

清熱潤膚湯이 DNFB로 유발된 알레르기 피부염에 미치는 효과

이경기, 김진주*, 정희재, 정승기

경희대학교 한의과대학 폐계내과학 교실, *경희대학교 약학대학 한방생리학교실

Effects of *Cheongyeolyunbu-tang* on DNFB-induced Allergic Dermatitis

Kyung-ki Lee, Jin-ju Kim*, Hee-jae Jung, Sung-ki Jung

Division of Allergy, Immune & Respiratory System, Department of Internal Medicine,
College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

*Department of orientalphysiology, College of Pharmacy, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objective : To examine the efficacy of CY, the improvement of atopy dermatitis(AD)-like lesions on the rostral back of the NC/Nga mice, which took CY orally and were treated with a chemical substance called DNFB, the inhibition of ear swelling, and the inhibition of inflammatory response of the ear tissue of the mice were observed and compared, and the inhibition of the serum IgE count and the IL-4 and IFN- γ count produced by CD4+ T cells of the lymph node were observed and compared.

Materials and Methods : For measurement of ear thicknesses, 0.15% DNFB 25 μ l mixed with acetone/olive oil(3:1) was applied to the right ear and dorsal skin of the NC/Nga mice 5 times at an interval of 7 days. Ear thickness was measured every day over a five-week period after the first application of DNFB. The total serum IgE count was measured with ELISA by taking blood samples 24 hours after the fifth application of DNFB. To measure the IL-4 and IFN- γ count, the lymph node was cut off, and the CD4+ T cells were purified and stimulated to activate the T cells, and then the IL-4 and IFN- γ count was measured with ELISA.

Results : Continuous oral administration of CY improved the AD-like skin lesions on the rostral back and inhibited the ear swelling in NC/Nga mice treated with DNFB and inhibited the inflammatory response in the NC/Nga mice treated with DNFB NC/Nga mice. Continuous oral administration of CY did not significantly inhibit the serum IgE count and failed to significantly reduce the IL-4 count generated after TCR stimulation in the CD4+ T cells of the NC/Nga mice treated with DNFB. Continuous oral administration of CY significantly reduced the IFN- γ count generated after TCR stimulation in the CD4+ T cells of the NC/Nga mice treated with DNFB.

Key words : Atopic dermatitis, 2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB), NC/Nga mice, *Cheongyeolyunbu-tang*(CY)

1. 緒 論

알레르기 질환인 아토피 피부염은 알레르기 천식, 식품알레르기, 알레르기 비염 등과 같은 다른

알레르기 질환보다 먼저 발생하며 주위에서 흔히 볼 수 있는 만성 염증성 피부질환이다¹. 최근에 아토피 피부염이 알레르기 천식, 비염 등의 다른 알레르기 질환에 선행한다는 여러 증거들이 제시되고 있으며 이는 아토피 피부염의 조기치료가 다른 알레르기 질환의 진행과 치료에 중요하다고 볼 수 있다². 아토피 피부염은 심한 癢痒感, 紅斑, 浮腫,

· 교신저자: 정승기 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 부속한방병원 한방5내과 의사실
TEL: 02-958-9147 FAX: 02-958-9148
E-mail: jskes@khmc.or.kr

滲出과 부스럼딱지를 특징으로 하는 만성 습진성 피부질환으로^{3,4}, 면역교란을 동반한 만성적인 염증성 피부염이 특징이며 그 예로 특정 immunoglobulin E(IgE) 및 총 IgE의 생성이 심하게 증가한다⁵.

급성 아토피 피부염의 경우 interleukin-4(IL-4)와 IL-5와 같은 T helper 2형(Th2형) cytokines이 많이 발현되는 반면 만성 아토피 피부염은 interferon- γ (IFN- γ)와 같은 T helper 1형(Th1형) cytokines이 발현되는 특징이 있다⁶. 또한 화학물질 접촉으로 인한 알레르기 반응은 지연형 과민성 반응(Delayed-type hypersensitivity, DTH) 형태로 나타나는 면역반응으로 Th1형 세포가 주로 관여한다고 보고되고 있다⁷. 그러므로 T 세포가 증개하는 염증반응인 화학물질 2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB)에 의한 접촉성 피부염 반응을 유발하고 Th1형 세포의 활성화와 관련된 면역반응을 나타내는⁸ Th1형 cytokines인 IFN- γ 의 수치변화를 살펴본다면 淸熱潤膚湯의 아토피 및 접촉성 피부염 치료효과를 입증할 수 있을 것으로 사료된다.

淸熱潤膚湯(CY)은 淸熱潤燥, 祛風止痒하는 효과로 경희대학교 한의과대학 부속한방병원 5내과(알레르기·면역·호흡기내과)에서 創方하였으며 알레르기 질환 중 피부병변에 많이 사용하는 처방이다.

이에 저자는 임상에서 알레르기 피부질환에 쓰이고 있는 淸熱潤膚湯(CY)의 효능을 알아보고자 화학물질인 DNFB 처치로 AD-like skin lesions이 유발된 NC/Nga mice에게 淸熱潤膚湯(CY)을 경구 투여하여 등 부위의 외관상의 호전효과와 염증점수에 의한 호전효과, ear swelling의 감소효과, 귀 피부 조직검사에서 염증반응의 억제효과를 비교 관찰하고 혈청 IgE 수치와 림프질의 CD4+ T세포가 生産하는 IL-4와 IFN- γ 의 수치의 억제효과를 비교 관찰하여 유의한 효과가 나타나 이에 보고하고자 한다.

II. 實 驗

1. 재 료

1) 동 물

생후 8주령의 암컷 NC/Nga mice를 구입하였으며(Orient Korea(Gyeonggi, Korea)) 무균상태로 온도가 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 유지되고 상대습도(RH)는 $40\% \pm 5\%$ 로 유지되는 동물 사육실에 두었다. 먹이는 실험실 사료와 물을 주었다. 모든 실험은 경희대학교 동물윤리위원회의 지침에 따라 이루어졌다.

