

涼血除濕湯이 아토피 피부염 유발 NC/Nga mouse의 비장 및 DLN내 면역 관련 인자에 미치는 영향

박두병·한재경·김윤희*

Effect of Yanghyeuljeseuptang on immunological factors in spleen and draining lymph node(DLN) of atopic dermatitis induced NC/Nga mouse by dinitrochlorobenzene(DNCB)

Park Doo-Byoung, Han Jae Kyung, Kim Yun-hee
Dept. of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Yanhyeoljeseuptang(YHJST) is a traditional herbal medicine used for the treatment of dermatitis. The aim of this study was to confirm whether or not YHJST has a preventive effect on development of atopic dermatitis in dinitrochlorobenzene(DNCB)-applied Nc/Nga mouse. This study was undertaken to develop a reliable mouse model demonstrating similar immunologic phenomena as human atopic dermatitis characterized with predominance of type-2 immune response. NC/Nga mouse were sensitized with 200 μ l of 1% 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB) (acetone : olive oil = 3 : 1 mixture) and challenged twice or three times with 150 μ l of 0.2% DNCB in a week for the following 4 weeks. YHJST was administered orally to Nc/Nga mouse for 8 weeks, which led to the remarkable suppression on the development of dermatitis, as determined by various immune factors related to pathogenesis of atopic dermatitis in splenocytes and DLN cells.

In this study, YHJST selectively suppressed T ce11 (CD4+, CD3+/CD69+, CD4+/CD25+) activation, which may be essential for ratio of IL-4 versus INF- γ produced in the splenic T cell culture supernatants was approximately 3-fold higher in the mouse treated with DNCB than their control mouse respectively. Immunologic studies showed down-regulated that the capacity of spleen T cells to produce IL-4, but IFN- γ was up-regulated by means of oral intake of these YHJST.

These results strongly suggest that YHJST is a promising candidate for treatment of human atopic dermatitis.

Key words : DNCB, atopic dermatitis, NC/Nga mouse, 涼血除濕湯, splenocytes, DNL cells

I. 서 론

아토피피부염은 주로 유·소아기에 발병이 시작하는 만성 재발성 피부질환으로 정확한 병인은 알려지지 않으나 유전적, 환경적 그리고 면역학적 요인이 복잡하게 연관되어 발병하는 것으로

* 대전대학교 한의과대학 한방소아학교실
· 교신저자 : 김윤희 · E-mail : unia67@dju.ac.kr
· 채택일 : 2007년 12월 1일

추측되고 있다¹⁾. 유아시기에서부터 성인까지의 광범위한 연령층에 특징적인 모양 및 분포를 가지는데, 유·소아에서는 頭部와 伸展部의 습진양 병변을 보이고, 성인에서는 사지의 屈側部, 목의 양측의 苔癬化, 手部濕疹 등의 소견을 보인다²⁾. 아토피피부염 환자의 50~70%가 개인력이나 가족력을 가지고 있음이 보고되기도 하였다³⁾.

아토피피부염의 발생에 대하여 여러 가지 측면에서의 병리기전이 제시되고 있지만 특징적인 면역학적인 기전이 관여한다는 점에는 이견이 없는데, 주로 IgE 증가에 따른 면역학적 결핍과 T세포, 호산구, 비만세포 등 다양한 세포들에 의해 발병되는 것으로 알려져 있으며, 그 중에서도 Th2 세포가 발현하는 IL-4, IL-5, IL-13 등의 Th2 cytokine 발병 과정에 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고되고 있다^{4,5)}.

아토피 피부염의 한의학적 범주는 『素問·玉機眞藏論篇』⁶⁾에서 “浸淫”이라고 기록된 이후로, 한의학 문헌 중에 다양하게 나타나는데 정확히 일치하는 한의학적 병명은 없는 관계로 현재까지 乳癬, 嬰兒濕疹, 胎熱症, 胎癬, 浸淫瘡, 胎斂瘡, 奶癬, 濕疹, 四彎風 등으로 혼용되고 있다⁷⁾.

아토피피부염의 한의학적 발생원인은 주로 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고 淸熱, 涼血, 除濕, 祛風, 養血 등의 治法을 주로 사용하고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 涼血除濕湯은 淸熱, 涼血, 除濕의 효능을 지닌 약물로 구성된 經驗方으로 임상에서 아토피피부염에 우수한 효과를 발휘하고 있다.

이에 저자는 涼血除濕湯이 아토피 피부염 발진 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 DNCB로 유도된 NC/Nga atopic dermatitis model mouse (이하 NC/Nga mouse)를 이용한 in vitro 실험에서 비장의 무게, 그리고 비장과 Draining lymph node (DLN)에서 CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD3+/CD69+, CD4+/CD25+, CCR3+, CD49b+ 등의 발현 총 세포수를 측정하였다. 또한 비장세포를 anti-CD3/CD28로 자극한 배양 상층액에서 IL-4와 IFN- γ 의 생산량을 측정한 결과, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 2,4-dinitrochloroben-zene(DNCB), Diethyl pyrocarbonate (DEPC), 3-4,5-dimethyl-thiazol-2,5-carboxymethoxy phenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium(MTS), ethyl ether, Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), acetone, antibody biotin-conjugated, antibody avidin-HRP conjugated, TMB, EtOH, magnesium chloride(MgCl₂) 등은 Sigma 사 (Washington D.C., USA) 제품을, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa 사 (Japan) 제품을, cyclosporin A(CsA)는 중외제약 (Korea) 제품을, 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, USA) 제품, PE (phycoerythrin)-anti-CD3e, FITC(fluorescein isothiocyanate)-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, PE-anti-CD49b, FITC-anti-CD69, anti-CD28, anti-CD3 는 BD-Pharmingen사 (California, USA) 제품을, 인간 재조합 IL-4, TNF- α 는 R & D system사 (Minneapolis, USA) 제품을, RNase inhibitor, Luciferase assay kit는 Promega 사 (Madison, USA) 제품을, LipofectamineTM2000 Reagent는 Invitrogen 사 (Carlsbad, USA) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), microwave oven (LG, Korea), rotary vacuum evaporator, vacuum pump (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA

FDU-540, Japan), CO2 incubator (Forma scientific Co., USA.), clean bench, water bath, vortex mixer, heating block, ice-maker (Vision scientific Co., Korea), autoclave, deep-freezer (Sanyo Co., Japan), micro-pipet (Gilson Co., France), plate shaker (Lab-Line Co., USA), spectrophotometer (Shimadzu, Co., Japan), centrifuge (한일, Korea), plate shaker (Lab-Line, USA), ELISA reader (Molecular Devices Co., USA), ELISA kit (Biosource, USA) kit, flow cytometer (Becton Dickinson, USA) 등을 사용하였다.

