

Original Article / 원저

급성 아토피 피부염 마우스 모델에서 한약조합약물의 염증반응 진정효과

정재훈 · 김경준

가천대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과

Anti-inflammatory effects of herbal medicines(Rubus coreanus, Rehmanniae Radix, Houttuynia cordata, Betulae cortex) EtOH extract on acute atopic dermatitis mice

Jae-Hoon Jung · Gyung-Jun Kim

Department of Ophthalmology, Otolaryngology and Dermatology, College of Korean Medicine, Gachon University

Abstract

Object : The object of this study was effected of composed of 4 herbal medicines(Rubus coreanus, Rehmanniae Radix, Houttuynia cordata, Betulae cortex) on acute atopic dermatitis mice.

Methods : BALB/c mice were divided 4 groups ; normal group, negative control group of acute atopic dermatitis mice induced by DNCB, treated apply to the back skin with the herbal medicine group, and treated orally with herbal medicine group. Treated with herbal medicine and DNCB during 2 weeks. After treated, measured WBCs, RBCs, and platelet in the blood, and analysed mRNA expression of spleen.

Result : Composed herbal medicines could reduce WBCs, lymphocytes, monocytes, neutrophils, and eosinophils in the mouse blood. And, could down TNF- α levels in spleen. In the skin tissue histology results, herbal medicines reduce the cells and T cells.

Conclusion : Composed herbal medicines help to another inflammatory disease because they reduce the cells and T cells in the skin tissues. And they have inhibitory effects of TNF- α mRNA expression, and Th 2 immune responses. Therefore herbal medicines use for an acute atopic dermatitis treatment.

Key words : atopic dermatitis; Rubus coreanus; Rehmanniae Radix; Houttuynia cordata; Betulae cortex

© 2015 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

아토피 피부염은 대부분 유아기나 소아 때 호발하여 호전과 악화를 반복하는 만성 재발성 피부염으로, 진단기준으로는 소양감, 특징적인 형태와 분포, 만성 피부염, 아토피질환의 병력이나 가족력 등이 제시되고 있다¹⁾. 국내에서 유병률은 꾸준히 증가하고 있는 것으로, 소아에서는 10-20 %, 성인에서는 2-4 %의 유병률을 보이며, 대기오염, 주거환경 변화로 인한 항원에 대한 노출의 증가, 모유 수유 감소, 소아기 감염 질환의 감소, 생활 방식의 서구화, 정신적 스트레스 등이 증가의 원인으로 추측된다²⁾.

아토피 피부염의 면역학적 특성으로는 혈중 IgE 항체의 양이 증가하고, IL-4 등의 발현이 증가되는 반면, IFN- γ 의 발현은 저하되어 제 2형 helper T 세포가 제 1형 helper T 세포보다 우세되어 제 2형 반응의 편향화가 나타난다³⁾.

그 치료는 염증과 소양감의 조절, 2차 병변 발생의 방지를 목적으로 스테로이드나 항생제등을 주로 사용하지만 만족도가 높지 못하고 그 부작용도 상당하기 때문에 한약을 비롯한 각종 생약이나 자연치유에 대한 관심이 날로 증가하고 있다⁴⁾.

한의학에서는 胎癩, 浸淫瘡, 胎皴瘡, 濕皴瘡등의 범주에 해당하며, 이들의 발병 원인을 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고 淸熱, 解毒, 除濕, 祛風, 養血 등의 처방을 주로 이용하고 있다⁵⁾.

복분자(*Rubus Coreanus Miquei*)는 장미과에 속한 낙엽관목인 복분자 딸기 및 동속 근연식물의 미성숙한 과실을 말하며, 오포자라고 불려지기도 한다⁶⁾. 항산화작용⁷⁾과 항염증작용⁸⁾ 등의 생리활성 효능을 지니는 것으로 보고되었다. 생지황(*Rehmannia glutinosa*

Libschitz var. purpurea Makino)은 현삼과에 속한 다년생 초목인 지황의 신선한 뿌리를 말한다⁹⁾. 항산화작용¹⁰⁾, 항염증작용^{11,12)}을 가지는 것으로 보고되었다. 어성초(*Houttuynia cordata thunb*)는 삼백초과에 속한 다년생 초본인 약모밀의 꽃 필 때의 지상부를 채취하여 건조시킨 것¹³⁾으로, 어성초 추출물에 항균작용, 항암작용, 항염증작용 및 항알레르기성 작용 등이 있다고 보고되었다^{14,15)}. 화피(*Betulae cortex*)는 자작나무과에 속한 落葉喬木인 자작나무의 樹皮를 건조한 것으로¹⁶⁾, 항산화, 항암효과를 가지고 있는 것으로 보고되었다¹⁷⁾.

마우스에 아토피 피부염을 유발시키는 방법은 여러 가지가 있는데, 화학물질을 이용하거나 항원을 이용하는 방법, 식이유도, 환경유도, 그리고 오발부민을 이용한 방법들이 있다. 화학물질을 이용한 경우는 DNCB(2,4-dinitrochloro benzene) 등을 용매에 녹여 마우스의 제모 부위에 적당량을 도포하여 아토피 피부염을 유발시키게 된다. DNCB 도포후 발생한 피부 병변은 엄밀히 말해 아토피 피부염과 유사한 접촉성 과민반응이나, IgE 및 Th2 사이토카인의 증가 등 아토피 피부염의 면역 반응이 유발되는 것으로 미루어 인간에서의 아토피 피부염과 유사한 병변으로 볼 수 있다¹⁸⁾. 또한, 집먼지 진드기 항원의 도포와 달리 tape-stripping이 필요 없고 화학약품이므로 치료약제와의 상호작용이 적을 것으로 사료되어 본 실험의 아토피 피부염 유발물질로 사용하였다.

연구자는 아토피 피부염에 대한 생약 특히 한약에 대한 효능을 확인하고자, 최근 연구 결과를 통해 항산화, 항염증효과가 입증되어 염증에 대한 진정효과가 우수할 것으로 추정되는 네가지 한약(복분자, 생지황, 어성초, 화피)을 균등하게 혼합한 후, DNCB로 급성적으로 아토피 피부염이 유발된 마우스를 대상으로, 그 효과를 혈액 및 조직학적 분석과 사이토카인 분석을 통하여 알아보고자 한다.

Corresponding Author : Gyung-Jun Kim,

Gachon University Oriental Medicine Hospital Gil Medical Center, 12, Dokjeom-ro 29beon-gil, Namdong-gu, Incheon, Korea(Tel : 032-468-0330, Fax : 032-468-4033, E-mail : kkjo215@gachon.ac.kr)

• Recieved 2015/1/7 • Revised 2015/1/28 • Accepted 2015/2/4

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

복분자, 생지황, 어성초, 화피 각 약재는 옴니허브(Korea)에서 구입하여 에탄올 추출법으로 추출하였다. 우선 각각의 약재를 믹서기를 이용하여 고운 분말로 분쇄시킨 후 분말화 된 시료 100 g을 정량 후 1 L의 80 % 에탄올을 가하여 30분간 Ultrasonicator를 이용하여 sonication 하였다. 추출된 액은 여과지(Whatman®, UK)를 이용하여 여과시킨다. 여과 후 남은 약재를 다시 1 L의 80 % 에탄올을 가하여 30분간 sonication 한다. 추출액을 감압농축기를 이용하여 45 °C에서 농축시키고, 그 농축액을 동결건조하였다. 각 약재의 수축율은 복분자 16.6 %, 어성초 5.5 %, 화피 7.7 %, 생지황 16.8 %이었다. 동결건조 후 약재를 막자사발을 이용해 곱게 갈아 분말 상태로 만든다. 분말 상태인 각 약재를 식염수에 넣고 균질기를 사용하여 녹여준 후 실험에 사용하였다. 분말 상태의 약재는 냉동 보관하여 필요시마다 사용하였다. 각 약재의 양은 복분자, 생지황, 어성초, 화피 각각 동일한 양을 혼합하여 실험약물을 만들었다.

