

원 저

柴胡清肝散 투여가 아토피 피부염을 유발한 동물모델의 각질층 기능회복에 미치는 영향

박민철, 최인화

동국대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

The Efficacy of *Sihocheonggan-san* (*Chaihuqinggan-san*) Extract to Improve the Function of Stratum Corneum on Mice Model after Atopic Dermatitis Elicitation.

Min-Chul Park, In-Hwa Choi

Department of Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, College of Oriental Medicine, DongGuk University

Objectives : To study change of external dermal formation, change of leukocytes in vasculature, change of lipid formation in stratum corneum and distribution of ceramide through administering *Sihocheonggan-san* (SC) extract on to the control (CON). This study was done through forcing injury to mice's back skin which have lipid protection formation in stratum corneum.

Materials and Methods : The CON to which damage was caused intentionally using the external application on the mice's back skin used the SC. The change of leukocytes in vasculature were identified through optima 5.2 and Student's t-test and the results were made into a dermal formation graph.

Results : After dispensing SC extract into the CON, dermal injury was decreased. Especially, recover of lipid protection formation, which includes lipid and ceramide in stratum corneum suppressing acute inflammation that some factors are PKC, TNF- α , IL-12B which controlled the secretion of relating inflammatory cytokine, also went onto decrease of angiogenesis, and a decrease of degranulated mast cells was noted. In addition, the decrease of epithelial injury also caused the growth of cells to decrease in stratum basale and cytoclasis. In the vasculature, the leukocytes were also decreased and it could relate to decrease in CON.

Conclusions : SC has effect on CON suppressing the dermal injury through recovering of lipid protection formation in stratum corneum.

Key Words: atopic dermatitis, *Sihocheonggan-san*, lipid protection, ceramide

서 론

아토피 피부염은 홍반, 부종, 심한 소양증, 삼출, 부스럼딱지와 인설을 특징으로 하는 염증성 피부질환이다¹⁾. 아토피 피부염의 원인에 대해서는 여러 가설이 제시되어 있으나 확실한 원인은 밝혀지지 않고 있으며 유전학적·면역학적 요인, 이상 약물반응, 환경요인, 미생물 등이 관여할 것이라 보고 있다¹⁻³⁾. 이

· 접수 : 2004년 7월 26일 · 논문심사 : 2004년 8월 13일
· 채택 : 2004년 8월 23일
· 교신저자 : 박민철. 서울시 성동구 성수2가 3동 289-262 2층 동서한의원
(Tel: 02-463-3370, E-mail: hanbangskin@empal.com)

질환은 부종이나 삼출, 부스럼딱지 등이 증상으로 나타나지만 처음에는 소양증이 특징이고⁴⁾ 삼출, 부스럼 딱지 등은 소양증으로 인해 얼굴을 비비고 긁는 행위에 의해 외상으로 수포와 딱지가 생기는 것으로 이는 2차적인 속발진의 증상이라고 할 수 있다. 또한 질환이 진행됨에 따라서 피부건조 등이 특징적으로 나타난다.

소양증과 피부건조증은 아토피 피부염의 주증상으로⁵⁾, 비정상적인 피부혈관 반응이나 면역학적 반응을 동반한다^{6,7)}. 특히 소양증은 아토피 피부염의 중요한 진단기준이 되며⁸⁾ 소양증 유발과정에 여러 가지 염증 유발인자 및 cytokine 등이 관여하는 것으로 생각된다⁹⁾. 한편 피부건조증은 만성화된 아토피 피부염 환자 대부분에서 관찰되며 특히 겨울철에 심하게 나타난다^{9,10)}.

아토피 피부염에 관한 최근 연구보고를 살펴보면 아토피 피부염 환자의 말초혈액에서 나타나는 IgE, ECP, 말초혈액 호산구 증가조건¹¹⁾, 아토피 피부염 환자에게 실시한 국소요법, 면역요법 등의 다양한 치료 후 효과에 대한 연구^{14,15)}, 환경인자의 영향에 관한 연구¹⁶⁾ 등이 있다. 한의학 연구에서는 한약의 복합처방을 이용한 아토피 피부염 치료에 관한 임상적 연구¹⁷⁾ 등과 같은 약물요법과 외치, 단식을 이용한 외래환자를 통한 아토피 피부염에 관한 임상적 연구^{20,22)} 등이 행해졌고 특히 이²³⁾는 生血潤膚飲加味方으로 각 질층기능회복에 대해 실험적으로 연구하여 유의성 있는 결과를 보고하였다.

한의학 문헌에서는 소양증을 火(熱)의 개념으로 보았다¹¹⁾. 또 피부건조증을 火와 血少에 의한 燥의 현상으로 인식하였다^{11,12)}. 이에 저자는 아토피 피부염의 주요 증상인 소양증과 피부건조증이 血虛(血少)와 火(熱)로 인해 유발되는 것에 착안하여 血虛와 火를 치료하는 처방 중 柴胡清肝散²⁴⁾의 한약추출물을 아토피 피부염이 유발된 동물모델에 투여하여 각질층내 지방구조와 ceramide 등에 미치는 영향을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물 및 재료

1) 동물

대한실험동물센터에서 분양받은 태령 4주된 BALB/c계 암컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 20g된 생쥐를 선별하여 사용하였다.

2) 약제

3) 柴胡清肝散 추출액의 제조

본 실험에서 사용된 柴胡清肝散(Sihocheonggansan : SC)은 동국대학교 경주 한방병원에서 구입하여 정성하여 사용하였다(Table 1). 柴胡清肝散 2첩 분량을 증류수 500ml에 넣고 3시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator로 50ml 농축하여 추출하였다.

2. 방법

1) 분류

정상군(normal group), 아토피 유발 대조군(control group), 아토피 피부염 유발 후 柴胡清肝散 추출액 투여군(실험군, experimental group)으로 나누었으며 각 군에 10마리씩 배정하였다.

