

荊芥連翹湯加味醱酵方의 항아토피피부염 효능에 관한 실험적 연구

황윤규¹ · 박보경² · 김선빈¹ · 이용구³ · 진미림² · 김동희^{1*}

Experimental Research of Hyunggaeyunkyotanggambalhyobang (HYGBH) on Atopic Dermatitis Treatment

Hwang Yun-Gyu¹ · Park Bo-Kyung² · Gim Seon-Bin¹ · Lee Yong-Koo³ · Jin Mi-Rim² · Kim Dong-Hee^{1*}

¹Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

²Lab of Preventive Medicine of Life, Daejeon University

³Department of Internal Medicine, Hyehe Hospital, Daejeon University

In order to investigate the efficacy of HYGBH on atopic dermatitis, various immune related factors were studied. The results and conclusions are as follows. Atopic dermatitis symptoms were improved in HYGBH treated group and significant decrease in dermatitis index were observed in 12 and 14 weeks. HYGBH treated group showed significant decrease in CD4+, CD3+/CD69+ immune cell ratio in PBMC by 18% and 40.6% respectively. HYGBH treated group showed significant decrease in CD3+, CD11b+/Gr-1+ immune cell ratio in dorsal skin by 44.6% and 53.1% respectively. HYGBH treated group showed significant decrease in IL-4, IFN- γ in spleen by 29.5%, 7.7% respectively. HYGBH treated group showed decrease in the expression of IL-5, IL-13, IL-17 and histamine by 21%, 9.6%, 14%, and 32.2% respectively. Also the group showed decrease in the expression of IgE by 6.8% respectively. HYGBH treated group showed significant decrease in the transcription of IL-5 and IL-3 mRNA in skin by 35.5% and 23.2% respectively. The results above indicated that treatment of HYGBH improved atopic dermatitis symptoms by anti-oxidant activity as well as immune modulation activity as a clinical evidence. Also, to increase the application of fermented oriental medicine, different fermentation conditions using various microbial strains should be accumulated as the clinical evidence in the future.

Key words : Hyunggaeyunkyogambalhyobang(HYGBH), atopic dermatitis, NC/Nga, fermentation,

I. 緒 論

아토피(Atopy)는 의미 그대로 다양한 원인이 복잡하게 연관되어 완화와 재발이 반복되는 난치

성 만성질환이다^{1,2)}. 아토피피부염(Atopic dermatitis)은 소양증과 피부 건조증, 특징적인 습진을 동반하며 비염이나 천식 같은 알러지성 질환을 가진 환자에게 많이 발견되고³⁾, 유전되는 가족력을 지니고 있다⁴⁾.

주로 유아기 혹은 소아기에 시작하나 최근 환경오염이 심해지고 정신적인 스트레스가 증가함

* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3, 대전대학교 한의과대학. E-mail : dhkim@dju.kr
접수일 : 2011년1월10일 게재확정일 : 2011년2월8일

에 따라 성인에서의 유병률이 늘고 있으며, 통계적으로 10~20% 정도가 도시화된 지역에서 이로 인하여 고통을 받고 있는 것으로 알려져 있다⁵⁾.

상기한 바와 같이 반복되는 난치성 질환인 까닭에 이에 대한 정확한 병리 기전은 아직까지 완전히 규명되지 않았으나, 기존의 연구 결과는 면역학적 기전을 주 병인·병기로 보고하고 있다⁶⁾. 면역학적 기전으로 아토피피부염은 Th1 세포와 Th2 세포의 면역학적 불균형에 의하여 유발된다고 여겨지며⁷⁾, Th2 세포의 우세한 면역 반응에 의하여 매개되는 질병이다⁸⁾. 항원에 의해 활성화된 Th2 세포가 IL-4, IL-5, IL-9, IL-13과 같은 사이토카인을 생성함으로써 B세포에 의한 IgE 항체의 생산, 호산구의 기도 내 유입에 따른 염증 유발 물질의 분비, 비만 세포에 의한 히스타민 분비 등이 유발되면서 조직 염증과 과민성이 증가되는 특징적 증상을 나타낸다⁹⁻¹¹⁾.

이러한 대표적인 병리 기전을 바탕으로 현재 아토피피부염에 대한 치료 방법은 스테로이드제나 항히스타민제의 도포나 복용 그리고 면역억제제가 사용되고 있으나, 장기간 사용에 따른 피부 과민반응 및 부작용으로 인하여 이에 대한 지속적인 보완이 요구되고 있다^{12,13)}.

한의학에서 아토피피부염은 증상, 병인, 연령 및 병소에 따라 한방소아과와 한방피부과 영역에서 ‘奶癬’, ‘浸淫瘡’, ‘濕疹’, ‘濕瘡’, ‘痒風’, ‘胎熱’, ‘血風瘡’, ‘四彎風’, ‘旋耳瘡’ 등이 유사 병증으로 언급되고 있다¹⁴⁻¹⁷⁾. 病因과 症狀에 대한 諸家の 의견이 분분하지만, 크게 實證인 경우 風·濕·熱邪의 錯雜에 의한 다양한 병리 및 증상의 나타나며, 虛證인 경우는 脾虛로 인한 濕邪의 偏盛에 기인한 것으로 이해되고 있다. 따라서 임상에서의 치료 역시 이들과 관련된 처방을 중심으로 辨證施治가 이루어지고 있으며, 침 치료와 더불어 사상체질에 따른 독특한 치료법^{18,19)}도 활용되고 있다.

실험적 연구 역시 임상에서 활용된 처방을 중심으로 객관적 효능 평가²⁰⁻²³⁾를 통하여 기초적 자료를 제공하고 있으며, 최근에는 아토피 환자

의 대부분의 치료 기간이 증장기인 점에 비추어 제형 및 약량의 변화 요구와 장기 복용에 따른 위장 장애를 극복하기 위하여 발효 한약에 대한 연구²⁴⁻²⁶⁾가 관심사로 대두되고 있다. 일반적으로 한약을 발효할 경우 한약재가 저분자 구조로 분해되어 체내 흡수율이 높아지고 생리 활성 물질이 풍부하게 생산되어 생체 이용률이 높으며 유용균의 활성으로 독성 및 각종 유해 물질의 제거가 용이하다고 보고되고 있으나²⁶⁾, 아직까지 객관적인 검증에 대한 실험 및 임상 연구는 미흡한 실정이다.

