

消風導赤湯加味가 IgE 과대생산과 피부염이 발진된 NC/Nga생쥐의 비장세포에서 CD4⁺/CD25⁺/foxp3⁺ Treg 증진에 의한 유전자 발현에 미치는 영향

한달수·한재경·김윤희*

Effect of SoPungDoJeokTang-KaMi on cytokine expression with CD4⁺/CD25⁺/foxp3⁺ (Treg) cell induction in atopic dermatitis-like skin lesions and IgE hyperproduction induced in NC/Nga mice

Han Dal-Soo, Han Jae-Kyung, Kim Yun-Hee

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

Wished to examine closely effect that SoPungDoJeokTang-KaMi (SPDJTK) medicines used to atopy dermatitis disease patient get in atopy eruption control experimentally. SPDJTK medicines controlled CD4⁺/IFN- γ , and CD4⁺/CD25⁺/foxp3⁺ revelation that an experiment that motive allergy immune reponse because an in vitro experiment stimulates T cells of a NC/Nga mouse same time by anti-CD40/rmIL-4, and interleukin-1 β , IL-6, TNF- α , and TGF- β mRNA outturn that bear in T and B cells decreased remarkably by SPDJTK medicines. Intracellular staining of splenocytes anti-CD40/rmIL-4 plus rmIL-4 stimulated as described in a, assessed after 24 h, SPDJTK exerts a mainly immunosuppressive effect that acts at least partially through suppression of the transcription factor GATA3 expression in CD4⁺ T cells. Atopic dermatitis (AD) usually develops in patients with an individual or family history of allergic diseases, and is characterized by chronic relapsing inflammation seen specially in childhood, association with IgE hyperproduction and precipitation by environmental factors. However, the exact etiology of AD has been unclear. To further explore the pathogenesis and treatment of AD, a suitable animal model is required. We found that skin lesions, which were clinically and histologically very similar to human AD, mite antigen-induced dermatitis on the face, neck, ears and dorsal skin of inbred NC/Nga mice.

Result that Th1 cell and Th2 cell observe to be shifted by cytokine expression with CD4⁺/CD25⁺/foxp3⁺ Treg cells induction by SPDJTK medicines could know that SPDJTK medicines can use usefully in allergy autoimmune disease.

Key words : atopic dermatitis, NC/Nga mouse, 消風導赤湯加味,

I. 서론

아토피 피부염은 심한 소양감과 이차적 습진이 형성되는 만성 재발성 염증성 질환으로 영아에서 가장 흔한 알레르기성 질환이다¹⁾. 현재 전 세계

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

적으로 10~20%의 유병율을 보이며²⁾ 최근 연구에서 7세 이상에서의 유병율이 10년 전에 비해 증가하였다³⁾. 또한 과거에는 4 세 이후 자연 치유가 되는 경우가 많았으나 최근에는 영유아의 약 50% 정도가 만성화되어 성인형 아토피 피부염으로 나타나고 있어⁴⁾ 사회적 관심사가 되고 있다.

아토피 피부염의 원인은 정확히 알려져 있지 않으나 유전과 환경 및 면역학적 요인이 복합적으로 작용한다⁵⁾. 일반적으로 IgE 증가에 따른 면역학적 결핍 및 T 세포, 호산구, 비만세포 등 다양한 세포들에 의해 발병되며 그 중 Th2 세포가 발현하는 IL-4, IL-5, IL-13 등의 Th2 cytokine 이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{6,7)}.

현재 임상에서 쓰이는 치료제로 스테로이드 외용제, 보습제, 항히스타민제, cyclosporin, DNA 합성 저해제 등이 있으나 장기 사용으로 인한 내성 증가와 피부의 위축, 소아의 성장 지연 등의 다양한 부작용의 가능성으로⁸⁻¹⁰⁾ 질병에 대한 근본적인 치료 약물의 개발이 요구되는 실정이다.

한의학에서 아토피 피부염은 임상상 乳癬, 胎熱, 苔癬, 奶癬, 胎斂瘡, 濕疹 등의 범위에 속하며¹¹⁾ 風熱, 血熱, 血虛, 脾胃濕熱 등을 그 원인으로 보았다¹²⁻¹⁴⁾.

본 실험에 사용된 消風導赤湯加味는 疏風清熱의 효능이 있는 消風導赤湯¹⁵⁾에 죽엽, 연교를 가하여 涼血利濕清火함으로써 胎火濕熱形의 아토피에 응용되는 처방이다¹⁶⁾.

최근 아토피피부염 치료와 관련하여 加味清心蓮子湯¹⁷⁾, 加味羌活散¹⁸⁾, 除濕胃答湯加減¹⁹⁾ 등 수종 처방에 대한 면역학적 연구가 보고되었으나 消風導赤湯加味에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 消風導赤湯加味が 아토피 발진 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 *in vitro*에서 NC/Nga 생쥐의 비장세포를 분리하여 비장세포에 대한 消風導赤湯加味の 알레르기 반응 억제를 GATA3의 FACS 분석과 사이토카인 분석을 위한 real-time PCR을 이용하여 관찰한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

(1) 시약

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, sodium dodecyl sulfate(SDS), PMA, ionomycin, FK506, antibiotics는 Sigma사 (USA) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (Logan, USA) 제품을, CD4⁺ T cell isolation kit와 B cell isolation kit는 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) 제품을, IL-4, IFN- γ , IL-5, IL-13 ELISA kit는 BioSource사 (California, USA) 제품을, LSAB kit는 DAKO 사 (Glostrup, Denmark) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., USA), 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, USA), deep-freezer (Sanyo, Japan), 자동혈구측정기 (MS9-5, France), Quantitative Real-Time RT-PCR (Applied Biosystems, USA), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, USA), plate shaker (Lab-Line, USA), VarioMACS (Bergisch Gladbach, Germany), FACScalibur (BD, USA) 및 ELISA leader (Molecular Devices, USA) 등

을 사용하였다.

