

驅風除濕湯이 DNCB로 유도된 NC/Nga mice의 아토피 피부염에 미치는 영향

윤재은 · 김윤희 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

Effect of Gupoongjeseuptang (GPJST) on DNCB (dinitrochlorobenzene)-induced Atopic Dermatitis-like Model NC/Nga Mice

Yoon Jae Eun, Kim Yun Hee, Han Jae Kyung, Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Objectives

The purpose of this study is to investigate the effect of Gupoongjeseuptang (GPJST) on atopic dermatitis by in vivo experiment using NC/Nga atopic dermatitis mouse, which has histological and clinical similarities to the atopic dermatitis of human.

Methods

To investigate the effect of GPJST on atopic dermatitis, we evaluated atopic dermatitis-like skin lesions by clinical skin index and analyzed immunological parameters in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), splenocytes, draining lymph node (DLN) and performed skin histology in ears and dorsal skin of atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse in vivo.

Results

In vivo, clinical skin severity score were significantly lower in GPJST group than control group. IgE, IL-6, TNF- α , IgG1, IgM, IgG2a and IgG2b levels in serum decreased remarkably in GPJST group than control group. Also, total absolute number of CD3⁺CD69⁺, and CCR3⁺ cells recovered as normal in PBMCs and CD3⁺, CD3⁺CD69⁺ decreased significantly compared with control group in isolated DLN from NC/Nga mouse and total absolute number of CD11b⁺Gr-1⁺, CCR3⁺CD3⁺ in dorsal skin of NC/Nga mouse decreased by GPJST.

We analyzed ear and neck-back skin after biopsy and dyeing by hematoxyline/eosin (H&E) and toluidine staining (mast cells marker) and obtained results that GPJST are very effective to histological symptoms (dermal and epidermal thickening, hyperkeratosis and inflammatory cell (CD4, CCR3⁺) infiltration).

Conclusions

This study demonstrates immunological activity of GPJST on atopic dermatitis-like model mice.

Key words : atopic dermatitis, Gupoongjeseuptang, NC/Nga mouse

I. 緒 論

아토피 피부염은 주위에서 흔히 볼 수 있는 만성 염증성 피부 질환으로 대개 천식, 식품 알레르기, 알레르기 비염 등과 같은 다른 알레르기 질환보다 어린 연령에서 발생하는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 영유아기에 흔히 발생하는 이 질환은 최근 전 세계적으로 유병률이 증가하면서 이에 대한 관심도 증가하고 있으며, 전 세계적으로 10~20%에서 발생하고 있는데³⁾, 대한소아알레르기 호흡기학회에서 1995년과 2000년도에 시행한 전국역학조사에서 우리나라 유병률도 15.5%에서 17%로 증가하고 있는 추세로 나타났다⁴⁾.

아토피 피부염의 정확한 병인은 알려져 있지 않지만, IgE의 증가와 T세포의 기능장애와 같은 면역학적 기능 이상과 함께 유전적, 환경적 요인이 중요한 역할을 하는 것으로 추측되고 있고, 증상의 발현과 악화에 항원이 관여한다고 보고되고 있다⁵⁻⁷⁾. 최근 연구에서 밝혀진 바로는 T cell에서의 interleukin 4 (IL-4) 과잉 생산은 B cell의 IgE 과잉생산과 일치되고, T cell의 interferon gamma (INF- γ) 과잉 생산은 IgE를 억제하는 것으로 알려졌다. 이 두 물질 사이의 balance가 중요한데 아토피에서 이 균형이 깨지고, IL-4의 과잉생산은 IgE 과잉생산을 초래하게 된다^{8,9)}.

아토피 피부염은 한의학적으로 浸淫瘡, 乳癬, 奶癬, 胎熱, 胎癬, 胎斂瘡, 濕疹, 四彎風, 旋耳瘡, 臍瘡 등의 범주에 속하는데¹⁰⁻⁴⁾, 이들의 발생 원인은 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고 淸熱, 解毒, 除濕, 祛風, 養血 등의 治法을 주로 사용하고 있다¹⁵⁻⁷⁾. 驅風除濕湯은 淸熱, 解毒, 祛風, 除濕의 효능을 지닌 약물 위주로 구성된 處方으로, 임상에서 아토피 피부염에 多用되고 있는 經驗方이다.

이에 저자는 驅風除濕湯이 아토피 피부염 발진 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 dinitrochlorobenzene (DNCB)으로 아토피 피부염이

유발된 NC/Nga mice를 이용하여 clinical skin score 값, 혈중 IgE치, 그리고 IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b의 혈청 내 농도와 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), draining lymph node (DLN) 및 피부조직 세포의 형광 유세포 분석을 하였다. 그리고 hematoxyline/eosin (H&E) 염색과 toluidine blue 염색으로 驅風除濕湯이 피부조직에 미치는 영향과 면역조직화학염색으로 CD4⁺와 CCR3⁺ 등 면역세포 변화를 관찰하였다. 또한 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga mice의 dorsal skin tissue를 분리하여 驅風除濕湯의 알레르기 반응 억제체를 real-time PCR을 이용하여 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), diethyl pyrocarbonate (DEPC) 3-4, 5-dimethylthiazol-2, 5-carboxymethoxyphenyl-2, 4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), antibody biotin-conjugated, antibody Avidin-HRP conjugated, TMB, EtOH, magnesium chloride (MgCl₂) 등은 Sigma 사 (Washington DC, USA) 제품을, Taq polymerase, Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa 사 (Japan) 제품을, cyclosporin A (CsA)는 중위제약 (Seoul, Korea) 제품을, 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, USA) 제품을, PE-anti-CD3 ϵ , FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69의 RNase, rat anti-mouse CD4 mAb (RM4-5), PE-conjugated goat

anti-rat IgG는 BD-Pharmingen 사 (California, USA) 제품을, rat anti-mouse CCR3 mAb (53-6.7)는 Becton Dickinson 사 (California, USA) 제품을, Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST)는 Dako 사 (Glostrup, Denmark) 제품을, 인간 재조합 IL-4, IL-6, TNF- α , IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM은 R & D system 사 (Minneapolis, USA) 제품을, Lipofectamine™2000 Reagent는 Invitrogen 사 (Carlsbad, USA) 제품을, Luciferase assay kit와 RNase inhibitor는 Promega 사 (Madison, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), microwave oven (LG, Korea), rotary vacuum evaporator, vacuum pump (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), LSAB kit (ScyTek, USA), CO₂ incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench, water bath, vortex mixer, heating block, ice-maker (Vision scientific Co., Korea), probe-on plus slide (Fisher Scientific, USA), autoclave, deep-freezer (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), plate shaker (Lab-Line Co., USA), spectrophotometer (Shima-

zuе Co., Japan), centrifuge (한일, Korea), ELISA reader (Molecular Devices, USA), flow cytometry (Becton Dickinson, USA), 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA), contrast fluorescence microscope (Nikon, Japan) 등을 사용하였다.

2) 동물

NC/Nga mice 7 주령은 Charles River사 (Yokohama, Japan)에서 공급받았다. 동물은 실험당일 까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2 °C, 습도 55±15 %, 12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물

본 실험에 사용한 驅風除濕湯 (Gupoongjeseuptang, GPJST)의 구성 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량은 다음과 같다 (Table 1).

4) 시료 추출

驅風除濕湯 4 첵 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은

Table 1. The Composition of Gupoongjeseuptang(GPJST)

韓藥名	生藥名	用量(g)
蒲公英	<i>Taraxaci Herba</i>	30
苦 蓼	<i>Sopborae Radix</i>	15
地膚子	<i>Kochiae Fructus</i>	15
黃 柏	<i>Phellodendri Cortex</i>	10
防 風	<i>Saposhnikoviae Radix</i>	10
金銀花	<i>Lonicerae Flos</i>	10
藿 香	<i>Pogostemonis Herba</i>	10
半 夏	<i>Pinelliae Tuber</i>	10
薏苡仁	<i>Coicis Semen</i>	10
茯 苓	<i>Hoelen</i>	10
蟬 蛻	<i>Cicadidae Periostracum</i>	6
薄 荷	<i>Menthae Herba</i>	3
Total amount		139

액을 흡입 여과하여, 이를 감압 증류장치(Rotary evaporator)로 농축하였다. 농축액을 다시 동결 건조기(Freeze dryer)를 이용하여 완전 건조한 34.5 g을 냉동 보관 (-80 °C) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 피부염 유도 및 시료 처리

8 주령이 된 NC/Nga mice의 등 부위를 깨끗하게 세정한 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 그리고 1% DNCB 용액 (아세톤 : 올리브오일 = 3 : 1) 200 μ l를 등 부위에 도포하였고, 4일 후, 1 주일에 2-3 번씩 0.2% DNCB 용액 150 μ l를 등 부위에 4 주간 도포한 후, 피부염이 유발된 mice를 선별하여 실험에 사용하였다. 대조군에는 생리식염수를, 실험군에는 GPJST를 7.1 mg/25 g/day의 농도로 8 주간 경구 투여하였으며, 양성 대조군은 cyclosporin A (CsA, 20 mg/kg)를 주 3 회 복강에 주사 하였다.

2) Clinical skin index

NC/Nga mice의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하여 20 주에 실시하였다. 육안평가 항목은 Yamamoto의 평가항목¹⁸⁾을 참고하여 erythema/hemorrhage, dryness/scarring, edema, excoriation/erosion, lichenification 5 가지 항목으로 하고, 육안평가 결과는 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타낸다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였으며 최소 0 점에서, 최고 15 점사이의 점수를 측정하였다.

3) 채혈 및 IgE 측정

약물 투여 전 (8 주령)과 약물 투여 후 4 주 (12 주령), 8 주 (16 주령)에 각각 NC/Nga -mouse 눈에서 capillary 관을 이용하여 약 100 μ l의 혈액을 채혈한

후 원심분리기 6,500 rpm에서 20 분간 원심분리하여 30 μ l의 혈청을 분리하였으며 -70 °C에 냉동 보관하였다. 실험 종료 후 NC/Nga mice의 혈청 내 IgE 농도는 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)로 측정하였다. 각 well에 NC/Nga mice 8 주, 12 주, 16 주령에서 채혈한 혈청 5 μ l (1/10 dilution)와 dilution buffer 45 μ l를 혼합하여 각 well에 분주하고, 2 시간 동안 25 °C 실온에서 방치한 후 2 회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-IgE conjugated를 넣고 2 시간 방치하였다. 다시 2 회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 등 피부조직의 총 면역 세포 수 측정

DNCB로 아토피양 피부염이 유발된 NC/Nga mice에게 GPJST를 8 주간 복용시킨 후, ethyl ether로 마취시킨 후 등 부위의 skin을 분리하여 skin에서의 총 면역세포수를 측정하였다.

5) 등 피부조직, 림프절 그리고 PBMCs에서의 형광 유세포 분석

실험을 종료한 후 DNCB로 아토피양 피부염이 유발된 NC/Nga mice에서 림프절을 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하고 D-PBS로 5 분간 원심 분리 (1,700 rpm)하여 2 회 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 등 피부조직은 잘게 chopping한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI1640)을 넣고 37 °C shaker (180 rpm, 20 min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4 회 반복하였다. PBMCs는 미리 heparin이 들어 있는 주사기로 심장 천자법으로 채혈하여 혈장을

분리한 후 혈액세포를 분리하였다. 이들 세포들을 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1L of de-mineralized water + 0.1 mM EDTA)으로 실온에서 5 분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 D-PBS로 2 회 세척한 후 0.04 % trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 측정된 피부조직 침윤 세포수를 5×10⁵로 조정된 후 4 °C에서 면역 형광 염색(immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-CCR3, PE-anti-CD11b, PE-anti-Gr-1 을 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3 회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3⁺, CD19⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁺, CCR3⁺, CD3⁺CD69⁺, CCR3⁺CD3⁺, CD11b⁺Gr-1⁺ 세포수를 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수(absolute number)를 산출하였다.

6) 염증 cytokine 분석

약물 투여 종료 후 ethyl ether로 마취하여 심장 천자법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 IL-6와 TNF- α 의 농도 측정은 ELISA 로 생산량을 측정하였다. 각 well에 NC/Nga mice 의 혈청 100 μ l (1/100 dilution)씩 분주하고, 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 washing 완충용액으로 2 회 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 실온에서 1 시간 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) Th1 and Th2 cytokine of ELISA analysis

실험 종료 후 적출한 비장에서 분리한 비장세포 (1×10⁵/well)는 anti-CD28 (1 μ g/ml) 항체와 anti-CD3 (1 μ g/ml), mite antigen (1 μ g/ml)으로 96-well coat-

ing된 plate에서 48 시간 동안 동시배양 하였다. IL-4와 IFN- γ 는 ELISA kit를 가지고 측정하였다. 각 well에 비장세포 배양 상층액 100 μ l씩 분주하고, 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 automatic ELISA washer를 이용하여 washing 완충용액으로 5 회 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 30 분간 방치하였다. 다시 5 회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 5 회 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) 혈청 내 immunoglobulin 측정

총 IgG1, IgG2a, IgG2b, 그리고 IgM의 혈청 농도 측정은 실험 종료 후 enzyme-linked immunosorbent assay로 생산량을 측정하였다. 각 well에 atopic dermatitis-like skin NC/Nga mice의 혈청 100 μ l (1/200 dilution)씩 분주하고, 12 시간 동안 4 °C 냉장실에서 방치한 후 2 회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 30 분간 방치하였다. 다시 2 회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) Histology

약물 투여 종료 후, 왼쪽 귀 끝부분과 등 쪽 목 부분의 피부조직을 떼어내어 24 시간 동안 10 % 포르말린 용액에 고정하였다. 그 조직을 파라핀으로 포매하였고 5 μ m 두께로 block을 만들었다. 그 조직부분은 염증을 일으키는 epidermis, dermis,

keratinocytes, neutrophils/eosinophil과, 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 H&E 염색과 비만세포(mast cells)를 염색하는 toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤을 관찰하였다.

