

# 아토피 피부염 동물 모델에서 아토피 크림과 紫雲膏의 병용도포가 피부염에 미치는 영향

여의주 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

## Abstract

### Effects of Atopy Cream-combined with Jawoongo Ointment on the Development of Atopic Dermatitis-like Skin Lesions in NC/Nga Mouse

Yeo Eui Ju, Han Jae Kyung, Kim Yun Hee

*Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dae Jeon University*

#### Objectives

The purpose of this study is to investigate the suppressive effects of Atopy cream-combined with Jawoongo ointment (A-J), on the development of atopic dermatitis-like skinlesions in NC/Nga mouse.

#### Methods

We evaluated clinical skin score, hematology and Serum total IgE and IgG1 of NC/Nga atopic dermatitis mouse, analyzed the cytokine level, total cell number, Immunohistochemical staining and Histological features of axillary lymph node(ALN), draining lymph node(DLN), peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) and dorsal skin tissue in NC/Nga mouse.

#### Results

A-J decreased the clinical skin score, total cell number of WBC, platelet, neutrophils, eosinophils in blood, Serum total IgE & IgG1, IL-5, IL-13. Also, total cell number of ALN and dorsal skin tissue, Absolute cell number of CD3e<sup>+</sup>&CD19<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>&CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CXCR5<sup>+</sup> in ALN, PBMCs, Absolute cell number of CCR3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> in dorsalskin tissue, Eotaxin2 mRNA, CCR3 mRNA in dorsal skin tissue and gene expression of IL-5 mRNA, IL-13 mRNA in ALN decreased significantly. Furthermore, thickness of epidermis, infiltrated inflammatory immune cell and mast cell in dermis, histologic infiltration of mast cell, the size of inflammatory lymphocytes cells and plasma cells in ALN and histologic infiltration of CD4<sup>+</sup> & CCR3<sup>+</sup> in ALN and dorsal skin tissue decreased significantly. However, total cell number of DLN, absolute cell number of CD3e<sup>+</sup>&CD19<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>&CD8<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> increased significantly.

#### Conclusions

A-J was the successful treatment of atopic dermatitis in a NC/Nga mouse model.

**Key words** : Atopic dermatitis, Jawoongo ointment, Atopy cream, NC/Nga mouse

■투 고 : 2009년 3월 24일, 수 정 : 2009년 4월 15일, 채 택 : 2009년 4월 20일

■교신저자 : 여의주, 충남 보령시 천북면 신죽리 295-1

(Tel : 041-632-0720, E-mail : foxlang@hanmail.net)

## I. 緒 論

아토피 피부염은 재발이 잦고 만성으로 경과하는 흔한 염증성 피부 질환으로, 피부 소양증에 대한 역치가 낮아 심한 소양감과 이로 인한 2차적인 습진이 형성되며<sup>1)</sup>, 홍반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등이 특징적으로 나타난다<sup>2)</sup>.

아토피 피부염의 정확한 기전은 알려져 있지 않지만, 유전적, 환경적 요인과 함께 면역학적 기능 이상이 복잡하게 연관되어 발생하는 것으로 추측되고 있다<sup>3)</sup>.

아토피 피부염에서 소양증은 환자로 하여금 반복적으로 병변을 긁게 하여 2차적인 병변을 형성시켜 재발과 만성화의 경과를 유도한다. 따라서 신속하게 소양증을 경감시키는 것이 중요한 치료 목표가 되며 이를 위해 다양한 치료 방법들이 시도되고 있으나 치료에 잘 반응하지 않는 경우가 많으며<sup>4)</sup>, 아토피 피부염의 치료제로 흔히 사용되는 스테로이드 외용제는 장기간 사용했을 때 피부의 위축이나 소아 환자에서 성장 지연의 가능성 등 각종 부작용이 문제되고 있어 새로운 외용제에 대한 필요성이 증가하고 있다<sup>5-7)</sup>.

아토피 피부염은 일반적으로 IgE 합성의 증가와 호산구 증가증이 나타나는데 기존의 면역학적 연구에 의하면 IL-4, IL-5와 같은 Th2 cytokine이 증가하고 Th1 cytokine인 IFN- $\gamma$ 의 분비가 감소하는 것과 관련이 있는 것으로 보고되었으며, 이러한 Th1과 Th2의 불균형을 조절하는 방법으로 피부염의 치료에 접근하고 있다<sup>8-13)</sup>.

아토피 크림은 항염작용과 소독작용이 있는 tea tree, lavender, chamomile-roman으로 구성된 아로마 오일과 보습작용이 있는 베이스 크림으로 만든 외용제로 아토피 피부염의 염증을

줄여주는 역할을 하며<sup>14)</sup>, 紫雲膏는 《外科正宗》<sup>15)</sup>에 기재된 潤肌膏라는 膏藥에 豚脂를 加하여<sup>16)</sup> 皮膚를 滋潤하여 祛風止痒할 목적으로 立方되었다.

최근의 연구 경향을 살펴보면 임상에서 사용되는 한약이 아토피 피부염 환자의 면역 조절에 미치는 영향에 대한 연구<sup>17,18)</sup>가 활발히 이루어지고 있고, 외용제인 紫雲膏에 대한 실험적 연구로는 이<sup>19)</sup>와 어<sup>20)</sup>등의 紫雲膏의 生肌作用 및 창상치료 효과에 대한 것이 있으며 이등<sup>21)</sup>이 紫雲膏加金銀花가 창상에 미치는 효과에 대하여 보고한 바가 있고, 한 등<sup>22)</sup>이 임상에서 한약과 외용제를 병용하여 치료한 사례를 보고한 바 있으나, 아로마 오일 제제인 아토피 크림과 紫雲膏가 아토피 피부염에 미치는 영향에 대한 실험적 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 본 연구에서는 NC/Nga 생쥐에 Biostir Mite antigen cream을 도포하여 아토피 피부염을 유발시킨 후 직접 조제한 아토피 크림과 紫雲膏를 병용 도포하여 아토피 피부염의 발진 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 하였다. 이에 저자는 NC/Nga 생쥐의 clinical skin score, hematology 및 혈청 중 IgE와 IgG 수준을 분석하였고, axillary lymph node(ALN), draining lymph node(DLN), peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) 및 등피부조직에서 cytokine level, 총세포수, 유세포형광분석 및 염증유전자 발현 분석을 하였다. ALN과 등피부조직에서 H&E 염색을 통하여 epidermis의 두께와 toluidine blue 염색을 통하여 비만 세포의 침윤정도를 관찰하였으며 면역화학조직 염색을 통하여 ALN에 침윤된 CCR3<sup>+</sup> 세포와 등피부조직에 분포하는 CD4<sup>+</sup> 세포를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재료

#### 1) 시약 및 기기

##### (1) 시약

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbo-nate(DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, 적혈구 용혈액 (ACK lysis solution), DMEM 배양액, dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), Sulforhodamin B(SRB), 2-isopropanol, sodium dodecyl sulfate(SDS), PMA, ionomycin, FK506, antibiotics는 Sigma사 (USA) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (Logan, USA) 제품을, anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein iso-thiocyanate), anti-CCR3-PE, anti-B220-PE, anti-CD8-FITC, anti-B220-FITC, anti-CD49b-FITC, anti-CD40 mAb, mL-4, mL-10, BD Cytotfix/Cytoperm plus kit, anti-CD3 mAb, anti-foxp3-PE, anti-IFN- $\gamma$ -PE, anti-CD8 mAb등은 Pharmingen 사 (Torreyana, USA) 제품을, CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit와 B cell isolation kit는 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) 제품을, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-13 ELISA kit는 BioSource 사 (California, USA) 제품을, IgE, IgG1 ELISA kit는 SHIBAYAGI 사 (Shibukawa, Japan) 제품을, anti-mouse CCR3 mAb와 anti-mouse CD4 mAb는 Santa-Cruz사 (California, USA) 제품을, LSAB kit는 DAKO사 (Glostrup, Denmark) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

##### (2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480,

Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, USA), deep-freezer (Sanyo, Japan), 자동혈구측정기 (MS9-5, France), Quantitative Real-Time RT-PCR (Applied Biosystems, USA), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, USA), plate shaker (Lab-Line, USA), VarioMACS (Bergisch Gladbach, Germany), FACScalibur (BD, USA) 및 ELISA leader (Molecular Devices, USA) 등을 사용하였다.

#### 2) 동물

수컷 7 주령의 SPF(specific pathogen-free) NC/Nga 생쥐 (15~20 g)는 Charles River Japan (Yokohama, Japan)사에서 공급받았다. 동물은 실험 당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2 °C, 습도 55±15 %, 12 시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 3) 아토피 크림 조제

본 실험에 사용된 아토피 크림의 베이스 크림과 아로마 오일은 Fine Korea Co. (Inchon, Korea)에서 구입하였으며 그 배합은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition of Atopy Cream

Aroma-oil	
Tea tree	10 drops
Lavender	7 drops
Chamomile-roman	3 drops
Base Cream	20 ml

Table 2. Composition of Jawoongo

Herbal Name	Scientific Name	Amount (g)
紫 草	Lithospermi Radix	0.074
當 歸	Angelicae Gigantis Radix	0.049
胡麻油	Sesameseed Oil	0.613
蜜 蠟	Bees Wax	0.245
豚 脂	Swine Oil	0.019
Total		1.000

#### 4) 紫雲膏 조제

紫雲膏의 구성은 《大田大學校 韓方病院 處方集》<sup>23)</sup>에 준하였으며, 사용한 약재들은 대전대학교 둔산한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고 그 내용과 1 g 당 조성은 다음과 같다(Table 2).

## 2. 방법

### 1) 피부염 유도 및 시료처리

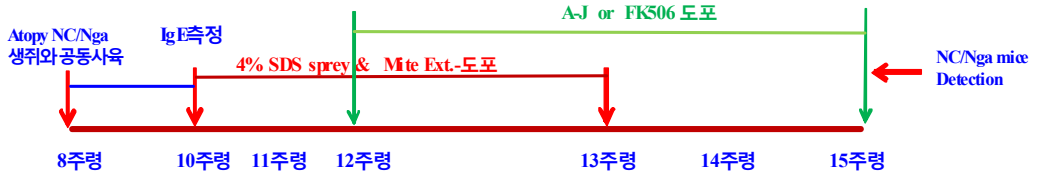
7 주령의 NC/Nga 생쥐를 1 주일 동안 적응시킨 후, 이미 conventional한 상태에서 피부염이 발생한 18 주령의 NC/Nga 생쥐(Atopy NC/Nga 생쥐)와 2 주간 같은 공간에서 동시 사육하여 항원감작을 시킨 후(10주령) capillary 관을 이용하여 눈에서 100  $\mu$ l의 혈액을 채혈하였다. 마취제인 chloral hydrate (10%)로 마취한 후 등 쪽 목 부위를 깨끗하게 제모한 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24 시간 방치하였다. 중앙실험동물에서 제공하는 Biostir Mite antigen cream(Mite Ext.)은 *Dematophagoides farinae* crude extract (Mite antigen, lyophilized)를 항원으로 제조된 것으로 진드기 항원 0.5% Tween 20이 포함된 ointment base로 제작되었다. 이를 1주에 2회 3주간(10~13 주령) 등 부위 및 목 부분에 고르게 도포하였고, 도포 2 시간 전에 4% SDS 용액을 분무하여 피부염이 잘 유발되도록 피부층을 파괴하였다(scheme 1). 2 주 후

(15 주령) 등부분에 피부염이 충분히 유발되면서 긁는 행동이 심화되면 육안 평가를 실시하였다. 정상군(Normal, Nr)은 7 주령 NC/Nga 생쥐를 15 주령까지 SPF(specific pathogen -free) 조건에서 사육하였다.

### 2) 약물처리 및 치료평가

실험은 7 주령 NC/Nga 생쥐를 15 주령까지 SPF 조건에서 사육한 정상군(Normal, Nr)과 Mite Ext.를 도포한 대조군 (control, CT), Mite Ext.를 도포하고 FK506 (tacrolimus 0.3%)을 도포한 양성대조군 (positive control, PC), 그리고 Mite Ext.를 도포하고 A-J (아토피 크림-紫雲膏)를 도포한 실험군으로 나누어 실시하였으며, 각 군당 개체 수는 6 마리로 하였다.

Mite Ext.는 10 주령부터 13 주령까지 3 주간 월, 목요일에 4% SDS 용액을 분무하고 2 시간 경과 후 등에 200  $\mu$ l씩 도포하였다(오전 11시, 총 6 회). 그리고 Mite Ext. 도포 시작 2 주 후 (12 주령) 피부 발진을 확인하고, 12 주령부터 15 주령까지 3 주간 매일 A-J를 각각 1회씩 등부분에 골고루 도포하였다(오후 3-4시, 아토피 크림 도포 1 시간 후 紫雲膏 도포, 200  $\mu$ l/마리). 또한 양성 대조 약물로 FK506도 12 주령부터 15 주령까지 3 주간 매일 1 회 등부분에 골고루 도포하였다. 실험 종료 후 (15 주령)에 임상적 육안 평가를 실시한 다음 혈액을



Scheme 1. Experimental design for the induction of atopic dermatitis like lesions in NC/Nga mouse.

채혈하고 등 부위의 피부를 절제하여 10 % 포르말린 용액에 담아 보관하였다.

### 3) Clinical skin score

실험 종료 후 15 주령에서 임상적 육안 평가를 실시하였으며, 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 Yamamoto M의 방법을 약간 변형하여 이용하였다. 육안 평가 항목은 erythema/hemorrhage, dryness/scarring, edema, excoriation/erosion, lichenification 5 가지 항목으로 하고, 육안 평가 결과는 각각 평가한 점수의 총합으로 나타냈다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였으며 최소 0 점에서, 최고 15 점 사이의 점수를 측정하였다<sup>24)</sup>.

### 4) Hematology

최종 임상적 육안 평가를 실시한 후 EDTA 처리된 튜브형 주사기로 심장 혈액 0.5 ml를 채취하였다. 진혈을 바이오투스텍(주) (청주, 충청북도)에 의뢰하여 혈액 중 적혈구, 백혈구, Hemoglobin 그리고 혈소판의 총 세포수를 측정하였으며, 백혈구 중 호중구, 호산구, 호염기구 및 림프구, 단핵구의 세포수를 측정하였다. 측정은 자동혈구측정기(MS9-5, MELET SCHLOESING, France)로 Fonio법<sup>25)</sup>에 준하여 Minos -ST로 시행하였다.

