

生脈散과 生脈散加味方이 NC/Nga 마우스의 아토피 피부염에 미치는 영향에 대한 비교 연구

¹문 효 · ¹황충연 · ¹홍석훈 · ²홍철희 · ¹김남권 · ¹조가원 · ³임규상
¹원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실
²상지대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실
³원광대학교 한의학전문대학원, 한국전통의학연구소

A Comparative Study on the Effects of Saengmaeksan and Saengmaeksan-gamibang on Atopic Dermatitis in NC/Nga mouse

*Hyo Moon · Chung-Yeon Hwang · Seok-Hoon Hong · Chul-Hee Hong ·
Nam-Kwen Kim · Ga-Won Jo · Kyu-Sang Lim*

Objective : This study was carried out to compare Saengmaeksan-gamibang(SG) to Saengmaeksan(SM) on the efficacy of moisturization, skin whitening, anti-inflammation, and anti-allergy in atopic dermatitis using NC/Nga mice model.

Methods : We assessed the effects of SG and SM on tyrosinase, filaggrin, serine-palmitoyl transferase(SPT), COX-2, AP-1 in vitro, on IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IgM, IgG1, IFN- γ in vivo with NC/Nga mice.

- Results** : 1. SG increased the tyrosinase inhibition activity and the levels of filaggrin and SPT, decreasing the level of COX-2 .
2. On the other hand, SM decreased the tyrosinase inhibition activity and the levels of filaggrin and SPT, increasing the level of COX-2 .
3. Serum IgE, IL-4, 5, 6, IgM, and IgG1 were decreased in both SG group and SM group compared to the control group. The decrease degree in these factors was higher in SG than in SM.
4. Serum IFN- γ was increased in both SG group and SM group compared to the control group. The increase degree in IFN- γ was higher in SG than in SM.

Conclusion : As the result of the above experiments, it was proved that SG has the moisturization, skin whitening, anti-inflammation, and anti-allergy effects, which are greater than those of SM, and provides the significant efficacy on atopic dermatitis treatment.

Key words : Saengmaeksan-gamibang, Saengmaeksan, Moisturization, Skin whitening, Anti-inflammation, Anti-allergy, Atopic dermatitis, NC/Nga mice

I. 緒 論

아토피 피부염은 알레르기성 비염, 천식과 더불어 대표적인 알레르기성 질환으로 알레르기성 습진, 소아 습진, 굴절부 습진, 범발성경 피부염 등으로 불리우며, 심한 소양감, 피부 건조, 진물, 홍종, 홍반, 각질, 태선화 등의 증상을 보이며 만성적으로 재발하는 습진성 질환이다^{1,2)}.

아토피 피부염의 유병률은 날로 증가하는 추세에 있으며^{3,4)}, 국내 아토피 피부염의 유병률에 대해 소아의 경우 2006년 지⁵⁾ 등이 전국 15개 지역 초등학교를 대상으로 역학조사를 시행한 결과 아토피 피부염으로 진단받은 유병률을 28.22%로 보고하였고, 김⁶⁾ 등은 2007년 국민건강영양조사의 건강 설문 중 아토피 피부염의 유병 경험 등에 대한 조사 항목의 자료를 분석하여 성인 아토피 피부염의 자각적 유병률을 약 3.09%로 보고하였다.

한의학에서는 아토피 피부염을 일반적으로 胎熱, 奶癬, 胎癬, 胎斂瘡이라 부르며, 風熱, 血熱, 血虛 등을 원인으로 본다. 내부에서 脾胃가 運化機能을 잃어 胎火濕熱이 있는 상태에서 외부로부터 風濕熱이 침입하여 相搏하면 肌膚에 鬱滯되어 발병한다고 하였다. 그밖에 소화불량, 잘못된 수유습관, 음식물에 대한 과민반응, 의복마찰, 한냉 등의 자극으로 인하여 증상이 심해진다고 하였다⁷⁻⁹⁾.

生脈散은 金代 李東垣의 《內外傷辨惑論》¹⁰⁾에 “夏月宣補者 補天真元氣非補熱火 夏食寒者是也. 故以人蔘之甘 補氣 麥門冬苦寒 瀉熱補水之源 五味子之酸 清肅燥金, 名曰生脈散. 孫真人云 五月常服 五味子 以補五臟之氣 亦此意也”라 기록된 이래 暑熱에 상하여 땀이 줄줄 흐르며 목이 마르고 몸이 나른하고 맥이 약한 증상이 나타나거나, 肺虛로 인해 마른 기침을 하며, 호흡이 짧고, 땀이 줄줄 흐르는

증상을 치료하는데 활용되어 왔다¹¹⁾. 生脈散에 대한 연구로는 이¹²⁾ 등이 스포츠음료로서 운동수행능력 향상을 보고하였으며, 김¹³⁾ 등은 生脈散의 항산화 효과, 박¹⁴⁾과 김¹⁵⁾ 등은 피로회복 효과 등을 보고하였고, 최근에는 김¹⁶⁾ 등이 한의학의 肺主皮毛 이론에 근거하여 補肺氣虛 나 清熱生津의 효능이 있는 生脈散의 피부 질환에 대한 항염증 효과를 보고하였다.

어성초는 三白草科에 속한 多年生 草本인 약모밀의 帶根全草로^{17,18)}, 항산화 작용^{19,20)}, 항균 활성 작용^{21,22)}, 항염증 작용^{23,24)}, 항알레르기 효과^{25,26)} 등이 보고되었다.

이에 저자는 補肺氣虛, 清熱生津, 潤燥의 효능을 가진 生脈散에 항염증, 항알레르기 작용이 있는 魚腥草를 가미함으로써 아토피 피부염에 대한 치료 효과가 있을 것으로 사료되어, 본 연구를 통해 生脈散(SM)에 魚腥草를 추가한 生脈散加味方(SG)의 아토피 피부염에 대한 보습, 미백, 항염증, 항알레르기 효과에 대해 조사하고, 이를 生脈散의 효과와 비교하고자 하였다. 이를 위하여 in vitro 실험에서 tyrosinase 억제 활성, filaggrin과 Serinepalmitoyl transferase(SPT)의 발현도, COX-2 및 AP-1의 발현도를 측정하였고, NC/Nga mice를 이용한 in vivo 실험에서 IgE, IL-4, 5, 6, IgM, IgG1, IFN- γ 의 혈청 수준을 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약으로 diethyl pyrocarbonate (DEPC), NH₄Cl, KHCO₃, Na₂ EDTA, complete adjuvant, chloroform, collagenase IV, RPMI-

교신저자 : 임규상, 원광대학교 한의학 전문대학원
(Tel : 063-850-6916, E-mail : kslim@wku.ac.kr)
• 접수 2012/1/15 • 수정 2012/2/6 • 채택 2012/2/13

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 및 INF- γ 의 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) 동물

웅성(雄性) 8주령의 NC/Nga mice를 중앙실험동물에서 공급받아 실험당일까지 고형사료와 물을 공급하고 실온 22±2℃, 상대습도 50~55%, 조도

200 lux(8시 점등, 20시 소등)를 계속 유지하면서 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

(3) 약물

본 실험에 사용한 生脈散(SM)과 生脈散加味方(SG)의 약제는 원광대 산본한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, SG는 SM와 동일한 내용과 구성에 1첩당 어성초 8g을 가한 것이다. SM와 SG 1첩의 내용과 구성은 다음과 같다(Table 1, 2).

2. 方法

(1) 시료 제조

(2) 세포주 배양

실험에 사용한 각질형성세포주(Human keratinocyte HaCaT cell line)를 DMEM 배지에 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco CO., USA), 1% penicilin-streptomycin(Gibco Co., USA)을 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 배양하여 사용하였다. 세포를 75mm plate에 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양하였다.

(3) 추출물 처리 방법

SM와 SG를 각각 DW로 1%의 추출물 stock을 만들어 최종 농도 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리하여 CO₂ 배양기에 24시간 배양하였다. 대조군은 상기와 동일한 배지에서 시험 물질을 첨가하지 않은 상태로 배양한 것을 이용하였다.

(4) 세포 생존능력 시험(Cell viability test)

세포 생존능력 시험은 cell counting assay를 이용하여 진행하였다. 추출물 시료를 처리하여 24시간 배양 후 처리된 배지와 시약을 제거하였다. 200 μ l의 TE(Trypsin-EDTA) buffer를 처리한 후

Table 1. Prescription of SM

Hrbal Name	Scientific Name	Dose(g)
人蔘	<i>Radix Ginseng</i>	4
麥門冬	<i>Radix Ophiopogonis</i>	8
五味子	<i>Fructus Schisandrae</i>	4
Total Amount		16

Table 2. Prescription of SG

Hrbal Name	Scientific Name	Dose(g)
人蔘	<i>Radix Ginseng</i>	4
麥門冬	<i>Radix Ophiopogonis</i>	8
五味子	<i>Fructus Schisandrae</i>	4
魚腥草	<i>Herba Houttuyniae</i>	8
Total Amount		24

incubator에서 2-3분 동안 방치하였다. 1.8ml의 PBS를 첨가한 후 세포를 plate에서 떨어뜨린 후 10 μ l의 Trypan blue와 10 μ l의 세포액을 잘 섞은 후 실온에서 3-4분 동안 반응시켰다. Hemacytometer에 cover glass를 올려놓은 후 hemacytometer와 cover glass사이의 틈에 반응물을 10 μ l 취하여 주입한 후 현미경을 이용하여 염색되지 않은 세포와 염색된 세포를 counting 하였다.

