大韓本草學會誌 제24권 제4호(2009년 12월)
Kor. J. Herbology 2009 ; 24(4) : 215-224

TNCB로 유발한 아토피피부염 생쥐 모델에서 天日鹽加味方과 淸肌解毒散의 병용 효과

이경미[1], 김선빈[1], 최학주[1], 최정준[1], 노성수[2], 김동희[1*]

1: 대전대학교 한의과대학 병리학교실
2: 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실

Suppressive Effects of *Chenilyeomgamibang* (CGB) and *Chenggihaedok-san* (CHS) on TNCB(trinitrochlorobenzene)-induced Atopic Dermtitis NC/Nga Mice Model

Kyoung-Mee Lee[1], Seon-Bin Gim[1], Hak-Ju Choi[1], Jeong-June Choi[1], Seong-Soo Roh[2], Dong-hee Kim[1*]

1: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University
2: Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : Atopic dermatitis is a chronic inflammatory disease characterized by typically distributed eczematous skin lesion with pruritus, lichenification and dry skin. In this study, we performed to assess the therapeutic effects of co-treatment of *Chenilyeomgamibang* (CGB) and *Chenggihaedok-san* (CHS, C&C) on the TNCB(trinitrochlorobenzene)-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice, characterized by the onset of atopic dermatitis along with an increase the number of inflammatory cells and dysregulation of Th2 cytokines.

Methods : Defined amount of CGB was sprayed on mice skin and CHS was simultaneously orally administrated to TNCB treated NC/Nga mice for 5 weeks. The immune cell types were caracterized by flow cytometry using each specific antibody. The amount of Th2 cytokines in serum and splenocytes culture supernatant were measured by ELISA.

Results : Administration of C&C significantly reduced clinical dermatitis severity including pruritus, edema, eczematous and erythema. Histological findings indicated that the thickening of epidermis/dermis and dermal infiltration of inflammatory cells were dramatically reduced. Flow cytometry analysis showed that infiltrated immune cell numbers of CCR3+, B220+/IgE+, Gr-1+/CD11b+, and CD117+ were significantly reduced in C&C-treated dorsal skin lesion. Furthermore, T cell composition rate in PBMC was also dramatically decreased by the treatment. C&C greatly down-regulated production of Th2 cytokines including IL-4, IL-5, IL-13 in the serum. The down- regulatory effects of C&C on these Th2 cytokines production were also detected in CD3/ CD28 activated splenocytes.

Conclusions : These results indicated that C&C is a plausible therapeutic agent for treatment of atopic dermatitis through regulating the Th2 skewed immune system.

Key words : Atopic dermatitis, *Chenilyeomgamibang* (CGB), *Chenggihaedok-san* (CHS), TNCB(trinitrochlorobenzene), NC/Nga mice, immune system

* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학 병리학교실
· Tel : 042-280-2623 · E-mail : dhkim@dju.ac.kr
· 접수 : 2009년 11월 25일 · 수정 : 2009년 12월 19일 · 채택 : 2009년 12월 21일

서 론

아토피피부염은 만성적인 재발성 염증성 피부상태를 말하는 것으로 가려움증, 피부 건조증, 태선화와 같은 증상을 동반하며 흔히 영유아기 때부터 발병한다[1]. International Study of Allergy and Asthma in Children (ISAAC)의 국내의 영유아 아토피 피부염 발병 설문조사에 따르면 초등학생의 경우 발병률이 1995년에는 15.3%에서 2000년에는 17.0%로 증가하였으며, 중학생의 경우에도 7.2%에서 9.2%로 점점 유병률이 증가하는 것으로 나타났다[2]. 해외 역시 지난 30년간 발병율이 2~3배 정도 증가한 것으로 보고되었으며[3]. 더욱이 유소아뿐만 아니라 성인에서도 아토피피부염의 발병이 증가하여 의학적 해결 과제로 남아있다[4]. 이는 공업화로 인한 대기 오염, 모유 수유의 감소, 새로운 항원 물질의 등장 및 주거 환경의 변화 등에 의해 기인한 것으로 밝혀지고 있다[5].

아토피피부염은 병리학적으로 다양한 면역세포들이 관여하는데, T세포를 비롯하여 랑게르한스세포, 호산구, 호염구 및 각질세포들이 병변 부위에서 증가되며, 다양한 사이토카인과 면역매개물질들도 아토피피부염에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[6]. 아토피피부염의 유발에 있어서 T세포는 주로 Th2세포들이 관여하게 되는데, 이들 세포가 분비하는 IL-4, IL-5, IL-13과 같은 Th2 매개사이토카인이 다른 면역세포에 영향을 주며[7], 이 외에도 B세포가 분비하는 IgE나 비만세포의 활성화가 관여하는 것으로 보고되고 있다[8,9].

현재 치료제는 스테로이드성 치료제와 비스테로이드성 면역억제제가 주로 사용되고 있는데[10], 스테로이드성 제제는 강력한 항염증 작용으로 아토피피부염에 효과적으로 작용하는 반면 장시간 사용시 steroid rebound 현상뿐만 아니라 심각한 부작용을 나타내는 문제점을 안고 있다[11]. 또한 비스테로이드성 제제는 주로 T세포의 활성을 억제하는 tacrolimus (protopic, FK-506)나 closporin A와 같은 약물이 사용되는데, 이들 제제는 스테로이드 제제에 비해 장기간 사용할 수 있는 장점이 있으나 이들 약물 또한 홍반, 두통, 여드름, 모낭염과 같은 다양한 부작용이 보고[12]되고 있어, 이들 제제들은 질병의 증상을 완화시켜 줄뿐 근본적인 치료에는 한계가 있다. 따라서 아토피피부염에 의한 환자의 삶의 질 저하와 함께 현대 사회에서 급격히 증가하는 발병률을 고려할 때 보다 안전하면서도 효과적인 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

본 실험에서 사용된 외치방인 天日鹽加味方과 내치방인 淸肌解毒散은 다양한 피부과 질환에 활용되고 있는 임상방으로 天日鹽加味方은 민간에서 피부과 질환에 사용되고 있는 한약재와 天日鹽을 중심으로 구성되어 있고, 淸肌解毒散은 이미 항알레르기 효능이 규명된 防風通聖散[13,14]의 가미방이다. 이들의 구성약물 대부분이 이미 실험적으로 항알레르기, 항염증 효능이 규명된 바[13-16]가 있어, 天日鹽加味方과 淸肌解毒散의 겸용은 아토피 피부염에 상승적 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