### 5) 채혈 및 IgE와 IgG1 측정

NC/Nga 생쥐의 눈에서 8 주령, 12 주령, 15 주령에 capillary 관을 이용하여 약 100  $\mu$ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기 6,500 rpm에서 20 분간 원심분리한 후 30  $\mu$ l의 혈청을 분리하여 IgE 수준을 측정하였고, IgG1 수준은 15 주령의 NC/Nga 생쥐를 ethylether로 흡입 마취한 다음 심장천자법으로 혈액을 분리한 후, 각각의 혈청을 취하여 -70  $^{\circ}$ C에 냉동 보관하였다. NC/Nga 생쥐의 혈청 내 IgE와 IgG1 농도는 enzyme-linked immuno-sorbent assay로 측정하였다. IgE는 NC/Nga 생쥐에서 8 주령, 12 주령, 15 주령에 채혈한 혈청 5  $\mu$ l (1/10 dilution)와 dilution buffer 45  $\mu$ l를 혼합하여 96 well plate의 각 well에 분주하였고, IgG1은 15 주령에서 채혈한 혈청 50  $\mu$ l (1/10 dilution)과 dilution buffer 50  $\mu$ l를 혼합하여 각 well에 분주하였다. 각각 2 시간 동안 25  $^{\circ}$ C 실온에서 방치한 후 2 회 washing 완충용액으로 세척한 다음 각각 antibody biotin-IgE conjugated와 antibody biotin-IgG1 conjugated를 넣고 2 시간 방치하였다. 다시 2 회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100  $\mu$ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100  $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA leader 450 nm에서 각각 IgE와 IgG1에 대한 흡광도를 측정하였다<sup>26)</sup>.

## 6) ALN 세포분리 및 cytokine 측정

실험 종료 후(15 주령) ALN를 적출하여 100 mesh로 ALN 세포를 분리하였다. 전날 Mite-Ext. 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 96 well plate에 coating하여 4 °C 냉장고에서 overnight한 다음 D-PBS로 2 회 수세하였다. 분리한 ALN 세포는 ACK 용액으로 RBC를 제거한 후 Mite-Ext.가 coating된 각각의 well에  $5 \times 10^5$  세포씩 5% FBS-DMEM 배양액에서 48 시간 동안 배양한 후, 원심분리기 2,000 rpm에서 3 분간 원심분리한 후 200  $\mu\text{l}$ 의 배양상층액을 얻었다. 배양상층액 내의 IL-4 (BioSource, USA), IFN- $\gamma$  (BioSource, USA), IL-5 (BioSource, USA), IL-13 (R&D system, USA)의 수준 측정은 enzyme-linked immuno-sorbent assay로 측정하였다. 각 well에 배양상층액 50  $\mu\text{l}$ 를 분주하고, 2 시간 동안 25 °C 실온에서 방치한 후 2 회 washing 완충용액으로 세척한 다음 각각 antibody biotin-IL-4 conjugated, antibody biotin-IL-5 conjugated, antibody biotin-IL-13 conjugated를 넣고 2 시간 방치하였다. 다시 2 회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100  $\mu\text{l}$ 를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100  $\mu\text{l}$ 의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 7) ALN, DLN, PBMCs, 등피부조직의 형광 유세포 분석

실험 종료 후 NC/Nga 생쥐에서 ALN과 DLN를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 처리 후 1,700 rpm에서 5 분간 원심분리하고 2 회 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. PBMCs는 실험을 종료한 후 NC/Nga 생쥐에서 heparin

을 처리한 3 ml 주사기로 채혈한 후 미리 준비한 10 ml의 ACK용액 (8.3 g NH<sub>4</sub>Cl, 1 g KHCO<sub>3</sub>, in 1 l of demineralized water + 0.1 mM EDTA)에 혼합하여 실온에서 5 분 동안 처리하여 적혈구를 제거하였다. 2 회 1 %의 FBS가 함유된 PBS (FACS buffer)로 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 불순물을 제거하였다. 등피부조직은 잘게 chopping한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2 % FBS + RPMI 1640)를 넣고 37 °C shaker (180 rpm, 20 min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4 회 반복하였다.

분리한 ALN, DLN, PBMCs 그리고 등피부조직의 총 세포수를 측정한 다음 모든 조직의 세포 등을  $5 \times 10^5$  세포로 조정한 후 4 °C에서 면역형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-CD8e-PE, anti-CD19-FITC, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD49b-FITC, anti-CCR3-PE 그리고 anti-B220-PE를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3 회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup> 그리고 B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> 세포수를 백분율(%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대세포수(total absolute cell number)를 산출하였다.

## 8) Quantitative real-time-PCR in dorsal skin tissue and ALN

### (1) 등피부조직과 ALN에서 RNA 분리

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 등피부조직과 ALN를 적출하여 각각에 RNAzol<sup>B</sup> 500  $\mu\text{l}$ 를 넣고 용해될 때까지 homogenizer로 분쇄하였다. 이 조직분쇄 혼합 부유액에 chloroform (CHCl<sub>3</sub>) 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200  $\mu\text{l}$

의 상층액을 회수하여 2-propanol 200  $\mu$ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80 % EtOH로 수세하고 3 분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20  $\mu$ l의 증류수에 녹여 heating block 75  $^{\circ}$ C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

reverse transcription 반응은 준비된 total RNA 2  $\mu$ g을 DNase I (10 U/ $\mu$ l) 2 U/tube를 37  $^{\circ}$ C heating block에서 30 분간 반응시킨 후 75  $^{\circ}$ C에서 10 분 동안 변성시키고, 이에 2.5  $\mu$ l 10 mM dNTPs mix, 1  $\mu$ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25  $\mu$ l), RNA inhibitor로서 1  $\mu$ l RNase inhibitor (20 U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l 100 mM DTT, 4.5  $\mu$ l 5 $\times$ RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1  $\mu$ l의 M-MLV RT (200 U/ $\mu$ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20  $\mu$ l가 되도록 하였다. 이 20  $\mu$ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 초간 원심 침강시키고 37  $^{\circ}$ C

heating block에서 60 분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95  $^{\circ}$ C에서 5 분 동안 방치하여 M-MLV RT(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega, USA)를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(3) Quantitative real-time RT-PCR

Quantitative real-time PCR은 7500 Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다<sup>27)</sup>.

Mouse Olionucleotid의 염기배열은 다음과 같다(Table 3).

Cytokine 유전자 발현은 SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master mix를 사용하였고, internal standard는 GAPDH로 Taqman probe를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Eotaxin 2와 CCR3 mRNA 발현은 등피부조직에서 관찰하였고, Th2 mediate인 IL-4, IL-5와 IL-13 mRNA 유전자 발현량 분석은 ALN에서 cDNA를 합성하여 분석하였다.

Quantitative real-time PCR의 조건은 pre-denaturation은 2 min at 50  $^{\circ}$ C, 10 min 94  $^{\circ}$ C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95  $^{\circ}$ C, 1 min at 60  $^{\circ}$ C에서 수

Table 3. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
GAPDH	Forward	5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
	Reverse	5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'
Eotaxin 2	Forward	5' CTGTGACCATCCCCTCATCT 3'
	Reverse	5' CTTATGGCCCTTCTTTGGTGA 3'
CCR3	Forward	5' CCCGAAGTGTGACTTTTGCT 3'
	Reverse	5' CCTCTGGATAGCGAGGACTG 3'
IL-5	Forward	5' AGCCTAACCTGTGTGGAGGT 3'
	Reverse	5' GTGATCGGCTTTTCTTGAGC 3'
IL-13	Forward	5' ATGCCCAACAAAGCAGAGAC 3'
	Reverse	5' TGAGAGAACCAGGGAGCTGT 3'

행하였다. FK506 도포군과 A-J 도포군의 대조군은 internal standard로 GAPDH를 사용하였고 target group의 Quantitative PCR은  $y = x(1+e)^{-n}$   $x =$  starting quantity  $y =$  yield  $n =$  number of cycles  $e =$  efficiency로 계산하여 RQ (relative quantitative) 을 측정하였다.

### 9) Histology 분석

ALN과 등 쪽 목 부분의 피부를 떼어내어 10 % paraform-aldehyde에서 24 시간 동안 포르말린에 고정하였다. 그 조직을 파라핀으로 포매하였고, 5  $\mu$ m 두께로 block을 만들었다. 그 조직부분은 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils, eosinophils 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline/eosin (H&E) 염색과 비만 세포를 염색하는 toluidine blue 염색으로 비만 세포의 침윤을 광학현미경 (Nikon, Japan,  $\times 200$ )으로 관찰하였다<sup>28)</sup>.

### 10) 면역화학조직염색 분석

모든 NC/Nga 생쥐는 15 주령에서 면역화학조직염색을 위하여 등쪽 피부를 적출하여 10 % 포르말린 용액에 고정한 다음 파라핀 블록을 만든 후 rat anti-mouse CCR3 mAb와 rat anti-mouse CD4 mAb를 사용하였다. 조직 절편을 4  $\mu$ m 두께로 세절하고 probe-on plus slide에 부착시켜 건조시켰다. 그리고 탈 파라핀 (deparaffinized) 후 합수시킨 다음 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)를 이용해 microwave oven에 15 분간 전 처리하였다. 조직 내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 10 분간 처리한 후, 조직 내의 항원과 비특이적 단백질 결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시켰다. 그리고 일차 단일항체에 1 시간 동안 부착시킨 다음 완충액으로 수세하였다. LSAB kit를 이용하여

PE-conjugated goat anti-rat IgG에 30 분간 반응시키고, 3 회 tris-buffered saline with 0.1% tween 20(TBST)용액으로 수세한 후 잘 건조하였다. 현미경은 형광위상차현미경을 사용하여  $\times 400$  배율로 관찰하였다<sup>29)</sup>.

### 3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean $\pm$  standard error로 기록하였고, 유효성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하였다<sup>30)</sup>.

## III. 成 績

### 1. Mite Ext.를 이용한 아토피 피부염 유발

10 주령의 NC/Nga 생쥐의 등 부위에 4 % SDS용액을 분무하고 Mite Ext.를 1 주에 2 회씩 2 주간 도포하기 전과 후의 사진으로, 2 주간 도포 후 사진에서는 긁는 행동을 동반한 흥반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등의 증상이 뚜렷하게 확인되었다.

### 2. A-J 도포 3 주 후 경과

정상군(A)은 피부발진이 전혀 없었고 3 주간 Mite Ext.를 도포하고 대조군(B)은 등피부에 긁는 행동을 동반한 흥반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등의 증상이 나타났다. FK506 도포군(C)은 대조군에 비하여 현저하게 피부발진이 줄어 정상군에 가깝게 억제되었다. A-J 도포군(D)은 대조군에 비해 흥반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등이 감소한 것을 알 수 있다(Fig. 3).



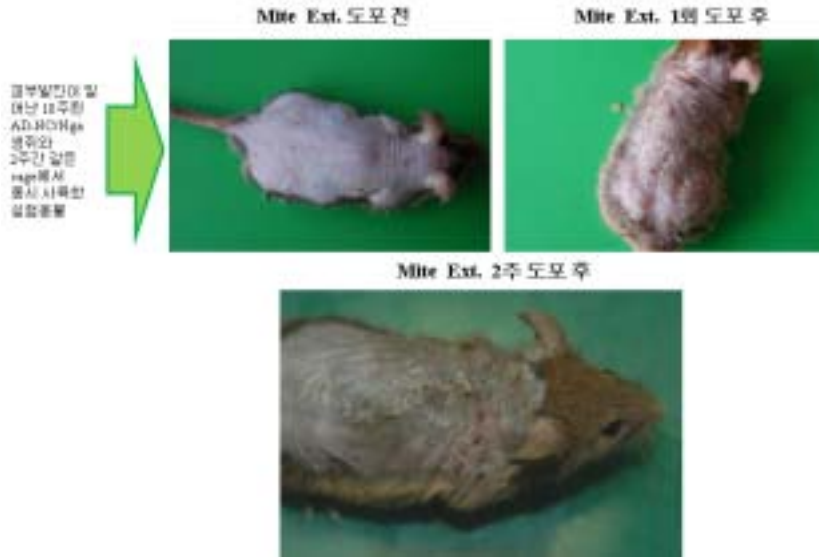


Fig. 1. Atopic dermatitis-like skin lesions induced in NC/Nga mouse by Mite Ext.  
Skin features of NC/Nga mouse after 2 weeks Mite Ext. application and typical photograph of each group.



Fig. 2. Topical application of FK506 or A-J ointment of dermatitis in NC/Nga mouse for 3 weeks.  
Shown are back of non treated Mite Ext. NC/Nga mouse (Normal, A), Mite Ext.-ointment NC/Nga mouse (control, B), Mite Ext. plus FK506 (0.3%)-ointment NC/Nga mouse (Mite-FK506, C) and Mite Ext. plus A-J (200  $\mu$ l/mouse)-ointment NC/Nga mouse (Mite-A-J, D) for 3 weeks.

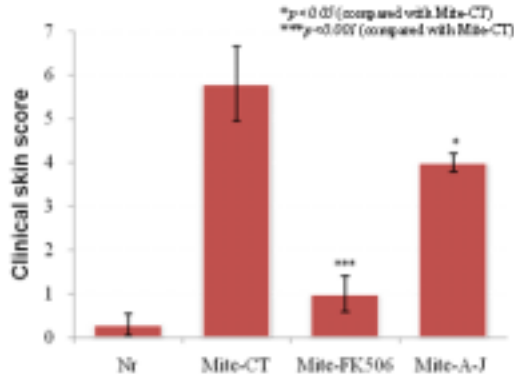


Fig. 3. Clinical skin features and severity of atopic dermatitis skin lesions in NC/Nga mouse induced by Mite Ext..

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite Ext. treatment in the dorsal skin, non treated Mite Ext. NC/Nga mouse (SPF group, Nr), Mite Ext.-ointment NC/Nga mouse (control), Mite Ext. plus FK506 (0.3%-ointment NC/Nga mouse (Mite-FK506) and Mite Ext. plus A-J (200  $\mu$ l/mouse)-ointment NC/Nga mouse (Mite-A-J) for 3 weeks. A total clinical severity score for atopic dermatitis-like lesions 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, scarring/dryness, edema, excoriation/erosion and lichenification) on the three parts of the body: ear, face and head and back. Each point represents the mean $\pm$ SE of six mice.

### 3. Clinical skin score

clinical skin score를 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 증가를 나타내었고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 감소를 나타내었으며(p<0.001), A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(p<0.05)(Fig. 4).

### 4. Hematology

실험 종료 후 WBC의 수를 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.05) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 4A).

RBC의 수와 Hemoglobin의 양을 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 감소하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 없었으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.05, p<0.01) 증가하였다 (Fig. 4B, 4C).

platelet의 수를 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.01) 감소하였다(Fig. 4D).

실험 종료 후 WBC의 neutrophils의 비율은 정상군에 비하여 대조군은 증가하였고, FK506 도포군과 A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.01) 감소하였다. lymphocytes의 비율은 정상군에 비하여 대조군은 약간 감소하였고, FK506 도포군과 A-J 도포군 모두 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.05, p<0.01) 증가하였다(Fig. 5A).

