

# 黃連解毒湯이 알러지성 접촉피부염에 미치는 영향 - 알러지성 접촉피부염 유발로 손상된 생쥐 상피세포의 완화를 중심으로

강운호, 김진택\*, 김성아

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 해부학교실\*

## The Effects of *Hangryunhaedocktang* on Allergic Contact Dermatitis Based on the Morphological Changes in Epidermal Damage in Mice

Yoon-Ho Kang, Jin-Taek Kim\*, Sung-A Kim

Dept. of Internal, Dept. of Anatomy\*, College of Oriental Medicine, Dongguk Univ.

This study was performed to investigate the effectiveness of *Hangryunhaedocktang* (HHT) on epidermal damages induced by allergic contact dermatitis (ACD). The sensitization were caused by one application of 25  $\mu$ l of 5% 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) onto a back-lumbar skin of BALB/c mice. 2 weeks later, ACD was elicited with 4  $\mu$ l of 2.5% DNCB and then mice were given HHT extract in doses of 3.3ml/kg/day, for 72 hours. The ACD induced epidermal damages in HHT treated ACD mice was more mitigated than non-treated ACD elicited mice. The features related with epidermal damage such as epidermal hyperplasia, infiltration of inflammatory cells, increase of nuclear shrinkages and vacuolation, and enlargement of intercellular space softened. And the distribution of soybean agglutinin (SBA) positive reaction in stratum spinosum (SS) and stratum basale (SB) were similarly maintained in a normal configuration. The numerical decrease of BrdU, TUNEL, and Fas positive cells observed were prominent in SB. Results suggest a benefit role for HHT in mitigating epidermal damages in mice with allergic contact dermatitis.

**Key Words:** allergic contact dermatitis, *Hangryunhaedocktang*, epidermis, BrdU, SBA, apoptosis.

### I. 緒 論

알러지성 접촉피부염은 특정 allergen에 대해 피부 내 항원제공 세포인 랑게르한스세포 (Langerhans cell; LC)와 주변 림프질의 도움 T 림프구의 관여로 유발되는 세포성 과민면역반응으로, 현대의 급격한 생활 환경 변화로 인해 발병이 증가하는 추세이다. 피부

를 통해 들어온 다양한 종류의 항원은 LC를 통해 국소 림프절로 이동하고 그 곳의 도움 T 림프구에게 항원이 제공됨으로써 감각은 일어난다. 감각된 항원에 재노출되면 상피의 LC나 진피 수지상세포에서 항원 제공이 일어나 감각 기억 T 림프구는 급속하고 강력한 2차 면역반응을 유발하여 알러지성 접촉피부염을 일으킨다. 이러한 알러지성 접촉피부염의 피부손상에 대한 자체 보호기전으로 급격한 상피세포 과형성이 일어난다. 이는 피부 상피에서 interleukin (IL)-1, IL-3, IL-18, interferon (IFN)- $\gamma$ , Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , cell adhesion molecule (CAM) 등의 각종 cytokine과 CC와 CXC 계열의 chemokine의 분비를 증가시킴으로써 세포성 면역과민반응을 한층 더 증가

· 접수 : 2004년 7월 26일    채택 : 2004년 8월 6일  
· 교신저자 : 김성아, 경기도 성남시 분당구 수내3동 87-2 동국대학교분당한방병원 내과외국  
(Tel : 031-710-3734, Fax : 031-710-3734, E-Mail : fatcat9@freechal.com)

시킨 결과를 초래한다<sup>4</sup>. 그 결과 상피에서는 손상된 상피세포의 증거인 응축된 핵과 핵포화의 증가, 세포 사이 공간의 확장, 침윤 림프구의 증가 등의 형태학적 변화가 일어난다<sup>5</sup>. 이러한 알러지성 접촉피부염을 치료하기 위해 부신피질 호르몬제, 항히스타민제가 광범위하게 사용되며, 근래에는 cyclosporin A, tacrolimus 등 면역억제제의 치료제사용에 대한 연구가 진행되고 있으나, 각각의 심각한 부작용으로 인해 사용에 한계가 있어 새로운 치료제제의 개발이 필요한 실정이다<sup>6</sup>.

韓醫學에서는 알러지성 접촉피부염을 瘡證, 癩疹, 發疹, 斑瘡, 赤白遊風, 面遊風, 漆瘡, 膏藥風 등의 범주로 설명하고 있으며<sup>7,8</sup> 祛風, 清熱, 除濕, 涼血, 瀉火 등의 治法이 應用되며, 韓藥劑 中 祛風除濕劑, 清熱解毒劑 등이 면역억제제의 작용을 한다. 특히 葛洪의 《肘後備急方》에 처음 收載된 處方인 黃連解毒湯은 黃芩 黃連 黃白 梔子로 構成되며 清熱解毒 消炎作用이 있다고 보고되었다<sup>9</sup>. 이러한 黃連解毒湯에 關한 이전 研究로 杜<sup>11</sup>는 黃連解毒湯이 解熱, 鎮痛, 鎮靜, 血糖抑制, 腸管弛緩作用에 關여하며, 鄭<sup>12</sup>은 黃連解毒湯의 解毒作用을, 그리고 尹<sup>13</sup>은 黃連解毒湯이 皮內, 經口, 腹腔內, 靜脈內 投與 등 다양한 投與 經路에 따라 다양한 一나 貳라시 抑制效果가 있음을 報告하였다.

