

# 아토피 피부염 유사 NC/Nga 마우스 모델에서 유용 미생물 발효물질의 항염증효과

목지예<sup>1</sup> · 정승일<sup>2</sup> · 조정근<sup>3</sup> · 최지원<sup>3</sup> · 남상윤<sup>3</sup> · 장원길<sup>3</sup> · 문병은<sup>4</sup> · 박광현<sup>5</sup> · 장선일<sup>1,3,\*</sup>

1: 전주대학교 아토피·건강전문연구소, 2: 전주생물소재연구소, 3: 전주대학교 대체의학대학,  
4: 에버미라클 부설연구소, 5: 전북대학교 의학전문대학원 생화학교실

## Anti-inflammatory Effects of Effective Microorganism Fermentation Substance on Atopic Dermatitis-like NC/Nga Mouse Model

Ji Ye Mok<sup>1</sup>, Seung Il Jeong<sup>2</sup>, Jung Keun Cho<sup>3</sup>, Ji Won Choi<sup>3</sup>, Sang Yun Nam<sup>3</sup>, Won Ghil Chang<sup>3</sup>,  
Byung Eun Moon<sup>4</sup>, Kwang Hyun Park<sup>5</sup>, Seon Il Jang<sup>1,3,\*</sup>

1: Jeonju University Atopy & Health Research Institute, 2: Jeonju Biomaterials Institute,  
3: School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeonju University,  
4: Evermiracle Research Institute, 5: Department of Biochemistry, Chonbuk National University Medical School

Atopic dermatitis (AD) is a chronically relapsing pruritic inflammatory skin disease. To find new anti-inflammatory products for skin inflammatory disease such as AD and contact dermatitis, we produced the effective microorganism fermentation substance (EM-S) by fermentation of medicinal plants with effective microorganisms including photosynthetic bacteria, lactic acid bacteria and yeast, screened the effects of EM-S on NC/Nga model mice. Murine AD-like skin lesions were made by painting *Dermatophagoides farinae* (*Df*) extract. Topically applied EM-S significantly reduced clinical severity score, ear thickness and histological grade in AD-like NC/Nga mouse model by *Df* antigen sensitization. In addition, the serum IgE and Th2 chemokine levels (TARC/CCL17, MDC/CCL22 and CTACK/CCL27) were significantly reduced by EM-S. Furthermore, skin tissue expressions of Th2 chemokines were significantly reduced by EM-S. These results demonstrate that topical application of EM-S may be improve the AD-like skin lesion by suppressing IgE and Th2 chemokines.

Key words : atopic dermatitis, *Dermatophagoides farinae* (*Df*), EM-S, IgE, Th2 chemokines

### 서 론

아토피 피부염(atopic dermatitis, AD)은 면역학적, 유전학적, 약리 및 생리학적, 그리고 환경 등 다인자적 요인(poly-factors)에 의해 발병되는 피부 습진(eczema)의 일종이다<sup>1,2</sup>. AD는 감염, 스트레스, 계절과 기후 변화, 자극 및 알러젠(allergen) 등에 의해 호전과 악화가 반복적으로 일어나는 만성적인 염증성 피부질환(chronically relapsing inflammatory skin disease)으로 영·유아부터 성인에까지 광범위하게 유발되며<sup>1-4</sup>, 고도로 산업화된 나라에서 어린이의 경우 AD의 유병율이 약

17%로 심각한 현대사회의 질환이다<sup>3</sup>.

AD는 여러 가지 경로를 거쳐 면역 및 염증 반응을 활성화하는 복잡한 특징을 나타내는 피부질환으로 IgE 매개 감작(IgE-mediated sensitization)에 의한 외인성 형태(extrinsic form, 70-80%)와 비 IgE 매개 감작(non-IgE-mediated sensitization)에 의한 내인성 형태(intrinsic form, 20-30%) 두 가지 형태로 구분된다<sup>5</sup>. 일반적으로 AD의 임상적 특징은 심한 가려움으로 인한 피부 장벽의 붕괴, 염증, 혈청 내 IgE의 증가, 염증부위에 호산구(eosinophil)의 침윤 및 Th2 세포의 편향된 발달을 들 수 있다<sup>2,3,6</sup>. 이러한 과정 속에서 AD의 핵심 원인인 Th2 세포가 편향적으로 발달하여 Th2 사이토카인과 케모카인을 과량 생산하고 이로 인해 혈청 내 IgE와 호산구가 증가하게 된다.

케모카인(chemokine)은 저분자 단백질로 알려져 있고, 화학

\* 교신저자 : 장선일, 전주시 완산구 효자동 3가, 전주대학교 대체의학대학

· E-mail : sonjjang@jj.ac.kr, · Tel : 063-220-3124

· 접수 : 2010/03/08 · 수정 : 2010/03/29 · 채택 : 2010/04/12

주성(chemoattractants)을 나타내며<sup>7)</sup>, 단백질의 구조와 기능에 따라 C, CC, CXC 및 CX3C 등 4가지 subfamily로 나눌 수 있는데, 이들 케모카인은 염증부위에 백혈구를 침윤시켜 염증반응을 더욱 유발한다<sup>8)</sup>. CC계열의 대표적인 Th2 케모카인은 thymus & activation-regulated chemokine (TARC/CCL17), macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) 및 cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK/CCL27) 등이 있고, 염증부위에 Th2 세포의 이동과 침윤을 유도하는 것으로 알려졌다<sup>3,9)</sup>. TARC/CCL17과 MDC/CCL22는 CC chemokine receptor 4(CCR4)를 경유하여 작용하는 반면, CTACK/CCL27는 CCR10을 경유하여 그 효과를 나타낸다<sup>10)</sup>. 최근 연구보고에 따르면 AD 환자 또는 AD 유사 동물모델의 혈청에서 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27 등 케모카인이 매우 높은량이 검출되는 것으로 알려졌다<sup>11,12)</sup>. 이와 같이 AD의 병인이 알려지면서 AD를 치료하기 위한 전략으로 Th2 사이토카인 억제 천연물질에 대한 연구는 활발히 진행되고 있으나<sup>13)</sup>, Th2 케모카인과 관련된 연구는 초기단계다<sup>12)</sup>.

