

三黃洗劑加減方の 항균, 항염 및 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구

원영호 · 심은기 · 안찬근 · 박민철 · 황충연
원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

A Study on the Anti-microbial Activity, Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Samhwangseje gagambang(SHB)

Young-Ho Weon · Eun-Ki Shim · Chan-Gn An · Min-Chul Park · Chung-Yeon Hwang

Herbal mixture water extract of (*Phellodendron amurense*, *Scutellaria baicalensis*, *Sophora flavescens*, *Lithospermum erythrorhizon*, *Mellaphis chinensis*, *Alumite*, *Zanthoxylum schinifolium*, *Glycyrrhiza uralensis*), which exhibit several beneficial effects including acne and skin diseases, was tested for anti-microbial activity and anti-inflammation effects. The herbal mixture extract showed antimicrobial activity against *Stapylococcus epidermis*, *Propionibacterium acne*, and *Malassezia furfur*. The growth of *Stapylococcus epidermis*, *Propionibacterium acne*, and *Malassezia furfur* was inhibited completely by addition of 1.0% of the extract. Also in the present study we examined the mixture extract on compound 48/80 induced allergy and LPS induced cyclooxygenase-2(COX-2)gene expression in RAW24.7macrophage. The results indicated the ear swelling and histamine release induced by compound 48/80 were dose-dependently reduced, ranging 11-38% and 11-56%, respectively. Furthermore the extract inhibited the expression of LPS-induced COX-2 proteins and mRNAs without an appreciable cytotoxic effects on RAW264.7 cells. The cytotoxicity of the extract using MTT assay showed the cytotoxicity of 7 and 18% against L929 cell line. Based on these results, it is concluded that the herbal mixture water extract can be applied to the acne and skin diseases therapy

Key words : Anti-microbial activity, Anti-inflammation effect, Skin disease, Herbal mixture extract

서론

三黃洗劑는 <外傷科學>에서 각종 無滲出性 皮膚

炎과 滲出性 皮膚癢痒症등에 사용되는 처방으로¹⁾. 三黃洗劑는 <外傷科學>에서 각종 無滲出性 皮膚炎과 滲出性 皮膚癢痒症등에 사용되는 처방으로¹⁾. 大黃, 黃柏, 黃芩, 苦參으로 구성되어 있으며 이후에도 黃水瘡, 赤白遊風, 乳癩 등의 병증에 外治藥으로 다용되는 처방이다²⁾.

교신저자: 황충연, 원광대학교 부속광주한방병원
안이비인후피부과교실
(Tel: 062-670-6434 E-mail: hwangida@wonkwang.ac.kr)

免疫은 <素問·上古天真論>³⁾에 '恬淡虛無 眞氣從之 精神內守 病安從來'라 하였고 <素問·刺法論>³⁾에서 '正氣存內, 邪不可干'이라 하여 正氣는 장부의 기능활동을 정상적으로 유지케 함으로써 病邪에 대해 抗病力을 갖는 抵抗力을, 邪氣는 질병을 일으키는 각종의 발병요인을 말하는 것으로 이러한 正邪間의 相爭으로 설명할 수 있다⁴⁾. 炎症反應은 正邪鬭爭의 결과로 체내에 나타나는 病理的 현상중의 하나로, 疾病의 發生 및 進行은 正邪抗爭의 과정이다^{5,6)}.

인체가 항원과 반응하는 데에는 면역과 과민성이 있는데 항원에 대한 감수성이 낮아서 질병이 생기지 않는 경우를 면역이라 하고 반응능력이 비정상적으로 증가되어 과민한 증상을 일으키는 경우를 알레르기라고 한다⁷⁾. 염증은 손상에 대한 살아있는 조직의 반응으로 염증반응은 면역계를 동원하는 생체의 방어와 치유에 핵심적인 역할을 하고 있을 뿐 아니라 많은 질병의 병리발생에 관련되어 있는 대단히 중요한 과정이다. 염증을 일으키는 원인은 무수히 많으나 세균, 진균, 바이러스와 같은 생물성 원인도 그 중 하나이다⁸⁾.

염증의 원인균으로는 일반적인 피부상재균 중 피부에 염증을 유발할 수 있는 *Staphylococcus aureus*와 병원성이 낮지만 친지방성 이상성 진균으로 정상피부의 모낭주위에서 발견되는 *Malassezia furfur*, 여드름 유발에 관여하는 *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermis* 등을 들 수 있다^{9,12)}. 따라서 염증의 치료 및 예방을 위해서 원인균에 대한 항균 작용을 갖는 약제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

항균력에 대한 한의학적 연구를 살펴보면 홍¹³⁾은 淸上防風湯加味로, 노¹⁴⁾는 苦蔘추출물로 *P. acnes*에 대한 항균효과를, 조¹⁵⁾는 淸上防風湯 및 구성약물로 *S. aureus*에 대한 항균효과를, 김¹⁶⁾은 大蒜으로 *C. albicans*에 대한 항균효과를, 박¹⁷⁾은 94종의 한약추출물로 6종의 균주에 미치는 항균효과를 연구하였다. 항알레르기 효과에 관한 연구는 이 등의 消風散 加味の 항알레르기 효과에 관한 실험적 연구¹⁸⁾, 정

등의 레밀 추출물의 항알레르기 반응에 대한 실험적 연구¹⁹⁾, 양 등의 葛根湯과 加味葛根湯의 항알레르기 및 消炎, 解熱, 鎮痛作用에 대한 실험적 연구²⁰⁾ 노 등의 數種의 韓藥 추출물이 항알레르기 반응에 미치는 영향²¹⁾ 등이 있었다.

저자는 外治藥으로 多用되는 三黃洗劑에 瀉火解毒 淸熱燥濕 疏散風熱의 효능이 있어^{22,24)} 內服藥과 外治藥으로 피부과 질환에 多用하는 紫草, 五倍子, 明礬, 花椒, 甘草를 加味하여 여드름 및 여러 염증성 피부질환의 원인균으로 알려진 *S. aureus*, *M. furfur*, *P. acnes*, *S. epidermis*에 대한 항균력을 평가하고, 아낙필락시에 미치는 영향을 알아보기 위해 Compound 48/80으로 알레르기를 유도한 후 히스타민의 방출량과 비만세포의 부유량을 비교하고 수동 피부 과민(Passive Cutaneous Anaphylaxis)반응을 유도하여 항알레르기 효과를 검증하고 Cyclooxygenase-2 활성에 미치는 영향으로 항염증 효과를 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 사용균주

사용한 균주는 *Staphylococcus epidermis* KCTC 1917, *Staphylococcus aureus* KCTC 1928, *Malassezia furfur* KCTC 7743, *Propionibacterium acnes* KCTC 3320으로서 한국유전자은행에서 분양 받아 사용하였다.

2. 실험동물

사용된 동물은 대한실험동물센터(대전)에서 구입한 Sprague-Dawley계 흰쥐 및 ICR계 mouse를 실험에 사용할 때까지 온도 22±2℃, 상대습도 55±5%로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 사육하였다.

3. 시약 및 배지

Compound 48/80, Anti-dinitrophenyl(DNP) IgE, DNP-Human serum albumin(HSA), Metrizamide, 및 o-phthaldialdehyde(OPA)는 Sigma사 제품을 사용하였다. α-minimal essential medium, Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Fetal bovine serum은 Gibco BRL사 제품을 사용하였다.

항균성 실험에 사용된 배지 중 nutrient broth, yeast-malt broth는 Difco(USA)에서 Actinomyces broth는 BBL(USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 사용된 시약은 Duksan(korea)에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial experiments

Strains	Media
<i>Staphylococcus epidermis</i> KCTC 1917	Nutrient broth
<i>Malassezia furfur</i> KCTC 7743	Yeast-malt broth
<i>Propionibacterium acnes</i> KCTC 3320	Actinomyces broth
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1928	Nutrient broth

Table 2. Composition of Nutrient broth(NB).

Components	contents
Beef extracts	3.0g
Peptone	5.0g
Distilled water	1L
pH	6.8±0.2

Table 3. Composition of Yeast-malt broth(YMB).

Components	contents
Yeast extracts	3.0g
Malt extracts	3.0g
Peptone	5.0g
Dextrose	10.0g
Olive oil	1%
Distilled water	1L
pH	6.2±0.2

Table 4. Composition of actinomyces broth.

Components	contents
Potassium phosphate	15.0g
Ammonium sulfate	1.0g
Magnesium sulfate	0.2g
Calcium chloride	0.01g
Infusion broth	25.0g
Dextrose	5.0g
L-cysteine · HCl	1.0g
Pancreatic digest of casein	4.0g
Yeast extract	5.0g
Soluble starch	10.0g
Distilled water	1L
pH	6.9±0.2

4. 사용 약재

실험에 사용된 三黃洗劑加減方의 처방내용은 다음과 같다. 黃柏, 黃芩, 苦蔘, 紫草, 五倍子, 明礬, 花椒, 甘草 (各 30g)

Table 5. Prescription of Sarnhwangseje gagambang (SHB)

Herb	Scientific Name	Dose(g)
黃 柏	<i>Phellodendron amurense</i>	30 g
黃 金	<i>Scutellaria baikalensis</i>	30 g
苦 蔘	<i>Sophora flavescens</i>	30 g
紫 草	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	30 g
五倍子	<i>Mellaphis chinensis</i>	30 g
明 礬	Alumite	30 g
花 椒	<i>Zanthoxylum schinifolium</i>	30 g
甘 草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	30 g
total		240 g

5. 추출 및 샘플 제조

본 실험에 사용된 한약재는 원광대학교 광주한방병원에서 구입하였으며 건조된 상태였다.

