

凉血除濕湯이 DNCB로 유도된 NC/Nga mice의 아토피 피부염에 미치는 영향

박두병 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

Effect of Yanghyeoljeseuptang (YHJST) Composition on Atopic Dermatitis NC/Nga Mice Induced by DNCB(dinitrochlorobenzene)

Park Doo Byoung, 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 effect of YHJST on atopic dermatitis in an experiment using an NC/Nga mice induced by DNCB, which has histological and clinical similarities to the condition in humans.

Methods

To investigate the effect of YHJST on atopic dermatitis(AD), we evaluated atopic dermatitis-like skin lesions by clinical skin index and analyzed immunological parameters in peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) and performed skin histology in ears and dorsal skin of NC/Nga ato-mouse.

Results

YHJST medicines decreased Serum level of IgE, IL-6, TNF- α . Also total number of CD69⁺, CD3⁺ in PBMCs, absolute cell number of CCR3⁺CD3⁺, CD11b⁺Gr-1⁺ in Dorsal skin tissue, Serum IgG1, IgM, IgG2a and IgG2b decreased significantly. Furthermore YHJST is extremely effective to histological symptoms; dermal and epidermal thickening, hyperkeratosis and inflammatory cell infiltration and suppressed histologic infiltration of CD4⁺& CCR3⁺ in ear and dorsal skin lesions significantly. YHJST decreased gene-expression of IL-6, TNF- α , CCR3, Eotaxin mRNA than that of control group.

Conclusions

YHJST on atopic dermatitis to atopic dermatitis NC/Nga mouse induced DNCB was incredibly effective.

Key words : atopic dermatitis, Yanghyeoljeseuptang, NC/Nga mouse.

I. 緒 論

아토피 피부염은 주로 유·소아기에 발병이 시작하는 만성 재발성 피부질환으로 정확한 병인은 알려지지 않으나 유전적, 환경적 그리고 면역학적 요인이 복잡하게 연관되어 발병하는 것으로 추측되고 있다¹⁾. 아토피 피부염은 유아시기에서부터 성인까지의 광범위한 연령층에 특징적인 모양 및 분포를 가지는데, 유·소아에서는 안면부와 伸展部의 습진양 병변을 보이고, 성인에서는 사지의 屈側部, 목의 양측의 苔癬化, 手部濕疹 등의 소견을 보인다²⁾.

아토피 피부염의 발생에 대하여 여러 가지 측면에서의 병리기전이 제시되고 있지만 특징적인 면역학적인 기전이 관여한다는 점에는 이견이 없는데, 주로 IgE 증가에 따른 면역학적 결핍과 T세포, 호산구, 비만세포 등 다양한 세포들에 의해 발병되는 것으로 알려져 있으며, 그 중에서도 Th2 세포가 발현하는 IL-4, IL-5, IL-13 등의 Th2 cytokine이 발병 과정에 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고되고 있다^{3,4)}.

아토피 피부염의 한의학적 범주는 《素問·玉機眞藏論篇》⁵⁾에서 “浸淫”이라고 기록된 이후로, 한의학 문헌 중에 다양하게 나타나 乳癬, 嬰兒濕疹, 胎熱症, 胎癬, 浸淫瘡, 胎斂瘡, 奶癬, 濕疹, 四彎風 등으로 언급되고 있으며⁶⁾, 한의학적 발생원인은 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고 清熱, 涼血, 除濕, 祛風, 養血 등의 治法을 주로 사용하고 있는데⁷⁻⁹⁾ 涼血除濕湯은 清熱, 涼血, 除濕의 효능을 지닌 약물로 구성되어 아토피 피부염의 치료에 多用되고 있다.

이에 저자는 涼血除濕湯이 아토피 피부염 발진 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, dinitrochlorobenzene(DNCB)로 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga mice (atopic dermatitis

NC/Nga mouse, 이하 NC/Nga ato-mouse)를 이용하여 혈청 내 IgE, IL-6, TNF- α , IgM, IgG1, IgG2a 및 IgG2b의 농도와 등 피부조직에서의 총 면역세포 수를 알아보고 등 피부조직과 peripheral blood mononuclear cells(PBMCs)에서의 형광 유세포 분석을 하였다. 그리고 涼血除濕湯 추출물을 경구 투여한 다음 귀와 등 쪽 목 부분의 피부를 hematoxyline/eosin(H&E) 염색하여 조직의 염증, 세포침윤 등을 관찰하였고, toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤과 분포를 검사하였으며, CD4⁺와 CCR3⁺의 면역형광조직검사를 시행하였다. 또한 NC/Nga ato-mouse의 등 피부조직을 분리하여 피부에 대한 涼血除濕湯의 알레르기 반응 억제를 real-time PCR을 이용하여 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), diethyl pyrocarbonate (DEPC), 3-4, 5-dimethylthiazol-2, 5-carboxymethoxyphenyl-2, 4-sulfophenyl-2H-tetrazolim (MTS), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), antibody biotin- conjugated, antibody Avidin-HRP conjugated, TMB, EtOH 등은 Sigma 사 (Washington D.C., USA.) 제품을, Taq polymerase, Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa 사 (Japan) 제품을, cyclosporin A (CsA)는 중외제약 (Seoul, Korea) 제품을, 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, USA.) 제품을, PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-

CD25, FITC-anti-CD69의 RNase, CD4 mAb (RM4-5), PE-conjugated goat anti-rat IgG는 BD-Pharmingen 사 (California, USA.) 제품을, rat anti-mouse CCR3 mAb (53-6.7)는 Becton Dickinson 사 (California, USA.) 제품을, Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST)는 Dako 사 (Glostrup, Denmark) 제품을, 인간 재조합 IL-4, IL-6, TNF- α , IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM는 R & D system 사 (Minneapolis, USA.) 제품을, LipofectamineTM2000 Reagent는 Invitrogen 사 (Carlsbad, USA.) 제품을, Luciferase assay kit와 RNase inhibitor는 Promega 사 (Madison, USA.) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

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

(Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), plate shaker (Lab-Line Co., USA.), spectrophotometer (Shimazue Co., Japan), centrifuge (한일, Korea), ELISA reader (Molecular Devices, USA.), flow cytometry (Becton Dickinson, USA.), 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA.), contrast fluoroseince microscope (Nikon, Japan) 등을 사용하였다.

2) 동물

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

3) 약물

본 실험에 사용한 凉血除濕湯 (YHJST)의 구성 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. The Composition of Yanghyeoljeseubtang(YHJST)

韓藥名	生藥名	用量(g)
石膏	<i>Gypsum</i>	15
百部根	<i>Stemnae Radix</i>	15
白鮮皮	<i>Diatami Radicis Cortex</i>	15
牡丹皮	<i>Moutan Cortex Radicis</i>	10
生地黃	<i>Rhemniae Radix Crudus</i>	8
車前草	<i>Plantaginis Semen</i>	8
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	8
苦參	<i>Sophrae Radix</i>	6
知母	<i>Anemurthanae Rhizom</i>	5
Total amount		90

4) 시료 추출

凉血除濕湯 (YHJST) 4첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여, 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator)로 농축하였다. 농축액을 다시 동결 건조기 (Freeze dryer)를 이용하여 완전 건조한 추출물 24.0 g을 냉동 보관 (-80°C) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 方法

1) 피부염 유도 및 시료 처리

8 주령이 된 NC/Nga mice의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24 시간 방치하였다. 그리고 1% DNCB 용액 (아세톤 : 올리브오일 = 3 : 1) 200 μ l를 등 부위에 도포하였고, 4 일 후, 1 주일에 2-3 번씩 0.2% DNCB 용액 150 μ l를 등 부위에 4 주간(8 주령에서 12 주령까지) 도포하여 피부염이 유발되도록 하고 이와 동시에 대조군에는 생리식염수를, 실험군에는 YHJST를 10 mg/25 g/day의 농도로 8 주간(8 주령에서 16 주령까지) 경구 투여하였다. 또한 양성 대조군은 CsA를 20 mg/kg 주 3 회 복강에 주사 하였다.

2) 채혈 및 IgE 측정

약물 투여 전 (8 주령)과 약물 투여 후 4 주 (12 주령), 8 주 (16 주령)에 각각 NC/Nga ato-mouse 눈에서 capillary 관을 이용하여 약 100 μ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기 6,500 rpm에서 20 분간 원심 분리하여 30 μ l의 혈청을 분리하여 -70°C에 냉동 보관하였다. 혈청 내 IgE 농도는 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)로 측정하였다. 각 well에 NC/Nga ato-mouse 8 주, 12 주, 16 주령에서 채혈한 혈청 5 μ l (1/10 dilution)와 dilution buffer 45 μ l를 혼합

하여 각 well에 분주하고, 2 시간 동안 25°C 실온에서 방치한 후 2 회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-IgE conjugated를 넣고 2 시간 방치하였다. 다시 2 회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 등 피부조직의 총 면역세포 수 측정

NC/Nga ato-mouse에 8 주간 YHJST를 투여한 후, 실험동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 skin을 분리하여 skin의 총 면역세포 수를 측정하였다.

4) 등 피부조직과 PBMCs에서의 형광 유세포 분석

NC/Nga ato-mouse의 등 부위의 일정량 피부조직을 잘게 chopping한 후 collagenase 1mg/ml (in 2% FBS + RPMI1640)을 넣고 37°C shaker (180 rpm, 20min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4 회 반복하였다. PBMCs는 미리 heparin이 들어있는 주사기로 심장 천자법(cardiac puncture)으로 채혈하여 혈장을 분리한 후 혈액세포를 분리하였다. 이들 세포들을 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)으로 실온에서 5 분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 D-PBS로 2 회 세척한 후 0.04 % trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 측정된 PBMCs 5×10⁵로 조정된 후 4°C에서 면역형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD69, PE-anti-CCR3, PE-anti-CD11b, PE-anti-Gr-1을 넣고

30 분간 얼음에서 반응시켰으며, 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3⁺CD69⁺, CCR3⁺, CCR3⁺CD3⁺, CD11b⁺Gr-1⁺ 세포수를 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

5) 염증 cytokine 분석

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

6) 혈청 내 immunoglobulin 측정

총 IgG1, IgG2a, IgG2b, 그리고 IgM의 혈청 내 농도 측정은 약물 투여 후에 ELISA로 생산량을 측정하였다. 각 well에 NC/Nga ato-mouse의 혈청 100 μ l (1/200 dilution)씩 분주하고, 12 시간 동안 4 $^{\circ}$ C 냉장실에서 방치한 후 2 회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 30 분간 방치하였다. 다시 2 회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 실온에서 1 시간 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처

리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) Histology

약물 투여 종료 후, 왼쪽 귀 끝부분과 등 쪽 목 부분의 피부를 떼어내어 10% 포르말린 용액에 24 시간 동안 고정하였다. 그 조직을 파라핀으로 포매하였고 5 μ m 두께로 block을 만들었다. 그 조직부분은 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils/ eosinophil 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline /eosin (H&E) 염색과 비만세포(mast cells)를 염색하는 toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤을 관찰하였다.