10) 면역조직화학염색 (immunohistochemical staining)

모든 NC/Nga mice는 20 주령에서 왼쪽 귀 끝 부분과 등 쪽 목 부분의 피부조직을 적출하여 10 % 포르말린 용액에 고정하고 파라핀 블록을 만든 후 rat anti-mouse CD4 mAb (RM4-5)와 rat anti-mouse CCR3 mAb (53-6.7) 단일항체를 사용하여 면역조직화학염색을 하였다. 조직절편을 4 μm 두께로 세절한 후 probe-on plus slide에 부착시켜 건조시켰다. 그리고 탈파라핀(deparaffinized) 후 흡수시키고 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)를 이용해 microwave oven에 15 분간 전 처리하였다. 조직 내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3 % H₂O₂에 10 분간 처리한 후, 조직 내의 항원과 비특이적 단백질합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시켰다. 그런 다음 일차 단일 항체에 1 시간 동안 부착시킨 다음 완충액으로 수세하였다. LSAB kit를 이용하여 PE-conjugated goat anti-rat IgG에 30 분간 반응시켰다. 3 회 Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) 용액으로 수세한 후 잘 건조하였다. 현미경은 형광위상차 현미경(contrast fluorescence microscope)을 사용하여 ×100 배율로 관찰하였다.

11) Quantitative real-time-PCR on dorsal skin tissue of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice

(1) 등 피부조직에서 RNA 분리

약물 투여 종료 후 NC/Nga mice의 등 피부조직을 떼어내어 피부조직 (0.1 g)과 RNAzol^B 500 μl를 넣고 용해될 때까지 분쇄하였다. 이 혼합 부유액

에 chloroform (CHCl₃) 50 μl를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합하였으며 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리하고 약 200 μl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80 % EtOH로 수세하고 3 분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 μl의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μg을 DNase I (10 U/μl) 2 U/tube를 37 °C heating block에서 30 분간 반응시킨 후 75 °C에서 10 분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 μl 10 mM dNTPs mix, 1 μl random sequence hexanucleotides (25 pmol/25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor (20 U/μl), 1 μl 100 mM DTT, 4.5 μl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μl의 M-MLV RT (200 U/μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl가 되도록 하였다. 이 20 μl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 초간 원심 침강하여 37 °C heating block에서 60 분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 °C에서 5 분동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(3) Quantitative real time-PCR

Quantitative real time-PCR은 7500 Fast real time-PCR system을 이용하여 수행하였다.

Mouse Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다 (Table 2).

Table 2. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
Mouse IL-6	sence	5' tccagttgcctcttgggac 3'
	anti-sence	5' gtgtaattaagcctccgacttg 3'
Mouse CCR3	sence	5' ttcaaatgagattgttgggaaat 3'
	anti-sence	5' accgatacagctacgtacagta 3'
Mouse TNF-alpha	sence	5' tgggaggaaaggggtcctaaag 3'
	anti-sence	5' acctacgacgtgggctacag 3'
mouse Eotaxin 2	sence	5' tcaagtggcatagatgtggaagaa 3'
	anti-sence	5' tggctctgcaggattttcatg 3'
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)	sence	5' tgcgctctagaaaaacctgcaaa 3'
	anti-sence	5' gccccaggctcaaaaggtg 3'

염증 cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard를 G3PDH를 사용하였고, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time-PCR의 조건은 다음과 같다; 50 °C에서 2 분, 94 °C에서 4 분간 반응하여 pre-denaturation 시킨 뒤, 95 °C에서 15 초, 60 °C에서 1 분간 반응하여 40 회 반복 수행하였다. GPJST 투여군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 표적 유전자의 발현을 표준화하였다.

$$y = x(1+e)^n$$

x : starting quantity

y : yield

n : number of cycles

e : efficiency로 계산하여 RQ (relative quantitative)값을 측정하였다.

12) 통계처리

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

III. 成 績

1. Clinical skin index

임상 지수를 측정한 결과, 정상군 (Normal)은 0.3 ± 0.33 이였으며, 대조군(Control)은 11.7 ± 0.33 으로 나타난 반면에, 양성대조군인 CsA 투여군은 4.3 ± 0.3 , GPJST 투여군은 5.0 ± 1.0 으로 아토피 피부염에서 나타날 수 있는 소양, 건조, 부종, 혈종, 짓무름, 태선화 등의 증상이 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.001$) 있게 줄어들었다 (Fig. 1).

2. 혈청 IgE 수치에 미치는 영향

약물 투여 전 (8 주령), 약물 투여 후 4 주 (12 주령), 약물 투여 후 8 주 (16 주령)의 혈청 IgE의 수치의 변화를 측정한 결과, 정상군에서는 각각 25.6 ± 6.2 , 53.5 ± 12.1 , 72.0 ± 20.1 (ng/ml), 대조군에서는 각각 35.2 ± 2.0 , 214.3 ± 4.4 , 217.3 ± 6.8 (ng/ml)로 나타났으며, CsA 투여군에서는 각각 43.1 ± 1.9 , 114.3 ± 18.1 ($p < 0.001$), 115.2 ± 4.9 ($p < 0.001$) (ng/ml)로 나타났다. 이에 비해 GPJST 투여군에서는 각각 34.9 ± 9.0 , 126.1 ± 23.8 ($p < 0.01$), 106.1 ± 7.5 ($p < 0.001$) (ng/ml)로 나타나, 약물 투여 후 4 주와 8 주에서 대조군에 비하여 유의적인 감소효과를 나타내었다 (Fig. 2).

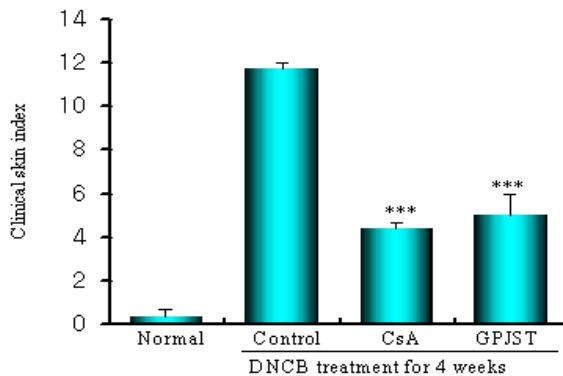


Fig. 1. Effects of GPJST on clinical skin features and severity in DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

Clinical skin index of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe) for each of five signs and symptoms (erythema/hemorrhage, dryness/scarring, edema, excoriation/erosion, lichenification) on the back. Statistically significant value compared with control group by t-test (**p<0.01, ***p<0.001).

Normal : no process

Control : administration of normal saline for 8 weeks

CsA : cyclosporin A (20mg/kg) injection for 8 weeks

GPJST : administration of GPJST extract (7.1 mg/25 g/day) for 8 weeks

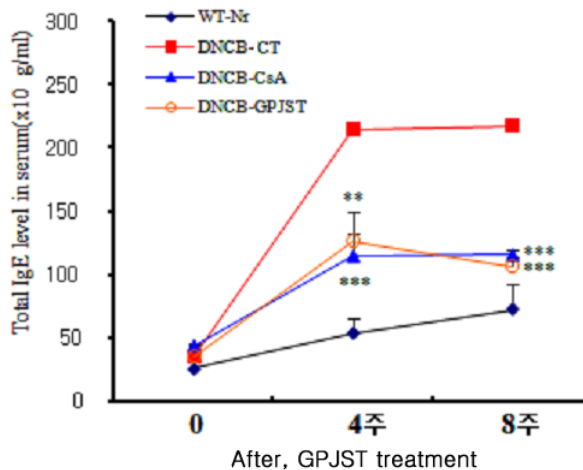


Fig. 2. Effects of GPJST on the serum levels of IgE in DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

The animals were administrated with normal (—◆), control (—■), CsA (20 mg/kg) (—▲), GPJST (7.1 mg/25 g/day, —○) for 8 weeks. Serum levels of IgE were measured by sandwich ELISA at indicated time points. Each point represents the mean ± S.E. of four mice. Statistically significant value compared with control group data by t-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

3. 등 피부조직 총 면역세포 수에 미치는 영향

등 피부조직에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, 정상군은 5.85 ± 1.65 , 대조군이 11.85 ± 0.75 , CsA 투여군은 5.65 ± 0.25 ($p < 0.001$), GPJST 투

여군이 8.95 ± 0.35 ($p < 0.01$) ($\times 10^5/g$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 3).

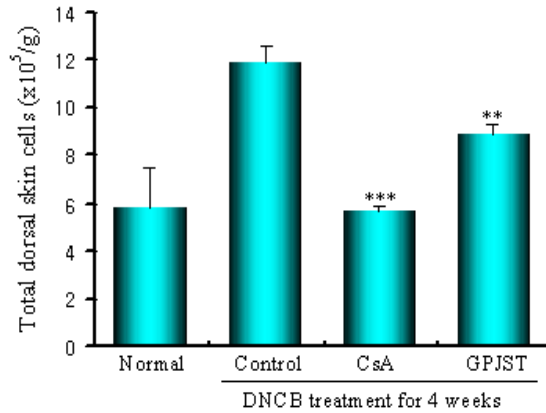


Fig. 3. Effect of GPJST on total cell number of skin in DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

NC/Nga mice model followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, dorsal skin ($\times 10^5/g$) were removed and total cell absolute number were measured by analyzed by flow cytometry. Each point represents the mean \pm S.E. Statistically significant value compared with control group data by T test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

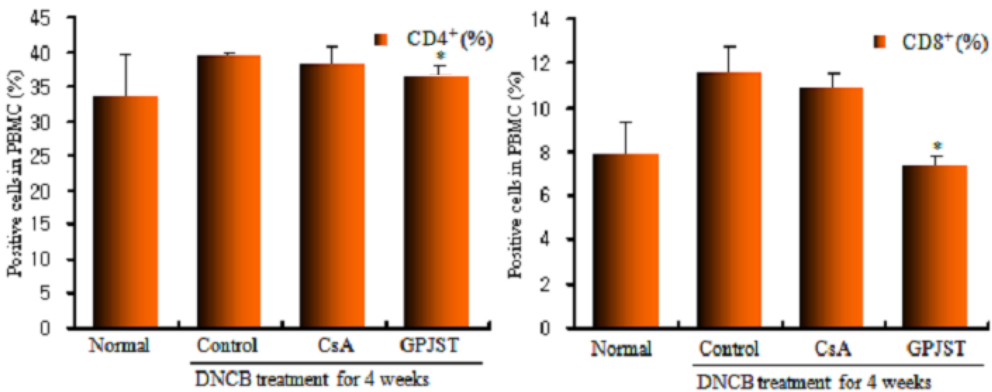


Fig. 4. Effect of GPJST on the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ in PBMCs in DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

NC/Nga mice model followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice PBMCs were removed and the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ were measured by analyzed by flow cytometry. Each point represents the mean \pm S.E. Statistically significant value compared with control group data by T test (* $p < 0.05$).

4. PBMCs내 면역세포 수 변화에 미치는 영향

1) CD4⁺ 와 CD8⁺ 세포 수에 미치는 영향

PBMCs에서의 CD4⁺ 세포 수는 정상군은 33.5 ± 6.12, 대조군은 39.4 ± 0.50, CsA 투여군은 38.3 ± 2.50 (%)으로 나타났으며, GPJST 투여군에서는 35.4 ± 1.95 (%)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (p<0.05) 있는 감소 효과를 나타내었다.

PBMCs에서의 CD8⁺ 세포 수는 정상군은 7.9 ± 1.45, 대조군은 11.6 ± 1.20, CsA 투여군은 10.9 ± 0.65 (%)로 나타났으며, GPJST 투여군에서는 8.7 ± 0.17 (%)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (p<0.05) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 4).

2) CD3⁺CD69⁺와 CD4⁺CD25⁺세포 수에 미치는 영향

PBMCs에서의 CD3⁺CD69⁺ 세포 수는 정상군은 3.0 ± 0.86, 대조군은 8.3 ± 0.20, CsA 투여군은 6.3 ± 1.40, GPJST 투여군에서는 4.1 ± 0.41

(%)로 나타나, GPJST 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 (p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었고, CD4⁺CD25⁺ 세포 수는 정상군은 2.2 ± 1.33, 대조군은 3.5 ± 0.12, CsA는 2.1 ± 0.02 (p<0.001), GPJST 투여군에서는 3.2 ± 0.51 (%)로 나타나 유의성 있는 변화는 없었다 (Fig. 5).