2) 동물

11주령이 된 NC/Nga mouse는 Charles River 사 (Yokohama, Japan)에서 공급받았다. 동물은 실험당일까지 고품사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12 시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물

본 실험에 사용한 凉血除濕湯의 구성 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량은 다음과 같다.

Scheme 1. The prescription of Yanghyeulje-seup-tang(YHJST)

韓藥名	生藥名	用量(g)
石膏	Gypsum	15
百部根	Stemonae Radix	15
白鮮皮	Dictamni Radicis Cortex	15
牡丹皮	Moutan Cortex Radicis	10
生地黃	Rhemaniae Radix Crudus	8
車前草	Plantaginis Semen	8
黃芩	Scutellariae Radix	8
苦參	Sophorae Radix	6
知母	Anemarrhenae Rhizoma	5
Total amount		90

4) 시료 추출

凉血除濕湯 4첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치(rotary vaccum evaporator)로 농축한 후, 이를 다시 동결 건조기(Freeze dryer)를 이용하여 완전 건조한 凉血除濕湯 추출물 (이하 YHJST) 24.0 g을 냉동 보관 (-80℃) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 피부염 유도 및 시료 처리

11주령이 된 Nc/Nga mouse의 등 부위를 깨끗하게 제모하고, 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치한 후 1% DNCB용액 (아세톤 : 올리브오일 = 3 : 1) 200 μl를 등 부위에 도포하였고, 4일 후, 1주일에 2~3번씩 4주간 0.2% DNCB용액 150 μl를 등 부위에 도포하여 이 부위에 피부염이 유발되게 하였다.

2) 약물처리 및 치료평가

실험군에는 YHJST를 10 mg/25 g/day의 농도로 8주간 (12주에서 20주까지) 경구 투여하였고 대조군에는 생리식염수를 투여하였다. 또한 양성 대조 약물로 cyclosporin A(CsA, 20 mg/kg)를 주 3회 복강에 주사 하였다.

3) 비장(spleen), 림프절(drainng lymph node, DLN)의 총세포수 측정

약물처리 종료 후, 실험동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 spleen, DLN을 분리하여 총 면역세포수를 측정하고, spleen은 무게를 재었다.

4) Spleen, DLN에서 형광 유세포 분석

실험 종료 후 NC/Nga mouse에서 spleen, DLN을 각각 적출하고 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5 분간 원심분리 (1,700 rpm)하여 2회 세척한 후, cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 이들 세포들을 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 용해시키고 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 측정된 spleen, DLN 침윤세포를 5×10⁵ 세포로 조정한 후 4℃에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 PE-anti-CD3, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD-25, FITC-anti-CD69, PE-anti-CD49b를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3 회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD3+CD69+, CD4+CD25+, CCR3+, CD49b+ (NK) 세포수를 백분율(%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포 수(absolute cell number)를 산출하였다.

5) Th1 and Th2 cytokine of ELISA Analysis

실험 종료 후 비장세포 (1×10⁵/well) 는 anti-CD28 (1 μg/ml) 과 anti-CD3 (1 μg/ml) 로 96-well coating된 plate에서 48 시간 동안 동시 배양하였고, IL-4, IFN-γ는 ELISA kit를 가지고 측정하였다. 각 well에 NC/Nga mouse의 비장세포 배양 상층액 100 μl씩 분주하고, 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 30 분간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody avidin-HRP conjugated 100 μl를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μl씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 통계처리

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

III. 성 적

1. 비장세포 무게에 미치는 영향

정상군은 0.10 ± 0.01, 대조군은 0.18 ± 0.02, CsA 투여군은 0.14 ± 0.02, YHJST 투여군은 0.22 ± 0.01 (g)로 나타났다(Fig. 1).

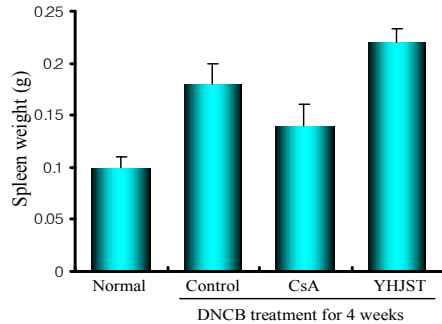


Fig. 1. Effect of YHJST extract on spleen weight in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse followed by the administration of YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen weight were measured. Each point represents the mean ± SE. of four mouse.

Normal : not treated group

Control : oral administration of normal saline.

CsA : abdominal injection of cyclosporin A (20 mg/kg three times a week)

YHJST : oral administration of YHJST (10 mg/25 g/day for 8 weeks)

2. 총 면역세포 수에 미치는 영향

Spleen에서 정상군은 10.65 ± 1.29, 대조군은 13.08 ± 1.62, CsA 투여군은 14.03 ± 1.64,

YHJST 투여군은 $10.5 \pm 1.50 (\times 10^7)$ 으로 나타나 유의성 있는 변화는 없었고, DLN에서는 정상군은 3.3 ± 1.60 , 대조군은 15.0 ± 1.23 , CsA 투여군은 6.15 ± 0.15 , YHJST 투여군은 $5.1 \pm 1.02 (\times 10^6)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 2).