8) 면역조직화학염색

(immunohistochemical staining)

약물 투여 후 NC/Nga ato-mouse의 면역조직화학염색을 위해 왼쪽 귀 끝부분과 등 쪽 목 부분의 피부를 적출하여 10% 포르말린 용액에 고정한 후 파라핀 블록을 만들고 rat anti-mouse CD4 mAb (RM4-5)와 rat anti-mouse CCR3 mAb (53-6.7)단일항체를 사용하였다. 조직절편을 4 μ m 두께로 세절한 후 probe-on plus slide에 부착시켜 건조시켰다. 그리고 탈 파라핀 (deparaffinized) 후 함수시키고 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)를 이용해 microwave oven에 15 분간 전 처리하였다.

조직 내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H₂O₂에 10 분간 처리한 후, 조직 내의 항원과 비특이적 단백질결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질질을 차단시켰다. 그리고 일차 단일 항체에 1 시간 동안 부착시킨 다음 완충액으로 수세하였다. LSAB kit를 이용하여 PE-conjugated goat anti-rat IgG에 30 분간 반응시켰다. 3 회 Tris-buffered saline with 0.1%

Tween 20 (TBST)용액으로 수세한 후 건조하였다. 현미경은 형광위상차현미경(contrast fluorescence microscope)을 사용하여 ×100 배율로 관찰하였다.

9) Quantitative real-time PCR on dorsal skin tissue of NC/Nga ato-mouse

(1) 등 피부조직에서 RNA 분리

약물 투여 종료 후, NC/Nga ato-mouse의 등 피부조직을 떼어내어 피부조직 (0.1g)과 RNazol^B 500 μl를 넣고 용해될 때까지 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μl를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3 분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μl의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된

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

(3) Quantitative real time-PCR

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

Mouse Olionucleotid의 염기배열은 다음과 같다 (Table 2).

염증 cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal

Table 2. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
Mouse IL-6	sence	5' tccagttgccttcttgggac 3'
	anti-sence	5' gtgaattaagcctccgacttg 3'
Mouse CCR3	sence	5' ttcaaatgagattgttgggaaat 3'
	anti-sence	5' accgatacagtacagtacagta 3'
Mouse TNF-α	sence	5' tgggaggaaaggggtcctaag 3'
	anti-sence	5' acctacgacgtgggctacag 3'
mouse Eotaxin 2	sence	5' tcaagtgatagatgtggaagaa 3'
	anti-sence	5' tggctctgcaggattttcatg 3'
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)	sence	5' tgcgctctagaaaaacctgcca 3'
	anti-sence	5' gccccaggctcaaaaggtg 3'

standard를 G3PDH를 사용하였고, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다.

Real time-PCR의 조건은 다음과 같다; 50°C에서 2 분, 94°C에서 4 분간 반응하여 pre-denaturation 시킨 뒤, 95°C에서 15 초, 60°C에서 1 분간 반응하여 40 회 반복 수행하였다. YHJST 투여군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 표적 유전자의 발현을 표준화하였다.

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

x : starting quantity

y : yield

n : number of cycles

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

10) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석법을 이용하여 p<0.05로 하였다.

III. 成 績

1. 혈청 IgE 수치에 미치는 영향

약물 투여 전(8 주령), 약물 투여 후 4 주(12 주령), 약물 투여 후 8 주(16 주령)의 혈청 IgE의 수치의 변화를 측정된 결과, 정상군에서는 각각 25.6 ± 6.2, 53.5 ± 12.1, 72.0 ± 20.1 (ng/ml), 대조군에서는 각각 35.2 ± 2.0, 214.3 ± 4.4, 217.3 ± 6.8 (ng/ml)로 나타나 12 주 이후 IgE 수치가 현저하게 증가하였다. 양성대조군인 CsA군에서는 각각 43.1 ± 1.9, 114.3 ± 18.1 (p<0.001), 115.2 ± 4.9 (p<0.001) (ng/ml)로 나타났으며 YHJST 투여군에서는 각각 80.6 ± 23.3, 150.7 ± 50.8 (p<0.001), 180.5 ± 1.9 (p<0.001) (ng/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 1).

2. 등 피부조직 총 면역세포 수에 미치는 영향

등 피부조직에서의 총 면역세포 수를 관찰한 결과, 정상군은 5.85 ± 1.65, 대조군이 11.85 ± 0.75, CsA군은 5.65 ± 0.25, YHJST 투여군은 7.3 ± 0.13 (×10⁵/g)으로 나타나, 대조군에 비하

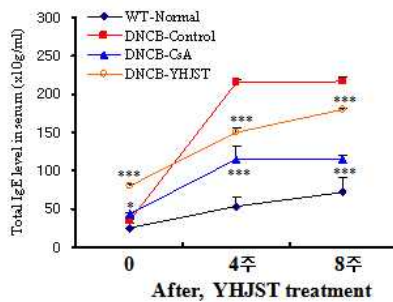


Fig. 1. Effects of YHJST on the serum levels of IgE in NC/Nga ato-mouse.

DNCB (0.2%) was applied topically to the dorsal skin of NC/Nga mouse, 2-3 times per week for 4 weeks. The animals were administrated with normal (◆), control (■), CsA (▲), YHJST (10 mg/25 g/day, ○) for 8 weeks. Serum levels of IgE were measured by sandwich ELISA at indicated time points. Each point represents the mean ± SE. of four mice. Statistically significant value compared with control group by t-test (*p<0.05, ***p<0.001).

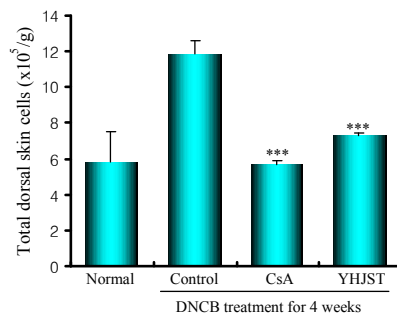


Fig. 2. Effect of YHJST on total cell number of skin in NC/Nga ato-mouse.

NC/Nga ato-mouse followed by the administration of YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, dorsal skin (x10⁵/g) were removed and total cell absolute number were measured by analyzed by flow cytometry. Each point represents the mean ± SE. Statistically significant value compared with control group by T test (***)p<0.001).

Normal : no process

Control : administration of normal saline for 8 weeks

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

YHJST : administration of YHJST extract (10 mg/25 g/day) for 8 weeks

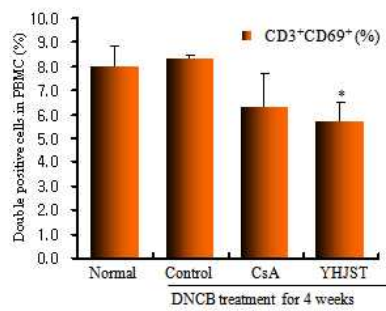


Fig. 3. Effect of YHJST on CD3⁺CD69⁺ cell percent of PBMCs in NC/Nga ato-mouse.

NC/Nga ato-mouse followed by the administration of YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice PBMCs were removed, CD3CD69 positive cell percent were measured by analyzed by flow cytometry. Each point represents the mean ± SE. Statistically significant value compared with control group by T test (*p<0.05).

여 유의성 (p<0.001) 있게 감소하였다 (Fig. 2).

에 비하여 유의성 있게 (p<0.05) 감소하였다 (Fig. 3).

3. PBMCs 내 면역세포 수 변화에 미치는 영향

1) CD3⁺CD69⁺ 활성화세포 수에 미치는 영향
PBMCs에서의 CD3⁺CD69⁺ 총 활성화세포 수 (%)는 정상군은 8.0 ± 0.86, 대조군은 8.3 ± 0.20, CsA군은 6.3 ± 1.40 (%)이었으며, YHJST 투여군에서는 5.7 ± 0.80 (%)로 나타나, 대조군

2) CCR3⁺ 총 활성화세포 수에 미치는 영향
PBMCs에서의 CCR3⁺ 총 활성화세포 수는 정상군은 5.6±0.52, 대조군은 14.8±2.80, CsA군은 9.8±2.09 (%)이었으며, YHJST 투여군에서는 7.0±0.45 (%)로 나타나, 대조군에 비하여 유의

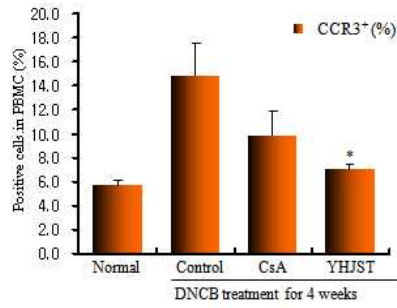


Fig. 4. Effect of YHJST on CCR3⁺ cell percent of PBMCs in NC/Nga ato-mouse.

NC/Nga ato-mouse followed by the administration of YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice PBMC were removed CCR3 positive cell percent were measured by analyzed by flow cytometry. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared with control group by T test (* $p < 0.05$).

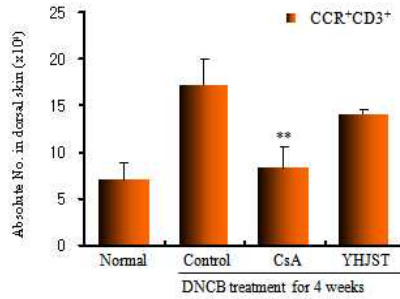


Fig. 5. Effect of YHJST on CCR3⁺CD3⁺ absolute cell number of skin in NC/Nga ato-mouse.

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

성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 4).

4. 등 피부조직 내 면역 세포 수 변화에 미치는 영향

1) CCR3⁺CD3⁺ 세포 수에 미치는 영향

등 피부조직에서의 CCR3⁺CD3⁺ 총 절대 세포수는 정상군은 7 ± 1.8 , 대조군은 17.2 ± 2.8 , CsA군은 8.2 ± 2.3 ($p < 0.01$)이었으며, YHJST 투여군에서는 14.0 ± 0.7 ($\times 10^4$)로 나타나 유의성은 없었다 (Fig. 5).

2) CD11b⁺Gr-1⁺ 세포 수에 미치는 영향

등 피부조직에서의 CD11b⁺Gr-1⁺ 총 절대 세포수는 정상군은 1.7 ± 1.6 , 대조군은 8.6 ± 0.5 , CsA군은 1.2 ± 0.8 ($p < 0.001$)이었으며, YHJST 투여군에서는 1.6 ± 0.2 ($\times 10^4$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.001$) 있게 감소하였다 (Fig. 6).

