

아토피 피부염에 대한 黃土加味方과 紫草複合方 겸용 연구

하여태·최학주·김선빈·김동희*

A Study on Combination of Topical Jachobokhabbang(JBB) and Internal Hwangtogamibang(HTGMB) for the Treatment of Atopic Dermatitis

Ha Yo-Tae, Choi Hak-Joo, Gim Seon-Bin, Kim Dong-Hee

Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

In order to investigate the efficacy of a combination of JBB as topical and HTGMB as internal treatment method, changes in various immune related factors and histological changes in NC/Nga induced animal model was studied. Combined treatment of topical JBB and internal HTGMB significantly reduced the atopic dermatitis clinical index, the number of immune cells such as CD19+, CCR3+, B220+/IgE+, and Gr-1+/CD11b+ in DLN and dorsal skin, compared to the control group. Otherwise increased CD3+, CD4+/CD25+, CD8+ and CD4+ cells in the DLN. And also combined treatment of topical JBB and internal HTGMB suppressed the lymphocytes and mast cells from infiltrating into the skin tissues when stained with H&E and toluidine blue. Based on the results above, it is strongly suggested that the combined treatment of topical JBB and internal HTGMB significantly induced anti-allergic activities through immune modulation. The findings can be applied to developing a more sustainable treatment for atopic dermatitis and be helpful in practicing combined treatments in clinical treatments in the future.

Key words : Jachobokhabbang, Hwangtogamibang, Atopic Dermatitis.

I. 緒 論

아토피피부염(AD)은 본래 유아기, 소아기에 발현되는 습진성 피부병이었으나, 최근 소아, 성인 모두에 걸쳐 발생률이 점차 높아지면서 사회적으로 문제시 되고 있다¹⁻³⁾.

AD는 소양감을 동반한 습진이 주증으로, 환자의 대부분이 IgE 항체를 생산하기 쉬운 요인이 존재하여 기관지천식, 알레르기성 비염, 결막염 등과 동반되는 경향이 있다⁴⁻⁷⁾.

AD 치료법은 주로 원인과 악화 인자의 제거, 스킨케어 및 약물 요법 등이 있으며, 다용되는 약물 요법으로는 염증에 대한 스테로이드 외용제와 연고, 외용 보습제 그리고 습진에 대한 항히스타민제와 항알레르기 약 등이 있다⁸⁻¹⁰⁾.

* 대전대학교 한의과대학 병리학교실
· 교신저자 : 김동희 · E-mail : dhkim@dju.kr

서양의학에서 사용하는 모든 질병의 명칭에 대한 한의학적 해석은 대부분 발현되는 증상과 부위에 준하여 ‘범주’라는 용어로 기술된다. AD 역시 瘙癢感, 紅斑, 浮腫, 滲出物, 鱗屑, 痂皮 및 苔癬化 증상과 안면, 관절 접합부, 전신 등의 발현 부위에 따라 ‘濕疹’, ‘濕瘡’, ‘奶癬’, ‘浸淫瘡’, ‘痒風’, ‘胎熱’, ‘血風瘡’, ‘四彎風’, ‘旋耳瘡’ 등의 범주로 표현¹¹⁻¹⁵⁾된다.

이에 대한 임상적 연구로 신¹⁶⁾은 ‘升葛湯’을, 유¹⁷⁾는 ‘內消和中湯加味方’을 사용하여 한의학적 치료가 매우 유의성이 있음을 보고한 바가 있으며, 임¹⁸⁾은 “아토피피부염 환자의 사상체질별 임상 특징에 관한 연구”를 통하여 체질적 접근에 따른 치료율 제고를, 윤¹⁹⁾은 “한의학적 임상 분류 및 치료”를 통하여 한의학적 변증 치료에 대한 특색을 보고한 바가 있다. 아울러 최근 보다 유의성 있는 치료 처방²⁰⁻²²⁾, 약물²³⁻²⁵⁾ 및 약침²⁶⁾ 개발과 더불어 기존 임상 활용 처방의 EBM 구축을 위한 다양한 실험적 연구가 진행되고 있으며, 문헌적 연구로 박²⁷⁾은 “아토피 피부염의 동서의학적 문헌 고찰”을 통하여 정의, 병인, 병기 및 치법을 비교 고찰하면서 한의학적 치료의 당위성을 주장하였다.

본 논문에서는 임상에서 다양한 외치법이 개발되어 사용되고 있다는 점과 과거 많은 피부 질환에서 내·외치법이 겸용되었다는 점에서 내·외치 겸용에 대한 실험적 연구를 진행하였다. 현재 내·외치 병용에 대한 실험적 보고²⁸⁻³⁰⁾는 소수에 불과한 실정이고, 내복약인 黃土加味方과 외용약인 紫草複合方에 대한 겸용 효과에 대한 연구는 보고된 바가 없다. 이에 본 실험에서는 임상에서 활용되는 내·외치 겸용 치료 효과를 객관적으로 규명하고자 AD와 유사한 병태를 나타내는 NC/Nga 병태 모델을 통하여 다양한 면역 관련 인자들의 변화와 조직학적 변화를 측정하였다.

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

2) 약물

본 실험의 外治에 사용한 紫草複合方 (Jacobokhabbang, 이하 JBB로 표기함)과 內治에 사용한 黃土加味方 (Hwangtogamibang, 이하 HTGMB로 표기함)의 구성 약재 중 청매는 경남 초록매실농장, 붕어는 청호농산, 주정은 대한주정관매(주)에서 구입하였고, 기타 나머지 약재들은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 그 내용과 분량은 다음과 같다. (Table 1, Table 2)

Table. 1 The Prescription of JBB (1첩)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
魚腥草	Houttuyniae Herba	8
蛇 莓	Duchesnea Indica	8
紫 草	Lithospermi Radix	8
苦 參	Sophorae Flavescentis Radix	6
蕎 麥	Fagopyrum esculentum Moench	6
石 膏	Gypsum	6
松 脂	Resina Pini	6
青 梅	Mume Fructus	6
沙 參	Adenophorae Radix	6
白鮮皮	Dictamni Radicis Cortex	6
地膚子	Kochiae Fructus	6
Total amount		72

II. 實 驗

1. 재료

1) 동물

Table. 2 The Prescription of HTGMB (1첩)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
人參	Ginseng Radix	20
鯽魚	Carassius auratus	20
黃土	Loess	10
昆布	Laminaria japonica	4
紫草	Lithospermi Radix	4
桔梗	Platycodi Radix	4
魚腥草	Houttuyniae Herba	4
蛇莓	Duchesnea hrysantha	4
枳殼	Aurantii Fructus	2
生薑	Zingiberis Rhizoma Crudus	2
Total amount		74

3) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 collagenase, trypsin-EDTA, acetic acid, tris- base, tris-HCl, paraformaldehyde, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 등은 Sigma사 (USA) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (USA) 제품을, DMEM은 Gibco사 (USA) 제품을, Protopic Ointment 0.1%는 Astellas Pharma Manufacturing사 (USA) 제품을, Biostir AD는 Biostir사 (Japan) 제품을, anti-CD19-FITC, anti-CD3-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD4-FITC, anti-CD69-FITC, anti-B220-PE, anti-IgE-FITC, anti-CCR3-PE, anti-CD11b-FITC, anti-Gr-1-PE 등은 BD-Pharmingen사 (USA) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 황토약탕기 (알파세라믹약탕기, Korea), 감압 증류장치 (Rotary evaporator, Büchi B-480, Switzerland), microwave oven (LG, Korea), freeze dryer (EYELA F

DU-540 Co., Japan), CO2 incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo Co., Japan), water bath (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-line Co., USA), vortex mixer, heating block (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan), centrifuge (한일, Korea), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), flow cytometer (Becton Dickinson, USA), Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

HTGMB 1제 분량에 물 (맥반석 + 삼다수) 8,000 ml를 가하여 황토 약탕기에서 3시간 추출하여 얻은 액 중 240 ml를 여과하여, 감압 증류장치로 농축하였다. 농축액을 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 18.0 g을 냉동 보관 (-80℃) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

JBB는 위와 동일한 방법으로 추출하여 얻은 액을 120 ml씩 파우치로 포장하여 4℃ 냉장보관하면서, 필요량만큼을 여과하여 사용하였다.

2) Biostir AD 연고를 이용한 피부염 유도

8 주령 NC/Nga 생쥐를 ether로 마취시킨 후 등 부위 및 목 뒷부분을 제모 후 VEET 제모크림 100 mg을 동일한 부위에 도포하여 등 부위 남은 잔털을 깨끗이 제거하고 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 4% SDS 용액 150 µl를 스프레이 하고 2~3시간 정도 완전히 건조시킨 후 Biostir AD연고 100 mg를 도포하였다. 피부염 유발은 주 2회씩 4주 동안 총 8회 도포하였으며, 3주째부터는 약물 구강 투여와 외치 약물 분무를 함께 시작하였다.

