

排毒丸醱酵方の 면역조절작용을 통한 항아토피 효능

김선빈¹ · 김수명² · 김동희¹ *

Effects of Baedokhwanbalhyobang (BDHBH) on Immune Modulation in Dermatitis Model of NC/Nga Mice

Gim Seon-Bin¹ · Kim Soo-Myung² · Kim Dong-Hee¹ *

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

²Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Herbal medicine has a high body absorption rate when it ferments. Biological and clinical research on the fermented herb gradually increases because it has effective materials for the treatment of a disease and it is a little bitter. In this study, we investigated the effect of fermented Baedokhwanbalhyobang (BDHBH) on attenuation of the development of atopic dermatitis in NC/Nga mice by evaluating the cytokine level in serum, the mRNA expression of cytokine and histological alteration of the skin, and the skin severity. We have come to the following conclusion.

BDHBH led to a significant decrease in the skin severity score (63.1%) as compared to the control group. CD4+/CD45+, CD4+, B220+/CD23+, and CD11b+/Gr-1+ cells of peripheral mononuclear cells (PBMCs) in the BDHBH-treated group were decreased to 6.7%, 31.1%, 22.4%, 36.6%, respectively. CD3+ and CD11b+/Gr-1+ immune cells in dorsal skin of the BDHBH-treated group were decreased to 52.9% and 28.0%. The levels of IL-5 and IL-13 in serum of the BDHBH-treated group were inhibited to 18.8% and 5.1%. The mRNA expressions of IL-5 and IL-13 in dorsal skin were also decreased to 30.6% and 27.8% after the treatment of BDHBH. BDHBH inhibited the proliferation and differentiation of eosinophils. In histological examination, BDHBH decreased the thickness of epidermis and dermis, and infiltration of mast cells as compared to the control group. These results indicate that BDHBH inhibits the pathogenic development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. These results may indicate that BDHBH attenuates the development of atopic dermatitis-like lesions by lowering immune cells and inflammatory cytokine levels, and that it is valuable in drug development for the treatment of atopic dermatitis. Further experiments on the components of BDHBH will be needed to better understand the effect of a fermented herb as compared to a herb.

Key words : Baedokhwanbalhyobang (BDHBH), atopy dermatitis, fermentations, NC/Nga, cytokine, immune cells

I. 서 론

아토피피부염은 일반적으로 유소아기에 발생 빈도가 높은 만성 염증성 피부 질환으로 세계적

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

접수일 : 2011년1월10일 게재확정일 : 2011년2월8일

으로 증가 추세이다¹⁻⁷⁾. 주 증상은 홍반, 부종, 심한 소양증, 삼출, 부스럼 딱지와 인설 등이며⁸⁾, 심한 소양증과 피부손상이 문제시 되고 있다⁹⁾.

특히 소양증으로 인한 이차 감염이나 피부 손상 등이 유발되고 또 다른 신체적·사회 심리적 문제 등이 동반되어, 정상적인 성장 발달 및 삶의 질에 부정적 영향을 미친다¹⁰⁻¹²⁾.

이 등¹³⁾이 2007년에 초등학교 8,718명, 유치원생 1,418명을 대상으로 조사한 아토피피부염 유병률은 각각 33.56%, 40.15%로 나타났으며, 성장하면서 50%는 천식으로, 75%는 알레르기 비염으로 진행되는 등¹⁴⁾ 다른 알레르기와 연관이 많아 아동기 때 더욱 적극적인 치료가 요구된다.

아토피피부염 치료는 주로 국소 스테로이드제, 국소 calcineurin 억제제 등의 외용제와 감마 인터페론 투여 및 면역글로블린 정맥 주사 등의 면역반응 조절제, 경구 스테로이드제와 같은 면역억제제 등이 사용되고 있으며¹⁵⁻¹⁷⁾, 증상이 심한 환자는 경구로 psoralen 투여 후 자외선을 비추는 광화학요법(psoralens and ultraviolet light therapy, PUVA)이 응용되고 있다¹⁸⁾. 그러나 이러한 방법 등은 피부의 위축으로부터 피부 암까지 다양한 부작용을 초래할 수 있어 보다 효과적이고 안전한 치료제 개발이 요구된다.

이러한 치료의 한계성으로 인하여 최근 생약 및 한약에서의 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 연구를 통해서 입증된 유효성 있는 추출물은 치료제 또는 치료보조제로써 실용화되고 있다. 특히 최근 한약 및 처방을 우수한 기준으로 발효시킨 후 이를 여과시켜 성분과 제형을 변화시키는 발효한약에 관한 연구 및 임상에서의 활용이 증가되고 있다¹⁹⁻²⁵⁾. 발효 과정 중 한약재는 저분자 구조로 분해되어 체내 흡수율이 증가하며 약효성분 증가와 더불어 20배 이상 고농축된 상태면서 소화도 용이하다는 장점이 있으며, 특히 한약의 쓴맛을 감소시키고 색을 연하게 하여 소아들의 복용에 용이하다^{19,20)}.

이에 대한 연구로 김¹⁹⁾은 한약의 효율성 개선을 위한 발효한약 유용성에 관한 연구를, 김²⁰⁾은 발효한약의 연구동향을, 신²¹⁾은 장수상황버섯과

마황을 이용한 고체발효 추출물로부터 항아토피활성의 분석을, 손²²⁾은 버섯균사체로 발효시킨 복령과 후박의 항산화 및 항암효과를, 최²³⁾는 구중구포 발효 한약 혼합물이 피부 노화에 미치는 영향을, 정²⁴⁾은 황련 발효추출물의 항균효과 및 항산화활성에 관한 연구를, 박²⁵⁾은 白芷와 醱酵白芷의 성분 및 항염 활성을 비교 보고한 바가 있다.

본 시료의 기본방인 배독환(排毒丸)은 기혈(氣血)의 정체에 의해 나타나는 아토피를 비롯한 다양한 피부질환에 활용되는 임상 활용방으로, 구성 약물의 대부분이 이미 항산화, 항염 효과 등 본 실험과 관련된 다양한 실험 보고²⁶⁻³⁰⁾가 있다. 특히 류³¹⁾는 유산균을 이용하여 감초를 발효한 경우 자동산화의 진행속도를 늦추어준다는 연구 결과를 보고하였고, 박²⁵⁾은 백지 발효가 항염증 활성이 우수하였음을 검증하여 발효를 통한 효능제고 가능성을 제시하였다.