5. 혈청 내 cytokine 생성량에 미치는 영향

IL-6 생성량은 정상군은 6.8 ± 0.3 , 대조군은 113.6 ± 4.9 , CsA군은 80.7 ± 6.2 였으며, YHJST

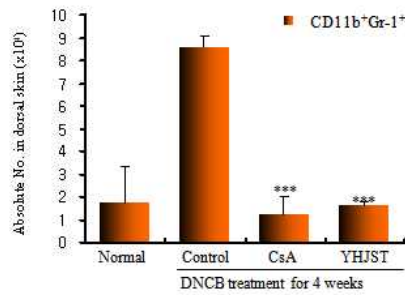


Fig. 6. Effect of YHJST on CD11b⁺Gr-1⁺ absolute cell number of skin in NC/Nga ato-mouse. NC/Nga ato-mouse followed by the administration of YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice dorsal skin ($\times 10^4$) were removed and CD11b⁺Gr-1⁺ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometry. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared with control group by T test (***) $p < 0.001$.

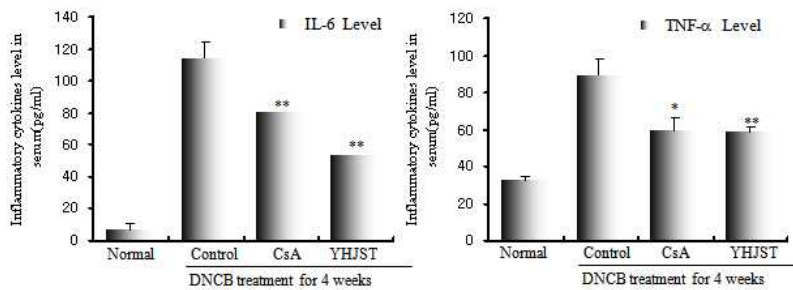


Fig. 7. Effect of YHJST on the levels of IL-6 and TNF- α in the serum of NC/Nga ato-mouse. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IL-6 and TNF- α were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with control group by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

투여군에서는 52.7 ± 2.4 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소하였고, TNF- α 생성량은 정상군은 32.3 ± 2.0 , 대조군은 89.3 ± 8.6 , CsA군은 58.8 ± 7.8 이었으며, YHJST 투여군에서는 58.5 ± 2.4 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소하였다 (Fig. 7).

6. 혈청 내 immunoglobulin 생성량에 미치는 영향

IgG1 혈중 농도는 정상군은 $2,645.0 \pm 85.2$, 대조군은 $3,774.0 \pm 76.4$, CsA군은 $3,238.5 \pm 23.5$

($\mu\text{g/ml}$)였으며, YHJST 투여군에서는 $3,533.6 \pm 51.5$ ($\mu\text{g/ml}$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였고, IgM 혈중 농도는 정상군은 647.0 ± 30.9 , 대조군은 929.5 ± 37.6 , CsA군은 458.5 ± 56.5 ($\mu\text{g/ml}$)였으며, YHJST 투여군에서는 647.0 ± 25.8 ($\mu\text{g/ml}$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.001$) 있게 감소하였다 (Fig. 8).

IgG2a 혈중 농도는 정상군은 $1,967 \pm 55.9$, 대조군은 $2,694.5 \pm 33.8$, CsA군은 $1,473.0 \pm 70.1$ ($\mu\text{g/ml}$)이었으며, YHJST 투여군에서는 $1,681.5 \pm 38.2$ ($\mu\text{g/ml}$)로 나타나, 대조군에 비하여 유

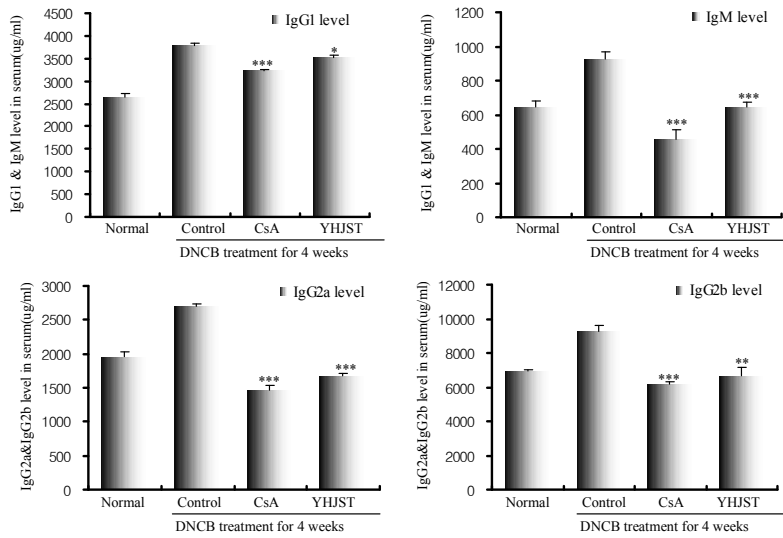


Fig. 8. Effect of YHJST on the levels of Immunoglobulin in the serum of NC/Nga ato-mouse. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgG1, IgM, IgG2a and IgG2b were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with control group by T test (*p<0.05, **p<0.01,***p<0.001).

의성 (p<0.001) 있게 감소하였고, IgG2b 혈 중 농도는 정상군은 6968.0 ± 46.1, 대조군은 9284.5 ± 355.8, CsA군은 6191.5 ± 141.1 (μg/ml) 이었으며, YHJST 투여군에서는 6690.5 ± 501.6 (μg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (p<0.01) 있게 감소하였다 (Fig. 8).

7. 피부 조직에 미치는 영향

YHJST이 피부조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 고자 약물 투여 종료 후 H&E 염색과 toluidine 염색을 하여 관찰하였다.

귀의 끝 부분 피부조직의 (Fig. 9) H&E 염색 (9-1) 에서 대조군 (B) 의 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, 백혈구의 침윤도 관찰되었다. 이에 비하여 YHJST 투여군 (D) 은 epidermis와 dermis의 두께와 백혈구의 침윤도 감소하여 상대적으로 부종이 감소하였다.

Toluidine 염색 (9-2) 에서는 dermis 주변에

비만세포 (화살표)가 많이 침윤된 대조군 (B) 에 비하여, YHJST 투여군 (D) 에서는 그림에서 나타난 바와 같이 비만세포를 거의 관찰할 수 없었다.

등 쪽 목 부분 피부조직에서 (Fig. 10) H&E 염색 (10-1) 을 한 대조군 (B) 의 skin은 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, 백혈구의 침윤도 관찰되었다. 이에 비해 YHJST 투여군 (D)에서는 대조군에 비하여 epidermis와 dermis의 두께가 상대적으로 줄었고, 백혈구의 침윤이 현저히 감소하여 부종이 발생하지 않은 것을 알 수 있었다.

Toluidine 염색 (10-2)에서는 대조군 (B) 은 dermis 주변에 비만세포 (화살표)가 많이 침윤된 것을 알 수 있다. 그러나 YHJST 투여군 (D) 에서는 대조군에 비하여 비만세포를 거의 관찰할 수 없었다.

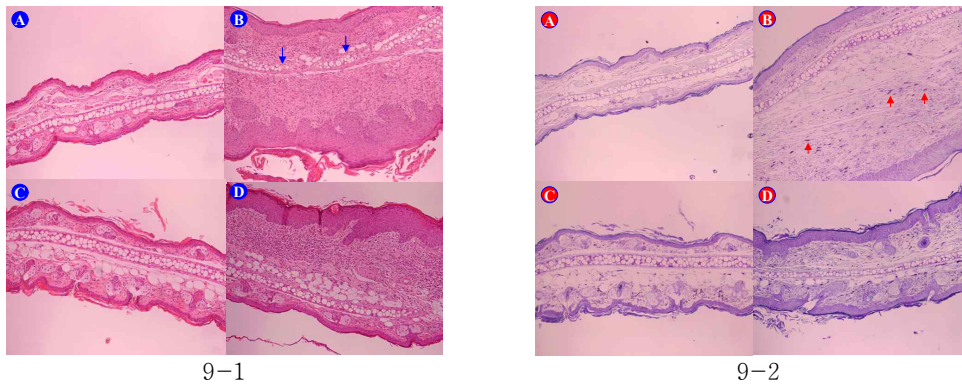


Fig. 9. Histologic examination of ear lesion in NC/Nga ato-mouse.

NC/Nga ato-mice were administrated with saline (control) or YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. Ear biopsy was stained with hematoxylin and eosin (H&E, 9-1) and toluidine blue (9-2) (A; normal. B: control, C: CsA, D; YHJST) for examining inflammatory cells and mast cell (B, arrow), respectively. Bright microscopy (Nikon, Japan, original magnification, $\times 100$).

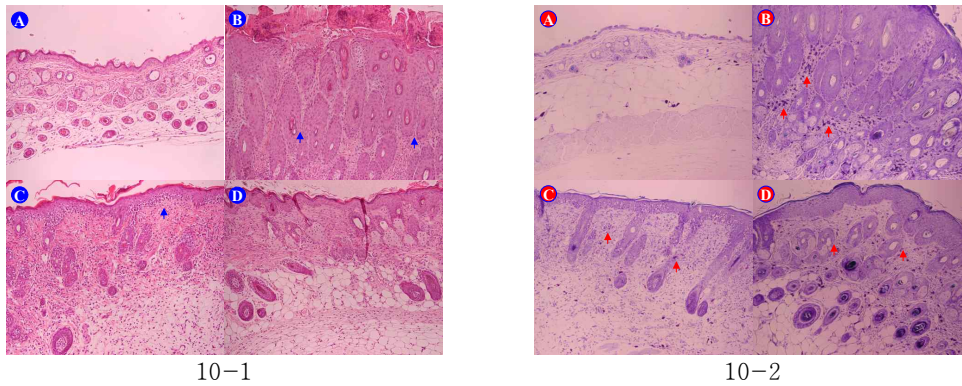


Fig. 10. Histologic examination of skin lesion in NC/Nga ato-mouse.

NC/Nga ato-mouse were administrated with saline (control) or YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. Skin biopsy was stained with hematoxylin and eosin (H&E, 10-1) (A; normal. B: control, C: CsA, D; YHJST) and toluidine blue (10-2) for examining inflammatory cells and mast cell (B, arrow), respectively. Bright microscopy (Nikon, Japan, original magnification, $\times 100$).

8. 조직 내의 면역세포 변화

귀 조직에서 면역조직화학염색을 하여 $CD4^+$ 와 $CCR3^+$ 세포를 분석한 결과, $CD4^+$ 세포 염색을 한 대조군 (B)은 $CD4^+$ Th 세포가 등 피부 조직에 침윤되어 관찰된 반면, YHJST 투여군 (D)에서는 대조군에 비하여 $CD4^+$ Th 세포가 거의 관찰되지 않았고, $CCR3^+$ 세포 염색에서도 역시 대조군 (B)에 비하여 $CCR3^+$ 세포

발현이 현저하게 줄어든 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 11).

