한방안이비인후피부과학회지 제23권 제1호(2010년 4월)
The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 2010;23(1) : 8-22

桂枝芍藥知母湯이 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉피부염에 미치는 영향

김성호 · 김희택
세명대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

The Effects of *Gyejijakyakjimo-Tang* on the Allergic Contact Dermatitis induced by DNCB

Sung-Ho Kim · Hee-Taek Kim

Objectives : The purpose of this study is to investigate the effects of *Gyejijakyakjimo-Tang* on the Allergic Contact Dermatitis caused by 2,4-dinitro-chlorobezene(DNCB).

Methods : Twenty eight mice were divided into four groups ; normal, control, experimental group A and B. Control and experimental groups were induced allergic contact dermatitis by DNCB. Experimental group A was orally administered the *Gyejijakyakjimo-Tang* and experimental group B was orally administered the prednisolone. In this study, ear thickness measurement, auricle microphotograph observation, MPO(Myeloperoxidase) activity measurement, Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) analysis of the mRNA level of TNF-α, IL-1β were performed on these four groups. In addition, the effect of *Gyejijakyakjimo-Tang* on cell viability and the effect of *Gyejijakyakjimo-Tang* on the compound 48/80-induced histamine release from HMC and RPMC were measured.

Results: 1. Both experimental group A and B had decreased ear thickness compared with control group In contact hypersensitivity assay.

2. In experimental group A, inflammatory edema was similarly observed comparing to control group. Nevertheless, inflammatory edema was obviously reduced in experimental group B. In both experimental group A and B, pathological lesion of dermatitis were alleviated. In addition, the numbers of infiltrated inflammatory cells were decreased compared with control group.
3. Compared to the normal group, there was a noticeable increase in MPO activity in control group. However, in experimental group A and B, it showed remarkable inhibition of the increase in MPO activity comparing with control group.
4. The level of expression of TNF-α, IL-1β in experimental group A and B were meaningfully lower than those in control group.
5. In MTT assay, the concentrations of *Gyejijakyakjimo-Tang* that were used on the test had no

cytotoxicity.

6. *Gyejijakyakjimo-Tang* dose-dependently inhibited the compound 48/80-induced histamine release from both HMC and RPMC.

Conclusions : According to above experiments, *Gyejijakyakjimo-Tang* was effective on allergic contact dermatitis.

Key Words : *Gyejijakyakjimo-Tang*, Allergic Contact Dermatitis, DNCB, MPO, TNF-α, IL-1β, histamine

Ⅰ. 서 론

알레르기성 접촉 피부염은 T 림프구와 대식세포 등에 의해 발생하는 세포성 면역과민반응으로 항원과 접촉 시 수 시간에서 72시간 사이에 염증반응이 시작되는 지연형 과민반응이며, 흔하고 만성적 경과를 나타내는 대표적인 피부 질환 중의 하나이다[1].

알레르기성 접촉피부염의 치료는 부신피질 호르몬제, 항히스타민제 등이 주로 사용되고 있으며, 최근 과민한 세포성 면역에 의한다는 점에 착안하여 면역능 억제 약물인 cyclosporin A와 FK 506을 이용하여 이를 억제하는 연구[2-4]가 이루어지고 있다.

한의학에서 알레르기성 접촉피부염은 漆瘡[5-7], 狐尿刺[8,9], 馬桶癬[10], 膏藥風[11], 粉花瘡[12]등의 범주에 속하며, 급성기는 風熱, 濕熱, 熱毒 등으로, 만성기는 熱毒으로 인하여 津液이 손상된 (風盛)血燥로 辨證하였으며, 치법에 있어서 급성기의 경우는 淸熱, 解毒, 祛風, 利濕, 凉血의 치법을, 만성기에는 祛風, 養血의 치법을 사용하고 있다[13].

DNCB(2,4-dinitrochlorobenzen)는 동물실험에서 알레르기성 접촉피부염을 유발시키는데 사용되는 대표적인 유발물질로 과민한 세포성 면역반응을 일으켜 피부손상 즉, 홍반, 해면화, 상피세포 과형성, 비만세포와 T림프구의 증가 등을 일으킨다[14-16].

