

## 아토피樣 피부염 NC/Nga생쥐에서 滋陰除濕湯加減의 투여가 피부염에 미치는 영향

이남열 · 김윤희 · 한재경

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

### Abstract

### Effects of JaUmJeSeupTangKaKam (JUJSTK) on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions in NC/Nga Mouse

Lee Nam Yerl, Kim Yun Hee, Han Jae Kyung

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

#### Objectives

The purpose of this study is to investigate the effect of JUJSTK on atopic dermatitis in an in-vitro experiment using an NC/Nga atopic dermatitis mouse, which has histological and clinical similarities to the humans in terms of health condition.

#### Methods

We evaluated IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  mRNA, TGF- $\beta$  mRNA, CD4+/IFN- $\gamma$ + and IL-17+CD4+ Th17 cells of NC/Nga atopic dermatitis mouse by real-time PCR and intracellular staining in vitro.

#### Results

JUJSTK medicines suppressed the activities of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  mRNA and IL-17+CD4+ Th17 cells and it increased the activities of IL-10 mRNA in B cells. The level of CD4+/IFN- $\gamma$ + in T cells were increased by JUJSTK.

#### Conclusions

JUJSTK on atopic dermatitis might be incredibly effective to the atopic dermatitis treatment.

**Key words** : Atopic dermatitis, JaUmJeSeupTangKaKam, NC/Nga mouse

## I. 緒 論

아토피 피부염은 영아에서 가장 흔한 알레르기성 질환으로 재발이 잦고 만성으로 경과하는 염증성 질환이며 심한 소양감을 유발하여 이차적으로 습진이 형성되는 질환으로<sup>1)</sup> 유전적 소인과 환경적인 요소 등 복합적인 원인에 의해 발생한다<sup>2)</sup>.

서양의학에서는 아토피 피부염의 원인을 T 림프구의 면역학적 이상이나 백혈구의 비면역학적 이상으로 보고 있으나 근본적인 원인은 밝혀지지 않고 있으며<sup>3)</sup>, 최근 연구에서는 Th1, Th2 세포와 함께 Th17 세포가 대표적인 cytokine인 IL-17과 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-22를 발현함으로써 아토피 피부염, 건선, 관절염과 같은 다양한 자가면역질환에 영향을 끼치고 천식에서도 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다. 이 중 IL-17이 알러지, 면역반응을 야기하고 유지하는데 중요한 요인이라는 것이 밝혀지면서 Th17 세포의 생산과 기능 조절의 균형이 깨지면 아토피 피부염이 발생한다고 하였다<sup>4)</sup>.

아토피 피부염은 한의학적으로 乳癬, 奶癬, 胎癬, 胎斂瘡, 濕疹 등의 범주에 속하며<sup>5)</sup> 원인으로서는 風熱, 血熱, 血虛, 脾胃濕熱 등으로 보고 淸熱, 解毒, 除濕, 祛風, 養血 등의 치법을 주로 사용한다<sup>6-8)</sup>.

滋陰除濕湯加減은 《皮膚病中醫診療學》<sup>9)</sup>에 수록되었으며 血虛風燥로 인한 피부질환에 사용될 목적으로 作方된 처방으로 아토피 피부염을 포함한 습진 및 소양증에 응용하고 있으나 그 효과에 대한 실험적 연구는 아직 접하지 못하였다.

이러한 배경에서 본 연구는 滋陰除濕湯加減(JaUmJeSeupTangKaKam, 이하 JUJSTK)이 BMAC(Biostir Mite Antigen Cream) 도포로 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga 생쥐의 Th17

세포 분화억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 in vitro에서 18 주령의 NC/Nga 생쥐의 비장세포를 분리하여 비장세포에 대한 JUJSTK의 알러르기 반응을 IFN- $\gamma$ , IL-17, GATA3의 세포내 염색을 통하여 FACS로 분석하였고 Real-Time PCR을 이용하여 cytokine을 분석하여 JUJSTK 투여 후 Th17 세포의 분화억제로 아토피 피부염 치료에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재료

#### 1) 시약 및 기기

##### (1) 시약

시약은 diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, 적혈구 용혈액 (ACK lysis solution), DMEM 배양액, dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), Sulforhodamin B(SRB), 2-isopropanol, sodium dodecyl sulfate(SDS), PMA, ionomycin, FK506, antibiotics는 Sigma사 (USA) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS) 은 Hyclone사 (Logan, USA) 제품을, anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-CCR3-PE, anti-B220-PE, anti-CD8-FITC, anti-B220-FITC, anti-CD49b-FITC, anti-CD40 mAb, rmIL-4, rmIL-10, BD Cytotfix/Cytoperm plus kit, anti-CD3 mAb, anti-foxp3-PE, anti-IFN- $\gamma$ -PE, anti-CD28 mAb등은 Pharmingen사 (Torreyana, USA) 제품을, CD4+ T cell isolation kit와 B cell isolation kit는 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)제품을, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-13 ELISA kit는 BioSource사 (California, USA) 제품을, IgE, IgG1

ELISA kit는 SHIBAYAGI 사 (Shibukawa, Japan) 제품을, anti -mouse CCR3 mAb와 anti-mouse CD4 mAb는 Santa-Cruz사 (California, USA) 제품을, LSAB kit는 DAKO사 (Glostrup, Denmark) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), rotary vaccum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO2 incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, USA), deep-freezer (Sanyo, Japan), 자동혈구측정기 (MS9-5, France), Quantitative Real-Time RT-PCR (Applied Biosystems, USA), 형광유세포분석기 (Cytometry, BD, USA), ice-maker (Vision scientific Co., Korea),

homogenizer (OMNI, USA), plate shaker (Lab-Line, USA), VarioMACS (Bergisch Gladbach, Germany), FACScalibur (BD, USA) 및 ELISA leader (Molecular Devices, USA) 등을 사용하였다.