샘플의 제조는 증탕가열을 통한 열수 추출법을 사용하였으며 이때의 추출 조건은 90℃, 90분이었다. 추출된 물질은 원심분리기(Hanil, Korea)를 이용 8,000rpm에서 10분 동안 2회 행하여 이물질을 제거하였으며 0.45µm 여과지(ADVANTEC, USA)로 필터

한 후 rotary evaporator(EYELA, Japan)를 이용하여 농축하였다. 그 후 농축액을 동결건조기(Ilshin, Korea)를 이용 분말을 회수, 4℃ 냉장고에 보관하면서 실험을 행하였다. 실험에 사용 시 샘플내의 미생물을 완전 제거하기 위해 autoclave(121℃, 15분)에서 멸균을 행하였다.

6. Agar diffusion법에 의한 SHB의 항균활성 측정

항균활성 검사는 Agar diffusion법을 이용하였으며 사용된 방법은 다음과 같다. 각기 균이 성장할 수 있는 고체 배지를 제조하고 그 위에 미생물 배양액 100 μ l를 도말하였다. 10분 동안 배지의 표면을 건조한 후, 배지위에 직경 10mm의 paper disk를 올려놓고 추출 샘플을 10%, 1% (w/v)로 희석한 용액 50 μ l씩을 적용하였다. 37℃로 고정된 배양조에서 보관하면서 paper disk 주위에서 미생물이 성장하지 않는 clear zone의 직경을 확인하여 항균활성을 비교하였다.

7. 균에 대한 SHB의 성장억제효과

SHB 분말을 함유한 배지(1.0%, 0.5%, 0.1%, w/v)를 제조한 후 여드름 균인 *Propionibacterium acnes*와 피부에 염증을 일으키는 주요균인 *Staphylococcus aureus* 배양액을 액체 배지에 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFU/ml이 되게 첨가한 후 37℃에서 진탕배양하면서 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 증류수로 적정 희석하여 600nm에서 OD값을 측정하여 균의 성장을 확인하였다.

8. 귀 부종 반응 실험 방법

Compound 48/80 비투여군(control), Compound 48/80 투여군(C48/80), 그리고 SHB 투여군은 SHB 100mg/ml 도포군, SHB 10mg/ml 도포군, SHB 1mg/ml 도포군으로 균을 나누어서 각 군당 생쥐 3마리씩 사용하였다.

Compound 48/80을 0.5%의 비율로 생리식염수에

무균적으로 희석하였다. SHB를 100mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml의 농도로 희석하여 생쥐의 귀 등쪽면과 안쪽면 모두 약간 흘러내릴 정도로 충분한 양을 발라주었다. 한약재 도포 40분 후, ether로 마취한 생쥐의 양쪽 귀 등쪽면에 microsyringe를 사용하여 희석한 Compound 48/80을 20 μ l씩(100 μ g/site) 각각 피내주사를 실시하였다. control군은 Compound 48/80 대신에 생리식염수를 20 μ l 피내주사하였다. 주사 40분 후 다시 ether로 마취하여 digimatic micrometer(Mitutoyo, Japan)를 이용하여 귀 두께를 측정하였다.

9. Alcian blue-NFR 염색 방법

귀 두께 측정 후 바로 귀를 절단하여 10% paraformaldehyde에 귀조직을 담아서 4℃에 보관하였다. 24시간 후 30%, 50%, 70%, 90%, 95%, 100% ethanol에 차례로 귀조직을 담아서 탈수를 하였다. xylene 처리 후 파라핀에 조직을 담아서 24시간 동안 52℃ incubator에 보관하여 잔여 xylene이 모두 증발하도록 하였다. 귀조직을 임베딩 틀에 고정하여 파라핀이 충분히 굳은 후에 조직을 8 μ m로 절편하여 슬라이드 글라스에 붙여서 37℃에서 24시간 동안 두어 조직이 슬라이드 글라스에 완전히 접착되도록 하였다. 슬라이드 글라스를 xylene에 담겨 파라핀을 녹인 후, 100%, 95%, 90%, 70%, 50%, 30%의 ethanol로 재수화시켜 염색을 실시하였다. 먼저 alcian blue로 40분 염색 후 증류수로 세척하고 NFR(nuclear fast red)로 2분 염색하여 증류수로 세척 후 커버글라스를 덮어서 현미경으로 관찰하였다.

10. 흰쥐 복강 비만세포(Rat Peritoneal Mast Cells, RPMC)의 분리

Kanemoto 등²⁵⁾의 방법에 따라 분리하였다. 즉 흰쥐를 에테르로 마취시킨 후 Tyrode buffer B (137mM NaCl, 12mM NaHCO₃, 2.7mM KCl, 0.3mM NaH₂PO₄, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 5.6mM dextrose, 0.1% bovine serum albumin) 20ml를 복강 내에 주입

하고 복벽을 마사지 하였다. 복벽 증양선을 절개하고 pasteur pipette로 복강 세척액을 채취하여 원심분리 (150×g, 10분)하였다. 상층액을 제거한 후 비만세포 부유액을 Tyrode buffer B에 재부유시켰다. 세포 부유액 중 비만세포는 Yurt 등²⁶⁾의 방법으로 정제하였다. 즉 Tyrode buffer B 1ml에 재부유시킨 비만세포 부유액을 22.5% metrizamide(0.225g/ml)(density 1.120g/ml; Sigma) 2ml에 가하여 원심분리(400×g, 15분)하였다. 완충액과 metrizamide의 접촉면에 남아있는 세포는 수집하여 제거하고, Tyrode buffer B 1ml에 재부유시킨 후 이 과정을 반복하여 비만세포는 toluidine blue 염색으로 확인시 순도 95%가 되도록 하였다.

11. 복강 비만세포(RPMC)에서의 히스타민 (Histamine) 유리실험

비만세포 현탁액(1×10^6 cells/ml)은 Compound 48/80을 처리하기 전 안정을 위해서 37도씨에서 10분간 안정화시킨 후, SHB를 0.01, 0.1, 1mg/ml 처리후 20분간 배양하고, Compound 48/80($5 \mu\text{g/ml}$)처리 후 15분 배양하였다. 히스타민 유리반응은 튜브를 얼음에 넣어서 반응을 중지하고, 4°C, 400×g 5분 동안 원심분리하여 상층액과 pellet으로 분리하였다.

히스타민은 Shore 등²⁷⁾방법에 따라 정량하였다. 즉 에펜돌프 튜브에 시료 $500 \mu\text{l}$ 를 취하여 0.1M HCl $450 \mu\text{l}$ 와 60% 과염소산 용액 $50 \mu\text{l}$ 를 혼합한 후 원심분리 400×g, 20분간 하였다. 그 상층액을 $800 \mu\text{l}$ 를 취해 5M NaOH 용액 $500 \mu\text{l}$, 증류수 3ml, n-butanol 10ml 및 NaCl 1.2g을 혼합한 시험관에 넣고 진탕 후 원심분리 500×g, 10분간 하였다. Butanol층 8ml를 취해 0.1M HCl 3ml, n-heptane 10ml를 가하여 진탕 후 원심분리 500Xg, 10분간 하였다. 여기에서 얻어진 수층 2ml 에 1M NaOH 용액 $400 \mu\text{l}$ 와 1% o-phthalaldehyde 용액 $100 \mu\text{l}$ 를 가하고 37°C 항온수조에서 3분간 반응시켰다. 3M HCl 용액 $200 \mu\text{l}$ 를 가한 다음 $\lambda_{ex} = 353\text{nm}$, $\lambda_{em} = 438\text{nm}$ 에서

spectrofluorometer로 상대형광강도를 측정하여 정량하였다.

히스타민 방출 억제율은 다음의 방식으로 계산한다.

% inhibition =

$$\left\{ \frac{\text{SHB가 처리 안된 비만세포의 히스타민 유리 측정값} - \text{SHB가 처리된 비만세포의 히스타민 유리 측정값}}{\text{SHB가 처리 안된 비만세포의 히스타민 유리 측정값}} \right\} \times 100$$

12. mouse에서의 Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA, 수동 피부 과민) 실험.

Kawabata 등²⁸⁾의 방법에 따라 실험하였다. 즉 ICR계 mouse의 등쪽 털을 제모 후, anti-DNP IgE 100ng을 생쥐의 등에 3부위에 피내주사하여 감작시켰다. 주사한 부위는 유성펜으로 표시하였다. 48시간 후에 anti-DNP IgE로 감작시킨 비만 세포를 DNP-HSA로 탈감작시키기 1 시간 전에 SHB를 1, 10, 100mg/ml 피부에 도포하여 처리하였다. 꼬리 정맥에 DNP-HSA(1mg/ml in PBS)와 Evan blue(4%) 16mg을 1:1($200 \mu\text{l}$)로 혼합하여 주사하여 항원 항체 반응을 야기시키고, 30분 후에 치사시켰다. Evans Blue로 염색된 처음 표시한 피부 부위 적출하여 1M KOH 1ml를 가하여 37°C로 20시간 incubation시켜 조직을 완전히 용해하였다. 1.2N H₃PO₄ 0.7ml를 가하여 용액을 중화시킨 후 3.3ml의 acetone을 가하고 교반하여 조직을 침전시켰다.

Refrigerated centrifuge로 2°C에서 400Xg에서 25분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상층액을 Katayama 등²⁹⁾의 방법에 따라 spectrofluorometer로 620nm에서 흡광도를 측정함으로써 조직내의 Evans Blue의 양을 정량하였다.

13. 세포배양

13-1 항염증실험

대식세포주인 RAW 264.7(monocyte)는 Korean Cell Line Bank(KCLB)로 구입하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 100unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지를 사용하며, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

13-2 세포독성실험

생쥐 섬유모세포의 일종인 L929 세포주를 사용하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 100unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지를 사용하며, 37°C, 5% CO₂로 조정된 배양기내에서 배양하며, 배양액은 3일마다 교환한다. 배양된 세포는 1× trypsin-EDTA로 부유시킨 후 0.4% trypan blue로 염색하여 혈구계측기(Hemocytometer)로 세포수를 계산한다. 세포독성 시험은 배양된 세포를 96 well plate에 5×10³ cell/well이 되도록 세포 부유액을 120 μl씩 분주하여 배양한 후 실험에 사용한다.

