

連翹敗毒散加味方이 알리지성 접촉피부염에 미치는 影響

- DNCB 재노출부위의 생쥐 피부손상완화와 비만세포 분포 변화를 중심으로 -

권오성 · 김진택¹⁾ · 박인식¹⁾ · 안상현¹⁾ · 이해풍²⁾ · 김호현³⁾ · 강윤호

동국대학교 한의과대학 내과학교실, ¹⁾해부학교실,
²⁾생명자원과학대학 응용생물학과, ³⁾세명대학교 한의과대학 생리학교실

【초 특】 본 실험은 連翹敗毒散加味方이 알리지성 접촉피부염 유발시 발생하는 면역과민반응과 염증반응 저해에 미치는 영향을 조사하기위해 행해진 것으로 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB, 5% DNCB 25 μ l로 감작, 7일경과 후 2.5% DNCB 5 μ l로 유발)처리로 알리지성 접촉피부염이 유발된 ICR계 암컷 생쥐에 連翹敗毒散加味方抽出物(0.51g/kg/day)을 음용투여한 다음 contact hypersensitivity assay, 피부의 일반적인 구조 그리고 비만세포의 분포 변화를 관찰하였다. Contact hypersensitivity assay의 결과, 連翹敗毒散加味方抽出物 투여군의 ear swelling이 DNCB군에 비해 유의성있게 감소한 것으로 나타났다. 알리지성 접촉피부염 유발 후 관찰되는 피부손상은 48시간에 제일 심한 것으로 관찰되었으나, 連翹敗毒散加味方抽出物 투여군에서는 DNCB군 비해 완화된 결과를 보였다. 連翹敗毒散加味方抽出物 투여군의 진피에서 림프구를 비롯한 염증관여세포의 이주와 혈관생성 그리고 표피내로의 림프구의 침윤 등이 감소되었고, 표피 기저층과 가시층세포에서는 세포질내 액포화와 세포사이 공간 확장도 줄어든 것으로 관찰되었다. 한편 알리지성 접촉피부염 유발 후 분포가 증가한 비만세포는 형태가 주로 세포내 함유물이 분비된 degranulated type로 나타났다. 이에 반해 連翹敗毒散加味方抽出物 투여군은 DNCB군에 비해 출현 비만세포 수가 일부 감소했고, 비만세포의 형태는 granulated t-type였다. 또한 serotonin 면역조직화학적 염색결과로 連翹敗毒散加味方抽出物 투여군에서 se-rotinin 양성반응성이 높은 granulated type의 비만세포가 주로 관찰되었다. 이상의 결과로 미루어 連翹敗毒散加味方抽出物은 알리지성 접촉피부염으로 유발된 피부 손상과 염증을 완화시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

중심낱말 : 알리지성 접촉피부염, 연교폐독산가미방, DNCB, 피부형태변화, 비만세포

I. 緒 論

최근 산업발달로 인하여 합성물질의 범람과 환경오염이 가속화되면서 각종 면역과민성질환

을 유발시키는 allergen들이 급증하는 추세이다(양(1983), 제(1988), 제(1996)). 면역과민반응(immune hypersensitivity)은 면역반응이 과도하거나 부적절한 형태로 일어나서 염증반응과 조직손상을 야기하는 질병상태로,

크게 체액성 면역과민반응과 세포성 면역과민 반응으로 구분된다.

알러지성 접촉피부염은 T 림프구와 대식세포 등에 의해서 발생하는 세포성 면역과민반응으로, allergen과 접촉시 수시간에서 72 시간 사이에 비교적 늦게 염증반응이 시작되기때문에 지연형 과민반응(delayed type hypersensitivity)이라고 부른다. 알러지성 접촉피부염에 관여하는 중추적인 세포는 도움 T 림프구(helper T lymphocytes)로, 이 세포의 활성화(activation)·증식(proliferation)에 의해 항원 특이적 세포 독성 T 림프구(antibody-specific cytotoxic T lymphocytes)의 활성화와 다양한 특이성 기전의 작동 등의 항원 특이적 반응이 일어난다. T 림프구 활성화와 증식을 위해서는 피부항원을 전달하는 항원제공세포(antigen presenting cell)인 랑게르한스 세포(Langerhans cell)가 필요하다. 피부를 통해 들어온 다양한 종류의 항원(대부분 분자량이 600 M.W. 이하인 hapten)은 상피의 운반 단백질과 결합된 후 항원제공세포로 전달된다고 Boerriger 들(1985)과 Rees 들(1990)이 보고하였다. Kinnaird 들(1989), Cumberbatch 와 Kimber(1990) 그리고 Steven 들(1987) 등에 의하면 항원을 부착한 항원제공세포는 림프관을 통해 국소 림프절로 이주(migration)하여 naive T 림프구에게 항원을 전달함으로써 감각을 일으킨다고 보고하였다. 감각된 T 림프구는 흉관(thoracic duct)을 통해 순환계로 들어가 recirculating lymphocyte pool로 합류하거나 특정 림프성 기관에 위치하게 된다. 항원 인식능력이 있는 채로 오랫동안 생존해 있는 기억 T 림프구(memory T lymphocytes)는 recirculating lymphocyte pool에서 postcapillary venules를 통해 원래 항원이 존재했던 특정 조직으로 유주하게 되며, 이는 내피세포 복귀 수용체(endothelial homing receptors)의 선별

적 선택에 의해 이뤄진다. 특정조직으로 유주한 감각 기억 T 림프구는 표피 혹은 진피에서 랑게르한스 세포나 진피 수지상세포(dermal dendritic cell)로부터 항원을 전달받아 빠르고 강력한 2차 면역반응을 유발하여 알러지성 접촉피부염을 일으키게 된다고 Ole와 Timothy(1991)와 Torres(1991)가 보고하였다. 알러지성 접촉피부염은 원인물질에 따라 특정부위에서 皮膚發赤, 發疹, 紅斑, 腫脹, 丘疹, 小水疱, 糜爛, 灼熱感, 痛症, 搔痒感, 濕疹狀變化 등의 병징을 나타내는 것으로 강(1993)과 강 들(1984)에 의해 보고하였다. 한편 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 範疇로 說明하고 있다(김(1991), 오(1990), 유(1990)).

