

아토피피부염 동물 병태모델에서의 荊芥連翹湯의 면역조절작용*

강란이·박보경·김선빈·최학주·김동희**

The effects of HYT on various immunological factors related to pathogenesis of allergic dermatitis in NC/Nga mice induced by Biostir AD

Kang Ran-yi, Park Bo-kyoung, Gim Seon-bin, Choi Hak-joo, Kim Dong-hee
Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Atopic dermatitis induced NC/Nga mice were used to investigate the efficacy of HYT on the recovery of dermatitic symptoms by how HYT influenced the immune related factors. The results are as below:

1. Compared to the control, HYT treated group showed recovery of atopic dermatitis by the naked eye observation, and significant reduction of dermatitis index was observed after 14 weeks.
2. HYT treated group showed significant decrease of the ratio of CCR3+, B220+/IgE+, and Gr-1+/CD11b+ immune cells in dorsal skin by 40.5%, 34.2%, and 48.1%, respectively.
3. HYT treated group showed increase in the ratio of CD19+ immune cells within PBMC by 10.8%, as well as decrease in CD3+, CD3+/CD69+, NKT+ ratios by 5.3%, 35.2%, and 44.9%, respectively.
4. HYT treated group showed increase in the expression of IFN- γ in serum by 589.3%, whereas the expression of IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α , MCP-1 and RANTES were decreased by 31.4%, 82.1%, 97.1%, 39.5%, 83.7%, 26.1%, 48.6%, respectively. A 47.2% decrease in IgE expression was also observed.

The results above strongly supported the improvement of atopic dermatitis by HYT treatment through immune modulation. Further studies on the synergistic effect of each ingredients of HYT and therapeutic effects according to the dosage of each ingredient should be followed for clinical applications.

This work was (partly) supported by the RIC program of MKE(Ministry of Knowledge Economy) in Daejeon University.

Key words : Hyunggaeyunkotang(HYT), Atopic dermatitis, immune cells

I. 緒 論

* 본 연구는 지식경제부 지정 대전대학교 난치성면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것입니다.

** 대전대학교 한의과대학 병리학교실

아토피피부염(Atopic dermatitis)은 주로 유아기 혹은 소아기에 시작되는 만성적이고 재발성의 염증성 피부질환으로 소양증과 피부 건조

· 교신저자 : 김동희 · E-mail : dhkim@dju.kr

증, 특징적인 습진을 동반 한다¹⁻³⁾. 특히 아토피 피부염 환자의 80% 정도는 후에 천식이나 비염 등의 호흡기 알레르기 질환을 보이며, 피부 병변 자체가 피부가 두꺼워지는 태선화(lichenification)와 손이나 발의 습진 형태로 변형되어 나타난다¹⁾.

아토피 피부염의 발병 원인은 아직 확실하게 알려져 있지 않은 상태이므로 어느 한 가지로만 설명될 수는 없지만, 환경적인 요인과 음식문화의 변화, 유전적인 소인, 면역학적 반응 및 피부 보호막의 이상 등이 주요 원인으로 여겨지고 있다³⁻⁵⁾. 특히 산업화로 인한 매연 등 환경 공해, 식품첨가물 사용 증가, 서구식 주거 형태로의 변화, 집먼지 진드기 등의 알레르기를 일으키는 원인 물질(알레르겐)의 증가 등의 환경적 요인들은 의학적 치료율의 한계를 제공하고 있다. 이 밖에 아토피 피부염 환자의 가족력을 통해 아토피 피부염이 유전적 영향을 받는다는 사실도 보고된 바가 있어, 아토피 피부염이 선·후천적으로 다양한 인자에 의해 발생됨을 알 수 있다⁵⁾.

주 병리로 언급되는 면역학적 측면에서 보면, 알러지 질환의 하나로 Th2 세포가 발현하는 IL-4, IL-5, IL-13 등의 다양한 사이토카인들이 Th1 세포의 증식 및 분화를 억제시킴으로써 Th1/Th2 세포들의 불균형이 초래되어 유발되는 것으로 보고되고 있다^{6,7)}. B 세포 또한 아토피 피부염에서 중요한 역할을 담당하고 있는데, 주로 Th2 세포들이 발현하는 사이토카인에 의해 IgE의 발현량이 증가하면서 이를 심화시킨다⁸⁾.

본 시료인 荊芥連翹湯은 『萬病回春』⁹⁾에 최초로 수제된 처방으로 淸熱, 祛濕, 和血, 解毒 작용으로 주로 風熱이 上攻하여 나타나는 제 증상을 치료하며, 청소년기 선병질자의 제 증상에도 응용된다. 이에 대한 실험적 연구로 김¹⁰⁾은 "lipopolysaccharide로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 Nitric Oxide의 생성 및 iNOS와 COX-2의 발현, Cytokine에 미치는 영향"을, 신¹¹⁾은 소염, 진통, 항알레르기에 미치는 영향을, 김¹²⁾은 해열 진통 및 소염 작용에 미치는 영향을 보고한 바가 있으며, 황¹³⁾은 의약품 독성실험기준에 준한 실험에서 荊芥連翹湯 추출물이 유전독성을

일으키지 않는 것으로 보고하였다. 이 밖에 임상적 연구로 이¹⁴⁾는 알레르기 반응 중 아토피 피부염이 같이 I형에 해당되는 중이염에서 中耳腔 滲出液 內 Immnoglobulin-G 亞型에 미치는 영향을 보고한 바가 있으나, 아토피 피부염에 관련된 다양한 면역관련 인자들에 대한 본 시료의 효능 평가는 아직 이루어진 바가 없다.

