

아토피樣 피부염 NC/Nga 생쥐에서 消風導赤湯加味와 아토피크림, 紫雲膏 및 消風導赤湯加味の 병용투여가 피부염에 미치는 영향

한달수 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

Effects of SPDJTK (SoPungDoJeokTangKami) and Concurrent Administration of AJ (Atopy cream, Jawoongo) Plus SPDJTK on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions in NC/Nga Mouse Induced by BMAC

Han Dal Soo, 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 SPDJTK(SoPungDoJeokTangKami) and concurrent administration of AJ(Atopy cream, Jawoongo)+SPDJTK on atopic dermatitis-like skin lesions by using in NC/Nga atopic dermatitis mouse induced by BMAC-induced mice.

Methods

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

Results

Orally administrated SPDJTK with concurrent administration of SPDJTK and AJ decreased the clinical skin score, total cell number of WBC, eosinophils in blood, serum total IgE & IgG1, IL-5, IL-13, IFN- γ . Also, total cell number of ALN and dorsal skin tissue, absolute cell number of CD4+, CD8+, CD3+CD69+, CD3+CCR3+, CCR3+, CD4+CXCR5+ in ALN, absolute cell number of CD3+CCR3+, CCR3+ in DLN, granulocytes in PBMCs, activation cell number of CD3+CD69+, CCR3+, total cell number of CD3+ T cell in dorsal skin tissue were significantly decreased.

Furthermore, thickness of epidermis, infiltrated inflammatory immune cell and mast cell in dermis, amount of Eotaxin2 mRNA, CCR3 mRNA in dorsal skin tissue, gene expression of IL-5, IL-13 mRNA in ALN, CD4+ Th cell in dorsal skin tissue and CCR3+ eosinophils in ALN were all significantly decreased.

However, total number of DLN, absolute number of CD3e+ T cell and CD19+ B cell, absolute number of CD4+, number of Th cell in DLN and gene expressoin of foxp3 mRNA were significantly increased significantly.

Conclusions

Concurrent administration of SPDJTK and AJ on atopic dermatitis in NC/Nga atopic dermatitis mouse was very effective treatment for atopic dermatitis.

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

I. 緒 論

현대 사회가 발달함에 따라 전 세계적으로 아토피 피부염 유병율이 증가하고 있으며 이에 대한 사회적 관심이 증가되고 있다. 우리나라에서도 최근 알레르기 질환의 급증과 함께 아토피 피부염 환자가 증가하고 있으며^{1,2)} 이는 다양한 피부 자극 유발 물질과 공기 중의 알레르겐, 음식, 미생물, 그리고 스트레스 등 다양한 환경적 인자의 증가 때문인 것으로 보인다³⁾.

아토피 피부염의 정확한 병인은 알려져 있지 않지만, IgE의 증가와 T세포의 기능장애와 같은 면역학적 기능 이상과 함께 유전적, 환경적 요인이 중요한 역할을 하는 것으로 추측되고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 특히 최근 면역반응을 직접적으로 억제할 수 있는 CD4+CD25+ 조절 T 림프구(regulatory T cell, Treg cell)의 존재가 알려지면서 이에 대한 관심이 높아지고 있다¹¹⁾.

한의학적으로 아토피 피부염은 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 속하며⁴⁾ 風熱, 血熱, 血虛, 脾胃濕熱 등을 그 원인으로 보았으며⁵⁻⁷⁾, 치료는 그 원인에 따라 清熱利濕, 祛風止痒, 滋陰養血 등의 치료방법을 주로 사용하고¹⁵⁾, 內外兼治法이 다용되는데¹⁶⁾, 內外兼治法을 사용함으로써 유효한 치료효과를 보인 연구결과들이 보고되고 있다¹⁷⁻¹⁹⁾.

본 실험에 사용된 消風導赤湯加味(SoPung DoJeok TangKami, 이하 SPDJTK)는 疏風清熱의 효능이 있는 消風導赤湯²⁰⁾에 竹葉, 連翹를 가하여 아토피 피부염에 응용되는 처방이다²¹⁾. 아토피 크림은 항염작용과 소독작용이 있는 tea tree, lavender, chamomile-roman으로 구성된 아로마 오일과 보습작용이 있는 베이스 크림으로 만든 외용제로 아토피 피부염의 염증을 줄여 주는 역할을 하고²²⁾, 紫雲膏는 《外科正宗》²³⁾에 기재된 潤肌膏라는 膏藥에 豚脂를 加하여²⁴⁾ 皮膚를 滋潤하여 祛風止痒할 목적으로 활용되고 있다.

현재까지 아토피피부염 치료와 관련하여 수증 처방에 대한 면역학적 연구가 보고되었고²⁵⁻²⁷⁾, 최근 NC/Nga mouse에 아토피 크림, 자운고를 도포하여 아토피 피부염에 대한 면역학적 치료효과를 연구한 논문이 발표된 바 있으며²⁸⁾ 加減消毒飲과 滋陰除濕湯加減이 아토피 크림, 자운고의 병행 투여가 아토피 피부염에 미치는 영향에 대한 면역학적 연구^{29,30)}가 보고된 바 있으나 消風導赤湯加味에 대한 연구는 아직까지 접하지 못하였다.

이에 저자는 NC/Nga 생쥐에 BMAC (biostir Mite Antigen Cream)을 도포하여 아토피 피부염을 유발시킨 후 SPDJTK를 단독 투여하거나, 아토피 크림과 紫雲膏 (Atopy cream, Jawoongo, 이하 AJ) 및 SPDJTK (이하 AJ+SPDJTK)를 병용투여한 다음 아토피 피부염에 미치는 효과를 평가하기 위하여 clinical skin score, 백혈구와 혈청 IgE 및 IgG1 수준을 분석하였다. 또한 Axillary Lymph Node (이하 ALN)와 Peripheral Blood Mononuclear Cells (이하 PBMCs), 등피부조직에서 세포수, 유세포형광분석 및 염증유전자발현 분석을 하였으며 ALN과 등피부조직에서 H&E 염색을 통하여 epidermis의 두께와 toluidine blue 염색을 통하여 비만세포의 침윤정도를 관찰하였다. 그리고 ALN과 등피부조직에서 면역조직화학 염색을 통하여 ALN에 침윤된 CCR3+ 세포와 등피부조직에 분포하는 CD4+ 세포를 관찰한 결과, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 研究方法

1. 材料

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, 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- γ -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- γ , IL-5, IL-13 ELISA kit는 BioSource 사 (California, USA) 제품을, IgE, IgG1 ELISA kit는 SHIBAYAGI 사 (Shibukawa, Japan) 제품을, anti-mouse

CCR3 mAb와 anti-mouse CD4 mAb는 Santa-Cruz 사 (California, USA) 제품을, LSAB kit는 DAKO 사 (Glostrup, Denmark) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 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), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, USA), plate shaker (Lab-Line, USA), VarioMACS (Bergisch Gladbach, Germany), FACScalibur (BD, USA) 및 ELISA leader (Molecular Devices, USA) 등을 사용하였다.

2) 동물

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

3) 약물

(1) 消風導赤湯加味

본 실험에 사용한 消風導赤湯加味の 구성은 《新編中醫皮膚病學》²¹⁾에 준하였으며, 사용한 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고 그 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

(2) 아토피 크림

본 실험의 아토피 크림에 사용된 베이스 크림과 아로마 오일은 Aroma Korea. Co.; A712, 89-4, Gyeongun-dong, Jongno-gu, Seoul, Korea에서 구입하여 사용하였으며 그 배합은 다음과 같다(Table 2).

Table 1. Composition of SoPungDoJeokTangKami (SPDJTK)

Herbal Name	Scientific Name	Amount(g)
生地黃	Rehmanniae Radix Crudus	6
赤茯苓	Poria	6
金銀花	Lonicerae Flos	6
牛蒡子	Arctii Fructus	6
白鮮皮	Dictamni Radicis Cortex	6
薄荷	Menthae Herba	4
黃連	Coptidis Rhizoma	4
木通	Akebiae Caulis	4
甘草	Glycyrrhizae Radix	4
燈心	Junci Medulla	4
淡竹葉	Lophatheri Herba	4
連翹	Forsythiae Fructus	4
Total amount		58

Table 2. Composition of Atopy Cream

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

Table 3. Composition of Jawoongo

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

(3) 紫雲膏

본 실험에 사용한 紫雲膏의 구성은 《大田大學校 韓方病院 處方集》³¹⁾에 준하였으며, 사용한 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고 그 내용과 1 g 당 조성은 다음과 같다(Table 3).

(4) 消風導赤湯加味 추출물 분리

消風導赤湯加味 2 칩 분량에 증류수 2,000 mL를 가하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (rotary vacuum evaporator) 로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기(freeze dryer)를 이용하여 완전 건조한 消風導赤湯加味 추출물 23.4 g 을 냉동 보관(-84℃)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 方法

1) 피부염 유도 및 시료처리

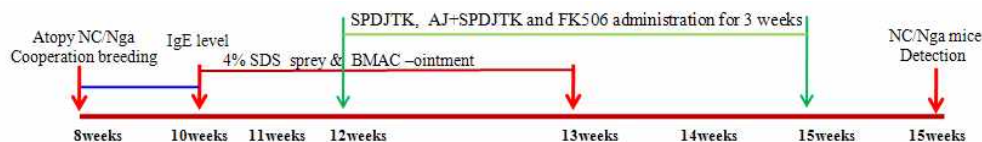
7 주령의 NC/Nga 생쥐를 1 주일 동안 적응시키고, 이미 피부염이 발생된 18 주령의 NC/Nga 생쥐와 2 주령 같은 공간에서 동시 사육하여 항원감작을 시킨 후 눈에서 capillary 관을 이용하여 100 μL의 혈액을 채혈하였다. 그 후 마취제인 chloral hydrate (10%)로 마취하고 등 쪽 목 부위를 깨끗하게 제모한 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24 시간 방치하였다. 그리고 중앙실험동물에서 제공하는 Biostir Mite antigen cream {이하 BMAC : Dermato -phagoides farinae crude extract (Biosir INC, Hyogo, Japan)}을 항원으로 제조된 것으로 진드기 항원 0.5% Tween 20이 포함된

ointment base로 제작되었다}을 1 주에 2 회 3 주간 (10 ~ 13 주령) 등과 목 부분에 고르게 도포하였고, 도포 2 시간 전에 4% SDS 용액을 분무하여 피부염이 잘 유발되도록 피부층을 파괴하여 이를 대조군으로 사용하였다 (Scheme 1). 도포 시작 2주 후 (12 주령) 등 부분에 피부염이 충분히 유발되면서 긁는 행동이 심화되면 육안평가를 실시하였다. 정상군 (NC/Nga-Wild Type, 이하 NC/Nga-WT)은 7 주령 NC/Nga 생쥐를 15 주령까지 SPF 조건에서 사육하였다.

2) 약물처리 및 치료평가

실험은 7 주령 NC/Nga 생쥐를 15 주령까지 SPF 조건에서 사육한 정상군(NC/Nga-WT)과 BMAC를 도포한 대조군 (control, CT), BMAC를 도포하고 FK506 (tacrolimus)을 도포한 양성대조군 (positive control, PC), 그리고 BMAC를 도포하고 SPDJTK 또는 AJ+SPDJTK 를 투여한 실험군으로 나누어 실시하였으며, 각 군당 개체 수는 6 마리로 하였다.

BMAC는 총 3 주간 (10 주령 ~ 13 주령) 월요일과 목요일에 4% SDS 용액을 분무하고 2 시간 경과 후, 등에 200 μL씩 도포하였다. 그리고 BMAC 도포 시작 2 주 후 (12 주령) 피부 발진을 확인하고, 12 주령부터 15 주령까지 3 주간 매일 1 회 오후 3 ~ 4 시 사이에 각각 SPDJTK (348 mg/kg)를 경구 투여 하였으며, AJ (아토피크림 도포 1 시간 후 紫雲膏를 도포함, 200 μL/마리)와 SPDJTK (348 mg/kg)를 병용투여 하였다. 또한 양성 대조 약물로 FK506 0.3%도 12 주령부터 15 주령까지 3 주간 매일 1 회 등부분에 골고루 도포하



Scheme 1. Experimental Design for the Induction of Atopic Dermatitis like NC/Nga Mouse

였다. 실험 종료 후 (15 주령)에 임상적 육안 평가를 실시한 다음 혈액을 채혈하고 등 부위의 피부를 절제하여 10% 포르말린 용액에 담아 보관하였다.

3) Clinical skin score 측정

임상적 육안 평가는 아토피 피부염에서 일반적으로 사용되는 Yamamoto M의 방법³³⁾을 약간 변형하여 시행하였고, 7 주령 NC/Nga 생쥐를 15 주령까지 SPF 조건에서 사육한 NC/Nga-WT군과 BMAC를 도포한 대조군 (CT), BMAC를 도포하고 FK506를 도포한 양성대조군 (PC), 그리고 SPDJTK와 AJ+SPDJTK를 각각 투여한 실험군으로 나누어 실시하였다 (15 주령). 육안평가 항목은 erythema/hemorrhage, scarring/dryness, excoriation/erosion, edema, lichenification 5 가지 항목으로 하고, 육안평가 결과는 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타냈다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였으며 최소 0 점에서 최고 15 점 사이의 점수를 측정하였다.

