜서 준비하였다. 제모 후 4일째 되는 날 등 부위에 0.5% DNFB 50 µL 3일간 도포하여 피부 감각 (sensitization)을 유도하였다. 피부 감각 4일 후부터 0.3% DNFB를 귀(ear)에 20 µL 도포 하여 (challenge) 아토피 피부염을 유발함과 동시에 각 그룹별로 7일간 시료를 도포 하였다.

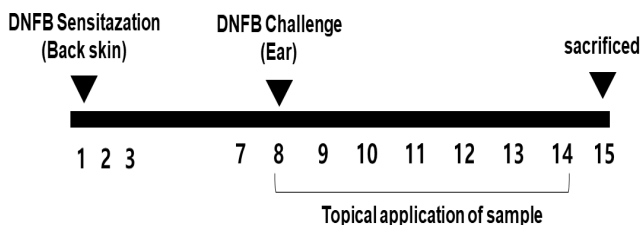


Fig. 1. Experimental design. Mice in the experimental groups were sensitized by painting 0.5% DNFB on day 1, 2 and 3. The mice than were challenged by 0.3% DNFB on day 14. Group was topically applied with MQ (20 µL) for 7 days.

3) 육안 평가

육안 평가는 아토피 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 평가방법으로써 아토피 피부염 증상의 심각성 정도를 측정하기 위해 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타내었다¹³⁾. 평가 항목은 홍반(erythema), 가려움(pruritus)과 피부건조(dry skin), 부종(edema)과 혈종(excoriation), 짓무름(erosion) 그리고

태선화(lichenification)이며 각각의 항목에 대해 증상 없음(0점), 약함(1점), 보통(2점), 심함(3점)으로 채점한 후, 합산하여 최소 0점에서 최고 15점 사이의 점수를 부여하였다.

4) 귀 두께 측정

DNFB 도포 후 피부조직의 변화를 측정하기 위해 Balb/c mice의 양쪽 귀를 측정하였다. 귀 두께는 vernier caliper (Mitutoyo Co., Japan)를 사용하여 도포(challenge) 후 7일간 귀 두께 변화를 측정하였다.

5) 비장 지수 (spleen index) 측정

귀 두께 측정 후 Balb/c mice를 희생시켜 비장을 적출하고 무게를 측정하였다. 비장 수치(spleen index)는 Balb/c mice의 비장 무게(mg)를 체중(g)으로 나누어 산출 하였다.

6) 혈청 사이토카인 측정

실험 종료 후 마우스를 isoflurane으로 마취시킨 후 안와 정맥에서 채혈하였고 3,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 사이토카인은 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, USA)을 이용하여 TNF-α, IL-4의 생성을 측정하였다. 항체가 붙어있는 각 well (R&D system, Mineapolis, USA)에 각 ADS[assay diluent solution] 50 µL를 첨가 후 시료 50 µL를 각각 첨가하여 실온에 2시간 방치한 후, wash buffer 400 µL로 4회 세척하였다. 세척 후 각 well에 항체로 TNF-α 및 IL-4 100 µL를 넣고 상온에서 2시간 반응 시킨 후 제거하고 4회 세척 하였다. 각 well에 기질 용액 100 µL를 넣고 30분 상온에 방치 후, 반응정지액 100 µL를 첨가하여 Molecular Devices사의 ELISA reader(SPECTRA max M2, St. California, US)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 병리조직학적 검사

시험 종료일에 채취한 귀 조직을 적출 하여 생리식염수로 세척한 다음 여과지로 수분을 제거한 후 병리조직학적 검사를 위하여 적출된 귀 조직의 일부를 10% 중성 포르말린에 고정하고, 병리조직학적 검사를 위한 통상적인 방법을 사용하여 파라핀 포매한 후, 4 µm의 두께로 절편한 뒤 슬라이드 제작한 후 hematoxyline eosin (H&E) 염색을 마친 뒤 광학 현미경(Eclipse E200, Nikon, Japan) 에서 측정하였다.

