

托裏消毒飲 合 黃連解毒湯의 아토피피부염에 대한 실험적 연구

원영호¹⁾ · 황충연¹⁾ · 임규상¹⁾ · 김종한²⁾ · 고성규³⁾ · 이부균⁴⁾ · 이동효¹⁾ · 김남권^{1)*}

¹⁾ 원광대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과학 교실

²⁾ 동신대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과학 교실

³⁾ 경희대학교 한의과대학 예방의학 교실

⁴⁾ 세명대학교 한의과대학 본초방제학 교실

Effect of Taklisodok-um and Hwangryunhaedok-tang on Atopic Dermatitis

*Young-Ho Weon · Chung-Yeon Hwang · Kyu-Sang Lim · Jong-Han Kim ·
Seong-Gyu Ko · Boo-Kyun Lee · Dong-Hyo Lee · Nam-Kwen Kim**

Objective : This Experimental study was done to investigate the Effect of Taklisodok-um and Hwangryunhaedok-tang(TH) on Atopic Dermatitis.

Methods : We assessed effects of TH on the IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IgM, IgG1, IFN- γ in vivo, on the IL-4, IL-5, CCR3 in the skin tissues of ear and dorsum with NC/Nga mice. And we assessed effects of TH on the COX-2, IL-1 β , TNF- α , IL-6 with RAW 264.7 cell.

Results and Conclusion :

1. IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IgM, IgG1 levels in the serum of TH treated NC/Nga mouse group were decreased compared to the untreated control mice. IFN-r showed a increase in the experimental group compared to the untreated control group. The spleen weight of TH treated NC/Nga mice was decreased compared to the untreated control group.
2. mRNA expression levels of IL-4, IL-5 and CCR3 in the skin tissues of TH treated NC/Nga mice were decreased, and expression levels of IL-6 in the skin tissues of TH treated NC/Nga mice were decreased compared to the untreated control group. IFN- γ mRNA expression levels were increased compared to the untreated control group.
3. Judged from that IL-1 β , TNF- α , IL-6 express of gene, effect of inflammatory Cytokines revelation were decreased compared to the untreated control group.
4. Depend on the strength of TH, inflammatory RAW 264,7 in the serum of TH were inhibited compared to the untreated control serum that leded a COX-2 activity model.
5. Histological observation of the ear and skin tissues showed that the extents of inflammation and infiltrated immune cells in the epidermis and dermis of TH treated NC/Nga mice were highly reduced compared to the untreated control group.

Key words : *Taklisodok-um(Tuōlǐxiāodú-yǐn)*, *Hwangryunhaedok-tang(Huángliánjiědú-tāng)*, Anti-allergy, Anti-inflammatory, Atopic dermatitis

I. 緒 論

아토피(atopy)란 1925년 Coca가 음식물과 흡입성 물질에 대한 알레르기 반응의 결과로 피부염이나 천식, 고초열이 나타나는 경향을 아토피라고 기술한 이후부터 사용되었으며¹⁾, 현재 세계적으로 수많은 사람들이 아토피성 피부질환으로 고통 받고 있다^{2,3)}. 국내에서도 한 연구에 의하면 전국 초등학생의 24.9%, 중학생의 12.8%가 아토피 피부염을 진단 받은 것으로 조사되었다⁴⁾.

아토피 피부염은 심한 소양증과 홍반, 부종, 삼출물, 가피를 동반하는 질환으로 급성기에는 표피 내에 수포를 형성하기도 하고, 만성기에는 인설과 피부의 비후를 유발하는 피부 염증의 일종이다⁵⁻⁸⁾.

한의학에서는 아토피 피부염을 일반적으로는 胎熱이라 하며, 원인은 風熱, 血熱, 血虛 등이다. 丙로는 脾胃가 運化機能을 잃어 胎火濕熱이 있는 상태에서 발생하고, 外로는 風濕熱이 침입하여 相搏하면 肌膚에 鬱滯되어 형성된다고 하였다. 또는 소화불량, 불규칙적인 수유습관, 음식물에 대한 과민반응, 의복마찰, 한냉 등의 자극으로 인하여 유발된다고 하였다^{9,10)}.

托裏消毒飲은 明의 古今醫鑑¹¹⁾에 처음 수록된 처방으로 龔의 萬病回春¹²⁾에 "治一切癰疽六七日未消者 服此藥 瘡未成即消 已成即帶"라고 기록되어 있다. 癰疽初發 및 化膿性 浸潤期나 潰瘍 등에 托毒, 消腫, 解毒 및 壯氣血之劑로서 응용되는 처방으로, 一切의 炎症性疾患 치료에 사용한다¹³⁾.

본 연구에서 托裏消毒飲에 함방한 약제인 黃連解毒湯은 外臺秘要¹⁴⁾의 崔氏方에 처음 수록되었으며, 三焦의 實火를 치료하는 기본처방으로 瀉火解毒 清火濕熱하는 효능이 있어 帶狀疱疹, 알레르기

성 皮膚炎 및 각종 炎症疾患에 사용된다¹⁵⁾.

아토피에 대한 한의학적 연구로 박¹⁶⁾은 아토피 피부염의 동·서의학적 문헌고찰, 윤¹⁷⁾은 아토피 피부염 환자의 한의학적인 임상유형 분류에 대한 문헌 연구를 보고한 바가 있으며, 실험 연구로는 김 등¹⁸⁻²⁰⁾이 단일 한약재를, 박 등²¹⁻²⁵⁾은 피부 질환에 다용되는 처방으로 아토피 효과를 규명한 바가 있다. 민²⁶⁾은 내·외치 병용치료가 아토피 생쥐 병태 모델에 미치는 영향에 대한 실험적 시도를 하였다.

본 연구에서 사용한 托裏消毒飲 合 黃連解毒湯은 각 처방이 개별적으로 항염증 및 항알레르기에 대한 효과가 검증된 바 있으나 병용하여 실험한 연구는 보고된 바 없었으며, 또한 임상에서 활용 시 아토피 질환에 대한 효과를 경험적으로 축적하였기에 실험을 계획하게 되었다.

저자는 托裏消毒飲 合 黃連解毒湯(이하 TH)을 사용하여 NC/Nga mice를 이용한 in vivo 실험에서 IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IgM, IgG1, IFN- γ 의 혈청 수준을 측정하였으며, 피부조직에서 IL-4, IL-5, IFN- γ , CCR3 유전자 발현을 조사하였으며 귀와 등의 피부를 조직 검사하였다. 또한 TH의 항염증 효과를 규명하기 위해서 in vitro 실험에서 RAW 264.7 cell에 TH를 농도별 처리하였을 때 COX-2발현과 IL-1 β , TNF- α , IL-6 등의 cytokine들을 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 재료

1) 동물

웅성(雄性) 6주령의 Balb/c, NC/Nga mice를 중앙실험동물에서 공급받아 실험당일까지 고품사료와

교신저자 : 원광대학교 산본한방병원 한방안이비인후피부과
(Tel : 031-390-2671, E-mail : drkim@wonkwang.ac.kr)
• 접수 2011/03/15 • 수정 2011/03/28 • 채택 2011/04/04

물을 공급하고 실온 22±2℃, 상대습도 50~65%, 조도 200 lux(8시 점등, 20시 소등)를 계속 유지하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약물

본 실험에 사용한 TH의 약제는 원광대 산본 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, TH 1첩의 내용과 구성은 다음과 같다¹²⁾(Table 1).

3) 시약 및 기기

① 시약

본 실험에 사용된 시약으로 diethyl pyrocarbonate (DEPC), NH₄Cl, KHCO₃, Na₂ EDTA, complete adjuvant, chloroform, collagenase IV, RPMI-1640, isopropanol, 적혈구용혈액(ACK lysis solution), ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), Dulbecco's minimum essential medium(DMEM), formaldehyde, magnesium chloride (MgCl₂),

agarose 는 Sigma 사 (U.S.A) 제품을, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Gibco BRL사 (U.S.A) 제품을, RNase inhibitor, Taq polymerase, random primer, dNTP, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase 는 promega 사(U.S.A.) 제품을, IL-4, 5, 6, IFN-r의 ELISA kit는 BD(USA)사 제품을, IgE, IgM, IgG1의 ELISA kit는 고마바이오텍(Korea) 제품을, RNAzolB는 invitrogen 사 (Carlsbad, CA, USA) 제품을 사용하였고, 그 외 사용된 시약은 Duksan (korea)에서 구입하여 사용하였다.

② 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기, CO₂ incubator, deep-freezer (Sanyo Co., Japan), Clean bench, autoclave, water bath, vortex, plate shaker, ice-maker (Vision scientific Co., Korea), micro-pipet (Gilson, France), GeneAmp PCR system 2400(Perkin Elmer, USA), ELISA reader(Bio-TEK, U.S.A.)이다.

2. 방법

1) 시료 제조

TH 1첩(88g)을 증류수 1000ml를 가하여 열탕 추출기에서 5시간 동안 전탕한 후 수득된 액을 감압 증류하여 100ml정도로 농축한 후 TS(Total solids)장치를 이용하여 고형분을 측정하였다. 3회 측정결과 평균 9.73%의 고형분 함유량이 나왔으며 이것을 경구투여 및 외용제 실험 시료로 사용하였다.

2) 약물 투여 및 염증 유발

NC/Nga 실험군은 TH를 8주간 주 3회(월, 수, 금) 0.2cc씩 경구투여(200mg/kg) 하였으며, 외용제로 사용한 실험의 경우 매일 2회 등 부위를 충분히 적실 정도로 분무하였다. NC/Nga 대조군은 생리식염수를 TH와 같은 용량, 용법으로 경구 투여

Table 1. Prescription of TH

Hrbal Name	Scientific Name	Dose(g)
金銀花	Flos Lonicerae	12
陳皮	Pericarpium Citri Reticulatae	12
黃芪	Radix Astragali	8
天花粉	Radix Trichosanthis	8
防風	Radix Saposhnikoviae	4
當歸	Radix Angelicae gigantis	4
川芎	Cnidii Rhizoma	4
白芷	Radix Angelicae Dahuricae	4
桔梗	Radix Platycodi	4
厚朴	Cortex Magnoliae Officinalis	4
穿山甲	Squama Manitis	4
皂角刺	Spina Gleditsiae	4
黃連	Coptidis Rhizoma	4
黃柏	Cortex Phellodendri	4
黃芩	Radix Scutellariae	4
梔子	Gardeniae Fructus	4
Total Amount		88

하였으며, 외용제 또한 생리식염수를 실험군과 같은 방법으로 분무하였다.

