驅風除濕湯이 아토피 피부염 유발 NC/Nga mouse의 비장 및 DLN내 면역 관련 인자에 미치는 영향

윤재은·한재경·김윤희*

Effect of Gupoongjeseuptang on immunological factors in spleen and draining lymph node(DLN) of atopic dermatitis induced NC/Nga mouse by dinitrochlorobenzene(DNCB)

Yoon Je-eun, Han Jae Kyung, Kim Yun-hee Dept. of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Gupoongjeseuptang(GPJST) is a traditional herbal medicine used for the treatment of dermatitis. The aim of this study was to confirm whether or not GPJST has a preventive effect on development of atopic dermatitis in dinitrochlorobenzene(DNCB)-applied Nc/Nga mouse. This study was undertaken to develop a reliable mouse model demonstrating similar immunologic phenomena as human atopic dermatitis characterized with predominance of type-2 immune response. NC/Nga mouse were sensitized with 200 $\mu\ell$ of 1% 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB) (acetone: olive oil = 3:1 mixture) and challenged twice or three times with 150 $\mu\ell$ of 0.2% DNCB in a week for the following 4 weeks. GPJST was administered orally to Nc/Nga mouse for 6 weeks, which led to the remarkable suppression on the development of dermatitis, as determined by various immune factors related to pathogenesis of atopic dermatitis in splenocytes and DLN cells.

In this study, GPJST selectively suppressed T ce11 (CD4+, CD3+CD69+, CD4+CD25+) activation, which may be essential for ratio of IL-4 versus INF- γ produced in the splenic T cell culture supernatants was approximately 3-fold higher in the mouse treated with DNCB than their control mouse respectively. Immunologic studies showed down-regulated that the capacity of spleen T cells to produce IL-4, but IFN- γ was up-regulated by means of oral intake of these GPJST.

These results strongly suggest that GPJST is a promising candidate for treatment of human atopic dermatitis.

Key words: DNCB, atopic dermatitis, NC/Nga mouse, 驅風除濕湯, splenocytes, DNL cells

I. 서 론

아토피피부염은 천식, 식품 알레르기, 알레르기 비염 등과 같은 다른 알레르기 질환보다 먼저 발 생하면서 주위에서 흔히 볼 수 있는 만성 염증성 피부 질환이다^{1,2)}. 영유아기에 흔히 발생하는 이 질환은 최근 전 세계적으로 유병률이 증가하면서

^{*} 대전대학교 한의과대학 한방소아학교실

[·] 교신저자 : 김윤희 · E-mail : unia67@dju.ac.kr

[·] 채택일 : 2007년 12월 1일

이에 대한 관심도 증가하고 있으며, 전 세계적으로 10^{-20} %에서 발생하고 있는데³⁾, 대한소아알레르기 호흡기학회에서 1995년과 2000년도에시행한 전국역학조사에서 우리나라 유병률도 15.5%에서 17%로 증가하고 있는 추세로 나타났다⁴⁾.

아토피피부염의 정확한 병인은 알려져 있지 않지만, IgE의 증가와 T세포의 기능장애와 같은 면역학적 기능 이상과 함께 유전적, 환경적 요인이중요한 역할을 하는 것으로 추측되고 있고, 증상의 발현과 악화에 알레르겐이 관여한다고 보고되고 있다⁵⁻⁷⁾.

아토피피부염의 한의학적 발생원인은 주로 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고 淸熱, 解毒, 除濕, 祛風, 養血 등의 治法을 주로 사용하고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 驅風除濕湯은 淸熱, 解毒, 祛風, 除濕의 효능을 지닌 약물 위주로 구성된 處方으로, 임상에서 아토피피부염에 多用되어 우수한 효과를 발휘하고 있는 經驗方이다.

이에 저자는 驅風除濕湯이 아토피 피부염 발진 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 DNCB로 유도된 NC/Nga atopic dermatitis model mouse (이하 NC/Nga mouse)를 이용한 in vivo 실험에서 비장의 무게, 그리고 비장과 Draining lymph node (DLN)에서 CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD3+/CD69+, CD4+/CD25+ 등의 발현 총 세포수를 측정하였다. 또한 비장세포를 anti-CD3/CD28로 자극한 배양 상측액에서 IL-4와 IFN-y의 생산량을 측정한 결과, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실 험

1. 재료

1) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 2,4-dinitrochloroben-zene(DNCB), Diethyl

