

황련-감초 추출물을 이용한 하태독법이 NC/Nga 생쥐에서 유발된 아토피 유사 피부염에 미치는 항염증 효과

차호열¹, 안상현², 정아람¹, 천진홍¹, 박선영³, 최준용⁴, 김기봉¹

¹부산대학교 한방병원 한방소아과, ²부산대학교 한의과학연구소
³세명대학교 한의과대학 생리학교실, ⁴부산대학교 한방병원 한방내과

Anti-inflammatory Effects of Hataedock Extracted from *Coptidis Rhizoma* and *Glycyrrhiza Uralensis* on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions of NC/Nga Mouse

Ho-yeol Cha¹, Sang-hyun Ahn², A-ram Jeong¹, Jin-hong Cheon¹
Sun-young Park³, Jun-yong Choi⁴, Ki-bong Kim¹

¹Dept. of Pediatrics of Korean Medicine, Pusan National University Hospital

²Research Institute for Korean Medicine, Pusan National University

³Dept. of Physiology, College of Korean Medicine, Se-Myung University

⁴Dept. of Internal Medicine of Korean Medicine, Pusan National University Hospital

ABSTRACT

Objectives: Hataedock is an orally administered herbal extract treatment for newborn babies that dispels toxic heat and meconium gathered by the fetus. The purpose of this study was to evaluate whether Hataedock alleviates inflammatory skin damage in AD (Atopic Dermatitis)-induced NC/Nga mice through regulating and maintaining the skin barrier and anti-inflammation effects.

Methods: We established an AD model in three-week-old NC/Nga mice through the repeated application of DNFB (dinitrochlorobenzene) on days 28, 35, and 42 after Hataedock treatment was orally administered. We identified changes in the skin barrier and anti-inflammation effects through the histological and immunohistochemical changes of TNF- α , NF- κ B p65, iNOS, COX-2, and apoptotic bodies.

Results: Skin damage and angiogenesis were mitigated in the HT (Hataedock) group. Damage to the intercellular space of the stratum corneum as well as hyperplasia, edema, the infiltration of lymphocytes, and the increase of capillaries decreased in the HT group. Our results suggest that Hataedock treatment significantly down-regulated levels of TNF- α by 38% ($p < 0.001$) and of NF- κ B p65 by 70% ($p < 0.001$). But Hataedock up-regulated apoptosis by 183% in dermatitis-induced skin.

Conclusions: These results suggest that Hataedock alleviates AD through diminishing the various inflammatory cytokines in skin lesions that are involved in the initial steps of AD development. It might have potential applications for the prevention and treatment of atopic dermatitis.

Key words: Hataedock, atopic dermatitis, TNF- α , NF- κ B p65, apoptosis

1. 서론

· 투고일: 2015.11.02, 심사일: 2015.12.02, 게재확정일: 2015.12.04

· 교신저자: 김기봉 경상남도 양산시 물금읍 금오로 20

부산대학교 한방병원 한방소아과

TEL: +82-55-360-5952 FAX: +82-55-360-5952

E-mail: kkb2630@gmail.com

아토피 피부염은 피부발진과 소양증을 주 증상으로 재발과 호전을 반복하는 만성 염증성 질환으

로 대한 소아알레르기 호흡기학회의 발표에 의하면 한국의 최근 유병률 또한 1995년에서 2010년 사이 초등학생은 9.2%에서 20.6%로 매년 0.76%씩, 중학생은 4.0%에서 12.9%로 매년 0.59%씩 상승하고 있다¹.

아토피 피부염(Atopic Dermatitis, AD)은 유전 요인, 환경 요인, 약물성, 심리적, 면역학적, 피부 장벽 요인 등의 다양한 요인들의 복잡한 상호관계로 인해 야기되는 것으로 알려져 있는데², 아토피 피부염으로 시작된 알레르기 행진(atopic march)은 부비동염, 알레르기비염, 천식 등 순차적 또는 복합적으로 진행되기 때문에 영·유아기부터 적정 치료와 지속적 관리, 위험인자 노출회피 등이 필요하다³.

각질세포 간 지질막을 형성하는 주된 지질은 세라마이드, 콜레스테롤, 자유지방산으로 이들 중 세라마이드가 50% 정도를 차지하고 있다. 아토피 피부염 환자의 경우 병변뿐만 아니라 건조한 양상의 비병변 부위에서도 세라마이드가 뚜렷하게 감소되는데, 이것이 거의 모든 아토피 피부염 환자에서 관찰되는 건조피부의 원인으로 지목되고 있다⁴. 각질층 내 세라마이드는 분해되면서 sphingosine을 생성시키며, 생성된 sphingosine은 PKC의 활성을 억제한다. 하지만 아토피 피부염의 경우에는, 각질층 세라마이드의 감소로 인해 protein kinase C (PKC)의 활성이 유도되며⁵, IκB kinase(IKKα, β)에 활성에 의한 IκB protein의 serine residue 인산화이 일어난 후 IκB protein은 ubiquitination 되어 26S proteasom에 의해서 분해(degradation)되고 그 결과 유리된 전사인자 nuclear factor(NF)-κB가 핵으로 들어가 target 유전자의 NF-κB binding site에 결합하여 염증관련유전자, anti-apoptosis 유전자 등의 발현을 유도한다⁶. 또한 NF-κB는 COX-2나 iNOS와 같은 유도효소(inducible enzyme) 등을 코드화하는 유전자를 조절함으로써 염증반응에도 중요 역할을 수행하게 되는데, 이로 인한 prostaglandin E2(PGE2)와 nitric oxide등의 염증촉진 매개물은

아토피 피부염을 더욱 악화시키는 것으로 알려져 있다^{7,8}.