14. Western Blot of COX-2

RAW 264.7(1×10⁶ cell)를 60mm plate에서 배양한 후 LPS(1μg/ml)를 처리한 후 SHB 50, 100, 200ppm을 24시간 처리한다. 24시간 처리 후 배양액을 제거하고 세포를 lysis bufer(RIPA buffer에 protease inhibitors(10 μg/ml Leupeptin, 1 mM AEBSF, 10 μg/ml, Aprotinin, 10 μg/ml Pepstatin A)와 phosphatase inhibitor(Na₃VO₄) 처리하고, cell scraper로 세포를 모은 후, 얼음에서 30분간 반응 후, 4°C, 12000rpm에서 원심분리하여, 상층액을 따서 BCA 방법으로 단백질 정량을 한다. 10% SDS-PAGE gel에 각 샘플 30μg의 단백질을 전기영동한다. 전기영동 후 NC membrane에 transfer한다. transfer된 NC membrane에 primary

antibody COX-2 (No-160116, Cayman Chem.)로 12시간 incubation한다. secondary Ab (1:2000)로 1시간 30분-2 시간 동안 incubation 한다. ECL 방법으로 COX-2 band를 detection한다.

15. SHB 처리능도 및 시간별 처리

SHB를 처리 당일 FBS가 첨가되지 않은 DMEM과 DMEM에 희석하여 처리농도별로 사용한다. 처리농도는 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm로 처리하고, 처리시간은 24시간으로 실시하였다.

16. MTT 정량

Mosmann³⁰⁾의 방법에 따라 배양한 세포주를 각각 5×10³ cell/ml이 되도록 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 이들 세포를 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm 농도의 SHB가 포함된 배양액에서 24시간 배양 후 MTT 200μl/ml 가 포함된 배양액을 well 당 200μl씩 넣은 후 다시 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 DMSO를 100μl/well씩을 넣어 5분간 실온에 방치하며 Formazan을 용해한 후 microplate Reader로 흡광도 570nm에서 측정한다.

17. 통계학적 분석

통계학적 유의성 검정은 one-way ANOVA (Analysis of Variance) 방법을 사용하였으며, 유의수준 p<0.05 의 범위내에서 그 결과들은 평균에 대한 표준 편차로 나타낸다.

실험 결과

1. Agar diffusion법에 의한 항균성 검사

여드름 균 및 염증 세균에 대한 SHB의 항균력을 측정하기 위해 한천평판법(agar diffusion method)을

사용하였다. 지수성장기의 중간단계에서 있는 미생물 배양액 100 μ l를 한천배지에 도말하고 10분 동안 표면을 건조시켰다. 그 후 paper disk를 위치시키고 SHB 1%, 10% 용액 50 μ l를 각각 흡수 시킨 후 37 $^{\circ}$ C에서 12~24시간 배양 후, 그 저지환을 측정하였다. 여드름균인 *S. epidermis*, *S. aureus*, *M. furfur*, *P. acnes*를 이용하여 항균활성 검증결과 Fig. 1과 같다. SHB를 1% 첨가하였을 시 *S. epidermis*, *P. acnes*, *M. furfur*등 여드름에 관련된 3균 모두에 대해서 10~11mm 정도의 항균 활성을 보였으며, 10% 고농도 처리 시 저지환의 크기가 증가하였으며 그때의 저지환의 직경은 13~16mm정도로서 비교적 높은 항균활성을 나타내었다. 또한 피부 염증 세균인 *S. aureus*의 경우 10% 농도 첨가시 저지환의 크기는 15mm 정도로 관찰되었는데 이는 SHB가 균에 대해서도 높은 항균효과를 나타낸다는 것을 의미한다. 각 균주에 대한 저지환의 직경을 측정하여 Table 6에 나타내었다.

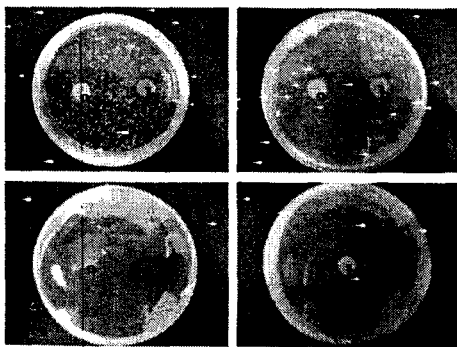


Fig. 1. Antimicrobial activity of SHB extracts against various microbials.
A: *S. epidermis* B: *M. furfur* C: *P. acnes* D: *S. aureus*
a. 1% SHB b. 10% SHB

Table 6. Antimicrobial activity of 10% SHB against various microbials.

Strains	Clear zone
<i>S. epidermis</i>	13 \pm 0.4
<i>M. furfur</i>	13 \pm 0.3
<i>P. acnes</i>	16 \pm 0.3
<i>S. aureus</i>	15 \pm 0.3

2. SHB가 *P. acnes*의 성장에 미치는 영향

일반적으로 *P. acnes*가 여드름을 유발하는 대표적인 균이라고 알려져 있으며 다양한 물질들을 사용하여 여드름의 치료 및 예방에 적용하고 있지만 항균활성에 대한 객관적인 자료들이 미비한 실정이다. 본 실험에서 SHB를 이용하여 agar diffusion법을 통해 SHB의 *P. acnes*에 대한 항균활성을 실험한 결과 항균활성이 나타났으므로 이를 직접 배양배지에 적용 균의 성장에 미치는 SHB의 영향을 알아보고자 하였다.

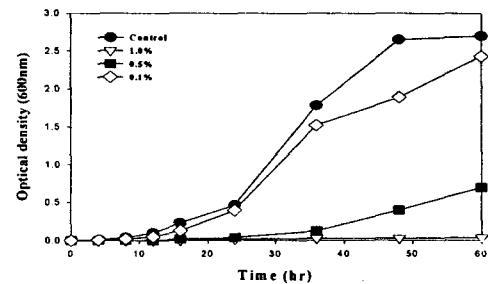


Fig. 2. Effects of SHB extracts for *P. acnes* growth with various concentration.

Fig. 2는 SHB가 *P. acnes*의 성장에 미치는 영향을 시간대별로 OD값을 측정 조사한 것이다. 그림에 보듯이 SHB를 0.1%~1.0%(w/v)까지 *P. acnes* 배양배지에 첨가하여 1×10^5 cfu/ml가 되게 균을 접종하였다. SHB를 함유하고 있지 않은 배지의 경우 균의 유도기는 14시간이었으며 그 후 급격한 균체량의 증가를 나타내는 대수 증식기에 들어갔다. 48시간이 지난 후 균은 정지기에 들어감을 관찰할 수 있었다. SHB 0.1%(w/v)를 첨가한 배지의 경우 SHB를 함유하지 않은 배지의 *P. acnes*의 성장속도를 늦추어 주었지만 균 성장을 억제하지는 못하였다. 그렇지만 0.5% SHB 첨가 배지 경우 24시간까지 균의 성장을 억제해 주었으며 그 후로도 균의 성장을 지속적으로 감소해주는 효과를 나타내었다. SHB 1.0%를 함유한 배지의 경우 균의 성장이 전혀 관찰되지 않았

다. 이는 SHB는 1.0%이상의 조건에서 *P. acnes*의 성장을 억제하며 균의 사멸을 유도한다고 생각된다.

3. SHB가 *S. aureus*의 성장에 미치는 영향

*S. aureus*는 아토피 피부염에서 흔히 집락을 형성하고 아토피 피부염의 중증도와 관계가 있다고 보고되고 있으므로 일반적으로 화학적인 살균제뿐만 아니라 항생제를 사용하여 그 균체수를 줄이거나 사멸시키는데 초점이 맞추어져 있다. 그렇지만 대부분 항생제에 대한 내성과 화학적 살균제의 세포독성 때문에 새로운 형태의 항 미생물제가 필요한 실정이다. 그러므로 본 실험에서 SHB를 이용하여 상기 균에 대한 항균 효과를 알아보하고자 하였다.

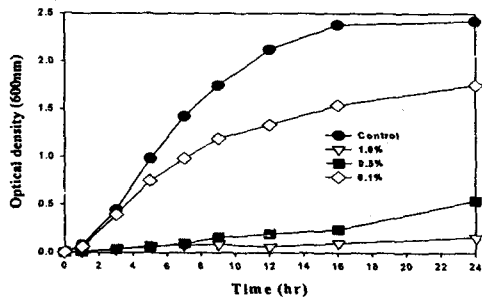


Fig. 3. Effects of SHB for *S. aureus* growth with various concentration.

Fig. 3은 SHB가 *S. aureus*의 성장에 미치는 영향을 시간대별로 OD값을 측정하여 조사한 것이다. *S. aureus*는 실험에 사용한 다른 미생물에 비해 성장속도가 빠르다는 것을 알 수 있으며 1×10^6 cfu/ml 접종 시 1시간 유도기를 거쳐 12시간 후 까지 대수 증식기를 나타냈다. SHB가 0.1%~1.0% 첨가된 배지의 경우 *P. acnes*의 성장과 비슷한 경향을 나타내고 있는데 SHB가 0.1% 첨가된 배지에서의 경우 초기 균의 성장을 억제할 수 없었지만 시간의 경과에 따라 약하게 균의 성장을 지속적으로 억제함으로써 최종적인 균체량을 감소시킴을 확인 할 수 있었다. 이러한 현상은 SHB의 농도가 증가함으로써 더 뚜렷하게 관찰되는데 SHB 0.5%가 첨가된 배지의 경우 16시

간까지 미생물 증식을 억제하였다. SHB 1.0%를 첨가한 배지의 경우 미생물이 일부 성장하는 경향을 나타내고 있지만 배양 후 24시간까지도 특이적 성장이 관찰되지 않았다. 이는 SHB에 의해 미생물의 성장이 억제된다는 것을 의미하며 고농도의 SHB 처리 시 *S. aureus*의 성장을 완전 억제할 수 있다는 것을 말해준다.

