

황련 추출물의 아토피피부염 유발 생쥐에서 피부손상 완화 효과

정아람¹ · 안상현² · 정한솔³ · 김기봉^{1,4*}

1 : 부산대학교 한의학전문대학원 한방소아과학교실, 2 : 세명대학교 한의과대학 해부학교실,
3 : 부산대학교 한의학전문대학원 응용의학부, 4 : 부산대학교한방병원 한방소아과

Effect of Coptidis Rhizoma extract on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions in NC/Nga Mice

A Ram Jung¹, Sang Hyun Ahn², Han Sol Jeong³, Ki Bong Kim^{1,4*}

1 : Department of Pediatrics, School of Korean Medicine, Pusan National University,
2 : Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Semyung University,
3 : Division of Applied Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University,
4 : Department of Pediatrics, Korean Medicine Hospital of Pusan National University

This study aims to evaluate the anti-inflammatory effect of Coptidis Rhizoma (CR) extract for atopic dermatitis through maintaining skin barrier and regulating Th2 cell differentiation. We divided NC/Nga mice into 3 groups as follows: atopy-like dermatitis induced group with CR treatment (CT, n=10), no treatment group(Ctrl), atopy-like dermatitis elicited group(AE). Atopy-like dermatitis was induced to NC/Nga mice by sensitizing with dermatophagoides farinae(DfE) on 7, 8, 9, 11, 12, and 13th week. After inducing atopic dermatitis, CR extract was administered 20 mg/kg daily for the experimental duration to the CT group. We measured the integrity of lipid layers in the epidermis and Th2 differentiation through immunohistochemical staining against filaggrin, loricrin, IL-4, and IL-13. We also measured the distribution of subcutaneous collagen fibers by the Masson's trichrome staining. Administration of CR significantly inhibited the reduction of lipid layers in the skin that caused atopy. The expression of IL-4, IL-13, each of which is a cytokine secreted by T helper type 2 (Th2) cells, was markedly suppressed in the CT group as compared with AE group (p<0.05). CR treatment also decreased the expression of iNOS, p-IkB. Atopic dermatitis induced dermatological damage to skin, such as hyperplasia of epithelium, and capillary proliferation was significantly reduced by CR administration. CR effectively inhibited the thinning of the skin barrier and inflammatory responses in atopic dermatitis-induced mice. In particular, it showed anti-inflammatory effects by reducing the expression of IL-4 and IL-13, Th2 cell cytokines, which play a crucial role in development of atopic dermatitis. Therefore, CR can be a good candidate to ameliorate and treat atopic dermatitis.

keywords : Coptidis Rhizoma, Atopic dermatitis, Lipid barrier, IL-4, IL-13

서론

아토피피부염(Atopic Dermatitis)은 만성 염증성 피부질환으로, 유전, 환경, 심리, T helper 1 (Th1) /T helper 2 (Th2) 불균형, 피부 장벽 이상 등 다양한 원인들이 복잡하게 상호작용하여 발생한다¹⁾. 아토피피부염은 약 85 %가 5세 미만의 소아에 집중되어 있을 정도로 소아에서 특히 유병률이 높은 피부질환이다²⁾. 소아기에 시작된 아토피피부염은 향후 알레르기비염, 천식과 같은 알레르기성 질환으로 진행될 가능성(atopic march)을 높이기 때문에 발

병 시 적정 치료와 관리, 위험인자에 대한 회피 등이 필요하다³⁾.

현재 아토피피부염에 대한 대표적인 양방 치료는 염증성 사이토카인의 생산을 억제하는 스테로이드제가 사용되고 있으나, 스테로이드제의 장기 사용은 피부 위축, 모세혈관 확장, 다모증 등의 피부 부작용 뿐 아니라, 골절 위험 증가, 쿠싱 증후군, 성장 지연 등의 전신 부작용을 야기할 수 있다⁴⁾. 이러한 치료적 한계로 인해, 아토피피부염 환자의 60 %가 민간요법을 경험한 적이 있을 정도로, 보완대체의학적 치료법에 대한 요구가 높아지고 있는 실정이다⁵⁾.

아토피피부염은 소양감, 건조감, 흥반성 습진 등 피부 장벽의

* Corresponding author

Ki Bong Kim, Department of Korean Pediatrics, Pusan National University Korean Medicine Hospital, Geumo-ro 20, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea

E-mail : kkb@pusan.ac.kr, Tel : +82-55-360-5952

Received : 2019/03/18 Revised : 2019/04/14 Accepted : 2019/04/22

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2019.04.33.2.102>

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

손상에 의한 증상들을 특징으로 한다. 아토피피부염 환자의 피부 각질층은 각질층 내 세라마이드 감소로 인해 장벽 기능 및 수분 유지 기능의 감소가 두드러지게 나타난다⁶⁾. 아토피피부염의 원인은 어느 한가지가 아닌 여러 가지 원인이 복합적으로 작용하나, 그 중 피부 장벽 기능의 손상과 이에 의해 야기된 면역계의 이상이 주요한 병인이 된다는 연구결과들이 주목받고 있으며, 또한 피부 장벽 손상이 아토피 행진(atopy march)으로 진행되는 기전에서 주요한 원인이 된다고 알려져 있다⁷⁾. 따라서 아토피피부염 치료에서 피부 장벽을 보존하는 것은 기타 알레르기질환의 예방 뿐 아니라, 피부 손상 완화를 통해 스테로이드제 사용을 줄여 약물 부작용 예방에도 기여할 수 있다⁸⁾.

