

理中湯이 IgE가 과잉생성되고 피부염이 유발된 NC/Nga생쥐에서 IFN- γ 반응에 의한 Th2 세포분화 억제에 미치는 영향

서희연 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

The Effect of Li Zhong Tang on the Suppression of Th2 Differentiation by IFN- γ Response in IgE Hyperproduction and Atopic Dermatitis-like Skin Lesions Induced NC/Nga Mouse

Seo Hui Yeon, Han Jae Kyung, Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Objectives

The purpose of this study is to investigate the effect of Li Zhong Tang(LZH-T) on atopic dermatitis by using NC/Nga atopic dermatitis mouse.

Methods

First, in vitro, we isolated B cells from NC/Nga mouse which induced atopic dermatitis-like skin for 18 weeks. We analyzed FACS by intracellular staining of IFN- γ , GATA-3⁺ and also analyzed cytokines by using real-time PCR. Secondly, in vivo, after administration of LZH-T to the 12 weeks old mouse with atopic dermatitis. We analyzed serum IgE, IFN- γ level and observed the changes of activated cell.

Results

In vitro, LZH-T decreased the levels of CD4⁺/IFN- γ ⁺ and increased the levels of CD4⁺/GATA3⁺. In vivo, serum IgE levels were decreased and IFN- γ levels were increased in LZH-T group compared to the control group. In PBMCs, the percentage of activated cell - granulocytes, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, B220⁺CD23⁺, and CCR3⁺ were decreased and CD19⁺, CD3⁺CD8⁺ were increased in LZH-T group compared to the control group.

Conclusions

This study demonstrates immunological activity of GPJST on atopic dermatitis-like model mice.

Key words : Atopic dermatitis, Li Zhong Tang, NC/Nga mouse

■투 고 : 2009년 3월 24일, 수 정 : 2009년 4월 15일, 채 택 : 2009년 4월 20일

■교신저자 : 한재경, 충남 천안시 두정동 621 천안한방병원 2층 소아과

(Tel : 041-521-7570, Fax : 041-521-7557, E-mail : philial@hanmail.net)

I. 緒 論

아토피 피부염은 현재 전 세계적으로 10~20%의 유병률¹⁾을 보이고 있는 흔한 알레르기 질환으로 최근 연구에 따르면 7세 이상 연령아에서의 유병률이 10년 전과 비교하여 증가하였고 중증환자의 구성비도 높아진 것으로 조사되면서²⁾ 사회적 관심사가 되고 있다.

아토피 피부염의 병인은 정확하게 알려져 있지 않으며 유전적 요인과 환경적 요인 및 면역학적 요인이 복합적으로 작용하지만³⁾ 면역학적으로는 아토피 피부염 중 약 80%가 IgE의 과잉생성과 관련이 있으며⁴⁾ 서로 길항작용을 하는 Th1 반응과 Th2 반응의 불균형이 아토피 피부염을 일으키는 핵심요인으로 보고되고 있다⁵⁾. 특히 IFN- γ 는 Th1 반응을 촉진시키며 Th2 반응을 억제시켜 IgE 생성을 감소시킴으로써 Th1/Th2 반응의 균형에 중요한 역할을 담당한다⁶⁾.

한의학에서 아토피 피부염은 문헌적으로 직접적으로 언급되어 있는 바는 없으나 임상 증상 상 奶癬⁷⁾, 侵淫⁸⁾, 侵淫瘡⁹⁾, 四彎風¹⁰⁾ 등의 범주에 속하며, 원인으로는 風熱, 血熱, 血虛 등의 원인으로 인하여脾胃의 운화기능실조로 생기는 內部的 濕熱과 外部로부터 침입하는 風濕熱이 肌膚에 蘊阻되어 형성된다고 인식하고 있다¹¹⁾.

본 실험에 사용된 理中湯은 《新方新編》¹²⁾ 皮膚門에 수록된 처방으로 “治血燥癢痒”이라 하여 脾虛로 인한 濕熱 및 血虛로 인한 血燥로 발생하는 癢痒症을 수반하는 피부 병변을 다스릴 목적으로 立方되었다.

최근 한약의 아토피성 알레르기 반응 조절 효과¹³⁾, 혈중 Cytokine 분비¹⁴⁾, IL-4와 GM-CSF 발현 및 항히스타민 효과¹⁵⁾, 혈액 내 면역관련

인자에 미치는 영향¹⁶⁻¹⁹⁾ 등 한약이 아토피 피부염 환자의 면역 조절에 미치는 영향에 대한 연구가 활발히 진행 중이며 脾의 기능실조로 인한 아토피 피부염의 한약치료에 관한 연구도 많이 보고되었으나^{14,16,20,21)} 理中湯이 아토피 피부염에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 理中湯이 아토피 발진 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 *in vitro*에서 18 주령의 NC/Nga 생쥐의 비장세포를 분리하여 비장세포에 대한 理中湯의 알레르기 억제 반응을 IFN- γ 와 GATA-3의 세포내 염색을 통하여 FACS 분석하였고, *real-time PCR*을 이용하여 사이토카인을 분석하였다. 또한 *in vivo*에서 12 주령의 NC/Nga 생쥐에 理中湯을 투여한 후 혈청 중 IgE와 IFN- γ 의 수준을 측정하고 PBMCs(Peripheral Blood Mononuclear Cells)에서 활성화세포의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, 적혈구 용혈액 (ACK lysis solution), DMEM 배양액, dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), Sulforhodamin B(SRB), 2-isopropanol, PMA, Ionomycin, cyclosporin A는 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-CCR3-PE, anti-B220-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD40 mAb, mIL-4, mIL-10, BD Cytfix/Cytoperm plus kit, anti-CD8 mAb, anti-CD28 mAb 등은 Pharmingen사(Torreyana, U.S.A.) 제품을, CD4⁺ T cell isolation kit와 B cell isolation kit는 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) 제품을, TGF- β 는 R&D 사(Minneapolis, USA) 제품을, IgE ELISA kit는 SHIBAYAGI 사 (Shibukawa, Japan) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기(대웅, Korea), rotary vacuum evaporator(Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator(Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench(Vision scientific Co., Korea), autoclave(Sanyo, Japan), micro-pipet(Gilson, France), water bath(Vision scientific Co., Korea), vortex mixer(Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan),

centrifuge(Sigma, U.S.A.), deep-freezer(Sanyo, Japan), thermocycler system(MWG Biotech, Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer(OMNI, U.S.A.), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.) 및 ELISA leader(Molecular Devices, U.S.A.) 등을 사용하였다.

2) 동물

수컷 7 주령의 SPF(Specific Pathogen Free) NC/Nga 생쥐 (15~20 g)는 Charles River Japan (Yokohama, Japan)사에서 공급받았다. 동물은 실험당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2 °C, 습도 55±15 %, 12 시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물

본 실험에 사용한 理中湯의 구성은 《新方新編》¹²⁾에 수록된 처방에 준하였으며, 사용한 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입, 정선하여 사용하였고 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition of LiZhong-Tang (LZH-T)

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

4) 理中湯 추출물 (이하 LZH-T) 분리

理中湯 76 g에 각각 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 LZH-T(14.7 g)을 냉동 보관(-84 °C)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포독성

(1) Human Fibroblast cells(hFCs) 배양

정상 사람 피부 조직을 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)와 DNase type I(0.15 mg/ml), antibiotics (penicillin 10^4 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 μ g/ml))를 넣고 37 °C CO₂ 배양기에서 2 시간 동안 배양하였으며, 0.5 % trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양한 후 인산완충생리식염수로 1,500 rpm에서 2 회 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 10^5 cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

(2) 세포독성 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법²²⁾을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. hFCs 세포는 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 1 시간 배양한 후 LZH-T (최종 농도 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1 mg/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml)를 48 시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액으로 2 회 세척하였다. 96 well plate의 각 well에 50 % TCA(trichloroacetic acid)를 50

μ 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 μ 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 μ l/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA leader 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) *In vitro*

(1) Spontaneous dermatitis in NC/Nga mouse conventional한 상태에서 사육한 18 주령의 NC/Nga mouse의 눈에서 capillary 관을 이용하여 100 μ l의 혈액을 채혈한 후 이 중 IgE 함량이 50 μ g/ml 이상이고 피부에 발진이 있는 NC/Nga mouse를 선택하였다 (이를 atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse(생쥐)라 하였다).

(2) Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장에서 T 세포와 B 세포의 분리 및 배양
비장을 적출한 후 100 mesh에서 분쇄하여 비장세포를 얻고 2,000 rpm에서 5 분간 원심분리로 세포를 회수하였다. 여기에 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1 l of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5 분 동안 처리하여 적혈구를 제거하였다. 분리한 비장 세포를 2 %의 FBS가 함유된 PBS (2 % FBS/PBS)에 1×10^8 /ml로 현탁시키고 normal rat serum을 5 %되게 첨가하여 4 °C에서 15 분간 blocking한 후, T 세포분리에는 biotinylated antibody cocktail for lineage (CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , CD235a (glycophorin A), (CD4⁺ T Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec)를 가하였고, B 세포 분리에는

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. 각각의 세포를 2% FBS/PBS로 세척하여 1×10^7 /ml로 현탁하고, 20 μ l의 Anti-Biotin-antibody Microbeads를 가하여 다시 4 °C에서 15 분간 반응시켰다. 그리고 각각의 Magnetic column (CS column, Milteny Biotech)을 PBS로 세척하여 준비해둔 VarioMACS (Milteny Biotech)에 장치하고, magnetic bead가 표지된 세포를 통과시킨 후 2 % FBS/PBS로 column을 충분히 세척한 다음 column을 통과한 부유액을 원심분리하여 lineage 음성인 T 세포와 B 세포를 각각 수집하였다.