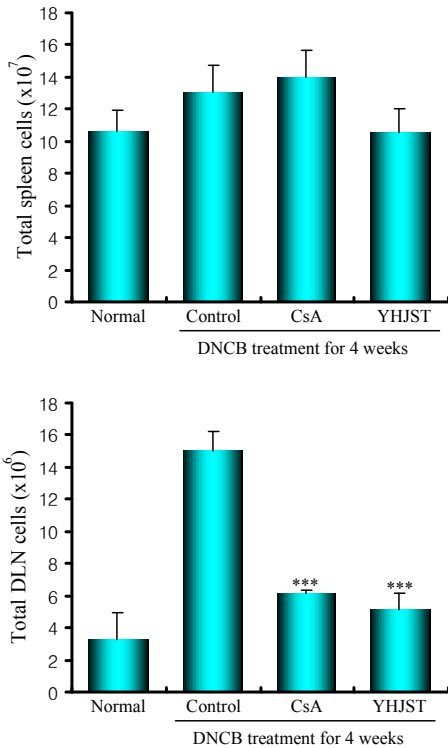


Fig. 2. Effect of YHJST extract on total cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse followed by the administration of YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen ($\times 10^7$) and DLN ($\times 10^6$) were removed and total cell absolute number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT (control) mouse group data by T test (***) ($p < 0.001$).

Normal : not treated group

Control : oral administration of normal saline.

CsA : abdominal injection of cyclosporin A (20 mg/kg three times a week)

YHJST : oral administration of YHJST (10 mg/25 g/day for 8 weeks)

3. Spleen 및 DLN내 면역세포 수에 미치는 영향

1) CD3+ 세포 수에 미치는 영향

Spleen에서 정상군이 32.0 ± 0.1 , 대조군이 26.0 ± 1.7 , CsA 투여군이 14.1 ± 0.4 ($p < 0.001$), YHJST 투여군이 $23.8 \pm 2.9 (\times 10^5)$ 로 나타났고, DLN에서는 정상군은 21.6 ± 14.4 , 대조군은 59.4 ± 5.4 , CsA 투여군은 31.6 ± 1.1 ($p < 0.01$), YHJST 투여군은 $25.9 \pm 5.2 (\times 10^4)$ ($p < 0.001$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 3).

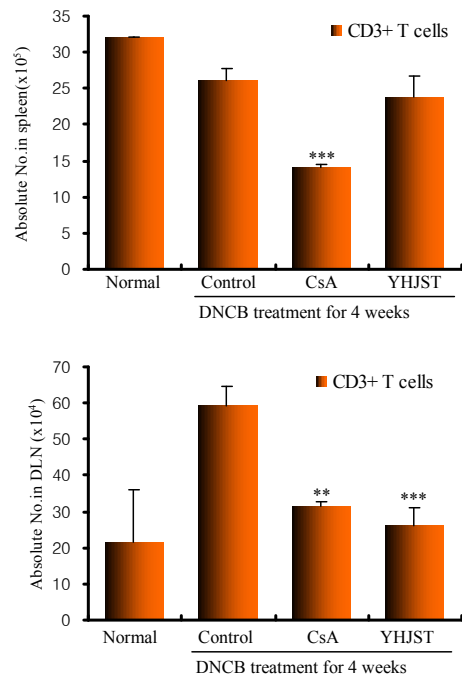


Fig. 3. Effect of YHJST extract on CD3+ absolute cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse followed by the administration of YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen ($\times 10^5$) and DLN ($\times 10^4$) were removed and CD3+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT (control) mouse group data by T test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Normal : not treated group

Control : oral administration of normal saline.

CsA : abdominal injection of cyclosporin A (20 mg/kg three times a week)

YHJST : oral administration of YHJST (10 mg/25 g/day for 8 weeks)

2) CD19+ 세포 수에 미치는 영향

Spleen에서 정상군은 67.5 ± 3.5 , 대조군은 69.5 ± 3.4 , CsA 투여군은 52.2 ± 2.6 ($p < 0.01$), YHJST 투여군은 54.9 ± 1.6 ($\times 10^5$) ($p < 0.001$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, DLN에서도 정상군이 10.4 ± 3.1 , 대조군이 84.8 ± 4.0 , CsA 투여군이 27.6 ± 2.0 , YHJST 투여군이 22.4 ± 1.7 ($\times 10^4$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 4).

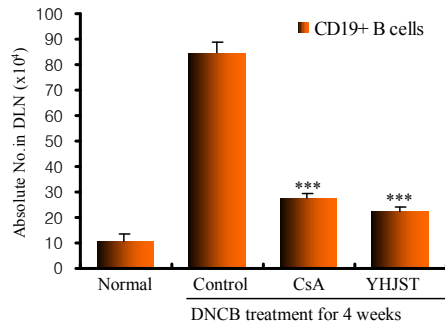
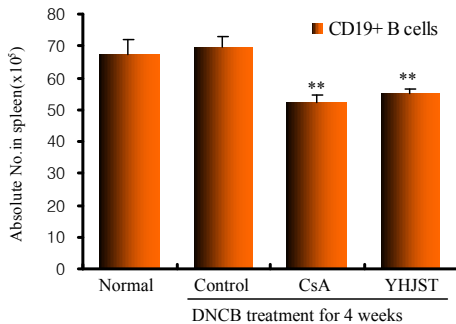


Fig. 4. Effect of YHJST extract on CD19+ absolute cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse model followed by the administration of YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen ($\times 10^5$) and DLN ($\times 10^4$) were removed and CD19+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT (control) mouse group data by T test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3) CD4+ 세포 수에 미치는 영향

Spleen에서 정상군은 23.9 ± 1.3 , 대조군은 22.2 ± 1.5 , CsA 투여군은 17.6 ± 0.4 ($p < 0.01$), YHJST 투여군은 18.8 ± 2.3 ($\times 10^5$)로 나타났고, DLN에서는 정상군은 16.7 ± 5.7 , 대조군은 47.0 ± 4.8 , CsA 투여군은 24.4 ± 0.4 ($p < 0.01$), YHJST 투여군은 21.4 ± 3.1 ($\times 10^4$) ($p < 0.001$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 5).

