理中湯이 Mite Antigen으로 유발된 NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염에 미치는 영향

서희연 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

Therapeutic Effects of *Yijungtang* on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions of NC/Nga Mouse Induced by Mite Antigen

Seo Hui Yeon · Han Jae Kyung · Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Objectives

The purpose of this study is to investigate the effects of *Yijungtang*(YJT) on atopic dermatitis in an *in-vitro* and *in-vivo* experiment using a RBL-2H3 mast cells and a NC/Nga atopic dermatitis mouse.

Methods

In-vitro experiment, IL-4, IL-13 mRNA expression were evaluated by a real-time PCR, IL-4, IL-13 production by ELISA and transcription factor as GATA-1, GATA-2, NF-AT1, NF-AT2, AP-1 and NF-κB by western blotting. *In-vivo* experiment, clinical skin score we evaluated by, hematology and Serum total IgE and IgG1 of NC/Nga atopic dermatitis mouse, cytokine level, total number of cell, Immunohistochemical staining and Histological features of auxiliary lymph node(ALN), draining lymph node(DLN), peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) and dorsal skin tissue in NC/Nga mouse.

Results

YJT decreased IL-4, IL-13 mRNA expression, IL-4, IL-13 production and prominently decreased the expression of mast cell specific transcription factors including GATA-2, NF-AT2, c-Fos and NF-κB. YJT oral administration reduced the levels of skin severity scores. It also decreased the level of inflammatory cytokines such as IL-5, IL-13, histamine and IgE in the serum. It elevated IFN-gamma level in the spleenocyte culture supernatant but decreased. CD3e⁺, CD19⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3e⁺CD69⁺, CD11b⁺Gr-1⁺, CCR3⁺ in the PBMCs, CD4⁺, CD8⁺, CD3e⁺CD69⁺, B220⁺CD23⁺ in the ALN, CD4⁺, CD3e⁺CD69⁺ in the ALN and CD4⁺, CD11b⁺Gr-1⁺ in the dorsal skin. Histological examination showed that infiltration levels of immune cells in the skin of AD-induced NC/Nga mice were much improved by YJT oral administration.

Conclusions

The anti-allergic activities of YJT may be mediated by down-regulation of Th2 cytokines, such as IL-4 and IL-13, through the regulation GATA-2, NF-AT2 and NF-κB transcription factors in mast cells. YJT would be regulate molecular mediators and immune cells which are functionally associated with atopic dermatitis induced in NC/Nga mice, and may play an important role in recovering AD symptoms.

Key words : 理中湯 (*Yijungtang*), NC/Nga mouse, Atopic dermatitis, Mite antigen, Mast cell

I. 서론

아토피 피부염은 특징적인 습진성 피부병변과 가려움을 동반하는 만성 염증성 알레르기 피부질환으로 유전적 요인과 환경적 요인 및 면역학적 요인이 복합적으로 작용하여 나타난다고 알려져 있다¹⁾. 현재 전 세계적으로 전연령에 걸쳐 10~20%의 유병률을 보이고 있고²⁾ 국내에서도 해마다 증가하는 추세에 있어³⁾ 사회적 관심이 되고 있으나 완치시킬 수 있는 뚜렷한 치료약이 없는 실정이다. 기존의 치료제로는 부신피질 호르몬제 및 항히스타민제, cyclosporine 등이 많이 사용되고 있으나 장기적으로 투여할 시 부작용이 따르며 근본 치료가 이루어지지 않으므로^{4,5)} 치료 효과가 높고 부작용이 적은 치료 약물의 개발이 요구되는 상황이다.

본 실험에 사용된 理中湯은 《新方新編·皮膚門》⁶⁾에 수록된 처방으로 “治血燥癢痒”이라하여 脾虛, 血燥로 발생하는 癢痒症을 치료하는 효과가 있어 아토피 피부염에 응용될 수 있다고 판단된다. 저자는 이전 연구⁷⁾에서 理中湯이 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에서 IFN- γ 의 생산을 증가시킴으로써 아토피 피부염을 억제할 수 있음을 밝힌 바 있으며 이를 바탕으로 理中湯의 아토피 피부염 억제에 대한 추가 기전 및 효능을 연구하기 위하여 본 실험을 시행하였다.

이에 저자는 理中湯의 항알레르기 효과를 알아보고자 *In vitro*에서 理中湯이 활성화된 RBL-2H3 mast cell이 발현하는 IL-4와 IL-13를 조절할 수 있는지 real-time PCR과 ELISA로 측정하였고, 비만세포의 Th2 사이토카인 발현을 강력히 억제하는 조절 메커니즘을 규명하기 위하여 western blot으로 확인하였다. *In-vivo* 실험은 Mite antigen으로 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga 생쥐에서 理中湯의 효능을 실험적으로 입증하고자 백혈구를 분석하였고, 혈청에서의 IgE, IgG1 수준을 관찰하였으며, 혈청에서의 IL-5, IL-13, histamine 수준, 비장 세포 분리 후 배양상층액에서의 IL-4, IFN- γ 수준 및 peripheral blood mononuclear cells(PBMCs), ALN, DLN, 등 피부조직에서의 CD3e⁺, CD19⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3e⁺CD69⁺, B220⁺CD23⁺, CD11b⁺Gr-1⁺, CCR3⁺의 총 absolute number를 측정하였다. 또한 理中湯 투여 후의 간기능 부작용 여부를 관찰하였으며, 실험 종료 후 귀 조직과 등 피부조직에 대해 H&E 염색으로 조직의 염증, 세포 침윤 등을 관찰하고 Toluidine blue 염색으로 비만세포(mast cells)의 침윤과 분포를 분석하여 유의한

결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약은 dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), collagenase A, phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), ionomycin, chloroform, 2-propanol, ethanol, diethyl pyrocarbonate(DEPC), phenyl-methylsulfonyl fluoride(PMSF), formaldehyde는 Sigma사(U.S.A.) 제품을 사용하였으며 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사(Logan, U.S.A.) 제품을, anti-CD3e-PE(phycoerythrin), anti-CD4-FITC(fluorescein isothiocyanate), anti-Gr1-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD19-PE, anti-CD23-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-IgE-FITC, anti-B220-PE, anti-CD69-FITC는 Pharmingen사(Torreyana, U.S.A.) 제품을 사용하였으며 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기(대웅, Korea), rotary vacuum evaporator(Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator(Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench(Vision scientific Co., Korea), autoclave(Sanyo, Japan), micro-pipet(Gilson, France), water bath(Vision scientific Co., Korea), vortex mixer(Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer(Shimadzu, Japan), centrifuge(Sigma, U.S.A.), deep-freezer(Sanyo, Japan), thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice-maker(Vision scientific Co., Korea), homogenizer(OMNI, U.S.A.), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.), ELISA reader(Molecular Devices, U.S.A.), 자동혈구측정기(MS9-5, MELET SCHLOESING, France), 생화학 자동분석기(Fully Automatic Chemistry Analyzer, COBAS INTEGRA, U.S.A.), 광학현미경(Nikon, Japan) 등을 사용하였다.

2) 동물

암컷 7주령 15~20 g의 SPF(Specific Pathogen Free)

Table 1. Composition of *Yijungtang*

Herb Name	Scientific Name	Amount(g)
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4
附 子	<i>Aconiti Lateralis Preparata Radix</i>	4
肉 桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	4
黃 芪	<i>Astragali Radix</i>	4
白 茯苓	<i>Hoelen</i>	4
白 朮	<i>Attractylodis Rhizoma Alba</i>	4
當 歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
乾 地 黃	<i>Rebmanniae Radix Preparat</i>	4
木 香	<i>Aucklandiae Radix</i>	4
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2
Total		38

NC/Nga 생쥐는 Charles River Japan (Yokohama, Japan)사에서 공급받았다. 동물은 실험 당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12시간(light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물

(1) 약물구성

본 실험에 사용한 理中湯의 구성은 《新方新編》⁶⁾에 준하였으며, 사용한 약제들은 대전대학교 둔산한방병원에서 구입 정선하여 사용하였고, 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다 (Table 1).

(2) 理中湯 추출물 분리

理中湯 2첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 동안 추출하여 얻은 액을 흡입 여과한 후, 감압 증류장치로 농축고 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 理中湯 추출물 (이하 YJT) 15.6 g을 냉동 보관 (-84℃)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. In vitro 실험

1) 세포 배양

본 실험에 사용된 RBL-2H3 mast cell은 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구매하였으며 minimal essential medium(MEM) (Gibco-BRL, U.S.A.)에 15% FBS와 penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml (Gibco-BRL, U.S.A.)을 첨가하여 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. human Fibroblast cells(hFCs)는 충남대학교 부속병원에서 제공받아 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서

5분간 원심분리하고, tube에 DMEM {containing collagenase A (5 mg/ml, BM, Indianapolis, U.S.A.)와 DNase type I (0.15 mg/ml), antibiotics (penicillin 10⁴ U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)}을 넣고 37℃ CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였으며 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 배양하였다. 그 다음 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 2주일 동안 배양하였다. 2주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 hFCs세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵ cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

2) 세포독성 측정

세포독성 측정방법은 EZ-Cytox assay법⁸⁾을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. Human Fibroblast cells(hFCs)는 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후 YJT (최종 농도 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml)를 48시간 동안 처리하였고, 배양종료 6시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 µl씩을 각 well에 가하고 실험 종료시까지 배양하였다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Real-time PCR

RBL-2H3 mast cell을 6-well plate에 2.5×10⁵ cells/ml로 2 ml씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 YJT를 50 µg/ml과 100 µg/ml로 처리하고, 1시간 후 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (0.5 µM)으로 자극하여 6시간 뒤 세포를 얻은 것을 실험군으로 사용하였고, 어떠한 처리도 하지 않은 RBL-2H3 mast cell을 정상군 (normal, Nr)으로 사용하였으며, PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (0.5 µM)

자극만 실시한 군을 대조군 (control, PI-CT)으로, cyclosporin A (CsA, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리하고, 1시간 후 PMA (50 ng/mL)와 ionomycin (0.5 μM)으로 자극하여 6시간 뒤 세포를 얻은 것을 양성대조군 (positive control, PI-CsA 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 사용하였다. 이후 세포에 trizol (ambion) 시약을 1 mL 넣고 EP-tube에 넣은 후 chloroform을 100 μL 넣었다. 이를 얼음에 17분 동안 두고 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하여 층이 분리되면 EP-tube에 상층액을 옮겨 담고, 동량으로 2-propanol을 넣어 얼음에 10분 정도 두었다가 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 한 후 상층액은 버리고 80% ethanol로 세척하고 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 완전히 제거하고 투명해질 때까지 말린 후 DEPC water를 cell의 양에 따라 20~30 μL 넣어 녹이고 원심분리기로 액을 모아서 75 $^{\circ}\text{C}$ 로 데워진 전기가열장치에 5분 동안 두었다가 얼음으로 재빨리 옮겼다. 일부는 RNA를 정량하고 나머지는 만들어 놓은 cDNA cocktail에 정량한 양을 계산해서 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 두고 95 $^{\circ}\text{C}$ 로 데워진 전기가열장치에 5분 동안 두었다가 얼음으로 옮겨서 cDNA를 합성하였다. IL-4, IL-13, β -actin primer를 적정 농도로 각각 희석하여 넣고 SYBR Green (Applied Biosystem, U.S.A.)과 cDNA를 넣은 후 real-time PCR을 95 $^{\circ}\text{C}$ 3분 실행 후 95 $^{\circ}\text{C}$ 15초, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20초로 40회 실행시켰다.

Rat Oligonucleotide의 염기서열은 다음과 같다 (Table 2).

