

## 아토피樣 피부염 NC/Nga생쥐에서 加減消毒飲과 아토피크림-紫雲膏의 병용투여가 피부염에 미치는 영향

송현지 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

### Abstract

## Effects of Concurrent Administration of KKSDU and AJ on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions in NC/Nga Mouse

Song Hyun Jee, Han Jae Kyung, Kim Yun Hee

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

### Objectives

The purpose of this study is to investigate the effect of concurrent administration of KKSDU and AJ on atopic dermatitis in an in-vivo experiment using an NC/Nga atopic dermatitis mouse, which has histological and clinical similarities to the condition in humans.

### Methods

We evaluated clinical skin score, hematology, serum total IgE and IgG1 of NC/Nga atopic dermatitis mouse and analyzed the cytoline level, total cell number, immunohistochemical staining, histological features of axillary lymph node(ALN), draining lymph node(DLN), peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) and dorsal skin tissue in NC/Nga mouse.

### Results

Orally administration of KKSDU and concurrent administration of KKSDU and AJ decreased the clinical skin score, total cell number of WBC, platelet, neutrophils, eosinophils in blood, serum total IgE & IgG1, IL-5, IL-13. Also, total cell number of ALN and dorsal skin tissue, absolute cell number of CD3e+&CD19+, CD4+&CD8+, CD3+/CCR3+, CCR3+, CD3+/CD69+, CD3+/CXCR5+ in ALN, PBMCs, absolute cell number of CCR3+, CD3+/CD69+, 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 are significantly decreased. Furthermore, thickness of epidermis, infiltrated inflammatory immune cell & mast cell in dermis, histologic infiltration of mast cell, the size of inflammatory lymphocytes cells & plasma cells in ALN and histologic infiltration of CD4+ & CCR3+ in ALN and dorsal skin tissue are significantly decreased. However, total cell number of DLN, absolute cell number of CD3+&CD19+, CD4+&CD8+, B220+/CD23+, CD3+/CD69+ in DLN and CD4+CD25+foxp3+ Treg cell, foxp3 mRNA in dorsal skin tissue are increased significantly.

■투 고 : 2009년 7월 24일, 수 정 : 2009년 8월 12일, 채 택 : 2009년 8월 17일  
■교신저자 : 송현지, 강원도 삼척시 교동 코아루@ 308-1008  
(Tel : 010-2417-8292, E-mail : misshani@hanmail.net)

**Conclusions**

Concurrent administration of KKSDU and AJ on atopic dermatitis in an in-vivo experiment using an NC/Nga atopic dermatitis mouse was very effective to the atopic dermatitis treatment.

**Key words :** Atopic dermatitis, Kakamsodokum, Atopy cream, Jawoongo, NC/Nga mouse

I. 緒 論

아토피 피부염은 어릴 때부터 시작되어 만성 경과를 보이며 장기간의 치료에도 불구하고 완치가 어려운 난치성 질환이라는 인식과 노출된 부위에 발생하여 신체 추형을 야기할 수 있다는 점으로 인해 다른 피부질환보다도 환자의 삶의 질에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다<sup>1,2</sup>. 특히 어린 시절에 발병하여 장기간 지속되기 때문에 정상적인 성장발달과정을 방해할 수 있어 환자를 돌보는 가족들에게 육체적 피로뿐만 아니라 정서적인 면, 가족관계 및 사회생활 등 여러 가지 면에서 영향을 끼치게 된다<sup>3</sup>. 또한 최근들어 환경적 요인과 식습관의 영향으로 인해 다른 알레르기성 질환과 함께 유병률이 증가하고 있어 근본적인 치료에 대한 연구가 절실히 요구되고 있는 실정이다<sup>4</sup>.

韓醫學에서 아토피 피부염은 그 원인이 風熱, 濕熱, 血虛風燥, 血熱, 濕熱溫燥 등에 있다 하여 清熱利濕, 祛風止癢, 滋陰養血 등의 치료 방법을 주로 사용하고 있다<sup>5</sup>. 최근 韓藥의 아토피 피부염에 대한 치료 효과를 증명하고자 다양한 실험 연구들이 발표되고 있으며<sup>6-10</sup>, 특히 당약 단독 치료뿐만 아니라 외치요법을 병용함으로써 더욱 유효한 치료효과를 보인 연구결과들이 보고되고 있다<sup>11-5</sup>.

加減消毒飲은 《晴崗醫鑑》<sup>16</sup>에 수록된 처방으로, 傷寒溫病과 時令感冒, 瘡疹의 질환에 사용되는 升麻葛根湯<sup>17</sup>에 荊芥, 防風, 薄荷, 牛

蒡子, 連翹, 石膏, 黃芩을 가하여<sup>16</sup> 風熱毒과 濕熱이 表部에 鬱滯되어 나타나는 피부질환을 다스릴 목적으로 作方되었으며, 최근 加減消毒飲의 아토피피부염 치료 효과에 대한 in vitro 실험 연구가 발표된 바 있다<sup>18</sup>.

加減消毒飲과 함께 외치요법으로서 병용투여된 紫雲膏는 紫草, 當歸, 胡麻油, 蜜蠟 및 豚脂로 구성되며<sup>19</sup> 肌膚를 滋潤하고 清熱解毒하며 피부재생력을 도와 피부질환 뿐만 아니라, 질상, 찰과상, 타박상, 동상, 화상 등 증상에 두루 쓰인다<sup>20</sup>. 또한 아토피크림은 베이스크림에 lavender, chamomile-Roman, tea tree 등을 가한 외용제로, 피부를 진정, 재생시키며 항알러지 및 소염작용이 있어<sup>21-3</sup> 임상에서 아토피 피부염의 치료에 다용되고 있으나 그 면역학적 기전을 살펴본 실험적 연구는 부족한 실정이다.

이러한 배경으로 본 연구에서는 아토피 크림 (Atopy cream)과 紫雲膏 (Jawoongo)를 도포하고 加減消毒飲 (KaKamSoDokUm)을 투여하여(이하 AJ+KKSDU) 아토피樣 피부염에 미치는 영향에 대해 규명하고자 하였다.

In vivo에서 KKSDU, 그리고 AJ+KKSDU를 투여하여 NC/Nga 생쥐의 clinical skin score, hematology 및 혈청 IgE와 IgG1 수준을 분석하였고, axillary lymph node (ALN), draining lymph node (DLN), peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) 및 등피부조직에서 cytokine level, 총 세포수, 형광유세포분석 및 염증유전자 발현 분석을 하였다. 그리고 등피부조직과 ALN에서 H&E 염색과 toluidine blue 염색을 통하여

epidermis의 두께와 비만세포의 침윤정도를 관찰하였으며, 면역화학조직염색을 통하여 등피부조직에 분포하는 CD4+ 세포와 ALN에 침윤된 CCR3+ 세포를 관찰한 결과, 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 재료

#### 1) 시약 및 기기

##### (1) 시약

시약은 diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, 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- $\gamma$ -PE, anti-CD28 mAb 등은 Pharmingen 사 (Torreyana, USA) 제품을, CD4+ T cell isolation kit와 B cell isolation kit는 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) 제품을, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-13 ELISA kit는 BioSource 사 (California, USA) 제품을, IgE, IgG1 ELISA kit는 SHIBAYAGI사 (Shibukawa, Japan) 제품을, anti-mouse CCR3 mAb와 anti-mouse CD4 mAb는 Santa-Cruz사 (California, USA) 제품을, LSAB kit는 DAKO사 (Glostrup, Denmark) 제품을 사

용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

##### (2) 기기

기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), rotary vaccum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, USA), deep-freezer (Sanyo, Japan), 자동혈구측정기 (MS9-5, France), Quantitative Real-Time RT-PCR (Applied Biosystems, USA), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, USA), plate shaker (Lab-Line, USA), VarioMACS (Bergisch Gladbach, Germany), FACScalibur (BD, USA) 및 ELISA leader (Molecular Devices, USA) 등을 사용하였다.

##### 2) 동물

수컷 7 주령의 SPF (specific pathogen-free) NC/Nga mouse (15 ~ 20 g)는 Charles River Japan (Yokohama, Japan)사에서 공급받았고, in vitro 실험을 위하여 conventional한 조건에서 수컷 NC/Nga 생쥐를 18 주령까지 사육하였다. 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.

##### 3) 약물

##### (1) 加減消毒飲 조제

본 실험에 사용한 加減消毒飲의 구성은

Table 1. Composition of KaKamSoDokUm(KKSDU)

| Herbal Name | Scientific Name      | Amount (g) |
|-------------|----------------------|------------|
| 葛 根         | Puerariae Radix      | 8          |
| 連 翹         | Forsythiae Fructus   | 6          |
| 牛蒡子         | Arctii Fructus       | 4          |
| 石 膏         | Gypsum Fibrosum      | 4          |
| 赤芍藥         | Paoniae Radix Rubra  | 4          |
| 防 風         | Saposhnikoviae Radix | 4          |
| 升 麻         | Cimicifugae Rhizoma  | 4          |
| 黃 芩         | Scutellariae Radix   | 4          |
| 荆 芥         | Schizonepetae Herba  | 4          |
| 薄 荷         | Menthae Herba        | 2          |
| 甘 草         | Glycyrrhizae Radix   | 2          |
| Total       |                      | 46         |

Table 2. Composition of Atopy Cream

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

Table 3. Composition of Jawoongo

| Herbal Name | Scientific Name          | Amount (g) |
|-------------|--------------------------|------------|
| 紫 草         | Lithospermi Radix        | 0.074      |
| 當 歸         | Angelicae Gigantis Radix | 0.049      |
| 胡麻油         | Sesameseed Oil           | 0.613      |
| 蜜 蠟         | Bees Wax                 | 0.245      |
| 豚 脂         | Swine Oil                | 0.019      |
| Total       |                          | 1.000      |

《晴崗醫鑑》<sup>16)</sup>에 준하였으며, 사용한 약재들은 대전대학교 둔산한방병원에서 구입 정선하여 사용하였고, 1 첩의 내용과 분량은 다음과 같다 (Table 1).

(2) 아토피크림 조제

본 실험의 아토피크림에 사용된 베이스 크림과 아로마 오일은 Fine Korea Co. (Inchon, Korea)에서 구입하여 사용하였으며 그 배합은 다음과 같다(Table 2).

(3) 紫雲膏 조제

본 실험에 사용한 紫雲膏의 구성은 《大田大學校 韓方病院 處方集》<sup>19)</sup>에 준하였으며,

사용한 약재들은 대전대학교 둔산한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고 그 내용과 1 g 당 조성은 다음과 같다 (Table 3).

(4) 加減消毒飲 추출물 분리

KKSDU 2 첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (rotary vaccum evaporator)로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기 (freeze dryer)를 이용하여 완전 건조한 KKSDU 추출물 11.6 g을 냉동 보관 (-84 °C)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) In vivo : Development of atopic dermatitis-like skin lesions induced by BMAC in NC/Nga mouse

(1) 피부염 유도 및 치료처리

7 주령의 NC/Nga 생쥐를 1 주일 동안 적응시키고 이미 피부염이 발생된 18 주령의 NC/Nga 생쥐와 2 주간 같은 공간에서 동시 사육하여 항원감작을 시킨 후 눈에서 capillary 관을 이용하여 100  $\mu$ l의 혈액을 채혈하였다. 그 후 마취제인 chloral hydrate (10 %)로 마취하고 등 쪽 목 부위를 깨끗하게 제모한 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24 시간 방치하였다. 그리고 중앙실험동물에서 제공하는 Biostir Mite antigen cream {이하 BMAC : Dermatophagoides farinae crude extract (Mite antigen, lyophilized)를 항원으로 제조된 것으로 진드기 항원 0.5 % Tween 20이 포함된 ointment base로 제작되었다}을 1 주에 2 회 3 주간 (10 ~ 13 주령) 등과 목 부분에 고르게 도포하였고, 도포 2 시간 전에 4 % SDS 용액을 분무하여 피부염이 잘 유발되도록 피부층을 파괴하여 이를 대조군으로 사용하였다 (Scheme 1). 도포 시작 2주 후 (12 주령) 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 (NC/Nga-WT)과 BMAC를 도포한 대조군 (control, CT), BMAC를 도포하고 FK506 (tacrolimus)을 도포한 양성대조군 (positive control, PC), 그리고 BMAC를 도포하고 KKSDU 또는 AJ+KKSDU를 투여한 실험군으로 나누어 실시하였으며, 각 군당 개체 수는 6 마리로 하였다.

BMAC는 총 3 주간 (10 주령 ~ 13 주령) 월요일과 목요일에 4 % SDS 용액을 분무하고 2 시간 경과 후, 등에 200  $\mu$ l씩 도포하였다. 그리고 BMAC 도포 시작 2 주 후 (12 주령) 피부 발진을 확인하고, 12 주령부터 15 주령까지 3 주간 매일 1 회 오후 3 ~ 4 시 사이에 각각 KKSDU (348 mg/kg)와 AJ (아토피크림 도포 1 시간 후 紫雲膏를 도포함, 200  $\mu$ l/마리)+ KKSDU (348 mg/kg)를 각각 병용투여하였다. 또한 양성 대조 약물로 FK506 0.3 %도 12 주령부터 15 주령까지 3 주간 매일 1 회 등부분에 골고루 도포하였다. 실험 종료 후 (15 주령)에 임상적 육안 평가를 실시한 다음 혈액을 채혈하고 등 부위의 피부를 절제하여 10 % 포르말린 용액에 담아 보관하였다.