2) 동물

실험동물은 생후 6주령이 된 수컷 Balb/c 마우스 12마리를 오리엔트(Korea)으로부터 공급받았다. 일주일간 온도(24±2 °C), 습도(40~60 %)와 밤낮주기(12시간씩)가 일정하게 조절되는 환경인 경희대 한의과대학 동물 사육실에서 고형 사료와 물을 섭취시켜 환경에 적응시켰다. 각 cage마다 3마리씩 배정하여 총 4cage에 나누었다.

2. 방법

1) 실험군 분류 및 아토피 유발

실험실 환경에서 1주간 적응시킨 Balb/c마우스를

각 세 마리씩 정상군(Normal), 대조군(Control), 피부도포군(DAHM), 경구투여군(OAHM)의 네 개 군으로 분류한 후 마우스 등의 털을 이발기와 면도기를 사용하여 제모한 다음 DNCB를 처리하여 급성 아토피 피부염을 유발시켰다. 단, 정상군은 DNCB를 녹일 때 사용한 용매인 아세톤을 DNCB 대신에 도포하였다.

DNCB의 감작은 일주일에 2회 시행하였다. 우선 첫 번째 주에는 2 %의 DNCB를 사용하였다. 그 다음 일주일의 휴지기를 보낸 후 세 번째 주에 0.2 % DNCB를 일주일 동안에 2번 처리하여 급성 아토피 피부염을 유발하였다. 그 후 다시 일주일의 휴지기를 보낸 후 약물을 처방하는 동안 일주일에 2번씩 DNCB를 처리하여 아토피 피부염 증상을 유지시켰다.

2) 약물처리

급성 아토피 피부염을 유발시킨 마우스의 실험군에 2일 간격으로 2주 동안 약물을 처방하였다. 피부도포군은 약재추출물을 200 mg/ml의 농도로 200 µl을 피부도포 하였고, 경구투여군은 50 mg/kg의 농도로 경구투여 하였다.

이 기간 동안 아토피 피부염의 증상 유지를 위해 지속적으로 일주일에 2번씩 대조군과 피부도포군, 경구투여군에 0.2 % DNCB를 도포하였고, 정상군에 아세톤을 도포하였다.

3) 혈액 및 장기 적출

2주 동안의 약제투여 실험이 끝난 마우스들을 zoletil과 rompun을 1:2로 섞어 식염수에 희석시킨 마취제를 각 마우스에 약 150~200 µl 복강주사하여 마취시켰다.

마취가 된 것을 확인한 후 개복하여 심장에서 혈액을 채취한 후 균등질이 되도록 잘 흔든 다음 1500 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 상등액인 혈장을 얻어 분석 전 까지 -70 °C에서 보관하였다.

심장에서 채혈한 후 비장을 적출하여 생리식염수로 씻은 후 마른 거즈로 물기를 제거하고, 액체질소에 바로

동결시켜 차후 실험 시까지 -70 °C에서 보관하였다.

4) 혈액 분석

심장에서 채혈한 혈액은 동물전용 전자동혈액분석기(HEMAVET 950, Drew Scientific, LTD, UK)를 사용하여 RBC, WBC, platelet, lymphocyte, monocyte, neutrophil, eosinophil를 검사하고 측정하였다.

5) 조직 절편 제조

마우스의 등 피부 조직을 분리하여 4 % PFA로 2 시간 동안 고정 시킨 후, PBS solution에 세척한 후 물기를 제거하고 동결조직 포매제인 Optical cutting temperature(O.C.T) compound(SAKURA, 미국)에 고정시켜 동결조직 block을 만들었으며 -70 °C에서 보관하였다. 간 조직은 30 μm 두께로 microtome으로 잘랐으며, 피부조직 절편을 슬라이드에 신속히 붙인 후 실온에서 1시간 가량 건조 후 -70 °C에서 슬라이드를 보관하였다.

6) 피부 조직 염색

피부조직 절편을 실온에서 30분~1시간 가량 건조 후 H&E(hematoxylin and eosin)과 CD3로 염색하였다.

H&E 염색은 우선 피부조직을 붙여놓은 슬라이드를 100 % 메탄올에 1~3분 가량 담가 OCT compound를 녹여주고, 조직을 고정시켰다. 그 후 물로 1분 가량 씻어준 다음 hematoxylin 용액에 담가 약 3분 동안 세포핵을 염색시켰다. 다시 물로 2~3회 씻어준 다음 1 % 염산의 70 % 에탄올에 4회 동안 빠르게 담갔다 빼었다. 다시 물로 씻어준 후 0.2 %의 암모니아수에 앞에서 했던 것과 마찬가지로 4회 동안 빠르게 담갔다 빼주었다. 물로 5~10분 가량 씻어준 다음 eosin에 30초 가량 담귀 세포질을 염색시켰다. 그 후 물로 씻어준 후 다시 에탄올로 씻은 다음 건조시켰다. 건조시킨 후 조직 위에 permount를 올린 후 cover glass를 덮고 현미경으로 관찰하였다.

CD3 면역염색은 1시간 가량 건조시킨 슬라이드를 파라포름알데히드에 약 20분 가량 담귀 조직을 고정시켰다. 고정시킨 조직을 인산염완충생리식염수(PBS)에 3회 반복으로 5분 가량 담귀 씻었다. 조직을 3 % 과산화수소에 30분 가량 담귀된 후 물과 인산염완충생리식염수로 씻어준 후 5 %의 혈청알부민 생리식염수에 1시간 가량 담귀주었다. 그 다음 primary antibody를 1:200으로 희석하여 4 °C에서 조직과 반응시켰다. Antibody와 반응시킨 조직을 인산염완충생리식염수로 5분 동안 각 3회 씻어준 후 second antibody를 1:500으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 다시 인산염완충생리식염수로 씻어준 다음 Vector laboratories에서 구입한 ABC kit와 DAB substrate를 이용하여 발색시켰다. 그 후 hematoxylin으로 2분 가량 염색 후 물로 씻어준 다음 건조시켜 permount를 올린 후 cover glass를 덮고 현미경으로 관찰하였다.

7) 혈중 IgE 농도 분석

마우스 심장에서 얻은 혈액의 혈장에서 혈중 IgE의 농도를 샌드위치 ELISA 방법을 통하여 확인할 수 있다.

Mouse IgE ELISA set(BD bioscience, USA)을 구입 후 샌드위치 ELISA용 plate에 capture antibody를 코팅시켰다. 하루동안 capture antibody를 코팅시킨 후 0.05 %의 Tween-20 PBS를 이용하여 씻어준 후 plate를 10 % FBS의 PBS를 이용하여 blocking시켰다. 그 후 다시 씻어준 다음 standard IgE와 적당히 희석시킨 마우스의 혈장을 각 well에 넣었다. 2시간 가량 방치 후 plate를 씻어준 후에 detection antibody 용액을 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 씻어준 후 substrate solution을 넣어준 다음 어두운 곳에서 반응시키면서 발색을 확인하고 적당히 발색되었을 때에 1M의 인산 또는 2N의 황산을 넣어 반응을 중지시켰다. 반응을 중지시킨 후 ELISA를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하여 IgE의 농도를 확인하였다.

8) 비장 조직 cDNA 합성

-70 °C에 보관해 두었던 비장 조직의 50 mg을 균질기로 분쇄하여 RNA purification Kit(Qiagen, USA)를 이용하여 mRNA를 추출하였다. 우선 조직에 1 ml의 lysis reagent를 가한 후 균질기로 조직을 잘게 갈았다. 5분 정도 실온에서 반응 시킨 후 0.2 ml의 클로로포름을 첨가하여 15초간 완전히 섞은 뒤 상온에서 2~3분 동안 반응시켰다. 그 다음 4 °C, 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 튜브에 옮기고, 70 % 에탄올 1 ml을 넣고 섞었다. 이 샘플을 컬럼에 옮겨준 후 실온, 10,000 rpm에서 15초간 원심분리 하였다. 한 번 더 원심분리한 후 RW1 버퍼 0.7 ml을 첨가하여 10,000 rpm에서 15초간 원심분리 하였다. RPE 버퍼 0.5 ml을 넣고 10,000 rpm으로 2분간 원심분리 했다. 그리고 1분간 원심분리를 한 번 더 하였다. 0.05 ml의 elution 버퍼를 넣고 10,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하여 total RNA를 추출했다.

