

消風散加減方과 外治方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향

민영규 · 최정화 · 김종한 · 박수연
동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

Effects of Sopoongsangagambang Administration along with External Spray Treatment on Atopic Dermatitis Development in NC/Nga Mice

Young-Gyu Min · Jung-Hwa Choi · Jong-Han Kim · Su-Yeon Park

Although the parallel prescription of Sopoongsangagambang (SG) administration along with external treatment such as spraying or ointment application on the skin is clinically used for the treatment of atopic dermatitis (AD), molecular mechanism underlying its effectiveness is unknown. Thus in the present study, diverse immune responses in terms of chemical mediators related to AD were investigated using an atopic mouse model NC/Nga after SG administration and external treatment (ET), and major findings are summarized as follows.

1. The clinical severities in 16 and 20 week old NC/Nga mice with SG and ET treatment were decreased to 72.2% and 62.3% respectively compared to the control NC/Nga mice with no drug treatment.
2. IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IgM, IgG1, and IgG2a levels in the serum of SG and ET treated NC/Nga mouse group were significantly decreased compared to the untreated control mice. In contrast, IFN- γ showed a significant increase in the experimental group compared to the untreated control group.
3. The spleen weight of SG and ET treated NC/Nga mice was significantly decreased compared to the untreated control group.
4. The B/T ratio in the lymph node of SG and ET treated NC/Nga mice was increased compared to the untreated control group. CD4⁺ and CD8⁺ cell numbers in the lymph node of SG and ET treated NC/Nga mice were significantly increased compared to the untreated control group, but CD69⁺ and CD11a⁺ cells were significantly decreased.
5. mRNA expression levels of IL-4, IL-5, and CCR3 in the skin tissues of SG and ET treated NC/Nga mice were significantly decreased, and expression levels of IL-6, IL-13, CD69⁺/CD3 ϵ ⁺ and CD19⁺/CD44⁺ in the skin tissues of SG and ET treated NC/Nga mice were significantly decreased compared to the untreated control group. IFN- γ mRNA expression levels were increased compared to the untreated control group.
6. Histological observation of the ear and neck skin tissues showed that the extents of inflammation and infiltrated immune cells in the epidermis and dermis of SG and ET treated NC/Nga mice were highly reduced compared to the untreated control group.

교신저자: 최정화, 동신대학교부속광주한방병원
안이비인후피부과학교실
(Tel. 062-350-7217, E-mail : mkyu0@hanmail.net)

7. Lymphokine assay showed a significant decrease in IL-4 levels in SG and ET treated NC/Nga mice compared to the untreated control group, but the levels of IFN- γ secretion were significantly increased in drug treated NC/Nga mice.

Key words : Sopoongsangagambang, External treatment, Atopic dermatitis

서론

아토피(atopy)란 1925년 Coca가 음식물과 흡입성 물질에 대한 알레르기 반응의 결과로 피부염이나 천식, 枯草熱이 나타나는 경향을 아토피라고 기술한 이후부터 사용되었으며¹⁾, 알레르기 질환에는 아토피 피부염 이외에 천식, 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염 등이 있다.

특히 아토피 피부염은 한 해에 태어나는 신생아 중 20%가 앓는다는 보고가 나올 정도로 매우 흔한 피부병이며, 이 중 약 5%는 어른이 되어도 지속되는 것으로 알려져 있어, 최근 의료계의 해결 과제로 대두되고 있다²⁾.

현재 알레르기 질환의 대표적 치료법은 원인 항원과 악화 요인의 회피를 위한 환경관리, 약물요법 및 면역요법 등이 있으며, 이 중 약물요법으로 glucocorticoid, antihistamines, antiallergic drugs, tarolimus, 교감신경자극제, 스테로이드 제제 등이 다용되고 있으나^{2,4)}, 장기 사용 시 나타나는 여러 부작용^{3,4)}으로 인하여 최근에는 보다 효과적이며 안전하게 치료할 수 있는 천연물에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.

한의학에서 奶癬, 胎風, 胎赤, 胎癬, 乳癬, 浸淫瘡 및 四彎風 등이 증상 및 병태면에서 아토피 피부염과 가장 유사하게 표현되었다⁵⁻¹⁰⁾.

최근 아토피에 대한 문헌적 연구로 朴¹¹⁾은 아토피 피부염의 동, 서의학적 문헌 고찰을, 尹¹²⁾은 아토피 피부염 환자의 한의학적 임상유형분류에 대한 연구를 보고한 바가 있으며, 실험적 연구로는 金 등¹³⁻¹⁵⁾이 단일 한약재를, 朴 등¹⁶⁻²⁰⁾이 피부 질환에 사용되는 처방을 시료로 이들의 항아토피 효과를 규

명한 바가 있다.

아토피에 대한 다양한 한의학적 접근이 시도되었으나, 그간의 한방 피부 치료 방법이 주로 내복약에 의존하였고, 외치에 대한 연구가 부족하였을뿐 아니라 실제 임상에서 응용되고 있는 내외치 병용 치료에 대한 연구는 아직까지 접하지 못하였다.

저자는 消風散加減方과 外治方의 병용치료 연구로 NC/Nga 생쥐 병태 모델을 이용하여 다양한 면역학적 기전을 관찰하였던 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

雄性 6주령의 C57bL/6, Balb/c 생쥐를 한국생명공학연구원에서 공급받았고, 雌性 6주령의 NC/Nga atopy mice는 Japan SLC사에서 공급받아 실험당일까지 고품사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2 °C, 습도 50~70%, 조도 200 lux(8시 점등, 20시 소등)를 계속 유지하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약물

본 실험에 사용한 消風散加減方(SG)과 外治方(ET)의 약제는 동신대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 消風散加減方 1貼 및 外治方

의 내용과 구성은 다음과 같다.(Table 1, 2)

Table 1. Prescription of Sopoongsangagambang(SG)

韓藥名	生藥名	分量(g)
胡麻仁	Paeonia Radix Alba	6
當歸	Angelicae gigantis Radix	6
乾地黃	Rehmanniae Radix Preparat	6
白芍藥	Paeonia Radix Alba	4
白蒺藜	Cnidii Rhizoma	4
山查肉	Crataegii Fructuse	4
橘皮	Citri Pericarpium	4
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	4
黃芩	Scutellariae Radix	4
浮萍草	Spirodela Herba	4
荊芥	Schizonepetae Herba	4
防風	Ledebouriellae Radix	4
赤芍藥	Paeonia Radix Rubra	4
白茯苓	Poria	4
甘草	Glycyrrhizae Radix	4
Total Amount		66

Table 2. Prescription of external spray treatment(ET)

韓藥名	生藥名	分量(g)
蕎麥	Fagopyrum esculentum Moench	17.0
松津	Oleum Terebinthinae	22.5
石膏	Gypsum Fibrosum	15.0
竹鹽	Bamboo salt	25.0
Total Amount		79.5

3) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약으로 diethyl pyrocarbonate (DEPC), NH₄Cl, KHCO₃, Na₂ EDTA, complete adjuvant, chloroform, collagenase IV, RPMI-1640 培養液, isopropanol, 적혈구용혈액(ACK lysis solution), ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), dulbecco's minimum essential medium (DMEM), formaldehyde, magnesium chloride (MgCl₂) 는 Sigma 사 (U.S.A) 제품을, 牛胎兒血清 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (Logan, U.S.A) 제품을, anti-CD28⁺ 과 anti-CD3ε⁺는 Serotec 사 (Kidlington, UK) 제품을, RNase inhibitor, Taq polymerase는 Takara사 (Shimogyo-ku, Japan) 제품을,

random primer, dNTP, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase는 promega사(M-MLV RT, Madison, USA) 제품을, RNAzolB는 Tel-test사 (Friendswood, USA) 제품을, anti-CD3ε⁺-PE (phycoerythrin), anti-CD4⁺- FITC(fluorescein isothiocyanate), anti-Gr1-PE, anti-CD8⁺- FITC, anti-CD25⁺-PE, anti-CD19⁺-FITC, anti-CD11a⁺- FITC, anti-CD44⁺-PE, anti-CD69⁺-FITC, propidium iodide (PI)와 RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, U.S.A) 제품을, agarose는 Seakem사 (Cambrex, USA) 제품을 사용하였고, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대응, 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), spectro- photometer (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), flow cytometer (Becton Dickinson, U.S.A) 및 ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A) Mab-Based Mouse Ig isotyping kit (PharMingen, San Diego, Calif) Primus 96 Legal PCR system (MWG Biotech., Germany) 24-well Costar plate (Corning Inc, Cambridge, Mass) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 제조

消風散加減方(SG) 66g에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 전탕후 추출하여 얻은 액

을 흡입 여과하여 이를 감압 증류 장치로 농축하였다. 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 분말(11.8g)로 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

外治方(ET)은 蕎麥 17 g, 松津 22.5 g, 石膏 15 g, 竹鹽 25 g을 먼저 물 1,200 CC에 약한 불로 3시간 전탕한 후, 다시 물이 없어질 때까지 달인 후 24시간 보관한 것에 梅實 역기스(Hannong Mall Co., Korea; composed of 50 % of Japanese apricot, 45 % of sugar, and 5 % of oligosaccharide) 2.7 l를 부어 희석한 후 이를 여과한 후 분무기에 넣어 사용하였다.

