

형개연교탕가미방의 아토피 피부염 병태모델에서의 면역조절능에 관한 연구

박성희·박보경·김선빈·최학주·김동희*

The effects of HYGB on various immunological factors related to pathogenesis of allergic dermatitis in NC/Nga mice

Park Sung-hee, 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 Hyunggaeyunkytanggamibang(HYGB) on the recovery of dermatitic symptoms through its influence on the immune related factors. The results are as below:

1. HYGB treated group showed improvement of atopic dermatitis with naked eye observation, and significant decrease of dermatitis index was observed after 14 weeks.
2. HYGB treated group showed significant decrease of the ratio of CCR3+, B220+/IgE+, and CD11b+/Gr-1+ immune cells in dorsal skin by 41.7%, 21.5%, and 23.8%, respectively.
3. HYGB treated group showed an increase of CD19+ immune cells by 10.3% in PBMC, whereas CD3+, CD3+/CD69+, NKT+ immune cells were decreased by 4.3%, 42.9%, and 21.7%, respectively.
4. HYGB treated group showed an increase in the expression of IFN- γ in the serum by 514.3%. However, the expressions of IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α , MCP-1 and RANTES were decreased by 21.2%, 69.8%, 90.5%, 28.7%, 72.2%, 26.1%, and 19.9%, respectively. Also, the expression of IgE was decreased by 44.3%.
5. HYGB treated group showed a decrease of the expression of IL-4 and IL-5 by 43% and 44.3%.

The results above indicated that HYGB clinically used for atopic dermatitis treatment has objective validity, and therefore can be provided as the basic data for EBM(Evidence based medicine) construction for anti-allergic and anti-inflammatory studies.

Key words : atopic dermatitis, immunological factors, HYGB(Hyunggaeyunkytanggamibang)

I. 緒 論

아토피 피부염(Atopic dermatitis)은 만성적으로 재발하는 염증성 피부질환으로 피부건조증,

심한 가려움증과 더불어 조직학적으로 면역세포의 침윤을 특징으로 한다¹⁾. 알레르기 비염, 기관지 천식과 함께 가장 대표적인 알레르기성 질환으로써 유·소아의 유병률이 2~3배 증가함과 동시에 최근 성인에게도 증가함으로써, 전 인구의 10~20% 정도가 이로 인하여 고통을 받고 있다

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

1-3).

현재까지 아토피 피부염은 환경적인 요소와 유전적인 소인이 모두 관여하는 복합적인 질환으로 알려져 있어 아직 정확한 발병 원인은 밝혀지지 않고 있다. 지금까지 연구된 면역학적 측면에서 보면 T lymphocytes, Langerhans cells, eosinophils, keratino- cytes, mast cell 같은 여러 세포들과 cytokine, chemokine, immunoglobulin 같은 인자들에 의해 발생되는데⁴⁻⁸⁾ CD4+, CD8+ 세포 비율, Th2 매개 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-10과 IgE, Langerhans 세포의 활성화 및 비만세포들의 증가와 더불어 IFN- γ 의 감소가 대표적인 병리 기전으로 이해되고 있다⁹⁻¹¹⁾.

이러한 면역학적 기전을 바탕으로 현재까지 알려진 아토피 피부염에 대한 치료 방법은 스테로이드제나 항히스타민제의 도포나 복용 그리고 면역억제제가 사용되고 있다. 그러나 이러한 치료는 증상의 완화에 있어서는 매우 효과적인 결과를 나타내고 있으나, 장기간 사용의 부작용과 역치값 상승으로 인하여 보완 대체약물에 대한 관심이 증가하는 추세이다^{12,13)}.

이에 저자는 현재 임상에서 다양한 염증성 질환에 응용되고 있는 荊芥連翹湯加味方(HYGB)을 시료로 아토피 피부염 개선 효과를 객관적으로 검증하고자, 아토피 피부염 유발 동물 모델인 NC/Nga 생쥐에서의 면역 관련 인자와 조직학적 변화에 미치는 영향을 검색하였다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 동물

실험동물인 수컷 7주령의 NC/Nga mice는 중앙실험동물에서 공급 받아 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co., korea)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2℃, 습도 55 ± 15%, 12시간-12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약물

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

Table. 1 The Prescription of HYGB (1첩)

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
熟地黃	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
馬齒莧	Portulacea Herba	4
牡丹皮	Paeonia Suffruticosa	4
蟬蛻	Cicadae Periostracum	4
白鮮皮	Dictamni Radicis Cortex	4
地膚子	Kochiae Fructus	4
Total amount		76

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-CD19-FITC, 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

HYGB은 2칩 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 23.6 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 HYGB를 9.8mg/day의 농도로 6주간 경구 투여하였으며, 대조군은 증류수를 실험군과 동일한 양으로 경구 투여하였다.

3) 관능 평가

약물 처리 후 6주에 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법으로 관능평가를 실시하였다. 평가 항목은 홍반 (Erythema), 가려움과 건조 피부 (Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종 (Edema & Hematoma), 긁무름 (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-CD19-FITC, 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 30분 간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산 완충 생리식염수로 수세하고 flow cytometry를 이용하여 측정하고 분석하였다.