4) 백혈구 분석

최종 임상적 육안 평가를 실시한 후, 심장천자법으로 채혈한 혈액을 바이오톡스텍(주)(청주, 충청북도)에 의뢰하여 혈액의 백혈구 중 호중구, 호산구, 호염기구 및 림프구, 단핵구의 세포수를 측정 하였다. 측정은 자동혈구측정기(MS9-5, MELET SCHLOESING, France)로 Fonio법³⁴⁾에 준하여 Minos -ST로 시행하였다.

5) 혈청 내 IgE와 IgG1 측정

NC/Nga 생쥐 8 주령, 12 주령, 15 주령의 눈에서 capillary 관을 이용하여 약 100 μ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기 6,500 rpm에서 20 분간 원심분리한 후 30 μ l의 혈청을 분리하여 IgE 수준을 측정하였고, IgG1 수준은 15 주령의 NC/Nga 생쥐를 ethylether로 흡입 마취한 다음 심장천자법으로 혈액을 분리한 후, 각각의 혈청을 취하여 -70 $^{\circ}$ C에 냉동보관하였다. NC/Nga 생쥐의 혈청 내 IgE와 IgG1 농도는 enzyme-linked immuno-sorbent assay로 측정하였다. IgE는 NC/Nga 생쥐 8 주령, 12 주령, 그리고 15 주령에서 채혈한 혈청 5 μ l (1/10 dilution)와 dilution buffer 45 μ l를 혼합하여 96 well plate의 각 well에 분주하였고, IgG1은 15주령에서 채혈한 혈청 50 μ l (1/10 dilution)과 dilution buffer 50 μ l를 혼합하여 각 well에 분주하였다. 각각 2 시간 동안 25 $^{\circ}$ C 실온에서 방치한 후 2 회 washing 완

충용액으로 세척한 다음 각각 antibody biotin-IgE conjugated와 antibody biotin-IgG1 conjugated를 넣고 2 시간 방치하였다. 다시 2 회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 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 leader 450 nm에서 각각 IgE와 IgG1에 대한 흡광도를 측정하였다³⁵⁾.

6) ALN 세포분리 및 cytokine 측정

약물투여 종료 후(15 주령) ALN을 적출하여 100 mesh로 ALN 세포를 분리하였다. 전날 BMAC 10 μ g/ml을 96 well plate에 coating하여 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 overnight한 다음 D-PBS로 2 회 수세하였다. 분리한 ALN 세포는 ACK 용액(8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1 l of demineralized water + 0.1 mM EDTA)으로 RBC를 제거한 후 BMAC가 coating된 각각의 well에 5 \times 10⁵ 세포씩 5% FBS-DMEM 배양액에서 48 시간 동안 배양한 후, 원심분리기 2,000 rpm에서 3 분간 원심 분리한 후 200 μ l의 배양상층액을 얻었다. 배양상층액내의 IL-4 (BioSource, USA), IFN- γ (BioSource, USA), IL-5 (BioSource, USA), IL-13 (R&D system, USA)의 수준 측정은 enzyme-linked immuno-sorbent assay로 측정하였다. 각 well에 배양상층액 50 μ l를 분주하고, 2 시간 동안 25 $^{\circ}$ C 실온에서 방치한 후 2 회 washing 완충용액으로 세척한 다음 각각 antibody biotin-IL-4 conjugated, antibody biotin-IL-5 conjugated, 그리고 antibody biotin-IL-13 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 leader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) ALN, DLN, PBMCs 및 등피부조직에서 형광 유세포 분석

약물투여 종료 후(15 주령) NC/Nga 생쥐에서 ALN과 DLN을 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5 분간 원심분리 (1,700 rpm)하고 2 회 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다.

Table 4. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
GAPDH	Forward	5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
	Reverse	5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'
Eotaxin 2	Forward	5' CTGTGACCATCCCCTCATCT 3'
	Reverse	5' CTTATGGCCCTTCTTGGTGA 3'
CCR3	Forward	5' CCCGAAGTGTGACTTTTGTCT 3'
	Reverse	5' CCTCTGGATAGCGAGGACTG 3'
IL-5	Forward	5' AGCCTAACCTGTTGGAGGT 3'
	Reverse	5' GTGATCGGCTTTTCTTGAGC 3'
IL-13	Forward	5' ATGCCCAACAAAGCAGAGAC 3'
	Reverse	5' TGAGAGAACCAGGGAGCTGT 3'

PBMCs는 실험을 종료한 후 NC/Nga 생쥐에서 heparin 을 처리한 3 ml 주사기로 채혈한 후 미리 준비한 10 ml의 ACK용액에 혼합하여 실온에서 5 분 동안 처리 하여 적혈구를 제거하였다. 2 회 1%의 FBS가 함유된 PBS (FACS buffer)로 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 불순물을 제거하였다. 등피부조직은 잘게 chopping한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)를 넣고 37°C shaker (180 rpm, 20 min) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4 회 반복 하였다.

분리한 ALN, DLN, PBMCs, 그리고 등피부조직 침윤세포의 총세포수를 측정 한 다음 모든 조직의 세포 등을 5 × 10⁵ 세포로 조정 한 후 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-CD3e -PE, anti-CD19-FITC, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD49b-FITC, anti-CCR3-PE, 그리고 anti-B220-PE를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3 회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometry의 CellQuest 프로그램을 이용하여 CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CCR3+, 그리고 B220+CD23+, CXCR5+ 세포수를 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 ALN, DLN, PBMCs, 그리고 등피부조직에서의 절대 세포수(absolute number)를 산출하였다.

8) Quantitative real-time PCR in dorsal skin & ALN

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 등 피부조직과 ALN를 적출하여 각각에 RNAzolB 500 µl를 넣고 용해될 때까지 homogenizer로 분쇄하였다. 이 조직 분쇄 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 µl를 첨가

한 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 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다. Quantitative real-time PCR은 7500 Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다³⁶⁾.

Mouse Olionucleotid의 염기배열은 다음과 같다 (Table 4).

Cytokine 유전자 발현은 SYBR[®] Green PCR Master mix를 사용하였고, internal standard는 GAPDH로 Taqman probe를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200 nM 이 되게 반응시켰다. Eotaxin2와 CCR3 mRNA 발현은 등피부조직에서 관찰하였고, Th2 mediate인 IL-5와 IL-13 mRNA 유전자 발현량 분석은 ALN에서 cDNA 를 합성하여 분석하였다.

Quantitative real-time PCR의 조건은 pre- denaturation 은 2 min at 50°C, 10 min 94°C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95°C, 1 min at 60°C에서 수행하였다. 대조군, FK506 도포군, SPDJTK 투여군과 AJ+SPDJTK 투여군은 internal standard로 GAPDH를 사용하였고 target group의 Quantitative PCR은 $y = x(1+e)^n$

x = starting quantity

y = yield

n = number of cycles

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

9) 피부조직 채취 및 염색

약물 투여 종료 후(15 주령) ALN과 등 쪽 목 부분의 피부를 떼어내어 10% paraformaldehyde에서 24 시간 동안 포르말린에 고정하였다. 그 조직을 파라핀으로 포매하였고, 5 μm 두께로 block을 만들었다. 그 조직부분은 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils/eosinophil 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline/eosin(H&E) 염색과 비만세포를 염색하는 toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤을 광학현미경 (Nikon, Japan, ×200)으로 관찰하였다³⁷⁾.

10) Immunohistochemical staining

약물 투여 종료 후(15 주령) 면역화학조직염색을 위하여 등쪽 피부를 적출하여 10% 포르말린 용액에 고정 한 다음 파라핀 블록을 만든 후 rat anti-mouse CCR3 mAb와 rat anti-mouse CD4 mAb를 사용하였다. 조직절편을 4 μm 두께로 세절하고 probe-on plus slide에 부착시켜 건조시켰다. 그리고 탈 파라핀 (deparaffinized) 후 흡수시킨 다음 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 비 특이적 단백질결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시켰다. 그리고 일차 단일항체에 1 시간 동안 부착시킨 다음 완충액으로 수세하였다. LSAB kit를 이용하여 PE-conjugated goat anti-rat IgG에 30 분간 반응

시키고, 3 회 tris-buffered saline with 0.1% tween 20(TBST)용액으로 수세한 후 잘 건조하였다. 현미경은 형광위상차현미경을 사용하여 ×400 배율로 관찰하였다³⁸⁾.

3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean± standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정하였다³⁹⁾.

III. 結果

1. BMAC를 이용한 아토피 피부염 유발 및 SPDJTK와 AJ+SPDJTK 투여 3 주 후 등피부 변화

BMAC를 2 주간(총 4 회) 400 mg 정도 도포한 결과, NC/Nga 생쥐 등피부부위에 사람 아토피 피부염과 같은 증상인 erythema/hemorrhage, scarring/dryness, excoriation/erosion, edema, lichenification이 나타났다(Fig.1 상단사진). BMAC를 1 주 더 도포하여 3 주간(총 6 회) 600 mg 정도 도포하고 SPDJTK, 그리고 AJ+SPDJTK를 3 주간 처리한 결과, SPDJTK만 투여한 실험군보다는 AJ+SPDJTK를 병용투여한 실험군에서 NC/Nga 생쥐 등피부의 erythema/hemorrhage, scarring/ dryness, excoriation/erosion, edema, lichenification이 대조군에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig. 1 하단사진).

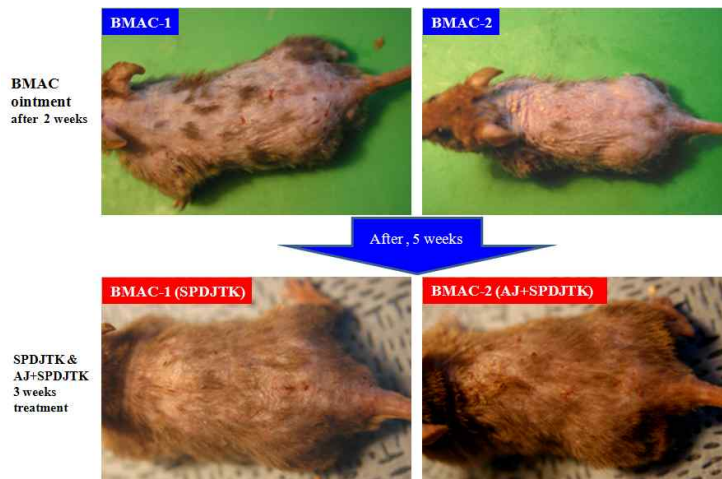


Fig. 1. Topical application of SPDJTK, AJ+SPDJTK treatment of atopic dermatitis skin lesions in NC/Nga mouse induced by BMAC for 3 weeks. Shown are back of BMAC-ointment NC/Nga mouse, BMAC plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration in NC/Nga mouse and BMAC plus AJ(200 μl/mouse)-ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration in NC/Nga mouse for 3 weeks.

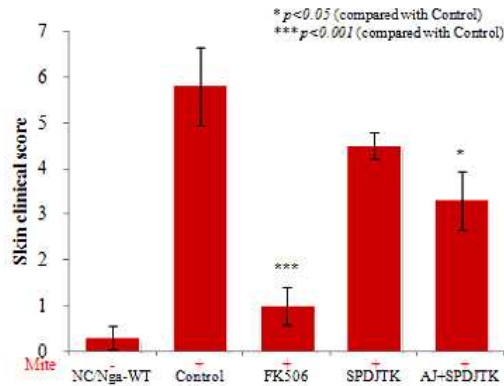


Fig. 2. Clinical skin features and severity of atopic dermatitis skin lesions in NC/Nga mouse induced by BMAC for 3 weeks.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks(Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%-ointment(FK506), BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg) -orally administration(SPDJTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ(200 μ l/mouse)-ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. A total clinical severity score for AD-like lesions was defined as the sum of the individual scores graded as 0(none), 1 (mild), 2(moderate) and 3(severe) for each of five signs and symptoms(erythema/hemorrhage, scarring/dryness, edema, excoriation/erosion and lichenification) on the three parts of the body: ear, face and head and back. Each point represents the mean \pm SE of six mice.

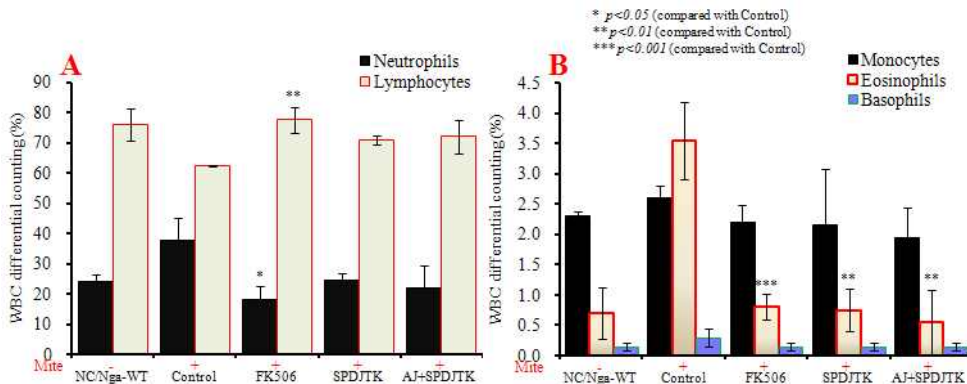


Fig. 3. WBC differential counting in atopic dermatitis skin lesions in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks(Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%-ointment(FK506), BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg) -orally administration(SPDJTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ(200 μ l/mouse)-ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately thereafter. Cell contents were measured by hematology(BD, USA).