pvrocarbonate (DEPC). 3-4,5-dimethylthiazol-2,5-carboxymethoxyp henyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolim (MTS), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS). antibody biotin-conjugated, antibody avidin-HRP conjugeted. TMB. EtOH, magnesium chloride(MgCl2)등은 Sigma 사 (Washington D.C., USA) 제품을, Tag polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa 사 (Japan) 제 품을, CsA(cyclosporin A)는 중외제약 (Korea) 제품을, 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS) 은 Hyclone 사 (Logan, USA) 제품을, PE (phycoerythrin)-anti-CD3, FITC(fluorescein isothiocyanate)-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8. PE-anti-CD25. FITC-anti-CD-69, PE-anti-CD49b, anti-CD28, anti-CD3은 BD-Pharmingen사 (California, USA) 제품을, 인간 재조합 IL-4, TNF-a는 R & D system사 (Minneapolis, USA) 제품을. RNase inhibitor. Luciferase assay kit는 Promega 사 (Madison, USA) 제품 읔. LipofectamineTM2000 Reagent는 Invitrogen 사 (Carlsbad, USA) 제품을 사용하 였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였 다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), microwave oven (LG, Korea), rotary vaccum evaporator, vaccum pump (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO2 incubator (Forma scientific Co., USA.), clean bench, water bath, vortex mixer, heating block, ice-maker (Vision scientific Co., Korea), autoclave, deep-freezer (Sanyo Co., Japan), micro-pipet (Gilson Co., France), plate (Lab-Line Co., USA), shaker spectrophotometer (Shimazue, Co., Japan), centrifuge (한일. Korea), plate shaker

(Lab-Line, USA), ELISA reader (Molecular Devices Co., USA), ELISA kit (Biosource, USA) kit, flow cytometer (Becton Dickinson, USA) 등을 사용하였다.

2) 동물

6주령이 된 Nc/Nga mouse는 Charles River 사 (Yokohama, Japan)에서 공급받았다. 동물은 실험당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12 시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물

본 실험에 사용한 驅風除濕湯의 구성 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입 정선하여 사 용하였고, 그 내용과 분량은 다음과 같다.

Scheme 1. The prescription of Gupoongjeseup-tang(GPJST)

生 藥 名	用量(g)
Taraxaci Herba	30
Sophorae Radix	15
Kochiae Fructus	15
Phellodendri Cortex	10
Saposhnikoviae Radix	10
Lonicerae Flos	10
Pogostemonis Herba	10
Pinelliae Tuber	10
Coicis Semen	10
Hoelen	10
Cicadidae Periostracum	6
Menthae Herba	3
	139
	Taraxaci Herba Sophorae Radix Kochiae Fructus Phellodendri Cortex Saposhnikoviae Radix Lonicerae Flos Pogostemonis Herba Pinelliae Tuber Coicis Semen Hoelen Cicadidae Periostracum

4) 시료 추출

驅風除濕湯 4첩 분량에 증류수 2,000 ㎡를 가하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치(rotary vaccum evaporator)로 농축한 후, 이를 다시 동결 건조기(Freeze dryer)를 이용하여 완전 건조한 驅風除濕湯 추출물 (이하 GPJST) 34.5 g 을

냉동 보관 (-80°C) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 피부염 유도 및 시료 처리

6주령이 된 Nc/Nga mouse의 등 부위를 깨끗하게 제모하고, 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치한 후 1% DNCB용액 (aceton : olive oil = 3:1) 200 μ 를 등 부위에 도포하였다(immunization). 4 일 후, 1 주일에 2^{\sim} 3번씩 0.2% DNCB용액 150 μ 를 등 부위에 도포하였다(induction). 4주 처리한 다음 이 부위에 피부염이 충분히 유발되어 긁는 행동이 심화되면 DNCB 처리를 중단한다.

2) 약물처리 및 치료평가

DNCB용액 도포를 종료하기 직전에 GPJST를 7.1 mg/25 g mouse/day의 농도로 6 주간 경구투여 하였고, CsA (10 mg/kg)는 주 3 회 복강주사 하였다. 정상군은 무처리, 대조군은 증류수를 0.2 ml 씩 경구투여 하였고 각 실험군은 4 마리씩 배정하였다.

3) 비장(spleen), 럼프절(draining lymph node, DLN)의 총세포수 측정

약물처리 종료 후, 실험동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 spleen, DLN을 분리하여 spleen은 무게를 재고, spleen, DLN의 총 면역세포수를 측정하였다.

4) Spleen, DLN에서 형광 유세포 분석

실험 종료 후 NC/Nga mouse에서 spleen, DLN을 각각 적출하고 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5 분간 원심분리 (1,700 rpm)하여 2회 세척한 후, cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 이들 세포들을 ACK 용액 (8.3 g NH4Cl, 1 g KHCO3, in 1 L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5 분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고

다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trvpan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 측정한 spleen, DLN 침윤세포를 5×105 세포로 조정한 면역 4℃에서 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 PE-anti-CD3. FITC-anti-CD19. FITC-anti-CD4. FITC-anti-CD8. PE-anti-CD-25, FITC-anti-CD69를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3 회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD3+CD69+, CD4+CD25+ 세포수를 백분율(%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수(absolute number)를 산 출하였다.

5) Th1 and Th2 cytokine of ELISA Analysis

실험 종료 후 비장세포 (1 \times 105/well)는 anti-CD28 (1 μ g/m ℓ)과 anti-CD3 (1 μ g/m ℓ)로 96-well coating된 plate에서 48 시간 동안 동시 배양하였다. 그리고 IL-4, IFN- χ 는 ELISA kit를 가지고 측정하였다. 각 well에 NC/Nga mouse의 비장세포 배양 상층액 100 μ \ell씩 분주하고, 1 시간 동안 실온에 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated

를 넣고 30 분간 방치하였다. 다시 2회 수세후 PBS로 세척한 다음 antibody avidin-HRP conjugeted $100~\mu$ 를 처리하고 1~시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 $100~\mu$ 씩 분주하고 암소에서 30~분간 방치한 후 $100~\mu$ 의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450~nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석법을 이용하여 결정하였다.