알러지성 접촉피부염의 치료제로는 부신피질 호르몬제, anti-histamine제가 광범위하게 사용되고 있다. 근래에는 Cyclosporin A, FK506 등 면역억제제의 치료제사용에 대한 연구가 진행되고 있으나, 각각의 심각한 부작용으로 인하여 이용에 한계가 있어(Lauerma 들(1994), Jo와 Houh(1995)) 새로운 치료제제의 개발이 필요한 실정이다.

韓醫學에서는 皮膚病에 祛風, 清熱, 除濕, 涼血, 瀉火 등의 治法이 應用되는데, 劉(1984)는 韓藥劑中 祛風除濕劑, 清熱解毒劑 등이 免疫抑制劑의 作用을 하며, 특히 荊防敗毒散 加 金銀花, 連翹, 薄荷, 黃芩之類의 處方이 過敏性 皮膚炎에 免疫過敏反應 抑制 效果가 있다고 鍾(1991)은 보고하였다. 連翹敗毒散은 清熱解毒의 대표적인 處方인 荊防敗毒散에 金銀花와 連翹를 加味한 處方으로, 癰疽 初期 및 諸瘡 등을 치료하는 효능이 있는 것으로 이(1987)와 이(1990)는 보고하였다.

이에 저자들은 連翹敗毒散에 宣風清熱, 解表透疹 및 止痒의 효능이 있는 蟬退를 加한 連翹敗毒散加味方을 DNCB에 의해 알러지성 접촉피부염이 유발된 생쥐에 투여시킨 후 피

부에서 나타나는 형태학적 변화를 조사하였다. 면역과민반응억제와 항염증작용을 통해 連翹敗毒散加味方이 알리지성 접촉피부염으로 유발된 피부손상을 완화시킨다는 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 실험동물

생명공학연구소에서 분양 받은 태령 4주된 ICR계 암컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 30g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 대조군, DNCB 처리군(DNCB군), DNCB 처리 連翹敗毒散加味方抽出物 투여군(YPGM군)으로 나눈 후 시간의 경과에 따라 24, 48 그리고 72시간으로 세분시켰으며, 각 군에 5마리씩 배정하였다. 한편 Contact hypersensitivity assay를 위해 각 군에 별도로 10마리씩 배정하여 실험하였다.

2. DNCB 제조와 도포에 의한 알리지성 접촉피부염의 유발

본 실험에서 사용될 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB: Sigma, USA)를 acetone과 olive oil이 4:1로 혼합된 용액에 5%와 2.5%로 희석한 다음 사용되었다. 각군에 5% DNCB 25 μ l를 면도된 오른쪽 살바위쪽 복부 2cm²에 도포하여 감작시켰다. 감작 후 7일째가 되었을 때 DNCB군과 YPGM군의 생쥐 왼쪽 복부에 2.5% DNCB 4 μ l를 도포하여 알리지성 접촉피부염을 유발시켰다. 한편 대조군에는 DNCB가 포함되지 않은 acetone과 olive 혼합액을 도포하였다. DNCB군과 YPGM군에서의 알리지성 접촉피부염 유발 여부는 직접 육안으로 확인할 수 있었다.

3. 連翹敗毒散加味方抽出物の 제조와 응용투여
連翹敗毒散加味方은 황(1987)의 方藥合編에 記載된 連翹敗毒散에 蟬退를 加味하여 構成하였고 藥材는 市中에서 구입하여 精選한 것을 사용하였다. 連翹敗毒散加味方 5첩 분량을 증류수 2000ml에 넣고 2시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator로 농축한 후 이를 냉동건조기에서 건조하여 連翹敗毒散加味方抽出物 50.52g을 만들었다. 連翹敗毒散加味方抽出物은 알리지성 접촉피부염 유발 후 YPGM군에 매일 0.51g/kg/day로 응용시켰다.

4. Contact hypersensitivity assay

각군에 5% DNCB 25 μ l를 면도된 오른쪽 살바위쪽 복부 2cm²에 도포하여 감작시켰다. 감작 이후 7일째 되었을 때 Contact hypersensitivity assay를 실시하기 위해서 생쥐 오른쪽 귀에 2.5% DNCB 4 μ l를 도포하여 알리지성 접촉피부염을 유발시킨 후 24, 48 그리고 72시간에 오른쪽 귀의 두께를 vernier calipers(Mitutoyo, JAPAN)로 측정하였다. 측정된 각 군의 ear swelling 값 차이를 비교하였다.

5. 피부 조직표본제작

알리지성 접촉피부염 유발 후 24, 48 그리고 72시간에 생쥐를 경추탈구로 희생시켰다. 적출된 피부절편을 실온에서 10% 중성 포르말린용액에 24시간동안 고정한 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5 μ m두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 Hematoxylin과 Eosin에 염색한 후 만들어진 표본을 광학현미경으로 관찰하였다.

6. 진피내 비만세포 관찰

(1) 비만세포의 형태와 분포변화 관찰

Table. 1. The amount and composition of Yunkyopaedosangamibang extract.

