



Original Article / 원저

## 黃連解毒湯의 아토피 피부염 개선 효과

기호필<sup>1</sup>·장선일<sup>2</sup>·윤용갑<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 한의과대학 방제학교실<sup>2</sup>전주대학교 보건관리학과

### Ameliorative Effects of Hwangnyeonhaedok-tang on Atopic Dermatitis

Ho-Pil Ki<sup>1</sup> · Seon Il Jang<sup>2</sup> · Young-Gab Yun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Oriental Medical Prescription, Woosuk University,

<sup>2</sup>Department of Healthcare & Science, Jeonju University

#### ABSTRACT

**Objectives** : The water extract of Hwangnyeonhaedok-tang (HHT), composed of the Scutellariae Radix, Coptidis Rhizoma, Phellodendri Cortex and Gardeniae Fructus has been traditionally used to treat fever, inflammation, gastritis and hypertension in east asia. However, little is known about the ameliorative effects of HHT on atopic dermatitis. Therefore, the purpose of this study was to investigate the therapeutic effect of HHT on atopic dermatitis

**Methods** : We investigated the inhibitory effects of HHT on the production of proinflammatory cytokines in rat peritoneal mast cells (RPMCs), on the scratching behavior in ICR mice, and on atopic dermatitis symptoms in 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced atopic dermatitis-like model hairless mice.

**Results** : Levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  increased by PMA plus A23187 co-treatment were significantly inhibited by HHT in a dose-dependent manner. HHT also inhibited the histamine release from RPMCs stimulated by compound 48/80, which promotes histamine release. The oral administration of HHT reduced the scratching behavior induced by compound 48/80 and histamine in ICR mice. Furthermore, the intradermal treatment of HHT reduced the ear edema, skin lesions, and atopic molecular marker (IgE and IL-4) in DNFB-induced atopic dermatitis model mice.

© 2013 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This is an open access journal which permits unrestricted access via the internet (URL, <http://www.ompak.okdanche.com>.) non-commercial use, distribution, reproduction and providing the original work is properly cited.

**Conclusions :** These results suggest that HHT may be used as a potential treatment for AD as a prescription for treatment of atopic dermatitis.

**Keyword :** Hwangnyeonhaedok-tang, Atopic dermatitis, Mast cells, Scratching behavior, Clinical signs, Ameliorative effects

## I. 서 론

黃連解毒湯은 外臺秘要의 崔氏方에 처음 수록된 方劑로 黃連(Coptidis Rhizoma), 黃芩(Scutellariae Radix), 黃柏(Phellodendri Cortex), 梔子(Gardeniae Fructus)로 구성되어 있으며<sup>1)</sup>, 清熱瀉火解毒 하는 효능이 있어<sup>2-5)</sup>, 實熱, 煩燥, 火毒, 大熱, 膿瘍, 疔毒, 發斑, 口燥, 咽乾, 不眠, 吐血, 衄血, 身熱下痢, 黃疸, 小便赤澀 등의 症狀에 널리 사용되어왔다<sup>1-5)</sup>.

최근에 黃連解毒湯에 대한 연구는 NC/Nga 마우스 모델에서 Immunoglobulin E (IgE) 생산에 관련된, interleukin-4 (IL-4), IL-5 등의 사이토카인 억제 효과와 RAW 264.7 대식 세포주에서 inflammatory cytokine의 생성 억제 효과<sup>6)</sup>와 더불어 NC/Nga 마우스를 화학적 항원으로 아토피 유사 모델을 유도하여 실험한 결과 IgE 생성, 輕皮水分蒸發量 및 皮膚表皮角化症에 억제 효과가 있음을 보고 하였다<sup>7)</sup>. 그러나 아직까지 아토피 피부염 (atopic dermatitis)의 핵심인 비만 세포의 활성화 및 가려움증에 대한 보고가 없는 실정이다.

아토피 피부염은 IgE 매개 감각(IgE-mediated sensitization)에 의한 외인성 형태(extrinsic form, 70-80%)와 비 IgE 매개 감각(non-IgE-mediated sensitization)에 의한 내인성 형태(intrinsic form, 20-30%) 두 가지로 구분하고 있으며<sup>8-11)</sup>, 아토피 피부염의 임상적 특징은 심한 가려움으로 인한 피부 장벽의 붕괴, 염증, 혈청 내 IgE의 증가, 염증 부위에 호산구(eosinophil)의 침윤 및 Th1(Type

I helper T cell)과 Th2(Type II helper T cell) 세포의 불균형 등이 있다<sup>11-13)</sup>. 이러한 과정 속에서 아토피 피부염은 급성일 경우 Th2 세포가 편향적으로 발달하여 Th2 사이토카인을 과량 생산하고 이로 인해 혈청 내 IgE와 호산구가 증가하게 된다. 또한 아토피 피부염이 심화되면 Th1 사이토카인도 동시에 증가해 염증반응을 더욱 악화시킨다. 비만세포(mast cell)는 알러지 또는 급성 알러지반응과 같은 염증질환 매개 물질을 생성하는 주요한 세포로 알려져 있다<sup>14,15)</sup>. 급성 알러지반응은 IgE와 결합된 항원이 비만세포의 FcεRI 수용체에 결합함에 따른 histamine 분비에 의해 일어난다. FcεRI의 활성화가 일어난 뒤 비만세포는 arachidonic acid 대사산물과 inflammatory cytokine과 같은 매개물질의 분비와 탈과립과정을 진행하면서 염증반응을 가속화 시킨다<sup>14,15)</sup>.