분리 정제된 2 µg의 RNA를 cDNA synthesis kit(Takara, Japan)을 이용하여 cDNA로 합성하였다. 이 cDNA를 실험시까지 -20 °C에서 보관하였다.

9) 비장의 cytokine 발현 분석

마우스의 비장에서 얻은 total mRNA를 분리하고 얻은 cDNA를 reverse transcription PCR을 이용하고, 전기영동을 통해 mRNA의 발현 정도를 측정할 수 있다. 이 실험에서는 maxime PCR PreMix Kit(iNtRON, Korea)를 사용하여 측정하였다.

mRNA 2 µl와 cDNA 프라이머를 각 1 µl씩 키트 튜브에 넣었다. 여기에 DW 17 µl를 넣어주고 거품이 생기지 않도록 주의하면서 충분히 섞었다. 그 후 spin-down을 해 준 다음 RT PCR을 하였다. Denature 95 °C 45초, annealing 55 °C 45초, extension은 72 °C 45초로 하여 30 cycle로 PCR을 수행하였다. 이때 각 프라이머는 table 1과 같이 코스모진텍(Korea)에 의뢰제작하여 사용하였다.

RT-PCR을 통해 얻은 cDNA 5 µl를 1 % agar gel에 loading STAR 1 µl와 섞어서 loading 하고, 마커 또한 loading하여 전기영동을 하였다. 전기영동을 한 후에 agar gel에 UV를 쬐어서 각 cDNA를 확인하였다. 이 cDNA를 프로그램을 이용해 수치화하여 분석하였다.

Table 1. The Sequence of PCR Primers.

Sequences		
IL-4	Forward	5'-AAG AAC ACC ACA GAG AGT GAG CTC-3'
	Reverse	5'-TTT CAG TGA TGT GGA CTT GGA CTC-3'
IL-6	Forward	5'-CAA GAG ACT TCC ATC CAG TTG C-3'
	Reverse	5'-TTG CCG AGT AGA TCT CAA AGT GAC-3'
TNF-α	Forward	5'-ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC-3'
	Reverse	5'-TAC AGG CTT GTC ACT GGA ATT-3'
IFN-γ	Forward	5'-GCC ATC AGC AAC AAC ATA AGC GTC-3'
	Reverse	5'-CCA CTC GGA TGA GCT CAT TGA ATG-3'
GAPDH	Forward	5'-GAG GGG CCA TCC ACA GTC TTC-3'
	Reverse	5'-CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG-3'

10) 통계처리

실험결과와 통계처리는 SPSS 프로그램을 사용하였으며, 모든 측정값은 평균±표준오차(Mean±SEM)로 표시하였고, 분석에 대한 유의성은 Student's t-test로 검증하였으며, p-value < 0.05 에서 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

III. 결 과

1. 실험동물의 체중에 미치는 영향

약물에 의한 몸무게 변화를 측정하여 동물에 미치는 영향이 있는 경우를 확인하기 위하여 몸무게의 변화를 관찰하였다. 실험재료는 마우스의 체중 변화에 영향을 주지 않았다(Fig. 1).

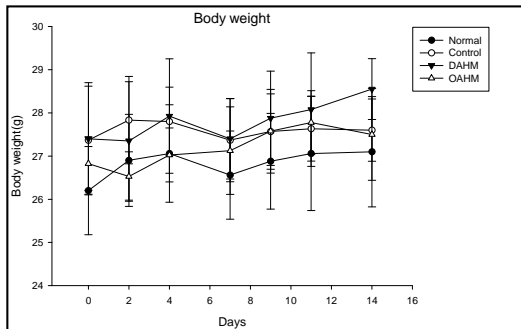


Fig. 1. A variation of acute atopic dermatitis induced mice body weight.

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM. Each value represents the mean±SD.

2. 혈액 분석 결과

2주의 실험기간이 지난 후 마우스의 심장에서 채취한 혈액을 혈액분석기를 이용하여 분석해 마우스의 적혈구, 혈소판, 백혈구, 림프구, 단핵 백혈구, 호중구, 호산구 등의 변화를 관찰하였다.

1) 적혈구에 미치는 영향

혈액분석 결과 정상군과 대조군에서 적혈구 양의 차이점을 보이지 않는 것을 보아 DNCB에 의한 급성 아토피 피부염 증상유발은 적혈구의 양에 영향을 주지 않았다. 또한 약물을 처리한 그룹에서도 적혈구의 양에 큰 차이가 없었다(Fig. 2).

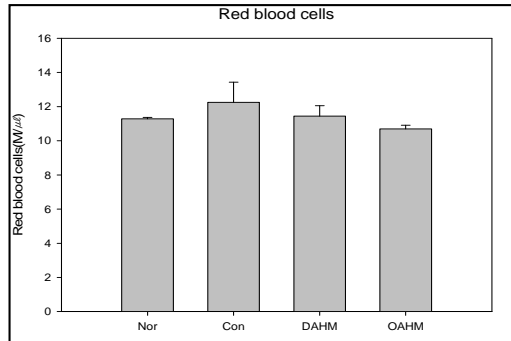


Fig. 2. Effects of herbal mixture on levels of blood RBCs in acute atopic dermatitis induced mice.

Each bar represents the mean±SD of RBCs levels in blood. Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM.

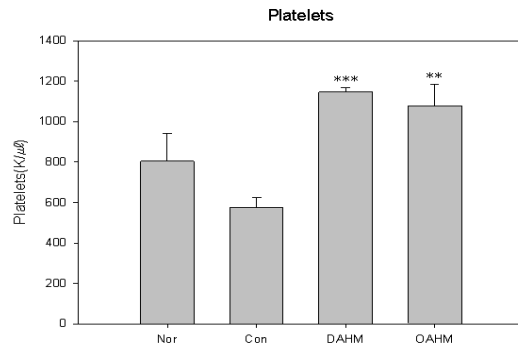


Fig. 3. Effects of herbal mixture on levels of blood platelets in acute atopic dermatitis induced mice.

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM. Each bar represents the mean±SD of platelets levels in blood(** : p<0.01, *** : p<0.001 vs negative control group).

2) 혈소판에 미치는 영향

혈소판 수치를 보면 대조군에서 감소되어 있는 것을 확인할 수 있다. 그러나 약물을 처리해준 두 그룹에서 모두 대조군에 비해 유의성 있게 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 3).

3) 백혈구에 미치는 영향

백혈구의 수치를 살펴보면 대조군에서는 정상 범위를 벗어나서 백혈구의 수가 증가하여 있는 것을 확인할 수 있다. 이에 반해 약물을 처리한 그룹에서는 백혈구의 수가 정상범위로 유의성 있게 줄어들어 있는 것을 확인할 수 있다(Fig. 4).

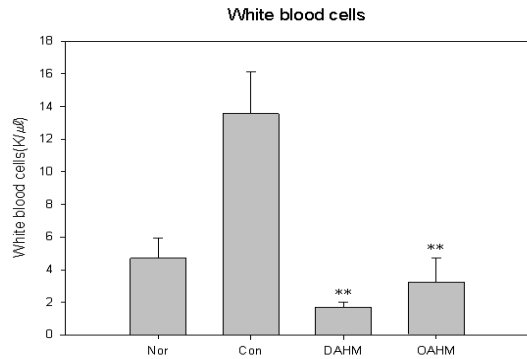


Fig. 4. Effects of herbal mixture on levels of blood white blood cells in acute atopic dermatitis induced mice.

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM. Each bar represents the mean±SD of WBCs levels in blood(** : p<0,01 vs negative control group).

4) 림프구에 미치는 영향

대조군은 정상군에 비해 림프구 숫자가 증가하였으나, 약물을 처리한 그룹에서는 림프구의 양이 대조군에 비해 유의성 있게 억제되어 있는 것을 볼 수 있다 (Fig. 5).

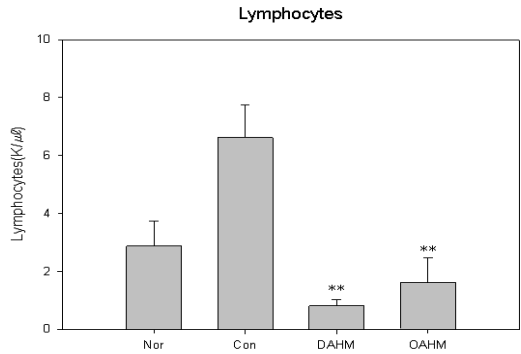


Fig. 5. Effects of herbal mixture on levels of blood lymphocytes in acute atopic dermatitis induced mice.