4) ELISA 측정

RBL-2H3 mast cell을 48-well plate에 4×10^5 cells/mL로 250 μL 씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 YJT를 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 그리고 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 각 well에 처리하고 1시간 후 PMA 50 ng/mL 와 ionomycin 0.5 μM 으로 자극하여 24시간 뒤 세포를 얻은 것을 실험군으로 사용하였고, 어떠한 처리도 하지 않은 RBL-2H3 mast cell

을 정상군 (normal, Nr)으로 사용하였으며, PMA 50 ng/mL 와 ionomycin 0.5 μM 자극만 실시한 군을 대조군 (control, PI-CT)으로, cyclosporin A (CsA, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리하고, 1시간 후 PMA (50 ng/mL)와 ionomycin (0.5 μM)으로 자극하여 24시간 뒤 세포를 얻은 것을 양성대조군 (positive control, PI-CsA 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 사용하였다. Rat IL-4 (BD bioscience), IL-13 (Biosource)은 ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 코팅 antibody를 micro-well에 100 μL 씩 분주하고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간 두었다. 각 well을 wash buffer로 세척하고 Assay diluent를 200 μL 씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양한 다음 표준품을 희석하고 상층액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상층액을 100 μL 씩 넣어 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 μL 씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였고 microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100 μL 씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양한 다음 stop solution을 각 well에 50 μL 씩 넣고 Microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 측정하였다.

5) Western blot

RBL-2H3 mast cell을 100 $\times$ 20 mm plate에 4×10^5 cells/mL로 10 mL씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 YJT를 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하고 1시간 후 PMA 50 ng/mL 와 ionomycin 0.5 μM 으로 자극하여 6시간 후에 세포를 얻은 것을 실험군으로 사용하였다. 어떠한 처리도 하지 않은 RBL-2H3 mast cell은 정상군(normal, Nr)으로 사용하였으며, PMA 50 ng/mL 와 ionomycin 0.5 μM 자극만 실시한 군을 대조군 (control, PI-CT)으로, cyclosporin A (CsA, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리하고, 1시간 후 PMA 50 ng/mL 와 ionomycin 0.5 μM 으로 자극하여 24시간 뒤 세포를 얻은 것을 양성대조군 (positive control, PI-CsA

Table 2. Primer Sequence (Rat Oligonucleotide)

Gene	Primer	Sequence
IL-4	Forward	5'-GGATGTAACGACAGCCCTCT-3'
	Reverse	5'-GTGTTCCCTTGTTGCCGTAAG-3'
IL-13	Forward	5'-CAGTTGCAATGCCATCCACA-3'
	Reverse	5'-AGCCACATCCGAGGCCTTT-3'
β -actin	Forward	5'-AGCAGATGTGGATCAGCAAG-3'
	Reverse	5'-AACAGTCCGCCTAGAAGCAT-3'

Scheme 1. Experimental design for the induction of atopic dermatitis skin lesions in NC/Nga mouse

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 사용하였다. 이후 차가운 PBS로 세척한 후 scraper로 세포를 얻고 원심분리 하여 상층액을 버렸다. whole cell lysate는 Lysis 버퍼 RIPA 버퍼 98 μL + protease inhibitor cocktail lysis solution (100 $\times$) 1 μL + PMSF (100 mM) 1 μL 100 μL 로 얼음에서 15~20분간 배양한 후 상층액을 얻었다. nuclear extract는 Nuclear extract kit (Active motif)를 사용하여 hypotonic 버퍼를 넣고 얼음에서 15분간 배양한 후 원심분리 하여 상층액 (cytoplasmic fraction)을 모았다. 튜브에 남아있는 핵에 complete lysis 버퍼를 넣고 30초 동안 얼음에서 배양한 후 원심분리 하여 상층액 (nuclear fraction)을 얻었다. 얻은 단백질은 BCA 단백질 정량법으로 정량하였다. 10% SDS page gel을 만들어서 running 버퍼를 채운 뒤 20분 동안 pre-running시키고 그 사이에 단백질을 loading 버퍼로 희석하고 끓는 물에 5분 동안 끓여서 단백질이 꼬인 것을 풀어주었다. Gel의 첫 번째 칸은 띠우고 두 번째 칸에 단백질 마커를 넣고 그 다음 칸부터 샘플을 넣어 4~5시간 120 V로 내렸다. 다 내린 gel을 크기에 맞게 자르고 20분 동안 transfer 버퍼에 담귀 놓고, 그 사이에 막을 gel의 크기에 맞게 자르고 transfer 버퍼에 미리 담귀 두었다. Transfer 버퍼로 가득 채우고 뜨거워지지 않게 얼음을 넣은 후 150 V로 1시간 30분 동안 membrane으로 이동시켰다. membrane을 크기에 맞게 자르고 5% skin milk (TBS/T 버퍼)로 1시간 동안 blocking하였다. primary antibody (GATA-1, GATA-2, NF-AT1, NF-AT2, c-Jun, p-c-Jun, c-Fos, NF- κB p65, β -actin)로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하루를 반응시키고 다음날 secondary antibody를 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 암실에서 ECL Detection 용액을 사용하여 필름에 옮기고 현상용액에 담귀 현상하고 고정액에 고정시켜 건조시켰다.

3. In vivo 실험

1) 피부염 유발 및 치료처리

7주령의 NC/Nga 생쥐를 1주일 동안 적응시킨 후 눈

에서 capillary 관을 이용하여 100 μL 의 혈액을 채혈하고, 이미 피부염이 발생된 18주령의 NC/Nga 생쥐와 2주간 같은 공간에서 동시 사육하여 항원감작을 시켰다. 그 다음 마취제인 chloral hydrate (10%)로 마취한 후 귀와 등쪽 목 부위를 깨끗하게 제모한 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 그리고 중앙실험동물에서 제공하는 Biostir Mite antigen cream {이하 Mite : *Dermatophagoides farinae* crude extract (Mite antigen, lyophilized)를 항원으로 제조된 것으로 진드기 항원 0.5% Tween 20이 포함된 ointment base로 제작되었다}를 1주에 2회 3주간 (10~13주령) 등 부위 및 목 부분에 고르게 도포하였고 도포 2~3시간 전에 4% SDS 용액을 분무하여 피부염이 잘 유발되도록 피부층을 파괴하였다. 도포 시작 2주 후 (12주령), 등 부분에 피부염이 충분히 유발되면서 굵는 행동이 심화되면 육안 평가를 실시하였다.

2) 약물처리 및 치료평가

실험은 7주령 NC/Nga 생쥐를 15주령까지 SPF 조건에서 사육한 정상군(SPF-normal, Nr)과 Mite를 도포한 대조군 (control, Mite-CT), Mite를 도포하고 CsA를 도포한 양성대조군 (positive control, Mite-CsA), 그리고 Mite를 도포하고 YJT를 투여한 실험군으로 나누어 실시하였으며, 실험군은 다시 YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk)투여군으로 나누었다.

양성 대조 약물인 CsA (10 mg/kg)는 12주령부터 15주령까지 3주간 주 5회 발진된 등 부위에 골고루 도포하였으며, 실험 약물인 YJT는 12주령부터 15주령까지 3주간 매일 1회 오전 11시에 260 mpk, 520 mpk를 경구 투여 하였다. 실험 종료 후 (15주령)에 관능 평가를 실시한 다음 혈액을 채혈하고 등 부위의 피부를 절제하여 10% 포르말린 용액에 담아 보관하였다 (Scheme 1).

3) 백혈구 측정

최종 관능평가를 실시한 후 EDTA 처리된 튜브형 주

사기를 사용하여 심장천자법으로 혈액 0.5 ml를 채취하였다. 백혈구 수는 자동혈구측정기로 Fonio법¹⁰⁾에 준하여 Minos-ST로 측정하였고 백혈구 중 호중구, 호산구, 단핵구의 총 세포수는 전혈을 바이오톡스텍 (주)(충청북도, 한국)에 의뢰하여 측정하였다.

4) 채혈 및 IgE 와 IgG1 측정

NC/Nga 생쥐의 눈에서 실험 시작 당시 (8주령), 4주 후 (12주령), 7주 후 (15주령)에 capillary 관을 이용하여 약 100 μ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기 6,500 rpm에서 20분간 원심분리한 후 30 μ l의 혈청을 분리한 후 -70°C에 냉동 보관하였다. NC/Nga 생쥐의 혈청 내 IgE와 IgG1 수준은 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)로 측정하였다. 각 well에 NC/Nga 생쥐에서 실험 시작 당시, 4주 후 그리고 7주 후에 채혈한 혈청 5 μ l (1/10 dilution)와 dilution buffer 45 μ l를 혼합하여 각 well에 분주하고, 2시간 동안 25°C 실온에서 방치한 후 2회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-IgE conjugated를 넣고 2시간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다¹¹⁾.

5) 비장 세포분리 및 cytokine 측정

NC/Nga 생쥐 실험 시작 7주 후 (15주령)에 비장 (spleen)을 적출하여 100 mesh로 비장세포 (splenocytes)를 분리하였다. 전날 anti-CD3/CD28 (1 μ g/ml)을 96 well plate에 coating하여 4°C 냉장고에서 overnight한 다음 D-PBS로 2회 수세하였다. 분리한 비장세포는 ACK 용액으로 RBC를 제거한 후 Mite antigen이 coating된 각각의 well에 5×10^5 세포씩 5% FBS-DMEM 배양액에서 48시간 동안 배양한 후 원심분리기 2,000 rpm에서 3분간 원심분리한 후 200 μ l의 배양상층액을 얻었다. 배양상층액 내의 IL-4 (BioSource, U.S.A.)와 IFN- γ (BioSource, U.S.A.), 그리고 혈장 내의 IL-5 (BioSource, U.S.A.), IL-13 (R&D system, U.S.A.), 그리고 histamine (BD, U.S.A.)의 수준은 enzyme-linked immuno-sorbent assay로 측정하였다. 각 well에 배양상층액 50 μ l를 분주하고 2시간 동안 25°C 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-IgE con-

jugated를 넣고 2시간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다¹¹⁾.

6) PBMCs, ALN, DLN 및 등 피부조직에서 형광 유세포 분석

PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells)를 분석하기 위해 실험을 종료한 후 NC/Nga 생쥐에서 heparin을 처리한 3 ml 주사기로 채혈한 후 미리 준비한 10 ml의 ACK용액 (8.3 g NH_4Cl , 1 g KHCO_3 , in 1 ℓ of demineralized water + 0.1 mM EDTA)에 혼합하여 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 제거하고 2회 1%의 FBS가 함유된 PBS (FACS buffer)로 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 불순물을 제거하였다. PBMCs의 총세포수는 12주령의 NC/Nga 생쥐의 혈액을 1.6 ml로 하여 hematology의 WBC ($\times 10^3$ cells/ μ l)에 적용하여 산출하였다. 또한 ALN (Axillary Lymph Node)과 DLN (Draining Lymph Node)의 분석을 위해 ALN과 DLN을 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1,700 rpm)하고 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 등 피부조직은 잘게 chopping한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)를 넣고 37°C shaker (180 rpm, 20 min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 분리한 PBMCs, ALN, DLN 그리고 등 피부조직 침윤세포의 총세포수를 측정한 다음 모든 조직의 세포들을 5×10^5 세포로 조정한 후 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-CD3e-PE, anti-CD19-FITC, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD69-FITC, anti-B220-PE, anti-CD23-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-Gr1-PE, anti-CCR3-PE를 넣고 30분간 얼음에서 반응시킨 후 3회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 $\text{CD}3\text{e}^+$, $\text{CD}19^+$, $\text{CD}4^+$, $\text{CD}8^+$, $\text{CD}3\text{e}^+\text{CD}69^+$, $\text{B}220^+$, $\text{CD}23^+$, $\text{CD}11\text{b}^+\text{Gr}1^+$, 그리고 $\text{CCR}3^+$ 세포수를 백분율 (%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

Table 3. Primer Sequence (Mouse Oligonucleotide)

Gene	Primer	Sequence
IL-5	Forward	5' AGCCTAACCCTGTTGGAGGT 3'
	Reverse	5' GTGATCGGCTTTTCTTGAGC 3'
IL-13	Forward	5' ATGCCCAACAAAGCAGAGAC 3'
	Reverse	5' TGAGAGAACCAGGGAGCTGT 3'

7) Quantitative real-time-PCR in dorsal skin tissue

(1) NC/Nga 생쥐의 등 피부조직에서 RNA 분리

NC/Nga 생쥐의 등 피부조직을 적출하여 각각에 RNAzol^B 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 homogenizer로 분쇄하였다. 이 조직분쇄 혼합 부유액에 chloroform (CHCl_3) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다. Quantitative real-time PCR은 7500 real-time PCR system을 이용하여 수행하였다¹²⁾.