이에 저자는 기존에 항아토피피부염 효능이 실험적으로 규명된 다양한 처방 중 현재 임상에서 활용도가 높은 荊芥連翹加味方을 발효제법으로 조제한 후 이를 시료로 면역세포 및 이와 관련된 면역 유발 물질들에 미치는 영향을 in vivo 실험을 통하여 검색하여 아토피피부염 개선 효과를 객관적으로 검증하고자 하였다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 동물

실험동물인 수컷 6주령의 NC/Nga Mice는 중앙실험동물에서 공급 받아 실험 당일까지 고품사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co., Korea)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2°C, 습도 55 ± 15%, 12시간-12시간(light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 대전대학교 동물실험윤리위원회(IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인(승인번호: DJUARB 2010-002)을 받았다.

2) 약물

본 실험에 사용한 加味荊芥連翹醱酵方(Hyunggaeyunkyogamibalhyobang, 이하 HYGBH)의 구성 약재들은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량(1첩)은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of HYGBH (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
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
白芷	Angelicae Dahuricae Radix	5
桔梗	Platycodi Radix	5
Total amount		76

3) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 collagenase, DEPC (diethyl pyrocarbonate), acetic acid, tris-base, tris-HCl, paraformaldehyde, D-PBS (dulbecco's phosphate buffered saline), dexamethasone 등은 Sigma (USA)사 제품을 사용하였고, TNCB (2,4,6-trinitrochlorobenzene)는 동아제약 (Korea)사 제품을, anti-CD4-FITC, anti-CD69-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-CD8-PE, anti-CD25-PE,

anti-B220-PE, anti-Gr-1-PE, anti-CD3-PE, anti-CD45-PE 등은 BD-Pharmingen (USA)사 제품을, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, histamine, IFN- γ ELISA kit 등은 Invitrogen (USA)사 제품을, IgE ELISA kit 등은 Shibayagi (Japan)사 제품을 구입하여 사용하였으며, 발효수는 이엠선옥균을 사용하였고, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 발효약탕기 (이엠생명과학연구원, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), microwave oven (LG, Korea), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), CO2 incubator (Forma scientific Co., USA), autoclave, deep-freezer (Sanyo Co., Japan), clean bench, water bath, vortex mixer, heating block, ice-maker (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-line Co., USA), centrifuge (Hanil Co., Korea), homogenizer (OMNI Co., USA), flow cytometer (Becton Dickinson, USA), Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA), ELISA reader (Bio-TekInstruments, VT, USA), fluorescence contrast microscope (Nikon, Japan) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

HYGBH 반재 분량을 약제 500 g에 물 5 l를 기준으로 하여 70°C에서 10시간 동안 약제를 불린 다음, 발효수 (이엠선옥균) 200 ml를 넣고 72시간 동안 40°C에서 발효한 후 1시간 30분 동안 끓여서 불활성화 시켰다. 추출액을 필터 한 후 흡입 여과하여, 증류장치로 농축하였다. 농축액을 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 다음 얻어진 분말 96.1 g을 냉동 보관 (-80°C) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 피부염 유도 및 시료 처리

7 주령이 된 NC/Nga 생쥐의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후 제모가 끝나면 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 1% TNCB 용액 (아세톤 : 올리브오일 = 3 : 1) 200 μ l를 등 부위에 도포하고, 4일 후 0.2% TNCB 용액 150 μ l를 다시 도포하였으며, 2일 후부터는 1주일에 2번씩 0.2% TNCB 용액 150 μ l를 4주간 등 부위에 도포하였다. 실험은 4개의 군으로 나누었으며 정상군, 대조군에는 증류수를, 양성대조군인 dexamethasone 투여군은 0.5 mg/kg 농도로, 실험군인 HYGBH 투여군은 8.0 mg/25 g/day 농도로 6주간 경구 투여 하였다.

3) 관능 평가

약물 처리 후 2주, 4주, 6주 때에 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가 방법으로 관능 평가를 실시하였다. 평가 항목은 홍반 (Erythema), 가려움과 건조 피부 (Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종 (Edema & Hematoma), 긁힘 (Excoriation), 태선화 (Lichenification)로 5가지이다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였다.

4) 면역세포 분리

실험 종료 후 TNCB로 유발된 NC/Nga 생쥐에서 일정량의 배부 피부 조직을 잘게 chopping 한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37°C shaker (140 rpm, 20 min.) 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 통과시킨 세포를 유세포 분석에 사용하였다. 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 후 4°C에서 면역형광염색을 실시하였다. 각각에 anti-CD4-FITC, anti-CD69-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-CD8-PE, anti-CD25-PE, anti-B220-PE, anti-Gr-1-PE, anti-CD3-PE, anti-CD45-PE를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 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-5, IL-13, IL-17, histamine 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 30분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리하고 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

IgG1과 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 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 µg/ml), anti-CD3 (1 µg/ml) 항체가 coating된 96-well plate에서 48시간 동안 배양한 후 배양액을 취하여 ELISA kit를 이용하여 IL-4, IFN-γ를 측정하였다. 측정 방법은 혈청 내 사이토카인 및 면역 글로불린 측정 방법과 동일하다.

8) 배부 피부 조직에서 Quantitative real-time-PCR 측정

(1) NC/Nga 생쥐의 배부 피부 조직에서 RNA 분리

NC/Nga 생쥐의 배부 피부 조직을 적출하여 각각에 RNAzolB 500 µl를 넣고 용해될 때까지 homogenizer로 분쇄하였다. 이 조직 분쇄 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 µl를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 µl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 µl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3 분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

(2) Quantitative real time PCR은 7500 Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다. Mouse Olionucleotid의 염기배열은 다음과 같다 (Table 2).

