

MC903으로 유도하는 아토피피부염 생쥐 동물 모델 최적화 : 유발 기간 단축 및 부작용 감소를 중심으로

김소연[#] · 류지효^{1,2#} · 김형우^{*}

부산대학교 한의학전문대학원, 1: 한의과학연구소, 2: 한국한의학연구원

Optimization of MC903-induced Atopic Dermatitis Mouse Model : Focusing on Reducing the Induction Period and Adverse Effects

Soyeon Kim[#], Ji Hyo Lyu^{1,2#}, Hyungwoo Kim^{*}

School of Korean medicine, Pusan National University,
1: Research Institute of Korean Medicine,
2: Korea Institute of Oriental Medicine

This study was designed to establish an atopic dermatitis (AD) model using MC903 and was conducted to find out the optimal challenge concentration that can cause dermatitis symptoms enough to be experimentally verified while reducing adverse effects such as weight loss. MC903 was treated at concentrations of 2, 3, and 4 nmol/day, and evaluation of skin surface symptoms, water contents, histopathological changes, body weight changes, and spleen/body weight ratio was conducted. In addition, the expression level of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) was also observed. In our results, MC903 induced AD skin lesions such as erythema, scab and fissure and lowered skin moisture level significantly. In addition, water holding capacities in the 3 or 4 nmol groups were diminished significantly compared to that in the control group. On the other hand, 4 nmol treatment induced a weight loss of up to 20% compared to control group. Finally, a higher level of TSLP expression was observed in the 3 nmol group than in the 2 nmol group or the 4 nmol group. Taken together, we propose a total 14-day protocol consisting of 3 days of sensitization (2 nmol/day) and 6 days of challenge (3 nmol/day).

keywords : MC903, Atopic dermatitis, Animal model, TSLP, Adverse effect

서 론

아토피피부염 (Atopic dermatitis, AD)은 알레르기 반응으로 인한 홍반, 건조, 인설, 태선화 등 피부의 여러 증상과 함께 심한 가려움증을 동반하는 염증성 피부 질환이다¹⁾. AD는 주로 유아기에 발병하여 스트레스와 같은 다양한 심리적 요인이나 계절 등과 같은 환경적 요인들에 의해 증상의 재발과 지속이 반복됨으로써 유병 기간이 장기화된다. 이러한 이유로 AD는 사회·심리적인 문제와 함께 환자와 보호자의 경제적 부담 또한 중요하게 다뤄지고 있는 범사회적 질환의 범주에 속한다²⁾. 또한 AD의 초기 발병은 알레르기성 비염과 천식 등으로 이어지는 경향이 잦으며, 이러한 현상은 아토피 행진 (atopic march)으로 지칭된다^{2,3)}.

최근 연구에 따르면, 많은 연구자들이 AD의 주요 요인으로 thymic stromal lymphopoietin (TSLP)을 강조하고 있다⁴⁾. TSLP는 피부, 폐 및 흉선 등에서 발현되는 상피 세포 유래 cytokine의 일종으로, Th2 매개 염증을 유도함으로써 염증성 장 질환 (Inflammatory bowel disease, IBD)이나 천식 혹은 AD의 주요 염증 매개 인자로 알려져 있다^{4,5)}. 이와 같이 AD의 발병과 증상에 많은 영향을 미치는 요인인 TSLP가 AD의 주요 치료 표적으로 대두되면서 TSLP의 발현을 중심으로 한 AD 실험 모델의 필요성 또한 중요해지고 있다.

이러한 이유로 최근, Mei와 Martinz 등은 1,25-(OH)2D3 (Vitamin D3)와 그 유도체인 calcipotriol (MC903)을 이용하여 AD를 유발하는 동물 실험 모델을 제시하였다^{6,7)}. MC903은 Vitamin D3의 유도체로 Vitamin D3보다 갈습 활성이 낮으며, 건선의 치료제로 사용되어 왔다. MC903을 이용한 AD 모델은 AD 환자에서 주로 관찰되는 혈청 IgE 수치의 증가와 함께 AD 환자의 급성 병변에서 관찰되는 것과 유사한 피부 형태 및 염증을 유발하면서도 oxazolone 또는 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) 등과

같은 유해 물질을 사용하지 않아도 된다는 등의 장점으로 인해 주목받고 있다⁷⁾.

2017년 Martinz 등은 총 19일 (제모 후 피부 회복기 3일을 포함)에 달하는 프로토콜을 제시한 바 있다⁷⁾. 본 연구진은 이 프로토콜을 적용하여 수행한 실험 과정에서 몇 가지 문제점이 발견할 수 있었다. 그 중 첫째는 제모 후 16일에 달하는 MC903 처리 기간으로 인해 유발 부위에 털이 자라 나오기 시작하는 것이었고, 두 번째는 실험 과정에서 MC903을 처리한 군의 체중이 용매만 처리한 대조군과 비교하여 20% 이상 감소하는 것이었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 본 연구진은 제모 후 MC903 처리 기간을 단축시키기 위한 사전 연구를 진행하였다. 그 결과를 바탕으로 감작 (sensitization) 과정을 추가한 프로토콜을 제안 하였는데, 제모 이전에 감작 처리를 함으로써, 제모 이후의 유발 기간을 줄여 털이 자라나오는 부작용을 개선할 목적이었다.

