

雄黃 외용 도포의 아토피성 피부염 소양증 완화 및 抗炎症 효능

이재성, 최유연, 양웅모

경희대학교 한의과대학 융합한의과학교실

Effects of topical application of realgar on pruritus and inflammation of atopic dermatitis

Jae Sung Lee, You Yeon Choi, Woong Mo Yang

Department of Convergence Korean Medical Science, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Objectives: Realgar has been frequently used for skin disorders in history of herbal medicine. However, the efficacy of realgar has not been examined in atopic dermatitis(AD). In this study, the effects of realgar on AD were investigated, especially on pruritus and inflammation.

Methods: AD lesions were induced in the shaved backs of BALB/c mice through repeated application of DNCB. The mice were treated for 11 days with 1% realgar (100 μ L/day). Histological changes in skin thickness were observed. The anti-pruritic effects of realgar were evaluated by the change in numbers of scratching behavior of mice and expression of substance P. The expressions of cytokines IL-4 and IL-6 were measured. Also, anti-inflammatory effects of realgar were examined on expressions of NF- κ B, phospho-I κ B α and mitogen-activated protein kinases (MAPKs).

Results: Realgar decreased skin thickness (both dermal and epidermal) 38% and 17% respectively, compared to positive control, DNCB group. The scratching behavior of mice was reduced by 42% and expression of substance P was significantly less. Cytokines IL-4 and IL-6 were significantly reduced by 52.6% and 77.6%, respectively. The expressions of NF- κ B, phospho-I κ B α and MAPKs (phospho-ERK1/2, -p38 and -JNK) were significantly suppressed with marked effects on phospho-ERK1/2.

Conclusions: The collective results suggest that realgar shows anti-pruritic and anti-inflammatory effects on AD. And realgar might be a potential therapeutic candidate for treatment of atopic dermatitis.

Key Words : Realgar, atopic dermatitis, scratching behavior, inflammation, pruritus

서론

아토피성 피부염(atopic dermatitis, AD)은 심한 소양증을 동반하는 만성 재발성 습진성 피부질환이다¹⁾. 산업화된 국가들 내 아토피성 피부염의 발병률은 소아 중 최소 15%, 성인은 2~10%이며, 점차 늘어나는 추세이다²⁾. 또한, 도시화가 진행되어 있는 경우, 아토피의 가족력 있는 경우, 사회경제적 지위

와 교육수준이 높을수록 발병률이 높으며, 소위 서구화된 생활습관이 발병률을 증가시키는 것으로 추정된다³⁾.

임상에서 아토피성 피부염에 주로 사용되는 약물은 항히스타민제, 국소 스테로이드 제제, 면역 억제제 등이 있다⁴⁾. 항히스타민제만으로는 아토피성 피부염의 가려움증에 한계가 있으며⁵⁾, 국소 스테로이드 제제는 피부 위축 등의 부작용이 발생할 수 있

• Received : 3 December 2014

• Revised : 13 March 2015

• Accepted : 17 March 2015

• Correspondence to : 양웅모(Woong Mo Yang)

서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한의과대학

Tel : +82-2-961-2209, E-mail : wmyang@khu.ac.kr

다. 또한, 면역 억제제는 간독성, 신독성, 전해질 이상 등의 전신적 부작용이 보고되고 있다⁶⁾. 따라서, 안전성이 확보된 새로운 아토피 피부염의 치료제가 시급한 상태이다.

한의학적으로 아토피성 피부염은 내선(奶癬), 태렴창(胎癩瘡), 태선(胎癬), 태열(胎熱) 등의 범주에 속하며⁷⁾, 크게 濕熱俱盛型, 脾虛濕盛型, 血虛風燥型 등으로 변증 분류한다. 또한, “外病內治”의 원칙하에 다양한 약물과 外治法이 병용되고 있으며⁸⁾, 국소 도포를 통한 직접 치료는 내복약의 제한적인 효과와 장기적 사용으로 인한 부작용을 보완한다고 보고되고 있어, 외치법에 대한 관심이 증가하고 있다⁶⁾.

본 연구에 사용된 옹황(雄黃)의 광물명은 계관석(鷄冠石, *Realgar*, As_4S_4)으로, 역대 문헌에서 피부 질환 외치에 가장 높은 빈도로 사용된 약물이다⁹⁾. 옹황의 성질은 신(辛), 온(溫)하며, 맛은 달고, 有毒하여, 아토피성 피부염과 관련된 搔癢症, 熱毒 등에 외용제로서 사용된 기록을 볼 수 있다¹¹⁾. 또한, 粉刺, 鼻瘡, 發癩, 陰癩, 白癩風, 頭瘡, 甲疽瘡, 發背, 陰疽, 丁瘡, 惡瘡, 腫毒, 癰疽, 疥癬 등 다양한 피부과 질환에 활용되어 왔다¹⁰⁾. 疥癬의 통증과 가려움증에 옹황이 포함된 一上散을 돼지기름이나 참기름에 개어 외용제로 활용하였으며[丹心], 溫毒으로 인한 發癩에 또한 옹황이 포함된 외용제를 활용한 기록이 있다[入門]. 특히 본초경에서는 古之瘍醫以五毒攻瘍中物也凡解瘡毒不可無雄黃朱砂事[本草]라 하여 창독에 반드시 옹황이 필요하다고 하였으며, 소아의 피부질환에도 활용하여 癩頭瘡과 口瘡 등에 이용되었다¹¹⁾.

최근 연구들은 천연 약용 식물들을 우선적으로 선택하고 있으나 광물성 약제를 이용한 연구는 많지 않으며 그 방법에 있어 피부 도포를 통한 연구도 충분하게 이루어 지지 않은 실정이다. 이에 본 연구에서는 옹황의 외용 도포가 아토피성 피부염에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, 조직학적 염색을 통해 피부조직의 두께 변화, scratching behavior의 빈도, substance P의 발현을 확인 하였다. 또한, T helper cell 2 (Th2) 관련 항염증 cytokine (IL-4,