Table 2. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
GAPDH	Probe	5'-6-FAM-AACAGCCCAGAATAATG A A T A A A G T T C
	-VIC	CTCAATTGTTAC-TAMRA-3'
IL-5	Forward	5' AGCCTAACCTGTGTGGAGGT 3'
	Reverse	5' GTGATCGGCTTTTCTTGAGC 3'
IL-13	Forward	5' ATGCCCAACAAAGCAGAGAC 3'
	Reverse	5' TGAGAGAACCAGGGAGCTGT 3'

Cytokine 유전자 발현은 SYBR® Green PCR Master mix를 사용하였고, internal standard는 GAPDH로 Taqman probe를 사용하였으며, primer의 최종 농도는 200 nM이 되게 반응시켰다. IL-5와 IL-13 mRNA 유전자 발현량 분석은 배부 피부조직에서 cDNA를 합성하여 분석하였다. Quantitative real time PCR의 조건은 50°C에서 2분, 94°C에서 10분간 반응하여 pre-denaturation 시킨 뒤, 95°C에서 0.15분, 60°C에서 1분간 반응하여 40회 반복 수행하였다. 실험약물 투여군의 대조군은 internal standard로 GAPDH를 사용하여 IL-5와 IL-13의 상대정량값 (RQ)을 측정하였다. RQ (relative quantitative) 값은 아래와 같이 측정하였다.

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

x = starting quantity y = yield n = number of cycles
e = efficiency

3. 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
 7주령의 NC/Nga 생쥐를 제모한 후 TNCB를 4주간 도포하여 피부염을 유발시키면서 HYGBH를 6주간 구강 투여하였다. Fig. 1 은 10주, 12주, 14주의 피부염 유발 정도와 개선 정도를 나타내주는 사진으로, HYGBH 투여군이 대조군에 비해서 피부염 유발 정도가 현저하게 떨어졌음을 확인할 수 있다 (Fig. 1). 피부염 지수는 아토피 피부염을 유발한 후 최종 6주 후에 피부염의 심화 정도를 관능적 방법에 의하여 측정된 결과로, 대조군은 7.67 ± 1.21 , Dexa 투여군은 3.33 ± 1.03 , HYGBH 투여군은 3.00 ± 0.89 로 대조군에 비해 모두 유의적인 (** $p < 0.01$) 감소를 나타내었다 (Fig. 2).

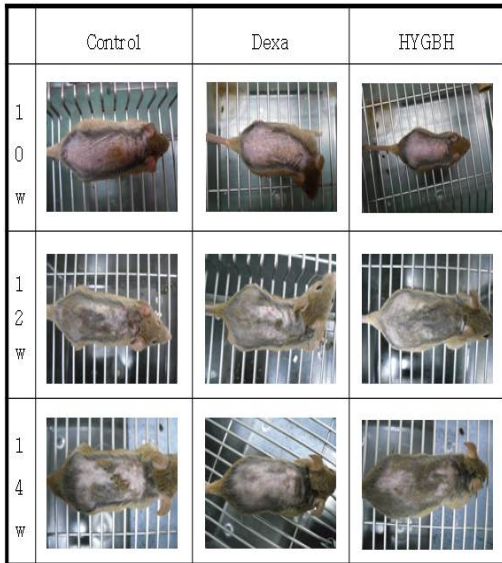


Fig. 1. Comparison of skin manifestation in NC/Nga mice between control and experimental group. Atopic dermatitis was induced by TNCB treatment in the dorsal skin.

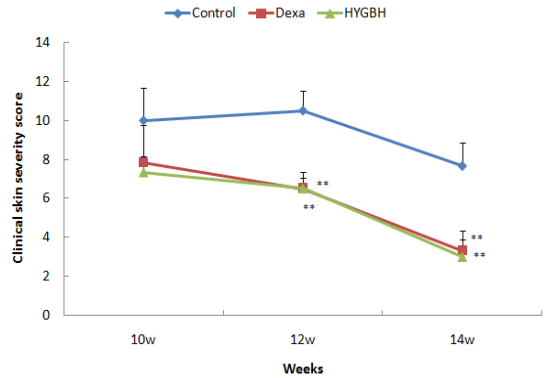


Fig. 2. Effects of HYGBH on clinical skin features and severity in TNCB-induced NC/Nga mice. Clinical skin index of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe) for each of five signs and symptoms (Erythema, Pruritus & Dry skin, Edema & Hematoma, Excoriation, Lichenification) ; Symptoms were evaluated by skin dryness, eruption and wound on the three parts of the body; ear, face and back. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (** $p < 0.01$).

2. PBMC 내 면역세포 변화에 미치는 영향

1) CD4+/CD45+ 세포 비율에 미치는 영향
 정상군은 4.73 ± 0.31 (%), 대조군은 14.20 ± 0.42 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (++) $p < 0.001$) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 9.14 ± 0.74 (%), HYGBH 투여군은 15.80 ± 1.40 (%)로 나타나 Dexa 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (***) $p < 0.001$) 감소를 나타내었다 (Table 3).

2) B220+/CD23+ 세포 비율에 미치는 영향
 정상군은 14.30 ± 1.60 (%), 대조군은 31.80 ± 1.90 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++) $p < 0.001$) 증가를 나타내

있고, Dexa 투여군은 25.20 ± 1.40 (%), HYGBH 투여군은 31.45 ± 0.55 (%)로 나타나 Dexa 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 감소를 나타내었다 (Table 3).

3) CD4+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 9.28 ± 1.63 (%), 대조군은 15.61 ± 0.60 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (++)p<0.01) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은 8.60 ± 1.00 (%), HYGBH 투여군은 12.80 ± 0.10 (%)로 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.001) 감소하였다 (Table 3).

4) CD8+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 6.00 ± 0.44 (%), 대조군은 9.14 ± 0.76 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (++)p<0.01) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은 6.80 ± 0.70 (%), HYGBH 투여군은 13.25 ± 0.95 (%)로 대조군에 비해서 각각 유의성 있게 (*p<0.05, **p<0.01) 감소, 증가하였다 (Table 3).

5) CD3+/CD69+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 3.80 ± 0.67 (%), 대조군은 7.20 ± 0.70 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (++)p<0.01) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은 4.80 ± 1.10 (%), HYGBH 투여군은 4.28 ± 0.12 (%)로 HYGBH 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.001) 감소하였다 (Table 3).

6) CD4+/CD25+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 0.72 ± 0.02 (%), 대조군은 2.32 ± 0.16 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++)p<0.001) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은 1.35 ± 0.08 (%), HYGBH 투여군은 1.41 ± 0.51 (%)로 나타나 Dexa 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.001) 감소하였다 (Table 3).