6) 혈청 내 사이토카인 및 면역 글로불린 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. 이를 다시 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 30분 간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리하고 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

IgE 생성량의 측정은 ELISA kit를 이용하여 다

음과 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 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) CD3/CD28에 의해 활성화된 비장세포 내 사이토카인 생성량 측정

실험 종료 후 비장세포 (1 x 10⁵ cells/well)를 anti-CD28 (1 ug/ml), anti-CD3 (1 ug/ml) 항체가 coating된 96-well plate에서 48시간 동안 배양한 후 배양액을 취하여 ELISA kit (Biosource, USA)을 이용하여 IL-4, IL-5를 측정하였다. 측정 방법은 혈청 내 사이토카인 및 면역 글로불린 IgE 측정 방법과 동일하다.

8) 통계처리

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

III. 實驗成績

1. NC/Nga 생쥐의 피부염 지수에 미치는 영향

8주령의 NC/Nga 생쥐를 제모한 후 Biostir AD 연고를 도포하여 피부염을 3주간 유발시키면서 9주령부터는 HYGB 구강 투여를 실시하였다. Fig. 1 은 10주부터 14주까지 2주 간격으로 대조군과 HYGB 투여군의 피부염 유발 정도와 개선 정도를 나타내주는 사진으로, 최종 14주에는 HYGB 투여군이 대조군에 비해서 피부염이 개선

되었음을 확인할 수 있다. SCORD법에 따른 피부염 지수는 아토피 피부염을 유발한 후 10주, 12주, 14주 때 측정된 결과, 시간 경과에 따른 감소를 보이다가 14주째 대조군은 7.00 ± 1.26 , HYGB 투여군은 4.00 ± 0.89 로 나타나 유의적인 감소를 나타내었다 (Fig. 2).

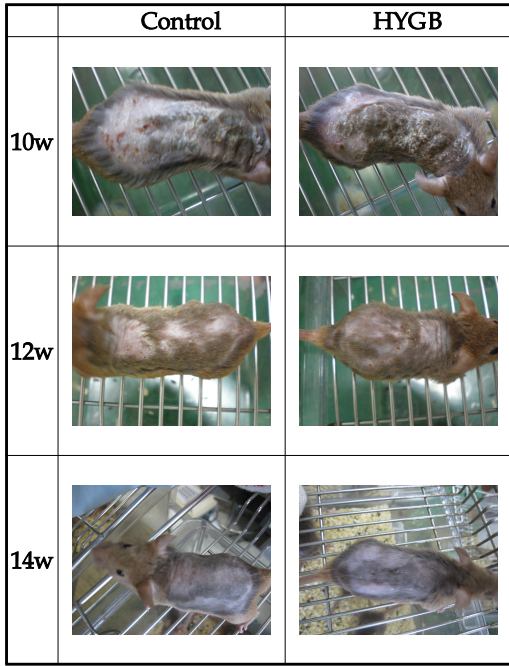


Fig. 1. Comparison of skin manifestation in NC/Nga mice between Control and HYGB. Atopic dermatitis was induced by Biostir AD treatment in the dorsal skin of NC/Nga mice.

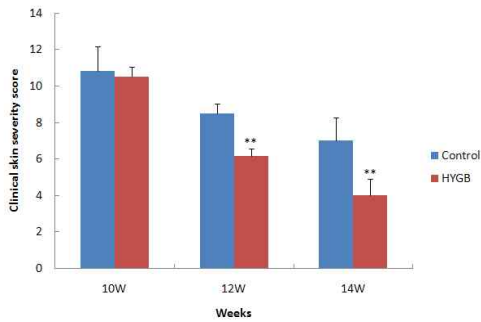


Fig. 2. Effects of HYGB on clinical skin features and severity in Biostir AD-induced

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

정상군은 3.95 ± 0.35 (%), 대조군은 12.35 ± 0.49 (%)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p < 0.01$) 증가를 나타내었고, HYGB 투여군은 7.20 ± 0.42 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (** $p < 0.01$) 감소하였다 (Fig. 3).

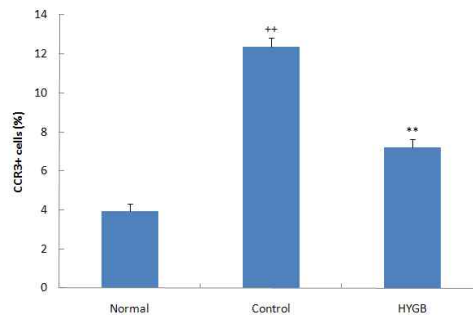


Fig. 3. Effect of HYGB on CCR3+ cell rate of dorsal skin in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYGB for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from skin stained with anti-CCR3 and positively stained cells were analyzed by 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

정상군은 2.15 ± 0.35 (%), 대조군은 3.95 ± 0.21 (%)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.05$) 증가를 나타내었고, HYGB 투여군은 3.10 ± 0.42 (%)로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다 (Fig. 4).

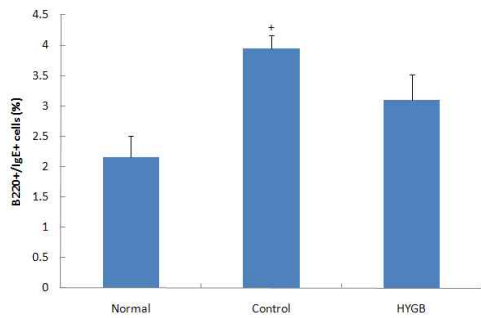


Fig. 4. Effect of HYGB on B220+/IgE+ cell rate of dorsal skin in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYGB for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from skin stained with anti-B220 and anti-IgE and positively stained cells 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 ($+p<0.05$).

3) Gr-1+/CD11b+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 2.95 ± 0.21 (%), 대조군은 10.50 ± 0.28 (%)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 증가를 나타내었고, HYGB 투여군은 8.00 ± 0.28 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($*p<0.05$) 감소하였다 (Fig. 5).

