

# NC/Nga 아토피 피부염 생쥐 모델에서의 養血潤膚湯 효과

박병준 · 최정준 · 김수명<sup>1</sup> · 이용구<sup>2</sup> · 김동희\*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1:대전대학교 한의과대학 해부학교실, 2:대전대학교 한의과대학 내과학교실

## Suppression of DNCB-induced Dermatitis in NC/Nga Murine Model by Yanghyulyoonbu-tang

Byung Jun Park, Jeong June Choi, Soo Myung Kim<sup>1</sup>, Yong Koo Lee<sup>2</sup>, Dong Hee Kim\*

Department of Pathology, 1:Department of Anatomy, 2:Department of Internal medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease characterized by inflammatory cell infiltration in the skin. This study was performed to assess the therapeutic effects of YHYBT on the DNCB-induced dermatitis in NC/Nga mice, characterized by the onset of AD along with an increase the number of Th2 cells and dysregulation of inflammatory mediators including cytokines and chemokines. YHYBT administration significantly reduced clinical dermatitis severity including pruritus, edema, eczematous and erythema. Histological findings indicated that the thickening of epidermis/dermis and dermal infiltration of inflammatory cells including mast cells were dramatically reduced. The suppression of dermatitis by YHYBT was accompanied by a decrease in the total number of immune cells in drained lymph node (DLN) and skin. Especially CD3+, CD4+ and CD3+CD69+ T cells in PBMC and DNL were greatly reduced. The level of IL-4 in CD3/CD28 activated splenocyte was downregulated, whereas that of IFN- $\gamma$  was increased. Furthermore, the expression of eotaxin2 and CCR3 in skin were significantly decreased. These data suggest that YHYBT may be effective therapeutic agents for the treatment of AD.

Key words : Yanghyulyoonbu-tang(YHYBT), atopic dermatitis, NC/Nga mice, immune modulation, T cell, cytokines

### 서 론

아토피 피부염(atopic dermatitis)은 소양증을 동반하는 만성 염증 피부질환으로써, 소아의 10~20 %가 이 질환으로 고통 받고 있으며, 산업화가 진행되면서 발병율이 증가하고 있다<sup>1,2)</sup>. 아토피 피부염은 면역학적으로 T 세포, 호산구, 비만세포 등 다양한 세포들에 의해 발병되는 것으로 알려져 있으며, 그 중에서도 Th2 세포가 발현하는 IL-4, IL-5, IL-13 등의 Th2 사이토카인이 발병 과정에 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고되고 있다<sup>3,4)</sup>.

특히 IL-4는 Th1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 의 발현을 억제시킴으로써 Th2과 Th1의 불균형을 초래하여 증상을 악화시키고<sup>4,5)</sup>, eotaxin과 같은 chemokine들은 아토피 환자에게서 과도하게 발현되며, 이 물질은 CCR3를 통해 다양한 면역세포들을 피부로 불러들임으로써 세포들의 침윤을 일으키고 부종과 같은 증상이 나

타나게 하는 역할을 한다<sup>6)</sup>. 따라서 아토피 피부염을 근본적으로 치료하기 위해서는 면역학적 관점에서의 다양한 접근이 필요하며, 실제로 최근 T 세포를 치료를 위한 표적세포로 인식하고, 이와 관련된 연구가 심도 있게 진행되고 있다<sup>7)</sup>.

현재 아토피 피부염의 치료제로 많은 약물이 개발되어 임상 실험 중에 있으나, 항히스타민제, 스테로이드제, FK506, cyclosporin 등이 임상에서 주로 사용되고 있다. 그러나 이들의 장기 사용은 내성 증가와 더불어 심각한 부작용을 초래할 뿐만 아니라 질병에 대한 근본적인 치료를 할 수 없는 단점이 있어<sup>8)</sup>, 안전하면서도 근본적으로 치료할 수 있는 약물 개발이 요구되고 있다.

본 시료인 養血潤膚湯(YHYBT)은 四物湯에 活血化癥, 祛風止癢 약물을 가미하여 소양감이 심한 피부 질환에 응용되는 처방으로, 이<sup>9)</sup>는 이를 시료로 in vitro에서 아토피피부염의 염증성 기전과 관련한 사이토카인 및 케모카인, histamine,  $\beta$ -hexosaminidase, NF-kB 및 활성산소 등에 미치는 영향을 검색하여 유의성있는 결과를 보고한 바가 있다.

