補陰祛風止痒湯이 아토피 피부염을 誘發한 NC/Nga 생쥐의 免疫 調節作用에 미치는 影響

방찬국·최정준·엄동명·김동희*

The Effects of BGG on Various Immunological Factors Related to Pathogenesis of Allergic Dermatitis in NC/Nga Mice Induced by Der-f

Bang Chan-kuk, Choi Jeong-jun, Eom Dong-myung, Kim Dong-hee
Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

To evaluate the therapeutic effects of BGG on atopic dermatitis, we investigated the composition of immune cells of lymph node, PBMC and skin of Dermatophagoides farinae-induced NC/Nga mice. The levels of immunoglobulins in serum were analyzed at the protein level and the amount of pathologic cytokines were investigated using CD3/CD28 stimulated splenocytes.

The results are summarized below;

1. BGG showed no cytotoxic effect up to 200 ㎍/㎖ on mLFC in vitro.

2. BGG showed no hepatotoxicity in vivo based on the levels of ALT and AST.

3. Atopic dermatitis was improved through naked eye examination. BGG reduced the skin clinical index from 2.9 to 1.3 ($p<0.01$).

4. H&E and toluidine blue staining of tissue biopsies revealed that BGG inhibited the infiltration of lymphocytes and mast cells to skin.

5. BGG reduced the number of CD19 positive B cells in PBMCs by 16% ($p<0.01$), whereas cells were increased by 26% ($p<0.05$) in lymph nodes.

6. BGG reduced the numbers of B220+/CD23+ cells by 15% ($p<0.01$) and 33% in PBMCs and lymph node, respectively.

7. BGG reduced the numbers of B220+/IgE+ cells in PBMCs and lymph node by 21% and 33% ($p<0.01$), respectively.

8. BGG suppressed the levels of IgE (13%, $p<0.001$) as well as IgM (34%, $p<0.001$), IgG2a (40%, $p<0.001$) and IgG2b (26%, $p<0.05$).

9. BGG reduced the levels of IL-4 and IFN-γ by 7% ($p<0.05$) and 13% ($p<0.001$) in anti-CD3 and anti-CD28-activated splenocytes, respectively.

10. BGG considerably inhibited the production of TNF-α and IL-6 by 42% ($p<0.01$) and 15% in the serum, respectively.

Based on the results above, we concluded that BGG has therapeutic effects on atopic dermatitis by regulating the differentiation of B cells and isotype switching of IgE. Further investigations on the molecular mechanisms of BGG on atopic dermatitis are anticipated.

Key words : BGG, Allergic Dermatitis, NC/Nga Mice, Der-f

I. 緖 論

아토피 피부염 (atopic dermatitis)은 만성 염증성 피부 질환으로 주로 소아에서 발병하며 전 세계적으로 10-20% 정도가 이 질환으로 고통받고 있다[1,2].

* 대전대학교 한의과대학 병리학교실
· 교신저자 : 김동희 · E-mail : dhkim@dju.ac.kr
· 채택일 : 2007년 12월 10일

아토피 피부염의 발병 원인으로는 환경적 원인 또는 유전적 원인과 같은 다양한 요인들이 학계에 보고되고 있는데, 환경적 원인으로는 인간의 주거 환경에 존재하는 다양한 항원들이 주된 요인으로 작용한다[3-6]. 그 중에서도 집먼지진드기(house dust mite, HDM)는 가장 대표적인 알레르기 유발 인자로 알려져 있으며[7], 아토피 피부염 외에도 천식, 비염 등의 알레르기 질환을 일으킨다[8-10].

Pyroglyphidae과[11]에 속하는 집먼지진드기를 호흡하는 것만으로도 아토피 피부염이 유발될 수 있을 정도로 이 기생충들은 강력한 알레르기 유발 물질로 작용한다[12]. 이 중 Dermatophagoides속에 속하는 Dermatophagoides farinae와 Dermatophagoides pternoyssinus가 가장 대표적인 알레르기 질환 유발 기생충으로[13], 현재 전 세계적으로 분포하고 있는 것으로 알려져 있다[14,15]. 집먼지진드기의 알레르기 유발 물질에 대한 명명은 영문 속명의 첫 세 글자와 영문 종명의 첫 글자로 이루어지게 되는데, D. farinae에서 추출된 항원은 Der f이며, D. pternoyssinus에서 추출된 항원은 Der p가 된다[16]. 이 항원은 약 25kDa 또는 14kDa 크기의 단백질로써 시스테인계 단백질 분해효소, 리소자임, 세린계 단백질 분해효소 등의 활성을 가지고 있으며1[7-19], 매우 안정적인 상태를 유지하므로 일반적인 가정과 같은 조건에서의 반감기는 약 10년 정도이다[20].

집먼지진드기가 아토피 피부염을 유발하는 기작이 아직 확실히 밝혀지지는 않았지만, 주로 집먼지진드기의 분비물이나 개체의 몸을 구성하는 물질인 Der f나 Der p가 비만세포, T 세포, B 세포 등 면역세포를 활성화시켜 아토피 피부염을 일으키는 것으로 이해되고 있다[21,22]. 집먼지진드기가 주로 T 세포들을 Th2로 활성화시키고 있다는 다양한 연구 보고[23,24]가 있으며, 집먼지진드기로 피부염을 일으킨 동물 모델의 비장세포에서 IL-4와 IL-5의 발현이 크게 증가한 연구 보고[25]가 있다.

한의학에서 아토피 피부병(AD)은 형성 시기, 발현 위치 및 병증의 양상에 따라 '胎熱', '胎癬', '四彎風', '奶癬', '濕癬', '濕疹', '浸淫瘡', '乾癬', '血風瘡' 및 '痒風' 등의 범주로 인식되고 있으며[26-33], 난치적이고 고질적인 의미로 '頑濕'이라는 용어로 지칭되기도 한다.

특히 만성적인 경우에는 '血虛不能養膚, 血虛生風, 風從內生'의 병기로 인하여 소양증을 중심으로 한 피부건조, 탈설, 비후, 각화, 파열 등의 증상이 동반됨으로써 養血潤膚法이 주 치료법으로 활용된다[26-33].

최근 한의학적 치료를 위해 내원하는 환자의 대부분은 이미 항히스타민, 스테로이드 계통 약물의 불응성 및 부작용으로 인하여 만성적 병변으로 진행된 경우가 대다수이며, 구병에 발현되는 血虛風燥證, 陰傷血燥證, 脾虛血燥證, 脾虛陰傷證과 독성 발현이 동시에 일어난 경우가 많다. 일례로 윤 등[33]은 내원한 아토피 피부염 환자의 변증 유형중 濕熱型과 血虛風燥型이 가장 많으며, 만성 혹은 급성 이 후의 환자는 대부분 瘙痒症을 주 증으로 하는 血虛風燥型임을 보고한 바가 있다.

아울러 이[34]는 "風濕蘊于皮膚 久治不愈則頑固性瘙痒…"이라 하여 초기 實證이 만성적으로 진행되면 심한 소양감을 초래함으로써 치료의 난해성을 제공한다고 하였으며, 王松榮의 '治風先治血, 血行風自滅' 이론을 인용하면서 소양증에 補陰補血 治法의 중요성을 강조하였다.

실제 임상에서 아토피 피부염의 난치성 환자들은 이러한 血虛風潮로 인한 瘙痒感으로 인하여 2차적 감염과 조직 손상이 이루어지고, 이로 인한 불면, 정신 및 성장 장애 등이 초래됨으로써 치료의 난해성을 제공하게 된다[35,36].

補陰祛風止痒湯은 현재 소양감을 주증으로 하는 血虛風燥型의 만성 피부 질환에 활용되는 임상방으로 疏散風熱, 燥濕解毒, 活血凉血 효능의 약물[37,38]과 養陰補血, 潤肺生津 緩中 효능의 약물[37,38]이 병용된 攻補兼法의 처방이다. 구성 약물 중 桑葉[39], 蟬蛻[40], 沙參[41], 生地黃[42], 防風[43], 紫草[44], 牧丹皮[45], 白鮮皮[46], 苦參[47] 등은 이미 항염증 작용과 항알러지 작용이 보고된 바가 있어, 이들로 구성된 補陰祛風止痒湯 역시 아토

피 피부염에 활용 가능할 것으로 사료된다.

이에 저자는 補陰祛風止痒湯의 항아토피 효능을 객관적으로 검증하고, 이를 기초적 자료로 활용하여 다양한 치료 처방을 개발하고자, Dermatophagoides farinae의 추출물로 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga 생쥐에 경구 투여한 후 PBMC와 림프절에 존재하는 면역세포들의 변화와 사이토카인 및 면역글로블린의 발현에 미치는 영향을 탐색하였다.

補陰祛風止痒湯은 현재 瘙痒感을 主症으로 하는 血虛風燥型의 慢性 皮膚 疾患에 活用되는 臨床方으로 疏散風熱, 燥濕解毒, 活血凉血 效能의 藥物[37,38]과 養陰補血, 潤肺生津 緩中 效能의 藥物[37,38]이 併用된 攻補兼法의 處方이다. 構成 藥物 中 桑葉[39], 蟬蛻[40], 沙參[41], 生地黃[42], 防風[43], 紫草[44], 牧丹皮[45], 白鮮皮[46], 苦參[47] 등은 이미 抗炎症 作用과 항알러지 作用이 報告된 바가 있어, 이들로 構成된 補陰祛風止痒湯 역시 아토피 피부염에 活用 可能할 것으로 思料된다.

이에 著者는 補陰祛風止痒湯의 항아토피 效能을 客觀的으로 檢證하고, 이를 基礎的 資料로 活用하여 多樣한 治療 處方을 開發하고자, Dermatophagoides farinae의 抽出物로 아토피 피부염을 誘發시킨 NC/Nga 생쥐에 經口 投與한 후 PBMC와 림프절에 存在하는 免疫細胞들의 變化와 사이토카인 및 면역글로블린의 發顯에 미치는 影響을 探索하였다.