2) 약물 투여 및 염증 유발

SG를 8주령 NC/Nga 생쥐에 12주간 주 3회(월, 수, 금) 경구 투여(250 mg/kg) 하였으며, 外治方인 ET는 매일 오전 11시에 100 μ l (20 μ l씩 5회 분무)를, 목 부위를 중심으로 분무하였다. 또한 아토피 피부염이 환자의 지속적인 자극에 의해 염증이 심화된다는 점에서 동물 모델에서도 주 3회(월, 수, 금) 사포(AA60, 대한방직)로 약 3-4회 자극하여 환자의 병태와 유사한 환경을 만들었다.

3) 피부 손상 정도²¹⁾ 측정

아토피 피부염 장애를 판정하기 위한 전체적인 피부 손상 정도 판정은 무증상을 0 (none)으로 규정하고, 각각의 증후 (itching, erythema, bleeding, pellicle/inflammation, scaling/dryness)를 1(mild), 2 (moderate), 3 (severe)으로 등급별로 나누어 이들 개개 특점의 총계로 계산하였다. 증후는 피부 건조, 귀, 얼굴, 背部의 피부 발진과 상처에 의해 평가하였다.

4) 혈청내 IgE, IL-6, IL-4, IL-5, IL-13, INF- γ , IgM, IgG1 및 IgG2a 정량화

혈청내 IgE 량은 8주, 12주, 16주, 20주에 생쥐의 눈에서 capillary tube를 이용하여 약 100 μ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기로 혈청을 분리하여 IgE 량을 ELISA kit로 측정하였다.

15주째 NC/Nga 생쥐를 ethyl ether로 마취한 후 심장 천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리한 후 혈청 중 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, INF- γ 량을 ELISA kit로 정량하였다. 그리고 혈청 중 immunoglobulin인 IgM, IgG1, IgG2a 량은 Mab-Based Mouse Ig isotyping kit로 측정하였다.

5) 유세포 분석(Fluorescence Activated Cell Sorting analysis)

NC/Nga 생쥐를 15주 후 비장과 lymph node를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리(1,700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 이 세포들을 적혈구 용혈액 (buffered ammonium chloride(ACK) solution)에 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04 % trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 측정된 비장세포와 lymph node 세포를 2×10^5 세포로 조정된 후 4℃에서 면역 형광염색 (immuno fluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 phycoerythrin (PE)-anti-mouse CD69⁺, PE-anti-CD11a⁺, PE-anti-mouse CD8⁺, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD3 ϵ ⁺-FITC, anti-CD4⁺-FITC, 그리고 FITC-anti-mouse CD19⁺ 등을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometer로 NC/Nga 생쥐의 비장세포와 lymph node세포에서 CD3 ϵ ⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD11a⁺, CD19⁺ 그리고 CD69⁺의 발현을 분석하였다. CD69⁺/CD3 ϵ ⁺, CD44⁺/CD19⁺의 비율(gated, %)을 Cell Quest 프로그램(Becton Dickinson, USA)으로 산출하였다.

6) 피부 조직에 대한 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction ; 역전사-중합효소 연쇄반응) 분석

(1) 피부 조직에서 RNA 분리

NC/Nga 생쥐의 얼굴 부위를 제모한 뒤 피부 조직

을 떼어내어 피부 조직(0.1g)과 RNazolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 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 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80 % 에탄올로 수세하고 3 분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC로 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(2) RT-PCR

RT 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 75°C에서 5 분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 μ l 10 mM dNTPs, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT (200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

(3) cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, CCR3, IFN- γ 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/ μ l)와 antisense primer (20 pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5 mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer (100 mM

Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 0.18 μ l Taq polymerase (5 U/ μ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μ l 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation; 95 °C, 5분, denaturation; 95 °C, 5분, annealing; 55 °C, 1분, elongation; 72 °C, 1분을 25 cycle한 뒤 post-elongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR product는 20 μ l 씩 1.2 % agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

■ Oligonucleotide의 염기 배열은 다음과 같다.

Gene	Primer	Sequence
IL-4	sense	5'-CCGTCGATAGTGGCATCCATGAAAC-3'
	antisense	5'-GGACCAATACCTCTATAGGG-3'
IL-5	sense	5'-AACCCCTACTGAACCTCAGATTGTTAG-3'
	antisense	5'-TAAGTCAGTTTAAATGCTTAGGG-3'
CCR3	sense	5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAAT-3'
	antisense	5'-ACCGATACAGTACAGTACAGTA-3'
IFN- γ	sense	5'-CCGATATTAGATAACGTTAAAC-3'
	antisense	5'-ATGCOCTAGTCAGTCTCTAAAT-3'
β -actin	sense	5'-TGGAAATCTGTGGTCCATGAAAC-3'
	antisense	5'-GTCACAGTCAGCTGTATAGGG-3'

7) 피부 세포내 IL-6, IL-13 정량 및 FACS에 의한 세포 표면 분자 발현 검색

NC/Nga 생쥐의 얼굴과 목 부위를 채모한 뒤 피부 조직을 각각 1 g씩 떼어내어 DMEM 배양액으로 수세하여 미세조각으로 잘게 썬 후 10 % FBS-DMEM으로 Petri-dish에서 7일간 배양하였다. 이후 배양 상층액을 제거하고 다시 10 % FBS-DMEM으로 교체하였다. 이를 7일간 배양하여 배양 상층액을 분리한 후 배양액내의 IL-6, IL-13 분비량을 ELISA kit로 측정하였다.

배양 종료 후 배양 세포에서 관련 세포 표면 분자들에 대한 항체를 이용한 면역 염색을 위하여 2.5 \times 10⁵ 세포로 조정하여 PBS(1 % 우태아 혈청, 0.01 % NaN₃, pH 7.4)으로 1회 세척하였다.

이를 FITC 또는 PE 형광 물질이 결합된 anti-CD3 ϵ ⁺-PE, anti-CD69⁺-FITC, anti-CD19⁺-FITC, anti-CD44⁺-PE 등의 항체를 시료에 가하여 4°C에서

30분간 반응시키고 PBS로 2회 세척한 후 CD3e⁺, CD69⁺, CD19⁺, CD44⁺ 세포 표면 분자들의 발현을 flow cytometer로 분석하였다.

8) 조직 병리 검사

실험 종료 후에, 왼쪽 귀 끝부분과 등쪽 목부분의 피부를 떼어내어 10 % paraformaldehyde에서 24 시간 동안 포르말린에 고정하였다. 고정된 조직을 파라핀으로 포맷한 후 5 μm 부분의 두께로 block을 만들었다. 조직부분은 표피, 진피, 케라틴 세포, 중성구, 호산구에서 염증과 부종을 구별하기 위해 hematoxyline/eosin (H&E)로 염색을 시행하였다.

9) Lymphokine assay

정상 C57BL/6에서 적출한 비장세포($2 \times 10^6/m\ell$)는 anti-CD28⁺ (1 μg/ml) 항체 (Pharming)와 anti-CD3e⁺ (1 μg/ml)을 가하여 24-well Costar plate에 coating하였다. 여기에 SG (100 μg/ml)을 넣어 48시간 동안 동시 배양한 후 IL-4, IFN-γ 분비량을 ELISA kit로 측정하였다.

10) 통계처리

결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 처리하였다.

실험 성적

1. 피부 손상 정도에 미치는 영향

SG를 구강 투여하고, ET 분무를 8주령부터 주 3회 실시하여 NC/Nga mice의 피부손상정도를 관찰한 결과, NC/Nga 생쥐가 자연적으로 피부염으로 유발된 conventional 조건에서는 12주 이후 IgE와 피부 발진이 유발된 것을 알 수 있었다(Fig. 1. A).

Conventional 조건에서 8주부터 20주까지 4주 간격으로 피부손상정도를 측정한 결과 대조군은 12주에 1.45 ± 0.04 , 16주에 7.33 ± 2.67 로 급격한 증가를 나타내었으며, 실험 종료 전 20 주령은 11.3 ± 3.04 로 나타났다. 이에 반해 실험군은 12주까지는 대조군과 비슷한 1.15 ± 0.45 로 관찰되었고, 16주와 20주에는 각각 2.04 ± 0.65 와 4.26 ± 1.53 으로 나타나 대조군에 비하여 현저한 피부손상정도지표(clinical skin severity score) 감소를 나타냈다(Fig. 1. B).

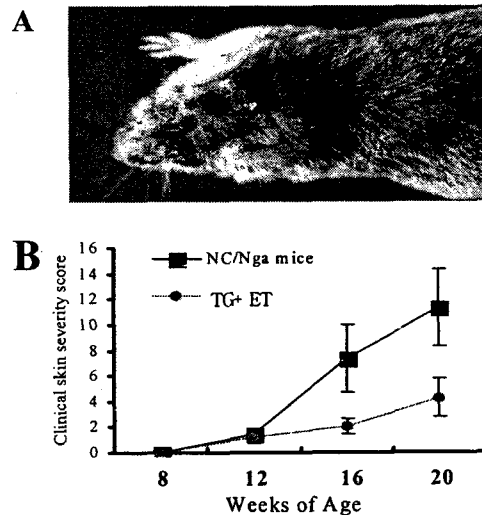


Fig. 1. Clinical skin features and severity of dermatitis in NC/Nga mice.

2. 혈청 중 IgE와 IL-6 발현에 미치는 영향

IgE 생성량은 대조군의 8주와 12주에서 각각 4.6 ± 1.3 , 51.2 ± 4.6 μg/ml로 나타났고, 실험군은 각각 3.8 ± 0.6 , 30.6 ± 3.6 μg/ml로 나타났다.

대조군의 16주와 20주에서는 각각 216 ± 19.1 , 365 ± 24.0 μg/ml로 나타났고, 실험군은 각각 96.2 ± 8.9 , 159.2 ± 20.2 μg/ml로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있게($p < 0.01$, $p < 0.001$) 감소했다(Fig. 2. A).

