

## 消風導赤湯이 아토피 피부염의 항염증효과와 각질층 ceramide 변화에 미치는 영향

김성아, 강운호

동국대학교한의학과대학 내과학교실

### Changes in Ceramide in Stratum Corneum and Anti-inflammatory Effects of *Sopungdojeok-tang* on Atopic Dermatitis.

Sung-a Kim, Yoon-ho Kang

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

**Objective :** This study was designed to identify lipid protection formation in stratum corneum and anti-inflammatory effects of *Sopungdojeok-tang*(SD) on atopic dermatitis(AD).

**Materials and Methods :** *In Vivo*, SD extract was orally administered to BALB/c mice at 2.5ml/kg/day for 2 days after 5% sodium dodecyl sulfate evoked atopic dermatitis in abdominal skin. Morphological changes were observed by immunohistochemical stain using monoclonal antibodies(BrdU, ceramide, MIP-2, NF- $\kappa$ B p50, IL-4, and STAT6) and TUNEL method. *In vitro*, the alterations of IL-4 mRNA expression were detected by RT-PCT in SD extract treated EL4 cells after phorbol-12-myristate-13-acetate and 4-*tert*-Octylphenol induce Th2 skewed condition.

**Results :** SD is used in Oriental Medicine for its potential curative for atopic dermatitis. In this study, we have investigated the anti-inflammatory and lipid lamella repair effects of SD were investigated. SD decreased the number of eosinophil in atopic dermatitis-induced mice. In the histological properties, the hyperplasia, edema, infiltration of lymphocytes, damage of intercellular space of stratum corneum, BrdU positive reacted cells in stratum basal, and degranulated mast cells and capillaries in dermal papillae decreased in mice with SD. Treatment of SD also decreased MIP-2, STAT6 and IL-4 in dermal papillae. The IL-4 mRNA expression decreased in a dose-dependant manner in SD treated EL4 cells. In addition, decrease of NF- $\kappa$ B p50 and increase of apoptotic cells in dermis were observed in SD treated mice. These data suggest that SD may be beneficial for atopic dermatitis.

**Conclusions :** These data suggest that SD is beneficial in treatment of atopic dermatitis, and that SD provides lipid protection in stratum corneum and anti-inflammatory effects on atopic dermatitis.

**Key Words:** *Sopungdojeok-tang*, atopic dermatitis, lipid protection, anti-inflammatory.

### 1. 緒 論

아토피 피부염은 알레르기성 비염이나 천식을 동반하는 경우가 많은 만성 재발성 피부질환으로, 임상 양상은 유아의 경우 안면과 사지 신축부에 습진병변이 있으며 나이가 들면서 굴측부를 침범하는 습진

양상, 소양증, 피부건조증, 어린선, 피부감염의 증가와 모공각화증 등을 보인다<sup>1</sup>.

원인은 환경적인 영향을 받아 다인성으로 유전되며 혈청 immunoglobulin E(IgE)가 과도하게 생성되는 것으로 알려져 있다. 아토피 피부염 병변내 림프구는 CD4:CD8의 비가 7:1정도로 증가되어 있고 interleukin-4(IL-4)에 강한 반응성을 보여 T helper2(Th2) 세포에 의한 면역반응이 우세하다<sup>1</sup>. 조직학적으로 과각화증, 이상각화증, 극세포증과 세포간 부종 및 소혈관의 확장 현상과 진피 상부에 호산구, 임파구, 조직

· 접수 : 2006. 2. 21. · 채택 : 2006. 2. 24.  
· 교신저자 : 김성아,  
(Tel. 031-710-3734, Fax. 031-710-3734  
E-mail : fatcat96@freechal.com)

구 등의 혈관주위 세포 침윤이 나타난다<sup>2</sup>. 최근에는 면역학적 이상 외에 피부장벽기능 손상이 중요한 요인 중의 하나로 생각되고 있다. 피부장벽기능의 손상은 각질층 지질 중 ceramide의 감소에서 기인하며 피부의 수분유지기능과 피부장벽기능이 저하되어 알레르겐이나 자극성 물질의 피부 투과성을 높여 피부 염증반응을 유발 또는 악화시키며 건조피부, 소양증 등이 발생하고, 역으로 면역학적 이상에 의해 발생한 피부염은 피부장벽기능을 손상시킬 수 있어 이와 같은 악순환의 고리를 차단하는 것이 치료의 중요한 과제중 하나가 된다<sup>3</sup>.

일반적인 치료는 악화시키는 요인들을 피하면서 수분공급과 보습제를 함께 사용하여 각질층의 장벽을 유지·재확립하거나 항히스타민제의 복용과 국소 스테로이드제를 도포하며, 심한 경우 광선치료, cyclosporine, interferon- $\gamma$ 와 dipeptide of thymopentin(TP-5) 등을 쓴다<sup>4</sup>. 한의학에서는 防風通聖散·消風散 등을 투여한 임상연구<sup>5</sup>, 紫雲膏 등의 외용요법을 병행한 임상연구가 있고<sup>6</sup>, 실험적으로는 流瀉丹<sup>7</sup>·仙方敗毒湯<sup>8</sup> 등으로 cytokine 조절효과에 대한 연구와, 生血潤膚飲<sup>9</sup>·柴胡清肝散<sup>10</sup>으로 각질층기능회복에 대한 연구가 보고된 바 있다.

아토피 피부염은 한의학에서 奶癩, 嬰兒濕疹, 胎敏瘡, 濕疹, 浸淫瘡, 異位性皮膚炎, 血風瘡, 四彎風 등의 범주로 볼 수 있고<sup>11</sup>, 稟性이 약하고 濕熱이 內蘊한 상태에서 風濕熱邪의 浸淫을 받아 內外邪氣가 肌膚에 相搏하여 발생하며<sup>12</sup> 특히 급성기의 경우는 風濕熱 浸淫肌膚證인 홍반, 구진, 수포, 소양 등의 증상이 나타난다<sup>13</sup>.

이에 疏風清熱의 효능으로 胎敏瘡에 활용되는 消風導赤湯이<sup>14</sup> 아토피 피부염 치료에 효과가 있을 것으로 기대되어 아토피 피부염을 유발한 동물모델에 추출물을 투여하여, 각질층내 지방방어구조의 회복과 T 세포 분화조절을 통해 초기 아토피 피부염의 진행 차단과 전사인자 nuclear factor kappa B(NF- $\kappa$ B) 활성 조절을 통한 항염증작용으로 피부 손상을 완화하는 유의성 있는 결과를 얻었다.