2) 병태유발

아토피 피부염은 Christophers E. and Mrowietz 과

Table 1. The Amount and Composition of Sihocheonggansan(SC)

韓藥名	生藥名	重量
當歸	ANGELICAE GIGANTIS RADIX	6g
川芎	CNIDII RHIZOMA	6g
芍藥	PAEONIAE RADIX ALBA	6g
地黃	REHMANNIAE RADIX PREPARAT	6g
黃蓮	COPTIDIS RHIZOMA	6g
黃芩	SCUTELLARIAE RADIX	6g
黃柏	PHELLODENDRI CORTEX	6g
梔子	GARDENIAE FRUCTUS	6g
連翹	FORSYTHIAE FRUCTUS	6g
甘草	GLYCYRRHIZAE RADIX	6g
桔梗	PLATYCODI RADIX	6g
牛蒡子	ARCTII FRUCTUS	6g
天花粉	TRICHOSANTHIS RADIX	6g
薄荷葉	MENTHAE HERBA	6g
柴胡	BUPLEURI RADIX	8g
	總量	92g

Minehiro 들의 방법^{45,51)} 을 병합·사용하여 유발하였다. 우선 생쥐의 등쪽 피부를 면도한 다음 cellophane tape (3M, USA) 10회 첩포를 통해 각질층의 최상부를 제거하였다. 그런 다음 70% ethyl alcohol로 소독하고 계면활성제의 하나인 5% sodium dodecyl sulfate (SDS : Sigma, USA) 1 ml 을 면봉으로 20회 문질러서 각질층의 lipid lamella를 제거하였다.

3) 柴胡清肝散 투여

아토피 피부염 유발 후 실험군에 매일 2.5 ml/kg /day로 경구 투여시켰다.

4) 측정

(1) 혈액내 산호성 백혈구(eosinophil) 변화

아토피 질환의 대표적 지표인 산호성 백혈구의 혈액내 빈도 변화를 조사하기 위해 우선 심장천자로 채혈한 후, Hinkelmann 용액에 희석한 다음 Neubauer 계산판(Superior, Germany)으로 계수하였다.

(2) 피부 조직표본 제작

아토피 피부염 유발 72시간 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 24시간동안 고정한 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5 μ m 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 Hematoxyline과 Eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다. 한편 지방과 ceramide 염색을 위한 냉동절편제작은 NBF에 고정한 후 10% formol-calcium에 1주일동안 oxidation 처리하였다. 30% sucrose 용액에 cryprotection 한 후 냉동절편기(Microm, Germany)로 10 μ m 두께의 냉동절편을 제작하였다. 각질층에서의 미세구조를 관찰하기 위해 절취된 피부 절편을 1/2 Karnovsky 용액에 신고정한 후 1% OsO₄ 용액에 후고정하였다. Uranyl acetate에 90분동안 염색한 후 통상적인 방법으로 epon에 포매하였다. ultramicrotome (LKB, Nova)으로 60-80nm 두께로 절편을 만든 다음 투과전자현미경(Hitach H-600)으로 관찰하였다.

(3) 각질층의 지질 보호장벽 변화

① 지방의 분포 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 10분간 염색하였다. 85% propylene glycol로 3분간 탈색한 후 증류수에 수세하고 nuclear fast red로 1분간 대조 염색하였다. 대조 염색 후 증류수로 3회 수세한 다음 glycerin jelly로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

② Ceramide 분포 변화 관찰

각질층내 지방중 26%을 차지하는 ceramide의 분포 변화를 조사하기위해 항 ceramide 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 냉동절편을 blocking serum인 10% normal goat serum(1:20, DAKO, Denmark)에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 면역반응을 억제하였다. 그리고 1차 항체인 mouse anti-mouse ceramine(1:10, Sigma, USA)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰으며, biotinylated goat anti-mouse IgG(DAKO)에 실온에서 10분간 link 하였다. Streptavidin peroxidase(DAKO)에 10분동안 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.

(4) 상피내 염증 변화

① 혈관 분포 변화 관찰

혈관 분포 변화를 조사하기 위해 혈관 관찰을 위한 Luna's method를 실시하였다. 피부조직을 hematoxylin-Biebrich scarlet 용액에 5분간 염색하고 0.5% lithium carbonate 용액에서 분별한 후 표피와 진피에서 나타나는 혈관분포의 변화를 광학현미경으로 관찰하였다.

② 비만세포의 분포 변화 관찰

염증반응에 관여하는 진피내 비만세포의 분포와 형태 변화를 조사하기 위해 비만세포 관찰을 위한 Luna's method를 실시하였다. 우선 5 μ m 두께의 연속절편을 aldehyde fuchsin에 30분간 염색한 후 Weigert's iron hematoxylin과 methyl orange 용액에 각각 1분, 5분 동안 대조 염색하였다.

③ 염증관련 Cytokine의 변화 관찰

상피내 염증에 관여하는 cytokine들 중 세포활성을 주도하는 protein kinase C (PKC), 염증관련 신호에 관여하는 nuclear factor (NF)- κ B p50, 염증 유발성 cytokine인 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 Interleukin-12(IL-12)의 분포 변화를 조사하기위해서 rabbit anti-mouse PKC(1:200, Santa Cruz Biotech, USA), rabbit anti-mouse NF- κ B p50(1:200, Santa Cruz Biotech, USA), rabbit anti-mouse TNF- α (1:200, Santa Cruz Biotech, USA) 그리고 rabbit anti-mouse IL-12 B(1:200, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였으며, 이후 과정은 위에 기술한 면역조직화학적 염색법과 동일하였다.

(5) 상피내 세포증식과 세포자기살해 변화

① 세포증식 변화 관찰

피부상피내 세포증식 변화를 조사하기위해 BrdU를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 실험동물에서 피부를 적출하기 5시간, 3시간 및 1시간전에 생리식염수에 녹인 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma) 50 mg/kg을 복강 주사 하였다. 얻어진 연속절편은 4℃와 37℃의 2N HCl용액에서 각각 20분씩 반응시켜 DNA-denaturation을 일으켰다. 0.1M borate 완충용액 처리로 안정시킨 후 비특이적 면역 반응을 억제하기위해 0.01%의 proteinase K(DAKO)가 포함된 normal goat serum에 1시간동안 반응시켰다. 그런 다음 1차 항체인 mouse anti-mouse BrdU(1:50, Amersham, UK)에 4℃ incubation chamber내에서 72시간 반응시켰고 이후 과정은 위에 기술한 면역조직화학적 염색법과 동일하였다.