이에 본 연구는 현재 임상에서 활용되고 있는 天日鹽加味方(外治方)과 淸肌解毒散(內治方) 병용 치료 효과를 실험적으로 규명하고자, TNCB (trinitrochlorobenzene)로 아토피피부염을 유발시킨 NC/Nga 생쥐에 투여한 뒤 생쥐의 피부 병변 및 혈액에 존재하는 면역세포들을 분석하고, 생쥐모델에서 분리된 혈청과 비장세포가 분비하는 사이토카인의 양을 ELISA를 통해 검색하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물인 수컷 6주령의 NC/Nga mice는 중앙실험동물에서 공급받아 실험당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co, korea)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2℃, 습도 55 ± 15%, 12시간~12시간(light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약물

본 실험의 外治方에 사용한 처방 天日鹽加味方(*Cheonil-yeomgamibang,* 이하, CGB로 표기함)와 內治方에 사용한 처방 淸肌解毒散(*Chenggihaedok-san,* 이하, CHS로 표기함)의 구성 약재들은 대전대학교 부속한방병원과 섬들채에서 구입하여 정선 후 사용하였으며, 그 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1, 2).

Table. 1 The Prescription of CGB (1첩)

韓藥名	生藥名	用量(g)
海桐皮	Erythrinae Cortex	8
蛇床子	Cnidii Fructus	8
黃芩	Scutellariae Radix	8
苦參	Sophorae Radix	6
蕎麥	Fagopyrum esculentum Moench	6
石膏	Gypsum	6
魚腥草	Houttuyniae Herba	6
蛇苺	Duchesnea Indica	6
松脂	Resina Pini	6
沙參	Adenophorae Radix	6
白鮮皮	Dictamni Radicis Cortex	6
地膚子	Kochiae Fructus	6
黃土	Loess	4
木炭	Charcoal	2.4
食鹽	Solar salt	0.4
Total amount		84.8

3) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 collagenase, trypsin-EDTA, acetic acid, tris-base, tris-HCl, paraformaldehyde, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 등은 Sigma사 (USA)

Table. 2 The Prescription of CHS (1첩)

韓藥名	生藥名	用量(g)
滑石	Talcum	10
川芎	Cnidii Rhizoma	4
防風	Saposhnikovia Radix	4
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	4
薄荷	Menthae Herba	4
連翹	Forsythiae Fructus	4
麻黃	Ephedrae Herba	4
芒硝	Natrii Sulfas	4
大黃	Rhei Rhizoma	4
石膏	Gypsum	4
桔梗	Platycodi Radix	4
黃芩	Scutellariae Radix	4
桑白皮	Morus Cortex	4
白朮	Atractylodis Rhizoma White	3
荊芥	Schizonepetae Spica	3
生薑	Zingiberis Rhizoma Crudus	3
梔子	Gardeniae Fructus	3
甘草	Glycyrrhizae Radix	2
Total amount		76

제품을 사용하였으며, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사(USA) 제품을, DMEM은 Gibco사(USA) 제품을, Protopic 연고(0.1%)는 Astellas Pharma Manufacuring사(USA) 제품을, TNCB (trinitrochlorobenzene)는 동아제약(Korea) 제품을, anti-CD19-FITC, anti-CD3-PE, anti-CD69-FITC, anti-B220-PE, anti-IgE-FITC, anti-CCR3-PE, anti-CD11b-FITC, anti-Gr-1-PE 등은 BD Pharmingen사(USA) 제품을, IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α, GM-CSF ELISA kit는 Biosource사(USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반시약은 특급시약을 사용하였다.

4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 황토약탕기(알파세라믹약탕기, Korea), 감압 증류장치(Rotary evaporator, Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co, Japan), CO2 incubator (Forma scientific Co, USA), clean bench (Vision scientific Co, Korea), autoclave (Sanyo Co, Japan), water bath (Vision scientific Co, Korea), plate shaker (Lab-line Co, USA), vortex mixer, heating block (Vision scientific Co, Korea), centrifuge (한일, Korea), deep freezer (Sanyo Co, Japan), ice-maker (Vision scientific Co, Korea), flow cytometery (Becton Dickinson, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

처방 CGB, CHS 모두 10첩 분량에 증류수 4,500 ㎖를 가하여 황토 약탕기에서 3시간 추출하여 얻은 액 중 480 ㎖를 여과하여, 감압 증류장치로 농축하였다. 농축액을 각각 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 21.5 g, 19.3 g을 냉동 보관(-80℃) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다. CGB는 추출한 시료에 천일염을 1% 첨가하여 사용하였다.

2) 피부염 유도

7 주령이 된 NC/Nga 생쥐의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후 제모가 끝나면 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 1% TNCB 용액(아세톤 : 올리브오일 = 3 : 1) 200 ul를 등 부위에 도포하고, 4일 후 0.2% TNCB 용액을 다시 150 ul 처리하였다. 3일 후부터는 1주일에 2~3번씩 0.2% TNCB 용액 150 ul를 등 부위에 4주간 (8주령에서 11주령까지) 도포하였다.

3) 시료 처리

실험은 4개 그룹으로 나누고 양성대조군은 0.1% Protopic 연고 100 ㎎을 피부염 유발 부위에 5주간(8~12주령) 매일 도포하였으며, CGB와 CHS 처리군 (이하, C&C로 표기함)은 CGB는 증류수에 10% 농도로 용해시킨 후, 천일염을 1% 첨가하여 1일 2~3회 150 ul씩 분무를, CHS는 9 ㎎/28 g/day의 농도로 경구투여를 5주간 (8~12주령) 병행하였다. 대조군은 증류수를 위와 동일한 방법으로 시행하였다.

4) 관능 평가

약물 처리 후 5주에 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법으로 관능평가를 실시하였다. 평가 항목은 홍반(Erythema), 가려움과 건조 피부(Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종(Edema & Hematoma), 짓무름(Excoriation), 태선화(Lichenification)로 5가지이다. 각각의 항목은 없음(0), 약함(1), 중증도(2), 심함(3)으로 채점하였다.

