

加減平胃散이 산화적 손상과 접촉성 피부염에서의 면역 조절작용에 미치는 영향

박응호·윤미영·김선빈·김동희*

Effects of GP extract on oxidative stress and contact dermatitis in NC/Nga Mice induced by DNCB

Park Eung-Ho, Yun mi-young, Kim Seon-bin, Kim Dong-Hee
Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

To evaluate the effects of GP on contact dermatitis, we examined the composition of immune cells from drain lymph node in DNCB-induced contact dermatitis murine model NC/Nga mice. And the amount of pathologic cytokines of spleen and antioxidant activity were investigated.

The results were summarized as follows:

1. GP did not show cytotoxic effect on mLFC in vitro.
2. GP did not have hepatotoxicity in vivo in the level of ALT, AST.
3. GP decreased the production of DPPH and in a dose-dependent.
4. GP significantly decreased total cell number of DLN in DNCB-induced NC/Nga mice compared to the untreated control group.
5. GP significantly decreased the number of CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD3+/CD69+ and CD4+/CD45+ in DLN of DNCB-induced NC/Nga mice compared to the untreated control group.
6. GP significantly reduced the level of IL-4 and IFN- γ in splenocytes of DNCB-induced NC/Nga mice compared to the untreated control group.

Taken together above results, GP have therapeutic effects on contact dermatitis by regulating T cell activation. This study warranted further investigations of molecular mechanisms of GP on contact dermatitis.

Key words : GP, NC/Nga Mice, DNCB

I. 緒 論

알러지 (Allergy)란 1906年 피케르가 처음으로

로 사용한 용어로, 대부분의 사람에게서 아무런 문제도 일으키지 않는 물질이 어떤 사람에게는 두드러기나 천식, 아토피 등의 이상 과민 반응을 일으키는 증상을 의미한다.

이는 Gell과 Coombs에 의해 I-IV형으로 분류되어 사용되고 있는데, 이 중 접촉성 피부염에

* 대전대학교 한의과대학 병리학교실
· 교신저자 : 김동희 · E-mail : dhkim@dju.ac.kr
· 채택일 : 2007년 12월 10일

해당하는 IV형은 지연형 과민반응 또는 T 세포에 의한 매개반응으로, 여러 염증 반응을 매개하는 cytokine들을 만들도록 CD4+ T 세포 등이 자극되어지면서 알러지성 접촉성 피부염으로 나타난다¹⁻⁶⁾.

접촉성 피부염은 allergen에 의해 피부 부위의 습진성 피부질환을 말한다⁷⁻¹¹⁾. 접촉성피부염을 일으키는 allergen은 대부분 화학물질로 불안정한 항원인 hapten이라 불리운다. 이 hapten은 먼저 피부에 침투하여 표피의 hapten carrier protein conjugates와 결합하여, 완전한 항원이 되고 Langerhan's 세포표면과 접촉하게 된다. Langerhan's 세포는 표면에 MHC-II를 가지면서 hapten뿐 아니라, 외부의 다른 단백질항원, 바이러스항원, 중앙항원을 T 림프구에 전달하여 많은 cytokine들의 방출을 유발시킨다. 이들 cytokine들은 염증유발 및 세포독성 등의 작용으로 피부내의 국소적 면역반응으로 나타난다^{8,12-14)}.

현재 치료제로는 항 histamin제, 부신피질 호르몬제 및 면역억제제 등이 사용되고 있으나, 사용되는 항 histamin제는 일시적으로 소양감을 완화시킬 뿐 근본적인 치료제로는 부적합하다. 이밖에 부신피질호르몬나 최근 다용되고 있는 cyclosporine A, FK 506등과 같은 면역억제역시 면역 조절 작용¹⁴⁻²⁰⁾은 인정되나, 장기간 투여시 체액 및 전해질의 균형 장애, 과혈당증, 당뇨, 결핵과 같은 이환성의 증가 및 간신 독성 등이 발현됨으로써 치료 결과에 있어 한계가 있다^{11,21-25)}.

이에 본 연구는 현대 치료제의 보완적 기능과 더불어 한의학에서 유의성있는 항알러지성 피부염 치료제 개발을 위한 기초적 연구로써 현재 임상에서 다양한 습진성 피부염에 응용되고 있는 加減平胃散을 시료로 항알러지 효능을 검증하고자 하였다. 실험은 접촉성 피부염 질환 동물모델인 NC/Nga mice를 이용하여 배액 림프절(Draining lymph node)내 면역 세포들의 변화와 비장세포내 사이토카인의 변화를 살펴보고, 최근 피부염의 공통 병리 인자로 보고되고 있는 산화적 손상에 대한 효과를 탐색하였다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 동물

실험동물은 수컷 6주령의 NC/Nga mice는 Japan SLC사에서 공급 받아 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co., Korea)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2°C, 습도 55 ± 15%, 12시간-12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

1) 약물

본 실험에 사용한 加減平胃散 (GP)의 구성 약재들은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. The prescription of Gagam pengleesan (GP)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
蒼 朮	Atractylodis Rhizoma	10
白 朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	10
厚 朴	Magnoliae Cortex	10
白 茯苓	Poria	15
貢 砂 仁	Amomi Semen	4
炒 薏 苡 仁	Coicis Semen	30
黃 柏	Phellodendri Cortex	10
車 前 子	Plantaginis Semen	10
白 鮮 皮	Dictamni Radix	15
地 膚 子	Kochiae Fructus	20
大 腹 皮	Arecae Pericarpium	10
陳 皮	Citri unshiu Pericarpium	4
鷄 內 金	Stomachicum Galli Corium	4
Total amount		152

3) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 diethyl pyrocarbonate (DEPC), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), ethanol, trichloroacetic acid, SRB, tris base, 2,2-diphenyl -1-picrylhydrazyl, pyrogallol 등