따라서 본 실험에서는 in vitro의 유의성 있는 결과에 준하

\* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학

· E-mail : djkim@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2623

· 접수 : 2007/03/09 · 채택 : 2007/04/09

여 *in vivo* 효능을 검색하고자, dinitrochlorobenzene (DNCB)로 아토피 피부염 증상을 유도시킨 NC/Nga 생쥐에서 피부 병리 반응, T 세포 변화 및 사이토카인 변화 등을 검색하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

실험 동물은 수컷 6주령의 NC/Nga mice는 Japan SLC사에서 공급 받아 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co., korean)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2 °C, 습도 55 ± 15 %, 12시간-12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응 시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 약물

본 실험에 사용한 養血潤膚湯 (YHYBT)의 구성 약재들은 대전대학교 부속 한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. The compositions of Yanghyulyoonbu-tang(YHYBT)

韓藥名	生藥名	用量(g)
當歸	<i>Angelicae Radix</i>	5
川芎	<i>Ligustici Rhizoma</i>	5
白何首烏	<i>Cynanchi Wilfordii Radix</i>	15
鷄血藤	<i>Mucunae Caulis</i>	15
丹參	<i>Salviae Radix</i>	8
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	8
熟地黃	<i>Rhemaniae Radix</i>	8
白茯苓	<i>Poria</i>	8
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	5
白鮮皮	<i>Dictamni Radix</i>	15
苦參	<i>Sophorae Flavescents Radix</i>	5
豬苓	<i>Polyporus Umbellatus</i>	8
合 計		105

#### 3) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 dinitrochlorobenzene (DNCB), diethylpyrocarbonate(DEPC), 3-4, 5-dimethyl-thiazol-2, 5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), chloroform, collagenase, trichloroacetic acid, trypsin-EDTA, 아세트산, tris-base, 아세톤, 올리브오일, 에탄올, DNase-1, dNTPs, RNase inhibitor, tris-HCl, isopropanol, paraformaldehyde, 적혈구 용혈액, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde 등은 Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (U.S.A.) 제품을, anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-CD28-PE, anti-CD69-FITC, rat anti-mouse CD4 mAb, PE-conjugated goat anti-rat IgG, tris-buffered saline 등은 Pharmingen사 (U.S.A.) 제품을, rat anti-mouse CCR3 mAb, 등은 Becton Dickinson사 (Mountain View, U.S.A.) 제품을, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

#### 4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), 전자레

인지 (LG, Korea), 감압증류기 (Büchi B-480, Switzerland), 동결 건조기 (EYELA FDU-540, Co., Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), 무균대 (Vision scientific Co., Korea), 멸균기 (Sanyo, Co., Japan), micro-pipet (Gilson, Co., France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), 흡광분광기 (Shimadzu, Co., Japan), 원심 분리기 (한일, Co., Korea), deep-freezer (Sanyo, Co., Japan), thermocycler system (MWG Biotech, Co., Germany), 제빙기 (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, Co., U.S.A.), plate shaker (Lab-Line, Co., U.S.A.), flow cytometer (Molecular Devices, Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices, Co., U.S.A.), 위상차현미경 (Nikon, Japan) 등을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 시료 조제

YHYBT 4첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여, 이를 감압증류장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하였다. 농축액을 다시 동결건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 18.4 g을 냉동 보관 (-80 °C) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

#### 2) 피부염 유도 및 시료 처리

NC/Nga 생쥐 (11주령)의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후 제모가 끝나면 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 그 뒤 1 % DNCB용액 (아세톤 : 올리브오일 = 3 : 1) 200 µl를 등 부위에 도포하였고, 4일 후부터 1주일에 2~3번씩 0.2 % DNCB용액 150 µl를 4주 동안 등 부위에 도포하여 피부염을 유발시켰다. 피부염이 충분히 유발되어 등 부위의 가피가 모두 벗겨지고, 이 부위에 새로운 피부염이 형성되면서 긁는 행동이 심화되면 DNCB 처리를 중단하고, 관능평가를 실시하였다.

#### 3) 관능평가

DNCB를 도포하여 피부염이 유발된 생쥐를 2개의 그룹으로 나누고, 대조군에는 생리식염수를, 실험군에는 YHYBT를 3.8 mg/25 g/day의 농도로 8주간 (12주령에서 20주령까지) 경구 투여하였다. 약물 처리 후 4주 후 (16 주령)에 관능평가를 실시하였는데 NC/Nga 생쥐의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하였다. 육안평가 결과는 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총합으로 나타내었다. 평가 항목은 홍반 (Erythema), 가려움과 건조 피부 (Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종 (Edema & Escoriation), 진무름 (Erosion), 그리고 태선화 (Lichenification)로 나누었다. 이 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였다. 일반적으로 DNCB를 이용해 피부염을 유발할 경우, 약 12-13 점이면 피부염이 최고조에 달했다고 판단하고 있다.

