

백호탕 추출물의 지방장벽 손상 개선을 통한 상피 내 Th2 분화 조절 효과

안상현¹ · 김기봉^{2,3} · 정아람^{4,*}

¹세명대학교 한의과대학 해부학교실, ²부산대학교 한의학전문대학원 한방소아과학교실,

³부산대학교한방병원 한방소아과, ⁴가천대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

The Effects of Baekho-tang Extracts on Regulating Th2 Differentiation through Improving Skin Fat Barrier Damage

Ahn Sang Hyun¹ · Kim Ki Bong^{2,3} · Jeong Aram^{4,*}

¹Dept. of anatomy, College of Korean Medicine, Semyung University

²School of Korean Medicine, Pusan National University

³Dept. of Korean Pediatrics, Pusan National University Korean Medicine Hospital

^{4,*}Dept. of Pediatrics, College of Korean Medicine, Gachon University

Objectives

The purpose of this study is to confirm the regulate effect of T helper (Th) 2 differentiation that Baekho-tang extract may produce to improves skin lipid barrier damages.

Methods

Four-weeks-old NC/Nga mice were divided into four groups: control group (Ctrl, n=10), lipid barrier eliminated group (LBE, n=10), Dexamethasone treatment after lipid barrier elimination group (DxT, n=10), and Baekho-tang extract treatment group after lipid barrier elimination group (BHIT, n=10). Baeko-tang extract was administered for 3 days after removal of the skin fat barrier in BHIT group. Then, we identified changes in external symptoms of the skin, factors affecting skin barrier such as potential of hydrogen (pH), filaggrin (FLG), transepidermal water loss (TEWL) and Th2 differentiation factors like Interleukin (IL)-4, Kallikrein Related Peptidase 7 (KLK7) and protease activated receptor 2 (PAR-2) through our immunohistochemistry.

Results

After lipid barrier elimination, the reduction of morphological skin inflammations was less in BHIT group than in LBE group and DxT group. Also, pH and TEWL were significantly decreased with BHIT group. However, FLG was significantly increased in BHIT group compared to LBE, DxT, and Ctrl group. All kinds of Th2 differentiation factors (IL-4, KLK7 and PAR-2) were also decreased in BHIT compared to the LBE and DxT.

Conclusions

As a result of this study, BHT administration decreased pH, TEWL, and increased FLG, thus participating in recovering damaged skin barrier. Since Th2 differentiation factors were decreased as well, BHT's regulatory effect in sequential immune reactions may be a possible explanation of how it enhances recovery of the damaged lipid barrier.

Key words: skin inflammation, lipid barrier, skin barrier, Baekho-tang, Th2 differentiation

• Received: October 26, 2021 • Revised: November 18, 2021 • Accepted: November 19, 2021

*Corresponding Author: Jeong Aram, K.M.D., Ph.D.

Department of Pediatrics, College of Korean Medicine, Gachon University, 1342, Seongnam-daero, Sujeong-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

TEL: +82-32-770-1292/ FAX: +82-32-764-9990

E-mail: cyoui22@gachon.ac.kr

© The Association of Pediatrics of Korean Medicine. All rights reserved. This is an open-access article 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. Introduction

피부는 인체의 가장 외벽에서 생존에 필수적인 다양한 기능을 수행한다. 피부의 기능에는 항상성 유지를 위한 장벽기능, 외부 변화 인지를 위한 감각기능, 체온조절 기능 등이 있으며, 이 중 피부의 장벽기능이 소아에서 다발하는 아토피피부염을 비롯한 각종 염증성 피부질환의 예방 및 치료에 있어 중요한 의미를 가지고 있다¹⁾.

피부의 장벽기능은 최외각의 각질층에 의해 이루어진다. 각질층 내 각질세포는 각질세포 지질외막과 단백질외막으로 구성되어 있는데, Filaggrin (FLG)과 같이 각질세포 단백질외막을 구성하는 단백질이 접착제 역할을 하여 각질세포 외부의 지질과의 공유결합을 통해 지질의 다중 층상 구조를 형성하게 되고, 이것이 견고한 피부장벽의 구조가 된다²⁾. 이렇게 형성된 물리적 장벽은 외부 항원이 체내로 유입되는 것을 막고 피부 투과도를 감소시켜, 각종 손상으로부터 인체를 보호하는 역할을 한다²⁾. 이 외에도, 피부장벽은 경피 수분 손실을 제어하여 수분항상성을 유지하고, 피부가 건조로 인해 생기는 균열을 예방함으로써 염증성 피부질환의 발생 및 악화를 예방하는 기능을 한다³⁾.

이러한 피부장벽의 기능은 면역계와도 유기적으로 연결되어 있다. 피부장벽이 손상되면 interleukin (IL)-4, IL-13과 같은 T helper (Th) 2 cytokine 생성이 증가되어 알레르기 반응이 유발되고, 피부 산성도 (potential of hydrogen; pH)가 증가되어 피부 내 정상세균총의 증식이 방해됨으로써 병원체 증식이 더 용이하게 된다⁴⁾. 위 면역계의 변화는 반대로 피부 장벽 주요 구성 단백질인 FLG, involucrin 등의 발현을 감소시켜, 피부장벽의 손상을 가속화시키기도 한다⁵⁾. 따라서 여러 보고들에 의하면, 표피 내 지질성분 조성 변화, Transepidermal water loss (TEWL) 저하, FLG 변이, pH 변화 등 각질층 내에서 일어나는 피부장벽 기능 손상이 아토피피부염을 비롯한 염증성 피부질환의 초기 기전임이 보고되고 있다⁶⁻⁸⁾.

아토피피부염을 비롯한 주요 염증성 피부질환은 피부장벽 손상 및 면역조절 장애 등의 요인이 복합적으로 작용하여 만성 및 재발성으로 발생하는 질환들의 총칭이다. 아토피피부염 환자의 병변 피부는 정상부위에 비해 각질층 내 세라마이드 (Ceramide) 및 FLG 발현이 감소되어 있음을 확인할 수 있고⁹⁾, 정상피부에 비해

높은 pH와 염증 및 가려움을 유발 protease인 Protease activated receptor 2 (PAR-2)가 활성화되어있는 특징을 확인할 수 있다⁹⁻¹⁰⁾. 따라서 피부장벽 손상 방지 및 기능 강화는 아토피피부염을 포함한 여러 염증성 피부질환의 예방 및 치료에 있어 가장 중요한 부분이라 할 수 있다.

한의학에서는 피부염 (skin inflammation)의 원인 중 하나를 체내에 쌓인 ‘열 (熱, heat)’로 보았으며¹¹⁾, 영유아에서 다발하는 아토피피부염의 경우 ‘태열 (胎熱)’이 제거되지 못해 발생하는 것으로 보았다¹²⁾. ‘열증 (熱症)’으로 진단되어지는 피부염의 증상은 홍반, 발진, 삼출물, 소양감 등을 주 증상들로 표현되게 되며, 흔히 피부염 (dermatitis) 또는 습진 (eczema)라고 임상에서 진단되어 지는 병증이다¹¹⁾. 따라서 한의학에서는 이와 같은 염증성 피부질환에 청열해독 (淸熱解毒) 효과가 있는 한약을 주로 사용하고 있다.