등 피부조직의 면역조직화학염색에서 $CD4^+$ 와 $CCR3^+$ 세포를 분석한 결과, $CD4^+$ 세포 염색을 한 대조군 (B)은 $CD4^+$ Th 세포가 등 피부 조직에 침윤되어 관찰된 반면, YHJST 투여군 (D)에서는 대조군에 비하여 $CD4^+$ Th 세포가 거의 관찰되지 않았고, $CCR3^+$ 세포 염색에

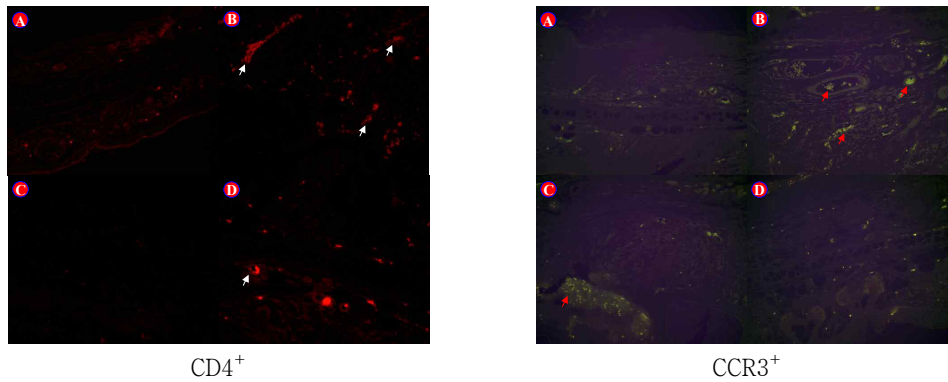


Fig. 11. Immunohistochemical staining of ear of NC/Nga at0-mouse. After 8 weeks administration of YHJST (10 mg/25 g/day), mice ear biopsy was stained with PE-rat anti-mouse CD4 mAb and PE-rat anti-mouse CCR3 mAb, respectively.

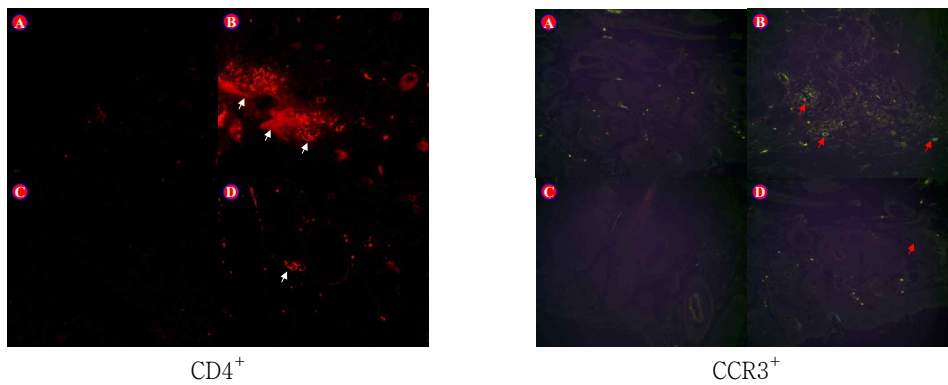


Fig. 12. Immunohistochemical staining of dorsal skin lesion in NC/Nga at0-mouse. After 8 weeks administration of YHJST (10 mg/25 g/day), mice dorsal skin biopsy was stained with PE-rat anti-mouse CD4 mAb and PE-rat anti-mouse CCR3 mAb, respectively.

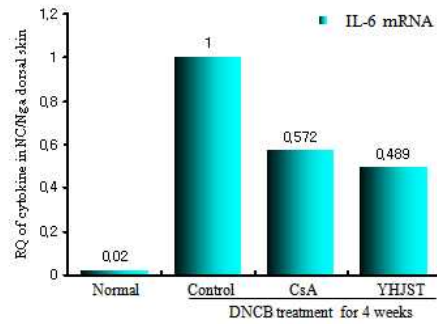


Fig. 13. Effect of YHJST on the IL-6 mRNA levels of cytokine in the skin of NC/Nga at0-mouse. IL-6 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-6 mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

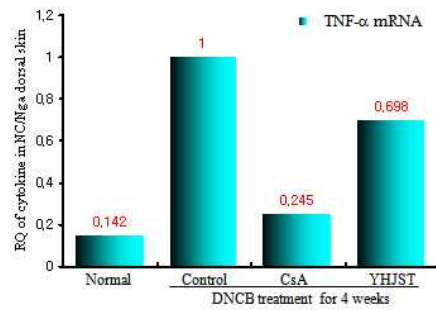


Fig. 14. Effect of YHJST on the TNF- α mRNA levels of cytokine in the skin of NC/Nga ato-mouse. TNF- α mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. TNF- α mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

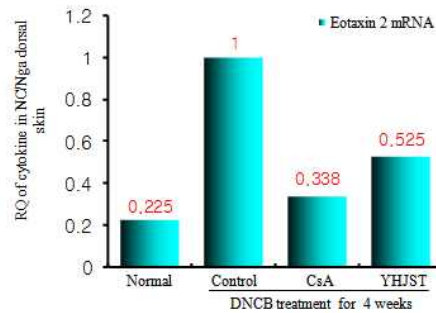


Fig. 15. Effect of YHJST on the Eotaxin 2 mRNA levels of cytokine in the skin of NC/Nga ato-mouse. Eotaxin 2 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Eotaxin 2 mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

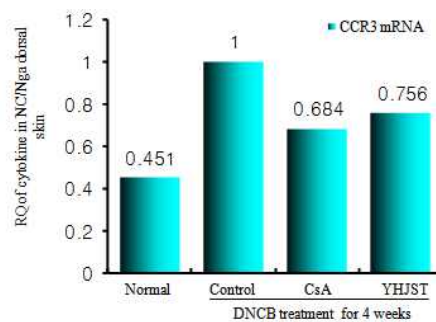


Fig. 16. Effect of YHJST on the CCR3 mRNA levels of cytokine in the skin of NC/Nga ato-mouse. CCR3 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. CCR3 mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

서도 역시 대조군에 비하여 CCR3⁺ 세포 발현이 현저하게 줄어든 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 12).

9. Real time-PCR analysis on NC/Nga ato-mouse

1) IL-6 mRNA 유전자 발현 분석

IL-6 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1 일때, 정상군은 0.02, 대조군은 1, CsA군은 0.572, YHJST 투여군에서는 0.489로 나타났다 (Fig. 13).

2) TNF- α mRNA 유전자 발현 분석

TNF- α mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1 일때, 정상군은 0.142, 대조군은 1, CsA군은 0.245, YHJST 투여군에서는 0.698로 나타났다 (Fig. 14).

3) Eotaxin 2 mRNA 유전자 발현 분석

Eotaxin 2 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1 일때, 정상군은 0.225, 대조군은 1, CsA군은 0.338, YHJST 투여군에서는 0.525로 나타났다 (Fig. 15).

4) CCR3 mRNA 유전자 발현 분석

CCR3 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1 일때, 정상군은 0.451, 대조군은 1, CsA군은 0.684, YHJST 투여군에서는 0.756로 나타났다 (Fig. 16).

IV. 考 察

아토피 피부염은 심한 소양감을 동반하는 만성, 재발성의 피부 염증을 특징으로 하는 유전성 질환으로^{10,11)}, 주로 유아와 소아기에 발

생하고 일반적으로 나이가 증가 할수록 유병률은 감소하며 대부분 경한 경과를 보여주며, 환자의 75%가 1세 이전에 발생되고 90%의 어린이 환자가 5년 내 저절로 호전되며 약 5%의 환자가 어른이 된 후에도 피부염이 지속되는 것으로 알려져 있다¹¹⁻¹⁵⁾. 최근 아토피 피부염의 발생은 전 세계적으로 증가하는 추세로¹⁶⁾, 외국의 경우 유·아동기의 10~20%¹⁷⁾, 국내에서는 초등학교 24%, 중학생 13%의 유병율이 보고되고 있다¹⁸⁾.

아토피 피부염의 발병원인은 아직까지 불분명하지만, 유전인자와 환경인자가 발병에 크게 관여하는 면역성 질환으로 인식되고 있다¹¹⁾. 이 질환의 원인으로 현재까지 IgE 증가에 따른 면역학적 결핍에 의하거나, T림프구의 기능적 결여, 피부에 존재하는 β -adrenergic 수용체의 차단 등에 의한다는 등의 여러 가지 설이 있다¹⁹⁾. 그러나 아토피 피부염을 가진 환자나 그 가족 중에 기관지천식 혹은 알레르기성 비염 등의 발생이 많은 사실로 미루어 알레르기가 깊이 관계되어 있을 것으로 생각되고 있다²⁰⁾.

아토피 피부염은 임상양상에 따라 삼출이 심하거나 가피, 농포, 침윤성 병변을 보이는 습윤형, 홍피와 각질박탈이 나타나는 지루형, 피부가 지나치게 건조하여 습진화되는 건조형이 있다²¹⁻²⁴⁾. 이들 환자는 면역학적 특성과 특이한 혈관 반응 및 병원균의 감염이 잘되는 경향이 있고 체질적으로 알레르기를 잘 일으켜서 생후 1년 이내에 시작되는 습진은 음식물이, 2년 이후에 처음 발진이 시작되었다면 꽃가루, 양모, 개털, 고양이털, 새털 등 외부요인에 의해 피부병변이 악화되는 경우를 흔히 관찰할 수 있다²⁵⁻²⁷⁾. 따라서 봄철에는 바람, 건조한 날씨 등과 아울러 이러한 항원에 의해 피부병변이 악화되는 수가 많다. 유아기에는 생후 2개월부터 2년 사이에 양 볼에 소양성 홍반으

로 나타나고 소아기에는 동일한 장소에 진물이 적고 보다 건조한 병변 겸 구진형으로 나타나는 경향이 있으며 유아기 습진보다 다소 경미한 급성 병변을 보이는데, 전형적인 병변부위는 전주부(前肘部), 슬와부(膝窩部), 손목, 안검, 안면, 목 주위 등이다²⁵⁻²⁷. 감염에 대한 감수성이 예민해 범발성 단순포진이나 중두 바이러스 감염이 흔히 발생하며 카포시 수두상 발진이 나타난다. 이러한 현상은 어린이에 흔하며 형제 중에 하나 혹은 그 이상에서 이러한 감염증이 나타날 수 있다. 사춘기 및 성인기에는 국한성 홍반, 인설, 구진 또는 수포성 반을 형성하거나 소양성 태선화반으로 나타날 수 있으며 병변은 전주부(前肘部)와 슬와(膝窩), 목, 이마, 눈 주위에 나타난다. 전신적으로 발진이 발생할 때에는 굴절부에 심한 병변이 있고 이 병변은 대부분 태선화가 되어있다²⁸⁻³¹. Mueller는 1989년 유아습진 환자에서 범발성의 수두양 발진이 보다 자주 발생하는 경향이 있음을 관찰하고 이들 환자가 세포매개성 면역에 이상이 있음을 처음 보고하였다³². 임상에서 보면 이러한 단순포진 바이러스 감염 외에도 유두종 바이러스에 의한 사마귀와 전염성 연속종 바이러스 감염도 증가되어 있음을 알 수 있다. 지연 면역반응의 이상을 관찰하기 위해 생체 내 반응으로 회상항원에 대한 반응검사(Multi-CMI test)와 DNCB에 의한 감각 반응검사가 있고 시험관내 반응으로 phytohemagglutinin (PHA) 자극 시험이 있는데 아토피 환자에서 이들 반응이 정상인에 비해 떨어져 있다³³⁻³⁶.

