

천연물 유래 산조인 복합오일 (*Zizyphus jujuba* var. *spinosa* Composite oil, ZjJ-C_oil) 및 독활 복합오일 (*Aralia cordata* var. *continentalis* Composite oil, ARC-C_oil)의 DNCB로 유도된 NC/Nga 생쥐의 아토피에 미치는 효과 연구

곽진영¹ · 최희정² · 박정미³ · 박정환⁴ · 고영미¹ · 장태수^{4*} · 안택원^{1*}

¹대전대학교 한의과대학 사상체질의학과, ²차의과대학교 통합의학대학원,
³대전대전대학교 천안한방병원 웰니스 스파 임상센터, ⁴서울대학교 그린바이오과학기술연구원

Abstract

Anti-atopic Effect of *Zizyphus jujuba* var. *spinosa* Composite oil(ZjJ-C_oil) and *Aralia cordata* var. *continentalis* Composite oil(ARC-C_oil) in DNCB-induced Atopic Dermatitis-like Skin Lesions NC/Nga Mice

Jin-young Kwak¹ · Hee-Jeong Choir² · Jung-mi Park³ · Jung-hwan Park¹

Young-mee Kho¹ · Tae-soo Jang^{4*} · Teakwon-Ahn^{1*}

¹Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon Univ,

²Graduate School of Intergrated Medicine, Cha University,

³Cheonan oriental hospital of Daejeon Univ. Wellness spa Clinical Cente,

⁴Institutes of Green Bio Science Technology, Seoul National University

The aim of this study is to investigate the effect of *Zizyphus jujuba* var. *spinosa* Composite oil(ZjJ-C_oil) and *Aralia cordata* var. *continentalis* Composite oil(ARC-C_oil) to NC/Nga mice induced in Atopic dermatitis-like skin lesions by DNCB. NC/Nga mice which have been induced to Atopic dermatitis-like skin lesions by DNCB are divided into 4 groups, the first is the mice which have been spread with *izyphus jujuba* var. *spinosa* Composite oil(ZjJ-C_oil), the second is the mice which have been spread with *Aralia cordata* var. *continentalis* Composite oil(ARC-C_oil), the third is which have been spread with dexamethasone (Dexa.) 0.5% on their Atopic lesion, the last is the control group. Then We analyzed skin clinical score, blood sample of each group of measure state of the dorsal skin, the number of immunocytes, and resect the skin lesion to anlyze the state of cells.

There are meaningful results of measuring the number of IgE, IL-4, IL-13, IFN- γ , IL-5, the total cells in ALN, dorsal skin, CD4+ Th, CD11b+/Gr-1+ in PBMCs, CD4+ Th, B220+/CD23+ in ALN, CD4+, CD8+ Th in dorsal skin, the level of COX-2, TNF- α , TGF- β 1, IL-4, IL-13 mRNA, the state of the skin lesion and cells in the group with ZjJ-C_oil, ARC-C_oil cream in comparision with the control group.

Key Words: Atopic Dermatitis, NC/Nga Mouse, *izyphus jujuba* var. *spinosa* Composite oil(ZjJ-C_oil), *Aralia cordata* var. *continentalis* Composite oil(ARC-C_oil).

Received December 18, 2017 Revised December 18, 2017 Accepted December 21, 2017

Corresponding author Taek-won Ahn¹ · Tae-soo Jang²

¹Notaesan-ro 4, Seobuk-gu, Cheon-an, Choongchungnamdo, South Korea.

Tel : +82-41-521-7535, Fax : +82-41-521-7007, E-mail : twahn@dju.kr

²1447, Pyeongchang-daero, Daehwa-myeon, Pyeongchang-gun, Gangwon-do, South Korea.

Tel : +82-33-339-5500, Fax : +82-33-339-5547, E-mail : jangts@snu.ac.kr

© The Society of Sasang Constitutional Medicine. All rights reserved. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons attribution Non-commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>)

I. 緒論

아토피는 '비정상적인 반응', '기묘한', '뜻을 알 수 없다'라는 그리스어(atonia-장소가 없음)를 어원으로 하며, 유전학적 요소, 환경적 요인, 사회경제적 요소, 면역학적 요인, 악리 생리학적 측면 등 여러 인자 간의 상호작용으로 발생되며, 음식물 혹은 흡입성 물질에 대한 알레르기 반응이 유전적으로 발생하는 경우를 일컫는 용어로 아토피 피부염, 천식, 알레르기 비염, 알레르기 결막염 등이 포함된다¹.

아토피 피부염(atopic dermatitis)은 아토피 알레르기 기를 가진 사람에서 나타나는 대표적인 피부질환으로 최근 발병률이 증가하고 있다. 흔히, 태열이라고 불리는 만성피부질환으로서 피부 건조증 및 가려움증이 주증상이다. 전 인구의 0.5-1%, 어린이의 경우 5-10%가 아토피 피부염을 앓고 있으며 증상이 나타나는 시기는 대체로 생후 2-6개월이며 특히, 1세 미만에서 가장 많이 나타나고 85%가 5세 이전에 나타나는 것으로 보고되었다². 아토피 피부염은 재발이 잦고 만성적인 경과를 보이는 흔한 염증성 피부 질환으로, 피부 소양증에 대한 역치가 낮아 심한 소양감과 이로 인한 2차적인 습진이 형성되며, 홍반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등이 특징적으로 나타난다. 아토피 피부염의 정확한 기전은 알려져 있지 않지만, 유전적, 환경적 요인과 함께 면역학적 기능 이상이 복잡하게 연관되어 발생하는 것으로 추측되고 있다³.

아토피 피부염에서 소양증은 환자로 하여금 반복적으로 병변을 긁게 하여 2차적인 병변을 형성시켜 재발과 만성화의 경과를 유도한다. 따라서 신속하게 소양증을 경감시키는 것이 중요한 치료 목표가 되며 이를 위해 다양한 치료 방법들이 시도되고 있으나 치료에 잘 반응하지 않는 경우가 많으며⁴, 아토피 피부염의 치료제로 흔히 사용되는 스테로이드 외용제는 장기간 사용했을 때 피부의 위축이나 소아 환자에서 성장 지연의 가능성 등 각종 부작용이 문제 되고 있어 새로운 외용제에 대한 필요성이 증가하고 있다⁵. 이러한 문제 점을 보완하기 위한 대증요법으로 오일의 사용이 늘

어나고 있는 추세로, 경험에 의존한 오일사용보다 과학적 검증을 통하여 안전한 개인별맞춤 오일치료제 개발을 위한 연구의 필요성이 증가하고 있다.

사상체질의학에서는 사람을 體形氣像, 容貌詞氣, 性質材幹, 病證藥理에 따라 태양인, 태음인, 소양인, 소음인으로 나누어 질병을 예방하고 치료하기 때문에 체질별 맞춤 치료가 가능하다. 오일은 2-3가지를 혼합하여 사용할 때 치료효과를 극대화 시키는 것으로 알려져 있어⁶ 태음인에게 효과적인 산조인을 주 성분으로 하는 복합오일과 소양인에게 효과적인 독활, 박하를 혼합한 오일을 만들어 아토피 피부염에 대한 치료효과를 확인하였다.

본 연구에서는 NC/Nga 생쥐에 DNCB(1-chloro 2,4-dinitrobenzene)를 도포하여 아토피 피부염을 유발시킨 후 산조인 복합 오일(*Zizyphus jujuba* var. *spinosa* Composite oil, ZJ-C_oil, 이하 산조인 복합오일), 독활 복합 오일(*Aralia cordata* var. *continentalis* Composite oil, ZJJ-C_oil, 이하 독활 복합 오일)의 아토피 피부염의 발진 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 NC/Nga 생쥐의 clinical skin score, hematology 및 혈청 중 Ig E 수준을 분석하였고, axillary lymph node(ALN), peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) 및 등 피부조직에서 cytokine level, 총세포수, 유세포 형광분석 및 염증유전자 발현 분석을 실시하였고, 등 피부조직에서 H&E 염색을 통하여 epidermis의 두께와 toluidine blue 염색을 통하여 비만 세포의 침윤정도를 관찰하였다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 시험물질

(1) 명칭: 산조인 복합오일 (ZJ-C_oil), 독활 복합오일군

(2) 공급자: (주) 힐링 네이처 농업회사법인

강원도 평창군 진부면 하송정길 340-50

Tel. 033 333 2018 Fax. 033.334.2018

www.healingnature.biz

(3) 성분: Table 1과 같다.

Table 1. The component of *Zizyphus jujuba* var. *spinosa* Composite oil (Zj-C_oil), *Aralia cordata* var. *continentalis* Composite oil (ARC-C_oil)

ARC-C_oil		
Herb	ratio	Component
상지	20%	isoquercetin,
		palmitic acid
		tannin
		oxyresveratrol
박하	25%	menthol
		limonene
		menthone
		camphene
		choline
독활	25%	continentalic acid
		stamasterol
		hederagenin
		sabinene
전나무	30%	a-pinene
		camphene
		B-pinene
		Limonene
Zj-C_oil		
후박	20%	eugenol
		honokiol
		magnolol
산조인	30%	jujuboside
		spinosin
		betulin
		capaene
		acidamide
전초	30%	hydroxy B-sanshool
		tannin
		hyperin
		dipentene
		estragole
곽향	20%	δ-guaiene
		tilianin
		α, β-pinene
		methylchavicol
		pogostol
		α-bulnesene

2) 양성대조물질

(1) 명칭 : Dexamethasone

(2) 구입처 : Sigma Co.

(3) 투여방법 : 0.3mg/kg/day로 증류수에 녹여 경구 투여

3) 동물

수컷 8주령의 20~22g NC/Nga 생쥐 (SLC, Inc, Japan)를 중앙실험동물에서 공급받았다. 동물은 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 온도 22±2 °C, 습도 55±15 %, 12 시간 light-dark cycle의 환경을 유지하며 2주간 적응 시킨 후 실험에 사용하였다. 그리고 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대전대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인을 받았다.

4) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, 적혈구 용혈액(ACK lysis solution), DMEM 배양액, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), Sulforhodamin B (SRB), 2-isopropanol, Sodium dodecyl sulfate (SDS), antibiotics은 Sigma사 (USA) 제품을 사용하였으며, 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (Logan, USA) 제품을, anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-CD11b-FITC, anti-Gr-1-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD69-FITC, 그리고 anti-B220-PE, anti-CD3 mAb 등은 Pharmingen사 (Torreyana, USA) 제품을, IL-4, IL-5, IFN-γ, IL-13 ELISA kit는 BioSource 사 (California, USA) 제품을, IgE ELISA kit는 SHIBAYAGI사 (Shibukawa, Japan) 제품을, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 CO2 incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, USA), deep-freezer (Sanyo, Japan), 유세포 형광분석기 (BD, USA), thermo-cycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, USA), plate shaker (Lab-Line, USA), probe-on plus slide (Fisher Scientific, USA), ELISA reader (Molecular Devices, USA), automatic ELISA washer (Diawasher, ELX50, USA), bright microscope (Nikon, Japan), contrast fluorescence microscope (Nikon, Japan) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 실험군 분류 및 약물처리

NC/Nga 생쥐에 아무처리도 하지 않은 정상군 (NC/Nga_Nr, Nr), DNCB를 2주간 도포한 대조군 (DNCB_CIL, CI), DNCB를 2주간 도포 후 Dexamethason (3 mg/kg) 투여한 양성대조군 (DNCB_Dexamethason, Dex), DNCB를 2주간 도포 후 산조인 복합 오일(ZJ-C_oil)로 도포한 군, DNCB를 2주간 도포 후 독활 복합 오일 (ARC-C_oil)로 도포한 군으로 분류하였다. 양성 대조 약물 Dexamethason 3 mg/kg 으로 12주령부터 15주령까지 3주간 매일 경구 투여 하였으며, 실험군인 산조인 복합 오일군(ZJ-C_oil), 독활 복합오일군(ARC-C_oil)은 12주령부터 15주령까지 매일 3주간 도포하였다.

2) 피부염 유발

8주령의 NC/Nga 생쥐를 2 주일 동안 적응시킨 후 NC/Nga 생쥐의 등(귀 하단부에서부터 꼬리 상단부)을 제모하고 24시간 방치 후 1%의 DNCB (dinitrochlorobenzene)가 들어 있는 아세톤 : 올리브오일 (3 : 1) 200 µl를 제모 부위에 도포하고, 3일 후 2차 도포하였다. 1차

도포 후 7일째부터는, 1 주일에 3회씩 3주간 0.2 % DNCB 용액 150 µl를 재차 도포 (10주령 ~13주령)하여 아토피 피부염을 유발시켰다.

3) 산조인 복합 오일 (ZJ-C_oil), 독활 복합 오일 (ARC-C_oil)의 크림 제형 제조

산조인 복합 오일과 독활 복합 오일의 크림제형은 수상, 유상, 안정제에 2% 복합 오일과 양성대조군 0.5% dexamethasone의 제형을 혼합하여 제조하였으며 구성성분은 다음과 같다 (Table 2).

Table 2. Ointment-cream Formulation

	Component	A	B	Base
	1% ZJ-C oil	to 100		
	1% ARC-C oil	to 100		
	vehicle control			
water phase	glycerin	10	10	10
	silicon 유도체	0.20	0.20	0.20
	Micricide -C	0.20	0.20	0.20
	EDTA-2Na	0.01	0.01	0.01
	Keltrol F(1%)	5.00	5.00	5.00
	Sepiplus 400	0.30	0.30	0.30
	Lanette O	2.00	2.00	2.00
	Olive M 1000	1.00	1.00	1.00
	Tego care 450	2.00	2.00	2.00
	Puresyn 4	2.00	2.00	2.00
oil phase	TCG-M	3.00	8.00	8.00
	DC 200/6cs	2.50	2.50	2.50
	Lipex Shea	1.00	1.00	1.00
	Vitamin E	0.50	0.50	0.50
	D-P	0.10	0.10	0.10
	BHT	0.02	0.02	0.02
stabilizer	TEA	0.10	0.10	0.10
	Di water	2.00	2.00	2.00
additives	1% ZJ-C oil	1.00		
	1% ARC-C oil	1.00		
	vehicle control			

4) 피부염 유발 평가

NC/Nga mouse의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하였다. 육안평가 항목은 erythema/hemorrhage (소양행동을 동반한 홍반), dryness/scarring (인설 및 가피), edema

(부종), excoriation/erosion (표피박탈/미란), lichenification (태선화) 5가지 항목으로 하고, 육안평가 결과는 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타났다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였으며 최소 0 점에서, 최고 15 점사이의 점수를 측정하였다.

5) 혈액 중 백혈구 세포 수 측정

최종 실험종료 후 EDTA가 처리된 튜브형 주사기로 심장 혈액 0.5ml를 채취한다. 전혈을 바이오투스텍 (주) 청주, 충청북도)에 의뢰하여 혈액 중 백혈구의 총 세포수를 측정한다.

6) 채혈 및 Ig E 측정

NC/Nga 생쥐의 눈에서 10주, 12주, 15주에 capillary 관을 이용하여 약 100 μ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기 6,500 rpm에서 20분간 원심분리한 후 30 μ l의 혈청을 분리하였다. 혈청은 취하여 -70°C에 냉동 보관하였다. NC/Nga 생쥐의 혈청 내 IgE 농도 측정은 enzyme-linked immuno-sorbent assay로 IgE 수준을 측정하였다.

각 well에 혈청 5 μ l (1/10 dilution)와 dilution buffer 45 μ l를 혼합하여 각 well에 분주하고, 2시간 동안 25°C 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-IgE conjugated를 넣고 2시간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 비장세포에서 Th1/Th2 cytokine 발현 변화

NC/Nga 생쥐 실험 시작 8주 후 (15주령)에 실험을 종료하고 비장 (spleen)을 적출하여 100 mesh로 비장세포 (splenocytes)를 분리하였다. 전날 CD3 mAb 1 μ g/ml을 96 well plate에 coating하여 4°C 냉장고에서 overnight한 다음 D-PBS로 2회 수세하였다. 분리한 비장세포

또는 ACK 용액으로 RBC를 제거한 후 DNCB extract가 coating된 각각의 well에 5×10^5 세포 씩 5% FBS-DMEM 배양액에서 48시간 동안 배양한 후 원심분리기 2,000 rpm에서 3분간 원심분리한 후 200 μ l의 배양 상층액을 얻었다. 배양 상층액 내의 IL-4 (BioSource, U.S.A.)와 IFN- γ (BioSource, U.S.A.), 혈청 내 IL-5 (BioSource, U.S.A.), 그리고 혈청 내 IL-13 (R&D system, U.S.A.)의 수준 측정은 ELISA로 측정하였다. 각 well에 배양 상층액 50 μ l를 분주하고, 2시간 동안 25°C 실온에서 방치한 후 2회 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-IgE conjugated를 넣고 2시간 방치하였으며, 다시 2회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) ALN, PBMCs 및 등 피부조직에서 형광 유세포 분석

실험을 종료한 후 NC/Nga 생쥐에서 ALN (Axillary lymph node)을 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1,700 rpm)하고 2회 세척한 후 cell strainer (FALCON, U.S.A.)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells)는 NC/Nga mouse에서 heparin을 처리한 3 ml 주사기로 채혈한 후 미리 준비한 10 ml의 ACK용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1 l of demineralized water + 0.1 mM EDTA)에 혼합하여 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 제거하고 2회 1%의 FBS가 함유된 PBS (FACS buffer)로 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 불순물을 제거하였다. 등 피부 조직은 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 4회 반복하였다. 분리한 ALN, PBMCs와 등 피부조직 침윤세포의 총 세포수를 측정한 다음, 모든 조직의 세포

등을 5×10^5 cells/ml로 조정 한 후 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-Gr-1-PE, 그리고 anti-B220-PE를 넣고 30분간 얼음에서 반응시킨 후 3회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺Gr-1⁺, 그리고 B220⁺CD23⁺ 세포수를 백분율 (%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

9) 등 피부조직에서 Quantitative Real-time PCR 분석

(1) NC/Nga 생쥐의 등 피부조직에서 RNA 분리

NC/Nga 생쥐의 등 피부조직을 적출하여 각각에 RNAzol^B 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 homogenizer로 분쇄하였다. 이 조직분쇄 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하

였다. Quantitative Real-time PCR은 7500 Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 2 μ g을 DNase I (10 U/ μ l) 2 U/tube를 37°C heating block에서 30분간 반응한 후 75°C에서 10 분 동안 변성시켰다. 이에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DIT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT (200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37°C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega, U.S.A.)를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(3) Quantitative Real-time RT-PCR

Quantitative Real-time RT-PCR은 7500 Real-time PCR system을 이용하여 수행하였으며 Mouse Oligonucleotid의 염기배열은 다음과 같다 (Table 3).

Table 3. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
GAPDH	Forward	5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
	Reverse	5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'
IL-4	Forward	5' -GGATGTAACGACAGCCCTCT-3'
	Reverse	5' -GTGTCCTTGTTGCCGTAAG-3 '
IL-13	Forward	5' ATGCCCAACAAAGCAGAGAC 3'
	Reverse	5' TGAGAGAACCAGGGAGCTGT 3'
TNF- α	Forward	5' TTCGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC 3'
	Reverse	5' GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'
TGF- β	Forward	5' TGGAGCAACATGTGGAATC 3'
	Reverse	5' CTGCCGTACAACCTCCAGTGA 3'
COX-2	Forward	5' GGGTGTCCCTTCACTTCTTTCA 3'
	Reverse	5' TGGGAGGCACTTGCATTGA 3'

Cytokine 유전자 발현은 SYBR[®] Green PCR Master mix를 사용하였고, internal standard는 GAPDH로 Taqman probe를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. IL-5와 IL-13 mRNA 유전자 발현은 등 피부조직에서 관찰하였고 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. 양성대조군, DIDT (300 mg/kg) 투여군, DIDT (100 mg/kg) 투여군의 대조군은 internal standard로 GAPDH를 사용하여 target group의 Quantitative PCR은

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

x : starting quantity

y : yield

n : number of cycles

e : efficiency

로 계산하여 RQ (relative quantitative) 값을 측정하였다.

10) Histology 분석

등 쪽 목 부분의 피부를 떼어내어 10% paraformaldehyde에서 24시간 동안 포르말린에 고정하였다. 그 조직을 파라핀으로 포맷하였고, 5 μm 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 (×200, Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

3. 통계 처리

각 실험군 결과 값은 unpaired student's T-test 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, p<0.05 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

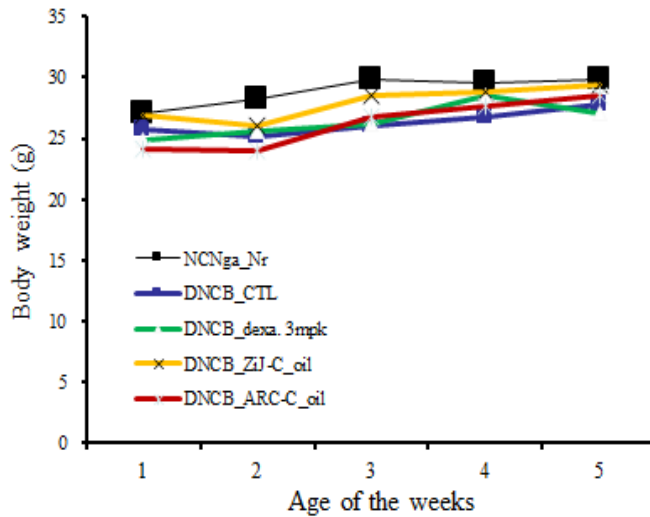
III. 結果

1. 체중변화

실험동물의 체중 변화를 측정된 결과, NC/Nga 생쥐에 DNCB를 도포하여 아토피 피부염 모델을 유도한 후, 매일 3주간 일정한 시각에 3주간 양성대조군은 (Dex)경구 투여하고, 산조인 복합오일(Zj-C_oil), 독활 복합오일(ARC-C_oil) 체중의 증감 확인을 위해 5주간 몸무게를 측정하였다. 그 결과 모든 군에서 눈에 띄는 체중 감소는 확인되지 않았다 (Figure 1).