Mouse Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다 (Table 3).

Cytokine 유전자 발현은 SYBR[®] Green PCR Master mix를 사용하였고, internal standard는 GAPDH로 Taqman probe를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. IL-5와 IL-13 mRNA 유전자 발현은 SYBR법으로 등 피부조직에서 관찰하였다. Quantitative real-time PCR의 조건은 pre-denaturation은 2 min at 50°C, 10 min 94°C, 40 cycles을 0.15 min at 95°C, 1 min at 60°C에서 수행하였다. 양성대조군, YJT (520mpk) 투여군, YJT (260mpk) 투여군의 대조군은 internal standard로 GAPDH를 사용하여 target group의 Quantitative real-time PCR은

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

x = starting quantity
 y = yield
 n = number of cycles
 e = efficiency

로 계산하여 RQ(relative quantitative)값을 측정하였다.

8) LFT 검사

NC/Nga 생쥐에서 3주간 약물을 처리한 후 ethyl ether로 마취하여 심장천자법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 ALT와 AST을 JSCC UV method의 원리를 이용하여 생화학 자동분석기로 측정하였다.

9) 피부조직 채취 및 염색

귀와 등 피부조직을 떼어내어 10% paraform-aldehyde에서 24시간 동안 포르말린에 고정하였다. 그 조직을 파라핀으로 포매하였고 5 μ m 두께로 block을 만들었다. 그 조직부분은 Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색으로 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils / eosinophil, 그 외 다른 세포와 부종을 식별하고, 비만세포를 염색하는 toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤을 광학현미경 $\times 100$ 배율로 관찰하였다¹³⁾.

4. 통계처리

각 실험군 결과 값은 unpaired Student's T-test 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, $P < 0.05$ 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)

III. 성 적

1. In vitro

1) 세포 독성

YJT의 세포독성을 측정한 결과, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml의 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1).

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

hFCs were pretreated with various concentration YJT. The results are expressed the mean± S.E. (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test.

2) Real-time-PCR analysis

(1) IL-4 mRNA expression from RBL-2H3 mast cell

정상군에 비하여 PI를 자극한 대조군에서 IL-4 mRNA 유전자 발현이 증가되었고, 대조군에 비하여 CsA를 처리한 양성대조군, 50 μg/ml, 100 μg/ml YJT를 처리한 실험군에서 IL-4 mRNA 유전자 발현이 유의성 있게 억제되었다 ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$)(Fig. 2).

(2) IL-13 mRNA expression from RBL-2H3 mast cell

정상군에 비하여 PI를 자극한 대조군에서 IL-13 mRNA 유전자 발현이 증가되었고, 대조군에 비하여 CsA를 처리한 양성대조군, 50 μg/ml, 100 μg/ml YJT를 처리한 실험군에서 IL-13 mRNA 유전자 발현이 유의성 있게 억제되었다 ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$)(Fig. 2).

3) ELISA analysis

(1) IL-4 production from RBL-2H3 mast cell

IL-4 생산량은 정상군에서는 전혀 없었고, 대조군에서는 3192.2 ± 26.5 (pg/ml)로 정상군에 비하여 증가하였으며, 양성대조군에서는 3.68 ± 0.181 (pg/ml), 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml YJT 처리 후 PI로 자극한 실험군에서는 각각 2744.7 ± 67.8 (pg/ml), 1764.9 ± 17.4 (pg/ml), 1192.9 ± 22.6 (pg/ml)로 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 IL-4 생산을 억제하였다 ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$)(Fig. 3).

Fig. 2. Inhibitory effects of YJT on IL-4 and IL-13 mRNA expression from RBL-2H3 mast cell

RBL-2H3 mast cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 μg/ml) or YJT (50, 100 μg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PMA-Ionomycin(PI) for 6 hours. IL-4 and IL-13 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. real-time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 real-time PCR system. Values are expressed as means±S.E. from two-independent experiments(***) $p<0.001$.

Fig. 3. Inhibitory effects of YJT on IL-4 production from RBL-2H3 mast cell

RBL-2H3 mast cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 μg/ml) or YJT (50, 100, 200 μg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PMA-Ionomycin (PI) for 24 hours. IL-4 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Values are expressed as means±S.E. from two-independent experiments(***) $p<0.001$.

Fig. 4. Inhibitory effects of YJT on IL-13 production from RBL-2H3 mast cell

RBL-2H3 mast cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 µg/ml) or YJT (50, 100, 200 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PMA-Ionomycin (PI) for 24 hours. IL-13 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Values are expressed as means±S.E. from two-independent experiments (***) $p < 0.001$.

(2) IL-13 production from RBL-2H3 mast cell

IL-13 생산량은 정상군에서는 28.0 ± 3.1 (pg/ml)이었고, 대조군에서는 462.5 ± 8.4 (pg/ml)로 정상군에 비하여 증가하였으며, 양성대조군에서는 32.6 ± 11.4 (pg/ml), 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml의 YJT 처리 후 PI로 자극한 실험군에서는 350.1 ± 5.3 (pg/ml), 327.6 ± 7.8 (pg/ml), 240.3 ± 27.3 (pg/ml)로 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 IL-13 생산을 억제하였다 ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$)(Fig. 4).

4) Western blot analysis

(1) Effect of YJT on GATA-1 and GATA-2 signal events in RBL-2H3 mast cell

GATA-1과 GATA-2 단백질 발현은 무처리군인 정상군에 비하여 PI만으로 자극한 대조군에서 현저하게 증가하였고 (Fig. 5, GATA-1과 GATA-2 lane 2) 대조군에 비하여 CsA 처리 후 PI로 자극한 양성대조군에서 현저하게 억제되었으며 (Fig. 5, GATA-1과 GATA-2 lane 3), 10 µg/ml, 100 µg/ml YJT 처리 후 PI로 자극한 실험군에서는 GATA-1의 경우 약간 억제되었고 GATA-2의 경우 현저하게 억제되었다 (Fig. 5, GATA-1과 GATA-2 lane 4-5).

Fig. 5. Effect of YJT on GATA-1 and GATA-2 signal events in RBL-2H3 cells stimulated with PMA-Ionomycin

RBL-2H3 mast cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 µg/ml) or YJT (10, 100 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PMA-Ionomycin (PI) for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. GATA protein were selected as the positive controls for Anti-GATA-1 and Anti-GATA-2, respectively.

Fig. 6. Effect of YJT on NF-AT signal events in RBL-2H3 mast cells stimulated with PMA-Ionomycin

RBL-2H3 mast cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 µg/ml) or YJT (10, 100 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PMA-Ionomycin (PI) for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. NF-AT protein were selected as the positive controls for Anti-NF-AT1 and Anti-NF-AT2, respectively.

(2) Effect of YJT on NF-AT signal events in RBL-2H3 mast cell

NF-AT1과 NF-AT2 단백질 발현은 무처리군인 정상군에 비하여 PI만으로 자극한 대조군에서 현저하게 증가하였고 (Fig. 6, NF-AT1과 NF-AT2 lane 2) 대조군에 비하여 CsA 처리 후 PI로 자극한 양성대조군에서 현저하게 억제되었다 (Fig. 6, NF-AT1과 NF-AT2 lane 3). NF-AT1 단백질 발현은 100 µg/ml YJT 처리 후 PI로 자극한 실험군에서는 억제되었으나 (Fig. 6, NF-AT1 lane 5), 10 µg/ml YJT 처리 후 PI로 자극한 실험군에서는 대조군에 비하여 차이가 나지 않았다 (Fig. 6, NF-AT1 lane 4). NF-AT2 단백질 발현은 10 µg/ml, 100 µg/ml YJT 처리한 실험군 모두, 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 6, NF-AT2 lane 4-5).

Fig. 7. Effect of YJT on AP-1 signal events in RBL-2H3 mast cells stimulated with PMA-Ionomycin

RBL-2H3 mast cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 μg/ml) or YJT (10, 100 μg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PMA-Ionomycin (PI) for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was western blot with AP-1 proteins. Another part of the lysate was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of AP-1 proteins were selected as the positive controls for anti-c-Jun, anti-c-Fos and anti-phospho-c-Jun, respectively.

(3) Effect of YJT on AP-1 signal events in RBL-2H3 mast cell

c-Jun, c-Fos 및 인산화된 c-Jun (p-c-Jun)의 단백질 발현은 정상군과 대조군, 양성대조군 사이에 차이를 보이지 않았으며 (Fig. 7, c-Jun, c-Fos 및 인산화된 c-Jun lane 1-3) c-Jun 및 인산화된 c-Jun 단백질 발현은 YJT 처리 후 PI로 자극한 실험군과 대조군 간에 차이가 없었으나 (Fig. 7, c-Jun 및 인산화된 c-Jun lane 4-5), c-Fos 단백질 발현은 10 μg/ml, 100 μg/ml YJT 처리한 실험군 모두, 대조군에 비하여 현저하게 억제되었다 (Fig. 7, c-Fos lane 4-5).

(4) Effect of YJT on NF-κB p65 signal events in RBL-2H3 mast cell

NF-κB p65 단백질 발현은 정상군에 비하여 PI만으로 자극한 대조군에서 현저하게 증가하였고 (Fig. 8, NF-κB p65 lane 2), 대조군에 비하여 CsA 처리 후 PI로 자극한 양성대조군에서 현저하게 억제되었으며 (Fig. 8, NF-κB p65 lane 3), 100 μg/ml YJT 처리 후 PI로 자극한 실험군에서는 억제되었으나 (Fig. 8, NF-κB p65 lane 4), 10 μg/ml YJT 처리 후 PI로 자극한 실험군에서는 대조군에 비하여 차이가 나지 않았다 (Fig. 8, NF-κB p65 lane 5).

2. In vivo

1) Mite antigen를 이용한 아토피 피부염 유발 및 YJT 투여

Mite를 도포한 대조군에서 긁는 행동을 동반한 흥반,

Fig. 8. Effect of YJT on NF-κB p65 signal events in RBL-2H3 mast cells stimulated with PMA-Ionomycin

RBL-2H3 mast cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 μg/ml) or YJT (100, 10 μg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PMA-Ionomycin (PI) for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was western blot with NF-κB p65 protein. Another part of the lysate was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. NF-κB p65 protein were selected as the positive controls for Anti-NF-κB p65, respectively.

Fig. 9. Topical application of CsA and YJT treatment of atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen for 3 weeks

Shown are back of Mite antigen-ointment NC/Nga mouse, Mite antigen plus YJT (260 mpk, 520 mpk)-orally administration in NC/Nga mouse for 3 weeks.

부종, 인설, 가피, 태선화 등의 증상이 확인되었다. 대조군에 비하여 CsA를 투여한 양성대조군은 피부 발진이 줄어들었으며 (Fig. 9), YJT (260mpk) 투여군과 YJT (520mpk) 투여군도 등 피부의 erythema / hemorrhage, dryness / scarring, edema, excoriation / erosion, lichenification이 현저하게 감소하였다 (Fig. 9).

2) 백혈구에 미치는 영향

혈액 중 WBC 수는 정상군에 비하여 대조군에서 2배 이상 증가하였고, CsA를 처리한 양성대조군은 대조군에 비하여 정상군에 가까운 수준으로 유의성 있게 감소하였

Fig. 10. WBC differential counts in atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite antigen treatment in the dorsal skin, before the treatment of Mite antigen (SPF-normal, Nr), Mite antigen treatment for 3 weeks (Mite-CT), Mite antigen treatment for 3 weeks with CsA (10mpk)-treatment (Mite-CsA), Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-260mpk orally administration (Mite-YJT 260mpk), and Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-520mpk orally administration (Mite-YJT 520mpk) for 3 weeks. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately thereafter. Cell contents were measured by hematology (BD, U.S.A.) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

고 ($p < 0.001$), YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk)투여군 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 10A).

Neutrophils의 비율은 정상군에 비하여 대조군에서 2배 이상 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군, YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk)투여군 모두 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 10B). Eosinophils의 비율은 정상군에 비하여 대조군에서 8배 이상 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군, YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk)투여군 모두 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$)(Fig. 10C). Monocytes의 비율은 양성대조군, YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk)투여군 모두 대조군과 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 10B).