2) 약 재

약재는 경희대학교 한의과대학 부속한방병원 약재실에서 구입하였다. 淸熱潤膚湯(CY) 1貼의 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Cheungyeulyunbu-tang (淸熱潤膚湯)

Herb	Scientific Name	Dose(g)
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	8.0
白痰藜	<i>Tribuli Fructus</i>	6.0
牛蒡子	<i>Arctii Fructus</i>	6.0
知 母	<i>Anemarrhenae Rhizoma</i>	4.0
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Vaporata</i>	4.0
黃 柏	<i>Phellodendri Cortex</i>	2.0
地膚子	<i>Kochiae Fructus</i>	2.0
羌 活	<i>Notopterygii Rhizoma</i>	2.0
Total Amount		34.0

3) 淸熱潤膚湯(CY)의 추출물 분리

약재는 한방병원 제제실에 의뢰하여 추출물 분리를 하였다. 淸熱潤膚湯(CY) 2貼 분량(68g)에 증류수를 가하여 열탕추출기에서 3시간 전탕 후 추출하여 얻은 液을 흡입 여과하여 이를 감압 증류 장치로 농축하였다. 이를 다시 동결건조기를 이용하여 완전 건조한 분말 15g으로 냉동 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방 법

1) 동물군

(1) 정상군

Acetone과 olive oil을 3:1로 혼합하여 NC/Nga mice의 오른쪽 귀와 등 피부에 7일 간격으로 5회에 걸쳐 발라주었다.

(2) DNFB 처치군

Acetone/olive oil(3:1)에 혼합된 0.15% DNFB 25 μ l를 NC/Nga mice의 오른쪽 귀와 등 피부에 7일 간격으로 5회에 걸쳐 발라주었다.

(3) 실험군

① DNFB+CJ 100mg/kg 처치군 : acetone/olive oil(3:1)에 혼합된 0.15% DNFB 25 μ l를 NC/Nga mice의 오른쪽 귀와 등 피부에 7일 간격으로 5회에 걸쳐 발라주면서 물 1kg당 清熱潤膚湯 분말 100mg을 희석한 시약을 지속적으로 경구 투여하였다.

② DNFB+CJ 500mg/kg 처치군 : acetone/olive oil(3:1)에 혼합된 0.15% DNFB 25 μ l를 NC/Nga mice의 오른쪽 귀와 등 피부에 7일 간격으로 5회에 걸쳐 발라주면서 물 1kg당 清熱潤膚湯 분말 500mg을 희석한 시약을 지속적으로 경구 투여하였다.

2) DNFB에 의해 유발된 dermatitis

Acetone/olive oil(3:1)에 혼합된 0.15% DNFB 25 μ l를 NC/Nga mice의 오른쪽 귀와 등 피부에 7일 간격으로 5회에 걸쳐 발라 주었다. 첫 번째 DNFB를 바른 후에 5주에 걸쳐 매일 귀두께(ear thicknesses)를 측정하였다. 귀두께는 두께 측정기(Digital Indicator, Mitsutoyo, Tokyo)를 사용하여 측정하였으며 기준치에 대한 귀두께의 증가와 감소 수치는 간단한 백분율로 계산하였다.

3) Inflammation score의 평가

NC/Nga mice body의 rostral back의 피부염의 심한 정도를 평가하였다. DNFB를 오른쪽 귀와 등 피부에 7일 간격으로 5회에 걸쳐 발라준 후 mice의 등 피부의 dryness, crust, keratinization을 Table 2와 같이 점수화하여 관찰하였다.

Table 2. Dermatitis Scores for Rostral Back

	Dryness	Crust	Keratinization
No lesion	0	0	0
Mild inflammation	1	1	1
Moderate inflammation	2	2	2
Severe inflammation	3	3	3
Total Score	9		

4) 조직 분석

마지막으로 DNFB를 도포한 후 24시간이 지난 후 귀 표본을 채취해서 10% 희석 포르말린에 고정시킨 후 파라핀에 담구어 3 μ m로 절편을 만든 다음 hematoxylin과 eosin(H&E)으로 염색을 하였다.

5) In vitro에서 cytokine 생산 측정

마지막 DNFB 처치를 완료한 시점에서 24시간 후의 NC/Nga mice의 림프절을 절제하여 MACS separation column(QIAGEN, Germany)을 이용 CD4+ T세포를 정제하였다. 정제한 CD4+T 세포(5 x 10⁵세포/ml)를 plate bound anti-CD3항체(2C11; 5 μ g/ml)와 용액 형태의 정제 anti-mouse CD28항체(BD Pharmingen, CA, U.S.A.)(1 μ g/ml)로 60시간 동안 10% FBS와 0.005% β -mercaptoethanol 그리고 글루타민 1%를 넣은 RPMI-1640에서 자극하였다. 자극된 T세포의 활성화 이후 생성된 IL-4와 IFN- γ 의 수치를 ELISA로 측정하였다.

6) 혈청 IgE 측정

총 혈청 IgE 수치를 ELISA로 측정하였다. DNFB를 마지막 5회째 도포하고 24시간 후 혈액 표본을 채취하였고 혈청내의 IgE농도는 BD OptEIA™ Set Mouse IgE ELISA kits(BD Pharmingen, CA, U.S.A.)로 양을 측정하였다.

7) 통계 분석

결과는 means \pm standard error로 나타내었다. 변화의 중요성은 t-test를 이용하여 평가하였다. (내용 생략) P<0.05 값을 의미 있는 수치로 받아들였다.

III. 結果

1. DNFB로 유발시킨 NC/Nga mice 등 부위의 AD-like skin lesions 호전효과

NC/Nga mice는 무균상태에서 DNFB를 국부에 反復하여 도포하면 AD-like skin lesions을 나타내는 것으로 알려져 있다⁹. 본 실험은 이 같은 상황에서 清熱潤膚湯(CY)의 효과를 관찰하기 위하여 NC/Nga mice를 이용하였다. 5주간의 연구에서 지속적으로 DNFB를 도포한 NC/Nga mice는 증상의 악화를 보였으며 DNFB의 도포와 함께 清熱潤膚湯(CY)을 경구 투여한 NC/Nga mice에서는 AD-like skin lesions을 억제하는 소견을 나타내었다(Fig 1a, 1b).

