

아토피樣 피부염 NC/Nga 생쥐에서 滋陰除濕湯加減과 아토피 크림-紫雲膏의 병용투여가 피부염에 미치는 영향

이남열 · 김윤희 · 한재경

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

Effects of Concurrent Administration of JaUmJeSeupTangKaKam(JUJSTK) and Atopy Cream, Jawoongo(AJ) on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions in NC/Nga Mouse

Lee Nam Yerl, Kim Yun Hee, Han Jae Kyung

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dae Jeon University

Objectives

The purpose of this study is to examine the effect of a concurrent administration of JUJSTK and AJ on atopic dermatitis in an *in-vivo* experiment. Thus, this study is expressed by using NC/Nga atopic dermatitis mice which have histological and clinical similarities to that of humans have been used.

Methods

Clinical skin score, hematology, serum total IgE and IgG1 of the mouse was evaluated, and cytokine levels, total number of the cells, immunohistochemical staining, histological features of axillary lymph node(ALN), peripheral blood mononuclear cells(PBMCs), and a dorsal skin tissue of the mouse were analyzed.

Results

Oral administration of JUJSTK and concurrent administration of JUJSTK and AJ lowered the clinical skin score, total cell number of WBC, eosinophils in blood, and serum total of IgE & IgG1, IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-17. In addition, total cell number of ALN and dorsal skin tissue, absolute cell number of CD3e⁺ T cell, CD4⁺ Th cell, CD8⁺ c/sT cell, CD3⁺CCR3⁺ cell, CCR3⁺ cell, CD3⁺CD69⁺, CD4⁺CXCR5⁺ in ALN, PBMCs, absolute cell number of CCR3⁺, CD3⁺/CD69⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ in dorsal skin tissue, Eotaxin2 mRNA, CCR3 mRNA in dorsal skin tissue and gene expression of IL-5 mRNA, IL-13 mRNA in ALN were significantly decreased. Furthermore, thickness of epidermis infiltrated inflammatory immune cell & mast cell in dermis, histological infiltration of mast cell, the size of inflammatory lymphocytes cells & plasma cells in ALN and histological infiltration of CD4⁺ & CCR3⁺ in ALN and dorsal skin tissue were significantly decreased as well.

- 투 고 : 2009년 11월 25일, 수 정 : 2009년 12월 18일, 채 택 : 2009년 12월 21일
- 교신저자 : 이남열, 서울시 서대문구 창천동 르메이에르 5차 825호
(Tel : 010-2355-5124, E-mail : dleoduf@hanmail.net)

Conclusions

Concurrent administration of JUJSTK and AJ on atopic dermatitis in an *in-vivoxperiment* by using an NC/Nga atopic dermatitis mouse was very effective as an atopic dermatitis treatment.

Key words : atopic dermatitis, JaUmJeSeupTangKaKam, atopy cream, Jawoongo, NC/Nga mouse

I. 緒 論

아토피 피부염은 심한 소양증을 동반한 만성 재발성 피부염으로 개인적 혹은 가족적인 아토피 병력을 가지는 유전적 소인을 보인다^{1,2)}.

2002년 보고에 의하면 선진국에서는 아토피 질환의 이환율이 상당히 증가하는 추세에 있으며³⁾ 국내에서도 알레르기 질환의 급증과 함께 아토피 피부염 환자가 증가하고 있고 2000년 전국 초등 및 중학생을 대상으로 한 연구에 따르면 초등학생의 24.9 %, 중학생의 12.8 %가 아토피 피부염을 진단받은 것으로 조사되었다⁴⁾. 이는 과거 영아 습진이나 태열 등으로 대표되며 자연 경과를 기대했던 아토피 피부염이 최근에는 연령이 증가하여도 증상이 지속되거나 심해지는 경향이 있음을 나타내는 것으로 아토피 피부염에 대한 조기 진단과 치료의 필요성을 보여주고 있다.

한의학에서 아토피 피부염은 浸淫瘡, 乳癬, 奶癬, 胎熱, 胎癬, 胎斂瘡, 濕疹, 四彎風, 旋耳瘡, 臍瘡 등의 범주에 속하는데^{5,9)}, 이들의 발생원인은 血熱, 濕熱, 血燥 등으로 보고 清熱, 解毒, 除濕, 祛風, 養血 등의 治法을 주로 사용하고 있다¹⁰⁻¹²⁾. 치료에는 內外兼治法이 다용되었는데¹³⁾ 최근에는 外治法의 사용은 점차 줄고 內治法인 내복약에 치우친 경향이 있어 연령이 낮은 소아에게 치료의 효과를 높이기 위해서는 內外治法의 병용이 필요한 실정¹⁴⁾이다.

滋陰除濕湯加減은 《皮膚病中醫診療學》¹⁵⁾

에 수록되었으며 血虛風燥로 인한 피부질환에 사용되는 처방으로 아토피 피부염을 포함한 습진 및 소양증에 응용되고 있다. 아토피 크림은 아로마 오일을 이용한 외용제로 부작용이 거의 없고¹⁶⁾ 항염작용과 소독작용을 하여 아토피 피부염을 완화시키는 것으로 알려져 있으며¹⁷⁾ 紫雲膏는 《外科正宗》의 潤肌膏⁸⁾에서 유래된 것으로¹⁸⁾ 生肌創傷 및 습진, 건선, 탈모, 아토피성 피부염 등 광범위한 피부질환에 사용되는 연고제로 임상적인 연구¹⁹⁻²²⁾등을 통하여 유의한 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.

최근 한 등²³⁾이 임상에서 한약과 외용제를 병용하여 치료한 사례를 보고한 바 있고 內外治療法을 병행한 아토피의 연구²⁴⁻²⁶⁾가 활발하게 이루어지고 있으나, 그 면역학적 기전을 살펴본 실험적 연구는 부족한 실정이다.

이러한 배경으로 본 연구에서는 滋陰除濕湯加減 (JaUmJeSeupTangKaKam, 이하 JUJSTK)이 Biostir Mite Antigen Cream (이하 BMAC) 도포로 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga 생쥐의 Th17 세포 분화억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 하였다. *In vivo* 실험에서 JUJSTK 투여군과 아토피 크림, 紫雲膏 (Atopy cream, Jawoongo, 이하 AJ)와 JUJSTK (이하 AJ+JUJSTK) 병용투여군의 아토피 피부염 치유에 미치는 효과를 평가하기 위해 12 주령의 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐의 혈청 중 IgE 수준과 clinical skin score, total IgG 수준을 분석하였고 Axillary Lymph Node (이하 ALN)와

Peripheral Blood Mononuclear Cell (이하 PBMC), 등피부조직에서 세포수, 유세포 형광분석 및 염증 유전자 발현 분석을 하였다. 그리고 ALN과 등피부조직에서 H&E 염색을 통하여 epidermis의 두께와 toluidine blue 염색을 통하여 비만세포의 침윤 정도를 관찰하였다. 마지막으로 ALN과 등피부조직에서 면역조직화학 염색을 통하여 ALN에 침윤된 CCR3⁺ 세포와 등피부조직에 분포하는 CD4⁺ 세포를 관찰하여 JUJSTK, AJ+JUJSTK 투여 후 아토피 피부염 치료에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 시약 및 기기

(1) 시약

시약은 diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, 적혈구 용혈액 (ACK lysis solution), DMEM 배양액, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), Sulforhodamin B(SRB), 2-isopropanol, sodium dodecyl sulfate (SDS), PMA, ionomycin, FK506, antibiotics는 Sigma사 (USA) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (Logan, USA) 제품을, anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-CCR3-PE, anti-B220-PE, anti-CD8-FITC, anti-B220-FITC, anti-CD49b-FITC, anti-CD40 mAb, rmIL-4, rmIL-10, BD Cytotfix/Cytoperm plus kit, anti-CD3 mAb, anti-foxp3-PE, anti-IFN- γ -PE, anti-CD28 mAb 등은 Pharmingen사 (Torreyana, USA) 제품을, CD4⁺ T cell isolation kit와 B cell isolation kit는 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) 제품을, IL-4, IFN- γ , IL-5, IL-13 ELISA kit는

BioSource사 (California, USA) 제품을, IgE, IgG1 ELISA kit는 SHIBAYAGI 사 (Shibukawa, Japan) 제품을, anti-mouse CCR3 mAb와 anti-mouse CD4 mAb는 Santa-Cruz사 (California, USA) 제품을, LSAB kit는 DAKO사 (Glostrup, Denmark) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, USA), deep-freezer (Sanyo, Japan), 자동혈구측정기 (MS9-5, France), Quantitative Real-Time RT-PCR (Applied Biosystems, USA), 형광유세포분석기 (Cytometry, BD, USA), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, USA), plate shaker (Lab-Line, USA), VarioMACS (Bergisch Gladbach, Germany), FACScalibur (BD, USA) 및 ELISA reader (Molecular Devices, USA) 등을 사용하였다.

2) 동물

수컷 7 주령 SPF(Specific Pathogen Free) NC/Nga 생쥐 (15~20g)는 Charles River Japan 사 (Yokohama, Japan)에서 공급받았다. 동물은 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2 °C, 습도 55±15 %, 12 시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

Table 1. Composition of *JaUmJeSeupTangKaKam*

Herb Name	Scientific Name	Amount(g)
地骨皮	<i>Lyii Radicis Cortex</i>	15
益母草	<i>Leonuri Herba</i>	15
知母	<i>Anemrhenae Rhizom</i>	10
澤瀉	<i>Alismatis Rhizom</i>	10
防風	<i>Lacturiellae Radix</i>	10
何首烏	<i>Polygoni Multiflori Radix</i>	10
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	10
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	10
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	6
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	6
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	6
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	6
Total		114

Table 2. Composition of Atopy cream

Aroma-oil	
Tea-tree	10 drops
Lavender	7 drops
Chamomile-roman	3 drops
Base Cream	
	20 ml

Table 3. Composition of *Jawoongo*

Herb Name	Scientific Name	Amount(g)
紫草	<i>Lithospermi Radix</i>	0.074
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	0.049
胡麻油	<i>Sesamsced Oil</i>	0.613
蜜蠟	<i>Bee Wax</i>	0.245
豚脂	<i>Swine Oil</i>	0.019
Total		1.000

3) 약물

(1) 滋陰除濕湯加減 조제

본 실험에 사용한 滋陰除濕湯加減의 구성은 《皮膚病中醫診療學》¹⁵⁾에 준하였으며 사용한 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입 정선하여 사용하였고 그 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

(2) 아토피 크림과 紫雲膏 조제

본 실험의 아토피 크림에 사용된 아로마 오일과 베이스 크림은 Fine Korea. Co. (Inchon, Korea)에서 구입하여 사용하였고 그 배합은 다음과 같으며(Table 2), 紫雲膏의 구성은 《大田大學校 韓方病院 處方集》²⁷⁾에 준하였으며 사용한 약재들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입 정선하여 사용하였고 1g 당 구성은 다음과 같다(Table 3).