#### 4) 조직 검사

실험 종료 후에 왼쪽 귀 끝부분, 등 쪽 목 부분의 피부와 림프를 떼어내어 10 % para-formaldehyde에서 24시간 동안 고정하였다. 그 조직을 파라핀으로 포맷한 뒤, 5 µm 의 두께로 블록

을 만들었다. 조직 부분을 사용하여 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils/ eosinophil 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline and eosin (H&E) 염색과 비만세포 (mast cells)를 염색하는 toluidine 염색을 시행하여 면역세포들의 침윤을 관찰하였다.

5) 면역화학조직염색

면역화학조직염색 (immunohistochemical stain)은 조직을 블록으로 만들고, 조직을 세절하여 (4 μm) probe-on plus slide (Fisher Scientific, U.S.A)에 부착시켰다. 탈파라핀 (Deparaffinized), 합수의 과정을 거친 뒤 10 mM citrate buffer (pH 6.0)를 이용해 전자레인지에서 15분간 전처리 하였다. 조직 내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 10분간 처리한 후, 조직 내의 항원과의 비특이적 결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시켰다. Rat anti-mouse CD4 (RM4-5; PharMingen, San Diego, CA), rat anti-mouse CCR3 mAb (53-6.7; Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 조직 절편에 각각 1시간 동안 부착시킨 다음 완충액으로 수세하였다. 이후 LSAB kit (ScyTek, U.S.A)를 이용하여 PE-conjugated goat anti-rat IgG (PharMingen)에 30분간 반응시켰다. 3회 tris-buffered saline with 0.1 % Tween-20 (TBST; Dako, Carpinteria, CA)으로 수세한 후 잘 건조하였다. 위상차형광현미경 (Contrast fluorescence microscope, Nikon, Japan)을 사용하여 ×100 배율로 관찰하였다.

6) 유세포 분석

DNCB로 8 주간 발진을 유도한 NC/Nga 생쥐 (20주령)로부터 비장, 림프절, 피부, PBMC를 각각 적출하여 100 mesh로 각각의 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1,700 rpm)하였다. 이를 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 분리된 세포에 ACK 용액 (163 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04 % trypan blue로 염색하여 세포수를 측정하였다. 측정된 비장, 림프절 세포를 5 × 10<sup>5</sup> 세포로 조정한 후 4 °C에서 면역형광염색 (Immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, FITC-anti-CD69를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 세포수를 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute cell number)를 산출하였다.

7) Quantitative real time-PCR

NC/Nga 생쥐의 등 피부 조직을 떼어내어 피부조직 (0.1 g)과 RNazol 500 μl를 넣고 용해될 때까지 분쇄한 뒤 제조사의 지시에 따라 RNA를 분리하였다. 역전사 (reverse transcription) 반응은 total RNA (3 μg)에 2 Unit의 DNase I으로 genomic DNA를 제거한 뒤, 1 mM dNTPs mix, 1 μM random sequence hexanucleotides, 20 Unit RNase inhibitor, 4 mM DTT, Reaction buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.3], 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>)에 200 Unit의 M-MLV Reverse Transcriptase로 37 °C에서 역전사

반응을 시켰다. Quantitative real time PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다. 실험에 사용된 프라이머는 Table 2와 같다. 검출 형광 물질로는 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였으며 primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time PCR의 조건은 다음과 같다; 50 °C에서 2분, 94 °C에서 4분간 반응하여 pre-denaturation 시킨 뒤, 95 °C에서 15초, 60 °C에서 1분간 반응하여 40회 반복 수행하였다. YHYBT 투여군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 표적 유전자의 발현을 표준화하였다.

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

x : starting quantity, y : yield, n : number of cycles, e : efficiency로 계산하여 RQ (relative quantitative)를 측정하였다.

Table 2. Primers used for real time PCR

Mouse CCR3	sence	5' tcaaatgagattgttgggaaat 3'
	anti- sence	5' accgatacagctacagctacagta 3'
Mouse Eotaxin 2	sence	5' tcaagtggcatagatgtggaagaa 3'
	anti- sence	5' tggctctgcaggattttcatg 3'
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)	sence	5' tgcgctctagaaaaacctgcca 3'
	anti- sence	5' gccccaggctcaaagggtg 3'

8) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 평균 ± 표준편차로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석법을 이용하여 결정하였다.

