

NC/Nga 생쥐에서 加味清心蓮子湯의 GATA-3 조절에 의한 항아토피 피부염 효과

박슬기 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

Anti-dermatitis Effects of *KamiCheongsimyeonjatang* on GATA-3 Regulation in NC/Nga Mouse

Park Seul Ki, 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 effectiveness of *KamiCheongsimyeonjatang* (KCSYJT) medicines to suppress atopic dermatitis in mouse model experimentally.

Methods

First, in vitro, we isolated B cells from 18 weeks of atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse. Then we analyzed FACS(Fluorescence Activated Cell Sorter) by intracellular staining of IFN- γ , GATA-3+ and analyzed cytokines by using real-time PCR. Secondly, in vivo, after administration of KCSYJT to atopic dermatitis NC/Nga mouse at 12 weeks of age, we analyzed serum IgE and the change of activated cell in PBMCs(Peripheral Blood Mononuclear Cells).

Results

In vitro, KCSYJT medicines suppressed IL-1 β , IL-6, TNF- α , and TGF- β mRNA and increased IL-10 mRNA in B cells. Also, KCSYJT medicines decreased the levels of GATA-3+CD4+ and increased the levels of IFN- γ +CD4+ in CD4+ T cell.

In vivo, serum IgE levels decreased in KCSYJT group than control group and In PBMCs, the activated cell percentage of granulocytes, CD3+, CD3+/CD4+, B220+/CD23+, and CCR3+ decreased and CD19+, CD3+/CD8+ increased in KCSYJT group than control group.

Conclusions

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

Key words : Atopic dermatitis, *KamiCheongsimyeonjatang* NC/Nga mouse.

I. 緒 論

아토피 피부염 (atopic dermatitis)은 특징적으로 홍반, 부종, 소양증, 삼출, 부스럼, 딱지, 인설 등이 되풀이되며¹⁾ 알레르기성 습진, 소아습진, 굴측부 습진, 범발성 신경피부염, Besnier 소양증으로 불리는 만성 재발성 염증성 피부 질환으로^{2,3)}, 현재 전 세계적으로 10 ~ 20% 정도의 유병률을 보이고 있는데, 2000년 대한 소아 알레르기 및 호흡기학회의 조사에 의하면 우리나라도 유병률이 초등학생 24.9%, 중학생 12.8%로⁴⁾ 우려할 만한 수준에 이르고 있다고 한다.

아토피 피부염은 종전까지 IgE에 감작된 비만세포가 histamine 등의 화학매체들을 분비시켜 부종, 붉은 반점 및 소양 등과 같은 증상들이 발생하는 것으로 설명해왔으나, 이것만으로는 만성 염증상태를 나타내는 이유와 아토피 피부염환자에서 흔히 보는 세포매개성 면역기능의 저하를 충분하게 설명할 수 없었다. 그렇지만 세포성 면역에서 중요한 위치를 차지하는 T 림프구 아형 또는 그와 관련된 cytokine이 면역체계에 관여한다는 사실이 규명된 다음 이 부분에 대한 설명이 가능해졌고, 세포면역을 담당하는 T 세포 및 그 아형의 이상, 그로 인해 나타나는 cytokine의 불균형이 아토피 피부염을 일으키는 주요 기전이 된다⁵⁾고 설명하고 있다.

최근 CD4⁺ T 림프구 등의 염증성 세포가 아토피 피부염의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있는데, T 림프구는 Th1 세포와 Th2 세포로 분화하며^{6,7)}, Th2 세포는 interleukin(IL)-4, IL-5, IL-9, IL-13을, Th1 세포는 IL-2, IFN- γ , TNF- α 를 생성하는데, 이 중 Th2 세포에서 분비되는 cytokine이 아토피의 발생에 중요한 역할을 한다⁸⁾. Th1 및 Th2 분화

에 중요한 역할을 하는 전사인자에는 T-box expressed in T-cells(T-bet), STAT-1, STAT-4, STAT-6, GATA-binding protein-3(GATA-3), c-maf 등이 알려져 있는데 T-bet, STAT-1, STAT-4 등의 전사인자가 활성화되면 Th1 림프구의 분화가 촉진되고, STAT-6, GATA-3, c-maf, NFAT 등의 전사인자가 활성화되면 Th2 림프구의 분화가 촉진된다⁹⁾. 특히, GATA-3와 T-bet은 신호전달과정에서 유전자의 전사를 조절하는 상위에 위치하는 전사인자이므로 Th1 및 Th2의 분화에 있어 가장 중요한 전사인자라 할 수 있다¹⁰⁻¹³⁾. GATA-3의 활성화로 인해 Th2 세포가 활성화되면 여러 Th2 cytokines의 생성, 분비가 증가하게 되고 B 세포 활성화가 이루어지므로 알레르기 염증반응을 매개하여 아토피 피부염, 기관지 천식 등의 만성적인 질환을 유발한다¹⁰⁾.

한의학에서는 아토피 피부염을 濕¹⁴⁾는 乾斂과 濕斂으로 구분하였고, 《中醫兒科學》¹⁵⁾에서는 濕熱型, 血熱型, 濕阻型, 血燥型으로 구분하여 각각 清熱利濕, 涼血清熱利濕, 健脾除濕, 養血祛風 清熱化濕으로 세분하여 치료하였다.

加味清心蓮子湯¹⁶⁾(이하 KCSYJT)은 주로 血熱과 風熱로 인해 津液이 손상되어 나타나는 皮膚疾患을 치료할 목적으로 處方되었으며, 이미 아토피 피부염에 미치는 실험적 영향¹⁷⁾과 임상 효과에¹⁸⁾ 관한 연구가 있었으나, GATA-3 조절에 의한 항아토피염 효과에 관한 연구는 없었다.

이에 저자는 加味清心蓮子湯¹⁶⁾이 아토피 피부염 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 in vitro에서 18 주령의 NC/Nga 생쥐의 비장세포를 분리하여 비장세포에 대한 KCSYJT의 알레르기 반응을 GATA-3의 세포내 염색을 통하여 FACS 분석하였고, real-time

PCR을 이용하여 cytokine을 분석 하였다. In vivo에서는 12 주령의 NC/Nga 생쥐에 KCSYJT를 투여하여 혈청 중 IgE의 수준을 측정하고 PBMCs(Peripheral Blood Mononuclear Cells) 에서 활성화세포의 변화를 관찰한 결과, 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, 적혈구 용혈액 (ACK lysis solution), DMEM 배양액, containing collagenase A (BM, Indianapolis, U.S.A.), DNase type I (Sigma), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), Sulforhodamin B(SRB), 2-isopropanol, PMA, Ionomycin, cyclosporin A는 Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (Logan, U.S.A.) 제품을, anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC(fluorescein isothiocyanate), anti-CCR3-PE, anti-B220-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD40 mAb, rmIL-4, rmIL-10, BD Cytotfix/Cytoperm plus kit, anti-CD3 mAb, anti-CD28 mAb등은 Pharmingen사 (Torreyana, U.S.A.) 제품을, CD4⁺ T cell isolation kit와 B cell isolation kit는 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)제품을, TGF- β 는 R&D 사 (Minneapolis, USA) 제품을, IgE ELISA kit는 SHIBAYAGI 사 (Shibukawa, Japan) 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), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), 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, U.S.A.), deep-freezer (Sanyo, Japan), Real Time Quantitative RT-PCR (Applied Biosystems, U.S.A), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, U.S.A.), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), VarioMACS (Bergisch Gladbach, Germany), FACScalibur (BD, U.S.A) 및 ELISA leader (Molecular Devices, U.S.A.) 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 실험당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양 사료 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) 약물

본 실험에서 사용한 加味清心蓮子湯의 구성은 《대전대학교 부속한방병원 처방집》¹⁶⁾에 준하였으며, 사용한 약제들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입, 정선하여 사용하였고 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. The Composition of KamiCheongsimyeonjatang(KCSYJT)16)

Herb name	Scientific name	Amount(g)
蓮子肉	Nelumbinis Semen	8
地骨皮	Lycii Radicis Cortex	6
黃芪	Astragali Radix	6
白茯苓	Poria	6
柴胡	Bupleuri Radix	6
黃芩	Scutellariae Radix	6
厚朴	Magnoliae Cortex	4
麥門冬	Liriopsis Tuber	4
連翹	Forsythiae Fructus	4
梔子	Gardeniae Fructus	4
蟬蛻	Cicadidae Periostracum	4
檳榔	Arecae Semen	4
石膏	Gypsum Fibrosum	4
車前子	Plantaginis Semen	4
葛根	Puerariae Radix	4
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4
赤茯苓	Poria	4
升麻	Cimicifugae Rhizoma	4
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	4
陳皮	Citri Unshii Pericarpium	4
牛蒡子	Arctii Semen	4
金銀花	Lonicerae Flos	4
薄荷	Menthae Herba	4
桃仁	Persicae Semen	4
薏苡仁	Coicis Semen	4
人蔘	Ginseng Radix Alba	2
甘草	Glycyrrhizae Radix	2
Total		118

4) KCSYJT 추출물 분리

KCSYJT 236 g에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 KCSYJT 추출물 (13.3 g)을 냉동 보관 (-84 °C)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포독성

(1) 세포 배양

① Human fibroblast cells(hFCs) 배양

정상 사람 피부 조직을 cool D-PBS로 3 회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5 분간 원심분리하고, tube에 DMEM {containing collagenase

