Original Article

면역반응 및 신경성장인자 조절을 통한 지실의 항아토피 효능

정선아, 최유연, 양웅모

경희대학교 한의과대학

Anti-atopic dermatitis effects of *Poncirus trifoliata* Rafinesque via regulation of immune response and nerve growth factor

Seon A Jung, You Yeon Choi, Woong Mo Yang

Department of Convergence Korean Medical Science, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Objectives: *Poncirus trifoliata* Rafinesque has been known to have anti-allergic effects in skin diseases. However, anti-atopic dermatitis effects of *P. trifoliata* Rafinesque have not been studied yet in skin diseases. The present study evaluated the anti-atopic dermatitis effects of *P. trifoliata* Rafinesque (PTR) using external treatments on AD.

Methods: AD lesions were induced by the repeated application of 2, 4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) on the shaved back of BALB/c mice. 100 μ l of PTR extracts was applied to the AD lesions for 11 days. Histological assessments, mast cells count and serum levels of IgE were analyzed. The anti-pruritic effects of PTR were examined by the change of scratching frequency and nerve growth factor (NGF) expression. In addition, the anti-inflammatory effects of PTR were examined by the expressions of Th2/Th1 cytokines and pro-inflammatory in dorsal skin.

Results: Histopathological findings showed that topical application of PTR decreased the thickness of dermal and epidermal skin compared with the DNCB group. PTR also notably decreased the mast cells count and serum IgE. The scratching behavior of mice and expression of NGF were significantly reduced. In addition, PTR group significantly suppressed the IL-4, IL-6, IFN- γ and TNF- α cytokines compared to the DNCB group.

Conclusions: These results indicated that *P. trifoliata* Rafinesque possess anti-pruritus and anti-atopic dermatitis properties. Therefore, *P. trifoliata* Rafinesque might be used for treatment of pruritus and atopic dermatitis.

Key Words : *Poncirus trifoliata*, atopic dermatitis, anti-pruritus, anti-inflammation

서론

아토피 피부염은 재발과 악화가 반복적으로 나타나며, 극심한 소양감과 만성 재발성 습진을 특징으로 하는 피부질환이다¹⁾. 우리나라를 비롯한 개발국들의 소아에서는 10~20%, 성인 1~3%의 유병률을 보이며, 전 세계적으로 지속적인 증가 추세에 있다²⁾. 연령에 따라 특징적인 피부 병변을 보이며, 천식, 비염 등 다른 알레르기성 질환과 관련이 있다³⁾.

아토피 피부염의 원인은 정확하게 밝혀지지는 않았으나 유전적 요인, 환경적 요인, 피부 장벽의 손상, 면역학적인 요인 등이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 따라서 아토피 질환의 진단을 위해 임상적인 증상에 의존하는 것이 불가피한 실정이다⁵⁾. 급성 증상으로 홍반, 구진 등이 인설을 동반하여 나타나며, 심한 경우 부종(浮腫), 미란(糜爛)과 가피(痂皮)가 나타난다. 만성적으로는 피부의 태선화, 균열, 색소침착 등의 증상이 나타난다⁶⁾. 가려움

• Received : 25 November 2015

• Revised : 14 March 2016

• Accepted : 17 March 2016

• Correspondence to : 양웅모(Woong Mo Yang)

서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한의과대학

Tel : +82-2-961-2209, E-mail : wmyang@khu.ac.kr

증을 주 증상으로 하며, 굵은 행동이 이어지면서 발진이 생기게 되며, 반복적인 긁거나 뜯는 등의 외부 자극에 기인한 찰상으로 인해 2차 감염으로 염증반응이 더욱더 악화된다. 따라서 이런 악순환의 고리를 차단하기 위해서 가려움증의 차단은 매우 중요한 의미를 가지고 있다.

현재 아토피 피부염의 치료를 위해 임상에서는 항히스타민제 및 경구용 스테로이드의 복용, 스테로이드 연고의 도포, 면역억제제, 광선 치료 등이 응용되고 있다⁷⁾. 그러나 항히스타민제의 복용이 중추신경계, 위장관, 간, 신장 기능에 영향을 줄 수 있고, 태아 기형 등의 부작용이 보고되었으며, 국소 스테로이드 제제의 경우 피부 위축, 모세혈관 확장, 홍반, 접촉성 피부염 등의 부작용 등이 알려져 있다⁸⁾. 이러한 부작용을 최소화하기 위해, 최근에는 대체의학에 기반을 둔 약용식물의 운용이 임상적인 기반과 비교적 안전하게 적용 가능하다는 장점을 바탕으로 아토피 피부염과 관련된 의약품 개발에 중요한 자원으로 인식 되고 있다⁹⁾.