IL-6 수준은 대조군의 8주와 12주에서 각각 87 ± 21.2 , 305 ± 76.5 pg/ml로 나타났고, 실험군은 각각 80.6 ± 26.4 , 156.5 ± 36 pg/ml로 나타나 12주에 대조군에

비하여 IL-6 수치가 크게 감소되었다.

대조군의 16주와 20주에서 각각 722±89.9, 798±68.4 pg/ml로 나타났고, 실험군은 각각 289.6±38.1, 309.8±36.5 pg/ml로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있는($p<0.01$, $p<0.001$) 감소를 나타냈다(Fig. 2. B).

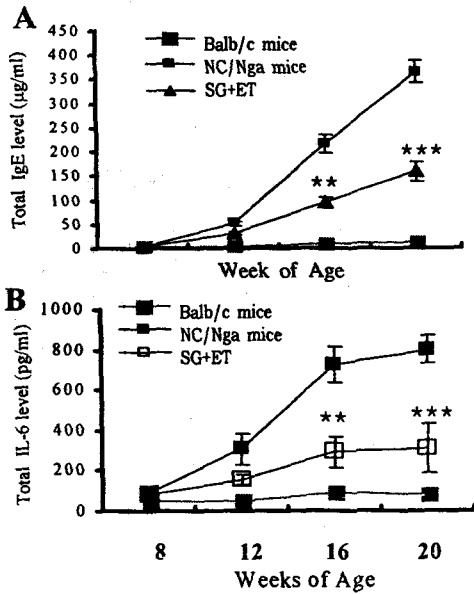


Fig. 2. Serum IgE and IL-6 elevation and development of dermatitis in NC/Nga atopy dermatitis model mice. Statistically significant value compared with NC/Nga mice group data by T test (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

3. 혈청 중 IL-4, IL-5 발현에 미치는 영향

IL-4 수준은 최종 20주령에서 정상군은 17.5±5.6 pg/ml로, NC/Nga 대조군은 78.3±7.9 pg/ml로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였고, 실험군은 34.1±5.0 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p<0.001$) 감소를 나타냈다(Fig. 3. A).

IL-5 수준은 최종 20주령에서 정상군은 48±12.1 pg/ml, NC/Nga 대조군은 250±26.0 pg/ml로 나타난 반면, 실험군은 129±27 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p<0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 3. B).

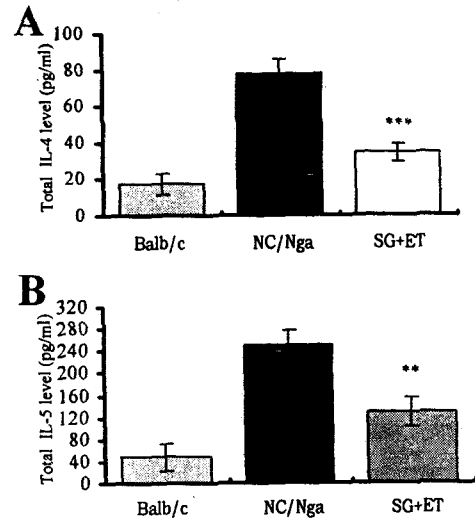


Fig. 3. Serum IL-4 and IL-5 elevation and development of dermatitis in NC/Nga atopy dermatitis model mice.

4. 혈청 중 IL-13, IFN-γ 발현에 미치는 영향

IL-13 수준은 정상군에서 35±3.9 pg/ml, NC/Nga 대조군에서 2,105±265.0 pg/ml, 실험군은 1,126±122.0 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p<0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 4. A).

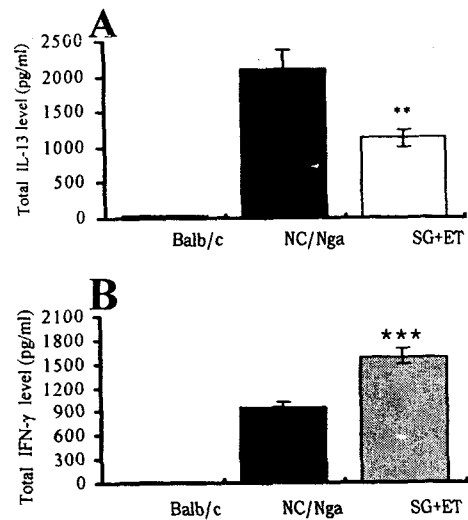


Fig. 4. Serum IL-13 and IFN-γ elevation and development of dermatitis in NC/Nga atopy dermatitis model mice.

혈청 중 IFN- γ 수준은 정상군에서 11 ± 3.1 pg/ml, NC/Nga 대조군에서 962 ± 63.0 pg/ml, 실험군에서 $1,586 \pm 101.2$ pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.001$) 증가를 나타냈다(Fig. 4. B).

5. 혈청 중 IgM 발현에 미치는 영향

IgM 수준은 최종 20주령에서 정상군은 59 ± 12.3 μ g/ml, NC/Nga 대조군은 683 ± 63.0 μ g/ml로 나타난 반면, 실험군은 320 ± 24.0 μ g/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.001$) 감소를 나타냈다(Fig. 5).

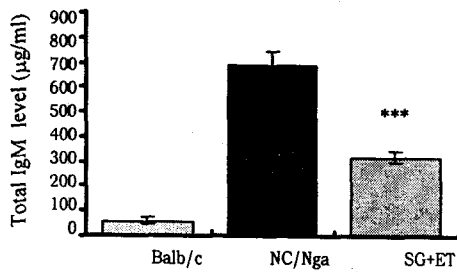


Fig. 5. IgM in NC/Nga atopy dermatitis model mice.

6. 혈청 중 IgG1 및 IgG2a 발현에 미치는 영향

IgG1 수준은 정상군에서 575 ± 39.0 μ g/ml로 나타났고, NC/Nga 대조군에서 $3,204 \pm 120$ μ g/ml로 나타났다. 이에 비해 실험군에서는 $1,760 \pm 490$ μ g/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 6. A).

IgG2a 수준은 정상군에서 196 ± 5.6 μ g/ml로 나타났고, NC/Nga 대조군에서 $2,110 \pm 386$ μ g/ml로 나타났다. 이에 비해 실험군에서는 $1,205 \pm 236$ μ g/ml로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.05$) 감소를 나타냈다 (Fig. 6. B).

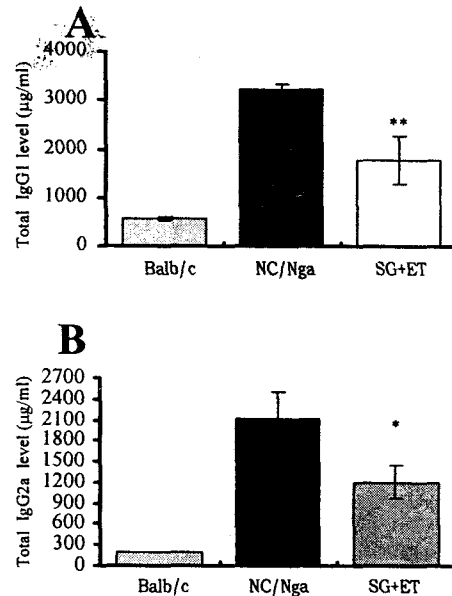


Fig. 6. Immunoglobulin G1 and G2a in NC/Nga atopy dermatitis model mice.

7. 비장 무게 변화에 미치는 영향

NC/Nga 생쥐 20주령 후 비장을 적출하여 무게를 측정된 결과, 정상군은 0.142 ± 0.009 g, NC/Nga 대조군은 0.152 ± 0.004 g, 실험군은 0.126 ± 0.011 g로 유의성 있는($p < 0.05$) 감소를 나타냈다(Fig. 7).

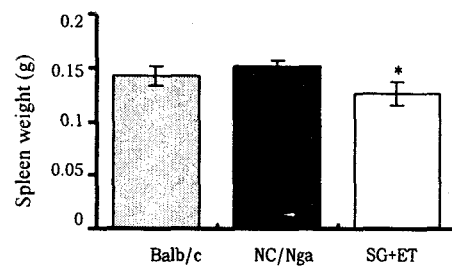


Fig. 7. Spleen weight in NC/Nga atopy dermatitis model mice.

8. Lymph node에서 FACS 분석

정상 Balb/c 생쥐는 CD3 ϵ^+ (T cells)가 71.3 ± 2.55 , CD19 $^+$ (B cells)가 27.4 ± 1.49 로 나타나 B/T의 비율이 0.38로 나타났고, NC/Nga 생쥐는 CD3 ϵ^+ (T cells)가

38.5±4.21, CD19⁺ (B cells)가 60.6±3.75로 나타나 B/T의 비율이 1.57로 나타났다. 실험군은 CD3ε⁺ (T cells)가 66.1±8.87, CD19⁺ (B cells)가 32.2±8.06로 나타나 B/T 비율이 0.49로 유의성 있는 (p<0.01, p<0.01) 결과가 나타났다(Table 3, Fig. 8).

Lymph node에서 CD4⁺와 CD8⁺의 세포수는 정상군이 각각 48.7±3.62, 27.7±3.68, NC/Nga 대조군은 각각 29.8±2.35, 13.9±1.89, 실험군은 각각 39.8±4.83,

17.0±3.54로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (p<0.05, p<0.01) 결과가 나타났다(Table 3, Fig. 9).