(3) Clinical skin score

임상적 육안 평가는 아토피 피부염에서 일반적으로 사용되는 Yamamoto M의 방법을 약



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

간 변형하여 시행하였고, 7 주령 NC/Nga 생쥐를 15 주령까지 SPF 조건에서 사육한 NC/Nga-WT군과 BMAC를 도포한 대조군 (CT), BMAC를 도포하고 FK506를 도포한 양성대조군 (PC), 그리고 KKSDU와 AJ+KKSDU를 각각 투여한 실험군으로 나누어 실시하였다 (15 주령). 육안평가 항목은 erythema/hemorrhage, scarring/dryness, excoriation/erosion, edema, lichenification 5 가지 항목으로 하고, 육안평가 결과는 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타냈다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였으며 최소 0 점에서 최고 15 점 사이의 점수를 측정하였다<sup>24)</sup>.

#### (4) Hematology

최종 임상적 육안 평가를 실시한 후, 심장천자법으로 채혈한 혈액을 바이오톡스텍(주) (청주, 충청북도)에 의뢰하여 혈액의 백혈구 중 호중구, 호산구, 호염기구 및 림프구, 단핵구의 세포수를 측정 하였다. 측정은 자동혈구측정기 (MS9-5, MELET SCHLOESING, France)로 Fonio법<sup>25)</sup>에 준하여 Minos-ST로 시행하였다.

#### (5) 혈청 내 IgE와 IgG1 측정

NC/Nga 생쥐의 눈에서 8 주령, 12 주령, 15 주령에 capillary 관을 이용하여 약 100  $\mu$ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기 6,500 rpm에서 20 분간 원심분리한 후 30  $\mu$ 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 보관하였다. NC/Nga 생쥐의 혈청 내 IgE와 IgG1 농도는 enzyme-linked immuno-sorbent assay로 측정하였다. IgE는 NC/Nga 생쥐에서 8 주령, 12 주령, 그리고 15 주령에 채혈한 혈청 5  $\mu$ l (1/10

dilution)와 dilution buffer 45  $\mu$ l를 혼합하여 96 well plate의 각 well에 분주하였고, IgG1은 15 주령에서 채혈한 혈청 50  $\mu$ l (1/10 dilution)과 dilution buffer 50  $\mu$ 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 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100  $\mu$ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100  $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 각각 IgE와 IgG1에 대한 흡광도를 측정하였다<sup>26)</sup>.

#### (6) ALN 세포분리 및 cytokine 측정

약물투여 종료 후 (15 주령) ALN을 적출하여 100 mesh로 ALN 세포를 분리하였다. 전날 BMAC 10  $\mu$ 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 $\times$ 10<sup>5</sup> 세포씩 5 % FBS-DMEM 배양액에서 48 시간 동안 배양한 후, 원심분리기 2,000 rpm에서 3 분간 원심분리한 후 200  $\mu$ l의 배양상층액을 얻었다. 배양상층액내의 IL-4 (BioSource, USA), IFN- $\gamma$  (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  $\mu$ 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, 그리고 antibody

biotin-IL-13 conjugated를 넣고 2 시간 방치하였다. 다시 2 회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100  $\mu$ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100  $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(7) ALN, DLN, PBMCs 그리고 등피부조직에서 형광 유세포 분석

실험을 종료한 후 NC/Nga 생쥐에서 ALN과 DLN을 각각 적출하여 100 mesh로 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. PBMCs는 실험을 종료한 후 NC/Nga 생쥐에서 heparin을 처리한 3 ml 주사기로 채혈한 후 미리 준비한 10 ml의 ACK용액 (8.3 g NH<sub>4</sub>Cl, 1 g KHCO<sub>3</sub>, 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 strainer에 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.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4 회 반복하였다.

분리한 ALN, DLN, PBMCs, 그리고 등피부조직 침윤세포의 총세포수를 측정하는 다음 모든 조직의 세포를 5 × 10<sup>5</sup> 세포로 조정하고 4 °C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence 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, 그리고 anti-B220-PE를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3 회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometry의 CellQuest 프로그램을 이용하여 CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CCR3+, 그리고 B220+CD23+ 세포수를 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 ALN, DLN, PBMCs, 그리고 등피부조직에서의 절대세포수 (absolute number)를 산출하였다.

(8) Quantitative real-time PCR in dorsal skin & ALN

① 등피부조직과 ALN에서 RNA 분리

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 등피부조직과 ALN를 적출하여 각각에 RNAzolB 500  $\mu$ l를 넣고 용해될 때까지 homogenizer로 분쇄하였다. 이 조직분쇄 혼합 부유액에 chloroform (CHCl<sub>3</sub>) 50  $\mu$ l를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200  $\mu$ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200  $\mu$ 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  $\mu$ l의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다. Quantitative real-time PCR은 7500 Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다<sup>27)</sup>.

Mouse Olionucleotid의 염기배열은 다음과 같다 (Table 4).

Cytokine 유전자 발현은 SYBR® Green PCR Master mix를 사용하였고, internal standard는 GAPDH로 Taqman probe를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Eotaxin2와 CCR3 mRNA 발현은 등피부조

Table 4. Primer Sequence

| Gene      | Primer  | Sequence                    |
|-----------|---------|-----------------------------|
| GAPDH     | Forward | 5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'   |
|           | Reverse | 5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'  |
| Eotaxin 2 | Forward | 5' CTGTGACCATCCCCTCATCT 3'  |
|           | Reverse | 5' CTTATGGCCCTTCTTGGTGA 3'  |
| CCR3      | Forward | 5' CCCGAACGTGACTTTTGCT 3'   |
|           | Reverse | 5' CCTCTGGATAGCGAGGACTG 3'  |
| IL-5      | Forward | 5' AGCCTAACCTGTTGGAGGT 3'   |
|           | Reverse | 5' GTGATCGGCITTTTCITGAGC 3' |
| IL-13     | Forward | 5' ATGCCCAACAAAGCAGAGAC 3'  |
|           | Reverse | 5' TGAGAGAACCAGGGAGCTGT 3'  |

직에서 관찰하였고, Th2 mediate인 IL-5와 IL-13 mRNA 유전자 발현량 분석은 ALN에서 cDNA를 합성하여 분석하였다.

Quantitative real-time PCR의 조건은 pre-denaturation은 2 min at 50 °C, 10 min 94 °C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95 °C, 1 min at 60 °C에서 수행하였다. 대조군, FK506 도포군, KKSUDU 단독투여군과 AJ+KKSUDU 병용투여군은 internal standard로 GAPDH를 사용하였고 target group의 Quantitative PCR은

$$y = x(1+e)^n \quad x = \text{starting quantity}$$

$$y = \text{yield} \quad n = \text{number of cycles}$$

$$e = \text{efficiency}$$

로 계산하여 RQ(relative quantitative)를 측정하였다.

#### (9) Histology

ALN과 등 쪽 목 부분의 피부를 떼어내어 10 % paraformaldehyde에서 24 시간 동안 포르말린에 고정하였다. 그 조직을 파라핀으로 포매하였고, 5  $\mu$ m 두께로 block을 만들었다. 그 조직부분은 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils/eosinophil, 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline/eosin

(H&E) 염색과 비만세포를 염색하는 toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤을 광학현미경 (Nikon, Japan,  $\times 200$ )으로 관찰하였다<sup>28)</sup>.

#### (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  $\mu$ m 두께로 세절하고 probe-on plus slide에 부착시켜 건조시켰다. 그리고 탈 파라핀 (deparaffinized) 후 함수시킨 다음 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)를 이용해 microwave oven에 15 분간 전 처리하였다. 조직 내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 10 분간 처리한 후, 조직 내의 항원과 비 특이적 단백질 합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시켰다. 그리고 일차 단일항체에 1 시간 동안 부착시킨 다음 완충액으로 수세하였다. LSAB kit를 이용하여 PE-conjugated goat anti-rat IgG에 30 분간 반응시키고, 3 회 tris-buffered saline with 0.1 % tween 20(TBST)용액으로 수세한 후 잘 건조하였다. 현미경은 형광위상차현



미경을 사용하여  $\times 400$  배율로 관찰하였다<sup>29)</sup>.

### 3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean  $\pm$  standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정하였다<sup>30)</sup>.

## III. 成 績

### 1. In vivo : Development of atopic dermatitis-like skin lesions induced by BMAC in NC/Nga mouse

1) BMAC를 이용한 아토피 피부염 유발 및 加減消毒飲과 아토피크림-紫雲膏 투여 3 주 후 등피부 변화  
BMAC를 2 주간 (총 4 회) 400 mg 정도 도포

한 결과, NC/Nga 생쥐 등피부부위에 사람 아토피 피부염과 같은 증상인 erythema/ hemorrhage, papule, scarring/dryness, excoriation/ erosion이 나타났다 (Fig.1 A,B). BMAC를 1 주 추가 도포하여 3 주간 (총 6 회) 600 mg 정도 도포하고 KKSDU, 그리고 AJ+KKSDU를 3 주간 처리한 결과, KKSDU만 투여한 실험군보다는 AJ와 KKSDU를 병용투여한 실험군에서 NC/Nga 생쥐 등피부의 erythema/hemorrhage, papule, scarring/dryness, excoriation/erosion이 대조군에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig.1 C,D).

### 2) Clinical skin score

대조군 (Control)의 clinical skin score는 NC/Nga-WT군 (정상군)에 비하여 증가하였고 FK506 도포군 (양성대조군)은 대조군에 비해 감소하였으며 ( $p < 0.001$ ), KKSDU 단독투여군 ( $p < 0.01$ )과 AJ+KKSDU 병용투여군도 대조군

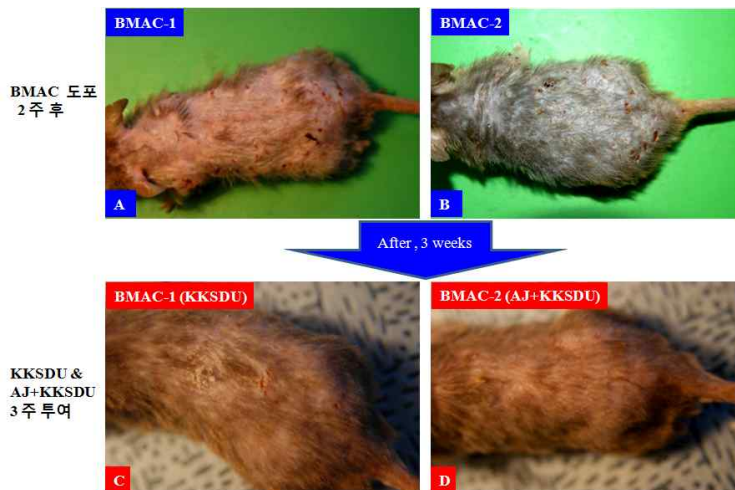


Fig.1 Topical application of KKSDU and AJ+KKSDU treatment of atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse induced by BMAC for 3 weeks.

Shown are back of BMAC-ointment NC/Nga mouse, BMAC plus KKSDU (348 mg/kg)-orally administration in NC/Nga mouse and BMAC plus AJ (200  $\mu$ l/mouse) plus KKSDU (348 mg/kg)-orally administration in NC/Nga mouse for 3 weeks.

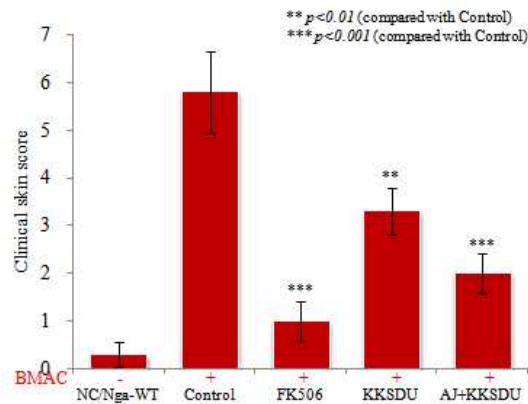


Fig.2. Clinical skin features and severity of atopic dermatitis skin lesions in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse) ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) for 3 weeks. A total clinical severity score for AD-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, face and head and back. Each point represents the mean $\pm$ SE of six mice.

에 비해 clinical skin score가 유의성있게 감소하였다 ( $p<0.001$ ) (Fig.2).

### 3) Hematology

15 주 실험 종료 후 WBC의 neutrophil과 eosinophils 비율은 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 증가하였다. FK506 도포군은 대조군에 비하여 NC/Nga-WT군에 가깝게 유의성있게 감소하였고 ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ), KKSDU 단독 투여군, 그리고 AJ+KKSDU 병용투여군은 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성이 나타난 것은 AJ+KKSDU 병용투여군이었다( $p<0.01$ ) (Fig.3A, Fig.3B).

그리고 WBC 중 lymphocytes 비율은 대조군에서 NC/Nga-WT군에 비하여 약간 감소하였고 FK506 투여군과 AJ+KKSDU 병용투여군은 대조군에 비해 유의성있게 증가하였다. 그

외 monocytes와 basophils의 WBC 내 비율을 분석한 결과, 모든 실험군에서 차이가 나타나지 않았다(Fig.3A, Fig.3B).