한의학적으로 아토피 피부염은 胎熱, 奶癬, 胎癩瘡, 四癩風 등의 범주에 속하며¹⁰⁾, 血熱, 風熱, 濕熱, 陰虛, 脾虛濕盛 등을 원인으로 보고 淸利濕熱, 淸熱解毒, 滋陰養血 등의 치법을 사용한다고 하였다¹¹⁾.

지실(枳實, *Ponciri fructus*)은 운향과에 속한 탕자나무의 미성숙한 과실을 반으로 쪼개어 말린 것으로, 한의학적으로 枳實의 性味는 苦寒하며, 破氣消積 化痰散結의 효능이 있다¹²⁾. 《神農本草經》에 “治大風在皮膚中 如麻豆苦痒”이라 언급되어 있으며, 胸腹脹滿, 食積, 腹痛, 便秘, 水腫, 胃下垂, 子宮下垂, 胃腸病에 기인한 皮膚疾患, 皮膚瘙癢症, 아나필락시스 쇼크 등을 치료하는데 사용된다¹³⁾. 康은 지실의 경구 투여가 수동적 피부 아나필락시스(PCA)를 억제하는 효과가 매우 크다고 하였으며¹⁴⁾, 黃은 지실물 추출액이 histamine의 방출을 억제하고 cAMP의 방출을 증가시켜 알레르기성 질환의 치료 및 예방에 유용할 것임을 보고 하였다¹⁵⁾.

따라서 본 연구를 통해 지실 추출물의 외용도포가 아토피성 피부염에 미치는 영향을 알아보기 위해

실험을 진행하였다. 이에 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)로 아토피 피부염을 유발한 BALB/c 생쥐에서 조직학적인 평가를 통한 표피 및 진피의 두께 측정, mast cells의 수, serum immunoglobulin (Ig) E의 측정, 가려움 억제력 평가 및 신경 성장 인자 (Nerve growth factor; NGF)의 발현 측정 및 Th1/Th2 cytokine의 변화를 분석하였다.

실험 재료 및 방법

1. 약물의 제조

실험에 사용된 지실은 정도생약국(Seoul, Korea)에서 건조된 열매 형태로 구입한 후 경희대학교 한의과대학 융합한의과학교실에서 형태학적 및 화학적으로 동정하였다. 지실(20g)에 70% ethanol (200 ml)을 가하여 상온에서 24시간 추출 한 후 여과지를 사용하여 여과하였다. 여과액은 55±2℃에서 회전 감압농축기(rotary vacuum evaporator, EYELA, Tokyo, Japan)로 감압 농축 후, 동결 건조하여 1.87 g 파우더 상태의 지실 에탄올 추출물을 얻었다(yield rate: 9.35%). 최종적으로 얻어진 70% ethanol 지실 추출물 표본(Voucher specimen: #PTR-70)은 본 실험실에 보관 되었으며, 실험동물에 사용 시는 증류수(Distilled water, DW)에 용해하여 도포하였다.

2. 실험동물

생후 5 주령의 암컷 BALB/c 생쥐 (16-18g)는 (주)라운바이오(yongin, Korea)로부터 구매하여 7일 동안의 적응기를 통해 본 실험에 사용되었다. 동물들은 전 실험 기간 동안 기존의 조건대로 표준화된 고형사료와 물을 공급하였으며, 사육실의 온도는 23±2℃, 습도 50±10%, 광주기와 암주기(light-dark cycle)는 12시간-12시간으로 유지되었다. 모든 동물 실험 과정은 NIH (National Institutes of Health)의 실험동물관리 규정(Principle of Laboratory Animal Care)과 경희대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 동물윤리 준칙에 의거하여 수행되었다(Permit

Number: KHUASP(SE)-14-030).

3. 아토피성 피부염 모델 유발

일주일의 적응기를 거친 생쥐는 제모기로 등 부위를 제모하고, 미세상처가 자연 치유되도록 24 시간 동안 방치하였다. 각 군의 생쥐 (n=5)는 아토피를 유발하지 않은 정상 대조군(NOR), 아토피만 유발한 음성 대조군(DNCB), 아토피 유발 후 지질을 처리한 실험 대조군(PTR), 아토피 유발 후 dexamethasone을 처리한 양성대조군(DEX)으로 구성하였다. 첫 번째 염증유발 과정으로 NOR군을 제외한 모든 군에 1% DNCB 용액(in acetone: olive oil=4:1) 100 μ l을 3일 동안 하루에 한 번씩 동일한 등 부위에 감작(sensitization) 시켰으며, NOR군에는 vehicle (acetone: olive oil=4:1)을 처리하였다. 4일 동안의 잠복기 후, 2 번째 감작은 NOR군을 제외한 모든 군에 0.5% DNCB 용액 100 μ l가 처리되었고, NOR군은 vehicle (acetone: olive oil=4:1)을 도포하였다. 0.5%의 DNCB 처리 4시간 전에 PTR 군에는 100 mg/ml (100 μ l), DEX군에는 dexamethasone 10 μ M (100 μ l) 도포하였으며, NOR군에는 vehicle (DW: 100 μ l)를 처리하였다. Sample처리 및 2차 감작은 1일 1회 11일 동안 처리되었으며, 실험 과정은 총 18 일 동안 진행되었다. 12시간 단식 후인 19 일째 되는 날 실험 목적에 따라 생쥐를 희생하였다. 아토피 피부염 발현 관련 각종 지표 분석을 위해 채혈, 피부 및 장기적출(spleen), scratching 빈도 측정이 실시되었다 (Fig. 1).