이에 저자는 보다 유의성있는 한방 아토피피부염 치료제 개발을 위한 일환으로 현재 임상에서 활용되고 있는 배독환을 이엠선육균으로 발효시켜 아토피피부병 동물 모델인 NC/Nga mouse를 이용하여 아토피피부염의 개선 효과를 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물인 수컷 6주령의 NC/Nga Mice는 중앙실험동물에서 공급 받아 실험 당일까지 고형사료(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 排毒丸醱酵方 (Baedokhwanbalhyobang, 이하 BDHBH)의 구성 약재들은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량 (1첩)은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. The Prescription of BDHBH (1첩)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
烏藥	Linderae Radix	8
葛根	Puerariae Radix	8
麻黃	Ephedrae Herba	6
桂枝	Cinnamomi Ramulus	6
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4
白芷	Angelicae Dahuricae Radix	4
蘇葉	Perilla Herba	4
乾薑	Zingiberis Rhizoma	4
桃仁	Persicae Semen	4
紅花	Carthami Flos	4
甘草	Glycyrrhizae Radix	2
大棗	Jujubae Fructus	5
Total mount		59

3) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 collagenase, RNAzolB, RBC lysis solution, acetone, olive oil, ethanol, Diethyl pyrocarbonate (DEPC), trypsin-EDTA, acetic acid, tris-base, tris-HCl, paraformaldehyde, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), Dexamethasone 등은 (Sigma, USA), TNCB(2,4,6-trinitrochlorobenzene)는 (동아제약, Korea), anti-CD4-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-CD8-PE, anti-B220-PE,

anti-Gr-1-PE, anti-CD3-PE, anti-CD45-PE, IL-5, IL-13 ELISA kit (Biosource, USA) 등의 제품을 구입하여 사용하였으며, 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), spectrophotometer, CMB-20A, ICPE-9000 (Shimadzu Co., Japan), 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 (Molecular Devices, Co., USA), fluorescence contrast microscope (Nikon, Japan) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

BDHBH 반제 분량을 약재 500 g에 물 5 l를 기준으로 하여 70℃에서 10시간 동안 약재를 불린 다음, 발효수 (이엠선옥균) 200 ml를 넣고 72시간 동안 40℃에서 발효한 후 1시간 30분 동안 끓여서 불활성화 시킨다. 추출액을 필터 한 후 여과하여, 증류장치로 농축하였다. 농축액을 동결건조기를 이용하여 완전 건조한 다음 얻어진 분말 56.3 g을 냉동 보관 (-80℃) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 피부염 유도 및 시료 처리

7 주령이 된 NC/Nga 생쥐의 등 부위를 깨끗하

게 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 (이하, dexa) 투여군은 0.5 mg/kg 농도로, 실험군인 BDHBH 투여군은 6.3 mg/25 g/day 농도로 6주간 경구투여 하였다.

3) 관능 평가

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

4) 면역세포 분리

실험 종료 후 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 조

정한 후 4°C에서 면역형광염색을 실시하였다. 각각에 anti-CD4-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-CD8-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 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.

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

① NC/Nga 생쥐의 배부 피부조직에서 RNA 분리

NC/Nga 생쥐의 배부 피부조직을 적출하여 각각에 RNazolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 homogenizer로 분쇄하였다. 이 조직분쇄 혼합 부유액에 chloroform(CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 액에 chloroform 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 10p간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80 μ l에 tOH로 수세하고 3 분간

vacuumopump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 아 PC를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화한 킨 후 firstRNA는 nd cDNA합성에 사용하였다.

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

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

Table 2. Primer Sequence

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 pre-denaturation은 2 min at 50°C, 10 min 94°C, 40 cycles을 0.15 min at 95°C, 1 min at 60°C에서 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

8) 조직 검사

실험 종료 후에, 배부의 피부를 떼어내어 10%

formaldehyde에서 24시간 고정하였다. 고정이 끝난 조직을 파라핀으로 포매하였고, 5 μ m 부분의 두께로 block을 만들었다. 이를 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils/eosinophil 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline/eosin (H&E) 염색과 비만세포 (mast cells)를 염색하는 toluidine blue 염색을 실시하여 조직 내 비만세포의 침윤을 관찰하였다.

3. 통계처리

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

III. 결 과

1. NC/Nga 생쥐의 피부염 지수에 미치는 영향
7주령의 NC/Nga 생쥐를 제모한 후 TNCB를 4주간 도포하여 피부염을 유발시키면서 실험군인 BDHBH를 6주간 구강 투여하였다. Fig. 1 은 10주, 12주, 14주의 피부염 유발 정도와 개선 정도를 나타내주는 사진으로, BDHBH 투여군이 대조군에 비해서 피부염 유발정도가 현저하게 떨어졌음을 확인할 수 있다 (Fig. 1). 피부염 지수는 아토피 피부염을 유발한 후 최종 6주 후에 피부염의 심화 정도를 관능적 방법에 의하여 중 한 결과로, 대조군은 7.67 \pm 1.21, Dexa 투여군은 3.33 \pm 1.03, BDHBH 투여군은 2.83 \pm 0.98 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.

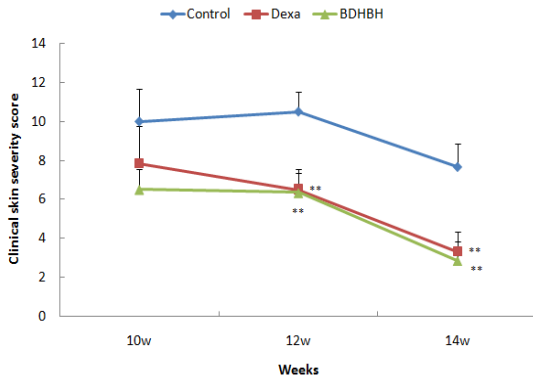
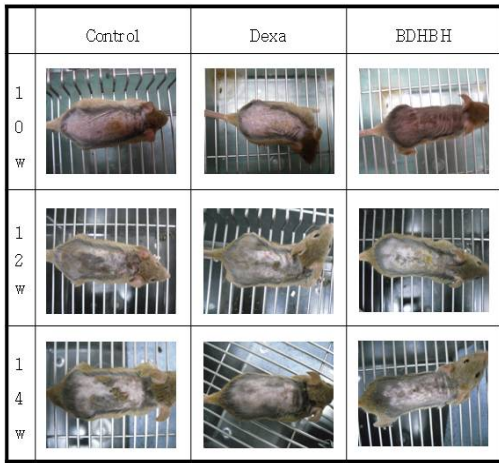


Fig. 2. Effects of BDHBH on clinical skin features and severity in TNCB-induced NC/Nga mice. Clinical skin index of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe) for each of five signs and symptoms (Erythema, Pruritus & Dry skin, 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 14.19 ± 0.42 (%)로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은 9.14 ± 0.74 (%), BDHBH 투여군은 10.40 ± 1.00 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (***) 감소하였다(Fig. 3).

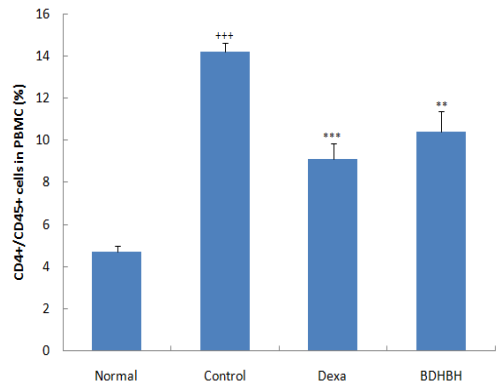


Fig. 3. Effect of BDHBH on CD4+/CD45+ cell rate of PBMC in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of BDHBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-CD4 and anti-CD45 and positively stained cells were analyzed 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).