(3) 滋陰除濕湯加減 추출물 분리

滋陰除濕湯加減 2 칩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 滋陰除濕湯加減 추출물 23.8g을 냉동 보관 (- 84℃)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 方法

1) *In vivo*

(1) 피부염 유도 및 치료처리

7 주령의 NC/Nga 생쥐를 1 주일 동안 적응시키고 이미 피부염이 발생된 18 주령의 NC/Nga 생쥐 (Atopy NC/Nga mouse)와 2 주간 같은 공간에서 동시 사육하여 항원감작을 시킨 후 눈에서 capillary 관을 이용하여 100 μl의 혈액을 채혈한 후 마취제인 chloral hydrate (10%)로 마취한 후 귀와 등 쪽 목 부위를 깨끗하게 제모한 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24 시간 방치하였다. 그리고 중앙실험동물실에서 제공하는 BMAC는 Dermatophagoides farinae crude extract (mite antigen, lyophilized)를 항원으로 사용하였으며 0.5% Tween 20이 포함된 ointment base로 제작되었다²⁸⁾. BMAC는 1 주에 2 회 3 주간 등 부위 및 목 부분에 고르게 도포하였고 도포 2~3 시간 전에 4% SDS 용액을 분무하여 피부염이 잘 유발되도록 피부층을 파괴하였으며 2 주 후 등부분에 피부염이

충분히 유발되면서 굵는 행동이 심화되면 육안 평가를 실시하였다. 정상군 (NC/Nga- wild type, 이하 NC/Nga-WT)은 7 주령 NC/Nga 생쥐를 15 주령까지 SPF 조건에서 사육하였다.

(2) 약물처리 및 치료평가

실험은 7 주령 NC/Nga 생쥐를 15 주령까지 SPF 조건에서 사육한 정상군(Normal, Nr)과 BMAC를 도포한 대조군 (Control, CT), BMAC를 도포하고 FK506(tacrolimus)을 도포한 양성 대조군 (Positive Control, PC), JUJSTK (714 mg/kg)와 AJ (200 μl/마리, 각각 100 μl씩)+JUJSTK (714 mg/kg)를 투여한 실험군으로 나누어 실시하였다.

BMAC는 총 3 주간 (10 주령~13 주령) 월, 목에 4% SDS 용액을 분무하고 2 시간 경과한 다음 등에 200 μl씩 도포하였다. 그리고 12 주령부터 15 주령까지 3 주간 매일 1 회 오후 3~4시 사이에 JUJSTK만 단독투여 하거나 AJ+JUJSTK(아토포 크림 도포 후 자운고 도포, 이후 JUJSTK 투여)를 병용투여 하였다. 또한 양성대조군에는 양성대조약물 FK506 0.3%도 12 주령부터 15 주령까지 3 주간 매일 1 회 등 부분에 골고루 도포하였다. 최종 15 주령에 관능평가를 실시한 다음 혈액을 채혈하고 등 부위의 피부를 절제하여 10% 포르말린 용액에 담가 보관하였다.



Scheme 1. Experimental design for the induction of atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse

(3) Clinical skin score

NC/Nga 생쥐의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하였다. BMAC를 도포하고, AJ 도포와 JUJSTK (714 mg/kg) 투여 종료 후 15 주령에서 육안평가를 실시하였다. 육안평가 항목은 Yamamoto의 평가항목²⁹⁾을 참고하여 erythema / hemorrhage, dryness / scarring, edema, excoriation / erosion, lichenification 5 가지 항목으로 하고 육안평가 결과는 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타났다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였으며 최소 0 점에서, 최고 15 점 사이의 점수를 측정하였다³⁰⁾.

(4) Hematology

최종 관능평가를 실시한 후 EDTA 처리된 튜브형 주사기로 심장 혈액 0.5 ml를 채취하였다. 전혈을 바이오톡스텍(주)(청주, 충청북도)에 의뢰하여 백혈구 중 호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구, 림프구의 총 세포수를 측정하였다. 백혈구 수는 심장천자법으로 채취한 혈액을 자동혈구측정기 (MS9-5, MELET SCHLOESING, France)로 Fonio법³¹⁾에 준하여 Minos-ST로 측정하였다.

(5) 채혈 및 IgE와 IgG1 측정

NC/Nga 생쥐의 눈에서 8 주령, 12 주령, 15 주령에 capillary 관을 이용하여 약 100 μ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기 6,500 rpm에서 20 분간 원심분리한 후 30 μ l의 혈청을 분리하여 IgE 수준을 측정하였고, IgG1 수준은 15 주령의 NC/Nga 생쥐를 ethylether로 흡입 마취한 다음 심장천자법으로 혈액을 분리한 후, 각각의 혈청을 취하여 -70 °C에 냉동 보관하였고 혈청 내 IgE와 IgG1 농도는 enzyme-linked immuno-

sorbent assay로 측정하였다. 각각 well에 IgE는 8 주령, 12 주령, 15 주령에 채혈한 혈청 5 μ l (1/10 dilution)와 dilution buffer 45 μ l를 혼합하여 96 well plate의 각 well에 분주하였고 IgG1은 15 주령에서 채혈한 혈청 50 μ l (1/10 dilution)과 dilution buffer 50 μ l를 혼합하여 각 well에 분주하였다. 각각 2 시간 동안 25 °C 실온에서 방치한 후 2 회 washing 완충용액으로 세척한 다음 각각 antibody biotin-IgE conjugated와 antibody biotin-IgG1 conjugated를 넣고 2 시간 방치하였다. 다시 2 회 세척 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 각각 IgE와 IgG1에 대한 흡광도를 측정하였다³²⁾.

(6) ALN 세포분리 및 cytokine 측정

약물투여 종료 후 (15 주령) ALN을 적출하여 100 mesh로 ALN 세포를 분리하였다. 전날 BMAC 10 μ g/ml을 96 well plate에 coating하여 4 °C 냉장고에서 overnight한 다음 D-PBS로 2 회 수세하였다. 분리한 ALN 세포는 ACK 용액으로 RBC를 제거한 후 BMAC가 coating된 각각의 well에 5×10^5 세포씩 5 % FBS-DMEM 배양액에서 48 시간 동안 배양한 후 원심분리기 2,000 rpm에서 3 분간 원심분리한 후 200 μ l의 배양상층액을 얻었다. 배양상층액내의 IL-4 (BioSource, USA), IFN- γ (BioSource, USA), IL-5 (BioSource, USA), IL-13 (R&D system, USA)의 수준 측정은 enzyme-linked immuno-sorbent assay로 측정하였다. 각 well에 배양상층액 50 μ l를 분주하고 2 시간 동안 25 °C 실온에서 방치한 후 2 회 washing 완충용액으로 세척한 다음 각각 antibody biotin-IL-4 conjugated, antibody

biotin-IL-5 conjugated, antibody biotin-IL-13 conjugated를 넣고 2 시간 방치하였다. 다시 2 회 세척 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다³²⁾.

(7) ALN, PBMCs 및 등피부조직에서 형광 유세포 분석

NC/Nga 생쥐에서 ALN을 적출하여 100 mesh 로 세포를 분리하여 D-PBS로 5 분간 원심분리 (1,700 rpm)하고 2 회 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. PBMCs 는 실험을 종료한 후 NC/Nga 생쥐에서 heparin 을 처리한 3 ml 주사기로 채혈한 후 미리 준비 한 10 ml의 ACK용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1 l of demineralized water + 0.1 mM EDTA) 에 혼합하여 실온에서 5 분 동안 처리하여 적혈구를 제거하였다. 2 회 1 %의 FBS가 함유된 PBS (FACS buffer)로 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 불순물을 제거하였다. 등피부조직은 잘게 chopping한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2 % FBS + RPMI 1640) 를 넣고 37 °C shaker (180 rpm, 20 min.) 배양 기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4 회 반복하였다. 분리한 ALN, PBMCs, 등 피부조직 침윤세포의 총세포수를 측정 한 다음 모든 조직의 세포들을 5 × 10⁵ 세포로 조정 한 후 4 °C에서 면역 형광염색(immuno-fluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-CD3e-PE, anti-CD19-FITC, anti-CD4- FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD49b-FITC, anti-CCR3-PE, anti-B220-PE를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시

킨 후 3 회 이상 PBS로 세척한 후 flow cytometry 의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3⁺, CD19⁺, CD4⁺, CD8⁺, CCR3⁺, B220+CD23⁺ 세포수를 백분율(%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수(absolute number)를 산출하였다.

(8) Quantitative Real-Time-PCR in dorsal skin & ALN

① NC/Nga 생쥐의 등 피부조직과 ALN에서 RNA 분리

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 등 피부조직과 ALN을 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 혼합 하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80 % EtOH로 수세하고 3 분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다. Quantitative Real Time PCR은 7500 Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다³³⁾. Mouse Oligonucleotide의 염기배열 은 다음과 같다(Table 5).

Cytokine 유전자 발현은 SYBR[®] Green PCR Master mix를 사용하였고, internal standard는 GAPDH로 Taqman probe를 사용하였으며, primer 의 최종 농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Eotaxin2와 CCR3 mRNA 발현은 등피부조직에서 관찰하였고, Th2 mediate인 IL-5와 IL-13 mRNA 유전자 발현량 분석은 ALN에서 cDNA

Table 5. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
IL-17A	Probe-FAM	5' -6-FAM-AACAGCCCAGAATAATGAA TAAAGTTC CTCAATTGTTAC-TAMRA-3'
IL-23	Probe-FAM	5' -6-FAM-ACCTCAACCGTTCC ACGTCACCCT G-3BHQ-1-3'
Eotaxin 2	Forward	5' CTGTGACCATCCCCTCATCT 3'
	Reverse	5' CTTATGGCCCTTCTTGGTGA 3'
CCR3	Forward	5' CCCGAACITGTGACTTTTGCT 3'
	Reverse	5' CCTCTGGATAGCGAGGACTG 3'
IL-5	Forward	5' AGCCTAACCCGTGTTGGAGGT 3'
	Reverse	5' GTGATCGGCTTTTCTTGAGC 3'
IL-13	Forward	5' ATGCCCAACAAAGCAGAGAC 3'
	Reverse	5' TGAGAGAACCAGGGAGCTGT 3'

를 합성하여 분석하였다. 또한 Taqman법으로 IL-17과 IL-23 mRNA 발현은 등피부조직에서 관찰하였다. Quantitative Real Time PCR의 조건은 pre-denaturation은 2 min at 50 °C, 10 min at 94 °C, 40 cycles을 0.15 min at 95 °C, 1 min at 60 °C에서 수행하였다. 대조군, FK506 도포군, JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK 투여군은 internal standard로 GAPDH를 사용하여 target group의 Quantitative Real Time PCR은

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

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

로 계산하여 RQ(relative quantitative)값을 측정하였다.

