

아토피피부염에 대한 天日鹽과 淸肌解毒散의 병용 투여 효과

안황용 · 김동희*

대전대학교 한의과대학 병리학교실

Combinational Treatment of Oral Chenggihaedok-san and Topical Solar salt on Atopic Dermatitis

Hwang Yong An, Dong Hee Kim*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

In order to investigate the therapeutic effect of SSC, NC/Nga animal model resembling the AD-like symptoms were used to measure the changes in cytokines and histology. SSC prescription group showed significant decrease in the atopic dermatitis clinical index by 40.2% compared to that of the control. The SSC prescription had significant effect on immune cells that are related to inducing AD symptoms. SSC prescription also increased the ratio of immune cells in DLN that were not directly involved in AD symptoms. SSC prescription group showed significant decrease in the level of cytokines within spleen cells and DLN. The prescription also decreased the level of immunoglobulin IgE levels in serum by 25.3%. The thickness of epidermis and dermis as well as the precipitation of erythrocytes were also observed. The results indicate the therapeutic effect of SSC in the treatment of atopic dermatitis through immune modulation. The study will provide a broader applications in the treatment of atopic dermatitis. Particularly, skin regeneration effect and supplemental use of topical application of SS in atopic dermatitis treatment had been reported previously, and further investigation on the dose dependent effect as well as skin irritation studies of SS should be followed.

Key words : NC/Nga, atopic dermatitis, Chenggihaedok-san(CHS), Solar salt(SS)

서 론

아토피피부염은 만성 재발성 피부염으로 유아와 소아에서 높은 발생빈도를 보이며, 세계적으로 유병률은 증가하는 추세로¹⁻³⁾, 의학적 문제를 넘어서 사회적 문제로 인식되나 아직 정확한 치료법은 없는 상태이다.

아토피피부염의 병인은 환경적 요인, 유전적 요인, 면역학적 요인 등으로 추측되며²⁻⁵⁾, 특히 아토피피부염 환자의 골수 이식시 아토피피부염이 전이 될 수 있다는 것을 보면 아토피피부염이 골수에서 파생되는 면역세포의 불균형에 따르며, 이로 인해 여러 가지 치료제들의 효능은 면역학적 기전의 변화 양상을 확인하는 것으로 검증할 수 있다⁶⁾.

아토피피부염은 혈중 IgE 수치 증가와 Th1/Th2 세포 간의 불균형, IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인 발현 증가라는 면역학적 특징을 가지며, 혈중 IgE 수치는 아토피 피부염뿐만 아니라 알레르기성 비염이나 천식 등의 아토피 질환에서 대부분 증가되어 있다^{7,8)}. 항체의 형성에 관여하는 T 림프구중 보조 T 세포는 사이토카인 종류에 따라 Th1 세포와 Th2 세포가 구분되는데, Th1 세포는 IL-2와 IFN- γ 를 생성하고 Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 등의 사이토카인을 생성한다. 아토피피부염에서 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 등의 사이토카인이 증가하고, IFN- γ 의 생성량이 상대적으로 적게 나타나는 것과 IFN- γ 와 IL-2의 in vivo 투여가 아토피피부염 호전에 유익하다는 것은 Th1 세포 반응보다 Th2 세포 반응의 우세한 활성화 반응에서 비롯된다고 볼 수 있다. 특히 IL-4는 IFN- γ 의 생성과 Th1 세포로의 분화를 억제하고, IgE 농도를 증가시키고, IL-5는 eosinophil colony stimulating factor 및 eosinophil growth stimulating factor 등을

* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3, 대전대학교 한의과대학

· E-mail : dhkim@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2623

· 접수 : 2009/11/10 · 수정 : 2009/11/25 · 채택 : 2009/12/10

생산하여 혈중 호산구를 증가시킨다^{7,9)}.

동서의학을 불문하고 피부는 타 질환에 비하여 상대적으로 병所の 특징에 의하여 內·外治가 동시에 이루어지는 경우가 많다. 한의학에서 피부는 有機的 整體性 이론에 따라 臟腑, 經絡, 氣血, 津液 등과 밀접한 관련이 있어, 이들의 기능 상태를 판단하는 生·病理 발현처로 인식되고 있다. 《靈樞·本藏》篇¹⁰⁾의 "衛氣者, 所以溫分肉, 充皮毛, 肥腠理, 司開闔者", 《素問·皮論》篇¹¹⁾의 "凡十二經脈者, 皮之部也", 《靈樞·百病始生》篇¹⁰⁾의 "夫百病之始生也...是故虛邪之中人也 先于皮毛", 《素問·經脈別論》篇¹¹⁾의 "飲食入胃...濁氣歸心, 陰精于脈, 脈氣流經, 經氣歸于肺, 肺朝百脈, 輸精于皮毛...", 中醫皮膚科臨床實踐¹²⁾의 "瘡屬生于肌膚之外 而其根本原于臟腑之內" 등과 "臟居于內 象見于外" "外治必本諸于內", '治病求本'의 기술은 이를 잘 증명해주고 있으며, 《素問·至真要大論》篇¹¹⁾의 "內者內治, 外者外治"라는 기술은 일찍부터 한의학에서 내·외치에 대한 입장이 활발하게 이루어졌음을 말해주고 있다.

역대 한의서에 나타난 '瘍' '瘡' '疥' '癬' '風', '毒' "癰", '疽', '疔', '癩' 등의 피부과 질환에서 많은 내·외치법이 소개되어 있다¹²⁻¹⁴⁾. 아울러 散劑, 酒劑, 膏劑, 洗劑, 浴劑, 熏劑, 坐劑, 敷劑 등 수종의 제형들이 소개되었을 정도로 피부 질환에 있어 다양한 외치법이 활용되었음을 알 수 있으며, "外科之法 最重外治"라고 언급한 바와 같이 外治 중요성은 줄곧 강조되어 왔다.

孫의 《千金翼方》¹⁵⁾에서는 피부 질환에 사용되는 다량의 약물과 처방을 비롯하여 미용에 사용되는 中藥 및 外用 방법에 대하여 자세히 기술하고 있으며, 陳의 《外科正宗》¹⁶⁾에서는 40여종의 피부 질환과 이에 대한 外治法과 內·外治法에 대하여 자세히 기술하고 있고, 《醫宗金鑑·外科心法要訣》¹⁷⁾에서도 100여종의 피부병과 이에 대한 외치법이 상세히 기술되어 있다. 아울러 최근 중국에서는 10여간 약 2000여 편의 중약 外治법에 대한 논문이 발표되었을 정도로 한약 外治에 대한 연구와 산업화가 심도 있게 이루어지고 있음을 알 수 있다.

한의학에서 아토피피부염은 瘙癢과 濕疹 이로 인한 피부 손상이 주 증상인 점에서 '濕疹'과 더불어 耳部에 발생하는 '旋耳瘡', 臍部에 발생하는 '臍瘡', 彎曲部에 발생하는 '四彎風', 嬰兒에 발생하는 '奶癬', '胎瘡', 노인에게 호발하는 '風痒', 전신에 浸淫 증상이 나타나는 '浸淫瘡' 등이 가장 유사 범주로 인식되고 있다¹⁸⁻²²⁾.

따라서 아토피피부염 역시 이들의 치료법에 근거하여 이루어지고 있는데, 크게 濕熱病型, 脾虛濕盛型, 血虛風燥型, 胃腸積滯型 등으로 辨證하여 祛風, 清熱, 利濕의 攻法과 健脾, 補陰, 補血 등의 補法이 검출되거나 단독으로 사용되어 지고 있다¹⁸⁻²²⁾. 왕²³⁾은 秦廉泉의 경험방을 기술하면서 濕疹 치료시 祛風, 清熱, 除濕 약물의 적절한 가감이 가장 중요한 치료 관건임을 언급한 바가 있다.

한의학에서 피부병 병명 중 風자가 들어갈 만큼 風은 피부 질환의 중요한 병인을 점하고 있다. 아울러 "百病之長"으로 熱, 濕 등의 他邪와 쉽게 결합함으로써 증상을 더욱 악화시키며²⁴⁾, 아토피피부염의 대표적 증상인 瘙癢症의 주 病因이 된다¹⁸⁻²²⁾.

濕邪 역시 內·外邪를 불문하고, 肌膚에 蘊襲하게 되면 모두

病因으로 작용하며, 제때에 치료가 이루어지지 않는 경우 熱邪와 결합하여 濕·熱邪 內蘊으로 인한 病理가 형성되면서 水疱, 糜爛, 腫脹 등의 다양한 병리적 증상이 발현된다^{18-22,24)}.

따라서 아토피피부염 주 증상인 瘙癢症과 糜爛, 滲出, 水疱 및 腫脹 등은 風·濕·熱邪와 매우 밀접한 관계가 있음을 알 수 있으며, 이러한 이유로 기존의 임상 및 실험 연구에서 祛風, 清熱, 利濕 처방과 약물이 가장 많이 사용되고 있다.