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 나타내었고, Dexa 투여군은 25.20 ± 1.40 (%)

BDHBH 투여군은 24.70 ± 2.20 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.01, *p<0.05) 감소하였다 (Fig. 4).

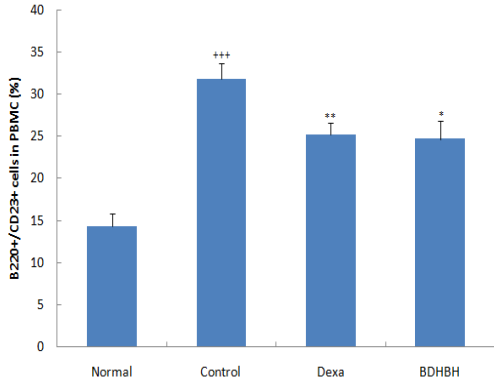


Fig. 4. Effect of BDHBH on B220+/CD23+ cell rate of PBMC in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of BDHBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-B220 and anti-CD23 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean ± 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<0.05).

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 (%), BDHBH 투여군은 10.75 ± 0.75 (%)로 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.001) 감소하였다 (Fig. 5).

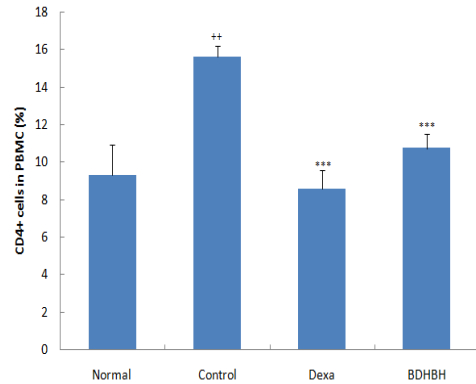


Fig. 5. Effect of BDHBH on CD4+ cell rate of PBMC in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of BDHBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-CD4 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. The results represent the mean ± 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, ***p<0.001).

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 나타내었다. Dexa 투여군은 6.80 ± 0.70 (%), BDHBH 투여군은 9.20 ± 0.70 (%)로 나타나, Dexa 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 (*p<0.05) 감소하였다 (Fig. 6).

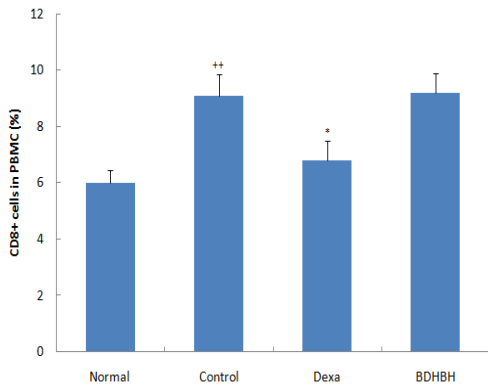


Fig. 6. Effect of BDHBH on CD8+ cell rate of PBMC in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of BDHBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-CD8 and positively stained cells were analyzed by flow cytometry. 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 ($*p<0.05$).

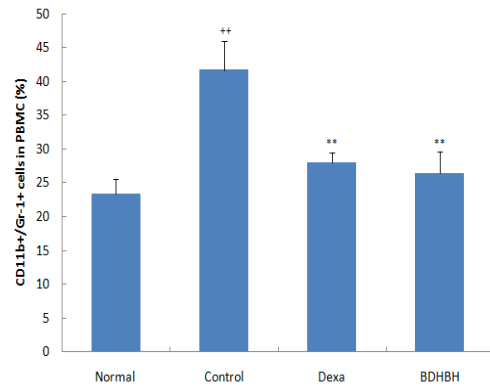


Fig. 7. Effect of BDHBH on CD11b+/Gr-1+ cell rate of PBMC in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of BDHBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from PBMC stained with anti-CD11b and anti-Gr-1 and positively stained cells were 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 ($**p<0.01$).

5) 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 (%), BDHBH 투여군은 26.45 ± 3.25 (%)로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($**p<0.01$) 감소하였다 (Fig. 7).

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 ($+++p<0.001$) 증가를 나타내었고, Dexa 투여군은 35.55 ± 5.15 (%), BDHBH 투여군은 29.70 ± 9.10 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($***p<0.001$, $**p<0.01$) 감소하였다 (Fig. 8).

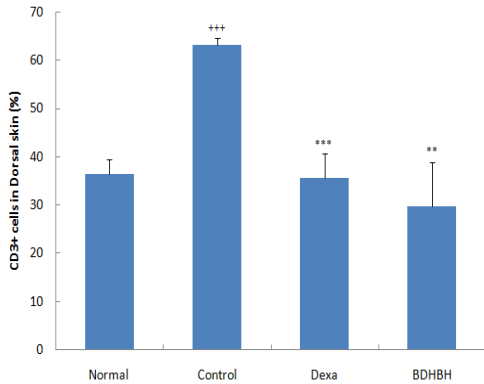


Fig. 8. Effect of BDHBH on CD3+ cell rate of Dorsal skin in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of BDHBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from Dorsal skin stained with anti-CD3 and positively stained cells were analyzed 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<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (***p<0.001, **p<0.01).

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 나타내었고, Dexa 투여군은 23.75 ± 1.65 (%), BDHBH 투여군은 24.00 ± 3.50 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (***p<0.001, **p<0.01) 감소하였다 (Fig. 9).

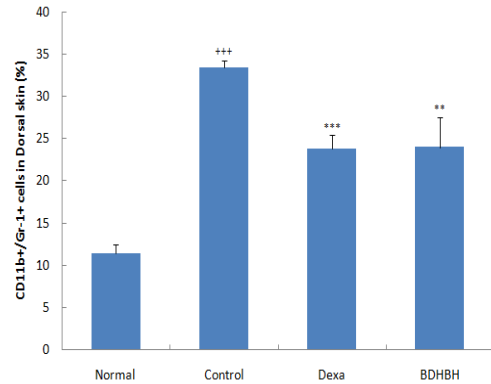


Fig. 9. Effect of BDHBH on CD11b+/Gr-1+ cell rate of Dorsal skin in TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of BDHBH for 6 weeks. At the end of the experiment, the cells from Dorsal skin stained with anti-CD11b and anti-Gr-1 and positively stained 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<0.001, **p<0.01).

4. 혈청 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-5 생성량에 미치는 영향

정상군은 54.0 ± 8.3 (pg/ml), 대조군은 168.3 ± 6.0 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 138.7 ± 14.4 (pg/ml), BDHBH 투여군은 136.7 ± 1.3 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 (***p<0.001) 감소하였다 (Fig. 10).