(3) IFN- γ ⁺ 세포의 intracellular staining 분석

18 주령의 NC/Nga 생쥐에서 분리한 CD4⁺ T를 미리 α -CD3/ α -CD28 Ab (1 μ g/ml)가 coating된 24 well plate에 분주한 후 cyclosporin A (CsA) 2 μ g/ml와 LZH-T 100 μ g/ml과 1 μ g/ml등을 가하여 48 시간 동안 동시 배양하였다. 또한 IFN- γ ⁺ 세포의 세포내 측정을 위하여 18 주령의 NC/Nga 생쥐에서 분리한 CD4⁺ T를 미리 α -CD3/ α -CD28 Ab (1 μ g/ml)가 coating된 24 well plate에 분주한 후 LZH-T 100 μ g/ml를 4 day 동안 동시 배양하였다.

실험은 CD4⁺ T cell에 아무 자극도 하지 않은 정상군 (Only CD4⁺ T cell), α -CD3/ α -CD28 Ab를 처리한 대조군 (Control), α -CD3/ α -CD28 Ab 그리고 CsA를 처리한 양성대조군 (CsA), α -CD3/ α -CD28 Ab, 그리고 LZH-T를 처리한 실험군 (LZH-T)으로 나누어 시행하였다.

배양종료 4 시간 전에 GolgiStop (1 μ g/ml), P MA (30 ng/ml, Sigma-Aldrich), 그리고 ionomycin (500 ng/ml, Sigma-Aldrich)을 처리하고, 실험 종료 후 BD Cytofix/Cytoperm Plus Kit (with BD

GolgiPlug, 555028)와 Mouse IFN- γ ⁺CD4⁺ Th cell Flow Cytometry Kit, (from BioLegend)를 이용하여 각각 세포내 염색을 통하여 CD4⁺/IFN- γ ⁺ 세포의 형광염색을 실시하였다. 반응 후 3 회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기 (Cytometry, BD, USA)로 분석하였다. 분석프로그램은 Cell Quest 프로그램으로 활성세포(%) 비율을 산출하였다.

(4) GATA-3⁺ T 세포의 intracellular staining 분석

18 주령의 NC/Nga 생쥐에서 분리한 비장세포를 미리 α -CD3/ α -CD28 Ab (1 μ g/ml)가 coating된 24 well plate에 분주한 후 양성대조군인 CsA 2 μ g/ml와 LZH-T 100 μ g/ml등을 가하고 mIL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 200 ng/ml)와 TGF- β (10 ng/ml)를 처리한 후 4 day 동안 동시배양 하였다.

실험은 CD4⁺ T cell에 아무 자극도 하지 않은 정상군 (Only CD4⁺ T cell), α -CD3/ α -CD28 Ab 와 mIL-4, 그리고 TGF- β 를 처리한 대조군 (Control), α -CD3/ α -CD28 Ab 와 mIL-4, TGF- β , 그리고 CsA를 처리한 양성대조군 (CsA), α -CD3/ α -CD28 Ab 와 mIL-4, TGF- β , 그리고 LZH-T를 처리한 실험군 (LZH-T)으로 나누어 시행하였다.

배양종료 4 시간 전에 GolgiStop (1 μ g/ml), P MA (30 ng/ml, Sigma-Aldrich), 그리고 ionomycin (500 ng/ml, Sigma-Aldrich)을 처리하고, 실험 종료 후 BD Cytofix/Cytoperm Plus Kit (with BD GolgiPlug, 555028)와 Mouse GATA3⁺ (BioLegend)를 이용하여 각각 세포내 염색을 통하여 CD4⁺GATA3⁺세포의 형광염색을 실시하였다. 반응 후 3 회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기로 분석하였다. 분석 프로그램은 Cell Quest 프로그램으로 활성세포

(%) 비율을 산출하였다.

(5) Quantitative real-time RT-PCR in B cells cultured

① 배양된 비장 B 세포에서 RNA 분리

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐에서 분리한 B 세포를 24 well plate에 1×10^6 세포/well로 분주하고 LZH-T 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하였고, 약물처리 1시간 후 anti-CD40 mAb (500 ng/ml)과 rmIL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 500 U/ml)를 동시 배양하였다. 그리고 rmIL-10 (recombinant mouse interleukin-10, 50 ng/ml)을 양성대조군으로 사용하였다. LZH-T와 anti-CD40 mAb와 rmIL-4를 동시 배양하여 6 시간 동시 배양 하였다.

실험은 약물처리를 하지 않은 정상군 (Only B cell), α -CD40 mAb, rmIL-4를 처리한 대조군 (CT), α -CD40 mAb, rmIL-4, 그리고 rmIL-10을 처리한 양성대조군 (PC), α -CD40 mAb, rmIL-4, 그리고 LZH-T를 처리한 실험군 (LZH-T) 으로 나누어 시행하였다.

배양 종료 후 배양상층액을 제거한 후 RNAzol^B 500 μl 를 넣고 용해될 때까지 분쇄하였으며 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl_3) 50 μl 를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μl 의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μl 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 DEPC를 처리한 20 μl 의 증류수에 녹여 heating block 75 $^\circ\text{C}$ 에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

② 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 2 μg 을 DNase I (10 U/ μl) 2 U/tube를 37 $^\circ\text{C}$ heating block에서 30 분간 반응시킨 후 75 $^\circ\text{C}$ 에서 10 분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μl 10 mM dNTPs mix, 1 μl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor (20 U/ μl), 1 μl 100 mM DTT, 4.5 μl 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2)를 가한 후, 1 μl 의 M-MLV RT (200 U/ μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl 가 되도록 하였다. 이 20 μl 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 초간 원심 침강시키고, 37 $^\circ\text{C}$ heating block에서 60 분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 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 Quantitative real-time RT-PCR

Quantitative real-time RT-PCR은 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다. Mouse Oligonucleotid의 염기배열은 다음과 같다(Table 2).

Cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard를 GAPDH를 사용하였으며 primer의 최종농도가 200 nM이 되도록 반응시켰다. Quantitative real-time RT-PCR의 조건으로 pre-denaturation은 2 min at 50 $^\circ\text{C}$, 10 min at 94 $^\circ\text{C}$, 40 cycles을 0.15 min at 95 $^\circ\text{C}$, 1 min at 60 $^\circ\text{C}$ 에서 수행하였다. LZH-T 투여군과 대조군은 internal standard로 GAPDH를 사용하여 target group의 Quantitative PCR은

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

$$x = \text{starting quantity}$$

$$y = \text{yield}$$

Table 2. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
GAPDH	Forward	5'-TGAAGCAGGCATCTGAGGG-3'
	Reverse	5'-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG-3'
IL-1 β	Forward	5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG3'
	Reverse	5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'
IL-6	Forward	5'-CCCATGAAGACCTTCACCTC-3'
	Reverse	5'-ACTCTCGGCCTACATTGGTG-3'
TNF- α	Forward	5'-TGGGAGGAAAGGGGTCTAAG-3'
	Reverse	5'-ACCTACGACGTGGGCTACAG-3'
IL-10	Forward	5'-AAGCAGCCTTGCAGAAAAGA-3'
	Reverse	5'-TGGGAAGTGGGTGCAGTTAT-3'
TGF- β	Forward	5'-TGGAGCAACATGTGGAATC-3'
	Reverse	5'-CTGCCGTACAACCTCCAGTGA-3'

n = number of cycles

e = efficiency

로 계산하여 RQ (relative quantitative)을 측정하였다.

3) *In vivo*

(1) 아토피 피부염 NC/Nga 생쥐의 선별 및 LZH-T 투여

SPF 상태에서 사육된 NC/Nga 생쥐를 정상군 (NC/Nga-SPF)으로 하였고, conventional한 상태에서 사육한 12 주령의 NC/Nga 생쥐의 눈에서 capillary 관을 이용하여 100 μ l의 혈액을 채혈한 후 혈청 중 IgE가 과잉 생성된 NC/Nga 생쥐를 선별하여 대조군 (control)으로 하였다. 선별된 동물에 양성 대조 약물로 CsA 10 mg/kg 을 복강에 매일 주사 하여 양성 대조군 (CsA) 으로 하였으며, LZH-T 441 mg/kg 을 2 주간 (12 주령~14 주령) 매일 경구투여 하여 실험군 (LZH-T)으로 하였다.