특히 아토피 피부염의 주된 증상인 가려움증은 피부병소(skin lesion)의 악화와 심한 정신적 방해요인으로 작용하며<sup>15-18)</sup>, 아토피 피부염 환자의 삶의 질을 악화시키는 가장 큰 원인 중의 하나이다. 가려움증으로 인해 환부를 긁는 행위는 피부 장벽의 붕괴를 발생시키며, 반복적인 가려움증으로 인해 피부 염증부위가 더욱 악화되므로, 가려움증의 효과적인 조절이 아토피 피부염의 치료에 있어서 중요한 대상이 되고 있다<sup>17)</sup>. 그러므로 최근 아토피 피부염의 치료 방향은 부작용이 적은 천연물을 이용한 치료제 개발에 관심이 많아지고 있는 추세이다.

따라서 본 연구는 黃連解毒湯을 대상으로 활성화된 랫트 복강 비만세포(rat peritoneal mast cells, RPMCs)에서 tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-1β와 히스타민(histamine) 조절에 대한 黃連解毒湯의 가려움증 완화에 대한 효과

\*교신저자 : 윤용갑, 전북 익산시 익산대로 460 원광대학교 한의과 대학 방제학교실

· Tel : 063-850-6834

· Email : yunyg@wku.ac.kr

· 접수 2013/05/24 · 수정 2013/05/27 · 채택 2013/06/10

를 조사하였으며, 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) 유도 아토피 피부염 유사모델 마우스에서 귀 부종과 피부염 완화 및 IgE와 IL-4의 생성 억제에 대한 실험을 통하여 黃連解毒湯이 아토피 피부염 개선에 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), IL-4, immunoglobulin E (IgE), histamine ELISA kit들은 R&D Systems (Minneapolis, USA)로부터 구입하였다. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), calcium ionophore A23187, 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), dimethyl sulfoxide (DMSO), percoll, hematoxylin & eosin, toluidine blue, HEPES와 기타 시약은 Sigma-Aldrich (USA)로부터 구입했으며, RPMI 1640 배지, fetal bovine serum (FBS)와 penicillin/streptomycin는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다.

#### 2) 약물의 추출 및 제조

실험에 사용한 黃連, 黃芩, 黃柏, 梔子是 경동시장(서울시, 대한민국)에서 구입하였으며, 圓光大學 韓醫科大學 方劑學教室에서 형태학적 및 화학적으로 동정하여 사용하였으며, 증거표본은 방제학교실에 보관 중에 있다. 黃連解毒湯은 Table 1과 같이 黃連, 黃芩, 黃柏 및 梔子を 각각 36g 씩 정량하여 총 114g으로 조성하여 한약추출기(대웅약탕기, SK-1600)에 넣고, 2,000 mL 증류수를 첨가하여 100°C에서 3시간 동안 煎湯하였다. 이와 같이 추출한 추출물은 5,000 rpm으로 30분간 원심침전시켜 상층액을 취하고 0.45  $\mu$ m 필터로 여과한 후 -70°C에서 동결 건조하여 15.5g을 얻어 -20°C 냉동고에 보관하면서 실험에 사용 하였다.

Table 1. Composition of Hwangnyeonhaedok-Tang (HHT)

Herb name	English name	Scientific name	Dose (g)
黃連	Coptidis Rhizoma	Coptis chinensis	36
黃芩	Scutellariae Radix	Scutellaria baicalensis	36
黃柏	Phellodendri Cortex	Phellodendron amurense	36
梔子	Gardeniae Fructus	Gardenia jasminoides	36

#### 3) 실험동물

무균환경에서 사육된 7주령의 수컷 hairless 와 ICR 마우스 그리고 10주령의 Sprague Dawley 랫트는 중앙실험동물(주)(서울시, 대한민국)에서 구입하였고, 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 낮과 밤의 주기를 12시간씩 하였고, 온도(20-22°C)와 습도(50-60%)는 일정하게 유지하였으며, 실험동물위원회의 규정에 준하여 실험하였다.

### 2. 방법

#### 1) RPMCs 분리 및 약물처리

건강한 수컷 Sprague Dawley 랫트로부터 복강비만세포(rat peritoneal mast cells, RPMCs)의 분리는 Martynova 등<sup>19)</sup>의 방법에 따라 분리하였다. 요약하면, 에테르(ether)로 마취시킨 다음 calcium-free HEPES-Tyrode buffer를 10 mL을 복강에 주입시켜 약 90초간 복강을 부드럽게 마사지한 후 복강을 주의 깊게 열어 Pasteur pipette을 사용하여 세포부유액을 취하고 percoll density gradient법으로 RPMCs를 얻었다. 특별히 본 실험 목적에 따라 충분한 세포를 확보하기 위해서 5-10마리 랫트에서 얻은 복강비만세포를 혼합하여 사용하였다. 황련 추출물(25-200  $\mu$ g/mL)은 RPMCs ( $2 \times 10^5$ )에 10분간 전 처리한 후 compound 48/80이나 PMA와 A23187로 자극하여 히스타민과 전염증성 사이토카인 측정에 사용하였다.

## 2) 사이토카인 측정

RPMCs로부터 사이토카인의 측정은 추출물(25–200 µg/mL)을 10분 동안 전 처리한 후 PMA(30 ng/mL)와 A23187(10 µM)로 동시에 자극한 다음 30분에 세포 상층액으로부터 TNF-α와 IL-1β를 측정하였다. DNFB로 감작한 마우스로부터 IgE와 사이토카인의 측정은 추출물(25–200 µg/mL) 투여 종료 후 12시간에 혈청을 취하고 혈청으로부터 IgE, IL-4를 측정하였다. IgE와 IL-4는 각각에 특이적으로 작용하는 ELISA kit을 사용하여 R&D Systems사가 제공하는 방법에 준하여 측정하고 정량하였다. 요약하면, 세포상층액(100 µL) 또는 혈청(20–50 µL)을 각각의 항체가 코팅된 plate에 주입하고 반응시킨 후 잘 세척한 다음 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체를 주입하고 반응시킨 후 발색 기질을 주입하고 반응시켜 ELISA reader (Molecular Devices, USA)로 측정하였으며, 각 물질에 대한 정량은 각각의 물질을 농도별로 처리하여 반응시켜 표준곡선을 정하고 세포상층액 또는 혈청에 함유된 물질의 양을 계산하였다.