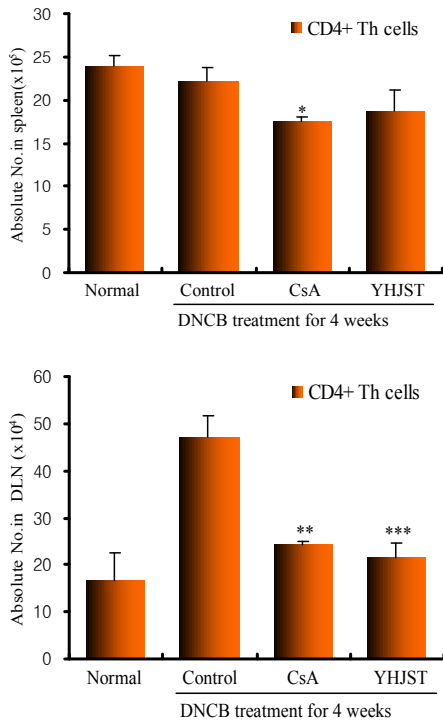


Fig. 5. Effect of YHJST extract on CD4+ absolute cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse model followed by the administration of YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen ($\times 10^5$) and DLN ($\times 10^4$) were removed and CD4+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT (control) mouse group data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Normal : not treated group

Control : oral administration of normal saline.

CsA : abdominal injection of cyclosporin A (20 mg/kg three times a week)

YHJST : oral administration of YHJST (10 mg/25 g/day for 8 weeks)

4) CD8+ 세포 수에 미치는 영향

Spleen에서 정상군은 7.5 ± 3.6 , 대조군은 4.2 ± 0.8 , CsA 투여군은 6.4 ± 0.3 ($p < 0.01$), YHJST 투여군은 2.1 ± 0.1 ($\times 10^5$) ($p < 0.001$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, DLN에서도 정상군이 5.1 ± 3.6 , 대조군이 17.9 ± 2.1 , CsA 투여군이 8.5 ± 0.6 ($p < 0.01$), YHJST 투여군이 5.8 ± 1.7 ($\times 10^4$) ($p < 0.001$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 6).

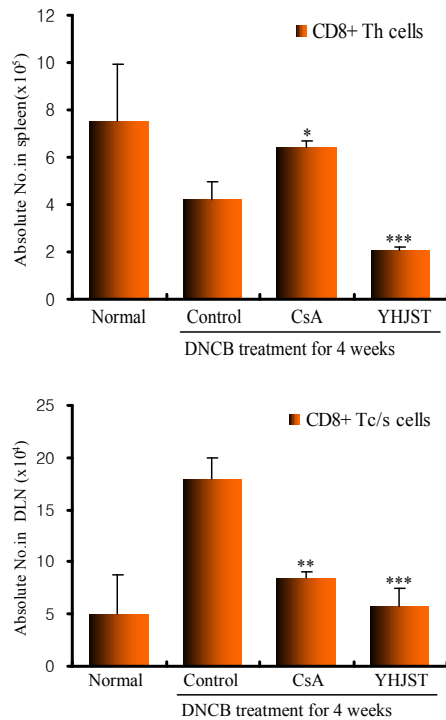


Fig. 6. Effect of YHJST extract on CD8+ absolute cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse model followed by the administration of YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen ($\times 10^5$) and DLN ($\times 10^4$) were removed and CD8+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared

with NC/Nga-CT (control) mouse group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Normal : not treated group

Control : oral administration of normal saline.

CsA : abdominal injection of cyclosporin A (20 mg/kg three times a week)

YHJST : oral administration of YHJST (10 mg/25 g/day for 8 weeks)

5) CD3+CD69+ 세포 수에 미치는 영향

Spleen에서의 정상군은 5.2 ± 0.3 , 대조군은 4.5 ± 0.2 , CsA 투여군은 6.5 ± 0.2 (p<0.001), YHJST 투여군은 4.3 ± 1.3 ($\times 10^5$)로 나타났고, DLN에서는 정상군은 4.6 ± 0.1 , 대조군은 14.0 ± 0.9 , CsA 투여군은 7.2 ± 1.2 (p<0.01), YHJST 투여군은 6.7 ± 2.6 ($\times 10^4$) (p<0.05)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 7).

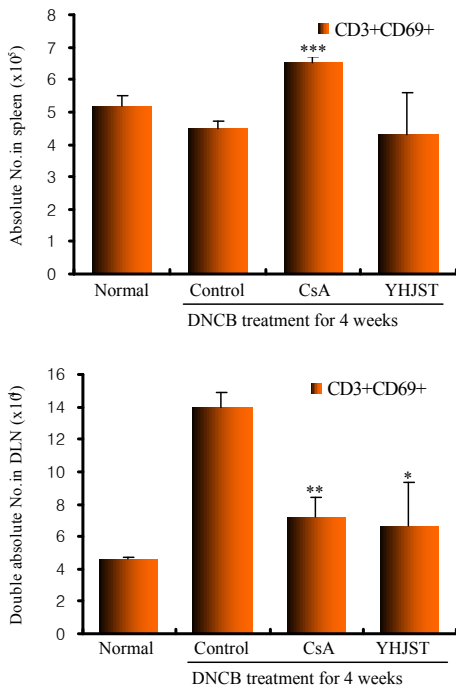


Fig. 7. Effect of YHJST extract on CD3+CD69+ absolute cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse model followed by the administration of YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen ($\times 10^5$) and DLN ($\times 10^4$) were removed and CD3+CD69+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT (control) mouse group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Normal : not treated group

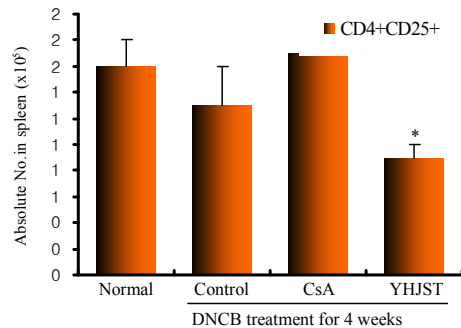
Control : oral administration of normal saline.

CsA : abdominal injection of cyclosporin A (20 mg/kg three times a week)

YHJST : oral administration of YHJST (10 mg/25 g/day for 8 weeks)

6) CD4+CD25+ 세포 수에 미치는 영향

Spleen에서의 정상군은 1.6 ± 0.21 , 대조군은 1.3 ± 0.3 , CsA 투여군은 1.7 ± 0.1 , YHJST 투여군은 0.9 ± 0.1 ($\times 10^5$)로, 대조군에 비하여 유의성 (p<0.05) 있게 감소하였고, DLN에서는 정상군이 1.7 ± 0.2 , 대조군이 5.0 ± 0.5 , CsA 투여군은 2.4 ± 0.01 (p<0.01), YHJST 투여군은 2.0 ± 0.3 ($\times 10^4$) (p<0.001)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 8).