IL-6)와 염증관련 단백질 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), phospho-nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha (I κ B α), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) ; extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), p38, c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)의 발현 등을 측정하여 아토피성 피부염에 대한 효과를 확인하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)와 dexamethasone 는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (MO, USA)에서 interleukin (IL)-4, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , Interferon (IFN)- γ ELISA kit와 tetramethylbenzidine (TMB) substrate reagent ELISA kit는 BD Bioscience (CA, USA) 제품을 구매하였다. Dual-color protein, standards protein assays, Tween-20, acrylamide, ammonium persulfate, bovine serum albumin (BSA), enhanced chemiluminescence (ECL), detection reagent와 polyvinyl difluoride (PVDF) membranes는 Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)의 제품을 사용하였다. Substance P의 면역조직화학적 염색을 위한 1차 항체인 goat anti-mouse substance P와 2차 항체인 anti-goat IgG는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA)에서 구매하였다. Western blotting 분석을 위한 항체 β -actin NF- κ B, phospho-I κ B α 와 anti-rabbit과 anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA)의 제품을 anti-extracellular signal-regulated kinases (ERK)1/2, phospho-ERK1/2, anti-p38, phospho-p38, anti-c-Jun NH2-terminal kinases (JNK), phospho-JNK는 Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA)의 제품을 사용하였다. 옹황의 연고화를 위해 Carbomer 프리젤

(CAS No.9003-01-4)은 비주(화인) 아로마(Seoul, Korea)에서 구입하였다.

2. 약물의 제조

본 실험에 사용된 옹황(雄黃)은 정도생약국(Seoul, Korea)에서 분말 형태로 구입하였으며 경희대학교 한의과대학 융합한의과학교실에서 형태학적 및 화학적으로 동정하여 사용하였다. 분말 형태의 雄黃은 화장품의 점증제로 사용되는 Carbomer 프리젤을 사용하여 연고화 하였다. 실험에 사용될 1% 雄黃 연고 제조는 10 g의 Carbomer 프리젤에 100 mg의 雄黃 분말을 균등하게 혼합하였으며, 1% 雄黃 연고의 표본은(A voucher specimen: # R-01)은 본 실험실에 보관하였다.

3. 실험동물

암컷 BALB/c 계통의 생쥐 (16-18 g, 6 weeks)는 (주)라온바이오(yongin, Korea)로부터 구매하여 7일 동안의 적응기를 통해 본 실험에 사용되었다. 실험 기간 동안 표준화된 고형사료와 물을 공급하였으며, 사육실의 온도는 23±2°C, 습도 50±10%, 광주기와 암주기는 12h/12h cycle로 유지되었다. 모든 동물실험 과정은 NIH (National Institutes of Health)의 실험동물관리 규정(Principle of Laboratory Animal Care)과 경희대학교 동물실험윤리위원회의 승인을

받아 수행되었다 (Permit Number: KHUASP(SE)-14-030). 적응기를 거친 생쥐는 아래와 같이 각각 5 마리씩 4 군으로 분류 하였다.

- (1) NOR: vehicle만 처리한 정상 대조군.
- (2) DNCB: DNCB로 아토피성 피부염을 유발한 음성 대조군.
- (3) DEX: DNCB로 아토피성 피부염 유발과 dexamethasone (DEX) 10 uM를 처리한 양성 대조군.
- (4) 雄黃: DNCB로 아토피성 피부염 유발과 옹황(雄黃) 1%를 처리한 실험군.

4. 아토피성 피부염 모델 유발

DNCB를 국소부위에 반복하여 도포하면 AD-like skin lesions를 나타내는 것으로 알려져 있다. 적응기를 거친 생쥐는 clipper로 등 부위를 깨끗이 제모 하고, 미세상처가 자연 치유되도록 24 시간 동안 방치하였다. 첫 번째 염증유발 과정으로 NOR군을 제외한 모든 군에 1% DNCB 용액(in acetone: olive oil=4:1) 100 μL을 3일 동안 하루에 한 번씩 동일한 등 부위에 도포하였고, NOR군에는 vehicle (acetone: olive oil=4:1)을 처리하였다. 4일 동안의 잠복기 후, 2 번째 감각은 0.5% DNCB 용액 100 μL가 처리되었다. DNCB 처리 4시간 전에 雄黃군에는 1% 雄黃 (100 μL), DEX군에는 dexamethasone

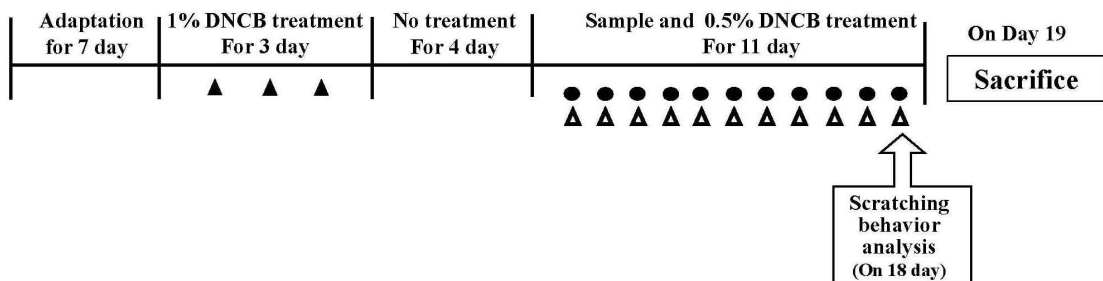


Fig. 1. Experimental schedule. ▲: The shaved dorsal skin was applied with 100 μ L of 1% DNCB solution (in acetone: olive oil=4:1) for sensitization, ●: The realgar group were treated 1% realgar (5 mg/day) and the DEX group treated 100 μ L dexamethasone (10 uM, dissolved in PBS), △: 100 μ L of 0,5 % DNCB solution were applied on the dorsal skin.

10 uM (100 μ L) 도포하였으며, NOR군과 DNCB 군은 연고기제 Carbomer 프리젤을 도포하였다. Sample처리 및 2차 감작은 1일 1회 11일 동안 처리되었다. 실험 과정은 총 18 일 동안 진행하였으며, 12시간 단식 후인 19 일째 되는 날 실험 목적에 따라 생쥐를 희생하여 피부를 적출하였다(Fig. 1).

5. 조직학적 평가

실험 과정에 따라 모든 군을 희생시킨 후 피부조직 약 5x5 mm를 적출하여 10% paraformaldehyde (pH 7.4)로 24h 고정하고, PBS로 3번 세척을 한 후, dehydration 과정(alcohol 70% \rightarrow 90% \rightarrow 95% \rightarrow 100%) 과 clearing (xylene I \rightarrow xylene II \rightarrow xylene III)과정을 거쳐 파라핀에 block을 만들었다. 완성된 paraffin block에서 4 μ m 간격으로 microtome cutting하여 slide를 얻었다. Slide는 deparaffinization (xylene III \rightarrow xylene II \rightarrow xylene I)과 hydration (alcohol 100% \rightarrow 95% \rightarrow 70%)의 과정을 거친 후 hematoxylin & eosin 으로 염색하여 표피와 진피의 두께를 확인하였다. 무작위로 선정된 5 장의 측정 이미지는 광학 현미경에서 X 100의 배율에서 관찰되었다(Leica Microsystems).