## 3) RPMCs에서 히스타민 방출량의 측정

실험을 시작하기 전에 실험군당 5마리의 마우스를 각각 투명 아크릴 케이지(20×26×13cm)에 한 마리씩 넣고, 안정을 위해 30분 동안 동일한 실험 환경에 방치하였다. 추출물(25–200 mg/kg)은 멸균증류수에 용해하여 각 마우스 당 0.20 mL씩 경구투여 하였다. Compound 48/80은 인산완충액(phosphate buffer saline, pH 7.2)에 용해하여 추출물 처리 1시간 뒤에, 26 게이지 주사기로 compound 48/80의 최종농도가 주사부위 당 50 µg농도로 0.10 mL씩 마우스 등의 양쪽 어깨 사이 높이에 피하주사하였다.

## 4) 가려움증 판정 시험

가려움증 유발 물질을 주사한 마우스는 곧바로 micro-camera (ONCCTV, 서울, 대한민국)를 사용하여 60분 동안 녹화하였으며, 뒷발로 가려움증 유발 물질이 주입된 부위를 긁는 횟수를 이중맹검법으로 계수하여 평가하였다.

## 5) 아토피 피부염 유사모델 유도

아토피 피부염 유사 모델을 유도하기 위해서 acetone과 olive 오일을 3:1로 제조된 용매에 0.15% DNFB를 제조하여 1일과 4일에 두 번 귀 등(25 µL)과 등 쪽 피부(100 µL)에 감작(sensitization)하였다. 두 번째 감작일인 4일부터 대조군은 생리 식염수 만 복강에 하루에 한번 실험 종료일까지 주사하였고, 실험군은 추출물(25–100 mg/kg)을 복강에 하루에 한번 실험 종료일인 13일까지 주사하였다. 첫 번째 감작일로부터 7일, 10일과 13일에 3일 간격으로 0.2% DNFB를 감작시킨 부위에 같은 용량으로 공격(challenge)을 하였다.

## 6) 혈청 및 조직의 두께 측정

마지막 공격 후 5시간 후에 마우스의 간 문맥으로부터 혈액을 채취하여 혈청을 얻고, 귀 조직과 등 피부조직의 두께는 verner digital caliper (Mitutoyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

## 7) 피부병변의 평가

피부상태는 0주째부터 1주 간격으로 4주 동안 사진을 찍어 조사하였다. 피부의 건조상태(dryness)와 스킨링(scaling) 그리고 미란(erosion), 찰과상(excoriation), 출혈 등을 체크하여 병변이 없는 상태를 0점(none), 가벼운 상태를 1점(mild), 중간 상태를 2점(moderate), 심한상태를 3점(severe)을 주었고 각 단계별로 총점수부여하여 평가하였다.

## 8) 피부조직

실험 과정에 따라 대조군과 실험군을 대상으로 희생시키고, 피부조직 약 5x5 mm를 적출하여 4% paraformaldehyde(pH 7.4)로 고정하고 일련의 과정을 통하여 파라핀 블록을 제작한 후, 5 µm 간격으로 피부조직을 종단면으로 절편하였다. 조직학적 검사와 백혈구 침윤을 검사하기 위해 hematoxylin & eosin 또는 toluidine blue로 염색하고 저배율(X40)에서 관찰하고 확대하면서 X100 현미경 시야에서 사진을 찍어 제시하였고, 백혈구의 침윤을 확인하기 위해 X400 현미경 시야에서 검경하였다(Leica, Wetzbre, Germany).

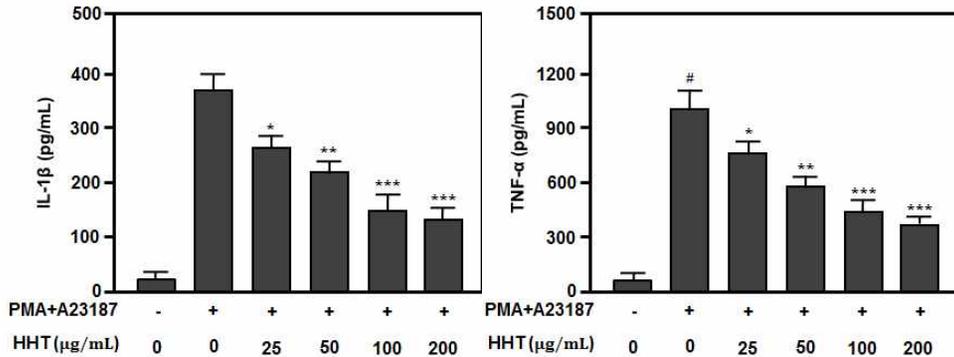


Fig. 1. Effects of Hwangnyeonhaedok-Tang (HHT) on TNF- $\alpha$  and IL- $\beta$  production in PMA plus A23187-stimulated RPMCs. RPMCs ( $1 \times 10^6$ /mL) were incubated for 18 h with medium alone or with PMA (30 ng/mL) plus A23187 (10  $\mu$ M) in the absence or presence of the indicated concentrations of HHT. Levels of TNF- $\alpha$  and IL- $\beta$  was measured by ELISA methods as described in the section of materials and methods. Data are means  $\pm$  SD of three independent experiments. # $p < 0.001$  vs untreated cells. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs PMA plus A23187 alone.

