

# IgE 과대생산과 피부염이 유발된 NC/Nga생쥐의 비장세포에서 GATA3 조절에 의한 유전자 발현에 미치는 영향

박슬기·한재경·김윤희\*

Effect of Kami-Cheongsimyeonjatang on cytokine expression with GATA3 regulation in atopic dermatitis-like skin lesions and IgE hyperproduction induced in NC/Nga mice

Park Seul-Ki, Han Jae-Kyung, Kim Yun-Hee

Dept. of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daejeon University

KCSYJT medicines controlled CD4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ , and CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/foxp3<sup>+</sup> revelation that an experiment that motive allergy immune reponse because an in vitro experiment stimulates T cells of a NC/Nga mouse same time by anti-CD40/rmIL-4, and interleukin-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$  mRNA outturn that bear in T and B cells decreased remarkably by KCSYJT medicines. Intracellular staining of splenocytes anti-CD40/rmIL-4 plus rmIL-4 stimulated as described in a, assessed after 24 h, KCSYJT exerts a mainly immunosuppressive effect that acts at least partially through suppression of the transcription factor GATA3 expression in CD4<sup>+</sup> T cells. We found that skin lesions, which were clinically and histologically very similar to human AD, mite antigen-induced dermatitis on the face, neck, ears and dorsal skin of inbred NC/Nga mice.

Result that Th1 cell and Th2 cell observe to be shifted by cytokine expression with GATA3 regulation by KCSYJT medicines could know that KCSYJT medicines can use usefully in allergy autoimmune disease.

Key words : atopic dermatitis, NC/Nga mouse, 加味清心蓮子湯, splenocytes, GATA3

## I. 서 론

아토피 피부염은 알레르기성 질환의 대표적인 것으로 그 발병률은 전 인구의 약 10~20% 정도로 보고되고 있으며, 지난 30년 간 계속적으로 증가하는 추세에 있다<sup>1)</sup>. 아토피 피부염은 심한

소양감과 특징적인 습진성 피부 병변을 나타내는 염증성 피부질환으로 만성 재발성이며, 주로 유소아기에 발병하는 아토피(atopy) 질환의 하나이다. 아토피 피부염 환자에 나타나는 심한 소양감은 환경 적응 능력, 활동력 및 작업 능력의 감소, 불면증, 정서장애 등을 초래할 수 있다. 그리고 색소 침착이 동반된 습진성 피부 병변은 피부 雛形을 유발하여 정상적인 대인 관계나 사회활동에

\* 대전대학교 한의과대학 소아과학교실  
· 교신저자 : 김윤희 · E-mail : unia67@dju.ac.kr

지장을 줄 수 있으며, 건조하고 자극에 민감한 환자의 피부는 흔히 자극성 접촉 피부염을 일으켜 직업 선택에 제한 요인이 될 수 있다<sup>2)</sup>.

최근 CD4<sup>+</sup>T 림프구 등의 염증성 세포가 아토피 피부염의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있는데, T 림프구는 주위 환경의 사이토카인과 전사인자들 (transcription factors)의 활성화에 의해 Th1세포와 Th2세포로 분화하며 각각에서 분비되는 사이토카인이 아토피의 병태생리에 중요한 역할을 한다는 것이 많은 연구에서 보고되었다<sup>3), 4)</sup>. Th2 세포는 interleukin (IL)-4, IL-5, IL-9, IL-13을 분비하는 특징을 지니고, Th1 세포는 IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 를 생성하는 특징을 가지는데, 이 중 Th2 세포에서 분비되는 사이토카인이 아토피의 발생에 중요한 역할을 한다<sup>5)</sup>. 따라서, 사이토카인의 분비와 T 림프구의 분화에 관여하는 전사인자에 대한 관심이 많아지고 많은 연구가 활발히 이루어지고 있다. Th1 및 Th2 분화에 중요한 역할을 하는 전사인자에는 T-box expressed in T-cells (T-bet), STAT-1, STAT-4, STAT-6, GATA-binding protein-3 (GATA-3), c-maf 등이 알려져 있는데 T-bet, STAT-1, STAT-4 등의 전사인자가 활성화되면 Th1 림프구로의 분화가 촉진되고, STAT-6, GATA-3, c-maf, NFAT 등의 전사인자가 활성화되면 IL-4 등의 사이토카인과 함께 Th2 림프구로의 분화를 촉진한다<sup>6)</sup>. 특히, GATA-3와 T-bet은 신호전달과정에서 유전자의 전사를 조절하는 상위에 위치하는 전사인자이므로 Th1 및 Th2의 분화에 있어 가장 중요한 전사인자라 할 수 있다. 즉, GATA-3는 Th2 림프구로의 분화를 촉진하고 IL-4와 IL-5의 전사를 조절한다<sup>7-10)</sup>. 따라서, GATA-3의 활성화로 인해 Th2 세포가 활성화되면 여러 Th2 cytokines의 생성, 분비가 증가하게 되고 B 세포 활성화가 이루어지므로 알레르기 염증반응을 매개하여 아토피 피부염, 기관지 천식 등의 만성적인 질환을 유발한다<sup>8)</sup>. GATA-3에 관한 연구는 현재 동물실험에서 세포나 혈액검사를 통해 활발히 이루어지고 있다<sup>11-15)</sup>.

加味清心蓮子湯<sup>16)</sup>은 清心蓮子飲에 宣散風熱, 涼血清熱, 解肌清熱, 健脾化濕의 效能을 갖는 柴胡, 蟬蛻, 葛根, 牛蒡子, 升麻, 薄荷, 金銀花, 連翹, 梔子, 石膏, 當歸, 薏苡仁, 桃仁, 赤茯苓, 檳榔, 蒼朮, 陳皮, 厚朴 등을 가하여 주로 血熱과 風熱로 인해 津液이 손상되어 나타나는 皮膚疾患을 다스릴 목적으로 處方되었다.

이에 저자는 加味清心蓮子湯이 아토피 발진 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 in vitro에서 NC/Nga 생쥐의 비장세포를 분리하여 비장세포에 대한 加味清心蓮子湯의 GATA3의 조절을 통한 알레르기 반응 억제를 FACS 분석과 사이토카인 분석을 위한 real-time PCR를 이용하여 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약 및 기기

##### (1) 시약

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate(DEPC), 3-4, 5-dimethyl-thiazol-2, 5-carboxymethoxyphenyl-2, 4-sulfophenyl- 2H-tetrazolium(MTS), 2, 7, -dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), complete adjuvant, chloroform, collagenase, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구 용혈액(RBC lysis solution), ethidium bromide(EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, lamide, magnesium chloride(MgCl<sub>2</sub>)는 Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사(Logan, U.S.A.) 제품을, anti-CD3-PE(phycoerythrin), anti-CD4-FITC(fluorescein isothiocyanate), anti-Gr1-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD25-PE, anti-CD28-PE, anti-CD11b-FITC, anti-IgE-FITC anti-B220-PE, anti-CD69-FITC, propidium iodide(PI)와 RNase는 Pharmingen사 (Torreyana, U.S.A.) 제품을, rhIL-1 $\beta$ , rhTNF-

α는 R & D system사(Minneapolis, U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 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), CO<sub>2</sub> incubator(Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench(Vision scientific Co., Korea), autoclave(Sanyo, Japan), micro-pipet(Gilson, France), water bath(Vision scientific Co., Korea), vortex mixer(Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge(Sigma, U.S.A.), deep-freezer (Sanyo, Japan), thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer(OMNI, U.S.A.), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.) 및 ELISA reader(Molecular Devices, U.S.A.) 등을 사용하였다.