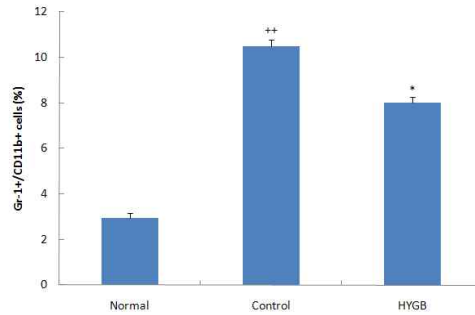


Fig. 5. Effect of HYGB on Gr-1+/CD11b+ cell rate of dorsal skin in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYGB for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from skin stained with anti-Gr-1 and anti-CD11b and positively stained 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 ($*p<0.05$).

3. PBMC 내 면역세포 변화에 미치는 영향

1) CD19+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 25.20 ± 0.57 (%), 대조군은 19.95 ± 0.78 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.05$) 감소를 나타내었고, HYGB 투여군은 22.00 ± 0.42 (%)로 나타나 대조군에 비하여 증가하였다 (Fig. 6).

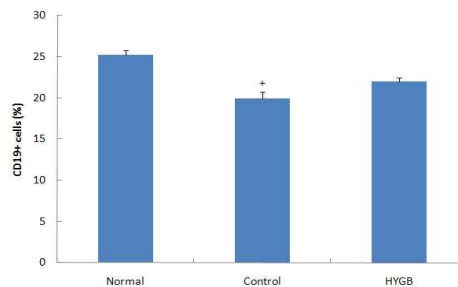


Fig. 6. Effect of HYGB on CD19+ cell rate of PBMC in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYGB for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-CD19+ and positively stained cells were analyzed by flow 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

정상군은 71.15 ± 0.92 (%), 대조군은 76.80 ± 0.57 (%)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있게 ($+p<0.05$) 증가하였고, HYGB 투여군은 73.50 ± 0.57 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($*p<0.05$) 감소하였다 (Fig. 7).

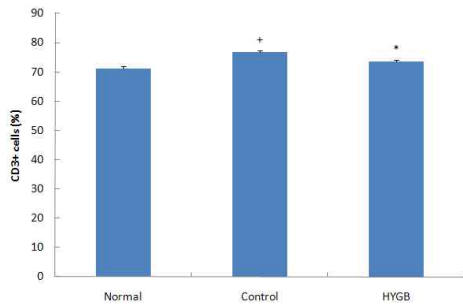


Fig. 7. Effect of HYGB on CD3+ cell rate of PBMC in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYGB for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-CD3+ and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. 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

정상군은 5.25 ± 0.21 (%), 대조군은 12.35 ± 0.49 (%)으로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있게 ($+p<0.01$) 증가하였고, HYGB 투여군은 7.05 ± 0.21 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($**p<0.01$) 감소하였다 (Fig. 8).

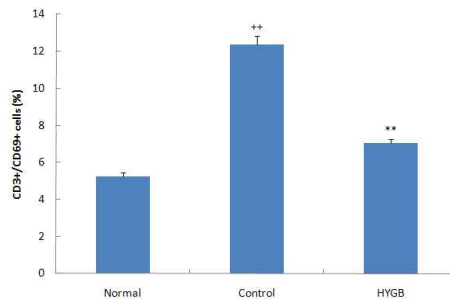


Fig. 8. Effect of HYGB on CD3+/CD69+ cell rate of PBMC in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYGB for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-CD3 and anti-CD69 and positively stained cells were 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

정상군은 1.10 ± 0.20 (%), 대조군은 3.45 ± 0.15 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있게 ($+p<0.05$) 증가하였고, HYGB 투여군은 2.70 ± 0.10 (%)로 나타나 대조군에 비하

여 감소하였다 (Fig. 9).

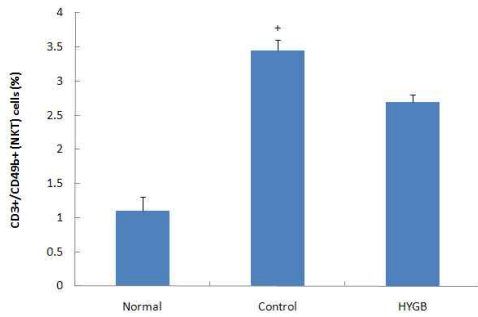


Fig. 9. Effect of HYGB on NKT+ cell rate of PBMC in Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYGB for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-NKT and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+ $p < 0.05$).

4. 혈청 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-4 생성량에 미치는 영향

정상군은 24.37 ± 1.10 (pg/ml), 대조군은 74.85 ± 4.91 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p < 0.01$) 증가를 나타내었고, HYGB 투여군은 59.01 ± 7.21 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다 (Fig. 10).

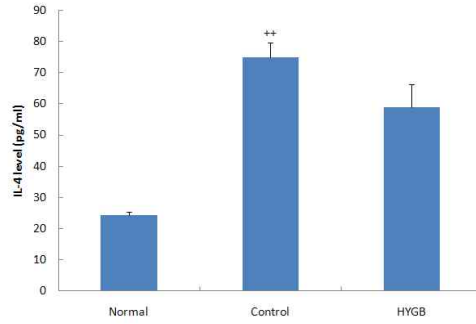


Fig. 10. Effect of HYGB on the levels of IL-4 in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of IL-4 were determined using a commercially 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 ($++p < 0.01$).