A (5 mg/ml)와 DNase type I (0.15 mg/ml), antibiotics (penicillinm 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)를 넣고 37 °C CO2 배양기에서 2 시간 동안 배양하였으며, 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양한 후 인산완충생리식염수로 1,500 rpm에서 2회 원심분리한 후 DMEM-10 % FBS에 1 주일 동안 배양하였다. 1 주일 후 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA로 hFCs 세포를 분리하여 DMEM-5 % FBS 배양액에 105 cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

(2) 세포독성 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법(19)을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. hFCs 세포는 37 °C, 5 % CO2 배양기에서 1 시간 배양한 후 KCSYJT 추출물 (최종 농도 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml)을 48 시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액으로 2 회 세척하였다. 96 well plate의 각 well에 50 % trichloroacetic acid(TCA)를 50 µl를 가하고 1 시간 동안 4°C에 방치하였다. 증류수로 5 회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB (0.4 %/1 % acetic acid) 용액을 100 µl/well로 가하고 실온에서 30 분간 염색하였다. 그리고 0.1 % acetic acid 용액으로 약 45 회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 µl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA reader 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) In vitro : Splenic T & B cells culture in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse

(1) Spontaneous dermatitis in NC/Nga mouse
Conventional한 상태에서 사육한 18 주령의

NC/Nga mouse의 눈에서 capillary 관을 이용하여 100 µl의 혈액을 채혈한 후 이 중 IgE 함량이 50 µg/ml 이상이고 피부에 발진이 있는 NC/Nga mouse를 선택하였다 (이를 atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse(생쥐)라 하였다).

(2) Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의

비장에서 T 세포와 B 세포의 분리 및 배양
비장을 적출한 후 100 mesh에서 분쇄하여 비장세포를 얻고 2,000 rpm에서 5 분간 원심분리로 세포를 회수하였다. 여기에 ACK 용액 (8.3 g NH4Cl, 1 g KHCO3, in 1 l of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5 분 동안 처리하여 적혈구를 제거하였다. 분리한 비장 세포를 2 %의 FBS가 함유된 PBS (2 % FBS/PBS)에 1×108/ml로 현탁시키고 normal rat serum을 5 %되게 첨가하여 4 °C에서 15 분간 blocking한 후, T 세포분리에는 biotinylated antibody cocktail for lineage {CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ, CD235a (glycophorin A), (CD4+ T Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec)}를 가하였고, B 세포 분리에는 biotinylated antibody cocktail for lineage {CD43 (Ly-48), CD4 (L3T4), Ter-119, (B Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec)}를 가하여 각각 4 °C에서 15 분간 반응시켰다. 각각의 세포를 2 % FBS/PBS로 세척하여 1×107/ml로 현탁하고, 20 µl의 Anti-Biotin-antibody Microbeads를 가하여 다시 4 °C에서 15 분간 반응시켰다. 그리고 각각의 Magnetic column (CS column, Miltenyi Biotec)을 PBS로 세척하여 준비해둔 VarioMACS (Miltenyi Biotec)에 장치하고, magnetic bead가 표지된 세포를 통과시킨 후 2 % FBS/PBS로 column을 충분히 세척한 다음 column을 통과한 부유액을 원심분리하여 lineage 음성인 T 세포와 B 세포를 각각 수집하였다.

(3) Quantitative real-time RT-PCR in cultured B cells

① 배양된 비장 B 세포에서 RNA 분리

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐에서 분리한 B 세포를 24 well plate에 1×10⁶ 세포/well로 분주하고 KCSYJT 추출물 (100 μg/ml)을 처리하였고, 약물처리 1 시간 후 α-CD40 mAb (500 ng/ml)와 rmIL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 500 U/ml)를 동시 배양하였다. 그리고 rmIL-10 (recombinant mouse interleukin-10, 50 ng/ml)을 양성대조군으로 사용하였다. KCSYJT 추출물과 α-CD40 mAb와 rmIL-4를 동시 배양하여 6 시간 동시 배양 하였다.

실험군은, 약물처리를 하지 않은 정상군 (Only B cell), α-CD40 mAb, rmIL-4를 처리한 대조군 (CT), α-CD40 mAb, rmIL-4, 그리고 rmIL-10을 처리한 양성대조군 (PC) 으로 하였으며 α-CD40 mAb, rmIL-4, 그리고 KCSYJT extract를 처리한 실험군 (KCSYJT) 으로 나누어 실험 하였다.

배양 종료 후 배양상층액을 제거한 후 RNazolB 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 원심분리한 후 약 200 μl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심분리한 후 80 % EtOH로 수세하고 3 분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 μl의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

② 역전사-증합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된

total RNA 2 μg을 DNase I (10 U/μl) 2 U/tube를 37 °C heating block에서 30 분간 반응시킨 후 75 °C에서 10 분 동안 변성시키고, 이에 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 원심침강시키고, 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 RT-PCR

Quantitative real-time RT-PCR은 Applied Biosystems 7,500 Real-time PCR system을 이용하여 수행하였다.

Mouse Oligonucleotid의 염기배열은 다음과 같다 (Table 2).

Cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix를 사용하였고, internal standard는 GAPDH를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200 nM가 되게 반응시켰다. Quantitative real-time RT-PCR의 조건은 pre-denaturation은 2 min at 50 °C, 10 min at 94 °C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95 °C, 1 min at 60 °C에서 수행하였다. KCSYJT 투여군과 대조군은 internal standard로 GAPDH를 사용하여 target group의 quantitative PCR은

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

$$x = \text{starting quantity}$$

$$y = \text{yield}$$

Table 2. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
GAPDH	Forward	5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
	Reverse	5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'
IL-1 β	Forward	5' CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG 3'
	Reverse	5' GATCCACACTCTCCAGCTGCA 3'
IL-6	Forward	5' CCCATGAAGACCTTCACCTC 3'
	Reverse	5' ACTCTCGGCCTACATTGGTG 3'
TNF- α	Forward	5' TGGGAGGAAAGGGTCTAAG 3'
	Reverse	5' ACCTACGACGTGGGCTACAG 3'
IL-10	Forward	5' AAGCAGCCTTGCAGAAAAGA 3'
	Reverse	5' TGGGAAGTGGGTGCAGTTAT 3'
TGF- β 1	Forward	5' TGGAGCAACATGTGGAACCTC 3'
	Reverse	5' CTGCCGTACAACCTCCAGTGA 3'

n = number of cycles

e = efficiency

로 계산하여 RQ (relative quantitative)를 측정하였다.

(4) IFN- γ ⁺와 foxp3⁺ Treg 세포의 intracellular staining 분석

18 주령의 NC/Nga 생쥐에서 분리한 CD4⁺ T 세포를 미리 α -CD3/ α -CD28 mAb (1 μ g/ml)가 coating된 24 well plate에 분주한 후 cyclosporin A(CsA) 2 μ g/ml와 KCSYJT 추출물 100 μ g/ml를 가하여 48 시간 동안 동시 배양 하였다. 또한 IFN- γ ⁺와 foxp3⁺ Treg 세포의 세포내 측정을 위하여 18 주령의 NC/Nga 생쥐에서 분리한 CD4⁺ T세포를 미리 α -CD3/ α -CD28 mAb (1 μ g/ml)가 coating된 24 well plate에 분주한 후 KCSYJT 추출물 100 μ g/ml를 4 일 동안 동시 배양 하였다.

CD4⁺ T cell에 아무자극도 하지 않은 정상군 (Only CD4⁺ T cell), α -CD3/ α -CD28 mAb를 처리한 대조군 (Control), α -CD3/ α -CD28 mAb 그리고 CsA를 처리한 양성대조군 (CsA), α -CD3/ α

-CD28 mAb, 그리고 KCSYJT extract를 처리한 실험군 (KCSYJT)으로 나누어 실험하였다.

배양종료 4 시간 전에 GolgiStop (1 μ g/ml), PMA (30 ng/ml, Sigma-Aldrich), 그리고 ionomycin (500 ng/ml, Sigma-Aldrich)을 처리하고, 실험 종료 후 BD Cytotfix/Cytoperm Plus Kit (with BD GolgiPlug, 555028)와 Mouse IFN- γ ⁺ CD4⁺ Th & foxp3⁺CD4⁺ Treg cell Flow Cytometry Kit (from BioLegend)를 이용하여 각각 세포내 염색을 통하여 IFN- γ ⁺CD4⁺ Th 세포와 foxp3⁺CD4⁺ Treg 세포의 형광염색을 실시하였다. 반응 후 3 회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기로 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램으로 활성세포 (%) 비율을 산출하였다.

(5) GATA-3⁺ (transcription factor) T 세포의 intracellular staining 분석

18 주령의 NC/Nga 생쥐에서 분리한 비장세포를 미리 α -CD3/ α -CD28 mAb (1 μ g/ml)가 coating된 24 well plate에 분주한 후 양성대조군인 CsA 2 μ g/ml와 KCSYJT 추출물 100 μ g/ml

를 가하고 rmIL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 200 ng/ml)와 TGF-β (10 ng/ml)를 처리한 후 4 일 동안 동시 배양하였다.