본 연구에서는 몇 가지 농도의 MC903을 생쥐의 등에 처리 (challenge)하여 AD를 유발하고, 육안적 관찰을 통해 AD가 유발된 피부 표면의 병변 정도와 홍반 지수, 수분 함량 및 수분 보유능에 미치는 영향을 확인하였다. 또한, 면역세포의 침윤 및 표피, 진피층의 상태를 중심으로 면역조직화학적 변화를 관찰하였으며, 체중 및 비장/체중의 비율에 미치는 영향에 대하여 확인하였다. 마지막으로 AD가 유발된 조직에서 TSLP 발현에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 동물

8주령의 수컷 Balb/c 마우스를 (주)하나바이오테크 (Gyeonggi, Korea)로부터 구입하였고, 일주일 동안 온도와 습도가 적절하게 조절되는 환경 (22 ± 2°C, 50%, 12 hours light and dark cycle)

Hyungwoo Kim, School of Korean Medicine, Pusan National University, Yangsan, Gyeongnam, 50612, South Korea

E-mail : kronos7@pusan.ac.kr Tel : +82-51-510-8458

Received : 2022/11/21 Revised : 2023/01/27 Accepted : 2023/02/17

© 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.2023.02.37.2.25

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

Both authors contributed equally to this work

에서 고품 사료와 물을 자유롭게 섭취하게 하며 적응시킨 후 같은 환경에서 본 실험을 진행하였다. 모든 실험 과정은 부산대학교 실험동물 윤리위원회의 승인을 얻었으며, 정해진 규정에 의하여 진행되었다 (PNU-2022-0195).

2. AD 유발을 위한 실험설계 및 실험군 선정

AD 유발을 위하여 MC903 (MedChemExpress, NJ, USA)을 100% ethanol에 0.1 mM로 녹인 다음, 마우스의 양쪽 귀에 각각 10 μ 씩 총 20 μ 를 3일간 처리하여 감작하였다 (2 nmol/day). 실험 4일째, 마우스의 등을 제모하고 2일간의 안정기를 준 뒤 실험 7일째부터 0.1 mM 농도의 MC903을 제모된 등에 각각 20, 30, 40 μ 씩 7일간 총 6회 처리하여 AD를 유발하였다.

본 연구에는 총 15 마리의 생쥐가 사용되었으며, 다음의 4개 군으로 임의분류 되었다. 대조군 (control)은 용매만 도포하였고 (n=3), 2 nmol 투여군 (2 nmol), 3 nmol 투여군 (3 nmol) 및 4 nmol 투여군 (4 nmol)은 MC903을 각각 2, 3, 4 nmol/day 농도로 6회 도포하였다 (n=4). 실험의 전체적인 일정은 Fig. 1과 같다.

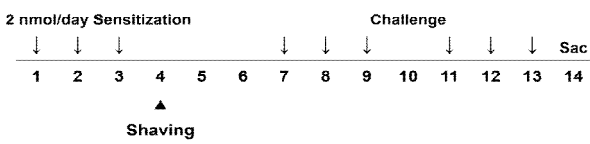


Fig. 1. Experimental design. All mice were shaved on day 4, then topically treated with MC903 on days 7, 8, 9, 11, 12, and 13 for the challenge. The mice in the control group were treated with vehicle in the same way. All animals were sacrificed on day 14. Sac means sacrifice.

3. 피부 표면 증상 정도 관찰 및 피부 표면 점수 평가

실험 마지막 날 (day 14), 디지털카메라 (Olympus, Tokyo, Japan)를 이용하여 생쥐의 등 피부를 촬영하였으며, 피부 표면 점수 평가는 Amano 등의 방법을 변형하여 사용하였다⁸⁾. 간략하게 설명하면, 각 유발 부위의 유발 특성 정도에 따라 피부 표면의 홍반, 딱지, 경화, 갈라짐의 정도를 4점 척도를 이용하여 육안으로 평가하였으며, 측정값 4개를 합산하여 해당 개체의 대푯값으로 사용하였다.

4. 홍반 및 멜라닌 지수 측정

홍반 및 멜라닌 지수의 측정에는 dermo-spectrophotometer (Cortex Technology, Hadsund, Denmark)가 사용되었다. 측정은 서로 다른 세 부위에서 진행되었으며, 세 값의 평균을 해당 개체의 대푯값으로 사용하였다.

5. 피부 수분량 및 보유능 측정

실험 마지막 날, 림폰 (Elanco Korea, Seoul, Korea)과 케타민 (Yuhan Corporation, Seoul, Korea)을 이용하여 마우스를 마취하고 피부 습도 측정기 (Scalar Corporation, Tokyo, Japan)를 이용하여 피부 수분량과 보유능을 측정하였다⁹⁾. 측정 방법을 간단하게 설명하면, 유발 부위 내의 서로 다른 세 부위에서 함유량을 측정하여 평균값을 피부 수분량으로 제시하였다. 보유능은 유발 부위에 일정량의 수분을 공급하고, 30초 간격으로 4회 측정한 결과를 제시하였으며, 수분 공급을 위해 증류수를 적신 거즈 (1cm × 1cm)를 30초간 유발 부위에 덮어 두었다. 모든 측정은 실내온도 24.3°C, 습도 43%의 환경에서 이루어졌다.