2) 동물

수컷 17 주령 SPF(Specific Pathogen Free) NC/Nga 생쥐 (15 ~ 20 g)는 C-harles River Japan (Yokohama, Japan)사에서 공급받았다. 동물은 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2 °C, 습도 55 ± 15 %, 12 시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물

(1) 滋陰除濕湯加減 조제

본 실험에 사용한 滋陰除濕湯加減의 구성은 《皮膚病中醫診療學》<sup>9)</sup>에 준하였으며 사용한 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입 정선하여 사용하였고 그 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Composition of JaUmJeSeupTangKaKam

Herb Name	Scientific Name	Amount(g)
地 骨 皮	Lycii Radicis Cortex	15
益 母 草	Leonuri Herba	15
知 母	Anemarrhenae Rhizoma	10
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	10
防 風	Ledebouriellae Radix	10
何 首 烏	Polygoni Multiflori Radix	10
甘 草	Glycyrrhizae Radix	10
熟 地 黃	Rehmanniae Radix Preparat	10
柴 胡	Bupleuri Radix	6
黃 芩	Scutellariae Radix	6
白 芍 藥	Paeoniae Radix Alba	6
當 歸	Angelicae Gigantis Radix	6
Total		114

(2) 滋陰除濕湯加減 추출물 분리

滋陰除濕湯加減 2 컵 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2 시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 滋陰除濕湯加減 추출물 23.8 g을 냉동 보관 (-84 °C)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포독성 측정

(1) Human Fibroblast cells(hFCs) 배양

사람피부조직을 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 (penicillin 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)}을 넣고 37 °C CO2 배양기에서 2 시간 동안 배양하였고 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수로 약 2 회 1,500 rpm에서 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 측정은 SRB assay법(10)을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. hFCs 세포는 37 °C, 5 % CO2 배양기에서 1 시간 배양한 후 JUJSTK 추출물(최종 농도 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml)을 48 시간 동안 처리하였고 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액으로 2 회 세척하였다. 96 well

plate의 각 well에 50 % TCA (trichloroacetic acid)를 50 µl를 가하고 1 시간 동안 4 °C에 방치한 후 증류수로 5 회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB (0.4 %/1 % acetic acid) 용액을 100 µl/well로 가하고 실온에서 30 분간 염색하였고 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 LEADER 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) In vitro

(1) Spontaneous dermatitis in NC/Nga mouse

Conventional한 상태에서 사육한 18 주령의 NC/Nga 생쥐의 눈에서 capillary 관을 이용하여 100 µl의 혈액을 채혈하여 이 중 IgE 함량이 50 µg/ml 이상이고 피부에 발진이 있는 NC/Nga 생쥐를 선택하였다(이를 atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse라 하였다).

(2) Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장에서 T 세포와 B 세포의 분리 및 배양

NC/Nga 생쥐의 비장을 적출한 후, 100 mesh에서 분쇄하여 비장세포를 얻어 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. 그리고 비장세포를 2 %의 FBS가 함유된 PBS (PBS/FBS)에 1 × 10<sup>8</sup>/ml로 현탁시키고 normal rat serum을 5 % 되게 첨가하여 4 °C에서 15 분간 blocking한 후, T 세포 분리는 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 분리는 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 PBS/FBS로 세척하여  $1 \times 10^8/\text{ml}$ 로 현탁 하였고 20  $\mu\text{l}$ 의 Anti-Biotin MicroBeads를 가하여 다시 4 °C에서 15 분간 반응시켰다. 이 세포를 Magnetic column (CS column, Milteny Biotech)을 PBS로 세척하여 준비해 둔 Vario MACS (Milteny Biotech)에 장치하고, magnetic bead가 표지된 세포를 통과시키고 PBS로 column을 충분히 세척한 다음 column을 통과한 부유액을 원심분리하여 lineage 음성인 T 세포와 B 세포를 각각 수집하였다.

(3) Quantitative Real-Time PCR in cultured B cells

① 배양된 비장 B 세포에서 RNA 분리

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장에서 분리한 B 세포를 24 well plate에  $1 \times 10^6$  세포/well로 분주하고 JUJSTK 추출물 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 처리하고 1 시간 후 anti-CD40 mAb (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 rmIL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 500 U/ml)를 동시배양하였고 rmIL-10 (recombinant mouse interleukin-10, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 양성 대조군으로 사용하였다. JUJSTK 추출물과 anti-CD40 mAb와 rmIL-4를 6 시간 동안 동시배양하여 배양 종료 후 배양 상층액을 제거한 후 RNAzolB 500  $\mu\text{l}$ 를 넣고 용해될 때까지 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합한 후 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200  $\mu\text{l}$ 의 상층액을 회수하여 2-propanol 200  $\mu\text{l}$ 와 동량혼합 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 diethylpyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20  $\mu\text{l}$ 의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

② RT-PCR

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 2  $\mu\text{g}$ 을 DNase I (10 U/ $\mu\text{l}$ ) 2 U/tube를 37 °C heating block에서 30 분간 반응시킨 후 75 °C에서 10 분 동안 변성시키고 이에 2.5  $\mu\text{l}$  10 mM dNTPs mix, 1  $\mu\text{l}$  random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25  $\mu\text{l}$ ), RNA inhibitor로서 1  $\mu\text{l}$  RNase inhibitor (20 U/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  100 mM DTT, 4.5  $\mu\text{l}$  5 × RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ )를 가한 후 1  $\mu\text{l}$ 의 M-MLV RT (200 U/ $\mu\text{l}$ )를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 이 20  $\mu\text{l}$ 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 초간 원심침강 시키고, 37 °C heating block에서 60 분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음 95 °C에서 5 분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

③ Quantitative Real Time RT-PCR

Quantitative Real Time PCR은 7500 Real-Time PCR system (Biosystems, U.S.A.)를 이용하여 수행하였다. Mouse Olionucleotid의 염기 배열은 다음과 같다 (Table 4).

Cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard를 GAPDH를 사용하였으며 primer의 최종농도가 200 nM이 되도록 반응시켰다. Quantitative Real Time PCR의 조건으로 pre-denaturation은 2 min at 50 °C, 10 min at 94 °C, 40 cycles을 0.15 min at 95 °C, 1 min at 60

Table 4. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
GAPDH	Forward	5'-TGAAGCAGGCATCTGAGGG-3'
	Reverse	5'-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG-3'
IL-1 $\beta$	Forward	5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG3'
	Reverse	5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'
IL-6	Forward	5'-CCCATGAAGACCTTCACCTC-3'
	Reverse	5'-ACTCTCGGCCTACATTGGTG-3'
TNF- $\alpha$	Forward	5'-TGGGAGGAAAGGGGTCTAAG-3'
	Reverse	5'-ACCTACGACGTGGGCTACAG-3'
IL-10	Forward	5'-AAGCAGCCTTGCAGAAAAGA-3'
	Reverse	5'-TGGGAAGTGGGTGCAGTTAT-3'
TGF- $\beta$	Forward	5'-TGGAGCAACATGTGGAACCTC-3'
	Reverse	5'-CTGCCGTACAACCTCCAGTGA-3'

℃에서 수행하였다. JUJSTK 투여군과 대조군은 internal standard로 GAPDH를 사용하였으며 target group의 Quantitative PCR은

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

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

$$y = \text{yield}$$

$$n = \text{number of cycles}$$

$$e = \text{efficiency}$$

로 계산하여 RQ(relative quantitative)를 측정하였다.

#### ④ IFN- $\gamma$ 와 IL-17+ Th 세포의 intracellular staining 분석

IFN- $\gamma$ 의 세포내 측정을 위하여 18 주령의 NC/Nga 생쥐에서 분리한 CD4+ T 세포를 미리  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Ab (1  $\mu$ g/ml)가 coating된 24 well plate에 분주 (Control 군)한 후 cyclosporin A (CsA, 2  $\mu$ g/ml) (Positive Control군)과 JUJSTK 추출물 (100  $\mu$ g/ml과 1  $\mu$ g/ml, 실험군, JUJSTK)을 가하여 48 시간 동안 동시배양 하였다.

IL-17의 세포내 측정을 위하여 18 주령의 NC/Nga 생쥐에서 분리한 CD4+ T 세포를 미리  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Ab (1  $\mu$ g/ml)가 coating된 24

well plate에 분주한 후 rmIL-6 (20 ng/ml)와 TGF- $\beta$  (2 ng/ml), JUJSTK 추출물 100  $\mu$ g/ml을 4 일 동안 배양하였다. 실험군은 아무처리도 하지 않은 Normal군 (Only CD4+ T cell), Negative control군 (rmIL-6와 TGF- $\beta$ 만 처리), Control군 ( $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Ab coating 처리 후 rmIL-6와 TGF- $\beta$ 를 처리), JUJSTK군 ( $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Ab coating 처리 후 rmIL-6와 TGF- $\beta$ 를 처리하여 JUJSTK extract를 1  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml로 각각 처리)으로 나누어 실험하였다.

배양종료 4 시간 전에 GolgiStop (1  $\mu$ g/ml), PMA (30 ng/ml, Sigma-Aldrich), ionomycin (500 ng/ml, Sigma-Aldrich)을 처리하고, 실험 종료 후 BD Cytotfix/Cytoperm Plus Kit (with BD GolgiPlug, 555028)와 Mouse IL-17+CD4+ Th cell Flow Cytometry Kit (from BioLegend)를 이용하여 각각 세포내 염색을 통하여 CD4+ /IFN- $\gamma$  + 세포와 IL-17+CD4+ Th17 세포의 형광염색을 실시하였다. 반응 후 3 회 이상 인산완충생리식염수로 세척한 후 유세포 형광분석기로 분석하였다. 분석 프로그램은 CellQuest 프로그램으로 활성세포(%) 비율을 산출하였다.

⑤ GATA3+ T 세포의 intracellular staining 분석

18 주령의 NC/Nga 생쥐에서 분리한 비장세포를 미리  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Ab (1  $\mu$ g/ml)가 coating된 24 well plate에 분주한 후 양성대조군인 CsA (2  $\mu$ g/ml)와 JUJSTK 추출물 (100  $\mu$ g/ml)을 가하고 rmIL-4 (100 ng/ml)와 TGF- $\beta$  (10 ng/ml)를 처리한 후 4 일간 동시배양 하였다. 실험군은 아무처리도 하지 않은 Normal군 (Only CD4+ T cell), Control군 ( $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Ab coating 처리 후 rmIL-6와 TGF- $\beta$ 를 처리), CsA군 ( $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Ab coating 처리 후 rmIL-6와 TGF- $\beta$ 를 처리하여 CsA 2  $\mu$ g/ml 처리), JUJSTK군 ( $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Ab coating 처리 후 rmIL-6와 TGF- $\beta$ 를 처리하여 JUJSTK extract를 100  $\mu$ g/ml로 처리)으로 나누어 실험 하였다.

배양종료 4 시간 전에 GolgiStop (1  $\mu$ g/ml), PMA (30 ng/ml, Sigma-Aldrich), 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+GATA3+세포의 형광염색을 실시하였다. 반응 후 3 회 이상 인산완충생리식염수로 세척한 후 유세포 형광분석기로 분석하였고 CellQuest 프로그램으로 활성세포(%) 비율을 산출하였다.

3. 통계처리

실험으로부터 얻은 결과는 mean $\pm$ standard error로 기록하였고 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하였으며<sup>11)</sup> P<0.05인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 成 績

1. 세포독성

JUJSTK 추출물의 세포독성을 측정한 결과 1 mg/ml, 500  $\mu$ g/ml, 250  $\mu$ g/ml에서 세포독성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 1).