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM. Each bar represents the mean±SD of lymphocytes levels in blood(** : p<0,01 vs negative control group).

5) 단핵 백혈구에 미치는 영향

정상군보다 단핵 백혈구 숫자가 증가한 대조군에 비해, 약물을 처리한 두 그룹에서 단핵 백혈구의 숫자가 유의성 있게 감소하는 것을 확인할 수 있다(Fig. 6).

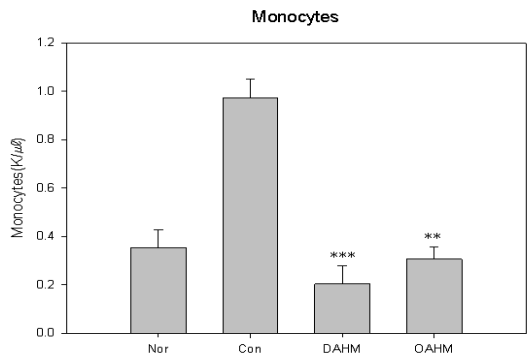


Fig. 6. Effects of herbal mixture on levels of blood monocytes in acute atopic dermatitis induced mice.

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM. Each bar represents the mean±SD of monocytes levels in blood(***) : p<0,001 vs negative control group).

6) 호중구에 미치는 영향

약물을 처리한 두 그룹에서 호중구의 수치도 대조군에 비해 유의성 있게 줄어들어 정상치를 보이고 있는 것을 알 수 있다(Fig. 7).

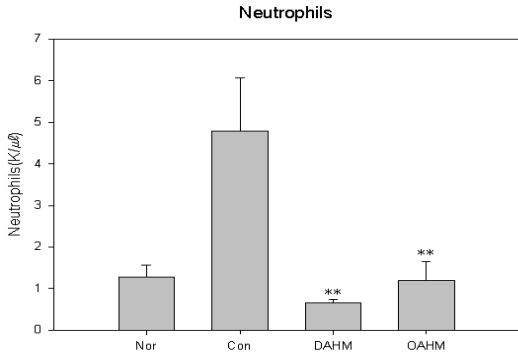


Fig. 7. Effects of herbal mixture on levels of blood neutrophils in acute atopic dermatitis induced mice.

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM. Each bar represents the mean±SD of neutrophils levels in blood(** : p<0,01 vs negative control group).

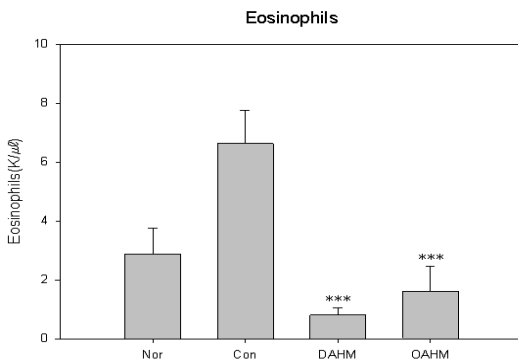


Fig. 8. Effects of herbal mixture on levels of blood eosinophils in acute atopic dermatitis induced mice.

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM. Each bar represents the mean±SD of eosinophils levels in blood(**** : p<0,001 vs negative control group).

7) 호산구에 미치는 영향

대조군에서 호산구의 증가가 관찰되었으나 약물을 처리한 그룹에서는 호산구의 양이 유의성 있게 줄어들어 있는 것을 확인할 수 있다(Fig. 8).

3. 피부 조직에 미치는 영향

1) 조직학적 특성에 미치는 영향

피부 조직을 H&E 염색법을 통해 염색해 본 결과 표피가 매우 얇아 선처럼 보이는 정상군에 비해 대조군에서는 표피와 진피가 두꺼워져 있는 것을 볼 수 있다(Fig. 9). 또한 피부층에 hematoxylin에 의해 염색되어 있는 세포가 대조군에서 많이 보이는데, 약물을 처방한 그룹에서는 그 수가 줄어들어 있는 것을 볼 수 있다(Fig. 10).

진피에 hematoxylin에 의해 염색된 세포의 수를 세어본 결과 대조군에서는 다른 군의 마우스보다 약 4배 가량 세포의 수가 높게 측정되었다. 그에 반해 피부도포군에서는 약 3배, 경구투여군에서는 약 2배 가량 정상군에 비해 높게 나타났다(Fig. 11).

2) T 세포에 미치는 영향

면역염색법을 통해 T 세포의 수용체인 CD3를 염색하여 T 세포의 양을 확인해 보았다(Fig. 12). 면역염색 확인 결과 대조군에서는 외피와 진피 부분에 진하게 염색되어 있는 반면, 다른 그룹에서는 대조군에 비해 연하게 염색되어 있는 것을 확인할 수 있다.

4. 혈액 내 IgE 분석 결과

정상군에 비해 대조군에서 혈중 IgE의 양이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있다. 경구투여군에서는 대조군에 비해 그 감소가 유의성이 없었으나, 피부도포군에서는 유의성 있게 감소하였다(Fig. 13).

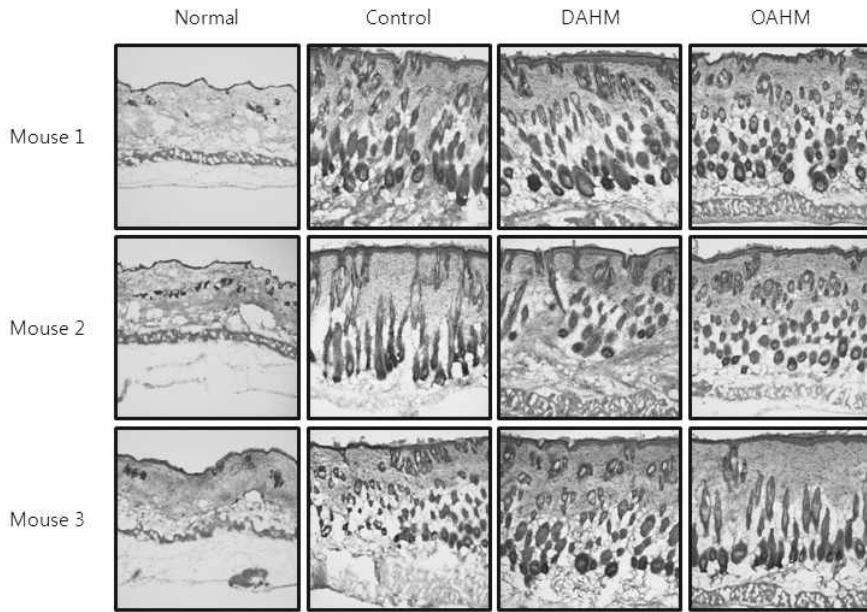


Fig. 9. Comparison of the histological feature of hematoxylin and eosin-stained dorsal skin sections in acute atopic dermatitis mice.

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM.

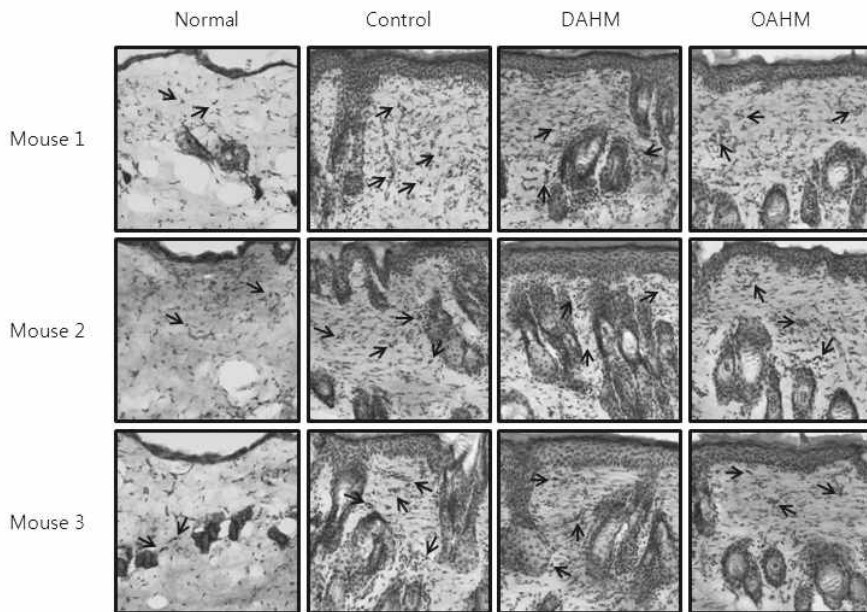


Fig. 10. Comparison of the hematoxylin-stained cells in acute atopic dermatitis mice.

