

# 아토피피부염 동물 병태 모델에서 石紫解肌湯의 면역조절작용에 관한 연구

이병웅 · 김선빈<sup>1</sup> · 송향희<sup>2</sup> · 지중구<sup>3</sup> · 박지원<sup>1</sup> · 김동희\*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 대전대학교 난치성면역질환의동서생명의학연구소센터,  
2: 벽성대학 헬스스킨케어과, 3: 중부대학교 한방건강관리학과

## Study on the Immune Modulatory Activity of Seokjahaeki-tang Using Atopic Dermatitis Animal Models

Byung Woong Lee, Seon Bin Gim<sup>1</sup>, Hyang Hee Song<sup>2</sup>, Joong-Gu Ji<sup>3</sup>, Ji won Bak<sup>1</sup>, Dong Hee Kim\*

*Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University,  
1: Traditional and Biomedical Research Center(TBRC), Daejeon University,  
2: Department of Health Skincare, Byuksung College, 3: Department of Oriental Health Care, Joongbu University*

In order to evaluate the efficacy of SHT against atopic dermatitis (AD), various immune related cytokines as well as histological comparison were performed in animal models, and the results are described. Clinical skin index of the SHT treated group decreased significantly in weeks 11 and 13, compared to the control group. Also, CD4+ immune cell ratio in the dorsal skin was significantly decreased to 69%, and both epidermal and dermal skin thickness was decreased. Serum IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, and TNF- $\alpha$ , which are all important markers of inflammation, were decreased to 64%, 44%, 87%, 48%, and 45%, respectively. The expression of histamine, a chemical transmitter increasingly released during the progression of inflammation, was significantly decreased to 47%. The production of IgE immunoglobulin was significantly decreased to 16% compared to the control group. In conclusion, SHT pacifies the activation of T cells, leading to suppression of both Th2 cytokine overexpression and infiltration of immune cells into skin. As a result, relative thinning of both epidermis and dermis were observed. With the results obtained from in vitro studies, the immune modulatory effect of SHT in AD animal models was experimentally demonstrated. This study should provide solid information to construct EBM and for clinical practice.

Key words : Atopic dermatitis(AD), Seokjagaeki-tang, Animal model, Cytokines, Immune cell, Clinical skin index

### 서 론

아토피 피부염은 알레르기성 질환 중 대표적인 난치성 질환으로 지속적인 소양증을 일으키는 피부 표층의 염증을 뜻한다<sup>1)</sup>. 일반적으로 피부 건조, 가려움, 염증을 동반한 천식, 알레르기성 비염, 아토피성 습진에 대한 개인 그리고 가족력과 밀접한 관련을 맺고 있다<sup>2,3)</sup>. 대부분 유전학적인 요인에 의하여 발병하지만 도시화에 따른 식이습관 변화 및 공해, 피부건조, 집먼지 진드기, 동물의 털과 분비물 등 다양한 환경적인 요인들이 유발 물질로

서 작용하기도 한다<sup>1-4)</sup>.

피부염의 종류에 따라 다양한 위험인자가 존재하나, 각 질환에 있어 유전적인 원인은 공통의 원인으로 작용한다. 아토피 피부염에 있어 Th2 면역 소인은 가장 큰 위험 인자로 피부염 환자의 혈청 내 IgE level을 높이는데 영향을 미친다<sup>5)</sup>. 면역학적 기전을 살펴보면, 항원에 의해 Th1 과 Th2 cytokines 사이의 균형이 깨지고 되고, 과잉 생산된 Th2 cytokine인 IL-4, 5, 9, 13이 B cell을 자극하여 면역글로블린 E (IgE)를 증가시킨다<sup>6)</sup>. 증가된 IgE는 비만세포 (mast cell) 표면의 Fc $\epsilon$ RI 수용체에 결합을 하며 (cross-linked), 알레르겐이 다시 인체에 침투하는 경우, 이 알레르겐과 위 Fc $\epsilon$ RI 수용체에 붙은 allergen-specific IgE가 결합해 비만세포를 감작시켜서, 이 세포 내에 저장되어 있는 히스타민

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

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

· 접수 : 2012/07/10 · 수정 : 2012/08/17 · 채택 : 2012/08/20

등의 화학물질들을 분비시키는데, 이러한 화학물질들이 혈관과 피부를 자극하여 피부에 붉은 반점과 부종 그리고 가려움증을 일으키며, 아토피 피부염을 유발하거나 악화시킨다. 결국 아토피 피부염의 가장 큰 특징 중의 하나는 정상인에 비해 serum내에 IgE 레벨이 높은 것인데, 이 때문에 IgE는 아토피 피부염의 표식자 역할을 한다고 알려져 있다<sup>7,8)</sup>.

대부분의 아토피 피부염 환자의 치료에 있어 국소 요법이 주로 사용되고 있으나 좋은 효능에도 불구하고 부작용으로 인하여 임상적으로 한계를 지니고 있다<sup>9,10)</sup>. 현재 사용 중인 아토피 피부염 치료제들은 대부분 외용제 중심의 증상 완화제들이며, 심각한 전신성 질환 치료제의 경우 독성 (부작용)이 발현되고 고가로 인해 장기간 사용하기 어려워 특히 빈번하게 발생하고 있는 소아나 유아에 있어 최적 치료제가 없는 실정이다<sup>9-12)</sup>.

한의학에서도 아토피피부염은 현대 의학이 해결하여야 할 난치성 질환으로 인식되면서부터 많은 관심의 대상이 되었다. 특히 면역학적 조절 장애로 인지되고 있는 질병의 특성상 단순 피부과적인 이해와 더불어 유기체적인 접근 방식이 필요하다는 점에서 이에 대한 다양한 논의가 이루어져 왔다<sup>13-15)</sup>.