3) 시료 처리

실험은 4개 그룹으로 나누고 양성대조군은 0.1% Protopic 연고 100 mg를 피부염 유발 부위에 5주간 매일 도포하였으며, HTGMB과 JBB 처리군 (이하, J&H로 표기함)은 HTGMB을 7.5 mg /25 g/day의 농도로 경구투여하고, JBB는 약물 : 맥반석물을 3 : 1 의 비율로 섞어 1일 3회 150 μ l씩 분무를, 5주간 병행하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 위와 동일한 방법으로 시행하였다.

4) 관능 평가

약물 처리 후 5주에 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법으로 관능평가를 실시하였다. 평가 항목은 홍반 (Erythema), 가려움과 건조 피부 (Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종 (Edema & Hematoma), 긁힘 (Excoriation), 태선화 (Lichenification)로 5가지이다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하여 평가한 점수의 총 합으로 나타내었다.

5) 피부와 DLN에서 면역세포 분리

실험 종료 후 Biostir AD 연고로 유발된 NC/Nga 생쥐에서 배부 일정량의 피부 조직을 잘게 chopping 한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37 $^{\circ}$ C shaker (140 rpm, 20min.) 배양기에서 배양하여 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이들 세포들에 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃ in 1L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 cell strainer를 통과 시킨 세포를 0.04% trypan blue로 염색하였다.

DLN 내 총 면역 세포 수 측정은 목과 앞다리 및 뒷다리 안쪽에서 림프절을 떼어 mesh를 통해 분리한 다음, 여기에 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃ in 1L of demineralized water +

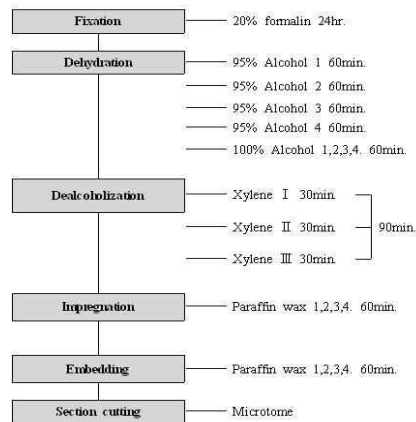
0.1 mM EDTA)을 가한 후 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 cell strainer를 통과 시킨 세포를 0.04% trypan blue로 염색하였다.

6) 형광 유세포 분석

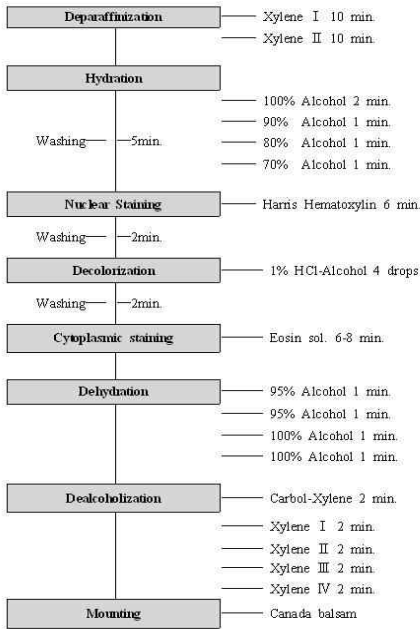
분리한 세포를 5 \times 10⁵ cells/ml의 농도로 조정 후 4 $^{\circ}$ C에서 면역형광염색을 실시하였다. 각각에 anti-CD19-FITC, anti-CD3-PE, anti-CD8-FITC, anti- CD4-FITC, anti-CD69-FITC, anti-B220-PE, anti-IgE-FITC, anti-CCR3-PE, anti- CD11b-FITC, anti-Gr-1-PE을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세하고 flow cytometry를 이용하여 측정하고 분석하였다.

7) 조직 검사

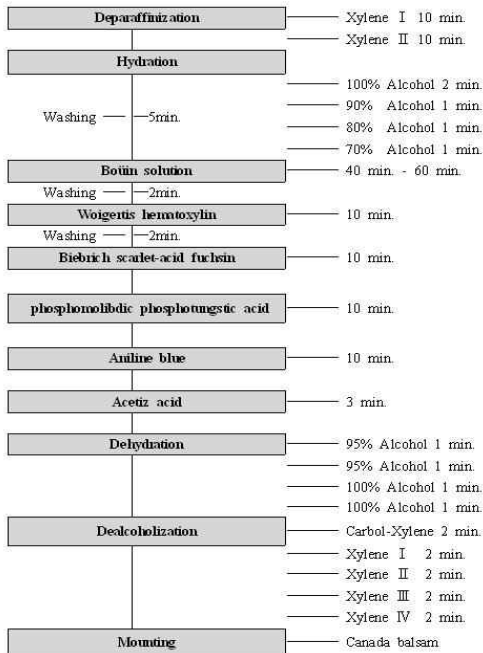
실험 종료 후에, 왼쪽 귀 끝부분, 배부 목 부분의 피부를 떼어내어 10% formaldehyde에서 24시간 고정하였다. 고정이 끝난 조직을 파라핀으로 포매하였고, 5 μ m 부분의 두께로 block을 만들었다. 이를 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils/eosinophil 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline/eosin (H&E) 염색과 비만세포 (mast cells)를 염색하는 toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤을 관찰하였다.



Scheme 1. Tissue processing



Scheme 2. Harris Hematoxylin & Eosin staining



Scheme 3. Masson's Trichrome staining

8) 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. NC/Nga 생쥐의 피부염 지수에 미치는 영향

8주령의 NC/Nga 생쥐를 제모한 후 Biostir AD 연고를 도포하여 피부염을 유발시키면서 10주령부터는 JBB 도포와 HTGMB 구강 투여를 동시에 실시하였다. 피부염 유발 시점인 8주부터 실험 종료 시점인 14주까지 2주 간격으로 피부염의 심화 정도를 관능적 방법에 의하여 측정하였으며, Fig. 1 은 8주령부터 14주령까지의 대조군과 J&H 투여군의 피부염 유발 정도와 개선 정도를 나타내주는 사진으로, 최종 14주령에는 J&H 투여군은 대조군에 비해서 피부염이 현저하게 개선되었음을 확인할 수 있다. 피부손상 정도 지표 (Clinical skin severity score)는 8주에 대조군과 양성 대조군 그리고 J&H 투여군은 각각 1.83 ± 0.41 , 10주에는 5.83 ± 0.98 , 5.80 ± 1.10 , 5.17 ± 0.98 , 12주에는 11.40 ± 0.89 , 8.00 ± 0.71 , 7.67 ± 1.03 이며, 최종 14주에는 10.20 ± 1.10 , 4.20 ± 1.64 , 1.83 ± 0.75 로 나타나 임상적 육안 평가에서 12주부터 대조군에 비하여 유의성 (**p<0.01) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 2).

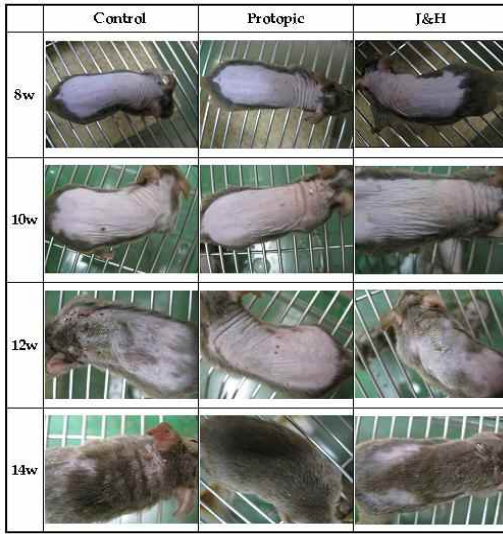


Fig. 1. Comparison of skin manifestation in NC/Nga mice between Control and J&H. Atopic dermatitis was induced by Biostir AD treatment in the dorsal skin.

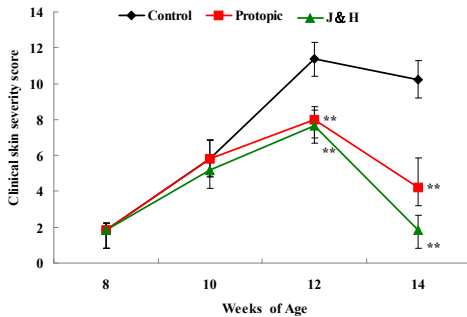


Fig. 2. Effects of J&H on clinical skin features and severity in Biostir AD-induced NC/Nga mice. Clinical skin index of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe) for each of five signs and symptoms (itch, erythema/hemorrhage, edema, excoriation/erosion and scaling/dryness); Symptoms were evaluated by skin dryness, eruption and wound on the three parts of the body; ear, face and back. Statistically significant value was calculated by being compared with control group by student's t-test (**p<0.01).