실험은 CD4⁺ T cell 에 아무 자극도 하지 않은 정상군 (Only CD4⁺ T cell), α-CD3/α-CD28 mAb 와 rmIL-4, 그리고 TGF-β를 처리한 대조군 (Control), α-CD3/α-CD28 mAb 와 rmIL-4, TGF-β, 그리고 KCSYJT를 처리한 실험군 (KCSYJT), α-CD3/α-CD28 mAb 와 rmIL-4, TGF-β, 그리고 CsA를 처리한 양성대조군 (CsA)으로 나누어 실험하였다.

배양종료 4 시간 전에 GolgiStop (1 μg/ml), PMA (30 ng/ml, Sigma-Aldrich), 그리고 ionomycin (500 ng/ml, Sigma-Aldrich)을 처리하고, 실험 종료 후 BD Cytotfix/Cytoperm Plus Kit (with BD GolgiPlug, 555028)와 Mouse GATA3⁺ (BioLegend)를 이용하여 각각 세포내 염색을 통하여 CD4⁺ GATA-3⁺세포의 형광염색을 실시하였다. 반응 후 3 회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기로 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램으로 활성세포 (%) 비율을 산출하였다.

3) In vivo : Effects of KCSYJT on IgE hyper production in NC/Nga mouse

(1) 아토피 피부염 NC/Nga 생쥐의 선별 및 KCSYJT 추출물 투여

SPF 상태에서 사육된 NC/Nga 생쥐를 정상군 (Normal)으로 하였고, conventional한 상태에서 사육한 12 주령의 NC/Nga 생쥐의 눈에서 capillary 관을 이용하여 100 μl의 혈액을 채혈한 후 혈청 중 IgE가 과잉 생성된 NC/Nga 생쥐 (대조군)으로 하였다. 선별된 동물에 KCSYJT 400 mg/kg을 2 주간 (12 주령 ~ 14 주령) 매일 경구투여 하였고 (실험군), 또한 양성 대조 약물로 CsA 10 mg/kg을 복강에 매일 주사

하였다 (양성대조군).

(2) 채혈 및 IgE 측정

12 주령과 14 주령의 NC/Nga 생쥐 눈에서 capillary 관을 이용하여 약 100 μl의 혈액을 채혈한 후 원심분리기 6,500 rpm에서 20 분간 원심분리한 후 30 μl의 혈청을 분리하여 -70 °C에서 냉동 보관하였다. NC/Nga 생쥐의 혈청 내 IgE 수준 측정은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)로 IgE 수준을 측정하였다. 각 well에 NC/Nga 생쥐 12 주령과 14 주령에서 채혈한 혈청 5 μl (1/10 dilution)와 dilution buffer 45 μl를 혼합하여 각 well에 분주하고, 2 시간 동안 25 °C 실온에서 방치한 후 2 회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-IgE conjugated를 넣고 2 시간 방치하였다. 다시 2 회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μl를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μl씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다²⁰.

(3) PBMCs에서 형광 유세포 분석

약물투여를 종료한 후 14 주령 NC/Nga 생쥐에서 heparin을 처리한 주사기로 채혈한 후 미리 준비한 10 ml의 ACK용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, 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 세포이외의 불순물을 제거하였다. 분리한 PBMCs의 총 세포수를 5 × 10⁵ 세포로 조정된 후 4 °C에서 면역 형광염색을 실시하였다. 각각에 anti-

CD3e-PE, anti-CD19-FITC, α-CD4 Ab -FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CCR3-PE, 그리고 anti-B220-PE를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3 회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometry의 CellQuest 프로그램을 이용하여 CD3⁺ & CD19⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺, CCR3⁺CD3⁺, 그리고 B220⁺/CD23⁺ 세포수를 백분율 (%)을 분석 산출하였다.

4) 통계처리

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

Ⅲ. 成 績

1. 세포독성 측정 분석

KCSYJT 추출물의 세포독성을 측정한 결과, 농도가 250 μg/ml에서 10 mg/ml까지 거의 세포 독성이 나타나지 않았다. 또한 저농도인 250

μg/ml, 500 μg/ml와 1 mg/ml에서는 약간의 세포 증식이 일어난 것으로 관찰 되었다 (Fig.1).

2. In vitro : Splenic T & B cells culture in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse

1) Real-time PCR analysis on atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse

(1) B 세포에서 IL-1β, IL-6, 그리고 TNF-α mRNA 유전자 발현 분석

대조군의 RQ값이 1 일 때, 정상군 (Only B cell)의 IL-1β, IL-6, 그리고 TNF-α mRNA 유전자 발현은 각각 0.795, 0.109, 0.491이었고, α-CD40 mAb/rmIL-4와 KCSYJT 추출물을 동시에 배양한 실험군은 각각 0.60, 0.788, 0.473으로 유전자 발현이 억제되었다. 또한 rmIL-10을 처리하고 α-CD40 mAb/rmIL-4으로 자극한 양성 대조군의 유전자 발현은 각각 0.233, 0.546, 0.375로 유전자 발현이 현저하게 억제 되었다 (Fig.2).

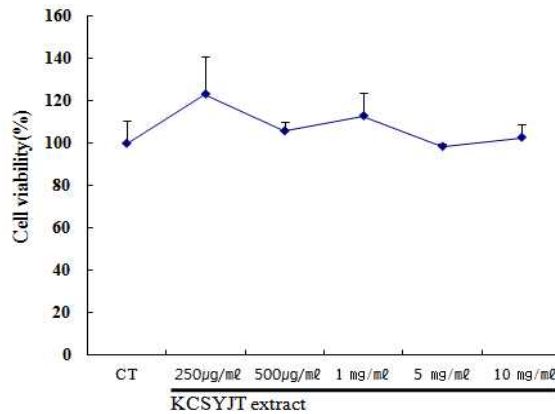


Fig.1. Cytotoxicity effects of KCSYJT extract on human fibroblast cells(hFCs). Human fibroblast cells(hFCs) were pretreated with various concentration KCSYJT extract. The results are expressed the mean± S.E (N=6).

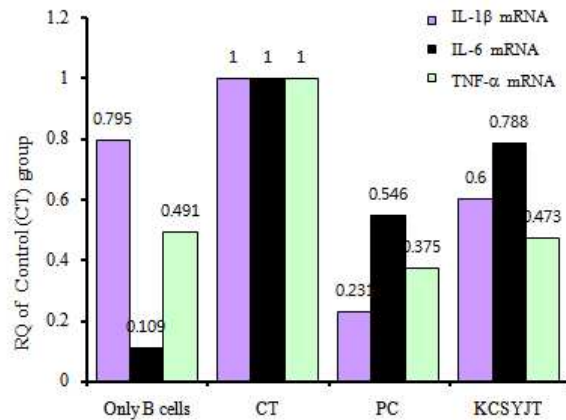


Fig.2 Effects of KCSYJT extract on IL-1β, IL-6 and TNF-α mRNA expression by KCSYJT extract plus α-CD40 mAb/rmIL-4-stimulated murine B cells.

Isolated B cells from 18 weeks of atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse were either stimulated with α-CD40 mAb (500 μg/ml)/ rmIL-4 (500 U/ml) plus treated with rmIL-10 (50 ng/ml) or KCSYJT extract (100 μg/ml). B cells were not treated (Only B cells), co-cultured with α-CD40 mAb /rmIL-4 (CT), with α-CD40 mAb /rmIL-4 plus rmIL-10 (PC), and with α-CD40 mAb /rmIL-4 plus KCSYJT extract (KCSYJT) for 4 hrs. IL-1β, IL-6 and TNF-α mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-1β, IL-6 and 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 (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real-time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7,500 Real-time PCR system.

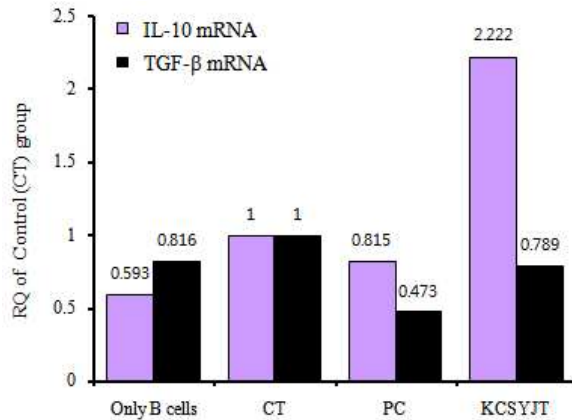


Fig.3 Effects of KCSYJT extract on IL-10 and TGF-β mRNA expression by KCSYJT extract plus α-CD40 mAb /rmIL-4-stimulated murine B cells.

Isolated B cells from 18 weeks of atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse were either stimulated with α-CD40 mAb (500 μg/ml)/rmIL-4 (500 U/ml) plus treated with rmIL-10 (50 ng/ml) or KCSYJT extract (100 μg/ml). B cells were not treated (Only B cells), co-cultured with α-CD40 mAb /rmIL-4 (CT), with α-CD40 mAb /rmIL-4 plus rmIL-10 (PC), and with α-CD40 mAb /rmIL-4 plus KCSYJT extract (KCSYJT) for 4 hrs. IL-10, and TGF-β mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-10, and TGF-β 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 7,500 Real-time PCR system.