6. 조직병리학적 소견 관찰

생쥐의 피부 조직은 10% formaldehyde 용액에서 고정되어 파라핀으로 포매된 다음, 4 μ m 두께로 절편되었다. Hematoxylin과 eosin으로 염색된 조직은 육안적 관찰을 위해 광학 현미경 (Zeiss, Württemberg, Germany)으로 촬영되었다 (x100).

7. 체중 및 비장/체중 비의 관찰

생쥐의 체중은 실험 시작일과 마지막 날, 체중계 (A&D Company, Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 체중 변화량은 마지막 날 측정된 체중을 실험 시작일 체중에 대한 백분율로 나타냈다. 비장의 무게는 실험 마지막 날, 비장을 적출하여 미

량 저울 (Sartorius, Göttingen, Germany)로 측정하였다. 비장/체중의 비는 측정된 비장의 무게를 마지막 날 측정된 체중에 대한 비율로 제시하였다.

8. RNA 분리 및 quantitative real-time PCR

Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 실험동물 모델의 등 조직으로부터 total RNA를 분리하였다. Lyu 등의 방법으로 cDNA를 합성하였으며¹⁰⁾, TOPreal SYBR Green qPCR premix (Enzymomics, Daejeon)를 이용하여 Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden)에서 quantitative real-time PCR을 실시하였다. GAPDH를 house keeping gene으로 사용하였고, 정량적 분석을 위해 2- Δ Ct 공식을 사용하여 역치값(Ct value)을 정규화하였다. 본 연구에서 사용한 primer sets는 Table 1과 같다.

Table 1. Oligonucleotide primers used for the PCR analysis.

| Target Gene | Oligonucleotide sequences (5' to 3' direction) |
|-------------|--|
| TSLP | F : GGAGATTTGAAAGGGGCTAA R : CATTTCCTGAGTACCGTCAT |
| GAPDH | F : GATGACATCAAGAAGGTGGT R : TACCAGGAAATGAGCTTGAC |

9. 단백질 추출과 Western blot 분석

채취된 등 조직은 PRO-PREP protein solution을 300 μ 와 함께 Bullet blender homogenizer (Next Advance, NY, USA)로 분쇄되었으며, 추출된 단백질의 정량을 위해 Bradford assay를 이용하였다. 샘플 (50 μ g)은 10% Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide (SDS) gel 상에서 분리되었으며, Polyvinylidene fluoride (PVDF; Merk Millipore, Darmstadt, Germany) membrane으로 transfer 되었다. TSLP 단백질 검출을 위해 5%로 희석한 BSA를 이용하여 membrane을 blocking하고, 1차 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA)를 처리하여 4°C에서 반응시켰다 (1:1000). 이후 2차 항체 (goat anti-mouse antibody, Enzo Life Sciences, NY, USA)를 처리한 뒤, 이미지 분석 시스템 (Amersham™ Imager 600, UK)을 통해 해당 단백질의 발현 정도를 분석하였다.

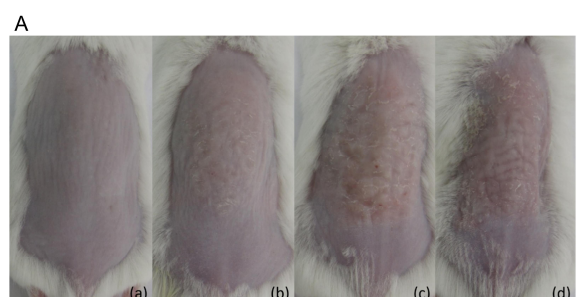
10. 통계처리

실험 결과에 대한 통계적 분석에는 Prism 5 for window version 5.01 (GraphPad Software Inc, CA, USA)가 이용되었다. 실험 성적은 평균 \pm 표준편차 (mean \pm SD)로 나타냈으며, 결과의 차이를 검증할 때에는 One-way ANOVA 방법을 통해 평가하고, Dunnett's 검증법으로 사후 검증하여 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 농도별 MC903 처리가 육안적 소견에 미치는 영향

실험 마지막 날의 피부 표면의 증상을 관찰한 결과, 용매만 도포한 대조군에서는 AD의 증상이 나타나지 않았으나 MC903 도포군에서는 홍반, 건조, 인설 등의 AD 증상이 나타났다. 특히 홍반의 경우 3 nmol과 4 nmol 투여군에서 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 2C). 반면 2 nmol 군에서는 대조군에 비해 약간의 붉어짐이나 인설 등 아토피피부염으로 보이는 증상이 나타나기는 하였으나 증상의 발현 정도가 다른 군에 비해 경미하였다 (Fig. 2A and 2B). 모든 군의 멜라닌 지수는 유사한 수준으로 나타났다 (Fig. 2D).