처치 종료 후 mice의 등 부위 사진에서는 DNFB 처치군의 염증양상이 무척 심한 것이 보이

며 DNFB+CY 100mg/kg 처치군의 炎症양상이 감소한 것을 볼 수 있으며, DNFB+CY 500mg/kg 처치군의 炎症양상은 대부분 소실된 것을 볼 수 있었다(Fig 1a).

Rostral back의 피부염 점수에서도 DNFB 처치군의 炎症점수는 3회차, 5회차로 진행될수록 5.4 ± 0.24 , 8.8 ± 0.2 로 증가하지만 DNFB+CY 100mg/kg 처치군의 炎症점수가 3회차는 $3.6 \pm 0.24^*$ 로 감소하였고 5회차도 $6.4 \pm 0.24^*$ 로 감소되어 나타났다. 또한 DNFB+CY 500mg/kg 처치군의 炎症점수도 3회차는 $3 \pm 0.32^*$, 5회차는 $5.4 \pm 0.24^*$ 로 DNFB 처치군에 비해 감소되어 나타났다(Fig 1b).

Fig 1a와 1b의 결과에서 清熱潤膚湯(CY)의 持續的인 經口投與가 DNFB 유발성 NC/Nga mice의 AD-like skin lesions을 호전시키는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1a, 1b).

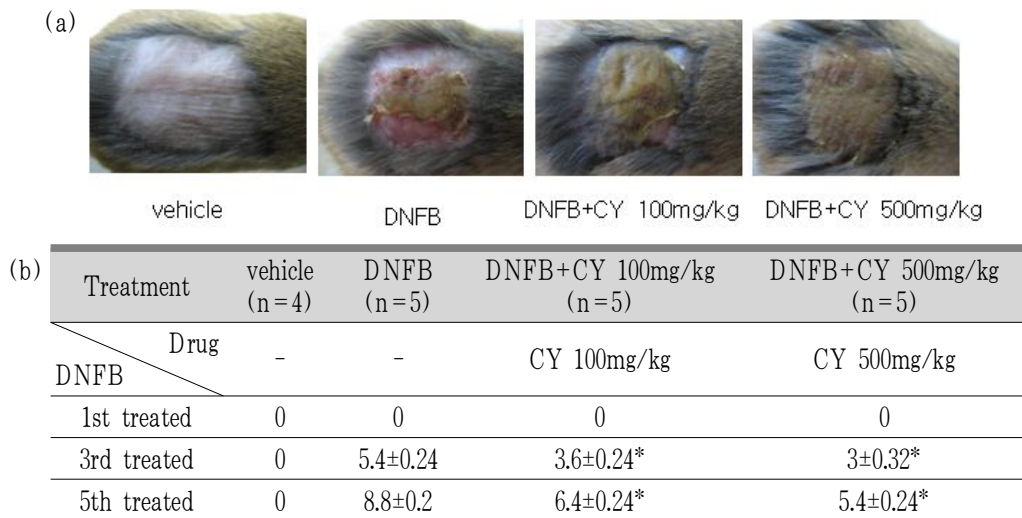


Fig. 1. Comparisons of DNFB-induced AD-like skin lesions in NC/Nga mice after CY administration.

(a) This photograph of mouse was taken the after treatment completion.

(b) Dermatitis scores of rostral back (mean+S.E.)

*p<0.05 compare with DNFB mice (t-test).

Vehicle: acetone:olive oil (3:1) treated. DNFB: DNFB+D.W. treated.

DNFB+CY100mg/kg: DNFB+CY 100mg/kg treated, and DNFB+CY 500mg/kg: DNFB+CY 500mg/kg treated.

2. DNFB로 유발시킨 NC/Nga mice의 ear swelling 감소효과

DNFB를 주 1회 간격으로 5회에 걸쳐 도포한 후 매일 귀두께(ear thickness)를 측정하여 그래프로 나타내었다. 정상군에 비해 DNFB 처치군은 귀의 부종이 점차 심해져 4, 5회차에서는 외관상 확연한 귀 부종의 증가를 보였다.

DNFB+CY 100mg/kg 처치군과 DNFB+CY 500mg/kg 처치군에서 1, 2, 3회차 처치에서는 약간의 귀 부종의 감소효과를 보였으며 후반 4, 5회차 처치에서 귀 부종이 DNFB 처치군에 비해 좀 더 많은 감소 경향을 보였다(Fig. 2).

3. DNFB로 유발시킨 NC/Nga mice의 귀 피부 조직 검사에서 염증반응 억제효과

DNFB 처치를 반복하자 귀 두께가 두꺼워지고 표피조직의 염증세포수가 증가되고 표피의 부종이 현저하게 나타나는 등 염증소견이 심하게 나타났다.

실험에서 채취한 귀 피부 조직표본의 검사소견상 염증세포수의 증가를 동반한 DNFB 처치군과 비교하여 DNFB+CY 100mg/kg 처치군의 조직소견과 DNFB+CY 500mg/kg 처치군의 조직소견 모두에서 염증세포수와 표피조직의 부종이 현저히 감소한 모습을 나타내었으며 清熱潤膚湯(CY)의 농도에 비례하여 나타나는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3).

