

Original Article / 원저

정향 추출물 도포가 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉 피부염에 미치는 영향

이경엽 · 강다혜 · 김희택
세명대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

The Effects of *Syzygium aromaticum* extract Spread on the Allergic Contact Dermatitis induced by DNCB

Kyung-Yeob Lee · Da-Hae Kang · Hee-Taek Kim

Dept. of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Dermatology, College of Korean Medicine, Semyung University

Abstract

Objectives : The purpose of this study is to investigate effects of *Syzygium aromaticum* (SAE) spread on the allergic contact dermatitis caused by 2,4-dinitro-chlorobezene (DNCB).

Methods : Forty-two mice were divided into six groups ; normal, negative control (DNCB-treated), positive control (DNCB + 1% pimecrolimus), experimental group I, II and III. control and experimental groups were induced allergic contact dermatitis by DNCB. Experimental group I (DNCB + 0.2% SAE), II(DNCB + 1% SAE) and III(DNCB + 5% SAE) were spread SAE and positive control was spread the 1% pimecrolimus. In this study, effect of SAE on clinical aspects on the skin, histopathological change, the blood level of IgE, cytokines, histamine were investigated. In addition, effect of SAE on spleen CD4⁺/CD8⁺ T cell subset was investigated.

- Results** : 1. In experimental group I, II and III, erythemas and edema were more reduced than negative control.
2. In experimental group I, II and III inflammatory edema and the numbers of infiltrated inflammatory cells were more reduced than negative control.
3. In experimental group I, II and III, clinical skin score was more reduced than negative control.
4. In experimental group II and III, the thickness of skin was statistically significant reduced than negative control.

© 2013 the Society of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

5. In experimental group II and III, histamine release was statistically significant reduced than negative control in dose-dependantly.
6. In experimental group II and III, cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10) were statistically significant reduced than negative control in dose-dependantly.
7. In experimental group I, II and III, the level of total IgE was statistically significant reduced than negative control in dose-dependantly.
8. In experimental group III, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were statistically significant decreased similar to the positive control.

Conclusions : According to above experiments, *Syzygium aromaticum*(SAE) was effective on allergic contact dermatitis.

Key words ; *Syzygium aromaticum*(SAE); Allergic Contact Dermatitis; DNCB; Th1; Th2; histamine; Spread

서 론

알레르기성 접촉피부염은 개체가 이미 항원에 감작된 후 다시 항원에 재차 노출되면서 T림프구와 대식세포 등에 의해서 발생하는 세포성 면역과민반응으로, 항원과 접촉 시 수 시간에서 72시간 사이에 염증반응이 시작되는 지연형 과민반응이다¹⁾.

알레르기성 접촉피부염의 치료로는 항히스타민제 및 부신피질 호르몬제가 사용되고 있으나 일시적인 진정효과 및 염증 완화작용은 뛰어나지만 오남용의 우려와 장기간 사용에 따른 각종 부작용 발생 등의 문제가 있어 근본적인 치료제는 부적합한 실정이고, 과민성 면역질환이라는 점에서 cyclosporin 등 면역억제제를 사용한 연구가 이루어지고 있으나 여러 부작용이 보고되고 있다^{2,3)}. 이에 따라 치료 효과가 높고 부작용이 적은 치료제를 개별 한약재나 처방에서 찾고자 하는 다양한 연구들이 진행되고 있다⁴⁻¹⁰⁾.

DNCB(2,4-dinitrochlorobenzen)는 동물실험에서 알레르기성 접촉피부염을 유발시키는데 사용되는 대표적인 유발물질로 최근 DNCB로 유발한 알레르기성 접촉피부염에 관한 한의학 연구에서는 개별 한약재^{4,5)}나 처방^{6,7)}을 이용한 항알레르기 및 소염효과에

대한 연구들이 이루어지고 있다. 특히 이들을 알레르기성 접촉피부염 병변부위에 직접 도포하여 외용제로 활용하는 연구 또한 소수 이루어지고 있다⁸⁻¹⁰⁾.

본 연구에 사용한 정향(*syzygium aromaticum*)은 본래 비위(脾胃)를 따뜻하게 하고, 곽란(霍亂), 분둔기(奔豚氣)와 냉기로 배가 아프고 음낭이 아픈 것을 치료하는 효능이 있는 약물이다¹¹⁾. 최근 피부 진균 및 장티프스, 디프테리아 같은 균에 대한 항균작용과 항산화활성에 대한 보고¹²⁻¹⁴⁾가 있으며, 즉각형 과민반응 억제효과¹⁵⁾와 항알레르기 작용¹⁶⁾ 등이 보고되고 있다. 정향의 외용에 대한 연구로는 에센셜 오일 형태로 피부에 도포하여 여드름¹⁷⁾과 칸디다 질염¹⁸⁾에 항균 효과가 있음이 보고된 바가 있지만 알레르기성 접촉피부염에 대한 연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는 정향 추출물을 직접 피부에 도포했을 때 피부 항균 효과 뿐만 아니라 항알레르기 효과를 검증하기 위해 본 실험을 설계하였다. DNCB을 이용하여 알레르기성 접촉성 피부염을 유발한 mouse에 정향 에탄올 추출물과 pimecrolimus을 각각 도포하는 실험을 진행하여 혈청 히스타민, IgE 면역관련인자인 사이토카인, T림프구의 발현과 육안적 피부병변과 조직병리학적 관찰을 통해 알레르기성 접촉성 피부염을 억제하는 효과를 관찰하였기에 보고하는 바이다.

교신저자 : 김희택, 충북 제천시 신월동 산 21-11
세명대학교부속제천한방병원 한방안이비인후피부과학교실
(Tel : 043-649-1817, E-mail : kht8725c@naver.com)

• 접수 2013/10/2 • 수정 2013/11/1 • 채택 2013/11/8

실 험 방 법

1. 실험 동물 및 실험 재료

1) 실험 동물

실험동물인 수컷 마우스(NC/Nga, 6주령)는 SLC (Japan)로부터 구입하였다. 모든 마우스는 25℃, 60% 습도 조건에서 멸균 시킨 사료로 사육 하였다. 세명대학교 한의과대학 동물실험실의 환경에 약 일주일 간 적응 후 실험에 포함시켰다. 본 실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하여 설계, 수행되었다.

2) 시약 구입

DNCB는 씨그마알드리치코리아(주)에서 구입하였다. Pimecrolimus는 NOVARTIS에서 판매하는 엘리텔(1% pimecrolimus 크림)을 사용하였다. RPMI 1640 배지는 lonza(주)에서 구입하였다.