황련(Coptidis Rhizoma)<sup>14)</sup>, 황백(Phellodendri Cortex)<sup>14)</sup> 및 녹차(Green Tea)는 항염증 효과가 있는 것으로 알려졌으며<sup>15)</sup>, 최근 우리는 황금(Scutellariae Radix)<sup>16)</sup>과 금은화(Lonicerae Flos)<sup>17)</sup>를 대상으로 Th2 사이토카인 및 케모카인을 효과적으로 억제하여 항염증뿐만 아니라 항알레르기 효과가 있음을 보고하였다. 더욱이 브로콜리의 성분인 sulforaphane의 항산화 효과뿐만 아니라 Th2 케모카인을 억제하는 효과에 대해서 최근에 보고하였다<sup>18)</sup>. 그러나 이들 물질을 복합적으로 조합하여 시행되는 AD와 관련된 연구는 없는 실정이다. 한편 유용 미생물(effective microorganism, EM)은 광합성세균(photosynthetic bacteria), 젖산균(lactic acid bacteria)과 효모(yeast) 등 약 90가지로 이루어진 복합 미생물로 알려져 있다<sup>19)</sup>. 최근 EM을 활용하여 현미, 파파야 및 해초류 등 천연물을 발효하여 추출한 EM-X를 대상으로 항암<sup>20)</sup>, 항염<sup>21)</sup>, 항스트레스<sup>22-24)</sup> 및 신경보호<sup>23)</sup> 등에 대한 연구 결과가 있다. 또한 ovalbumin으로 감작된 마우스 모델에서 EM-X는 Th2 사이토카인을 선택적으로 억제한다는 보고가 있다<sup>25)</sup>. 이러한 효과를 발휘하는 EM-X는 flavonoids, saponins, ubiquinones, lycopene과 비타민 E 등을 함유하는 것으로 알려졌다<sup>22)</sup>.

따라서 본 연구는 항염증, 항알레르기 및 항스트레스에 효과가 있는 것으로 알려진 황련, 황금, 황백, 금은화, 모과, 녹차 및 브로콜리 등 7가지 복합 추출물을 기본 배지에 1%첨가하여 EM으로 배양한 후 얻은 EM-S(effective microorganism fermentation substance)를 대상으로 집먼지 진드기(*Dermatophagoides farinae*, Df) 항원으로 유도된 NC/Nga 모델 마우스에 도포하여 피부병변, 혈청 내 IgE와 Th2 케모카인의 생성 및 귀 조직에서 Th2 케모카인 분자 발현을 조사한 결과 매우 흥미 있는 자료를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

집먼지 진드기(*Dermatophagoides farinae*, Df) 항원은 연세대학교 의용절지동물소재은행(서울)으로부터 구입하였으며, IgE ELISA kit는 Shibayagi사(일본)로부터 구입하였다. 마우스 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27 등 각각의 ELISA kit와 항체는 R&D사(Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. Rabbit anti-mouse IgG-FITC 항체와 haematoxylin, eosin, paraformaldehyde와 xylene 그리고 기타 시약은 Sigma사(ST Louis, MO)로부터 구입하였다.

#### 2) 약물의 추출

실험에 사용한 황금, 황련, 황백, 금은화, 모과, 녹차, 브로콜리는 서울경동 약령시장에서 구입하여 원광대학교 방제학교실에서 동정하였다. 약물의 구성은 Table 1과 같으며, 구성 약물 500 g를 세절하여 메탄올(2 L)을 넣고 밀봉하여 방치한 후 0.45 μm 필터로 여과하였다. 여과액은 농축기(Eyela, Japan)로 농축하고, -70°C에서 동결기(Eyela, Japan)로 건조하여 45 g의 추출물을 얻은 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

Table 1. The composition of medicinal plant (CMP) for EM culture medium additive

Drug name	Crude drug name	Scientific name	Rate (%)
황금	Scutellariae Radix	<i>Scutellaria baicalensis</i>	10
황련	Coptidis Rhizoma	<i>Coptis chinensis</i>	5
황백	Phellodendri Cortex	<i>Phelloedndron amurense</i>	5
금은화	Lonicerae Flos	<i>Lonicera japonica</i>	5
모과	Chaenomeles Fructus	<i>Chaenomeles sinensis</i>	30
녹차	Green Tea	<i>Camellia sinensis</i>	15
브로콜리	Broccoli	<i>Brassica oleracea var. italica</i>	30

#### 3) EM-S의 제조

EM-S를 제조하기 위해서 각각 1%되게 적절한 광합성세균, 효모균 및 유산균 등과 각설탕 1%, 발효물질 50 g을 배지 1 L에 용해한 후, 상기 복합생약추출물(CMP)을 1% 첨가하여 38°C에서 21일간 혐기조건의 발효배양기에서 배양하였다. 배양액은 0.2 μm filter를 사용하여 미생물과 잔여물을 제거하고, -70°C에서 동결기(Eyela, Japan)로 건조하여 40 g를 얻은 후, -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 4) 실험동물

7주령의 수컷 NC/Nga 마우스는 중앙실험동물(주)(서울)로부터 구입하여 1주간 낮과 밤의 주기를 12시간씩 고정하여 사료(중앙실험동물(주))와 멸균 물을 공급하면서 사육한 후 실험에 사용하였다. 실험은 전주대학교동물윤리위원회의 규정에 준하여 수행하였다.

## 2. 방법

### 1) 면역 및 약물처리

Df 항원 면역에 의한 AD 유도는 Noh 등<sup>26)</sup> 등의 방법을 약간 변형하여 실험하였다. 요약하면, 8주령의 NC/Nga 마우스의 양쪽 귀를 강력 테이프를 붙였다가 신속하게 떼어내어 털을 제거한 후 0.5% Tween 20이 함유된 인산완충액(pH 7.2)에 ml 당

5 mg의 *Df* 항원을 1주일에 2회씩 4주간 도포하여 AD 유사 모델을 유도하였다.

*Df* 항원을 처리하지 않은 정상 대조군과 *Df* 항원을 처리한 양성대조군은 acetone과 olive(1:1)오일 혼합액을 각각의 귀에 1일에 1회 10  $\mu$ l씩 4주간 도포하였으며, *Df* 항원을 처리한 후, 복합생약 추출물과 EM-S 약물을 처리한 실험군은 최종적으로 각각 1%와 3% 농도로 acetone과 olive(1:1) 오일 혼합액에 약물을 용해하여, 각각의 귀에 1일당 1회 20  $\mu$ l씩 4주간 도포하였다. 약물의 효과를 비교하기 위해서 Tacrorimus(0.1%) 연고(한국아스텔라스제약)를 약물의 도포와 같은 방법으로 귀에 도포하였다.