8) 통계처리

본 실험에 얻어진 결과분석은 SPSS사(Chicago, St. IL, USA)의 사회과학용 통계 패키지 프로그램 (SPSS, Window ver. 12.0 version)을 이용하여 기술적인 통계치를 산출하였다. 측정값은 평균 ± 표준편차 (mean ± SD)로 나타내었다. ANOVA test를 실시한 후, P < 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test로 분석하였다.

결 과

1. RAW264.7 세포 생존률 측정 결과

MQ의 세포독성은 대식세포주인 RAW264.7 세포에 시료를 1, 10, 100 µg/mL 농도로 24시간 처리한 다음 MTT 분석방법으로 세포생존율을 간접적 방법으로 세포독성을 측정하였다. Fig. 2에서 보이는 것과 같이, 추출물에 의한 세포생존율은 95% 이상의 생존율이 나타나 세포독성을 보이지 않았다.

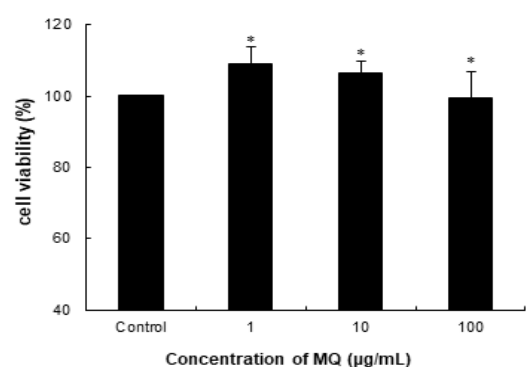


Fig. 2. Effects of MQ on viability of RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were exposed for 24 h to MQ at indicated doses. Values are shown as mean ± SDof 3 replicates. * p < 0.05 with respect to untreated control group.

2. 초석잠 에탄올 추출물의 육안 평가 결과

실험 종료 후 각 실험군별 시료를 처리한 오른쪽 귀 부위를 관찰하여 아토피 피부염 병변의 형태학적 변화를 확인하였다. DNFB만 처리한 대조군에서는 아무것도 처리하지 않은 왼쪽 귀에 비해 흉반, 피부건조, 짓무름, 부종과 혈종 등의 아토피성 피부 변화가 확인되었다(Fig. 3).

아토피 피부염의 여러 증상들을 종합하여 관찰결과를 점수로 비교한 결과 대조군(DNFB)의 경우 8.72 ± 0.51 점에 비해 MQ300 군의 경우 6.60 ± 0.40 점과 MQ500군의 경우 4.08 ± 0.54 점으로, 모두 육안점수가 유의적으로 감소되었음을 확인하였다(Fig. 4).

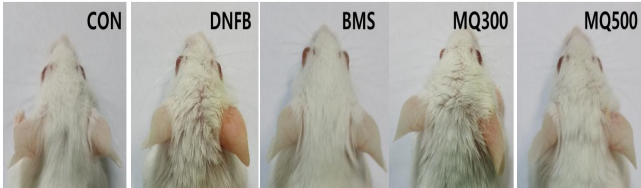


Fig. 3. Balb/c mice developed chronic skin inflammation and the healing activity of MQ. CON; Normal + Distilled water, DNFB; 0.3% DNFB + Distilled water, BMC; 0.3% DNFB + Betamethasone 0.61 mg/g. MQ300; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 45 mg/mL, MQ500; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 100 mg/mL.