6. Scratching behaviour

雄黃의 외용 도포가 아토피성 피부염으로 인한 가려움 억제력을 평가하기 위해 실험 종료 전날(18 일째)에 scratching behaviour를 측정하였다. DNCB 도포 1시간 후 digital-camera (NEX-C3, sony, Japan)를 사용하여 20분 동안 녹화하여 행동을 분석하였다. 마우스는 개체 별로 격리되어 관찰되었으며, 마우스의 뒷발이 등 부위로 올라갔다 바닥에 내려올 때까지의 행동을 1번의 횟수로 평가 하였다. 또한 연속동작은 1회로 간주하였고, 잠시라도 중단 후 다시 긁는 경우는 각각을 횟수에 포함하였다.

7. 면역조직화학적 염색

Substance P는 염증세포 이주 및 증식뿐만 아니

라 소양증에 관여하는 신경펩타이드 중 하나이다. Substance P의 분포변화를 관찰하기 위해 면역조직화학적(Immunohistochemistry) 염색을 실시하였다. 파라핀 slide의 deparaffinization과 hydration과정은 조직학적 평가에 사용했던 방법과 동일하게 진행되었다. 전처리가 마무리 된 slide는 peroxidase활성을 억제하기 위하여 3% hydrogen peroxide로 반응시킨 다음, 1 차 항체로는 goat anti mouse substance P (1:100)를 이용하였으며, 2차 항체로는 anti-goat IgG (1:200)를 이용하였다. 면역조직화학적 염색은 Avidin/Biotinylated enzyme Complex (ABC) kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 사용하였다. 염색된 슬라이드는 X 200의 배율에서 광학 현미경으로 관찰되었다(Leica Microsystems).

8. Cytokine 측정

희생시킨 생쥐 등 피부 조직에서 단백질을 추출하여 Th2 cytokine (IL-4, IL-6)의 변화를 분석하였다. 단백질 추출은 각각의 tissue 500 mg (n=5/group)을 1 mL의 T-PER (Rockford, IL, USA)용액과 함께 분쇄되었으며, 원심분리를 통해 얻어진 상층액은 bovine serum albumin (BSA)를 표준으로 한 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량한 후 cytokine의 분석에 사용되었다. 생쥐 등 피부 조직의 IL-4와 IL-6의 분비량은 ELISA-kit (BD bioscience, SanJose, CA, USA)를 이용하였으며, 세부적인 과정은 제조사의 지시에 따라 진행되었다. 반응이 종료된 후, cytokine의 농도는 ELISA reader (Molecular Devices, Downingtown, PA)를 이용하여 450nm 파장에서 분석되었으며 표준 흡광도 값으로부터 얻어진 선형 회귀식을 이용하여 계산하였다.

9. Western Blotting을 통한 피부 염증 단백질 발현 확인

염증유발 유전자들을 조절하는 전사인자 NF- κ B, phospho-I κ B α , MAPKs (ERK1/2, p38, JNK)의

발현을 분석하기 위하여 생쥐 피부 조직으로부터 단백질을 추출하여 Western blot을 방법을 사용하였다. Nucleus에 존재하는 NF- κ B 분석을 위해 protease inhibitors cocktail을 포함한 nuclear buffer (20 mM HEPES, pH7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.50% Nonidet P-40, 50 mM b-glycerophosphate, 10 mM NaF and 5 mM Na₃VO₄)를 사용하였으며, phospho-I κ B α 의 분석은 protease inhibitors cocktail이 포함된 cytoplasmic buffer를 사용하였다. 또한, MAPKs (phospho-ERK1/2, p38, JNK)의 분석을 위해서는 protease inhibitors cocktail이 포함된 RIPA assay buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM EDTA)가 사용되었다. 생쥐 등 피부 조직(n=5/group)은 각각의 buffer와 함께 분쇄되었으며 추출한 단백질은 Dc Protein assay kit를 이용하여 30 μ g씩 같은 양을 정량하여 실험에 사용하였고, SDS 12%-polyacrylamide 겔을 이용하여 전기영동을 통해 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질은 Nitrocellulose 막으로 이동시킨 후, 5% BSA (in TBS-T)를 이용하여 blocking시키고 TBS-T로 15분간 3번 세척 하였다. 1차 항체인 Anti-rabbit β -actin, NF- κ B, phospho-I κ B α , ERK1/2, phospho-ERK1/2, JNK, phospho-JNK, p38, phospho-p38 (in TBS-T, 1:1000)를 처리하여 4°C에서 overnight binding시켰다. TBS-T로 15분간 3번 세척하고 HRP (horseradish-peroxidase)가 붙어있는 goat-anti-rabbit 2차 항체를 TBS-T에 1:2000으로 희석하여 넣고 실온에서 1시간 동안 처리한 후 ECL kit를 이용하였다. LAS Image Gauge 프로그램을 이용하여 각 밴드의 밀도를 측정하였다.

10. 안전성 평가

雄黃 처리에 의한 간 조직의 변화를 관찰하기 위해 조직학적 평가와 동일한 방법으로 hematoxylin & eosin 염색을 실시하여 분석하였다.

11. 통계처리

각 data는 Mean \pm SD 값으로 표시 하였으며, 각 실험 결과로부터 ANOVA (analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 군의 평균 간의 유의성을 검정하였다. 일반적으로 *P* 값이 0.05 이하인 경우 통계학적으로 유의 한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 雄黃의 외용 도포가 피부두께 변화에 미치는 영향

염증이 유발된 DNCB군에서는 각질층이 손상된 피부탈락 및 염증, 홍조가 육안으로 관찰되었고, 조직학적 관찰을 통한 마우스의 피부조직에서 각질증식증(hyperkeratosis) 및 과각화(hyperplasia)를 확인할 수 있었다. DNCB로 유도된 군에서의 표피(101.8 \pm 10.0 μ m) 및 진피(493.6 \pm 26.1 μ m)의 두께는 NOR군(표피: 31.3 \pm 10.1 μ m, 진피: 156.6 \pm 26.2 μ m)에 비해 유의적으로 증가됨을 확인 하였다. 雄黃을 도포한 군의 표피 두께는 63.2 \pm 17.9 μ m, 진피 두께는 411.9 \pm 38.3 μ m로 DNCB의 군에 비해 현저히 개선됨을 확인하였고, 양성대조군으로 사용된 DEX군에서도 DNCB군에 비해 피부의 두께가 감소됨을 확인하였다 (표피: 53.4 \pm 12.2 μ m, 진피: 338.7 \pm 29.1 μ m, Fig. 2).