4. 귀 부종 반응 실험 결과

생리식염수를 투여한 control군이 0.145 ± 0.008 mm, Compound 48/80만 투여한 C48/80군이 0.405 ± 0.073 mm의 귀두께를 나타내었다. Compound 48/80에 의해 유발된 귀부종에 대한 SHB의 농도별 억제효과를 digimatic micrometer로 측정된 결과, SHB 100mg/ml 도포군이 0.306 ± 0.046 mm, SHB 10mg/ml 도포군이 0.312 ± 0.030 mm, SHB 1mg/ml 도포군이 0.375 ± 0.040 mm를 각각 나타내었다(Table 7, Fig 4). 귀부종에 대한 농도별 억제효과를 백분율로 환산하면 SHB 100mg/ml가 38.08%, SHB 10mg/ml가 35.77%, SHB 1mg/ml가 11.54%의 억제효과를 각각 나타내었다(Table 7).

Table 7. Effect of topical application of SHB on ear swelling response in mice.

	control	SHB 100mg/ml	SHB 10mg/ml	SHB 1mg/ml	C48/80
귀두께 (mm)	0.145 ± 0.008	0.306 ± 0.046	0.312 ± 0.030	0.375 ± 0.040	0.405 ± 0.073
억제율 (%)	-	38.08	35.77	11.54	-

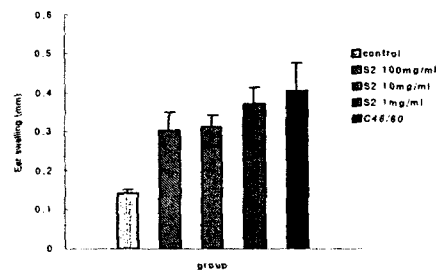


Fig. 4. Effect of SHB on compound 48/80 induced ear swelling response in mice.

5. 귀조직 염색 결과

모든 생쥐의 귀를 주사부위에서 절제하여 조직검사를 실시한 결과, control군에 비하여 C48/80군의 비만세포의 수가 다소 많았으며 SHB 100mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml 도포군에서는 C48/80군에 비하여 비만세포의 수가 감소하는 경향을 보였다. 또한 alcian blue에 의해 염색되는 비만세포 세포질의 과립이 SHB 도포군에서 더 크게 관찰되는 것으로 보아 SHB가 Compound 48/80에 의해 유발되는 비만세포의 탈과립을 억제하였다고 생각된다(Fig 5.)

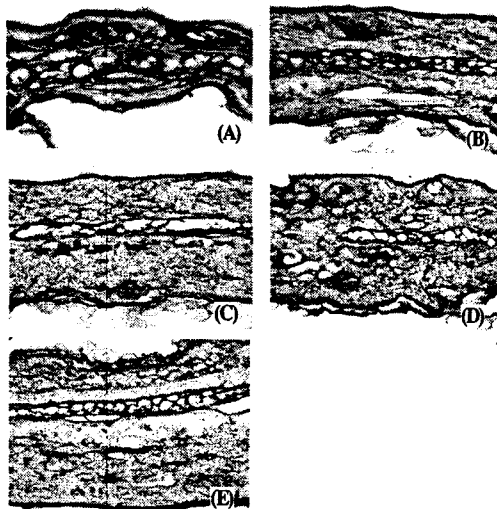


Fig. 5. The photographs of alcian blue and nuclear fast red stained ear tissue undergone ear swelling response by normal saline in SHB untreated mice (A) and compound 48/80 in SHB 100mg/ml treated mice (B), SHB 10mg/ml treated mice (C), SHB 1mg/ml treated mice (D) and SHB untreated mice (E).

6. 비만세포의 히스타민 유리에 미치는 SHB의 효과

흰쥐의 복강 비만세포에 미치는 SHB의 효과를 검토하기 위하여 Compound 48/80을 투여하기 20분 전에 SHB를 0.01, 0.1, 1mg/ml의 농도로 처리하였다. Table 8. 에서와 같이 SHB는 비만세포에서

Compound 48/80에 의한 히스타민의 유리를 농도 의존적으로 억제하였으며, 1mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다. 농도별 히스타민 억제율은 0.01, 0.1mg/ml에서는 11%, 33%의 억제 효과를 나타내었으며, 1mg/ml에서는 56%의 억제율이 나타내었다(Fig 6.).

Table 8. Effects SHB on compound 48/80-induced histamine release from RPMC. Each datum represents the mean±S.E. of three independent experiments.

SHB treatment (mg/ml)	Compound 48/80 (5µg/ml)	Amount of histamine (µg/ml)
None (saline)	+	0.425±0.039
0.01	+	0.378±0.029
0.1	+	0.285±0.019
1	+	0.190±0.016

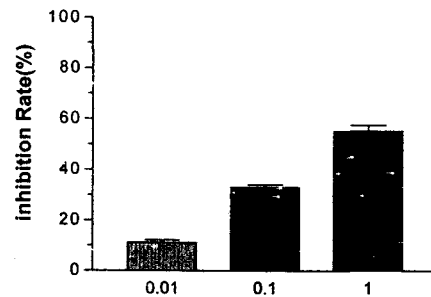


Fig. 6. The effect of SHB on compound 48/80-mediated histamine release from RPMC. Each data point represents the mean±S.E. of three experiment.

7. 수동 피부 아나필락시(PCA) 반응에 대한 SHB의 효과.

PCA 반응에 미치는 SHB의 효과를 검토하기 위하여 DNP-HSA와 Evans blue의 혼합액을 투여하기 1시간 전에 SHB를 1, 10, 100mg/ml의 농도로 피부에 도포하여 처리하였다. Table 9. 에서와 같이 수동 피부 아나필락시 반응은 S2 농도 의존적으로 억제 되었으며, 특히 100mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다.

Table 9. Effect of SHB on the 48 hr PCA. Each datum represents the mean±S.E. of three independent experiments.

SHB treatment (mg/ml)	Anti-DNP IgE plus DNP-HSA	Amount of dye (μg/site)
None (saline)	+	3.519±0.298
1	+	2.268±0.232
10	+	1.718±0.138
100	+	0.738±0.079

8. RAW 264.7 세포에서 COX-2의 발현에 대한 SHB의 효과

LPS(1μg/ml)를 사용하여 대식세포주인 RAW 264.7(1×10⁶ cell)의 COX-2 활성을 유도한 모델에서 SHB를 50, 100, 200ppm 농도로 24시간 처리하여 COX-2 발현 정도를 Western Blot 수행하여 분석하였다. LPS 단독 처리군에 비해 SHB를 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. Fig 7.에서 같이 100ppm을 처리한 군에서 25% 정도 발현 억제 효과가 나타남을 확인하였고, 200ppm에서는 55% 정도의 COX-2 발현 억제 효과가 있는 것으로 나타났었다.

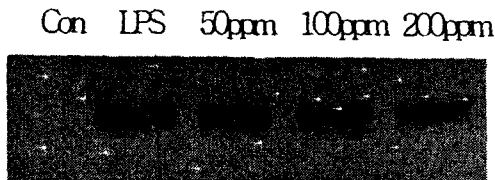


Fig. 7. Effects on COX-2 expression from LPS-induced RAW 264.7 cells(Western blot). The same amount of protein(30μg) was loaded in each lane.

9. MTT 정량에 의한 세포생존률 측정

MTT 정량방법을 이용하여 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000ppm 농도의 SHB 을 포함한 배양액에서 L929 세포를 24시간 배양 후 세포증식률을 측정하여 대조군과 비교하였다(Fig. 8). SHB가 50ppm농도에서는 세포증식률이 대조군에 비해 4%로 증가되었고, 100ppm에서는 8% 증가됨을 확인하였다. 500ppm과 1000ppm에서는 세포생존률 대조군에 비해 7, 18%

이하로 감소하였다. 이는 SHB기 L929 세포에 500ppm 농도 이상에서 세포 독성을 유발됨을 알 수 있었다.

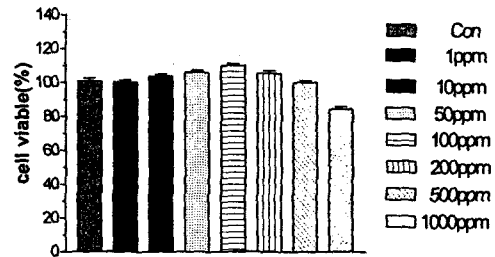


Fig. 8. Cell viability as assessed by the MTT assay for L929 cell line pretreated for 24h with SHB. The data are presented as the arithmetic mean percent of the control ± S.D.

고찰

免疫이란 병원성 미생물 또는 이들의 독소에 대한 개체의 저항성을 지칭하여 왔다. 최근에는 그 영역이 확대되어 자기와 비자기의 인식, 염증반응의 유발 및 조절에도 면역반응이 직접적으로 작용한다는 사실이 입증되었다. 면역과 알레르기는 본질적으로 동일한 면역반응에 의해서 일어나는 것이지만 이러한 결과가 숙주에게 유익하게 작용하는 경우를 임상적으로 면역이라고 하고 해롭게 작용하는 경우를 알레르기 혹은 과민반응이라고 한다⁸⁾.

炎症은 “균의 감염, 열, 외상, 항원, 항체반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어기전”이라고 정의하고 있으며 염증이라는 용어가 “불같은 상태”라는 어원에서 유래한 것과 같이 염증이 발생한 부위는 발적, 발열, 동통, 종창, 기능장애와 같은 염증의 5대 징후가 발생된다. 이러한 염증을 병리조직학적으로 볼 때에는 혈관투과성 항진과 과립구 및 대식세포와 같은 세포의 침윤이 커다란 특징이라고 할 수 있다³⁾.

한의학에서 免疫은 <黃帝內經>³⁾에 ‘恬淡虛無 眞

氣從之 精神內守 病安從來’, ‘正氣存內, 邪不可間’이라 하여 正氣는 장부조직기관의 기능활동을 정상적으로 유지케 함으로써 病邪에 대해 抗病力을 갖는 抵抗力을, 邪氣는 인체를 발병케 하는 각종의 發病要因을 말하는 것으로 이러한 正邪間의 相爭으로 설명할 수 있다⁴⁾. <諸病源候論>³²⁾에 ‘漆有毒, 人有稟性畏毒, 但見漆, 便中其毒, 亦有性者耐者, 終日燒者, 境不爲害也’라 하였고 <證治要訣>³³⁾에 ‘有人一不可食 鷄肉及 獐魚等物 才食即丹隨發’이라 하여 알레르기 반응과 유사한 내용이 언급되어 있다. 炎症反應은 正邪鬪爭의 결과로 체내에 나타나는 病理的 현상중의 하나로, 疾病의 發生 및 進行은 正邪抗爭의 과정이다⁵⁶⁾.