韓藥名	生藥名	重量 (g)
羌活	Angelicae koreanae Radix	4
獨活	Araliae cordatae Radix	4
柴胡	Bupleuri radix	4
川芎	Cnidii rhizoma	4
防風	Sileris radix	4
前胡	Anthrisci radix	4
枳殼	Auranti fructus	4
桔梗	Platycodi radix	4
白茯苓	Hoelen ruba	4
甘草	Glycyrrhizae radix	4
荊芥	Nepetae herba	4
連翹	Forsythiae fructus	6
金銀花	Lonicerae flos	10
蟬退	Cicadae periostracum	2
薄荷	Mentae folium	1.5
生薑	Zingiberis rhizoma	4
總量		67.5

알러지성 접촉피부염 유발 후 피부 진피에서의 비만세포 변화를 관찰하기 위해 Luna's method를 실시하였다. 우선 5µm 연속절편을 aldehyde fuchsin에 30분간 염색한 후 Weigert's iron hematoxylin과 methyl orange solution에 각각 1분, 5분동안 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(2) 비만세포내 serotonin 변화 관찰

비만세포내 serotonin 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 먼저 1 : 100으로 희석된 normal rabbit serum (vector LAB, USA)에 실온에서 1시간동안 Blocking 한 후 1 : 1000으로 희석된 1차항체인 rat anti mouse serotonin(Vector LAB, USA)에 4℃ incubation chamber내에서 24시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 1 : 500으로 희석된 2차항체인 biotinylated rabbit anti rat IgG(Vector LAB, USA)에 1차항체와 같은 환경에서 12시간 반응시킨 후 avidin biotin complex(ABC;

Vector LAB, USA)에 1시간 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB; Sigma, USA)과 0.01% H2O2가 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH7.4)에서 발색시킨 후 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

7. 피부 표피미세구조 표본제작

피부절편을 1/2 Karnovsky 용액에 선 고정된 다음 1% OsO4 용액에 후고정하였다. Uranyl acetate에 90분동안 염색한 후 통상적인 방법에 의해 epon 812에 포매하였다. 조직절편은 ultramicrotome(LKB, Nova)으로 1µm 두께로 절편을 제작한 다음 toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

8. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과의 통계와 유의성

Table. 2. The ear swelling inhibition of Yunkyopaedosangamibang(YPGM) extract in allergic contact dermatitis elicited mice. After allergic contact dermatitis, the mean of ear swelling began to increase at hour 24 and reach a peak at hour 48. The ear swelling in mouse administered with YPGM extract noticeably decreased than DNCB treated group for experimental period and this inhibition had probability in $P < 0.05$ of student T test.

group	Initiation	24	48	72 hrs
CONTROL	354 ± 5	358 ± 5	359 ± 3	355 ± 6
DNCB	356 ± 5	400 ± 7	418 ± 10	406 ± 6
YPGM	355 ± 6	378 ± 5*	380 ± 14*	373 ± 5*

Abbreviation) M ± S.D : Mean ± Standard Deviation, CONTROL : Only acetone & olive treated group, DNCB : allergic contact dermatitis elicited group, YPGM : Yunkyopaedosangamibang extracts administered group after allergic contact dermatitis elicitation., * : $P < 0.05$ compared with DNCB.

검정은 Sigma Plot program 4.0(Sigma, USA)에 의해서 처리되었다.

Ⅲ. 實驗結果

1. Contact hypersensitivity assay

Acetone & Olive 용액을 도포한 대조군에서는 실험기간 동안 오른쪽 귀두께 변화가 나타나지 않은 반면 DNCB군과 YPGM군은 대조군에 비해 유의성있는 증가를 보였다 (Table. 2.). 우선 DNCB군에서 일어난 ear swelling 변화를 살펴보면, 알리지성 접촉피부염 유발 후 24시간이 경과했을 때 오른쪽 귀의 두께는 $400 \pm 7 \mu\text{m}$ 로 대조군의 $358 \pm 5 \mu\text{m}$ 에 비해 증가된 양상으로 관찰되었고, 48시간이 되었을 때 가장 큰 증가인 $418 \pm 10 \mu\text{m}$ 으로 측정되었다. 이런 증가는 72시간이 되었을 때에는 오히려 $406 \pm 6 \mu\text{m}$ 으로 약간 감소되는 경향성을 보였으나, 여전히 대조군에 비해서는 월등히 증가된 값이다. 한편 連翹敗毒散

加味方抽出物を 투여한 YPGM군도 전 실험기간동안 대조군에 비해서는 ear swelling이 증가된 것으로 나타났다. 그러나 YPGM군의 증가는 DNCB군에 비해서는 감소된 것으로 나타났으며, 이러한 유의성 있는 감소경향은 전 실험기간 동안 지속되었다. 알리지성 접촉피부염 유발 후 YPGM군의 ear swelling 값의 변화는 24시간에는 $378 \pm 5 \mu\text{m}$, 48시간에는 $380 \pm 14 \mu\text{m}$ 그리고 72시간에는 $373 \pm 5 \mu\text{m}$ 로 측정되었다.

2. 피부의 외형적 형태 변화

대조군에서는 정상적인 피부 상태가 실험기간동안 유지되었다. 그러나 DNCB군과 YPGM군은 다른 양상으로 관찰되었다. 우선 DNCB군에서 알리지성 접촉피부염 유발 후 24시간이 경과되었을 때 붉은 좁쌀 형태의 erythematous papule가 일부 DNCB 도포부위에서 나타나는 피부손상이 시작되었으며, 48시간이 경과되었을 때는 그 생성부위가 확

Table. 3. The change of skin-damage on YPGM extarct administered mice after allergic contact dermatitis elicitation. After allergic contact dermatitis elicitation, the degree of erythema began to increase and reach a peak at hour-48. The degree of erythema in mice treated with YPGM extract noticeably softer than DNCB treated group for experimental period.

group	Initiation	24	48	72 hrs
CONTROL	-	-	-	-
DNCB	-	+	+++	++
YPGM	-	+	++	+

Abbreviation) - : negative, + : trace, ++ : moderate, +++ : strong

산된 모양으로 관찰되었다. 그러나 이러한 외형적 피부손상은 시간이 경과되어 72시간이 되었을 때 48시간보다는 약화되는 것으로 나타났다. 한편 YPGM군에서 나타난 외형적 피부손상 변화는 DNCB군과 유사한 경향으로 나타났으나 YPGM군의 피부손상 정도는 DNCB 처리군보다는 완화된 것으로 관찰되었다.