5) 피부와 DLN에서 면역세포 분리

실험 종료 후 TNCB로 유발된 NC/Nga 생쥐에서 배부 일정량의 피부 조직을 잘게 chopping한 후 collagenase 1 ㎎/㎖ (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37℃ shaker (140 rpm, 20min.) 배양기에서 배양하여 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이들 세포들에 ACK 용액 (8.3 g NH_4Cl, 1 g $KHCO_3$ in 1L of dH_2O + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 cell strainer를 통과시킨 세포를 0.04% trypan blue로 염색하였다.

6) 형광 유세포 분석

분리한 세포를 5 × 10^5 cells/㎖의 농도로 조정한 후 4℃에서 면역형광염색을 실시하였다. 각각에 anti-CD19-FITC, anti-CD3-PE, anti-CD69-FITC, anti-B220-PE, anti-CCR3-PE, anti-CD11b-FITC, anti-Gr-1-PE, anti-CD49-FITC를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회

이상 인산완충 생리식염수로 수세하고 flow cytometry를 이용하여 측정하고 분석하였다.

7) 혈청 내 사이토카인 및 면역 글로불린 생성량 측정

실험 종료 후 ethyl ether로 마취한 상태에서 심장 천자법을 이용하여 채혈한 다음 6,500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α, GM-CSF 농도는 ELISA kit를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 각 well에 혈청을 50 ㎕씩 분주하고 biotin-conjugated antibody를 50 ㎕씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 37℃에서 반응시키고 washing buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 이를 다시 100 ㎕의 streptavidin-HRP Working solution을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 washing buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 100 ㎕의 stabilized chromogen을 가하여 암소에서 30분간 방치한 후 100 ㎕의 stop 용액을 처리하고 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) CD3/CD28에 의해 활성화된 비장세포 내 사이토카인 생성량 측정

실험 종료 후 비장세포(1 x 10^5 cells/well)를 분리한 뒤 anti-CD28 (1 ㎍/㎖), anti-CD3 (1 ㎍/㎖) 항체로 하룻밤 동안 코팅한 96-well plate에 세포들을 48시간 동안 배양한 후 배양액을 취하여 ELISA kit (Biosource, USA)을 이용하여 IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α, GM-CSF를 측정하였다. 측정 방법은 혈청 내 사이토카인 측정 방법과 동일하다.

9) 조직검사

실험 종료 후에, 배부의 피부를 떼어내어 10% formaldehyde에서 24시간 고정하였다. 고정이 끝난 조직을 파라핀으로 포매하였고, 5 ㎛ 부분의 두께로 block을 만들었다. 이를 염증을 일으키는 epidermis, dermis, 각질세포, 중성구, 호산구 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤을 관찰하였다.

10) 통계처리

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

결 과

1. 피부염 지수에 미치는 영향

7주령의 NC/Nga 생쥐를 제모한 후 TNCB를 도포하여 피부염을 유발시키면서 동시에 CGB 스프레이와 CHS 구강 투여를 실시하였다. Fig. 1은 9주부터 13주까지 2주 간격으로 대조군, Protopic 처리군, C&C 처리군의 피부염 유발 정도와 개선 정도를 나타내주는 사진으로, 최종 13

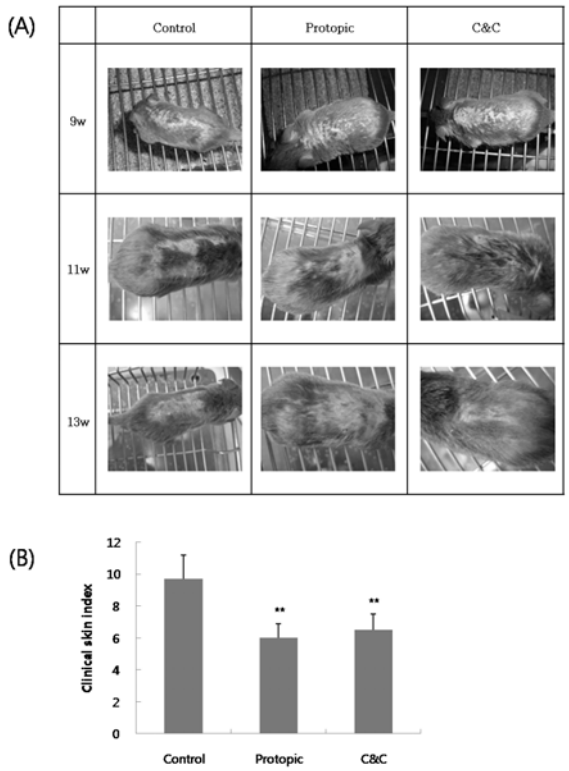

Fig. 1. Effects of C&C on clinical skin features and severity in TNCB-induced atopic dermtitis model of NC/Nga mice

(A) Atopic dermatitis was induced by TNCB treatment on the dorsal skin. The clinical features were observed with naked eye.
(B) 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 (itch, erythema/hemorrhage, edema, excoriation/erosion and scaling/dryness) ; Symptoms were evaluated by skin dryness, eruption and wound on the three parts of the body; ear, face and back. Statistically significant value was calculated by comparing with that of control group by student's *t*-test (** $p < 0.01$).

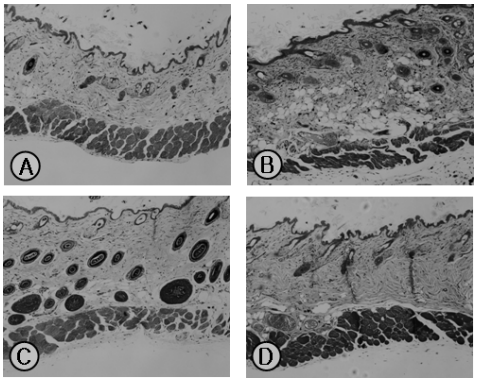

Fig. 2. Histological examination of dorsal skin lesion in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice

NC/Nga mice model followed by the treatment of C&C (CGB spray & CHS administration) for 5 weeks. dorsal skin biopsies were stained with toluidine blue (A; normal. B; control, C; Protopic, D; C&C) for examining inflammatory cells. The stained tissues were observed by light microscopy (Nikon, Japan, orignal magnification, x100).