Table 3. Cell Content in Lymph Node of NC/Nga Atopy Dermatitis Model Mice

Leucocytes type	Organ	Normal Balb/c	NC/Nga atopy dermatitis mice (scratching/drug)	
			Control	SG+ET
CD3ε ⁺ (T)	LN*	71.3±2.55	38.5±4.21	66.1±8.87**
CD19 ⁺ (B)	LN	27.4±1.49	60.6±3.75	32.2±8.06**
CD69 ⁺ /CD3ε ⁺	LN	5.3±0.26	9.7±1.22	5.5±1.79*
CD4 ⁺	LN	48.7±3.62	29.8±2.35	39.8±4.83*
CD8 ⁺	LN	27.7±3.68	13.9±1.89	17.0±3.54**
CD11a ⁺ /CD19 ⁺	LN	21.4±2.45	47.5±3.87	29.9±5.44**
※LN : Lymph node	B/T Rate	0.38	1.57	0.49

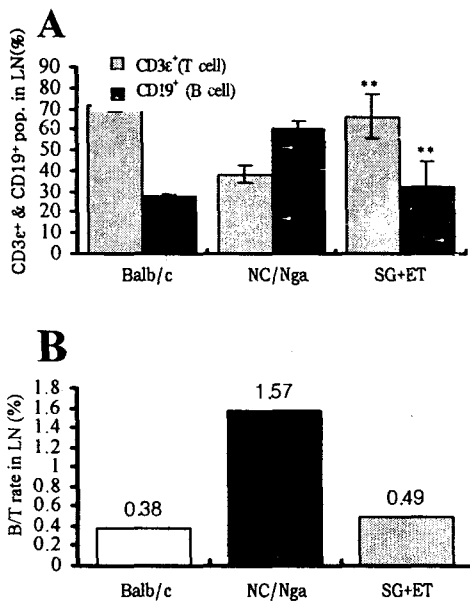


Fig. 8. Effect of SG and ET on CD3ε⁺ and CD19⁺ (%) population in lymph node cells of NC/Nga atopy dermatitis mice.

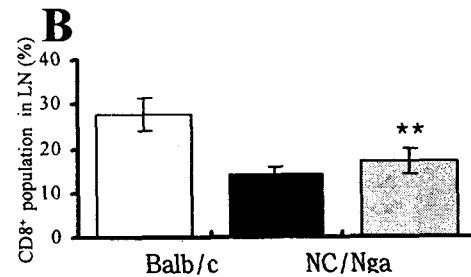
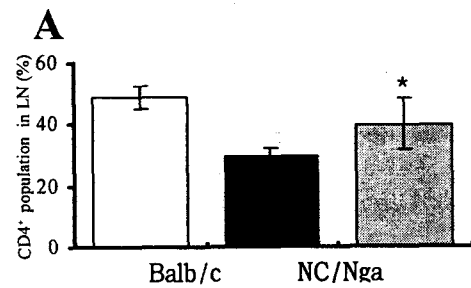


Fig. 9. Effect of SG and ET on CD4⁺ and CD8⁺ (%) population in lymph node cells of NC/Nga atopy dermatitis mice.

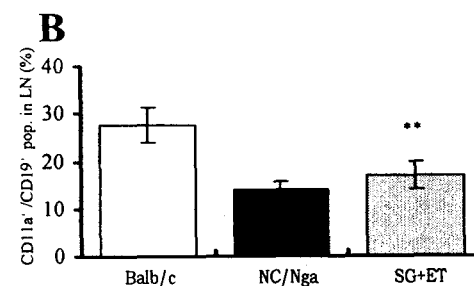
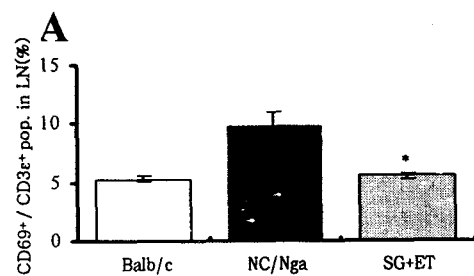


Fig. 10. Effect of SG and ET on CD69⁺/CD3ε⁺ and CD11a⁺/CD19⁺ (%) population in lymph node cells of NC/Nga atopy dermatitis mice.

T 세포 활성 표면 분자인 CD69⁺ 세포수는 정상군이 5.3±0.26, NC/Nga 대조군이 9.7±1.22, 실험군은 5.5±1.79로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (p<0.05) 결과가 나타났다(Fig. 10. A).

임파구세포 활성 표면 분자인 CD11a⁺ 발현은 정상군이 21.4±2.45, NC/Nga 대조군이 47.5±3.87, 실험군이 29.9 ± 5.44로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.01) 결과가 나타났다(Fig. 10. B).

9. Spleen에서 FACS 분석

정상 Balb/c 생쥐의 CD3ε⁺ (T cells) 발현은 49.8±3.64로 나타났고, CD19⁺ (B cells) 발현은 38.3±2.02로 나타나 B/T의 비율이 0.77로 나타났다. NC/Nga 대조군은 CD3ε⁺ (T cells) 발현이 20.6±3.44,

CD19⁺ (B cells) 발현이 74.4±5.64로 나타나 B/T의 비율이 3.61로 나타났다. 이에 비해 실험군은 CD3ε⁺ (T cells) 발현이 24.2±0.43, CD19⁺ (B cells)가 70.6±1.86로 나타나 B/T의 비율이 2.92로 나타났다 (Table 4, Fig. 11).

CD4⁺와 CD8⁺의 발현은 정상군이 각각 5.48±0.74, 4.97±0.53, 대조군은 12.5±0.68, 7.40±1.15로 나타났으며, 실험군은 각각 10.3±0.24, 7.25±0.43으로 나타나 유의성 있는 (p<0.01) 결과를 나타냈다(Table 4, Fig. 12).

CD69⁺ 발현은 정상군이 0.87±0.04, NC/Nga 대조군은 3.4±0.26으로 나타났으며, 실험군은 2.34±0.55로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Table 4, Fig. 13A).

CD11a⁺ 발현은 정상군이 55.3±4.58, NC/Nga 대조군이 76.8±3.8, 실험군이 67.9± 2.55로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 감소하였다(Table 4, Fig. 13. B).

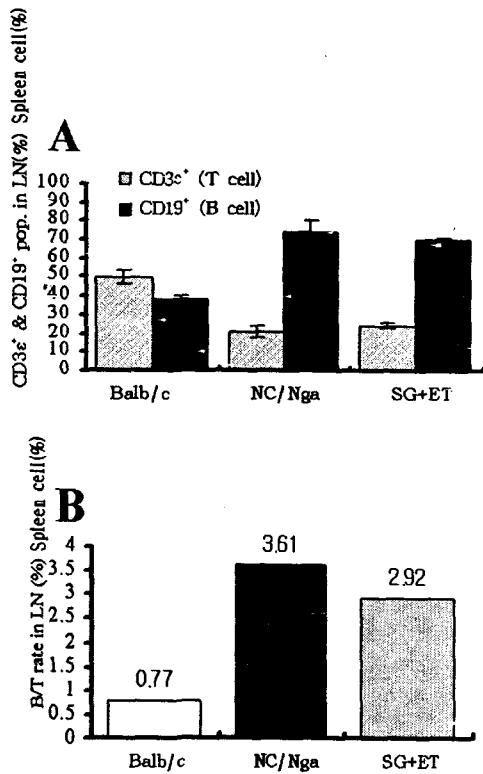


Fig. 11. Effect of SG and ET on CD3ε⁺ and CD19⁺ (%) population in NC/Nga atopy dermatitis mice spleen cells.

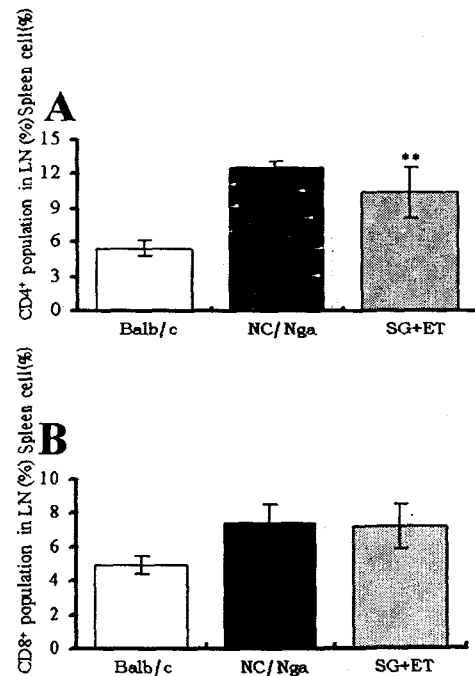


Fig. 12. Effect of SG and ET on CD4⁺ and CD8⁺ (%) population in NC/Nga atopy dermatitis mice spleen cells.