4. 조직학적 평가

적출된 피부조직(5x5mm)을 10% paraformaldehyde (pH 7.4)로 24시간 고정하고, phosphate buffered saline (PBS)로 30분씩, 3번 세척을 한 후 일반적인 조직처리과정(수세-탈수-투명-침투-포매)의 과정을 거쳐, 4 μ m 간격으로 microtome cutting하여 slide를 얻었다. Slide는 deparaffinization과 hydration 과정을 거친 후 표피와 진피의 두께를 관찰을 위해 hematoxylin & eosin (H&E)의 염색을, 진피 내 및 피하 층 내의 비만세포(Mast cell)의 분포양상 정도를 확인하기 위해 변성 염색법인 toluidine blue 염색을 실시하였다. 각 염색법에 따라 염색된 무작위로 선정된 slide 측정 이미지(n=5)는 광학 현미경에서 X100의 배율에서 관찰되었다.

5. IgE 측정

아토피 피부염의 발현 관련 혈청 내에 IgE를 분석하기 위해, 실험 종료일(on 19 days)에 심장 채혈 후, 30분 (4°C, 15,000rpm) 동안 원심 분리하여 혈청을 분리하여 분석 직전까지-80°C에 보관하였다. 혈청 내 존재하는 total IgE 수준은 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays, 효소면역측정법) kit를 이용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다. 측정 반응이 종료된 후, IgE의 농도는 ELISA reader (Molecular Devices, Downingtown, PA)를 이용하여 450nm 파장에서 분석되었으며 표준 흡광도 값으로부터 얻어진 선형 회귀식을 이용하여 계산하였다.

6. Scratching behavior

Fig. 1. Experimental scheme for atopic dermatitis induction and PTR application.

아토피 피부염 발현 시 나타나는 대표적인 행동학적 관찰 측정인 가려움 억제력 평가를 위해, 지질의 외용 도포 후 실험 종료 전날(on 18 day)에 긁는 횟수(scratching frequency)를 측정하였다. 마지막 DNCB 도포 1시간 후 digital-camera (NEX-C3, Sony, Japan)를 사용하여 20분 동안 녹화하여 행동을 분석하였다. 마우스는 개체 별로 격리되어 관찰되었으며, 마우스의 습관적인 행동인 입 주변을 만지는 횟수는 평가에서 제외 하였다. 마우스의 뒷발이 등 부위로 올라갔다 바닥에 내려올 때까지의 행동을 1번의 횟수로 평가하였으며, 연속동작은 1회로 간주하였고, 잠시라도 중단 후 다시 긁는 경우는 횟수에 포함하였다.

7. 피부에서의 nerve growth factor (NGF) 발현 확인

신경 성장 인자인 (nerve growth factor, NGF)의 발현을 분석하기 위하여 생쥐 피부 조직으로부터 단백질을 추출하여 western blot을 방법을 사용하였다. Protease inhibitors cocktail이 포함된 RIPA assay buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM EDTA)가 사용되었다. 생쥐 등 피부 조직(n=5/group)은 각각의 buffer와 함께 분쇄되었으며, 정량된 단백질(30ug)은 SDS 12%-polyacrylamide gell을 이용하여 전기영동을 통해 단백질을 분리 후 nitrocellulose 막으로 이동시켰다. Membrane은 5% BSA (in TBS-T)를 이용하여 blocking시키고 TBS-T로 15분간 3번 세척 하였다. 1차 항체인 Anti-rabbit β -actin, NGF (in TBS-T, 1:1000)를 처리하여 4℃에서 overnight binding시켰다. 세척 후 HRP가 붙어있는 goat-anti-rabbit 2차 항체를 TBS-T에 희석하여 실온에서 1시간 동안 처리한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) assay kit를 이용하여 밴드를 측정하였다.