또한, 아토피피부염을 비롯한 각종 염증성 질환은 Interleukin (IL)-4, IL-13과 같은 Th2 사이토카인의 과발현으로 인한 Th2 우세형의 면역학적 상태를 특징으로 한다⁹⁾. Th2 분화의 활성화는 B 림프구의 생성과 분화를 유도해 비만세포를 자극하여 여러 염증성 매개물질을 분비하며, 이 메커니즘이 염증반응 발현에 있어 핵심이 된다¹⁰⁾. Th2 분화 활성화와 관련하여 아토피피부염의 발병 시기가 생후 6개월 내 45 %, 12개월 이전에 60 %로 영유아기 시기에 집중되어 있다는 사실 또한 Th2 분화 활성화와 연관이 있다²⁾. 영유아시기에 발병률이 높다는 사실은 임신 시 모체가 태아 및 태반 유지를 위해 Th2 우세형의 면역학적 상태로 유지되고, 이에 노출되어 있던 태아가 출산 이후 정상 면역의 균형에 도달하지 못한 채 외인성 알러젠에 감작된 결과로 볼 수 있다¹¹⁾.

아토피피부염의 병인을 한의학에서는 영유아의 태열(胎熱)이 제대로 제거되지 못하여 발생하는 것으로 본다¹²⁾. 영유아의 태열은 임신 시 모체의 식이나 생활습관 등에 의해 축적된 열(熱)이 태아에게 전달되어 생기는데, 이 체내에 축적되었던 열이 체표에 표출되어 홍반, 발진, 소양감 등 현대의 알레르기성 피부질환과 연관된 증상들을 발현한다¹³⁾. 한의학에서 이르는 병리 상태 중 하나인 '열(熱)'의 개념은 서양의학의 신경-면역학적 개념에 의하면 염증이나 감염에 해당한다¹⁴⁾. 따라서 아토피피부염에 대한 한약치료에는 체표의 열을 제거해주는 청열(淸熱)효과가 있는 한약재들이 사용된다¹⁵⁾.

황련(黃蓮, *Coptidis Rhizoma*)은 미나리아재비과에 속하는 여러해살이 본초식물로서 청열조습(淸熱燥濕), 사화해독(瀉火解毒)의 효능이 있다¹⁶⁾. 황련에 대한 이전 연구들에 의하면 황련은 사화(瀉火)작용에 의해 해열, 강압, 가슴두근거림 등의 열성 질환에 효과가 있으며¹⁷⁾, 최근에는 각종 염증성 매개물질들을 억제하여 화상의 피부손상회복에도 효과가 있음이 보고되었다¹⁸⁾. 따라서 열성 질환인 아토피피부염에 황련이 피부손상을 개선시키고, 면역학적 변화를 야기할 것을 기대할 수 있다.

본 연구에서는 아토피 유사 피부염을 유발한 NC/Nga 생쥐에 황련 추출물을 투여하여 피부장벽손상의 회복 및 Th2 분화조절을 통한 면역학적 지표들의 변화를 관찰하여 유의미한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 황련 추출물의 제조

중류수 1,000 mL에 황련 100 g을 넣은 후 3시간동안 전탕하고 침전물을 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator를 사용하여 50 mL으로 감압농축 후 동결 건조하여 시료 15 g (수득률 15.0%)을 획득하였다.

2. 실험동물과 아토피 피부염 유발

실험에 사용된 생쥐는 체중 20 g의 생후 6주된 NC/Nga 수컷 마우스이며, 중앙실험동물에서 분양 받았다. 생쥐들은 총 3그룹; 아토피 피부염 유발군(AE군), 아토피 피부염 유발 후 황련 추출물 치료군(CT군), 대조군(Ctrl군)으로 나누었고, 각 그룹당 10마리씩 배정하였다. 황련 추출물은 아토피피부염 유발 이후 실험기간동안 매일 경구투여 하였다(20 mg/kg/day). 아토피피부염 유발을 위해 생쥐 등쪽 피부를 면도하고, 면봉에 sodium dodecyl sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, State of Missouri, USA) 1 mL을 묻혀 피부에 20회 문질러서 각질층의 lipid lamella를 제거하였다. 이후 *Dermatophagoides farinae* (DfE) crude extract 100 mg (Biostir, Osaka, Japan)을 7, 8, 9, 11, 12 그리고 13주차에 주 2회씩 도포하여 유발하였다(Fig. 1). 본 연구과정은 부산대학교 Institutional Animal Care and Use Committees (IACUC) 승인을 받아 시행되었으며 (IACUC number: PNU-2015-0924), 실험실 동물의 관리와 사용에 대해서는 National Institute of Health (NIH) 가이드라인에 따랐다.