한의학에서는 태아기동안 쌓인 태독(胎毒)이 출산시 제대로 처리되지 못하고 계속 남아 태열(胎熱)의 형태로 소화기증상과 피부증상으로 발병되며, 아토피 피부염도 이 범주에 속하는 질환으로 구분한다⁹. 출산 후 이러한 태독(胎毒)을 효과적으로 제거하는 방법으로 하태독법(下胎毒法)을 사용하였다. 하태독법(下胎毒法)의 종류는 감초법(甘草法), 황련법(黃連法), 주밀법(朱蜜法), 우황법(牛黃法), 두시법(豆豉法), 구즙법(韭汁法), 홍분법(汞粉法) 등이 있으며, 각각의 약재를 물에 달여 신생아에게 소량을 먹이는 방법이다¹⁰. 하태독법이 아토피 피부염 발진 억제에 효과가 있을 것으로 생각되나, 아직까지 하태독법의 면역조절 작용에 의한 효능을 체계적으로 검증한 연구가 부족한 실정이다.

본 연구는 피부 국소부위에 반복 처리하면 면역세포 침윤을 통한 다양한 pro-inflammatory cytokines이나 mediators 즉, histamine, tumor necrosis factor (TNF)-α, vascular endothelial growth factor(VEGF)를 분비한다고 보고된 DNFB¹¹로 아토피 유사 피부염을 Ng/Nga 생쥐에 유발하는 동물모델을 적용하였다. 황련과 감초 복합추출물을 이용한 하태독법 실시 후 아토피 유사 피부염에서 일어난 전염증효소, 염증전사인자, 염증효소, 염증세포의 apoptosis 변화를 면역조직학적 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 피부염 실험모델

중앙실험동물(한국)에서 분양받은 태령 3주된 13~15 g Nc/Nga 암컷 생쥐를 선별하여 사용하였다. 대조군(Ctrl군), 피부염유발군(DE군), 하태독처리 후 피부염유발군(HT군)으로 나누었으며, 각군에 각 10마리씩 배정하였다. 피부염 유발은 생쥐 등쪽 부위 피부를 면도한 다음 5% sodium dodecyl

sulfate(SDS : Sigma, USA) 1 ml을 면봉으로 20회 문질러서 각질층의 lipid lamella를 제거하였다. Acetone/Olive(4:1)에 희석된 1% 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) 100 µl로 감작시킨 후 7일과 14일째 2% DNFB 100 µl을 도포하여 피부염을 유발하였다. 피부염 유발 72시간 후 sodium pentobarbital 용액으로 마취 후 처지하였다. 얻어진 등쪽 피부를 10% NBF에 실온에서 24시간 동안 고정한 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5 µm 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 Phloxine-tartrazine 염색하여 표본을 제작하였다. 본 연구과정은 부산대학교 IACUC 승인을 받아 시행되었으며(IACUC number: PNU-2014-0732), 실험실 동물의 관리와 사용에 대해서는 NIH 가이드라인에 따라 시행되었다(Fig. 1).

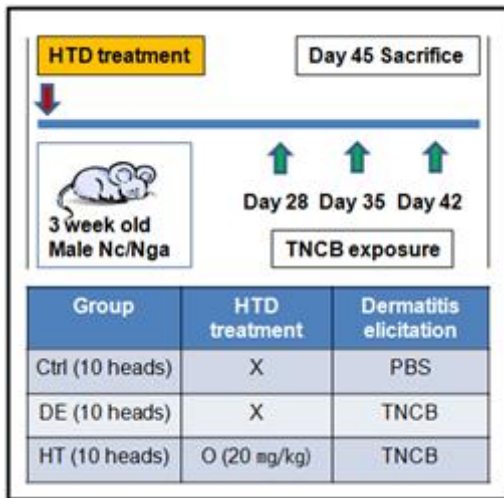


Fig. 1. Protocol of HTD for DNFB induced dermatitis.

Mice were sensitized on days 28 by exposure of 1% DNFB 100 µl. On days 7 and 14 after initial sensitization, the mice were challenged with 2% DNFB 100 µl. HTD treatment was orally administered on days 0. HTD : Hataedock, PBS : phosphate-buffered saline, DNFB : 2,4-dinitrofluorobenzene

2. 하태독법 약물의 제조와 처리

황련 100 g과 감초 100 g을 증류수 1000 ml에 넣고 3시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml으로 감압·농축한 후 동결 건조하여 추출물 31 g(수득률 15.5%) 획득했다. 획득된 황련-감초 혼합 추출물을 3주령 Nc/Nga 생쥐 HTD군에 경구투여하는 하태독법을 실시하였다(20 mg/kg).