은 Sigma 사 (U.S.A.) 제품을, CsA (cyclosporin A)는 중외제약 제품을, 우태아 혈청 (fetal bovine serum : FBS)은 Hyclone 사 (U.S.A.) 제품을, DMEM은 Gibco 사 (U.S.A.) 제품을, PE-anti-CD3, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69의 RNase는 BD-Pharmingen 사 (U.S.A.) 제품을, IL-4, IFN- γ ELISA kit는 Biosource사 (U.S.A.) 제품을, anti-CD3, anti-CD28은 serotec 사 (U.K.) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), microwave oven (LG., Korea), rotary vacuum evaporator, vacuum pump (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo Co., Japan), micropipet (Gilson Co., France), vortex mixer, water bath (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-line Co., U.S.A.), spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan), centrifuge (한일, Korea), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), plate shaker (Lab-line Co., U.S.A.), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), flow cytometry (Becton Dickinson, U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

加減平胃散 (GP) 2첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여, 이를 감압 증류장치로 농축하였다. 농축액을 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 26.0g을 냉동 보관 (-80°C) 하

여, 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) 배양
정상 Balb/c 생쥐의 폐조직 (1 g)을 잘게 분쇄하여 ACK 용액으로 적혈구를 제거하고, cold D-PBS로 3회 세척하여 15 ml tube에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 tube에 DMEM {containing collagenase A (5 mg/ml, BM, indianapolis, IN, U.S.A.)과 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillinm 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 μ g/ml)}를 넣고, 37°C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후, 30분간 배양하여 PBS로 약 2회 1500 rpm으로 원심분리 하였다. 이를 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 세포를 분리하여 연속으로 1주일씩 3회 반복하여 살아있는 부착세포를 DMEM-5% FBS 배양액에서 배양하였다.

3) 세포독성 측정

mLFCs에 GP (200, 100, 50, 10, 1 μ g/ml)를 처리하고, 배양 종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다. 세척한 각 well에 50% trichloroacetic acid를 50 μ l를 가하고, 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 이를 다시 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 μ l/well로 가하고, 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4-5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM tris base를 100 μ l/well로 부착되어진 세포를 용해시킨다. plate shaker로 shaking하고, ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 간독성 검사

실험 종료 후, NC/Nga 생쥐에서 심장 채혈 후, 혈청을 분리하여 ALT, AST를 바이오독스텍

(주) 검사기관에 의뢰하여 측정하였다.

5) 항산화 활성 측정

(1) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 측정

150 mM DPPH/EtOH 150 μ l에 GP을 1000, 500, 250, 125, 62.5 μ g/ml 농도로 희석한 후, 100 μ l 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 흡광도 518 nm에서 측정하여 아래의 방법으로 계산하였다.

$$\text{DPPH 소거능 대조군의 흡광도} - \text{GP 투여군의 흡광도} \\ (\%) = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

(2) Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성 측정

GP 0.2 ml에 tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.6 ml과 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 가하여 25°C에서 10분간 반응 후 1 N HCl 0.1 ml로 반응을 정지시켰다. 반응액을 420 nm에서 흡광도를 측정하고, buffer를 첨가한 것을 대조군으로 하여 활성도를 측정하였다

6) 피부염 유도 및 시료 처리

11 주령이 된 NC/Nga 생쥐의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후, 제모가 끝나면 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 1% DNCB 용액 (아세톤 : 올리브오일 = 3 : 1) 200 μ l를 등 부위에 도포하고, 4일 후 0.2% DNCB 용액을 다시 150 μ l 처리하였다. 2일 후부터는 1주일에 3번씩 0.2% DNCB 용액 150 μ l를 등 부위에 4주간 도포하였다. 정상군, 대조군에는 생리식염수를, 양성대조군은 CsA를 (10 μ g/ml) i.p, 실험군에는 GP를 10.8 mg/25 g/day의 농도로 8주간 경구 투여하였다.

7) 림프절 (draining lymph node: DLN)의 총 세포수 측정

실험을 종료한 후, DNCB로 유발된 NC/Nga 생쥐에서 DLN을 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하고 D-PBS로 5분간 원심분리 (1700

rpm)하였다. 분리한 세포를 2회 세척한 후, cell strainer에 통과시켜 세포이외의 조직이나 불순물을 제거한다. 이들 세포들을 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃ in 1 L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색하여 세포수를 측정한다.

8) DLN에서 형광 유세포 분석

분리한 DLN 침윤세포를 1 x 10⁵/ml 세포로 조정된 후, 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 PE-anti-CD3+, FITC-anti-CD19+, FITC-anti-CD4+, FITC-anti-CD8+, PE-anti-CD25+, FITC-anti-CD69+를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD3+/CD69+, CD4+/CD25+ 세포수를 백분율 (%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

9) 비장내 IL-4, IFN- γ 의 생성량 측정

실험 종료 후 비장세포 (1 x 10⁵ cells/well)를 anti-CD28 (1 μ g/ml)과 anti-CD3 (1 μ g/ml) 항체가 coating된 96-well plate에서 48시간 동안 동시 배양하여, 비장세포내 IL-4, IFN- γ 생성량을 측정하였다. 각 well에 DNCB로 유발된 NC/Nga 생쥐의 비장세포 배양 상층액 100 μ l씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치하였다.

이를 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 biotin-conjugated를 넣고 30분간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충 용액으로 세척한 다음 HRP-conjugated Avidin 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하

였다.

10) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error (S.E.)로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석법을 이용하여 결정하였다.

III. 實驗成績

1. 세포독성에 미치는 영향

세포독성을 측정한 결과, 대조군은 100 ± 5.2 일때, GP 투여군에서는 200, 100, 50, 10, 1 µg/ml 농도에서 생존율이 각각 82.3 ± 2.8, 86.4 ± 3.0, 91.1 ± 3.8, 95.8 ± 4.6, 101.2 ± 5.5 %로 나타내었다 (Fig. 1).

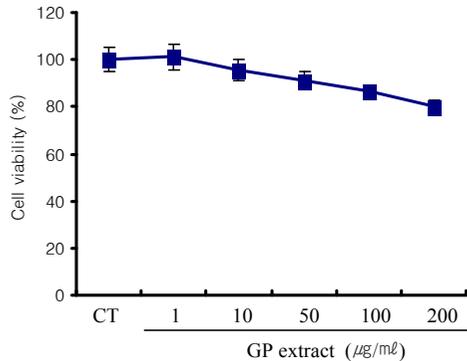


Fig. 1. Effects of GP on the viability of mouse lung fibroblast cells. Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) were cultured with various concentration of GP extract for 48 hr and the cell viability was measured by SRB method. The results were presented by the mean ± S.E.