3) CCR3⁺ 세포 수에 미치는 영향

PBMCs에서의 CCR3⁺ 세포 수는 정상군은 5.6 ± 0.52, 대조군은 14.8 ± 2.80, CsA 투여군은 9.8 ± 2.09, GPJST 투여군에서는 7.4 ± 1.05 (%)로 나타나, GPJST 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 (p<0.05) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 6).

5. DLN내 면역 세포 수 변화에 미치는 영향

1) CD3⁺ 와 CD19⁺ 총 세포 수에 미치는 영향

DLN에서의 CD3⁺ 세포 수는 정상군은 21.6 ± 14.4, 대조군은 59.4 ± 15.4, CsA 투여군은 31.6

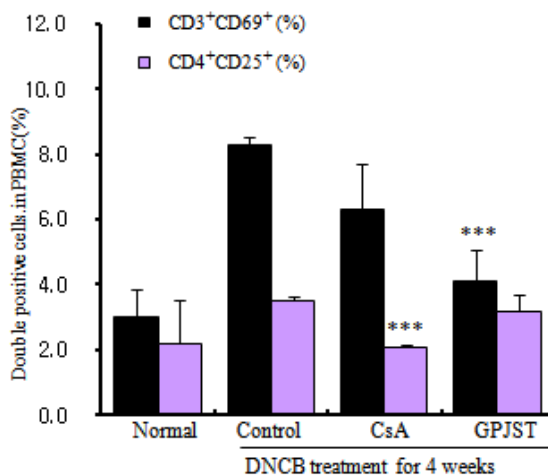


Fig. 5. Effect of GPJST on the percentage of CD3⁺CD69⁺ and CD4⁺CD25⁺ in PBMCs in DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice PBMCs were removed and the percentage of CD3⁺CD69⁺ and CD4⁺CD25⁺ were measured by analyzed by flow cytometry. Each point represents the mean ± S.E. Statistically significant value compared with control group data by T test (**p<0.001).

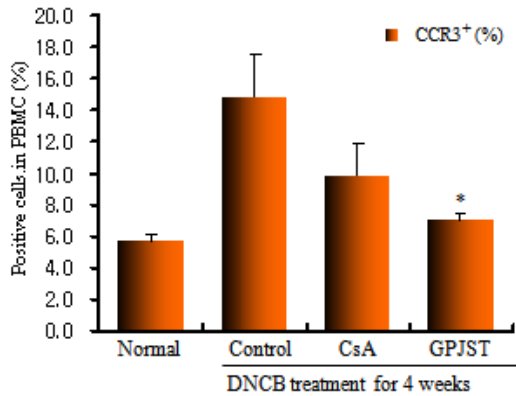


Fig. 6. Effect of GPJST on the percentage of CCR3⁺ in PBMCs in DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice PBMCs were removed and the percentage of CCR3⁺ were measured by analyzed by flow cytometry. Each point represents the mean \pm S.E. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05).

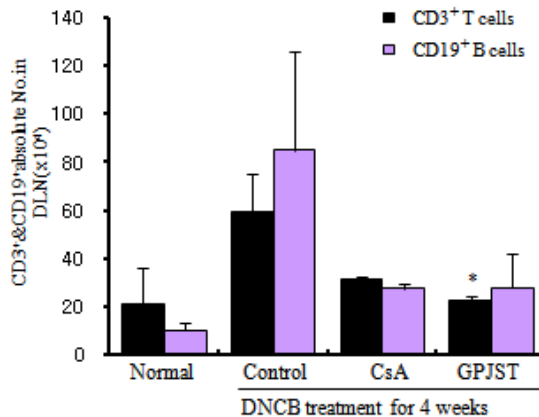


Fig. 7. Effect of GPJST on CD3⁺ and CD19⁺ absolute cell number in DLN in DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice DLN ($\times 10^4$) were removed and CD3⁺ & CD19⁺ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometry. Each point represents the mean \pm S.E. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05).

± 1.1 , GPJST 투여군에서는 $23.0 \pm 1.5 (\times 10^4)$ 로 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다. CD19⁺ 세포 수는 정상군은 $10.4 \pm$

3.1 , 대조군은 84.8 ± 41.0 , CsA는 27.6 ± 2.0 , GPJST 투여군에서는 $27.7 \pm 14.3 (\times 10^4)$ 로 나타나 유의성 있는 변화는 없었다(Fig. 7).

2) $CD3^+CD69^+$ 와 $CD4^+CD25^+$ 총 세포 수에 미치는 영향

DLN에서의 $CD3^+CD69^+$ 세포 수는 정상군은 4.6 ± 0.1 , 대조군은 14.0 ± 2.9 , CsA 투여군은 7.2 ± 4.2 , GPJST 투여군에서는 $7.9 \pm 0.7 (\times 10^4)$ 로 유의성 ($p < 0.05$)있게 감소하였고, $CD4^+CD25^+$ 세포 수는 정상군은 1.7 ± 1.2 , 대조군은 5.0 ± 2.5 , CsA

투여군은 2.4 ± 0.01 , GPJST 투여군에서는 $2.1 \pm 0.6 (\times 10^4)$ 으로 감소되었으나 유의성은 없었다 (Fig. 8).

6. 등 피부조직 내 면역 세포 수 변화에 미치는 영향

1) $CCR3^+CD3^+$ 세포 수에 미치는 영향

Skin에서의 $CCR3^+CD3^+$ 세포 수는 정상군은 7 ± 1.8 , 대조군은 17.2 ± 2.8 , CsA 투여군은 8.2 ± 2.3

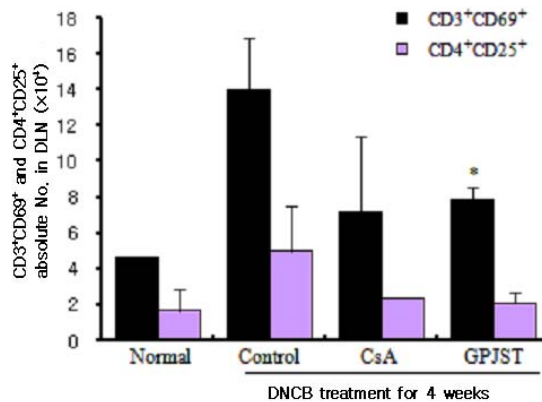


Fig. 8. Effect of GPJST on $CD3^+CD69^+$ and $CD4^+CD25^+$ absolute cell number in DLN in DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

NC/Nga mice model followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice DLN ($\times 10^4$) were removed and $CD3^+CD69^+$ and $CD4^+CD25^+$ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm S.E. Statistically significant value compared with control group data by T test ($*p < 0.05$).

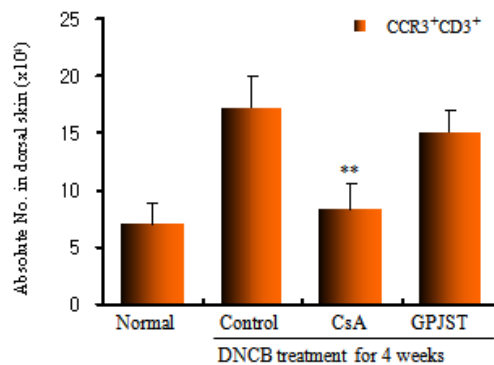


Fig. 9. Effect of GPJST on $CCR3^+CD3^+$ absolute cell number of skin in DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

NC/Nga mice model followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice skin ($\times 10^4$) were removed and $CCR3^+CD3^+$ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometry. Each point represents the mean \pm S.E. Statistically significant value compared with control group data by T test ($**P < 0.01$).

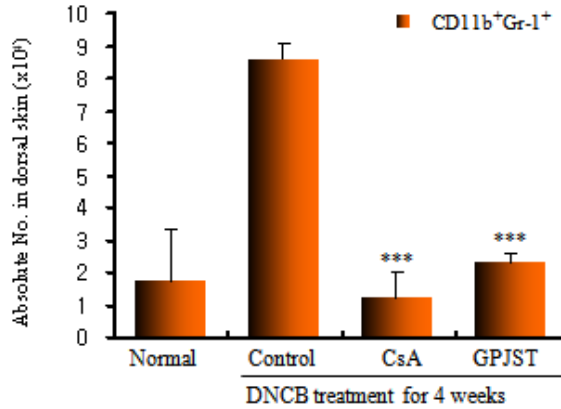


Fig. 10. Effect of GPJST extract on CD11b⁺Gr-1⁺ absolute cell number of skin in DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice skin ($\times 10^4$) were removed and CD11b⁺Gr-1 absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometry. Each point represents the mean \pm S.E. Statistically significant value compared with control group data by T test (***p<0.001).

($\times 10^4$)로 대조군에 비하여 유의성 (p<0.01) 있는 감소를 나타내었고, GPJST 투여군에서는 15.0 \pm 2.5 ($\times 10^4$)로 나타나 유의성은 없었다 (Fig. 9).

2) CD11b⁺Gr-1 세포 수에 미치는 영향

Skin에서의 CD11b⁺Gr-1 세포 수는 정상군은 1.7 \pm 1.6, 대조군은 8.6 \pm 0.5, CsA 투여군은 1.2 \pm 0.8 ($\times 10^4$)로 대조군에 비하여 유의성 (p<0.001) 있는 감소를 나타내었고, GPJST 투여군에서는 2.3 \pm 0.3 ($\times 10^4$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 10).

7. 혈청 내 cytokine 생성량에 미치는 영향

IL-6 생성량은 정상군은 6.8 \pm 0.3, 대조군은 113.6 \pm 4.9, CsA 투여군은 80.7 \pm 6.2, GPJST 투여군은 66.4 \pm 2.7 (pg/ml)로 CsA 투여군, GPJST 투여군 모두 대조군에 비하여 유의성 (p<0.01) 있는 감소 효과를 나타내었고, TNF- α 생성량은 정상군이 32.3 \pm 2.0, 대조군이 89.3 \pm 8.6, CsA 투여군은 58.8 \pm 7.8, GPJST 투여군에서는 57.3

\pm 8.2 (pg/ml)로, CsA 투여군, GPJST투여군 모두 대조군에 비하여 유의성 (p<0.05) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 11).

8. 비장세포 배양 상층액에서 cytokine 생성량에 미치는 영향

IL-4 생성량은 정상군은 351.7 \pm 18.1, 대조군은 1042.5 \pm 30.5, CsA 투여군은 904.3 \pm 2.7, GPJST 투여군에서 905.1 \pm 6.3 (pg/ml)로, CsA, GPJST 투여군 모두 대조군에 비하여 유의성 (p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다.

IFN- γ 생성량은 정상군은 170.9 \pm 23.0, 대조군은 326.1 \pm 33.9, CsA는 294.0 \pm 17.2, GPJST 투여군에서는 354.0 \pm 45.8 (pg/ml)로, 대조군에 비하여 약간 증가하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 12).

9. 혈청 내 immunoglobulin 생성량에 미치는 영향

IgG1 혈중 농도는 정상군은 2645.0 \pm 85.2, 대조군은 3774.0 \pm 76.4, CsA 투여군은 3238.5 \pm 23.5 (μ g/ml)로 대조군에 비하여 유의성 (p<0.001) 있는

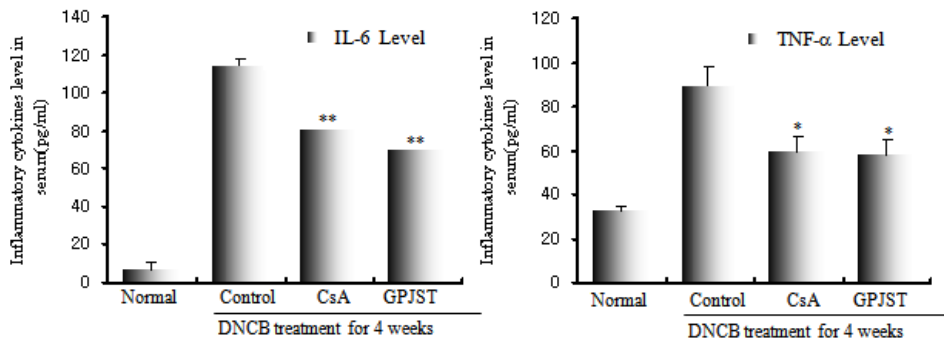


Fig. 11. Effect of GPJST on the levels of IL-6 and TNF-α in the serum of DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20 °C until use. The levels of IL-6 and TNF-α were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01).

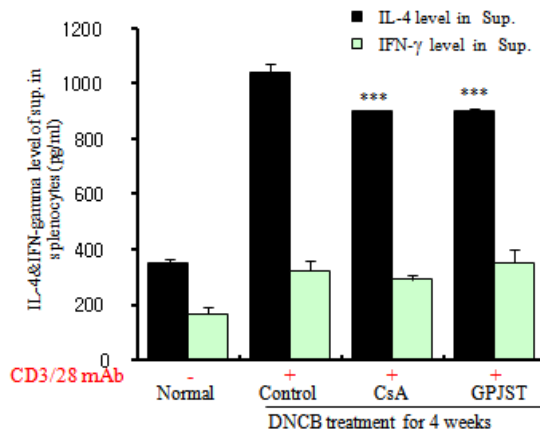


Fig. 12. Effect of GPJST on the Levels of cytokines in the culture supernatant of splenocytes of DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice

Splenocytes from mice at 20 weeks of age were stimulated with mite antigen (1 μg/ml), and anti-CD3 (1 μg/ml) plus anti-CD28 (1 μg/ml) antibody for 48hrs. IL-4 and IFN-γ in the culture supernatants was measured by mice IL-4 or IFN-γ ELISA. Statistically significant value compared with control group data by T test (***p<0.001).