1970년대의 연구에서는 아토피 피부염 환자의 혈액 내 T세포의 수가 떨어져 있고 억제 T세포의 상대적 감소가 있다는 보고들이 많았으나 이러한 T세포 아형에 대한 연구에서 아토피에 대한 특이 표식자는 찾아낼 수 없었다³⁷. 다만 아토피 피부염 환자의 단핵구 표면에

CD23 표식자가 증가되어 있는데 이것들이 이들 환자의 상피 내 CD23 발현 Langerhans 세포의 증가와 관련이 있을 것으로 생각하였고 이 2가지 현상이 IL-4에 의한 IgE 합성을 증가시킬 것으로 생각하였다³⁸⁻⁴¹.

CD4⁺ T세포는 생성하는 cytokine의 종류에 따라 Th1과 Th2로 분류하고 있다. 급성 아토피 피부염 환자의 CD4⁺ T 세포는 Th2로 전환된 소견을 보이고 있어서 이때 분비되는 cytokine은 IL-4, 5, 10, 13 및 16의 양이 많고, IFN- γ 의 생산을 억제시키고 IL-16은 T세포를 피부 안으로 들어오게 하는 역할을 한다⁴². 아토피 피부염 병변에 존재하는 T세포는 CD4⁺ T세포 뿐만 아니라 CD8⁺ T세포도 존재하기 때문에 CD4⁺ T세포에서 생성한 cytokine만 있는 것이 아니다. 억제 T세포(CD8⁺ T cell)도 생산한 cytokine에 따라 Th1과 Th2와 같이 TC1과 TC2로 구분할 수 있다. 아토피 피부염 환자의 말초혈액 단핵구를 시험관 내에서 자극하면 정상인에 비해 IL-4 생산은 많아지고 IFN- γ 생산은 적어진다⁴³⁻⁴⁵. 이러한 현상으로 아토피 피부염 환자의 말초 혈액 단핵구를 시험관 내에서 배양하였을 때 IgE 생산이 증가하는 이유를 설명할 수 있을 것이다. 아토피 피부염 환자의 말초혈액 내 CLA(cutaneous lymphocytes associated antigen) T세포에 의한 IL-13도 증가되었다. 이러한 사실로 미루어 일부 T세포는 피부에 진입하기 전에 이미 Th2 cytokine을 생산하도록 예정되어 있는 것으로 생각되고 있다. 그러나 일단 피부에 도달하면 그곳의 환경항원, 세균항원, 상피항원 등의 미세 환경으로 인해 급성 아토피 피부염에서는 Th2형의 cytokine이 자가 증폭되어 발생하는 것으로 생각된다⁴⁶⁻⁴⁹.

피부는 물론 피부이외의 항원특이 T세포 모두 아토피 피부염의 병인에 관여할 수 있는데 이는 일부 피부에 있는 기억 T세포가 부유한

원(aeroallergen)이나 음식물항원 같은 피부를 통하여 흡수되지 않은 항원에서도 반응하는 것으로 보아 추정할 수 있다. 만성 아토피 피부염 병변에 침윤되는 염증세포들은 주로 대식세포, 호산구 같은 속발반응에 관여하는 세포들로 구성되어 이들은 아토피 피부염의 급성기에 존재하던 세포들에서 생성된 IL-4, IL-5, IFN- γ , IL-12, GM-CSF, chemokine (macrophage infiltration protein-1 α , IL-8, eotaxin) 등이며, 침윤된 T 세포는 Th2 cytokine의 성향이 약해지면서 Th1과 Th2형 cytokine이 함께 존재하게 된다⁵⁰⁻⁵³.

아토피 피부염의 한의학적 범주는 《素問·玉機眞藏論篇》⁵⁾에서 “浸淫”이라고 기록된 이후로, 한의학 문헌 중에 다양하게 나타나는데 현재까지 乳癬, 胎熱, 胎癬, 浸淫瘡, 胎斂瘡, 奶癬, 濕疹, 四彎風 등으로 혼용되고 있다⁶⁾. 이 중 乳癬, 胎熱, 奶癬, 胎斂瘡, 胎癬 등은 아토피 피부염이 주로 유아와 소아기에 발생하는 특징에 따른 것으로, 《諸病源候論》⁵⁴⁾에서 “小兒面上癬皮如甲錯起乾燥, 謂之乳癬”이라 하여 嬰兒濕疹과 유사하게 설명하였으며, 《外科正宗》⁵⁵⁾에서는 “因兒在胎中, 母食五辛, 父餐炙燂, 遺熱與兒, 生後頭面遍身發奶癬, 流滋成片, 睡臥不安, 瘙癢不絕”이라 하여 嬰兒濕疹과 유사한 증상과 원인에 대해서도 언급하고 있다. 또한 浸淫瘡은 급성습진을 표현한 것이며, 四彎風을 비롯해 旋耳瘡, 乳頭風 등은 아토피 피부염의 발생부위에 따라 표현한 것으로 보여진다⁶⁻⁹⁾.

아토피 피부염의 한의학적 발생원인은 주로 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고 있으며⁷⁻⁹⁾, 발생 정도에 따라 急性과 亞急性은 濕熱과 風濕으로 辨證하고 濕疹의 상태가 심한 것은 濕毒으로 辨證하고, 慢性은 병이 오래되어 陰血의 損傷을 초래하여 血虛生風한 所致이거나 脾胃虛

弱으로 초래된 水濕停滯로 인한 寒濕의 所致로 辨證하기도 한다⁵⁶⁾. 그에 따라 치료법으로는 清熱除濕, 祛風止痒, 健脾除濕, 養血潤燥 등의 治法을 주로 사용하고 있다^{7-9,56)}.

아토피 피부염의 치료는 피부염에 대한 기본적인 방법과 유발인자의 규명과 제거와 같은 방법들로 이루어진다⁵⁷⁾. 주로 염증과 소양감의 조절, 2차 병변의 발생방지를 목적으로 부신피질 호르몬제와 같은 국소적인 스테로이드제, 항히스타민제가 사용되고 있지만, 약물의 지속적인 사용 시 심각한 문제를 일으킬 수 있으며 모세혈관 확장, 여드름, 다모증과 같은 피부 부작용뿐 아니라 성장장애, 쿠싱증후군(Cushing syndrome) 등과 같은 전신적 부작용의 발생 우려가 크다. 근래에는 cyclosporin A, Azathioprine, Mycophenolate mofeil(MMF), IFN- γ , Thymopetin 등의 면역억제제 및 조절제와 국소 면역 조절제(calcineurin 억제제)인 tarcolimus 나 pimecrolomus 등을 사용하기도 한다. 그러나 이러한 방법들도 사용기간, 비용, 부작용, 반동(rebound)현상 등에 대한 논란은 여전하다⁵⁸⁾. 따라서 새로운 아토피피부염 치료제의 개발이 절실히 필요한 실정이며, 치료제의 개발과 관련된 재료로 최근에는 부작용이 적은 한약제 등 천연물이 선택되고 있다⁵⁹⁾. 또한 아토피 피부염은 아토피 질환일 뿐만 아니라 유전적 요인, 환경적 요인, 정신적 요인, 피부감염 등 여러 요인에 의하여 영향을 받는 다인자적 질환이기 때문인데, 의학적인 완치보다는 증상의 완화를 통해 관해를 적극적으로 유도해주는 것이 가장 올바른 치료법으로 알려져 있다⁶⁰⁾.

凉血除濕湯은 현재 血熱型의 만성 피부질환에 활용하는 臨床方으로 清熱作用이 있는 石膏와 知母, 清熱 뿐 아니라 除濕의 효과를 겸한 黃芩, 苦蓼 및 白鮮皮, 凉血作用이 있는 生地黃과 牡丹皮, 滲濕泄熱의 效가 있는 車前

子, 潤肺하면서 殺蟲作用이 있다고 알려진 百部根으로 구성된⁶¹⁾ 處方이다. 構成 藥物 중 白鮮皮⁶²⁾, 牡丹皮⁶³⁾, 生地黃⁶⁴⁾, 黃芩⁶⁵⁾, 苦參^{66,67)} 등은 이미 항염증 작용과 항알러지 작용이 보고된 바가 있어, 이들로 구성된 涼血除濕湯 역시 아토피 피부염에 활용 가능할 것으로 사료된다. 이에 본 실험에서는 현재 임상에서 다양한 만성 피부질환에 활용되고 있는 涼血除濕湯의 아토피 피부염에 대한 효과를 객관적으로 검증하고자 하였다.

현재까지 아토피성 피부염 발생과 원인적 연관성을 갖고 있는 것으로 확인된 물질이 부재한 상황이어서 본 연구에서는 접촉성 알레르기성 피부염을 유발하는 것으로 알려진 DNCB를 이용하여 사람에게서 발생하는 아토피성 피부염의 면역학적 이상과 유사한 과민반응 발현을 NC/Nga mice에서 유도할 수 있었다⁶⁸⁻⁷¹⁾. 이미 DNCB를 도포한 mice에서 아토피성 피부염의 대표적인 면역학적 지표인 혈장 내 IgE 수치가 대조군 마우스에 비해 유의하게 항진되고, Th type-1 response에 비해 상대적으로 우세한 Th type-2 response 활성화가 유도되었다는 보고가 있고⁷²⁾, IL-4에 의해 isotype switching이 유도되는 IgG1 수치가 증가되었고, IFN- γ 에 의해 isotype switching되는 IgG2a 수치가 증가된 것과 비장 T 임파구를 in vitro에서 활성화시켰을 때 IFN- γ 에 비해 상대적으로 항진된 IL-4의 생성을 DNCB 도포 mice에서 관찰한 연구보고가 있다⁷³⁻⁷⁶⁾. 2,4-dinitrofluorobenzene, α -hexyl cinnamic aldehyde, 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene, 이염화니켈 등 피부감작물질로서 알려진 화학물질들을 이용한 접촉성 알레르기성 피부염 연구 실험동물 모형이 개발되어 사용됨으로써 접촉성 알레르기성 피부염의 발생기전 및 치료제 개발에 많은 도움이 되고 있다. 이에 본 연구는 접촉성 알레르기성 피부

염을 유도하는 화학물질 중 DNCB로 type-2 response의 우세와 연관된 cytokine의 발현이 유도될 가능성에 대해 토의된 보고에 근거하였다^{22,29)}. 즉, DNCB는 접촉성 피부염 유발 물질로 사람의 아토피성 피부염과 유사한 면역학적 특성이 유도되는 실험 모형이 만들어진다. 본 연구에서도 DNCB를 등 피부에 도포함으로써 전반적인 피부발진과 관련된 면역반응인 IgE, Th2 response와 CCR3 유전자 발현 증가 등이 관찰되었고, 면역염증 반응으로 염증 cytokine의 증가와 IgE 생산량의 증가를 나타내어 실험동물 모형로 사용하여 YHJST 추출물의 피부발진 억제효과를 관찰하였다.