Table 4. Cell Content in Spleen of NC/Nga Atopy Dermatitis Model Mice

Leucocytes type	Organ	Normal Balb/c	NC/Nga atopy dermatitis mice(scratching/drug)	
			Control	SG+ET
CD3ε ⁺ (T)	SP*	49.8±3.64	20.6±3.44	24.2±0.43
CD19 ⁺ (B)	SP	38.3±2.02	74.4±5.64	70.6±1.86
CD69 ⁺ /CD3ε ⁺	SP	0.87±0.04	3.40±0.26	2.34±0.55
CD4 ⁺	SP	5.48±0.74	12.5±0.68	10.3±0.24**
CD8 ⁺	SP	4.97±0.53	7.40±1.15	7.25±0.43
CD11a ⁺ /CD19 ⁺	SP	55.3±4.58	76.8±3.80	67.9±2.55*
※SP : spleen	B/T Rate	0.77	3.61	2.92

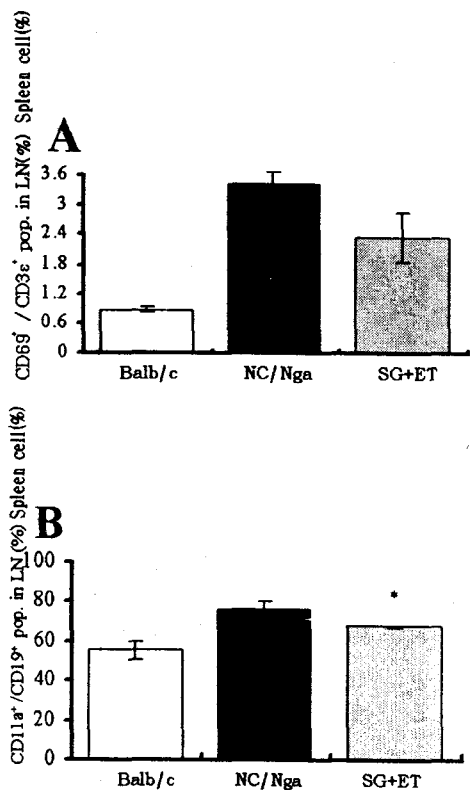


Fig. 13. Effect of SG and ET on CD69⁺/CD3ε⁺ and CD11a⁺/CD19⁺ (%) population in NC/Nga atopy dermatitis mice spleen cells.

10. Facial skin lesion 에서 IL-4, IL-5, IFN-γ 및 CCR3 발현에 미치는 영향

IL-4 mRNA 발현량(Ht값)은 정상군이 25 (Ht), NC/Nga 대조군이 85 (Ht)로 나타났으며, 이에 반해

실험군은 33 (Ht)으로 나타나 대조군에 비하여 현저히 감소하였다(Fig. 14).

IFN-γ mRNA 발현은 정상군이 12 (Ht), NC/Nga 대조군이 15 (Ht)로 나타났고, 실험군이 81 (Ht)으로 나타나 대조군에 비하여 현저히 증가하였다(Fig. 14).

IL-5 mRNA 발현은 정상군이 31 (Ht), NC/Nga 대조군이 92 (Ht)로 나타났고, 실험군은 27 (Ht)으로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 현저히 감소하였다 (Fig. 15).

Chemokine인 CCR3 발현은 정상군이 22 (Ht), NC/Nga 대조군이 116 (Ht)로 나타났고, 실험군이 29 (Ht)으로 나타나 대조군에 비하여 현저히 감소하였다(Fig. 15).

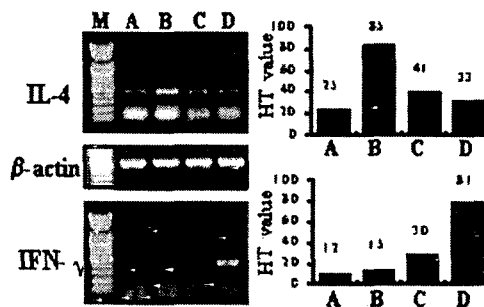


Fig. 14. RT-PCR on facial skin biopsy of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Normal Balb/c mouse skin (A), NC/Nga mouse skin control (B), positive control (treated with Sopoongsan, C) and SG and ET (D). The numbers above each bar denotes the Ht value for the treatment.

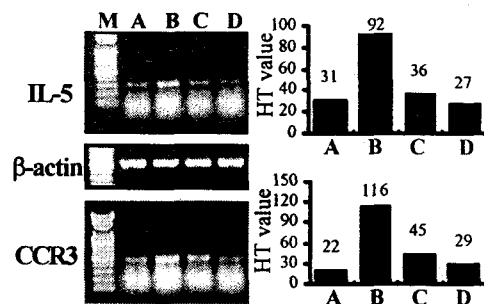


Fig. 15. RT-PCR on facial skin biopsy of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice.

11. NC/Nga dermatitis skin lesion에서의 IL-6, IL-13 발현에 미치는 영향

IL-6 수치는 정상군이 7.5±1.2 pg/ml, NC/Nga 대조군이 64.3±5.3 pg/ml로 나타났고, 실험군이 38.5±5.6 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 실험군에서 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 16. A).

IL-13 수치는 정상군이 22±4.3 pg/ml, NC/Nga 대조군은 305±36.4 pg/ml로 나타났고, 실험군은 155±22.2 pg/ml로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.001) 감소를 나타냈다(Fig. 16. B).

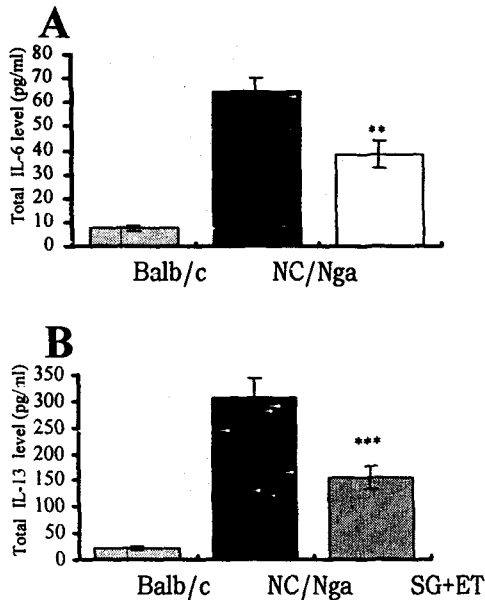


Fig. 16. Culture supernatant IL-6 and IL-13 production in facial skin biopsy of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice.

12. NC/Nga dermatitis skin lesion 배양 세포에서 CD69⁺/CD3E⁺, CD19⁺/CD44⁺ 세포 발현에 미치는 영향

CD69⁺/CD3E⁺ 세포 발현은 대조군이 26.4 %, 실험군은 15.2 %로 나타나 대조군에 비하여 현저히 감소했다(Fig. 17. A).

CD19⁺/CD44⁺ 세포 발현은 대조군이 24.1 %, 실험군이 13.2 %로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 현저한 감소를 나타냈다(Fig. 17. B).

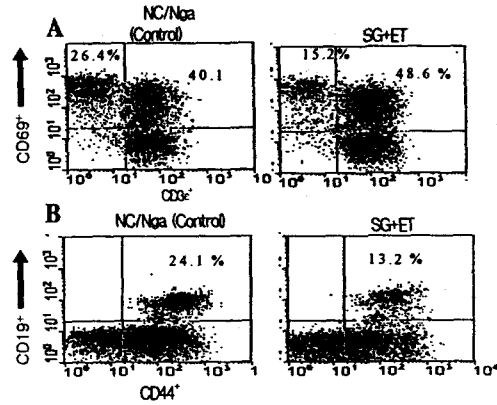


Fig. 17. FACS analysis of cultured facial & neck skin cells in dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice.

13. NC/Nga dermatitis ear lesion의 조직 검사

정상 Balb/c 생쥐의 조직에서는 표피, 진피, 그리고 뼈가 뚜렷하게 관찰되었으나, NC/Nga 대조군은 표피와 진피가 부종으로 현저하게 확장된 것을 관찰할 수 있고, 백혈구의 침윤도 관찰되었다(Fig. 18).

실험군에서는 대조군에 비하여 표피와 진피의 두께도 거의 정상으로 되었고, 진피 사이에 백혈구의 침윤도 보이지 않아 부종이 거의 없어진 것을 알 수 있었다(Fig. 19).

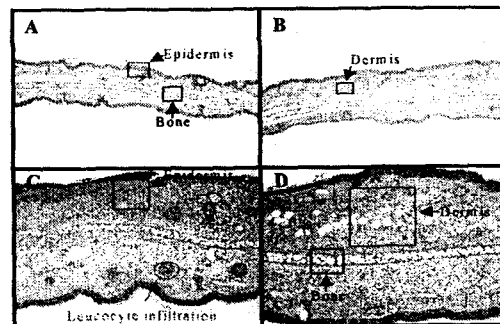


Fig. 18. Histologic features of ear lesion in NC/Nga mice. (A, B) : ear tissues from Balb/c mouse. (C or D) : ear tissues from NC/Nga mouse with no treatment.

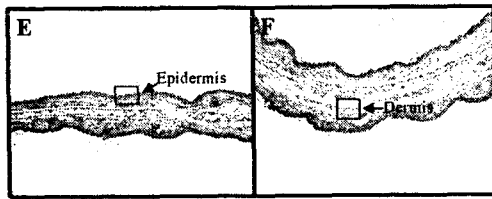


Fig. 19. Histologic features of ear lesion in NC/Nga mice. (E or F) Ear tissues from NC/Nga mouse with SG and ET treatment.

14. NC/Nga dermatitis skin lesion의 조직 검사

정상 Balb/c 생쥐의 조직에서는 표피, 진피, 그리고 기선이 관찰되나, NC/Nga 대조군에서는 표피가 진피쪽으로 두껍게 내려가 현저하게 확장되었으며, 피부염증이 심화되어 발진이 많이 진행되고, 백혈구의 침윤도 관찰되었다(Fig. 20).

이에 비해 실험군은 대조군에 비하여 표피와 진피의 두께도 거의 정상으로 되었고, 표피 사이에 백혈구의 침윤도 관찰되지 않았다(Fig. 21).