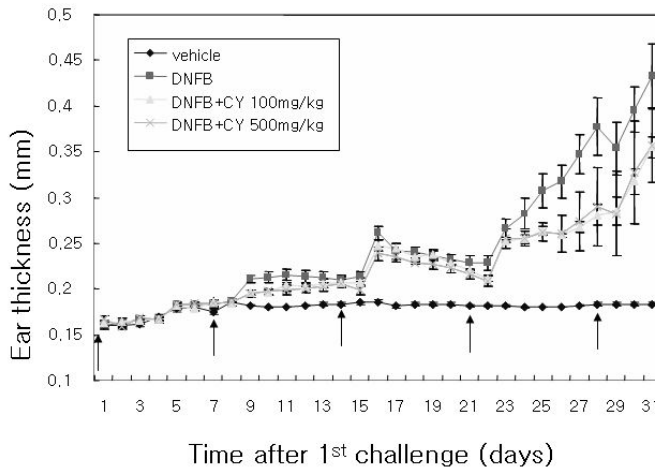


Fig. 2. Change in ear thickness caused by repeated topical DNFB application in NC/Nga mice.

Ear thickness were measured daily, after DNFB application. Values are means±S.E. of five animals per group.

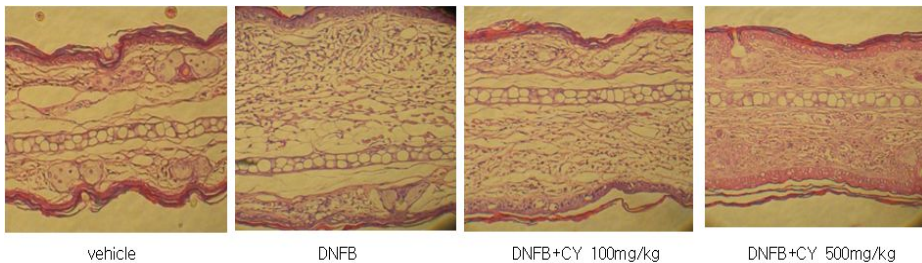


Fig. 3. Histopathologies of ear skin lesions in DNFB-treated NC/Nga mice after treatment.

Ear sections were stained with H&E.

4. DNFB로 유발시킨 NC/Nga mice의 혈청 IgE 수치 억제효과

NC/Nga mice에 DNFB 처치를 한 후 혈청표본을 채취하여 ELISA로 IgE 수치를 측정하였다. 정상군과 비교하여 DNFB 처치군의 혈청 IgE 수치는

확연히 증가하였다. DNFB+CY 100mg/kg 처치군에서는 DNFB 처치군보다 혈청 IgE 수치가 조금 억제되는 듯 하였으나 DNFB+CY 500mg/kg 처치군에서는 혈청 IgE 수치가 오히려 더 많이 증가하여 유의성 있는 결과가 되지 못하였다(Fig. 4).

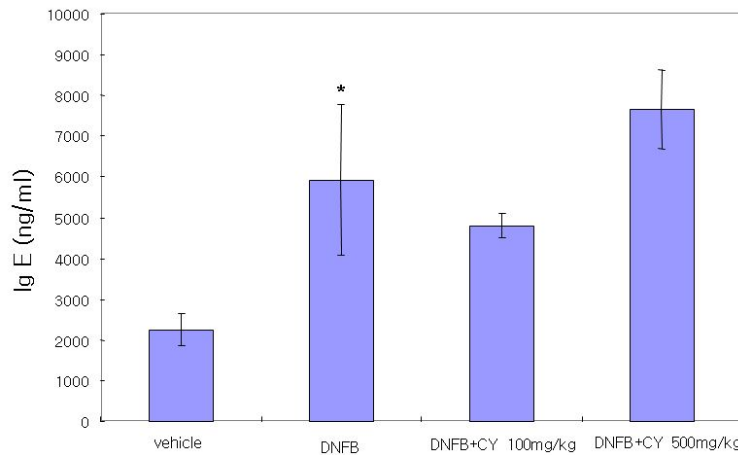


Fig. 4. Serum IgE levels in NC/Nga mice.

Serum IgE concentrations in the indicated groups were measured 24h after final administration of DNFB.

Data are means±S.E.(n=5).

*p<0.05 compared with vehicle mice (t-test).

5. DNFB로 유발시킨 NC/Nga mice의 CD4+ T세포에서의 TCR 자극 후 생성된 IL-4 수치의 억제효과

마지막 DNFB 처치 완료 24시간 후에 NC/Nga mice의 림프절에서 CD4+ T세포를 채취하여 anti-CD3 Ab와 anti-CD28 Ab로 60시간동안 자극하였고 이들이 IL-4를 합성하는 능력은 ELISA로 측정하였다.

정상군과 비교하여 DNFB 처치군의 IL-4 수치는 확연히 증가하였다. 그리고 DNFB+CY 100mg/kg 처치군에서는 DNFB 처치군보다 IL-4의 수치가 조금 억제되는듯 하였으나 DNFB+CY 500mg/kg 처치군에서는 IL-4의 수치가 오히려 더 많이 증가하였다(Fig. 5).

6. DNFB로 유발시킨 NC/Nga mice의 CD4+ T세포에서의 TCR 자극 후 생성된 IFN-γ 수치의 억제효과

마지막 DNFB 처치 완료 24시간 후에 NC/Nga mice의 림프절에서 CD4+ T세포를 채취하여 anti-CD3 Ab와 anti-CD28 Ab로 60시간동안 자극하였다. 이들이 IFN-γ를 합성하는 능력은 ELISA로 측정하였다.

정상군과 비교하여 DNFB 처치군의 IFN-γ의 수치는 증가하였다. 그리고 DNFB+CY 100mg/kg 처치군에서 DNFB 처치군보다 IFN-γ 수치가 다소 억제되었으며, DNFB+CY 500mg/kg 처치군에서는 IFN-γ 수치가 유의하게 억제되었다(Fig. 6).