최근 DNCB로 유발한 알레르기성 접촉피부염에 관한 최근의 한의학 연구에서는 개별 한약재[17-19]나 처방[20-27]을 이용한 연구들이 이루어지고 있으며, 각각의 연구들은 한의학에서의 알레르기성 접촉피부염의 변증치법[13]에 따라 각각 凉血[17,19,21], 淸熱解毒[18,20,22-24], 淸熱凉血祛風[25,27], 祛風養血[26]의 연구로 분류해 볼 수 있다.

桂枝芍藥知母湯은 〈金匱要略〉 72條에 나오는 處方이며[28-30] 風濕性 질환을 치료하는 처방으로서, 알레르기성 접촉피부염의 치법의 한 분류인 祛風, 利濕, 凉血의 치료법과 유사성을 갖고 있다. 지금까지 桂枝芍藥知母湯에 관한 연구 보고로는 이 등[31-33]의 연구가 있는데 이러한 연구들은 주로 관절염[32], 복통에 대한 효과[33]등의 실험 연구로서 알레르기성 접촉피부염에 관한 연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는 DNCB를 이용하여 알레르기성 접촉피부염을 유발한 mouse에 桂枝芍藥知母湯과 양약 중 prednisolone을 각각 경구 투여하는 실험을 진행하였으며 귀의 부종 변화 측정, 귀의 병리조직학적 변화 관찰, 호중구의 침착정도 평가, 전염증성 사이토카인의 유전자 발현 관찰, MTT assay를 통한 桂枝芍藥知母湯의 세포독성 여부 파악, 사람의 비만세포와 흰쥐 복강 비만세포에서의 histamine 유리량을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

교신저자 : 김희택, 충북 제천시 신월동 산 21-11 세명대학교부속한방병원
(Tel : 043-649-1817, e-mail : kht8725c@semyung.ac.kr)
• 접수 2010/03/10 • 수정 2010/03/31 • 채택 2010/04/05

Ⅱ. 실 험 방 법

1. 실험동물, 세포배양 및 재료

1) 실험동물

실험동물은 오리엔트 바이오(Korea)에서 구입한 6주령 female BALB/c mouse와 6주령 male SD(Sprague-Dawley)계 rat을 사용하였다. 충분한 고형 사료와 음수를 공급하여 자유 섭취케 했으며, 온도 20±2℃, 습도 50±5%, 밤낮주기(12시간 light/12시간 dark)로 조건에서 사육하였다.

2) 세포배양

Human mast cell line(HMC)은 세명대학교 본초학교실에서 분양 받아 사용하였다. 10% Fetal bovine serum(LONZA, USA)과 1% anti-biotic (Gibco, USA)가 포함된 Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM)의 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

3) 처방 구성 및 시료 제조

Table 1. The Composition of *Gyejijakyakjimo-tang*

韓藥名	生藥名	用量/貼(g)
白　朮	*Atractylodis Rhizoma Alba*	10
桂　枝	*Cinnamomi Ramulus*	8
防　風	*Saposhnikoviae Radix*	8
知　母	*Anemarrhenae Rhizoma*	8
白芍藥	*Paeoniae Radix Alda*	6
甘　草	*Glycyrrhizae Radix*	4
麻　黃	*Ephedrae Herba*	4
炮附子	*Aconiti Lateralis Preparata Radix*	2
生　薑	*Zingiberis Rhizoma Crudus*	10
合　計		60

桂枝芍藥知母湯(*Gyejijakyakjimo-tang*)의 구성 약물(Table 1)을 (주)한의유통에서 구입하여 사용하였다. 桂枝芍藥知母湯 5첩 분량에 해당하는 300 g을 증류수 3L와 혼합하여 2시간 동안 100℃로 전탕한 후 여과액을 여과지로 3회 반복 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator(EYELA, Japan)를 이용하여 200 ㎖로 농축하고, freezer dryer system(Labconco, USA)로 동결건조하여 최종적으로 52.69 g의 분말을 얻었으며, 이 분말을 3차 증류수에 용해시켜 실험동물에 투여하였다.