2. Clinical skin score에 미치는 영향

대조군(Control)의 clinical skin score는 NC/Nga -WT군(정상군)에 비하여 10 배 이상 증가하였고 FK506 도포군(양성대조군)은 대조군에 비해 감소하였으며 ($p < 0.001$), SPDJTK 단독처리군보다 AJ+SPDJTK 병용투여군에서($p < 0.05$) 대조군에 비해 clinical skin score가 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

3. 백혈구에 미치는 영향

실험 종료 후(15 주령) 백혈구(WBC)의 neutrophil과

eosinophils 비율은 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군(Control)이 현저하게 증가하였다. FK506 도포군은 대조군에 비하여 NC/Nga-WT군에 가깝게 유의성 있게 감소하였고($p < 0.05$, $p < 0.001$), SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군의 neutrophil의 비율은 대조군에 비하여 감소하였지만 유의성은 없었고, eosinophils 비율은 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.01$)(Fig. 3A, Fig. 3B).

그리고 WBC 중 lymphocytes 비율은 대조군에서 NC/Nga-WT군에 비하여 약간 감소하였으나 FK506

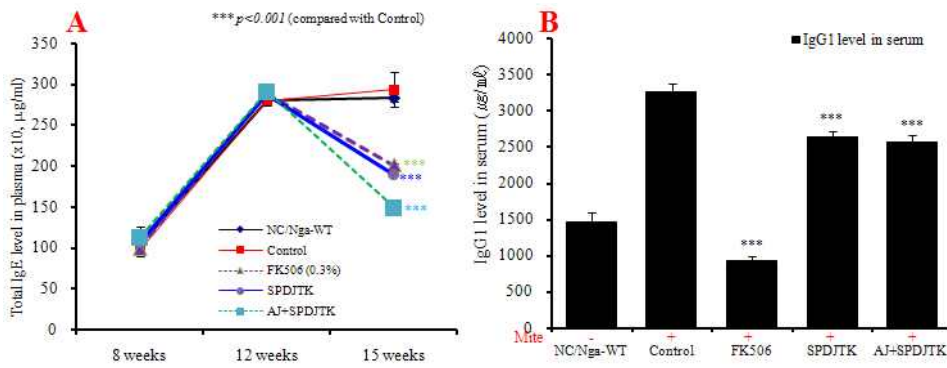


Fig. 4. Serum IgE & IgG1 elevation and development of atopic dermatitis skin lesions in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks(Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%) ointment(FK506), BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg) -orally administration(SPDJTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ(200 µl/mouse) ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately thereafter. Plasma samples were obtained by centrifugation and stored at -20°C until use. Total IgE and IgG1 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit(Shibayagi, Japan). Each point represents the mean±SE of six mice.

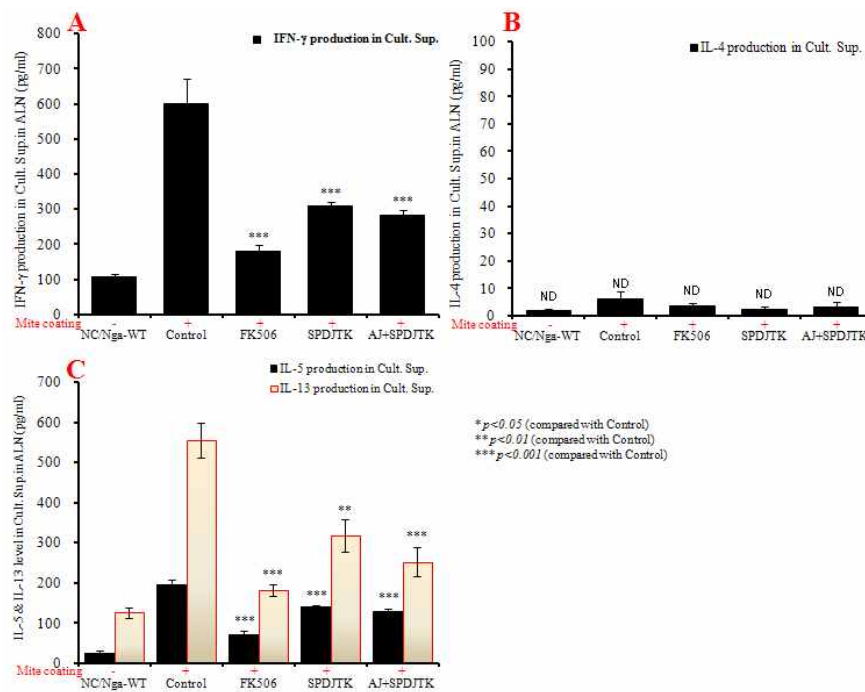


Fig. 5. Culture supernatant IL-4, IL-5, IL-13, and IFN-γ level in ALN in atopic dermatitis skin lesions in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks(Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%) ointment(FK506), BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg) -orally administration(SPDJTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ(200 µl/mouse) ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. ALN from mouse at 15 weeks of age were re-stimulated with Mite extract(1 µg/ml) for 48 hrs. IL-4, IL-5, IL-13, and IFN-γ levels were measured by a sandwich ELISA using an mouse ELISA kit (Biosource, USA).

도포군은 유의성 있게 증가하였고(p<0.01), SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군에서는 차이가 없었다.

monocytes와 basophils의 WBC 내 비율을 분석한 결과, 모든 실험군에서 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3A, Fig. 3B).

4. 혈청 IgE와 IgG1 수준에 미치는 영향

혈청 IgE 수준은 8 주령 NC/Nga 생쥐에서 자연적으로 증가가 되고 대조군(Control)은 15 주령에서 NC/Nga-WT군과 차이가 없이 IgE 수준이 증가되었다. 그리고 FK506 도포군, SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군의 혈청내 IgE 수준은 12 주령 이후 감소하여 15 주령에서는 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다($p < 0.001$)(Fig. 4A).

혈청 IgG1의 수준은 FK506 도포군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었고($p < 0.001$), SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군 또한 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다($p < 0.001$)(Fig. 4B).

5. ALN에서 cytokine level에 미치는 영향

IFN- γ 의 생산량은 NC/Nga-WT군에 비하여 BMAC를 도포한 대조군(Control)이 증가한 결과를 얻었다. 그리고 FK506도포군은 대조군에 비하여 유의성있게 감소되었다($p < 0.001$). 또한 SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다($p < 0.001$)(Fig. 8A). 반면, ALN 세포 배양상층액 중 IL-4 생산량을 측정된 결과는 모든 실험군에서 차이가 나타나지 않았다(Fig. 5B).

IL-5와 IL-13의 생산량을 측정된 결과, NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 각각 증가되었다. 그리고 FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성있게 감소되었다($p < 0.001$). SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군 또한 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다($p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 5C).

6. ALN, DLN과 등피부조직의 총 세포수에 미치는 영향

ALN과 등피부부위의 총 세포수를 측정된 결과, NC/Nga-WT군에 비하여 대조군(Control)이 현저하게 증가하였다. 그리고 FK506 도포군, SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$, $p < 0.001$) (Fig. 6A, Fig. 6C).

DLN의 총 세포수를 측정된 결과, ALN과는 반대로 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 현저하게 감소하였다. FK506 도포군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군은 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다($p < 0.05$, $p < 0.001$). 그리고 SPDJTK만을 투여한 실험군은 대조군에 비하여 총 세포수가 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 6B).

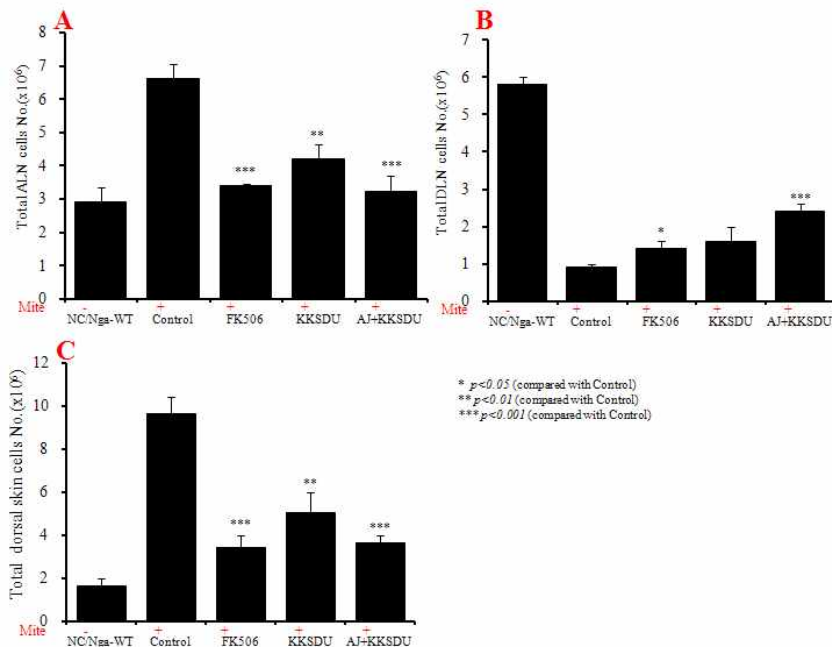


Fig. 6. Total cell number of ALN, DLN and dorsal skin in atopic dermatitis skin lesions in NC/ Nga mouse. Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks(Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%) ointment(FK506), BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg) orally administration(SPDJTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ(200 μ l/mouse) ointment plus SPDJTK(348 mg/kg) orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks.

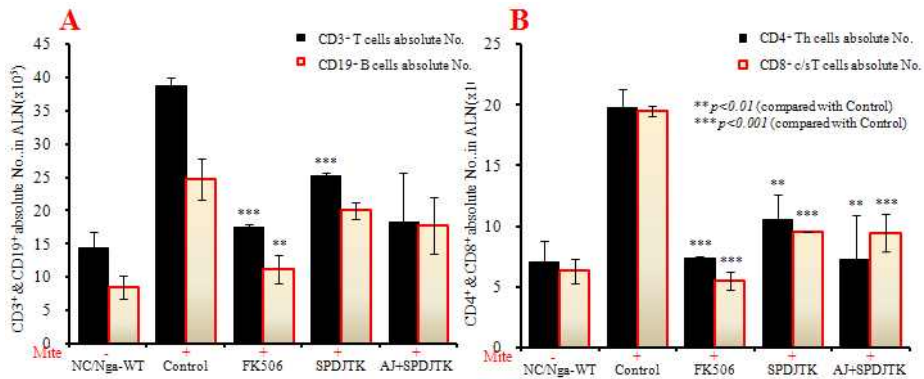


Fig. 7. Effects of SPDJTK & AJ+SPDJTK treatment on T and B cell changes of absolute numbers in ALN cells in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks(Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%) ointment(FK506), BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg) orally administration(SPDJTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ(200 μl/mouse) ointment plus SPDJTK(348 mg/kg) orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. NC/Nga mouse ALN cells (2×10⁵ cells/ml) were isolated from ALN, and the ALN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute numbers of CD3+, CD19+(A) and CD4+, CD8+(B) in NC/Nga mouse.

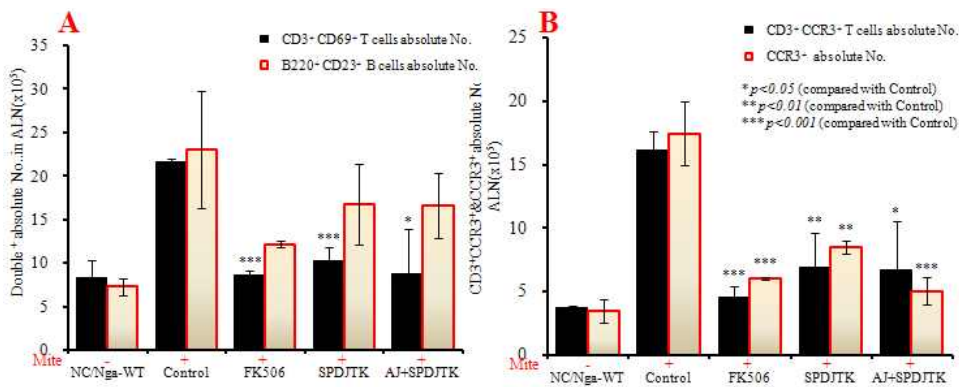


Fig. 8. Effects of SPDJTK & AJ+SPDJTK treatment on CD3+CD69+, B220+CD23+ and CD3+CCR3+, CCR3+ changes of absolute numbers in ALN cells in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks(Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%) ointment(FK506), BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg) orally administration(SPDJTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ(200 μl/mouse) ointment plus SPDJTK(348 mg/kg) orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. NC/Nga mouse ALN cells (2×10⁵ cells/ml) were isolated from ALN, and the ALN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute numbers of CD3+CD69+, B220+CD23+(A) and CD3+CCR3+, CCR3+(B) in NC/Nga mouse.

7. ALN에서 형광유세포분석을 통한 T & B 세포수에 미치는 영향

1) CD3+, CD19+ & CD4+, CD8+ absolute number

ALN에서 활성화 CD3+ T세포의 절대 세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군(Control)이 현저하게 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다($p < 0.001$). 또한 SPDJTK 투여군에서는 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었지만($p < 0.001$) AJ+SPDJTK 병용투여군에서는 유의성은 없었다(Fig.7A). ALN에서 활성화 CD19+ B세포의 절대 세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 현

저하게 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다($p < 0.01$). 또한 SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군도 ALN에서 CD19+ B 절대 세포수가 모두 대조군에 비하여 감소하였으나, 유의성은 없었다 (Fig. 7A).