본 실험에서 알러지성 접촉피부염을 유발하기 위한 특정항원으로 DNCB를 사용하였는데, DNCB는 과도한 세포성 면역반응을 유발시켜 피부손상 즉, 홍반, 해면화, 상피세포 과형성, 비만세포와 T 림프구의 증가 등을 일으키며, 면역조직학적으로 Mac-1, IL-1 $\beta$ , IL-2, ICAM-1, vascular adhesion molecule (VCAM)-1 등의 발현 증가를 유도한다고 보고되었다<sup>4</sup>.

이에 저자들은 DNCB에 의해 알러지성 접촉피부염이 유발된 생쥐에 黃連解毒湯 추출액을 경구투여한 후 염증부위에서 상피세포의 복합당질변화 및 피부상피 과형성의 미세구조변화, SBA와 BrdU를 이용한 면역조직화학, TUNEL과 Fas를 이용한 apoptosis 조사를 통해 黃連解毒湯이 알러지성 접촉피부염의 상피손상을 완화시킨다는 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 실험동물

대한실험동물센터에서 분양 받은 체중 20 g, 4주령 BALB/c계 암컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 선별하여 사용하였다. 대조군, 알러지성 접촉피부염 유발군 (ACD군), 알러지성 접촉피부염 유발 후 黃連解毒湯 투여군 (HHT군)으로 나누는 후 시간의 경과에 따라 24, 48 그리고 72시간으로 세분시켰으며, 각 군에 10마리씩 배정하였다.

### 2. DNCB 제조와 도포에 의한 알러지성 접촉피부염의 유발

2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB: Sigma, USA)를 acetone과 olive oil이 4:1로 혼합된 용액에 5%와 2.5%로 희석한 다음 사용하였다. 각군에 5% DNCB 25  $\mu$ l를 면도된 오른쪽 살바위쪽 복부 2cm<sup>2</sup>에 도포하여 감각시켰다. 감각 후 14일째가 되었을 때 ACD군과 HHT군의 생쥐에게만 왼쪽 복부에 2.5% DNCB 4  $\mu$ l를 도포하여 알러지성 접촉피부염을 유발시켰다. 한편 대조군에는 DNCB가 포함되지 않은 acetone과 olive oil 혼합액을 도포하였다. ACD군과 HHT군에서의 알러지성 접촉피부염 유발 여부는 직접 육안으로 확인하였다.

### 3. 黃連解毒湯 추출액의 제조와 경구투여

실험에 사용한 黃連解毒湯의 구성은 Table. 1과 같으며 구성약물과 용량은 許浚의 《東醫寶鑑》<sup>15</sup>을 참고하였다. 동국대학교 부속한방병원에서 처방된 黃連

**Table 1.** The contents of Hangryunhaedocktang (HHT)

藥名	生藥名	重量(g)
黃芩	<i>Scutellaria Baicalensts Georgi</i>	5.0
黃連	<i>Coptis Japonica Makino</i>	5.0
黃白	<i>Phellodendror Amurense Ruprecht</i>	5.0
梔子	<i>Gardehra Jasminoides Ellis</i>	5.0
Total amount		20.0

解毒湯 2첩 분량을 증류수 1000ml에 넣고 3시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator로 100ml로 농축하여 HHT군에 매일 3.3ml/kg/day로 경구투여하였다.

#### 4. 피부 조직표본 제작

알러지성 접촉피부염 유발 후 24, 48 그리고 72시간의 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 후 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액 (neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. DNCB 도포부위에서 얻어진 피부는 실온의 10% NBF에 24시간동안 고정 한 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5 $\mu$ m 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 hematoxyline과 eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다. 한편 미세구조 관찰을 위한 전자현미경용 표본제작을 위해 우선 피부절편을 1/2 Karnovsky 용액에 선 고정 한 다음 1% OsO<sub>4</sub> 용액에 후고정하였다. Uranyl acetate에 90분동안 염색한 후 통상적인 방법에 의해 Epon 812 (EMS, USA)에 포매하였다. 조직절편은 ultramicrotome (LKB, Nova, Germany)으로 60-80nm 두께로 절편을 만든 다음 투과전자현미경 (Hitach H-600, Japan)으로 관찰하였다.

#### 5. 면역조직화학적 염색

##### 1) 복합당질의 분포 변화 관찰

복합당질 (glycoconjugate)인 *soybean agglutinin* (SBA)의 피부상피에서의 분포 변화를 조사하기 위해 lectin을 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 실온에서 1% bovine serum albumin (BSA: Sigma)에 30분간 처리한 다음 1:100으로 희석된 biotinylated anti SBA (Sigma)에 4 $^{\circ}$ C incubation chamber 내에서 24시간동안 반응시켰다. 그런 다음 Avidin biotin complex (ABC: Vector, USA)에 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB: Sigma, USA)와 0.01% hydrogen peroxide가 포함된 0.05 Mtris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. Lectin 반응의 강도는 - (음성), + (약한 양성),

++ (중간정도의 양성) 그리고 +++ (강한 양성) 등으로 표시하였다.