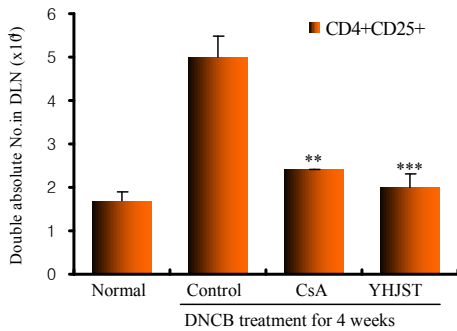


Fig. 8. Effect of YHJST extract on CD4+CD25+ absolute cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse model followed by the administration of YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen (×105) and DLN (×104) were removed and CD4+CD25+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean ± SE. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT (control) mouse group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Normal : not treated group

Control : oral administration of normal saline.

CsA : abdominal injection of cyclosporin A (20 mg/kg three times a week)

YHJST : oral administration of YHJST (10 mg/25 g/day for 8 weeks)

7) CCR3+ 세포 수에 미치는 영향

Spleen에서의 정상군은 3.7 ± 0.2, 대조군은 1.8 ± 1.1, CsA 투여군은 5.1 ± 0.5 (p<0.05), YHJST 투여군은 2.8 ± 0.1 (×105)로 유의한 변화는 없었고, DLN에서는 정상군이 3.4 ± 1.4, 대조군이 7.5 ± 2.7, CsA 투여군이 6.8 ± 2.3, YHJST 투여군은 5.5 ± 1.4 (×104)로 나타나 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 보이지 않았다(Fig. 9).

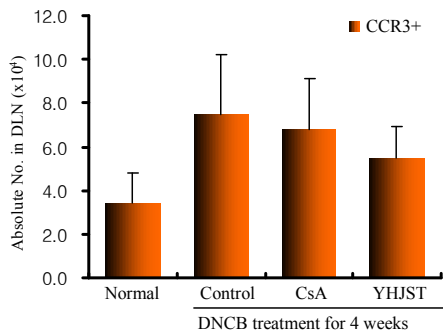
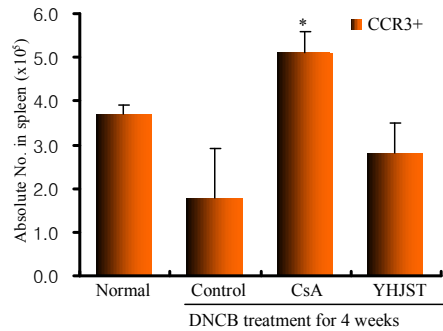


Fig. 9. Effect of YHJST extract on CCR3+ absolute cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse model followed by the administration of YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen (×105) and DLN (×104) were removed and CCR3+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean ± SE. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT (control) mouse group data by T test (*p<0.05).

Normal : not treated group

Control : oral administration of normal saline.

CsA : abdominal injection of cyclosporin A (20 mg/kg three times a week)

YHJST : oral administration of YHJST (10 mg/25 g/day for 8 weeks)

8) CD49b+ 세포 수에 미치는 영향

Spleen에서의 정상군은 3.8 ± 0.4 , 대조군은 2.9 ± 0.2 , CsA 투여군은 5.5 ± 0.3 ($p < 0.001$), YHJST 투여군은 1.7 ± 0.8 ($\times 10^5$)로 나타나 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었고, DLN에서는 정상군은 5.8 ± 1.6 , 대조군은 19.2 ± 2.1 , CsA 투여군은 4.9 ± 3.6 ($p < 0.01$), YHJST 투여군은 3.4 ± 1.7 ($\times 10^4$) ($p < 0.01$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 10).

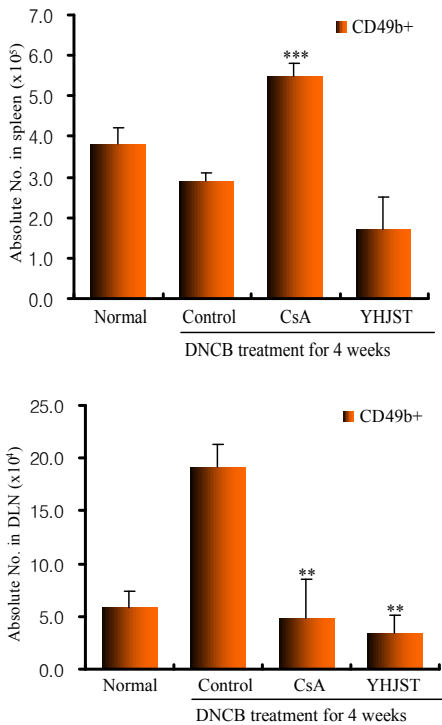


Fig. 10. Effect of YHJST extract on CD49b+ absolute cell number of spleen and DLN in DNCB-induced NC/Nga mouse.

NC/Nga mouse model followed by the administration of YHJST (10 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mouse spleen ($\times 10^5$) and DLN ($\times 10^4$) were removed and CD49b+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SE. Statistically significant value compared

with NC/Nga-CT (control) mouse group data by T test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Normal : not treated group

Control : oral administration of normal saline.

CsA : abdominal injection of cyclosporin A (20 mg/kg three times a week)

YHJST : oral administration of YHJST (10 mg/25 g/day for 8 weeks)

4. 비장세포 부유액내 IL-4, IFN- γ 생성량에 미치는 영향

1) IL-4 생성량에 미치는 영향

정상군은 351.7 ± 18.1 , 대조군은 1042.5 ± 15.5 , CsA 투여군은 904.3 ± 2.7 , YHJST 투여군은 664.7 ± 2.7 (pg/ml)로, 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.001$) 있게 감소하였다(Fig. 11).