2. 雄黃의 외용 도포가 소양증에 미치는 영향

아토피성 피부염을 유발한 마우스에서 雄黃의 처리가 소양증을 억제하는 효과가 있는지 알아보기 위하여 scratching behavior를 관찰하였다. Fig. 3과 같이 DNCB로 유발된 생쥐에서 긁는 횟수가 급격히 증가한 반면 (144 \pm 31, *P* < 0.001), 雄黃을 도포한 군에서는 DNCB군에 비하여 유의적으로 소양증 억제 효과를 확인할 수 있었다(82 \pm 20, *P* < 0.01). 이런 소양증 완화 증상은 스테로이드 계열인 양성대조군 DEX 처리 군에서도 확인되었다(87 \pm 22, *P* < 0.01).

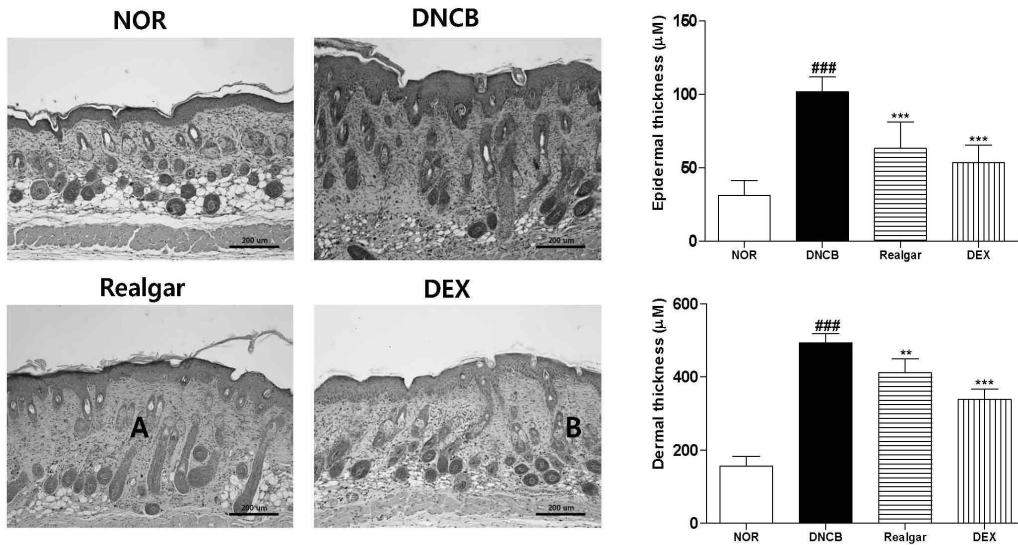


Fig. 2. Change in epidermis and dermis upon application of realgar, (A) The thickness of epidermis, (B) The thickness of dermis, Hematoxylin–eosin staining showed a decrease thickness of epidermis and dermis in the realgar–treated group and DEX group. Results shown are representative of five observations. Data are presented as means \pm SD and analyzed with ANOVA, ### P < 0,001, versus the NOR group, *** P < 0,001, versus the DNCB group. Magnification : X 100.

3. 雄黃의 외용 도포가 substance P 발현 억제에 미치는 영향

Fig. 3 의 행동학적 결과를 분자표적의 발현차이에서 확인하기 위해 피부의 소양증에 관여하는 신경 펩타이드인 substance P의 발현 정도를 면역조직화학적 염색을 통해 분석하였다. DNCB로 아토피성 피부염이 유발된 군의 진피에서 substance P의 염색이 뚜렷이 증가됨을 확인 하였으며, 雄黃군에서는 DNCB군에 비해 양성반응세포가 감소된 것으로 나타났다. 양성대조군으로 사용된 DEX의 군의 진피에서도 substance P의 발현정도가 감소된 것을 확인 하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 scratching behavior 실험 결과를 뒷받침하며, 雄黃 도포의 가려움증 완화 효능은 substance P 조절과 관련이 있는 것으로 유추해 볼 수 있다.

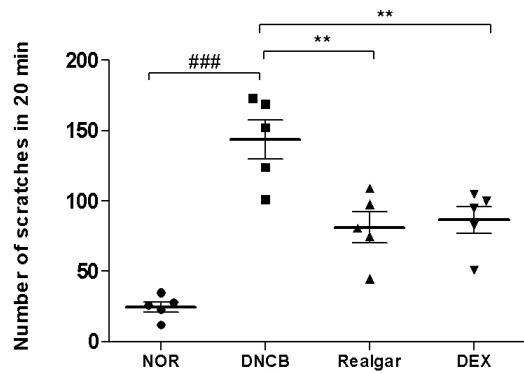


Fig. 3. Changes in scratching behavior upon application of realgar. Scratching behavior of mouse was checked after 1 h had passed following the last application of DNCB (on 18 day). Each mouse of all group were videotaped for 20 min to count the number of scratching behavior. Data are presented as means \pm SD (n = 5) and analyzed with ANOVA, ### P < 0,001, versus the NOR group, ** P < 0,05, versus the DNCB group.

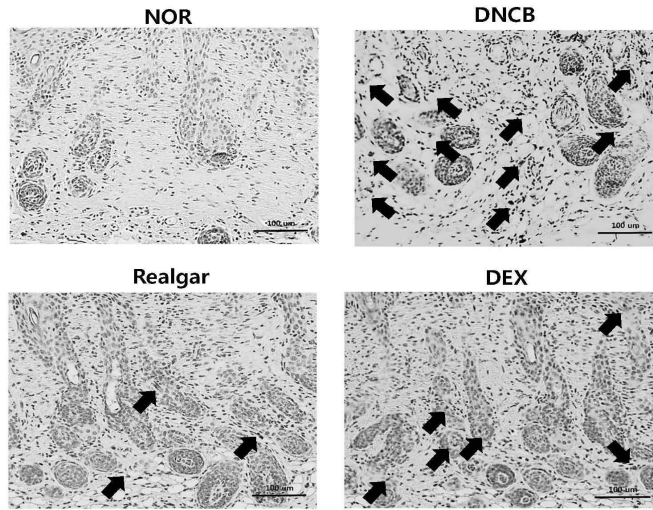


Fig. 4. Changes in substance P expression upon application of realgar. The expression of substance P was confirmed by Immunohistochemistry staining. Skin specimens were excised 12 h after the final DNCB challenge. The arrow indicates the expression of substance P. Magnification : X 200.