### 9) 통계처리

모든 실험값은 평균 $\pm$ 표준편차로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리하였으며, 유의성 한계는  $p < 0.05$ 로 정하였다.

## III. 결 과

### 1. RPMCs에서 黃連解毒湯이 전염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향.

黃連解毒湯 추출물이 RPMCs에서 전염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RPMCs( $1 \times 10^6$ /mL)를 접종하고 각각의 추출물을 25-200  $\mu$ g/mL 농도로 30분간 전 처리한 다음 PMA (30 ng/mL)와 A23187 (10  $\mu$ M)을 동시에 처리하고 18시간 후 배양액에 측정된 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  양을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 PMA와 A23187를 처리한 대조군은 정상 대조군에 비해서 TNF- $\alpha$  생성이  $1,012 \pm 125$  pg/mL로 현저히 증가( $p < 0.001$ )한 반면, 黃連解毒湯 추출물을 처리한 실험군에서는 의존적으로 TNF- $\alpha$  생성 억제 효과가 있었다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). 또한 대조군은 정상 대조군에 비해서 IL-1 $\beta$ 생성이  $367 \pm 31$  pg/mL로 현저히 증가( $p < 0.001$ )한 반면, 黃連解毒湯 추출물을 처리한 실험군에서는 의

존적으로 IL-1 $\beta$ - $\alpha$ 생성 억제 효과가 있었다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). 이러한 결과로 설치류 비만세포에서 黃連解毒湯이 전 염증성 사이토카인을 효과적으로 억제함을 알 수 있었다.

### 2. RPMCs에서 黃連解毒湯이 히스타민 방출에 미치는 영향.

黃連解毒湯 추출물이 RPMCs에서 히스타민의 방출에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RPMCs( $1 \times 10^6$ /mL)를 접종하고 각각의 추출물을 25-200  $\mu$ g/mL 농도로 15분간 전 처리한 다음 compound 48/80 (0.5  $\mu$ g/mL)을 처리하고 30시간 후 방출된 히스타민 양을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2과 같이 compound 48/80를 처리한 대조군은 아무런 약물을 처리하지 않은 정상 대조군에 비해서 히스타민이  $77.25 \pm 7.2$  ng/mL로 현저히 증가( $p < 0.001$ )한 반면, 黃連解毒湯 추출물을 처리한 실험군에서는 의존적으로 히스타민 방출 억제 효과가 있었다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). 이러한 결과로 黃連解毒湯이 설치류 비만세포의 활성을 억제하여 히스타민 방출을 효과적으로 차단하였음을 알 수 있었다.

### 3. ICR 마우스 가려움증에 미치는 黃連解毒湯의 효과.

ICR (7주령) 마우스를 대상으로 黃連解毒湯 추

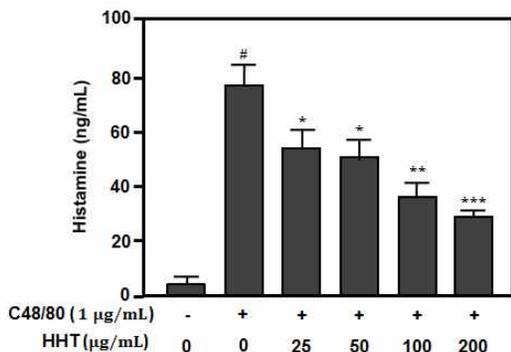


Fig. 2. Effects of HHT on histamine release in compound 48/80-stimulated RPMCs. RPMCs ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) were preincubated with medium or HHT (25-200  $\mu\text{g/mL}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  for 10 min prior to incubation with compound 48/80. Histamine level was measured by ELISA methods described in the section of materials and methods. Data are means  $\pm$  SD of three independent experiments.  $\#p < 0.001$  vs untreated cells.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$  vs compound 48/80 alone.

출물이 compound 48/80과 히스타민으로 유발한 가려움증을 억제하는 효과가 있는지 알아보았다. 그 결과 Fig. 3A와 같이 compound 48/80으로 유발한 가려움증으로 인한 긁는 횟수가  $257.5 \pm 20.7$ 로 현저히 증가한 반면 ( $p < 0.001$ ), 추출물을 농도별로 처리한 군이 실험 대조군에 비하여 농도 의존적으로 가려움증 억제 효과를 보임을 알 수 있었다 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). 또한 Fig. 3B와 같이 히스타민으로 유발한 가려움증으로 인한 긁는 횟수가  $153.4 \pm 15.2$ 로 현저히 증가한 반면 ( $p < 0.001$ ), 추출물을 농도별로 처리한 군이 실험 대조군에 비하여 농도 의존적으로 가려움증 억제 효과를 보임을 알 수 있었다 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). 이러한 결과로 黃連解毒湯이 설치류의 가려움증을 현저히 억제시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

#### 4. DNFB로 유도된 hairless 마우스 귀 부종에 미치는 黃連解毒湯의 효과.

Hairless 마우스를 대상으로 DNFB로 아토피 피부염 유사 모델 동물을 유도하여 귀부종에 미치는 黃連解毒湯 추출물의 효과를 알아본 결과 Fig. 4 A와 같이 DNFB만 처리한 대조군은 정상 대조군에 비해서 현저히 귀부종이 유발된 반면, 黃連解