3. Fingerprinting analysis

지표성분의 정량분석을 위해서 binary solvent delivery pump(G1312A), auto sampler(G1329A), column oven(G1316A), diode array detector(DAD; G1315D), vacuum degasser(G1322A) 등으로 구성된 HPLC system(Agilent technologies 1200 series; Agilent Technologies, CA, USA)을 사용하였다. 컬럼은 Capcell PAKMGII C₁₈(3.0×150 mm, 3.0 µm; Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하였고, 컬럼 온도는 35 °C, 유속은 0.6 mL/min, 시료 주입량은 15 µL로 설정하였다. 이동상은 0.5% formic acid가 포함된 water(v/v; A)와 acetonitrile(B)로 구성하였고, 기울기 용리법을 이용하여 분석을 진행하였다(기울기 용리 조건: initiation-5 min-2% B, 12 min-10% B, 20 min-25% B, 27 min-25% B, 25 min-80% B, 37 min-80% B, 40 min-30% B, 45 min-2% B). Palmitine, Berberine(ChemFaces, Wuhan, China) 및 Liquiritin, Liquiritigenin(Sigma-Aldrich, USA) 등의 지표물질 각 10 mg을 증류수 100 mL에 녹여 지표물질 혼합액을 제조하였다. 시료 용액은 0.45 µm syringe filter로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다.

하태독법의 성분분석을 사용한 표준성분은 *Coptidis rhizoma*의 Palmitine, Berberin과 *Glycyrrhiza uralensis*의 Liquiritigenin, Liquiritin을 사용하였다. 분석결과 Palmitine, Berberin, Liquiritigenin, Liquiritin 이 검출되었다(Fig. 2).

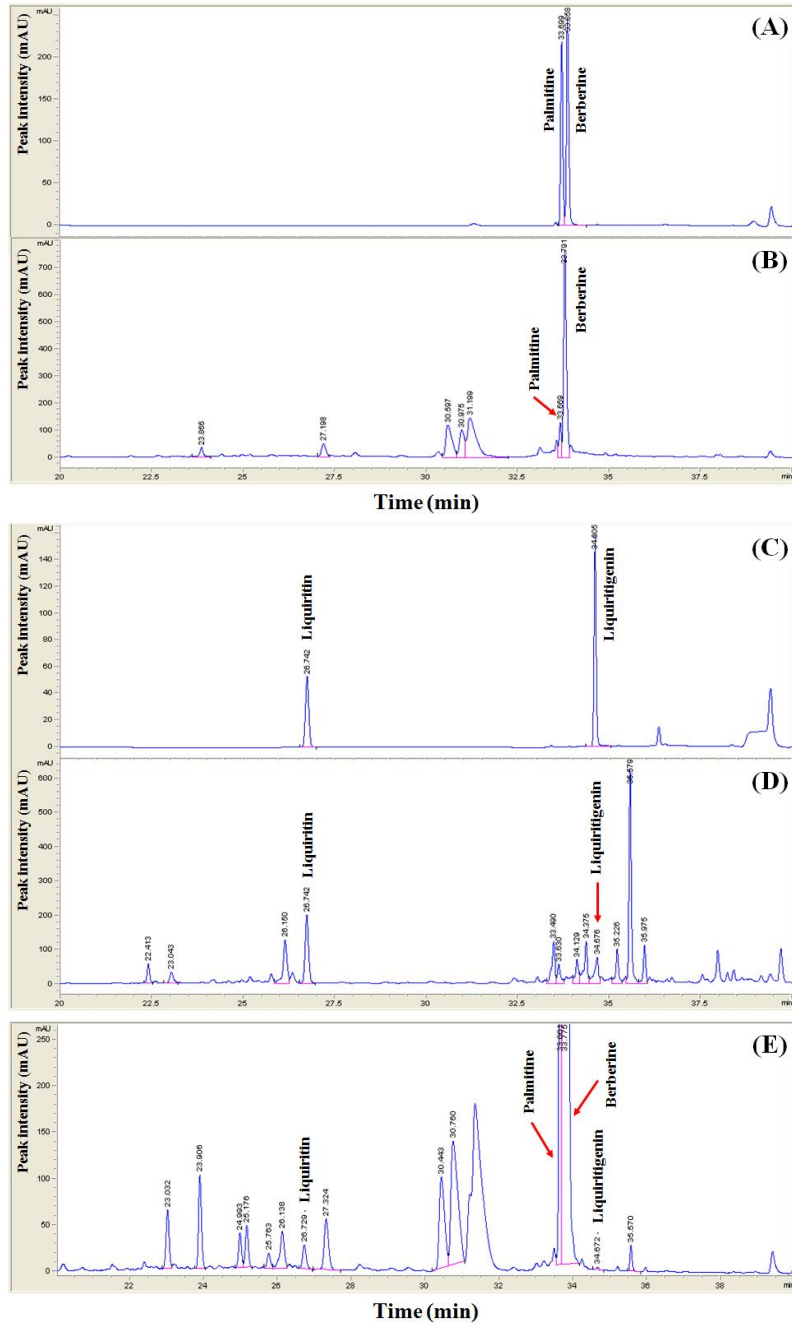


Fig. 2. The high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of herbal drugs extract and its standard components.

(A) The standard solution of *Coptidis rhizoma*. (B) The water extraction of *Coptidis rhizoma*. (C) The standard solution of *Glycyrrhiza uralensis*. (D) The water extract of *Glycyrrhiza uralensis*. (E) The water extract of *Coptidis rhizoma*-*Glycyrrhiza uralensis* formula.

4. 면역조직화학

피부절편을 proteinase K(20 µg/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에 4시간 동안 실온에서 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 goat anti-TNF-α(1:200, Santa Cruz Biotech, USA), goat anti-NF-κB p65 (1:500, Santa Cruz Biotech, USA), goat anti-iNOS (1:200, Santa Cruz Biotech, USA) 그리고 goat anti-COX-2(1:100, Santa Cruz Biotech, USA)에 4 °C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated rabbit anti-goat IgG(1:100, Santa Cruz Biotech)에 실온에서 24시간 동안 반응 하였고, 그런 다음 avidin biotin complex kit(Vector Lab, USA)를 이용하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05 M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조 염색하였다.