## 2) 동물

암컷 7주령의 NC/Nga 생쥐 (15-20 g)를 Charles River Japan (Yokohama, Japan)사에서 공급받아 이후 실험당일까지 고품사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12 시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1 주간 적응시킨 다음, 18주령까지 conventional 한 상태로 둔 후 실험에 사용하였다.

## 3) 약물

본 실험에 사용한 加味清心蓮子湯<sup>16)</sup>의 구성은 『대전대학교 부속한방병원 처방집』에 준하였으며, 사용한 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고 그 내용과 분량은 다음과 같다. (Table.1)

Table 1. Kami Cheongsimyeonjatang (KCSYJT) 의 처방구성<sup>16)</sup>

韓藥名	生藥名	用量(g)
蓮子肉	Nelumbinis Semen	8
地骨皮	Lycii Radicis Cortex	6
黃芪	Astragali Radix	6
白茯苓	Poria	6
柴胡	Bupleuri Radix	6
黃芩	Scutellariae Radix	6
厚朴	Magnoliae Cortex	4
麥門冬	Liriodendron Tuber	4
連翹	Forsythiae Fructus	4
梔子	Gardeniae Fructus	4
蟬蛻	Cicadidae Periostracum	4
檳榔	Arecae Semen	4
石膏	Gypsum Fibrosum	4
車前子	Plantaginis Semen	4
葛根	Puerariae Radix	4
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4
赤茯苓	Poria	4
升麻	Cimicifugae Rhizoma	4
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	4
陳皮	Citri Unshii Pericarpium	4
牛蒡子	Arctii Semen	4
金銀花	Lonicerae Flos	4
薄荷	Menthae Herba	4
桃仁	Persicae Semen	4
薏苡仁	Coicis Semen	4
人參	Ginseng Radix Alba	2
甘草	Glycyrrhizae Radix	2
合 計		118

## 4) KCSYJT 추출물 분리

KCSYJT 236 g에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 KCSYJT 추출물(13.3 g)을 냉동 보관(-84℃)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) in vitro 세포독성 측정

## (1) 세포 배양

## ① Human Fibroblast cells(hFCs) 배양

정상사람의 fibroblast 세포는 사람피부조직을 cool D-PBS로 3 회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube(15 ml)에 넣어 1, 400 rpm에서 5 분간 원심분리하고, tube에 DMEM {containing collagenase A(5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, U.S.A.), DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25  $\mu$ g/ml)}를 넣고 37°C CO2 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수로 약 2 회 1500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1 주일 동안 배양하였다. 1 주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 hFCs 세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 105 cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

## (2) 세포독성 측정

세포독성방법은 SRB assay법<sup>55)</sup>을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. hFCs 세포는 37°C, 5% CO2 배양기에서 1 시간 배양한 후 加味清心蓮子湯 추출물(최종 농도 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1 mg/ml, 500  $\mu$ g/ml, 250  $\mu$ g/ml)을 48 시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액으로 2 회 세척하였다. 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid)를 50  $\mu$ l를 가하고 1 시간 동안 4°C에 방치하였다. 증류수로 5 회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 $\mu$ l/well로 가하고 실온에서 30 분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 45 회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100  $\mu$ l/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker(Lab-Line, U.S.A.)에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA LEADER(molecular devices, U.S.A.)에서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) in vitro : T cells & B cells splenocytes cultured of NC/Nga-induced atopic dermatitis mice

## (1) Spontaneous dermatitis in NC/Nga mice

Conventional한 상태에서 사육하고 IgE hyperproduction이 된 18주령의 NC/Nga 생쥐를 선별하여 눈에서 capillary 관을 이용하여 100  $\mu$ l의 혈액을 채혈하였다. 채혈된 혈액에서 혈장을 분리하여 IgE 함량을 측정하여 50  $\mu$ g/ml 이상 된 생쥐, 그리고 피부에 발진이 나타난 NC/Nga생쥐만을 선택하였다.

## (2) Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장에서 T 세포와 B 세포의 분리 및 배양

① 비장을 적출하여 100 mesh에서 분쇄하여 비장세포를 얻어 2000 rpm에서 5 분간 원심분리로 세포를 회수하였다. 여기에 ACK 용액 (8.3 g NH<sub>4</sub>Cl, 1 g KHCO<sub>3</sub>, in 1 L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5 분 동안 처리하여 적혈구를 제거한다.

② 비장 세포를 2%의 FBS가 함유된 PBS (PBS/FBS)에 1 $\times$ 10<sup>8</sup>/ml로 현탁시키고 normal rat serum을 5%되게 첨가하여 4°C에서 15 분간 blocking한 후, T 세포 분리는 biotinylated antibody cocktail for lineage (CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR  $\gamma/\delta$ , CD235a (glycophorin A)), ( CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec)를 가하였고, B세포 분리는 biotinylated antibody cocktail for lineage (CD43 (Ly-48), CD4 (L3T4), Ter-119), (B Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec)를 가하여 각각 4°C에서 15 분간 반응시켰다.

③ 각각의 세포를 PBS/FBS로 세척하여 1 $\times$ 10<sup>8</sup>/ml로 현탁하고 100  $\mu$ l의 streptavidin-microbeads/ml을 가하여 다시 4°C에서 10 분간 반응시켰다.

④ 각각의 Magnetic column (CS column, Miltenyi Biotec)을 PBS로 세척하여 준비해둔

Vario MACS (Milteny Biotech)에 장치하고, magnetic bead가 표지된 세포를 통과시킨 후 PBS로 column을 충분히 세척한 다음 column을 통과한 부유액을 원심 분리하여 lineage 음성인 T 세포와 B 세포를 각각 모았다.