8. Cytokine 측정

생쥐 희생 부검 시 적취된 생쥐 피부 조직에서 단백질을 추출하여 cytokine (IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α)의 변화를 분석하였다. 단백질을 추출을 위해 각각의 조직 500mg (n=5/group)과 1ml의 T-PER (Rockford, IL, USA)가 함께 분쇄되었으며, 원심분리를 통해 얻어진 상층액은 bovine serum albumin (BSA)를 표준으로 한 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량한 후 cytokine의 분석에 사용되었다. 생쥐의 등 피부 조직의 cytokine의 분비량의 정량 방법을 기술하면 다음과 같다. 각각의 capture antibody를 각각의 coating buffer로 희석하여 well 당 100 μ l씩 넣은 뒤 냉장상태로 overnight 시킨 후, plate를 washing buffer (0.05% tween-20 in 1X PBS)를 이용하여 plate를 3회 세척하였다. 세척한 plate에 well 당 10% FBS in 1X PBS 200 μ l씩 분주하여 실온에 2시간 동안 non-specific binding을 차단하였다. 3회의 세척 후, 각각의 standard와 정량된 단백질을 각 100 μ l/well로 분주하고 상온에서 2시간 후 방치하였다. plate를 6회 세척하고 10% FBS in 1X PBS에 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 항체 (IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α)를 희석하여 100 μ l씩 첨가하고 실온에서 1시간 반응시켰다. plate를 6회 세척한 후, TMB (substrate reagent set A: B=1:1) 100 μ l씩 분주한 후 약 30분 동안 발색 정도를 확인하여 stop solution (2M H₂SO₄)으로 반응을 종료하였다. 반응이 종료된 후, cytokine의 농도는 ELISA reader (Molecular Devices, Downingtown, PA)를 이용하여 450nm 파장에서 분석되었으며, 표준 흡광도 값으로부터 얻어진 선형 회귀식을 이용하여 계산하였다.

9. 통계처리

모든 결과는 평균 $\pm$ 표준오차(mean $\pm$ standard error) 값으로 표시 하였으며, 각 실험 결과로부터 ANOVA (analysis of variance)를 구한 후 사후검증은 DNCB 군을 기준으로 Dunnett's test를 이용하여 각 군의 평균 간의 유의성을 검정하였다. 일반적으로 P 값이 0.05 이하인 경우 통계학적으로 유의 한 것으로 간

주하였다.

결 과

1. 지실 추출물이 피부조직 변화에 미치는 영향

아토피 피부염이 유발된 DNCB군에서는 NOR군에 비해 표피의 과각화증(epidermal hyperplasia), 표피 및 진피의 세포질 증가(thickening of epidermis and dermis)등의 조직병리 소견이 관찰되었다(표피: 약 6.2 ± 4.3 배, 진피: 약 1.9 ± 1.2 배, Fig. 2). 아토피 피부염 유도 후 PTR 도포한 군 (표피: $128.9 \pm 18.9 \mu$

m, 진피: $660.0 \pm 46.7 \mu$ m) 은 DNCB로 유도된 음성대조군 (표피: $227.5 \pm 33.4 \mu$ m, 진피: $917.2 \pm 75.8 \mu$ m)에 비해 표피 및 진피의 두께가 유의하게 감소되었고, DNCB군에 비해 내부 조직이 보다 안정된 상태로 회복되었다 ($P < 0.001$). 양성대조군으로 사용된 DEX군에서도 DNCB군에 비해 피부의 두께가 감소됨을 확인하였다(표피: $142.6 \pm 30.5 \mu$ m, 진피: $660.9 \pm 90.0 \mu$ m, $P < 0.001$, Fig. 2).

2. 지실 추출물이 비만세포(Mast cells) 수 변화에 미치는 영향

Fig. 2. Effects of PTR on skin thickness in DNCB-induced mice. (A) The thickness of epidermis, (B) the thickness of dermis. Hematoxylin–eosin staining showed a decrease thickness of epidermis and dermis in the PTR-treated group. Results shown are representative of five observations. Data are presented as means $\pm$ SD and analyzed with ANOVA. ### $P < 0.001$, versus the NOR group. *** $P < 0.001$, versus the DNCB group. Magnification: X 100.

반복적인 DNCB 자극으로 유발된 아토피 피부염 모델에서 NOR군(28 ± 8)에 비해 진피 부분에서 증가된 비만 세포의 침윤을 확인하였다(202 ± 37 , $P < 0.001$). 증가된 비만세포는 PTR의 처리에 의해 유의적인 감소를 나타내었고(PTR: 138 ± 19 , $P < 0.01$), 양성대조군으로 처리된 DEX군에서도 유의적인 감소를 나타내었다(DEX: 132 ± 24 , $P < 0.001$, Fig. 3).