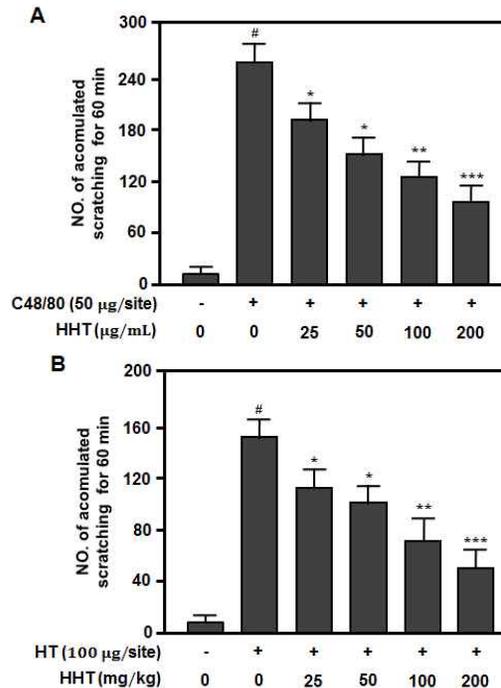


Fig. 3. The antipruritic effect of HHT on the scratching behavior induced by compound 48/80 (A) and histamine (B) in ICR mice. HHT was administered orally 1 hour before the pruritogen injection and then compound 48/80 (50  $\mu\text{g}/\text{site}$ ) or histamine (100  $\mu\text{g}/\text{site}$ ) was injected into rostral back, and scratching of the injected site by the hind paw was counted for an hour. Data are shown as the cumulative means  $\pm$  SE of 5 individual mice.  $\#p < 0.001$  compared with the normal control group (noncompound 48/80 treated group).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.01$  compared with 48/80 alone group.

毒湯 추출물을 투여한 실험군에서는 농도에 의존적으로 귀 부종이 개선되었다. 즉 Fig. 4 B와 같이 실험 대조군은  $48.9 \pm 2.86$  mm로 귀 부종이 현저히 증가 ( $p < 0.001$ )한 반면, 추출물을 농도별로 처리한 군은 실험 대조군에 비하여 농도 의존적으로 귀 부종이 현저히 억제되었다 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). 또한 Fig. 4 C와 같이 귀조직을 H&E로 염색한 결과 DNFB 처리 실험 대조군은 심한 부종과 함께 백혈구의 침윤이 현저히 유발된 반면, 黃連解毒湯 추출물을 투여한 실험군에서는 농도에 의존적으로 백혈구의 침윤의 억제와 염증현상이 현저히 개선되는 효과가 있었다. 이러한 결과로 黃連解毒湯이 가려움증 경감뿐만 아니라 귀 부종과 염증반응 억제에도 우수한 효과가 있음을 알 수

있었다.

5. DNFB로 유도된 hairless 마우스 피부조직에 미치는 黃連解毒湯의 효과.

Hairless 마우스를 대상으로 DNFB로 아토피 피부염 유사 모델 동물을 유도하여 귀부종에 미치는 黃連解毒湯 추출물의 효과를 알아본 결과 Fig. 5와 같이 DNFB로 유도된 마우스의 피부조직은 극세포증(acanthosis), 각질증식증(hyperkeratosis), 상처 및 출혈 수준이 매우 심각할 뿐만 아니라 백혈구의 침윤이 많이 관찰되었으나, 黃連解毒湯 추출물을 투여한 결과 농도 의존적으로 그 증상과 백혈구 침윤이 현저히 줄어 들었다. 또한 Fig. 6와 같이 DNFB로 유도된 대조군 마우스의 피부조직의 두께는  $147.1 \pm 15.8$ 로 정상대조군의 피부조직에 비해 현저히 증가하였고( $p < 0.001$ ), 피부병변 스코어도  $7.89 \pm 1.25$ 로 정상 피부상태에 비해 매우 심각하였다( $p < 0.001$ ). 그러나 DNFB로 유도되고 黃連解毒湯 추출물이 처리된 실험군은 농도에 의존적으로 피부두께와 피부병변이 현저히 개선되었는데( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ), 100 mg/kg

과 200 mg/kg 투여군에서는 정상조직과 유사한 피부조직 소견을 보였다. 더욱이 Fig. 6과 같이 DNFB로 유도된 마우스 혈청에서 IL-4 ( $790.5 \pm 66.7$  pg/mL)와 IgE ( $2,103 \pm 314$  pg/mL)으로 현저히 증가한( $p < 0.001$ ) 반면, 黃連解毒湯 추출물이 처리된 실험군은 농도에 의존적으로 IL-4와 IgE가 현저히 억제되는 효과를 보였다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). 이러한 결과로 黃連解毒湯이 피부조직의 부종, 병변, 염증억제 및 과민반응 억제에 우수한 효과가 있음을 알 수 있었다.

#### IV. 고 찰

黃連解毒湯의 구성약물들의 아토피 피부염에 관련된 약리작용을 조사하여 보면 黃芩은 항알러지 항아토피 작용이 있고<sup>20)</sup>, 黃連은 해열 진정 효과가 있으며<sup>21)</sup>, 黃柏은 항암작용이 있다<sup>22)</sup>. 또한 黃連과 黃柏 유래물질인 berberine는 아토피 피부염 완화에 대한 직접적인 보고는 없지만, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 과 같은 proinflammatory cytokine