2) 동물

수컷 18주령의 SPF NC/Nga 생쥐 (15-20g)는 Charles River Japan (Yokohama, Japan)사에서 공급받았다. 동물은 실험당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2℃, humidity 55±15%, 12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물

(1) 消風導赤湯加味の 조제

본 실험에 사용한 消風導赤湯加味¹⁶⁾의 구성은 『신편중의피부병학』에 준하였으며, 사용한 약재들은 대전대학교 부속 한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고 그 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition of SoPungDoJeokTang-KaMi (SPDJTK)

Herbal Name	Scientific Name	Amount(g)
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	6
赤茯苓	<i>Poria</i>	6
金銀花	<i>Locinerae Flos</i>	6
牛蒡子	<i>Arctii Fructus</i>	6
白鮮皮	<i>Dictamni Radicis Cortex</i>	6
薄荷	<i>Menthae Herba</i>	4
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	4
木通	<i>Akebiae Caulis</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
燈心	<i>Junci Medulla</i>	4
淡竹葉	<i>Lophatheri Herba</i>	4
連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	4
Total amount		58

(2) 消風導赤湯加味の 추출물 분리

SPDJTK 2 첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (rotary vaccum evaporator)로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기 (freeze dryer)를 이용하여 완전 건조한 SPDJTK 추출물 6.8 g을 냉동 보관 (-84℃)하면

서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 실험 방법

I. 세포독성 측정

1) Human Fibroblast cells(hFCs) 배양

사람피부조직을 cool D-PBS로 3 회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5 분간 원심분리하고, tube에 DMEM {containing collagenase A (5 mg/ml), DNase type I (0.15 mg/ml), antibiotics (penicillin 10⁴ U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)}을 넣고 37℃ CO₂ 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수로 약 2 회 1,500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1 주일 동안 배양하였다. 1 주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 hFCs 세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵ cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

2) 세포독성 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay²⁰⁾을 일부 변형하여 실험에 사용하였다. hFCs 세포는 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 1 시간 배양한 후 KKSUDU 추출물(최종 농도 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1 mg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml)을 48 시간 동안 처리하였고 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액으로 2 회 세척하였다. 96 well plate의 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid) 50 µl를 가하고 1 시간 동안 4℃에 방치한 후 증류수로 5 회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 µl/well로 가하고 실온에서 30 분간 염색하였으며 0.1% acetic acid 용액으로 약 45 회 세척한 다음, 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 µl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA leader 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

II. *In vitro* : Splenic T & B cells culture in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse

1. Spontaneous dermatitis in NC/Nga mouse

Conventional한 상태에서 사육한 18 주령의 NC/Nga 생쥐의 눈에서 capillary 관을 이용하여 100 μ l의 혈액을 채혈하여 이 중 IgE 함량이 50 μ g/ml 이상이고 피부에 발진이 나타난 NC/Nga 생쥐를 선택하여 실험에 사용하였으며 이를 atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐라 하였다.

2. Atopy dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장에서 T 세포와 B 세포의 분리 및 배양

NC/Nga 생쥐의 비장을 적출한 후, 100 mesh로 분쇄하고 2,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 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. 그리고 비장세포를 2%의 FBS가 함유된 PBS (PBS/FBS)에 1×10^8 /ml로 현탁시키고 normal rat serum을 5% 되게 첨가하여 4°C에서 15 분간 blocking한 후, T 세포 분리는 biotinylated antibody cocktail for lineage {CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , CD235a (glycophorin A)} (CD4⁺ T Cell Isolation Kit)를 가하였고, B 세포 분리는 biotinylated antibody cocktail for lineage {CD43 (Ly-48), CD4 (L3T4), Ter-119} (B Cell Isolation Kit)를 가하여 각각 4°C에서 15 분간 반응시켰다. 각각의 세포를 PBS/FBS로 세척하여 1×10^7 /ml로 현탁하였고, 20 μ l의 anti-biotin microbeads를 가하여 다시 4°C에서 15 분간 반응시켰다. 이 세포를 magnetic column (CS column, Milteny Biotech)을 이용하여 PBS로 세척하여 준비해둔 varioMACS에 장치하고, magnetic bead가 표지된 세포를 통과시켰다. PBS로 column을 충분히 세척한 다음 column을 통과한 부유액을 원심분리하여 lineage 음성인 T 세포와 B 세포를 각각 수집하였다.