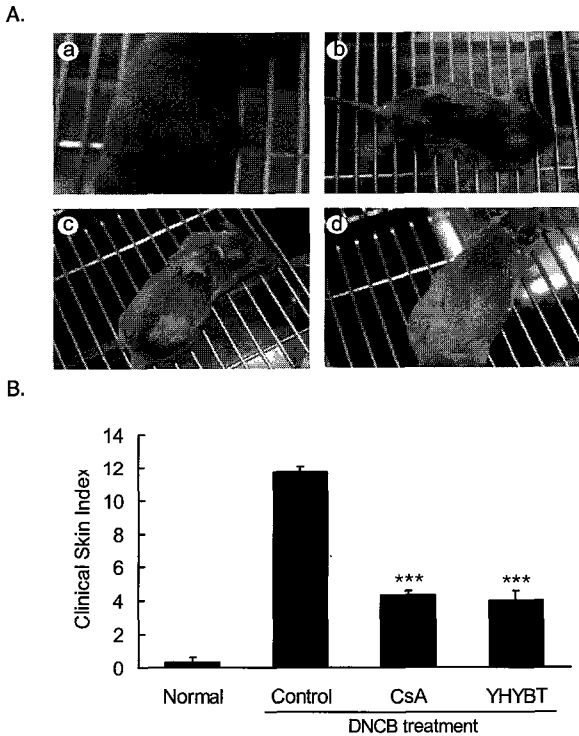
결과 및 고찰

1. YHYBT가 NC/Nga 생쥐에서 유발된 아토피 피부염의 억제에 미치는 효과

NC/Nga 생쥐는 SPF (specific pathogen free) 조건하에서는 정상적인 상태를 유지하지만 일반적인 상황에서는 가려움으로 인한 긁기와 습진성 피부염의 증상이 나타나 홍반과 출혈을 일으키게 되어 부종, 진무름, 찰상, 피부 건조 등의 증상을 나타내어 사람의 아토피 피부염과 유사한 질병이 발병하는 질환 동물 모델이다<sup>4,10,11</sup>). 따라서 본 실험에서는 YHYBT의 아토피 피부염의 억제 작용을 확인하기 위하여 NC/Nga 생쥐를 이용하여 실험을 하였다. 생쥐의 등 피부를 제모하고 DNCB를 1주일간 도포하여 피부염을 유발시키면 가피가 모두 벗겨지고 피부염증이 나타나기 시작하였다(Fig. 1A, a and b). 반면 YHYBT를 매일 3.8 mg/25 g/day의 농도로 경구 투여할 실험군은 대조군에 비해 굵은 행동이 상대적으로 감소하면서 피부염이 현저히 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1A, c and d).

아토피 피부염에 대한 관능 평가에서는 12점까지 증가하였던 피부지수가 약물 투여 후 소양, 건조, 부종, 혈종, 진무름, 태선화 등의 증상이 개선되면서 4점으로 현저하게 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1B). 양성대조군으로는 현재 아토피 피부염의 치료제로 사용하고 있는 cyclosporin A (CsA)를 투여한 결과 4.3

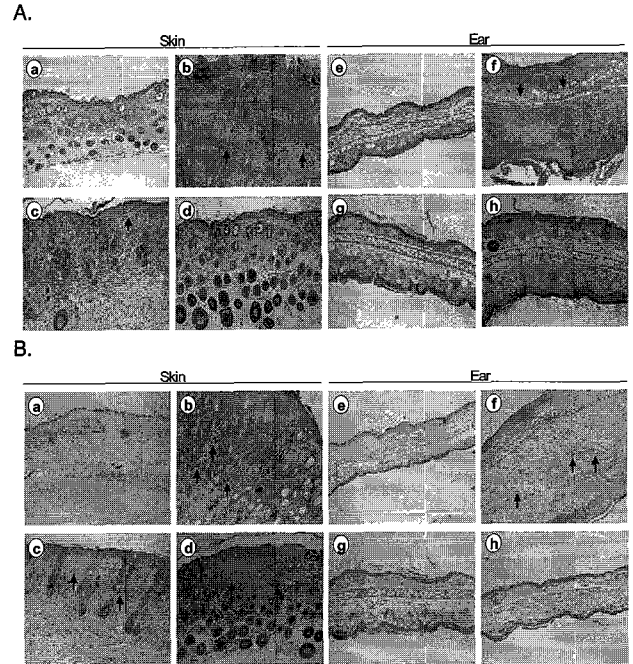
의 피부지수를 나타내었다. 이러한 결과는 YHYBT가 NC/Nga 생쥐에서 자발적으로 발생한 아토피 피부염을 개선시키는 효과가 있음을 시사해주고 있다.