2. 실험방법

1) 실험군

Mouse 28마리를 무작위로 각각 7마리씩 다음의 네 군으로 분류하였다.

① 정상군(Normal, N) : 무처치군.
② 대조군(Control, C) : 알레르기성 접촉피부염을 유발한 군.
③ 실험군 A(Sample A, SA) : 알레르기성 접촉피부염을 유발하고, 桂枝芍藥知母湯을 1.5 g/㎏로 경구투여한 군.
④ 실험군 B(Sample B, SB) : 알레르기성 접촉피부염을 유발하고, Prednisolone을 3 ㎎/㎏로 경구투여한 군.

2) 알레르기성 접촉피부염 병태 모델

Kim[34]등의 방법을 변형하여 알레르기성 접촉피부염의 병태 모델을 만들었다. 병태 모델 유발 항원으로 2,4-dinitro-chlorobezene(DNCB; Sigma, USA)을 acetone과 olive oil의 4:1 혼합액에 용해한 후 사용하였다. 1차 감작으로 마우스의 상복부를 제모한 후 1주일 간(day -7, -5, -2) 3회에 걸쳐 0.5%의 DNCB 용액 50 ㎕을 도포하였으며, 이어서 1주간(day 0, 3. 6) 총 3회에 걸쳐 마우스의 우측 귀 안쪽면에 1.5%의 DNCB 용액 15 ㎕을 도포하여 2차 감작을 시켰다.

3) 시료의 투여

桂枝芍藥知母湯 분말을 3차 증류수에 용해시켜

1차 감작 시작일(day -7)부터 2차 감작 종료일(day 6)까지 1일 1회 1.5 g/㎏의 농도로 총 14회 경구 투여했으며, Prednisolone(Sigma, USA)은 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt 용액에 용해시킨 후 1차 감작일 부터 2차 감작 종료일까지 1일 1회 3 ㎎/㎏의 농도로 총 14회 경구 투여했다.

4) 귀의 부종 측정

2차 감작일(day 0, 3, 6)에 DNCB 도포 4시간 후 digital calipper (Mitutoyo, Japan)를 이용하여 마우스 우측 귀의 이개(auricle) 부분을 3회 측정 후 평균을 구하였다.

5) 귀의 조직 관찰

최종 DNCB 도포 24시간 후(day 7) 경추 탈골로 마우스를 희생하고 우측 이개(auricle)를 적출하여 10% 중성포르마린 용액에 1일간 고정한 후 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하고 5 ㎛ 두께의 이개 절단면 박절편을 제작하였다. 박절편을 Hematoxylin & Eosin 염색하여 광학현미경으로 병리조직학적 변화를 관찰하였다.

6) Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

최종 DNCB 도포 24시간 후(day 7) 마우스를 희생하여 마우스의 spleen을 떼어내고, pH 7.4 Phosphate buffered saline으로 세척한 후 RNA later(QIAGEN)에 보관하였다가 RNA를 추출하였다. TRI reagent(Molecular Research Center, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하고, 각각의 RNA를 동량으로 하여 cDNA를 합성한 후, cDNA template 1 ㎕, 10pM primer, 10mM dNTP mix, 1.25U EF-Taq DNA polymerase, 10X EF-Taq buffer(Solgent, Korea)로 total volume 50 ㎕가 되게 하여 pre-denaturing phase 95℃ 2min, 1 cycle ; denaturing phase 95℃ 20sec, annealing phase 60℃ 40sec, elongation phase 72℃ 20sec 40 cycle ; post-elongation phase 72℃ 5min, 1 cycle 조건에서 PCR을 수행하였다. 이에 따른 product를 10 ㎕씩 ethidium bromide(EtBr)가 포함된 1.5% agarose gel에 100V 전압에서 20분 전기영동한 후, UV로 관찰하였다.