본 실험의 內治方인 清肌解毒散은 消風, 滋陰, 養血, 清熱의 효능으로 外感風熱과 肝火, 血虛, 陰虛, 濕痰 등에 의해 생긴 열이 과해지면서 발생하는 증상을 치료하는 임상방이다. 防風通聖散과 荊芥連翹湯의 變方인 까닭에 피부과 영역에서는 주로 瘙癢症과 發赤이 심하면서 다양한 實證性 증상이 동반되는 곳에 사용되며, 이미 구성 약물의 대부분은 消炎, 항알러지, 血液 粘度 改善을 통한 혈액 순환작용이 약리학적으로 규명된 바가 있는데, 관련 연구로 홍²⁵⁾의 '白芍藥이 LPS로 誘發된 BV-2 미교세포의 炎症反應에 미치는 影響', 송²⁶⁾의 '連翹의 알레르기성 염증 반응 조절 효과', 손²⁷⁾의 '大黃, 黃金, 黃柏 복합 추출물의 抗菌, 抗炎 및 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구', 조²⁸⁾의 '柔白皮가 항알러지 및 항염증반응에 미치는 영향' 등이 있다.

外治方에 활용된 天日鹽은 우리나라의 서남해안에서 생산되며, 프랑스와 일부 국가에서만 생산되는 양질의 소금이다. 이미 실험적으로 간 기능 개선 효과²⁹⁾, 항균 효과³⁰⁾ 등이 보고되었으며, 정³¹⁾은 "천일염 및 생물자원의 피부 재생효과에 관한 연구"에서 collagen 생성, 피부 수축율, 항균 및 항산화 활성에 있어 유의성 있는 결과가 도출됨으로써 피부 재생에 관한 기능성 소재로서의 가능성을 제시한 바가 있다. 이 밖에 소금과 관련된 연구로 최³²⁾는 사해 소금을 이용한 balneotherapy 치료 전후의 SCORAD 평균값 변화를 통하여 아토피피부염 치료 보조제로서의 활용을 제시하였다.

따라서 본 실험에서는 이 같은 결과 보고에 준하여 다양한 아토피치료제 개발의 일환으로 아토피피부염을 유발한 NC/Nga 생쥐에 清肌解毒散을 경구 투여하고, 식품으로 분류된 天日鹽을 증류수에 용해(10%)시켜 분무한 후 다양한 면역학적 인자들의 변화를 검색하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물인 수컷 6주령의 NC/Nga mice는 중앙실험동물에서 공급 받아 실험 당일까지 고품사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co., Korea)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2°C, 습도 55 ± 15%, 12시간-12시간(light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약물

본 실험의 外治方에 사용한 Solar salt(이하, SS로 표기함)는 섬들체에서 토판천일염 100%를 구매하여 사용하였고, 內治方에 사용한 처방 清肌解毒散(Chenggihaedoksan - 이하, CHS로 표기

함)의 구성 약재들은 대전대학교 부속 한방병원에서 구입하여 정선 후 사용하였으며, 그 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of CHS(1첩)

| 韓藥名 | 生藥名 | 用量 (g) |
|--------------|----------------------------|--------|
| 滑石 | Talcum | 10 |
| 川芎 | Cnidii Rhizoma | 4 |
| 防風 | Saposhnikovia Radix | 4 |
| 當歸 | Angelicae Gigantis Radix | 4 |
| 白芍藥 | Paeoniae Radix Alba | 4 |
| 薄荷 | Menthae Herba | 4 |
| 連翹 | Forsythiae Fructus | 4 |
| 麻黃 | Ephedrae Herba | 4 |
| 芒硝 | Natrii Sulfas | 4 |
| 大黃 | Rhei Rhizoma | 4 |
| 石膏 | Gypsum | 4 |
| 桔梗 | Platycodi Radix | 4 |
| 黃芩 | Scutellariae Radix | 4 |
| 桑白皮 | Morus Cortex | 4 |
| 白朮 | Atractylodis Rhizoma White | 3 |
| 荊芥 | Schizonepetae Spica | 3 |
| 生薑 | Zingiberis Rhizoma Crudus | 3 |
| 梔子 | Gardeniae Fructus | 3 |
| 甘草 | Glycyrrhizae Radix | 2 |
| Total amount | | 76 |

3) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 collagenase, trypsin-EDTA, acetic acid, tris-base, tris-HCl, paraformaldehyde, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 등은 Sigma사 (USA) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (USA) 제품을, DMEM은 Gibco사 (USA) 제품을, Protopic Ointment 0.1%는 Astellas Pharma Manufacturing사 (USA) 제품을, TNCB는 동아제약 (Korea) 제품을, anti-CD19-FITC, anti-CD3-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD4-FITC, anti-CD69-FITC, anti-CD25-PE, anti-B220-PE, anti-IgE-FITC, anti-CCR3-PE, anti-CD11b-FITC, anti-Gr-1-PE 등은 BD-Pharmingen사 (USA) 제품을, IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α ELISA kit는 Biosource사 (USA) 제품을, IgE ELISA kit는 Shibayagi사 (Japan) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 황토약탕기 (알파세라믹약탕기, Korea), 감압 증류장치 (Rotary evaporator, Büchi B-480, Switzerland), microwave oven (LG, Korea), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo Co., Japan), water bath (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-line Co., USA), vortex mixer, heating block (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan), centrifuge (한일, Korea), deep -freezer (Sanyo Co., Japan), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), flow cytometer (Becton Dickinson, USA), Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA), ELISA

reader (Molecular Devices, Co., USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

처방 CHS은 10첩 분량에 증류수 4,500 ml를 가하여 황토 약탕기에서 3시간 추출하여 얻은 액 중 480 ml를 여과하여, 감압 증류장치로 농축하였다. 농축액을 각각 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 19.3 g 을 냉동 보관 (-80℃) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 피부염 유도

7 주령이 된 NC/Nga 생쥐의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후 제모가 끝나면 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 1% TNCB 용액 (아세톤 : 올리브오일 = 3 : 1) 200 ul을 등 부위에 도포하고, 4일 후 0.2% TNCB 용액을 다시 150 ul 처리하였다. 3일 후부터는 1주일에 2~3번씩 0.2% TNCB 용액 150 ul을 등 부위에 4주간 (8주령에서 11주령까지) 도포하였다.

3) 시료 처리

실험은 4개 그룹으로 나누고 양성대조군은 0.1% Protopic 연고 100 mg를 피부염 유발 부위에 5주간 (8주령에서 12주령까지) 매일 도포하였으며, SS와 CHS 처리군 (이하, SSC로 표기함) 중 SS는 증류수에 천일염을 1% 농도로 용해시켜 1일 2~3회 150 ul 씩 분무를, CHS는 9 mg/28 g/day의 농도로 경구투여를 5주간 (8주령에서 12주령까지) 병행하였다. 대조군은 증류수를 위와 동일한 방법으로 시행하였다.

4) 관능 평가

약물 처리 후 5주에 아토피피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법으로 관능평가를 실시하였다. 평가 항목은 홍반 (Erythema), 가려움과 건조 피부 (Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종 (Edema & Hematoma), 긁힘(Excoriation), 태선화 (Lichenification)로 5가지이다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였다.

5) 피부와 DLN에서 면역세포 분리

실험 종료 후 TNCB로 유발된 NC/Nga 생쥐에서 배부 일정량의 피부 조직을 잘게 chopping 한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37℃ shaker (140 rpm, 20min.) 배양기에서 배양하여 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이들 세포들에 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃ in 1L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 cell strainer를 통과 시킨 세포를 0.04% trypan blue로 염색하였다. DLN 내 총 면역세포 수 측정은 목과 앞다리 및 뒷다리 안쪽에서 림프절을 떼어 mesh를 통해 분리한 다음, 여기에 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃ in 1 L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 가한 후 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 cell strainer를 통과 시킨 세포를 0.04% trypan blue로 염색하였다.

6) 형광 유세포 분석

분리한 세포를 5 × 10⁵ cells/ml의 농도로 조정한 후 4℃에서

면역형광염색을 실시하였다. 각각에 anti-CD19-FITC, anti-CD3-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD4-FITC, anti-CD69-FITC, anti-B220-PE, anti-IgE-FITC, anti-CCR3-PE, anti-CD11b-FITC, anti-Gr-1-PE를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세하고 flow cytometry를 이용하여 측정하고 분석하였다.