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM.

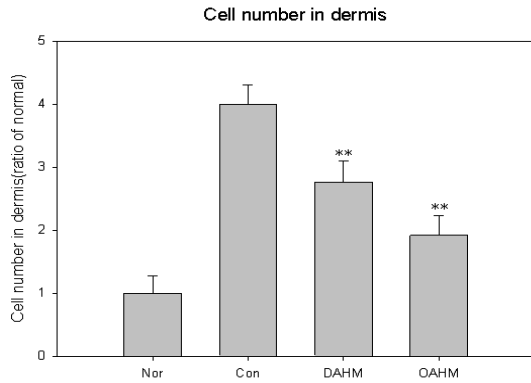


Fig. 11. Comparison of hematoxylin-stained cell count in the lesional skin of acute atopic dermatitis mice(** : $p < 0.01$ vs negative control group).

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM.

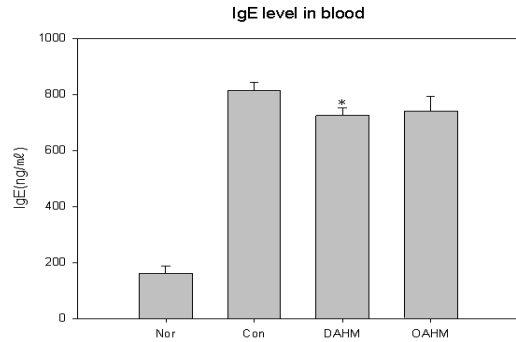


Fig. 13. Effects of herbal mixture on levels of blood IgE in acute atopy dermatitis induced mice.

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM.

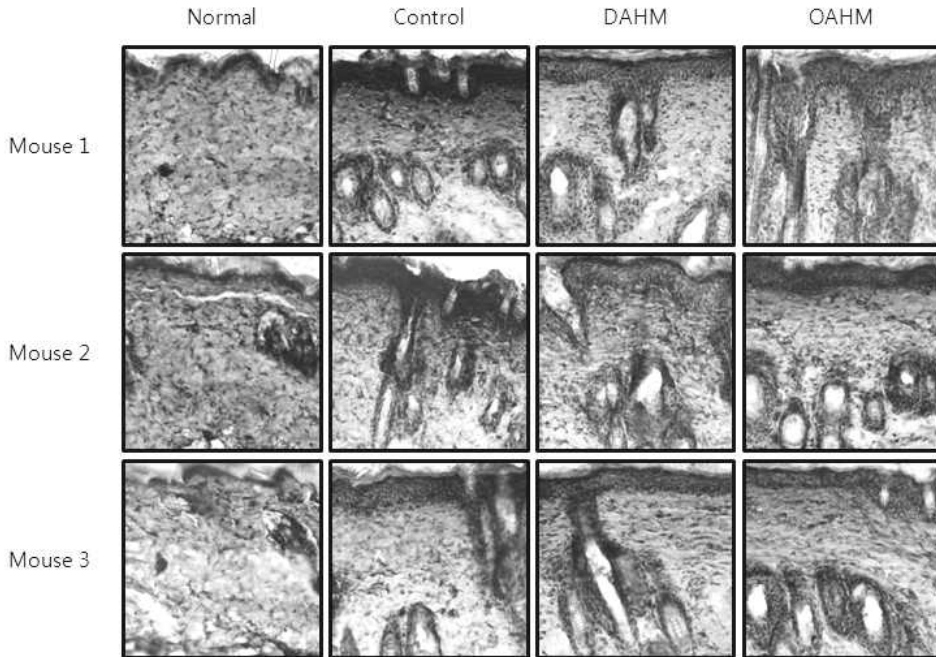


Fig. 12. Comparison of the histological feature of CD3 immunostained dorsal skin sections in acute atopic dermatitis mice.

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM.

5. 비장의 사이토카인 발현에 미치는 영향

1) IL-4 발현에 미치는 영향

IL-4의 mRNA 발현이 정상군에 비해 줄었으나 대조군에 비해 유의성 있는 감소는 보이지 않는다(Fig. 14).

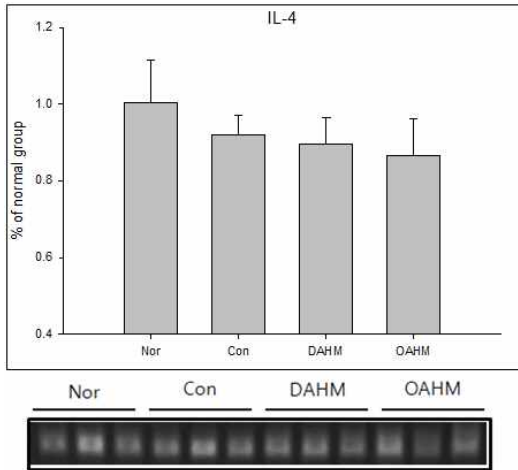


Fig. 14. The levels of IL-4 mRNA in spleen from mice. Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM.

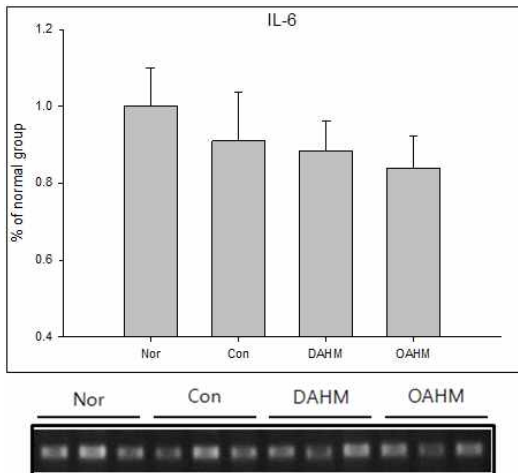


Fig. 15. The levels of IL-6 mRNA in spleen from mice. Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM.

2) IL-6 발현에 미치는 영향

피부도포군과 경구투여군이 대조군에 비해 IL-6의 발현이 감소되었으나 유의성은 없는 것으로 보인다 (Fig. 15).

3) TNF- α 발현에 미치는 영향

경구투여군에서 TNF- α 가 대조군에 비해 유의성있게 감소하는 것을 확인할 수 있으며, 피부도포군에서는 TNF- α 가 대조군에 비해 감소되었으나 유의성은 없는 것으로 보인다(Fig. 16).

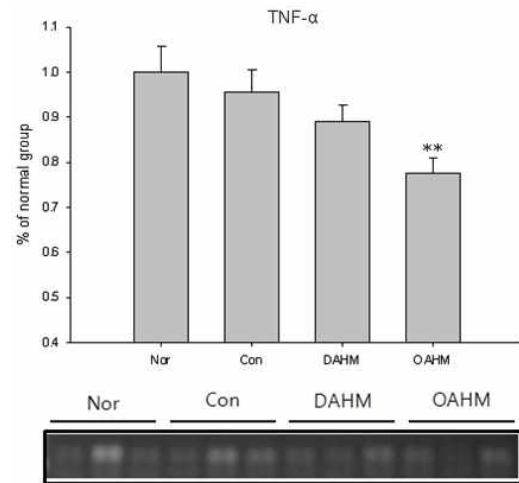


Fig. 16. The levels of TNF- α mRNA in spleen from mice(** : $p < 0.01$ vs negative control group).

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM.

4) IFN- γ 발현에 미치는 영향

경구투여군을 제외한 다른 그룹들에서 유의성 있는 차이가 없는 것을 확인할 수 있다(Fig. 17). 그러나 TNF- α 와 IFN- γ 의 비율을 구해본 결과 약물을 처방한 실험군 모두에서 TNF- α 보다 IFN- γ 의 비율이 유의성 있게 증가한 것을 확인해 볼 수 있다(Fig. 18).