2. In vitro

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

(1) IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현 분석

IL-1 $\beta$ 는 CT군(Control군)의 RQ값이 1일 때 only B cells군 (Normal군)은 0.795였고 PC군 (Positive control군)은 0.231이였으며 JUJSTK 처리군(JUJSTK군)은 0.975였고, IL-6는 CT군의 RQ값이 1일 때 only B cells군은 0.109, PC군은 0.546, JUJSTK 처리군은 0.814였다. TNF- $\alpha$  mRNA는 CT군의 RQ값이 1 일 때 only B cells군은 0.491, PC군은 0.375, JUJSTK 처리군은 0.821로 나타났다(Fig. 2).

(2) IL-10과 TGF- $\beta$  mRNA 유전자발현 분석

IL-10은 CT군의 RQ값이 1 일 때 only B cells군 (Normal군)은 0.593이였고 PC군은 0.815로 나타났으며 JUJSTK 투여군은 1.695로 증가하였고, TGF- $\beta$  mRNA는 only B cells군에서 0.816, PC군은 0.473, JUJSTK 처리군은 0.783으로 모두 억제되었다(Fig. 3).

(3) CD4+/IFN- $\gamma$ + intracellular staining분석

CD4+/IFN- $\gamma$ +는 Only CD4+ T cell군 (Normal군)에서 2.9 %였고 Control군은 10.8 %였으며 CsA군은 6.8 %였고 JUJSTK 처리군은 16.5 %로 Control군에 비하여 증가하였다(Fig. 4).

(4) IL-17+CD4+ Th17 cells intracellular staining 분석

IL-17+CD4+ Th17은 Only CD4+ T cell군

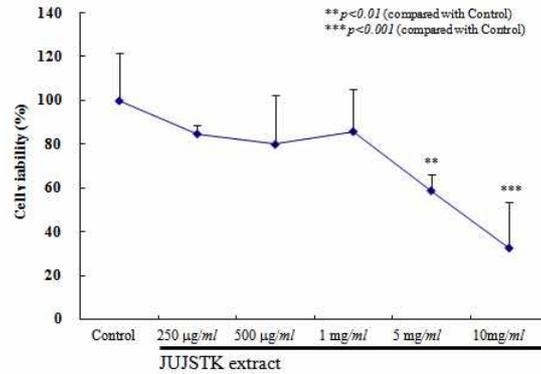


Fig. 1. Cytotoxicity effects of JUJSTK extract on human fibroblast cells(hFCs).

HFCs were pretreated with various concentration JUJSTK extract. The results are expressed the mean± S.E (N=6).

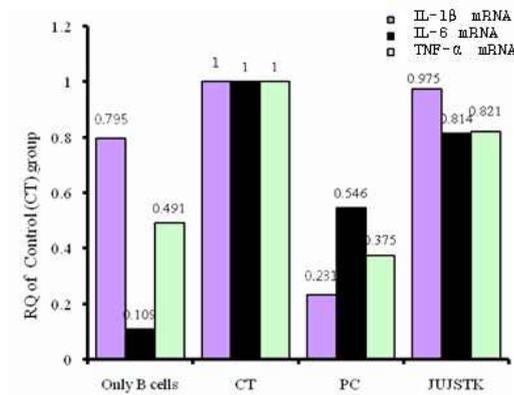


Fig. 2. Effects of JUJSTK extract on IL-1β, IL-6 and TNF-α mRNA expression by JUJSTK extract plus anti-CD40mAb/rmIL-4-stimulated murine NC/Nga B cells.

Isolated B cells from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse were either stimulated with anti-CD40mAb (500 µg/ml)/rmIL-4 (500 u/ml) or treated with JUJSTK extract (100 µg/ml). B cells were not treated (normal; only B cells), co-cultured with anti-CD40mAb/rmIL-4 (CT), anti-CD40mAb/rmIL-4 plus rmIL-10 (PC), and anti-CD40mAb/rmIL-4 plus JUJSTK extract (JUJSTK) for 4hrs. 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 7500 Real-Time PCR system.

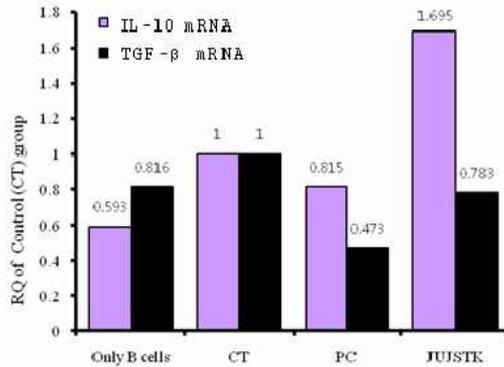


Fig. 3. Effects of JUJSTK extract on IL-10, and TGF-β mRNA expression by JUJSTK extract plus anti-CD40mAb/rmIL-4-stimulated murine splenocytes.

Isolated B cells from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse were either stimulated with anti-CD40mAb (500 μg/ml)/rmIL-4 (500 u/ml) or treated with JUJSTK extract. B cells were not treated (normal; only B cells), co-cultured with anti-CD40mAb/rmIL-4 (CT), anti-CD40/rmIL-4 plus rmIL-10 (500 u/ml) (PC), and anti-CD40mAb/rmIL-4 plus JUJSTK extract (100 μg/ml) (JUJSTK) for 4hrs. 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 7500 Real-Time PCR system.

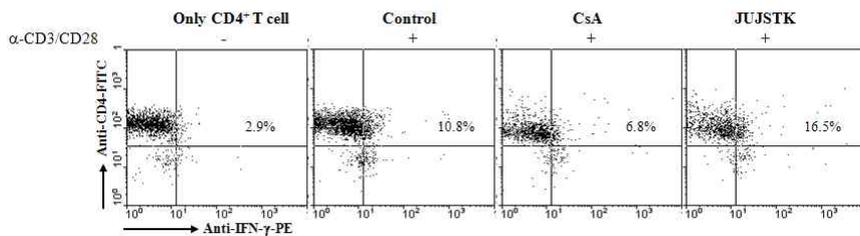


Fig. 4. Effects of JUJSTK extract on IFN-γ+ intracellular staining analysis by α-CD3/α-CD28-stimulated murine CD4+ T cells.