ALN에서 활성화 CD4+ Th 세포와 활성화 CD8+ c/sT 세포에 대한 절대 세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 현저하게 증가하였고, FK506 도포군, SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군에서는 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다($p < 0.01$, $p < 0.001$) (Fig. 7B).

2) CD3+CD69+, B220+CD23+ & CD3+ CCR3+, CCR3+ absolute number

ALN에서 CD3+CD69+ T 세포와 B220+ CD23+ B 세포의 절대 세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군(Control)이 모두 증가하였고, FK506 도포군, SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군의 CD3+CD69+ 절대 세포수는 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다($p < 0.01$, $p < 0.001$). 그리고 FK506 도포군,

SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군의 B220+CD23+ B 세포 수는 모두 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 8A).

ALN에서 활성 CD3+CCR3+ 세포와 CCR3+ 세포에 대한 절대 세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 증가하였고, FK506 도포군, SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군에서는 대조군에 비하여 현저하게 유의성 있는 감소를 나타내었다($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 8B).

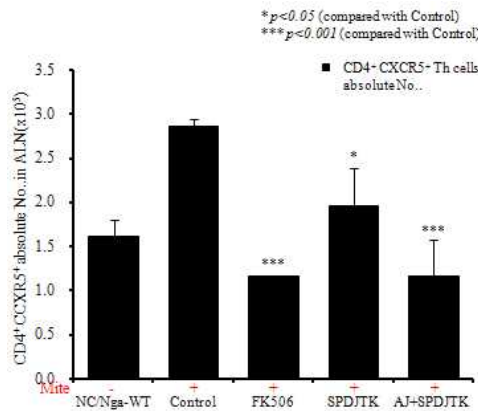


Fig. 9. Effects of SPDJTK & AJ+SPDJTK treatment on CD4+CXCR5+ gated cells and changes of absolute numbers in ALN cells in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks(Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%)-ointment(FK506), BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg) -orally administration(SPDJTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ(200 μ l/mouse)-ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks.. NC/Nga mouse ALN cells (2×10^5 cells/ml) were isolated from ALN, and the ALN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute number of CD4+CXCR5+ in NC/Nga mouse.

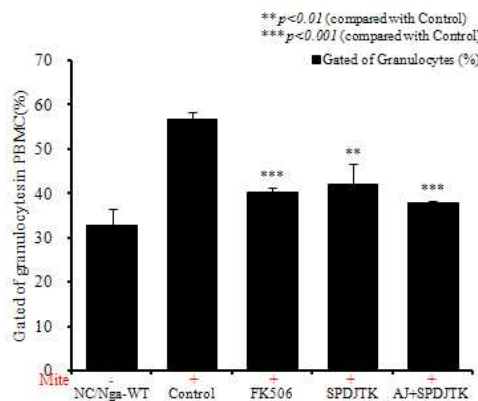


Fig. 10. Effects of SPDJTK & AJ+SPDJTK treatment on the percentage of granulocytes gated cells in PBMCs in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks(Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK(0.3%)-ointment(FK), BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg) -orally administration(SPDJTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ(200 μ l/mouse)-ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 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 gated cells in NC/Nga mouse.

3) CD4+CXCR5+ absolute number

ALN에서 활성화된 T세포를 관찰한 결과 CD4+CXCR5+ 절대 세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군(Control)이 현저하게 증가하였고, FK506 도포군, SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용 투여군에서는 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(p<0.05, p<0.001)(Fig. 9).

8. PBMCs에서 세포수에 미치는 영향

1) PBMCs에서 granulocyte의 변화

PBMCs에서 granulocytes의 빈도(%)는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군(Control)이 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (p<0.001). SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용 투여군의 granulocytes의 빈도수(%)는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.(p<0.01, p<0.001) (Fig. 10).

2) PBMCs에서 형광유세포분석을 통한 T & B 세포수에 미치는 영향

PBMCs의 CD3+ T세포, CD4+ Th세포, CD8+ c/s T세포, CD3+/CD69+세포, B220+ /CD23+, CD3+ /CCR3+세포, 그리고 CCR3+세포는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군(Control)에서 총활성세포 빈도(%)가 모두 현저하게 증가하였다. FK 도포군의 CD3+ T세포, CD8+ c/s T세포, CD3+/CD69+세포, B220+ /CD23+, 그리고 CCR3+ 세포의 총활성세포 빈도(%)는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고(p<0.01, p<0.001), CD4+ Th 세포와 CD3+CCR3+ 세포는 감소하였으나 유의성은 없었다. 또한 SPDJTK 투여군의 CD3+ T세포, CD4+ Th세포, CD8+ c/s T세포, CD3+ /CD69+, 그리고 CD3+/CCR3+ 세포의 총활성세포 빈도(%)는 대조군에 비하여 감소하였지만 CD3+/CD69+세포에서만 유의성이 나타났고(p<0.05), AJ+SPDJTK 병용투여군에서는 모두에서 유의성있게 감소하였다(p<0.01,

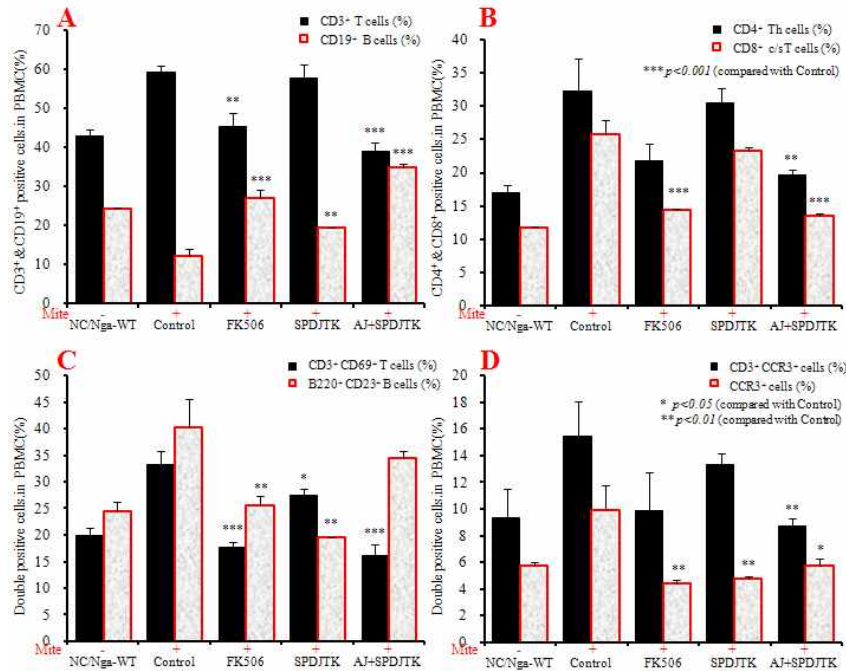


Fig. 11. Effects of SPDJTK & AJ+SPDJTK treatment on the percentage of T & B gated cells in PBMCs in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks(Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%) ointment(FK506), BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg) -orally administration(SPDJTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ(200 μl/mouse)-ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 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), CD4+ & CD8+(B), CD3+CD69+ and B220+CD23+(C), CD3+CCR3+ and CCR3+(D) in NC/Nga mouse.

$p < 0.001$). 그리고 CCR3+ 세포는 SPDJTK 투여군과 AJ+SPDJTK 병용투여군 모두에서 감소하였고 유의성이 나타났다($p < 0.05$, $p < 0.01$)(Fig. 11).

PBMCs에서 CD19+ B세포의 총활성세포 빈도(%)는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 현저하게 감소하였고, FK506 도포군에서는 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다($p < 0.001$). 그리고 SPDJTK 투여군과 AJ+ SPDJTK 병용투여군에서도 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 나타내었다($p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 11A).

9. DLN에서 형광유세포분석을 통한 T & B 세포수에 미치는 영향

DLN내 총 CD3+, CD19+과 CD4+, CD8+의 절대 세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 현저하게 감소하였고, FK506 도포군의 CD3+($p < 0.001$)와 CD4+($p < 0.05$), CD8+($p < 0.001$)의 절대 세포수는 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다. SPDJTK 투여

군, AJ+SPDJTK 병용투여군의 CD3+, CD4+의 절대 세포수는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고($p < 0.001$), CD19+의 절대 세포수는 각 투여군 모두 유의성 있게 증가하였으나, CD8+ 절대 세포수는 AJ+SPDJTK 병용투여군 대조군에 비하여 증가되었으나 유의성은 없었다 (Fig. 12A, B).

DLN내 CD3+CD69+ T cell의 절대 세포수와 B220+CD23+ B cell의 절대 세포수는 NC/ Nga-WT군에 비하여 대조군이 현저하게 감소하였고, 모든 실험군은 대조군과 큰 차이가 없었으며 유의성도 없었다(Fig. 12C).

CD3+CCR3+ 절대 세포수는 SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며($p < 0.001$), CCR3+의 절대 세포수는 FK506 도포군($p < 0.05$), SPDJTK 투여군($p < 0.01$), AJ+SPDJTK 투여군($p < 0.001$)은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 12D).

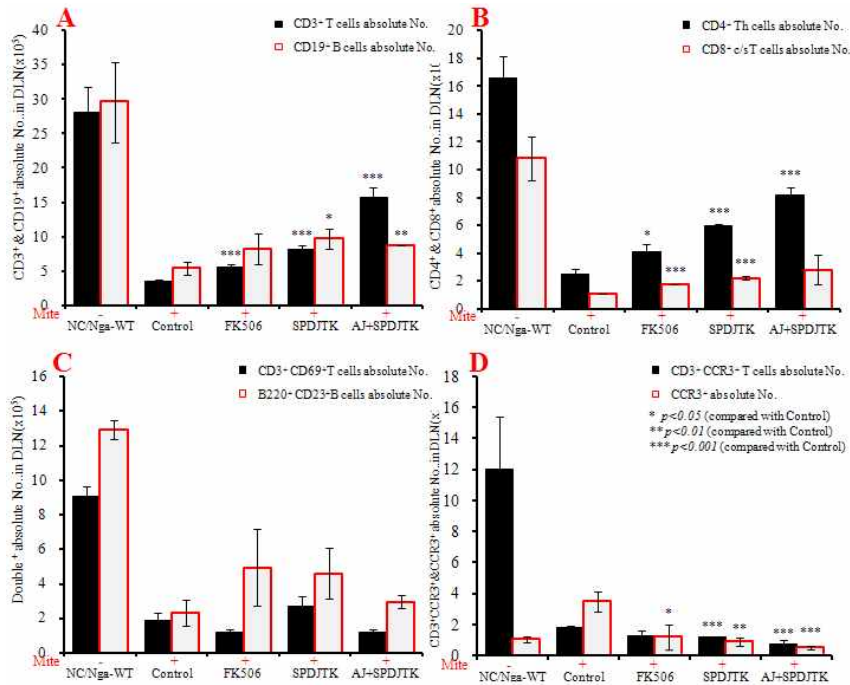


Fig. 12. Effects of SPDJTK & AJ+SPDJTK treatment on T cell and B cell changes of absolute numbers in DLN cells in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks(Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%) ointment(FK506), BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg) -orally administration(SPDJTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ(200 μ l/mouse)-ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 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 CD3+ & CD19+(A), CD4+ & CD8+(B), CD3+CD69+ and B220+CD23+(C), CD3+CCR3+ and CCR3+(D) in NC/Nga mouse.

10. 등피부조직에서 형광유세포분석을 통한 T & B 세포수에 미치는 영향

등피부조직에서 CD3+ 세포의 절대 세포수를 측정 한 결과 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 현저하게 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 6배 이상 유의성있게 감소하였다(p<0.001). SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+ SPDJTK 병용투여군 또한 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 나타내었다(p<0.001)(Fig. 13A).

CCR3+, CD3+/CD69+세포, CD11b+Gr-1+ MSC

세포의 절대 세포수를 측정 한 결과는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 현저하게 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 각각 유의성있게 감소하였다 (p<0.001). SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용 투여군 또한 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 나타내었다(p<0.001)(Fig. 13A, Fig. 13B).

11. 등피부조직에서 foxp3 mRNA 유전자 발현 분석

등피부조직에서 대조군(Control)에 대한 foxp3 mRNA

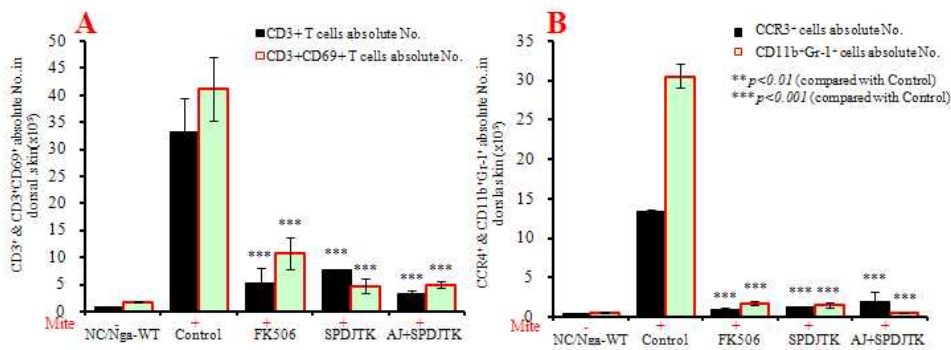


Fig. 13. Effects of SPDJTK & AJ+SPDJTK treatment on changes of absolute numbers in dorsal skin cells in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks(Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%-ointment(FK506), BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg) -orally administration(SPDJTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ(200 μl/mouse)-ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. NC/Nga mouse dorsal skin cells(2×10⁵ cells/ml) were isolated from dorsal skin, and the dorsal skin cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute numbers of CD4+CD25+, CD3+CD69+(A), and CCR3+, CD11b+Gr-1+(B) in NC/Nga mouse.