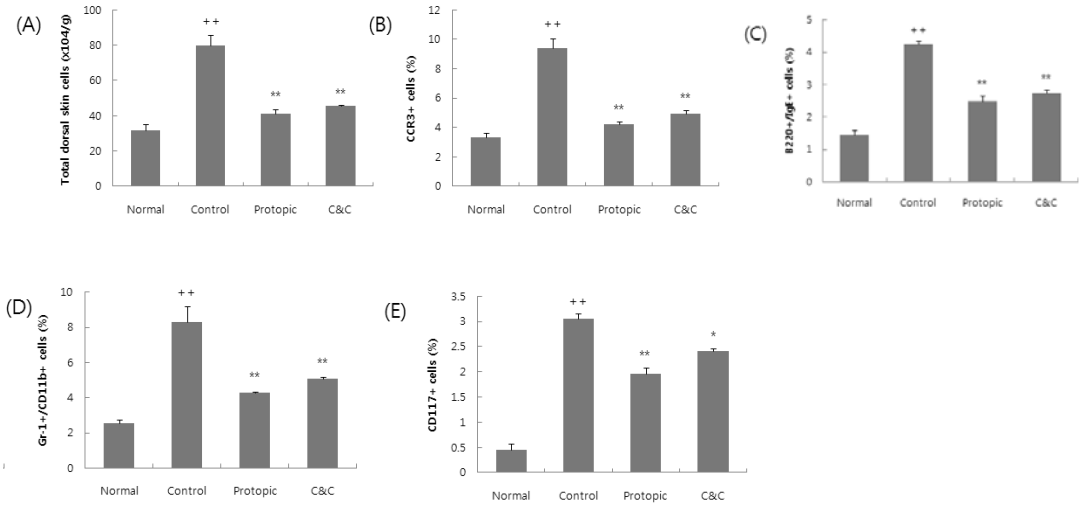

Fig. 3. Effects of C&C on immune cells of dorsal skin in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice

(A) NC/Nga mice model followed by the treatment of C&C (CGB spray & CHS administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the mice dorsal skin was removed and total cell were measured. (B) CCR3+, (C) B220+/IgE+, (D) Gr-1+/CD11b+ and (E) CD117+cells were detected by staining with each specific antibody and analyzed with flow cytometry The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by comparing with normal group by student's t-test (++ $p < 0.01$). Statistically significant value was calculated by comparing with control group by student's *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

주에는 C&C 처리군이 대조군에 비해서 현저하게 개선되었음을 확인할 수 있다. 피부염 지수는 아토피 피부염을 유발한 후 최종 5주 후에 피부염의 심화 정도를 관능적 방법에 의하여 측정한 결과, 대조군은 9.7 ± 1.5, Protopic 처리군은 6.0 ± 0.9, C&C 처리군은 6.5 ± 1.0로 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 2).

2. 조직 변화에 미치는 영향

C&C 투여가 피부 조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험 종료 후 생쥐 배부의 피부 일부를 채취하여 toluidine blue 염색을 실시하였다. H&E 염색을 한 대조군의 배부 피부 조직은 epidermis와 dermis가 부종으로 현저히 확장되었고, 백혈구 침윤도 관찰된 반면(Fig. 2B), C&C 처리군은 epidermis와 dermis의 두께 및 백혈구 침윤이 상대적으로 감소하였다(Fig. 2D).

3. 배부 피부(dorsal skin) 내 면역세포에 미치는 영향

배부 피부에 존재하는 총 면역세포수를 조사한 결과 정상군은 31.5 ± 3.5 ($\times 10^4$/g), 대조군은 80.0 ± 5.7 ($\times 10^4$/g)으로 나타나, 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (++p<0.01) 증가를 나타내었다. 이에 비해 Protopic 처리군은 41.0 ± 2.8 ($\times 10^4$/g), C&C 처리군은 45.5 ± 0.7 ($\times 10^4$/g)로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 3A).

배부 피부에 존재하는 CCR3+ 세포 비율은 정상군이 3.32 ± 0.28 (%), 대조군은 9.41 ± 0.66 (%)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 4.21 ± 0.17 (%), C&C 처리군은 4.95 ± 0.23 (%)으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 3B).

B220+/IgE+ 세포 비율은 정상군이 1.46 ± 0.13 (%), 대조군은 4.26 ± 0.09 (%)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 2.49 ± 0.17 (%), C&C 처리군은 2.75 ± 0.09 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 3C).

Gr-1+/CD11b+ 세포 비율은 정상군이 2.53 ± 0.23 (%), 대조군은 8.28 ± 0.94 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 4.31 ± 0.04 (%), C&C 처리군은 5.10 ± 0.09 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다 (Fig. 3D).

CD117+ 세포 비율은 정상군이 0.45 ± 0.13 (%), 대조군은 3.05 ± 0.11 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (++p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 1.96 ± 0.12 (%), C&C 처리군은 2.41 ± 0.05 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01, *p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 3E).

4. PBMC 내 면역세포 변화에 미치는 영향

PBMC에 존재하는 CD3+ 세포의 비율은 정상군이 70.72 ± 1.17 (%), 대조군은 79.21 ± 1.03 (%)으로 나타나

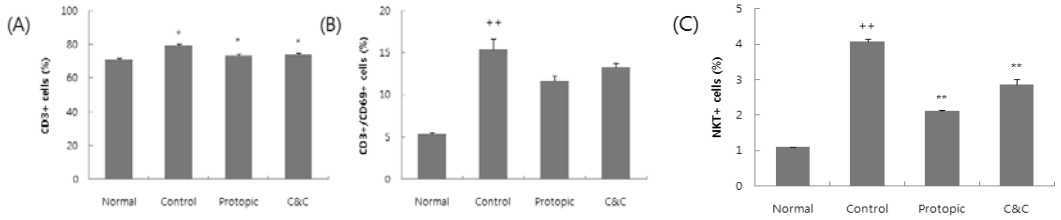

Fig. 4. Effects of C&C on immune cells composition of PBMC in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice

NC/Nga mice model followed by the treatment of C&C for 5 weeks. At the end of the experiment, PBMCs were isolated and stained with (A) anti-CD3, (B) anti-CD3/anti-CD69, and (C) anti-NKT antibodies and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's *t*-test (+p<0.05, ++p<0.01). Statistically significant value was calculated by comparing with that of control group by student's *t*-test (*p<0.05, *p<0.01).