5. TUNEL assay

Apoptosis 변화를 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 µl TdT enzyme : 72 µl reaction buffer)을 처리하여 37 °C의 humidified chamber에서 1시간 동안 반응시킨 후 strength stop/wash buffer에서 10분 동안 처리하였다. Anti-digoxigenin-peroxidase에 1시간 동안 반응시킨 후 DAB를 처리하였다. Eosin으로 대조 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

6. 영상처리, 분석과 통계처리

혈관분포는 sharpen low-filter를 사용하여 x4 배율로 촬영 후, 반전(invert) 처리하였다. 반전 처리

된 TUNEL assay의 결과와 면역조직화학 결과는 image Pro Plus(Media cybernetics, USA)를 이용한 영상분석을 통해 수치화(means±standard error)했다. 통계는 SPSS software(SPSS 23, SPSS Inc., USA)를 이루어졌으며, one-way ANOVA 시행을 통해 유의성(P<0.001)을 검증하고 Levene's(LSD) test로 사후 검증하였다.

III. 결 과

1. 피부 손상 완화

외부 형태 변화를 관찰한 결과, DNBF로 피부염을 유발한 군(DE군)의 피부 대부분의 지역에서 각질층이 손상된 습진(eczema)이 나타났으며, 일부 가장자리지역에서는 탈락과정에 있는 혈병(blood clot)과 표피 잔재도 관찰되었다. 이에 반해 하태독법을 시행한 후 피부염을 유발한 군(HT군)은 피부손상이 적은 것으로 관찰되었다(Fig. 3A).

피부를 절개하여 혈관의 직경 차이와 모세혈관 분포 차이를 확인하였다. 진피 쪽 혈관을 관찰한 결과, DE군에서 혈관분포가 증가한 반면, HT군에서는 감소하였다(Fig. 3B).

DE군의 피부에서는 각질층의 탈락 및 세포 과형성, 그리고 피부 기저층으로 과립백혈구와 림프구와 같은 면역세포의 침윤이 증가되었다. 이에 반해 HT군은 일부 지역을 제외하고는 각질층 탈락, 상피층 증가, 과립백혈구와 림프구의 침윤 및 출현이 감소하였다(Fig. 3C).

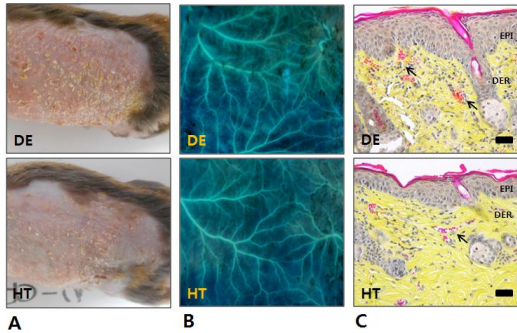


Fig. 3. The mitigative effect of HTD for dermatitis.

(A) External morphology. The skin damages as eczema were mitigated in HT group. (B) The angiogenesis were increased in DE group, but decreased in HT group (x4). (C) The damage of intercellular space of stratum corneum, hyperplasia, edema, infiltration of lymphocytes, and increase of capillary (arrow) were increased in DE group, but decreased in HT group (Bar size, 50µm; Phloxine-tartrazine method). EPI : epithelium, DER : dermis

2. 항염증효과

상피, 상피 기저부, 진피 유두에서 관찰되는 TNF-α 양성반응은 세포질에서 강하게 나타났으며. TNF-α 양성반응은 DE군에 비해 HT군이 적은 것으로 관찰되었다. 영상분석결과 HTD군에서는 DE군에 비해 38% 감소한 것으로 관찰되었다(Fig. 4).

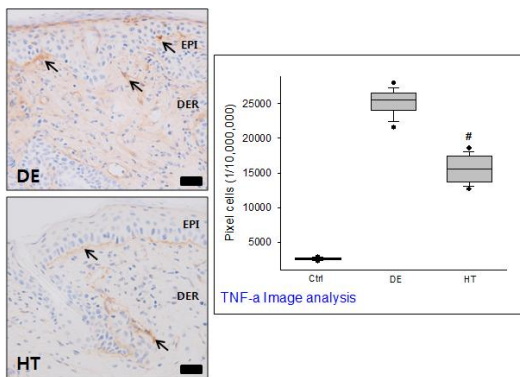


Fig. 4. Down-regulation of TNF-α activation in dermatitis Induced skin by HTD treatment (TNF-α immunohistochemistry).

TNF-α positive reaction (arrow) was activated

by DNFB in the DE group. Arrows indicate TNF-α positive reactions in the epidermis and dermis. The TNF-α positive reactions of HT group were remarkably decreased compared with those of the DE group. Data of TNF-α image analysis was also shown same result in photograph. Bar size : 50 µm. # : P<0.001 compared with DE.

DE군의 상피각질층, 상피 기저부, 진피 유두에서 NF-κB p65 양성반응은 세포 핵 주변에서 강하게 나타났으며. HT군의 NF-κB p65 양성반응은 DE군에 비해 낮게 관찰되었다. 영상분석결과 HT군에서는 DE군에 비해 70% 감소했다(Fig. 5).