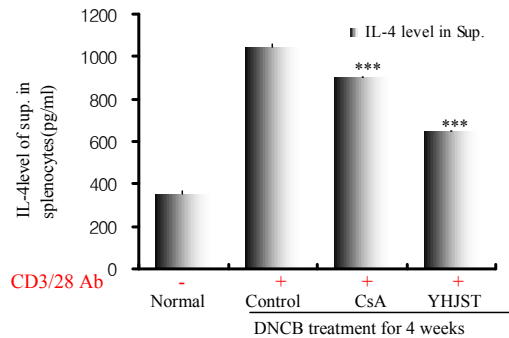


Fig. 11. Effects of YHJST on IL-4 production in the culture supernatant of CD3/CD28-stimulated splenocytes.

Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IL-4 were in the culture supernatant determined using commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (** $p < 0.001$).

Normal : not treated group

Control : oral administration of normal

saline.

CsA : abdominal injection of cyclosporin A (20 mg/kg three times a week)

YHJST : oral administration of YHJST (10 mg/25 g/day for 8 weeks)

2) IFN- γ 생성량에 미치는 영향

정상군은 170.9 \pm 23.0, 대조군은 326.1 \pm 8.9, CsA 투여군은 294.0 \pm 2.2 (p<0.01), YHJST 투여군은 575.9 \pm 1.7 (pg/ml)로, 대조군에 비하여 유의성 (p<0.001) 있게 증가하였다 (Fig. 12).

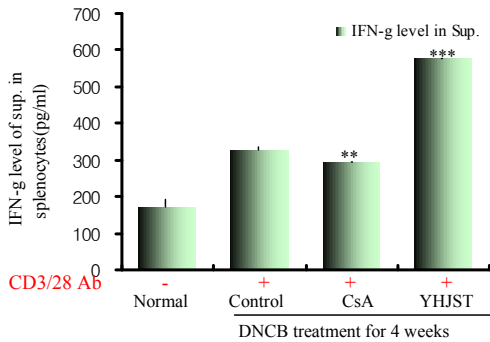


Fig. 12. Effects of YHJST on IFN- γ production in the culture supernatant of CD3/CD28-stimulated splenocytes.

Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IFN- γ were in the culture supernatant determined using commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (**p<0.01,***p<0.001).

Normal : not treated group

Control : oral administration of normal saline.

CsA : abdominal injection of cyclosporin A (20 mg/kg three times a week)

YHJST : oral administration of YHJST (10 mg/25 g/day for 8 weeks)

IV. 고찰

사회가 발달함에 따라 예전과는 다른 양상의 질환이 증가되고 있는데 그 중 대표적인 질환이 알레르기 질환으로 우리나라에서도 최근 알레르기 질환의 급증과 함께 아토피 피부염 환자가 증가하고 있다^{11,12).}

아토피피부염은 주로 유아와 소아기에 발생하는 만성 재발성 피부염으로, 건조하여 소양감이 심하고 반복적으로 재발되며, 각종 자극(특히 긁는 행위)에 의해 쉽게 피부염이 유발된다^{13).}

아토피피부염의 유병율은 외국의 경우 유아동기의 10~20%¹⁴⁾, 국내에서는 초등학교의 24%, 중학생의 13% 정도로 매년, 전 세계적으로 증가 추세에 있다^{15).}

아토피피부염의 발병원인은 아직까지 불분명하지만, 현재 유전인자와 환경인자가 발병에 크게 관여하는 면역성 질환으로 인식되고 있다^{13).}

아토피성 질환의 발생에는 helper T cell의 분화가 관여하며¹⁶⁾, Th1 cell과 Th2 cell의 분화 정도가 알레르기성 질환의 발생과 연관되어 있는데¹⁷⁾, 유전적 요인에 의해 Th2 cell로의 분화가 많이 이루어지는 경우 아토피성 질환이 발생하게 된다. 유전적 인자에 관하여는 아직까지 정확히 밝혀지지 않았으나 여러 유전 인자가 복합적으로 작용한다고 생각되어지며 특히 3q21 혹은 5번 염색체와의 연관성이 많이 연구되고 있다^{18).} 환경적인 요인으로는 개선된 위생상태, 서구화된 식습관, 핵가족화 및 유아기 다른 아이와의 접촉 기회의 소실, 세균이나 바이러스 감염에 노출 기회 감소, 장내 세균총 변화 등이 위험인자로 알려져 있는데¹⁹⁻²²⁾ 이러한 인자에 의해 Th1 cell로의 분화가 이루어지지 않아 아토피피부염의 발생이 증가하게 된다.

아토피피부염의 진단은 아직까지 특이한 방법이나 검사가 없어 대개의 경우 임상 증상에 의존하고 있다^{13,23).}

아토피피부염의 치료는 피부염에 대한 기본적인 방법과 유발인자의 규명과 제거와 같은 방법으로 이루어진다^{24).} 주로 염증과 소양감의 조절,

2차 병변의 발생방지를 목적으로 부신피질 호르몬제와 같은 국소적인 스테로이드제, 항히스타민제가 사용되고 있지만, 약물의 지속적인 사용 시 심각한 문제를 일으킬 수 있으며 모세혈관 확장, 여드름, 다모증과 같은 피부 부작용뿐 아니라 성장장애, 쿠싱증후군(Cushing syndrome) 등과 같은 전신적 부작용의 발생 우려가 크다. 근래에는 cytoclosporin A, Azathioprine, Mycophenolate mofeil(MMF), IFN- γ , Thymopetin 등의 면역억제제 및 조절제와 국소 면역 조절제(calcineurin 억제제)인 tarcolimus 나 pimecrolomus 등을 사용하기도 한다. 그러나 이러한 방법들도 사용기간, 비용, 부작용, 반동(rebound)현상 등에 대한 논란은 여전하다²⁵⁾. 따라서 새로운 아토피피부염 치료제의 개발이 절실히 필요한 실정이며, 치료제의 개발과 관련된 재료로 최근에는 부작용이 적은 한약제 등 천연물이 되어 지고 있다²⁶⁾. 또한 아토피 피부염은 아토피 질환일 뿐만 아니라 유전적 요인, 환경적 요인, 정신적 요인, 피부감염 등 여러 요인에 의하여 영향을 받는 다인자적 질환이기 때문인데, 의학적인 완치보다는 증상의 완화를 통해 관해를 적극적으로 유도해주는 것이 가장 올바른 치료법으로 알려져 있다²⁷⁾.