백호탕 (白虎湯, Baekho-tang)은 상한론 (傷寒論, Sanghanron)에 소개된 처방으로, 한의학에서 청열 (淸熱) 효과를 가진 것으로 알려져있는 대표적인 처방이다¹³⁾. 구성약재로는 석고 (石膏, *gypsum fibrosum*), 지모 (知母, *Anemarrhena asphodeloides* Bunge), 갯미 (梗米, *Oryza sativa* L) 감초 (甘草, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 로 구성되어 있으며, 피부염 뿐 아니라, 간염, 폐렴, 일본성 뇌염 등 다양한 염증성 질환에 다용되고 있다¹⁴⁾.

본 연구에서는 위 근거들을 토대로 NC/Nga 생쥐 모델을 사용하여 백호탕의 투여가 피부 지방장벽 손상 회복을 통해 Th2 분화를 조절하여 염증반응을 감소시킬 것이라는 가설을 세우고 이를 확인하고자 수행되었다. NC/Nga 생쥐 모델은 아토피피부염 유발 시 hyperkeratosis, acanthosis, lymphocyte and macrophage infiltration 등의 면역학적, 조직학적, 생화학적 분석 결과들이 사람에서 유발된 아토피피부염의 결과와 유사하여 아토피피부염의 병인을 이해하기 위해 가장 전통적으로 사용되어 온 모델이다¹⁵⁾. 또한 통상적인 환경에서도 아토피피부염의 표현형을 나타내어 본 연구의 목적에 부합하는 면역학적 변화 및 피부장벽 손상을 최대한 실제 피부염 병변에 가깝게 구현할 수 있어 본 실험에서도 해당 모델을 사용하였다¹⁵⁾.

피부 질환의 치료에 있어 피부장벽의 중요성이 강조되에도 불구하고, 이제까지 백호탕의 항염증 효과에 대한 3편의 실험연구 외에¹⁶⁻¹⁸⁾, 피부장벽 손상 회복에 대한 연구는 전무하다. 이에 본 연구는 태령 4주의 지방장벽 (lipid lamella) 손상이 유발된 NC/Nga 생쥐에서

백호탕 투여 후 지방장벽의 회복 여부를 확인하고, 그 결과 염증반응의 원인이 되는 Th2 분화조절 효과를 확인하였기에 해당 결과를 보고하는 바이다.

II. Materials and Methods

1. 실험동물

자바이오 (대한민국)에서 분양 받은 태령 4주 수컷 NC/Nga계 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 16 ± 1 g로 선별하여 실험에 사용하였다. 대조군 (Control, Ctrl), 지방장벽제거군 (lipid barrier elimination group, LBE), 지방장벽제거 후 dexamethasone 투여군 (dexamethasone (Dx) treatment after lipid barrier elimination, DxT) 그리고 지방장벽제거 후 백호탕 투여군 (Baekho-tang extract treatment group after lipid barrier elimination, BHTT)으로 나누었고, 각각 10마리씩 배정하였다.

동물을 실험군에 배정하고, 결과를 평가할 때 발생할 수 있는 주관적 편향을 최소화하기 위해 2주 적응기간을 거친 후 행동행태를 관찰하여 공격적 과잉행동 및 회피행동 개체를 선정에서 제외하였다. 평가 공정을 위해 Ctrl, LBE, DxT 그리고 BHTT 순으로 즉, 각 그룹 순번제 (Ctrl 1, LBE 1, DxT 1 그리고 BHTT 1 / Ctrl 2 LBE 2, DxT 2 그리고 BHTT 2 식으로)로 실시하였다. 모든 군의 생쥐들은 23 - 25 °C, $55 \pm 10\%$ 의 습도, 12 h 명암 주기에서 사육되었고, SAFE-40+RMM (SAFE, France) 및 filtered tap water의 식이를 자유롭게 제한없이 제공하였다.

동물 수의 산출 근거는 본 연구와 유사한 주제의 연구인 Jung의 논문¹⁹⁾에 근거하여 sample size (n=40) 및 통계적으로 유의한 개체 수를 산정하였다. 실험동물들은 SPF Barrier system의 소동물실에서 사육되었으며, 개체별로 다른 색의 색소를 칠하여 구분하는 유색법과 각 10마리씩 케이지별로 구별하여 군별 동물을 식별하고 그룹별로 실험 단위를 구성하였다. 동물 보정을 위해 피부장벽 손상 유발 직전에 Ether를 이용한 흡입마취를 시행하였다. 실험 전반의 과정에서 실험동물의 고통 및 스트레스 경감을 위해 wood block 및 house를 제공하고, 체중감소가 20%이상 발생하거나, skin score를 (1) 홍반 / 출혈 (2) 각질 / 피부진조 (3) 부종 (4) 찰과 / 미란 의 4항목을 각각 무증상 = 0, 경미 = 1, 중간

= 2, 심각 = 3으로 분류하여 각 항목에 대한 점수의 총 합이 15 이상인 경우 고통경감을 위해 CO2 안락사를 결정하였다.

실험에 앞서 가천대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (IACUC No. GU1-2021-IA0035-00)을 받았으며, 실험실 동물의 관리와 사용에 대해서는 NIH 가이드라인에 따라 시행되었다.

2. 백호탕의 제조

본 실험에서 사용한 백호탕 (白虎湯, Baekho-tang)은 국내 한약공급업체인 바른한약 (Barunhanyak, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 석고 (*Gypsum fibrosum*) 20 g, 지모 (*Anemarrhena asphodeloides Bunge*) 8 g, 갯미 (*Oryza sativa L.*) 3 g 감초 (*Glycyrrhiza uralensis Fisch*) 3 g으로 구성된 백호탕 31 g을 증류수 1000 ml에 넣고 3시간 동안 전탕 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압·농축 후 동결건조기로 건조된 백호탕 추출물 2.015 g (수득률 6.5%)을 획득하였다.

3. 지방장벽제거와 치료약물 투여

먼저, 생쥐의 피부 등쪽 부위에 제모크림 (Body natur, Spain)을 이용하여 제모한 다음 Tape (3M, Maplewood, State of Minnesota, USA)를 이용하여 각질층의 탈락막 (desquamation)을 제거하였다. 그런 다음 10% sodium dodecyl sulfate (SDS: Sigma-Aldrich, St. Louis, State of Missouri, USA) 500 μ l를 제모부위에 도포한 후 면봉으로 20회 문질러 각질층의 지방장벽을 제거하였다. 이후 백호탕 추출물을 생리식염수에 희석하여 3일 동안 68 mg / kg의 양을 0.2 ml씩 BHTT에 경구투여 하였다. 대조약물로 사용된 dexamethasone (Sigma-Aldrich, USA)도 BHTT와 동일하게 68 mg / kg량으로 0.2 ml씩 3일 동안 경구투여하였다.

