

Original Article / 원저

大靑龍湯이 DNCB로 유발된 생쥐의 아토피피부염에 미치는 영향

김지은¹ · 이호찬¹ · 강은정¹ · 최정화² · 김종한² · 박수연² · 정민영²
동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실(¹수련의, ²교수)

Effects of Daecheonglyong-tang on Atopic Dermatitis Induced by DNCB in Mice

*Ji-Eun Kim · Ho-Chan Lee · Eun-Jeong Kang · Jung-Wha Choi · Jong-Han Kim ·
Soo-Yeon Park · Min-Yeong Jung*

Department of Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology,
College of Korean medicine, Dongshin University

Abstract

Objectives : This study was designed to examine the effects of Daecheonglyong-tang(DCL) on atopic dermatitis induced by DNCB in mice

Methods : The Nc/Nga mice were divided into 5 groups, and four groups excluding the normal group were applied by 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB), to cause AD and were orally administered with distilled water(negative control), dexamethasone(positive control), and DCL 200 or 400mg/kg once a day for 4 weeks respectively. The visual changes on skin, changes in skin tissue thickness and eosinophil infiltration were observed. IgE, Histamine, Cytokines, immune cells and the amount of gene expression of filaggrin, VEGF, TGF- β 1, EGF were measured.

Results : Dermatitis score showed a gross improvement on all DCL groups, similar to or better than positive control. All DCL groups showed no significant change in the basophils, while neutrophils and eosinophils decreased. In only DCL 400 mg/kg groups, white blood cells and mononuclear cells were decreased and lymphocytes were increased. In particular, neutrophils had similar or better effects than the positive control. In all DCL groups, IgE, Histamine, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6 and TNF- α were decreased and IL-2 was increased. In only DCL 400 mg/kg groups, IL-10 decreased and IFN- γ increased. In particular, IL-1 β and IFN- γ showed a similar rate of increase and decrease comparing positive control in DCL 400 mg/kg. TGF- β 1 was increased in all DCL groups, filaggrin and VEGF were increased in only DCL 400 mg/kg groups. EGF did not make any changes. Epidermis, dermis thickness and eosinophil infiltration were also decreased in all DCL groups.

Conclusions : By increasing Th1 cytokine and decreasing Th2 cytokine, DCL extracts appear to be effective in controlling immune response imbalances, anti-inflammatory and skin regeneration and are likely to be available as a treatment for AD.

Keywords : Nc/Nga mice; 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB); Atopic dermatitis(AD); Daecheonglyong-tang(DCL)

I. 서론

아토피피부염(Atopic dermatitis, AD)은 가장 흔한 피부질환 중 하나로 소아에서 10-20%, 성인에서 1-3%의 유병률을 보이며, 세계적으로 증가 추세에 있다. 특히 서구화된 국가의 유병률이 높고, 개발도상국에서도 꾸준히 증가하고 있다. 그 원인으로 대기오염, 주거환경의 변화, 소아기 항생제사용 증가, 정신적 스트레스 증가 등이 추측되고 있으며, 특히 최근 국내 성인 AD 환자가 많아지는 추세이다^{1,2)}.

AD의 발병 기전은 정확히 알려져 있지 않으나 유전적 소인, 피부 장벽기능, 면역체계의 이상, 환경요인 등 복잡한 상호작용의 결과로 발생하는 것으로 보고 있다¹⁾. 그러나 현재 1차 치료의 85%를 차지하는 국소 스테로이드요법의 경우 피부 위축과 같은 부작용과 독성으로 인해 장기적으로 사용할 수 없는 한계가 있고, 다른 보조치료법도 치료 중단 시 재발 가능성이 있어 아직 근본적인 치료는 없는 실정이다³⁾.

『傷寒論』에 기재된 大靑龍湯(Daecheonglyong-tang, DCL)은 『傷寒論』의 대표적인 發汗解表劑인 麻黃湯보다 麻黃의 양이 2배 더 많은 강력한 發汗劑⁴⁾, 임상적으로 流行性感冒, 流行性髓膜炎, 肺炎, 氣管支哮喘, 胸膜炎, 急性關節炎, 丹毒, 麻疹, 急性皮膚病性浮腫 등 급성열병 초기의 高熱에 表寒과 內熱, 煩躁가 보일 때 응용 가능하다⁵⁾. DCL에서 君藥인 石膏는 肺胃 氣分の 熱을 淸解하고 血藥을 도와 涼血解毒하며, 斑疹을 發하는 병은 肺胃의 鬱熱과 관계가 있으므로 邪熱이 鬱閉하여 나타나는 發疹과 邪熱이 營血에 파급된 發斑에도 사용할 수 있다고 하였다⁶⁾.

지금까지 DCL에 관한 연구로는 호흡기에서 mucin 분비 억제 효능⁷⁾, 지방세포분화 억제 및 항비만 효능^{8,9)}, 소아에서 만성 상기도 감염증 치험례¹⁰⁾가 있었으

며, 피부질환과 관련된 논문은 DCL 유사 처방인 麻杏甘石湯을 이용한 AD 및 건선에 대한 치험례 1례¹¹⁾와 일본 논문 중 천식과 동반된 AD 치험례 1례¹²⁾가 있었으나 DCL이 AD에 작용하는 면역학적 기전과 관련한 자세한 연구는 없었다.

이에 저자는 DCL이 AD에 유의한 효능이 있는지 알아보기 위해, 백서에 DNCB(2,4-dinitrochlorobenzene) 용액을 도포하여 AD를 유발시킨 후 각 실험군에 증류수, dexamethasone, DCL을 경구 투여하여 피부의 육안적인 상태, 혈액 내 IgE, Histamine, 각종 Cytokine, 면역관련 세포, 조직 내 Filaggrin, VEGF, TGF- β 1, EGF 등의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

본 실험에 사용한 大靑龍湯(石膏, 麻黃, 桂枝, 杏仁, 甘草, 生薑, 大棗 complex extract, DCL)의 구성 약재들은 대전한약국에서 구입하여 사용하였고, 그 내용 및 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of DCL

Herbal medicine name	Scientific name	Weight (g)
石膏	<i>Gypsum Fibrosum</i>	16
麻黃	<i>Ephedra sinica</i> Stapf	12
桂枝	<i>Cinnamomum cassia</i> Presl	8
杏仁	<i>Prunus armeniaca</i> Linné	6
生薑	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	6
大棗	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller	4
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	4
Total amount		56

Corresponding author : Min-Yeong Jung, Department of Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, College of Korean medicine, Dongshin University, 313 Baengnyeondaero, Mokpo-si, Jeollanam-do, 58665, Republic of Korea. (Tel : 061-280-7788, E-mail : mining32@naver.com)

• Received 2019/7/2 • Revised 2019/7/24 • Accepted 2019/7/31

2) 실험동물 및 사육

본 실험에 사용된 Nc/Nga mice(5주령, 수컷, 15-18g)는 ㈜라온바이오(Korea)에서 공급받아 실험 당일까지 물과 고형사료를 충분히 공급하고 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12시간-12시간(light-dark cycle)의 환경에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리 위원회의 승인(승인번호: DJUAR2018-011)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실험하였다.

3) 시약

사용된 시약은 DNCB(Sigma-Aldrich, USA), dexamethasone(Sigma-Aldrich, USA), formalin(Merck, Germany), total RNA prep kit(Intronbio, Korea), AccuPower CycleScript RT PreMix(Bioneer, Korea), histamine ELISA kit(MyBio-Source, U.S.A), mouse IgE single plex magnetic bead kit(Millipore, USA), mouse magnetic luminex assay kit(R&D system, USA)를 사용하였다.

4) 기기

사용된 기기는 reflux extractor(EYELA Co., Japan), rotary vacuum evaporator(EYELA Co., Japan), freeze dryer(Ilshinbiobase Co., Korea), HPLC(Shimadzu, Co., Japan), ICP-AES(Shimadzu, Co., Japan), 수은분석기(TELEDYNE Leeman Labs, U.S.A.), clean bench(Vision scientific Co., Korea), autoclave(Sanyo Co., Japan), vortex mixer(Vision scientific Co., Korea), centrifuge(Sigma Co., U.S.A.), deep-freezer(Sanyo Co., Japan), ice-maker(Vision scientific Co., Korea), plate shaker(Lab-Line Co., U.S.A.), luminex(Millipore, U.S.A.), micro plate reader(Molecular Devices Co., U.S.A.), nanodrop(Thermofisher, U.S.A.), alpha cyler 1 PCRmax(PCRmax, U.K.), electro-

phoresis system(ADVANCE, Japan), real time PCR(Qiagen, Germany)을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

DCL(56g)에 1차 증류수 500ml을 넣어 3시간 동안 환류 추출 후 얻은 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 DCL 분말 6.1g(수율: 10.8%)을 얻었으며, 얻은 분말을 초저온 냉동고(-80℃)에서 보관하며 실험에 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) HPLC 분석

DCL 30mg을 80% 에탄올 1ml에 녹여 0.45µm membrane filter로 여과시킨 후 10µl를 HPLC 시료로 사용하였다. 이동상 water(A)와 acetonitrile(B)로 gradient elution system을 적용하여 0-5min(0% B), 5-30min(40% B), 30-40min(80% B), 40-55min(100% B)로 설정하였다. 유속은 1.0ml/min, column 온도는 40℃를 유지하였고, UV wavelength는 210nm로 설정하여 분석하였다.