#### 2) 피부병변의 평가

피부상태는 0주째부터 1주 간격으로 4주 동안 사진을 찍어 조사하였다. 피부의 건조상태(dryness)와 스케링(scaling) 그리고 미란(erosion), 찰과상(excoriation), 출혈 등을 체크하여 병변이 없는 상태를 0점(none), 가벼운 상태를 1점(mild), 중간 상태를 2점(moderate), 심한상태를 3점(severe)을 주었고 각 단계별로 총 점수부여하여 평가하였다. 귀의 두께는 digital caliper (Mitutoyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

#### 3) 피부조직

실험 과정에 따라 대조군과 실험군을 대상으로 희생시키고, 피부조직 약 5x5 mm를 적출하여 4% paraformaldehyde(pH 7.4)로 고정하고 일련의 과정을 통하여 파라핀 블록을 제작한 후, 5  $\mu$ m 간격으로 피부조직을 종단면으로 절편 하였다. 조직학적 검사와 백혈구 침윤을 검사하기 위해 hematoxylin & eosin 또는 Congo red로 염색하고 저배율(X40)에서 관찰하고 확대하면서 X200 현미경 시야에서 사진을 찍어 제시하였고, 백혈구의 침윤을 확인하기 위해 X400 현미경 시야에서 검경하였다(Olympus, Japan).

#### 4) 면역화학염색

파라핀에 매몰된 피부조직을 5  $\mu$ m 간격으로 종단하여 슬라이드에 부착하고 xylene으로 파라핀을 제거한 후, 일련의 과정을 거쳐 조직표본을 준비하였다. 준비된 파라핀 조직은 1% bovine serum albumin으로 1시간동안 blocking한 후 anti-mouse TARC/CCL17, anti-mouse MDC/CCL22와 anti-mouse CTACK/CCL27을 각각 1:100으로 희석하고 조직이 충분히 잠길 수 있도록 하여 4 $^{\circ}$ C 냉장상태에서 12시간 이상 방치하였다. 그 후 rabbit anti-mouse FITC를 1:500으로 희석하여 1시간 동안 실온에 방치하고, 잔여 항체를 잘 씻은 후, 커버슬립으로 봉합하여 형광현미경(Olympus, Japan)으로 검경하고 사진을 촬영하여 비교분석하였다.

#### 5) 혈청 내 IgE와 Th2 케모카인의 측정

혈청 내 *Df* 항원에 대한 IgE와 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27의 정량은 ELISA법으로 측정하였다. 먼저 혈청 내 IgE 총량은 혈청을 25배 희석하여 각 well에 주입하고 Shibayagi사가 제공하는 표준시료를 주입하여 제조회사에서 제시하는 방법에 준하여 측정하였다. 그리고 혈청 내 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27의 정량은 혈청을 10배로 희석하여 각 well에 주입하고 R&D사가 제공하는 표

준 시료를 주입하여 제조회사에서 제시하는 방법에 따라 측정하였다.

#### 7) 통계처리

모든 실험값은 평균 $\pm$ 표준편차로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리하였으며, 유의성 한계는  $p < 0.05$ 로 정하였다.

## 결 과

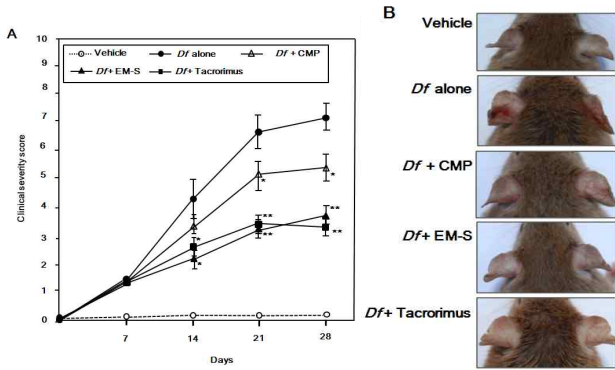
### 1. NC/Nga 마우스의 피부병변에 미치는 EM-S의 효과

NC/Nga(8주령) 마우스를 대상으로 4주간 털이 제거된 각각의 귀에 정상대조군은 0.5% Tween 20이 함유된 인산완충액, *Df* 유도군은 5 mg/ml 농도의 *Df* 항원을 20  $\mu$ l씩 1주일에 2회씩 4주간 도포하여 AD 유사 모델을 유도하였다. 약물의 효능을 확인하기 위해 *Df* 항원을 처리하지 않은 정상 대조군과 *Df* 항원을 처리한 양성대조군은 acetone과 olive(1:1)오일 혼합액을 각각의 귀에 10  $\mu$ l씩 1일에 1회씩 4주간 도포하였으며, *Df* 항원을 처리한 CMP와 EM-S 실험군은 약물을 최종적으로 각각 1%와 3% 농도로 acetone과 olive오일 혼합액에 약물을 용해하여 각각의 귀에 20  $\mu$ l씩 1일에 1회씩 4주간 도포하였다. 실험기간동안 피부병변의 변화를 알아보기 위해 0주째부터 1주 간격으로 4주 동안 사진을 찍어 조사하였다. 그 결과 정상대조군에 있어서 피부병변의 임상적인 변화는 없었으나, *Df* 항원이 도포된 양성대조군은 2주째부터 피부병변이 증가되었고 4주까지 그 정도가 심각하게 증가되었다(Fig. 1A). 더불어 Fig. 1B와 같이 *Df* 항원이 도포된 양성대조군은 홍반과 출혈(erythema/hemorrhage), 부종(edema), 찰과상과 미란(excoriation/erosion) 그리고 박리와 건조(scaling/dryness) 등 AD에서 발견되는 증상이 뚜렷하게 나타났다. 그러나 *Df* 항원으로 유도되고 약물이 처리된 실험군은 피부의 임상적 병변 정도가 개선되었는데, CMP 처리군은 3주째부터 개선효과( $p < 0.05$ )가 있는 반면, EM-S 처리군은 2주째부터( $p < 0.05$ ) 개선효과가 나타났으며 3주와 4주째까지 뚜렷한 피부병변 개선효과가 있었다( $p < 0.01$ ). EM-S의 효과를 검증하기 위해 피부병변의 개선효과가 우수한 것으로 잘 알려진 0.1% Tacrorimus 연고의 효과와 비교하였다(Fig. 1). 그 결과 EM-S의 피부병변에 대한 개선효과는 0.1% Tacrorimus 연고를 도포한 실험군과 유사했다.