(2) 혈청 중 IgE 및 IFN- γ 수준 측정

12 주령과 14 주령의 NC/Nga 생쥐의 눈에서

capillary관을 이용하여 약 100 μ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기 6,500 rpm에서 20 분간 원심분리한 후 30 μ l의 혈청을 분리하고 -70 $^{\circ}$ C에서 냉동 보관하였다. NC/Nga 생쥐의 혈청 내 IgE와 IFN- γ 수준 측정은 enzyme-linked immuno-sorbent assay로 측정하였다. 각 well에 NC/Nga 생쥐에서 채혈한 혈청 5 μ l (1/10 dilution)와 dilution buffer 45 μ l를 혼합하여 각 well에 분주하고, 2 시간 동안 25 $^{\circ}$ C 실온에서 방치한 후 2 회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 2 시간 방치하였다. 다시 2 회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA leader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다²³⁾.

(3) PBMCs에서 형광 유세포 분석

약물 투여를 종료한 후 14 주령 NC/Nga 생쥐에서 heparin을 처리한 주사기(3 ml)로 채혈

한 후 미리 준비한 10 ml의 ACK용액 (8.3 g N H₂Cl, 1 g KHCO₃, in 1 l of demineralized water + 0.1mM EDTA)에 혼합하여 실온에서 5 분 동안 처리하여 적혈구를 제거하였다. 2 회 1%의 FBS가 함유된 PBS (FACS buffer)로 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포이외의 불순물을 제거하였다. 분리한 PBMCs의 총 세포수를 5 × 10⁵ 세포로 조정한 후 4 °C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-CD3e-PE, anti-CD19-FITC, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CCR3-PE, anti-B220-PE를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3 회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3⁺&CD19⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺, CCR3⁺ 그리고 B220⁺/CD23⁺ 세포수를 백분율(%)로 분석 산출하였다.

4) 통계처리

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

III. 成 績

1. 세포 독성

LZH-T의 세포독성을 측정한 결과, 250 µg/ml과 500 µg/ml까지는 세포독성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 1).

2. In vitro

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

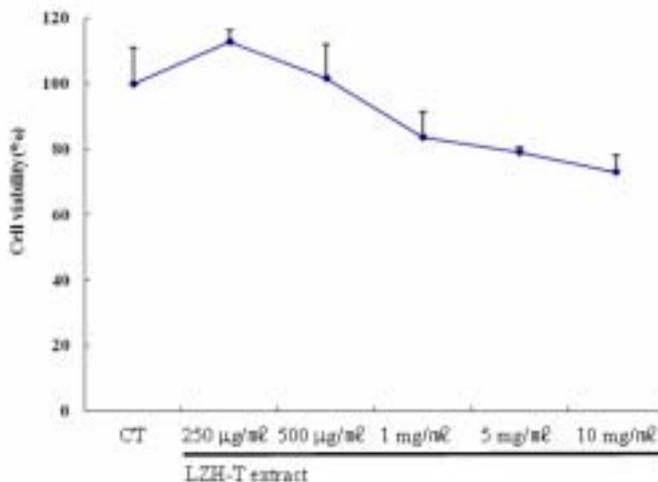


Fig. 1. Cytotoxicity effects of LZH-T on hFCs.

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

(1) CD4⁺ T세포에서 CD4⁺/IFN- γ ⁺ intracellular staining 분석

정상군 (Only CD4⁺ T cell)의 CD4⁺/IFN- γ ⁺는 2.9 %이었고, 대조군(Control)은 10.8 %이었으며 양성대조군 (CsA)군은 6.8 %이었고, 실험군 (LZH-T)은 21.7 %로 대조군에 비하여 증가하였다(Fig. 2).

(2) CD4⁺ T세포에서 CD4⁺/GATA-3⁺ intracellular staining 분석

정상군 (Only CD4⁺ T cell)의 CD4⁺/GATA-3⁺는 0.7 %이었고, 대조군 (Control)은 10.5 %이었으며 양성 대조군 (CsA)은 1.3 %으로 대조군에 비하여 감소하였고 실험군 (LZH-T)은 4.2 %로 대조군에 비하여 감소하였다.(Fig. 3).

(3) B세포에서 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α mRNA 유전자 발현 분석

정상군 (Only B cells)의 IL-1 β , IL-6, TNF- α mRNA 유전자 발현은 대조군(CT)의 RQ값이 1 일 때 각각 0.795, 0.109, 0.491이었고, 양성대조군 (PC)은 각각 0.233, 0.546, 0.375이었으며 실험군 (LZH-T)은 각각 0.69, 0.557, 0.686으로 모두 억제되었다(Fig. 4).

(4) B세포에서 IL-10과 TGF- β mRNA 유전자 발현 분석

정상군 (Only B cells)의 IL-10과 TGF- β mRNA 유전자 발현은 대조군 (CT)의 RQ값이 1 일때 각각 0.593, 0.816이었고, 양성대조군 (PC)은 각각 0.815, 0.473이었으며, LZH-T 투여군은 각각 1.177, 0.62로 IL-10 mRNA 유전자 발현은 대조군보다 약간 증가하였고, TGF- β mRNA 유전자 발현은 억제되었다(Fig. 5).

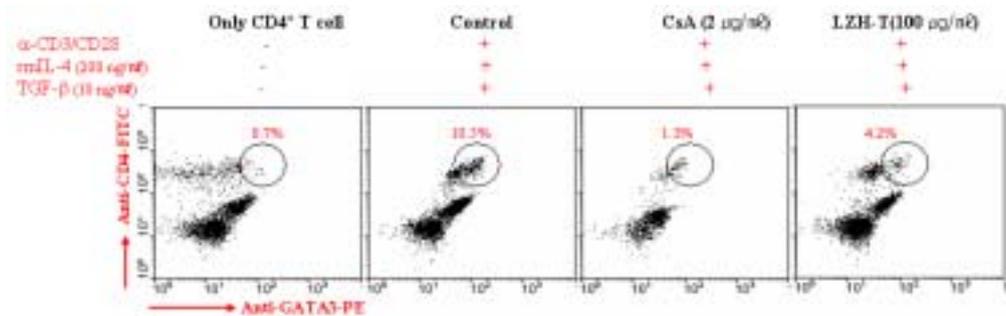


Fig. 2. Effects of LZH-T on CD4⁺/IFN- γ ⁺ intracellular staining analysis by anti-CD3/anti-CD28-stimulated murine CD4⁺ T cells.

Isolated CD4⁺ T cells from atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was either stimulated with α -CD3/ α -CD28 Ab (1 μ g/ml) plus treated with CsA (2 μ g/ml) or LZH-T (100 μ g/ml). CD4⁺ T cells were not treated (Only CD4⁺ T cells), co-cultured with α -CD3/ α -CD28 Ab (Control), with α -CD3/ α -CD28 Ab plus CsA (CsA), and with α -CD3/ α -CD28 Ab plus LZH-T(LZH-T) for 4 days. After a 4 days stimulation, 0.6 μ 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 Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen), cells were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer (BD Pharmingen), stained with PE-labeled anti-IFN- γ mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

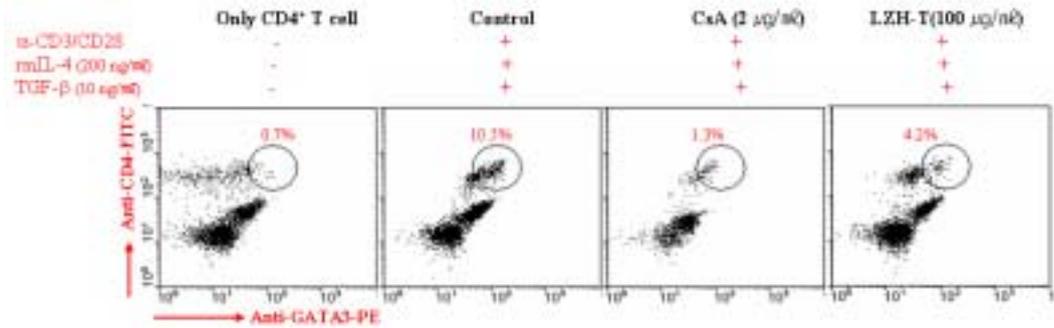


Fig. 3. Effects of LZH-T on GATA-3⁺/CD4⁺ intracellular staining analysis by anti-CD3/ anti-CD28-stimulated murine CD4⁺ T cells.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was either stimulated with α-CD3/α-CD28 Ab (1 μg/ml) plus mIL-4 (200 ng/ml) plus TGF-β (10 ng/ml) plus treated with CsA (2 μg/ml) or LZH-T (100 μg/ml). CD4⁺ T cells were not treated (Only CD4⁺ T cells), co-cultured with α-CD3/α-CD28 Ab plus mIL-4 plus TGF-β (Control), and with α-CD3/α-CD28 Ab plus mIL-4 plus TGF-β plus CsA 2 μg/ml (CsA), and with α-CD3/α-CD28 Ab plus mIL-4 plus TGF-β plus LZH-T (LZH-T) for 4 days. After a 4 days stimulation, 0.6 μl/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-GATA-3 mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

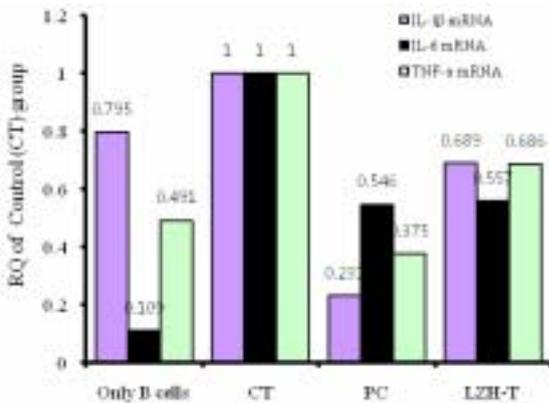


Fig. 4. Effects of LZH-T on IL-1β, IL-6 and TNF-α mRNA expression by LZH-T plus anti-CD40/rmIL-4-stimulated murine B cells.