이에 저자는 현재 임상에서 피부과 질환에 사용되고 있는 荊芥連翹湯(HYT)의 아토피 피부염 개선 효과를 객관적으로 증명하고 이를 기초적 자료로 제공하고자 in vivo 실험동물 모델인 NC/Nga 생쥐에 인간병증과 유사한 AD 병태를 유발하여 피부염 지수, DLN과 배부피부 내 면역세포, 혈액 내 사이토카인 및 혈청 내 면역글로블린에 미치는 영향 등을 검색하였다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 동물

실험동물인 수컷 7주령의 NC/Nga 생쥐는 중앙실험동물에서 공급 받아 실험 당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co., Korea)와 물을 충분히 공급하고 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 15\%$, 12시간-12시간(light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약물

본 실험에 사용한 荊芥連翹湯(Hyunggaeyunkyotang, 이하 HYT)의 구성 약재들은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선 후 사용하였고, 그 내용과 분량(1첩)은 다음과 같다(Table 1).

Table. 1 The Prescription of HYT

韓藥名	生藥名	用量 (g)
當歸	Angelicae Gigantis Radix	3
芍藥	Paeoniae Radix Alba	3
川芎	Cnidii Rhizoma	3
熟地黄	Rehmanniae Radix Preparat	3
黃連	Coptidis Rhizoma	3
黃芩	Scutellariae Radix	3
黃柏	Phellodendri Cortex	3
梔子	Gardeniae Fructus	3
連翹	Forsythiae Fructus	3
防風	Saposhnikovia Radix	3
薄荷	Menthae Herba	3
荊芥	Schizonepetae Spica	3
甘草	Glycyrrhizae Radix	3
枳殼	Aurantii Fructus	3
柴胡	Bupleuri Radix	4
白芷	Angelicae Dahuricae Radix	5
桔梗	Platycodi Radix	5
Total mount		56

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, Biostir AD는 Biostir사 (Japan) 제품을, anti-CD3-PE, anti-CD69-FITC, anti-NKT-FITC, anti-B220-PE, anti-IgE-FITC,

anti-CCR3-PE, anti-CD11b-FITC, anti-Gr-1-PE 등은 BD-Pharmingen사 (USA) 제품을, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, RANTES ELISA kit는 Biosource사 (USA) 제품을, IgE ELISA kit는 Shibayagi사 (Japan) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), 감압 증류장치 (Rotary evaporator, Büchi B-480, Switzerland), microwave oven (LG, Korea), freeze dryer (EYELA FDU-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), ELISA reader (Molecular Devices, Co., USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

HYT은 2첩 분량에 증류수 1,500 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 추출액을 다시 흡입 여과하여, 증류장치로 농축하였다. 농축액을 각각 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 다음 얻어진 분말 21.4 g을 냉동 보관 (-80°C) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 피부염 유도 및 시료 처리

8 주령 NC/Nga 생쥐를 ether로 마취시킨 후 등 부위 및 목 뒷부분을 제모하였다. 제모가 끝나면 VEET 제모크림 100 mg을 동일한 부위에 도포하여 등 부위 남은 잔털을 깨끗이 제거하고 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 4% SDS 용액 150 μ g를 스프레이 하고 2~3 시간 정도 완전히 건조시킨 후 Biostir AD 연고 100 mg를 도포하였으며, 주 2회씩 3주 동안 총 6회 시행하였다.

실험군은 9주령부터 HYT 를 8.9mg/day의 농도로 6주간 경구 투여하였으며, 대조군은 증류수를 실험군과 동일한 양으로 경구 투여하였다.

3) 관능 평가

6주간의 약물 투여후 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법으로 관능 평가를 실시하였다. 평가 항목은 홍반 (Erythema), 가려움과 건조 피부 (Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종 (Edema & Hematoma), 짓무름(Excoriation), 태선화 (Lichenification)로 5가지이다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였다.

4) 면역세포 분리

실험 종료 후 Biostir AD로 유발된 NC/Nga 생쥐에서 배부 일정량의 피부 조직을 잘게 chopping 한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37°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 염색하여 count 하였다. PBMC는 심장 채혈 후 ACK 용액을 넣어 적혈구를 용해시키고 2번 세척한 후 cell strainer를 통과 시켜 얻은 세포를 유세포 분석에 사용하였다.

5) 형광 유세포 분석

분리한 세포를 5×10^5 cells/ml의 농도로 조정 한 후 4°C에서 면역형광염색을 실시하였다. 각각에 anti-CD3-PE, anti-CD69-FITC, anti-NKT-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 분석하였다.

6) 혈청 내 사이토카인 및 면역 글로블린 생성량 측정

실험 종료 후 ethyl ether로 마취한 상태에서 심장 천자법을 이용하여 채혈한 다음 6,500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, RANTES 농도는 ELISA kit를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 각 well에 혈청을 50 μ l씩 분주하고 biotin-conjugated antibody를 50 μ l씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 37°C에서 반응시키고 washing buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 이 후 뒤시 100 μ l의 streptavidin-HRP Working solution을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 washing buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 100 μ l의 stabilized chromogen을 가하여 암소에서 30분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리하고 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

IgE 생성량의 측정은 ELISA kit를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 항체를 coating 완충 용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight 하였다. 각 well을 3회 washing 완충 용액으로 세척한 후 혈청 (100배 희석)을 100 μ l씩 분주하였다. 이를 1시간 동안 실온에서 방치하고 washing 완충 용액으로 2회 세척한 다음, avidin-HRP conjugated antibody 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 다음 50 μ l의 stop 용

액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 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

Fig. 1 은 10주부터 14주까지 2주 간격으로 대조군, HYT 투여군의 피부염 유발 정도와 개선 정도를 나타내주는 사진으로, 최종 14주에는 HYT 투여군이 대조군에 비해서 피부염이 개선되었음을 확인할 수 있다 (Fig. 1). 피부염 지수는 아토피 피부염을 유발한 후 10주, 12주, 14주 때 관능적 방법에 의하여 측정된 결과 시간이 경과할수록 피부염지수가 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하여, 14주째 대조군은 7.00 ± 1.26 , HYT 투여군은 3.50 ± 1.38 로 유의성 있는 (**p<0.01) 감소를 나타내었다 (Fig. 2).