3) 중금속 검사

납, 비소, 카드뮴 분석의 경우 DCL 0.5g을 극초단파 시료 전처리장치 전용 용기에 넣은 후 질산 10ml을 넣고, 용기를 후드 안에 정치시켜 발생 가스를 제거한 뒤 극초단파 시료 전처리장치를 사용하여 분해하였다. 분해가 끝난 후 분해액을 여과지로 여과하여 용량 플라스크에 넣고 물을 넣어 표준액의 농도 범위로 적절하게 희석하여 검액으로 사용하였다. 질산 10ml를 극초단파 시료 전처리장치 전용 용기에 따로 넣어 검액 조제와 같은 방법으로 조작하여 공시험액으로 사용하였다. 준비된 검액, 표준액 및 공시험액을 가지고 유도결합플라즈마분광계(ICP)를 이용하여 검량선을 작성하고 공시험액으로 보정하여 검색을 측정하였다. 수은 분석의 경우

수은분석기를 이용하여 DCL 50mg을 달아 특별한 전처리 과정 없이 측정하였다.

4) 아토피 피부염 유발 및 시료처리

1주간 안정기를 거친 뒤 6주령이 된 Nc/Nga mice의 등을 귀 하단부에서부터 꼬리 상단부까지 제모하고 24시간 방치 후 2주간 격일로 1% DNCB(2,4-dinitrochlorobenzene) 용액(아세트·올리브오일=3:1) 150 μ l를 제모 부위에 도포하였다. 2주간 도포 후, 주 3회씩 0.5% DNCB 용액을 150 μ l를 계속 도포하면서, 음성대조군은 증류수, 양성대조군은 dexamethasone 1mg/ml, DCL은 200mg/kg, 400mg/kg으로 매일 1회 200 μ l씩 4주간 경구 투여하였다.

5) 혈청 분리 및 등 조직 채취

실험종료 후 심장천자법으로 채혈하여 1cc의 전혈을 얻었고, 이 중 0.25cc의 전혈을 통해 혈구분석을 진행하였으며, 나머지 전혈을 30분간 상온에서 굳히고 원심 분리(3,000rpm, 15min)하여 혈청을 획득하였고 분리한 혈청은 바이오마커 측정용량에 맞게 ep tube에 넣어 초저온 냉동고(-80 $^{\circ}$ C)에 보관하여 사용하였다. 획득한 혈청 중 Millipore사의 IgE kit와 R&D system사의 cytokine kit, MyBioSource사의 histamine ELISA kit는 혈청을 각각 50 μ l 사용하였다. 혈액 채취 후 유발한 등 면적부분을 미세가위를 이용하여 근막 전까지 잘라 질소로 즉각 냉각 시킨 후 ep tube에 넣어 초저온 냉동고(-80 $^{\circ}$ C)에 보관하며 사용하였다.

6) 육안적 평가

AD 유발 후 시료를 경구 투여한 4주차에 사진 촬영을 진행하고 사진을 바탕으로 AD에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법으로 관능 평가를 실시하였다. 평가 항목은 홍반(erythema), 가려움과 건조 피부(pruritus & dry skin), 부종과 혈종(edema & hematoma), 짓무름(excoriation), 태선화(lichenification) 등으로 5가지이며, 각각의 항목은 없음(0),

약함(1), 중증도(2), 심함(3)으로 채점하였다. 가려움에 대한 항목은 실험동물용 빈 케이지에 넣어 10분간 동영상 촬영 후, 반복 재생하여 등을 굽는 횟수를 측정해 평가하였다.

7) 면역세포 분석

실험 종료 후 획득한 혈액으로 면역세포 white blood cell, monocyte, eosinophil, neutrophil, basophil, lymphocyte 측정을 대전대학교 한방 Bio Fab Lab(Korea)에 분석 의뢰하였다.

8) 혈액 내 바이오마커 측정

㉞ Immunoglobulin E(IgE)

실험 종료 후 획득한 혈청으로 IgE를 측정하였다. 96 well plate에 분리한 혈청, standard를 50 μ l씩 bead를 25 μ l씩 각 well에 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 후 washing buffer를 이용하여 3회 세척 작업을 진행하였다. 세척 후 25 μ l의 anti-mouse light chain, PE를 넣어 다시 상온에서 15분 반응시키고 3회 세척한 뒤 sheath fluid를 200 μ l씩 넣은 후 luminex를 통해 측정하였다.

㉟ Histamine

실험 종료 후 획득한 혈청으로 histamine을 측정하였다. 96 well plate에 분리한 혈청, 96 well plate에 분리한 혈청, standard를 50 μ l씩 biotin-labeled antibody를 50 μ l씩 각 well에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 45분 반응시킨 후 washing buffer를 이용하여 3회 세척 작업을 진행하였다. 세척 후 100 μ l의 HRP-streptavidin conjugate를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분 반응 3회 세척한 뒤 TMB substrate를 90 μ l씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 15분 반응시켰다. 반응 후 stop solution을 50 μ l씩 넣고 micro plate reader기를 통해 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

㊱ Cytokine

실험 종료 후 획득한 혈청으로 IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ 를 측정하였다. 96 well plate에 분리한 혈청, standard를 50 μ l씩 microparticle cocktail를 50 μ l씩 각 well에 넣고 상온에서 2시간 반응시킨 후 washing buffer를 이용하여 3회 세척 작업을 진행하였다. 세척 후 50 μ l의 biotin-antibody cocktail를 넣어 다시 상온에서 1시간 반응시키고 3회 세척한 뒤 streptavidin-PE를 50 μ l씩 넣어 상온에서 30분 반응 시켰다. 반응 후 washing buffer를 이용하여 3회 세척 작업을 진행, 세척한 뒤 sheath fluid 150 μ l를 넣어 상온에서 2분 반응시킨 후 luminex를 통해 측정하였다.

9) 조직 내 바이오마커 측정

실험 종료 후 획득한 등 조직으로 filaggrin, VEGF, TGF- β 1, EGF의 mRNA 발현량을 확인하였다. 조직 100mg에 cell lysis buffer 1ml씩 넣은 후 미세가위로 조직을 잘라준 후 chloroform을 200 μ l씩 첨가하여 다시 혼합하였다. 이를 원심분리 (13,000rpm, 10min) 후 400 μ l의 상층액을 회수하여 binding buffer를 400 μ l씩 넣고 혼합하여 column에 주입하고 원심분리 하였다. column에 washing buffer A를 700 μ l씩 넣어 원심분리 하고 washing buffer B를 700 μ l씩 넣어 원심분리 한 뒤 elution buffer 50 μ l을 넣고 원심분리 하여 RNA를 추출하였다. 역전사(reverse transcription) 반응은 RT premix(reverse transcriptase, reaction buffer, dNTPs, dT20 primer, stabilizer)에 total RNA를 1 μ g 첨가하고 최종 부피가 20 μ l가 되도록 diethyl pyrocarbonate(DEPC)처리된 증류수를 첨가하였다. 이 혼합액을 섞은 후 원심침강(2,000rpm, 5sec)하고 45 $^{\circ}$ C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 이를 다시 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응시켜 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다. Real-time PCR을 진행하여 합성이 완료된 cDNA를

증폭하였는데, real-time 전용 tube에 cDNA 1 μ l, 각 primer 2 μ l, SYBR Green 10 μ l, DEPC-DW 5 μ l씩 넣어 다음과 같이 진행하였다. 95 $^{\circ}$ C 2분 반응 후 95 $^{\circ}$ C 5초, 62.5 $^{\circ}$ C 30초를 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다. 이 후 유전자 발현량은 대조군에 비하여 계산하였고, 사용된 primer의 sequence와 size는 Table 2와 같다.

Table 2. The Sequences of Primers for Real-Time PCR

Primer	F/R*	Sequences	Size (bp)
Filaggrin	F	TACTGGTGCTAAAGDTGGCA	100
	R	CCTTTATAATCAGTTTTACT	
VEGF	F	AGGAGACGGAATACAGGGCT	97
	R	GGTCCTCCCCGACGTTTGGCTG	
TGF- β 1	F	CGAGCCGCGAGGAACCGAAG	110
	R	GAGCCCAGAAGTTCGGACGAA	
EGF	F	TCCTGACCCCGAACTTCTCA	130
	R	TTCGCAGTACTTCCGGTCTC	
GAPDH	F	TGCTGCATACGAGCATCCAT	167
	R	TGTCCTCAAAGTGAACCGCA	

* F : forward, R : reverse

10) 조직학적 검사

실험 종료 후 등 피부 채취하여 10% 포르말린에 고정시킨 조직을 시험검사 기관인 KPNT(Korea)에 조직 염색(H&E, M&T 염색)을 의뢰하였다. 이 후, 염색된 조직은 광학현미경을 통해 관찰하여 피부 두께와 호산구 침윤 변화를 비교분석하였다.

3. 통계처리

실험 결과는 SPSS 18.0의 ANOVA를 이용한 통계처리 및 Dunkan test로 사후검정 하였고 p<0.001, p<0.01 및 p<0.05 수준에서 그 유의성을 검정하였다.

III. 실험결과

1. HPLC 분석

DCL의 HPLC 분석 결과, 2분, 4분, 23분대에 피크(peak)가 확인되었다(Fig. 1).