### 4) 혈청 IgE와 IgG1 수준

혈청 IgE의 양은 8 주령 NC/Nga 생쥐에서 자연적으로 증가가 되고 대조군은 15 주령에서 NC/Nga-WT군과 차이가 없이 IgE 수준이 증가되었다. 그리고 FK506 도포군, KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군의 혈청내 IgE 수준은 12 주령 이후 감소하여 15 주령에서는 대조군에 비해 유의성있게 감소되었다( $p<0.05$ ,  $p<0.001$ )(Fig.4A).

혈청 IgG1의 수준은 FK506 도포군에서 대조군에 비해 유의성있게 감소되었고 ( $p<0.001$ ), KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군 또한 대조군에 비해 유의성있게 감

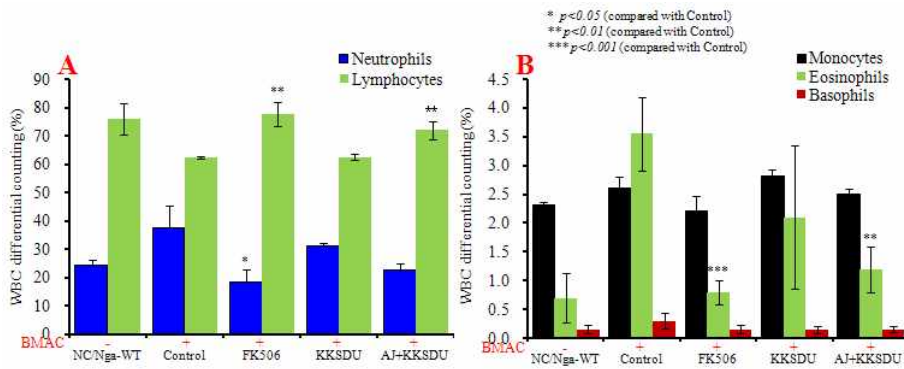


Fig.3. WBC differential counting in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse)-ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) 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, USA).

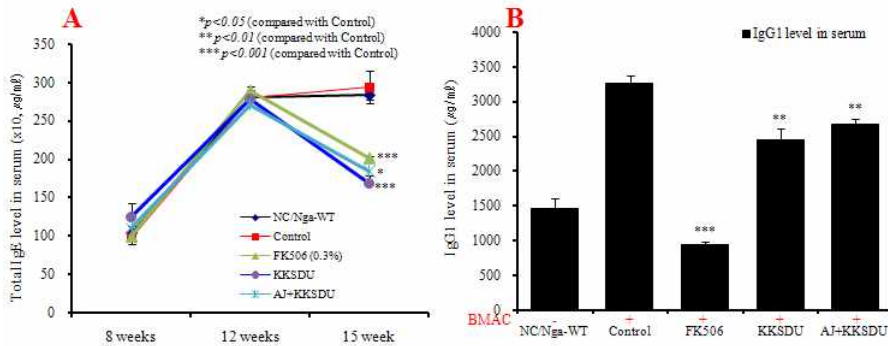


Fig.4. Serum IgE & IgG1 elevation and development of atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse)-ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) for 3 weeks. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately thereafter. Plasma samples were obtained by centrifugation and stored at -20  $^{\circ}$ 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 $\pm$ SE of six mice.

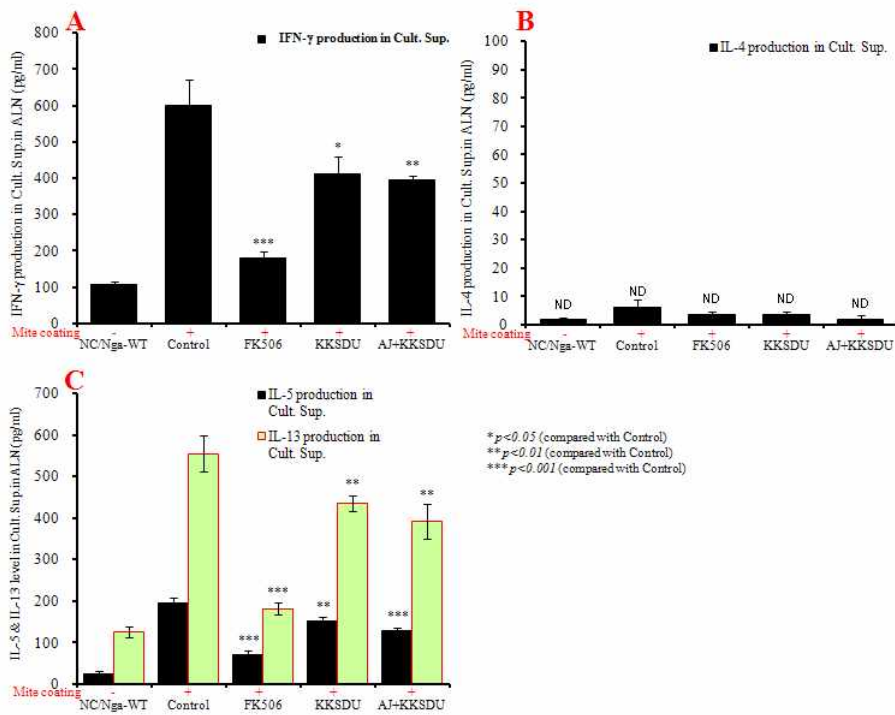


Fig.5. Culture supernatant IL-4, IL-5, IL-13, and IFN- $\gamma$  level in ALN in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse)-ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) for 3 weeks. ALN from mouse at 15 weeks of age were re-stimulated with Mite extract (1  $\mu$ g/ml) for 48 hrs. IL-4, IL-5, IL-13, and IFN- $\gamma$  levels were measured by a sandwich ELISA using an mouse ELISA kit I (Biosource, USA).

소되었다( $p < 0.01$ )(Fig.4B).

### 5) ALN에서 cytokine level

IFN- $\gamma$ 의 생산량은 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 증가되었고 FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성있게 감소되었으며 ( $p < 0.001$ ) KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군 또한 각각 대조군에 비하여 유의성있게 감소되었다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig.8A). 반면, ALN 세포 배양상층액 중 IL-4 생산량은 모

든 실험군에서 차이가 나타나지 않았다 (Fig.5B).

IL-5와 IL-13의 생산량은 각각 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 증가되었다. 그리고 FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성있게 감소되었다 ( $p < 0.001$ ). KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군 또한 대조군에 비하여 유의성있게 감소되었다( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ )(Fig.5C).

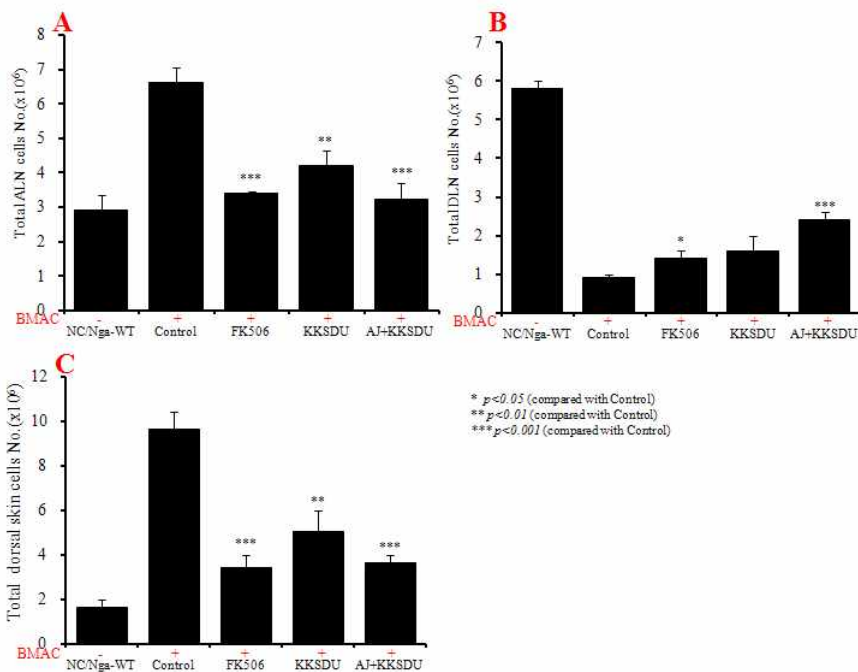


Fig.6. Total cell number of ALN, DLN and dorsal skin in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μl/mouse)-ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) for 3 weeks.

**6) ALN, DLN과 등피부조직의 총 세포수**

ALN과 등피부부위의 총 세포수를 측정하 결과, NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 총 세포수가 증가하였다. 그리고 FK506 도포군, KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군에서는 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다 (p<0.01, p<0.001)(Fig.6A, Fig.6C).

DLN의 총 세포수를 측정하 결과, ALN과는 반대로 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 총 세포수가 감소하였다. FK506 도포군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군은 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였고 (p<0.05, p<0.001),

KKSDU 단독투여군은 대조군에 비하여 총 세포수가 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다 (Fig.6B).

**7) ALN, PBMCs, DLN과 등피부조직에서의 형광유세포분석**

(1) ALN에서 T & B cell content 변화

① CD3+ & CD19+, CD4+ & CD8+ 절대 세포수

ALN에서 활성 CD3+ T세포의 절대세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유

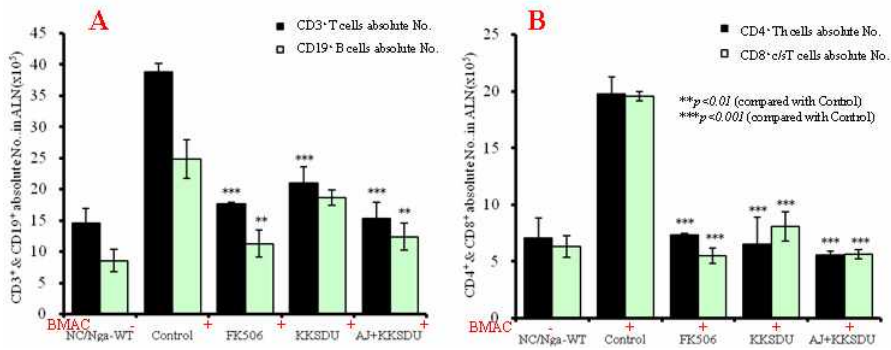


Fig.7. Effects of KKSDU & AJ+KKSDU treatment on T and B cell changes of absolute numbers in ALN cells in NC/Nga mouse by BMAC.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse)-ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) for 3 weeks. NC/Nga mouse ALN cells ( $2 \times 10^5$  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.

의성있게 감소하였다( $p < 0.001$ ). 또한 KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군도 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다( $p < 0.001$ )(Fig.7A). ALN에서 활성화 CD19+ B 세포의 절대세포수는 NC/Nga-WT 군에 비하여 대조군이 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다( $p < 0.01$ ). 또한 KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군도 ALN에서 CD19+ B 절대세포수가 모두 대조군에 비하여 감소하였으나, 유의성은 AJ와 KKSDU 병용투여군에서만 관찰되었다( $p < 0.01$ )(Fig.7A).

ALN에서 활성화 CD4+ Th 세포와 활성화 CD8+ c/sT 세포에 대한 절대세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 증가하였고, FK506 도포군, KKSDU 단독투여군, AJ+KKSDU 병용투여군에서도 각각 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다( $p < 0.001$ ) (Fig.7B).

② CD3+CD69+, B220+CD23+, CCR3+ 절대세포수

ALN에서 CD3+CD69+ T 세포와 B220+CD23+ B 세포의 절대세포수는 NC/Nga-WT 군에 비하여 대조군에서 모두 증가하였고, FK506 도포군, KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군의 CD3+CD69+ 절대세포수는 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다( $p < 0.001$ ). 그리고 FK506 도포군, KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군의 B220+CD23+ B 세포 수는 모두 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig.8A).

ALN에서 활성화 CD3+CCR3+세포와 CCR3+세포에 대한 절대세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 증가하였고, FK506 도포군, KKSDU 단독투여군, AJ+KKSDU 병용투여군에서는 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 나타내었다( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ )(Fig.8B).

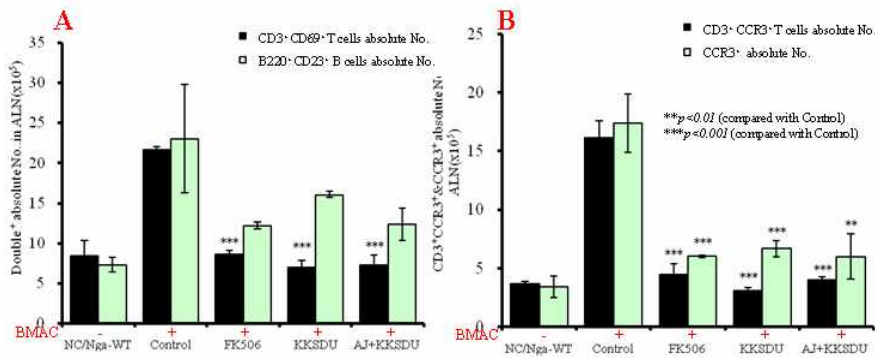


Fig.8. Effects of KKSDU & AJ+KKSDU treatment on CD3+CD69+ or B220+CD23+ and CCR3+ changes of absolute numbers in ALN cells in NC/Nga mouse

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse)-ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) for 3 weeks. NC/Nga mouse ALN cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were isolated from ALN, and the ALN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute number of CD3+CD69+, B220+CD23+ (A), and CD3+CCR3+, CCR3+ (B) in NC/Nga mouse.