병인, 병증, 및 부위론적 관점에서 유사 범주에 속하는 다양한 증상에 활용되는 처방 및 약제에 대한 역대 문헌 검색이 이루어졌고, 이를 중심으로 현대적인 실험 기법을 통하여 이에 대한 유용성을 규명함과 동시에 최적 치료제 개발을 위한 노력이 진행되어 왔다<sup>13-17)</sup>. 아울러 변증사치 임상 과정에서 유의적인 결과가 도출된 임상방에 대한 객관적인 효능 규명을 통한 EBM 구축 노력도 꾸준히 진행되어 왔다<sup>18,19)</sup>. 결과적으로 실험과 임상 연구의 이원화된 노력을 통하여 과거에 비하여 유의적인 효능이 보고되고 있으나, 병리의 복잡성으로 인하여 치료율의 한계는 여전히 존재하고 있다.

본 연구는 지속적인 EBM 구축을 위한 노력으로 현재 in vitro에서 항산화 및 항염증이 효능이 확인된 石紫解肌湯(SHT)<sup>20)</sup>을 아토피 피부염 동물병태 모델에 투여한 후 피부염지수 및 여러 면역세포 내 염증성 인자에 미치는 영향 등을 검색하여 객관적으로 검증된 기초 자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

실험 동물인 수컷 6주령의 NC/Nga Mice는 중앙실험동물에서 공급 받아 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가 삼양사료 Co., Korea)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2℃, 습도 55 ± 15%, 12시간-12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 대전대학교 동물실험윤리위원회 (IACUC : Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받았다.

#### 2) 약물

본 실험에 사용한 石紫解肌湯 (Seokjahaeki-tang ; 이하 SHT)의 구성 약제들은 대전대학교 난치성면역질환의 동서생명

과학연구센터 (TBRC)에서 구입하여 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량 (1첩)은 다음과 같다.

Table 1. The Composition of Seokjahaekitang (SHT)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
荊芥	Schizonepetae Spica	4
連翹	Forsythiae Fructus	4
防風	Saposhnikovia Radix	4
柴胡	Bupleuri Radix	4
枳殼	Aurantii Fructus	4
黃芩	Scutellariae Radix	4
梔子	Gardeniae Fructus	4
白芷	Angelicae Dahuricae Radix	4
桔梗	Platycodi Radix	4
生地黃	Rehmanniae Radix	8
牡丹皮	Moutan Cortex Radicis	8
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	8
石膏	Gypsum	28
魚腥草	Houttuyniae Herba	10
紫草	Lithospermi Radix	10
Total		108

### 3) 시약

실험에 사용된 시약 중 collagenase, RBC lysis solution, acetone, olive oil, trypan-EDTA, acetic acid, tris-base, tris-HCl, paraformaldehyde, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), dexamethasone 등은 Sigma (USA)사 제품을 사용하였고, 2, 4, 6-trinitrochlorobenzene (TNCB)는 동아제약 (Korea) 제품을, anti-CD4-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-Gr-1-PE은 BD-Pharmingen (USA)사 제품을, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF-α Milliplex panel은 Millipore (USA)사 제품을, Histamine ELISA kit는 Biosource (USA)사 제품을, IgG1 ELISA kit는 Bethyl Laboratories (USA)사 제품을, IgE ELISA kit는 Shibayagi (Japan)사 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

### 4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 CO<sub>2</sub> incubator (Sanyo Co, Japan), autoclave, deep-freezer (Nihon Co, Japan), clean bench, water bath, vortex mixer, heating block, Ice Flaker Machine (Icematic Co, Italy), plate shaker (Lab-line Co, USA), flow cytometer (Becton Dickinson, USA), centrifuge (Hanil Co, Korea), 48well microchamber (Neuroprobe, Gaithersburg, MD, USA), ELISA reader (Molecular Devices, Co, USA), Luminex (Millipore, Co, USA), fluorescence contrast microscope (Nikon, Japan) 등을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 시료

시료 추출 방법은 SHT 2첩을 한약 유출기에 넣고, 증류수 1200 ml과 같이 혼합하여 3시간 열탕하여 추출한 후 흡입 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 SHT를 분리한 후, 다시 동결 건조기에서 24시간 동결 건조하여 분말 18.7 g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80℃)에서 보관하면

서, 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) 피부염 유도 및 시료 처리

7 주령이 된 NC/Nga 생쥐의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후 제모가 끝나면 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 1% TNCB 용액 (아세톤 : 올리브 오일 = 3 : 1) 200  $\mu$ l를 등 부위에 도포하고, 4일 후 0.4% TNCB 용액 150  $\mu$ l를 다시 도포하였으며, 2일 후 부터는 1주일 3번씩 0.4% TNCB 용액 150  $\mu$ l를 3주간 등 부위에 도포하였다. 실험은 4개의 군으로 나누었으며 정상군, 대조군에는 증류수를, 양성대조군인 dexamethasone (이하, Dexa) 투여군은 100 mg/kg 농도로, 실험군인 SHT 투여군은 3.7 mg/25 g/day 농도로 3주간 경구 투여 하였다.

3) 관능 평가

약물 처리 후 3주, 4주, 5주 때에 아토피성 피부염에서 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) 등으로 5가지이다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였다.

4) 면역세포 분리

(1) 배부 피부조직 면역세포 분리

실험 종료 후 TNCB로 유발된 NC/Nga 생쥐에서 일정량의 배부 피부 조직을 잘게 chopping 한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37°C shaker (140 rpm, 20 min) 배양기에서 배양하여 상청액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이들 세포들에 ACK 용액 (8.3 g NH<sub>4</sub>Cl, 1 g KHCO<sub>3</sub> in 1 L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 cell strainer를 통과시킨 세포를 유세포 분석에 사용하였다.

5) 형광 유세포 분석

분리한 세포를 5 × 10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 조정된 후 4°C에서 면역형광염색을 실시하였다. 각각에 anti-CD4-FITC 를 넣고 30분간 얼음에서 반응시킨 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세하고 flow cytometry로 분석하였다.