3. 지질 추출물이 Immunoglobulin E (IgE) 변화에 미치는 영향

알레르기 반응에 관여하는 혈청 내의 IgE 상승은

아토피 피부염 반응의 중요한 지표 인자이며, 비만 세포의 활성화를 통해 각종 알레르기 증상을 유발한다. 아토피 피부염을 유발한 DNCB 도포 그룹($1886.1 \pm 191.1 \text{ ng/ml}$)에서 NOR군 ($190.8 \pm 60.3 \text{ ng/ml}$)에 비해 유의적으로 약 9.9 $\pm$ 3.2 배 정도 증가되었으며($P < 0.001$), PTR 처리군의 IgE 수준은 $1184.0 \pm 120.5 \text{ ng/ml}$ 으로 DNCB군에 비해 37.2% 감소하였다($P < 0.001$). 양성대조군 DEX 그룹에서도 $1275.9 \pm 82.0 \text{ ng/ml}$ 로 DNCB 그룹에 비해 32.4% 감소되었다(Fig. 4).

Fig. 3. Effects of PTR on the number of mast cells in DNCB-induced mice, Toluidine blue staining showed a decrease the number of mast cells in the RTR group. Results shown are representative of five observations. Data are presented as means $\pm$ SD and analyzed with ANOVA. ### $P < 0.001$, versus the NOR group. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ versus the DNCB group. Magnification: X 100.

Fig. 4. Effects of PTR on serum IgE level in DNCB-induced mice. Data are presented as means $\pm$ SD and analyzed with ANOVA. ### $P < 0.001$, versus the NOR group. *** $P < 0.001$, versus the DNCB group.

4. 지실 추출물이 소양증에 미치는 영향

아토피성 피부염의 대표적인 임상 특징인 소양증 관련 행동양상을 관찰하기 위해 가려움 횟수 (scratching frequency)를 DNCB 도포 1시간 후 20분 동안 관찰 하였다 (Fig. 5). 아토피 피부염 유발과 함께 11일 간의 PTR 도포한 군의 가려움증 횟수는 아토피 피부염 대조군(92 ± 25)에 비해 유의적으로 감소하였다(54 ± 19 , $P < 0.05$). 반면 양성대조군 DEX 처리 군에서는 유의적인 감소를 확인 할 수 없었다 (65 ± 20).

5. 지실 추출물이 신경성장인자(Nerve Growth Factor, NGF) 발현에 미치는 영향

Fig. 5. Effects of PTR on scratching behavior in DNCB-induced mice. Scratching behavior of mouse was checked after 1 h had passed following the last application of DNCB (on 18 day). Each mouse of all group were videotaped for 20 min to count the number of scratching behavior. Data are presented as means $\pm$ SD ($n = 5$) and analyzed with ANOVA. ### $P < 0.001$, versus the NOR group. * $P < 0.05$, versus the DNCB group. N.S: non-significant.

소양증에 관여하는 2차 감각신경 및 면역시스템을 조절하는 신경성장인자(NGF) 발현 정도를 western blot 분석을 통해 평가하였다. DNCB로 유도된 아토피성 피부염에서는 NOR군에 비해 약 1.6 ± 1.3 배 증가됨을 확인 하였으며, PTR군 에서는 DNCB군에 비해 NGF의 발현이 유의적으로 약 36.2% 감소된 것으로 나타났다. 반면, 양성대조군으로 사용된 DEX의 군에서는 약 11.6%의 감소 경향은 나타났지만 유의적인 감소는 확인 할 수 없었다. (Fig. 6). 이

Fig. 6. Effects of PTR on NGF expression in DNCB-induced mice. The expression of NGF was confirmed by western blotting assay. ### $P < 0.001$, versus the NOR group. ## $P < 0.01$, versus the DNCB group. N.S: non-significant.

러한 결과는 소양증 관련 행동양상과 유사한 결과를 보이고 있으며, NGF의 조절에 의해 유도된 감각신경을 PTR 도포를 통해 조절할 수 있음을 시사한다.

6. 지질 추출물이 cytokine 발현에 미치는 영향

아토피성 피부염의 대표적 면역학적 지표로 인용되는 cytokine 생성 변화를 확인하기 위해 IL-4, IL-6, IFN- γ 및 TNF- α 의 수준 변화를 분석하였다 (Fig. 7). IL-4 발현은 DNCB로 유도된 아토피성 피부염에서 약 14.7배 이상 증가되었으며, PTR 군은 DNCB군에 비해 약 79.6%의 감소를($P < 0.001$), DEX 군은 20.9%의 감소를 보였다($P < 0.05$). IL-6 발현은 NOR군($64.2 \pm 9.0 \text{ pg/mg}$)에 비해 DNCB의 반복 도포로 인해 증가 되었으며($659.4 \pm 58.7 \text{ pg/mg}$), PTR군($181.3 \pm 44.9 \text{ pg/mg}$)과 DEX군($133.1 \pm 15.7 \text{ pg/mg}$)에서 각각 72.5%, 79.8%로 모두 유의적으로 감소하였다($P < 0.001$). IFN- γ 수준의 경우, NOR군($284.2 \pm 26.7 \text{ pg/ml}$)에 DNCB군($597.2 \pm 32.4 \text{ pg/ml}$)에서 2.1배 이상 증가되었으며, PTR군($245.7 \pm 60.4 \text{ pg/}$