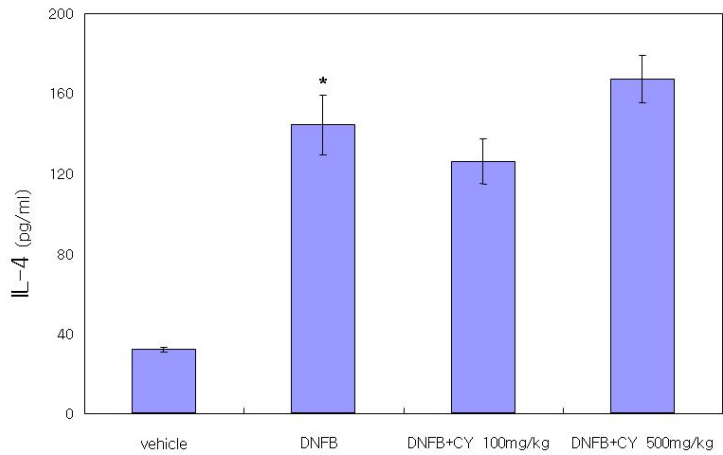


Fig. 5. Productions of IL-4 by CD4+ T Cells from DNFB-treated NC/Nga mice.

CD4+ T cells were prepared from lymph nodes and stimulated with TCR for 60hrs. IL-4 concentrations in the culture medium were measured by ELISA. Data are means±S.E (n=5).

*p<0.05 compared with vehicle mice (t-test).

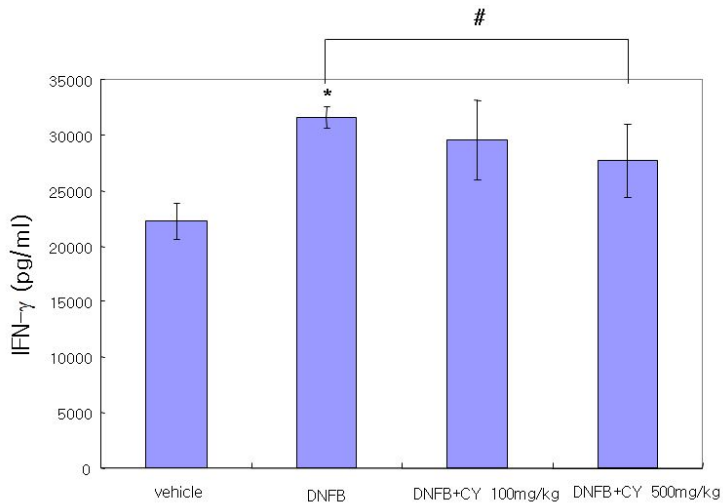


Fig. 6. Productions of IFN- γ by CD4+ T Cells from DNFB-treated NC/Nga mice.

CD4+ T cells were prepared from lymph nodes and stimulated with TCR and CD28 for 60hrs. IFN- γ concentrations in the culture medium were measured by ELISA. Data are means±S.E.(n=5).

*p<0.05 compared with vehicle mice.

#p<0.05 compared with DNFB mice (t-test).

IV. 考 察

알레르기질환 중 아토피 피부염은 소아 피부질환 중 가장 흔한 질환으로 유전적 요인이 관여된 만성 재발성 습진성 질환으로 심한 소양증과 함께 紅斑, 浮腫, 滲出, 부스럼딱지, 鱗屑등과 같은 전형적인 피부증상을 특징으로 한다¹⁰. 이 질환은 발생 빈도가 증가하고 있으며, 대기오염, 주거환경변화로 인한 항원에 대한 노출의 증가, 모유 수유 감소, 소아기 감염질환의 감소 등을 그 원인으로 추측하고 있다¹¹.

최근 들어서 아토피 피부염은 전 세계적으로 증가추세를 보이며 특히 소아의 발병률은 성인에 비해 훨씬 높은 것으로 알려져 있다¹². 미국 소아의 아토피 피부염의 유병률은 17.2%, 유럽의 소아에서는 15.2%, 일본의 5-6세 소아의 유병률은 24%이다². 대한 소아 알레르기 호흡기학회에서 1995년과 2000년에 시행한 전국역학조사에서는 우리나라의 유병률도 15.3%에서 17%로 증가하고 있는 추세로 나타났다¹. 아토피 피부염 환자는 보통 환자 본인이나 가족 중에 다른 아토피성 질환의 내력을 가지고 있으며 지금까지 그 명확한 원인은 밝혀지지 않고 있다^{10,11,13}.

韓醫學에서는 乳癬, 奶癬, 胎癬, 胎斂瘡, 濕瘡, 胎熱症, 胎毒, 胎瘡, 浸淫瘡, 旋耳瘡, 血風瘡, 四彎風, 濕疹, 嬰兒濕疹, 異位性皮膚炎, 異位性濕疹 등이 아토피 피부염과 유사하다고 보여지며 정확한 명칭 없이 混用되어 왔다^{14,15}. 《金櫃要略》¹⁶에서 浸淫瘡이라고 기술한 以來로 《諸病源候論》¹⁷에서는 小兒의 面部에 癬皮가 甲錯되고 乾燥하게 되는것을 乳癬이라 하였고, 《外科正宗》¹⁸에서는 胎中에 母가 五辛을 먹고 그 熱이 胎兒로 가서 發하는 것을 奶癬이라 하여 음식물과 유전적 요인을 모두 원인으로 보았으며, 《外科大成》¹⁹에서는 四彎風으로 腿彎脚彎에 生하고, 一月에 一發하고, 가려움이 참기가 힘들며, 그 形이 風癬과 같고, 긁어 破하여 瘡을 이룬다고 하였으며, 吳謙의 《醫宗金鑑》²⁰에서는

奶癬을 胎斂瘡이라하여 가려워 白屑이 일어나는 乾斂과 가려움이甚하여 黃水가 浸淫하여 퍼져가는 濕斂으로 나누어 說明하여 오늘날 아토피 피부염과 가장 類似하게 表現하고 있다.

原因으로는 風熱, 血熱, 血虛, 脾胃運化機能失調에 의한 胎火濕熱, 風濕熱의 侵入등을 들 수 있으며^{18,21,22}, 이외에도 氣溫의 變化, 飮食物, 불규칙한 授乳習慣, 의복마찰, 寒冷의 變化등이 原因이 될 수 있다^{20,21,23}.