**Fig. 1. Effects of YHYBT on clinical skin features and severity in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice.** (A) Comparison of skin manifestation in NC/Nga mice between control and experimental group. Atopic dermatitis was induced by DNCB treatment in the dorsal skin. a: before the treatment of DNCB, b: DNCB treatment for 1 weeks, c: DNCB treatment for 4 weeks, d: DNCB treatment for 4 weeks with oral administration of YHYBT. (B) Clinical skin index of dermatitis 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 (itch, erythema/hemorrhage, edema, excoriation/erosion and scaling/dryness). Statistically significant values are calculated by comparing with control group by t-test (\*\*\*p<0.001).

**2. YHYBT가 피부와 귀의 조직 변화에 미치는 영향**

아토피 피부염의 특징 중 하나는 T 세포, 비만세포, 호산구와 같은 면역 세포들이 피부에 침윤되어 있으며 epidermis와 dermis가 두꺼워지고 출혈 등이 나타나는 것이다<sup>12)</sup>. YHYBT가 피부조직에 면역세포들의 침윤을 막음으로써 아토피 피부염의 증상을 완화시켰는지 확인해 보기 위하여 피부와 귀 조직을 hematoxylin and eosin (H&E)과 toluidine blue로 염색하였다. Fig. 2A의 b와 f의 H&E 염색에서 보듯이 DNCB를 처리하게 되면 피부와 귀 조직에 백혈구의 침윤이 나타나면서 epidermis와 dermis 부분이 두꺼워진다. 반면 8주 동안 YHYBT를 투여한 실험군에서는 epidermis/dermis의 두께가 감소하고 면역세포들의 침윤이 대조군에 비해 크게 감소한 것을 볼 수 있었다(Fig. 2A, d and h). Toluidine blue 염색에서는 대조군에서 증가하였던 비만세포 (화상표)의 수가 YHYBT에 의해 많이 감소한 것을 볼 수 있어(Fig. 2B), 결과적으로 YHYBT가 면역세포들이 피부로 침윤되는 것을 막음으로써 아토피 피부염에 효과가 있음을 보여주었다.



**Fig. 2. Histologic examination of skin and ear lesion in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice.** The animals were administrated with saline (control) or YHYBT (3.8 mg/25 g/day) for 8 weeks. (A) Skin and ear biopsy were stained with hematoxylin and eosin (H&E) (a and e: normal, b and f: control, c and d: CsA, d and h: YHYBT). Arrows indicate inflammatory cells. (B) Skin and ear biopsy were stained with toluidine blue (a and e: normal, b and f: control, c and d: CsA, d and h: YHYBT). Arrows indicate inflammatory and mast cells. The microscope original magnification was  $\times 100$  (Nikon, Japan).

**3. YHYBT가 T 세포에 미치는 영향**

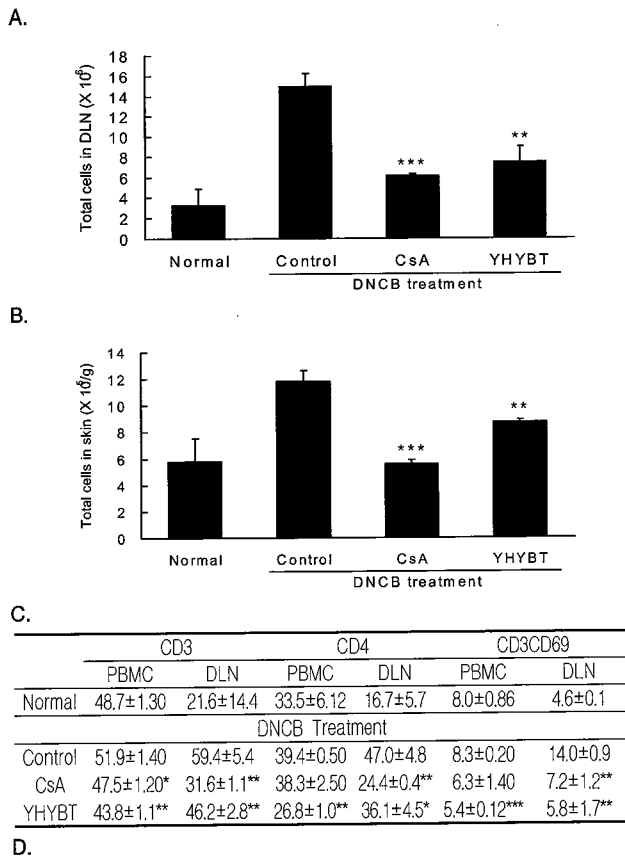
YHYBT의 투여가 면역 세포들을 피부조직으로 침윤되는 것을 막는 작용이 전체적인 면역세포 수를 조절해서 나타난 현상인지 알아보기 위하여 림프절 (DLN)과 피부에 존재하는 면역세포 수를 조사하였다. 정상적인 생쥐의 경우 림프절과 피부에서 각기  $3.3 \times 10^6$ ,  $5.85 \times 10^5$ /g이었던 면역세포 수가 피부염을 유발시키면 각각  $15 \times 10^6$ ,  $11.85 \times 10^5$ /g으로 크게 증가하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 3A and B). 그러나 8주간 YHYBT를 투여하게 되면 면역세포의 수가 림프절에서는 50 % 정도 감소되고, 피부에서는 27 % 정도 감소하는 유의적인 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 3A and 3B).