3. Quantitative real-time-PCR in B cells cultured

1) 배양된 비장 B세포에서 RNA 분리

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 비장에서 분리한 B 세포를 24 well plate에 1×10^6 세포/well로 분주하여 KKSDU 추출물 (100 μ g/ml)을 처리하고, 1 시간 후 anti-CD40 mAb (500 μ g/ml)와 rmIL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 500 U/ml)를 6 시간동안 동시 배양하여 B 세포를 자극, 더욱 활성화시킨 후 이를 실험군으로 사용하였다. 그리고 어떠한 처리도 하지 않은 only B cells를 정상군으로 사용하였으며 anti-CD40 mAb (500 μ g/ml)와 rmIL-4 (500 U/ml) 배양만 실시한 군을 대조군 (control, CT)으로, rmIL-10 (recombinant mouse interleukin-10, 50 ng/ml)을 처리하고 anti-CD40 mAb (500 μ g/ml)과 rmIL-4 (500 U/ml)로 자극한 군을 양성대조군 (positive control, PC)으로 사용하였다. 배양 종료 후 배양 상층액을 제거하고 RNAzol^B 500 μ l를 넣어 용해될 때까지 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치하고 13,000 rpm에서 원심분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3 분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

2) RT-PCR

Reverse transcription 반응은 준비된 total RNA 2 μ g을 DNase I (10 U/ μ l) 2 U/tube를 37°C heating block에서 30 분간 반응한 후 75°C에서 10 분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1

μl 100 mM DTT, 4.5 μl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μl의 M-MLV RT (200 U/μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl가 되도록 하였다. 이 20 μl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 초간 원심침강시키고 37°C heating block에서 60 분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 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 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다.

사용된 mouse oligonucleotid의 염기배열은 다음과 같다 (Table 2).

Table 2. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
GAPDH	Forward	5'-TGAAGCAGGCATC TGAGGG-3'
	Reverse	5'-CGAAGGTGGAAGA GTGGGAG-3'
IL-1 β	Forward	5'-CAACCAACAAGTG ATATTCTCCATG3'
	Reverse	5'-GATCCACACTCTCC AGCTGCA-3'
IL-6	Forward	5'-CCCATGAAGACCT TCACCTC-3'
	Reverse	5'-ACTCTCGGCCTACA TTGGTG-3'
TNF-α	Forward	5'-TGGGAGGAAAGGG GTCTAAG-3'
	Reverse	5'-ACCTACGACGTGG GCTACAG-3'
IL-10	Forward	5'-AAGCAGCCTTGCA GAAAAGA-3'
	Reverse	5'-TGGGAAGTGGGTG CAGTTAT-3'
TGF-β1	Forward	5'-TGGAGCAACATGT GGAAGTC-3'
	Reverse	5'-CTGCCGTACAACCTC CAGTGA-3'

Cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR

Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard로 GAPDH를 사용하였고, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다.

Quantitative real-time RT-PCR의 조건은: pre-denaturation은 2 min at 50°C, 10 min 94°C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95°C, 1 min at 60°C에서 수행하였다. SPDJTK 투여군과 대조군은 internal standard로 GAPDH를 사용하였고 target group의 quantitative PCR은 $y = x(1+e)^n$ $x = \text{starting quantity}$ $y = \text{yield}$ $n = \text{number of cycles}$ $e = \text{efficiency}$ 로 계산하여 RQ(relative quantitative)를 측정하였다.

4. CD4⁺IFN-γ⁺와 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ Treg cell의 intracellular staining 분석

18 주령 NC/Nga 생쥐의 비장에서 순수 분리한 CD4⁺ T세포를 미리 α-CD3/α-CD28 Ab (1 μg/ml)가 coating된 24 well plate에 분주하여 자극, 활성화 시킨 후 대조군 (control, CT)으로 사용하였으며, 분주 후 면역억제제인 cyclosporin A (CsA, 2 μg/ml)와 KKSDU 추출물 (100 μg/ml)을 가하고 48 시간 동안 동시 배양하여 각각 양성대조군 (positive control, PC)과 실험군으로 사용하였다. 또한 α-CD3/α-CD28 Ab (1 μg/ml)로 자극하지 않은 only CD4⁺ T세포는 정상군으로 사용하였다.

배양 종료 후 BD cytofix/cytoperm plus kit (with BD GolgiPlug, 555028)와 mouse CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ flow cytometry kit (from BioLegend)를 이용하여 각각 세포내염색을 통하여 CD4⁺IFN-γ⁺세포와 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ Treg cell의 형광염색을 실시하였다. 반응 후 3 회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 형광유세포분석기로 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램으로 활성세포 (%) 비율을 산출하였다.

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

18주령의 NC/Nga생쥐에서 분리한 비장세포를 미리 α-CD3/α-CD28 Ab (1 μg/ml)가 coating된

24 well plate에 분주한 후 양성대조군인 cyclosporin A (CsA) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,과 消風導赤湯加味 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등을 가하고 rmIL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 200ng/ml, PharMingen)를 처리한 후 24시간 동안 동시배양 하였다. 배양종료 4 시간 전에 GolgiStop (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), PMA (30 ng/ml, Sigma-Aldrich), ionomycin (500 ng/ml, Sigma-Aldrich)을 처리하고 실험 종료 후 BD Cytotfix/Cytoperm Plus Kit (with BD GolgiPlug, 555028)와 Mouse GATA3⁺ (BioLegend)를 이용하여 각각 세포내 염색을 통하여 CD4⁺GATA3⁺세포의 형광염색을 실시하였다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기로 분석하였다. 분석 프로그램은 CellQuest 프로그램으로 활성세포(%) 비율을 산출하였다.

III. 統計處理

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

III. 성적

1. SPDJTK의 세포독성 측정

SPDJTK 추출물의 세포독성을 측정한 결과, 1 mg/ml, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 거의 세포독성이 나타나지 않았다(Fig.1).

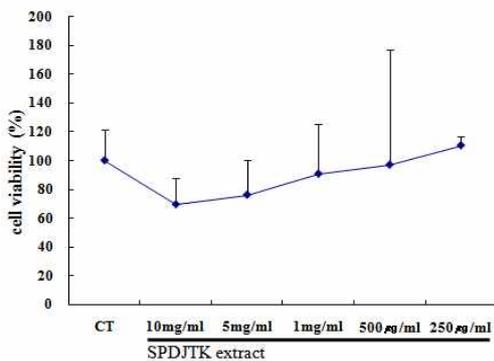


Fig.1. Cytotoxicity effects of SPDJTK extract on human fibroblast cells(hFCs).