화농성 염증질환은 한의학적으로 瘡瘍, 癰疽 등의 병증에서 찾아볼 수 있는데 그 중 현대의학의 여드름의 범주에 속하는 것으로 面疱를 찾아볼 수 있다.

面疱는 <黃帝內經素問·生氣通天論>³⁴⁾에서 “汗出見濕 內生痤癬...勞汗當風 寒薄爲皴 鬱乃痤”라 하여 痤癬라는 명칭을 사용한 이래, 巢³²⁾는 “面疱者 爲面上有風熱氣生疱 頭如米大 亦如穀大 白色者是”라 하여 처음으로 病名, 原因, 症狀를 구체적으로 언급하였고, 吳³⁵⁾는 “肺風粉刺 面鼻疙瘩 亦腫脹 破出粉汁或結屑”이라 하여 증상에 대하여 자세하게 언급하였다. 이후 痤瘡³⁶⁻³⁸⁾, 面疱^{32,39,40)}, 痤癬³⁴⁾, 面生瘡⁴¹⁻⁴³⁾, 粉刺^{41,44)}, 粉刺^{34,40,45)}, 面腫⁴⁶⁾, 面熱^{40,46)}, 肺風粉刺^{36,47,48)} 등 다양한 명칭으로 표현되면서 안면부에 발생하는 기미, 주근깨, 뺨띠, 뽀두라지, 딸기코 등과 혼용되어 사용되었다.

面疱의 발병원인을 살펴보면 巢³²⁾는 風熱氣로 孫⁴²⁾은 風毒熱로 宋太宗⁴¹⁾은 由內熱外虛 風濕小乘하거나, 脾氣虛하여 風濕小乘하면 肌肉生熱 濕熱相搏하여 발생한다고 하였고 李⁴³⁾는 風客皮膚하거나 脾肺風濕博熱하여 生하는 것으로 龔⁴⁰⁾은 面瘡는 上焦火로 粉刺는 肺火로 面熱은 陽明經風熱로 보았으며 許⁴⁶⁾는 面熱은 胃熱上薰하거나 或者食不絶하여, 面腫은 胃風으로 발생한다고 하였다. 이상을 종합해보면 巢^{32,34,43,44)} 등은 風, 濕, 熱 등의 外因으로 許

^{40-42,44,46,48)} 등은 胃熱, 肺熱, 痰飲, 血熱 등의 內因으로 발생한다고 하였다. 최근의 여러 문헌^{36-38,47,49,50)}에서는 肺胃積熱, 血熱血燥, 脾虛痰飲, 腸胃濕熱, 陰虛血瘀 등이 원인이 된다고 하였으며 이외에 過食과 기름진 음식, 지나친 기호식품의 섭취⁵¹⁾ 또한 여드름의 발생원인이라고 하였다.

치료법에 있어서는 清肺胃, 清熱解毒, 清熱涼血滋陰, 健脾化痰, 利濕清熱, 清熱化濕通腑, 清熱滋陰, 活血化瘀하는 방법을 위주로 하여 清上防風湯^{40,46)}, 升麻黃連湯^{40,46,52,53)}, 桃紅四物湯^{37,38)}, 枇杷清肺^{35,37,38,47,50)}, 清胃散^{37,42)} 등의 內服藥과 西施玉容散⁴⁵⁾, 顛倒散^{38,50)} 등의 外用藥을 사용하였다. 최근 이렇게 다용되는 처방이나 한약재에 대해서 현대 의학적으로 여드름에 효과가 있다는 것을 입증하기 위한 실험적 연구가 활발히 진행되고 있는데 그 연구는 항균과 항염, 항알레르기 효과가 있는지의 여부에 중점이 맞추어져 있다.

자세히 살펴보면 한약재의 항균효과에 관한 연구는 홍¹³⁾의 清上防風湯加味, 노¹⁴⁾의 苦蔘추출물의 *P. acnes*에 대한 항균효과, 조¹⁵⁾의 清上防風湯 및 구성약물의 *S.aureus*에 대한 항균효과, 김¹⁶⁾의 大蒜의 *C. albicans*에 대한 항균효과, 박¹⁷⁾의 94종의 한약추출물의 6종의 균주에 대한 항균효과 등이 있었고 항염 효과에 대한 연구는 枳實⁵⁴⁾, 獨活⁵⁵⁾, 蒲公英⁵⁶⁾, 蛇床子⁵⁷⁾, 斑貓⁵⁸⁾, 加味芷貝散⁵⁹⁾, 靈仙除痛陰⁶⁰⁾, 黃芪內托散⁶¹⁾, 升麻葛根湯加味方⁶²⁾, 龍膽瀉肝湯加味方⁶³⁾ 등 한약재 및 기존처방의 항염증작용에 대한 논문이 있었고 항알레르기 효과에 관한 연구는 이 등의 消風散加味の 항알레르기 효과에 관한 실험적 연구¹⁸⁾, 정 등의 메밀 추출물의 항알레르기 반응에 대한 실험적 연구¹⁹⁾, 양 등의 葛根湯과 加味葛根湯의 항알레르기 및 消炎, 解熱, 鎮痛作用에 대한 실험적 연구²⁰⁾ 노 등의 數種의 韓藥 추출물이 항알레르기 반응에 미치는 영향²¹⁾ 등이 있었으나 이러한 세가지 효과를 동시에 검증한 실험논문은 없었다.

三黃洗劑는 <外傷科學>에서 각종 無滲出性 皮膚炎과 滲出性 皮膚瘙癢症등에 사용되는 처방으로¹⁾.

大黃, 黃柏, 黃芩, 苦蘘으로 구성되어 있으며 이후에도 黃水瘡, 赤白遊風, 乳癢 등의 병증에 外治藥으로 다용되는 처방이다²⁾.

이에 저자는 三黃洗劑에 瀉火解毒 清熱燥濕 疏散風熱의 효능이 있어^{22,24)} 서로 배합하여 內服藥과 外用藥으로 피부과 질환에 多用하는 紫草, 五倍子, 明礬, 花椒, 甘草를 加味하여 항균, 항염, 항알레르기 효과를 평가하기 위해 본 실험을 시행하였다.

黃柏은 苦寒無毒하고 清熱燥濕, 瀉火解毒, 清退虛熱 등의 효능이 있어 瘡瘍腫毒, 濕疹, 火傷 등에 쓰이는 약제²²⁾로 berberine의 혈압강화작용, 결핵균을 비롯한 일반 병원 미생물에 대한 항균작용, 해열작용, 요도의 염증치료 작용 등 여러 약리효과를 나타내는 것으로 알려져 있다^{64,66)}.

黃芩은 性寒無毒하고 清熱燥濕 瀉火解毒하는 효과가 있어 瀉實火 除濕熱하는 작용을 하여 外傷內癰 및 外科 五官科의 熱毒證에 多用하는 약제²²⁾ 최근 실험연구에 의해 Bradykinin 길항작용⁶⁷⁾, 항 Allergy작용⁶⁸⁾, 항산화 효능⁶⁹⁾, 병원성 미생물에 대한 항균효과⁷⁰⁾ 등이 밝혀져 있다.

苦蘘은 苦寒無毒하고 心肝胃大腸膀胱에 歸經하며 清熱燥濕 去風殺蟲 등의 효능이 있어 陰痒, 黃疸, 皮膚瘙癢, 疹癩, 膿疱瘡 등의 병증을 치료한다²²⁾. 현재까지 알려진 苦蘘의 약리작용을 보면 혈압강화, 혈관수축, 마취작용, 레이치료, 이질치료, 살충효과, 항균작용, 항산화작용 등에 대한 보고가 있다^{23,24,71-73)}.

紫草는 苦寒無毒하고 心包絡, 肝 二經에 작용하며 涼血活血, 解毒透疹, 滑腸 등의 효능이 있어 麻疹不透, 溫熱病發斑疹, 丹毒, 瘡瘍, 癰疽, 火傷, 凍傷, 濕疹, 陰痒 등의 병증을 치료한다²²⁾. 자초에 대한 약효 연구로는 항염작용, 항암작용, 항바이러스작용, 육아종형성촉진작용, TNF- α 생성촉진작용 및 면역조절 작용 등이 보고되어 있다⁷⁴⁾. 주성분은 shikonin인데, shikonin은 항암작용을 비롯한 진통, 해열, 체온강화, 항균작용, 항알레르기 작용 등의 다양한 생리활성을 갖고있는 것으로 알려져 있다⁷⁵⁾.

五倍子는 酸澁寒無毒하고 肺腎大腸 三經에 작용하고 斂肺強火, 澁腸止瀉, 斂汗止血, 澁精縮尿 등의 효능이 있어 肺虛久咳, 久瀉久痢, 脫肛, 盜汗, 崩漏下血, 遺精, 遺尿 등의 병증을 치료한다²²⁾. 현재까지는 항균작용, 항혈전작용, 항산화효과 등이 밝혀져 있다⁷⁶⁻⁷⁸⁾.

明礬은 黃酸鹽類의 明礬石 鑛物을 加工製鍊하여 만든 結晶으로 酸寒小毒하고 肺肝脾胃大腸 五經에 歸經하며 止血止瀉, 去痰開閉, 解毒燥濕, 清熱退黃 등의 효능이 있어 崩漏, 中風痰盛, 癰疽瘡毒, 口舌生瘡, 濕熱瘙癢, 濕熱黃疸 등의 병증을 치료한다. 임상에서 癰疽紅腫 및 濕疹, 瘙癢症을 다스릴 경우 研末하여 患處에 塗布하여 外治藥으로 사용하는 경우가 많다²²⁾. 밝혀진 약리작용으로는 육아조직 신생작용, 항괴사작용, 각질연화작용 등이 있다⁷⁹⁾.