4. 피부 내 TEWL과 pH 측정

지방장벽 제거 3일 경과 후 경피수분손실도 (Trans-epidermal water loss, TEWL)는 Vapometer (Delfin Technologies Ltd, Kuopio, Finland)를 이용하여 측정하고, 피부의 pH 변화는 SKIN-O-MET (COSMOMED, Ruhr, Germany)으로 측정하였다.

5. 조직표본제작과 조직화학

피부는 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액 (neutral buffered formalin, NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 적출된 등쪽 피부를 10% Neutral Buffered formalin에 실은 환경에서 24시간 동안 고정한 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5 μ m 두께로 연속절편을 만들었다. 연속절편은 Masson's trichrom (M / T) 염색 후 관찰하였다.

6. 면역조직화학 및 영상분석

지방장벽 손실, 상피 염증 그리고 Th2 분화의 면역조직학적 변화를 조사하기 위해 항 FLG, Kallikrein (KLK) 7, PAR-2, thymic stromal lymphopoietin (TSLP) 그리고 IL-4항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 피부절편을 proteinase K (20 μ g / ml, Dako, USA)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 1% fetal bovine serum (Sigma, USA)이 포함된 10% normal goat serum (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)에서 1시간 동안 blocking 반응을 시켰다. 1차 항체인 mouse anti-FLG (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-KLK7 (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc.), mouse anti-PAR-2 (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc.), mouse anti-TSLP (1: 100, Abcam, Waltham, MA, USA) 그리고 mouse anti-IL-4 (1 : 50, Santa Cruz Biotechnology Inc.)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc.)에 실온에서 24시간 link 하였고, avidin biotin complex kit (Vector Lab)에 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 대조염색하였다. 면역조직화학의 결과는 image Pro 10 (Media cybernetics, Rockville, MD, USA)를 이용한 영상분석을 통해 수치화 (means $\pm$ standard error) 되었다. 각 군의 피부표본 10개를 임의로 선정 한 후 x 400 배율에서 촬영한 다음 positive pixels (intensity 80 ~ 100) / 20,000,000 pixels로 영상분석하였다.

7. 통계

통계는 SPSS software (SPSS 25, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이루어졌으며, one-way ANOVA 시행을 통

해 유의성 ($p < 0.05$)을 검증하고, 사후 검증은 Tukey HSD를 실시하였다.

III. Results

1. 피부손상 정도의 변화

백호탕추출물 적용에 따른 피부 변화를 조사하기 위해 육안을 통한 외부형태와 M / T 염색을 통한 조직학적 구조를 관찰하였다. 피부염에 따른 외부형태는 찢어진 피부 중심부에서 홍반, 출혈 및 미란을, 가장자리 경계부에서는 가피 등의 극심한 피부염소견이 LBE에서 광범위하게 관찰되었다. 이에 반해 DxT 그리고 BHTT에서는 LBE에 비해 낮은 피부염 유발경향으로 관찰되었다. 관찰된 피부염유발부위의 크기는 LBE > DxT > BHTT 순으로 감소하였다 (Fig. 1.). 손상피부에 대한 조직화학적 변화는 LBE과 DxT에서는 상피세포 과형성, 가시층의 세포사이공간의 확장, 기저층 내 붕괴, 바닥면 주변으로 림프구 침윤 증가와 혈관 신생성 증가 등의 구조적 변화가 관찰되었다. 이에 반해 BHTT의 피부에서는 LBE와 C3A에서 관찰되었던 피부염 손상이 줄어든 것으로 나타났다 (Fig. 1).

지방장벽제거 후 TEWL는 Ctrl (15 ± 1 g/m²h)보다 모든 그룹에서 증가하였는데, LBE (273 ± 5 g / m²h)는 1720%, DxT (210 ± 6 g/m²h)는 1300% 그리고 BHTT (100 ± 5 g / m²h)는 567% 순으로 측정되었다. 특히, 지방장벽제거 후 BHTT의 TEWL이 가장 낮았는데, LBE에 비해 63% 그리고 DxT에 비해 52%로 유의성 있는 감소가 확인되었다 (Fig. 1).

pH도 지방장벽제거 후 Ctrl (5.66 ± 0.04)보다 증가하여 LBE (8.3 ± 0.08)는 46%, DxT (7.5 ± 0.04)는 33% 그리고 BHTT (6.97 ± 0.06)는 23% 순으로 측정되었다. 특히, 지방장벽제거 후 BHTT의 pH가 가장 낮았는데, LBE에 비해 16% 그리고 DxT에 비해 7%로 유의성 있는 감소가 확인되었다 (Fig. 1).

2. Filaggrin 조절

각질층 내 지방장벽 변화는 FLG 면역조직화학적 염색 실시 후 영상분석을 통해 조사되었다. FLG 양성반응은 LBE와 DxT에서는 Ctrl에 비해 유의성 있는 감소 경향을, BHTT에서는 유의성 있는 증가 경향을 보였

다. 지방장벽제거 후 LBE의 FLG양성반응은 Ctrl ($47,212 \pm 1,235 / 20,000,000$ pixel)에 비해 83% 감소한 $8,208 \pm 332 / 20,000,000$ pixel로, DxT는 67% 감소한 $15,479 \pm 332 / 20,000,000$ pixel로 측정되었다. 감소된 LBE과 DxT과는 달리 BHHT에서는 Ctrl에 비해

17% 증가한 $55,210 \pm 2,124 / 20,000,000$ pixel로 나타났다. BHHT은 LBE에 비해 573% 그리고 DxT에 비해 257%로 유의성 있는 증가를 한 것으로 확인되었다 (Fig. 2).

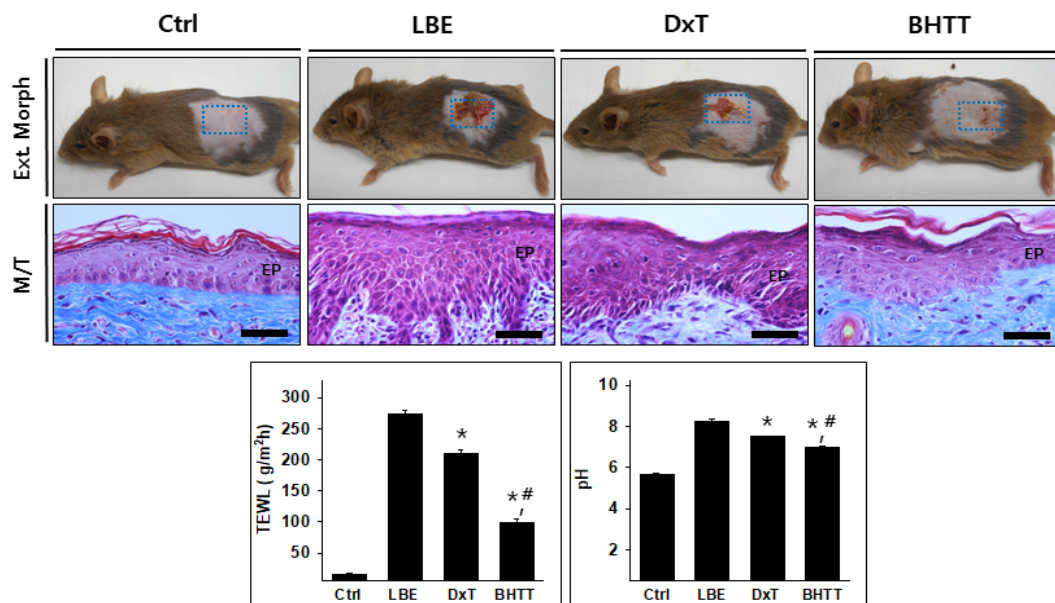


Figure 1. The mitigative effects of lipid barrier elimination invoked induced skin lesions by BHT.