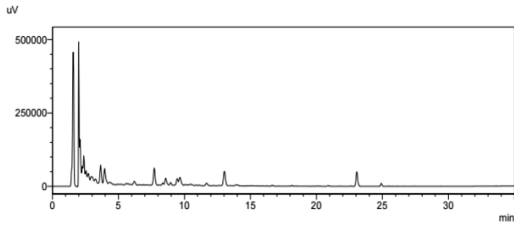


Fig. 1. HPLC Analysis of DCL

* DCL was analysis with HPLC chromatogram, HPLC : high performance liquid chromatography

2. 중금속 함량

중금속 함량을 측정한 결과 DCL은 납, 비소, 카드뮴이 기준치 이하로 검출되었고 수은은 검출되지 않았다(Table 3).

Table 3. Content of Pb, As, Cd and Hg in DCL

	Pb	As	Cd	Hg
permissible concentration	5	3	0.3	0.2
DCL	0.5	1.7	0.1	N.D

* Unit :mg/kg

3. 육안적 평가

DNCB 처리에 의하여 정상군을 제외한 모든 그룹에서 심한 상처와 짓무름에 의한 피부염 유발 현상을 확인하였으며, 6주차에 각 그룹의 피부상태를 육안으로 관찰한 결과, 대조군은 시간이 지날수록 각질의 각화와 탈락의 현상이 심한 반면, DCL 투여군은 AD의 증상이 현저하게 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

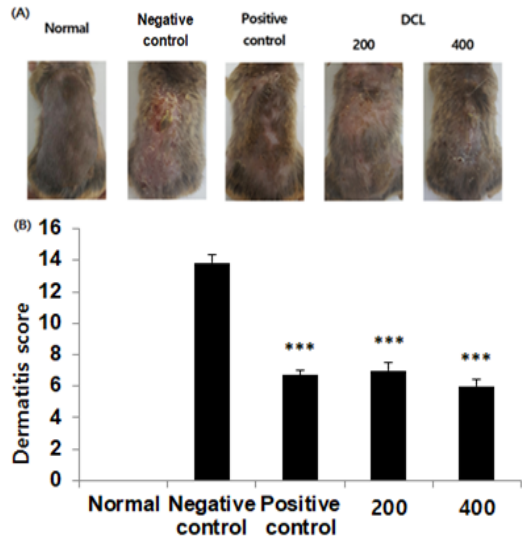


Fig. 2. Effects of DCL on Skin Lesions in the DNCB-induced AD Mice(A : photography example, B : dermatitis score)

*Photography example and dermatitis score of the clinical severity in DNCB-induced AD mice skin lesions were monitored once in the final week. Values represent the mean±SD of the total score from 6 mice for each group(***p<0.001 compared with the negative control group).

Normal : Non DNCB induced Nc/Nga mice

Negative control : DNCB-induced mice group was treated orally with D.W

Positive control : DNCB-induced mice group was treated orally with dexamethasone 1mg/kg

200 : DNCB-induced mice group was treated orally with DCL 200mg/kg

400 : DNCB-induced mice group was treated orally with DCL 400mg/kg

4. 면역세포

1) White blood cell

White blood cell level을 측정한 결과, 정상군은 $1.1 \pm 0.1 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$, 음성대조군은 $3.3 \pm 0.2 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$, 양성대조군은 $1.5 \pm 0.2 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$ 로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 $2.9 \pm 0.2 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$, $2.1 \pm 0.1 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$ 로 나타나 DCL 200mg/kg을 제외한 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.001$) 감소가 나타났다(Fig. 3).

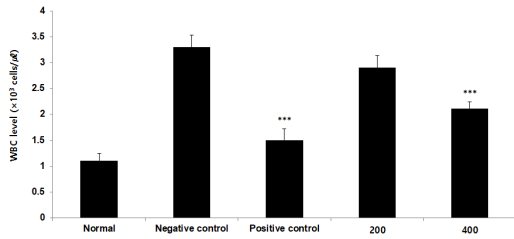


Fig. 3. The Effects of DCL on White Blood Cell Level in the DNCB-induced AD Mice

*The level of white blood cell data represents the mean \pm SD(** p <0.001, compared with the negative control group).

2) Monocyte

Monocyte level을 측정한 결과, 정상군은 7.4 \pm 1.1%, 음성대조군은 25.0 \pm 1.9%, 양성대조군은 17.4 \pm 1.0%로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 22.3 \pm 0.9%, 21.5 \pm 1.0%로 나타나 DCL 200mg/kg을 제외한 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 유의성 있는(p <0.01, p <0.05) 감소가 나타났다(Fig. 4).

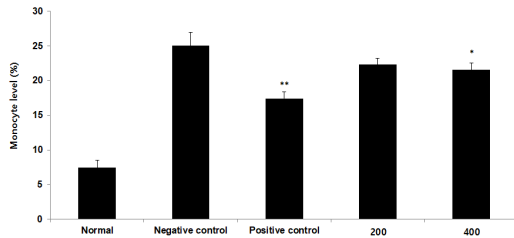


Fig. 4. The Effects of DCL on Monocyte Level in the DNCB-induced AD Mice

*The level of monocyte data represents the mean \pm SD(** p <0.01, p <0.05 compared with the negative control group).

3) Neutrophil

Neutrophil level을 측정한 결과, 정상군은 5.7 \pm 0.6%, 음성대조군은 10.9 \pm 0.4%, 양성대조군은 7.5 \pm 0.2%로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 8.6 \pm 0.1%, 7.2 \pm 0.2%로 나타나 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 유의성 있는(p <0.001, p <0.01) 감소가 나타났다(Fig. 5).

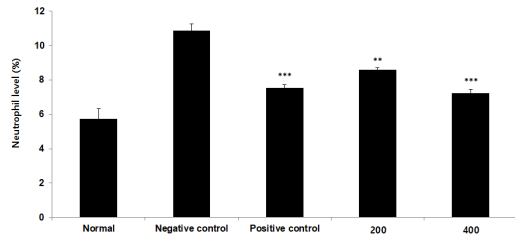


Fig. 5. The Effects of DCL on Neutrophil Level in the DNCB-induced AD Mice

*The level of neutrophil data represents the mean \pm SD(** p <0.001, ** p <0.01 compared with the negative control group).

4) Eosinophil

Eosinophil level을 측정한 결과, 정상군은 5.4 \pm 0.3%, 음성대조군은 10.8 \pm 0.4%, 양성대조군은 6.7 \pm 0.4%로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 9.3 \pm 0.5%, 8.2 \pm 0.2%로 나타나 모든 투여군은 음성대조군에 비해 유의성 있는(p <0.001, p <0.01, p <0.05) 감소가 나타났다(Fig. 6).

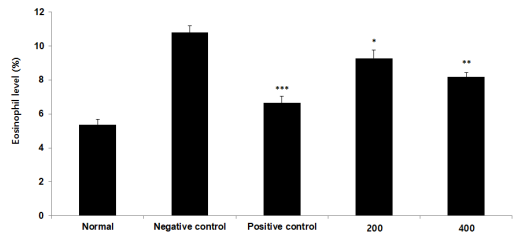


Fig. 6. The Effects of DCL on Eosinophil Level in the DNCB-induced AD Mice

*The level of eosinophil data represents the mean \pm SD(** p <0.001, ** p <0.01, p <0.05 compared with the negative control group).

5) Basophil

Basophil level을 측정한 결과, 정상군은 10.6 \pm 0.1%, 음성대조군은 10.7 \pm 0.1%, 양성대조군은 9.9 \pm 0.2%로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 11.6 \pm 0.2%, 10.8 \pm 0.2%로 나타나 모든 실험군에서 차이를 나타내지 않았다(Fig. 7).

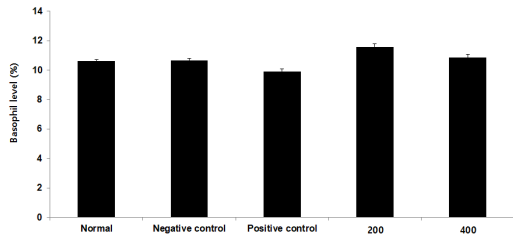


Fig. 7. The Effects of DCL on Basophil Level in the DNCB-induced AD Mice

* The level of basophil data represents the mean±SD.

6) Lymphocyte

Lymphocyte level을 측정한 결과, 정상군은 70.6±2.4%, 음성대조군은 41.7±5.1%를 양성대조군은 57.8±6.2%로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 47.6±4.9%, 51.4±1.9%로 나타나 DCL 200mg/kg을 제외한 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 유의성 있는(* p<0.01, * p<0.05) 증가가 나타났다(Fig. 8).

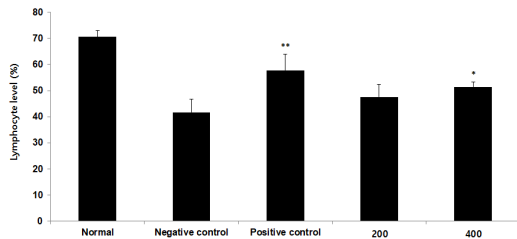


Fig. 8. The Effects of DCL on Lymphocyte Level in the DNCB-induced AD Mice

* The level of lymphocyte data represents the mean±SD(** p<0.01, * p<0.05 compared with the negative control group).

