

Original Article / 원저

生料四物湯이 DNCB로 유발된 생쥐의 아토피 피부염에 미치는 영향

김지수 · 최정화 · 김종한 · 정민영 · 박수연*

동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

Effects of *SaengRyo-SaMul-tang* on Atopic Dermatitis Induced by DNCB in Mice

Ji-Soo Kim · Jung-Hwa Choi · Jong-Han Kim · Min-Yeong Jeong · Soo-Yeon Park

Department of Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, College of Korean medicine, Dongshin University

Abstract

Objectives : Atopic Dermatitis (AD) is chronic skin disease characterized by allergic hypersensitivity reactions. *Saeng-ryo-SaMul-tang* (SRSM) can treat skin disease by cooling down blood heat, cealering away congenital fever and detoxicating. This study was conducted to investigate the effects of SRSM on AD induced by 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) in mice

Methods : In this study, the effects of SRSM on changes in body weights, thicknesses of dorsum skin, thicknesses and weights of ear, changes of symptoms on the dorsum skin, histopathological degree of ear and dorsum skin, IL-10 and TNF- α in serum were observed. And the effects on the proliferation rates of splenocytes were also investigated *in vivo* and *in vitro* study.

Results : In SRSM topical application (Topical) group, SRSM oral application (Oral) group and SRSM Combination (Combi) group thickness of dorsum skin decreased significantly. But in TPC, ORL and CBN group, weight of ear didn't show any changes, but thickness of ear decreased significantly. And TPC, ORL and CBN group showed meaningful effectiveness symptoms like desquamation and erythema on AD's clinical aspect.

In histopathological observation, spongiosis, edema and inflammatory cell infiltration of epidermal were remarkably diminished in TPC, ORL and CBN group. And SRSM diminished the proliferation rates of splenocytes *in vivo* and *vitro* study.

Conclusions : The present study suggests that SRSM can significantly reduced symptoms of AD, therefore SRSM is effective to treatment of AD.

Key words : *SaengRyo-SaMul-tang*(SRSM); Atopic Dermatitis(AD); 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB); cytokine; TNF- α ; IL-10

© 2017 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

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

I. 서 론

아토피 피부염(Atopic Dermatitis, AD)은 일반적으로 유아기 혹은 소아기에 초발하는 만성 재발성 피부질환으로, 흔히 성장하면서 호흡기 아토피 질환인 알레르기 비염이나 천식을 동반하는 경우가 많다¹⁾. 아토피 피부염은 만성 피부 발진이 주증상 중 하나로, 긁어서 팔꿈치, 무릎의 굴측 부위 및 기타 호발 부위에 습진 형태의 피부발진이 형성된다²⁾.

아토피 피부염은 최근 증가추세이며 서구화된 국가에서 흔한 질환으로 소아는 10~20%, 성인은 1~3% 정도의 유병률을 보이고 국내의 유병률도 비슷하다. 특히 최근 국내 성인 아토피 피부염 환자의 수가 증가하는 추세이다³⁾.

과거에 아토피 피부염은 小兒哺乳時 所生되는 癬疾이므로 奶癬, 胎癬이라 하였고 또는 多形性皮疹 反復發作 時輕時重하고 兒童期에서 成人까지 연속되며 哮喘 등의 過敏性疾病을 동반하는 경우를 異位性 皮膚炎이라고 칭했다. 병인은 주로 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고 치료방법은 清熱解毒 主가 되며 除濕, 祛風, 養血 등의 治法을 사용하였다^{4,6)}.

生料四物湯(Saengryo-samul-tang, SRSM)은 補血調血하는 四物湯에서 熟地黃을 대신하여 生地黃으로 바꾸고, 祛風清熱하는 防風, 黃芩, 薄荷 등을 配伍하여 여러 가지 皮膚瘡에 활용할 수 있는 방제로⁷⁾, 아토피 피부염에 임상에서 사용할 수 있다는 보고⁸⁾와 최근 비만세포에서의 탈과립 억제효과⁹⁾와 제 1형 및 4형 알레르기 반응의 억제효과¹⁰⁾와 동물 모델 실험에서의 항염증 효과¹¹⁾에 대한 연구 논문이 보고되어 왔으나 DNCB로 유발된 아토피 피부염 동물 모델에서 피부

증상을 감소시키는 것에 관한 직접적인 연구는 없었다.

이에 저자는 DNCB를 이용하여 아토피 피부염이 유발된 생쥐의 체중 변화, 귀의 두께와 무게 변화, 등 피부의 두께와 피부염 증상 발현 정도, 귀와 등 조직의 조직병리학적 변화 소견, 비장의 무게와 비장세포 증식을, 혈청 내 TNF- α , IL-10의 수치 변화를 관찰함으로써 生料四物湯이 아토피 피부염에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

실험에 사용된 시료는 복합처방인 생료사물탕(生料四物湯, Saengryo-samul-tang, 이하 SRSM)으로 처방구성은 아래와 같으며(Table 1), 이들 약재는 동신대학교 부속한방병원에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of SRSM

Herb name	Scientific name-Used part	Weight(g)
生地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> -root skin	2.4
赤芍藥	<i>Paeonia veitchii</i> -root	2.4
川芎	<i>Cnidium officinale</i> -rhizome	2.4
當歸	<i>Angelica gigas</i> -root	2.4
防風	<i>Saposhnikovia divaricata</i> -root	2.4
黃芩	<i>Scutellaria baicalensis</i> -root	1.6
薄荷	<i>Mentha var. Piperascens</i> -herba	1.6
Total amount		15.2 g

2) 실험동물

실험동물은 동신대학교 실험동물윤리위원회(승인번호 : DSU-2014-048)의 승인을 거친 후 반입하였고, 동물의 구입은 동물실험 전문업체인 (주)샘타고에서 수컷 Balb/c 계열의 생쥐 (7주령, 23±3 g)를 구매하여

Corresponding author : Ph.D. Soo-Yeon Park, Department of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, Suncheon Oriental Hospital of Dongshin University, 331 Isu-ro, Suncheon-si, Jeollanam-do, Korea, 540-320.
(Tel : +82-61-729-7122, E-mail : swallow92@hanmail.net FAX : (061) 725-1717)

• Recieved 2017/1/16 • Revised 2017/2/9 • Accepted 2017/2/16

반입하였다. 반입 후 식품의약품안전청에서 고시한 동물실험시설 규정에 적합한 사육장 시설에서 1 주일간 적응시켰다. 적응조건은 12시간 명암주기 및 실내 온도 ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$)와 습도 ($55\pm 5\%$)를 유지시키고 고형사료와 물을 충분히 공급하여 적응시켰다.

3) 아토피 피부염 유발 약물

본 실험은 AD가 유발된 생쥐를 대상으로 하는 실험으로써, AD유발을 위해 2,4-dinitrochlorobenzene (이하 DNCB, Sigma, USA)을 사용하였다. 병태 모델 유발을 위해 olive oil과 acetone을 4대 1로 섞은 (이하 AOO) 혼합액에 1% DNCB가 혼합된 용액을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 제조

경구투여용 약물은 열수추출 후 동결건조의 방식으로 제조하였고, 도포용 약물은 에탄올추출 후 동결 건조하는 방법을 사용하였다.

경구투여용 약물은 SRSM 50 g을 증류수(D/W) 1,500 ml에서 4시간 동안 100°C 에서 열수추출한 다음 찌꺼기를 제거한 상층액을 모아서 감압농축기 (EYELA, Japan)를 이용하여 농축하였다. 이후 동결 건조기 (ILshin, Korea)를 이용하여 동결 건조하였다. 이 때, 최종적으로 얻은 약제의 동결 건조 분말은 14.1 g으로 수득율은 28.2%이었고, 이를 식염수에 희석하여 경구투여 시료로 사용하였다.

AD 부위에 직접 도포하기 위한 도포액 제조를 위해 70% 에탄올에 SRSM 150 g을 24시간 동안 추출 후 농축하고 동결 건조하여 1.99 g을 얻었으며, 동결 건조된 분말을 에탄올에 녹인 다음 이를 AOO에 희석하여 도포에 사용하였다.

2) 아토피 피부염의 유발 및 시료의 투여

아토피 피부염은 귀 부위와 등 부위에 DNCB 혼합

액을 도포하여 유발시켰다. 먼저 귀 부위에 yellow tip pipet을 이용하여 1일 1회 3일간 $30\ \mu\text{l}$ 을 도포하였고, 3일 후 등 부위의 아토피 피부염 유발을 위해서 등 부위의 제모를 시행하였다. 제모를 위해서 호흡마취제인 isoflurane(Hana Pharm, Korea)을 O_2 와 혼합하여 2.5% 농도로 유지시키며 마취시켰고 마취된 생쥐를 전기면도기(Panasonic ER 806A, Japan)를 사용하여 엉덩이 쪽부터 1차 제모한 후 다시 크림용 제모제(Veet, Rerckitt Benckiser, France)를 바른 후 도포용 주걱을 이용하여 넓게 도포한 후 5-10분 방치하였다. 이후 온수를 거즈에 묻혀 제모제를 제거하고 티슈로 물기를 제거한 후 상처 치유를 위해 24시간 방치하는 과정을 거쳐 제모를 실시하였다.