7) CD11b+/Gr-1+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 23.35 ± 2.15 (%), 대조군은 41.70 ± 4.30 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (++)p<0.01) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은 28.05 ± 1.45 (%), HYGBH 투

여군은 32.95 ± 1.45 (%)로 대조군에 비하여 Dexa 투여군에서 유의성 있게 (**p<0.01) 감소하였다 (Table 3).

Table 3. Effect of HYGBH on Immune Cells Rate of PBMC in TNCB-induced Atopic Dermatitis Model of NC/Nga Mice

(%)	Normal	Control	Dexa	HYGBH
CD4+	4.73 ± 0.31	14.20 ± 0.42 ⁺⁺⁺	9.14 ± 0.74 ^{***}	15.80 ± 1.40
/CD45+				
B220+	14.30 ± 1.60	31.80 ± 1.90 ⁺⁺⁺	25.20 ± 1.40 ^{**}	31.45 ± 0.55
/CD23+				
CD4+	9.28 ± 1.63	15.61 ± 0.60 ⁺⁺	8.60 ± 1.00 ^{***}	12.80 ± 0.10
CD8+	6.00 ± 0.44	9.14 ± 0.76 ⁺	6.80 ± 0.70 [*]	13.25 ± 0.95 ^{**}
CD3+	3.80 ± 0.67	7.20 ± 0.70 ⁺⁺	4.80 ± 1.10	4.28 ± 0.12 ^{***}
/CD69+				
CD4+	0.72 ± 0.02	2.32 ± 0.16 ⁺⁺⁺	1.35 ± 0.08 ^{***}	1.41 ± 0.51
/CD25+				
CD11b+	23.35 ± 2.15	41.70 ± 4.30 ⁺⁺	28.05 ± 1.45 ^{**}	32.95 ± 1.45
/Gr-1+				

3. Dorsal Skin내 면역세포 변화에 미치는 영향

1) CD3+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 36.45 ± 2.95 (%), 대조군은 63.10 ± 1.50 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++)p<0.01) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 35.55 ± 5.15 (%), HYGBH 투여군은 34.95 ± 4.95 (%)로 나타나, 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.001) 감소하였다 (Fig. 3A).

2) CD11b+/Gr-1+ 세포 비율에 미치는 영향

정상군은 11.45 ± 0.95 (%), 대조군은 33.35 ± 0.85 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++)p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 23.75 ± 1.65 (%), HYGBH 투여군은 15.65 ± 3.25 (%)로 나타나, 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.001) 감소하였다 (Fig. 3B).

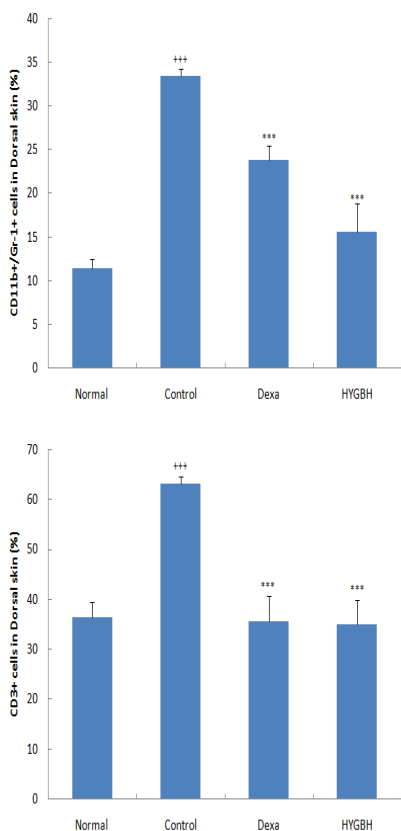


Fig. 3. Effect of HYGBH on CD3+ and CD11b+/Gr-1+ cell rate of Dorsal skin in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of HYGBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from Dorsal skin stained with anti-CD3(A) and anti-CD11b / anti-Gr-1(B) 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<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (**p<0.01, ***p<0.001).

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

1) IL-4 생성량에 미치는 영향

정상군은 288.9 ± 39.4 (pg/ml), 대조군은 511.1 ± 13.6 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 285.6 ± 25.6 (pg/ml), HYGBH 투여군은 360.5 ± 34.6 (pg/ml)로 나타나, 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.01, ***p<0.001) 감소하였다 (Fig. 4A).

2) IFN- γ 생성량에 미치는 영향

정상군은 419.4 ± 58.7 (pg/ml), 대조군은 785.6 ± 9.9 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 355.1 ± 45.5 (pg/ml), HYGBH 투여군은 725.0 ± 15.0 (pg/ml)으로 나타나, 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.01, ***p<0.001) 감소하였다 (Fig. 4B).

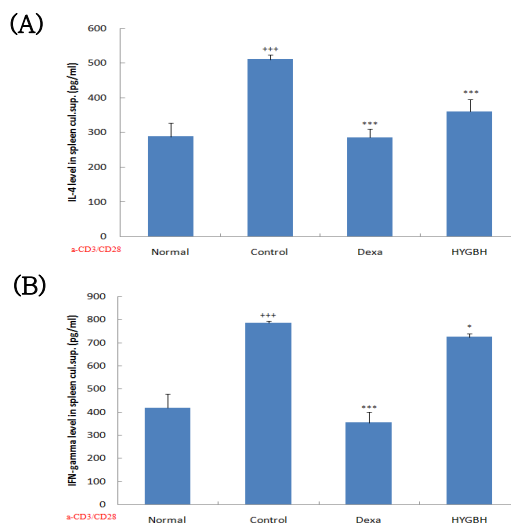


Fig. 4. Effect of HYGBH on the level of IL-4 and IFN- γ in splenocytes of NC/Nga mice. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IL-4(A) and IFN- γ (B) in the culture supernatant were determined

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<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (**p<0.001).

5. 혈청 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-5 생성량에 미치는 영향

정상군은 54.0 \pm 8.3 (pg/ml), 대조군은 168.3 \pm 6.0 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 138.7 \pm 14.4 (pg/ml), HYGBH 투여군은 132.9 \pm 8.3 (pg/ml)로 나타나, HYGBH 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.01) 감소하였다 (Fig. 5A).