Ⅲ. 성 적

1. 비장세포 무게에 미치는 영향

정상군은 0.10 ± 0.01, 대조군은 0.18 ± 0.02, CsA 투여군은 0.14 ± 0.02, GPJST 투여군은 0.18 ± 0.03 (g)으로 나타나 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

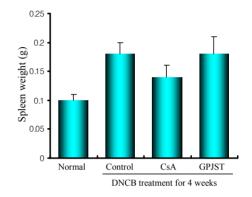


Fig. 1. Effect of GPJST extract on spleen weight in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 6 weeks. At the end of

the experiment, the spleen weight was measured. Each point represents the mean \pm SE. of four mouse.

Normal: not treated group

Control: oral administration of normal saline.

CsA: abdominal injection of cyclosporin A (10 mg/kg three times a week)

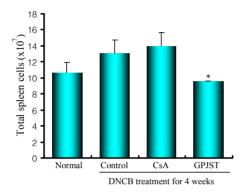
GPJST: oral administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day for 6 weeks)

2. 총 면역세포 수에 미치는 영향

Spleen에서 정상군은 10.65 ± 1.29, 대조군은 13.08 ± 1.62, CsA 투여군은 14.03 ± 1.64, GPJST 투여군은 9.6 ± 0.02 (×107)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성(p<0.05) 있는 감소를 나타내었고, DLN에서는 정상군은 3.3 ± 1.60, 대

조

군은 15.0 ± 1.23, CsA는 6.15 ± 0.15 (p<0.001), GPJST 투여군은 7.2 ± 0.30 (×106) (p<0.01)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 2).



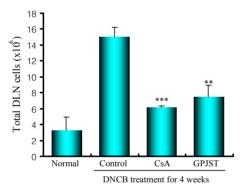


Fig. 2. Effect of GPJST extract on total cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 6 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen ($\times107$) and DLN ($\times106$) were removed and total cell absolute number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared with control mouse group data by T test (*p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001).

Normal: not treated group

Control: oral administration of normal

saline.

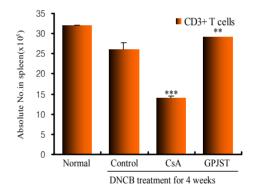
CsA: abdominal injection of cyclosporin A (10 mg/kg three times a week)

GPJST: oral administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day for 6 weeks)

3. Spleen 및 DLN내 면역세포 수에 미치 는 영향

1) CD3+ 세포 수에 미치는 영향

Spleen에서는 정상군이 32.0 ± 0.1, 대조군이 26.0 ± 1.7, CsA 투여군이 14.1 ± 0.4 (p<0.001), GPJST 투여군이 31.4 ± 1.4 (×105) (p<0.01)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, DLN에서는 정상군은 21.6 ± 14.4, 대조군은 59.4 ± 5.4, CsA 투여군은 31.6 ± 1.1, GPJST 투여군은 42.1 ± 3.2 (×104)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (p<0.01)있게 감소하였다(Fig. 3).



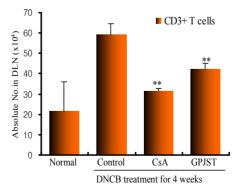


Fig. 3. Effect of GPJST extract on CD3+

absolute cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 6 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen ($\times 105$) and DLN ($\times 104$) were removed and CD3+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared with control mouse group data by T test (**p<0.01 ***p<0.001).

Normal: not treated group

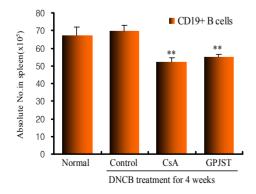
Control: oral administration of normal saline.

CsA: abdominal injection of cyclosporin A (10 mg/kg three times a week)

GPJST: oral administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day for 6 weeks)

2) CD19+ 세포 수에 미치는 영향

Spleen에서의 정상군은 67.5 ± 3.5, 대조군은 69.5 ± 3.4, CsA 투여군은 52.2 ± 2.6 (p<0.01), GPJST 투여군에서는 57.5 ± 0.1 (×105) (p<0.01)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, DLN에서의 정상군은 10.4 ± 3.1, 대조군은 84.8 ± 4.0, CsA투여군은 27.6 ± 2.0 (p<0.001), GPJST 투여군은 26.1 ± 0.8 (×104) (p<0.001)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 4).



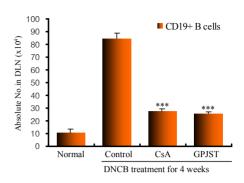


Fig. 4. Effect of GPJST extract on CD19+ absolute cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 6 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen ($\times 105$) and DLN ($\times 104$) were removed and CD19+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared with control mouse group data by T test **p<0.01 ***p<0.001).

