

DNCB로 유발된 알레르기성 접촉피부염에 황련해독탕이 미치는 영향

김보애¹, 양재찬², 박찬익^{1*}

1: 대구한의대학교 화장품약리학과, 2: LG생활건강 화장품연구소

Effect of *Hwangryunhaedok-tang* Extracts on DNCB-induced Allergic Contact Dermatitis

Bo Ae Kim¹, Jae Chan Yang², Chan Ik Park^{1*}

1: Dep. of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University 2: Cosmetic R&D Institute, LG Household & Health Care

ABSTRACT

Objectives : HRHDT has been known as a useful prescription with antibiotic, anti-inflammatory, antioxidative and immunosuppressive activity. To evaluate anti-inflammatory effect of HRHDT, we treated HRHDT-skin in Balb/c mice model induced contact hypersensitivity.

Methods : Contact hypersensitivity, a local inflammatory response of skin, was induced by spreading the back skin of Balb/c mice with 1% DNCB. HRHDT-skin was prepared by dissolving 3% 1,3-butylene glycol extract of HRHDT in solution and treated 2 weeks on the back skin.

Results : HRHDT-skin significantly reduced TEWL and erythema by 0.4-1% of DNCB treatment compared with control group. HRHDT-skin reduced IgE on serum obtained from blood of DNCB-treated Balb/c mice. Histopathological examination showed that thickening of the epidermis, hyperkeratosis and the infiltration of inflammatory cells were found in Balb/c mice under conventional circumstances.

Conclusions : These results showed that HRHDT-skin could be used as a pharmaceutical material with antiinflammatory effects by reducing IgE in contact hypersensitivity dermatitis Balb/c mice by DNCB.

Key words : *Hwangryunhaedok-tang* (HRHDT), Contact hypersensitivity, Balb/c mice, DNCB, IgE, H&E stain

서 론

복잡한 사회 구조로 인한 스트레스, 식생활의 변화, 환경오염의 증가 등은 새로운 질병을 유발시키는 원인이 되어 과거와는 달리 알레르기, 고혈압, 당뇨병, 만성 스트레스 등과 연관되는 질병들이 현대인에게 흔히 발병되고 있다¹⁾. 특히 알레르기성 질환으로는 기관지 천식, 비염, 아토피성 피부염 그리고 알레르기성 결막염 등이 있는데, 산업의 발달 및 환경오염의 심화로 각종 면역과민성 질환을 유발시키는 인공화학 합성물질 즉 알레르겐(allergen)이 급증하는 것이 현실이다²⁾. 그리고 알레르기

유발 물질들은 주로 피부, 소화기 및 중추 신경계 등에 나타나며, 특히 피부과 질환 중에서 가장 많이 볼 수 있는데 화학물질, 약물, 식물 및 기타 자극물에 의한 피부의 알레르기성 반응으로 유발되는 것이 접촉피부염이다³⁾. 알레르기성 접촉피부염의 치료제로 부신피질 호르몬제 및 항히스타민제가 사용되고 있으나 이러한 치료제를 장기간 투여할 경우 여러 가지 부작용이 보고되고 있어 이에 대한 새로운 대체 물질이 필요한 실정이다. 특히 항알레르기제의 개발과 관련된 재료로서 천연재료인 약용식물이 우선적으로 선택되고 있다⁴⁾.

황련해독탕(黃蓮解毒湯)은 황련, 황금, 황백, 치자의

* 교신저자 : 박찬익, 경북 경산시 유곡동 290번지 대구한의대학교 화장품약리학과 화장품신제형연구실
· Tel : 053-819-1491 · E-mail : cipark@dhu.ac.kr
· 접수 : 2009년 2월 9일 · 수정 : 2009년 4월 1일 · 채택 : 2009년 6월 22일