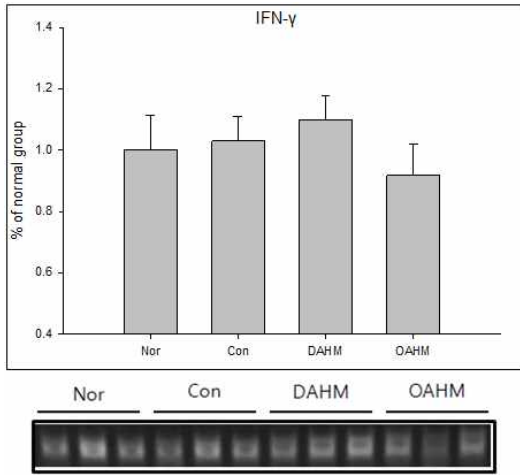


Fig. 17. The levels of IFN- γ mRNA in spleen from mice.

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM.

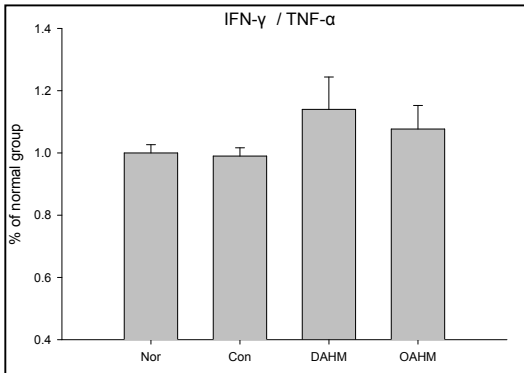


Fig. 18. The levels of IFN- γ / TNF- α mRNA in spleen from mice.

Non-treated normal group is Normal, non-treated control group is Control, herbal mixture apply to the back skin group is DAHM, and oral administration group is OAHM.

IV. 고찰

아토피 피부염은 천식과 함께 대표적인 알러지성 질환으로, 항원에 의해 면역반응이 과도하게 일어나서 발생하게 된다². 아토피는 일반적으로 면역유전자

질환으로 가족력을 보이지만, 피부의 세라마이드가 감소하는 등의 여러 원인에 의해서도 발병이 된다¹⁹.

아토피 피부염은 Th 2 면역반응과 연관을 보이는 데, IL-4, IL-5, IL-13 의 분비가 증가되는 것을 볼 수 있고, 환자의 진피와 외피에 호산구, 비만세포, 수지상세포 등이 많이 증가되고 침윤되는 것을 볼 수 있다^{3,20}.

염증과 소양감의 조절, 2차병변 발생 방지를 위해 스테로이드나 항생제, 항히스타민제등을 사용하는 기존의 치료는 만족도가 높지 못하고 그 부작용도 상당하기 때문에 한약을 비롯한 각종 생약이나 자연치유에 대한 관심이 날로 증가하고 있다⁴.

한의학에서는 胎癩, 浸淫瘡, 胎敏瘡, 濕敏瘡 등의 범주에 해당하며, 이들의 발병 원인을 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고 淸熱, 解毒, 除濕, 祛風, 養血 등의 처방을 주로 이용하고 있다⁵.

본 연구에서는 아토피 피부염에 대한 생약, 특히 한약에 대한 효능을 확인하고자, 최근 연구 결과를 통해 항산화, 항염증 효과가 입증되어 염증에 대한 진정효과가 우수할 것으로 추정되는 네가지 한약(복분자, 생지황, 어성초, 화피)을 균등하게 혼합한 후, DNCB로 급성적으로 아토피 피부염이 유발된 마우스를 대상으로 그 효과를 혈액학적 분석과 피부조직 관찰 및 사이토카인 분석 등을 통하여 알아보려 하였다.

실험약제의 경우 아토피 피부염 치료의 효과에 대한 직접적인 연구는 없었지만, 항산화작용과 항염증작용 등에 대해 여러 연구가 이루어져 있다.

복분자(*Rubus Coreanus Miquel*)는 장미과에 속한 낙엽관목인 복분자 딸기 및 동속 근연식물의 미성숙한 과실을 말하며, 오표자라고 불려지기도 한다⁶. 복분자는 항산화작용⁷과 항염증작용⁸ 등의 생리활성 효능을 지니는 것으로 보고되었다. 최근 연구 결과 토종 복분자 에탄올 추출물이 macrophage에 의해 생성되는 염증반응의 매개물질인 NO, PGE, 염증성 cytokine 등의 생성을 억제함으로 염증반응을 완화시켜 주는 것으로 확인하였다²¹.

생지황(*Rehmannia glutinosa Libschitz var.*

purpurea Makino)은 현삼과에 속한 다년생 초목인 지황의 신선한 뿌리를 말한다⁹⁾. 항산화작용¹⁰⁾, 항염증 작용을 가지는 것으로 보고되었다^{11,12)}. 최근 항염증 효과에 대한 연구를 통해, 신생혈관신생인자 중 하나인 HIF-1 α 단백질 발현 감소를 통해 VEGF 단백질 발현을 감소시켜 신생혈관을 억제하고, PI3K-Akt, COX-2를 통한 세포생존 및 염증관련 단백질의 발현도 조절하여 신생혈관 억제에 관여하며¹¹⁾, NO생성 저해능을 통한 항염효과를 가지고 있는 것으로 보고되었다¹²⁾. 또한 TNF- α 의 생산을 억제하고 IL-10 생산을 증가시켜 소염효과를 지닐 것으로 사료되며, IL-2 및 INF- γ 의 생산을 촉진하여 세포성 면역반응을 증진시킬 것으로 기대되지만 고용량에서는 염증반응 항진 및 세포성 면역능 저하를 유도하는 것으로 보고된 결과도 있다²²⁾.

어성초(*Houttuynia cordata thunb*)는 삼백초과에 속한 다년생 초본인 약모밀의 꽃 필 때의 지상부를 채취하여 건조시킨 것으로¹³⁾, 어성초 추출물에 항균작용, 항암작용, 항염증작용 및 항알레르기성 작용 등이 있다고 보고되었다^{14,15)}. 특히 항염증효과에 대한 최근의 연구로는 어성초가 비만세포 매개 염증반응에 미치는 영향¹⁴⁾, 발효 어성초 물추출물의 마우스 대식세포 항염활성 연구²³⁾ 등이 있어, 어성초가 염증매개인자 억제를 통한 항염증효과를 가지는 것으로 보고되었다.

화피(*Betulae cortex*)는 자작나무과에 속한 落葉喬木인 자작나무의 樹皮를 건조한 것으로¹⁶⁾, 항산화, 항암효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 최근 항염증 효과에 대한 연구로 NO와 PGE2의 분비를 억제하고, iNOS와 COX-2의 발현을 감소시키며, NF- κ B의 활성을 억제하는 것으로 보고되었다²⁴⁾.

아토피 피부염에서의 혈액학적 변화는 염증 반응에 의해 면역관련 세포들이 대부분 증가하게 된다. 혈소판은 면역반응에서 내재면역에 관여하는 세포로 알려진 등에 의해 활성화되어서 염증반응을 유도하는 역할을 한다²⁵⁾. 백혈구는 외부로부터 침입한 세균이나 이물질을 분해하는 역할을 지는데, 염증이 발현되

면 백혈구의 수가 증가하게 된다⁴⁾. 면역세포는 생성 후 일정기간이 지나면 자연스럽게 세포사멸에 의해 소멸되어야 하는데 아토피 환자에게서는 사이토카인 등에 의해 면역세포의 세포사멸이 억제되어서 림프구가 증가되어 아토피 피부염 등의 질환이 일어나게 된다²⁶⁾. 단핵 백혈구는 내재면역과 적응면역 모두에서 중요한 역할을 하는 세포로 대식세포와 항원제시세포를 분화하는 역할을 하지만²⁷⁾, 단핵 백혈구가 과도하게 되면 심한 염증을 유발시킬 수 있다. 호중구는 혈액에 가장 많이 존재하는 과립성 백혈구로 항균, 항박테리아의 중요한 역할을 지니고 있지만, 류마티스 관절염 같은 염증성 질병에서 조직 파괴를 매개하기도하므로²⁸⁾, 호중구의 양이 과할 경우 염증반응을 유발하여 아토피 피부염 증상이 더욱 악화될 수 있다. 마지막으로 호산구는 기생충 등의 면역에 주로 작용하는 과립성 백혈구로 일반적으로 아토피성 질병과 비만세포와 함께 연관되어 있으며, MBP(major basic protein)을 포함하고 있는데, 높은 MBP는 조직에 독성을 보이고 아토피 피부염에서 현저하게 관찰된다²⁹⁾.