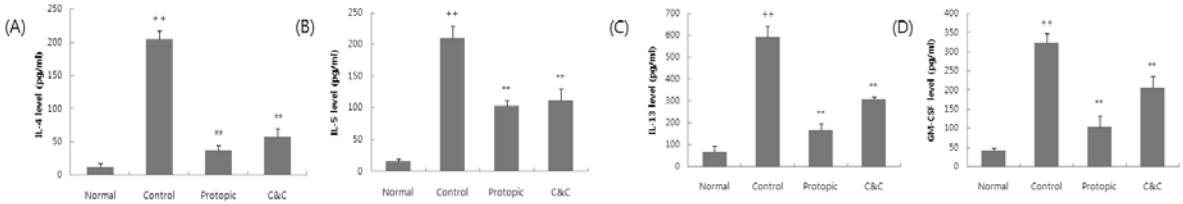

Fig. 5. Effects of C&C on the levels of cytokines in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice

Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serums were obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of (A) IL-4, (B) IL-5, (C) IL-13, and (D) GM-CSF were determined by using commercially available ELISA kits. The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by comparing with the level of normal group by student's t-test (++p<0.01). Statistically significant value was calculated by comparing with the level of control group by student's t-test (**p<0.01).

대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있게(+p<0.05) 증가하였고, Protopic 처리군은 73.18 ± 1.00 (%), C&C 처리군은 73.88 ± 0.97 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(*p<0.05) 감소를 나타냈다(Fig. 4A).

CD3+/CD69+ 세포 비율은 정상군은 5.31 ± 0.23 (%), 대조군은 15.33 ± 1.33 (%)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있게(++p<0.01) 증가하였고, Protopic 처리군은 11.73 ± 0.51 (%), C&C 처리군은 13.31 ± 0.45 (%)로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 4B).

NKT+ 세포 비율은 정상군은 1.09 ± 0.02 (%), 대조군은 4.07 ± 0.10 (%)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있게(++p<0.01) 증가하였고, Protopic 처리군은 2.13 ± 0.02 (%), C&C 처리군은 2.86 ± 0.15 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게(**p<0.01) 감소하였다(Fig. 4C).

5. 혈청 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

IL-4 생성량은 정상군이 13.02 ± 3.90 (pg/㎖), 대조군은 204.30 ± 13.54 (pg/㎖)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 37.60 ± 6.48 (pg/㎖), C&C 처리군은 57.13 ± 12.80 (pg/㎖)으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 5A).

IL-5 생성량은 정상군이 16.11 ± 3.03 (pg/㎖), 대조군은 209.26 ± 20.34 (pg/㎖)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 103.51 ± 8.55 (pg/㎖), C&C 처리군은 111.84 ± 18.34 (pg/㎖)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 5B).

IL-13 생성량은 정상군이 68.31 ± 26.55 (pg/㎖), 대조군은 592.11 ± 52.41 (pg/㎖)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 165.67 ± 31.41 (pg/㎖), C&C 처리군은 307.55 ± 11.24 (pg/㎖)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게(**p<0.01) 감소하였다(Fig. 5C).

GM-CSF 생성량은 정상군이 42.78 ± 5.92 (pg/㎖), 대조군은 324.09 ± 23.61 (pg/㎖)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 102.71 ± 30.82 (pg/㎖), C&C 처리군은 206.05± 30.36 (pg/㎖)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게(**p<0.01) 감소하였다(Fig. 5D).

6. CD3/CD28로 활성화된 비장세포 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

IL-4 생성량은 정상군이 16.57 ± 3.84 (pg/㎖), 대조군은 211.14 ± 9.26 (pg/㎖)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 104.27 ± 13.58 (pg/㎖), C&C 처리군은 133.21 ± 19.47 (pg/㎖)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 6A).

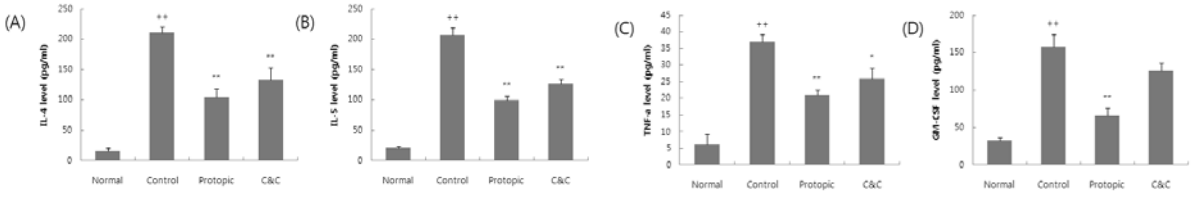

Fig. 6. Effects of C&C on the levels of cytokines in CD3/CD28-activated splenocytes of NC/Nga mice

Splenocytes were isolated and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of (A) IL-4, (B) IL-5, (C) TNF-α, and (D) GM-CSF in the culture supernatants were determined by using commercially available ELISA kits. The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by comparing with the level of normal group by student's *t*-test (++p<0.01). Statistically significant value was calculated by comparing with the level of control group by student's *t*-test (*p<0.05, **p<0.01).

IL-5 생성량은 정상군이 21.38 ± 2.22 (pg/㎖), 대조군은 206.68 ± 12.28 (pg/㎖)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 99.94 ± 6.04 (pg/㎖), C&C 처리군은 126.49 ± 7.38 (pg/㎖)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 6B).

TNF-α 생성량은 정상군이 6.20 ± 3.07 (pg/㎖), 대조군은 37.01 ± 2.18 (pg/㎖)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 20.97 ± 1.69 (pg/㎖), C&C 처리군은 25.84 ± 3.24 (pg/㎖)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01, *p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 6C).

GM-CSF 생성량은 정상군이 32.23 ± 4.37 (pg/㎖), 대조군은 157.28 ± 17.07 (pg/㎖)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타내었고, Protopic 처리군은 66.41 ± 9.74 (pg/㎖), C&C 처리군은 126.19 ± 9.79 (pg/㎖)로 나타났다(Fig. 6D).