##### 2) 피부상피 세포 증식 변화 관찰

피부상피 세포 증식 변화를 조사하기 위해 BrdU를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 실험동물에서 피부상피를 적출하기 5시간전, 3시간전, 1시간전에 생리식염수에 녹인 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma) 50mg/kg을 복강주사하였다. 얻어진 연속절편은 4 $^{\circ}$ C와 37 $^{\circ}$ C의 2M HCL용액에서 각각 20분씩 반응시켜 DNA-denaturation을 일으켰다. 0.1M borate 완충용액 처리로 안정시킨 후 비특이적 면역 반응을 억제하기 위해 0.01%의 proteinase K (DAKO, Denmark)가 포함된 10% normal goat serum (DARK)에 1시간동안 반응시켰다. 그런 다음 1:50으로 희석된 1차 항체인 mouse anti-mouse BrdU (Amersham, UK)에 4 $^{\circ}$ C incubation chamber내에서 48시간 반응시켰고 1:100으로 희석된 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG (DAKO)에 실온에서 4시간동안 반응시켰다. ABC에 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 DAB에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 6. Apoptosis 변화 관찰

##### 1) TUNEL을 통한 apoptotic 세포의 분포 변화 관찰

Apoptotic 세포의 분포변화를 조사하기 위해 *in situ* apoptosis detection kit (Apoptag, Intergen, USA)를 이용한 TUNEL (terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUPT-biotin nick-end labelling) 방법을 실시하였다. 먼저 조직 절편을 proteinase K (20 $\mu$ g/ml)에 5분간 proteolysis 시킨 다음 equilibration buffer에서 20초간 처리하였다. 그런 다음 strength TdT enzyme (36 $\mu$ l TdT enzyme : 72 $\mu$ l reaction buffer)을 처리하여 37 $^{\circ}$ C의 humidified chamber에서 1시간 동안 반응시킨 후 strength stop/wash buffer에서 10분 정도 처리하였다. Anti-digoxigenin-peroxidase에 1시간 동안 반응시킨 후 처리하였다. Methyl green으로 대조염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

##### 2) Fas 분포 변화 관찰

Apoptosis 신호분자들의 변화를 조사하기 위해서 Fas에 대한 단클론항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 1차 항체인 hamster anti-mouse Fas (CD95; Serotec, UK)을 1:100으로 희석하여 사용했으며 위에서 서술한 동일한 면역조직화화법을 이용하였다.

7. 영상분석과 통계처리

면역조직화학과 TUNEL의 결과를 수치화하기위해 Optimas 5.2 (Optima Co., USA)를 이용한 영상분석 (image analysis)을 실시하였다. 영상분석 결과는 Sigma Plot 4.0 (Sigma)을 통한 student T test로 유의성을 검증하였다.

III. 實驗結果

1. 피부의 외형적 형태 변화

대조군에서는 정상적인 피부 상태가 실험기간동안 유지되었으나, ACD군과 HHT군은 변화가 관찰되었다. 우선 ACD군에서 알러지성 접촉피부염 유발 후 24시간이 경과되었을 때 붉은 좁쌀 형태의 erythematous papule가 일부 DNCB 도포부위에서 관찰되었으며, 48시간이 경과되었을 때는 그 생성부위가 확산되었다. 그러나 외형적 피부손상은 72시간이 되었을 때 48시간보다는 약화되는 것으로 나타났다. 반면 HHT군에서 나타난 외형적 피부손상 변화는 ACD군과 유사한 경향으로 나타났으나 HHT군의 피부손상 정도는 ACD군보다는 적은 것으로 관찰되었다 (Table. 2).

2. 피부 상피의 형태 변화

대조군에서 나타난 복부 상피는 기저층, 가시층, 과립층, 각질층으로 구성되어 있었다. 기저층의 세포들은 일반적으로 전자밀도가 높고 큰 핵을 가진 원주 세포로 세포질 내에 세사 (filament)를 가지고 있었으며, 기저층 쪽으로 많은 절반부착반 (hemidesmosome)을 가지고 있었다. 가시층의 세포들은 손가락모양의 돌기들을 서로 뺀고 있는 입방형의 세포로 많은 세

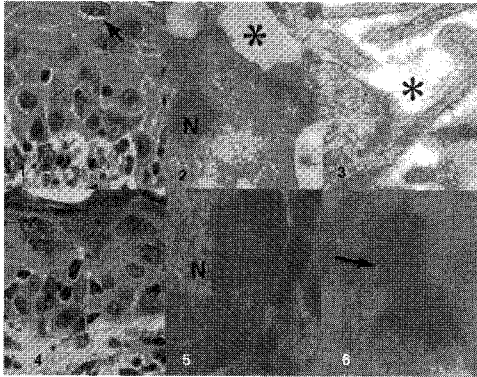
**Table 2.** The change of skin-damage on *Hangryunhae doctang* (HHT) extract administered mice after allergic contact dermatitis (ACD) elicitation. After ACD elicitation, the degree of erythema began to increase and reach a peak at hour-48. The degree of erythema in mice treated with HHT extract noticeably softer than DNCB treated group for experimental period.

Group	Initiation	24	48	72 hrs
CONTROL	-	-	-	-
ACD	-	++	++++	+++
HHT	-	+	++	+

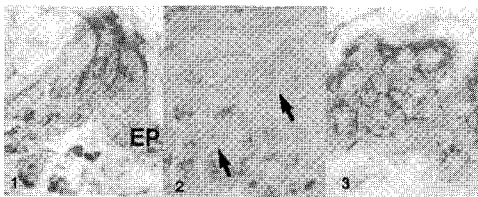
Abbreviation> CONTROL, Acetone & olive oil only treated mice; ACD, ACD elicited mice; HHT, HHT extracts administered mice after ACD elicitation