제모를 실시한 24시간이 지난 후 isoflurane(Hana Pharm, Korea)을 이용해 호흡마취를 시킨 후 등 부위와 귀 부위에 AOO액과 1% DNCB가 혼합된 용액을 3일간 등 부위에 $50\ \mu\text{l}$ 와 귀 부위에 $30\ \mu\text{l}$ 을 1일 1회 일정한 시간에 도포하였다. 이후 3일간 관찰 후 등 부위에 SRSM 시료 도포 및 경구 투여를 시작하면서 2일 1회에 걸쳐 DNCB 혼합용액을 귀와 등에 각각 $30\ \mu\text{l}$ 과 $50\ \mu\text{l}$ 씩 도포하여 최종적으로 AD를 유발하였다.

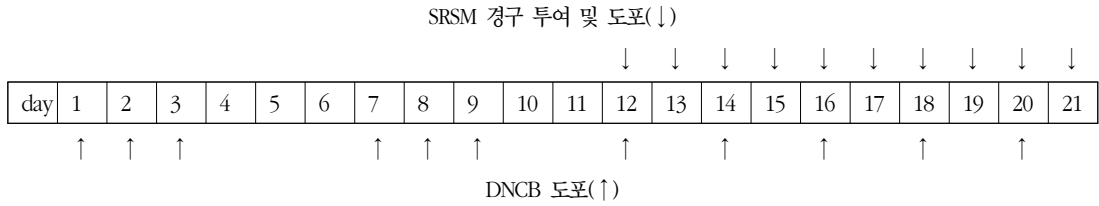
이 때 SRSM 시료의 최종 도포액 농도가 $4\ \text{mg/ml}$ 로 도포하였고, AD 유발액인 혼합용액을 바르는 시간과 겹치는 경우 최소 4시간 이상 차이를 두었다. 경구 투여의 경우, AD를 충분히 유발한 후 SRSM 시료의 투여량을 $500\ \text{mg/kg}$ 농도로 10일간 투여하였다.

AD 유발을 위한 DNCB도포 및 시료의 투여 및 도포를 표로 정리하면 다음과 같다(Table 2).

3) 실험군 설정

SRSM의 효능을 관찰하기 위하여 실험군을 정상군(normal), 대조군(control), SRSM 도포군(SRSM Topical application, TPC), 生料四物湯 경구투여군(SRSM Oral application, ORL) 그리고 SRSM 도포 및 경구투여군(SRSM Topical & Oral Combination,

Table 2. Oral Administration and Spread of SRSM



CBN)으로 총 5개 군으로 나누었다. 정상군은 제모 후 AD 유발약물 대신 식염수를 도포한 후 식염수를 투여하고 AOO를 도포하였고, 대조군은 AD를 유발하고, 식염수를 경구투여하고 AOO를 도포한 군으로 설정하였다.

TPC군은 AD 혼합용액을 도포한 후 SRSM을 도포한 군으로 설정하였고, ORL군은 AD 혼합용액을 도포한 후 SRSM을 경구투여한 군으로 설정하였다. CBN군은 AD를 유발하고 SRSM의 열수 추출액의 경구투여와 에탄올 추출액의 도포를 동시에 시행한 군으로 설정하였다. 각 실험군의 개체 수는 Normal군은 8마리로 실험을 수행하였고, 대조군 및 실험군은 모두 9마리로 실험을 시행하였다.

4) 체중의 측정

DNCB와 SRSM의 투여가 AD 유발 생쥐의 체중에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 실험 기간 중 총 8차례 생쥐의 체중을 측정하였다. 체중의 측정은 측정일 오후 2시에 실시하였고 전자저울 (HANA, KC-200, Korea)을 이용하였고 마지막 측정은 생쥐를 희생시키기 직전 시행하였다.

5) 귀 무게의 측정

SRSM 투여가 AD 유발 생쥐에 미친 영향 중 귀의 무게를 측정하기 위하여 실험 마지막날 생쥐를 희생시킨 후 가위로 귀를 절제한 다음 수동 편치기를 이용하여 직경 5 mm의 둥근 절편을 만들어 미량 저울 (OHAUS, USA)을 이용하여 무게를 측정하였다.

6) 귀 및 등 피부 두께의 측정

SRSM 투여가 AD 유발 생쥐에 미친 영향 중 종창되어진 귀의 두께와 등 피부의 두께를 측정하기 위해 생쥐를 희생시킨 후 등 피부와 귀를 피부를 절제한 다음 각각의 두께를 Digital calliper (Mitutoyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

7) 피부 표면의 육안적 관찰 및 Symptom score 판정

DNCB와 SRSM 투여가 AD 변화에 어떠한 영향을 미쳤는지 관찰하기 위해서 각 군별의 생쥐 등 부위를 디지털 카메라 (Samsung, Korea)로 촬영하고 사진을 기초로 생쥐 등에 나타난 피부질환의 병변 정도를 관찰하여 수치화하였고 피부 부종과 종창의 정도를 다음과 같은 기준에 따라 판정하였다(Table 3).

Table 3. Grade of Skin Conditions

Grade	Skin conditions
0	Normal
1	Light skin pigmentation
2	Severe skin pigmentation, erythema
3	Erythema and desquamation
4	Erythema, desquamation and bloodstain
5	Severe erythema, desquamation and bloodstain

8) 조직병리학적 관찰

(Histopathological assessment)

SRSM 투여로 개선된 생쥐 피부의 조직을 관찰하기 위하여 H & E (Hematoxylin & Eosin stain) 염색

을 시행하였다. 생쥐를 희생시킨 후 등 부위 피부조직을 일정부분 절제한 후 이를 10 % 포르말린에 고정된 다음 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 미세절단기 (Sakura, Japan)를 사용하여 4 μm 두께로 박절하였다. 이후 슬라이드에 부착시킨 후 탈수와 투명 (cleansing) 과정을 거쳐 흐르는 물에 침전시켰고 파라핀을 제거하는 과정을 거친 조직 절편은 Hematoxylin & Eosin (SIGMA, USA)으로 염색하였다. 이 후 과염색된 부분은 5분 정도 흐르는 수돗물에 씻어내었고 다시 탈수와 투명화과정을 거쳐 봉입 (mounting) 하고 100배율 광학현미경 (Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

9) 비장세포 증식율에 미치는 영향

① *in vitro* 실험

약물 및 시료 등을 처리하지 않은 생쥐의 비장에서 추출한 비장세포 (splenocyte)의 부유액을 RPMI 1640 배지에 희석하고 96 well plate에 5.0×10^5 cells/well 농도로 접종한 후 24시간동안 배양하고 SRSM 열추출물을 농도별로 처리한다. 그 후 다시 24시간동안 배양한 후 각 well에 LPS를 첨가하고 차광상태에서 2시간 정도 배양한 다음 각 well의 흡광도를 Microplate Reader로 450 nm에서 측정하였다.

② *in vivo* 실험

실험이 종료된 후 각종 약물과 시료를 처리한 생쥐에서 비장을 적출해낸 뒤 비장세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 5.0×10^5 cells/well 농도로 96 well plate에 접종한 다음 각 well에 Ez-cytox 15 μl 를 첨가하고 차광상태로 2시간 정도 배양한 다음 각 well의 흡광도를 Microplate Reader로 450 nm에서 측정하였다.

10) Cytokine 측정

① 채혈 및 혈청분리

각각의 실험군 cytokine에 약물의 적용이 미친

영향을 측정하기 위해 채혈 후 혈청을 분리하였다. 이를 위해서 최종적으로 실험이 진행된 생쥐를 isoflurane(Hana Pharm, Korea)와 O₂ 혼합 gas로 호흡마취를 시킨 후 심장을 통해 채혈하였다. 채혈한 혈액을 plastic tube에 담아 실온에서 30분 정도 방치한 후 3,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층의 혈청을 분리하였다.

② Tumor necrosis factor- alpha (TNF- α) 양 측정
혈청 내에서 생성되는 TNF- α 양을 mTNF- α ELISA kit (Novex, U.S.A.)를 이용해 측정하였다. 이 때 혈청 및 standards 100 μl 를 Kit 각각의 96 well plate에 넣은 후 biotin conjugate 100 μl 를 첨가하고 90분 실온에서 incubation한 후 washing buffer에 4회 세척하고, 준비해 놓은 streptavidin-HRP를 100 μl 씩 각 well에 분주한 다음 실온에서 30분 동안 incubation하고 washing buffer로 4회 세척하였다. 그 다음으로 stabilized chromogen을 100 μl 씩 각 well에 분주한 다음 빛이 차폐된 실온에서 30분 동안 incubation하고 stop solution을 100 μl 씩 각 well에 주입하고 Microplate Reader를 이용, 450 nm 파장에서 측정하였다.