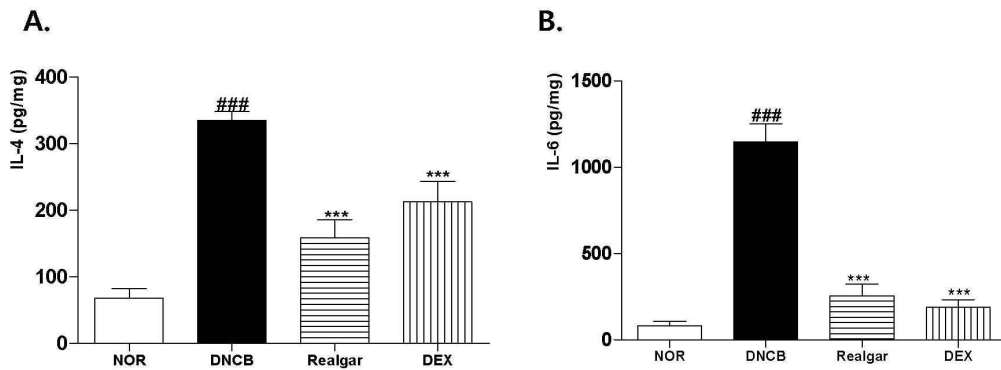


Fig. 5. Changes in cytokine levels upon application of realgar. The cytokine levels of IL-4 and IL-6 were measured in the dorsal skin using mouse ELISA kits. Data are presented as means \pm SD ($n = 5$) and analyzed with ANOVA, ### $P < 0.001$, versus the NOR group. *** $P < 0.001$, versus the DNCB group.

4. 雄黃의 외용 도포가 사이토카인 (IL-4, IL-6) 발현에 미치는 영향

雄黃을 도포한 국소부위의 cytokine의 변화를 확인하기 위해 대표적인 면역학적 지표인 IL-4와 IL-6 수치를 추가적으로 확인하였다. IL-4 수치는 NOR

군 68.3 ± 13.9 pg/mg, DNCB군 335.0 ± 13.2 pg/mg, 雄黃군 158.6 ± 27.7 pg/mg, DEX군 212.4 ± 31.4 pg/mg로, 음성대조군 DNCB군에 비해 雄黃군 IL-4의 발현이 52.6% 감소하였으며, 양성 대조군 DEX를 처리한 군에서도 36.6% 유의적인 감소를 나타냈다($P < 0.001$). IL-6 발현은 NOR군(81.6 ± 25.1

pg/mg)에 비해 DNCB의 반복도포로 인해 증가 되었으며(1145.7 ± 106.6 pg/mg), 雄黃군(256.2 ± 66.7 pg/mg)과 DEX군(189.0 ± 44.1 pg/mg)에서 각각 77.6%, 83.5%으로 모두 유의적으로 감소하였다($P < 0.001$, Fig. 5).

5. 雄黃의 외용도포가 염증전사인자 NF- κ B와 phospho-I κ B α 발현에 미치는 영향

염증유발 유전자를 조절하는 핵 내 NF- κ B 및 세포질의 phospho-I κ B α 단백질 발현을 확인하기 위하여 western blotting assay를 시행하였다. DNCB로 유도된 군에서 NF- κ B 및 phospho-I κ B α 발현은 NOR군에 비하여 각각 약 1.9배와 2.4배 발현되었다($P < 0.001$). DNCB 자극과 함께 雄黃을 처리한 군에서는 NF- κ B의 발현이 현저하게 억제 되었으며 (Fig. 6A, $P < 0.001$), cytoplasmic phospho-I κ B α 발현 또한 雄黃군에서 유의적인 감소를 확인하였다 (Fig. 6B, $P < 0.001$). 양성대조군인 DEX군도

DNCB군에 비해 NF- κ B, phospho-I κ B α 의 발현양이 감소됨을 확인하였다($P < 0.01$).

6. 雄黃의 외용도포가 염증전사인자 MAPKs (ERK1/2, p38, JNK) 발현에 미치는 영향

NF- κ B의 활성화 과정에 관계되는 MAP kinase 인산화의 활성화를 추가적으로 확인하였다. NOR군에 비해 DNCB군에서는 phospho-ERK1/2, -p38, -JNK의 활성이 모두 유의적으로 증가하였으며(4.3배, 2.3배 및 3.5배, respectively), 雄黃의 외용도포군에서는 DNCB군에 비해 각각 76.6%, 34.3%, 35.3%의 유의적인 감소를 나타내었다. 특히, 雄黃처리군은 ERK의 인산화 활성도에서 가장 우수한 인산화 억제능을 확인하였다. 양성대조군 DEX군에서도 DNCB군에 비해 유의적인 감소를 보였다 (26.3%, 27.8% and 25.1%, respectively, $P < 0.001$, Fig. 7).