5. 혈액 내 바이오마커

1) Immunoglobulin E(IgE)

IgE level을 측정한 결과, 정상군은 245.6±50.4ng/ml, 음성대조군은 3562.8±282.0ng/ml 양성대조군은 1698.8±400.9ng/ml로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 2717.0±370.7ng/ml, 2290.9±136.3ng/ml로 나타나 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 유의성 있는(** p<0.001, * p<0.05) 감소가 나타났다(Fig. 9).

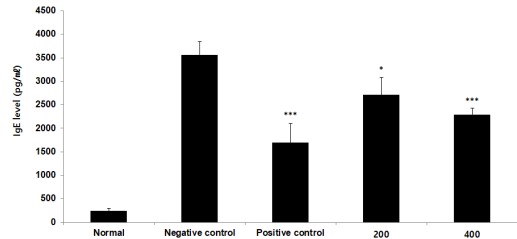


Fig. 9. The Effects of DCL on IgE Level in the DNCB-induced AD Mice

* The level of IgE was examined by luminex multiplex assays. Each data represents the mean±SD(** p<0.001, * p<0.05 compared with the negative control group).

2) Histamine

Histamine level을 측정한 결과, 정상군은 12.0±3.7ng/ml, 음성대조군은 62.6±3.1ng/ml, 양성대조군은 32.8±3.1ng/ml로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 55.0±3.3ng/ml, 39.9±5.2ng/ml로 나타나 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 유의성 있는(** p<0.001, * p<0.05) 감소가 나타났다(Fig. 10).

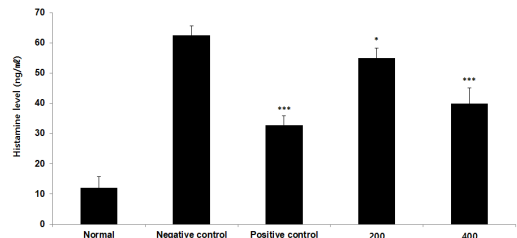


Fig. 10. The Effects of DCL on Histamine Level in the DNCB-induced AD Mice

* The level of histamine was examined by ELSIA. Each data represents the mean±SD(** p<0.001, * p<0.05 compared with the negative control group).

3) Cytokine

⑦ IL-1β: IL-1β level을 측정한 결과, 정상군은 1.4±1.3pg/ml, 음성대조군은 40.3±3.7pg/ml, 양성대조군은 17.1±2.3pg/ml로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 28.6±3.7pg/ml, 21.1±2.8pg/ml로 나타나 모든 투여군은 음성대조군에 비해 유의성 있는(** p<0.001, ** p<0.01)

감소가 나타났다(Fig. 11).

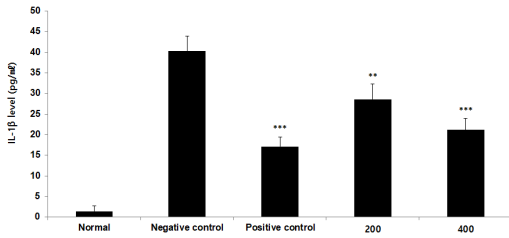


Fig. 11. The Effects of DCL on IL-1β Level in the DNCB-induced AD Mice

* The level of IL-1β was examined by luminex multiplex assays. Each data represents the mean±SD(***p<0.001, **p<0.01 compared with the negative control group).

㊤ IL-2 : IL-2 level을 측정한 결과, 정상군은 45.7±3.2pg/ml, 음성대조군은 19.0±2.4pg/ml, 양성대조군은 40.4±2.6pg/ml로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 27.9±3.6pg/ml, 33.1±3.3pg/ml로 나타나 모든 투여군은 음성대조군에 비해 유의성 있는(***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05) 증가가 나타났다(Fig. 12).

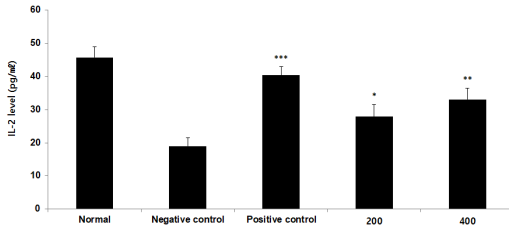


Fig. 12. The Effects of DCL on IL-2 Level in the DNCB-induced AD Mice

* The level of IL-2 was examined by luminex multiplex assays. Each data represents the mean±SD(***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 compared with the negative control group).

㊤ IL-4 : IL-4 level을 측정한 결과, 정상군은 5.1±2.2pg/ml, 음성대조군은 72.7±7.1pg/ml, 양성대조군은 34.4±5.9pg/ml로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 259.4±5.6pg/ml, 48.9±3.9pg/ml로 나타나 모든 투여군에서 음성

대조군에 비해 유의성 있는(***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05) 감소가 나타났다(Fig. 13).

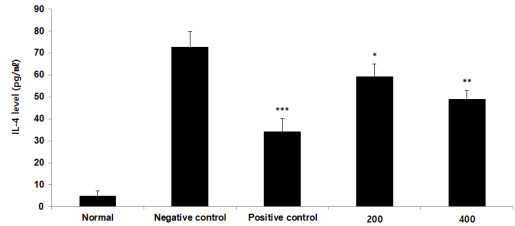


Fig. 13. The Effects of DCL on IL-4 Level in the DNCB-induced AD Mice

* The level of IL-4 was examined by luminex multiplex assays. Each data represents the mean±SD(***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 compared with the negative control group).

㊤ IL-5 : IL-5 level을 측정한 결과, 정상군은 1.3±1.9pg/ml, 음성대조군은 33.4±4.4pg/ml, 양성대조군은 18.9±3.5pg/ml 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 26.0±2.4pg/ml, 25.8±1.4pg/ml로 나타나 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 유의성 있는(**p<0.01, *p<0.05) 감소가 나타났다(Fig. 14).

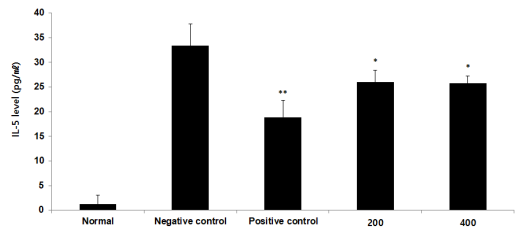


Fig. 14. The Effects of DCL on IL-5 Level in the DNCB-induced AD Mice

* The level of IL-5 was examined by luminex multiplex assays. Each data represents the mean±SD(*p<0.01, *p<0.05 compared with the negative control group).

㊤ IL-6 : IL-6 level을 측정한 결과, 정상군은 17.1± 11.6pg/ml, 음성대조군은 270.9± 12.4pg/ml, 양성대조군은 135.8±16.4pg/ml로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 207.4±12.3pg/ml, 162.4±12.3pg/ml로 나타나

모든 투여군은 음성대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$) 감소가 나타났다(Fig. 15).

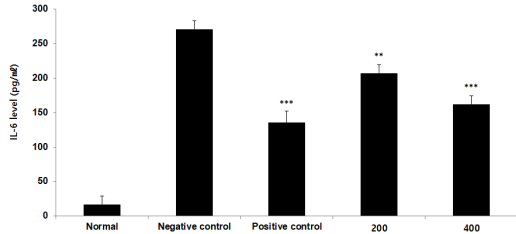


Fig. 15. The Effects of DCL on IL-6 Level in the DNCB-induced AD Mice

* The level of IL-6 was examined by luminex multiplex assays. Each data represents the mean \pm SD (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ compared with the negative control group).

㉞ IL-10 : IL-10 level을 측정한 결과, 정상군은 1.5 ± 2.0 pg/ml, 음성대조군은 59.7 ± 4.6 pg/ml, 양성대조군은 25.7 ± 3.1 pg/ml로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 51.0 ± 3.1 pg/ml, 39.2 ± 3.9 pg/ml로 나타나 DCL 200mg/kg을 제외한 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$) 감소가 나타났다(Fig. 16).

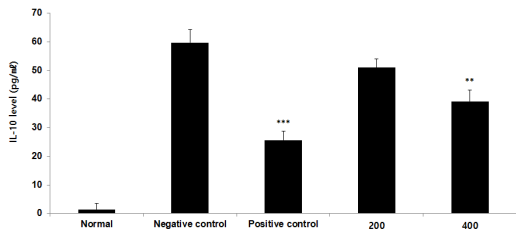


Fig. 16. The Effects of DCL on IL-10 Level in the DNCB-induced AD Mice

* The level of IL-10 was examined by luminex multiplex assays. Each data represents the mean \pm SD (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ compared with the negative control group).

㉞ TNF- α : TNF- α level을 측정한 결과, 정상군은 94.9 ± 68.5 pg/ml, 음성대조군은 982.4 ± 54.1 pg/ml, 양성대조군은 570.2 ± 79.3 pg/ml로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 856.3 ± 54.1 pg/ml, 762.2 ± 79.3 pg/ml로 나타나 모

든 투여군에서 음성대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 감소가 나타났다(Fig. 17).

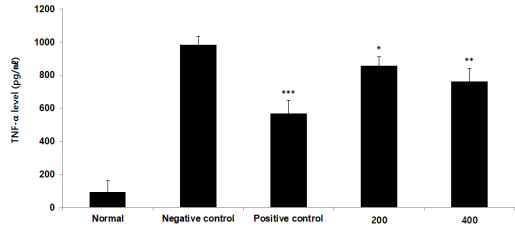


Fig. 17. The Effects of DCL on TNF- α Level in the DNCB-induced AD Mice

* The level of TNF- α was examined by luminex multiplex assays. Each data represents the mean \pm SD (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with the negative control group).