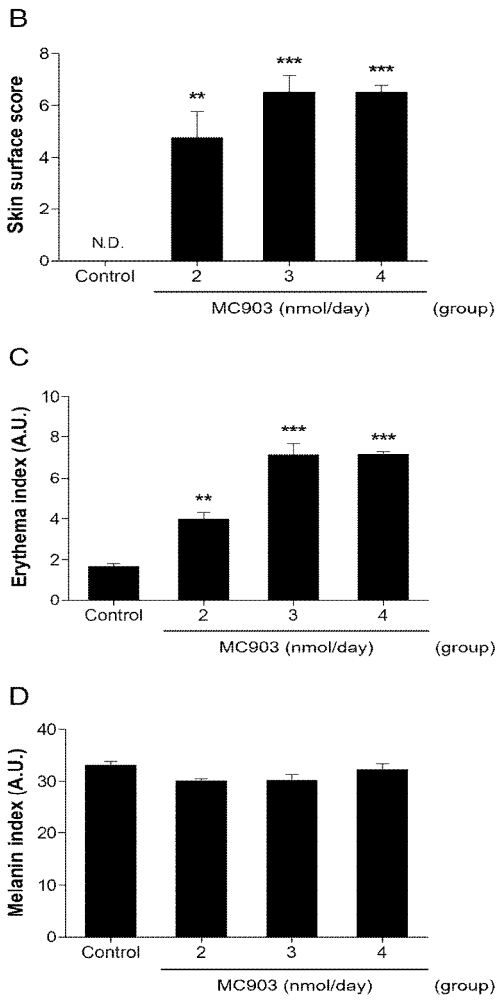


Fig. 2. The severities of skin lesions in mice according to the concentration of MC903. (A), The control group (a), 2 nmol/day group (b), 3 nmol/day group (c), and 4 nmol/day group (d). (B), Skin surface score. (C), Erythema index. (D), Melanin index. All values were represented as mean \pm SD. **P < 0.01 and ***P < 0.001 vs. control group. N.D. means not detected.

2. 농도별 MC903 처리가 수분 함량과 보유능에 미치는 영향

MC903을 농도 별로 도포한 부위의 수분 함량을 측정한 결과, 모든 MC903 도포군에서 유의한 수분 함량의 감소가 나타났으며, 4 nmol 군의 수분 함량은 대조군의 절반 이하였다 (Fig. 3A). 시간에 따른 수분 보유능의 변화를 살펴본 결과, 2 nmol 군의 경우 대조군과 비슷한 수준의 보유능이 관찰되었으나, 3 nmol과 4 nmol 군의 경우 시간이 지날수록 보유능이 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, 90초 경과 후의 결과에서 유의한 수준의 수분량 감소가 관찰되었다(Fig. 3B).

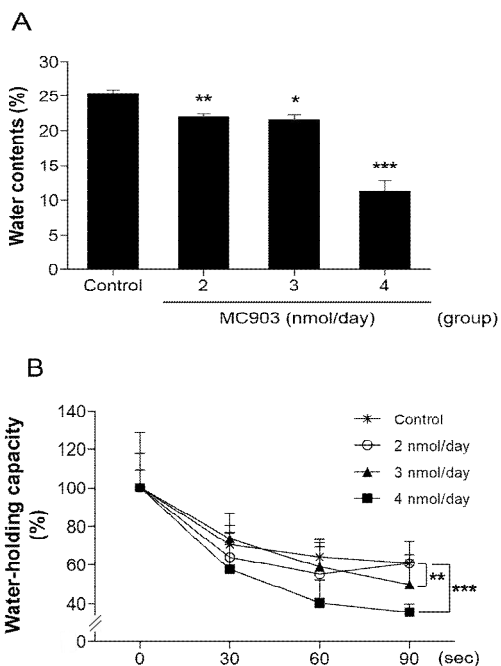


Fig. 3. The effects of MC903 on water contents and water-holding capacity on dorsal skin in AD mice. (A), Water contents. (B), Water-holding capacity. All values were represented as mean \pm SD. *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001 vs. control group.

3. 농도별 MC903 처리가 조직병리학적 변화에 미치는 영향

생쥐 등 조직의 조직병리학적 변화를 관찰한 결과, 3 nmol 및 4 nmol 군에서 유두층 및 기저층의 손상으로 인한 표피와 진피의 불분명한 경계부가 관찰되었으며, 일부 조직에서는 부종으로 인한 조직 팽창의 흔적이 발견되었다 (spongiotic change). 이에 부가하여, 3 nmol 및 4 nmol 군에서는 과다하게 각화된 각질층 또한 관찰되었다 (Fig. 4A). MC903이 면역세포의 침윤에 미치는 영향을 관찰한 결과, 2 nmol 군 이상에서 경미한 면역세포 침윤 현상이 관찰되었고, 3 nmol 군과 4 nmol 군에서는 진피 조직과 표재성 혈관 주변으로 면역세포의 침윤이 발생하였다 (Fig. 4B).