고 찰

산업화와 공업화로 인해 점차 발병률[17]이 증가하고 있는 아토피피부염은 소양증으로 인한 수면 장애, 피부 염증 및 감염으로 인한 미용상의 문제로 인하여 환자 개인에게 있어서 삶의 질을 급격히 저하시키며[18], 경제·사회적으로도 큰 손실이 발생하는 질병으로 인식되면서 아토피피부염의 병리학적 기전에 대한 연구와 치료제 개발에 많은 노력을 기울이고 있다[19]. 그러나 기존의 치료제들은 아토피피부염의 근본적인 치료가 불가능하고 많은 부작용을 나타낸다는 점에서 천연추출물을 이용한 제제들이 본 질병의 새로운 대체 치료제로서 주목을 받고 있다[20]. 이에 전통 한의학에 의한 한약 제제들이 그 안전성과 효과적인 측면에서 새로이 인정을 받고 있다. 일례로 *in vitro*에서 RBL-2H3에 防風葛根湯을 처리하면 IL-4의 발현이 감소하고 히스타민과 같은 물질의 분비가 억제된다고 보고되었으며[21], 동물 실험에서도 고삼 추출물을 NC/Nga 생쥐에게 투여하면 IgE 및 Th2 케모카인의 발현이 억제되고[22], 연교, 방풍 등의 약재를 포함하는 연교패독산은 생쥐모델에서 IL-4와 IL-5와 같은 Th2 사이토카인의 발현을 낮추는 것으로 보고되었다[23].

아토피피부염은 현재 정확한 발병원인 및 발병기전이 밝혀지지 않았으나, 다양한 면역세포들이 질병에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 아토피피부염에 주로 침윤되는 T세포는 Th세포들로, Th세포는 그 기능에 따라 크게 Th1과 Th2로 나뉘는데, 이들 세포는 Th0에서 분화된다[24]. 아토피피부염에서 급성기에는 Th2세포가 Th1에 비해 상대적으로 비율이 높아져 있는 것으로 알려져 있다[25]. Th2세포는 Th2계열 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13을 생산하여 B세포를 자극하여 IgE의 생산을 유도하며, 이들 사이토카인은 비만세포와 호산구, 호중구의 활성화를 유도하여 제I형 과민반응을 일으킨다[26]. 더욱이 Th2 사이토카인은 Th0세포들의 분화를 Th2로 유도하는 데 중요한 역할을 하며, Th1세포 및 IFN-γ의 생산을 억제하는 기능을 가지고 있어서 Th2로 기울어진 면역 체계는 더욱 아토피피부염을 심화시킨다[27].

한의학에서 아토피 피부염은 증상과 부위에 준하여 '奶癬', '浸淫瘡', '風痒', '胎熱', '血風瘡', '四彎風' 및 '旋耳瘡' 등의 범주에 속하는 것으로 인식되고 있으며, 변증 및 치료법 역시 이에 준하여 이루어지고 있다[28-30]. 주요 병인으로는 크게 六淫 등의 외인과 七情內傷, 飮食不節, 稟性不耐, 榮衛不和 등의 내인으로 크게 나눌 수 있으며, 이들 내·외인은 상호 병리적 영향을 미침으로써 증상의 악화 및 재발을 유도한다. 특히 병태 양상이 濕疹과 瘙痒이 심하다는 점에서 역대 의서에서는 風과 濕의 병기가 집중적으로 기술되어 있고, 초기 내부 병리 과정 중 熱邪併合으로 인하여 '風熱', '濕熱', '血熱', '血毒' 등의 病機가 진행됨으로써 치료에 있어 난치성과 재발성을 초래한다는 것이 제가의 중론이다[28-33].

본 실험에서 사용된 외치방인 天日鹽加味方은 민간에서 피부관련 질환에 사용하고 있는 천일염, 황토, 숯 등과 한의학에서 외치에 다용되는 苦蔘, 蛇床子, 白鮮皮, 地膚子 등[34,35] 수종의 약물을 가미하여 작방된 임상방이다. 내치방인 淸肌解毒散은 항알레르기, 항염 효능이 실험 및 임상에서 입증된 防風通聖散[13-16]의 가미방으로 淸熱, 疏風, 祛濕 작용으로 이 역시 피부과 영역에서 다양하게 응용되고 있어, 이들 병용은 소양증을 주증으로 하는 아토

피피부염에 상승 치료 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

본 연구에서 먼저 TNCB로 아토피피부염을 유도한 NC/Nga 생쥐 모델에 C&C를 투여하고 육안으로 관찰 시 대조군에 비해 상당한 피부염 개선 효과를 볼 수 있었다 (Fig. 1). 이러한 개선 효과는 피부 조직에서도 나타나는데, 피부 조직으로 침윤된 다수의 면역 세포들이 C&C에 의해 사라지는 효과를 관찰할 수 있었으며(Fig. 2), 아울러 피부 조직에 존재하는 면역세포 수 역시 직접 측정한 결과 유의성있게 감소하여(Fig. 3A), 본 시료의 처치가 면역세포의 활성 및 침윤 과정을 억제함으로써 아토피피부염을 개선시키는 효과가 있음을 시사하였다.

C&C에 의해 영향을 받는 면역세포를 각 세포에 특이적인 항체를 사용하여 심층적으로 분석한 결과, 배부피부에서 IgE를 분비하는 B세포를 비롯하여 대식세포와 비만세포의 비율이 현저하게 감소하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 3). 외부 항원과 결합된 IgE는 비만세포를 활성화시키게 되는데, 이렇게 활성화된 비만세포는 히스타민과 류코트리엔을 분비하여 소양증과 홍반 등을 유발하게 된다. 이러한 반응은 항원에 노출이 되면 비교적 즉각적인 반응으로 나타나 아토피피부염을 악화시키게 된다[36]. 따라서 C&C에 의해 비만세포를 나타내는 CD117+ 세포[37]의 수가 감소하고 IgE를 분비하는 B세포의 발현이 감소한 결과는 아토피피부염을 개선시키는 데 매우 의미가 있다고 할 수 있다. CCR3+ 세포와 대식세포는 케모카인을 분비하여 의해 염증부위로 면역세포들을 불러오는 역할을 하는 것으로 알려져 있는데[38], 이렇게 환부로 침윤되는 면역세포들은 아토피피부염을 더욱 악화시키고 부종 등의 증상을 나타낸다. 본 실험에서 C&C에 의해 이들 세포가 피부조직에서 감소한 것은 상기한 바와 같이 본 시료가 면역 세포들이 피부 조직으로 침윤하는 것을 효과적으로 억제하고 있음을 알 수 있다.