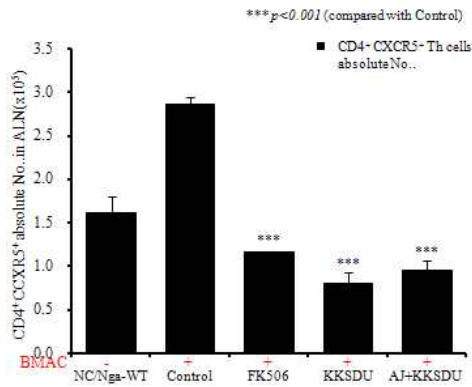


Fig.9. Effects of KKSDU & AJ+KKSDU treatment on CD4+CXCR5+ gated cells and changes of absolute numbers in ALN cells in NC/Nga mouse by BMAC.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse)-ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) for 3 weeks. NC/Nga mouse ALN cells ( $2 \times 10^5$  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.

③ CD4+CXCR5+ 절대세포수

ALN에서 활성화된 T세포를 관찰한 결과 CD4+CXCR5+ 절대세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 증가하였고, FK506 도포군, KKSDU 단독투여군, AJ+KKSDU 병용투여군에서는 각각 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다( $p < 0.001$ )(Fig.9).

(2) PBMCs에서 cell content 변화

① Granulocyte의 변화

PBMCs에서 granulocytes의 빈도(%)는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 증가하였고, FK506군은 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다 ( $p < 0.001$ ). KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군의 granulocytes의 빈도수(%) 또한 각각 대조군에 비하여 유의성

있게 감소하였다( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ )(Fig.10).

② T & B cell content 변화

PBMCs의 CD3+ T 세포, CD4+ Th세포, CD8+ c/s T 세포, CD3+/CD69+세포, B220+/CD23+, CD3+/CCR3+세포, 그리고 CCR3+세포는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 총활성세포 빈도(%)가 모두 증가하였다. FK506 도포군의 CD3+ T세포, CD8+ c/s T세포, CD3+/CD69+세포, B220+/CD23+, 그리고 CCR3+ 세포의 총활성세포 빈도 (%)는 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였고 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ), CD4+ Th 세포와 CD3+ CCR3+ 세포는 감소하였으나 유의성은 없었다. 또한 KKSDU 단독투여군과 AJ+KKSDU 병용투여군의 CD3+ T세포, CD4+ Th세포, CD8+

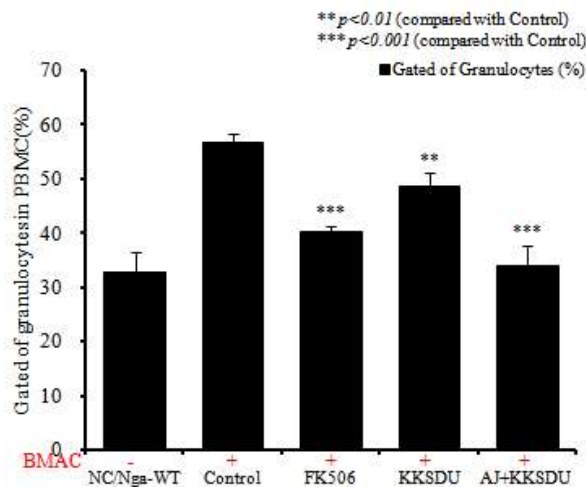


Fig.10. Effects of KKSDU & AJ+KKSDU treatment on the percentage of granulocytes gated cells in PBMCs in NC/Nga mouse by BMAC.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse)-ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) for 3 weeks. NC/Nga mouse PBMCs ( $2 \times 10^5$  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.



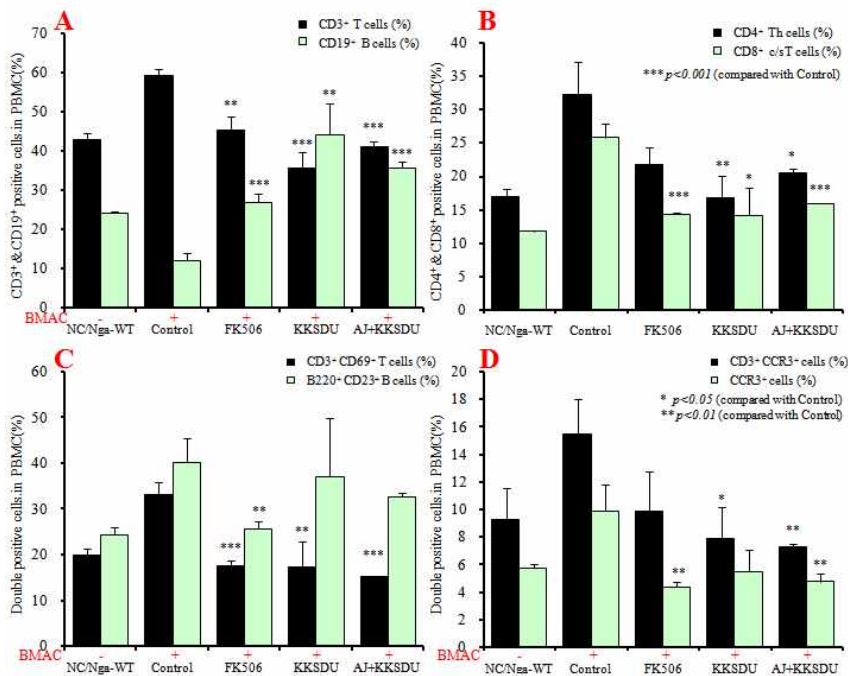


Fig.11. Effects of KKSDU & AJ+KKSDU treatment on the percentage of T & B gated cells in PBMCs in NC/Nga mouse by BMAC.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse) ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) for 3 weeks. NC/Nga mouse PBMCs ( $2 \times 10^5$  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.

c/s T세포, CD3+/CD69+, 그리고 CD3+/CCR3+ 세포의 총활성세포 빈도(%)는 각각 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ). 그리고 CCR3+ 세포는 KKSDU 단독투여군과 AJ+KKSDU 병용투여군 모두에서 감소하였으나 AJ+KKSDU 병용투여군에서만 유의성이 나타났다(Fig.11).

PBMCs에서 CD19+ B 세포의 총활성세포 빈도(%)는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 감소하였고, FK506 도포군에서는 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다( $p < 0.001$ ). 그리고

고 KKSDU 단독투여군과 AJ와 KKSDU 병용투여군에서도 대조군에 비하여 유의성있는 증가를 나타내었다( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ )(Fig.11A).

### (3) DLN에서 T & B cell content 변화

DLN내 CD3e+&CD19+과 CD4+&CD8+의 절대세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 현저하게 감소하였고, FK506 도포군의 CD3e+와 CD4+& CD8+의 절대세포수는 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ). KKSDU 단독투여군, 그리고

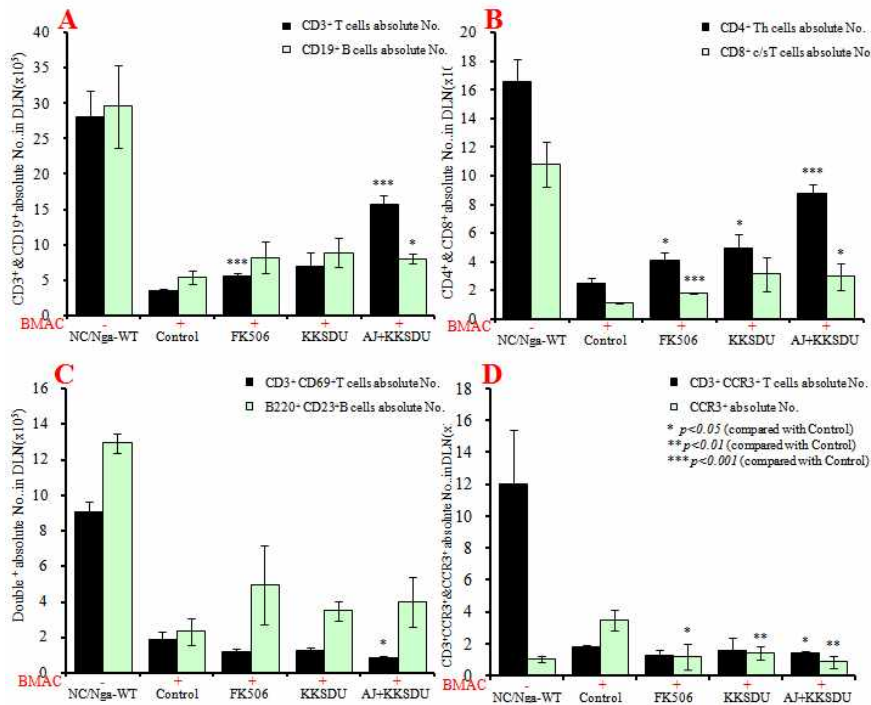


Fig.12. Effects of KKSDU & AJ+KKSDU treatment on T & B cell changes of absolute numbers in DLN cells in NC/Nga mouse by BMAC.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse) ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) for 3 weeks. NC/Nga mouse PBMCs ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were isolated from Blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute number of CD3+ & CD19+ (A), CD4+ & CD8+ (B), CD3+CD69+ & B220+CD23+ (C), CD3+CCR3+ & CCR3+ (D) in NC/Nga mouse.

AJ와 KKSDU 병용투여군의 CD3e+ & CD19+ 와 CD4+&CD8+ 절대세포수는 각각 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ )(Fig.12A, Fig.12B).

DLN내 CCR3+ (Fig.12D)의 절대세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 증가하였고, FK506 도포군, KKSDU 단독투여군, AJ와 KKSDU 병용투여군에서 CCR3+ (Fig.12D)의 절대세포수는 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 나타내었다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )(Fig.12D).

(4) 등피부조직에서 T & B cell content 변화 등피부조직에서 NC/Nga-WT군, 대조군, 그리고 FK506 도포군의 CD4+CD25+foxp3+ Treg cell 절대세포수는 큰 차이가 없었고 KKSDU 단독투여군의 CD4+CD25+foxp3+ Treg cell은 대조군에 비하여 절대세포수가 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 그러나 AJ와 KKSDU 병용투여군의 CD4+CD25+foxp3+ Treg cell 절대세포수는 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다( $p < 0.01$ )

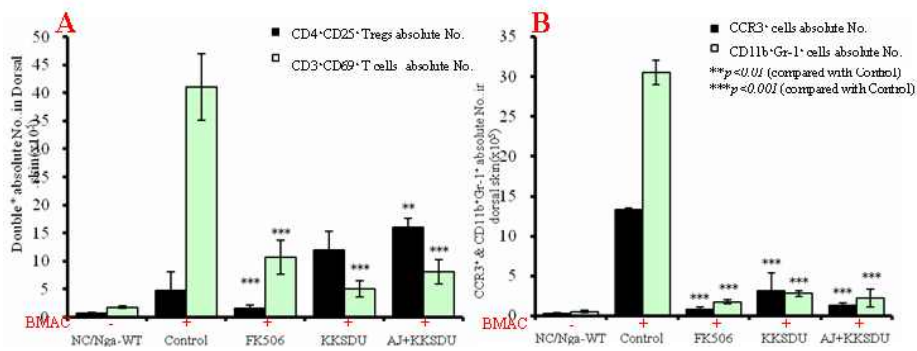


Fig.13. Effects of KKSDU & AJ+KKSDU treatment on changes of absolute numbers in dorsal skin cells in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse)-ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) for 3 weeks. NC/Nga mouse dorsal skin cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were isolated from dorsal skin, and the dorsal skin cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Absolute number of CD4+CD25+ & CD3+CD69+ (A), CCR3+ & CD11b+Gr-1+ (B) in NC/Nga mouse.

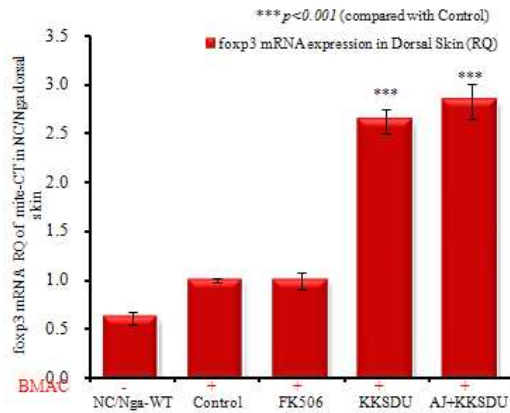


Fig.14. Effects of KKSDU & AJ+KKSDU treatment on foxp3 mRNA expression in dorsal skin tissue in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse induced by BMAC.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse)-ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) for 3 weeks. Foxp3 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 mice.

(Fig.13A).

CCR3+, CD3+/CD69+세포, CD11b+Gr-1+ MSC 세포의 절대세포수를 측정한 결과는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 현저하게 증가하였고, FK506 도포군은 대조군에 비하여 각각 유의성있게 감소하였다( $p < 0.001$ ). KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군 또한 각각 대조군에 비하여 현저하게 유의성 있는 감소를 나타내었다( $p < 0.001$ ) (Fig.13A, Fig.13B).

**8) 등피부조직에서 foxp3 mRNA 유전자 발현**

등피부조직에서 대조군에 대한 foxp3 mRNA의 유전자발현 상대정량 값 (RQ)은 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군과 FK506 도포군에서는 차이가 나타나지 않았으나

KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군에서는 각각 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.001$ )(Fig.14).