3) 실험 재료

본 실험에 사용할 정향은 (주)한의학유통을 통해서 500g 구입하여 3차 증류수 1 l 와 혼합하여 2시간 동안 80℃로 열탕한 후 상층액을 여과지로 여과하고 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, NE-1001, Japan)를 이용하여 200ml로 농축시킨 후, -80℃에서 동결시켰다. 이 농축액을 다시 freezer dryer system (Labconco, USA)를 이용하여 7일 간 동결 건조 시킨 후 최종적으로 97.5g(수율 19.5%)의 분말을 얻었으며, 이 분말을 3차 증류수 50ml에 0.2%, 1%, 5%로 용해시켜 실험동물의 피부에 도포 하였다.

2. 실험방법

1) 실험군의 구성

생후 6주령 된 수컷 마우스(NC/Nga, 6주령)를 실험

실시 전 두피를 제외하고 복부와 등부의 털을 모두 제거 하였고, 무작위로 각각 7마리씩 다음의 여섯 군으로 분류하였다.

- ① Normal Control (NC)
- ② Negative Control (DNCB 도포군, DNCB)
- ③ Positive Control (DNCB + 1% pimecrolimus 도포군, PC)
- ④ Experimental Group I (DNCB + 0.2% 정향 도포군, EG I)
- ⑤ Experimental Group II (DNCB + 1% 정향 도포군, EG II)
- ⑥ Experimental Group III (DNCB + 5% 정향 도포군, EG III)

2) 알레르기성 접촉피부염 유발

Day 0에 100 μ l 의 0.8% DNCB in acetone/ethanol (1:4) 을 등부에 1주일간 도포하여 감작시켰다. 그리고 100 μ l 의 5%의 DNCB in Olive oil 을 등에 주 3회씩 총 5주 동안 도포 (day 7 to 42) 하여 알레르기성 접촉피부염을 유발시켰다. 동시에 200 μ l 씩 각각의 실험물질(dissolved distilled water)을 등에 주 5회의 간격으로 도포하였으며, 정상 대조군에는 distilled water만 도포하였다. 피부의 증상에 대한 평가는 실험물질 도포 후 0, 1, 2, 3, 4, 5 그리고 6주차에 각각 이루어졌다.

3) 혈청 histamine, IgE, cytokine 측정

실험시작 후 42일째, 마우스의 심장으로 부터 혈액을 채취하였다. 혈청은 원심분리 (1,700 x g, 10 min) 하여 채취하였고 실험 전 까지 -80℃ 에서 보관하였다. 혈청에 포함되어있는 IgE (R&D system), histamine (SPI Bio), TNF- α , IL-1 β , IL-6 (R&D system) 그리고 Th1/Th2 cytokine (eBioscience)의 양을 ELISA kit을 사용하여 측정하였다. 구체적인 실험방법은 각각의 제조사의 방법에 따라 이루어 졌으며, 측정은 SPECTRAMAX190(Molecular Devices)

를 사용하여 이루어졌다.

4) 피부 병변에 대한 평가

마우스의 피부 병변의 정도(Clinical Skin Severity Score) 측정은 아토피 피부염에서 일반적으로 사용되는 Yamamoto M의 방법을 약간 변형하여 임상적 육안 평가법을 이용하였다¹⁹⁾. 육안평가 항목은 erythema/hemorrhage, dryness/scarring, edema, excoriation/erosion, lichenification 5가지 항목으로 하고, 육안평가 결과는 각각 평가한 점수의 총합으로 나타낸다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였으며 최소 0 점에서, 최고 15 점사이의 점수를 측정하였다.

5) CD4⁺/CD8⁺ T세포 분석

각 실험군의 마우스에서 무균적으로 비장을 채취하였다. 채취된 비장을 glass slider로 분쇄하고 Red Blood Lysis Buffer (0.83% ammonium chloride 용액; NH₄Cl:Tris=9:1)로 적혈구를 용해시킨 뒤, 비장 림프구를 분리하였다. 5×10⁶ cell/ml의 세포를 4% paraformaldehyde로 고정시킨 후 Alexa Fluor 488 conjugated CD4+ 항체와 PE conjugated CD8+ 항체를 이용하여 비장에서 분리한 림프구에 붙였다. Flow cytometric analysis 는 FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences)를 사용하여 이루어졌다.

6) 피부의 조직병리학적 관찰

마우스의 등 부위 피부를 적출하여 10% 의 중성 포르말린 용액에서 고정하였다. 고정시킨 피부조직을 파라핀 포매하고, 8µm 로 박절한 후 Hematoxylin & Eosin 염색을 하였다. 이렇게 제작된 각 실험군의 검체를 가지고 광학현미경으로 조직병리학적 병변을 관찰하였다.

7) 통계분석

각 실험군간 통계적 유의성을 분석하기 위하여

Kruskal Wallis 검정 (ANOVA 에 대한 비모수적 검정법)과 Student t-test 를 사용하였다. 모든 결과는 각 실험군의 평균값 ± 표준편차 (Mean ± SD) 로 나타내었고, 유의확률(p-value)은 p (0.05로 하였다.

실험 결과

1. 육안적 관찰

DNCB의 도포가 반복될수록 정상군에 비해 DNCB 도포군의 홍반과 부종은 증가하였다. 양성대조군인 DNCB + 1% pimecrolimus 도포군은 발생된 홍반과 부종을 감소시켰으며, 실험군 I, II, III 은 농도 의존적으로 홍반과 부종을 감소시켰다. 특히 실험군 III인 DNCB + 5% 정향 도포군은 양성대조군과 유사할 정도로 홍반과 부종을 감소시켰다 (Fig. 1).

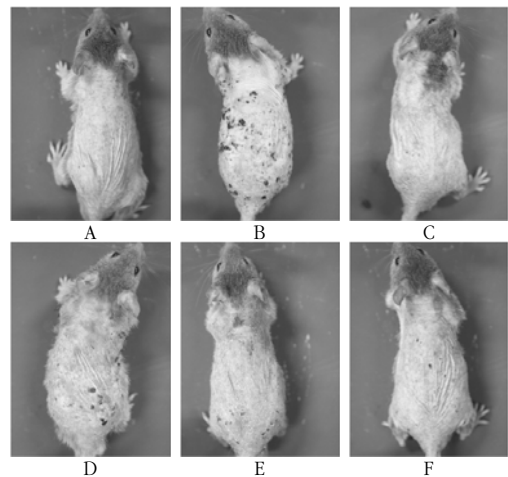


Fig. 1. Therapeutic effect of SAE in NC/Nga mice with allergic contact dermatitis induced by DNCB

- A : Normal Control
- B : Negative Control (DNCB-treated)
- C : Positive Control (DNCB + 1% pimecrolimus treated)
- D : Experimental Group I (DNCB + 0.2% SAE treated)
- E : Experimental Group II (DNCB + 1% SAE treated)
- F : Experimental Group III (DNCB + 5% SAE treated)

2. 조직병리학적 변화

마우스의 등 부위 피부조직을 광학현미경을 이용하여 100배와 200배 배율로 관찰하였다(Fig. 2, 3). 정상군의 피부조직은 특별한 이상 소견이 발견되지 않은 반면(Fig. 3A), DNCB 도포군은 피부 조직의 비후화와 염증성 부종이 관찰되었다. 표피세포의 유극세포층 증식소견이 여러 부위에서 관찰되었으며, 진피표피 경계부(dermoepidermal junction)는 틈새가 형성되어 있었으며, 모세혈관의 확장이 두드러지게 관찰되었다. 침윤된 염증세포는 대부분 호중구 및 림프구가 혼재되어 있었으며, 또한 많은 수의 호중구도 침윤되어 있었다(Fig. 3B).