아토피 피부염은 Th2 세포의 증식과 함께 이들 세포가 IL-4, IL-5, IL-13과 같은 사이토카인을 분비하면서 피부염의 증상을 나타내게 하는 것으로 알려져 있다<sup>13)</sup>. YHYBT가 T 세포의 감소를 통해 아토피 피부염을 억제시키는지 알아보기 위하여 T 세포의 특이표면 단백질인 CD3<sup>14)</sup>를 사용하여 말초혈액단핵세포구 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)와 림프절에 존재하는 T 세포의 수를 조사하였다. Fig. 3C에서 나타난 바와 같이 정상적인 NC/Nga 생쥐에 비해 대조군은 CD3 양성 T 세포의 수가 증가하였으며, YHYBT 투여군에서는 PBMC와 림프절에서 대조군에 비하여 각각 16 %와 23 % 정도의 감소가 일어났다.

T 세포 중에서도 사이토카인을 분비하여 체액성 면역 반응을 조절하는 것으로 알려진 CD4 양성 Th 세포<sup>15)</sup>의 수는 YHYBT에 의해 PBMC 및 림프절에서 각각 32 %, 24 % 정도 감소하는 것으로 나타났다. 특히 활성화된 T 세포를 의미하는 CD3+CD69+

세포<sup>16)</sup>의 수도 PBMC와 림프절에서 대조군에 비해 각각 35 %와 41 % 정도 감소하는 효과를 보여 YHYBT가 주로 T 세포의 수나 활성화를 감소시키는 작용이 있음을 보여주고 있다.

Th 세포의 수가 실제로 피부에서 감소했는지 확인해보기 위해 NC/Nga 생쥐의 피부 조직을 이용하여 CD4에 대한 면역조직화학염색법을 수행하였는데, DNCB로 피부염을 유발한 NC/Nga의 피부 조직에서는 침윤되어있는 CD4+ 세포의 수가 정상에 비해 크게 증가되어있는 것을 볼 수 있는 반면, YHYBT를 경구 투여한 생쥐의 피부 조직에서는 그 수가 크게 감소되어 있는 것을 관찰되어(Fig. 3D) 상기 결과등과 부합되었다.



**Fig. 3. Effect of YHYBT extract on inflammatory cell populations.** The animals were administrated saline or YHYBT for 8 weeks. At the end of the experiment, (A) lymph node or (B) dorsal skin were removed and total cell absolute number was measured by flow cytometer. (C) Isolated cells from PBMC or DLN were stained with anti-CD3, anti-CD4, anti-CD3 and CD69 antibodies, respectively, and absolute cell number was measured by flow cytometer. Values are expressed as mean ± SE. of four mice. Statistically significant value was calculated by comparing with control group by t-test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). (D) Dorsal skin biopsy were stained with PE-rat anti-mouse CD4 mAb. Arrows indicate CD4-positive cells.

**4. YHYBT가 면역조절인자의 발현에 미치는 영향**

IL-4는 대표적인 Th2 사이토카인으로써 알레르기 반응을 유발하며 아토피 피부염을 일으키는 중요한 면역 조절물질로 알려져 있다<sup>17)</sup>. 반면 IFN-γ는 Th1 사이토카인으로 IL-4의 발현을 억제시키며, Th0 세포가 Th1 세포로 분화하게 하는 데 중요한 역할을 하고 있으며 IL-4의 발현을 억제함으로써 T 세포들이 Th2로 분화하지 못하게 한다<sup>18)</sup>. 정상적인 상태에서는 IL-4와 IFN-γ의 발현이 균형을 이루고 있지만 아토피 피부염이 발생하게 되면 IL-4의 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>. 따라서, IL-4의 발현을 낮추고 IFN-γ의 발현을 증가시켜 두 사이토카인의 균형을 이루게 하면 아토피 피부염을 치료할 수 있을 것으로 일반적으로 받아들여지고 있다<sup>19,20)</sup>. 본 실험에서는 YHYBT가 아토피 피부염 질환 모델 생쥐에서 IL-4와 IFN-γ의 발현을 어떻게 조절하는지 확인해보고자 DNCB로 아토피 피부염을 유발시키고 YHYBT를 경구 투여한 NC/Nga 생쥐의 비장세포를 얻은 뒤 여기에 CD3/CD28을 처리하여 활성화된 T 세포가 분비하는 각 사이토카인의 양을 ELISA로 측정하였다.