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

2. In vitro; Splenic T & B cells culture in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse

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

무처리군 (정상군)의 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때 각각 0.795, 0.109, 0.491이었고, anti-CD40/rmIL-4과 SPDJTK 추출물과 동시배양한 실험군은 대조군의 RQ값이 1 일때 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α mRNA 유전자 발현이 0.572, 0.365, 그리고 0.808으로 IL-6 유전자 발현은 현저하게 억제되었고, IL-1 β 와 TNF- α mRNA 유전자 발현은 20-45%이상 감소를 나타내었다. 또한 양성대조군인 rmIL-10을 처리하고 anti-CD40/rmIL-4으로 자극한 실험군의 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α mRNA 유전자 발현이 0.233, 0.546, 그리고 0.375로 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α mRNA 유전자 발현은 55-75%이상 현저하게 유전자 발현이 억제 되었다(Fig.2).

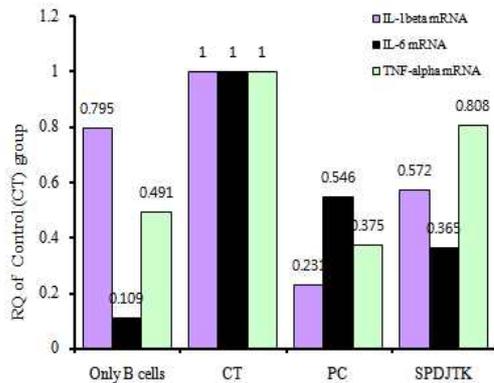


Fig.2 Effects of SPDJTK extract on IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNA expression by SPDJTK extract plus

anti-CD40/rmIL-4-stimulated murine B cells.

Isolated B cells from atopy dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with anti-CD40/rmIL-4 (10 µg/ml) or treated with SPDJTK extract (100 µg/ml) plus SPDJTK extract. B cells were not treated (normal; only cells), co-cultured with anti-CD40/rmIL-4 (Control), and with anti-CD40/rmIL-4 plus SPDJTK extract for 4hrs. IL-1β, IL-6, and TNF-α mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-1β, IL-6, and TNF-α mRNA 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.

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

무처리군 (정상군)의 IL-10과 TGF-β mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때 각각 0.593 과 0.816이었고, anti-CD40/rmIL-4과 SPDJTK 추출물과 동시배양한 실험군은 대조군의 RQ값이 1 일때 IL-10과 TGF-β mRNA 유전자 발현이 2.644와 0.615로 IL-10 mRNA 유전자 발현은 대조군(RQ)보다 2.5배이상 증가를 하였고, TGF-β 유전자 발현은 40%이상 억제되었다. 또한 양성대조군인 rmIL-10을 처리하고 anti-CD40/rmIL-4으로 자극한 실험군의 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때 IL-10 그리고 TGF-β mRNA 유전자 발현이 0.815과 0.473으로 대조군에 비하여 모두 억제를 나타내었다(Fig.3).

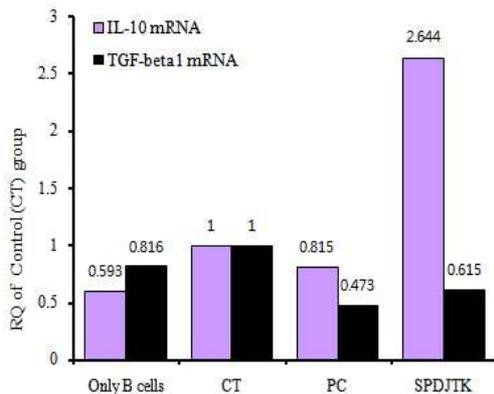


Fig.3 Effects of SPDJTK extract on IL-10, and TGF-β mRNA expression by SPDJTK extract plus anti-CD40/rmIL-4-stimulated murine splenocytes.

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

3) NC/Nga생쥐의 CD4⁺T세포에서 CD4⁺/IFN-γ⁺ intracellular staining 분석

anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/ml)로 자극하지 않은 only CD4⁺ T 세포군의 CD4⁺/IFN-γ⁺는 2.9% 이었고, anti-CD3/anti-CD28 (1 mg/ml)로 자극한 대조군의 CD4⁺/IFN-γ⁺는 10.8% 이었다. 양성대조군으로 cyclosporin A (1 µg/ml)를 anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/ml)와 동시 배양한 CsA 처리군의 CD4⁺/IFN-γ⁺는 6.8% 이었고, 실험군인 SPDJTK 추출물 (100 µg/ml)를 anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/ml)와 동시 배양한 SPDJTK 추출물 처리군의 CD4⁺/IFN-γ⁺는 16.9%로 대조군에 비하여 56%이상 증가하였다 (Fig.4).

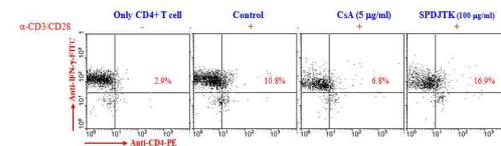


Fig.4 Effects of SPDJTK extract on IFN-γ⁺ intracellular staining analysis by anti-CD3/anti-CD28-stimulated murine CD4⁺ T cells.