(2) B 세포에서 IL-10과 TGF-β mRNA 유전자 발현 분석

대조군의 RQ값이 1 일 때, 정상군 (Only B cell)의 IL-10과 TGF-β mRNA 유전자 발현은 각각 0.593, 0.816이었고, α-CD40 mAb/rmIL-4 와 KCSYJT 추출물을 동시 배양한 실험군은 각각 2.222와 0.789로 IL-10 mRNA 유전자 발현이 대조군 (RQ)보다 증가하였으나, TGF-β 유전자 발현은 억제되었다. 또한 rmIL-10을 처리하고 α-CD40 mAb/rmIL-4로 자극한 양성대조군은 각각 0.815와 0.473으로 대조군에 비하여 모두 억제를 나타내었다 (Fig.3).

(3) CD4⁺ T 세포에서 CD4⁺IFN-γ⁺ intracellular staining 분석

정상군 (Only CD4⁺ T cell)의 CD4⁺IFN-γ⁺는 2.9 %이었다. α-CD3/α-CD28 mAb (1 μg/ml)로 자극한 대조군은 10.8 % 이었다. 양성대조군인 CsA 처리군은 6.8 %, 실험군인 KCSYJT 추출물 처리군은 16.5 %로 대조군에 비하여 증

가하였다 (Fig.4).

(4) CD4⁺ T세포에서 CD4⁺/CD25⁺/foxp3⁺ intracellular staining 분석

정상군 (Only CD4⁺ T cell)의 CD4⁺/CD25⁺/foxp3⁺는 1.3 %였다. α-CD3/α-CD28 mAb (1 μg/ml)로 자극한 대조군은 5.16 % 이었고, 양성대조군인 CsA 처리군은 3.1 %로 대조군에 비하여 감소하였다. 실험군인 KCSYJT 추출물 처리군은 13.6 %로 대조군에 비하여 증가하였다 (Fig.5).

(5) CD4⁺GATA-3⁺ intracellular staining 분석

정상군 (Only CD4⁺ T cell)의 CD4⁺GATA-3⁺는 0.7 %이었다. α-CD3/α-CD28 mAb (1 μg/ml)와 rmIL-4 (200 ng/ml), 그리고 TGF-β (10 ng/ml)로 자극한 대조군은 10.5 %이었다. 양성대조군인 CsA 처리군은 1.3 %로 대조군에 비하여 감소를 나타내었다. 실험군인 KCSYJT 추출물 처리군은 4.9 %로 대조군에 비하여 감소하였다 (Fig.6).

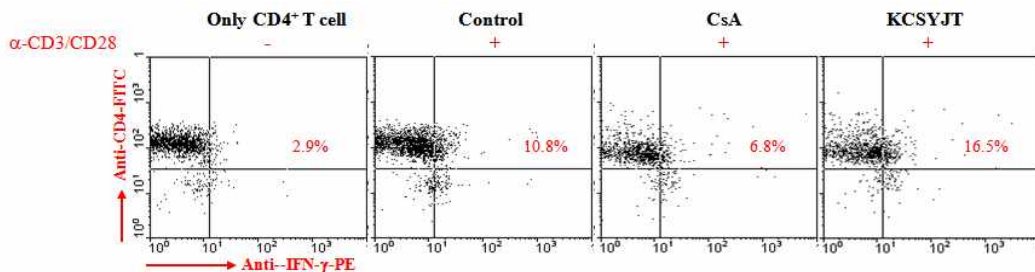


Fig.4 Effects of KCSYJT extract on CD4⁺IFN-γ⁺ intracellular staining analysis by α-CD3/α-CD28 mAb-stimulated murine CD4⁺ T cells.

Isolated CD4⁺ T cells from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse were either stimulated with α-CD3/α-CD28 mAb (1 μg/ml) plus treated with CsA (2 μg/ml) or KCSYJT extract (100 μg/ml). CD4⁺ T cells were not treated (Only CD4⁺ T cells), co-cultured with α-CD3/α-CD28 mAb (Control), with α-CD3/α-CD28 mAb plus CsA (CsA), and with α-CD3/α-CD28 mAb plus KCSYJT extract (KCSYJT) for 4 days. After a 4 days stimulation, 0.6 μl/ml monensin (GolgiStop; BD Pharmingen) was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled α-CD4 mAb. After fixation in Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen), cells were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer (BD Pharmingen), stained with PE-labeled anti-IFN-γ mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

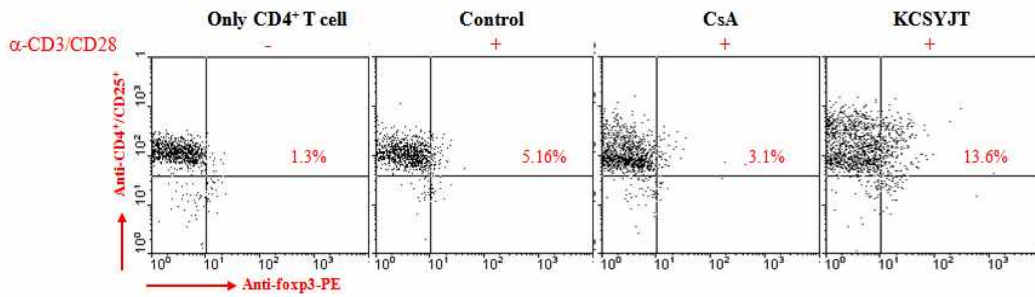


Fig.5 Effects of KCSYJT extract on CD4⁺/CD25⁺/foxp3⁺ intracellular staining analysis by α-CD3/α-CD28 mAb-stimulated murine CD4⁺ T cells.

Isolated CD4⁺ T cells from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse were either stimulated with α-CD3/α-CD28 mAb (1 μg/ml) plus treated with CsA (2 μg/ml) or KCSYJT extract (100 μg/ml). CD4⁺ T cells were not treated (Only CD4⁺ T cells), co-cultured with α-CD3/α-CD28 mAb (Control), with α-CD3/α-CD28 mAb plus CsA (CsA), and with α-CD3/α-CD28 mAb plus KCSYJT extract (KCSYJT) for 4 days. After a 4 days stimulation, 0.6 μl/ml monensin (GolgiStop; BD Pharmingen) was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled α-CD4 mAb, and Cychrom5.5-labeled α-CD25 mAb. After fixation in Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen), cells were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer (BD Pharmingen), stained with PE-labeled anti-foxp3 mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

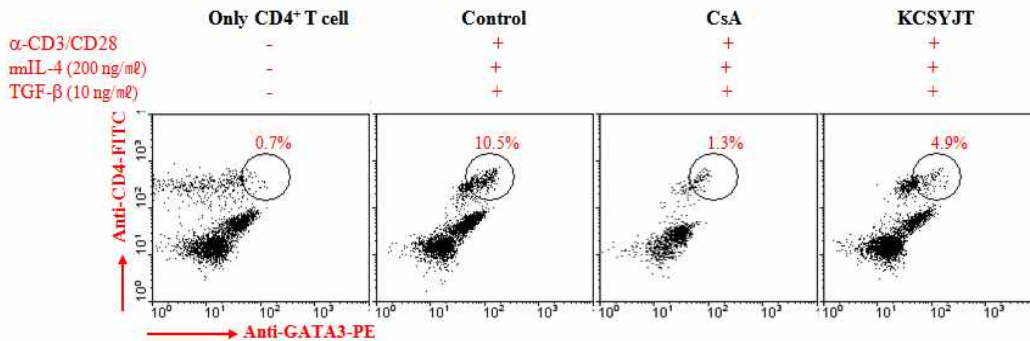


Fig.6 Effects of KCSYJT extract on CD4⁺GATA-3⁺ intracellular staining analysis by α-CD3/α-CD28 mAb-stimulated murine CD4⁺ T cells.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse were either stimulated with α-CD3/α-CD28 mAb (1 μg/ml) plus rmIL-4 (200 ng/ml) or treated with KCSYJT extract (100 μg/ml). CD4⁺ T cells were not treated (Only CD4⁺ T cells), co-cultured with α-CD3/α-CD28 mAb plus rmIL-4 plus TGF-β (Control), and with α-CD3/α-CD28 mAb plus rmIL-4 plus TGF-β plus KCSYJT extract (KCSYJT), and with α-CD3/α-CD28 mAb plus rmIL-4 plus TGF-β plus CsA 2 μg/ml (CsA) for 4 days. After a 4 days stimulation, 0.6 μl/ml monensin (GolgiStop; BD Pharmingen) was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled α-CD4 mAb. After fixation in Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen), cells were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer (BD Pharmingen), stained with PE-labeled anti-GATA-3 mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

3. In vivo : Effects of KCSYJT on IgE hyperproduction in NC/Nga mouse

1) 혈청 IgE에 미치는 영향

혈청 IgE의 양을 12 주령, 14 주령에 측정하고, 대조군은 12 주령과 14 주령에서 IgE 수

준이 비슷하였으나, 2 주간 CsA와 KCSYJT를 투여한 양성대조군과 실험군은 14 주령에서 IgE 수준이 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.001$) 있게 감소하였다(Fig.7).