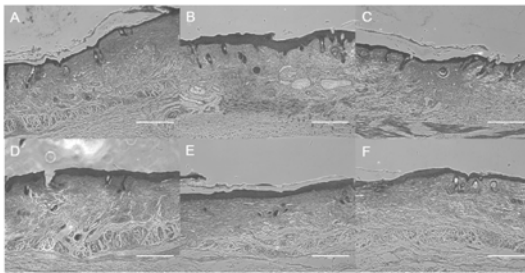


Fig. 2. Histologic analysis of allergic contact dermatitis in NC/Nga mice treated with SAE(x100)

- A : Normal Control
- B : Negative Control (DNCB-treated)
- C : Positive Control (DNCB + 1% pimecrolimus treated)
- D : Experimental Group I (DNCB + 0,2% SAE treated)
- E : Experimental Group II (DNCB + 1% SAE treated)
- F : Experimental Group III (DNCB + 5% SAE treated)

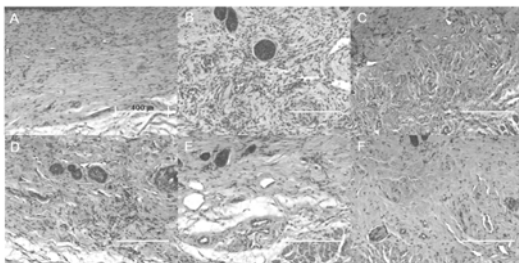


Fig. 3. Histologic analysis of allergic contact dermatitis in NC/Nga mice treated with SAE(x200)

실험군 I, II, III에서는 염증성 부종과 염증세포 침윤이 늘어드는 경향을 보였는데, 특히 실험군 III은 DNCB+1% pimecrolimus 도포한 양성대조군과 유사한 감소를 보였다(Fig. 3D-F).

3. 피부 병변의 정도에 미치는 영향

Erythema/hemorrhage, dryness/scarring, edema, excoriation/erosion, lichenification 의 총 5가지 항목에 대하여 3점 척도를 사용하여 6주간 육안적 관찰을 실시하였다.

6주 후 clinical skin score는 실험군 I, II, III 모두 DNCB 도포군에 비해 감소하였는데, 특히 5% 정향 도포군인 실험군 III는 양성대조군인 DNCB+1% pimecrolimus 도포군 보다 피부 병변의 정도가 감소되어 있는 것이 관찰되었다(Fig. 4).

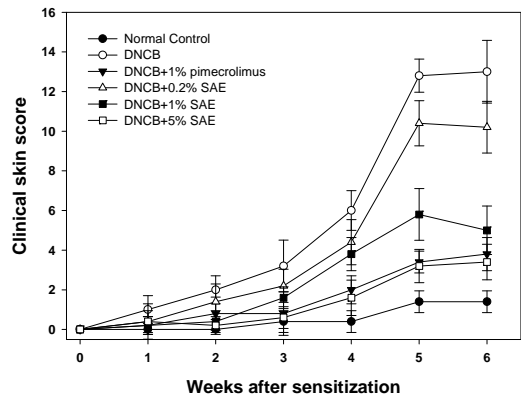


Fig. 4. Effects of SAE on development of allergic contact dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice in response to repeated DNCB challenge

4. 표피의 두께에 미치는 영향

실험 마지막 날 마우스의 등 부위 피부조직을 채취하여 표피의 두께를 측정된 결과, DNCB 도포군에 비해 실험군 II와 실험군 III에서는 농도 의존적으로 유의하게($p < 0.05$) 표피 두께를 감소시켰다(Fig. 5).

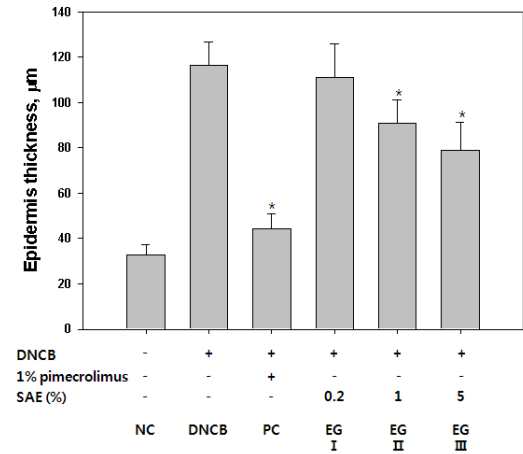


Fig. 5. Effects of epidermis thickness in NC/Nga mice

NC : Normal Control
 DNCB : Negative Control (DNCB-treated)
 PC : Positive Control (DNCB + 1% pimecrolimus treated)
 EG I : Experimental Group I (DNCB + 0.2% SAE treated)
 EG II : Experimental Group II (DNCB + 1% SAE treated)
 EG III : Experimental Group III (DNCB + 5% SAE treated)
 Results represent as the mean±SD. *p<0.05 : significant as compared to DNCB-treated.

5. 혈중 histamine 유리 억제에 미치는 영향

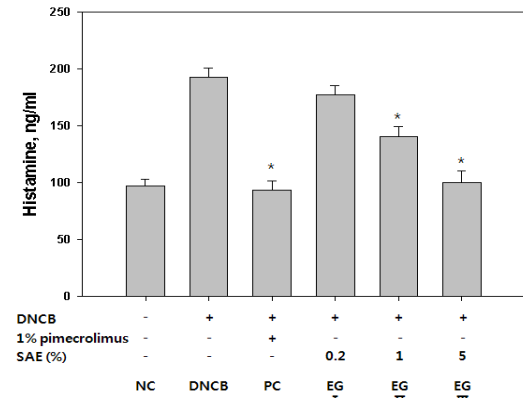


Fig. 6. Effects of SAE on the serum histamine levels in DNCB treated Nc/Nga mice

Results represent as the mean±SD. *p<0.05 : significant as compared to DNCB-treated.