Isolated B cells from 18 weeks of atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was either stimulated with α-CD40 mAb (500 μg/ml)/ mIL-4 (500 U/ml) plus treated with mIL-10 (50 ng/ml) or LZH-T (100 μg/ml). B cells were not treated (Only B cells), co-cultured with α-CD40 mAb /mIL-4 (CT), with α-CD40 mAb /mIL-4 plus mIL-10 (FC), and with α-CD40 mAb /mIL-4 plus LZH-T (LZH-T) for 4 hrs. IL-1β, IL-6, and TNF-α mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-1β, IL-6, and TNF-α 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.

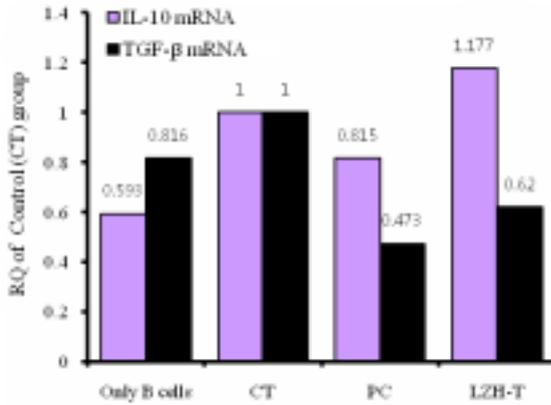


Fig. 5. Effects of LZH-T on IL-10, and TGF- β mRNA expression by LZH-T plus anti-CD40/rmIL-4-stimulated murine B cells.

Isolated B cells from 18 weeks of atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was either stimulated with α -CD40 mAb (500 μ g/ml)/rmIL-4 (500 U/ml) plus treated with rmIL-10 (50 ng/ml) or LZH-T (100 μ g/ml). B cells were not treated (Only B cells), co-cultured with α -CD40 mAb /rmIL-4 (CT), with α -CD40 mAb /rmIL-4 plus rmIL-10 (PC), and with α -CD40 mAb /rmIL-4 plus LZH-T (LZH-T) for 4 hrs. 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. In vivo

1) 혈청 내 IgE와 IFN- γ 수준에 미치는 영향
 혈청 내 IgE의 수준을 측정 비교한 결과, 12 주령과 14 주령에서 대조군(control)은 각각 $288.6 \pm 2.9 (\times 10, \mu\text{g/ml})$ 와 $293.4 \pm 0.3 (\times 10, \mu\text{g/ml})$ 으로 서로 비슷하였으나 양성 대조군 (CsA)은 각각 $288.5 \pm 6.9 (\times 10, \mu\text{g/ml})$ 와 $210.7 \pm 1.4 (\times 10, \mu\text{g/ml})$ 로 14 주령 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고($p < 0.001$), LZH-T 투여군은 각각 $289.8 \pm 1.3 (\times 10, \mu\text{g/ml})$ 과 $259.0 \pm 5.2 (\times 10, \mu\text{g/ml})$ 로 14 주령 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$). 혈청 내 IFN- γ 의 수준을 측정한 결과, 정상군 (NC/Nga SPF)은 $12.4 \pm 1.1 (\text{pg/ml})$ 이었고, 대조군(Control)은 $21.2 \pm 6.7 (\text{pg/ml})$ 로 약간 증가하였으며, 양성 대조군 (CsA)은 $5.4 \pm 2.3 (\text{pg/ml})$ 으로 대조군에 비하여 감소하였고, 실험군 (LZH-T)은 14 주령에서 IFN- γ 수준

이 $64.8 \pm 8.9 (\text{pg/ml})$ 로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다($p < 0.001$)(Fig. 6).

2) PBMCs에서의 활성세포 비율 분석

(1) Granulocytes의 cell content

Granulocytes의 활성세포 빈도(%)를 측정한 결과, 정상군 (NC/Nga-SPF)은 23.5 %이었고, 대조군 (CT)은 57.8 %로 정상군에 비해 증가하였고, 양성 대조군 (CsA)과 실험군 (LZH-T)은 각각 36.3 %, 45.1 %로 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 7).

(2) CD3⁺&CD19⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺ cell content

활성 CD3 T 세포의 세포 빈도(%)와 활성 CD19 B 세포의 세포 빈도(%)를 측정한 결과, CD3 T 세포의 경우 정상군 (NC/Nga-SPF)은

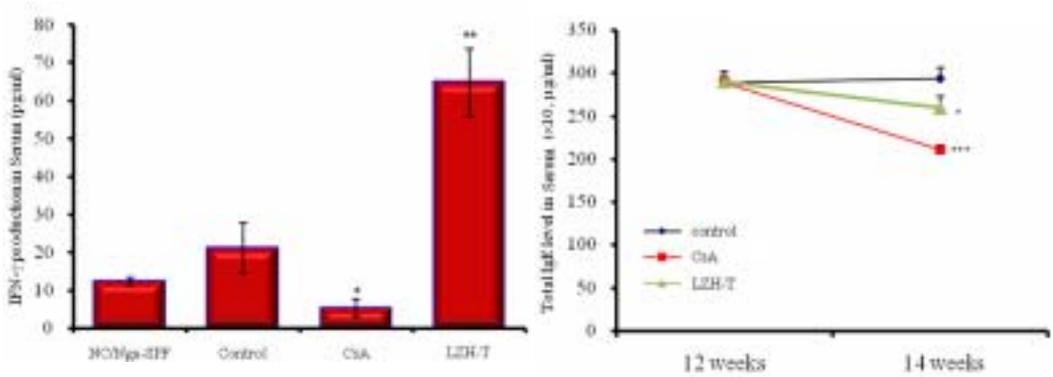


Fig. 6. Effect of LZH-T on serum IgE and IFN- γ level in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse at 12 weeks of age was maintained under conventional conditions, and orally administration of LZH-T and intraperitoneal injection of CsA (10 mg/kg) for 2 weeks. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately thereafter. Plasma samples were obtained by centrifugation and stored at -20°C until use. Total IgE and IFN- γ levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Shibayagi, Japan). Each point represents the mean \pm SE of six mice. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001).

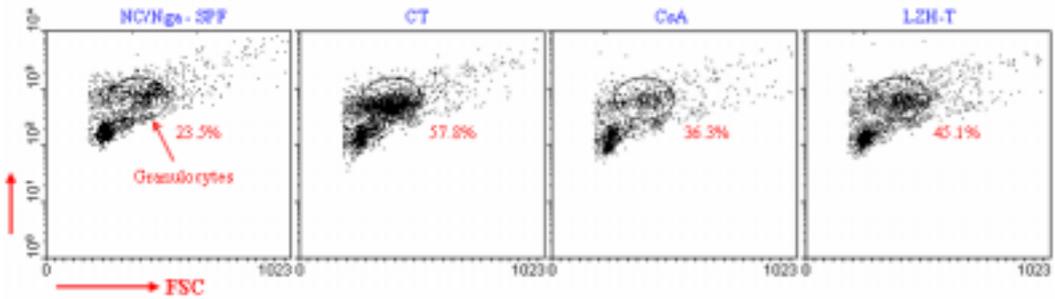


Fig. 7. Effects of CsA and LZH-T on the percentage of granulocytes gated cells in PBMCs cells in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse at 12 weeks of age was maintained under conventional conditions, and orally administration of LZH-T and intraperitoneal injection of CsA (10 mg/kg) for 2 weeks. NC/Nga mouse PBMCs (2×10^5 cells/ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total cell content (%) of granulocytes from FAC & SSC in NC/Nga mouse.