The BHT treatment relieved symptom as erythema, hemorrhage, scarring, erosion, and excoriation in BHHT. The TEWL and pH is decreased in BHHT, but increased in LBE and DxT. *Abbreviations:* BHT, Baekho-tang; Ctrl, control group; LBE, lipid barrier eliminated group; DxT, dexamethasone (Dx) treatment after lipid barrier elimination; BHHT, Baekho-tang extract treatment group after lipid barrier elimination; Ext. Morpho, External morphology; M/T, Masson's trichrome; TEWL, Transepidermal water loss; H & E, hematoxylin and eosin staining; EP, epidermis; Bar size, 50 μ m; *, $p < 0.05$ compared with LBE; #, $p < 0.05$ compared with DxT.

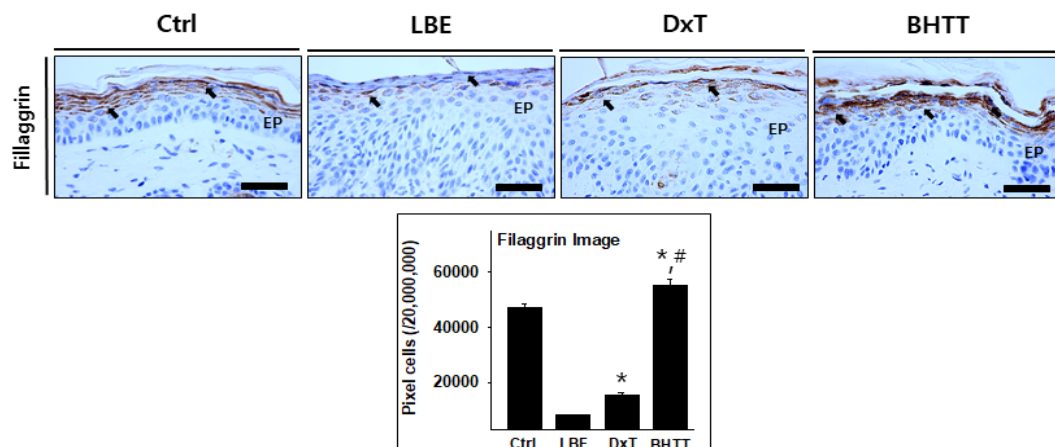


Figure 2. Effects of BHT on the FLG regulation.

The distribution of FLG (arrow indicates light brown particle) was significantly increased in BHHT as compared with LBE and DxT, the data of FLG image analysis showed the same results (FLG immunohistochemistry). *Abbreviations:* BHT, Baekho-tang; Ctrl, control group; LBE, lipid barrier eliminated group; DxT, dexamethasone (Dx) treatment after lipid barrier elimination; BHHT, Baekho-tang extract treatment group after lipid barrier elimination; FLG, Filaggrin. Bar size, 50 μ m; *, $p < 0.05$ compared with LBE; #, $p < 0.05$ compared with DxT.

3. 상피염증조절을 통한 Th2 분화 조절

지방장벽 손상으로 유발된 연쇄적 염증반응 조절을 통한 Th2 분화 변화를 염색 실시 후 영상분석을 통해 조사되었다. 지방장벽제거 후 증가되는 Serine Palmitoyltransferase (SP)의 하나인 Kallikrein Related Peptidase 7 (KLK7)의 면역조직화학 결과, 각질층, 과립층 그리고 가시층의 세포사이공간에서 강한 KLK7 양성반응이 지방장벽 손상 후 모든 군에서 증가하였다. LBE는 Ctrl ($6,730 \pm 390 / 20,000,000$ pixel)에 비해 881% 증가한 $66,013 \pm 2,315 / 20,000,000$ pixel로, DxT는 Ctrl에 비해 645% 증가한 $50,169 \pm 1,360 / 20,000,000$ pixel로 그리고 BHTT는 Ctrl에 비해 298% 증가한 $26,808 \pm 1,048 / 20,000,000$ pixel로 측정되었다. BHTT의 KLK7 양성반응은 LBE에 비해 59% 그리고 DxT에 비해 47% 감소한 것으로 기록되었고, 유의성은 통계를 통해 확인되었다 (Fig. 3. KLK7).

지방장벽제거 후 피부상피 모든 층에서 강한 양성반응을 보이는 PAR-2의 분포는 Ctrl ($6,802 \pm 278 /$

$20,000,000$ pixel)에 비해 모든 군에서 증가한 것으로 측정되었다. LBE는 Ctrl에 비해 978% 증가한 $73,326 \pm 2,115 / 20,000,000$ pixel로, DxT는 Ctrl에 비해 632% 증가한 $49,759 \pm 1,216 / 20,000,000$ pixel로 그리고 BHTT는 Ctrl에 비해 251% 증가한 $23,866 \pm 639 / 20,000,000$ pixel로 측정되었다. PSCA의 PAR-2 양성반응은 LBE에 비해 67% 그리고 DxT에 비해 52% 감소한 것으로 기록되었고, 유의성은 통계를 통해 확인되었다 (Fig. 3. PAR-2).