2) IL-5 생성량에 미치는 영향

정상군은 0.35 ± 0.06 (pg/ml), 대조군은 7.73 ± 1.46 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p < 0.01$) 증가를 나타내었고, HYGB 투여군은 2.33 ± 1.55 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다 (Fig. 11).

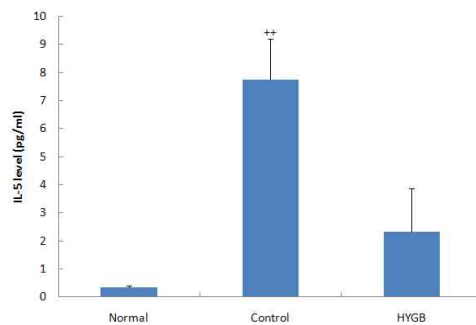


Fig. 11. Effect of HYGB on the levels of IL-5 in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice.

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 ($+p < 0.01$).

3) IL-6 생성량에 미치는 영향

정상군은 6.08 ± 0.62 (pg/ml), 대조군은 329.44 ± 64.97 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p < 0.05$) 증가를 나타내었고, HYGB 투여군은 31.40 ± 3.59 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($*p < 0.05$) 감소하였다 (Fig. 12).

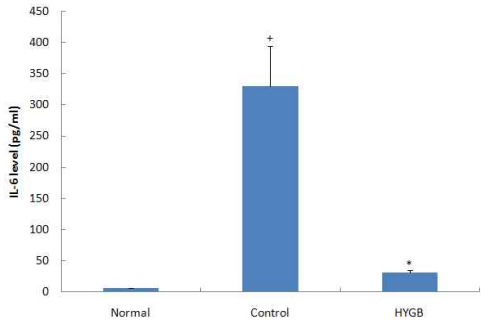


Fig. 12. Effect of HYGB on the levels of IL-6 in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of IL-6 were determined using a commercially 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 ($+p < 0.05$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($*p < 0.05$).

4) IL-13 생성량에 미치는 영향

정상군은 391.22 ± 23.62 (pg/ml), 대조군은 785.51 ± 13.61 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p < 0.01$) 증가를 나타내었고, HYGB 투여군은 559.60 ± 9.47 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($**p < 0.01$) 감소하였다 (Fig. 13).

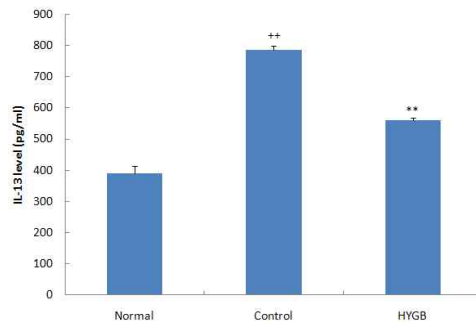


Fig. 13. Effect of HYGB on the levels of IL-13 in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of IL-13 were determined using a commercially 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

정상군은 2.96 ± 0.43 (pg/ml), 대조군은 22.08 ± 5.03 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p < 0.01$) 증가를 나타내었고, HYGB 투여군은 6.13 ± 0.46 (pg/ml)로 나타나 유의성 있게 ($**p < 0.01$) 감소하였다 (Fig. 14).

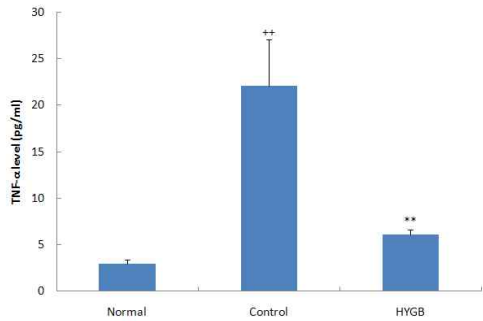


Fig. 14. Effect of HYGB on the levels of TNF- α in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of TNF- α were determined using a commercially 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

정상군은 8.34 ± 0.25 (pg/ml), 대조군은 0.56 ± 0.29 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 감소를 나타내었고, HYGB 투여군은 3.44 ± 0.00 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($**p<0.01$) 증가하였다 (Fig. 15).

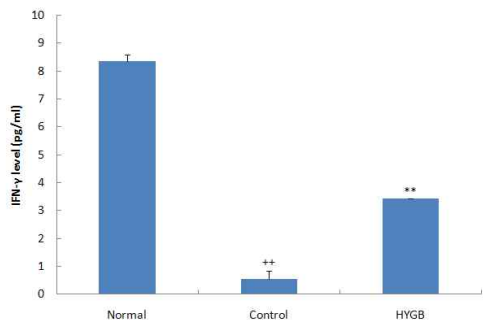


Fig. 15. Effect of HYGB on the levels of IFN- γ in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of IFN- γ were determined using a commercially 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 ($**p<0.01$).

7) MCP-1 생성량에 미치는 영향

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

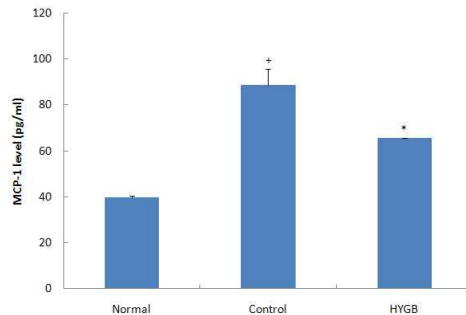


Fig. 16. Effect of HYGB on the levels of MCP-1 in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of MCP-1 were determined using a commercially 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

정상군은 40.36 ± 2.02 (pg/ml), 대조군은 82.83 ± 3.02 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.01$) 증가를 나타내었고, HYGB 투여군은 66.32 ± 4.66 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다 (Fig. 17).