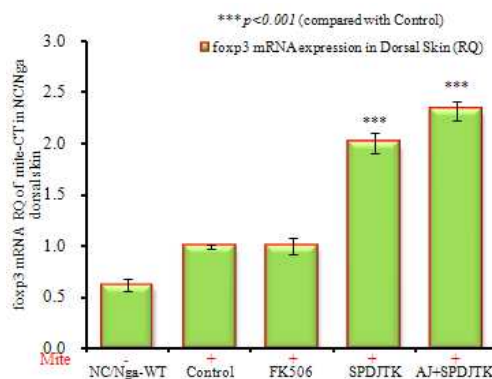


Fig. 14. Effects of SPDJTK & AJ+SPDJTK treatment on Foxp3 mRNA expression in dorsal skin tissue in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks(Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%-ointment(FK506), BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg) -orally administration(SPDJTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ(200 μl/mouse)-ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. Foxp3 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. The amount of Taqman probe 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. Each point represents the mean±SE of six mice.

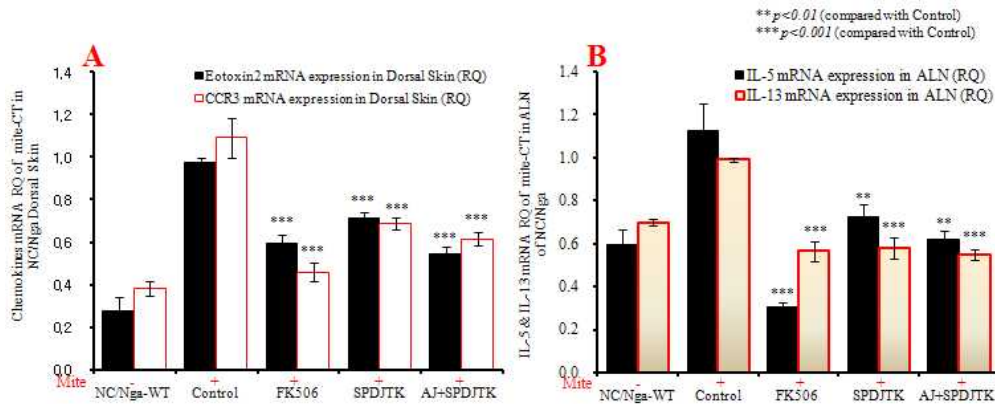


Fig. 15. Effects of SPDJTK & AJ+SPDJTK treatment on Eotaxin2, CCR3, IL-5, and IL-13 mRNA expression in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks(Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%)-ointment(FK506), BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK (348 mg/kg)-orally administration (SPDJTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μ l/mouse)-ointment plus SPDJTK (348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. Total RNAs were extracted in dorsal skin tissue or ALN, and eotaxin 2, CCR3, IL-5, and IL-13 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ(relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real-time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

의 유전자발현 상대정량 값(RQ)은 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군과 FK506 도포군에서는 차이가 나타나지 않았으나 SPDJTK 단독투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군에서는 대조군에 비하여 각각 유의성있게 증가하였다($p < 0.001$)(Fig. 14).

12. 등피부조직과 ALN에서 염증유전자 발현 분석

등피부조직에서 대조군(Contro)에 대한 Eotaxin2 mRNA와 CCR3 mRNA 유전자발현의 상대정량 값(RQ)은 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 각각 현저하게 증가하였고, FK506 도포군에서는 대조군에 비하여 유의성있는 억제효과를 나타내었다($p < 0.001$). 그리고 SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군 또한 대조군에 비하여 각각 유의성있는 억제효과를 나타내었다($p < 0.001$)(Fig. 15A).

ALN에서 IL-5 mRNA와 IL-13 mRNA 유전자발현의 대조군에 대한 상대정량 값(RQ)을 분석한 결과, NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 각각 유전자 발현이 증가한 결과를 얻었고, FK506 도포군의 RQ값은 대조군에 비하여 유의성있는 억제효과를 나타내었다($p < 0.001$). 또한 SPDJTK투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군의 IL-5 mRNA와 IL-13 mRNA의 유전자 발현의 RQ값은 대조군에 비하여 유의성있는 억제효과를 나타내었다($p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 15B).

13. 등피부조직에 미치는 영향

1) 등피부조직

등피부조직에 H&E 염색과 toluidine blue 염색을 실시한 결과, NC/Nga-WT군에서는 epidermis가 얇게 분포하고 비만세포는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 16A, Fig. 17A). 그러나 대조군에서는 epidermis가 두께가 hyperplasia로 현저하게 확장되고(long red arrow), 그 주변에 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis, parakeratosis, 그리고 비만세포(Fig. 17B, red arrow)의 침윤 등이 NC/Nga-WT군에 비하여 현저하게 증가되었다(Fig. 16B, Fig. 17B).

FK506 도포군(양성대조군)에서는 대조군에 비하여 일부는 NC/Nga-WT군에 가깝게 epidermis의 두께가 줄어들었고, 나머지 일부는 epidermis가 두께(red arrow)와 그 주변에 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis, parakeratosis 그리고 비만세포(Fig.17C, red arrow)의 침윤 등이 현저하게 감소하였다(Fig. 16C, Fig. 17C).

SPDJTK 단독투여군(Fig.16D, Fig.17D)에서는 대조군에 비하여 일부에서 epidermis의 두께가 줄어들었고, 나머지 일부에서는 epidermis가 두께(red arrow)와 그 주변에 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis, parakeratosis 그리고 비만세포(Fig. 17D, red arrow)의 침윤 등이 감소하였다.

AJ+SPDJTK 병용투여군에서는 대조군에 비하여

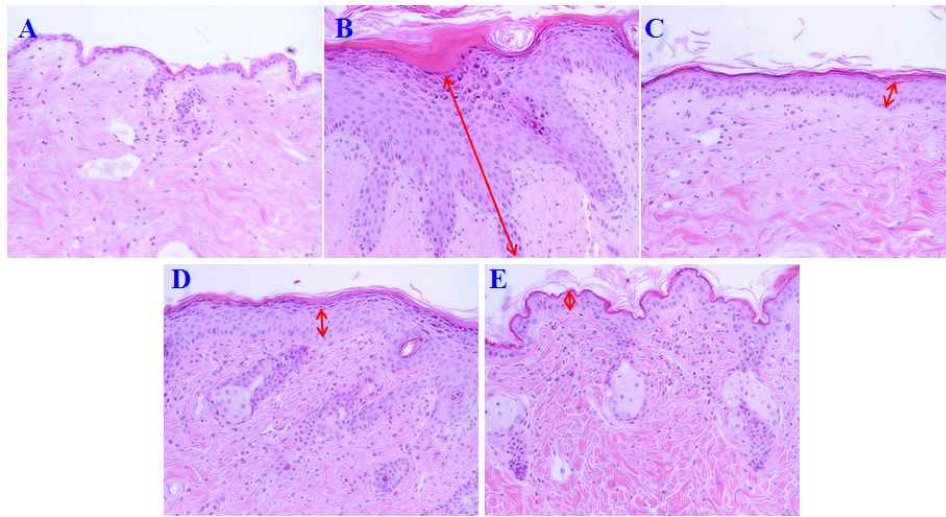


Fig. 16. Histological features of dorsal skin group in atopic dermatitis-like NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), B; BMAC treatment for 3 weeks(Control), C; BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%) ointment(FK506), D; BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(SPDJTK), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μ l/mouse)-ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. NC/Nga skin biopsy were stained with hematoxylin and eosin(H&E) and shows the thickening of the epidermis(red arrow) by bright microscope(\times 200). Data represent individual values and the average value of four individual mice in each group.

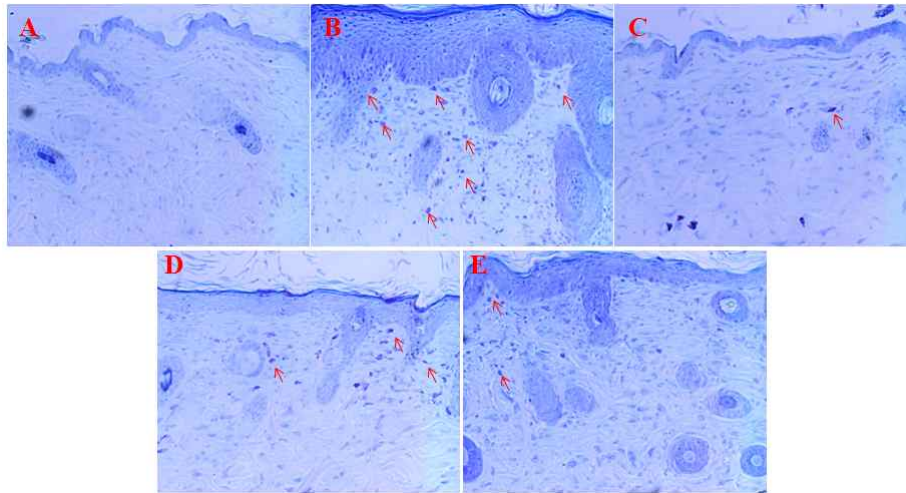


Fig. 17. Histological status of the skin stained with toluidine blue of dorsal skin group in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), B; BMAC treatment for 3 weeks(Control), C; BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%) ointment(FK506), D; BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(SPDJTK), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μ l/mouse)-ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. NC/Nga skin biopsy were stained with toluidine blue staining and shows the degranulated mast cells in the dermis(red arrow) by bright microscope(\times 200). Data represent individual values and the average value of four individual mice in each group.

epidermis의 두께가 NC/Nga-WT군에 가깝게 현저하게 줄어, 그 주변에 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis, parakeratosis 그리고 비만세포(Fig.17E, red arrow)의 침윤 등이 거의 없었다(Fig. 16E, Fig. 17E).

2) ALN

ALN에 H&E 염색을 실시하여 조직에 침윤된 inflammatory lymphocytes cells(ILC)와 plasma cells(PC)를 관찰한 결과, NC/Nga -WT군(Fig. 18A)에 비하여 대조군(Fig. 18B)에서 ILC와 PC의 침윤이 현저하게 증가된

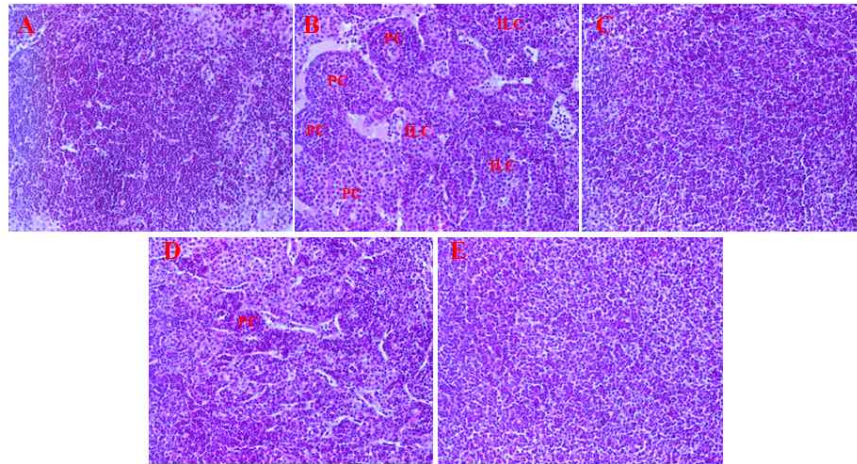


Fig. 18. Histological features of ALN group in atopic dermatitis skin lesions in NC/Nga mouse. Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), B; BMAC treatment for 3 weeks(Control), C; BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%-ointment(FK506), D; BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(SPDJTK), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μ l/mouse)-ointment plus-SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. NC/Nga ALN biopsy were stained with hematoxylin and eosin(H&E), and the NC/Nga control(B) shows ALN in the infiltration of the Inflammatory Lymphocytes Cells (ILC, blue arrow) and plasma Cells(PC)(arrows) by bright microscope(\times 200).

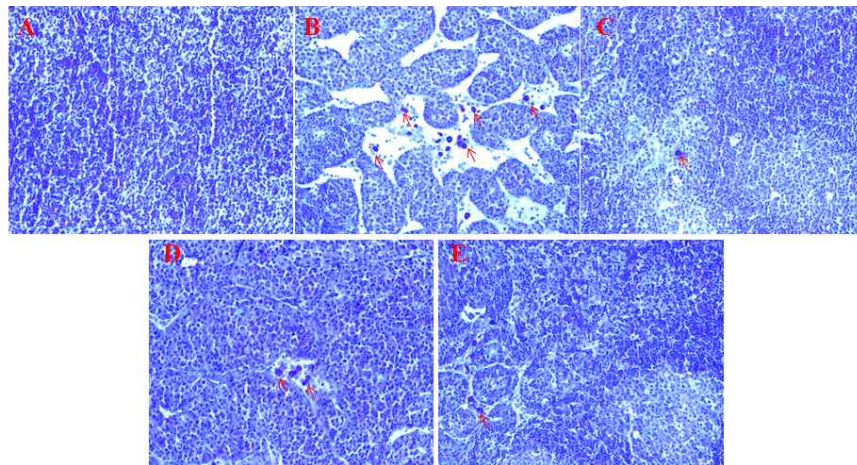


Fig. 19. Histological status of the tissue stained with toluidine blue of ALN group in atopic dermatitis skin lesions in NC/Nga mouse. Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), B; BMAC treatment for 3 weeks(Control), C; BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%-ointment(FK506), D; BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(SPDJTK), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μ l/mouse)-ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. NC/Nga ALN biopsy were stained with toluidine blue staining and shows the degranulated mast cells in the dermis(red arrow) by bright microscope(\times 200). Data represent individual values and the average value of four individual mice in each group.