3. 피부 조직의 일반적인 형태 변화

대조군은 실험기간동안 피부 조직의 형태 변화가 관찰되지 않았다. 이에 반해 DNCB군과 YPGM군은 대조군과는 달리 알러지성 접촉피부염 유발 후 시간의 경과에 따른 피부손상의 차이가 관찰되었다. 알러지성 접촉피부염 유발 후 DNCB군의 피부조직에서 나타나는 변화는 48시간에서 가장 심한 것으로 관찰되었다. 이러한 변화는 우선 표피에서 각질형성세포(keratinocyte)의 과형성(hyperplasia)으로 인한 피부 상피층수의 급격한 증가(Fig. 1.), 기저층의 원주상피세포와 기저판의 결합이 파괴된 공간으로 침윤(infiltration)하는 림프구의 증가가 확인되었다(Fig. 3.). 또한 가시층과 기저층사이에서 핵의 수

축으로 인한 핵막과 세포질사이공간의 확장된 상피세포의 증가와 세포사이공간(intercellular space)의 확장이 관찰되었다(Fig. 4., 5.). 한편 표피쪽 진피에서는 염증관여세포의 DNCB 도포부위로의 이주(migration) 증가와 혈관 신생성 증가가 관찰되었다(Fig. 1.). 이러한 변화는 72시간이 되었을때는 완화된 것으로 관찰되었다. 한편 YPGM군에서의 형태변화도 DNCB군과 유사한 경향성을 보였으나, 전반적으로 DNCB에 의한 알러지성 접촉 피부염이 약화된 양상으로 나타났다. 특히 이러한 피부 조직 손상의 완화는 48시간의 피부상피에서 잘 나타났는데 DNCB군보다 표피세포의 과형성 감소, 침윤하는 림프구의 수의 감소, 표피 원주상피세포 손상감소 그리고 세포사이공간의 회복 등이 관찰되었다(Fig. 6., 7.). 또한 진피에서 염증관여세포의 침윤 감소와 혈관 신생성 감소가 확인되었다(Fig. 6.)

4. 피부 비만세포의 관찰

1) 비만세포 형태와 분포변화

염증반응에서 관여하는 비만세포(mast cell)의 분포변화는 비만세포내에 함유되어

Table. 4. The differentiation of mast cell in murine abdominal skin for granule deposited type at hour-48 after allergic contact dermatitis elicitation. The number of degranulated mast cell in DNCB group was significantly increased in both position type than control group. But the number of degranulated mast cell in YPGM group was less than DNCB group.

group	position	granule deposited type		total
		granulation	degranulation	
CONTROL	dermis	26±2	8±1	34±2
	hyperdermis	32±2	7±2	39±4
DNCB	dermis	32±2	53±7	84±7
	hyperdermis	41±4	31±6	73±6
YPGM	dermis	34±2	38±4*	72±2*
	hyperdermis	39±5	23±4*	62±4*

있는 histamine, heparin 그리고 serotonin 등의 sulfated mucopolysaccharide를 Luna's method로 염색한 후 관찰하였다. 먼저 대조군에서는 정상적인 피부에서처럼 소량의 비만세포가 분포하였으며, 관찰되는 비만세포의 형태는 세포질함유물을 제대로 함유하고 있는 방추사모양의 granulated type 이었다(table. 4.). 대조군에서의 이러한 분포양상은 실험기간동안 계속되었다. 그러나 DNCB군과 YPGM군에서는 대조군과는 다른 비만세포의 분포와 형태로 관찰되었다. DNCB군에서의 비만세포의 분포는 알러지성 접촉피부염 유발 후 서서히 증가하였으며, 이러한 증가는 48시간이 되었을 때 최고에 이르렀다(Fig. 8.). 48시간의 DNCB군에서 주로 관찰되는 비만세포의 형태는 세포내 함유물이 이미 분비되어 세포질에는 일부 mucopolysaccharide granule만이 남아있는 degranulated type 이었다(Fig. 10., table. 4.). 그러나 YPGM군에서 분포하는 비만세포의 수는 DNCB군에서처럼 대조군에 비해 증가하였지만(Fig.9., Table. 4.), degranulated type의 비만세포의 출현은 DNCB군에 비해 적었다(Fig: 9., 11., table. 4.).

2) 비만세포내 serotonin의 변화

비만세포내에서 serotonin 변화는 면역조

직화학적인 염색을 한 후 관찰되었는데, 대조군에서는 낮은 반응성으로 일부 비만세포에서 나타났고, 이런 경향은 실험기간동안 유지되는 것으로 관찰되었다(Fig. 12.). 그러나 DNCB군과 YPGM군에서는 시간의 경과에 따라 대조군과는 다른 반응성의 차이와 반응세포수의 변화가 관찰되었다. DNCB군에서 나타나는 serotonin양성반응 비만세포의 수는 대조군에 비해 증가된 것으로 나타났으며, 그 수가 48시간에서 최고인 것으로 나타났다. 양성반응을 보인 비만세포 대부분의 반응성은 아주 낮은 것으로 관찰되었고(Fig. 13.) 이런 반응성이 낮은 세포들은 주로 표피쪽 진피에서 잘 나타났다. 한편 YPGM군의 양성반응 비만세포의 수도 DNCB군과 마찬가지로 대조군에 비해 증가한 것으로 나타났지만, 약한 양성 반응성을 보인 DNCB군과는 달리 강한 양성 반응을 보이는 것으로 관찰되었다(Fig. 14.).

IV. 考察

알러지성 접촉피부염(Allergic contact dermatitis)은 생활양식의 변화와 산업의 급속한 발달로 생성된 다양한 항원(allogens)들