Isolated CD4+ T cells from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse were either stimulated with α-CD3/α-CD28 (1 μg/ml) or treated with JUJSTK extract (100 μg/ml). CD4+ T cell were not treated (normal, only CD4+ T cell), co-cultured with α-CD3/α-CD28 (Control), and with α-CD3/α-CD28 plus CsA, and with α-CD3/α-CD28 plus JUJSTK extract (JUJSTK) for 4 days. After a 24-hours stimulation, 0.6 μl/ml monensin (GolgiStop; BD Pharmingen) was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled anti-CD4. After fixation in Cytotfix/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).

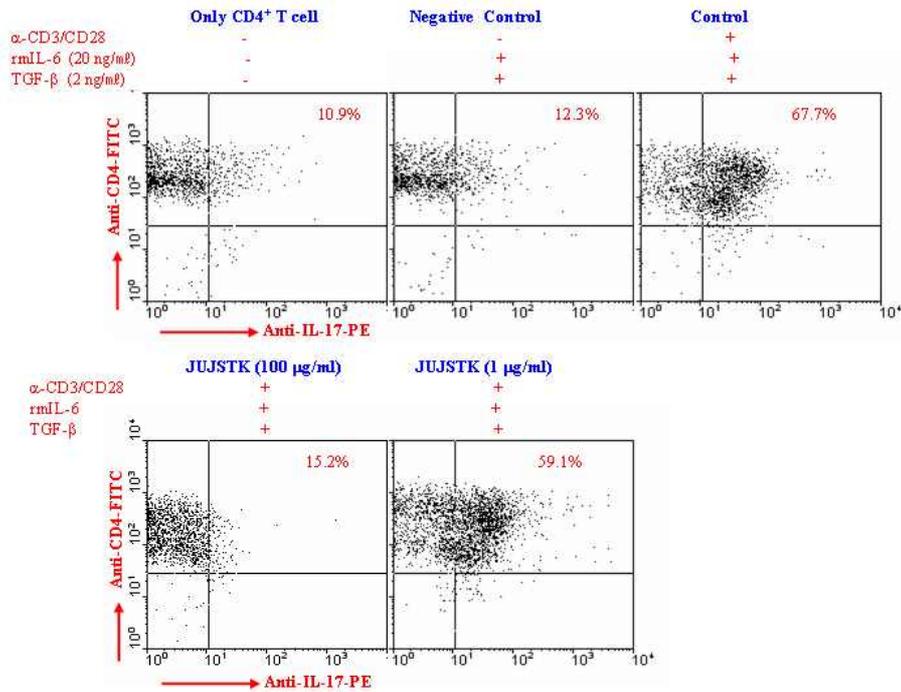


Fig. 5. Effects of JUJSTK extract on IL-17+CD4+ Th17 cells intracellular staining analysis by  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28-stimulated murine NC/Nga CD4+ T cells.

Isolated CD4+ T cell from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse were either stimulated with  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 or treated with JUJSTK extract. CD4+ T cells were not treated (normal, only CD4+ T cell), co-cultured with rmIL-6 (20 ng/ml) plus TGF- $\beta$  (2 ng/ml) (Negative control), and with  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 (1  $\mu$ g/ml) plus rmIL-6 (20 ng/ml) plus TGF- $\beta$  (2 ng/ml) (Control), and with  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 (1  $\mu$ g/ml) plus rmIL-6 (20 ng/ml) plus TGF- $\beta$  (2 ng/ml) plus JUJSTK extract (1  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml) (JUJSTK) for 4 days. After a 4 days stimulation, 0.6  $\mu$ l/ml monensin (GolgiStop; BD Pharmingen) was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled anti-CD4. After fixation in Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen), cells were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer (BD Pharmingen), stained with PE-labeled anti-IL-17 mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

(Normal군)에서 10.9 %였고  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Ab coating 처리를 하지 않고 rmIL-6와 TGF- $\beta$ 만 처리한 Negative Control군은 12.3 %로 Th17 세포의 분화가 유도되지 않았고 Control군의 세포는 67.7 %로 Th17 세포의 분화가 유도되었다. 100  $\mu$ g/ml JUJSTK 처리군의 세포는 15.23 %로 Control군에 비하여 감소를 나타내었으며, 1  $\mu$ g/ml JUJSTK 처리군의 세포는 59.1 %로 Control군에 비하여 큰 차이가 없었다(Fig. 5).

(5) GATA3+CD4+ Th cells intracellular staining 분석

GATA3+CD4+ Th 세포는 Only CD4+ T cell군 (Normal군)에서 0.7 %였고 Control군은 10.5 %로 증가되었다. CsA군은 1.3%로 Control군에 비하여 큰 감소를 나타내었으며 JUJSTK 처리군은 2.9 %로 Control군에 비하여 현저한 감소를 나타내었다(Fig. 6).

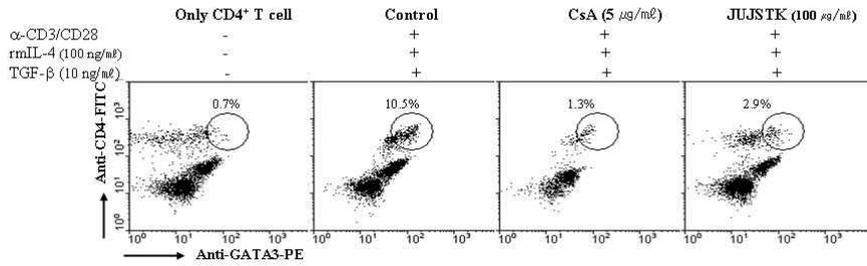


Fig. 6. Effects of JUJSTK extract on GATA3+CD4+ Th cells intracellular staining analysis by  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28-stimulated murine NC/Nga CD4+ T cell.