(9) Histology

ALN과 등 쪽 목 부분의 피부를 떼어내어 10 % paraform-aldehyde에서 24 시간 동안 포르말린에 고정한 후 그 조직을 파라핀으로 포매하였고 5 μm 두께로 block을 만들었다. 조직 부분은 염증을 일으키는 epidermis, dermis,

keratinocytes, neutrophils / eosinophils 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline / eosin (H&E) 염색과 비만세포를 염색하는 toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤을 광학현미경 (Nikon, Japan, × 200)으로 관찰하였다³⁴⁾.

(10) Immunohistochemical staining

모든 NC/Nga 생쥐는 15 주령에서 면역화학 조직염색을 위하여 등쪽 피부를 적출하여 10% 포르말린 용액에 고정한 다음, 파라핀 블록을 만든 후 rat anti-mouse CCR3 mAb와 rat anti-mouse CD4 mAb를 사용하였다. 조직절편을 4 μm 두께로 세절하고 probe-on plus slide에 부착시켜 건조시키고 탈 파라핀(deparaffinized)한 후 흡수시켜 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)를 이용해 microwave oven에 15 분간 전 처리하였다. 조직 내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3 % H₂O₂에 10 분간 처리한 후 조직 내의 항원과 비 특이적 단백질결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시키고 일차 단일항체에 1 시간 동안 부착시킨 다음 완충액으로 세척하였다. LSAB kit를 이용하여 PE-conjugated goat anti-rat IgG에 30 분간 반응시

켰다. 3 회 Tris-buffered saline with 0.1 % Tween 20 (TBST)용액으로 수세한 후 잘 건조하였다. 현미경은 형광위상차현미경을 사용하여 × 400 배율로 관찰하였다³⁵⁾.

3. 통계처리

실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하였으며³⁶⁾ P<0.05인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 成 績

1. *In vivo*

1) BMAC를 이용한 아토피 피부염 유발 및 JUJSTK, AJ 투여 3 주 후 피부변화

BMAC를 이용한 대조군에서 긁는 행동을 동반한 홍반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등의 증상이 확인되었고 3 주 후 JUJSTK 투여군보다 AJ+JUJSTK 투여군에서 긁는 행동을 동반한 홍반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등의 증상이 현저하게 감소하였다(Fig. 1).

2) Clinical skin score

Clinical skin score는 Control군이 NC/Nga-WT 군에 비하여 증가하였고, FK506 도포군은 Control군에 비해 감소를 나타내었으며 (p<0.001), 단독 JUJSTK (p<0.01) 투여군은 유의성 있는 감소가 없었으나 AJ+JUJSTK 투여군은 유의성 있는 감소를 나타냈다 (p<0.01) (Fig. 2).

3) Hematology

실험종료 후 WBC 비율 중 neutrophil의 비율은 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 증가하였고 FK506 도포군의 비율은 Control군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며 (p<0.05) JUJSTK 투여군과 AJ+JUJSTK 투여군에서는 차이가 없었다. Lymphocytes의 비율은 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 약간 감소하였고 FK506 도포군에서 유의성 있는 증가를 보였으나 (P<0.01) JUJSTK 투여군과 AJ+JUJSTK 투여군은 대조군과의 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3A).

Eosinophil은 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 현저하게 증가하였고 FK506 도포군은 대

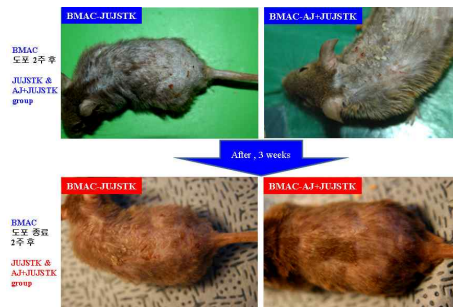


Fig. 1. Topical application of JUJSTK & AJ+JUJSTK treatment of atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse induced by BMAC for 3 weeks.

Shown are back of BMAC-ointment NC/Nga mouse, BMAC plus JUJSTK (714 mg/kg)-orally administration in NC/Nga mouse and BMAC plus AJ (200 μg/mouse) plus JUJSTK (714 mg/kg)-orally administration in NC/Nga mouse for 3 weeks.

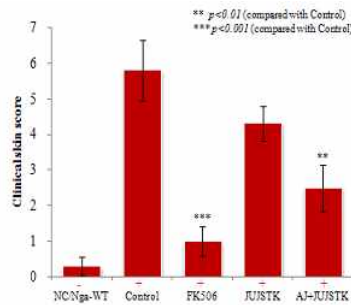


Fig. 2. Clinical skin features and severity of atopic dermatitis skin lesions in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, not treated BMAC (SPF normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks (Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%-ointment) (FK506), BMAC treatment for 3 weeks with JUJSTK (714 mg/kg) orally administration (JUJSTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μ l/mouse)-ointment plus JUJSTK (714 mg/kg) orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. A total clinical skin score for atopic dermatitis-like lesions 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/hemorrhage, scarring/dryness, edema, excoriation/erosion and lichenification) on the three parts of the body: ear, FSCe and head and back. Each point represents the mean \pm SE of six mouse.

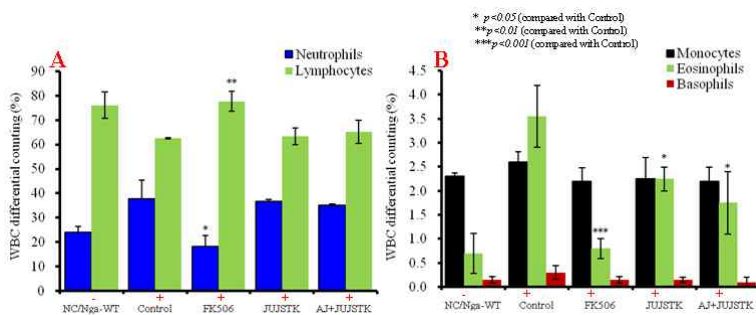


Fig. 3. WBC differential counting in atopic dermatitis like skin in NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks (Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%-ointment) (FK506), BMAC treatment for 3 weeks with JUJSTK orally administration (JUJSTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μ l/mouse)-ointment plus JUJSTK orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately thereafter. Cell contents were measured by hematology (BD, U.S.A.).

조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며 ($p < 0.001$) JUJSTK 투여군과 AJ+JUJSTK 투여군에서도 Control 군에 비하여 유의성 있는 감소를 보였고 ($p < 0.05$), monocyte와 basophil은 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 약간 증가하

였으나 JUJSTK 투여군과 AJ+JUJSTK 투여군에서는 큰 차이가 없었다(Fig. 3B).

4) 혈청 IgE와 IgG1에 미치는 영향

IgE의 양은 NC/Nga-WT군에서 8 주령에서

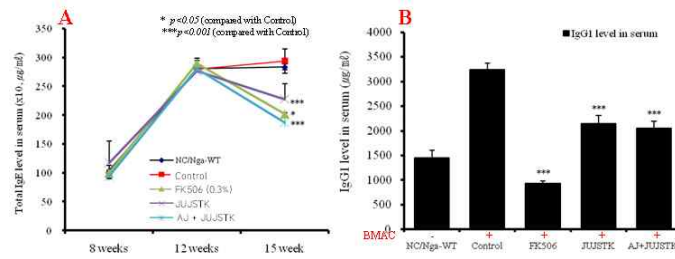


Fig. 4. Serum IgE & IgG1 elevation and development of atopic dermatitis like skin in NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks (Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), BMAC treatment for 3 weeks with JUJSTK orally administration (JUJSTK), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μl/mouse) ointment plus JUJSTK orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately thereafter. Serum samples were obtained by centrifugation and stored at -20°C until use. Total IgE and IgG1 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Shibayagi, Japan). Each point represents the mean±SE of six mouse.

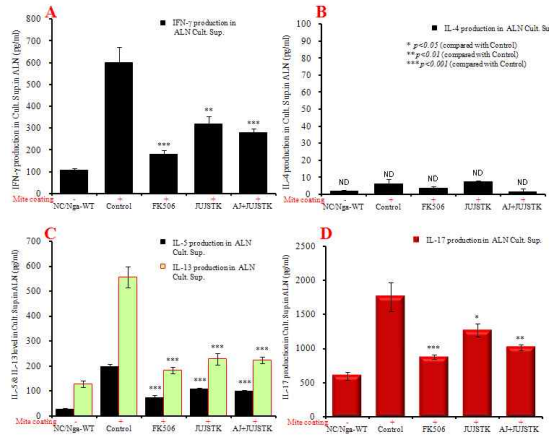


Fig. 5. Culture supernatant IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 and IFN-γ level in ALN in atopic dermatitis like skin in NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks (Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of JUJSTK orally administration (JUJSTK), and BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of AJ (200 μl/mouse) ointment plus JUJSTK orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. ALN from mouse at 15 weeks of age were re-stimulated with BMAC (10 μg/ml) for 48 hrs. IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, and IFN-γ levels were measured by a sandwich ELISA using an mouse ELISA kit I (Biosource, U.S.A.).

12 주령 사이에 자연적으로 증가되었고 Control 군은 15 주령에서 NC/Nga-WT군과 비슷하게 증가되었으며, FK506 도포군, JUJSTK 투여군,

AJ+JUJSTK 투여군은 15 주령에서 Control군에 비해 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$, $p < 0.001$) (Fig 4A).

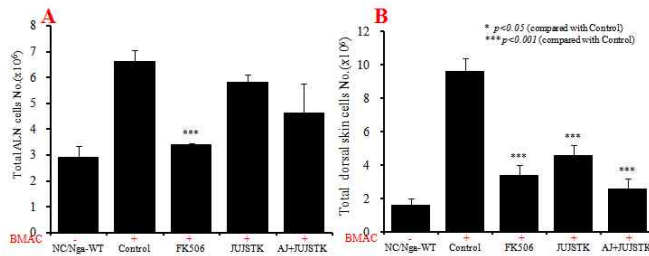


Fig. 6. Total cell number of ALN and dorsal skin in atopic dermatitis like skin NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks (Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of JUJSTK orally administration (JUJSTK), and BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of AJ (200 μl/mouse) ointment plus JUJSTK orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks.

IgG1의 수준은 FK506 도포군이 Control군에 비해 유의성 있게 감소하였고(p<0.001) JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK 투여군도 Control군에 비해 유의성 있게 감소하였다 (p<0.001) Fig 4B).

5) Cytokine level in ALN

IFN-γ의 생산량은 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 증가하였고, FK506 도포군은 Control군에 비하여 유의성 있게 감소를 나타내었으며 (p<0.001), JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK 투여군은 Control군에 비하여 각각 유의성 있게 감소하였다 (p<0.01, p<0.001) Fig. 5A).

IL-4 생산량은 모든 실험군에서 차이가 나타나지 않았다(Fig. 5B).

IL-5와 IL-13의 생산량은 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 증가한 결과를 얻었고 FK506 도포군은 Control군에 비하여 유의성 있게 감소를 나타내었으며 (p<0.001), JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK 투여군은 Control군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (p<0.001)(Fig. 5C).