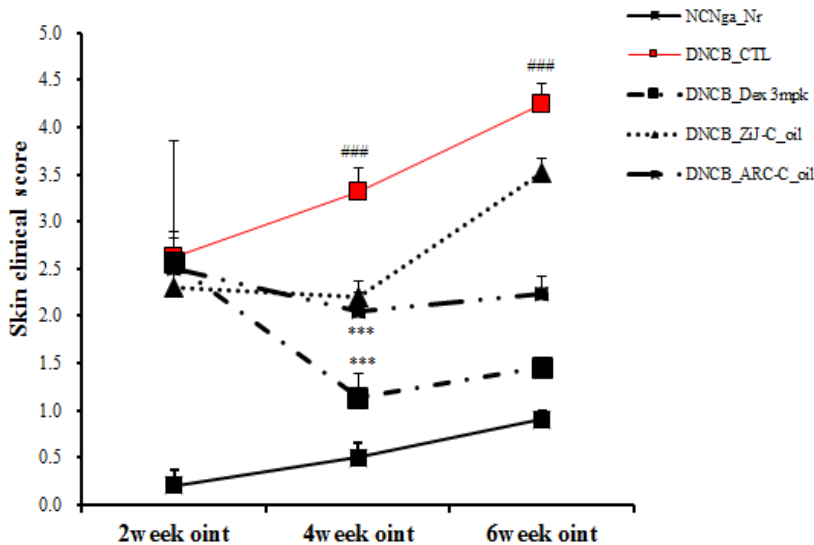
2. Skin clinical score

NC/Nga mouse에 DNCB를 3주간 도포하고 최종 5주 후 등 피부에 나타난 소양행동을 동반한 홍반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등의 단계를 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate), 3 (severe)로 개체마다 평가 기록하여 피부 발진 점수로 평가한 결과 대조군의 skin clinical score는 DNCB를 도포하지 않은 정상군(NC/Nga-Nr, 이하 정상군)에 비하여 4배 이상 증가를 나타내었고, 양성 대조군인 dexamethasone (3mg/kg) 투여군(이하, 양성대조군)은 대조군(CI, 이하 대조군)에 비해 3배 정도의 감소를 나타내었다. DNCB를 도포한 후 산조인 복합 오일 (Zj-C_oil)을 도포시킨 군(이하, 산조인 복합 오일군)은 대조군에 비해 약간의 감소를 나타내었으며, DNCB를 도포한 후, 독활 복합 오일 (ARC-C_oil)를 도포시킨 군(이하, 독활 복합오일군)에서는 대조군에 비해 skin clinical score가 2배 이상 감소를 나타내었다 (Figure 2).



Atopic dermatitis NC/Nga mice were induced by DNCB treatment in the dorsal skin, before the treatment of DNCB (NC/Nga-Nr), DNCB treatment for 3 weeks (CT), DNCB treatment for 3 weeks with dexamethasone (3mg/kg) (Dex), DNCB treatment Zij-C_oil, ARC-C_oil for 3 weeks with for 3 weeks. (* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001)

Figure 1. Changes in body weight in experimental mice

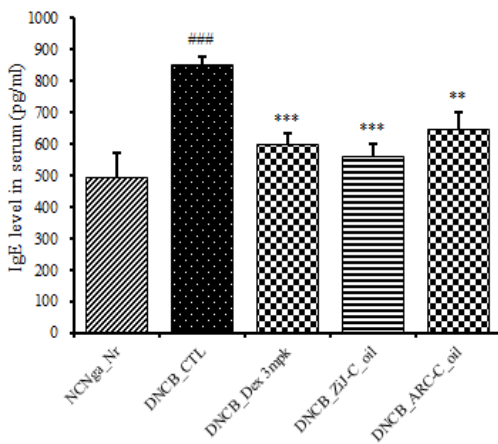


Atopic dermatitis NC/Nga mice were induced by DNCB treatment in the dorsal skin, before the treatment of DNCB (normal, NC/Nga-Nr), DNCB treatment for 3 weeks (DNCB_CTL, CT), DNCB treatment for 3 weeks with Dexamethasone (DNCB_Dexamethason, Dex), DNCB treatment for 3 weeks with Zij-C_oil, DNCB treatment for 3 weeks with ARC-C_oil treatment 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, and head and back. Each point represents the mean±SE of five mice.

Figure 2. Clinical skin features and severity of atopic dermatitis skin lesions in atopic dermatitis-like NC/Nga mice induced by DNCB

3. 혈청 IgE에 미치는 영향

혈청 Ig E를 측정된 결과, 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.001$) 증가 하였으며, 양성대조군은 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.001$) 감소하였다. 산조인 복합오일군, 독활 복합오일군 모두 대조군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 감소하는 것으로 나타났다 (Figure 3).



Topical application of atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and induced by DNCB in the dorsal skin for 3 weeks, and next to ZJ-C_oil, ARC-C_oil for 3 weeks. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately thereafter. Serum samples were obtained by centrifugation and stored at -20°C until use. Total IgE levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Shibayagi, Japan). Each point represents the mean \pm SE of five mice. Statistically significant value compared with DNCB_CT group data by student's T-test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).### : $p < 0.001$ compared with normal group.

Figure 3. Serum Ig E elevation and development of atopy dermatitis skin lesions-induced in NC/Nga mice by DNCB

4. 비장세포 cytokine 발현

비장세포를 분리하여 배양 상층 액에서의 cytokine 발현을 측정된 결과, IL-4 생산량은 정상군에 비해 대조군에서 약 4배 증가하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 감소하였으며 산조인 복합오일군과 독활 복합오일군이 대조군에 비해 감소하였으며 특히 산조인 복합오일군에서 유의성 있게($p < 0.05$) 감소하였다 (Figure 4).

IFN- γ 생산량은 정상군에 비해 대조군에서 증가하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 감소하였으며, 산조인 복합오일군과 독활 복합오일군이 대조군에 비해 감소하였으며 특히 산조인 복합오일군에서 유의성 있게($p < 0.05$) 감소하였다 (Figure 4).

IL-13 생산량은 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게($p < 0.001$) 증가하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.05$) 감소하였다. 그리고 산조인 복합오일군과 독활 복합오일군이 대조군에 비해 감소하였으며 특히 산조인 복합오일군에서 유의성 있게 ($p < 0.01$) 감소하였다 (Figure 4).

IL-5 생산량은 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게($p < 0.05$) 증가하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.05$) 감소하였다. 그리고 산조인 복합오일군과 독활 복합오일군이 대조군에 비해 감소하였으며 특히 산조인 복합오일군에서 유의성 있게 ($p < 0.05$) 감소하였다 (Figure 4).

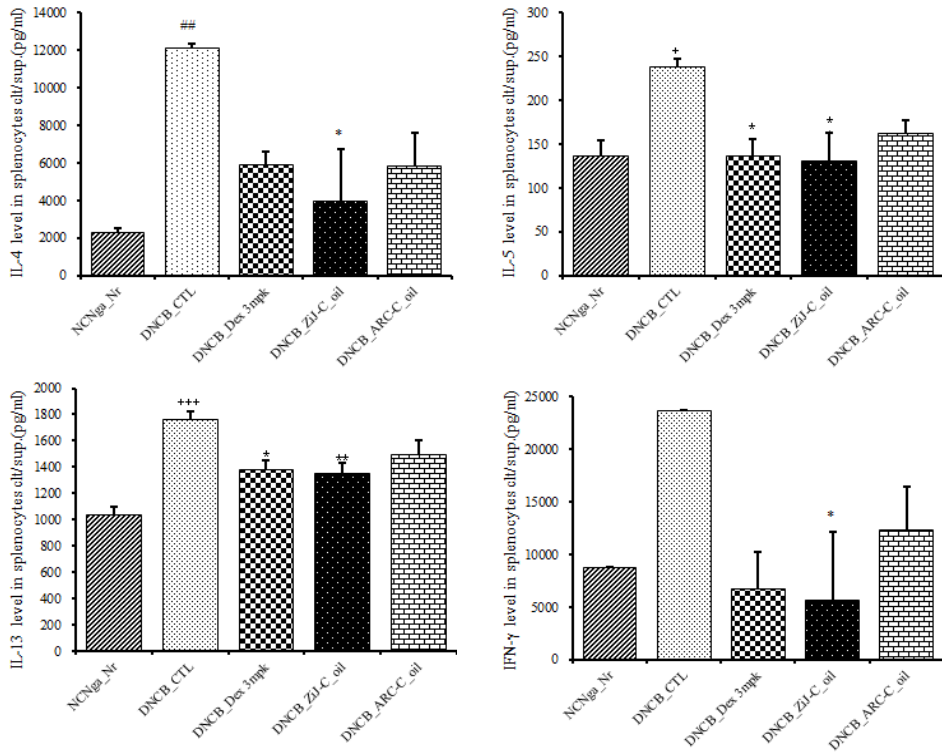
5. ALN, PBMCs, 등 피부조직에서 형광 유세포 분석

1) 총세포수 측정

실험 종료 후 15주령의 NC/Nga 생쥐를 ethyl ether 로 마취한 한 후 ALN, spleen 그리고 등 피부 부위를 적출하여 총 세포수를 측정하였다.

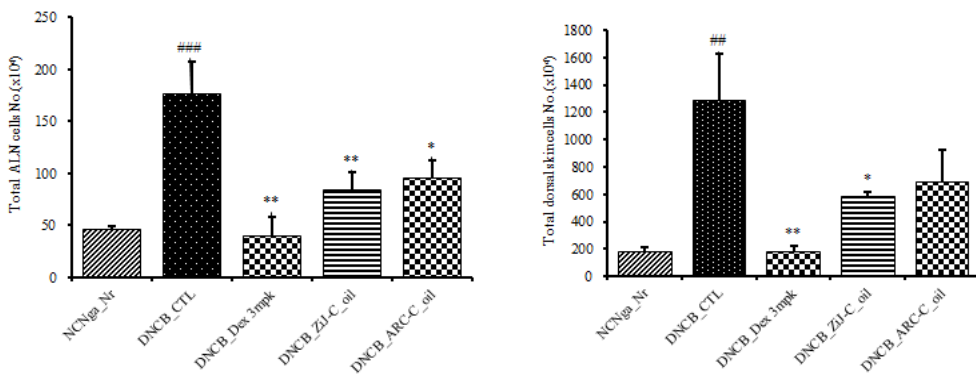
ALN 세포 수는 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게($p < 0.001$) 증가하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.01$) 감소하였으며, 산조인 복합오일군($p < 0.01$), 독활 복합오일군($p < 0.05$)은 대조군에 비해 유의성 있게 감소되는 것으로 나타났다 (Figure 5).