Ⅱ. 實 驗

1. 材料

1) 동물

실험 동물인 수컷 6주령의 NC/Nga mice는 Japan SLC사에서 공급 받아 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co., Korea)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2℃, 습도 55 ± 10%, 12시간-12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약물

본 실험에 사용한 補陰祛風止痒湯 (BGG)의 구성 약재들은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선 후 사용하였고, 그 내용과 분량(2첩)은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. The Prescription of Boeumgeopoongjiyangtang (BGG)

韓 藥 名	生 藥 名	用量 (g)
桑 葉	Mori Folium	15
蟬 蛻	Cicadidae Periostracum	12
麥門冬	Liriopis Tuber	15
沙 參	Adenophorae Radix	20
生地黃	Rehmanniae Radix	20
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	15
防 風	Saposhnikoviae Radix	12
白蒺藜	Tribuli Fructus	15
紫 草	Lithospermi Radix	15
牧丹皮	Moutan Cortex Radicis	10
甘 草	Glycyrrhizae Radix	3
白鮮皮	Dictamni Radicis Cortex	12
苦 參	Sophorae Radix	10
합 계		174

3) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 collagenase, trypsin-EDTA, acetic acid, tris-base, tris-HCl, paraformaldehyde, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde 등은 Sigma사 (USA) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (USA) 제품을, anti-CD19-FITC, anti-Gr-1-PE, anti- CD11b-FITC, anti-IgE-FITC, anti-B220-PE, anti-CCR3-PE, anti-CD23-PE 등은 BD-Pharmingen사 (USA) 제품을, IL-4, IFN-γ, IL-6, TNF-a ELISA kit는 Biosource사 (USA) 제품을, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM ELISA kit는 Endogen사 (USA) 제품을, IgE ELISA kit는 Shibayagi사 (Japan)제품을 사용하였으며, Dermatophagoides farinae 추출물 (Der f)은 연세대학교 미생물학교실에서 구입하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), 전자레인지 (LG., Korea), 감압증류기 (Büchi, Switzerland), 동결건조기 (EYELA Co., Japan), CO2 incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo Co., Japan), micro-pipet (Gilson Co., France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), 흡광분광기 (Shimazu Co., Japan), centrifuge (Hanil Co., Korea), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), 제빙기 (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI Co., USA), pleate shaker (Lab-line Co., USA). flow cytometry (Molecular Devices Co., USA), ELISA reader (Molecular Devices Co., USA), probe-on plus slide (Fisher Scientific, USA), 위상차현광현미경 (Nikon, Japan) 등을 사용하였다.

2. 方法

1) 시료 조제

BGG 2첩 분량에 증류수 1,500 ㎖를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출한 후 얻은 추출액을 다시 흡입 여과하여, 이를 감압 증류 장치로 농축하였다. 농축액을 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 다음 얻어진 분말 28.5 g을 냉동 보관(-80℃) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) Der f를 이용한 피부염 유도 및 시료 처리

8 주령이 된 NC/Nga 생쥐의 목, 귀, 등 인접 부위를 깨끗하게 제모한 후, 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 그리고 다음날부터 4% SDS 용액을 제모 부위에 분사한 후 0.5% Tween-20과 PBS에 Dermatophagoides farinae 추출물을 10 ㎎/㎖으로 만들어, 1주일에 3번씩 8주간 50 ㎕씩 제모한 피부에 도포하였고, 실험군은 BGG를 11.8 ㎎/25 g/day의 농도로 8주간 경구 투여 하였다. 양성대조군인 CsA 투여군은 10 ㎍/㎖/0.1 ㎖ 농도로 1주일에 3회 복강 주사 (i.p.) 하였다.

3) 관능 평가

투여 후 16주에 관능 평가를 실시하였는데, 이는 NC/Nga 생쥐의 피부염을 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법으로 평가하였다. 결과는 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타내었다. 평가 항목은 홍반 (Erythema), 가려움과 건조 피부 (Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종 (Edema & Hematoma), 짓무름 (Excoriation), 그리고 태선화 (Lichenifi-cation)로 나누었다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였다.

4) Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) 배양

정상 Balb/c 생쥐의 폐 조직을 잘게 분쇄하여 ACK 용액으로 적혈구를 제거한 후, cold D-PBS로 3회 세척하여 튜브 (15 ㎖)에 넣고 1,400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 튜브에 collagenase A (5 ㎎/㎖, BM, indianapoilis, IN, USA), DNase type I (0.15 ㎎/㎖, Sigma), antibiotics (penicillin 104 U/㎖, streptomycin 10 ㎎/㎖, amphotericin B 25 ㎍/㎖)가 포함된 DMEM을 넣고 37℃ CO2 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후, 30분간 반응시키고 PBS로 약 2회 1500 rpm으로 원심분리하였다. 이를 다시 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 세포를 분리하여 원심분리한 후 살아있는 부착세포를 DMEM-5% FBS 배양액에서 배양하였다. 이러한 과정을 1주일에 3회 반복하였다.

5) 세포독성 측정

mLFCs에 BGG (200 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 1 ㎍/㎖)를 처리하고, 배양 종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다. 세척한 각 well에 50% trichloroacetic acid 50 ㎕를 가하고, 1시간 동안 4℃에서 반응시켰다. 이

를 다시 증류수로 5회 세척한 다음 well plate에 올려놓고 공기 중에서 건조하였다. 여기에 sulforhodamin B (SRB, 0.4% dissolved in 1% acetic acid) 용액을 100 ㎕/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM tris base로 용해시켰다. Plate shaker로 교반하여 540 ㎚에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

6) 간 기능 검사

실험 종료 후, NC/Nga 생쥐에서 심장 천자를 통하여 채혈한 후 혈청을 분리하여 ALT, AST의 측정을 바이오톡스텍 (오창, Korea)에 의뢰하였다.

7) 조직 검사

실험 종료 후에, 왼쪽 귀 (ear) 끝부분, 背部 목 부분의 피부를 떼어내어 10% paraform-aldehyde에서 24 h 동안 포르말린에 고정하였다. 고정이 끝난 조직을 파라핀으로 포매하였고, 5 ㎛ 부분의 두께로 block을 만들었다. 이를 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratino-cytes, neutrophils/eosinophil 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline/eosin (H&E) 염색과 비만세포 (mast cells)를 염색하는 toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤을 관찰하였다.

8) 피부와 DLN에서 면역세포 및 PBMC의 분리

실험을 종료한 후 Der f로 유발된 NC/Nga 생쥐에서 배부 일정량의 피부 조직을 잘게 chopping한 후 collagenase 1 ㎎/㎖ (in 2% FBS + RPMI1640)을 넣고 37℃ shaker (140 rpm, 20 min.) 배양기에서 배양하여 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이들 세포들에 ACK 용액 (8.3 g NH4Cl, 1 g KHCO3 in 1L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 cell strainer를 통과 시킨 세포를 0.04% trypan blue로 염색하였다.

DLN내 총 면역 세포 수 측정은 뒷다리 안쪽에서 각각 1개의 림프절을 떼어 mesh를 통해 분리한 다음, 여기에 ACK 용액 (8.3 g NH4Cl, 1 g KHCO3 in 1L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 가한 후 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 D-PBS로 2회 세척한 후, cell strainer를 통과한 세포를 0.04% trypan blue로 염색하였다.

PBMC는 heparin이 포함된 3 ㎖ 주사기로 혈액을 취한 후 tube에 넣은 다음 배지를 가하여 1200 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 상등액을 버리고 다시 ACK 용액을 2 ㎖ 가하여 RBC를 제거한 후 세척하고 PBMC를 분리하였다.

9) 형광 유세포 분석

분리한 세포를 5 x 105 cells/㎖의 농도로 조정한 후 4℃에서 면역형광염색을 실시하였다. 각각에 anti-CD19-FITC, anti-Gr-1-PE, anti-CD11b-FITC, anti-IgE-FITC, anti- B220-PE, anti-CCR3-PE, anti-CD23-PE을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세하고 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD19+, B220+/IgE+, B220+/CD23+, CCR3+, CD11b+/Gr-1+ 세포수를 백분율 (%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute cell number)를 산출하였다.

10) 비장세포 내 IL-4, IFN-γ 생성량 측정

실험 종료 후 비장세포 (1 x 105 cells/well)를 anti-CD28 (1 ㎍/㎖), anti- CD3 (1 ㎍/㎖) 항체가 coating된 96-well plate에서 48시간 동안 동시 배양하여 ELISA kit (Biosource, USA)로 측정하였다. 각 well에 비장세포 배양액을 50 ㎕씩 분주하고 biotin-conjugated IL-4 antibody를 50 ㎕씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 37℃에서 반응하였다. 반응 후 washing buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 다시 100 ㎕의 streptavidin-HRP Working solution을 가하여

30분 동안 실온에서 반응시킨 후 washing buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 100 ㎕의 stabilized chromogen을 가하여 암소에서 30분간 방치한 후 100 ㎕의 stop 용액을 처리하고 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. IFN-γ는 IL-4와 같은 방법으로 측정하였다.

11) 혈액 내 IL-6, TNF-α 생성량 측정

실험 종료 후 ethyl ether로 마취한 상태에서 심장천자법을 이용하여 채혈한 다음 혈청을 분리하였다. IL-6와 TNF-α 농도는 시중에서 구매한 ELISA kit (Biosource, USA)를 사용하여 제조사의 protocol에 따라 측정하였다.

12) 혈청 중 면역글로블린 측정

혈청 내 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM 그리고 IgE 생성량의 측정은 ELISA kit를 사용하였으며, 제조사의 protocol에 따라 실험을 진행하였다. 혈청은 실험 종료 후 ethyl ether로 마취 상태에서 심장을 천자하여 채혈한 후 원심분리기 6,500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. ELISA의 측정 방법은 다음과 같다. 항체를 coating 완충 용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4℃에서 overnight 하였다. 각 well을 3회 washing 완충 용액으로 세척한 후 혈청 (100배 희석)을 100 ㎕씩 분주하였다. 이를 1시간 동안 실온에서 방치하고 washing 완충 용액으로 2회 세척한 다음, avidin-HRP conjugated antibody 100 ㎕를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 ㎕씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 다음 50 ㎕의 stop 용액을 처리하였다. 반응 용액은 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

13) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error (S.E)로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석법을 이용하여 결정하였다.

Ⅲ. 實驗成績

1. 안전성 검사

1) 세포독성에 미치는 영향

세포독성은 mLFCs를 이용하여 측정하였는데, 약물을 처리하지 않은 상태인 대조군의 세포생존율은 100.0 ± 5.8(%) 로 나타났다. 반면 BGG를 200, 100, 50, 10, 1 (㎍/㎖) 농도로 처리한 실험군은 각각 83.6 ± 2.1, 88.7 ± 3.4, 91.1 ± 5.4, 93.2 ± 5.8, 112.1 ± 5.9(%) 로 나타났다 (Fig. 1).