③ Interleukin (IL-10) 양 측정

혈청 내의 IL-10 양을 측정하기 위하여 혈청 50 μl 를 standard diluent buffer 50 μl 와 혼합하여 만든 solution 100 μl 을 96 well plate에 분주한 다음 실온에서 60분 incubation한 다음 washing buffer로 4회 세척한다. 그 다음 biotin conjugate 100 μl 를 첨가하고 실온에서 2시간 incubation한 후 다시 washing buffer로 4회 세척하였다. 희석하여 준비해 놓은 streptavidin-HRP를 100 μl 씩 각 well에 분주한 후 다시 실온에서 30분 동안 incubation한 다음 washing buffer로 4회 세척하고, stabilized chromogen을 100 μl 씩 각 well에 분주한 다음 차광된 실온에서 30분 동안 incubation하고 stop solution을

100 μ 씩 각 well에 분주한 후 Microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다.

3. 통계 처리

수집된 데이터의 통계 처리는 통계프로그램인 IBM SPSS Statistics 22을 사용하였다. 수집된 데이터의 평균 비교는 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 사용하였고 통계적으로 유의한 경우 사후검정은 Tukey 방식을 시행하였으며 p-value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 인정하였다.

III. 성적

1. 체중 변화에 미치는 영향

DNCB와 SRSM의 투여가 생쥐의 체중에 어떠한 영향을 끼치는지 관찰하기 위하여 실험기간 동안 총 8회에 걸쳐 체중을 측정하였다. 이를 관찰한 결과 DNCB로 AD를 유발하지 않은 normal 군에 비해 다른 실험군이 대체로 체중이 감소되는 경향이 보였으며 특히, 6회 측정 때 control군이 다른 실험군에 대

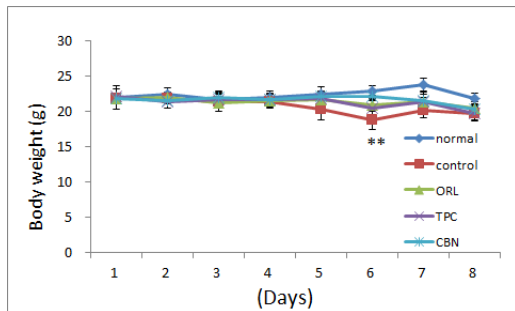


Fig. 1. The changes of body weight in AD induced mice

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group. Values are represented by mean \pm SD.

** : Statistically significance compared with control group(** ; P<0,01).

해 유의성 있게 감소한 것이 관찰되었다(Fig. 1).

2. 귀 무게에 미치는 영향

SRSM의 적용이 생쥐의 귀 무게에 미친 영향을 관찰하기 위하여 귀 무게를 측정된 결과, control 군에 비해 실험군이 모두 감소하는 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 4, Fig. 2).

Table 4. The Changes of Ear Weight in AD Induced Mice

Group	Ear weight (g)
Normal	0.006 \pm 0.001
Control	0.017 \pm 0.002
ORL	0.016 \pm 0.002
TPC	0.015 \pm 0.003
CBN	0.015 \pm 0.002

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group. Values are represented by mean \pm SD.

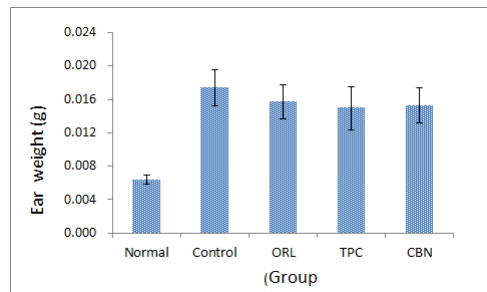


Fig. 2. The changes of ear weight in AD induced mice

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group. Values are represented by mean \pm SD.

3. 귀 두께에 미치는 영향

SRSM의 적용이 생쥐의 귀 두께에 미친 영향을 관찰하기 위하여 귀 두께를 측정된 결과 control 군에 비해 ORL(p<0.01), TPC(p<0.05), CBN(p<0.01) 군 모두에서 귀 두께가 통계적으로 유의하게 얇아진 것을 확인할 수 있었다(Table 5, Fig. 3).

Table 5. The Changes of Ear Thickness in AD Induced Mice

		Ear thickness
Normal	Mean(mm)	0.18 ± 0.01
Control	Mean(mm)	0.47 ± 0.05
ORL	Mean(mm)	0.39 ± 0.06 **
TPC	Mean(mm)	0.40 ± 0.04 *
CBN	Mean(mm)	0.38 ± 0.03 **

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* feeding group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* spread group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* spread & feeding group. Values are represented by mean±SD.

* : Statistically significance compared with control group(* ; P<0.05).

** : Statistically significance compared with control group(** ; P<0.01).

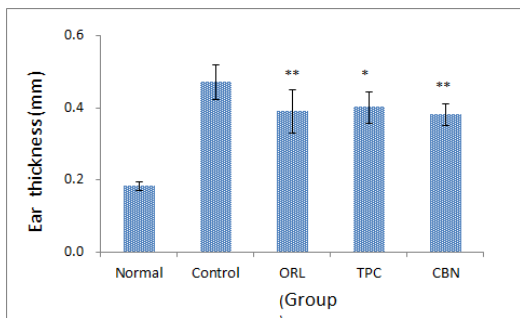


Fig. 3. The changes of ear thickness in AD induced mice

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group. Values are represented by mean±SD.

* : Statistically significance compared with control group(* ; P<0.05).

** : Statistically significance compared with control group(** ; P<0.01).

4. 등 피부 두께에 미치는 영향

SRSM의 투여가 생쥐의 등 부위의 두께에 미친 영향을 관찰한 결과 control 군에 비해 ORL(p<0.01), TPC(p<0.05), CBN(p<0.01) 군 모두에서 통계적으로 유의하게 얇아진 것을 확인할 수 있었다(Table 6, Fig. 4).

Table 6. The Changes of Back Skin Thickness in AD Induced Mice

		Back skin thickness (mm)
Normal		0.54 ± 0.02
Control		0.75 ± 0.08
ORL		0.60 ± 0.09 **
TPC		0.65 ± 0.08 *
CBN		0.59 ± 0.04 **

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group. Values are represented by mean±SD.

* : Statistically significance compared with control group(* ; P<0.05).

** : Statistically significance compared with control group(** ; P<0.01).

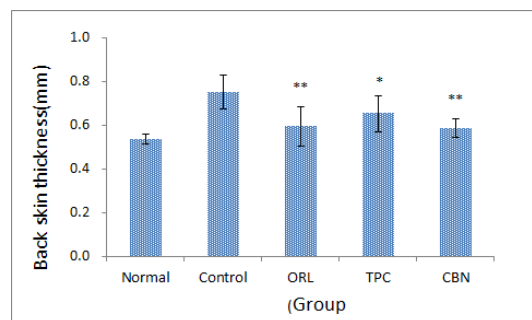


Fig. 4. The changes of back skin thickness in AD mice

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group. Values are represented by mean±SD.

* : Statistically significance compared with control group(* ; P<0.05).

** : Statistically significance compared with control group(** ; P<0.01).

5. 등 피부 증상에 미치는 영향

SRSM 적용으로 개선된 정도를 관찰한 결과, normal 군의 등 피부에서는 특별한 변화를 관찰 할 수 없었고, control 군과 실험군의 등 피부에서는 피부 홍반, 낙설 등의 이상의 증상이 관찰되었다. 이러한 증상들을 실험방법에서 언급한 바와 같이 5점 척도를 사용하여 등 피부의 증상을 수치로 나타낸 결과, control 군에 비해 실험군 모두에서 유의한 수준 ($P < 0.01$)으로 AD 증상 정도가 감소됨이 관찰 되었다 (Table 7, Fig. 5).

Table 7. Effects of *SangRyoSaMulTang* on Symptom Score in AD Induced Mice

	Symptom score
Normal	0.00 ± 0.00
Control	4.14 ± 0.69
ORL	2.88 ± 0.64 **
TPC	2.13 ± 0.35 **
CBN	1.88 ± 0.35 **

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group. Values are represented by mean±SD.