3) 혈청 IgE와 IgG1에 미치는 영향

혈청내 IgE의 수준은 정상군에서 자연적으로 증가되었고 실험 시작 7주 후 (15주령) 대조군에서 정상군

에 비하여 현저하게 증가하였으며, 양성대조군과 YJT (260mpk) 투여군, YJT (520mpk) 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다 ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$) (Fig. 11A).

혈청내 IgG1의 수준은 정상군에 비하여 대조군에서 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군에서 유의성 있게 감소되었으며 ($p < 0.05$), YJT (260mpk)투여군과 YJT (520mpk)투여군에서는 대조군에 비하여 감소되기는 하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 11B).

4) Cytokine level in serum and splenocytes culture supernatants

혈청 내 IL-5와 IL-13 수준은 정상군에 비하여 대조군에서 약 10배 이상 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군에서 유의성 있게 감소하였으며 ($p < 0.001$, $p < 0.001$), YJT (260mpk)투여군에서는 IL-5와 IL-13 수준이 모두 감소하였으나 유의성은 IL-5만이 나타났고 ($p < 0.05$), YJT (520mpk)투여군에서는 IL-5와 IL-13 수

Fig. 11. Serum IgE & IgG1 elevation and development in atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite antigen treatment in the dorsal skin, before the treatment of Mite antigen (SPF-normal, Nr), Mite antigen treatment for 3 weeks (Mite-CT), Mite antigen treatment for 3 weeks with CsA (10mpk)-treatment (Mite-CsA), Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-260mpk orally administration (Mite-YJT 260mpk), and Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-520mpk orally administration (Mite-YJT 520mpk) for 3 weeks. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately thereafter. Plasma samples were obtained by centrifugation and stored at -20°C until use. Total IgE and IgG1 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Shibayagi, Japan). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of six mice (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

Fig. 12. Culture supernatant IFN- γ , IL-4 level in splenocytes, and IL-5, IL-13, histamine release level in serum in atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite antigen treatment in the dorsal skin, before the treatment of Mite antigen (SPF-normal, Nr), Mite antigen treatment for 3 weeks (Mite-CT), Mite antigen treatment for 3 weeks with CsA (10mpk)-treatment (Mite-CsA), Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-260mpk orally administration (Mite-YJT 260mpk), and Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-520mpk orally administration (Mite-YJT 520mpk) for 3 weeks. Splenocytes from mouse at 15 weeks of age were re-stimulated with anti-CD3/CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$) for 48 hrs. IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , and histamine release levels were measured by a sandwich ELISA using an mouse ELISA kit I (Biosource, U.S.A.). Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately thereafter. Plasma samples were obtained by centrifugation and stored at -20°C until use. IL-5, IL-13 and histamine levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Biosource, U.S.A.). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of six mice (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig. 13. Total cell number PBMCs, ALN, DLN, and dorsal skin in atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite antigen treatment in the dorsal skin, before the treatment of Mite antigen (SPF-normal, Nr), Mite antigen treatment for 3 weeks (Mite-CT), Mite antigen treatment for 3 weeks with CsA (10mpk)-treatment (Mite-CsA), Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-260mpk orally administration (Mite-YJT 260mpk), and Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-520mpk orally administration (Mite-YJT 520mpk) for 3 weeks (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

준이 모두 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.001$, $p < 0.01$) (Fig. 12A).

혈청 내 histamine의 수준은 정상군에 비하여 대조군에서 약 2.5배 이상 증가하였고, 대조군에 비하여 양성 대조군에서 유의성 있게 감소하였으며($p < 0.001$), YJT (260mpk) 투여군의 경우 수준이 감소하기는 하였으나 유의성은 없었고, YJT (520mpk) 투여군에서는 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 12B).

IFN- γ 수준은 정상군에 비하여 대조군에서 약 4.8배 이상 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군에서 약간 감소하였으며 YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk) 투여군에서는 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.01$, $p < 0.05$)(Fig. 12C). IL-4 수준은 정상군에 비하여 대조군에서 약 11.6배 이상 증가되었고, 대조군에 비하여 양성대조군에서 유의성 있게 감소하였으며 ($p < 0.001$), YJT (260mpk)투여군과 YJT (520mpk)투여군의 경우 대조군과 비하여 생산량이 감소하기는 하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 12C).

5) PBMCs, ALN, DLN 및 등 피부조직에서의 유세포 형광분석

(1) 총세포수 측정

PBMCs와 등 피부(dorsal skin) 조직에서의 총세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 증가하였고, 양성대조군과 YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk)투여군 모두에서 유의성 있는 감소를 보였다 ($p < 0.001$, $p < 0.001$)

($p < 0.001$, $p < 0.05$)($p < 0.001$, $p < 0.001$)(Fig. 13A). ALN와 DLN의 총세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군에서 유의성 있는 감소를 보였으며 ($p < 0.05$, $p < 0.01$), YJT (260mpk) 투여군과 YJT (520mpk)투여군에서도 감소하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 13B).

(2) 면역형광염색에 의한 cell content 변화

① Immune cell content absolute No. change in PBMCs
CD3e⁺ T 총 절대 세포수와 CD19⁺ B 총 절대 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군과 YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk)투여군에서 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$)($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$)(Fig. 14A).

CD4⁺ Th 총 절대 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 현저하게 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군과 YJT (520mpk)투여군에서 유의성 있게 감소하였으며 ($p < 0.001$, $p < 0.01$), YJT (260mpk)투여군에서는 감소하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 14B). CD8⁺ c/s T 총 절대 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 현저하게 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군과 YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk)투여군에서 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.01$)(Fig. 14B).

CD3e⁺CD69⁺ T 총 절대 세포수와 B220⁺CD23⁺ B 총 절대 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 증가하였고, CD3e⁺CD69⁺ T 총 절대 세포수는 대조군에 비하

Fig. 14. Effects of CsA and YJT treatment on immune cell content changes of absolute numbers in PBMCs in atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite antigen treatment in the dorsal skin, before the treatment of Mite antigen (SPF-normal, Nr), Mite antigen treatment for 3 weeks (Mite-CT), Mite antigen treatment for 3 weeks with CsA (10mpk)-treatment (Mite-CsA), Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-260mpk orally administration (Mite-YJT 260mpk), and Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-520mpk orally administration (Mite-YJT 520mpk) for 3 weeks. NC/Nga mouse PBMCs ($\times 10^3$ cells/ μ l) were isolated from WBC (hematology counter), and the PBMC cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute number of CD3e⁺, CD19⁺ (A), CD4⁺, CD8⁺ (B), CD3e⁺CD69⁺ (C), B220⁺CD23⁺ (C), CD11b⁺Gr-1⁺ (D), CCR3⁺ (D) in NC/Nga mouse(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

여 양성대조군과 YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk) 투여군에서 모두 유의성 있게 감소하였다 ($p<0.001$, $p<0.01$, $p<0.001$)(Fig. 14C). B220⁺CD23⁺ B 총 절대 세포수는 대조군에 비하여 양성대조군에서 유의성 있게 감소하였고 ($p<0.05$), YJT (260mpk)투여군과 YJT (520mpk) 투여군에서는 감소를 보였으나 유의성은 없었다 (Fig. 14C).

CD11b⁺Gr-1⁺ 과립구세포와 CCR3⁺ 세포의 총 절대 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군과 YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk)투여군에서 유의성 있게 감소하였다 ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.01$, $p<0.001$)(Fig. 14D).

② Immune cell content absolute No. change in ALN
ALN에서 CD3e⁺ T 총 절대 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군과 YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk)투여군에서 감소하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 15A). CD19⁺ B 총 절대 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군에서 유의성 있게 감소하였으며 ($p<0.01$), YJT (260mpk)투여군과 YJT (520mpk)투여군에서는 감소하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 15A).

CD4⁺ Th 총 절대 세포수와 CD8⁺ c/s T 총 절대 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 현저하게 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군, YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk)투여군에서 모두 감소하였으나 유의성은 YJT

Fig. 15. Effects of CsA and YJT treatment on immune cell content changes of absolute numbers in ALN cells in atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite antigen treatment in the dorsal skin, before the treatment of Mite antigen (SPF-normal, Nr), Mite antigen treatment for 3 weeks (Mite-CT), Mite antigen treatment for 3 weeks with CsA (10mpk)-treatment (Mite-CsA), Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-260mpk orally administration (Mite-YJT 260mpk), and Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-520mpk orally administration (Mite-YJT 520mpk) for 3 weeks. NC/Nga mouse ALN cells (2×10^5 cells/ml) were isolated from ALN, and the ALN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry, and the ALN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute number of CD3e⁺, CD19⁺ (A), CD4⁺, CD8⁺ (B), CD3e⁺CD69⁺ (C), B220⁺CD23⁺ (C) in NC/Nga mouse(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

(260mpk)투여군에서만 나타났다(p<0.05)(Fig. 15B).

CD3e⁺CD69⁺ T 총 절대 세포수와 B220⁺CD23⁺ B 총 절대 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 현저하게 증가하였고, CD3e⁺CD69⁺ T 총 절대 세포수는 대조군에 비하여 양성대조군, YJT (260mpk)투여군과 YJT (520mpk)투여군에서 유의성 있게 감소하였다 (p<0.01, p<0.001, p<0.001)(Fig. 15C). B220⁺CD23⁺ B 총 절대 세포수는 대조군에 비하여 양성대조군, YJT (260mpk) 투여군, YJT (520mpk)투여군에서 모두 감소하였으나 유의성은 YJT (520mpk)투여군에서만 나타났다 (p<0.05) (Fig. 15C).

③ Immune cell content absolute No. change in DLN

DLN에서 CD3e⁺ T 총 절대 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조

군에서 유의성 있게 감소하였으며 (p<0.01), YJT (520mpk)투여군에서는 감소하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 16A). CD19⁺ B 총 절대 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군에서 유의성 있게 감소하였으며 (p<0.001), YJT (520mpk)투여군에서는 감소하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 16A).

CD4⁺ Th 총 절대 세포수와 CD8⁺ c/s T 총 절대 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 증가하였고, CD4⁺ Th 총 절대 세포수는 대조군에 비하여 양성대조군, YJT (520mpk) 투여군에서 유의성 있게 감소되었다 (p<0.001, p<0.01)(Fig. 16B). CD8⁺ c/s T 총 절대 세포수는 대조군에 비하여 양성대조군에서 유의성 있게 감소하였고 (p<0.05), YJT (520mpk)투여군에서는 감소하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 16B).

Fig. 16. Effects of CsA and YJT treatment on immune cell content changes of absolute numbers in DLN cells in atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite antigen treatment in the dorsal skin, before the treatment of Mite antigen (SPF-normal, Nr), Mite antigen treatment for 3 weeks (Mite-CT), Mite antigen treatment for 3 weeks with CsA (10mpk)-treatment (Mite-CsA), Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-260mpk orally administration (Mite-YJT 260mpk), and Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-520mpk orally administration (Mite-YJT 520mpk) for 3 weeks. NC/Nga mouse DLN cells (2×10^5 cells/ml) were isolated from DLN, and the DLN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry., and the DLN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute number of CD3e⁺, CD19⁺ (A), CD4⁺, CD8⁺ (B), CD3e⁺CD69⁺ (C), B220⁺CD23⁺ (C) in NC/Nga mouse(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

CD3e⁺CD69⁺와 B220⁺CD23⁺ 총 절대 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 현저하게 증가하였고, CD3e⁺CD69⁺ 총 절대 세포수는 대조군에 비하여 양성대조군, YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk)투여군 모두 유의성 있게 감소하였으며 (p<0.01, p<0.001, p<0.05), B220⁺CD23⁺ B 총 절대 세포수는 대조군에 비하여 양성대조군에서 유의성 있게 감소하였고 (p<0.001), YJT (260mpk) 투여군과 YJT (520mpk)투여군에서는 감소하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 16C).