등 피부조직의 세포 수는 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게($p < 0.01$) 증가하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.01$) 감소하였으며, 산조인 복합오일군은 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.05$) 감소되는 것으로 나타났다. 독활 복합오일군에서는 감소하였지만 유의성은 나타나지 않았다 (Figure 5).



Topical application of atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and induced by DNCB in the dorsal skin for 3 weeks, and next to ZJ-C_oil, ARC-C_oil for 3 weeks. Spleen from mouse at 15 weeks of age were re-stimulated with CD3 mAb (1 μg/ml) for 48 hrs. IL-4, IL-5, IL-13 and IFN-γ levels were measured by a sandwich ELISA using a mouse ELISA kit I (Biosource, USA). Statistically significant value compared with DNCB_CTL group data by student's T-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). #: p<0.05 compared with normal group. ###: p<0.001 compared with normal group.

Figure 4. Culture supernatant IL-4, IL-5, IL-13 and IFN-γ level in splenocytes cytokines level in NC/Nga mouse by DNCB



Topical application of atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and induced by DNCB in the dorsal skin for 3 weeks, and next to ZJ-C_oil, ARC-C_oil treatment for 3 weeks. Statistically significant value compared with DNCB_CTL group data by student's T-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). #: p<0.05 compared with normal group. ###: p<0.001 compared with normal group.

Figure 5. Total cell number of ALN, spleen and dorsal skin in NC/Nga mouse

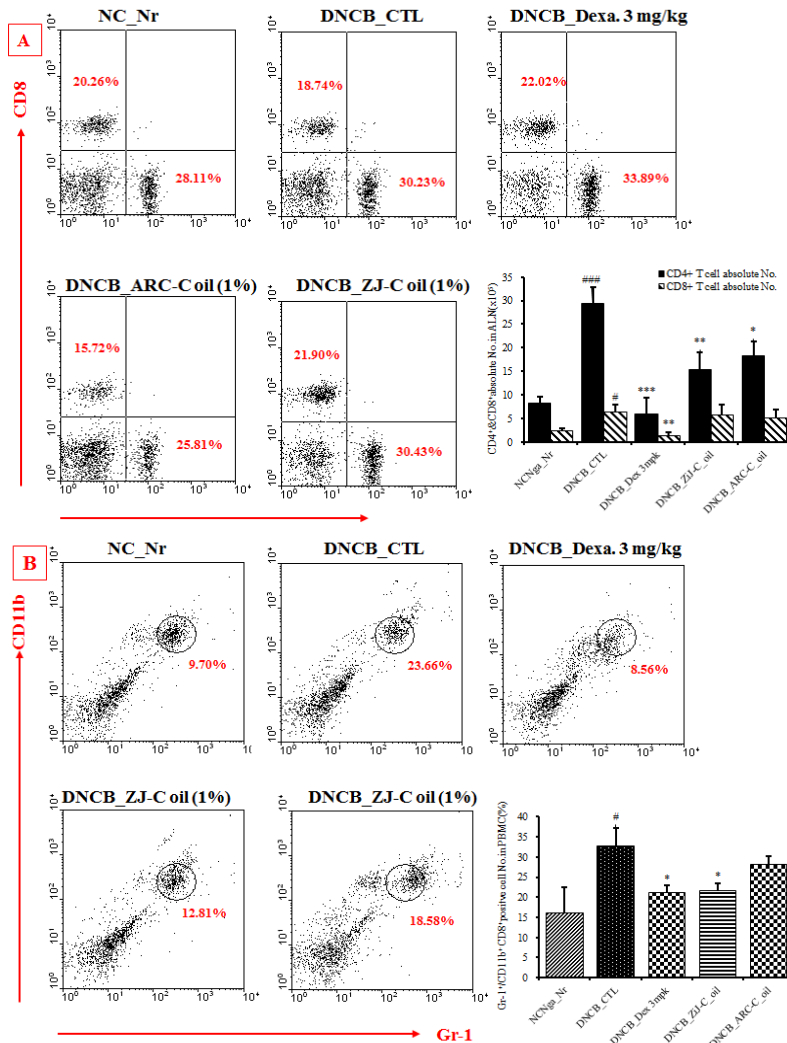
2) 면역형광염색에 의한 cell contents 변화

(1) PBMCs에서 CD4⁺&CD8⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포 수

CD4⁺ Th 세포의 총 절대 세포 수는 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게 (p<0.001) 감소하였고, 양성 대조군은 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.05) 증가하였으며, 산조인 복합오일(ZjJ-C_oil), 독활 복합오일

(ARC-C_oil)은 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.001) 증가하는 것으로 나타났다 (Figure 6).

CD8⁺ c/s T 세포의 총 절대 세포 수는 정상군에 비해 대조군에서 감소하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 증가 하였으며, 산조인 복합오일군, 독활 복합 오일 (ARC-C_oil)은 대조군과 비슷한 수준으로 나타



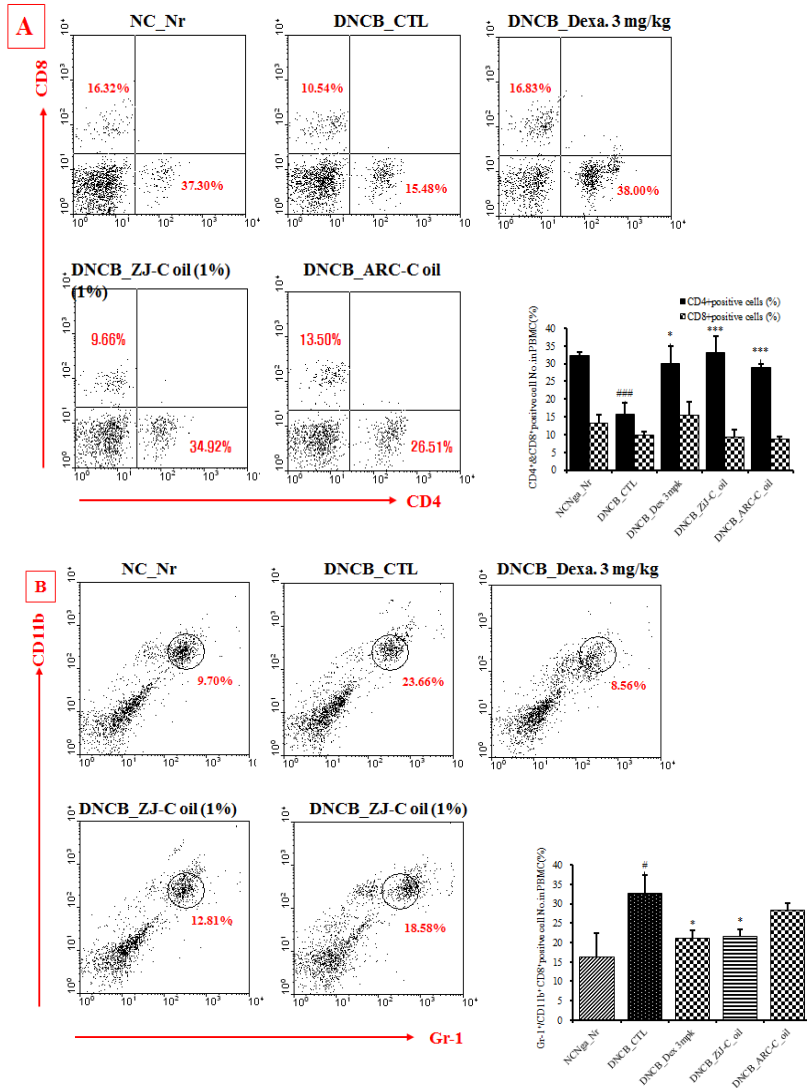
Topical application of atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and induced by DNCB in the dorsal skin for 3 weeks, and next to ZjJ-C_oil, ARC-C_oil treatment for 3 weeks. NC/Nga mouse PBMC cells (5x10⁵ cells/ml) were isolated from blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total absolute number of CD4⁺&CD8⁺ and CD11b⁺/Gr-1⁺ in NC/Nga mouse. Statistically significant value compared with DNCB_CTL group data by student's T-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). #: p<0.05 compared with normal group. ###: p<0.001 compared with normal group.

Figure 6. Effects of ZjJ-C_oil, ARC-C_oil treatment on the percentage of CD4⁺&CD8⁺ and CD11b⁺/Gr-1⁺ changes of total absolute numbers in PBMC cells in NC/Nga mouse by DNCB

났다 (Figure 6).

CD11b⁺/Gr-1⁺ MSC의 총 절대 세포 수는 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게 (p<0.05) 증가하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.05) 감

소하였으며, 산조인 복합 오일(Zj-C_oil)은 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.001) 감소하였고 독활 복합 오일 (ARC-C_oil) 대조군에 비해 감소하였지만 유의성은 나타나지 않았다 (Figure 6).



Topical application of atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and induced by DNCB in the dorsal skin for 3 weeks, and next to Zj-C_oil, ARC-C_oil treatment for 3 weeks. NC/Nga mouse ALN cells (5x10⁵ cells/ml) were isolated from ALN, and the ALN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total absolute number of CD4⁺&CD8⁺ and B220⁺/CD23⁺ in NC/Nga mouse. Statistically significant value compared with DNCB_CTL group data by student's T-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). ###: p<0.001 compared with normal group.

Figure 7. Effects of Zj-C_oil, ARC-C_oil treatment on the percentage of CD4⁺&CD8⁺ and B220⁺/CD23⁺ changes of total absolute numbers in ALN cells in NC/Nga mouse by DNCB

2) ALN에서 CD4⁺&CD8⁺, B220⁺/CD23⁺ 세포수

CD4⁺ Th 세포의 총 절대 세포수는 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게(p<0.001) 증가하였고, 양성 대조군은 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.001) 감소하였으며, 산조인 복합오일군(p<0.01), 독활 복합오일군(p<0.05)에서는 대조군에 비해 유의성 있게 감소한 것으로 나타났다 (Figure 7).

CD8⁺ T c/s 세포의 총 절대 세포수는 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게 (p<0.05) 증가하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01)감소 하였다. 산조인 복합오일군, 독활 복합 오일 (ARC-C_oil)은 대조군에 비해 감소되었다 (Figure 7).