Table 2. Primer Sequences used in this study

Gene name	Primer sequence
Cyclophilin (299bp)	Forward : 5'-CATTTGCCATGGACAAGATG-3' Reverse : 5'-ACCCCACCGTGTTCTTCGAC-3'
TNF-α (118bp)	Forward : 5'-TCAGCGAGGACAGCAAGGG-3' Reverse : 5'-CAGTGAGTGAAAGGGACAGAACC-3'
IL-1β (124bp)	Forward : 5'-TACATCAGCACCTCACAAGCAG-3' Reverse : 5'-CATTAGAAACAGTCCAGCCCATAC-3'

7) Myeloperoxidase(MPO) activity

MPO activity는 Han[35]등의 방법을 수정 보완하여 시행하였다. 마우스를 희생일(day 7)에 우측 귀를 일정한 크기로 잘라서 PBS에 담궈 washing한 귀조직을 Protein Extraction solution(iNtRON, Korea)과 Protease inhibitor cocktail(Pierce, USA)이 0.05M PBS(pH 7.4)에 각각 1% 농도가 되도록 만든 혼합액에 넣어 homogenizer(IKA, T10 basic, Germany)를 이용하여 tissue를 분쇄하였다. 이때 얻어진 Homogenates를 4℃에서 13200 rpm, 30min 동안 원심분리를 수행하고 상층액을 얻었다. 이 상층액 30 ㎕를 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide(in 50 mM potassium phosphate, pH 6.4), 0.165 ㎎/㎖ o-dianisidine dihydrochloride, 0.0015% H_2O_2를 포함하는 반응액 170 ㎕에 넣고 상온에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 450 ㎚파장에서 흡광도를 측정했다.

8) MTT assay

桂枝芍藥知母湯의 독성 여부는 MTT assay를 통해 평가하였다. HMC를 24well plate에 4×10^5 cells/㎖로 분주하고, 桂枝芍藥知母湯을 0, 10, 50, 100, 500㎍/㎖로 처치하였다. 24시간 배양 시킨 후, cell proliferation kit I(Roche, Germany)을 10 ㎕씩 넣어 4시간 반응시키고, 최종적으로 얻어진 cell을 모아 원심분리 후 dimethyl sulfoxide (Sigma, USA)에 녹여 ELISA reader(Bio-Tek, USA)를 이용하여 595 ㎚파장에서 흡광도를 측정하였다.

9) 사람 비만세포(HMC)에서 histamine 유리량 측정

HMC를 24well plate에 4×10^5 cells/㎖으로 분주하고, 3시간 incubation 후에 桂枝芍藥知母湯을 0, 10, 50, 100, 500 ㎍/㎖로 처치하였다. 30분 후 Normal군을 제외한 나머지 군에 compound 48/80(Sigma, USA) 1 ㎎/㎖ 농도로 처치하였다. 15분 경과 후 상층액을 96well plate에 duplicate로 옮겨 1M NaOH를 50 ㎕씩 넣고, 이어서 1 ㎎/㎖의 o-phthaldialdehyde(in EtOH)를 100 ㎕씩 넣은 후 ELISA reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 Exitation(360/40), Emission(460/40) 조건에서 형광값을 측정하였다.