2. 조직 변화에 미치는 영향

J&H 투여가 피부 조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험 종료 후 귀와背部의 피부 일부를 채취하여 H&E 염색과 toluidine blue 염색을 실시하였다. H&E 염색을 한 대조군의 귀 조직은 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, 백혈구의 침윤도 관찰된 반면 (Fig. 3B, upper panel), J&H 투여군은 epidermis와 dermis의 두께 및 백혈구의 침윤이 상대적으로 감소하였다 (Fig. 3D, upper panel). 비만세포 (mast cell)를 염색하는 toluidine blue 염색에서는 대조군 (Fig. 4B, upper panel)의 dermis 주변에 비만세포가 많이 침윤된 반면, J&H 투여군은 상대적으로 대조군에 비하여 비만세포의 침윤이 감소되었다 (Fig. 4D, upper panel). 피부 조직에서도 J&H 투여군은 dermis /epidermis의 두께와 침윤된 백혈구의 수가 대조군에 비하여 감소하였으며 (Fig. 3D, lower panel), 피부 조직 내 비만세포의 침윤 역시 감소하였음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4D, lower panel).

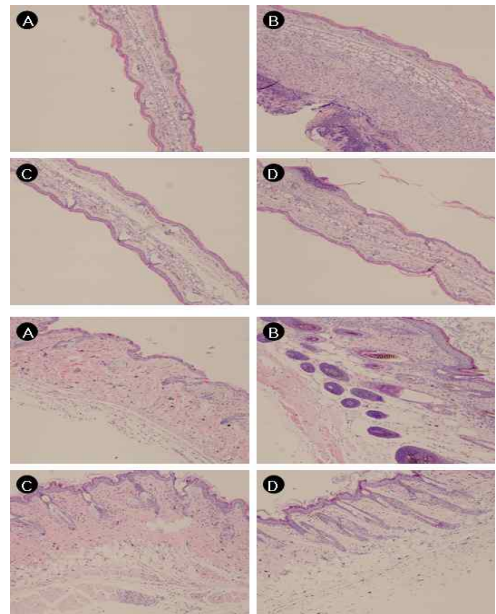


Fig. 3. Histologic examination of ear and dorsal skin lesion in Biostir AD-induced

NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of J&H (JBB spray & HTGMB administration) for 5 weeks. Ear and dorsal skin biopsies were stained with hematoxylin and eosin (H&E) (A; normal, B; control, C; Protopic, D; J&H) for examining inflammatory cells. The stained tissues were observed by bright microscopy (Nikon, Japan, original magnification, x100).

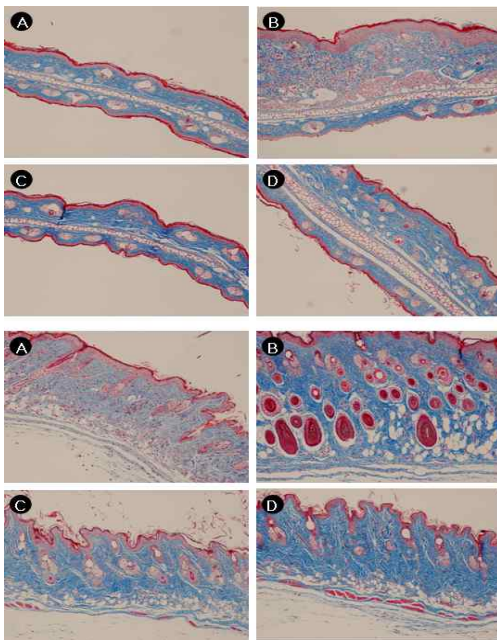


Fig. 4. Ear and dorsal skin biopsies were stained with toluidine blue in Biostir AD-induced NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of J&H (JBB spray & HTGMB administration) for 5 weeks. Ear and dorsal skin biopsies were stained with toluidine blue (A; normal, B; control, C; Protopic, D; J&H) for examining mast cells. The stained tissues were observed by bright microscopy (Nikon, Japan, original magnification, x100).

3. 면역 세포군의 변화에 미치는 영향

1) DLN 내 총 면역세포 수에 미치는 영향

정상군은 $44.5 \pm 4.9 (\times 10^5)$, 대조군은 $26.5 \pm 2.1 (\times 10^5)$ 로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 ($+p < 0.05$) 감소를 나타내었고, Protopic 투여군은 $33.5 \pm 2.1 (\times 10^5)$, J&H 투여군은 $38.0 \pm 2.8 (\times 10^5)$ 로 나타나 대조군에 비하여 J&H 투여군에서 유의성 있는 ($*p < 0.05$) 증가를 나타내었다.

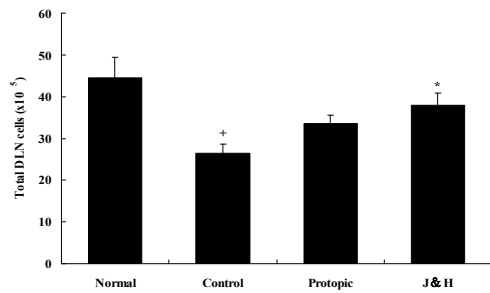


Fig. 5. Effect of J&H on total cell number of DLN in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of J&H (JBB spray & HTGMB administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the mice DLN were removed and total cell were measured. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($+p < 0.05$). Statistically significant value was calculated by being compared with control group by student's t-test ($*p < 0.05$).

2) 배부 피부(Dorsal skin) 내 총 면역세포 수에 미치는 영향

정상군은 $23.0 \pm 5.7 (\times 10^4/g)$, 대조군은 $112.0 \pm 5.7 (\times 10^4/g)$ 으로 나타나, 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p < 0.01$) 증가를 나타내었다. 이에 비해 Protopic 투여군은 $43.0 \pm$

7.1 ($\times 10^4/g$), J&H 투여군은 58.5 ± 3.5 ($\times 10^4/g$)로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 (** $p < 0.01$) 감소를 나타내었다 (Fig. 6).

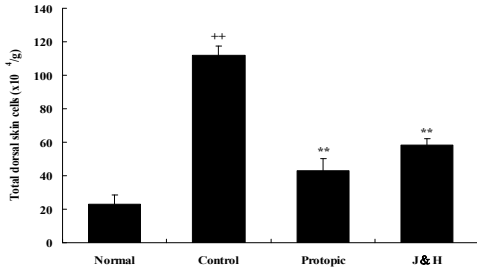


Fig. 6. Effect of J&H on total cell number of dorsal skin in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of J&H (JBB spray & HTGMB administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the mice dorsal skin were removed and total cell were measured. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by being compared with normal group by student's t-test ($++p < 0.01$). Statistically significant value was calculated by being compared with control group by student's t-test (** $p < 0.01$).

4. DLN 내 면역세포 변화에 미치는 영향

1) CD19+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 19.6 ± 1.4 (%), 대조군은 29.1 ± 5.4 (%), protopic 투여군은 21.7 ± 1.4 (%), J&H 투여군은 22.2 ± 3.7 (%)로 각각 나타나 대조군에 비하여 감소를 나타냈다 (Fig. 7).

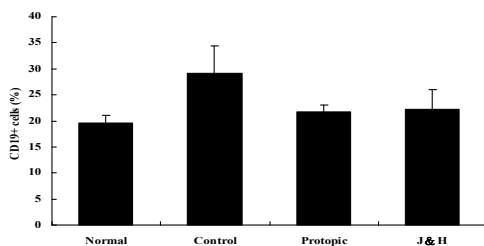


Fig. 7. Effect of J&H on CD19+ cell rate of DLN in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of J&H (JBB spray & HTGMB administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from DLN stained with anti-CD19+ and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E.

2) CD3+ 세포 비율에 미치는 영향

CD3+ 세포 비율은 정상군은 78.7 ± 6.6 (%), 대조군은 67.9 ± 5.6 (%)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 감소하였고, protopic 투여군은 73.3 ± 1.5 (%), J&H 투여군은 75.7 ± 2.2 (%)로 나타나 대조군에 비하여 증가를 나타냈다 (Fig. 8).