② 세포자기살해 변화 관찰

Apoptotic 세포의 분포변화를 조사하기 위해 *in situ* apoptosis detection kit (Apoptag, Intergen, USA)를 이용한 TUNEL (terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labelling) 방법을 실시하였다. 먼저 조직 절편을 proteinase K에 5분간 proteolysis 시킨 다음 equilibration buffer에서 20초간 처리하였다. 그런 다음 strength TdT enzyme(36 μ l TdT enzyme : 72 μ l reaction buffer)을 처리하여 37℃의 humidified chamber

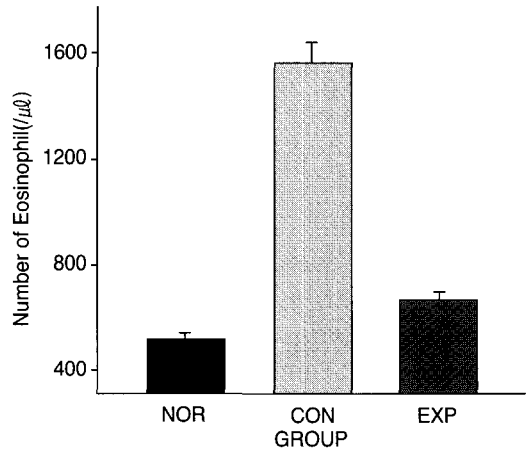


Fig. 1. The inhibition effect of eosinophil in SC treated murine at hour-72 after atopic dermatitis elicitation. control group, atopic dermatitis elicited mice; experimental group, SC extract administered mice after AD elicitation; *, $p < 0.05$

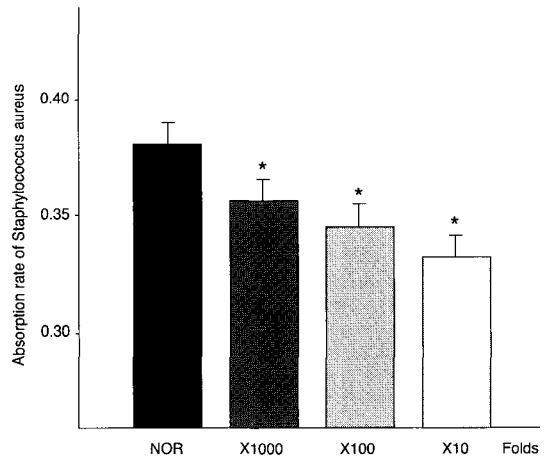


Fig. 2. The inhibition effect of proliferation in *Staphylococcus aureus* at hour-16 after SC extract treatment. NOR, no treated; X1000, 1000-folds dilution; X100, 100-folds dilution; X10, 10-folds dilution

에서 1시간 동안 반응시킨 후 strength stop/wash buffer에서 10분 동안 처리하였다. Anti-digoxigenin-peroxidase에 1시간 동안 반응시킨 후 DAB를 처리하였다. Hematoxylin으로 대조염색한 후 광학현미경으

로 관찰하였다.

(6) *Staphylococcus aureus*의 성장 변화

아토피 피부염에서 높은 감염률을 보이는 *Staphylococcus aureus*에 대한 柴胡清肝散의 성장 억제력을 조사하기 위해 *Staphylococcus aureus* KCTC 1928(LB medium, 24°C, 120 rpm)을 柴胡清肝散 추출액을 농도에 따라 처리한 다음 16시간 배양하여 배양액을 분광광도계(UV-160A UV-Vis spectrophotometer, Shimadzu Co., Japan)의 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 LB 한천배지에 도포시켜 16시간동안 성장시킨 *Staphylococcus aureus*의 colony 변화도 관찰하였다

(7) 영상분석과 통계처리

면역조직화학과 TUNEL 염색 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2(Optima Co, USA)를 이용한 영상분석을 실시하였다. 영상분석 결과는 Sigma Plot 2000 (Sigma, USA)을 통한 student t-test($p < 0.05$)로 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 외부형태 변화

대조군의 피부에서는 대부분의 지역에서 각질층이 손상된 습진 형태로 관찰되었다. 또한 가장자리지역에서는 탈락과정에 있는 혈병 조각이 나타났다(Fig. 3). 아토피 유발 피부를 절개하여 진피쪽 피부를 관찰한 결과 혈관의 직경과 가지수가 많아졌으며, 중심 지역은 누출된 혈액으로 검붉은색을 띠고 있었다(Fig. 4). 이에 반해 실험군은 일부 가장자리 지역을 제외하고는 정상적인 각질층의 분포를 유지하였다(Fig. 5). 또한 진피쪽 피부의 혈관 분포도 대조군에 비해 적었고, 누출된 혈액이 적어 혈관의 분포가 잘 확인되었다(Fig. 6).

2. 혈액내 산호성 백혈구 변화

본 실험 결과 513±15.4개/μl인 정상군에 비해 대조군은 205.4%나 증가한 1566±27.8개/μl로 측정되었으나 이에 반해 실험군에서는 662.5±18.8개/μl로 대조군에 비해 45% 감소되어 유의성이 관찰되었다

Table 2. The Image Analysis of Ceramide Distribution in SC Treated Murine Skin with AD.

(Image Analysis for 100,000 Particles / Range of Intensity : 80 - 140)

Antibody	Group		
	Normal ※	Control ※	Experimental ※
Ceramide	5439±148	646±12	4867±174*

Abbreviation : ※, Mean ± Standard Deviation; *, $p < 0.05$ compared with control group

Table 3. The Image Analysis of Immunohistochemistry for Inflammation Intricated Cytokine in SC Treated Murine Skin with AD.

(Image Analysis for 200,000 Particles / Range of Intensity : 80 - 140)

Antibody	Group		
	Normal ※	Control ※	Experimental ※
PKC	1357±26	8114±231	1817±97*
NF-κB p50	211±31	1248±139	768±57*
TNF-α	346±31	2438±191	420±24*
IL-12B	891±42	4270±211	1532±61*

Abbreviation as same as Table II

Table 4. The Image Analysis of Cell Proliferation and Apoptosis in SC Treated Murine Skin with AD

(Image Analysis for 200,000 Particles / Range of Intensity : 80 - 140)

Antibody	Group		
	Normal ※	Control ※	Experimental ※
BrdU	1047±74	3799±126	1887±87*
Apoptosis	861±32	11293±831	1631±84*

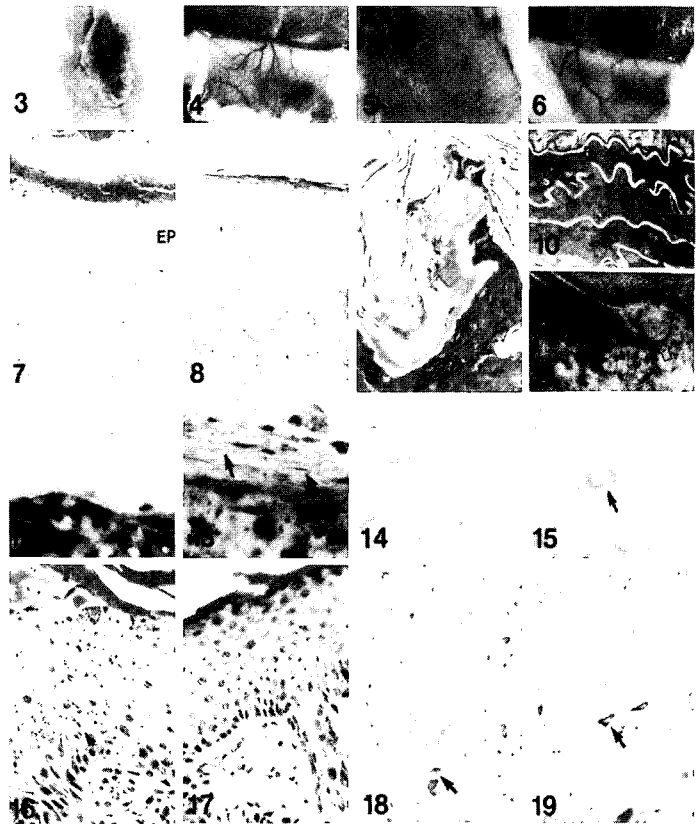
Abbreviation as same as Table II

(Fig. 1).