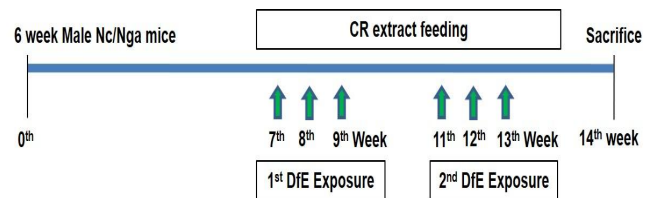


Fig. 1. Experimental design. After inducing AD, the extract of *Coptidis Rhizoma* was administered orally to the CT group during experimental period. Mice were challenged by DfE on 7th, 8th, 9th, 11th, 12th, and 13th week. Abbreviation: CR, *Coptidis Rhizoma*; DfE, *Dermatophagoides farinae*.

3. 조직절편제작

각 군의 생쥐를 14주차에 펜토바비탈나트륨 (Sodium pentobarbital) 용액으로 마취하여 희생시키고, 얻어진 등쪽 피부를 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액을 사용하여 심장관류고정을 실시하였다. 이를 10% neutral buffered formalin (NBF)에 실온에서 24시간 동안 고정하고 파라핀에 포매하여 5 μ m 두께의 연속 절편을 만들었다. 만들어진 연속 절편의 조직학적 변화(상피세포 과형성, 모세혈관 분포, 아교섬유 분포 등)를 조사하기 위해 아교섬유(collagen fiber)를 관찰하는데 사용하는 염색법인 Masson's trichrome (M/T) method를 사용하였다. 표피의 lipid lamella층을 관찰하기 위해 피부조직을 cryo-section용 샘플로 준비한 후, Sudan Black B를 이용한 histochemical staining을 실시하였다.

4. 면역조직화학

피부조직절편의 protein inactivation을 위해 proteinase K

(20 µg/ml)에 5분 동안 처리 후 non-specific binding을 막기위해 4시간동안 10% normal mouse serum에서 blocking 시켰다. 그리고 해당 절편을 1차 항체인 goat anti-IL-4 (1:50, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA), goat anti-IL-13 (1:50), goat anti-p-IkB (1:500), goat anti-iNOS (1:200), goat anti-loricrin (1:100), goat anti-filaggrin (1:100) 에 72시간 동안 4 °C humidified chamber에서 반응시켰다. 그 다음 해당 절편을 2차 항체인 biotinylated rabbit anti-goat IgG (1:100)에 24시간동안 실온에서 link 하였고, avidin biotin complex kit (Vector Lab, USA)에 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 이후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine 및 0.05% HCl이 포함된 0.05 M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시키고, hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다.

5. 영상처리분석방법 및 통계처리

Image Pro Plus (Media cybernetics, USA)를 이용하여 면역조직화학결과들을 영상분석하여 평균 ± 표준편차로 수치화 하였다. 임의로 선정된 각 군의10개의 표본을 x400배율로 촬영 후 positive pixels/20,000,000 pixels (80-100 intensity range)로 영상분석 하였다. 통계는 SPSS software (SPSS 23, SPSS Inc., USA)로 이루어졌으며, one-way ANOVA와 Levene's (LSD) test 를 통해 유의성 (p<0.05)을 검증하였다.

결 과

1. 각질 내 지방 장벽 재생 효과

표피 각질층의 세포사이공간은 ceramide로 이루어진 지질로 채워져 있는데, 이 지방장벽(lipid lamella)은 filaggrin과 loricrin 과 같은 단백질들에 의해 강한 물리적 지지력을 형성한다. Filaggrin 양성반응의 경우, CT군 (95149 ± 2697)에서는 AE군 (14987 ± 498)에 비해 535% 증가함을 확인할 수 있었으며, AE군에서 Ctrl군 (145297 ± 2060)에 비해 90% 감소하였음을 확인할 수 있었다 (p<0.05). Loricrin 양성반응의 경우, CT군 (114837 ± 2339)에서 AE군 (21477 ± 1138)에 비해 435% 증가하고, AE군에서 Ctrl군 (154850 ± 2350)에 비해 86% 감소하는 결과가 관찰되었다 (p<0.05). 최종적으로 Sudan black B 염색결과, CT군에서 AE군에 비해 더 두꺼운 지방장벽층이 보존되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