ml), DEX군($299.6 \pm 27.3 \text{ pg/ml}$)에서 유의하게 IFN- γ 수준이 감소되었음이 관찰되었다($P < 0.001$). 친염증성 cytokine인 TNF- α 의 경우 역시 DNCB에 의해 유도된 아토피피부염 유발군이 PTR의 도포에 의해 77.2 %의 감소를, 양성대조군인 DEX 군이 78.4%의 감소를 보였다($P < 0.001$).

고 찰

아토피 피부염의 병인 및 관련 기전을 밝히기 위한 연구가 지속적으로 진행되고 있으나 완치를 위한 확실한 대안은 없는 실정이다. 아토피 피부염 환자의 절반 이상이 1세 이전에 증상을 경험하게 되며, 청소년기를 거쳐 자연 관해가 되기는 하나 25%는 성인기에 접어들어서 만성 습진의 형태로 증상을 나타내거나 잦은 재발을 경험하게 된다¹⁶⁾. 또한 야간 가려움증으로 인한 불면, 단체 활동의 제약, 자신감 부족 및 심한 우울감 등 정신 신체적 영향뿐 아니라 사회적 측면에서도 다양하게 영향을 끼쳐 환자의 삶

Fig. 7. Effects of PTR on levels of cytokine in DNCB-induced mice. The cytokine levels of IL-4, -6, IFN- γ and TNF- α were measured in the dorsal skin using mouse ELISA kits. Data are presented as means $\pm$ SD ($n = 5$) and analyzed with ANOVA. ### $P < 0.001$, versus the NOR group. *** $P < 0.001$ * $P < 0.05$, versus the DNCB group.

의 질 저하와 밀접한 관련이 있는 질환이다¹⁷⁾.

아토피 피부염의 피부 증상의 특징으로는 소양증과 함께 홍반, 구진, 소수포, 균열, 각질이 나타나며 만성화된 경우 태선화(苔癬化)를 보인다. 조직학적 소견으로는 표피의 해면화 및 비대, 과각화증 및 이상각화증, 림프구의 침윤을 특징으로 한다¹⁸⁾. 본 연구의 조직학적 평가에서 반복적인 DNCB 도포로 인해 표피의 과각화증 (hyperplasia)과 진피의 부종 (edema)을 확인하였으며, 이런 아토피 증상은 지질의 외용도포에 의해 유의적으로 감소되었다(Fig. 2). 또한 양성대조군으로 사용된 dexamethasone의 처리군에서도 아토피 피부 증상이 완화된 것을 확인 하였다(Fig. 2).

혈청 Ig E의 농도의 증가가 아토피 피부염의 염증 반응에 관여하는 병리 기전은 확실히 밝혀져 있지 않으나 비만세포 수용체와 결합하여 히스타민을 유리시킴으로써 가려움증을 유발한다고 알려져 있다¹⁹⁾. 아토피 병변 부위에는 고친화성 IgE 수용체를 가진 랑게르한스 세포와 염증성 수지상 표피세포가 증가되어 있으며 이들 항원 제시세포들은 T helper (Th) 2와 Th1 cell을 자극하여 cytokine의 분비가 증가되고, 염증 반응을 일으키게 된다²⁰⁾. 정상과 아토피 환자 모두 anti-IgE가 비만세포의 반응을 일으키지만 알레르겐은 아토피 환자에게만 반응을 나타낸다²¹⁾. 또한 비만세포의 활성화는 histamine과 같은 pruritogen을 방출할 뿐 아니라 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1, IL-6 등을 생산하여 T cell을 포함한 대식세포를 자극하여 염증을 악화시키는 원인이 된다²²⁾. 본 연구 결과 DNCB로 유발된 마우스 모델의 진피에 비만세포의 침윤을 확인하였고, PTR 도포군에서 비만세포의 유의적인 감소를 나타내었다. 또한, 아토피 피부염의 중요한 지표 인자인 혈청 내 IgE의 농도는 DNCB군에서 NOR군과 비교하여 약 10 배의 증가를 보였으며, PTR 도포시 혈청 IgE 농도가 DNCB군에 비해 37.2% 감소하였다.