(5) Tyrosinase 억제활성

(Tyrosinase inhibition activity) 분석

각 조건별 시료를 처리한 세포 추출물을 취한 다음, 96well plate에 세포 추출물 100 μ l와 500U tyrosinase 20 μ l 및 1.5mM L-DOPA 80 μ l(A)를 각각 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 tyrosinase 대신 PBS를 첨가하여 동일한 방법으로 측정한 Blank 값(B)과 시료용액 대신 lysis buffer를 첨가하고 위와 같이 tyrosinase를 첨가(C)한 것과 PBS를 첨가(D)하여 동일한 방법으로 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정한 값으로부터 다음의 식에 의해 억제활성을 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition activity(\%)} = \frac{[1 - ((C-D) - (A-B) / (C-D))]}{\times 100}$$

(6) Filaggrin 과 SPT

(serine palmitoyltransferase) 발현 분석

Filaggrin의 발현을 평가하기 위하여 상기의 방법으로 배양 및 시험한 세포로부터 트리졸(Trizol, invitrogen CO., USA)을 이용하여 total RNA를 추출한 다음, one step RNA PCR kit(AMV) (Takara Bio Inc., Otsu, Japan)에서 제공되는 방법에 준하여 reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) 분석을 시행하였다. PCR amplification은 GeneAmp[®] PCR System 2700

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 denaturation을 시킨 후, 60 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 annealing을 하고, 72 $^{\circ}$ C에서 75초 동안 extension이 되도록 하였다. 이때 amplification products는 filaggrin과 β -액틴(actin)이 각기 약 400bp와 300bp이다. 이 때, 프라이머(primer)로는 filaggrin primer (Bioneer Corp., Daejeon, Korea, 5'-GGTAGA TAGATCTGGACTCAGGG-3')를 사용하였으며, internal control으로는 β -액틴을 이용하여 발현량을 비교하였다. 또한 SPT의 발현을 분석하기 위하여 SPT의 mRNA level은 Dorfman과 Lichtenstein의 방법에 따라 RT-PCR로 분석하였다. 상기의 방법으로 배양 및 시험한 세포로부터 트리졸을 이용하여 total RNA를 추출하고, First strand cDNA synthesis kit(Fermentas, Hanover, MD, USA)에서 제공되는 방법에 준하여 cDNA를 합성하였다. RT PCR은 1 μ l template, 10 μ l PCR master mix(Qiagen, Valencia, CA, USA), 1 μ l β -actin과 7 μ l 증류수로 총 부피를 20 μ l로 한 PCR mix로 PCR을 수행하였다. 그때의 조건은 denature(95 $^{\circ}$ C, 15초), annealing, extension(60 $^{\circ}$ C, 60초)으로 45cycle을 수행하였으며 mRNA의 양은 comparative CT method를 이용하여 각각의 template의 변이에 기인하는 증폭량을 normalization하였고, 또한 house keeping gene인 β -actin을 각 유전자의 기준으로 정하여 정량을 유도해 내었고, 대조시료에서의 각 유전자를 calibrator로 정하여 정량을 하였다.

(7) 단백질 추출 및 COX-2, AP-1의 Western 분석

COX-2와 AP-1의 발현을 평가하기 위하여 상기의 방법으로 배양 및 시험한 세포에 lysis buffer(0.1% TritonX-100, 20mM Tris-Cl(pH7.4), 1mM EDTA, 1mM EGTA, 150mM NaCl)를 처

리하여 단백질을 추출하였다. 30 μ g의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 한 후, nitrocellulose membrane으로 단백질을 이동시키고 COX-2, AP-1, Actin 부분의 membrane을 blocking solution(5% skimmilk in 1 \times T-TBS)으로 1시간동안 blocking시킨다. 1차 항체를 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 반응시키고, 세척 후 2차 항체를 반응시킨 후 ECL western blotting detection system을 이용하였다.

(8) DNCB 도포 및 염증 유발

NC/Nga mice는 실험군별로 각각 6마리를 실험하였으며 cage별로 3마리씩 사육하였다. 즉 대조군 6마리에 cage 2개, SM군 6마리에 cage 2개, 그리고 SG군 6마리에 cage 2개로 총 NC/Nga mice 18마리에 cage 6개로 나누어 실험을 실시하였다.

아토피 피부염은 1-chloro 2,4-dinitrobenzene (DNCB)을 이용하여 유발하였다. 먼저 NC/Nga mice의 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 시작일 부터 종료일까지 4주간 일주일에 2번 0.2% DNCB용액 150 μ l를 등 부위에 도포하여 염증을 유발하였다.

NC/Nga mice 실험군은 SM군과 SG군으로 나누었으며 실험군 각각은 2ml의 SM와 SG 농축액을 매일 4주간 음용수와 혼합하여 투여하였다. 대조군은 음용수만 투여하였다. 추출물 투여시 실험군과 대조군의 음수량을 계산하여 음수량의 차이가 없음을 확인하였다.

(9) 피부 손상도 측정

NC/Nga mice의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하였다. 육안평가 결과는 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타내었으며 평가항

목은 홍반(Erythema), 가려움과 건조피부(Pruritus & Dry Skin), 부종과 혈종(Edema & Escoriation), 미란(Erosion), 그리고 태선화(Lichenification)로 나누어졌다. 이 각각의 항목은 없음(0), 약함(1), 중증도(2), 심함(3)으로 나누어서 채점하였다.

(10) 혈청내 IgE 정량

혈청내 IgE 량은 0주, 1주, 2주, 3주, 4주에 mice의 눈에서 capillary tube를 이용하여 약 100 μ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기로 혈청을 분리하여 IgE 량을 ELISA(enzyme-linked immunosorbent aSMay) kit로 측정하였다.

(11) 혈청내 IL-4, 5, 6 및 IgM, IgG1, IFN- γ 정량

추출물 투여 4주 후 NC/Nga mice를 ethyl ether로 마취한 후 심장 천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리한 후 혈청 중 IL-4, 5, 6 및 INF- γ , IgM, IgG1 농도는 ELISA(enzyme-linked immuno-sorbent assay) kit로 정량하였다.

(12) 통계학적 분석

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

III. 結 果

1. 피부세포에 미치는 영향

(1) 세포 양상 분석

SM과 SG가 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 농도를 다르게 처리하여 세포의 양상을 확인하였다. SM과 SG를 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%를 처리하였을 때 세포 양상을 확인한 결과, 두 시료

모두 세포 생존에 유해한 영향을 주지 않았고, 세포 성장도 대조군과 마찬가지로 잘 자라는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

(2) tyrosinase 억제 활성에 미치는 영향

SM과 SG를 HaCaT cell에 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리하여 본 결과, SM에서는 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%에서 각각 tyrosinase 억제 활성이 39.8 ± 0.55 , 38.3 ± 0.45 , 37.4 ± 0.12 , 31.4 ± 0.85 , $30.4 \pm 0.12\%$ 로 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으나, 반대로 SG에서는 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%에서 각각 tyrosinase 억제 활성이 39.8 ± 0.55 , 40.1 ± 0.75 , 43.7 ± 0.32 , 44.6 ± 0.15 , $45.8 \pm 0.51\%$ 로 농도 의존적으로 증가함을 보였다(Fig. 2).

(3) 피부 장벽 조절 인자에 미치는 영향

SM을 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리하였을 시 filaggrin의 상대적 발현량은 1.15 ± 0.03 , 1.10 ± 0.14 , 1.05 ± 0.10 , 1.04 ± 0.25 , 0.83 ± 0.14 로 농도 의존적으로 filaggrin의 발현양이 감소되는 것을 확인할 수 있었지만(Fig. 3(a)) 반면, SG는 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리하였을 시 filaggrin

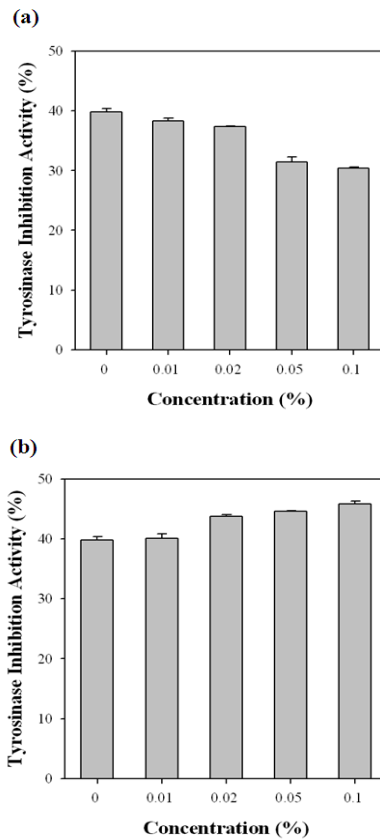


Fig. 2. Effect of extracts on tyrosinase inhibition [(a) SM, (b) SG]

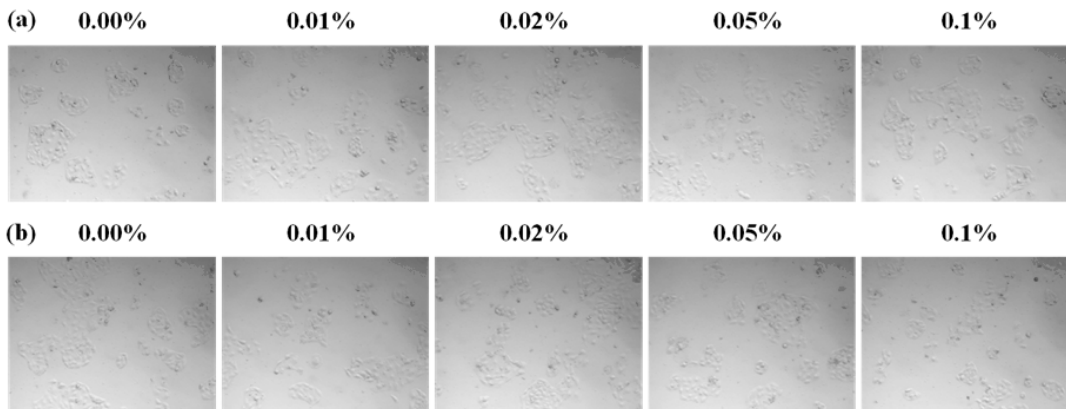


Fig. 1. Effect of extracts on cell viability [(a) SM, (b) SG]

의 상대적 발현량이 1.15 ± 0.02 , 1.29 ± 0.10 , 1.36 ± 0.05 , 1.86 ± 0.05 , 1.16 ± 0.07 로 filaggrin 발현양이 농도 의존적으로 증가하다가 0.05%에서 가장 높은 발현양을 보이는 것을 확인하였다(Fig. 3(b)). 또한 SPT의 발현양 역시 SM을 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1% 처리시 각각 0.68 ± 0.02 , 0.73 ± 0.10 , 0.66 ± 0.21 , 0.44 ± 0.02 , 0.34 ± 0.06 으로 나타나 0.01%에서 잠시 증가하는 것 같았으나 이후 농도 의존적으로 감소하는 양상을 보였고(Fig. 3(a)), SG에서는 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1% 처리시 각각 0.61 ± 0.09 , 0.76 ± 0.03 , 0.86 ± 0.11 , 1.02 ± 0.10 , 0.94 ± 0.12 로 농도 의존적으로 증가하다가 0.05%에서 가장 높은 발현양을 보였다(Fig. 3(b)).

(4) 피부 항염증 반응 인자에 미치는 영향

SM을 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리하였을 때에 COX-2의 상대적 발현이 각각 0.12 ± 0.10 ,

0.37 ± 0.01 , 0.33 ± 0.03 , 0.43 ± 0.07 , 0.52 ± 0.02 로, 0.02%로 처리하였을 때를 제외하고는 농도 의존적으로 COX-2의 발현이 증가함을 확인하였고(Fig. 4(a)), 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리시 AP-1 상대적 발현이 각각 0.35 ± 0.01 , 0.37 ± 0.04 , 0.56 ± 0.02 , 0.76 ± 0.04 , 0.98 ± 0.02 으로 농도가 증가함에 따라 그 발현양이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4(b)). 또한 SG의 경우에는 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리하였을 때에 COX-2의 상대적 발현이 각각 0.30 ± 0.10 , 0.17 ± 0.01 , 0.25 ± 0.05 , 0.11 ± 0.03 , 0.09 ± 0.01 로 0.02%로 처리하였을 때를 제외하고는 농도 의존적으로 COX-2의 발현이 감소하는 것을 확인하였고(Fig. 4(a)), 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리시 AP-1의 상대적 발현이 각각 0.56 ± 0.07 , 0.61 ± 0.01 , 0.47 ± 0.02 , 0.28 ± 0.05 , 0.25 ± 0.06 로 농도가 증가함에 따라 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4(b)).