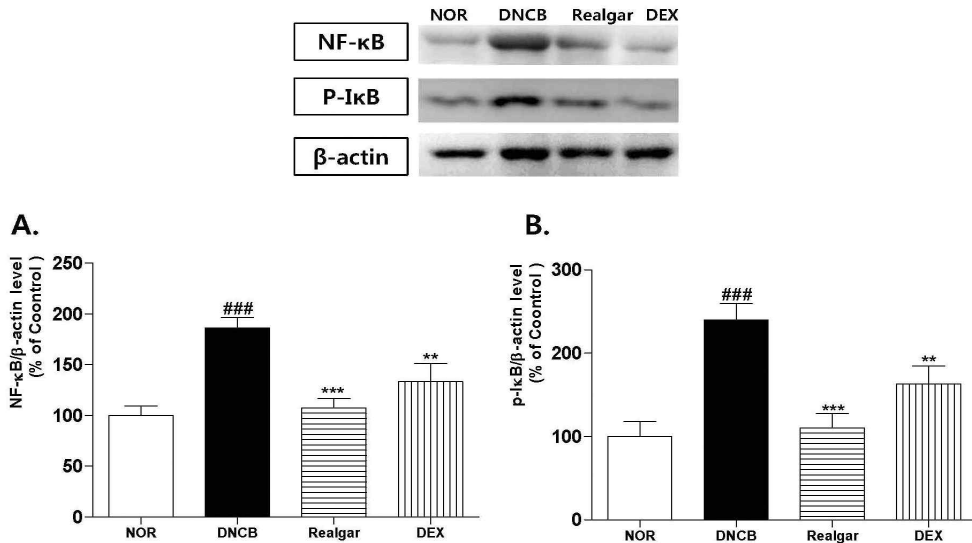


Fig. 6. Changes in expressions of NF- κ B, phospho-I κ B α upon application of realgar. The effects of realgar on the expressions of NF- κ B and phospho-I κ B α was assessed using western blot analysis. Results shown are representative of five observations. Data are presented as means \pm SD and analyzed with ANOVA. ### $P < 0.001$, versus the NOR group. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, versus the DNCB group.

7. 간 조직학적 평가

안전성 평가를 위한 간 조직학적 분석 결과, 雄黃 처리군에서 비소중독에 의해 나타나는 간 비대(hepatomegaly), 간 문맥의 섬유화(portal fibrosis) 및 연화(softening)를 확인 할 수 없었다(Fig. 8).

고 찰

BALB/c 생쥐에서 DNCB로 유도한 AD-like skin lesion이 사람의 아토피성 피부염과 매우 유사함이 알려져 있다¹²⁾. 본 연구는 雄黃이 DNCB로 유발한 아토피성 피부염에 미치는 영향을 동물 모델을 통해 실험하였다. DNCB의 1차 감작과 2차 감작을 통해 쥐에서 AD-like skin lesion이 발현됨을 확인하였고, 雄黃의 증상 개선 효과를 확인하였다.

아토피성 피부염의 발생 원인은 정확하게 알려진 바 없으나 유전적 취약성, 면역계의 불균형, 소양증, 피부장벽기능의 이상 등이 상호복합적인 작용을 한다고 보고되었다¹³⁾. 아토피성 피부염 환자의 주요 피부 증상은 표피의 수분 손실, keratinocyte의 분화 능력 손실로 인한 ceramide, filaggrin, antimicrobial peptides 등의 감소이다¹⁴⁾. 피부 장벽의 손상으로 더 많은 항원이 피부를 투과하게 되어 단핵구(monocyte) 침투가 늘어나고 만성적인 피부 염증과 습진이 발생하며¹⁵⁾, 이로 인하여 표피의 과증식이 발생하여 피부의 태선화(lichenification)가 나타난다¹⁾. 雄黃의 도포는 DNCB군에서 보이는 피부조직의 각질증식증과 과각화로 인한 표피 및 진피의 두께 증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 2).

소양증은 아토피성 피부염의 주요 증상들 중 하나이며, 가려움증으로 인한 긁는 행위는 피부장벽을 손상시킬 뿐만 아니라¹⁶⁾. 심할 경우 환자의 삶의 질에 극심한 영향을 준다. 가려움증과 환자의 우울증이 상관관계가 있음이 밝혀졌으며¹⁷⁾, 아토피성 피부염 환자들 중 다수가 소양증으로 인하여 일상생활을 하는데 성가시고(78.9%), 걱정스럽고(72.2%), 화가 난다고(70.0%) 느끼는 것으로 보고되었다¹⁸⁾. 따라서 소양증의 완화가 아토피성 피부염의 치료에 큰 비중

을 차지하게 된다⁶⁾.

Substance P는 신경펩티드(neuropeptide)¹⁹⁾로 신경 생성에 관여하며 피부, 근육, 관절의 감각신경 말단에서 분비된다²⁰⁾. Substance P는 신경성 염증과 관련되어 미세혈관을 확장하여 투과성을 증가시키고 mast cell의 탈과립과 염증세포 이주 및 증식을 유도하여 직접, 간접적으로 생쥐의 소양증을 유발하면서²¹⁾ scratching behavior를 유도하는 매개체의 역할을 한다²²⁾. Hon KL et al.은 substance P가 아토피성 피부염의 활성화, 환자의 삶의 질, 야간 긁기 정도와 연관이 있다고 보고하였으며²³⁾, Substance P의 혈장 농도와 아토피성 피부염의 질병 활성화도 간의 상관관계가 보고된 바 있다²⁴⁾. 본 실험에서, NOR군에 비해 DNCB군의 scratching behavior가 7배 정도 증가하였으며, 雄黃군에서는 DNCB군에 비해 scratching behavior가 43% 정도 감소하였다(Fig. 3). Scratching behavior 감소의 원인을 찾기 위해 소양증에 관여하는 물질 중 하나인 substance P를 분석한 결과, NOR군에 비해 증가된 DNCB군의 substance P의 발현이 雄黃군에서는 유의적으로 억제되었다(Fig. 4). 따라서 상기 결과는 雄黃이 substance P의 발현 억제를 통한 소양증 완화에 임상적으로 효과적임을 시사한다.

IL-4는 Th2 세포의 다면 발현성(pleiotropic) cytokine으로, Th2 세포의 분화에 관여하고 Th1 관련 면역 반응을 억제한다²⁵⁾. 또한, IL-4는 macrophage에서 IL-6의 생산을 촉진하며²⁶⁾, IL-6는 keratinocyte proliferation을 유발한다²⁷⁾. Fig. 5의 결과에서 雄黃군이 DNCB군에 비해 유의하게 감소된 IL-4 발현을 보였을 뿐만 아니라 IL-6의 발현 또한 유의하게 감소한 것을 확인하였다. 따라서 雄黃의 외용 처리는 IL-4의 발현을 억제하여 Th2 세포의 성장을 억제하고, IL-4에 의해 유도되는 IL-6의 발현을 억제하는 것으로 보여진다.