10) 흰쥐 복강 비만세포(RPMC)에서 histamine 유리량 측정

Kanemoto 등[36] 방법을 변형하여 시행하였다. Rat을 경추 탈골하여 마취 시킨 후, Tyrode buffer B(137 mM NaCl, 5.6mM glucose, 12 mM $NaHCO_3$, 2.7 mM KCl, 0.3 mM NaH_2PO_4, 0.1% gelatin; pH 7.4) 20 ㎖을 복강에 넣고 90초간 맛사지하고, 복강을 열어 cell을 모아서 150×g, 10분 원심분리를 시행하였다. 이어서 상층액을 버리고 Tyrode buffer B 1 ㎖를 넣고 셀을 부유시킨 뒤, iodixanol 1.5 ㎖와 3차 증류수 0.5 ㎖의 혼합액을 추가하고 다시 400×g, 15분 원심분리를 시행하였다. 원심 분리 후 상층액을 버리고 Tyrode buffer A(10 mM HEPES, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.4 mM CaCl2, 1 mM MgCl, 5.6 mM glucose, 0.1% BSA; pH7.4)를 1 ㎖ 넣고, 1200 rpm 2분 원심분리 하였다. 상층액을 버리고, 최종적으로 얻어진 pellet에 Tyrode buffer A 13 ㎖을 넣고 24well plate에 3×10^5 cells/㎖로 분주하였으며, 이후의 실험 방법은 9)와 동일하게 시행하였다.

11) 통계처리

① SPSS version 12.0 프로그램을 이용하여 통계처리를 시행하였고, 각 실험군의 결과치 비교는 one-way ANOVA test의 Tukey test를 이용하였으며, 통계적 유의확률은 $p<0.05$로 설정하였다. 모든 측정값은 평균값±표준편차(Mean±SD)로 나타내었고, 유의확률(p-value)은 $p<0.05$로 하였다.

② 모든 측정값은 평균값±표준편차(Mean±SD)로 표시하였다.

Ⅲ. 실 험 성 적

1. 귀의 부종 변화에 미치는 영향

DNCB의 도포가 반복 될수록 정상군에 비해 대조군과 실험군 A, 실험군 B는 부종이 증가하였다. 대조군의 부종 증가폭이 가장 컸으며, 실험군 A는 통계적으로 유의하지는 않지만($p>0.05$) 대조군에 비해 부종 증가폭이 적었고, 실험군 B는 대조군에 비해 부종의 증가폭이 유의한 수준($p<0.01$)으로 적었다(Table 3, Fig. 1).

Table 3. Changes of Ear thickness induced by repeated application of DNCB

	0	3	6
N	0.23±0.01	0.23±0.01	0.24±0.01
C	0.26±0.01***	0.58±0.01***	0.78±0.12***
SA	0.25±0.01*	0.53±0.07***	0.62±0.11***
SB	0.23±0.01###	0.45±0.06***,##	0.54±0.13***,###

N : Normal group
C : Control group (DNCB-treated group)
SA : Sample A group (DNCB and *Gyejijakyakjimo-tang* treated group)
SB : Sample B group (DNCB and Prednisolone treated group)
Values are represented as mean ± SD.(n=7)
*, *** : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as $p<0.05$, $p<0.001$
##, ### : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Tukey test as $p<0.01$, $p<0.001$

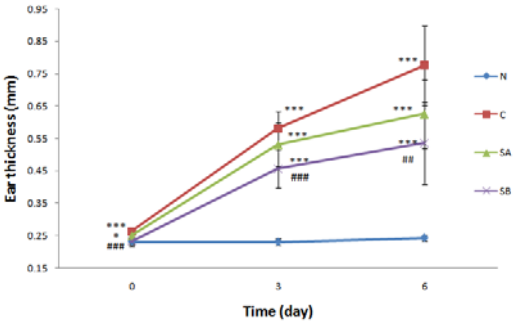

Fig. 1. Changes of Ear thickness induced by repeated application of DNCB.

N : Normal group
C : Control group (DNCB-treated group)
SA : Sample A group (DNCB and *Gyejijakyakjimo-tang* treated group)
SB : Sample B group (DNCB and Prednisolone treated group)
Values are represented as mean ± SD.(n=7)
*, *** : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as $p<0.05$, $p<0.001$
##, ### : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Tukey test as $p<0.01$, $p<0.001$

2. 조직학적 관찰

정상군의 이개는 피부, 부속기관 및 연골 모두 정상적인 구조를 유지하고 있었다(Fig. 2A). 대조군의 이개는 염증성 부종으로 현저히 두터워져 있었으며, DNCB를 도포한 속피부를 포함하여 바깥피부에서도 화농성 염증이 관찰되었다. 표피세포의 유극세포층 증식소견이 여러 부위에서 관찰되었으며, 부위에 따라 이개연골이 괴사되고 붕괴되어 연골이 단절된 소견도 관찰되었다.