花椒는 川椒의 異名으로 辛熱小毒하고 脾胃腎 三經에 歸經하며 溫中散寒, 燥濕, 止痛, 殺蟲 등의 효능이 있어 脘腹疼痛, 泄瀉, 虫積腹痛, 皮膚濕疹 등의 병증을 치료한다. 임상에서 皮膚濕疹으로 인한 瘙癢症을 다스리는 데는 苦蘘이나 明礬을 배합하여 煎水로 熏洗한다²²⁾.

甘草는 甘平無毒하고 脾胃肺 三經으로 歸經하며 補脾益氣, 潤肺止咳, 緩急止痛, 清熱解毒 등의 효능이 있어 脾胃虛弱, 臟躁, 四肢攣急作痛, 癰疽瘡腫, 咽喉腫痛 등의 병증을 치료하며 藥物中毒에도 사용된다²²⁾. 이 약제는 사용빈도가 높아서 많은 연구가 이루어져 있는데 밝혀진 유효성분으로는 saponin과 유사한 glycoside로 당류보다 50배이상 단맛을 내는 glycyhizin, flavonoid계 당류coumarin유도체, 당, mannitol, asparagin, 22,23-dihydrostigmasterol, 20%정도의 전분류 등이 알려져 있다^{80,81)}. 또한 약리작용으로는 위궤양 치료효과를 가지고 있으며 이외에도 항염증, 항알레르기, 항관절염작용, 항바이러스 효과 뿐만 아니라 항암효과도 보이는 것으로 알려져 있고 대표성분인 glycyhizin도 유사한 작용을 나타낸다고 보고되었다^{82,84)}.

화농성 염증의 병인과 치료에 있어서 세균의 역

할의 중요성은 오랫동안 관심의 대상이 되어왔다. 일반적인 피부 상재균중 피부에 염증을 유발할 수 있는 균주로서 *S. aureus*와 병원성이 낮지만 친지방성 이상성 진균으로 정상피부의 모낭주위에서 발견되는 *M. furfur*, 여드름 유발에 관여하는 *P. acnes*, *S. epidermis* 등을 들 수 있다^{9,12}). 그 중에서도 황색 포도상 구균인 *S. aureus*는 그람 양성구균으로 크기는 0.5-1.2 μ m이며, 포도송이 모양의 불규칙한 배열을 하고, 호기성 및 통상혐기성 조건에서도 잘 성장한다⁶⁵). 이 균주는 건강인의 비강에서도 40-50% 검출되는 등 사람이 피부와 구강 이후 점막에 상재하는 균의 하나이지만 부상과 찰과상으로 인해 손상된 부위에 침입해 국소적으로 표피에서의 농가진, 모낭에서는 종기등을 유발시킨다⁶⁵). *S. aureus*는 특히 화상부위에 침입해 전신적으로 퍼져나가 맹장염, 담낭염, 봉와직염, 골수염의 원인이 되기도하고 결막염이나 식중독등의 원인균으로 임체의 여러 염증질환에 작용하는 중요한 미생물중 하나인 것으로 알려져 있다⁶⁵). 여드름에 있어서는 3,4기의 중증의 화농성 여드름에서 흔히 이 균이 발견되고 있다⁶⁶).

모낭은 정상적으로 다양한 미생물총을 함유하고 있다. 가장 흔한 미생물로는 누두하부(infrainfundibulum)에는 혐기성 디프테리아 균인 *P. acnes*가 있으며, 상부인 말단누두부(acroinfundibulum)에는 *M. furfur*가 존재하고 모낭주위의 피부표면에는 호기성인 *S. epidermis*가 존재한다⁶⁷).

여드름 균으로 잘알려진 *P. acnes*는 통성 혐기성 그람양성균으로 피지가 없이는 거의 발육할수 없는 호지성균이다. 따라서 *P. acnes*는 lipid rich 부위에 한정되어 있으며 피지가 많은 부분이 여드름의 호발부위인 동시에 *P. acnes*이 균수가 많은 부위이기도 하다⁶⁸). *P. acnes*는 세균성 lipase와 같은 지방분해효소와 화학주성인자를 분비하여 피지를 triglyceride와 free fatty acid로 가수분해하고, free fatty acid는 모회벽 comedonic에 작용해 모낭벽을 파괴하여 모낭 내용물이 진피내로 유출되면서 염증반응이 일어나게 된다⁶⁹). 따라서 여드름을 억제시키고

치료하기 위해서는 피지생성과 염증반응을 억제시키는 노력과 함께 *P. acnes*의 증식을 억제시키는 것이 필요하다. *M. furfur*는 사람 피부의 정상 상재균중에 속하는 이형태성 호지성 효모균(dimorphic lipophilic yeast)이며 때로는 기회감염을 일으켜 전풍, Malassezia 모낭염, 지루성 피부염의 원인이 된다^{90,91}).

본 연구에서는 黃柏, 黃芩, 苦蘘, 紫草, 五倍子, 明礬, 花椒, 甘草를 이용하여 여드름 및 피부에 염증을 유발할 수 있는 이 네가지 균주들에 대한 저해작용 및 생육 특성을 파악하고자 하였다. *S. epidermis*, *S. aureus*, *M. furfur*, *P. acnes*를 이용하여 항균활성 검증결과 SHB를 1% 첨가하였을 시 *S. epidermis*, *P. acnes*, *M. furfur*에서 10-11mm 정도의 저해환을 나타냈다. SHB 10% 첨가 시 저지환의 크기가 증가하였으며 13-16mm정도로 높은 항균활성을 나타내었다. 피부 염증 세균인 *S. aureus*의 경우 10% 농도 첨가 시 저지환의 크기는 15mm로 관찰되었는데 이는 SHB가 이 균에 대해 비교적 높은 항균효과를 나타낸다는 것을 의미한다. 또한 피부 여드름을 유발하는 대표적인 균주인 *P. acnes*의 성장을 1.0%(w/v)정도의 농도에서 완전 억제한다는 것은 이 추출물이 세균성 여드름 균에 높은 항균성을 가지고 있다는 것을 말해주며 이 추출물을 세균성 여드름 병반에 적용 시 효과를 기대할 수 있으리라 생각된다. 아토피 피부염에서 대표적인 균주로 알려져 있는 *S. aureus*의 경우 SHB 저농도 처리 시에 최대 균체량을 낮추어 주며 고농도 처리 시에는 성장을 억제한다는 것으로 미루어 보아 *S. aureus*에 유발되는 세균성 피부염증에 SHB의 적용이 가능하리라 생각된다. 본 실험에서 얻어진 결론을 바탕으로 보았을 시 SHB는 여드름 및 피부 염증세균이 성장억제 물질로 적용가능하다고 생각된다.

알레르기는 I-V형으로 분류된다^{92,93}). 특히 제1형 알레르기는 비만세포와 Ig E항체가 중요한 역할을 하며 대부분 알레르기 질환은 제 1형으로 알레르기를 유발하는 알레르겐에 의하여 여러 가지 병적인

증상이 나타난다. 비만세포에 항원이 접촉되면 세포 표면 IgE 수용체의 상호결합(antigen-induced IgE receptor cross-linking)이 일어나며, 이를 통해 비만세포 활성화가 일어난다. 이러한 세포 활성화로 인해 비만세포 내에 이미 형성되어 있었거나 도는 새로 합성되는 여러 종류의 매개체들이 세포 밖으로 방출된다⁹⁶. 이때 비만세포로부터 방출되는 매개체에는 histamine, proteases, leukotrienes, prostaglandins 그리고 여러 종류의 cytokine 등이 포함된다⁹⁷. 특히 histamine은 즉시형 알레르기 반응을 주도하며 비만세포로부터 생성되는 cytokine으로 interleukins-1,3,4,5, 6,10,13,16, TNF- α , nerve growth factor, 그리고 lymphotactin 등이 포함된다^{96,98,99}. 이들은 Th-2형 면역반응 활성화, 염증매개, 세포성장 촉진 및 세포주화반응매개 등 많은 역할을 수행하는데, GI tract에서는 체액분비촉진, 장동 운동증가와 Airway 에서는 기관지 협착, 체액분비의 촉진과, 혈관에서는 모세혈관 확장과 투과성 증대가 되고 또한 2차적으로 chemokines, 염증세포의 삼출, 호산구에 의한 조직손상이 발생하여 각종 질병을 일으킨다. 이러한 병태로 인해 알레르기성 피부질환은 피부의 만성 재발성 염증성 질환으로 아토피 소인을 갖는 사람에게 많이 발생하여 임상증상으로 강한 소양감, 발적 및 맥관부종, 피진의 형태도 습윤성, 건조성병변 및 태선화병변 등으로 다양하게 나타난다¹⁰⁰⁻¹⁰³.

본 실험에서는 마우스 귀 피내조직에 비만세포의 탈과립을 유도하여 히스타민을 방출시키는 물질인 compound 48/80을 주사하여 히스타민에 의한 즉시형 과민반응을 인위적으로 유발시켜서 SHB의 국소 도포에 의한 귀부종의 감소 효과와 조직검사를 통한 비만세포의 탈과립 정도를 알아보았다. Fig. 5에서 control군에 비하여 C48/80군의 비만세포의 수가 다소 많았으며 SHB 100mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml 도포군에서는 C48/80군에 비하여 비만세포의 수가 감소하는 경향을 보였다. 또한 alcian blue에 의해 염색되는 비만세포 세포질의 과립이 S2 도포군에서 더 크게

관찰되는 것으로 보아 SHB가 Compound 48/80에 의해 유발되는 비만세포의 탈과립을 억제하였다고 생각된다. 이렇게 볼 때 물질 SHB는 피부에서 세포막의 유동성을 안정화시켜 비만세포의 탈과립을 조절하는 작용이 있을 것으로 생각된다.