2. Th2 분화 조절

Th2 분화 조절을 관찰하기위해 면역조직화학 염색 후 Image-pro Plus를 이용해 영상분석을 실시하였다. 항 IL-4항체를 이용한 면역조직화학적 염색 결과, IL-4 양성반응은 각질세포, 진피 내 림프구 및 대식세포에서 관찰되었다. 아토피피부염 유발 후 두 군 모두에서 IL-4양성반응이 세포질에서 강하게 나타났고, AE군 (334047 ± 9197)에서 Ctrl군 (45002 ± 1642)에 비해 642% 증가한 결과가 확인되었고, CT군 (85259 ± 2368)에서는 AE군에 비해 74% 유의성 있는 감소가 관찰되었다 (p<0.05). 세포질에서

강한 양성반응을 보인 IL-13 양성반응 역시 AE군 (161626 ± 3913)에서 Ctrl군 (9516 ± 427)에 비해 1598% 증가한 결과가 확인되었으며, CT군 (61997 ± 2784)에서 AE군에 비해 62% 유의성 있는 감소가 나타났다(p<0.05)(Fig. 3).

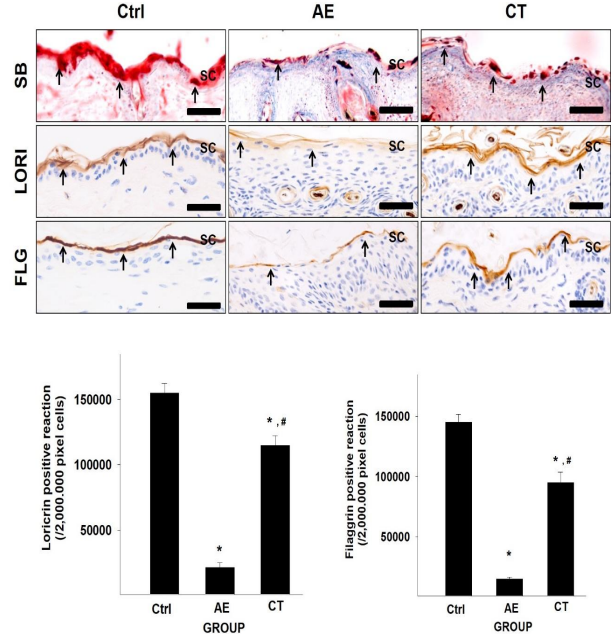


Fig. 2. Maintenance of lipid barrier. In Sudan Black B results, thicker lipid lamella layer (arrow indicating red layer) was observed on epidermis in the CT group compared with the AE group. Image analysis data for filaggrin, loricrin-positive reactions (arrow indicating dark brown spot) remarkably decreased in the AE group (n=10) compared with Ctrl group (n=10). In contrast, CR application induced that filaggrin-, loricrin-positive reactions significantly increased in the CT group (n=10) compared with AE group. *: p < 0.05 compared with Ctrl, #: p < 0.05 compared with AE. Abbreviation: AE, Atopic dermatitis elicited group; CT, Coptidis Rhizoma extract treated group after AD elicitation; Ctrl, no treatment; FLG, filaggrin; LORI, loricrin; SB, Sudan Black B; SC, Stratum Corneum. Bar size: 50 µg.

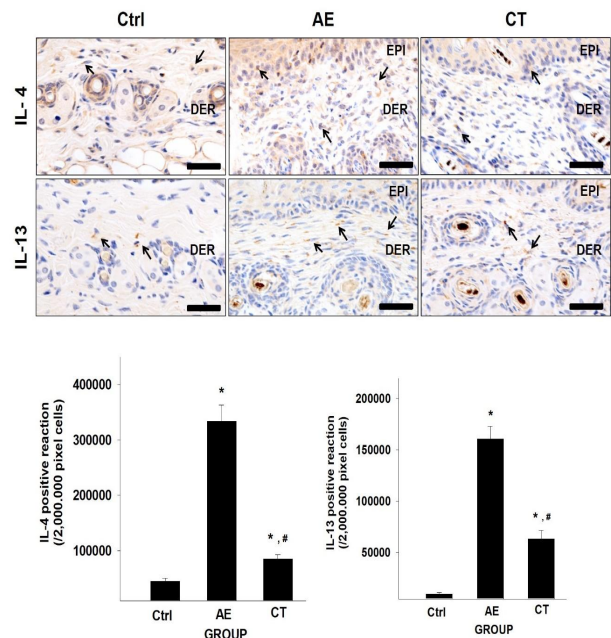


Fig. 3. The regulation of Th2 differentiation. The IL-4 and IL-13 positive reaction decreased in the CT compared with the AE group (immunohistochemistry; bar size, 50 μ m). Results from the image analysis also show the same result. arrow: positive reacted cell, *: p <0.05 compared with Ctrl, #: p <0.05 compared with AE. Abbreviation: AE, Atopic dermatitis elicited group; CT, Coptidis Rhizoma extract treated group after AD elicitation; Ctrl, no treatment; Der, Dermis; Epi, Epidermis; T helper, Th; Interleukin, IL.