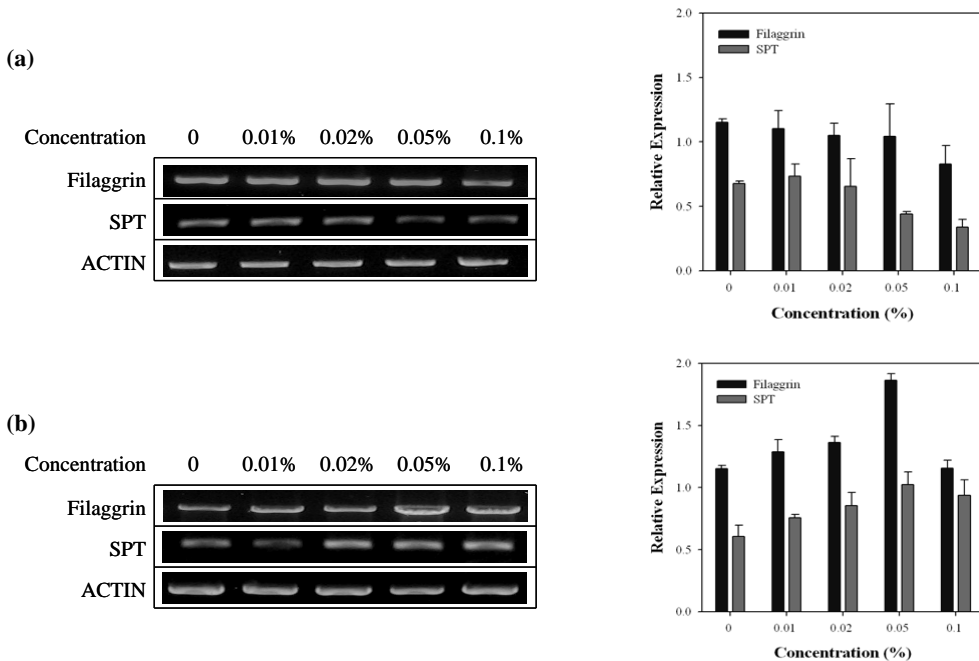


Fig. 3. Effect of extracts on skin barrier factor
[(a) SM, (b) SG]

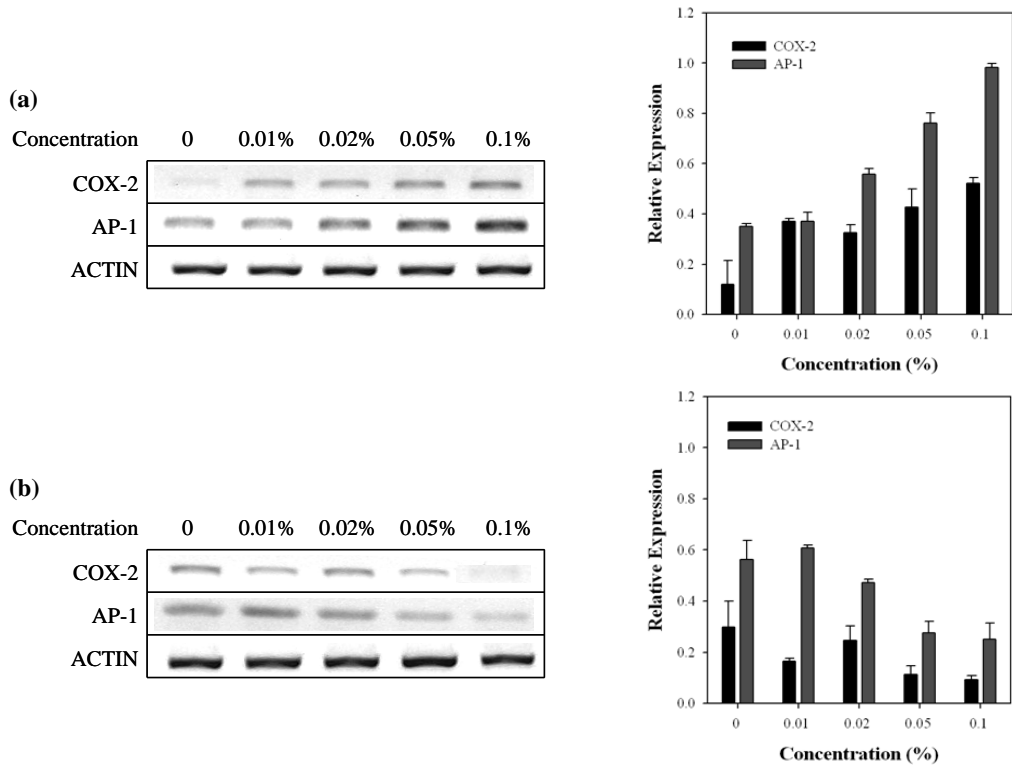


Fig. 4. Effect of extracts on anti-inflammation factors
 [(a) SM,(b) SG]

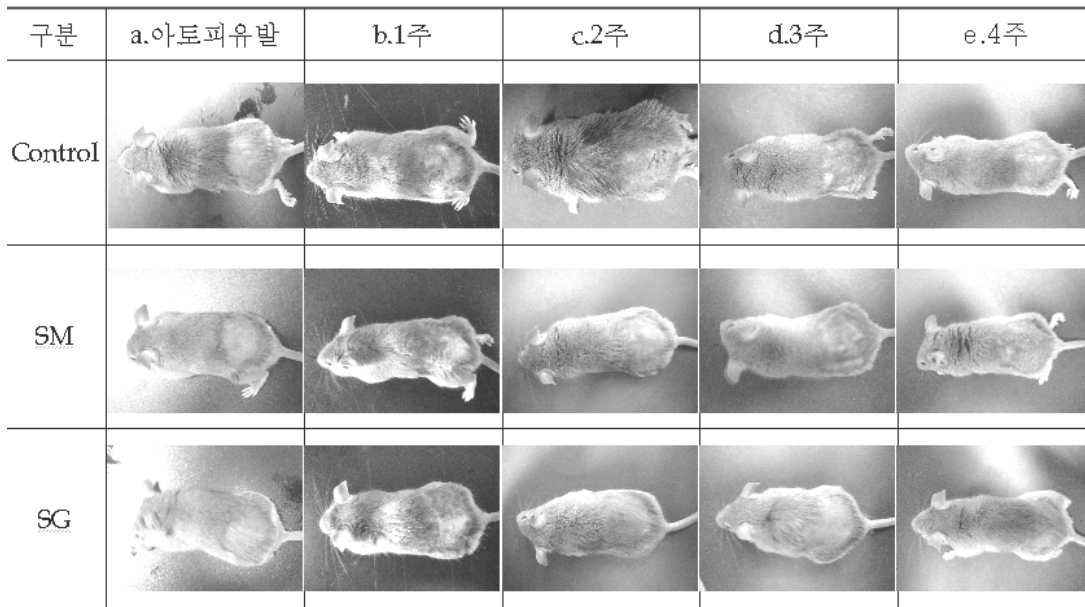


Fig. 5. Clinical skin features of dermatitis in NC/Nga atopy dermatitis model mice.

2. *in vivo* 동물 실험을 통한 항알레르기 효능 검증

(1) 피부 손상도에 미치는 영향

DNCB 처리한 NC/Nga mice는 모든 군에서 4 일후부터 피부발진이 나타나기 시작했다(Fig. 5(a)). 추출물 처리 1주후 대조군은 피부발진이 심해졌으며 SM와 SG 처리군들 역시 대조군 보다는 약하지만 피부발진이 진행됨을 관찰 할 수 있었다(Fig. 5(b)). 추출물 처리 2주후는 대조군의 피부발진은 더욱 악화 되었으나 SM군과 SG군 모두 피부발진이 조금씩 개선되는 증상을 관찰할 수 있었으나 SG군이 개선되는 정도가 다소 높음을 확인할 수 있었다(Fig. 5(c)). 추출물 처리 3주후, 대조군의 피부발진은 더 이상 악화되지는 않았으나 SM군과 SG군에서 피부발진이 상당히 많이 회복되어감을 볼 수 있었다(Fig. 5(d)). 추출물 처리 4주후, 대조군의 피부발진도 다소 개선됨을 볼 수 있었으며 SM군과 SG군에서 피부발진이 거의 정상 수준으로 회복되었음을 관찰 할 수 있었다(Fig. 5(e)).

피부손상정도지표(Clinical skin severity score) 역시 2주후 대조군 8.5 보다 SM와 SG 처리군 모두 3.8, 3.5로 감소함을 볼 수 있었다. 3주차에는 대조군의 피부손상정도 9.5로 2주 보다 다소 심해지는 반면 SM군과 SG군 모두 피부발진 및 손상정

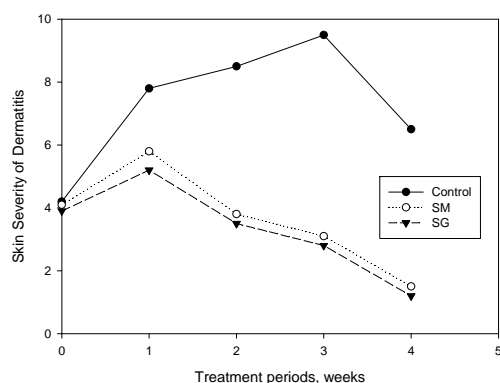


Fig. 6. Clinical skin severity of dermatitis in NC/Nga mice.

도가 지속적으로 회복(SM군: 3.1, SG군: 2.8)되어 감을 관찰 할 수 있었고 4주후에는 대조군 피부손상은 6.5로 3주차 보다는 많이 개선되었고 반면 SM군과 SG군 모두는 피부발진 및 손상정도가 1.5와 1.2로서 거의 정상으로 개선됨을 확인할 수 있었다. 피부 손상 개선도면에서는 SM군보다는 SG군이 조금 더 큰 것으로 관찰되었다(Fig. 6).