IL-17의 생산량은 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 증가한 결과를 얻었고 FK506 도포군은 Control군에 비하여 유의성 있게 감소를

나타내었으며 (p<0.001), JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK 투여군은 Control군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (p<0.05, p<0.01)(Fig. 5D).

6) ALN, PBMCs 및 등피부조직에서의 유세포형광분석

(1) ALN과 등피부조직의 세포수 측정

ALN 세포는 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 증가하였고 FK506 도포군은 Control군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며 (p<0.001) JUJSTK 투여군과 AJ+JUJSTK 투여군에서는 Control군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6A).

등피부조직의 세포도 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 증가하였고 FK506 도포군은 Control군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며 (p<0.001) JUJSTK 투여군과 AJ+JUJSTK 투여군에서도 Control군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (p<0.001)(Fig. 6B).

(2) ALN에서 cell content 변화

① CD3⁺&CD19⁺, CD4⁺&CD8⁺ 절대 세포수
ALN에서 활성 CD3⁺ T 세포의 절대 세포수

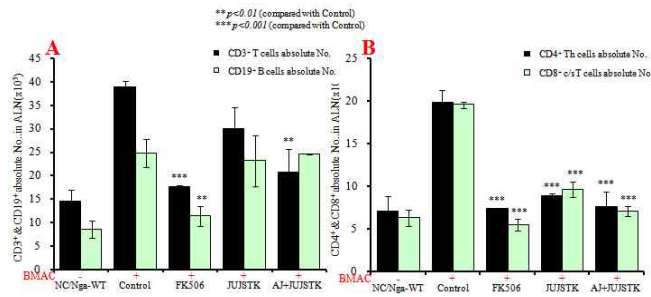


Fig. 7. Effects of JUJSTK & AJ+JUJSTK treatment on T and B cell changes of absolute numbers in ALN cells in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks (Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of JUJSTK orally administration (JUJSTK), and BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of AJ (200 μ l/mouse) ointment plus JUJSTK orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. NC/Nga mouse ALN cells (2×10^5 cells/ml) were isolated from ALN, and the ALN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute number of CD3+, CD19+ (A), and CD4+, CD8+ (B) in NC/Nga mouse.

는 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 증가하였고 FK506 도포군은 유의성 있는 감소를 나타내었으며 ($p < 0.001$) AJ+JUJSTK 투여군은 Control군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 ($p < 0.01$). CD19+ B 절대 세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 현저하게 증가하였고 FK506 도포군은 Control군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었으나 ($p < 0.01$) JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK 투여군은 모두 Control군과 차이가 없었다(Fig. 7A).

CD4+ T 세포와 CD8+ c/sT 세포에 대한 절대 세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 증가한 결과를 얻었고 FK506 도포군, JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK 투여군에서 Control군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 ($p < 0.001$)(Fig. 7B).

② CD3+CD69+, B220+CD23+, CD3+CCR3+ 절대 세포수

CD3+CD69+ T 세포와 B220+CD23+ B 세포의 절대 세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 증가하였고 FK506 도포군, JUJSTK 투여

군, AJ+JUJSTK 투여군의 CD3+CD69+ 세포의 절대 세포수는 Control군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 ($p < 0.001$)(Fig. 8A).

CD3+CCR3+ T 세포와 CCR3+ 세포의 절대 세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 증가하였고 FK506 도포군, JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK 투여군은 Control군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 ($p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 8B).

③ CD4+CXCR5+ 절대 세포수

CD4+CXCR5+ 세포의 절대 세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 증가하였고, FK506 도포군, JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK 투여군은 Control군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 ($p < 0.001$)(Fig. 9).

(3) PBMCs에서 cell content 변화

① Granulocyte의 변화

Granulocytes의 빈도(%)는 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 증가하였고, FK506 도포군은 Control군에 비하여 유의성 있는 감소를 나

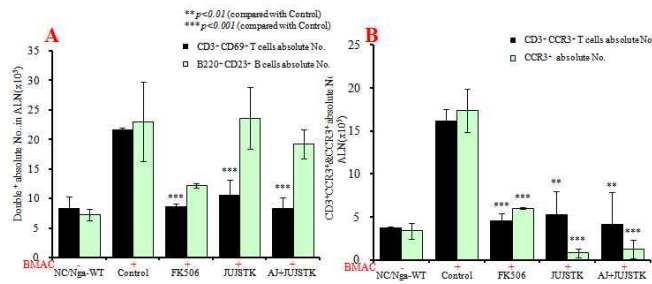


Fig. 8. Effects of JUJSTK & AJ+JUJSTK treatment on CD3+CD69+, B220+CD23+, CD3+CCR3+, CCR3+ changes of absolute numbers in ALN cells in NC/Nga mouse

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks (Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of JUJSTK orally administration (JUJSTK), and BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of AJ (200 μl/mouse) ointment plus JUJSTK orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. NC/Nga mouse ALN cells (2 × 10⁵ cells/ml) were isolated from ALN, and the ALN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute number of CD3+CD69+, CD3+CD69+, B220+CD23+ (A), and CD3+CCR3+, CCR3+ (B) in NC/Nga mouse.

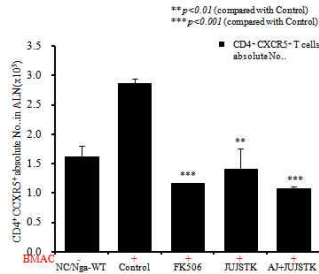


Fig. 9. Effects of JUJSTK & AJ+JUJSTK treatment on CD4+CXCR5+ gated cells and changes of absolute numbers in ALN cells in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks (Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of JUJSTK orally administration (JUJSTK), and BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of AJ (200 μl/mouse) ointment plus JUJSTK orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. NC/Nga mouse ALN cells (2 × 10⁵ cells/ml) were isolated from ALN, and the ALN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute number of CD4+CXCR5+ in NC/Nga mouse.

타내었으며(p<0.001), JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK 투여군은 Control군에 비하여 각각 감소하여 유의성 있는 결과를 나타냈다 (p<0.001) (Fig. 10).

② T & B cell content 변화

CD3⁺ T 세포, CD4⁺ Th 세포, CD8⁺ c/s T 세포, CD3⁺CD69⁺ 세포, B220⁺CD23⁺, CD3⁺CCR3⁺ 세포, CCR3⁺ 세포는 NC/Nga-WT군에 비하여

Control군이 총활성세포 빈도(%) 각각에서 모두 증가하였고, FK506 도포군에서 모두 감소를 나타내어 유의성 있는 결과를 나타내었다 (p<0.01, p<0.001). 또한 AJ+JUJSTK 투여군은 Control군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며 (p<0.001, p<0.01) JUJSTK 투여군의 CD3⁺CD69⁺, B220⁺CD23⁺, CCR3⁺ 세포의 활성세포도 유의성 있는 감소를 나타내었다.

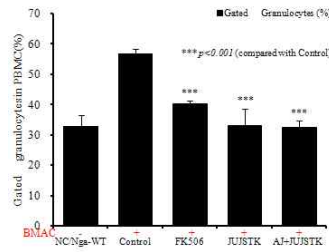


Fig. 10. Effects of JUJSTK & AJ+JUJSTK treatment on the percentage of granulocytes gated cells in PBMCs in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks (Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of JUJSTK orally administration (JUJSTK), and BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of AJ (200 $\mu\text{l}/\text{mouse}$) ointment plus JUJSTK orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. NC/Nga mouse PBMCs (2×10^5 cells/ ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total cell content (%) of granulocytes gated cells in NC/Nga mouse.

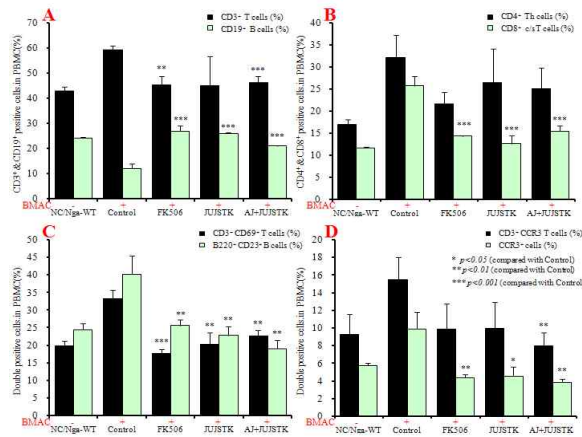


Fig. 11. Effects of JUJSTK & AJ+JUJSTK treatment on the percentage of T & B gated cells in PBMCs in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks (Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of JUJSTK orally administration (JUJSTK), and BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of AJ (200 $\mu\text{l}/\text{mouse}$) ointment plus JUJSTK orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. NC/Nga mouse PBMCs (2×10^5 cells/ ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total cell content (%) of CD3+ & CD19+ (A), CD4+ & CD8+ (B), CD3+ & CD69+ & B220+ & CD23+ (C), CD3+ & CCR3+ & CCR3+ (D) in NC/Nga mouse.

CD19⁺ B 세포에서는 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 총활성세포 빈도(%)가 감소한 결과를 얻었고 FK506 도포군은 Control군에 비하여 유의성 있게 증가한 결과를 나타내었으

며 ($p < 0.001$), JUJSTK 투여군과 AJ+JUJSTK 투여군도 유의성 있는 증가를 나타내었다 ($p < 0.001$)(Fig. 11).

(4) 등피부조직에서 T & B cell content 변화 CD3⁺ T 세포, CD3⁺CD69⁺ 세포, CCR3⁺, CD11b⁺Gr-1⁺ 세포를 측정된 결과 NC/Nga-WT 군에 비하여 Control군이 증가한 결과를 얻었고 FK506 도포군은 Control군에 비하여 각각 유의성 있는 감소를 나타내었으며 (p<0.001), JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK 투여군은 Control

군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 (p<0.001)(Fig. 12A, B).

7) 등피부조직에서 IL-17과 IL-23 mRNA 유전자 발현 분석

IL-17과 IL-23 mRNA는 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 증가하였고, FK506 도포군은

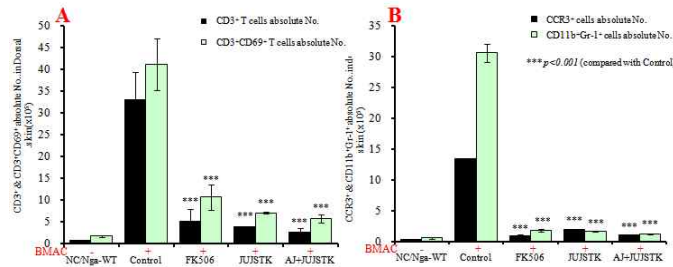


Fig. 12. Effects of JUJSTK & AJ+JUJSTK treatment on changes of absolute numbers in dorsal skin cells in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks (Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%-ointment (FK506), BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of JUJSTK orally administration (JUJSTK), and BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of AJ (200 μ l/mouse)-ointment plus JUJSTK orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. NC/Nga mouse dorsal skin cells (2×10^5 cells/ml) were isolated from dorsal skin, and the dorsal skin cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute number of CD3⁺ & CD3⁺CD69⁺ (A), CCR3⁺ & CD11b⁺Gr-1⁺ (B) in NC/Nga mouse.