3. 일반적인 형태와 미세구조의 변화

대조군에서 외부형태상 각질층 손상이 확인된 피부에서는 과립백혈구와 림프구의 침윤과 혈관에서 누출된 혈액의 분포 증가가 두드러지게 관찰되었다(Fig. 7). 그리고 외부형태상 각질층 손상주변의 상피는 세포과형성으로 인한 상피층의 증가와 부종화를 확인할 수 있었다. 손상된 각질층에서는 각질세포사이공간에 lipid lamella가 존재하지 않았으며, 세포사이공간의 확장과 각질세포의 탈락이 두드러졌다(Fig. 9). 이에 반해 실험군에서는 과립백혈구와 림프구의 침윤과 혈관에서 누출된 혈액의 분포가 관찰되지 않았으며, 상피층 증가와 부종화도 적었다(Fig. 8). 각질

Legends for Figures



- Fig. 3.** The morphology of back-skin from mice at hour-72 after atopic dermatitis(AD) elicitation. The subacute skin lesion were seen. $\times 2$
- Fig. 4.** The vasculature of dermis from mice at hour-72 after AD elicitation. The increase of angiogenesis and congestion in dermis were seen. $\times 2$
- Fig. 5.** The morphology of back skin from SC treated mice at hour-72 after AD elicitation. The subacute skin lesion were disappeared. $\times 2$
- Fig. 6.** The vasculature of dermis in back skin at hour-72 after AD elicitation. The decrease of angiogenesis and congestion in dermis were seen. $\times 2$
- Fig. 7.** The morphology of skin from mice at hour-72 after AD elicitation. The infiltration of leukocytes in atopic eczema elicited region were increased. EP, epidermis. H & E. $\times 100$
- Fig. 8.** The morphology of skin from SC treated mice at hour-72 after AD elicitation. The atopic eczema elicited region were not seen. H & E. $\times 100$
- Fig. 9.** The ultrastructure of SC from mice at hour-72 after AD elicitation. The intercellular space of stratum corneum were destroyed. $\times 10000$.
- Fig. 10.** The ultrastructure of SC from SC treated mice at hour-72 after AD elicitation. The intercellular space of stratum corneum were maintained. $\times 10000$.
- Fig. 11.** The magnification of lipid lamella (arrow) & body (vacanted arrow) in Fig. 10. $\times 100000$.
- Fig. 12.** The morphology of stratum corneum from mice at

hour-72 after AD elicitation. The lipid of lipid lamella in stratum corneum were disappeared. Sudan black B $\times 1000$

- Fig. 13.** The morphology of stratum corneum from SC treated mice at hour-72 after AD elicitation. The lipid (arrow) of lipid lamella in SC were seen. Sudan black B $\times 1000$
- Fig. 14.** The immunohistochemisrty of ceramide in stratum corneum from mice at hour-72 after AD elicitation. The ceramide of lipid lamella in stratum corneum were disappeared. $\times 1000$
- Fig. 15.** The immunohistochemisrty of ceramide in stratum corneum from SC treated mice at hour-72 after AD elicitation. The distribution of ceramide (arrow) of lipid lamella in stratum corneum were seen. $\times 1000$
- Fig. 16.** The morphology of epidermis from mice at hour-72 after AD elicitation. The increase of congestion (arrow) in enlarged intercellular space of epidermis were seen. Luna' s method. $\times 200$
- Fig. 17.** The morphology of epidermis from SC treated mice at hour-72 after AD elicitation. The congestion in epidermis were disappeared. Luna' s method. $\times 200$
- Fig. 18.** The morphology of dermis from mice at hour-72 after AD elicitation. The increase of degranulated mast cell (arrow) were seen. Luna' s method. $\times 200$
- Fig. 19.** The morphology of dermis from SC treated mice at hour-72 after AD elicitation. The decrease of degranulated mast cell were seen. arrow, granulated mast cell. Luna' s method. $\times 200$

층의 각질세포사이공간에서는 lipid lamella와 lipid body가 균일하게 분포하였으며(Fig. 11), 대조군과는 달리 세포사이공간의 확장과 각질세포의 탈락이 관찰되지 않았다(Fig. 10).

4. 각질층의 지질 보호장벽 변화

대조군에서의 각질층 지방과립의 분포는 표피탈락이 일어나는 각질층 상부에서만 관찰되었으며, 그 외 지역에서는 나타나지 않았다(Fig. 12). 이에 반해 실험군에서는 과립층 상부에서부터 각질층의 표피탈락까지의 각질세포사이에서 선모양으로 배열된 지방분포를 관찰할 수 있었다(Fig. 13).

한편 각질층의 ceramide 분포 조사결과 대조군에서는 ceramide에 약한 양성반응이 관찰된 반면(Fig. 14), 실험군에서는 강한 양성반응이 나타났다(Fig. 15). 대조군은 정상군에 비해 88% 감소한 $646 \pm 12 / 100,000$ pick cell로 관찰되었고 이에 반해 실험군에서는 대조군에 비해 653.4% 증가한 $4867 \pm 174 / 100,000$ pick cell로 관찰되었으며 주로 각질세포사이에서 강한 양성반응을 보였다(Table 2).

5. 상피내 염증 변화

1) 혈관 분포 변화

대조군의 상피에서는 기저부에서 각질층까지 확대된 혈액 누출을 관찰할 수 있었는데, 주로 확장된 상피세포사이공간에서 잘 나타났다(Fig. 16). 각질층 손상이 심했던 일부지역에서는 각질층에서까지 모세혈관이 출현하였다. 이에 비해 실험군에서는 상피내 혈액 누출은 관찰되지 않으나, 일부 진피유두에서만 혈액 누출이 확인되었다(Fig. 17).

2) 비만세포의 분포 변화

대조군의 진피 유두에서 피하 인접부까지 많은 수의 비만세포가 분포하고 있었으며, 주로 탈과립형이 주를 이루었다(Fig. 18). 실험군에서는 대조군에 비해 적은 수가 관찰되었으며, 과립형이 주를 이루었다(Fig. 19).