복합처방으로 수년에 걸쳐 피부질환 임상에서 널리 사용되고 있으며, 지금까지의 연구를 살펴보면 항궤양 효과⁵⁾, 이노작용 및 혈압강하 효과⁶⁾, 그리고 항균 효과⁷⁾ 등이 보고된 바 있다. 피부와 관련하여서는 습진, 아토피성 피부염, 접촉피부염, 지루성 피부염 등에 주로 응용되고 있다. 황련에는 berberine⁸⁾, worenine 등의 각종 알칼로이드가 함유되어 항균 작용이 뛰어나며, 혈압을 저하시키고 담(痰)을 원활하게 하며 해열, 진정, 진통, 국소마비 등의 작용을 한다. 황금은 습사(濕邪)와 열사(濕熱邪)를 제거하고 해독, 지혈하는 효능을 가지며 체외에서도 각종 병원성 피부사상균을 억제하며 baicalin과 baicalein을 다량 함유하고 있어 항염증·항알레르기 작용을 하므로 알레르기성 천식을 완화한다. 황백 또한 berberine·phellodendrine 등의 각종 알칼로이드 이외에 obacunone·obaculactone 등이 함유되어 있다. 황백의 항균 작용은 황련과 같이 피부 진균 및 각종 병원성 세균을 억제하고 담(痰)을 순조롭게 하고 해열하는 작용이 있다. 이와 같이 황금, 황련, 황백은 공통적으로 성질이 차가워 청열, 해독의 기능을 가지므로 이들을 배합하여 사용하면 치료효과가 더 증강될 뿐 아니라 방부효과가 있다. 각종 화장품·목욕제품 등의 배합제로 쓰여 알레르기성 피부염과 각종 피부병을 예방·치료한다⁹⁾.

본 연구는 한의학에서 오래전부터 피부질환 치료제로 사용되어온 황련해독탕이 알레르기성 접촉피부염에 어떠한 영향을 끼치는지 알아보고자 하였다. 즉 알레르기 반응을 억제시키고 항산화·항염 효과 및 표피회복능에 효과가 있는 기능성 화장품 재료로 이용하기 위하여 본 연구를 수행하였으며, Balb/c mice를 1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)으로 인위적인 접촉피부염을 유발시킨 후 황련해독탕을 피부병변 부위에 도포하여 IgE 수준 변화, 표피회복능 등에 미치는 효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물의 사육

실험동물은 male Balb/c mice 7주령을 중앙실험동물 (SLC, Japan)로부터 공급받았으며, 실험군은 1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB: Aldrich, USA)를 도포하지 않은 정상 대조군(Normal군), DNCB 단독 도포군(Control군), DNCB와 황련해독탕 3% 추출물을 도포한 군(HRHDT ext.군), DNCB와 황련해독탕 3% 추출물이 함유된 로션제형을 도포한 군(HRHDT lotion군), Hydrocortisone을 1% 함유하는 로션제형을 도포한 군(Hydrocortisone 1%)으로 나누었다. 각 군에 6마리씩 분리하여 polycarbonate cage에 수용하고, 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 자유롭게 섭취시키면서 1주 동안 적응시킨 후 사용하였다. 이때 사육실의 조건은 온도가 21.4 ± 0.05°C,

습도는 61 ± 1%, 12시간 명 : 암 조건을 유지했다.

2. 시료의 제조

실험에 사용한 황련해독탕은 미원상사(주)로부터 공급받았으며 추출방법은 다음과 같다. 황금, 황련, 황백, 치자 1 : 1 : 1 : 1 비율에 1,3-butylene glycol을 용매로 하여 85°C에서 추출하였다. 용매 5 L와 황련해독탕 처방 4 kg 기준으로 최종 추출물의 수득 무게는 3.5 kg이었다. 황련해독탕은 3%의 농도로 제조하였으며, 로션제형의 처방(Table 1)과 제조방법(Fig. 1)은 아래와 같다. 접촉피부염이 유발된 Balb/c mice의 귀 뒤쪽과 등 부위에 100 μl씩 2주 동안 마이크로 피펫 팁의 뒤쪽을 이용하여 골고루 도포하였다.