### (3) Real-time quantitative PCR in B cells cultured

#### ① 배양된 비장 B세포에서 RNA 분리

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga생쥐에서 분리한 B 세포를 24 well plate에  $1 \times 10^6$  세포/well로 분주하고 加味清心蓮子湯 추출물(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 처리하였고, 약물처리 1 시간 후 anti-CD40 mAb (500  $\text{ng}/\text{ml}$ )과 rmIL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 500 U/ml, PharMingen)를 동시 배양하였다. 그리고 rmIL-10 (recombinant mouse interleukin-10, 50  $\text{ng}/\text{ml}$ , Endogen)을 양성대조군으로 사용하였다. 加味清心蓮子湯 추출물과 anti-CD40 mAb과 rmIL-4를 동시 배양하여 6 시간 동시 배양 하였다. 배양 종료 후 배양상층액을 제거한 후 RNAzolB 500  $\mu\text{l}$ 를 넣고 용해될 때까지 분쇄한다. 이 혼합 부유액에 chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200  $\mu\text{l}$ 의 상층액을 회수하여 2-propanol 200  $\mu\text{l}$ 와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3 분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20  $\mu\text{l}$ 의 증류수에 녹여 heating block 75  $^\circ\text{C}$ 에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

#### ② 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 2  $\mu\text{g}$ 을 DNase I (10U/ $\mu\text{l}$ ) 2 U/tube를 37  $^\circ\text{C}$  heating block에서 30 분간 반응한 후 75  $^\circ\text{C}$ 에서 10 분 동안 변성시키고, 이에 2.5  $\mu\text{l}$

10 mM dNTPs mix, 1  $\mu\text{l}$  random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25  $\mu\text{l}$ ), RNA inhibitor로서 1  $\mu\text{l}$  RNase inhibitor (20 U/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  100 mM DTT, 4.5  $\mu\text{l}$  5 $\times$ RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ )를 가한 후, 1  $\mu\text{l}$ 의 M-MLV RT (200 U/ $\mu\text{l}$ )를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 이 20  $\mu\text{l}$ 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 초간 원심 침강하여 37  $^\circ\text{C}$  heating block에서 60 분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한다. 다음, 95  $^\circ\text{C}$ 에서 5 분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

#### ③ Real Time Quantitative RT-PCR

Real time quantitative PCR은 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다.

사용된 primers는;

#### mouse glyceraldehyde-3-phosphate

##### dehydrogenase (G3PDH)

Forward Primer: 5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'

Reverse Primer: 5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'

#### mIL-1 beta

Forward Primer:

CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG

Reverse Primer: GATCCACACTCTCCAGCTGCA

#### mouse IL-6

LEFT PRIMER ccatgaagaccttcacctc

RIGHT PRIMER actctcggcctacattggtg

#### mouse TNF-alpha

LEFT PRIMER tgggaggaaaggggtctaag

RIGHT PRIMER acctacgacgtgggctacag

**mouse IL-10**

LEFT PRIMER aagcagccttgagaaaaga

RIGHT PRIMER tgggaagtgggtgcagttat

**mouse TGF-beta 1**

LEFT PRIMER tggagcaacatgtggaactc

RIGHT PRIMER ctgccgtacaactccagtga

사이토카인 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard로 G3PDH를 사용하였고, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은: pre-denaturation은 2 min at 50 °C, 10 min 94 °C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95 °C, 1 min at 60 °C에서 수행하였다. KCSYJT 투여 군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 target group의 Quantitative PCR

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

x = starting quantity

y = yield

n = number of cycles

e = efficiency

로 계산하여 RQ (relative quantitative)을 측정하였다.

(4) IFN- $\gamma$ + 와 foxp3+ T 세포의 intracellular staining 분석

18주령의 NC/Nga생쥐에서 분리한 CD4<sup>+</sup> T를 미리  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Ab (1  $\mu$ g/ml)가 coating된 24 well plate에 분주한 후 cyclosporin A (Cs A) 5  $\mu$ g/ml과 加味清心蓮子湯 추출물 100  $\mu$ g/ml 등을 가하여 48 시간 동안 동시배양 하였다. 배양 종료 후 BD Cytotfix/Cytoperm Plus Kit (with BD GolgiPlug, 555028)와 Mouse foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Flow Cytometry Kit, (from BioLegend)를 이용하여 각각 세포내 염색을 통하여 CD4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 세포와 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/foxp3<sup>+</sup> Treg 세포의 형광염색을 실시하였다. 반응 후 3 회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형

광분석기 (Cytometry, BD, USA)로 분석하였다. 분석프로그램으로는 CellQuest 프로그램을 사용하여 활성세포(%) 비율을 산출하였다.

(5) GATA3+ (transcription factor) T 세포의 intracellular staining 분석

18주령의 NC/Nga생쥐에서 분리한 비장세포를 미리  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Ab (1  $\mu$ g/ml)가 coating된 24 well plate에 분주한 후 양성대조군인 CsA 5  $\mu$ g/ml과 加味清心蓮子湯 추출물 100  $\mu$ g/ml를 가하고 rmlL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 200ng/ml, Pharmingen)를 처리한 후 24 시간 동안 동시 배양 하였다. 배양 종료 후 BD Cytotfix/Cytoperm Plus Kit (with BD GolgiPlug, 555028)를 이용하여 각각 세포내 염색을 통하여 CD4<sup>+</sup>/GATA3<sup>+</sup> 세포의 형광염색을 실시하였다. 반응 후 3 회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기 (Cytometry, BD, USA)로 분석하였다. 분석프로그램으로는 CellQuest 프로그램을 사용하여 활성세포(%) 비율을 산출하였다.

**3) 統計處理**

실험으로부터 얻은 결과는 mean $\pm$ standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

**III. 성 적****1. KCSYJT의 세포독성 측정**

KCSYJT 추출물의 세포독성을 측정한 결과, Fig.1에서 보듯이 농도가 10 mg/ml에서 250  $\mu$ g/ml까지는 거의 세포독성이 나타나지 않았다. 또한 저농도인 1 mg/kg, 500  $\mu$ g/ml과 250  $\mu$ g/ml에서는 세포의 증식이 일어난 것으로 관찰 되었다.

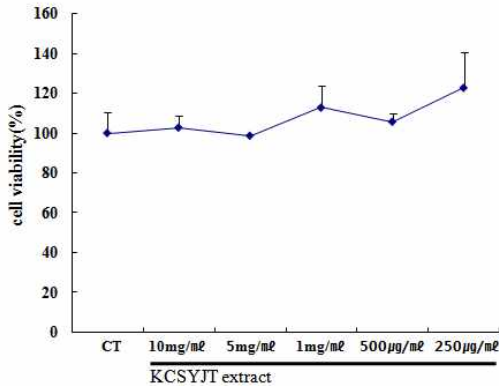


Fig.1. Cytotoxicity effects of KCSYJT extract on human fibroblast cells(hFCs).

hFCs were pretreated with various concentration KCSYJT extract. The results are expressed the mean± S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

2. in vitro : Splenocytes culture of NC/Nga-induced atopic dermatitis mice

1) Real-time-PCR analysis on atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse

(1) NC/Nga 생쥐의 B세포에서 IL-1β, IL-6, 그리고 TNF-α mRNA 유전자 발현 분석

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장세포를 anti-CD40/rmIL-4으로 자극하여 활성화 시킨 후 KCSYJT 추출물에 의하여 IL-1β, IL-6, 그리고 TNF-α mRNA 유전자 발현이 억제되는지를 관찰한 결과로 대조군에 대한 KCSYJT 추출물 처리군의 상대정량(RQ)값으로 분석하였다. Fig.2에서 보듯 무처리군 (정상군)의 IL-1β, IL-6, 그리고 TNF-α mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일 때 각각 0.795, 0.109, 0.491이었고, anti-CD40/rmIL-4과 KCSYJT 추출물과 동시 배양한 실험군은 대조군의 RQ값이 1 일때 IL-1β, IL-6, 그리고 TNF-α

mRNA 유전자 발현이 0.60, 0.788, 그리고 0.473으로 TNF-α 유전자 발현은 현저하게 억제되었고, IL-1β와 IL-6 mRNA 유전자 발현은 20-40%이상 감소를 나타내었다. 또한 양성대조군인 rmIL-10을 처리하고 anti-CD40/rmIL-4으로 자극한 실험군의 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1 일 때 IL-1β, IL-6, 그리고 TNF-α mRNA 유전자 발현이 0.233, 0.546, 그리고 0.375로 나타나 IL-1β, IL-6, 그리고 TNF-α mRNA 유전자 발현은 55-75%이상 유전자 발현이 현저하게 억제되었다.