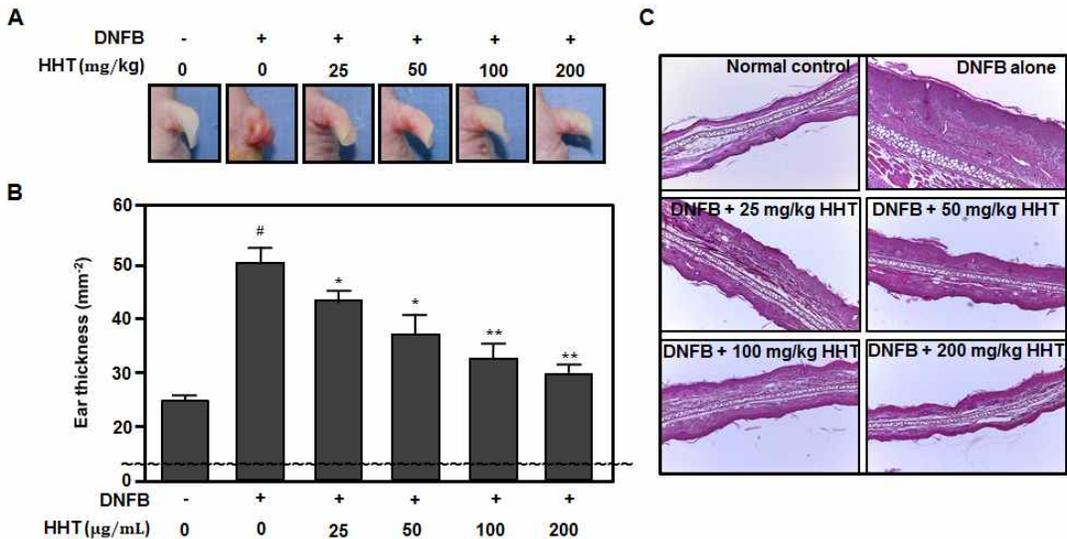


Fig. 4. Effect of HHT on an ear edema(A and B) and histological changes (C) induced by DNFB in hairless mice. Atopic dermatitis like mice were induced with DNFB as described in the section of materials and methods. Experimental groups received a various concentrations (25-200 mg/kg) of HHT with ip for 10 days from 4 to 13 days. Ear thickness was measured by vernier calipers. Ear tissue was stained by H&E. Data are shown as the cumulative means  $\pm$  SE of 5 individual mice. # $p < 0.001$  compared with the normal control group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared with DNFB alone group.

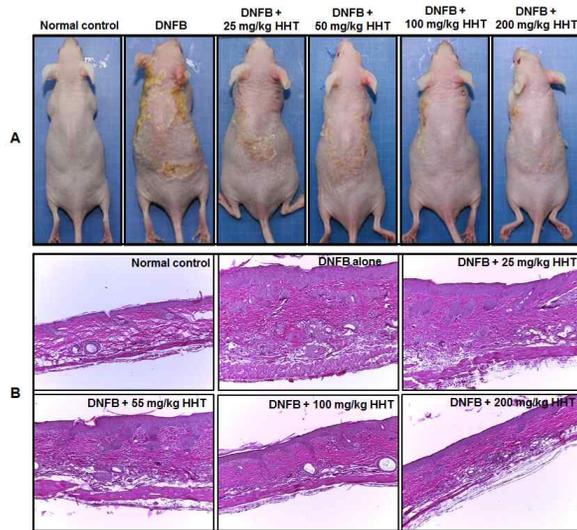


Fig. 5. Effect of HHT on an ear edema (A) and histological changes (B) induced by DNFB in hairless mice. Atopic dermatitis like mice were induced with DNFB as described in the section of materials and methods. Experimental groups received a various concentrations (25-200 mg/kg ) of HHT with ip for 10 days from 4 to 13 days. Epidermal skin tissue was stained by H&E as described in the section of materials and methods.

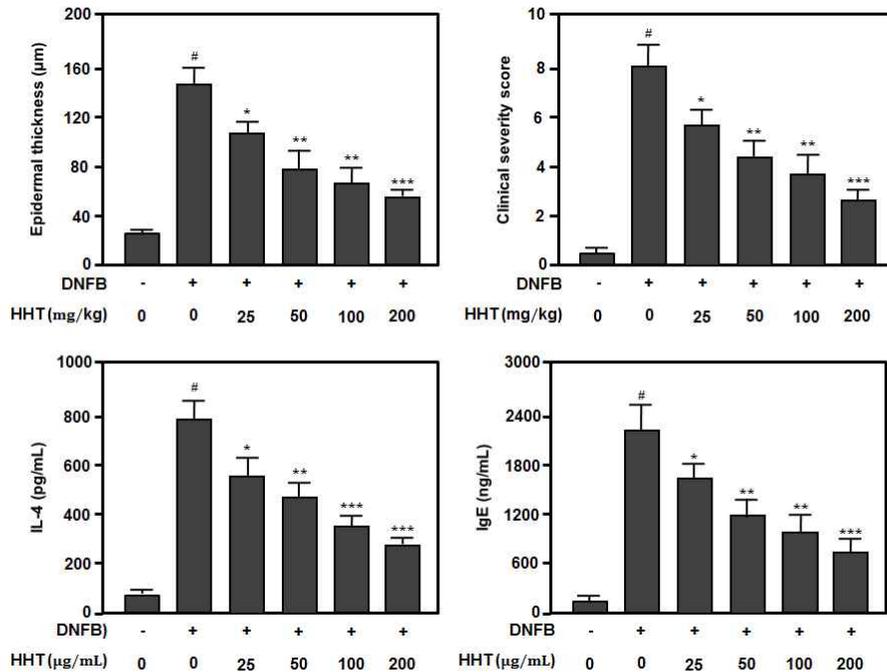


Fig. 6. Effect of HHT on an epidermal thickness, clinical severity, IL-4 and IgE induced by DNFB in hairless mice. Atopic dermatitis like mice were induced with DNFB as described in the section of materials and methods. Experimental groups received a various concentrations (25-200 mg/kg ) of HHT with ip for 10 days from 4 to 13 days. Levels of IL-4 and IgE were measured by ELISA method. Epidermal skin tissue thickness was measured by vernier calipers. Clinical severity score was measured by blander test. Data are shown as the cumulative means±SE of 5 individual mice. #p<0.001 compared with the normal control group. \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.01 compared with DNFB alone group.