④ Immune cell content absolute No. change in dorsal skin cells

등 피부세포 (dorsal skin cells)에서 CD4⁺ Th 총 절대 세포수와 CD11b⁺Gr-1⁺ 총 절대 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대

조군, YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk)투여군 모두 유의성 있게 감소하였다 (p<0.001, p<0.01, p<0.001) (p<0.01, p<0.05, p<0.01)(Fig. 17).

(3) 등 피부조직에서 IL-5와 IL-13 mRNA 유전자 발현 분석

IL-5와 IL-13 mRNA의 유전자 발현은 정상군에 비하여 대조군에서 증가하였고, 대조군에 비하여 양성대조군, YJT (260mpk) 투여군, YJT (520mpk) 투여군 모두 유의성 있는 발현 억제를 보였다 (p<0.05, p<0.01, p<0.001)(Fig. 18).

6) LFT 분석

AST의 혈청내 수준은 양성대조군, YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk) 투여군 모두 차이가 없었다. ALT

Fig. 17. Effects of CsA and YJT treatment on immune cell content changes of absolute numbers in dorsal skin cells in atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite antigen treatment in the dorsal skin, before the treatment of Mite antigen (SPF-normal, Nr), Mite antigen treatment for 3 weeks (Mite-CT), Mite antigen treatment for 3 weeks with CsA (10mpk)-treatment (Mite-CsA), Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-260mpk orally administration (Mite-YJT 260mpk), and Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-520mpk orally administration (Mite-YJT 520mpk) for 3 weeks. NC/Nga mouse Dorsal skin cells (2×10^5 cells/ml) were isolated from Dorsal skin cells, and the Dorsal skin cells were washed twice and analyzed by flow cytometry, and the Dorsal skin cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute number of CD4⁺ CD11b⁺Gr-1⁺ in NC/Nga mouse(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Fig. 19. Effects of CsA and YJT treatment on on blood chemistry levels serum level in atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite antigen treatment in the dorsal skin, before the treatment of Mite antigen (SPF-normal, Nr), Mite antigen treatment for 3 weeks (Mite-CT), Mite antigen treatment for 3 weeks with CsA (10mpk)-treatment (Mite-CsA), Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-260mpk orally administration (Mite-YJT 260mpk), and Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-520mpk orally administration (Mite-YJT 520mpk) for 3 weeks. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately thereafter. Serum were obtained by 10,000rpm centrifugation and stored at -20°C until use. ALT and AST were measured by automatic blood chemistry analyzer(*** p<0.001).

Fig. 18. Effects of CsA and YJT treatment on IL-5 and IL-13 mRNA expression in dorsal skin tissue in atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite antigen treatment in the dorsal skin, before the treatment of Mite antigen (SPF-normal, Nr), Mite antigen treatment for 3 weeks (Mite-CT), Mite antigen treatment for 3 weeks with CsA (10mpk)-treatment (Mite-CsA), Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-260mpk orally administration (Mite-YJT 260mpk), and Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-520mpk orally administration (Mite-YJT 520mpk) for 3 weeks. IL-5 and IL-13 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. The amount of SYBR green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. real-time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 real-time PCR system. Each point represents the mean±S.E. of six mice(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

수준은 YJT (260mpk)투여군과 YJT (520mpk) 투여군에서는 정상과 차이가 없었고, 양성대조군에서는 대조군에 비하여 ALT가 증가된 혈청수준을 나타내어 약간의 간독성이 관찰되었다 (Fig. 19).

7) 피부조직에 미치는 영향

(1) 귀의 조직검사 및 분석

실험 종료 후 ear 일부를 절단한 후 H&E 염색과 toluidine 염색을 하여 조직을 분석하였다. Fig. 20은 H&E 염색을 한 것으로 정상군 (Fig. 20A)에 비하여 진드기 항원을 도포한 대조군 (Fig. 20B)은 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, leukocytes의 침윤, erythema, edema, excoriation, scaling도 관찰되었다. 양성대조군 (Fig. 20C)과 YJT (520mpk)투여군 (Fig. 20E)에서는 대조군에 비하여 epidermis와 dermis의 두께도 현저하게 줄었고, leukocytes의 침윤 및 erythema, edema, excoriation, scaling 등은 거의 보이지 않아 부종이 거의

Fig. 20. Histological features of ear tissue group in atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite antigen treatment in the dorsal skin, before the treatment of Mite antigen (SPF-normal, Nr, **A**), Mite antigen treatment for 3 weeks (Mite-CT, **B**), Mite antigen treatment for 3 weeks with CsA (10mpk)-treatment (Mite-CsA, **C**), Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-260mpk orally administration (Mite-YJT 260mpk, **D**), and Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-520mpk orally administration (Mite-YJT 520mpk, **E**) for 3 weeks. NC/Nga ear biopsy were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and shows the thickening of the epidermis (red arrow) by bright microscope ($\times 100$). Data represent individual values and the average value of four individual mouse in each group.

Fig. 21. Histological status of the ear stained with toluidine blue of dorsal skin group in atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite antigen treatment in the dorsal skin, before the treatment of Mite antigen (SPF-normal, Nr, **A**), Mite antigen treatment for 3 weeks (Mite-CT, **B**), Mite antigen treatment for 3 weeks with CsA (10mpk)-treatment (Mite-CsA, **C**), Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-260mpk orally administration (Mite-YJT 260mpk, **D**), and Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-520mpk orally administration (Mite-YJT 520mpk, **E**) for 3 weeks. NC/Nga ear biopsy were stained with toluidine blue staining and shows the degranulated mast cells in the dermis (red arrow) by bright microscope ($\times 100$). Data represent individual values and the average value of four individual mouse in each group.

사라진 것이 관찰되었다. 그리고 YJT (260mpk)투여군 (Fig. 20D)에서도 대조군에 비하여 염증정도가 약간 감소하였다. Fig. 21은 비만세포 (mast cell)를 염색하는 toluidine 염색을 한 것으로 대조군 (Fig. 21B) dermis 주

변에 비만세포 (화살표)가 많이 침윤되었으나 양성대조군 (Fig. 21C), YJT (260mpk)투여군 (Fig. 21D), 그리고 YJT (520mpk)투여군 (Fig. 21E)에서는 대조군에 비하여 비만세포가 현저하게 감소하였다.

Fig. 22. Histological features of dorsal skin group in atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite antigen treatment in the dorsal skin, before the treatment of Mite antigen (SPF-normal, Nr, **A**), Mite antigen treatment for 3 weeks (Mite-CT, **B**), Mite antigen treatment for 3 weeks with CsA (10mpk)-treatment (Mite-CsA, **C**), Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-260mpk orally administration (Mite-YJT 260mpk, **D**), and Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-520mpk orally administration (Mite-YJT 520mpk, **E**) for 3 weeks. NC/Nga skin biopsy were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and shows the thickening of the epidermis (red arrow) by bright microscope ($\times 100$). Data represent individual values and the average value of four individual mouse in each group.

Fig. 23. Histological status of the skin stained with toluidine blue of dorsal skin group in atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by Mite antigen

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by Mite antigen treatment in the dorsal skin, before the treatment of Mite antigen (SPF-normal, Nr, **A**), Mite antigen treatment for 3 weeks (Mite-CT, **B**), Mite antigen treatment for 3 weeks with CsA (10mpk)-treatment (Mite-CsA, **C**), Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-260mpk orally administration (Mite-YJT 260mpk, **D**), and Mite antigen treatment for 3 weeks with skin apply of YJT-520mpk orally administration (Mite-YJT 520mpk, **E**) for 3 weeks. NC/Nga skin biopsy were stained with toluidine blue staining and shows the degranulated mast cells in the dermis (red arrow) by bright microscope ($\times 100$). Data represent individual values and the average value of four individual mouse in each group.

(2) 등 피부의 조직검사 및 분석

H&E 염색 결과, 정상군 (Fig. 22A)의 피부조직에 비해 대조군은 epidermis의 두께가 과형성, 확장되어 (long red arrow) 그 주변에 과각화, 색소침착, 과립증가, 부전 각화증, 비만세포의 침윤 등이 현저하게 증가하였고

(Fig. 22B), 양성대조군의 일부는 대조군에 비하여 정상군에 가깝게 epidermis의 두께가 줄어들었고 그 주변에 세포변형과 각화증상, 비만세포 침윤 등이 감소하였다 (Fig. 22C). YJT (260mpk)투여군은 대조군에 비하여 epidermis의 두께가 정상군에 가깝게 현저하게 줄어 그

주변에 과각화, 색소침착, 과립증가, 부전각화증, 비만세포의 침윤 등이 거의 찾아볼 수 없이 감소하였으며 (Fig. 22D), YJT (520mpk)투여군은 대조군에 비하여 epidermis의 두께가 약간 줄어들었고 그 주변에 과각화, 색소침착, 과립증가, 부전각화증, 비만세포의 침윤 등이 감소하였다 (Fig. 22E).

toluidine 염색 결과, 대조군 dermis 주변에 비만세포 (화살표)가 많이 침윤되었으나 (Fig. 23B), 양성대조군 (Fig. 23B)과 YJT (260mpk)투여군 (Fig. 23D), YJT (520mpk) 투여군 (Fig. 23E)에서는 대조군에 비하여 비만세포가 현저하게 감소하였다.

IV. 고 찰

알레르기란 정상적인 경우 인체에 해를 끼치지 않는 물질에 대해 면역 체계가 이상반응을 일으키는 것을 말한다¹⁴⁾. 아토피 피부염 (atopic dermatitis)은 알레르기 성 질환의 대표적인 것으로 심한 소양감, 홍반, 부종, 삼출, 가피, 인설, 태선화 등을 특징으로 하며¹⁾ 그 발병률은 전 인구의 약 10~20% 정도로 보고되고 있다²⁾. 주로 유아와 소아에 발생하고¹⁵⁾ 대개 5 세 이전에 90% 정도가 발병하며¹⁶⁾ 일반적으로 나이가 증가할수록 유병율이 감소한다고 알려져 있으나 전체적 유병률은 증가하는 추세이고¹⁷⁻⁸⁾ 점차 중증화되고 만성화되는 경향을 보이고 있어¹⁹⁾ 사회적 관심이 되고 있다.

아토피 피부염의 원인은 아직 뚜렷하게 밝혀진 바가 없으나²⁾ 유전적 요인, 환경적 요인과 함께 면역학적 기능 이상이 복잡하게 연관되어 발생하는 것으로 추측되고 있다²⁰⁾.

아토피 피부염에 유전적 요인이 작용함은 이미 여러 연구²¹⁻⁶⁾에서 밝혀진 바 있으며, 이²¹⁾는 아버지가 아토피 피부염이 있는 경우 자녀의 아토피 피부염 발생률은 66.6%, 어머니가 아토피 피부염이 있는 경우 자녀의 아토피 피부염 발생률은 70.0%에 육박한다고 보고하였고, 원인 유전자에 대해서는 IL-4 promoter 혹은 IL-4 수용체의 변이 등이 제시되고 있다²⁷⁾.

환경적으로는 산업화로 인한 각종 공해 및 부모, 주거 환경, 식생활 등의 수많은 유인들이 아토피 피부염의 위험을 증가시킨다²⁸⁻³¹⁾.

면역학적으로 아토피 피부염은 IgE의 과잉 생성, 비만세포와 대식세포의 과활성화, 호산구 증가 등과 관련이

있으며³²⁻⁴⁾ Th1 반응과 Th2 반응의 불균형이 아토피 피부염을 일으키는 핵심 요인으로 보고되고 있다³⁵⁾.

알레르기 반응의 기전에 중요하게 관여하는 T 세포의 표면 항원 수용체를 T 세포 수용체 (T cell receptor, 이하 TCR)라 하며 TCR은 다시 TCR1과 TCR2로 구별되고 그 중 TCR2를 가진 T 세포는 CD4⁺인 보조 T 세포 (이하 Th세포)와 CD8⁺인 세포독성 T 세포로 나뉜다³⁶⁾. 아토피 피부염 피부 병변의 주된 구성은 CD4⁺ T 세포로 나타나며 이는 생성되는 사이토카인의 종류에 따라 Th1 세포와 Th2 세포로 구분된다.