아토피 피부염은 1-chloro 2,4-dinitrobenzene (DNCB)을 이용하여 유발하였다. 먼저 NC/Nga 마우스의 등 부위를 깨끗이 제모한 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 실험 4일 전 1% DNCB용액(acetone:olive oil=3:1) 200 μ l를 등 부위에 도포하고 실험 시작일부터 종료일까지 8주간 일주일에 2번 0.2% DNCB용액 150 μ l를 등 부위에 도포하였다.

3) 피부 손상 정도 측정

NC/Nga 마우스의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하였다. 육안평가 결과는 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타낸다. 평가항목은 윤 등²⁷⁾이 평가분석한 아토피평가방법 중 홍반(erythema), 찰상(Abrasion), 부종과 혈종(Edema & escoriation), 깃무름(Erosion), 태선화(Lichenification)로 선정하였다. 이 각각의 항목은 없음(0), 경증(1), 중등도(2), 중증도(3)의 3단법을 이용하여 채점하였다.

4) 혈청내 IgE, IL-4, 5, 6, IFN- γ , IgM, IgG1 정량화

혈청내 IgE와 IL-6량은 실험 시작(0주), 2주, 5주, 8주에 생쥐의 눈에서 capillary tube를 이용하여 약 100 μ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기로 혈청을 분리하여 IgE 양을 ELISA Kit로 측정하였다. TH 투여 8주째 NC/Nga 생쥐를 ethyl ether로 마취한 후 심장 천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리한 후 혈청 중 IL-4, 5, IFN- γ , IgM, IgG1 양을 ELISA kit로 정량하였다.

5) 피부 조직에 대한 RT-PCR

(Reverse Transcription-Polymerase Chain reaction ; 역전사-중합효소 연쇄반응) 분석

① 피부 조직에서 RNA 분리

NC/Nga 생쥐의 등 부위를 제모한 뒤 피부 조직을 떼어내어 피부 조직(0.1g)과 RNAzolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 13,000rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000rpm에서 원심 분리한 후 70% 에탄올로 수세하고 5분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC로 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 65 $^{\circ}$ C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

② RT-PCR(IL-4, IL-5, IL-6, CCR3, IFN- γ)

RT 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 65 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 μ l 10 mM dNTPs, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l 100mM DTT, 4.5 μ l 5X RT buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

③ cDNA PCR

PCR은 GeneAmp PCR system 2400을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, IL-4, IL-5, CCR3, IFN- γ 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmol/ μ l)와 antisense primer (20 pmol/ μ l)를 혼합하여 1 μ l

를 가하고, 다시 3 μ l 2.5 mM dNTPs, 4 μ l 10xPCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 0.18 μ l Taq polymerase (5 U/ μ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 40 μ l가 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5분, denaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5분, annealing; 55 $^{\circ}$ C, 1분, elongation; 72 $^{\circ}$ C, 1분을 25 cycle한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR product는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

6) 피부 세포내 IL-6 정량

NC/Nga 생쥐의 등 부위를 제모한 뒤 피부 조직을 1g 떼어내어 DMEM 배양액으로 수세하여 미세조각으로 잘게 썬 후 10% FBS-DMEM으로 Petri-dish에서 7일간 배양하였다. 이 후 배양 상층액을 제거하고 다시 10% FBS-DMEM으로 교체하였다. 이를 7일간 배양하여 배양 상층액을 분리한 후 배양액내의 IL-6 분비량을 ELISA kit로 측정하였다.

7) 항염증 실험 및 세포독성 실험

① 항염증실험에 대한 RAW 264.7 배양

대식세포주인 RAW 264.7(monocyte)는 Korean Cell Line Bank(KCLB)로 구입하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 100unit/ml의 penicillin/ streptomycin을 1% 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DEME) 배지를 사용하며, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

② 독성실험에 대한 L929 세포 배양

생쥐 섬유모세포의 일종인 L929 세포주를 사용하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 100unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium

(DEME) 배지를 사용하였으며, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂로 조정된 배양기내에서 배양하였고, 배양액은 3일마다 교환하였다. 배양된 세포는 1 \times trypsin-EDTA로 부유시킨 후 0.4% trypan blue로 염색하여 혈구계측기(Hemocytometer)로 세포수를 계산하였다. 세포독성 시험은 배양된 세포를 96 well plate에 5 \times 10³ cell/well이 되도록 세포 부유액을 120 μ l씩 분주하여 배양한 후 실험에 사용하였다.

③ Western Blot of COX-2

RAW 264.7(1 \times 10⁶ cell)를 60mm plate에서 배양한 후 LPS(lipopolysaccharide) 1 μ g/ml를 처리한 후 TH 10, 50, 100ppm을 24시간 처리하였다. 24시간 처리 후 배양액을 제거하고 세포를 lysis bufer(RIPA buffer에 protease inhibitors(10 μ g/ml Leupeptin, 1 mM AEBSE, 10 μ g/ml, Aprotinin, 10 μ g/ml Pepstatin A)와 phosphatase inhibitor(Na₃VO₄) 처리하고, cell scraper로 세포를 모은 후, 얼음에서 30분간 반응 후, 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm에서 원심분리하여, 상층액을 따서 BCA 방법으로 단백질 정량을 하였다. 10% SDS-PAGE gel에 각 샘플 30 μ g의 단백질을 전기영동하였으며, 전기영동 후 NC membrane에 transfer하였다. transfer된 NC membrane에 primary antibody COX-2 (No-160116, Cayman Chem.)로 12시간 incubation하였고, secondary Ab (1:2000)로 2시간 동안 incubation 하였다. ECL 방법으로 COX-2 band를 detection하였다.

④ TH의 처리농도 및 시간별 처리

추출한 한약물을 처리 당일 FBS가 첨가되지 않은 DMEM에 희석하여 처리농도별로 사용하였다. 처리농도는 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000 μ g/ml로 처리하고, 처리시간은 24시간으로 실시하였다.

⑤ MTT 정량

Mosmann의 방법에 따라 배양한 세포주를 각각 5 \times 10³ cell/ml이 되도록 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 이들 세포를 10, 50, 100, 200,

300, 500, 1000 ppm 농도의 TH가 포함된 배양액에서 24시간 배양 후 MTT 200 μ /ml가 포함된 배양액을 well 당 200 μ 씩 넣은 후 다시 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 DMSO를 100 μ /well씩을 넣어 5분간 실온에 방치하며 Formazan을 용해한 후 microplate Reader로 흡광도 570 nm에서 측정하였다.

⑥ RT-PCR(IL-1 β , TNF- α , IL-6)

역전사중합연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)은 역전사 kit(promega, Madison USA)와 중합연쇄반응 kit(Pre-mix, 한국생공, 대덕)를 이용하여 실시하였다. 즉 rapid guanidium isothiocyanate 방법으로 마우스 대식세포주로부터 추출한 0.5 μ g의 total RNA를 역전사반응액 (0.1 μ g; oligo (dT)15, reverse transcription buffer, 5mM MgCl₂, 1 mM dNTP mixture, 10 unit; rRNase ribonuclease inhibitor, 10 units; AMV reverse transcriptase)과 혼합하여 42 oC에서 30분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA 1 μ l(0.01 μ l), cytokine 혹은 β -actin primers 각각 1 μ l(25 pg), 그리고 중합연쇄반응액 (Premix, 한국생공, 대덕; 1 unit; thermostable DNA polymerase, 0.25 mM dNTP, 50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) 17 μ l을 혼합한 후 Perkin elmer (GeneAmp PCR system 2400)를 이용하여 95 oC에서 30 초, 62 oC에서 30초, 72 oC에서 30 초 동안 30회 반복 실시하여 증폭된 cDNA는 1.2% agarose gel에서 전기영동하였다. Cytokines의 mRNA/ β -actin mRNA 양은 ethidium bromide로 염색한 band density를 Fluor-STM Imager (Bio-Rad, Munchen, Germany)로 측정하여 정량하였다.

8) 조직 병리 검사

실험 종료 후에, 왼쪽 귀 끝부분과 등 쪽 피부

를 떼어 내어 10% paraformaldehyde에서 24시간 동안 포르말린에 고정하였다. 24시간 후 30%, 50%, 70%, 90%, 95%, 100% ethanol에 차례로 조직을 담아서 탈수를 하였다. xylene 처리 후 파라핀에 조직을 담아서 24시간 동안 52oC incubator에 보관하여 잔여 xylene이 모두 증발하도록 하였다. 조직을 임베딩 틀에 고정하여 파라핀이 충분히 굳은 후에 조직을 5 μ m로 절편하여 슬라이드 글라스에 붙여서 37oC에서 24시간 동안 두어 조직이 슬라이드 글라스에 완전히 접착되도록 하였다. 슬라이드 글라스를 xylene에 담귀 파라핀을 녹인 후, ethanol로 재수화시켜 hematoxylin-eosin(H&E) 염색을 실시하였다.

9) 통계학적 분석

통계학적 유의성 검정은 one-way ANOVA (Analysis of Variance) 방법을 사용하였으며, 유의수준 p<0.01의 범위내에서 그 결과들은 평균에 대한 표준 편차로 나타냈다.

III. 實驗結果

1. 피부 손상 정도에 미치는 영향

TH를 구강 투여 및 분무를 실시하여 NC/Nga mice의 피부손상정도를 관찰한 결과, NC/Nga 생쥐가 피부염이 유발된 conventional 조건에서는 2주 이후 피부 발진이 유발된 것을 알 수 있었다 (Fig. 1-A).