Table 1. The Experimental Formulation of the Lotion Containing HRHDT Extract

Chemical name	함량 (%)
Stearic acid	1.0
Cetanol	1.9
Isopropyl myristate	7.0
Olive oil	2.0
Glyceryl monostearate	2.5
Polysorbate 20	0.7
Propylene glycol	6.0
Triethanol amine	0.7
Hydroxyethyl cellulose	0.1
Water	75.1
HRHDT extract	3

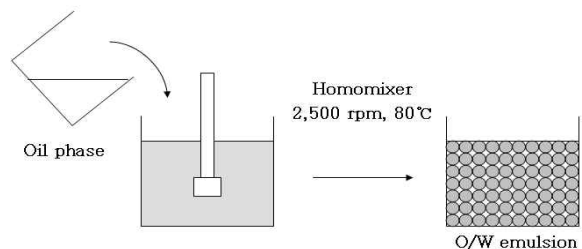
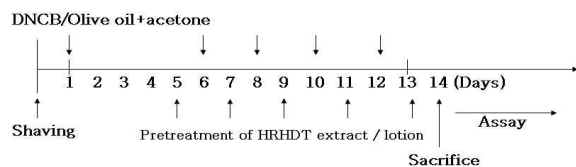


Fig. 1. Schematic diagram for the preparation of O/W emulsion

3. 피부염 유도 및 시료처리

접촉피부염을 유발하기 위해 우선 8주령이 된 Balb/c mice의 등 부위를 깨끗하게 제모 하였다. 제모 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였고, DNCB의 침투력을 높이기 위해 4% SDS (sodium dodecyl sulfate) 수용액을 마이크로 피펫 뒤쪽을 이용하여 등 부위, 귀 뒤쪽 부분에 균일하게 도포하고 2-3시간 자연건조시킨다. 본 실험에 사용된 DNCB는 아세톤과 올리브오일이 3 : 1로 혼합된 용액을 1%로 희석한 다음 사용되었다. 제조된 DNCB 용액 100 μl를 등 부위에 도포하였고 4일 동안 면역반응을 유발한 후, 다시 1% DNCB 용액 100 μl를 등

부위에 도포하여 접촉피부염을 유발하였다(Scheme 1). DNCB군과 HRHDT+DNCB군에서의 접촉피부염 유발 여부는 직접 육안으로 확인 할 수 있었다.



Scheme 1. Experimental design

4. 시료의 채취

채혈은 Balb/c mice를 12시간 절식시킨 다음 에테르로 마취시킨 후 복부를 개복하여 헤파린이 도포된 주사기를 이용해 심장으로부터 혈액을 채취한 후 원심분리(2,000 rpm, 20분, 4°C)하여 혈청을 분리하고, 분석 전까지 -70°C에 보관하였다. 혈액을 채취한 후 즉시 피부조직은 등 주변의 환부를 중심으로 $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ 넓이로 생검하여 10% 포르말데히드 용액에 고정한 후 염색 전까지 4°C에 보관하였다.

5. 피부조직 병리검사

실험 종료 후에, 등쪽 목부위의 피부를 적출하여 10% paraformaldehyde에서 24시간 동안 포르말린에 고정하였다. 그 조직을 파라핀으로 포매하였고 $5 \mu\text{m}$ 두께로 block

을 만들었다. 그 조직은 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils, eosinophil 그 외 다른 세포와 부종을 식별할 수 있는 haematoxylin-eosin 염색법을 이용하여 조직 염색을 했고, 광학현미경상에서 100배의 배율로 피부의 전반적인 상태를 관찰하였다.

6. Serum IgE 수준측정

혈중 IgE 수준은 Mouse IgE ELISA kit (Shibayagi Co, Shibukawa, Japan)를 사용하여 종합면역분석기 (Wallac OY, Turku, Finland) 450 nm에서 측정하였다.

7. 통계처리

결과 통계처리는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 평균치간의 유의성은 Student's T-test를 이용한 후 p값이 0.05미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 황련해독탕이 피부조직 변화에 미치는 영향

DNCB를 단독으로 처치한 Control군의 귀 등쪽 목 부위에 skin lesions, erythema, erosion, skin dryness가 HRHDT군, Hydrocortisone군에 비해 심화된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 실험 종료 후 등쪽 목부위 피부를