NC/Nga-SPF : 12-weeks-old specific pathogen free(SPF) NC/Nga mouse

CT : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse

CsA : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and injection of CsA (10 mg/kg, *i.p*)

LZH-T : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and administration of LZH-T (441 mg/kg, *p.o*)

34.2 %이었고, 대조군 (CT)은 61.6 %로 정상군에 비해 증가하였고, 양성 대조군 (CsA)과 실험군 (LZH-T)은 각각 44.3 %, 43.3 %로 대조군에

비하여 감소하였으며, CD19 B 세포의 경우 정상군은 47.8 %이었고, 대조군은 20.6 %로 정상군에 비해 감소하였고, 양성 대조군과 실험

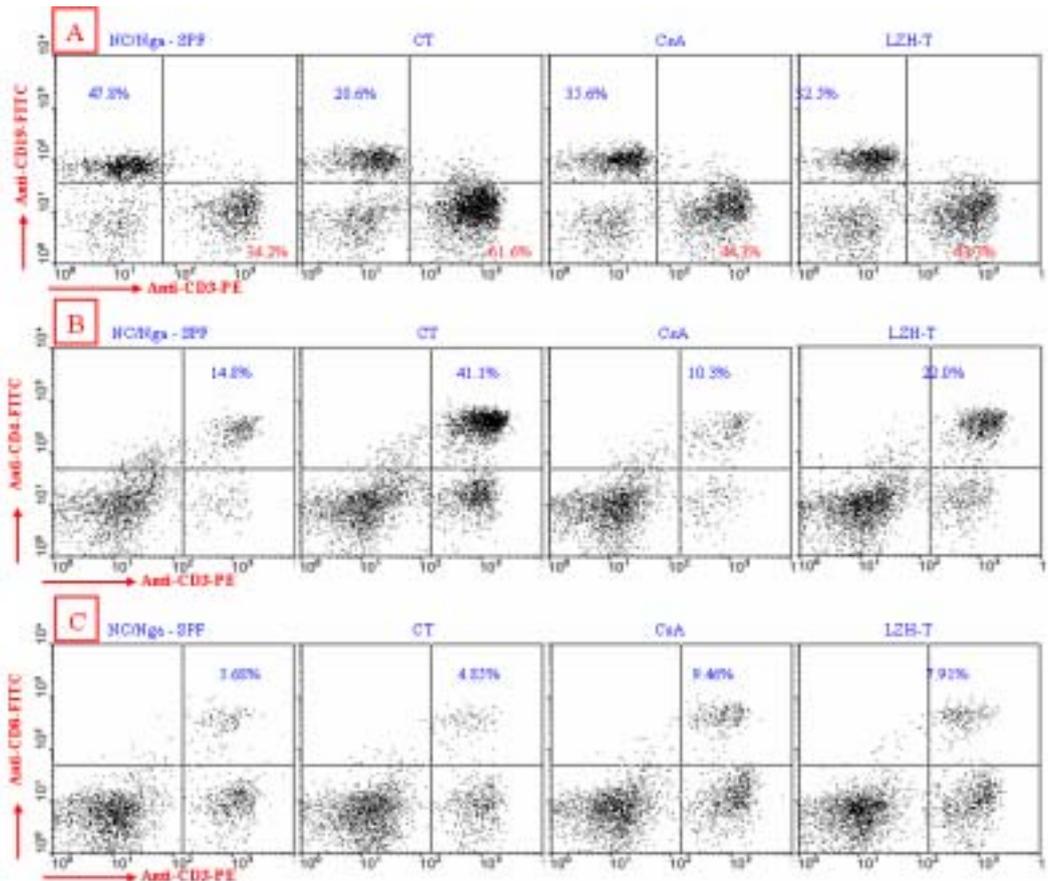


Fig. 8. Effects of CsA and LZH-T on the percentage of CD3+&CD19+, CD3+/CD4+, and CD3+/CD8+ gated cells in PBMCs in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse at 12 weeks of age was maintained under conventional conditions, and orally administration of LZH-T and intraperitoneal injection of CsA (10 mg/kg) for 2 weeks. NC/Nga mouse PBMCs (2×10^5 cells/ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total cell content (%) of CD3⁺ & CD19⁺ (A), CD3⁺/CD4⁺ (B), and CD3⁺/CD8⁺ (C) in NC/Nga mouse. NC/Nga-SPF : 12-weeks-old specific pathogen free(SPF) NC/Nga mouse
 CT : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse
 CsA : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and injection of CsA (10 mg/kg, *i.p*)
 LZH-T : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and administration of LZH-T (441 mg/kg, *p.o*)

군은 각각 35.6 %, 32.5 %로 대조군에 비하여 증가하였다(Fig. 8A).

활성 CD3 T 세포에 대한 활성 CD4 Th 세포의 빈도(%)는 정상군은 14.8 %이었고, 대조군은 41.1 %로 정상군에 비해 증가하였고, 양성 대조군과 실험군은 각각 10.3 %, 22.0 %로 대

조군에 비하여 감소하였다(Fig. 8B).

활성 CD3 T 세포에 대한 활성 CD8 Th 세포의 빈도(%)는 정상군과 대조군에서 각각 5.6 %, 4.85 %로 비슷하였으나, 양성 대조군과 실험군은 각각 9.46 %, 7.91 %로 대조군에 비하여 증가하였다(Fig. 8C).

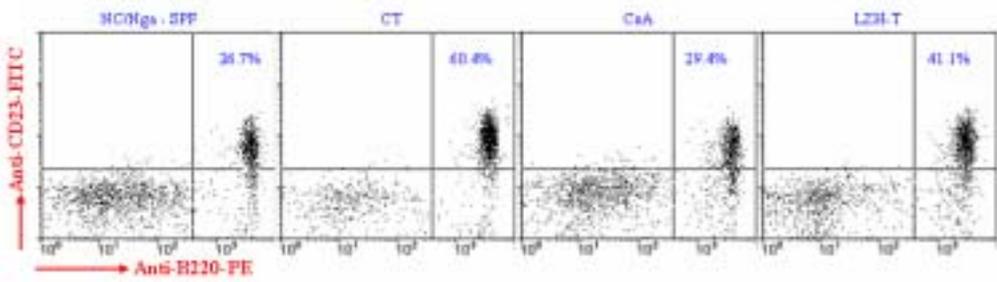


Fig. 9. Effects of CsA and LZH-T on the percentage of B220⁺/CD23⁺ gated cells in PBMCs in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse at 12 weeks of age was maintained under conventional conditions, and orally administration of LZH-T and intraperitoneal injection of CsA (10 mg/kg) for 2 weeks. NC/Nga mouse PBMCs (2×10^5 cells/ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total cell content (%) of B220⁺/CD23⁺ in NC/Nga mouse.

NC/Nga-SPF : 12-weeks-old specific pathogen free(SPF) NC/Nga mouse

CT : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse

CsA : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and injection of CsA (10 mg/kg, *i.p*)

LZH-T : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and administration of LZH-T (441 mg/kg, *p.o*)

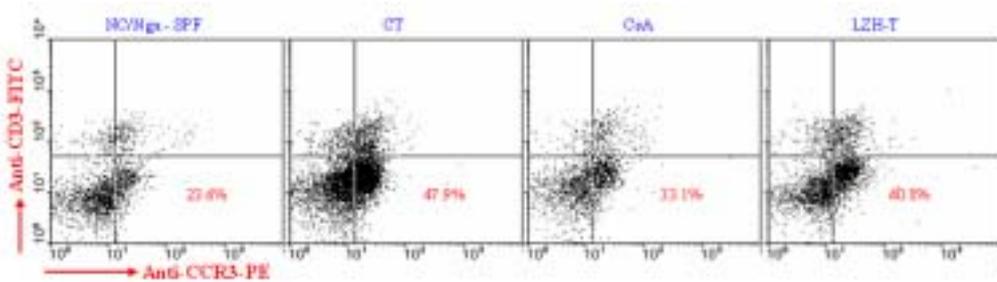


Fig. 10. Effects of CsA and LZH-T on the percentage of CCR3⁺ gated cells in PBMCs in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse at 12 weeks of age was maintained under conventional conditions, and orally administration of LZH-T and intraperitoneal injection of CsA (10 mg/kg) for 2 weeks. NC/Nga mouse PBMCs (2×10^5 cells/ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total cell content (%) of CCR3⁺ in NC/Nga mouse.

NC/Nga-SPF : 12-weeks-old specific pathogen free(SPF) NC/Nga mouse

CT : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse

CsA : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and injection of CsA (10 mg/kg, *i.p*)

LZH-T : 12-weeks-old conventional NC/Nga mouse and administration of LZH-T (441 mg/kg, *p.o*)

(3) B220⁺/CD23⁺ cell content

활성 B220⁺/CD23⁺ B 세포의 빈도(%)는 정상군 (NC/Nga-SPF)은 26.7%이었고, 대조군 (CT)은 60.4%로 정상군에 비해 증가하였고, 양성대조군 (CsA)과 실험군 (LZH-T)은 각각 29.4%, 41.1%로 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 9).

(4) CCR3⁺ cell content

활성 CCR3⁺ 세포의 빈도(%)는 정상군 (NC/Nga-SPF)은 23.6%이었고, 대조군 (CT)은 47.9%로 정상군에 비해 증가하였고, 양성대조군 (CsA)과 실험군 (LZH-T)은 각각 33.1%, 40.8%로 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 10).

IV. 考 察

아토피 피부염에 대한 활발한 연구에도 불구하고 아직도 이 질환의 기전에 대해 밝혀지지 않은 바가 많으며¹⁾ 현재까지 아토피 피부염은 환경적인 요소와 유전적인 소인 및 면역학적 요소가 모두 관여하는 복합적인 질환으로 알려져 있다²⁴⁾.

환경적 요인으로 대기 오염, 핵가족화, 모유수유의 감소, 수입과 교육수준의 증가, 항생제 사용의 증가로 인한 항원에 대한 노출의 증가, 주거환경 변화, 곰팡이 발달로 인한 새로운 항원 물질의 등장 등이 관여하는 것으로 생각되고 있다²⁵⁾.