Normal: not treated group

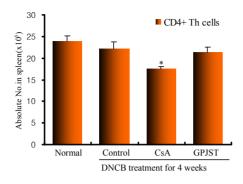
Control: oral administration of normal saline.

CsA: abdominal injection of cyclosporin A (10 mg/kg three times a week)

GPJST: oral administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day for 6 weeks)

3) CD4+ 세포 수에 미치는 영향

Spleen내 정상군은 23.9 ± 1.3, 대조군은 22.2 ± 1.5, CsA 투여군은 17.6 ± 0.4 (p<0.05), GPJST 투여군은 21.3 ± 1.2 (×105) 로 감소하였으나 유의성은 없었으며, DLN에서는 정상군은 16.7 ± 5.7, 대조군은 47.0 ± 4.8, CsA 투여군은 24.4 ± 0.4 (p<0.01), GPJST 투여군은 34.2 ± 1.5 (×104) (p<0.001)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 5).



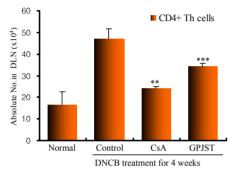


Fig. 5. Effect of GPJST extract on CD4+ absolute cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 6 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen ($\times105$) and DLN ($\times104$) were removed and CD4+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared with control mouse group data by T test (*p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001).

Normal: not treated group

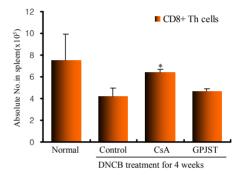
Control: oral administration of normal saline.

CsA: abdominal injection of cyclosporin A (10 mg/kg three times a week)

GPJST: oral administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day for 6 weeks)

4) CD8+ 세포 수에 미치는 영향

Spleen에서의 정상군은 7.5 ± 3.6, 대조군은 4.2 ± 0.8, CsA 투여군은 6.4 ± 0.3 (p<0.01), GPJST 투여군에서는 4.7 ± 0.2 (×105)로 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었으며, DLN에서는 정상군은 5.1 ± 3.6, 대조군은 17.9 ± 2.1, CsA 투여군은 8.5 ± 0.6 (p<0.01), GPJST 투여군에서는 10.0 ± 0.2 (×104) (p<0.001)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 6).



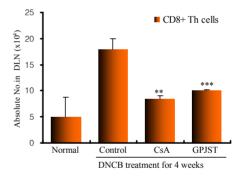


Fig. 6. Effect of GPJST extract on CD8+ absolute cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 6 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen ($\times 105$) and DLN ($\times 104$) were removed and CD8+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared

with control mouse group data by T test (*p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001).

Normal: not treated group

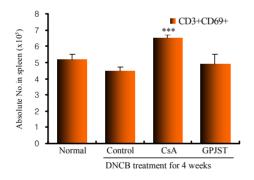
Control: oral administration of normal saline.

CsA: abdominal injection of cyclosporin A (10 mg/kg three times a week)

GPJST: oral administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day for 6 weeks)

5) CD3+CD69+ 세포 수에 미치는 영향

Spleen내 정상군은 5.2 ± 0.3, 대조군은 4.5 ± 0.2, CsA 투여군은 6.5 ± 0.2 (p<0.001), GPJST 투여군은 4.9 ± 0.6 (×105)로 나타나 유의한 변화가 없었고, DLN에서는 정상군은 4.6 ± 0.1, 대조군은 14.0 ± 0.9, CsA 투여군은 7.2 ± 1.2, GPJST 투여군은 7.1 ± 0.7 (×104)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성(p<0.01) 있게 감소하였다(Fig. 7).



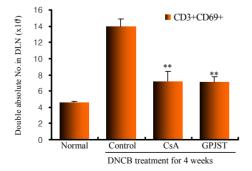


Fig. 7. Effect of GPJST extract on CD3+CD69+ absolute cell number of spleen

and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse model followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 6 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen ($\times105$) and DLN ($\times104$) were removed and CD3+CD69+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared with control mouse group data by T test (**p<0.01 ***p<0.001).

Normal: not treated group

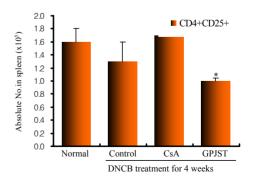
Control: oral administration of normal saline.

CsA: abdominal injection of cyclosporin A (10 mg/kg three times a week)

GPJST: oral administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day for 6 weeks)

6) CD4+CD25+ 세포 수에 미치는 영향

Spleen에서 정상군은 1.6 ± 0.21, 대조군은 1.3 ± 0.3, CsA 투여군은 1.7 ± 0.1, GPJST 투여군은 1.0 ± 0.05 (×105)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성(p<0.05) 있는 감소를 나타내었고, DLN에서는 정상군은 1.7 ± 0.2 (×104), 대조군은 5.0 ± 0.5 (×104), CsA 투여군은 2.4 ± 0.01 (×104) (p<0.01), GPJST 투여군에서는 1.9 ± 0.3 (×104) (p<0.001)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 8).