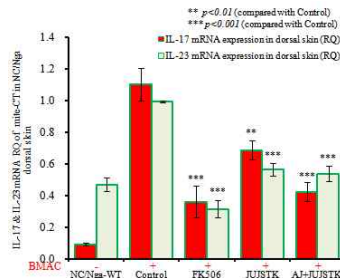


Fig. 13. Effects of JUJSTK & AJ+JUJSTK treatment on IL-17 and IL-23 mRNA expression in dorsal skin tissue in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, not treated BMAC (normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks (Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%-ointment (FK506), BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of JUJSTK (714 mg/kg) orally administration (JUJSTK), and BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of AJ (200 μ l/mouse)-ointment plus JUJSTK (714 mg/kg) orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. IL-17 and IL-23 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. The amount of Taqman probe was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Each point represents the mean \pm SE of six mouse.

Control군에 비하여 유의성 있게 억제되었으며 ($p < 0.001$), JUJSTK 투여군과 AJ+JUJSTK 투여군에서도 대조군에 비하여 각각 유의성 있게 억제되었다 ($p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 13).

8) 등피부조직과 ALN에서 염증 유전자발현 분석

Eotaxin2 mRNA와 CCR3 mRNA의 유전자발현은 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 각각 증가한 결과를 얻었고 FK506 도포군은 Control군에 비하여 유의성 있는 억제효과를 나타내었으며 ($p < 0.001$), JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK 투여군은 Control군에 비하여 각각 유의성 있는 억제효과를 나타내었다 ($p < 0.001$)(Fig. 14A).

IL-5 mRNA와 IL-13 mRNA의 유전자발현은 NC/Nga-WT군에 비하여 Control군이 각각 증가한 결과를 얻었고 FK506 도포군은 Control군에 비하여 유의성 있는 억제효과를 나타내었으며($p < 0.001$), JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK

투여군은 IL-13 mRNA에서 Control군에 비하여 각각 유의성 있는 억제효과를 나타내었다 ($p < 0.001$)(Fig. 14B).

9) Histology

(1) 등피부 조직의 조직검사 및 분석

등피부조직에 H&E 염색과 toluidine blue 염색을 실시한 결과, NC/Nga-WT군(A)의 피부조직에 비해 Control군(B)은 epidermis의 두께가 과형성, 확장되어 (long red arrow) 그 주변에 과각화, 색소침착, 과립증가, 부전각화증, 비만세포의 침윤등이 NC/Nga-WT군에 비하여 현저하게 증가되었고, FK506 도포군(C)의 일부는 Control군에 비하여 NC/Nga-WT군에 가깝게 epidermis의 두께가 줄어들었고 그 주변에 세포변형과 각화증상, 비만세포의 침윤 등이 감소를 나타내었다. JUJSTK 투여군(D)은 Control군에 비하여 epidermis의 두께가 약간 줄어들었고 그 주변에 과각화, 색소침착, 과립증가, 부전각화증, 비만세포의 침윤 등이 감소를 나타

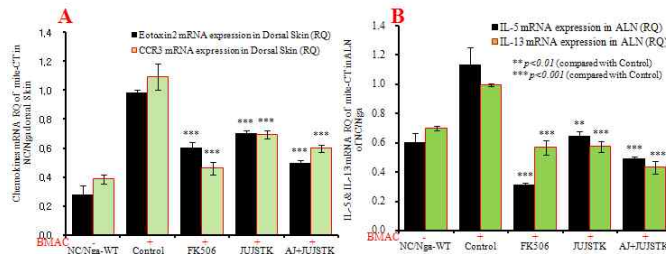


Fig. 14. Effects of JUJSTK & AJ+JUJSTK treatment on eotaxin 2, CCR3, IL-5, and IL-13 mRNA expression in NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), BMAC treatment for 3 weeks (Control), BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of JUJSTK orally administration (JUJSTK), and BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of AJ (200 μ l/mouse) ointment plus JUJSTK orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. Total RNAs were extracted in dorsal skin tissue or ALN, and eotaxin 2, CCR3, IL-5, and IL-13 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

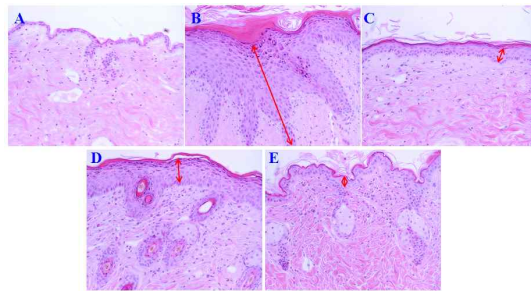


Fig. 15. Histological features of dorsal skin group in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse induced by BMAC

Atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), B; BMAC treatment for 3 weeks (Control), C; BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), D; BMAC treatment for 3 weeks with JUJSTK (714 mg/kg) orally administration (JUJSTK), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μ l/mouse) ointment plus JUJSTK (714 mg/kg) orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. NC/Nga skin biopsy were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and shows the thickening of the epidermis (red arrow) by bright microscope (\times 200). Data represent individual values and the average value of four individual mouse in each group.

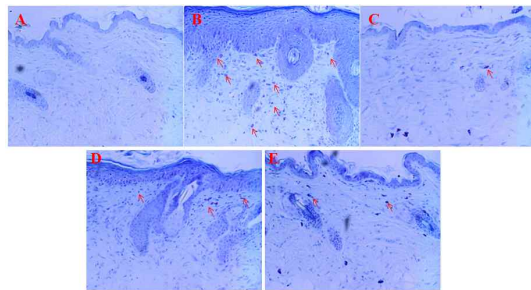


Fig. 16. Histological status of the skin stained with toluidine blue of dorsal skin group in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), B; BMAC treatment for 3 weeks (Control), C; BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), D; BMAC treatment for 3 weeks with JUJSTK orally administration (JUJSTK), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μ l/mouse) ointment plus JUJSTK orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. NC/Nga skin biopsy were stained with toluidine blue staining and shows the degranulated mast cells in the dermis (red arrow) by bright microscope (\times 200). Data represent individual values and the average value of four individual mouse in each group.

내었다. AJ+JUJSTK 투여군(E)은 Control군에 비하여 epidermis의 두께가 NC/Nga-WT군에 가깝게 현저하게 줄었고 그 주변에 과각화, 색소침착, 파립증가, 부전각화증, 비만세포의 침윤 등도 현저하게 감소하였다(Fig. 15, 16).

(2) ALN 조직 검사 및 분석

NC/Nga-WT군(A)에 비하여 Control군(B)에서 inflammatory lymphocytes cells(ILC)과 plasma cells(PC) 침윤등이 현저하게 증가된 것이 관찰되었고 FK506 도포군(C)은 Control군에 비하여 크기가 현저하게 줄어들었다. 그러나 JUJSTK 투여군(D)에서는 Control군에 비하여 약간 줄

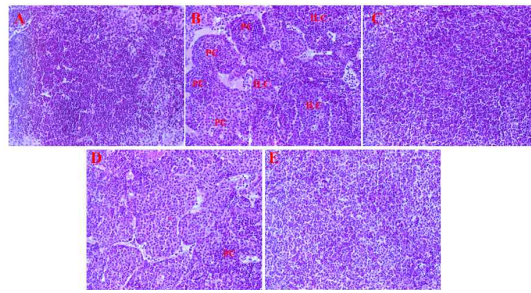


Fig. 17. Histological features of ALN group in atopic dermatitis like skin NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), B; BMAC treatment for 3 weeks (Control), C; BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), D; BMAC treatment for 3 weeks with JUJSTK (714 mg/kg) orally administration (JUJSTK), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μ l/mouse) ointment plus JUJSTK (714 mg/kg) orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. NC/Nga ALN biopsy were stained with hematoxylin and eosin (H&E), and the NC/Nga control (B) shows ALN in the infiltration of the Inflammatory Lymphocytes Cells (ILC, blue arrow) and plasma Cells (PC) (arrows) by bright microscop (Nikon, Japan, original magnification, \times 200).

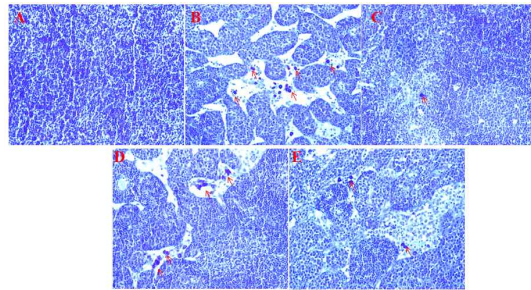


Fig. 18. Histological status of the tissue stained with toluidine blue of ALN group in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), B; BMAC treatment for 3 weeks (Control), C; BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), D; BMAC treatment for 3 weeks with JUJSTK (714 mg/kg) orally administration (JUJSTK), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μ l/mouse) ointment plus JUJSTK (714 mg/kg) orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. NC/Nga ALN biopsy were stained with toluidine blue staining and shows the degranulated mast cells in the dermis (red arrow) by bright microscope (\times 200). Data represent individual values and the average value of four individual mouse in each group.

어 들었 고 AJ+JUJSTK 투여군(E)은 Control군에 비하여 NC/Nga-WT군에 가깝게 감소하였다 (Fig. 17).

NC/Nga-WT군(A)에 비하여 Control군(B)의 ALN에서 mast 세포들이 cluster를 형성된 상태로 관찰되었고 FK506 도포군(C)은 Control군에 비하여 현저하게 감소되었다. 그리고 JUJSTK

투여군(D), AJ+JUJSTK 투여군(E)은 Control군과 비슷하게 감소되었다(Fig. 18).

10) Immunohistochemical staining

NC/Nga-WT군(A)에 비하여 Control군(B)의 등피부조직에서 CD4+ Th 세포들이 epidermis 아래 부분에 cluster를 형성된 상태로 현저하게

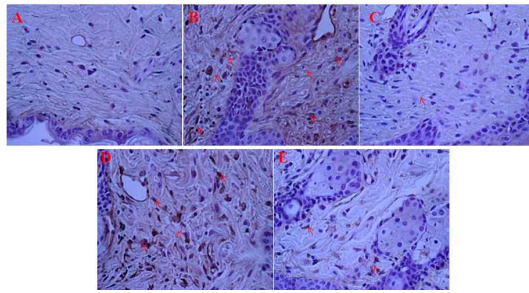


Fig. 19. Immunohistochemical staining of the skin stained with CD4+ Th cells of dorsal skin in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), B; BMAC treatment for 3 weeks (Control), C; BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), D; BMAC treatment for 3 weeks with JUJSTK (714 mg/kg) orally administration (JUJSTK), and E; BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of AJ (200 μl/mouse) ointment plus JUJSTK (714 mg/kg) orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. Following 3 weeks, mouse dorsal skin biopsy were stained with anti-mouse CD4mAb respectively. Dorsal skin biopsy were stained with anti-mouse CD4mAb, used LSAB2 HRP. Rabbit/mouse(DAB) kit and shows the CD4+ T cells in the dermis (red arrow) by bright microscope (× 400).