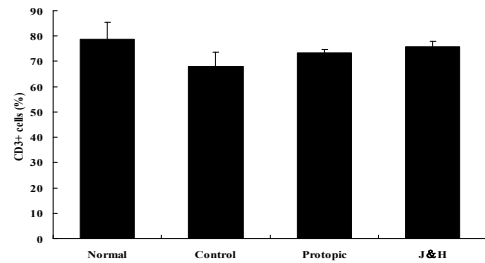


Fig. 8. Effect of J&H on CD3+ cell rate of DLN in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of J&H (JBB spray & HTGMB administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from DLN stained with anti-CD3+ and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E.

3) CD8+ 세포 비율에 미치는 영향

CD8+ 세포 비율은 정상군은 19.9 ± 0.2 (%), 대조군은 10.8 ± 0.5 (%)으로 나타나 대조군에

서 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 감소를 나타내었고, protopic 투여군은 14.2 ± 1.4 (%), J&H 투여군은 18.1 ± 0.1 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($*p<0.05$, $**p<0.01$) 증가를 나타냈다 (Fig. 9).

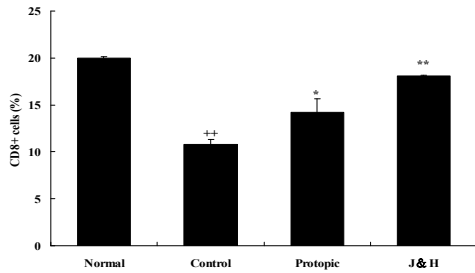


Fig. 9. Effect of J&H on CD8+ cell rate of DLN in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of J&H (JBB spray & HTGMB administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from DLN stained with anti-CD8+ and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by being compared with normal group by student's t-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by being compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$, $**p<0.01$).

4) CD4+ 세포 비율에 미치는 영향

CD4+ 세포 비율은 정상군은 31.4 ± 1.2 (%), 대조군은 22.7 ± 2.2 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.05$) 감소를 나타내었고, protopic 투여군은 29.9 ± 0.0 (%), J&H 투여군은 29.3 ± 0.7 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($**p<0.01$, $*p<0.05$) 증가를 나타냈다 (Fig. 10).

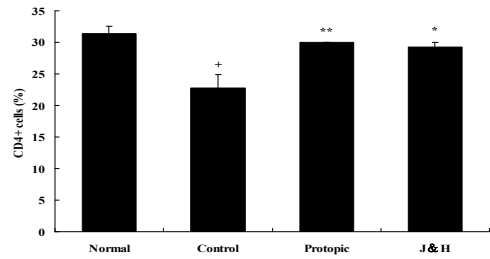


Fig. 10. Effect of J&H on CD4+ cell rate of DLN in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of J&H (JBB spray & HTGMB administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from DLN stained with anti-CD4 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by being compared with normal group by student's t-test ($+p<0.05$). Statistically significant value was calculated by being compared with control group by student's t-test ($**p<0.01$, $*p<0.05$).

5) CD4+/CD25+ 세포 비율에 미치는 영향

CD4+/CD25+ 세포 비율은 정상군은 3.9 ± 0.4 (%), 대조군은 2.3 ± 0.4 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.05$) 감소를 나타내었고, protopic 투여군은 3.7 ± 0.5 (%), J&H 투여군은 2.7 ± 0.1 (%)로 나타나 대조군에 비하여 protopic 투여군에서만 유의성 있는 ($*p<0.05$) 증가를 나타냈다 (Fig. 11).

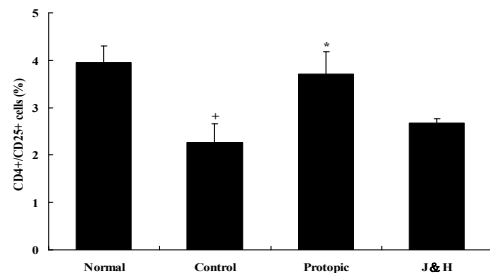


Fig. 11. Effect of J&H on CD4+/CD25+ cell rate of DLN in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of J&H (JBB spray & HTGMB administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from DLN stained with anti-CD4 and anti-CD25 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by being compared with normal group by student's t-test ($+p<0.05$). Statistically significant value was calculated by being compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$).

5. 배부 피부 (Dorsal Skin) 내 면역세포 변화에 미치는 영향

1) CCR3+ 세포 비율에 미치는 영향

CCR3+ 세포 비율은 정상군이 5.5 ± 0.2 (%), 대조군은 17.7 ± 2.5 (%)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.01$) 증가를 나타내었고, Protopic 투여군은 8.9 ± 0.9 (%), J&H 투여군은 7.8 ± 2.8 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($*p<0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 12).

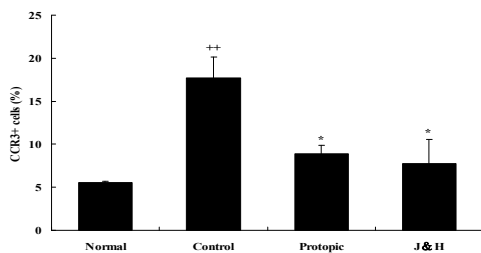


Fig. 12. Effect of J&H on CCR3+ cell rate of dorsal skin in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of J&H (JBB spray & HTGMB administration)

for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from skin stained with anti-CCR3 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by being compared with normal group by student's t-test ($+p<0.01$). Statistically significant value was calculated by being compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$).

2) B220+ /IgE+ 세포 비율에 미치는 영향

B220+ /IgE+ 세포 비율은 정상군이 2.4 ± 0.3 (%), 대조군은 5.4 ± 0.5 (%)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.05$) 증가를 나타내었고, Protopic 투여군은 3.0 ± 0.9 (%), J &H 투여군은 3.4 ± 0.5 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($*p<0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 13).

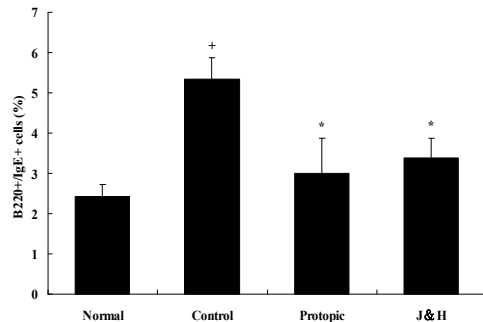


Fig. 13. Effect of J&H on B220+ /IgE+ cell rate of dorsal skin in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of J&H (JBB spray & HTGMB administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from skin stained with anti-B220 and anti-IgE and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by being compared with normal

group by student's t-test ($+p<0.05$). Statistically significant value was calculated by being compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$).

3) Gr-1+/CD11b+ 세포 비율에 미치는 영향

Gr-1+/CD11b+ 세포 비율은 정상군이 3.7 ± 0.4 (%), 대조군은 12.1 ± 0.7 (%)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+++p<0.01$) 증가를 나타내었고, Protopic 투여군은 5.9 ± 2.5 (%), J&H 투여군은 4.9 ± 0.1 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($*p<0.05$, $***p<0.001$) 감소를 나타내었다 (Fig. 14).

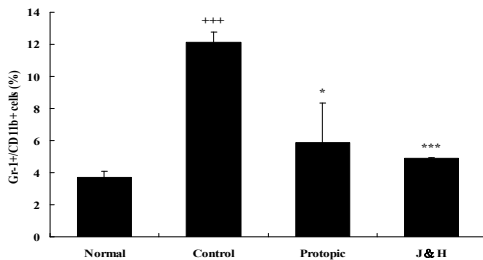


Fig. 14. Effect of J&H on Gr-1+/CD11b+ cell rate of dorsal skin in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of J&H (JBB spray & HTGMB administration) for 5 weeks. At the end of the experiment, the cells from skin stained with anti-Gr-1 and anti-CD11b and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by being compared with normal group by student's t-test ($+++p<0.001$). Statistically significant value was calculated by being compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$, $***p<0.001$).

IV. 考 察

아토피피부염(AD)은 각질층의 이상에 의한 피부 건조와 피부 배리어 기능 장애라고 하는 피부의 생리학적 이상을 동반한 다수의 비특이적 자극과 특이적 알레르겐 관여로 발생한다^{31, 32}.

약물 치료는 주로 염증에 대한 스테로이드 외용제와 연고, 외용 보습제 그리고 습진에 대한 항히스타민제와 항알레르기약 등이 사용되고 있으나³³⁻³⁵, 대증 치료에 한정되어 근본적인 치료에는 한계가 있다.