것이 관찰되었다. FK506 도포군(Fig. 18C)의 ILC와 PC는 대조군에 비하여 크기가 현저하게 줄어들었고 SPDJTK 투여군(Fig. 18D)에서는 대조군에 비하여 약간 줄어들었다. 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군(Fig. 18E)의 ILC와 PC는 대조군에 비하여 정상군에 가깝게 감소했다. ALN 조직에 침윤된 비만세포(red arrow)를 관찰하기 위해 toluidine blue 염색을 실시한 결과, NC/Nga-WT

군(Fig. 19A)에 비하여 대조군(Fig. 19B)에서 비만세포들이 증가하여 cluster를 형성된 상태로 관찰되었다. FK506 도포군(Fig.19C)에서는 비만세포들이 대조군에 비하여 현저하게 감소되었으며, SPDJTK 투여군(Fig. 19D), 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군(Fig. 19E)의 비만세포 또한 감소하였으나 두 실험군 사이의 큰 차이는 없었다.

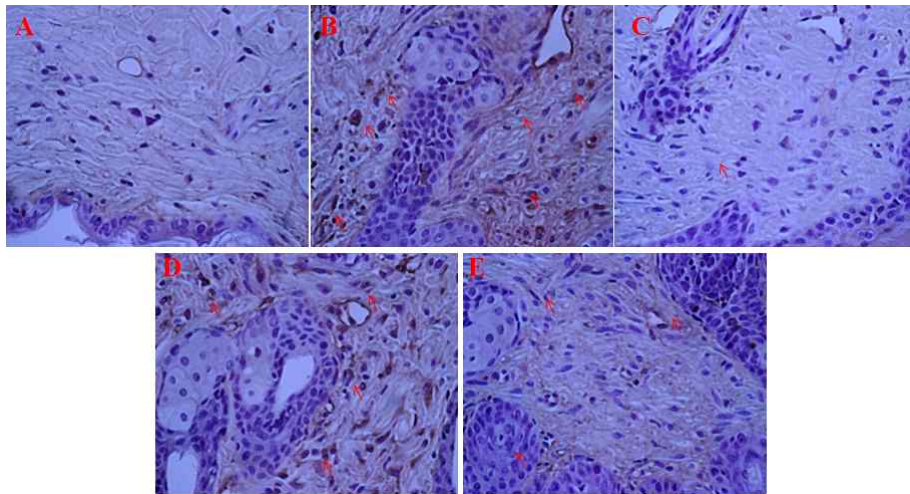


Fig. 20. Immunohistochemical staining of the skin stained with CD4+ Th cells of dorsal skin in atopic dermatitis skin lesions in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), B; BMAC treatment for 3 weeks(Control), C; BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%) ointment(FK506), D; BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(SPDJTK), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μl/mouse)-ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. Following 3 weeks, mouse dorsal skin biopsy were stained with anti-mouse CD4mAb respectively. Dorsal skin biopsy were stained with anti-mouse CD4mAb, used LSAB2 HRP. Rabbit/mouse(DAB) kit and shows the CD4+ T cells in the dermis(red arrow) by bright microscope(×400).

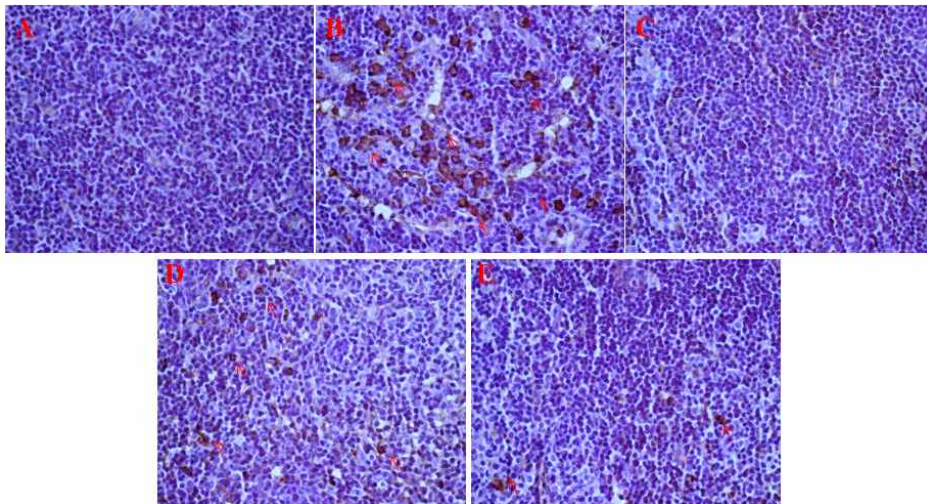


Fig. 21. Immunohistochemical staining of the tissue stained with CCR3+ cells of ALN in atopic dermatitis skin lesions in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in ALN, A; non treated BMAC(SPF-normal, NC/Nga-WT), B; BMAC treatment for 3 weeks(Control), C; BMAC treatment for 3 weeks with FK506(0.3%) ointment(FK506), D; BMAC treatment for 3 weeks with SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(SPDJTK), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μl/mouse)-ointment plus SPDJTK(348 mg/kg)-orally administration(AJ+SPDJTK) for 3 weeks. Following 3 weeks, mouse ALN biopsy were stained with anti-mouse CCR3mAb respectively. ALN biopsy were stained with anti-mouse CCR3mAb, used LSAB2 HRP. Rabbit/mouse(DAB) kit and shows the CCR3+ cells in the dermis(red arrow) by bright microscope(×400).

14. 등피부조직과 ALN에서 면역화학조직염색 후 세포의 변화

1) 등피부조직에서 CD4+ Th 세포의 변화

면역화학조직 염색 후 등피부조직에 침윤된 CD4+

Th 세포(brown color, arrow)를 관찰한 결과, NC/Nga-WT군(Fig. 20A)에 비하여 대조군(Fig. 20B)에서 CD4+ Th세포들이 epidermis 아래 부분에 cluster를 형성된 상태로 현저하게 증가되었다. FK506 도포군(Fig. 20C),

SPDJTK 투여군(Fig. 20D)에서는 CD4+ Th세포들이 모두 대조군에 비하여 현저하게 감소되었으며, 특히 AJ+SPDJTK 병용투여군(Fig. 20E)에서는 정상군에 가깝게 현저히 감소되었다.

2) ALN에서 CCR3+ eosinophils 세포의 변화

면역화학조직 염색 후 ALN 조직에 침윤된 CCR3+ eosinophils 세포(strong brown color, arrow)를 관찰한 결과, NC/Nga-WT군(Fig.21A)에 비하여 대조군(Fig. 21B)에서 CCR3+ eosino -phils 세포들이 ALN 조직사이에 침윤되어 현저하게 증가되었다. FK506 도포군(Fig. 21C)과 AJ+SPDJTK 병용투여군(Fig.21E)에서는 CCR3+ eosinophils 세포가 대조군에 비하여 NC/Nga- WT군에 가깝게 현저히 감소되었고, SPDJTK 투여군(Fig. 21D) 또한 대조군에 비하여 CCR3+ eosinophils 세포 침윤이 감소되었다.

IV. 考 察

아토피 피부염(Atopic Dermatitis)은 습진(eczema), 아토피 습진(atopic eczema), IgE 피부염(IgE dermatitis) 등과 동의어로⁴⁰⁾ 유아습진의 가장 흔한 형태이며⁴¹⁾ 그 증상은 특징적으로 홍반, 부종, 소양증, 삼출, 부스럼, 딱지, 인설 등이 반복되고⁴²⁾ 만성적으로는 피부를 반복해서 긁어 태선화 현상이 나타나면서 통증이 동반된 균열과 색소 침착이 발생된다⁴⁰⁾.

아직까지 아토피 피부염의 정확한 원인을 규명하지 못하고 있으나 유전적인 가족력과 음식섭취 등으로 인한 생활·환경의 영향, 손상된 피부층을 통해 유입된 항원물질에 대한 면역반응에 따른 혈중 IgE 항체의 수준이 증가함으로써 나타나는 복합적 질환으로 생각되고 있다^{43,44)}.

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 되는데, 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) 등이다⁴⁵⁾. 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 이루어진다⁴⁶⁾. Th 세포는 IL-2를 생산하고, 세포 주기의 G0 단계에서 G1단계로 들어가게 되어 세포 증식을 시작하게 되며⁴⁷⁾, 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 된다⁴⁸⁾. 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^{49,50)}, 잘 알려져 있듯이 이들의 과도한 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 상호조절을 통해 균형을 이루며 Th1과 Th2 면역반응을 조절하므로, 이 균형이 깨어지게 되면 Th1/Th2 불균형으로 인한 여러 가지 면역질환을 겪게 된다⁵¹⁾. 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 나타낸다⁵²⁾.

이와 같이 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 실현

될 가능성이 있어, 이에 대한 연구가 더욱 필요한 실정이다⁵³⁾.

특히 면역반응을 직접적으로 억제할 수 있는 세포가 있을 것이라는 의견은 오래 전부터 제기되어 왔으나 최근의 연구결과에 의해서야 비로소 Treg cell의 존재가 드러났다. 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-β를 생성하는 속성을 갖는다⁵⁴⁾. 따라서 Treg cell에서 발현되는 foxp3 전사인자는 알레르기성 질환이나 자가면역질환들을 조절하는데 필수적이며 이에 대한 관심 또한 증가하는 추세이다⁵⁵⁾.

아토피 피부염은 한의학적으로는 乳癬, 胎熱, 苔癬, 奶癬, 胎斂瘡, 濕疹 등의 범위에 속하는 것으로⁵⁶⁾ 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^{4,57)}고 하였으며, 증상과 경과에 따라 清熱利濕, 涼血清熱利濕, 健脾除濕, 涼血祛風, 清熱化濕의 방법을 사용하여 치료한다⁵⁸⁾.

消風導赤湯加味는 疏風清熱의 효능이 있어 胎斂瘡 치료에 사용되어온 消風導赤湯²⁰⁾에 竹葉, 連翹를 가하여 胎火濕熱型的 아토피에 응용되는 처방으로²¹⁾ 清熱涼血 養陰生津하는 生地黃, 行水 利濕熱의 赤茯苓, 清熱解毒 疏散風熱하는 金銀花, 牛蒡子, 清熱燥濕 祛風解毒하는 白鮮皮와 黃連, 宣散風熱 透疹하는 薄荷, 瀉火行水 通利血脈하는 木通, 潤肺 調和諸藥하는 甘草, 그리고 利水滲濕 清心除煩하는 燈心, 清心火 除煩熱의 淡竹葉과 清熱解毒 消腫散結하는 連翹로 구성되어 涼血利濕清火하는 효능을 가진다^{21,59)}.

아토피 크림은 베이스 크림과 허브에서 추출한 아로마 오일(Tea-tree, Lavender, Chamomile-roman)로 구성되어 있다. 베이스 크림은 항산화작용이 있는 Vitamin E를 함유하고 있어 상처의 회복과 피부의 재생을 촉진하고, 아로마 오일은 면역 세포에 새로운 활성을 주어

병든 세포와 싸워 이기도록 하며, 피부의 수분 증발을 막아 피부 표면의 습기를 유지하고 피부에 원래 만들어진 보습 효과를 대체시켜주는 효과가 있다. 특히 Tea-tree는 면역체계 및 백혈구를 활성화시키고 가려움증을 완화하는 효과가 있고, Lavender는 소독작용, 진정작용 및 피부세포의 활성화에 좋은 효과가 있으며, Chamomile-roman은 항염증작용이 있어 조직재생 과정을 빠르게 하며 알레르기 반응성을 약화시키고 진정효과가 있는 것으로 알려져 있다^{22,60)}.

紫雲膏는 紫草, 當歸, 胡麻油, 蜜蠟 및 豚脂의 5가지 약재로 구성된 膏藥으로 陳實功의 《外科正宗》²³⁾에 潤肌膏라 하여 피부를 滋潤하여 깨끗하게 하는 膏藥을 華岡이 豚脂를 加하여 《春林軒膏方便覽》에 紫雲膏라 처음 命名하여²⁴⁾ 현재 임상에서 습진, 건선, 탈모, 백전풍, 알러지성 피부염, 아토피성 피부염 등 광범위한 피부질환에 치료 연고로 사용되고 있다.

현재까지 아토피 피부염 치료와 관련하여 수종 처방에 대한 면역학적 연구가 보고되었고²⁵⁻²⁷⁾, 최근 NC/Nga mouse에 아토피 크림, 자운고를 도포하여 아토피 피부염에 대한 면역학적 치료효과를 연구한 논문이 발표된 바 있으나²⁸⁾ 소포도적당에 대한 연구는 아직까지 접하지 못하였다.