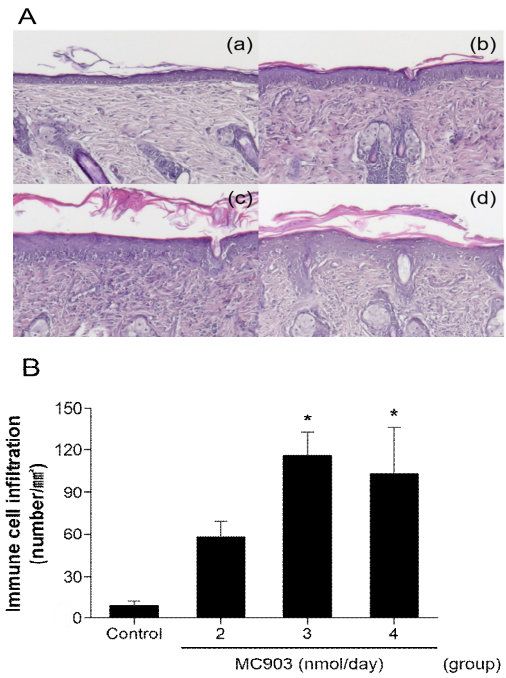


Fig. 4. The effects of MC903 on histopathological changes in inflamed tissues. (A), The control group (a), 2 nmol/day group (b), 3 nmol/day group (c), and 4 nmol/day group (d). All observations were made at a magnification of x 100. (B), Immune cell infiltration. All values were represented as mean \pm SD. **P < 0.01 vs. control group.

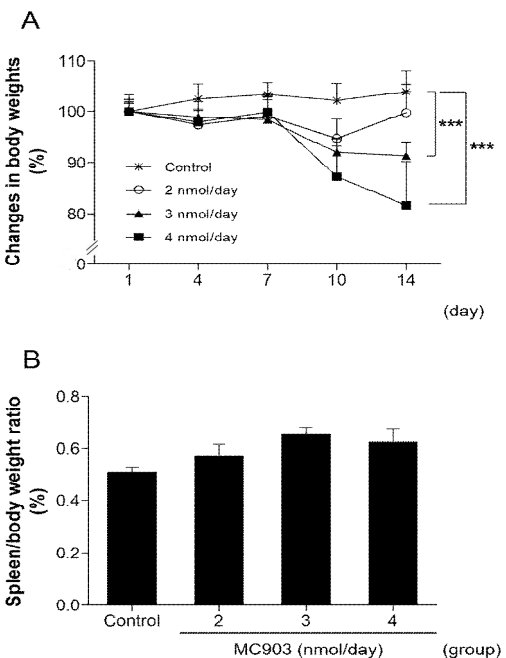


Fig. 5. The effects of MC903 on changes in body weight and spleen/body weight ratio. (A), Changes in body weights. (B), Spleen body weight ratio. All values were represented as mean \pm SD. ***P < 0.001 vs. control group.

4. 농도별 MC903 처리가 체중 변화 및 비장/체중의 비율에 미치는 영향

실험 시작일과 마지막 날의 체중을 비교한 결과, 대조군은 3.88%의 체중 증가를 보였으며, 2 nmol 군의 체중 증가율은 0.63%로 실험 시작일의 체중에서 크게 벗어나지 않았다. 그에 반해 3 nmol 군의 평균 체중은 실험 시작일에 비해 7.63%가 감소하였고 4 nmol 군은 16.38%로 크게 감소하였다. 이를 실험 마지막 날의 대조군과 비교해 보면, 2 nmol 군은 3.13%, 3 nmol 군은

11.08%, 4 nmol 군은 19.51% 차이를 보였다 (Fig. 5A). 체중에 대한 비장의 무게 비율을 확인한 결과, 3 nmol 군과 4 nmol 군에서 증가하는 경향을 보였으나, 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 5B).

5. 농도별 MC903 처리가 TSLP의 발현에 미치는 영향

TSLP의 단백질과 mRNA 발현 정도를 확인하고자 생쥐의 등 조직을 이용하여 western blot과 quantitative real-time PCR을 실시하였다. mRNA에서는 대조군에 비해 MC903을 도포한 군에서 모두 유의한 수준으로 TSLP가 발현하였다. 3 nmol 군에서 TSLP의 상대 발현 정도는 최고점을 나타내었으며 4 nmol 군에서는 오히려 발현 정도가 감소하여 2 nmol 군과 유사한 발현 정도를 나타내었다 (Fig. 6A). 단백질에서는 대조군과 비교하여 3 nmol과 4 nmol 군에서 유의한 수준으로 TSLP가 증가하는 양상을 보였으며, mRNA와 마찬가지로 3 nmol 군에서의 발현 정도가 가장 높았음을 확인하였다 (Fig. 6B).

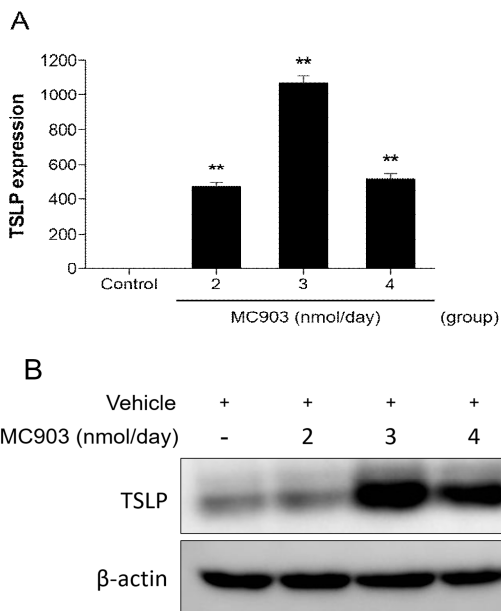


Fig. 6. The effects of MC903 in TSLP expression in AD mice. (A), TSLP mRNA. All values were represented as mean \pm SD. ** $P < 0.01$ vs. control group. (B), TSLP protein. TSLP means thymic stromal lymphopoietin.