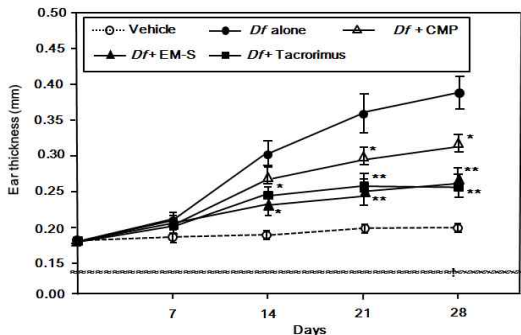
### 2. NC/Nga 마우스의 귀 부종에 미치는 EM-S의 효과

NC/Nga(8주령) 마우스를 대상으로 피부병변에 미치는 영향과 같은 조건에서 귀 부종을 측정하였다. 그 결과 정상대조군에선 귀 부종이 나타나지 않았으나, *Df* 항원이 도포된 양성대조군은 2주째부터 귀 부종이 증가되었고, 4주까지 그 정도가 심각하게 증가되었다(Fig. 2A). 그러나 *Df* 항원으로 유도되고 약물이 처리된 실험군은 귀의 부종이 현저히 억제되었는데, CMP 처리군은 3주째부터 개선효과( $p < 0.05$ )가 있는 반면, EM-S 처리군은 2주째부터( $p < 0.05$ ) 개선효과가 나타나 3주와 4주째까지 뚜렷한 귀 부종에 대한 억제효과가 있었다( $p < 0.01$ ). 우리는 EM-S의 효과를

검증하기 위해 귀 부종억제효과가 우수한 것으로 잘 알려진 0.1% Tacrorimus 연고의 효과와 비교하였다(Fig. 2). 그 결과 EM-S의 귀 부종억제효과는 0.1% Tacrorimus 연고를 도포한 실험군과 유사했다.



**Fig. 1.** Changes of the total clinical severity score by topical EM-S treatment. *Df* antigen application on the ears of NC/Nga mice for 4 weeks induced the AD-like skin lesions. The total clinical severity score was defined as the sum of scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate), and 3 (severe) for each of five aspects: itch, erythema/hemorrhage, edema, excoriation/erosion, and scaling/dryness. (A) Topical application of EM-S significantly lowered the total clinical severity scores provoked by *Df*. (B) Photographs revealed that topical EM-S treatment significantly improved the clinical signs such as erythema/hemorrhage, edema, excoriation/erosion, and dryness on day 28. The squares indicate the enlarged ear features. Data are shown as mean±S.D. of the changes in the total clinical severity scores on the face, ears, nose and neck of five mice of each group. \*= $p<0.05$  and \*\*= $p<0.01$  compared with the *Df* alone group.

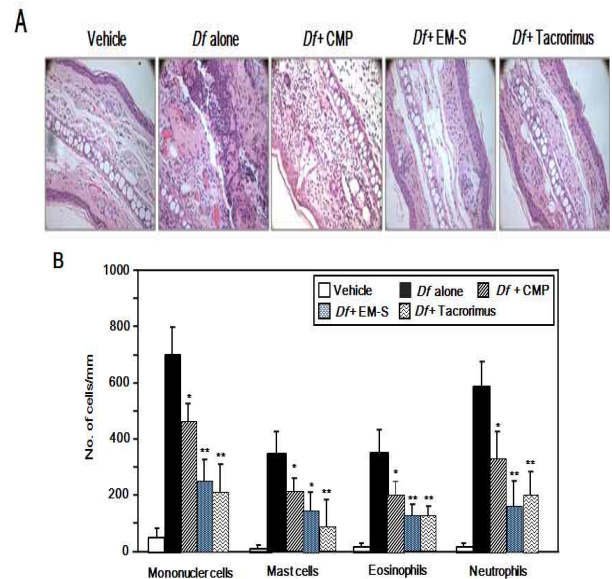


**Fig. 2.** Changes of the ear thickness by topical EM-S treatment. *Df* antigen application on the ears of NC/Nga mice for 4 weeks induced the AD-like skin lesions. Ear thickness was measured using a dial caliper every week. Topical EM-S treatment significantly reduced the ear thickness. Data are shown as mean±S.D. of the changes in the thickness of both ears of five mice of each group. \*= $p<0.05$  and \*\*= $p<0.01$  compared with the *Df* alone group.

### 3. NC/Nga 마우스의 피부조직 및 백혈구 침윤에 미치는 EM-S의 효과

EM-S가 *Df* 항원으로 유도된 NC/Nga 마우스의 피부조직과 백혈구 침윤에 미치는 영향을 알아보기 위하여 항원과 약물이 4주간 처리된 마우스를 대상으로 피부조직학적 검사를 수행하였다. 그 결과 Fig. 3A와 같이 정상대조군은 28일 실험 종료 후 피부조직의 변화가 없었지만, *Df* 항원으로 유도된 마우스의 피부조직은 극세포증(acanthosis), 각질증식증(hyperkeratosis), 상처 및 출혈 수준이 매우 심각했다. 그러나 *Df* 항원으로 유도되고 약물

이 처리된 실험군은 피부병변이 현저히 개선되었는데, CMP 처리군보다 EM-S 처리군과 0.1% Tacrorimus 연고 처리군은 뚜렷한 효과를 보였고, 정상 대조군과 유사한 피부조직 소견을 보였다. 또한 백혈구 침윤에 미치는 EM-S의 효과를 알아보기 위해 Congo red로 조직을 염색하여 400배 현미경 시야에서 검정한 결과 Fig. 3B와 같이 정상대조군에서는 백혈구의 변화가 없었지만, *Df* 항원으로 유도된 양성대조군에서는 단핵구(mononuclear cells)가  $720.5\pm92.3/\text{mm}$ , 비만세포(mast cells)가  $350.5\pm70.3/\text{mm}$ , 호산구(eosinophils)가  $358.4\pm73.3/\text{mm}$  그리고 호중구(neutrophils)가  $680.7\pm80.5/\text{mm}$ 로 백혈구 침윤이 현저히 증가했으나, CMP 처리군( $p<0.05$ ) 보다 EM-S 처리군과 0.1% Tacrorimus 연고 처리군은 뚜렷한 효과를 보였고, 정상 대조군과 유사한 피부조직 소견을 보였다( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ).



**Fig. 3.** Effects of EM-S treatment on histological changes and leukocyte infiltrations. *Df* antigen application on the ears of NC/Nga mice for 4 weeks induced the AD-like skin lesions. Skin tissues were obtained from *Df* antigen-induced and control mice on 28 days. (A) Skin tissues ( $5\ \mu\text{m}$ ) were stained with hematoxylin & eosin. Original magnification  $\times 200$  for all photos. (B) Skin tissues ( $5\ \mu\text{m}$ ) were stained with hematoxylin & eosin or Congo red. Leukocyte infiltrations were measured on  $\times 400$  microscope view. Data are shown as mean±S.D. of the changes in the leukocyte infiltrations of five mice of each group. \*= $p<0.05$  and \*\*= $p<0.01$  compared with the *Df* alone group.