3) 염증관련 Cytokine의 변화

상피 기저부와 진피유두에서 관찰되는 PKC 양성

반응은 핵막과 세포질에서 강하게 나타났으며 대조군에 비해 실험군에서 PKC 양성반응세포가 감소된 것으로 관찰되었다(Fig. 20, 21). 대조군은 정상군에 비해 498% 증가한 $8114 \pm 231 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다. 이에 반해 실험군에서는 대조군에 비해 77.6% 감소한 $1817 \pm 97 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table III).

일부 기저부와 진피유두에서 관찰되는 NF- κ B p50 양성반응은 핵막과 세포질에서 강하게 나타났으며 대조군에 비해 실험군에서 NF- κ B p50 양성반응세포가 감소된 것으로 관찰되었다(Fig. 22, 23). 즉 대조군은 정상군에 비해 491.5% 증가한 $1248 \pm 139 / 200,000$ pick cell로 관찰되었고 실험군에서는 대조군에 비해 58.5% 감소한 $768 \pm 57 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table III).

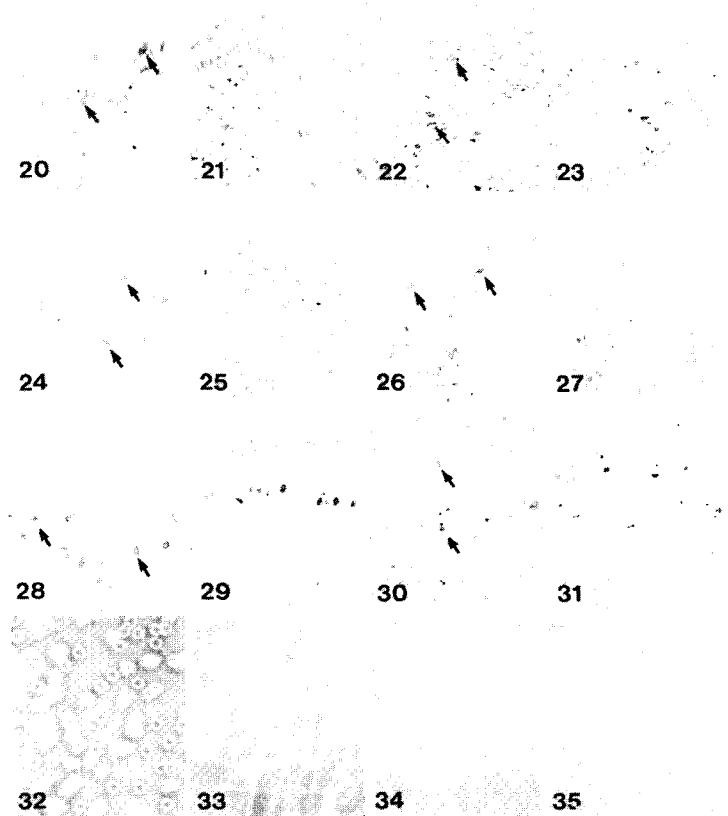
상피 기저부에서 관찰되는 TNF- α 양성반응은 핵막주변 세포질에서 강하게 나타났으며, 대조군에 비해 실험군에서 TNF- α 양성반응세포가 감소된 것으로 관찰되었다(Fig. 24, 25). 즉 대조군에서는 정상군에 비해 604% 증가한 $2438 \pm 191 / 200,000$ pick cell로 관찰되었고 실험군에서는 대조군에 비해 82.8% 감소한 $420 \pm 24 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table III).

상피 기저부에서 관찰되는 IL-12B 양성반응은 세포질에서 강하게 나타났으며, 대조군에 비해 실험군에서 IL-12B 양성반응세포가 감소된 것으로 관찰되었다(Fig. 26, 27). 즉 대조군에서는 정상군에 비해 372% 증가한 $4270 \pm 211 / 200,000$ pick cell로 관찰되었고 실험군에서는 대조군에 비해 64.1% 감소한 $1532 \pm 61 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table III).

6. 상피내 세포증식과 세포자기살해 변화

1) 세포증식 변화 관찰

상피 기저층에서 증식된 세포에서 관찰되는 BrdU 양성반응은 핵에서 강하게 나타났으며, 대조군에 비해 실험군에서 BrdU 양성반응세포가 감소된 것으로 관찰되었다(Fig. 28, 29). 즉 대조군은 정상군에 비해 263% 증가한 $3799 \pm 126 / 200,000$ pick cell로 관찰되었고 실험군에서는 대조군에 비해 50.3% 감소한 1887



- Fig. 20.** The immunohistochemisrty of PKC in stratum basale from mice at hour-72 after AD elicitation. The PKC positive reacted cell (arrow) were increased. $\times 200$
- Fig. 21.** The immunohistochemisrty of PKC in stratum basale from SC treated mice at hour-72 after AD elicitation. The PKC positive reacted cell were remarkably decreased. $\times 200$
- Fig. 22.** The immunohistochemisrty of NF- κ B p50 in stratum basale from mice at hour-72 after AD elicitation. The NF- κ B p50 positive reacted cell (arrow) were increased. $\times 200$
- Fig. 23.** The immunohistochemisrty of NF- κ B p50 in stratum basale from SC treated mice at hour-72 after AD elicitation. The NF- κ B p50 positive reacted cell were remarkably decreased. $\times 200$
- Fig. 24.** The immunohistochemisrty of TNF- α in stratum basale from mice at hour-72 after AD elicitation. The TNF- α positive reacted cell (arrow) were increased. $\times 200$
- Fig. 25.** The immunohistochemisrty of TNF- α in stratum basale from SC treated mice at hour-72 after AD elicitation. The TNF- α positive reacted cell were remarkably decreased. $\times 200$
- Fig. 26.** The immunohistochemisrty of IL-12B in stratum basale and dermal papilla from mice at hour-72 after AD elicitation. The IL-12B positive reacted cell

(arrow) were increased. $\times 200$

- Fig. 27.** The immunohistochemisrty of IL-12B in stratum basale and dermal papilla from SC treated mice at hour-72 after AD elicitation. The IL-12B positive reacted cell were remarkably decreased. $\times 200$
- Fig. 28.** The immunohistochemisrty of BrdU in stratum basale from mice at hour-72 after AD elicitation. The BrdU positive reacted cell (arrow) were increased. $\times 200$
- Fig. 29.** The immunohistochemisrty of BrdU in stratum basale from SC treated mice at hour-72 after AD elicitation. The BrdU positive reacted cell were remarkably decreased. $\times 200$
- Fig. 30.** The distribution of apoptotic cell in epidermis from mice at hour-72 after AD elicitation. The apoptotic cell (arrow) were increased. $\times 200$
- Fig. 31.** The distribution of apoptotic cell in epidermis from SC treated mice at hour-72 after AD elicitation. The apoptotic cell were decreased. $\times 200$
- Fig. 32.** The plate of Staphylococcus aureus(S. aureus) at hour-16 after incubation. $\times 2$
- Fig. 33.** The plate of SC 1000-fold diluted S. aureus at hour-16 after incubation. $\times 2$
- Fig. 34.** The plate of SC 100-fold diluted S. aureus at hour-16 after incubation. $\times 2$
- Fig. 35.** The plate of SC 10-fold diluted S. aureus at hour-16 after incubation. $\times 2$

±87 / 200,000 pick cell로 관찰되었다(Table IV).