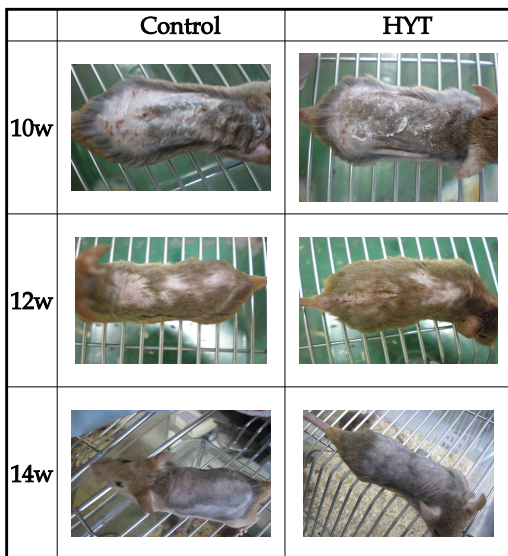


Fig. 1. Comparison of skin manifestation in NC/Nga mice between Control and HYT . Atopic dermatitis was induced by Biostir AD treatment in the dorsal skin of NC/Nga mice.

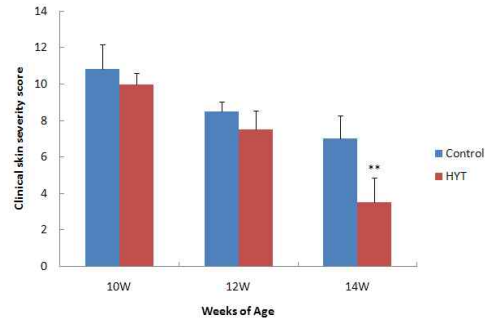


Fig. 2. Effects of HYT on clinical skin features and severity in Biostir AD-induced NC/Nga mice. Clinical skin index of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe) for each of five signs and symptoms (itch, erythema/hemorrhage, 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 compared with control group by student's t-test (**p<0.01).

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

1) CCR3+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군이 3.95 ± 0.35 (%), 대조군은 12.35 ± 0.49 (%)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (++p<0.01) 증가를 나타내었고, HYT 투여군은 7.35 ± 0.07 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.01) 감소하였다 (Fig. 3).

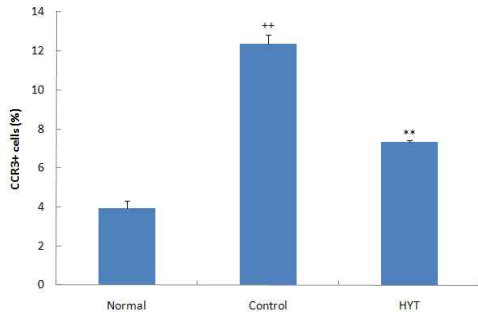


Fig. 3. Effect of HYT on CCR3+ cell rate of dorsal skin in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYT for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from skin stained with anti-CCR3 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($**p<0.01$).

2) B220+ /IgE+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군이 2.15 ± 0.35 (%), 대조군은 3.95 ± 0.21 (%)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.05$) 증가를 나타내었고, HYT 투여군은 2.60 ± 0.14 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($*p<0.05$) 감소하였다 (Fig. 4).

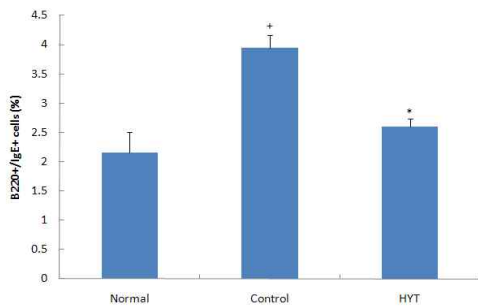


Fig. 4. Effect of HYT on B220+ /IgE+ cell rate of dorsal skin in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYT for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from skin stained with anti-B220 and anti-IgE and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($+p<0.05$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$).

3) Gr-1+ /CD11b+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군이 2.95 ± 0.21 (%), 대조군은 10.50 ± 0.28 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 증가를 나타내었고, HYT 투여군은 5.45 ± 0.35 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($**p<0.01$) 감소하였다 (Fig. 5).

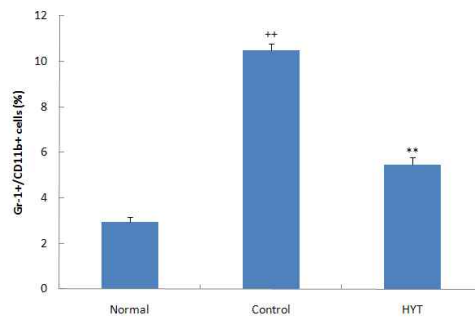


Fig. 5. Effect of HYT on Gr-1+ /CD11b+ cell rate of dorsal skin in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYT for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from skin stained with anti-Gr-1 and anti-CD11b and positively stained cells were analyzed by

flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($+p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($**p<0.01$).

3. PBMC 내 면역세포 변화에 미치는 영향

1) CD19+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군이 25.20 ± 0.57 (%), 대조군은 19.95 ± 0.78 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.05$) 감소를 나타내었고, HYT 투여군은 22.10 ± 0.28 (%)로 나타나 대조군에 비하여 증가하였다 (Fig. 6).