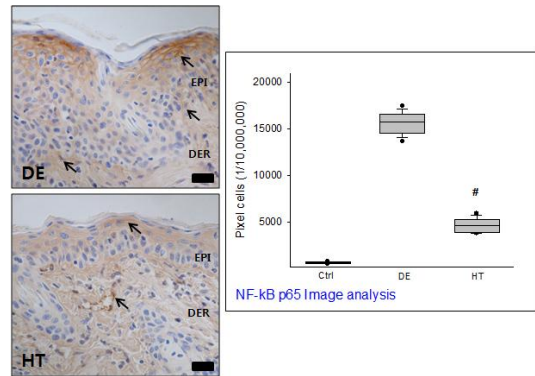


Fig. 5. Down-regulation of NF-κB p65 activation in dermatitis induced skin by HTD treatment (NF-κB p65 immunohistochemistry).

NF-κB p65 positive reaction (arrow) was activated by DNFB in the DE group. Arrows indicate NF-κB p65 positive reactions in the stratum corneum and dermal papillae. The NF-κB p65 positive reactions of HT group were remarkably decreased compared with those of the DE group. Data of NF-κB p65 image analysis was also shown same result in photograph. Bar size : 50 µm. # : P<0.001 compared with DE.

또한, 상피각질층, 상피 기저부, 진피 유두에서 관찰되는 iNOS 양성반응은 세포질 가장자리에서 강하게 나타났으며. iNOS 양성반응은 DE군에 비해 HT군이 적은 것으로 관찰되었다. 영상분석결과 HT군에서는 DE군에 비해 71% 감소했다(Fig. 6).

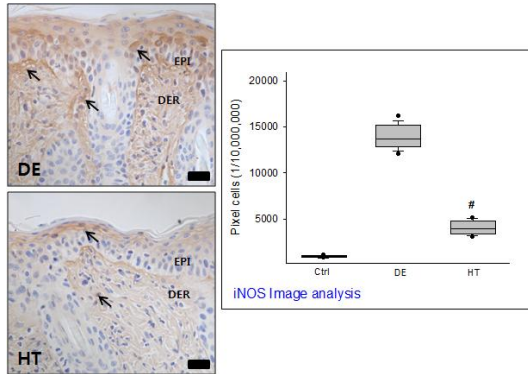


Fig. 6. Down-regulation of iNOS production in dermatitis induced skin by HTD treatment (iNOS immunohistochemistry).

iNOS positive reaction (arrow) was activated by DNFB in the DE group. Arrows indicate iNOS positive reactions in the stratum corneum and dermal papillae. The iNOS positive reactions of HT group were remarkably decreased compared with those of the DE group. Data of iNOS image analysis was also shown same result in photograph. Bar size : 50 μ m. # : P<0.001 compared with DE.

상피 기저부, 진피 유두에서 관찰되는 COX-2 양성반응은 세포질에서 강하게 나타났으며, COX-2 양성반응은 DE군에 비해 HT군이 적은 것으로 관찰되었다. 영상분석결과 HT군에서는 DE군에 비해 44% 감소했다(Fig. 7).

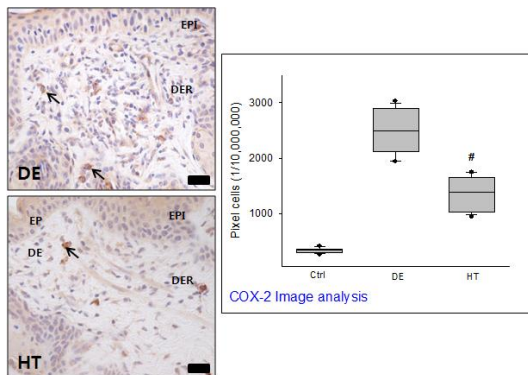


Fig. 7. Down-regulation of COX-2 production in dermatitis induced skin by HTD treatment

(COX-2 immunohistochemistry).

COX-2 positive reaction (arrow) was activated by DNFB in the DE group. Arrows indicate COX-2 positive reactions in the dermal papillae. The COX-2 positive reactions of HT group were remarkably decreased compared with those of the DE group. Data of COX-2 image analysis was also shown same result in photograph. Bar size : 50 μ m. # : P<0.001 compared with DE.

진피 유두에서 관찰되는 apoptotic body는 DE 군에 비해 HTD군이 많은 것으로 관찰되었다. 영상분석결과 HT군에서는 DE군에 비해 183% 증가했다(Fig. 8).

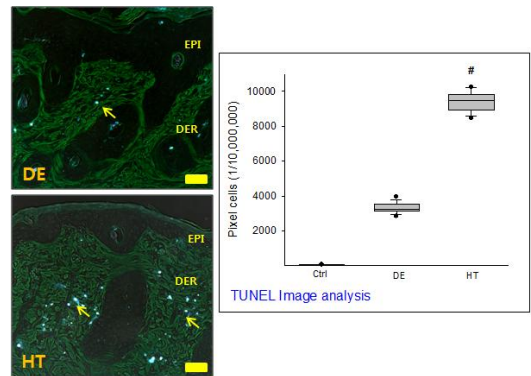


Fig. 8. Up-regulation of apoptosis in dermatitis induced skin by HTD treatment (TUNEL assay).

The apoptotic body (arrow) in the HT group were remarkably increased than the DE group. Data of TUNEL assay image analysis was also shown same result in photograph. Bar size : 50 μ m. # : P<0.001 compared with DE.