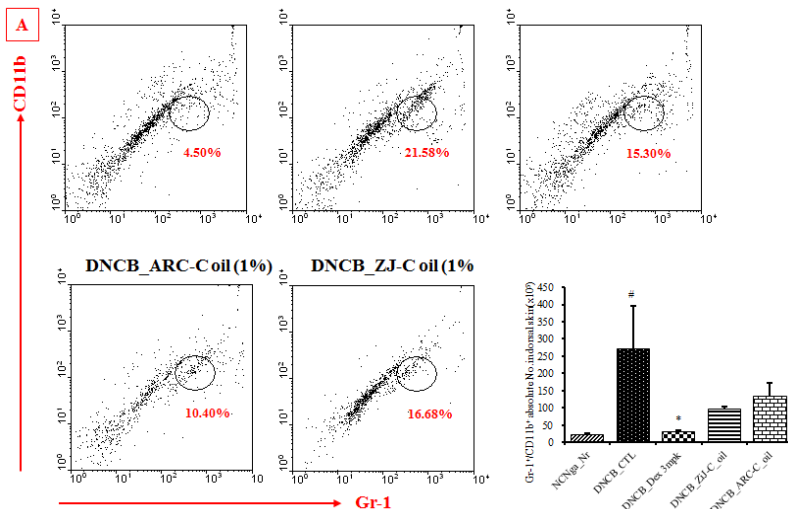
B220⁺/CD23⁺ 세포의 총 절대 세포 수는 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게 (p<0.001) 증가하였고, 양성 대조군은 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.001) 감소하였다. 그리고 산조인 복합 오일(ZjJ-C_oil) (p<0.001), 독활 복합오일(ARC-C_oil)(p<0.01)에서는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다 (Figure 7).

3) 등 피부조직에서 CD4⁺&CD8⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포수

CD4⁺ Th 세포의 총 절대 세포수는 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게 (p<0.001) 증가하였고, 양성 대조군은 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.001) 감소 하였다. 그리고 산조인 복합오일군, 독활 복합오일군에서는 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01) 감소되는 것으로 나타났다 (Figure 8).

CD8⁺ c/s T 세포의 총 절대 세포 수는 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게 (p<0.001) 증가하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.001) 감소하였으며, 산조인 복합 오일(ZjJ-C_oil), 독활 복합 오일 (ARC-C_oil)은 대조군에 비해 증가되는 것으로 나타났다. 특히 산조인 복합오일(ZjJ-C_oil)은 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01) 감소되는 것으로 나타났다 (Figure 8).

CD11b⁺/Gr-1⁺ MSC의 총 절대 세포 수는 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게 (p<0.05) 증가하였고,



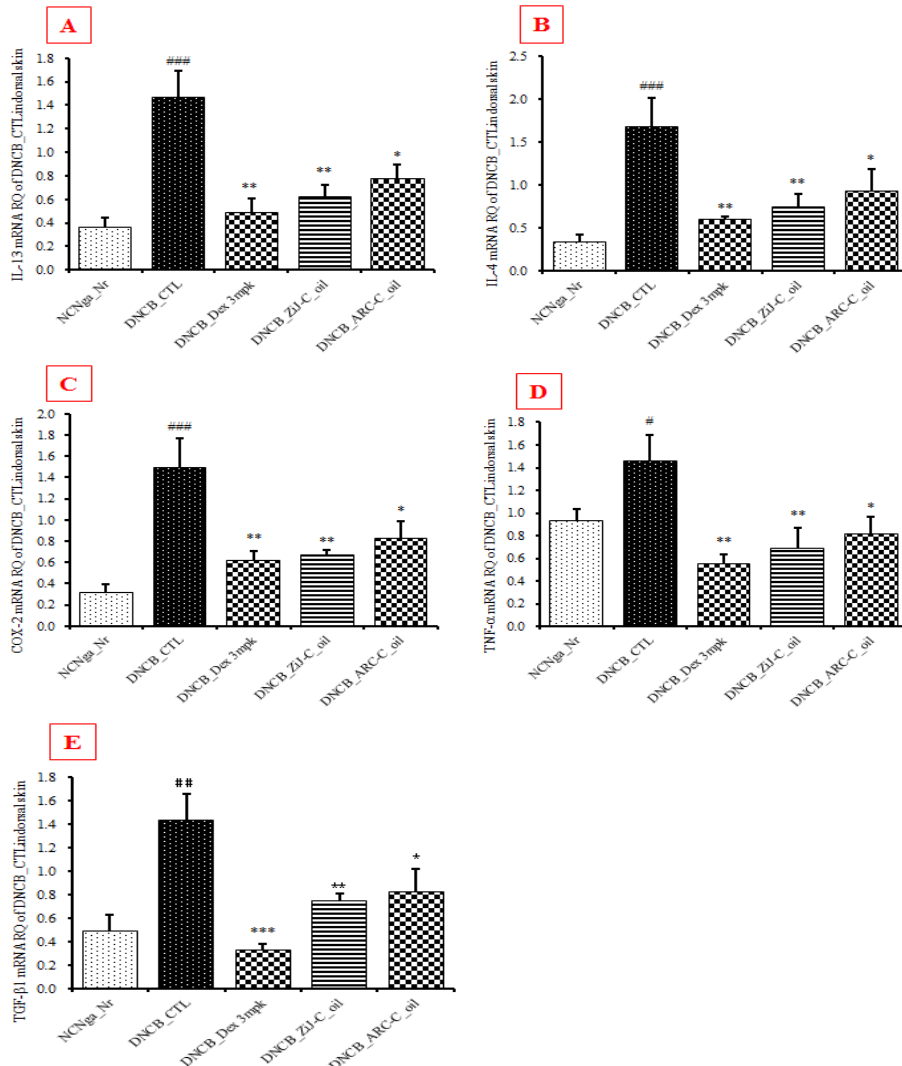
Topical application of atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and induced by DNCB in the dorsal skin for 3 weeks, and next to ZjJ-C_oil, ARC-C_oil treatment for 3 weeks. NC/Nga mouse dorsal skin cells (5x10³ cells/ml) were isolated from dorsal skin, and the dorsal skin cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total absolute number of CD4⁺&CD8⁺ and CD11b⁺/Gr-1⁺ in NC/Nga mouse. Statistically significant value compared with DNCB_CT group data by student's T-test (*p<0.05, ***p<0.001). #: p<0.05 compared with normal group. ###: p<0.001 compared with normal group.

Figure 8. Effects of ZjJ-C_oil, ARC-C_oil treatment on the percentage of CD4⁺&CD8⁺ and CD11b⁺/Gr-1⁺ changes of total absolute numbers in dorsal skin cells in NC/Nga mouse by DNCB

양성대조군은 대조군에 비해 유의성 있게 ($p<0.05$) 감소하였다. 그리고 산조인 복합오일군, 독활 복합오일군에서는 대조군에 비해 감소하는 것으로 나타났다 (Figure 8).

7. 등 피부조직에서 mRNA 유전자 발현

실험 종료 후 등 피부조직에서 유전자 발현을 측정 한 결과, COX-2 mRNA의 유전자 발현의 상대 정량값

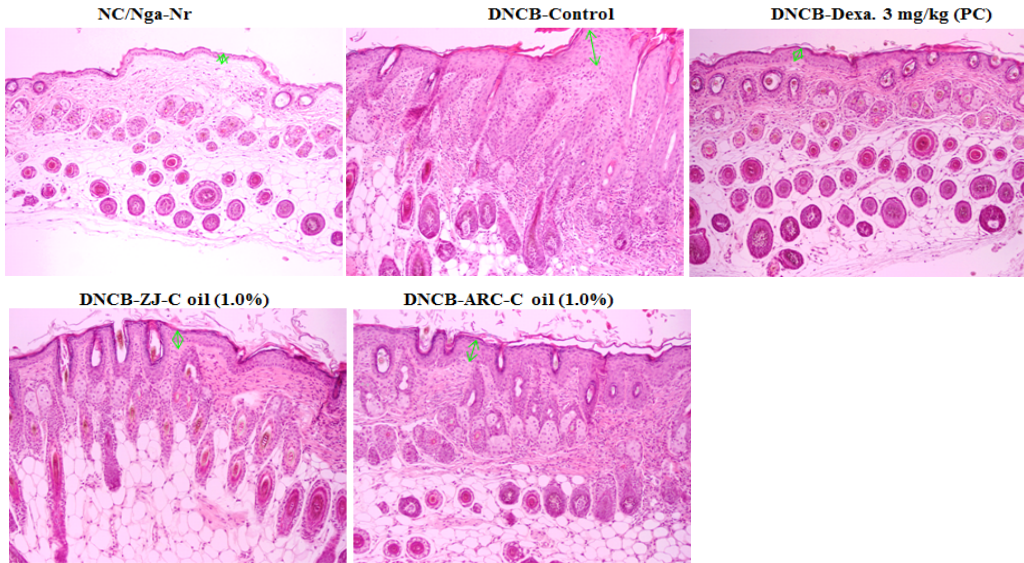


Topical application of atopic dermatitis NC/Nga mouse was maintained under conventional conditions, and induced by DNCB in the dorsal skin for 3 weeks, and next to Zj-C_oil, ARC-C_oil treatment for 3 weeks. Total RNAs were extracted in dorsal skin tissue IL-4, IL-13, COX-2, TNF-α and TGF-β1 mRNA synthesized 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 Fast Real-Time PCR system. Statistically significant value compared with DNCB_CTL group data by student's T-test (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). #: $p<0.05$ compared with normal group. ##: $p<0.01$ compared with normal group. ###: $p<0.001$ compared with normal group.