6) 혈청 내 사이토카인 및 면역 글로블린 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-6, -13, TNF- $\alpha$  농도는 custom-made 6-plex cytokine Milliplex panel을, histamine 농도는 ELISA kit를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. Well에 혈청 25  $\mu$ l씩 분주하고 assay buffer 및 matrix buffer, antibody-immobilized beads를 각 25  $\mu$ l씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 실온에서 반응시키고 washing buffer를 이용하여 2회 세척하였다. 이를 다시 25  $\mu$ l의 detection antibody를 가하여 1시간 동안 실온에서 암소 반응시키고 추가로 25  $\mu$ l의 Streptavidin-Phycoerythrin을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 washing buffer를 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 PBS를 150 $\mu$ l 넣고 5분간 shaking한 후 Luminex를 이용하여 측정하였다. IgE 생성량의 측정은 ELISA kit을 이용하여 다음과 같

이 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  $\mu$ l씩 분주하였다. 이를 1시간 동안 실온에서 방치하고 washing 완충 용액으로 2회 세척한 다음, avidin-HRP conjugated antibody 100  $\mu$ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB substrate를 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 다음 50  $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 조직검사

실험 종료 후에, 배부의 피부를 떼어내어 10% formaldehyde에서 24시간 고정하였다. 고정이 끝난 조직을 파라핀으로 포매하였고, 5  $\mu$ m 두께로 block을 만들었다. 이를 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils/eosinophils 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline /eosin (H&E) 염색과 비만세포 (Mast cells)를 염색하는 toluidine blue 염색을 실시하여 조직 내 비만세포의 침윤을 관찰하였다

3. 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 3주간 도포하여 피부염을 유발시키면서 실험군인 SHT를 3주간 도포하였다. 피부염 지수는 아토피 피부염을 유발한 후 최종 3주 후에 피부염의 심화 정도를 관능적 방법에 의하여 측정된 결과로, 대조군은 7.0  $\pm$  0.4, Dexa 투여군은 2.4  $\pm$  0.5, SHT 투여군은 4.3  $\pm$  0.3으로 대조군에 비해 모두 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 1)

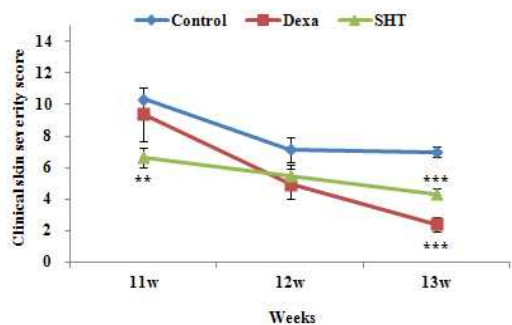


Fig. 1. Effects of SHT on clinical skin features and severity in TNCB-induced NC/Nga mice. Clinical skin index of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate), 3 (severe) for each of five signs and symptoms (Erythema, Pruritus & Dry skin, Edema & Hematoma, Excoriation, Lichenification); Symptoms were evaluated by skin dryness, eruption and wound on the three parts of the body; ear, face and back. The results represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with Control group by student's t-test (\*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.001)

2. 背部 피부(Dorsal Skin)내 CD4+ 세포에 미치는 영향

SHT 투여 종료 후에 背部 피부 내 면역세포를 측정된 결과, 정상군은  $3.5 \pm 1.9 (\times 10^5 \text{ cells})$ , 대조군은  $26.0 \pm 0.8 (\times 10^5 \text{ cells})$ 로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ( $++$ ,  $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은  $15.3 \pm 3.0 (\times 10^5 \text{ cells})$ , SHT 투여군은  $8.0 \pm 0.9 (\times 10^5 \text{ cells})$ 로, SHT 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있 ( $**$ ,  $p < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 2).

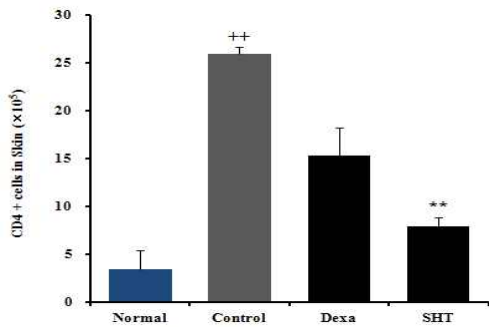


Fig. 2. Effect of SHT on CD4+ cell count of Skin in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of SHT for 3 weeks. At the end of the experiment, the cells from Skin stained with anti-CD4 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results were represented by 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 ( $**$ ,  $p < 0.01$ ).

3. 혈청 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-4 생성량에 미치는 영향

SHT 투여 종료 후에 혈청 내 사이토카인을 측정된 결과, 정상군은  $9.0 \pm 0.6$  (MFI), 대조군은  $22.0 \pm 2.7$  (MFI)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ( $++$ ,  $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은  $13.8 \pm 0.6$  (MFI), SHT 투여군은  $8.0 \pm 0.6$  (MFI)으로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $*$ ,  $p < 0.05$ ) 감소하였다(Fig. 3).

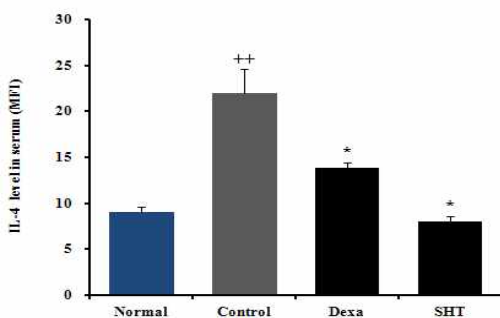


Fig. 3. Effect of SHT on the level of IL-4 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IL-4 were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The results were represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant 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

SHT 투여 종료 후에 혈청 내 사이토카인을 측정된 결과, 정상군은  $6.5 \pm 1.0$  (MFI), 대조군은  $16.5 \pm 1.3$  (MFI)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ( $++$ ,  $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은  $7.8 \pm 0.6$  (MFI), SHT 투여군은  $9.3 \pm 1.4$  (MFI)로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $**$ ,  $p < 0.01$ ,  $*$ ,  $p < 0.05$ ) 감소하였다(Fig. 4).