Conventional 조건에서는 2주, 3주, 3주 간격으로 피부 손상정도를 측정한 결과 대조군은 2주차에는 4.10 \pm 1.00, 5주차에는 7.23 \pm 1.20로 급격한 증가를 나타내었으며, 실험 종료 전 8주차 때는 10.21 \pm 1.30 나타났다. 이에 반해 실험군은 2주차까지는 대조군과 약간 감소한 4.10 \pm 0.90로 관찰되었고, 5주차와 8주차에는 각각 4.92 \pm 1.20, 과

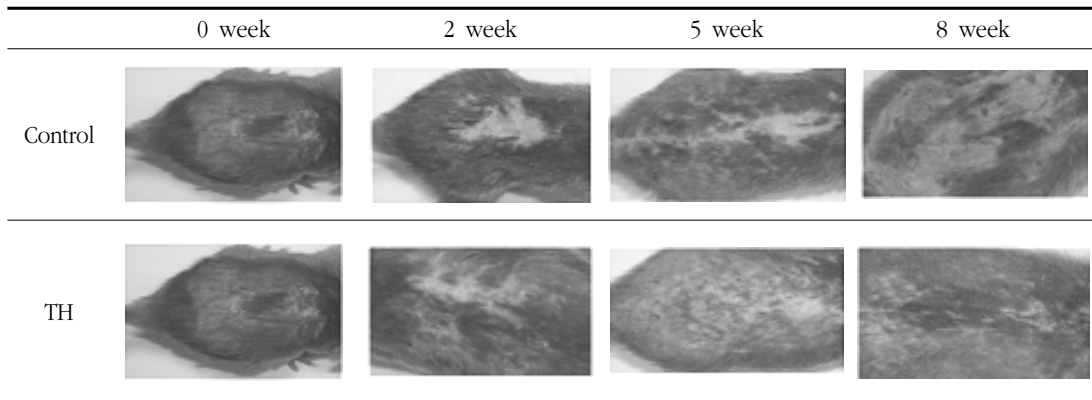


Fig. 1-A. Clinical skin features of dermatitis in NC/Nga atopy dermatitis model mice

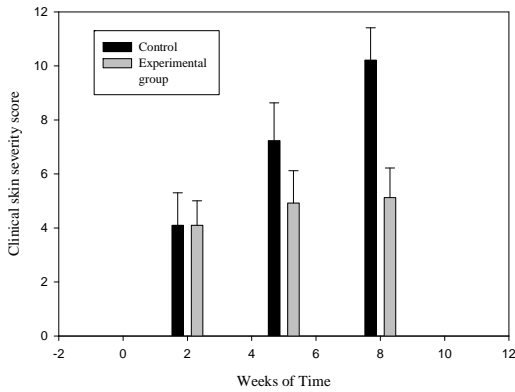


Fig. 1-B. Clinical skin features of dermatitis in NC/Nga atopy dermatitis model mice

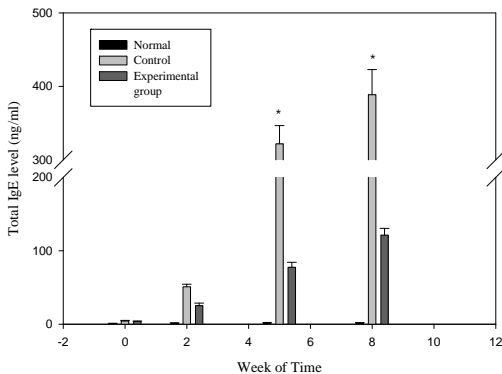


Fig. 2-A. Serum IgE elevation and development of dermatitis in NC/Nga atopy dermatitis model mice

5.12±1.10으로 나타나 대조군에 비하여 피부손상 정도지표(Clinical skin severity score) 감소를 나타냈다(Fig. 1-B).

2. 혈청 중 IgE와 IL-6 발현에 미치는 영향

IgE 생성량은 대조군의 0주와 2주에서 각각 4.40±0.92, 50.90±2.34 ng/ml로 나타났고, 실험군의 0주는 3.78±0.60 ng/ml로 나타났으며 2주에는 25.30±3.43, 으로 나타났다.

대조군의 5주와 8주에서는 각각 321.60±24.85, 388.50±34.11 ng/ml로 나타났고, 실험군의 5주에는 77.60±6.57 ng/ml로 나타났으며 8주에는 121.80±9.14, 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.01$) 감소했다(Fig. 2-A).

IL-6 수준은 대조군의 0주와 2주에서 각각 85.30±5.05, 312.20±17.75 pg/ml로 나타났고, 실험군 0주는 79.33±6.00 pg/ml로 2주에는 139.33±25.31으로 나타나 2주에 대조군에 비하여 IL-6 수치가 크게 감소되었다.

대조군의 5주와 8주에서 각각 689.30±19.06, 721.30±46.69 pg/ml로 나타났고, 실험군의 5주 200.36±41.3 pg/ml로 8주에는 253.60±41.13으로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 2-B).

3. 혈청 중 IL-4, IL-5 발현에 미치는 영향

IL-4 수준은 최종 8주에서 정상군은 12.30 ± 1.45 pg/ml 로, NC/Nga 대조군은 69.80 ± 3.52 pg/ml로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 큰폭으로 증가하였고, 실험군은 28.50 ± 3.78 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 3-A).

IL-5 수준은 최종 8주에서 정상군은 40.25 ± 5.44 pg/ml, NC/Nga 대조군은 211.30 ± 18.47 pg/ml로 나타난 반면, 실험군은 100.23 ± 6.47 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 3-B).

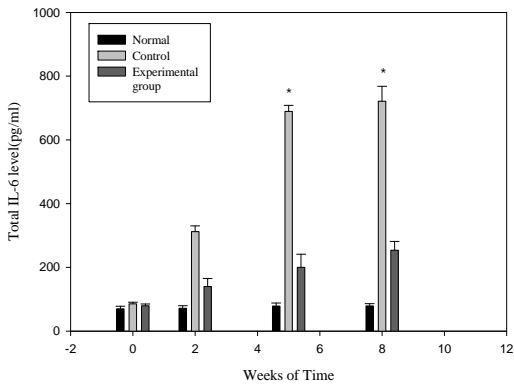


Fig. 2-B. Serum IL-6 elevation and development of dermatitis in NC/Nga atopy dermatitis model mice

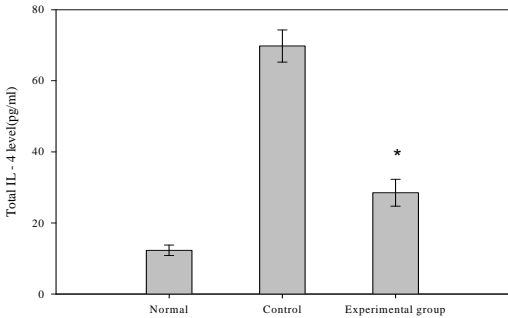


Fig. 3-A. Serum IL-4 elevation and development of dermatitis in NC/Nga atopy dermatitis model mice

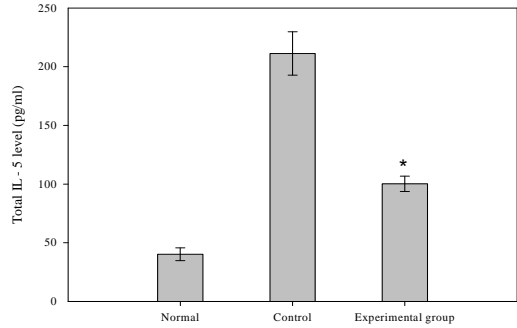


Fig. 3-B. Serum IL-5 elevation and development of dermatitis in NC/Nga atopy dermatitis model mice

4. 혈청 중 IFN-γ 발현에 미치는 영향

혈청 중 IFN-γ 수준은 최종 8주에서 정상군은 15.23 ± 1.30 pg/ml, NC/Nga 대조군은 500.23 ± 74.27 pg/ml, 실험군은 788.63 ± 33.13 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.01$) 증가를 나타냈다(Fig. 4).

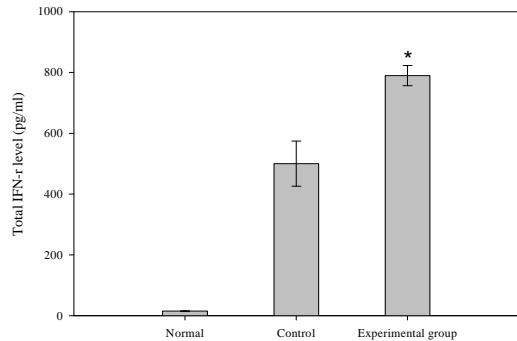


Fig. 4. Serum IFN-γ in NC/Nga atopy dermatitis model mice

5. 혈청 중 IgM 발현에 미치는 영향

IgM 수준은 최종 8주에서 정상군은 49.63 ± 8.80 μg/ml, NC/Nga 대조군은 500.23 ± 42.83 μg/ml로 나타난 반면, 실험군은 296.30 ± 36.37 μg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 5).

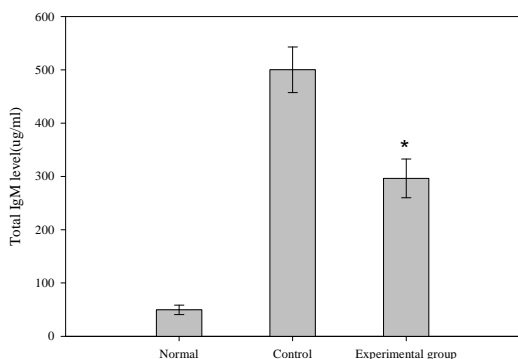


Fig. 5. Immunoglobulin M in NC/Nga atopy dermatitis model mice

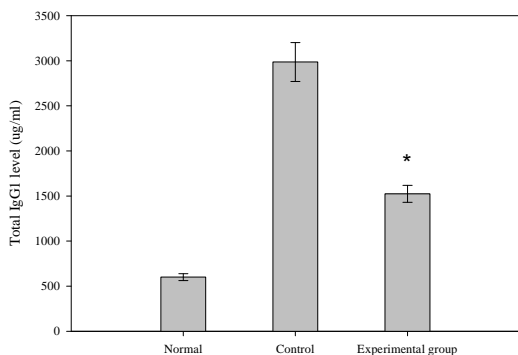


Fig. 6. Immunoglobulin G1 in NC/Nga atopy dermatitis model mice

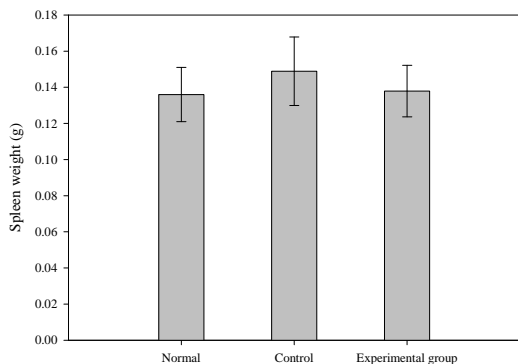


Fig. 7. Spleen weight in NC/Nga atopy dermatitis model mice

6. 혈청 중 IgG1 발현에 미치는 영향

IgG1 수준은 최종 8주에서 정상군은 600.23

$\pm 48.83 \mu\text{g/ml}$ 으로 나타났고, NC/Nga 대조군은 $2986.33 \pm 215.62 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 이에 비해 실험군은 $1523.89 \pm 94.01 \mu\text{g/ml}$ 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 6).