NF- κ B는 DNA의 전사를 조절하는 단백질로, 세포기질에 존재하며 NF- κ B를 억제하는 I κ B와 결합한 형태로 존재한다²⁸⁾. NF- κ B는 선천적, 후천적 면역 반응과 관련되어 있으며²⁹⁾, 많은 염증성 질환

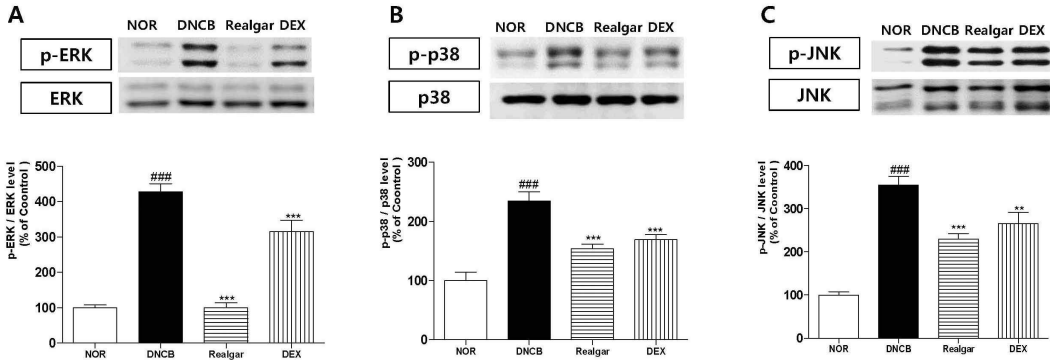


Fig. 7. Changes in MAPKs upon application of realgar. (A) phospho-ERK1/2, (B) phospho-p38 and (C) phospho-JNK. Total protein of the dorsal skin was analyzed by western blotting. Results shown are representative of five observations. Data are presented as means \pm SD and analyzed with ANOVA. ### $P < 0.001$, versus the NOR group. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, versus the DNCB group.

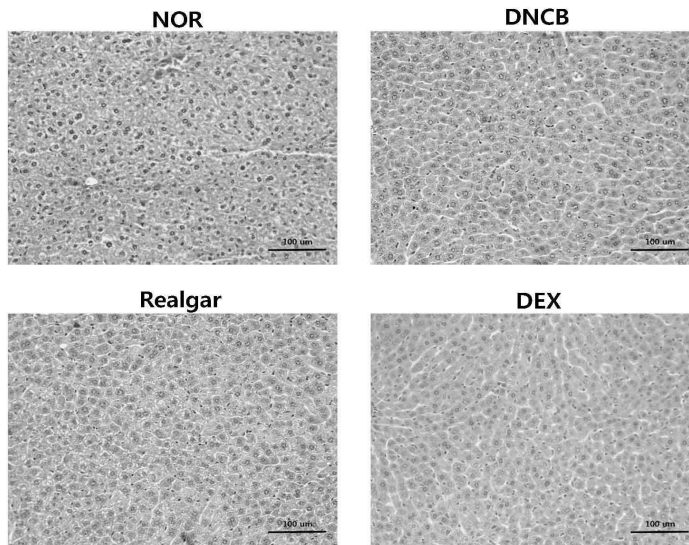


Fig. 8. Changes in liver tissues upon application of realgar. Results shown are representative of five observations. Magnification: X 200.

에서 나타나는 대표적인 pro-inflammatory cytokine 이다³⁰⁾. 본 연구에서 western blotting assay를 통해 NF- κ B와 p-I κ B α 의 발현을 확인한 결과 Fig. 6에서와 같이 NOR군에 비해 DNCB군에서 NF- κ B와 p-I κ B α 가 각각 1.9배와 2.4배 발현되었으나, 雄黃군에서는 NF- κ B와 p-I κ B α 가 DNCB군보다 유의

하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 雄黃이 NF- κ B 및 p-I κ B α 의 기전에 관여하여 염증 완화 작용을 하는 것으로 관찰되었다.

MAPKs는 면역 반응의 신호 전달 체계에서 중요한 역할을 하며 NF- κ B의 활성화 과정과 관련되어 염증성 반응을 조절한다³¹⁾. MAPKs의 세 가지 주요

그룹인 ERK1/2, p38, JNK 는 서로 특징적이고 연관된 신호 체계를 통해 조절된다³²⁾. MAPKs의 활성화를 확인한 결과 NOR군에 비해 DNCB군에서 p-ERK1/2, p-p38, p-JNK의 발현이 유의하게 증가하였으며, 雄黃군에서는 DNCB군에 비해 p-ERK1/2, p-p38, p-JNK의 발현이 모두 유의하게 억제되었다. 특히 p-ERK1/2에서 가장 뛰어난 억제능을 보였다 (Fig. 7).

雄黃의 주성분인 비소화합물들은 ‘雄黃’으로 통칭되어 사용되어 왔으며 색과 채취된 장소에 따라 石雄黃, 雌黃, 雄精, 黃石, 石黃 등의 異名이 있다. 雄黃 등의 비소화합물의 경우 비소로 인한 독성의 우려가 있어 간간 국내에서는 거의 사용되지 않았으나, 현재 비소 제제가 급성 백혈병에 사용되고 있으며³³⁾, 중국에서는 감기, 설사, 복통, 두통, 어지럼증 등에도 다양하게 활용되고 있다³⁴⁾. 본 연구에 사용된 바와 같이 외용제로 2.86 g/L의 농도로 수용성 액체를 피부에 발랐을 때 약 2.8%의 흡수율을 보였으며, 대부분 대사과정을 거쳐 소변으로 배출되어 혈중 비소 농도에 유의한 변화가 나타나지 않았다³⁵⁾. 본 실험에서는 기존 연구보다 낮은 1% 농도를 사용하였으며 따라서 비소의 피부흡수로 인한 혈중 비소 농도의 유의미한 변화는 발생하지 않았을 것으로 추정된다. 간의 섬유화, 비대, 연화와 같은 비소 중독에 의해 나타나는 간의 조직학적 변화는 확인되지 않았다(Fig. 8).

결론

雄黃 외용제의 아토피성 피부염의 소양증 및 염증에 대한 개선효과를 객관적으로 검증하기 위해 雄黃의 외용 도포가 표피 및 진피 두께 증감, 생쥐 scratching behavior의 횟수, substance P의 발현, IL-4 및 IL-6의 발현, NF- κ B와 p-I κ B α 의 발현, MAPKs인 ERK1/2, p38, JNK의 발현에 미치는 영향을 관찰하여 다음의 결론을 얻었다.

1. 雄黃은 DNCB 대조군에 비하여 표피 및 진피의

두께 증가를 각각 38%, 17% 정도 유의성 있게 감소시켰다.

2. 雄黃은 DNCB 대조군에 비하여 scratching behavior를 42% 정도 유의성 있게 감소시켰다.