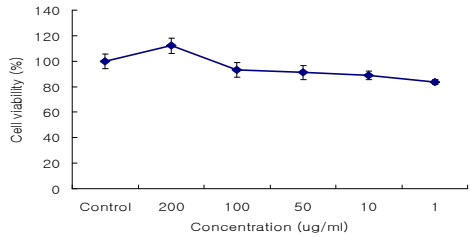

Fig. 1. Effects of BGG on the viability of mouse lung fibroblast cells. Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) were cultured with various concentration of BGG extract for 48 hr and the cell viability was measured by SRB method. The results were presented by the mean ± S.E.

2) 간 기능에 미치는 영향

간 기능 측정의 지표 성분인 ALT 수치는 정상군이 32.0 ± 2.5 (I.U/L), 대조군이 284.7 ± 10.7 (I.U/L), CsA 투여군이 80.6 ± 54.2 (I.U/L), BGG 투여군이 45.8 ± 16.4 (I.U/L)로 나타났다. AST 수치는 정상군이 114.4 ± 27.7 (I.U/L), 대조군이 510.6 ± 7.6 (I.U/L), CsA 투여군이 182.0 ± 52.8 (I.U/L), BGG 투여군이 298.2 ± 21.3 (I.U/L)로 나타났다 (Fig. 2).

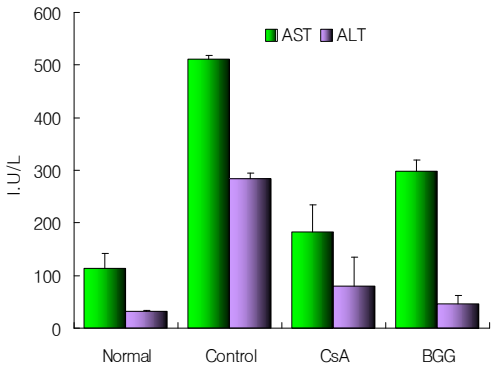

Fig. 2. Effect of BGG extract on ALT and AST in Der f-induced dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of BGG (11.8 ㎎/25 g/day) for 8 weeks. The level of ALT and AST were measured as described in Materials and Methods.

2. NC/Nga 생쥐의 피부염 지수에 미치는 영향

Der f를 제모한 피부에 도포하여 아토피 피부염을 유발한 후 최종 8주에 피부염의 심화 정도를 관능적 방법에 의하여 측정한 결과, 대조군은 2.9 ± 0.2, CsA 투여군은 1.0 ± 0.3 (***p<0.001), BGG 투여군은 1.3 ± 0.4 (**p<0.01)로 피부염 지수가 나타나 유의적인 임상 증상 개선 효과가 나타났다 (Table 2).

Table 2. Effects of BGG on Clinical Skin Features and Severity in Der f-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

	Control	CsA	BGG
Clinical skin index	2.9 ± 0.2	1.0 ± 0.3***	1.3 ± 0.4**

3. 조직 변화

BGG가 피부 조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험 종료 후 귀와 배부의 피부 일부를 채취하여 H&E 염색과 toluidine blue 염색을 실시하였다. H&E 염색을 한 대조군의 귀 조직은 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, 백혈구의 침윤도 관찰된 반면 (Fig. 3B, upper panel), BGG 투여군에서는 epidermis와 dermis의 두께 및 백혈구의 침윤이 상대적으로 감소하였다 (Fig. 3D, upper panel). 비만세포 (mast cell)를 염색하는 toluidine blue 염색에서는 대조군 (Fig. 4B, upper panel)의 dermis 주변에 비만세포 (화살표)가 많이 침윤된 반면, BGG 투여군은 상대적으로 대조군에 비하여 비만세포의 침윤이 감소되었다 (Fig. 4D, upper panel). 피부 조직에서도 BGG 투여군에서는 dermis /epidermis의 두께와 침윤된 백혈구의 수가 대조군에 비하여 감소하였으며 (Fig. 3D, lower panel), 피부 조직내 비만세포의 침윤 역시 감소하였음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4D, lower panel).

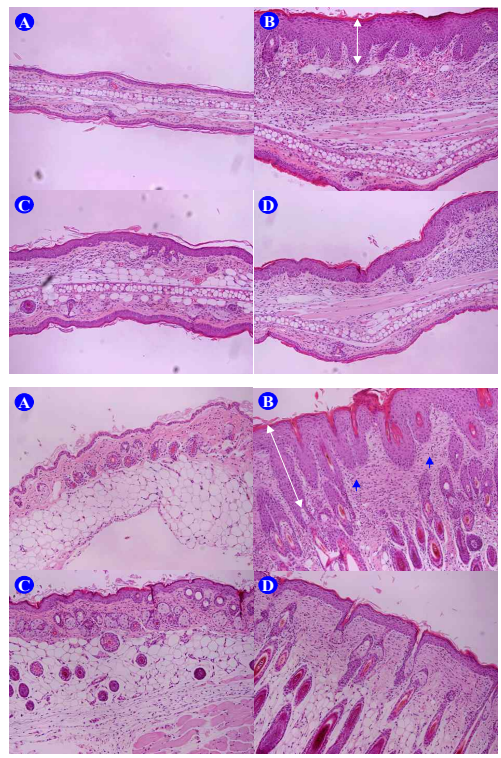

Fig. 4. Histologic examination of ear and

dorsal skin lesion in Der f-induced dermatitis model of NC/Nga mice. The animals were administrated with saline (control) or BGG (11.8 ㎎/25 g/day) for 8 weeks. Ear and dorsal skin biopsies were stained with hematoxylin and eosin (H&E) (A; normal. B; control, C; CsA, D; BGG) for examining inflammatory cells. The stained tissues were observed by bright microscopy (Nikon, Japan, orignal magnification, x100).

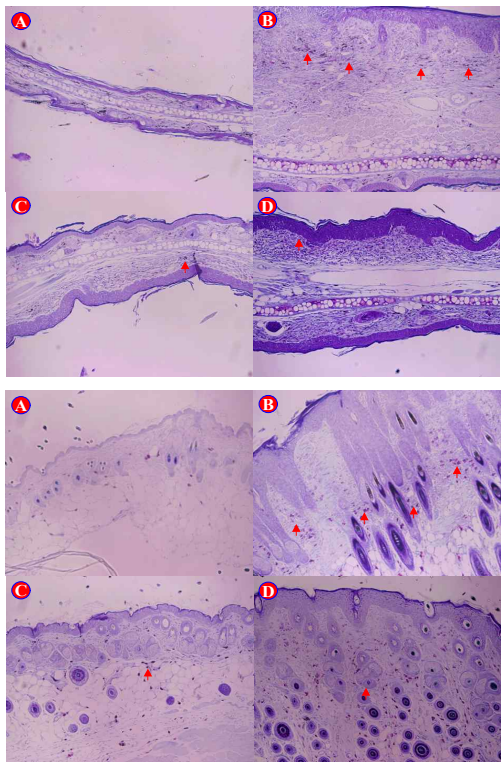

Fig. 5. Histologic examination of ear and dorsal skin lesion in Der f-induced dermatitis model of NC/Nga mice. The animals were administrated with saline (control) or BGG (11.8 ㎎/25 g/day) for 8 weeks. Ear and dorsal skin biopsies were stained with toluidine blue (A; normal. B; control, C; CsA, D; BGG) for examining mast cells. The stained tissues were observed by bright microscopy (Nikon, Japan, orignal magnification, x100).

4. 면역 세포군의 변화에 미치는 영향

1) DLN 내 총 면역세포 수에 미치는 영향

DLN에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, 정상군은 3.80 ± 0.34 ($x10^6$ cells), 대조군은 1.95 ± 0.09 ($x10^6$ cells), CsA 투여군은 3.25 ± 0.11 ($x10^6$ cells), BGG 투여군은 3.75 ± 0.25 ($x10^6$ cells)로 나타나, BGG 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 (***$p<0.001$) 있는 증가 효과를 나타내었다 (Table 3).

Table 3. Effect of BGG Extract on Total Cell Number of DLN in Der f-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

$x10^6$cells	Normal	control	CsA	BGG
Total cell number	3.80 ± 0.2	1.95 ± 0.09++	3.25 ± 0.25***	3.75 ± 0.25***

2) Dorsal skin 내 총 면역세포 수에 미치는 영향

Dorsal skin 내 총 면역세포 수를 관찰한 결과, 정상군은 2.90 ± 0.21 ($x10^5$ cells/g), 대조군은 11.95 ± 2.00 ($x10^5$ cells/g), CsA 투여군은 5.20 ± 1.59 ($x10^5$ cells/g), BGG 투여군은 6.65 ± 0.25 ($x10^5$ cells/g)로 나타나, 이 역시 BGG 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 (*$p<0.05$) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Table 4).

Table 4. Effect of BGG Extract on Total Cell Number of Dorsal Skin in Der f-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

x10^5 cells/g	Normal	control	CsA	BGG
Dorsal skin cell number	2.90 ± 0.21	11.95 ± 2.00++	5.20 ± 1.59*	6.65 ± 0.25*

3) PBMC 내 면역세포 수에 미치는 영향

(1) CD19+ 세포 수에 미치는 영향

CD19+ 세포 수는 정상군은 36.7 ± 1.23(%), 대조군은 47.8 ± 3.85(%), CsA 투여군은 40.4 ± 5.78(%), BGG 투여군은 40.2 ± 0.50(%)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 감소 효과를 나타냈다 (Table 5).

Table 5. Effect of BGG Extract on CD19+ Cell Percent of PBMC in Der f-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

%	Normal	control	CsA	BGG
CD19+	36.7 ± 1.23	47.8 ± 3.85++	40.4 ± 5.78*	40.2 ± 0.50**

(2) B220+/IgE+ 세포 수에 미치는 영향

B220+/IgE+ 세포 수는 정상군은 0.5 ± 0.14(%), 대조군은 4.8 ± 0.3(%), CsA 투여군은 3.9 ± 0.1(%), BGG 투여군은 3.8 ± 0.18(%)로 나타났다 (Table 6).

Table 6. Effect of BGG Extract on B220+/IgE+ Cell Percent of PBMC in Der f-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

%	Normal	control	CsA	BGG
B220+/IgE+	0.5 ± 0.14	4.8 ± 0.3+++	3.9 ± 0.1	3.8 ± 0.18

(3) B220+/CD23+ 세포 수에 미치는 영향

B220+/CD23+ 세포 수는 정상군은 31.0 ± 0.25(%), 대조군은 41.4 ± 1.5(%), CsA 투여군은 42.2 ± 1.35(%), BGG 투여군은 35.4 ± 0.34(%)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 감소 효과를 나타냈다 (Table 7).