면역학적으로 AD는 혈중의 IgE와 호산구수가 매우 증가하며^{36, 37}, helper T cell I형 (Th1)과 helper T cell II형 (Th2)의 균형이 Th2 세포로 크게 기울어져 일어난다. Th1 세포는 IFN- γ , IL-2, TNF- β 등의 사이토카인을 생산하고 세포성 면역을 유도한 반면, Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인을 생산하고 체액성면역을 유도하는데, 이 중 IL-5는 B세포의 항체 생산능을 상승시킴과 동시에 호산구의 분화를 유도한다. 따라서 Th2형 사이토카인의 상승은 알레르기 질환의 특징인 혈중의 IgE 수치와 호산구 수치 상승을 유도하게 된다³⁸⁻⁴⁰.

한의학에서 AD는 ‘濕疹’, ‘奶癬’, ‘浸淫瘡’, ‘胎熱’, ‘血風瘡’, ‘四彎風’ 및 ‘旋耳瘡’ 등의 범주에 속하는데¹¹⁻¹⁵, 이는 瘙癢感, 紅斑, 浮腫, 滲出物, 鱗屑, 痂皮 등의 발현 증상과 발생 시기 및 부위에 준한 것이다. 내경을 비롯한 많은 관련 서적에서 ‘瘡’, ‘癬’, ‘風’, ‘胎’로 표현되며, 특히 ‘胎’라는 명칭은 유전적인 영향이 있음을 시사하고 있다.

이에 대한 문헌적 연구로 박²⁷)은 “아토피 피부염의 동·서의학적 문헌 고찰”을 통하여 한의학적 정의, 병인, 병리, 변증 및 치료법에 대하여 상세하게 검토 기술하였다. 또한 이⁴¹)는 “아토피 피부염 치료 처방에 대한 방제학적 고찰”을 통하여 AD 치료에 관련된 논문 42편에 수록된 처방을 분석 보고하면서 급성기에는 ‘升麻葛根湯’, ‘回春涼膈散’, ‘導赤散’, ‘荊防敗毒散’, ‘九味羌活湯’, ‘白虎湯’, ‘桂枝湯’을, 아급성기에는 ‘平胃散’을, 만성기에는 ‘生津四物湯’, ‘溫清飲’을 기본방으로

활용할 수 있음을 제시하였는데, 이는 급성기에서는 濕熱이, 아급성기에서는 脾虛濕盛이. 만성기에서는 陰虛血燥가 주 병기임을 간접적으로 반영해주고 있다.

임상적 연구로 신¹⁶⁾은 ‘升葛湯’을 투여하여 투약 후 피부 상태, 아토피 지수 및 혈액 변화를, 유¹⁷⁾는 ‘內消和中湯加味方’을 투여하여 말초 혈액내 호산구수와 혈청 총 IgE 변화를 통하여 한의학적 치료가 매우 유의성 있음을 보고한 바가 있으며, 이 밖에도 소수의 환자를 대상으로 한 다양한 임상례에 대한 보고가 있다.

실험적 연구로는 보다 유의성 있는 치료 처방, 약물 개발과 임상 활용 처방의 EBM 구축을 위한 다양한 실험²⁰⁻²⁶⁾이 진행되어 객관적 효능이 검증된 바가 있다. 대부분 면역세포와 사이토카인 및 케모카인 등 면역 조절에 관련된 인자들과 임상 지수 및 조직 검사를 통한 피부 병변 변화에 대한 연구 결과가 주를 이루고 있다.

본 실험과 유사한 내·외치 병용 연구로 민²⁸⁾과 김²⁹⁾은 각각 ‘消風散加減方’, ‘當歸飲子加減方’과 外治方 병용이 NC/Nga 아토피 동물 병태에 미치는 영향을 보고한 바가 있다. 이 밖에 김³⁰⁾은 加味生料四物湯과 止痒膏에 대한 항아토피 효능을 실험적으로 규명한 바가 있으나, 아직 내·외치 병용 효과에 관한 연구는 소수에 불과한 실정이고, 내복약인 黃土加味方과 외용약인 紫草複合方의 겸용 효과에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

내복약 구성 약물인 黃土는 점토성 광물의 복합 풍화체로 미네랄, 회토류, 회토성 금속류 등의 생리활성 물질이 포함되어 있으며, 항산화능이 보고된 바가 있다⁴²⁾.

鯽魚는 脾·胃·大腸에 入하여 健脾利濕, 溫中下氣, 利水消腫 효능이 있으며, 諸瘡不久者에 활용된다는 기록이 있다. 관련된 연구로 윤⁴³⁾은 붕어가 항산화 효능이 있으며, 세포사를 억제할 뿐만 아니라 세포 보호 효과가 있음을 보고한 바가 있다. 昆布는 肝·胃·腎經에 入하여 軟堅散結, 消痰, 利水 효능으로 癭瘤, 痰飲水腫 등을 治하며⁴⁴⁾, 관련 연구로 강⁴⁵⁾은 “항염증 활성”을, 김⁴⁶⁾은

“항산화 활성”을 보고한 바가 있다. 紫草는 心·肝經에 入하여 涼血活血, 解毒透疹 효능으로 血熱毒盛, 癩疹不透, 瘡瘍, 濕疹 등을 治하고⁴⁴⁾, 관련 연구로 김 등⁴⁷⁾은 아토피 동물모델에서 소양증, IgE 및 표피 세라마이드 함량에 미치는 영향을, 강⁴⁸⁾은 피부염을 포함한 염증에 미치는 항염 작용 및 TNF-alpha, iNOS 생성 억제 효과를 보고한 바가 있다. 人蔘은 脾·肺·心經에 入하여 大補元氣, 固脫生津, 安神之 효능으로 일절 氣血津液 부족을 治하며⁴⁴⁾, 관련 연구로 항산화 효능이 보고⁴⁹⁾된 바가 있다. 魚腥草는 肺經에 入하여 清熱解毒, 消腫排膿, 利尿通淋 효능으로 肺癰, 癰腫瘡瘍, 痰熱喘咳 등을 治하며⁴⁴⁾, 관련 연구로 노⁵⁰⁾는 항알러지 효능을, 장⁵¹⁾은 항산화 효능을 보고한 바가 있다. 蛇莓는 민간에서 通經, 解熱, 消炎, 解毒, 抗腫瘤, 止血 효능으로 咽喉頭炎, 濕疹, 咳嗽, 百日咳, 氣管支炎, 디프테리아, 子宮出血, 癌 등에 사용되고 있으며⁵²⁾, 관련 연구로 임 등⁵³⁾은 蛇莓가 Ovalbumin 감작으로 유발된 천식 생쥐 모델에서 기관지염증 억제에 미치는 영향을 보고한 바가 있다. 桔梗은 肺經에 入하여 宣肺利咽, 祛痰排膿 효능으로 咳嗽痰多, 咽痛, 肺癰, 瘡瘍膿盛不潰 등을 治하며⁴⁴⁾, 관련 연구로 배⁵⁴⁾는 알레르기 저감화에 미치는 영향을 보고한 바가 있다. 枳殼은 肺·脾·大腸經에 入하여 破氣, 行痰, 消積 효능으로 胸膈痰滯, 食積, 下利後重을 治하며⁴⁴⁾, 生薑은 肺·脾·胃經에 入하여 解表散寒, 溫中止嘔, 化痰止咳 효능으로 外感風寒, 胃寒嘔吐, 喘咳 등을 治한다⁴⁴⁾.

전체적으로 내복약인 黃土加味方은 肺主皮毛와 脾主濕의 한의학적 이론에 준하여 健脾, 清肺, 清熱, 解毒 및 透疹 효능으로 다양한 피부 질환에 응용될 수 있을 것으로 사료된다. 아울러 외치법에 사용되는 紫草複合方 역시 구성 약물 대부분이 黃土加味方 약물로 이루어져 있고, 白鮮皮, 地膚子, 苦參, 石膏 등은 이미 한의학에서 피부 질환 외치 약물로 알려져 있으며^{55, 56)}, 이에 관련된 다양한 실험 결과 역시 보고된 바가 있어 이들 내·외치 병용은 상승적 효능을 발휘할 것으로 기대된다.

AD는 아토피성 소인이라는 유전적인 요인과 환경적인 요인이 관여하는 多因子 질환으로 복잡하고 다양한 병태 발생 기전 해석과 치료법의 확립이 요구된다. 본 실험에 사용된 NC/Nga 생쥐 모델은 인간의 아토피 피부염과 유사한 병태모델로 Th2형 사이토카인의 분비를 항진시키는 것으로 알려져 있다⁵⁷⁻⁵⁹.