-, negative; +, trace; ++, moderate; +++, strong; +++++, hard

사다발을 가지고 있었으며, 주변의 세포들과 부착반 (desmosome)을 형성하여 단단히 결합하고 있었다. 과립층의 세포들은 각질유리과립을 함유하는 전자밀도가 상대적으로 낮은 세포들로 구성되어있으며, 이 과립층 세포들의 외곽으로 핵이 없는 각질이 형성되어 있었다. 알러지성 접촉피부염이 유발된 ACD군의 상피에서는 먼저 세포과형성 (hyperplasia)에 의한 상피 세포 층수의 증가가 관찰되었다 (Fig. 1-1). 미세구조를 관찰한 결과 일반적인 피부의 염증반응과 비슷한 변화들이 일어났다. 즉, 24, 48시간 ACD군 상피 가시층에서의 손가락모양 돌기사이에서 세포간결사이부종의 형태로 세포사이 공간이 확대되어 해면화가 발생하였으며, 시간이 갈수록 그 공간이 확대되었다 (Fig. 1-3). 그리고 그 확대된 세포사이 공간 사이로 림프구 등 여러 단핵세포들과 다형핵 백혈구들의 침윤이 나타났다. 또한 상피세포의 핵이 위축되었으며 (Fig. 1-2), 이러한 세포에서는 apoptosis로 추정할 수 있는 apoptotic body와 유사한 구조들이 관찰되었다. 또한 세포질에서는 형질내세망들의 확장과 함께 세사다발들 사이로 많은 공포를 관찰할 수 있었다. 이러한 변화는 72시간이 경과하면서 해면화가 감소되는 경향을 보였다. 이에 반해 HHT군의 상피세포 과형성은 ACD군보다는 낮은 것으로 관찰되었다. 또한 상피세포사이 공간이 확대되는 해면화는 관찰되었으나 ACD군에 비해 훨씬 감소된 것을 알 수 있었고, 가시층의 세포사이 공간내에서 림프구와 백혈구의



**Fig. 1.** The morphology of skin from mice at hour 48 after allergic contact dermatitis (ACD) elicited by DNCB re-exposure. The hyperplasia in epidermis (EP) are noticed. H&E.  $\times 400$ (1). The shrinkage of nucleus (N) and vacuolation (asterisk)(2) and the enlargement of intercellular space (asterisk)(3).  $\times 40000$ . The morphology of skin from HHT administered mice at hour 48 after ACD elicitation.  $\times 400$ (4). The repair of nuclear damages and vacuolation(5) and the decrease of intercellular space (arrow)(6).  $\times 40000$ .



**Fig. 2.** The distribution of SBA from DNCB no treated mice(1), from mice at hour 48 after ACD elicitation(2) and from HHT administered mice at hour 48 after ACD(3).  $\times 400$ .

출현 감소를 관찰할 수 있었다. 그리고 세포내적 손상도 회복정도가 ACD군보다 훨씬 빨라짐을 관찰할 수 있었다(Fig. 1-4, 5, 6).

### 3. 피부 상피의 면역조직화학적 변화

#### 1) SBA의 분포변화

대조군에서는 가시층, 과립층, 기저층의 순으로 세포사이 공간에서 강한 SBA 양성반응을 보였다. ACD군에서는 알러지성 접촉피부염 유발 후 SBA 양성반응이 과립층의 세포사이 공간에서는 유지되었지만, 가시층과 기저층의 세포사이 공간에서는 사라졌다. 반면 HHT군에서는 ACD군과는 달리 가시층과 기저층의 세포사이 공간에서 강한 양성반응을 보였다 (Fig. 2, Table. 3).

#### 2) 상피세포분열 변화

대조군의 상피에서는 일부 기저층 세포에서 세포분열을 확인할 수 있는 BrdU 양성반응이 나타났으며 실험기간동안 BrdU 양성반응세포의 분포 변화가 관찰되지 않았다 (Table. 4). ACD군에서는 알러지성 접촉피부염 유발 후 BrdU 양성반응세포는 가시층과 일부 상부 기저층에서 많은 수가 분포하였다. BrdU 양성반응은 세포 핵과 그 주변세포질에서 강하게 일어나는 것으로 관찰되었다. 이에 반해 HHT군에서는 대조군과 유사하게 일부 기저층에서 BrdU 양성반응세포가 관찰되었으며 그 수가 ACD군보다는 적었다 (Fig. 3, Table. 4).

### 4. 피부 상피의 apoptosis 변화

#### 1) Apoptotic 세포의 분포

**Table 3.** The difference of SBA distribution at hour 48 after ACD elicitation.

LECTIN	POSITION	GROUP		
		CONTROL	ACD	HHT
SBA	stratum corneum	+	+	+
	stratum granulosum	++	++	++
	stratum spinosum	+++	+	+++
	stratum basale	+	-	+
	dermis	-	-	-

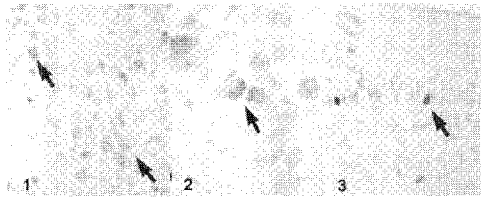
Abbreviation> -: negative, + : weak, ++ : moderate, +++ : strong

**Table 4.** The image analysis of BrdU immunohistochemistry at hour 48 after ACD elicitation.

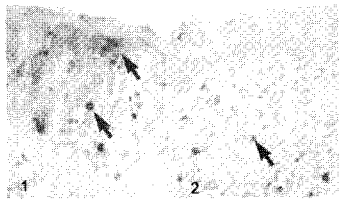
Antibody	CONTROL		ACD		HHT	
	particle	intensity	particle	intensity	particle	intensity
BrdU	521 ± 24	136.7 ± 29.3	3985 ± 12	123.3 ± 23.2	1357 ± 18*	134.7 ± 28.7

(analysis for 200000 particles / range of intensity : 50 - 150)

Abbreviation : M ± S.D, Mean ± Standard Deviation; \*, P < 0.05 compared with ACD.