Th1 세포는 IFN- γ , IL-2, TNF를 생산하며 주로 지연형 과민반응을 조절하고 Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-16 등 일련의 사이토카인을 분비하여 IgE와 호산구, 비만세포에 의한 면역반응을 촉진하여 알레르기 반응에 관여한다³⁷⁾. IL-4는 림프구의 성숙과 면역글로불린의 생성에 밀접한 관계가 있으며 IL-5는 호산구의 분비, 분화와 성숙에 밀접한 연관이 있다³⁸⁻⁹⁾.

최근의 연구들에서는 알레르기 반응에 있어 Th2 세포의 활성화에 연이은 Th1 세포의 활성화도 가정되고 있다⁴⁰⁾. 즉, 아토피 피부염의 급성기에는 주로 Th2 세포에 의해 사이토카인 IL-4, IL-5, IL-13이 생산되지만 (Scheme 2), 만성기에는 Th2 세포 보다는 Th1 세포에 의해 사이토카인이 발현되는 경향을 보여 아토피 피부염은 항원에 대한 Th2 세포 반응이라는 추측은 전적으로 옳지 않으며 Th1 세포 반응도 유발될 수 있다⁴¹⁾. 그러나 아토피 피부염의 초기 반응은 Th2 세포 반응이 관여하기 때문에 초기에 Th1 세포 반응으로 전환시키는 것은 병변의 호전을 위해서 도움이 될 수 있다⁴²⁾.

Scheme 2. Production of cytokines

Th1 세포와 Th2 세포에서 특이하게 발현되는 사이토카인은 역관계를 나타낸다. 즉 Th1 세포가 생산하는 IFN- γ 에 의해 Th2 세포에서 IL-4, IL-5 생산이 억제되고⁴³⁾, Th2 세포가 생산하는 IL-4, IL-5 등은 Th2 세포의

IFN- γ 생산을 억제한다 (Scheme 3).

Scheme 3. Variation according to the increase of Th2 (E : Eosinophil)

Th1 및 Th2 분화에 중요한 역할을 하는 전사인자는 T-box expressed in T-cells (T-bet), STAT-1, STAT-4, STAT-6, GATA-binding protein-3 (GATA-3), c-maf 등이 알려져 있는데, T-bet, STAT-1, STAT-4 등의 전사인자가 활성화되면 Th1 림프구로의 분화가 촉진되고, STAT-6, GATA-3, c-maf, NFAT 등의 전사인자가 활성화되면 IL-4 등의 사이토카인과 함께 Th2 림프구로의 분화를 촉진한다⁴⁴⁾.

비만세포는 신체의 거의 모든 조직에 존재하지만 주로 외부 환경과 접하는 부분, 즉 피부, 내장 및 호흡기에서 많이 발견되며⁴⁵⁾, 알레르기 반응기간 동안 생리적인 변화를 유발하는 중심인자로 인식되고 있다⁴⁶⁾. 비만세포는 interleukin(IL)-3와 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)의 효과에 의존하면서 발달한 후 성숙세포로서 골수에서 생산되는 것으로 생각되며⁴⁷⁾ 세포질 내에 과립을 풍부하게 가지고 있다⁴⁸⁾.

항원이 신체에 들어오면 수지상세포, 대식세포, B세포 등과 같은 항원제시세포가 항원을 포식하여 MHC II와 함께 세포 표면에 노출하게 되고 특히 기생충이나 알레르기 유발물질 (allergen)이 항원으로 작용하면 B세포가 활성화되어 항원 특이적 IgE가 생성되고 이 IgE가 비만세포의 세포막에 있는 고친화성 IgE 수용체 (Fc ϵ RI)에 결합하는데 이러한 반응을 비만세포의 감작 (sensitization)이라고 부른다. 감작된 비만세포에 항원이 노출되면 항원이 비만세포 막에 있는 IgE에 결합하여 IgE를 교차결합 (cross-link)시키게 되고 이로 인해 비만세포가 활성화되어 탈과립이 발생하여 여러 가지 물질들이 방출된다⁴⁹⁾.

비만세포는 과립내의 화학 매개체와 사이토카인을 분비하면서 염증반응에 관여하는데 히스타민은 비만

세포의 과립으로부터 가장 빠르게 유리되며 가장 많이 유리되는 화학 매개체로 말초혈관에 대한 투과성 항진과 확장작용, 기관지 평활근에 대한 수축작용, 점막 표면에 대한 선상세포의 분비 항진 작용 등을 나타내어 과민반응 및 만성 염증반응을 일으켜 알레르기 반응에 중요한 작용을 한다⁵⁰⁻²⁾.

또한 비만세포는 IL-4, IL-13과 같은 Th2 사이토카인을 분비하여 알레르기 반응을 확장하는 역할을 하는데⁵³⁾, IL-4는 비만세포에서 선택적으로 발현되는 GATA-1, GATA-2, PU.1와 같은 인트론 부위에 결합하는 전사인자에 의해 특이적으로 조절되며⁵⁴⁻⁵⁾, IL-13은 NFAT, GATA, AP-1을 포함하는 여러 전사 인자와의 협동에 의해 조절된다⁵⁶⁾.

비만세포는 이외에도 다양한 사이토카인을 생산 분비하게 되는데 IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-16, tumor necrosis factor- α (TNF- α), vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor (VPF/VEGF), Granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF), stem cell factor(SCF), basic fibroblast growth factor(bFGF), monocyte inhibitory protein-1 α (MIP-1 α)등이 포함된다⁵⁷⁾.

韓醫學에서 아토피 피부염은 문헌상 직접 언급된 바는 없으나 “奶癬 痒起白屑 形如癰疥 由胎中血熱”⁵⁸⁾, “小兒面上癬皮如甲錯起乾燥 謂之乳癬”⁵⁹⁾, “奶癬 極烈癢痒 以致嬰兒哭鬧不安 日久後飲食減少 消化不良 或有腹瀉 體重減輕”⁶⁰⁾ 등으로 기재되어 있어 奶癬, 乳癬, 胎熱, 胎癬, 胎斂瘡 등의 범주에 속하며 現代中醫에서는 異位性皮炎으로 표현하기도 한다⁶¹⁾. 치료에 있어 《中醫兒科臨床手冊》⁶²⁾에서는 濕熱蘊蒸型과 脾虛血虧型의 2가지로 변증하여 濕熱蘊蒸型은 清熱, 利濕, 祛風하고, 脾虛血虧型은 健脾, 燥濕, 養血, 祛風하여 치료하였고, 《中醫外科治療大成》⁶³⁾에서는 肺胃蘊熱證, 濕熱蘊阻證, 脾虛血燥證의 3가지로 변증하여 清肺胃之熱, 清熱除濕, 健脾養血潤燥하여 치료하였으며 《中醫兒科學》⁶⁴⁾에서는 血熱, 濕熱, 濕阻, 血燥로 4가지로 변증하여 涼血祛風, 清熱利濕, 健脾除濕, 養血潤燥하여 치료하여, 전반적으로 병변의 초기 혹은 濕性型일 경우에는 清熱除濕하고, 경과가 오래되거나 乾性型일 경우 健脾養血하는 경향을 보였다.

본 실험에 사용된 理中湯은 《新方新編·皮膚門》⁶⁾에 수록된 처방으로 “治血燥癢痒”한다고 기록되어 있다. 小兒의 脾常不足, 肺常不足한 경향⁶⁴⁾과 아토피 피부염 자체의 병리인 脾虛 血燥를 치료하고자 健脾補肺 益氣하는 人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草, 木香, 黃芪와 補腎

陽함으로써 溫脾할 수 있는 附子, 肉桂와 補血補陰하는 當歸, 乾地黃으로 구성되어 脾氣陽虛, 血虛血燥로 인한 瘙癢症을 치료할 목적으로 立方되었다.

이에 저자는 임상에서 아토피 피부염 환자들에게 응용되고 있는 理中湯의 항알레르기 효과 및 아토피 피부염 발진 억제에 미치는 영향을 알아보고자 본 실험에 임하게 되었다.

본 실험의 결과를 살펴보면, *In vitro* 실험에서 hFCs를 배양하여 YJT의 세포독성을 측정한 결과 모든 농도에서 세포 독성이 관찰되지 않았으며 (Fig. 1), YJT가 비만세포에서 IL-4와 IL-13 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 RBL-2H3 비만세포에 CsA와 다양한 농도의 YJT를 처리한 후 비만세포를 활성화시키기 위해 PMA와 ionomycin (PI)로 자극한 뒤 6시간 후 real-time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석한 결과, 대조군에 비하여 CsA를 처리한 양성대조군과 YJT를 처리한 실험군 모두에서 유전자 발현이 유의성 있게 억제되었고 (Fig. 2), YJT가 비만세포에서 IL-4와 IL-13 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RBL-2H3 비만세포에 CsA와 다양한 농도의 YJT를 처리한 후 PI로 자극한 뒤 24시간 후 ELISA로 분석한 결과, CsA를 처리한 양성대조군과 YJT를 처리한 실험군 모두에서 IL-4와 IL-13의 생성이 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 3, 4).

Th2 사이토카인 발현은 비만세포에서 선택적으로 발현되는 GATA-1, GATA-2, NF-AT, AP-1, NF-κB p65 등의 전사인자에 의해 특이적으로 조절되므로^{54,5)} YJT가 Th2 사이토카인 발현을 억제하는 조절 메커니즘을 연구하기 위해 western blot으로 대조군, CsA를 처리한 양성대조군, 10 μg/ml와 100 μg/ml의 YJT를 처리한 실험군을 비교 분석한 결과, GATA-1의 단백질 발현은 대조군에 비하여 실험군에서 약간 억제되었고, GATA-2의 경우 보다 많이 억제 되었다 (Fig. 5). GATA-1은 조혈모세포로부터 비만세포로의 발달에 관여하며^{65,6)}, Stem cell factor (SCF)와 GM-CSF가 있는 조건에서 GATA-1 또는 GATA-2가 발현되면 호산구가 생성되는데 동물 실험에서 GATA-1 결합 부위를 소실시켰을 때 호산구 계열이 소실되는 현상을 보인 연구 결과⁶⁷⁾는 GATA-1이 호산구 생성과 발달에 중요한 역할을 함을 시사한다.

NF-AT는 활성화된 면역세포들에서 면역반응의 유도과 조절에 필수적인 여러 사이토카인 유전자(IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, TNF-α, IFN-γ 등) 및 세포 표면인자 (CD40L, FasL, IL-2Rα) 등의 발현에 중요한 역할

을 하는 전사조절인자이며^{68,9)}, 비만세포에서 IL-4와 IL-13 유전자 발현은 선택적으로 발현되는 NF-AT1, NF-AT2와 같은 인트론 부위에 결합하는 전사인자에 의해 특이적으로 조절되는 것으로 알려져 있다⁷⁰⁾. 본 실험 결과, NF-AT1 단백질 발현은 100 μg/ml YJT 처리한 실험군에서는 억제되었으나 10 μg/ml YJT 처리한 실험군에서는 대조군과 차이가 없었으며 NF-AT2의 경우 10 μg/ml, 100 μg/ml YJT 처리한 실험군 모두, 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 6).

비만세포에서 PI와 관련된 여러 형태의 인자는 T 세포의 NFAT와 같지 않을 가능성이 있다. NF-AT와 근접해 있는 OAP와 MARE는 T 세포 특이적 조절 부분이고 OAP는 AP-1, MARE는 c-maf 결합 부위이다. GATA-2는 IL-13에 결합하는 AP-1 결합을 유도 할뿐만 아니라 비만세포에서 IL-13 생성을 증가시킨다. c-Jun과 c-Fos는 AP-1 단백질 복합체의 중요한 구성원으로서 heterodimer이며 AP-1 결합 부위를 통해 전사를 조절한다⁷¹⁾. 본 실험 결과, c-Jun 및 p-c-Jun의 단백질 발현은 대조군과 실험군이 차이를 보이지 않았으나 c-Fos의 경우 10 μg/ml, 100 μg/ml YJT 처리한 실험군 모두, 대조군에 비하여 현저히 억제되었다 (Fig. 7).