** : Statistically significance compared with control group(** ; $P < 0.01$).

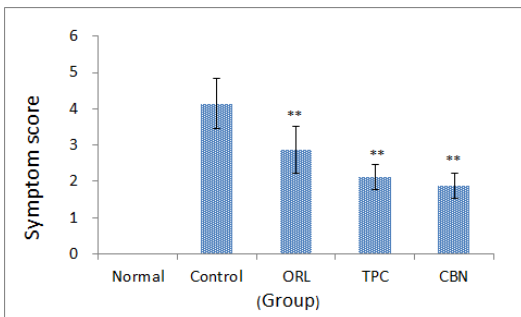


Fig. 5. Effects of *SangRyoSaMulTang* on symptom score in AD induced mice

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group. Values are represented by mean±SD.

** : Statistically significance compared with control group(** ; $P < 0.01$).

6. 등 피부의 조직병리학적 소견에 미치는 영향

SRSM 적용으로 등 피부조직의 AD 개선 정도를 관찰 결과, normal군의 피부조직은 특별한 이상 소견 이 발견되지 않았으나 control 군의 피부조직에서는 과각질화(hyperkeratosis)와 부종(edema)이 관찰되었으며 실험군 모두에서는 과각질화와 부종이 줄어드는 경향을 보였다(Fig. 7).

7. 생체외 (in vitro) 비장세포 증식율에 미치는 영향

측정값은 LPS를 투여하지 않은 control(-) 군을 기준으로 하여 백분율로 표시하였으며, SRSM이 in vitro 상에서 비장세포의 증식율에 미치는 영향을 관찰한 결과 농도가 증가됨에 따라 증식율이 감소하는 경향을 보였으며, LPS를 처리한 control(+)군에 비해 SRSM을 0.25 mg/ml, 0.50 mg/ml과 1 mg/ml처리한 군에서 유의한 수준의 비장세포 증식을 감소가 관찰되었다 (Table 8, Fig. 8).

Table 8. Effects of *SangRyoSaMulTang* on Proliferation Rates of Splenocyte in Vitro

Group & concentration	Proliferation rates (%)
Control(-)	100.0 ± 7.86
Control(+)	180.6 ± 29.33
0.0625 mg/ml	168.9 ± 26.67
0.125 mg/ml	153.9 ± 17.80
0.25 mg/ml	135.5 ± 23.84 **
0.5 mg/ml	123.1 ± 11.79 **
1 mg/ml	135.7 ± 15.25 **

Control(-) : *SangRyoSaMulTang* and LPS not treated group, Control(+) : *SangRyoSaMulTang* not treated and LPS treated group. Values are represented by mean±SD. All groups data were expressed as mean±SD.

** : Statistically significance compared with control(+) group(** ; $P < 0.01$).

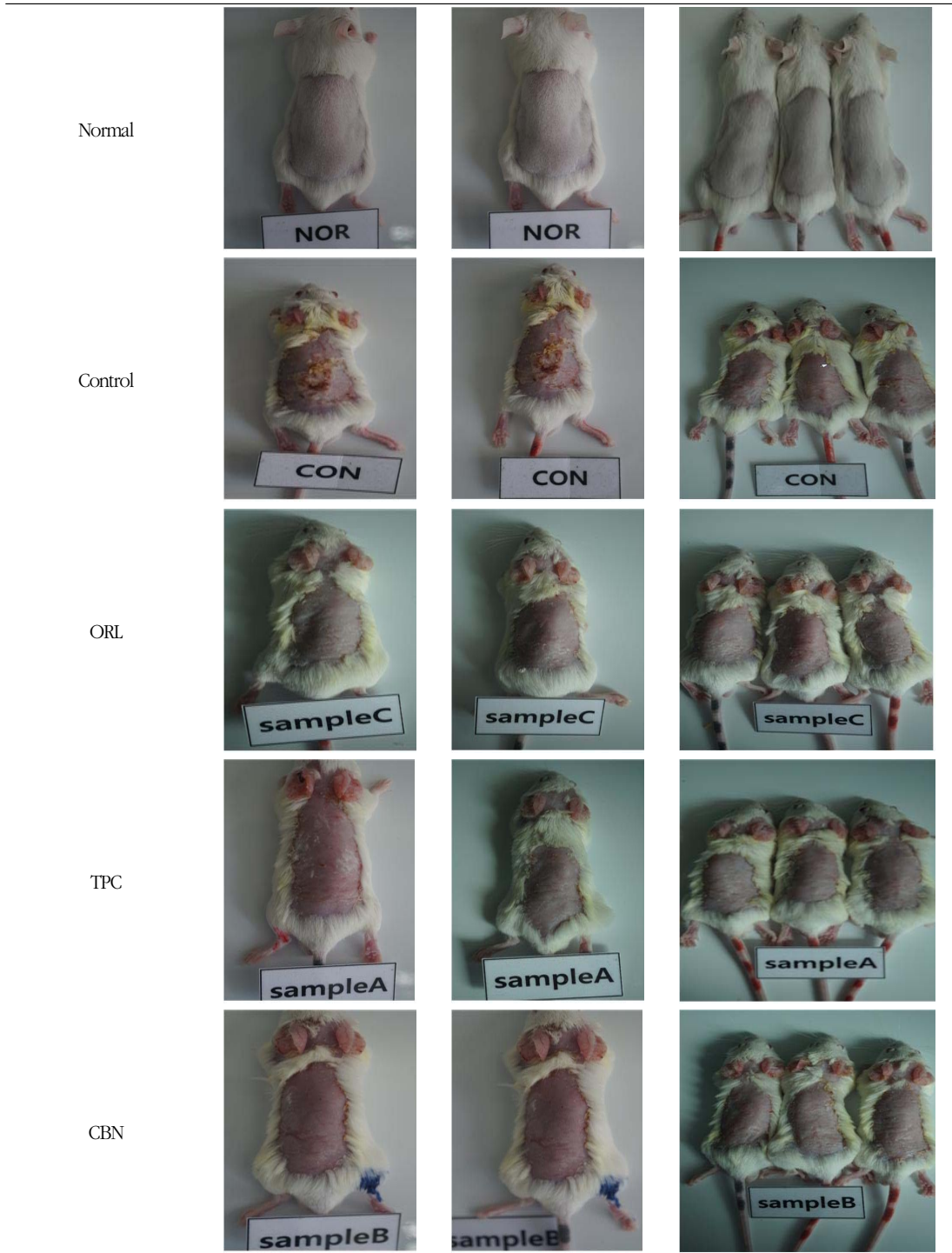


Fig. 6. Effects of *SangRyoSaMulTang* on clinical aspect in AD induced mice

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group.