**Fig. 3.** The immunohistochemical stain for BrdU from mice at hour 48 after ACD elicitation. ×200(1). The magnification of BrdU positive cells in epidermis from mice at hour 48 after ACD elicitation. ×400(2). The immunohistochemical stain for BrdU from HHT administered mice at hour 48 after ACD elicitation. ×200(3).



**Fig. 4.** The increase of apoptotic cells (arrow) are seen in the epidermis from mice at hour 48 after ACD elicitation(1). The numerical decrease of apoptotic cells in epidermis from HHT administered mice at hour 48 after ACD elicitation(2). TUNEL method. ×200.

대조군의 상피에서는 apoptotic 세포가 일부 각질층(stratum corneum)에서만 관찰되었으며 이러한 분포는 실험기간동안 별다른 변화가 관찰되지 않았다(Table. 5). 알러지성 접촉피부염 유발 후 apoptotic 세포는 상피에서 다수 분포하였다. Apoptotic 세포의 형태는 양성반응이 핵막을 경계면으로 원형으로 나타났고, 핵내부에서 강한 양성반응성을 보였다. 반면 HHT군에서는 ACD군에 비해 apoptotic 세포 수가 적었으며, 이러한 감소는 상피 기저층에서 잘 관찰되었다(Fig. 4, Table. 5).

2) Apoptosis 신호분자의 변화

대조군에서는 Fas 양성반응세포가 전 실험기간동안 관찰되지 않았다(Table. 5). 알러지성 접촉피부염 유발 후 가시층과 기저층에서 많은 Fas 양성반응세포가 관찰되었으며, 양성반응은 응축된 핵을 가진 세포에서 일어났다. 반면 HHT군에서는 ACD보다는 적은 수의 양성반응세포가 관찰되었으며, 대부분 약한 양성반응성을 보였다(Fig. 5, Table. 5).

IV. 考 察

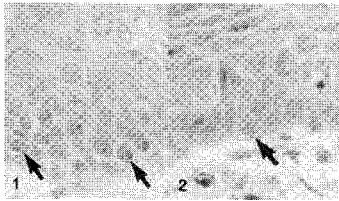
현대사회는 산업 발달로 인하여 합성물질의 범람과 환경오염의 가속화로 각종 알러지성 접촉피부염

**Table 5.** The image analysis of TUNEL and Fas immunohistochemistry at hour 48 after ACD elicitation

Antibody	CONTROL		ACD		HHT	
	particle	intensity	particle	intensity	particle	intensity
TUNEL	341 ± 11	121.4 ± 21.1	2093 ± 21	111.3 ± 25.5	780 ± 10*	118.6 ± 20.9
Fas	40 ± 9	134.4 ± 21.1	2931 ± 26	125.3 ± 25.5	980 ± 89*	130.9 ± 26.4

(analysis for 200000 particles / range of intensity : 50 - 150)

Abbreviation : M ± S.D, Mean ± Standard Deviation; \*, P < 0.05 compared with ACD.



**Fig. 5.** The immunohistochemical stain for Fas in epidermis from mice at hour 48 after ACD elicitation(1) and in epidermis from HHT administered mice at hour 48 after ACD elicitation(2). ×400.

을 유발시키는 Allergen들이 급증하는 추세이다. 알러지성 접촉피부염의 감각 과정은 특정 외부 항원 (대부분 분자량이 600 M.W. 이하인 hapten)이 상피의 운반 단백질과 결합되어 항원제공세포인 LC (CD1a<sup>+</sup>-DR<sup>+</sup>-LC)에서 내재화과정을 거친 후, 주변 림프절의 naive 도움 T 림프구에 항원이 제공되어 시작된다. 외부항원을 인식한 도움 T 림프구가 IL-2를 분비하고 이에 의해 세포독성 T 림프구와 항원 특이성 기억 T 림프구 (TCR<sup>+</sup>-CD4<sup>+</sup>-IL-2R<sup>+</sup>-DR<sup>+</sup> T lymphocyte)는 면역 활성화된다. 이들은 혈관계를 통해 항원 노출지역으로 이동하여 세포성 면역반응에 의해 표적세포를 파괴시킨다. 감각된 T 림프구는 recirculating lymphocyte pool로 합류하거나 특정 림프성 기관에 위치하게 되며, 기억 T 림프구는 내피세포 복귀 수용체의 선별적 선택에 의해 항원노출 피부로 유주된다. 감각을 유도한 특정 항원에 재노출되었을 때 알러지성 접촉피부염이 유발되는데, 피부에 산재해 있던 기억 T 림프구가 CD1a<sup>+</sup>-DR<sup>+</sup>-LC와 CD1a<sup>+</sup>-DR<sup>+</sup>-비LC에 의해 항원제공을 받게 되어 피부에 급성 접촉피부염이 일어난다.

알러지성 접촉피부염의 치료제로는 부신피질 호르몬제나 항히스타민제가 광범위하게 이용되고 있으나 부신피질 호르몬제는 급성부신기능부전증, 장기투여 시 세균감염 감수성의 증가, 소화장애, 골다공증, 백내장 등의 부작용을 일으키며, 항히스타민제는 염증 완화 작용은 뛰어나지만 일시적인 진정작용만 하므로 근본적인 치료제로는 부적합하다. 또한 근래 들어서는 알러지성 접촉피부염이 과민한 세포성 면역에 의한다는 점을 착안하여 면역억제약물인 cyclosporin

A와 tacrolimus을 이용하여 과민한 세포성면역반응을 억제함으로써 알러지성 접촉피부염 치료에 대해 많은 연구가 이루어지고 있는데, 이러한 면역억제제들은 도움 T 림프구의 IL-2 생산 저해를 통해 세포성 면역반응을 억제함으로써 치료에 효과적인 면은 있으나 간, 신장조직 등을 손상시키는 부작용을 일으키므로 사용에 한계가 있는 실정이다<sup>6,16</sup>.