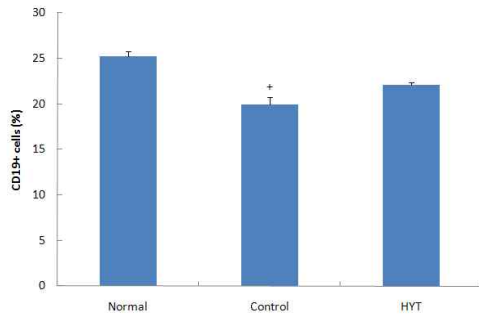


Fig. 6. Effect of HYT on CD19+ cell rate of PBMC in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYT for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-CD19+ and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($+p<0.05$).

2) CD3+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군이 71.15 ± 0.92 (%), 대조군은 76.80 ± 0.57 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하

여 유의성 있게 ($+p<0.05$) 증가하였고, HYT 투여군은 72.75 ± 0.35 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($*p<0.05$) 감소하였다 (Fig. 7).

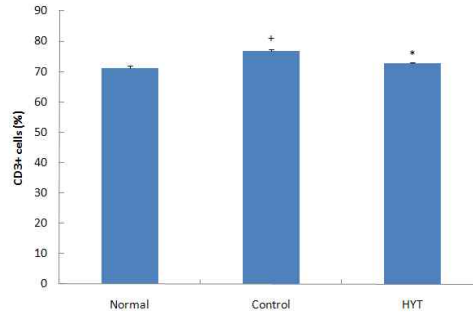


Fig. 7. Effect of HYT on CD3+ cell rate of PBMC in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYT for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-CD3+ and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. 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 compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$).

3) CD3+/CD69+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군이 5.25 ± 0.21 (%), 대조군은 12.35 ± 0.49 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있게 ($+p<0.01$) 증가하였고, HYT 투여군은 8.00 ± 0.28 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($**p<0.01$) 감소하였다 (Fig. 8).

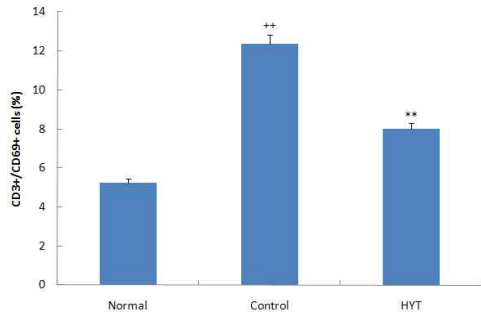


Fig. 8. Effect of HYT on CD3+/CD69+ cell rate of PBMC in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYT for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-CD3 and anti-CD69 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($**p<0.01$).

4) NKT+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군이 1.10 \pm 0.20 (%), 대조군은 3.45 \pm 0.15 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있게 ($+p<0.05$) 증가하였고, HYT 투여군은 1.90 \pm 0.10 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($*p<0.05$) 감소하였다 (Fig. 9).

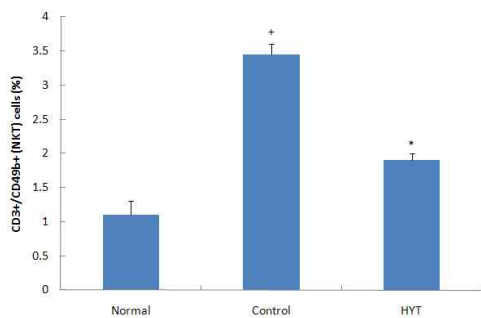


Fig. 9. Effect of HYT on NKT+ cell rate of PBMC in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYT for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-NKT and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. 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 compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$).

4. 혈청 내 사이토카인과 케모카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-4 생성량에 미치는 영향

정상군이 24.37 \pm 1.10 (pg/ml), 대조군은 74.85 \pm 4.91 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 증가를 나타내었고, HYT 투여군은 51.36 \pm 3.88 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($*p<0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 10).

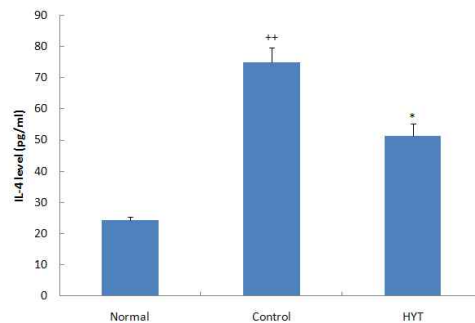


Fig. 10. Effect of HYT on the levels of IL-4 in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of IL-4 were determined using a

commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($+++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$).

2) IL-5 생성량에 미치는 영향

정상군이 0.35 ± 0.06 (pg/ml), 대조군은 7.73 ± 1.46 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+++p<0.001$) 증가를 나타내었고, HYT 투여군은 1.38 ± 0.19 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($***p<0.001$) 감소하였다 (Fig. 11).

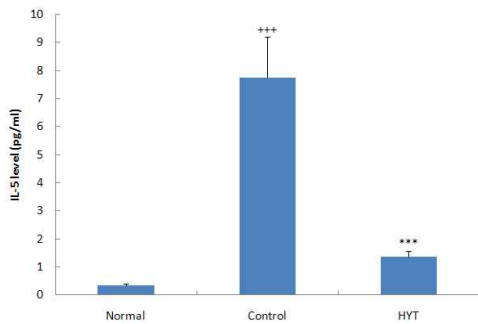


Fig. 11. Effect of HYT on the levels of IL-5 in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of IL-5 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($+++p<0.001$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($***p<0.001$).