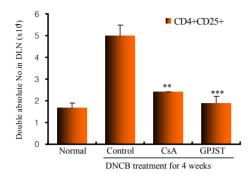


Fig. 8. Effect of GPJST extract on CD4+CD25+ absolute cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 6 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen ($\times 105$) and DLN ($\times 104$) were removed and CD4+CD25+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared with control mouse group data by T test (*p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001).

Normal: not treated group

Control: oral administration of normal saline.

CsA: abdominal injection of cyclosporin A (10 mg/kg three times a week)

GPJST: oral administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day for 6 weeks)

4. 비장세포 부유액내 IL-4, IFN-y 생성 량에 미치는 영향

1) IL-4 생성량에 미치는 영향

정상군은 351.7 ± 18.1, 대조군은 1042.5 ± 15.5, CsA 투여군은 904.3 ± 2.7, GPJST 투여군은 909.3 ± 5.6 (pg/mℓ)로, 대조군에 비하여유의성(p<0.001) 있게 감소하였다(Fig. 9).

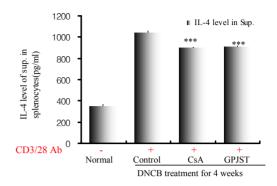


Fig. 9. Effects of GPJST on IL-4 production in the culture supernatant of CD3/CD28-stimulated splenocytes.

Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IL-4 were in the culture supernatant (Sup.) determined using commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with control by T test (***p<0.001).

Normal: not treated group

Control : oral administration of normal saline.

CsA: abdominal injection of cyclosporin A (10 mg/kg three times a week)

GPJST: oral administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day for 6 weeks)

2) IFN-y 생성량에 미치는 영향

정상군은 170.9 ± 23.0, 대조군은 326.1 ± 8.9, CsA 투여군은 294.0 ± 2.2 (P<0.01), GPJST 투여군은 596.5 ± 1.7 (pg/ml) (P<0.001)로 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 10).

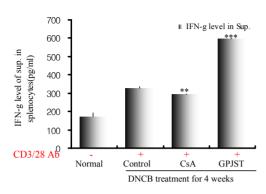


Fig. 10. Effects of GPJST on IFN-y production in the culture supernatant of CD3/CD28-stimulated splenocytes.

Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IFN-y were in the culture supernatant determined using commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01,***p<0.001).

Normal: not treated group

Control: oral administration of normal saline.

CsA: abdominal injection of cyclosporin A (10 mg/kg three times a week)

GPJST: oral administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day for 6 weeks)

IV. 고 찰

사회가 발달함에 따라 예전과는 다른 양상의 질환이 증가되고 있는데 그 중 대표적인 질환이 알레르기 질환으로 우리나라에서도 최근 알레르기 질환의 급증과 함께 아토피 피부염 환자가 증가하고 있다^{11,12)}.

아토피피부염은 유, 소아기에 높은 발생빈도를 보이는 질환으로, 환아는 소양감으로 인해 잦은 피부손상과 같은 신체적 문제를 경험할 뿐 아니라 수면장애로 인하여 짜증이 심하거나 집중력이 떨어지고 항상 피곤하여 학습, 놀이, 운동 등의 활동에도 제한을 받는다. 또한 다양한 이유로 사회 심리적 문제를 경험하고 또래관계나 가족활동에도 영향을 주어 삶의 질이 저하될 수 있다 13-16). 국내 연구에서도 아토피피부염을 앓고 있는 대부분의 환아가 개인의 삶 그리고 가정경제에 영향을 미치고 아토피피부염이 심할수록 그영향도 크다는 것을 확인할 수 있었다¹⁷⁾. 따라서적극적인 치료와 증상의 관리를 통한 피부염의 진행과정을 조절하는 장기간의 전략이 필요하다.

아토피피부염의 치료방법으로는 전신 및 국소 치료법으로 항히스타민제, 부신피질호르몬제, 항 균제, 탈감작 요법, 광선요법, 면역요법 등이 시행되고 있지만 일부 환자에서는 반응하지 않는 경우도 많고, 다양한 부작용이 발생하기도 하고, 증상이 완화된다고 하더라도 지속적으로 재발하기도 한다고 하였다. 따라서 새로운 아토피피부염 치료제의 개발이 절실히 필요한 실정이며, 치료제의 개발과 관련된 재료로 최근에는 부작용이적은 한약제 등 천연물이 되어 지고 있다¹⁸⁻²⁰⁾.

아토피 피부염의 한의학적 범주는 『素問·玉機 眞藏論篇』²¹⁾에서 "浸淫"이라고 기록된 이후로,『 金匱要略』²²⁾에서부터는 "浸淫瘡"이라 기록되어 있고, 『諸病源候論』²³⁾에 이르러 "乳癬"이란 기 록이 있으며,『外科正宗』²⁴⁾에서 "奶癬"이란 病名 이 처음 사용되었다. 이 외에 胎熱症, 胎癬, 胎斂 瘡, 濕疹, 四彎風, 旋耳瘡, 臍瘡 등의 病名이 혼 용되고 있다²⁵⁾.