Th2 분화 매개체인 TSLP 면역조직화학 결과, 지방장벽제거 후 TSLP 양성반응은 피부 상피 기저층과 진피유두에서 강한 양성반응을 보였으며, Ctrl ($6,744 \pm 351 / 20,000,000$ pixel)에 비해 모든 군에서 증가한 것으로 측정되었다. LBE는 Ctrl에 비해 819% 증가한 $62,000 \pm 1,106 / 20,000,000$ pixel로, DxT는 Ctrl에 비해 500% 증가한 $40,470 \pm 1,010 / 20,000,000$ pixel로 그리고 BHTT는 Ctrl에 비해 251% 증가한 $23,666 \pm 1,339 / 20,000,000$ pixel로 측정되었다. Protein se-

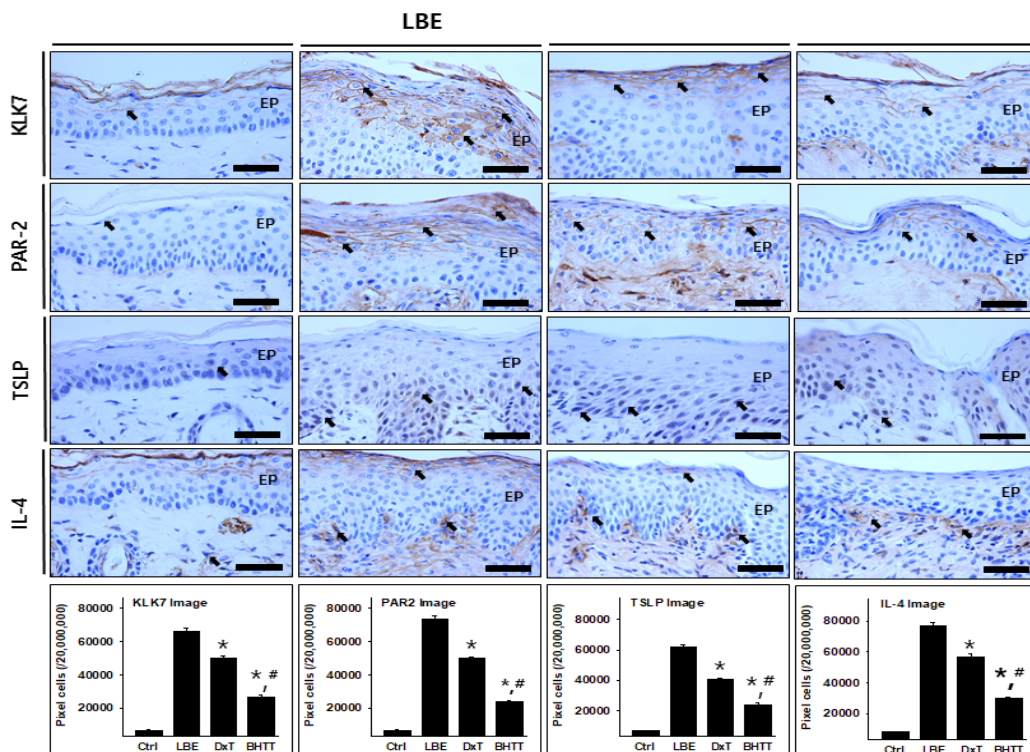


Figure 3. The regulation of Th2 differentiation by application of BHT.

The positive reaction of KLK7, PAR-2, TSLP & IL-4 (arrow indicates light brown particle) was significantly decreased in BHTT as compared with LBE (Immunohistochemistry; Bar size, $50 \mu\text{m}$). The data of image analysis for positive reaction showed the same results. Abbreviations: BHT, Baekho-tang; Ctrl, control group; LBE, lipid barrier eliminated group; DxT, dexamethasone (Dx) treatment after lipid barrier elimination; BHTT, Baekho-tang extract treatment group after lipid barrier elimination; KLK7, Kallikrein Related Peptidase 7; TSLP, Thymic stromal lymphopoietin; PAR-2, Protease activated receptor 2; IL, Interleukin. Bar size, $50 \mu\text{m}$; *, $p < 0.05$ compared with LBE; #, $p < 0.05$ compared with DxT.

quence comparative analysis의 TSLP 양성반응은 LBE에 비해 67% 그리고 DxT에 비해 42% 감소한 것으로 기록되었고, 유의성은 통계를 통해 확인되었다 (Fig. 3. TSLP).

Th2 분화유도 cytokine인 IL-4 면역조직화학 결과, 지방장벽제거 후 IL-4 양성반응은 피부 진피유두에서 강한 양성반응을 보였으며, Ctrl (7,983 ± 430 / 20,000,000 pixel)에 비해 모든 군에서 증가한 것으로 측정되었다. LBE는 Ctrl에 비해 861% 증가한 76,752 ± 2,326 / 20,000,000 pixel로, DxT는 Ctrl에 비해 611% 증가한 56,725 ± 1,706 / 20,000,000 pixel로 그리고 BHTT는 Ctrl에 비해 271% 증가한 29,638 ± 1,052 / 20,000,000 pixel로 측정되었다. Protein sequence comparative analysis의 IL-4 양성반응은 LBE에 비해 61% 그리고 DxT에 비해 48% 감소한 것으로 기록되었고, 유의성은 통계를 통해 확인되었다 (Fig. 3. IL-4).

IV. Discussion

본 연구는 인위적으로 피부 지방장벽 손상을 야기한 NC/Nga 생쥐에 백호탕 추출물을 투여 한 후 피부지방장벽 재생 효과를 확인하고, 이를 통한 Th2 분화 조절 여부를 확인하기 위해 수행되었다.

실험결과, BHTT에서 지방장벽 손상의 지표가 되는 경피수분손실량 감소, pH 증가 정도가 모두 Ctrl, LBE, DxT 그룹에 비해 유의미하게 적게 나타나는 결과를 확인할 수 있었고, 특히 FLG 양성반응의 경우, BHTT에서 LBE, DxT 뿐만 아니라, Ctrl 군에 비해 증가하는 결과를 보여 백호탕이 피부장벽의 응집력을 강화시키는 FLG 회복 기전에 특히 뚜렷한 효과를 보임을 확인할 수 있었다. 또한, 지방장벽 제거 후 전체적으로 KLK7, PAR-2, TSLP, IL-4 양성반응이 증가하였으나, BHTT 군에서 증가 정도가 가장 낮았고, LBE, DxT군에 비해서는 유의하게 감소됨을 확인할 수 있었다. 최종적으로 피부 지방장벽의 재생효과가 Th2 분화조절의 지표가 되는 KLK7, PAR-2, TSLP, IL-4 등의 염증성 매개물들의 반응을 억제함으로써 육안으로 확인할 수 있는 염증 반응들이 감소되는 결과도 확인할 수 있었다.

소아에서 다발하는 염증성 피부질환인 아토피피부염의 경우, 그 병인이 다양하고 복잡한데, 그 중 피부각질층 내의 세라마이드 손실로 발생하는 피부장벽 이상

이 초기 발병기전이라는 견해가 우세하다²⁰. 또한, 피부장벽 이상은 Th2 분화 유도 cytokine 증가를 야기하는데, 이는 다시 역으로 각질층 내의 FLG, loricrin 등에 손상을 주어 재차 피부장벽을 손상시키는 악순환을 반복하게 한다²⁰. 이와 같이 피부의 염증반응은 피부장벽 손상과 내부의 면역학적 변화들이 서로 유기적으로 연결되어 발생한다.

피부장벽은 표피의 각질층을 이르는 말로, 각질세포와 FLG, loricrin과 같은 단백질 성분들이 연결된 막 (Brick)과 세라마이드, 콜레스테롤, 지방산으로 구성된 각질세포 간 지질 (Mortar)로 구성된 표피지질의 연속된 구조이다¹. 피부장벽 기능에 영향을 미치는 인자로는 세라마이드 감소와 같은 표피 지질의 이상, 필라그린 발현 정도, 피부 각질층의 pH, Protease 및 PAR-2, Cytokines, 스트레스와 스테로이드 호르몬 제제의 과사용이 알려져 있다²⁰. 본 연구 결과에서도 인위적으로 피부손상을 야기하였을 시 FLG 발현감소, KLK 감소, pH, PAR-2 증가, TSLP, IL-4 양성반응이 증가됨을 확인할 수 있었다.