소양증은 아토피 환자의 삶의 질에 다양한 방면에서 영향을 끼치며, 물리적 자극을 가할수록 더욱 심하게 나타나며 피부 장벽 손상의 대표적 원인이

된다. 이 과정에서 세균 및 바이러스 등 감염에 대한 감수성이 증가 되며, 마찰에 의한 자극으로 찰상, 가피, 균열 등이 발생하며 만성화된 경우 태선화 등의 증상을 동반할 수 있다. Fig. 5의 결과처럼, 가려움 횟수의 관찰을 통해 행동 양식을 분석한 결과 PTR군에서 양성대조군인 DEX군에 비해 유의한 소양증 억제를 관찰 할 수 있었다. 또한, 접촉성 피부염, 아토피 피부염 등 심한 소양증을 동반하는 피부 질환에서 표피 내에 위치한 무수 신경섬유의 자유 신경 말단이 매개하며 신경성장인자(NGF) 분비의 증가를 관찰할 수 있다²³⁾. 지속적인 NGF의 분비는 keratinocyte의 증식으로 인한 표피 비대를 가속화시키는 역할을 하며 아토피 피부염 병변의 비만세포의 활성화를 유도하고 피부 소양증을 더욱 심화시키게 된다²⁴⁻²⁵⁾. 따라서 NGF의 발현을 western blot 분석을 통해 평가한 결과 DNCB로 유도된 아토피성 피부염에서는 NOR군에 비해 1.6배 증가하였으며, PTR군에서는 DNCB군에 비해 NGF의 발현이 약 36.2% 유의하게 감소된 것으로 나타났다(Fig. 6). 이런 결과를 통해 PTR도포가 NGF의 억제제를 통한 가려움증 완화에 도움을 줄 것이라고 생각할 수 있다.

아토피 피부염의 면역학적 기작은 Th2 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 등이 증가되고 Th1 cytokine인 INF- γ , TNF- β 의 감소로 인한 불균형을 특징으로 한다²⁶⁾. IL-4는 B세포를 자극하여 IgE를 생성하도록 하며, IL-6은 IgE를 증폭시키는 역할을 한다²⁷⁾. INF- γ 는 Th1 면역 반응에 관여하는 cytokine으로 대식세포를 활성화하며, Th2 림프구의 증식 및 IgE의 생성을 억제한다²⁸⁾. TNF- α 는 만성 염증 반응과 관련 있으며, 대식세포 등에서 분비된다. 활성화된 대식세포는 염증 반응을 일으키는 과정에서 TNF- α , ROS (Reactive oxygen species), IL-6, IL-1 β 과 같은 염증성 cytokine을 생산한다²⁹⁾. Th2 및 Th1 면역 반응에 관여하는 cytokine인 IL-4, IL-6, IFN- γ 및 TNF- α 의 변화를 관찰한 결과 (Fig. 7.) IL-4 발현은 PTR 군에서 DNCB군에 비해 약 79.6%의 감소를 보였으며 IL-6 발현은 PTR군에서 72.5%로 유의하게 감소하였다. IFN- γ 수준 또한

PTR에서 유의하게 감소되었다. TNF- α 역시 PTR군에서 77.2 %의 감소를 보였다. 이러한 cytokine의 분비 조절은 allergy반응 및 염증 기전에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 지질 도포를 통한 표피의 과각화증, 진피의 부종, cytokines 등 아토피에 대한 개선 효능을 확인하였으며, 특히 가려움증, 비만세포의 수, IgE의 생산 및 신경성장인자 발현 등에서도 유의적인 감소를 확인하였다. 이러한 결과를 통해 지질의 외용도포는 아토피 피부염에 유효한 항염증 효능과 면역기전 및 신경성장인자의 조절을 통한 항소양증의 효능을 나타내었으며, 이러한 효능 및 기전을 활용하여 아토피 및 소양증 치료에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Min DL, Park EJ, Kang KH. Review of Clinical and Experimental Studies on External Application Treatment for Atopic Dermatitis in the Korean Literature. *J Korean Orient Pediatr.* 2013; 27(1):36-49.
2. Park Y. Status of clinical practice on diagnosis and management of atopic dermatitis in Korea: a questionnaire survey of physicians. *Allergy Asthma Respir Dis.* 2013;1(3):257-265.
3. Lee YJ, Kang HY, Jeong BJ, Kim KE, Lee KY, Lee SY. Significance of atopic index in children with atopic dermatitis. *Allergy Asthma Respir Dis.* 1994;4(2):11-24.
4. Choi HJ, Sim BY, Miyamoto T. Effects of Lobophytum crassum extract (MC-1) on Various Immunological Factors Related to Pathogenesis of Atopic Dermatitis in Dermatophagoides Pteronyssinus Treated NC/Nga mice. *Korea J Herbol.* 2015;30(1):95-101.
5. Yun HJ, Ko WS. Clinical Study of Atopic Dermatitis; the Classification of Oriental Medical Clinical type and Treatment. *J Korean Oriental Med.* 2001;22(2):10-21.
6. Lee SH, Yun YG. Study for Treatment of Atopic Dermatitis in Oriental Medical Prescription. *J Korean Med.* 2006;15(1):56-69.
7. Shin SH, Kim MB, Byun SM, Lee HS, Park SG, Ko WS, et al. A Review on External Treatment for Atopic Dermatitis in Korean Journals. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2008;21(2):80-93.
8. Katayama I, Kohno Y, Akiyama K, Ikezawa Z, Kondo N, Tamaki K, et al. Japanese Society of Allergology. Japanese Guideline for Atopic Dermatitis. *Allergol Int.* 2011;60:205-220.
9. Boneberger S, Rupec RA, Ruzicka T. Complementary therapy for atopic dermatitis and other allergic skin diseases: facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2010;28(1):57-61.
10. Cha KB, Kim YS, Seol IC. Literatural study on Atopic dermatitis. *Daejeon J Institute Orient Med.* 2005;14(2):113-126.
11. Kim EH, Lee BW, Kim EH. A Literal Study of the Main Symptoms of Atopic Dermatitis. *J Korean Med Classic.* 2009;22(1):207-228.
12. College of korean medicine co association editorial board. Textbook of herbology. Seoul :Younghlimsa. 2011:392.
13. Aeom YD, Kim DH, Jeong JG, Shin MK, Song HJ. The Comparative Study of Fructus Immaturus Poncirii and Fructus Poncirii Effect on Allergic Re action. *J Korean Orient Med.* 2001;22(4):10-21.
14. Kang BS. Korean medicine clinical allergy. Seoul: Seongbosa. 1988:57-59.
15. Hwang KH, Lee EJ, Song BK, Kim HK.