또한 본 실험에서는 SHB가 즉시형 알레르기 반응의 조절에 미치는 효과를 검토하기 위하여 *in vivo* 실험으로 비면역학적 자극제인 Compound 48/80에 의한 IgE 매개 수동 피부 아나필락시에 대한 효과를 실험하였다. 또 *in vitro* 실험으로 Compound 48/80에 의해 유도되는 복강비만세포로부터 히스타민 유리 조절에 미치는 효과를 실험하였다. SHB는 비만세포로부터 Compound 48/80에 의한 히스타민의 유리를 농도 의존적으로 억제하였으며, 1mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다(Fig. 6.) 또한 PCA 반응에 미치는 SHB의 효과는 Table 9. 에서와 같이 SHB의 농도 의존적으로 억제되었으며, 특히 100mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다. 그러므로 SHB는 히스타민 유리 억제와 PCA 반응에 효과를 나타냄으로써 비만세포 매개 즉시형 알레르기 반응을 억제하는 성분이 함유되어 있을 것으로 생각된다.

Prostaglandin(PG)은 arachidonic acid에서 유래해 염증과 면역반응을 비롯해 smooth muscle tone, vascular permeability, cellular proliferation 등에 작용하는 intercellular, intercellular messenger이다. PG은 세포의 감염에서 유래한 LPS 혹은 외부자극에 의해 세포막 지질 성분이 phospholipase A2에 의해 생성되는 arachidonic acid로부터 만들어진다. 즉 arachidonic acid는 cyclooxygenase(COX)효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE2와 PGI2는 혈관투과성 향진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 관련이 가장 깊은 것으로 알려져 있다. 오래전부터 발열, 발적, 동통 등을 치료하는데 널리 사용되어온 aspirin이 이러한 PG을 합성하는데 핵심적인 작용을 하는 COX의 작용을 억제시키기 때문인 것에서 알 수 있듯이 염증 억제를 위해

COX의 활성을 억제시키고자 하는 시도가 활발히 이루어지고 있다. COX는 I형과 II형의 2가지 isoform이 존재한다. 이중 I형인 COX-1은 위장관보호, 신장의 혈류조절, 혈소판응집 등 우리몸의 정상적인 기능 유지에 중요한 작용을 하는, 대부분의 정상적인 조직에서 발생하는 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 II형인 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다. 따라서 항염증제와 항암제의 개발을 위해 COX-2의 활성을 억제시키는 물질의 탐색에 많은 연구자들이 힘을 쓰고 있다¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

이에 LPS(1 μ g/ml)를 사용하여 대식세포주인 RAW 264.7(1 \times 10⁶ cell)의 COX-2 활성을 유도한 실험에서 COX-2는 LPS 단독 처리군에 비해 S2 처리군에서 S2농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. Fig. 7.에서 같이 50ppm에서는 억제효과가 없었으나 100ppm, 200ppm농도에서는 25-55% 정도의 COX-2발현 억제 효과가 있는 것으로 생각된다.

SHB의 안전성을 확인한 실험으로 세포독성평가는 SHB가 50ppm농도에서는 세포증식률이 대조군에 비해 4%로 증가되었고, 100ppm에서는 8% 증가됨을 확인하였다(Fig. 8). 500ppm과 1000ppm에서는 세포생존률 대조군에 비해 7,18%이하로 감소하였다. 이는 SHB가 L929 세포에 500ppm 농도 이상에서 세포 독성을 유발됨을 알 수 있었다. 좀더 안전성을 확인하기 위해서는 경구 아급성 독성, 급성 독성등의 in vivo 실험을 수행해야 할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합할 때 黃柏, 黃芩, 苦參, 紫草, 五倍子, 明礬, 花椒, 甘草 로 구성된 三黃洗劑加味方은 항균력과 항염효과, 항알레르기효과를 모두 가지고 있는 것으로 평가되며 여드름이나 각종 다양한 염증성, 알레르기성 피부과 질환에 임상적으로 광범위한 활용가치가 있을 것으로 사료되며 배합하여 효과를 더할수 있는 한약제의 발견, 순수물질의 정제 및 성분 분석에 대한 연구가 지속되어야 할 것이라고 사료된다.

결론

三黃洗劑加味方이 다양한 피부 질환의 원인균으로 알려진 *Staphylococcus aureus*, *Malassezia furfur*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermis*에 대한 항균력을 평가하고, Compound 48/80으로 알레르기를 유도한 후 히스타민의 방출량과 비만세포의 부유량을 비교하고 PCA반응을 유도하여 항알레르기 효과를 검증하고, COX-2 활성에 미치는 영향 및 세포독성 정도를 평가한결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SHB는 농도의존적으로 *S. epidermis*, *P. acnes*, *M. furfur*, *S. aureus*에 대해 높은 항균활성을 나타내었다.
2. SHB는 Compound48/80에 의한 귀부종 및 히스타민에 대해 농도의존적으로 억제효과를 나타내었다.
3. 수동 피부 아나필락시 반응은 SHB농도 의존적으로 억제 되었으며, 특히 100mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다.
4. COX-2 발현 정도를 분석한 결과 LPS 단독 처리군에 비해 SHB 투여군이 SHB 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다.
5. MTT 정량에 의한 세포생존률을 측정된 결과 SHB가 L929 세포에 500ppm 농도 이상에서 세포 독성이 유발됨을 알 수 있었다.

참고 문헌

1. 江克明, 包明蕙. 방제대사전. 서울: 의성당. 1991: 68.
2. 楊思澍, 張樹生, 傅景華. 중의임상대전. 서울: 의성당. 1993: 864, 886, 900.

3. 金圭烈 黃帝內經素問校注滙粹. 서울: 일증사. 1998: 上 6, 中 284-8.
4. 鄭遇悅 韓方病理學. 이리: 서울공판사. 1983: 5-34.
5. Kim, E.J., Jin, H.K., Kim, K., Lee, H.Y., Lee, S.Y., Lee, K.R., Zee, O.P., Han, J.W. and Lee, H.W. Suppression by a sesquiterpene lactone from *Carpesium divaricatum* of inducible nitric oxide synthase by inhibiting nuclear factor- κ B activation. *Biochem. Pharmacol.* 2001; 61: 903-10.
6. 최승만, 김민주, 최영호, 안호정, 윤여표. *Propionibacterium acnes*에 대한 천연물의 항균효과 검색. *대한약학회지*. 1998; 42: 89-94.
7. 丁奎萬. 알레르기과 한방. 서울: 제일로. 1993: 15-55, 98-107, 120-1, 292-8.
8. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. *피부과학*. 서울: 여문각. 2001: 45, 53, 161-6, 461-4.
9. Peter G, Smith AL Group A Streptococcal infections of the skin and pharynx, *N Engl J Med.* 1977; 297: 311-5.
10. Steele RW Recurrent Staphylococcal infection in families, *Arch Dermatol.* 1980; 116: 189-196.
11. Leyden JJ, McGinley KJ, Cavaliere S *Propionibacterium acnes* resistance to antibiotics in acne patients, *J. Am Acad Dermatol.* 1983; 8: 41-6.
12. 성준모, 박나영, 이신호. 여드름 원인균의 성장에 미치는 오미자와 솔잎의 효과. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 2003; 31(1): 69-74.
13. 홍석훈, 노석선. 청상방풍탕가미가 면포에 미치는 영향. *대한안이비인후과학회지*. 2002; 15(1): 315-35.
14. 노현찬, 노석선. 고삼추출물이 모발성장 촉진 및 면포억제에 미치는 영향. *대한안이비인후과학회지*. 2002; 15(1): 96-126.
15. 조희창 외 3인. 청상방풍탕 및 구성약물의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균효과에 관한 연구. *분초학회지*. 2003; 18(2): 37-47.
16. 김희석 외 3인. 대산의 분획별 추출물에서 항균 활성 검색. *동의생리병리학회지*. 2002; 16(6): 1184-9.
17. 박수연 외 2인. 수종의 한약이 피부질환과 관련된 균주 6종에 미치는 항균력 및 목향이 염증기전에 미치는 영향. *대한안이비인후과학회지*. 2004; 17(1): 104-22.
18. 이준성, 서형식, 노석선. 소풍상가미방의 항알레르기 효과에 관한 실험적 연구. 2001; 14(2): 9-19.
19. 정지영, 노석선. 메밀 추출물의 항알레르기 반응에 관한 실험적 연구. 2002; 15(1): 31-49.
20. 양태규, 김윤범, 채병윤. 갈근탕과 가미갈근탕의 항알레르기 및 소염 해열 진통작용에 대한 실험적 연구. 2002; 15(1): 76-95.
21. 노태석, 노석선. 수종의 한약 추출물이 항알레르기 반응에 미치는 영향. 2002; 15(1): 1-29.
22. 신민교 임상본초학: 영림사. 1997: p.172,312,374, 391,394,400,405,785.
23. 강소중의학원. *중약대사전*. 서울: 대성출판사. 1992: 1316-8, 1283-5, 2307.
24. 雷載權, 張延模. *中華臨床中藥學*. 北京: 인민위생출판사. 1998: 406,407, 455-8, 1060-4.
25. Kanemoto, T., Kasugai, T., Yamatodani, A., Ushio, H., Mochizuki, T.K., Kimura, M., Nishimura, M. and Kitamura, Y. Supernormal histamine release and normal cytotoxic activity of beige rat mast cells with giant granules. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1993; 100: 99-106.
26. Yurt, R.W., Leid, R.W. and Austen, K.F. Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J. Biol. chem.* 1977; 252: 518-21.
27. Shore, P.A., Burkhalter, A. and Cohn, V.H. (1959) A method for fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1959; 127: 182-6.
28. Kawabata, T. T. and Babcock, L. S. Measurement