7) 혈청 내 사이토카인 및 면역 글로불린 생성량 측정

실험 종료 후 ethyl ether로 마취한 상태에서 심장 천자법을 이용하여 채혈한 다음 6,500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α 농도는 ELISA kit를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 각 well에 혈청을 50 μ l씩 분주하고 biotin-conjugated antibody를 50 μ l씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 37°C에서 반응시키고 washing buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 이를 다시 100 μ l의 streptavidin-HRP Working solution을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 washing buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 100 μ l의 stabilized chromogen을 가하여 암소에서 30분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리하고 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. IgE 생성량의 측정은 ELISA kit를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 항체를 coating 완충 용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight 하였다. 각 well을 3회 washing 완충 용액으로 세척한 후 혈청 (100배 희석)을 100 μ l씩 분주하였다. 이를 1시간 동안 실온에서 방치하고 washing 완충 용액으로 2회 세척한 다음, avidin-HRP conjugated antibody 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 다음 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) CD3/CD28에 의해 활성화된 비장세포 내 사이토카인 생성량 측정

실험 종료 후 비장세포 (1 x 10⁵ cells/well)를 anti-CD28 (1 μ g/ml), anti-CD3 (1 μ g/ml) 항체가 coating된 96-well plate에서 48시간 동안 배양한 후 배양액을 취하여 ELISA kit (Biosource, USA)을 이용하여 IL-4, IL-5, TNF- α 를 측정하였다. 측정 방법은 혈청 내 사이토카인 및 면역 글로불린 IgE 측정 방법과 동일하다.

9) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error (S.E.)로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석법을 이용하여 결정하였다.

결 과

1. NC/Nga 생쥐의 피부염 지수에 미치는 영향

7주령의 NC/Nga 생쥐를 제모한 후 TNCB를 도포하여 피부염을 유발시키면서 동시에 SS 스프레이와 CHS 구강 투여를 실시하였다. Fig. 1 은 9주부터 13주까지 2주 간격으로 대조군, Protopic 처리군, SSC 처리군의 피부염 유발 정도와 개선 정도를 나타내주는 사진으로, 최종 13주에는 SSC 처리군이 대조군에 비

해서 피부염이 현저하게 개선되었음을 확인할 수 있다(Fig. 1). 피부염 지수는 아토피 피부염을 유발한 후 최종 5주 후에 피부염의 심화 정도를 관능적 방법에 의하여 측정된 결과로, 대조군은 9.7 \pm 1.5, Protopic 처리군은 6.0 \pm 0.9, SSC 처리군은 5.8 \pm 1.0로 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 2).

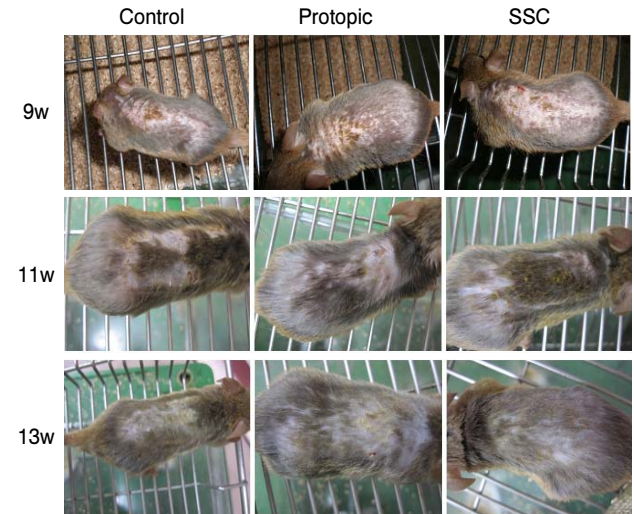


Fig. 1. Comparison of skin manifestation in NC/Nga mice between Control and SSC. Atopic dermatitis was induced by TNCB treatment in the dorsal skin.

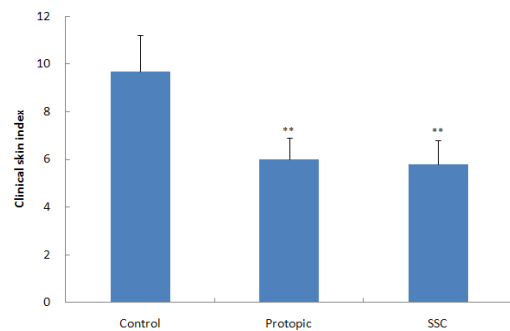


Fig. 2. Effects of SSC on clinical skin features and severity in TNCB-induced NC/Nga mice. Clinical skin index of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe) for each of five signs and symptoms (itch, erythema/hemorrhage, edema, excoriation/erosion and scaling/dryness) : Symptoms were evaluated by skin dryness, eruption and wound on the three parts of the body; ear, face and back. Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (**p<0.01).

2. DLN 내 면역세포 변화에 미치는 영향

1) CD19+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 20.36 \pm 0.55 (%), 대조군은 30.84 \pm 1.95 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+p<0.05) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 23.39 \pm 0.56 (%), SSC 처리군은 26.01 \pm 0.52 (%)로 나타났다(Fig. 3).

2) CD3+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 77.46 \pm 2.17 (%), 대조군은 67.33 \pm 2.80 (%)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 감소하였고, Protopic 처리

군은 74.87 ± 2.28 (%), SSC 처리군은 72.77 ± 0.55 (%)로 나타나 대조군에 비하여 증가를 나타냈다(Fig. 4).

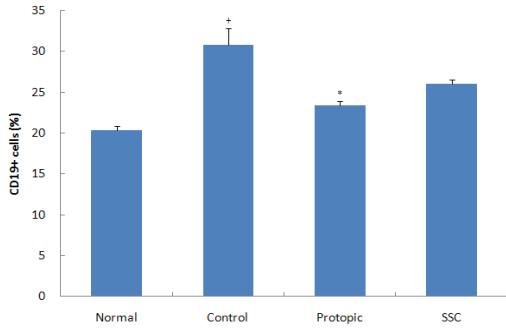


Fig. 3. Effect of SSC on CD19+ cell rate of DLN in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of SSC (SS spray & CHS administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from DLN stained with anti-CD19+ and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($+p<0.05$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($+p<0.05$).

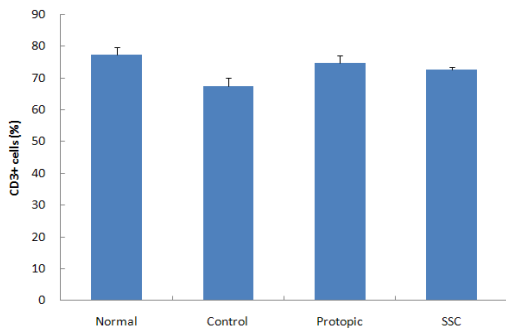


Fig. 4. Effect of SSC on CD3+ cell rate of DLN in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of SSC (SS spray & CHS administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from DLN stained with anti-CD3+ and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E.

3) CD8+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 19.31 ± 1.63 (%), 대조군은 12.04 ± 1.18 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 감소하였고, Protopic 처리군은 17.81 ± 0.84 (%), SSC 처리군은 15.64 ± 1.31 (%)로 나타나 대조군에 비하여 증가하였다(Fig. 5).

4) CD4+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 31.96 ± 1.00 (%), 대조군은 23.59 ± 1.30 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.05$) 감소를 나타내었고, Protopic 처리군은 25.68 ± 0.64 (%), SSC 처리군은 23.85 ± 1.09 (%)로 나타냈다(Fig. 6).

5) CD3+/CD69+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 2.75 ± 0.16 (%), 대조군은 1.57 ± 0.12 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.05$) 감소를 나타내었고, Protopic 처리군은 2.39 ± 0.06 (%), SSC 처리군은 2.10 ± 0.22 (%)로 나타냈다(Fig. 7).

6) CD4+/CD25+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 4.89 ± 0.30 (%), 대조군은 2.61 ± 0.67 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.05$) 감소를 나타내었고, Protopic 처리군은 3.84 ± 0.33 (%), SSC 처리군은 3.48 ± 0.52 (%)로 나타냈다(Fig. 8).

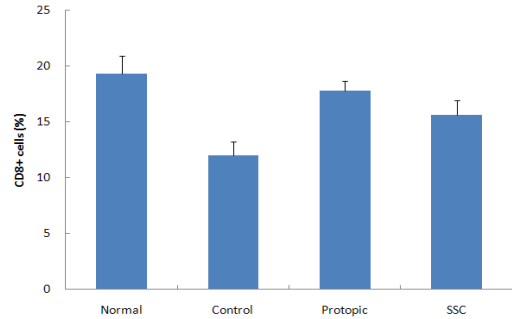


Fig. 5. Effect of SSC on CD8+ cell rate of DLN in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of SSC (SS spray & CHS administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from DLN stained with anti-CD8+ and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E.