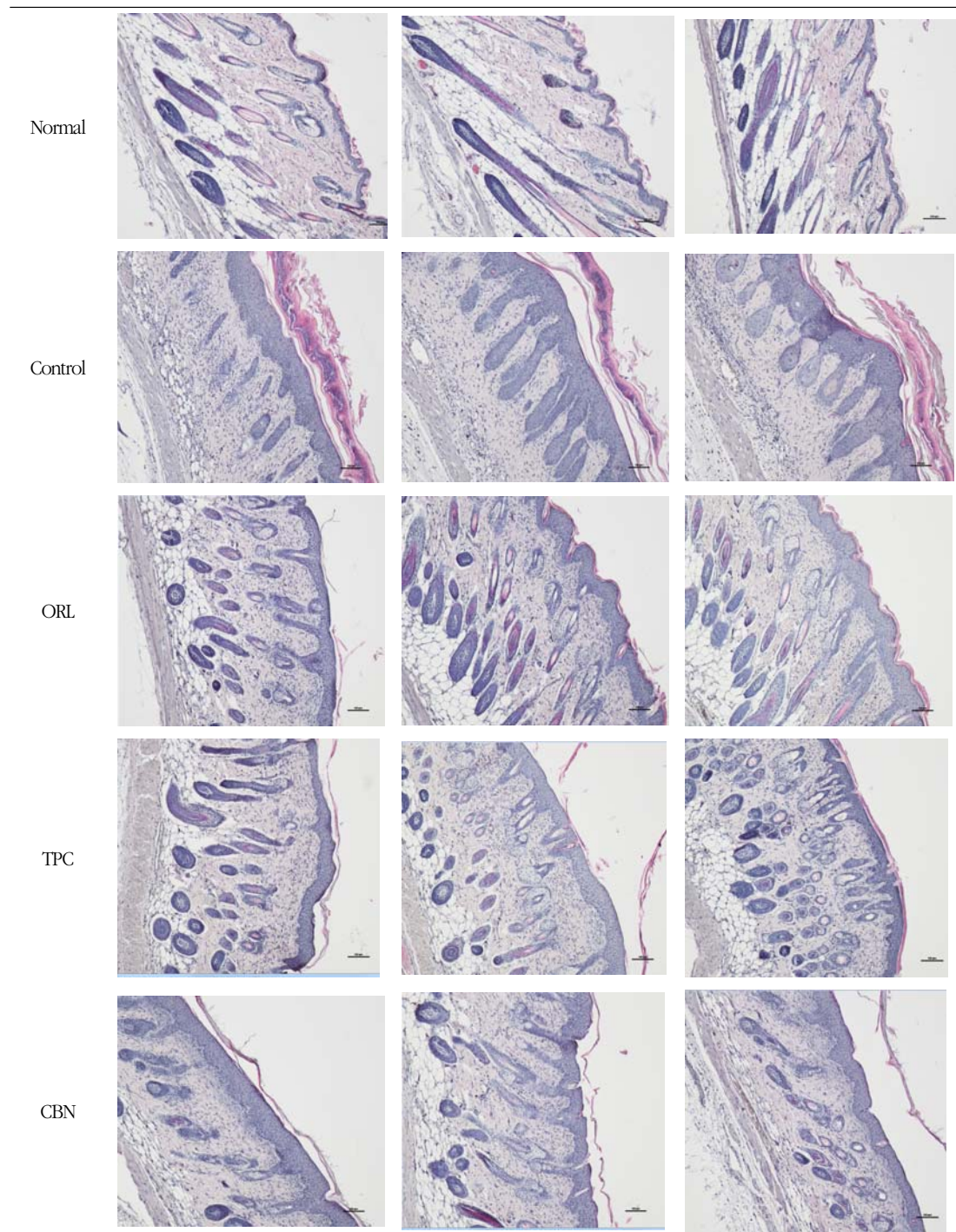


Fig. 7. Effects of *SangRyoSaMulTang* on histopathological observation of dorsum skin in AD induced mice

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group.

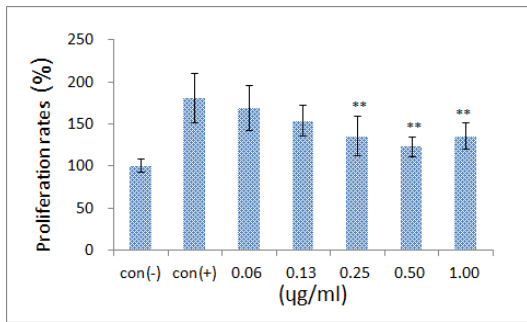


Fig. 8. Effects of *SangRyoSaMulTang* on proliferation rates of splenocyte in vitro

Control(-) : *SangRyoSaMulTang* and LPS not treated group, Control(+) : *SangRyoSaMulTang* not treated and LPS treated group. Values are represented by mean±SD. All groups data were expressed as mean±SD.

** : Statistically significance compared with control(+) group(** ; P(0.01).

8. 생체내 (in vivo) 비장세포 증식율에 미치는 영향

SRSM이 in vivo 상에서 비장세포의 증식율에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 비장 세포를 분리하여 증식율을 측정하였다. 측정값은 LPS를 투여하지 않은 normal 군을 기준으로 백분율로 표시하였으며, 관찰한 결과 control 군에 비해 모든 실험군에서 감소하는 경향이 보였으며 특히 TPC(p<0.01)군과 CBN(p<0.01)에서 유의한 수준의 비장세포 증식을 감소가 관찰되었다(Table 9, Fig. 9).

Table 9. Effects of *SangRyoSaMulTang* on Proliferation Rates of Splenocyte in Vivo

	Proliferation rates (%)
Normal	100.0 ± 14.53
Control	272.8 ± 38.18
ORL	248.6 ± 49.35
TPC	194.9 ± 28.29 **
CBN	179.0 ± 32.91 **

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group. Values are represented by mean±SD.

** : Statistically significance compared with control group(** ; P(0.01).

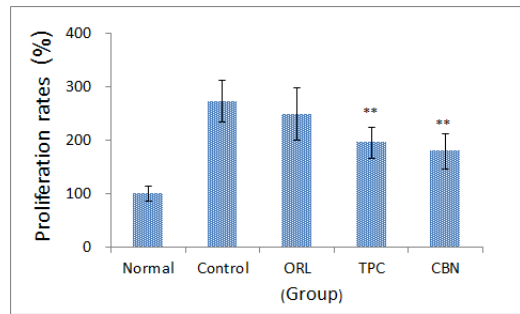


Fig. 9. Effects of *SangRyoSaMulTang* on proliferation rates of splenocyte in vivo

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group. Values are represented by mean±SD.

** : Statistically significance compared with control group(** ; P(0.01).

9. TNF-α 변화에 미치는 영향

SRSM 적용이 TNF-α에 미치는 영향을 관찰하기 혈청 내 TNF-α의 함량을 측정한 결과, control 군에 비해 ORL(p<0.05), TPC(p<0.01), CBN(p<0.01) 군 모두에서 통계적으로 TNF-α 수치가 유의하게 감소한 것으로 확인할 수 있었다(Table 10, Fig. 10).

Table 10. The Changes of TNF-α in AD Induced Mice

	TNF-α (ng/ml)
Normal	1.25 ± 0.029
Control	1.32 ± 0.044
ORL	1.27 ± 0.027 *
TPC	1.26 ± 0.012 **
CBN	1.25 ± 0.021 **

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group. Values are represented by mean±SD.

* : Statistically significance compared with control group(* ; P(0.05).

** : Statistically significance compared with control group(** ; P(0.01).

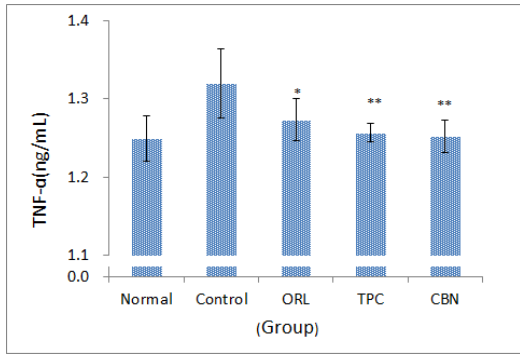


Fig. 10. The changes of TNF- α in AD induced mice
 Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group. Values are represented by mean \pm SD.
 * : Statistically significance compared with control group(* ; P(0,05).
 ** : Statistically significance compared with control group(** ; P(0,01).

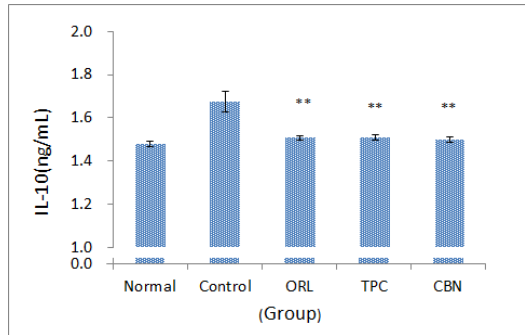


Fig. 11. The changes of IL-10 in AD induced mice
 Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group. Values are represented by mean \pm SD.
 ** : Statistically significance compared with control group(** ; P(0,01).

10. IL-10 변화에 미치는 영향

SRSM 적용이 IL-10에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 혈청 내 IL-10의 함량을 측정한 결과, control 군에 비해 ORL(p < 0,01), TPC(p < 0,01), CBN(p < 0,01) 군 모두에서 통계적으로 IL-10 수치가 유의하게 감소한 것으로 확인할 수 있었다(Table 11, Fig. 11).

Table 11. The Changes of IL-10 in AD Induced Mice

	IL-10 (ng/ml)
Normal	1,48 \pm 0,012
Control	1,67 \pm 0,049
ORL	1,51 \pm 0,011 **
TPC	1,51 \pm 0,011 **
CBN	1,50 \pm 0,014 **

Normal : naive group, Control : AD-induced and no treatment group, ORL : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral application group, TPC : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* topical application group, CBN : AD-induced and *SangRyoSaMulTang* oral&topical combination group. Values are represented by mean \pm SD.
 ** : Statistically significance compared with control group(** ; P(0,01).

IV. 고 찰

아토피 피부염(Atopic Dermatitis, AD)은 피부에 심한 홍반 구진과 물집이 나타나며 병터를 긁으면 삼출병터가 발생하고 이차감염이 쉬워지는 질병이다. 이 급성기에는 긁은 상처(excoriation), 홍반 혹은 비늘이 덮인 구진과 판이 발생하며, 만성기에서는 반복적으로 긁은 결과 피부가 두꺼워진 태선화가 생기고 결절 가려움발진(prurigo nodularis)이 관찰될 수 있다³⁾.

AD 환자의 급성기 병터에서는 표피에서 해면화가 관찰되며, 랑게르한스 세포(Langerhans)와 같은 가지돌기모양 항원전달 세포(myeloid dendritic cell)가 분포한다. 만성태선화병태로 진행하면 해면화는 감소하고, 과증식된 표피와 표피능선 연장, 과다각화증과 이상각화증 등이 나타나게 된다^{1,3)}.