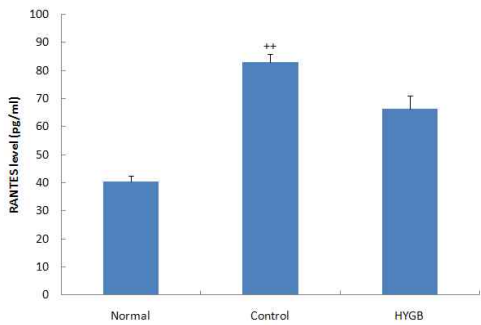


Fig. 17. Effect of HYGB on the levels of RANTES in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 6,500 rpm centrifugation. The levels of RANTES were determined using a commercially 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 ($+p<0.01$).

5. 혈청 내 IgE 생성량에 미치는 영향

IgE 농도는 정상군이 59.5 ± 9.8 (ug/ml), 대조군은 224.3 ± 11.5 (ug/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.01$) 증가를 나타내었고, HYT 투여군은 125.0 ± 27.2 (ug/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는

($*p<0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 18).

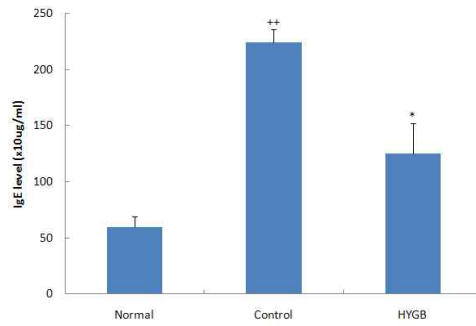


Fig. 18. Effects of HYGB on the levels of IgE in the serum of Biostir AD-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Serum levels of IgE were measured by sandwich ELISA at indicated time points. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with 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 ($*p<0.05$).

6. CD3/CD28로 활성화된 비장세포 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-4 생성량에 미치는 영향

정상군은 13.80 ± 0.16 (pg/ml), 대조군은 85.70 ± 2.02 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.01$) 증가를 나타내었고, HYGB 투여군은 48.85 ± 1.17 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($**p<0.01$) 감소를 나타내었다 (Fig. 19).

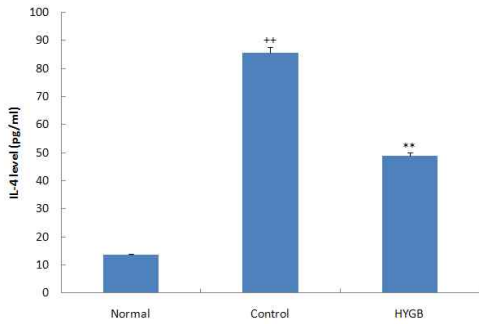


Fig. 19. Effect of HYGB on the levels of IL-4 in splenocytes of NC/Nga mice. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IL-4 in the culture supernatant were determined using commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. 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 ($**p<0.01$).

2) IL-5 생성량에 미치는 영향

정상군은 33.83 ± 0.38 (pg/ml), 대조군은 132.33 ± 9.42 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($++p<0.01$) 증가를 나타내었고, HYGB 투여군은 73.74 ± 5.59 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($*p<0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 20).

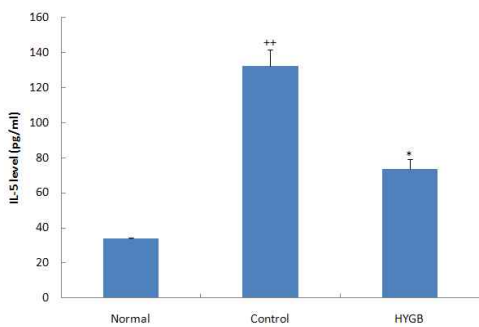


Fig. 20. Effect of HYGB on the levels of

IL-5 in splenocytes of NC/Nga mice. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IL-5 in the culture supernatant were determined using 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 ($*p<0.05$).

IV. 考 察

아토피 피부염은 최근 20~30년간 현저히 증가하였는데, 다양한 알레르겐의 노출과 환경 및 식생활 등의 변화 등이 주원인으로 언급되고 있다¹⁻³. 소양감, 피부 건조증, 홍반, 찰상 및 태선화 등이 특징이며, 증상이 심할수록 혈청 IgE가 정상인에 비해 증가 된다^{1-3,14}.

또한 알레르기 증상의 대부분이 비만세포나 호산구가 분비하는 히스타민 등의 염증반응 매개 물질에 의해서 임상적 증상이 나타나는데, 아토피 성 피부염 환자 역시 이러한 경향을 지니고 있으며, 피부조직을 관찰했을 때 과각화증과 염증세포의 침윤 등을 볼 수 있다. 따라서 피부장벽이 제 기능을 하지 못하게 되고 피부 수분 함량이 감소하며 경피 수분 손실이 증가하는 양상을 나타내는 것이 특징이다^{1-3,14,15}.