7. 비장 무게 변화에 미치는 영향

NC/Nga 생쥐 16주령 후 비장을 적출하여 무게를 측정한 결과, 정상군은 $0.13 \pm 0.01\text{g}$, NC/Nga 대조군은 $0.15 \pm 0.02\text{g}$, 실험군은 $0.14 \pm 0.01\text{g}$ 로 감소를 나타냈다(Fig. 7).

8. Dorsal skin lesion에서 IL-4, IL-5, IFN- γ 및 CCR3 발현에 미치는 영향

IL-4 mRNA 발현량(IF)은 정상군이 1.00 (Index Fold, IF), NC/Nga 대조군이 2.20 (IF)로 나타났으며, 이에 반해 실험군은 1.50 (IF)으로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 8).

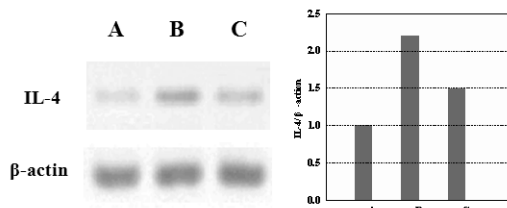


Fig. 8. IL-4 RT-PCR on dorsal biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice normal Balb/c mouse skin (A), NC/Nga mouse skin control (B), TH (C)

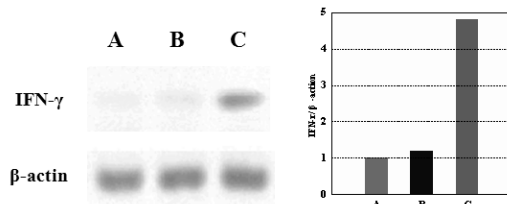


Fig. 9. IFN- γ RT-PCR on dorsal biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice normal Balb/c mouse skin (A), NC/Nga mouse skin control (B), TH (C)

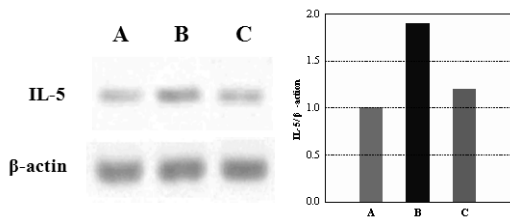


Fig. 10. IL-5 RT-PCR on dorsal biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice normal Balb/c mouse Skin (A), NC/Nga mouse skin control (B), TH (C)

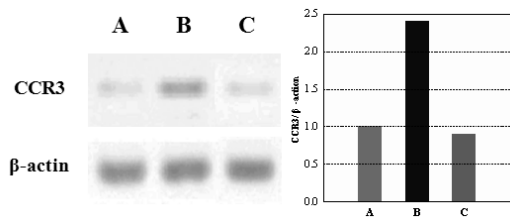


Fig. 11. CCR3 RT-PCR on dorsal biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice normal Balb/c mouse skin (A), NC/Nga mouse skin control (B), TH (C)

IFN- γ mRNA 발현은 정상군이 1.00 (IF), NC/Nga 대조군이 1.20 (IF)로 나타났고, 실험군이 4.80 (IF)으로 나타나 대조군에 비하여 증가하였다 (Fig. 9).

IL-5 mRNA 발현은 정상군이 1.00(IF), NC/Nga 대조군이 1.90 (IF)로 나타났고, 실험군이 1.20 (IF)으로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 10).

Chemokine인 CCR3 mRNA 발현은 정상군이 1.00 (IF), NC/Nga 대조군이 2.40 (IF)로 나타났고, 실험군이 0.90 (IF)으로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 11).

9. Dorsal skin lesion에서의 IL-6 발현에 미치는 영향

IL-6 수치는 정상군이 5.55 ± 0.81 pg/ml, NC/Nga 대조군이 55.64 ± 3.84 pg/ml 로 나타났

고, 실험군은 29.36 ± 6.28 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소를 나타냈다 (Fig. 12).

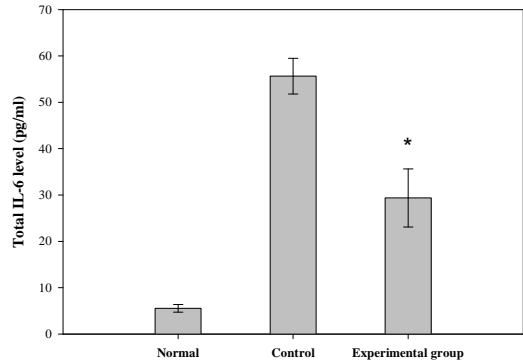


Fig. 12. Culture supernatant IL-6 production in dorsal skin biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice

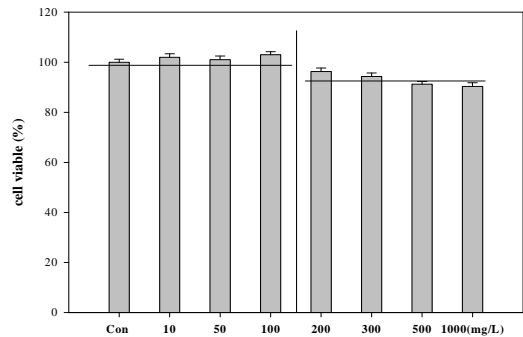


Fig. 13. Cell viability as assessed by the MTT assay for L929 cell line pretreated for 24h with TH the data are presented as the arithmetic mean percent of the control \pm S.D

10. MTT 정량에 의한 세포생존률 측정

MTT 정량방법을 이용하여 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000ppm 농도의 TH가 포함된 배양액에서 L929 세포를 24시간 배양 후 세포증식률을 측정하여 대조군과 비교하였다(Fig. 13). TH 10, 50, 100ppm농도에서는 세포증식률이 대조군에 비해 변화가 없었으며, 200ppm과 300ppm에서는 세

포생존률이 대조군에 비해 4, 10%이하로 감소하였다. 이는 TH이 L929 세포에 200ppm 농도 이상에서 미비하지만은 세포의 독성을 유발함을 알 수 있었다.

11. RAW 264.7 세포에서 염증성 Cytokines 발현도에 대한 TH 의 효과

IL-1 β , TNF- α , IL-6의 발현도를 분석하기 위해서 RAW 264.7에 TH를 10, 50, 100ppm으로 LPS(0.1 μ g/ml)로 자극하기 30분 전에 처리하고 20시간 배양하였다(Fig. 14). 배양후 RT-PCR 결과 IL-1 β 은 House keeping gene인 β -actin의 양과 비교 측정시 Table 2. 에서 같이 TH를 10, 50, 100ppm의 처리하였을때 IL-1 β 의 발현량이 75.0%, 66.0%, 62.0%으로 나타나 TH의 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. TNF- α 은 House keeping gene인 β -actin의 양과 비교 측정시 Table 3. 에서 같이 TH를 10, 50, 100ppm의 처리하였을때 TNF- α 의 발현량이 90.0%, 83.0%, 72.0%으로 나타나 TH의 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. IL-6은 House keeping gene인 β -actin의 양과 비교 측정시 Table 4. 에서 같이 TH를 10, 50, 100ppm의 처리하였을때 IL-6의 발현량이 85.0%, 65.0%, 60.0%으로 나타나 TH의 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다.

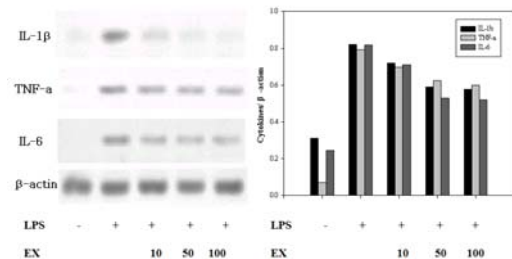


Fig. 14. LPS-induced expression of IL-1 β , TNF- α and IL-6 mRNA is inhibited by TH in RAW 264.7 cells

Table 2. The Effect of TH Against the IL-1 β Gene Expression.

LPS(0.1 μ g/ml)	+	+	+	+
DG ppm	0	10	50	100
IL-1 β / β -actin(%)	100	75.0	66.0	62.0

Table 3. The Effect of TH Against the TNF- α Gene Expression.

LPS(0.1 μ g/ml)	+	+	+	+
DG ppm	0	10	50	100
TNF- α / β -actin(%)	100	90.0	83.0	72.0

Table 4. The Effect of TH Against the IL-6 Gene Expression.