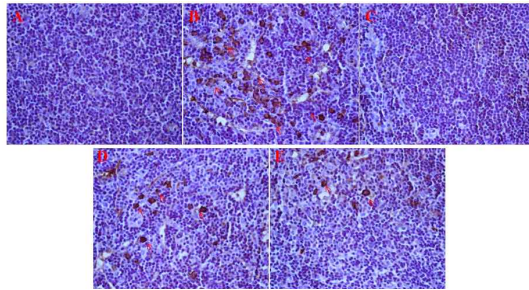


Fig. 20. Immunohistochemical staining of the tissue stained with CCR3+ cells of ALN in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; not treated BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT), B; BMAC treatment for 3 weeks (Control), C; BMAC treatment for 3 weeks with FK506 (0.3%) ointment (FK506), D; BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of JUJSTK (714 mg/kg) orally administration (JUJSTK), and E; BMAC treatment for 3 weeks with skin apply of AJ (200 μl/mouse) ointment plus JUJSTK (714 mg/kg) orally administration (AJ+JUJSTK) for 3 weeks. Following 3 weeks, mouse ALN biopsy were stained with anti-mouse CCR3mAb respectively. ALN biopsy were stained with anti-mouse CCR3mAb, used LSAB2 HRP. Rabbit/mouse(DAB) kit and shows the CCR3+ cells in the dermis (red arrow) by bright microscope (× 400).

증가된 것을 관찰하였다. FK506 도포군(C)은 Control군에 비하여 감소되었고 AJ+JUJSTK 투여군(E)과 JUJSTK 투여군(D)은 CD4+ Th 세포들이 NC/Nga-WT군에 가깝게 감소되었다 (Fig. 19).

NC/Nga-WT군(A)에 비하여 Control군(B)의

ALN에서 CCR3+ 세포들이 ALN 조직사이에 침윤되어 현저하게 증가된 것을 관찰하였다. FK506 도포군(C)과 AJ+JUJSTK 투여군(E)에서 Control군에 비하여 NC/Nga-WT군에 가깝게 현저하게 감소되었고 JUJSTK 투여군(D)도 감소되었다(Fig. 20).

IV. 考 察

아토피 피부염은 홍반, 부종, 소양증, 삼출과 부스럼 딱지와 인설을 특징으로 하며¹⁾ 알레르기성 습진, 소아습진, 굴측부 습진, 범발신경피부염, Besnier 소양증으로 불리워지는 만성 재발성 염증성 피부 질환이다^{37,8)}. 아토피 피부염의 발병 기전은 면역학적 기전과 함께 유전적 요인, 환경적 요인이 복잡하게 관여한다. 또한 원인 항원으로 식품 항원과 흡입성 항원을 들 수 있는데, 식품 항원은 영아와 어린 소아에서, 흡입성 항원은 식품 항원보다는 좀 더 연장아에서 연관이 있다³⁹⁾.

아토피 피부염의 서양의학적 치료는 염증과 소양증의 조절, 2차 병변의 발생 방지를 목적으로 한다. 스테로이드 외용제는 보습제, 식이 조절, 항히스타민제, 항생제와 함께 흔히 사용된다. 그러나 이를 장기간 사용했을 때 피부의 위축이나 소아 환자에서 성장 지연의 가능성 등 각종 부작용이 문제되고 있어 새로운 치료에 대한 필요성이 증가하고 있다^{41,42)}.

Naive T 세포는 항원적 자극에 의해 반응할 때 cytokine 환경이 T-cell을 적절히 분화시키는데 예를 들어 국소적 APC(All Purpose Cure) 들이 IL-12를 생산하는데 특히 IFN- γ 가 존재할 때 CD4⁺T 세포들이 세포내 병원균에 대한 세포매개성 면역반응을 촉진하는 IFN- γ 분비 Th1 세포로 우선적으로 분화된다⁴³⁾. 그리고 IL-4가 존재할 때 CD4⁺T 세포가 우선적으로 IL-4, IL-5, IL-13을 만드는 Th2 세포로 발달되고 Th2는 세포외 병원균에 대한 체액성 면역반응을 촉진시킨다⁴⁴⁾. 이런 T 세포들은 IL-17A, IL-17F (Th1, Th2, CD4+ T 세포에 의해 생성되지 않는 cytokine들)이라는 생산물에 의해 Th17이라고 이름 붙여졌다. 또한 Th17 세포들은 면역반응을 일으킨다고 알려져 있는 다른

범위의 요소들도 생산하는데 이들은 TNF- α , IL-6, GM-CSF, CXCL-1, CCL-20을 포함한다. T cell의 한부분의 주된 기여로 일반적인 면역반응이 이루어진다는 것은 아직 규명되지 않은 채 남아 있지만 그들이 어떤 감염매개물의 제거에 관한 역할을 할 수 있다고 보인다⁴⁵⁾. 최적으로 조절된 T-cell subset(부분집합)반응의 결과는 병원균의 제거와 memory T 세포의 생성이다. 부적절하거나 지속적으로 활성을 띤 T-cell subset들은 자가면역이나 자연적 알러지와 같은 질병을 유발시킬 수 있으며⁴⁶⁾ IL-17은 염증성 자가면역 반응을 일으키는 병원균인 T 세포를 생산하며 IL-23은 Th17 세포들의 증식과 생존에 있어서의 중요한 요소이다⁴⁷⁾.

아토피 피부염은 한의학적으로는 乳癬, 胎熱, 苔癬, 奶癬, 胎斂瘡, 濕疹 등의 범위에 속하는 것⁴⁸⁾으로 《巢氏諸病源候論》⁷⁾에서는 “小兒面上癬皮如甲錯起乾燥, 謂之乳癬.”이라 하였고 《保嬰全書》⁴⁹⁾에서 “胎熱者 初生旬日之間 自閉 色赤 眼胞腫 啼煩壯熱 溺黃”이라 하여 아토피성 피부염과 유사한 원인 및 증상을 찾아볼 수 있으며 《醫宗金鑑·外科心法要訣·嬰兒部·胎斂瘡》⁵⁰⁾에서는 胎斂瘡이 奶癬과 동일 질병임을 밝히면서 乾斂과 濕斂으로 분류하여 치료하였다.

최근 한의학에서도 아토피 피부염 연구가 활발하게 이루어지고 있으며⁵¹⁻⁶⁰⁾ 임상에서의 연구로는 金銀花 추출물을 이용한 Kim 등⁶¹⁾의 연구 및 當歸飲子加減이 아토피 피부염의 발진 억제에 미치는 영향에 대한 연구⁶²⁾ 등이 있었고, 아토피 피부염 환자에 仙方敗毒湯을 투여하여 말초혈액의 단핵세포에서 IL-4, IL-5, IL-13, IgE의 수준이 대조군에 비하여 현저하게 감소하였다는 연구가 있었다⁶³⁾.

滋陰除濕湯加減은 《皮膚病中醫診療學》¹⁵⁾에 수록된 처방으로 滋陰除濕, 潤燥止痒하는

효능이 있어 血燥皮疹을 치료한다고 하였다. 本方은 益氣시키고 補血潤燥하는 甘草, 當歸, 白芍藥, 熟地黃, 何首烏에 活血利水 작용이 있는 益母草, 虛熱을 退하고 瀉火시키는 知母, 黃芩, 地骨皮, 風濕을 없애고 風熱을 發散시키는 防風과 柴胡, 利水滲濕, 泄熱작용이 있는 澤瀉로 조성되어 血燥濕熱하여 피부가 건조하고 가려우며 습진이 형성되고 태선화와 각질, 피부 비후, 결찰 후에 소량의 출혈이 발생하거나 血癩가 생기며 특히 야간에 증상이 심해지는 것을 치료할 목적으로 사용되는 처방이다⁶⁴.

아토피 크림은 아로마 오일을 이용한 외용제로 강한 항염작용과 소독작용을 하는 알데히드(Aldehyde), 에시드(Acid), 페놀(Phenol), 에테르(Ether)등의 성분을 포함하고 있어 아토피성 피부의 염증을 줄여주는 것으로 알려져 있다. Tea Tree는 면역기능을 강화, 염증과 가려움을 제거해 주고 독소배출을 도와주며 Lavender는 피부 재생 효과가 있어 세포 성장을 촉진시키고 진정의 효능이 있으며⁶⁵ Chamomile roman은 상처를 아물게 하고 강력한 안정효과와 항염증 작용을 가지고 있다⁶⁶. 베이스 크림은 천연 식물성 오일의 함유로 보습효과를 주며 알로에베라와 비타민 E(초산토크페롤)가 함유되어 항산화작용을 한다⁶⁶.

紫雲膏는 紫草, 當歸, 胡麻油, 蜜蠟 및 豚脂의 5 가지 약재로 구성된 膏藥으로 陳實功의 《外科正宗》⁸⁾에 潤肌膏라 하여 피부를 滋潤하여 깨끗하게 하는 膏藥을 華岡이 豚脂를 가하여 《春林軒膏方便覽》에 紫雲膏라 처음 命名하였고⁶⁷⁾ 《醫宗金鑑·外科心法要訣》⁶⁸⁾에 “若肌膚燥裂者 用潤肌膏擦之甚效”라 하여 현재 임상에서 습진, 건선, 탈모, 백전풍, 알러지성 피부염, 아토피성 피부염 등 광범위한 피부 질환에 치료 연고로 사용되고 있다.

역대 문헌과 중의 잡지에서는 아토피성 피

부염 치료에 대한 內治法과 外治法이 다소 소개된 바가 있다¹³⁾. 그러나 아직까지 한의학 임상에서 外治法을 보편적으로 활용하는데 한계가 있으며 약물복용에만 치중하여 內治法에 의존하는 경향이 주류를 이루고 있는 실정이다²³⁾. 특히 소아의 아토피성 피부염은 장기간 내복약을 투여해야 하는 어려움이 있어 단순한 內治法을 활용하기보다 內外治法을 병용하면 치료효과를 높이는 데 기여할 것⁶⁹⁾으로 기대된다.

이러한 배경에서 본 연구는 JUJSTK와 AJ+JUJSTK 투여가 IL-17 생성억제를 촉진하여 아토피질환을 치료하는데 효과적인 효능을 나타내는지 알아보려고 하였다.