2. 간독성에 미치는 영향

간 기능 측정의 지표 성분인 ALT는 정상군이 64.1 ± 0.8 (U/L), 대조군은 72.2 ± 1.4 (U/L), CsA는 70.4 ± 2.1 (U/L), GP 투여군에서는

68.4 ± 1.2 (U/L)로 나타났다. AST 수치에서는, 정상군이 29.5 ± 0.5 (U/L), 대조군은 35.5 ± 1.6 (U/L), CsA는 48.5 ± 1.2 (U/L), GP 투여군에서는 34.2 ± 1.1 (U/L)로 나타나, ALT와 AST의 수치가 정상군과 비슷하게 나타나 실험 약물에 의한 간독성은 발견되지 않았다 (Fig. 2).

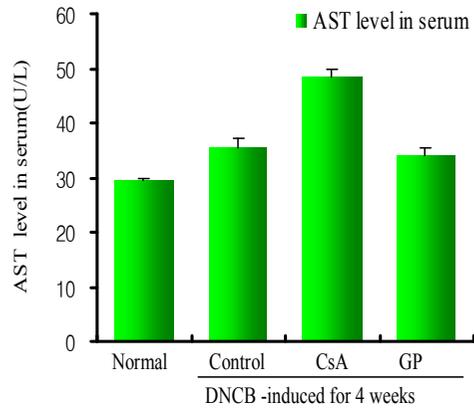
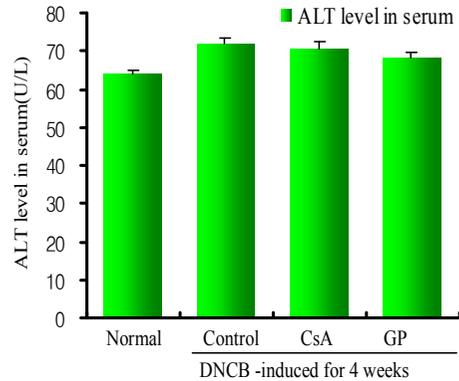


Fig. 2. Effect of GP extract on ALT and AST of serum in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of GP (10.8 mg /25 g/day) for 8 weeks.

3. 항산화 활성에 미치는 영향

(1) DPPH 소거능에 미치는 영향

GP에 의한 DPPH의 소거 활성은 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/ml 농도에서 각각 13.2 ± 1.2, 20.5 ± 0.2, 34.2 ± 0.7, 55.4 ± 1.4, 72.2

± 2.3(%)의 소거활성 효과를 나타내었다 (Fig. 3).

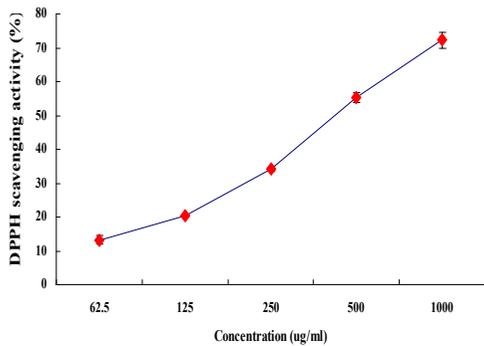


Fig. 3. Scavenging activity of GP on DPPH free radical. GP were reacted with DPPH for 30 minutes at 37°C and the absorbance at 518 nm due to DPPH radical was determined. The results were presented by the mean ± S.E.

(2) Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성화에 미치는 영향

GP에 의한 DPPH의 소거 활성은 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/ml 농도에서 각각 5.8 ± 2.1, 16.7 ± 0.7, 23.9 ± 0.9, 42.8 ± 1.9, 55.5 ± 1.3 (%)의 소거활성 효과를 나타내었다 (Fig. 4).

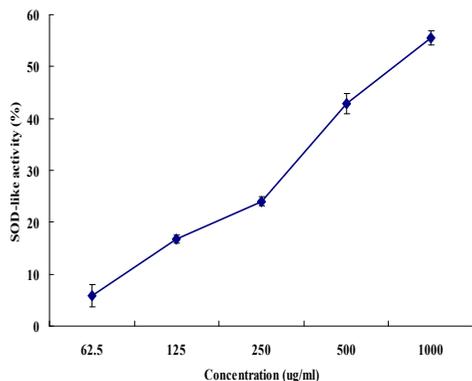


Fig. 4. Scavenging activity of GP on Superoxide dismutase.

GP were reacted with tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.6 ml and 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml

for 10 minutes at 25°C and determined at 420 nm after stopping the reaction by adding 0.1 ml of 1N HCl. The results were presented by the mean ± S.E. of three independent experiments.

4. DLN내 면역세포 수에 미치는 영향

1) DLN 총 면역세포 수에 미치는 영향

DLN에서의 총 면역세포 수는, 정상군이 3.3 ± 1.60 (×10⁶), 대조군은 15.0 ± 1.23 (×10⁶), 양성대조군인 CsA는 6.15 ± 0.15 (×10⁶), GP 투여군에서는 4.8 ± 0.30 (×10⁶)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (***) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 5).

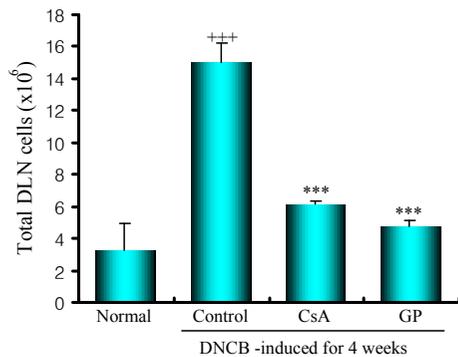


Fig. 5. Effect of GP extract on total cell number of DLN in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of GP (10.8 mg /25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice DLN (×10⁶) were removed and total cell absolute number were measured by analyzed by flow cytometry. The results were presented by the mean ± S.E. Statistically significant value compared with NC/Nga-normal mice group data by t-test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with NC/Nga-control mice group data by t-test (***)p<0.001).