Figure 9. Effects of Zj-C_oil, ARC-C_oil treatment on IL-4, IL-13, COX-2, TNF-α and TGF-β1 mRNA expression in dorsal skin cells in NC/Nga mouse by DNCB

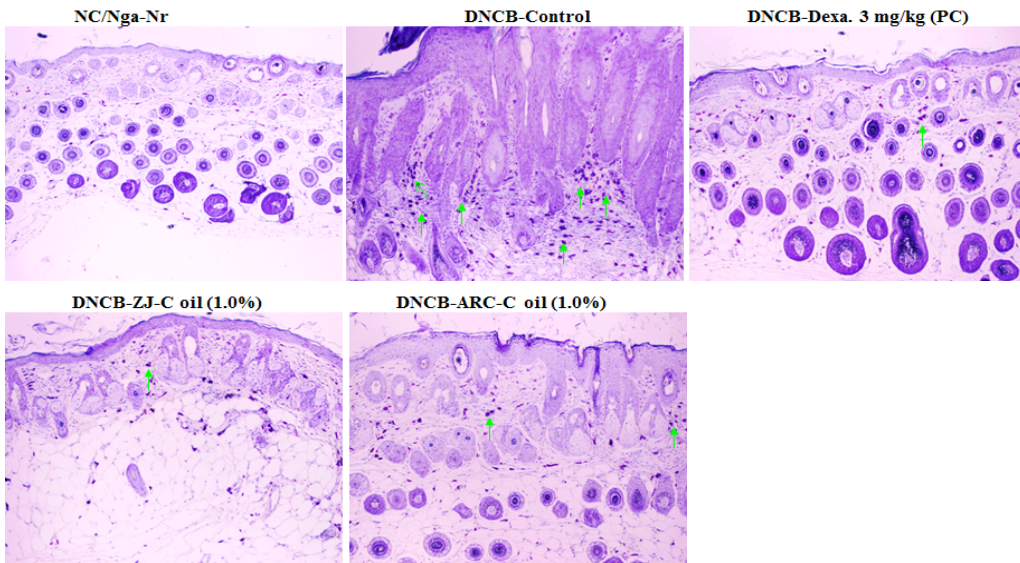
(RQ)은 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게 ($p<0.001$) 증가하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 유의성 있게($p<0.01$) 감소하였으며, 산조인 복합오일

군($p<0.01$), 독활 복합오일 (ARC-C_oil)($p<0.05$) 에서는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다(Figure 9).



Atopic dermatitis NC/Nga mice were induced by DNCB treatment in the dorsal skin, before the treatment of DNCB (NC/Nga-Nr), DNCB treatment for 3 weeks (CI), DNCB treatment for 3 weeks with dexamethasone (3mg/kg) (Dex), DNCB treatment for 3 weeks with ZjJ-C_oil, DNCB treatment for 3 weeks with ARC-C_oil treatment for 3 weeks.

Figure 10. H&E staining on histological features of dorsal skin



Atopic dermatitis NC/Nga mice were induced by DNCB treatment in the dorsal skin, before the treatment of DNCB (NC/Nga-Nr), DNCB treatment for 3 weeks (CI), DNCB treatment for 3 weeks with dexamethasone (3mg/kg) (Dex), DNCB treatment for 3 weeks with ZjJ-C_oil, DNCB treatment for 3 weeks with ARC-C_oil treatment for 3 weeks.

Figure 11. Toluidin staining on histological features of dorsal skin

TNF- α mRNA의 유전자 발현의 상대 정량값(RQ)은 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게($p < 0.05$) 증가하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.01$) 감소하였으며, 산조인 복합오일군($p < 0.01$), 독활 복합오일군($p < 0.05$)에서도 대조군에 비해 유의성 있게 감소되는 것으로 나타났다(Figure 9).

TGF- $\beta 1$ mRNA의 유전자 발현의 상대정량값(RQ)은 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게($p < 0.01$) 증가하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.001$) 감소하였다. 산조인 복합오일군($p < 0.01$), 독활 복합오일군($p < 0.05$)에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Figure 9).

IL-4 mRNA의 유전자 발현의 상대 정량값(RQ)은 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게 ($p < 0.001$) 증가하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.01$) 감소하였다. 산조인 복합오일군($p < 0.01$), 독활 복합오일군($p < 0.05$)은 대조군에 비해 유의성 있게 감소되는 것으로 나타났다(Figure 9).

IL-13 mRNA의 유전자 발현의 상대 정량값(RQ)은 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게 ($p < 0.001$) 증가하였고, 양성대조군은 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.01$) 감소하였다. 산조인 복합오일군($p < 0.01$), 독활 복합오일군($p < 0.05$)은 대조군에 비해 유의성 있게 감소되는 것으로 나타났다(Figure 9).

8. 등 피부 조직검사 및 분석

실험 종료 후 등 피부를 절단하여 H&E 염색 하여 분석한 결과, 정상 군에 비하여 대조군의 상피조직이 부종으로 현저하게 확장되었고 leucocytes의 침윤, erythema, edema, excoriation, scaling도 보이고 있다. 산조인 복합오일(ZjJ-C_oil), 독활 복합오일(ARC-C_oil)은 대조군에 비하여 상피조직의 두께가 현저하게 줄었고, leucocytes의 침윤 및 erythema, edema, excoriation, scaling 등은 보이지 않아 부종이 거의 사라진 것을 알 수 있다(Figure 10).

또한 등피부에 침윤된 비만세포를 관찰하기 위하여

toluidine blue 염색 하여 분석한 결과, 정상군에 비하여 대조군의 비만세포가 현저하게 증가되었고, 산조인 복합오일군, 독활 복합오일군은 대조군에 비하여 비만세포가 거의 사라진 것을 알 수 있다(Figure 11).

IV. 考察

아토피 피부염은 심한 가려움과 습진성 변화, 태선화를 일으키는 만성 염증성 피부질환이다^{1,2}. 아토피 피부염은 전 인구의 0.5-1%, 어린이의 경우 5-10% 가 앓고 있으며 최근 유소아의 유병률이 2-3배 증가하고 성인에게서도 증가하고 있는 추세이다².

아토피 피부염은 일반적으로 Ig E 합성의 증가와 호산구 증가증이 나타나는데 기존의 면역학적 연구에 의하면 IL-4, IL-5와 같은 Th2 cytokine이 증가하고 Th1 cytokine인 IFN- γ 의 분비가 감소하는 것과 관련이 있는 것으로 보고되었으며, 이러한 Th1과 Th2의 불균형을 조절하는 방법으로 피부염의 치료에 접근하고 있다³. 아토피 피부염의 치료법으로는 스테로이드제, 항히스타민제, 면역 억제제가 사용되는데 반복적으로 사용시 피부의 위축이나 소아 환자에서 성장 지연의 가능성 등 각종 부작용이 문제 되고 있어 새로운 대체요법의 필요성이 증가하고 있다.

동무 이체마가 창안한 사상체질의학은 성정(性情)의 차이에서 비롯된 장부(臟腑)의 대소, 생리, 외형 특성에 따라 사람을 태양인, 소양인, 태음인, 소음인으로 분류하여 체질에 맞는 치료법과 양생법을 제시하여 오늘날 개인별 맞춤형의 치료의 기틀을 마련하였다. 동의수세보원⁸에 따르면 4가지 체질 중 각 체질의 비율은 태음인 50%, 소양인 30%, 소음인 20%, 태양인 1%미만이고 명⁹의 연구에 따르면 아토피 환자중 61.3%가 태음인, 29.1%가 소양인, 9.6%가 소음인으로 나타나 가장 많은 비율을 차지하는 태음인과 소양인에게 적합한 복합오일의 치료제가 필요할 것으로 생각된다.

태음인 약재인 산조인(酸棗仁)은 갈매나무과

(Rhamnaceae)에 속한 낙엽관목인 뽕대추의 성숙한 종자(種子)를 건조한 것으로 심경(心經)과 간경(肝經)으로 들어가 마음을 안정시키고, 땀을 수렴시켜 불면, 경계(驚悸), 다한(多汗), 구갈(口渴) 등을 치료하며¹⁰ 이 등¹¹의 연구처럼 불면, 신경안정 효과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 소양인 약재인 독활(獨活)은 미나리과에 속한 다년생 초본(草本)인 중치모당귀의 뿌리인데, 신경(腎經)과 방광경(膀胱經)에 들어가 습(濕)을 제거하고 통증과 저림을 해소하는 효과가 있어 무릎과 허리통증, 관절운동이상, 발열, 두통, 전신통을 치료하며¹⁰ 이 등¹²의 연구처럼 항염증 효과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 소양인 약재인 방풍(防風)은 미나리과에 속하는 다년생 초본(草本)인 방풍(防風)의 근(根) 및 근경(根莖)으로 간경(肝經), 비경(脾經), 방광경(膀胱經)에 들어가 표증을 해소하고 습을 제거하며 경련을 멈추는 효과가 있어 감기로 인한 두통, 풍습(風濕)으로 인한 저림증상, 관절통, 소양감, 발진, 경련, 파상풍을 치료하며¹² 노의 연구처럼 항염 효과에 대한 연구가 이루어지고 있다¹³. 이처럼 신경안정, 항염증 효과가 증명되었으나 아직 직접적으로 아토피 피부염에 대한 효과에 대한 연구는 이루어지고 있지 않아 본 논문에서는 산조인 복합오일, 독활 복합오일의 아토피 동물모델에서 호전도를 실험적으로 검증해 보고자 하였다.

상기 실험에서는 NC/ N_{ga} mouse를 아무런 처리를 하지 않은 정상군, 등을 제모한 후 1%의 DNCB를 2주간 도포한 음성대조군, 등을 제모한 후 1%의 DNCB를 2주간 도포하고 양성 대조 약물 dexamethasone(Dexa.) 0.5%를 주 5회 등에 도포한 양성대조군, 등을 제모한 후 1%의 DNCB를 2주간 도포하고 산조인 복합오일을 3주간 등에 도포한 실험군, 등을 제모한 후 1%의 DNCB를 2주간 도포하고 독활, 방풍 복합오일을 3주간 등에 도포한 실험군으로 나누어 실험을 진행하였다.

최종 5주후 skin clinical score를 측정한 결과, DNCB를 도포한 후 산조인 복합오일군을 도포시킨 군은 대조군에 비해 약간의 감소를 나타내었으며, DNCB를 도포한 후, 독활 복합 오일 (ARC-C_oil)를 도포시킨

군에서는 대조군에 비해 skin clinical score가 2배 이상 감소를 나타내었다. 이는 산조인, 독활 복합오일이 가려움을 동반한 홍반, 부종, 인설, 가피, 태선화를 개선시킬 수 있음을 보여준다.

혈청 IgE를 측정한 결과, 산조인 복합오일군, 독활 복합오일군 모두 대조군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 감소하는 것으로 나타났다. 아토피 피부염 환자는 랭게르한스 세포에 알레르기 원인물질을 전달해 주는 세포표면의 수용체가 정상인보다 증가되어 있다¹⁴. 항원에 대한 특이 IgE는 랭게르한스 세포가 가진 이러한 항원전달능력을 증가시킨다. 항원이 들어와 IgE에 결합하면 랭게르한스 세포가 항원을 림프구에 전달하여 세포매개 면역반응을 유도함으로써 병변을 유발시킬 수 있을 뿐만 아니라, 면역반응을 지속적으로 유지시키는데 중요한 역할을 한다¹⁵. 이와 같은 결과 산조인 복합 오일(ZJ-C_oil), 독활 복합오일군으로 인하여 알레르기 면역반응을 억제하여 B세포 분화과정에서 분비되어 염증반응을 유도하는 IgE 분비를 억제하는 것으로 사료된다.