2) 세포자기살해 변화 관찰

상피 상부에서 자기살해세포에서 관찰되는 apoptotic 양성반응은 핵에서 강하게 나타났으며, 대조군에 비해 실험군에서 apoptotic 양성반응세포가 감소된 것으로 관찰되었다(Fig. 30, 31). 즉 대조군은 정상군에 비해 1212% 증가한 11293±831 / 200,000 pick cell로 관찰되었고 실험군에서는 대조군에 비해 85.6% 감소한 1631±84 / 200,000 pick cell로 관찰되었다(Table IV).

7. Staphylococcus aureus의 생장 억제 효과

Staphylococcus a.는 SC 추출물에 대해 농도의존적인 생장 억제 경향을 보였다(Fig. 32, 33, 34, 35). 무처리시 0.38±0.0012인데 비해 SC 추출물 1000배 희석 처리시 6.3% 감소한 0.356±0.0028, 100배 희석처리시 9.2% 감소한 0.345±0.0018, 10배 희석처리시 12.6% 감소한 0.332±0.0011로 관찰되었다(Fig. 2).

고 찰

아토피 피부염은 비정상적인 피부혈관 반응이나 면역학적 반응을 동반하고^{1,2,7)} 홍반, 부종, 심한 소양증, 삼출, 부스럼딱지와 인설을 특징으로^{4,5)} 하는 염증성 피부질환이다¹⁾. 이 중 피부건조증은 만성 아토피 피부염의 중요한 증상으로 환자의 대부분에서 관찰되고 특히 소양증은 아토피 피부염의 가장 특징적인 증상으로 중요한 진단기준의 하나가 되는데 소양증 유발과정에 여러 가지 염증 유발인자 및 cytokine 등이 관여하는 것으로 생각된다^{8,9)}.

아토피 피부염은 세계적으로 유병율이 점차 증가하는 추세이고, 그 임상증상 또한 중증화되는 경향을 보인다. 우리나라에서도 그 빈도가 차츰 증가하면서 그에 대한 관심도 높아지고 있는데^{5,6)} 그 증가 원인으로 공해와 같은 자극물질의 증가, 여러 가지 알레르기 물질의 증가 등이 거론되고 있다. 대기오염과 주위환경 변화로 인한 항원에 대한 노출 증가, 모유수유 감소, 소아기 감염질환의 감소 등으로 인하여 발

생빈도가 증가되고 있으나 확실한 치료방법이 없어 그 치료에 있어 아직 많은 어려움을 겪고 있다^{5,6,19,20)}.

한의학 문헌에서는 胎熱, 赤遊丹, 赤遊風, 奶癬, 嬰兒濕疹, 胎斂瘡, 濕疹, 浸淫瘡, 異位性皮膚炎, 血風瘡 및 四彎風 등의 범주에 속하는 것으로 원인으로는 風熱·血熱·血虛 등을 들 수 있다^{5,6)}.

아토피 피부염의 대표적인 증상인 소양증에 관하여《劉完素 六書》¹¹⁾에서는 “가려울 때 손으로 긁어서 가려움이 없어지는 것은 긁는 것이 火의 작용이기 때문이다. (피부에) 火熱이 弱하면 가려운 느낌이 들고 火熱이 심하면 통증이 생기고 피부가 불(火)에 아주 가까이 다가가면 피부가 타고 수포가 생기는 것처럼 火熱이 더욱 강하면 피부에 증상이 이리하게 나타난다. 이러한 증상이 나타나는 것은 다 火의 작용이다. 혹 통증은 實한 것이고 가려운 것은 虛한 것이라고 하는데 여기서 虛하다는 것은 寒의 의미가 아니라 熱이 심하지 않은 것을 가리킨다”라고 하여 소양증을 火(熱)의 개념으로 보았다. 또한 《東醫寶鑑 雜病篇 燥》¹²⁾에서는 “피부가 갈라지고 피가 나면서 통증이 심한 것 또는 피부가 가렵고 爪甲이 뜨고 일어나는 것은 다 火燦肺金燥가 심해서 된 것이다”라고 하여 피부건조증을 火로 인한 燥의 원인으로 보았는데 燥는 “大都因血氣有火 變爲燥病”《張三石醫學準繩六要》¹¹⁾, “燥因血少”라고《東醫寶鑑 雜病篇燥》¹²⁾에서 언급한 것으로 보아 燥는 火와 血少에 의해서 나타나는 病機로 볼 수 있다. 따라서 아토피 피부염의 대표적인 증상인 소양증과 피부건조증은 血虛와 火에 의해서 생기는 증상과 많이 유사하다고 볼 수 있다.

일본 一貫堂醫學에서 상용하는 처방인 柴胡清肝散은 血虛를 치료하는 四物湯과 火를 치료하는 黃連解毒湯에 桔梗, 薄荷葉, 牛蒡子, 天花粉, 連翹, 甘草, 柴胡가 가미된 처방이다²⁵⁾. 이는 면역력이 결핍되어 나타나는 제반증상에 쓸 수 있는 처방으로서 아토피 피부염 환자가 고초열, 기관지천식, 알레르기성 비염 등의 질환을 동시에 앓게 되는 경우가 일반 사람보다 많다는 특징²⁶⁾을 볼 때 충분히 활용가치가 있을 것으로 보인다. 또 《外科樞要》의 “髮疽及肝膽三焦風熱.....