3. 항염증효과

염증효소 전사인자인 p-IkB 양성반응을 확인하였다. AE군 (79829 \pm 1667)에서 Ctrl군 (5418 \pm 170)에 비해 1373% 증가, CT군 (23402 \pm 1060)에서 AE군에 비해 71% 유의성 있는 감소가 확인되었다 (p<0.05). 또한, nitric oxide (NO)생성을 통한 혈관확장으로 염증을 주도하는 inducible nitric oxide (iNOS) 양성반응이 진피 내 대식세포에서 확인되었다. 항 iNOS항체를 이용한 면역조직화학 염색 결과, iNOS 양성반응에서 AE군 (46470 \pm 1129)이 Ctrl군 (4529 \pm 100)에 비해 926% 증가한 결과가 확인되었고, CT군 (16681 \pm 444)이 AE군에 비해 64% 유의성 있는 감소가 관찰되었다(p<0.05)(Fig. 4).

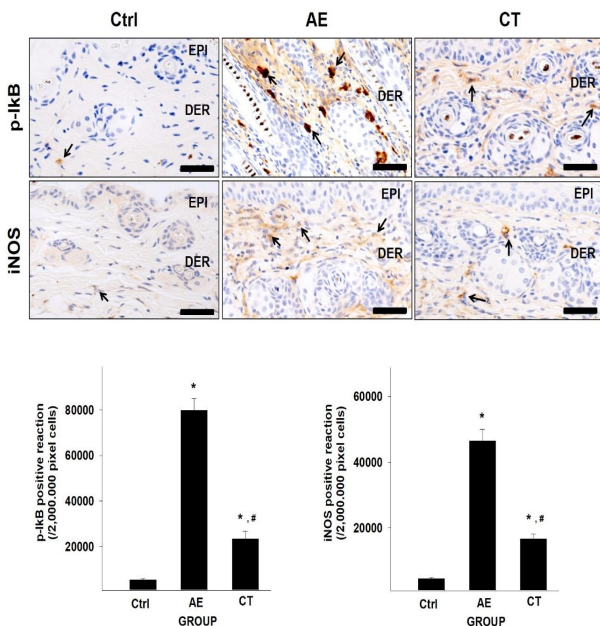


Fig. 4. The anti-inflammatory effect. The p-IkB and iNOS positive reaction decreased in the CT compared with the AE group (immunohistochemistry; bar size, 50 μ m). Results from the image analysis also show the same result. arrow: positive reacted cell, *: p <0.05 compared with Ctrl, #: p <0.05 compared with AE. Abbreviation: AE, Atopic dermatitis elicited group; CT, Coptidis Rhizoma extract treated group after AD elicitation; Ctrl, no treatment; Der, Dermis; Epi, Epidermis; Inducible nitric oxide synthase, iNOS.

4. 아토피피부염 손상 완화효과

반복된 DfE의 도포는 아교섬유 분포가 현저히 감소한 아토피 유사 피부 상태를 유발하였다. M/T method를 이용하여 관찰한 결과, 아토피 유사 피부염 유발 후 AE군의 피부에서는 각질층의 탈락, 상피세포 과형성 (\uparrow), 기저층에서의 림프구 침윤의 증가, 모세혈관 분포증가 (\curvearrowright), 진피 내 아교섬유 분포 감소 등의 급성 피부

손상이 관찰되었다. 반면, CT군에서는 대부분의 지역에서 상기 피부손상의 특징들이 적게 나타났다(Fig. 5).

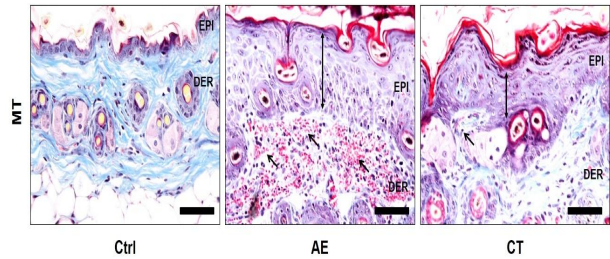


Fig. 5. The reduction of skin damage in Nc/Nga mice. The distribution of collagen fiber (bright blue), capillary proliferation (\curvearrowright) were decreased in AE group but increased in CT group (Masson trichrome method; bar size, 50 μ m). The hyperplasia of epithelial cell (\dagger) in CT was remarkably decreased compared with AE group. Abbreviation: AE, Atopic dermatitis elicited group; CT, Coptidis Rhizoma extract treated group after AD elicitation; Ctrl, no treatment; Der, Dermis; Epi, Epidermis.

고찰

아토피피부염은 소양감, 홍반성 습진, 건조함 등의 증상으로 인해 심각한 삶의 질 저하를 초래하는데, 최근 한 보고에 의하면, 아토피피부염으로 진단받은 환자들의 17.1%가 정신과 진단을 받은 경험이 있어 아토피피부염이 단순한 피부질환이 아니며 신체 전체의 건강을 저해하며 사회적 문제로 이어질 수 있음을 보고하고 있다¹⁹).