### 4. NC/Nga 마우스의 혈청 IgE와 Th2 케모카인의 생산에 미치는 EM-S의 효과

EM-S가 *Df* 항원으로 유도된 NC/Nga 마우스의 혈청 IgE와 Th2 케모카인의 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 항원과 약물이 4주간 처리된 마우스를 대상으로 혈청을 얻고 ELISA assay kit를 이용하여 IgE와 Th2 케모카인의 생산량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 4A와 같이 정상대조군의 혈청 IgE의 양은 베이스 수준이었지만, *Df* 항원으로 면역된 양성대조군은  $1,195.5\pm185.6\ \text{ng/ml}$ 로 현저히 증가되었다. 그러나 CMP, EM-S과 0.1% Tacrorimus 연고 처리군은 각각  $590.8\pm70.3\ \text{ng/ml}$ ,  $565\pm55.4\ \text{ng/ml}$ 과  $428.7\pm49.5\ \text{ng/ml}$ 로 나타나 뚜렷한 억제효과

를 보였다.

한편 EM-S가 *Df* 항원으로 유도된 NC/Nga 마우스에서 백혈구의 이동에 결정적으로 영향을 미치는 Th2 케모카인의 영향을 알아보기 위해 항원과 약물이 4주간 처리된 마우스를 대상으로 TARC/CCL17, MDC/CCL22 그리고 CTACK/CCL27에 특이적인 ELISA assay kit를 이용하여 혈청 내 Th2 케모카인의 양을 측정하였다. 그 결과 *Df* 항원으로 유도된 양성대조군은 TARC/CCL17, MDC/CCL22 그리고 CTACK/CCL27의 양이 각각 3,095.5±485.8 pg/ml, 2,750.1±250.3 pg/ml, 901.6±95.8 pg/ml로 측정되어 정상대조군에 비해 현저히 높았다. 그러나 약물이 처리된 실험군은 TARC/CCL17, MDC/CCL22 그리고 CTACK/CCL27 생성량이 현저히 억제되는 효과가 있었다(Fig. 4B). TARC/CCL17의 경우 CMP는 2,340.5±270.3 pg/ml( $p<0.05$ )이었고, EM-S과 0.1% Tacrolimus 연고 처리군은 각각 780.5±83.2 pg/ml과 781.7±80.2 pg/ml로 억제하는 효과가 뚜렷하였다( $p<0.01$ ). MDC/CCL22의 경우 CMP는 2,083.4±265.6 pg/ml( $p<0.05$ )이었고, EM-S과 0.1% Tacrolimus 연고 처리군은 각각 901.5±120.3 pg/ml과 905.2±125.6 pg/ml로 나타나 TARC/CCL17와 유사하게 현저히 억제하는 효과가 있었다( $p<0.01$ ). 또한 CTACK/CCL27의 경우 CMP는 730.3±89.3 pg/ml로 억제하는 효과가 없었지만, EM-S와 0.1% Tacrolimus 연고 처리군은 405.3±75.5 pg/ml과 400.2±78.2 pg/ml로 현저히 억제하는 효과가 있었다( $p<0.01$ ).

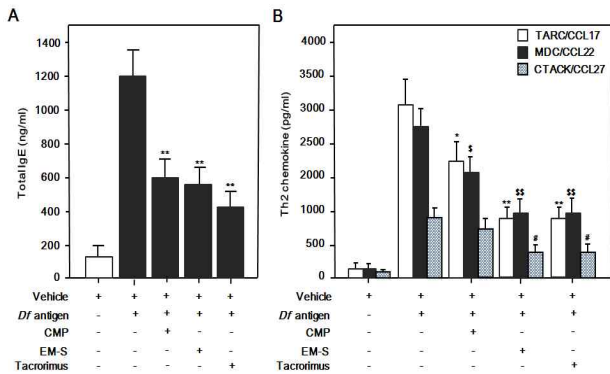


Fig. 4. Effects of EM-S on serum IgE (A) and Th2 chemokine (B) productions. *Df* antigen application on the ears of NC/Nga mice for 4 weeks induced the AD-like skin lesions. Sera were obtained from *Df* antigen-induced and control mice on 8 week. Serum IgE and Th2 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22 and CTACK/CCL27) were measured using IgE ELISA assay kit. Data are shown as mean±S.D. of the changes in the serum IgG and Th2 chemokines of five mice of each group. (A) \* $p<0.01$  compared with the *Df* alone group. (B) \* $p<0.05$  and \*\* $p<0.01$  compared with the *Df* alone group about TARC/CCL17,  $p<0.05$  and  $p<0.01$  compared with the *Df* alone group about MDC/CCL22, and # $p<0.05$  and ## $p<0.01$  compared with the *Df* alone group about CTACK/CCL27.

#### 5. NC/Nga 마우스 귀 조직의 Th2 케모카인의 발현에 미치는 EM-S의 효과

마지막으로 우리는 EM-S가 Th2 케모카인의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 정상 대조군, *Df* 항원으로 유도된 양성대조군과 *Df* 항원으로 유도되고 약물이 처리된 NC/Nga 마우스 귀 조직에 대해 TARC/CCL17, MDC/CCL22 그리고

CTACK/CCL27에 특이적인 마우스 항체를 활용하여 면역화학 조직염색을 수행하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 TARC/CCL17, MDC/CCL22 그리고 CTACK/CCL27 등 Th2 케모카인은 정상 대조군에서 발현이 되지 않은 반면, *Df* 항원으로 처리된 양성모델은 그 발현이 현저히 유도되었다. 그러나 *Df* 항원으로 처리되고 약물 처리된 실험군은 피부병변이 현저히 개선되었는데, 복합 약용식물 추출물(CMP) 처리군보다 EM-S 처리군과 0.1% Tacrolimus 연고 처리군은 뚜렷한 효과를 보였고, 정상 대조군과 유사한 피부조직 소견을 보였다.

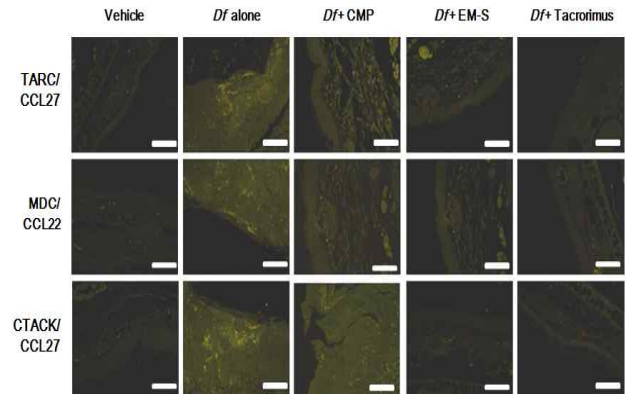


Fig. 5. Effect of EM-S on *Df* antigen induced Th2 chemokine expressions of NC/Nga mouse ear tissues. *Df* antigen application on the ears of NC/Nga mice for 4 weeks induced AD-like skin lesions. Topical EM-S treatment significantly reduced the Th2 chemokine expressions. Scale bar= 150  $\mu$ m.