감소 효과를 나타내었고, GPJST 투여군에서는 3706.0 ± 51.1 (μg/ml)로 유의성은 없었다.

IgM 혈중 농도는 정상군은 647.0 ± 30.9, 대조군은 929.5 ± 37.6, CsA 투여군은 458.5 ± 56.5 (μg/ml)로 대조군에 비하여 유의성 (p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었고, GPJST 투여군에서

는 680.5 ± 122.8 (μg/ml)로 유의성은 없었다.

IgG2a 혈중 농도는 정상군은 1967 ± 55.9, 대조군은 2694.5 ± 33.8, CsA 투여군은 1473.0 ± 70.1 (μg/ml)로 대조군에 비하여 유의성 (p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었고, GPJST 투여군도 2153.0 ± 118.7 (μg/ml)로 대조군에 비하여 유의성 (p<0.01)

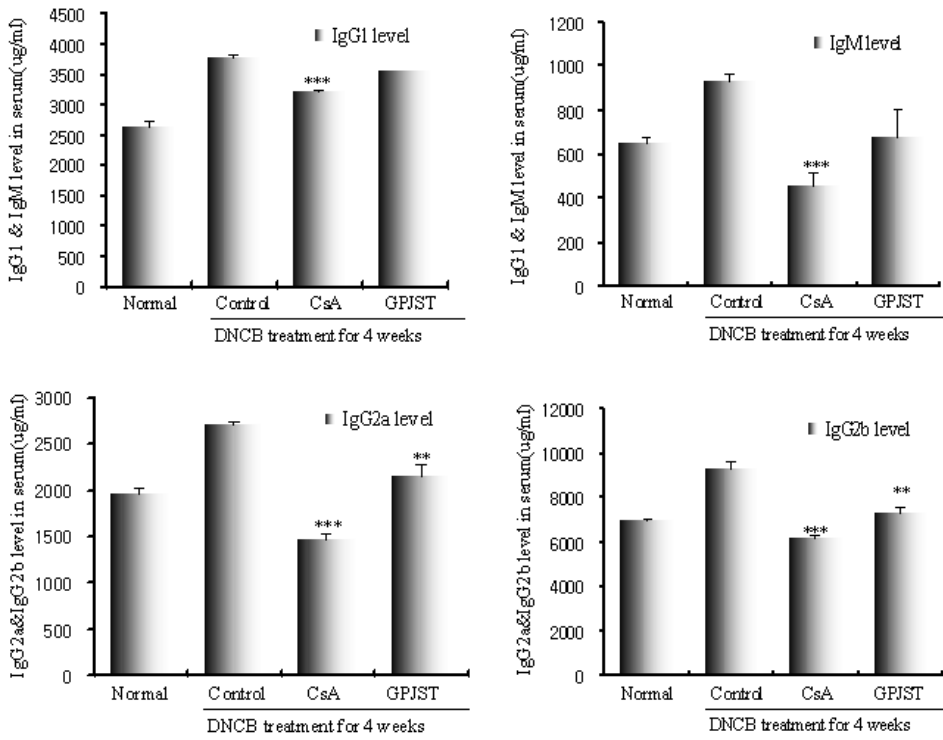


Fig. 13. Effect of GPJST on the levels of immunoglobulin in the serum of DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgG1 were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with control group data by T test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

있는 감소 효과를 나타내었다.

IgG2b 혈중 농도는 정상군은 6968.0 ± 46.1 , 대조군은 9284.5 ± 355.8 , CsA 투여군은 6191.5 ± 141.1 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)로 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.001$) 있는 감소 효과를 나타내었고, GPJST 투여군도 7324.5 ± 287.6 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)로 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.01$) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 13).

10. 피부조직에 미치는 영향

GPJST이 피부 조직에 미치는 영향을 알아보기 고자 약물 투여 종료 후 H&E 염색과 toluidine 염색을 하여 관찰하였다.

Ear 조직의 H&E 염색(Fig. 14-1)에서 대조군

(B)의 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, 백혈구의 침윤도 관찰되었다. 이에 비하여 GPJST 투여군 (D) 은 epidermis와 dermis의 두께와 백혈구의 침윤도 감소하여 상대적으로 부종이 감소하였다.

Toluidine 염색(Fig. 14-2)에서는 dermis 주변에 비만세포(화살표)가 많이 침윤된 대조군 (B) 에 비하여, GPJST 투여군 (D) 에서는 그림에서 나타난 바와 같이 비만세포를 거의 관찰할 수 없었다.

Skin 조직에서 H&E 염색(Fig. 15-1)을 한 대조군 (B)의 skin은 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, 백혈구의 침윤도 관찰되었다. 이에 비해 GPJST 투여군 (D)에서는 대조군

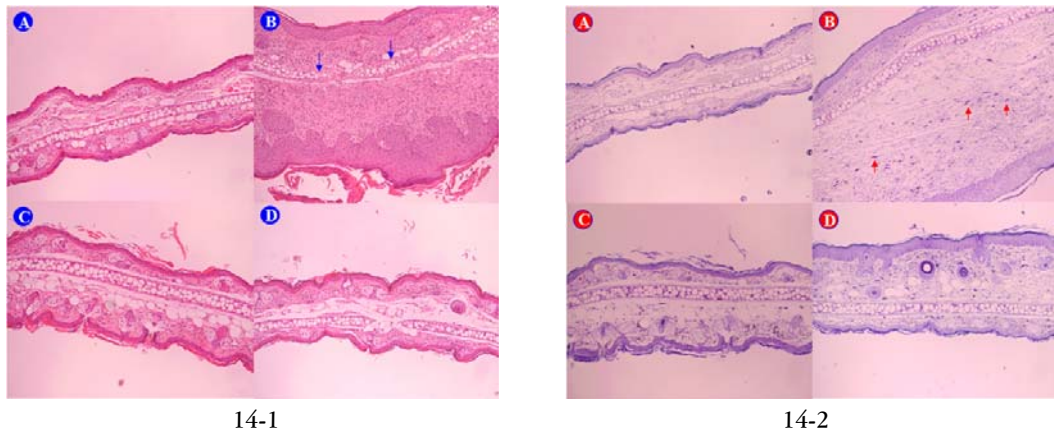


Fig. 14. Histologic examination of ear skin lesion in DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

The animals were administrated with saline (control), CsA (20 mg/kg), GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 8 weeks. Ear biopsy was stained with H&E(14-1) and toluidine blue (14-2) for examining inflammatory cells and mast cell (B, arrow), respectively (A; normal. B; cotrol, C; CsA, D; GPJST).

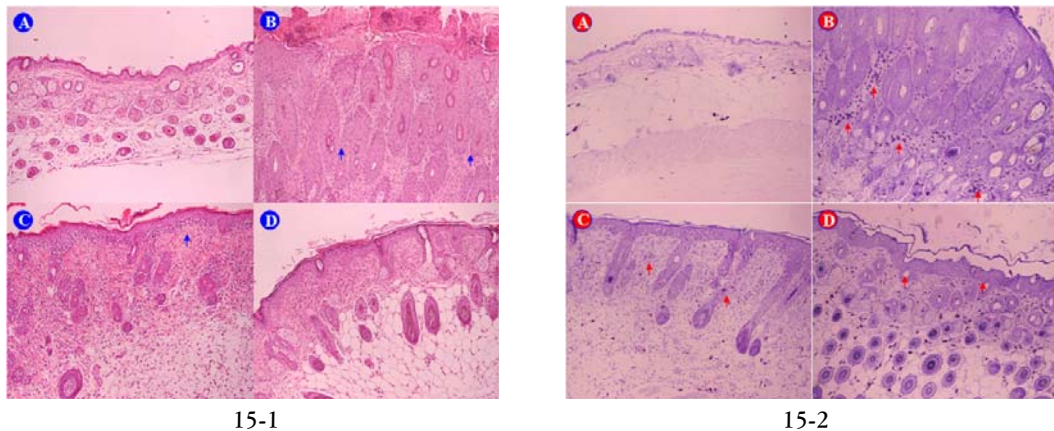


Fig. 15. Histologic examination of dorsal skin lesion in DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

The animals were administrated with saline (control), CsA (20 mg/kg), GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 8 weeks. Skin biopsy was stained with H&E (15-1) and toluidine blue (15-2) for examining inflammatory cells and mast cell (B, arrow), respectively (A; normal. B; cotrol, C; CsA, D; GPJST).

에 비하여 epidermis와 dermis의 두께가 상대적으로 줄었고, 백혈구의 침윤이 현저히 감소하여 부종이 발생하지 않은 것을 알 수 있었다.

Toluidine 염색(Fig. 15-2)에서는 대조군 (B)는

dermis 주변에 비만세포(화살표)가 많이 침윤된 것을 알 수 있다. 그러나 GPJST 투여군 (D)에서는 대조군에 비하여 비만세포를 거의 관찰할 수 없었다.

11. 조직 내의 면역세포 변화

1) 귀에서의 면역세포 변화

면역 조직 화학 염색을 하여 $CD4^+$ 와 $CCR3^+$ 세포를 분석한 결과, $CD4^+$ 세포 염색을 한 대조군 (B)은 $CD4^+$ Th 세포가 등 피부 조직에 침윤되어

관찰된 반면, GPJST 투여군 (D)에서는 대조군에 비하여 $CD4^+$ Th 세포가 거의 관찰되지 않았다. $CCR3^+$ 세포 염색에서도 역시 대조군 (B)에 비하여 GPJST 투여군 (D)에서 $CCR3^+$ 세포 발현이 현저하게 줄어든 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 16).

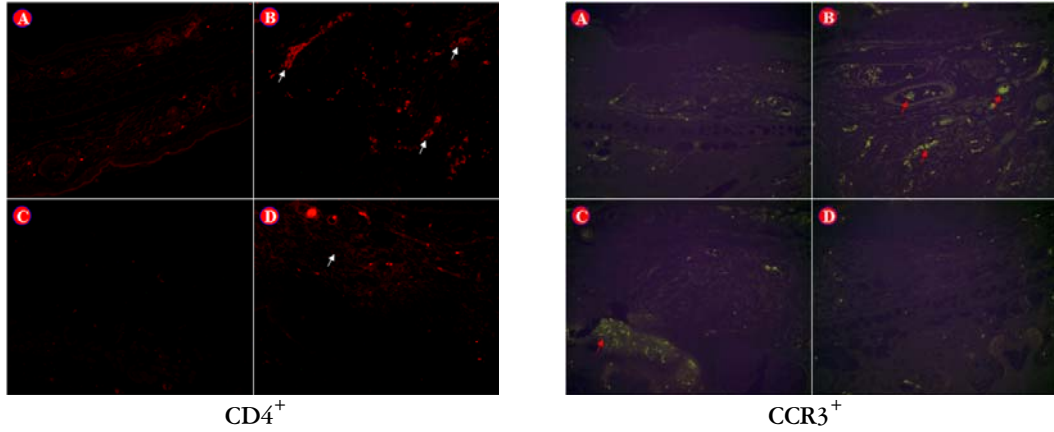


Fig. 16. Immunohistochemical staining of ear skin lesion of DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

The animals were administrated with saline (control), CsA (20 mg/kg), GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 8 weeks. Ear skin biopsy were stained with PE-rat anti-mice CD4 mAb and PE-rat anti-mouse CCR3 mAb, respectively (A; normal. B; cotrol, C; CsA, D; GPJST).

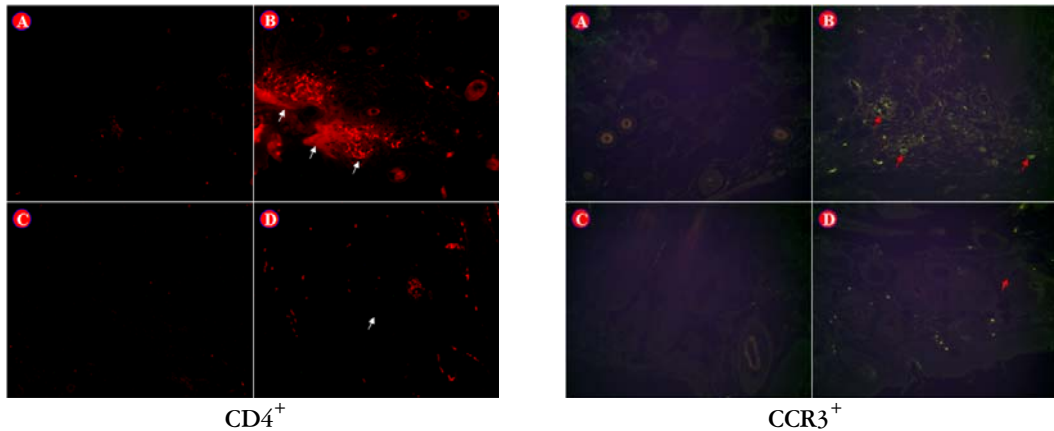


Fig. 17. Immunohistochemical staining of dorsal skin lesion in DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

The animals were administrated with saline (control), CsA (20 mg/kg), GPJST (7.1 mg/25 g/day) for 8 weeks. Dorsal skin biopsy were stained with PE-rat anti-mouse CD4 mAb and PE-rat anti-mouse CCR3 mAb, respectively (A; normal. B; cotrol, C; CsA, D; GPJST).