(2) 혈청 중 IgE 발현에 미치는 영향

대조군의 혈청 중 IgE 생성량은 0주에서 152.9 ± 12.80 ng/ml로 정상적인 수치보다 높게 나와 피부염 유발을 확인할 수 있었으며 1주, 2주, 3주차까지 혈청 중 IgE 생성량은 258.4 ± 14.54 , 286.74 ± 11.14 , 312.5 ± 16.12 ng/ml로 지속적으로 증가하였으나 4주차에는 225.4 ± 12.21 ng/ml로 감소하였다. SM군에서 혈청 중 IgE 생성량은 0주에서 145.9 ± 10.12 ng/ml로 대조군과 유사하였다. 1주차에 피부염 유발로 인해 IgE 생성량이 214.5 ± 11.87 ng/ml로 급격히 증가한 후 2주, 3주, 4주차에서는 174.2 ± 10.52 , 132.2 ± 11.45 , 105.3 ± 11.02 ng/ml로 시간경과에 따라 크게 감소되었다. SG군의 IgE 생성량은 추출물 1과 유사한 경향으로 1주차에 피부염 유발로 인해 IgE 생성량이 195.5 ± 10.74 ng/ml 급격히 증가한 후 2주, 3주, 4주차에서는 155.1 ± 10.20 , 122.4 ± 11.31 , 85.3 ± 9.25 ng/ml로 시간경과에 따라 유의성 있게 ($p < 0.01$) 크게 감소되었다. SG군이 SM군보다 혈청 중 IgE 생성량 감소폭이 더 컸다(Fig. 7).

(3) 혈청 중 IL-4 발현에 미치는 영향

혈청내 IL-4 수준은 4주차에서 대조군은 45.25 ± 4.85 pg/ml, SM 처리군은 25.12 ± 2.9 pg/ml, SG 처리군에서는 20.35 ± 3.54 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소를 나타내었으며(Fig. 8) SM보다는 SG 처리군에서 IL-4 감소폭이 더 컸다(Fig. 8).

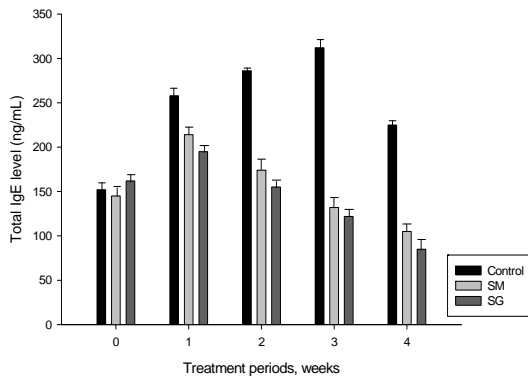


Fig. 7. Serum IgE level in NC/Nga atopy dermatitis model mice

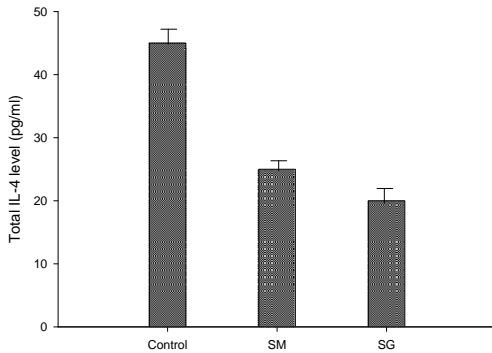


Fig. 8. Serum IL-4 level after treatment of dermatitis in NC/Nga mice.

(4) 혈청 중 IL-5 발현에 미치는 영향.

혈청내 IL-5 수준은 4주차에서 대조군은 215.63 ± 5.22 pg/ml, SM 처리군은 156.52 ± 4.12 pg/ml, SG 처리군에서는 145.66 ± 4.52 pg/ml로 나타나 IL-4 수준과 마찬가지로 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타내었으며 SM보다는 SG 처리군에서 IL-5 감소폭이 더 컸다(Fig. 9).

(5) 혈청 중 IL-6 발현에 미치는 영향.

IL-6 수준 또한 IL-4와 IL-5와 유사한 경향을 보였는데 4주차에서 대조군은 450.12 ± 4.25 pg/ml, SM 처리군은 256.45 ± 4.75 pg/ml, SG 처리군에서

는 241.54 ± 5.23 pg/ml로 나타나 대조군에 비해 SM와 SG 처리군에서 유의성 있게 ($p < 0.01$) 큰 감소를 보였다. 그리고 SM보다는 SG처리군에서 IL-6 감소폭이 더 컸다(Fig. 10).

(6) 혈청 중 IgM 발현에 미치는 영향.

혈청내 IgM 농도는 대조군에서는 585.15 ± 45.58 $\mu\text{g/ml}$, SM 처리군은 325 ± 19.21 $\mu\text{g/ml}$, SG 처리군에서는 288 ± 25.25 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타나 대조군에 비하여 SM 및 SG 처리군이 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타내었으며 SM보다는 SG 처리군에서 IgM 감소폭이 더 컸다(Fig. 11).

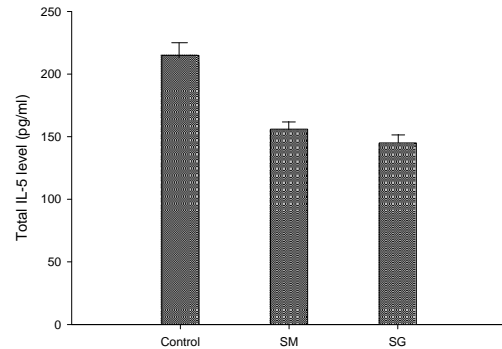


Fig. 9. Serum IL-5 level after treatment of dermatitis in NC/Nga mice.

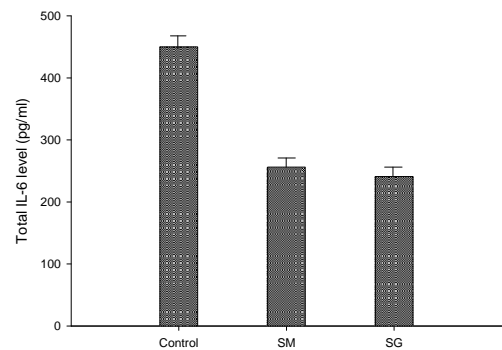


Fig. 10. Serum IL-6 level after treatment of dermatitis in NC/Nga mice.

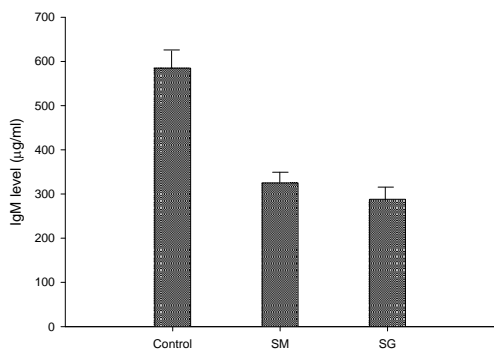


Fig. 11. Serum IgM level after treatment of dermatitis in NC/Nga mice.

(7) 혈청 중 IgG1 발현에 미치는 영향.

혈청내 IgG1 농도는 대조군에서는 $2784 \pm 255.85 \mu\text{g/ml}$, SM 처리군은 $1958 \pm 125.25 \mu\text{g/ml}$, SG 처리군에서는 $1754 \pm 165.73 \mu\text{g/ml}$ 로 나타나 대조군에 비하여 SM 및 SG 처리군이 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소를 나타내었으며 SM보다는 SG 처리군에서 IgG1 감소폭이 더 컸다(Fig. 12).

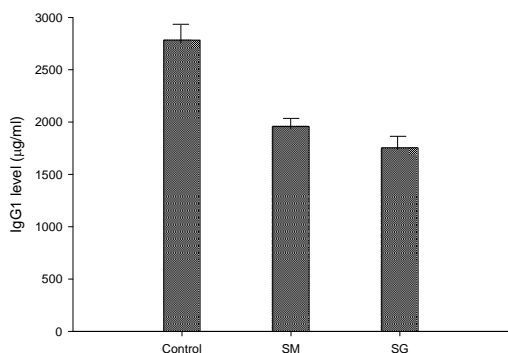


Fig. 12. Serum IgG1 level after treatment of dermatitis in NC/Nga mice.

(8) 혈청 중 INF-γ 발현에 미치는 영향.

혈청내 INF-γ 농도는 4주차에서 대조군은 $815.15 \pm 58.52 \text{ pg/ml}$, SM 처리군은 $1158 \pm 85.65 \text{ pg/ml}$, SG 처리군에서는 $1298 \pm 128.54 \text{ pg/ml}$ 로 나

타나 대조군에 비하여 SM 및 SG 처리군이 유의성 있는 ($p < 0.01$) 증가를 나타내었으며 SM보다 SG 처리군에서 INF-γ 증가량이 더 컸다(Fig. 13).

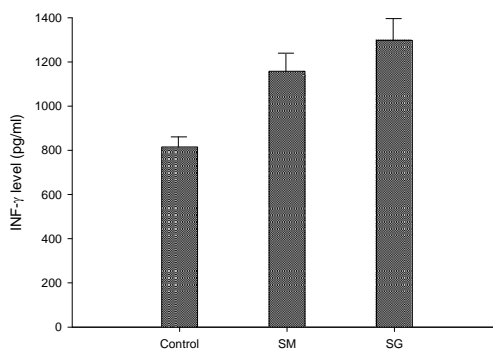


Fig. 13. Serum INF-γ level after treatment of dermatitis in NC/Nga mice.

IV. 考 察

아토피 피부염은 알레르기성 비염, 천식과 더불어 대표적인 알레르기성 질환으로, 심한 소양감, 피부 건조, 진물, 홍종, 홍반, 각질, 태선화 등의 증상을 보이며 만성적으로 재발하는 습진성 질환이다. 아토피 피부염은 알레르기성 습진, 소아 습진, 굴절부 습진, 범발신경 피부염 등으로 불리우며, 유아 습진에서부터 소년기, 사춘기, 성인에 나타나는 진행적인 태선화 피부염에까지 다양한 임상 및 조직학적 진행 과정을 보여주는 질환이다^{1,2)}.

아토피 피부염은 환자과 환자 가족의 삶의 질을 파괴하고 경제적, 정신적으로도 심각한 영향을 끼치는 질환으로^{29,30)}, 그 원인은 유전적 배경, 약리학적 이상, 환경적 요인과 함께 면역학적 이상과 피부장벽 손상이 중요한 비중을 차지하고 있으며³¹⁾, 환경 오염, 식생활의 변화, 모유수유의 감소, 감염에의 노출 감소, 애완동물의 증가 등의 이유로

유병률이 날로 증가하는 추세에 있다^{4,32)}.

국내 아토피 피부염의 유병률에 대해 소아의 경우 2006년 지⁵⁾ 등이 전국 15개 지역 초등학교를 대상으로 역학조사를 시행한 결과 아토피 피부염으로 진단받은 유병률을 28.22%로 보고하였고, 김⁶⁾ 등은 2007년 국민건강영양조사의 건강 설문 중 아토피 피부염의 유병 경험 등에 대한 조사 항목의 자료를 분석하여 성인 아토피 피부염의 자각적 유병률을 약 3.09%로 보고하였다.