본 實驗에 사용된 清熱潤膚湯(CY)은 清熱潤燥 祛風止痒하는 효과로 경희대학교 한의과대학 부속 한방병원 5내과(알레르기·면역·호흡기내과)에서 알레르기질환 중 피부병변에 많이 쓰는 처방으로 1貼 기준으로 生地黃 8g, 白蒺藜 6g, 牛蒡子 6g, 知母 4g, 熟地黃 4g, 黃柏 2g, 地膚子 2g, 羌活 2g으로 구성된 처방이다. (내용생략) 따라서 清熱潤膚湯(CY)이 알레르기 질환 중 아토피 피부염 치료에 유효할 것으로 판단되어 NC/Nga mice를 이용한 DNFB 유발성 atopy dermatitis(AD)-like skin lesions의 호전 반응을 관찰하였다.

NC/Nga mice에 DNFB를 처치하여 유발되는 피부증상의 특징으로는 癢痒感, 紅斑, 浮腫, 表皮剝離, 滲出, 부스럼딱지 그리고 조직학적으로 많은 염증세포의 침투 등이 있다. 이는 전통적인 조건하의 AD-like skin lesions의 NC/Nga mice에서 보고된 것과 유사하다^{3,4}. 때문에 근래 아토피성 피부염 연구에 NC/Nga mice가 많이 사용되고 있으며, 본 실험에서도 清熱潤膚湯(CY)의 효과를 관찰하기 위하여 NC/Nga mice를 이용하였다.

清熱潤膚湯(CY 100mg/kg, 500mg/kg)의 경구투여는 DNFB를 처치한 AD-like skin lesions의 NC/Nga mice의 피부병변을 뚜렷하게 억제하였다(Fig 1,2,3). 5주간의 실험에서 DNFB를 지속 도포한 NC/Nga mice는 AD-like skin lesions 증상을 악화시켰다. DNFB 도포와 함께 清熱潤膚湯(CY 100mg/kg, 500mg/kg)을 경구투여한 NC/Nga mice에서는 AD-like skin lesions 피부병변을 억제하는

소견을 보였다(Fig 1a,1b). Fig 1a의 mice의 등 부위 사진에서는 DNFB 처치군의 염증양상이 무척 심하게 나타났으며 DNFB+CY 100mg/kg 처치군에서는 염증양상이 감소하였으며, DNFB+CY 500mg/kg 처치군에서는 더 많이 소실된 것을 볼 수 있었다. 또한 Fig 1b의 rostral back의 피부염 점수에서도 3회차에서는 염증점수가 DNFB 처치군에 비해 DNFB+CY 100mg/kg 처치군, DNFB+CY 500mg/kg 처치군 모두 유의한 AD-like skin lesions의 억제효과가 관찰되었다. 그러므로 위의 Fig 1a와 1b의 결과에서 NC/Nga mice에게 清熱潤膚湯(CY)의 지속적인 경구투여는 DNFB 유발성 AD-like skin lesions을 호전시키는 효과를 볼 수 있다(Fig. 1a,1b).

DNFB를 오른쪽 귀와 등피부에 7일 간격으로 5회에 걸쳐 발라 준 후 매일 귀두께를 측정된 결과를 보면 정상군에 비해 DNFB 처치군은 귀의 부종이 점차 심해져 4, 5회차에서는 확연한 귀 부종의 증가를 보였다. 이에 반해 DNFB+CY 100mg/kg 처치군과 DNFB+CY 500mg/kg 처치군에서는 1, 2, 3회차 처치에서는 약한 감소효과를 보였으나 후반 4, 5회차 처치에서는 좀 더 많은 귀 부종 감소효과를 보였다(Fig. 2).

DNFB를 마지막으로 처치완료 24시간 후에 NC/Nga mice의 귀 피부에서 조직표본을 채취하여 조직 검사한 결과에서 DNFB 처치군에서 표피조직의 염증세포가 증가되고 부종이 현저하게 나타나는 염증소견이 나타났으나, DNFB+CY 100mg/kg 처치군과 DNFB+CY 500mg/kg 처치군의 조직소견에서 염증세포수의 감소와 표피조직의 부종이 감소한 모습을 보였으므로 清熱潤膚湯(CY)이 귀 피부조직의 염증반응을 억제시킴을 알 수 있었다(Fig. 3).

DNFB를 마지막 5회째 도포하고 24시간 후 혈액표본을 채취하여 IgE 수치를 측정된 결과에서 정상군에 비해 DNFB 처치군의 혈청 IgE 수치는 확연히 증가하였고, DNFB+CY 100mg/kg 처치군

에서는 DNFB 처치군보다 혈청 IgE 수치가 조금 억제되는 듯 하였으나 DNFB+CY 500mg/kg 처치군에서는 혈청 IgE 수치가 더 증가하여 유의성 있는 결과를 얻지 못하였다. 그러므로 清熱潤膚湯(CY)은 DNFB 처치군의 혈청 IgE 수치 억제효과는 있었으나 유의성은 없었다(Fig. 4).

DNFB를 마지막 5회째 도포하고 24시간 후 mice의 림프절에서 CD4+T세포를 채취하여 활성화 시킨 후 생성되는 IL-4의 수치를 측정된 결과에서 정상군과 비교하여 DNFB 처치군의 IL-4 수치는 확연히 증가하였으며, DNFB 처치군에 비하여 DNFB+CY 100mg/kg 처치군에서는 IL-4의 수치가 조금 억제되는 듯하였으나 DNFB+CY 500mg/kg 처치군에서는 IL-4의 수치가 오히려 증가하여 나타나 유의성 있는 결과를 얻지 못하였다. 그러므로 清熱潤膚湯(CY)은 림프절에서 채취하여 활성화 시킨 IL-4의 수치를 유의성 있게 억제하지 못하였다(Fig. 5).