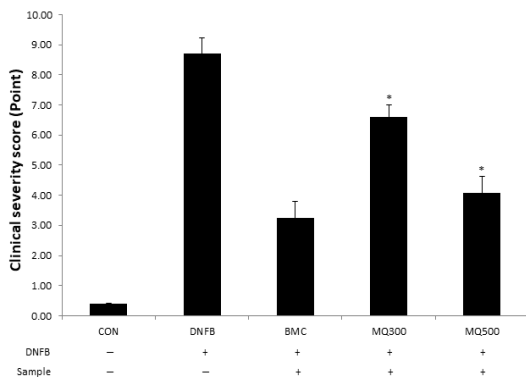


Fig. 4. Clinical severity score. CON; Normal + Distilled water, DNFB; 0.3% DNFB + Distilled water, BMC; 0.3% DNFB + Betamethasone 0.61 mg/g. MQ300; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 45 mg/mL, MQ500; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 100 mg/mL. * P < 0.05 with respect to DNFB group

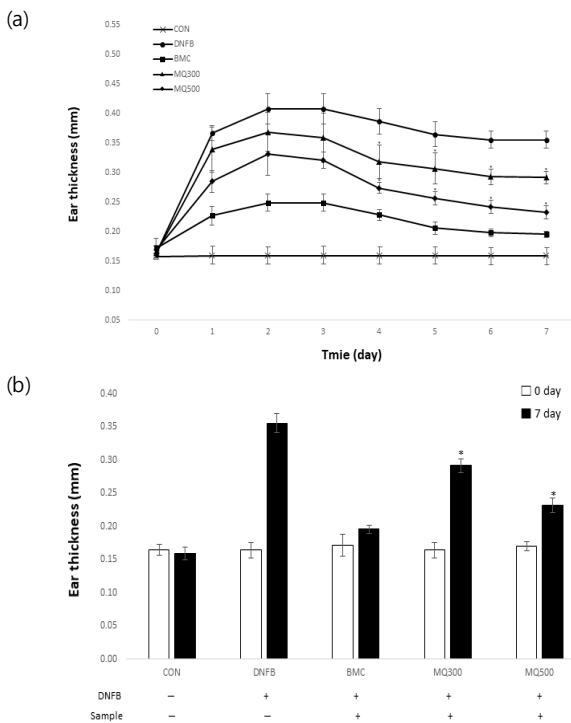


Fig. 5. Effect of MQ on changed ear thickness levels (a). Ear thickness were measured on day 7 (b). CON; Normal + Distilled water, DNFB; 0.3% DNFB + Distilled water, BMC; 0.3% DNFB + Betamethasone 0.61 mg/g. MQ300; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 45 mg/mL, MQ500; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 100 mg/mL. * P < 0.05 with respect to DNFB group.

3. 초석잠 에탄올 추출물의 귀 두께 변화

DNFB에 의해 아토피 피부염이 유발된 마우스 귀 두께를 측정

한 결과, 다음과 같다(Fig. 5a). 정상군의 경우 변화가 없었으며, 대조군(DNFB)의 경우 DNFB 도포 후 3일째 되는 날 149.3%로 가장 크게 증가하였으며, 시료 투여군 각각 119.1%, 88.7%로 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 실험 종료 전날 귀 두께를 측정 한 결과 시료 투여군 각각 78.4%, 36.5%로 대조군 117.2%에 비해 유의적으로 감소하였다(Fig. 5b).

4. 비장지수 (spleen index) 측정 결과

DNFB를 통해 피부염 유발 후 비장 수치를 비교해 본 결과는 다음과 같다(Fig 6). 시료 투여군 각각 6.60 ± 0.40 , 4.08 ± 0.54 으로 대조군 (DNFB) 8.72 ± 0.51 에 비해 육안점수가 유의적으로 감소되었음을 확인하였다.