실험 6주 후 마우스의 심장에서부터 혈액을 채취하여 histamine 유리에 미치는 영향을 관찰한 결과,

DNCB 도포군은 비만세포주의 활성화에 의하여 정상군에 비하여 2배 이상 증가된 histamine 유리를 보였다. 실험군 II, III는 농도 의존적으로 유의하게 (p<0.05) histamine 유리를 감소시켰는데, 특히 5% 정향 도포군인 실험군 III는 양성대조군인 DNCB+1% pimecrolimus 도포군과 유사하게 histamine 유리를 감소시켰다(Fig. 6).

6. Cytokine에 미치는 영향

1) Pro-inflammatory cytokine

실험 마지막 날, 심장 채혈을 통하여 얻은 혈청에서 pro-inflammatory cytokine인 IL-1β와 TNF-α의 농도를 분석하였다. 그 결과 IL-1β와 TNF-α는 실험군 II, III에서 농도 의존적으로 유의하게 (p<0.05) 감소되었는데, 특히 5% 정향 도포군인 실험군 III는 양성대조군인 DNCB+1% pimecrolimus 도포군과 유사하게 IL-1β와 TNF-α의 농도를 감소시켰다(Fig. 7, 8).

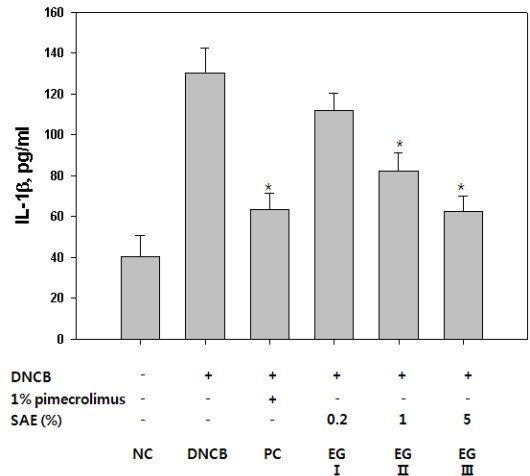


Fig. 7. Effects of SAE on serum level of IL-1β in DNCB treated Nc/Nga mice

Results represent as the mean±SD. *p<0.05 : significant as compared to DNCB-treated.

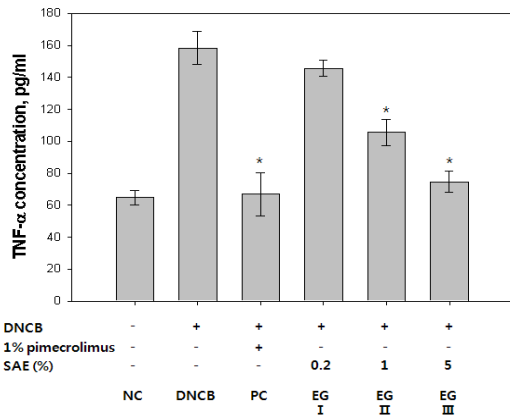


Fig. 8. Effects of SAE on serum level of TNF- α in DNCB treated Nc/Nga mice

Results represent as the mean \pm SD. *p<0.05 : significant as compared to DNCB-treated.

2) Th1

실험 마지막 날, 심장 채혈을 통하여 얻은 혈청에서 Th1 cytokine인 INF- γ 를 분석하였다. 그 결과 INF- γ 의 농도는 모든 실험군에서 유의성이 관찰되지 않았다(Fig. 9).

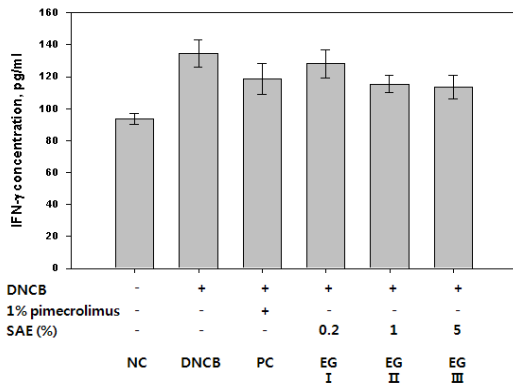


Fig. 9. Effects of SAE on serum level of INF- γ in DNCB treated Nc/Nga mice

Results represent as the mean \pm SD. *p<0.05 : significant as compared to DNCB-treated.

3) Th2

실험 마지막 날, 심장 채혈을 통하여 얻은 혈청에

서 Th2 cytokine인 IL-4, IL-6, IL-10의 농도를 분석하였다. 그 결과 IL-4, IL-6, IL-10은 실험군 II, III에서 농도 의존적으로 유의하게(p<0.05) 감소되었는데, 특히 5% 정향 도포군인 실험군 III는 IL-4 농도를 양성대조군인 DNCB+1% pimecrolimus 도포군과 유사하게 감소시켰으며, IL-10의 경우에는 양성대조군인 DNCB+1% pimecrolimus 도포군보다 더 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 10, 11, 12).

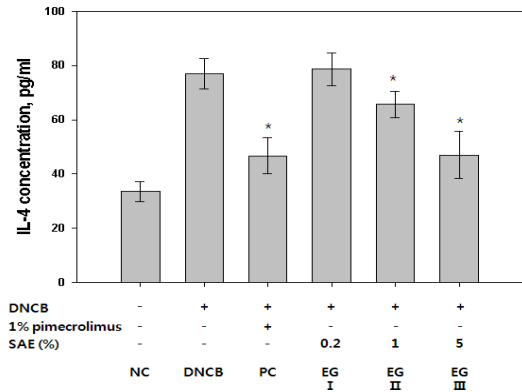


Fig. 10. Effects of SAE on serum level of IL-4 in DNCB treated Nc/Nga mice

Results represent as the mean \pm SD. *p<0.05 : significant as compared to DNCB-treated.

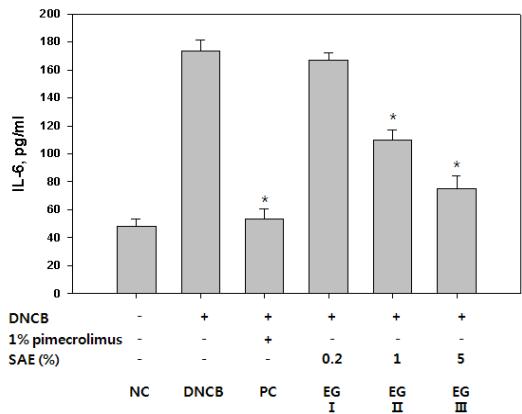


Fig. 11. Effects of SAE on serum level of IL-6 in DNCB treated Nc/Nga mice

Results represent as the mean \pm SD. *p<0.05 : significant as compared to DNCB-treated.