알러지성 접촉피부염은 韓醫學的으로 瘡證, 癩疹, 發疹, 斑瘡, 赤白遊風, 面遊風, 漆瘡, 膏藥風 등의 범주로 설명할 수 있다<sup>17</sup>. 이 중 漆瘡은 《諸病源候論》<sup>18</sup>과 《外科正宗》<sup>19</sup>에서 漆이 有毒하여 이에 접촉하게 되면 발생하나 종일 노출되어도 발생하지 않는 사람도 있다 하였고, 膏藥風은 《中醫外科學》<sup>20</sup>에서 稟賦가 견디지 못하여 藥毒의 氣가 肌膚에 쌓여 발생했다하여 질환의 발생이 체질적 요인 및 신체의 면역기능과 관련 있음을 언급하고 있다. 즉, 이 질환들은 腠理가 不密한 신체상태 혹은 체질적 소인이 있는 內因과 有毒한 물질의 접촉이라는 外因의 결합을 통해 발생하며, 病機의 측면에서 辛熱有毒한 邪氣에 接觸하여 營衛氣血의 鬱滯로 인해, 그리고 火熱로 인해 傷津耗血하여 발생한다고 볼 수 있다<sup>17</sup>. 따라서 그 治法으로는 祛風, 清熱, 涼血, 解毒, 利濕, 瀉火 등이 응용될 수 있다.

黃連解毒湯은, 王燾의 《外臺秘要》<sup>21</sup>에서 作方經緯와 病症을 詳論하였고, 金代에 이르러 劉에 의하여 本方의 加減 등 活用法을 提示한 바 있다. 葛<sup>22</sup>은 黃連解毒湯을 時氣溫疫病에 “若已六七日 熱極心下煩悶 狂言見鬼 慾起走煩嘔 不得眠口燥呻吟 錯語不得臥”病에 應用하였다. 그후 劉<sup>23</sup>는 “傷寒雜病 躁熱毒煩悶乾嘔口燥 呻吟喘滿 陽厥極深 蓄熱內甚 俗妄傳爲陰毒者 及汗吐下後 寒涼諸藥 不能退熱勢症”을 治한다 하였다. 近代에는 一切熱化證 譫語昏狂 濕熱黃疸熱甚吐血衄血 錯語不眠 丹毒 一般炎症 및 糖尿病 등이 列擧되고 있다<sup>24</sup>.

黃連解毒湯을 構成하고 있는 韓藥材의 氣味와 歸經 및 效能을 살펴보면 黃連은 性이 寒無毒하고 味는 苦하며, 清熱 燥濕 瀉火 解毒藥으로 瀉心火 鎮肝 涼血 燥濕開鬱 解毒除煩 痞滿曹雜 吞酸吐酸 解毒毒

明目 定驚 止嘔의 效能이 있다. 黃芩은 性은 寒無毒하고 味는 苦하며, 淸熱燥濕 瀉火解毒으로 淸中焦實火 除脾家濕熱 活癰痢 腹痛 寒熱往來 黃疸五淋血閉 氣逆癰疽瘡瘍 失血降痰 解渴安胎의 效能이 있다. 黃柏은 性은 寒無毒하고 味는 苦하며, 淸熱燥濕 瀉火解毒 淸虛熱益陰藥으로 瀉膀胱相火 除濕淸熱 療下焦虛胃蒸勞熱 陰虛生內熱諸證 凍瘡頭瘡 口瘡 殺蟲安尤의 效能이 있다. 梔子는 性은 寒無毒하고 味는 苦하며, 淸熱瀉火 涼血解毒藥으로 瀉心肺之邪 便之屈曲下行 由小便出 三焦之鬱火以解 熱厥心痛以平 吐衄崩淋 血痢之病以息 治心煩懊憹不眠五黃 五淋의 效能이 있다<sup>1)</sup>. 현대 의학적인 관점에서 보면 黃芩은 解熱 血壓降下 殺菌 粥狀動脈硬化의 防止作用 등이 있으며, 黃連은 殺菌 殺蟲 鎮痙 血糖調節 등의 作用을, 梔子는 血壓降下 消炎 解熱鎮痛作用 등이 있으며, 黃柏은 血糖降下 中樞神經抑制 抗炎症 등이 報告되어 있다<sup>2)</sup>.

따라서 이러한 점을 착안하여 黃連解毒湯이 알리지성 접촉피부염시 발생하는 과도한 피부상피 손상을 완화시킬 수 있을 것으로 생각되어 본 연구에 응용하였다.

본 실험은 DNCB에 의해 인위적으로 생쥐의 복부에 접촉 피부염을 유발시켜 SBA의 분포와 상피세포 분열 변화를 통해 피부 상피의 면역조직화학적 변화를 관찰하고 apoptotic 세포의 변화와 apoptosis 신호분자의 변화를 통해 피부 상피의 apoptosis 변화를 관찰하였다.