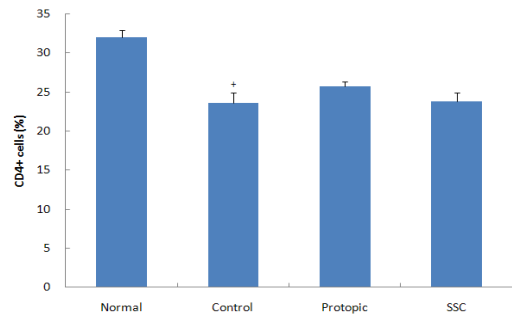


Fig. 6. Effect of SSC on CD4+ cell rate of DLN in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of SSC (SS spray & CHS administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from DLN stained with anti-CD4 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($+p<0.05$).

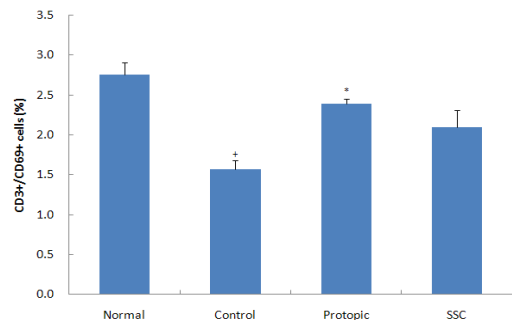


Fig. 7. Effect of SSC on CD3+/CD69+ cell rate of DLN in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of SSC (SS spray & CHS administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from DLN stained with anti-CD3 and anti-CD69 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($+p<0.05$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($+p<0.05$).

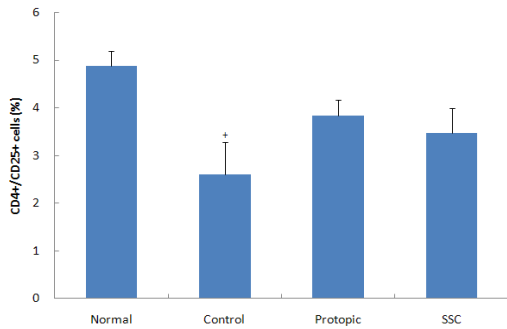


Fig. 8. Effect of SSC on CD4+/CD25+ cell rate of DLN in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of SSC (SS spray & CHS administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from DLN stained with anti-CD4 and anti-CD25 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+p<0.05).

7) B220+/IgE+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 0.34 ± 0.08 (%), 대조군은 4.02 ± 0.04 (%)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 2.05 ± 0.11 (%), SSC 처리군은 3.19 ± 0.04 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 9).

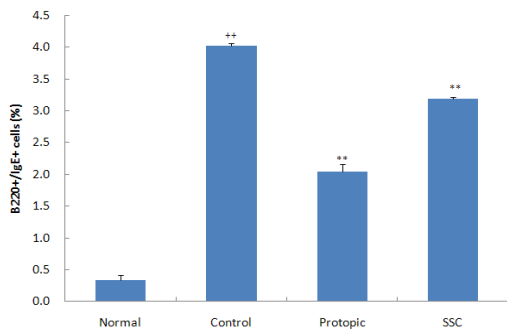


Fig. 9. Effect of SSC on B220+/IgE+ cell rate of DLN in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of SSC (SS spray & CHS administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from DLN stained with anti-B220 and anti-IgE and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (*p<0.01). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (**p<0.01).

3. 배부 피부 (Dorsal Skin) 내 면역세포 변화에 미치는 영향

1) CCR3+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군이 3.32 ± 0.28 (%), 대조군은 9.41 ± 0.66 (%)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 4.21 ± 0.17 (%), SSC 처리군은 5.57 ± 0.18 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01, *p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 10).

2) B220+/IgE+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 1.46 ± 0.13 (%), 대조군은 4.26 ± 0.09 (%)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 2.49 ± 0.17 (%), SSC 처리군은 2.79 ± 0.22

(%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01, *p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 11).

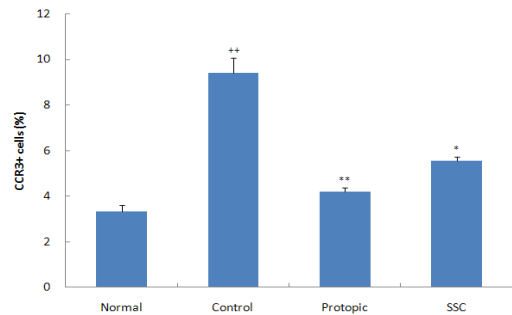


Fig. 10. Effect of SSC on CCR3+ cell rate of dorsal skin in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of SSC (SS spray & CHS administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from skin stained with anti-CCR3 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean±S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (**p<0.01). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (**p<0.01, *p<0.05).

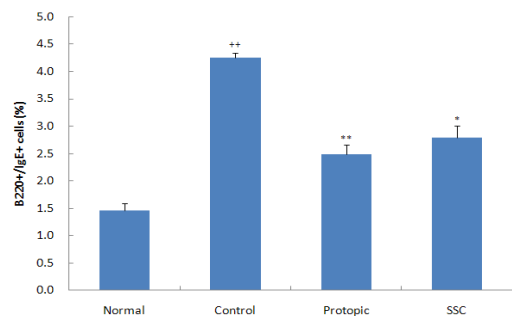


Fig. 11. Effect of SSC on B220+/IgE+ cell rate of dorsal skin in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of SSC (SS spray & CHS administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from skin stained with anti-B220 and anti-IgE and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (**p<0.01). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (**p<0.01, *p<0.05).

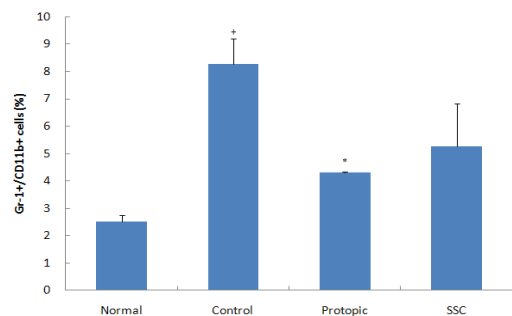


Fig. 12. Effect of SSC on Gr-1+/CD11b+ cell rate of dorsal skin in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of SSC (SS spray & CHS administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from skin stained with anti-Gr-1 and anti-CD11b and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+p<0.05). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (*p<0.05).

3) Gr-1+/CD11b+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 2.53 ± 0.23 (%), 대조군은 8.28 ± 0.94 (%)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 4.31 ± 0.04 (%), SSC 처리군은 5.27 ± 1.56 (%)로 나타났다(Fig. 12).

4. 혈청 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-4 생성량에 미치는 영향

정상군이 13.02 ± 3.90 (pg/ml)로 나타난 반면, 대조군은 204.30 ± 13.54 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p < 0.01$) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 37.60 ± 6.48 (pg/ml), SSC 처리군은 69.47 ± 21.57 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($**p < 0.01$, $*p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 13).

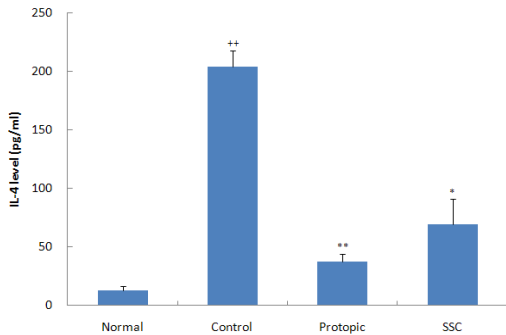


Fig. 13. Effect of SSC on the levels of IL-4 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of IL-4 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($++p < 0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($**p < 0.01$, $*p < 0.05$).

2) IL-5 생성량에 미치는 영향

정상군이 16.11 ± 3.03 (pg/ml)으로 나타난 반면, 대조군은 209.26 ± 20.34 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p < 0.01$) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 103.51 ± 8.55 (pg/ml), SSC 처리군은 105.42 ± 31.51 (pg/ml)로 나타났다(Fig. 14).

3) IL-13 생성량에 미치는 영향

정상군이 68.31 ± 26.55 (pg/ml)로 나타난 반면, 대조군은 592.11 ± 52.41 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p < 0.01$) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 165.67 ± 31.41 (pg/ml), SSC 처리군은 217.14 ± 31.70 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($*p < 0.05$) 감소하였다(Fig. 15).

4) TNF- α 생성량에 미치는 영향

정상군이 6.89 ± 0.70 (pg/ml)으로 나타난 반면, 대조군은 47.37 ± 4.40 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p < 0.01$) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 19.59 ± 4.77 (pg/ml), SSC 처리군은 22.65 ± 8.22 (pg/ml)로 나타났다(Fig. 16).

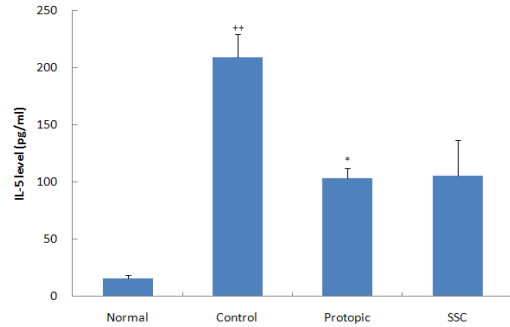


Fig. 14. Effect of SSC on the levels of IL-5 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of IL-5 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($++p < 0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($*p < 0.05$).