## II. 材 料

### 1. 실험동물

대한실험동물센터에서 분양 받은 대령 4주된 BALB/c계 암컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 20g된 생쥐로 선별하여 사용하였다. 대조군, 아토피 피부염 유발군(atopic dermatitis, AD군), 아토피 피부염 유발 후 消風導赤湯 투여군(Sopungdojeok-tang, SD군)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

### 2. 세포주와 세포배양

Th2 세포의 분화 변화를 조사하기위해 사용된 EL4 세포는 Korean Cell Line Bank(KCBL; Korea)에서 구입하였다. EL4 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 10% Fetal Bovine Serum(FBS; Sigma, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Sigma)을 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100unit/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다.

### 3. 消風導赤湯의 제조

消風導赤湯(Table 1.) 2침을 증류수 500ml에 넣고 2시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary

Table 1. The Amount and Composition of Sopungdojeok-tang(SD) Extract

韓藥名	生藥名	用量(g)
生地黃	REHMANNIAE RADIX	4.0
赤茯苓	PORIA	4.0
牛蒡子	BARDANAE FRUCTUS	3.2
白藜皮	CORTEX DICTAMNI	3.2
金銀花	LONICERAE FLOS	3.2
薄荷葉	MENTHAE HERBA	3.2
木通	AKEBIAE LIGNUM	3.2
燈心	JUNCI MEDULLA	2.0
黃連	COPTIDIS RHIZOMA	0.9
甘草	GLYCYRRHIZAE RADIX	0.9
總量		27.8

evaporator를 이용하여 감압·농축하여 추출액 50ml을 얻었다. 한편 *in vitro*에 사용될 消風導赤湯 추출물은 1첩을 위에 서술한 방법으로 처리한 후 동결 건조하여 건조추출물 3.24g을 얻었다.

### III. 方 法

#### 1. 아토피 피부염의 유발과 추출액 투여

아토피 피부염은 Christophers와 Mrowietz의 방법과<sup>16</sup> Minehiro의 방법을<sup>17</sup> 병합·사용하여 유발하였다. 우선 생쥐 살부위 위쪽 복부 피부를 면도한 다음 cellophane tape(3M, USA) 5회 첩포를 통해 각질층의 탈락층(desquamation)을 제거하였다. 그런 다음 70% ethyl alcohol로 소독하고 계면활성제인 5% sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma, USA) 1ml을 면봉으로 20회 문질러 각질층의 lipid lamella를 제거하였다. 아토피 피부염 유발 후 消風導赤湯 추출액을 SD군에 48시간 동안 2.5ml/kg/day 양으로 구강투여 하였다.

#### 2. Th2 세포의 분화 유발과 추출물 처리

消風導赤湯의 Th2 세포 분화 조절에 대한 작용 기전을 조사하기 위해 EL4 세포( $5 \times 10^5$  cells/well)를 6well에 plating하고 12시간동안 배양한 후, phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA, Sigma) 1ng/ml과 4-tert-Octylphenol(Sigma) 5uM/ml로 1시간 처리하여 Th2 skewed condition을 유발하였다. 유발 후 消風導赤湯 추출물 첨가는 MTT assay를 통해 결정된 0.5, 1, 1.5 그리고 2mg/ml 농도로 이루어졌다. MTT assay는 우선 96well plate에 EL4 세포( $5 \times 10^3$  cells/well)를 12시간 배양한 후 FBS를 첨가하지 않은 serum free medium (Sigma)으로 교환하여 4시간동안 안정화시키고, 1, 5, 10, 20mg/ml 농도로 消風導赤湯 추출물을 첨가하여 24시간 배양하였다. 그리고 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-YL)-2,5-Diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT; Sigma) 2mg/ml를 넣고, incubator에서 4시간 배양한 후 dimethylsulfoxide(DMSO; Sigma)로 용해시켜 595 nm의 파장에서 microplate reader(Molecular devices, USA)로 흡광도를 측정하여 세포생존률을 계산하였다.

MTT assay 결과 消風導赤湯 추출물 10mg/ml까지는 세포생존률의 변화가 일어나지 않아 0.5, 1, 1.5 그리고 2mg/ml를 첨가량으로 결정하여 사용하였다.

#### 3. 피부 조직표본 제작

아토피 피부염 유발 48시간 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin, NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. SDS 처리부위에서 얻어진 피부를 10% NBF에 실온에서 24시간 동안 고정된 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5μm 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 hematoxyline과 eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다. 한편 지방과 ceramide 염색을 위한 냉동절편 제작은 NBF에 고정된 후 10% formol-calcium에 1주일 동안 oxidation 처리하였다. 30% sucrose 용액에 cryo-protection한 후 냉동절편기(Microm, Germany)로 10μm 두께의 냉동절편을 제작하였다. 각질층 내 세포사이공간의 미세구조 변화를 관찰하기 위해 절취된 피부 절편을 1/2 Karnovsky 용액에 선고정한 후 1% OsO<sub>4</sub> (EMS, USA)용액에 후고정하였다. Uranyl acetate (EMS)에 90분 동안 염색한 후 통상적인 방법으로 epon에 포매하였다. Ultramicrotome(LKB, Nova, Germany)으로 600~800nm 두께로 절편을 만든 다음 toluidine blue(Sigma)로 염색하여 관찰하였다.

#### 4. 혈액내 산호성백혈구 변화 조사

아토피 질환의 대표적 지표인 산호성백혈구의 혈액 내 빈도 변화를 조사하기 위해 심장천자로 채혈하여, Hinkelmann 용액에 희석한 다음 Neubauer 계산반(Superior, Germany)으로 계수하였다.

#### 5. 손상 피부에 대한 효능 조사

##### 1) 상피 세포과형성 변화 관찰

피부 상피내 세포증식 변화를 조사하기 위해 BrdU를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 실험동물에서 피부를 적출하기 5시간 전, 3시간 전, 1시간 전에 생리식염수에 녹인 5-bromo-2'-deoxyu-

ridine(BrdU, Sigma) 50mg/kg을 복강주사하였다. 얻어진 연속절편은 4°C와 37°C의 2N 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 normal goat serum(DAKO)에 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 1차 항체인 mouse anti-mouse BrdU(1:50, Amersham, UK)에 4°C incubation chamber내에서 72시간 반응시켰고 biotinylated goat anti-mouse IgG(DAKO)에 실온에서 10분간 link 하였다. Streptavidin peroxidase(DAKO)에 10분 동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

## 2) 비만세포 변화 관찰

염증부위내 세포이주에 영향을 미치는 비만세포의 분포와 형태 변화를 조사하기 위해 Luna's method를 실시하였다. 우선 진피내 비만세포 과립을 aldehyde fuchsin에 30분간 염색하였다. 그런 다음 Weigert's iron hematoxylin과 methyl orange 용액에 각각 1분, 5분 동안 대조염색한 후 관찰하였다.