2) CD3+ 세포 수에 미치는 영향

DLN에서의 CD3+ 절대세포 수는 정상군에서는 $21.6 \pm 14.4 (\times 10^4)$, 대조군은 $59.4 \pm 5.4 (\times 10^4)$, CsA는 $31.6 \pm 1.1 (\times 10^4)$, GP 투여군은 $29.1 \pm 2.8 (\times 10^4)$ 로, 나타나 대조군에 비하여 GP 투여군에서 유의성 있는 ($***p < 0.001$) 결과를 나타내었다 (Fig. 6).

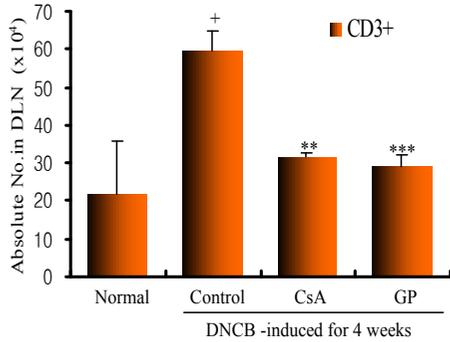


Fig. 6. Effect of GP extract on absolute cell number of DLN in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of GP (10.8 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice DLN ($\times 10^4$) were removed and absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometry. The results were presented by the mean \pm S.E. Statistically significant value compared with NC/Nga-normal mice group data by t-test (+ $p < 0.05$). Statistically significant value compared with NC/Nga-control mice group data by t-test ($**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

3) CD19+ 세포 수에 미치는 영향

DLN에서의 CD19+ 절대세포 수는 정상군에서는 $10.4 \pm 3.1 (\times 10^4)$, 대조군은 $84.8 \pm 4.0 (\times 10^4)$, CsA는 $27.6 \pm 2.0 (\times 10^4)$, GP 투여군에서는 $15.4 \pm 0.1 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 ($***p < 0.001$) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 7).

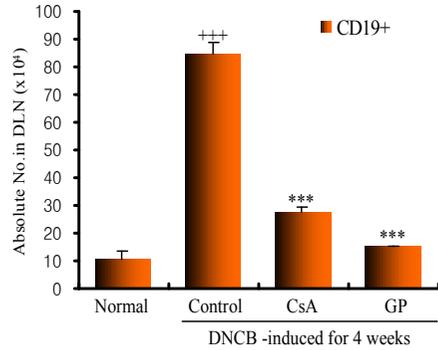


Fig. 7. Effect of GP extract on absolute cell number of DLN in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of GP (10.8 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice DLN ($\times 10^4$) were removed and absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometry. The results were presented by the mean \pm S.E. Statistically significant value compared with NC/Nga-normal mice group data by t-test ($+++p < 0.001$). Statistically significant value compared with NC/Nga-control mice group data by t-test ($***p < 0.001$).

4) CD4+ 세포 수에 미치는 영향

DLN에서의 CD4+ 절대세포 수는 정상군에서는 $16.7 \pm 5.7 (\times 10^4)$, 대조군은 $47.0 \pm 4.8 (\times 10^4)$, CsA는 $24.4 \pm 0.4 (\times 10^4)$, GP 투여군은 $24.2 \pm 3.5 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 ($***p < 0.001$) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 8).

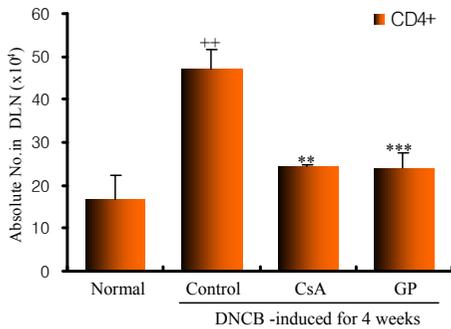


Fig. 8. Effect of GP extract on absolute cell number of DLN in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of GP (10.8 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice DLN ($\times 10^4$) were removed and absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometry. The results were presented by the mean \pm S.E. Statistically significant value compared with NC/Nga-normal mice group data by t-test (++p<0.01). Statistically significant value compared with NC/Nga-control mice group data by t-test (**p<0.01, ***p<0.001).

5) CD8+ 세포 수에 미치는 영향

DLN에서의 CD8+ 절대세포 수는 정상군에서는 $5.1 \pm 3.6 (\times 10^4)$, 대조군은 $17.9 \pm 2.1 (\times 10^4)$, CsA는 $8.5 \pm 0.6 (\times 10^4)$, GP 투여군은 $7.5 \pm 1.7 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 9).

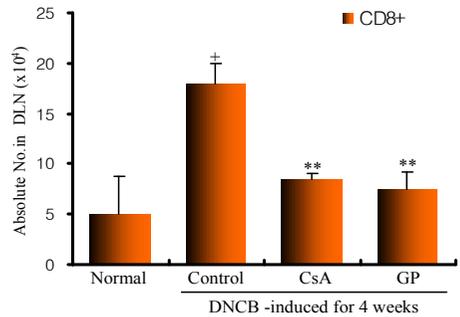


Fig. 9. Effect of GP extract on absolute cell number of DLN in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of GP (10.8 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice DLN ($\times 10^4$) were removed and absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometry. The results were presented by the mean \pm S.E. Statistically significant value compared with NC/Nga-normal mice group data by t-test (†p<0.05). Statistically significant value compared with NC/Nga-control mice group data by t-test (**p<0.01).

6) CD3+/CD69+ 세포 수에 미치는 영향

DLN에서의 CD3+/CD69+ 절대세포 수는 정상군은 $4.6 \pm 0.1 (\times 10^4)$, 대조군은 $14.0 \pm 0.9 (\times 10^4)$, CsA는 $7.2 \pm 1.2 (\times 10^4)$, GP 투여군에서는 $5.0 \pm 2.4 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 10).