2) IL-13 생성량에 미치는 영향

정상군은 210.3 \pm 5.0 (pg/ml), 대조군은 368.0 \pm 22.2 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 292.6 \pm 8.6 (pg/ml), HYGBH 투여군은 332.7 \pm 43.0 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 Dexa 투여군에서 유의성 있게 (**p<0.01) 감소하였다 (Fig. 5B).

3) IL-17 생성량에 미치는 영향

정상군은 235.0 \pm 19.4 (pg/ml), 대조군은 719.0 \pm 60.3 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 524.7 \pm 68.5 (pg/ml), HYGBH 투여군은 618.3 \pm 30.3 (pg/ml)로 나타나 Dexa 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 (*p<0.05) 감소하였다 (Fig. 5C).

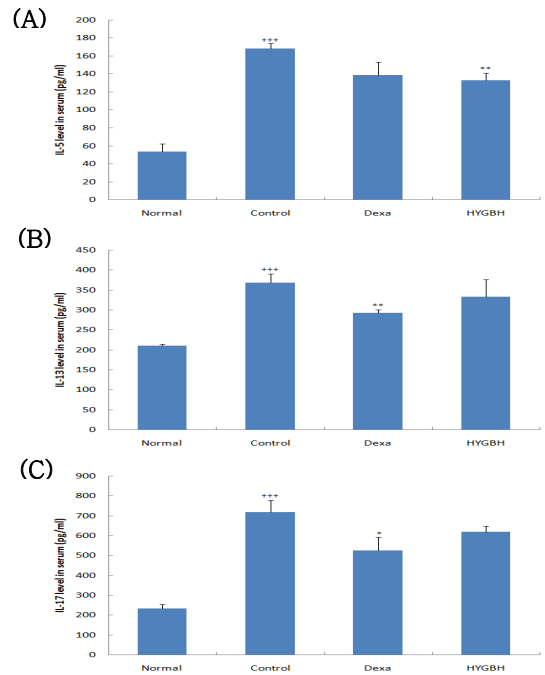


Fig. 5. Effect of HYGBH on the level of IL-5, IL-13 and IL-17 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IL-5(A), IL-13(B) and IL-17(C) were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value 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<0.05).

6. 피부에서의 사이토카인 mRNA 발현에 미치는 영향

1) IL-5 mRNA 발현에 미치는 영향

IL-5 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1.103 \pm 0.103일 때, 정상군은 0.673 \pm 0.076으로 나타나, 정상군에 비하여 유의성 있게 (++p<0.01) 증가하였다. Dexa 투여군은 0.797 \pm 0.049, HYGBH 투여군은 0.711 \pm 0.031로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게

(**p<0.01) 감소하였다 (Fig. 6A).

2) IL-13 mRNA 발현에 미치는 영향

IL-13 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1.060 ± 0.060 일 때, 정상군은 0.809 ± 0.040 으로 나타나, 정상군에 비하여 유의성 있게 ($+p<0.01$) 증가하였다. Dexamethasone 투여군은 0.721 ± 0.027 , HYGBH 투여군은 0.814 ± 0.102 로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 ($***p<0.001$, $*p<0.05$) 감소하였다 (Fig. 6B).

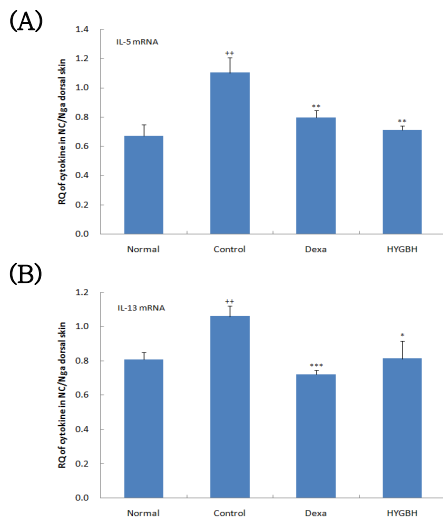


Fig. 6. Effect of HYGBH Extract on the level of IL-5(A) mRNA and IL-13(B) mRNA in the dorsal skin of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Skin was obtained by biopsy and used for preparing total RNA. Isolated RNAs were analyzed by Real Time-PCR using gene specific oligomers. The results 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. Histamine 생성량에 미치는 영향

정상군은 38.5 ± 2.9 (ng/ml), 대조군은 100.5

± 1.9 (ng/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+++p<0.001$) 증가를 나타내었고, Dexamethasone 투여군은 74.1 ± 14.6 (ng/ml), HYGBH 투여군은 68.1 ± 19.5 (ng/ml)로 나타났다 (Fig. 7).

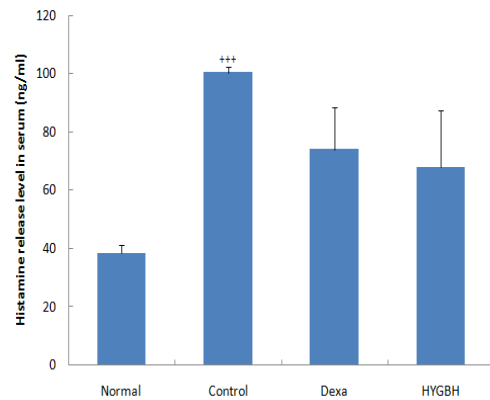


Fig. 7. Effect of HYGBH on the level of Histamine in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of histamine were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($+++p<0.001$).

8. 혈청 내 IgE 생성량에 미치는 영향

최종 14주에는 정상군이 473.5 ± 5.0 (ng/ml), 대조군은 505.7 ± 7.4 (ng/ml)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($+p<0.01$) 증가를 나타내었다. Dexamethasone 투여군은 416.2 ± 14.6 (ng/ml), HYGBH 투여군은 471.5 ± 12.5 (ng/ml)로 나타나, 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 ($***p<0.001$, $*p<0.05$) 감소하였다 (Fig. 8)

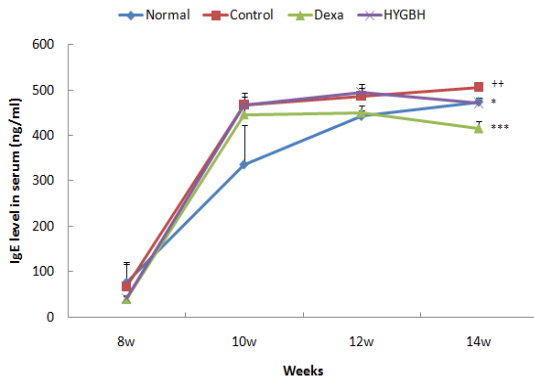


Fig. 8. Effect of HYGBH on the level of IgE in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IgE were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test ($+ + p < 0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test ($*** p < 0.001$, $* p < 0.05$).