3) IL-6 생성량에 미치는 영향

정상군이 6.08 ± 0.62 (pg/ml), 대조군은 329.44 ± 64.97 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+++p<0.001$) 증가를 나타내었고, HYT 투여군은 9.56 ± 0.42 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($***p<0.001$) 감소하였다 (Fig. 12).

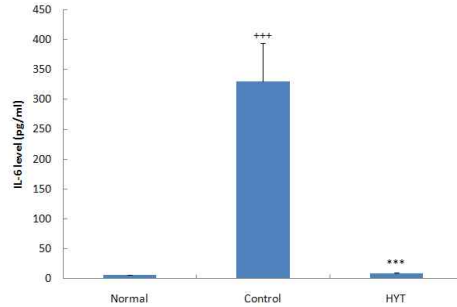


Fig. 12. Effect of HYT on the levels of IL-6 in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of IL-6 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($+++p<0.001$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($***p<0.001$).

4) IL-13 생성량에 미치는 영향

정상군이 391.22 ± 23.62 (pg/ml), 대조군은 785.51 ± 13.61 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 증가를 나타내었고, HYT 투여군은 475.05 ± 4.84 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($**p<0.01$) 감소하였다 (Fig. 13).

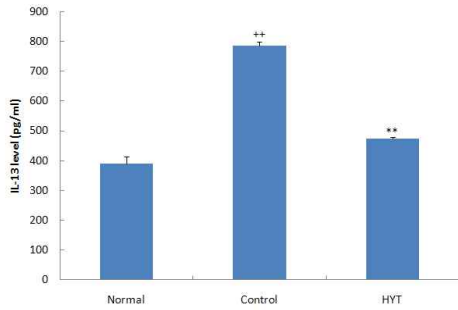


Fig. 13. Effect of HYT on the levels of IL-13 in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of IL-13 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($**p<0.01$).

5) TNF- α 생성량에 미치는 영향

정상군이 2.96 ± 0.43 (pg/ml), 대조군은 22.08 ± 5.03 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 증가를 나타내었고, HYT 투여군은 3.60 ± 0.56 (pg/ml)로 나타나 유의성 있게 ($**p<0.01$) 감소하였다 (Fig. 14).

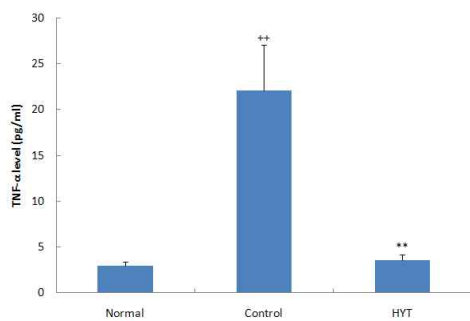


Fig. 14. Effect of HYT on the levels of

TNF- α in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of TNF- α were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($**p<0.01$).

6) IFN- γ 생성량에 미치는 영향

정상군이 8.34 ± 0.25 (pg/ml), 대조군은 0.56 ± 0.29 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 감소를 나타내었고, HYT 투여군은 3.81 ± 0.52 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($*p<0.05$) 증가하였다 (Fig. 15).

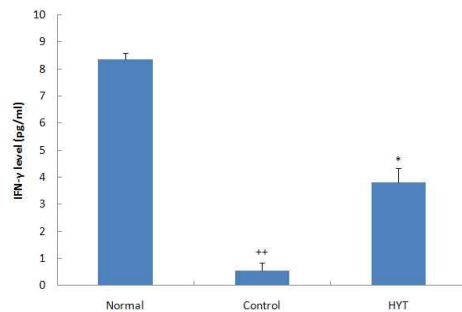


Fig. 15. Effect of HYT on the levels of IFN- γ in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of IFN- γ were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated

by compared with normal group by student's t-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$).

7) MCP-1 생성량에 미치는 영향

정상군이 39.63 ± 0.72 (pg/ml), 대조군은 88.65 ± 7.11 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.05$) 증가를 나타내었고, HYT 투여군은 65.51 ± 0.00 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($*p<0.05$) 감소하였다 (Fig. 16).

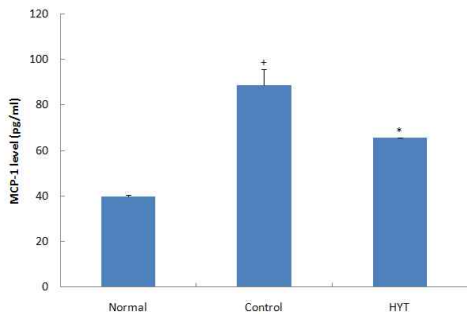


Fig. 16. Effect of HYT on the levels of MCP-1 in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of MCP-1 were determined using a commercially available ELISA kit. 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 compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$).

8) RANTES 생성량에 미치는 영향

정상군이 40.36 ± 2.02 (pg/ml), 대조군은 82.83 ± 3.02 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 증가를 나타내었고,

HYT 투여군은 42.57 ± 0.22 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($**p<0.01$) 감소하였다 (Fig. 17).

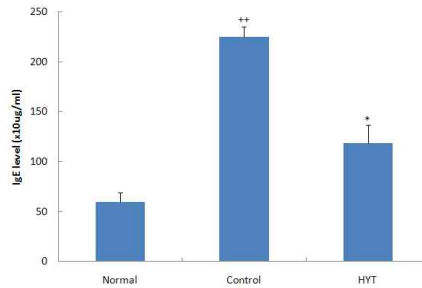


Fig. 17. Effect of HYT on the levels of RANTES in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of RANTES were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($**p<0.01$).

5. 혈청 내 IgE 생성량에 미치는 영향

정상군이 59.6 ± 9.7 (ug/ml), 대조군은 224.5 ± 10.5 (ug/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 증가를 나타내었고, HYT 투여군은 118.5 ± 18.0 (ug/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($*p<0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 18).