Table 7. Effect of BGG Extract on B220+/CD23+ Cell Percent of PBMC in Der f-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

%	Normal	control	CsA	BGG
B220+/IgE+	31.0 ± 0.25	41.4 ± 1.5+++	42.2 ± 1.35	35.4 ± 0.34**

4) DLN 내 면역세포 변화에 미치는 영향

(1) CD19+ 세포 수에 미치는 영향

CD19+ 세포 수는 정상군은 13.8 ± 1.4 (x10^5), 대조군은 9.8 ± 2.0 (x10^5), CsA 투여군은 12.5 ± 1.7 (x10^5), BGG 투여군은 13.2 ± 0.8 (x10^5)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (*p<0.05) 증가 효과를 나타냈다 (Table 8).

Table 8. Effect of BGG Extract on CD19+ Cell Absolute Number of DLN in Der f-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

x10^5	Normal	control	CsA	BGG
CD19+	13.8 ± 1.4	9.8 ± 2.0	12.5 ± 1.7	13.2 ± 0.8*

(2) B220+/IgE+ 세포 수에 미치는 영향

B220+/IgE+ 세포 수는 정상군은 1.0 ± 0.1 (x10^5), 대조군은 6.4 ± 0.4 (x10^5), CsA 투여군은 5.1 ± 0.1 (x10^5), BGG 투여군은 4.3 ± 0.2 (x10^5)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 감소 효과를 나타냈다 (Table 9).

Table 9. Effect of BGG Extract on B220+/IgE+ Cell Absolute Number of DLN in Der f-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

$x10^5$	Normal	control	CsA	BGG
B220+ /IgE+	1.0 ± 0.1	6.4 ± 0.4+++	5.1 ± 0.1*	4.3 ± 0.2**

(3) B220+/CD23+ 세포 수에 미치는 영향

B220+/CD23+ 세포 수는 정상군은 9.0 ± 2.0 ($x10^5$), 대조군은 16.3 ± 0.6 ($x10^5$), CsA 투여군은 9.3 ± 0.3 ($x10^5$), BGG 투여군은 11.0 ± 1.9 ($x10^5$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (*p<0.05) 감소 효과를 나타냈다 (Table 10).

Table 10. Effect of BGG Extract on B220+/CD23+ Cell Absolute Number of DLN in Der f-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

$x10^5$	Normal	control	CsA	BGG
B220+ /CD23+	9.0 ± 2.0	16.3 ± 0.6++	9.3 ± 0.3***	11.0 ± 1.9*

5) Dorsal Skin 내 면역세포 변화에 미치는 영향

(1) CCR3+ 세포 수에 미치는 영향

CCR3+ 세포 수는 정상군은 0.7 ± 0.3 ($x10^4$), 대조군은 9.4 ± 0.68 ($x10^4$), CsA 투여군은 5.3 ± 18 ($x10^4$), BGG 투여군은 4.9 ± 0.5 ($x10^4$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 감소 효과를 나타냈다 (Table 11).

Table 11. Effect of BGG Extract on CCR3+ Absolute Cell Number of Dorsal Skin in Der f-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

$x10^4$ cells/g	Normal	control	CsA	BGG
CCR3+	0.7 ± 0.3	9.4 ± 0.68+++	5.3 ± 18*	4.9 ± 0.5**

(2) B220+/IgE+ 세포 수에 미치는 영향

B220+/IgE+ 세포 수는 정상군은 0.6 ± 0.3 ($x10^4$), 대조군은 6.4 ± 0.5 ($x10^4$), CsA 투여군은 3.5 ± 0.21 ($x10^4$), BGG 투여군은 2.9 ± 0.28 ($x10^4$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는(***p<0.001) 감소 효과를 나타냈다 (Table 12).

Table 12. Effect of BGG Extract on B220+/IgE+ Absolute Cell Number of Dorsal Skin in Der f-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

$x10^4$ cells/g	Normal	control	CsA	BGG
B220+ /IgE+	0.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5+++	3.5 ± 0.21***	2.9 ± 0.28***

(3) CD11b+/Gr-1+ 세포 수에 미치는 영향

CD11b+/Gr-1+ 세포 수는 정상군은 1.0 ± 0.8 ($x10^4$), 대조군은 9.2 ± 0.8 ($x10^4$), CsA 투여군은 2.2 ± 0.8 ($x10^4$), BGG 투여군은 4.6 ± 0.37 ($x10^4$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 감소 효과를 나타냈다 (Table 13).

Table 13. Effect of BGG Extract on CD11b+/Gr-1+ Absolute Cell Number of Dorsal Skin in Der f-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

$x10^4$ cells/g	Normal	control	CsA	BGG
CD11b+ /Gr-1+	1.0 ± 0.8	9.2 ± 0.8+++	2.2 ± 0.8***	4.6 ± 0.37**

5. 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) CD3/CD28로 활성화된 비장세포 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

(1) IL-4 생성량에 미치는 영향

IL-4 생성량은 정상군은 74.2 ± 2.5 (pg/㎖), 대조군은 491.8 ± 4.3 (pg/㎖), CsA 투여군은 680.2 ± 26.6 (pg/㎖), BGG 투여군은 459.5 ± 10.3 (pg/㎖)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성

있는 (*p<0.05) 감소 효과를 나타냈다 (Table 14).

Table 14. Effect of BGG Extract on the Levels of IL-4 in Splenocytes of NC/Nga Mice

pg/㎖	Normal	control	CsA	BGG
IL-4	74.2 ± 2.5	491.8 ± 4.3+++	680.2 ± 26.6***	459.5 ± 10.3*

(2) IFN-ɣ 생성량에 미치는 영향

IFN-ɣ 생성량은 정상군은 41.3 ± 2.8 (pg/㎖), 대조군은 570.8 ± 3.3 (pg/㎖), CsA 투여군은 546.9 ± 1.0 (pg/㎖), BGG 투여군은 500.9 ± 3.7 (pg/㎖)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (***p<0.001) 감소 효과를 나타냈다 (Table 15).

Table 15. Effect of BGG Extract on the Levels of IFN-ɣ in Splenocytes of NC/Nga Mice

pg/㎖	Normal	control	CsA	BGG
IL-4	41.3 ± 2.8	570.8 ± 3.3+++	546.9 ± 1.0***	500.9 ± 3.7****

2) 혈청 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

(1) IL-6 생성량에 미치는 영향

IL-6 생성량은 정상군은 137.9 ± 0.1 (pg/㎖), 대조군은 175.6 ± 16.9 (pg/㎖), CsA 투여군은 88.0 ± 12.1 (pg/㎖), BGG 투여군은 150.4 ± 16.4 (pg/㎖)로 나타났다 (Table 16).

Table 16. Effect of BGG Extract on the levels of IL-6 in the serum of Der f-induced NC/Nga Mice

pg/㎖	Normal	control	CsA	BGG
IL-6	137.9 ± 0.1	175.6 ± 16.9+	88.0 ± 12.1**	150.4 ± 16.4

(2) TNF-α 생성량에 미치는 영향

TNF-α 생성량은 정상군은 8.2 ± 1.5 (pg/㎖), 대조군은 36.3 ± 5.4 (pg/㎖), CsA 투여군은 25.6 ± 3.0 (pg/㎖), BGG 투여군은 21.2 ± 0.5 (pg/㎖)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (*p<0.05) 감소 효과를 나타냈다 (Table 17).

Table 17. Effect of BGG Extract on the levels of TNF-α in the serum of Der f-induced NC/Nga Mice

pg/㎖	Normal	control	CsA	BGG
TNF-α	8.2 ± 1.5	36.3 ± 5.4+++	25.6 ± 3.0	21.2 ± 0.5*

6. 혈청 내 immunoglobulin 생성량에 미치는 영향

1) IgM 생성량에 미치는 영향

IgM 혈중 농도는 정상군은 647.0 ± 30.9 (㎍/㎖), 대조군은 929.5 ± 37.6 (㎍/㎖)), CsA 투여군은 458.5 ± 56.5 (㎍/㎖), BGG 투여군은 619.5 ± 16.1 (㎍/㎖)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (***p<0.001) 감소 효과를 나타냈다 (Table 18).

Table 18. Effect of BGG Extract on the Levels of IgM in the Serum from Der f-induced Atopic Dermatitis NC/Nga Mice

㎍/㎖	Normal	control	CsA	BGG
IgM	647.0 ± 30.9	929.5 ± 37.6+++	458.5 ± 56.5***	619.5 ± 16.1***

2) IgG1 생성량에 미치는 영향

IgG1 혈중 농도는 정상군은 2645.0 ± 85.2

(㎍/㎖), 대조군은 3774.0 ± 76.4 (㎍/㎖), CsA 투여군은 3238.5 ± 111.4 (㎍/㎖), BGG 투여군은 3621.0 ± 46.1 (㎍/㎖)로 나타났다 (Table 19).

Table 19. Effect of BGG Extract on the Levels of IgG1 in the Serum from Der f-induced Atopic Dermatitis NC/Nga Mice

㎍/㎖	Normal	control	CsA	BGG
IgG1	2645.0 ± 85.2	3774.0 ± 76.4+++	3238.5 ± 111.4**	3621.0 ± 46.1

3) IgG2a 생성량에 미치는 영향

IgG2a 혈중 농도는 정상군은 1967.5 ± 55.9 (㎍/㎖), 대조군은 2694.5 ± 33.8 (㎍/㎖), CsA 투여군은 1473.0 ± 70.1 (㎍/㎖), BGG 투여군은 1631.5 ± 26.8 (㎍/㎖)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (***p<0.001) 감소 효과를 나타냈다 (Table 20).

Table 20. Effect of BGG Extract on the Levels of IgG2a in the Serum from Der f-induced Atopic Dermatitis NC/Nga Mice

㎍/㎖	Normal	control	CsA	BGG
IgG2a	1967.5 ± 55.9	2694.5 ± 33.8+++	1473.0 ± 70.1***	1631.5 ± 26.8***

4) IgG2b 생성량에 미치는 영향

IgG2b 혈중 농도는 정상군은 6968.0 ± 46.1 (㎍/㎖), 대조군은 9284.5 ± 355.8 (㎍/㎖), CsA 투여군은 6191.5 ± 141.1 (㎍/㎖), BGG 투여군은 6931.5 ± 653.1 (㎍/㎖)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (*p<0.05) 감소 효과를 나타냈다 (Table 21).