한의학에서는 아토피 피부염에 관하여 奶癬, 胎癬, 胎斂瘡, 胎熱, 濕疹, 濕瘡 등으로 표현하였는데⁸⁾ 隨代의 巢가 《諸病源候論·小兒雜病諸候·癬候》³²⁾에서 “小兒面上癬皮如甲錯起乾燥, 謂之乳癬”이라 하여 아토피 피부염의 증상에 대해 최초로 언급한 이래 淸代의 吳는 《醫宗金鑑·外科心法要訣·嬰兒部》³³⁾에서 아토피 피부염에 대해 胎斂瘡이라 하고 그 중 嬰兒 頭面이나 눈썹 끝에 나타나는 것을 奶癬이라 하였는데 癢瘡와 鱗屑이 있고 형태는 奶疥와도 같다 하였다. 또한 증상에 따라 피부가 마른 풀과 같은 모양이면 乾斂, 粟粒狀으로 매우 가렵고 누른 진물이 온몸에 두루 있으면 濕斂이라 하였으며, 이는 모두 胎中風熱이 원인이라 하여 임신중의 섭생이 관련됨을 언급하였다.

또한 陳은 《外科正宗》³⁴⁾에서 “奶癬, 因兒在胎中, 母食五辛, 父餐灸燻, 遺熱與兒”라 하여 역시 胎中의 섭생이 중요한 원인이 된다는 점을 강조하였으며, 그 임상표현은 “生後頭面遍身發奶癬, 流滋成片, 睡臥不安, 癢瘡不絕”이라 하였다.

한의학적인 변증에 따르면, 발현양상에 따라서 乾症과 濕症으로 구분하였으며, 다시 급성기에는 風濕偏盛형, 熱重於濕형, 濕中於熱형으로 구분하였고, 만성기에는 脾虛濕熱內蘊형, 陰傷血燥血熱형으로 구분하였다.

발병 시기에 따라서는 嬰兒期, 兒童期, 成人期로 분류하였는데, 嬰兒期는 다시 脂溢性, 濕性, 乾性으로 분류하여 脂溢性은 생후 1-2개월, 濕性은 생

후 3-6개월, 乾性은 생후 1세 이상에서 주로 나타나는 양상으로 보았다⁸⁾.

한의학적인 치료에 있어서는 內治法과 外治法으로 나뉘는데, 內治法으로는 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 약제가 淸熱利濕, 養血祛風의 목적으로 風濕型에 사용되고, 白朮, 茯苓, 白扁豆, 薏苡仁, 澤瀉, 地膚子, 牡丹皮 등의 약제가 健脾利濕, 消導淸熱의 목적으로 脾虛濕性型에 사용되며, 生地黃, 牡丹皮, 當歸, 梔子, 黃柏, 麥門冬, 白茅根, 紫草 등의 약제가 養血潤燥, 淸熱解毒의 목적으로 血燥型에 사용되었다³⁵⁾. 또한 外治法으로는 敷貼法, 洗滌法, 油膏法 등이 있고 黃蓮, 黃柏, 苦參, 蛇床子, 枯礬 등의 약제가 淸熱, 解毒, 祛風, 殺蟲, 止痒의 목적으로 사용되었다³⁶⁾.

아토피에 대한 한의학적인 연구로 朴⁸⁾은 아토피 피부염의 동·서의학적 문헌고찰을, 金³⁷⁾은 아토피 피부염의 주증상에 대한 문헌적 고찰을, 尹³⁸⁾은 아토피 피부염 환자의 한의학적인 임상유형분류에 대한 연구를 보고하였고, 단일 한약제에 대한 실험적 연구로는 張³⁹⁾은 小葉麥門冬이, 金⁴⁰⁾은 白屈菜가, 安⁴¹⁾은 野菊이 아토피 피부염에 미치는 영향을 보고하였으며, 처방에 대한 연구로 鄭⁴²⁾은 平胃散 加味方, 徐⁴³⁾는 理中湯, 洪⁴⁴⁾은 溫淸飲과 三黃洗劑, 尹⁴⁵⁾은 驅風除濕湯을 시료로 사용해 아토피 피부염에 대한 효과를 규명한 바 있다.

生脈散은 李의 《內外傷辯惑論》¹⁰⁾에 “夏月宣補者 補天真元氣 非補熱火 夏食寒者是也. 故以人蔘之甘 補氣 麥門冬苦寒 瀉熱補水之源 五味子之酸 淸肅燥金, 名曰 生脈散.”이라 하여 최초로 언급된 처방으로, 人蔘으로 기운을 북돋우고, 麥門冬으로 熱을 내려주면서 水의 근원을 보하고, 五味子로 폐의 건조한 기운을 맑게 해준다 하였다. 이후 동의보감에서는 生脈散에 관하여, 心火가 너무 왕성해진 것을 내려주며 水의 기운을 자양해주고 元氣를 생성시키는 효능을 말하였다⁴⁶⁾.

生脈散을 구성하는 약재들의 효능을 각각 살펴 보면, 人蔘은 甘溫無毒하여 大補元氣, 補脾益氣, 生津止渴, 寧神益志의 효능이 있고 麥門冬은 苦寒無毒하여 滋陰潤肺, 益胃生津, 清心除煩, 潤腸의 효능이 있으며, 五味子是 酸溫無毒하여 斂肺滋腎, 生津斂汗, 滋精止瀉, 寧心安神的 효능이 있음이 밝혀져 있다¹⁷⁾.

또한 동의보감의 燥門에서는 피부가 갈라져 피가 나고 통증이 있으며 피부가 가려운 것은 모두 火가 肺에 영향을 주어 건조함이 심해진 까닭이라 설명하고, 血을 보하는 처방에 生脈散을 合方하여 복용하는 치료법을 제시하여, 生脈散이 피부 건조 및 소양감에 효과가 있음을 언급하고 있다⁴⁶⁾.

生脈散에 대한 연구로는 이¹²⁾ 등이 스포츠음료로서 운동수행능력 향상을 보고하였으며, 김¹³⁾ 등은 生脈散의 항산화 효과, 박과 김^{14,15)} 등은 피로 회복 효과 등을 보고하였고, 최근에는 김¹⁶⁾ 등이 한의학의 肺主皮毛 이론에 근거하여 補肺氣虛 나 清熱生津의 효능이 있는 生脈散의 피부 질환에 대한 항염증 효과를 보고하였다.

어성초는 三白草科에 속한 多年生 草本인 약모밀의 帶根全草로 蕺菜, 蕺, 紫蕺, 臭猪巢, 重藥, 臭菜, 熱草, 臭牡丹, 臭靈丹蔘 등의 異名으로 불리며, 性味는 辛, 微寒 하고 향균, 진통, 지혈, 거담 및 조직 재생 작용과 함께 清熱解毒, 排膿 등의 효능이 있다고 하였다^{17,18)}. 어성초는 주로 항산화 작용^{19,20)}, 항균 활성작용^{21,22)}, 항염증 작용^{23,24)}, 항알레르기 효과^{25,26)} 등이 보고되었다.

이에 生脈散(SM)에 어성초를 가한 生脈散加味方(SG)의 아토피 피부염에 대한 보습, 미백, 항염증, 항알레르기 효과에 대해 조사하고, 이를 生脈散의 효과와 비교하기 위해 본 실험을 계획하게 되었다. 아토피 피부염의 치료법으로 현재 유발 혹은 악화 인자의 제거, 피부 보습과 함께 약물 치료로서 국소 스테로이드제, 항히스타민제, 면역억제제, 심한 경우 전신 스테로이드제를 사용하고 피부 감염이

있는 경우는 항생제, 항바이러스제 또는 항진균제를 사용하고 있으나⁴⁷⁾ 장기간 사용시 나타나는 부작용으로 인해²⁷⁾ 보다 안전하고 효과적인 치료제의 개발을 위해 많은 연구가 이루어지고 있다.

실험동물인 NC/Nga mice는 인체 아토피 피부염과 가장 유사한 증상을 나타내는 실험동물 모델로, conventional condition에서 생후 7~8주령부터 피부병변이 나타나고 혈중 IgE 수치가 상승하여 12~16주에 최고치에 달한다. 그러나 자발적인 피부염 유도 비율이 낮고 유도된 피부염의 정도 차이가 심해 DNCB를 이용하여 균일한 상태의 아토피 피부염을 유발하여 실험을 진행하였다⁴⁸⁾.

아토피 피부염은 주로 극심한 소양감과 피부의 건조를 동반하는데, 소양감으로 인해 피부를 긁는 행위를 반복하게 되고, 이로 인한 상처로 인해 다시 소양감이 심해져 "itch-scratch-itch"의 악순환이 나타나게 된다. 이때 피부를 긁음으로써 피부 장벽의 손상이나 이차 감염이 유발될 뿐 아니라 피부의 두께가 증가하는 태선화가 나타나고 환부에 색소침착이 일어나 피부색이 어둡게 변하게 된다^{28,49)}.

따라서 아토피의 치료에는 보습과 함께 색소침착을 억제하는 것 또한 중요한데, 피부의 색소 침착에는 멜라닌이 가장 중요한 인자로 작용한다⁵⁰⁾.

멜라닌은 melanocyte 내의 melanosome에서 만들어져 인접된 keratinocyte로 이동하고 keratinocyte가 외피로 이동하여 피부색을 띠게 되는데 멜라닌의 생성에 key enzyme으로 작용하는 것이 tyrosinase이다.

멜라닌은 피부, 모발, 눈에 색깔을 부여하는 체내의 색소로서, 갈색과 흑색을 나타내는 eumelanin과, 황색과 적색을 나타내는 pheomelanin이 있으며, 이들의 함량과 비율에 따라 피부색이 결정된다.

tyrosine이 hydroxylation 되어 dihydroxyphenylalanine(DOPA)을 형성하고 이것이 다시 산화되어 DOPAquinone을 형성하며 DOPAquinone

은 DOPAchrome으로 변환된다. 여기서 DOPAchrome이 DOPAchrome tautomerase에 의해 DHICA(5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid)가 되고 DHICA가 TRP-1(DHICAoxidase)에 의해 Indole-5,6-quinone-carboxylic acid가 되면 이것이 eumelanin이 된다. 한편 DOPAchrome이 환원 및 탈탄산 반응을 거쳐 DHI(5,6-dihydroxyindole)로 생성되고 다시 DHIOxidase에 의해 Indole-5,6-quinone이 되면 이것 또한 eumelanin이 되는데, eumelanin은 갈색과 흑색을 나타내는 색소이다.

그러나 DOPAquinone이 만약 glutathione이나 cysteine을 만나게 되면 5-Cysteinyldopa가 만들어지고 이것은 결국 황색과 적색을 나타내는 pheomelanin이 된다⁵¹⁾.