발병원인과 기전에 대해서는 아직 정확히 밝혀진 바는 없으나 유전적 환경적 면역학적인 요인들이 서로 복합적으로 작용하여 생기는 증상으로 보는 견해가 지배적이다. 또한 산업발달에 따른 식습관, 생활습관, 스트레스, 공해, 농약과 식품첨가물 등 다양한 환

경적 변화와 오염을 아토피의 발병 요인으로 보는 견해들이 많다¹²⁾. 임상증상은 유전, 환경, 대사, 신경내분비, 감염, 면역 등 여러 요소의 복잡한 상호작용의 결과로 생각할 수 있다¹³⁾.

고전문헌에서의 AD는 《諸病源候論·小兒雜病諸侯·癬候》에 최초로 “小兒面上 癬皮如甲錯起乾燥 謂之乳癬。言兒飲乳 乳汁漬汚兒面 變生此症”라記載되어 있다. 이후로明代 《外科正宗·奶癬》에서 “奶癬”,清代 《醫宗金鑑·外科心法要訣·嬰兒部》에서 “胎斂瘡”에 대하여 설명하고 있다⁴⁾.

AD의 한의학적 발생원인은 주로 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고 있으며, 증상에 따라 乾癢, 風濕熱浸淫肌膚症, 脾虛濕熱內蘊症, 陰傷血燥濕熱症로 구분하여 그에 따라 치료법으로는 清熱除濕, 祛風止痒, 健脾除濕, 養血潤燥 등의 治法을 주로 사용하고 있다^{4,5,14,15)}.

최근의 실험 논문 상 馬齒莧¹⁶⁾, 白屈菜¹⁷⁾, 白鮮皮¹⁸⁾, 沙參¹⁹⁾, 枳實²⁰⁾, 苦參²¹⁾, 熟地黃²²⁾ 등 단미제와 葛根解肌湯²³⁾, 驅風除濕湯²⁴⁾, 加味芎歸湯²⁵⁾, 涼血除濕湯²⁶⁾, 黃連解毒湯²⁷⁾, 溫清飲·三黃洗劑加味方 병용²⁸⁾, 連翹敗毒散²⁹⁾, 理中湯³⁰⁾, 消風清營湯³¹⁾, 當歸飲子加減方³²⁾, 消風散³³⁾ 등 많은 처방들이 동물모델 AD 유발 연구에서 면역학적 지표 물질 및 임상적 증상 면으로 AD 치료에 효과를 나타냈다.

生料四物湯(Saengryyo-samul-tang, 이하 SRSM) 또한 《東醫寶鑑·世醫得效方》에서 “治諸瘡 生地黃 赤芍藥 川芎 當歸 防風 各三分 黃芩 薄荷 各二分”라고 나오는 처방으로⁷⁾ 濕疹 분류에 속하는 AD에 방제학적 관점으로 사용 가능한 처방 중 하나이다⁸⁾.

SRSM의 처방 구성을 살펴보면, 補血調血의 四物湯에서 熟地黃을 清熱涼血하는 生地黃으로, 補血養血하는 白芍藥을 清熱涼血하는 赤芍藥으로 교체한 후, 防風 黃芩 薄荷를 加한 方劑이다. 方 중의 SRSM은 清血調血하는데 防風 黃芩 薄荷가 血分에 끌어들여 散風清熱하므로 小兒의 諸瘡(胎毒)을 치료한다^{34,35)}.

SRSM의 이전 연구들을 살펴보면, 비만세포 실험에서 IL-4, IL-13의 생성을 억제함으로써 알레르기 염증

반응을 억제하고, 향후 AD를 포함하는 알레르기 질환에 적용이 가능할 것이라는 전망이 있었으며⁹⁾, 동물모델 실험에서도 제1형 및 4형 알레르기 반응 억제 효능이 있어 AD를 포함한 여러 알레르기성 질환에 효과가 있을 것으로 보았다¹⁰⁾. 또 다른 동물모델 실험에서는 加味生料四物湯이 histamine 분비를 억제하고, 조직학적으로 mast cell의 탈과립 또한 감소시켜 염증반응에 관하여는 hydrocortison에 비해 동등 내지 이상의 뛰어난 효과를 나타내는 것¹¹⁾으로 보고 된 적이 있다.

오늘날 AD 치료에는 기본적인 보습과 악화인자 분석 및 제거, 국소 스테로이드제, 국소 calcineurin 억제제를 사용하며, 선택적으로 광선치료, 전신 스테로이드제, Cyclosporine 등을 이용하고 있지만³⁶⁾, 현재까지 AD의 근본적인 치료법은 없는 실정이다³⁷⁾.

이러한 상태에서 본 저자는 알레르기성 반응을 억제하면서 세포독성은 나타나지 않으며^{9,10)}, 피부 도포에 있어서도 steroid 계열의 약과 비슷한 수준의 피부 증상의 감소¹¹⁾를 가져올 수 있는 SRSM의 동물실험적인 연구가 AD에 대한 근본적인 치료에 대한 해결책을 제시하는데 도움이 될 것이라고 생각하였다.

이에 따라 SRSM이 AD의 치료에 나타나는 효과를 확인하기 위해 AD를 유발한 생쥐의 체중 변화, 귀의 무게와 피부 두께의 변화, 등 피부 두께의 변화, 혈중 TNF- α 과 IL-10의 함량을 측정하였고, 피부의 조직병리학적 정도의 변화를 관찰하고, *in vivo*와 *in vitro*에서 비장세포 증식율을 측정하는 방법으로 연구를 진행하였다.

실험기간 동안 생쥐의 체중을 총 8차례 측정한 결과 normal 군에 비해 control군을 포함한 다른 실험군이 대체로 체중이 감소되는 경향이 보였다(Table 1, Fig. 1). 이는 유발된 AD에 의해 일반적인 증상 발현과 함께 체중에 영향이 온 것으로 보이며, SRSM이 체중감소 억제에 큰 영향을 주지는 못했다.

AD가 유발된 생쥐의 피부에 SRSM이 끼치는 영향을 평가하기 위해 우선 피부의 상태를 파악하였다. 등

피부의 두께, 귀 피부의 두께 및 무게 변화를 확인하고 육안적 평가를 내렸다.

본 연구에서 등 피부의 두께를 측정한 결과, control 군에 비해 ORL(p (0.01), TPC(p (0.05), CBN(p (0.01) 군 모두에서 통계적으로 유의하게 얇아진 것을 확인할 수 있었다(Table 6, Fig. 4). 육안적 평가의 경우, 생쥐의 등에 발생한 피부질환의 병변 정도를 관찰하여 피부 부종과 종창의 정도를 5점 척도로 수치화하여 판정하였다. AD 유발 후 도포와 약물 투여를 하지 않은 control 군과 SRSM을 투여한 실험군의 등 피부에서는 피부 홍반, 가피, 낙설 등의 이상의 증상이 관찰되었으나, control 군에 비해 SRSM을 투여한 모든 군에서 유의한 수준으로 AD 증상 정도가 감소됨이 관찰 되었다(Table 7, Fig. 5, 6). 이 결과는 SRSM이 AD가 유발된 생쥐 등 피부의 두께 증가를 효과적으로 억제하고 있으며, SRSM이 AD를 발현 증상을 줄여줄 가능성이 있음을 보여준다.

그 다음 AD가 유발된 생쥐의 귀의 무게와 두께의 변화를 측정하였다. 피부염증 유발 동물 모델에서 국소부위 염증 부종과 그에 따라 동일 면적 대비 귀 무게가 증가하는 경향을 보여, 약물의 피부 부종 정도와 무게 변화는 항염증 작용의 평가 척도로 사용할 수 있다³⁸⁾.

귀 두께를 측정한 결과, control 군에 비해 ORL(p (0.01), TPC(p (0.05), CBN(p (0.01) 군 모두에서 귀 두께가 통계적으로 유의하게 얇아진 것을 확인할 수 있었다(Table 5, Fig. 3). 귀 무게의 경우 측정한 결과 control 군에 비해 실험군이 모두 감소하는 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 4, Fig. 2).

위와 같은 SRSM의 AD 피부 증상 개선을 조직병리학적으로 확인하기 위해 등 피부조직을 절제하여 측정하기로 하였다. AD의 표피에서 해면화가 관찰되는 것이 특징이며, 혈관 주위에 림프구와 조직구의 침윤이 보이며⁴⁾, 이러한 세포들의 염증반응으로 인해 epidermis 의 비후가 관찰된다고 알려져 있다³⁹⁾. 만

성태선화병태로 진행하면서 과증식된 표피와 표피기능 연장, 과다각화증이 생긴다³⁾.