Table 21. Effect of BGG Extract on the Levels of IgG2b in the Serum from Der f-induced Atopic Dermatitis NC/Nga Mice

㎍/㎖	Normal	control	CsA	BGG
IgG2b	6968.0 ± 46.1	9284.5 ± 355.8+++	6191.5 ± 141.1***	6931.5 ± 653.1*

5) 혈청 IgE 생성량에 미치는 영향

IgE의 혈중 농도는 정상군은 791.5 ± 147.1 (ng/㎖), 대조군은 3616.5 ± 23.9 (ng/㎖)로 나타난 반면, 양성대조군인 CsA 투여군은 3259.0 ± 46.8 (ng/㎖), BGG 투여군은 3177.5 ± 58.4 (ng/㎖)로 나타나 대조군에 대하여 유의적인 (***p<0.001) 감소 효과를 나타내었다 (Table 22).

Table 22. Effect of BGG Extract on the Levels of IgE in the Serum from Der f-induced Atopic Dermatitis NC/Nga Mice

ng/㎖	Normal	control	CsA	BGG
IgE	791.5 ± 147.1	3616.5 ± 23.9+++	3259.0 ± 46.8***	3177.5 ± 58.4 ***

IV. 考 察

아토피 피부염은 습진에 의한 피부 손상, 소양성 찰과상, 심각한 피부 건조 및 태선화 등의 증상이 나타나는 염증성 피부질환이다[48]. 임상에서는 IgE를 매개로 하는 외인성 아토피 피부염 (extrinsic-type atopic dermatitis, EAD)과 IgE 비매개성 내인성 아토피 피부염 (intrinsic-type atopic dermatitis, IAD)으로 구분하고 있으며[49,50], 최근에는 atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS)라는 새로운 이름을 부여하고 있다[51]. 성인 아토피 피부염 환자의 대부분은 주로 외인성 아토피 피부염 환자로 밝혀지고 있어[52], B 세포의 활성화 정도 및 IgE의 발현량은 아토피 피부염의 경중을 가늠할 수 있는 중요한 척도가 될 수 있다.

한의학에서 아토피 피부염은 증상 및 발병 부

위로 보아 역대 한의서에 나타난 '胎熱', '胎癬', '四彎風', '奶癬', '濕癬', '濕疹', '浸淫瘡', '乾癬', '血風瘡' 및 '痒風' 등이 가장 유사 범주로 이해된다[26-33]. 최근 中醫學에서는 난치적이고 고질적인 의미로 '頑濕'이라는 용어로 사용되며, 알러지성 피부 질환이라는 의미에서 '異位性皮炎', '變態反應性皮膚病'으로 지칭된다.

이에 대한 치법은 "外治必本諸于內" "急則治其表, 緩則治其本"의 원칙에 따라 초기 실증인 경우에는 祛風除濕, 淸熱解毒, 淸熱凉血, 凉血消風, 解毒殺蟲法 등이, 만성적인 경우에는 養血潤膚, 健脾除濕, 補腎壯陽, 益氣健脾法 등이 치료법으로 응용된다[26-33].

특히 만성적인 경우에는 '血虛不能養膚, 血虛生風, 風從內生'의 병기로 인하여 소양증을 중심으로 한 피부건조, 탈설, 비후, 각화, 파열 등의 공통 증상이 동반됨으로써 養血潤膚法이 타 치법과 병용되어 활용되고 있다. 이렇듯 소양증은 아토피 피부염의 주요 증상이자 악화의 요인으로, 참을 수 없는 소양감으로 인하여 2차적 조직 감염과 조직 손상이 이루어지고 불면, 성장 장애 등이 초래됨으로써 치료의 난해성을 제공한다.

이 등[34]은 피부병의 병인·병기에 대한 제가의 설을 비교 고찰하면서 소양증의 병인에 대하여 "外由風濕熱三者之邪蘊結所致, 內因血熱血虛而發"이라 하여 내·외인을 불문하고 風邪가 소양증의 주요 병인임을 언급하였고, 朱仁康의 임상방을 인용하면서 陰虛血虧, 生風化燥型인 경우 피부건조와 더불어 時重時減, 陳發性 發作 및 전신적인 성격을 띤 소양증이 동반된다고 언급하였다. 아울러 王松榮은 '治風先治血, 血行風自滅' 이론을 인용하면서 소양증에 있어 四物湯을 기본으로 하는 補陰補血 치법의 중요성을 강조하였다[34].

본 시료인 補陰祛風止痒湯은 현재 소양감을 주증으로 하는 만성 피부질환에 활용되는 임상방으로, 疏散風熱, 燥濕解毒, 活血凉血 효능[37,38]의 桑葉, 蟬蛻, 防風, 白蒺藜, 紫草, 牧丹皮, 白鮮皮, 苦蔘 등과 養陰補血, 潤肺生津 緩中 效能[37,38]의 麥門冬, 沙蔘, 生地黃, 甘草로 이루어진 攻補兼法의 처방이다.

구성 약물의 관련 연구로 김 등[39,53]은 桑葉의 아토피 피부염에 미치는 영향과 면역 조절 작용을. 김[40]은 蟬蛻의 알레르기의 예방 효과를, 신[41]은 沙參의 면역조절작용을, 권 등[42,54]은 生地黃의 선천면역 및 적응면역 반응과 Allergy성 접촉피부염에 미치는 영향을 김[43]은 防風의 항염증 효과를, 김 등[44,55]은 紫草의 항알러지 염증 반응과 아토피 동물 모델에 미치는 영향을, 이 등[45,56]은 牧丹皮의 항알러지 작용을, 임[50]은 白鮮皮의 항알레르기의 작용을, 박 등[47,57]은 苦參의 항염증 작용과 B 세포에 미치는 항알레르기 효과를 각각 보고한 바가 있다.

이 같이 본 처방의 구성 약물 대부분은 이미 아토피 피부염과 관련된 항염증 및 항알러지 작용이 실험적으로 규명된 바가 있어, 이들로 구성된 補陰祛風止痒湯 역시 유의성있는 항알러지 작용을 통하여 아토피 피부염에 활용 가능할 것으로 사료된다.

이에 본 실험에서는 현재 임상에서 소양증이 동반된 다양한 피부과 질환에 활용되고 있는 補陰祛風止痒湯의 항아토피 효과를 객관적으로 검증하고자, Dermatophagoides farinae의 추출물로 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga 생쥐에서의 면역 관련 병리적 인자들의 변화를 검색하였다.

아토피 피부염 발생 시 알레르기 유발 물질을 가장 먼저 인지하는 것은 피부에 존재하는 IgE이다. 이러한 IgE들은 순환계에 떠돌아다니는 형태로 존재하기 보다 epidermis나 dermis에 존재하는 항원제시세포 (antigen presenting cells, APCs)의 수용체인 FcεR에 결합한 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다[58,59]. IgE의 수용체는 크게 고친화성수용체 (high-affinity IgE receptor, FcεRI)와 저친화성수용체 (low-affinity IgE receptor, FcεRII)로 나눌 수 있으며[60,61], 그 중에서 FcεRI이 아토피 피부염의 발생을 유도하는데 있어서 대부분의 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다[62,63]. 이들이 발현하는 APC는 주로 랑게르한스 세포, 수지상세포, 대식세포들이며[58,64], APC 외에도 FcεRI-IgE 결합체는 비만세포와 호염구, 호산구에도 다수 분포하고 있다[65].

FcεRI을 구성하는 β-체인과 ɣ-체인은 세포 내부에 존재하는 부분중에 immunotyrosine-based activation motifs (ITAMs)이라 불리는 도메인이 있는데[66], 항원-IgE-FcεRI 결합체가 형성되면 Lyn이나 Syk과 같은 tyrosine kinase에 의해 ITAM의 인산화 과정이 진행되어 하위 단계에 존재하는 다양한 세포 신호전달 과정이 진행된다[67]. 이때 활성화되는 하위 세포 신호전달 물질들은 Bruton's tyrosine kinase (Btk), linker of activated T cells (LAT), growth-factor-receptor-bound protein 2 (Grb2), Grb2-associated- binder-like protein 2 (Gab2), protein kinase C (PKC) 등이 있으며[68-71], 최근에는 PKC에 의해 활성화된 B cell lymphoma 10 (Bcl10), mucosa-associated lymphoid tissue 1 (Malt1) 등의 새로운 adopter molecule이 nuclear factor κB (NF-κB)를 활성화시켜 비만세포와 같은 곳에서 사이토카인을 발현하게 하는 기작이 보고되었다[72]. 그 외에도 항원에 의해 활성화된 FcεRI-IgE는 Ca+ influx를 유도하고[73] 히스타민이나 세로토닌 등을 분비하여 혈관벽의 투과성을 증진시킨다[74]. 특히, 항원과 결합된 FcεRI-IgE에 의해 단핵구에서는 IL-1이나 TNF-α와 같은 사이토카인을 분비하는데[75], 이들은 혈관 내피세포를 자극하여 E-selectin이나 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 등을 발현시킴으로써 T 세포, B 세포, 호산구, 호염구, 중성구 등 면역세포들의 침윤을 가속시키는 역할을 하게 된다[76]. 피부 병변으로 들어오는 T 세포들은 이 후 Th2 세포로 분화가 되고 Th2 사이토카인들을 발현하게 되는 아토피 피부염의 과정을 거치게 된다[77].

NC/Nga 생쥐는 사람의 아토피 피부염과 유사한 질병이 발병하는 질환 동물 모델로써[78], SPF 상황에서도 집먼지진드기 추출물을 NC/Nga 생쥐에 투여하면 Th2 관련 사이토카인의 발현이 증가하고, 피부로 다양한 면역세포들의 침윤이 일어나는 등 사람의 아토피 피부염과 유사한 상태가 된다[79,80].

집먼지진드기 (house dust mite, HDM)는 가장 대표적인 알레르기 유발 인자로[7], 아토피 피부염 외에도 천식, 비염 등의 알레르기 질환을 일으킨다[8-10]. 집먼지진드기의 알레르기 유발 물질에 대한 명명은 영문 속명의 앞 세 글자와 영문 종명의 첫 글자로 이루어지게 되는데, 본 실험에서 사용한 Der f는 Dermatophagoides farinae에서 추출된 항원이다[16].

집먼지진드기가 아토피 피부염을 유발하는 기작이 확실히 밝혀지지 않았지만, 주로 집먼지진드기의 분비물이나 개체의 몸을 구성하는 물질인 Der f나 Der p가 비만세포, T 세포, B 세포 등 면역세포를 활성화시켜 아토피 피부염을 일으키는 것으로 이해되고 있다[21,22].