여기서 tyrosine이 DOPA가 되고 이것이 다시 DOPAquinone이 되는 과정에 tyrosinase가 관여하기 때문에⁵⁰⁾, melanin의 생산을 감소시키는 가장 효과적인 방법인 tyrosinase의 활성 억제를 위한 다양한 시도가 이루어져왔다⁵²⁾.

따라서 SG의 tyrosinase의 활성에 대한 억제효과를 평가하여 아토피 피부염의 증상중 하나인 색소 침착을 감소시키는 효능을 알아보고 SM의 효능과 비교해보고자 하였다.

이를 위해 SM과 SG를 HaCaT cell에 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리하여 본 결과, SM에서는 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%에서 각각 tyrosinase 억제 활성이 39.8 ± 0.55 , 38.3 ± 0.45 , 37.4 ± 0.12 , 31.4 ± 0.85 , 30.4 ± 0.12 %로 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보인 반면, SG에서는 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%에서 각각 tyrosinase 억제 활성이 39.8 ± 0.55 , 40.1 ± 0.75 , 43.7 ± 0.32 , 44.6 ± 0.15 , 45.8 ± 0.51 %로 농도 의존적으로 증가함을 보였다 (Fig. 2(a), 2(b)).

피부 장벽의 기능을 하는 표피의 각질층은 크게 각질세포와 세포간 지질막으로 이루어져 있으며, 각질세포는 벽돌에, 세포간 지질은 벽돌 사이사이

를 채워주는 회반죽에 해당한다. 각질세포는 filaggrin, keratin, involucrin, loricrin 등의 물질로 구성되어 있으며, 세포간 지질막은 다중층상구조(lamellar structure)를 이루고 있다⁵³⁾.

피부 장벽은 외부의 물질로부터 체내의 환경을 보호하는 방어기능과 함께, 수분이 유실되지 않도록 보호하는 대단히 중요한 기능을 수행하고 있다. 따라서 아토피 피부염 환자에게서는 표피 장벽이 기능을 상실하게 되므로 심한 피부건조가 유발되는 것이다^{54,55)}.

각질세포층에서는 filaggrin이 중요한 역할을 담당하고 있고^{54,56)} 세포간 지질막에서는 ceramide가 필수적인 구성성분이며⁵⁷⁾, ceramide의 합성과정에는 serine-palmitoyl transferase가 반드시 필요하다. 따라서 filaggrin과 serine-palmitoyl transferase는 피부 장벽 조절 인자로서 피부의 보습에 필수적인 물질이다.

filaggrin은 표피 각질층 분화와 자연보습인자의 형성에 기여하며, 히스티딘이 풍부한 단백질로서 각질형성세포 내에서 케라틴을 응집하는 역할 및 각질층의 수분 유지에 중요한 역할을 한다⁵⁸⁾. 따라서 SG의 filaggrin 발현에 대한 촉진효과를 평가하여 아토피 피부염에 대한 보습효과를 알아보고 SM의 효과와 비교하고자 하였다.

이를 위해 filaggrin의 발현을 reverse transcription(RT) PCR로 분석한 결과, SM을 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리하였을시 filaggrin의 상대적 발현량은 1.15 ± 0.03 , 1.10 ± 0.14 , 1.05 ± 0.10 , 1.04 ± 0.25 , 0.83 ± 0.14 로 농도 의존적으로 filaggrin의 발현양이 감소되는 것을 확인할 수 있었지만, 반면 SG은 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리하였을시 filaggrin의 상대적 발현량이 1.15 ± 0.02 , 1.29 ± 0.10 , 1.36 ± 0.05 , 1.86 ± 0.05 , 1.16 ± 0.07 로 농도 의존적으로 증가하다가 0.05%에서 가장 높은 발현양을 보이는 것을 확인하였다 (Fig. 3(a), 3(b)).

또한 각질층의 각질세포 사이에는 세포간 지질막이 존재하는데, 이 세포간 지질막은 각질층에서 보습에 대단히 중요한 역할을 한다. 실험에 의하면 각질층의 지질막을 제거한 뒤와 다시 지질을 도포한 뒤의 bound-water의 양을 관찰하였을 때, 33.3%에서 19.7%로 감소하였다가 다시 원래대로 회복되는 것을 볼수 있었다. 이것은 지질막이 피부 장벽으로서 중요한 수분함유 기능을 한다는 것을 증명한다⁵⁹⁾.

이처럼 보습에 중요한 세포간 지질은 squalene, cholesterol esters, wax esters, triglycerides, free fatty acids, cholesterol, ceramides, cholesterol sulphate and phospholipids 로 구성되며⁵⁵⁾ 이 중 ceramide가 26% 정도로 가장 많이 존재하며 보습 기능에 주 결정인자로 작용한다⁶⁰⁾.

SPT는 serine에 palmitoyl CoA가 붙는 과정을 촉매하여 3-ketosphinganine 을 합성시키는데, 이것이 sphinganine으로 변환된 후 지방산의 부가 반응에 의해 dihydroceramide가 합성되고, 이것이 스펅고신 구조의 4,5번 탄소사이에 이중결합을 형성하여 ceramide로 변환되는 것이다. 따라서 ceramide의 합성에 중요한 기능을 하는 SPT의 활성을 촉진하는 것은 세포간 지질막에 대한 작용을 평가하는데 중요한 지표가 될수 있다고 하겠다^{61,62)}.

SPT의 발현양을 RT PCR로 분석한 결과, SM을 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1% 처리시 각각 0.68 ± 0.02 , 0.73 ± 0.10 , 0.66 ± 0.21 , 0.44 ± 0.02 , 0.34 ± 0.06 으로 나타나 0.01%에서 잠시 증가하는 것 같았으나 농도 의존적으로 감소하는 양상을 보였고, SG에서는 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1% 처리시 각각 0.61 ± 0.09 , 0.76 ± 0.03 , 0.86 ± 0.11 , 1.02 ± 0.10 , 0.94 ± 0.12 로 농도 의존적으로 증가하며 0.05%에서 가장 높은 발현양을 보였다(Fig. 3(a), 3(b)).

COX에는 두가지 isotype이 있는데, COX-1은 체내의 생리적 항상성을 유지하는 prostaglandin을

생성하는 반면, COX-2는 PEG2를 합성하는데 이것은 체내의 염증반응에 관여하는 핵심적인 효소로 알려져 있다. 따라서 COX-2 및 그 전사인자(transcription factor)인 AP-1에 대한 억제작용은 아토피 피부염에 있어서 항염증 효과를 보여주는 것이라 하겠다⁶³⁾. 이에 SG의 항염증 효과를 알아보고 SM과 비교하였다.

COX-2의 발현과 COX-2의 전사인자중의 하나인 AP-1의 발현을 western blotting으로 분석한 결과, SM을 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리하였을 때에 COX-2의 상대적 발현은 각각 0.12 ± 0.10 , 0.37 ± 0.01 , 0.33 ± 0.03 , 0.43 ± 0.07 , 0.52 ± 0.02 로 0.02%로 처리한 경우를 제외하고는 농도 의존적으로 COX-2의 발현이 증가함을 확인하였고, 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리시 AP-1의 상대적 발현은 각각 0.35 ± 0.01 , 0.37 ± 0.04 , 0.56 ± 0.02 , 0.76 ± 0.04 , 0.98 ± 0.02 으로 농도가 증가함에 따라 그 발현양이 증가하는 것을 확인하였다. 반면, SG의 경우에는 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리하였을 때에 COX-2의 상대적 발현이 각각 0.30 ± 0.10 , 0.17 ± 0.01 , 0.25 ± 0.05 , 0.11 ± 0.03 , 0.09 ± 0.01 로 0.02%로 처리한 경우를 제외하고는 농도 의존적으로 COX-2의 상대적 발현이 감소하는 것을 확인하였고, 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처리시 AP-1의 상대적 발현은 각각 0.56 ± 0.07 , 0.61 ± 0.01 , 0.47 ± 0.02 , 0.28 ± 0.05 , 0.25 ± 0.06 로 농도가 증가함에 따라 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4(a), 4(b)).

NC/Nga mice 실험군 각각은 20% SM과 SG를 4주간 음용수와 혼합하여 투여하고 NC/Nga mice 대조군은 음용수만 투여하여 1, 2, 3, 4주에 각각 피부손상정도를 측정하였다. 그 결과, 2주후 대조군 8.5 ± 0.4 보다 SM과 SG 처리군 모두 3.8 ± 0.3 , 3.5 ± 0.3 로 감소함을 볼 수 있었다. 3주차에는 대조군의 피부손상정도는 9.5 ± 0.5 로 2주 보다 다소 심해지는 반면 SM과 SG 처리군 모두 피부발진 및

손상정도가 지속적으로 회복(SM: 3.1 ± 0.3 , SG: 2.8 ± 0.2)되어 감을 관찰 할 수 있었고 4주후에는 대조군 피부손상은 6.5 ± 0.3 로 3주차 보다는 많이 개선되었고 반면 SM군과 SG군은 모두 피부발진 및 손상정도가 1.5 ± 0.2 와 1.2 ± 0.2 로서 거의 정상으로 개선됨을 확인할 수 있었다. 피부 손상 개선도면에서는 SM군보다는 SG군이 다소 높은 것으로 관찰되었다(Fig. 6).

인체의 면역반응에서 T cell은 특히 중요한 부분을 담당하는데, 이중 활성화된 $CD4^+$ T cell(helper T cell)은 Th1, Th2 두 종류의 effector $CD4^+$ T cell로 분화되며 Th1은 세포성 면역반응을 담당하고 Th2는 체액성 면역반응을 담당한다. Th1은 IFN- γ , TNF- α , IL-2 등을 분비하며 대식세포와 $CD8^+$ T cell을 활성화시키는 반면, 알러지 반응에 주로 관여하는 Th2는 IL-4, 5, 6, 10, 13 등의 cytokine을 분비하며 B cell을 활성화시켜 항체의 생산을 촉진시킨다⁶⁴⁾.

Th1에서 생산되는 cytokine은 Th1 세포의 분화를 촉진함과 동시에 Th2 세포의 분화를 억제하고, Th2에서 생산되는 cytokine은 그 반대의 작용을 함으로써 서로에 대한 억제작용을 가진다⁶⁵⁾.

알러지 반응에서 가장 중요한 지표가 되는 항체는 IgE인데^{66,67)}, IgE는 B cell에서 분비되어 mast cell에 부착되었다가 재차 항원의 침입을 받게 되면 mast cell의 탈과립에 관여하여 leukotriene, histamine 등이 분비되어 조직에 염증반응을 유발시킨다⁶⁸⁾.

따라서 가미生脈散의 IgE 생산에 대한 억제효과를 통해 아토피 피부염의 알레르기반응에 대한 억제효과를 알아보고 生脈散의 효과와 비교하고자 하였다.