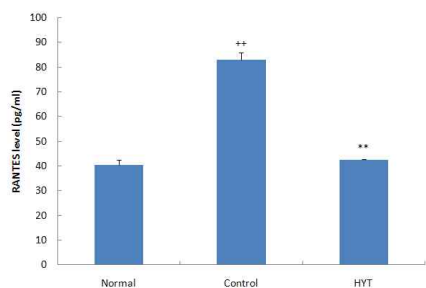


Fig. 18. Effects of HYT on the levels of IgE in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Serum levels of IgE were measured by sandwich ELISA at indicated time points. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($*p<0.05$).

IV. 考 察

아토피 (Atopy)는 진드기나 환경적인 물질이 자극원으로 작용하여 IgE를 매개로한 과도한 신체 방어라고 할 수 있다⁶⁻⁸. 아토피 소인을 가지고 있는 개인에서 피부, 호흡기 점막, 안 점막, 장 점막 등에 나타나는 일련의 알레르기 증상을 말하며, 이러한 아토피 소인은 유전되어 가족적으로 나타나는 경우가 빈번하다^{5,15}.

아토피 피부염 (Atopic dermatitis)은 아토피 알레르기를 가진 사람에서 나타나는 대표적인 피부 질환으로서 피부 건조증 및 가려움증이 주 증상인 만성 피부질환이다¹⁻³. 아토피 피부염의 진단이 현재까지도 임상적 특징을 중심으로 이루어지고 있기는 하지만, 최근에 들어 면역 기전을 포함한 이 질병의 병태 생리 기전의 이해에 많은 발전이 있어 왔다¹⁶.

면역 시스템에 관련이 있는 세포 중에는 두 종류의 helper T 세포 (Th)가 있고, 이들 세포들이 생산하는 사이토카인의 종류에 의해 다시 Th1과

Th2 등의 subtype으로 분류된다^{6-8,17}. 이 중에 아토피 피부염은 Th2의 활성화에 기초를 둔 면역 시스템으로 특징지어진다. 아토피 피부염의 면역학적 기전으로 Naive T 세포에서 분화된 Th2 세포들은 IL-4, IL-5, IL-13 등에 의해 B 세포에서 IgE 생산을 촉진하고 비만세포 (mast cell)를 탈과립화 시키고, 호산구 (eosinophil) 등을 활성화 시킨다. 이로 인해 혈액 내 IgE 함량이 증가되고, 히스타민과 같은 cytotoxin 물질들의 농도가 증가하면서 각종 염증 반응들이 진행되게 되는 것이다^{6-8,18-20}. 반대로 Th1 세포에 의해 생산된 IL-12와 IFN- γ 등은 Th2에 의해 생산되는 IL-4, IL-5 생성을 억제하는 연구 결과도 있다. 실제로 아토피와 천식을 동시에 가지고 있는 환자의 혈액 속에 사이토카인을 분석한 결과 IL-4와 IFN- γ 및 IL-12 등이 과다 분비되는 것이 확인되었고, 이 중에 아토피는 IL-4의 과분비와 이에 따른 IgE 생산에 의한 것으로 확인되었으며, 천식의 경우에는 IL-12에 의해 조절되는 IFN- γ 의 과분비로 확인되었다²¹⁻²⁴.

실제로 면역 반응은 그물망과 같이 얽혀 있는 구조를 이루고 있어 어느 한 부분을 손상시키게 되면 전체적으로 연쇄적인 반응이 일어날 가능성이 크고, 전체적인 예측도 불가능하다. 그러하기 때문에 이를 제어하기 위해서는 면역 억제 약물을 쓰는 것이 대부분인데 주로 사이클로스포린이나, 타크로리무스 등이다. 사이클로스포린은 마크로라이드계 면역억제제로서 아토피 피부염에 관여하는 사이토카인의 유전자 전사 (gene transcription)를 변화시켜 T 세포 활성화를 억제함으로써 세포 면역반응을 조절한다. 총 3~6개월 이내로 사용하는데, 중단 후 재발이 있고 신장 독성이 있으므로 소아에서는 아주 중증을 제외하고는 추천되지 않는다²⁵. 타크로리무스 (Tacrolimus : FK506 : Prograf)는 사이클로스포린과 작용 기전은 유사하나 피부에 침투력이 강해서 국소용으로 사용이 가능하다. 7세 이상의 소아에게 국소 도포로 약 85%에서 효과가 있다고 하나 장기적인 효과와 부작용에 대해서는 좀 더 연구가 필요한 것으로 보고되고 있다²⁶. 이와

더불어 타이모펜틴, 인터페론, 감마글로불린 등 다른 여러 가지 면역조절제가 있기는 하나 이들 역시 상당수가 재발의 빈도가 높고 다양한 부작용과 장기 복용에 따른 이상 반응이 초래되어 지속적인 보완이 요구되고 있다²⁷⁾.

본 실험에서는 객관적인 효능 검증을 통하여 임상 활용 근거를 제시하고 효과적인 의학적 치료 영역 확대를 위한 기초적 자료를 제공하고자 荊芥連翹湯(HYT)을 시료로 면역 세포 및 이와 관련된 면역 반응 유발 물질들에 미치는 영향을 조사하였다.

먼저 Biostar AD 연고를 도포하여 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga 생쥐의 피부염 유발 정도를 육안으로 살펴본 결과, HYT 투여군이 대조군에 비해 투여 기간 증가와 비례하여 현저한 피부 개선 효과를 보였다 (Fig. 1). SCORD 법을 이용한 피부염 지수에서도 육안으로 관찰된 결과와 마찬가지로 대조군의 7.0에 비해 HYT 투여군은 3.5로 유의적인 감소를 보였다 (Fig. 2).