## 3) 각질층내 지방 방어구조의 변화 관찰

Sudan black B 염색법을 통해 각질층내 지방 분포 변화를 조사하였는데, 우선 제작된 냉동절편을 absolute propylene glycol로 10분간 탈수한 후 sudan black B 용액에 2분간 염색하였다. 85% propylene glycol로 10분간 탈색한 후 증류수에 수세하고 nuclear fast red로 1분간 대조 염색하였다. 대조 염색 후 증류수로 3회 수세한 다음 glycerin jelly로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

한편 각질층내 지방 중 26%를 차지하며 protein kinase C(PKC)의 활성을 억제하는 역할을 하는 ceramide의 분포 변화를 조사하기위해 항 ceramide 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 냉동절편을 blocking serum인 normal goat serum에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 면역반응을 억제하였다. 그리고 1차 항체인 mouse anti-mouse ceramide

(1:100, Sigma)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰으며, 이후 과정은 위에 기술한 면역조직화학적 염색법과 동일하였다.

## 4) NF-κB 분포 변화 관찰

염증유발유전자들을 조절하는 전사인자 NF-κB의 활성 변화를 관찰하기위해 NF-κB p50(1:250, Santa Cruz Biotech, USA)을 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

## 5) 세포자살해 변화 관찰

Apoptotic 세포의 분포변화를 조사하기 위해 in situ apoptosis detection kit(Apoptag, Intergen, USA)를 이용한 terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labelling(TUNEL) 방법을 실시하였다. 먼저 조직 절편을 proteinase K에 5분간 proteolysis 시킨 다음 equilibration buffer에서 20초간 처리하였다. 그런 다음 strength TdT enzyme(36μl TdT enzyme : 72μl reaction buffer)을 처리하여 37°C의 humidified chamber에서 1시간 동안 반응시킨 후 strength stop/wash buffer에서 10분 동안 처리하였다. Anti-digoxigenin-peroxidase에 1시간 동안 반응시킨 후 DAB를 처리하였다. Methyl green으로 대조염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

## 6. 혈관신생성 억제 효과 조사

### 1) Angiogenic chemokine 변화 관찰

혈관신생성에 관여하는 IL-8 유사 chemokine인 macrophage inflammatory protein(MIP)-2 분포 변화를 조사하기 위해서 rabbit anti-mouse MIP-2(1:100, Santa Cruz Biotech)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였으며, 이후 과정은 위에 기술한 면역조직화학적 염색법과 동일하였다.

### 2) 혈관신생성의 영상분석 변화 관찰

아토피 피부염이 유발된 오른쪽 살부위 위쪽 복부 피부를 절개하여 젖힌 후, 나타나는 얇은배벽동맥을 x4 배율로 촬영한다. Optimas 5.2(Optima, USA)에서 먼저 image 기능의 sharpen low-filter를 사용하여 혈관을 명확하게 한다. 그런 다음 binary morphology에서 invert 기능을 선택하여 모세혈관을 intensity 180

~200으로 전환·부각시킨다. Histogram을 통해 동일 영역의 pixel을 계수하였다.

3) 진피유두내 모세혈관 분포 변화 관찰

진피유두와 기저층 사이에 분포하는 모세혈관을 조사하기 위해서 심장관류고정 없이 피부 조직 적출 후 바로 10% NBF로 고정처리하여 Wright's stain solution에 30분간 반응 후 관찰하였다.

7. Th2 세포 분화 억제제를 통한 기전 조사

1) IL-4 mRNA 발현 변화 조사

Th2 세포 분화에 대한 조절기전을 조사하기 위해 IL-4 mRNA 발현 변화를 측정하였는데, Th2 세포 분화 유발 후 24시간 배양한 EL4 세포의 RNA를 trizol reagent(Sigma)를 사용하여 추출한 다음 UV-spectrophotometer(Shimadzu, Japan)로 순도와 농도를 측정하였다. RT-PCR kit(Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후, IL-4 primer를 PCR machine으로 온도 조건에 따라 반응시켰다(Table. 2). PCR 산물은 1~2% agarose gel 상에서 전기영동 하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 beta-actin의 증폭을 동시에 실시하였다(Table. 2).

2) IL-4 분비 변화 관찰

피부 진피내 IL-4의 분비 변화를 조사하기위해 goat anti-mouse IL-4(1:250, Santa Cruz Biotec)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

3) 전사인자 STAT6 활성 변화 관찰

피부 진피내 IL-4의 전사인자인 STAT6의 활성 변화를 조사하기위해 rabbit goat anti-STAT6(1:250, Santa Cruz Biotec)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

8. 영상분석과 통계처리

면역조직화학, TUNEL 염색 그리고 전기영동의 relative intensity 등의 결과를 수치화하기 위해 Optimas 5.2(Optima, USA)를 이용한 영상분석을 실시하였다. 영상분석 결과는 Sigma plot 2000(Sigma)을 통한 Student t test로 p값이 0.05 미만의 수준에서 유의성을 검증하였다.

IV. 結果

1. 혈액내 산호성백혈구 변화

혈액내 산호성백혈구 수를 조사한 결과, 대조군에 비해 AD군에서는 그 수가 증가한 반면, SD군에서는 AD군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 1). 48시간에 1111.25±108.50개/μl인 대조군에 비해 AD군은 144.25%나 증가한 2714.25±255.25개/μl로 측정되었다. 이에 반해 SD군에서는 1657.50±139.30개/μl로 AD군에 비해 38.93% 감소된 것으로 나타났다(Fig. 1).

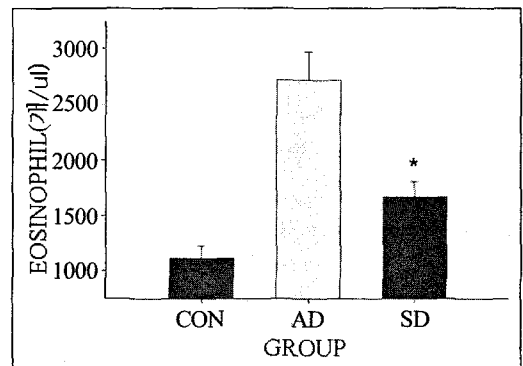


Fig. 1. The inhibition of Eosinophil in SD Treated Mice after AD Elicitation.