LPS(0.1 μ g/ml)	+	+	+	+
DG ppm	0	10	50	100
IL-6 / β -actin(%)	100	85.0	65.0	60.0

COX-2

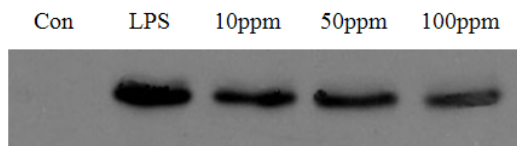


Fig. 15. effects on COX-2 expression from LPS-induced RAW 264.7 cells(Western blot) the same amount of rotein(30 μ g) was loaded in each lane

12. RAW 264.7 세포에서 COX-2의 발현에 대한 TH의 효과

LPS(1 μ g/ml)를 사용하여 대식세포주인 RAW 264.7(1×10^6 cell)의 COX-2 활성을 유도한 모델에

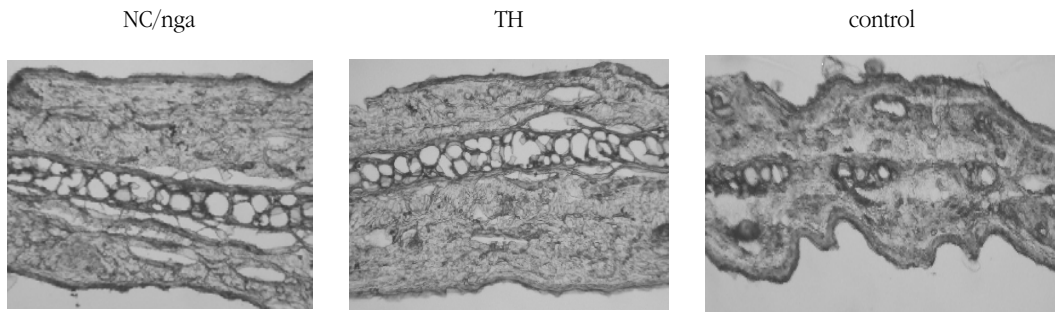


Fig 16. Histologic features of ear lesion in NC/Nga mice

* The optical microscope : 400 magnifications

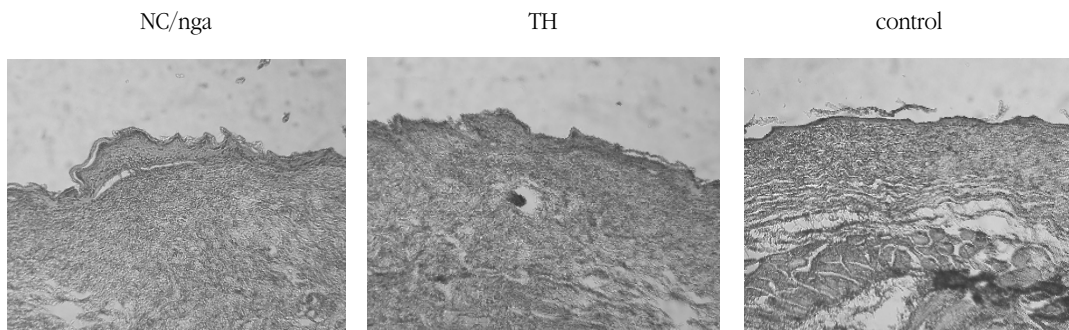


Fig 17. Histologic features of skin lesion in NC/Nga mice

* The optical microscope : 400 magnifications

서 TH를 10, 50, 100ppm 농도로 24시간 처리하여 COX-2 발현 정도를 Western Blot 수행하여 분석하였다. LPS 단독 처리군에 비해 TH를 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. 10, 50ppm을 처리한 군에서 45.0, 50.0% 정도 발현 억제 효과가 나타남을 확인하였고, 100ppm에서는 60.0% 정도의 COX-2 발현 억제 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 15).

13. NC/Nga dermatitis ear & skin lesion의 조직 검사

정상 Balb/c 생쥐의 귀 조직에서는 표피, 진피, 그리고 연골이 뚜렷하게 관찰되었으나, NC/Nga

대조군은 표피층이 두꺼워져 있고, 진피층은 콜라겐의 부종이 있고, Fibroblast의 증식 및 혈관의 확장이 관찰되었다.

실험군에서는 대조군에 비하여 표피와 진피의 두께가 다소 줄어들었고, 표피의 각질화도 심하지 않은 것으로 관찰되었다(Fig. 16).

정상 Balb/c 생쥐의 피부 조직에서는 표피, 진피, 그리고 기저부선이 관찰되나, NC/Nga 대조군에서는 표피가 전반적으로 확장되었으며, 진피의 부종이 심하고 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 반면, 실험군은 대조군에 비하여 표피의 각화와 진피의 부종이 심하지 않고, 염증세포의 침윤도 덜 관찰되었다(Fig. 17).

Ⅳ. 考 察

아토피성 피부염은 알레르기성 비염, 천식과 함께 대표적인 알레르기성 질환으로, 알레르기성 습진, 소아 습진, 굴절부 습진, 범발 신경 피부염 등으로 불리우며, 유아 습진에서부터 소년기, 사춘기, 성인에 나타나는 전형적 태선화 피부염에까지 다양한 임상 및 조직학적 진행 과정을 보여주는 질환이다^{28,29)}.

韓醫學에서는 아토피 피부염을 奶癬, 胎癬, 胎敏瘡 등으로 표현하였는데 隨代 巢³⁰⁾는 《諸病源候論. 小兒雜病諸候. 癬候》에서 小兒의 面部에 癬皮가 甲錯되고 乾燥하게 되는 것을 乳癬이라 하여 嬰兒濕疹과 유사한 것으로 보았다. 清代 吳³¹⁾는 《醫宗金鑑. 外科心法要訣. 嬰兒部》에서 아토피 피부염에 대해 胎敏瘡이라 하고 그 중 嬰兒 頭面이나 눈썹 끝에 나타나는 것을 奶癬이라 하였는데 癢痒과 鱗屑이 있고 형태는 奶疥와도 같다 하였다. 이는 모두 胎中風熱이 원인이라 하였으며 증상에 따라 피부가 마른 풀과 같은 모양이면 乾敏, 粟粒狀으로 매우 가렵고 누런 진물이 온몸에 두루 있으면 濕敏이라 하였다.

아토피 피부염의 한의학적 원인으로는 風熱, 血熱, 血虛, 脾胃運化機能 失調에 의한 胎火濕熱, 風濕熱의 侵入 등을 들 수 있으며, 이외에도 기온의 변화, 음식물, 불규칙한 수유습관, 의복 마찰, 寒冷의 변화 등의 자극이 관여 된다^{16,17)}. 주로 임신 중에 五辛炙燻를 섭취함으로써 아기에게 열이 전해져 생후에 風熱 邪氣를 감수하여 발생하거나 혹은 稟性不耐하여 脾胃不和하니 濕熱이 內生하여 발생한다고 하였다. 또한 이외에도 消化不良, 食物過敏, 衣服摩擦 등의 자극에 의해서도 발생된다고 보았다^{18,19)}.

치료에 있어서는 內治法으로 濕熱型은 清熱利濕, 養血祛風하며 生地黃, 淡竹葉, 防風, 蒼朮, 白鮮皮, 燈心草, 赤芍藥, 連翹, 車前子, 蟬蛻 등의 약물이

주로 사용되고, 脾虛濕盛型은 健脾利濕, 消導清熱하며 白朮, 茯苓, 白扁豆, 薏苡仁, 澤瀉, 地膚子, 牡丹皮 등의 약물이 주로 사용되고 血燥型은 養血潤燥, 清熱解毒하며 生地黃, 牡丹皮, 當歸, 梔子, 黃柏, 麥門冬, 白茅根, 紫草 등의 약물이 주로 사용된다³²⁾. 多用되는 外治法으로는 敷貼法, 洗滌法, 油膏法 등이 있고 清熱, 解毒, 祛風, 殺蟲, 止痒의 효과가 있는 黃連, 黃柏, 苦參, 蛇床子, 枯礬 등의 약물이 많이 사용된다³³⁾.

아토피에 대한 한의학적 연구로 박¹⁶⁾은 아토피 피부염의 동·서의학적 문헌고찰을, 윤¹⁷⁾은 아토피 피부염 환자의 한의학적 임상유형 분류에 대한 문헌 연구를 보고하였고, 단일 한약제에 대한 실험 연구로는 金¹⁸⁾은 桑葉이, 韓¹⁹⁾은 牛蒡子, 金²⁰⁾은 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향을 보고하였으며, 처방에 대한 연구로는 朴²¹⁾은 “消風散”, 金²²⁾은 “加味生料四物湯”, 金²³⁾은 “沆瀣丹”, 朴²⁴⁾은 “消風清營湯加味方”, 洪²⁵⁾은 “溫清飲과 三黃洗劑”를 이용하여 항아토피 효과를 규명한 바가 있으며, 민²⁶⁾은 내·외치 병용치료가 아토피 생쥐 병태 모델에 미치는 영향에 대한 연구를 하였다.

托裏消毒飲은 龔의 萬病回春¹²⁾뿐만 아니라 東醫寶鑑³⁴⁾을 비롯한 각종 의서에서 癰疽, 瘡瘍의 치료에 활용되어온 처방이다. 托裏消毒飲의 '托'은 手推를, '裏'는 裏內를, '消'는 消退를, '毒'은 毒膿을 의미하는 것으로 本方은 氣血을 補益하고 正氣를 扶助하여 膿毒을 裏內에서 外表로 托하여 毒邪의 內陷을 막아내는 처방이다^{35,36)}.

托裏消毒飲의 구성약물은 萬病回春¹²⁾에 의하면 金銀花, 陳皮 各 3錢, 天花粉, 黃芪(鹽水炒)各 2錢, 防風, 當歸(酒洗), 川芎, 白芷, 桔梗, 厚朴(薑汁炒), 穿山甲(炒成珠), 皂角刺(炒) 各 1錢으로 되어 있다. 각 약물의 기미와 효능을 살펴보면 金銀花는 甘寒 無毒하고 清熱解毒하며 抗菌, 抗바이러스, 利尿 작용이 있고, 陳皮는 辛苦溫無毒하고 理氣健脾, 燥濕化痰하며 健胃, 整腸, 止嘔 작용이 있고, 天花粉은

甘酸寒無毒하고 淸熱潤燥, 排膿消腫, 生津止渴하며 抗腫瘍 작용이 있고, 黃芪는 甘味溫無毒하고, 補氣升陽, 固表止汗, 利水消腫, 托裏排膿하며 利尿, 強心, 抗菌 작용이 있고, 防風은 甘辛味溫無毒하고 祛風解表, 祛濕解痙, 止瀉止血하며 解熱, 鎮痛, 利尿, 抗菌 작용이 있고, 當歸는 辛甘味溫無毒하고 補血行血, 潤腸, 調經하며 鎮靜, 利尿, 抗菌 작용이 있고, 川芎은 辛溫無毒하고 活血行氣, 去風止痛하며, 鎮痙, 鎮靜, 抗菌 작용이 있고, 白芷는 辛溫無毒하고 祛風解表, 消腫排膿, 燥濕止帶하며, 鎮痙, 抗菌 작용이 있고, 桔梗은 辛苦平無毒하고, 淸肺提氣, 祛痰排膿하며, 鎮咳, 抗真菌 작용이 있고, 厚朴은 辛苦溫無毒하고 燥濕除滿, 行氣降逆하며, 抗菌, 鎮靜, 健胃 작용이 있고, 穿山甲은 鹹味寒無毒하고 活血通經, 下乳, 消腫排膿하고, 皂角刺는 辛溫無毒하고 消腫排膿, 祛風殺蟲작용이 있다. 이를 정리하면 淸熱解毒, 消腫排膿 작용을 가지고 있는 약물이 12종이고, 이들 약물 중 金銀花, 天花粉, 黃芪, 白芷, 桔梗, 穿山甲, 皂角刺 7종으로 주를 이루고 있으며, 여기에 活血祛瘀藥인 當歸 川芎, 順氣健脾藥인 陳皮, 厚朴, 解表勝濕藥인 防風이 보좌하고 있음을 알 수 있다^{12,37,38)}.