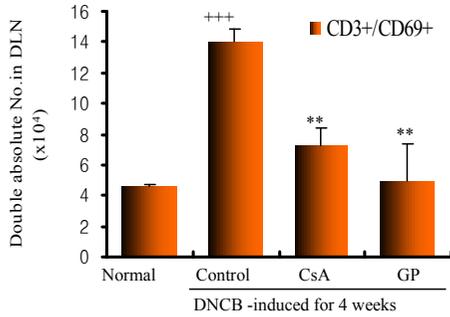


Fig. 10. Effect of GP extract on absolute cell number of DLN in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of GP (10.8 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice DLN ($\times 10^4$) were removed and absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometry. The results were presented by the mean \pm S.E. Statistically significant value compared with NC/Nga-normal mice group data by t-test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with NC/Nga-control mice group data by t-test (**p<0.01).

7) CD4+/CD25+ 세포 수에 미치는 영향

DLN에서의 CD4+/CD25+ 절대세포 수는 정상군은 $1.7 \pm 0.2 (\times 10^4)$, 대조군은 $5.0 \pm 0.5 (\times 10^4)$, CsA는 $2.4 \pm 0.01 (\times 10^4)$, GP 투여군에서는 $2.1 \pm 0.2 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (***) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 11).

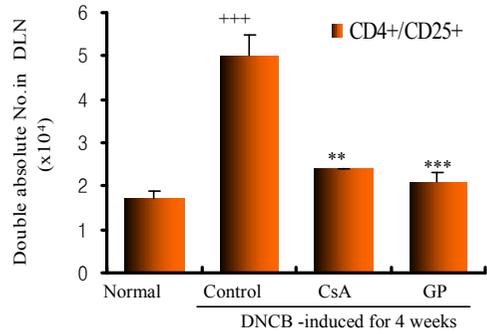


Fig. 11. Effect of GP extract on absolute cell number of DLN in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of GP (10.8 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice DLN ($\times 10^4$) were removed and absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometry. The results were presented by the mean \pm S.E. Statistically significant value compared with NC/Nga-normal mice group data by t-test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with NC/Nga-control mice group data by t-test (**p<0.01, ***p<0.001).

5. 비장세포 부유액내 IL-4, IFN- γ 생성량에 미치는 영향

Anti-CD3/CD28로 활성화된 비장세포내, IL-4 생성량은 정상군이 351.7 ± 18.1 (pg/ml), 대조군이 1042.5 ± 15.5 (pg/ml), CsA이 904.3 ± 2.7 (pg/ml), GP 투여군이 848.1 ± 16.3 (pg/ml)로, 대조군에 비하여 유의성 있는 (***) 감소 효과를 나타내었고, IFN- γ 생성량은 정상군이 170.9 ± 23.0 (pg/ml), 대조군이 326.1 ± 8.9 (pg/ml), CsA이 294.0 ± 2.2 (pg/ml), GP 투여군이 538.7 ± 26.4 (pg/ml)로, 대조군에 비하여 유의성 있는 (***) 증가로 효과적인 결과를 나타내었다 (Fig. 12).

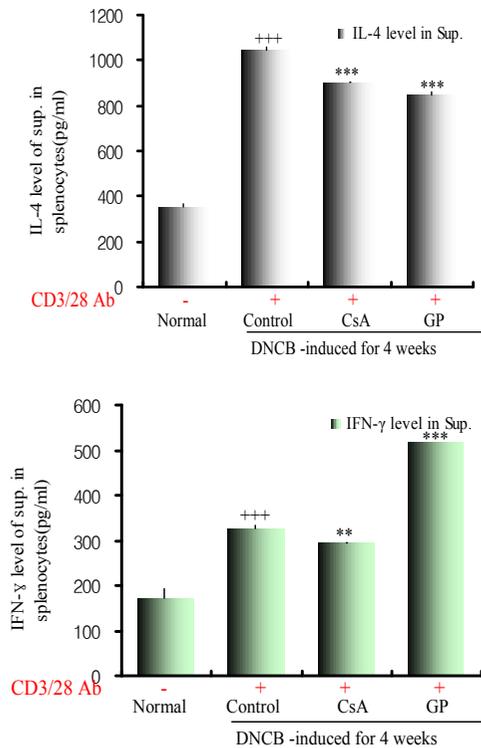


Fig. 12. Effects of GP on IL-4 and IFN- γ production in the culture supernatant of anti-CD3/CD28-stimulated splenocytes.

Splenocytes were stimulated with anti-CD3/CD28 antibodies for 2 days and the levels of IL-4 and IFN- γ were in the culture supernatant determined using commercially available ELISA kit. The results were presented by the mean \pm S.E. Statistically significant value compared with NC/Nga-normal mice group data by t-test ($+ + + p < 0.001$). Statistically significant value compared with NC/Nga-control mice group data by t-test ($**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

IV. 考 察

알러지성 접촉성 피부염은 습진성 피부염의 일종으로 항원 접촉시 72시간 이후 정도 비교적 늦

게 반응이 나타나므로 지연형 과민반응이라고 한다. 이 반응의 중추적인 세포는 T 세포로서 세포 매개형 과민반응이라고 한다.^{26,27)}

발생 기전은 1차 감작 단계와 2차 감작 단계로 구성되는데, 먼저 표피의 allergen은 hapten carrier protein conjugates를 형성하게 되고 이들은 Langerhan's 세포의 pinocytosis에 의하여 내포낭을 형성하게 된다. 내포낭은 MHC II complex가 세포표면에서 CD4+ T 세포를 인지하게 된다. T 세포의 TCR이 MHC/peptide complex를 인지하여 IL-2를 비롯한 IFN- γ , TNF- β 등의 cytokine이 방출되고, 이들에 의해 CD4+ T 세포와 CD8+ 세포의 면역 활성이 일어나게 된다. 이러한 면역세포로 인하여 각질 형성 세포 표면에 표면 부착 배위자를 생성하여 결국 monocyte/macrophage 계열이 혈관 밖으로 빠져 나오게 된다. 이러한 일련의 반응을 거치면서 염증 반응은 증폭이 되어 많은 백혈구가 병변부의 표피와 진피에 침윤하게 되며, 조직 손상을 야기 시켜 알러지성 접촉성 피부염을 유도하게 된다.^{28,29)}

먼저 면역 실험에 앞서 먼저 GP 추출물의 세포 독성과 간독성에 미치는 영향을 조사하였다. BALB/c 생쥐의 폐 조직에서 mouse lung fibroblast cells (mLFCs)을 분리하여 SRB 방법을 이용하여 세포독성을 측정한 결과, 실험에서 사용한 GP 추출물의 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 90% 이상의 세포생존율을 나타내었고 (Fig. 1), 동물에서의 ALT 수치는 정상군이 64.1 ± 0.8 (U/L), GP 투여군이 68.4 ± 1.2 (U/L)로, AST 수치에서는 정상군이 29.5 ± 0.5 (U/L), GP 투여군에서는 34.2 ± 1.1 (U/L)로 나타나 실험 약물에 의한 간 독성은 발견되지 않았다 (Fig. 2).