Isolated CD4⁺ T cells from atopy dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/ml) or treated with SPDJTK extract (100 µg/ml). CD4⁺ T cells were not treated (normal; only cells), co-cultured with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/ml) (Control), and with

anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) plus SPDJTK extract, and with anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) plus CsA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hrs. After a 24-hours stimulation, 0.6 $\mu\text{l}/\text{ml}$ monensin (GolgiStop; BD Pharmingen) was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled anti-CD4. After fixation in Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen), cells were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer (BD Pharmingen), stained with PE-labeled anti-IFN- γ mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

4) NC/Nga 생쥐의 CD4⁺ T 세포에서 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ intracellular staining 분석

anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극하지 않은 only CD4⁺ T 세포군의 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺는 1.3% 이었고, anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극한 대조군의 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺는 5.16% 이었다. 양성대조군으로 cyclosporin A (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 동시 배양한 CsA 처리군의 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺는 3.1%로 대조군에 비하여 감소를 나타내었다. 실험군인 것으로 SPDJTK 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 동시 배양한 SPDJTK 추출물 처리군의 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺는 17.3%로 대조군에 비하여 3.4배 이상의 현저한 증가를 나타내어 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ regulatory T cells의 증가를 유도하는 것을 알 수 있다(Fig.5).

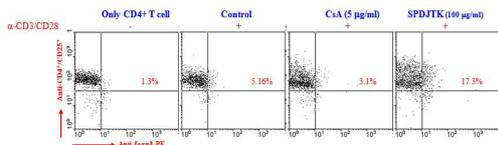


Fig.5 Effects of SPDJTK extract on CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ intracellular staining analysis by anti-CD3/anti-CD28-stimulated murine CD4⁺ T cells. Isolated CD4⁺ T cells from atopy dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or treated with SPDJTK extract (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). CD4⁺ T cells were not treated (normal; only cells), co-cultured with anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Control), and with anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) plus SPDJTK extract, and with anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) plus CsA (5

$\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48hrs. After a 48-hours stimulation, 0.6 $\mu\text{l}/\text{ml}$ monensin (GolgiStop; BD Pharmingen) was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled anti-CD4, and Cychrom5.5-labeled anti-CD25. After fixation in Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen), cells were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer (BD Pharmingen), stained with PE-labeled anti-foxp3 mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

5) NC/Nga 생쥐의 비장세포에서 CD4⁺/GATA3⁺ intracellular staining 분석

anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극하지 않은 only CD4⁺ T 세포군의 CD4⁺/GATA3⁺는 0.7% 이었고, anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 rmIL-4 (200 ng/ml)로 자극한 대조군의 CD4⁺/GATA3⁺는 10.5% 이었다. 양성대조군으로 cyclosporin A (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 rmIL-4 (200 ng/ml)와 동시 배양한 CsA 처리군의 CD4⁺/GATA3⁺는 1.3%로 대조군에 비하여 감소를 나타내었다. 실험군인 것으로 SPDJTK 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 rmIL-4 (200 ng/ml)와 동시 배양한 SPDJTK 추출물 처리군의 CD4⁺/GATA3⁺는 5.8%로 대조군에 비하여 45% 이상 CD4⁺/GATA3⁺ T 세포의 transcription factor를 억제하는 것을 알 수 있다(Fig.6).

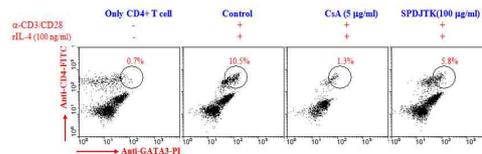


Fig.6 Effects of SPDJTK extract on CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ intracellular staining analysis by anti-CD3/anti-CD28-stimulated murine CD4⁺ T cells. Isolated splenocytes dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) plus rmIL-4 (200 ng/ml) or treated with SPDJTK extract (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). splenocytes were not treated (normal; only cells), co-cultured with anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) plus rmIL-4 (200 ng/ml) (Control), and with anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) plus rmIL-4 (200 ng/ml) plus SPDJTK extract, and with anti-CD3/anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) plus rmIL-4 (200 ng/ml) plus CsA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hrs. After a 24-hours stimulation, 0.6 $\mu\text{l}/\text{ml}$ monensin (GolgiStop;

BD Pharmingen) was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled anti-CD4. After fixation in Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen), cells were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer (BD Pharmingen), stained with PE-labeled anti-GATA3 mAb (BD Pharmingen) and immediately analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

IV. 고찰

아토피란 말은 알레르기 반응을 일으키게 하는 면역 물질인 면역글로불린 E를 쉽게 형성하는 경향을 갖으며, 특정 질환 군인 천식, 고조열, 알레르기성 비염, 아토피 피부염을 잘 일으키는 유전적 경향을 보이는 경우를 말한다²¹⁾. 아토피 피부염은 이러한 아토피성 체질을 가진 사람에서 발생하는 만성 피부염으로 주로 5세 이전에 발병하는 경우가 많고 홍반, 삼출 가피, 인설 등의 특징적 증상이 반복되는 양상을 보인다²²⁻²⁵⁾.

아토피 피부염의 정확한 병리는 아직까지 완전히 이해되고 있지 않으나 유전적 소인과 함께 면역학적, 비면역학적 기전이 관여하리라고 생각하고 있다. 아토피 피부염의 대부분을 차지하는 외인성 아토피 피부염은 IgE와 연관된 면역기전에 의해 발생되는데, 특정 알레르겐에 대한 즉시형 면역반응 보다는 T 세포 이상에 의한 지연형 면역 반응이 관여 한다는 보고들이 많다²⁶⁻³⁰⁾.