이 신체에 노출됨으로서 야기되는 피부염(eczema)으로, 그 발병이 점차 증가되는 추세를 보이고 있다. 이러한 알러지성 접촉피부염의 발병은 먼저 특정 항원에 대한 노출, 즉 감작(sensitization) 과정을 거쳐야 한다. 피부내의 항원제공세포인 랑게르한스(CD1a+ DR+ Langerhans cell)에서 내재화(internalization) 과정을 거친(Becker 등(1994), Becker 등(1992a), Becker 등(1992b)) 특정 외부 항원-low molecular weight, high reaction, lipid-soluble hapten과 epidermal carrier protein의 conjugator(Boerrigter 등(1985), Jo와 Houh(1985), Rees 등(1990))은 항원노출주변의 림프절(regional lymph node)의 결피질(paracortex)에서 CD4+ T lymphocytes(helper T lymphocytes)의 T cell receptor(TCR)에 의해 인식된다고 Kinnaird 등(1989)와 Cumberbatch와 Kimber(1990)은 보고하였다. 외부항원을 인식한 후 도움 T 림프구는 autocrine인 interleukin 2 (IL-2) 분비(Minami 등(1993)와 Smith(198))에 의해 면역활성된 CD8+ - 세포독성 T 림프구 / 억제 T 림프구(cytotoxic T lymphocytes/suppressor T lymphocytes), 항원 특이성 기억 T 림프구(TCR+ CD4+ IL-2R+ DR+ T lymphocyte)는 혈관계를 통해 항원 노출지역으로 이동(homing)하여 세포성 면역반응에 의해 haptenized epidermal cell을 파괴시킨다고 Baadsgaard와 Timothy(1991)이 보고하였다. 이상의 감작과정은 반응지체에 의해 지연형 과민반응(delayed type hypersensitivity)이라고도 한다. 이미 감작된 특정 외부항원에 재노출되었을 때 알러지성 접촉피부염은 유발(elicitation) 되는데, 피부에 산재해 있던 기억 T 림프구가 CD1a+ DR+ 랑게르한스 세포와 CD1a- DR+ non-랑게르한스 세포에 의해 항원제공을 받게되므로써 피부에서 급성 접촉피부염(acute contact dermatitis)이 일어

난다. 이때 알러지성 접촉피부염의 유발에 관여하는 cytokine은 첫째, interleukin 1(IL-1)으로 이는 각질형성세포, 랑게르한스 세포, 대식세포 등에서 분비되어 각질형성세포의 성장을 자극하여 상피과형성(epidermal hyperplasia)과 granulocytes macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)의 분비를 촉진하거나, 랑게르한스세포수를 증가시키며(Dustin 등(1986)과 Raz 등(1988)) 둘째, IL-2로 도움 T 림프구에서 분비되어 T 림프구의 활성화 및 증식을 일으키고(Minami 등(1993), Smith(1988), Baadsgaard와 Timothy(1991)) 셋째, IL-3로 각질형성세포에서 분비되어 비만세포의 증식, 단핵구세포(monocytes)의 활성화 증식 그리고 각질세포의 증식이 유도된다(Danner와 Luger(1987)). 또한 이외에도 Interferon γ (INF- γ)에 의한 각질형성세포와 진피 혈관내피세포에서의 ICAM-1의 발현이 증가(Wedi 등(1986)), 비만세포에서 분비한 histamine에 의한 potent vasoconstriction과 plateletactivating factor(PAF)에 의한 leukocyte 이동의 촉진(Holliday 등(1993), Rachel 등(1989)) 등이 보고되었다.

알러지성 접촉피부염의 치료제로는 부신피질 호르몬제나 anti-histamine제가 광범위하게 이용되고 있으나 부신피질 호르몬제는 급성부신피기능부전증, 장기투여시 세균감염 감수성의 증가, 소화장애, 골다공증, 백내장 등의 부작용을 일으키며, anti-histamine제는 염증완화 작용은 뛰어나지만 일시적인 진정작용만 하므로 근본적인 치료제로는 부적합하다. 또한 근래 들어서는 알러지성 접촉피부염이 과민한 세포성 면역에 의한다는 점을 착안하여 면역억제약물인 cyclosporin A와 FK506을 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.

韓醫學에서 諸般 皮膚病의 治法으로 祛風, 清熱, 涼血, 解毒, 利濕, 瀉火 등이 應用되고 있으며(오(1980), 진(1983)), 그 중에 清熱解毒의 代表的인 處方이 連翹敗毒散이다. 連翹敗毒散은 疔癰독산에 金銀花와 連翹를 加味한 處方으로 癰疽 初期 및 諸瘡 등을 치료한다. 本方에 加味한 蟬退는 解表透疹의 效能이 있어 風疹搔痒症을 止痒하는 作用이 있다고 제와 맹(1984)와 제(1989)가 보고하였다. 劉(1990)에 의하면 韓藥物中에 祛風除濕劑, 清熱解毒劑, 活血化癆劑 등이 免疫抑制劑의 作用을 하며 특히 過敏性 皮膚炎에 荊防敗毒散加 薄荷, 金銀花, 連翹, 黃芩之類의 處方을 써서 免疫過敏反應 抑制效果를 한다고 했다. 따라서 이러한 점을 착안하여 連翹敗毒散加味方이 免疫抑制效果를 통해 알러지성 접촉피부염시 발생하는 과도한 피부손상을 완화시킬 수 있을 것으로 생각되어 본 연구에 응용하였다.

본 실험은 DNCB에 의해 인위적인 접촉피부염을 유발한 후 생쥐 오른쪽 귀피부의 swelling 정도를 측정하는 contact hypersensitivity assay를 실시하였는데, 별 다른 변화가 없는 대조군과는 달리 DNCB군에서는 swelling정도가 점점 증가하여 48시간에 가장 높게 측정되었다. 이에 반해 YPGM군에서는 DNCB군에 비하여 유의성있는 감소경향이 나타났다. 따라서 連翹敗毒散加味方은 피부염에서 관찰되는 피부의 염증성 부종을 완화시켜주는 작용을 하는 것으로 사료된다. 피부 외부형태변화를 관찰한 바 DNCB군에서는 알러지성 접촉피부염 유발 24시간 후 붉은 좁쌀모양의 erythematous papule가 나타나기 시작하여 48시간에 손상정도가 가장 심하였다. YPGM군에서는 전반적으로 DNCB군보다 피부염상태가 다소 완화된 것으로 관찰되었다. 알러지성 접촉피부염 유발