托裏消毒飲에 관한 연구로는 金³⁹⁾이 항알레르기 효과에 대한 연구를 보고하였고, 李 등^{40,41)}은 소염작용에 대한 연구를 시행하였으며, 安⁴²⁾은 마우스의 적혈구에 대한 면역연구를 보고하였고, 朴 등⁴³⁻⁴⁷⁾은 항종양 효과 및 면역조절반응에 관한 실험적 연구를 한 바 있다.

본 연구에서 托裏消毒飲에 가미한 약제는 外臺秘要¹⁴⁾의 崔氏方에 수록된 黃連解毒湯 方劑로 黃連, 黃芩, 黃柏, 山梔子 등 4가지로 구성되어 있다. 구성약물 중 黃連은 心火와 中焦의 火를 瀉하고, 黃芩은 上焦의 火를 瀉하며, 黃柏은 下焦의 火를 瀉하고, 梔子는 三焦의 火를 瀉하여 導火下行 하므로 전체적으로 瀉下解毒 淸火濕熱하는 효능을 발휘한다. 그러므로 黃連解毒湯은 三焦의 實火를 치

료하는 기본처방으로써 각종 炎症疾患 및 알레르기성 皮膚炎 등에 응용할 수 있다¹⁵⁾.

黃連解毒湯의 抗炎작용에 관련한 연구로는 金⁴⁸⁾은 黃連解毒湯의 水針 및 경구투여가 진통, 소염, 해열작용에 미치는 영향에 대해 보고하였고, 李⁴⁹⁾는 접촉성피부염에서의 림프구 활성을 보고하였으며, 安⁵⁰⁾은 궤양성대장염에서의 효과, 松⁵¹⁾은 면양적혈구에 대한 면역반응에 미치는 영향을 보고하였다.

현재 알레르기 질환의 대표적 치료법은 원인 항원과 악화 요인의 회피를 위한 환경관리, 약물요법 및 면역요법 등이 있으며, 이중 약물요법으로 Glucocorticoid, Antihistamines, Antiallergic drugs, Tarolimus, 교감신경자극제, 스테로이드 제제 등이 다용되고 있으나⁵²⁻⁵⁶⁾, 장기 사용 시 나타나는 여러 부작용²⁷⁾으로 인하여 최근에는 보다 효과적이며 안전하게 치료할 수 있는 약물에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다. 또한 알레르기 질환과 관련된 유전자 연구는 알레르기 질환의 분자적 기전을 분석하는데 도움을 줄 뿐만 아니라, 새로운 알레르기 질환 치료제 개발에도 기여 할 수 있어 활발하게 이루어지고 있다^{57,58)}.

실험동물인 NC/Nga 생쥐는 일반적인 환경에서 사람의 아토피 피부염과 매우 유사한 증상인 가려움, 심한 피부염증, 血脹, 체중 감소를 나타내는 실험동물 모델로 air-uncontrolled 상황 (conventional NC/Nga mice)에서 12주 이후 혈청 중 IgE 수준이 정상의 100배 까지 기록되고 아토피성 피부염의 피부 장애가 동반 된다⁵⁹⁾.

아토피 피부염의 정확한 병리는 아직까지 완전히 이해되고 있지 않으나 유전적 소인과 함께 면역학적, 비면역학적 기전이 관여하리라고 생각되고 있다. 아토피 피부염의 대부분을 차지하는 외인성 아토피 피부염은 IgE와 연관된 면역 기전에 의해 발생되는데, 특정 알레르겐에 대한 즉시형 면역반응 보다는 T 세포 이상에 의한 지연형 면역 반응

이 관여 한다는 보고들이 많다⁶⁰⁻⁶⁴.

아토피 피부염 환자에서 세포 매개성 면역기능 장애가 IgE 증가와 관련 있음이 밝혀지면서 즉시형 과민 반응 외에도 지연형 과민 반응이 아토피 피부염의 병인에 관여함을 주장하는 보고들이 증가하고 있다. 아토피 피부염 환자에서 세포 매개성 면역 장애는 약 80% 까지 발생하는 것으로 알려져 있으며, 바이러스 및 피부 사상균등에 의한 피부 감염증에 대해 감수성이 증가되고, 접촉 알레르겐에 대한 감수성은 감소된 경향을 보인다. 과거에는 T 세포 성숙 결핍설, CD8+ 억제 T 세포의 수적 감소 등이 보고 된 바 있었으나, 최근엔 CD4+ T세포의 역할이 더욱 중요한 것으로 알려지고 있다^{59,64}. 즉 B 세포로부터 IgE의 생성을 유도하는 IL-465), B 세포로부터 IgE의 생성을 촉진하는 IL-566), IgE의 생성을 증폭시키는 IL-667) 등을 분비하는 T 세포는 CD4+ T 세포중 Th2 세포인데, 입원 환자의 말초 혈액 및 피부 병변으로부터 분리한 항원 특이 T 세포 클론이 Th2 로 밝혀졌고, 이 세포들에서 IL-4 등의 Th2 사이토카인 프로파일 분비된다는 사실이 입증되었다. 아토피 피부염 환자들의 80% 이상에서 혈청 IgE의 수치가 증가되어 있으며⁶⁵⁻⁶⁸, 이 수치는 대체적으로 아토피 피부염의 임상적 중증도와 비례하는 것으로, 아토피 피부염의 발병 기전과 밀접한 상관 관계가 있는 것으로 보고되어 기본적인 검사 대상이 된다. 알레르기 질환의 발생 과정은 크게 초기 반응과 후기 반응으로 구분되는데, 초기 반응은 항원의 자극에 의해 항체(IgE)가 생산된 후 항체가 비만세포 표면의 high affinity receptor(FcεRI)에 결합하였을 때 항원이 제 침입하면 FcεRI와 결합하고 있는 항체 IgE와 결합하여 비만세포내로 신호를 빠르게 전달하여 알레르기를 일으키는 화학적 매개물질(inflammatory chemical mediator ; cytokine, histamine, leukotrienes)을 분비하게 된다. 이에 비해 후기 반응은 Th2-type2 사이토카인(IL-4, 5,

6, 10, 13)이 tissue 또는 fibroblast 또는 epithelial cell들의 케모카인(chemokine ; monocyte chemoattractant protein-1, eotaxin-1, RANTES) 생산을 유도하여, 그 결과 염증성 세포 특히 호산구가 알레르기 반응 부위로 이동하는 것이다⁶⁸⁻⁷⁰.

본 실험은 TH를 이용하여 in vivo 실험으로 아토피 유발 모델인 NC/Nga mice에 대해 아토피 유발 억제 및 항염증 효능에 대한 실험(in vitro)으로, TH를 8주령부터 주 3회 구강 투여하고, 외용제로 사용한 경우 TH 분무를 8주령부터 일 2회 실시하여 실험시작 0주부터 8주까지 2, 3, 3주(2, 5, 8주) 간격으로 NC/Nga mice의 피부 손상정도를 측정하였다. 그 결과 대조군은 2주에 4.10±1.00, 5주에 7.23±1.20로 급격한 증가를 나타내었으며, 실험 종료 전 8주는 10.21±1.30로 나타났다. 이에 반해 실험군은 2주까지는 대조군과 약간 감소한 4.10±0.90로 관찰되었고, 5주와 8주에는 각각 4.92±1.20와 5.12±1.10으로 나타나 대조군에 비하여 피부손상정도지표(Clinical skin severity score) 감소를 나타냈다(Fig. 1-B).

TH를 처리한 NC/Nga mice의 혈액에서 IgE 수치는 5주와 8주에서 대조군에 비하여 약 75.9%와 68.6%의 유의성 있게(p<0.01) 감소를 나타내었고(Fig. 2-A), 혈중 IL-6 수치 역시 대조군에 비하여 5주와 8주에서 70.9%와 64.8%의 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 2-B).

또한 혈중 IL-4 수치는 8주에서 NC/Nga 대조군에 비하여 59.2%(Fig. 3-A), IL-5 수치는 52.6%(Fig. 3-B)의 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타냄으로써, TH가 B세포 분화에 수반되는 IgE, IL-6 발현과 Th2에서 분비되는 IL-4, IL-5 발현을 억제함을 확인하였다.

Dorsal skin lesion 에서의 IL-6 발현(Fig. 12)에서 유의성 있는 (p<0.01) 감소 역시 상기한 결과와 부합됨을 입증해 주고 있다.

IL-5와 더불어, 피부 염증 부위에 만성으로 침윤

이 일어나는 Th2, 호산구, 중성구 및 mast 세포 등에서 발현되는 CCR3 발현 또한 대조군이 2.40(IF) 실험군이 0.90(IF)로 62.5% 발현이 감소하였다(Fig. 11).