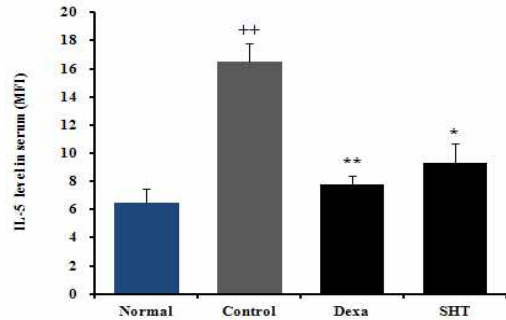


Fig. 4. Effect of SHT on the level of IL-5 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IL-5 were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The results were represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant 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 ( $*$ ,  $p < 0.05$ ,  $**$ ,  $p < 0.01$ ).

3) IL-6 생성량에 미치는 영향

SHT 투여 종료 후에 혈청 내 사이토카인을 측정된 결과, 정상군은  $104.5 \pm 9.0$  (MFI), 대조군은  $448.3 \pm 26.9$  (MFI)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ( $+++$ ,  $p < 0.001$ ) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은  $168.5 \pm 12.9$  (MFI), SHT 투여군은  $59.3 \pm 6.9$  (MFI)로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $***$ ,  $p < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 5).

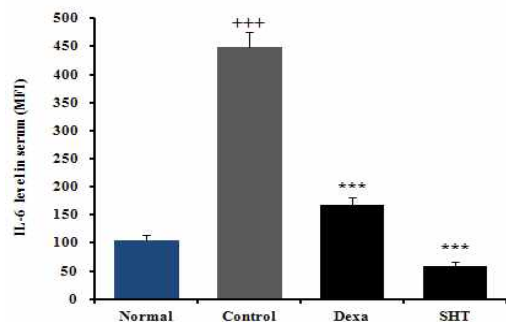
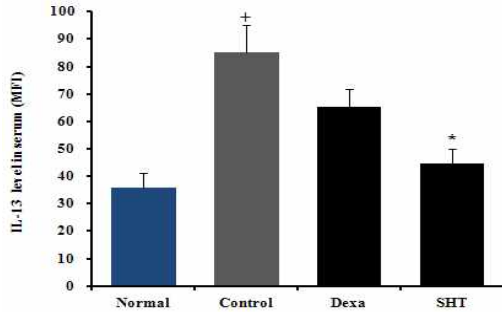


Fig. 5. Effect of SHT on the level of IL-6 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IL-6 were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The results were represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ( $+++$ ,  $p < 0.001$ ). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ( $***$ ,  $p < 0.001$ ).

4) IL-13 생성량에 미치는 영향

SHT 투여 종료 후에 혈청 내 사이토카인을 측정된 결과, 정상군은  $36.0 \pm 5.2$  (MFI), 대조군은  $85.1 \pm 9.9$  (MFI)로 나타나 대

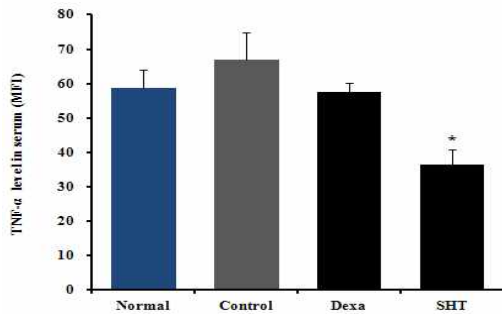
조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+,  $p < 0.05$ ) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은  $65.3 \pm 6.5$  (MFI), SHT 투여군은  $44.5 \pm 5.6$  (MFI)으로, SHT 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*,  $p < 0.05$ ) 감소하였다(Fig. 6).



**Fig. 6.** Effect of SHT on the level of IL-13 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IL-13 were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The results were 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 (\*,  $p < 0.05$ ).

5) TNF- $\alpha$  생성량에 미치는 영향

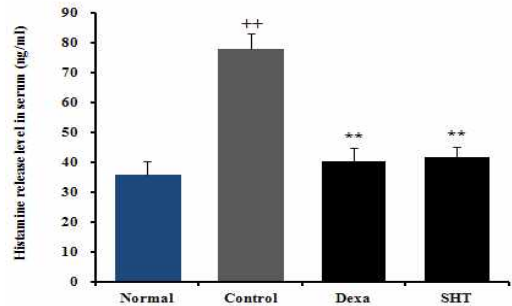
SHT 투여 종료 후에 혈청 내 사이토카인을 측정된 결과, 정상군은  $58.8 \pm 5.1$  (MFI), 대조군은  $66.8 \pm 8.2$  (MFI)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은  $57.5 \pm 2.7$  (MFI), SHT 투여군은  $36.5 \pm 4.3$  (MFI)으로, SHT 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게(\*,  $p < 0.05$ ) 감소하였다 (Fig. 7).



**Fig. 7.** Effect of SHT on the level of TNF- $\alpha$  in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of TNF- $\alpha$  were determined using a commercially available fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) kit. The results were represent the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (\*,  $p < 0.05$ ).