후 나타나는 피부조직에서의 일반적인 변화는 진피에서 림프구의 침윤의 증가, 혈관 생성과 직경 증가와 표피로의 림프구 침윤 증가가 일어났으며 이는 R. Viraben 들(1990), Richard(1991) 그리고 Veronique 들(1995) 등의 보고와 일치한다. YPGM군은 DNCB군에 비해 진피에서 림프구의 침윤 감소, 혈관 생성과 직경 감소, 표피로의 림프구 침윤 감소가 일어나는 것으로 관찰되었다. 이는 連翹敗毒散加味方이 알러지성 접촉피부염의 일반적인 조직병태를 회복시키는 것으로 사료된다. 또한 semithin section한 DNCB군에서는 표피세포의 세포질내 액포화의 증가와 세포사이공간이 확장되는 표피세포 손상이 관찰되었다. 그러나 YPGM군에서는 표피세포의 손상이 DNCB군에서보다는 감소된 것으로 나타나, 連翹敗毒散加味方이 염증시 나타나는 표피세포의 손상회복에 효과가 있는 것으로 사료된다. 알러지성 접촉피부염은 비만세포에서 염증관여물질이 분비되어, 림프구를 비롯한 염증관여세포의 혈관투과성을 증가시켜 발생하는 것으로 Gregory와 Arthur(1993)과 Holliday 들(1993) 등이 보고하였다. 한편, 본 실험의 DNCB군에서는 비만세포의 수가 증가되었으며, 비만세포의 형태는 histamin, serotonin, heparin 등의 물질을 분비한 degranulated type으로 나타났다. DNCB군의 이러한 변화에 비해 YPGM군에서는 비만세포의 수는 증가하였으나 대부분의 비만세포가 granulated type의 세포형태를 취하고 있었다. 이는 連翹敗毒散加味方이 비만세포에서 분비되는 serotonin을 비롯한 염증관여물질의 분비를 억제시킴으로서 항염증작용을 하는 것으로 생각된다.

이상에서 세포성 면역과민반응인 알러지성 접촉피부염에 連翹敗毒散加味方을 투여하여 피부손상의 완화를 형태학적 측면에서 조사한 바, 連翹敗毒散加味方이 DNCB로 유발된 생쥐의 알러지성 접촉피부염을 회복시

키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 본 실험 결과를 토대로 連翹敗毒散加味方이 알러지성 접촉피부염 치료에 광범위하게 이용될 수 있고, 기존의 치료제보다 더 뛰어난 치료효과와 부작용이 없는 안전성이 확보된 치료제로 개발하기 위해서는 치료기전을 중심으로하는 지속적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

V. 參考文獻

- 康晰榮 : 알레르기疾患의 診斷과 治療, 서울, 一潮閣, pp.253-254, 1993.
- 康舜洙, 盧昇鉉, 李尙仁 : 方劑學, 서울, 癸丑文化社, pp.67-68, 1984.
- 蔡仁植, 孟華燮譯 : 國譯醫方集解, 서울, 大成文化社, pp.139,142, 1984.
- 蔡炳允 : 韓方外科學, 서울, 高文社, pp.268, 288,292,306,311,312, 1989.
- 金中鎬 : 消風散과 加味消風散이 免疫反應 및 알레르기에 미치는 影響, 大韓韓方外官科學會誌, 第4卷(1), pp.1-22, 1991.
- 양준모 : 접촉피부염의 역학적연구, 대한피부과학회지, 제21권(2), pp.165-169, 1983.
- 俞太燮 : 荊芥連翹湯이 抗알레르기作用에 관한 實驗的 效果, 大韓韓方小兒科學會誌, 第4卷(1) pp.20-29, 1990.
- 李東炫 : 防風通聖散 및 防風通聖散加味方이 抗알레르기와 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙大學校大學院 博士學位論文, 1990.
- 李漢求 : 敗毒散에 대한 文獻的 考察, 大韓韓醫學會誌, 第8卷(1) pp79-81, 1987.
- 蔡炳允 : 알레르기에 대한 考察, 慶熙醫學誌, 第12卷(2), pp.128-129, 1996.
- 蔡炳允 : 接觸性皮膚炎에 관한 考察, 大韓韓方外官科學會誌, 第1卷(1) pp.91-92, 1988.
- 吳 崐 : 醫方考, 北京, 人民衛生出版社, p.115, 1990.
- 吳克潛 : 古今醫方集成, 서울, 翰成社, p.73, 1980.
- 陳實功 : 外科正宗, 北京, 人民衛生出版社, p.259, 1983.
- 中島一 : 皮膚科 韓方治療, 서울, 一中社, pp.35,39, 1991.
- A. I. Lauerma, B. D. Stein, B. Homey, C. H. Lee, E. Bloom, and H. I. Maibach : Topical FK506: suppression of allergic and irritant contact dermatitis in the guinea pig. Arch. Dermatol. Res. 286: 337-340, 1994.
- A. Kinnaird, S. W. Peters, J. R. Foster, and I. Kimber : Dendritic Cell Accumulation in Draining Lymph Nodes during the Induction Phases of Contact Allergy in Mice. Int Arch Allergy Appl Immunol. 89: 202-210, 1989.
- B. Wedi, J. Elsner, W. Czech, J. H. Butterfield, and A. Kapp : Modulation of intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1) expression on the human mast-cell line(HMC)-1 by inflammatory mediators. Allergy. 51: 676-684, 1996.
- Danner M. and Luger T. A. : Human keratinocytes and epidermoid carcinoma cell lines produce a cytokine with interleukin 3-like activity. J. Invest. Dermatol. 88: 353-361, 1987.
- Detlef Becker, Gerhard Kolde, Konrad Reske, and Juren Knop: An in vitro test for endocytotic activation of murine epidermal Langerhans cells under the influence of allergens. J. Immuno. methods. 169: 195-204, 1994.