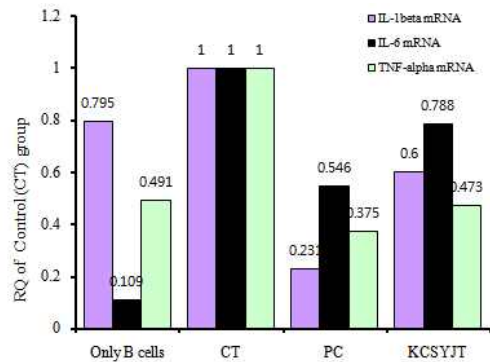


Fig.2 Effects of KCSYJT extract on IL-1β, IL-6 and TNF-α mRNA expression by KCSYJT extract plus anti-CD40/rmIL-4-stimulated murine B cells.

Isolated B cells from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with anti-CD40/rmIL-4 (10 µg/ml) or treated with KCSYJT extract (100 µg/ml) plus KCSYJT extract. B cells were not treated (normal; only cells), co-cultured with anti-CD40/rmIL-4 (Control), and with anti-CD40/rmIL-4 plus KCSYJT extract for 4hrs. IL-1β, IL-6, and TNF-α mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-1β, IL-6, and TNF-α mRNA expression were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above

the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

(2) NC/Nga 생쥐의 비장 B세포에서 IL-10와 TGF-β mRNA 유전자 발현 분석

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장 B세포를 anti-CD40/rmIL-4으로 자극하여 활성화 시킨 후 KCSYJT 추출물에 의하여 IL-10과 TGF-β mRNA 유전자 발현을 관찰한 결과로 대조군에 대한 KCSYJT 추출물 처리군의 상대정량 (RQ) 값으로 분석하였다. Fig.3에서 보듯 무처리군 (정상군)의 IL-10과 TGF-β mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일 때 각각 0.593과 0.816이었고, anti-CD40/rmIL-4과 KCSYJT 추출물과 동시 배양한 실험군은 대조군의 RQ값이 1 일때 IL-10과 TGF-β mRNA 유전자 발현이 2.222와 0.789로 IL-10 mRNA 유전자 발현은 대조군(RQ)보다 2 배 이상 증가를 하였고, TGF-β 유전자 발현은 20%이상 억제되었다. 또한 양성대조군인 rmIL-10을 처리하고 anti-CD40/rmIL-4으로 자극한 실험군의 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일 때 IL-10 그리고 TGF-β mRNA 유전자 발현이 0.815과 0.473으로 대조군에 비하여 모두 억제를 나타내었다.

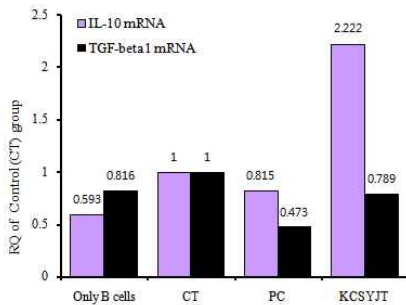


Fig.3 Effects of KCSYJT extract on IL-10, and TGF-β mRNA expression by KCSYJT extract plus anti-CD40/rmIL-4-stimulated

murine splenocytes.

Isolated B cells from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with anti-CD40/rmIL-4 (10 μg/ml) or treated with KCSYJT extract (100 μg/ml) plus KCSYJT extract. B cells were not treated (normal; only cells), co-cultured with anti-CD40/rmIL-4 (Control), and with anti-CD40/rmIL-4 plus KCSYJT extract for 4hrs. IL-10, and TGF-β mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-10, and TGF-β mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

(3) NC/Nga 생쥐의 CD4+ T세포에서 CD4+/IFN-γ+ intracellular staining 분석

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장에서 CD4+ T 세포를 varioMACS를 사용하여 순수 분리하여 미리 coating 해놓은 anti-CD3/anti-CD28 (1 μg/ml)로 자극하여 활성화 시킨 후 24 시간 배양하여 세포내 IFN-γ+ intracellular staining으로 분석하였다. 그 결과 anti-CD3/anti-CD28 (1 μg/ml)로 자극하지 않은 only CD4+ T 세포군의 CD4+/IFN-γ+ 는 2.9% 이었고, anti-CD3/anti-CD28 (1 mg/ml)로 자극한 대조군의 CD4+/IFN-γ+ 는 10.8% 이었다. 양성대조군으로 Cs A (1 μg/ml)를 anti-CD3/anti-CD28 (1 μg/ml)와 동시 배양한 CsA 처리군의 CD4+/IFN-γ+는 6.8% 이었고, 실험군으로 KCSYJT 추출물 (100 μg/ml)를 anti-CD3/anti-CD28 (1 μg/ml)와 동시 배양한 KCSYJT 추출물 처리군의 CD4+/IFN-γ+는



16.5%로 대조군에 비하여 53%이상 증가하여 알레르기 반응에서 우위한 Th2 세포에서 Th1 세포로 Shift 시킬 수 있을 것으로 생각된다.

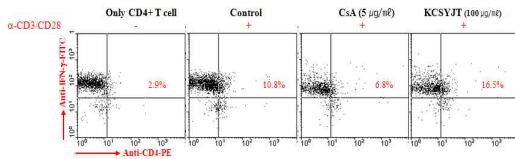


Fig.4 Effects of KCSYJT extract on IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> intracellular staining analysis by anti-CD3/anti-CD28-stimulated murine CD4<sup>+</sup> T cells.

Isolated CD4<sup>+</sup> T cells from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml) or treated with KCSYJT extract (100  $\mu$ g/ml). CD4<sup>+</sup> T cells were not treated (normal; only cells), co-cultured with anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml) (Control), and with anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml) plus KCSYJT extract, and with anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml) plus CsA (5  $\mu$ g/ml) for 24hrs. After a 24-hours stimulation, 0.6  $\mu$ l/ml monensin (GolgiStop; BD Pharmingen) was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled anti-CD4. After fixation in Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen), cells were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer (BD Pharmingen), stained with PE-labeled anti-IFN- $\gamma$  mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

(4) NC/Nga 생쥐의 CD4<sup>+</sup> T세포에서 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/foxp3<sup>+</sup> intracellular staining 분석

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장에서 CD4<sup>+</sup> T 세포를 varioMACS를 사용하여 순수 분리하여 미리 coating 해놓은 anti-CD

3/anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml)로 자극하여 활성화 시킨 후 48 시간 배양하여 세포내 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/foxp3<sup>+</sup> intracellular staining으로 분석하였다. 그 결과 anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml)로 자극하지 않은 only CD4<sup>+</sup> T 세포군의 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/foxp3<sup>+</sup>는 1.3% 이었고, anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml)로 자극한 대조군의 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/foxp3<sup>+</sup>는 5.16% 이었다. 양성대조군으로 cyclosporin A (1  $\mu$ g/ml)를 anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml)와 동시 배양한 CsA 처리군의 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/foxp3<sup>+</sup>는 3.1%로 대조군에 비하여 감소를 나타내었다. 실험군으로 KCSYJT 추출물 (100  $\mu$ g/ml)를 anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml)와 동시 배양한 KCSYJT 추출물 처리군의 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/foxp3<sup>+</sup>는 13.6%로 대조군에 비하여 2.6배 이상 증가를 나타내어 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells의 증가를 유도하는 것을 알 수 있다.