Der f나 Der p 투여 시 수지상세포들은 IL-12의 발현을 억제하여 CD4+ 세포들을 Th2 세포로 분화시킬 수 있음이 알려져 있고[24] 이 물질이 가지는 단백질 분해효소 활성을 통해 T 세포의 표면에 있는 CD25를 분해시킴으로써 IFN-ɣ의 발현을 억제시킨다는 연구결과도 보고되었다[81]. 또한 비만세포도 Der f에 반응하여 IL-4, IL-5, IL-13과 같은 사이토카인을 만들어냄으로써 Th2 반응을 더욱 이끌어내며[82], Th2 반응 이외에도 집먼지진드기의 항원은 IgE의 발현을 증가시켜 외부 항원에 대한 민감도를 증가시킨다[83]. 또한, 호산구도 집먼지진드기에 의해 발생하는 아토피 피부염에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 호산구는 알레르기유발물질에 의해 약 2-6시간 만에 dermis 부위로 침윤되는데, 약 24-48 시간 후에는 eosinophil cationic protein (ECP)를 분비하여 다른 면역세포들을 피부 병변 부위로 침윤시켜 아토피 피부염의 증상을 악화시키는 역할을 하게 된다[84].

최근 한약 및 한방 처방의 항아토피 효능 규명을 위해 본 실험 동물에 DNCB를 처리하여 다양한 면역 인자들의 변화를 살펴본 많은 연구들이 있으나, 본 실험 동물 병태를 이용하여 한약 및 한방 처방의 효능을 검색한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 본 실험에서는 補陰祛風止痒湯이 임상에서 소양감을 주증으로 하는 만성 피부 질

환에 응용된다는 점에서 소양증을 극대화할 수 있는 병태 모델을 선택하였다.

시료의 안전성을 위한 독성 검사에서는 in vitro 세포독성 평가와 in vivo 간기능 검사를 실시하였는데, mLFCs에 대한 세포독성에서는 모든 실험 농도에서 80%를 상회하는 세포 생존율이 나타나 세포독성이 없는 것으로 나타났다 (Fig. 1). 본 시료를 8주 동안 복용한 실험 동물의 AST, ALT에서도 물만 복용한 정상군과 차이가 없어 음용으로 인한 안전성이 인정되었다 (Fig. 2).

피부 병변에 대한 육안적 평가에서는 집먼지진드기 추출물인 Der f를 도포한 대조군에서는 각화 현상이 진행되어 피부 염증이 발현되었다. 이에 반해 양성대조군인 CsA 투여군과 BGG를 8주간 경구 투여한 실험군에서는 대조군에 비하여 긁는 행동이 상대적으로 감소함과 동시에 각화 현상으로 인한 피부염 등이 현저히 줄어들었다. 이러한 변화는 SCORAD 法[85]을 사용한 피부 임상지수에 반영되었는데, 대조군은 2.9 ± 0.2, CsA 투여군은 1.0 ± 0.3 (***p<0.001), BGG 투여군은 1.3 ± 0.4 (**p<0.01)로 나타나, 유의적인 임상 증상 개선 효과를 나타내었다 (Table 2).

아토피 피부염 환자의 피부에는 림프구를 비롯하여 비만세포, 호산구와 같은 면역세포들이 다수 침윤되어 있으며, epidermis와 dermis가 비후해지고 소양감으로 인한 긁는 자극에 의해 출혈 등 조직의 손상이 나타남으로써 면역세포 변화와 조직 변성은 아토피 피부염을 평가하는 중요한 지표가 된다[86]. 본 실험의 조직 검사에서는 피부와 귀 조직을 hematoxylin and eosin (H&E)과 toluidine blue로 염색하여 조직학적 변화를 관찰하였는데, H&E 염색에서 대조군은 피부와 귀 조직에 백혈구의 침윤과 더불어 epidermis와 dermis 부분의 부종이 발생한 반면 (Fig. 3B), BGG 투여군에서는 이들의 병리적인 현상이 상대적으로 감소한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3D). 또한 toluidine blue 염색에서도 대조군 (Fig. 4B)에서 증가하였던 비만세포 (화살표)의 수가 BGG에 의해 상대적으로 감소한 것을 볼 수 있어 (Fig. 4D), BGG가 면역 조절작용을 통해 면역세포들의 침윤을 억제하였음을 확인할 수 있었다.

아토피 피부염에서 Th2 세포에 의해 발현된 IL-4, IL-13과 같은 사이토카인은 B 세포의 분화를 촉진하고, IgE를 생산할 수 있게 isotype switching을 일으켜 면역글로블린의 분비를 촉진시킨다[87]. 아토피 피부염 환자뿐만 아니라 집먼지진드기의 추출물로 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga 생쥐의 혈청에는 IgE의 양이 크게 증가해 있다고 보고된 바가 있다[88]. 따라서 IgE와 결합할 수 있는 유전자 재조합 항체인 IgG1을 투여하여 IgE 활성을 저해하거나[89,90], FcεRI의 작용을 억제할 수 있는 물질을 투여하여 IgE-FcεRI complex의 형성을 방해하는 기작을 통해 아토피 피부염과 같은 알레르기 질환을 개선하기 위한 약물이 개발되고 있다[91].

본 실험에서는 BGG의 투여에 의해 아토피 피부염이 억제되는 과정이 B 세포가 영향을 받아 나타난 현상인지 확인하고자 B 세포의 특이적 표면 단백질인 CD19[92]를 사용하여 말초혈액단핵세포구 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)와 림프절에 존재하는 B 세포 수를 조사하였는데, 대조군에서는 PBMC에서 약 23% 정도 증가한 반면, BGG 투여군에서는 대조군에 비해 16% 정도 감소하여 B 세포의 구성이 정상군과 비슷해진 것을 확인할 수 있었다 (Table 5). 림프절에서 CD19+ 세포는 PBMC와는 반대로 대조군에서 감소하였으며, BGG 투여군에서는 유의적으로 증가하여 PBMC와 대조적인 결과가 나타났다 (Table 8).

B220+/CD23+ 세포는 성숙한 B 세포를 나타내는데[93,94], PBMC에 존재하는 B220+/CD23+ 세포수는 대조군에 비해 BGG 투여군에서 유의적으로 감소하였으며 (Table 7), 림프절에 존재하는 B220+/CD23+ B 세포의 수도 대조군에 비해 BGG를 투여한 생쥐에서 유의적으로 감소하였다 (Table 10). 따라서 림프절에서 증가된 B 세포는 주로 미성숙한 상태로 있는 것으로 사료되나, 보다 정확한 기전을 확인하기 위해서는 이

와 관련된 보완 연구가 필요할 것으로 보인다.

집먼지진드기 추출물인 Der f는 단백질 분해효소의 기능을 갖추고 있어서 B 세포 표면에 존재하는 CD23을 분해할 수 있음이 알려져 있다[95,96]. 따라서 BGG 투여 시 PBMC와 림프절에서 B220+/CD23+ B 세포가 감소하는 상기의 결과는 BGG가 CD23+ B 세포의 감소에 영향을 줄 수 있는 가능성이 2가지가 있음을 의미한다. 첫째, BGG가 B 세포의 성숙을 억제하여 CD23+ 세포의 수를 감소시키거나, 둘째 BGG 투여에도 불구하고 IgE를 발현하는 CD23+ B 세포의 수가 증가되었으나 Der f의 단백질 분해효소 작용에 의해 CD23이 B 세포의 표면에서 해리되어 나올 수 있을 가능성이 있다. 그런데 B 세포 표면에 존재하는 CD23과 IgE는 서로 결합할 수 있으며, IgE와 결합된 CD23은 B 세포 내부에 억제 신호를 내보내어 IgE의 생산을 감소시키는 기능이 있다[97,98]. 따라서 IgE를 발현하는 CD23+ B 세포에 Der f의 분해효소 기능이 작용하여 CD23이 해리된 것이라면 FACS 분석 시 B220+/CD23+가 감소된 결과를 얻게 되나, 이 때는 CD23이 제거된 B 세포는 IgE의 생산이 더욱 증가하게 되어 B220+/IgE+ 세포 수는 더 증가할 수 있음을 의미한다. 즉, BGG가 B220+/CD23+ 세포 수를 감소시킨 기전이 첫 번째 가능성에 의한 것이라면 B220+/IgE+ 세포 수가 감소되어 있을 것이다. 이 가설을 검증해 보고 BGG가 IgE를 생산하는 B 세포를 실제적으로 감소시켰는지 확인해보고자 B220과 IgE에 특이적인 항체를 사용하여 B220 양성 B 세포 중에서 IgE를 발현하는 세포의 분포를 PBMC와 림프절에서 FACS로 살펴보았다. 정상군에 비해 대조군에서는 PBMC와 림프절에서 B220+/IgE+ 세포 수가 크게 증가하였는데, BGG를 투여한 NC/Nga 생쥐에서는 이들 세포의 수가 각각 21%와 33% 정도 감소하는 것을 볼 수 있었다 (Table 6,9). 이 같은 결과는 상기 결과와 종합하여 볼 때 BGG가 B 세포의 성숙을 억제시킴으로써 면역글로블린의 발현을 감소시키는 방법으로 아토피 피부염을 억제하는 것으로 평가된다.

BGG를 투여하였을 때 B220+/IgE+ 세포 수가 대조군에 비해 감소한 상기 결과 (Table 6,9)는 BGG가 혈청내에 존재하는 IgE의 발현을 낮출 수 있음을 의미한다. 이 같은 결과는 NC/Nga 생쥐에서 혈청내에 존재하는 IgE의 양을 ELISA로 측정한 결과에서 잘 나타난다. 약물 처리 후 8주에 IgE의 양이 대조군에 비해 유의성있게 감소하였으며 (Table 22), IgE와 더불어 다른 isotype의 면역글로블린의 양도 8주째에 대조군에 비해 IgM은 34%, IgG2a는 40%, IgG2b는 26% 정도 감소하였다 (Table 18, 20, 21). IgE 뿐만 아니라 다른 isotype의 면역글로블린도 BGG에 의해 감소하여 PBMC와 림프절에서 감소한 B220+/CD23+ 세포의 결과와 부합함으로써 BGG가 B 세포의 분화를 억제하여 전체적인 면역글로블린의 발현 감소를 초래한 것으로 판단된다.

BGG 투여에 의한 아토피 피부염의 감소가 피부 조직에 존재하는 면역 세포들에 어떠한 영향을 미쳤는지 확인해 본 결과, 피부 조직으로 침윤되는 면역 세포인 CCR3+ 세포 수는 48% 정도 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Table 11). 또한 피부 조직에 존재하는 면역 세포들 중에서 IgE-FcεRI 결합체를 가지는 세포들은 주로 과립구인데, 이 중 Gr-1/CD11b 과립구 수[99]는 BGG 투여에 의해 50% 정도 감소하였으며 (Table 13), B220+/IgE+ B 세포 수도 BGG에 의해 55% 정도 감소하였다 (Table 12). 이 같은 결과는 조직 결과에 준하여 볼 때 BGG가 피부 조직으로 면역 세포들의 침윤을 억제함과 동시에 IgE 매개형 아토피 피부염에 효과적임을 설명하고 있다.