아토피 피부염 피부 병변에 분포하는 T세포의 주된 구성은 CD4⁺T세포이며 이는 생성되는 사이토카인의 종류에 따라 Th-1세포와 Th-2세포로 나뉘어진다. 최근의 연구들에서는 Th-2세포의 활성화에 연이은 Th-1세포의 활성화도 가정되고 있다³¹⁾. 즉, 보조 T 세포(CD4⁺T cell)에 대한 억제 T세포(CD8⁺T cell)비의 감소, Th-2세포에서 분비되는 IL-4, -5, -10의 증가, Th-1세포에서 분비되는 (IFN- γ)비의 감소³²⁾. 비만세포의 증가³³⁾등 면역학적 이상이 아토피성 피부염의 발생과 악화에 영향을 미치리라 추측되고 있다. 아토피 피부염에서 IFN- γ 와 IL-2의 *in vivo* 투여의 유익

한 효과는 Th-1/Th-2 불균형의 복원이 아토피 피부염을 호전시킨다는 사실을 뒷받침해준다³⁴⁾.

아토피 피부염의 한의학적 범주는 『素問 玉機眞藏論篇』³⁵⁾에서 “浸淫”이라고 기록된 이후로, 한의학 문헌 중에 다양하게 나타나는데 정확히 일치하는 한의학적 병명은 없는 관계로 현재까지 乳癬, 胎熱症, 胎癬, 浸淫瘡, 胎斂瘡, 奶癬, 濕疹, 四彎風 등으로 혼용되고 있다³⁶⁾. 아토피피부염의 한의학적 발생원인은 주로 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고 清熱, 涼血, 除濕, 祛風, 養血 등의 治法을 주로 사용하고 있다³⁷⁻³⁹⁾.

실험에 사용된 消風導赤湯加味는 疏風清熱의 효능이 있어 胎斂瘡 치료에 사용되어온 消風導赤湯¹⁵⁾에 竹葉, 連翹를 가하여 胎火濕熱형의 아토피에 응용되는 처방으로¹⁶⁾ 清熱涼血 養陰生津하는 生地黃, 行水 利濕熱의 赤茯苓, 清熱解毒 疏散風熱하는 金銀花, 牛蒡子, 清熱燥濕 祛風解毒하는 白鮮皮와 黃連, 宣散風熱 透疹하는 薄荷, 瀉火行水 通利血脈하는 木通, 潤肺 調和諸藥하는 甘草, 그리고 利水滲濕 清心除煩하는 燈心, 清心火 除煩熱의 淡竹葉과 清熱解毒 消腫散結하는 連翹로 구성되어 涼血利濕清火하는 효능을 가진다^{16,40)}

본 실험의 결과를 살펴보면, *In vitro* 실험에서 정상 생쥐의 폐세포를 분리하여 消風導赤湯加味 추출물의 세포독성을 SRB 법³³⁾을 약간 변형하여 측정된 결과, 1 mg/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml에서 거의 세포독성이 나타나지 않았다(Fig.1).

또한 消風導赤湯加味 추출물이 NC/Nga 생쥐의 면역세포의 알레르기 면역반응을 억제하는지를 알아보고자 24시간동안 消風導赤湯加味 추출물 100 μ g/ml과 anti-CD40/rmIL-4을 동시배양한 결과, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때 각각 0.795, 0.109, 0.491이었다. 또한 anti-CD40/rmIL-4과 SPDJTK 추출물과 동시배양한 실험군은 대조군의 RQ값이 1 일때 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α mRNA 유전자 발현이 0.572, 0.365, 그리고 0.808으로 IL-6 유전자 발현은 현저하게 억제되었고, IL-1 β 와 TNF- α mRNA 유전자 발현은 20-45%이상 감소를 나타

내었다. 양성대조군인 rmIL-10을 처리하고 anti-CD40/rmIL-4으로 자극한 실험군의 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α mRNA 유전자 발현이 0.233, 0.546, 그리고 0.375로 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α mRNA 유전자 발현은 55-75%이상 현저하게 유전자 발현이 억제 되었다(Fig.2). 그리고 IL-10과 TGF- β 의 경우, 무처리군 (정상군)의 IL-10과 TGF- β mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때 각각 0.593 과 0.816이었고, anti-CD40/rmIL-4과 SPDJTK 추출물과 동시배양한 실험군은 대조군의 RQ값이 1 일때 IL-10과 TGF- β mRNA 유전자 발현이 2.644와 0.615로 IL-10 mRNA 유전자 발현은 대조군(RQ)보다 2.5배이상 증가를 하였고, TGF- β 유전자 발현은 40%이상 억제되었다. 또한 양성대조군인 rmIL-10을 처리하고 anti-CD40/rmIL-4으로 자극한 실험군의 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때 IL-10 그리고 TGF- β mRNA 유전자 발현이 0.815과 0.473으로 대조군에 비하여 모두 억제를 나타내었다(Fig.3). 이는 消風導赤湯加味 추출물이 알러젠에 의한 알러르기 반응에 반드시 수반되는 B세포의 활성화, 분화, 그리고 IgE 생성을 선택적으로 억제하여 초기 알러르기 반응을 효과적으로 억제하는 것으로 생각된다.