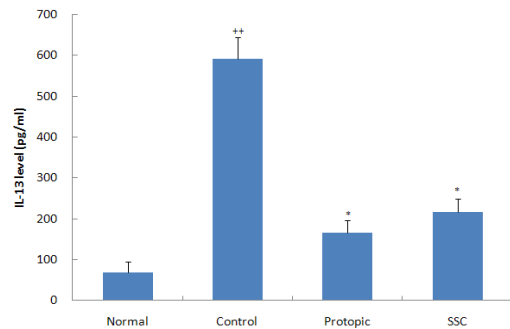


Fig. 15. Effect of SSC on the levels of IL-13 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of IL-13 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($++p < 0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($*p < 0.05$).

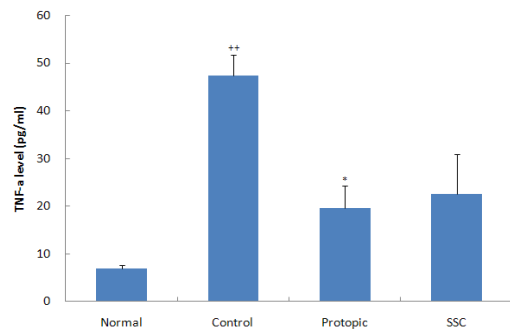


Fig. 16. Effect of SSC on the levels of TNF- α in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of TNF- α were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($++p < 0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($*p < 0.05$).

5. 혈청 내 IgE 생성량에 미치는 영향

IgE 농도는 9주, 11주, 13주에 각각 정상군은 35.44 ± 0.62 (ng/ml), 51.00 ± 2.84 (ng/ml), 78.05 ± 3.56 (ng/ml), 대조군은 100.36 ± 1.29 (ng/ml), 118.25 ± 0.04 (ng/ml), 125.79 ± 9.37 (ng/ml) 으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 9주째 62.30 ± 5.95 (ng/ml), SSC 처리군은 9주와 13주째 각각 69.52 ± 7.99 (ng/ml), 93.99 ± 12.83 (ng/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 ($*p<0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 17).

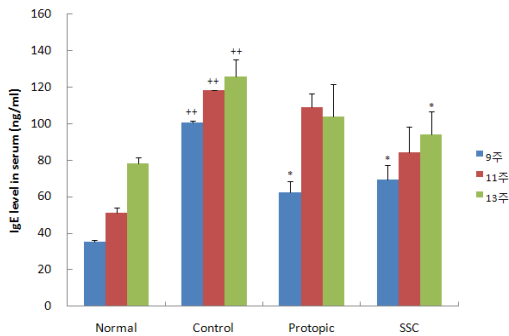


Fig. 17. Effects of SSC on the levels of IgE in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Serum levels of IgE were measured by sandwich ELISA at indicated time points. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$).

6. CD3/CD28로 활성화된 비장세포 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-4 생성량에 미치는 영향

정상군이 16.57 ± 3.84 (pg/ml)으로 나타난 반면, 대조군은 211.14 ± 9.26 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 104.27 ± 13.58 (pg/ml), SSC 처리군은 139.47 ± 20.95 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($*p<0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 18).

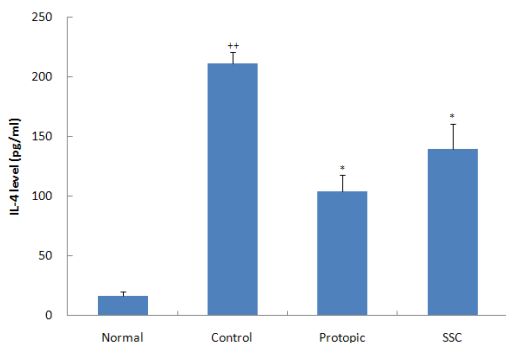


Fig. 18. Effect of SSC on the levels of IL-4 in splenocytes of NC/Nga mice. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IL-4 in the culture supernatant were determined using commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$).

2) IL-5 생성량에 미치는 영향

정상군이 21.38 ± 2.22 (pg/ml)로 나타난 반면, 대조군은 206.68 ± 12.28 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 99.94 ± 6.04 (pg/ml), SSC 처리군은 98.52 ± 15.73 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($**p<0.01$, $*p<0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 19).

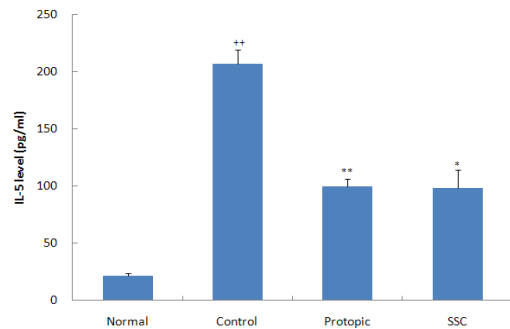


Fig. 19. Effect of SSC on the levels of IL-5 in splenocytes of NC/Nga mice. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IL-5 in the culture supernatant were determined using commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($**p<0.01$, $*p<0.05$).

3) TNF- α 생성량에 미치는 영향

정상군이 6.20 ± 3.07 (pg/ml)로 나타난 반면, 대조군은 37.01 ± 2.18 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 20.97 ± 1.69 (pg/ml), SSC 처리군은 25.36 ± 3.41 (pg/ml)로 나타났다(Fig. 20).

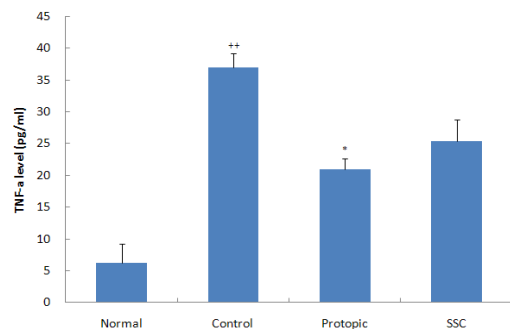


Fig. 20. Effect of SSC on the levels of TNF- α in splenocytes of NC/Nga mice. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of TNF- α in the culture supernatant were determined using commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$).

고찰

아토피피부염은 유아와 소아에게 높은 발생빈도를 보이는 만성 재발성 피부염으로¹⁻³⁾ 소양감, 홍반, 부종, 삼출과 부스럼을

특징으로 한다³³⁻³⁵). 세계적으로 유병률이 증가하는 가운데, 아토피 피부염 치료를 위한 다양한 연구가 동·서의학적으로 진행되고 있으며, 특히 면역학적 병리 기전과 이에 대한 치료 기전 연구가 심도 있게 이루어지고 있다³⁶⁻³⁹).

아토피피부염의 면역학적 특징은 혈중 IgE 수치 증가와 Th1/Th2 세포 간의 불균형, IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인 발현 증가, 호산구 수치 상승 등이 두드러지며 활성화된 호산구는 다양한 화학물질을 방출하여 염증 반응 및 조직 손상을 일으킨다^{7,9}). 이에 대한 치료제로는 염증에 대한 스테로이드 외용제와 연고, 습진에 대한 항히스타민제와 항알레르기약을 비롯하여 T 세포에 작용하여 세포내의 단백질, cyclophilin과 결합하여 calcineurin을 억제함으로써 사이토카인 유전자의 전사를 방해하는 면역억제제인 macrolide 화합물 등이 사용되고 있으나^{7,40,41}, 근본적인 치료에는 한계가 있다.

피부는 다 질환에 비하여 상대적으로 병소의 특징에 의하여 內·外治가 동시에 이루어지는 경우가 많은 반면에, 한의학에서는 주로 內治에 의한 치료 연구가 이루어졌다. 최근 들어 內·外治 병용에 관한 연구가 꾸준히 지속되고 있으며, 관련 논문으로 여⁴²)는 ‘아토피 피부염 동물 모델에서 아토피 크림과 紫雲膏의 병용도포가 피부염에 미치는 영향’을, 홍⁴³)은 ‘溫淸飲과 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향’을, 송⁴⁴)은 ‘當歸飲자와 三黃洗劑加味方 併用이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향’을, 김⁴⁵)은 ‘아토피 피부염에 대한 황토가미방과 청삼가미방의 내외치 겸용에 관한 연구’를, 하⁴⁶)는 ‘내외치 겸용법의 아토피 피부염 활용에 관한 실험적 연구’ 등을 보고한 바가 있다.