㉞ IFN- γ : IFN- γ level을 측정한 결과, 정상군은 70.4 ± 5.0 pg/ml, 음성대조군은 41.2 ± 6.4 pg/ml, 양성대조군은 62.8 ± 7.0 pg/ml로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 44.3 ± 6.2 pg/ml, 60.6 ± 3.2 pg/ml로 나타나 DCL 200mg/kg을 제외한 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 유의성 있는 (* $p < 0.01$) 증가가 나타났다(Fig. 18).

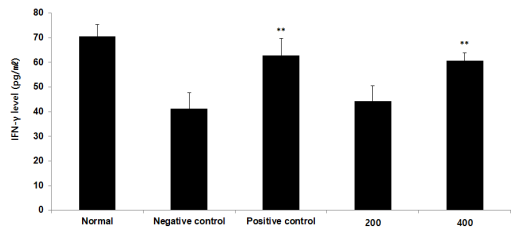


Fig. 18. The Effects of DCL on IFN- γ Level in the DNCB-induced AD Mice

* The level of IFN- γ was examined by luminex multiplex assays. Each data represents the mean \pm SD (* $p < 0.01$ compared with the negative control group).

6. 조직 내 바이오마커

1) Filaggrin

Filaggrin mRNA 발현량을 측정한 결과, 정상군은

2.2±0.1, 음성대조군은 1.0±0.1, 양성대조군은 1.7±0.1로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 1.1±0.3, 1.4±0.2로 나타나 DCL 200mg/kg을 제외한 모든 투여군은 음성대조군에 비해 유의성 있는 (**p<0.001, ***p<0.01) 증가가 나타났다(Fig. 19).

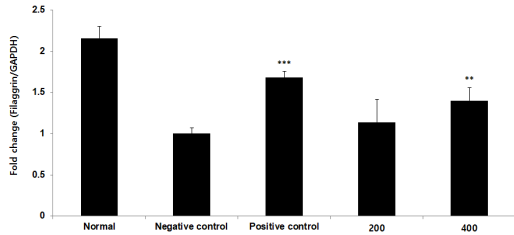


Fig. 19. The Effects of DCL on Filaggrin mRNA Level in the DNCB-induced AD Mice

* The mRNA level of filaggrin was examined by a real-time PCR. Each data represents the mean±SD(***p<0.001, **p<0.01 compared with the negative control group).

2) VEGF

VEGF mRNA 발현량을 측정한 결과, 정상군은 1.7±0.1, 음성대조군은 1.0±0.1, 양성대조군은 1.5±0.1로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 1.0±0.0, 1.2±0.1로 나타나 DCL 200mg/kg을 제외한 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 유의성 있는 (**p<0.001, *p<0.05) 증가가 나타났다(Fig. 20).

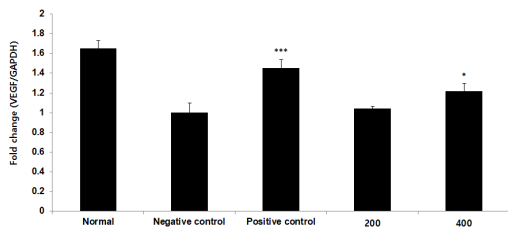


Fig. 20. The effects of DCL on VEGF mRNA level in the DNCB-induced AD mice

* The mRNA level of VEGF was examined by a real-time PCR. Each data represents the mean±SD(***p<0.001, *p<0.05 compared with the negative control group).

3) TGF-β1

TGF-β1 mRNA 발현량을 측정한 결과, 정상군은

2.2±0.1, 음성대조군은 1.0±0.2, 양성대조군은 1.6±0.1로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 1.3±0.1, 1.5±0.1로 나타나 모든 투여군은 음성대조군에 비해 유의성 있는 (**p<0.01, *p<0.05) 증가가 나타났다(Fig. 21).

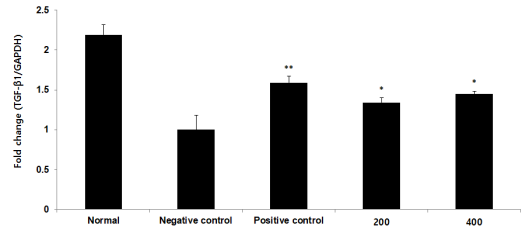


Fig. 21. The Effects of DCL on TGF-β1 mRNA Level in the DNCB-induced AD Mice

* The mRNA level of TGF-β1 was examined by a real-time PCR. Each data represents the mean±SD(*p<0.01, **p<0.05 compared with the negative control group).

4) EGF

EGF mRNA 발현량을 측정한 결과, 정상군은 2.3±0.0, 음성대조군은 1.0±0.1, 양성대조군은 1.7±0.1로 나타난 반면, DCL 200, 400mg/kg 투여군은 1.0±0.1, 1.3±0.3으로 나타나 DCL 투여군에서는 음성대조군에 비해 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(Fig. 22).

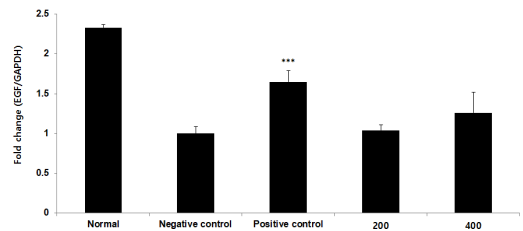


Fig. 22. The Effects of DCL on EGF mRNA Level in the DNCB-induced AD Mice

* The mRNA level of EGF was examined by a real-time PCR. Each data represents the mean±SD(***p<0.001, compared with the negative control group).

7. 조직학적 검사

1) 피부 두께

피부 두께 변화를 측정된 결과, 정상군에 비해 음성 대조군은 epidermis(E; black arrow)와 dermis(D; red arrow) 두께가 뚜렷하게 증가하였으며, 모든 투여군은 음성대조군에 비해 epidermis와 dermis의 두께가 감소하였다(Fig. 23).

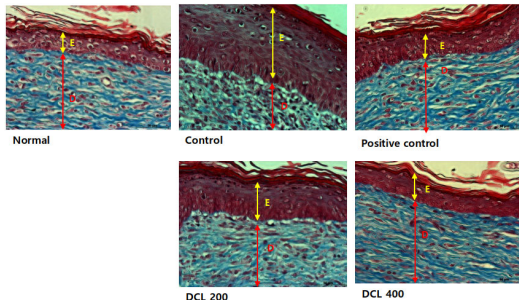


Fig. 23. The Effects of DCL on Skin Thickness in the DNCB-induced AD Mice

* The skin thickness were examined by M & T staining of skin sections(magnification : $\times 50$, scale bar : $200\mu\text{m}$)

2) 호산구 침윤

호산구의 침윤 변화를 측정된 결과, 정상군에 비해 음성대조군은 호산구의 침윤이 뚜렷하게 증가하였으며, 모든 투여군은 음성대조군에 비해 침윤이 감소하였다(Fig. 24).

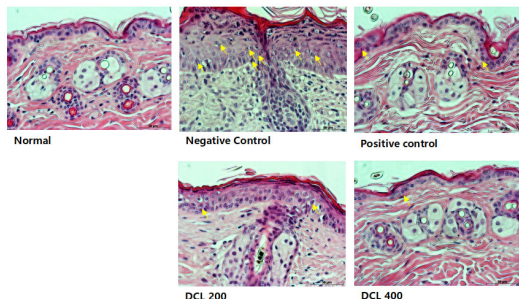


Fig. 24. The Effects of DCL on Eosinophil Infiltration in the DNCB-induced AD Mice

* The eosinophil infiltration was examined by H&E staining of skin sections(magnification : $\times 200$, scale bar : $50\mu\text{m}$).

IV. 고찰

AD의 원인과 발병 기전은 정확히 알려져 있지는 않으나, 유전적 소인, 피부 장벽기능, 면역체계의 이상, 환경요인 등 복잡한 상호작용의 결과로 발생하는 것으로 보고 있다¹⁾. 최근에는 AD의 병인을 1차적으로 피부 장벽의 이상이 원인이 되어 작용한다는 outside-in model과 비정상적인 면역반응이 먼저 발생하여 이로 인해 피부장벽기능이 손상된다는 inside-out model, 그리고 이 두 가지 기전을 통합하여 상호 복합적으로 작용한다는 outside-inside-outside model로 설명하고 있다³⁾. 즉 취약한 피부장벽의 기능이상과 선천면역 및 후천면역 체계의 비정상적인 반응이 복합적으로 AD의 병인에 기여한다⁴⁾.

outside-in model 이론은 표피장벽의 결함에 초점을 두고 AD의 발병 기전을 설명한다. 표피장벽의 기능 장애는 AD 환자의 정상 피부에서도 나타나며, 각질층 수화의 감소, 경피 수분 손실의 증가 및 특정 구조적 결손 등이 특징적으로 관찰된다. 각질층 내 각질세포막을 형성하는 구조 단백질 Filaggrin 유전자의 돌연변이는 AD환자의 15-50%에서 관찰된다. 반면 inside-out model 이론에 따르면 면역조절장애는 AD의 발병 기전에 핵심 요인 중 하나이며, AD는 전신 면역 질환으로 염증반응을 유발하는 쪽으로 경향성이 증가된 양상을 보인다. 항원에 의해 랑게르한스세포, 비만세포, 각질형성 세포가 활성화되면, 호산구 및 염증성 수상돌기 표피세포가 증가하게 되고, 이후에 AD에서 보이는 Th2 우세 반응으로의 변화가 일어나게 된다²⁾.