CD4⁺ T 세포를 분리하여 anti-CD3/CD28로 자극하여 배양한 후 Th1에서 분비하는 IFN- γ , 그리고 Treg 세포인 CD4⁺/foxp3⁺를 intracellular 염색으로 측정할 결과 anti-CD3/anti-CD28 (1 μ g/ml)로 자극하지 않은 only CD4⁺ T 세포군의 CD4⁺/IFN- γ ⁺는 2.9%이었고, anti-CD3/anti-CD28 (1 mg/ml)로 자극한 대조군의 CD4⁺/IFN- γ ⁺는 10.8% 이었다. 양성대조군으로 cyclosporin A (1 μ g/ml)를 anti-CD3/anti-CD28 (1 μ g/ml)와 동시 배양한 CsA 처리군의 CD4⁺/IFN- γ ⁺는 6.8% 이었고, 실험군으로 SPDJTK 추출물 (100 μ g/ml)를 anti-CD3/anti-CD28 (1 μ g/ml)와 동시 배양한 SPDJTK 추출물 처리군의 CD4⁺/IFN- γ ⁺는 16.9%로 대조군에 비하여 56%이상 증가하였다(Fig.4).

anti-CD3/anti-CD28 (1 μ g/ml)로 자극하지 않은 only CD4⁺ T 세포군의 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺는 1.3% 이었고, anti-CD3/anti-CD28 (1 μ g/ml)로 자극한 대조군의 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺는 5.16% 이었다. 양성대조군으로 cyclosporin A (1 μ g/ml)를 anti-CD3/anti-CD28 (1 μ g/ml)와 동시 배양한 CsA 처리군의 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺는 3.1% 로 대조군에 비하여 감소를 나타내었다. 실험군으로 SPDJTK 추출물 (100 μ g/ml)를 anti-CD3/anti-CD28 (1 μ g/ml)와 동시 배양한 SPDJTK 추출물 처리군의 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺는 17.3%로 대조군에 비하여 3.4배 이상의 현저한 증가를 나타내어 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ regulatory T cells의 증가를 유도하는 것을 알 수 있다(Fig.5). 이상의 실험결과는 消風導赤湯加味 추출물이 Treg 세포를 증식하여 면역세포의 알러르기 반응으로의 분화를 억제하고 관련 유전자 발현을 선택적으로 조절하여 항알러르기의 효과가 있음을 나타내는 것으로 생각된다.

GATA3는 Th2 세포의 IL-4, IL-5, 그리고 IL-13등 유전자 발현의 전사인자인 transcription factor로 T세포를 Th2세포로 분화와 증식을 유도하는 인자이다. 비장세포를 분리하여 anti-CD3/CD28와 rmIL-4로 자극하여 배양한 후 CD4⁺/GATA3⁺를 intracellular 염색으로 측정할 결과 anti-CD3/anti-CD28 (1 μ g/ml)로 자극하지 않은 only CD4⁺ T 세포군의 CD4⁺/GATA3⁺는 0.7% 이었고, anti-CD3/anti-CD28 (1 μ g/ml)과 rmIL-4 (200 ng/ml)로 자극한 대조군의 CD4⁺/GATA3⁺는 10.5% 이었다. 양성대조군으로 cyclosporin A (1 μ g/ml)를 anti-CD3/anti-CD28 (1 μ g/ml)과 rmIL-4 (200 ng/ml)와 동시 배양한 CsA 처리군의 CD4⁺/GATA3⁺는 1.3% 로 대조군에 비하여 감소를 나타내었다. 실험군으로 SPDJTK 추출물 (100 μ g/ml)를 anti-CD3/anti-CD28 (1 μ g/ml)과 rmIL-4 (200 ng/ml)와 동시 배양한 SPDJTK 추출물 처리군의 CD4⁺/GATA3⁺는 5.8%로 대조군에 비하여 45% 이상CD4⁺/GATA3⁺ T 세포의 transcription factor를 억제하는 것을 알 수 있다(Fig.6).

이상의 결과로 미루어 보아 消風導赤湯加味는 알레르기 치료에 유효하게 활용할 수 있을 것으로 판단되며 향후 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

아토피 질환 환자에 사용되는 消風導赤湯加味가 아토피 발진 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

I. *In vitro*

1. 消風導赤湯加味는 활성화 B 세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 TGF- β 의 유전자 발현을 억제하였다.

2. 消風導赤湯加味는 활성화 B 세포에서 IL-10 유전자 발현을 증가시켰다.

3. 消風導赤湯加味가 활성화 T 세포에서 CD4⁺/IFN- γ ⁺와 CD4⁺/CD25⁺/foxp3⁺ intracellular staining을 통하여 대조군에 비하여 세포내 발현량이 현저하게 증가되었다.

4. 消風導赤湯加味가 비장세포에서 전사인자인 CD4⁺/GATA3⁺ intracellular staining을 통하여 대조군에 비하여 세포내 발현량이 억제되었다.

이상의 결과로 미루어 보아 消風導赤湯加味는 아토피 피부염의 치료에 유효하게 활용할 수 있을 것으로 판단되며, 아토피 피부염에 대한 정확한 기전에 대한 연구가 요구되어 지며 실험적 보완과 임상연구가 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 김덕곤 외 7명 : 동의소아과학, 서울, 정담,

p.660, 2002.

2. 박용민 : 아토피피부염 병태생리에 대한 최신 지견, 소아알레르기 호흡기 학회지, 16(3): 189-196, 2006.

3. 이해성, 김종서, 편복양 : 소아 아토피 피부염의 빈도와 원인의 변화, 소아알레르기 및 호흡기학회지, 12(4):263-270, 2002.

4. 김진일, 정규만 : 아토피 피부염에 대한 동서의학적 고찰. 대한한방소아과학회지, 8(1):75- 80, 1994.

5. Halbert AR, Weston WL, Moreli JG : Atopic dermatitis : Is it an allergic disease, J Am Acad Dermatol. 33:1008-1018, 1995.