WBC의 수중 monocytes, eosinophils, basophils의 비율을 분석한 결과, monocytes의 비율은 모든 실험군에서 큰 차이가 나타나지 않았다. eosinophils의 비율은 정상군에 비하여 대조군은 증가하였고, FK506 도포군과 A-J 도포군의 eosinophils의 비율은 대조군에 비하여 유의성

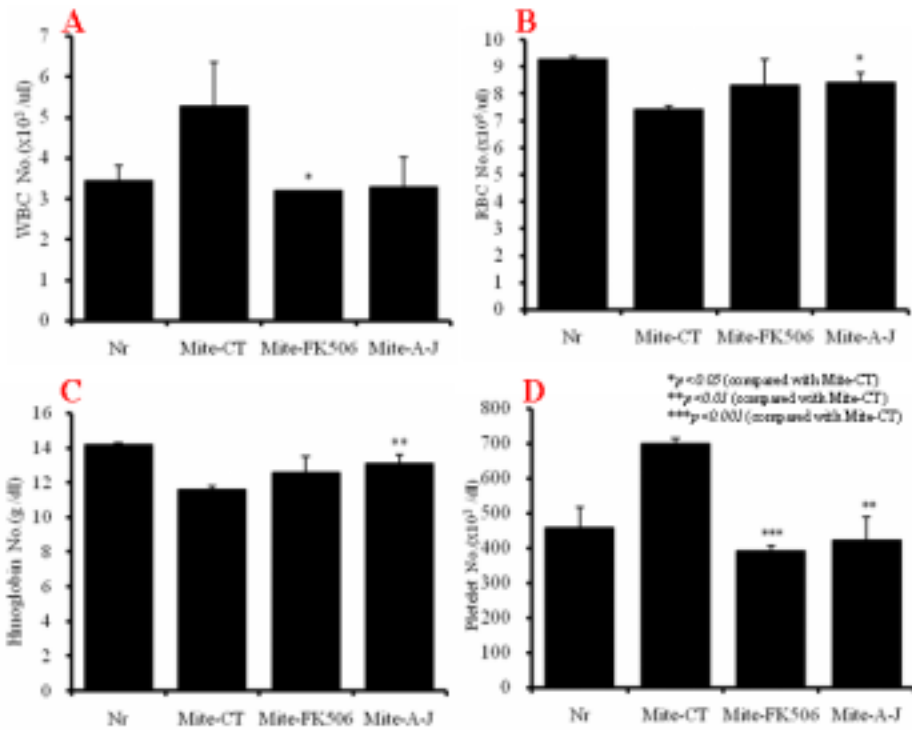


Fig. 4. Hematology in NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment–atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%)–ointment or A-J (200 μl/mouse)–ointment for 3 weeks. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately thereafter. Cell contents were measured by hematology (BD, USA).

있게( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) 감소하였다. Basophils의 비율은 정상군에 비하여 대조군은 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.05$ ) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 5B).

### 5. 혈청 IgE와 IgG1에 미치는 영향

혈청 IgE의 변화를 측정된 결과, 혈청 IgE의 양은 8 주령 NC/Nga 생쥐에서 자연적으로 증가되고, 대조군은 12 주령에서 정상군과 차이가 없이 IgE 수준이 증가하였다. FK506 도포군과 A-J 도포군은 12 주령 이후 감소하여 15

주령에서는 대조군에 비해 유의성 있게 ( $p < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 7A).

혈청 내 IgG1의 수준은 대조군은 정상군에 비해 증가하였고, FK506 도포군이 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 감소하였고, A-J 도포군은 대조군에 비해 유의성 있게( $p < 0.05$ ) 감소하였다(Fig. 7B).

### 6. Cytokine level in ALN of NC/Nga mouse

IFN- $\gamma$ 는 정상군에 비하여 대조군은 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군과 차이를 나타내지 않았다(Fig. 7A).

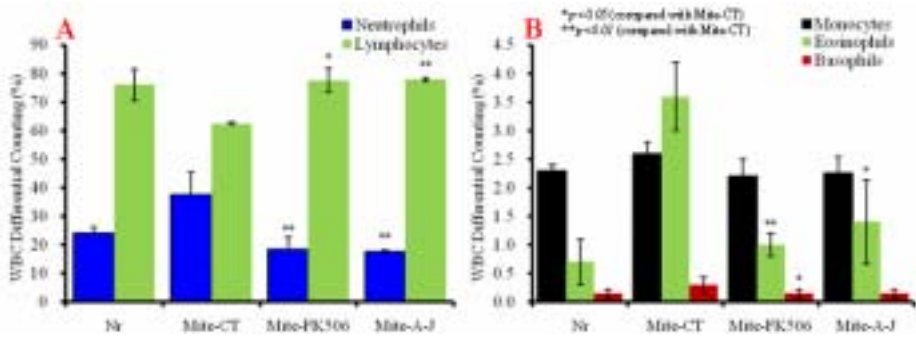


Fig. 5. WBC differential counting in NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200 μl/mouse) ointment for 3 weeks. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately thereafter. Cell contents were measured by hematology (BD, USA).

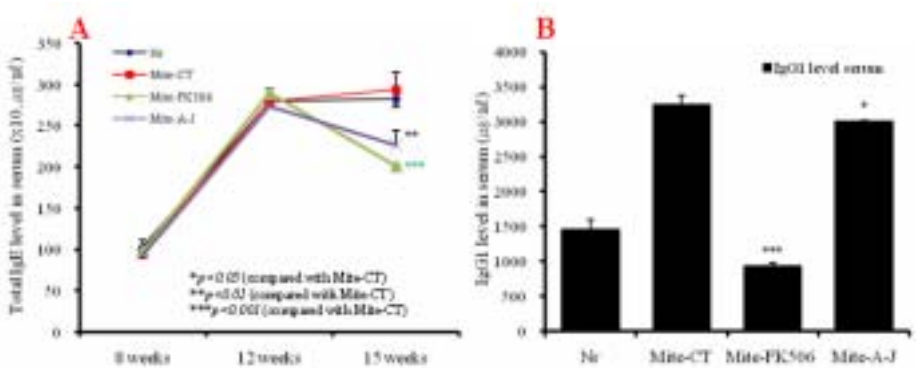


Fig. 6. Serum IgE & IgG1 elevation and development of atopy dermatitis skin lesions-induced in NC/Nga mouse.

Shown are back of non treated Mite Ext. NC/Nga mouse (SPF group, Nr), Mite Ext. ointment NC/Nga mouse (control), Mite Ext. plus FK506 (0.3%) ointment NC/Nga mouse (Mite-FK506) and Mite Ext. plus A-J (200 μl/mouse) ointment NC/Nga mouse (Mite-A-J) for 3 weeks. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately thereafter. Serum samples were obtained by centrifugation and stored at -20°C until use. Total IgE and IgG1 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Shibayagi, Japan). Each point represents the mean±SE of six mice.

IL-4는 모든 실험군에서 차이가 나타나지 않았다(Fig. 7B).

IL-5와 IL-13은 정상군에 비하여 대조군은 각각 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 약간 감소하였

으나 유의성은 없었다(Fig. 7C).

### 7. ALN, DLN과 등피부조직의 총 세포수

ALN의 총세포수는 정상군에 비하여 대조군은 증가하였고, FK506 도포군과 A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001, p<0.01)

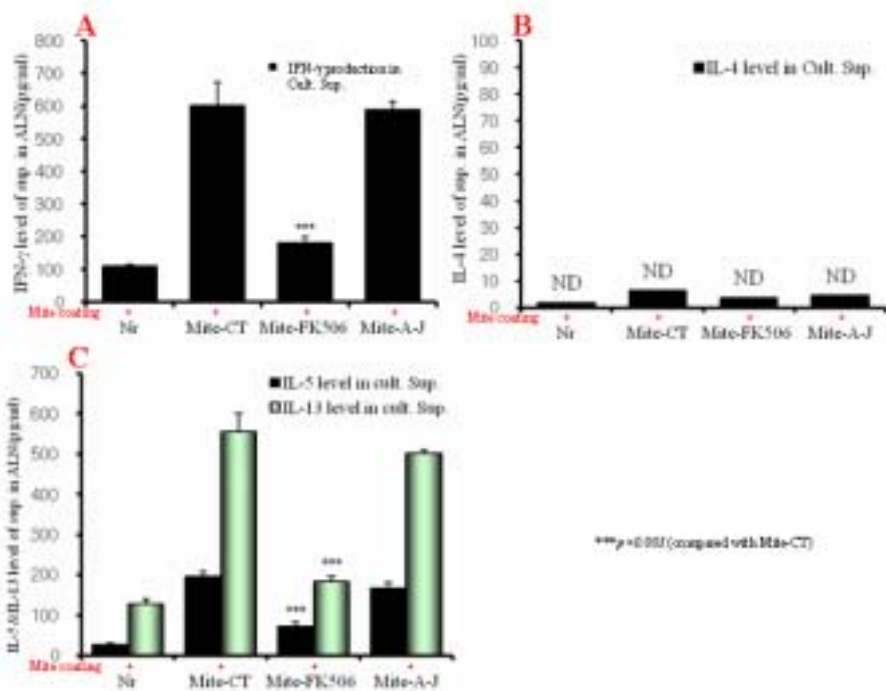


Fig. 7. Culture supernatant IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-13 level in ALN of NC/Nga mouse. Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse) ointment for 3 weeks. ALN from mouse at 15 weeks of age were re-stimulated with Mite Ext. antigen (1  $\mu$ g/ml) for 48 hrs. IL-4, IL-5, IL-13, and IFN- $\gamma$  levels were measured by a sandwich ELISA using an mouse ELISA kit I (Biosource, USA).

감소하였다(Fig. 8A).

DLN의 총세포수는 정상군에 비하여 대조군은 감소하였고, FK506 도포군과 A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ) 증가하였다(Fig. 8B).

등피부조직의 총세포수는 정상군에 비하여 대조군은 증가하였고, FK506 도포군과 A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 8C).

### 8. NC/Nga 생쥐의 ALN, PBMCs, DLN의 활성화 세포 비율 및 절대세포수

#### 1) ALN에서 CD3<sup>+</sup>&CD19<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>&CD8<sup>+</sup>의 cell content와 절대세포수

활성 CD3<sup>+</sup> T 세포의 빈도(%)는 정상군(51.1%)에 비하여 대조군(61.7%)은 증가하였고, FK 506 도포군(50.9%)과 A-J 도포군(52.1%)은 대조군에 비하여 감소하였다. 활성 CD19<sup>+</sup> B 세포의 빈도(%)는 대조군(29.8%)은 정상군(32.1%)과 큰 차이가 없었고, FK506 도포군(39.5%)과 A-J 도포군(36.8%)은 대조군에 비하여 증가하였다(Fig. 9A).

활성 CD4<sup>+</sup> Th 세포의 빈도(%)는 정상군(26.7%)에 비하여 대조군(34.9%)은 증가하였고, FK506 도포군(22.0%)과 A-J 도포군(25.4%)은 대조군에 비하여 감소하였다. 활성 CD8<sup>+</sup>

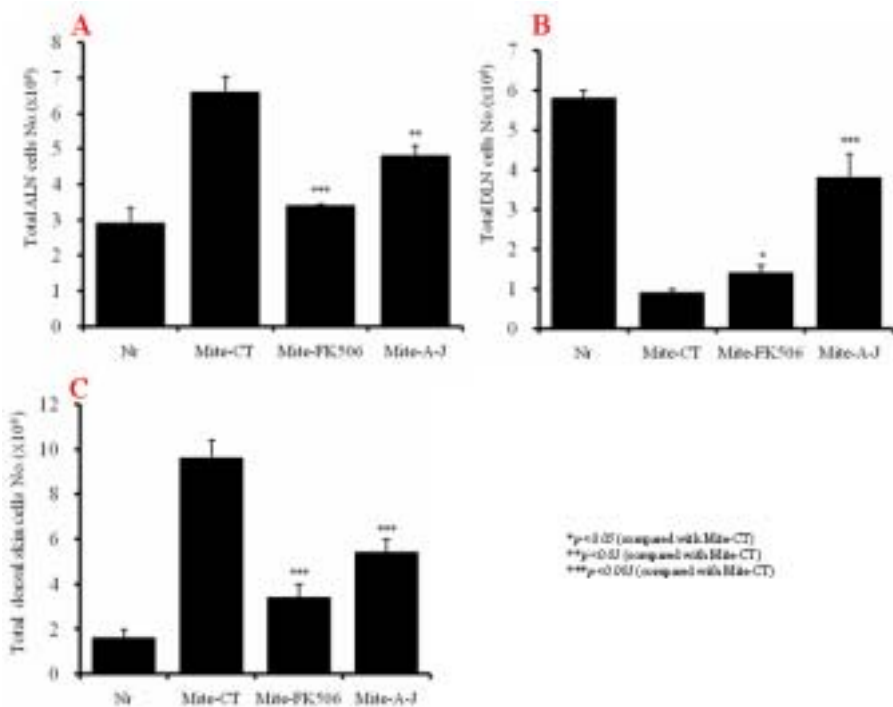


Fig. 8. Total cell number of ALN, DLN and Dorsal skin in NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200 μl/mouse) ointment for 3 weeks.

c/sT 세포의 빈도(%)는 대조군(18.5%)은 정상군(17.3%)과 큰 차이가 없었고, FK506 도포군(14.1%)은 대조군에 비하여 감소하였으며, A-J 도포군(22.6%)은 대조군에 비하여 증가하였다 (Fig. 9B).

CD3<sup>+</sup> T 세포의 절대세포수는 대조군은 정상군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.01) 감소하였다. CD19<sup>+</sup> B 세포의 절대세포수는 대조군은 정상군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.01) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 9C).

CD4<sup>+</sup> Th 세포의 절대세포수는 대조군은 정상군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군과 A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 감소하였다. CD8<sup>+</sup> c/sT 세포의 절대세포수는 대조군은 정상군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 감소하였다(Fig. 9D).