본 실험의 內治方인 淸肌解毒散은 消風, 滋陰, 養血, 淸熱의 효능으로 주로 瘙癢症과 發赤이 심한 實證性 皮膚炎 증상에 사용되며, 구성 약물 대부분 消炎, 항알러지 등의 효능이 실험적으로 규명된 바가 있다⁴⁷⁻⁵⁵).

外治方인 天日鹽 역시 collagen 생성, 피부 수축을, 항균, 항산화 활성에 있어 유의적임이 실험적으로 규명된 바가 있다. 또한 최³²)는 사해 소금을 이용한 balneotherapy 치료 전후의 SCORAD 평균값 변화를 통하여 아토피피부염 치료 보조제로써의 활용을 제시하였으며, 김⁵⁶)은 hairless mice에 마그네슘이 다량 함유된 해양미네랄수를 국소적으로 도포하였을 때 피부수분 함량이 증가한 반면 경피 수분 손실, 멜라닌 지수, 거칠기, 각질 정도 및 혈청 IgE 등이 감소됨을 보고한 바 있다.

따라서 미네랄 함량이 많은 天日鹽(SS)과 內治方인 淸肌解毒散(CHs)의 병용 투여(SSC)는 아토피피부염에 있어 상승효과가 있으리라 기대되어 기존의 관련된 인자에 대한 실험 방식으로 이를 평가하고자 하였다.

실험에 사용된 NC/Nga 생쥐는 아토피 피부염의 실험 연구에 주로 사용되는 spontaneously developed dermatitis 모델로 면역병리학적 이상이 사람에게서 발생하는 병변과 매우 유사하지만, 발병 정도나 발병시기가 다양하고 자연 유발률이 50% 이하로^{57,58} 국내외적으로 아토피 피부염 치료제 개발과 관련된 실험의 효능 평가를 위한 모델로는 재현성이 높지 않다는 단점이 있어⁵⁹), 본 실험에서는 별도로 2,4,6-trinitrochlorobenzene(TNCB)

를 반복 적용하여 아토피피부염을 유발시켰다. TNCB의 반복 적용은 피부가 두꺼워지고 부종이 생기며, 손상된 피부로의 염증세포 침윤을 증가시키거나 유지시키므로⁶⁰), 본 실험에서는 NC/Nga 생쥐의 등 부분을 제모하고 TNCB를 반복 도포 후 SSC를 처리하였다. 양성대조군으로는 Protopic 연고 (0.1% tacrolimus)를 도포하였다.

Tacrolimus는 사이클로스포린과 유사한 작용기전을 가지나 분자량이 작고 높은 효율의 면역억제제이다. 아토피피부염의 국소 도포용으로 개발되었으며, T 림프구의 calcineurin phosphatase 활성도를 감소시켜 관련 사이토카인의 합성을 억제하는 것으로 알려져 있다⁶¹). 시중에 시판되는 0.03%와 0.1% 두 가지 모두 비교적 안전하고 효율적인 치료제이나 0.1% tacrolimus 연고가 좀 더 높은 치료 효과를 보인다⁶¹⁻⁶⁶).

먼저 관능적 방법에 의한 피부염 지수에서는 SSC 처리군이 대조군에 비해 40.2% 감소함으로써 유의적인 효과를 나타냈으며, 양성대조군인 Protopic 처리군은 38.1% 감소하였다(Fig. 2).

B 세포 표면 표식인자인 CD19+⁶⁷)는 DLN 내에서는 정상군에 비해 대조군에서 51.6% 유의성 있게 증가하였으나, Protopic 처리군과 SSC 처리군에서는 대조군에 비해 24.3%, 15.6% 로 각각 감소하였다(Fig. 3).

DLN에서의 B220+/IgE+ 세포 비율은 대조군이 정상군에 비해 1088.2% 유의성 있게 증가한 반면, Protopic 처리군과 SSC 처리군은 대조군에 비해 각각 49.8%, 19.9% 로 각각 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 9). B cell marker와 IgE 양성 세포수의 감소는 앞서 기술한 CD19+ 세포 비율 감소 결과와도 부합되는 결과이며, 배부 피부에서도 B220+/IgE+ 세포 비율은 Protopic 처리군과 SSC 처리군에서 대조군에 비해 각각 42.3%, 35.2% 로 유의적인 감소를 나타냄으로써 일관된 결과를 나타냈다(Fig. 11). 아울러 혈청 내 IgE 생성량 역시 감소하여 본 시료가 B 세포 활성화 억제 효능이 있음을 제시해주고 있다.

B 림프구가 체액성 면역의 매개자로서 기능한다면, T 림프구는 세포 내 미생물성 항원을 인식하며 이들 미생물 혹은 감염된 세포를 파괴하는 기능을 갖는 것으로 항원에 대한 제한된 특이성을 갖는다. 이들은 주조직적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC) 내 유전자에 의해 부호화되며 다른 세포의 표면에 발현되는 숙주단백질에 부착된 펩티드 항원만을 인식한다. 그 결과로 T 세포들은 수용성 항원이 아닌 세포 표면-결합 항원을 인식하고 반응한다⁶⁸).

실험 종료 후 DLN에서 T 림프구와 관련된 CD3+, CD8+, CD4+세포 비율을 보면 정상군에 비해 대조군에서 각각 13.0%, 37.8%, 26.3% 감소하였고, SSC 처리군에서는 대조군에 비해 각각 8.0%, 29.9%, 1.3% 증가하였는데(Fig. 4-6), 이 같은 변화는 김 등^{45,46})의 논문에서 보고된 결과와 동일하다. 활성화된 T 세포인 CD3+/CD69+ 세포 비율도 마찬가지로 정상군에 비해 대조군에서 43.6% 감소하였고, Protopic 처리군과 SSC 처리군에서 대조군에 비해 각각 51%, 31.8% 증가하였다(Fig. 7).

아토피피부염이 심화됨에 따라 T 세포가 활성화되고, 개선이 되면서 T 세포 비율이 감소할 것으로 추측되나, 실험 결과는

아토피피부염을 지속적으로 유발시킨 대조군에서 감소하였고, 시료 처리군에서 증가하였다. 게다가 정상군에서 이미 T 세포 비율이 증가하였기에 대조군과 시료 처리군의 세포 비율 변화는 유의미하다 할 수 있겠다.

CD3+는 T 림프구 항원 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달하는 기능을 하며, CD4+와 CD8+는 T 림프구 활성화에 중요한 분자들이다. 그러나 이 분자들은 항원을 직접 인식하는 역할은 없으며, MHC 분자를 감별하여 인식하는 기능을 가지고 있다. CD4+ 분자는 MHC 제I항원을 알아보고 작용하며 CD8+ 분자는 MHC 제II항원을 알아보고 작용한다. 다시 말하면 MHC 제I항원과 붙은 항원은 CD4 분자를 가진 T 림프구와 그리고 MHC 제II항원과 붙은 항원은 CD8 분자를 가진 T 림프구와 작용을 하게 된다⁹⁾.

조절 T 림프구는 CD4+ T 세포의 아부류로 면역반응을 억제하고 자가관용을 유지하는 역할을 하며, 대부분의 CD4+ 조절 T 세포는 높은 수준의 CD25를 발현하고 있다⁶⁸⁾. DLN 에서의 CD4+/CD25+세포 비율은 정상군에 비해 대조군에서 47% 유의성 있게 감소였으며, Protopic 처리군과 SSC 처리군에서는 대조군에 비해 46%, 34.5% 로 각각 증가하면서 면역반응 억제 효과를 나타냄으로써(Fig. 8), 본 시료의 면역 조절 효과를 확인할 수 있었다.

배부 피부에서 CCR3+ 세포 비율은 정상군에 비해 대조군에서 183.7% 증가한 반면, Protopic 처리군과 SSC 처리군에서 대조군에 비해 각각 55.3%, 40.0% 로 유의성 있게 감소하였다(Fig. 10). CCR3 수용체는 호산구, 호염기구 및 T 세포 등의 세포 표면에 존재하는 chemokine receptor 이며^{69,70)}, 연구 결과에 따른 CCR3+ 세포 비율의 감소는 하, 이^{46,71)} 등의 연구 결과와 마찬가지로 본 시료가 아토피피부염 억제에 효과적임을 시사해 주고 있다. Gr-1+/CD11b+ 세포는 정상군에 비해 대조군에서 229.2% 유의성 있게 증가하였으며, Protopic 처리군과 SSC 처리군에서 대조군에 비해 각각 48.3%, 36.2% 감소함으로써(Fig. 12), SSC 투여가 과립구의 염증 국소 유입과 관련 사이토카인 생성을 억제함을 알 수 있다.