아토피 피부염은 임상 소견과 마찬가지로 면역학적 양상도 복잡하고 다양하다. 아토피 피부염이 진행되게 되면 T 세포의 활성화가 일어나고 helper T 세포로 변화 된다¹⁶. 변화된 helper T 세포는 발현되는 사이토카인에 따라 Th1과 Th2 세포로 분화하는데, 면역계 발달 과정 중 비정상적인 성숙으로 인해 Th1과 Th2 세포간의 균형 이상으로 Th2 반응에 치우치게 된다^{17,18}. 분화된 Th2 세포들은 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 같은 사이토카인을 분비하게 되고 이 사이토카인들

은 B 세포의 isotype switching을 유도하여 IgE의 발현을 증가시켜, 호산구 같은 면역 세포를 피부로 끌어오는 역할을 한다¹⁹⁾. 또한 비만세포 표면에 있는 고친화성 IgE 수용체(FcεRI)에 과발현된 IgE가 결합하여 잠작된 상태가 되고 그 상태에서 다시 항원에 노출되게 되면 비만세포를 활성화시켜 히스타민, Leukotriene(LT) 등의 화학전달물질과 IL-4, IL-5, TNF-α, GM-SCF 등의 사이토카인을 분비하여 과민반응을 유발하게 된다²⁰⁾. 반대로, Th1 세포에 의해 생산된 IL-12와 IFN-γ 등은 Th2에 의해 생산되는 IL-4와 IL-5의 생산을 억제한다는 연구 결과도 있다²¹⁾(Fig. 21).

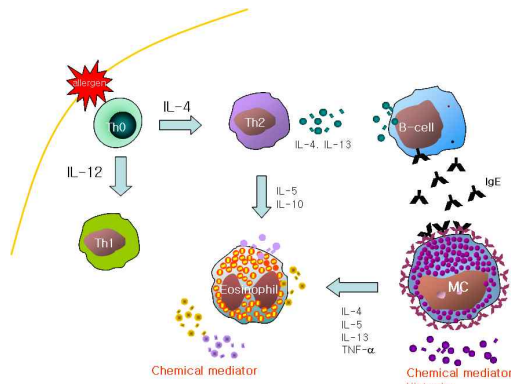


Fig. 21. 아토피 피부염의 면역학적 기전

이렇듯 아토피 피부염은 다양한 면역 세포가 관여하기 때문에 이를 치료하기 위한 치료제는 면역조절 물질인 경우가 많다. 대표적인 치료제로서 스테로이드제가 있는데, 이는 아토피의 근본 치료는 불가능하지만, 알레르기 증상을 완화하고 피부의 염증을 가라앉히는 ‘대증요법’의 역할을 수행한다. 소염작용이 강하다고 알려져 있지만 실제로는 염증을 치료하는 것이 아닌 억제하는 작용을 하는 것이다. 스테로이드 연고를 바르는 중에는 염증이 나타나지 않다가 약을 끊으면서 다시 증상이 재발하는 것도 이 때문이다. 스테로이드제는 몸 안에서 부신피질 호르몬과 같은 작용을 하지만 약을 통해 인위적으로 흡수하는 기간이 길어지면 우리 몸 안의 부신 기능이 점차

위축되면서 기능이 상실되기도 한다²²⁾. 천연의 부신피질 호르몬 분비가 되지 않으면서 점차 스테로이드에 대한 의존성이 높아지는 스테로이드 중독 상태에 이르게 되는 것이다. 이 때 스테로이드제를 끊으면 면역력 저하로 인해 피부를 비롯한 내분비계, 대사계, 순환기계, 혈액계, 면역계, 결합조직, 소화기계, 중추신경, 눈 등 몸 속 곳곳에서 이상을 호소하게 된다²³⁾.

다른 제제로는 사이클로스포린과 타그로리무스, 타이모펜탄, 인터페론 등이 있으나 이들 역시 투약 중지 후 상당수가 재발하고, 장기적인 효과와 부작용에 대해 좀 더 연구가 필요한 약물들이다^{24,25)}.

이에 본 실험에서는 기초와 임상적 체계화된 연구 환경을 조성하고, 보다 효과적인 처방 및 개발을 위한 기초적 자료를 제공하고자 荊芥連翹湯加味方(HYGB)을 시료로 in vivo 실험 모델인 NC/Nga 생쥐를 선정하여 피부 병변 부위를 중심으로 다양한 면역 관련 인자들의 변화를 검색하였다.

본 실험에 사용한 동물 모델인 NC/Nga 생쥐는 SPF (specific pathogen free) 조건하에서는 정상적인 상태를 유지하지만, 일반적인 환경에서는 가려움으로 인한 긁기와 습진성 피부염의 증상(부종, 진무름, 찰상, 피부 건조)이 나타나 일반적으로 사용되고 있는 아토피 피부염 질환 모델이다^{26,27)}. 사람에서의 아토피 피부염과 유사하게 발현되어 Th2 세포의 과발현과 IgE의 증가가 특징적이다. 피부 병소는 귀, 목, 등 주위에서 가장 흔하게 관찰되며, 약 7주령부터 IgE의 증가가 시작되고 17주령에는 최고조에 이르러 비만세포와 호산구의 피부조직으로의 침윤과 표피의 과각질화가 관찰된다.

HYGB가 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐의 직접적인 임상 효과를 육안으로 살펴본 결과 Fig. 1에서 보는바와 같이 현저한 피부개선 효과를 보였는데, SCORD²⁸⁾ 법을 이용한 피부염 지수에서도 대조군에 비해 42.8% 정도 크게 감

소하여 육안으로 관찰된 결과와 부합되었다(Fig. 2).

아토피 피부염에는 여러 가지 세포들과 인자들이 관여하는데, 특히 T 림프구가 항체 형성에 관여하고 보조 T 림프구는 주로 아토피 피부염 병변에 침윤된다¹⁶⁾.