IV. 考 察

아토피피부염은 환경적인 요소와 유전적인 소인이 모두 관여하는 복합적인 질환으로 대기 오염, 핵가족화, 모유 수유의 감소, 수입과 교육 수준의 증가, 주거 환경 변화 및 공업 발달로 인한 새로운 항원 물질의 등장 등이 관여하는 것으로 알려져 있다^{27,28}. 어릴 때부터 시작하여 만성 경과를 보이며 장기간의 치료에도 불구하고 치료가 어려운 난치성 질환이라 인식되고 있으며, 특히 노출된 부위에 발생하여 신체 추형장애를 야기할 수 있어서 어느 다른 질환보다도 환자의 삶의 질에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다²⁹.

대개 유소아기에 발병하여 만성적으로 재발되는 특징이 있으며, 소양증, 태선화, 모공 각화증,

비 특이적인 습진 병변 등을 나타내는 피부 증상의 종합적인 질병군이라고 할 수 있다³⁰. 병변의 초기인 급성기에는 주로 가려움증이 심한 홍반성 구진과 수포가 발생하고, 급게 되면 진물이 나오는 삼출성 병변으로 변하는데, 이때 2차 감염이 흔히 일어난다³¹. 병변이 진행되어 아급성기에는 찰상, 인설이 덮인 구진이 발생하며, 만성기에 접어들면 피부가 두껍게 되는 태선화 현상이 일어난다³². 보통 임상 양상과 분포는 환자의 나이에 따라 다르게 나타나며, 대개는 환자에게서 다양한 병변들이 동시에 관찰된다³³.

아토피피부염은 임상 소견과 마찬가지로 면역학적 양상도 복잡하고 다양하다. 아토피피부염이 진행되게 되면 T 세포의 활성화가 일어나고 helper T 세포로 변화 된다³⁴. 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^{35,36}. 분화된 Th2 세포들은 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 같은 사이토카인을 분비하게 되고 이 사이토카인들은 B 세포의 isotype switching을 유도하여 IgE의 발현을 증가시켜, 호산구 같은 면역세포를 피부로 침윤시키는 역할을 한다³⁷. 또한 비만세포 표면상에 있는 고친화성 IgE 수용체 (FcεRI)에 과발현된 IgE가 결합하여 감각된 상태가 되고 그 상태에서 다시 항원에 노출되게 되면 비만세포를 활성화시켜 히스타민, Leukotrien(LT) 등의 화학전달물질과 IL-4, IL-5, TNF-α, GM-SCF 등의 사이토카인을 분비하여 과민반응을 유발하게 된다³⁸.

아토피 피부염, 비염 및 천식 등의 난치성 질환이 면역억제제 같은 약물치료의 한계에 이르러 최근 한약으로의 접근이 활발해지고 있는데 주목하고 있는 분야가 바로 발효한약에 대한 연구이다³⁹. 발효(醱酵, Fermentation)는 식용 미생물로 식품을 분해하는 것이며, 발효법제(醱酵法製, Bio-fermentation)는 식용 미생물로 한약제를

순수 발효시켜 그 유효 성분을 분해 추출하는 것이다. 발효법제에 사용되는 미생물은 형태학적으로 분류하여 진균(眞菌), 효소(酵素), 세균(細菌) 가운데 안전성이 과학적으로 입증된 식용 미생물이며, 순수 액체발효 또는 순수 고체발효 방법을 이용하여 한약재를 修治法製한다. 순수 액체발효(液體醱酵, Liquid-state fermentation)에 의한 修治法製는 한약재를 완전히 물속에 넣어 물을 매체로 이용하여 액체상태의 발효한약을 얻는 것이고, 순수 固體醱酵(Solid-state fermentation)에 의한 수지법제는 한약재를 공기에 완전히 노출시켜 공기를 매체로 이용하여 고체상태의 발효한약을 얻는 것이다²⁶⁾. 본 시료는 액체발효의 방법을 사용하였으며, 醱酵法製 과정에 한약재가 다른 미생물에 의해 오염되지 않도록 멸균수를 발효매체(醱酵媒體, Fermentation media)로 사용하였다.

본 실험에 사용한 동물 모델인 NC/Nga 생쥐는 사람에서의 아토피 피부염과 유사하게 발현되어 Th2 세포의 과발현과 IgE의 증가가 특징적이다⁴⁰⁾. 피부 병소는 귀, 목, 등 주위에서 가장 흔하게 관찰되며, 약 7주령부터 IgE의 증가가 시작되고 17주령에는 최고조에 이르러 비만세포와 호산구의 피부조직으로의 침윤과 표피의 과각질화가 나타나 일반적으로 사용되고 있는 아토피 피부염 모델이다⁴¹⁾.

HYGBH가 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐의 직접적인 임상 효과를 육안으로 살펴본 결과, Fig. 1에서 보는바와 같이 현저한 피부개선 효과를 보였는데, SCORD⁴²⁾ 법을 이용한 피부염 지수에서도 대조군에 비해 60.8% 정도 크게 감소하여 육안으로 관찰된 결과와 부합되었다(Fig. 2).

아토피 피부염은 여러 면역세포들이 관여하는데 그 중 T 세포의 활성화가 주된 역할을 한다⁴³⁾. 외부에서 항원이 유입되면 Th1 세포와 Th2 세포의 면역학적 불균형에 의해 Th2 세포의 우세적인 활성화가 진행되고 IL-4, IL-5, IL-13과 같은 사이토카인을 분비함으로써 B 세포에

의한 IgE 항체의 과생산, 호산구에 의한 염증 유발 물질의 분비, 비만세포에 의한 히스타민 분비 등이 증가되면서 조직 염증이 증가되고, 과민성이 증가되는 알러지성 질환이 유발된다^{44,45)}.