비단 피부조직뿐만 아니라 말초혈액단핵구인 PBMC내의 T세포의 분포를 살펴 본 결과도 C&C가 아토피피부염의 증상을 개선시키는 효과가 있음을 뒷받침 해주고 있었다. PBMC에 존재하는 CD3+ T세포의 비율은 TNCB로 아토피피부염을 일으켰을 때 유의적 수준으로 증가하였으나 C&C를 처리한 생쥐의 PBMC에 존재하는 CD3+ 세포의 수는 유의적으로 감소하였다(Fig. 4A). 특히 그 중에서 활성화된 T세포인 CD3+/CD69+ 세포[39]의 수가 대조군에 비해 확연하게 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4B).

임상적으로 아토피피부염의 환자에게서는 IL-4와 IL-5의 양이 유의적으로 크게 증가하는데, 특히 IL-4는 호산구를 피부 병변으로 이끌어오는 화학주성을 나타내어 면역 세포가 피부로 침윤되게 한다[40]. 따라서 IL-4 생성량 변화는 아토피피부염에서 중요한 역할을 하고 있음을 의미한다. 본 실험에서도 아토피피부염을 유발한 생쥐의 혈장과 비장세포에 의해 분비된 IL-4의 농도는 정상쥐에 비해 크게 증가하였다. 반면 C&C를 처리한 생쥐는 IL-4의 농도가 대조군에 비해 크게 감소한 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 5A, 6A). 또한 Th2 사이토카인에 속하는 IL-5와 IL-13의 발현도 대조군에 비해 C&C를 처리한 생쥐에서 유의적으로 감소한 것으로 나타나 본 처방이 효과적으로 Th2 사이토카인의 발현을 억제함으로써 아토피피부염의 증상을 개선시킨 것으로 보인다.

GM-CSF는 림프구에 의해 분비되는 사이토카인으로 만성적인 아토피피부염에서는 그 발현이 증가되어 있는데, 이것은 림프구의 세포사멸이 억제되고 생존을 증가시켜 피부 병변의 만성 염증을 일으키는 것으로 알려져 있다[8]. TNCB에 의해 유도된 아토피피부염 생쥐의 혈장과 비장세포에서도 GM-CSF의 발현은 증가되었으나, C&C 처리군은 이 사이토카인의 발현을 크게 낮춤으로써, 본 시료가 Th2 사이토카인의 발현을 억제시켜 Th1/Th2의 불균형을 완화시킴과 동시에 GM-CSF의 발현을 낮추어 림프구의 수를 조절하는 것으로 사료된다.

결과적으로 본 시료는 아토피피부염의 발병으로 인해 변화된 면역 세포들의 분포를 효과적으로 조절할 수 있는 것으로 보여지며, Th2 사이토카인의 발현을 억제하여 아토피피부염에 효능을 나타내는 것을 알 수 있었다. 따라서 C&C는 아토피 피부염에 유효한 제제로 판단되며 본 연구를 통해 좀 더 심도있는 연구를 수행할 수 있는 토대를 제공하였다. 그러나 C&C의 개별 약재가 가지는 아토피피부염에 대한 효과와 유효 성분의 규명이 앞으로 풀어야할 숙제로 남았으며 좀 더 깊은 연구를 통해 더 명확한 약효기전이 있어야할 것으로 사료된다.

결 론

天日鹽加味方과 淸肌解毒散의 병용이 아토피 피부염을 치료할 수 있는가를 확인하기 위하여 TNCB로 아토피피부염을 유발한 NC/Nga 생쥐에게 본 제제를 처리한 뒤 피부 조직과 PBMC에 존재하는 면역세포의 분포를 알아보고 혈청 내에 존재하는 Th2 사이토카인의 발현을 조사하였다. 그 결과 본 제제를 5주 동안 투여하면 아토피피부염의 증상은 육안으로 확연히 구별할 수 있을 정도로 감소하는 것을 볼 수 있었다. 배부 피부에 존재하는 총 면역세포 수를 비롯하여 CCR+, B220+/IgE+. Gr-1+/CD11b+, CD117+ 세포의 수를 flow cytometry로 조사한 결과 피부 조직으로 침윤된 면역세포들은 대조군에 비해 각각 43%, 64%, 52%, 38%, 21%씩 본 처방에 의해 감소하였다. PBMC에 존재하는 CD3+, CD3+/CD69+ 세포 수도 대조군에 비하여 각각 7%와 13%씩 감소하는 것으로 관찰되었다. 天日鹽加味方과 淸肌解毒散을 처리한 NC/Nga 생쥐 혈장에 존재하는 사이토카인 검색에서 IL-4는 72%, IL-5는 46%, IL-13은 48%, GM-CSF는 36% 정도 감소한 것으로 나타났다. 또한 CD3/CD28로 활성화시킨 비장세포가 분비하는 사이토카인에서 IL-4는 37%, IL-5는 39%, TNF-α는 30% GM-CSF는 20% 정도가 본 시료에 의해 감소하는 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 본 시료

가 면역조절 작용을 통하여 면역세포들이 피부조직으로 침윤되는 것을 막고, Th2 사이토카인의 발현을 낮추어 아토피피부염에 효과적임을 증명해줌으로써 임상적 활용 가치를 제고해 주었다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지정 대전대학교 난치성면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것으로 이에 감사드린다.