- Detlef Beckera, Mansour Mohamadzaeh, Konrad Reske, and Jurgen Knop: Increased Level of Intracellular MHC Class II Molecules in Murine Langerhans Cells Following In Vivo and In Vitro Administration of Contact Allergens. *J. Invest. Dermatol.* 99: 545-549. 1992.
- Detlef Beckerb, Ursula Neib, Sabine Neis, Konrad Reske, and Jurgen Knop: Contact Allergens Modulate the Expression of MHC Class II Molecules on Murine Epidermal Langerhans Cells by Endocytotic Mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* 98: 700-705. 1992.
- Dustin M. L., Rothlein R., and Bahn A. K.: Induction by IL-1 and interferon: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule(ICAM-1). *J. Immunol.* 137: 245-254. 1986.
- G. H. Boerrigter, H. Bril, and R. J. Scheper: Hapten-specific antibodies in allergic contact dermatitis in the guinea pig. *Int. Archs Allergy. appl. immun.* 85: 385-391. 1985.
- Ik Jo and Won Houh: Cyclosporin modulates DNCB contact hypersensitivity reaction in guinea pigs. *Korea J. Dermatol.* 23(2): 204-207. 1985.
- J. L. Rees, P. S. Friedmann, and J. N. S. Matthews: The influence of area of application on sensitization by dinitrochlorobenzene. *British Joun. Dermatol.* 122: 29-31. 1990.
- K. Gregory Moore and Arthur M. Dannenberg: Immediate and Delayed (Late phase) Dermal Contact Sensitivity Reactions in Guinea Pigs. Passive Transfer by IgG1 Antibodies, Initiation by Mast Cell Degranulation, and Suppression by Soybean Proteinase Inhibitor. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 101: 72-81. 1993.
- M. Cumberbatch and I. Kimber: Phenotypic characteristics of antigen-bearing cells in the draining lymph nodes of contact sensitized mice. *Immunology.* 71: 404-410. 1990.
- M. R. Holliday, R. J. Dearman, I. Kimber and J. W. Coleman: Sensitization of mice to chemical allergens modulates the responsiveness of isolated mast cells to IgE-dependent activation. *Immunology.* 78: 508-510. 1993.
- Minami Y., Kono T., Miyazaki T., and Taniguchi T.: The IL-2 receptor complex: Its structure, function and target genes. *Ann. Rev. Immunol.* 11: 245-265. 1993.
- Ole Baadsgaard and Timothy Wang, B. S.: Immune Regulation in Allergic and Irritant Skin Reactions. *Int. J. Dermatol.* 30(3): 161-172. 1991.
- P. Torres, F. Guerra, A. Aenas, R. Miguel, C. Moreno, J. C. Daza, M. Santamaria, and P. Sanchez Guijo: Humoral and Cellular Immunity in Different Phases of Contact Dermatitis. *Am. J. Contact Dermatitis.* 2(3): 187-191. 1991.
- R. Viraben, J. L. Labrousse, and J. Bazex: Erythema multiforme due

to DNCB. Contact Dermatitis. 22: 179-191, 1990.

Rachel E. L., Marion B., Diana W., and George F. M. : Intercellular adhesion molecule expression in the evolving human cutaneous delayed hypersensitivity reaction. *J. Invest. Dermatol.* 93: 672-677, 1989.

Raz A., Wyche A., and Siegel N. : Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. *J. Biol. Chem.* 263: 3022-3028, 1988.

Richard S. Kalish : Recent Developments in the Pathogenesis of Allergic Contact Dermatitis. *Arch. Dermatol.* 127: 1558-1563, 1991.

Smith K. L. : Interleukin-2: inception, impact and implications. *Science.* 240: 1169-1178, 1988.

Steven E. Macatonia, Stella C. Knight, Andrew J. Edwards, Stephen Griffiths, and Patricia Fryer : Localization of antigen of lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate functional and morphological studies. *J. Exp. Med.* 166: 1654-1667, 1987

Veronique Galliaerde, Cyril Desvignes, Eric Peyron, and Dominique Kaiserial : Oral tolerance to haptens: intestinal epithelial cells from 2,4-dinitrochlorobenzene-fed mice inhibit hepten-specific T cell activation in vitro. *Eur. J. Immunol.* 25: 1385-1390, 1995.

Legens for figure

Fig. 1. The abdominal skin in mouse

at hour-48 after allergic contact dermatitis elicitation. The hyperplasia of epidermal cell and increase of angiogenesis were shown in allergic contact dermatitis elicited region and infiltration of inflammatory component cell were increased. H & E. $\times 200$

Fig. 2. The abdominal skin in YPGM administered mouse at hour-48 after allergic contact dermatitis elicitation. The hyperplasia of epidermal cell and angiogenesis were decreased than DNCB group and infiltration of inflammatory component cell were diminished. H & E. $\times 200$

Fig. 3. The insertion of T lymphocytes to epidermis of murine skin at hour-48 after allergic contact dermatitis elicitation. H & E. $\times 400$

Fig. 4. The vacuolation of epithelial cell in stratum basalis of mouse at hour-48 after allergic contact dermatitis elicitation. semithin-section. Toluidine blue. $\times 1000$

Fig. 5. The enlargement of intercellular space in stratum spinosum of mouse at hour-48 after allergic contact dermatitis elicitation. semithin-section. Toluidine blue. $\times 1000$

Fig. 6. The softened insertion of T lymphocytes in YPGM administered murine skin at hour-48 after allergic contact dermatitis elicitation. H & E. $\times 400$

Fig. 7. The epithelial cell in stratum basalis of mouse at hour-48 after allergic contact dermatitis elicitation with daily YPGM treatment.