## 고찰

인간의 AD는 만성적 알러지성 피부질환으로 고도로 산업화된 선진국에서 급증하고 있지만, 현재까지 만족할만한 치료제는 없는 실정이다. Hanifin 등<sup>26)</sup>은 AD 관리에 대한 지침에서 한 가지 약물을 AD에 사용하기 보다는 여러 가지 AD에 사용되는 약물을 동시에 복용 또는 도포해야 효과적이라는 보고를 하였다. 즉, 국부성 corticosteroid, calcineurin 억제제, 항생제와 항소크제, 항히스타민, 아토피 피부염 알러젠 음식물 섭취 제한, 비약물성 물리적 치료, 면역억제제, 약용식물(medical plants) 및 최면요법 마사지 요법과 같은 보완대체 치료(complementary/alternative therapies) 등 복합적인 관리가 필요하다고 제시했다. 이와 같이 AD는 여러 가지 약물 및 물리적 치료방법을 병행하여 치료하고 관리해야 할 현대인의 난치성 피부질환이다. 따라서 인간의 AD를 해결하기 위해서는 핵심적 병인 기전과 약물의 효능을 대량으로 검증할 수 있는 모델동물이 필요하다.

NC/Nga 마우스의 피부질환은 인간의 AD에서 나타나는 외견상 특징뿐만 아니라 면역학적 특징이 매우 유사한 것으로 보고되었다<sup>27,28)</sup>. 자연적으로 시간이 지남에 따라 AD가 유발되지만, 6주령의 어린 마우스에서는 AD현상이 없으나, 집먼지진드기(house dust mite)의 항원 *Df*를 피하에 주사하거나 피부에 도포하였을 때 민감하게 반응하여 AD가 가속화되는 것으로 알려졌다<sup>25)</sup>. 이러한 NC/Nga 마우스의 외관적인 특징은 가려움증



(itching), 홍반(erythema)과 출혈(hemorrhage)을 시작으로 피부의 부종(edema), 표면의 짓무름(superficial erosion), 심한 찰과(deep excoriation), 박리(scaling) 및 건조(dryness) 그리고 발육저하(low growth) 등이 시간이 지날수록 심각한 증상을 보이고, 면역학적 특징은 혈청 내 IgE의 급격한 증가와 병변 부위의 호산구, 호염구, 비만세포, CD4<sup>+</sup> Th2 세포, 대식세포 등의 급격한 증가 등의 병리현상이 인간의 AD에서 나타나는 일련의 알려지지 않은 면역학적 특징과 유사하다<sup>27,28</sup>). AD는 Th2 세포의 편향된 발달에 의해 IL-4와 IL-5 등의 Th2 사이토카인이 과량 생산되는 반면, IFN- $\gamma$ 와 같은 Th1 사이카인의 생산은 억제 되는 것으로 알려졌다<sup>1,8,9</sup>). 최근에 Th2 세포의 편향적 발달에 직접적으로 영향을 미치는 대표적인 Th2 케모카인은 TARC/CCL17, MDC/CCL22, 그리고 CTACK/CCL27로 알려졌다<sup>9,10,29-32</sup>).

EM은 광합성세균, 젖산균과 효모(yeast) 등 약 90가지로 이루어진 복합 미생물로 알려져 있다<sup>19</sup>). 최근 일본에서는 EM을 활용하여 현미, 파파야 및 해조류 등 천연물을 발효하여 추출한 EM-X를 대상으로 항염<sup>20</sup>), 항염<sup>21</sup>), 항스트레스<sup>22-24</sup>) 및 신경보호<sup>23</sup>) 등에 대한 연구 결과를 토대로 건강증진 음료로 발전시키고 있다<sup>19</sup>). 최근에 ovalbumin으로 감작된 마우스 모델에서 EM-X는 Th2 사이토카인을 선택적으로 억제한다는 보고가 있다<sup>25</sup>). 이러한 효과를 발휘하는 EM-X는 flavonoids, saponins, ubiquinones, lycopene과 비타민 E 등을 함유하는 것으로 알려졌다<sup>22</sup>). AD 치료 또는 케어에 효과가 있는 유용물질로 알려진 천연물을 대상으로 EM을 활용한 발효 및 그 산물에 대한 보고는 아직까지 없는 실정이다.

본 연구에서 우리는 8주령의 수컷 NC/Nga 마우스를 대상으로 *Df* 항원으로 처리된 AD 유사 모델을 유도하여 EM-S의 임상적 영향을 조사한 결과 Tacrolimus<sup>33</sup>)와 유사한 치료효과를 얻었다. Fig. 1과 2에 나타난 바와 같이 8주령의 마우스를 대상으로 4주간 복합생약물(CMP), EM-S 및 Tacrolimus를 피부에 도포하면서 피부병변에 대한 임상스코어 및 귀 부종을 조사하여 매우 흥미로운 결과를 얻었다. 즉, *Df* 항원만 도포할 경우 2주째부터 AD와 유사한 홍반과 출혈(erythema/hemorrhage), 부종(edema), 찰과상과 부식(excoriation/erosion) 그리고 박리와 건조(scaling/dryness) 등 피부병변이 나타나 4주째는 그 증상이 뚜렷하게 나타났고(Fig. 1-2), 단핵구, 비만세포, 호산구와 호중구의 침윤이 현저했다(Fig. 3B). 그러나 약물이 처리된 실험군에서는 피부병변을 현저히 억제하는 결과를 얻었는데, CMP보다는 EM-S와 Tacrolimus를 처리한 실험군에서 그 효과가 좋았다(Fig. 1-3). 이러한 결과는 EM-S 처리는 임상적으로 AD를 크게 개선시킬 수 있는 약물로 평가되었다.

*Df* 항원으로 유도된 AD 모델 NC/Nga 마우스에서 중요한 면역학적 특징은 인간의 외인성 AD와 유사하게 혈청 내 높은 IgE가 검출된다는 사실은 잘 알려져 있다. 본 연구의 결과에서도 *Df* 항원으로 유도된 마우스의 혈청 내 IgE가 매우 높은 양으로 검출되었으나, EM-S를 처리한 결과 그 생산량이 크게 억제되었다(Fig. 4A).