**9) 등피부조직과 ALN에서 염증유전자 발현**

등피부조직에서 대조군에 대한 Eotaxin2 mRNA와 CCR3 mRNA 유전자발현의 상대정량 값 (RQ)은 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 각각 증가하였고, FK506 도포군에서는 대조군에 비하여 유의성있는 억제효과를 나타내었다( $p < 0.001$ ). 그리고 KKSDU투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군 또한 대조군에 비하여 각각 유의성있게 억제되었다( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ )(Fig.15A).

ALN에서 IL-5 mRNA와 IL-13 mRNA 유전자발현의 대조군에 대한 상대정량 값 (RQ)을

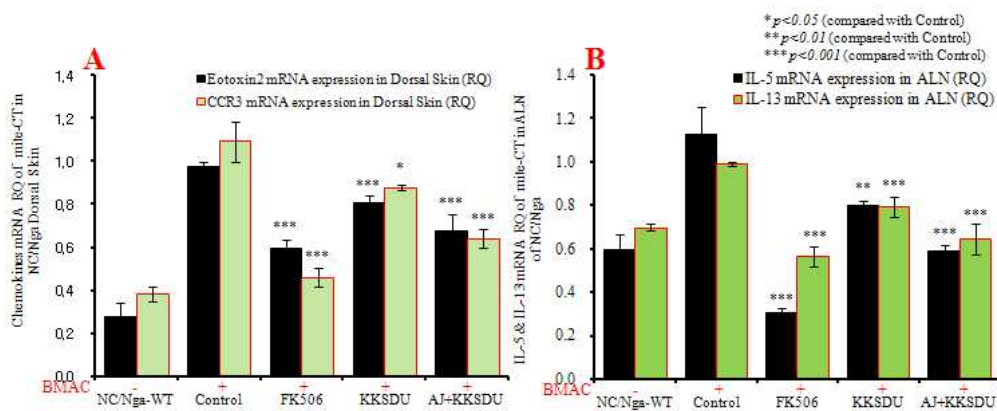


Fig.15. Effects of KKSDU & AJ+KKSDU treatment on Eotaxin2, CCR3, IL-5, and IL-13 mRNA expression in NC/Nga mouse by BMAC.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse)-ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) 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.

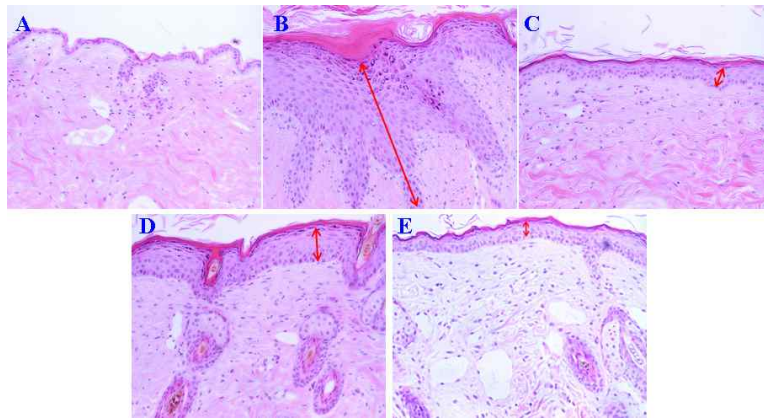


Fig.16. Histological features of the skin stained with H&E of dorsal skin group in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse) ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) 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 mice in each group.

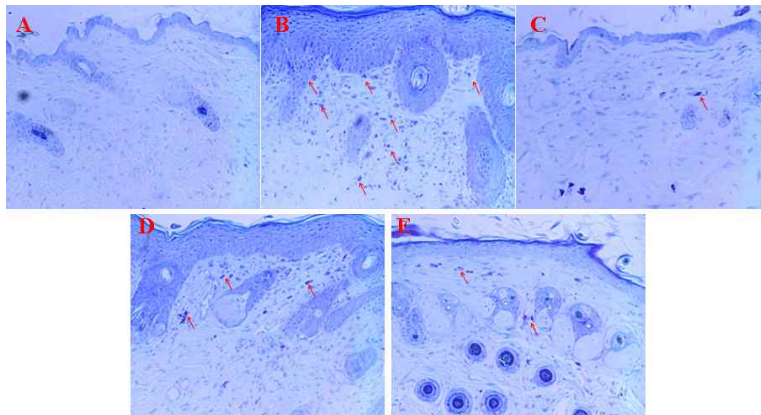


Fig.17. Histological status of the skin stained with toluidine blue of dorsal skin group in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse) ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) 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 mice in each group.

분석한 결과, NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 각각 유전자 발현이 증가한 결과를 얻었고, FK506 도포군의 RQ값은 대조군에 비하여 유의성있는 억제효과를 나타내었다 ( $p < 0.001$ ). 또한 KKSDU투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군의 IL-5 mRNA와 IL-13 mRNA 유전자 발현의 RQ값은 대조군에 비하여 유의성있는 억제효과를 나타내었다 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig.15B).

**10) 등피부조직과 ALN에서 histology**

(1) 등피부조직의 histology

등피부조직에 H&E 염색과 toluidine blue 염색을 실시한 결과, NC/Nga-WT군에서는 epidermis가 얇게 분포하고 비만세포는 거의 관찰되지 않았다(Fig.16A, Fig.17A). 그러나 대조

군에서는 epidermis가 두께가 hyperplasia로 현저하게 확장되고 (long red arrow), 그 주변에 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis, parakeratosis, 그리고 비만세포 (Fig.17B, red arrow)의 침윤 등이 NC/Nga-WT군에 비하여 현저하게 증가되었다.

FK506 도포군에서는 대조군에 비하여 일부는 NC/Nga-WT군에 가깝게 epidermis의 두께가 줄어들었고, 나머지 일부는 epidermis가 두께 (Fig.16C, red arrow)와 그 주변에 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis, parakeratosis 그리고 비만세포 (Fig.17C, red arrow)의 침윤 등이 감소하였다.

KKSDU 단독투여군에서는 대조군에 비하여 일부에서 epidermis의 두께가 줄어들었고, 나머지 일부에서는 epidermis가 두께 (Fig.16D, red

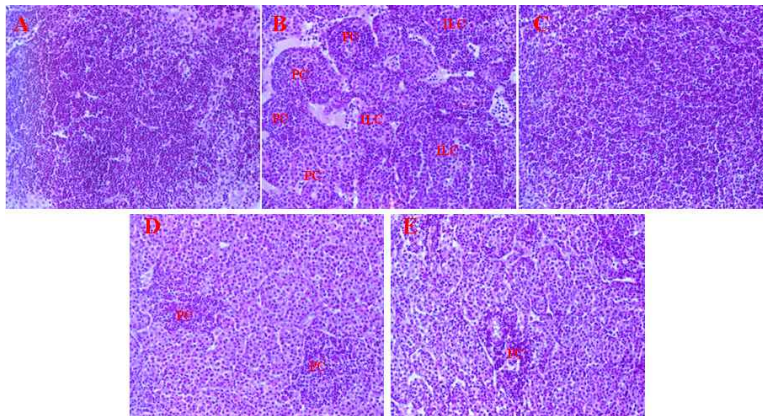


Fig.18. Histological features of the tissue stained with H&E of ALN group in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse) ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) 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). original magnification ( $\times 200$ ), Bright microscop (Nikon, Japan, original magnification,  $\times 100$ ).

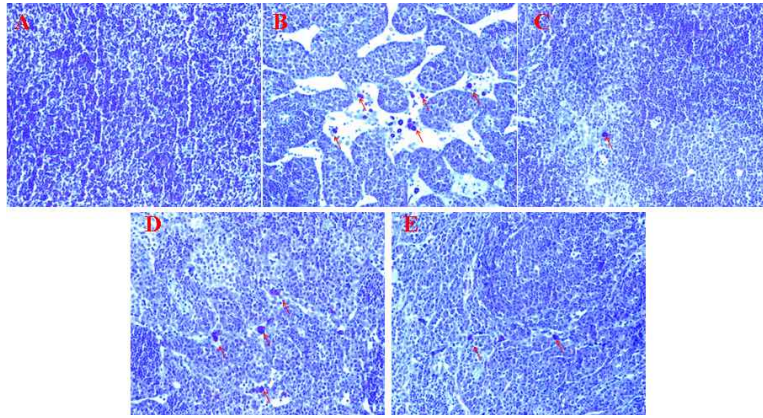


Fig.19. Histological status of the tissue stained with toluidine blue of ALN group in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200  $\mu$ l/mouse) ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) 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 mice in each group.

arrow)와 그 주변에 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis, parakeratosis 그리고 비만세포 (Fig.17D, red arrow)의 침윤 등이 감소하였다.

AJ와 KKSDU 병용투여군에서는 대조군에 비하여 epidermis의 두께가 NC/Nga-WT군에 가깝게 현저하게 줄어, 그 주변에 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis, parakeratosis 그리고 비만세포 (Fig.17E, red arrow)의 침윤 등이 현저하게 감소하였다 (Fig.16E, Fig.17E).

#### (2) ALN의 histology

ALN에 H&E 염색을 실시하여 조직에 침윤된 inflammatory lymphocytes cells(ILC)와 plasma cells(PC)를 관찰한 결과, NC/Nga-WT군 (Fig.18A)에 비하여 대조군 (Fig.18B)에서 ILC와 PC의 침윤이 현저하게 증가된 것이 관찰되었다. FK506 도포군 (Fig.18C)의 ILC와 PC는 대조군

에 비하여 크기가 줄어들었고 KKSDU 단독투여군 (Fig.18D)에서도 대조군에 비하여 약간 줄어들었다. 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군 (Fig.18E)의 ILC와 PC는 대조군에 비하여 정상군에 가깝게 감소했다.

ALN 조직에 침윤된 비만세포 (red arrow)를 관찰하기 위해 toluidine blue 염색을 실시한 결과, NC/Nga-WT군 (Fig.19A)에 비하여 대조군 (Fig.19B)에서 비만세포들이 증가하여 cluster를 형성된 상태로 관찰되었다. FK506 도포군 (Fig.19C)에서는 비만세포들이 대조군에 비하여 감소되었으며, KKSDU 단독투여군 (Fig.19D), 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군 (Fig.19E)의 비만세포 또한 감소하였다.

#### 11) 등피부조직과 ALN에서 immunohistochemical staining

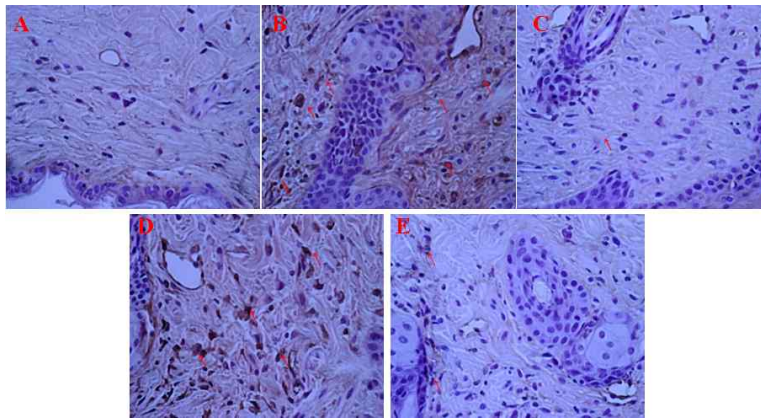


Fig.20. Immunohistochemical staining of the skin stained with CD4+ T cells of dorsal skin in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μl/mouse)-ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) 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).

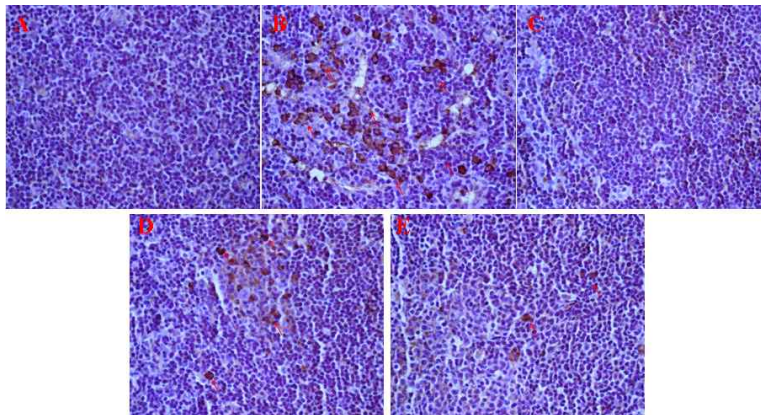


Fig.21. Immunohistochemical staining of the tissue stained with CCR3+ cells of ALN in atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse.

Atopic dermatitis-like skin NC/Nga mouse was induced by BMAC treatment in the dorsal skin, A; non 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 KKSDU (348 mg/kg) orally administration (KKSDU), and E; BMAC treatment for 3 weeks with AJ (200 μl/mouse)-ointment plus KKSDU (348 mg/kg) orally administration (AJ+KKSDU) 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).