DNFB를 마지막 5회째 도포하고 24시간 후 mice의 림프절에서 CD4+ T세포를 채취하여 활성화 시킨 후 생성되는 IFN- γ 를 측정된 결과에서 정상군과 비교하여 DNFB 처치군의 IFN- γ 수치는 확연히 증가하였으며, DNFB 처치군에 비해 DNFB+CJ 100mg/kg 처치군에서는 IFN- γ 의 수치가 조금 억제되었으며 DNFB+CJ 500mg/kg 처치군은 IFN- γ 수치가 더 감소되어 나타났다. 이는 清熱潤膚湯(CY)이 림프절에서 채취한 CD4+ T세포의 활성화 이후 생성된 IFN- γ 수치를 유의성 있게 抑制한다고 할 수 있다(Fig. 6).

IFN- γ 수치의 증가는 Th1형 cytokine의 증가가 Th2형 cytokine을 억제한다는 것으로 이로 인해 알레르기 면역반응을 조절한다고 볼 수 있다. 이는 Th1형 cytokine은 Th1형 세포의 분화를 유도하고 Th2형 세포의 증식과 분화를 억제하고, 반대로 Th2형 cytokine은 Th2형 세포의 증식과 분화를 유도하고 Th1형 세포의 분화를 억제하는 상호조제를 통한 균형을 이루며 Th1과 Th2의 면역반응을 조

절하며 이 균형에 따라 여러 면역반응을 나타낸다는 것을 보여주고 있다^{24,25}.

清熱潤膚湯(CY)이 DNFB 유발성 AD-like skin lesions을 완화시키는 소견을 보였지만 활성화된 CD4+ T세포에 의한 IL-4와 총 혈청 IgE의 수치는 억제하지 못하였다(Fig. 4, 5). 총 혈청 IgE의 증가는 아토피성 피부염의 특징으로 알려져 있으며 Th2형 cytokine인 IL-4가 B 세포의 IgM에서 IgE로의 전환을 증가시킨다. 따라서 NC/Nga mice에서 얻은 활성화된 CD4+ T세포에 의한 IL-4 생성의 증가와 마찬가지로 총 혈청 IgE는 DNFB를 처치한 NC/Nga mice에서 상당량 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4, 5). 하지만 최근 보고에 따르면 IgE 생성의 증가와 이에 따른 IgE 중개성 고민감 반응이 전통적 환경하의 NC/Nga mice에서 관찰되는 AD-like skin lesions의 원인이 아닐 수도 있다고 한다²⁶. 따라서 이 문제는 더 많은 연구가 필요할 듯하다.

최근 Th1형 cytokine인 IFN- γ 가 AD-like skin lesions의 만성화를 결정짓는데 중요한 역할을 한다는 연구들이 지속 보고되고 있으며²⁷⁻²⁹, 만성 아토피 피부염 환자에서 알레르겐에 특이하게 반응하는 피부침투성 T세포가 IFN- γ 단백질을 분비하는 것으로 보고되었다²⁴. IFN- γ 가 아토피 피부염의 피부증상 발생에 있어서 정확히 어떤 병리학적 역할을 하는지 제대로 알려지지는 않았지만 최근 연구에서 그 관련성에 대한 것들이 보고되고 있으며 DNFB 같은 화학적 항원이 NC/Nga mice의 T세포 cytokine의 분비를 촉진하며 화학적 항원에 노출되어 극성을 띤 Th1형 cytokine인 IFN- γ 를 유발한다는 것이 실험논문을 통해 발표되고 있다^{30,31}. 그러므로 본 실험에서 지속적인 DNFB 처치로 NC/Nga mice의 림프절의 CD4+ T세포의 활성화에 의한 IFN- γ 의 생성은 증가되었고 여기에 清熱潤膚湯(CY)을 투여하여 IFN- γ 의 생성이 유의성 있게 억제되었다는 것은 清熱潤膚湯(CY)이 DNFB 처치로 유발된 AD-like skin lesions을 억제시키는

효과가 있다고 할 수 있다(Fig 6).

화학물질 접촉으로 인한 알레르기 반응과 같은 지연형 과민성 반응(DTH, Delayed-type hypersensitivity)은 Th1형 세포가 주로 관여하며⁷, 본 실험에서 사용된 화학물질인 DNFB의 유발성 접촉성 피부염 반응은 T 세포가 중개하는 염증반응으로 Th1형 세포⁸의 활성화와 깊이 관련된 면역반응이므로, Th1형 cytokines인 IFN- γ 수치의 감소는 DNFB 유발성 NC/Nga mice의 AD-like skin lesions의 억제효과를 나타내는 중요한 의미가 되며 이는 DNFB 처치로 유발된 NC/Nga mice의 AD-like skin lesions을 호전시키는 것이 IFN- γ 수치 감소와 관련이 있다는 것이다.

따라서 등 부위의 AD-like skin lesions의 호전효과, ear swelling의 억제효과, mice의 귀피부 조직검사에서의 염증 억제효과와 림프절의 CD4+ T세포에서 IFN- γ 의 생성을 감소시키는 효과는 清熱潤膚湯(CY)이 DNFB로 유발된 NC/Nga mice의 AD-like skin lesions을 유의성 있게 억제한다고 할 수 있겠다.

V. 結 論

清熱潤膚湯(CY)의 효능을 알아보려고 NC/Nga mice에게 DNFB를 지속적으로 처치하여 유발시킨 후 NC/Nga mice의 등 부위 AD-like skin lesions의 호전효과, Ear swelling의 억제효과, mice의 귀피부조직검사에서의 염증반응 억제효과 등을 비교 관찰하고 혈청 IgE 수치와 림프절의 CD4+ T세포가 생산하는 IL-4와 IFN- γ 의 수치를 비교 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DNFB로 유발된 NC/Nga mice의 등 부위의 atopy dermatitis-like skin lesions를 유의성 ($p < 0.05$) 있게 호전, ear swelling을 감소, 귀피부 조직검사소견상 염증억제효과를 보였다.
2. DNFB로 유발된 NC/Nga mice의 혈청 IgE 수

치를 유의성 있게 억제하지 못하였고, CD4+ T 세포에서의 TCR 자극 후 생성된 IL-4 수치를 유의성 있게 억제시키지 못하였으나, CD4+ T 세포에서의 TCR 자극 후 생성된 IFN- γ 수치를 유의성(p<0.05) 있게 억제시켰다.