이 중, 첫째로, 아토피피부염의 대표적인 유전 인자 중 하나인 FLG는, Profilaggrin으로부터 분해되어 만들어진 세포 구조 단백질이다⁸. FLG변이는 각질층 세포 외막의 변형을 초래하여 외부 자극물질의 침투를 통해 Immunoglobulin E (IgE) 감작을 용이하게 하여, Th2 우세한 면역학적 상태를 만든다²². 또한, FLG는 pyrrolidine carboxylic acid, trans-urocanic acid라는 자연보습인자로 대사되어 경피 수분 함유량을 적절히 유지하여 각질층의 보습에 중요한 역할을 한다²³. 즉, FLG의 감소는 각질층의 수분도 감소를 포함한 피부장벽 손상을 야기하고, 이것이 Th2-dominant의 면역학적 변화를 야기하여 결과적으로 염증성 피부질환이 진행되게 된다^{20,21}.

본 연구결과, 피부장벽 손상 후 육안적으로 확인되는 상피세포 과형성, 가시층의 세포사이공간의 확장, 기저층 내 붕괴, 바닥면 주변으로 림프구 침윤 증가와 혈관 신생성 증가 등의 피부염 손상에 의한 변화가 BHTT에서 LBE와 DxT에 비해 적게 관찰되었다. 또한 BHTT에서 LBE, DxT에 비해 FLG 회복 효과가 유의성 있게 증가함도 확인하였다. 특히, 지방장벽을 제거했음에도 불구하고, BHTT에서 지방장벽을 제거하지 않은 Ctrl에 비해 FLG 양성반응이 높게 나온 점이 주목할 만하다. 이는 백호탕이 지방장벽에 영향을 미치는 여러 인자 중 특히 FLG 회복에 있어 충분한 효과를 보인다고 해석할 수 있다. 아토피피부염에 널리 처방되고

있는 스테로이드계 성분인 dexamethasone 처리 그룹은 오히려 Ctrl에 비해 FLG이 감소된 결과를 볼 때, 스테로이드제의 경우 피부장벽을 약화시켜 장기 치료 시 피부염을 심화시킬 것임을 예상할 수 있는 반면에, 백호탕의 경우 피부 지방장벽을 오히려 회복시키면서 염증성 피부질환의 치료에 도움을 줄 것이라는 가능성을 생각해 볼 수 있다. 상기 설명된 FLG의 역할을 볼 때, 이러한 FLG 회복 효과는 본 실험에서 TEWL 및 Th2 분화유도 cytokine인 IL-4 양성반응이 BHTT에서 타 그룹에 비해 유의미하게 감소한 결과를 이끌었다고도 볼 수 있으며, 백호탕 추출물이 피부장벽 손상 회복에 실험적으로 충분한 효과가 있음을 의미한다.

둘째로, 피부 각질층의 TEWL 및 pH도 피부장벽 유지에 중요한 역할을 하는데, pH의 증가는 KLK7와 같은 SP를 활성화시켜 lipid processing을 담당하는 효소들을 분해하여 각질세포의 탈락을 유도한다²³⁾. KLK는 FLG 분해과정 초기에 작용하는 활성 인자로 PAR-2를 활성화시켜 염증반응을 일으킨다²⁴⁾. PAR-2는 표피 장벽 항상성 유지에 관여하는 G-protein coupled receptor로, 각질형성 세포 내 칼슘 농도를 변화를 통해 충상소체 분비를 억제시켜 피부장벽 회복을 지연시킨다²⁵⁾. 증가된 PAR-2 활성은 IL-5, IL-13, TNF- α 와 같은 Th2 cytokine의 분비를 촉진하는 역할을 하는 TSLP 과발현을 유도하는 촉매제로 작용한다²⁶⁾. TSLP는 표피 각질형성세포로부터 생성되어 Th2세포가 병소로 이동하는데 관여하며, 수상돌기세포의 활성화를 유도하여 Th2 면역 반응을 강력하게 유발하고 지속시키는 인자이다²⁷⁾.

한 연구에 의하면, 아토피피부염이 유발된 생쥐 모델에서 pH를 인위적으로 낮추면 Th2 양성 림프구의 림프구들의 발현이 저하되고 serum IgE level이 저하되는 면역학적 호전 반응이 나타남을 보고하고 있어²⁸⁾, 피부 각질층의 pH를 정상범위로 유지하는 것은 염증성 피부질환의 예방에 있어 중요한 인자임을 알 수 있다. 본 실험 결과, 피부 지방장벽 손상을 야기한 생쥐에서 백호탕 추출물 투여 시 LBE, DxT에 비해 pH가 현저하게 감소하였으며, LBE, DxT에 비해 PAR-2, TSLP 와 같은 Th2 분화 관련 인자들이 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 백호탕 추출물의 피부 각질층의 산성도를 감소시킴으로써, 피부장벽 회복에 기여하여 Th2 매개 염증반응으로 이어지는 경로를 억제한 결과로 보여진다. 또한, Th2 dominant state의 면역상태가 피부장벽의 2차적 손상을 유도한다는 사실을 고려할 때, KLK7, TSLP, PAR-2 감소가 Th1.2 균형을 정

상화 하여 피부장벽의 회복정도를 더욱 높일 수 있을 것이라 생각된다.

백호탕은 상한론에서, 汗出, 大煩渴, 脈洪大, 大熱 등 陽明經의 熱證이 뚜렷한 병증에 사용한다고 소개되어 있어 흥반, 소양감 등 한의학에서 ‘熱證’으로 진단할 수 있는 염증성 피부질환에 임상적으로 많이 처방되고 있다¹³⁾. 구성약재를 보면 석고는 대표적인 청열사화(淸熱瀉火)약으로, 煩燥 熱毒壅盛 發斑發疹 등 임상에서 肺胃氣分에 쌓인 實熱을 제거하는 목적으로 사용되며, 실험적으로는 IL-4 감소 효능이 보고된 바 있다²⁹⁾. 지모는 그 성질이 寒 하고, 淸熱除煩, 滋陰降火효능이 있어, 석고의 淸熱 효능을 돕는 역할을 한다³⁰⁾. 실험적으로는 피부각질형성세포에서의 IL-4, IL-13, IL-6의 mRNA 발현 억제와 FLG upregulation을 통한 피부장벽 기능 손상 억제 효능이 밝혀진 바 있다³⁰⁾. 그 외 갱미는 除煩渴하여 心煩口渴을 치료하고, 감초는 調和諸藥, 解毒하는 효능이 있다³¹⁾. 현재까지 백호탕은 발열을 억제하고 높은 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 CD8+ 수준을 감소시키는 효능과, 패혈증 동물모델에서 IL-6, IL-10 감소 효과가 보고되어 있음을 근거로 볼 때¹⁷⁾, 본 연구결과에서 나타난 피부장벽 회복능과 Th2 분화 조절능은 백호탕의 위와 같은 면역학적 근거 및 한의학적 효능에 의한 결과로 해석할 수 있다.