IV. 고찰

아토피 피부염은 특징적 임상증상을 갖고 있는 만성 재발성의 습진성 질환으로¹², 아토피 피부염이 발생하는 데에는 유전학적 소인, 환경적 요인, 약리학적 이상, 면역학적 요인 등 여러 가지 인자간의 상호작용이 관여한다¹³. 최근 연구들에서는 다양

한 면역학적 이상을 동반한 질환으로 보고되고 있으며^{12,13} 이러한 면역학적 이상은 면역계 발달 과정 중 비정상적 성숙으로 인해 Th1과 Th2 세포의 불균형으로 Th2 반응에 치우침에 따른 과도한 면역 반응을 주된 기전으로 보고하고 있다¹².

특히 아토피 피부염의 경우 2012년 기준 ‘연령대 별 진료인원 구성 비율’에서 9세 이하 어린이가 전체 진료인원(979천명) 중 48%(474천명)로 나타났는데¹⁴, 이는 출산시 Th2 치우침 상태의 영·유아가 아직 정상 Th1/Th2 balance로 도달하지 못한 상태에서 아토피 피부염 관련 병인에 노출된 결과로 볼 수 있다¹⁵.

한의학에서는 아토피 피부염을 태열(胎熱) 혹은 태독(胎毒)이 제대로 제거되지 못한 상황에서 발생하는 질환으로 보고 있다⁹. 이러한 태독(胎毒)을 제거하는 방법으로 한의학에서는 하태독법(下胎毒法)을 사용하였는데, 하태독법(下胎毒法)은 각각의 약재를 물에 달여 신생아에게 소량을 먹이는 방법이다¹⁰. 하태독법(下胎毒法)은 태독(胎毒)이 증상으로 발현된 신생아뿐만 아니라 현재 증상이 발현되지 않았더라도 가능성이 있는 신생아에게도 가능한 방법이지만 아직까지 이에 대한 연구는 미미한 실정이다¹⁶.

동의보감에서는 하태독법에 황련과 감초를 함께 달인 물을 사용하고 있는데¹⁷, 본 연구에서는 이를 근거로 황련-감초 추출물을 사용하여 하태독법을 시행하였다. 감초(甘草)는 성미(性味)가 감평무독(甘平無毒)하여 청열해독(淸熱解毒), 윤폐지해(潤肺止咳), 보비익기(補脾益氣), 조화제약(調和諸藥) 등의 효능이 있으며, 황련(黃連)은 청열조습(淸熱燥濕), 사화해독(瀉火解毒), 청심제번(淸心除煩), 청열명목(淸熱明目), 후장지리(厚腸止痢) 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다¹⁸. 황련은 이질, 종양, 당뇨, 습진 등의 질병을 다스리기 위한 처방에 사용되어 왔다¹⁹. 특히, 황련의 주요 활성성분인 berberine은 isoquinoline alkaloid계열로 항암²⁰⁻²², 항바이러스²³, 항균²⁴ 작용 등과 같은 다양한 약리적 효능이

보고되고 있다. 감초 또한 오래전부터 간염, 만성 호흡기 질환, 소화기 질환, 종양 성장, 면역관련 질환 등을 예방하기 위해 사용되어온 약제이다^{25,26}. 감초는 항염증 및 항알레르기 작용에 대한 보고가 많이 이루어지고 있으며, 감초의 성분인 glycyrrhizin, liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin은 항균효과의 효능이 보고되었다^{27,28}.

본 연구는 황련-감초 추출물을 이용한 하태독법이 NC/Nga 생쥐에서 유발된 아토피 유사 피부염에 미치는 항염증 효과의 확인을 통해 하태독법의 효능을 평가하고자 하였다. 기존 연구들은 아토피 유사 피부염을 먼저 유발시킨 후 실험약물 혹은 외용약물의 투약을 통하여 아토피 유사 피부염의 경감 정도를 파악하였다. 반면 본 연구는 하태독법을 먼저 시행하고, 이후 아토피 유사 피부염을 유발시킴으로써 아토피 피부염의 염증 경감 정도를 확인했다는 점에서 차이를 보인다.

본 연구에서 외부 형태의 변화를 관찰하여 피부 손상 정도를 파악하였다. 반복적으로 DNFB를 감각한 결과 실험 동물의 등쪽 피부 각질층이 손상되었고 습진이 나타났으며, 가장자리 부근에서는 혈병도 관찰되었다. 그러나 황련-감초 혼합물로 하태독법을 실시하고 피부염을 유발시킨 군에서는 피부 손상 정도가 현저히 낮았다(Fig. 3(A)).

알레르겐에 의해 알레르기 반응이 나타나면 백혈구, 비만세포, 대식세포와 같은 다양한 면역세포들이 반응이 나타난 부위로 침윤하게 되고, 일련의 세포 반응에 의해 이들 세포에서는 다양한 염증 매개 물질들이 분비된다²⁹⁻³¹. 이들 염증 매개 물질들은 화학주성을 이용하여 기관지 평활근이나 혈관 내피세포 등에 직접 작용하거나 부교감신경을 자극하여 혈류이상, 혈관투과성 항진, 기관지 평활근 수축 등을 유도하여 알레르기성 질환의 병태를 형성한다⁹. 아토피 피부염과 같은 만성 염증 반응이 일어난 조직에서는 신생혈관이 상당히 많이 형성되어 있으며, lymphatic endothelial remodeling이 많이 진행되어 있다. 염증 반응을 매개하는 다양한

물질 중에서 VEGF는 신생혈관 형성 조절에 주요한 cytokine으로 알려져 있다³². 본 연구에서 DNFB로 피부염을 유발한 후 피부 진피층의 혈관 분포 정도를 살펴본 결과, 매우 많은 혈관이 형성되어 있었으나, 황련-감초 혼합물로 하태독법을 실시하고 피부염을 유발시킨 군에서는 혈관이 비교적 적게 형성되어 있었다(Fig. 3(B)).