혈청 중 IgE 수준은 NC/Nga ato-mouse 12주령 (DNCB 도포 4 주후)에서 DNCB를 도포하지 않은 정상군에 비하여 대조군이 약 4배 이상 증가하였고, CsA 투여군은 대조군에 비하여 현저하게 IgE 수준이 감소하였고 ($p < 0.001$), YHJST 투여군도 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 1). 이러한 결과는 IgE가 아토피 환자에서 중요한 인자로 작용하여 피부발진 등의 원인이 되기 때문에 YHJST의 투여로 IgE의 감소는 피부발진 억제에 큰 역할을 하는 것으로 생각된다. 즉, 아토피 피부염 환자의 80%에서 혈청 IgE치가 증가되었다는 사실은 적어도 이 질환이 면역학적 이상과 관련이 있다는 확실한 증거가 되고 IgE치의 증감은 병변의 범위와 증상의 중증도와 관련이 있음을 알 수 있다⁷⁷⁻⁷⁹⁾. 이러한 현상에도 불구하고 IgE가 아토피 피부염의 병인과 관련이 있는 것인지 아니면 염증세포나 기타 미확인 인자들에 의해 증가된 자극만을 반영하는 것인지 확실치 않다^{80,81)}. 그 이유는 내인성(intrinsic) 아토피 피부염에서는 IgE도 정상이고 피부단자 반응도 음성이나 아토피 피부염 증상이 있기 때문이다. 아토피 환자의 혈

액 단핵구를 시험관 내에서 7~21일간 배양하면 IgE 생성이 증가하고 IL-4의 증가와 IFN- γ 의 감소를 볼 수 있다⁸²⁾. 그리고 IgE 생성의 증가와 세포매개성 면역현상의 결여가 함께 있는 것은 IgE 생성을 조절하는 T 세포의 근본적 결함이 있다는 것을 의미한다. 아토피 피부염의 Langerhans 세포에는 고친화 IgE 수용체(Fc ϵ R2/CD23) 발현이 모두 상향 조절되어 있고, 병변에서는 Langerhans 세포수가 증가되어 있다^{83,84)}. 특히 Fc ϵ R1 발현이 증가되었다는 사실은 매우 중요한데 그 이유는 이 수용체가 아토피 피부염 환자의 피부에 있어서 유력한 IgE 결합구조이기 때문이다. 감각된 개체가 부유항원에 대해 아토피 첩포검사(atopy patch test) 상 양성 반응을 보이는 것은 이 부유항원에 대한 특이항체 IgE를 지니고 있는 Langerhans 세포 때문이다⁸⁵⁻⁸⁷⁾. 염증상의 수지상 상피세포(inflammaory dendritic epidermal cell: IDECs)에는 보다 강한 Fc ϵ R1 발현이 있고 말초 혈액 내 수지상 세포들도 Fc ϵ R1이 발현되고 있다. 아토피 피부염의 CD1a+Langerhans 세포는 많은 양의 공통자극(co-stimulatory) 분자인 CD86이 발현되고 있다. 이러한 Fc ϵ R1 과 CD86의 증가는 이 세포로 하여금 알레르겐을 탐식하고 처리하는 능력을 증가시키고 이로 인해 보다 활성화된 CD4⁺ T 세포는 아토피 피부염 환자에서 더 많은 IgE를 생성하게 하고 주어진 알레르겐에 대한 반응을 증폭시키는 positive feed-back 고리를 형성하게 한다⁸⁸⁻⁹¹⁾. IgE 생산의 증가와 세포매개성 면역의 결여가 함께 나타난다는 것은 IgE 생성을 조절하는 T세포의 결함에 의한다는 것을 의미한다. CD4⁺ Th2 세포에서 분비되는 여러 cytokine중 IL-4와 IL-13이 B세포의 IgE 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 시험관 내에서 IFN- γ 는 IL-4에 의한 IgE 생성을 억제하고 IL-4는 IFN- γ 의 발현과

분비를 억제시키는 복잡한 상호조절 장치를 갖고 있다. IL-4는 B세포나 단핵구상의 Fc ϵ R2/CD23의 발현을 증가시키고 수용성 CD23은 IgE 결합인자로서 B세포의 IgE 생산을 조절한다^{92,93)}. 이러한 결과들로 보아 IL-4 생성 Th2 세포가 IgE 생성에 결정적 역할을 하는 것으로 생각되나 이러한 기전이 알레르겐 특이 IgE 항체 합성에도 관여하는지 알아볼 필요가 있다⁹⁴⁾.

실험에서 면역조직화학 염색을 통하여 귀와 등 피부조직의 상피층(epidermis)에 존재하는 CD4⁺ Th2 세포를 관찰한 결과, 대조군에는 많은 수의 CD4⁺ Th2 세포가 분포하지만, YHJST를 투여한 실험군에서는 현저하게 CD4⁺ Th2 세포가 감소된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 11, 12). 그리고 PBMCs에서 염증활성 T 면역세포인 CD3⁺CD69⁺ 세포수를 관찰한 결과, 대조군에서 정상군에 비하여 증가하였고, YHJST 투여군에서는 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 3). 이러한 염증활성 면역세포는 자가 항원에 의하여 활성화되어, 염증 cytokine인 IL-6와 TNF- α 의 수준을 증가시킨다. 본 실험 결과에서도 혈청 중 IL-6의 수준은 대조군에 비하여 YHJST 투여군이 2배 이상 유의성 ($p < 0.01$) 있는 감소를 나타내었고, TNF- α 의 수준도 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.01$) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 7).

또한 NC/Nga ato-mouse의 등 피부조직을 biopsy하여 유전자 발현 정도를 real-time PCR로 관찰한 결과, IL-6 mRNA 유전자 발현은 대조군에 비하여 YHJST 투여군의 RQ 값이 2배 이상 감소를 나타내었고 (Fig. 13), TNF- α mRNA 유전자 발현도 대조군에 비하여 약 30% 이상 감소하였다 (Fig. 14). 이는 YHJST가 자가 항원 등으로 유도된 염증활성 면역세포를 억제하여 염증 cytokine을 억제하는 것으로 생각된다.

아토피에서 eotaxin과 CCR3는 피부 발진 부위에 호산구, 비만세포, 백혈구의 이동 및 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다^{80,95-101}. Eotaxin은 CCR3의 ligand로 대표적인 비만세포와 호산구 화학유인물질로 알려져 있다⁹⁹. 주로 상피세포, 비만세포, 호염기구, 가지세포(dendritic cell), 각질세포, 피부 섬유아세포 등에서 분비되고 IL-4와 수용체를 공유하여 IL-4와 유사한 작용을 나타낸다¹⁰². Eotaxin의 활성화로 비만세포, 호산구, 호염기구, Th2 세포 등에 존재하는 chemokine receptor CCR3에 결합하여 염증세포들이 피부 조직 내로 이동한다^{82,99,100,102}. Eotaxin은 염증반응 초기에 국소 비만세포와 호산구증을 유발하며 이후 연속반응을 통해 더욱 강력한 비만세포증 및 호산구증을 일으킨다^{100,103,104}. 이 과정은 eotaxin 단독 작용 때 보다 IL-5 및 IL-13과 같은 cytokine과의 상호작용을 통해 극대화되고, 특히 IL-13은 상피세포를 자극하여 eotaxin의 분비를 증가시키고, 비만세포 및 호산구 화학주성을 유발하는 강력한 인자로 알려져 있다^{100,103,104}. 또한 Eotaxin은 Th2 세포의 유인인자로도 보고되고 있다^{82,102}.

본 연구에서 NC/Nga ato-mouse의 등 피부조직에서 cDNA를 합성하여 eotaxin과 CCR3 mRNA 유전자 발현을 비교하였는데, 대조군의 RQ 값을 1이라 했을 때 YHJST 투여군의 등 피부조직에서의 eotaxin mRNA 유전자 발현이 대조군에 비하여 RQ 값이 50% 감소를 나타내었고 (Fig. 15), CCR3 mRNA 유전자 발현은 대조군에 비하여 RQ 값이 25% 감소를 나타내었다 (Fig. 16). 또한 귀와 등 피부 조직에서 면역형광조직염색을 통하여, 대조군에 비하여 YHJST 투여군의 CCR3⁺ 활성화세포가 현저하게 감소를 나타낸 것을 알 수 있었다 (Fig. 11, 12). 이 결과는 다른 연구자들의 결과인 eotaxin과 CCR3

receptor외에 MCP(macrophage chemoattractant protein)-3, MIP-1, 그리고 interleukin (IL)-8과 같은 chemokine이 염증세포의 recruitment와 동시에 일어난다는 결과와 일치하였다^{103,104}. 또한 PBMCs에서 CCR3⁺ 활성화세포가 대조군에서 정상군에 비해 현저하게 증가하였고, YHJST 투여한 실험군은 대조군에 비하여 2배 이상 감소하여 유의성 ($p < 0.05$) 있는 감소를 나타내었고 (Fig. 4), 등 피부조직을 biopsy하여 FACS로 분석한 결과에서도 CCR3⁺CD3⁺ 활성화 세포수가 대조군에 비하여 YHJST 투여군이 현저하게 감소되었다 (Fig. 5).

이러한 결과는 NC/Nga ato-mouse에서 피부 발진 조직으로 염증세포들이 이동하는 기전 중 eotaxin과 CCR3의 상호작용을 YHJST가 방해하여 피부발진을 억제하는 것으로 생각된다. 다른 보고에 의하면 eotaxin이 염증부위로 recruit된 단핵세포와 호산구 세포와 마찬가지로 epithelial 그리고 endothelial 세포 같은 resident 세포들에서 발견된다. 또한 발진피부에 있는 eotaxin의 발현은 주로 fibroblast 안에 mononuclear 세포와 eosinophil, 그리고 중요한 keratinocytes의 활성화로 관찰되었고⁹⁷, 발진피부에 있는 CCR3 immunoreactive 세포는 mononuclear 세포와 eosinophil 등과 같이 진피에서 현저하게 관찰되어^{82,105} 우리의 연구 결과와 일치하였다.

B세포는 Th2 세포의 신호를 받아 분화를 하고 IgE와 immunoglobulin을 분비하게 된다. 일반적으로 IL-4에 의해 isotype switching이 유도되는 IgG1 수준과 IFN- γ 에 의해 isotype switching되는 IgG2a 수준은 만성 피부질환 동물의 혈청에서 증가되어 나타난다¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. 본 연구의 결과에서 혈청 중 IgM, IgG1, IgG2a 및 IgG2b의 수준을 측정된 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 증가되었으며 YHJST 투여로 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 8). 이는 DNCB 같은 알레

르기 매개체에 의한 B 세포의 활성화에 따라 IgG isotype 분비가 증가되는데, YHJST에 의해 B 세포의 항원에 대한 항체생산의 분화가 억제된 것으로 생각된다.