아토피피부염을 비롯한 여러 염증성 피부질환은 특유의 만성 재발성의 경과를 거친다는 특징이 있다. 이는 환자들의 삶의 질을 저하시키고, 특히 소아 환자에서는 피부염으로 인한 식이제한, 수면 장애로까지 이어져 최종적으로 성장에 악영향을 미칠 수 있다³²⁾. 피부장벽 강화의 중요성으로 인해 보습제 사용, 염증 억제를 위한 스테로이드 사용이 치료방법으로 권고되고 있으나, 만성으로 재발한다는 아토피피부염의 특성상 과도한 스테로이드 사용이 항상 문제로 지적되고 있으며, 일시적인 증상 완화에 불과할 뿐 근본적인 치료가 되지 않아 효과적인 치료법이 필요한 실정이다. 과도한 스테로이드 사용 및 단기간의 증상 완화라는 한계를 보완하기 위해 최근 아토피피부염의 활성 전치료(proactive therapy)의 장점이 부각되고 있다³³⁾. 활성 전치료란, 아토피피부염의 병변이 시작되는 시점에서 고강도의 항염증 치료를 시행한 후 이후 완화된 상태를 유지하여 재발을 방지하는 치료로서, 기존의 ‘증상 위주의 반응적 치료’가 아닌 장기 유지 치료의 의미가 있다³³⁾. 백호탕은 염증성 질환의 급성기에 주로 사용되는 처방이나, 본 연구 결과를 통해 피부장벽 회복을

통한 Th2 분화 조절 감소 효능이 확인되었고, 피부장벽기능과 면역학적 조절반응이 유기적인 관계임을 고려할 때⁴⁾ Th2 유도 cytokine 감소는 다시 FLG 증가를 통한 피부장벽 재생에 도움을 줌으로써 외부 항원으로 부터의 추가적 손상을 방지하는 장기 치료 유지효과를 보일 것을 기대해 볼 수 있다. 따라서, 본 연구 결과를 통해 백호탕의 활성 전치료 활용 가능성도 생각해 볼 수 있다.

결과적으로 피부장벽이 손상되어 염증반응이 야기된 NC/Nga 동물모델에서 백호탕 추출물 투여를 통해 IL-4, KLK7, TSLP 과발현과 같은 Th2 분화 억제 효과를 확인하였으며, 이는 pH 감소, TEWL감소, FLG 발현 증가와 같은 피부장벽 회복에 의한 일련의 연쇄적 피부염증반응 억제의 결과라 생각된다.

본 연구에 사용된 NC/Nga 생쥐 모델은 사람에서 피부장벽을 손상시켰을 때와 면역조직화학적 반응이 유사하여 최대한 인체 피부장벽손상에 가깝게 구현 가능한 모델이다¹⁵⁻¹⁶⁾. 저자들은 동물실험으로 인한 인위적인 스트레스를 최소화하고자 실험동물 사용에 관한 3R 원칙 중 개선 (refinement)의 관점에 따라 최대한 스트레스 및 고통을 감소시키기 위해 skin score 15이상 또는 체중 20% 이상 감소 시 안락사 기준을 마련하고, wood block 및 house를 제공하는 방법을 사용하였다. 스트레스도 피부 장벽 손상 및 염증반응의 원인 중 하나이므로, 위와 같은 방법으로 실험환경을 개선하는 방법은 윤리적 측면 및 실험결과에 영향을 미치는 변인을 최소화하는데 기여했을 것으로 생각된다.

이상으로 백호탕 추출물의 염증성 피부질환의 예방 및 치료효과에 대한 가능성을 확인하였으나, 본 연구는 동물실험 연구로서의 잠재적 한계점을 가지고 있다. 비록 인간의 피부 면역조직화학적 변화와 가장 유사한 결과를 도출할 수 있는 NC/Nga 동물 모델을 사용하였으나, 일반적으로 동물과 인간의 생물학적 차이로 인해 발생할 수 밖에 없는 재현의 한계가 있으며, 한 선행 연구에 의하면 동물실험의 정확도가 인체 적용 시 대비 43.5-66.7%로 보고하고 있어 실험의 결과를 절대적으로 적용하기에는 어려움이 있다³⁴⁾. 따라서, 이는 유효성에 대한 가능성을 제시할 뿐, 임상에서 적극적으로 활용하기 위한 근거를 마련하기 위해서는 동물실험에 국한되지 않고, 추가적인 임상연구가 수행되어야 할 필요가 있다.

V. Conclusion

백호탕 추출물의 피부 지방장벽 손상 회복 효능과 이를 통한 Th2 분화 조절 효과를 확인하기 위해 본 연구는 태령 4주의 NC/Nga 생쥐에 인위적인 지방장벽 손상을 야기하여 백호탕 추출물을 투여한 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

i. 지방장벽회복

1. 육안으로 확인할 수 있는 홍반, 출혈, 미란, 상처와 같은 피부염증 소견과 상피세포 과형성, 가시층의 세포사이공간 확장, 기저층 붕괴, 바닥면 주변 림프구 침윤 및 혈관 신생성 증가 등의 조직화학적 변화가 LBE, DxT과 비교하여 BHTT에서 가장 적게 관찰되었다.
2. FLG 양성반응은 BHTT가 LBE, DxT에 비해 유의성 있게 증가되었으며, 특히 지방장벽이 제거되지 않은 Ctrl 에 비해 증가한 결과를 확인하였다 ($p < 0.05$).
3. TEWL과 pH은 BHTT에서 LBE, DxT에 비해 유의성 있게 낮게 관찰되었다 ($p < 0.05$).

ii. Th2 분화 조절

Th2 우세한 면역반응을 이끄는 지표인 KLK7, PAR-2, TSLP 양성반응은 BHTT가 LBE, DxT에 비해 유의한 감소를 보였다 ($p < 0.05$).

VI. Acknowledgement

이 성과는 정부 (과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2020 R1F1A106197012).