Isolated CD4+ T cells from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse were either stimulated with  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 or treated with JUJSTK extract. CD4+ T cell were not treated (normal, only CD4+ T cell), co-cultured with  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 (1  $\mu$ g/ml) plus rmIL-4 (100 ng/ml) plus TGF- $\beta$  (10 ng/ml) (Control), and with  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 (1  $\mu$ g/ml) plus rmIL-6 (100 ng/ml) plus TGF- $\beta$  (10 ng/ml) plus CsA (2  $\mu$ g/ml), and with  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 (1  $\mu$ g/ml) plus rmIL-4 (100 ng/ml) plus TGF- $\beta$  (10 ng/ml) plus JUJSTK extract (100  $\mu$ g/ml) (JUJSTK) for 4 days. After a 4 days stimulation, 0.6  $\mu$ l/ml monensin (GolgiStop; BD Pharmingen) was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled anti-CD4. After fixation in Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen), cells were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer (BD Pharmingen), stained with PE-labeled anti-IL-17 mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

#### IV. 考 察

아토피 피부염은 만성적으로 재발하는 흔한 습진성 병변으로 가족력 및 특징적인 피부 분포와 소양감을 특징으로 하며 감염이나 알레르겐, 약제 등 자극원에 대한 면역학적인 과반응이 기본적인 병태 생리로 아토피 알레르기를 가진 사람에서 나타나는 대표적인 피부 질환이다<sup>12)</sup>. 아토피 피부염의 정확한 유전 양식은 아직 확실치 않으나 환자 가족의 약 50% 이상에서 아토피 피부염, 천식, 알레르기성 피부염이 발생하는 것으로 보아 유전적인 요인이 있을 것으로 보이며 환자가 일상의 생활에서 흔히 접하는 집 먼지, 진드기, 동물의 털, 꽃가루, 세균이나 바이러스나 진균류 등의 감염, 정서적 요인 등의 다양한 환경적 요인도 아토피 피부염의 발생과 관련이 있을 수 있다.

유아기 아토피 피부염의 경우 과거에는 대

략 4 세 이후 자연 치유가 되는 경우가 많았으나 최근에는 영유아의 약 50% 정도가 만성화되어 성인형 아토피 피부염으로 나타나고 있어 조기 진단 및 치료가 중요한 실정이다<sup>13)</sup>.

알레르기 반응이란 알레르겐과 같은 비자기(non-self) 물질에 대한 병적인 과민반응이라고 할 수 있으며 이는 Th2 세포 반응으로 대표되는데 IFN- $\gamma$ 와 IL-12는 Th1 세포 분화에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 오랫동안 알려져 있으며 IFN- $\gamma$ 는 Th1 분화를 안정화하고 완성시키는데 중요한 역할을 하고<sup>14)</sup> IL-12는 APCs에 의해 주로 생산되고 전사 인자인 STAT4를 활성화시켜 IFN- $\gamma$ 의 생산을 자극한다. Th1 분화에 필수적인 다른 요소는 전사인자인 T-bet이며 최근에는 IRF1이 Th1 분화에 필수적인 또 다른 전사인자라고 보고되고 있다<sup>15)</sup>. IRF1은 선천성과 적응성 면역 반응들에 관여된 IRF 전사인자 종류에서 처음으로 동정된 요소이며<sup>16)</sup> IRF1의 존

재 없이는 IL-12Rb1의 발현이 낮아 IL-12의 신호전달을 충분히 활성화시킬 수 없다. 또한 IRF1이 유전적으로 제거된 생쥐의 경우 Th17 세포의 분화는 정상적으로 진행되는 것을 관찰했고 다른 cytokine IL-23이 IL-12Rb1/IL-23R heterodimer 수용체를 통해 신호를 전달하고 Th17 세포의 분화를 강화시킨다. 유전자 발현이 낮다 할지라도 IL-12Rb1은 IL-23과 결합하여 IL-23을 통한 정상적인 신호전달이 가능하기 때문에 Th17의 발달은 IRF1 없이도 일어날 수 있다고 설명하고 있으며 다른 가능성은 IL-12가 IL-12Rb1/IL-12Rb2의 신호 전달을 통해 Th17의 분화를 억제하는 경우이다<sup>17)</sup>.

Th17은 orphan nuclear receptor 종류인 ROR $\gamma$ t,  $\alpha$ t라는 전사인자가 활성화되면서 IL-23R가 발현하게 되면 다양한 pathogen들의 자극에 의한 면역반응으로 분비된 IL-23과 결합한 후 세포내부의 신호전달경로가 활성화되어 IL-17A/F cytokine을 분비함으로써 분화가 이루어진다<sup>18)</sup>. 이 때 TGF- $\beta$ 와 IL-6가 신호전달의 중심에서 IL-17의 분비를 조절한다. 아토피동물 모델에서 IL-17은 eosinophil과 neutrophil의 피부발진 부위로의 infiltration을 증가시키고 또한 Th17이 분비하는 CXCL1, 2, 8 등에 의해서 neutrophil들이 ALN를 통하여 피부 epidermis로 이동하게 하여 피부에서 여러 acute inflammation을 일으키게 되는 원인을 제공한다<sup>19)</sup>.

아토피 피부염은 한의학적으로는 乳癬, 胎熱, 苔癬, 奶癬, 胎敏瘡, 濕疹 등의 범위에 속하는 것<sup>5)</sup>으로 선천적으로 稟賦不足하여 內로는 胎火濕熱이 蘊積하고 外로는 風熱之邪가 侵襲하여 肌膚에 蘊積한 所致이거나 또는 불규칙한 수유습관, 소화불량, 음식물에 대한 과민반응, 의복마찰, 한냉 등의 자극으로 인하여 유발된다<sup>3,20)</sup>고 하였다. 《聖濟總錄》<sup>21)</sup>에서는 “皮膚頑厚則變諸癬或斜或圓漸漸長大得寒則

稍減暖則痒悶搔之則黃汁出”, “又或在面上皮如甲錯乾燥爲之奶”, 《巢氏諸病源候論》<sup>22)</sup>에서는 “小兒面上癬皮如甲錯起乾燥, 謂之乳癬.”이라 하였다.