Th2 세포들의 분화를 일으키며, IgE를 발현하게 하는데 있어서 중요한 역할을 하는 IL-4의 변화에서는 대조군에 비하여 약 7% 정도 생산이 감소되었다 (Table 14). IFN-γ는 Th1 사이토카인으로 IL-4의 발현을 억제시키며, 아토피 피부염이 발생하면 그 발현량이 감소하는 것으로 알려져 있다[100]. 그러나 아토피 피부염 발생시 IL-4는 물론이고 IFN-γ의 양이 mRNA 및 단백

질 수준에서 증가된다는 다수의 보고가 있다[101]. 아토피 피부염이 만성 상태가 되면 피부 병변에서는 IFN-ɣ의 양이 정상적인 상태보다 더 증가하게 되며[102], 아토피 피부염이 치료되면 오히려 IFN-ɣ의 양이 감소한다고 알려져 있다[103]. 또한 집먼지진드기로 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga 생쥐의 비장세포가 분비하는 IFN-ɣ의 양이 증가했다는 보고도 있다[25]. 본 실험에서 CD3/CD28로 활성화된 비장세포가 분비하는 IL-4, IFN-ɣ의 양은 대조군에서 정상군에 비해 증가한 반면, BGG 투여군에서는 모두 감소하였다 (Table 14, 15). IFN-ɣ 양의 증감에 대한 상반된 결과는 기존의 연구에서도 이에 대한 이론이 분분하여 향 후 심도있는 논의가 필요할 것으로 보인다. 또한 한방 처방을 시료로 DNCB로 유발한 접촉성 알러지 피부염에 대한 연구는 수 종의 보고가 있으나, 본 실험처럼 Der f로 유발한 실험 연구는 아직 없어 지속적인 연구를 통하여 타 처방과의 작용 기전의 차이에 대한 해석이 필요할 것으로 보인다.

V. 結 論

補陰祛風止痒湯의 아토피 피부염 개선 효능을 확인하고자, 집먼지진드기 추출물로 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga 생쥐에 경구 투여한 후 다양한 면역 관련 인자들의 변화를 살펴보았던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 補陰祛風止痒湯은 mLFC 대하여 모든 실험 농도에서 20% 이내의 세포독성을 나타내었다.

2. 補陰祛風止痒湯은 간기능 검사에서 혈청내 ALT와 AST 농도를 정상 범위로 유지시켜 간독성을 나타내지 않았다.

3. 補陰祛風止痒湯은 대조군에 비하여 아토피 피부염 임상지수를 유의성있게 감소시켰다.

4. 補陰祛風止痒湯은 대조군에 비하여 H&E와 toluidine blue 염색에서 피부 조직으로 침윤되는 림프구와 비만세포들의 침윤을 억제하였다.

5. 補陰祛風止痒湯은 대조군에 비하여 PBMC에 존재하는 CD19+ 세포 수를 유의성있게 감소시켰으며, 림프절에서는 26% 증가시켰다.

6. 補陰祛風止痒湯은 대조군에 비하여 B220+/CD23+ 세포 수를 PBMC, 림프절에서 유의성 있게 감소시켰다.

7. 補陰祛風止痒湯은 대조군에 비하여 B220+/IgE+ 세포 수를 PBMC에서 21% 감소시켰으며, 림프절에서는 유의성 있게 감소시켰다.

8. 補陰祛風止痒湯은 대조군에 비하여 혈청 내 IgE, IgM, IgG2a, IgG2b의 발현을 유의성 있게 감소시켰다.

9. 補陰祛風止痒湯은 대조군에 비하여 脾臟細胞 내 IL-4와 IFN-ɣ의 생성량을 유의성 있게 감소시켰다.

10. 補陰祛風止痒湯은 대조군에 비하여 혈액중 IL-6와 TNF-α의 생성량을 감소시켰으나, TNF-α에서만 유의성 있는 감소가 나타났다.

이상의 결과들을 보아 補陰祛風止痒湯은 항알러지 작용을 통하여 유의성 있는 면역조절 작용을 나타냄으로써 아토피 피부염에 효과적으로 응용할 수 있을 것으로 사료되며, 개별적인 약물에 대한 지속적인 연구가 요구된다.

參 考 文 獻

1. Sampson, H.A. Atopic dermatitis, Ann Allergy, 69(6):469-479, 1992.
2. Daniels, J., et al. The epidemiology of atopic dermatitis, Hosp Med, 63(11): 649-652, 2002.
3. Hill, P.B., et al. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens, Vet Immunol Immunopathol, 81(3-4):169-186, 2001.
4. Beltrani, V.S. The clinical spectrum of atopic dermatitis, J Allergy Clin Immunol, 104(3):S87-98, 1999.
5. Millikan, L.E. Atopic dermatitis. Clinical spectrum and approach to treatment, Postgrad Med, 76(1):139-146, 1984.
6. Valenta, R., et al., Autoallergy: a pathogenetic factor in atopic dermatitis? J Allergy Clin Immunol, 105(3):432-437, 2000.
7. Friedmann, P.S. The role of dust mite antigen sensitization and atopic dermatitis, Clin Exp Allergy, 29(7) :869-872, 1999.
8. Beltrani, V.S. The role of house dust mites and other aeroallergens in atopic dermatitis, Clin Dermatol, 21(3):177-182, 2003.
9. Rabito, F.A., et al., Prevalence of Indoor Allergen Exposures among New Orleans Children with Asthma, J Urban Health, 84(6):782-792, 2007.
10. Sheikh, A., et al. House dust mite avoidance measures for perennial allergic rhinitis, Cochrane Database Syst Rev, 1: CD001563, 2007.
11. Colloff, M.J., et al. Pictorial keys for the identification of domestic mites, Clin Exp Allergy, 22(9):823-830, 1992.
12. Tupker, R.A., et al. Induction of atopic dermatitis by inhalation of house dust mite, J Allergy Clin Immunol, 97(5):1064-1070, 1996.
13. de Groot, A.C., et al. The role of contact allergy to aeroallergens in atopic dermatitis, Contact Dermatitis, 21(4):209-214, 1989.
14. DeBoer, D.J. Survey of intradermal skin testing practices in North America, J Am Vet Med Assoc, 195(10):1357-1363, 1989.
15. Pike, A.J., et al. Development of Dermatophagoides pteronyssinus (Acari: Pyroglyphidae) at constant and simultaneously fluctuating temperature and humidity conditions, J MedEntomol, 42(3):266-269, 2005.
16. Nuttall, T.J., et al. House dust and forage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis, Vet Dermatol, 17(4):223-235, 2006.
17. O'Hehir, R.E., et al. House dust mite allergy: from T-cell epitopes to immunotherapy, Eur J Clin Invest, 23(12):763-772, 1993.
18. Lombardero, M., et al. Conformational stability of B cell epitopes on group I and group II Dermatophagoides spp. allergens. Effect of thermal and chemical denaturation on the binding of murine IgG and human IgE antibodies, J Immunol, 144(4):1353-1360, 1990.
19. John, R.J., et al. Functional effects of the inhibition of the cysteine protease activity of the major house dust mite allergen Der p 1 by a novelpeptide -based inhibitor, Clin Exp Allergy, 30(6):784-793, 2000.
20. Sidenius, K.E., et al.: Decay of

house-dust mite allergen Der f 1 at indoor climatic conditions, Ann Allergy Asthma Immunol, 89(1):34-37, 2002.
21. Topham, C.M., et al. Comparative modelling of major house dust mite allergen Der p I: structure validation using an extended environmental amino acid propensity table, Protein Eng, 7(7):869-894, 1994.
22. Chua, K.Y., et al.: Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases, J Exp Med, 167(1):175-182, 1988.
23. Comoy, E.E., et al.: The house dust mite allergen, Dermatophagoides pteronyssinus, promotes type 2 responses by modulating the balance between IL-4 and IFN-gamma, J Immunol, 160(5):2456-2462, 1998.
24. De Wit, D., et al.: Helper T-cell responses elicited by Der p 1-pulsed dendritic cells and recombinant IL-12 in atopic and healthy subjects, J Allergy Clin Immunol, 105(2)Pt 1:346-352, 2000.
25. Huang, C.H., et al.: Mite allergen induces allergic dermatitis with concomitant neurogenic inflammation in mouse, J Invest Dermatol, 121(2): 289-293, 2003.
26. 박민철 : 아토피 피부염의 東·西醫學的 文獻 考察, 원광대학교 대학원, 2001.
27. 王保方 외 : 皮膚病中醫診療學, 인민위생출판사, pp. 254-255, pp. 310-311, pp. 351- 354, 2000.
28. 謝 娟 외 : 皮膚病奇效良方, 인민군의출판사, pp. 170-178, 2007.
29. 吳 軍 외 : 中西醫結合皮膚性病手冊, 사천과학기술출판사, pp. 276-279, 2007.
30. 林俊華 외 : 皮膚性病科絶技, 과학기술문헌출판사, pp. 131-133, 2002.
31. 劉建國 외 : 新編皮膚學, 광동세계도서출판공사, pp. 257-262, 2003.
32. 馬紹堯 : 實用中醫皮膚病學, 상해중의약대학출판사, pp. 244-246, 1999.
33. 윤화정 외 : 아토피 피부염 환자의 한의학적 유형분류에 대한 임상적 연구, 동의한의연구논문집, 5: 43-57, 2001.
34. 李元文 외 : 皮膚病, 인민위생출판사, pp.214-217, pp. 227-229, 2004.
35. 이희정 외 : 성인 아토피 피부염 환자에서 삶의 질 평가의 임상적 유용성, 대한피부과학회지, 45(2):159-164, 2007.
36. 임정우 외 : 아토피 피부염 환자의 발병과 치료에 대한 실태 조사, 소아알레르기 및 호흡기학회지, 15(1):44-52, 2005.
37. 전국한의과대학공동교재편찬위원회 : 본초학, 영림사, p. 163, p. 181, p. 193, p. 225, p. 226, p. 231, p. 235, p. 238, p. 556, p. 583, p. 634, p. 641, p. 644, 2007.
38. 지형준 외 : 대한약전 및 대한약전 외, 한약규격 주해 제2 개정, 한국메디칼인덱스사, p. 65, p. 95, p. 211, p. 222, p. 246, p. 265, p. 269, p. 305, p. 336, p. 361, p. 341, 1998.
39. 김기훈 외 : 桑葉이 아토피 피부염에 미치는 영향, 慶熙醫學, 20(1):37-45, 2004.
40. 김광호 외 : 蟬蛻가 알레르기의 豫防에 미치는 影響, 동의병리학회지, 8(1): 225-234, 1993.
41. 신동훈 : 沙參의 免疫調節作用에 대한 實驗的 硏究, 大韓本草學會誌, 15(1): 31-43, 2000.
42. 신광식 : 生地黃抽出物이 DNCB로 誘導된 생쥐의 Allergy性 接觸皮膚炎에 미치는 影響, 동국대학교 대학원, 1999.
43. 김동민 : 방풍과 갯방풍의 항염증 효과 비교 연구, 경희대학교 대학원, 2006.
44. 김정민 : 자초추출물의 식이공급이 아토피