진피표피 경계부(dermoepidermal junction)는 틈새가 형성되어 있었으며, 모세혈관의 확장이 두드러지게 관찰되었다. 침윤된 염증세포는 대부분 호중구 및 림프구가 혼재되어 있었으며, 또한 많은 수의 호염구도 침윤되어 있었다(Fig. 2B).

실험군 A에서 이개의 염증성 부종이 대조군과 유사한 정도로 관찰되었으나, 바깥피부 진피에서의 염증세포 침윤은 관찰되지 않았고, 속피부에서의 염증세포 침윤정도는 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었다(Fig. 2C).

실험군 B에서 이개의 염증성 부종은 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었으며, 바깥피부 진피에서의 염증세포 침윤은 관찰되지 않았다. 그리고 속피부에서의 염증세포 침윤정도는 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었다(Fig. 2D).

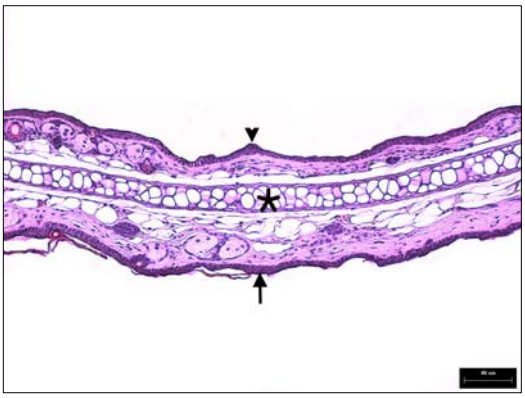

Fig. 2A. Microphotograph of auricle from Normal group. The histological structure of external skin(arrow head), internal skin(arrow) and cartilage(asterisk) of auricle are intact. H&E stain. Bar=40 ㎛

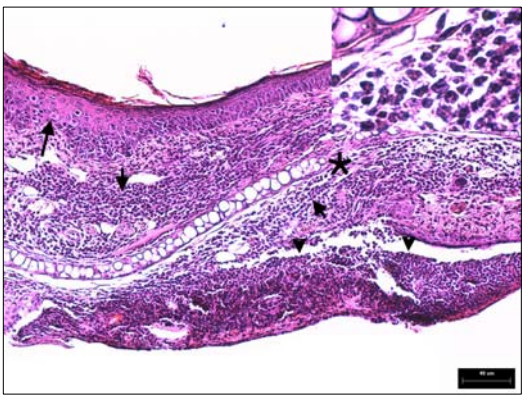

Fig. 2B. Microphotograph of auricle from control group. Severe suppurative dermatitis are occurred. Inflammatory cells are infiltrated into both dermal layers(short arrows) of internal and external skin. Major infiltrated cells are neutrophils and lymphocyte (insert). Some region of auricular cartilage is destructed(asterisk). Acanthosis(long arrow), cleft of dermoepidermal junction (arrow head), and edematous thickening of the auricular skin are prominent. H&E stain, Bar=40㎛

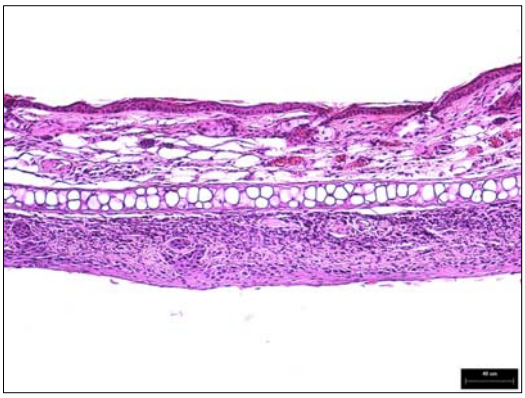

Fig. 2C. Microphotograph of auricle from SA group. Pathological lesions of dermatitis are alleviated. Edematous thickening is similar with that of control group. However, infiltration of inflammatory cells are not observed in dermal layer of external skin, and the numbers of infiltrated cells are reduced compare with control group. H&E stain, Bar=40㎛