(1) 등피부조직에서 CD4+ Th 세포의 immunohistochemical staining

등피부조직에 침윤된 CD4+ Th 세포 (brown color, arrow)를 관찰한 결과, NC/Nga-WT군 (Fig.20A)에 비하여 대조군 (Fig.20B)에서 CD4+ Th세포들이 epidermis 아래 부분에 cluster를 형성된 상태로 증가되었다. FK506 도포군 (Fig.20C), KKSUDU 단독투여군 (Fig.20D)에서는 CD4+ Th세포들이 모두 대조군에 비하여 감소되었으며, 특히 AJ+KKSUDU 병용투여군 (Fig.20E)에서는 정상군에 가깝게 감소된 것이 관찰되었다.

(2) ALN에서 CCR3+ 세포의 immunohistochemical staining

ALN 조직에 침윤된 CCR3+ 세포 (strong brown color, arrow)를 관찰한 결과, NC/Nga-WT군 (Fig.21A)에 비하여 대조군 (Fig.21B)에서 CCR3+ 세포들이 ALN 조직사이에 침윤되어 증가된 것을 관찰하였다. FK506 도포군 (Fig.21C)과 AJ+KKSUDU 병용투여군 (Fig.21E)에서는 CCR3+ 세포가 대조군에 비하여 NC/Nga-WT군에 가깝게 감소되었고, KKSUDU 단독투여군 (Fig.21D) 또한 대조군에 비하여 CCR3+ 세포 침윤이 감소되었다.

#### IV. 考 察

아토피 피부염은 아토피성 체질을 가진 사람에서 발생하는 만성 피부염으로 흔히 태열이라고 부르는 유아 습진으로 시작되며, 만성, 재발성 경과를 보인다. 자각 증상으로 심한 소양감을 특징으로 하는데 발병 시기에 따라 특징적인 병변의 분포와 양상을 보인다<sup>31)</sup>.

아토피 피부염의 서양의학적 치료로는 기존

의 경구용 항히스타민제, 국소용 스테로이드 외에도 경구용 스테로이드, 항생제, 항바이러스제, 항진균제, 탈감작요법, 생균제, 경구용 면역억제제, 국소용 면역억제제, 광선치료 등의 다양한 치료법을 개발하여 아토피 치료에 응용하고자 노력하고 있으나<sup>31-2)</sup> 이와 같은 노력에도 불구하고 아토피 피부염 환자의 유병율은 점차 증가하고 있는 추세이다<sup>4)</sup>.

일반적으로 아토피 피부염에서는 IgE와 호산구가 증가하는데, 이는 IL-4, IL-5와 같은 Th2 cytokine이 증가하고 Th1 cytokine인 interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )의 분비가 감소하는 것과 관련이 있으며<sup>33)</sup> 이와 관련하여 pimecrolimus, tacrolimus 등과 같은 여러 면역치료제들이 시도되고 있다<sup>34)</sup>. 특히 최근 면역반응을 직접적으로 억제할 수 있는 CD4+CD25+ 조절 T 림프구 (regulatory T cells, Treg cells)의 존재가 알려졌는데, Treg cell은 흉선에서 발생되고 다양한 T 림프구의 활동을 제어하는 능력을 갖고 있으며 대식세포나 B 세포와 같은 면역세포들에 대하여 Treg cell이 세포 표면에 발현하는 CTLA4, GITR, CD25 그리고 LAG3 등을 통하여 면역 억제 신호를 전달하거나 면역 세포들 사이의 상호작용을 억제한다. 또한 기존에 잘 알려진 IL-10 외에 TGF- $\beta$ , IL-35 등의 cytokine을 통해서도 면역 억제 반응을 유도한다<sup>35)</sup>. 이러한 Treg cell은 세포 표면에 CD25 (IL-2Ra)와 foxp3라는 전사인자를 특이적으로 발현하여 CD25와 foxp3를 marker로 CD4+CD25+foxp3+ natural Treg cell을 식별할 수 있다<sup>36)</sup>.

Treg cell에서 발현되는 foxp3 전사인자는 알레르기성 질환이나 자가면역질환들을 조절하는데 필수적이며<sup>37)</sup> 이러한 이유 때문에 흉선이나 흉선 외 주변조직에서 foxp3의 발현을 조절에 관여하는 약물과 cytokine들은 상당한 연구의 관심이 되고 있다<sup>38)</sup>. 이와 같은 배경으로 본

연구에서는 한의학적 약물과 외용제의 투여가 CD4+CD25+foxp3+ Treg cell 조절을 통한 아토피 피부염 치료에 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였다.

한의학적으로 아토피 피부염과 일치하는 병명은 없으나 胎熱, 胎蘚, 浸淫瘡, 胎斂瘡, 奶癬, 濕疹, 四彎風 등의 범주로 보고, 그 원인이 風熱, 濕熱, 血虛風燥, 血熱, 濕熱溫燥 등에 있다하여 清熱利濕, 祛風止癢, 滋陰養血 등의 치료방법이 주로 사용된다<sup>2)</sup>

加減消毒飲은 《晴崗醫鑑》에 수록된 처방이며 升麻葛根湯의 변방으로<sup>16)</sup> 升麻葛根湯은 宋代 錢乙의 《小兒藥證直訣》<sup>39)</sup>에 최초로 수록되어 傷寒溫病과 時令感冒, 瘡疹의 질환에 사용되어온 要方이며 解肌透疹의 升麻, 葛根, 補血의 芍藥, 清熱解毒의 甘草로 구성되어 있다<sup>17)</sup>. 方中の 升麻 葛根은 모두 辛甘微寒한 약물로 능히 疏散風熱于表 할 뿐만 아니라 능히 解毒透疹하고 二藥이 合하여 諸毒을 解하고 升陽散火하니 諸腫毒을 發散하며 透斑하여 主藥이 되고 芍藥은 甘草와 合하여 止痛하며 甘草는 和胃溫胃하고 和諸藥한다<sup>40)</sup>. 加減消毒飲은 이러한 升麻葛根湯에 解表祛風 除濕透疹하는 荊芥, 防風과 疏散風熱 消腫透疹하는 薄荷, 牛蒡子, 清熱解毒 消腫散結의 連翹, 清熱解肌의 石膏, 除濕熱, 治癰腫疔瘡하는 黃芩을 가하여 清熱 透疹 除濕 發斑의 효능을 더욱 강화시킨 처방이다<sup>41)</sup>. 따라서 加減消毒飲은 風熱毒과 濕熱이 表部에 울체되어 皮膚赤爛 搔癢하는 風熱斑疹을 치료하며<sup>16)</sup> 이는 임상에서 발적, 구진, 홍반, 삼출, 부종, 소양 등의 증상을 보이는 濕熱型의 아토피 피부염 치료에 적합할 것으로 생각된다.

본 연구에 사용된 紫雲膏는 紫草, 當歸, 胡麻油, 黃蠟 및 豚脂로 구성된 고약으로 일본 江戸時代의 외과의사 華岡이 潤肌膏<sup>42)</sup>에 豚脂

를 가하여 《春林軒膏方便覽》에서 紫雲膏라 처음 명명하였다<sup>43)</sup>. 潤肌膏는 《外科正宗》<sup>42)</sup>에서 ‘治禿瘡乾枯白斑, 作痒髮脫’이라 하였고, 《醫宗金鑑·外科心法要訣》<sup>44)</sup>에서는 ‘若肌膚燥裂者, 用潤肌膏擦之甚效’라 하였으며, 《外科大成》<sup>45)</sup>에서는 ‘治白屑風油風, 及禿瘡白斑作痒’이라 하였다. 또한 《中醫外科》<sup>46)</sup>에는 手掌과 足底의 皸裂, 皮膚裂紋에 外敷한다고 하여, 건선, 탈모, 백전풍, 습진, 절상, 타박상, 동상, 화상, 궤양 등의 피부질환에 두루 사용할 수 있는 연고로 알려져 있다.

구성약물 중 當歸는 潤燥, 補血, 化血, 항균 작용이 있으며<sup>41,47)</sup>, 항산화효과<sup>48)</sup> 및 혈관신생 억제<sup>49)</sup> 등의 효과가 보고된 바 있어 아토피 피부염으로 인한 피부의 스트레스와 염증시의 혈관신생을 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 또한 紫草는 涼血, 解毒, 透疹, 清潤의 작용이 있고<sup>41,47)</sup> histamine의 유리 억제<sup>50)</sup> 및 IL-1과 TNF- $\alpha$ 의 발현 억제<sup>51)</sup> 등의 효과가 보고된 바 있으며, 胡麻油는 潤燥, 解毒, 止痛의 작용이 있고<sup>47)</sup> 성질이 차가워 肌膚의 열을 없애주며 피부재생을 돕는 효과가 있어<sup>52)</sup> 화상을 비롯한 피부질환이 응용할 수 있다. 그리고 黃蠟은 解毒, 生肌, 止痛의 작용이 있으며<sup>47)</sup> 豚脂와 함께 紫雲膏의 賦形劑 역할을 한다.

紫雲膏는 현재까지도 임상에서 아토피 피부염을 비롯해 알레르기성 피부염, 지루성 피부염, 화상, 백반증, 피부건조증 등의 여러 피부질환에 널리 응용되고 있으며<sup>20)</sup> 이에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다<sup>53-55)</sup>.

본 연구에 사용된 아토피크림은 아로마 요법에 기초를 두고 베이스크림과 lavender, chamomile-Roman, tea tree로 구성된 외용제로, 허브에서 추출한 오일들의 대부분은 강한 항염작용과 소독작용을 하는 aldehyde, acid, phenol, ether 등의 성분을 포함하고 있어 아토피

피성 피부의 염증을 줄여주는 것으로 알려져 있다<sup>56)</sup>.

아토피크림 중 lavender는 모든 기관의 진정 효과가 뛰어나고, 항바이러스, 항진균, 항박테리아 효과가 있으며, 피부재생효과가 뛰어나 상처, 화상 등의 피부손상 치료에 효과적이다. 그리고 tea tree는 항박테리아, 항바이러스, 항진균, 소염, 진통, 살균 작용이 있고, 기저귀 발진, 무좀, 질염에도 효과적이고 자극성이 적어서 원액을 피부에 직접 도포할 수 있는 오일 중의 하나이며, chamomile-Roman은 강한 항염증, 진정, 이완작용 및 방부, 소염, 항알러지효과가 있어 여드름, 습진, 화상에 쓸 수 있으며 상처치유에도 효과적이다<sup>21-3)</sup>.

이러한 배경으로 임상에서 아토피 피부염 치료에 널리 쓰이고 있는 아토피크림과 紫雲膏를 도포하고 加減消毒飲을 투여가 아토피 피부염 치료에 미치는 영향을 알아보기 위하여 in vivo에서 NC/Nga 생쥐에 BMAC를 처리하여 피부염을 유발시킨 후 (대조군), 양성대조군으로 FK506 (tacrolimus) 0.3 % 연고<sup>57)</sup>를 사용하였고 KKSDU, AJ+KKSDU를 각각 투여하여 피부발진 및 활성화된 면역질환이 억제되는지를 관찰하였다.

NC/Nga 생쥐는 태어난 후 어렸을 때부터 일반 사육환경 (conventional system)에서 노출되어 자라게 되면 사람에서의 아토피 피부염과 유사하게 딱지가 앉은 상처 및 작은 병변이 관찰되는 동물로서 아토피 피부염 모델동물로 사용되고 있다<sup>58)</sup>.

양성대조군으로 사용된 FK506 (tacrolimus) 0.3 %는 Macroride계통의 항생물질로 cyclosporin과 유사한 calcineurin 억제제이며, IL-2와 다른 lymphokine들의 전사에 필요한 T 림프구 수용체 매개성 신호전달과정을 차단함으로써 T세포에 대한 억제작용을 하는 것으로 알려져 있

다<sup>59)</sup>. 최근 연구에서 아토피 피부질환이 유도된 NC/Nga 생쥐에 FK506을 도포하여 CD4+ T 세포, 비만세포, eosinophils, IL-4, IL-5 그리고 IgE 등이 대조군에 비하여 감소하고 탈모와 피부위축이 현저하게 완화되었다는 보고가 있었다<sup>60)</sup>.

본 실험에서 BMAC를 2 주간 도포한 결과, NC/Nga 생쥐 등피부부위에 사람 아토피 피부염과 같은 증상인 erythema/hemorrhage, papule, scarring/dry-ness, excoriation/erosion이 나타났다 (Fig.1 A,B). BMAC를 1 주 추가 도포하고 KKSDU, 그리고 AJ+KKSDU를 3 주간 처리한 결과, KKSDU 단독투여군보다는 AJ와 KKSDU를 병용투여한 실험군에서 NC/Nga 생쥐 등피부의 erythema/hemorrhage, 구진, scarring/dryness, excoriation/erosion이 대조군에 비하여 현저하게 감소하였다 (Fig.1 C,D). 각 NC/Nga 생쥐의 clinical skin score를 측정된 결과는 양성대조군인 FK506과 KKSDU 단독투여군, AJ+KKSDU 병용투여군 모두에서 대조군에 비하여 유의성있게 clinical skin score가 감소하였다 (Fig.2). 이러한 결과로 AJ와 KKSDU 투여를 통해 사람 아토피 피부염 또한 임상적으로 호전될 수 있을 것으로 기대된다.