아토피피부염의 병인은 다양하고 복잡적인데, 그 중 피부각질층 내 ceramide 손실로 발생하는 피부장벽의 이상이 아토피피부염 발병의 초기 기전이라는 견해 (outside-inside 가설)와, 알레르겐 접촉을 통한 Th2 면역계의 이상이 피부장벽 손상을 야기한다는 견해가 있다 (inside- outside 가설)²⁰. 실험적으로는 피부장벽의 손상이 IL-4, IL-13과 같은 Th2 사이토카인 분비를 증가시켜 Th2 우세형의 면역학적 상태를 야기하여 염증반응을 일으킨다는 선행연구들과^{21,22}, IL-1 α , TNF- α 와 같은 사이토카인을 증가시켜 염증을 발생시킨다는 연구가 outside-inside가설을 뒷받침하고 있으며²³, Th2 분화가 filaggrin, loricrin의 손상에 직접적으로 영향을 끼쳐 피부장벽을 손상시킨다는 연구들이 inside-outside 가설을 뒷받침하고 있다^{24,25}. 또한 최근 한연구에 의하면 Th2 분화와 피부장벽 손상이 아토피피부염 발현에 있어 서로 독립적이지 않고 유기적으로 함께 작용함을 보고하고 있다²⁶. 즉 모든 가설들을 종합해 볼 때 아토피피부염의 발병 기전에 있어 피부장벽손상이 발병 초기 단계에 매우 중요한 역할을 함을 알 수 있다²⁷. 본 연구는 피부장벽손상이 야기한 면역학적 변화를 관찰하고, 이에 대한 황련 추출물의 효과를 관찰하기 위하여 설계하였다.

피부의 장벽 기능을 하는 각질층은 세라마이드, 콜레스테롤 등의 지질복합체로 이루어져, 체내 수분손실을 막고, 외부 알레르겐의 침입으로부터 장벽 기능을 효과적으로 수행한다²⁸. 각질층의 구조와 기능을 제시한 “Brick and mortar” 모델은 각질세포를 벽돌로, 각질세포간 지질은 반죽으로 비유하여 각질 내 지방 장벽이 견고한 피부 장벽을 유지하는데 중요한 역할을 수행함을 제시하고 있다²⁹. Filaggrin과 loricrin은 각질형성세포의 분화에 의해 발현되

는 단백질로써 각질 내 지방장벽에서 케라틴 간 접촉제 역할을 수행하여 피부 장벽을 견고하게 한다. Filaggrin 유전자는 아토피피부염의 대표적인 유전인자로 밝혀져 있으며, Filaggrin 변이로 인한 각질층의 손상은 IgE 감작을 용이하게 Th2분화를 쉽게 유도하여 염증 발현을 증가시킨다³⁰⁾. 또한, IL-4, IL-13은 피부 장벽을 구성하는 loricrine 감소에 영향을 주어²⁵⁾, 피부 장벽의 추가적 손상을 야기해 염증을 심화시킨다. 피부장벽 손상과 Th2 우세형의 면역학적 상태는 항원 특이적인 IgE생성으로 이어져, 비만세포로부터 여러 염증성 매개물질을 유리시킴으로써 소양감, 혈관확장 등 아토피피부염 증상들이 나타나게 한다²⁷⁾.

본 연구에서는 피부장벽 손상을 유도함으로써 아토피피부염을 발현시키기 위해 DfE를 사용하였다. DfE는 우리나라에서 가장 흔한 집먼지진드기 항원으로서, 높은 효소활성도를 가지고 있어, 표피의 밀착 연접을 파괴하여 피부 장벽의 손상을 쉽게 야기한다³¹⁾. 또한 proteinase-activated receptors (PARS)를 활성화시킴으로써 IL-6, IL-8 같은 염증성 사이토카인의 분비를 증가시키는 역할을 하여 아토피피부염과 같은 알레르기성 염증 질환의 동물실험에서 주로 사용되는 항원이다³²⁾.

우리는 황련 추출물이 지방 장벽을 보존하여 Th2 분화조절에 기여하는지 확인하기 위해 filaggrin과 loricrin지표의 변화를 확인하였다. 연구결과, DfE를 통한 인위적인 피부장벽 손상에 의해 filaggrin과 loricrin의 발현이 억제되고, IL-4 및 IL-13이 증가된 것을 확인하였다. 또한 CT군에서의 filaggrin과 loricrin의 감소가 AE군에 비해 유의미하게 적게 나타났음을 확인하였으며, IL-4와 IL-13의 발현 억제도 함께 확인하였다. Outside-inside가설을 고려해 볼 때, 본 연구결과는 황련 추출물이 filaggrin과 loricrin 분해를 저해함으로써 피부 장벽 손상을 완화해 Th2 분화를 제어에 관여하였다고 생각된다.