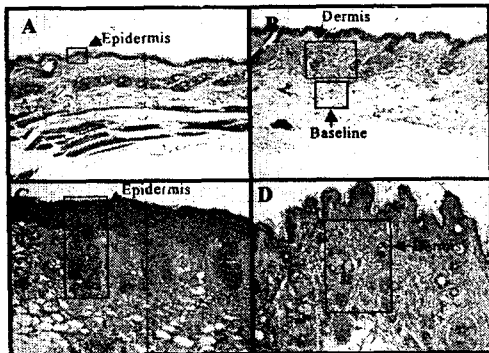


Fig. 20. Histologic features of skin lesion in NC/Nga mice. (A, B) : skin tissues from Balb/c mouse. (C or D): skin tissues from NC/Nga mouse with no treatment.



Fig. 21. Histologic features of skin lesion in NC/Nga mice. (E or F) : skin tissues from NC/Nga mouse with SG and ET treatment.

15. Lymphokine assay

IL-4 수준은 대조군이 57.4 ± 0.5 pg/ml, 실험군이 43.6 ± 2.5 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.001$) 감소를 나타냈고, IFN- γ 수준은 대조군이 107.9 ± 2.15 pg/ml, 실험군이 128.6 ± 2.96 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.001$) 증가를 나타냈다(Fig. 22).

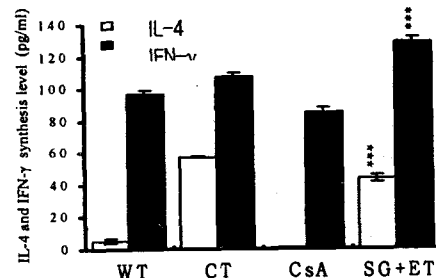


Fig. 22. IL-4 and IFN- γ synthesis in splenocytes from treated with SG + ET in C57BL/6 mice.

WT : Normal C57BL/6 mice

CT : Anti-CD3 ϵ (1 μ g/mg) plus anti-CD28* (1 μ g/mg) antibody coated plate

CsA : Anti-CD3 ϵ plus anti-CD28* plus cyclosporin A (10 μ g/mg)

SG + ET: Anti-CD3 ϵ plus anti-CD28* plus SG (100 μ g/mg)

고찰

알레르기(Allergy)란 용어는 1906年 프랑스 학자 피케르가 처음으로 사용하였는데 대부분의 사람에게서 아무런 문제도 일으키지 않는 물질이 어떤 사람에게는 두드러기나 천식 등의 이상 과민 반응을 일으키는 것을 말한다¹⁾.

이 중 아토피성 피부염은 알레르기성 비염, 천식과 함께 대표적인 알레르기성 질환으로, 알레르기성 습진, 소아 습진, 굴절부 습진, 범발 신경 피부염 등으로 불리우며, 유아 습진에서부터 소년기, 사춘기, 성인에 나타나는 전형적 태선화 피부염에까지 이르

는 임상 및 조직학적 진행 과정을 보여주는 질환이다.¹⁴⁾

한의학에서의 奶癬, 胎風, 胎赤, 胎癬, 乳癬, 浸淫瘡, 四彎風 등이 아토피성 피부염의 범주에 속하며 현대 중국에서는 영아습진 또는 이위성 피부염이라고 부르기도 한다.⁵⁻¹⁰⁾

《諸病源候論》⁶⁾에서 “小兒面上, 癬皮如甲錯起乾燥, 謂之乳癬, 言兒飲乳, 乳汁潰汚兒面, 變生此症”, 《外科正宗》⁷⁾에서 “奶癬, 兒在胎中, 母食五辛, 父餐炙博, 流熱與兒, 生後頭面遍身, 發爲奶癬, 流脂成片, 睡臥不安, 瘙痒不絕, 治以文蛤散”, 《外科大成》⁸⁾에서 “胎赤者, 初生月里, 肌膚忽然發赤如丹, 由胎熱所致”, “四彎風, 生于腿彎脚彎, 一月一發, 痒不可忍, 形如風癬, 搔破成瘡”, 《醫宗金鑑》⁹⁾에서 “此證初生頭頂, 或生尾端, 痒起白屑, 形如疥癬, 由胎中血熱, 落草受風鎖綿, 此即乾斂瘡, 有誤用湯火洗皮膚起粟粟 瘙痒無度, 黃水津淫, 延及遍身, 即成濕斂瘡”라고 기술하여 오늘날 아토피 피부염과 가장 유사하게 표현하고 있다.

아토피에 대한 한의학적 연구로朴¹¹⁾은 아토피 피부염의 東서의학적 문헌 고찰을, 尹¹²⁾은 아토피 피부염 환자의 한의학적인 임상유형분류에 대한 연구를 보고하였고, 단일 한약제에 대한 실험적 연구로 金¹³⁾은 桑葉이, 韓¹⁴⁾은 牛蒡子가, 金¹⁵⁾은 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향을 보고하였으며, 처방에 대한 연구로 金¹⁶⁾은 “加味生料四物湯”, 朴¹⁷⁾은 “消風散”, 金¹⁸⁾은 “沈瀝丹”, 朴¹⁹⁾은 “消風清營湯加味方”, 尹²⁰⁾은 “涼膈散火湯”을 시료로 면역 조절작용을 통한 항아토피 효과를 규명한 바가 있다.

본 시료이며, 내복약으로 사용된 消風散加減方은 血燥生風으로 인한 피부 질환에 응용되는 처방으로 消風散을 기본방으로 透疹止痒하는 浮萍草, 消瘡解表하는 荊芥, 祛風止痒하는 防風과 白蒺藜 등의 清熱藥이 加味되어 있다.

外治方은 민간에서 사용되고 있는 처방으로 滋陰解毒하는 蕎麥, 燥濕殺蟲하는 松津, 清熱斂瘡하는 石膏, 消炎解毒하는 竹鹽, 祛瘡毒하는 梅實 엑기스의

配合에 의해 구성된 처방이다. 따라서 內服藥과 外治方 併用은 補血, 補陰, 祛風, 清熱解毒 작용을 겸하고 있다.

알레르기 질환의 치료법은 원인 항원과 악화요인의 회피를 위한 환경관리, 약물요법, 면역요법 등이 있는데, 이 중 다용되는 약물요법은 알레르기 반응의 특정 단계를 억제하거나 증상을 약화시키는 역할을 하는 glucocorticoid, antihistamines(항히스타민제), antiallergic drugs, tarolimus, 교감신경자극제, 스테로이드 제제 등이 있다²⁻⁴⁾. 이 밖에 환경관리와 약물요법으로 증상이 잘 조절되지 않는 경우, 전문가의 감독하에 면역요법을 시행하기도 한다²²⁾.

최근에는 알레르기 질환과 관련된 유전자 연구가 진행되고 있는데^{23,24)}, 이러한 연구는 알레르기 질환의 분자적 기전을 분석하는데 도움을 줄 뿐만 아니라, 새로운 알레르기 질환 치료제 개발에도 기여할 수 있어 주목받고 있다. 현재까지 알레르기 반응에 관련된 인자들로 밝혀진 분자들은 싸이토카인, 키모카인, 사이토카인 수용체, 키모카인 수용체, 구조 복합체, 전사인자 등이 있다²⁵⁻²⁹⁾. 이들은 알레르기 질환을 일으키기 쉬운 강력한 후보 유전자들로서 IgE 생산과 염증 반응에 관여하는 것으로 보고되고 있다.

실험 동물인 NC/Nga 생쥐는 일반적인 환경에서 사람의 아토피 피부염과 매우 유사한 증상인 가려움, 심한 피부염증, 血脹, 체중 감소를 나타내는 실험 동물 모델로 air-uncontrolled 상황 (conventional NC/Nga mice)에서 12주 이후 혈청 중 IgE 수준이 정상 100배 까지 기록되고 아토피성 피부염의 피부 장애가 동반된다³⁰⁾.

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

한다는 보고들이 많다²⁵⁻³⁰.

아토피 피부염 환자에서 세포 매개성 면역기능 장애가 IgE 증가와 관련 있음이 밝혀지면서 즉시형 과민 반응 외에도 지연형 과민 반응이 아토피 피부염의 병인에 관여함을 주장하는 보고들이 증가하고 있다. 아토피 피부염 환자에서 세포 매개성 면역 장애는 약 80%까지 발생하는 것으로 알려져 있으며, 바이러스 및 피부 사상균등에 의한 피부 감염증에 대해 감수성이 증가되고, 접촉 알레르겐에 대한 감수성은 감소된 경향을 보인다. 과거에는 T 세포 성숙 결핍설, CD8⁺ 억제 T 세포의 수적 감소 등이 보고 된 바 있었으나, 최근엔 CD4⁺ T 세포의 역할이 더욱 중요한 것으로 알려지고 있다^{29,30}. 즉 B 세포로부터 IgE의 생성을 유도하는 IL-4³¹, B 세포로부터 IgE 생성을 촉진하는 IL-5³², IgE 생성을 증폭시키는 IL-6³³ 등을 분비하는 T 세포는 CD4⁺ T 세포 중 Th2 세포인데, AD 환자의 말초 혈액 및 피부 병변으로부터 분리한 항원 특이 T 세포 클론이 Th2로 밝혀졌고, 이 세포들에서 IL-4 등의 Th2 싸이토카인 프로필이 분비된다는 사실이 입증되었다.

아토피 피부염 환자들의 80% 이상에서 혈청 IgE 수치가 증가되어 있으며^{30,34}, 이 수치는 대체적으로 아토피 피부염의 임상적 중증도와 비례하는 것으로, 아토피 피부염의 발병 기전과 밀접한 상관 관계가 있는 것으로 보고되어 기본적인 검사 대상이 된다.