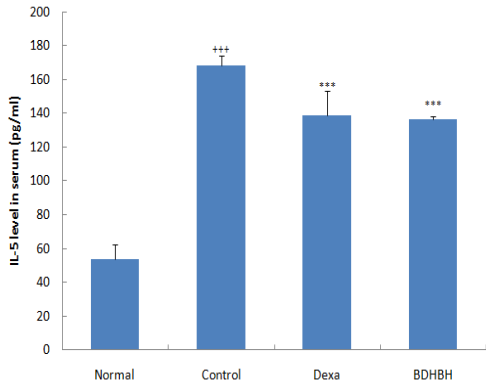


Fig. 10. Effect of BDHBH on the level of IL-5 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IL-5 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (***p<0.001).

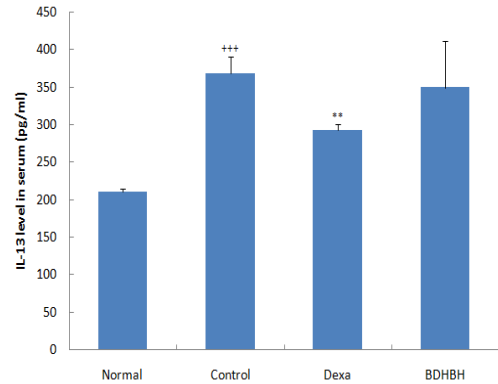


Fig. 11. Effect of BDHBH on the level of IL-13 in the serum of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. The levels of IL-13 were determined using a commercially available ELISA kit. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (**p<0.01).

2) IL-13 생성량에 미치는 영향

정상군은 210.3 \pm 5.0 (pg/ml), 대조군은 368.0 \pm 22.2 (pg/ml)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타내었다. Dexa 투여군은 292.6 \pm 8.6 (pg/ml), BDHBH 투여군은 349.4 \pm 61.8 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 Dexa 투여군에서 유의성 있게 (**p<0.01) 감소하였다 (Fig. 11).

5. 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, BDHBH 투여군은 0.765 \pm 0.050로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 (**p<0.01) 감소하였다 (Fig. 12).

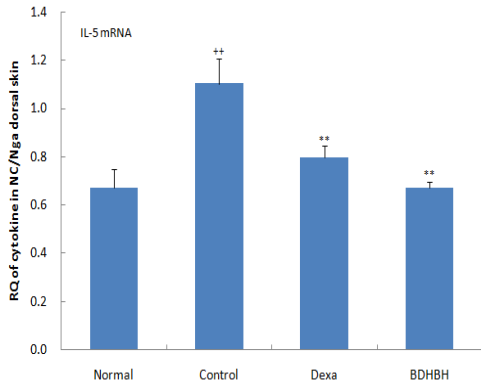


Fig. 12. Effect of BDHBH Extract on the level of IL-5 mRNA in the dorsal skin of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Skin was obtained by biopsy and used for preparing total RNA. Isolated RNAs were analyzed by Real Time-PCR using gene specific oligomers. The results represent the mean \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 ($**p<0.01$).

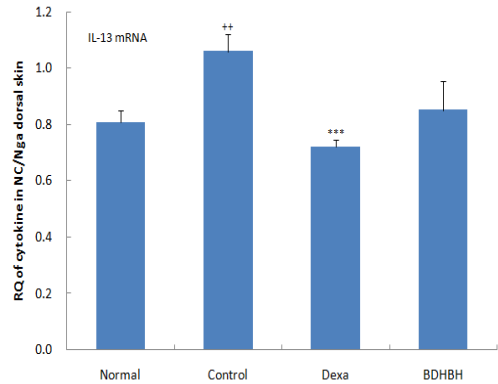


Fig. 13. Effect of BDHBH Extract on the level of IL-13 mRNA in the dorsal skin of TNCB-induced atopic dermatitis model of NC/Nga mice. Skin was obtained by biopsy and used for preparing total RNA. Isolated RNAs were analyzed by Real Time-PCR using gene specific oligomers. The results represent the mean \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 ($***p<0.001$).

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. Dexa 투여군은 0.721 ± 0.027 , BDHBH 투여군은 0.765 ± 0.050 으로 나타나, Dexa 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 ($***p<0.001$) 감소하였다 (Fig. 13).

6. 조직 변화에 미치는 영향

1) Hematoxylin and eosin 염색 변화

BDHBH 투여가 피부 조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험 종료 후 배부의 피부 일부를 채취하여 H&E 염색을 실시하였다. H&E 염색을 한 대조군의 배부 피부 조직은 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, 백혈구의 침윤도 관찰된 반면 (Fig. 14B), BDHBH 투여군은 epidermis와 dermis의 두께 및 백혈구의 침윤이 상대적으로 감소하였다 (Fig. 14D).

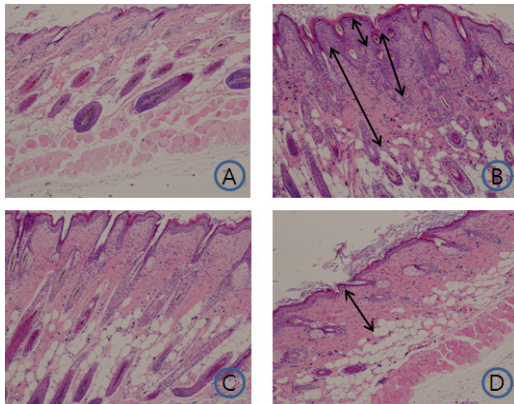


Fig. 14. Histologic examination of dorsal skin lesion in TNCCB-induced NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of BDHBH for 6 weeks. Dorsal skin biopsies was stained with hematoxylin and eosin (H&E) (A; Normal, B; Control, C; Dexa, D; BDHBH) for examining inflammatory cells. The stained tissues were observed by bright microscopy (Nikon, Japan, original magnification, x100).

2) Toluidine blue 염색 변화

BDHBH 투여가 피부 조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험 종료 후 배부의 피부 일부를 채취하여 toluidine blue 염색을 실시하였다. Toluidine blue 염색을 한 대조군의 dermis 주변에 비만세포가 많이 침윤된 반면 (Fig. 15B), BDHBH 투여군은 대조군에 비하여 비만세포의 침윤이 감소되었다 (Fig. 15D).

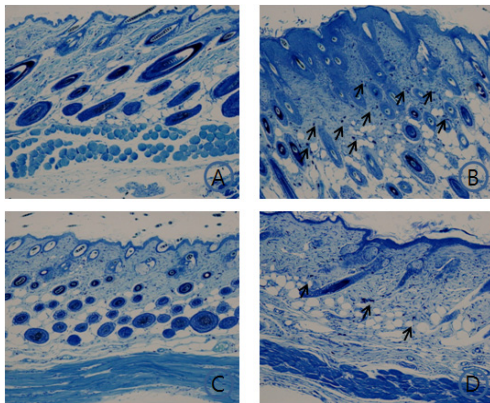


Fig. 15. Histologic examination of dorsal skin lesion in TNCCB-induced NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the treatment of BDHBH for 6 weeks. Dorsal skin biopsies was stained with toluidine blue (A; Normal, B; Control, C; Dexa, D; BDHBH) for examining mast cells. The stained tissues were observed by bright microscopy (Nikon, Japan, original magnification, x100).