동물모델 NC/Nga mice 피부의 세라미이드 함량 및 천연 보습인자의 함량에 미치는 영향, 경희대학교 동서의학대학원, 2006.
45. 이석원 외 : 목단피 추출물 및 EA분획의 항알러지 작용에 대한 연구, 동의병리학회지, 15(4):631-635, 2001.
46. 임철홍 : 白鮮皮가 抗알레르기의 作用에 미치는 影響, 경희대학교 대학원 1994.
47 鄭善英 : 苦參(Sophorae Radix)이 생쥐의 B-cells에 미치는 항알레르기 효과, 경희대학교 대학원, 2002.
48. Sharma, L.: Diagnostic clinical features of atopic dermatitis, Indian J Dermatol Venereol Leprol, 67(1):25-27, 2001.
49. Bos, J.D.: Atopiform dermatitis, Br J Dermatol, 147(3):426-429, 2002.
50. Schmid-Grendelmeier, P., et al.: Epidemiology, clinical features, and immunology of the "intrinsic" (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis), Allergy, 56(9):841-849, 2001.
51. Johansson, S.G., et al.: A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force, Allergy, 56(9):813-824, 2001.
52. Folster-Holst, R., et al.: Low prevalence of the intrinsic form of atopic dermatitis among adult patients, Allergy, 61(5):629-632, 2006.
53. 조주형 외 : 桑葉의 免疫 調節 作用에 대한 實驗的 硏究, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 9(2):123-134, 2001.
54. 권영달 외 : 生地黃의 投與가 마우스의 先天免疫 및 適應免疫 反應에 미치는 影響, 韓方再活醫學科學會誌, 8(1):233-254, 1998.
55. 김선영 : 桑葉 牛芳子 紫草가 항알러지 염증반응에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 2005.
56. 손성용 외 : 목단피 추출물이 RAW264.7 대식세포주에서 유도 일산화질소 합성효소 유전자의 발현 억제 요구, 大韓泌尿器科學會誌, 43(6):480-485, 2002.
57. 문철 : 고삼으로부터 항염증활성물질의 분리와 구조에 관한 연구, 원광대학교 대학원, 2006.
58. Bruynzeel-Koomen, C., et al.: The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in patients with atopic dermatitis, Arch Dermatol Res, 278(3):199-205, 1986.
59. Leung, D.Y., et al.: The presence of IgE on macrophages and dendritic cells infiltrating into the skin lesion of atopic dermatitis, Clin Immunol Immunopathol, 42(3):328-337, 1987.
60. Metzger, H.: The high affinity receptor for IgE, FcepsilonRI, Novartis Found Symp, 257: 51-59; discussion 59-64, 98-100, 276-85, 2004.
61. Kijimoto-Ochiai, S.: CD23 (the low-affinity IgE receptor) as a C-type lectin: a multidomain and multifunctional molecule, Cell Mol Life Sci, 59(4): 648-664, 2002.
62. Takenaka, M., et al.: High affinity IgE receptor-mediated prostaglandin E2 production by monocytes in atopic dermatitis, Int Arch Allergy Immunol, 108(3):247-253, 1995.
63. Maurer, D., et al.: The high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) mediates IgE-dependent allergen presentation, J Immunol, 154(12):6285-6290, 1995.
64. Klubal, R., et al.: The high-affinity receptor for IgE is the predominant IgE-binding structure in lesional skin of atopic dermatitis patients, J Invest

Dermatol, 108(3):336-342, 1997.
65. Marquardt, D.L., et al.: Dependence of mast cell IgE-mediated cytokine production on nuclear factor-kappaB activity, J Allergy Clin Immunol, 105(3):500-505, 2000.
66. Soto-Cruz, I., et al.: Analysis of proteins binding to the ITAM motif of the beta-subunit of the high-affinity receptor for IgE (FcepsilonRI), J Recept Signal Transduct Res, 27(1):67-81, 2007.
67. Kihara, H., et al.: Src homology 2 domains of Syk and Lyn bind to tyrosine-phosphorylated subunits of the high affinity IgE receptor, J Biol Chem, 269(35):22427-22432, 1994.
68. Gilfillan, A.M., et al.: Integrated signalling pathways for mast-cell activation, Nat Rev Immunol, 6(3):218-230, 2006.
69. Siraganian, R.P.: Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor, Curr Opin Immunol, 15(6):639-646, 2003.
70. Kawakami, Y., et al.: Regulation of protein kinase CbetaI by two protein-tyrosine kinases, Btk and Syk, Proc Natl Acad Sci USA, 97(13): 7423-7428, 2000.
71. Liu, Y., et al.: Protein kinase C theta is expressed in mast cells and is functionally involved in Fcepsilon receptor I signaling, J Leukoc Biol, 69(5):831-840, 2001.
72. Klemm, S., et al.: The Bcl10-Malt1 complex segregates Fc epsilon RI-mediated nuclear factor kappa B activation and cytokine production from mast cell degranulation, J Exp Med, 203(2):337-347, 2006.
73 Cho, S.H., et al.: Protein kinase Cdelta functions downstream of Ca2+ mobilization in FcepsilonRI signaling to degranulation in mast cells, J Allergy Clin Immunol, 114(5):1085-1092, 2004.
74. Inagaki, N., et al.: Studies on vascular permeability increasing factors involved in 48-hour homologous PCA in the mouse ear, Int Arch Allergy Appl Immunol, 80(3):285-290, 1986.
75. Borish, L., et al.: IgE-dependent cytokine production by human peripheral blood mononuclear phagocytes, J Immunol, 146(1):63-67, 1991.
76. Leung, D.Y., et al.: Expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 in elicited late phase allergic reactions, J Clin Invest, 87(5):1805-1809, 1991.
77. Van Neerven, R.J., et al.: IgE-mediatedallergen presentation and blocking antibodies: regulation of T-cell activation in allergy, Int Arch Allergy Immunol, 141(2):119-129, 2006.
78. Vestergaard, C., et al.: The NC/Nga mouse: a model for atopic dermatitis, Mol Med Today, 6(5):209-210, 2000.
79. Heishi, M., et al.: Gene expression analysis of atopic dermatitis-like skin lesions induced in NC/Nga mice by mite antigen stimulation under specific pathogen-free conditions, Int Arch Allergy Immunol, 132(4):355-363, 2003.
80. Sasakawa, T., et al.: Atopic dermatitis-like skin lesions induced by topical application of mite antigens in NC/Nga mice, Int Arch Allergy Immunol, 126(3):239-247, 2001.
81. Schulz, O., et al.: Proteolytic cleavage

of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity, J Exp Med, 187(2):271-275, 1998.
82. Yu, C.K., et al.: Activation of mast cells is essential for development of house dust mite Dermatophagoides farinae-induced allergic airway inflammation in mice, J Immunol, 171(7):3808-3815, 2003.
83. Shakib, F., et al.: The proteolytic activity of Der p 1 selectively enhances IgE synthesis: a link between allergenicity and cysteine protease activity, Clin Exp Allergy, 30(6):751-752, 2000.
84. Bruijnzeel, P.L., et al.: The involvement of eosinophils in the patch test reaction to aeroallergens in atopic dermatitis: its relevance for the pathogenesis of atopic dermatitis, Clin Exp Allergy, 23(2):97-109, 1993.
85. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis, Dermatology, 186(1):23-31, 1993.
86. Robert, C., et al.: Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance, N Engl J Med, 341(24):1817-1828, 1999.
87. Lebman, D.A., et al.: Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures, J Exp Med, 168(3):853-862, 1988.
88. Van der Heijden, F.L., et al.: Serum-IgE-facilitated allergen presentation in atopic disease, J Immunol, 150(8):Pt 1, pp.3643-50, 1993.
89. Wachholz, P.A., et al.: Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy, J Allergy Clin Immunol, 112(5):915-922, 2003.
90. Lane, J.E., et al.: Treatment of recalcitrant atopic dermatitis with omalizumab, J Am Acad Dermatol, 54(1):68-72, 2006.
91. Wiegand, T.W., et al.: High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I, J Immunol, 157(1):221-230, 1996.
92. Kozmik, Z., et al.: The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP, Mol Cell Biol, 12(6):2662-2672, 1992.
93. Getahun, A., et al.: IgE enhances antibody and T cell responses in vivo via CD23+ B cells, J Immunol, 175(3):1473-1482, 2005.
94. Li, Y.S., et al.: Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow, Immunity, 5(6):527-535, 1996.
95. Schulz, O., et al.: Der p I, a major allergen of the house dust mite, proteolytically cleaves the low-affinity receptor for human IgE (CD23), Eur J Immunol, 25(11):3191-3194, 1995.
96. Hewitt, C.R., et al.: A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases, J Exp Med, 182(5):1537-1544, 1995.
97. Lamers, M.C., et al.: Regulation of IgE synthesis. Lessons from the study of IgE transgenic and CD23-deficient mice, Immunol Rev, 148: 71-95, 1995.

98. Yu, P., et al.: Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23, Nature, 369(6483):753-756, 1994.
99. Song, X., et al.: CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells, J Immunol, 175(12):8200-8208, 2005.
100. Sager, N., et al.: House dust mite-specific T cells in the skin of subjects with atopic dermatitis: frequency and lymphokine profile in the allergen patch test, J Allergy Clin Immunol, 89(4):801-810, 1992.
101. Thepen, T., et al.: Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial TH2 response to a TH1 response in situ: an immunocytochemical study, J Allergy Clin Immunol, 97(3):828-837, 1996.
102. Werfel, T., et al.: Allergen specificity of skin-infiltrating T cells is not restricted to a type-2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis, J Invest Dermatol, 107(6):871-876, 1996.
103. Grewe, M., et al.: Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema, Lancet, 343(8888):25-26, 1994.