혈액분석을 통한 실험결과 대조군에서는 적혈구를 제외한 모든 항목에서 정상범위를 벗어났다. 혈소판은 정상군에 비해 감소하였으며, 백혈구, 림프구, 단핵백혈구, 호중구, 호산구는 증가하였다. 혼합 한약물을 처방한 피부도포군과 경구투여군에서는 혈소판이 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었고, 그 외 과발현된 면역세포들은 유의성 있게 감소되었다. 이는 아토피 피부염에 의한 염증 반응들이 실험약물을 통해 억제되었음을 의미한다.

아토피 피부염의 병리조직학적 소견은 병변의 단계에 따라 다르지만 대체로 만성적이 되면 표피의 증식이 관찰되고, 진피에 염증세포 중 림프구가 주로 침윤된다³⁾. 실험약물이 아토피 피부염 마우스의 피부조직에 미치는 영향을 알아보기 위해 H&E 염색과 CD3염색을 시행하였다. 표피의 증식은 H&E 염색법을 통하여 확인할 수 있는데, 동물조직학에서 일반적으로 많이 사용하는 방법으로 hematoxylin에 의해 조직에서 인

산기가 많이 들어있는 세포핵이 염색되고, 세포 안팎에 널리 분포하고 있는 단백질의 아미노기에 eosin이 염색되어서 대부분의 세포질을 확인할 수 있다. 림프구의 침윤정도는 T 세포의 수용체인 CD3를 염색하여 T 세포의 양을 확인하는 CD3염색법을 통하여 확인할 수 있다.

H&E로 염색실험 결과 대조군과 경구투여군, 피부도포군에서 정상군에 비해 진피와 외피의 두께가 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 hematoxylin에 의해 염색되어 있는 세포의 수를 비교한 결과, 피부도포군과 경구투여군에서는 피부에 침윤되어 있는 세포들이 대조군에 비해 감소되어 있음을 확인할 수가 있다. 실험 결과로 보아 약물을 처방한 그룹에서 대조군에 비해 아토피 증상이 호전되어 있다는 것을 확인할 수 있고, 피부도포군보다 경구투여군이 효과가 더 좋다는 것을 확인할 수 있었다.

CD3 염색실험 결과 대조군에서는 외피와 진피 부분에 진하게 염색되어 있는 반면, 다른 그룹에서는 대조군에 비해 연하게 염색되어 있는 것을 확인할 수 있다. 즉, 대조군에 비해 다른 그룹에서는 총 T 세포의 양이 더 적은 것으로 약물에 의해 과도한 T 세포의 생성이 억제될 수 있음을 알 수 있다. 한편, CD3 염색에서는 H&E 염색과 다르게 약물을 경구투여군보다 피부도포군에서의 T 세포 생성 억제 효과가 더 뛰어나 보였다.

이와 같은 H&E 염색과 CD3염색을 통한 실험 결과는 경구투여군이나 피부도포군 모두에서 조직, 병리학적 개선 효과가 확연히 드러남을 의미하며, 급성 아토피 피부염 치료에 있어서 큰 효과를 거둘 수 있을 것으로 기대된다.

한편, IgE 항체는 비만세포의 표면수용체와 강력하게 결합하여 기생충을 축출하고 파괴하는 역할을 한다. 그러나 IgE가 비만세포와 결합할 경우 강한 염증반응을 촉발하므로 알려지 반응을 일으키게 된다³⁰. 실험결과, 정상군에 비해 대조군에서 혈중 IgE의 양이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있으며, 피부도포군

에서는 유의성있게 감소하였다. 하지만 경구투여군에서는 대조군에 비해 감소하기는 하였으나 유의성은 없었다.

좀 더 확실히 알아보기 위해 각 그룹 마우스의 비장세포에서 총 mRNA를 추출하여 Th 2 면역반응에 주요한 사이토카인인 IL-4와 TNF- α , 그리고 염증반응에 큰 관련이 있는 IL-6와 Th 1 면역반응의 사이토카인인 IFN- γ 의 mRNA 발현 수치를 비교분석 해보았다.

Th1과 Th2 세포는 상호작용을 통해 면역 균형을 유지하는데, IL-4는 Th1형 반응을 억제하고 IFN- γ 는 Th2형 반응을 억제한다. 아토피피부염 환자의 T세포는 IFN- γ 를 생산하는 능력이 저하되어 있고, IL-4에 강한 반응성을 보여 아토피피부염에서는 Th2형 세포에 의한 면역 반응이 주된 것으로 생각된다³¹. 이 외에도 IL-5, IL-13 등 다양한 사이토카인이 아토피 피부염을 유발시키는데 관여하는데 이들에 의해 상피과형성, GM-CSF(granulocytes macrophage colony stimulating factor)의 발현 등이 촉진된다³¹. 그 중 IL-4는 Th2 세포의 활성화에 주요한 역할을 하며, IgE의 생성을 촉진한다³². IL-6는 대식세포에 의해 분비되는 전염증 사이토카인이다³³. 상처나 감염이 있을 경우 빠르게 발현되어 그 역할을 수행하지만, 과도하게 발현이 되면 염증반응을 촉진, 지속시켜 염증질환을 가져오게 된다³⁴. TNF- α 는 여러 사이토카인의 생성, 세포의 성장과 분화 등에 작용하여 아토피 피부염에 영향을 미친다³⁵. 비만세포에서 분비되는 TNF- α 는 Th1 세포의 증식을 억제한다고 알려져 있어 비만세포의 탈과립 물질이 아토피 피부염의 면역반응이 Th2형 반응으로 기울도록 하는데 역할을 할 것으로 생각하고 있으며, 실제로 아토피 피부염 환자의 혈청에는 TNF- α 가 증가되어 있고 혈청의 히스타민 증가와 일치한다³. 또한, IL-4, IL-10 등이 과도하게 분비되면서 Th2 면역반응이 주도적으로 일어나게 되므로 IFN- γ 의 분비가 감소되고 Th1 면역반응이 억제된다³⁵.

본 실험 결과, IL-4, IL-6가 대조군에 비해 피부도포군, 경구투여군에서 모두 감소하였으나 유의성은 없었고 TNF- α 의 경우 경구투여군에서는 유의성있게 감소하였으나 피부도포군에서는 유의성이 없었다. 그러나 TNF- α 와 IFN- γ 의 비율을 구해본 결과 피부도포군과 경구투여군 모두에서 TNF- α 보다 IFN- γ 의 비율이 유의성 있는 증가를 보였다. 이는 실험약물이 Th 2 면역반응을 억제하고 있음을 의미하며, 이를 통해 아토피 피부염의 염증 반응이 진정되고 있다고 판단되어 진다.

혈액 및 조직학적 검사 결과로 보아 본 실험에서 사용한 혼합 한약재가 급성 아토피 피부염의 염증반응 진정 효과가 있다고 기대가 되며, IgE와 각종 사이토카인 mRNA의 발현 정도를 분석해본 결과 Th 2 면역반응을 억제하고 있다고 사료된다. 하지만, 사이토카인 발현 변화정도가 혈액 및 조직학적 변화에 비해 유의성이 낮으므로 본 실험에서 확인해본 면역물질 이외에 다른 방법이나 경로에 의한 혼합 한약재의 효과가 있을 것으로 추정되며 이에 대해 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 실험은 BALB/c 마우스에 DNCB를 등에 도포하여 유발시킨 급성 아토피 피부염에서 복분자, 생지황, 어성초, 화피의 혼합 한약재 처방에 따른 효과를 확인하기 위해 6주령의 BALB/c 마우스를 정상군, 대조군, 피부도포군, 경구투여군 총 4 그룹으로 나누어 실험하였다. 실험약물의 아토피 치료 기전을 규명하고자, 실험동물의 혈액 및 조직학적 검사와 사이토카인 분석을 통하여 관찰하였던바, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈액학적 분석 결과 대조군에서 증가한 백혈구, 림프구, 단핵백혈구, 호중구, 호산구의 양이 피부도

포군과 경구투여군에서 유의하게 감소하였다.