고찰

Martinz⁷⁾ 등은 AD 동물 모델을 만드는 데 있어, 전신칼슘대사에 부작용을 일으킬 수 있는 Vitamin D3보다 체중에 주는 영향이 덜한 MC903의 사용을 권장하고 있다. 또한, MC903을 사용하는 경우, 귀가 아닌 등 부위에도 AD를 유발할 수 있음을 주장한 바 있다⁷⁾.

본 연구진은 그들이 제시한 프로토콜에 따라 AD를 유발하는 예비실험을 진행한 바 있는데 제모 된 등 부위의 털이 다시 자라나와 결과 분석에 어려움이 있었다. 이에 상기한 문제의 개선을 위해 유발 기간을 줄일 필요가 있다고 판단하고, 동일한 용량의 MC903을 단축된 기간 동안 처리하는 연구를 수행하였다. 그 결과에서 다음과 같은 몇 가지 문제점을 발견할 수 있었다. 첫째로 실험 도중 생쥐가 폐사하거나, 폐사하지 않은 생쥐들 역시 무기력해지고 움직임이 둔해지는 현상이 관찰되었다. MC903의 처리는 약 20%에 달하는 체중감소를 유발하였는데, 이는 인도적 실험종료 기준 (PNU-2022-0195)에 해당하는 수치였다. 둘째로 수분 측정이 불가능할 정도로 심한 피부 장벽 기능 손상이 발생하였으며, 이외에도 표피층에서는 각질이 계속해서 떨어져 나오고, 염증으로 인해 형성된 딱지가 탈락되면서 피부가 건조해지고 얇아지는 등의 현상이 관찰되었다.

위의 결과는 단기간에 고용량의 MC903을 지속적으로 처리하는 것이 또 다른 문제를 야기한다는 사실을 의미한다. 이에 본 연구진은 유발 기간을 단축하면서도 적정 수준의 조직 손상을 유발하면서도 체중 감소의 부작용을 최소화 할 수 있는 새로운 프로토콜의 정립이 필요하다고 판단하였다.

상기한 이유로 본 연구진은 기존의 DNFB 피부염 모델을 참고하여, 양쪽 귓등에 3일간 감작하는 과정¹¹⁾이 적용된 새로운 프로토

콜을 적용해 보았다. 해당 실험의 결과를 살펴보면, 감작 기간을 도입함으로써 제모 후 유발 기간이 단축됨에 따라 실험 마지막 날까지 생쥐의 등 표면에 털이 자라 나오지 않았고, 2 nmol/day 농도로 감작한 군에서, 1 nmol/day 농도로 감작한 군과 감작을 하지 않은 군에 비해 심한 피부 표면 증상이 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 상기한 결과를 바탕으로 본 연구진은 2 nmol/day 농도의 감작 기간 (3일)과, 제모 및 2일 간의 안정기를 포함하는 프로토콜을 확립하였다. 해당 실험의 결과로 확립된 실험 일정은 Fig. 1과 같다. 상기된 내용을 바탕으로 본 연구에서는 다양한 항아토피 후보 물질의 효능 검증에 적합한 수준의 AD 증상을 유발하면서도, 부작용을 최소화할 수 있는 MC903의 Challenge 농도를 결정하고자 하였다.

AD의 증상과 양상은 매우 다양하고 연령, 환경 등에 따라 개인의 차이를 나타내지만 일반적으로 홍반, 건조, 인설 등의 증상이 나타난다¹⁾. 본 연구의 결과를 살펴보면, 3 nmol 군과 4 nmol 군에서 전형적인 AD의 피부 증상이 나타나고 홍반 지수도 유사한 경향을 보였다. 반면, 2 nmol 군에서는 유의한 수준의 홍반 지수 상승이 나타났으나 표면 증상의 경우 다른 군에 비해 상대적으로 경미한 수준이었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 후보 물질의 효능 검증에 적합한 수준의 AD 증상을 유발하기 위해서는 3 nmol/day 이상의 MC903 challenge가 필요함을 의미한다.

피부 건조는 AD의 증상임과 동시에 악화 요인으로 작용하기도 한다. 또한, 피부 수분량과 보유능, 경피수분손실량 등은 피부 장벽 기능을 측정하는 유용한 도구이기도 하다^{12,13)}. 농도별 MC903 처리가 수분 함량에 미치는 영향을 살펴본 결과, 모든 군에서 유의한 수준으로 피부 수분량이 감소하였으며, 4 nmol 군에서는 대조군의 절반 수준으로 감소하였다. 수분 보유능에서는 3 nmol군 이상에서 유의한 수준의 감소를 보였으며, 2 nmol 군은 대조군과 유사한 수준의 보유능을 보였다 (Fig. 3) 이러한 결과는 3 nmol/day 농도 이상에서 이상적인 수준의 피부 장벽 기능의 손상이 발생한 것을 의미한다.