2) 등 피부에서의 면역세포 변화

면역 조직 화학 염색을 하여 CD4⁺와 CCR3⁺ 세포를 분석한 결과, CD4⁺ 세포 염색을 한 대조군 (B)은 CD4⁺ Th 세포가 등 피부 조직에 침윤되어 관찰된 반면, GPJST 투여군 (D)에서는 대조군에 비하여 CD4⁺ Th 세포가 거의 관찰되지 않았다. CCR3⁺ 세포 염색에서도 역시 대조군에

비하여 CCR3⁺ 세포 발현이 현저하게 줄어든 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 17).

12. Real-time PCR analysis on atopic dermatitis-like model NC/Nga mice

1) IL-6 mRNA 유전자 발현 분석

IL-6 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이

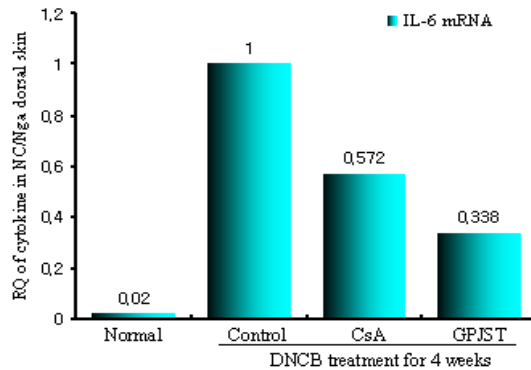


Fig. 18. Effect of GPJST on the IL-6 mRNA levels in the skin of DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

IL-6 mRNA synthesized by RT-PCR was analyzed. IL-6 mRNA express were measured RT-PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration.

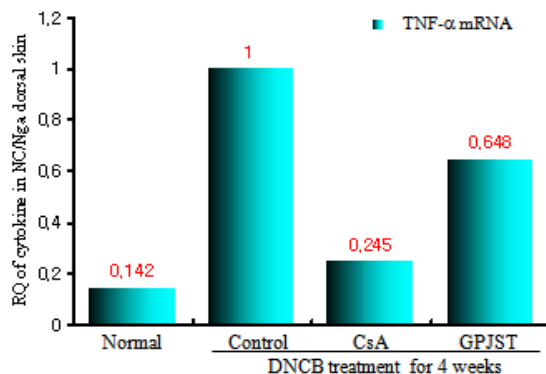


Fig. 19. Effect of GPJST on the TNF-α mRNA levels in the skin of DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

TNF-α mRNA synthesized by RT-PCR was analyzed. TNF-α mRNA express were measured RT-PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration.

1 일때, 정상군은 0.02, CsA 투여군은 0.572, GPJST 투여군에서는 0.338로 대조군에 비해 66 % 이상 억제되었다(Fig. 18).

이 1 일때, 정상군은 0.142, CsA 투여군은 0.245, GPJST 투여군에서는 0.648로 대조군에 비해 35 % 정도 억제되었다(Fig. 19).

2) TNF- α mRNA 유전자 발현 분석

TNF- α mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값

3) Eotaxin 2 mRNA 유전자 발현 분석

Eotaxin 2 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값

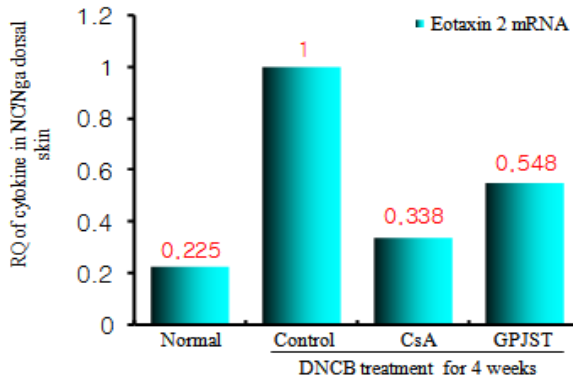


Fig. 20. Effect of GPJST Extract on the Eotaxin 2 mRNA levels in the skin of DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

Eotaxin 2 mRNA synthesized by RT-PCR was analyzed. Eotaxin 2 mRNA express were measured RT-PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration.

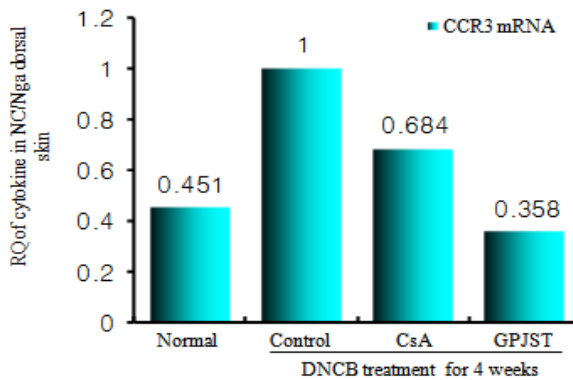


Fig. 21. Effect of GPJST Extract on the CCR3 mRNA levels in the skin of DNCB-induced atopic dermatitis-like model NC/Nga mice.

CCR3 mRNA synthesized by RT-PCR was analyzed. CCR3 mRNA express were measured RT-PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration.

이 1 일때, 정상군은 0.225, CsA 투여군은 0.338, GPJST 투여군에서는 0.548로 대조군에 비해 현저한 억제 효과를 보였다 (Fig. 20).

4) CCR3 mRNA 유전자 발현 분석

CCR3 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1 일때, 정상군은 0.451, CsA 투여군은 0.684, GPJST 투여군에서는 0.358로 대조군에 비해 현저한 억제효과를 보였다 (Fig. 21).

IV. 考 察

아토피 피부염은 심한 소양감을 동반하는 만성, 재발성의 피부염증을 특징으로 하는 유전성 질환으로, 일반적으로 유, 소아기에 높은 발생빈도를 보이며 나이가 증가 할수록 유병율은 감소하여 대부분 경한 경과를 갖는 질환으로 알려져 있다^{2,19)}. 사회가 발달함에 따라 전 세계적으로 유병율이 증가하면서 이에 대한 관심도 증가하고 있으며, 우리나라에서도 최근 알레르기 질환의 급증과 함께 아토피 피부염 환자가 증가하고 있다²⁰⁻¹⁾.

아토피 피부염 환자는 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 있다²²⁻⁵⁾. 국내 연구에서도 아토피피부염을 앓고 있는 대부분의 환자가 개인의 삶 그리고 가정경제에 영향을 미치고 아토피피부염이 심할수록 그 영향도 크다는 것을 확인할 수 있었다²⁶⁾. 따라서 적극적인 치료와 증상의 관리를 통한 피부염의 진행과정을 조절하는 장기간의 전략이 필요하다.

아토피 피부염의 특징은 초기의 심한 소양감인데, 임상양상의 대부분이 피부를 긁고 문질러서 오는 2차적인 것으로, 면역학적으로 혈청 IgE 수치가 상승되고 세포매개성 면역이 감소되며 호중구 및 단핵구의 화학 주성 능력이 늦어진 것 등이 아토피 환자에게 발견된다²⁷⁾.

아토피 피부염을 정확하게 진단할 수 있는 실험적 방법은 없지만, 알레르기 질환에서 면역반응에 기초한 아토피 피부염 진단 방법이 연구 중에 있다. 아토피 피부염을 비롯해서 천식, 알레르기성 비염 등 흔히 보이는 알레르기 질환에서는 allergen-specific IgE response와 tissue-specific inflammation이 나타나는데 이러한 반응을 기초로 아토피 피부염의 발병 위험 등을 예측할 수 있다. 아토피 환자의 염증반응은 사실 IgE에 의한 즉각적 과민반응보다 더 복잡한 것으로 보인다. 혈중 IgE의 농도가 상승하고 eosinophilia가 나타나도 이것이 직접적인 피부염증의 특별한 자극제라고 보기는 힘들다²⁸⁻³⁰⁾. IgE의 sensitivity는 아토피 피부염을 예측하는데 있어서 가족력에 의한 것보다 민감도가 떨어진다. Food allergen의 조사에서도 IgE 농도로는 결과를 예측하기 어렵다. 그러나 aeroallergen sensitization이나 계란, 우유, 땅콩에 대한 sensitivity를 조사할 경우 IgE에 의한 예측이 비교적 정확하다. 아토피 피부염이 있는 환자의 경우 혈중의 IgG anti-IgE antibody의 농도는 그렇지 않은 사람에 비해서 낮게 나타나고, 생후 3개월 된 아이의 peripheral blood eosinophilia를 조사한 결과 아토피 환자의 혈중 IgE가 더 높은 것으로 보고되었다³¹⁻³⁾. 결론적으로 소아에서 IgE antibody의 혈중농도가 높을수록 아토피 피부염의 발병이 일찍 시작된다. IgE의 혈중농도가 잘 조절되지 않는 이유 중의 하나는 IgE 생산을 억제하는 IFN- γ 의 생성에 이상이 있기 때문인데, IgE 농도가 정상일지라도 IFN- γ 의 농도가 낮은 경우 아토피 피부염의 발병위험이 높은 것으로

알려져 있다.

아토피 피부염의 악화정도와 관련이 있는 수치로 eosinophil cationic protein (ECP, eosinophil granule 내부에 존재하는 protein) 농도가 있다. ECP는 알레르기 반응이나 염증반응 동안 활성화된 eosinophil에서 분비되는 protein으로 기생충에 세포독성이 있는데, 아토피 피부염 환자의 경우 그렇지 않은 환자에 비해서 ECP의 농도가 높다는 보고가 있다³⁴⁾.

활성화된 lymphocytes, 대부분의 CD4 helper cells, mast cell, 피부(dermal)의 Langerhans cells, 과도하게 자극된 antigen-presenting activity가 있는 표피(epidermal)의 Langerhans cells 등이 아토피 피부염과 관련된 면역요인으로 보고 있다³⁵⁻⁷⁾. Langerhans cells은 피부의 주된 antigen-presenting cell로, 아토피 피부염에서 이 세포의 표피에 antigen-specific IgE와 반응하는 receptor를 발현하는데, 이것은 allergen-specific T cell이 IgE의 target이 되는 allergen을 인지할 수 있도록 한다. 알레르기 반응에서 보통 보이는 eosinophil은 아토피 피부염에서는 현저하지 않지만 면역 세포 화학적 연구

에서, 특히 만성인 경우 eosinophil-derived protein의 존재가 확인되었고, Mast cell 역시 아토피 피부염의 주요 병인이 된다. Th cell은 Th0에서 분화되어 Th1과 Th2로 나뉘는데 이것은 각각 서로 다른 cytokine을 분비하고, 분비된 cytokine들은 각각 다른 반응을 하여 상대편 반응을 길항한다³⁸⁻⁴⁰⁾. Th1 cell은 IFN- γ 과 IL-2를 분비하고 Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13을 분비하는데 이러한 cytokine에 의해 유도되고 길항되는 여러 가지 반응은 다음과 같다 (Fig. 22).

Th1, Th2 둘 다 antigen이 있는 상태에서 IgM, IgG, IgA를 유도하지만 알레르기 반응에 관여하는 IgE의 경우 Th2에 의해서만 유도된다. Th2 cell이 활성화되면, 앞에서 말했듯이 IL-4, IL-13이 분비되고 이것은 B cell을 자극해서 IgE를 분비한다. IL-5는 eosinophilia를 유발하고 IL-10은 macrophage에 의한 cytokine 분비를 저해하여 delayed-type hypersensitivity를 저해한다. IFN- γ 는 Th2 cell을 길항하므로 IgE 합성을 저해한다. 순환하는 antigen-specific memory 또는 effector T cell에서 세포 내 림프구성 침윤물 (cellular lym-

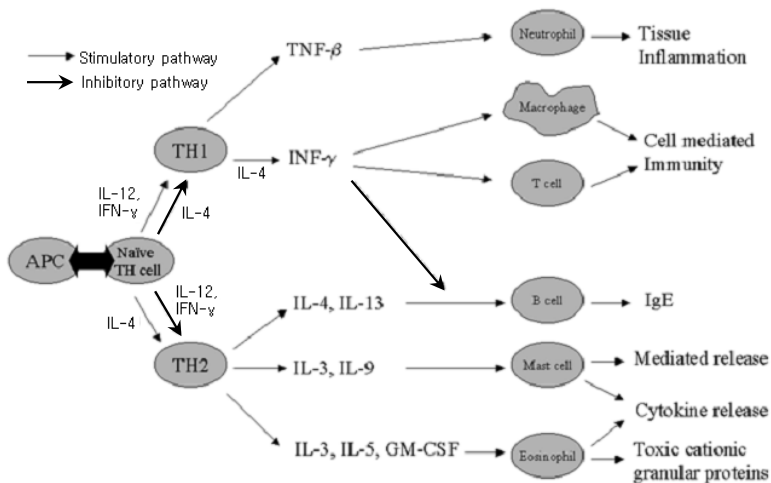


Fig. 22. Major cytokines in allergic inflammation and cellular interactions

phocytic infiltrates)이 생기고 이것은 아토피 피부염에서 활성화되어 IL-13 등에 의한 cytokine pattern 등에 따라 IgE 생성을 조절한다⁴¹⁻²⁾. 생산된 IgE는 피부의 lymphocyte antigen과 피부 혈관 내 E-selectin의 반응으로 매개되어 피부로 이동되므로 결국 수용성 E-selectin의 농도는 혈중 IgE의 농도 및 eosinophil의 수와 관련성이 있다. Th2 lymphocyte는 aeroallergen이나 food antigen에 민감하고, 또한 house-dust mites나 environmental antigen에 민감한 환자의 경우 피부 림프구 항원 (cutaneous lymphocyte-antigen, CLA)에 양성인 세포에 의해 아토피 피부염이 유발된다. 피부에 상주하는 staphylococci에 생성된 독성물질인 superantigen은 아토피 피부염을 악화시키는데 이것은 Th2가 관여하는 메커니즘에 의한 것으로 보인다. Superantigen은 IL-4, IL-5의 분비를 자극하고 IFN- γ 의 분비는 저해하며 CLA의 수를 증가시켜서 결국 IgE 생성을 촉진 한다⁴³⁾.