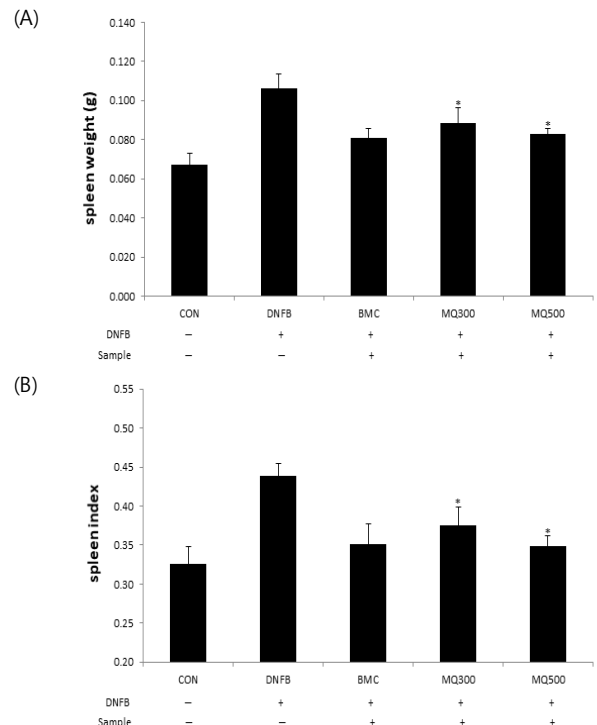


Fig. 6. Spleen weight (A) and spleen index (B). CON; Normal + Distilled water, DNFB; 0.3% DNFB + Distilled water, BMC; 0.3% DNFB + Betamethasone 0.61 mg/g. MQ300; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 45 mg/mL, MQ500; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 100 mg/mL. * P < 0.05 with respect to DNFB group.

5. 혈청 사이토카인 측정 결과

1) TNF-α 측정 결과

실험 종료 후 혈청을 분리하여 혈청 내 TNF-α 수치를 측정 한 결과는 다음과 같다(Fig. 7). 측정 결과 시료 투여군 각각 53.32 ± 2.59 pg/mL, 47.26 ± 3.96 pg/mL으로 대조군 64.61 ± 4.70 pg/mL에 비해 TNF-α 수치가 농도 의존적으로 감소하였다.

2) IL-4 측정 결과

실험 종료 후 혈청을 분리하여 혈청 내 IL-4 수치를 측정 한 결과는 다음과 같다 (Fig. 8). 측정 결과 시료 투여군 각각 46.31 ± 1.94 pg/mL, 42.45 ± 1.55 pg/mL으로 대조군 (DNFB) 53.40 ± 1.97 pg/mL에 비해 IL-4 수치가 농도 의존적으로 감소하였다.

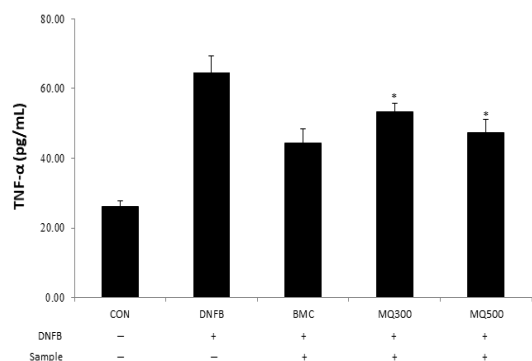


Fig. 7. Serum TNF-α levels. CON; Normal + Distilled water, DNFB; 0.3% DNFB + Distilled water, BMC; 0.3% DNFB + Betamethasone 0.61 mg/g. MQ300; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 45 mg/mL, MQ500; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 100 mg/mL. * P < 0.05 with respect to DNFB group.

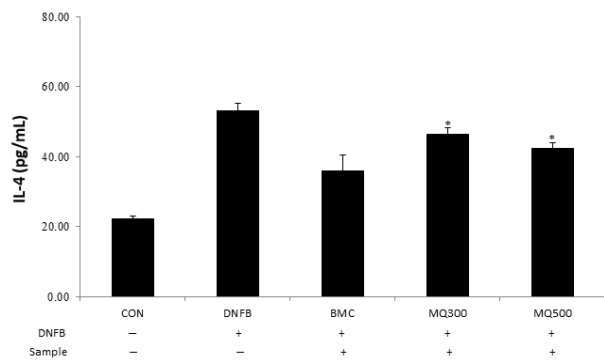


Fig. 8. Serum IL-4 levels. CON; Normal + Distilled water, DNFB; 0.3% DNFB + Distilled water, BMC; 0.3% DNFB + Betamethasone 0.61 mg/g. MQ300; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 45 mg/mL, MQ500; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 100 mg/mL. * P < 0.05 with respect to DNFB group.