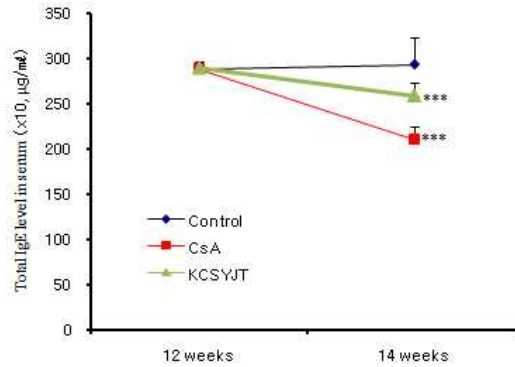


Fig.7 Effect of KCSYJT serum IgE-level- in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse at 12 weeks of age were maintained under conventional conditions, and orally administration of KCSYJT extract and intraperitoneal injection of CsA (10 mg/kg) for 2 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 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Shibayagi, Japan). Each point represents the mean±SE of six mice. Statistically significant value compared with Control group data by T test (***) $p < 0.001$.

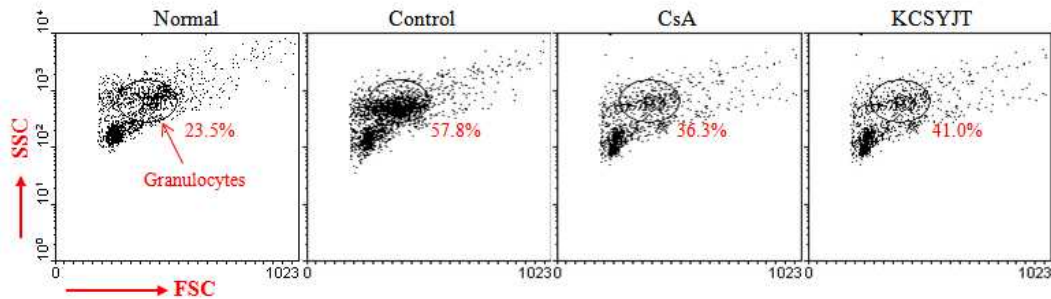


Fig.8 Effects of CsA and KCSYJT extract on the percentage of granulocytes gated cells in PBMCs in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and orally administration of KCSYJT extract and CsA (10 mg/kg, i.p) for 2 weeks. NC/Nga mouse PBMCs (2×10^5 cells/ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total cell content (%) of granulocytes from FSC & SSC in NC/Nga mouse.

Normal : 12-weeks-old specific pathogen free(SPF) NC/Nga mouse

Control : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse

CsA : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and CsA (10 mg/kg, i.p)

KCSYJT : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and KCSYJT extract (400 mg/kg, p.o)

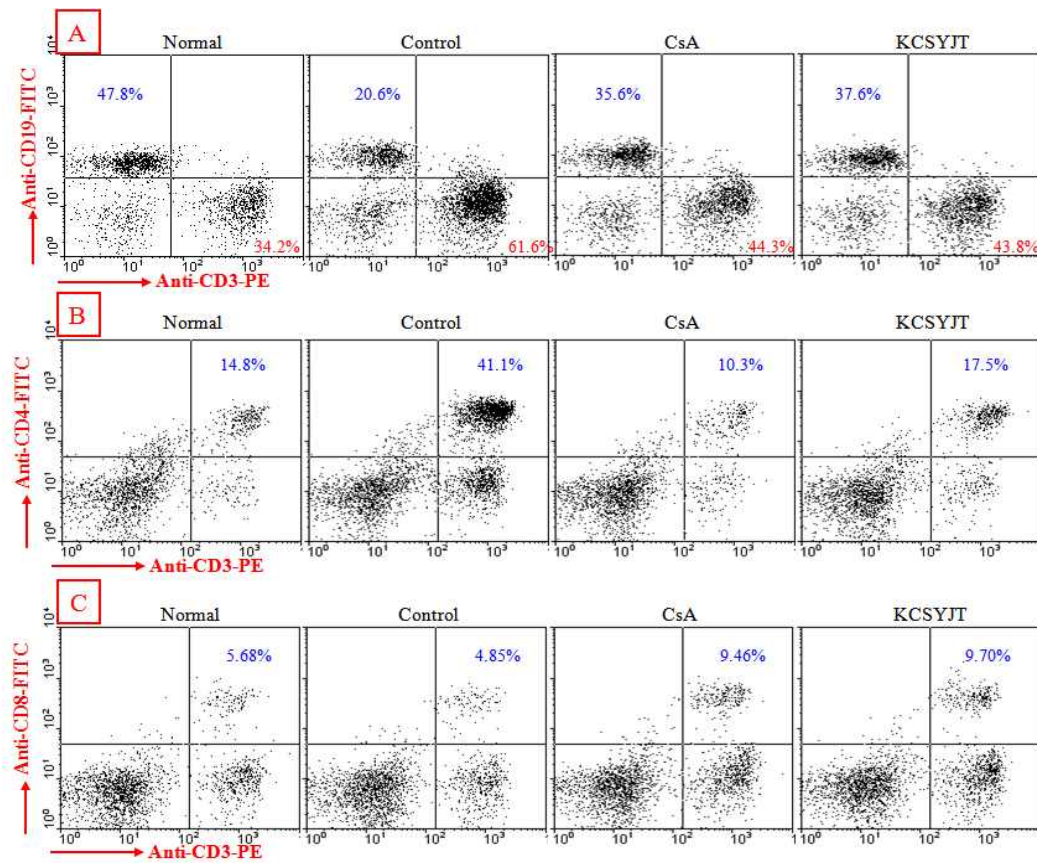


Fig.9 Effects of CsA and KCSYJT extract on the percentage of CD3⁺&CD19⁺, CD3⁺/CD4⁺ and CD3⁺/CD8⁺ gated cells in PBMCs in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and orally administration of KCSYJT extract and CsA (10 mg/kg, i.p) for 2 weeks. NC/Nga mouse PBMCs (2×10⁵ cells/ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total cell content (%) of CD3⁺& CD19⁺ (A), CD3⁺/CD4⁺ (B) and CD3⁺/CD8⁺ (C) in NC/Nga mouse.

Normal : 12-weeks-old specific pathogen free(SPF) NC/Nga mouse

Control : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse

CsA : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and CsA (10 mg/kg, i.p)

KCSYJT : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and KCSYJT extract (400 mg/kg, p.o)

2) PBMCs에서의 활성세포 비율 분석

(1) Granulocytes의 cell content

Granulocytes의 활성세포 빈도(%)는 정상군 (23.5%)에 비하여 대조군 (57.8%)이 현저하게 증가하였으며, CsA를 투여한 양성대조군 (CsA, 36.3%)과 실험군인 KCSYJT 투여군 (41.0%)은 대조군에 비하여 모두 감소하였다 (Fig.8).

(2) CD3⁺ & CD19⁺, CD3⁺/CD4⁺ and CD3⁺/CD8⁺ cell content

PBMCs에서 CD3⁺ 세포와 CD19⁺ 세포를 분석한 결과, CD3⁺ 세포의 활성세포 빈도 (%)는 정상군 (34.2%)에 비하여 대조군 (61.6%)이 현저하게 증가하였고, 양성대조군 (44.3%)과 실험군 (43.8%)은 대조군에 비하여 모두 감소

하였다 (Fig.9A).

CD19⁺ 세포의 빈도 (%)는 정상군 (47.8 %)에 비하여 대조군 (20.6 %)의 활성화세포 빈도는 감소하였으나 양성대조군 (35.6 %)과 실험군 (37.6 %)은 증가하였다 (Fig.9A).

PBMCs에서 CD3⁺/CD4⁺ 세포의 빈도 (%)는 정상군 (14.8 %)에 비하여 대조군 (41.1 %)의 활성화세포 빈도는 현저하게 증가하였고, 양성대조군 (10.3 %)은 대조군에 비하여 감소하였으며, 실험군 (17.5 %)은 대조군에 비하여 감

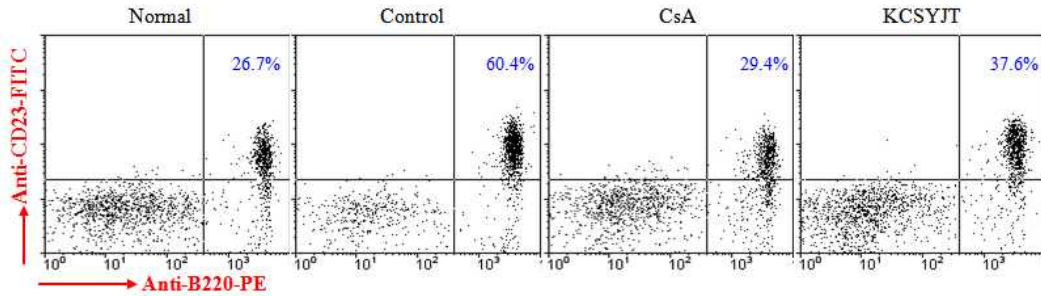


Fig.10 Effects of CsA and KCSYJT extract on the percentage of B220⁺/CD23⁺ gated cells in PBMCs in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and orally administration of KCSYJT extract and CsA (10 mg/kg, i.p) for 2 weeks. NC/Nga mouse PBMCs (2×10⁵ cells/ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total cell content (%) of B220⁺/CD23⁺ in NC/Nga mouse.