IV. 고찰

아토피피부염은 일반적으로 유소아기에 발생 빈도가 높은 만성 염증성 피부 질환으로 정확한 원인은 밝혀지지 않는으나 크게 유전적 요소, 대기오염이나 주거환경의 변화에 따르는 환경적 요소 및 면역학적 기능 이상으로 알려져 있다.

생체 내 면역반응은 항원자극을 받은 B-cell 이 항체를 생성하고 생성된 항체가 항원과 특이 반응을 하는 항체매개면역반응과 항원감염세포와 특이반응을 한 T-cell이 생성한 cytokine이 대식세포, 자연세포독세포 등을 활성화하여 표적 세포를 파괴하는 세포성매개면역반응으로 나눌 수 있다³²⁾.

보조 T-cell (helper T cell : Th)은 세포성 면역반응에 관여하는 항원 특이적 세포로 특정 항원을 인식하여 효과세포로의 증식 유도 및 대식세포나 다른 효과세포의 기능적 활성화를 증가시키며, 표면에 CD4+ 를 가지는 당단백(분자량 62KD)으로 생성되는 cytokine의 종류에 따라 Th1과 Th2로 분류되고 있다³²⁾. Th2 세포들은 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 cytokine을 분비하며, 이 중 IL-4와 IL-13은 B세포에서 IgE를 생산하도록 유도하며 IL-5는 eosinophil을 활성화시켜 지속적인 염증을 일으킨다³³⁻³⁵⁾. 또 IL-6은 B-cell 분화에 관여하고, IL-10은 Th1이나 탐식세포로부터 IFN- γ 의 생산을 억제시킨다^{32,33)}. 한편 Th1 세포들은 IFN- γ , tumor necrosis factor(TNF)- α , lymphotoxin 등을 분비하여 세균감염에 방어적 역할을 담당하는데³⁶⁾,

일반적으로 아토피피부염의 면역학적 연구에 따르면 T 림프구의 활성화, IgE 증가와 Th1/Th2의 불균형에 의한 사이토카인 체계의 이상이 특징적으로 나타난다³⁷⁻⁴²⁾.

아토피피부염의 주 증상은 홍반, 부종, 심한 소양증, 삼출, 부스럼 딱지와 인설 등이며⁸⁾, 초기에는 소양증이 특징적으로 나타난다⁹⁾. 소양증은 피부를 자주 긁게 하고 이로 인한 이차감염이나 피부 손상 등을 유발시킴과 동시에 사회 심리적 문제 등을 동반하여 특히 아동기에는 성장발달 및 삶의 질에 영향을 미치게 된다¹⁰⁻¹²⁾.

급성기의 증상은 표피 내에 수포를 형성하기 쉽고, 면역학적으로는 CD4+ T cell이 Th2로 전환되어, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13의 양이 많은 반면 IFN- γ 는 상대적으로 적게 나타나며, 만성기에는 인설과 피부의 비후가 나타나며, IL-4, IL-5, IL-12, IFN- γ , GM-CSF, Chemokine (macrophage infiltration protein-1a, IL-8, eotaxin) 등이 주 cytokine으로 작용하여 Th2 cytokine의 성향이 약해지면서 Th1과 Th2형 cytokine이 공존하게 된다^{33,43,44)}.

아토피피부염 치료에 사용되는 국소 스테로이드제는 피부 위축이나 모세혈관 확장, 스테로이드성 여드름, 다모증 등의 피부 부작용을 일으킬 수 있으며^{45,46)}, 국소 calcineurin 억제제는 일시적 피부의 작열감과 자극이 보고되었다^{47,48)}. 감마 인터페론 주사의 경우 초기에 발열, 몸살, 두통 증상을 보이며, 경구 스테로이드제는 사용 시 극적인 호전을 보이거나 중단할 경우 심한 반동 발적(rebound flaring)을 유발할 수 있다¹⁵⁾. 또한 아토피피부염에서 치료 효과가 우수한 약으로 알려진 cyclosporin은 고혈압, 신독성의 부작용이 있으며, 광화학요법은 증상이 심한 환자에게 사용할 수 있으나, 고열과 다습으로 인해 땀이나 소양증을 유발하거나 피부암의 위험을 높일 수가 있어 효과적이고 안전한 천연물 치료제에 대한 요구가 증가하고 있다^{15,49)}.

최근 천연물 치료제 개발의 일환으로 발효한 약에 관한 연구 및 임상에서의 활용이 증가되고 있는데¹⁹⁻²⁵⁾, 이는 장내 미생물의 분해과정 없이

도 약리성분을 흡수 가능하게 한다. 발효 과정 중 한약재가 저분자 구조로 분해되어 체내흡수율이 높아 20배 이상 고농축 된 상태에서도 소화가 용이하며, 농약이나 중금속 등 각종 유해 물질을 분해 처리하는 작용이 있어 안전성면에서도 장점이 있다. 특히 아토피피부염 이환율이 높은 소아들에게 한약의 쓴맛이 감소되고 색도 연하여 복용이 편한 장점을 가지고 있다^{19,20)}.

본 시료인 배독환발효방(排毒丸醱酵方-BDHBH)은 아토피의 발생이 피부에 공급되는 기혈(氣血)의 정체에 의해 나타나는 것을 치료하는 임상 활용방으로 烏藥, 葛根, 麻黃, 桂枝, 當歸, 白芷, 蘇葉, 乾薑, 桃仁, 紅花, 甘草, 大棗로 구성되어 있으며, 이미 구성 약물 대부분에서 본 실험과 관련된 항산화, 항염 효과에 대한 다양한 실험적 보고가 있다. 김⁵⁰⁾은 오약의 항염증 활성을, 김 등^{26,51,52)}은 같은 추출물의 항산화에 미치는 영향을, 김 등^{27,53)}은 마황의 면역작용에 미치는 효과 및 마황이 섞인 10종 처방의 NO 억제 효과를 보고한 바가 있고, 박 등^{28,54)}은 계지의 항염 및 항산화 효과를, 박 등^{29,55)}은 당귀 물 추출물의 면역증강 효과 및 항산화 효능을, 이 등^{23,30,56)}은 백지의 항산화 및 항염증 효능을, 정 등⁵⁷⁾은 소엽의 항산화 활성을, 윤⁵⁸⁾은 도인의 항산화 효능을, 김⁵⁹⁾ 등은 홍화의 항산화 활성 등을 보고한 바 있다. 특히 류³¹⁾는 유산균을 이용하여 감초를 발효한 경우 자동산화의 진행속도를 늦추어준다는 연구 결과를 보고하였고, 박²⁵⁾은 백지를 발효해서 사용했을 때 항염증 활성이 우수하였음을 보고한 바가 있다.