실험의 결과를 살펴보면, In vivo 실험에서는 NC/Nga 생쥐에 BMAC를 적용하여 피부발진을 유발시킨 후 양성대조군으로는 FK506 (Tacrolimus) 연고⁷⁰⁾를 사용하였고 JUJSTK, AJ+JUJSTK를 각각 투여하여 피부발진 및 활성화된 면역질환이 억제되는지를 관찰하였다. BMAC를 NC/Nga 생쥐에 3 주간 도포하고 최종 5 주 후 등피부에 나타난 소양행동을 동반한 홍반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등의 단계를 clinical skin score로 측정된 결과 양성대조군인 FK506과 AJ+JUJSTK 투여군은 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다(Fig. 2). 실험 종료 후 혈액을 채취하여 분석한 결과 WBC 내의 neutrophils과 eosinophils 비율(%)은 정상군에 비해 대조군이 증가한 결과를 얻었고 FK506 도포군의 neutrophils, eosinophils, basophils 비율은 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다. 또한 AJ+JUJSTK 투여군의 eosinophils의 비율은 유의성 있는 감소를 나타내었고(p<0.01), neutrophils와 basophils 비율은 대조군에 비하여 감소를 나타내었지만 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 3). 이는 NF-κ B decoy ODNs

의 투여로 CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells (Treg)의 확장으로 혈액상의 eosinophils, basophils의 비율이 감소되었다는 연구 결과⁷¹⁾와 일치한다. 또한 염증 반응을 유도하는 IgE와 IgG1의 수치를 측정 한 실험에서 대조군 수치 결과는 급격한 증가를 나타내었는데 반하여 FK506, JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK 투여군에서는 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 AJ+JUJSTK 투여군이 NC/Nga 생쥐에서 Th17 세포의 분화를 억제하여 B 세포 분화에서 수반되는 IgE와 IgG1의 수치를 억제하는 것으로 보인다.

ALN는 만성아토피질환 동물에서 중요한 역할을 하는 면역기관으로 아직 임상에서는 아토피와의 연관성에 대한 연구와 임상보고가 부족한 상태이다. 그러나 일부 심한 만성아토피환자의 경우 겨드랑이가 부어올라 ALN의 크기가 증가되어 있다는 보고가 있으며⁷²⁾ 최근 NC/Nga 아토피 연구보고에서 ALN을 target으로 하여 연구결과를 보고하고 있다⁷³⁾. 본 실험에서도 BMAC로 유발된 만성 아토피 피부발진 NC/Nga 생쥐의 ALN이 2개 이상인 경우로 아토피 피부발진에 대한 NC/Nga 생쥐의 임파절 target을 ALN으로 정하였다.

BMAC 도포로 등에 피부염을 유발한 NC/Nga 생쥐의 ALN를 적출한 후 cytokine을 측정 한 결과 IFN- γ 의 생산량이 BMAC를 도포하지 않은 정상군에 비하여 대조군이 증가한 결과를 얻었고 FK506 도포군은 대조군에 비하여 IFN- γ 의 생산량이 유의성 있게 감소를 나타내었다. 또한 JUJSTK 투여군, AJ+JUJSTK 투여군의 IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-17의 생산량도 대조군에 비하여 각각 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

최근 연구에서 FK506을 아토피 피부발진 NC/Nga 생쥐에 도포하여 피부등 면역기관을 toluidine-blue 염색으로 조직 검사한 결과 비만

세포 density 증가를 억제한다는 결과가 있었다⁷⁴⁾. 본 실험에서 ALN와 등피부조직의 총세포수를 측정한 결과 대조군에 비하여 JUJSTK 투여군의 등피부조직 세포수는 유의성 있게 감소하였고 ALN세포수도 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6). 또한 ALN에서 유세포형광분석을 통한 세포 수 측정 결과 CD3⁺ T세포, CD4⁺ Th 세포, CD3+CD69+, 활성화된 B 세포, CCR3⁺, CD4+CXCR5⁺ 세포 등이 활성세포수와 세포수에서 감소를 나타내었고(Fig. 7, 8). CD4⁺ Th세포에 대한 활성세포수와 세포수도 현저한 감소 효과를 나타내었다(Fig. 9). 이러한 결과는 ALN과 등피부조직에서 real-time PCR로 IL-5, IL-13, eotaxin2, CCR3 mRNA를 분석하여 FACS 실험 결과를 통해 알 수 있었으며 AJ+JUJSTK의 투여가 ALN에서 Th17세포의 분화를 억제하여 ALN와 등피부발진 부위로 면역염증세포의 생성을 억제하는 것으로 보인다.

PBMC에서 granulocyte, T & B cell content 변화를 FACS로 SSC와 FSC를 dot plot으로 4 마리를 분석한 결과, JUJSTK, AJ+JUJSTK 투여군의 granulocytes의 비율이 각각 감소하여 유의성 있는 결과를 나타냈으며(Fig. 10) CD3⁺ CCR3⁺ 세포, CCR3⁺ 세포에서도 정상군에 비하여 AJ+JUJSTK 투여군의 빈도(%)가 감소를 나타내어 유의성 있는 결과를 나타냈다 (p < 0.001) (Fig. 11). 이는 AJ+JUJSTK 투여군이 ALN과 등피부발진조직에서 Th17 세포의 분화 억제로 활성 B 세포와 호산구, 비만세포의 생성을 억제하는 것으로 생각된다.

FACS상의 활성세포에 적용하여 아토피 피부발진 부위 내 침윤된 세포수를 측정한 결과 JUJSTK투여군, AJ+JUJSTK 투여군의 CD3+T세포, CCR3+, CD3+/CD69+ 세포, CD11b+Gr-1+ MSC 세포의 세포수도 유의성 있는 감

소를 나타내었다(Fig. 12). 또한 NC/Nga 아토피 생쥐의 등피부부위를 biopsy하여 피부세포에서 cDNA를 합성한 후 Real-Time PCR을 이용하여 IL-17과 IL-23 mRNA의 유전자 발현양을 비교 분석한 결과 IL-17과 IL23 mRNA 유전자는 AJ+JUJSTK 투여군에서 유의성 있는 발현억제를 보였다(Fig. 13). 또한 발진피부세포에서 cDNA를 합성한 후 Real-Time PCR을 이용하여 Eotaxin2 mRNA와 CCR3 mRNA의 유전자 발현 비교 분석한 결과 AJ+JUJSTK 투여군은 유의성 있는 억제효과가 나타났으며 IL-5 mRNA와 IL-13 mRNA의 유전자 발현의 RQ값도 대조군에 비하여 유의성 있는 억제효과를 나타내었다(Fig. 14).

실험 종료 후 SPF와 conventional 조건에 사육한 NC/Nga 생쥐의 등피부조직을 biopsy하여 H&E 염색과 dermis에 침윤된 비만세포를 관찰하기 위하여 toluidine blue 염색을 실시한 결과 AJ+JUJSTK 투여군이 대조군에 비하여 epidermis의 두께가 정상군에 가깝게 현저하게 줄어들었고(Fig. 15, 16E) ALN을 biopsy하여 H&E 염색과 toluidine blue 염색을 실시한 결과 염증세포 침윤이 감소하였으며 epidermis의 두께가 현저하게 줄어들었고(Fig. 17) 비만세포 침윤이 감소되었다(Fig. 18). 등피부조직에서 CD4⁺ Th 세포의 면역화학조직 염색 결과 JUJSTK 투여군(Fig. 19D)과 AJ+JUJSTK 투여군(Fig. 19E)에서 epidermis의 두께가 정상군에 가깝게 감소되었다. 또한 CCR3⁺ eosinophils 세포들은 FK506 도포군(Fig. 20C)과 AJ+JUJSTK 투여군(Fig. 20E)에서 대조군에 비하여 정상군에 가깝게 감소되었고 JUJSTK 투여군(Fig. 20D)도 감소되었다.

이상에서 JUJSTK와 AJ+JUJSTK 병용투여군이 CD4⁺ T 세포에서 Th17⁺CD4⁺ T 세포로의 분화를 억제하여 BMAC로 유도된 아토피성 피부발진모델에서 피부 비후에 의한 epidermis

두께 확장, Th2 면역세포의 과잉 침윤 (CD4⁺) 과 비만세포 (CCR3⁺)의 침윤을 감소시켜 피부염을 완화시킨다는 결과를 얻었다. 이로써 JUJSTK와 AJ+JUJSTK는 Th17 세포의 분화를 억제하여 아토피 피부염의 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단되며 향후 이에 대한 실험적 보완 및 후속 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

BMAC(Biostir Mite Antigen Cream)로 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에 滋陰除濕湯加減, 아토피 크림, 紫雲膏와 滋陰除濕湯加減 병용투여가 아토피 피부염 치료에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. JUJSTK 투여군, AJ와 JUJSTK 병용투여군이 각각 대조군에 비하여 clinical skin score를 유의성 있게 감소시켰다.
2. JUJSTK 투여군, AJ와 JUJSTK 병용투여군이 각각 대조군에 비하여 혈액 중 WBC 내 eosinophils의 세포비율이 유의성 있게 감소되었다.
3. JUJSTK 투여군, AJ와 JUJSTK 병용투여군이 각각 대조군에 비하여 혈장 중 IgE, IgG1 수준을 유의성 있게 감소시켰다.
4. JUJSTK 투여군, AJ와 JUJSTK 병용투여군이 각각 대조군에 비하여 IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-17 생산량을 유의성 있게 감소시켰다.
5. JUJSTK 투여군, AJ와 JUJSTK 병용투여군이 각각 대조군에 비하여 ALN과 등피부조직의 세포수를 감소시켰다.
6. JUJSTK 투여군, AJ와 JUJSTK 병용투여

군이 각각 ALN, PBMC, 등피부조직에서 CD3e+ T cell, CD4+ Th cell, CD8+ c/sT cell, CD3+CCR3+ cell, CCR3+ cell, CD3+CD69+, CD4+CXCR5+의 세포수를 대조군에 비하여 감소시켰다.

7. JUJSTK 투여군, AJ와 JUJSTK 병용투여군이 각각 등피부조직에서 CD11b⁺/Gr-1⁺의 세포수를 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.
8. JUJSTK 투여군, AJ와 JUJSTK 병용투여군이 각각 등피부조직에서 Eotaxin2 mRNA, CCR3 mRNA, ALN에서 IL-5 mRNA, IL-13 mRNA의 유전자 발현을 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.
9. JUJSTK 투여군, AJ와 JUJSTK 병용투여군이 각각 등피부조직과 ALN에서 epidermis의 두께와 dermis 부분의 침윤된 염증면역세포 및 비만세포등을 현저하게 감소시켰다.
10. JUJSTK 투여군, AJ와 JUJSTK 병용투여군이 등피부조직과 ALN에서 CD4+와 CCR3+ 세포의 침윤을 대조군에 비하여 감소시켰다.

of atopic dermatitis in Singapore school children. Br J Dermatol. 2002;146:101-6.