아토피 피부발진이 심화되면 피부발진부위에 Th2 세포, 호산구, 단핵구, 비만세포 등 면역 염증세포가 증가하게 되고, 표피층이 두꺼워지는 원인을 제공하여, 만성 피부질환 동물의 피부발진을 계속 유지하고 악화시키는데 기여하게 된다. 면역 조절작용 중 myeloid 세포의 역할은 다양한 질환상태에 관여하여 면역 억제작용을 하는 것으로 이해하고 세포의 성장과 분화에도 중요하게 작용하는 것으로 알고 있다¹¹⁰⁻¹¹². 그리고 myeloid suppressor cells (MSC)의 특징은 macrophage (Mac-1/CD11b)와 granulocyte (Gr-1) lineages를 공통적으로 모두 표면분자를 발현하는 것이다¹⁰⁹. 이 CD11b⁺Gr-1⁺ MSC는 spleen, lymph nodes에서 염증 피부 및 조직으로 이동하여 많이 존재하는데, 이 세포는 antibody production, cytotoxic T lymphocyte (CTL) generation, 그리고 lymphocyte proliferative responses를 억제하여 아토피의 경우 만성 피부질환을 계속적으로 심화시키는 역할을 한다^{110,112,113}.

아토피 피부발진 부위를 biopsy하여 세포를 분리하여 FACS로 침윤된 세포들을 분석한 결과, 활성화 CD11b⁺Gr-1⁺ MSC 세포수는 정상군에 비하여 대조군이 현저하게 활성화 세포수가 증가한 결과를 얻었고, CsA를 투여한 양성대조군의 활성화 CD11b⁺Gr-1⁺ MSC 세포수는 대조군에 비하여 현저하게 감소하였으며 (p<0.001), YHJST 투여군의 활성화 CD11b⁺Gr-1⁺ MSC 세포수도 대조군에 5배 이상 감소하여 유의성 (p<0.001) 있는 감소를 보였다 (Fig. 6).

등 피부조직에서의 총 면역세포수를 측정할 결과, 대조군에서 정상군에 비해 현저한 증가

를 보였고, YHJST을 투여한 실험군은 대조군에 비하여 유의성 (p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 2). 또한 YHJST이 피부조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험 종료 후 귀와 등 피부조직을 H&E 염색과 toluidine 염색을 하여 관찰한 결과, 대조군의 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, 백혈구와 비만세포의 침윤이 많이 관찰된 반면, YHJST 투여군은 epidermis와 dermis의 두께와 백혈구의 침윤도 감소하여 상대적으로 부종이 감소하고 비만세포의 침윤도 거의 관찰할 수 없었다 (Fig. 9, 10).

이상의 결과로 미루어 보아 凉血除濕湯은 아토피 피부염 치료에 유효하게 활용할 수 있을 것으로 판단되며 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

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

1. 凉血除濕湯은 혈청 중 IgE, IL-6, TNF- α 함유량을 유의성 있게 감소시켰다.
2. 凉血除濕湯은 등 피부조직에서의 총 면역세포 수를 유의성 있게 감소시켰다.
3. 凉血除濕湯은 PBMCs에서 CD3⁺CD69⁺, CCR3⁺의 총 활성화세포수를 유의성 있게 감소시켰다.
4. 凉血除濕湯은 등 피부조직에서 CCR3⁺CD3⁺, CD11b⁺Gr-1⁺의 총 절대 세포수를 유의성 있게 감소시켰다.
5. 凉血除濕湯은 혈청에서 IgG1, IgM, IgG2a 그리고 IgG2b의 혈중 수준을 유의성 있게 감소시켰다.

6. 凉血除濕湯은 귀와 등 피부조직에서 epidermis와 dermis부분의 염증정도와 염증면역세포의 침윤을 감소시켰다.
7. 凉血除濕湯은 귀와 등 피부조직에서 CD4⁺와 CCR3⁺ 세포의 조직침윤을 현저하게 감소시켰다.
8. 凉血除濕湯은 등 피부조직에서 IL-6, TNF- α , CCR3, Eotaxin mRNA 유전자 발현을 대조군에 비하여 감소시켰다.

中國醫藥科技出版社. 1999:193-198.

9. 馬紹堯, 趙尙華 主編. 代中醫皮膚性病診療大全. 山西:山西科學技術出版社. 1999:475-493.
10. Oranje AP, de Waard-van der Spek, Flora B. Atopic dermatitis. review 2000 to January 2001, *Curr Opin Pediatr.* 2002;14:410-413.
11. 안성구, 지혜구, 황상민, 정준, 장경훈. COMMON SKIN DISEASE 진단/치료. 서울: 퍼시픽출판사. 2003:68-88.
12. Marks R, Kilkenny M, Plunkett A, Merlin K. The prevalence of common skin conditions in Australian school students : 2. Atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 1999; 140:468-473.
13. 박건수, 김정원. Cytokine patterns of acute and remission stages in patients with atopic dermatitis : expression of interferon- γ , interleukin-12. 카톨릭 대학 의학부 논문집. 1998;51:384.
14. 박영민, 박홍진, 김태운, 김정원. 피부과 외래환자에서 아토피 피부염의 상대빈도와 임상적 특징 및 검사 소견에 관한 연구. 대한피부과학회지. 1997;35:96.
15. Ring J, Darsow U, Gfessor M, Vieuf D. The "Atopy patch test" in evaluating the role of aeroallergens in atopic eczema. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997;13:379.
16. 장호선. 아토피 피부염의 진단과 치료. 가정의학회지. 2002;23:831-8382.
17. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet.* 2003;361:151-160.
18. 오재원, 김규원, 편복양 외 18명. 1995년과 2000년의 학동기와 2003년 학동전기 소아에서의 아토피피부염의 역학적 변화에 관한 전국적인 연구. 소아알레르기 및 호흡기. 2003;13(4):227-237.
19. Abdel-Hamid KM. Atopic dermatitis in Allergy, Asthma, and Immunology Subspecialty

參考文獻

1. Morren MA, Przybilla RG, Bamelis M, Heykants B, Reynaers B, Degreef H. Atopic dermatitis : triggering factors. *J Am Acad Dermatol.* 1994;4670-473.
2. Leung DY, Eichenfield LF, Boguniewicz M. Atopic dermatitis, In. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 6th ed. New York: McGraw-Hill. 2003:1180-1194.
3. Leung DY, Soter NA. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:S1-S1201.
4. Spergel JM, Mizoguchi E, Oettgen H, Bhan AK, Geha RS. Roles of Th1 and Th2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. *J Clin Invest.* 1999;103(8):1103-1111.
5. 洪元植 編著. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院 出版部. 1985:72-80, 246-248.
6. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연. 아토피 피부염의 동, 서의학적 문헌고찰. 대한안이비인후피부과학회지. 2002;15(1):226-252.
7. 馬紹堯. 現代中醫皮膚性病學. 上海:上海中醫藥大學出版社. 2001:153-160.
8. 金起鳳, 周德瑛 主編. 中醫皮膚病學. 北京:

- Consult (BC. Jost, E. Friedman, KM. Abdel-Hamid, AL. Jani, Ed.). Philadelphia: LippincottWilliams & Wilins. 2003:66-73.
20. Boguniewicz M, Beltrani VS. Atopic dermatitis and contact dermatitis in Manual of Allergy and Immunology (DC. Adelman, TB. Casale, J. Corren, Ed.). Philadelphia: LippincottWilliams & Wilins. 2002;165-186.
 21. Caron G, Delneste Y, Roelandts E, Duez C, Bonnefoy JY, Pestel J, Jeannin P. Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effectordendritic cells. *J Immunol.* 2001;167:3682-3686.
 22. Cumberbatch M, Clelland K, Dearman RJ, Kimber. Impact of cutaneous IL-10 on resident epidermal Langerhans' cells and the development of polarized immuneresponses. *J Immunol.* 2005;175:43-50.
 23. Friedmann PS. Contact sensitization and allergic contact dermatitis: Immunobiological mechanisms. *Toxicol Lett.* 2006;162:49-54.
 24. Goutet M, Pepin E, Langonne I, Huguet N, Ban M. Identification of contact and respiratory sensitizers using flow cytometry. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;205:259-270.
 25. Heo Y, Parsons PJ, Lawrence DA. Lead differentially modifies cytokine production in vitro and in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996;138:149-157.
 26. Hilkens CM, Kalinski P, de Boer M, Kapensberg ML. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood.* 1997;90:1920-1926.
 27. Kepron MR, Chen YW, Uhr JW, Vitetta ES. IL-4 induced the specific rearrangement of gamma 1 genes on the expressed and unexpressed chromosomes of lipopolysaccharide-activated normal murine B cells. *J Immunol.* 1989;143:334-339.
 28. Kiekens RC, Thepen T, Oosting AJ, Bihari IC, van de Winkel JG, Bruijnzeel-Koomen CA, Knol EF. Heterogeneity within tissue-specific macrophage and dendritic cell populations during cutaneous inflammation in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2001;145(6):957-965.
 29. Kitagaki H, Ono N, Hayakawa K, Kitazawa T, Watanabe K, Shiohara T. Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile. *J Immunol.* 1997;159:2484-2481.
 30. Leung DYM, Tharp M, Boguniewicz M. Atopic dermatitis in Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine (IM Freedberg, AZ Eisen, K Wolff, KF Austen, LA Goldsmith, SI Katz, TB Fitzpatrick, Ed.). New York: McGraw-Hill. 1999;1464-1480.
 31. 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 mice, a model for human atopic dermatitis. *J Immunol.* 1999;162:1056-1063.
 32. 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;7:445-480.
33. Ohmen JD, Hanifin JM, Nickoloff BJ, Rea TH, Wyzkowski R, Kim J, Jullien D, McHugh T, Nassif AS, Chan SC, Modlin RL. Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. *J Immunol.* 1995;154:1956-1963.
34. Plitnick LM, Loveless SE, Ladics GS, Holsapple MP, Selgrade MJ, Sailstad DM, Smialowicz RJ. Cytokine profiling for chemical sensitizers: Application of the ribonuclease protection assay and effect of dose. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;179:145-154.
35. Sikorski EE, Gerberick GF, Ryan CA, Miller CM, Ridder GM. Phenotypic analysis of lymphocyte subpopulations in lymph nodes draining the ear following exposure to contact allergens and irritants. *Fund Appl Toxicol.* 1996;34:25-35.
36. Snapper CM, Paul WE. Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science.* 1987;236:944-947.
37. 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;30:100-107.
38. US Dept. Health and Human Services. Atopic dermatitis (A type of eczema). Bethesda: NIH publication. 2003;03:4272.
39. 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.
40. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13 : Central mediator of allergic asthma. *Science.* 1998;282:2258-2261.
41. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clinical Invest.* 1999;103:779-789.
42. Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. Chemokines in asthma : Cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:227-242.
43. Yang G, Volk A, Petley T, Emmell E, Giles-Komar J, Shang X, et al. Anti-IL-13 monoclonal antibody inhibits airway hyperresponsiveness, inflammation and airway remodeling. *Cytokine.* 2004;28:224-232.
44. 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;167:4668-4675.
45. 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.
46. 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;112:935-943.
47. 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;162:2477-2487.
 48. Pope SM, Brandt EB, Mishra A, Hogan SP, Zimmermann N, Matthaei KI, et al. IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5 and eotaxin dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108:594-601.
 49. Matsukura S, Stellato C, Georas SN, Casolaro V, Plitt JR, Miura K, et al. Interleukin-13 upregulates eotaxin expression in airway epithelial cells by a STAT6-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24:755-761.
 50. Moore PE, Church TL, Chism DD, Panettieri RA Jr, Shore SA. IL-13 and IL-4 cause eotaxin release in human airway smooth muscle cells : a role for ERK. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282:847-852.
 51. 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;169:1021-1027.
 52. Kim JT. Evaluation of inflammation in childhood asthma; Non-invasive measurement. *J Korean Pediatr Soc.* 2001;44:334-339.
 53. Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y, Akaiwa M, Mao XQ, Enomoto T, et al. Upregulation of IL-13 concentraion in vivo the IL-13 variant associated with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109:980-987.
 54. 巢元方 編著. 巢氏諸病源候論. 서울:대성문화사. 1992;251-253.
 55. 陳實功. 外科正宗. 天津:天津科學技術出版社. 2000;298.
 56. 肅達民 主編. 兒科病. 北京:人民衛生出版社. 2002;664-674.
 57. Abeck D, Strom K. Optimal management of atopic dermatitis. *Am Clin Dermatol.* 2000; 1:41-46.
 58. Graham-Brown RA. Therapeutic in atopic dermatitis. *Adv Dermatol Clin.* 1990;8:747-750.
 59. 이지현 외 10인. 아토피피부염학회 보고서: 한국 아토피피부염의 치료지침. 대한 피부과학회지. 2006;44(8):907-913.
 60. 이진용. 아토피피부염의 한방치료. 대한한방알레르기 및 면역학회 자료집. 2002;61-79.
 61. 전국한의과대학 本草學敎室 共編著. 本草學. 서울:도서출판 永林社. 2000;160-163, 178-179, 185-187, 190-191, 193-195, 313-314, 479-481.
 62. 임철홍. 白鮮皮가 항알레르기의 작용에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1994.
 63. 이석원 외. 牡丹皮 추출물 및 EA분획의 항알러지 작용에 대한 연구. 동의병리학회지. 2001;15(4):631-635.
 64. 신광식. 生地黃 추출물이 DNCB로 유도된 생쥐의 allergy성 접촉피부염에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 1999.
 65. 이용숙. 金銀花-黃芩 配合이 항염증 작용에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 2005.
 66. 정선영. 苦蔘의 생쥐의 B-cells에 미치는 항알레르기 효과. 경희대학교 대학원. 2002.
 67. 우무륜 외. 苦蔘이 알러지성 염증 반응에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2006;15(2):135-148.
 68. O'Bryan L, Pinkston P, Kumaraswami V,