아토피 피부염에서 유전적 요인이 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있으며 원인 유전자에 대해서는 IL-4 promoter 혹은 IL-4 수용체의 변이 등이 제시되었으나 유전 양식과 원인 유전자는 아직 확실히 밝혀지지 않았다²⁶⁾.

면역학적 기전으로는 Th1/Th2 세포간의 불균형, 랑게르한스 세포 활성 증가, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 등의 사이토카인 체계이상 등이 제시되고 있으며 각질형성세포의 내인적 이상, 말초혈액의 비정상적 IgE 증가, 비만세포와 대식세포의 활성화, 호산구 증가 소견을 관찰할 수 있다²⁷⁻⁹⁾고 하였다.

T세포는 항체의 형성을 돕는 CD4⁺ T세포와 억제하는 CD8⁺ T세포가 있으며 아토피 피부염에서는 CD4⁺ T세포에 대한 CD8⁺ T세포 비율의 감소가 나타나³⁰⁾ 피부 병변의 주된 구성은 CD4⁺ T세포로 나타나며 이는 생성되는 사이토카인의 종류에 따라 Th1세포와 Th2세포로 구분된다. Th1세포는 IFN- γ , IL-2, TNF를 생산하며 주로 지연형 과민반응을 조절하고 Th2세포는 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-16 등 일련의

사이토카인을 분비하여 IgE와 호산구, 비만세포에 의한 면역반응을 촉진하여 알레르기 반응에 관여한다³¹⁾. Th1 사이토카인은 Th1 세포의 분화를 유도하는 반면 Th2 세포의 증식과 분화를 억제하며, 반대로 Th2 사이토카인은 Th2 세포의 증식과 분화를 유도하는 반면 Th1 세포의 분화를 억제하여 정상상태에서 이들은 서로 길항작용을 하며 균형을 이루는데³²⁻⁴⁾ 급성 아토피 피부염 환자의 CD4⁺ T세포는 Th1보다 Th2로의 전환이 우세하게 나타난다³⁵⁾.

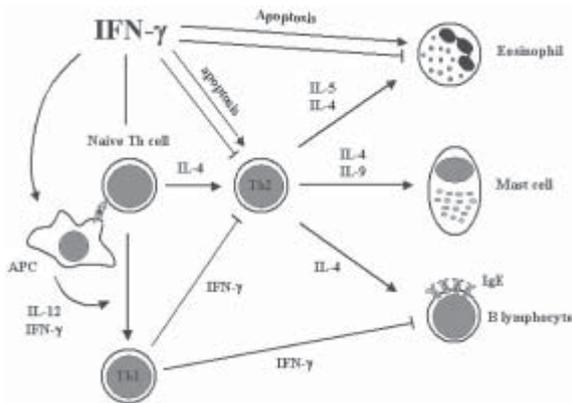
Th1/Th2 반응의 균형에 있어서는 IL-4와 IFN- γ 가 중요한데, IL-4는 대표적 Th2 사이토카인으로써 IFN- γ 생성과 Th1 세포로의 분화를 억제하며 B세포에서 IgE 생성과 Th2 세포로의 분화를 촉진하고³⁶⁻⁷⁾, IFN- γ 는 대표적 Th1 사이토카인으로써 Th1 세포로의 분화를 촉진하고 Th2 반응의 전사인자인 GATA-3을 억제하여 IL-4 발현을 억제시켜 Th2 세포로의 분화를 억제한다³⁸⁾. GATA-3은 Th2 세포로의 분화와 증식을 유도하고 Th1 세포로의 분화를 억제하여 IL-4 생산의 증가와 B 세포 분화를 촉진하여 알레르기 반응을 유발하는 것으로 알려져 있어 알레르기 염증반응에 필수적인 요소로 생각되어지고 있다³⁹⁻⁴¹⁾. 그 밖에 Th2 사이토카인인 IL-13은 IL-4와 함께 B 세포에서 IgE생성을 유도하고 IL-5는 호산구 증식을 유발하며 IL-10은 Th1 세포나 대식세포로부터 IFN- γ 생산을 억제시켜 Th1 반응을 억제하는 작용을 하고 IL-16은 T세포의 지속적인 염증반응을 유도한다. 또한 Th1 사이토카인인 TNF는 면역반응조절에 중요한 역할을 담당하며 TNF- α 는 IL-1, TNF, IFN- γ 같은 Th1 사이토카인을 유도하고 TGF- β 는 IFN- γ 생산을 증가시키며 IL-5, IL-13, IgE 생산을 억제하는데, 아토피 피부염 환자는 TGF- β 의 생성이 감소되어 있다²⁷⁾. 이러한 방식으로 서로 상호관계를 통해 균

형을 이루며 Th1과 Th2 면역반응을 조절하므로, 이 균형이 깨어지게 되면 Th1과 Th2 불균형으로 인한 여러 가지 면역질환을 겪게 된다.

이와 관련하여 최근 영유아기의 감염은 알레르기 반응과 서로 상반된 작용을 하는 것으로 보고되었다. 한 연구에서 영유아기의 감염이 T세포의 IFN- γ 의 생성을 촉진함으로써 Th2 반응을 억제하여 알레르기 질환의 발생을 감소시키고, 선진국의 경우 영유아기에 감염의 기회가 감소하면서 Th1 분화에 필요한 자극을 받지 못해 Th2 면역반응이 항진되어 아토피 피부염 등의 알레르기 질환의 발생이 증가한다고 보고하였으며⁴²⁾, 또 다른 연구에서 소아의 경우 감염이나 염증질환에 노출되었을 경우 천식 유발률이 감소한다고 보고하였다⁴³⁾. 이와는 반대로 건강한 사람에 비하여 아토피 및 천식환자의 PBMCs에서는 IFN- γ 분비가 감소한다고 보고되었다⁴⁴⁾. 결과적으로 IFN- γ 가 알레르기반응에 대하여 억제하는 역할을 수행함을 알 수 있다(Scheme. 1).

이와 같이 면역반응제어에 있어서 IFN- γ 가 Th 세포기능 조절의 중요성이 강조되고 있고, 특히 Th1/Th2 분화 및 사이토카인의 균형과 알레르기 반응과의 밀접한 관계로 미루어 볼 때, Th 세포분화조절을 통하여 단순히 임상적 증상들을 완화시키는 일시적인 치료제 개발이 아닌, 보다 근본적인 요인에 초점을 맞춘 새로운 알레르기 치료제 개발이 실현될 가능성이 있어, 앞으로 IFN- γ 에 대한 연구는 더욱 활성화 될 것으로 보인다.

아토피 피부염은 韓醫學的으로 《素問：玉機眞藏論篇》⁸⁾에서 “浸淫”이라고 기록된 이후 《外科正宗》⁷⁾에서 “奶癬”이란 病名이 처음 사용되었으며 임상증상 상 胎熱, 胎癩, 浸淫瘡, 胎斂瘡, 奶癬, 濕疹 등의 범주에 속한다. 原因 및 治療에 있어서 《實用中醫外科學》⁴⁵⁾에서는 “先天不足 稟賦不耐 脾失健運 濕熱內生 復感風濕熱邪 蘊積肌膚而成” 이라 하였으며 《中醫兒科臨床手冊》⁴⁶⁾에서는 濕熱蘊蒸型和 脾虛血虧型으로 나누어 濕熱蘊蒸型은



Scheme. 1. Interferon- γ (IFN- γ) controls Th immune and allergic responses.

IFN- γ is produced by different cell sources. It may counteract Th2 immune responses (by suppressing the development of Th2 lymphocytes), induce Th1 differentiation (by enhancing IL-12 production by APC or skewing naive Th lymphocytes toward the Th1 phenotype), and control several steps of allergic responses (by inducing eosinophil apoptosis and blocking IgE isotype switch in B cells).

清熱, 利濕, 祛風하고, 脾虛血虧型은 健脾, 燥濕, 養血, 祛風하여 치료하였다. 蔡⁴⁷⁾는 濕熱型은 乳兒型 아토피 피부염에 귀속시키고 그 병리를 脾胃氣虛 때문에 濕熱의 邪氣를 쉽게 感受하여 胃의 痰飲이 일어나고 脾胃의 健전한 기능이 손상을 입은 體質虛弱한 小兒가 外部의 영향을 받아 腠理에 濕熱症을 일으킨다고 하여 補氣補血 치료약에 加減하여 주로 사용하였고, 燥熱型은 幼·成人型 아토피 피부염에 귀속시켜 先天的으로 虛弱한데다 脾의 健전한 運化機能을 상실한 사람이 濕熱邪가 內에 發生하면 風熱邪가 皮膚에 浸潤하여 發生된다고 하였으며 발작이 반복되어 오랫동안 치유되지 않으면 결국은 脾虛 血燥로 되어 피부영양실조를 일으킨다고 하였다. 이는 아토피 피부염의 치료에 있어 비위기능의 중요성을 나타낸다고 할 수 있다.