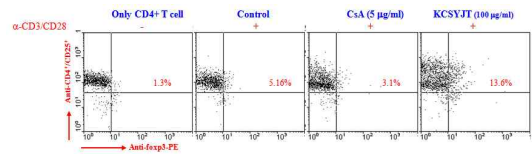


Fig.5 Effects of KCSYJT extract on CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/foxp3<sup>+</sup> intracellular staining analysis by anti-CD3/anti-CD28-stimulated murine CD4<sup>+</sup> T cells.

Isolated CD4<sup>+</sup> T cells from atopy dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml) or treated with KCSYJT extract (100  $\mu$ g/ml). CD4<sup>+</sup> T cells were not treated (normal; only cells), co-cultured with anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml) (Control), and with anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml) plus KCSYJT extract, and with anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml) plus CsA (5  $\mu$ g/ml) for 48hrs. After a 48-hours stimulation, 0.6  $\mu$ l/ml monensin (GolgiStop; BD Pharmingen) was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled anti-CD4, and Cychrom5.5-

labeled anti-CD25. After fixation in Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen), cells were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer (BD Pharmingen), stained with PE-labeled anti-foxp3 mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

(5) NC/Nga 생쥐의 비장세포에서 CD4<sup>+</sup>/GATA3<sup>+</sup> intracellular staining 분석

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장에서 비장세포를 분리하여 미리 coating 해 놓은 anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 rmIL-4 (200 ng/ml)으로 자극하여 활성화 시킨 후 24 시간 배양하여 세포내 CD4<sup>+</sup>/GATA3<sup>+</sup> intracellular staining으로 분석하였다. 그 결과 anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 자극하지 않은 only CD4<sup>+</sup> T 세포군의 CD4<sup>+</sup>/GATA3<sup>+</sup>는 0.7% 이었고, anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 rmIL-4 (200 ng/ml)로 자극한 대조군의 CD4<sup>+</sup>/GATA3<sup>+</sup>는 10.5% 이었다. 양성대조군으로 cyclosporin A (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 rmIL-4 (200 ng/ml)와 동시 배양한 CsA 처리군의 CD4<sup>+</sup>/GATA3<sup>+</sup>는 1.3% 로 대조군에 비하여 감소를 나타내었다. 실험군으로 KCSYJT 추출물 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 rmIL-4 (200 ng/ml)와 동시 배양한 KCSYJT 추출물 처리군의 CD4<sup>+</sup>/GATA3<sup>+</sup>는 4.9%로 대조군에 비하여 53% 이상 CD4<sup>+</sup>/GATA3<sup>+</sup> T 세포의 transcription factor를 억제하는 것을 알 수 있다

murine CD4<sup>+</sup> T cells.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) plus rmIL-4 (200 ng/ml) or treated with KCSYJT extract (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). splenocytes were not treated (normal; only cells), co-cultured with anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) plus rmIL-4 (200 ng/ml) (Control), and with anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) plus rmIL-4 (200 ng/ml) plus KCSYJT extract, and with anti-CD3/anti-CD28 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) plus rmIL-4 (200 ng/ml) plus CsA (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24hrs. After a 24-hours stimulation, 0.6  $\mu\text{l}/\text{ml}$  monensin (GolgiStop; BD Pharmingen) was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled anti-CD4. After fixation in Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen), cells were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer (BD Pharmingen), stained with PE-labeled anti-GATA3 mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

IV. 고 찰

아토피피부염에서의 주된 면역학적 변화는 IgE의 증가와 T세포의 기능장애이다<sup>17)</sup>. 대부분의 알레르겐에 특이한 T세포 클론은 TH0로, 이는 TH1 세포나 TH2 세포로 변하게 된다<sup>18)</sup>. TH1 세포는 IL-2와 IFN- $\gamma$ 를 생성하여 세포매개성 면역반응에 관여하고, TH2 세포는 IL-4, IL-5, 그리고 IL-10을 생성하며 체액성 면역반응을 조절 한다<sup>19)</sup>. IL-12는 대식세포에서 분비되며 TH1 세포로의 분화를 촉진하는 반면 초기에 IL-4가 형성되면 TH2 세포가 만들어진다<sup>20)</sup>. TH1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 는 TH2 반응을 억제 한다<sup>21)</sup>. TH2 사이토카인인 IL-4, IL-10은 TH1

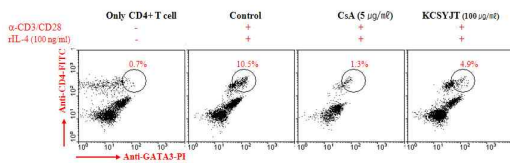


Fig.6 Effects of KCSYJT extract on CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> intracellular staining analysis by anti-CD3/anti-CD28-stimulated

반응을 억제하며 IgE의 생성을 증가시키고, 비만세포의 증식 그리고 호산구의 침윤에 관여한다<sup>22)</sup>. TH1 반응은 자가면역, Lyme 병, 결핵성 나, 접촉피부염, 건선 등에 관여하며, TH2 반응에는 아토피피부염, Sezary 증후군, 나종형 나 등이 있다<sup>20)</sup>. IL-4는 비만세포나 호염구에서 FcεRI에 의한 신호에 의해 미리 형성된 형태로 분비된다<sup>23)</sup>. IL-4는 IFN-γ의 생성과 TH1세포로의 분화를 억제하며, B세포에서 IgE의 생성과 TH2 세포로의 분화를 촉진한다. IL-4는 표적세포 수용체를 통하여 작용을 하는데, 수용체는 이형체인 IL-4Ra와 γ로 구성 되어있다<sup>24)</sup>. IL-4Ra는 IL-4의 결합과 신호전달에 있어 중요한 역할을 하고<sup>25-27)</sup>. IL-4Rγ는 여러 사이토카인 수용체에 공통으로 존재하며 α수용체의 신호를 증폭하게 된다<sup>28-29)</sup>. IL-4가 IL-4수용체를 자극하게 되면 Janus tyrosine kinase-1과 -3이 활성화되고 뒤이어 Stat6가 활성화 된다<sup>30-31)</sup>. Stat6는 IgE의 생성에 중요한 역할을 하는데, 실제로 Stat6가 없는 생쥐에서는 IL-4에 의한 TH2 반응이 일어나지 않는다<sup>33)</sup>. IL-4 수용체는 T세포나 B세포, 비만세포, 그리고 대식세포 등에서도 관찰된다<sup>34)</sup>. IL-4 수용체는 정상시에는 적으나 세포가 활성화되면 표현이 증가 된다<sup>35)</sup>. IL-4가 IL-4 수용체에 부착하게 되면 B세포, 단핵구 또는 대식세포의 표면에 low-affinity IgE receptor (CD23)를 표현하게 된다<sup>36)</sup>. IL-4 수용체가 IL-4에 노출되면 TH0세포가 TH2 세포로 분화와 성장을 하게 된다. IL-4는 활성화된 TH2 세포에서 생성되기 때문에 TH2 반응을 지속시키는 역할을 한다<sup>37)</sup>. 알레르기성 질환의 발생에 관여하는 유전자는 약 20종류가 있는 것으로 알려져 있지만 그 중에서도 특히 염색체 5q31-33은 IL-4 유전자 프로모터의 다형성과 염색체 16p12는 IL-4 수용체 α 유전자의 다형성과 연결되어 있다<sup>38)</sup>. 염색체 5q31-33에는 IL-4 이외에도 IL-3, IL-5, IL-13 그리고 GM-CSF와 같은 TH2 사이토카인에 대한 유전자가 속해 있다<sup>39)</sup>. IL-4는 TH2 반응을 시작하며 유지시키는데 중요한 역할을 하여 아토피피부염의 발생과 연관되