6. Leung DY, Soter NA : Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis, J Am Acad Dermatol, 44:S1-S12, 2001.

7. Spengel JM, Mizoguchi E, Oettgen H, Bhan AK, Geha RS : Roles of Th1 and Th2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis, J Clin Invest. 103(8):1103-1111, 1999.

8. Guin JD : Complications of topical hydrocortisone. J Am Acad Dermatol 4:417-22. 1981.

9. Graham-Brown R : Managing adults with atopic dermatitis. Dermatol Clin. 14:531-7. 1996.

10. Smith CH : New approaches to topical therapy. Clin Exp Dermatol 25:250-4. 2000.

11. 공남미, 지선영 : 아토피 피부염의 양 한방적 고찰. 대한외관과학회지, 12(1):241-53, 1999.

12. 馬紹堯 : 現代中醫皮膚性病學. 上海, 上海中醫藥大學出版社, pp.153-60, 2001.

13. 金起鳳, 周德瑛 主編 : 中醫皮膚病學. 北京, 中國醫藥科技出版社, pp.193-8, 1999.

14. 馬紹堯, 趙尚華 主編 : 現代中醫皮膚性病

- 診療大全. 山西, 山西科學技術出版社, pp.475-93, 1999.
15. 吳謙 : 醫宗金鑑(武英殿版排印本), 北京:人民衛生出版社, p907-908, 1998.
 16. 歐陽恒, 楊志波, 신편중의피부병학, 북경:인민군의출판사, p263, 612, 2000.
 17. 윤지연, 한재경, 김윤희 : 加味淸心蓮子湯이 NC/Nga mouse의 아토피樣 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지, 21(1):87-116, 2007.
 18. 김윤희, 한재경, 김윤희 : 加味羌活散이 집먼지 진드기 추출물로 유도된 NC/Nga mouse의 아토피 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지, 22(1):69-94, 2008.
 19. 나동규, 한재경, 김윤희 : 除濕胃答湯加減이 집먼지 진드기 추출물로 유도된 NC/Nga mouse의 아토피 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지, 22(2):81-114, 2008
 20. 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. 82(13):1107-1112, 1990
 21. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회 : 피부과학, 서울, 여문각, p.161, 2000.
 22. I. Janeway, Travers, walport shlomchik : 면역생물학, 서울, 라이프사이언스, pp.361, 551-594, 2005.
 23. 에카자와 셀로우 : 소아 피부과학, 서울, 고려의학, pp.20-30, 2005.
 24. 임정우, 문경상, 공도연, 편복양 : 아토피피부염 환자의 발병과 치료에 대한 실태 조사, 소아알레르기 및 호흡기 학회지, 15(1): 44-52, 2006.
 25. 홍창의 : 소아과학, 서울, 대한교과서주식회사, pp.1207-1211, 2005.
 26. Yoshizawa H, Nomaguchi H, Izaki S, Kitamura K. Serum cytokine levels in atopic dermatitis. Clin and Exp Dermatol. 2002;27:225-9.
 27. Kondo S, Yazawa H, Jimbow K. Reduction of serum interleukin-5 levels reflect clinical improvement in patients with atopic dermatitis. J Dermatol. 2001;28(5):237-43.
 28. Frezzolini A, Paradisi M, Zaffiro A, Provini A, Cadoni S, Ruffelli M, De Pita O. Circulating interleukin 16 in children with atopic/eczema dermatitis syndrome(AEDS): a novel serologic markers of disease activity. Allergy. 2002;57(9):815-20.
 29. Miyajima H, Hirano T, Hirose S, Karasuyama H, Okumura K, Ovary Z. Suppression by IL-2 of IgE production by B cells stimulated by IL-4. J Immunol. 1991;146:457-62.
 30. Tlaskalova-Hogenova H, Tuc L, Lodinova-Zadnikova R et al. Mucosal Immunity: Its role in Defense and Allergy. Int Arch Allergy Immunol. 2002;128:77-89
 31. Patrick D (1994). Does atopic dermatitis result from cytokine dysregulation? J Invest Dermatol, 102, 741
 32. Jekler J, larko O (1988). UVB phototherapy of atopic dermatitis. Br J Dermatol, 119, 697-705
 33. Hanifin JM, Rajka G (1980). diagnostic features of atopic dermatitis. Acta Derm Venereal(Stockh)(suppl), 92, 44-7
 34. Mills LB, Mordan LJ, Roth HL, Winger EE, Epstein WL (2000). Treatment of severe atopic dermatitis by topical immune modulation using dinitro chlorobenzene. J Am Acad Dermatol, 42, 687-9
 35. 洪元植 編著 : 精校黃帝內經素問, 東洋醫

- 學研究院 出版部, 1985, pp.72-80, 246-248.
36. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연 : 아토피 피부염의 동, 서의학적 문헌고찰, 대한안이비인후피부과학회지, 2002;15(1):226-252.
37. 馬紹堯 : 現代中醫皮膚性病學, 上海, 上海中醫藥大學出版社, 2001, pp.153-160.
38. 金起鳳, 周德瑛 主編 : 中醫皮膚病學, 北京, 中國醫藥科技出版社, 1999, pp.193-198.
39. 馬紹堯, 趙尚華 主編 : 現代中醫皮膚性病診療大全, 山西, 山西科學技術出版社, 1999, pp.475-493.
40. 전국한의학대학교 본초학교수 공편저 : 본초학, 서울, 영림사, p.144, 170, 180, 186, 190, pp.198-199, p.302, 315, 326, 540, 2000.