6. 병리조직학적 분석 결과

DNFB를 이용하여 아토피성 피부염을 유발시킨 mice에서 귀 두께 변화에 대한 병리조직학적 관찰 결과는 다음과 같다 (Table 2, Fig. 9). 시료 투여군에서 대조군인 DNFB 군과 비교 하였을 때 귀 두께가 유의적으로 감소하였으며, 호산성 과립구 유입(infiltration)을 억제 하였다.

Table 2. Histochemical analysis of ear thickness

Group	Ear thickness (μm)
1 CON	113.7 \pm 14.6
2 DNFB	1027.7 \pm 64.7
3 BMC	241.9 \pm 69.7
4 MQ300	835.9 \pm 65.0
5 MQ500	508.2 \pm 112.8

CON; Normal + Distilled water, DNFB; 0.3% DNFB + Distilled water, BMC; 0.3% DNFB + Betamethasone 0.61 mg/g. MQ300; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 45 mg/mL, MQ500; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 100 mg/mL.

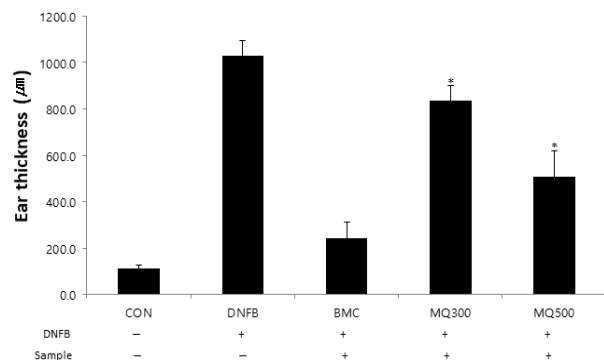


Fig. 9. Histochemical analysis of ear thickness. CON; Normal + Distilled water, DNFB; 0.3% DNFB + Distilled water, BMC; 0.3% DNFB + Betamethasone 0.61 mg/g. MQ300; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 45 mg/mL, MQ500; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 100 mg/mL. * P < 0.05 with respect to DNFB group.

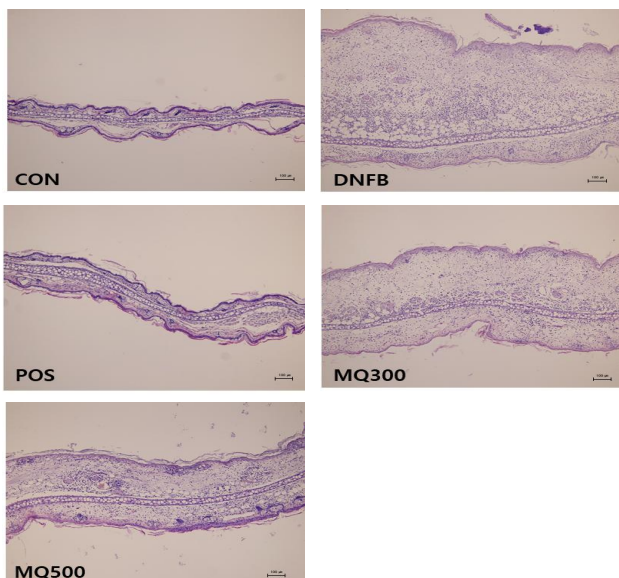


Fig. 10. Histochemical analysis of skin epidermis. via H&E staining ($\times 100$). CON; Normal + Distilled water, DNFB; 0.3% DNFB + Distilled water, BMC; 0.3% DNFB + Betamethasone 0.61 mg/g. MQ300; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 45 mg/mL, MQ500; 0.3% DNFB + Stachys affinis 80% ethanol extracts 100 mg/mL.