대조군의 혈청 중 IgE 생성량은 0주에서 152.9 ± 12.80 ng/ml로 정상적인 수치보다 높게 나와 아토피 유발을 확인할 수 있었으며 1주, 2주, 3주차 까지 혈청 중 IgE 생성량은 258.4 ± 14.54 , 286.74

± 11.14 , 312.5 ± 16.12 ng/ml로 지속적으로 증가하였으나 4주차에는 225.4 ± 12.21 ng/ml로 감소하였다. SM군에서 혈청 중 IgE 생성량은 0주에서 145.9 ± 10.12 ng/ml로 대조군과 유사하였다. 1주차에 IgE 생성량이 214.5 ± 11.87 ng/ml 급격히 증가한 후 2주, 3주, 4주차에서는 174.2 ± 10.52 , 132.2 ± 11.45 , 105.3 ± 11.02 ng/ml로 시간경과에 따라 크게 감소되었다. SG군의 IgE 생성량은 SM군과 유사한 경향으로 1주차에 IgE 생성량이 195.5 ± 10.74 ng/ml 급격히 증가한 후 2주, 3주, 4주차에서는 155.1 ± 10.20 , 122.4 ± 11.31 , 85.3 ± 9.25 ng/ml로 시간경과에 따라 유의성 있게 ($p < 0.01$) 크게 감소되었다. SG군이 SM군보다 혈청 중 IgE 생성량 감소폭이 큰 것으로 확인되었다 (Fig. 7).

IL-4는 B세포의 분화를 촉진하며 T세포의 활성화와 증식을 유도하고 비만세포의 증식을 촉진하는 역할을 하며, IL-5는 B세포의 증식과 분화를 유도하고 killer T cell의 분화를 유도하며, 호산구의 분화를 유도한다. 또한 IL-6은 T cell과 섬유모세포 그리고 대식세포에서 생성되며, B cell의 분화를 유도하고 T cell에서 IL-2의 생성을 증강시키며, 골수종세포의 증식을 촉진하고 간세포에서 급성기의 단백질합성을 유도한다. 이들은 Th2에서 분비되는 주된 사이토카인으로 공통적으로 B cell을 활성화시켜서 항체의 생성을 촉진하여 알레르기반응을 유발하는 기능을 하므로 IL-4, 5, 6에 대한 억제작용으로부터 아토피 피부염에 대한 항알레르기효과를 평가할 수 있다⁶⁹⁾.

따라서 본 실험에서는 Th2에서 분비되는 IL-4, 5, 6에 대한 SG의 억제작용을 평가하여, 아토피 피부염에 대한 항알러지 효과를 알아보고 SM의 효과와 비교하고자 하였다.

혈청내 IL-4 수준은 4주차에서 대조군은 45.25 ± 4.85 pg/ml, SM 처리군은 25.12 ± 2.9 pg/ml, SG 처리군에서는 20.35 ± 3.54 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타

내었으며 SM보다는 SG 처리군에서 IL-4 감소폭이 더 컸다(Fig. 8).

혈청내 IL-5 수준은 4주차에서 대조군은 215.63 ± 5.22 pg/ml, SM 처리군은 156.52 ± 4.12 pg/ml, SG 처리군에서는 145.66 ± 4.52 pg/ml로 나타나 IL-4 수준과 마찬가지로 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타내었으며 SM보다는 SG 처리군에서 IL-4 감소폭이 더 컸다(Fig. 9).

IL-6 수준 또한 IL-4와 IL-5와 유사한 경향을 보였는데 4주차에서 대조군은 450.12 ± 4.25 pg/ml, SM 처리군은 256.45 ± 4.75 pg/ml, SG 처리군에서는 241.54 ± 5.23 pg/ml로 나타나 대조군에 비해 SM과 SG 처리군에서 유의성 있게($p < 0.01$) 큰 감소를 보였다. 그리고 SM보다는 SG 처리군에서 IL-6 감소폭이 더 컸다(Fig. 10).

IgM은 인체에서 생산되는 5가지 주요 항체군 중 하나로서 혈액과 림프액을 순환하는 가장 큰 항체이다. 항원이 침입하여 B cell이 활성화되면 신속하게 B cell로부터 생산되어 5개 분자의 복합체(pentamer)를 이루어 동시에 많은 항원을 포획하여 빠르게 제거하는 기능을 한다⁷⁰. IgM이 염증 반응의 초기에 활동하는 반면, IgG는 활성화된 B cell로부터 대량 생산되는데 시간이 걸리므로 후기 염증반응에 주로 활동한다. IgG는 바이러스, 세균, 곰팡이 등 다양한 항원에 대해서 응집작용, 고정작용, 보체의 활성화, 식세포 작용을 위한 옵소닌화, 독성에 대한 중화작용 등을 통해 방어기능을 수행하는데⁷¹, IgG1은 IgG의 아형 가운데 66%로 가장 높은 비율을 차지하고 있다⁷². 이에 IgM과 IgG1의 발현도를 측정하여 SG에 대해 항체의 기준 표본을 IgE로 전환시키는 Th2 세포의 활성 억제 및 B cell의 분화에 대한 억제효과를 조사하고 SM의 효과와 비교하고자 하였다.

혈청내 IgM 농도는 대조군에서는 585.15 ± 45.58 μ g/ml, SM 처리군은 325 ± 19.21 μ g/ml, SG 처리군에서는 288 ± 25.25 μ g/ml로 나타나 대조군에 비하

여 SM 및 SG 처리군이 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타내었으며 SM보다는 SG 처리군에서 IgM 감소폭이 더 컸다(Fig. 11).

혈청내 IgG1 농도는 대조군에서는 2784 ± 255.85 μ g/ml, SM 처리군은 1958 ± 125.25 μ g/ml, SG 처리군에서는 1754 ± 165.73 μ g/ml로 나타나 대조군에 비하여 SM 및 SG 처리군이 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소를 나타내었으며 SM보다는 SG 처리군에서 IgG1 감소폭이 더 컸다(Fig. 12).

IFN- γ 는 T cell과 NK cell에서 생산되며 가장 주된 대식세포 활성화인자(macrophage-activating factor, MAF)이며, CD4⁺ T cell에서 Th1 림프구로의 분화를 촉진시키는 반면, Th2 림프구의 증식을 억제한다. 또한 B cell에 작용하여 IgG2a와 IgG3 아종으로의 전환을 촉진시키지만 IgG1과 IgE로의 전환은 억제한다. 또한 혈관내피세포를 활성화시켜 CD 4⁺ T cell의 부착을 증진시키고 림프구가 쉽게 빠져나가도록 해준다. 이러한 IFN- γ 의 기능을 종합하면, 대식세포염증반응은 촉진하는 반면, IgE 의존성 호산구 반응은 억제하는 작용을 한다⁶⁹. 이처럼 IFN- γ 가 Th2 세포를 억제할 수 있다는데 착안하여 직접 IFN- γ 를 피하주사하는 치료법도 실험적인 치료로서 시도되고 있다⁴⁷. 따라서 SG의 IFN- γ 에 대한 억제효과를 측정하여 Th2 세포를 억제하는 항알러지 효과를 알아보고, 이를 SM의 효과와 비교하고자 하였다.

혈청내 INF- γ 농도는 4주차에서 대조군은 815.15 ± 58.52 pg/ml, SM 처리군은 1158 ± 85.65 pg/ml, SG 처리군에서는 1298 ± 128.54 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 SM 및 SG 처리군이 유의성 있는($p < 0.01$) 증가를 나타내었으며 SM보다는 SG 처리군에서 INF- γ 증가폭이 더 컸다(Fig. 13).

또한 SM과 SG를 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%를 처리하였을 때 세포 양상을 확인한 결과, 두 가지 모두 세포 생존과 성장에 유해한 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다.

종합하면 SG는 tyrosinase 억제 활성을 증가시키고 피부장벽 조절인자(filaggrin, SPT)의 발현을 증가시키며, 항염증반응인자(COX-2)의 발현을 감소시킨 반면, SM은 tyrosinase 억제 활성을 감소시키고 피부장벽 조절인자(filaggrin, SPT)의 발현을 감소시키며, 항염증반응인자(COX-2)의 발현을 증가시킨 것으로 보아, SM에 어성초를 추가함으로써 生脈散 보습, 미백, 항염증 효과가 강화되는 것을 알 수 있다. 또한 SG와 SM 모두 IgE, IL-4, 5, 6, IgM, IgG1의 발현을 억제시키고 IFN- γ 의 발현을 증가시켰으며, 각 경우에서 SG군이 대조군과의 차이가 더 컸던 실험 결과로부터, 두 처방 모두 항알레르기 효과가 있으며 SG의 항알레르기 효과가 더 크다는 것을 알 수 있다. 두 처방이 이같은 항알레르기 효과를 나타내는 기전은 Th1세포에서 생산되는 IFN- γ 를 증가시킴으로써 Th2세포가 억제되고, 이에 따라 B cell에서의 IgE 생산이 감소되는 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과로써 SG는 SM보다 강한 보습(moisturization), 미백(skin whitening), 항염증(anti-inflammation), 항알레르기(anti-allergy) 효과를 가지며, 아토피 피부염의 치료에 대해 유의성이 인정된다. 향후 아토피 피부염의 치료제로 활용하기 위해 추가적인 임상 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

生脈散加味方(SG)의 아토피 피부염 치료기전을 규명하고 生脈散(SM)의 효과와 비교하고자, 피부세포에 대한 효과 및 NC/Nga mice의 동물 병태 모델을 이용한 반응을 관찰하였던 바, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SM과 SG를 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%로 처

리하였을 때, 두 가지 모두 피부 세포 생존에 유해한 영향을 주지 않았다.

2. SM에서는 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 억제 활성이 감소하는 경향을 보였으나, SG에서는 농도 의존적으로 tyrosinase 억제 활성이 증가함을 보였다.
3. SM은 농도 의존적으로 filaggrin의 발현양이 감소되었고, SG는 filaggrin 발현양이 농도 의존적으로 증가하였다.
4. SPT의 발현양은 SM에서는 농도 의존적으로 감소하는 양상을 보였고, SG에서는 농도 의존적으로 증가하며 0.05%에서 가장 높은 발현양을 보였다.
5. COX-2의 발현양은 SM에서 0.02%로 처리한 경우를 제외하고는 농도 의존적으로 증가하였고 SG에서는 0.02%로 처리한 경우를 제외하고는 농도 의존적으로 감소하였다. AP-1의 발현양은 SM에서는 농도 의존적으로 증가하였고 SG에서는 농도 의존적으로 감소하였다.
6. DNCB 처리한 NC/Nga mice의 피부 손상 정도는 4주차에서 SM군과 SG군이 대조군에 비하여 각각 61.5%, 66.1% 감소하였다.
7. DNCB 처리한 NC/Nga mice의 혈청중 IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IgM, IgG1 수준은 SM군과 SG군 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.
8. DNCB 처리한 NC/Nga mice의 혈청중 IFN- γ 수준은 SM군과 SG군 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다.