Table 2. The Primer of IL-4 and β-actin mRNA

Primer		Primer sequences	Product(bp)	No. of cycles
IL-4	sense	5'-TAGTTGTCATCCTGCTCTT-3'	404	35
	antisense	5'-CTACGAGTAATCCATTTGC-3'		
β-actin	sense	5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	antisense	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

2. 손상피부에 미치는 영향

1) 외부형태 및 조직 손상 완화

AD군의 피부 대부분의 지역에서 각질층이 손상된 습진이 나타났으며, 일부 가장자리지역에서는 탈락과정에 있는 혈병과 표피 잔재도 관찰되었다. 외부형태상 각질층 손상이 확인된 피부에서는 상피내 각질층의 탈락과 세포과형성, 진피유두에서 과립백

혈구와 림프구의 침윤증가와 누출혈액 증가가 두드러지게 관찰되었다. 이에 반해 SD군은 일부 지역을 제외하고는 정상적인 외부형태로 관찰되었는데, 상피내 세포과형성 감소, 진피내 과립백혈구와 림프구의 침윤이 감소하였다(Fig. 2-A, B.).

2) 상피 세포과형성 억제

최근에 세포분열된 세포에서 관찰되는 BrdU 양성

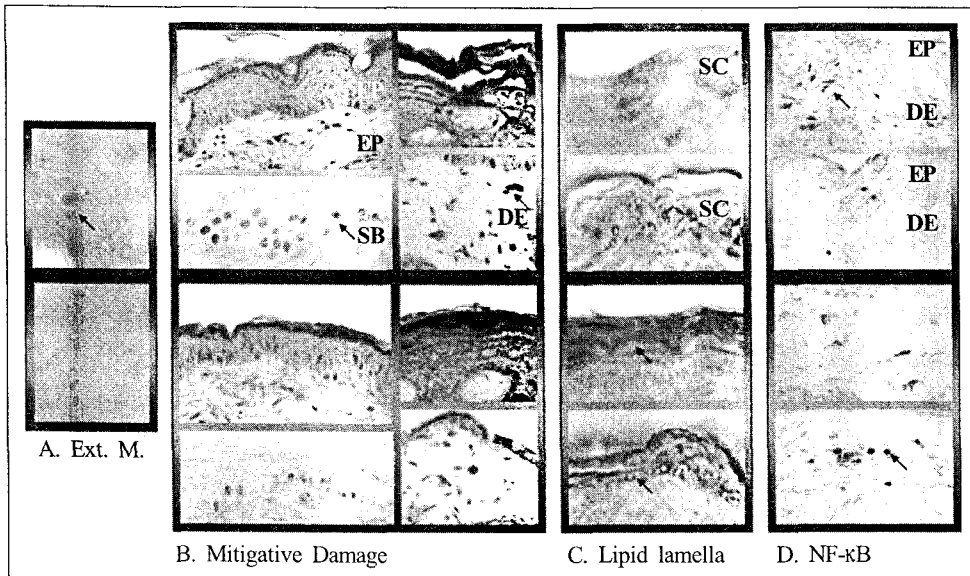


Fig. 2. The Mitigative Effect of SD for AD Caused Skin Damages (AD, upper-box; SD, lower-box). A. External morphology. Skin damages as eczema (Arrow, x4). B. The hyperplasia, edema, infiltration of lymphocytes, and congestion (L. upper, x400), damage of intercellular space of SC (R. upper, semi-thin section, x2000), BrdU positive reacted cell (arrow) in SB (L. lower, x400), and degranulated mast cell (arrow) in dermal papillae (R. lower, x400). C. Lipid deposition (upper, x1000) and ceramide (lower, x1000) in intercellular space of SC. D. Decrease of NF-κB p50 positive reacted cell (upper, arrow, x400) and increase of apoptotic cell (lower, arrow, x1000) in dermis. SC, stratum corneum; SB, stratum basale; EP, epithelium; DE, dermis

Table 3. The Image Analysis in SD Treated Mice after AD Elicitation

Antibody	Group(M±S.D)		
	CON	AD	SD
BrdU	893±83	3094±237	1971±173*
Ceramide	8021±41	1820±86	6195±250*
NF-κB p50	498±15	2824±116	1252±129*
Apoptosis	271±15	736±13	1896±35*

(image analysis for 100,000 pixel / range of intensity : 70-130)  
 CON, no treated group; M±S.D, Mean±Standard Deviation; \*, P<0.05 compared with AD

반응은 핵에서 강하게 나타났으며, 상피 기저층과 일부 가시층까지 분포하는 것으로 확인되었다. AD군에 비해 SD군에서는 BrdU 양성반응세포의 분포가 감소된 것으로 관찰되었다. AD군은 대조군에 비해 246.31% 증가한 3094±237/100,000pixel로 관찰된 데 반해 SD군에서는 AD군에 비해 36.29% 감소한 1971±173/100,000pixel로 관찰되었다(Table 3, Fig. 2-B.).

3) 비만세포의 분포 변화

AD군의 진피 유두에서 피하 인접부까지 많은 수의 비만세포가 분포하고 있었으며, 탈과립형이 주를 이루었다. 이에 반해 SD군에서는 AD군에 비해 적은 수가 관찰되었으며, 과립형이 주를 이루었다(Fig. 2-B.).

4) 각질층내 지방 방어구조의 변화 관찰

AD군에서 각질층내 지방과립의 분포는 표피탈락이 일어나는 각질층 상부에서만 관찰되었으며, 그 외 지역에서는 나타나지 않았다. 각질세포의 탈락과 세포사이공간의 확장된 각질층에서는 각질세포사이공간에 lipid lamella가 존재하지 않았으며, 이에 반해 SD군에서는 과립층 상부에서부터 각질층 표피탈락까지의 각질세포사이공간에서 선형으로 배열된 지방과립을 관찰할 수 있었고, AD군과는 달리 세포사이공간의 확장과 각질세포의 탈락은 관찰되지 않았다.

한편 ceramide 분포에 관한 영상분석 결과 AD군에서 대조군에 비해 77.31% 감소한 1820±86/100,000 pixel로 관찰되었다. 이에 반해 SD군에서는 AD군에 비해 240.38% 증가한 6195±250/100,000pixel로 관찰되었으며, 주로 각질세포의 세포사이공간에서 강한 양성반응을 보였다(Table 3, Fig. 2-C.).