6) Histamine 생성량에 미치는 영향

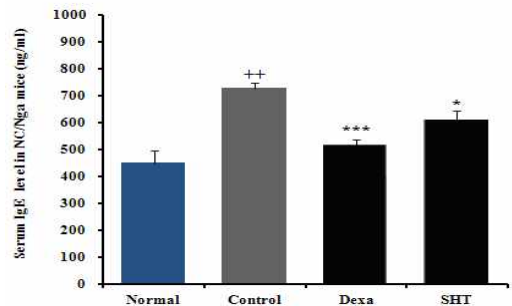
SHT 투여 종료 후에 혈청 내 Histamine을 측정된 결과, 정상군은  $35.7 \pm 4.8$  (ng/ml), 대조군은  $78.1 \pm 5.0$  (ng/ml)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (++,  $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은  $40.3 \pm 4.6$  (ng/ml), SHT 투여군은  $41.7 \pm 3.4$  (ng/ml)로, 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*,  $p < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 8).



**Fig. 8.** Effect of SHT on the level of histamine in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of histamine were determined using a commercially available ELISA kit. The results were 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 (\*\*,  $p < 0.01$ ).

4. 혈청 내 IgE 생성량에 미치는 영향

SHT 투여 종료 후에 혈청 내 IgE를 측정된 결과, 정상군은  $447.6 \pm 48.4$  (ng/ml), 대조군은  $726.4 \pm 22.3$  으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (++,  $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은  $513.4 \pm 23.5$ , SHT 투여군은  $608.3 \pm 34.9$ 로, 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*\*,  $p < 0.001$ , \*,  $p < 0.05$ ) 감소하였다(Fig. 9).



**Fig. 9.** Effect of SHT on the level of IgE in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IgE were determined using a commercially available ELISA kit. The results were 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 (\*,  $p < 0.05$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

5. 조직 변화에 미치는 영향

피부 조직에 H&E 염색과 toluidine blue 염색을 실시한 결과, 정상군(A)은 epidermis가 얇게 분포하였고, 비만세포가 거의 관찰되지 않았다. 이에 비해 대조군(B)은 epidermis의 두께가 과형성, 확장 되어 (화살표), 그 주변에 과각화, 색소침착, 과립증가, 부전각화증, 비만세포의 침윤이 (화살표) 정상군에 비하여 현저하게 증가하였고, Dexa 투여군(C)의 일부는 대조군에 비하여 정상군에 가깝게 epidermis의 두께가 줄어들었고, 그 주변에 세포 변형과 각화 증상, 비만세포의 침윤 등이 감소되었다. SHT 투여군(D) 역시 대조군에 비하여 epidermis의 상대적으로 두께가 줄어들었고, 상기한 병리 조직학적 증상 등이 현저하게 감소되었다



(Fig. 10).

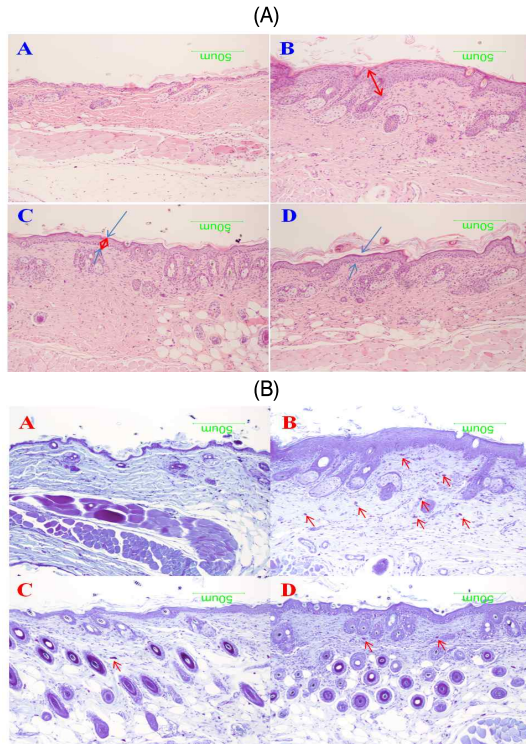


Fig. 10. Histologic examination of dorsal skin lesion in TNCB-induced NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of SHT for 3 weeks. (A) Dorsal skin biopsies was stained with hematoxylin and eosin (H&E) (A: Normal, B: Control, C: Dexa, D: SHT) for examining inflammatory cells. (B) Dorsal skin biopsies was stained with toluidine blue (A: Normal, B: Control, C: Dexa, D: SHT) for examining mast cells. The stained tissue were observed by bright microscopy (Nikon, Japan, original magnification,  $\times 100$ ).

## 고 찰

아토피 (atopy), 혹은 아토피 피부염 (atopic dermatitis)은 주로 유아기 혹은 소아기에 시작되는 만성적이고 재발성의 염증성 피부질환으로 소양증과 피부건조증, 습진 등이 특징적이다<sup>21)</sup>. 아토피 피부염의 발병 원인은 아직 확실하게 알려져 있지 않은 상태이고 임상 증상도 다양하게 나타나기 때문에 발병 원인이 어느 한 가지로만 설명될 수는 없지만, 환경적인 요인과 유전적인 요인이 주 원인으로 여겨지고 있다<sup>22,23)</sup>. 아토피 피부염의 가장 큰 문제점은 원인이 다양하기 때문에 치료가 쉽지 않고, 면역체계와 연관된 질병이라 완치가 어렵다는 점, 어느 정도 증상이 완화되었다 하더라도 재발이 쉬운 점, 그리고 환자들의 대부분이 영유아라는 점에서 문제시 되고 있다<sup>23,24)</sup>.