4. 이해성, 김종서, 편복양. 소아 아토피 피부염의 빈도와 원인의 변화, 소아 알레르기 및 호흡기. 2003;13(4):227-37.
5. 洪元植 編著. 精校黃帝內經素問. 東洋醫學研究院 出版部. 1985:72-80, 246-8.
6. 宋書功 主編. 金匱要略 廣州校註. 人民衛生出版社. 1994:221-5.
7. 巢元方 編著. 巢氏諸病源候論. 서울: 대성문화사. 1992:251-3.
8. 陳實功. 外科正宗. 北京: 人民衛生出版社. 1983:269, 322.
9. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연. 아토피 피부염의 동, 서의학적 문헌고찰, 대한안이비인후피부과학회지. 2002;15(1):226-52.
10. 馬紹堯. 現代中醫皮膚性病學. 上海: 上海中醫藥大學出版社. 2001:153-60.
11. 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. 1999:193-8.
12. 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. 1999:475-93.
13. 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海: 上海科學技術出版社. 1994:461.
14. 박보경, 장규태, 김장현. 소아 아토피성 피부염의 외치법에 대한 고찰. 대한한방소아과학회지. 2003;17(1):71-86.
15. 徐宜厚 王保方 張寒英 編著. 皮膚病中醫診療學. 北京: 人民衛生出版社. 1997:255.
16. 조성준. 향기치료의 기적. 서울: 도서출판宇石. 2000:120, 139, 170.
17. 양기숙. 아토피 피부염 상재균인 황색포도상구균에 대한 아로마 오일의 성장 저해 효과에 관한 연구. 전남대학교 대학원. 2007.

參考文獻

1. 홍창의. 소아과학. 서울:대한교과서(주). 1994: 4-6, 1066-8
2. Kunz B, Oranje Ap, Labreze L, Stalder JF, Ring J, Taieb A. Clinical validation and guidelines for the SCORAD index:Consensus Report of the European Task Force on AtropicDermatitis. Dermatology. 1997;195:10-9.
3. Tay YK, Kong KH, Khoo L, Goh CL, Giam YC : The prevalence and descriptive epidemiology

18. 失數道明. 韓方治療百話. 서울, 동남출판사. 1991:322.
19. 李鏞泰. 紫雲膏가 生肌作用에 미치는 영향. 동의대학교 東醫論集. 1998;28:547-58.
20. 어경정, 고우신, 김영균. 紫雲膏가 흰쥐의 창상에 미치는 효과. 대한 외관과학회지. 1998;11(1):54-68.
21. 이금택, 최병태, 이용태, 고우신. 紫雲膏加 金銀花가 흰쥐의 창상에 미치는 효과. 대한한의학회지. 1999;20(1):132-41.
22. 全宰弘. 자운고가 자외선에 의한 피부손상 및 광노화에 미치는 영향. 동국대학교 대학원 박사논문. 2007.
23. 한재경, 김윤희. 외용 요법을 병행한 아토피 피부염 환자 20례에 대한 임상적 연구. 대한한방소아과학회지. 2001;15(1):15-37.
24. 신상호, 김미보, 변석미, 이호섭, 박선규, 고우신, 윤화정. 아토피 피부염의 외치법에 대한 고찰. 한방안이비인후피부과학회지. 2008;21(2):80-93.
25. 황치환, 윤채성, 송승현, 원영호, 황충연. 葛根解肌湯加味方과 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2008;21(2):1-18.
26. 민영규, 최정화, 김종한, 박수연. 消風散加 減方과 外治方 병용이 NC-Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. 대한이비인후피부과학회지. 2005;18(1):116-34.
27. 大田大學校 韓方病院. 韓方病院 處方集, 大田: 韓國出版社. 2001:542.
28. Mina Yamamoto, Takayo Haruna, Kiyoshi Yasui, Hisashi Takahashi, Miho Iduhara, Shigeki Takaki, Masashi Deguchi and Akinori Arimura. A Novel Atopic Dermatitis Model Induced by Topical Application with Dermatophagoides Farinae Extract in NC/Nga mouse. Allergology International. 2007;56:1-10.
29. Kang K, Kubin M, Cooper KD, Lessin SR, Trinchieri G, Rook AH. IL-12 synthesis by human Langerhans cells. J Immunol. 1996; 156:1402-7.
30. Dogru M., Katakami C., Nakagawa N., Tetsumoto K. and Yamamoto M. Impression cytology in atopic dermatitis. Ophthalmology. 1998;105, 1478-84.
31. Hoffler U. Oette K. Comparative studies on four thrombocyte counting methods: counting in the smear preparation after Fonio, chamber counting in the phase contrast microscope, counting with the Coulter Thrombocounter, and the Technicon Auto-Counter. Z Klin Chem Klin Biochem. 1974;12(5):198-206.
32. Matsuda, H., N. Watanabe, G.P. Geba, J. Sperl, M. Tsudzuki, J. Hiroi. Development of atopic dermatitis like skin lesion with IgE hyperproduction in Nc/Nga mouse. Int Immunol. 1997;9:461-6.
33. Galli SJ. Allergy. Curr. Biol. 2006;10:93-5.
34. Yuki, Hashimoto., Iwao Arai, Yutaka Nakanishi, Takanobu Sakurai, Atsushi Nakamura. Scratching of their skin by Nc/Nga mouse leads to development of dermatitis. Life Sciences. Japan 17 March. 2004;76:783-94.
35. K Jöhrens, I Anagnostopoulos, H Dürkop & H Stein. Different T-bet expression patteerns characterize particular reactive lymphoid tissue lesions. Histopathology. 2006;48:343-52.
36. Danniel W. W.. A foundation for analysis in the health science. Biostics. 1983:136-46.
37. 대한피부과학회. 피부과학. 서울:녹문각. 1994:133-8.

38. 강석영. 알레르기 질환 임상 의 실제. 서울: 일조각. 1988:293-7.
39. Turvey SE. Atopic disease of childhood. *Curr Opin Pediatr.* 2001;13:487-95.
40. Sicherer SH, Morrow EH, Sampson HA. Dose-response in double-blind, placebocontrolled oral food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 105:582-6.
41. Guin JD. Complications of topical hydrocortisone. *J Am Acad Dermatol.* 1981;4:417-22. Graham-Brown R. Managing adults with atopic dermatitis. *Dermatol Clin.* 1996;14: 531-7.
42. Smith CH. New approaches to topical therapy. *Clin Exp Dermatol.* 2000;25:567-74.
43. Infante-Duarte, C., Horton, H.F., Byrne, M.C., Kamradt, T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.* 2000;165:6107-15.
44. Harrington, L.E., et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 2005;6: 1123-32.
45. Langrish, C.L., et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 2005; 201:233-40.
46. Park, H., et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 2005;6: 1133-41.
47. Kolls, J.K. Linden, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004; 21:467-76.
48. 공남미, 지선영. 아토피 피부염의 양·한 방적 고찰. *대한외관과학회지.* 1999;12(1); 241-53.
49. 薛鎧. 保嬰全書, 台北: 新文豐出版公司. 1979:252-6.
50. 吳謙. 醫宗金鑑(下), 北京: 人民衛生出版社. 1982:443-4.
51. 신동길, 김우연, 이진용, 김덕곤. 仙方敗毒散이 아토피 피부염 환자 단핵세포의 Cytokine 분비에 미치는 영향. *대한한방 알레르기 및 면역학회 자료집.* 2003;1: 93-110.
52. 한재경, 김윤희. 加味當歸飲子가 아토피 동물 모델에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지.* 2005;19(1):35-52.
53. 조백건, 이진용, 김덕곤. 內消和中湯加味方의 아토피 피부염 치료에 대한임상고찰. *대한한방소아과학회지.* 2005;19(1):131-41.
54. 유한정, 이진용, 김덕곤. 內消和中湯加味方이 아토피 피부염 환자의 혈중 cytokine 분비에 미치는 영향. *대한한방소아과학회 지.* 2006;20(1):15-29.
55. 박지수, 김윤희, 강탁림. 連翹散이 아토피 동물 모델에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2006;20(1):58-64.
56. 김홍배, 김원일, 이승연. 升麻葛根湯의 항 히스타민 효과 및 IL-4와 GM-CSF 발현에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지.* 2006; 20(2):69-83.
57. 윤지연, 한재경, 김윤희. 加味清心蓮子湯이 NC/Nga mouse의 아토피樣 피부염에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지.* 2007; 21(1):87-116.
58. 박성의, 진미림, 구영선, 김동희. 脾虛蘊濕方이 아토피 피부염 유발 NC/Nga 생쥐의 혈액 내 면역관련인자에 미치는 영향. *동*

- 의생리병리학회지. 2007;21(4):849-55.
59. 김윤희, 한재경, 김윤희. 加味羌活散이 집먼지 진드기 추출물로 유도된 NC/Nga mouse의 아토피 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2008;22(1):69-94.
60. 나동규, 한재경, 김윤희. 除濕胃答湯加減이 집먼지 진드기 추출물로 유도된 NC/Nga mouse의 아토피 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2008;22(2):81-114.
61. Kim SC, Lee JR, Choi KI, Park SJ, Kwon YK, Byun SH. Effect of Lonicerae Flos-skin on contact hypersensitivity induced by repeat elicitation of DNCB. Kor. J. Herbology, 2006;21(1): 9-15.
62. 심상신, 김종환, 최정화. 당귀음자가감을 응용한 아토피 환자 1례에 대한 임상적 고찰. 대한안이비인후피부과학회지. 2002; 15(1):336~42.
63. 신동길, 김우연, 이진용, 김덕곤. 선방패독탕이 아토피피부염환자 단핵세포의 Cytokine 분비능에 미치는 영향. 대한한방알레르기 및 면역학회 자료집. 2003;1:93-110.
64. 康秉秀 外. 本草學. 서울:永林社. 1991:131, 149, 162, 178, 237, 305, 422, 540, 579, 580, 583.
65. 조소은. 병리학적 관점에서의 아토피 피부염의 치료와 스킨케어 방향에 관한 연구. 공주영상정보대학 논문집. 2001;8:637-51.
66. 김종인, 박재순. 복합 비타민 섭취가 항산화효소 활성화에 미치는 효과에 관한 연구. 스포츠과학 연구소 논문. 15, 2001.
67. 失數道明. 韓方治療百話. 서울: 동남출판사. 1991:322.
68. 誤謙. 醫宗金鑑. 서울: 대성문화사. 1983:80.
69. 신광호. 한방외용약. 서울: 열린책들. 1994:8.
70. Schreiber SL and Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. Immunol Today. 1992;13(4):136-42.
71. Iwao Isomura and Akimichi Morita. Regulation of NF- κ B Signaling by Decoy Oligodeoxynucleotides. MICROBIOLOGY and IMMUNOLOGY. 2006;8; 559-63.
72. R Yagi, H Nagai, Y Iigo, T Akimoto, T Arai, M Kubo. Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in STAT6-Deficient NC/Nga mouse. The Journal of Immunology. 2002;168:2020-7.
73. Yang-soon Kim et. al. Improvement of Atopic Dermatitis in NC/Nga mouse by Topical Application of CpG Phosphodiester-ODN, Int Arch Allergy Immunol. 2007;144: 315-24.
74. Noriko Inada, Jun Shoji, Kyoko Tabuchi, Keiko Saito, and Mitsuru Sawa. Histological Study on Mast Cells in Conjunctiva of NC/Nga mouse. Jpn J Ophthalmol, 2004; 48:189-94.