고 찰

본 연구는 DNFB를 통해 알레르기성 접촉성 피부염에 대한 초석잠 추출물의 피부염 개선 효과를 분석하였다. 실험적 피부장벽의 손상이 IL-4, IL-13과 같은 Th2 사이토카인 분비를 증가시켜 Th2 우세형의 면역학적 상태를 야기하여 염증반응을 일으킨다는 선행연구들과^{14,15} IL-1 α , TNF- α 와 같은 사이토카인을 증가시켜 염증을 발생시킨다는 연구를 바탕으로 실험을 진행하였다¹⁶.

초석잠 추출물을 농도별로 처리한 오른쪽 귀 부위를 육안적으로 관찰하여 피부 병변의 형태학적 변화를 확인한 결과 DNFB만 처리한 군에서는 아무것도 처리하지 않은 왼쪽 귀에 비해 홍반, 피부건조, 짓무름, 부종과 혈종 등의 아토피성 피부 변화가 감소 되었음을 확인하였다. 이는 DNFB를 통해 아토피성 피부염이 유발된 마우스에서 황련 등을 도포 하였을 때 아토피 피부염을 억제시키는 것으로 보고된 실험 결과와 유사하며¹⁷, 이를 바탕으로 초석잠 에탄올 추출물 도포군 역시 아토피 피부질환에서 나타나는 피부 병변의 변화를 호전시킬 수 있음을 시사한다. 또한, 비파엽과 삼백초 추출물에서 가피형성과 발적의 소견이 감소됨을 육안상 관찰되었고, 피부염 유발 동물에서 히스타민 생산을 감소시키며, 세라마이드 함량은 증가시켜 아토피 질환에 있어 소양증을 감소시켜 피부장벽 강화는 물론 피부 물리적 자극을 최소화하여 아토피 질환의 근본 원인인 피부의 물리적 손상을 감소시킬 수 있음을 제시 하였다¹⁸. 상기의 결과를 볼 때 DNFB와 초석잠 추출물 도포 후 3일째 되는 날 대조군 비해 귀 두께 변화량이 유의적으로 감소하였다. 이는 피부의 물리적 손상을 감소시킬 수 있음을 나타냈다.

비장은 면역 반응에 주요한 역할을 하는 장기로 비장세포의 활성 변화 및 면역 반응은 염증 상태나 항염증 효과에 대한 지표로 활용된다¹⁹. 반복적인 DNFB 피부 처리는 유의한 수준의 비장/체중 비 상승을 유도했으며²⁰ 본 연구 결과에서 초석잠 추출물의 체중 및 비장 체중비에서 상승이 억제되었음을 확인하였다.

TNF- α 는 염증반응의 개시와 관련되어 있는 전염증성 (pro-inflammatory) 사이토카인으로 TNF- α 단독 또는 Th2 사이토카인과의 공동으로 작용하여 아토피 피부염 피부의 지질 장벽 기능을 조절하며, TSLP [thymic stromal lymphopoietin]의 증식에도 관여한다^{21,22}. 생성된 TNF- α 는 대식세포, 호중구와 같은 면역세포를 활성화시켜 2차 염증반응을 유발하고, 특히 IL-4는 Th2 면역의 생성 및 증강에 관여한다^{23,24}. 피부장벽 손상과 Th2 우세형의 면역학적 상태는 항원 특이적인 IgE 생성으로 이어져, 비만세포로부터 여러 염증성 매개물질을 유리시킴으로써 소양감, 혈관확장 등 아토피 피부염 증상들이 나타나게 한다²⁵. 초석잠 에탄올 추출물 투여군은 DNFB를 통해 아토피 피부염 유발된 동물모델에서 혈청 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-4 의 분비를 억제함을 확인 하였다.

아토피 피부염 발생에 따른 피부 조직에 병리적 변화는, hyperkeratosis, acanthosis, exocytosis와 같은 현상으로 이는 염증반응, 호염구, 호산구의 진피세포로의 다량 침윤, 비만세포의 탈과립화로 활성화된 T 세포 및 키모카인 수용체의 발현과 관련이 크다²⁶. 본 시료 투여군에서 대조군인 DNFB군과 비교 하였을 때 유의적인 귀 두께가 감소와 염증에 대한 감소를 나타내었다.