- Normal : 12-weeks-old specific pathogen free(SPF) NC/Nga mouse
- Control : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse
- CsA : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and CsA (10 mg/kg, i.p)
- KCSYJT : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and KCSYJT extract (400 mg/kg, p.o)

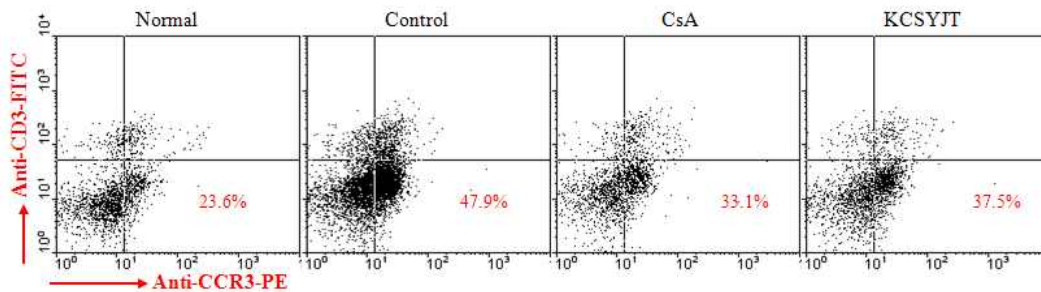


Fig.11 Effects of CsA and KCSYJT extract on the percentage of CCR3⁺ gated cells in PBMCs in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and orally administration of KCSYJT extract and CsA (10 mg/kg, i.p) for 2 weeks. NC/Nga mouse PBMCs (2×10⁵ cells/ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total cell content (%) of CCR3⁺ in NC/Nga mouse.

- Normal : 12-weeks-old specific pathogen free(SPF) NC/Nga mouse
- Control : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse
- CsA : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and CsA (10 mg/kg, i.p)
- KCSYJT : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and KCSYJT extract (400 mg/kg, p.o)

소하였다 (Fig.9B).

PBMCs에서 CD3⁺/CD8⁺ 세포의 활성세포 빈도 (%)는 정상군 (5.68 %)에 비하여 대조군 (4.85 %)과 차이가 없었으나, 양성대조군 (9.46 %)과 실험군 (9.7 %)은 대조군에 비하여 증가하였다 (Fig.9C).

(3) B220⁺/CD23⁺ cell content

B220⁺/CD23⁺ B 세포의 활성세포 빈도 (%)는 정상군 (26.7 %)에 비하여 대조군 (60.4 %)이 현저하게 증가하였고, 양성대조군 (29.4 %)과 실험군 (37.6 %)은 대조군에 비하여 각각 감소하였다 (Fig.10).

(4) CCR3⁺ cell content

PBMCs에서 CCR3⁺세포의 활성세포 빈도 (%)는 정상군 (23.6 %)에 비하여 대조군 (47.9 %)이 현저하게 증가하였고, 양성대조군 (33.1 %)과 실험군 (37.5 %)은 각각 대조군에 비하여 감소하였다 (Fig.11).

IV. 考 察

아토피 피부염의 한의학적 범주는 《素問 : 玉機眞藏論篇》²¹⁾에서 “浸淫”, 《金匱要略》²²⁾에서 “浸淫瘡”, 《諸病源候論》²³⁾에 “乳癬”이란 기록이 있으며 《外科正宗》²⁴⁾에서 “奶癬”이란 病名이 처음 사용되었다. 아토피 피부염에 해당하는 내용을 역대 문헌에서 살펴보면 정확히 일치되는 병명은 없으나, 乳癬, 嬰兒濕疹, 胎熱, 胎癬, 浸淫瘡, 胎斂瘡, 奶癬, 濕疹, 四彎風 등의 범주에 속한다고 할 수 있다²⁵⁾.

발생 원인을 살펴보면 《聖濟總錄》²⁶⁾에서 “論曰, 心惡熱, 若風熱蘊于心經, 則神志躁鬱, 氣血鼓作發于肌膚, 而爲浸淫瘡也”라 하여 정서적 요인, 《諸病源候論》²³⁾에서 “言兒飲乳,

乳汁漬汚兒面, 變生此症”이라 하여 환경적 요인을 강조하고 있으며, 《外科正宗》²⁴⁾에서는 “奶癬因兒在胎中, 母食五辛, 父餐炙燻, 遺熱與兒”라 하여 항원으로서의 음식물과 유전적 요인을 동시에 언급하고 있다.

최근에는 주로 임신 중 모체의 잘못된 음식 섭취로 胎中에서 濕熱이 蘊積되거나 모체의 정신적 스트레스로 인한 肝火가 태아에게 전해져서 발생하는 선천적인 경우와 체질적으로 虛弱하거나 생후 섭취불량으로 인해 脾胃虛弱해져서 脾失健運하여 濕熱이 발생한 경우로 나누어보고 있으며²⁷⁻²⁹⁾, 급·만성으로 나누어서 급성은 濕熱 위주로 夾有外風하고, 만성은 血虛風燥, 脾虛濕熱蘊阻가 원인이 되는 것으로 보기도 한다³⁰⁻³³⁾.

아토피 피부염의 치료에 있어서는 吳¹⁴⁾는 消風導赤湯을 通治方으로 하고 乾斂인 경우는 扶潤肌膏를, 濕斂인 경우에는 嫩黃栢頭末을 응용한다고 하였고, 《中醫兒科學》¹⁵⁾에서는 辨證을 濕熱型, 血熱型, 濕阻型, 血燥型으로 4분하여 각각 清熱利濕, 涼血清熱利濕, 健脾除濕, 養血祛風 清熱化濕으로 세분하여 치료하였다.

加味清心蓮子湯¹⁶⁾은 清心蓮子飲에 宣散風熱, 涼血清熱, 解肌清熱, 健脾化濕의 效能을 갖는 柴胡, 蟬蛻, 葛根, 牛蒡子, 升麻, 薄荷, 金銀花, 連翹, 梔子, 石膏, 當歸, 薏苡仁, 桃仁, 赤茯苓, 檳榔, 蒼朮, 陳皮, 厚朴 등을 加하여 주로 血熱과 風熱로 인해 津液이 손상되어 나타나는 皮膚疾患을 다스릴 목적으로 處方되었다.

인체의 방어 기전인 면역체계는 T 세포의 활성화를 중심으로 이루어진다. 따라서 T 세포의 활성화에 관한 충분한 이해는 면역체계의 조절 과정을 파악하는데 도움이 되며, 많은 면역질환의 예방 및 치료제 개발의 자료가 되

는데, T 세포 (Naive CD4⁺ T cell)의 활성화는 T 세포 수용체 (TCR : T cell receptor)를 통한 매우 복잡한 신호전달과정을 통하여 이루어지며, 이 과정에 참여하는 주요 인자는 수용체, 인산화 효소, adapter, effector, 전사조절인자 (transcription factor) 등이다³⁴. 활성화된 CD4⁺ T 세포는 보조 T 세포 (helper T cell, Th 세포)로서 이들 Th 세포는 B 세포의 항체 생산을 보조하고 (Th2), 감염된 대식세포의 활성화를 돕는다 (Th1). 이러한 작용은 직접 세포-세포간 상호 결합에 의해서 또는 cytokine의 분비를 통해서 이루어진다³⁵. Th 세포는 IL-2를 생산하고, 세포 주기의 G0 단계에서 G1단계로 들어가게 되어 세포 증식을 시작하게 되며³⁶, 다음 단계는 분화 (differentiation)로 세포의 기능이 결정 지워지는 단계이다. 즉, 활성화된 Th 세포는 그들이 분비하는 cytokine의 종류와 분비한 cytokine에 의한 면역 조절기능에 따라 Th1과 Th2, 두 종류의 효력 T 세포 (effector CD4⁺ T cell)로 분화하게 된다³⁷. 이렇게 분화된 효력 Th1 세포는 IFN- γ , IL-12와 같은 Th type 1 cytokine (proinflammatory cytokine)을 생산하여 박테리아 감염과 같은 intracellular pathogen에 대항하는 면역반응에 관여한다. 한편 이들의 과도한 발현은 자가면역질환을 초래하기도 한다. 이와는 달리 효력 Th2 세포는 IL-4, 5, 9, 10, 13 등과 같은 Th type 2 (antiinflammatory cytokine)를 생산하여 기생충과 같은 extracellular parasite의 감염에 대항하고, B 세포와 함께 체액성 면역반응에 관여하는데^{38,39}, 잘 알려져 있듯이 이들의 과다한 발현은 알레르기 질환을 초래할 수 있다.

이처럼 Th1 세포가 생산하는 Th type 1 cytokine은 Th1 세포의 분화를 유도하는 반면 Th2 세포의 증식과 분화를 억제하며, 반대로 Th2 세포가 생산하는 Th type 2 cytokine은 Th2

세포의 증식과 분화를 유도하는 반면 Th1 세포의 분화를 억제하는 식으로 서로 상호작용을 통해 균형을 이루며 Th1과 Th2 면역반응을 조절하므로, 이 균형이 깨어지게 되면 Th1/Th2 불균형으로 인한 여러 가지 면역질환을 겪게 된다⁴⁰. 알레르기 질환도 그 균형이 Th2 쪽으로 치우친 결과로 유발된 면역질환 중의 하나이다. 이렇듯 알레르기 발생과 조절에 있어 가장 중요한 세포는 Th2 세포로, 알레르기는 항체의 isotype을 IgM 또는 IgG에서 IgE로 바꾸어주는 Th2 세포가 활성화되면서 시작되며, Th2 세포가 생산하는 Th type 2 cytokine (IL-4, IL-10 etc)에 의해서 B 세포의 IgE 생성, 호산구의 활성화, 염증반응 등을 나타낸다⁴¹. 따라서 알레르기 질환이 Th1 세포와 Th2 세포의 균형이 깨어져 Th2 쪽으로 치우쳐서 유발되는 질환이라는 것에 근거해 볼 때, Th1 세포로의 분화를 주도하는 T-bet은 중요한 알레르기 반응 조절제로서의 역할을 수행하리라 생각되어 알레르기 치료제 개발에 있어 매우 흥미로운 대상으로 부각되고 있다⁴². 이와 같이 면역반응 제어에 있어서 Th 세포기능 조절의 중요성이 강조되고 있고, 특히 Th1/Th2 분화 및 cytokine의 균형과 알레르기 반응과의 밀접한 관계로 미루어 볼 때, 단순히 임상적 증상들을 완화시키는 일시적인 치료제 개발이 아닌, 보다 근본적인 요인에 초점을 맞춘 새로운 알레르기 치료제 개발이 Th 세포분화조절을 통하여 실현될 가능성이 있어, 앞으로 이 분야의 연구는 더욱 활성화 될 것으로 보인다.