어 있다.

인체의 방어 기전인 면역체계는 T 세포의 활성화를 중심으로 이루어진다. 따라서 T 세포의 활성화에 관한 충분한 이해는 면역체계의 조절 과정을 파악하는데 도움이 되며, 많은 면역질환의 예방 및 치료제 개발의 자료가 되는데, T 세포(Naive CD4<sup>+</sup> T cell)의 활성화는 T 세포 수용체(TCR : T cell receptor)를 통한 매우 복잡한 신호전달과정을 통하여 이루어지며, 이 과정에 참여하는 주요 인자는 수용체, 인산화 효소, adapter, effector, 전사조절인자(transcription factor) 등이다<sup>40)</sup>. 활성화된 CD4<sup>+</sup> T세포는 보조 T세포(helper T cell, Th세포)로서 이들 Th세포는 B세포의 항체 생산을 보조하고(Th2), 감염된 대식세포의 활성화를 돕는다(Th1). 이러한 작용은 직접 세포-세포간 상호 결합에 의해서 또는 cytokine의 분비를 통해서 이루어진다<sup>41)</sup>. Th 세포는 IL-2를 생산하고, 세포 주기의 G0 단계에서 G1 단계로 들어가게 되어 세포 증식을 시작하게 되며<sup>42)</sup>, 다음 단계인 분화(differentiation) 단계에서 세포의 기능이 결정된다. 즉, 활성화된 Th 세포는 그들이 분비하는 사이토카인의 종류와 분비한 cytokine에 의한 면역 조절기능에 따라 Th1과 Th2, 두 종류의 효력 T세포(effector CD4<sup>+</sup> T cell)로 분화하게 된다<sup>43)</sup>. 이렇게 분화된 효력 Th1 세포는 IFN-γ, IL-12와 같은 Th type 1 cytokine(proinflammatory cytokine)을 생산하여 박테리아 감염과 같은 intracellular pathogen에 대항하는 면역반응에 관여한다. 한편 이들의 과도한 발현은 자가면역질환을 초래하기도 한다. 이와는 달리 효력 Th2 세포는 IL-4, 5, 9, 10, 13 등과 같은 Th type 2(antiinflammatory cytokine)을 생산하여 기생충과 같은 extracellular parasite의 감염에 대항하고, B 세포와 함께 체액성 면역반응에 관여하는데<sup>44-45)</sup>, 잘 알려져 있듯이 이들의 과다한 발현은 알레르기 질환을 초래할 수 있다.

이처럼 Th1 세포가 생산하는 Th type 1 cytokine은 Th1 세포의 분화를 유도하는 반면 Th2 세포의 증식과 분화를 억제하며, 반대로 Th2 세

포가 생산하는 Th type 2 cytokine은 Th2 세포의 증식과 분화를 유도하는 반면 Th1 세포의 분화를 억제하는 식으로 서로 상호조절을 통해 균형을 이루며 Th1과 Th2 면역반응을 조절하므로, 이 균형이 깨어지게 되면 Th1/Th2 불균형으로 인한 여러 가지 면역질환을 겪게 된다<sup>46)</sup>. 알레르기 질환도 그 균형이 Th2 쪽으로 치우친 결과로 유발된 면역질환 중의 하나이다. 이렇듯 알레르기 발생과 조절에 있어 가장 중요한 세포는 Th2 세포로, 알레르기는 항체의 isotype을 IgM 또는 IgG에서 IgE로 바꾸어주는 Th2 세포가 활성화되면서 시작되며, Th2 세포가 생산하는 Th type 2 cytokine(IL-4, IL-10 etc)에 의해서 B 세포의 IgE 생산, 호산구의 활성화, 염증반응 등을 나타낸다<sup>47)</sup>. 따라서 알레르기 질환이 Th1 세포와 Th2 세포의 균형이 깨어져 Th2 쪽으로 치우쳐서 유발되는 질환이라는 것에 근거해 볼 때, Th1 세포로의 분화를 주도하는 T-bet은 중요한 알레르기 반응조절제로서의 역할을 수행하리라 생각되어 알레르기 치료제 개발에 있어 매우 흥미로운 대상으로 부각되고 있다<sup>48)</sup>. 이와 같이 면역반응제어에 있어서 Th 세포기능 조절의 중요성이 강조되고 있고, 특히 Th1/Th2 분화 및 cytokine의 균형과 알레르기 반응과의 밀접한 관계로 미루어 볼 때, 단순히 임상적 증상들을 완화시키는 일시적인 치료제 개발이 아닌, 보다 근본적인 요인에 초점을 맞춘 새로운 알레르기 치료제 개발이 Th 세포분화조절을 통하여 실현될 가능성이 있어, 앞으로 이 분야의 연구는 더욱 활성화될 것으로 보인다. 이러한 알레르기는 Coombs와 Gell에 의해 발생기전에 따라 제 1형: IgE 매개성 과민반응, 제 2형: 항원-항체 매개성 과민반응, 제 3형: 항원-항체 복합체 매개성 과민반응, 제 4형: T세포 매개성 과민반응으로 분류한다. 그 중 제 1형 알레르기 반응은 일반적으로 불리는 알레르기 반응의 대부분을 차지하는데 피부, 기관지점막, 비점막 등에 분포되어 있는 비만세포 표면의 IgE와 항원이 반응하여 비만세포의 탈과립 현상을 유발시켜 수 분 내에 비만세포에서 혈관 확장 및 염증반응 매개물질이 분비되어