이러한 연구 결과를 종합해 보았을 때, 초석잠 추출물은 피부장벽의 손상을 완화시킴으로써 Th2 분화를 조절하는 효과가 있으며, TNF- α 와 IL-4같은 염증성 매개물들의 발현을 억제 시켜 피부 손상 완화에 기여한 것으로 보인다. 향후 비장의 중량/체중 비율 감소, 혈액 내 염증성 사이토 카인 분비를 억제함과 병리조직학적인 관찰을 통해 호중구의 침윤 억제 아토피성 피부염 대해 효과적인 물질임을 확인하였다. 이에 아토피 피부염의 예방 및 치료제 개발에 있어 초석잠 추출물은 응용 가능성 있는 물질로 판단된다.

결 론

본 실험은 아토피 피부염에 대한 초석잠 에탄올 추출물의 보호 효과를 알아보기 위하여 DNFB로 유도한 실험적 아토피 피부염 동물 모델에서 귀 두께 변화와 부종과 혈종에 대한 육안적 관찰, 비장의 중량/체중 비율, 혈청 염증성 사이토카인 및 병리조직학적 분

석을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

초석잠 에탄올 추출물을 RAW264.7 세포에서 세포 생존율을 측정할 결과 유의적 감소는 보이지 않았다. 초석잠 에탄올 추출물 도포군은 DNFB 유발 접촉성 피부염군에 비해 귀 두께 변화의 조직학적 손상을 유의성 있게 억제하였다. 초석잠 에탄올 추출물 투여군은 DNFB 유발 접촉성 피부염군에 비해 비장 지수에 대해 유의성 있게 감소하였다. 초석잠 에탄올 추출물 투여군은 DNFB 유발 접촉성 피부염군 (대조군)에 비해 혈청 내 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-4 의 분비를 억제하였다. 초석잠 에탄올 추출물 투여군은 DNFB 유발 접촉성 피부염군 (대조군)에 비해 귀 조직을 염색하여 병리조직학적 분석한 결과 귀 두께가 유의적으로 감소하였다.

이와 같은 결과로 보아 초석잠 에탄올 추출물이 DNFB 유발 접촉성 피부염에 대한 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