Toluidine blue.×1000

Fig. 8. The distribution of mast cell in mouse at hour-48 after allergic contact dermatitis elicitation. The number of mast cell was increased and shown as degranulated type. Luna's method.×400

Fig. 9. The distribution of mast cell in mouse at hour-48 after allergic contact dermatitis elicitation with daily YPGM treatment. The number of mast cell was increased, but shown as granulated type. Luna's method.×400

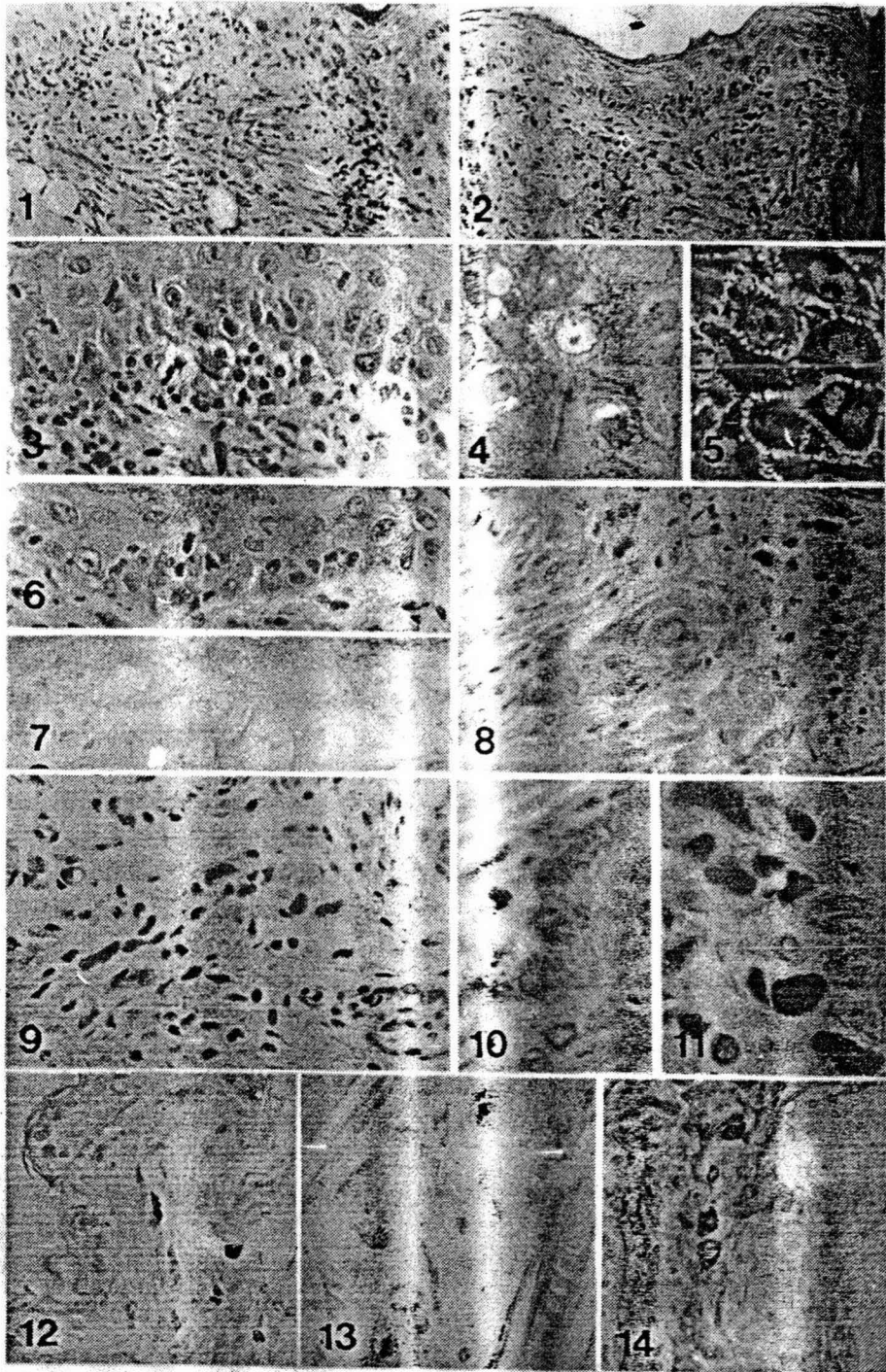
Fig. 10. The degranulated type of mast cell. Luna's method.×1000

Fig. 11. The granulated type of mast cell. Luna's method.×1000

Fig. 12. The serotonin of mast cell in mouse at hour-48 after only acetone & Olive oil treatment. immunostain.×400

Fig. 13. The serotonin of mast cell in mouse at hour-48 after allergic contact dermatitis elicitation. immunostain.×400

Fig. 14. The serotonin of mast cell in mouse at hour-48 after allergic contact dermatitis elicitation with daily YPGM treatment. immunostain×400



=Abstract=

The Effect of Yunkyopaedosangamibang on Allergic Contact Dermatitis

: Based on the mitigation of skin damage and distributive change of mast cell on DNCB re-exposure region of Mice

Oh-Sung Kwon · Jin-Tack Kim¹⁾ · In-Sick Park¹⁾ · Sang-Hyun Ahn¹⁾,
Hai-Poong Lee²⁾ · Ho-Hyun Kim³⁾ · Yun-Ho Gang

*Dept. Internal Medicine, ¹⁾Dept. of Anatomy, Oriental Medical College,
²⁾Dept. of Applied Biology, College of Life Resource, Dongguk University,
³⁾Dept. of Physiology, Oriental Medical College, Semyung University*

After allergic contact dermatitis elicited by Dinitrochlorobenzene(DNCB) treatment, ICR female mice administered Yunkyopaedocksangamibang(YPGM) extract were observed to investigate the effect of YPGM on allergic contact dermatitis. This study investigated that contact hypersensitivity assay, abdominal skin morphologic changes including mast cells. At contact hypersensitivity assay, the right ear swelling in YPGM group were probability decreased than DNCB group. At observation of abdominal skin morphologic change, the infiltration of lymphocyte, lymphocyte insertion to epithelium, enlarged capillary, angiogenesis, and damages of epithelium as cytoplasmic vacuolation and enlarge of inter cellular space in YPGM were diminished than DNCB group. The number of mast cell was increased both DNCB and YPGM group. The shape of mast cell in DNCB group was mainly appeared degranulated type, but granulated type in YPGM group. The number of serotonin positive cell was increased both DNCB and YPGM group. The shape of serotonin positive cell in DNCB group was mainly appeared degranulated type, but granulated type in YPGM group. As results indicated that the YPGM extract administration work on the mitigation of skin damages in mouse with allergic contact dermatitis.

Key Word : Allergic contact dermatitis, Yunkyopaedosangamibang, DNCB, Skin, Mast cell