뿐만 아니라 monocyte chemoattractant protein (MCP)-1과 monocyte adhesion molecules을 효과적으로 억제하는 효과가 있는 것으로 알려졌다<sup>22-24</sup>). 또한 梔子是 geniposide, genipin, geniposidic acid, crocetin, crocin 등 생리활성 성분이 함유되어 있고<sup>24</sup>), 梔子 유래 iridoids계열의 화합물은 급성 및 만성 염증을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었다<sup>25</sup>). 본 연구의 결과 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子등으로 구성된 黃連解毒湯은 활성화된 RPMCs의 전 염증성 사이토카인과 가려움 유발물질로 유도된 피부 가려움증을 효과적으로 억제하였을 뿐만 아니라 DNFB로 유도된 아토피 유사 모델 마우스에서 피부병변, 염증성 백혈구의 침윤과 과민반응 매개물을 억제하는 우수한 효과가 있었다.

가려움증 혹은 가려움증으로 인해 긁는 행위는 아토피 피부염 환자의 전형적인 증상으로<sup>26</sup>) 반복적으로 피부 병소를 긁는 행위는 피부 장벽의 붕괴와 더불어 아토피 피부염을 더욱 악화시킨다. 그러므로 본 연구는 가려움증에 대한 효과를 알아보기 위해서 먼저 黃連解毒湯 추출물을 전처리하고 PMA와 A23187로 RPMCs를 자극하여, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  생성을 조사하였다. 그 결과 농도에 의존적으로 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 를 억제시키는 유효한 효과가 있었다(Fig. 1). 또한 黃連解毒湯 추출물이 활성화된 비만세포의 히스타민 방출에 미치는 영향을 조사한 결과 농도에 의존적으로 히스타민 방출을 억제시키는 효과도 있었으며(Fig. 2), 아토피 피부염 증상의 핵심인 가려움증 경감에 미치는 효과를 검증한 결과 가려움증 경감에 유효한 효과가 있었다(Fig. 3). 이번 연구에서는 compound 48/80 또는 히스타민을 마우스 등쪽에 피하주사(subcutaneous injection) 하여 가려움증 유발 물질이 주입된 부위를 마우스 뒷발로 긁는 횟수를 측정하여 가려움증과 연관된 행위라 간주하고 이를 가려움증 유발 동물모델로 제시하였는데, 이는 黃連解毒湯이 아토피 피부염 치료 또는 개선에 사용할 수 있는 근거로 제시할 수 있으며, 이러한 결과로 Kuraishi 등<sup>27</sup>)의 보고와 일치한다.

DNFB는 피부표면에 감작되면 즉시형 및 지연형 과민반응을 유도하여 AD 유사 모델을 유도할 수 있는 화학적 항원이다<sup>28</sup>). 본 연구에도 DNFB로 아토피 피부염 유사모델에 黃連解毒湯 추출물은 귀의 부종과 피부병변 개선에 우수한 효과가 있었다. 즉, DNFB로 유도된 피부조직의 극세포증(acanthosis), 각질증식증(hyperkeratosis)이나, 상처 및 출혈을 현저히 개선하는 효과가 있었다. 특히 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군에서는 정상조직과 거의 유사한 피부조직 소견을 보였다. 이러한 결과로 黃連解毒湯이 피부조직의 두께, 병변 및 염증억제에 유효한 효과가 있음을 제시하고 있다.

아토피 피부염은 초기에 Th2 세포가 IL-4, IL-5 및 IL-13과 같은 Th2 사이토카인을 과량 생성한다<sup>8-11</sup>). 이들 중 IL-4는 B세포를 자극하여 IgE을 대량생성하게 하여, 비만세포 활성을 유도하고 아토피 피부염의 핵심 분자들을 발현시켜 염증반응을 가속화 시킨다. 이와 같이 AD이 급성적으로 진행된다면 Th2 사이토카인 뿐만 아니라 CCL17, CCL22와 CCL27과 같은 일련의 Th2 케모카인이 발현됨으로써 염증관련 면역세포가 상처부위로 과다하게 침윤되고 더욱 더 심한 염증반응을 유발하여 피부조직에 부종과 함께 가려움증이 생기며 심각한 피부손상을 일으킨다<sup>11-13,15-17</sup>). 이러한 아토피 피부염의 세포생물학적 기전을 감안하여 본 연구는 마지막으로 DNFB로 유도된 아토피 피부염 유사모델에서 혈청의 IL-4와 IgE을 측정하고 결과 黃連解毒湯 추출물이 처리된 실험군은 농도에 의존적으로 IL-4와 IgE가 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 黃連解毒湯이 Th2와 B세포 반응에 관련된 일정한 작용이 있음을 시사하고 있다.

이상의 실험결과를 종합하여 보면 黃連解毒湯은 활성화된 비만세포의 전염증성 사이토카인과 히스타민을 억제할 뿐만 아니라 가려움증 완화에 유효한 효과가 있었다. 더불어 DNFB로 유도한 아토피 유사 모델동물에서 귀의 부종 완화와 피부병변을 현저히 개선시켰을 뿐만 아니라 아토피 피부염의 핵심 원인 분자인 IgE와 IL-4를 효과적으로 억제하는 결과를 보여주었다. 이러한 결과를



종합하여 볼 때 黃連解毒湯이 아토피 피부염 치료 또는 개선에 일정한 효과가 있음을 제시하였고, 앞으로 보다 效果의이고 副作用이 없으면서, 實用성이 높은 黃連解毒湯을 이용한 治療劑 開發에 대한 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

## V. 결 론

黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子등으로 구성된 黃連解毒湯이 PMA와 A23187로 활성화된 RPMCs의 전염증성사이토카인과 히스타민 억제, 가려움 유발물질로 유도된 마우스의 가려움증 완화 및 DNFB로 유도된 아토피 피부염 유사 마우스 모델에서 아토피 피부염 증상 개선 효과에 대한 결과를 다음과 같이 얻었다.