- Mechanism of Inhibitory Action of Anaphylaxis by Aqueous Extract of *Poncirus trifoliata*. *J Korean Orient Med*. 1997;18(1):316-325.
16. Williams HC. Clinical practice. Atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2005;352(22):2314-2324.
 17. Cho JB, Lee JH, Suh JM, Yu JS, Lee HS, Park EA, et al. Change in Quality of Life according to the Change in Atopic Dermatitis Severity. *Allergy Asthma Respir Dis*. 2012; 22(1):86-99.
 18. Carstens E, Akiyama T. Itch: Mechanisms and Treatment. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. 2014. Ebook-Chapter 3.
 19. Lee YJ, Kang HY, Jeng BJ, Kim GE, Lee GY, Lee SY. Significance of atopic index in children with atopic dermatitis. *Allergy Asthma Respir Dis*. 1994;4(2):11-24.
 20. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2003;361:151-160.
 21. Hong SJ. Review Articles: Mast Cells and Allergic Diseases. *Allergy Asthma Respir Dis*. 2000;10(3):207-217.
 22. Hwang SY, Lee SH, Lee CW, Kim JH, Jang SI, Kim AN, et al. Anti-inflammatory and Anti-Pruritic Effects of WSY-1075 composited with Medicinal Plants on the Activated Rat Peritoneal Mast cells and Mouse Pruritus. *Korea J Herbol*. 2013;28(4):93-100.
 23. Metz M, Grundmann S, Ständer S. Pruritus: an overview of current concepts. *Vet Dermatol*. 2011;22(2):121-131.
 24. Yamaguchi J, Aihara M, Kobayashi Y, Kambara T, Ikezawa Z. Quantitative analysis of nerve growth factor (NGF) in the atopic dermatitis and psoriasis horny layer and effect of treatment on NGF in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 2009;53(1):48-54.
 25. Pincelli C, Marconi A. Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2000;22(2):71-79.
 26. Lim JH, Kang H, Park YM, Cho SH, Lee SY. Effect of substance P on Production of interleukin-12 and interferon-gamma from peripheral blood mononuclear cells of chronic severe atopic dermatitis patients. *J Asthma*. 2001;21(4):636-646.
 27. Lee IJ. Epidermal cytokine profiles in allergic and irritant contact dermatitis. Yonsei Univ Grad School, Doctoral dissertation. 2002; 28.
 28. Yu JS, Kim JU, Lee CH, Lee SR, Yook TH. The Effects of *Lonicerae Flos*, *Forsythiae Fluctus* and *Hwangryunhaedok Decoction* Pharmacopuncture on Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. *J Korean Acupunct Moxibust Soc*. 2015;32(4):119-131.
 29. Yu HS, Gim S, Song H, Ji J, Bal JW, Kim D. A Study on the Immune Modulation of *Chunghwatang* (CHT) in Atopic Dermatitis Animal Models. *Daejeon J Institute Orient Med*. 2012;21(1):53-64.