아토피 피부염의 한의학적 범주는 『素問·玉機眞藏論篇』⁶⁾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 있다⁷⁾. 이 중 乳癬, 奶癬, 胎斂瘡, 胎癬 등의 표현은 아토피피부염이 주로 유아와 소아기에 발생하는 특징에 따른 것으로 볼 수 있고, 浸淫瘡은 급성습진을 표현한 것이며, 四彎風을 비롯해 旋耳瘡, 乳頭風, 臍瘡 등은 아토피피부염의 발생부위에 따라 표현한 것으로 보여진다⁷⁻¹⁰⁾.

아토피피부염의 한의학적 발생원인은 주로 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고 淸熱, 涼血, 除濕, 祛風, 養血 등의 治法을 주로 사용하고 있다⁸⁻¹⁰⁾.

涼血除濕湯은 淸熱作用이 우수한 石膏, 知母,

淸熱 뿐 아니라 除濕의 효과를 겸한 黃芩, 苦參, 白鮮皮, 涼血作用이 우수한 生地黃, 牡丹皮, 滲濕泄熱의 효과가 있는 車前子, 潤肺하면서 殺蟲作用이 우수한 것으로 알려진 百部根으로 구성된 經驗方이다²⁸⁾.

이에 임상에서 아토피 피부염 환자들에게 多用되고 있으며 임상 상 효과를 보이고 있는 약물로 구성된 涼血除濕湯이 아토피 피부염에 실험적으로도 효과가 있을 것으로 보여 NC/Nga mouse 에서 피부염 발진에 대한 억제 효과를 알아보고자 본 실험에 임하게 되었다.

만성 염증 반응 등의 면역 반응에는 수많은 면역세포와 염증세포, 각종 화학매개체들이 관여한다. 이러한 염증 반응에 관여하는 주된 세포로는 T cell, B cell, 비만세포, 호산구, 호중구 등이 있다²⁹⁾. 또한 염증 반응에서 면역 병리학적 검사로 관찰하는 주요 장기로는 골수, 흉선, 비장, 림프절 등이 있다. 본 실험에서는 아토피피부염 치유 효과에 대한 면역 세포학적 기초를 조사하기 위하여 아토피피부염을 유발시킨 NC/Nga mouse에 YHJST을 10 mg/25 g/day의 농도로 8주간 경구투여한 후, Spleen의 무게와 Spleen과 DLN에서의 총 면역세포수를 측정하였다. spleen의 무게와 spleen에서의 총 면역 세포수는 유의한 변화가 없었고, DLN에서는 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 1, 2).

T 세포는 면역반응을 결정하는 가장 중요한 세포이며, 항체를 생산하는 B세포에 작용하여 항체를 생산하고 대식세포에 작용하여 대식세포를 활성화시키기도 한다³⁰⁾. T 세포의 membrane molecule로 CD(cluster of differentiation) isotype 들은 T 세포 수용체 (T cell receptor; TCR)에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달하며, T 세포의 결정표지인자이다^{31,32)}. 면역반응의 조절에 관여하는 T cell을 Helper T cell(Th cell)이라고 부르며, 반면에 직접 다른 세포를 죽이는 기능을 가지고 있는 T cell을 Cytotoxic T cell(Tc cell)이라고 부른다. 대부분의 Th cell은 세포표면에 TCR(T cell receptor)외에 CD4 분

자를 공통적으로 가지고 있으며, Tc cell은 CD8 분자를 가지고 있기 때문에 각각 CD4 T cell 또는 CD8 T cell이라고 부르기도 한다³²⁾. CD4+ 세포는 Th1과 Th2의 분화를 활성화하고 여러 종류의 cytokine을 생산하여 B cell이 효율적으로 항체를 생산하도록 도와주며, CD3+ 는 T cell의 특이표면 단백질로 T cell의 항원인식에서 세포내로 활성화 신호를 전달하는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다³³⁾.

YHJST에 의한 T 세포군의 변화를 측정한 결과, CD3+ 와 CD4+ 세포 수는 Spleen에서 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었고, DLN에서는 대조군에 비하여 유의성 (p<0.001) 있는 감소를 나타내었고(Fig. 3, 5), CD8+ 세포 수는 Spleen과 DLN에서 모두 대조군에 비하여 유의성 (p<0.001) 있게 감소하였다(Fig. 6).

활성화된 T 세포를 의미하는 CD3+ CD69+ 세포 수는 Spleen에서 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었고, DLN에서는 대조군에 비하여 유의성 (p<0.05) 있게 감소하였고(Fig. 7), CD4+ CD25+ 세포 수는 Spleen (p<0.05)과 DLN (p<0.001) 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 8).

CCR3+ 세포 수는 Spleen과 DLN 모두에서 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었고(Fig. 9), CD49b+ 세포 수는 Spleen에서는 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었고, DLN에서는 대조군에 비하여 유의성 (p<0.01) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 10).

B cell에 특이적으로 존재하는 CD19+ 세포 수를 측정한 결과, Spleen과 DLN 모두에서 대조군에 비하여 유의성 (p<0.001) 있게 감소하였다(Fig. 4).

이러한 결과는 YHJST이 피부염의 발생에 관련된 T cell의 항원인식과 세포 내로의 활성화 신호를 억제하여 피부염 발생을 효과적으로 억제할 뿐 아니라, 체액성 면역반응에 관여하는 항체 생산 분비를 억제함으로써 아토피피부염을 유발을 지연시킬 수 있음을 보여주고 있다.

IL-4는 IFN- γ 의 생성과 Th1 세포로의 분화를

억제하며, B 세포에서 IgE의 생성과 Th2 세포로의 분화를 촉진하고, IFN- γ 는 Th1 세포에서 생산되는 cytokine으로 IL-4를 counter regulation 하는 것으로 알려져 있다³⁴⁾.