HYGBH 투여군이 면역 세포간의 비율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PBMC 내의 면역 세포 비율을 조사한 결과 활성화하여 분화된 T 세포를 나타내는 CD4+⁴⁶⁾ 세포는 18%로 유의적으로 감소하였고, CD8+⁴⁶⁾ 세포는 44.7% 증가하였으며, 활성화된 전체 T 세포를 나타내는 CD3+/CD69+⁴⁷⁾ 세포의 비율은 40.6%로 크게 감소한 것으로 나타났다(Table. 3). 반면, T 세포를 조절하는 CD4+/CD45+⁴⁸⁾, CD4+/CD25+⁴⁹⁾, B 세포를 나타내는 B220+/CD23+⁵⁰⁾, 과립구를 나타내는 CD11b+/Gr-1+⁵¹⁾ 세포비율을 조사한 결과 HYGBH 군에서 대조군과 비교하여 큰 변화가 없는 것으로 나타났다(Table. 3). 이 결과로 보아 HYGBH이 활성화된 T 세포 중 특히 CD4+ 세포의 비율을 감소시킴으로써 세포 비율을 정상으로 회복시키는 경향이 있음을 제시하고 있다.

피부에서의 면역세포에 미치는 영향을 조사한 결과 역시 HYGBH 투여군에서 CD3+⁴⁶⁾ 세포 비율이 44.6%로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였으며, 과립구를 나타내는 CD11b+/Gr-1+ 세포 역시 53.1%로 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이는 PBMC 내에서의 결과와 같이 T 세포의 감소로 면역세포간의 비율을 회복시키고, 이로 인하여 과립구가 피부로 침윤하는 것을 막아 아토피 피부염의 증상을 완화시키는 작용을 하는 것으로 생각되어 진다.

상기 결과에서와 같이 T 세포가 감소함에 따라 T 세포에서 분비되는 사이토카인인 IL-4, IFN- γ 생성량이 비장에서도 각각 29.5%, 7.7% 감소되었으며, 혈청 내에서도 IL-5, IL-13, IL-17 생성량이 각각 21%, 9.6%, 14% 감소되었고, 피부에서의 Th2 세포와 관련된 IL-5, IL-13 mRNA 역시 각각 35.5%, 23.2% 감소하였으며, 염증 매개 물질인 히스타민과 IgE는 각각 32.2%, 6.8% 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4~8).

아토피피부염에 대한 연구에서 HYGBH와 荊芥連翹湯加味方의 효과를 비교해보면⁵²⁾, 荊芥連翹湯加味方은 배부피부 내 과립구 세포 비율을 23.8% 감소시키는데 비하여 HYGBH는 53.1%의 큰 감소 효과를 보이는 것으로 보아 HYGBH 처리군에서 항산화 작용을 통해 과립구들의 활성화가 크게 억제 된 것으로 사료된다. 반면, IgE 생성 억제에 대한 효과는 荊芥連翹湯加味方은 44.3%에 비하여 HYGBH는 7.7%의 미미한 감소 효과로 본 시료가 IgE를 매개로한 면역반응에 대한 억제효과는 荊芥連翹湯加味方보다 떨어지는 것으로 나타났다. 또한 혈청 및 비장 내 사이토카인에서도 荊芥連翹湯加味方은 IL-5, IL-13 및 IL-4가 69.8%, 28.7%, 43% 감소되었으나 HYGBH는 21%, 9.6%, 29.5% 감소한 것으로 나타나 Th2 세포에서 생성된 사이토카인을 억제하는 효과 역시 荊芥連翹湯加味方보다 떨어지는 것으로 나타났다. 두 시료의 결과를 종합하여 볼 때, 荊芥連翹湯加味方의 항산화 실험 결과가 없어 비교 할 수는 없으나 발효함으로써 항산화 효과가 증가되어 과립구들의 활성화 억제 효과가 높아지는 것으로 생각되어지며, 일반적인 아토피 피부염의 원인이라고 생각되어지는 Th2 세포의 사이토카인과 면역글로불린의 억제 효과는 감소 되는 것으로 추측된다.

V. 結 論

荊芥連翹湯加味醱酵方(HYGBH)의 아토피피부염 개선효과를 객관적으로 검증하기 위하여 동물 병태 모델의 면역 관련 인자를 검색한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HYGBH 처리군은 대조군에 비하여 육안적으로 아토피 피부염을 개선시켰으며, 12주와 14주에서 피부염 지수를 유의성 있게 감소시켰다.

2. HYGBH 처리군은 대조군에 비하여 PBMC 내 CD4+, CD3+/CD69+ 면역세포 비율을 각각 18%, 40.6%로 유의성 있게 감소시켰다.

3. HYGBH 처리군은 대조군에 비하여 배부피부 내 CD3+, CD11b+/Gr-1+ 면역세포 비율을 각각 44.6%, 53.1%로 유의성 있게 감소시켰다.

4. HYGBH 처리군은 대조군에 비하여 비장 내 IL-4, IFN- γ 의 발현을 각각 29.5%, 7.7% 감소시켰다.

5. HYGBH 처리군은 대조군에 비하여 혈청 내 IL-5, IL-13, IL-17 및 histamine의 발현을 각각 21%, 9.6%, 14%, 32.2% 감소시켰으며, IgE의 발현 또한 6.8% 감소시켰다.

6. HYGBH 처리군은 대조군에 비하여 피부 내 IL-5 및 IL-13 mRNA 발현을 각각 35.5%, 23.2% 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 荊芥連翹湯加味醱酵方(HYGBH)의 면역 조절 작용을 통한 아토피피부염의 개선 효과가 실험적으로 규명됨으로써 임상 활용의 객관적 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것임.