7. Total IgE에 미치는 영향

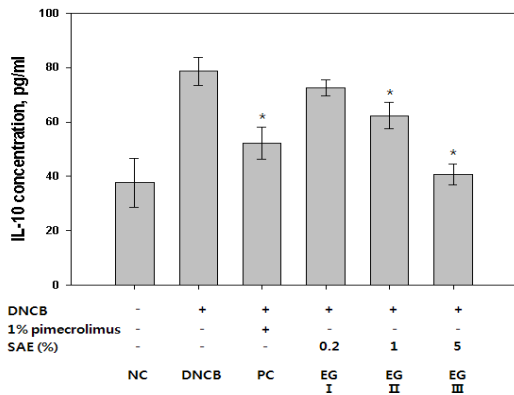


Fig. 12. Effects of SAE on serum level of IL-10 in DNCB treated Nc/Nga mice

Results represent as the mean±SD. *p(0.05 : significant as compared to DNCB-treated.

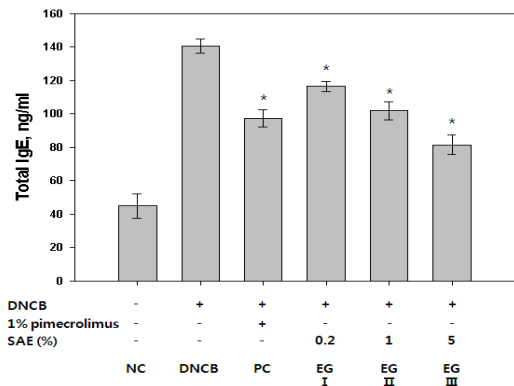


Fig. 13. Effects of SAE on the serum IgE levels in DNCB treated Nc/Nga mice

Results represent as the mean±SD. *p(0.05 : significant as compared to DNCB-treated.

Table 1. Effect of SAE on Spleen T Lymphocyte Subset

Group	CD4 ⁺ , %	CD8 ⁺ , %	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ , %
Normal Control	2.82±0.523	1.72±0.302	2.03±0.362
DNCB	6.43±0.702	2.52±0.452	5.63±0.623
DNCB+1% pimecrolimus	3.15±0.356 ^o	1.82±0.369 ^o	2.13±0.396 ^o
DNCB+0.2% SAE	5.94±0.564	2.41±0.362	2.63±0.412
DNCB+1% SAE	5.02±0.632	2.32±0.251	2.03±0.213
DNCB+5% SAE	3.82±0.236 ^o	2.08±0.302 ^o	1.92±0.152 ^o

Results represent as the mean±SD. *p(0.05 : significant as compared to DNCB-treated.

실험 6주 후 마우스의 심장으로부터 혈액을 채취하여 total IgE에 미치는 영향을 관찰한 결과, DNCB 도포군은 정상군에 비하여 total IgE 수치가 3배 이상 증가되었다. 실험군 I, II, III은 농도 의존적으로 유의하게(p(0.05) total IgE 수치를 감소시켰는데, 특히 5% 정향 도포군인 실험군 III는 양성 대조군인 DNCB+1% pimecrolimus 도포군보다 더 유의성 있게 total IgE 수치를 감소시켰다(Fig. 13).

8. 비장의 CD4⁺, CD8⁺ T세포 변화에 미치는 영향

정향이 T 세포의 유입을 억제하는가를 비장에서 추출한 T 세포를 유세포분석기를 이용하여 조사하였다(Table 1).

비장에서 각 군의 CD4⁺와 CD8⁺ T 세포를 조사한 결과 실험군 I, II, III에서 농도 의존적으로 CD4⁺와 CD8⁺ T 세포가 감소하였는데, 특히 실험군 III에서는 양성대조군인 DNCB+1% pimecrolimus 도포군과 유사한 유의성(p(0.05) 있는 CD4⁺와 CD8⁺ T 세포 감소를 보였다.

고 찰

알레르기성 접촉성 피부염은 급속한 산업화의 진행과 생활양식의 변화로 다양한 항원에 신체가 노출되면서 야기되는 피부염으로, 발병이 점차 증가하는 추세이다.

알레르기성 접촉피부염은 항원에 이미 감작된 개

체가 재차 항원에 접촉될 때 접촉된 국소부위에 발적, 구진, 소수포, 소양 등의 염증반응을 일으키는 제 IV형 지연형 과민반응(Delayed type hypersensitivity)에 속하는 면역질환으로, World Allergy Organization에 따르면 항원과 결합한 단백질 복합체에 감작된 사람들에게 일어나는 Th1 우세 면역 반응으로 정의하고 있다^{1,20,21}.

발병기전은 알레르겐이 피부를 침투하여 표피에서 매개 단백질과 결합하여 완전한 항원이 된 뒤, 항원제시세포인 랑게르한스세포와 접촉하여 T 림프구에 항원을 전달하게 된다. 이러한 T림프구 중 일부가 기억세포로 체내에 남아 있게 되면서 재차 항원이 피부를 침투하게 되면 기억세포가 이를 감지하여 IL-1, IL-3, IL-6, INF- γ , TNF- α , GM-CSF 등과 같은 각종 화학물질이 분비되며, 이를 매개로 염증이 발생된다^{21,22}.

모든 물질들이 항원이 될 수 있으며, 특히 니켈, 크롬을 포함하여 옷나무의 pentadecylcatechol, 은행나무 열매의 ginkgolic acid 등이 항원성이 높다. 이외에도 화장품의 방향성 화합물, 염색약에 포함된 paraphenylenediamine, 매니큐어 성분, 합성수지를 고분자화 하기 전의 중간물질이나 촉매제제, 농약 등이 항원으로 종종 작용한다^{21,22}.

알레르기성 접촉피부염은 한의학적인 범주로서 발생 부위와 원인 물질에 따라 漆瘡²³, 狐尿刺²⁴, 粉花瘡²⁵ 등에 해당한다. 漆瘡는 漆의 辛熱之毒이 원인이 되어 얼굴에 발생하며, 狐尿刺는 螻蛄의 분비물, 狐狸의 배설물로 인하여 수족지절에 생긴다. 粉花瘡는 鉛粉을 이용한 화장으로 인해 얼굴에 발생하는 것으로 접촉하는 항원의 종류만 달라 현대의학의 알레르기성 접촉피부염과 유사하다²⁶.

한의학적 치료는 內治와 外治로 구분할 수 있으며 內治法의 경우 급성기에는 清熱解毒, 祛風, 利濕, 涼血이 위주가 되며, 만성기에는 祛風, 養血을 위주로 하였다. 外治法의 경우 급성기에는 清熱燥濕하는 약물들이, 만성기에는 活血養血하는 약물들이 사용되

었다. 劑型에서도 급성기에는 丘疹 위주이거나 水疱가 터지지 않았을 경우에는 洗劑, 散劑를, 水疱가 터져 삼출물이 있는 경우는 煎湯液, 洗劑, 散劑를, 滲出液이 없는 경우와 糜爛하거나 結痂를 이룬 경우 또는 만성기에는 膏劑를 사용하였다²⁷.