일반적인 형태변화는 黃連解毒湯 투여군에서 피부 손상이 적었다. 알리지성 접촉피부염은 특정 항원에 노출된 표적세포를 제거하기 위한 세포살해기전이 과도해서 유발되는 것으로, 조직자체의 과민한 방어기전이 오히려 조직손상을 유도한다. 상피세포 손상을 보상하려는 상피세포 과형성은 오히려 면역과민반응을 유도하는 cytokine 분비를 촉발시켜 진피내에서 세포성 면역반응을 극대화시키는 결과를 초래한다<sup>3)</sup>. 그 결과 본 실험의 알리지성 접촉피부염유발군에서는 DNCB 재 노출 후 피부에서 극심한 접촉 피부염이 유발되었다. 그러나 黃連解毒湯 투여군은 피부에서는 피부손상의 육안적인 지표인 홍반의 발생이 적었

으며, 표피에서는 상피세포 과형성 감소, 상피 기저층의 림프구 침윤 감소, 손상 표피세포의 감소 등이 나타났다. 이러한 결과는 黃連解毒湯 투여가 과도한 피부손상을 완화시킨 결과로 알리지성 접촉피부염 유발시 인위적으로 세포성 면역 억제를 유도했을 때 상피에서 나타난 결과와 동일하였다<sup>4)</sup>. 또한 미세구조의 변화를 관찰해 보면 알리지성 접촉피부염 유발군에서는 상피세포의 핵응축, 세포질내 액포화의 증가 그리고 세포사이 공간이 확장되는 상피세포 손상이 관찰되었다. 그러나 黃連解毒湯 투여군에서는 상피세포의 손상이 감소된 것으로 나타나, 黃連解毒湯이 피부 염증시 나타나는 상피세포의 손상회복에 효과가 있는 것으로 사료된다.

한편 상피로의 림프구 침윤은 손상된 표피세포의 확장된 세포사이 공간을 통해서 이루어지는데 본 실험에서는 이러한 변화를 SBA 분포변화를 통해 확인할 수 있었다. SBA는 세포사이 공간에 분포하는 N-acetyl-galactosamine에 양성반응을 보이는 것으로, 알리지성 접촉피부염유발군에서 분포가 적었다는 것은 세포사이 공간의 파괴 및 손상적 변화를 시사하는 결과이다. 이에 반해 黃連解毒湯 투여군에서는 강한 SBA 양성반응이 나타났으며 그 분포도 대조군과 유사한 형태로 나타나 세포사이 공간 손상이 회복되었다는 사실을 확인하게 하였다.

알리지성 접촉피부염에서의 상피세포 과형성은 손상된 상피에 대한 과도한 보상작용으로 알리지성 접촉피부염 유발군 기저층에서 많은 수의 세포분열이 일어나게 된다. 본 실험에서는 thymidine analogue인 BrdU를 합성되는 DNA에 끼워 넣은 후 면역조직화학<sup>27)</sup>을 통해 기저층에서 세포분열 증가를 직접 확인할 수 있었다. 즉 알리지성 접촉피부염에서는 BrdU 양성반응세포의 분포가 증가한 것으로 나타났지만 상피세포의 손상이 적었던 黃連解毒湯 투여군은 BrdU 양성반응세포의 분포가 적게 나타나 상피세포 손상에 대한 세포 과형성은 일어나지 않았다는 사실을 확인할 수 있었으며 이는 상피세포 과형성으로 인한 전염증성 cytokine의 분비증가로 인한 악순환이 黃連解毒湯 투여군에서는 일어나지 않았음을 시사하



는 결과이다.

본 실험에서 apoptosis 유발 변화를 조사하기 위해서 사용한 TUNEL 방법은 apoptosis의 초기단계를 볼 수 있는 방법으로, apoptosis 기전에서 endogenous endonuclease의 활성이 증가되어 염색체가 분절되는 것에 기본원리를 두고 있다. 이 방법은 분절된 DNA의 3'-OH에 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)를 붙이고 TdT에 biotinylated dUTP를 결합시킨 후 발색시켜 광학현미경하에서 apoptotic 세포만을 구분할 수 있다. 또한 Fas 항체를 이용한 면역조직화학을 통해서 apoptosis 신호체계의 세포질내 변화도 조사하였다. 그 결과 apoptosis는 과도한 상피세포 손상이 관찰되는 알러지성 접촉피부염 유발군의 과립층과 가시층에서 높았던 반면, 상피세포 손상이 적은 黃連解毒湯 투여군에서는 낮게 나타났다. 또한 두 군사이의 Fas 양성반응세포의 분포는 apoptosis와 유사한 경향성을 보였지만 Fas 양성반응은 주로 기저층에서 나타났다. 그 이유는 TUNEL에 의한 apoptotic cell은 이미 apoptosis가 진행된 결과이며, Fas 양성반응은 그 이전 단계로 인식된다.

이상 알러지성 접촉피부염에 黃連解毒湯을 투여하여 피부상피손상의 완화를 형태학적 측면에서 조사한 바, 黃連解毒湯이 DNCB로 유발된 생쥐의 알러지성 접촉피부염을 회복시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 본 실험 결과를 토대로 黃連解毒湯이 알러지성 접촉피부염 치료에 광범위하게 이용될 수 있고, 기존의 치료제보다 더 뛰어난 치료효능과 부작용이 없는 안전성이 확보된 치료제로 개발하기 위해서는 치료기전을 중심으로 하는 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### V. 結 論

黃連解毒湯이 알러지성 접촉피부염으로 유발된 피부상피손상에 대한 치료효과를 조사하기위해 행해진 본 연구는 인위적인 알러지성 접촉피부염이 유발된 생쥐에 黃連解毒湯 추출액을음용투여 시킨 후 피부

상피의 일반적인 구조, 미세구조, 세포사이 공간의 SBA 면역조직화학, 기저층의 세포분열에 대한 BrdU 면역조직화학, 세포자기살해 조사를 위한 TUNEL과 Fas 면역조직화학을 통해 나타난 결과를 관찰하였다.