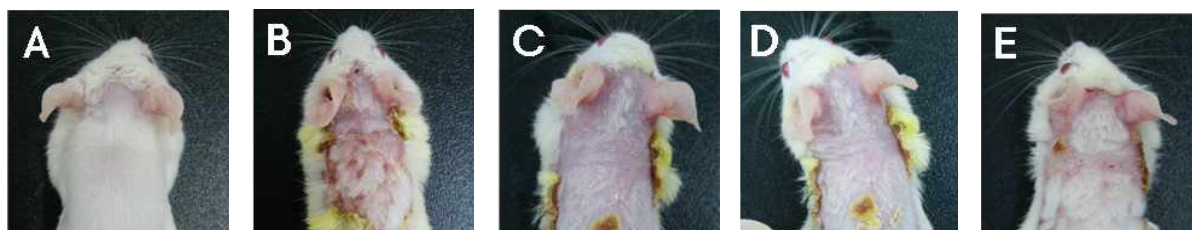


Fig. 2. Clinical skin features of back skin in BALB/c mice

Balb/c mice skin Normal group (A), and Control group (B). NC/Nga mice (C)(D) followed by the epicutaneous application of $100 \mu\text{l}$ of 3% HRHDT solution and lotion for 3 weeks. Normal (A), Control is only DNCB treatment (B), DNCB+HRHDT extract 3% solution (C), DNCB+HRHDT extract 3% lotion (D), Hydrocortisone 1% (E).

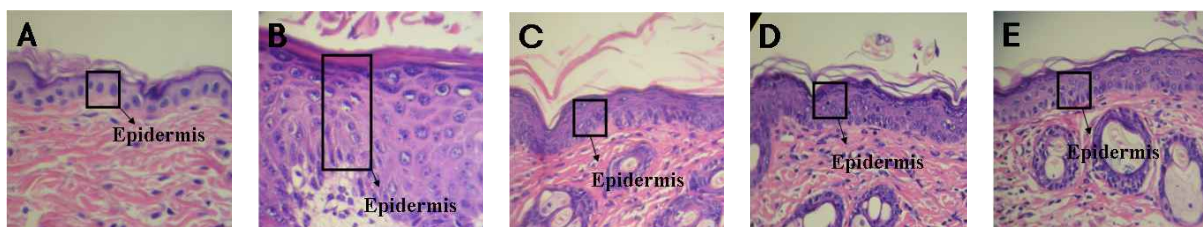


Fig. 3. Histologic features of skin lesion in Balb/c mice

Balb/c mice skin Normal group (A), and Control group (B). NC/Nga mice (C)(D) followed by the epicutaneous application of $100 \mu\text{l}$ of 3% HRHDT solution and lotion for 3 weeks. Normal (A), Control is only DNCB treatment (B), DNCB+HRHDT extract 3% solution (C), DNCB+HRHDT extract 3% lotion (D), Hydrocortisone 1% (E).

Mice skin biopsy were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Bright microscop (Nikon, Japan, Magnification, $\times 100$).

박리한 후 H&E 염색법을 이용하여 피부 조직을 분석한 결과, Normal군은 epidermis, dermis, baseline이 $\times 100$ 에서 관찰되었고, DNCB로 피부염을 유발한 Control군은 epidermis가 dermis쪽으로 두껍게 내려가 현저하게 확장된 피부손상을 나타내는 것으로 보아 발진이 많이 진행된 것을 확인할 수 있었으며 백혈구의 침윤도 관찰되었다.

DNCB로 접촉피부염을 유발한 후 황련해독탕을 처리한 HRHDT군 (C)와 (D)는 Control군 (B)에 비해 epidermis의 두께도 현저히 줄었고, 부종이 많이 사라진 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

2. 황련해독탕이 혈청 IgE 농도에 미치는 영향

혈청 IgE 수준은 ELISA에서 450nm로 측정하였으며 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. Normal군, Control군, HRHDT ext.군, HRHDT lotion, Hydrocortisone군에서 각각 0.48 \pm 0.38, 27.80 \pm 8.16, 16.29 \pm 3.92, 12.37 \pm 6.54, 4.95 \pm 3.23 (ng/ml)으로 Normal군에 비해 Control군에서 유의하게 증가하였으며, HRHDT 추출물을 포함하는 군에서는 Control군에 비해 정상군의 수준으로 유의하게 감소하였다.