보조 T 림프구는 기능에 따라 Th1 세포와 Th2 세포로 구분되는데, 아토피 피부염에서는 Th2 세포가 우세하게 나타나며, 증가된 Th2 세포는 B세포를 자극하여 여러 면역관련 인자들을 생산하는데, 이 과정을 겪게 되면서 자연스레 T 세포와 B 세포 비율 균형이 깨지게 된다^{18,20)}.

PBMC 내 CD19+ 와 CD3+ 의 비율은 대조군과 비교하여 각각 10.3%의 증가, 4.3%의 감소를 보였고(Fig. 6, 7), 활성화된 T 세포를 나타내는 CD3+/CD69+ 30)세포는 대조군에 비해 42.9% 감소하였으며(Fig. 8), 염증성 사이토카인을 생산하는 NKT+ 31)세포 역시 21.7% 정도 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 9). 이는 DLN의 결과와 반대되는 양상으로 본 시료가 아토피 피부염의 초기에 증가된 Th2 세포를 감소시키는 작용을 통해 변화된 세포비율을 정상으로 회복시키는 효과가 있음을 보여주는 결과로 평가된다.

CCR3는 CC 케모카인의 하나로 eotaxin 2의 수용체인데, 이는 eotaxin, regulation upon activation, normal T expressed and secreted(RANTES), MCP-4와 결합하여 호산구를 피부로 침윤시킴으로써 염증 반응에 중요한 역할을 한다³²⁾. 따라서 CCR3의 발현과 면역세포들이 피부로 침윤되는 것과는 밀접한 관련이 있다.

본 실험에서 배부피부 내 CCR3+ 세포 발현 비율은 대조군과 비교하여 41.7% 감소하였고(Fig. 3), 과립구를 나타내는 Gr-1+/CD11b+³³⁾ 세포 비율 역시 대조군에 비해 23.8% 정도 유의성 있는 감소를 보임으로써(Fig. 5), 본 시료가 염증 세포수 및 활성을 감소시켜 피부로의 침윤을 억제함으로써 피부염에 효과적으로 작용하는 것으로 나타났다.

로 나타났다.

IgE는 대부분의 아토피 피부염 환자들에게서 발현되는 표식자 역할을 하는 immuno- globulin으로써 B 세포에서 생성되고 비만세포 및 호산구와 호중구의 탈과립화(degranulation)를 유발하여 히스타민과 같은 염증성 물질의 분비를 매개한다. 배부피부 내 B220+/IgE+ 세포는 대조군에 비하여 21.5% 감소하였으며(Fig. 4), 혈청 내 IgE 발현 또한 대조군과 비교하여 44.3% 정도 감소하여(Fig. 18), 본 시료가 IgE를 매개로 한 면역 반응 억제 효능이 있음을 제시하였다.

Th2 세포들은 여러 사이토카인과 케모카인 같은 인자들을 생성하여 아토피 피부염 진행을 유도하는 것으로 알려져 있다. 생성된 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 같은 Th2 사이토카인은 B 림프구의 생성과 분화를 유도하고 비만세포와 호산구의 과민반응을 유도한다¹⁹⁾. 이들 중 특히 IL-4, IL-13은 B 세포의 class switching에 관여하여 IgE의 발현을 증가시키고, TNF- α 는 keratinocyte에 의한 MCP-1, RANTES 같은 케모카인의 생성을 증가시킨다. 또, RANTES는 호산구와 T 세포를 이동시켜서 면역세포들을 피부로 침윤시킨다²⁰⁾.

혈청 내 사이토카인 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 대표적 염증성 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13³⁴⁾ 그리고 TNF- α 는 대조군과 비교하여 각각 21.2%, 69.8%, 90.5%, 28.7%, 72.2% 정도 감소한 것으로 나타났고(Fig. 10-14), 반대로 Th2 분화를 억제하는 Th1 사이토카인인 IFN- γ 는 대조군에 비해 514.3% 정도 유의성 있게 증가한 것으로 나타났으며(Fig. 15), TNF- α 에 의해 분비가 증가되는 염증성 케모카인인 MCP-1과 RANTES³⁵⁾은 대조군과 비교하여 각각 26.1%, 19.9% 정도 감소한 것으로 나타났다(Fig. 16, 17). 또한, 비장세포 내에서의 사이토카인 생성량 역시 IL-4는 대조군에 비해 43% 감소하였고(Fig. 19), IL-5는 대조군에 비해 44.3% 정도 크게 감소하였다 (Fig. 20).

이상의 결과로 보아 HYGB가 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 荊芥連翹湯加味方(HYGB)이 나타내는 피부염 개선효과를 객관적으로 검증하기 위하여 다양한 면역 관련 인자에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HYGB 처리군은 대조군에 비하여 육안적으로 아토피 피부염을 개선시켰으며, 14주에서 피부염 지수를 유의성 있게 감소시켰다.

2. HYGB 처리군은 대조군에 비하여 배부피부 내 CCR3+, B220+/IgE+, CD11b+/Gr-1+ 면역세포 비율을 각각 41.7%, 21.5%, 23.8%로 유의성 있게 감소시켰다.

3. HYGB 처리군은 대조군에 비하여 PBMC 내 CD19+ 면역세포 비율을 10.3% 증가시켰고, CD3+, CD3+/CD69+, NKT+ 면역 세포비율을 각각 4.3%, 42.9%, 21.7% 감소시켰다.

4. HYGB 처리군은 대조군에 비하여 혈청 내 IFN- γ 의 발현을 514.3% 증가시켰고, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α , MCP-1 및 RANTES의 발현을 각각 21.2%, 69.8%, 90.5%, 28.7%, 72.2%, 26.1%, 19.9% 감소시켰으며, IgE의 발현 또한 44.3% 감소시켰다.