- of murine ovalbumin-specific IgE by a rat basophil leukemia cell serotonin release assay. *J. Immunol. Method.* 1993; 162: 9-15.
29. Katayama, S., Shinoya, H. and Ohtake, S. A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol. Immunol.* 1978; 22: 89-101.
30. Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983; 65: 55-63.
31. 박광균. 구강생화학 12장 번역과 염증: 군자출판사. 1999: 318-25.
32. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 台中: 昭人出版社. 1982: 10-1.
33. 戴思恭. 證治要訣 傳方. 中醫免疫思想急成就 증의잡지. 1884: 11(25): 56.
34. 王琦 외. 黃帝內經 素問今釋. 서울: 成輔社. 1983: 14.
35. 吳謙 외. 醫宗金鑑. 台北: 大中國圖書公司. 1981: 125.
36. 柳志允. 外科 皮膚科의 辨證論治. 부친: 서원당. 1987: 232-3.
37. 申天浩. 病症診治. 서울: 성보사. 1990: 592-4.
38. 중의연구원. 중국증상감별진단학. 북경: 인민위생출판사. 1981: 656-7.
39. 배원식. 최신훈방임상학. 서울: 남산당. 1987: 595, 656-7.
40. 龔延賢. 萬病回春 券下. 서울: 행림서원. 1972: 9-10.
41. 宋太宗命撰. 太平聖惠方 券四十. 서울: 윤성사. 1979: 1207-19.
42. 李用粹. 證治彙補. 台北: 선풍출판사. 1977: 229.
43. 李梴. 醫學入門. 서울: 윤성사. 1983: 405-6.
44. 趙佶. 聖濟總錄. 태북: 신문풍출판사. 1978: 841-3.
45. 朴炳昆. 증보 한방임상사십년. 서울: 대광문화사. 1971: 460-1.
46. 許俊. 東醫寶鑑. 서울: 남산당. 1976: 209, 239, 284.
47. 顧伯華 외. 實用中醫外科學. 상해: 상해과학기술출판사. 1986: 535-6.
48. 陳實功. 外科正宗. 북경: 인민위생출판사. 1964: 255.
49. 金定濟. 診療要鑑. 서울: 동양의학연구원. 1979: 347-50.
50. 蔡炳允. 한방외과학. 서울: 고문사. 1975: 90-1.
51. 송점식. 한방피부미용. 서울: 효림. 1993: 245-7.
52. 孫思邈. 備急千金要方. 서울: 대성출판사. 1984: 247.
53. 樓英. 醫學綱目 券二十. 태남: 북일출판사. 1984: 4-5, 17.
54. 홍남두 외. 지실의 항염증 성분연구. 생약학회지. 1991.
55. 한병훈 외. 독활의 항염증 유효성분 Continentalic acid의 화학구조, 생약학회지. 1981.
56. 이은방 외. 포공영의 항위염작용. 생약학회지. 1993; 24(4): 313-8.
57. 이은방 외. 사상자의 항염증작용. 생약학회지. 1998; 29(4): 384-90.
58. 조충식 외. 반묘와 Cantharidin의 항염증효과에 대한 연구. 대전대학교 한의학 연구소 논문집. 1998; 6(2): 471-82.
59. 이한철. 가미지폐산이 실험동물의 진통 소염, 해열 및 항균에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1988.
60. 이봉주. 영선제통음이 염증 및 혈중 uric acid level에 미치는 영향. 동의 병리학회지. 1995; 12: 383-407.
61. 홍성진 외. 황기내탁산의 소염작용에 관한 실험적 연구. 2004; 17(2): 1-11.
62. 송성필, 김진만 외. 승마갈근탕가미방이 소염작용에 미치는 영향. 2004;17(2): 12-30.
63. 최은규, 노석선. 용담사간탕가미방이 염증치료

- 및 예방에 미치는 영향에 대한 연구. 2004; 17(2): 39-47.
64. 신풍출판공사(편집). 중약대사전: 신풍출판공사. 1982: 58.
65. 한국교육문화사 편집부. 동의대백과 사전: 한국 교육문화사. 1994: 234.
66. 지형준. 본초에서 건강식품의 개발. 한국식품개발연구원. 1994; 7(3): 42.
67. 정성현, 최진재, 유경숙, 윤혜숙. 황금의 Bradykinin 길항작용. 생약학회지. 1991; 22(3): 215-9.
68. 전재홍, 강원호. 황금 추출물이 DNCB로 유도된 생쥐의 Allergy성 접촉피부염에 미치는 영향. 동국한의약연구소논문집. 1998; 7(1): 119-33.
69. 김성만 등. 황금약침액의 흰쥐 간세포내의 항산화 효능에 관한 연구. The Journal of Korea Acupuncture & Moxibustion Society. 1999; 16(1): 497-509.
70. 조성환, 김영록. 황금추출물의 항균특성. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2001; 30(5): 964-8.
71. 朴桶基 외. 薏苡仁和 苦蔘의 抗酸化 作用에 關한 研究. 서울. 대한본초학회지. 2000; 15(2): 57-68.
72. 채영복 외. 한국유용식물자원연구총람. 서울: 한국화학연구소 1988: pp.426-33, 994-1005.
73. 朴桶基 외. 葛花와 鬱金 및 苦蔘의 抗酸化 作用에 關한 研究. 서울. 대한본초학회지. 2001; 16(1): 41-53.
74. 원경숙, 김대근, 오찬, 소준노, 은재순. 자근에 의한 백혈병 세포주인 백혈병 세포주인 L1210세포의 세포사 유도. 동의생리병리학회지. 2001; 15(6): 936-40.
75. 송규용, 이효정, 길재호, 김성훈. 자초의 항암성분 유도체 2-THIONQ-S160에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2002; 16(3): 542-6.
76. 동의학연구소 편저동물성 독약. 평양: 여강출판사. 1997: 233-7.
77. 송규용, 박경준, 김성훈. 오배자의 항혈전효과. 생약학회지. 2002; 33(2): 120-3.
78. 차배천 외. 오배자의 항산화 활성성분 및 자유라디칼 소거효과. 생약학회지. 2000; 31(2): 185-9.
79. 이정원, 강병수. 한방임상을 위한 한방포제와 응용. 서울: 영림사. 1992: pp.135-325.
80. Tyler VE, Brady LR, Robbers JE. Pharmacognosy, 9th Ed. Lee&Fabiger, Philadelphia . 1988: 67-70.
81. Huang KC. The Pharmacology of Chinese herbs. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. 1999: 364-8.
82. Tangri KK, Seth PK, Parmar SS, Bhargava KP. Biochemical study of anti-inflammatory and anti-arthritis properties of glycyrrhetic acid. Biochem Pharmacol. 1965; 14: 1277-81.
83. Badam L. In vitro antiviral activity of indigenous glycyrrhizin, licorice and glycyrrhetic acid(Sigma) on Japanese encephalitis virus. J Commun Dis. 1997; 29: 91-9.
84. Wang ZY, Nixon DW. Licorice and cancer Nutr Cancer. 2001; 39: 1-11.
85. 이진갑 외6인. 진단미생물학(3판). 서울: 고려의학. 1999: 322-3, 359-74.
86. 김종대. 여드름의 피부관리 및 예방에 관한 연구. 한국미용학회지. 1995; 1(1): 101-18.
87. Marples PR, Leyden JJ, Stewart RN, Mills OH, Kligman AM. The skin microflora in acne vulgaris. J Invest Dermatol. 1974; 62: 37-41.
88. McGinley KJ et al. Regional variations in density of cutaneous propionibacteria. correlation of Propionobacterium acnes populations with sebaceous secretion, J Clin Microbiol, 1980; 12: 672-5.
89. 최승만 외 4인. Propionibacterium acnes에 대한 천연물의 항균효과 검색. 대한약학회지. 1998; 42: 89-94.
90. Faergemann J. Pityrosporum species as a cause of allergy and infection. Allergy. 1999; 54: 413-9.
91. Faergemann J. Pityrosporum yeasts-what's new?

- Mycoses. 1997;40(Suppl 1): 29-32.
92. 康秉秀. 한방임상 알레르기. 서울: 성보사. 1988: 22-3, 61-8. 196-201
93. 서울대학교의과대학. 면역학: 서울대학교출판부. 1994: 135-42, 165, 167-9, p.229, 234-41.
94. 김형민. 면역과 알레르기. 서울: 신일상사. 1988: 179-98.
95. ROITT, IVAN. M 로이트 필수면역학. 서울: 고문사. 1991: 227-30.
96. Metcalfe, D.D., Baram, D., Mekori, Y.A. Mast cells. *Physiol. Rev.* 1997; 77: 1033-79.
97. Okayama, Y., Petit-Frere, C., Kassel, O., Semper, A., Quint, D., Tunon-de-Lara, M.J., Bradding, P., Holgate, S.T., Church, M.K.. Ig E-independent expression of mRNA for IL-4 and IL-5 HUMAN LUNG MAST CELLS. *J.Immunol.* 1995; 155: 1796-808.
98. Moller, A., Heng, B.M., Grutzkau, A., Lippert, U., Aragane, Y., Schwarz, T., Kruger-Krasagakes, S. Comparative cytokine gene expression: regulation and release by human mast cells. *Immunology.* 1998; 93: 289-95.
99. Nilsson, G., Forsberg-Nilsson, K., Xiang, Z., Halibook, F., Nilsson, K., Metcalfe, D.D. Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 2295-301.
100. Andridge VT. Pseudomonas bacteremia. Can antibiotic therapy improve survival. *J Lab Clin Med.* 1979; 94: 196-205.
101. Holgate, S.T., Robinson, C., and Church, M.K.. Allergy, Principles and Practice. 3rd ed, Mosby, St. Louis. 1988: pp.135-6.
102. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S.. Cellular and Molecular Immunology. 2nd ed., Saunders, Philadelphia. 1994: 279-92.
103. 허충립. 피부알레르기. 서울. 경희의학. 1996; 12(2): 108-16.
104. 서영준. 발암과정에 있어서 Cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암예방. 분자생물학뉴스 2002; 13: 8-17, 213-347.
105. 노민수 외. 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. 약학회지. 1998; 42: 558-66.
106. 문태철 외. 천연물로부터 Cyclooxygenase-2 저해제 검색. 약학회지. 1998; 42: 214-19.