본 연구 관찰 결과 AD 유발 없이 제모만을 시행한 normal군의 피부조직에선 특별한 이상 소견이 보이지 않았으나 control 군의 피부조직에서는 위의 설명처럼 과각질화(hyperkeratosis)와 부종(edema)이 관찰되었다. 반면 SRSM을 투여한 군에서는 과각질화와 부종이 줄어드는 경향을 보였다(Fig. 7). 특히, TPC 군에서도 과증식한 표피조직이 눈에 띄게 줄어든 것으로 보아 도포에서도 섭취와 비슷한 효과가 나타난다고 생각할 수 있다.

이와 같은 조직병리학적 결과는 위에 기술한 등과 귀 피부 두께의 증가 억제와 더불어 SRSM이 AD 피부 염증 반응에 대해 효과적인 항염증 작용을 가질 수 있다는 것을 시사하며, 피부 면역 반응에 직간접적인 영향을 끼치는 것을 유추 할 수 있다.

비장에서는 면역조절에 관여하는 세포가 다수 존재하는데, 면역조절에 관여하는 대부분의 T 세포는 interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α 를 분비하는 Th1 type과 interleukin (IL)-4, IL-5, IL-10 등을 분비하는 Th2 type이 있다. 특히 만성 병변에서 관찰되는 염증성 변화에는 여러 가지 cytokine의 역할이 면역 세포와 염증계간의 신호 전달 과정에서도 매우 중요하다고 알려져 있다^{1,40,41)}. 따라서 면역반응 증가와 감소를 확인하는 하나의 지표로 비장세포 증식율을 이용할 수 있으며⁴²⁾, 주로 염증성 변화와 종양, 빈혈, 물질의 침윤 및 비정상 세포 등의 면역반응이 증가되는 경우에 비장 종대가 일어나는 것으로 알려져 있다⁴³⁾.

본 연구에서 AD에 SRSM이 면역 조절 반응에 미치는 영향을 확인하기 위해 약물 및 시료 등을 처치하지 않은 정상 상태의 생쥐의 비장에서 추출한 비장 세포에 SRSM 열수추출물을 농도별로 처리하여 비장 세포의 증식율을 관찰하였다. 관찰결과 농도가 증가됨에 따라 증식율이 감소하는 경향을 보였으며, LPS를 처리한 control(+)군에 비해 0.25 mg/ml(P (0.01),

0.50 mg/ml(P <0.01)과 1 mg/ml에서 (P <0.01)에서 유의한 수준의 비장세포 증식을 감소가 관찰되었다(Table 8, Fig. 8).

생체 내에서의 SRSM이 비장세포의 증식율에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 모든 실험을 모두 마친 상태의 생쥐를 희생시킨 후 비장을 적출하고, 비장 세포를 분리하여 증식율을 측정하였다. 관찰결과 control 군에 모든 실험군에서 감소하는 경향이 보였으며 특히 TPC(p <0.01)군과 CBN(p <0.01)에서 유의한 수준의 비장세포 증식을 감소가 관찰되었다(Table 9, Fig. 9). 등 피부의 조직병리학적 검사 결과와 같이 TPC군에서도 비장세포 증식을 감소가 유의하게 나타난 것으로 보아 도포가 표피에서뿐만 아니라 비장세포에서도 한약 투여와 비슷한 효과를 나타낸다는 사실을 확인할 수 있다.

이상의 결과를 토대로 SRSM이 비장세포의 증식율을 억제하는데 관여하여 염증 반응을 포함한 면역반응을 완화시키는 역할을 한다고 추론할 수 있다. SRSM이 비장 세포에서 면역반응을 조절 할 수 있다면 주 면역 물질 중 한 종류인 cytokine에 영향을 미칠 수 있기 때문에 이를 관찰하기 위하여 채혈 후 혈청을 분리하였다.

아토피 피부염은 초기에 Th2 면역반응에 의한 염증반응이 유발되고, 만성병변이 되면서 염증부위에 Th1 면역반응이 일어나는 2단계 T 세포매개 질환(biphasic T cell-mediated disease)으로 설명한다. 염증성 변화에는 여러 가지 cytokine의 역할이 면역 세포와 염증계간의 신호 전달 과정에서도 매우 중요하다고 알려져 있다¹⁾. cytokine은 조혈계세포와 신체의 다른 세포간 교통에 중추적 역할을 하는 용해성폴리펩티드로 면역반응과 관련된 모든 세포에서 분화, 성장, 활성화와 억제 등을 조절한다³⁾.

TNF- α 는 Th1 cytokine의 일종으로 중요한 피부염증의 매개자이다. 자극물질이나 접촉민감화물질에 의한 염증반응은 각질형성세포에서 생성된 TNF- α 에 노출되면 랑게르한스세포가 배출 림프질로 이주하게

되고 naive T세포의 민감화를 일으키게 된다^{3,44)}.

IL-10은 Th2 cytokine에 속하는 염증 반응을 매개하는 것으로 알려져 있으며, Th1 세포가 활성화된 후 생성되는 초기 염증 반응을 조절한다^{3,45)}.

SRSM의 투여 및 도포가 TNF- α 및 IL-10에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 생쥐에서 혈청을 분리하여 TNF- α 과 IL-10의 함량을 측정하였다. 측정된 결과 control 군에 비해 ORL(p <0.05), TPC(p <0.01), CBN(p <0.01) 군 모두에서 통계적으로 TNF- α 수치가 유의하게 감소 하였으며(Table 10, Fig. 10), IL-10 수치 또한 측정된 결과 control 군에 비해 ORL(p <0.01), TPC(p <0.01), CBN(p <0.01) 군 모두에서 통계적으로 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다(Table 11, Fig. 11).

이러한 결과를 통해서 SRSM은 AD에서 나타나는 cytokine의 발현을 조절함으로써 염증반응 및 지연형 면역 반응을 억제하여 피부염 증상을 개선하는 것으로 생각할 수 있다. 다만 이번 실험에서는 여러 cytokine 및 면역 물질 중에서 일부만 측정된 것으로 확실한 기전을 확인하기 위한 추가적인 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이와 같은 결과들을 요약하면 SRSM은 비장세포의 증식을 억제하여 cytokine의 면역반응을 조절하고, Epidermis의 부종 및 만성 태선화 되어가는 과각질증을 개선하여 DNCB로 유도된 AD을 억제하는 것으로 생각할 수 있다. 또한 단순 경구투여 뿐만 아니라 도포를 시행할 경우에도 비슷한 효과가 나타나며, 이를 이용하여 연고나 다른 외용약의 개발도 가능하다고 생각된다.

본 연구를 통해 SRSM이 근본적인 해결책을 찾지 못하고 있는 AD 등 습진성 피부질환의 염증반응과 만성화된 상태를 개선하고 치료하는 임상적 치료약으로서 다양하게 활용 될 수 있음을 보여주었다. 향후 본 연구에서 확인하지 못했던, 에탄올 추출물, 열수 추출물 등 추출 용매에 따른 효과의 차이를 비교 관찰하고, DNCB로 유도된 AD 동물모델 이외의 알레

르기성 증상 실험모델에서 유효한 효과를 확인할 수 있는 후속 연구가 필요하다고 생각한다.

V. 결 론

生料四物湯이 DNCB로 유발된 아토피 피부염에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 모든 실험군에서 체중 변화는 control군과 비교하여 차이가 없었다.
2. 모든 실험군에서 귀의 무게에 유의한 변화는 없었으나 귀의 두께는 유의하게 감소하였다.
3. 모든 실험군에서 등 피부 두께가 유의하게 감소하였다.
4. 모든 실험군에서 피부 증상 발현을 효과적으로 억제하였고, 척도 수치(5점) 또한 통계적으로 유의하게 감소하였다.
5. 모든 실험군에서 피부조직 비후와 면역세포 침윤이 감소하였다.
6. *in vitro* 상 生料四物湯의 농도가 증가함에 따라 비장세포 증식율이 감소되었으며 0.25 mg/ml, 0.50 mg/ml과 1 mg/ml에서 유의한 수준의 감소가 관찰되었다.
7. *in vivo* 상 control군에 비해 生料四物湯군이 통계적으로 유의한 비장세포 증식율의 감소를 나타냈다.
8. 모든 실험군에서 혈청 TNF- α 와 IL-10 함량의 유의한 수준의 감소가 관찰되었다.