조직병리학적 관찰의 결과를 살펴보면, 3 nmol 및 4 nmol 군에서 유두층과 기저층의 파괴, spongiotic change 등으로 인하여 표피와 진피의 경계부가 불분명해지는 현상이 발견되었으며, 진피 조직의 표재성 혈관 주위로 면역세포의 침윤이 관찰되었다 (Fig. 4) 이러한 결과 역시 상기한 결과들과 마찬가지로 3 nmol/day 이상의 농도에서 조직병리학적으로 유의미한 변화가 발생한다는 사실을 의미한다.

선행 연구를 통해 실험동물의 체중 감소와 체력 저하와 같은 부작용이 관찰된 바 있는데, 이는 고농도의 Vitamin D 혹은 analogue 처리에 따른 고칼슘혈증으로 인한 부작용이다¹⁴⁾. 본 연구의 결과에서 3 nmol 군은 대조군과 비교하여 약 10%, 4 nmol 군은 대략 20%에 달하는 체중감소가 관찰되었다 (Fig. 5). 이러한 결과는 MC903이 농도 의존적으로 체중 감소를 일으킬 수 있음을 시사한다. 또한, 동물실험계획서 상의 인도적 실험종료 기준이 20% 이상의 체중감소라는 점을 감안한다면 이상적인 처리 농도는 4 nmol/day보다 낮아야 함을 의미한다.

피부각질형성세포에서 피부면역반응을 유도하는 초기자극 인자인 TSLP의 발현은 다양한 염증성 cytokine의 분비를 유도한다. 이러한 이유로 TSLP는 AD 치료의 주요한 표적 중의 하나이다^{4,5)}. 본 연구 결과에서 mRNA의 TSLP 발현 정도는 모든 군에서 대조군에 비해 증가하였으나, 3 nmol 군에서 가장 높은 증가를 보였다 (Fig. 6A). TSLP 단백질의 발현 정도를 살펴본 결과 2 nmol 군은 대조군 수준의 발현량을 보였으며, 3 nmol 군과 4 nmol 군에서는 확연한 발현량 증가가 관찰되었다 (Fig. 6B), 이러한 결과 역시 상기한 결과들과 함께 3 nmol/day의 농도가 이상적인 challenge 농도임을 의미한다.

본 AD 모델에서 두드러지게 나타나는 홍반과 인설 같은 증상은 급성기 혹은 아급성기에 주로 나타난다²⁾. 이에 반해 AD의 만성기 대표 증상인 태선화 현상은 나타나지 않았으며, 홍반 지수가 유의성 있게 증가한 것에 비해 멜라닌 지수는 특별한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 2D). 이러한 결과는 본 연구를 통하여 확립된 모델이 급성 혹은 아급성기의 AD 모델임을 의미하며, 만성기의 AD 연구에는 적절하지 않음을 의미한다. 또한 TSLP가 주로 AD의 급

성기 T helper cell type 2 (Th2) 매개 염증 반응을 유도한다는 사실^{7,15} 역시 본 연구에서 제시하고 있는 동물 모델이 급성기 혹은 아급성기 모델임을 뒷받침한다.

AD의 증상은 계절과 환경의 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 습도는 피부 상태에 직접적으로 영향을 미치며, 피부 건조가 가려움증을 유발하여 AD를 악화시키는 것은 잘 알려진 사실이다^{16,17}. DNFB 모델이 습도의 차이에 특별한 영향을 받지 않았던 것과 달리 MC903을 이용한 AD 모델은 습도에 증상 유발 정도에 차이를 나타냈다. 습도가 다른 조건에서 동일한 프로토콜을 사용하여 연구를 진행한 결과, 습도가 높은 환경 (40 ~ 50%)에서는 낮은 환경 (20 ~ 30%)에서 보다 상대적으로 유발의 정도가 약하게 나타났다 (data not shown). 이처럼 MC903을 이용한 AD 모델은, DNFB와 같은 유해 물질을 이용한 AD 모델과는 다르게 온도와 습도 등의 환경적 요인의 영향을 받는다. 이는 AD 환자들이 습도가 낮은 가을과 겨울철에 증상이 심해지는 현상¹⁸을 반영하는 것으로 해석 될 수 있으며, MC903으로 유발된 AD가 DNFB와 같은 물질을 사용하여 유발된 피부염 보다 인간의 AD와 유사할 가능성을 확인하기 위한 후속 연구가 필요하다고 생각된다.

본 연구에서 4 nmol 투여군의 체중 감소를 언급하였는데, 이는 일반적으로 사용하는 6주 혹은 7주령의 생쥐 (20 g 내외)를 사용하는 것을 전제로 한 것이다. 생쥐의 체중 증가량을 고려하였을 때, 9주령 혹은 10주령의 생쥐를 사용한다면 3 nmol/day 보다 더 높은 농도를 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구결과에서 도출된 3 nmol/day는 14일의 기한 안에 적절한 수준의 피부염을 유발하는 최소 농도라고 할 수 있다.