따라서 비위기능을 강화시키는 한약이 아토피 피부염 치료에 미치는 영향에 대한 연구도 다양하게 보고되고 있으며 이와 관련된 연구로 조²⁰⁾ 등은 內消和中湯加味方을 아토피 피부염 환아를 대상으로 투여한 결과 SCORAD score의 유의한 감소가 있다고 보고하였으며, 유¹⁴⁾ 등은 內消和中湯加味方의 투여 전후로 말초 혈액 중 IFN- γ , IL-4, IL-5의 변화를 관찰한 결과 IFN- γ , IL-5는 증가하고 IL-4는 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다고 보고하였고, 박¹⁶⁾ 등은 脾虛溫濕方이 혈중 IgE 생산량을 감소시키는 등 면역조절작용을 통한 항아토피 작용이 있음을 보고하였으며, 나²¹⁾ 등은 除濕胃筴湯加減이 혈중 IgE를 감소시키고 IFN- γ 를 증가시키는 등 아토피 피부염 치료에 활용될 수 있음을 보고하였다.

본 실험에 사용된 理中湯은 《新方新編》¹²⁾ 皮膚門에 수록된 처방으로 “治血燥瘙癢” 한다고 기록되어있다. 小兒의 脾常不足, 肺常不足

한 경향⁴⁸⁾과 아토피 피부염 자체의 병리인 脾虛 血燥를 치료하고자 本方은 健脾補肺益氣하는 人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草, 木香, 黃芪, 補腎陽함으로써 溫脾할 수 있는 附子, 肉桂, 補血補陰하는 當歸, 乾地黃으로 구성되어 脾氣陽虛, 血虛血燥로 인한 瘙癢症을 치료할 목적으로 立方된 處方이다.

이에 임상에서 아토피 피부염 환자들에게 효과를 보이고 있는 理中湯이 IgE가 과잉생성되고 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에서 IFN- γ 반응에 의한 Th2 세포분화 억제에 미치는 영향을 알아보기로 본 실험에 임하게 되었다.

본 실험에 사용된 NC/Nga 생쥐는 태어난 후 어렸을 때부터 일반사육환경(conventional system)에서 노출되어 자라게 되면 12 주령 이상에서 사람에서 나타나는 아토피 피부염과 유사한 병변인 딱지가 앉은 상처 및 작은 가피의 병변이 관찰되는 동물로서 아토피 피부염 모델동물로 사용되고 있다⁴⁹⁾. 또한 본 실험에서 양성대조군으로 CsA를 사용하였는데 이는 T세포의 분화와 성숙과정의 억제, T세포 성장인자인 IL-2 생성 억제, IFN- γ 생성 촉진, B세포의 항체 생성 억제 등의 효과⁵⁰⁻⁴⁾를 나타내는 면역억제제로 널리 알려져 있어 주로 장기이식환자에서 사용되어 왔으나 최근 피부과 영역에서도 이용이 증가되고 있으며⁵⁵⁾ CsA를 사용하면 NC/Nga 생쥐에서 피부의 병변이나 혈중 IgE의 수준이 줄어드는 것으로 나타났다⁵⁶⁾.

실험의 결과를 살펴보면, *in vitro* 실험에서 hFCs을 배양하여 LZH-T의 세포독성을 측정된 결과, 1 mg/ml 이상의 농도에서 세포독성이 나타났다(Fig. 1).

NC/Nga 아토피 발진 생쥐에서 분리한 비장에서 naive CD4⁺ T 세포를 순수분리한 후

anti-CD3/CD28로 자극한 후 LZH-T를 처리하여 CD4⁺/IFN- γ ⁺ Th1 세포의 분화를 세포내염색법으로 측정된 결과, LZH-T 처리군이 대조군에 비하여 2배 이상 증가를 나타내었다(Fig. 2). 또한 NC/Nga 아토피 발진 생쥐에서 비장 세포를 분리하여 anti-CD3/CD28과 rmIL-4로 자극하여 배양한 후 CD4⁺/GATA-3⁺를 세포내염색법으로 측정된 결과 LZH-T 처리군이 대조군에 비하여 62% 이상 감소를 나타내었다(Fig. 3). 이는 理中湯이 아토피 질환에서 IL-4와 IL-10의 과잉으로 인해 항진된 Th2 세포로의 분화 경향을 억제시킴과 동시에 Th1 세포로의 분화로 shift 시킬 수 있음을 의미하며 향후 항아토피 제제로 사용할 수 있는 기초적인 결과라 할 수 있다.

또한 LZH-T가 NC/Nga 생쥐의 면역세포의 알레르기 면역반응을 억제하는지를 알아보고자, 24시간동안 LZH-T 100 μ g/ml와 anti-CD40/rmIL-4을 동시배양한 후 IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, TNF- β 의 유전자 발현을 대조군의 RQ값에 비하여 PCR로 분석하였다. 그 결과 LZH-T가 염증사이토카인과 TGF- β 의 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 4, 5). 이는 理中湯이 알러젠에 의한 알레르기 반응에 반드시 수반되는 B세포의 활성화, 분화, 그리고 IgE 생성을 선택적으로 억제하여 초기 알레르기 반응을 효과적으로 억제함을 의미한다.

In vivo 실험에서 12 주령에서 14 주령까지 2주간 CsA와 LZH-T를 투여한 후 IgE와 IFN- γ 의 수준의 변화를 측정된 결과, IgE 수준은 대조군에 비하여 CsA와 LZH-T 투여군이 유의성 있게 감소하였고, 혈청내 IFN- γ 수준은 대조군에 비하여 LZH-T 투여군이 3배 이상으로 측정되어 통계학적으로 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이는 LZH-T 투여로 NC/Nga 생쥐에서 IFN- γ 를 증가시켜 Th1 세포와 Th2 세포와의

길항적 작용으로 B 세포 분화에서 수반되는 IgE의 수치를 억제하는 것으로 생각된다.

아토피 피부염의 병인을 알기 위해 말초혈액단핵구(PBMCs)에서 생산하는 사이토카인의 조절 이상을 연구할 수 있는데, 일반적으로 자극 배양된 아토피 피부염 환자의 PBMCs는 정상인에 비해 IFN- γ 의 분비는 저하된 반면 GATA-3에 의해 조절되는 IL-4의 분비는 증가되어 있어, 여러가지 면역학적 이상, 즉 IgE의 증가, 호산구 증가 (CCR3⁺), 세포매개성면역의 저하 등을 초래하는 것으로 알려져 있다⁵⁷⁾. NC/Nga 생쥐의 PBMCs에서 Granulocytes의 활성 세포빈도를 조사한 결과 대조군은 정상군에 비해 감소하였으며 LZH-T 투여군은 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 7). 또한 NC/Nga 생쥐의 PBMCs에서 CD3⁺&CD19⁺ 세포, CD3⁺/CD4⁺ 세포, CD3⁺/CD8⁺ 세포, B220⁺CD23⁺ 세포, CCR3⁺ 세포의 활성세포빈도를 조사한 결과 SPF 조건에 사육된 정상 NC/Nga 생쥐군에 비하여 conventional 한 조건에서 사육된 14 주령의 대조군의 총활성세포 빈도(%)는 CD3⁺/CD4⁺ 세포, B220⁺/CD23⁺ 세포, CCR3⁺에서 증가하였으며 CD19⁺ 세포는 감소하였고 CD3⁺CD8⁺ 세포는 비슷하게 측정되었으며 CsA와 LZH-T 투여군의 총활성세포 빈도(%)는 각각 대조군에 비하여 CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺ 세포, B220⁺/CD23⁺ 세포, CCR3⁺에서는 감소하였으며 CD19⁺ 세포, CD3⁺/CD8⁺ 세포에서는 증가되었다(Fig. 8-10). 이는 理中湯이 IFN- γ 의 생산을 유발함으로써 CD4⁺ T 세포에서 Th1 세포로의 분화를 증가시키고 GATA-3 전사인자를 억제함으로써 Th2 면역세포의 과잉증식과 비만세포의 분화증식을 감소시켜 피부발진에 치료효과가 있음을 의미한다.

이상의 결과로 미루어 보아 理中湯은 IFN- γ 의 생산량을 증가시켜 TH2/TH1 세포의 길항

적 작용에 의하여 Th2에서 GATA-3 발현을 down-regulation함으로써 Th2 세포분화를 억제하여 Th1과 Th2의 균형이 Th2쪽으로 치우쳐서 유발되는 아토피 피부염에 있어 Th2세포에서 Th1세포로 shift 시킴으로써 아토피 피부염 치료에 유효하게 활용할 수 있을 것으로 판단되며 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

理中湯 (LZH-T)이 아토피 피부염 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

I. In vitro

1. LZH-T는 hFCs에서 1 mg/ml 농도 이상에서 세포독성이 나타났다.
2. LZH-T는 CD4⁺ T 세포에서 CD4⁺/IFN- γ ⁺ 세포 수를 증가시켰다.
3. LZH-T는 CD4⁺ T 세포에서 CD4⁺/GATA3⁺ 세포수를 감소시켰다.
4. LZH-T는 B 세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β mRNA 유전자 발현을 억제하였다.