KCSYJT에 대한 연구로는 이미 윤¹⁷의 아토피 피부염에 미치는 실험적 영향과 송¹⁸의 임상 치료 효과에 관한 논문이 보고되어 있으나, Th1과 Th2의 분화에 있어 가장 중요한 전사인자인 GATA-3 조절에 의한 KCSYJT의 항아토피 피부염 효과에 대해 알아보하고자 본 실험에

입하게 되었다.

실험 결과를 살펴보면, *in vitro* 실험에서 정상 사람 피부 조직을 분리하여 KCSYJT 추출물의 세포독성 측정 결과, 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다 (Fig.1). 또한 KCSYJT 추출물이 NC/Nga 생쥐의 면역세포의 알레르기 면역반응을 억제하는지를 알아보고자, KCSYJT 추출물과 α -CD40 mAb/rmIL-4를 동시 배양한 실험군의 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α 유전자 발현을 관찰하였다. 대조군의 RQ값이 1 일 때, 실험군은 각각 0.60, 0.788, 0.473로 모두 억제되었다. 이는 KCSYJT 추출물이 항원에 의한 알레르기 반응에 반드시 수반되는 B 세포의 활성화, 분화, 그리고 IgE 생성을 선택적으로 억제하여 초기 알레르기 반응을 효과적으로 억제하는 것으로 생각된다 (Fig.2). NC/Nga 생쥐의 비장 B 세포를 α -CD40 mAb/rmIL-4으로 자극하여 활성화 시킨 후, IL-10과 TGF- β mRNA 유전자 발현을 관찰하였다. KCSYJT 추출물과 동시 배양한 실험군의 IL-10 mRNA 유전자 발현은 대조군 (RQ)보다 증가하였고, TGF- β 유전자 발현은 억제되었다 (Fig.3).

Treg 세포는 다른 T 세포의 활성을 적극적으로 억제 하는 세포이다. 이 세포는 활성화 되지 않은 상태에서도 활성화 표지인 CD25를 세포표면에 발현하고 있으므로 CD4⁺CD25⁺ Treg 세포로, 흉선에서 자연적으로 발생된다고 하여 natural Treg 세포로 불리기도 한다. CD25 이외에도 CTLA-4, GITR 등의 활성화 표지와 foxp3라는 전사인자를 발현한다. 일반적으로 CD4⁺ T 세포가 활성화되면 IL-2를 생성하는 현상과는 달리 Treg 세포는 활성화 되어도 IL-2를 생성하지 않으며 대신 IL-10과 TGF- β 를 생성하는 속성을 갖는다⁴³⁾. CD4⁺ T 세포를 분리하여 α -CD3/ α -CD28 mAb로 자극하여 배양한 후 Th1에서 분비하는 IFN- γ ⁺, 그리고

Treg 세포인 CD4⁺/foxp3⁺를 intracellular 염색으로 측정된 결과, 실험군이 대조군에 비하여 현저하게 증가를 나타내었다 (Fig.4,5).

이상의 실험결과는 KCSYJT 추출물이 면역세포의 알레르기 반응으로의 분화를 억제하고 관련 유전자 발현을 선택적으로 조절하여 항알레르기의 효과가 있음을 나타내는 것으로 생각된다.

Th2 세포로의 분화는 조직 내 cytokine 환경과 항원의 용량, 항원제시세포의 종류, 항원제시세포와 T 림프구 반응 시의 자극신호 종류 등에 의해 결정된다고 알려져 있다. 즉 Th0 세포는 CD8 α 수지상세포의 영향 하에서 IL-4, STAT-6, GATA-3, NFATc, c-maf 등의 물질이 관여하는 중간과정을 통해 Th2 세포로 분화되는 것으로 알려져 있다⁴⁴⁾. 즉, GATA-3는 Th2 세포의 IL-4, IL-5, 그리고 IL-13등 유전자 발현의 전사인자인 transcription factor로 T 세포를 Th2 세포로 분화와 증식을 유도하는 인자이다. GATA-3는 전사인자로 6 개의 family (GATA-1 - GATA-6)로 이루어 졌는데 이는 haematopoietic (GATA-1 to GATA-3)과 non-haematopoietic (GATA-4 to GATA-6)에서 유전자가 발현되는 것으로 알려져 있다⁴⁵⁾. GATA-3 유전자 발현의 증가는 Th 2 세포의 분화를 촉진하고 Th 1 세포 경로의 세포분화를 억제하여 알레르기 반응을 촉진하는 IL-4 생산의 증가와 B 세포 분화의 촉진을 가져오는 것으로 알려져 있다⁴⁶⁾.

비장세포를 분리하여 α -CD3/ α -CD28 mAb와 rmIL-4로 자극하여 배양한 후 CD4⁺GATA-3⁺를 intracellular 염색으로 측정된 결과 실험군이 대조군에 비하여 감소하였다 (Fig.6).

본 실험에 사용된 NC/Nga 생쥐는 태어난 후 어렸을 때부터 일반 사육환경 (conventional system)에서 노출되어 자라게 되면, 12 주령 이

상에서, 사람에게서 나타나는 아토피성 피부염과 유사한 병변이 관찰되어 아토피 피부염 모델동물로 사용되고 있다²⁰. 또한 본 실험에서 양성대조군으로는 CsA 면역억제제를 사용하였다⁴⁷. NC/Nga 생쥐에서 면역억제제인 CsA를 사용하면 피부의 병변이나 혈청 IgE의 수준이 줄어드는 것으로 나타났다⁴⁸. 특히 IgE 생성에는 IL-4가 필수적이고 이는 Th1 세포보다 Th2 세포가 우세한 상태에서 생산이 항진되며 알레르기 발현에 관계한다.

12 주령에서 14 주령까지 2 주간 CsA와 KCSYJT를 투여한 후 혈청 IgE 수준의 변화를 측정한 결과, 대조군에 비하여 CsA와 KCSYJT 투여군이 유의성 있게 감소하였다 (Fig.7).

이러한 결과는 KCSYJT 투여로 NC/Nga 생쥐에서 Th2 세포의 분화를 억제하여, B 세포 분화에서 수반되는 IgE의 수치를 억제하는 것으로 생각된다. Th2 세포에서 분비되는 IL-4는 면역글로블린 생성 시 IgE의 분화를 유도하고 유착분자들을 활성화시켜 단핵구나 호산구 등 염증세포들을 염증이 일어나는 조직 세포로 이동하게 하고 IL-5는 호산구의 증식과 활성화를 유도하는 기능이 있으며 IL-13은 IgE 생성을 자극한다. Th1 세포에서 분비되는 IFN- γ 는 알레르기 반응을 일으키는 Th2 세포를 억제하고 IgE 생성을 증가시키는 B 세포 분화를 억제하는 것으로 알려진 cytokine으로 알려져 있다⁴⁹.

알레르기 질환의 말초혈액에서는 생체의 알레르기 반응에 의하여 염증반응이 일어나고, 백혈구 수와 과립구의 증가가 나타나는 것으로 알려져 있다. 또한 아토피 피부손상 부위에서는 비만세포가 세포질 내에 과립을 풍부하게 가지고 있는 세포로서 주로 결체조직과 점막에 존재하면서 알레르기 염증반응에 관여한다⁵⁰. PBMCs에서 granulocytes의 활성세포 빈도(%)는 실험군 (41.0%)이 대조군 (57.8%)에 비

하여 감소하였다 (Fig.8). 알레르기 질환은 비만세포와 호염기구 표면의 고 친화성 Fc ϵ 수용체 (high affinity Fc receptor for IgE 또는 Fc ϵ R I)에 결합된 IgE (reaginic antibody)에 집먼지, 동물상피, 화분, 곰팡이, 음식물 등 가운데 포함되어 있는 알러젠이 결합되어 활성화된 이들 세포의 탈과립 현상에 따라 유리되는 화학매체에 의하여 일어나는 과민반응을 말한다. CCR3는 eotaxin, RANTES(regulated and normal T cell expressed and secreted), monocyte chemotactic protein(MCP)-3 및 MCP-4와 높은 친화력으로 결합하고, 호산구 (CCR3⁺)에서 다량 발현되며 호중구, 단핵구에서는 발현되지 않기 때문에 선택적인 호산구의 조직 내 침윤을 연구하는데 중요한 가치가 있다. 또한 CCR3는 Th2 림파구 (CD3⁺/CCR3⁺), Basophil, 비만세포 (mast)에서 발현되는 것으로 알려져 있다⁵¹. PBMCs에서 CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺, B220⁺/CD23⁺, 그리고 CCR3⁺세포의 활성세포 빈도(%)는 정상군에 비해 대조군이 각각 증가하였고, CD19⁺세포에서는 감소하였으며, CD3⁺/CD8⁺세포에서는 별 차이 없었다. 양성대조군과 실험군의 CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺, B220⁺/CD23⁺, 그리고 CCR3⁺ 세포의 활성세포 빈도(%)는 대조군에 비하여 감소하였고, CD19⁺세포와 CD3⁺/CD8⁺세포는 증가하였다(Fig.9,10,11).