현재까지 AD의 양방치료는 국소요법으로 보습제, 스테로이드, 칼시뉴린 억제제, 전신요법으로 항히스타민제, 전신스테로이드제, Cyclosporine, Interferon- γ 등의 면역억제제, 기타치료법으로 자외선요법, 면역요법, 감마리놀렌산 등의 치료법이 사용되고 있으며 새로운 치료제로 Th2 경로를 차단하는 생물학제제와 small molecule inhibitors가 개발 중이다¹⁵⁾.

그러나 현재 일차치료의 85%를 차지하는 국소 스테

로이드요법의 경우 피부 위축 등의 부작용과 독성으로 인해 장기적으로 사용할 수 없는 한계가 있고, 끊었을 때 빠르게 재발하는 반동현상의 문제가 있다. 중증 환자의 증상조절을 위해 사용하는 전신면역억제제 중 첫 번째로 권장되는 Cyclosporine의 경우에도 고혈압, 신장독성 등의 부작용이 있고 다른 면역억제제도 백혈구 감소, 간독성 등의 부작용으로 오래 사용할 수 없으며, 다른 보조 치료들 또한 치료를 중단하면 재발 가능성이 있어 아직까지 근본적인 치료는 없는 실정이다^{2,3)}.

한의학에서 AD는 奶癬, 胎癬, 胎胎瘡, 濕疹, 濕瘡, 四彎風, 浸淫瘡 등의 범주로 볼 수 있는데¹⁶⁾ 『諸病源候論』 “小兒面上, 癬皮如甲錯起乾燥, 謂之乳癬”이라 하고 “浸淫瘡…發于肌膚, 初生甚小, 先痒後痛而成瘡, 汁出浸漬肌肉, 浸淫漸闊乃遍體 …以其漸漸增長, 因名浸淫也”이라고 정의한 이래로 수많은 의가들에 의한 기록이 있으며 『外科正宗』에는 “…頭面遍身 發爲奶癬 流脂成片, 睡臥不安, 瘙痒不絕…”이라 하여 구체적으로 기술되어있고, 清代 『醫宗金鑑』에 이르러서는 胎胎瘡가 乾皴과 濕皴으로 변증이 이루어지는 등 여러 문헌에 AD와 관련된 내용이 기록되어 있다¹⁷⁾.

최근 한의학에서는 AD 증상의 발현양상에 따라 濕證과 乾證으로, 병인병기에 따라 급성기에는 濕熱證, 아급성기에는 脾虛濕熱證, 만성기에는 陰虛血燥證으로, 발병 시기에 따라 영아기, 성인기로 나누어 변증이 이루어지고 있으며^{17,18)} 영아기에는 健脾除濕, 消風清熱止痒, 소아기에서 성인기에는 風濕熱浸淫肌膚症에 清熱利濕, 消風止痒 脾虛濕熱內蘊症에는 健脾除濕, 陰傷血燥濕鬱症에는 滋陰養血, 除濕止痒의 치법을 쓰고 있다¹⁹⁾. 현재까지 黃連解毒湯^{20,21)}, 荊芥連翹湯²²⁾, 溫清飲²³⁾, 清肌散²⁴⁾, 理中湯²⁵⁾, 涼血除濕湯²⁶⁾ 生料四物湯²⁷⁾, 涼膈散火湯²⁸⁾, 仙方敗毒湯²⁹⁾ 등 다양한 한약복합제제의 AD에 대한 유효성과 기전에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

한편 『傷寒論』에 “太陽中風, 脈浮緊, 發熱惡寒, 身疼痛, 不汗出而煩躁者, 大青龍湯主之” “傷寒脈浮緩, 身不疼, 但重, 乍有輕時, 無少陰證者, 大青龍湯發之”라 기재되어있는 DCL은 麻黃湯에 石膏 生薑 大棗를 넣어 ‘發熱惡寒身

疼痛無汗而煩躁’를 치료하는 처방으로 『傷寒論』의 대표적인 發汗解表劑인 麻黃湯보다 麻黃의 양이 2배 더 많은 강력한 發汗劑이다. DCL증은 衛氣가 왕성하고 表實한 사람이 邪氣의 침습을 받아 體表에서 衛氣와 邪氣가 대립하고 있는 상황으로, 麻黃湯證과 병기가 유사하나 병세가 한층 심하여 위 병기에 더해 內熱煩躁가 있다. 즉, 裏熱에 의해 혼증된 진액이 外泄 되지 못하고 體表로 물리는 과정에서 발생하는 병증일 때 시급하게 體表를 뚫어주는 약이다^{4,10)}. 임상적으로 DCL은 流行性感冒, 流行性髓膜炎, 肺炎, 氣管支哮喘, 胸膜炎, 急性關節炎, 丹毒, 麻疹, 急性皮膚病性浮腫 등 급성열병 초기의 高熱에 表寒과 內熱, 煩躁가 보일 때 응용 가능하다⁸⁾.

DCL에서 君藥인 石膏는 『本草求真』에서 清熱解肌의 효능이 있어 發汗시키면서 울체된 것을 풀어준다고 하였고⁴⁾ 清熱瀉火, 除煩止渴하여 煩渴, 神昏譫語, 發狂을 치료하며 특히 皴瘡 효능이 있어 發斑, 癰疽瘡瘍, 濕疹, 湯火傷의 피부질환을 치료한다. 斑疹을 發하는 병은 肺胃의 鬱熱과 관계가 있고, 石膏는 肺胃 氣分の 熱을 清解하고 血藥을 도와 涼血解毒하기 때문에 邪熱이 鬱閉한 發疹과 邪熱이 營血에까지 파급된 發斑에도 사용할 수 있으며³⁰⁾, 또한 접촉성 피부염의 外治法에도 빈용되는 약재이다³¹⁾. 麻黃 또한 發汗解表, 宣肺平喘, 利水通淋, 溫散寒邪의 효능이 있으며 外感風寒의 表實證 뿐 아니라 肌膚不仁, 風疹瘙痒, 陰疽核核 등 피부질환에 자주 쓰인다³⁰⁾. DCL에서 桂枝는 發汗解肌, 生薑은 解表散寒 하여 麻黃의 發汗解表 작용과 함께 노폐물을 제거하며, 杏仁은 麻黃과 함께 外泄 되지 못하는 진액을 배출해준다. 甘草는 調和諸藥, 大棗는 緩和藥性 하는 작용과 함께 몸에 영양성분을 공급해주는 역할을 한다³²⁾.

지금까지 DCL에 관한 연구로는 호흡기에서 mucin 분비 억제효능⁷⁾, 지방세포분화 억제 및 항비만 효능^{8,9)}, 소아에서 만성 상기도감염증 치험례¹⁰⁾가 있었으며, 피부질환과 관련된 논문은 DCL유사 처방인 麻杏甘石湯을 이용한 AD 및 건선에 대한 치험례 1례¹¹⁾와 일본 논문 중 천식과 동반된 AD 치험례 1례¹²⁾가 있었으나 DCL이 AD에 작용하는 면역학적 기전과 관련한 자세한 연구는

없었다.

이에 저자는 DCL이 AD에 유의한 효능이 있는지 알아보기 위해, 백서에 DNCB 용액을 도포하여 AD를 유발시킨 후 증류수를 투여한 Negative control군, Dexamethasone을 투여한 Positive control군, DCL의 저농도(200mg/kg) 및 고농도(400mg/kg) 투여군 그리고 normal군 까지 총 5개의 비교 군으로 나누어 본 연구를 시행하였다. 비교군에는 각각의 시료를 매일 1회 4주간 경구 투여한 뒤, 피부의 육안적인 상태, 혈액 내 IgE, Histamine, 각종 Cytokine, 면역관련세포 그리고 조직 내 Filaggrin, VEGF, TGF- β 1, EGF 등의 변화를 관찰하였다.

연구에 앞서 먼저 HPLC 분석을 통해 DCL의 유효성분을 살핀 결과 2분, 4분, 23분대에 피크가 확인되었다(Fig. 1). 또한 임상활용을 고려하여 DCL의 중금속 함량을 확인해본 결과, 납, 비소, 카드뮴이 기준치 이하로 검출되었고 수은은 검출되지 않아 중금속에 대한 안정성이 확인되었다(Table 3).

보조 T세포는 기능에 따라 Th1, Th2로 구분되는데, Th1은 IFN- γ 등 일련의 cytokine을 분비하여 세포의 탐식작용을 촉진시키는 반면, Th2는 IL-4, IL-5 등의 cytokine을 분비하여 IgE와 호산구, 비만세포에 의한 면역반응을 촉진하면서 Th1 반응은 억제한다. AD에서의 면역학적 이상은 Th2세포가 우세하여 이차적으로 IgE 생산과 cytokine들이 증가하고, 피부에서의 지연 과민반응, 실험실 내 림프구 형질전환 및 화학주성 등의 세포면역기능이 저하된다³³⁾.