혈청에서 검색한 IL-4, IL-5, IL-13 사이토카인 생성량은 정상군에 비해 대조군에서 각각 1469.3%, 1199.3%, 766.8% 로 유의성 있게 증가하였으나, SSC 처리군에서는 대조군에 비해 각각 66.0%, 49.6%, 63.3% 감소하였으며(Fig. 13-15), 비장세포에서 검색된 IL-4, IL-5 생성량 역시 정상군에 비해 대조군에서 각각 1174.4%, 866.7% 로 유의성 있는 증가를 나타내었으나, SSC 처리군에서는 대조군에 비해 34.0%, 52.4% 로 각각 유의성 있게 감소하였다(Fig. 18, 19).

앞서 언급했듯이 아토피 피부염의 특징 중 하나가 IL-4, IL-5, IL-13 사이토카인 발현 증가이다. 항체의 형성에는 T 림프구가 관여하고, T 림프구는 항체의 형성을 돕는 보조 T 세포(helper T cell)와 억제하는 억제 T 세포(suppressor T cell)가 있는데, 아토피피부염은 보조 T 세포가 주로 침윤된다. 보조 T 세포는 Th1 과 Th2 로 구분되며, Th1은 IL-2, IFN- γ 등의 사이토카인을 분비하여 세포내에 기생하는 미생물 감염을 막는 탐식작용

을 촉진하고, Th2는 IL-4, IL-5 등을 분비하여 IgE와 호산구 등에 의한 면역반응을 촉진하지만 Th1의 반응은 억제하는 작용을 한다. 아토피피부염의 면역학적 이상은 바로 이러한 Th1과 Th2 간의 불균형으로 이루어지며, Th2 세포가 우세하여 이에 대한 사이토카인이 증가되는 것이다⁷⁾.

Th2는 IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인을 주로 생산하는데, IL-4는 Th1 반응을 억제하고, B세포에서 IgE 생성과 Th2 세포로의 분화를 촉진시키며, IFN- γ 생성을 감소시켜 아토피피부염의 발병기전에 중요하게 작용한다^{7,72)}. IL-5는 호산구증다증에 관여하며, 심한 아토피피부염 환자에서 말초 호산구 증가가 관찰되므로 이는 병의 활성도와 연관하며, IL-13은 IL-4와 마찬가지로 B세포에서 IgE 생성을 유도한다⁷⁾.

TNF- α 는 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)로 그람 음성세균과 그 외의 감염균에 의한 급성 염증반응의 주된 매개자이며, 중증 감염의 전신적 합병증의 원인이 된다. TNF는 항원에 자극된 T 세포, NK 세포, 비만세포와 활성화된 단핵 포식세포에서 주로 분비되며, 감염 부위로 호중구와 단핵구의 보충을 촉진시키며, 이 세포들을 활성화시켜서 미생물을 제거하게 하는 것이다. 중증 감염에서, TNF는 많은 양이 생산되어 전신적인 임상적 그리고 병리학적 비정상을 야기시킨다⁶⁸⁾. 본 실험의 혈청과 비장세포에서 확인한 TNF- α 생성량은 대조군에서 정상군에 비해 각각 587.8%, 496.8% 씩 각각 유의성 있게 증가한 반면, SSC 처리군에서는 대조군에 비해 각각 52.1%, 31.6% 감소하였다(Fig. 16, 20).

아토피 발생에서 가장 중요한 역할을 담당하는 항체는 IgE이며, 특정 항원에 대한 IgE가 비만 세포(mast cell), 호염기구(basophil) 등과 결합한 상태로 존재하다가 원인 항원에 재차 노출 시 히스타민 등의 각종 화학 매체를 분비하여 아토피 질환이 발생한다^{73,74)}.

본 실험에서는 9주, 11주, 13주마다 각각 채혈하여 혈청을 분리하여 혈청 내 IgE 생성량을 측정하였는데, 대조군은 정상군에 비해 각각 183.1%, 132%, 61.1% 로 유의성 있게 증가하였으며, SSC 처리군은 9주와 11주째 30.7%, 25.3%로 유의성 있게 감소하였다(Fig. 17). 이 같은 결과는 아토피 피부염이 IL-4를 생산하는 2형 보조 T 세포 반응이 특징적이며, B세포에 의한 IgE 생산이 IL-4의 영향을 받는다는 것을 볼 때^{75,76)}, Fig. 18에서 확인된 IL-4 생성량의 감소 결과와도 부합된다.

이상의 결과로 보아 외용제인 천일염과 내치방인 청기해독산의 병용 투여는 아토피 동물 병태 모델에서 2형 보조 T 세포 반응 및 B 세포의 활성을 억제시킴으로써 아토피 부염을 개선에 효과적임을 확인할 수 있었다. 그러나 외치방과 내치방의 개별 투여 효과에 대한 상호 비교가 이루어지지 않아 상승효과를 판단할 수 없으나 전반적인 효능과 독성 부분에서 안전성은 임상에서 활용을 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

결론

天日鹽과 淸肌解毒散의 외·내치 병용(SSC) 치료 효과를 객

관적으로 규명하고자, AD와 유사 병태를 나타내는 NC/Nga 동물 병태 모델에서 다양한 면역 관련 인자들의 변화를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

SSC 투여군은 대조군에 비하여 아토피 피부염 임상지수를 40.2% 로 유의성 있게 감소시켰다. SSC 투여군은 대조군에 비하여 DLN 내의 CD19+는 15.6% 감소시켰고, B220+/IgE+ 는 19.9% 로 유의성 있게 감소시켰다. SSC 투여군은 대조군에 비하여 DLN 내의 CD3+, CD8+, CD4+, CD3+/CD69+, CD4+/CD25+ 면역 세포 비율을 각각 8.0%, 29.9%, 1.3%, 31.8%, 34.5% 씩 증가시켰다. SSC 투여군은 대조군에 비하여 배부 피부에서의 CCR3+, B220+/IgE+ 면역 세포 비율을 각각 40.0%, 35.2%로 유의성 있게 감소시켰으며, Gr-1+/CD11b+는 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다. SSC 투여군은 대조군에 비하여 비장세포 내 사이토카인인 IL-4, IL-5, TNF- α 생성량을 각각 34.0%, 52.4%, 31.6% 로 감소시켰다. SSC 투여군은 대조군에 비하여 혈청 내 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α 생성량을 각각 66.0%, 49.6%, 63.3%, 52.1% 로 감소시켰다. SSC 투여군은 대조군에 비하여 혈청 내 면역글로불린인 IgE 수치를 25.3% 로 감소시켰다.

이상의 실험 결과를 통하여 SSC의 면역조절 작용을 통한 항아토피 효능이 실험적으로 규명됨으로써 향후 지속적인 연구를 통해 아토피피부염 치료에 다양하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 특히 외치제로 사용된 천일염의 경우 피부 재생효과와 아토피 피부염 치료보조제 활용 등의 연구 결과가 이미 보고된 바가 있었으며, 추후에 천일염의 농도에 따른 효과 및 피부 자극성 등과 관련하여 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지정 대전대학교 난치성면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것임.

참고문헌

1. Sampson, H.A. Atopic dermatitis, *Ann Allergy*, 69(6):469-479, 1992.
2. 전남대학교 의과대학 면역 및 알레르기학 편찬위원회. 면역 및 알레르기학. 전남대학교출판부, 2006.
3. Daniels, J. and Harper, J. The epidemiology of atopic dermatitis, *Hosp Med*, 63(11):649-652, 2002.
4. 이지현 외. 아토피피부염학회 보고서: 한국 아토피피부염의 치료지침. *대한피부과학회지* 44(8):907-913, 2006.
5. McGrath, J.A. Filaggrin and the great epidermal barrier grief, *Australas J. Dermatol.*, 7(73):114-128, 2008.
6. 김의겸. phytosterol 유도체의 합성 및 아토피 억제 효과. 충남대학교대학원, 2009.
7. 안성구 외. 아토피 피부염. 퍼시픽출판사, 2007.
8. Van der Heijden, F.L., et al. Serum-IgE-facilitated allergen