백혈구는 granulocyte, lymphocyte, monocyte로 구분하고 말초혈액에서 일반적으로 외부항원에 대한 면역기능을 갖는다. 이 중, granulocyte는 골수에서 만들어지고 혈액을 거쳐 전신조직에 분포하며 전골수구 단계부터 각 세포의 특이한 과립이 나타나 neutrophil, eosinophil, basophil 등으로 세포를 분류한다. 최근의 연구에서 만성 천식, 아토피 환자의 말초혈액에서 granulocyte의 세포수가 증가하면서 백혈구의 수도 증가하는 것으로 알려져 있다<sup>61)</sup>. 본 연구에서 NC/Nga 생쥐의 혈액을 분석한 결과, WBC 내의 neutrophil, eosinophil 빈도 (%)는 NC/Nga-WT군

(정상군)에 비해 대조군이 증가하였고, KKSDU 단독투여군, AJ와 KKSDU 병용투여군의 neutrophil과 eosinophil의 비율은 대조군에 비하여 감소하였으며 특히 AJ와 KKSDU 병용투여군에서는 유의성있게 감소하였다( $p < 0.01$ ). 그리고 WBC 중 lymphocytes 비율은 대조군에서 NC/Nga-WT군에 비하여 약간 감소하였고 FK 506 투여군과 AJ+KKSDU 병용투여군은 대조군에 비해 유의성있게 증가하였다. 그 외 monocyte와 basophil의 비율은 모든 실험군에서 차이가 나타나지 않았다(Fig.3A, Fig.3B).

B 세포가 분화되는 과정에서 분비, 결합되어 염증 반응을 유도하는 IgE와 Th2 세포에서 분비되어 B 세포의 분화를 촉진하는 IL-4에 의하여 유도되는 IgG1의 수치를 혈청에서 측정 한 실험에서 total IgE와 IgG1의 수치는 대조군에서 급격한 증가를 나타내었으나 FK506, KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ+KKSDU 병용투여군에서는 모두 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다(Fig.4).

ALN은 만성아토피질환 동물에서 중요한 역할을 하는 면역기관으로 아직 임상에서는 아토피와의 연관성에 대한 연구와 임상보고가 부족한 상태이다. 그러나 일부 심한 만성아토피환자의 경우 겨드랑이가 붓고 ALN의 크기가 증가되었다는 보고가 있고, 먼지진드기로 유발된 만성 아토피 피부발진 NC/Nga 생쥐의 경우 ALN이 2 개 이상인 경우도 해부학적으로 관찰되었다. 즉, 아토피 피부발진이 심화되면 ALN으로 Th2 세포, 호산구, 단핵구, 호중구, 비만세포 등 면역염증세포가 증가하게 되어 만성피부질환 동물의 피부발진을 계속 유지하고 악화시키는데 기여하게 된다. 최근 많은 NC/Nga 아토피 연구에서 ALN을 target으로 하여 결과를 보고하고 있으며<sup>63)</sup>, 본 연구에서도 아토피 피부발진에 대한 NC/Nga 생쥐의 입과절 target

을 ALN으로 정하여 실험에 임하였다.

ALN에서의 cytokine을 측정한 결과, 만성 아토피 질환에서 감염에 의하여 증가하게 되는<sup>62)</sup> IFN- $\gamma$  생산량이 대조군에서 NC/Nga-WT군에 비하여 증가하였고(Fig.5A), KKSDU 단독투여군 그리고 KKSDU와 AJ 병용투여군에서는 대조군에 비해 유의성있게 감소하였다(Fig.5A). 또한 Th2 세포에서 생산되는 IL-5와 IL-13의 생산량을 측정한 결과, 대조군에서 각각 증가되었고 KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군에서는 대조군에 비하여 유의성있게 감소되었다( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig.5C).

CD4+ T 세포는 특정한 B 림프구에 작용하여 B 림프구가 항원과 반응하도록 함으로써 체액성면역반응을 촉진 (항체형성촉진)시키며, 세포성면역반응 자체도 증강시킨다. 또한 CD8+ T 세포는 직접적으로 항원을 죽일 수 있는 독성물질을 방출하여 항원을 죽이며, 자극을 받으면 세포성 면역반응을 이끌어 낸다. 이로써 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포는 우리 몸의 면역기능을 가늠하는 가장 중요한 지표가 된다. 또한 최근 연구에서 따르면 CD8+ T 세포는 염증발진에서 migration으로 중요한 역할을 하고 또한 LTB4를 통해 비만세포를 활성화시켜 알레르기 질환의 pathogenesis에서 중심적 역할을 한다<sup>64)</sup>.

T 세포 활성화 표지분자중 하나인 CD69는 특정한 항원이나 호르몬에 의해 활성화된 T 세포에서 볼 수 있다. 즉, CD3 T 세포의 활성화는 CD4+/CD69+ 와 CD8+/CD69+ 세포로 구분되고 이러한 활성화된 T 세포에서 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , 그리고 IL-4 등이 항원에 따라 생산량이 증가되어, 염증면역반응에서는 염증세포의 정도에 따라 CD3+/CD69+ 활성화세포의 증가와 염증 cytokine이 비례적으로 증가하는 양상

을 나타낸다<sup>65</sup>).

T 세포에서 발현되는 CXCR5의 ligand는 CXCL13으로 만성아토피 피부발진 부위의 질환을 계속 유지하기 위하여, 피부발진 부위에서 활성화된 antigen-loaded DCs 나 memory T 세포 (APC)가 lymph node의 naive T 세포를 감작하고 유도함으로써 CD4+/CXCR5+ 활성화 세포가 되어 피부발진 부위로 skin-homing T 세포를 침윤하는 역할을 하는 것으로 최근 알려졌다. 그래서 피부발진 부위에 대식세포나 염증면역세포에 의해 분비된 CXCL13과 binding 하여 만성아토피질환을 계속 유지하게 된다<sup>66</sup>.

본 연구에서 ALN, DLN과 등피부조직의 총세포수가 대조군에 비하여 KKSDU와 AJ 투여로 감소하였고 (Fig.6), 또한 ALN에서 CD3+ T 세포, CD4+ Th 세포, CD3+CD69+, CCR3+, CD4+CXCR5+ 세포 등의 활성화세포수와 절대세포수도 KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군에서 대조군에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig.7, Fig.8, Fig.9).

CCR3는 eotaxin, RANTES(regulated and normal T cell expressed and secreted), monocyte chemotactic protein(MCP)-3 및 MCP-4와 높은 친화력으로 결합하고, 호산구 (CCR3+)에서 다량 발현되며 호중구, 단핵구에서는 발현되지 않기 때문에 선택적인 호산구의 조직내 침윤을 연구하는데 중요한 가치가 있다. 또한 CCR3는 Th2 림프구 (CD3+CCR3+), basophils, 비만세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다<sup>67</sup>.

면역조절작용 중 myeloid 세포의 역할은 다양한 질환상태에 관여하여 면역억제작용을 하고 세포의 성장과 분화에 중요하게 작용하는 것이다. 그리고 myeloid suppressor cells(MSC)는 macrophage (Mac-1/CD11b)와 granulocyte (Gr-1) lineages를 공통적으로 모두 표면분자로 발현한다. 이 CD11b+Gr-1+ MSC는 spleen, lymph

node에서 염증 피부 및 조직으로 이동하여 많이 존재하는데<sup>68</sup>, 이 세포는 antibody production, cytotoxic T lymphocyte (CTL) generation, 그리고 lymphocyte proliferative responses를 억제하여 아토피 피부염의 경우 만성피부질환을 계속적으로 심화시키는 역할을 한다<sup>69</sup>.

본 연구에서 ALN과 PBMCs에서 CD3+CCR3+세포, 그리고 CCR3+세포의 총활성세포 빈도 (%)가 NC/Nga-WT군에 비하여 BMAC를 도포한 대조군이 각각에서 증가한 결과를 얻었고, 0.3 %의 FK506 도포군, KKSDU 단독투여군, AJ+KKSDU 병용투여군의 CD3+/CCR3+세포와 CCR3+세포의 총활성세포 빈도 (%)가 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다 ( $p < 0.01$ )(Fig.8B, Fig.11D). 또한 등피부조직에서 CCR3+, CD3+CD69+ T세포, 그리고 CD11b+Gr-1+ MSC 세포는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군에서 각각 절대세포수가 증가하였고, FK506 투여군과 AJ+KKSDU 병용투여군의 CCR3+, CD3+/CD69+ T세포, CD11b+Gr-1+ MSC 세포의 절대세포수는 대조군에 비하여 각각 유의성있는 감소를 나타내었다 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ )(Fig.13).

이러한 연구결과는 AJ+KKSDU 병용투여군이 ALN과 등피부발진조직에서 Treg cell을 유도 및 증가시켜 활성화된 T 세포, 체액성 면역염증세포인 활성화 B 세포와 호산구, 비만세포의 보충을 제한하는 것으로 판단된다. 그러나 정확한 기전과 chemokine 등에 대해서는 추후 실험이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

만성 아토피발진 동물모델에서는 손상된 피부로 박테리아가 상피세포의 벽을 통과하면서 수지상 세포 (DCs)를 자극하여 활성화된 DCs가 다시 DLN으로 이동하여 DLN에 있는 naive T 세포를 자극한다. 자극으로 활성화된 T 세포는 피부발진 부위로 이동하여 염증반응을 일으키

게 된다. 그래서 만성질환 동물의 경우 DLN의 면역세포가 피부발진 부위로 이동하여 DLN 내 면역세포의 현저한 감소가 나타난다<sup>70)</sup>.

본 실험에서도 DLN내 총 CD3e+, CD4+ 그리고 CD8+의 절대세포수는 NC/Nga-WT군에 비하여 대조군이 각각 감소한 결과를 얻었고, 0.3 %의 FK506, 그리고 AJ와 KKSDU 병용투여군의 CD3e+, CD4+ 그리고 CD8+의 absolute number는 대조군에 비하여 각각 유의성 있는 증가를 나타내었다( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ )(Fig.12).

등피부조직에서 CD4+CD25+foxp3+ Treg cell의 절대세포수를 측정된 결과는 NC/Nga-WT군, 대조군, 양성대조군에서는 큰 차이가 없었으나 KKSDU 단독투여군에서 대조군에 비하여 절대세포수가 증가하였으며, 특히 AJ+KKSDU 병용투여군에서 대조군에 비해 유의성있게 증가하였다( $p < 0.01$ )(Fig.13A). 또한, 등피부조직에서의 foxp3 mRNA의 유전자 발현양을 비교분석한 결과, 대조군과 양성대조군에서는 NC/Nga-WT군에 비해 차이가 없었으나 KKSDU 단독투여군, 그리고 AJ+KKSDU 병용투여군에서는 대조군에 비하여 각각 유의성 있는 증가를 나타내었다 (Fig.14). 이러한 결과는 KKSDU와 AJ에 의하여 유도된 Treg cell이 피부발진부위로 이동하여 호산구세포, 비만세포 그리고 염증세포의 증식 및 활성을 억제하여 피부발진을 감소시키는 것으로 생각된다.

등피부조직과 ALN에서 real-time PCR로 IL-5, IL-13, eotaxin2, 그리고 CCR3 mRNA를 분석한 결과, KKSDU 단독투여군과 AJ와 KKSDU 병용투여군 모두에서 대조군에 비해 유전자 발현이 억제되었다(Fig.15). 또한 등피부조직과 ALN에서 H&E 염색을 실시한 결과, KKSDU와 AJ의 투여로 등피부조직에서 epidermis의 두께가 대조군에 비하여 현저하게 줄어들었고 ALN에서 또한 염증세포 침윤이 감소하였다

(Fig.16, Fig.18). 그리고 toluidine-blue 염색 결과, 등피부조직과 ALN 모두에서 KKSDU와 AJ의 투여로 비만세포 침윤이 대조군에 비해 현저하게 감소되었다 (Fig.17, Fig.19). 이는 AJ와 KKSDU의 투여가 ALN에서 Treg cell을 유도함으로써 ALN과 등피부발진 부위로 면역염증세포의 보충을 제한하는 것으로 판단된다.

등피부조직에서 CD4+ Th 세포의 면역화학조직 염색한 결과는 KKSDU 단독투여군에서 대조군에 비하여 현저하게 감소되었고 특히 AJ+KKSDU 병용투여군은 NC/Nga-WT군에 가깝게 감소되었다(Fig.20). 또한 ALN에서 면역화학조직 염색을 통해 CCR3+ 세포를 관찰한 결과에서도 KKSDU 단독투여군에서 대조군에 비하여 CCR3+ 세포 침윤이 감소되었으며 AJ+KKSDU 병용투여군에서는 NC/Nga-WT군에 가깝게 현저히 감소된 것이 관찰되었다 (Fig.21). 이러한 결과는 KKSDU 단독투여군과 AJ+KKSDU 병용투여군이 CD4+CD25+foxp3+Treg cell을 활성화시킴으로써 BMAC로 유도된 아토피성 피부발진모델에서 hyperplasia에 의한 epidermis 두께 확장, Th2 면역세포의 과잉 침윤(CD4+)과 비만세포 (CCR3+)의 침윤을 감소시켜 피부발진 치료효과를 나타낸 것이다.