References

1. The Department of Dermatology of Seoul University College of Medicine, Dermatology For a medical student, 3rd ed. Seoul:Korea Medical Book Publishing Company, 2011:37-9.
2. Kang YH, Atlas of skin disease, 2nd ed,

- Seoul:Hanmi Medical Publishing Co, 2008:83.
3. Kang H, Kang HY, Park G, Park KC, Park MY, Seo YJ, et al. Text book of Dermatology, 6th ed. Seoul:Medbook, 2015:75-8,202,205.
4. Kim KJ, Kim NK, Kim YB, Kim JH, Park MC, Park SY, et al. Text of Traditional Korean Dermatology & Surgery. Busan:Seonu, 2007:355-6.
5. Ma SY. Hyeondaejunguipibuseongbyeonghag. Sanghae:Sanghae Junguiyagdaehagchulpansa, 2001:153-60.
6. Cha KB, Kim YS, Seol IC. Literatual study on Atopic dermatitis. J Daejeon University Institute of Korean Medicine, 2005;14(2): 113-26.
7. Yun YG. Donguibangjewa cheobanghaeseol. Seoul:Eui Seong Dang Publishing Co, 2007:250-1,281.
8. Lee SH, Yun YG. Study for treatment of Atopic dermatitis in Oriental Medical Prescription. J Korean Med Ophtahlmol Otolaryngol Dermatol, 2006;19(3):103-17.
9. Son MJ, Han JK, Kim YH. Suppressive Effect of SaengRyoSaMulTang On Activated RBL-2H3 Mast cells. J Korean Oriental Pediatrics, 2011; 25(1):28-39.
10. Choe CG, Park EJ, Jeong GM. Study of the effect of Woohwangporhyonghwan(minus REALGAR and CINNABARIS) and Saengnyosamultang on the Anti-allergic in rats and mice. J Korean Oriental Pediatrics, 1993;7(1):1-16.
11. Kim JJ, Yang SW, Son NW, Ahn KS. Anti-inflammatory action by Gamisangryosamutang and The effect of Ziyang-Go on atopic dermatitis-like lesion and pruritus in NC/Nga

- mice. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2003;17(2):428-35.
12. Park SE, Heo Y. A study on the cause of the cause of atopic dermatitis. J Natural Sciences Research Institute. 2009;7(1):1-8.
 13. Eichenfield LF, Hanifin JM, Luger TA, Stevens SR, Pride HB. Consensus conference on pediatric atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol. 2003;49(6):1088-95.
 14. Kim GB, Joo DY. Junguipibubyeonghag. Beijing:China Medico Pharmaceutical Science & Technology Publishing House. 1999:193-8.
 15. Ma CY, Jo SH. Daejunguipibuseongbyeongjinlyodaejeon. Shanxi:Shanxi Science Technology Publishing House. 1999:475-93.
 16. Lee JC, Park SY, Choi JH, Kim JH. Effects of Portulacae Herba (PH) on Allergic Contact Dermatitis (ACD) Induced by DNCB in Mice. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2014;27(3):115-32.
 17. Kim SH. Effect of Chrysanthemi Borealis Flos on atopy dermatitis induced by DNCB in NC/Nga mouse. Kyunghee University Dissertation, 2010.
 18. Lee YS, Han JK, Kim YH. The Effects of Dictamni Radicis Cortex Extracts on DNCB Induced Atopic Dermatitis-like Skin Lesions of NC/Nga Mouse. J Pediatr Korean Med. 2014;28(4):1-29.
 19. Lim KM. Effects of Adenophorae Radix(AR) on Atopic Dermatitis(AD) Induced by DNCB in Mice. Dongshin University Thesis. 2016.
 20. Park JM, Chae JW. Effects of Aurantii Immaturus Fructus (AI) on Atopic Dermatitis (AD) Induced by DNCB in Mice. J Pediatr Korean Med. 2015;29(1):27-43.
 21. Jeong SI, Choi BM, Yun YG, Lee JW, Jang SI. A Noble Therapeutic Approach of Atopic dermatitis by Development of Th2 Chemokine Inhibitors from Natural Products : Inhibitory Effect of Sophora flavescens Extract in Atopic Dermatitis Model mice, NC/Nga. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription. 2009;17(1):141-51.
 22. Sung YY, Yoon TS, Jang JY, Yang WK, Kim HK. Topical application of Rehmannia glutinosa extract inhibits mite allergen-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. J Korean Society of Medicinal Crop Science. 2010;349-50.
 23. Hwang CH, Yun CS, Song SH, Weon YH, Hwang CY. Effects of Galgeunhaegitanggamibang Administration along with Samhwangseze-gamibang on Atopic Dermatitis of NC/Nga Mice. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2008;21(2):1-18.
 24. Yoon JE, Kim YH, Han JK. Effect of Gupoongjeseuptang (GPJST) on DNCB (dinitrochlorobenzene)-induced Atopic Derm. J Korean Oriental Pediatrics. 2008;22(3):105-37.
 25. Yang HJ. Effects of Gungguitang gamibang on atopic dermatitis induced by DNCB in mice. Wonkwang university Dissertation. 2014.
 26. Park DB, Han JK, Kim YH. Effect of Yanghyeuljeseuptang on immunological factors in spleen and draining lymph node(DLN) of atopic dermatitis induced NC/Nga mouse by dinitrochlorobenzene (DNCB). J Research Institute of Korean Medicine. 2007;16(2):251-65.

27. Kim BA, Kim MS, Kang BM, Byeon SH, Park IH, Park JH, et al. Inhibitory Studies of Hwangryunhaedok-tang on Development of Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. *Kor J Herbology*. 2008;23(2):59-65.
28. Hong CH, Seo ES, Weon YH, Kim YG, Hwang CY. Effects of Onchung-eum Administration along with Samhwangseze-gamibang on Treatment Atopic Dermatitis Development in NC/Nga Mice. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2007; 21(3):679-87.
29. Khwag NG, Kang H, Myung EG, Park SM, Shim BS, Kim SH, et al. Effect of Yeongyupaedog-san on Cytokine Levels of Mouse Th1/Th2 Cells and Anti-allergic Activity in Ovalbumin-sensitized Allergic Inflammation Model. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2006;20(4):844-52.
30. Seo HY, Han JK, Kim YH. The effect of Li Zhong Tang on the suppression of Th2 differentiation by IFN- γ response in IgE hyperproduction and atopic dermatitis-like skin lesions induced NC/Nga mouse. *J Korean Oriental Pediatrics*. 2009;23(1):1-22.
31. Park ES, Choi IH. The Effect of Sopungchengyoungtangami-bang Extract to Recover Function of Stratum Corneum on Mice Model after Atopic Dermatitis Elicitation. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2003;16(3):96-115.
32. Kim SH, Choi JW, Kim JH, Park SY. Effects of Tang-gwi-eum-za-gagambang along with External Spray Therapy on the Spontaneously Occurring Atopic Dermatitis Development in NC/Nga Mouse. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2005;18(1):27-49.
33. Min YG, Choi JH, Kim JH, Park SY. Effects of Sopoongsangagambang administration along with external spray treatment on atopic dermatitis development in NC/Nga mice. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2005;18(1):116-34.
34. Hwang DY. *Sinjeungbangyaghabpyeon*. Seoul:Younglimsa, 2007:253.
35. Kim IL, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YG, Park JH, et al. *Bonchohag*. Seoul:Jungumsa, 2011:162,177,217.
36. Kim TY. Treatment of Atopic Dermatitis:an Update and Review of the Literature. *Pediatric allergy and respiratory disease*. 2009;19(3):209-19.
37. Lee JH, Kim KH, Kim MN, Kim JW, Ro YS, Park YL, et al. Report from ADRG: The Treatment Guideline of Korean Atopic Dermatitis. *Korean J Dermatol*. 2006;44 (8):907-13.
38. Kim JK, Kim YH, Lee HH, Lim SS, Park KW. Effect of Scrophularia buergeriana Extract on the Degranulation of Mast Cells and Ear Swelling Induced by Dinitrofluorobenzene in Mice. *Inflammation*. 2011:12.
39. Galli E, Cicconi R, Rossi P, Casati A, Brunetti E, Mancino G. Atopic dermatitis:molecular mechanisms, clinical aspects and new therapeutical approaches. *Curr MolMed*. 2003;3:127-38.
40. Khayyamian S, Hutloff A, Büchner K, Gräfe M, Henn V, Kroczeck RA, et al. ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion

- by memory CD4⁺ T cells, Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(9):6198-203.
41. Marzo AL, Vezys V, Williams K, Tough DF, Lefrançois L. Tissue-level regulation of Th1 and Th2 primary and memory CD4 T cells in response to Listeria infection. J Immunol. 2002;168(9):4504-10.
 42. Kim IS, Moon HJ. Essential Immunology. Seoul:Daihak Publishing Company. 2010:24-5.
 43. Jung IJ, Wang JH, Yun JW, Lee KW, Yeon SC, Lee HJ, et al. Radiographic Estimation of Experimentally Induced Splenomegaly in Dogs. Journal of Veterinary Clinics. 2006;23(3):263-6.
 44. Stasiuk LM, Abehsira-Amar O, Fournier C. Collagen-induced arthritis in DBA/1 mice;cytokine gene activation following immunization with type II collagen. Cell Immunol. 1996;173:269-75.
 45. Kwon HH, Kim EJ, Kim IT, Park GH, Yang MG, Eom YB, et al. Clinical Immunology. Seoul:Korea Medical Book Publishing Company. 2010:166.