5) NF-κB 활성 억제를 통한 항염증효과

상피 기저부와 진피유두에서 관찰되는 NF-κB p50 양성반응은 핵 일부분과 핵막주변의 세포질에서 강하

게 나타났으며, AD군에 비해 SD군에서 NF-κB p50 양성반응세포가 감소된 것으로 관찰되었다. AD군은 대조군에 비해 467.07% 증가한 2824±116/100,000 pixel로 관찰되었다. 이에 반해 SD군에서는 AD군에 비해 55.70% 감소한 1252±129/100,000pixel로 관찰되었다(Table 3, Fig. 2-D.).

6) 세포자연살해 증가

진피유두에 있는 자연살해세포에서 관찰되는 apoptotic 양성반응은 핵에서 강하게 나타났으며, AD군에 비해 SD군에서 apoptotic 양성반응세포가 증가된 것으로 관찰되었다. AD군은 대조군에 비해 171.59% 증가한 736±13/100,000pixel로 관찰되었다. 이에 반해 SD군에서는 AD군에 비해 157.61% 증가한 1896±35/100,000pixel로 관찰되었다(Table 3, Fig. 2-D.).

3. 혈관신생성 억제 효과

1) Angiogenic chemokine 발현 감소

진피유두의 모세혈관주변 세포에서 관찰된 MIP-2 양성반응은 AD군에서 대조군에 비해 397.98% 증가한 6918±521/100,000pixel로 나타났다. 이에 반해 SD군에서는 AD군에 비해 45.06% 감소한 3801±239/100,000pixel로 관찰되었다(Table 4, Fig. 3-A.).

2) 혈관 분포 감소

아토피 유발 피부를 절개하여 진피쪽 피부를 영상분석 한 결과, 대조군에 비해 AD군은 혈관가지 수가 증가한 반면, SD군은 AD군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다. 영상분석 결과 48시간에는 9023±372pixel인 대조군에 비해 AD군은 226.04%나 증가한 29419±1148pixel로 측정되었다. 이에 반해 SD군에서는 14564±1441pixel로 AD군에 비해 50.19% 감소된 것으로 나타났다(Fig. 3-B.).

Table 4. The Inhibition of MIP-2 in SD Treated Mice after AD Elicitation

Antibody	Group		
	CON	AD	SD
MIP-2	1648±36	6918±521	3801±239*

(image analysis for 100,000 pixel / range of intensity : 70-130)

3) 진피유두내 모세혈관 분포 감소

AD군에서 손상이 심했던 상피주변의 진피 유두에서는 많은 수의 모세혈관이 관찰되었다. 이에 반해 SD군의 진피 유두에서는 모세혈관의 수가 AD군에 비해 적었다(Fig. 3-C).

4. Th2 세포 분화 억제 효과

1) IL-4 mRNA 발현 억제

PMA와 OP 자극에 의해 EL4 세포에서의 IL-4 mRNA 발현은 증가하였는데, 消風導赤湯 추출물 처리 후 농도의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, PMA와 OP 자극시 발현되는 IL-4 mRNA 발현량에 비해 0.5mg시 5.17%, 1mg시 11.48%, 1.5mg시 21.55%, 2mg

시 30.98%가 감소하였다(Fig. 4-A.).

2) 진피내 전사인자 STAT6 활성 억제

진피에서 관찰되는 전사인자 STAT6 양성반응은 핵과 핵주변 세포질에서 강하게 나타났으며, AD군에 비해 SD군에서 STAT6 양성반응세포가 감소된 것으로 관찰되었다. AD군은 대조군에 비해 357.92% 증가한 2198±95/100,000pixel로 관찰되었다. 이에 반해 SD군에서는 AD군에 비해 61.42% 감소한 1350±23/100,000pixel로 관찰되었다(Table 5, Fig. 4-B.).

3) 진피내 IL-4 분비 억제

상피 기저부 근처 진피유두에서 관찰되는 IL-4 양성반응은 세포질에서 강하게 나타났으며, AD군에 비해 SD군에서 IL-4 양성반응세포가 감소된 것으로

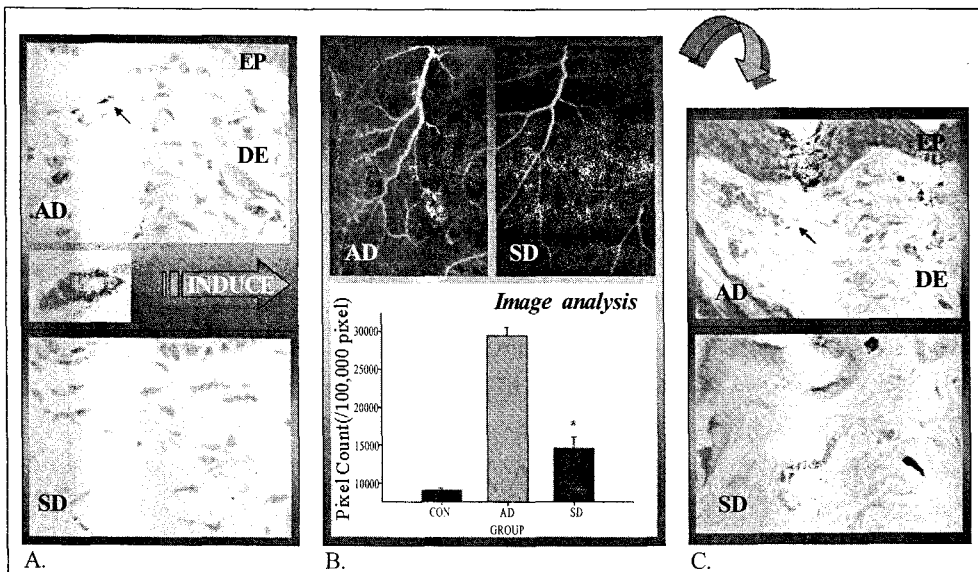


Fig. 3. Inhibition of Angiogenesis by SD. A. Increase of CXC chemokine (x400). Distribution of MIP-2 positive reacted cell (arrow). B. Angiogenesis analysis (x4). C. Distribution of capillary in dermal papillae (arrow, x400).

Table 5. The Inhibition of Th2 Cell Differentiation Intricated Cytokine(IL-4) and STAT6 in SD Treated Mice after AD Elicitation

Antibody	Group		
	CON	AD	SD
STAT6	480±30	2198±95	1350±23*
IL-4	1427±206	10517±993	5548±168*

(image analysis for 100,000 pixel / range of intensity : 70-130)



관찰되었다. AD군은 대조군에 비해 637.52% 증가한 10517±993/100,000pixel로 관찰되었다. 이에 반해 SD군에서는 AD군에 비해 47.25% 감소한 5548±168/100,000pixel로 관찰되었다(Table 5, Fig. 4-C).