- Vijayan V, Yenokida G, Rosenberg HF, et al. Localized eosinophil degranulation mediates disease in tropical pulmonary eosinophilia. *Infect Immun.* 2003;71:1337-1342.
69. Min JW, Jang AS, Park SM, Lee JH, Park SW, Park CS. Comparison of plasma eotaxin family level in aspirin-induced and aspirin-tolerant asthma patient. *Chest.* 2005;128:127-132.
70. Li J, Saito H, Crawford L, Inman MD, Cyr MM, Denburg JA. Haemopoietic mechanisms in murine allergic upper and lower airway inflammation. *Immunology.* 2005;114:386-396.
71. Taube C, Duez C, Cui ZH, Takeda K, Rha YH, Park JW, et al. The role of IL-13 in established allergic airway disease. *J Immunol.* 2002;169:6482-6489.
72. Venkayya R, Lam M, Willkom M, Grunig G, Corry DB, Erle DJ. The Th2 lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness through direct effects on resident airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;26:202-208.
73. Chang JY, Shin SA, Oh JW, Lee HB. Crucial factors for bronchial hyperresponsiveness in children with mild asthma. *Pediatr Allergy Respir Dis.* 2005;15:142-149.
74. Shin SA, Oh JW, Lee HB, Kim NS, Lee HB. Relationship between airway hyperresponsiveness and duration of asthma in children. *J Asthma Allergy Clin Immunol.* 2003;23:77-83.
75. Hummelshoj T, Bodtger U, Datta P, Malling HJ, Oturai A, Poulsen K, et al. Association between an interleukin-13 promoter polymorphism and atopy. *Eur J Immunogenet.* 2003;30:355-359.
76. Zhou G, Zhai Y, Dong X, Zhang X, He F, Zhou K, et al. Haplotype structure and evidence for positive selection at the human IL13 locus. *Mol Biol Evol.* 2004;21:29-35.
77. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update, *Annu Rev Immunol.* 1997;15:675 - 705.
78. Bartels J, Schlüter C, Richter E, Noso N, Kulke R, Christophers D, Schröder JM. Human dermal fibroblasts expression eotaxin: molecular cloning mRNA expression, and identification of eotaxin sequence variants. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;225:1045-1051.
79. Bonocchi R, Bianchi G, Bordignon PP, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med.* 1998;187:129 - 134.
80. Daugherty BL, Siciliano SJ, DeMartino JA, Malkovitz L, Sirotna A, Springer MS. Cloning expression and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J Exp Med.* 1996;183:2349 - 2354.
81. Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT, Celestin J, Leder P, Luster AD. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med.* 1996;2:449 - 456.
82. Gerber BO, Zanni MP, Ugucioni M, et al. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Curr Biol.* 1997;7:836 - 843.
83. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen C, Schopf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka

- T, Krutmann J. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today*. 1998;19:359 - 361.
84. Grewe M, Gyufko K, Czech W, Krutmann J. Lesional expression of interferon- γ in atopic eczema. *Lancet*. 1994;343:24 - 26.
85. Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DYM. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest*. 1994;94:870 - 876.
86. Hanifin J, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Dermatol Venereol*. 1980;92:44 - 47.
87. Harrison PR. Molecular mechanisms involved in the regulation of gene expression during cell differentiation and development. *Immunol Ser*. 1990;49:411 - 464.
88. van der Heijden FL, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. High frequency of IL-4-producing CD4⁺ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. *J Invest Dermatol*. 1991;97:389 - 394.
89. Kitaura M, Nakajima T, Imai T, et al. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. *J Biol Chem*. 1996;271:7725 - 7730.
90. Kunz B, Oranje AP, Labreze L, Stalder JF, Ring J, Taieb A. Clinical validation and guidelines for the SCORAD index: consensus report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*. 1997;195:10 - 19.
91. Lamkhioued B, Renzi PM, Abi-Younes S, et al. Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *J Immunol*. 1997;159:4593-4601.
92. Leiferman KM, Gleich, GJ. The role of eosinophils in atopic dermatitis, In: Leung, DYM eds. *Atopic Dermatitis. From Pathogenesis to Treatment*. Heidelberg: Springer-Verlag. 1996;145 - 172.
93. Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, et al. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J Clin Invest*. 1997;99:1767 - 1773.
94. Luster AD. Chemokine-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Engl J Med*. 1998;338:436 - 445.
95. Mattoli S, Stacey MA, Sun G, Bellini A, Marini M. Eotaxin expression and eosinophilic inflammation in asthma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236:299 - 301.
96. Minshall EM, Cameron L, Lavigne F, et al. Eotaxin mRNA and protein expression in chronic sinusitis and allergen-induced nasal responses in seasonal allergic rhinitis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;17:683-690.
97. Mochizuki M, Bartels J, Mallet AI, Christophers E, Schröder JM. IL-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. *J Immunol*. 1998;160:60 - 68.
98. Ohmen JD, Hanifin JM, Nickoloff BJ, et al. Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions. *J Immunol*. 1995;154:1956 - 1963.
99. Ponath PD, Qin S, Post TW, et al. Molecular cloning and characterization of a

- human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. *J Exp Med.* 1996;183:2437-2448.
100. Rubbert A, Combadiere C, Ostrowski M, et al. Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry. *J Immunol.* 1998;160:3933 - 3941.
101. Ugucioni M, Mackay CR, Ochsenberge, B, et al. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest.* 1997;100:1137-1143.
102. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science.* 1997;277:2005 - 2007.
103. van Reijssen FC, Bruijnzeel-Koomen CA, Kalthoff FS, Maggi E, Romagnani S, Westland JK, Mudde GC. Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1992;90:184-193.
104. Romagnani S. Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996;80:225-235.
105. Ying S, Robinson DS, Meng Q, et al. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *Eur J Immunol.* 1997;27:3507-3516.
106. Ying S, Taborda-Barata L, Meng Q, Humbert M, Kay AB. The kinetics of allergen-induced transcription of messenger RNA for monocyte chemoattractant protein-3 and RANTES in the skin of human atopic subjects: relationship to eosinophil, T cell, and macrophage recruitment. *J Exp Med.* 1995;181:2153 - 2159.
107. Ulfgren AK, Lindblad S, Klareskog L, Andresson J, Andresson U. Detection of cytokine producing cells in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheumatic Diseases.* 1995;54:654-661.
108. Xia MQ, Qin SX, Wu LJ, Mackay CR, Hyman BT. Immunohistochemical study of the beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 and their ligands in normal and Alzheimers disease brains. *Am J Pathol.* 1998;153:3137.
109. Yamada H, Hirai K, Miyamasu M, et al. Eotaxin is a potent chemotaxin for human basophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;231(2):365 - 368.
110. Bronte V, Wang M, Overwijk WW, et al. Apoptotic death of CD8⁺ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J Immunol.* 1998;161(10):5313 - 5320.
111. Bronte V, Chappel DB, Apolloni E, Cabrelle A, Wang M, Hwu P, Restifo NP. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8⁺ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol.* 1999;162(10):5728-5737.
112. Angulo I, de las Heras FG, Garcia-Bustos JF, Gargallo D, Munoz-Fernandez A, Fresno M. Nitric oxide-producing CD11b(+)Ly-6G(Gr-1)(+)CD31(ER-MP12)(+) cells in the

spleen of cyclophosphamide-treated mice: implications for T-cell responses in immunosuppressed mice. *Blood*. 2000;95(1): 212-220.

113. Young MR, Wright MA, Matthews JP, Malik I, Prechel M : Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor- β and nitric oxide. *J Immunol*. 1996;156(5):1916-1922.