또한 DNFB로 피부염을 유발한 군에서는 피부 상피층에 세포가 과형성되어 상피층이 매우 두껍게 형성되어 있었으며, 기저층에는 다양한 면역세포가 다수 침윤되어 있었다. 그러나, 황련-감초 혼합물로 하태독법을 실시한 군에서는 무처치군에 비해 상피층이 두껍지 않았으며, 면역세포의 침윤 정도도 낮았다(Fig. 3(C)). 따라서 황련-감초 혼합물을 이용한 하태독법은 피부 각질층을 보호하고, 피부 진피층의 신생혈관 형성을 억제하며, 상피층에서의 세포 과형성 및 기저층에서의 면역세포 침윤 정도를 억제하여 항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

알레르기 및 염증 반응에는 비만세포와 대식세포가 주요하게 작용한다. 이들 세포가 자극되면 interleukins, prostaglandins, TNF- α , nitric oxide 등과 같은 물질들을 분비하게 된다. TNF- α 는 염증 반응을 개시하는데 주요하게 작용하며, 다양한 자극에 의해 분비된다³³. 실험 동물의 피부 조직을 이용하여 면역조직염색을 실시한 결과 DNFB에 의해 피부염이 유도된 군의 예서는 상당히 높이 TNF- α 발현 되었다. 그러나 황련-감초 혼합물로 하태독법을 실시하고 피부염을 유발시킨 군에서는 무처치군에 비해 유의적으로 TNF- α 발현이 감소했다(Fig. 4).

NF- κ B는 염증 반응에 주요한 전사인자로, hypoxia-inducible factor(HIF)-1이나 cyclooxygenase(COX)-2과 같은 다양한 pro-inflammatory mediators의 유전자 발현을 조절한다³⁴. DNFB에 의해 피부염이 유도된 군에서는 NF- κ B가 세포 핵에서 상당히 높게 발현되었으며, COX-2의 발현도 상당히 높았다. 그러나 황련-감초 혼합물로 하태독법을 실시

하고 피부염을 유발시킨 군에서는 무처치군에 비해 유의적으로 NF- κ B과 COX-2 발현이 감소했다(Fig. 5, 7).

Nitric oxide(NO)는 생체 방어에 중요한 역할을 하지만, inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 과잉 생산된 NO는 염증 반응을 더욱 심화시킨다³⁵. DNFB에 의해 피부염이 유도된 군에서는 iNOS가 상당히 높게 발현되었으나, 황련-감초 혼합물로 하태독법을 실시하고 피부염을 유발시킨 군에서는 무처치군에 비해 유의적으로 iNOS 발현이 감소했다(Fig. 6).

알레르기 반응에서 주요하게 작용하는 비만세포는 calcium signaling이 제대로 조절되지 못하면, activation-induced cell death-associated apoptosis가 일어나서 세포가 사멸된다³⁶. 앞에서 확인한 염증 매개 물질들의 발현이 감소한 원인이 염증성 세포들의 사멸에 의한 것인지 확인하고자 실험 동물의 피부 조직을 이용하여 TUNEL assay를 실시했다. DNFB에 의해 피부염이 유도된 군에서는 apoptotic cell이 거의 관찰되지 않았으나, 황련-감초 혼합물로 하태독법을 실시하고 피부염을 유발시킨 군에서는 무처치군에 비해 약 2배 많은 apoptotic cell이 관찰되었다(Fig. 8). 따라서 황련-감초 혼합물을 이용한 하태독법은 염증성 세포의 사멸을 유도함으로써 염증 매개 물질의 분비와 전사인자의 발현을 감소시켜 피부염의 증상을 경감시키는 것으로 사료된다.

하태독법의 항염증작용을 통한 아토피 유사 피부염의 조절효과를 조사하기 위해 행해진 본 연구는, 태령 3주에 하태독을 전처리한 Nc/Nga 생쥐에 DNFB를 이용하여 피부염을 유발한 후 피부의 면역조직학적 변화를 관찰하였다. 하태독법 전처리로 피부 손상(상피 세포 과형성, 과립백혈구와 림프구의 침윤 증가, 모세혈관 분포 증가)은 완화되었다. 면역조직화학적 결과, 하태독법을 실시한 군에서 TNF- α , NF- κ B p65, iNOS, COX-2 양성반응이 피부염을 유도한 군보다 현저히 낮았다. TUNEL assay

결과, 피부염만 유발한 군보다 하태독법을 실시한 후 피부염을 유발한 군에서 apoptosis가 유의적으로 증가했다. 이상의 결과로 하태독법의 실시는 과도한 염증 반응을 매개하는 다양한 염증성 세포의 사멸을 유도함으로써 염증 매개 물질 분비가 감소되어 알레르기 및 염증 반응에 의한 피부 손상이 경감된 것으로 사료된다. 향후 후속연구를 통해 하태독법의 염증조절과 관련된 기전과 안정성 및 유효성의 검증이 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 2014년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. NRF-2014R1A1A2055061).