參考文獻

1. 박용민. 아토피 피부염 병태생리에 대한 최신지견. 소아알레르기및호흡기학회지. 2006;16(3):189-96.
2. 김정희. 아토피피부염의 최신지견. 소아알레르기 및호흡기학회지. 2004;14(1):12-23.
3. Shiohara T, Hayakawa J, Mizukawa Y., Animal models for atopic dermatitis:are they relevant to human disease?. Journal of Dermatological Science. 2004;36(1):1-9.
4. Suto H, Matsuda H, Mitsuishi K, Hira K, Uchida T, Unno T, Ogawa H, Ra C. NC/Nga Mice:A Model for Atopy Dermatitis. Int Arch Allergy Immunol. 1999;120(1):70-5.
5. Miyauchi Hashimoto H, Okamoto H., Suqihara A, Horio T., Therapeutic and prophylactic effects of PUVA photochemotherapy on atopic dermatitis-like lesions in NC/Nga mice. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2005; 21(3):125-30.
6. Tomimori Y, Tanaka Y, Goto M, Fukuda Y., Repeated Topical Challenge with Chemical Antigen Elicits Sustained Dermatitis in NC/Nga Mice in Specific-Pathogen-Free Condition. The Journal of Investigative Dermatology. 2005;124(1) :119-24.
7. Dearman RJ, Kimber I., Role of CD4+ T helper 2-type cells in cutaneous inflammatory responses induced by fluorescein isothiocyanate. Immunology. 2000;101(4):442-51.
8. Takeshita K, Tamasaki T, Akira S, Gantner F, Bacon KB., Essential role of MHC II -independent CD4+T cells,IL-4 and STAT6 in contact hypersensitivity induced by fluorescein isothiocyanate in the mouse. International Immunology.,2004;16(5) :685-95.
9. Kobayashi H., Mizuno N., Kutsuna H., Teramae H., Ueoku S., Onoyama J., Yamanaka K., Fujita N., Ishii M., Drugs. Exp.Clin. Res., 2003;29:81-4.
10. 홍창의. 소아과학. 서울:대한교과서(주); 2004, p. 1016-9.
11. 대한피부과학회간행위원회. 피부과학. 서울:여문각; 2001, p. 161-3.
12. 오재원, 김규언, 편복양 외18인. 1995년과 2000년의 학동기와 2003년 학동전기 소아에서의 아토피피부염의 역학적 변화에 관한 전국적인 연구. 소아알레르기및호흡기학회지. 2003;13(4):227-37.
13. 전국한의과대학본초학교수 공편저. 본초학. 서울: 영림사; 1998, p. 129, 144, 162, 182, 191, 322, 519, 580.
14. 김미정, 이승연, 소아 아토피 피부염에 대한 문헌적고찰. 대한한방소아과학회지. 2000;14:169-84.
15. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연. 아토피 피부염의 東西醫學的文獻考察. 대한안이비인후과학회지. 2002;15(1):226-52.
16. 宋書功 編著. 金櫃要略廣州教典. 北京: 民衛生出版社; 1994, p. 221-5.
17. 巢元方 編著. 巢氏諸病源候論. 서울: 大成文化社; 1992, p. 251-3.
18. 陳實功. 外科正宗. 上海: 上海科學技術出版社: 1989, p. 30-4.
19. 祁坤. 外科大成. 臺北: 文光圖書有限公司; 1987. p. 198, 365.
20. 吳謙. 醫宗金鑑(下). 北京: 人民衛生出版社: 1982, p. 443-4, 451-2.
21. 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海: 上海科學技術出版社; 1985. p. 461-3.

22. 中國中醫研究院. 中醫兒科學. 北京: 中國古籍出版社: 1994. p. 348-50.
23. 顧伯康. 中醫外科學. 北京: 人民衛生出版社: 1987. p. 613.
24. Thepen T., Langeveld wildschut EG., Bihari IC., van Wichen DF., van Reijssen FC., Mudde GC., Bruijnzeel Koomen CA., Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial Th2 response to a Th2 response in situ: An immunocytochemical study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996;97:828-37.
25. 민영규, 최정화, 김종환, 박수연. 消風散加味方과 外治方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. *한방안이비인후피부과학회지*. 2005; 18(1):116-34.
26. Yagi R., Nagai H., Iigo Y., Akimoto T., Arai T., Kubo M., Development of Atopic Dermatitis-like skin lesions in STAT6-Deficient NC/Nga Mice. *The Journal of Immunology.*, 2002;168:2020-7.
27. Taniguchi Y, Kohno K, Inoue S-i, Koya-Miyata S, Okamoto I, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *International Immunopharmacology*. 2003;3(9):1313-24.
28. Grewe M., Gyufko K., Schopf E., Krutmann J., Lesional expression of interferon-gamma in atopy eczema. *Lancet.*, 1994;343:25-6.
29. Werfel T., Morita A., Grewe M., Renz H., Wahn U., Krutmann J., Kapp A., Allergen specificity of skin-infiltrating T cells is not restricted to a type-2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis. *The Journal of Investigative Dermatology.*, 1996; 107:871-6.
30. Vestergaard C., Yoneyama H., Murai M., Nakamura K., Tamaki K., Terashima Y., Imai T., Yoshie O., Irimura T., Mizutani H., Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *The Journal of Clinical Investigation*. 1999;104(8):1097-105.
31. Josephine EH., Dean JN., Neil RK., Rebecca JD., Ian K., Kebin Park B., Selective Haptenation of Cellular or Extracellular Protein by Chemical Allergens: Association with Cytokine Polarization. *Chem. Res. Toxicol.*, 2005;18:375-81.