References

1. Yun MY, Noh YH, Shin GR, Cheong KJ. Effects of ELL on various immunological factors in spleen related to pathogenesis of atopy dermatitis in DNCB-induced NC/Nga mice. *J Kor Soc Cosm.* 2008;14:954-63.
2. Lee SH, Baek SJ, Kim HA, Heo Y. 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis like immune alteration in mice. *J Toxicol Pub Health.* 2006;22:357-64.
3. Leung DY, Soter NA. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:1-12.
4. McGrath JA. Filaggrin and the great epidermal barrier grief. *Australas J Dermatol.* 2008;49
5. Kim MA, Son HU, Nam DY, Cha YS, Shin YK, Choi YH, Lee SH. Inhibitory Effect of Angelica keiskei Extract in an Atopic Dermatitis Animal Model. *Korean J Food Preserv.* 2012;19:792-8.
6. Kim MY, Kim HN, Lee MR, Kim BJ, Choi CH, Jeoung HW, Kim HW. Effects of 1-fluoro-2,4 dinitrobenzene on Induction of Dermatitis in Mice. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 2012;26:693-8.
7. Lee GS, Pena ID, Choi JY, Yoon SY, Choi JH, Kang TJ, Oh SK, Cheong JH. Effect of SPZZC, a Composition of Herb Extracts on Atopic Dermatitis in BALB/c and NC/Nga Mouse. *Yakhak Hoeji.* 2008;52:232-39.
8. Park SO, Park BS, Ryu CM, Ahn YS. Effect of Herb Extracts Mixed with Houttuynia Cordata on Antiatopic Dermatitis in DNCB-Induced BALB/c Mouse. *J. of Korean Oil Chemists' Soc.* 2021;29:175-83.
9. Baek HS, Na YS, Kim DH, Lee CH, Song SK, Ryu BH. Antioxidant Activities of Stachys sieboldii MIQ Roots. *Journal of Life Science.* 2004;14(1):1-7.
10. Lee JW, Lim SY. Comparison of Flavonoid Content and Antioxidant Effect of Extracts from Stachys sieboldii Miq. and Lycopodium lucidus Turcz. *Journal of Life Science.* 2018;28(7):841-8.
11. Park SI. Antioxidant effect and quality characteristics of white bread prepared with Stachys sieboldii Miq. Ga Chon University. 2015.
12. Yin J, Yang G, Wang S, Chen Y. Purification and determination of stachyose in Chinese artichoke (Stachys Sieboldii Miq.) by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Talanta.* 2006;70:208-12.
13. Kim JE, Lee HC, Kang EJ, Choi JW, Kim HJ, Park SY, Jung MY. Effects of Daecheonglyong-tang on Atopic Dermatitis Induced by DNCB in Mice. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2019;32(3):58-76.
14. Chamlin SL, Kao J, Frieden IJ, Sheu MY, Fowler AJ, Fluhr JW, et al. Ceramide-dominant barrier repair lipids alleviate childhood atopic dermatitis: changes in barrier function provide a sensitive indicator of disease activity. *J Am Acad Dermatol.* 2002;47(2):198-208.
15. Onoue A, Kabashima K, Kobayashi M, Mori T, Tokura Y. Induction of eosinophil- and Th2-attracting epidermal chemokines and cutaneous late-phase reaction in tape-stripped skin. *Exp Dermatol.* 2009;18(12):1036-43.
16. Wood LC, Elias PM, Calhoun C, Tsai JC, Grunfeld C, Feingold KR. Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *J Invest Dermatol.* 1996;106(3):397-403.
17. Jung AR, Ahn SH, Jeong HS, Kim KB. Effect of Coptidis Rhizoma extract on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions in NC/Nga Mice. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2019;33(2):102-8.
18. Anti-Allergic Activities of Fermented Eriobotrya japonica and Saurus chinensis Extracts in 2,4-Dinitrochlorobezene-Induced BALB/c Mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2010;39(11):1611-18.
19. Ou L, Kong LY, Zhang XM, Niwa M. Oxidation of ferulic acid by Momordica charantia peroxidase and related anti-inflammation activity changes. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(11):1511-6.
20. Yang BD, Kim SR, Choi CH, Jeoung HW, Kim HW. Effects of Scutellaria baicalensis Extract on Skin Lesion of Contact Dermatitis induced by DNFB in Mice. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2017;31(1):59-64.
21. Danso MO, van Drongelen V, Mulder A, van Esch J, Scott H, van Smeden J, et al. TNF- α and Th2 Cytokines Induce Atopic Dermatitis-Like Features on Epidermal Differentiation Proteins and Stratum Corneum Lipids in Human Skin Equivalents. *Current Opinion in Immunology.* 2014;134(7):1941-50.
22. Sumimoto S, Kawai M, Kasajima Y, Hamamoto T. Increased plasma tumour necrosis factor-alpha concentration in atopic dermatitis. *Archives of Disease in Childhood.* 1992;67(3):277-9.
23. Church MK, Clough GF. Human skin mast cells: in vitro and in vivo studies. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1999;83:471-5.
24. Church MK, el-Lati S, Okayama Y. Biological properties of human skin mast cells. *Clin Exp Allergy.* 1991;21:1-9.
25. Kim HJ, Shin JU, Lee KH. Atopic dermatitis and skin barrier dysfunction. *Allergy Asthma Respir Dis.* 2013;1(1):20-8.
26. Daniels J., et al. The epidemiology of atopic dermatitis. *Hosp Med.* 2002;63:649-52.