참고문헌

1. Suh SH. Prevalence of allergic diseases in Korean children, 2010. *Health Dis* 2011;4:425-31.
2. Donald YM, Thomas B. Atopic dermatitis. *Lancet* 2003;361(9352):151-60.
3. Schneider L, Tilles S, Lio P, Boguniewicz M, Beck L, LeBovidge J, et al. Atopic dermatitis: a practice parameter update 2012. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131(2):295-9.
4. Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: An etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* 1991;96(4):523-6.
5. Park MC, Choi IH. The Efficacy of Sihochonggan-san (Chaihuqinggan-san) Extract to Improve the Function of Stratum Corneum on Mice Model after Atopic Dermatitis Elicitation. *J Kor Oriental Med* 2004;25(3):137-48.
6. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996;87(1):13-20.
7. Bruch-Gerharz D, Fehsel K, Suschek C, Michel G, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J Exp Med* 1996;184(5):2007-12.
8. Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease - a review. *Arch Dermatol Res* 1998;290(12):643-51.
9. Im GM, Jeong HW, Kim HS, Jeong WY. Oriental Medical Approach on the Allergic Disease. *Kor J Oriental Physiology & Pathology* 2002; 16(5):831-9.
10. Kang MY, Jang GT, Kim JH. A study on fetal toxicosis removal therapy. *J Pediatr Korean Med* 2003;17(1):29-51.
11. 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.
12. Kim JW. Atopic dermatitis form allergy and immunological perspective. *Kor J dermatology* 2003;41(6):687-9.
13. Park YM. Advances In the Pathophysiology of Atopic Dermatitis. *Allergy Asthma & Respiratory Disease* 2006;16(3):189-96.
14. Ministry of Health and Welfare. Korea Health Statistics 2012 : Korea National Health and Nutrition Examination Survey[KNHANES V-3].
15. Halonen M, Lohman IC, Stern DA, Spangenberg A, Anderson D, Mobley S, et al. Th1/Th2 patterns and balance in cytokine production in the parents and infants of a large birth cohort.

- J Immunol* 2009;182(5):3285-93.
16. Jeong MJ. A Study Regarding Current Usage of Ha-Taedok Method in Korean Pediatrician. *J Pediatr Korean Med* 2014;28(2):88-102.
 17. Heo J. *DongUiBoGam* 2nd ed. Seoul: NamSanDang; 2004.
 18. Korean Medical Pharmacology Text publication committee. Korean medical pharmacology. Seoul: Shinil Books; 2010, p. 116-249.
 19. Tang J, Feng YB, Tsao S, Wang N, Curtain R, Wang YW. Berberine and Coptidis Rhizoma as novel antineoplastic agents: A review of traditional use and biomedical investigations. *J Ethnopharmacol* 2009;126(1):5-17.
 20. Jabbarzadeh Kaboli P, Rahmat A, Ismail P, Ling KH. Targets and mechanisms of berberine, a natural drug with potential to treat cancer with special focus on breast cancer. *Eur J Pharmacol* 2014;740:584-95.
 21. Ortiz LM, Lombardi P, Tillhon M, Scovassi AI. Berberine, an epiphany against cancer. *Molecules* 2014;19(8):12349-67.
 22. Yu M, Tong X, Qi B, Qu H, Dong S, Yu B. Berberine enhances chemosensitivity to irinotecan in colon cancer via inhibition of NFkappaB. *Molecular medicine reports* 2014;9(1):249-54.
 23. Chin LW, Cheng YW, Lin SS, Lai YY, Lin LY, Chou MY, et al. Anti-herpes simplex virus effects of berberine from Coptidis rhizoma, a major component of a Chinese herbal medicine, Ching-Wei-San. *Arch Virol* 2010;155(12):1933-41.
 24. Yu YE, Park EY, Jung DH, Byun SH, Kim SC, Park SM. Antibacterial activity of oriental medicinal herb extracts against skin pathogens. *Journal of Life Science* 2010;20(7):1143-50.
 25. Miao KL, Zhang JZ, Dong Y, Xi YF. Research progress on the chemical compounds and pharmacology of *Sophora flavescens*. *Natural Product Research Development* 2001;13:69-73.
 26. Kusano G, Shibano M, Watanabe H. Pharmaceutical botanical studies on some Glycyrrhiza species. *Yakugaku Zasshi* 2003;123:619-31.
 27. Kim HJ, Bae JY, Jang HN, Park SN. Comparative study on antimicrobial activity of Glycyrrhiza uralensis and Glycyrrhiza glabra extracts in various country of origin as natural antiseptics. *Kor J Microbiol Biotechnol* 2013;41(3):358-66.
 28. Kim HJ, Jang HN, Bae JY, Ha JH, Park SN. Antimicrobial activity, quantification and bactericidal activities of licorice active ingredients. *Kor J Microbiol Biotechnol* 2014;42(2):386-92.
 29. Castells M. Mast cell mediators in allergic inflammation and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006;26(3):465-85.
 30. Galli SJ, Tsai M. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol* 2010;40(7):1843-51.
 31. Park DK, Lee YG, Park HJ. Extract of Rhus verniciflua Bark Suppresses 2,4-Dinitrofluorobenzene-Induced Allergic Contact Dermatitis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:Article ID 879696.
 32. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9(6):669-76.
 33. Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Cytokine expression in chronic inflammatory disease. *Br Med Bull* 1995;51(2):368-84.
 34. Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* 2003;17(14):2115-7.

35. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where? *Nitric Oxide* 1997;1(2):107-20.
36. Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Calcium in cell injury and death. *Annu Rev Pathol* 2006;1:405-34.