감사의 글

이 논문은 2011년 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행되었음.

參 考 文 獻

1. 홍창의. 소아과학. 서울:대한교과서주식회사. 1987:612-4.
2. Hanafin JM. Atopic dermatitis : broadening the perspective. J Am Acad Dermatol. 2004;51:23-4.
3. Banetson R, Rogers M. Childhood atopic eczema. Br Medicine J. 2002:1379.
4. SJ Chong, KH Kim, DW Kim, et al. Report from ADRG:A Study on the Clinical Manifestations of Childhood Atopic Dermatitis in Korea. Korean J Dermatol. 2005;43(11):1497-509.
5. 지혜미 등. 2006년 초등학생의 알레르기 질환 유병률의 전국적 역학조사. 소아알레르기 호흡기. 2009;19(2):165-72.
6. 김남권 등. 성인 만성 아토피 피부염 환자의 삶의 질과 한방 치료비용에 대한 고찰. 한방안 이비인후피부과학회지. 2010;23(1):215-23.
7. 吳克潛. 吳氏兒科學. 台北:新文豐出版社. 1984: 645.
8. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연. 아토피 피부염의 동서의학적 문헌고찰. 대한안이비인후피부과학회지. 2002;15(1):226-52.
9. 龔信. 古今醫鑑. 江西科學技術出版社. 1990:418.
10. 李東垣. 東垣醫書. 서울:대성문화사. 1983: 41, 90-91, 339.
11. 한의학대사전편찬위원회. 한의학대사전. 서울: 도서출판 정담. 2001:712.
12. 이응세. 生脈散이 스포츠飲料로서 運動遂行能力과 血液學的 變化에 미치는 影響. 경희대학교 석사학위논문집. 1989.
13. 김유승. 元氣生脈散의 가미生脈散별 항산화작용과 쥐의 운동피로 회복 효과. 경희대학교 석사학위논문집. 2009.
14. 박동하. 生脈散加鹿角이 흰쥐의 運動疲勞 恢復에 미치는 影響. 동의대학교 석사학위논문집. 2009.
15. 김지용. 加味生脈散이 흰쥐의 運動疲勞 恢復에 미치는 影響. 동의대학교 석사학위논문집. 1999.
16. 김은섭. 生脈散이 자외선에 의한 피부각질세포의 상해에 미치는 영향. 대전대학교 박사학위논문집. 2010.
17. 신민교. 임상본초학. 서울:도서출판 영림사. 1997:188, 265, 280, 574.
18. 두인선. 5% 어성초 가미生脈散 수용액의 외용요법이 여드름에 미치는 임상적 연구. 원광대학교 석사학위논문집. 2003.
19. 김주형. 어성초의 항산화작용 및 활성성분. 숙명여자대학교 대학원 석사학위논문. 1998.
20. 이연재. 패모, 어성초, 쇠비름 및 들깨박 에탄올 가미生脈散의 순차용매 분획별 항산화 효과. Korean J. Food SCI. Technol. 1993; 25(6):683-8.
21. 박효경. 어성초(Houttuynia cordata Thunb.)의 抗菌活性에 관한 研究. 순천대학교 대학원 석사학위논문. 2002.
22. 김근영. 어성초의 화학적 조성 및 향미생물 활성. 전남대학교 대학원 석사학위논문. 1994.
23. 이희조. 어성초가 비만세포 매개 염증반응에 미치는 영향. 경원대학교 박사학위논문집. 2008.
24. 조완익. Lipopolysaccharide에 의해 활성화된 Raw 264.7 세포에서 어성초 가미生脈散의 항염증 효과. 중앙대학교 대학원 박사학위논문. 2010.
25. 李光昭. 어성초와 복분자의 항알레르기 기전. 전북대학교 대학원 박사학위논문. 2003.
26. 노병규. 魚腥草 抽出物의 抗알레르기 效果에 관한 研究. 원광대학교 석사학위논문집. 1998.

27. 전국의과대학교수 역. *오늘의 진단과 치료*. 서울:도서출판 한우리. 1999:132-4.
28. 도영민. 아토피란 무엇인가(아토피의 실상과 배독법의 이해). 서울:미크로. 2003.
29. Akdis CA, Akdis M, Bieber T, Bindslev-Jensen C, Boguniewicz M, Eigenmann P. *Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report*. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:152-69.
30. 정재석. 아토피피부염 소아청소년에 대한 정신과적 고찰. 서울대학교 대학원 석사학위논문. 2000.
31. Leung DYM, Eichenfield LF, Boguniewicz M. *Atopic dermatitis(Atopic eczema)*. In: *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 6th Ed. New York:McGraw Hill, 2003:1180-94.
32. 소원방. *제병원후론교석*. 북경:인민위생출판사. 1982:1383.
33. 吳謙. *醫宗金監(下)*. 北京, 人民衛生出版社. 1982:443-4.
34. 陳實功. *外科正宗*. 瀋陽:遼寧科學技術出版社. 1977:115.
35. 김미정, 이승연. 소아 아토피 피부염에 대한 문헌적 고찰. *대한한방소아과학회지*. 2000;14(2):169-84.
36. 박혜선, 지선영, 구덕모. 아토피 피부염의 증의 외치법 고찰. *대한외관과학회지*. 2001;14(1):32-41.
37. 김은희. 아토피 피부염의 주증상에 대한 문헌적 고찰. *대구한의대학교 박사학위논문집*. 2009.
38. 윤화정. 아토피 皮膚炎 患者의 韓醫學的인 臨床類型分類에 대한 研究. 동의대학교 석사학위논문집. 2000.
39. 장성은. 小葉麥門冬이 NC/Nga 마우스의 아토피 피부염에 미치는 영향. *경희대학교 박사학위논문집*. 2008.
40. 김소형. DNCB로 유도된 NC/Nga 마우스의 아토피 피부염에 대한 白屈菜의 효능 연구. *경희대학교 박사학위논문집*. 2010.
41. 안덕근. DNCB로 유도된 NC/Nga 마우스의 아토피 피부염에 대한 野菊의 효능 연구. *경희대학교 석사학위논문집*. 2010.
42. 정의령. 平胃散加味方이 아토피피부염을 유발한 NC/Nga mouse에 미치는 영향. *경희대학교 박사학위논문집*. 2011.
43. 서희연. 이중탕이 Mite antigen으로 유발된 NC/Nga mice의 아토피 피부염에 미치는 영향. *대전대학교 박사학위논문집*. 2011.
44. 홍철희. 溫清飲과 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga 아토피 mice에 미치는 영향. *원광대학교 박사학위논문집*. 2007.
45. 윤재은. 구풍계습탕이 DNCB로 유도된 NC/Nga mice의 아토피 피부염에 미치는 영향. *대전대학교 박사학위논문집*. 2008.
46. 허준. *동의보감*. 서울:도서출판 단촌글방. 2000:145, 655.
47. 김도원. 아토피 피부염의 최신 치료지침. *피부과 전문의를 위한 Update in Dermatology*. 2003;1(3):14-20.
48. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Immunol*. 1997;9(3):461-6.
49. Buggiani G, Ricceri F, Lotti T. Atopic dermatitis. *Dermatologic therapy*. 2008;21:

- 96-100.
50. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev.* 2004;84(4):1155-228.
 51. Jimbow K. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. *British J Derma.* 2001; 144:55.
 52. Hideya Ando, Hirofumi Kondoh, Masamitsu Ichihashi & Vincent J. Hearing. Approaches to Identify Inhibitors of Melanin Biosynthesis via the Quality Control of Tyrosinase. *Journal of Investigative Dermatology.* 2007;127:751-61.
 53. Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2003;121:231-41.
 54. Michael J Cork, Simon G Danby, Yiannis Vasilopoulos, Jonathan Hadgraft, Majella E Lane, Manar Moustafa, Richard H Guy, Alice L MacGowan, Rachid Tazi-Ahnini & Simon J Ward. Epidermal Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology.* 2009;129: 1892-908.
 55. Yamamoto A, Serizawa S, Ito M, Sato Y. Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 1991;283:219-23.
 56. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 2006;38:441-6.
 57. Matsumoto M, Umemoto N, Sugiura H, Uehara M. Difference in ceramide composition between "dry" and "normal" skin in patients with atopic dermatitis. *Acta Dermatol Venereol.* 1999;79:246-7.
 58. Ovaere P, Lippens S, Vandenabeele P, Declercq W. The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends in Biochemical Sciences.* 2009;34(9):453-63.
 59. Akasaki S, Minematsu Y, Yoshizuka N, Imokawa G. A role of intercellular lipids in the water-holding properties of the stratum corneum: recovery effect on experimentally induced dry skin. *Jpn J Dermatol.* 1988;98:41-51.
 60. Feingold KR. The regulation and role of epidermal lipid synthesis. *Adv Lipid Res.* 1992;24:57-82.
 61. Miyake Y, Kozutsumi Y, Nakamura S, Fujita T, Kawasaki T. Serine-palmitoyl transferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;211(2):396-403.
 62. W. M. Holleran, M. L. Williams, W. N. Gao, and P. M. Elias. Serine-palmitoyl transferase activity in cultured human keratinocytes. *Journal of Lipid Research.* 1990;31:1655-61.
 63. 은희철 등. 피부면역학. 서울:서울대학교출판부. 1999:27-34.
 64. Cooper KD. Atopic dermatitis: Recent trends in pathogenesis and therapy. *J Invest Dermatol.* 1994;102:128-37.
 65. Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DYM. Differential in situ cytokine gene

- expresMion in acute versus chronic atopic dermatitis, *J Clin Invest*, 1994;94:870-6.
66. Dawn Cooper, Jonathan Hales & Richard Camp. IgE-Dependent Activation of T cells by Allergen in Atopic Dermatitis: Pathophysiologic Relevance. *Journal of Investigative Dermatology*, 2004;123:1086-91.
67. Thomas Werfel. The Role of Leukocytes, Keratinocytes, and Allergen-Specific IgE in the Development of Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 2009; 129:1878-91.
68. Krishnaswamy G, Kelley J, Johnson D, Youngberg G, Stone W, Huang SK, Bieber J, Chi DS. The human mast cell: Functions in physiology and disease. *Font. Biosci*, 2001;6:1109-27.
69. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Jordan S. Pober, *Cellular and molecular immunology*, 3th, W.B. Saunders Company, 1997:205-6, 262, 269.
70. Erik J. Wiersma, Cathy Collins, Shafie Fazel, and Marc J. Shulman Structural and Functional Analysis of J Chain-Deficient IgM. *J. Immunol*, 1998;160:5979-89.
71. Mallery DL, McEwan WA, Bidgood SR, Towers GJ, Johnson CM, James LC. Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 2010;107(46):19985-90.
72. Hashira S, Okitsu-Negishi S, Yoshino K. Placental transfer of IgG subclaSMes in a Japanese population. *Pediatr Int*, 2000;42 (4):337-42.