아토피 피부염 환자에서 세포 매개성 면역기능장애가 IgE의 증가와 관련 있음이 밝혀지면서 즉시형 과민반응 외에도 지연형 과민반응이 아토피 피부염의 병인에 관여함을 주장하는 보고들이 증가하고 있다. 아토피 피부염 환자에서 세포 매개성 면역장애는 약 80%까지 발생하는 것으로 알려져 있으며, 바이러스 및 피부사상균 등에 의한 피부감염증에 대해 감수성이 증가되어 있고, 접촉 알레르겐에 대한 감수성은 감소된 경향을 보인다. 과거에는 T세포 성숙 결핍설, CD8⁺ 억제 T세포의 수적 감소 등이 보고된 바 있었으나, 최근엔 CD4⁺ T세포의 역할이 더욱 중요한 것으로 알려지고 있다⁴⁴⁻⁵⁾. 즉 B세포로부터 IgE의 생성을 유도하는 IL-4, B세포로부터 IgE 생성을 촉진하는 IL-5, IgE 생성을 증폭시키는 IL-6등을 분비하는 T세포는 CD4⁺ T세포 중 Th2 세포인데, 아토피 피부염 환자의 말초혈액 및 피부병변으로부터 분리한 항원 특이 T세포 클론이 Th2로

밝혀졌고 이 세포들에서 IL-4 등의 Th2 cytokine profile이 분비된다는 사실이 입증되었다⁴⁶⁾. 현재까지의 여러 연구들로부터 추정되는 개략적인 아토피 피부염의 병태 생리기전은 다음과 같다. 즉 알레르겐이 IgE에 의해 인식되면 Langerhans cell 표면 IgE 부착 Fc수용체에 유착되어 T림프구에 항원을 전달함으로써 T림프구가 활성화되게 된다. 이때 자가 펩타이드나 staphylococcus의 초항원(superantigen)에 의해서도 T림프구가 활성화될 수 있다. 다른 피부질환과 달리 아토피 피부염의 피부병변에 침윤되는 염증세포는 주로 Th2 세포로서 IL-4, IL-5 등의 cytokine을 생성하여, 혈중 IgE의 상승을 촉진하고, 호산구의 증가를 유도한다. cAMP phosphodiesterase가 상승되어 있는 아토피 피부염의 비정상적인 단구에 의해 PGE의 생성이 증가하게 되고 이로 인해 Th1 림프구의 침윤이 억제된다. 또한 Th1 림프구는 아토피 피부염에서 쉽게 활성화되는 비만세포로부터 유리된 TNF에 의해서도 억제된다⁴⁷⁻⁵⁰⁾. 아토피 피부염에서 Th1의 감소된 기능은 Th1증식을 억제하고 결국 세포매개성 면역의 저하를 초래한다. 각종 cytokine은 혈관 내피세포를 활성화하여 여러 세포유착분자의 발현을 유도하거나 증가시켜 기억 T림프구의 복귀를 촉진시킴으로써 습진성 병변이 유발되게 된다⁵¹⁻²⁾.

아토피 피부염의 치료방법으로는 전신 및 국소 치료법으로 항히스타민제, 부신피질호르몬제, 항균제, 탈감작 요법, 광선요법, 면역요법 등이 시행되고 있지만 일부 환자에서는 반응하지 않는 경우도 많고, 다양한 부작용이 발생하기도 하고, 증상이 완화된다고 하더라도 지속적으로 재발하기도 한다. 따라서 새로운 아토피피부염 치료제의 개발이 절실히 필요한 실정이며, 치료제의 개발과 관련된 재료로 최근에는 부작용이 적은 한약제 등 천연물이 관심을 받고 있다⁵³⁻⁵⁾.

아토피 피부염의 한의학적 범주는 《素問: 玉

機眞藏論篇¹⁰⁾에서 “浸淫”이라고 기록된 이후, 《金匱要略》¹¹⁾에서부터는 “浸淫瘡”이라 기록되어 있고, 《諸病源候論》¹²⁾에 이르러 “乳癬”이란 기록이 있으며, 《外科正宗》¹³⁾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 혼용되고 있다¹⁴⁾.

아토피 피부염의 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 있다¹⁴⁻⁷⁾.

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, 苦參, 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로 구성된⁵⁶⁾ 經驗方으로, 임상에서 熱毒, 濕熱 등의 원인으로 발생하는 피부염에 주로 사용되고 있다. 構成 藥物 중 苦參⁵⁷⁻⁸⁾, 黃柏⁵⁹⁾, 防風⁶⁰⁾, 金銀花⁶¹⁻²⁾, 蟬蛻⁶³⁾ 등은 이미 항염증 작용과 항알레르기 작용이 보고된 바가 있다.

이에 임상에서 아토피 피부염 환자들에게 多用되고 있으며 임상에서 효과를 보이고 있는 약물로 구성된 驅風除濕湯이 아토피 피부염에 실험적으로도 효과가 있을 것으로 보여 NC/Nga mice에서 clinical skin score 값, 혈중 IgE치, 면역세포의 변화, 혈청 내 cytokine과 immunoglobulin 생성량, 피부조직에 미치는 영향 등을 알아보고자 본 실험에 임하게 되었다.

현재까지 아토피성 피부염 발생과 원인적 연관성을 갖고 있는 것으로 확인된 물질이 부재한 상황이어서 본 연구에서는 접촉성 알레르기성 피부염을 유발하는 것으로 알려진 DNCB를 이용하여 사람에게서 발생하는 아토피성피부염의

면역학적 이상과 유사한 과민반응 발현을 NC/Nga mice에서 유도할 수 있었다⁶⁴⁻⁸⁾. DNCB는 acetone이나 alcohol과 같은 기체 (carrier solution)에 녹여 피부에 바르면 국소적 면역반응을 유도하는 것으로 알려진 피부 증감제 (skin sensitizer)이다⁶⁹⁻⁷¹⁾. 피부에 접촉한 후 수 분 뒤 DNCB는 피부에 스며들어 hapten을 형성하고, epidermal langerhans cells은 DNCB hapten을 CD4⁺ T cells에 제시하여 면역반응이 활성화 된다⁷²⁻³⁾.

연구에서 사용한 NC/Nga mice는 자발적 아토피성 피부염 유발 모델로 잘 알려져 있으며⁷⁴⁾ 최근엔 IgE와 Th2 cytokine 생성에 필수적인 stat6 knockout NC/Nga mice를 만들어 시험한 결과, 피부염이 여전히 자발적으로 유도되어 흔히 예상한 기전 이외에 다른 기전으로 피부염이 유도되는 것으로 예상되고 있다. 이러한 장점에도 불구하고 자발적인 피부염 유도비율이 낮고, 유도된 피부염의 severity에도 차이가 심해 평가를 위해 신뢰할 만한 모델 수준은 되지 못하고 있는 것이 사실이다. 이에 일본에서는 hapten 형성 물질인 picryl chloride (1-chloro 2,4,6-trinitro benzene)을 이용하여 피부염을 인위적으로 유도하여 이러한 문제를 해결하고 있다⁷⁵⁾. 그러나 picryl chloride의 경우 국내 반입이 금지되어 이용할 수 없음에 여기에선 구조적으로 picryl chloride와 유사하여 같은 기전으로 작용하는 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)을 이용하여 시험을 진행하여 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 이 모델에 의하면 아토피성 피부염의 주된 증상들 (가려움, IgE증가, 피부염증)을 모두 관찰할 수 있었고, 더 나아가 아토피성 피부염의 치료제로 잘 알려진 국소 스테로이드나 경구용 cyclosporin 의해 증상이 완전히 치유되는 현상을 관찰할 수 있다.

NC/Nga mice의 등 피부에 DNCB를 도포하여 피부염을 유발시킨 후 GPJST의 피부발진 억제 효과를 관찰한 결과, 아토피 피부염에서 나타날 수

있는 소양, 건조, 부종, 혈종, 짓무름, 태선화 등의 임상적 증상 (clinical score)이 GPJST 투여군에서 유의성 ($p < 0.001$) 있게 줄어들었고 (Fig. 1), 아토피 피부염의 대표적인 면역학적 지표인 혈청 중 IgE 수준은 DNCB 도포 후 8 주에서 DNCB 를 도포하지 않은 정상군에 비하여 대조군이 약 4배 이상 증가하였고, GPJST 투여시 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 IgE가 아토피 환자에서 중요한 인자로 작용하여 피부 발진 등의 원인이 되기 때문에 GPJST의 투여로 인한 IgE의 감소는 피부발진 억제에 큰 역할을 하는 것으로 생각된다.

IgE 생산의 증가와 세포매개성 면역의 결여가 함께 나타난다는 것은 IgE 생성을 조절하는 T세포의 결함에 의한다는 것을 의미한다. $CD4^+$ Th2 세포에서 분비되는 여러 cytokine 중 IL-4와 IL-13이 B세포의 IgE 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 시험관 내에서 IFN- γ 는 IL-4에 의한 IgE 생성을 억제하고 IL-4는 IFN- γ 의 발현과 분비를 억제시키는 복잡한 상호조절 장치를 갖고 있다. IL-4는 B세포나 단핵구상의 Fc ϵ R2/CD23의 발현을 증가시키고 수용성 CD23은 IgE 결합인자로서 B세포의 IgE 생산을 조절한다⁷⁶⁻⁸⁾. 이러한 결과들로 보아 IL-4 생성 Th2 세포가 IgE 생성에 결정적 역할을 하는 것으로 생각되나 이러한 기전이 알레르겐 특이 IgE 항체 합성에도 관여하는지 알아볼 필요가 있다⁷⁹⁾. 실험에서 비장세포 배양 상층액에서 IL-4와 IFN- γ 의 생성량을 알아본 결과, GPJST 투여군이 대조군에 비해 IL-4는 유의성 ($p < 0.001$) 있게 감소하였고, IFN- γ 는 대조군에 비하여 증가하였다 (Fig. 12). 이는 GPJST이 IFN- γ 의 생성을 촉진시킴으로써 IgE 생성을 억제시키는 효과를 나타내는 것으로 볼 수 있다.

면역조직화학염색을 통하여 귀와 등 피부조직의 상피층 (epidermis)에 존재하는 $CD4^+$ Th2 세포를 관찰한 결과, 대조군에는 상피층에 많은 수의

$CD4^+$ Th2 세포가 분포하지만, GPJST를 투여한 실험군에서는 현저하게 $CD4^+$ Th2 세포가 감소된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 16, 17).

PBMCs와 DLN에서 염증활성 면역 세포의 변화를 관찰한 결과, PBMCs에서의 $CD4^+$ 와 $CB8^+$ 세포 수는 모두 GPJST 투여군에서 유의성 ($p < 0.05$) 있는 감소효과를 나타내었고 (Fig. 4), $CD3^+$ $CD69^+$ 세포 수(%)는 정상군에 비하여 DNCB로 유도된 대조군이 증가하였고, GPJST 투여군에서는 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.001$) 있게 감소하였다 (Fig. 5). DNL에서는 $CD3^+$ 와 $CD19^+$ 의 세포 수 모두 대조군에서 정상군에 비해 증가하였고, GPJST 투여군에서는 대조군에 비하여 현저한 감소를 나타내었다 (Fig. 7). $CD3^+$ $CD69^+$ 세포 수는 정상군에 비하여 DNCB로 유도된 대조군이 증가하였고, GPJST 투여군에서는 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 8). 이러한 염증활성 면역세포는 자가 항원에 의하여 활성화되어, 염증 cytokine인 IL-6와 TNF- α 의 수준을 증가시킨다. 실험에서도 혈청 중 IL-6와 TNF- α 수준 모두 DNCB로 유도된 대조군에 비하여 GPJST 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 11). 또한 NC/Nga mice의 등 피부조직을 biopsy하여 유전자 발현 정도를 RT-PCR로 관찰한 결과, IL-6 mRNA 유전자 발현은 DNCB로 유도된 대조군에 비하여 GPJST 투여군의 RQ 값이 66%이상 감소를 나타내었고 (Fig. 18), TNF- α mRNA 유전자 발현도 대조군에 비하여 약 35%이상 감소하였다 (Fig. 19). 이는 GPJST가 자가 항원 등으로 유도된 염증활성 면역세포를 억제하여 염증 cytokines를 억제하는 것으로 생각된다.