한의학에서도 아토피 피부염 연구가 활발하게 이루어지고 있으며<sup>23-32)</sup> 최근 임상에서의 연구로는 黃蓮解毒湯의 투여로 아토피 피부질환이 유발된 NC/Nga 생쥐의 혈액 내 IgE 농도감소, 경표피 수분증발량 및 피부홍반의 감소, 피부표피각화증의 완화효과가 있었고<sup>33)</sup> 천연물 추출물중 상항버섯의 한 품종인 목질진흠버섯(Phellinus linteus)의 다당류 성분이 T세포, B세포, 자연 살해세포(natural killer cell) 및 대식세포(macrophage)에 작용하여 항피부염 및 면역증강효과를 보였으며<sup>34)</sup> 염증성 cytokine 및 혈청중의 IgE의 생성을 억제하였다는 연구 결과가 있었다<sup>35)</sup>.

滋陰除濕湯加減은 《皮膚病中醫診療學》<sup>12)</sup>에 수록된 처방으로 滋陰除濕, 潤燥止痒하는 효능이 있어 血燥皮疹을 치료한다고 하였다. 本方은 益氣시키고 補血潤燥하는 甘草, 當歸, 白芍藥, 熟地黃, 何首烏에 活血利水 작용이 있는 益母草, 虛熱을 退하고 瀉火시키는 知母, 黃芩, 地骨皮, 風濕을 淸하고 風熱을 發散시키는 防風과 柴胡, 利水滲濕, 泄熱작용이 있는 澤瀉로 조성되어 血燥濕熱하여 피부가 건조하고 가려우며 습진이 형성되고 태선화와 각질, 피부 비후, 결찰 후에 소량의 출혈이 발생하거나 血痂가 생기며 특히 야간에 증상이 심해지는 것을 치료할 목적으로 사용되는 처방이다<sup>36)</sup>.

이러한 배경에서 본 연구는 JUJSTK (JaUmJeSeupTangKaKam) 투여가 Th17 세포의 분화를 억제하여 아토피 질환을 치료하는데 효과적인 효능을 나타내는지 알아보려고 하였다.

실험의 결과를 살펴보면, in vitro 실험에서 JUJSTK 추출물의 세포독성을 측정된 결과 1

mg/ml 농도 이하에서 세포독성이 나타나지 않았으며(Fig. 1) NC/Nga 생쥐의 비장세포를 anti-CD40/rmIL-4로 자극하여 활성화시킨 후 JUJSTK 추출물에 의하여 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 의 유전자 발현억제를 관찰한 결과 대조군의 RQ값에 비하여 감소하여(Fig. 2, 3) JUJSTK 추출물이 알레르기 반응에 반드시 수반되는 B 세포의 활성화, 분화, IgE 생성을 선택적으로 억제하여 초기 알레르기 반응을 효과적으로 억제하는 것으로 보였다. 또한 CD4+ T 세포를 VarioMACS를 사용하여 순수 분리하여 미리 coating 해놓은  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 (1  $\mu$ g/ml)로 자극하여 활성화시킨 후 CD4+ /IFN- $\gamma$ + intracellular staining 분석한 결과 JUJSTK 처리군이 대조군에 비하여 현저히 증가한 결과를 보여(Fig. 4) 알레르기 반응에서 우위한 Th2 세포에서 Th1 세포로 Shift시킬 수 있을 것으로 보였고 IL-17+CD4+ Th17, GATA3+CD4+ intracellular staining 분석 결과 대조군에 비하여 JUJSTK 처리군이 대조군에 비하여 현저하게 감소를 나타내었다(Fig. 5, 6). 이상의 실험 결과는 JUJSTK 추출물이 Th17 세포의 분화를 억제하여 면역세포의 알레르기 반응으로의 분화를 억제하고 관련 유전자 발현을 선택적으로 조절하여 항알레르기의 효과가 있음을 나타내는 것으로 보인다.

이상의 결과로 JUJSTK은 Th17 세포의 분화를 억제하여 아토피 피부염의 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단되며 향후 이에 대한 실험적 보완 및 후속 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

BMAC(Biostir Mite Antigen Cream)로 아토피

피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에 滋陰除濕湯加減이 Th 17 세포의 분화억제 및 피부염 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. JUJSTK는 hFCs에서 1 mg/ml 이하에서 세포 독성이 나타나지 않았다.
2. JUJSTK는 NC/Nga 생쥐의 B세포에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  mRNA 유전자 발현은 억제하였고 IL-10 mRNA 유전자 발현은 증가시켰다.
3. JUJSTK는 CD4+ T 세포에서 IFN- $\gamma$ +CD4+ T 세포 수를 대조군에 비하여 증가시켰다.
4. JUJSTK는 CD4+ T 세포에서 Th17+CD4+ T 세포로의 분화를 억제하였다.
5. JUJSTK는 GATA3+CD4+ T 총세포수를 대조군에 비하여 감소시켰다.