최근 DNCB로 유발한 알레르기성 접촉피부염에 관련한 연구들은 개별 한약제^{4,5}나 처방^{6,7}을 이용한 연구들이 이루어지고 있다.

정향(*syzygium aromaticum*)은 도금낭과(Myrtaceae)에 속하는 정향나무의 피지 않은 꽃봉우리이다. 성분은 eugenol, oleanolic acid, kaempferol 7-O-methylether, 3,3'4-trio-O-methylellagic acid, maslinic acid, β -sitosterol-3-O-glucoside, isorhamnetin 3-O-glucoside 7가지로 분리된다¹². 性味는 辛溫 無毒하며 暖胃健脾, 理氣消食, 止嘔 등의 효능이 있는 약물이다. 최근 피부진균 및 장티프스, 디프테리아 같은 병원성 미생물에 대한 항균작용과 항산화활성, 항응고작용에 대한 보고^{13,14}가 있으며, 즉각형 과민반응 억제효과와 항알레르기 작용^{15,16} 등이 보고되고 있으나 알레르기성 접촉성 피부염에 치료 효과를 실험한 연구는 없었다.

이를 위해 NC/Nga mouse 42마리를 각각 7마리씩 정상군, 음성대조군 (DNCB 도포군), 양성대조군 (DNCB+1% pimecrolimus 도포군), 실험군 I (DNCB+0.2% 정향도포군), 실험군 II (DNCB+1% 정향도포군), 실험군 III (DNCB+5% 정향도포군) 6개군으로 나누어 육안적 피부병변과, 병리조직학적 변화 관찰, 혈청 히스타민, IgE, 면역관련인자인 사이토카인의 양을 측정하였다.

본 연구에서 알레르기성 접촉피부염 유발을 위하여 사용한 2,4-dinitrochlorobenzen (DNCB)는 과민한 세포성 면역반응을 일으켜 피부손상 즉 홍반, 해면화, 상피세포과형성, 비만세포와 T림프구, 혈청 IgE의 증가 등을 일으킨다^{28,29}. 대부분의 사람이 DNCB에 노출되게 되면 T 림프구의 type IV hypersensitivity reaction을 일으키게 된다³⁰. Matsukura

등은 실험쥐에 장기적으로 도포하면 Th1형이 우세한 접촉 과민반응이 유도되어 접촉성피부염과 유사한 피부 병변의 자연적 발생을 촉진한다고 하였다³¹⁾. 본 연구에서도 DNCB를 사용하여 만든 알레르기성 접촉피부염 모델은 피부 홍반 (erythema), 낙설 (desquamation), 각화 (keratosis) 등이 발생하고, 조직병리학적 소견에서 비후된 스폰지 조직 (spongiosis) 등을 보여 인간에서 보이는 중등도 이상의 피부염 소견을 발현시킨 것으로 평가 되었다.

양성대조군에 사용된 pimecrolimus는 스테로이드의 부작용이 없는 칼시뉴린 억제제로서 알레르기성 접촉피부염, 아토피피부염 등에 사용되고 있는 연고제이며 최근 스테로이드제제의 부작용을 줄이기 위해 병용되어지고 있다³²⁾.

DNCB를 사용하여 NC/Nga mice에 알레르기성 접촉피부염을 유발시키고 실험군 I, II, III를 도포하고 육안적 관찰을 한 결과 실험군 I, II, III 모두 농도 의존적으로 부종을 감소시켰는데, 특히 실험군 III인 DNCB + 5% 정향 도포군의 부종 감소는 양성대조군과 유사할 정도로 부종을 감소시켰다.

알레르기성 접촉피부염 조직의 가장 특징적인 변화는 스폰지 조직의 비후와 부종, 단핵구 및 각종 염증관련 면역 세포의 침윤 등이라고 할 수 있는데, 본 연구에서도 음성대조군의 피부 조직에서 스폰지 조직의 비후소견과 기저조직에서 단핵구들이 증가하는 소견이 관찰되었다. 실험군 I, II, III에서는 염증성 부종과 염증세포 침윤이 줄어드는 경향을 보였는데, 특히 실험군 III는 1% pimecrolimus 도포한 양성대조군과 유사한 감소를 보였다.

정향 도포가 피부 병변의 정도에 미치는 영향을 알아보고자 erythema/hemorrhage, dryness/scarring, edema, excoriation/erosion, lichenification 의 총 5가지 항목에 대하여 3점 척도를 사용하여 6주간 육안적 관찰을 실시하였다. 6주 후 clinical skin score는 실험군 I, II, III 모두 DNCB 도포군에 비해 감소하였는데, 특히 5% 정향 도포군인 실험군

III는 양성대조군인 DNCB+1% pimecrolimus 도포군 보다 피부 병변의 정도가 감소되어 있는 것이 관찰되었다. 또한 표피의 두께를 측정한 결과 실험군 II와 실험군 III에서는 농도 의존적으로 유의하게 ($p < 0.05$) 표피 두께를 감소시켰다.

Histamine은 항원-항체 반응에 의해 비만세포가 자극될 때, 비만세포의 과립에서 세로토닌, 뉴코트리엔, 헤파린 등의 많은 화학물질들과 함께 유리되는데, 혈관확장과 단백질의 유출을 유도하여 가려움증, 발적, 홍반, 팽진 등을 야기하고 제 I 형 아나필락시스 과민반응을 일으킨다¹⁾. 본 연구에서는 실험 6주 후 마우스의 심장으로부터 혈액을 채취하여 histamine 유리에 미치는 영향을 관찰한 결과, DNCB 도포군은 비만세포주의 활성화에 의하여 정상군에 비하여 2배 이상 증가된 histamine 유리를 보였다. 실험군 II, III는 농도 의존적으로 유의하게($p < 0.05$) histamine 유리를 감소시켰는데, 특히 5% 정향 도포군인 실험군 III는 양성대조군인 DNCB+1% pimecrolimus 도포군과 유사하게 histamine 유리를 감소시켰다.

과민성 면역질환에서 매개 역할을 하는 것으로 알려진 IgE는 정상군보다 DNCB 도포군에서 3배이상 증가하였으나 실험군 I, II, III는 농도 의존적으로 유의하게($p < 0.05$) total IgE 수치를 감소시켰다. 특히 5% 정향 도포군인 실험군 III는 양성대조군인 DNCB+1% pimecrolimus 도포군보다 더 유의성 있게 IgE 수치를 감소시켰다. B림프구에서의 IgE 생성은 Th2 사이토카인인 IL-4 및 IL-13에 의해 증가되며 Th1 사이토카인인 IFN- γ 등에 의해서 강력히 억제된다³³⁾. 본 연구에서는 IL-4에 의존하여 IgE가 증가하는 것을 볼 수 있었다.