그 결과 아토피 피부염이 유발된 생쥐의 비장세포는 정상적인 생쥐보다 약 3배 정도 많은 양의 IL-4를 생성하여 1042.5 ± 15.5 pg/ml의 농도를 세포배양액에서 측정할 수 있었으나, YHYBT를 투여하게 되면 17% 정도 감소한 873.2 ± 4.4 (P < 0.001) pg/ml의 발현량을 나타내었다 (Table 2). 반면 YHYBT를 투여한 생쥐의 비장세포가 598.3 ± 0.7 pg/ml의 IFN-γ를 분비하여 대조군의 326.1 ± 8.9 pg/ml에 비해 45% 정도 증가된 발현량을 나타내었다. 이 같은 결과는 YHYBT가 Th 세포에 작용하여 Th2 사이토카인의 발현을 억제시키는 반면 Th1 사이토카인의 발현을 증가시켜 아토피를 조절하는 효과가 있음을 시사해주고 있다.

YHYBT가 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga 생쥐의 eotaxin의 발현을 조절할 수 있는 지 확인해 보기 위해 생쥐의 피부 조직에서 발현된 eotaxin 2의 RNA 양을 real time-PCR을 사용하여 분석하였다. DNCB로 피부염을 유발시킨 생쥐의 피부 조직에 존재하는 mRNA의 양을 기준으로 잡았을 때, YHYBT를 투여하게 되면 eotaxin 2의 발현이 대조군에 비해 62 % 정도 감소하여 유의성 있는 결과를 얻을 수 있었다(Table 2B). 또한 eotaxin 2의 세포 수용체로 알려진 CCR3<sup>21)</sup>의 발현도 YHYBT에 의해 유의적으로 감소하는 것을 알 수 있었다.

**Table 3. Effects of YHYBT on inflammatory mediators**

**A.**

	Normal	Control	CsA	YHYBT
IL-4 (pg/ml)	351.7 ± 18.1	1042.5 ± 15.5	904.3 ± 2.7***	873.2 ± 4.4***
IFN-γ (pg/ml)	170.9 ± 23.0	326.1 ± 8.9	294.0 ± 2.2**	598.3 ± 0.7***

**B.**

	Normal	Control	CsA	YHYBT
Eotaxin2	0.225	1	0.338	0.384
CCR3	0.451	1	0.684	0.887

(A) Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IL-4 and IFN-γ in the culture supernatant were determined using commercially available ELISA kit. Statistically significant value was calculated by comparing with control group by t-test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). (B) Total RNAs from skin were isolated and analyzed the amount of eotaxin2 and CCR3 mRNA with detection of SYBR green intensity by real time PCR. Relative quantitative was calculated by comparing fluorescence intensity of each group with that of control group.

## 결 론

DNCB로 피부염을 유발한 NC/Nga 생쥐 모델을 통해 養血潤膚湯(YHYBT)이 면역세포와 사이토카인에 미치는 영향을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

YHYBT는 DNCB로 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐의 발진, 부종, 가려움, 홍반 등의 병변을 현저하게 감소시켰다. YHYBT는 피부 및 귀 조직에 비만세포를 비롯한 면역세포들의 침윤을 억제하였으며, dermis/epidermis 부위가 대조군에 비하여 조직 부종이 감소하였다. YHYBT는 림프절과 피부의 세포에 존재하는 면역세포들과 PBMC와 림프절에 존재하는 CD3, CD4, CD3CD69 양성세포들의 수도 감소시켰으며, CD4 양성 세포들이 피부로 침윤되는 것을 억제하였다. YHYBT는 IL-4, eotaxin2, CCR3의 생산을 감소시키는 반면, IFN- $\gamma$ 의 발현을 증가시켰다.

이상의 결과들은 養血潤膚湯(YHYBT)이 T 세포의 증식 및 사이토카인의 발현에 영향을 주어 선택적 면역작용을 나타내는 아토피 피부염 치료제로서 가능성을 시사해 주고 있다.