II. In vivo

5. LZH-T 투여군은 혈청 중 IgE 수준을 유의성 있게 감소시켰고, IFN- γ 수준을 증가시켰다.
6. LZH-T 투여군은 PBMCs에서 granulocytes의 활성 세포 빈도(%)를 감소시켰다.
7. LZH-T 투여군은 CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, B220⁺CD23⁺, CCR3⁺ 세포의 활성세포

빈도(%)를 감소시켰으며, CD19⁺, CD3⁺CD8⁺의 활성세포 빈도(%)는 증가시켰다.

參考文獻

1. 박용민. 아토피피부염 병태생리에 대한 최신 지견. 소아알레르기 호흡기 학회지. 2006;16(3):189-96.
2. 이해성, 김종서, 편복양. 소아 아토피 피부염의 빈도와 원인의 변화. 소아알레르기 및 호흡기학회지. 2002;12(4):263-70.
3. Halbert AR, Weston WL, Moreli JG. Atopic dermatitis : Is it an allergic disease. J Am Acad Dermatol. 1995;33:1008-18.
4. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. Lancet. 2003;361:151-60.
5. Renz H, Judo K, Bradley KL, Domenico J, Gelfand EW, Leung DYM. Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma. J Invest Dermatol. 1992; 99:403.
6. 강재성. 세포분자면역학. 제5판. 서울:범문사. 2005:268.
7. 陳實功. 外科正宗. 北京:人民衛生出版社. 1983:269.
8. 홍원식 편저. 정교황제내경소문. 서울:동양 의학연구원출판부. 1985:72-80,246.
9. 宋書功 主編. 金匱要略 廣州校註. 北京:人民衛生出版社. 1994:221.
10. 吳謙. 의중금감(하). 北京:人民衛生出版社. 1982:443.
11. 전국 한의과대학 소아과학교실. 한방소아

- 과학강의록. 서울:누리기획. 2001:606-11.
12. 이원세. 新方新編. 서울:대성의학사. 2001: 114.
 13. 진경선, 임태형, 박은정, 이해자, 한경훈, 나원경. 淸上防風湯의 아토피성 알레르기 반응 조절 효과. 대한한방소아과학회지. 2004;18(2):61-76.
 14. 유한정, 이진용, 김덕근. 內消和中湯加味方 이 아토피 피부염 환자의 혈중 Cytokine 분비에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2006;20(1):15-29.
 15. 김홍배, 김원일, 이승연. 升麻葛根湯의 항 히스타민 효과 및 IL-4와 GM-CSF 발현에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2006;20(2):69-83.
 16. 박성희, 진미림, 구영선, 김동희. 脾虛蘊濕方이 아토피 피부염 유발 NC/Nga 생쥐의 혈액 내 면역관련인자에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(4):849-55.
 17. 윤재은, 한재경, 김윤희. 驅風除濕湯이 아토피 피부염 유발 NC/Nga mouse의 비장 및 DLN내 면역 관련 인자에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2007;16(2):267-80.
 18. 박두병, 한재경, 김윤희. 涼血除濕湯이 아토피 피부염 유발 NC/Nga mouse의 비장 및 DLN내 면역 관련 인자에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2007;16(2):251-65.
 19. 윤지연, 한재경, 김윤희. 加味淸心蓮子湯이 NC/Nga mice의 아토피樣 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2007;21(1):87-116.
 20. 조백건, 이진용, 김덕근. 內消和中湯加味方の 아토피 피부염 치료에 대한 임상고찰. 대한한방소아과학회지. 2005;19(1):131-41.
 21. 나동규, 한재경, 김윤희. 除濕胃答湯加減이 집먼지 진드기 추출물로 유도된 NC/Nga mouse의 아토피 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2008;22(2):81-114.
 22. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monk A, McMahon J, Visca D, Warren JT, Kennedy S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. J Natl Cancer Inst. 1990;82(13):1107-12.
 23. Matsuda, H., N. Watanabe, G.P. Geba, J. Sperl, M. Tsudzuki, J. Hiroi. Development of atopic dermatitis like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. Int Immunol. 1997;9:461-6.
 24. Sturgil S, Bernard LA. Atopic dermatitis update. Curr Opin Pediatr. 2004;16:396-401.
 25. Wollenberg A, Kraft S, Opiel T, Bieber T. Atopic dermatitis : pathogenetic mechanism. Clin Exp Dermatol. 2000;25:530-4.
 26. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. Science. 1994;264:1152.
 27. 안성구, 박병덕, 원진형, 성열오, 천승현. 아토피 피부염. 서울:퍼시픽출판사. 2007: 32.
 28. Kevin DC. Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy. J invest Dermatol. 1994;102:128-37.
 29. Horsmanheimo L, Harvima IT, Jarvikallio A, Harvima RJ, Naukkarinen A, Horsmanheimo M. Mast cells are one major source of interleukin-4 in atopic dermatitis. Br J Dermatol. 1994;131:348-53.

30. Patrick D. Does atopic dermatitis result from cytokine dysregulation?. *J invest Dermatol.* 1994;102:741.
31. Foster PS., Martinez-Mozygamba M., Huston DP. and Corry DB. Interleukin-4, -5, and -13 : emerging therapeutic targets in allergic disease. *Pharmacology & Therapeutics.* 2002; 94:253-64.
32. 노건웅, 이우길. 아토피피부염의 감마 인터페론 치료. *소아알레르기 및 호흡기 학회지.* 1998;7(2):239-47.
33. 김세종. *IMMUNOLOGY.* 서울:고려의학. 1994;1,65,24-36,154-6,260-5.
34. 오재원, 이하백, 정용훈, 최용, 송미경. 집먼지진드기에 감염된 아토피 및 비아토피 개체에서 Derp I 및 면역변환제의 자극에 의한 T 림프구의 Interleukin-4와 Interferon- γ 생성의 차이. *천식과 알레르기.* 1999; 19(4):548-56.
35. 김정원. 알레르기 및 면역학적 관점에서의 아토피피부염. *대한피부과학회지.* 2003;41(6):687-9.
36. Renz H, Jujo K, Bradley KL, Domenico J, Gelfand EW, Leung DY. Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma. *J Invest Dermatol.* 1992; 99(4):408.
37. Paul WE. Interleukin-4 : a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood.* 1991; 77:1859-70.
38. Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2002;3:549-57.
39. Masakatsu Yamashita, Maki Ukai-Tadenuma, Takeshi Miyamoto, Kaoru Sugaya, Hiroyuki Hosokawa, Akihiro Hasegawa, Motoko Kimura, Masaru Taniguchi, James DeGregori, Toshinori Nakayama. Essential role of GATA3 for the maintenance of Th2 cytokine production and chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci. *The Journal of Biological Chemistry.* 2004;279(26):26983-90.
40. Gavett, S. H., D. J. O'Hearn, X. Li, S. K. Huang, F. D. Finkelman and M. K. Wills. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J. Exp. Med.* 1995;182:1527-36.
41. 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.
42. Ramsey CD, Celdon JC. The hygiene hypothesis and asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2005;11:14-20.
43. Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science.* 1997;275:77-9.
44. Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FHY, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT, Glimcher LH. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science.* 2002;295:336-8.
45. 고백화. 실용중의외과학. 상해:상해과학기술출판사. 1885:461-4.
46. 上海中醫學院. 中醫兒科臨床手冊. 上海:上

海科學技術出版社. 1980:203-4.

47. 채병윤. 피부과의 한방치료. 서울:일지사. 1991:68-71.
48. 김덕곤 외 7명. 동의 소아과학. 서울:정담. 2002:660-4.
49. H Matsuda, N Watanabe, GP Geba, J Sperl, M Tsudzuki, J Hiroi, M Matsumoto, H Ushio, S Saito, PW Askenase and C Ra. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *International Immunology*. 1997;9: 461-6.
50. Schreiber SL and Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and CsA. *Immunol Today*. 1992;13(4):136-42.
51. Lillehoj HS, Malek TR, Shevach EM. Differential effect of cyclosporin A on the expression of T and B lymphocyte activation antigen. *J Immunol*. 1986;133:244-50.
52. Biren CA, Barr RJ. Dermatologic application of cycloporin. *Arch Dermatol*. 1986;122:1028-32.
53. Siegel RM, Yui K, Tenenholz DE. Inhibition of T cell development in thymic organ culture: implication for the mechanism of action of cyclosporin A. *Eur J Immunol*. 1991;147:391-7.
54. Elias J, Boss E, Kaplan AP. Studies of the cellular infiltrate of chronic idiopathic urticaria: prominence of T-lymphocytes, monocytes, and mast cells. *J allergy Clin Immunol*. 1986; 78:914-8.
55. 김병수, 조현호, 고현창, 김성준, 오창근, 권경술, 김문범. 만성 특발성 두드러기 환자에서 저용량 Cyclosporine 치료 효과에 관한 연구. *대한피부과학회지*. 2007;45 (7):680-6.
56. Takano, N., I. Arai, M. Kurachi. A method to induce stable atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice housed with skin-lesioned mice. *British Journal of Dermatology*. 2006;154:426-30.
57. Naohiro Watanabe, Hidekazu Tamauchib, Hideyuki Ozawa, Mamoru Itod, Zoltan Ovarye, Sonoko Habuc. Th2 Immune Responses in GATA-3-Transgenic Mice Infected with *Heligmosomoides polygyrus*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;131:11-4.