아토피피부염의 한의학적 발생원인은 주로 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고, 급성기와 만성기로 나누어 급성기는 風濕偏盛型, 熱重于濕型, 濕重于熱型으로, 만성기는 脾虛濕熱內蘊型, 陰傷血燥 濕變型으로 파악된다. 따라서 치료는 주로 淸熱, 解毒, 除濕, 祛風, 健脾, 養血 등의 治法을 사용하고 있다^{8-10,25)}.

驅風除濕湯은 대표적인 淸熱解毒 藥物인 蒲公 英과 金銀花, 淸熱燥濕의 효능이 뛰어난 黃柏, 苦蔘, 發散解表시키는 防風, 蟬蛻, 薄荷, 除濕, 利水, 祛痰시키는 藿香, 薏苡仁, 茯苓, 半夏²⁶⁾로 구성된 經驗方으로, 임상에서 熱毒, 濕熱 등의 원인으로 발생하는 피부염에 사용된다. 이에 임상에서 아토피 피부염 환자들에게 多用되고 있으며 임상 상 효과를 보이고 있는 약물로 구성된 驅風除濕湯이 아토피 피부염에 실험적으로도 효과가 있을 것으로 보여 NC/Nga mouse에서 비장 및 DLN내 면역관련 인자에 미치는 영향을 알아보고자 본 실험에 임하게 되었다.

본 실험에서는 dinitrochlorobenzen(DNCB)를 이용하여 NC/Nga mouse에서 atopic dermatitis을 유도하였는데, DNCB는 aceton이나 alcohol과 같은 기체 (carrier solution)에 녹여 피부에 바르면 국소적 면역반응을 유도하는 것으로 알려진 피부 증감제(skin sensitizer)이다²⁷⁻²⁹⁾. 피부에 접촉한 후 수 분 뒤 DNCB는 피부에 스며들어 hapten을 형성하고, epidermal langerhans cells은 DNCB hapten을 CD4+ T cells에 제시하여 면역반응이 활성화된다^{30,31)}. 이런 까닭에 DNCB는 dendritic cell의 면역조절제로 치료가능성이 제기되기도 하였으며, 또한 피부의 viral infection에 대한 치료, 원형탈모증과 같은 자가면역질환의 치료, 사마귀의 치료 등에 응용되기도 하였다^{28,29)}.

연구에서 사용한 NC/Nga mouse는 자발적 아 토피성 피부염 유발 모델로 잘 알려져 있으며32) 최근엔 IgE와 Th2 cytokine 생성에 필수적인 stat6 knockout NC/Nga mouse를 만들어 시험 한 결과, 피부염이 여전히 자발적으로 유도되어 흔히 예상한 기전이외에 다른 기전으로 피부염이 유도되는 것으로 예상되고 있다. 이러한 장점에 도 불구하고 자발적인 피부염 유도비율이 낮고, 유도된 피부염의 severity에도 차이가 심해 평가 를 위해 신뢰할만한 모델 수준은 되지 못하고 있 는 것이 사실이다. 이에 일본에서는 hapten 형성 물질인 picryl chloride(1-chloro 2,4,6-trinitro benzene)을 이용하여 피부염을 인위적으로 유도 하여 이러한 문제를 해결하고 있다³³⁾. 그러나 picryl chloride의 경우 국내 반입이 금지되어 이 용할 수 없음에 여기에선 구조적으로 picryl chloride와 유사하여 같은 기전으로 작용하는 DNCB(2,4-dinitrochlorobenzene)을 이용하여 시험을 진행하여 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 이 모델에 의하면 아토피성 피부염의 주된 증상들 (가려움, IgE증가, 피부염증)을 모두 관찰할 수 있 었고, 더 나아가 아토피성 피부염의 치료제로 잘 알려진 국소 스테로이드나 경구용 cyclosporin 의 해 증상이 완전히 치유되는 현상을 관찰할 수 있 었다.

DNCB로 유도된 NC/Ng mouse에서 비장무게를 측정한 결과, 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았고(Fig. 1), 총 면역 세포수는 Spleen (p<0.05)과 DLN(p<0.01)에서 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 2).

아토피피부염에서의 주된 면역학적 변화는 IgE 의 증가와 T세포의 기능장애이다^{6,7)}. 특히 type-2 helper T cell 활성도의 type-1 helper T cell에 대한 상대적 우세에 따른 type-2 response 편향화가 특징적인 아토피성 피부염 면역병리현상으로 알려져 있다³⁴.

CD4+ 세포는 Th1과 Th2의 분화를 활성화하고 여러 종류의 cytokine을 생산하여 B cell이 효율적으로 항체를 생산하도록 도와주며, CD3+는 T cell의 특이표면 단백질로 T cell의 항원인식에서 세포내로 활성화 신호를 전달하는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다³⁵⁾.

GPJST에 의한 T 세포군의 변화를 측정한 결과, CD3+ 세포 수는 Spleen에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.01) 있게 증가하였고, DLN에서는 대조군에 비하여 유의성(p<0.01) 있게 감소하였고(Fig. 3), CD4+와 CD8+ 세포 수는 모두 Spleen에서 대조군에 감소하였으나 유의성은 없었으며, DLN에서는 유의성(p<0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 5, 6).