활성산소는 불포화지방산을 과산화지질 (Lipid peroxide: LPO)로 변형시켜 피부의 생성을 방해함과 동시에 피부를 손상을 유발한다. 그 결과 피부는 보호 기능을 잃게 되어 자극에 약해지며 세균의 감염도 용이하게 되어 피부염 발생의 원인으로 작용한다. 또한 활성산소는 불포화지방산의 변형뿐만 아니라 피부를 직접 공격함으로써 피부

염을 발생시키거나 더욱 악화시키는 역할을 하는 것으로 알려졌다³⁰⁻³²⁾. 본 실험에서는 본 시료의 산화적 손상에 대한 방어 작용을 검색하기 위하여 DPPH free radical 소거능과 superoxide dismutase (SOD) 유사 활성 효과를 확인하였는데, 모두 농도 의존적으로 증가함으로써(Fig. 3, 4), 유의적인 항산화 작용을 나타내었다.

동물 실험은 Scalf³³⁾의 실험 방법을 응용하여, 대표적인 haptan으로 작용하는 DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene)를 피부에 도포하여, 피부염을 유발하고, 8주간 GP (10.8 mg/25 g/day)를 경구 투여하여, 감염 부위에 모인 체액을 받는 배액 림프절 (Draining lymph node; DLN) 내 면역 세포들의 변화를 검색하였다. 아울러 면역 조절 작용의 한 축을 형성하고 있는 비장세포내 IL-4, IFN- γ 생성량을 검색하였다.

DLN은 대부분 미성숙한 T 세포와 B 세포가 머무는 곳으로³⁴⁾, 피부에 염증이 생기면 피부염 유발에 따른 면역세포가 과도하게 증가 한다. DNCB 유발에 따른 실험에서는 정상군이 $3.3 \pm 1.60 (\times 10^6)$ 일 때, 대조군은 $15.0 \pm 1.23 (\times 10^6)$, 양성대조군인 CsA는 $6.15 \pm 0.15 (\times 10^6)$, GP 투여군에서는 $4.8 \pm 0.30 (\times 10^6)$, 나타나 대조군에 비하여 면역세포의 과도한 증가를 유의적으로 (**p<0.01) 감소시켰다 (Fig. 5).

면역계는 각종 병원체의 침입에 대항하는 기관, 조직 및 세포들을 총칭하며 이러한 면역 체계를 조절하여 항상성을 유지하는데, 알러지 면역 반응을 결정하는데 있어 T cell은 중요한 인자로 알려져 있다. T 세포 중, CD4+ T 세포는 TH cell로 Th1 (helper T)과 Th2로 분화 활성화 되고, 여러 종류의 cytokine을 생산하여 B cell이 효율적으로 항체를 생산하도록 도와주며, 면역 반응의 행동세포를 활성화시키는 역할로 보고되어져 있다. Till³⁵⁾등의 연구에 따르면, 과거에는 T 세포 성숙 결핍설, CD8+ 억제와 T 세포의 수적 감소 등으로 알러지 유발에 대한 보고가 된 바 있었으나, 최근엔 CD4+ T 세포의 역할이 더욱 중요한 것으로 알려지고 있다. 즉, B 세포로부터 IgE의 생성을 유도하는 IL-4³⁶⁾, B 세포로부터

IgE의 생성을 촉진하는 IL-5³⁷⁾, IgE의 생성을 증폭시키는 IL-6³⁸⁾ 등을 분비하는 T 세포는 CD4+ T 세포 중 Th2 세포인데, 알러지 피부염 환자의 말초 혈액 및 피부 병변으로부터 분리한 항원특이 T 세포 클론이 Th2 로 밝혀졌고, 이 세포들에서 IL-4 등의 Th2 사이토카인이 분비된다는 사실이 입증되었다.

Christian 등³⁹⁾의 실험 방법을 응용하여, 본 실험에서는 DLN 내의 CD3+, CD4+, CD8+ 세포 수의 변화를 살펴보았는데, CD3+ 세포에서는 대조군은 $59.4 \pm 5.4 (\times 10^4)$, GP 투여군은 $29.1 \pm 2.8 (\times 10^4)$ 으로, CD4+ 세포에서는 대조군은 $47.0 \pm 4.8 (\times 10^4)$, GP 투여군은 $24.2 \pm 3.5 (\times 10^4)$ 로 나타났다. 또한 CD8+ 세포에서는 대조군은 $17.9 \pm 2.1 (\times 10^4)$, GP 투여군에서는 $7.5 \pm 1.7 (\times 10^4)$ 로 나타나, 각각 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.001, ***p<0.001, **p<0.01) 감소 효과를 나타내었다. 또한 활성화된 T 세포인 CD3+/CD69+ 세포에서도 역시 대조군은 $14.0 \pm 0.9 (\times 10^4)$, GP 투여군은 $5.0 \pm 2.4 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 6, 8, 9, 10).

Hakansson 등⁴⁰⁾의 연구에 따르면, B 세포의 표면에서 발현되는 CD19+ 는 B 세포의 분화 단계에서 발현된 후, 항체 생성 plasma B 세포 단계에서 소실되어진다고 알려져 있다. 본 실험에서 B세포인 CD19+ 세포 수는 대조군은 $84.8 \pm 4.0 (\times 10^4)$, GP 투여군은 $15.4 \pm 0.1 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.001) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 7). 또한 자가 면역 질환은 지속적으로 활성화된 수지상세포 (DC)나 항원제시세포 (APC)에 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 T 세포와 B 세포의 불균형을 나타낸다⁴¹⁾. 위의 대조군에서 T 세

포와 B 세포의 비율이 6 : 8.5, GP투여군에서는 5.8 : 3으로 나타나, T 세포가 항염증 작용에 의하여 면역세포 이동이 억제되어 T 세포와 B 세포의 불균형을 회복시킴을 알 수 있었다.