자가 항원으로 피부발진 부위에는 호산구, 비만세포, 백혈구의 이동 및 활성화에 중요한 CCR3, eotaxin 및 macrohage chemoattractant protein (MCP) 등의 chemokine 축적이 관찰된다⁸⁰⁻⁴⁾. 이 중 대표적인 비만세포와 호산구화학유인물질인 eotaxin은

CCR3의 ligand로 주로 상피세포에서 분비되고 피부 섬유아세포에서도 분비된다. 비만세포, 호산구, 호염기구, Th2 세포 등에 존재하는 CCR3 수용체와 eotaxin이 결합하여 염증세포들이 피부조직 내로 이동한다⁸⁵). Eotaxin은 염증반응 초기에 국소 비만세포와 호산구증을 유발하며 이후 연속반응을 통해 더욱 강력한 비만세포증 및 호산구증을 일으킨다. 이 과정은 eotaxin 단독 작용 보다 IL-5 및 IL-13과 같은 cytokine과의 상호작용을 통해 극대화되고, 특히 IL-13은 상피세포를 자극하여 eotaxin의 분비를 증가시키고, 비만세포 및 호산구 화학주성을 유발하는 강력한 인자로 알려져 있다⁸⁶⁻⁸⁸). IL-13은 T 세포외에 비만세포, 호염기구, 가지세포 (dendritic cell), 각질세포 등에서도 분비되고, IL-4와 수용체를 공유하여 IL-4와 유사한 작용을 나타낸다⁸⁹). 아토피 혹은 비아토피 천식, 아토피 피부염, 알레르기 비염, 만성 부비동염 및 type II 육아종성 질환에서도 IL-13의 증가가 보고되었다. eotaxin 같은 chemokine도 조직염증을 유발한다⁹⁰⁻¹). 즉, chemokine은 8-10 kDa basic heparin-binding polypeptide mediators의 family로 염증 조직 부위로 염증백혈구세포를 recruitment하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이는 2개의 cysteine과 2개의 main subfamilie인 CXC 그리고 CC로 구분된다. eotaxin은 CC chemokine으로 잠재적인 chemoattractant와 호산구 활성화⁸¹)과 basophils 활성을⁹²⁻³) 하는 것으로 알려져 있다. 또한 Th2 세포의 유인인자로 보고되고 있다⁸⁹). eotaxin은 다양한 조직에서 생산되는데, 호산구, 임파구, 대식세포, chondrocytes, fibroblasts, 평활근, endothelial, 그리고 epithelial 세포 등이다^{80-1,85,94-5}). eotaxin의 활성화로 chemokine receptor CCR3에 결합하는데, CCR3는 호산구, 호중구, 비만세포, 그리고 Th2 세포에서 발현된다^{85,88-9,93}). 또한 아토피에서 eotaxin과 CCR3가 피부 발진에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다^{85,88,93,96}).

실험 결과, DNCB로 유도된 NC/Nga mice의 등 피부조직에서 cDNA를 합성하여 eotaxin과 CCR3 mRNA 유전자 발현을 대조군과 비교하여 DNCB로 유도된 대조군의 RQ 값을 1이라 했을 때, GPJST 투여군의 등 피부조직에서의 eotaxin mRNA 유전자 발현이 대조군에 비하여 RQ 값이 45% 감소를 나타내었고, CCR3 mRNA 유전자 발현은 대조군에 비하여 RQ 값이 65% 감소를 나타내었다 (Fig. 20, 21). 또한 말초혈액의 PBMC에서 CCR3⁺ 활성화세포가 DNCB로 유도된 대조군에 비하여 현저하게 증가하였고, GPJST 투여한 실험군은 2배 이상 감소를 나타내었다 (Fig. 6). 그리고 등 피부 조직을 biopsy하여 FACS로 분석한 결과에서도 CCR3⁺CD3⁺ 활성화세포가 대조군에 비하여 GPJST 투여군이 현저하게 감소를 나타내었고 (Fig. 9), 귀와 등 피부 조직에서 면역형광조직염색을 통하여, DNCB로 유도된 대조군에 비하여 GPJST 투여군의 CCR3⁺ 활성화세포가 현저하게 감소를 나타낸 것을 알 수 있었다 (Fig. 16, 17).

이러한 결과는 DNCB로 유도된 아토피 피부염 NC/Nga mice에서 피부발진 조직으로 염증세포들이 이동하는 기전 중 eotaxin과 CCR3의 상호작용을 GPJST가 방해하여 피부발진을 억제하는 것으로 생각된다.

Eosinophil에 eotaxin의 활성화에 의한 발현과 축적으로 CCR3는 알레르기성 비염과 천식을 유발하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다^{80-1,85,95}). 그리고 다른 보고에 의하면 eotaxin이 염증부위로 recruit된 단핵세포와 호산구 세포와 마찬가지로 epithelial 그리고 endothelial 세포 같은 resident 세포들에서 발현된다. 또한 발진피부에 있는 eotaxin의 발현은 주로 fibroblast 안에 mononuclear 세포와 eosinophil, 중요한 keratinocytes의 활성화로 관찰되었고⁸²), 발진피부에 있는 CCR3 immunoreactive 세포는 mononuclear 세포와 eosinophil 등과 같이 진피에서 현저하게 관찰되어⁹⁵) 실험 결과와 일치

하였다.

B세포는 Th2 세포의 신호를 받아 분화를 하고 IgE와 immunoglobulin을 분비하게 된다. 일반적으로 IL-4에 의해 isotype switching이 유도되는 IgG1 수준과 IFN- γ 에 의해 isotype switching되는 IgG2a 수준은 만성 피부질환 동물의 혈청에서 증가되어 나타난다⁹⁷⁻⁹⁹.

실험에서 혈청 중 IgM, IgG1, IgG2a 및 IgG2b의 수준을 측정된 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 증가되었으며 GPJST 투여로 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 13). 이는 DNCB 같은 알레르기 매개체에 의한 B 세포의 활성화에 따라 IgG isotype 분비가 증가되는데, GPJST에 의해 B 세포의 항원에 대한 항체생산의 분화가 억제된 것으로 생각된다.

아토피 피부발진이 심화되면 피부발진 부위에 Th2 세포, 호산구, 단핵구, 비만세포 등 면역염증 세포가 증가하게 되고, 표피층이 두꺼워지는 원인을 제공하여 만성 피부질환 동물의 피부발진을 계속 유지하고 악화시키는데 기여하게 된다¹⁰⁰. 면역 조절작용 중 myeloid 세포의 역할은 다양한 질환 상태에 관여하여 면역 억제작용을 하는 것으로 이해되고 있으며 세포의 성장과 분화에도 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다¹⁰¹⁻⁴. 그리고 myeloid suppressor cells (MSC)의 특징은 macrophage (Mac-1/CD11b)와 granulocyte (Gr-1) lineages 공통적으로 모두 표면분자를 발현하는 것이다¹⁰¹. 이 CD11b⁺Gr-1⁺ MSC는 spleen, lymph nodes에서 염증 피부 및 조직으로 이동하여 많이 존재하는데, 이 세포는 antibody production, cytotoxic T lymphocyte (CTL) generation, 그리고 lymphocyte proliferative responses를 억제하여 아토피의 경우 만성피부질환을 계속적으로 심화시키는 역할을 한다^{101,104-5}.

아토피 피부발진 피부부위를 biopsy하여 세포를 분리하여 FACS로 침윤된 세포들을 분석한 결과,

활성 CD11b⁺Gr-1⁺ MSC 세포 수는 DNCB를 도포하지 않은 정상군에 비하여 대조군이 현저하게 증가하였고, CsA을 투여한 양성대조군은 대조군에 비하여 현저하게 감소하였으며, GPJST 투여군은 대조군에 비해 약 4배정도 감소하였다 (Fig. 10).

등 피부조직에서의 총 면역세포수를 측정한 결과, DNCB로 유도된 대조군에서 정상군에 비해 현저한 증가를 보였고, GPJST을 투여한 실험군은 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.01$) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 3). 또한 GPJST이 피부조직에 미치는 영향을 알아보기로 실험 종료 후 귀와 등 피부조직을 H&E 염색과 toluidine 염색을 하여 관찰한 결과, DNCB로 유도된 대조군의 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, 백혈구와 비만세포의 침윤이 많이 관찰된 반면, GPJST 투여군은 epidermis와 dermis의 두께와 백혈구의 침윤도 감소하여 상대적으로 부종이 감소하고 비만세포의 침윤도 거의 관찰할 수 없었다 (Fig. 14, 15).

이상의 결과로 미루어 보아 驅風除濕湯은 아토피 피부염 치료에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

驅風除濕湯이 NC/Nga mice의 아토피 피부염에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 驅風除濕湯이 DNCB로 유발된 피부발진의 clinical score값을 감소시켰다.
2. 驅風除濕湯은 혈청 중 IgE, IL-6, TNF- α

- 함유량을 유의성 있게 감소시켰다.
3. 驅風除濕湯은 혈청에서 IgG1, IgM, IgG2a 그리고 IgG2b의 혈중 수준을 유의성 있게 감소시켰다.
 4. 驅風除濕湯은 PBMCs에서 CD3⁺CD69⁺, CCR3⁺의 총 활성화세포수를 정상군에 가깝게 회복시켰다.
 5. 驅風除濕湯은 DLN에서 CD3⁺, CD3⁺CD69⁺의 총 활성화세포수를 유의성 있게 감소시켰다.
 6. 驅風除濕湯은 등 피부조직에서 CD11b⁺ Gr-1⁺, CCR3⁺CD3⁺의 총 절대 세포수를 유의성 있게 감소시켰다.
 7. 驅風除濕湯은 등 피부조직에서 IL-6, TNF- α , CCR3, Eotaxin mRNA 유전자 발현을 감소시켰다.
 8. 驅風除濕湯은 귀와 등 피부조직에서 epidermis와 dermis부분의 염증 정도와 염증면역 세포의 침윤을 감소시켰다.
 9. 驅風除濕湯은 귀와 등 피부조직에서 CD4⁺와 CCR3⁺ 세포의 조직침윤을 현저하게 감소시켰다.

- 적인 연구. 소아알레르기 및 호흡기. 2003;13(4):227-37.
5. Halbert AR, Weston WL, Moreli JG. Atopic dermatitis : is it an allergic disease? J Am Acad Dermatol. 1995;33:1008-18.
 6. Leung DYM. Pathogenesis of atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol. 1999;104:99-108.
 7. Mosmann TR, Coffman RI. Th1 and Th2 cells : Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol. 1989;7:145-73.
 8. Babe KS, Serafin WE. Histamine, Bradykinin, and their antagonists. In : Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB et al. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 3th ed. International edition. New York:Mcgraw-Hill. 1996:589-90.
 9. Guzzo CA, Lazatus GS, Werth VP. Dermatological pharmacology. In : Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB et al. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 3th ed. International ed. New York:Mcgraw-Hill. 1996:1595-611.
 10. 홍원식 편저. 정교황제내경소문, 서울:동양 의학연구원출판부. 1985:72-80, 246.
 11. 宋書功 主編. 金匱要略 廣州校註. 北京:人民衛生出版社. 1994:221-25.
 12. 巢元方 編著. 巢氏諸病源候論. 서울:대성 문화사. 1992:251-53.
 13. 陳實功. 外科正宗. 北京:人民衛生出版社. 1983:269.
 14. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연. 아토피 피부염의 동, 서의학적 문헌고찰. 대한안이비인후피부과학회지. 2002;15(1):226-52.
 15. 馬紹堯. 現代中醫皮膚性病學. 上海:上海中醫藥大學出版社. 2001:153-60.
 16. 金起鳳, 周德英 主編. 中醫皮膚病學. 北京:

參考文獻

1. Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2006;117:S475-80.
2. Oranje AP, de Waard-van der Spek, Flora B. Atopic dermatitis : review 2000 to January 2001. Curr Opin Pediatr. 2002;14:410-13.
3. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. Lancet. 2003;361:151-60.
4. 오재원, 김규원, 편복양 외 18명. 1995년과 2000년의 학동기와 2003년 학동전기 소아에서의 아토피 피부염의 역학적 변화에 관한 전국