- presentation in atopic disease, *J Immunol*, 150(8):3643-3650, 1993.
9. 김세중. 면역학. 고려의학, 1994.
10. 배병철 역. 今釋黃帝內經靈樞. 成輔社, p 360, 490, 1995.
11. 왕기 외. 黃帝內經素問今釋. 成輔社, p 117, 250, 440, 1979.
12. 가민 외. 中醫皮膚科臨床實踐. 貴州科學出版社, p 33, 2002.
13. 마소요. 實用中醫皮膚病學. 上海中醫藥大學出版社, 1999.
14. 진달인 외. 中醫外治法效方300. 科學技術文獻出版社, 2006.
15. 손사막. 千金翼方. 대성문화사, 1989.
16. 진실공. 外科正宗. 인민위생출판사, 1973.
17. 오겸. 醫宗金鑑. 大成文化社, 1991.
18. 공남미 외. 아토피피부염의 양·한방적 고찰. *대한외과과학회지* 12: 241-253, 1999.
19. 서선후 외. 皮膚病中醫診療學. 人民衛生出版社, p 254, 310, 316, 1995.
20. 이박감. 皮科證治概要. 人民衛生出版社, pp 47-48, 1999.
21. 이원문 외. 皮膚性病手冊. 人民衛生出版社, p 193, 2004.
22. 廖新華 외, 皮膚病驗方600首, 上海中醫藥大學出版社, pp 128-130, 2001.
23. 왕명혜 외. 皮膚病性病. 人民軍醫出版社, pp 91-92, 2004.
24. 한방병리학교재편찬위원회. 한방병리학. 한의문화사, pp 37-42, 52-58, 2008.
25. 홍성관. 白芍藥이 LPS로 誘發된 BV-2 미교세포의 炎症反應에 미치는 影響. 경원대학교대학원, 2005.
26. 송운용. 연교의 알레르기성 염증 반응 조절 효과. 원광대학교대학원, 2002.
27. 손대범. 大黃, 黃金, 黃柏 복합 추출물의 항균, 항염 및 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구. 원광대학교대학원, 2004.
28. 조형준. 桑白皮가 항알러지 및 항염증반응에 미치는 영향. 경희대학교대학원, 2005.
29. 고천성. Effects of Korean Solar Salt and Its Processed Salt Supplements on Liver Function and Biochemical Profiles in Rats with Liver injured by CCl4. 목포대학교대학원, 2005.
30. 정유정. 구운 소금의 항균 효과. 공주대학교대학원, 2009.
31. 정재천. 천일염 및 생물자원의 피부재생효과에 관한 연구. 목포대학교대학원, 2009.
32. 최성곤. 아토피 피부염 치료보조제로서의 사해 소금 효과에 관한 연구. 숙명여자대학교 원격대학원.
33. 楊志波 외. 皮膚病. 人民軍醫出版社, pp 109-133, 2007.
34. 손대범 외. 清肌散과 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga mice의 아토피 피부염에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 22(5):1168-1177, 2008.
35. Leung, D.Y. Atopy dermatitis: new insight and opportunities for therapeutic intervention, *J Allergy Clin Immunol.*, 105: 860-867, 2000.
36. 방숙현. 소아, 청소년 아토피 피부염에서 DPCP 면역요법의 치료효과. 이화여자대학교대학원, 2004.
37. 김룡국. (+)-decursin 유도체의 합성 및 그들의 아토피 피부염

- 억제효과 평가. 충남대학교대학원, 2009.
38. 정환수. 加味熱多寒少湯 투여후 아토피 피부염 환자의 임상상 변화에 대한 연구. 경희대학교대학원, 2002.
 39. 양성완. 수증 한약 처방이 아토피 피부염 환자의 SCORAD 및 Cytokine변화에 미치는 영향. 경희대학교대학원, 2004.
 40. DeBoer, D.J. Survey of intradermal skin testing practices in North America, *J Am Vet Med Assoc*, 195(10):1357-1363, 1989.
 41. Pike, A.J., et al. Development of Dermatophagoides pteronyssinus (Acari: Pyroglyphidae) at constant and simultaneously fluctuating temperature and humidity conditions, *J MedEntomol*, 42(3):266-269, 2005.
 42. 여의주. 아토피 피부염 동물 모델에서 아토피 크립과 紫雲膏의 병용도포가 피부염에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 2009.
 43. 홍철희. 溫清飲과 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. 원광대학교대학원, 2007.
 44. 송성필. 當歸飮子와 三黃洗劑加味方 併用이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. 원광대학교대학원, 2007.
 45. 김선빈. 아토피 피부염에 대한 황토가미방과 청삼가미방의 내외치 검용에 관한 연구. 대전대학교대학원, 2009.
 46. 하여태. 내외치 검용법의 아토피 피부염 활용에 관한 실험적 연구. 대전대학교대학원, 2009.
 47. 김창중 외. 천궁 엑스 및 분획의 소염 · 진통작용. *생약학회지* 27(3):282-288, 1996.
 48. 이도연 외. 강활과 방풍의 항염증 상승작용에 관한 연구. *대한본초학회지* 23(4):39-44, 2008.
 49. 조성기 외. 당귀 추출물이 생쥐 유래 대식세포의 일산화질소 생산에 미치는 영향. *생명자원과 산업*, 3: 1-8, 1999.
 50. 김대근 외. 박하의 항알레르기 활성. *생약학회지* 29(3):248-253, 1998.
 51. 김성윤 외. 연교 추출물의 Microglia에서 LPS에 의해 유도되는 염증매개물질 생성 억제 효과. *大韓本草學會誌* 23(3):93-102, 2008.
 52. 박성민 외. 대황 추출물의 항산화 활성 및 MMP-1 저해 활성. *생명과학회지* 18(12):1700-1704, 2008.
 53. 김명규 외. 黃芩이 사람 비만세포의 사이토카인 및 케모카인 분비에 미치는 영향. *大韓本草學會誌* 22(4):233-238, 2007.
 54. 임홍진 외. 마우스 모델을 이용한 상백피 추출물의 알러지성 천식 억제 효과. *한국전통의학지* 14(1):79-99, 2004.
 55. 김성수 외. 桔梗에 의한 알레르기 천식효과에 대한 연구. *大韓本草學會誌* 19(2):61-70, 2004.
 56. 김정례. Inhibitory effects of sea mineral water on the development of DNCB-induced atopic dermatitis-like skin lesions in hairless mice. *연세대학교대학원*, 2008.
 57. Matsumoto, M., et al. IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis, *J. Immunol.*, 162(2):1056-1063, 1999.
 58. Shiohara, T., Hayakawa, J. and Mizukawa, Y. Animal models for atopic dermatitis: are they relevant to human disease? *J. Dermatol. Sci.* 36(1):1-9, 2004.
 59. Jun-Won Yun 외 4인. Comparative Evaluation of Animal Models for Atopic Dermatitis in NC/Nga mice, *Lab. Anim. Res.* 24(1):59-66, 2008.
 60. Harada, D., et al. Analyses of a mouse model of the dermatitis caused by 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB)-repeated application, *Journal of dermatological science*, 37(3), 2005.
 61. Nasr, I.S., Topical tacrolimus in dermatology, *Clin Exp Dermatol.*, 25(3):250-254, 2000.
 62. Gupta, A.K., Adamiak, A., Chow, M. Tacrolimus: A review of its use for the management of dermatoses, *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 16: 100-114, 2002.
 63. Katoh, N., Hirano, S., Yasuno, H., Kishimoto, S. Effects of tacrolimus ointment on facial eruption, itch and scratching in patients with atopic dermatitis, *J Dermatol*, 34: 194-199, 2004.
 64. Hanifin, J.M., Ling, M.R., Langley, R., Breneman, D., Rafal, E. Tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in adult patients: part I, efficacy, *J Am Acad Dermatol*, 44: S28-38, 2001.
 65. Soter, N.A., Fleischer, A.B.Jr., Webster, G.F., Monroe, E., Lawrence, I. Tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in adult patients: part II, safety, *J Am Acad Dermatol*, 44(Suppl 1): S39-46, 2001.
 66. Kapp, A., Allen, B.R., Reitamo, S. Atopic dermatitis management with tacrolimus ointment (Protopic®), *J Dermatol Treat*, 14: 155-166, 2003.
 67. 黃昌夏. 魚腥草複合方이 NC/Nga mouse 아토피 병태 모델의 관련 면역 세포 및 IgE 생성량에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 2006.
 68. 세포분자면역학 교재연구회, 세포분자면역학 제6판, 이퍼블릭, 2008.
 69. White, J.R., et al. Cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine that binds to the CCR3 receptor and activates human eosinophils, *J Leukoc Biol.*, 62(5):667-675, 1997.
 70. Erin, E.M., Williams, T.J., Barnes, P.J., Hansel, T.T. Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease, *Curr Drug Target Inflamm Allergy*, 1(2):201-214, 2002.
 71. 李元求. 遺疹止痒湯의 NC/Nga 생쥐에 유발된 아토피 피부염 억제 효과와 免疫調節作用. 대전대학교대학원, 2008.
 72. 윤미숙. 호두추출물이 아토피 피부염에 미치는 영향. 대구가톨릭대학교대학원, 2009.
 73. Benhamou, M., Siraganian, R.P. Protein-tyrosine phosphorylation an essential component of Fc epsilon RI

- signaling, *Immunol Today*, 13: 195-197, 1992.
74. Sada, K., Zhang, J., Siraganian, R.P. Point mutation of a tyrosine in the linker region of Syk results in a gain of function, *J Immunol*, 164: 338-344, 2000.
75. Siraganian, R.P. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor, *Curr Opin Immunol*, 15(6):639-646, 2003.
76. Bruynzeel-Koomen, C., et al. The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in patients with atopic dermatitis, *Arch Dermatol Res*, 278(3):199-205, 1986.