자연 발생에서 가장 대표적인 면역조절 T 세포는 흉선이 기원인 CD4+ 와 CD25+ 를 함께 발현하는 세로로 알려져 있다⁴²⁾. T 세포 중 면역 반응을 조절하는 CD4+/CD25+ regulatory T 세포는 대부분 잘못되거나 과도한 면역 반응을 줄여주는 세포로 자가 내성을 유지하는 데 중요하다. Pace 등⁴³⁾의 연구에 따르면, B세포의 분화 활성을 촉진하는 IL-4는 CD4+/CD25+ 와 같이 면역조절 T세포에 영향을 준다고 알려져 있다. 결과적으로 CD4+/CD25+ regulatory T 세포와 IL-4의 억제가 IgE의 억제로 이어져 자가 면역 반응과 같은 이상 면역반응을 억제하는 기능을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 본 실험에서 CD4+/CD25+ 세포 변화는 대조군은 $5.0 \pm 0.5 (\times 10^4)$, GP 투여군은 $2.1 \pm 0.2 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 ($***p < 0.001$) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 11).

IFN- γ 는 Th1 세포와 NK (natural killer) 세포에서 주로 분비되는 사이토카인으로, 세포 매개성 면역을 활성화시키고 대식세포를 활성화시켜 Th2 세포의 증식을 억제하고, 미성숙한 T 세포가 좀 더 직접적으로 Th1 세포로 분화되도록 유도한다고 보고되고 있다⁴⁴⁻⁴⁶⁾. 또한, IL-4와 IL-13에 의해 IgE 전환을 억제하며, T세포에서 생성되는 IgE는 IFN- γ 의 생산에 역비례 한다고 알려져 있다. IL-4는 조력 T세포, 호산구, 호염기구 및 비만 세포 등에서 생산하는 것으로 알려져 있다⁴⁷⁾. 본 실험에서는 anti-CD3/CD28로 활성화된 비장 세포내에서 IL-4 생성량을 살펴본 결과, 정상군은 351.7 ± 18.1 (pg/ml), 대조군은 1042.5 ± 15.5 (pg/ml), CsA는 904.3 ± 2.7 (pg/ml), GP 투여군에서는 848.1 ± 16.3 (pg/ml)로, 대조군에 비하여 유의성 있는 ($***p < 0.001$) 감소 효과를 나타내었고, IFN- γ 생성량은 정상군은 170.9 ± 23.0 (pg/ml), 대조군은 326.1 ± 8.9 (pg/ml), CsA 투여군은 294.0

± 2.2 (pg/ml), GP 투여군은 538.7 ± 26.4 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($***p < 0.001$) 증가를 나타내었다 (Fig. 12).

이상의 결과로 보아 加減平胃散은 피부 손상을 유발하고 더욱 악화시키는 인자중 하나인 활성산소에 대한 항산화 효능을 발휘함과 동시에, 림프절에서 전반적인 T 세포 활성화 억제와 더불어 B 세포의 균형을 회복시키는 방식으로 면역조절 작용을 발휘한 것으로 사료된다. 아울러 IFN- γ , IL-4 생성량을 감소시킴으로써, B 세포의 활성화와 IgE를 비롯한 면역글로블린의 생성을 억제시킬 수 있음을 시사하였다.

V. 結 論

加減平胃散의 항알러지 효능을 검색하기 위한 기초적 연구로써, 접촉성 피부염 질환 동물모델인 NC/Nga mice를 이용하여 배액림프절내 면역세포들의 변화와 비장세포내 사이토카인의 변화 및 산화적 손상에 대한 효과를 검색하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加減平胃散은 정상 세포인 mLFC에 대하여 모든 실험 농도에서 100% 생존율을 나타내었다.
2. 加減平胃散은 접촉성 피부염 유발 NC/Nga 생쥐의 혈 중 ALT, AST 수치를 정상범위로 유지시켰다.
3. 加減平胃散은 DPPH 소거능과 SOD 유사활성을 농도 의존적으로 증가시켰다.
4. 加減平胃散은 접촉성 피부염 유발 NC/Nga 생쥐의 DLN 내 총 면역 세포수를 유의성 있게 감소시켰다.
5. 加減平胃散은 접촉성 피부염 유발 NC/Nga 생쥐의 DLN 내 CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD3+/CD69+, CD4+/CD45+ 세포수를 유의성있게 감소시켰다.
6. 加減平胃散은 접촉성 피부염 유발 NC/Nga