비장세포를 분리하여 배양 상층 액에서의 cytokine 발현을 측정한 결과, IL-4, IFN- γ , IL-5생산량은 산조인 복합오일군과 독활 복합오일군이 대조군에 비해 감소하였으며 특히 산조인 복합오일군에서 유의성 있게 ($p < 0.05$) 감소하였다. IL-13 생산량은 산조인 복합오일군과 독활 복합오일군이 대조군에 비해 감소하였으며 특히 산조인 복합오일군에서 유의성 있게($p < 0.01$) 감소하였다.

아토피 피부염은 급성일 경우 Th2 세포가 편향적으로 발달하며 아토피 피부염이 심화되면 Th1 cytokine도 동시에 증가해 염증반응을 더욱 악화시킨다. Th2 세포는 다양한 cytokine과 chemokine인자들을 생성하여 아토피 피부염의 진행을 유도하는데 Th2 세포에서 발현된 IL-4, IL-5, IL-13 cytokine은 B림프구의 생성과 분화를 유도한다¹⁶. IL-4는 Th2 세포가 분비하는 cytokine으로 B 세포에서 IgE의 생산을 유도하고 B 세포에서 IgM에서 IgE로 전환하는 정도를 증가시킨다. IL-4는 면역 반응의 초기에 naive Th 세포를 Th2

세포로 분화되게 하며 Th1 세포집단으로의 확장을 저해하기도 한다¹⁷. IL-5는 Th2 세포가 생산하고 호산구의 발달, 생존에 중요한 역할을 하며¹⁸ 호산구를 활성화시키고, IL-13은 Th2 세포가 생산하는 cytokine이고 대식세포가 미생물을 죽이는 활동을 억제한다¹⁹. IFN- γ 는 대식세포를 활성화하고, 대식세포의 항미생물 활성을 증가하도록 자극하며, Th1 림프구의 분화와 활성을 촉진시키는 주된 조절분자의 발현을 상향 조절하고 Th2 집단의 확장을 저해한다. 아토피 피부염 환자의 말초혈액과 피부조직에서 IFN- γ 생산저하가 보고되고 있고 IFN- γ 가 IgE 생성 및 Th2 림프구의 증식을 억제한다²⁰. 따라서 산조인 복합오일군, 독활 복합오일군은 Th2 cytokines과 IFN- γ 의 발현을 조절하여 피부염증반응을 억제한다고 사료된다.

실험 종료 후 15주령의 NC/Nga 생쥐를 ALN, spleen 그리고 등 피부 부위를 적출하여 총 세포수를 측정하였다. ALN 세포 수는 산조인 복합오일군($p < 0.01$), 독활 복합오일군($p < 0.05$)에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되는 것으로 나타났다. 등 피부조직의 세포 수는 산조인 복합오일군에서 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.05$) 감소되는 것으로 나타났다. 독활 복합오일군에서는 감소하였지만 유의성은 나타나지 않았다. 아토피 피부발진이 심화되면 피부발진 부위에 Th2 세포, 호산구, 단핵구, 비만세포 등 면역염증세포가 증가하게 되고, 표피층이 두꺼워지는 원인을 제공하여 만성 피부질환 동물의 피부발진을 계속 유지하고 악화시키는데 기여하게 된다¹⁸. 실험 결과 산조인 복합오일군($p < 0.01$), 독활 복합오일군($p < 0.05$)이 면역염증세포수 증가를 억제하는 것으로 사료된다.

면역 조절작용 중 myeloid 세포의 역할은 다양한 질환 상태에 관여하여 면역 억제작용을 하고 세포의 성장과 분화에도 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다. 그리고 myeloid suppressor cells (MSC)의 특징은 macrophage (Mac-1/CD11b)와 granulocyte (Gr-1)lineages를 모두 표면분자로 발현하는 것이다. CD11b+Gr-1+ MSC는 spleen, lymphnodes에서 염증 피부 및 조직으로 이동하여 많이 존재하는데, 이 세포는 antibody pro-

duction, cytotoxic T lymphocyte (CTL) generation, 그리고 lymphocyte proliferative responses를 억제하여 아토피의 경우 만성피부질환을 계속적으로 심화시키는 역할을 한다²². CD4+ T 세포는 특정한 B 림프구에 작용하여 B 림프구가 항원과 반응하도록 함으로써 체액성 면역반응을 촉진 (항체형성촉진)시키며 세포성 면역반응 자체도 증강 시킨다. 또한 CD8+ T 세포는 직접적으로 항원을 죽일 수 있는 독성물질을 방출하여 항원을 죽이며 자극을 받으면 세포성 면역반응을 이끌어낸다. 이로써 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포는 우리 몸의 면역기능을 가늠하는 가장 중요한 지표가 된다. 또한 최근 연구에서 따르면 CD8+ T세포는 염증발진에서 migration으로 중요한 역할을 하고 또한 LTB4를 통해 비만세포를 활성화시켜 알레르기 질환의 pathogenesis에서 중심적 역할을 한다²³. CD23+ 세포는 비만세포, 호중구, 호산구 등의 표면분자이며 알레르기 질환에서 IgE 생성 및 염증반응에 연관된다. CD23+을 통한 allergen-loaded IgE에 의해 세포들이 활성화 되면 IL-1, IL-6, TNF- α 가 생성된다²⁴. B220+세포는 사람에게는 없지만 생쥐의 B세포표면에 있는 표식자로 B세포의 표면에서 발현되는 B세포 마커이며 B220+가 증가하면 체액성 면역이 증가한다는 것을 의미한다²⁵.

PBMCs에서 CD4+&CD8+, CD11b+/Gr-1+ 세포 수를 측정한 결과, CD4+ Th 세포의 총 절대 세포 수가 산조인 복합오일(ZJ-C_oil), 독활 복합오일(ARC-C_oil)에서 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.001$) 증가하는 것으로 나타났다. CD8+ c/s T 세포의 총 절대 세포 수는 산조인 복합오일군, 독활 복합 오일 (ARC-C_oil)에서 대조군과 비슷한 수준으로 나타났다(Figure 8). CD11b+/Gr-1+ MSC의 총 절대 세포 수는 산조인 복합오일(ZJ-C_oil)은 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.001$) 감소하였고 독활 복합 오일 (ARC-C_oil)은 대조군에 비해 감소하였지만 유의성은 나타나지 않았다. 산조인 복합 오일(ZJ-C_oil), 독활 복합오일군으로 CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor 세포가 염증피부 및 조직으로의 이동을 제한하여 면역반응과 지속적인 피부염증을 억제할 것으로 사료된다.

ALN에서 CD4⁺&CD8⁺, B220⁺/CD23⁺ 세포 수를 측정 한 결과, CD4⁺ Th 세포의 총 절대 세포수는 산조인 복합오일군(p<0.01), 독활 복합오일군(p<0.05)에서는 대조군에 비해 유의성 있게 감소한 것으로 나타났다. CD8⁺ T c/s 세포의 총 절대 세포수는 산조인 복합오일군, 독활 복합 오일 (ARC-C_oil)에서 대조군에 비해 감소되었다. B220⁺/CD23⁺ 세포의 총 절대 세포 수는 산조인 복합 오일(ZJJ-C_oil)(p<0.001), 독활 복합오일 (ARC-C_oil)(p<0.01)에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다. 산조인 복합오일(ZJJ-C_oil), 독활 복합오일군으로 인하여 ALN로 활성화 B세포, CD4⁺ T세포, CD8⁺ T세포의 침윤을 억제하여 체액성 면역반응과 세포성 면역반응을 제한하는 것으로 판단 된다.

등피부조직에서 CD4⁺&CD8⁺, CD11b+/Gr-1 세포 수를 측정한 결과, CD4⁺ Th 세포의 총 절대 세포수는 산조인 복합오일군, 독활 복합오일군에서는 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01) 감소되는 것으로 나타났다. CD8⁺ c/s T 세포의 총 절대 세포 수는 산조인 복합 오일(ZJJ-C_oil), 독활 복합 오일 (ARC-C_oil)은 대조군에 비해 증가되는 것으로 나타났다. 특히 산조인 복합오일(ZJJ-C_oil)은 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01) 감소되는 것으로 나타났다. CD11b+/Gr-1+ MSC의 총 절대 세포 수는 산조인 복합오일군, 독활 복합오일군에서 대조군에 비해 감소하는 것으로 나타났다. 산조인 복합오일군, 독활 복합오일군의 효과 등 피부발진 부위로 CD4⁺ T세포, CD8⁺ T세포 그리고 CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor 세포의 침윤을 억제하여 면역반응을 제한하고, 피부질환이 심화되는 것을 조절 할 수 있을 것이라고 판단된다.

아토피 피부염의 면역학적 기전을 살펴보면 우선 Th1과 Th2 cytokine의 균형이 항원에 의해 깨지게 되고, 이에 따라 비정상적으로 IL-4, IL-5, IL-13 같은 Th2 cytokine들이 과잉 생산되고 B세포를 자극하여 혈청 내 IgE가 증가하게 된다는 특징을 가진다. 아토피 질환에서 분비되어 증가된 IgE는 비만세포 표면의 IgE 수용체와 결합하여 비만세포를 감작시키며, 항원이

침투 하면 비만세포 표면의 Ig E와 결합하게 되면서 비만세포 활성화 및 탈 과립이 유도되고, 세포내 저장되어 있던 히스타민과 같은 화학전달물질이 생성되어 세포표면으로 분비되는데, 이러한 화학전달물질들로 인하여 알레르기 증상이 나타난다. 즉, 아토피 질환은 항원 노출, 항원 특이 Th2 세포와 B 세포의 활성화, IgE 항체의 생산, 비만세포의 Fc 수용체에 항체 결합, 항원의 재차 노출에 의한 비만세포의 자극의 경과를 따르며 이에 따라 비만세포의 매개자 방출로 나타난 병리학적 반응이라고 요약할 수 있다⁴⁰. 비만세포는 모든 결합조직과 상피세포 아래층에 존재하여 흔히 즉시형 과민반응이 나타나는 부위이며, 아토피 피부염 피부 병변에서 자주 관찰 된다²⁶. 비만세포는 FcεRI의 자극을 통해 IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, GM-CSF 등과 같은 다양한 cytokine을 생산, 분비하는데 이러한 cytokine을 분비함으로써 조기 알레르기 반응뿐 아니라 후기 반응이나 만성 알레르기 반응에도 기여하게 된다¹⁹. 이렇듯 아토피 피부염의 증상 발현에 여러 가지 cytokine이 복합적으로 작용하여 우리 몸 피부에서 소양감 및 각종 알레르기 염증 상태를 유발하게 된다. Cyclooxygenase는 두 가지 형이 있는데 세포의 구성성분으로 되어있는 cyclooxygenase-1 (COX-1)과 염증 매개 물질에 의해 유도되는 cyclooxygenase-2 (COX-2)가 있다. COX-1은 주로 혈관 내피세포, 위점막 및 신장 등에 존재하면서 위 점막 보호 작용이나 신장 혈류를 조절하는 항상성 기능을 가지고 있다. 이에 비하여 COX-2는 염증 매개 물질에 의하여 생성된 후 염증부위에서 염증을 일으키고 유지시키는 작용을 한다²⁷. TGF-β도 IFN-γ와 같이 순수 분리된 B 세포와 anti-CD40 mAb와 rIL-4와 동시 배양하여 자극할 경우 B세포의 분화 및 IgE 생성을 억제한다고 보고되어 있다²⁸.