### V. 考 察

아토피 피부염은 급성, 아급성, 만성적 경과를 취하는 가려운 피부질환으로 고초열, 천식, 알레르기성 비염, 아토피 피부염 등의 개인병력 또는 가족력을 보인다. 가려움증은 아토피 피부염의 가장 중요한 증상으로 급게 되면 발진, 다시 가려움증의 악성 순환을 하게 된다. 급성기는 경계가 불확실한 홍반성 반, 구진이 인설과 동반되어 나타나고 심한 경우 부종이 오며 미란과 가피가 보이고 긁어서 생긴 찰상으로 포도상구균에 의한 이차감염이 있을 수 있고 농포, 가피가 발생한다. 만성기는 태선화 현상과 손, 발 등에 통증이 동반된 균열이 나타난다. 알레르기, 자주 씻어 건조한 피부, 정신적 스트레스, 호르몬, 임신, 월경, 감상선 질환, 감염, 계절적 변화, 의류 등이 악화요인이 된다<sup>11</sup>.

아토피 피부염의 한의학적 범주에 해당하는 병명

은 奶癬, 嬰兒濕疹, 胎斂瘡, 濕疹, 浸淫瘡, 異位性皮膚炎, 血風瘡, 四彎風 등이 있고<sup>12</sup>, 원인은 정서적, 환경적, 음식물 또는 유전적 요인과 함께 濕熱이 內蘊한 상태에서 다시 風濕熱邪의 浸淫을 받아 內外邪氣가 相搏하여 肌膚에 발생한다고 본다<sup>13</sup>.

發現樣相에 따라 濕症과 乾症으로, 病因病機에 따라 급성기와 만성기로 분류하고 이 중 급성기는 濕熱型에 해당하여<sup>12,18</sup> 주로 風濕熱이 挾感한 양상으로 증상이 발현하게 되는데, 발병이 급하고 홍반, 구진, 수포, 구포진, 미란, 결가 등이 각처에 범발하여 대칭 분포하며 극렬한 소양을 특징으로 한다<sup>14,19</sup>. 따라서 소양증과 발진 등을 주소로 하는 급성기 아토피 피부염의 치료에 대한 접근은, 風濕熱을 조절하는 방법에서 고려해 볼 수 있을 것이다.

疏風清熱의 효과가 있는 消風導赤湯은 『醫宗金鑑·外科心法要訣』<sup>15</sup>의 胎斂瘡 부분에 제시된 처방으로 風濕熱로 발생한 급성기 아토피 피부염 증상을 개선시킬 수 있을 것으로 생각된다. 胎斂瘡은 奶癬이라고도 부르는데, 血熱에 風纏을 받아 疥癬과 같은 白屑 乾痒 濕淫水가 생기며 熱極하면 濕斂이 발생한다 하여 血熱에 風이 兼한 것을 원인으로 보았으며<sup>15</sup>, 이상의 증상은 아토피 피부염 급성기의 구진, 인설, 미란

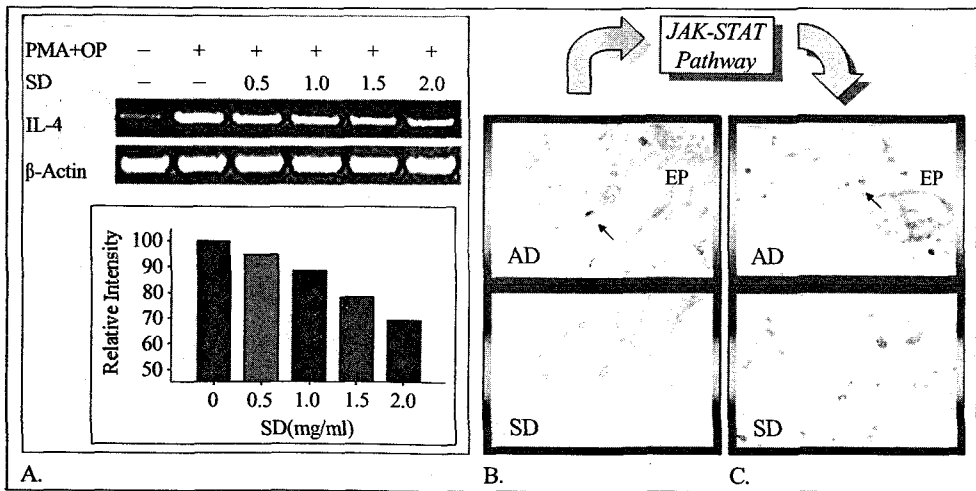


Fig. 4. Inhibition of Th2 Cell Differentiation by SD. A. *In vitro* (IL-4 mRNA expression). B. *In vivo*, distribution of STAT6 positive reacted cell (arrow, x400) C. Distribution of IL-4 positive reacted cell (arrow x400) in dermal papillae. The IL-4 positive reaction was appeared in nucleus around cytoplasm (lower, x1000).

등 증과 부합한다. 치료방인 消風導赤湯은 清熱涼血 養陰生津하는 生地黃, 疏散風熱 透疹하여 風疹 麻疹 등에 쓰이는 牛蒡子와 薄荷, 清熱燥濕 祛風解毒하여 濕熱瘡毒 濕疹 疥癬瘡癩에 쓰이는 白蘚皮, 清熱解毒 涼散風熱하여 癰腫疔瘡 丹毒에 쓰이는 金銀花, 利濕熱하는 赤茯苓, 瀉火行水하는 木通, 利水滲濕하는 燈心, 清熱燥濕 瀉火解毒하는 黃連, 和中緩急 解毒하는 甘草로 구성되어<sup>20</sup> 清熱하면서 生津하고 利水を 통한 燥濕과 疏風止痒의 효과를 나타낸다고 생각된다. 楊<sup>14</sup>은 환자가 瘦弱하고 皮損이 大片紅斑 丘疹위주이며 이후 皮膚粗糙 油膩鱗屑 혹은 痂皮가 있고 심해지면 水疱滲出이 생기면서 극심한 소양으로 수면이 어려운 증상을 보이는 乾疥에 消風導赤湯을 이용한다 하였다. 따라서 風濕熱로 인한 상기 증상을 疏風清熱 함으로써, 아토피 피부염 급성기에 소양증을 진정시키고 염증반응을 완화시키는 치료효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