Th1 세포는 IFN- γ 와 같은 Th type 1 사이토카인(Th1 cytokine ; proinflammatory cytokine)을 생산하여 박테리아 감염과 같은 intracellular pathogen에 대항하는 면역 반응에 관여한다. 특히 Th1 세포에서 분비되는 IFN- γ 는 알레르기 반응을 일으키는 Th2 세포를 억제하는 것으로 알려져 있는데, 본 실험에서 혈청 중 IFN- γ 수준은 대조군이 500.23 \pm 74.27 pg/ml, 실험군이 788.63 \pm 33.13 pg/ml로 57.6% 유의성 있는 (p<0.01) 증가를 나타냈고(Fig. 4), skin lesion의 발현 결과에서는, IL-4 발현은 대조군이 2.20(IF), 실험군이 1.50(IF)로 31.8%(Fig. 8) 감소, IFN- γ 발현은 대조군이 1.20(IF), 실험군이 4.80(IF)로 300% 증가(Fig. 9), IL-5은 대조군이 1.90(IF), 실험군이 1.20(IF)로 36.8% 감소(Fig. 10)하였으며, 역시 혈청 결과와 부합된 결과가 도출되었다.

알레르기는 항체의 기준 표본을 IgM 또는 IgG에서 IgE로 바꾸어주는 Th2 세포가 활성화되면서 시작되는데, 본 실험에서 IgE의 생산과 관련되는 IgM과 B세포 분화 중에 비례적으로 증가되는 IgG1 등 치환된 면역 글로불린의 변화에서 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 감소로(Fig. 5, 6), IgE 발현 결과와 부합됨으로써, TH 시료가 Th2 세포 활성화 억제와 더불어 IgE 생산에 관련된 B세포 분화를 억제하는 작용에 대한 연구 결과를 얻을 수 있었다.

아토피 피부염의 염증반응은 손상에 대한 국소 반응으로, 여기에는 여러 종류의 염증세포와 염증성 cytokine 및 mediator 들이 관여한다. 특히 IL-1 β , TNF- α , IL-6는 염증을 일으키는 주요한 cytokine으로 보고 되고 있으며, 염증반응의 정도를 나타내는 지표로 이용되고 있다⁷¹⁾. 또한 이들

cytokine 유전자의 프로모터에 존재하는 NF- κ B element는 cytokine 유전자 발현에 중요한 역할을 한다⁷²⁾. 마우스 대식세포주인 RAW 264.7에서 LPS(Lipopolysaccharide)에 유도된 NF- κ B의 활성화에 의해 생성되는 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 발현도를 측정하기 위해서 본 연구에서는 RT-PCR 방법을 이용하여 TH에 대한 염증성 cytokine인 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 유전자 발현도 억제 효과를 확인하고자 하였다. 염증의 억제는 크게 phospholipase 저해제, lipoxygenase 저해제 및 cyclooxygenase (COX)의 저해제의 작용으로 나눌 수 있다. Eicosanoids의 생합성 과정 중 염증반응은 cyclooxygenase (COX)에 의해 진행되며 두 종류의 이성효소를 가지고 있는데, 여러 가지 생체내 장기의 항상성 유지 및 보호작용들은 COX-1에 의하며, 염증성, 유도성 효과들은 주로 COX-2에 의한 것이다⁷³⁾. COX-2에 의해 생성되는 PEG2 합성은 비스테로이드성 항염증약(NSAIDs)에 의해 억제되거나 소화성궤양이나 신기능 이상 등의 부작용으로 사용이 제한되어 왔으므로, 독성이 낮고 부작용이 없는 새로운 약물이 요구되고 있다. 천연물에서는 문 등⁷⁴⁾이 230여종의 생약에 대해 COX-2 활성 억제에 관하여 검색하였다. 본 연구에서는 TH에 대한 COX-2 억제활성 효과를 확인하고자 하였다.

세포독성실험에서 세포독성을 검정하는 방법 중 MTT 정량과 NR 정량은 다른 기작을 이용하지만 두 정량 모두 살아 있는 세포수를 측정하는 염색법이다. MTT 정량은 미토콘드리아의 숙신산 탈수효소 (Succinate dehydrogenase)의 활성도를 이용한 방법으로 용해 가능한 황색 MTT tetrazolium salt가 숙신산 탈수효소에 의해 불용성의 청색 MTT formazan으로 환원되는 정도를 흡광도로 측정하는 방법이다^{75,76)}.

TH의 염증성 Cytokines 발현도에 대한 효과(Fig. 14)는 IL-1 β 는 TH를 10, 50, 100ppm의

처리시 75.0%, 66.0%, 62.0%으로 나타나 TH의 농도 의존적으로 억제되었으며(Table 2), TNF- α 에서는 10, 50, 100ppm의 처리시 90.0%, 83.0%, 72.0%으로 나타나 TH의 농도 의존적으로 억제되었으며(Table 3), IL-6에서도 10, 50, 100ppm의 처리시 85.0%, 65.0%, 60.0%으로 나타나 TH의 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다(Table 4). TH는 LPS에 의해 생성된 cytokine들을 농도 의존적으로 억제하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

항염증 효과에 대한 실험에서는 LPS(1 μ g/ml)를 사용하여 대식세포주인 RAW 264.7(1 \times 10⁶ cell)의 COX-2 활성을 유도한 모델에서 TH는 LPS 단독 처리군에 비해 TH의 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. Fig. 15에서와 같이 TH는 10, 50, 100ppm 농도에서 45.0%, 50.0%, 60.0%의 COX-2 발현 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

TH의 안전성을 확인한 실험으로 세포독성평가는 TH이 10, 50, 100ppm농도에서는 세포증식률이 대조군에 비해 변화가 없었으며, 200ppm과 300ppm에서는 세포생존률 대조군에 비해 4, 10% 이하로 감소하였다. 이는 TH이 L929 세포에 200ppm 농도 이상에서 세포 독성을 유발됨을 알 수 있었다. 좀 더 안전성을 확인하기 위해서는 경구 아급성 독성, 급성 독성 등의 in vivo 실험을 수행해야 할 것으로 사료된다.

결과적으로 본 시료가 Th1 세포의 IFN-r 생성 증가와 더불어 관련 면역세포 활성화를 통해 Th2 세포를 억제함으로써 IL-4, 5 등의 염증 관련 사이토카인 생성을 억제하고 이로 인해 IgE 생성 역시 억제됨으로써 조직 사진(Fig. 16,17)에서 나타난 바와 같은 유의성 있는 결과가 도출된 것으로 사료된다. 이 같은 결과는 기존의 면역학적 작용 기전과 부합됨으로써, 본 시료의 면역 조절 작용을 통한 항알러지 효과가 인정되며, 향후 약물 독성 평가(in vivo) 등의 안전성에 관한 연구가 필요하다 사료 된다.

V. 結 論

托裏消毒飲 合 黃連解毒湯(TH)의 아토피 치료 기전을 규명하고자, NC/Nga 생쥐의 동물 병태 모델을 이용하여 다양한 면역 반응을 관찰하였던 바, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. NC/Nga 생쥐의 피부 손상 정도는 5주와 8주에 실험군이 대조군에 비하여 각각 32.0%, 50.0% 감소하였다.
2. NC/Nga 생쥐의 혈중 IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IgM 및 IgG1 수준은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, IFN- γ 수준은 유의성 있게 증가하였다.
3. NC/Nga 생쥐의 비장 무게는 실험군이 대조군에 비하여 감소하였다.
4. NC/Nga 생쥐의 피부 조직 배양에서 IL-4, IL-5, CCR3 유전자 발현은 실험군이 대조군에 비하여 감소하였고, IL-6 발현량은 유의성 있게 감소하였으며, IFN- γ 의 유전자 발현은 실험군이 대조군에 비하여 증가하였다.
5. 세포독성평가는 L929 세포에서 10, 50, 100ppm 농도에서 세포증식률이 실험군이 대조군에 비해 변화가 없었으며, 200ppm 농도 이상에서는 세포 독성을 유발됨을 확인하였다.
6. RAW 264.7에서 염증성 Cytokines 발현도에 대한 효과는 IL-1 β , TNF- α , IL-6 유전자 발현은 실험군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다.
7. RAW 264.7에서 항염증 효과는 COX-2 활성을 유도한 모델에서 실험군이 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제되었다.
8. NC/Nga 생쥐의 귀와 등 피부 조직 변화에서는 표피와 진피의 염증 정도와 침윤된 염증 면역 세포 등은 실험군이 대조군에 비하여 감소되었다.

Acknowledgment

이 논문은 2010학년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨.

參考文獻

1. Bonini s, Ruffilli A. The genetics of atopy, *Acta Microbiol Immunol Hung.* 1998;45 (1):3-13.
2. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2004; 113:651-7.
3. Heinzmann A, Daser A. Mouse models for the genetic dissection of atopy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;127:170-80.
4. 오재원, 김규언, 편복양, 이해란, 정지태, 홍수중, 박강서, 이수영, 송상욱, 김철홍, 안강모, 남승연, 손명현, 김우경, 이미희, 권병철, 최성연, 이소연, 이하백, 이상일, 이준성. 1995년과 2000년의 학동기와 2003년 학동전기 소아에서의 아토피피부염의 역학적 변화에 관한 전국적인 연구. *소아알레르기 및 호흡기학회지.* 2003;13(4):227-37.
5. 조기여. *피부과학.* 서울:성화. 2001:161-3.
6. 강병수. *한방임상 알레르기.* 서울:성보사. 1988:196-201.
7. 홍창의. *소아과학.* 서울:대한교과서. 1991: 766-9.
8. 顧伯華. *實用中醫外科學.* 上海:上海科學技術出版社. 1985:280-2.
9. 吳克潛. *吳氏兒科學.* 台北:新文豐出版社. 1984: 645.
10. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연. 아토피 피부염의 동서의학적 문헌고찰. *대한안이비인후피부과학회지.* 2002;15(1):226-52.
11. 龔信. *古今醫鑑.* 江西科學技術出版社. 1990:418.
12. 龔延賢. *萬病回春.* 北京:人民衛生出版社. 1984: 437.
13. 김경선. 탁리소독음의 항알레르기 효과에 관한 실험적 연구. *경희대학교 석사학위논문집.* 1994.
14. 王燾. *外臺秘要.* 北京:人民衛生出版社. 1996:72.
15. 김형진. 동의보감 중 황련해독탕 활용에 대한 연구. *원광대학교 박사 학위논문집.* 2008.
16. 박민철, 김진만, 홍철희. 아토피 피부염의 동·서의학적 문헌 고찰. *대한안이비인후피부과학회지.* 2002;15(1):226-52.
17. 윤화정, 고우신. 아토피 피부염 환자의 한의학적 임상유형분류에 대한 연구. *대한한의학회.* 2001;22(2):319-26.
18. 金岐勳. 桑葉이 아토피 피부염에 미치는 영향, *경희대학교 석사학위논문.* 2004.
19. 韓奎哲. 牛蒡子가 아토피 피부염에 미치는 영향, *경희대학교 석사학위논문집.* 2004.
20. 金施慧. 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향, *경희대학교 석사학위논문집.* 2004.
21. 박성남. 消風散이 BALB/c mouse를 이용한 Atopy 피부염 Model 에 미치는 영향, *경희대학교.* 2003.
22. 김정진. 加味生料四物湯의 항염증효과와 지양고의 아토피 피부염 손상 및 지양효과에 미치는 影響. *경희대학교 박사학위논문집.* 2002.
23. 김우연. 沉瀉丹이 아토피 피부염 환자 단핵세포의 Cytokine 분비 능에 미치는 영향. *경희대학교 박사학위논문집.* 2000.
24. 박응식. 아토피 피부염을 유발한 동물모델에서 消風清營湯加味方이 각질층 기능 회복에 미치는 영향. *동국대학교 석사학위논문집.* 2004.
25. 홍철희. 溫清飲과 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. *원광대학교*