이러한 결과 KCSYJT 투여는 GATA-3 발현의 억제로, CD4⁺ T 세포에서 Th2⁺CD4⁺ Th 세포로의 분화를 억제하여 Th2 면역세포의 과잉 증식 (CD4⁺)과 비만세포 (CCR3⁺)의 분화증식을 감소시켜 피부염에 치료효과가 있음을 보여주었다³⁶⁻⁴⁰.

이로써 KCSYJT은 아토피 피부염에 유효하게 활용할 수 있을 것으로 판단되며 향후 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

加味清心蓮子湯(KCSYJT)이 아토피 피부염에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

I. In vitro

1. KCSYJT는 hFCs에서 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다.
2. KCSYJT는 CD4⁺ T 세포에서 foxp3⁺CD4⁺ Treg 세포로의 분화를 증가시켰다.
3. KCSYJT는 NC/Nga 생쥐의 B세포에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, 그리고 TGF-β mRNA 유전자 발현은 억제하였고, IL-10 mRNA 유전자 발현은 증가시켰다.
4. KCSYJT는 GATA-3⁺CD4⁺ T 세포수를 감소시켰다.
5. KCSYJT는 CD4⁺ T 세포에서 IFN-γ⁺CD4⁺ T 세포 수를 증가시켰다.

II. In vivo

1. KCSYJT 투여군이 혈청 중 IgE 수준을 유의성 있게 감소시켰다.
2. KCSYJT 투여군이 PBMCs에서 granulocytes의 활성화세포 빈도 (%)를 감소시켰다.
3. KCSYJT는 CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺, B220⁺/CD23⁺, 그리고 CCR3⁺세포의 활성화세포 빈도 (%)를 감소시켰다.
4. KCSYJT는 CD19⁺, CD3⁺/CD8⁺세포의 활성화세포 빈도 (%)를 증가시켰다.

VI. 參 考 文 獻

1. 홍창의. 소아과학. 서울:대한교과서(주). 1994: 4-6, 1066-8.
2. 강형재 외. 피부과학. 서울:대한피부과학회 교과서편찬위원회.1994:21-25, 133-138.
3. 강석영. 알레르기 질환 임상 의 실제. 서울: 일조각. 1998:293-7.
4. 김정희. 아토피 피부염의 최신지견. 소아알레르기 및 호흡기학회지.2004;14(1):12-23.
5. 殷熙哲 등. 피부면역학. 서울:서울대학교출판부. 1999:27-34.
6. Kay AB. Leukocytes in asthma. Immunol Invest. 1988;17:679-705.
7. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. J Allergy Clin Immunol. 2003;111:450-63.
8. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature. 1996;383:787-93.
9. Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'shea JJ, et al . Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation new players and new insights. J Clin Immunol. 2003;23:147-61.
10. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell. 2000;100:655-69.
11. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in Th1 lineage commitment and IFN-γ production in CD4 and CD8 T cells. Science. 2002;295:338-42.
12. Ting CN, Olson MC, Barton KP, Leiden JM. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. Nature. 1996;384:474-8.
13. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient

- for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997;89:587-96.
14. 吳謙. 御纂 醫宗金鑑. 人民衛生出版社. 1998:777, 892-893, 908.
 15. 王伯岳, 江育仁. 中醫兒科學. 上海:上海科學技術出版社. 1984:203-204.
 16. 大田大學校 韓方病院. 韓方病院 處方集. 大田:韓國出版社. 2001:335.
 17. 윤지연, 한재경, 김윤희. 加味清心蓮子湯이 NC/Nga mouse의 아토피樣 피부염에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지*. 2007;21(1):87-116.
 18. 宋賢知, 韓在敬, 金允姬. 加味清心蓮子湯의 아토피 피부염 치료에 대한 임상고찰. *대한한방소아과학회지*. 2007;21(3):21-31.
 19. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(13):1107-12.
 20. 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 mice. *Int Immunol*. 1997;9:461-466.
 21. 洪元植 編著. 精校黃帝內經素問. 東洋醫學研究院 出版部. 1985:72-80, 246-248.
 22. 宋書功 主編. 金匱要略 廣州校註. 人民衛生出版社. 1994:221-225.
 23. 巢元方 編著. 巢氏諸病源候論. 서울:대성문화사. 1992:251-253.
 24. 陳實功. 外科正宗. 北京:人民衛生出版社. 1983:269.
 25. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연. 아토피 피부염의 동, 서의학적 문헌고찰. *대한안이비인후피부과학회지*. 2002;15(1):226-252.
 26. 越佶. 聖濟總錄(中國醫學大系). 서울: 여강출판사 1987:739.
 27. 歐陽恒, 楊志波. 新編中醫皮膚病學. 北京:人民軍醫出版社. 2000:262-263.
 28. 徐宜厚, 王保方, 張賽英 編著. 皮膚病中醫診療學. 北京:人民衛生出版社. 1997:310-312.
 29. 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.
 30. 楊思澍의 2인 主編. 中醫臨床大全. 서울:醫聖黨. 1993:889-891.
 31. 顧伯華 主編. 實用中醫外科學. 上海:上海科學技術出版社. 1985:454-459, 461-464.
 32. 신광호. 韓醫外治療法學. 서울:대성의학사. 2000:501-4.
 33. 陣貴廷, 楊思澍. 實用中西醫結合診斷治療學. 中國醫藥科技出版社. 1991:1445-1454.
 34. Okudaira H, Hongo O, Ogita T, et al. Serum IgG and IgE antibody levels in patients with bronchial asthma, atopic dermatitis, eosinophilic granulomas of the soft tissue (Kimura's disease) and other diseases. *Ann Allergy*. 1983;50:51 - 4.
 35. Ikezawa Z, Miyakawa K, Komatsu H, et al. A probable involvement of rice allergy in severe type of atopic dermatitis in Japan. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1992; 176:103 - 7.
 36. Uehara M, Kimura C, Uenishi T. Type I allergy to foods in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1992;176:38 - 40.
 37. Marino M, Donzelli GP, Gallil L, et al.. Food allergy in preterm infants fed human milk. *Biol Neonat*. 1989;56:301 - 5.
 38. Sampson HA, McCaskill CC. Food hypersensitivity and atopic dermatitis, evaluation of 113 patients. *J Pediatr*. 1985;107:669 - 75.
 39. Gustafsson D, Lowhagen T, Andersson K.

- Risk of developing atopic disease after early feeding with cow's milk based formula. *Arch Dis Child*. 1992;67:1008 - 10.
40. Casimir GJA, Duchateau J, Gossart B, et al. Atopic dermatitis role of food and house dust mite allergens. *Pediatrics*. 1993;92:252 - 6.
41. Sampson HA, Albergo R. Comparison of results of skin tests, RAST, and double-blind, placebo-controlled food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1984;74:26 - 33.
42. Hanifin JH, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1980;92:44 - 7.
43. 윤지희. Regulatory T cells in immune homeostasis. *대한결핵 및 호흡기학회*. 2006: 3-4.
44. Jyothi Rengarajan, Susanne J. Szabo and Laurie H. Glimcher. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunology Today*. 2000;(21):479-483.
45. Ouyang, W., S. H. Ranganath, K. Weindel, D. Bhattacharya, T. L. Murphy and W. C. Sha. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity*. 1998;(9):745-755.
46. Gavett, S. H., D. J. O'Hearn, X. Li, S. K. Huang, F. D. Finkelman and M. K. Wills. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J. Exp. Med*. 1995;(182):1527-1536.
47. Schreiber SL and Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and CsA. *Immunol Today*. 1992;13(4):136-42.
48. Takano, N., I. Arai and M. Kurachi. A method to induce stable atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice housed with skin-lesioned mice. *British Journal of Dermatology*. 2006; (154):426-430.
49. Christian Vestergaard, Hiroyuki Yoneyama, Masako Murai, Kohichiro Nakamura, Kunihiko Tamaki, Yuya Terashima, Toshio Imai, Osamu Yoshie, Tatsuro Irimura, Hitoshi Mizutani, and Kouji Matsushima. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest*. 1999;104(8):1097 - 1105.
50. Pène, A Rivier, B Lagier, W M Becker, F B Michel, and J Bousquet. Differences in IL-4 release by PBMC are related with heterogeneity of atopy. *Immunology*. 1994;81(1):58 - 64.
51. Yanelda García-Vegaa, Judith Rodríguez-Perez, Cimara Bermúdez-Badell, Elizabeth Blanco-Garcés, Carmen Valenzuela-Silva, Pedro López-Saura, Iraldo Bello-Rivero. IgE-Dependent Regulation of the CCR3 Chemokine Receptor by INF- γ in Atopic Asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;148:219-227.