한편 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27 등은

대표적인 Th2 케모카인으로 염증부위에 Th2 세포의 이동과 침윤을 유도한다. 특히 말초혈액단핵구(peripheral blood monocytes)에 의해 생산된 TARC/CCL17과 MDC/CCL22는 Th2 세포의 CCR4와 결합함으로써 염증부위로 이동하는 결정적인 화학주성(chemoattractant)을 야기하는 분자로 성인 AD환자의 혈청에 높은 양으로 검출될 뿐만 아니라 Th2 세포의 이동과 침윤을 가속화시키는 중요한 케모카인이다<sup>29-32</sup>). 또한 CTACK/CCL27는 CCR10을 경유하여 그 효과를 나타내는<sup>32,34</sup>) 것으로 알려져 있으며, NC/Nga 마우스의 피부병변 부위인 표피의 기저층에서 중요하게 발현되는 현상이 밝혀졌다<sup>35</sup>). 본 연구의 결과 *Df* 항원으로 유도된 마우스 혈청의 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27 등은 정상대조군에 비해 현저히 높았으나, EM-S가 처리된 실험군에서는 혈청 내 Th2 케모카인의 생산량이 Tacrolimus와 유사하게 현저히 억제되었다(Fig. 4B). 더욱이 귀 조직에서 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27 등 Th2 케모카인의 발현을 조사한 결과 혈청 내 Th2 케모카인의 생성 억제와 유사하게 발현이 현저히 억제되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 *Df* 항원으로 유도되는 Th2 세포의 이동과 침윤을 EM-S가 효과적으로 억제하는 효과가 있음을 제시해 주었다. 그러나 EM-S의 이러한 작용을 명확히 규명하기 위해서는 EM-S 구성 약물의 종류 및 구조를 밝혀내야 함은 물론, 이들 케모카인과 CCR4와 CCR10의 발현에 관련된 EM-S의 효과와 약물신호전달 기전을 더 조사해야 확실한 AD 억제 약물로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

이상의 결과를 종합해볼 때, 유용 미생물의 산물인 EM-S의 처리는 *Df* 항원으로 유도된 AD 모델 NC/Nga 마우스의 임상적 피부 병변을 개선할 뿐만 아니라 Th2 케모카인을 억제함으로써 단핵구, 비만세포, 호산구 및 호중구의 침윤을 억제하는데 효과가 있었다. 더욱이 AD의 가장 중요한 특징 중의 하나로 알려진 혈청 내 높은 함량의 IgE는 EM-S를 처리함으로써 현저히 억제시킬 수 있는 결과를 얻었다. 따라서 EM-S는 인간의 AD 개선에 이용할 수 있는 효과적인 물질이라 사료된다.

## 결론

본 연구는 NC/Nga 마우스를 대상으로 유용미생물 발효산물(EM-S)을 피부에 도포하는 방법으로 AD의 억제 효과를 조사하였다. 마우스(8주령)를 대상으로 털이 제거된 양쪽 귀에 4주간 집먼지 진드기(*Dermatophagoides farinae*, *Df*) 항원을 1주일에 2회씩 도포함으로써 AD 유사 모델을 확립하였다. AD의 판정은 피부병변 스코어, 피부조직과 면역학적 파라미터(혈청 IgE, TARC/CCL17, MDC/CCL22과 CTACK/CCL27)를 조사하여 평가했다. EM-S를 피부에 도포한 결과 피부병변 스코어와 백혈구 침윤을 포함하는 *Df* 항원 유도 아토피 피부염의 임상적 징후를 유의하게 억제하는 효과가 있었다. 더욱이 EM-S 처리는 혈청 IgE와 Th2 케모카인(TARC/CCL17, MDC/CCL22과 CTACK/CCL27)의 생산과 발현을 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 EM-S 도포가 *Df* 유도 AD 모델 마우스에서 AD의 임상적

징후와 Th2 케모카인을 유의하게 억제시킬 수 있다는 것을 제시하였다. 따라서 EM-S는 인간의 AD 개선에 활용될 수 있는 효과적인 물질임을 확인하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2009년도 산학협력 기업부설연구소지원사업으로 중소기업청의 지원을 받아 연구되었다(과제번호: 000387770209).

## 참고문헌

1. Spergel, J.M., Paller, A.S. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 112(6 Suppl):S118-127, 2003.
2. Leung, D.Y., Bieber, T. Atopic dermatitis. *Lancet.* 361(9352): 151-160, 2003.
3. Leung, D.Y., Boguniewicz, M., Howell, M.D., Nomura, I., Hamid, Q.A. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 113: 651-657, 2004.
4. Mohrenschlager, M., Darsow, U., Schnopp, C., Ring, J. Atopic eczema: what's new? *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 20: 503-513, 2006.
5. Novak, N., Bieber, T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 112: 252-262, 2003.
6. Schultz-Larsen, F., Hanifin, J.M. Epidermology of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 22: 1-24, 2002.
7. Rollins, B.J., Yoshimura, T., Leonard, E.J., Poher, J.S. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol.* 136: 1229-1233, 1990.
8. Power, C.A., Proudfoot, A.E. The chemokine system: novel broad-spectrum therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol.* 1: 417-424, 2001.
9. Pivarsci, A., Homey, B. Chemokine networks in atopic dermatitis: traffic signals of disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 5: 284-290, 2005.
10. Reiss, Y., Proudfoot, A.E., Power, C.A., Campbell, J.J., Butcher, E.C. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med.* 194: 1541-1547, 2001.
11. Nakazato, J., Kishida, M., Kuroiwa, R., Fujiwara, J., Shimoda, M., Shinomiya, N. Serum levels of Th2 chemokines, CCL17, CCL22, and CCL27, were the important markers of severity in infantile atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol.* 19: 605-613, 2008.
12. 정승일, 최병민, 윤용갑, 이장원, 장선일. 천연물 유래 Th2 케모카인 억제제 발굴에 의한 새로운 아토피 피부염 치료기술패

개발 : 아토피 피부염 모델 NC/Nga 마우스에서 고삼 추출액의 억제 효과. *대한한의학방제학회지* 17: 141-151, 2009.