或治瘡毒發熱”하는 柴胡清肝散에 그 뿌리를 두고²⁴⁾ 이에 血虛를 보충하는 四物湯의 개념을 더한 것으로서 아토피피부염의 주원인으로 보이는 血虛, 風熱, 血熱을 치료하는데 효과적인 처방이라 할 수 있다^{5,6,25)}. 柴胡清肝散의 구성약물을 살펴보면 當歸, 川芎, 芍藥, 地黃은 四物湯의 기본방으로 補血調血하는 효능을 가지고 있으며 黃連, 黃芩, 黃柏, 梔子是 黃連解毒湯의 구성약물로서 瀉火解毒하는 효능을 가지고 있다²⁵⁾. 이에 더하여 祛痰排膿하여 瘡瘍膿成不潰에 사용하는 桔梗, 散風濕하여 風疹癢痒을 치료하는 薄荷, 疏散風熱 宣肺透疹 하여 麻疹 風疹 癰腫瘡毒을 치료하는 牛蒡子, 降火潤燥 排膿消腫하여 癰腫痔漏 熱病口渴 消渴을 치료하는 天花粉, 清熱解毒 消腫散結하여 癰疽 癩歷 乳癰 丹毒 溫病을 치료하는 連翹, 和解退熱 疏肝解鬱 升舉陽氣하는 柴胡, 調和諸藥 解毒 和中 緩急하는 甘草로 구성되어 있다²⁷⁾.

표피의 구조 중 전해질과 수분손실을 억제하고 외부의 물리적 손상과 자극적 물질로부터 인체를 보호하는 장벽인 피부 각질층은 각질세포와 lamella body에서 분비한 지질로 형성된 lipid lamella로 구성된다³⁴⁾. 각질층의 지질은 단지 세포사이의 구조적 결합뿐만 아니라 피부장벽의 기능적 조절자로서의 역할을 수행하는 것으로 알려져 있는데³⁵⁾, 각질층의 지질은 ceramide, 유리지방산, 콜레스테롤, triglyceride, steryl ester 및 cholesterol sulfate로 구성된다. 이중 ceramide가 26%정도로 가장 많이 존재하는데, ceramide는 수분함유기능을 가지며 투과장벽으로서 작용한다³⁶⁾. 특히 아토피 피부염과 건선은 ceramide의 결핍에 의한 장벽손상으로 인해 발생하는 대표적 피부질환이다^{38,39)}.

본 실험에서는 이런 점을 착안하여 인위적으로 아토피 피부염을 유발하기 위해 우선 Christophers와 Mrowietz 등의 방법³²⁾으로 각질층 상부의 desquamation을 제거한 다음 Minehiro의 방법³³⁾으로 계면활성제인 sodium dodecyl sulfate를 도포하여 각질층내 지질을 제거하였다. 그 결과는 Sudan black B 염색을 통한 각질층내 지질분포감소와 항 ceramide를 이용한 면역조직화학법을 통한 ceramide 분포 감소로

확인되었고, 이로써 아토피 피부염의 대표적 지표로 보고된 소양성 홍반구진, 급성 피부손상, 세포자기살해, 산호성 백혈구와 탈과립형 비만세포의 침윤 등의 증가가 일어났다³²⁾. 한편 각질층내 ceramide는 분해되면서 sphingosine을 생성시키며, 생성된 sphingosine은 protein kinase C(PKC)의 활성을 억제하는데³⁴⁾, 아토피 피부염 유발시 각질층내 ceramide 감소로 인한 PKC 활성이 유도되며, 이는 피부 상피 기저층에서의 세포분열 증가를 일으킨다³⁶⁾. 본 실험에서도 일치된 결과를 확인할 수 있었다. 또한 PKC의 활성은 TNF- α 와 IL-12 등의 염증유발성 cytokine의 발현 증가를 통해 염증반응 가속화를 유도한다³⁹⁾. TNF- α 증가는 IL-8, vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor 등의 생성을 증가시켜 혈관생성을 촉진하는 역할을 하게 되며⁴⁰⁾, 본 실험에서는 상피내 적혈구 누출 증가를 통해 혈관신생 증가를 간접적으로 확인할 수 있었다.

柴胡清肝散은 각질층내 지질 특히, ceramide의 생성을 유도함으로써 기능적 장벽 손상으로 기인된 아토피 피부염에 대한 치료효과가 있을 것으로 생각되는 결과가 관찰되었다. 즉 ceramide 분포 회복을 통해 급성 염증반응을 차단함으로써 피부 손상을 억제하였다. 또한 본 실험에서는 柴胡清肝散이 아토피 피부염의 손상피부에서 90% 이상 감염된 것으로 보고된 *Staphylococcus aureus*³⁸⁾에 대한 성장 억제기능을 조사한 결과 농도 의존적인 감소경향을 보여 *Staphylococcus aureus*에 의한 특정 IgE의 생산을 억제³⁰⁾하여 아토피 피부염의 증상을 완화시킬 것으로 생각된다.

이²³⁾는 生血潤膚飲加味方을 대상으로 본 실험과 유사한 연구를 시행한바 유의성있는 결과를 보고하였다. 추후 두 처방의 비교연구는 아토피 피부염의 병기 및 증상에 맞는 처방 선택에 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 이상 살펴본 바 柴胡清肝散은 표피의 각질형성세포의 기능을 회복시키고 항근작용을 통한 피부 보호작용이 있어 血虛를 치료하고 부적절한 火의 기운을 다스려 아토피 피부염의 소양증과 피부건조증의 치료에 효과적인 것으로 기대된다. 앞으로 다른 아토피 피부염 치료제와의 비교연구를 통하여 그

효능의 우수성을 심도깊게 살펴보고 血虛와 火를 다스리는 다른 처방들의 효과에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결론

아토피 피부염에 대한 柴胡清肝散의 치료효과를 알아보기 위해 행해진 본 연구는 생쥐 피부 상피 각질층의 지방 방어구조를 손상시켜 인위적으로 아토피 피부염을 유발시킨 후 柴胡清肝散 추출물을 투여하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 외부형태상 일부 가장자리 지역을 제외하고는 정상적인 각질층의 분포를 유지하였으며 대조군에 비해 진피쪽 피부의 혈관분포도 적고 누출된 혈액도 적어 혈관의 분포가 잘 확인되었다.
2. 柴胡清肝散은 산호성 백혈구를 유의성 있게 감소시켰다.
3. 일반적인 형태와 미세구조의 변화
 - 1) 柴胡清肝散 투여군에서는 과립백혈구와 림프구의 침윤과 혈관에서 누출된 혈액의 분포가 관찰되지 않았으며 상피층 증가와 부종화를 유의성 있게 감소시켰다.
 - 2) 대조군에 비해 lipid lamella와 lipid body가 균일하게 분포하였으며 세포사이공간의 확장 과 각질세포의 탈락이 관찰되지 않았다.
4. 각질층의 지질 보호장벽 변화
 - 1) 실험군은 대조군과는 달리 과립층 상부에서부터 각질층의 표피탈락 까지의 각질세포사이에서 선모양으로 배열된 지방분포를 관찰할 수 있었다.
 - 2) ceramide 반응도 실험군이 대조군에 비하여 강한 양성반응으로 나타났다.
5. 상피내 염증 변화
 - 1) 실험군은 혈액 누출이 대조군과는 달리 잘 나타나지 않았다.
 - 2) 실험군의 비만세포는 주로 과립형이 주를 이루었으며 대조군에 비해 적은 수가 관찰되었다.
- 3) PKC 양성반응, NF- κ B p50 양성반응, TNF- α 양성

반응, IL-12B 양성반응은 실험군이 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다.