1. 黃連解毒湯 투여군은 알러지성 접촉피부염에 비해 외형적인 피부손상이 적었다.
2. 알러지성 접촉피부염에서 관찰되는 상피조직손상인 상피세포 과형성, 응축된 핵과 액포를 가진 상피세포의 증가, 세포사이 공간의 확장, 침윤립프구의 증가가 黃連解毒湯 투여군에서 낮게 관찰되었다.
3. 黃連解毒湯 투여군에서 나타나는 이러한 결과는 면역조직화학과 TUNEL을 통해 다시 확인되었는데 정상적인 상피와 유사한 세포사이 공간에서 SBA 양성반응, 기저층에서 낮은 BrdU 양성세포의 분포, 낮은 apoptotic 세포와 Fas 양성반응세포 등의 완화된 상피의 형태가 나타났다.

이상의 결과로 볼 때 黃連解毒湯은 알러지성 접촉피부염에서 일어나는 상피손상 완화를 통해 상피세포 손상으로 유도되는 알러지성 접촉피부염의 일련의 악순환을 제어하는 것으로 사료된다.

### 參 考 文 獻

1. Johannes Ring. Allergy and hypersensitivity allergies on the increase. *Curr. Opin. in Immunol.* 2001;13:699-700.
2. Cumberbatch M, Kimber I. Phenotypic characteristics of antigen-bearing cells in the draining lymph nodes of contact sensitized mice. *Immunol.* 1990;71:404-10.
3. P. Torres, F. Guerra, A. Aenas, R. Miguel, C. Moreno, J. C. Daza, et al. *Humoral and Cellular Immunity in Different Phases of Contact Dermatitis.* *Am. J. Contact Dermatitis.* 1991;2(3):187-91.
4. Hiroshi Uchi, Hiroshi Terao, Tetsuya Koga, Masataka Furue. Cytokines and chemokines in the epidermis. *J. Dermatol. Sci.* 2000;24:S29-38.
5. 金嶺澤, 朴仁植, 安相炫. DNCB에 의한 생쥐 복강피부의 지연형 과민반응에 의한 연구. 동국대학교 한의학연구소논문집. 1997;6(1):117-28.

6. A. Wollenberg, T. Bieber. Topical immunomodulatory agents and their targets in inflammatory skin diseases. *Transpl. Proceed.* 2001;33:2212-6.
7. 吳崐. 醫方考. 北京:人民衛生出版社; 1990, p.115.
8. 蔡炳允. 接觸性皮膚炎에 관한 考察. 大韓韓方外官科學會誌. 1998;1(1):91-2.
9. 葛仙益. 肘後備急方. 台埠:集文書局; 1978, p.38-9.
10. 金光湖, 金聖洙. 黃連解毒湯과 溫性瘀血方의 水針 및 經口投與가 鎮痛, 消炎, 解熱作用에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌. 1994;15(1):9-25.
11. 杜鎬京, 朴憲在. 黃連解毒湯의 藥理學的 研究. 慶熙大學校論文集. 1982;5:103-14.
12. 鄭遇悅. 黃連解毒湯 역기스가 家兎의 體溫 및 血壓에 미치는 영향. 慶熙大學校 大學院. 1975.
13. 尹星燦. 黃連解毒湯加味方에 의한 면역글로불린E 媒介性 아나필락시의 抑制. 한방성인병학회지. 1997; 3(1):66-77.
14. Hollyday M. R., Dearman R. J., Kimber I., Coleman J. W. Sensitization of mice to chemical allergens modulates the responsiveness of isolated mast cells to IgE-dependent activation. *Immunology.* 1993;78:508-10.
15. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:法人文化社; 1999, p.1040.
16. A. I. Lauerma, B. D. Stein, B. Homey, C. H. Lee, E. Bloom, H. I. Maibach. Topical FK506: suppression of allergic and irritant contact dermatitis in the guinea pig. *Arch. Dermatol. Res.* 1994;286:337-40.
17. 金宰弘, 金賢兒, 姜允皓. 接觸性 皮膚炎에 관한 文獻的 考察. 大韓韓方外官科學會誌. 1997;10(1):263-283.
18. 巢元方. 諸病源候論. 臺北:集文書局; 1982, p.353-4.
19. 陳實功. 外科正宗. 北京:人民衛生出版社; 1983, p.259.
20. 傅景華 등. 中醫外科學. 北京:中醫古籍出版社; 1994, p.340-2.
21. 王燾. 外臺秘要. 北京:人民衛生出版社; 1982, p.416.
22. 葛仙益. 肘後備急方. 台埠:集文書局; 1978, p.38-9.
23. 劉完素. 劉河間傷寒三六書. 臺北:교육주부사출판부; 1976, p.55, 181, 340, 341, 520.
24. 大塚敬節. 漢方診療醫典. 서울:高文社; 1969, p.463.
25. 丘晨波. 中藥生藥. 香港:太平書局; 1968, p.35, 277, 279, 282.
26. 朴仁植, 金鎮澤, 權五性, 安相炫, 李海浜, 金鎬顯 등. 연교폐독산가미방이 알려진성 접촉피부염에 미치는 영향. 동국대학교 한의학연구소논문집. 1999;8:77-91.
27. Martin Kulldorff, Lisa M. McShane, Arthur Schatzkin, Laurence S. Freedman, Michael J. Wargovich, Cindy woods, et al. Measuring cell proliferation in rectal mucosa : Comparing bromodeoxyuridine(BrdU) and proliferating cell nuclear antigen(PCNA) assays. *J Clin Epidem.* 2000;53:875-83.