아토피피부염에서 Th2 우세형 상태의 조절이 항염증 인자에 기여했는지 알아보기 위해 p-IkB와 iNOS 와 같은 항염증 지표들을 확인하였다. IL-4, IL-13과 같은 Th2 사이토카인은 iNOS inducer로 잘 알려진 NF-κB를 활성화시킴으로써 iNOS의 증가를 야기한다³³⁾. NF-κB 는 NF-κB 활성화를 억제하는 IkB와 복합체를 이루어 비활성화 상태로 세포질에 존재하다가, 활성화가 되면 IkB가 인산화되고 복합체가 분리됨으로써 핵으로 이동하여 iNOS 합성에 관여한다³⁴⁾. iNOS는 NO를 증가시켜 조직 내 염증세포를 이주 및 침적시키는 역할을 하는데, 이 NO는 혈관투과성 증가를 유도하여 조직내 산화스트레스를 증가시킴을 통해 아토피피부염의 발현을 가속화시킨다³⁵⁾. 염증효소 전사인자인 p-IkB의 경우, CT군에서 AE군에 비해 양성반응의 유의미한 감소를 보였다. 또한 iNOS 양성반응에서도 CT군은 AE군에 비해 유의성 있는 감소를 확인하였다 (Fig. 5). 이러한 결과는 황련 추출물이 아토피피부염에서 항염증 효과가 있음을 의미한다.

급성기 염증반응을 야기하는 염증성 사이토카인들의 증가는 한의학에서 이르는 '열증(熱證)'과 연관이 있다¹⁴⁾. 황련 (黃蓮, *Coptidis rhizoma*)은 심열 (心熱) 및 비위 (脾胃)의 습열 (濕熱)을 없애고, 열독 (熱毒)을 제거하는 효능이 있어 태열 및 태독을 제거하는 하태독법의 대표적인 약재로 사용되기도 하며, 황련을 이용한

하태독법에서 아토피피부염에 대한 효과가 보고된 바 있다³⁶⁾. 우리의 실험결과에서 확인된 Th2 사이토카인 증가 및 이에 따른 각종 염증성 매개물질 분비의 증가는 피부표부에 축적된 '열'에 의한 것으로 사료되며, 황련의 청열효과가 이를 완화시킨 것으로 보인다.

최종적으로 M/T를 통해 아토피피부염 완화 효과를 확인해 본 결과, CT군에서 AE군에 비해 아교섬유의 분포가 더 많이 관찰되었으며, 모세혈관의 분포는 적게 확인되었다. 또한, 상피세포의 과형성 및 기저층에서의 림프구 침윤이 CT군에서 AE군에 비해 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 이를 통해 황련 추출물이 아토피피부염에서 피부 장벽의 보존을 통해 여러 염증성 매개물질의 분비를 감소시켜, 피부손상을 감소시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

이러한 연구결과로 볼 때, 황련은 피부장벽의 손상을 완화시킴으로써 Th2 분화를 조절하는 효과가 있으며, 이러한 면역학적 변화가 p-IkB와 iNOS 와 같은 염증성 매개물질의 발현을 억제시켜 피부손상 완화에 기여한 것으로 보인다. 향후 황련 추출물의 아토피피부염 치료에 대한 분자 메커니즘을 설명할 수 있는 연구가 필요하다고 사료되며, 황련에 대한 안전성 및 유효성 검증에 관한 추가연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 2016년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. NRF-2016R1D1A1B03930474).

References

1. Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet* (London, England). 2016;387(10023):1109-22.
2. Kim JH. Review Articles : Current Understanding of Atopic Dermatitis *Pediatr Allergy Respir Dis*. 2004;14(1):12-23.
3. Boguniewicz M. Atopic dermatitis: the updated practice parameter and beyond. *Allergy Asthma Proc*. 2014;35(6):429-34.
4. Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork MJ. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54(1):1-15; quiz 6-8.
5. Yun Y, Choi IW. A treatment utilization of Atopic Dermatitis According to Severity *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2009;22(1):172-80.
6. Kim BE LD. Epidermal barrier in atopic dermatitis. *Immunol Res*. 2012;4:12-6.
7. Hogan MB, Peele K, Wilson NW. Skin barrier function and its importance at the start of the atopic march. *J Allergy (Cairo)*. 2012;2012:901940.
8. Boguniewicz M, Eichenfield LF, Hultsch T. Current management of atopic dermatitis and interruption of the atopic march. *J Allergy Clin Immunol*.