비장세포 부유액내 IL-4와 IFN- γ 생성량을 알아본 결과, IL-4는 대조군에 비하여 유의성 (p<0.001) 있게 감소하였고(Fig. 11), IFN- γ 는 대조군에 비하여 유의성 (p<0.001) 있게 증가하였다(Fig. 12). NC/Nga mouse는 Th2의 면역질환 모델로 IL-4가 과잉으로 분비되어 IgE 생산이 촉진되어 피부발진을 심화시키는 기전을 가지는데, YHJST에 의해 활성화된 Th2세포가 억제되어 IL-4의 양이 감소되는 반면, IFN- γ 의 생산량을 증가시켜 IL-4의 과잉생산을 억제한 것으로 YHJST이 Th1/Th2세포로의 shift 기능이 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과로 미루어 보아 涼血除濕湯은 아토피 피부염 치료에 유효하게 활용할 수 있을 것으로 판단되며 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

아토피 질환 환자에 사용되는 涼血除濕湯이 아토피 피부염 유발 NC/Nga mouse의 비장 및 DLN내 면역관련 인자에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 涼血除濕湯은 비장세포 무게에는 별다른 영향을 주지 않았다.
2. 涼血除濕湯은 비장과 DLN의 총세포수를 대조군에 비하여 감소시켰다.
3. 涼血除濕湯은 비장과 DLN에서 CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD3+ CD69+, CD4+ CD25+, CCR3+, CD49b+ 의 총세포수를 대조군에 비하여 억제시켰다.

4. 涼血除濕湯은 IFN- γ 분비량은 증가시키고 IL-4 분비량은 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과로 미루어 보아 涼血除濕湯은 아토피 피부염의 치료에 유효하게 활용할 수 있을 것으로 판단되며, 향후 실험적 보완과 임상연구가 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Morren MA, Przybilla RG, Bamelis M, Heykants B, Reynaers B, Degreef H : Atopic dermatitis : triggering factors, J Am Acad Dermatol, 1994;31:4670-473.
2. Leung DY, Eichenfield LF, Boguniewicz M, Atopic dermatitis, In: Feedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editors. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2003:1180-1194.
3. Diepgen TL, Fartasch M : Recent epidemiologic and genetic studies in atopic dermatitis, Acta Derm Venerol, 1992;176:13-18.
4. Leung DY, Soter NA : Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis, J Am Acad Dermatol. 2001;44:S1-S12.
5. Spergel 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. 1999;103(8):1103-1111.
6. 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.
7. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연 : 아토피 피부염의 동, 서의학적 문헌고찰, 대한안이비인후피부과학회지, 2002;15(1):226-252.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 丁奎萬 : Allergy와 韓方, 서울, 第一路, 1990, pp. 101-108.
12. 장호선 : 아토피 피부염의 진단과 치료, 가정의학회지, 2002;23:831-838.
13. 안성구, 지혜구, 황상민, 정준, 장경훈 : COMMON SKIN DISEASE 진단/치료, 서울, 퍼시픽출판사, 2003, pp. 68-88.
14. Leung DY, Bieber T, Atopic dermatitis, Lancet, 2003;361:151-160.
15. 오재원, 김규원, 편복양 외 18명 : 1995년과 2000년의 학동기와 2003년 학동전기 소아에서의 아토피 피부염의 역학적 변화에 관한 전국적인 연구, 소아알레르기 및 호흡기, 2003;13(4):227-237.
16. Renz H, Mutius E, Illi S, Wolkers F, Hirsch T, Weiland SK, et al. : T(H)1/T(H)2 immune response profiles differ between atopic children in eastern and western Germany, J Allergy Clin Immunol. 2002;109:338-342.
17. Kay AB : Allergy and allergic disease. First of two parts, N Engl J Med. 2001;344:30-37.
18. McIntire VK, Barsh GS, et al. : Identification of Tapr(an airway hyperactivity regulatory locus) and linked TIM gene family, Nat Immunol. 2001;12:1109-1111.
19. Oranje AP, de Waard-van der Spek, Flora B : Atopic dermatitis : review 2000 to January 2001, Curr Opin Pediatr. 2002;14:410-413.

20. Ehrenstein OS, Mutius E, Illi S, Baumann L, Bohm O, Kries R : Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers, *Clin Exp Allergy*. 2000;30:187-193.
21. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL : Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood, *N Engl J Med*. 2000;343:538-543.
22. Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M : Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life, *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:516-520.
23. 최유성, 유충의, 박미연, 손숙자, 황규왕 : 아토피피부염의 중증도에 따른 임상 및 검사실 소견에 관한 연구, *대한피부과학회지* 2006;44(7):824-829.
24. Abeck D, Strom K : Optimal management of atopic dermatitis, *Am Clin Dermatol*. 2000;1:41-46.
25. Graham-Brown RA : Therapeutic in atopic dermatitis, *Adv Dermatol. Clin*. 1990, 8:747-750.
26. 이지현 외 10인 : 아토피피부염학회 보고서: 한국 아토피피부염의 치료지침, *대한피부과학회지*, 2006;44(8):907-913.
27. 이진용 : 아토피피부염의 한방치료, *대한한방알레르기 및 면역학회 자료집*, 2002, pp. 61-79.
28. 전국한의과대학 *本草學教室 共編著 : 本草學*, 서울, 도서출판 永林社, 2000, pp.160-163, 178-179, 185-187, 190-191, 193-195, 313-314, 479-481.
29. Hardy RR, Hayakawa K. : B cell development pathways, *Annu Rev Immunol*. 2001;19:595-621.
30. Prussin C, Foster B : TCR V alpha 24 and V beta 11 coexpression defines a human NK1 T cell analog containing a unique Th0 subpopulation, *J Immunol*. 1997;159:5862-5870.
31. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB : Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma, *N Engl J Med*. 1992;326:298-304.
32. Watanabe A, Mishima H, Renzi PM, Xu LJ, Hamid Q, Martin JG : Transfer of allergic airway responses with antigen-premed CD4+ but not CD8+ T cells in brown Norway rats, *J Clin Invest*. 1995;96:1303-1310.
33. Hoglund P : Induced peripheral regulatory T cells : the family grows larger, *Eur J Immunol*. 2006;36:264-266.
34. Vercelli D, Jabara HH, Lauener RP, Geha RS : IL-4 inhibits the synthesis of IFN- γ and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures, *J Immunol*. 1990;144:570-573.