13. Gao, X.K., Fuseda, K., Shibata, T., Tanaka, H., Inagaki, N., Nagai, H. Kampo Medicines for Mite Antigen-Induced Allergic Dermatitis in NC/Nga Mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2: 191-199, 2005.
14. Park, E.K., Rhee, H.I., Jung, H.S., Ju, S.M., Lee, Y.A., Lee, S.H., Hong, S.J., Yang, H.I., Yoo, M.C., Kim, K.S. Antiinflammatory effects of a combined herbal preparation (RAH13) of *Phellodendron amurense* and *Coptis chinensis* in animal models of inflammation. *Phytother Res.* 21: 746-750, 2007.
15. Noh, S.U., Cho, E.A., Kim, H.O., Park, Y.M. Epigallocatechin-3-gallate improves Dermatophagoides pteronissinus extract-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice by suppressing macrophage migration inhibitory factor. *Int Immunopharmacol.* 28: 1172-1182, 2008.
16. Jang, S.I. Wogonin inhibits Cytokine-induced TARC/CCL17 Expression by Suppression of NF- $\kappa$ B activation via p38 MAP kinase Signaling Pathways in HaCaT Keratinocytes. *Korean J. Oriental Physiol. Pathol.* 21: 1017-1024, 2007.
17. Yun, Y.G., Kim, G.M., Lee, S.J., Ryu, S.H., Jang, S.I. JangInhibitory Effect of Aqueous Extract from *Lonicera japonica* Flower on LPS-induced Inflammatory Mediators in RAW 264.7 Macrophages. *Korean J. Herbol.* 22: 117-125, 2007.
18. Choi, B.M., Jeong, S.I., Mok, J.Y., Jang, S.I. Sulforaphane suppresses IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ -stimulated TARC/CCL17 and MDC/CCL22 expression through heme oxygenase-1 and NF- $\kappa$ B in HaCaT keratinocytes. *J. Dermatol.* 2010 (in press).
19. Higa, T., Ke, B. Clinical and basic medical research on EMX. EMRO Okinawa, 2001.
20. Chui, C.H., Cheng, G.Y., Ke, B., Lau, F.Y., Wong, R.S., Kok, S.H., Fatima, S., Cheung, F., Cheng, C.H., Chan, A.S., Tang, J.C. Growth inhibitory potential of effective microorganism fermentation extract (EM-X) on cancer cells. *Int J Mol Med.* 14: 925-929, 2004.
21. Aruoma, O.I., Deiana, M., Rosa, A., Casu, V., Piga, R., Peccagnini, S., Dessi, M.A., Ke, B., Liang, Y.F., Higa, T. Assessment of the ability of the antioxidant cocktail-derived from fermentation of plants with effective microorganisms (EM-X) to modulate oxidative damage in the kidney and liver of rats in vivo: studies upon the profile of poly- and mono-unsaturated fatty acids. *Toxicol Lett* 135: 209-217, 2002.
22. Deiana, M., Dessi, M.A., Ke, B., Liang, Y.F., Higa, T., Gilmour, P.S., Jen, L.S., Rahman, I., Aruoma, O.I. The

- antioxidant cocktail effective microorganism X (EM-X) inhibits oxidant-induced interleukin-8 release and the peroxidation of phospholipids in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 1148-1151, 2002.
23. Aruoma, O.I., Moncaster, J.A., Walsh, D.T., Gentleman, S.M., Ke, B., Liang, Y.F., Higa, T., Jen, L.S. The antioxidant cocktail, effective microorganism X (EM-X), protects retinal neurons in rats against N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in vivo. *Free Radic Res* 37: 91-97, 2003.
  24. Datla, K.P., Bennett, R.D., Zbarsky, V., Ke, B., Liang, Y.F., Higa, T., Bahorun, T., Aruoma, O.I., Dexter, D.T. The antioxidant drink effective microorganism-X (EM-X) pre-treatment attenuates the loss of nigrostriatal dopaminergic neurons in 6-hydroxydopamine-lesion rat model of Parkinson's disease. *J Pharm Pharmacol* 56: 649-654, 2004.
  25. Do, J.S., Seo, H.J., Hwang, J.K., Kim, J.H., Nam, S.Y. Effective microorganism fermentation extract (EM-X) attenuates airway hyperreactivity and inflammation through selective inhibition of the TH2 response independently of antioxidant activity. *Int J Mol Med*. 220: 631-635, 2007.
  26. Hanifin, J.M., Cooper, K.D., Ho, V.C., Kang, S., Krafchik, B.R., Margolis, D.J., Schachner, L.A., Sidbury, R., Whitmore, S.E., Sieck, C.K., Van Voorhees, A.S. Guidelines of care for atopic dermatitis, developed in accordance with the American Academy of Dermatology (AAD)/American Academy of Dermatology Association "Administrative Regulations for Evidence-Based Clinical Practice Guidelines". *J Am Acad Dermatol*. 50: 391-404, 2004.
  27. Matsuda, H., Watanabe, N., Geba, G.P., Sperl, J., Tsudzuki, M., Hiroi, J., Matsumoto, M., Ushio, H., Saito, S., Askenase, P.W., Ra, C. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE-hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol*. 9: 461-466, 1997.
  28. Yamamoto, M., Haruna, T., Yasui, K., Takahashi, H., Iduhara, M., Takaki, S., Deguchi, M., Arimura, A. A Novel Atopic Dermatitis Model Induced by Topical Application with *Dermatophagoides Farinae* Extract in NC/Nga Mice. *Allergol Int*. 56: 139-148, 2007.
  29. Tsunemi, Y., Saeki, H., Nakamura, K., Nagakubo, D., Nakayama, T., Yoshie, O., Kagami, S., Shimazu, K., Kadono, T., Sugaya, M., Komine, M., Matsushima, K., Tamaki, K. CCL17 transgenic mice show an enhanced Th2-type response to both allergic and non-allergic stimuli. *Eur J Immunol*. 36: 2116-2127, 2006.
  30. Sebastiani, S., Danelon, G., Gerber, B., Uguccioni, M. CCL22-induced responses are powerfully enhanced by synergy inducing chemokines via CCR4: evidence for the involvement of first beta-strand of chemokine. *Eur J Immunol*. 35: 746-756, 2005.
  31. Reiss, Y., Proudfoot, A.E., Power, C.A., Campbell, J.J., Butcher, E.C. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med*. 194: 1541-1547, 2001.
  32. Homey, B., Alenius, H., Müller, A., Soto, H., Bowman, E.P., Yuan, W., McEvoy, L., Lauerma, A.I., Assmann, T., Bünemann, E., Lehto, M., Wolff, H., Yen, D., Marxhausen, H., To, W., Sedgwick, J., Ruzicka, T., Lehmann, P., Zlotnik, A. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med*. 8: 157-165, 2002.
  33. Oshio, T., Sasaki, Y., Funakoshi-Tago, M., Aizu-Yokota, E., Sonoda, Y., Matsuoka, H., Kasahara, T. *Dermatophagoides farinae* extract induces severe atopic dermatitis in NC/Nga mice, which is effectively suppressed by the administration of tacrolimus ointment. *Int Immunopharmacol*. 9: 403-411, 2009.
  34. Nakazato, J., Kishida, M., Kuroiwa, R., Fujiwara, J., Shimoda, M., Shinomiya, N. Serum levels of Th2 chemokines, CCL17, CCL22, and CCL27, were the important markers of severity in infantile atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 19: 605-613, 2008.
  35. Vestergaard, C., Yoneyama, H., Murai, M., Nakamura, K., Tamaki, K., Terashima, Y., Imai, T., Yoshie, O., Irimura, T., Mizutani, H., Matsushima, K. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest*. 104: 1097-1105, 1999.