CD3+CD69+ 세포 수는 Spleen에서 유의한 변화가 없었고, DLN에서는 대조군에 비하여 유의성 (p<0.01) 있게 감소하였고(Fig. 7), CD4+CD25+ 세포 수는 Spleen (p<0.05) 과 DLN (p<0.001) 에서 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 8).

B cell에 특이적으로 존재하는 CD19+ 세포 수를 측정한 결과, Spleen (p<0.01) 과 DLN (p<0.001) 에서 모두 대조군에 비하여 유의성 있 게 감소하였다(Fig. 4).

이러한 결과는 GPJST이 피부염의 발생에 관련된 T cell의 항원인식과 세포 내로의 활성화 신호를 억제하여 피부염 발생을 효과적으로 억제할뿐 아니라, 체액성 면역반응에 관여하는 항체 생산 분비를 억제함으로써 아토피피부염을 유발을지연시킬 수 있음을 보여주고 있다.

전반적으로 Spleen과 DLN에서의 면역세포수를 분석한 결과, 대조군에 비하여 GPJST 처리군이 DLN에서 현저하게 감소를 관찰할 수 있었고, 비장에서는 대조군과의 차이가 크지 않은 것으로나타났다.

아토피성 피부염의 진행과 관련하여 나타나는 면역학적 특성의 하나는 혈중 IgE 항체의 수준이 유의하게 상승하고 IL-4의 발현 수준은 상승하는 반면 IFN-y 발현은 저하된다는 점이다³⁶⁾. IL-4는 IFN-y의 생성과 Th1세포로의 분화를 억제하며, B세포에서 IgE의 생성과 Th2 세포로의 분화를 촉진한다³⁷⁾.

본 연구에서 비장세포를 anti-CD3/CD28로 자극 후 배양 상충액을 lymphokine assay한 결과, IL-4 생산량은 정상군에 비하여 대조군이 3배정도 상승하였고, CsA와 GPJST 투여군에서 유의성(p<0.001) 있는 감소를 나타내었고(Fig. 9), IFN-y의 생산량은 정상군 대조군, CsA군에서큰 차이가 없었으나 GPJST 투여군에서 2배정도 증가하여 유의성(p<0.001) 있는 변화를 나타내었다(Fig. 10). 이는 GPJST에 의해 활성화된 Th2세포가 억제되어 IL-4의 양이 감소되는 반면, IFN-y의 생산량을 증가시켜 IL-4의 과잉생산을 억제한 것으로 GPJST이 Th1/Th2세포로의 shift 기능이 있는 것으로 생각된다.

결론적으로 NC/Nga mouse에 DNCB를 피부도포하여 전반적인 면역반응을 type-2 response로 유도한 모형을 제시하여 驅風除濕 湯의 투여가 아토피피부염 억제에 미치는 영향을 알아본 결과, 임상에서 유효하게 활용할 수 있을 것으로 판단되며 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

아토피 질환 환자에 사용되는 GPJST의 영향을 실험적으로 규명한 결과 다음과 같은 결론을 얻 었다.

- 1. GPJST는 비장세포 무게에는 별다른 영향을 주지 않았다.
- 2. GPJST는 비장과 DLN의 총세포수를 대조군 에 비하여 감소시켰다.
- 3. GPJST는 비장과 DLN에서 CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD3+ CD69+, CD4+ CD25+의 총세포수를 대조군에 비하여 억제시켰다.
- 4. GPJST는 IFN-y 분비량은 증가시키고 IL-4 분비량은 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과로 미루어 보아 GPJST은 아토피피 부염의 치료에 유효하게 활용할 수 있을 것으로 판단되며, 향후 실험적 보완과 임상연구가 지속 적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Boguniewicz M, Leung DY : Atopic dermatitis, J Allergy Clin Immunol. 2006;117:S475-480.
- Oranje AP, de Waard-van der Spek, Flora B: Atopic dermatitis: review 2000 to January 2001, Curr Opin Pediatr. 2002;14:410-413.
- 3. Leung DY, Bieber T: Atopic dermatitis, Lancet, 2003;361:151-160.
- 4. 오재원, 김규원, 편복양 외 18명: 1995년과 2000년의 학동기와 2003년 학동전기소아에서의 아토피피부염의 역학적 변화에