아토피 피부염 환자의 말초 혈액에는 IL-4, IL-5, IL-13을 생성하는 allergen-specific T 세포 (Th2 림프구)가 증가한다고 알려져 있다<sup>25)</sup>. IL-4와 IL-13은 미성숙 항체를 IgE로 변화시키는데 필요한 사이토카인이기 때문에, 이와 같은 면역학적 변화는 아토피 피부염의 발병 기전에 있어 중요한 역할을 하게 된다<sup>26)</sup>. 이러한 사이토카인들은 호산구 침윤에 관련된 VCAM-1과 같은 부착 분자의 발현을 증가시키며 IgE의 발현을 저해하는 INF- $\gamma$  와 같

은 Th1-type 사이토카인 활성을 억제한다<sup>27)</sup>. 정상인과 비교하였을 때, 아토피 피부염 환자의 피부 조직에는 IL-4와 IL-13을 발현하는 Th2 세포가 증가되어 있는 것을 확인할 수 있으며 상처 난 피부에는 IL-4, IL-5, IL-13의 mRNA level이 현저히 증가되어 있는 것을 알 수 있다<sup>28,29)</sup>. 아울러 Th2 림프구의 사이토카인 (IL-4, -5, -10)에 의해 조절되는 비만세포, 림프구, 백혈구와 관련된 복잡한 염증 과정에 의하여 발생한다. 이러한 결과 아토피 피부염에서 말초혈액 호산구증가증이 관찰되며 혈청 내 IgE 농도가 증가되어 있는 것을 알 수 있다<sup>30)</sup>.

아토피 피부염의 치료제로써 코르티코스테로이드, 면역억제제, 항히스타민제, 피부 보습제, 피부연화제 등이 사용되고 있으나 현재 사용되고 있는 대부분의 약들이 심각한 부작용을 나타내고 있고 치료를 중단하면 재발 가능성이 높기 때문에 근본적인 치료 방법이라고 할 수 없다<sup>31,32)</sup>.

본 시료인 石紫解肌湯(SHT)은 소양증을 주증으로 하는 다양한 피부 질환에 활용되고 있는 임상방으로, 약물 구성상 초기 실증에 활용되는 荊芥連翹湯加減方으로 볼 수 있다. 기본방인 荊芥連翹湯은 이미 기존 논문에서 항염증, 항아토피피부염에 대한 많은 연구와 더불어 안전성, 항균 효과에 대한 연구 등이 진행된 바 있으며, 이러한 실험적 연구 배경에는 荊芥連翹湯 자체가 임상에서 매우 활용 가치가 높고, 다양한 염증성 질환에 활용되고 있기 때문이다<sup>33-36)</sup>. 본 石紫解肌湯(SHT)은 특히 石膏, 紫草, 魚腥草 등의 清熱解毒 약물을 다량으로 사용하여 임상에서 가장 문제시되고 있는 소양증을 다스리는데, 중점을 두었다. 紫草, 魚腥草는 한약뿐만 아니라 민간약에서도 피부과질환에서 내외복약으로 사용되는 약물로, 이미 김, 정<sup>37,38)</sup> 등은 아토피피부염에 관련된 효능을 실험적으로 규명한 바가 있다. 특히 본 처방을 시료로 정<sup>20)</sup>은 in vitro에서 항산화 항염증 효능을 객관적으로 규명한 바가 있어 전임상 단계로써 in vivo에서의 효능 검색은 보다 더 과학적이고 객관적인 효능에 대한 기초 자료가 될 수 있을 것으로 본다.

아토피 피부염 모델인 NC/Nga 생쥐는 사람의 아토피 피부염과 면역학적 변화가 유사하여 Th2 세포가 우세하게 활성화되어 있으며 IgE의 증가가 특징적으로 아토피 피부염 실험에 가장 일반적으로 이용되는 모델이다<sup>39)</sup>.

NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염 유발 및 시료 처리 방법은 TNCB를 3주간 도포하고 유발하였고, 이후 3주간 SHT를 도포하며 피부염 지수를 측정하였으며 종료 후 다양한 세포에 대한 면역학적 실험 및 조직학적 실험을 실시하였다.

SHT가 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에 대한 임상 효과를 알아보기 위해 아토피 피부염의 육안 평가인 SCORD법을 이용하여 피부염 지수에 미치는 영향을 본 결과 대조군에 비하여 유의적으로 감소한 것으로 나타났다(Fig. 1). 아토피 피부염은 여러 면역세포들이 관여하는데 그 중 T 세포의 활성화가 두드러지는 경향을 나타낸다. 활성화된 T 세포는 Th1과 Th2 세포로 분화하는데, 면역학적 이상으로 비정상적인 Th2 반응에 치우치게 된다<sup>40)</sup>. 분화된 Th2 세포들은 IL-4, 5, 13 같은 Th2 사이토카인을 과도하게 생산하게 되고 과도하게 생산된 Th2 사이토카

인은 B 세포의 isotype switching을 유도하여 IgE의 발현을 증가시켜 호산구를 포함하는 과립구 및 비만세포 등의 면역세포를 피부로 침윤시키는 역할을 한다. 또한 비만세포에 표면상에 있는 고친화성 IgE 수용체(FcεRI)에 IgE가 결합하여 히스타민, Leukotrien(LT) 등의 염증성 화학전달물질을 유발시키고 IL-4, 5, 6, TNF-α 같은 염증성 사이토카인의 활성을 증가시켜 과민반응을 일으키게 된다<sup>41,42</sup>).

SHT가 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에서 배부피부 내 면역세포간의 비율에 미치는 영향을 알아보기 위해 조사한 결과 활성화된 T 세포를 나타내는 CD4+ T 세포 수<sup>43</sup>는 대조군에 비하여 69%로 크게 감소된 것으로 나타나(Fig. 2) 이 같은 결과는 SHT가 CD4+ 세포를 감소시킴으로써 활성화된 T 세포를 진정시키고 피부 내 과립구의 침윤을 억제함으로써 병리적 진행을 차단하는 효능이 있음을 제시해 주고 있다.