## 2) ALN에서 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup>의 cell content와 절대세포수

활성 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> T 세포의 빈도(%)는 대조군(34.8%)은 정상군(17.5%)에 비하여 증가하였고, FK506 도포군(24.6%)과 A-J 도포군



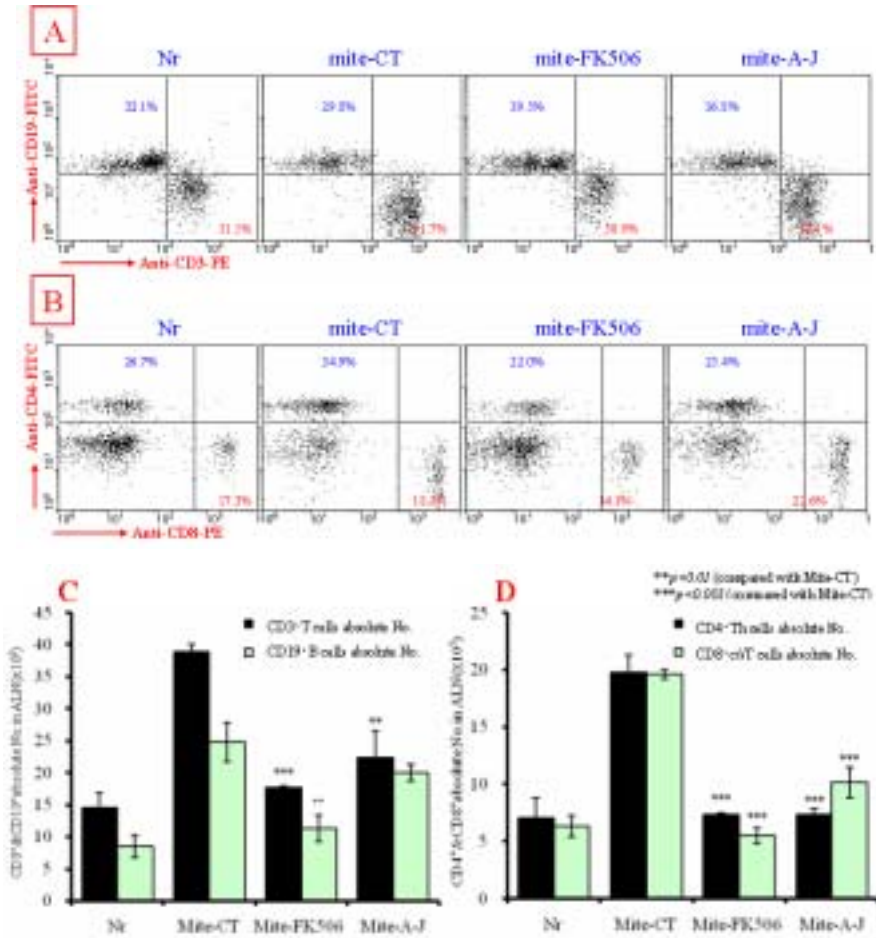


Fig. 9. Effects of FK506 and A-J ointment on the percentage of CD3+&CD19+, CD4+&CD8+ gated cells and changes of total absolute cell numbers in ALN cells of NC/Nga mouse. Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%-ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse)-ointment for 3 weeks. NC/Nga mouse ALN cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were isolated from ALN and the ALN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total cell content (%) of CD3+&CD19+ (A) and CD4+&CD8+ (B), total absolute cell number of CD3+&CD19+ (C) and CD4+&CD8+ (D) in NC/Nga mouse.

(27.8 %)은 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 10A).

활성 B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> B 세포의 빈도(%)는 대조군(42.5 %)은 정상군(26.5 %)에 비해 증가하였고, FK506 도포군(35.8 %)과 A-J 도포군(35.9 %)은 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 10B).

CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> T 세포의 절대세포수는 대조

군은 정상군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 감소하였다(Fig. 10C).

B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> B 세포의 절대세포수는 대조군은 정상군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성

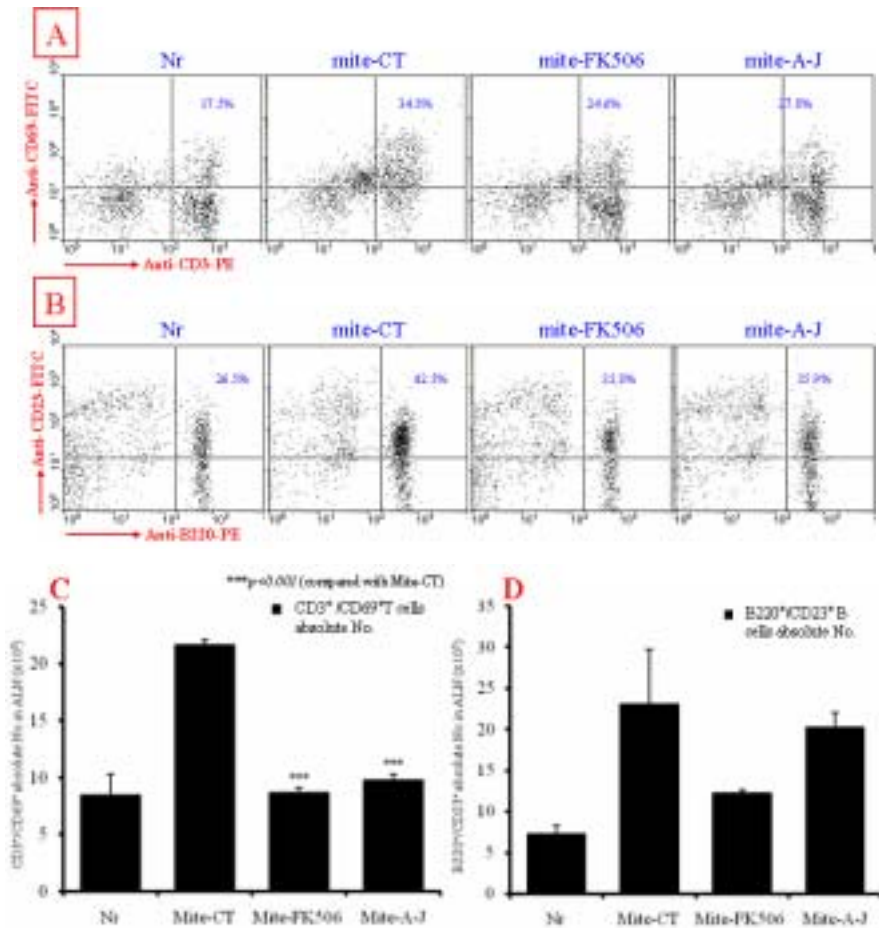


Fig. 10. Effects of FK506 and A-J ointment on the percentage of CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> gated cells and changes of total absolute cell number in ALN cells of NC/Nga mouse. Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse) ointment for 3 weeks. NC/Nga mouse ALN cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were isolated from ALN and the ALN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total cell content (%) of CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> (A) and B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> (B), total absolute cell number of CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> (C) and B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> (D) in NC/Nga mouse.

은 없었으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 감소하였지만 유의성은 없었다(Fig. 10D).

### 3) ALN에서 CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>의 cell content 와 CD3<sup>+</sup>/CXCR5<sup>+</sup>의 절대세포수

활성 CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> 세포의 빈도(%)는 정상군(10.5%)에 비하여 대조군(25.1%)은 증가하였고,

FK506 도포군(10.6%)과 A-J 도포군(20.3%)은 대조군에 비하여 감소하였다. 활성 CCR3<sup>+</sup> 세포의 빈도(%)는 정상군(10.3%)에 비하여 대조군(28.4%)은 증가하였고, FK506 도포군(14.5%)과 A-J 도포군(18.5%)은 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 11A).

CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> 세포와 CCR3<sup>+</sup> 세포의 절대세포수는 대조군은 정상군에 비하여 각각 증가



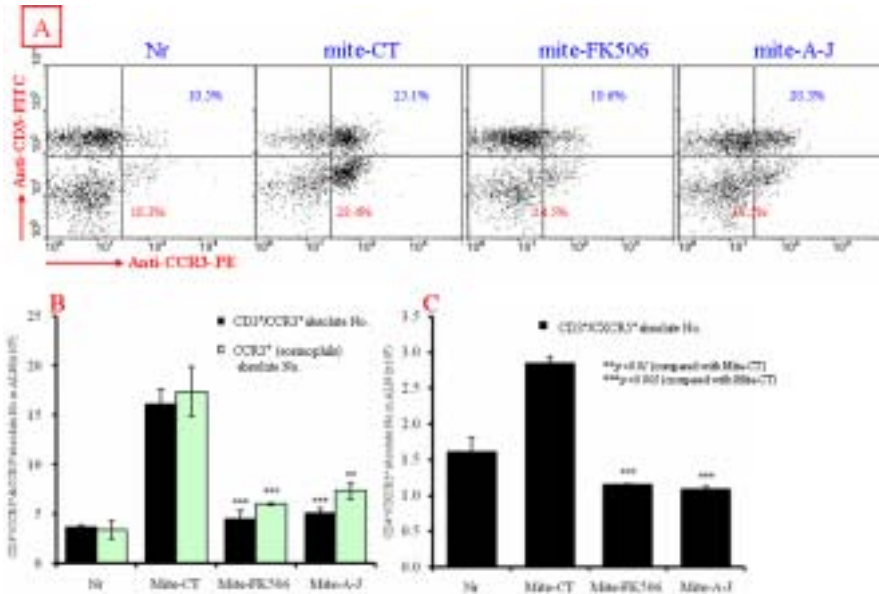


Fig. 11. Effects of FK506 and A-J ointment on the percentage of CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CXCR5<sup>+</sup> gated cells and changes of total absolute cell numbers in ALN cells of NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse) ointment for 3 weeks. NC/Nga mouse ALN cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were isolated from ALN and the ALN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total cell content (%) of CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> (A) and CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> or CCR3<sup>+</sup> (B) and total absolute number of CD3<sup>+</sup>/CXCR5<sup>+</sup> (C) in NC/Nga mouse.

하였고, FK506 도포군과 A-J 도포군은 대조군에 비하여 각각 유의성 있게( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 11B).

CD3<sup>+</sup>/CXCR5<sup>+</sup> 세포의 절대세포수는 대조군은 정상군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군과 A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 11C).

#### 4) PBMCs에서 granulocytes의 cell content

PBMCs에서 granulocytes의 빈도(%)는 대조군(58.4%)은 정상군(29.1%)에 비하여 증가하였고, FK506 도포군(39.4%)은 대조군에 비하여 감소하였으며, A-J 도포군(51.3%)은 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 13A).

granulocytes의 빈도수는 대조군은 정상군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.05$ ) 감소하였다(Fig. 13B).

#### 5) PBMCs에서 T & B cell content

CD3<sup>+</sup> T 세포의 총활성빈도(%)는 대조군은 정상군에 비해 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 감소하였다. CD19<sup>+</sup> B 세포의 총활성빈도(%)는 대조군은 정상군에 비해 감소하였고, FK506 도포군과 A-J 도포군은 대

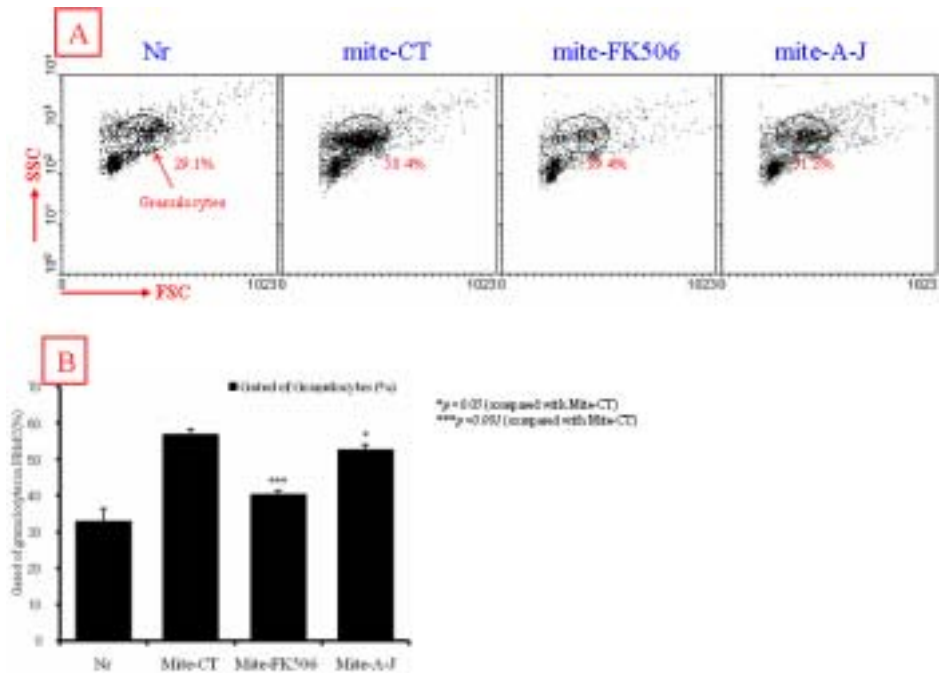


Fig. 12. Effects of FK506 and A-J ointment on the percentage of granulocytes gated cells in PBMCs cells of NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse) ointment for 3 weeks. NC/Nga mouse PBMCs ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Cell content (%) of granulocytes from FAC & SSC (A) and granulocytes gated cells (B) in NC/Nga mouse.

조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 13A).

CD4<sup>+</sup> Th 세포와 CD8<sup>+</sup> c/sT 세포의 총활성빈도(%)는 대조군은 정상군에 비해 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 13B).

CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포의 총활성빈도(%)는 대조군은 정상군에 비해 증가하였고, FK506 도포군과 A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 13C).

B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> 세포의 총활성빈도(%)는 대조

군은 정상군에 비해 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.05$ ) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 약간 감소하였지만 유의성은 없었다(Fig. D).

### 6) PBMCs에서 CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>와 CCR3<sup>+</sup> 활성 세포의 변화

CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> 세포의 총활성빈도(%)는 대조군은 정상군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 감소하였지만 유의성은 없었으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 14A).

CCR3<sup>+</sup> 세포의 총활성빈도(%)는 대조군은

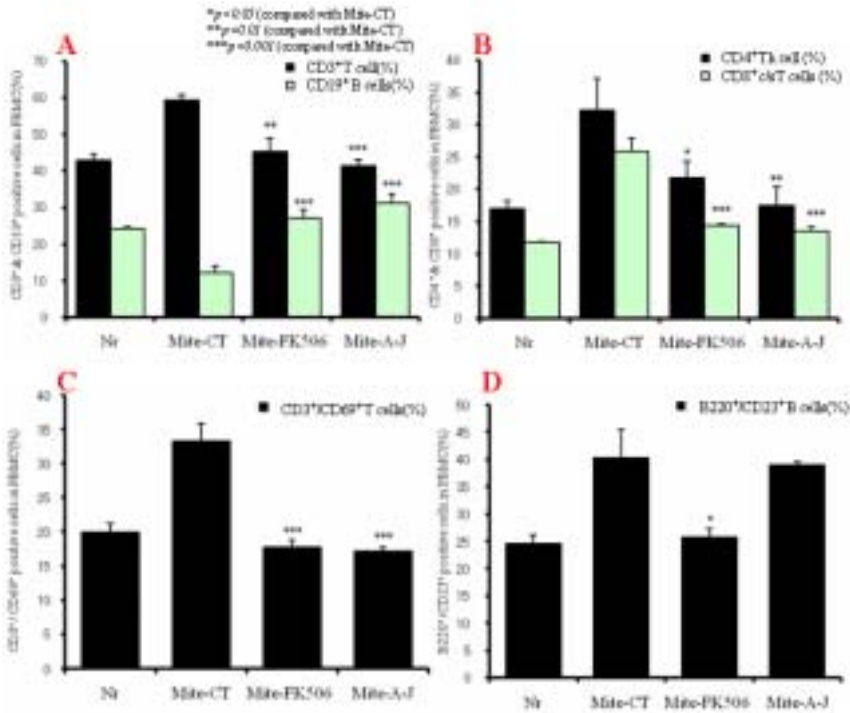


Fig. 13. Effects of FK506 and A-J ointment on the percentage of T & B positive cells in PBMC cells of NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse) ointment for 3 weeks. NC/Nga mouse PBMCs ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Cell content (%) of CD3<sup>+</sup>&CD19<sup>+</sup> (A), CD4<sup>+</sup>&CD8<sup>+</sup> (B), CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> (C) and B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> (D) in NC/Nga mouse.