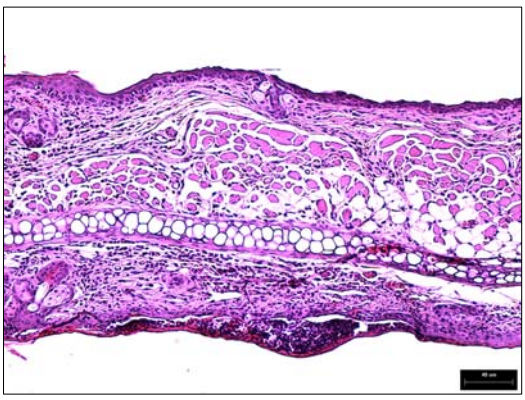

Fig. 2D. Microphotograph of auricle from SB group. Pathological lesions of dermatitis are alleviated. Edematous thickening is less severe than that of control group. Also infiltration of inflammatory cells are not observed in dermal layer of external skin, and the numbers of infiltrated cells are reduced compare with control group. H&E stain, Bar=40㎛

3. 호중구의 침착에 미치는 영향

호중구의 marker enzyme인 MPO activity를 측정한 결과 대조군의 OD값은 0.57±0.08로 정상군의 0.13±0.02에 비해 크게 증가되었다. 실험군 A와 실험군 B의 OD값은 각각 0.45±0.03, 0.47±0.09로 대조군에 비해 통계적으로 유의한 수준의 차이가 있었다(Fig. 3).

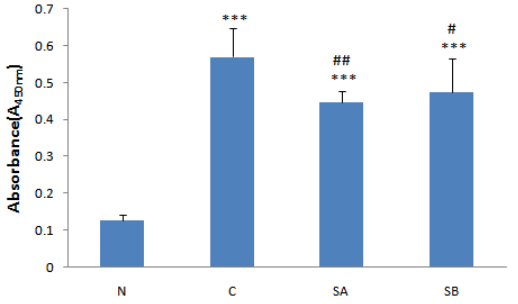

Fig. 3. Effect of *Gyejijakyakjimo-tang* on MPO (Myeloperoxidase) activity.

N : Normal group
C : Control group (DNCB-treated group)
SA : Sample A group (DNCB and *Gyejijakyakjimo-tang* treated group)
SB : Sample B group (DNCB and Prednisolone treated group)
Values are represented as mean ± SD.(n=7)
*** : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as $p<0.001$
#, ## : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Tukey test as $p<0.05$, $p<0.01$

4. Proinflammatory cytokine의 유전자 발현에 미치는 영향

전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine) TNF-α, IL-1β의 발현을 확인하기 위해 spleen을 적출하여 RT-PCR을 시행하였다. 정상군에 비해 대조군에서 TNF-α와 IL-1β의 발현이 뚜렷하게 증가하였으며, 실험군 A와 실험군 B에서는 대조군에 비해 TNF-α, IL-1β의 발현이 억제되었음을 확인할 수 있었다. House keeping gene으로는 cyclophilin을 사용하였다(Fig. 4).

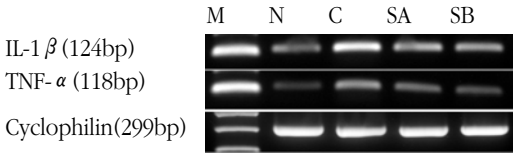

Fig. 4. Results of RT-PCR analysis of the mRNA levels of TNF-α, IL-1β.