DNCB를 마우스 피부에 반복 도포 시 면역학적으로 Th1에서 Th2 우세한 반응으로 전환시키며, 혈청 내 IgE 뿐 아니라 비만세포, 대식세포, 호염구, 호산구, Th2세포 등의 급격한 증가가 나타나 인체에서의 AD과 매우 유사한 상태를 나타낸다^{34,35)}. 때문에 DNCB를 마우스의 AD를 유발하기 위한 시료로 사용했으며, 정상군을 제외한 모든 군에 DNCB를 처리하여 피부염 유발을 확인하였다. 처리 6주차에 각 군의 피부 상태를 항목별로 평가하여 채점한 결과, 음성대조군과 비교하여

DCL 투여군은 AD의 증상이 현저하게 감소되었을 뿐 아니라 양성대조군에 비해 비슷하거나 더 우수한 효과를 나타내었다(Fig. 2).

중등도 이상의 AD에는 여러 가지 면역세포가 현저히 침윤되어 있는데, 수지상세포나 T세포와 같은 후천성면역세포와 함께 호산구나 비만세포 같은 선천성 면역세포가 침윤되어 있어 최근에는 여러 가지 새로운 선천성면역 세포에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 호산구는 AD에 중요하게 생각되는 병인으로, 피부조직에 침윤한 호산구 수와 AD의 중증도가 상관있는 것으로 알려져 있고 만성화에 관여할 것으로 보고 있다²⁾.

DCL이 혈액 내 면역세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험한 결과, 음성대조군에 비해 호염구(Basophil)는 모든 군에서 차이가 없었고(Fig. 7), 호중구(Neutrophil), 호산구(Eosinophil)는 모든 군이 유의하게 감소하였으며(Fig. 5, Fig. 6), DCL 400mg/kg 투여군에서 백혈구(White blood cell), 단핵구(Monocyte)는 유의한 감소를(Fig. 3, Fig. 4), 림프구(Lymphocyte)는 유의한 증가를 보였다(Fig. 8). 특히 DCL 400mg/kg 투여군에서 호중구의 감소효과는 양성대조군보다 우수하게 나타났다. 따라서 염증 반응에 관여하는 호염구에서는 차이를 보이지 않았으나, 면역 세포와 기전을 담당하는 백혈구와 단핵구, 호중구, 호산구의 감소와 림프구의 증가는 체내로 유입된 병원체를 제거하여 빠르게 염증반응을 종료시켰다고 볼 수 있다.

Immunoglobulin E(IgE)는 AD에서 특징적으로 높게 관찰되는 대표적인 생물학적 지표로, AD환자의 경우 활성화된 Th2세포가 과도하게 생산한 cytokine이 B세포에 작용해 IgE항체를 유리시키므로 대다수의 AD환자에서(약 80%) IgE가 증가되어 있으며, IgE치의 증감은 AD병변의 범위와 증상의 중증도와도 관련이 있다^{33,36,37)}. AD를 포함한 다수의 염증성피부질환에 관여하는 Histamine은 비만세포에서 합성되어 여러 자극에 반응하여 분비되는데, AD 병변에서 Histamine 분비가 비교적 증가되어 있으며, 이는 H4 Histamine 수용체를 발현하는 수지상세포의 활성화를 유도하여 염증 기

전에 기여한다²⁾. 따라서 본 실험에서 DCL의 경구 투여가 IgE, Histamine에 미치는 영향을 알아본 결과 음성대조군에 비해 모든 투여군에서 유의한 감소를 나타내었고 고농도 DCL 투여군에서 감소율이 더 높게 나타났다(Fig. 9, Fig. 10).

DCL 경구투여가 Cytokine(IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ)들에 미치는 영향을 알아본 결과, 모든 실험군에서 TNF- α 및 IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6은 모두 감소하였고(Fig. 11, Fig. 13, Fig. 14, Fig. 15, Fig. 17), IL-2는 증가하였으며(Fig. 12), DCL 400mg/kg 투여군에서는 IL-10가 감소(Fig. 16), IFN- γ 가 증가하였다(Fig. 18). 특히 IL-1 β 와 IFN- γ 에서는 DCL 400mg/kg 투여군에서 양성대조군과 거의 비슷한 증감률을 보였다.

AD의 주된 면역학적 변화는 Th1/Th2세포의 불균형으로, AD에서 Th1세포는 활성이 감소하고 Th2세포는 증가하여 Th1세포에 의해 유도되는 cytokine인 IL-2, IFN- γ 는 감소하고, Th2에 의해 유도되는 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10은 증가하므로³⁸⁾ DCL이 Th1 cytokine은 촉진하면서 Th2 cytokine은 억제하여 Th1/Th2세포의 불균형을 줄여준다는 것을 알 수 있다. 또한 AD의 염증반응에 가장 첫 단계에서 작용하는 cytokine인 IL-1 β 는 AD의 병인에 작용하는 선천 면역에 중요한 역할을 하며, TNF- α 와 함께 중요한 피부염증의 매개자²⁾라는 점에서 DCL이 염증성 cytokine도 억제하여 항염증 작용을 통한 AD억제 효능도 있다고 판단된다.

상처재생의 과정에서 신생 혈관의 형성은 상처 주위에 존재하는 세포들로부터 분비되는 각종 성장인자, cytokine들에 의하여 조절된다. 이러한 세포간의 상호작용을 위한 신호전달과 조절에 있어서 중요한 역할을 하는 cytokine으로 vascular endothelial growth factor(VEGF), transforming growth factor beta (TGF- β) 및 epidermal growth factor(EGF)등이 있다³⁹⁾. 임상에서 AD가 병변부위를 긁는 것으로 인한 피부손상 때문에 더욱 증상이 심해지는 점에 착안하여

DCL이 면역조절, 항염증 작용 외에 피부재생에도 효능이 있는지 알아보기 위해, 이러한 피부조직 재생과 관련된 조직 내 바이오마커인 Filaggrin, VEGF, TGF- β 1, EGF의 mRNA 발현량을 측정 관찰하였다.

실험 결과 EGF는 유의한 변화가 없었으나(Fig. 22), 섬유모세포의 증식과 전체 상처치유과정에 중요한 역할을 하는 TGF- β 1³⁹⁾은 모든 투여군에서 유전자 발현량이 증가하였으며(Fig. 21), 새롭게 형성되는 모세혈관의 수를 늘려 혈관형성과 상처치유를 촉진하는 VEGF³⁹⁾와 표피의 각질층에서 중요한 장벽역할을 하는 Filaggrin²⁾은 DCL 400mg/kg 투여군에서 유전자발현량이 유의하게 증가하여(Fig. 19, Fig. 20) DCL의 경구 투여가 피부조직의 재생에도 도움을 주는 것으로 나타났다.

실험 종료 후 등 피부를 채취하여 피부 두께와 호산구 침윤변화도 측정하였는데, 그 결과 모든 투여군에서 epidermis, dermis 두께와 호산구 침윤이 모두 감소하였다(Fig. 23, Fig. 24).

이상의 결과들을 종합해 보면, DCL은 Th1/Th2 면역 반응의 불균형으로 발생한 AD에서 Th1 cytokine (IL-2, IFN- γ)을 유의하게 증가시키고 Th2 cytokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)을 유의하게 감소시킴으로써, B세포의 생산과 분화를 억제하고 Th1/Th2 면역 반응의 항상성을 유지시키는 작용이 있으며, 그로 인해 IgE의 합성을 감소시키고 호산구를 억제하여 histamine의 방출을 차단함으로써 염증성 cytokine(TNF- α , IL-1 β)을 억제한 것으로 보인다. 그 뿐만 아니라 DCL은 피부조직의 재생에 관련된 filaggrin, VEGF, TGF- β 1, EGF 유전자 발현량을 증가시킴으로써 피부조직의 손상과 염증 반응을 감소시켰다. 또한 양성대조군과 비교하여 일부 지표에서는 더 우수하거나 동등한 효과를 보이기도 하여, DCL 치료가 스테로이드제제 치료와 비교했을 때도 의미가 있다고 볼 수 있다.

따라서 AD에 있어서 DCL이 면역조절 및 항염증, 피부재생의 효과가 있을 것으로 판단되며 본 연구결과를 바탕으로 조직 내에서 발현되는 지표를 이용한 자제한 효능 보강 및 임상 실험이 뒷받침 된다면 AD치료를 위

한 한의학적 처방으로써 활용이 가능할 것으로 보인다.

성대조군에 비해 감소하였다.