- 1) 黃連解毒湯은 PMA와 A23187로 활성화된 RPMCs에서 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 생성을 농도 의존적으로 억제하였다.
  - 2) 黃連解毒湯은 compound 48/80으로 자극된 RPMCs에서 히스타민의 방출을 농도 의존적으로 억제하였다.
  - 3) 黃連解毒湯은 compound 48/80과 히스타민에 의해 유도된 가려움증을 농도 의존적으로 완화시켰다.
  - 4) 黃連解毒湯은 DNFB로 유도된 아토피 피부염 유사모델에서 귀 부종, 피부두께, 피부병변, 염증성 백혈구 침윤 및 혈청의 IL-4와 IgE생성을 농도 의존적으로 억제하는 효과가 있었다.
- 이러한 결과를 종합하여 볼 때 黃連解毒湯은 아토피 피부염 치료 또는 개선에 우수한 효과가 있어 實用성이 높은 治療劑 開發에 대한 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. 王燾. 外臺秘要. 北京:人民衛生出版社. 1996:72.
2. 尹吉榮. 東醫臨床方劑學, 서울:明寶出版社. 1985:228, 229.
3. 朴喜守. 臨床處方講座, 서울:大成醫學社. 2000:167-71.
4. 鄭津牟. 中國處方解說. 臨床. 應用. 서울:癸丑文化史. 1992:354-7.
5. 尹用甲. 圖解增補 東醫方劑와 處方解說. 서울:醫聖堂. 2007:730-46.
6. 원영호, 황충연, 임규상, 김종한, 고성규, 이부균, 이동효, 김남권. 托裏消毒飲 合 黃連解毒湯의 아토피피부염에 대한 실험적 연구. 한방안이비인후피부과학회지. 2011;24:121-41.
7. 김보애, 김미소, 강보미, 변선희, 박일향, 박지하, 정지옥, 안은미, 정현아, 장정희, 배원, 이하영, 최필너, 박찬익. 黃連解毒湯이 NC/Nga Mice에서 유발된 아토피 피부염에 미치는 영향. 대한본초학회. 2008;23:59-65.
8. Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. J Allergy Clin Immunol. 2003;112:S118-27.
9. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. Lancet. 2003;361:151-60.
10. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. J Clin Invest. 2004;113:651-7.
11. Mohrenschlager M, Darsow U, Schnopp C, Ring J. Atopic eczema: what's new? J Eur Acad Dermatol Venereol. 2006;20:503-13.
12. Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. J Allergy Clin Immunol. 2003;112:252-62.
13. Schultz-Larsen, F. Hanifin, JM. Epidemiology of atopic dermatitis. Immunol Allergy Clin North Am. 2002;22:1-24.
14. Saluja R, Delin I, Nilsson GP, Adner M. Fc $\epsilon$ RI-mediated mast cell reactivity is amplified through prolonged Toll-like receptor-ligand treatment. PLoS One. 2012;7:e43547.
15. Beltrani VS. The clinical spectrum of atopic

- dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 1999;104:87-98.
16. Raiford DS. Pruritus of chronic cholestasis. Q J Med. 1995;88:603-7.
  17. Wahlgren CF. Itch and atopic dermatitis: an overview. J Dermatol. 1999;26:770-9.
  18. Galli SJ. New concepts about the mast cell. N Engl J Med. 1993;328:257-65.
  19. Martynova MG, Bystrova OA, Moiseeva OM, Evdonin AL, Kondratov KA, Medvedeva ND. The presence of ANP in rat peritoneal mast cells. Cell Res. 2005;15:811-6.
  20. Lee YM, Cheng PY, Chim LS, Kung CW, Ka SM, Chung MT, Sheu JR. Baicalein, an active component of *Scutellaria baicalensis* Georgi, improves cardiac contractile function in endotoxaemic rats via induction of heme oxygenase-1 and suppression of inflammatory responses. J Ethnopharmacol. 2011;135:179-185.
  21. Lin CC, Ng LT, Hsu FF, Shieh DE, Chiang LC. Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2004;31:65-9.
  22. Hsiang CY, Wu SL, Cheng SE, Ho TY. Acetaldehyde-induced interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha production is inhibited by berberine through nuclear factor-kappaB signaling pathway in HepG2 cells. J Biomed Sci. 2005;12:791-801.
  23. Auyeung KK, Ko JK. Coptis chinensis inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene activation. Int J Mol Med. 2009;24:571-77.
  24. Lee B, Sur B, Shim I, Lee H, Hahm DH. *Phellodendron amurense* and Its Major Alkaloid Compound, Berberine Ameliorates Scopolamine-Induced Neuronal Impairment and Memory Dysfunction in Rats. Korean J Physiol Pharmacol. 2012;16:79-89.
  25. Fu Y, Liu B, Liu J, Liu Z, Liang D, Li F, Li D, Cao Y, Zhang X, Zhang N, Yang Z. Geniposide, from *Gardenia jasminoides* Ellis, inhibits the inflammatory response in the primary mouse macrophages and mouse models. Int Immunopharmacol. 2012;14:792-8.
  26. Wahlgren CF. Itch and atopic dermatitis: an overview. J Dermatol. 1999;26:770-9.
  27. Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice. Eur J Pharmacol. 1995;275:229-33.
  28. Nagai H, Matsuo A, Hiyama H, Inagaki N, Kawada K. Immunoglobulin E production in mice by means of contact sensitization with a simple chemical, hapten. J Allergy Clin Immunol. 1997;100:S39-S44.