参 考 文 献

1. Williams Hywel C.. Atopic dermatitis. Cambridge Univ Press, pp.142-153, 2000.
2. Daniels J and Harper J. The epidemiology of atopic dermatitis. Hosp Med 63(11):649-52, 2002.
3. 이혜란. 아토피 피부염. 소아과학회지 43(9):1161-1167, 2000.
4. Holden CA and Parish WE. Atopic dermatitis. Blackwell Science, Oxford,

- 1998.
5. Kevin DC, Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy. *J invest Dermatol* 102:128-37, 1994.
 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 and Capron, T Cell Regulation in Allergy, Asthma and Atopic Skin Diseases. S Karger Pub, pp.121-137, 2008.
 8. Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'shea JJ and Frucht DM, Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* 23:147-61, 2003.
 9. Beellant JA, Cytokine and allergic disease; clinical aspect. *Allergy Asthma Proc* 19(6):337-341, 1998.
 10. Wollenberg A, Kraft S, Oppel T, Bieber T, Atopic dermatitis: pathogenetic mechanism. *Clin Exp Dermatol* 25:530-4, 2000.
 11. Leung DYM, Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 104:S99-108, 1999.
 12. Fry Lionel, Ellis Charles N., An Atlas of Atopic Eczema. Informa Healthcare, pp.87-101, 2003.
 13. Rudikoff D, Leibold M, Atopic dermatitis. *Lancet* 351(9117):1715-21, 1998.
 14. 장서현 외. 皮膚科卷. 학원출판사, pp.299-230, 2004.
 15. 민수 외. 當代兒科常見病妙方. 인민군의출판사, p.567, 2003.
 16. 이원문 외. 皮膚性病(手冊). 인민위생출판사, pp.193-199, 2004.
 17. 장지례. 皮膚科手冊. 중의고적출판사, p.279, 2004.
 18. 김남권 외. 사상체질 검사를 통한 성인병 아토피 피부염 환자의 예후에 대한 임상적 고찰. *동의생리병리학회지*, 15(6):1029-1033, 2001.
 19. 임진희. 아토피피부염 患者의 四象體質別 臨床特徵에 관한 研究. 경희대학교대학원, 2008.
 20. 강란이. 아토피피부염 동물 병태 모델에서의 형개연교당의 면역조절작용. 대전대학교 대학원, 2010.
 21. 유한정. 內消和中湯加味方이 아토피 피부염 환아의 혈중 cytokine 분비에 미치는 영향. 경희대학교대학원, 2006.
 22. 진가현. 가미패독산의 NC/Nga 생쥐에서 발생된 아토피피부염 억제 작용. 대전대학교 대학원, 2006.
 23. 민영규 외. 소풍산가미방과 외치방 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지, 18(1):116-134, 2005.
 24. 김용미. 발효한약의 연구동향 연구. 경원대학교 한의학대학원 논문집, pp.4-12, 2009.
 25. 강동희. Lactobacillus 균주로 발효시킨 한약의 기능성 연구. 계명대학교 생물학대학원 논문집, pp.20-35, 2009.
 26. 김상현. 한약의 효율성 개선을 위한 발효한약 유용성에 관한 연구. 경기대학교대체 의학대학원, 2008.
 27. Leung DY, Atopic dermatitis: The skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 96:302-18, 1995.
 28. Leung DY, Atopy dermatitis: new insight and opportunities for for therapeutic intervention, *J Allergy Clin Immunol*

- 105:860-867, 2000.
29. 조일영, 박순권. 아토피 피부염 치료를 위한 심신의학적 접근. 한국콘텐츠학회논문지 8(11):242-250, 2008.
 30. 박영립, 박준. 아토피 피부염의 병인. 대한 피부연구학회지 14(3):67-72, 2007.
 31. 허창훈. 아토피 피부염의 증상 및 치료. 한국산업간호협회지 13(3):42-46, 2006.
 32. Harifin JM, Rajka G, Diagnostic features of atopic dermatitis. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh) 92:44-7, 1980.
 33. Diepgen TL, Fartasch M, Recent epidemiological and genetic studies in atopic dermatitis. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh) 176:13-8, 1992.
 34. Walker C, Kägi MK, Ingold P et al. Atopic dermatitis: correlation of peripheral blood T cell activation, eosinophilia and serum factors with clinical severity. Clinical & Experimental Allergy 23(2):145-153, 1993.
 35. Romagnani S: immunologic influences on allergy and the Th1/Th2 balance. J Allergy Clin Immunol 113:395-400, 2004.
 36. Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH: Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. Immunol Today 21:479-483, 2000.
 37. Nora Laske, Bodo Niggemann. Does the severity of atopic dermatitis correlate with serum IgE levels? Pediatric Allergy and Immunology 15(1):86-88, 2004.
 38. 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.
 39. 강동희, 고희선, 김현수. 발효한약의 특성 분석. 자연과학연구논집 27(1): 45-53, 2008.
 40. Vestergard C, et al The Nc/Nga mouse: a model for atopic dermatitis. Mol Med Today 5: 209-10, 2000.
 41. Matsuda H et al., Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in Nc/Nga mice. Int. Immunol 9:461-466, 1997.
 42. 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.
 43. Mosmann T, Coffman R: Two types of mouse helper T-cell clone. Implications for immune regulation. Immunol Today 8:223-227, 1987.
 44. Miller AL. The etiologies, pathophysiology, and alternative/complementary treatment of asthma. Altern Med Rev 6:20-47, 2001.
 45. 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.
 46. Helena Aniansson Zdolsek, Jan Ernerudh, Patrick G. Holt, Joacim Nilsson, Bengt Björkstén, Expression of the T-Cell Markers CD3, CD4 and CD8 in Healthy and Atopic Children during the First 18 Months of Life. Arch Allergy Immunol 119:6-12, 1999.
 47. Vanhecke D, Leclercq G, Plum J and Vandekerckhove B, 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.
48. Zaffaroni M., Rossini S., Ghezzi A., Parma R. and Cazzullo C.L.. Decrease of CD4+ CD45+ T-cells in chronic-progressive multiple sclerosis. *Journal of Neurology* 237(1):1-4, 1990.
49. Huan-Zhong Shi, Shan Li, Zheng-Fu Xie, Xue-Jun Qin, Xue Qin, Xiao-Ning Zhong, Regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma. *Clinical Immunology* 113:172-178, 2004.
50. Askenasea Philip W., Kawikovaa I., Paliwala V., Akahira-Azumaa M., Gerardc C., Huglib T., Tsujid R., A New Paradigm of T Cell Allergy: Requirement for the B-1 Cell Subset. *Int Arch Allergy Immunol* 118:145-149, 1999.
51. 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.
52. 박성희. 형개연교탕가미방의 아토피 피부염 병태모델에서의 면역조절능에 관한 연구. 대전대학교 한의학대학원논문집. pp.49-54, 2010.