평활근 수축, 점액분비, 점액부종, 혈관과민성 항진, 혈관 확장을 일으켜 알레르기 질환을 발생하게 하는 주요 원인이 된다. 주요 표적기관은 폐, 피부, 위장관이고 주된 알레르기 질환은 아토피 피부염, 고초열, 기관지 천식, 알레르기성 비염 등이 있다<sup>49-51)</sup>. 아토피 피부염은 제1형 알레르기 반응기전에 의한 아토피 질환의 하나로 구분되면서도 다른 아토피 질환과는 달리 정확한 병인이 알려져 있지 않으며 병인에 알레르기 기전이 얼마나 관여하는가에 대해서도 논란이 되고 있다. 아토피 피부염 환자의 약 80% 이상에서 혈청 IgE가 증가하는데 대부분의 환자에서 음식물이나 대기 중 항원에 대한 특이 IgE 항체가 나타나고 즉시형 피부반응도 양성으로 나타나며 일부 환자는 해당 음식물 섭취 후 피부염이 악화된다. 호흡기를 통하여 대기 중 항원에 노출된 후 피부염이 악화되기도 하며, 대기 중 항원에 대한 철폘 시험에 대하여 양성반응을 보이는 경우도 있다. 그러나 검사소견에서 나타나는 특이 IgE 항체나 양성 피부반응의 대부분은 질환의 심한 정도, 범위와의 상관관계와는 깊은 연관이 없다. 또한 아토피 피부염 환자는 세균, 바이러스, 진균 등의 피부감염이 정상인보다 흔하고, dinitrochlorobenzene (DNCB)과 같은 접촉성 항원에 대한 감각 기능이 저하되는 등 세포면역반응이 저하되어 있다<sup>52-57)</sup>. 이와 같이 아토피 피부염은 종전까지는 IgE에 감작된 비만세포가 histamine 등의 화학매체들을 분비시켜 부종, 붉은 반점 및 소양 등과 같은 증상들이 발생하는 것으로 설명해왔으나 이것만으로는 만성 염증상태를 나타내는 이유와 아토피 피부염환자에서 흔히 보는 세포매개성 면역기능의 저하를 충분하게 설명할 수 없었다. 그렇지만 세포성 면역에서 중요한 위치를 차지하는 T림프절구 아형 또는 그와 관련된 cytokine이 면역체계에 관여한다는 사실이 규명된 다음 이 부분에 대한 설명이 가능해졌고 최근에는 세포면역을 담당하는 T세포 및 그 아형의 이상, 그로 인해 나타나는 cytokine의 불균형이 아토피피부염을 일으키는 주요 기전이 된다고 설명하고 있다<sup>58-60)</sup>.

이에 임상에서 아토피 피부염 환자들에게 다용

되고 있으며 임상상 효과를 보이고 있는 加味清心蓮子湯이 아토피 피부염에 실험적으로 효과가 있다고 가정할 때 NC/Nga 아토피모델 생쥐에서 피부염과, IgE 증가에 대한 억제 효과를 알아보고자 본 실험에 임하게 되었다.

본 실험의 결과를 살펴보면, In vitro 실험에서 정상 생쥐의 폐세포를 분리하여 加味清心蓮子湯 추출물의 세포독성을 SRB 법<sup>61)</sup>을 약간 변형하여 측정된 결과, 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다. 또한 加味清心蓮子湯 추출물이 NC/Nga 생쥐의 면역세포의 알레르기 면역반응을 억제하는지를 알아보고자 24시간동안 加味清心蓮子湯 추출물 100 $\mu$ g/ml과 anti-CD40/rmIL-4을 동시 배양한 결과, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , 그리고 - $\beta$ 의 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1일 때, 양성대조군은 2.222였다. 이로부터 加味清心蓮子湯 추출물이 알러젠에 의한 알레르기 반응에 반드시 수반되는 B세포의 활성화, 분화, 그리고 IgE 생성을 선택적으로 억제하여 초기 알레르기 반응을 효과적으로 억제하는 것으로 생각된다. NC/Nga 아토피발진 생쥐에서 분리한 비장면역세포를 anti-CD40/rmIL-4으로 자극한 후 加味清心蓮子湯 추출물을 처리하여 알레르기 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 보기 위해 real-time PCR로 RQ값을 관찰하였다. 또한 CD4<sup>+</sup> T 세포를 분리하여 anti-CD3/CD28로 자극하여 배양한 후 Th1에서 분비하는 IFN- $\gamma$ , 그리고 Treg 세포인 CD4<sup>+</sup>/foxp3<sup>+</sup>를 intracellular 염색으로 측정된 결과 대조군에 비하여 加味清心蓮子湯 추출물 처리군이 대조군에 비하여 현저하게 증가를 나타내었다. 이상의 실험결과는 加味清心蓮子湯 추출물이 면역세포의 알레르기 반응으로의 분화를 억제하고 관련 유전자 발현을 선택적으로 조절하여 항알레르기의 효과가 있음을 나타내는 것으로 생각된다. 또한 GATA3는 Th2 세포의 IL-4, IL-5, 그리고 IL-13등 유전자 발현의 전사인자인 transcription factor로 T세포를 Th2세포로 분화와 증식을 유도하는 인자이다. 비장세포를 분리하여 anti-CD3/CD28와 rmIL-4로 자극하여 배양한 후 CD4<sup>+</sup>/GATA3<sup>+</sup>를 intracellular

r 염색으로 측정된 결과 대조군에 비하여 加味清心蓮子湯 추출물 처리군이 대조군에 비하여 현저하게 감소를 나타내었다.

## V. 결 론

아토피 질환 환자에 사용되는 加味清心蓮子湯이 아토피 발진 억제에 미치는 영향을 in vitro에서 실험한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

### 1. In vitro

- 1) 加味清心蓮子湯은 활성화 B 세포에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 와 TGF- $\beta$ 의 유전자 발현을 억제하였다.
- 2) 加味清心蓮子湯은 활성화 B 세포에서 IL-10 유전자 발현을 증가시켰다.
- 3) 加味清心蓮子湯이 활성화 T 세포에서 CD4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>와 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/foxp3<sup>+</sup> intracellular staining을 통하여 대조군에 비하여 세포내 발현량이 증가되었다.
- 4) 加味清心蓮子湯이 비장세포에서 전사인자인 CD4<sup>+</sup>/GATA3<sup>+</sup> intracellular staining을 통하여 대조군에 비하여 세포내 발현량이 억제되었다.

## VI. 참고 문헌

1. 丁奎萬 : Allergy와 韓方, 서울, 第一路, pp.101~108, 1990.
2. 이영진, 강혜영, 정병주, 김규언, 이기영. 아토피 피부염에서 아토피 지표의 의의. 소아알레르기 및 호흡기, 1994;(12)4: p11-24.
3. Kay AB. Leukocytes in asthma. Immunol Invest 1988;17:679-705
4. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. J Allergy Clin Immunol 2003; 111:450-63
5. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T

- lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-93
6. Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'shea JJ, et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* 2003;23:147-61
  7. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000;100:655-69
  8. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in Th1 lineage ommitment and IFN- $\gamma$  production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 2002;295:338-42
  9. Ting CN, Olson MC, Barton KP, Leiden JM. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 1996;384:474-8
  10. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997;89:587-96
  11. Kay AB. The role of T lymphocytes in asthma. *Chem Immunol Allergy* 2006;91:59-75
  12. Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha R, Soussi-Gounni A, Zhang DH, et al. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:215-22
  13. Christodoulopoulos P, Cameron L, Nakamura Y, Lemiere C, Muro S, Dugas M, et al. Th2 cytokine-associated transcription factors in atopic and nonatopic asthma: evidence for differential signal transducer and activator of transcription 6 expression. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:586-91
  14. Taha R, Hamid Q, Cameron L, Olivenstein R. T helper type 2 cytokine receptors and associated transcription factors GATA-3, c-Maf, and signal transducer and activator of transcription factor 6 in induced sputum of atopic asthmatic patients. *Chest* 2003; 123:2074-8
  15. Zheng W, Flavell RA: The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89:587-596, 1997
  16. 大田大學校 韓方病院. 韓方病院 處方集. 大田:韓國出版社. 2001:335
  17. Friedlaender MH. The current and future therapy of allergic conjunctivitis. *Curr. Opin Ophthalmol.* 9:54~58, 1998.
  18. German JA. and Harper MB. Environmental control of allergic disease. *Am. Fam. Physician.* 66:421~426, 2002.
  19. Grogan JL. and Locksley RN. T helper cell differentiation : on again , off again. *Current Opinion in Immunology* 14:366~372, 2002.
  20. Inagaki N. and Nagai H. Drugs for the treatment of allergic diseases. *Jpn J. Pharmacol.* 86:275~280, 2001.
  21. Kay AB. Overview of allergy and allergic disease : with a view to the future. *Br. Med. Bull.* 56:843~864, 2000.
  22. Park, L. S., D. Friend, K. Grabstein, and D. L. Urdal. 1987. Characterization of the high-affinity cell-surface receptor

- for murine B-cell-stimulating factor 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1669.
23. Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, et al. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. Science 2002;295:336-8
  24. Walker C, Bauer W, Braun RK, Menz G, Braun P, Schwarz F, et al. Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. Am J Respir Crit Care Med 1994;150:1038-48
  25. Humbert M, Durham SR, Ying S, Kimmitt P, Barkans J, Assoufi B, et al. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. Am J Respir Crit Care Med 1996;154:1497-504
  26. Zhang DH, Yang L, Cohn L, Parkyn L, Homer R, Ray P, et al. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant negative mutant of GATA-3. Immunity 1999;11:473-82
  27. Finotto S, De Sanctis GT, Lehr HA, Herz U, Buerke M, Schipp M, et al. Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. J Exp Med 2001;193:1247-60
  28. Agarwal S, Avni O, Rao A. Cell-type-restricted binding of the transcription factor NFAT to a distal IL-4 enhancer in vivo. Immunity 2000;12:643-52
  29. Kim JI, Ho IC, Grusby MJ, Glimcher LH. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. Immunity 1999;10:745-51
  30. Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. Science 2005;307:430-3
  31. Ansel KM, Lee DU, Rao A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. Nature Immunol 2003;4:616-23
  32. Shimoda K, Van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, et al. Lack of IL-4-induced TH2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. Nature 1996;380:620-33
  33. Mullings R, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL, Bucchieri F, Djukanovic R, et al. Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6) expression and function in asthmatic bronchial epithelium. J Allergy Clin Immunol 2001;108:832-8
  34. Hanifin JM. Atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 1984;73:211-26.
  35. Brunsting LA, Reed WB, Bair HL. Occurrence of cataract and keratoconus with atopic dermatitis. Arch Dermatol 1955;72:237-41.
  36. Hogan MJ. Atopic keratoconjunctivitis. Am J Ophthalmol 1953;36:937-41.
  37. Easty D, Entwistle C, Funk A, Witcher J. Herpes simplex keratitis and keratoconus in the atopic patient: a

- clinical and immunological study. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1975;95:267--76.
38. Ingram RM. Retinal detachment associated with atopic dermatitis and cataract. *Br J Ophthalmol* 1965;49:96--7.
39. Garrity JA, Liseseang TJ. Ocular complications of atopic dermatitis. *Can J Ophthalmol* 1984;19:21--4.
40. Okudaira H, Hongo O, Ogita T, et al. Serum IgG and IgE antibody levels in patients with bronchial asthma, atopic dermatitis, eosinophilic granulomas of the soft tissue (Kimura's disease) and other diseases. *Ann Allergy* 1983;50:51--4.
41. Ikezawa Z, Miyakawa K, Komatsu H, et al. A probable involvement of rice allergy in severe type of atopic dermatitis in Japan. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1992;176:103--7.
42. Uehara M, Kimura C, Uenishi T. Type I allergy to foods in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1992;176:38--40.
43. Marino M, Donzelli GP, Gallil L, et al. Food allergy in preterm infants fed human milk. *Biol Neonat* 1989;56:301--5.
44. Sampson HA, McCaskill CC. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. *J Pediatr* 1985;107:669--75.
45. Gustafsson D, Lowhagen T, Andersson K. Risk of developing atopic disease after early feeding with cow's milk based formula. *Arch Dis Child* 1992;67:1008--10.
46. Casimir GJA, Duchateau J, Gossart B, et al. Atopic dermatitis: role of food and house dust mite allergens. *Pediatrics* 1993;92:252--6.
47. Sampson HA, Albergo R. Comparison of results of skin tests, RAST, and double-blind, placebo-controlled food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1984;74:26--33.
48. Hanifin JH, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1980;92:44--7.
49. Amemiya T, Matsuda H, Uehara H. Ocular findings in atopic dermatitis with special reference to the clinical features of atopic cataract. *Ophthalmologica* 1980;180:129--31.
50. Miyakawa K. Analysis of clinical factors and IgE-RAST of *Dermatophagoides farinae* and rice in atopic dermatitis by multiple factor analysis of quantification theory type II. *Jpn J Allergy* 1991;40:1500--10.
51. Komatsu H, Suga C, Miyakawa K, et al. The clinical symptoms, RAST titers for rice and wheat, serum IgE values and eosinophil number in atopic dermatitis patients fed an elimination diet of rice. *Jpn J Allergy* 1990;39:402--9.
52. Sampson HA. Role of immediate food hypersensitivity in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1983;71:473--80.
53. Patel M, Shine B, Murray PI. Antilens antibodies in cataract and inflammatory eye disease: an evaluation of a new technique. *Int Ophthalmol* 1990;14:97--100.
54. Sandberg HO, Closs O. The alpha and gamma crystallin content in aqueous humor of eyes with clear lenses and with cataracts. *Exp Eye Res* 1979;



- 28:601--10.
55. Schreier MH, Tees R, Nordin AA, et al. Functional aspects of helper T cell clones. *Immunobiology* 1982;161:107--38.
  56. Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL. IFN-g4 regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol* 1988;140:1022--7.
  57. Wierenga EA, Snoek M, de Groot C, et al. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* 1990;144:4651--6.
  58. Helleboid L, Khatami M, Wei Z-G, Rockey JH. Histamine and prostacyclin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2281--9.
  59. Goetzl EJ. Inflammation and hypersensitivity. *Int Ophthalmol Clin* 1985;25:25--34.
  60. Nathan H, Naveh N, Meyer E. Levels of prostaglandin E2 and leukotriene B4 in tears of vernal conjunctivitis patients during a therapeutic trial with indomethacin. *Doc Ophthalmol* 1994; 85:247--54.
  61. Vanicha Vichai, and Kanyawim Kirtikara. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* 1, 2006:1112-1116.