아토피 피부염 발생에서 피부장벽기능 손상은 면역학적 이상과 더불어 중요한 요인이 되는데<sup>3</sup>, 피부장벽인 피부 각질층은 각질세포와 lamella body에서 분비한 지질로 형성된 lipid lamella로 구성되어 전해질과 수분손실을 억제하고 외부의 물리적 손상과 자극적 물질로부터 인체를 보호한다<sup>21</sup>. 각질층의 지질은 ceramide, 유리지방산, 콜레스테롤, triglyceride, steryl ester 및 cholesterol sulfate로 구성되며, 이중 ceramide가 26%정도로 가장 많이 존재하여 수분함유와 투과장벽으로 작용하므로<sup>22</sup> 각질층의 지질은 단지 세포사이의 구조적 결합뿐만 아니라 피부장벽의 기능적 조절자로서의 역할도 수행하는 것으로 알려져 있는데<sup>23</sup>, 이러한 장벽손상으로 발생하는 대표적 피부질환으로 아토피 피부염과 건선이 있다<sup>24</sup>. 본 실험에서는 이런 점에 착안하여 인위적으로 아토피 피부염을 유발하기 위해 각질층의 최상부와 각질층내 지질을 제거하여, 아토피 피부염의 대표적 지표로 보고된<sup>25</sup> 소양성 구진홍반, 아급성 피부손상, 산호성백혈구와 탈과립형 비만세포 침윤 증가 등이 발생한 것을 확인하였다. 消風導赤湯 투여 후에는 아토피 지표인 산호성백혈구 수는 감소하였고, lipid lamella도

회복되어 피부상피 손상이 완화되었으며, 그 결과 상피 세포과형성 감소, 탈과립형 비만세포 억제를 통한 침윤세포 감소 등이 관찰되어 消風導赤湯의 각질층내 지방방어구조 회복효과를 확인하였다.

혈관신생성이 활발하게 진행되는 곳에서 angiogenic CXC chemokine이 과발현되는데, 특히 생쥐의 경우 IL-8의 기능적 유사 chemokine인 MIP-2가 혈관생성을 촉진하는 역할을 하게 된다<sup>26</sup>. AD군에서는 MIP-2의 과발현이 확인되었으나, 消風導赤湯 처리군에서는 MIP-2 발현 억제를 통해 혈관신생성이 억제되는 효과를 보였다.

IL-4에 의한 Th2 반응은 Jak-STAT 경로를 통해 ligand 자극에 대한 특정 반응을 정확하고 빠르게 유도한다. 즉 Jak1&Jak3의 활성화는 STAT6와 결합을 이룰 수 있는 docking site를 형성하도록 유도하고, 이어서 세포질 단백질인 STAT의 수용체로서의 보충이 일어나면 STAT는 핵으로 전위되어 IL-4 유전자의 촉진자인 STAT-response element에 결합하여 전사 조절인자로서 작용함으로써 유전자의 발현을 유도하게 되고<sup>27</sup>, Th2 세포로 IL-4를 분비하여 IgE의 합성과 IgE 수용체의 발현을 유발한다<sup>28</sup>. AD군의 피부진피내에서 IL-4와 STAT6 양성반응세포의 분포 증가가 관찰되었으며, IL-4 양성반응세포는 림프구형으로 핵주변 세포질에서 양성반응을 보였다. 한편 STAT6 양성반응세포는 림프아세포형으로 핵과 세포질에서 강한 양성을 보여, 인산화 이후 STAT6가 핵내로 전위된 것으로 유추된다. 본 실험에서 消風導赤湯은 Th2 세포 편중 상태인 EL4 세포에서 농도의존적인 IL-4 mRNA 발현 억제와, 피부 조직내 IL-4와 STAT6 분포 감소를 통해 과도한 Th2 세포 분화를 조절하여, Th2 세포의 과도한 분화가 IL-4, IL-5, IL-6 분비를 증가시키는 아토피 피부염의 기전을 차단하는 효과를 기대할 수 있다.

각질층내 ceramide는 분해되면서 sphingosine을 생성하여 PKC의 활성을 억제하는데<sup>29</sup>, 아토피 피부염 유발시에는 각질층내 ceramide 감소로 인해 PKC 활성이 유도되며 NF-κB를 자극한다. 1986년 B 세포에서 immunoglobulin κ light chain에 결합하는 인자로

서 발견된 전사인자 NF-κB는, cytokine(TNF-α, IL-1), bacterial 또는 viral infection, stress 등의 다양한 자극에 의해 IκB protein이 인산화되어 분해되고, 유리된 NF-κB는 핵으로 들어가 target 유전자의 NF-κB binding site에 결합하여 염증관련유전자, anti-apoptosis 유전자 등의 발현을 유도한다<sup>30</sup>. 전사인자 NF-κB는 TNF-α, IL-1β 등의 proinflammatory cytokine 과 LPS 등에 활성화가 유도되어 COX-2와 iNOS 등의 염증 효소와 세포부착분자 ICAM-1등의 발현 증가를 통해 염증반응의 가속화에 의한 조직손상을 유도한다<sup>31</sup>. 본 실험에서도 AD군에서 NF-κB p50의 분포가 상피 기저층과 진피유두에서 급격하게 증가된 양상을 보였다. 한편 NF-κB는 anti-apoptotic signal에 관여하는 Bcl-2 등의 protein 발현을 조절하는데<sup>32</sup>, 본 실험에서도 AD군은 진피유두에서 세포자멸살해 증가가 관찰되지 않았다. 그러나 消風導赤湯 처리를 한 군은 ceramide 회복으로 실제 조직 손상을 유도하는 염증반응의 주도적 전사인자 NF-κB의 활성화 억제를 일으켰으며, anti-apoptotic signal 억제를 통해 세포자멸살해를 유도함으로써 과도한 염증을 억제하였다.

이상의 결과로 消風導赤湯은 각질층내 지방방어 구조의 회복과 T 세포 분화조절을 통해 초기 아토피 피부염의 진행 차단과 전사인자 NF-κB 활성화 조절을 통한 항염증작용으로 피부 손상을 완화하는 것으로 생각되며, 임상에서는 風濕熱이 원인이 되는 아토피 피부염 급성기에 疏風清熱하는 효과로 구진, 홍반, 소양 등의 증상을 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

## VI. 結 論

消風導赤湯의 아토피 피부염에 미치는 영향을 조사하기 위해 생쥐 피부 상피 각질층의 지방 방어구조를 손상시켜 아토피 피부염을 유발한 후 消風導赤湯 추출물을 투여하여 혈액내 산호성백혈구 변화, lipid lamella 손상 후 피부 변화, 혈관신생성, Th2 세포 분화 조절(IL-4, STAT6), ceramide 결핍으로

기인된 전사인자 NF-κB 활성화와 세포자멸살해 등의 변화를 관찰하였다.