이에 본 연구에서는 NC/Nga 생쥐에 BMAC를 처리하여 피부발진을 유발시킨 후(대조군), Macroride계통의 항생물질로 T세포에 대한 억제작용을 하는 FK506(Tacrolimus) 연고⁶³⁾를 양성대조군으로 사용하였고, SPDJTK, AJ+SPDJTK를 각각 투여하여 피부발진 및 활성화된 면역질환이 억제되는지를 관찰하였다.

본 실험에서 BMAC를 2주간 도포한 결과, NC/Nga 생쥐 등피부부위에 사람 아토피 피부염과 유사한 증상이 나타났다(Fig. 1 상단사진). BMAC를 1주 더 도포하고 SPDJTK, AJ+SPDJTK를 3주간 처리한 후 등피부의 소양 행동을 동반한 erythema/hemorrhage, scarring/ dryness, excoriation/erosion, edema, lichenification 증상이 SPDJTK 투여군보다 AJ+SPDJTK 병용투여군에서 대조군에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig. 1 하단사진). 각 NC/Nga 생쥐의 clinical skin score를 측정한 결과 양성대조군인 FK506과 AJ+SPDJTK 병용투여군 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있게 clinical skin score가 감소하였으나(p<0.05, p<0.001), SPDJTK 단독투여군에서는 대조군에 비하여 감소하였지만 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 2).

최근의 연구에서 만성 천식, 아토피 환자의 말초혈

액에서 과립구의 세포수가 증가하면서 백혈구의 수도 증가하는 것으로 알려져 있다⁶⁴). 본 연구에서 NC/Nga 생쥐의 혈액을 분석한 결과, WBC 내의 neutrophils, eosinophils 빈도(%)는 NC/Nga-WT군(정상군)에 비해 대조군이 증가하였고, SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군의 neutrophil의 비율은 대조군에 비하여 감소하였으며 특히 eosinophils의 비율이 통계학적으로 유의성있게 감소하였다($p < 0.01$). 그리고 WBC 중 lymphocytes는 대조군에서 약간 감소하였으나 FK506 도포군에서는 유의성있게 증가하였고($p < 0.01$), SPDJTK투여군, AJ+ SPDJTK 병용투여군에서는 차이가 없었다. monocytes와 basophils의 비율은 모든 실험군에서 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3A, Fig. 3B).

또한 염증 반응을 유도하는 IgE와 IgG1의 수치를 측정할 실험에서 대조군 수치 결과는 증가를 나타내었는데 반하여 FK506, SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군에서는 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다($p < 0.001$)(Fig. 4). 이러한 결과는 SPDJTK 투여군이 NC/Nga 생쥐에서 Treg cell을 유도하여 Treg cell이 B 세포 알레르기 면역반응을 억제하여 B 세포 분화에 수반되는 IgE와 IgG1의 수치를 억제하는 것으로 생각된다.

ALN는 만성아토피질환 동물에서 중요한 역할을 하는 면역기관으로 아직 임상에서는 아토피와의 연관성에 대한 연구와 임상보고가 부족한 상태이다. 그러나 일부 심한 만성아토피환자의 경우 겨드랑이가 부어올라 ALN가의 크기가 증가되어 있다는 보고가 있으며⁶⁵) 최근 NC/Nga 아토피 연구보고에서 ALN을 target으로 하여 연구결과를 보고하고 있다⁶⁶). 본 실험에서도 아토피 피부발진에 대한 NC/Nga 생쥐의 임파절 target을 ALN으로 정하였다.

ALN에서의 cytokine을 측정할 결과, IFN- γ 생산량이 대조군에서 NC/Nga-WT군에 비하여 증가하였고(Fig. 5A), SPDJTK 투여군 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군에서는 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5A). 또한 IL-5와 IL-13의 생산량을 측정할 결과, 대조군에서 각각 증가되었고 SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다($p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 5C). 최근 Tanaka등⁶⁷)은 아토피피부발진 NC/Nga 생쥐에 새로운 NF- κ B억제제인 IMD-0354와 양성대조군으로 FK506을 피부발진 부위에 도포하여 IgE 수준이 감소하였고, 피부발진 및 피부조직에서 IL-2, IL-4,

IL-5, IL-12, IL-13, 그리고 TNF- α mRNA가 대조군에 비하여 억제되었고, ALN세포를 분리하여 PWM (체세포분열자극인자)으로 자극한 후 IL-4, IL-13, 그리고 IFN- γ mRNA를 분석한 결과에서도 대조군에 비하여 억제되었다고 보고하였다.

CD4+ T 세포는 특정한 B 림프구에 작용하여 B 림프구가 항원과 반응하도록 함으로써 체액성면역반응을 촉진(항체형성촉진)시키며, 세포성면역반응 자체도 증강시킨다. 또한 CD8+ T 세포는 직접적으로 항원을 죽일 수 있는 독성물질을 방출하여 항원을 죽이며, 자극을 받으면 세포성 면역반응을 이끌어 낸다. 이로써 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포는 우리 몸의 면역기능을 가늠하는 가장 중요한 지표가 된다. 또한 최근 연구에서 따르면 CD8+ T세포는 염증발진에서 migration으로 중요한 역할을 하고 또한 LTB4를 통해 비만세포를 활성화시켜 알레르기 질환의 pathogenesis에서 중심적 역할을 한다⁶⁸).

T 세포 활성 표지분자중 하나인 CD69는 특정한 항원이나 호르몬에 의해 활성화된 T 세포에서 볼 수 있다. 즉, CD3 T 세포의 활성은 CD4+/CD69+ 와 CD8+/CD69+ 세포로 구분되고 이러한 활성화된 T 세포에서 IFN- γ , TNF- α , 그리고 IL-4 등이 항원에 따라 생산량이 증가되어, 염증면역반응에서는 염증세포의 정도에 따라 CD3+/CD69+ 활성세포의 증가와 염증 cytokine이 비례적으로 증가하는 양상을 나타낸다⁶⁹).

본 연구에서 ALN, 등피부조직의 총세포수가 대조군에 비하여 SPDJTK 투여군, AJ+ SPDJTK 병용투여군에서 유의성있게 감소하였고, DLN에서는 유의성있게 증가하였다(Fig. 6). 또한 ALN에서 CD3+ T세포, CD4+Th 세포, CD3+CD69+, CCR3+, CD4+CXCR5+ 세포 등의 활성세포수와 절대 세포수도 SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군에서 대조군에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9). 최근 연구에서 만성아토피 피부발진 환자의 경우 피부염증 질환을 계속 유지하기 위하여 피부발진 부위에서 활성화된 antigen-loaded DCs나 memory T cells (APC)이 림프절의 naive T 세포를 점화교화 (priming)하여 Cutaneous Lymphocyte- Associated antigen (CLA)을 발현하는 CD4+CCR5+ T 활성화세포가 되어 피부발진 부위로 이동하여 (skin-homing T cells) 침윤(infiltration)하는 역할을 하는 것으로 알려졌다⁷⁰). 이렇게 피부발진 부위로 침윤된 CLA+CD4+ CCR5+ T 활성화세포는 대식세포나 염증면역세포에 의해 분비된 CXCL13과

결합하여 만성아토피피부질환을 유발하게 된다⁷¹⁾.

실험에서 ALN과 PBMCs에서 CD3+CCR3+세포, 그리고 CCR3+세포의 총활성세포 빈도(%)를 측정할 결과, NC/Nga-WT군에 비하여 BMAC를 도포한 대조군이 각각에서 현저하게 증가한 결과를 얻었고, 0.3%의 FK506 도포군, SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용 투여군의 CD3+CCR3+ 세포와 CCR3+세포의 총활성세포 빈도(%)가 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 8B, Fig. 11D). 또한 등피부조직에서 CCR3+, CD3 + CD69+ T세포, 그리고 CD11b+Gr-1+ MSC 세포는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 각각 현저하게 절대 세포수가 증가하였고, 0.3%의 FK506와 SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용 투여군의 CCR3+, CD3+CD69+ T세포, CD11b+Gr-1+ MSC 세포의 절대 세포수는 대조군에 비하여 현저하게 유의성있는 감소를 나타내었다 ($p < 0.001$)(Fig. 13).

이러한 연구결과는 SPDJTK 투여군과 AJ+SPDJTK 병용 투여군이 ALN과 등피부발진조직에서 Treg cell을 유도 및 증가시켜 활성화된 T 세포, 체액성 면역염증세포인 활성화 B 세포와 호산구, 비만세포의 보충을 제한하는 것으로 판단된다. 그러나 그 기전에 관하여서는 보다 정확한 chemokine등 기전실험이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

만성아토피발진 동물모델에서는 손상된 피부로 박테리아가 상피세포의 벽을 통과하면서 수지상 세포(DCs)를 자극하여 활성화된 DCs가 다시 배수 림프절(drainig lymph nodes, DLN)로 이동하여 DLN에 있는 naive T 세포를 자극한다. 자극으로 활성화된 T 세포는 피부발진 부위로 이동하여 염증반응을 일으키게 된다. 그래서 만성질환 동물의 경우 DLN의 면역세포가 피부발진 부위로 이동하여 DLN내 면역세포의 현저한 감소가 나타난다⁷²⁾.

본 실험에서도 DLN내 총 CD3+, CD4+ 그리고 CD8+의 절대 세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 각각 절대 세포수가 현저하게 감소한 결과를 얻었고, 0.3%의 FK506, SPDJTK투여군 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군의 CD3+, CD4+ 그리고 CD8+의 절대 세포수는 대조군에 비하여 각각 유의성 있는 증가를 나타내었지만($p < 0.001$, $p < 0.05$), AJ+SPDJTK 병용투여군의 CD8+의 절대 세포수는 유의성을 나타내지 않았다(Fig. 12).

등피부조직에서 CD3+ 세포의 절대 세포수를 측정

한 결과는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 현저하게 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다($p < 0.001$). SPDJTK 투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군 또한 대조군에 비하여 현저하게 유의성있는 감소를 나타내었다($p < 0.001$)(Fig. 19A). 또한, 등피부조직에서의 foxp3 mRNA의 유전자 발현양을 비교분석한 결과, 대조군과 양성대조군에서는 NC/Nga-WT군에 비해 차이가 없었으나 SPDJTK 단독투여군, 그리고 AJ+SPDJTK 병용투여군에서는 대조군에 비하여 각각 유의성있는 증가를 나타내었다(Fig. 14). 이러한 결과는 SPDJTK에 의하여 유도된 Treg cell이 피부발진부위로 이동하여 호산구세포, 비만세포 그리고 염증세포의 증식 및 활성을 억제하여 피부발진을 감소시키며 AJ를 병용투여함으로써 아토피 피부발진 억제에 상승작용을 하는 것으로 생각된다.

등피부조직과 ALN에서 real-time PCR로 IL-5, IL-13, eotaxin2, 그리고 CCR3 mRNA를 분석한 결과, SPDJTK 투여군과 AJ+SPDJTK 병용투여군 모두에서 대조군에 비해 유전자 발현이 억제되었으며 SPDJTK 단독투여군보다 병용투여군에서 유의성이 더욱 높았다(Fig. 15).

등피부조직과 ALN에서 H&E 염색을 실시한 결과, SPDJTK와 AJ+SPDJTK의 투여로 등피부조직에서 epidermis의 두께가 대조군에 비하여 현저하게 줄어들었고 ALN에서 또한 염증세포 침윤이 감소하였다(Fig. 16, Fig. 18). 그리고 toluidine-blue 염색 결과, 등피부조직과 ALN 모두에서 SPDJTK와 AJ+SPDJTK의 투여로 비만세포 침윤이 대조군에 비해 현저하게 감소되었다(Fig. 17, Fig. 19).

이는 AJ+SPDJTK의 병용투여가 ALN에서 Treg cell을 유도함으로써 ALN과 등피부발진 부위로 면역염증세포의 보충을 제한하는 것으로 판단된다. 그러나 그 기전에 관하여서는 더 정확한 기전실험이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

등피부조직에서 CD4+ Th 세포의 면역화학조직 염색한 결과는 SPDJTK 투여군에서 대조군에 비하여 정상군에 가깝게 현저하게 감소되었고 특히 AJ+SPDJTK 병용투여군은 NC/Nga-WT군에 가깝게 현저하게 감소되었다(Fig. 20). 또한 ALN에서 면역화학조직 염색을 통해 CCR3+ eosinophils 세포를 관찰한 결과에서도 SPDJTK 투여군에서 대조군에 비하여 CCR3+eosinophils 세포 침윤이 감소되었으며 AJ+SPDJTK 병용투여군에서는 NC/Nga-WT군에 가깝게

현저하게 감소된 것이 관찰되었다(Fig. 21). 이러한 결과로 SPDJTK와 AJ+SPDJTK 병용 투여군이 CD4+ CD25+foxp3+ Treg cell을 활성화시켜 BMAC로 유도된 아토피성 피부발진모델에서 hyperplasia에 의한 epidermis 두께 확장, Th2 면역세포의 과잉 침윤(CD4+)과 비만세포(CCR3+)의 침윤을 감소시켜 피부발진 치료효과가 있음을 입증하였다. 또한 실험 결과로 볼 때 SPDJTK만을 투여한 실험군 보다는 AJ와 SPDJTK를 병용 투여한 실험군이 Treg cell의 활성화를 통해 아토피피부발진 치료에 뚜렷한 상승효과가 나타났다.