정상군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군과 A-J 도포군은 대조군에 비하여 모두 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 14B).

**7) DLN에서 T세포와 B세포의 절대세포수**

CD3<sup>+</sup> T 세포의 절대세포수를 측정 한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 감소하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 증가하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 증가하였다 (Fig. 15A).

CD19<sup>+</sup> B 세포의 절대세포수는 대조군은 정

상군에 비하여 감소하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 없었 으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 증가하였다(Fig. 15A).

CD4<sup>+</sup> Th세포의 절대세포수는 대조군은 정상군에 비하여 감소하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.05$ ) 증가하였 으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 증가하였다(Fig. 15B).

CD8<sup>+</sup> c/sT세포의 절대세포수는 대조군은 정상군에 비하여 감소하였고, FK506 도포군과 A-J 도포군은 모두 대조군에 비하여 유의성 있

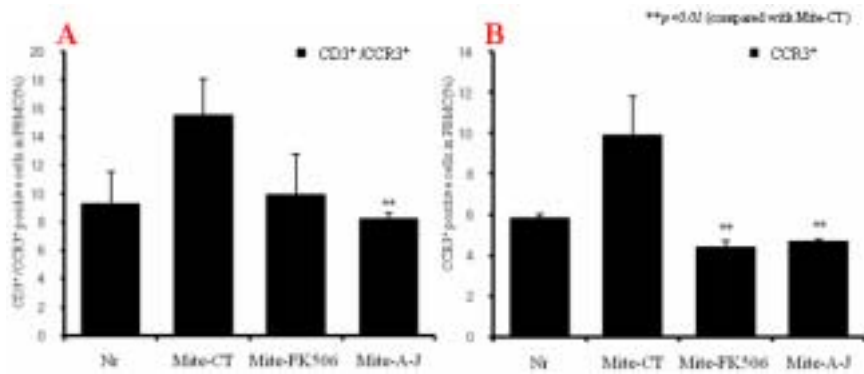


Fig. 14. Effects of FK506 and A-J ointment on the percentage of CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> and CCR3<sup>+</sup> positive cells in PBMC cells of NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse) ointment for 3 weeks. NC/Nga mouse PBMCs ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Cell content (%) of CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> (A) and CCR3<sup>+</sup> (B) in NC/Nga mouse.

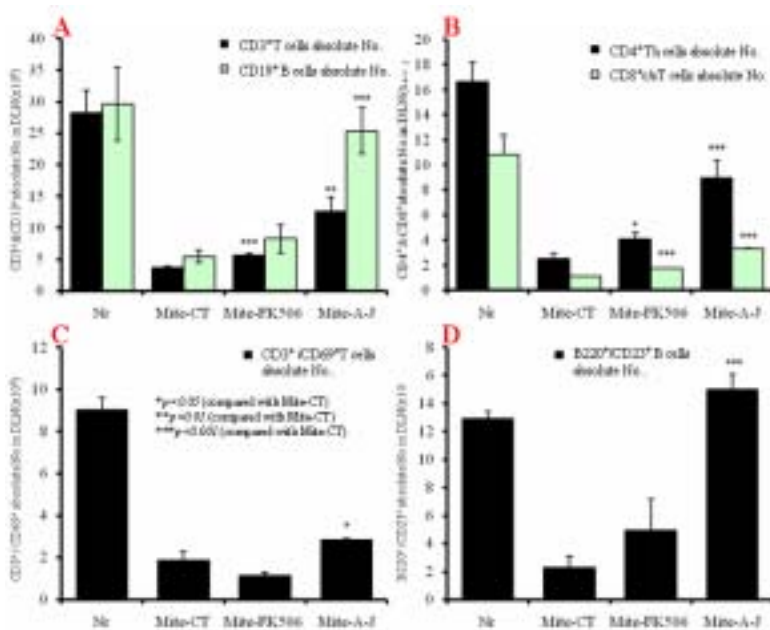


Fig. 15. Effects of FK506 and A-J ointment on T cell and B cell changes of total absolute numbers in DLN cells of NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse) ointment for 3 weeks. NC/Nga mouse PBMCs ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total absolute number of CD3<sup>+</sup>&CD19<sup>+</sup> (A), CD4<sup>+</sup>&CD8<sup>+</sup> (B), CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> (C) and B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> (D) in NC/Nga mouse.

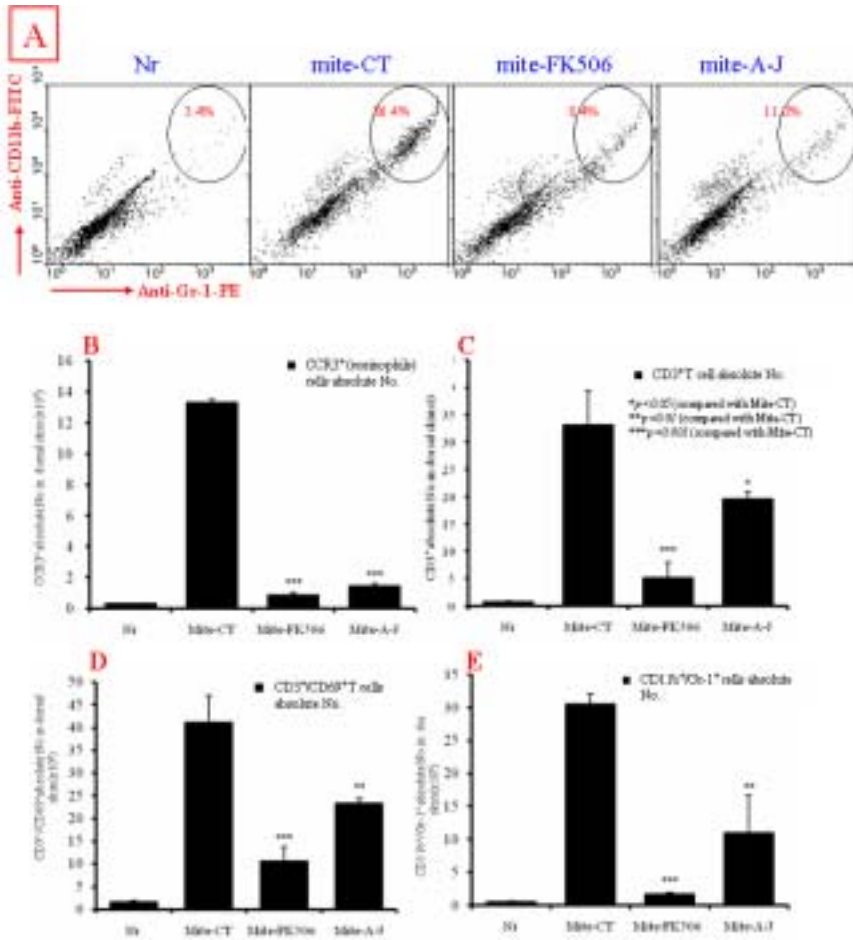


Fig. 16. Effects of FK506 and A-J ointment on the percentage of CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> positive cells and cell content changes of total absolute cell numbers in dorsal skin cells in NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse) ointment for 3 weeks. NC/Nga mouse dorsal skin cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were isolated from dorsal skin, and the dorsal skin cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Cell content (%) of CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> (A) and total absolute number of CCR3<sup>+</sup> (B), CD3<sup>+</sup> (C), CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> (D) and CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> (E) in NC/Nga mouse.

계(p<0.001) 증가하였다(Fig. 15B).

CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포의 절대세포수는 대조군은 정상군에 비하여 감소하였고, FK506 도포군은 대조군과 큰 차이가 없었으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.05) 증가하였다(Fig. 15C).

B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> 세포의 절대세포수는 대조군은 정상군에 비하여 감소하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 약간 증가하였으나 유의성은 없었으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.001) 증가하였다(Fig. 15D).

**8) 등피부조직에서 T 세포와 B 세포의 활성화 세포 비율 및 절대세포수**

활성 CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> MSC 세포의 빈도(%)는 대조군은 정상군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 크게 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 16A).

CCR3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> T세포, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포, CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> MSC 세포의 절대세포수는 대조군은 정상군에 비해 증가하였고, FK506 도포군과 A-J 도포군은 대조군에 비하여 각각 유의성 있게(p<0.05, p<0.01, p<0.001) 감소하였다(Fig. 16B, C, D, E).

mRNA의 유전자발현의 상대정량 값(RQ)은 대조군은 정상군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001, 0.01) 감소하였다(Fig. 17A).

ALN에서 IL-5 mRNA와 IL-13 mRNA의 유전자발현의 RQ값은 대조군은 정상군에 비하여 각각 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 감소하였으며, A-J 도포군은 대조군에 비하여 IL-5 mRNA는 감소하였으나 유의성은 없었고, IL-13 mRNA는 유의성 있게(p<0.01) 감소하였다(Fig. 17B).

**9. NC/Nga 생쥐의 ALN과 등피부조직에서 염증유전자 발현**

등피부조직의 Eotaxin2 mRNA와 CCR3

**10. NC/Nga 생쥐의 등피부조직 검사**

A-J가 피부조직에 미치는 영향을 알아보고자 실험 종료 후 등피부조직을 적출하여 H&E

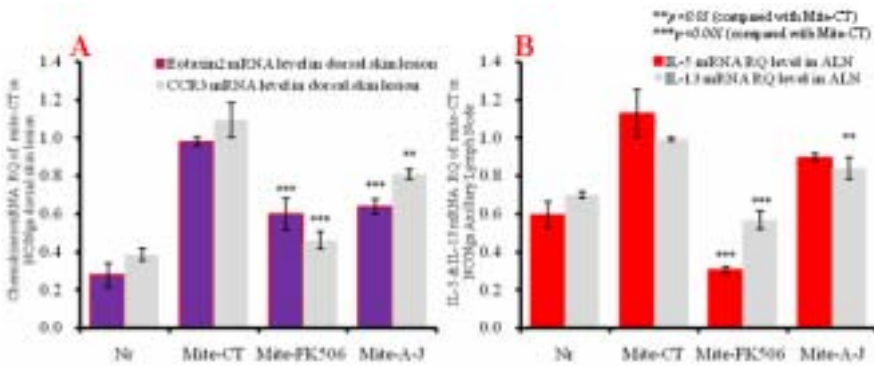


Fig. 17. Effects of FK506 and A-J ointment on Eotaxin 2, CCR3, IL-5 and IL-13 mRNA expression in NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200 μl/mouse) ointment for 3 weeks. Total RNA were extracted in dorsal skin tissue or ALN and Eotaxin 2, CCR3, IL-5 and IL-13 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. 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 (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system.



염색과 toluidine blue 염색을 실시하였다. 정상군의 피부조직(A)은 epidermis가 얇게 분포하고 비만 세포는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 18A, 19A). 대조군(B)은 epidermis의 두께가 부종으로 현저하게 확장되어(화살표), 그 주변에 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis, parakeratosis, 비만 세포(화살표)의 침윤 등이 정상군에 비하여 증가한 것을 볼 수 있다(Fig. 18B, 19B). FK506 도포군(C)은 대조군에 비하여 정상군에 가깝게 epidermis의 두께가 줄어들었고, 그 주변에 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis, parakeratosis, 비만 세포(화살표)의 침윤 등이 감소하였다(Fig. 18C, 19C). A-J 도포군(D)은 정상군에 가깝게 epidermis의 두께가 줄어들었고, 나머지 일부에서는 epidermis가 두께(화살표)와 그 주변에 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis, parakeratosis, 비만 세포(화살표)의 침윤 등이 감소하였다(Fig. 18D, 19D).

### 11. NC/Nga 생쥐의 ALN 조직 검사

실험 종료 후 NC/Nga 생쥐의 ALN을 적출하여 H&E 염색을 실시 후 조직에 침윤된 inflammatory lymphocytes cells(ILC)와 plasma cells(PC)를 관찰한 결과, 대조군(B)은 정상군(A)에 비하여 ILC와 PC가 침윤되어 있고, FK506 도포군(C)에서 ILC와 PC는 대조군에 비하여 크기가 줄어들어 있으며, A-J 도포군(D)의 ILC와 PC는 대조군에 비하여 크기가 줄어들었다(Fig. 20).

NC/Nga 생쥐의 ALN을 biopsy하여 toluidine blue 염색을 실시하여 조직에 침윤된 비만 세포(화살표)를 관찰한 결과, 대조군(B)은 정상군(A)에 비하여 비만 세포들이 cluster를 형성한 상태로 관찰되고, FK506 도포군(C)과 A-J 도포군(D)은 대조군에 비하여 비만 세포가 감소하였다(Fig. 21).

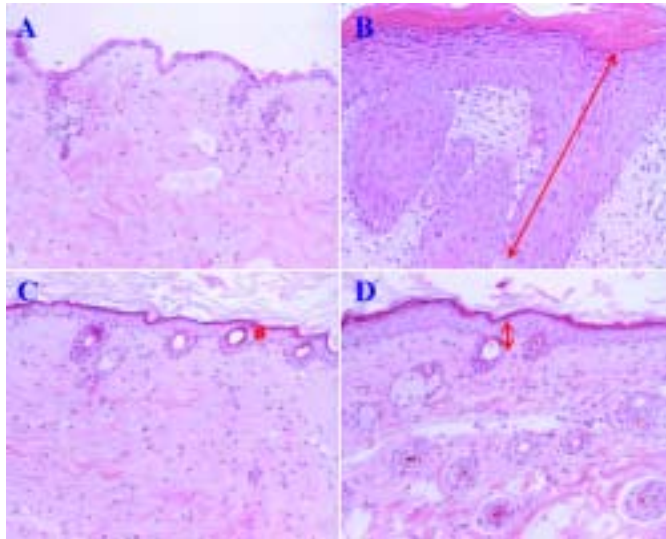


Fig. 18. Histological features of dorsal skin in NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%)-ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse)-ointment for 3 weeks. NC/Nga skin biopsy were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and shows the thickening of the epidermis (red arrow) by bright microscope ( $\times 200$ ). Data represent individual values and the average value of four individual mouse in each group.