알레르기 질환의 발생 과정은 크게 초기 반응과 후기 반응으로 구분되는데, 초기 반응은 항원의 자극에 의해 항체(IgE)가 생산된 후 항체가 비만세포 표면의 high affinity receptor(FcεRI)에 결합하였을 때 항원이 재침입하면 FcεRI 와 결합하고 있는 항체(IgE)와 결합하여 비만세포내로 신호를 빠르게 전달하여 알레르기를 일으키는 화학적 매개물질(inflammatory chemical mediator ; cytokine, histamine, leukotrienes)을 분비하게 된다.

이에 비해 후기 반응은 Th2-type 2 사이토카인(IL-4, 5, 6, 10, 13)이 tissue fibroblast 또는 epithelial cell들의 케모카인(chemokine ; monocyte chemo-

attractant protein-1, eotaxin-1, RANTES) 생산을 유도하여, 그 결과 염증성 세포 특히 호산구가 알레르기 반응 부위로 이동하는 것이다³⁴⁻³⁶.

본 실험에서도 실험군의 혈중 IgE 수치는 16 주령과 20 주령에서 대조군에 비하여 약 55.5 %와 56.4 %의 유의성 있는(p<0.01, p<0.001) 감소를 나타내었고(Fig. 2), 혈중 IL-6 수치 역시 대조군에 비하여 20 주에 61.2%의 유의성 있는 (p<0.001) 현저한 감소가 나타났다(Fig. 2).

아울러 대조군에 비하여 혈중 IL-4 수치는 56.4%, IL-5 수치는 48.4%, IL-13 수치는 46.5%의 유의성 있는(p<0.001, p<0.01) 감소를 나타냄으로써(Fig. 3, 4), 본 시료가 B 세포 분화에 수반되는 IgE, IL-6 발현과, Th2에서 분비되는 IL-4, IL-5 및 IL-13 발현을 억제함을 알 수 있다.

lymphokine assay에서도 IL-4 분비량이 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.001) 감소를 나타내고(Fig. 22), facial skin lesion에서의 IL-4, IL-5 발현(Fig. 14, 15)과 NC/Nga dermatitis skin lesion 에서의 IL-6, IL-13 발현(Fig. 16)에서 유의성 있는 (p<0.01, p<0.001) 감소 역시 상기한 결과와 부합됨을 입증해 주고 있다.

또한 IL-5와 더불어, 피부 염증 부위에 만성으로 침윤이 일어나는 Th2, 호산구, 중성구 및 mast 세포 등에서 발현되는 CCR3 발현 또한 대조군에 비하여 4배 정도 발현이 감소하였다(Fig. 15).

Th1 세포는 IFN-γ, IL-12와 같은 Th type 1 사이토카인(Th1 cytokine ; proinflammatory cytokine)을 생산하여 박테리아 감염과 같은 intracellular pathogen에 대항하는 면역 반응에 관여한다. 특히 Th1 세포에서 분비되는 IFN-γ는 알레르기 반응을 일으키는 Th2 세포를 억제하고 IgE 생산을 증가시키는 B 세포 분화를 억제하는 것으로 알려져 있는데, 본 실험에서 혈청 중 IFN-γ 수준은 대조군에 비하여 유의성 있는 (p<0.001) 증가를 나타냈고(Fig. 4 B), lymphokine assay에서의 발현량(Fig. 22)과 facial skin lesion에서의 발현 결과(Fig. 14, 15), 역시 혈청 결과와 부합된

결과가 도출되었다.

이 같은 결과는 본 시료가 Th1 세포에서 분비되는 IFN- γ 를 증가시켜 알레르기 면역 반응에 관여하는 Th2 세포를 억제함으로써, Th2 세포에서 Th1 세포로의 전환 작용을 발휘함을 알 수 있다.

알레르기 증상의 대부분은 비만세포나 호산구가 분비하는 히스타민 등의 염증 반응 매개물질에 의해 氣道, 피부 등의 상피세포 주변의 모세혈관의 확장, 면역 세포의 유입, 근육의 수축과 점액 분비물의 증가에 따른 소양, 부종, 충혈, 기침, 가래 등의 임상적 증상으로 나타난다³⁷⁾.

따라서 아토피 피부염에서 치료 증거로 가려움증, 부종 등의 변화는 매우 중요한데, 본 실험에서 최종 결과로 평가할 수 있는 피부손상정도가 16주와 20주에서 대조군에 비하여 72.2%와 62.3%의 현저한 감소를 나타내고(Fig. 1), 조직학적 분석에서 염증을 일으키는 면역세포, 이완된 세포, 염증표피, 그리고 각화과다로 인한 표피의 두께가 감소된 점(Fig. 18, 19, 20, 21)은 본 시료의 항알러지 작용에 대한 유의성을 실험적으로 증명해준다.

인체의 방어 기작인 면역 체계는 T 세포의 활성화를 중심으로 이루어진다. 따라서 T 세포의 활성화에 관한 충분한 이해는 면역 체계의 조절 과정을 파악하는데 도움이 되며, 많은 면역 질환의 예방 및 치료제 개발의 자료가 된다.

Th1 세포가 생산하는 Th type 1 사이토카인은 Th1 세포의 分化를 유도하는 반면 Th2 세포의 증식과 분화를 억제하며, 반대로 Th2 세포가 생산하는 Th type 2 사이토카인은 Th2 세포의 증식과 분화를 유도하는 반면 Th1 세포의 분화를 억제하는 식으로 서로 상호 조절을 통해 균형을 이루며 Th1과 Th2 면역반응을 조절하므로, 이 균형이 깨어지게 되면 Th1/ Th2 불균형으로 인한 여러 가지 면역질환을 겪게 된다^{38,39)}. 알레르기 질환도 그 균형이 Th2 쪽으로 치우친 결과로 유발된 면역 질환 중의 하나이다. 즉 Th2 세포와 알레르기 질환의 발생 관계는 Th2 세포 기능의 증가와 Th1 세포 기능의 감소(Th2/Th1 불균형)라

는 Th2 가설을 통해 이해할 수 있다.

자가면역질환은 지속적으로 활성화된 수지상세포(DC)나 APC 세포들에 의하여 염증 조직 부분으로 lymph node에 있는 순수한 T 세포 (immature CD4⁺, immature CD8⁺)를 염증 조직 부분으로 이동시킨다. 이로 인하여 정상적인 lymph node에서 T 세포와 B 세포 비율이 7:3을 유지하다가 염증 조직 질환 동물에서는 T 세포의 이동이 이루어져 조직 쪽으로 염증 활성 T 세포가 과잉으로 침윤이 일어나게 된다.

본 실험의 lymph node에서 FACS 분석은 이를 증명해주는데, 정상군 B/T의 비율이 0.38로 나타났는데 비하여, 대조군은 1.57로 나타나 T 세포가 염증 부위로 이동이 일어남으로써 T 세포와 B 세포의 불균형이 일어남을 알 수 있다(Table 3).

이에 비해 실험군은 B/T 비율이 0.49로 나타나, T 세포가 항염증 작용에 의하여 이동이 되는 것이 억제되어 T 세포와 B 세포의 불균형을 회복시킴을 알 수 있다(Table 3).

T 세포 활성 표지분자인 CD69⁺는 지속적인 self-Ag이나 성숙한 수지상세포에 의하여 활성화가 일어나는데⁴⁰⁾, NC/Nga 대조군에서는 증가된 CD69⁺ 세포를 관찰할 수 있었으며, 이에 반해 실험군에서는 CD69⁺ 세포수가 현저히 감소함을 관찰할 수 있었다(Table 3). 그리고 CD4⁺ 세포도 피부 염증 조직으로 이동이 일어나 대조군의 NC/Nga 대조군 lymph node에서는 감소를 나타내었지만, 실험군에서는 정상에 가깝게 회복된 것을 관찰할 수 있었다(Table 3).

알레르기는 항체의 기준 표본을 IgM 또는 IgG에서 IgE로 바꾸어주는 Th2 세포가 활성화되면서 시작되는데⁴¹⁾, 본 실험에서 IgE의 생산과 관련되는 IgM과 B 세포 분화 중에 비례적으로 증가되는 IgG1 및 IgG2a 등 치환된 면역 글로블린^{42,43)}의 변화에서 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 감소로(Fig. 7), IgE 발현 결과와 부합됨으로써, 본 시료가 Th2 세포 활성화 억제와 더불어 IgE 생산에 관련된 B 세포 분화를 억제하는 작용이 있음을 알 수 있다.

결과적으로 본 시료가 Th1 세포의 IFN- γ 생성 증가와 더불어 관련 면역세포 활성화를 통해 Th2 세포를 억제함으로써 IL-4, IL-5, IL-13 등의 염증 관련 사이토카인 생성을 억제하고, 이로 인해 IgE 생성 역시 억제됨으로써 조직 사진에서 나타난 바와 같은 유의성있는 결과가 도출된 것으로 생각된다. 이같은 결과는 기존의 면역학적 작용 기전과 부합됨으로써, 본 시료의 면역 조절작용을 통한 항알러지 효과가 인정되며, 향후 약물 독성평가 등의 안정성에 관한 연구가 기대된다.