아토피피부염과 관련된 연구와 보고에 주로 이용되는 NC/Nga mouse는 spontaneously developed dermatitis 모델로 면역병리학적 이상이 사람에게 발생하는 병변과 유사하나 발병 정도와 발병시기가 다양하다는 단점이 있기에⁶⁰⁻⁶²⁾, 본 실험에서는 2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB)를 반복 도포하여 아토피피부염을 유발하였다.

BDHBH 투여 6주 후에 피부염 심화정도를 판능적 방법에 의해 측정하였는데, 대조군에 비해

63.1% 감소함으로써 유의성 있는 아토피피부염 개선 효과가 나타났다 (Fig. 1, 2).

림프구는 항원에 대한 특이 수용기를 만드는 유일한 세포로서 적응면역의 불가결한 매개체로 흔히 표면 단백질들로서 구분된다⁶³⁾. 이 단백질들의 표준 명명법은 'CD (cluster of differentiation) 숫자' 명칭인데, 이 체계는 림프구, APCs, 면역계의 많은 다른 유형의 세포 상에 발현된 세포 표면 분자를 확인하는 방법을 제공한다⁶⁴⁾. 예를 들면, 대부분의 보조 T 세포는 CD4라는 표면 단백질을 발현하는데 CD40리간드와 같은 표면 분자를 발현하며 큰 포식세포 및 B림프구와 상호작용하여 이들을 활성화시키는 사이토카인을 분비하며, 세포독성 T 세포 (CTLs)는 CD8이라 불리는 다른 표면 단백질을 발현하는데 분화된 CTLs는 바이러스-감염세포 및 종양세포를 죽이는 단백질이 포함된 세포질 내 과립을 함유한다⁶⁴⁾.

CD45는 백혈구 공통항원으로 알려진 단백질로 T림프구, B림프구, 대식세포, 과립구, 홍선세포 등 면역관련세포에 광범위하게 존재하며^{65,66)}, 특히 림프구에서 발현이 높다. 또 세포내 영역의 일부가 protein tyrosine phosphatase (PTP)를 포함함으로써 T 세포 수용체 (T cell receptor; TCR)를 통한 T 세포의 활성화 및 초기 신호전달에 매우 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다^{67,68)}.

말초혈액단핵세포구 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)에서 살펴본 CD4+/CD45+ 세포 비율은 BDHBH 투여군에서 대조군에 비해 26.7% 유의성 있게 감소한 것으로 나타나 (Fig. 3) CD4+ 세포 비율이 대조군에 비해 31.1% 유의성 있게 감소시킨 (Fig. 5) 결과와 부합되었다. 반면에 세포 독성 T 세포에서는 대조군과 큰 차이가 없었으며 (Fig. 6), B220+/CD23+ 세포비율에서 대조군에 비해 BDHBH 투여군에서 22.4% 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 4). CD23은 비만세포, 호중구, 호산구 등의 표면 분자이며⁶⁹⁾, B220+/CD23+는 성숙한 B 세포를 나타내는 것으로^{70,71)} B 세

포는 항원에 의하여 형질세포로 분화하여 IgG, IgE 등의 항체를 생산하여 분비한다^{72,73)}. 또 CD23 표식자의 증가가 아토피피부염 환자의 단핵구 표면에 증가되었다는 보고³³⁾ 등을 미루어 볼 때 BDHBH 투여군의 B220+/CD23+ 의 감소 결과는 아토피피부염 증상이 개선되었음을 입증하고 있다.

CD11b+/Gr-1+는 과립구 특이 세포 표면 단백질로, 호염기구는 탈과립을 통해 히스타민 등의 알레르기 인자들을 유리시켜 IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인의 생성에 관여하여 피부염증을 악화시키는 요인으로 작용한다^{74,75)}.

PBMC와 Dorsal skin에서 BDHBH 투여군의 CD11b+/Gr-1+의 세포비율은 대조군에 비해 각각 36.6%, 28.0% 유의성 있게 감소함으로써 (Fig. 7, 9) 본 시료가 과립구의 염증 국소 유입을 억제하는데 유의적임을 시사해주고 있으며, 이와 같은 결과는 고 등⁷⁶⁻⁷⁸⁾의 연구결과와도 일치하는 것으로 확인되었다.

CD3는 5가지 폴리펩타이드 γ , δ , ϵ , ζ , η 복합체이며, TCR이 T세포 표면에 표현되는데 필요한 분자로 T 세포의 항원 인식에서 세포내로 활성화 신호를 전달하는 기능을 가지는데^{79,80)}, Dorsal skin에서 CD3+의 세포비율은 DBHBH 투여군에서 대조군에 비해 52.9% 유의성 있게 감소하여 (Fig. 8) T cell의 세포내 활성화 신호를 억제한 것으로 사료된다.

T세포는 Th1과 Th2의 길항작용에 의해 균형을 맞추어 가며 면역조절을 하게 되는데^{81,82)}, 특히 알레르겐에 반응하는 T세포는 일반적으로 Th2 세포로 IL-4, IL-13 등을 분비하여 B 세포의 IgE 생산을 유도하고, IL-5를 분비하여 호산구 발달과 활성화 등에 관여하여 만성 알레르기 반응을 나타낸다^{83,84)}.

BDHBH 투여군은 혈청 내 IL-5, IL-13 생성량을 각각 18.8%, 5.1% 감소시켰으며 (Fig. 10, 11), Dorsal skin의 사이토카인 mRNA 발현에 있어서도 BDHBH 투여군에서 IL-5 mRNA, IL-13 mRNA 발현이 대조군에 비해 각각 30.6%, 27.8% 감소하였다 (Fig. 12, 13). 특히

IL-5 mRNA 발현에서 유의성 있는 결과는 혈청에서 확인한 IL-5 생산량의 유의성 있는 감소 결과와도 일치되는 결과로, 본 시료가 호산구 분화 증식 억제에 효과적임을 시사하였다.

최종 결과인 H&E 염색과 toluidine 염색을 통한 조직변화에서는 대조군의 피부조직이 부종으로 확장되면서 비만세포가 많이 침윤된 반면 (Fig. 14B, 15B), BDHBH 투여군에서는 대조군에 비해 표피, 진피의 두께와 비만세포의 침윤이 감소되었다 (Fig. 14D, 15D).

이상의 결과로 보아 BDHBH는 NC/Nga 생쥐를 이용한 동물실험에서 Th2 세포 활성을 억제하여 면역반응을 조절하는 효과를 확인할 수 있었으며, 특히 과립구 및 호산구 감소로 인한 아토피피부염 개선효과가 특징적으로 나타났다.