## 감사의 글

본 연구는 산업기술평가원에서 지원하는 지역혁신연구센터 과제인 대전대학교 난치성면역질환 동서생명의학 연구센터 (TBRC, RRC04700, 2005)의 지원에 의해 수행되었음을 밝히며 이에 감사합니다.

## 참고문헌

1. Sampson, H.A. Atopic dermatitis. *Ann Allergy* 69(6):469-479, 1992.
2. Daniels, J. and Harper, J. The epidemiology of atopic dermatitis. *Hosp Med* 63(11):649-652, 2002.
3. Leung, D.Y. and Soter, N.A. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 44(1 Suppl):S1-S12, 2001.
4. Spergel, J.M., Mizoguchi, E., Oettgen, H., Bhan, A.K. and Geha, R.S. Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. *J Clin Invest* 103(8):1103-1111, 1999.
5. Chen, L., Martinez, O., Overbergh, L., Mathieu, C., Prabhakar, B.S. and Chan, L.S. Early up-regulation of Th2 cytokines and late surge of Th1 cytokines in an atopic dermatitis model. *Clin Exp Immunol* 138(3):375-387, 2004.
6. Yawalkar, N., Ugucioni, M., Scharer, J., Braunwalder, J., Karlen, S., Dewald, B., Braathen, L.R. and Baggiolini, M. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 113(1):43-48, 1999.
7. Leung, D.Y. Atopic dermatitis: immunobiology and treatment with immune modulators. *Clin Exp Immunol* 107 Suppl 1: 25-30, 1997.
8. Cooper, K.D. Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy. *J Invest Dermatol* 102(1):128-137, 1994.
9. 이경미. 養血潤膚湯의 免疫調節作用을 통한 항알러지 效能. 대전대학교대학원, 대전, 2007.
10. Vestergaard, C., Yoneyama, H. and Matsushima, K. The NC/Nga mouse: a model for atopic dermatitis. *Mol Med Today* 6(5):209-210, 2000.
11. Heishi, M., Imai, Y., Katayama, H., Hashida, R., Ito, M., Shinagawa, A. and Sugita, Y. Gene expression analysis of atopic dermatitis-like skin lesions induced in NC/Nga mice by mite antigen stimulation under specific pathogen-free conditions. *Int Arch Allergy Immunol* 132(4):355-363, 2003.
12. Robert, C. and Kupper, T.S. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med* 341(24):1817-1828, 1999.
13. Vestergaard, C., Yoneyama, H., Murai, M., Nakamura, K., Tamaki, K., Terashima, Y., Imai, T., Yoshie, O., Irimura, T., Mizutani, H. and Matsushima, K. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest* 104(8):1097-1105, 1999.
14. Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T. and Terhorst, C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 6: 629-662, 1988.
15. van der Heijden, F.L., Wierenga, E.A., Bos, J.D. and Kapsenberg, M.L. High frequency of IL-4-producing CD4+ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. *J Invest Dermatol* 97(3):389-394, 1991.
16. Bieber, T., Rieger, A., Stingl, G., Sander, E., Wanek, P. and Strobel, I. CD69, an early activation antigen on lymphocytes, is constitutively expressed by human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 98(5):771-776, 1992.
17. Renz, H., Jujo, K., Bradley, K.L., Domenico, J., Gelfand, E.W. and Leung, D.Y. Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma. *J Invest Dermatol* 99(4):403-408, 1992.
18. Lester, M.R., Hofer, M.F., Gately, M., Trumble, A. and Leung, D.Y. Down-regulating effects of IL-4 and IL-10 on the IFN-gamma response in atopic dermatitis. *J Immunol* 154(11):6174-6181, 1995.
19. Stevens, S.R., Hanifin, J.M., Hamilton, T., Tofte, S.J. and Cooper, K.D. Long-term effectiveness and safety of recombinant human interferon gamma therapy for atopic dermatitis despite unchanged serum IgE levels. *Arch*

- Dermatol 134(7):799-804, 1998.
20. Schneider, L.C., Baz, Z., Zarcone, C. and Zurakowski, D. Long-term therapy with recombinant interferon-gamma (rIFN-gamma) for atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 80(3):263-268, 1998.
21. Ma, W., Bryce, P.J., Humbles, A.A., Laouini, D., Yalcindag, A., Alenius, H., Friend, D.S., Oettgen, H.C., Gerard, C. and Geha, R.S. CCR3 is essential for skin eosinophilia and airway hyperresponsiveness in a murine model of allergic skin inflammation. *J Clin Invest* 109(5):621-628, 2002.