VII. References

1. Kim HJ, Shin JU, Lee KH. Atopic dermatitis and skin barrier dysfunction. Allergy Asthma Respir Dis. 2013; 1(1):20-8.

2. Kubo A, Nagao K, Amagai M. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J Clin Invest.* 2012;122(2):440-7.
3. Rawlings AV, Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther.* 2004;17(1):43-8.
4. Rippke F, Schreiner V, Doering T, Maibach HI. Stratum corneum pH in atopic dermatitis: impact on skin barrier function and colonization with *Staphylococcus Aureus*. *Am J Clin Dermatol* 2004;5:217-23.
5. Silverberg NB, Silverberg JI. Inside out or outside in: does atopic dermatitis disrupt barrier function or does disruption of barrier function trigger atopic dermatitis? *Cutis.* 2015;96(6):359-61.
6. Yang G, Seok JK, Kang HC, Cho YY, Lee HS, Lee JY. Skin barrier abnormalities and immune dysfunction in atopic dermatitis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2867.
7. Egawa G, Kabashima K. Multifactorial skin barrier deficiency and atopic dermatitis: Essential topics to prevent the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 2016; 138(2):350-8.
8. Drislane C, Irvine AD. The role of filaggrin in atopic dermatitis and allergic disease. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2020;124(1):36-43.
9. Seeliger S, Derian CK, Vergnolle N, Bunnett NW, Nawroth R, Schmelz M, Weid P, Buddenkotte J, Sunderkotter C, Metze D, Patricia AG, Harms E, Vestweber D, Luger TA, Steinhoff M. Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. *FASEB J.* 2003;17:1871 - 85.
10. Egawa G, Kabashima K. Barrier dysfunction in the skin allergy. *Allergol Int.* 2018;67(1):3-11.
11. Wu D, Huang C, Mo X, Liu J, Cai J, Liu C, Zhu H, Li H, Chen D. Development and initial validation of a traditional Chinese Medicine symptom-specific outcome measure: a Zheng-related atopic dermatitis symptom questionnaire (ZRADSQ). *Health Qual. Life Outcomes.* 2013;11:212.
12. Im GM, Joeng HW, Kim HS, Jeong WY. Oriental medical approach on the allergic disease. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2002;16(5):831-9
13. Seop HM. Sanghanronjiphae. Beijing. Hakwon publisher. 2005. p.301, 576, 578.
14. Kim KW, Lee IS, Lee WJ, Park J, Chung WS, Cho JH, Lee SL, Jang HJ, Chung SH. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells promoted by the crude extracts of the mixture of cortex mori radicis, atrinia saniculaefolia. *Mol Cell Toxicol.* 2015; 11:475-82.
15. Inoue J, Aramaki Y. Suppression of skin lesions by transdermal application of CpG-oligodeoxynucleotides in NC/Nga mice, a model of human atopic dermatitis. *J Immunol.* 2007;1:178(1):584-91.
16. Lee IS, Ahn HJ, Kim KH, Park JY, Kim YM, Han JW, Kim DH, Jung JH, Jung HJ, Jang HJ. The effects of Baekho-tang on 1-Fluoro-2,4-dinitrofluorobenzene-induced allergic dermatitis in BALB/c mice. *Orient Pharm Exp Med.* 2016;16:349-54.
17. Lin CJ, Su YC, Lee CH, Li TC, Chen YA, Lin SJS. Bai-Hu-tang, ancient Chinese medicine formula, may provide a new complementary treatment option for sepsis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013: 193084.
18. Brislinger D, Daxböck C, Roßmanith E, Stückler M, Lang I, Falkenhagen D. Bai Hu tang, Si Ni Tang, and Xue Bi tang amplify pro-inflammatory activities and reduce apoptosis in endothelial cells in a cell culture model of sepsis. *J Ethnopharmacol.* 2018;28(225): 309-18.
19. Zaniboni MC, Samorano LP, Orfali RL, Aoki V. Skin barrier in atopic dermatitis: beyond filaggrin. *An Bras Dermatol.* 2016;91(4):472-8.
20. Hönzke S, Wallmeyer L, Ostrowski A, Radbruch M, Mundhenk L, Schäfer-Korting M, Hedtrich S. Influence of Th2 cytokines on the cornified envelope, tight junction proteins, and β -Defensins in filaggrin-deficient skin equivalents. *J Invest Dermatol.* 2016;136(3):631-9.
21. Jung AR, Ahn SH, Park IS, Park SY, Jeong SI, Cheon JH, Kim K. Douchi (fermented Glycine max Merr.) alleviates atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice by regulation of PKC and IL-4. *BMC Complement Altern Med.* 2016 ;16(1):416.
22. Kim HJ, Jeong SK, Yum HY, Lee SH. Understanding of skin barrier and integrated treatment on atopic dermatitis. *Journal Skin Barrier Research.* 2010;12(1): 67-78.

23. Scharschmidt TC, Man MQ, Hatano Y, Crumrine D, Gunathilake R, Sundberg JP et al. Filaggrin deficiency confers a paracellular barrier abnormality that reduces inflammatory thresholds to irritants and haptens. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:496-506,e1-6.
24. Demerjian M, Hachem JP, Tschachler E, Denecker G, Declercq W, Vandenabeele P, Mauro T, Hupe M, Crumrine D, Roelandt T, Houben E, Elias PM, Feingold KR. Acute modulations in permeability barrier function regulate epidermal cornification: role of caspase-14 and the protease-activated receptor type 2. *Am J Pathol*. 2008 ;172(1):86-97.
25. Chen JQ, Liang BH, Li HP, Mo ZY, Zhu HL. Roles of kallikrein-related peptidase in epidermal barrier function and related skin diseases. *Int J Dermatol Venereol*. 2019;2(3):150-5.
26. Demerjian M, Hachem JP, Tschachler E, Denecker G, Declercq W, Vandenabeele P, Mauro T, Hupe M, Crumrine D, Roelandt T, Houben E, Elias PM, Feingold KR. Acute modulations in permeability barrier function regulate epidermal cornification: role of caspase-14 and the protease-activated receptor type 2. *Am J Pathol*. 2008 ;172(1):86-97.
27. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt Rd R, Bazan F, Kastelein RA, Liu YJ. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol*. 2002;3(7):673-80.
28. Hatano Y, Man MQ, Uchida Y, Crumrine D, Scharschmidt TC, Kim EG, Mauro TM, Feingold KR, Elias PM, Holleran WM. Maintenance of an acidic stratum corneum prevents emergence of murine atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2009;129(7):1824-35.
29. Leem KH, Jin SY, Kim HM, Kim JS, Jo JJ, Kim SU, An HJ. Effect of *Gypsum Fibrosum* on Interleukin-4 secretion of mice splenocytes. *Korean J Herbology*. 2002;17(2):139-44.
30. Jeong MR, Lee KY, Hong CH. Effects of ethanol extracts of *Anemarrhena asphodeloides* on skin barrier function by inflammation. *J Korean Orient Otolaryngol Dermatol*. 2018;31(2):11-23.
31. Ju YS. Ungok herbology. 2nd ed. Jeonju: Woosuk Press. 2013:416-22.
32. Boguniewicz M. Atopic dermatitis: the updated practice parameter and beyond. *Allergy Asthma Proc*. 2014;35(6): 429-34.
33. Wollenberg A, Frank R, Kroth J, Ruzicka T. Proactive therapy of atopic eczema--an evidence-based concept with a behavioral background. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2009;7(2):117-21.
34. Clark M, Steger-Hartmann T. A big data approach to the concordance of the toxicity of pharmaceuticals in animals and humans. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018 ;96:94-105.