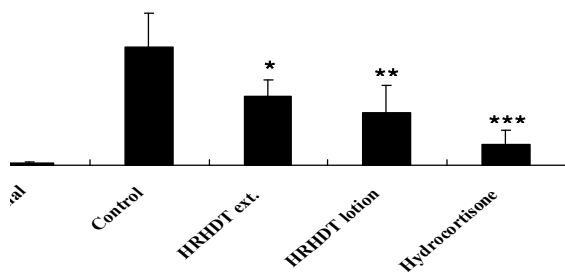


Fig. 4. The effects of HRHDT on IgE levels in serum BALB/c mice Normal group, and Control group. BALB/c mice followed by the epicutaneous application of 100 μ l of 3% HRHDT solution and lotion for 2 weeks. Normal (-), Control (DNCB), HRHDT ext. (DNCB and HRHDT extract 3% solution), HRHDT Lotion (DNCB and HRHDT 3% lotion), Hydrocortisone (1%). Statistically significant value compared with BALB/c mice group data by T-test (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

고찰

알레르기성 접촉피부염은 환경이나 직업적 건강과 관련된 질환의 하나로 수많은 화학물질 및 천연물이 항원으로 작용하여 피부감작(skin sensitization)을 일으킬 수 있다. 피부감작 단계로서 피부 면역 반응을 일으키기에 충분한 양의 항원물질들이 감수성이 있는 사람에게 국소적으로 노출됨으로써 일어나게 된다. 그 다음으로 감작되어 있는 개체가 이전에 노출된 부위 또는 그 밖의 다른 부위에 반복적으로 항원에 노출되게 되면 노출되는 순간에 더욱 강력한 면역 반응이 발생된다. 이 과정을 통하여

흔히 알레르기성 접촉피부염이라는 피부염증 반응이 일어나게 된다¹⁰. 피부 알레르기 반응은 면역 글로블린이 항원과 반응하여 방출하는 화학전달 물질이나 T 임파구에 의한 각종 화합물에 의해 혈관의 확장, 모세혈관의 투과성 항진, 점액의 증가 및 점막의 부종과 염증들을 유발시킨다¹¹. 접촉피부염 환자는 TH2 세포가 강력히 관련되어 있으며 IgE의 증가와 연관된다. 또한 피부조직에서는 탈과립화가 일어나는 비만 세포와 호산수가 피부 조직에 다수 침윤되며 표피의 과각질화가 관찰된다는 보고가 있다^{12,13}. 알레르기성 피부염 환자에서는 피부 표면의 수분증발이 증가되어서 항원의 침투가 용이해지므로 피부의 과민 반응이 더욱 심화되어 세라마이드에 결합하는 매트릭스 구조 단백질에 의해 형성되는 피부장벽을 약화시킴으로 감염과 염증에 대한 감수성이 높아지게 된다¹⁴. 면역반응에 의한 피부염의 치료를 위해서는 자극을 일으키는 항원을 제거하는 것이 가장 좋은 방법이지만, 특이적 항원을 알 수 없는 경우도 많기 때문에 적절한 조치를 취해야 한다. 보습제와 피부상재균을 제거하기 위한 항생제가 사용되고 국소적으로는 스테로이드 제제를 사용하는데 장기간 사용에 대한 안전성 문제는 아직도 해결되지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 한의학에서 피부질환에 축적된 임상결과를 가진 황련해독탕의 알레르기성 접촉피부염 치료 보조제로서의 효능을 검증하고자 BALB/c mice를 이용하여 IgE 수준, 피부조직 관찰과 관련하여 피부개선 효능을 조사하였다.

본 연구 결과에서 DNCB로 알레르기성 접촉피부염 질환을 유발한 Control군은, 인위적 피부질환을 유발하지 않은 Normal군에 비교하여 약 20배 이상 유의성 있게 IgE의 수준을 증가시켰으며, 황련해독탕 3% 추출물을 처리한 실험군에서는 Control군에 비하여 약 1.5배 이상 IgE 수준이 감소하였고, 황련해독탕 3%를 함유한 로션을 처리한 실험군에서는 Control군에 비하여 약 2배 이상 유의성 있는 IgE 수준 감소 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 황련해독탕이 혈액 내의 IgE 수준 감소에 관여함을 시사하는 동시에 알레르기성 접촉피부염 환자에서의 면역 염증반응을 감소시켜 피부의 과민반응 감소 효과가 기대된다.