6. 상피내 세포증식과 세포사기살해 변화
BrdU 양성반응, apoptotic 양성반응은 실험군이 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다.
7. 실험군은 *Staphylococcus aureus*의 성장을 유의성 있게 억제하였다.

참고문헌

1. 은희철. 피부면역학. 서울:서울대학교출판부. 1999:27-34.
2. 강석영. 알레르기 질환의 진단과 치료. 서울:일조각. 1993:241-252
3. 정규만. 동의소아과학. 서울:행림출판사. 1985:567-568.
4. 박윤기, 이승현, 안승구. 흔히 보는 피부질환 진단과 치료. 서울: 고려의학. 1993:6-7.
5. 공남미, 지선영. 아토피 피부염의 양·한방적 고찰. 대한의관과학회지. 1999;12(1):241-253.
6. 김윤희, 이한철. 아토피성 피부염에 관한 동서의학적 고찰, 대한한방소아과학회지. 1993;7(1):121-133.
7. 정규만. 동의소아과학. 서울:행림출판사. 1985:567-568.
8. 강병수. 한방임상 알레르기. 서울:성보사. 1988:196-201.
9. 조용주, 채병윤. 아토피 피부염의 발생부위에 관한 고찰. 대한한의학회지. 1994;15(1):763-770.
10. 방형돈, 이현승, 안필수 외 3인. 아토피피부염 환자에 대한 thymopentin의 치료 효과. 천식 및 알레르기. 1998;18(3):640-646.
11. 醫部全錄 卷二百一十一 皮門. 서울:大星文化社. 572-577
12. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1992:614-615.
13. 강훈, 차미경. 아토피 피부염에서 eosinophil cationic protein의 변화. 알레르기. 1994;14:227-234.
14. 이영진. 아토피 피부염의 중증도와 혈청 ECP치 및 가용성 IL-2 수용체지 사이의 상관관계와 Thymopentin 치료에 따른 변화. 대한알레르기학회 추계학술대회

- 초록집. 1995;15(3):1-5.
15. 최현주, 김수민, 이광훈 외 3인. 아토피피부염 환자에 서 집먼지 진드기 항원-자가항체 면역 복합치료효과. 천식 및 알레르기학회지. 1999;19(6):942-952.
 16. 김진우, 김정원, 이종욱 외 2인. 아토피 피부염에 대한 환경인자의 영향. 추계학술대회 초록집. 1995:551.
 17. 노석선. 當歸飲子 수출액이 항 Allergy 반응과 Mouse 의 면역세포기능에 미치는 영향. 외관과학회지. 1991;4(1):1-12.
 18. 이승희, 김장현. 補肺定喘湯을 이용한 아토피 피부염 치료에 관한 임상연구. 소아과 학회지. 2000;14(1):137-152.
 19. 남봉수, 조재훈, 김윤범 외 1인. 아토피 피부염에 대한 임상적 연구, 대한한의학회지. 2000;21(4):204-215.
 20. 최인화, 채병윤. 아토피 피부염에 관한 임상적 연구. 대한한의학회지. 1991;12(1):709-719.
 21. 박해선, 지선영, 구덕모. 아토피 피부염의 증의 외치법 고찰. 대한외관과학회지. 2001;14(1):32-41.
 22. 정찬호, 지선영. 아토피 피부염에 대한 단식 치험 2례. 대한외관과학회지. 1995;8(1):153-161.
 23. 이현우. 生血潤膚飲이 아토피 피부염을 유발한 동물 모델의 각질층 기능회복에 미치는 영향. 대한안이비인후피부과학회지. 2002; 16(1):112-130.
 24. 矢數格. 漢方一貫堂醫學. 서울:의학연구소. 1996:22-35, 54, 55, 75-77.
 25. 이상인, 김동걸, 김영관 외 4인. 방제학. 서울:영림사. 1994:111-113, 171-172.
 26. 강원형. 피부질환 아틀라스. 서울:한미의학. 2002:71.
 27. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:영림사. 1992:144, 149, 165, 199, 448, 460, 540.
 28. Akiyama H, Tada H, and Torigoe R. Detection of very slow-growing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in skin lesion of AD patient Japan J Dermatol. 1994;104:119-21.
 29. Andrea H, Thomas k, Josef P. and Konrad S. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. Biochemica et Biophysica Acta. 2000;1485:63-99.
 30. Bunikowski R, Mielke M. E. and Skarabis H. Evidence for a disease promoting effect of *Staphylococcus aureus*-derived exotoxins in AD. J. Allergy Clin. Immunol. 2000;105:814-19.
 31. Christophers E. and Mrowietz U. The inflammatory infiltrate in psoriasis. Clin. Dermatol. 1995;13:131-135.
 32. Donald Y. M and Thomas Bieber. Atopic dermatitis. Lancet. 2003;361;151-60.
 33. Elias P. M., Williams M. L., Maloney M. E., Bonifas J. A., Brown B. E., Grayson S. and Epstein E. H. Stratum corneum lipids in disorders of cornification. J. Clin. Invest. 1984;74:1414-1421.
 34. Gopinathan K. M. New insights into skin structure: Scratching the surface. Adv. Drug Delivery Rev. 2002; 54:3-17.
 35. Feinglod K. R. The regulation and role of epidermal lipid synthesis. Adv. Lipid Res. 1998;24:57-82.
 36. Hunnum Y. A. and Bell R. M. Function of sphingolipid breakdown production in cellular regulation. Science. 1989;243:500-507.
 37. Minehiro O, Takashi Y. and Hideoki O. Detergent-induced epidermal barrier dysfunction and its prevention. J. Dermatol. Sci. 2002;30:173-179.
 38. Motta S, Monti M, Sesana S, Mellei L, Ghidoni R. and Caputo R. Abnormality of water barrier function in psoriasis. Arch Dermatol. 1994;130:452-456.
 39. Paige D. G, Morse-Fisher N, Harper J. I. Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramide in the hereditary ichthyoses. Br. J. dermatol. 1994;131:23-27.
 40. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M. Involvement of IL-8, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in TNF- α dependent angiogenesis. mol. Cell Biol. 1997;17:4015-4023.