이상의 결과로 미루어보아 SPDJTK와 AJ+SPDJTK는 아토피 피부염의 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단되며 향후 이에 대한 실험적 보완 및 후속 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

BMAC로 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에서 消風導赤湯加味와 아토피 크림과 紫雲膏 및 消風導赤湯加味 병용투여가 피부염에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BMAC를 NC/Nga 생쥐에 3 주간 도포하여 피부발진이 유도되었고 SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군에서 피부발진이 감소되었다.
2. AJ+SPDJTK 병용투여군은 대조군에 비하여 clinical skin score를 유의성 있게 감소시켰다.
3. SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군은 각각 대조군에 비하여 혈액내 WBC 중 eosinophils의 비율을 유의성 있게 감소시켰다.
4. SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군은 각각 대조군에 비하여 혈청 중 IgE와 IgG1 수준을 유의성 있게 감소시켰다.
5. SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군은 ALN에서 각각 Th2 세포에서 분비되는 IL-5, IL-13과 피부감염에 의한 염증 IFN- γ 의 생산량을 유의성 있게 감소시켰다.
6. SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군은 각각 대조군에 비하여 ALN과 등피부세포의 총세포수를 유의성 있게 감소시켰고, AJ+SPDJTK 병용투여군은 DLN의 총세포수를 유의성 있게 증가시켰다.

7. SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군은 ALN에서 CD4+, CD8+, CD3+CD69+, CD3+CCR3+, CCR3+, CD4+CXCR5+ 세포에 대한 절대세포수를 유의성있게 감소시켰다.
8. SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군은 PBMCs에서 granulocytes의 총빈도수(%)와 CD3+CD69+, CCR3+활성세포 빈도(%)를 유의성 있게 감소시켰으며 CD3+ T세포, CD4+ Th세포, CD8+ c/s T세포, 그리고 CD3+CCR3+ 세포는 AJ+SPDJTK 병용투여군만이 유의성 있게 감소하였다. 또한 CD19+세포는 SPDJTK 투여군과 AJ+SPDJTK 병용투여군 모두 대조군에 비하여 총활성세포빈도(%)를 유의성 있게 증가 시켰다.
9. SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군은 각각 DLN에서 CD3e+ T 세포, CD19+ B 세포, 그리고 CD4+ Th 세포의 총절대세포수를 대조군에 비하여 유의성 있게 증가시켰고, CD3+CCR3+와 CCR3+의 총절대세포수는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.
10. SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군은 각각 등피부조직에서 CD3+ T cell의 총세포수를 유의성있게 감소시켰고, foxp3 mRNA의 유전자 발현을 유의성 있게 증가시켰다.
11. SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군은 각각 등피부조직에서 Eotaxin2 mRNA, CCR3 mRNA, 그리고 ALN에서 IL-5 mRNA, IL-13 mRNA의 유전자 발현을 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.
12. SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군은 각각 등피부조직과 ALN에서 epidermis의 두께와 dermis 부분의 침윤된 염증면역세포 및 비만세포 등을 현저하게 감소시켰다.
13. SPDJTK 투여군, AJ+SPDJTK 병용투여군은 각각 등피부조직에서 CD4+ Th 세포, 그리고 ALN에서 CCR3+ eosinophils 세포의 침윤을 대조군에 비하여 감소시켰다.

參 考 文 獻

1. 丁奎萬. Allergy와 韓方. 서울:第一路. 1990:101-108.
2. 장호선. 아토피 피부염의 진단과 치료. 가정의학회지. 2002;23:831-838.

3. Morren M, Przybilla B, Bamelis M, et al.. Atopic dermatitis triggering factors. *J Am Acad Dermatol.* 1994;467-473.
4. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연. 아토피 피부염의 동, 서의학적 문헌고찰. *대한안이비인후피부과학회지.* 2002;15(1):226-252.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Halbert AR, Weston WL, Moreli JG. Atopic dermatitis : is it an allergic disease?. *J Am Acad Dermatol.* 1995;33:1008-1018.
9. Leung DYM. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:99-108.
10. Mosmann TR, Coffman RI. Th1 and Th2 cells : Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-73.
11. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M.. Smad3 and NFAT cooperate to induce foxp3 expression through its enhancer. 2008;9(2):194-202.
12. Guin JD. Complications of topical hydrocortisone. *J Am Acad Dermatol.* 1981;4:417-22.
13. Graham-Brown R. Managing adults with atopic dermatitis. *Dermatol Clin.* 1996;14:531-7.
14. Smith CH. New approaches to atopical therapy. *Clin Exp Dermatol.* 2000;25:250-4.
15. 허인희, 홍성민, 엄유식, 변학성, 심성용, 김경준. 외치요법을 위주로 한 아토피 피부염 환자 증례. *한방안이비인후피부과학회지.* 2006;9(3):201-208.
16. 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海:上海科學技術出版社. 1994:461.
17. 황치환 · 윤채성 · 송승현 · 원영호 · 황충연. 葛根解肌湯加味方과 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염에 미치는 영향. *한방안이비인후피부과학회지.* 2008;21(2):1-18.
18. 민영규, 최정화, 김종한, 박수연. 消風散加減方과 外治方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. *대한안이비인후피부과학회지.* 2005;18(1):116-134.
19. 홍철희, 서은성, 원영호, 김영근, 황충연. 溫清飲과 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2007;21(3): 679-687.
20. 吳謙. 醫宗金鑑(武英殿版排印本). 北京:人民衛生出版社. 1998:907-908.
21. 歐陽恒, 楊志波. 新編中醫皮膚病學. 북경:인민군 의출판사. 2000:263, 612.
22. 조성준. 향기치료의 기적. 서울:도서출판 宇石. 2000:120, 140, 169-171.
23. 陳實功. 外科正宗. 北京:人民衛生出版社. 1983:269.
24. 失數道明. 韓方治療百話. 서울:동남출판사. 1991: 322.
25. 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.
26. 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.
27. 나동규, 한재경, 김윤희. 除濕胃苓湯加減이 집먼지 진드기 추출물로 유도된 NC/Nga mouse의 아토피 피부염에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지.* 2008;22(2):81-114.
28. 여의주, 한재경, 김윤희. 아토피 피부염 동물 모델에서 아토피 크림과 紫雲膏의 병용도포가 피부염에 미치는 영향. *대전대학교 대학원 박사학위논문.* 2009.
29. 송현지, 한재경, 김윤희. 아토피樣 피부염 NC/Nga 생쥐에서 加減消毒飲과 아토피크림-紫雲膏의 병용투여가 피부염에 미치는 영향. *대전대학교 대학원 박사학위논문.* 2009.
30. 이남열, 한재경, 김윤희. 아토피樣 피부염 NC/Nga 생쥐에서 滋陰除濕湯加減과 아토피 크림, 紫雲膏의 병용투여가 Th17 세포의 분화억제 및 피부염에 미치는 영향. *대전대학교 대학원 박사학위논문.* 2009.
31. 大田大學校 韓方病院. 韓方病院 處方集. 大田:韓國出版社. 2001:542.
32. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monk A, McMahon J, Visca D, Warren JT, Kennedy S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J Natl Cancer Inst.*

- 1990;82(13):1107-1112.
33. Dogru M, Katakami C, Nakagawa N, Tetsumoto K, and Yamamoto M. Impression cytology in atopic dermatitis. *Ophthalmology*. 1998; 105:1478-1484.
34. Hoffler U., Oette K.. Comparative studies on four thrombocyte counting methods: counting in the smear preparation after Fonio, chamber counting in the phase contrast microscope, counting with the Coulter Thrombocounter, and the Technicon Auto-Counter. *Z Klin Chem Klin Biochem*. 1974; 12(5):198-206.
35. Matsuda H., N. Watanabe, G.P. Geba, J. Sperl, M. Tsudzuki, J. Hiroi.. Development of atopic dermatitis like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mouse. *Int Immunol*. 1998;9:461-466.
36. Galli SJ. *Allergy. Curr. Biol*. 2006;10:93-95.
37. Yuki, Hashimoto., Iwao Arai, Yutaka Nakanishi, Takanobu Sakurai, Atsushi Nakamura.. Scratching of their skin by NC/Nga mouse leads to development of dermatitis. *Life Sciences, Japan* 17 March. 2004;76:783-794.
38. K Jo`hrens, I Anagnostopoulos, H Du` rkoop & H Stein. Different T-bet expression patteerns characterize particular reactive lymphoid tissue lesions. *Histopathology*. 2006;48:343- 352.
39. Danniell W. W.. A foundation for analysis in the health science. *Biostics*. 1983;136-146.
40. 피부과학원색도감 편찬위원회 편, Thomas B.Fitzpatrick 외 3명공저. *皮膚과학원색도감*. 서울: 정담. 1999:54.
41. 안성구 외 2명 공저. *흔히 보는 피부질환*. 서울: 고려의학. 1993:6.
42. 홍창의. *소아과학*. 서울:대한교과서(주). 1994: 4-6, 1066-8.
43. Matsuda H, Watanabe N, Gregory PG et al.. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with hyperproduction in NC/Nga mouse. *Int. Immunol*. 1996;9:461-466.
44. Morita E, Kaneko S, Hiragun T et al.. Fur Mite Ext.s induce dermatitis associated with IgE hyperproduction in an inbred strain of mouse. *NCKuj. J. Dermatol. Sci*. 1999; 19:37-43.
45. 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.
46. Iijima OT, Takeda H, Komatsu Y, Matsumiya T, Takahashi H.. Atopic dermatitis in NCJic mouse associated with Myobia musculi infestation. *Comp. Med*. 2000;50:225-228.
47. Yamaguchi T, Ono K, Shigeta S et al.. Differences in response of patient's blood cells with bronchial asthma to diverse house dust Mite Ext. allergens by histamine release assay. *Jpn. J. Allergol*. 1993;42: 1754-63.
48. Leung DYM, Bieber T.. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2003;361:151-160.
49. Kang K, Stevens SR.. Pathophysiology of atopic dermatitis. *Clin. Dermatol*. 2003; 21:116-121.
50. Ellis C, Luger T, Abeck D et al.. International Consensus Conference on Atopic Dermatitis II (ICCAD II): clinical update and current treatment strategies. *Br. J. Dermatol*. 2003;63:3-10.
51. 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.
52. 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: 1956-63.
53. 박슬기, 한재경, 김윤희. NC/Nga 생쥐에서 加味 清心蓮子湯의 GATA-3 조절에 의한 항아토피 피부염 효과. *대전대학교 대학원 석사학위논문*. 2009.
54. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD et al.. New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest*. 2004;113:651-657.
55. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F.. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. 2001;27(1):68-73.
56. 공남미, 지선영. 아토피 피부염의 양·한방적 고찰. *대한외관과학회지*. 1999;12(1):241-53.

57. 김미정, 이승연. 소아 아토피 피부염에 대한 문헌적 고찰. 대한한방소아과학회지. 2002;14(2):169-83.
58. 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.
59. 전국한의학대학교 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:영림사. 2000:144, 170, 180, 186, 190, 198-199, 302, 315, 326, 540.
60. 최경임. 아로마 미용학. 서울:뷰티프라자. 2000: 30.
61. 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.
62. 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.
63. Schreiber SL and Crabtree GR,. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today*. 1992;13(4):136-142.
64. Elena Gonzalez-Rey, Alejo Chorny and Mario Delgado. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:52-63.
65. R Yagi, H Nagai, Y Iigo, T Akimoto, T Arai, M Kubo. Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in STAT6-Deficient NC/Nga mouse. *The Journal of Immunology*. 2002;168:2020-7.
66. Yang-soon Kim et. al,. Improvement of Atopic Dermatitis in NC/Nga mouse by Topical Application of CpG Phosphodiester- ODN. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007; 144:315-24.
67. Tanaka A., Susumu Muto², Kyungsook Jung¹, Akiko Itai² and Hiroshi Matsuda. Topical Application with a New NF- κ B Inhibitor Improves Atopic Dermatitis in NC/NgaTnd Mice. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127:855-863.
68. Ryouji Yagi, Haruko Nagai, Yutaka Iigo, Toshihiro Akimoto, Takao Arai and Masato Kubo. Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in STAT6-Deficient NC/Nga mouse. *The Journal of Immunology*. 2002;168:2020-2027.
69. Tatsuya Sasakawaa, Yasuyuki Higashib, Syozo Sakumac, Yoshitaka Hirayamaa, Yuka Sasakawaa, Yoshitaka Ohkuboa, Toshio Gotoa, Masahiro Matsumotod, Hiroshi Matsudae. Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions Induced by Topical Application of Mite Antigens in NC/Nga mouse. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;126:239-247.
70. SENEVIRATNE S.L, A.P. BLACK, L. JONES, A.S. BAILEY and G.S. OGG. The role of skin-homing T cells in extrinsic atopic dermatitis. Oxford University Press on behalf of the Association of Physicians. 2006:1-9.
71. Radeke HH, Ludwig RJ, Boehncke W-H. Experimental approaches to lymphocyte migration in dermatology in vitro and in vivo. *Exp Dermatol*. 2005;14:641 - 666.
72. Wolfgang Weninger, and Ulrich H. von Andrian.. Chemokine regulation of naïve T cell traffic in health and disease. *Seminars in Immunology*. 2003;15: 257-270.