V. 결 론

大靑龍湯(DCL) 추출물의 아토피피부염(AD)에 대한 효능을 검증하기 위하여 DNCB를 통해 AD를 유발시킨 Nc/Nga mice를 통해 다양한 인자를 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Dermatitis score 평가 결과, 모든 DCL 투여군은 음성대조군에 비해 증상이 호전되었고, 양성대조군과 비슷하거나 더 우수한 효과를 보였다.
2. 면역세포 분석 결과, 모든 DCL 투여군은 호염구는 차이를 보이지 않았으며, 호중구, 호산구는 유의한 감소를 보였으며, 백혈구, 단핵구는 DCL 400mg/kg에서만 유의하게 감소하였고, 림프구는 DCL 400mg/kg에서만 유의하게 증가하였다. 특히 호중구는 양성대조군과 비슷하거나 더 우수한 효과를 보였다.
3. IgE 측정 결과, 모든 DCL 투여군은 음성대조군에 비해 유의하게 감소하였다.
4. Histamine 측정 결과, 모든 DCL 투여군은 음성대조군에 비해 유의하게 감소하였다.
5. Cytokine 측정 결과, 모든 DCL 투여군은 음성대조군에 비해 IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α 는 유의하게 감소하였고, IL-2는 유의하게 증가하였다. DCL 400mg/kg 투여군에서만 IL-10이 유의하게 감소하였고, IFN- γ 는 증가하였다. 특히 IL-1 β 와 IFN- γ 의 DCL 400mg/kg에서 양성대조군과 비슷한 증감률을 보였다.
6. 유전자 발현량을 측정한 결과, 모든 DCL 투여군은 TGF- β 1가 음성대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, DCL 400mg/kg 투여군에서만 filaggrin과 VEGF를 유의하게 증가하였고 EGF는 유의한 변화가 없었다.
7. 피부조직 내의 epidermis와 dermis 두께, 호산구 침윤 변화를 확인한 결과, 모든 DCL 투여군에서 음

ORCID

- Ji-Eun Kim
(<https://orcid.org/0000-0002-8734-015X>)
- Ho-Chan Lee
(<https://orcid.org/0000-0002-3619-3962>)
- Eun-Jeong Kang
(<https://orcid.org/0000-0001-6112-1197>)
- Jung-Wha Choi
(<https://orcid.org/0000-0002-5500-141X>)
- Jong-Han Kim
(<https://orcid.org/0000-0003-0302-3673>)
- Soo-Yeon Park
(<https://orcid.org/0000-0001-6812-0787>)
- Min-Yeong Jung
(<https://orcid.org/0000-0003-2344-1960>)

References

1. Korean Society of Dermatology Textbook Compilation Committee. Textbook of Dermatology. 6th ed. Seoul:Medbook. 2014: 109, 202-13.
2. Kim JW, Lee KH. Atopic Dermatitis. Gyeonggi-do:Koonja publishing. 2017:13,71, 112-3,124-7,145,154,165,379.
3. Lee BW, Kim SB, Song HH, Ji JK, Park JW, Kim DH. Study on the Immune Modulatory Activity of Seokjahaeki-tang Using Atopic Dermatitis Animal Models. Korean Journal of Oriental Physiology&Pathology. 2012;26(4): 446-54.
4. Park SG, Bang JG. The study on the

- Syndrome of Daecheongryongtang in Sang Han Lon. The journal of korean medical history. 2014;27(2):127-34.
5. Lee JM, Cho SW, Kang KH, Lee SY, Yu SA. The Effects of Daecheongryong-tang on Transcription Factors and Adipogenic Genes during 3T3-L1 Differentiation. The Journal of Korean Oriental Pediatrics. 2010;24(3): 92-105.
 6. Textbook Compilation Committee of National University of Korean medicine. Herbalogy. Seoul:Yeong-Lim publishing. 2010:199-201.
 7. Park WY, Suh WG. The Effect of Daecheongryong-tang and prescription A on airway mucin secretion. The Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 2006; 27(1):92-101.
 8. Lee JM, Cho SW, Kang KH, Lee SY, Yu SA. The Effects of Daecheongryong-tang on Transcription Factors and Adipogenic Genes during 3T3-L1 Differentiation. The Journal of Korean Oriental Pediatrics. 2010;24(3): 92-105.
 9. Cho EJ, Yang SJ, Cho SH. The Effects of Daecheongryong-tang on Anti-weight Gain and Anti-hyperlipidemic in Obese Sprague Dawley Rat Induced by High Fat Diet. Journal of Society of Korean Medicine for Obesity Research. 2018;18(1):27-35.
 10. Park YH. The 6 case reports of chronic upper respiratory infections with high fever in children, treated with Daqinglong-tang. The journal of korean medical history. 2013;26(1):19-26.
 11. Noh HM, Park SG, Kweon SH, Jo EH, Park MC. Case Report of the Patient with the Atopic Dermatitis, Psoriasis Treated with Mahaenggamseog-tang. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2018;32 (1):80-7.
 12. Tetsuro O, Yoshiko M, Toshihiko H, Akihiko M. A case of atopic dermatitis successgully treated with Daiseiryuto. Japanese journal of oriental medicine. 2009;60(6):629-33.
 13. Elias PM, Steinhoff M. Outside-to-inside(and now back to outside) pathogenic mechanisms in atopic dermatitis. The journal of Investigative Dermatology. 2008;128:1067-70.
 14. Choi EH, Yoon NY. Pathogenesis of atopic dermatitis. Journal of the Korean Medical Association. 2014;57(3):218-25.
 15. Lee SC. Clinician's Dermatology. Seoul: Medbook. 2016:114-5.
 16. Go BH. Practical Chinese Medicine Surgery. Shanghai:Shanghai Science and Technology Publishing. 1994:461.
 17. Park MC. A Literature study about comparison of Eastern-Western medicine on the Atopic dermatitis. Wonkwang University; Thesis of Master's Degree. 2001.
 18. Kim KB, Kim DG, Kim YH, Kim JH, Min SY, Park EJ, et al. Oriental medicine for children and adolescents. Seoul:EuiSeongDang Publishing Co. 2010:185-7.
 19. Textbook compilation committee of National university korean medicine Dermatology & Surgery. Oriental Medical Dermatology & Surgery. Busan:Sunwoo publishing. 2008: 355-61.
 20. Kim BA, Kim MS, Kang BM, Byun SH, Park IH, Park JH, et al. Inhibitory Studies of

- Hwangryunhaedok-tang on Development of Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. *The Korea Journal of Herbology*. 2008;23(2): 59-65.
21. Ko MJ, Baek JH. A Clinical Study on the Effect of Hwangryunhaedock-tang on Atopic Dermatitis. *The Journal of Korean Oriental Pediatrics*. 2012;26(4):51-60.
 22. Kang RY, Park BK, Kim SB, Choi HJ, Kim DH. The effects of HYT on various immunological factors related to pathogenesis of allergic dermatitis in NC/Nga mice induced by Biostir AD. *Journal of Korean Oriental Medicine Institute*. 2009;18(2):47-62.
 23. Hong CH, Seo ES, Weon YH, Kim YG, Hwang CY. Effects of Onchung-eum Administration along with Samhwangseze-gamibang on Treatment Atopic Dermatitis Development in NC/Nga Mice. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*. 2007;21(3):679-87.
 24. Ku YH, Hong SU. Therapeutic Effects of Cheonggi-san Extract on NC/Nga Mice with Atopic Dermatitis-like Skin Lesions. *Journal of Korean Medicine*. 2008;29(1):179-91.
 25. Seo HY, Han JK, Kim YH. Therapeutic Effects of Yijungtang on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions of NC/Nga Mouse Induced by Mite Antigen. *The Journal of Korean Oriental Pediatrics*. 2011;25(1):1-27.
 26. Park DB, Han JK, Kim YH. Effect of Yanghyeoljeseuptang Composition on Atopic Dermatitis NC/Nga Mice Induced by DNCB. *The Journal of Korean Oriental Pediatrics*. 2009;23(3):263-91.
 27. Kim JS, Choi JH, Kim JH, Jeong MY, Park SY. Effects of SaengRyo-SaMul-tang on Atopic Dermatitis Induced by DNCB in Mice. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2017;30(1):87-105.
 28. Yun BH, Park SS. Yangkyuksanhwatang effected to Atopic Dermatitis. *Journal of Sasang constitutional medicine*. 2004;16(2): 84-98.
 29. Shin DG, Kim WY, Lee JY, Kim DG. Effect of Sunbangaedoktang on the Cytokine Secretory Function of Monocyte Isolated and Cultured from Peripheral Blood of AD Patients. *The Journal of Korean Oriental Pediatrics*. 2002;16(1):21-37.
 30. Shin MK. *Clinical Traditional Herbalogy*. Seoul:Yeong-Lim Publishing. 2010:164-9, 329-31,374-6,859.
 31. Jeon JH, Kim HA, Kang YH. A Literature study on the external therapy of contact dermatitis. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 1998;11(1):197-218.
 32. Kim IL, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YG, Park JH, et al. *Bonchohag*. Seoul:Younglimsa. 2008: 152,171,513,584,586.
 33. Lee AY. Immunology of atopic dermatitis. *Update in Dermatology*. 2003;1(3):10-3.
 34. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor: New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(12):7313-6.
 35. Kitagaki H, Fujisawa S, Watanabe K, Hayakawa K, Shiohara T. Immediate-Type Hypersensitivity Response Followed by a Late Reaction Is Induced by Repeated Epicutaneous application of Contact

- Sensitizing Agents in Mice. *Journal of investigative dermatology*. 1995;105(6):749-55.
36. Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2016;387(10023):1109-22.
37. Kim JW. Atopic dermatitis from an allergic and immunological point of view. *Korean journal of dermatology*. 2003;41(6):687-9.
38. Kwon KI, Baek IH, Kim YT, Yoon HY, Lee JY, Kang WG, et al. Biomarkers and Efficacy Screening Method for the Development of Anti-atopic Dermatitis Agents. *Korean Journal of Clinical Pharmacy*. 2007;17(2):102-8.
39. Kim BH. Sopung-san Extract Enhances healing potential on Full-thickness Skin Wound in Rats: Role of VEGF and TGF. *Herbal formula science*. 2017;25(2):123-34.