AD의 주요 항원으로는 집먼지진드기 (house dust mite, 이하 HDM), 식물, 진균, 세균 등이 알려져 있으며, 그 중에서도 HDM가 가장 널리 알려져 있다^{60, 61}. Yoshida 등⁶²은 AD 환자에서 혈청 IgE 농도가 높고, HDM 특이적 IgE 발현율이 높은 것을 확인하면서, 면역 형광염색을 통해 비만세포 표면에 HDM이 결합하여 세포의 탈과립을 유도하는 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 NC/Nga 생쥐에 HDM이 함유된 Biostir AD 연고를 도포함으로써 인간의 병증과 유사한 AD 병태를 유발하여, JBB 도포와 HTGMB의 구강 투여를 동시에 실시하여 치료 효과의 극대화를 유도하였다.

AD의 중요한 증상중의 하나는 가려움이다. 가려움에 의한 긁기 행동이 피부 병태의 악화를 초래함에 따라 가려움을 억제하는 약물은 유용한 치료제가 될 수 있을 것으로 생각되어 왔다.

본 실험에서 NC/Nga 생쥐의 등 부분을 제모하고, Biostir AD 연고를 도포하여 긁기 행위에 의한 피부의 병변에 변화를 육안으로 확인하였다. Biostir AD 연고만 도포한 대조군에서는 각화 현상이 진행되어 피부 염증이 발현된 반면, 양성대조군인 protopic 투여군과 J&H 투여군은 대조군에 비하여 긁는 행동이 상대적으로 감소함과 동시에 각화 현상으로 인한 피부염이 현저히 줄어들었다. 이러한 변화는 SCORAD 法⁶³을 사용한 피부 임상 지수에 반영되었는데, 12주째부터 대조군에 비하여 J&H 투여군에서 유의성 있는 임상 증상 개선 효과를 나타내었다. 이 같은 임상지수 결과는 치료 기전을 떠나 본 치료법이 아토피 피부염에 유의성이 있음을 나타내주고 있다 (Fig 1, 2).

AD 환자의 피부에는 림프구를 비롯하여 비만

세포, 호산구와 같은 면역세포들이 다수 침윤되어 있으며, epidermis와 dermis가 비후해지고 소양감으로 인한 긁는 행동에 의해 출혈 등 조직의 손상이 나타남으로써 면역세포 변화와 조직 변성은 AD를 평가하는 중요한 지표가 된다⁶⁴⁻⁶⁶. 본 연구에서 도포 부위의 피부와 귀 조직을 hematoxylin and eosin (H&E)과 toluidine blue로 염색하여 조직학적 변화를 관찰하였는데, H&E 염색에서 대조군은 피부와 귀 조직에 면역세포들의 침윤과 더불어 epidermis와 dermis 부분의 부종이 발생한 반면 (Fig. 3B), J&H 투여군에서는 이들의 병리적인 조건이 상대적으로 감소한 것으로 나타났다 (Fig. 3D). 또한 M.T 염색에서도 대조군 (Fig. 4B)에서 증가하였던 비만세포의 수가 J&H 투여군에서는 상대적으로 감소한 것을 볼 수 있어 (Fig. 4D), J&H 투여에 의해 면역 조절작용이 일어나 아토피성 피부염의 국소에 면역세포들의 침윤을 억제하였음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3, 4).

DLN 총세포수 측정에서는 대조군에서 면역세포수의 감소가 뚜렷하게 나타난 반면 J&H 투여군에서는 정상군에 가까운 면역세포수의 증가를 나타내었다. Dorsal skin 내 총 세포수에서는 DLN 총세포수 결과와 상반적으로 대조군에서 증가한 반면, J&H 투여군에서는 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 5, 6). 이 같은 결과는 면역조절 작용에 대한 본 시료의 효능을 간접적으로 시사해 주고 있어, 관련 면역세포에 대한 실험을 통해서 입증하고자 하였다.

AD 유발을 통해서 DLN 내의 세포 수 조절에 어떤 면역세포가 관여하는지를 확인하기 위하여 먼저 FACS 분석을 통해 B 세포의 특이적 표면 단백질인 CD19^{67, 68} 항체를 사용하여 DLN에 존재하는 B 세포 수를 측정한 결과 대조군에 비하여 J&H 투여군에서 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 7).

T 세포에는 IL2, IFN- γ , TNF- β 등을 생산하는 Th1과 IL-4, 5, 6, 10 등을 생산하는 Th2가 존재하는데, 서로가 길항하여 밸런스를 맞추어 감으로써 면역조절이 이루어지고 있다^{69, 70}. 알

레르겐에 반응하는 T세포는 일반적으로 Th2 타입이며, IL-4나 IL-13을 생산해서 B세포로부터 IgE 생산을 유도하고, IL-5를 생산하여 호산구의 분화 증식 또는 활성화에 의해 만성형의 알레르기 반응이 이루어진다^{71, 72)}. 실제로 AD의 염증 국소에 Th2 세포가 증가하는 것으로 보고되고 있다. Th2 타입은 NKT 세포, 비만세포, 호염기구 등으로부터 생성되어 IL-4에 의해 유도되는 것으로 보고되고 있다. 아울러 아토피 피부염에서는 림프절과 비장 등에서 CD4+ T세포와 CD8+ T세포의 비율이 감소하는 것으로 알려져 있다⁷³⁻⁷⁶⁾. Tsukuba 등⁷⁷⁾에 의하면 림프절 등의 세포를 분리하여 FACS 분석한 결과 정상군에 비하여 CD4+/CD8+ T세포의 비율이 감소하는 것으로 보고하고 있다. 본 실험 결과에서도 DLN에서 CD4+ 세포와 CD8+ 세포가 대조군에서 정상군에 비하여 감소하였으며, J&H 투여군에서는 유의성 있는 증가를 나타내었다 (Fig. 8-10). 또한 면역조절 T 세포인 CD4+/CD25+ 세포수 측정에서 대조군에 비해 J&H 투여군에서 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 11). 결과적으로 J&H 투여가 T세포 수 감소와 활성을 억제하는 등의 면역조절 작용을 통하여 아토피의 증상을 완화시키는 것으로 생각되어진다.

호산구는 골수에서 생산되어 많은 조직과 골수에 존재한다. 염증 국소에 집적하는 기능이 있고, 우리 몸의 integrin family의 VLA-4가 선택적으로 호산구 침윤에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 호산구에 활성화에 있어서 IL-5 뿐만 아니라 IL-3, IL-8, GM-CSF 등이 중요하게 작용하는데, 이러한 사이토카인은 호산구 자체에서도 생산되어진다⁷⁸⁻⁸⁰⁾. 따라서 호산구의 증가는 AD의 악화와 깊은 관련이 있으며, 호산구 증가 억제는 AD 치료에 중요한 목표가 될 수 있다. 본 연구에서는 피부 부위의 세포를 분리하여 FACS로 분석한 결과, 호산구와 관련한 CCR3+ 세포수가 대조군에서 유의성 있게 증가하였으나, J&H 투여군에서는 유의성 있는 감소 효과를 나타냈다 (Fig. 12).

IgE는 주로 소화관 기도 증의 점막림프절의

IgE 생산세포에서 생산되며, 혈중 반감기는 2-3일로 비교적 짧다. IgE는 고전적 경로에 의한 보체 활성화 능력이 없고 태반 통과성도 없으며 Fc 부분에 의해 특정 세포와 결합한다. 비만세포나 호염기구에는 친화성이 높은 IgE 수용체 (FcεRI)가 있으며 림프구, 단구, 호산구, 혈소판에는 저친화성 IgE 수용체 (FcεRII)가 있다. 저친화성 IgE 수용체의 역할은 지금까지 확실히 밝혀져 있지 않으나 IgE를 통해서 특이항원을 도와 T세포에의 항원제시에 의해 항체 생산을 증가하는 기능을 갖고 있는 것으로 밝혀졌다⁸¹⁻⁸³⁾. IgE를 생산하는 B세포는 현재 아토피 질환에서의 역할은 정확히 밝혀져 있지 않으나, B세포의 활성화, 세포사 등에 관한 많은 분자에 관해서는 그 기능이 밝혀지고 있다. B세포의 IgE 생산 유도에는 Th2 세포가 생산하는 IL-4와 IL-13 등의 사이토카인이 있다^{84, 85)}. 본 연구에서 피부 부위의 B220+/IgE+ 세포수는 정상군에 비하여 대조군에서 증가하였으며, J&H 투여군에서는 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 13).

호염기구는 혈액 중에 존재하며 알레르기성 염증의 진전과 함께 염증 부위에 유입된다. 호염기구는 탈과립을 통해 히스타민 등 과립에 저장되어 있는 알레르기 인자들을 유리시켜 프로스타그란딘 등의 지질 인자의 신규 합성과 TNF-α, IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인의 생성 및 방출 등에 관여하여 피부의 염증을 악화시키는 요인으로 작용 한다⁸⁶⁻⁸⁸⁾. 본 연구에서 과립구를 나타내는 Gr-1+/CD11b+ 세포의 비율이 대조군에 비하여 J&H 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타냄으로써 J&H 투여가 과립구의 염증 국소 유입과 관련 사이토카인의 생성을 억제에 유의적임을 알 수 있었다 (Fig. 14).