2. 조직학적 분석 결과 대조군에 비해 피부도포군과 경구투여군에서 진피세포의 수가 적고 T세포의 양도 유의하게 감소하였다.
3. 혈액내 IgE 분석 결과 대조군에 비해 피부도포군에서 유의하게 감소하였다.
4. 비장의 사이토카인 분석결과 대조군에 비해 경구투여군에서 TNF- α 가 유의하게 감소되었다.

이상의 결과로 복분자, 생지황, 어성초, 화피의 복합 약물은 아토피 피부염이나 기타 염증 질환에 효과가 있을 것으로 기대되며 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 가천대학교 교내연구비 지원에 의한 결과임.

References

1. Kang WH, Atlas of Skin Disease, Seoul: Hanmi medical publishing co, 2003:71-2.
2. Korean Dermatological Association Dermatology Textbook Editing Board, Textbook of Dermatology 5th edit, Seoul:Ryomoongak., 2008:170-8.
3. Eun HC, Immunodermatology. Seoul university publisher, 1999:27-34.
4. Lee GS, Pena ID, Choi JY, Yoon SY, Choi SH, Kang TJ, Oh SK, Cheong JH, Effect of SPZZC, a composition of herb extracts, on atopic dermatitis in BALB/c and NC/Nga mouse, Yakhak Hoeji, 2008;52(3):232-9.
5. Korea Food & Drug Administration, Clinical

- trial guidelines of herbal medicinal products about atopic dermatitis, 2009:1-17.
6. Nationwide College of Korean Oriental Medicine Joint Instruction Compilation Committee, Bonchohak, Seoul:Yeonggrimsa, 2005:694-5.
 7. Yoon I, Cho JY, Kuk JH, Wee JH, Jang MY, Ahn TH, Park KH, Identification and antioxidative compounds from *Rubus coreanum* fruit, Korean J Food Sci Technol, 2002;34:898-904.
 8. Choi J, Lee KT, Yun SY, Ko CD, Jung HJ, Park HJ, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of nigaichigoside F1 and 23-hydroxytormentonic acid obtained from *Rubus coreanus*, BiolPharm Bull, 2003, 26: 1436-41.
 9. Nationwide College of Korean Oriental Medicine Joint Instruction Compilation Committee, Bonchohak, Seoul:Yeonggrimsa, 2005:233-4.
 10. Oh KO, Kim SW, Kim JY, Ko SY, Kim HY, Baek JH, Ryoo HM, Kim JK, Effect of *Rehmannia glutinosa* Libosch extract on bone metabolism, Clinica Chimica Acta, 2003; 334(1):185-95.
 11. Kim SB, Kim KJ, The Effects of *Rehmannia glutinosa* on the Protein Expression Related to the Angiogenesis, Cell Survival and Inflammation, J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2006;19(3):22-33.
 12. Seo HS, The Experimental Study on Anti-inflammation and Anti-oxidation of *Indigo Naturalis* and *Rehmanniae Radix*, J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2008;21(3):104-10.
 13. Nationwide College of Korean Oriental Medicine Joint Instruction Compilation Committee, Bonchohak, Seoul:Yeonggrimsa, 2005:272-3.
 14. Lee HJ, Kim GJ, The Effects of *Houttuynia Herba* on the Mast Cell-mediated Inflammatory Responses, J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2009;22 (2):60-73.
 15. Kim J, Ryu HS, Shin JH, Kim HS, In vitro and Ex vivo Supplementation of *Houttuynia cordata* Extract and Immunomodulating Effect in Mice, J Korean Soc Food Sci Nutr, 2005;34(2):167-75.
 16. Nationwide College of Korean Oriental Medicine Joint Instruction Compilation Committee, Bonchohak, Seoul:Yeonggrimsa, 2005:741.
 17. Ju EM, Lee SE, Hwang HJ, Kim JH, Antioxidant and anticancer activity of extract from *Betula platyphylla* var. *japonica*, Life Sciences, 1998;74:1013-26.
 18. Joo YH, Won CH, Kim JY, Cho KH, Min KU, Kim KH, Developing an atopic dermatitis model and the effects of actinidia extract on dermatitis in NC/Nga mice, Korean J Dermatol, 2009;47(10):1105-12.
 19. Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, Larsen CG, A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin., The Journal of investigative dermatology, 2000;115(4): 640-6.
 20. Oshio T, Sasaki Y, Funakoshi-Tago M, Aizu-Yokota E, Sonoda Y, Matsuoka H, Kasahara T, *Dermatophagoides farinae* extract

- induces severe atopic dermatitis in NC/Nga mice, which is effectively suppressed by the administration of tacrolimus ointment. 2009. *International Immunopharmacology*. 2009;9(4): 403-11.
21. Yang HM, Lim SS, LEE YS, Shin HK, Oh YS, Kim JK. Comparison of the Anti-inflammatory Effects of the Extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. *Korean J Food Sci Technol*. 2007;39(3):342-7.
 22. Chae BS, Shin TY. Effect of Fresh *Rehmanniae Radix* Methanol Extracts on the Production of Cytokines. *Yakhak Hoeji*. 2006;50(3):184-90.
 23. Lee JY, Lee YJ, Park WS, Kim SJ, Han HS. Anti-inflammatory Effects of Fermented *Houttuyniae Herba* Water Extract on LPS-induced Mouse Macrophage. *Kor. J. Herbology*. 2010;25(3):27-34.
 24. Ryu MH, Park EK, Kim YH, Lee YA, Lee SH, Yang HI, Hong SJ, Baek YH, Park DS, Han JS, Yoo MC, Kim KS. Anti-inflammatory Effects of an Ethanolic Extract from *Betula Platyphylla*. *J Korean Oriental Med*. 2006;27(1):184-95.
 25. Pitchford SC. Defining a role for platelets in allergic inflammation. *Biochemical Society Transactions*. 2007;35(5):1104-8.
 26. Trautmann A, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Role of dysregulated apoptosis in atopic dermatitis. *Apoptosis*. 2000;5:425-9.
 27. Nagata N, Oshida T, Yoshida NL, Yuyama N, Sugita Y, Tsujimoto G, Katsunuma T, Akasawa A, Saito H. Analysis of highly expressed genes in monocytes from atopic dermatitis patients. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2003;132:156-67.
 28. Zhang Z, Cherryholmes G, Shively JE. Neutrophil secondary necrosis is induced by LL-37 derived from cathelicidin. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008;84(3):780-8.
 29. Trocme SD, Leiferman KM, George T, Bonini S, Foster CS, Smit EE, Sra SK, Grabowski LR, Dohlman CH. Neutrophil and eosinophil participation in atopic and vernal keratoconjunctivitis. *Current Eye Research*. 2003;26(6):319-25.
 30. Parham P. *The immune system*. New York:Garland Science. 2005:30.
 31. Kim YH, Park YS. Effect of *Acanthopanax cortex* Water Extract on Antioxidative Activity, Lipid Profile and Epidermal Thickness in DNCB-induced Allergic Contact Dermatitis Animal Model. *Korean J Food Sci Technol*. 2006;38(5):668-73.
 32. Lee IH, Lee SH, Lee IS, Park YK, Chung DK, Choue RW. Effects of Probiotic Extracts of Kimchi on Immune Function in NC/Nga Mice. *Korean J Food Sci Technol*. 2008; 40(1):82-7.
 33. Niebuhr M, Werfel T. Innate immunity, allergy and atopic dermatitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2010;10: 463-8.
 34. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CC Jr, Silliman CC, Peterson VM. Interleukin-6 stimulates neutrophil production of platelet-activating factor. *Journal of Leukocyte Biology*. 1996;59:569-74.
 35. Kang TJ, Lee SR. The Causes and Treatment of Atopic Dermatitis. *BioWave*. 2010;10(3): 1-25.