消風導赤湯 처리 후 아토피 지표인 산호성백혈구 수는 감소하였고, lipid lamella도 회복되어 피부상피 손상이 완화되어, 상피에서 세포과형성 감소, 진피에서 비만세포 탈과립 억제를 통한 침윤세포 감소 등이 관찰되었다. 또한 혈관신생성 chemokine인 MIP-2 발현 억제를 통해 혈관신생성은 감소되었다. EL4 세포에서 농도의존적인 IL-4 mRNA 발현 억제와 피부 조직내 IL-4와 STAT6 분포 감소가 관찰되었다. 또한 염증반응의 주도적 전사인자 NF-κB 활성화 억제가 일어났고 그 결과 세포자멸살해가 유도되었다. 이상의 결과로 消風導赤湯은 T 세포 분화조절을 통해 초기 아토피 피부염의 진행 차단과 각질층내 지방 방어구조의 회복과 그에 따른 전사인자 NF-κB 활성화 조절을 통한 항염증작용으로 피부 손상을 완화하는 것으로 생각된다.

## 參考文獻

1. 의학교육연수원. 가정의학. 서울: 서울대학교출판부; 2001, p.862-6.
2. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 개정4판 피부과학. 서울: 여문각; 2001, p.161-6.
3. 최지호. 아토피피부염에서의 피부장벽기능이상. 천식 및 알레르기. 2000;20(5):693-4.
4. 김정희. 아토피피부염의 최신 지견. 소아알레르기 및 호흡기. 2004;14(1):12-23.
5. 남봉수, 조재훈, 김윤범, 채병윤. 아토피 피부염에 대한 임상적 연구. 대한한의학회. 2000;21(4): 204-15.
6. 한재경, 김현희. 외용요법을 병행한 아토피 피부염 환자 20례에 관한 임상적 연구. 대한한방소아과학회. 2001;15(1):15-37.
7. 김우연. 沈瀧丹이 아토피 피부염 환자 단핵세포의 Cytokine 분비능에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2000.
8. 신동길, 김우연, 이진용, 김덕곤. 仙方敗毒湯이

- 아토피 피부염 환자 단핵세포의 Cytokine 분비  
능에 미치는 영향. 대한한방소아과학회. 2002;  
16(1):21-38.
9. 이현우. 生血潤膚飲이 아토피 피부염을 유발한  
동물모델의 각질층 기능회복에 미치는 영향. 대  
한안이비인후피부과학회지. 2002;16(1):112-30.
  10. 박민철, 최인화. 柴胡清肝散 투여가 아토피 피부  
염을 유발한 동물모델의 각질층 기능회복에 미치  
는 영향. 대한한의학회지. 2004;25(3):137-48.
  11. Thomas B. Fitzpatrick. 피부과학원색도감. 서울:  
정담; 1999, p.54-5.
  12. 박민철. 아토피 피부염의 東口西醫學의 文獻 考察.  
원광대학교대학원. 2001.
  13. 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海: 上海科學技術出版  
社; 1985, p.454-9, 461-4.
  14. 楊思樹, 張樹生, 傅景華. 中醫臨床大全. 北京: 北  
京科學技術出版社; 1991, p.888-90.
  15. 吳謙. 醫宗金鑑. 北京: 人民衛生出版社; 1982, p.  
443-4.
  16. Christophers E. and Mrowietz U. The inflamma-  
tory infiltrate in psoriasis. Clin. Dermatol. 1995;  
13:131-5.
  17. Minehiro O., Takashi Y. and Hideoki O. Deter-  
gent-induced epidermal barrier dysfunction and  
its prevention. J. Dermatol. Sci. 2002;30:173-9.
  18. 楊醫亞. 中醫學問答. 北京: 人民衛生出版社; 1985,  
p.396-7.
  19. 柳志允. 中醫臨床特講-外科·皮膚科의 辨證施治.  
서울: 書苑堂; 1987, p.209-13.
  20. 李挺. 國譯編註醫學入門II. 서울: 南山堂; 1988,  
p197, 222, 272, 334, 383, 473, 476, 571, 628,  
870.
  21. Gopinathan K. M. New insights into skin struc-  
ture: Scratching the surface. Adv. Drug Delivery  
Rev. 2002;54:S3-17.
  22. Feinglod K. R. The regulation and role of  
epidermal lipid synthesis. Adv. Lipid Res. 1998;  
24:57-82.
  23. Elias P. M., Williams M. L., Maloney M. E.,  
Bonifas J. A., Brown B. E., Grayson S. and Ep-  
stein E. H. Stratum corneum lipids in disorders  
of cornification. J. Clin. Invest. 1984;74:1414-  
21.
  24. Motta S., Monti M., Sesana S., Mellese L.,  
Ghidoni R. and Caputo R. Abnormality of water  
barrier function in psoriasis. Arch Dermatol.  
1994;130:452-6.
  25. Donald Y. M and Thomas Bieber. Atopic der-  
matitis. Lancet. 2003;361:151-60.
  26. Yoshida S., Ono M., Shono T., Izumi H., Ishi-  
bashi T., Suzuki H., Kuwano M. Involvement  
of IL-8, vascular endothelial growth factor, and  
basic fibroblast growth factor in TNF- $\alpha$  depend-  
ent angiogenesis. Mol. Cell Biol. 1997;17:4015-  
23.
  27. 이충은. JAK-STAT pathway를 경유하는 cytokine  
과 호르몬의 작용기전. 대한내분비학회. 2000;15  
(3):367-87.
  28. Friedmann P. S., Tan B. B., Musaba E. Patho-  
genesis and management of atopic dermatitis.  
Clin. Exp. Allergy. 1995;25:799-806.
  29. Andrea H., Thomas k., Josef P. and Konrad S.  
Physiology and pathophysiology of sphingolipid  
metabolism and signaling. Biochemica et Biophy-  
sica Acta. 2000;1485:63-99.
  30. Baeuerle P. A. and Baltimore D. NF- $\kappa$ B - Ten  
years after. Cell. 1996;87:13-20.
  31. Baeuerle P. A. I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B structure: at the inter-  
face of inflammation control. Cell. 1998;95:729-  
31.
  32. Wu, M. X., Z. Ao, K. V. S. Prasad, R. Wu,  
and Schlossman. IEX-1L, an apoptosis inhibitor  
involved in NF- $\kappa$ B-mediated cell survival. Scie-  
nce. 1998;281:998-1001.