참고문헌

1. Daniels J, Harper J. The epidemiology of atopic dermatitis. Hosp Med. 2002 ; 63 : 649-52.
2. Oh J, Kim K, Pyun B, Lee H, Choung J. Nationwide study for epiemiological change of atopic dermatitis in school aged children in 2003 in Korea. Pediatr Allergy Respir Dis (Korea). 2003 ; 13 : 227-37.
3. Schultz Larsen F, Hanifin JM. Secular change in the occurrence of atopic dermatitis. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh). 1992 ; 176 : 7-12.
4. Hassan AS, Kaelin U, Braathen LR, Yawalkar N. Clinical and immunopathologic findings during treatment of recalcitrant atopic eczema with efalizumab. J Am Acad Dermatol. 2007 ; 56 : 217-21.
5. Wollenberg A, Kraft S, Oppel T, Bieber T. Atopic dermatitis: pathogenetic mechanisms. Clin Exp Dermatol. 2000 ; 25 : 530-4.
6. Holden CA, Parish WE. Atopic dermatitis. Oxford : Blcackwell Science. 1998 : 681-708.
7. Meagher LJ, Wines NY, Cooper AJ. Atopic dermatitis: review of immunopathogenesis and advances in immunosuppressive therapy. Australas J Dermatol. 2002 ; 43 : 247-54.
8. Cooper KD. Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy. J Invest Dermatol. 1994 ; 102 : 128-37.
9. Williams HC. Clinical practice. Atopic dermatitis. N Engl J Med. 2005 ; 352 : 2314-24.
10. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. Lancet. 2003 ; 361 : 151-60.
11. Kimata H. Selective enhancement of production of IgE, IgG4, and Th2-cell cytokine during the rebound phenomenon in atopic dermatitis and prevention by suplatast tosilate. Ann Allergy Asthma Immunol. 1999 ; 82 : 293-5.
12. Hanifin JM, Cooper KD, Ho VC, Kang S, Krafchik BR, Margolis DJ, Schachner LA, Sidbury R, Whitmore SE, Sieck CK, Van Voorhees AS. Guidelines of care for atopic dermatitis, developed in accordance with the American Academy of Dermatology (AAD)/American Academy of Dermatology Association "Administrative Regulations for Evidence-Based Clinical Practice Guidelines". J Am Acad Dermatol. 2004 ; 50 : 391-404.
13. 이동현. 防風通聖散 및 防風通聖散 加味方이 抗 알레르기와 免疫反應에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 1990.
14. 성현제. 防風通聖散의 鎭痛 消炎 解熱 및 抗菌作用에 관한 實驗的 硏究. 경희대학교대학원. 1984.
15. 김대근 외. 박하의 항알레르기 활성. 생약학회지. 1998 ; 29(3) : 248-53.
16. 申淑正. 황금 추출물이 면역반응과 항균작용에 미치는 영향. 전주대학교 대학원. 1993.
17. Schultz Larsen F, Diepgen T, Svensson A. The occurrence of atopic dermatitis in north Europe: an international questionnaire study. J Am Acad Dermatol. 1996 ; 34 : 760-64.
18. Kiebert G, Sorensen SV, Revicki D, Fagan SC, Doyle JJ, Cohen J, Fivenson D. Atopic dermatitis is associated with a decrement in health-related quality of life. Int J Dermatol. 2002 ; 41 : 151-8.
19. Lapidus CS, Kerr PE. Social impact of atopic dermatitis. Med Health R I. 2001 ; 84 : 294-5.
20. Hon KL, Leung TF, Ng PC, Lam MC, Kam WY, Wong KY, Lee KC, Sung YT, Cheng KF, Fok TF, Fung KP, Leung PC. Efficacy and tolerability of a Chinese herbal medicine concoction for treatment of atopic dermatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Br J Dermatol. 2007 ; 157 : 357-63.
21. 이주은 외. 방풍갈근탕의 항알레르기효과에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2007 ; 21 : 1118-26.
22. 장선일 외. 천연물 유래 Th2 케모카인 억제제 발굴에 의한 새로운 아토피 피부염 치료기술 개발: 아토피 피부염 모델 NC/Nga 마우스에서 고삼 추출액의 억제 효과. 대한한의방제학회지. 2009 ; 17 : 141-51.
23. 곽노규 외. 연교패독산 물 추출물의 마우스 Th1/Th2 사이토카인 조절에 의한 항알레르기 효과. 동의생리병리학회지. 2006 ; 20 : 844-52.
24. Leung DY. Pathogenesis of atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 1999 ; 104 : S99-108.
25. Morren MA, Przybilla B, Bamelis M, Heykants B, Reynaers A, Degreef H. Atopic dermatitis: triggering factors. J Am Acad Dermatol. 1994 ; 31 : 467-73.

26. Valenta R, Seiberler S, Natter S, Mahler V, Mossabeb R, Ring J, Stingl G. Autoallergy: a pathogenetic factor in atopic dermatitis? J Allergy Clin Immunol. 2000 ; 105 : 432-7.
27. Muller KM, Jaunin F, Masouye I, Saurat JH, Hauser C. Th2 cells mediate IL-4-dependent local tissue inflammation. J Immunol. 1993 ; 150 : 5576-84.
28. 李博鑑. 皮科證治槪要. 人民衛生出版社. 1999 : 47-8.
29. 徐宜厚 외. 皮膚病中醫診療學. 人民衛生出版社. 1995 : 254, 310, 316.
30. 이원문 외. 皮膚性病手冊. 人民衛生出版社. 2004 : 193.
31. 공남미 외. 아토피피부염의 양·한방적 고찰. 대한외관과학회지 1999 ; 12 : 241-53.
32. 廖新華 외. 皮膚病驗方600首. 上海中医葯大學出版社. 2001 : 128-30.
33. 한방병리학 교재편찬위원회. 한방병리학. 한의문화사. 2008 : 37-42, 52-8.
34. 김선빈. 아토피 피부염에 대한 황토가미방과 청삼가미방의 내외치 겸용에 관한 연구. 대전대학교 대학원. 2009.
35. 손대범 외. 淸肌散과 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga mice의 아토피 피부염에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2008 ; 22(5) : 1168-77.
36. Leung DY. Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. J Allergy Clin Immunol. 1995 ; 96 : 302-18 ; quiz 319.
37. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, Aldanondo I, Sanchez L, Dominguez M, Botana LM, Sanchez-Jimenez F, Sotlar K, Almeida J, Escribano L, Orfao A. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. Blood. 2006 ; 108 : 2366-72.
38. Yawalkar N, Uguccioni M, Scharer J, Braunwalder J, Karlen S, Dewald B, Braathen LR, Baggiolini M. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis. J Invest Dermatol. 1999 ; 113 : 43-8.
39. Bieber T, Rieger A, Stingl G, Sander E, Wanek P, Strobel I. CD69, an early activation antigen on lymphocytes, is constitutively expressed by human epidermal Langerhans cells. J Invest Dermatol. 1992 ; 98 : 771-6.
40. Dubois GR, Bruijnzeel-Koomen CA, Bruijnzeel PL. IL-4 induces chemotaxis of blood eosinophils from atopic dermatitis patients, but not from normal individuals. J Invest Dermatol. 1994 ; 102 : 843-6.