V. 結 論

紫草複合方(JBB)과 黃土加味方(HTGMB)의 내외치 겸용 치료 효과를 객관적으로 규명하고자, AD와 유사 병태를 나타내는 NC/Nga 병태

모델에서 다양한 면역 관련 인자들의 변화와 조직학적 변화를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. JBB 도포와 HTGMB 투여군은 대조군에 비하여 아토피 피부염 임상지수를 유의성 있게 감소시켰다.
2. JBB 도포와 HTGMB 투여군은 대조군에 비하여 DLN 내의 면역 세포수를 유의성 있게 증가시켰다.
3. JBB 도포와 HTGMB 투여군은 배부 피부(Dorsal skin) 내의 면역 세포수를 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.
4. JBB 도포와 HTGMB 투여군은 대조군에 비하여 H&E와 toluidine blue 염색에서 피부 조직으로 침윤되는 림프구와 비만세포들의 침윤을 억제하였다.
5. JBB 도포와 HTGMB 투여군은 대조군에 비하여 DLN 내의 CD19+ 세포 수는 감소시킨 반면, CD3+ 세포 수는 증가시켰다.
6. JBB 도포와 HTGMB 투여군은 대조군에 비하여 DLN 내의 CD4+ / CD25+ 세포수를 증가시켰으며, CD8+, CD4+ 세포 수는 유의성 있게 증가시켰다.
7. JBB 도포와 HTGMB 투여군은 대조군에 비하여 배부 피부(Dorsal skin) 내의 CCR3+, B220+ / IgE+ 그리고 Gr-1+ / CD11b+ 세포수를 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과들을 보아 JBB 도포와 HTGM 투여군은 유의성 있는 면역조절 작용을 통하여 항알러지 작용을 나타냄으로써, 아토피피부염에 지속적인 응용이 가능할 것으로 보인다.

參 考 文 獻

1. Sampson, H.A. Atopic dermatitis, *Ann Allergy*, 69(6):469-479, 1992.
2. Daniels, J., et al. The epidemiology of atopic dermatitis, *Hosp Med*, 63(11): 649-652, 2002.
3. Hill, P.B., et al. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens, *Vet Immunol Immunopathol*, 81(3-4):169-186, 2001.
4. Beltrani, V.S. The clinical spectrum of atopic dermatitis, *J Allergy Clin Immunol*, 104(3):S87-98, 1999.
5. Millikan, L.E. Atopic dermatitis. Clinical spectrum and approach to treatment, *Postgrad Med*, 76(1):139-146, 1984.
6. Valenta, R., et al., Autoallergy: a pathogenetic factor in atopic dermatitis? *J Allergy Clin Immunol*, 105(3):432-437, 2000.
7. Friedmann, P.S. The role of dust mite antigen sensitization and atopic dermatitis, *Clin Exp Allergy*, 29(7):869-872, 1999.
8. Beltrani, V.S. The role of house dust mites and other aeroallergens in atopic dermatitis, *Clin Dermatol*, 21(3):177-182, 2003.
9. Rabito, F.A., et al., Prevalence of Indoor Allergen Exposures among New Orleans Children with Asthma, *J Urban Health*, 84(6):782-792, 2007.
10. Sheikh, A., et al. House dust mite avoidance measures for perennial allergic rhinitis, *Cochrane Database Syst Rev*, 1: CD001563, 2007.
11. 劉建國 외 편저 : 新編皮膚病驗方薈萃, 廣東世界圖書出版公社, p.229, 2003.
12. 王保方 외 : 皮膚病中醫診療學, 인민위생

- 출판사, pp.254-255, pp.310-311, pp.351 - 354, 2000.
13. 謝 娟 외 : 皮膚病奇效良方, 인민군의출판사, pp.170-178, 2007.
 14. 林俊華 외 : 皮膚性病科絶技, 과학기술문헌출판사, pp.131-133, 2002.
 15. 馬紹堯 : 實用中醫皮膚病學, 상해중의약대학출판사, pp.244-246, 1999.
 16. 신상호 : 升葛湯을 사용한 아토피 피부염 환자에 대한 임상연구, 동의대학교 대학원, 2008.
 17. 유한정 : 內消和中湯加味方이 아토피 피부염 환자의 혈중 cytokine 분비에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 2006.
 18. 임진희 : 아토피피부염 患者의 四象體質別 臨床特徵에 관한 研究, 慶熙大學校 大學院, 2008.
 19. 윤화정 외 : 아토피 피부염 환자의 한의학 적 유형분류에 대한 임상적 연구, 동의한의 연구, Vol.5, pp.43-57, 2001.
 20. 한재경 : 加味當歸飲子가 아토피 동물 모델에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 2004.
 21. 具英姬 : 清肌散이 아토피피부염 동물 모델에 미치는 영향, 동국대학교대학원, 2007.
 22. 박성희 외 : 脾虛蘊濕方이 아토피 피부염 유발 NC/Nga 생쥐의 혈액내 면역 관련 인자에 미치는 영향, 대한동의병리학회지, 21(4):849- 855, 2007.
 23. 김기훈 외 : 桑葉이 아토피피부염에 미치는 영향, 慶熙醫學, Vol.20, No.1, pp.37-45, 2004.
 24. 박대원 외 : 생쥐의 B 세포에서 anti-CD40과 rIL-4로 유도된 싸이토카인 생산에 대한 紫草의 효과, 大韓本草學會誌, Vol.18, No.4, pp.73-81, 2003.
 25. 백윤하 : DNCB(dinitrochlorobenzene)로 자극한 NC/Nga 생쥐에서 丹參의 아토피 억제 효과, 원광대학교대학원, 2005.
 26. 박정훈 : 足三里(ST36)에 시술한 용담 약침이 아토피 피부염을 유발한 동물모델의 각질층 기능회복에 미치는 영향, 東國大學校 大學院, 2004.
 27. 박민철 : 아토피 피부염의 東·西醫學의 文獻 考察, 圓光大學校 대학원, 2001.
 28. 민영규 : 消風散加減方과 外治方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향, 東新大學校 大學院, 2005
 29. 김성훈 : Effects of Tang-gwi-eum-za-gagambang along with external spray therapy on the spontaneously occurring atopic dermatitis development in NC/Nga mouse, 東新大學校 大學院, 2005.
 30. 김정진 외 : 加味生料四物湯의 抗炎症효과와 止痒膏의 아토피피부염 손상 및 止痒 효과에 미치는 영향, 동의병리학회지, Vol.17 No.2, pp.428-435, 2003.
 31. Colloff, M.J., et al. Pictorial keys for the identification of domestic mites, Clin Exp Allergy, 22(9):823-830, 1992.
 32. Tupker, R.A., et al. Induction of atopic dermatitis by inhalation of house dust mite, J Allergy Clin Immunol, 97(5): 1064-1070, 1996.
 33. de Groot, A.C., et al. The role of contact allergy to aeroallergens in atopic dermatitis, Contact Dermatitis, 21(4): 209-214, 1989.
 34. DeBoer, D.J. Survey of intradermal skin testing practices in North America, J Am Vet Med Assoc, 195(10):1357-1363, 1989.
 35. Pike, A.J., et al. Development of Dermatophagoides pteronyssinus (Acari: Pyroglyphidae) at constant and simultaneously fluctuating temperature and humidity conditions, J MedEntomol, 42(3):266-269, 2005.
 36. Nuttall, T.J., et al. House dust and