배부 피부 내 면역 세포 변화에서는, 호산구를 나타내는 CCR3+²⁸⁾ 세포의 비율이 대조군에 비해 40.5% 감소하였고 (Fig. 3), B세포에서의 IgE 생성도 대조군에 비해 34.2% 감소하였으며 (Fig. 4), 과립세포를 나타내는 Gr-1+/CD11b+²⁹⁾ 세포에서도 대조군에 비해 48.1% 감소한 것으로 나타났다 (Fig. 5). 이는 본 시료인 HYT가 피부로 침윤되는 면역세포들 중에서 호산구와 과립구의 침윤^{28,29)}을 억제시킴으로써 아토피 피부염에 효과적으로 작용함을 추측케 한다.

혈액 내 면역세포에 미치는 영향을 살펴보고자 PBMC 내 면역 세포의 비율을 조사하였다. B 세포를 나타내는 CD19+³⁰⁾ 세포의 비율이 대조군에 비해 10.8% 증가하였고 (Fig. 6), T 세포를 나타내는 CD3+³¹⁾는 5.3% 감소하였으며 (Fig. 7), 활성화 T 세포를 나타내는 CD3+/CD69+³²⁾ 세포 또한 대조군에 비하여 35.2% 정도 감소하였다 (Fig. 8).

NKT 세포는 IFN- γ 등의 사이토카인을 생산하

여 대식세포와 T 세포를 피부에 유도하여 피부염을 유발하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다³³⁾. HYT가 NKT+ 세포 비율에 미치는 영향을 조사한 결과, 대조군에 비하여 44.9% 정도 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 9). 이 결과들은, DLN에서의 결과와 마찬가지로 HYT가 혈액 내에서도 세포간의 균형을 유지시켜주고 염증성 사이토카인을 분비하는 세포의 활성화를 억제하는 기전이 있음을 입증해 주고 있다.

아토피 피부염을 일으키는 중요한 면역조절 물질인 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, RANTES를 혈청에서 측정하여 HYT가 사이토카인 발현에 미치는 영향을 알아보았다. IL-4, IL-5, IL-13은 Th2 사이토카인 중 대표적인 염증성 사이토카인이고 IL-6, TNF- α 와 같은 사이토카인은 B세포 및 비만세포를 활성화 시키고 염증을 유도하는 역할을 하며³⁴⁾ MCP-1과 RANTES 같은 케모카인은 혈액에서 염증 부위로 백혈구의 이동을 조절하여 세포 침윤이 일어나게 하는 물질이다³⁵⁾. 먼저, IL-4, IL-5, IL-13의 발현은 정상군의 수치와 비교하여 대조군에서 50% 이상 증가한 반면, HYT 투여군은 대조군과 비교하여 31.4%, 82.1%, 39.5% 정도 감소하였고 (Fig. 10, 11, 13), IL-6는 대조군과 비교하여 97.1%의 현저한 감소를 보였으며 (Fig. 12), TNF- α 역시 대조군과 비교하여 83.7% 정도 유의적인 감소를 보였다 (Fig. 14). 반대로, Th1 사이토카인으로서 Th2의 분화를 억제하는 사이토카인인 IFN- γ ³⁶⁾에서는 대조군과 비교하여 589.3%의 증가를 보였다 (Fig. 15). MCP-1과 RANTES는 CC 케모카인의 하나로서 사이토카인과 비슷한 성질을 가지는데³⁵⁾, 이들 역시 대조군과 비교하여 26.1%, 48.6% 정도 감소하는 경향을 보였고 (Fig. 16, 17), 혈청 내 IgE 생성량 또한 대조군과 비교하여 47.2%의 유의성 있는 감소를 보였다 (Fig. 18).

이상의 결과로 보아 HYT가 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에서 나타나는 피부염 개선 효과는 주로 염증세포의 활성화 억제와 면역조절

물질인 사이토카인, 케모카인의 발현 감소를 통하여 호산구의 분화 및 피부로의 침윤을 억제함으로써 임상 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

V. 結 論

아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에서 荊芥連翹湯(HYT)의 피부염 개선효과를 객관적으로 검증하기 위하여 다양한 면역 관련 인자에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HYT 투여군은 대조군에 비하여 육안적으로 아토피 피부염을 개선시켰으며, 14주에는 피부염 지수를 유의성 있게 감소시켰다.

2. HYT 투여군은 대조군에 비하여 배부피부 내 CCR3+, B220+/IgE+, Gr-1+/CD11b+ 면역세포 비율을 각각 40.5%, 34.2%, 48.1%로 유의성 있게 감소시켰다.

3. HYT 투여군은 대조군에 비하여 PBMC 내 CD19+ 면역세포 비율을 10.8% 증가시켰고, CD3+, CD3+/CD69+, NKT+ 면역 세포비율을 각각 5.3%, 35.2%, 44.9% 감소시켰다.

4. HYT 투여군은 대조군에 비하여 혈청 내 IFN- γ 의 발현을 589.3% 증가시켰고, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α , MCP-1 및 RANTES의 발현을 각각 31.4%, 82.1%, 97.1%, 39.5%, 83.7%, 26.1%, 48.6% 감소시켰으며, IgE의 발현 또한 47.2% 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 임상에서 활용되고 있는 荊芥連翹湯(HYT)의 아토피 피부염의 개선 효과가 실험적으로 규명됨으로써 지속적인 임상 활용이 기대된다. 아울러 향후 荊芥連翹湯과 관련된 연구에 있어 기초적 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료되며, 변증시치에 의한 보다 효과적인 처방 개발을 위해서는 구성 약물 혹은 구성 약물간