결론

消風散加減方과 外治方 병용의 항아토피 치료 기전을 규명하고자, NC/Nga 생쥐의 동물 병태 모델을 이용하여 다양한 면역 반응을 관찰하였던 바, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. NC/Nga 생쥐의 피부 손상 정도는 16주와 20주에 대조군에 비하여 각각 72.2%, 62.3% 감소하였다.
2. NC/Nga 생쥐의 혈중 IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IgM, IgG1 및 IgG2a 수준은 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였고, IFN- γ 수준은 유의성있게 증가하였다.
3. NC/Nga 생쥐의 비장 무게는 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다
4. NC/Nga 생쥐의 lymph node에서 B/T rate는 증가된 대조군에 비하여 감소하였으며, CD4⁺와 CD8⁺ 세포 발현은 대조군에 비하여 증가하였고, CD69⁺, CD11a⁺ 세포 발현은 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다.
5. NC/Nga 생쥐의 피부 조직 배양에서 IL-4, IL-5, CCR3 유전자 발현은 대조군에 비하여 현저히 감소하였고, IL-6, IL-13, CD69⁺/CD3e⁺, CD19⁺/CD44⁺ 발현량은 유의성있게 감소하였으

며, IFN- γ 의 유전자 발현은 대조군에 비하여 증가하였다.

6. NC/Nga 생쥐의 귀, 목 피부 조직 변화에서는 표피와 진피의 염증 정도와 침윤된 염증 면역 세포 등이 대조군에 비하여 현저하게 감소되었다.
7. Lymphokine assay에서 IL-4 발현량은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, IFN- γ 의 발현량은 유의성 있게 증가하였다.

참고 문헌

1. Bonini S, Ruffilli A. The genetics of atopy. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 1998;45(1):3-13.
2. 도영민 : 아토피란 무엇인가(아토피의 실상과 배독법의 이해), 마이크로, 2003.
3. 전국의과대학교수 편 : *Katzung's 임상약리학*, 한우리, pp 1049-1068, 1998.
4. 전국의과대학교수 역 : *오늘의 진단과 치료*, 도서출판한우리, pp.132- 134, 1999.
5. 양성완 : *한방으로 잡는 아토피 피부염*, 시공사, p.63, 2003.
6. 巢元方 : *諸病源候論*, 北京, 人民衛生出版社, p.1383, 1982.
7. 陳實功 : *外科正宗*, 瀋陽, 요령과학기술출판사출판, p.115, 1977.
8. 祁坤 : *外科大成*, 대북, 문광도서유한공사, p.365, p.198, 1987.
9. 吳謙 : *醫宗金鑑(下)*, 北京, 人民衛生出版社, p.443, 1982.
10. 丁煥守 : *加味熱多寒少湯* 투여후 아토피 피부염 환자의 임상상 변화에 대한 연구, 경희대학교 석사학위논문, 2002.
11. 朴珉徹 : 아토피 피부염의 東, 西醫學的 文獻考察, 원광대학교 석사학위논문, 2002.
12. 尹華廷 : 아토피 皮膚炎 患者의 韓醫學的인 臨床

- 類型分類에 대한 研究, 동의대학교 석사학위논문, 2001.
13. 金岐勳 : 桑葉이 아토피 피부염에 미치는 영향, 경희대학교 석사학위논문, 2004.
 14. 韓奎哲 : 牛蒡子가 아토피 피부염에 미치는 영향, 경희대학교 석사학위논문, 2004.
 15. 金施慧 : 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향, 경희대학교 석사학위논문, 2004.
 16. 김정진 : 加味生料四物湯의 抗炎症效果와 止痒膏의 아토피 皮膚炎 損傷 및 止痒效果에 미치는 影響, 경희대학교 박사학위논문, 2002.
 17. 박성남 : 消風散이 BALB/c mouse를 이용한 Atopy 피부염 Model에 미치는 영향, 경희대학교 박사학위논문, 2003.
 18. 김우연 : 抗癩丹이 아토피 피부염 환자 단핵세포의 Cytokine 분비능에 미치는 영향, 경희대학교 박사학위논문, 2000.
 19. 박용식 : 아토피 피부염을 유발한 동물모델에서 消風清營湯加味方이 각질층 기능 회복에 미치는 영향, 동국대학교 석사학위논문, 2004.
 20. 윤보현 : 涼膈散火湯이 Atopy 皮膚炎에 미치는 影響, 동국대학교박사학위논문, 2004.
 21. Heishi M, Kagaya S, Katsunuma T, Nakajima T, Yuki K, Kasawa A, Maeda M, Gunji S, Sugita Y, Tsujimoto, G, Saito H : high-density oligonucleotide array analysis of mRNA transcripts in peripheral blood cells of severe atopic dermatitis patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:57-66.
 22. Vogel G. Missing gene takes mice's breath away. *Science*. 295 : 253, 2002.
 23. Foy, T. M., D. M. Shepherd, F. H. Durie, A. Aruffo, J. A. Ledbetter, and R. J. Noelle. 1993. In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymusdependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39. *J. Exp. Med.* 178:1567.
 24. Gauchat, J.-F., D. A. Leberman, R. L. Coffman, H. Gascan, and J. E. de Vries. 1990. Structure and expression of germline transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production. *J. Exp. Med.* 172:463.
 25. Horan, R. F., L. C. Schneider, and A. L. Sheffer. 1992. Allergic skin disorders and mastocytosis. *JAMA* 268:2858.
 26. Ohmen, J. D., J. M. Hanifin, B. J. Nickoloff, T. H. Rea, R. Wyzikowski, J. Kim, D. Jullien, T. McHugh, A. S. Nassif, S. C. Chan, et al. 1995. Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis: contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions. *J. Immunol.* 154:1956.
 27. Renz, H., C. Brodie, K. Bradley, D. Y. M. Leung, and E. W. Gelfand. 1994. Enhancement of IgE production by anti-CD40 antibody in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93:658.
 28. Rousset, F., J. Robert, M. Andary, J.-P. Bonnin, G. Souillet, I. Chretien, F. Briere, J. Pene, and J. E. de Vries. 1991. Shifts in interleukin-4 and interferon-gamma production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87:58.
 29. Till S, Dickason R, Huston D, Humbert M, Robinson D, Larche M, Durham S, Kay AB, Corrigan. IL-5 secretion by allergen-stimulated CD4⁺ T cells in primary culture: relationship to expression of allergic disease. *J Allergy Clin Immun.* 93:658.
 30. Masahiro Matsumoto, Chisei Ra, Keiko Kawamoto, Hiroaki Sato, Atsuko Itakura, Junko Sawada, Hiroko Ushio, Hajime Suto, Kouichi Mitsuishi, Yoshiaki Hikasa, and Hiroshi Matsuda. IgE Hyperproduction Through Enhanced Tyrosine Phosphorylation of Janus Kinase 3 in NC/Nga Mice, a Model for Human Atopic Dermatitis. *The Journal of*

- Immunology*, 1999, 162: 1056-1063.
31. Renz, H., K. Jujo, K. L. Bradley, J. Domenico, E. W. Gelfand, and D. Y. M. Leung. 1992. Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon- γ . *J. Invest. Dermatol.* 99:403.
 32. Kay, A. B., S. Ying, V. Varney, M. Gaga, S. R. Durham, R. Moqbel, A. J. Wardlaw, and Q. Hamid. 1991. Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J. Exp. Med.* 173:775.
 33. Nobuyuki Sudo, Xiao-Nian Yu, Chiharu Kubo. Dehydroepiandrosterone attenuates the spontaneous elevation of serum IgE level in NC/Nga mice. *Immunology Letters* 79 (2001) 177-179
 34. Matsumoto M, Ra C, Kawamoto K, Sato H, Itakura A, Sawada J. IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis. *J. Immunol* 1999;162:1056-63.
 35. Mitsuru Mochizuki, Joachim Bartels, Antony I. Mallet, Erno Christophers and Jens-M. Schröder. IL-4 Induces Eotaxin: A Possible Mechanism of Selective Eosinophil Recruitment in Helminth Infection and Atopy. *The Journal of Immunology*, 1998, 160: 60-68.
 36. Ponath, P. D., S. Qin, D. J. Ringler, I. Clark-Lewis, J. Wang, N. Kassam, H. Smith, X. Shi, J.-A. Gonzalo, W. Newman, J.-C. Gutierrez-Ramos, C. R. Mackay. 1996. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. *J. Clin. Invest.* 97:604.
 37. Wardlaw, A. J., F. S. Symon, G. M. Walsh. 1994. Eosinophil adhesion in allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 94:(Suppl.):1163.
 38. Bellanti JA. Cytokines and allergic diseases: clinical aspects. *Allergy Asthma Proc.* 1998;19(6):337-41.
 39. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. T helper Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 15;168(6):633-9.
 40. Ishikawa S, Akakura S, Abe M, Terashima K, Chijiwa K, Nishimura H, Hirose S, Shirai T. A subset of CD4+ T cells expressing early activation antigen CD69 in murine lupus: possible abnormal regulatory role for cytokine imbalance. *J Immunol.* 1998 Aug 1;161(3):1267-73.
 41. Del Prete, G., E. Maggi, P. Parronchi, I. Chretien, A. Tiri, D. Macchia, M. Ricci, J. Banchereau, J. De Vries, S. Romagnani. 1988. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J. Immunol.* 140:4193.
 42. Roper RL, Conrad DH, Brown DM, Warner GL, Phipps RP. Prostaglandin E2 promotes IL-4-induced IgE and IgG1 synthesis. *Immunol.* 1990 15;145 (8):2644-51.
 43. Mayumi Kotani, Motonobu Matsumoto, Akihito Fujita, Shinji Higa, Way Wang, Masaki Suemura, Tadamitsu Kishimoto, and Toshio Tanaka. Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J Allergy Clin. Immunol* 2000; 106:159-66.