- 박사학위논문집, 2007.
26. 민영규. 消風散加減方과 外治方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2005;26(4):116-34.
 27. 윤화정, 윤정원, 윤소원, 고우신. 아토피 피부염의 평가방법에 대한 연구 : 비교 분석 및 설립. 대한한의학회지. 2002;23(4):15-26.
 28. 전국의과대학교수 역. 오늘의 진단과 치료. 도서출판 한우리. 1999:132-4.
 29. 도영민. 아토피란 무엇인가(아토피의 실상과 배독법의 이해). 마이크로. 2003.
 30. 巢元方 編著. 巢氏諸病源候論. 大星文化社. 1992:251-3.
 31. 吳謙. 醫宗金鑑(下). 北京:人民衛生出版社. 1982:443.
 32. 김미정, 이승연. 소아 아토피 피부염에 대한 문헌적 고찰. 대한한방소아과학회지. 2000;14(2):169-84.
 33. 박혜선, 지선영, 구덕모. 아토피 피부염의 중의 외치법 고찰. 대한외관과학회지. 2001;14(1):32-41.
 34. 許俊. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1908:538.
 35. 최웅, 최정화. 탁리소독산이 항종양 및 면역작용에 미치는 효과. 대한외관과학회지. 1999;12(1):79-98.
 36. 신재용. 방약합편해설. 서울:전통의학연구소. 1993:80.
 37. 신길영. 신씨본초학. 서울:집문사. 1973:9-12, 80-4, 268, 271-5, 404-7, 456-61, 542-3, 589-92, 600-3, 617-20, 675-7.
 38. 이상인. 본초학. 서울:영림사. 1991:129-31, 165-6, 219-20, 291-2, 409-10, 428-30, 454-5, 460-1, 578-80.
 39. 김경선. 托裏消毒飲의 항알레르기 효과에 관한 實驗的 研究. 경희대학교 석사학위논문집. 1994.
 40. 이상문. 托裏消毒飲이 급성 부비동염을 유발시킨 마우스에 미치는 영향. 동국대학교 박사학위논문집. 2007.
 41. 박용기. 皂角刺의 消炎作用에 대한 實驗的 研究 : 托裏消毒飲과 瓜蒌牛蒡湯의 加減에 따른 效能比較. 동국대학교 박사학위논문집. 1996.
 42. 안대중. 탁리소독음이 마우스의 緬羊赤血球에 對한 免疫反應에 미치는 影響. 원광대학교 석사학위논문집. 1981.
 43. 박관우. 탁리소독음 추출물의 남성호르몬 수용체 발현억제 및 고사 유도 효과. 원광대학교 박사학위논문집. 2007.
 44. 김영선. 전립선 암세포 LNCaP 세포에서 托裏消毒飲 추출물의 세포고사 유도 효과. 원광대학교 석사학위논문집. 2003.
 45. 박형권. 托裏消毒飲의 PC-3 세포에 대한 세포고사 유도 효과 및 기전 연구. 원광대학교 석사학위논문집. 2003.
 46. 이형재. 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포에서 托裏消毒飲 추출물의 세포고사 유도 효과. 원광대학교 석사학위논문집. 2003.
 47. 양기호. 托裏消毒飲의 抗腫瘍 效果 및 免疫調節反應에 關한 研究. 원광대학교 박사학위논문집. 1997.
 48. 김광호, 김성수. 黃連解毒湯과 溫性瘀血方의 水針 및 경구투여가 진통, 소염, 해열작용에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1994;15(1):9-25.
 49. 이정현. 接觸性 皮膚炎에서 黃連, 黃連解毒湯, 金銀花가 림프구 活性에 미치는 影響. 동아대학교 박사학위논문집. 2000.
 50. 안중환. 황련해독탕이 DSS로 유발된 흰쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향. 동국대학교 박사학위논문집. 2005.
 51. 송호준. 황련해독탕이 면양 적혈구에 대한 면역반응에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1985;6(1):104-111.
 52. 피부과학 원색도감 편찬위원회 편. 피부과학

- 원색도감. 서울:도서출판 정담. 1999:54-63.
53. 전국의과대학교수 편. *Katzung's 임상약리학*, 한우리. 1998:1049-68.
54. 이유신. *임상피부과학*. 서울:여문각. 1987:19-25, 327.
55. 김규환. 아토피피부염의 임상양상 및 치료. *천식 및 알레르기*. 1995;15(1):11-25.
56. 김정원. 아토피피부염의 진단과 치료. *천식 및 알레르기*. 1993;13(3):87-8.
57. Foy, TM, Shepherd DM, Durie FH, Aruffo A, Ledbetter JA, and Noelle RJ. In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymusdependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39. *J. Exp. Med.* 1993;178:156-7.
58. Gauchat, JF., Lebman DA, Coffman RN, Gascan H, and J. E. de Vries. Structure and expression of germline transcripts in human B cells induced by interleukin to switch to IgE production. *J. Exp. Med.* 1990;172:463.
59. Masahiro M, Chisei R, Keiko K, Hiroaki S, Atsuko I, Junko S, Hiroko U, Hajime S, Kouichi M, Yosiaki H, and Hiroshi M. IgE Hyperproduction Through Enhanced Tyrosine Phosphorylation of Janus Kinase 3 in NC/Nga Mice, a Model for Human Atopic Dermatitis. *The Journal of Immunology*. 1999;162:1056-63.
60. Horan, RF, Schneider LC, and Sheffer AL. Allergic skin disorders and mastocytosis. *JAMA*. 1992;268:2858.
61. Ohmen, JD, Hanifin JM, Nickoloff BG, Rea TH, Wzyzkowski R, Kim J, Jullien D, McHugh T, Nassif AS, Chan SC, et al. 1995. Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis: contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reaction. *J. Immunol.* 1956:154.
62. Renz, H, Brodie C, Bradley K, Leung DYM, and Gelfand EW. Enhancement of IGE production by anti-CD40 antibody in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994;93:658.
63. Rousset, F, Robert J, Andary M, Bonnin JP, Souillet G, Chretien I, Briere F, Pene J, and J. E. deVries. Shifts in interleukin-4 and interferon-gamma production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991;87:58.
64. Till S, Dickason R, Huston D, Humbert M, Robinson D, Larche M, Durham S, Kay AB, Corrigan. IL-5 secretion by allergen-stimulated CD4+ T cells in primary culture: relationship to expression of allergic disease. *J Allergy Clin Immun.* 1997;99(4):563-9.
65. Renz, H, Jujo K, Bradley KL, Domenico J, Gelfand EW, and Leung DYM. 1992. Enhanced IL-4 Production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma. *J. Invest. Dermatol.* 1992;99:403.
66. Kay, AB, Ying S, Vamey V, Gaga M, Durham SR, Moqbel R, Wardlaw AJ, and Hamid Q. Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3(IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/

- macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J. Exp. Med.* 1991;173:775.
67. Nobuyuki S, Xiao-Nian Y, Chiharu K. Dehydroepiandrosterone attenuates the spontaneous elevation of serum IgE level in NC/Nga mice. *Immunology Letters*. 2001;79:177-9.
68. Matsumoto M, Ra C, Kawamoto K, Sato H, Itakura A, Sawada J. IgE hypertention through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis. *J. Immunol.* 1999;162:1056-63.
69. Mitsuru M, Joachim B, Antony IM, Enno C. and Jens-M. Schroder. IL-4 Induces Eotaxin: A Possible Mechanism of Selective Eosinophil Recruitment in Helminth Infection and Atopy. *The Journal of Immunology*. 1998;160:60-8.
70. Ponath, PD, Qin S, Ringler DJ, Clark-Lewis I, Wang J, Kassam N, Smith H, Shi X, Gonzalo JA, Newman W, Gutierrez-Ramos JC, Mackay CR. 1996. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. *J. Clin. Invest.* 1997;604.
71. Baeuerle, PA. The inducible transcription activator NF- κ B Regulation by distinct subunits. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991; 1072:63-70.
72. Benjamin, RV, Shijun Y, and James JL. Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*. *Infection and Immunity*. 1995;63: 3158-65.
73. Golden BD. and Abramson SB. Selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 1999; 25:359-78.
74. 문태철, 정규찬, 손건호, 김현표, 강삼식, 장현욱. 천연물로부터 사이클로옥시나아제-2 저해제 검색. *약학회지*. 1998;42(2):214-9.
75. Wei Y. and Daniel A. Cytotoxicity potential of surfactants mixtures evaluated by primary cultures of ravit corneal epithelial cells. *Toicol. Lett.* 1994;70: 309-18.
76. Cornelis M, Dupont CH. and Wepierre J. Prediction of eye irritancy portential of surfactants by cytotoxicity test in vitro on cultures of human skin fibroblasts and keratinocytes. *Toxical. in vitro*. 1992;6(2): 119-28.