효능 평가에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. Kevin DC, Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy. *J invest Dermatol* 102:128-37, 1994.
2. Williams Hywel C., Atopic dermatitis. Cambridge Univ Press, pp.142-153, 2000.
3. 박영립, 박준 : 아토피 피부염의 병인, 대한 피부연구학회지 14(3):67-72, 2007.
4. Daniels J and Harper J, The epidemiology of atopic dermatitis. *Hosp Med* 63(11):649-52, 2002.
5. Holden CA and Parish WE, Atopic dermatitis. Blackwell Science, Oxford, pp.99-111, 1998.
6. Meagher LJ, Wines NY and Cooper AJ, Atopic dermatitis: review of immunopathogenesis and advances in immunosuppressive therapy. *Australas J Dermatol* 43(4):247-54, 2002.
7. Blaser Kurt, Ring Johannes, Capron, T Cell Regulation in Allergy, Asthma and Atopic Skin Diseases. S Karger Pub, pp.121-137, 2008.
8. Fry Lionel, Ellis Charles N., An Atlas of Atopic Eczema. Informa Healthcare, pp.87-101, 2003.
9. 공정현 : 增補 萬病回春(하권), 일중사, pp.12-14, 1994.
10. 김민지 : 荊芥連翹湯의 물추출물이 lipopolysaccharide로 유도된 Raw264.7 cell에 서의 Nitric Oxide의 생성 및 iNOS와 COX-2의 발현, Cytokine에 미치는 영향, 대구한의대학교 대학원, 2005.
11. 신소영 : 荊芥連翹湯과 加味荊芥連翹湯의 消炎·鎮痛 및 抗알레르기에 미치는 影響,

- 원광대학교대학원, 1997.
12. 김동일 : 荊芥連翹湯과 加味荊芥連翹湯이 解熱鎮痛 및 消炎作用에 미치는 影響, 경희대학교, 1986.
 13. 황순이 : 荊芥連翹湯 추출물의 遺傳毒性 평가, 대구한의대학교대학원, 2007.
 14. 이운심 : 小兒 再發性 滲出性 中耳炎에 加味荊芥連翹湯이 中耳腔 滲出液 內 Immnoglobulin-G 亞型에 미치는 影響, 원광대학교대학원, 2001.
 15. Leung DY, Atopic dermatitis : The skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 96:302-18, 1995.
 16. Leung DY, Atopy dermatitis: new insight and apportunities for for therapeutic intervention, *J Allergy Clin Immunol* 105:860-867, 2000.
 17. Mosmann T, Coffman R: Two types of mouse helper T-cell clone. Implications for immune regulation. *Immunol Today* 8:223-227, 1987.
 18. Leung DY and Soter NA, Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 44(1 suppl):S1-S12, 2001.
 19. Pastore S, Mascia F, Giustizieri ML, Giannetti A and Girolomoni G, Pathogenic mechanisms of atopic dermatitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48(6):497-504, 2000.
 20. Romagnani S: immunologic influences on allergy and the Th1/Th2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 113:395-400, 2004.
 21. Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH: Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 21:479-483, 2000.
 22. Magnan AO, Mely LG, Camilla CA, Badier MM, Montero- Julian FA, Guillot CM, Casano BB, Prato SJ, Fert V, Bongrand P, Vervloet D: Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1790-1796, 2000.
 23. Romagnani S: Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 12:227-257, 1994.
 24. Abbas AK, Murphy K, Sher A: Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793, 1996.
 25. Schreiber SL and Crabtree GR, The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 13(4):136-42, 1992.
 26. Fleischer AB, Jr., Treatment of atopic dermatitis: role of tacrolimus ointment as a topical noncorticosteroidal therapy. *J Allergy Clin Immunol* 104(3 Pt 2):S126-30, 1999.
 27. Yatscoff RW and Aspeslet LJ, The monitoring of immunosuppressive drugs: a pharmacodynamic approach. *Ther Drug Monit* 20(5):459-63, 1998.
 28. Yawalkar N, Uguccioni M, Scharer J et al., Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis, *J Invest Dermatol* 113:43-48, 1999.
 29. Rongcun Yang, Zhong Cai, Yuan Zhang, William H. Yutzy, IV, Katherine F. Roby and Richard B.S. Roden, CD80 in Immune Suppression by Mouse Ovarian Carcinoma-Associated Gr-1+CD11b+ Myeloid Cells. *Cancer Research* 66:6807-6815, 2006.
 30. Thomas F. Tedder, Liang-Ji Zhou, Pablo

- Engel, The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes, *Trends in Immunology* 15(9):437- 442, 1994
31. R Testi, JH Phillips and LL Lanier, Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular $[Ca^{++}]$ and stimulation of protein kinase C, *The Journal of Immunology* 142(6):1854-1860, 1989.
32. D Vanhecke, G Leclercq, J Plum and B Vandekerckhove, Characterization of distinct stages during the differentiation of human CD69+CD3+ thymocytes and identification of thymic emigrants. *The Journal of Immunology* 155(4):1862-1872, 1995.
33. Everett H. Meyer, Rosemarie H. DeKruyff, and Dale T. Umetsu, T Cells and NKT Cells in the Pathogenesis of Asthma, *Annual Review of Medicine* 59:281-292, 2007.
34. Mosmann T, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T-cell clones. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357, 1986.
35. Yuko Kaburagi, Yuka Shimada, Tetsuya Nagaoka, Minoru Hasegawa, Kazuhiko Takehara and S. Sato, Enhanced production of CC-chemokines (RANTES, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , and eotaxin) in patients with atopic dermatitis, *Archives of Dermatological Research* 297(7):350-355, 2001.
36. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H: Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* 373:255-257, 1995.