이상의 결과를 통하여, 본 연구진은 수정된 프로토콜이 체중 감소 등의 부작용을 감소시키면서도, 적절한 수준의 증상 유발이 가능한 것을 확인 할 수 있었다. 본 프로토콜은 다양한 항아토피 후보물질들이 가지는 증상 완화 효능 및 TSLP 억제 활성을 검증하는 데에 활용 될 수 있을 것이다.

결 론

본 연구는 MC903을 이용한 아토피피부염 모델의 부작용을 줄이면서도 적절한 수준의 증상을 유발할 수 있는 새로운 프로토콜의 확립을 위해 수행되었다. 본 연구를 통해, 3 nmol 이상의 MC903 처리가 아토피피부염의 대표 증상인 홍반, 인설, 피부 건조 및 유두층 파괴, 면역세포 침윤 등의 전형적인 조직병리학적 변화를 일으킬 수 있음을 확인하였으나, 4 nmol 군에서는 20%에 달하는 체중 감소가 발생하였고, 3 nmol 군에 비해 상대적으로 낮은 TSLP 발현을 보였다. 이는 3 nmol/day의 MC903 처리가 적절한 수준의 아토피피부염을 유발하면서도 용인될 수 있는 부작용을 보이는 적정 농도임을 의미한다. 이상의 결과를 바탕으로 본 저자들은 2 nmol/day 농도의 감작 기간 3일과 제모 및 제모 후 안정기 3일, 3 nmol/day 농도 처리 기간 6일 및 휴지기 1일을 포함한 총 14 일 간의 새로운 프로토콜을 제안하는 바이다.

감사의 글

이 성과는 정부 (과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2022R1A2C2091960).

References

- Kim EH, Lee BW, Kim EH. A Literal study of the main symptoms of Atopic dermatitis. *Journal of Korean Medical classics* 2009;22(1):207-28.
- Avena-Woods C. Overview of atopic dermatitis. *The American journal of managed care* 2017;23(8 Suppl):S115-S123.
- Kim M, Kim J. Phenotypes and endotypes of atopic dermatitis: Clinical implications. *Allergy, Asthma & Respiratory Disease* 2020;8(1):9-14
- Indra AK. Epidermal TSLP: a trigger factor for pathogenesis of atopic dermatitis. *Expert review of proteomics* 2013;10(4):309-11.
- He R, Geha RS. Thymic stromal lymphopoietin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010;1183(1):13-24.
- Li M, Hener P, Zhang Z, Kato S, Metzger D, Chambon P. Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006;103(31):11736-41.
- Moosbrugger-Martinez V, Schmuth M, Dubrac S. A mouse model for atopic dermatitis using topical application of vitamin D3 or of its analog MC903. *Inflammation: Methods and Protocols*. 2017:91-106.
- Amano H, Negishi I, Akiyama H, Ishikawa O. Psychological stress can trigger atopic dermatitis in NC/Nga mice: an inhibitory effect of corticotropin-releasing factor. *Neuropsychopharmacology* 2008;33(3):566-73.
- Kim HW, Kim KY, Kim BJ, Chiang SY, Do YH, Nam NL, et al. Effects of alcoholic fermentation extracts from ovary and rind of pear on human skin. *The Korea Journal of Herbology* 2009;24(1):133-9.
- Lyu JH, Kim KH, Kim HW, Cho SI, Ha KT, Choi JY, et al. Dangkwisoo-san, an herbal medicinal formula, ameliorates acute lung inflammation via activation of Nrf2 and suppression of NF-κB. *Journal of ethnopharmacology* 2012;140(1):107-16.
- Jang S, Kang Y, Kang Y, Oh S, Kim S, Lyu JH, et al. The ethanol extract of *Caragana sinica* ameliorated skin lesions in mice with contact dermatitis. *Pharmacognosy Magazine* 2022;18(77):201.
- Addor FA, Takaoka R, Rivitti EA, Aoki V. Atopic dermatitis: correlation between non-damaged skin barrier function and disease activity. *International journal of dermatology* 2012;51(6):672-6.
- Knor T, Meholfić-Fetahović A, Mehmedagić A. Stratum corneum hydration and skin surface pH in patients with atopic dermatitis. *Acta dermatovenerologica Croatica: ADC* 2011;19(4):242-7.
- Oghazian MB, Ateai S, Radfar M. Vitamin D Intoxication with hypercalcemia due to overuse of supplement. *Journal of Pharmaceutical Care* 2013:114-6.
- Kabata H, Flamar A-L, Mahlaköiv T, Moriyama S, Rodewald HR, Ziegler SF, et al. Targeted deletion of the TSLP receptor reveals cellular mechanisms that promote type 2 airway inflammation. *Mucosal immunology* 2020;13(4):626-36.
- Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *Journal of Investigative Dermatology* 1991;96(4):523-6.
- Simpson EL, Chalmers JR, Hanifin JM, Thomas KS, Cork MJ, McLean WI, et al. Emollient enhancement of the skin barrier from birth offers effective atopic dermatitis prevention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2014;134(4):818-23.
- Kim MR, Woo SE, Shin SO, Hong SM, Yang SY. A study on the distribution of staphylococcus aureus in atopic dermatitis. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea* 2006;32(2):93-7.