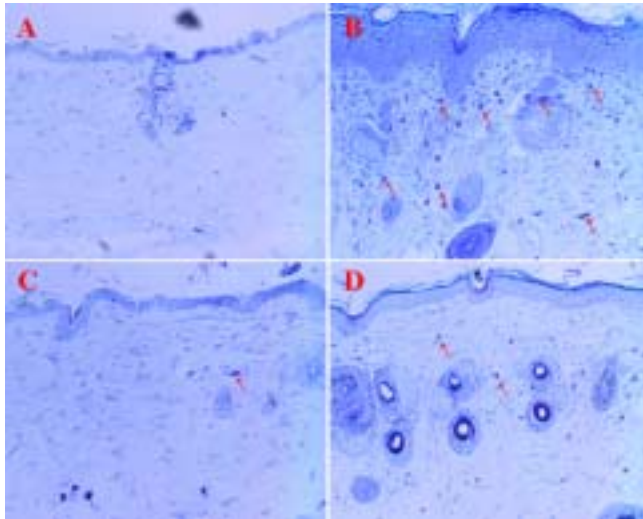


Fig 19. Histological status of the skin stained with toluidine blue of dorsal skin in atopic dermatitis-like NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse) ointment for 3 weeks. NC/Nga skin biopsy were stained with toluidine blue staining and shows the degenerated mast cells in the dermis (red arrow) by bright microscope ( $\times 200$ ). Data represent individual values and the average value of four individual mouse in each group.

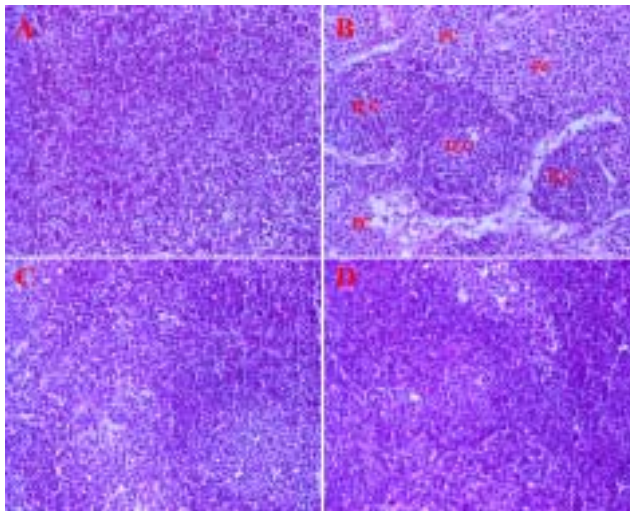


Fig. 20. Histological features of ALN in NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse) ointment for 3 weeks. NC/Nga ALN biopsy were stained with hematoxylin and eosin (H&E), and the NC/Nga control (B) shows ALN in the infiltration of the Inflammatory Lymphocytes Cells (ILC, blue arrow) and plasma Cells (PC) (arrows). original magnification  $\times 100$ , Bright microscoph (Nikon, Japan, original magnification,  $\times 200$ ).



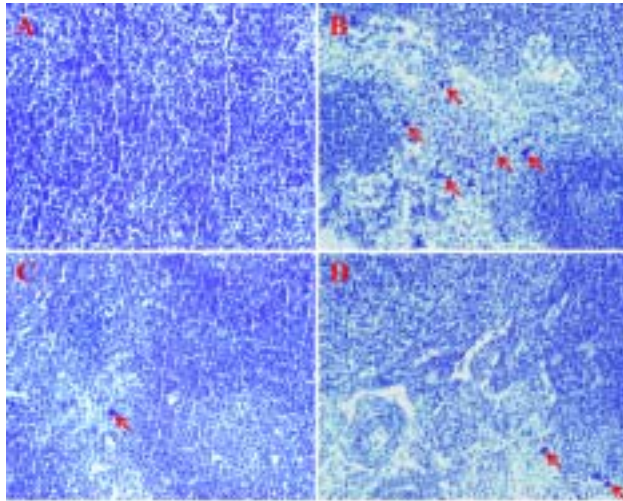


Fig. 21. Histological status of the tissue stained with toluidine blue of ALN in atopic dermatitis-like NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse) ointment for 3 weeks. NC/Nga ALN biopsy were stained with toluidine blue staining and shows the degranulated mast cells in the dermis (red arrow) by bright microscope ( $\times 200$ ). Data represent individual values and the average value of four individual mouse in each group.

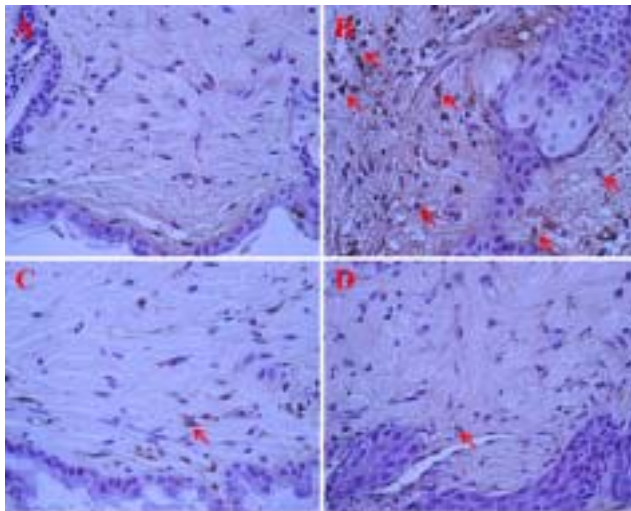


Fig. 22. Immunohistochemical staining of the skin stained with CD4<sup>+</sup> Th cells of dorsal skin in atopic dermatitis-like NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse) ointment for 3 weeks. Following 3 weeks ointment of FK506 and A-J ointment, mouse dorsal skin biopsy were stained with anti-mouse CD4mAb respectively. Dorsal skin biopsy were stained with anti-mouse CD4mAb, used LSAB2 HRP. Rabbit/mouse(DAB) kit and shows the CD4<sup>+</sup> T cells in the dermis (red arrow) by bright microscope ( $\times 400$ ).

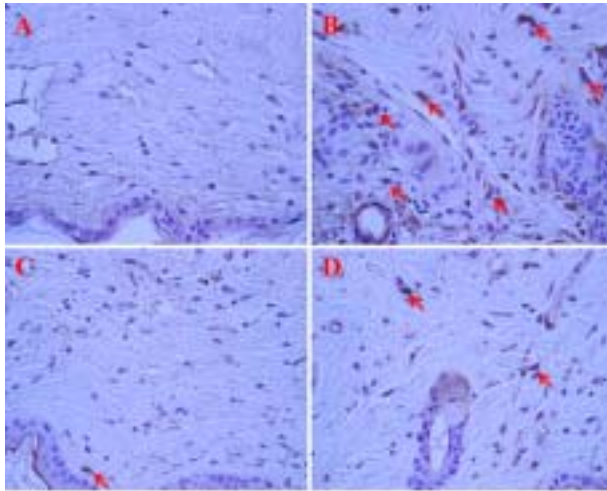


Fig. 23. Immunohistochemical staining of the skin stained with CCR3+ cells of dorsal skin in atopic dermatitis-like NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions and induced by Mite Ext. ointment in the dorsal skin for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse) ointment for 3 weeks. Following 3 weeks ointment of FK506 and A-J ointment, mouse dorsal skin biopsy were stained with anti-mouse CCR3mAb respectively. Dorsal skin biopsy were stained with anti-mouse CCR3mAb, used LSAB2 HRP. Rabbit/mouse(DAB) kit and shows the CCR3<sup>+</sup> T cells in the dermis (red arrow) by bright microscope ( $\times$ 400).

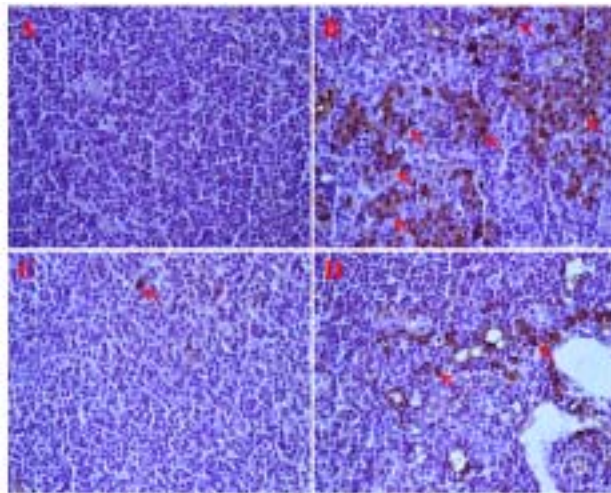


Fig. 24. Immunohistochemical staining of the tissue stained with CCR3+ cells of ALN in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse.

Topical application of A-J ointment-atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and induced by Mite Ext. ointment in the ALN for 2 weeks and next to FK506 (0.3%) ointment or A-J (200  $\mu$ l/mouse) ointment for 3 weeks. Following 3 weeks ointment of FK506 and A-J ointment, mouse ALN biopsy were stained with anti-mouse CD4mAb respectively. ALN biopsy were stained with anti-mouse CCR3mAb, used LSAB2 HRP. Rabbit/mouse(DAB) kit and shows the CCR3<sup>+</sup> cells in the dermis (red arrow) by bright microscope ( $\times$ 400).

## 12. 면역화학조직염색

NC/Nga 생쥐의 등피부조직을 biopsy하여 면역조직화학염색을 실시하고 조직에 침윤된  $CD4^+$  Th 세포와  $CCR3^+$  eosinophils 세포를 관찰한 결과, 정상군(A)에 비하여 대조군(B)의 epidermis 아래에  $CD4^+$  Th 세포들(화살표)이 cluster를 형성한 상태로 증가하였고, FK506 도포군(C)은 대조군에 비하여 감소하였으며, A-J 도포군(D)은 대조군에 비하여 눈에 띄게 감소하였다(Fig. 22).

$CCR3^+$  eosinophils 세포(화살표)는 정상군(A)에 비하여 대조군(B)은 epidermis와 dermis 사이에 넓게 분포된 상태로 증가하였고, FK506 도포군(C)은 대조군에 비하여 감소하였으며, A-J 도포군(D)은 대조군에 비하여 크게 감소하였다(Fig. 23).

NC/Nga 생쥐의 ALN을 적출하여 조직에 침윤된  $CCR3^+$  eosinophils 세포(화살표)를 관찰한 결과, 정상군(A)에 비하여 대조군(B)의 ALN에서  $CCR3^+$  eosinophils 세포들이 ALN 조직 사이에 증가하였으며, FK506 도포군(C)과 A-J 도포군(D)의 세포들은 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 24).

## VI. 考 察

아토피 피부염은 주로 유아와 소아에 발생하는 염증성 피부질환으로<sup>31)</sup> 심한 소양감, 홍반, 부종, 삼출, 가피, 인설, 태선화 등을 특징으로 하며<sup>2)</sup>, 재발이 잦고 만성으로 경과하며 반복적인 소파로 인한 찰상과 태선화 등 2차적인 병변이 특징적으로 나타난다.

문명의 발달과 함께 수천여종의 화학물질이 사용되고 있으며, 각종 유해가능물질과 환

경오염으로 인한 자극물질의 증가 등으로 인해 면역계 이상으로 나타나는 알레르기성 질환이 전 세계적으로 증가하고 있다. 아토피 피부염은 대개 5세 이전에 90%가 발병하며 일반적으로 나이가 증가할수록 유병율이 감소한다고 알려졌으나, 인구 대비 전체적인 유병율은 점차 증가하는 추세를 보이고 있으며, 임상증상 또한 중증화되고 만성화되는 경향을 보이고 있어<sup>32)</sup> 아토피 피부염의 치료에 대한 관심이 높아지고 있다.

아직까지 아토피 피부염의 정확한 원인을 규명하지 못하고 있으나 유전적인 가족력과 음식섭취 등으로 인한 생활환경의 영향, 손상된 피부층을 통해 유입된 항원물질에 대한 면역반응에 따른 혈중 IgE 항체의 수준이 증가함으로써 나타나는 복합적 질환으로 생각된다<sup>33-4)</sup>. 기존 연구보고에 따르면 아토피 환자에서 T 세포들의 불완전한 IFN- $\gamma$ 의 분비 그리고 B 세포들에서의 IgE 항체의 과발현 등이 나타난다<sup>35)</sup>. 즉 아토피 초기 단계에서 Th2 타입의 T 세포들에서 IL-4와 IL-10이 과도하게 분비되고 따라서 IL-12가 불안정하게 생산되어 IFN- $\gamma$  분비가 감소된다<sup>8,9)</sup>. 아토피 피부염은 Th2 면역반응에 의하여 개시되어 점차 만성적인 Th1 면역반응으로 전환된다고 믿어지고 있다<sup>10,11)</sup>.

아토피 피부염은 일반적으로 IgE 농도가 높아서 흡입성 또는 음식항원에 대해 즉각적인 반응을 보이지만 일부 아토피 피부염 환자들은 IgE도 정상 범위에 있으면서 항원에 대한 과민반응과 무관한 유형이 있다<sup>36-8)</sup>. 전자를 extrinsic type 아토피 피부염이라고 하며 후자는 intrinsic type의 아토피 피부염이라고 분류하기도 하는데 intrinsic type은 보고마다 다르지만 전체 아토피 피부염에서 15~45%를 차지하는 것으로 알려져 있다. 이 두 유형은 cytokine 발현 면에서도 뚜렷한 차이점이 있는

데 IL-5와 IFN- $\gamma$ 는 모두 비슷한 양으로 검출되나 extrinsic type은 intrinsic type에 비해 IL-4, IL-13 발현이 증가하였고 IgE에 대한 B cell의 Fc receptor (CD23)이 증가하였다<sup>39-44</sup>. 이처럼 아토피 피부염의 면역학적인 측면은 기관지 천식이나 알러지 비염과 같은 다른 알러지 질환에 비해 매우 복잡한 양상을 가진다. 아직 아토피 피부염의 병인은 정확히 밝혀지지 않았으나 최근 들어 면역학적인 측면에서 많은 연구가 이루어지고 있다<sup>44-7</sup>. 아토피 피부염의 피부 병변에 분포하는 T 세포의 주된 구성은 CD4<sup>+</sup> T세포이며 이는 생성되는 cytokine의 종류에 따라 Th-1세포와 Th-2세포로 나뉘어진다. 최근의 연구들에서는 Th-2세포의 활성화에 연이은 Th-1세포의 활성화도 가정되고 있다<sup>48</sup>. 보조 T 세포(CD4<sup>+</sup> T cell)에 대한 억제 T세포(CD8<sup>+</sup> T cell)비의 감소, Th-2세포에서 분비되는 IL-4, IL-5, IL-10의 증가, Th-1세포에서 분비되는 IFN- $\gamma$ 비의 감소, 비만세포의 증가 등 면역학적 이상이 병의 발생과 악화에 영향을 미치리라 추측되고 있다. 아토피 피부염에서 IFN- $\gamma$ 와 IL-2의 *in vivo* 투여의 유익한 효과는 Th-1/Th-2 불균형의 복원이 아토피 피부염을 호전시킨다는 사실을 뒷받침해 준다. 이러한 소견들은 아토피 피부염의 치료법으로 접촉 항원에 대한 특이적 또는 비특이적인 면역반응을 일으키는 국소 면역요법을 사용해 볼 수 있는 근거로 생각된다<sup>49</sup>.