- forage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis, *Vet Dermatol*, 17(4):223-235, 2006.
37. O'Hehir, R.E., et al. House dust mite allergy: from T-cell epitopes to immunotherapy, *Eur J Clin Invest*, 23(12):763-772, 1993.
 38. Lombardero, M., et al. Conformational stability of B cell epitopes on group I and group II *Dermatophagoides* spp. allergens. Effect of thermal and chemical denaturation on the binding of murine IgG and human IgE antibodies, *J Immunol*, 144(4):1353-1360, 1990.
 39. John, R.J., et al. Functional effects of the inhibition of the cysteine protease activity of the major house dust mite allergen Der p 1 by a novel peptide-based inhibitor, *Clin Exp Allergy*, 30(6):784-793, 2000.
 40. Sidenius, K.E., et al.: Decay of house-dust mite allergen Der f 1 at indoor climatic conditions, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 89(1):34-37, 2002.
 41. 이상현 외 : 아토피 피부염 치료 처방에 대한 方劑學的 考察, *한국전통의학지*, Vol.15 No.1, pp.56-69, 2006.
 42. 이원섭 : 황토요법, *한국정신과학 학술대회 논문집*, Vol.14, pp.69-70, 2001.
 43. 윤여민 : SK-N-MC 신경세포주의 과산화수소로 유발된 細胞死에서 붕어 추출물의 보호 효과, *尙志大學校 大學院*, 2006.
 44. 韓醫科大學 本草學 編纂委員會 編著, 本草學, 永林社, pp.510-511, pp.240-241, pp.575-577, pp.272-273, pp.499-500, pp.396-397, pp. 172-174, 2004.
 45. 강지영 : 갈조류 미역(*Undaria pinnatifida*)과 다시마(*Laminaria japonica*)의 항염증 활성 및 미역의 품질평가, *부경대학교 대학원*, 2008.
 46. 김선숙 : 다시마 분말 용매 추출물과 다시마 매작과의 항산화 효과, *목포대학교 교육대학원*, 2008.
 47. 김영란 : 아토피 피부염 동물모델 NC/Nga mice에서 자초 및 보라지 추출물의 식이공급이 소양증, IgE 및 표피 세라마이드 함량에 미치는 영향, *경희대학교 동서의학대학원*, 2007.
 48. 강제훈 : 紫草의 피부염을 포함한 염증에 미치는 항염작용 및 TNF-alpha, iNOS 생성 억제효과에 관한 연구, *경희대학교 대학원*, 2005.
 49. 한용남 외 : 인삼의 항산화 활성성분에 관한 연구 (V), *한국생화학회지*, Vol.24 No.2, pp.337-340, 1991.
 50. 盧柄圭 외 : 漁腥草 抽出物의 抗알레르기 효과에 관한 研究, *大韓本草學會誌*, Vol.13 No.2, pp.77-89, 1998.
 51. 장영상 외 : 패모, 어성초, 쇠비름 및 들깨박 에탄올 추출물의 순차용매 분획별 항산화 효과, *한국식품과학회지*, Vol.25 No.6, pp.683-688, 1993.
 52. 이인란 외 : 사매의 생리활성에 관한 연구, *생약학회지*, Vol.15 No.2, pp.85-90, 1984.
 53. 임중근 외 : 사매가 Ovalbumin 감작으로 유발된 천식 생쥐 모델에서 기관지염증 억제에 미치는 영향, *大韓本草學會誌*, Vol.20 No.1, 73-83, 2005.
 54. 배만중 외 : 길경이 알레르기 저감화에 미치는 영향, *생명자원과 산업*, Vol.1, pp.15-19, 1996.
 55. 강호건 : PMA plus A23187로 유도된 RBL-2H3 세포에서의 백선피의 항알레르기 효과, *동의대학교 일반대학원*, 2007.
 56. 金正善 : 地膚子의 皮膚 塗布가 Histamine으로 誘發된 搔痒感, 紅斑 및 膨疹에 미치는 影響, *경희대학교 대학원*, 2002.
 57. Topham, C.M., et al. Comparative modelling of major house dust mite

- allergen Der p I: structure validation using an extended environmental amino acid propensity table, *Protein Eng*, 7(7):869-894, 1994.
58. Chua, K.Y., et al.: Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases, *J Exp Med*, 167(1): 175-182, 1988.
59. Comoy, E.E., et al.: The house dust mite allergen, *Dermatophagoides pteronyssinus*, promotes type 2 responses by modulating the balance between IL-4 and IFN-gamma, *J Immunol*, 160(5):2456-2462, 1998.
60. De Wit, D., et al.: Helper T-cell responses elicited by Der p 1-pulsed dendritic cells and recombinant IL-12 in atopic and healthy subjects, *J Allergy Clin Immunol*, 105(2)Pt 1:346-352, 2000.
61. Huang, C.H., et al.: Mite allergen induces allergic dermatitis with concomitant neurogenic inflammation in mouse, *J Invest Dermatol*, 121(2): 289-293, 2003.
62. Yoshida S.T. : 알레르기성 疾患 : 診斷과 治療의 進歩-아토피性 皮膚炎 日本內科學 會紙 82(10): 1672-1677 1993
63. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis, *Dermatology*, 186(1):23-31, 1993.
64. Leung, D.Y., et al.: The presence of IgE on macrophages and dendritic cells infiltrating into the skin lesion of atopic dermatitis, *Clin Immunol Immunopathol*, 42(3):328-337, 1987.
65. Metzger, H.: The high affinity receptor for IgE, FcepsilonRI, Novartis Found Symp, 257: 51-59; discussion 59-64, 98-100, 276-85, 2004.
66. Kijimoto-Ochiai, S.: CD23 (the low-affinity IgE receptor) as a C-type lectin: a multidomain and multifunctional molecule, *Cell Mol Life Sci*, 59(4): 648-664, 2002.
67. Robert, C., et al.: Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance, *N Engl J Med*, 341(24): 1817-1828, 1999.
68. Sharma, L.: Diagnostic clinical features of atopic dermatitis, *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 67(1):25-27, 2001.
69. Bos, J.D.: Atopiform dermatitis, *Br J Dermatol*, 147(3):426-429, 2002.
70. Schmid-Grendelmeier, P., et al.: Epidemiology, clinical features, and immunology of the "intrinsic" (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis), *Allergy*, 56(9):841-849, 2001.
71. Johansson, S.G., et al.: A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force, *Allergy*, 56(9):813-824, 2001.
72. Folster-Holst, R., et al.: Low prevalence of the intrinsic form of atopic dermatitis among adult patients, *Allergy*, 61(5): 629-632, 2006.
73. Bruynzeel-Koomen, C., et al.: The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in patients with atopic dermatitis, *Arch Dermatol Res*, 278(3): 199-205, 1986.
74. Leung, D.Y., et al.: The presence of IgE on macrophages and dendritic cells infiltrating into the skin lesion of atopic dermatitis, *Clin Immunol Immunopathol*,

- 42(3):328-337, 1987.
75. Metzger, H.: The high affinity receptor for IgE, FcεRI, Novartis Found Symp, 257: 51-59; discussion 59-64, 98-100, 276-85, 2004.
76. Kijimoto-Ochiai, S.: CD23 (the low-affinity IgE receptor) as a C-type lectin: a multidomain and multifunctional molecule, *Cell Mol Life Sci*, 59(4): 648-664, 2002.
77. Tsukuba T, Yamamoto K. : Atopic demartitis and cathepsin E. *Folia Phamacol.Jpn*. 122, 15-20, 2003.
78. Maurer, D., et al.: The high affinity IgE receptor (Fc εRI) mediates IgE-dependent allergen presentation, *J Immunol*, 154(12):6285-6290, 1995.
79. Klubal, R., et al.: The high-affinity receptor for IgE is the predominant IgE-binding structure in lesional skin of atopic dermatitis patients, *J Invest Dermatol*, 108(3):336-342, 1997.
80. Marquardt, D.L., et al.: Dependence of mast cell IgE-mediated cytokine production on nuclear factor-κB activity, *J Allergy Clin Immunol*, 105(3): 500-505, 2000.
81. Soto-Cruz, I., et al.: Analysis of proteins binding to the ITAM motif of the beta-subunit of the high-affinity receptor for IgE (FcεRI), *J Recept Signal Transduct Res*, 27(1):67-81, 2007.
82. Kihara, H., et al.: Src homology 2 domains of Syk and Lyn bind to tyrosine-phosphorylated subunits of the high affinity IgE receptor, *J Biol Chem*, 269(35):22427-22432, 1994.
83. Gilfillan, A.M., et al.: Integrated signalling pathways for mast-cell activation, *Nat Rev Immunol*, 6(3): 218-230, 2006.
84. Siraganian, R.P.: Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor, *Curr Opin Immunol*, 15(6): 639-646, 2003.
85. Bruynzeel-Koomen, C., et al.: The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in patients with atopic dermatitis, *Arch Dermatol Res*, 278(3): 199-205, 1986.
86. Liu, Y., et al.: Protein kinase C theta is expressed in mast cells and is functionally involved in FcεRI signaling, *J Leukoc Biol*, 69(5):831-840, 2001.
87. Klemm, S., et al.: The Bcl10-Malt1 complex segregates Fc εRI-mediated nuclear factor kappa B activation and cytokine production from mast cell degranulation, *J Exp Med*, 203(2):337-347, 2006.
88. Cho, S.H., et al.: Protein kinase Cδ functions downstream of Ca²⁺ mobilization in FcεRI signaling to degranulation in mast cells, *J Allergy Clin Immunol*, 114(5):1085-1092, 2004.