등쪽 목부위 피부를 박리한 후 H&E 염색법을 이용하여 피부조직을 분석한 결과, DNCB로 피부염을 유발한 Control군은 표피두께가 증가하고, 표피가 진피쪽으로 두껍게 내려가 현저하게 확장된 피부손상을 나타내는 것으로 보아 발진이 많이 진행된 것을 확인할 수 있었으며 백혈구의 침윤도 관찰되었다. DNCB와 황련해독탕을 함께 처리한 HRHDT extract 3% solution군과 HRHDT extract 3% lotion군은 DNCB를 단독처리한 Control군에 비해 표피두께도 현저히 줄었고, 부종이 많이 사라진 것을 관찰할 수 있었다.

황련해독탕의 치료로 아토피 피부질환이 유발된 BALB/c mice의 혈액 내 IgE 농도감소, 피부조직 손상의 감소, 피

부표피각화증의 완화효과가 나타났다. 이러한 결과는 황련해독탕이 DNCB로 알레르기성 접촉피부염이 유발된 Balb/c mice의 피부질환에 긍정적인 유용성을 시사하며 더 나아가 접촉피부염에 효과적인 응용이 기대된다.

결론

DNCB로 유발된 접촉피부염 질환에 대한 황련해독탕에 대한 효과를 알아보기 위하여 H&E 피부조직염색, IgE 수준 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 피부 조직 표변 검사상 황련해독탕을 처리한 군은 시간이 경과함에 따라 정상군에 비해 각질층의 재생이 증가하였다.
2. 황련해독탕을 처리한 실험군에서는 단독 DNCB를 처리한 Control군에 비교하여 유의한 IgE의 감소를 유도하였다.
3. 황련해독탕을 처리한 실험군에서는 단독 DNCB를 처리한 Control군에 비교하여 유의한 피부표피각화증의 완화효과를 유도하였다.

참고문헌

1. Kim MH, Kim MC, Park JS, Kim JW, Lee JO. The antioxidative effects of the water-soluble extracts of plants used as tea materials. *Korean J Food Sci Technol.* 2001 ; 33 : 12-8.
2. Kang SY, Hue SH, Kim SI. Immunologic aspects of hypersensitivity disease in Korea. *Seoul J Medicine.* 1978 ; 19 : 12-8.
3. Chio KU, Paek DM. Asthma and air pollution in Korea. *Korean J Epidermiology.* 1995 ; 17 : 64-75.
4. Tasaka K. Antiallergic drugs. *Drugs of Today.* 1986 ; 22 : 101-33.
5. 안중환, 최은영, 이성환, 박인식, 임성우. 황련해독탕이 DDS로 유발된 흰쥐의 케양성 대장염에 미치는 영향. *대한한의학회지.* 2006 ; 27(2) : 182-95.
6. 국윤범. 황련해독탕이 자발적 고혈압 백서의 혈압 및 신장 기능에 미치는 영향. *대한한의학방제학회지.* 2002 ; 10(1) : 113-29.
7. 서형식. 소염약침액, 황련해독탕, 황련이 staphylococcus epidermidis에 미치는 항균효과에 대한 실험적 연구. *한방안이비인후피부과학회지.* 2006 ; 10(2) : 19-25.
8. 양재현, 은재순, 이남희. 베르베린 제제의 생체이용율에 관한 연구 (II): 황련과 감초 공침물의 항균 효과 및 생체이용율. *약제학회지.* 1995 ; 25(3) : 185-92.
9. 주영승, 김기연, 장성환. *미용동의보감.* 서울 : 성보사. 2004 ; 140-3.
10. Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Dearman RJ. Allergic contact dermatitis. *Immunopharmacol.* 2002 ; 2(2-3) : 201-11.
11. Ishizaka K. Regulation of IgE synthesis. *Annu Rev Immunol.* 1984 ; 2 : 159-82.
12. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol.* 1997 ; 9 : 461-6.
13. Vestergaard C, Yoneyama H, Murai M, Nakamura K, Tamaki K, Terashima Y, Imai T, Yoshie O, Irimura T, Mizutani H, Matsushima K. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest.* 1999 ; 104 : 1097-105.
14. Sator PG, Schmidt JB, Honnigsmann H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad dermatol.* 2003 ; 48 : 352-8.