3. 雄黃은 DNCB 대조군에 비하여 substance P의 발현을 유의성 있게 억제하였다

4. 雄黃은 DNCB 대조군에 비하여 IL-4 및 IL-6의 발현을 각각 52.6%, 77.6% 정도 유의성 있게 억제하였다.

5. 雄黃은 DNCB 대조군에 비하여 NF- κ B와 p-I κ B α 의 발현을 유의성 있게 억제하였다.

6. 雄黃은 DNCB 대조군에 비하여 MAPKs인 p-ERK1/2, p-p38, p-JNK의 발현을 유의성 있게 억제하였으며, 특히 뛰어난 p-ERK1/2 인산화 억제능을 보였다.

이상의 결과로 보아 雄黃은 아토피성 피부염에 항소양증과 항염증 작용을 보였으며 향후 아토피성 피부염에 대한 외용제로의 활용 가능성을 보였다.

참고문헌

1. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2008;358:1483-94.
2. Akdis CA, Akdis M, Bieber T, Bindslev-Jensen C, Boguniewicz M, Eigenmann P, et al. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology /PRACTALL Consensus Report. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(1):152-169.
3. DaVeiga SP. Epidemiology of atopic dermatitis: a review. *Allergy Asthma Proc*. 2012;33(3): 227-234.
4. Ständer S, Luger TA. Itch in atopic dermatitis—pathophysiology and treatment. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2010;18(4):289-296.
5. Klein PA, Clark RAF. An Evidence-Based review of the efficacy of antihistamines in

- relieving pruritus in atopic dermatitis. *Arch Dermatol.* 1999;135(12):1522-1525.
6. Sher L, Chang J, Patel B, Balkrishnan R, Fleischer AB. Relieving the Pruritus of Atopic Dermatitis: A Meta-analysis. *Value Health.* 2012;15(4):A249-A250.
 7. Sohn KH, Lee JG, Jee SY. A philological study on demonstration of atopic dermatitis, *J East-West Med.* 2009;34(4):15-24
 8. Min DL, Park EJ, Kang KH. Review of Clinical and Experimental Studies on External Application Treatment for Atopic Dermatitis in the Korean Literature. *J Pediatr Korean Med.* 2013;27(1):36-49.
 9. Park BK, Chang GT, Kim JH. A study of external treatments for the atopic dermatitis, *J Korean Orient Pediatr.* 2003;17(1):71-86
 10. Wu YL, Bonchojongsin. First edition. Seoul : Haeng Lim Publishers Co. 1982:143
 11. Heo J. Newly translated Donguibogam. Second edition. Seoul:Bubin Publishers Co. 2009:797-810
 12. Lee KS, Jeong ES, Heo SH, Seo JH, Jeong DG, Choi YK. A Novel Model for Human Atopic Dermatitis: Application of Repeated DNCB Patch in BALB/c Mice, in Comparison with NC/Nga Mice. *Lab Anim.* 2010;26(1):95-102.
 13. Kabashima K. New concept of the pathogenesis of atopic dermatitis: Interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity, *J Invest Dermatol.* 2013;70;3-11
 14. Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, et al. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2009;129(8):1892-1908.
 15. Ye YM, Kim BE, Shin YS, Park HS, Leung DYM. Overexpression of Epidermal Filaggrin in Patients with Chronic Idiopathic Urticaria Correlates with Urticaria Severity. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(2):AB56.
 16. Koblenzer CS. Itching and the atopic skin. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(3):S109-S113.
 17. Gupta MA, Gupta AK. Depression modulates pruritus perception. A study of pruritus in psoriasis, atopic dermatitis and chronic idiopathic urticaria. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;885:394-395.
 18. Shim WH, Song CH, Park HJ, Kim HS, Chin HW, Kim SH, et al. Clinical characteristics of itch in patients with adult and childhood atopic dermatitis. *Korean J Dermatol.* 2011;49(4): 318-327
 19. Park SW, Yan YP, Satriotomo I, Vemuganti R, Dempsey RJ. Substance P is a promoter of adult neural progenitor cell proliferation under normal and ischemic conditions. *J. Neurosurg.* 2007; 107(3):593-599.
 20. Donkin JJ, Turner RJ, Hassan I, Vink R. Substance P in traumatic brain injury. *Prog Brain Res.* 2007;161:97-109.
 21. Ebner K, Singewald N. The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids.* 2006;31(3):251-272.
 22. Yamaoka J, Kawana S. Rapid changes in substance P signaling and neutral endopeptidase induced by skin-scratching stimulation in mice. *J Dermatol Sci.* 2007;48(2):123-132.
 23. Hon KLE, Lam MCA, Wong KY, Leung TF, Ng PC. Pathophysiology of Nocturnal Scratching in Childhood Atopic Dermatitis: The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Substance P. *Br J Dermatol.* 2007;157(5):922-925.
 24. Toyoda M, Nakamura M, Makino T, Hino T, Kagoura M, Morohashi M. Nerve growth factor and substance P are useful plasma markers of disease activity in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2002;147(1):71-79.
 25. Mosmann TR, Coffmann RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol.* 1989;46:111-139.
 26. Ogawa H, Mukai K, Kawano Y, Minegishi Y,

- Karasuyama H. Th2-inducing cytokines IL-4 and IL-33 synergistically elicit the expression of transmembrane TNF- α on macrophages through the autocrine action of IL-6. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;420(1):114-118 .
27. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* 2007;127(5):998-1008.
28. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(1):49-62.
29. Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004;25(6):280-288.
30. Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Mauri C, Bicknell C, Foxwell B, et al. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(15):5634-5639
31. Arbabi S, Maier RV. Mitogen-activated protein kinases. *Crit Care Med.* 2002;30(1):S74-S79.
32. Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(2):211-218.
33. Hong ZY, Xiao M, Yang Y, Han ZQ, Cao Y, Li CR, et al. Arsenic disulfide synergizes with the phosphoinositide 3-kinase inhibitor PI-103 to eradicate acute myeloid leukemia stem cells by inducing differentiation. *Carcinogenesis.* 2011; 32(10):1550-1558.
34. Liu J, Lu Y, Wu Q, Goyer RA, Waalkes MP. Mineral arsenicals in traditional medicines: orpiment, realgar, and arsenolite. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;326;363-368
35. Wester RC, Hui X, Barbadillo S, Maibach HI, Lowney YW, Schoof RA, et al. In Vivo Percutaneous Absorption of Arsenic from Water and CCA-Treated Wood Residue. *Toxicol Sci.* 2004;79(2):287-295.