- 2003;112(6):140-50.
9. Lou H, Fu Y, Wang C, Wang Y, Zhang L. [Imbalance between Th1 and Th2 cells in cord blood is influenced by maternal allergic rhinitis and associated with atopic dermatitis during the first two years of life]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2014;49(5):390-4.
 10. Heratizadeh A. Atopic dermatitis: new evidence on the role of allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2016;16(5):458-64.
 11. Halonen M, Lohman IC, Stern DA, Spangenberg A, Anderson D, Mobley S, et al. Th1/Th2 patterns and balance in cytokine production in the parents and infants of a large birth cohort. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;182(5):3285-93.
 12. Im GM, Kim HJ, Jeong WY, Jeong HW. Oriental Medical Approach on the Allergic Disease. *Korea J Oriental Physiology & Pathology*. 2002;16(5):831-9.
 13. Cha HY, Ahn SH, Cheon JH, Park SY, Kim KB. Hataedock treatment has preventive therapeutic effects for atopic dermatitis through skin barrier protection in *Dermatophagoides farinae*-induced NC/Nga mice. *J Ethnopharmacol*. 2017;206:327-36.
 14. Li S, Zhang ZQ, Wu LJ, Zhang XG, Li YD, Wang YY. Understanding ZHENG in traditional Chinese medicine in the context of neuro-endocrine-immune network. *IET Syst Biol*. 2007;1(1):51-60.
 15. Muluye RA, Bian Y, Alemu PN. Anti-inflammatory and Antimicrobial Effects of Heat-Clearing Chinese Herbs: A Current Review. *J Tradit Complement Med*. 2014;4(2):93-8.
 16. Korean Medical Pharmacology Text ublication committee. *Korean medical pharmacology*. Seoul:Shinil Books;2010.116-249.
 17. Heo J. *Donguibogam*. Seoul:Yegang publish;2019. p.2976.
 18. Kim HK, Hong SU. The anti-inflammatory effects of Huang-Lyun (*Coptidis Rhizoma*, CR) on injured tissue after burn elicitation. *J Korean Oriental Med*. 2011;32(2):1-13.
 19. Kauppi S, Jokelainen J, Timonen M, Tasanen K, Huilaja L. Adult Patients with Atopic Eczema have a High Burden of Psychiatric Disease: A Finnish Nationwide Registry Study. *Acta dermato-venereologica*. 2019.
 20. Kim HJ, Shin JU, Lee KH. REVIEW ARTICLE : Atopic dermatitis and skin barrier dysfunction *Allergy Asthma Immunol Res*. 2013;1(1):20-8.
 21. Chamlin SL, Kao J, Frieden IJ, Sheu MY, Fowler AJ, Fluhr JW, et al. Ceramide-dominant barrier repair lipids alleviate childhood atopic dermatitis: changes in barrier function provide a sensitive indicator of disease activity. *J Am Acad Dermatol*. 2002;47(2):198-208.
 22. Onoue A, Kabashima K, Kobayashi M, Mori T, Tokura Y. Induction of eosinophil- and Th2-attracting epidermal chemokines and cutaneous late-phase reaction in tape-stripped skin. *Exp Dermatol*. 2009;18(12):1036-43.
 23. Wood LC, Elias PM, Calhoun C, Tsai JC, Grunfeld C, Feingold KR. Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *J Invest Dermatol*. 1996;106(3):397-403.
 24. Cornelissen C, Marquardt Y, Czaja K, Wenzel J, Frank J, Luscher-Firzlaff J, et al. IL-31 regulates differentiation and filaggrin expression in human organotypic skin models. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(2):426-33.
 25. Kim BE, Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol*. 2008;126(3):332-7.
 26. Sehra S, Krishnamurthy P, Koh B, Zhou HM, Seymour L, Akhtar N, et al. Increased Th2 activity and diminished skin barrier function cooperate in allergic skin inflammation. *Eur J Immunol*. 2016;46(11):2609-13.
 27. Kim HJ, Shin JU, Lee KH. Atopic dermatitis and skin barrier dysfunction. *Allergy Asthma Respir Dis*. 2013;1(1):20-8.
 28. van Smeden J, Bouwstra JA. Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Curr Probl Dermatol*. 2016;49:8-26.
 29. Lee SH, Jeong SK, Ahn SK. An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med J*. 2006;47:293-306.
 30. Armengot-Carbo M, Hernandez-Martin A, Torrelo A. The role of filaggrin in the skin barrier and disease development. *Actas Dermosifiliogr*. 2015;106(2):86-95.
 31. Brown A, Farmer K, MacDonald L, Kalsheker N, Pritchard D, Haslett C, et al. House dust mite Der p 1 downregulates defenses of the lung by inactivating elastase inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29(3 Pt 1):381-9.
 32. Moya R, Carnes J, Sinovas N, Ramio L, Brazis P, Puigdemont A. Immunoproteomic characterization of a *Dermatophagoides farinae* extract used in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2016;180:1-8.
 33. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF

- kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem.* 1995;270(16):9558-63.
34. Chae S. Function and Activation of NF- κ B in Immune System. *Korean J Otolaryngol.* 2005;48:284-8.
35. Abdallah WI, Abd El Maksoud RA, Hashad DI, El Azhary NM, Abonayem SM. Correlation between waist:height ratio and serum nitric oxide level in children with atopic dermatitis. *Pediatr Dermatol.* 2015;32(3):429-30.
36. Cha HY, Ahn SH, Cheon JH, Park SY, Choi JY, Kim KB. Anti-inflammatory Effects of Hataedock Extracted from *Coptidis Rhizoma* and *Glycyrrhiza Uralensis* on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions of NC/Nga Mouse. *J Int Korean Med.* 2015;36(4):486-97.