실험 종료 후 등 피부조직에서 유전자 발현을 측정한 결과, COX-2, TNF-α, TGF-β1, IL-4, IL-13 mRNA의 유전자 발현의 상대 정량값(RQ)은 산조인 복합오일군(p<0.01), 독활 복합오일군(p<0.05)에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다. 이와 같은

결과는 산조인 복합오일군, 독활 복합오일군이 아토피 피부염에서 발현되는 다양한 cytokine 유전자 발현을 억제함으로써 아토피 피부염의 염증반응을 호전시킬 수 있다고 판단된다.

실험 종료 후 등 피부를 절단한 후 H&E 염색 하여 분석한 결과, 산조인 복합오일(ZJ-C_oil), 독활 복합오일(ARC-C_oil)은 대조군에 비하여 상피조직의 두께가 현저하게 줄었고, leucocytes의 침윤 및 erythema, edema, excoriation, scaling 등은 보이지 않아 부종이 거의 사라졌고 등피부에 침윤된 비만세포를 관찰하기 위하여 toluidine blue 염색 하여 분석한 결과, 산조인 복합오일군, 독활 복합오일군은 대조군에 비하여 비만세포가 거의 사라진 것으로 나타났다. 이를 통해 산조인 복합오일(ZJ-C_oil), 독활 복합오일(ARC-C_oil)이 상피조직이 두꺼워지고 부종이 생기는 걸 억제하며 비만세포 증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

상기 실험의 결과를 종합하여 볼 때, 산조인 복합오일(ZJ-C_oil), 독활 복합오일(ARC-C_oil)이 IgE 증가, cytokine 발현, 면역염증세포수 증가, 세포성면역과 체액성 면역, 유전자발현을 조절하여 NC/Nga mouse에서 알레르기 염증반응을 효과적으로 억제한다고 볼 수 있다. 이를 통해 산조인 복합오일(ZJ-C_oil), 독활 복합오일(ARC-C_oil)을 아토피 피부염의 새로운 보조요법제로 이용 가능할 것으로 판단된다.

하지만 아토피 피부염 동물모델이 사람에서 발생하는 유전적인 요인을 고려하지 못했고 재현성에서 한계가 있다는 단점이 있다. 또한 오일 성분에 치료효과를 위해 첨가하였던 전나무, 천초 약재가 동의수세보원에 체질이 구체적으로 명시되어있지 않아 태음인, 소양인에 맞는 치료제로 사용되기에 한계가 있어 약재 구성과 함량을 체질에 맞게 조정하여 치료의 보조요법으로 사용하기 전에 태음인, 소양인 환자를 대상으로 한 임상 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結論

1. 혈청 IgE 수치가 산조인 복합오일군, 독활 복합오일군 모두 대조군에 비해 유의성 있게 ($p<0.01$) 감소하였다.
2. IL-4, IFN- γ , IL-5생산량은 산조인 복합오일군이 대조군에 비해 유의성 있게($p<0.05$) 감소하였다. IL-13 생산량은 산조인 복합오일군에서 대조군에 비해 유의성 있게($p<0.01$) 감소하였다.
3. ALN의 총 세포 수가 산조인 복합오일군($p<0.01$), 독활 복합오일군($p<0.05$)에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다. 등 피부조직의 총세포 수는 산조인 복합오일군에서 대조군에 비해 유의성 있게($p<0.05$) 감소되었다.
4. PBMC에서 CD4+ Th 세포의 총 절대 세포 수가 산조인 복합오일(ZJ-C_oil), 독활 복합오일(ARC-C_oil)에서 대조군에 비해 유의성 있게($p<0.001$) 증가하였고 CD11b+/Gr-1+ MSC의 총 절대 세포 수는 산조인 복합 오일(ZJ-C_oil)에서 대조군에 비해 유의성 있게($p<0.001$) 감소하였다.
5. ALN에서 CD4+ Th 세포의 총 절대 세포수는 산조인 복합오일군($p<0.01$), 독활 복합오일군 ($p<0.05$)에서는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였고 B220+/CD23+ 세포의 총 절대 세포 수는 산조인 복합 오일(ZJ-C_oil)($p<0.001$), 독활 복합 오일(ARC-C_oil)($p<0.01$)에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.
6. 등피부조직에서 CD4+ Th 세포의 총 절대 세포수는 산조인 복합오일군, 독활 복합오일군에서 대조군에 비해 유의성 있게 ($p<0.01$) 감소되었다. CD8+ c/s T 세포의 총 절대 세포 수는 산조인 복합오일(ZJ-C_oil)은 대조군에 비해 유의성 있게 ($p<0.01$) 감소되었다.
7. 피부조직에서 유전자 발현을 측정할 결과, COX-2, TNF- α , TGF- β 1, IL-4, IL-13 mRNA의 유전자 발현의 상대 정량값(RQ)은 산조인 복합오일군($p<0.01$), 독활 복합오일군($p<0.05$)에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.
8. 실험 종료 후 등 피부를 절단하여 H&E 염색 하여

분석한 결과, 산조인 복합오일(ZjJ-C_oil), 독활 복합오일(ARC-C_oil)은 대조군에 비하여 상피조직의 두께가 현저하게 줄었고, 부종이 줄었다. 등피부에 칩윤된 비만세포를 관찰하기 위하여 toluidine blue 염색 하여 분석한 결과, 산조인 복합오일군, 독활 복합오일군은 대조군에 비하여 비만세포가 줄었다.

감사의 말씀

본 논문은 산업통상자원부의 제품개발 및 헬스케어 인턴트 연동 프로그램 개발사업(과제번호: R0004833)과 웰니스 스파 임상지원센터 구축사업(과제번호: N030300001) 지원비에 의해 수행되었습니다.

VI. References

1. Journal of asthma,allergy and chinal immunology, 40 million allergies. Seoul: Medical history corporation of medical science. 2005:1-22, 233-239(Korean).
2. SP Yoon, BS Kim, JH Ree, SC Lee, YK Kim. The environment and lifestyle of atopic dermatitis patients. Korean J. Dermatol. 1999;37:983-991(Korean).
3. HS Ahn, Hongchangui pediatrics. 9th edition. Seoul. Miraen, p.1142, 2010.(Korean).
4. HJ Lee, CY P, JH Lee, KH Lee: The Antipruritic Effect of Topical Doxepin Cream in Patients with Atopic Dermatitis, Korean journal of dermatology, 2006;44(3):309-14.
5. JD Guin. Complications of topical hydrocortisone. J Am Acad Dematol. 4:417-422, 1981.
6. H Sugano. Psychology and Biology of Fragrance I. Chapman and Hall. 1990.
7. Okada M, Hirasawa Y, Yoshijima K et al. : Effect of clobetasol propionate, a corticosteroid on hapten-induced dermatitis in SPF NC/Nga mouse, Pharmacometrics, 59: 135-139, 2000.
8. Lee JM. Dongeiseusebowon. Seoul: Daesungmoonhwasa. 1997;1:5, 4:1,10,29-32(Korean).
9. SK Myungm, A Survey Study about Eating Habits, Living Environment and Sasang Constitution of Children with Atopic Dermatitis, The Graduate School of Education at Incheon National University, a Master's degree, 2014;1-95(Korean).
10. National College of Oriental Medicine Collaborative Textbook Compilation Committee, Herbal medicine. Seoul: YeongLimSa. 2010; 323(Korean).
11. JH Lee, JY Baek, HS Jeong, SD Park., A clinical study of Sanjoincho - induced injection on insomnia patients, The Korean Society of Oriental Neuropsychiatry, 2000;11(2):79-86.
12. SK Lee, DJ Joe, HJ Jang, K Hyun, Journal of Naturopathy, Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Ethanol Extracts from Aralia continentalis Kitagawa, 2015;4(1): 10-14.
13. SI Noh, SD Kim, SC Park, BY Seo, SR Yeom, YD Kwon, et al.,Mechanism of Anti-inflammatory Effect of Peucedanum japonicum Thunb, Journal of Oriental Rehabilitation Medicine, 2005;15(2):31-43.
14. Abramovits W. Atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol. 2005;53(Suppl):S98-104.
15. Valladeau J, Saelan S. Cutaneous dendritic cells. Semin Immunol. 2005;17:273-283.
16. Beltrani VS. The clinical spectrum of atopic. 21(1): 80-90. 2013.
17. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, Janis Kuby. KUBY Immunology 5th.. World Science,. 2006;104-5, 310, 327-30.
18. YM Park,. Advances In the Pathophysiology of Atopic Dermatitis. The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease, 2006;16(3):190.(Korean).
19. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. Basic immunol-

- ogy 3th. Epublic., 2009;123-4.
20. TY Kim, Therapeutic effect of IFN- γ in refractory atopic dermatitis. The Korean Dermatological Association, 2000;38(10):55.(Korean).
 21. Ying, S, Taborca-Barata, L, Meng, Q, Humbert, M, Kay, AB: The kinetics of allergen-induced transcription of messenger RNA for monocyte chemoattractant protein-3 and RANTES in the skin of human atopic subjects:relationship to eosinophil, T cell, and macrophage recruitment. *J Exp Med*, 181:2153-2159, 1995.
 22. Bronte V, Wang M, Overwijk WW, et al.:Apoptotic death of CD8+T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J Immunol*, 161(10):5313-5320, 1998.
 23. 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*. 168: 2020-2027. 2002.
 24. Young MR, Wright MA, Matthews JP, Malik I, Prechel M: Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte macrophage progenitor cells producing transforming growth factor- β and nitric oxide. *J Immunol*, 156(5):1916-1922, 1996.
 25. Rosenwasser, L.J., Busse, W.W., Lizambri, R.G., Olejnik, T.A., Totoritis, M.C : Allergic asthma and an anti-CD23+ mAb (IDEC-152): results of a phase I, single-dose, dose-escalating clinical trial. *J Allergy Clin Immunol*. 112(3):563-570. 2003.
 26. Heijden FL, Joost N, Katwijk M, Bos JD, Kapsenberg ML. Serum-IgE-facilitated allergen presentation in atopic disease. *J Immunol*. 1993;150(8):3643-50.
 27. The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology. *Asthma and Allergic disease*. Seoul: Koonja Publishing Co. 2002:13-116.
 28. Komai-Koma, M and PC Wilkinson. TGF- β stimulates but IFN- γ inhibits growth-related activation of locomotion of human B cells. *The Journal of Immunology*, 1997;(158):3125-3129.