생체 내에서 발생하는 면역 반응에서 T림프구가 관여하는 면역 반응을 중심으로 분류 해보면 Th1 반응과 Th2 반응으로 나누어 볼 수 있다³⁴⁾. 즉, CD4⁺ T림프구가 활성화되었을 때 분비하는 cytokine에 따라서 Th1세포와 Th2세포로 분류된다. Th1 세

포는 IL-2, IFN- γ 를 분비하며, 지연형 과민반응을 매개하지만 Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10을 분비하여 즉시형 과민반응, 체액성 면역반응에 관여한다. 이러한 Th1 세포와 Th2 세포의 상호길항작용을 통해서 인체는 면역균형을 유지하게 된다. Th1과 Th2 반응에서 가장 대표적인 cytokine으로 IL-4와 IFN- γ 를 들 수 있다^{34,35}. 천식 (asthma)과 같은 질환은 Th2 반응이 위주가 되므로 IL-4를 비롯하여 IL-5, IL-6, IL-10과 같은 Th2 계열 cytokine이 증가되며^{34,35}, 알레르기 접촉피부염은 Th1 반응이 위주가 되어 IFN- γ , IL-2 등의 cytokine이 증가하게 된다³⁶.

IFN- γ 는 주로 CD4⁺ 보조 T림프구의 Th1세포에 의해 생산되는 cytokine으로 대식세포를 활성화하고 지연형 면역반응을 매개한다³⁵. IL-4는 주로 CD4⁺ 보조 T림프구의 Th2세포에 의해 생산되는 cytokine으로 미감작 CD4⁺ 전구세포로부터 Th2림프구의 분화를 유도하며, B림프구에 의한 IgE생산을 자극한다³⁴. IL-6는 활성화된 대식세포, 내피세포, 섬유아세포와 같은 여러 유형의 세포로부터 생산되는 사이토카인으로 B림프구의 성장에 관여하며 과민성 면역반응을 매개한다³⁷. TNF- α 는 대식세포에서 생성되며 감염 부위과 호중구 및 단핵구의 보충을 자극시키는 cytokine으로 혈관 내피세포를 자극하여 새로운 부착 분자를 발현하게 한다³⁸. IL-1 β 는 랑게르한스세포나 단핵세포, 대식세포의 주된 cytokine으로서 표피로부터 랑게르한스세포가 이주하는데 관여한다. TNF- α 와 IL-1 β 는 모든 염증 반응의 시작을 유발할 수 있어서 전염증성(pro-inflammatory) cytokine으로 불린다¹.

본 연구에서 정향 도포가 cytokinedp 미치는 영향을 살펴본 결과 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β 와 TNF- α 는 실험군 II, III에서 농도 의존적으로 유의하게(p<0.05) 감소되었는데, 특히 5% 정향 도포군인 실험군 III는 양성대조군인 DNCB+1% pimecrolimus 도포군과 유사하게 IL-1 β 와 TNF- α

의 농도를 감소시켰다.

Th1 cytokine인 INF- γ 의 농도를 분석한 결과 INF- γ 의 농도는 모든 실험군에서 유의성이 관찰되지 않았다. Th2 cytokine인 IL-4, IL-6, IL-10의 농도를 분석한 결과 IL-4, IL-6, IL-10은 실험군 II, III에서 농도 의존적으로 유의하게(p<0.05) 감소되었는데, 특히 5% 정향 도포군인 실험군 III는 IL-4 농도를 양성대조군인 DNCB+1% pimecrolimus 도포군과 유사하게 감소시켰으며, IL-10의 경우에는 양성대조군인 DNCB+1% pimecrolimus 도포군보다 더 유의성 있게 감소시켰다

CD4⁺는 도움 T림프구의 표지인자이고, CD8⁺는 세포독성 T림프구의 표지인자³⁹로서 비장에서 각 군의 CD4⁺와 CD8⁺ T 세포를 조사한 결과 실험군 I, II, III에서 농도 의존적으로 CD4⁺와 CD8⁺ T 세포가 감소하였는데, 특히 실험군 III에서는 양성대조군인 DNCB+1% pimecrolimus 도포군과 유사한 유의성(p<0.05) 있는 CD4⁺와 CD8⁺ T 세포 감소를 보였다.

그러나 본 연구에서는 에탄올 추출물을 피부를 통하여 직접 처리하였기 때문에 피부 조직 내에서의 정향 농도는 구강투여 보다는 높을 것으로 유추하지만 어느 정도 수준일지에 대하여 아직까지 어떤 연구 결과도 없는 실정이다. 추후 정향의 특정 성분을 측정하는 등의 방법을 통하여 피부 조직 내의 농도를 가늠할 수 있는 후속 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결론

정향이 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉성 피부염에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 육안적 관찰에서 실험군 I, II, III는 DNCB 도

- 포군에 비해 농도 의존적으로 홍반과 부종을 감소시켰다.
2. 실험군 I, II, III에서 DNCB 도포군에 비해 염증성 부종과 염증세포 침윤이 감소되었다.
 3. 실험군 I, II, III은 DNCB 도포군에 비해 clinical skin score를 감소시켰다.
 4. 실험군 II, III은 DNCB 도포군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 감각된 표피의 두께를 감소시켰다.
 5. 실험군 II, III은 DNCB 도포군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 histamine 유리를 감소시켰다.
 6. 실험군 II, III은 DNCB 도포군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10의 농도를 감소시켰다.
 7. 실험군 I, II, III은 DNCB 도포군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 total IgE 수치를 감소시켰다.
 8. 실험군 III에서 양성대조군과 유사한 유의성 있는 CD4⁺와 CD8⁺ T 세포 감소를 보였다.