## VI. 參考文獻

1. 김덕근 외 7명. 동의소아과학. 서울:정담. 2002:660.
2. 안성구. 개원의를 위한 아토피 피부염. 서울:퍼시픽 출판사. 2007:25.
3. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연. 아토피 피부염의 동서의학적 문헌 고찰. 대한한방소아과학회지. 2002;15(1):226-52.
4. 김영호, 차기원. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. The Journal of Experimental Medicine. 2006;204:161-70.
5. 공남미, 지선영. 아토피 피부염의 양·한방적 고찰. 대한외관과학회지. 1999;12(1); 241-53.
6. 馬紹堯. 現代中醫皮膚性病學. 上海:上海中醫藥大學出版社. 2001:153-60.
7. 金起鳳, 周德瑛 主編. 中醫皮膚病學. 北京:

- 中國醫藥科技出版社. 1999:193-8.
8. 馬紹堯, 趙尙華 主編. 現代中醫皮膚性病診療大全. 山西:山西科學技術出版社. 1999: 475-93.
  9. 徐宜厚 王保方 張寒英 編著. 皮膚病中醫診療學. 北京:人民衛生出版社. 1997: 255.
  10. Griess S. S. E. A. Jaffe, R. Levi and R. G. Kilbourn. Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide sythease which of tetrahydrobiopterin-dependent calmodium-independent of activated macro-phages. *Biochem: Biophys. Res. Commun.* 1991;178:823-9.
  11. Danniell W. W.. A foundation for analysis in the health science, *Biostics* 1983;136-46.
  12. Hanifin JM. Atopic dermatitis, broadening the perspective. *J Am Acad Dermatol.* 2004; 51(Suppl 1):23-4.
  13. 김진일, 정규만. 아토피 피부염에 대한 동서의학적 고찰. *대한한방소아과학회지.* 1994;8(1):75-80.
  14. Susanne J. Szabol, Brandon M. Sullivan, Stanford L. Peng and Laurie H. Glimcher. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol,* 2003;21:713-58.
  15. Derya Unutmaz and Jan Vilcek. IRF1. a deus ex machina in TH1 differentiation. *Nat. Immunol.* 2008;9:9-10.
  16. Tadatsugu Taniguchi, Kouetsu Ogasawara, Akinori Takaoka, and Nobuyuki Tanaka. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 2001;19:623-55.
  17. Shin-ichi Kano<sup>1</sup>, Kojiro Sato, Yasuyuki Morishita, Sabine Vollstedt, Sunhwa Kim, Keith Bishop, Kenya Honda, Masato Kubo, and Tadatsugu Taniguchi. The contribution of transcription factor IRF1 to the interferon-interleukin 12 signaling axis and TH1 versus TH-17 differentiation of CD4+ T cells. *Nature Immunology.* 2008;9:34-41.
  18. Liang Zhou, Jared E. Lopes, Mark M. W. Chong, Ivaylo I. Ivanov, Roy Min, Gabriel D. Victora, Yuelei Shen, Jianguang Du, Yuri P. Rubtsov, Alexander Y. Rudensky, Steven F. Ziegler & Dan R. Littman. TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t function. *NATURE.* 2008;453:236-41.
  19. Antonella Di Cesare, Paola Di Meglio, and Frank O. Nestle. A Role for Th17 Cells in the Immunopathogenesis of Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology.* 2008; 128:2569-71.
  20. 김미정, 이승연. 소아 아토피 피부염에 대한 문헌적 고찰. *대한한방소아과학회지.* 2002;14(2):169-83.
  21. 曹孝忠. 聖濟總錄. 臺北:新文豐出版社. 1978:1439-40.
  22. 巢元方 編著. 巢氏諸病源候論. 서울:大星文化社. 1992:251-3.
  23. 신동길, 김우연, 이진용, 김덕곤. 仙方敗毒散이 아토피 피부염 환자 단핵세포의 Cytokine 분비능에 미치는 영향. *대한한방 알레르기 및 면역학회 자료집.* 2003;1 :93-110.
  24. 한재경, 김윤희. 加味當歸飲子가 아토피 동물 모델에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지.* 2005;19(1):35-52.
  25. 조백진, 이진용, 김덕곤. 內消和中湯加味方の 아토피 피부염 치료에 대한임상고찰. *대한한방소아과학회지.* 2005;19(1):131-41.

26. 유한정, 이진용, 김덕곤. 內消和中湯加味方이 아토피 피부염 환아의 혈중 cytokine 분비에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2006;20(1):15-29.
27. 박지수, 김윤희, 강탁립. 連翹散이 아토피 동물 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(1):58-64.
28. 김홍배, 김원일, 이승연. 升麻葛根湯의 항 히스타민 효과 및 IL-4와 GM-CSF 발현에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2006;20(2):69-83.
29. 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.
30. 박성의, 진미림, 구영신, 김동희. 脾虛蘊濕方이 아토피 피부염 유발 NC/Nga 생쥐의 혈액 내 면역관련인자에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(4):849-55.
31. 김윤희, 한재경, 김윤희. 加味羌活散이 집먼지 진드기 추출물로 유도된 NC/Nga mouse의 아토피 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2008;22(1):69-94.
32. 나동규, 한재경, 김윤희. 除濕胃答湯加減이 집먼지 진드기 추출물로 유도된 NC/Nga mouse의 아토피 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2008;22(2):81-114.
33. Bo Ae Kim, Mi So Kim, Bo Mi Kang, Seon Hui Byeon, Il Hyang Park, Ji Ha Park, Ji Wook Jung, Eun Mi Ahn, Hyeon A Jung, Jung Hee Jang, Won Bae, Ha Young Lee, Phil Nye Choi, Chan Ik Park. Inhibitory Studies of Hwangryunhaedok-tang on Development of Atopic Dermatitis in NC/Nga mouse. Kor. J. Herbology. 2008;23(2):59-65.
34. Inagaki N, Shibata T, Itoh T, Suzuki T, Tanaka H, Nakamura T, et al. Inhibition of IgE-dependent mouse triphasic cutaneous reaction by a boiling water fraction separated from mycelium of *Phellinus linteus*. Evid Based Complement Alternat Med. 2005;2:369-74.
35. Lim BO, Jeon TI, Hwang SG, Moon JH, Park DK. *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice suppresses IgE production by the modulation of Th1/Th2 balance in murine mesenteric lymph node lymphocytes. Biosci Biotechnol Biochem. 2005;27:613-7.
36. 康秉秀 外. 本草學. 서울:永林社, 1991:131, 149, 162, 178, 237, 305, 422, 540, 579, 580, 583.