- 관한 전국적인 연구, 소아알레르기 및 호흡기. 2003;13(4):227-237.
- 5. Halbert AR, Weston WL, Moreli JG:
 Atopic dermatitis: is it an allergic disease?, J Am Acad Dermatol. 1995;33:1008-1018.
- Leung DYM : Pathogenesis of atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 1999;104:99-108.
- Mosmann TR, Coffman RI: Th1 and Th2 ells; Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol. 1989;7:145-73.
- 8. 馬紹堯: 現代中醫皮膚性病學, 上海, 上海中醫藥大學出版社, 2001, pp. 153-160.
- 9. 金起鳳, 周德瑛 主編: 中醫皮膚病學, 北京, 中國醫藥科技出版社, 1999, pp. 193-198.
- 10. 馬紹堯, 趙尚華 主編: 現代中醫皮膚性病 診療大全, 山西, 山西科學技術出版社, 1999, pp. 475-493.
- 11. 丁奎萬 : Allergy와 韓方, 서울, 第一路, 1990, pp. 101-108
- 12. 장호선 : 아토피 피부염의 진단과 치료, 가정의학회지. 2002;23:831-838.
- Lewis-Jones MS, Finlay AY: The Children's Dermatology Life Quality Index(CDLQI): initial validation and practical use, Br J Dermatol. 1995;132:942-949.
- Howlett S: Emotional dysfunction child-family relationships and childhood atopic dermatitis, Br J Dermatol. 1999;140:381-384.
- 15. Chung JS, Kim GH, Hong KE: A study on comorbid psychopathology and parenting attitude in children and adolescents with atopic dermatitis, J Korean Child Adolescent Psychiatry. 1999;10:34-42.

- Absolon CM, Cottrell D, Eldrige SM, Glover MT: Psychological disturbance in atopic eczema: the extent of the problem in school aged children, Br J Dermatol, 1997;137:241-245.
- 17. 박창근, 박천옥, 이철헌 : 유, 소아기 아토 피피부염이 환아의 삶의 질과 가족에 미치는 영향, 대한피부과학회지. 2007;45(5):429-438.
- 18. 강형재 외 : 피부과학, 서울, 대한 피부과 학회 교과서 편찬위원회, 1994, pp. 21-25. 133-138.
- 19. 대한피부과학회 : 피부과학, 서울, 여문각, 1994, pp. 133-138.
- 20. 이지현 외 10인: 아토피피부염학회 보고 서: 한국 아토피피부염의 치료지침, 대한피 부과학회지, 2006;44(8):907-913.
- 21. 洪元植 編著 : 精校黃帝內經素問, 東洋醫 學研究院 出版部, 1985, pp. 72-80, 246-248.
- 22. 宋書功 主編: 金匱要略 廣州校詮, 人民衛 生出版社, 1994, pp. 221-225.
- 23. 巢元方 編著: 巢氏諸病源候論, 서울, 대성 문화사, 1992, pp. 251-253.
- 24. 陳實功: 外科正宗, 人民衛生出版社, 1983, p. 269.
- 25. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연 : 아토피 피부염의 동, 서의학적 문헌고찰, 대한안이 비 인 후 피 부 과 학 학 회 지 , 2002;15(1):226-252.
- 26. 전국한의과대학 本草學教室 共編著: 本草學, 서울, 도서출판 永林社, 2000, pp.131-132, 142-144, 155-156, 182-183, 185-186, 198-199, 201-202, 292-294, 302-304, 306-308, 321-322, 448-449.
- 27. Robert H Lim, Mohamed S Arredouani, Alexey Fedulov, Lester Kobzik, Cedric Hubeau, Maternal allergic atopic dermatitis causes increased asthma risk

- in offspring. Respir Res. 2007;8(1):56.
- 28. Stricker RB, Elswood BF, Abrams DI:
 Dendritic cells and dinitrochlorobenzene
 : a new treatment apptoach to AIDS,
 Immunol Lett. 1991;29(3):191-196.
- Hill S, Edwards AJ, Kimber I, Knight SC, Systemic migration of dendritic cells during atopic sensitization, Immunology. 1990;71:277-281.
- 30. Gawkrodger DJ, Haftek M, Botham PA, Carr MM, Spencer MJ, Ross JA, Hunter JA, Thivolet J: The hapten in atopic hypersensitivity to dinitrochlorobenzene: immuno-electron microscopic and immunoflurescent studies, Dermatologica. 1989;178(3):126-130.
- 31. Bang D, Nakagawa S, Oka D, Taikei Y, Jinno Y, Ueki H: The distribution of 2,4-dinitrophenyl groups on Thy-1 positive cells in the epidermis of mouse following skin painting with 2,4-dinitrochlorobenzene, J Dermatol. 1988;15(1):27-31.
- 32. Konji Matsushima et al.: The NC/Nga mouse: a model for atopic dermatitis. Molecular medicine today. 2000;6: 209-210.
- 33. Masahiro Matsumoto et al.: IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus Kinase 3 in NC/Nga mouse, a mouse model for Human Atopic Dermatitis. Journal of Immunology. 1999;162:1056-63.
- 34. Groisser DS, Griffiths CEM, Ellis CN et al.: A review and update of the clinical uses of cyclosporine in dermatology. Dermatol Clin. 1992;9: 805-807.
- 35. Hoglund P: Induced peripheral regulatory T cells: the family grows larger, Eur J Immunol. 2006;36:264-266.

- 36. Boguniewicz M, Beltrani, VS: Atopic dermatitis and contact dermatitis in Manual of Allergy and Immunology, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilins, 2002, pp. 165–186.
- 37. Vercelli D, Jabara HH, Lauener RP, geha RS: IL-4 inhibits the synthesis of IFN-y and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures, J Immunol. 1990;144:570-5736.