이상의 결과로 KKSDU와 AJ+KKSDU가 아토피 피부염의 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단되며 향후 아토피 피부염의 정확한 기전에 대한 연구와 실험적 보완 및 임상 연구가 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

BMAC로 아토피樣 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에서 加減消毒飲 그리고 아토피 크림-紫

雲膏와 加減消毒飲 병용투여가 피부염 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BMAC를 NC/Nga 생쥐에 3 주간 도포하여 피부발진이 유도되었고 KKSUDU 단독투여군, AJ와 KKSUDU 병용투여군 모두 발진이 감소되었다.
2. KKSUDU 단독투여군과 AJ와 KKSUDU 병용투여군 모두 clinical skin score를 유의성있게 감소시켰다.
3. KKSUDU 단독투여군, AJ와 KKSUDU 병용투여군 모두 혈액내 WBC 중 neutrophils과 eosinophils의 비율을 유의성있게 감소시켰다.
4. KKSUDU 단독투여군, AJ와 KKSUDU 병용투여군 모두 혈청 중 IgE와 IgG1 수준을 유의성있게 감소시켰다.
5. KKSUDU 단독투여군, AJ와 KKSUDU 병용투여군 모두 ALN에서 IL-5, IL-13과 IFN- $\gamma$ 의 생산량을 유의성있게 감소시켰다.
6. KKSUDU 단독투여군, AJ와 KKSUDU 병용투여군 모두 ALN과 등피부세포의 총세포수를 유의성있게 감소시켰고, DLN의 총세포수를 증가시켰다.
7. KKSUDU 단독투여군, AJ와 KKSUDU 병용투여군 모두 PBMCs, ALN, 등피부조직에서 CD3e+ T cell, CD4+ Th cell, CD8+ c/sT cell, CD3+CCR3+ cell, CCR3+ cell, CD3+CD69+, CD4+CXCR5+ 그리고 CD11b+/Gr-1+의 절대세포수를 감소시켰다.
8. KKSUDU 단독투여군, AJ와 KKSUDU 병용투여군 모두 DLN에서 CD3e+ T cell, CD19+ B cell, CD4+ Th cell, CD8+ c/sT cell, B220+CD23+ cell, 그리고 CD3+CD69+의 절대세포수를 증가시켰다.
9. KKSUDU 단독투여군, AJ와 KKSUDU 병용투

여군 모두 등피부조직에서 CD4+CD25+foxp3+ Treg cell의 총세포수와 foxp3 mRNA의 유전자 발현을 유의성있게 증가시켰다.

10. KKSUDU 단독투여군, AJ와 KKSUDU 병용투여군 모두 등피부조직에서 Eotaxin2 mRNA, CCR3 mRNA, 그리고 ALN에서 IL-5 mRNA, IL-13 mRNA의 유전자 발현을 유의성있게 감소시켰다.
11. KKSUDU 단독투여군, AJ와 KKSUDU 병용투여군 모두 등피부조직과 ALN에서 epidermis의 두께와 dermis 부분에 침윤된 염증면역세포 및 비만세포 등을 현저하게 감소시켰다.
12. KKSUDU 단독투여군, AJ와 KKSUDU 병용투여군 모두 등피부조직에서 CD4+ Th 세포, 그리고 ALN에서 CCR3+ 세포의 침윤을 감소시켰다.

## VI. 參考文獻

1. Finlay AY. Quality of life in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45:S64-6.
2. Lewis-Jones S. Quality of life and childhood atopic dermatitis: the misery of living with childhood eczema. *Int J Clin Pract.* 2006; 60:984-92.
3. Feldman S, Behnam SM, Behnam SE, Koo JYM. Involving the patient: impact of inflammatory skin disease and patient-focused care. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53:S78-85.
4. 안효섭. 홍창의. 소아과학. 서울:대한교과서 주식회사. 2004:1166-92, 1207-11.
5. 허인희, 홍성민, 엄유식, 변학성, 심성용, 김경준. 외치요법을 위주로 한 아토피 피부염 환자 증례. 한방안이비인후과피부과학회지.

- 2006;9(3):201-8.
6. 진경선, 임태형, 박은정, 이해자, 한경훈, 나원경. 淸上防風湯의 아토피성 알레르기 반응 조절 효과. 대한한방소아과학회지. 2004; 18(2):61-76.
  7. 유한정, 이진용, 김덕곤. 內消和中湯加味方이 아토피 피부염 환자의 혈중 Cytokine 분비에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2006;20(1):15-29.
  8. 김홍배, 김원일, 이승연. 升麻葛根湯의 항히스타민 효과 및 IL-4와 GM-CSF 발현에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2006;20(2):69-83.
  9. 박성의, 진미림, 구영선, 김동희. 脾虛蘊濕方이 아토피 피부염 유발 NC/Nga 생쥐의 혈액 내 면역관련인자에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(4):849-55.
  10. 손정민, 홍승욱. 防風通聖散이 아토피 피부염을 유발한 동물모델의 피부 손상에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2007;20(1):99-114.
  11. 신상호, 김미보, 변석미, 이호섭, 박선규, 고우신, 윤화정. 아토피 피부염의 외치법에 대한 고찰. 한방안이비인후피부과학회지. 2008;21(2):80-93.
  12. 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.
  13. 민영규, 최정화, 김종환, 박수연. 消風散加減方과 外治方 병용이 NC-Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. 대한이비인후피부과학회지. 2005;18(1):116-34.
  14. 김정진, 양성완, 손낙원, 안규석. 加味生料四物湯의 항염증 효과와 止痒膏의 아토피 피부염 손상 및 止痒 효과에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2003;17(2):428-35.
  15. 홍철희, 서은성, 원영호, 김영근, 황충연. 溫清飲과 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(3):679-87.
  16. 金永勳. 晴崗醫鑑. 서울:성보사. 1984:361.
  17. 韓醫科大學 方劑學教授 共編著. 方劑學. 서울:영림사. 1999:92-3.
  18. 송현지, 김윤희, 한재경. 아토피樣 피부염 NC/Nga생쥐에서 加減消毒飲의 투여가 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2009;23(1):23-35.
  19. 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.
  20. 蔡炳允. 韓方外科. 서울:고문사. 1991:397.
  21. 조태동, 송진희. 허브 아로마 라이프. 서울:대원사. 2006:19-23,29,41,43.
  22. 문수진. 에센셜 오일의 여드름피부 개선효과-lavender, tea tree, 캐모마일 오일의 피부 임상중심. 중앙대학교 의약식품대학원 석사학위논문. 2005.
  23. 조성준. 향기치료의 기적. 서울:도서출판宇石. 2000:120,140,169-71.
  24. Dogru M., Katakami C., Nakagawa N., Tetsumoto K., and Yamamoto M. Impression cytology in atopic dermatitis. Ophthalmology. 1998;105:1478-84.
  25. Hoffer 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.
  26. 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.
27. Galli SJ. *Allergy. Curr. Biol.* 2006;10:R93-5.
28. 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.
29. K Jo`hrens, I Anagnostopoulos, H Durkop & H Stein. Different T-bet expression patteerns characterize particular reactive lymphoid tissue lesions. *Histopathology.* 2006;48:343-52.
- 30 Danniell W. A foundation for analysis in the health science. *Biotics.* 1983:136-46.
31. 안성구, 박병덕, 원진형, 성열오, 천승현. 개원의를 위한 아토피 피부염. 서울:퍼시픽출판사. 2007:25,35.
32. 김정희. 아토피 피부염의 최신 지견. 소아알레르기 및 호흡기학회지. 2004;14(1):12-23.
33. Leung DYM. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:99-108.
34. 이지현, 김규한, 김명남, 김진우, 노영석, 박영립, 박천욱, 이광훈, 이해영, 조상현, 최지호. 한국 아토피피부염의 치료지침. *대한피부과학회지.* 2006;44(8):907-13.
35. 이상규. Immune System-Two Face of the Same Coin. 분자세포생물학뉴스. 2008;20(1):70-7.
36. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immuno-suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surFSCe-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 2001;194:629-44.
37. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics.* 2001;27(1):68-73.
38. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce foxp3 expression through its enhancer. *Nature Immunology.* 2008;9(2):194-202.
39. 錢乙. 小兒藥證直訣. 북경:인민위생출판사. 1985:212-6.
40. 윤길영. 동의방제학. 서울:고문사, 1980:48-51, 64.
41. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:영림사. 2000:196-7, 578-80.
42. 陳實功. 外科正宗. 上海:上海科學技術出版社. 1989:269, 303.
43. 矢數道明. 漢方治療百話(6권). 서울:東南出版社. 1991:322.
44. 吳謙. 醫宗金鑑. 서울:大星文化社. 1983:80.
45. 祁坤. 外科大成. 台北:文光圖書有限公司. 1975:212.
46. 邱嗣康. 中醫外科. 北京:人民衛生出版社. 1989:233.
47. 김창민, 신민규, 안덕균, 이경순. 중약대사전. 서울:도서출판 정담. 1997:887-95, 3611-8, 1182-3, 1458-60.
48. 임종국, 안준철, 문진영. 當歸藥針液의 항산화효능에 관한 연구(2). *대한침구학회지.* 1997;14(1):383-96.
49. 오하식, 김형환, 안덕균, 최호영. 當歸類가 혈관신생에 미치는 영향에 대한 비교연구. *대한본초학회지.* 2001;16(2):19-26.
50. 김시혜, 정혁상, 조백건, 이진용, 김덕곤. 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향. 대

- 대한한방소아과학회지. 2004;18(1):63-75.
51. 박대원, 이용섭, 서영배, 안덕균, 최호영. 생쥐의 B 세포에서 anti-CD40과  $\gamma$ IL-4로 유도된 cytokine 생산에 대한 紫草의 효과. 대한본초학회지. 2004;16(2):19-27.
  52. 남상윤, 이범준. 랫드의 화상모델에서 전복 껍질과 참기름의 치료효과. 한국수의공중보건학회지. 2003;27(2):119-27.
  53. 김수경, 최해운, 지선영, 이상곤. 紫雲膏와 Gentamicin 併用이 創傷治癒 및 創傷感染에 미치는 影響에 關한 研究. 대한본초학회지. 2004;19(4):137-60.
  54. 전재홍. 紫雲膏가 자외선에 의한 피부손상과 광노화에 미치는 영향. 동국대학교 박사학위논문. 2006.
  55. 공태영, 박태열. 紫雲膏(A)를 이용한 火傷 치료 및 피부질환치험례. 한의외치요법학회지. 2000;2(1):53-7.
  56. 조소은. 병리학적 관점에서의 아토피 피부염의 치료와 스킨케어 방향에 관한 연구. 공주영상정보대학 논문집. 2001;8:637-51.
  57. Schreiber SL and Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. Immunol Today. 1992;13(4):136-42.
  58. H Matsuda, N Watanabe, GP Geba, J Sperl, M Tsudzuki, J Hiroi, M Matsumoto, H Ushio, S Saito, PW Askenase and C Ra. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mouse. International Immunology. 1997;9:461-6.
  59. Tocci MJ, Matkovich DA, Collier KA. The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. J Immunol. 1989;143:718-26.
  60. Jun Hiroi, Takanori Sengoku, Kyoko Morita, Shinichi Kishi, Sachio Sato, Toshikazu Ogawa, Masaoki Tsudzuki, Hiroshi Matsuda, Adumi Wada and Kozaburo Esaki. Effect of Tacrolimus Hydrate(FK506) Ointment on Spontaneous Dermatitis in NC/Nga Mice. The Japanese Journal of Pharmacology. 1998;76:175-83.
  61. Elena Gonzalez-Rey, Alejo Chorny and Mario Delgado. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. Nat Rev Immunol. 2007;7:52-63.
  62. Leung DY. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic tervention. J Allergy Clin Immunol. 2000;105(5):860-76.
  63. Christian Vestergaard, Hiroyuki Yoneyama, Masako Murai, Kohichiro Nakamura, Kunihiko Tamaki, Yuya Terashima, Toshio Imai, Osamu Yoshie, Tatsuro Irimura, Hitoshi Mizutani, and Kouji Matsushima. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mouse exhibiting atopic dermatitis-like lesions. J Clin Invest. 1999;104(8):1097 - 105.
  64. Ryouji Yagi, Haruko Nagai, Yutaka Iigo, Toshihiro Akimoto, Takao Arai and Masato Kubo. Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in STAT6-Deficient NC/Nga mouse. The Journal of Immunology. 2002;168:2020-7.
  65. Tatsuya Sasakawaa, Yasuyuki Higashib, Syozo Sakumac, Yoshitaka Hirayamaa, Yuka Sasakawaa, Yoshitaka Ohkuboa, Toshio Gotoa, Masahiro Matsumotod, Hiroshi Matsudae. Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions Induced by Topical Application of

- Mite Antigens in NC/Nga mouse. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;126:239-47.
66. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells : B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med.* 2001;18;193(12):1373-81.
67. Masayuki Heishi, Yukiho Imai, Hiroko Katayama, Ryoichi Hashida, Mikito Ito, Akira Shinagawa, Yuji Sugita. Gene Expression Analysis of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions Induced in NC/Nga mouse by Mite Antigen Stimulation under Specific Pathogen-Free Conditions. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003;132:355-63.
68. Bo Huang, Ping-Ying Pan, Qingsheng Li, Alice I. Sato, David E. Levy, Jonathan romberg, Celia M. Divino and Shu-Hsia Chen. Gr-1+CD115+ Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host. *Cancer Research.* 2006;15:1123-31.
69. Ebtekar M. Effects of Persistent Organic Pollutants on the Immune System: The Case of Dioxins. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering.* 2004;2:1-7.
70. Wolfgang Weninger, and Ulrich H. von Andrian. Chemokine regulation of naïve T cell traffic in health and disease. *Seminars in Immunology.* 2003;15:257-70.