GATA-3는 염색체의 구조를 느슨하게 만들어 유전자의 발현을 크게 증가시키는 기능을 가진 조직 특이적으로 발현되는 전사인자로서 T 세포에서 IL-13을 발현하는데 있어서 중요한 역할을 하며 IL-4, IL-5의 발현에도 영향을 미친다. 또한 GATA-3는 T 세포에서 STAT6와 NF-κB p65의 활성화를 필요로 하며, 이 세 요소가 결합하여 IL-13 유전자 프로모터의 전사적 활성화를 촉진한다⁷²⁻³⁾.

NF-κB는 p50과 p65라는 2개의 subunit으로 구성된 다단백질 복합체이며⁷⁴⁾ inhibitor of NF-κB (IκB)라고 불리는 억제성 단백질의 결합으로 불활성화 상태를 유지하다가⁷⁵⁾ 자극에 의해 해리되면 핵내로 이동하여 특정한 유전자의 promoter 부위에 결합함으로써 유전자의 전사를 활성화시킨다⁷⁶⁾. 실험 결과, NF-κB p65 단백질 발현은 대조군에 비하여 100 μg/ml YJT 처리한 실험군에서 현저히 억제되었다 (Fig. 8). 이는 YJT가 비만세포의 알레르기 반응으로의 분화 및 활성을 억제하고 관련 유전자 발현을 선택적으로 조절하여 항알레르기의 효과가 있음을 나타내는 것으로 보인다.

본 실험에 사용된 NC/Nga 생쥐는 태어난 후 어렸을 때부터 일반사육환경 (conventional system)에서 노출되어 자라게 되면 12주령 이상에서 사람에서 나타나는

아토피 피부염과 유사한 병변인 딱지가 앓는 상처 및 작은 가피의 병변이 관찰되는 동물로서 아토피 피부염 모델동물로 사용되고 있다⁷⁷⁾. *In vivo* 실험 결과를 살펴 보면 진드기 항원 (Mite antigen)으로 피부염을 유발한 대조군에 비하여 YJT를 투여한 실험군에서 홍반, 부종, 인설, 가피, 미란, 태선화 등의 제반 증상이 현저하게 감소된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 9).

일반적으로 WBC는 말초혈액에서 외부항원에 대한 면역기능을 갖는데 아토피 환자 말초혈액에서 WBC 수는 granulocyte 세포수가 증가하면서 함께 증가한다. Neutrophil은 2~6%로 세균이 침입하는 즉시 극적으로 증가하여 대식세포와 함께 다양한 세균들의 표면에 있는 공통성분을 인지, 결합하여 식세포 작용을 하며, 사이토카인을 분비하고⁷⁸⁾, Eosinophil은 1~5%로 피부나 호흡기도의 내벽과 같이 외부에 접해있는 부위에 다량 군집되어 외부로부터 체내로 들어오는 독성 물질을 해독하는데 중요한 역할을 한다⁷⁹⁾. 최종 관능평가 후 혈액을 채취하여 분석한 결과 WBC 수는 대조군에 비하여 YJT를 투여한 실험군에서 2배 이상 감소하였으며, Neutrophil과 Eosinophil의 비율도 대조군에 비하여 각각 2배 이상, 3배 이상 감소하였다 (Fig. 10). IgE는 B 세포의 분화되는 과정에서 분비되어 염증반응을 유도하고 IgG1은 Th2 세포에서 분비되어 B 세포의 분화를 촉진하는 IL-4에 의하여 유도되고 B 세포 분화 중 IgE 생산과 관련되어 증가한다. 본 실험 결과, YJT를 투여한 실험군에서의 혈청 중 IgE 수준은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고 IgG1 수준도 감소하였다 (Fig. 11). 이러한 결과는 YJT가 NC/Nga 생쥐의 B 세포 알레르기 반응을 억제하여 B 세포 분화에 수반되는 IgE 수준을 억제한 것으로 보이며 이로 인해 IgG1의 수준도 감소된 것으로 생각된다. Th2 세포에서 분비되는 IL-4는 면역글로블린 생성시 IgE로 분화를 유도하고 유착 분자들을 활성화시켜 단핵구나 호산구 등 염증세포들을 염증이 일어나는 조직 세포로 이동하게 하고, IL-5는 호산구의 증식과 활성화를 유도하는 기능이 있으며, IL-13은 IgE 생산을 자극한다. 본 실험 결과, YJT (260mpk)투여군은 대조군에 비하여 IL-5와 IL-13, histamine 수준이 감소하였으나 유의성은 IL-5만이 나타났으며, YJT (520mpk)투여군에서는 대조군에 비하여 IL-5, IL-13, histamine 수준이 모두 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 12A,B). 또한 등 피부조직에서 대조군에 대한 IL-5과 IL-13 mRNA의 유전자 발현은 YJT를 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다

(Fig. 18). Th1 세포에서 분비되는 IFN- γ 는 알레르기 반응을 일으키는 Th2 세포를 억제하고 IgE 생산을 증가시키는 B 세포 분화를 억제하는 것으로 알려진 사이토카인이다. 피부발진이 유발된 NC/Nga 생쥐의 비장을 적출하여 비장세포를 배양한 후 배양상층액을 분리하여 IL-4와 IFN- γ 의 양을 측정된 실험에서 YJT를 투여한 실험군의 IL-4 수준은 대조군에 비하여 감소하기는 하였으나 유의성은 없었고 IFN- γ 수준은 YJT (260mpk) 투여군, YJT (520mpk) 투여군 모두 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 12C). 이 결과는 YJT가 NC/Nga 생쥐의 알레르기 자가 면역 질환으로 Th2 세포에서 분비되는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13을 억제하며 Th1 세포에서 분비되는 IFN- γ 를 증가시켜 Th2 세포를 억제하는 것일 것으로 보여진다.

ALN, DLN, PBMCs 및 등 피부조직에서 유세포형광 분석을 한 결과, PBMCs, 등 피부조직의 총세포수는 YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk)투여군 모두 유의성 있게 감소하였고 (Fig. 13A), ALN, DLN의 총세포수는 대조군에 비하여 YJT를 투여한 실험군에서 감소하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 13B). PBMCs에서 CD3e⁺, CD19⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3e⁺CD69⁺, CD11b⁺Gr-1⁺, CCR3⁺와 ALN, DLN에서 CD3e⁺CD69⁺와 등 피부조직에서 CD4⁺, CD11b⁺Gr-1⁺의 총 절대 세포수는 YJT (260mpk)투여군, YJT (520mpk) 투여군 모두 유의성 있게 감소하였고 ALN에서 CD4⁺, CD8⁺의 총 절대 세포수는 YJT (260mpk)투여군에서, ALN에서 B220⁺CD23⁺와 DLN에서 CD4⁺의 총 절대 세포수는 YJT (520mpk) 투여군에서 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 14, 15, 16, 17).

CD11b⁺Gr-1⁺는 spleen, lymph nodes에서 염증 피부 및 조직으로 이동하여 많이 존재하는데⁸⁰⁾ 비만세포, 호산구세포에서 발현되며 CCR3⁺는 호산구에서 다량 발현된다. 따라서 이는 YJT의 투여로 인해 알레르기 반응에 의한 피부 염증이 억제되어 T 세포가 염증부위로 이행되는 것이 억제되고 호산구세포, 호중구세포 비만세포의 침윤이 억제된 결과라고 생각되며 YJT의 투여에 의하여 Th1과 Th2 세포의 불균형으로 초래된 아토피 피부염 생쥐에서 Th2 세포에서 Th1세포로 shift될 수 있음을 나타내는 결과로 생각된다.

실험에 사용된 YJT가 생체에 미치는 부작용의 여부를 판단하기 위해 3주간 YJT를 처리한 후 혈청중 blood chemistry (AST, ALT)를 분석한 결과에서 YJT를 투여한 실험군과 정상군, 그리고 대조군과의 큰 차이가 없었

는데 (Fig. 19) 이것으로 보아 YJT가 생체에 미치는 부작용은 없어보인다.

실험 종료 후 귀 일부를 절단한 후 H&E 염색을 하여 귀 조직을 분석한 실험에서 YJT를 투여한 실험군은 대조군에 비하여 epidermis와 dermis의 두께도 현저하게 줄었고, leukocytes의 침윤은 보이지 않아 부종이 거의 사라진 것을 알 수 있었으며 (Fig. 20), 등 피부조직을 분석한 결과에서는 대조군에 비하여 epidermis의 두께가 현저하게 줄었고, 과각화, 색소침착, 과립증가, 부전각화증, 비만세포의 침윤이 감소된 것을 알 수 있었다 (Fig. 22). 또한 비만세포 (mast cells)의 침윤을 관찰하게 위하여 조직검사 후 toluidine blue 염색을 한 결과에서도 대조군에 비하여 YJT를 투여한 실험군에서 toluidine blue에 반응하는 비만세포가 현저하게 감소한 것을 알 수 있었다 (Fig. 21, 23)

이상의 결과로 미루어 보아, 理中湯은 IL-4, IL-5, IL-13을 억제하고 IFN- γ 는 증가시킴으로써 아토피 피부염 피부 병변에 관여하는 Th2 세포 반응을 억제하여 아토피 피부염 치료에 유효하게 활용할 수 있을 것으로 판단되며 향후 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

理中湯이 아토피 발진 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

I. *In vitro* 에서의 理中湯의 효과

1. RBL-2H3에서 IL-4와 IL-13 mRNA 단백질 발현을 억제시켰다.
2. RBL-2H3에서 IL-4와 IL-13 단백질 생산을 억제시켰다.
3. RBL-2H3에서 GATA-2 단백질 발현을 억제시켰다.
4. RBL-2H3에서 NF-AT2 단백질 발현을 억제시켰다.
5. RBL-2H3에서 c-Fos 단백질 발현을 억제시켰다.
6. RBL-2H3에서 NF- κ B p65 단백질 발현을 억제시켰다.

II. *In vivo* 에서의 理中湯의 효과

1. 혈청 중 IgE 수준을 유의성 있게 감소시켰다.
2. IL-5, IL-13, histamine의 생산량을 유의성 있게 감소시켰고, IFN- γ 의 생산량은 유의성 있게 증가시켰다.

3. 대조군에 비하여 혈액 중 WBC, eosinophils, neutrophils의 세포수를 감소시켰다.
4. PBMCs, 등 피부조직에서 총세포수를 감소시켰다.
5. PBMCs에서 CD3e⁺, CD19⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3e⁺CD69⁺, CD11b⁺Gr-1⁺, CCR3⁺의 총세포수를 감소시켰다.
6. ALN에서 CD4⁺, CD8⁺, CD3e⁺CD69⁺, B220⁺CD23⁺의 총세포수를 감소시켰다.
7. DLN에서 CD4⁺, CD3e⁺CD69⁺의 총세포수를 감소시켰다.
8. 등 피부조직에서 CD4⁺, CD11b⁺Gr-1⁺의 총세포수를 감소시켰다.
9. 귀 조직과 등 피부조직에서 epidermis의 두께와 dermis 부분의 침윤된 염증면역세포 및 비만세포 등을 현저하게 감소시켰다.