SHT가 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에서 혈청 내 사이토카인에 미치는 영향을 알아보기 위해 조사한 결과, IL-4는 대조군에 비하여 64%로 크게 감소하였고, IL-5는 대조군에 비하여 44%로 유의성 있게 감소하였으며 IL-13 역시 대조군에 비하여 48%로 유의성 있게 감소한 것으로 나타나 Th2 사이토카인의 감소 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 3, 4, 5). IL-6는 아토피 피부염이 진행됨에 따라 혈액 중에 생산량이 증가하는 사이토카인으로, B 세포의 항체 생산을 증가시키고 TNF-α와 같이 염증성 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>44</sup>). 본 실험에서 혈청 내 염증성 사이토카인인 IL-6 및 TNF-α의 생성량이 대조군에 비하여 87%, 45%로 감소한 점과 in vitro에서 Raw cell에서 나타난 사이토카인의 결과와 부합됨으로써 SHT가 기본적으로 항염증 효과가 있는 것으로 사료된다(Fig. 6, 7). 또한 염증성 반응이 유도됨에 따라 증가된 화학전달물질인 histamine 역시 47%로 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 8).

면역글로불린은 Th2 사이토카인으로부터 자극 받은 B 세포에서 생산되며 IgG급 항체에서 항원에 재차 노출되면 switch recombination을 통한 isotype switching이 일어나 IgE급 항체로 유도되어 생산된다<sup>45</sup>). SHT가 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에서 혈액 내 면역글로블린 생성량에 미치는 영향을 알아보기 위해 조사한 결과 IgE 생성량은 대조군에 비하여 16%로 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 9). 이 결과로 보아 SHT가 면역매개 물질인 면역글로블린의 생성에 있어 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

마지막으로 조직학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 림프구 또는 호산구를 확인하는 H&E 염색과 비만세포를 확인하는 toluidine blue 염색을 실시하여 조사한 결과 대조군은 epidermis와 dermis의 두께가 확장되어 있었고 그 주면에 과각화, 색소침착, 과립증가, 부전각화증, 호산구 및 비만세포의 침윤이 정상군에 비하여 현저하게 증가한 반면, SHT 투여군은 대조군에 비하여 epidermis와 dermis의 두께가 상대적으로 줄어들었고 병리적 결과인 과각화, 색소침착, 과립증가, 부전각화증, 호산구 및 비만세포의 침윤이 현저하게 감소하는 것으로 관찰되었다(Fig. 10).

이상의 결과로 보아 淸肌排毒方 (SHT)이 일반적인 아토피 피부염의 원인인 T 세포의 활성화를 진정시킴으로써 Th2 사이토카인의 과발현을 억제하고 염증성 매개물질의 생성량을 감소시켜 면역세포의 침윤을 막아 병리적 진행을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 따라서 항 후 개별 구성 약제들과 기존 실험 처방들의 효능을 비교 평가하는 보완적 실험이 심도있게 진행되어 임상 활용과 신약 개발을 위한 기초적인 자료가 지속적으로 제시되어야 할 것으로 사료된다.

## 결론

石紫解肌湯 (SHT)의 아토피 피부염 개선 효과를 객관적으로 검증하기 위하여 동물병태 모델에서 다양한 면역 관련 인자 및 조직학적 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 먼저 본 실험의 최종적 결론이라고 할 수 있는 피부염 임상지수에서는 SHT 처리군이 대조군에 비하여 11주와 13주에 모두 유의성 있게 감소시킴과 동시에 배부피부 내 CD4+ 면역세포 비율 역시 69%로 유의성 있게 감소시켰으며, 조직 검사에서도 epidermis와 dermis의 두께를 상대적으로 감소시킴으로써 임상 처방의 객관적 효능이 실험적으로 규명되었다. 염증의 기본 지표로 측정되어지는 혈청 내 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF-α 생성량은 대조군에 비하여 각각 64%, 44%, 87%, 48%, 45%로 감소시켰으며, 염증성 반응이 유도됨에 따라 증가된 화학전달물질인 histamine 발현 역시 47%로 유의성 있게 감소시켰다, 마지막으로 면역 매개 물질인 IgE 면역글로블린 생성량 역시 대조군에 비하여 16%로 유의성 있게 감소시켰다. 결과적으로 SHT는 T 세포의 활성화를 진정시킴으로써 Th2 사이토카인의 과발현을 억제하고 면역세포가 피부로 침윤되는 것을 억제함으로써, epidermis와 dermis의 두께를 상대적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 보아 in vitro 실험 결과와 더불어 동물 실험에서 石紫解肌湯의 면역조절 작용을 통한 아토피 피부염의 개선 효과가 실험적으로 규명됨으로써 EBم 구축과 더불어 임상 활용 제고를 위한 객관적 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

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

## 참고문헌

1. Holden, C.A. and Parish, W.E. Atopic dermatitis. Blackwell Science, Oxford, 1998.
2. Kang mo Ahn, Role of mast cells in allergic inflammation and innate immunity. Korean Journal of Pediatrics 47(11):1137-1141, 2004.
3. Shea, K.M., Truckner, R.T., Weber, R.W., Peden, D.B. Climate change and allergic disease. J Allergy Clin