- 中國醫藥科技出版社, 1999:193-98.
17. 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: 475-93.
 18. Yamamoto M, Haruna T, Yasui K, Takahashi H, Iduhara M, Takaki S, Deguchi M, Arimura A. A novel atopic dermatitis model induced by topical application with dermatophagoides farinae extract in NC/Nga mice. *Allergol Int.* 2007;56(2): 139-48.
 19. Marks R, Kilkenny M, Plunkett A, Merlin K. The prevalence of common skin conditions in Australian school students. *Br J Dermatol.* 1999;140:468-73.
 20. 丁奎萬. Allergy와 韓方. 서울:第一路 1990: 101-8.
 21. 장호선. 아토피 피부염의 진단과 치료 가정의 학회지. 2002;23:831-8.
 22. Lewis-Jones MS, Finlay AY. The Children's Dermatology Life Quality Index(CDLQI): initial validation and practical use. *Br J Dermatol.* 1995;132:942-9.
 23. Howlett S. Emotional dysfunction child-family relationships and childhood atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 1999;140:381-4.
 24. 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.
 25. 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;137:241-45.
 26. 박창근, 박천옥, 이철현. 유, 소아기 아토피 피부염이 환자의 삶의 질과 가족에 미치는 영향. *대한피부과학회지.* 2007;45(5):429-38.
 27. Yura A, Shimizu T. Trends in the prevalence of atopic dermatitis in school children: longitudinal study in Osaka Prefecture, Japan, from 1985 to 1997. *Br J Dermatol.* 2001;145(6):966-73.
 28. Amerson AB. Allergic and drug induced skin disease. In: Herfindal ET, Gourley DR. editor. Text book of therapeutics-Drug and disease management. 7th ed. Baltimore(MD): Lippincott Williams & Wilkins. 2000:973-88.
 29. Chang TT, Stevens SR. Atopic dermatitis: the role of recombinant interferone-gamma therapy. *Am J Clin Dermatol.* 2002;3(3):175-83.
 30. Stander S, Steinhoff M. Pathophysiology of pruritus in atopic dermatitis: an overview. *Exp Dermatol.* 2002;11(1):12-24.
 31. Arkwright PD, Daniel TO, Sanyal D, David TJ, Patel L. Age related prevalence and antibiotic resistance of pathogenic staphylococci and streptococci in children with infected atopic dermatitis at a single-specialty center. *Arch Dermatol.* 2002; 138 (7):939-41.
 32. Raimer SS. Managing pediatric atopic dermatitis. *Clin Pediatr.* 2000;39:1-14.
 33. Eigenmann PA. Clinical features and diagnostic criteria of atopic dermatitis in relation to age. *Pediatr Allergy Immunol.* 14(12):69-74.
 34. Reitamo S, Rustin M, Ruzicka T, Cambazard F, Kalimo K, Friedmann PS et al. Efficacy and safety of tacrolimus ointment compared with that of hydrocortisone butyrate ointment in adult patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(3):547-55.
 35. Ormerod AD. What is new in therapy. *Br J Dermatol.* 2001;145:691-95.
 36. Deguchi H, Danno K, Sugiura H, Uehara M.

- Sun exposure is an aggravating factor responsible for the recalcitrant facial erythema in adult patients with atopic dermatitis. *Dermatology*. 2002;204(1):23-8.
37. Capella GL, Grigerio E, Altomare G. A randomized trial of leukotrien receptor antagonist montelukast in moderate-to-severe atopic dermatitis. *Eur J Dermatol*. 2001;11(3):209-13.
 38. Akdis CA, Akdis M, Bieber T, Bindslev-Jensen C et al. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy. *Asthma and Immunology /PRACTALL Consensus Report*. *Allergy*. 2006;61(8):969-87.
 39. Spergel JM, Palier AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112S:118-27.
 40. Noverr MC, Huffnagle GB. The "microflora hypothesis" of allergic disease. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:1511-20.
 41. Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis-the epidemiological evidence. *Immunobiology*. 2007;212(6):433-9.
 42. Hashizume H, Horibe T, Ohshima A et al. Anxiety accelerates T-helper 2-tilted immune responses in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2005;152:1161-4.
 43. Friedman NJ, Zieger RS. The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115:1238-48.
 44. Kull I, Bohme M, Wahlgren CF et al. Breast-feeding reduces the risk for childhood eczema. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:657-61.
 45. Denburg JA, Hatfield HM, Cyr MM et al. Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal progenitors at birth in infants at risk of atopy. *Pediatr Res*. 2005;57:276-81.
 46. Wijga AH, van Houwelingen AC, Kerkhof M et al. Breast milk fatty acids and allergic disease in preschool children: The Prevention and incidence of asthma and mite allergy birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:440-7.
 47. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomized placebocontrolled trial. *Lancet*. 2001;357:1076-9.
 48. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T et al. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of randomized placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003;361:1869-71.
 49. Chang YC, Lin CC, Hsu CH. Inhibition of allergy-induced airway inflammation and hyperreactivity by recombinant lactic-acid bacteria. *Vaccine*. 2006;24:5931-6.
 50. Brouwer ML, Wolt-Plompen SA, Dubois AE et al. No effects of probiotics on atopic dermatitis in infancy: A randomized placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy*. 2006;36:899-906.
 51. Wright RJ. Alternative modalities for asthma that reduce stress and modify mood states: Evidence for underlying psychobiologic mechanisms. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004;93:S18-23.
 52. Chan-Yeung M, Ferguson A, Watson W et al. The Canadian Childhood Asthma Primary Prevention Study: Outcomes at 7 years of age. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:49-55.
 53. 강형재 외. *피부과학*. 서울:대한 피부과학회 교과서 편찬위원회. 1994:21-5, 133-8.
 54. *대한피부과학회. 피부과학*. 서울:여문각. 1994:

- 133-8.
55. 이지현 외 10인. 아토피피부염학회 보고서: 한국 아토피피부염의 치료지침. *대한피부과학회지*. 2004;44(8):907-13.
 56. 全國韓醫科大學 本草學教室 共編著. 本草學. 서울:도서출판 永林社. 2002:131-2, 142-4, 155-6, 182-3, 185-6, 198-9, 201-2, 292-4, 302-4, 306-8, 321-2, 448-9.
 57. 정선영. 苦蔘의 생쥐의 B-cells에 미치는 항알레르기 효과. *경희대학교 대학원*. 2002.
 58. 우무륜 외. 苦蔘이 알러지성 염증 반응에 미치는 영향. *대전대학교 한의학연구소 논문집*. 2006;15(2):135-148.
 59. 최수임 외. 생약재 추출물의 hyaluronidase 저해 및 라디칼 소거 활성 검색. *한국생물공학회지*. 2003;18(4):282-8.
 60. 김동민. 防風과 갯防風의 항염증 효과 비교 연구. *경희대학교 대학원*. 2006.
 61. 김상찬. 金銀花 화장수가 DNCB로 유발된 접촉성 피부염에 미치는 영향. *대한본초학회지*. 2006;21(1):9-15.
 62. 이정현. 접촉성 피부염에서 黃連, 黃連解毒湯, 金銀花가 림프구 활성화에 미치는 영향. *동아대학교 대학원*. 2000.
 63. 김광호 외. 蟬蛻가 알레르기의 예방에 미치는 영향. *동의병리학회지*. 1993;8(1):225-34.
 64. Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y, Akaiwa M, Mao XQ, Enomoto T et al. Upregulation of IL-13 concentraion in vivo the IL-13 variant associated with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:980-7.
 65. O'Bryan L, Pinkston P, Kumaraswami V, Vijayan V, Yenokida G, Rosenberg HF et al. Localized eosinophil degranulation mediates disease in tropical pulmonary eosinophilia. *Infect Immunol*. 2003;71:1337-42.
 66. Min JW, Jang AS, Park SM, Lee JH, Park SW, Park CS. Comparison of plasma eotaxin family level in aspirin-induced and aspirin-tolerant asthma patient. *Chest*. 2005;128:127-32.
 67. Li J, Saito H, Crawford L, Inman MD, Cyr MM, Denburg JA. Haemopoietic mechanisms in murine allergic upper and lower airway inflammation. *Immunology*. 2005;114:386-96.
 68. Taube C, Duez C, Cui ZH, Takeda K, Rha YH, Park JW et al. The role of IL-13 in established allergic airway disease. *J Immunol*. 2002;169:6482-9.
 69. 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.
 70. Stricker RB, Elswood BF, Abrams DI. Dendritic cells and dinitrochlorobenzene: a new treatment approach to AIDS. *Immunol Lett*. 1991;29(3):191-6.
 71. Hill S, Edwards AJ, Kimber I, Knight SC. Systemic migration of dendritic cells during atopic sensitization. *Immunology*. 1990;71:277-81.
 72. Gawkrödger DJ, Haftek M, Botham PA, Carr MM, Spencer MJ, Ross JA, Hunter JA, Thivolet J. The hapten in atopic hypersensitivity to dinitrochlorobenzene: immunoelectron microscopic and immunofluorescent studies. *Dermatologica*. 1989;178(3):126-30.
 73. Bang D, Nakagawa S, Oka D, Taikēi 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.
 74. Konji Matsushima et al. The NC/Nga mouse: a

- model for atopic dermatitis. *Molecular medicine today*. 2000;6:209-10.
75. 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.
 76. Leiferman KM, Gleich GJ. The role of eosinophils in atopic dermatitis, In: Leung DYM eds. *Atopic Dermatitis. From Pathogenesis to Treatment*. Heidelberg: Springer-Verlag. 1996:145-72.
 77. Leung DYM, Hamid Q. The immunology of atopic dermatitis. In: Leung DYM eds. *Atopic Dermatitis. From Pathogenesis to Treatment*. Heidelberg:Springer-Verlag. 1996:113-43.
 78. Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H et al. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J Clin Invest*. 1997;99:1767-73.
 79. Luster AD. Chemokine - chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Engl J Med*. 1998;338:436-45.
 80. Mattoli S, Stacey MA, Sun G, Bellini A, Marini M. Eotaxin expression and eosinophilic inflammation in asthma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236:299-301.
 81. Minshall EM, Cameron L, Lavigne F et al. Eotaxin mRNA and protein expression in chronic sinusitis and allergen-induced nasal responses in seasonal allergic rhinitis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;17:683-90.
 82. Mochizuki M, Bartels J, Mallet AI, Christophers E, Schröder JM. IL-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. *J Immunol*. 1998;160:60-8.
 83. Ohmen JD, Hanifin JM, Nickoloff BJ et al. Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions. *J Immunol*. 1995;154:1956-63.
 84. Ponath PD, Qin S, Post TW et al. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. *J Exp Med*. 1996;183:2437-48.
 85. Ponath PD, Qin S, Ringler DJ et al. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin, expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J Clin Invest*. 1996;97(3):604-12.
 86. Van Reijssen FC, Bruijnzeel-Koomen CA, Kalthoff FS, Maggi E, Romagnani S, Westland JK, Mudde GC. Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1992;90:184-93.
 87. Romagnani S. Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996;80:225-35.
 88. Rubbert A, Combadiere C, Ostrowski M et al. Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry. *J Immunol*. 1998;160:3933-41.
 89. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science*. 1997;277:2005-7.
 90. Schröder JM, Noso N, Sticherling M, Christophers E. Role of eosinophil-chemotactic C-C chemokines in cutaneous inflammation. *J Leuk Biol*. 1996;59:1-5.
 91. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human

- chemokines: an update. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:675-705.
92. Tiffany HL, Alkhatib G, Combadiere C, Berger EA, Murphy PM. CC Chemokine receptors 1 and 3 differentially regulated by IL-5 during maturation of eosinophilic HL-60 cells. *J. Immunol.* 1998;160(3):1385-92.
93. Uguccioni M, Mackay CR, Ochsenger B et al. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest.* 1997;100:1137-43.
94. Bartels J, Schlüter C, Richter E, Noso N, Kulke R, Christophers D, Schröder JM. Human dermal fibroblasts expression eotaxin: molecular cloning mRNA expression and identification of eotaxin sequence variants. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;225:1045-51.
95. Ying S, Robinson DS, Meng Q et al. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *Eur J Immunol.* 1997;27:3507-16.
96. Daugherty BL, Siciliano SJ, DeMartino JA, Malkovitz L, Sirotna A, Springer MS. Cloning expression and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J Exp Med.* 1996;183:2349-54.
97. Ulfgrén AK, Lindblad S, Klareskog L, Andresson J, Andresson U. Detection of cytokine producing cells in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheumatic Diseases.* 1995;54:654-61.
98. Xia MQ, Qin SX, Wu LJ, Mackay CR, Hyman BT. Immunohistochemical study of the beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 and their ligands in normal and Alzheimers disease brains. *Am J Pathol.* 1998;153:3137.
99. Yamada H, Hirai K, Miyamasu M et al. Eotaxin is a potent chemotaxin for human basophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;231:365-8.
100. Ying S, Taborda-Barata L, Meng Q, Humbert M, Kay AB. The kinetics of allergen-induced transcription of messenger RNA for monocyte chemotactic protein-3 and RANTES in the skin of human atopic subjects: relationship to eosinophil, T cell, and macrophage recruitment. *J Exp Med.* 1995;181:2153-9.
101. Bronte V, Wang M, Overwijk WW et al. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J Immunol.* 1998;161(10):5313-20.
102. Bronte V, Chappel DB, Apolloni E, Cabrelle A, Wang M, Hwu P, Restifo NP. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol.* 1998; 162(10):5728-37.
103. al-Ramadi BK, Brodtkin MA, Mosser DM, Eisenstein TK. Immunosuppression induced by attenuated Salmonella: evidence for mediation by macrophage precursors. *J Immunol.* 1991; 146(8):2737-46.
104. Inigo Angulo, Federico Gomez de las Heras, Jose F. Garcia-Bustos, Domingo Gargallo, M. Angeles Munoz-Fernandez, and Manuel Fresno. Nitric oxide-producing CD11b(+)Ly-6G(Gr-1)(+)CD31(ER-MP12)(+) cells in the spleen of cyclophosphamide-treated mice: implications

- for T-cell responses in immunosuppressed mice. Blood. 2000;95(1):212-20.
105. Young MR, Wright MA, Matthews JP, Malik I, Prechel M. Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor-b and nitric oxide. J Immunol. 1996; 156(5):1916-22.