V. 결론

한약을 발효할 경우 체내 흡수율이 높고 보다 많은 약효성분이 추출되면서 쓴맛이 감소되는 장점이 있어 최근 발효한약에 대한 연구 및 임상에서의 활용이 증가되고 있다. 본 실험에서는 현재 임상에서 다양한 피부 질환에 활용되고 있는 배독환을 발효시켜 이를 시료(BDHBH)로 NC/Nga 동물 병태 모델에서 임상지수, 면역세포 변화, 혈청 사이토카인 생성량, 피부조직에서의 mRNA 발현 및 조직학적 변화 등을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BDHBH는 피부염 임상 지수에서 대조군에 비하여 63.1%로 유의성 있게 감소시켰고,
2. BDHBH는 대조군에 비하여 PBMC 내 CD4+/CD45+, CD4+, B220+/CD23+, CD11b+/Gr-1+는 각각 26.7%, 31.1%, 22.4%, 36.6%로 유의성 있게 감소시켰다.
3. BDHBH는 대조군에 비하여 dorsal skin에서 CD3+, CD11b+/Gr-1+ 면역세포율은 각각 52.9%, 28.0%로 유의성 있게 감소시켰다.
4. BDHBH는 대조군에 비하여 혈청 내 IL-5, IL-13 생성량을 18.8%, 5.1% 감소시켰으며, dorsal skin의 IL-5, IL-13 mRNA 발현량도

30.6%, 27.8% 감소시켰다.

5. BDHBH는 조직 검사에서 대조군에 비하여 표피, 진피의 두께와 비만세포의 침윤 등이 감소되어 육안적, 면역학적, 조직학적 측면 모두에서 아토피피부염 개선효과가 검증되었다.

이상의 결과로 배독환발효방의 항아토피피부염 효능이 객관적으로 규명되어 임상에서 발효한약으로 폭넓은 활용이 기대되며, 향 후 구성 약물의 개별 발효 효능에 대한 심도 있는 연구와 원방과의 비교 관찰이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

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

참고문헌

1. 신삼식 외. 아토피 피부염 환자에서 임상증상 및 가족력과 면역학적 검사의 상관관계. 대한 피부과학회지, 1999;37(10):1399-1406.
2. 김덕곤 외. 동의 소아과학. 정담, 2002:660-664.
3. Sampson, H.A. : Atopic dermatitis, Ann Allergy, 1992;69(6):469-479.
4. Daniels, et al. : The epidemiology of atopic dermatitis, Hosp Med, 2002;63(11):649-652.
5. Shiohara T., et al. : Animal models for Atopic dermatitis: Are they relevant to human disease? Journal of Dermatological Science, 2004;36:1-9.
6. Hoare C., et al. : Systematic review of treatment for atopic eczema, Health Technol Assess, 2000;4(37):151-191.
7. Yamamoto M., et al. : A novel atopic dermatitis model induced by topical application with dermatophagoides

- farinae extract in NC/Nga mice, *Allergol Intern*, 2007;56(2):139-148.
8. 홍창의. 소아과학. 대한교과서(주), 1994;1066-1067.
 9. 박윤기 외. 흔히 보는 피부질환 진단과 치료. 고려의학, 1993;6-9.
 10. Howlett, S. : Emotional dysfunction, child-family relationships and childhood atopic dermatitis, *Br J Dermatol*, 1999;140(38):381-384.
 11. Lapidus, C. S., et al. : Social impact of atopic dermatitis. *Med Health*, 2001;84(9):294-295.
 12. Lewis-Jones, M. S., et al. : The children's dermatology life quality index : initial validation and practical use, *Br J Dermatol*, 1995;132(6):942-949.
 13. 이윤미 외. 학령전기와 학령기 아동에서의 아토피 피부염 유병률과 위험인자. *아동간호학회지*, 2008;14(3):285-294.
 14. Barnetson, R. S. C., et al. : Childhood atopic eczema, *BMJ*, 324(7350):1376-1379.
 15. 이지현 외. 아토피피부염학회 보고서: 한국 아토피피부염의 치료지침. *대한피부과학회지*, 2006;44(8):907-913.
 16. Brehler R., et al. : Recent developments in the treatment of atopic eczema, *J Am Acad Dermatol*, 1997;36:983-994.
 17. Hanifin JM. : Atopic dermatitis, *J Am Acad Dermatol*, 1982;6:1-13.
 18. Sampson HA. : Atopic dermatitis, *Ann Allergy*, 1992;69:469-481.
 19. 김상현. 한약의 효율성 개선을 위한 발효 한약 유용성에 관한 연구. *경기대학교대학원 의학대학원*, 2008.
 20. 김용미. 발효한약의 연구동향 연구. *경원대학교대학원*, 2009.
 21. 신용규 외. 장수상황버섯과 마황을 이용한 고체 발효 추출물로부터 항아토피 활성의 분석. *한국식품저장유통학회*, 2010;17(2):297-300.
 22. 손미예. 버섯균사체로 발효시킨 복령과 후박의 항산화 및 항암효과. *식품산업과 영양*, 2007;12(2):51-57.
 23. 최재환 외. 구증구포 발효 한약 혼합물이 피부 노화에 미치는 영향. *대한본초학회지*, 2009;24(4):101-106.
 24. 정윤희. 황련 발효추출물의 항균효과 및 항산화활성에 관한 연구. *중부대학교대학원*, 2010.
 25. 박경호. 白芷와 醱酵白芷의 성분 및 항염 활성 비교. *경희대학교대학원*, 2007.
 26. 김시나 외. 갈근 추출물에 의한 염증성 Cytokine 생성 억제 및 Prostaglandin E2 활성 저해에 관한 연구. *한국식품영양과학회지*, 2006;35(1):28-34.
 27. 김태희 외. 마황의 면역작용에 미치는 효과. *생약학회지*, 1991;22(2):183-191.
 28. 박희준 외. 계지의 항염 효과에 관한 연구. *대한한의학회지*, 2005;26(2):140-151.
 29. 박혜란 외. 당귀 물추출물의 면역증강 효과. *생명자원과 산업*, 1998;3:80-88.
 30. 이양숙 외. 백지의 항산화성 및 생리기능. *한국식품영양과학회지*, 2007;36(1):20-26.
 31. 류희중. 고정화 유산균에 의한 감초추출물의 유산발효 특성. *동국대학교대학원*, 2006.
 32. 서철. 임상면역학. *고려의학*, 2009;121-132.
 33. 김정원. 알레르기 및 면역학적 관점에서의 아토피피부염. *대한피부과학회지*, 2003;41(6):687-689.
 34. Soumelis V., et al. : Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP, *Nat Immunol*, 2002;3:673-680.
 35. Hamid Q., et al. : In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis, *J Allergy Clin Immunol*, 1996;98:225-231.
 36. Mosmann T., et al. : Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional

- properties, *Ann Rev Immunol*, 1989;7:145-173.
37. Wollenberg A., et al. : Atopic dermatitis: pathogenetic mechanisms, *Clin Exp Dermatol*, 2000;25:530-534.
 38. Leung, D.Y.M. : Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention, *J. Allergy Clin. immunol*, 2000;105:860-876.
 39. Hill, P.B. et al. : The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens, *Vet Immunol Immunopathol*, 2001;81(3-4):169-186.
 40. Valenta, R., et al. : Autoallergy: a pathogenetic factor in atopic dermatitis? *J Allergy Clin Immunol*, 2000;105(3):432-437.
 41. Mosmann T., et al. : Two types of mouse helper T-cell clone: Implications for immune regulation, *Immunol Today*, 1987;8:223-227.
 42. Romagnani S. : Immunologic influences on allergy and the Th1/Th2 balance, *J Allergy Clin Immunol*, 2004;113:395-400.
 43. 조기여. 피부과학. 성화, 2001;161-163.
 44. 강병수. 한방임상 알레르기. 성보사, 1988;196-201.
 45. Hill CJ., et al. : Adverse effects from topical steroids, *Cutis*, 1978;21:624-628.
 46. 이인규. 스테로이드 치료시 문제점. 대한내분비학회지, 1993;8(2):45-54.
 47. Reitamo S., et al. : Efficacy and safety of tacrolimus ointment compared with that of hydrocortisone acetate ointment in children with atopic dermatitis, *J Allergy Clin Immunol*, 2002;109:539-546.
 48. Reitamo S., et al. : Efficacy and safety of tacrolimus ointment compared with that of hydrocortisone butyrate ointment in adult patients with atopic dermatitis, *J Allergy Clin Immunol*, 2002;109:547-555.
 49. Cooper KD. : New therapeutic approaches in atopic dermatitis, *Clin Rev Allergy*, 1993;11:543-559.
 50. 김종수. 烏藥의 抗炎症 活性. 우석대학교 대학원, 2010.
 51. 은영준. 葛根 추출물이 항산화에 미치는 영향. 경원대학교대학원, 2007.
 52. 이옥희. 갈근 추출물이 흰쥐 혈액의 항산화계에 미치는 영향. 자연과학연구소논문지, 2004;9(1):73-79.
 53. 배주연. LPS로 활성화된 복강 대식세포에서 麻黃이 配伍된 10種 처방의 NO 억제 효과. 원광대학교대학원, 2009.
 54. 이태현. 계지, 과체, 백자인의 항산화, 항염증, 미백 및 주름 억제 효과. 대전대학교 대학원, 2008.
 55. 서영남. 당귀의 감별 및 항산화 효능. 조선대학교대학원, 2004.
 56. 김종학. 백지 에틸 아세테이트 추출물의 항염증 효능 및 그 작용 기전에 관한 연구. 원광대학교대학원, 2009.
 57. 정성제 외. 약용 식물 추출물의 항산화 활성 검색. 한국응용생명화학회지, 2004;47(1):135-140.
 58. 윤태호. 도인으로부터 항산화 물질의 생산과 특성. 배재대학교대학원, 2007.
 59. 김준한 외. 홍화씨 추출분말 함유 건강음료의 제조와 항산화성. 한국식품과학회지, 2002;34(4):617-624.
 60. Konji Matsushima, et al. : The NC/Nga mouse : a model for atopic dermatitis, *Molecular medicine today*, 2000;6:209-210.
 61. Shiohara T., et al. : Animal models for atopic dermatitis: are they relevant to human disease? *J. Dermatol. Sci.* 2004;36(1):1-9.
 62. Matsumoto M., et al. : IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation

- of Jauus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis, *J. Immunol.*, 1999;162(2):1056-1063.
63. Abul K., et al.. 최신면역학입문 3판. 이퍼블릭, 2009;pp.8-13.
64. Abul K., et al.. 세포분자면역학 6판. 이퍼블릭, 2008;47-51,54-61.
65. Wranke RA., et al. : Diagnosis of human lymphoma with monoclonal anti-leukocyte antibodies, *New Engl J Med*, 1983;309:1275-1281.
66. Kurtin PJ., et al. : Leukocyte common antigen recognized by a monoclonal antibody, *Proc Natl Acad Sci*, 1981;78:1791-1795.
67. 이경일. 백혈구에서 CD45 분자의 역할. 소아과, 1996;39(12):1652-1660.
68. 김정철 외. 한눈에 알 수 있는 면역학. 이퍼블릭, 2008;36-37.
69. Dorshkind K., et al. : Regulatory cells and cytokines involved in primary B lymphocyte production, *Adv. Exp. Med. Biol*, 1992;323:119-123.
70. Getahun, A., et al. : IgE enhances antibody and T cell responses in vivo via CD23+ B cells, *J Immunol*, 2005;175(3):1473-1482.
71. Li, Y.S., et al. : Identification of the earliest B lineaga stage in mouse bone marrow, *Immunity*, 1996;5(6):527-535.
72. Sancho D., et al. : CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation, *Trends Immunol*, 2005;26:136-140.
73. Dorshkind K., et al. : Regulatory cells and cytokines involved in primary B lymphocyte production, *Adv Exp Med Biol*, 1992;323:119-123.
74. Klemm, S., et al. : The Bcl10-Malt1 complex segregates Fc epsilon RI-mediated nuclear factor kappa B activation and cytokine production from mast cell degranulation, *J Exp Med*, 2006;203(2):337-347.
75. Cho, S.H., et al. : Protein kinase Cdelta functions downstream of Ca2+ mobilization in FcepsilonRI signaling to degranulation in mast cells, *J Allergy Clin Immunol*, 2004;114(5):1085-1092.
76. 高弘胤. 아토피피부염에 대한 苦參加味方과 清肌解毒散의 併用 投與 效果. 대전대학교대학원, 2010.
77. 方瓚國. 補陰祛風止痒湯이 아토피 피부염을 誘導한 NC/Nga 생쥐 모델에서의 免疫調節 作用. 대전대학교대학원, 2008.
78. 河如泰. 內外治 兼用法의 아토피 피부염 활용에 관한 실험적 연구. 대전대학교대학원, 2009.
79. Bonifacino JS., et al. : The T-cell antigen receptor: a complex signal-transducing molecule, *Princess Takamatsu Symp*, 1988;19:87-104.
80. 김세중 : 면역학, 고려의학, 1994;74-81.
81. Bos, J.D. : Atopiform dermatitis, *Br J Dermatol*, 2002;147(3):426-429.
82. Schmid-Grendelmeier, P., et al. : Epidemiology, clinical features, and immunology of the "intrinsic" (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis), *Allergy*, 2001;56(9):841-849.
83. Johansson, S.G., et al. : A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force, *Allergy*, 2001;56(9):813-824.
84. Folster-Holst, R., et al. : Low prevalence of the intrinsic form of atopic dermatitis among adult patients, *Allergy*, 2006;61(5):629-632.