아토피 피부염은 한의학적으로 血熱, 濕熱, 濕阻, 血燥로 변증할 수 있으며, 증상과 경과에 따라 清熱利濕, 涼血清熱利濕, 健脾除濕, 涼血祛風, 清熱化濕의 방법을 사용하여 치료한다<sup>50</sup>.

아토피 크림은 베이스 크림과 허브에서 추출한 아로마 오일(Tea-tree, Lavender, Chamomile-roman)로 구성되어 있다. 베이스 크림은 항산화작용이 있는 Vitamin E를 함유하고 있어 상처의 회

복과 피부의 재생을 촉진하는 효과가 있고, 아로마 오일은 허브의 자연치유적 효능을 이용한 것으로 면역 세포에 새로운 활성을 주어 병든 세포와 싸워 이기도록 하며, 피부의 수분 증발을 막아 피부 표면의 습기를 유지해 주며, 피부에 원래 만들어진 보습 효과를 대체시켜주는 효과가 있다. 특히 Tea-tree는 면역 체계 및 백혈구를 활성화시키고 가려움증을 완화하는 효과가 있고, Lavender는 소독작용, 진정작용 및 피부세포의 활성화에 좋은 효과가 있으며, Chamomile-roman은 항염증작용이 있어 조직재생과정을 빠르게 하며 알레르기 반응성을 약화시키고 특히 피부점막에 대한 소염작용이 강하며 진정효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>14,51</sup>. 따라서 아토피 피부염에서 나타나는 피부손상과 2차적 병변에 사용가능 하리라 생각된다.

紫雲膏는 紫草, 當歸, 胡麻油, 蜜蠟 및 豚脂의 5가지 약재로 구성된 膏藥으로 明代 陳實功의 《外科正宗》<sup>15</sup>에 潤肌膏라 기재된 피부를 滋潤하여 깨끗하게 하는 膏藥에 日本 江戸時代 의 외과의사 華岡이 豚脂를 加하여 《春林軒膏方便覽》에 紫雲膏라 처음 命名하였다<sup>16</sup>. 潤肌膏는 《外科正宗》에 “治禿瘡乾枯白斑, 作痒髮脫”이라 하였고, 《醫宗金鑑外科心法要訣》<sup>52</sup>에 “若肌膚燥裂者 用潤肌膏擦之甚效”라 하여 白屑風에 외용제로 사용하였으며 오늘날 임상에서 화상, 습진, 건선, 백전풍, 알레르기성 피부염 등 다양한 피부질환에 활용되고 있다. 또한 紫雲膏의 조제방법에 대한 연구<sup>53</sup> 및 피부 창상치유효과에 대한 연구는 이미 보고되어 있다<sup>19-21</sup>.

현재 아토피 피부염의 치유 및 2차 감염 방지 등의 목적으로 사용되고 있는 연고제들의 대부분은 일정량의 소염제 및 부신 피질스테로이드 등이 함유되어 있고 이중 부신 피질호

르몬제제들은 장기간 사용 시 내성을 나타내며 피부의 위축이나 성장 지연의 가능성 등 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>54</sup>.

외용제를 병용하여 아토피 피부염의 치료에 활용한 임상보고가 있으며<sup>22</sup>, 아토피 크림과 紫雲膏는 스테로이드제제가 포함되지 않아 장기간 사용 시에도 독성이나 내성을 나타내지 않을 것으로 사료되어 잦은 재발과 만성적인 경과를 보이는 아토피 피부염에 활용하기 좋은 외용제로 생각된다.

이에 저자는 아토피 동물 모델(NC/Nga mouse)에 아토피 크림과 紫雲膏(A-J)를 병용도포하여 아토피 피부염의 발진 억제 효과를 실험적으로 검증하고자 하였다.

본 실험의 결과를 살펴보면, 10 주령의 NC/Nga 생쥐의 등 부위에 Mite Ext.를 3 주간 도포하여 피부발진을 유도하고, 이후 3 주간 A-J를 도포한 결과, A-J 도포로 피부발진이 억제되어 흥반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등이 감소하였으며(Fig. 2), 대조군에 비하여 유의성 있게 clinical skin score가 감소하였다(Fig. 3).

실험 종료 후 혈액을 채취하여 분석한 결과, A-J 도포군의 neutrophils과 eosinophils의 빈도(%)는 대조군에 비하여 유의성 있게( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) 감소하였고, basophils의 빈도(%)는 대조군에 비하여 약간 감소하였지만 유의성은 없었다(Fig. 4, 5). 이것은 A-J가 알레르기 반응으로 인한 조직의 염증반응을 억제하는 것으로 생각된다.

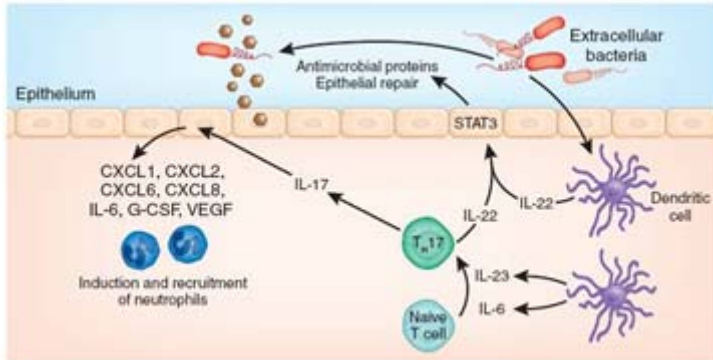
B 세포의 분화과정에서 분비되어 염증 반응을 유도하는 IgE와 B 세포의 분화를 촉진하는 IL-4에 의하여 유도되는 IgG1의 수준을 측정할 결과, A-J 도포군은 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 6). 이러한 결과는 다른 연구에서 보고된 바와 같이<sup>55-60</sup> A-J가 NC/Nga 생쥐의 B 세포 알레르기 면역반응을 억제하여 B 세포 분화에

수반되는 IgE와 IgG1의 분비를 억제하는 것으로 생각된다.

IFN- $\gamma$ 의 생산량은 Mite Ext.를 도포하지 않은 정상군에 비하여 대조군이 증가한 결과를 얻었다. 이는 알레르기 반응 중 아토피, 천식, 비염, 당뇨 등 자가면역질환이 Th1세포보다 Th2 세포가 우세한 상태에서 IgE, IL-4, IL-5, IL-13등 생산이 항진되며 알레르기 발현에 작용하는 지금까지의 결과와 반하는 결과이다<sup>57</sup>. 그러나 다른 연구자들에 의하면 급성 아토피 질환보다 만성 아토피 질환에서 감염에 의한 Th2 세포보다 Th1 세포가 predominant하여 만성 아토피 질환에서 IFN- $\gamma$ 의 생산량이 IL-4 생산량보다 증가한다는 결과를 발표하였다<sup>58</sup>. 이러한 결과는 15 주령 된 NC/Nga 생쥐의 만성 아토피 피부발진 모델에 적용되는 것으로 IFN- $\gamma$ 의 생산량이 정상군에 비하여 대조군이 증가한 결과와 일치하며 A-J 도포군은 대조군에 비하여 약간 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

ALN은 만성아토피질환 동물에서 중요한 역할을 하는 면역기관으로 일부 심한 만성 아토피 환자의 경우 겨드랑이가 부어오르고 ALN의 크기가 증가되어 있다는 보고가 있고, Mite Ext.로 유발된 만성 아토피 피부발진 NC/Nga 생쥐의 경우 ALN이 2 개 이상인 경우도 해부학적으로 관찰되었으며, 최근 많은 NC/Nga 생쥐를 이용한 아토피 연구보고에서 ALN을 target으로 하여 연구결과를 보고하고 있다<sup>59</sup>.

만성 아토피발진 동물모델에서 손상된 피부로 박테리아가 상피세포의 벽을 통과하면서 수지상 세포(DCs)를 자극하여 활성화된 DCs가 다시 DLN으로 이동하여 DLN에 있는 naive T 세포를 자극한다. 자극으로 활성화된 T 세포는 피부발진 부위로 이동하여 염증반응을 일으키게 된다(Scheme. 2). 그래서 만성질환 동물의 경우 DLN의 면역세포가 피부발진 부위로



Scheme. 2. Home-rolling mechanism in DLN

migration이 일어나 DLN내 면역세포의 현저한 감소가 나타나는 것으로 알려졌다<sup>60)</sup>.

실험 종료 후 15 주령의 NC/Nga 생쥐의 ALN, DLN과 등피부조직을 적출하여 총 세포수를 측정할 결과, A-J는 ALN과 등피부조직의 총 세포수를 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ) 감소시켰으며, DLN의 총 세포수는 유의성 있게 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ) 증가시켰다(Fig. 8). 이는 등피부 발진 부위에 염증 면역세포를 공급하는 ALN, DLN과 등피부조직의 총 면역세포가 피부발진에 상관관계가 있으므로 FK506과 A-J 도포군의 조직검사의 결과와 더불어 의미있는 실험 결과라 판단된다.

T 세포 활성화 표지분자중 하나인 CD69<sup>+</sup>는 특정한 항원이나 호르몬에 의해 활성화된 T 세포에서 볼 수 있다. 즉, CD3<sup>+</sup> T 세포의 활성화는 CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포와 CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포로 구분되고 이러한 활성화된 T 세포에서 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 등이 항원에 따라 생산량이 증가되어 염증면역반응에서는 염증세포의 정도에 따라 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 활성화세포가 증가하고, 염증 cytokine도 비례적으로 증가하는 양상을 나타낸다<sup>61)</sup>.

CCR3<sup>+</sup>는 호산구에서 다량 발현되며 호중구, 단핵구에서는 발현되지 않기 때문에 선택

적인 호산구의 조직 내 침윤을 연구하는데 중요한 가치가 있다. 비만 세포는 세포질 내에 과립을 풍부하게 가지고 있는 세포로서 주로 결합조직과 점막에 존재하면서 알레르기 염증 반응에 관여하며 cytokine (IL-5, TNF- $\alpha$ )을 분비하면서 알레르기 염증의 초기 반응과 후기 반응을 일으키고 만성적으로 염증을 지속시키는 데에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>62)</sup>. CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup>은 spleen, lymph nodes에서 염증 피부 및 조직으로 이동하여 많이 존재하는데<sup>63)</sup>, antibody production, cytotoxic T lymphocyte (CTL) generation, lymphocyte proliferative responses를 억제하여 아토피의 경우 만성피부질환을 계속적으로 심화시키는 역할을 한다.

NC/Nga 생쥐의 ALN, PBMCs, DLN과 등피부조직의 활성화세포 비율 및 총세포수를 분석한 결과, ALN와 등피부조직의 총세포수가 대조군에 비하여 A-J 도포로 감소하였고, 또한 ALN에서 CD3<sup>+</sup> T세포, CD4<sup>+</sup> Th 세포, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> B 세포, CCR3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CXCR5<sup>+</sup> 세포의 절대세포수가 대조군에 비하여 감소하였다. 등피부조직의 CD4<sup>+</sup> Th세포에 대한 활성화세포수와 절대세포수도 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 9 - 11).



PBMCs에서 CD3<sup>+</sup> T 세포, CD4<sup>+</sup> Th 세포, CD8<sup>+</sup> c/sT 세포, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포, B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> 세포의 총활성빈도(%)를 측정된 결과, A-J 도포군에서 CD3<sup>+</sup> T 세포, CD4<sup>+</sup> Th 세포, CD8<sup>+</sup> c/sT 세포, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포의 빈도는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> 세포는 약간 감소하였지만 유의성은 없었다. CD19<sup>+</sup> B 세포, CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> 세포와 CCR3<sup>+</sup> 세포의 총활성빈도(%)는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 12 - 14). 그러나 CD19<sup>+</sup> B 세포의 총활성세포 빈도는 CD3<sup>+</sup> T 세포의 총활성세포 빈도에 반비례하여 증가와 감소되기 때문에 면역학상의 감소와 증가에 따른 의미는 없는 것으로 생각되고, 다만 혈청 중 IgE 수준이 B 세포의 분화 및 증식에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이는 A-J가 ALN으로 면역염증세포의 recruitment를 제한하는 것으로 판단된다. 그러나 그 이전에 관하여서는 더 정확한 기전실험이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

DLN내 CD3e<sup>+</sup>&CD19<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>&CD8<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup>의 절대세포수를 측정된 결과 A-J 도포군이 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.001, p<0.01) 증가되었고(Fig. 15), 등피부조직에서 CCR3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> T 세포, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포, CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> MSC 세포의 절대세포수는 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.05, p<0.01, p<0.001) 감소하였다(Fig. 16).

등피부조직과 ALN을 biopsy하여 cDNA를 합성한 후 real-time PCR을 이용하여 유전자 발현의 상대정량 값(RQ)을 분석한 결과, A-J 도포군에서 Eotaxin2 mRNA, CCR3 mRNA, IL-13 mRNA의 발현량은 유의성 있게 감소하였으며 IL-5 mRNA는 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 17). 이러한 결과는 A-J가 관련 유전자 발현을 선택적으로 조절하여 염증 반응을 억제

하는 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

실험 종료 후 NC/Nga 생쥐의 등피부조직을 각 군마다 6 마리씩 biopsy하여 분석한 결과, A-J 도포군은 대조군에 비하여 epidermis의 두께가 현저하게 줄어들었고, 그 주변의 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis, parakeratosis, 비만 세포의 침윤 등이 감소하였다(Fig. 18, 19). ALN의 inflammatory lymphocytes cells(ILC)와 plasma cells(PC)의 크기가 줄어들었고(Fig. 20), 조직에 침윤된 비만 세포가 감소하였다(Fig. 21).