- Immunol 122: 443-453, 2008.
4. Epstein, P.R. Climate change and human health. *N Engl J Med* 353: 1433-1436, 2005.
  5. Galli, S.J., Gordon, J.R., Wershil, B.K. Mast cell cytokines in allergy and inflammation. *Agents Actions Suppl*, 43: 209-201, 1993.
  6. Agnello, D., Lankford, C.S., Bream, J., Morinobu, A., Gadina, M., O'shea, J.J. and Frucht, D.M. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* 23: 147-161, 2003.
  7. Metcalfe, D.D., Baram, D., Mekori, Y.A. Mast cells, *Physiol Rev.* 77: 1033-1079, 1997.
  8. Leung, D.Y.M. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 104: S99-108, 1999.
  9. Kevin, D.C. Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy. *J invest Dermatol* 102: 128-137, 1994.
  10. Leung, D.Y. Atopy dermatitis: new insight and opportunities for for therapeutic intervention, *J Allergy Clin Immunol* 105: 860-867, 2000.
  11. N. Novak, D. Simon, Atopic dermatitis - from new pathophysiologic insights to individualized therapy. *Allergy* 66(7):830-839, 2011.
  12. Andreas Wollenberg, Christina Schnopp, Evolution of Conventional Therapy in Atopic Dermatitis. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 30(3):351-368, 2010.
  13. 王保方 외. 皮膚病中醫診療學, 인민위생출판사, pp 254-255, 310-311, 351-354, 2000.
  14. 馬紹堯. 實用中醫皮膚病學, 상해중의약대학출판사, pp 244-246, 1999.
  15. 장서현 외. 皮膚科券, 학원출판사, pp 299-230, 2004.
  16. 박선민. 피부세포에서 아토피 피부염의 유발과 관련된 PAR-2 및 사이토카인의 발현을 감소시키는 한약재 탐색, 동의생리병리학회지 25(2):270-274, 2011.
  17. 고흥운 외. 아토피 피부염에 대한 고삼가미방과 청기패독산의 검용 투여 효과, 동의생리병리학회지 23(6):1281-1291, 2009.
  18. 김혜림. 清肌消毒湯이 아토피피부염 염증 관련 인자에 미치는 영향, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 20(2):41-52, 2012.
  19. 排毒丸의 아토피피부염 병태모델에서의 면역 억제 효능, 동의생리병리학회지 24(5):796-806, 2010.
  20. 정대웅 외. 석자해기탕이 아토피 피부염 유관인자인 산화적 손상과 염증 인자에 미치는 영향, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 20(2):53-65, 2012.
  21. Blaser Kurt, Ring Johannes and Capron, T Cell Regulation in Allergy, Asthma and Atopic Skin Diseases. S Karger Pub, pp 121-137, 2008.
  22. 박영립, 박 준, 아토피 피부염의 병인, 대한피부연구학회지 14(3):67-72, 2007.
  23. Beellanti, J.A., Cytokine and allergic disease; clinical aspect. *Allergy Asthma Proc* 19(6):337-341, 1998.
  24. 조수익, 김진혜, 정보영, 안인수, 김혜원, 박천옥, 이철현. 소아청소년 아토피피부염 환자의 삶의 질. *대한피부과학회지* 49(5):415-421, 2011.
  25. Wollenberg, A., Kraft, S., Oppel, T., Bieber, T. Atopic dermatitis: pathogenetic mechanism. *Clin Exp Dermatol* 25: 530-534, 2000.
  26. Schmid-Grendelmeier, P., Altnauer, F., Fischer, B., Bizer, C., Straumann, A., Menz, G., et al., Eosinophils express functional IL-13 in eosinophilic inflammatory disease. *J Immunol.* 169: 1021-1027, 2002.
  27. Zhu, Z., et al., Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities and eotaxin production. *J Clin Invest*, 103: 779-788, 1999.
  28. Wills-Karp, M., Chiamonte, M. Interleukin-13 in Asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 9(1):21-7, 2003. Review.
  29. Church, M.K., Bradding, P., Walls, A.F., Okayama, Y. Human mast cells and basophils. In *Allergy and allergic diseases*. 1st ed. MA : Blackwell Science pp 149-170, 1997.
  30. Gauchat, J.F., et al., Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 365: 340-343, 1993.
  31. A. Svensson, C. Chambers, A. Gånemo, S.A. Mitchell, A systematic review of tacrolimus ointment compared with corticosteroids in the treatment of atopic dermatitis. *Current Medical Research and Opinion* 27(7):1395-1406, 2011.
  32. Eric L. Simpson, Atopic dermatitis: a review of topical treatment options. *Current Medical Research and Opinion* 26(3):633-640, 2010.
  33. 荊芥連翹湯과 加味荊芥連翹湯이 消炎·鎮痛 및 抗알레르기에 미치는 影響, 원광대학교대학원, 1997.
  34. 김민지. 형개연교탕의 물추출물이 lipopolysaccharide로 유도된 Raw264.7cell에서의 Nitric Oxide의 생성 및 iNOS와 COX-2의 발현, Cytokine에 미치는 영향, 대구한의대학교대학원, 2005.
  35. 유태섭. 荊芥連翹湯의 항알레르기작용에 대한 실험적 효과, 대한한방 소아과학회지 4(1):19-30, 1990.
  36. 姜蘭伊. 아토피피부염 동물 병태 모델에서의 형개연교탕의 면역조절작용, 대전대학교대학원, 2010.
  37. 金德坤. 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향, 慶熙大學校大學院, 2004.
  38. 鄭明我. 아토피성 피부염 유발 NC/Nga mice 동물 모델에 있어 삼백초, 어성초, 자초로 구성된 복합처방의 항아토피 작용, 木浦大學校大學院, 2010.
  39. Vestergard, C., et al The Nc/Nga mouse: a model for



- atopic dermatitis. *Mol Med Today* 5: 209-210, 2000.
40. Romagnani, S. immunologic influences on allergy and the Th1/Th2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 113: 395-400, 2004.
  41. Matsuda, H., et al., Development of atopic dermatitis - like skin lesion with IgE hyperproduction in Nc/Nga mice. *Int. Immunol* 9: 461-466, 1997.
  42. Everett H. Meyer, Rosemarie H. DeKruyff, and Dale T. Umetsu, T Cells and NKT Cells in the Pathogenesis of Asthma, *Annual Review of Medicine* 59: 281-292, 2007.
  43. Helena Aniansson Zdolsek, Jan Ernerudh, Patrick G. Holt, Joacim Nilsson, Bengt Björkstén, Expression of the T-Cell Markers CD3, CD4 and CD8 in Healthy and Atopic Children during the First 18 Months of Life. *Arch Allergy Immunol* 119: 6-12, 1999.
  44. D.B. Peden, Development of atopy and asthma: candidate environmental influences and important periods of exposure. *Environ Health Perspect.* 108(Suppl 3):475-482, 2000.
  45. Toshiaki Kawakami, Stephen J. Galli, Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nature Reviews Immunology* 2: 773-786, 2002.