참고문헌

1. Korean Dermatological Association, Dermatology. Seoul:Yeomoonkak Co. 2008:64-8, 72-4, 78-80, 125-33, 179-85, 234-5.
2. Kim SW. Cyclosporin Treatment Atopic Dermatitis. Is it really associated with infection disease. Ann Dermatol. 2010;20:170-1.
3. ML Pacor, G Di Lorenzo, N Martinelli, P Mansueto, GB Rini, R Corrocher. Comparing tacrolimus ointment and oral cyclosporine in adults patients affected by atopic dermatitis. A randomized study. Clin Exp Allergy. 2004;34:639-45.
4. Shin GS. The Effects of *Rhemanniae Radix* Extract on Allergic Contact Dermatitis induced by DNCB in Mice. Graduate School Dongguk University. 2000.
5. Baik YH. *Salviae Miltiorrhizae* Root inhibits Atopic Dermatitis in the DNCB(dinitrochlorobenzene)-induced Atopic Dermatitis NC/Nga Mice. Graduate School Kyung Won University Seoul, Korea. 2006.
6. Byun SH, Lee BW, Kim SC. Effect of Samyoyongantang on Contact Hypersensitivity induced by Repeat Elicitation of DNCB. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription. 2005;13(2):59-69.
7. Kim CH, Kim KJ. The Effects of Yanghyulsamultanggamibang to Allergic Contact Dermatitis. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2005;18(1):13-26.
8. Kim SC, Lee JR, Choi KI, Park SJ, Kwon YK, Byun SH. Effect of Lonicerae Flos-Skin on Contact Hypersensitivity induced by Repeat Elicitation of DNCB. Kore. J. Herbology. 2006;21(1):9-15.
9. Lim JH, Park YM, Kim JS, Jeong HY, Seo EW. Effect of Cnidium officinale Extract on Recovery Capability of Allergic Contact-Dermatitis in Rat. Korean J. Plant Res. 2011;24(4):430-7.
10. Kim CJ, Kim YB, Ku YH, Nam HJ. The Effects of Sophorae Radix and Coptidis Rhizoma - Iotophoresis in Allergic contact Dermatitis. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2005;18(1):1999-220.

11. Huh J. Donguibogam, 1st ed. Bubin Publishers, 2005:3588.
12. Son KH. Constituents from *Syzygium aromaticum* Merr, et, Perry. Natural Product Sciences, 1998;4(4):263-7.
13. Lee OH, Jung SH, Song JY. Antimicrobial Activity of Clove Extract by Extraction Solvents. J Korean Soc Food Sci Nutr, 2004;33(3):494-9.
14. Dong S, Jung SH, Lee SK, Song JY. Antioxidant Activities of Clove by Extraction Solvent. J Korean Soc Food Sci Nutr, 2004;33(3):609-13.
15. Bae SH, Moon G, Won JH. Inhibitory Effect of Immediate-Type Hypersensitivity of *Syzygium aromaticum* extract by Anal Therapy. The Journal of Oriental Medical Surgery, Ophthalmology & Otolaryngology, 2000;13(1):141-56.
16. Kim HM. Antiallergic Drugs from Oriental Medicines. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 2000;1(1):1-7.
17. YJ Fu, LY Chen, YG Zu, ZG Liu, X Liu, Y Liu, et al. The Antibacterial Activity of Clove Essential Oil Against Propionibacterium acnes and Its Mechanism of Action. Arch Dermatol, 2009;145(1):86-8.
18. Ahmad N, Alam MK, Shehbaz A, Khan A, Mannan A, Hakim SR, et al. Antimicrobial activity of clove oil and its potential in the treatment of vaginal candidiasis. J Drug Target, 2005;13(10):555-61.
19. Yamamoto M, Takayo H, Kiyoshi Y, Hisashi T, Miho I, Shigeki T, et al. A Novel Atopic Dermatitis Model Induced by Topical Application with Dermatophagoides Farinae Extract in NC/Nga mouse. Allergy International, 2007;56:139-48.
20. Eun HC. Epidemiological and Clinical Review of Contact Dermatitis in Korea. Korean J Dermatol 1995;33(2):209-24.
21. Kang SY. Clinical Practice of Allergic Diseases. Seoul:Ilcholkak, 1997:301-6.
22. Guterath J, Behrendt H, Ring J, Jakob T. Model of contact dermatitis and atopic eczema. Drug Discovery Today: Disease Model, 2005 summer;2(2):135-40.
23. So WB. Sossijebyeongwonhuron, Seoul:Daesung Publisher, 1992:258.
24. Cho G. Seongjechongrok, Beijing:People's Medical Publishing House, 1995:1557-9, 1610-1.
25. Go SJ. Yanguidaeyeon, Beijing:People's Medical Publishing House, 1987:475.
26. Kim YB, Kim JH, Chae BY. Oriental Consideration on Contact Dermatitis. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, 1992;5(1):113-20.
27. Jun JH, Kim HA, Kang YH. A Literature Review on External Treatment of Contact Dermatitis. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, 1998;11(1):197-218.
28. Gunnes G, Jorundsson E, Tverdal A, Landsverk T, Press CM. Accumulation of CD25+ CD4+ T-cells in the draining lymph node during the elicitation of DNCB induced contact hypersensitivity in lambs. Research in Veterinary Science, 2004;77:115-22.
29. Kataranovski M, Vlaski M, Kataranovski D, Tosic N. Immunotoxicity of epicutaneously

- applied anticoagulant rodenticide wafarin : evaluation by contact hypersensitivity to DNCB in rats, *Toxicology*, 2003;188:83-100.
30. Hopkins JE, Naisbitt DJ, Kitteringham NR, Dearman RJ, Kimber I, Park BK, Selective haptenation of cellular or extracellular protein by chemical allergens: association with cytokine polarization, *Chem Res Toxicol*, 2005;18(2):375-81.
31. Ju YH. Developing an Atopic Dermatitis Model and the Effects of Actinidia Extract on Dermatitis in NC/Nga Mice. *Korean J Dermatol*, 2009;47(10):1105-12.
32. Kim BJ, Kim MN, Kim GH, Kim DW, Roh YS, Park CU, et al, Multicenter Survey of the Efficacy and Compliance with Using Topical Pimecrolimus by Patients with Atopic Dermatitis, *Korean J Dermatol*, 2008;46(10):1357-61.
33. Paul WE, Seder RA. Lymphokine responses and cytokines, *Cell*, 1994;76:241-51.
34. Toshio H. Cytokine Molecular Biology. Seoul:WorldScience, 2002:51-5.
35. Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma, *J Clin Pathol*, 2001;54(8):577-89.
36. Hayashi M, Higash, K, Kato H, Kaneko H, Assessment of Preferential Th1 or Th2 Induction by Low-Molecular-Weight Compounds Using a Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Method: Comparison of Two Mouse Strains, C57BL/6 and Balb/c, *Toxicol, Appl, Pharmacol*, 2001;177:38-45.
37. Corsini E, Galli CL, Cytokines and irritant contact dermatitis, *Toxicol Lett*, 1998;28: 102-3, 277-82.
38. Sebastiani S, Albanesi C. The role of cheokines in allergic contact dermatitis, *Arch Dermatol Res*, 2002;293(11):552-9.
39. Kim JT, Ahn SH, Park IS, Chung JM, Kim HH, Immunohistochemical Study on the Activation of Cell mediated immunity in Murine Lymph node on Allergic Contact Dermatitis by DNCD, *Dongguk J. The Institute of Oriental Medicine*, 1998;7(1): 33-44.