생쥐의 splenocytes에서 IL-4 생성량은 유의성있게 감소시킨 반면, IFN- γ 생성량은 유의성있게 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 加減平胃散의 면역조절 작용을 통한 항알러지 효능이 인정되어 항 후 다양한 약물 가감을 통하여 濕盛의 접촉성 피부염에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 홍창의. 소아과학. (주)대한교과서: 1124-1128. 2003.
2. 김형민. 면역과 알레르기. 신일상사: 234-241. 1998.
3. 김세종. 면역학. 고려의학: 260-265. 1994.
4. 김덕곤, 김윤희, 김장현, 박은정, 백정환, 이승연, 이진용, 장규태. 東醫小兒科學. 도서출판정담. 660-664. 2002.
5. Cooper K. D. Atopic dermatitis : Recent trends in pathogenesis and therapy. J Invest Dermatol. 102:128-137. 1994.
6. Leung DYM. Atopic dermatitis. new insights and opportunities for therapeutic intervention. J Allergy Clin Immunol. 105:860-876. 2000.
7. 강석형. 알레르기 질환의 진단과 치료. 일호각. pp253-264. 1993.
8. 대한 미생물학회. 의학 비생물학. 제 2권 서홍출판사. pp250-273. 1997.
9. 한피부과학회. 피부과학 개정3판 여문각. pp53-69, 123-132. 1994.
10. 안성구, 이승현, 박윤기. 흔히 보는 피부질환, 고려의학. pp13-18. 1993.
11. 이기영. 알레르기의 진료, 서울, 한국의학사. pp313-315, 502-526. 1992.
12. Daniel P. Stites. Basic & Clinical immunology, 8th ed, appleton & lange. pp363-365. 1994.
13. Eli Benjamini, Geoffrey Sunshin, Sidney Leskowitz. Immunology, CRC Press. p.11, 50, 54, 55, 149, 184. 1995.
14. Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David Male. Immunology, 4th Ed. pp25.1-25.11. 1996.
15. Smith KA. Interleukin-2: Inception, impact, and implications. Science 240:1169-1176. 1988.
16. Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, et al. Structure and Expression of a cloned cDNA for interleukin-2. Nature. 302: 305-310. 1983.
17. Pooenheim JJ, Kovacs EJ, Matsugima K, Durum SK. There is more than one interleukin 1. Immunol Today. 136: 143-155. 1986.
18. March CJ, Mosley B, Larsen A, et al. Cloning sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. Nature. 315:641-647. 1985.
19. Kluger MJ, Oppenheim JJ, Powanda NC. The Physiologic, Metabolic and Immunologic Actions of Interleukin 1. Alan R Liss, New York. 1986.
20. Gillis S, Ferm MM, Ou W, Smith KA: T cell growth factor. parameters of production and a quantitative microassay for activity. J Immunol. 120:2027-2033. 1978.
21. 서울대학교 의과대학교 약리학교실 : 약리학, 고려의학. p780, pp708-709. 1994.
22. A. I. Lauerma, B.D. Homey, C.H. Lee, E. Bloom, H.I Maibach. Topical FK506 suppression of allergic and irritant contract dermatitis in the guinea pig, Arch. Dermatol. Res., 286:337-340. 1994.
23. J. John Chhen. Glucocorticoids. Encyclo.

- Immunol., Academic press Inc. pp616-617. 1992.
24. Monte S.Meltzer. Role of Macrophages and dendritic cell in contact dermatitis Am. J. Contact Dermatitis. 5(2):76-83. 1994.
25. T.Tachibana, K.I. Toda, F. Furukawa, S. Taniguchi, S. Imamura. Histamine metabolism in delayed type hypersensitivity-Comparative analysis with cellular infiltrates, Arch Dermatol Res. 282:217-222. 1990.
26. Daniel P. Stites. Basic & Clinical Immunology, 8th ed, Appleton & Lange. pp. 363-365. 1991.
27. Eli Benjamini, Geoffrey Sunshine, Sidney Leskowiz. Immunology A Short Course, 3rd ed, Wiley-Liss, Inc. pp299-306, 1996.
28. J.L. Rees, P.S. Friedmann, J.N.S. Matthews. The influence of area of application on sensitization by dinitrochlorobenzene, British. Foun. Dermato. 122:29-31, 1990.
29. Monte S. Meltzer. Role of Macrophages and Dendritic Cell in Contact Dermatitis, Am. J. Contact Dermatitis. 5(2):76-83, 1994.
30. Geronikaki AA, Gavalas AM. Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. Comb Chem High Throughput Screen. Jul;9(6):425-42. 2006.
31. Sebban H, Courtois G. NF-kappa B and inflammation in genetic disease. Biochem Pharmacol. Oct 30;72(9): 1153-60. 2006.
32. Franklin PJ, Turner SW, Le Souef PN, Stick SM. Exhaled nitric oxide and asthma complex interactions between atopy, airway responsiveness, and symptoms in a community population of children.
33. Scalf LA, Shenefelt PD. Contact dermatitis. diagnosing and treating skin conditions in the elderly. Geriatrics. Jun. 62(6):14-9. 2007.
34. 김성영 외 13. 면역학, 라이프사이언스. pp13-19. 2006.
35. 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.
36. Renz, H, K Jujo, K. L. Bradley, J Domenico, E. W. Gelfand, and D. Y. M. Leung. Enhanced IL-4 Production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon- γ , J. Invest. Dermatol. 99:403. 1992.
37. Kay, A B., S. Ying, V. Vamey, M. Gaga, S. R Durham, R. Moqbel, A.J. Wardlaw, and Q. Hamid. 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. 1991.
38. Nobuyuki Sudo, Xiao-Nian Yu, Chiharu Kubo. Dehydroepiandrosterone attenuates the spontaneous elevation of serum IgE level in NC/Nga mice, Immunology Letters 79:177-9. 2001.
39. Christian Vestergaard, Hiroyuki Yoneyama, Masako Murai, Kohichiro

- Nakamura, Kunihiko Tamaki, Yuya Terashima, Toshio Imai, Osamu Yoshie, Tatsuro Irimura, Hitoshi Mizutani, and Kouji Matsushima. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis like lesions. *The Journal of Clinical Investigation*. October. 104(8): 1097-1105. 1999.
40. Hakansson L, Heinrich C, Rak S, Venge P. Activation of B-lymphocytes during pollen season. Effect of immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. Jul;28(7):791-8. 1998.
41. Romagnani S. Immunologic influences on allergy and the Th1/Th2 balance. *J Allergy Clin Immunol*. 113:395-400. 2004.
42. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev*. Aug; 182:58-67. 2001.
43. Pace L, Pioli C, Doria G. IL-4 modulation of CD4+CD25+ T regulatory cell-mediated suppression. *J Immunol*. Jun 15;174(12):7645-7653. 2005.
44. Grassegger A, Hopfl R. Significance of the cytokine interferon gamma in clinical dermatology. *Clin Exp Dermatol*. 29(6):584-588. 2004.
45. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 75(2):1163-1189. 2004.
46. Chang TT, Stevens SR. Atopic dermatitis : the role of recombinant interferon-gamma therapy. *Am J Clin Dermatol*. 3(3):175-183. 2002.
47. 대한 소아알레르기 및 호흡기학회. 소아 알레르기 호흡기학: 군자출판사. 10-18. 2005.