5. HYGB 처리군은 대조군에 비하여 비장 내 IL-4, IL-5의 발현을 각각 43%, 44.3% 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 荊芥連翹湯加味方

(HYGB)의 면역 조절 작용을 통한 아토피 피부염의 개선 효과가 실험적으로 규명됨으로써 지속적인 임상 활용이 기대되나, 향후 임상 활용의 제고를 위해서는 구성 약물간의 상승작용과 가감을 통한 효능 변화에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

参 考 文 献

1. 박영립, 박준 : 아토피 피부염의 병인. 대한 피부연구학회지 14(3):67-72, 2007.
2. 이해란 : 아토피 피부염. 소아과학회지 43(9):1161-1167, 2000.
3. Holden CA and Parish WE, Atopic dermatitis. Blackwell Science, Oxford, 1998.
4. Kevin DC, Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy. J invest Dermatol 102:128-37, 1994. Singh, V.K., Mehrotra, S., Agarwal, S.S., The paradigm of Th1 and Th2 cytokine: its relevance to autoimmunity and allergy. Immunol. Res 20:147-161, 1990.
5. Singh, V.K., Mehrotra, S., Agarwal, S.S., The paradigm of Th1 and Th2 cytokine: its relevance to autoimmunity and allergy. Immunol. Res 20:147-161, 1990.
6. Beellant JA, Cytokine and allergic disease; clinical aspect. Allergy Asthma Proc 19(6):337-341, 1998.
7. Wollenberg A, Kraft S, Oppel T, Bieber T, Atopic dermatitis: pathogenetic mechanism. Clin Exp Dermatol 25:530-4, 2000.
8. Leung DY, Pathogenesis of atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 104:S99-108, 1999.
9. Paludan, S.R., Interleukin-4 and interferon-gamma; the quintessence of a mutual antagonistic relationship. Scand J

- Immunol 48:459-468, 1998.
10. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Schopf E, et al. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 19:356-61, 1998.
 11. Valenta R, Natter S, Seiberler S, Wichlas S, Maurer D, Hess M. et al. Molecular characterization of an autoallergen, Hom S1, identified by serum IgE from atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* 111:1178-83, 1998.
 12. Robert Sidbury MD, Jon M. Hanifin MD, OLD, NEW, AND EMERGING THERAPIES FOR ATOPIC DERMATITIS. *Dermatologic Clinics* 18(1):1-11, 2000.
 13. Schreiber SL and Crabtree GR, The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 13(4):136-42, 1992.
 14. Kevin DC, Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy. *J invest Dermatol* 102:128-37, 1994.
 15. Harifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol(Stockh)* s92:44-7, 1980.
 16. Rao, A., Avni, O., Molecular aspects of T cell differentiation. *Br Med Bull* 56(4):969-984, 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. Romagnani S: immunologic influences on allergy and the Th1/Th2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 113:395-400, 2004.
 19. Aversa G, Punnonen J, Cocks BG, de Waal Malefyt R, Vega F Jr, Zurawski SM, Zurawski G, de Vries JE: An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. *J Exp Med* 178:2213-2218, 1993.
 20. Toshiaki Kawakami, Stephen J. Galli, Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nature Reviews Immunology* 2:773-786, 2002.
 21. 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.
 22. Patel L., Clayton P. E., Addison G. M., Price D. A., David T. J., Adrenal function following topical steroid treatment in children with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 132(6):950-5, 1995.
 23. S R Meadow, J K Sarsfield, D G Scott, S M Rajah, Steroid-responsive nephrotic syndrome and allergy: immunological studies. *Archives of Disease in Childhood* 56:517-524, 1981.
 24. 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.
 25. Yatscoff RW and Aspeslet LJ, The monitoring of immunosuppressive drugs: a pharmacodynamic approach. *Ther Drug*

- Monit 20(5):459-63, 1998.
26. Vestergard C, et al The Nc/Nga mouse: a model for atopic dermatitis. *Mol Med Today* 5: 209-10, 2000.
27. Matsuda H et al., Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in Nc/Nga mice. *Int. Immunol* 9:461-466, 1997.
28. Leung DY, Hirsch RL, Schneider L, Moody C, Takaoka R, Li SH, Meyerson LA, Mariam SG, Goldstein G and Hanifin JM, Thymopentin therapy reduces the clinical severity of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 85(5):927-33, 1990.
29. Akdis CA, Akdis M, Simon D, Dibbert B, Weber M, Gratzl S, Kreyden O, Disch R, Wuhrich B, Blaser K, Simon H-U, Role of T Cells and Cytokines in the Intrinsic Form of Atopic Dermatitis. *Curr Probl Dermatol* 28:37-44, 1999.
30. 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.
31. 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.
32. Yawalkar N, Ugucioni M, Scharer J et al., Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis, *J Invest Dermatol* 113:43-48, 1999.
33. Silny W, [Atopic dermatitis. IV. Granulocyte chemotaxis]. *Przegl Dermatol* 70(5-6):475-80, 1983.
34. Maeda S, Yanagihara Y. Inflammatory cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13). *Nippon Rinsho* 59:1984-9, 2001.
35. Conti, P., DiGioacchino, M., MCP-1 and RANTES Are Mediators of Acute and Chronic Inflammation. *Allergy and Asthma Proceedings* 22(3):133-137, 2001.