參考文獻

1. 홍창의. 소아과학. 서울:대한교과서주식회사. 2007; 1142-7.
2. 박용민. 아토피피부염 병태생리에 대한 최신 지견. 소아알레르기 호흡기 학회지. 2006;16(3):189-96.
3. 지혜미, 김경원, 김창수, 손명현, 신동천, 김규연. 2006년 초등학생의 알레르기 질환 유병률의 전국적 역학조사. 소아알레르기 호흡기학회지. 2009;19(2):165-72.
4. Arellano FM, Wentworth CE, Arana A. Risk of lymphoma following exposure to calcineurin inhibitors and topical steroids in patients with atopic dermatitis. J. Invest. Dermatol. 2007;127:808-16.
5. Furue M, Terao H, Moroi Y, Koga T, Kubota Y, Nakayama J, Furukawa F, Tanaka Y, Katayama I, Kinukawa N, Nose Y, Urabe K. Dosage and adverse effects of topical tacrolimus and steroids in daily management of atopic dermatitis. J Dermatol. 2004;31(4):277-83.
6. 이원세. 新方新編. 서울:대성의학사. 2001:114.
7. 서희연, 한재경, 김윤희. 이중탕이 IgE가 과잉생성되고 피부염이 유발된 NC/Nga생쥐에서 IFN- γ 반응에 의한 Th2 세포분화 억제에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2009;23(1):1-22.
8. Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt

- as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*. 1997;44(7):1299-305.
9. 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. *Int Immunopharmacol*. 2009; 9(4):403-11.
10. FONIO A. Justifying my method of separation of structural elements of thrombocytes. *Wien Z Inn Med*. 1956;37(6):255-6.
11. Goka AK, Farthing MJ. The use of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a peroxidase substrate in microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunoassay*. 1987; 8(1):29-41.
12. Witney AA, Doolan DL, Anthony RM, Weiss WR, Hoffman SL, Carucci DJ. Determining liver stage parasite burden by real time quantitative PCR as a method for evaluating pre-erythrocytic malaria vaccine efficacy. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;118(2):233-45.
13. Otsuka H, Dolovich J, Befus D, Bienenstock J, Denburg J. Peripheral blood basophils, basophil progenitors, and nasal metachromatic cells in allergic rhinitis. *Am Rev Respir Dis*. 1986;133(5):757-62.
14. Dr Joanne Clough. 알레르기. 서울:아카데미아. 2005: 15-21.
15. Schultz-Larsen F, Hanifin JM. Epidemiology of atopic dermatitis. *Immunol. Allergy Clin. North Am*. 2002; 22:1-24.
16. 임정우, 문경상, 공도연, 편복양. 아토피피부염 환자의 발병과 치료에 대한 실태 조사. 소아알레르기 및 호흡기 학회지. 2006;15(1):44-52.
17. 오재원, 김규원,. 편복양. 1995년과 2000년의 학동기와 2003년 학동전기 소아에서의 아토피 피부염의 역학적 변화에 관한 전국적인 연구. 소아알레르기 및 호흡기. 2003;13(4):227-37.
18. 이혜성, 김중서, 편복양. 소아 아토피 피부염의 빈도와 원인의 변화. 소아알레르기 및 호흡기. 2002;12(4):263-70.
19. 김정희. 아토피피부염의 최신지견. 소아 알레르기 및 호흡기. 2004;14(1):12-23.
20. Sturgil S, Bernard LA. Atopic dermatitis update. *Curr Opin Pediatr*. 2004;16:396-401.
21. 이윤미, 황선욱. 학령전기과 학령기 아동에서의 아토피 피부염 유병률과 위험인자. 아동간호학회지. 2008;14(3):285-94.
22. 이종근, 이호성, 하진실, 박동진, 백도현, 하권철. 창원시 학동 전기 소아들의 아토피 피부염 유병률과 그 원인에 관한 연구. 한국환경보건학회지. 2009;35(3): 169-77.
23. Dei-Cas I, Dei-Cas P, Acuna K. Atopic dermatitis and risk factors in poor children from Great Buenos Aires, Argentina. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34(3):299-303.
24. Moore MM, Rifas-Shiman SL, Rich-Edwards JW, Kleinman KP, Camargo CA Jr, Gold DR, Weiss ST, Gillman MW. Perinatal predictors of atopic dermatitis occurring in the first six months of life. *Pediatrics*. 2004;113(3 Pt 1):468-74.
25. van Beijsterveldt CE, Boomsma DI. Genetics of parentally reported asthma, eczema and rhinitis in 5-yr-old twins. *Eur Respir J*. 2007;29(3):516-21.
26. Zutavern A, Hirsch T, Leupold W, Weiland S, Keil U, von Mutius E. Atopic dermatitis, extrinsic atopic dermatitis and the hygiene hypothesis: results from a cross-sectional study. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(10):1301-8.
27. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science*. 1994;264(5162):1152-6.
28. 김성현, 한덕현, 박혜진, 변지연, 최유원, 최혜영, 명기범. 소아청소년 아토피피부염 환자의 애착반응 및 부모의 삶의 질과의 관계. 대한피부과학회지. 2008; 46(11):1457-62.
29. 강명화, 김은영, 최미경. 아토피 피부염 미취학아동의 식습관 및 영양섭취상태. 대한지역사회영양학회 춘추계학술대회지. 2008;2:124.
30. 박철중, 이종욱, 김태운, 김진우, 김정원. 아토피피부염에 대한 환경인자의 영향. 대한천식 및 알레르기학회 추계학술대회 초록집. 1995;1995:551.
31. 신경옥, 박현서, 오세영. 학령 전 아동에서 아토피피부염의 영향, 행동 위험 요인 분석. 한국영양학회지. 2006;39(8):795-800.
32. 안성구, 박병덕, 원진형, 성열오, 천승현. 아토피 피부염. 서울:퍼시픽출판사. 2007:32.
33. Cooper KD. Atopic dermatitis. recent trends in patho-

- genesis and therapy. *J Invest Dermatol.* 1994;102(1): 128-37.
34. Horsmanheimo L, Harvima IT, Jarvikallio A, Harvima RJ, Naukkarinen A, Horsmanheimo M. Mast cells are one major source of interleukin-4 in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 1994;131(3):348-53.
35. Renz H, Jujo K, Bradley KL, Domenico J, Gelfand EW, Leung DY. Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma. *J Invest Dermatol.* 1992;99(4):403-8.
36. 김세중. 면역학. 서울:고려의학. 2002:257-64.
37. Foster PS, Martinez-Moczygemba M, Huston DP, Corry DB. Interleukins-4, -5, and -13: emerging therapeutic targets in allergic disease. *Pharmacol Ther.* 2002;94(3): 253-624.
38. Ricci M, Rossi O, Bertoni M, Matucci A. The importance of Th2-like cells in the pathogenesis of airway allergic inflammation. *Clin Exp Allergy.* 1993;23(5):360-9.
39. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 1996;17(3):138-46.
40. Kim JT. Evaluation of inflammation in childhood asthma; Non-invasive measurement. *J Korean Pediatr Soc.* 2001; 44(3):334-9.
41. Möller A, Henz BM, Grützkau A, Lippert U, Aragane Y, Schwarz T, Krüger-Krasagakes S. Comparative cytokine gene expression: regulation and release by human mast cells. *Immunology.* 1998;93(2):289-95.
42. Valent P, Spanblöchl E, Sperr WR, Sillaber C, Zsebo KM, Agis H, Strobl H, Geissler K, Bettelheim P, Lechner K. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood.* 1992;1;80(9):2237-45.
43. Schroeder JT, MacGlashan DW Jr, Kagey-Sobotka A, White JM, Lichtenstein LM. Cytokine generation by human basophils. *J Allergy Clin Immunol.* 1994;94(6 Pt 2):1189-95.
44. Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Frucht DM. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol.* 2003;23(3): 147-61.
45. Weber A, Knop J, Maurer M. Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *Br J Dermatol.* 2003;148(2):224-8.
46. Kim HM, Lee YM. Role of TGF-beta 1 on the IgE-dependent anaphylaxis reaction. *J Immunol.* 1999;15;162(8): 4960-5.
47. Gibbs BF, Haas H, Wolff HH, Grabbe J. Early IgE-dependent release of IL-4 and IL-13 from leukocytes is restricted to basophils: a comparison with other granulocytes and mononuclear cells. *Inflamm Res.* 2000;49(1):9-10.
48. Katz HR, Stevens RL, Austen KF. Heterogeneity of mammalian mast cells differentiated *in vivo* and *in vitro*. *J Allergy Clin Immunol.* 1985;76(2 Pt 2):250-9.
49. Humbert M, Grant JA, Taborda-Barata L, Durham SR, Pfister R, Menz G. High-affinity IgE receptor (Fcepsilon RI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:1931-7.
50. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(10):787-99.
51. Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev.* 2000;173:131-40.
52. Petersen LJ, Mosbech H, Skov PS. Allergen-induced histamine release in intact human skin *in vivo* assessed by skin microdialysis technique: characterization of factors influencing histamine releasability. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;97(2):672-9.
53. Matsubara M, Masaki S, Ohmori K, Karasawa A, Hasegawa K. Differential regulation of IL-4 expression and degranulation by anti-allergic olopatadine in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(7):1315-26.
54. Weiss DL, Hural J, Tara D, Timmerman LA, Henkel G, Brown MA. Nuclear factor of activated T cells is associated with a mast cell interleukin 4 transcription complex. *Mol Cell Biol.* 1996;16(1):228-35.
55. Hirasawa N, Sato Y, Fujita Y, Ohuchi K. Involvement of a phosphatidylinositol 3-kinase-p38 mitogen activated protein kinase pathway in antigen-induced IL-4 production in mast cells. *Biochim Biophys Acta.* 2000;3;1456(1): 45-55.

56. Masuda A, Yoshikai Y, Kume H, Matsuguchi T. The interaction between GATA proteins and activator protein-1 promotes the transcription of IL-13 in mast cells. *J Immunol.* 2004;173(9):5564-73.
57. Toru H, Pawankar R, Ra C, Yata J, Nakahata T. Human mast cells produce IL-13 by high-affinity IgE receptor cross-linking: enhanced IL-13 production by IL-4-primed human mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;102(3):491-502.
58. 吳謙. 醫宗金鑑(下). 北京:人民衛生出版社. 1982:443-4.
59. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 서울:大星文化社. 1992:251-3.
60. 王伯岳, 江育仁. 中醫兒科學. 上海:上海科學技術出版社. 1984:203-4.
61. 손국호, 이재근, 지선영. 아토피피부염의 한의학적 변증에 대한 문헌적 고찰. *동서의학.* 2009;34(4):15-24.
62. 中醫兒科臨床手冊. 上海中醫學院. 上海:上海科學技術出版社. 1980:203-4.
63. 王沛, 李日慶, 張燕生. 中醫臨床大系 中醫外科治療大成. 石家莊:河北科學技術出版社. 1997:544-6.
64. 김덕곤 외 7명. 동의 소아과학. 서울:정담. 2002:660-4.
65. McNagny K, Graf T. Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. *J Exp Med.* 2002;3;195(11):43-7.
66. Nerlov C, Graf T. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* 1998;12(15):2403-12.
67. Hirasawa R, Shimizu R, Takahashi S, Osawa M, Takayanagi S, Kato Y, Onodera M, Minegishi N, Yamamoto M, Fukao K, Taniguchi H, Nakauchi H, Iwama A. Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. *J Exp Med.* 2002;3;195(11):1379-86.
68. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:707-47.
69. Latinis KM, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA. Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem.* 1997;272(50):31427-34.
70. Klein M, Klein-Hessling S, Palmethofer A, Serfling E, Tertilt C, Bopp T, Heib V, Becker M, Taube C, Schild H, Schmitt E, Stassen M. Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines. *J Immunol.* 2006;15;177(10):6667-74.
71. Lewin I, Nechushtan H, Ke Q, Razin E. Regulation of AP-1 expression and activity in antigen-stimulated mast cells: the role played by protein kinase C and the possible involvement of Fos interacting protein. *Blood.* 1993;15;82(12):3745-51.
72. Min YD, Choi CH, Bark H, Son HY, Park HH, Lee S, Park JW, Park EK, Shin HI, Kim SH. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflamm Res.* 2007;56(5):210-5.
73. Reber L, Vermeulen L, Haegeman G, Frossard N. Ser276 phosphorylation of NF-kB p65 by MSK1 controls SCF expression in inflammation. *PLoS One.* 2009;4(2):e4393.
74. Urban MB, Schreck R, Baeuerle PA. NF-kappaB contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit. *EMBO J.* 1991;10(7):1817-25.
75. Baeuerle PA, Baltimore D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell.* 1988;22;53(2):211-7.
76. Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF-kB: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta.* 1991;16;1072(1):63-80.
77. 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. *Int Immunol.* 1997;9(3):461-6.
78. Bellanti JA. Cytokines and allergic diseases: clinical aspects. *Allergy Asthma Proc.* 1998;19(6):337-41.
79. Yawalkar N, Uguccioni M, Schärer J, Braunwalder J, Karlen S, Dewald B, Braathen LR, Baggiolini M. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 1999;113(1):43-8.
80. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM, Chen SH. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 2006;15;66(2):1123-31.