면역화학조직염색을 하여 CD4<sup>+</sup> Th세포와 CCR3<sup>+</sup> 세포를 관찰한 결과, A-J도포군에서 CD4<sup>+</sup> Th세포와 CCR3<sup>+</sup> 세포수가 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 22 - 24).

이상의 결과로 미루어 보아 A-J는 아토피 피부염의 치료에 유효하게 활용할 수 있을 것으로 판단되며 향후 아토피 피부염의 정확한 기전에 대한 연구와 함께 실험적 보완과 임상연구가 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

아토피 크림과 紫雲膏의 병용도포가 아토피 피부염에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 아토피 크림과 紫雲膏의 병용도포는 clinical skin score를 유의성 있게 감소시켰다.
2. 아토피 크림과 紫雲膏의 병용도포는 혈액 중 WBC, platelet, neutrophils, eosinophils 등의 세포수를 유의성 있게 감소시켰다.

3. 아토피 크립과 紫雲膏의 병용도포는 혈청 중 IgE와 IgG1 수준을 유의성 있게 감소시켰다.
4. 아토피 크립과 紫雲膏의 병용도포는 IL-5, IL13의 생산량을 감소시켰다.
5. 아토피 크립과 紫雲膏의 병용도포는 ALN과 등피부조직의 총세포수를 유의성 있게 감소시켰고, DLN의 총세포수는 유의성 있게 증가시켰다.
6. 아토피 크립과 紫雲膏의 병용도포는 ALN, PBMCs에서  $CD3e^+&CD19^+$ ,  $CD4^+&CD8^+$ ,  $CD8^+/CCR3^+$ ,  $CCR3^+$ ,  $CD8^+/CD69^+$ ,  $CD8^+/CXCR5^+$ 의 절대세포수를 유의성 있게 감소시켰다.
7. 아토피 크립과 紫雲膏의 병용도포는 DLN에서  $CD3e^+&CD19^+$ ,  $CD4^+&CD8^+$ ,  $B220^+/CD23^+$ ,  $CD3^+/CD69^+$ 의 절대세포수를 유의성 있게 증가시켰다.
8. 아토피 크립과 紫雲膏의 병용도포는 등피부조직에서  $CCR3^+$ ,  $CD3^+/CD69^+$ ,  $CD11b^+/Gr-1^+$ 의 절대세포수를 유의성 있게 감소시켰다.
9. 아토피 크립과 紫雲膏의 병용도포는 등피부조직의 Eotaxin2 mRNA, CCR3 mRNA와 ALN에서 IL-5 mRNA, IL-13 mRNA의 유전자 발현을 유의성 있게 감소시켰다.
10. 아토피 크립과 紫雲膏의 병용도포는 등피부조직에서 epidermis의 두께와 dermis 부분의 침윤된 염증면역세포 및 비만 세포 등을 감소시켰다.
11. 아토피 크립과 紫雲膏의 병용도포는 ALN에서 inflammatory lymphocytes cells와 plasma cells의 크기와 비만 세포의 조직 침윤을 감소시켰다.
12. 아토피 크립과 紫雲膏의 병용도포는 등피부조직과 ALN에서  $CD4^+$ 와  $CCR3^+$  세포의 조직 침윤을 감소시켰다.

## 參考文獻

1. 김덕곤 외. 동의소아과학. 서울:정담. 2002 :660.
2. 홍창의. 소아과학. 서울:대한교과서주식회사. 2005:1207-11.
3. Morren MA, Przybilla RG, Bamelis M, Heykants B, Reynaers B, Degreef H. Atopic dermatitis : triggering factors. J Am Acad Dermatol. 1994;31:467-73.
4. 이희정, 박창욱, 이주희, 이광훈. 아토피 피부염 환자에서 독세핀 크림 국소도포요법의 소양증 경감 효과에 대한 연구. 대한 피부과학회지. 2006;44(3):309-14.
5. Guin JD. Complications of topical hydrocortisone. J Am Acad Dermatol. 1981;4:417-22.
6. Graham-Brown R. Managing adults with atopic dermatitis. Dermatol Clin. 1996;14:531-7.
7. Smith CH. New approaches to topical therapy. Clin Exp Dermatol. 2000;25:250-4.
8. Okada M, Hirasawa Y, Yoshijima K et al. Effect of clobetasol propionate, a corticosteroid on hapten-induced dermatitis in SPF NC/Nga mouse. Pharmacometrics. 2000;59:135-9.
9. Makiura M, Akamatsu H, Akita H et al. Atopic dermatitislike symptoms in HR-1 hairless mouse fed a diet low in magnesium and zinc. J. Int. Med. Res. 2004;32:392-9.
10. Holm L, van Hage-Hamsten M, Ohman S, Scheynius A. Sensitization to allergens of house-dust Mite Ext. in adults with atopic dermatitis in a cold temperate region. Allergy. 1999;54:708-15.
11. Sanda T, Yasue T, Oohashi M, Yasue A. Effectiveness of house dust-Mite Ext. allergen avoidance through clean room therapy in



- patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992;89:653-7.
12. Matsuoka H, Maki N, Yoshida S et al. A mouse model of the atopic eczematodermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust Mite Ext. *Dermatophagoides farinae*. *Allergy.* 2003;58: 139-45.
  13. Katoh N, Hirano S, Suehiro M, Matsuda K, Kishimoto S. The characteristics of patients with atopic dermatitis demonstrating a positive reaction in a scratch test after 48 hours against house dust Mite Ext. antigen. *J. Dermatol.* 2004;31:720-6.
  14. 조성준. 향기치료의 기적. 서울:도서출판 宇石. 2000:120, 140, 169-171.
  15. 陳實功. 外科正宗. 北京:人民衛生出版社. 1983:269.
  16. 失數道明. 韓方治療百話. 서울:동남출판사. 1991:322.
  17. 김윤희, 한재경, 김윤희. 加味羌活散이 집먼지 진드기 추출물로 유도된 NC/Nga mouse의 아토피 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2008;22(1):69-93.
  18. 나동규, 한재경, 김윤희. 除濕胃苓湯加減이 집먼지 진드기 추출물로 유도된 NC/Nga mouse의 아토피 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2008;22(2):82-114.
  19. 李鏞泰. 紫雲膏가 生肌作用에 미치는 영향. 동의대학교 東醫論文集. 1998;28: 547-58.
  20. 어경정, 고우신, 김영균. 紫雲膏가 흰쥐의 창상에 미치는 효과. 대한 외관과학회지. 1998;11(1):54-68.
  21. 이금택, 최병태, 이용태, 고우신. 紫雲膏加 金銀花가 흰쥐의 창상에 미치는 효과. 대한 한의학회지. 1999;20(1):132-41.
  22. 한재경, 김윤희. 외용 요법을 병용한 아토피 피부염 환자 20례에 대한 임상적 연구. 대한한방소아과학회지. 2001;15(1):15-37.
  23. 大田大學校 韓方病院. 韓方病院 處方集. 大田:韓國出版社. 2001:542.
  24. Dogru M., Katakami C., Nakagawa N., Tetsumoto K., and Yamamoto M. Impression cytology in atopic dermatitis. *Ophthalmology.* 1998;105:1478-84.
  25. Hoffler U., Oette K. Comparative studies on four thrombocyte counting methods: counting in the smear preparation after Fonio, chamber counting in the phase contrast microscope, counting with the Coulter Thrombocounter, and the Technicon Auto-Counter. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 1974;12(5):198-206.
  26. Matsuda, H., N. Watanabe, G.P. Geba, J. Sperl, M. Tsudzuki, J. Hiroi. Development of atopic dermatitis like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mouse. *Int Immunol.* 1997;9:461-6.
  27. Galli SJ. *Allergy. Curr. Biol.* 2006;10:R93-95.
  28. Yuki, Hashimoto, Iwao Arai, Yutaka Nakanishi, Takanobu Sakurai, Atsushi Nakamura. Scratching of their skin by NC/Nga mouse leads to development of dermatitis. *Life Sciences. Japan* 17 March. 2004;76:783-94.
  29. K Jo'hrens, I Anagnostopoulos, H Du`rkoop & H Stein. Different T-bet expression patteerns characterize particular reactive lymphoid tissue lesions. *Histopathology.* 2006;48:343-52.
  30. Danniel W. W. A foundation for analysis in the health science. *Bioistics.* 1983:136-46.
  31. Schultz-Larsen F, Hanifin JM. *Epidemiology*

- of atopic dermatitis. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2002;22:1-24.
32. 김정희: 아토피피부염의 최신지견. 소아 알레르기 및 호흡기. 2004;14(1):12-23.
33. Matsuda H, Watanabe N, Gregory PG et al. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with hyperproduction in NC/Nga mouse. *Int. Immunol.* 1996;9:461-6.
34. Morita E, Kaneko S, Hiragun T et al. Fur Mite Ext.s induce dermatitis associated with IgE hyperproduction in an inbred strain of mouse. NCKuj. *J. Dermatol. Sci.* 1999;19:37-43.
35. Iijima OT, Takeda H, Komatsu Y, Matsumiya T, Takahashi H. Atopic dermatitis in NCJic mouse associated with *Myobia musculi* infestation. *Comp. Med.* 2000;50:225-8.
36. Matsumoto M, Ra C, Kawamoto K, Sato H, Itakura A, Sawada J, Ushio H, Suto H, Mitsuishi K, Hikasa Y, Matsuda H. IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mouse, a model for human atopic dermatitis. *J Immunol.* 1999;162:1056-63.
37. Mueller DL, Jenkins MK, Schwarz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation : A costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Ann Rev Immunol.* 1989;7: 445-80.
38. Plitnick LM, Loveless SE, Ladics GS, Holsapple MP, Selgrade MJ, Sailstad DM, Smailowicz RJ. Cytokine profiling for chemical sensitizers: Application of the ribonuclease protection assay and effect of dose. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;179:145-4.
39. Snapper CM, Paul WE. Interferon- $\gamma$  and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science.* 1987;236: 944-7.
40. Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Sekiya T, Hirai K, Kakinuma T, Fujita H, Asano N, Tanida Y, akugawa M, Torii H, Tamaki K. Interleukin-13 gene polymorphism G4257A is associated with atopic dermatitis in Japanese patients. *J Dermatol Sci.* 2002;30:100-7.
41. Wiemann C, Berthold K, Heusener A, Kruger N, Seeberger A, Stropp G. Joint positive control testing in guinea pig skin sensitization tests. *Reg Toxicol Pharmacol.* 2002;35:14-22.
42. Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. Chemokines in asthma : Cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:227-42.
43. Walter DM, McIntire JJ, Berry G, McKenzie AN, Donaldson DD, DeKruyff RH, et al. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol.* 2002;167:4668-75.
44. Jung EM, Kim HS, Kang IJ. A 10 year follow-up childhood asthma : Potential risk factors on persistence of nonspecific bronchial hyperresponsiveness. *Pediatr Allergy Respir Dis.* 2002;12:82-92.
45. Yang M, Hogan SP, Mahalingam S, Pope SM, Zimmermann N, Fulkerson P, et al. Eotaxin-2 and IL-5 cooperate in the lung to regulate IL-13 production and airway eosinophilia and hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:935-43.
46. Li L, Xia Y, Nguyen A, Lai YH, Feng L,

- Mosmann TR, et al. Effect of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung : IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells. *J Immunol.* 1999;162: 2477-87.
47. Schmid-Grendelmeier P, Altnauer F, Fischer B, Bizer C, Straumann A, Menz G, et al. Eosinophils express functional IL-13, in eosinophilic inflammatory disease. *J Immunol.* 2002;169:1021-27.
48. Kim JT. Evaluation of inflammation in childhood asthma: Non-invasive measurement. *J Korean Pediatr Soc.* 2001;44:334-939.
49. Kalliomaki, Isolauri E. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2003;3:15-20.
50. 王伯岳, 江育仁. 中醫兒科學. 上海:上海科學技術出版社. 1984:203-4.
51. 최경임. 아로마 미용학. 서울:뷰티프라자. 2000:30.
52. 誤謙. 醫宗金鑑. 서울:대성문화사. 1983:80.
53. 高祐新. 紫雲膏의 조제방법에 대한 연구. 동의대학교 東醫論文集. 1998;28:779-6.
54. 홍사석. 이우주의 약리학 강의 제 3판. 서울:의학문화사. 1993:1-758.
55. Eun-Jin Park, Kyoung Chul Park, Haekwan Eo, Jangkyun Seo, Miwon Son, Kyu Han Kim, Yoon-Seok Chang, Sang-Heon Cho, Kyung-Up Min, Mirim Jin and Sunyoung Kim. Suppression of Spontaneous Dermatitis in NC/Nga Murine Model by PG102 Isolated from *Actinidia arguta*. *Journal of Investigative Dermatology.* 2007;127:1154-60.
56. Yang-soon Kima, Younghwa Kima, Kang-Jin Leea, Hyung-Joo Kwonb, Doo-Sik Kimc, Tae-Yoon Kima. Improvement of Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice by Topical Application of CpG Phosphodiester-ODN. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;144:315-24.
57. Leung, Donald Y. M..Infection in atopic dermatitis. *Current Opinion in Pediatrics.* 2003;15(4):399-404.
58. Leung DY. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(5): 860-876.
59. Christian Vestergaard,1,2 Hiroyuki Yoneyama,1 Masako Murai,1 Kohichiro Nakamura,3 Kunihiko Tamaki,3 Yuya Terashima,1 Toshio Imai,4 Osamu Yoshie,4 Tatsuro Irimura,5 Hitoshi Mizutani,6 and Kouji Matsushima. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest.* 1999;104(8):1097-105.
60. Véronique Angeli, Delphine Staumont, Anne-Sophie Charbonnier, Hamida Hammad, Philippe Gosset, Muriel Pichavant, Bart N. Lambrecht, Monique Capron, David Dombrowicz and François Trottein. Activation of the D Prostanoid Receptor 1 Regulates Immune and Skin Allergic Responses. *The Journal of Immunology.* 2004;172:3822-9.
61. Tatsuya Sasakawaa, Yasuyuki Higashib, Syozo Sakumac, Yoshitaka Hirayamaa, Yuka Sasakawaa, Yoshitaka Ohkubo, Toshio Gotoa, Masahiro Matsumotod, Hiroshi Matsudae. Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions Induced by Topical Application of Mite Antigens in NC/Nga Mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;126:239-47.
62. Christian Vestergaard, Hiroyuki Yoneyama, Konji Matsushima. The NC/Nga mouse: a

model for atopic dermatitis. *Molecular Medicine Today* 6. 2000;5(1):209-10.

63. Bo Huang, Ping-Ying Pan, Qingsheng Li, Alice I. Sato, David E. Levy, Jonathan Bromberg, Celia M. Divino and Shu-Hsia Chen. Gr-1+CD115+ Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host. *Cancer Research*. 2006;15:1123-31.