M : marker
N : Normal group
C : Control group (DNCB-treated group)
SA : Sample A group (DNCB and *Gyejijakyakjimo-tang* treated group)
SB : Sample B group (DNCB and Prednisolone treated group)

5. 세포 독성 평가

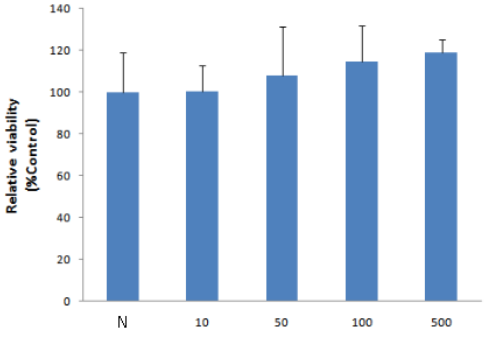

Fig. 5. The effect of *Gyejijakyakjimo-tang* on cell viability.

N : 0 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
10 : 10 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
50 : 50 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
100 : 100 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
500 : 500 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
Values are represented as mean ± SD.(n=4)

桂枝芍藥知母湯의 독성을 알아보기 위해 HMC에 桂枝芍藥知母湯을 각각 0, 10, 50, 100, 500㎍/㎖의 농도로 처리한 후 MTT assay를 시행하였다. Control(0㎍/㎖)에서의 생존률을 100%로 하였을 때 10, 50, 100, 500㎍/㎖의 생존률은 각각

100.51±12.05%, 108.22±23.29%, 114. 72±17.31%, 118.87±6.11%로 桂枝芍藥知母湯을 처리하였을 때 오히려 생존률이 증가하였다(Fig. 5).

6. 사람 비만세포와 흰쥐 복강 비만세포에서 histamine의 유리량에 미치는 효과

桂枝芍藥知母湯의 항히스타민 작용을 알아보기 위해 사람 비만세포(HMC)와 흰쥐 복강 비만세포(RPMC)에 compound 48/80으로 histamine 분비를 유도하고 桂枝芍藥知母湯을 각각 0, 10, 50, 100, 500㎍/㎖로 처치한 결과, 桂枝芍藥知母湯이 비교적 농도 의존적으로 histamine의 분비를 억제함을 알 수 있었다(Table 4, Fig. 6, Fig. 7).

Table 4. The effect of *Gyejijakyakjimo-tang* on the compound 48/80-induced histamine release from HMC and RPMC

	HMC	RPMC
	Histamine (㎍/㎖)	Histamine (㎍/㎖)
N	0.30 ± 0.03	0.04 ± 0.04
C	3.08 ± 0.19***	3.01 ± 0.31***
10	2.40 ± 0.23***	2.76 ± 0.42***
50	2.32 ± 0.65***,#	2.52 ± 0.28***
100	1.22 ± 0.49**,###	2.42 ± 0.48***
500	1.16 ± 0.50*,###	2.16 ± 0.34***,##

N : no treatment
C : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 treated group
10 : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 and 10 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
50 : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 and 50 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
100 : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 and 100 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
500 : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 and 500 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
Values are represented as mean ± SD.(HMC n=6; RPMC n=4)
*, **, *** : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as p<0.05, p<0.01, p<0.001
#, ##, ### : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Tukey test as p<0.05, p<0.01, p<0.001

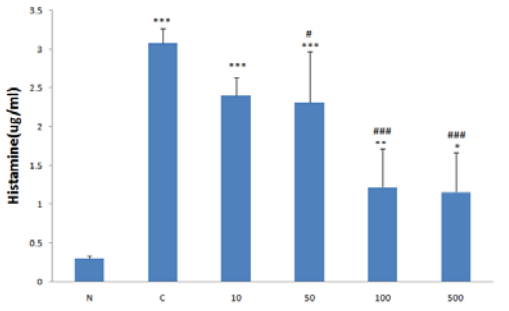

Fig. 6. The effect of *Gyejijakyakjimo-tang* on the compound 48/80-induced histamine release from HMC.

N : no treatment
C : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 treated group
10 : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 and 10 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
50 : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 and 50 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
100 : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 and 100 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
500 : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 and 500 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
Values are represented as mean ± SD.(n=6)
*, **, *** : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as p<0.05, p<0.01, p<0.001
#, ### : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Tukey test as p<0.05, p<0.001

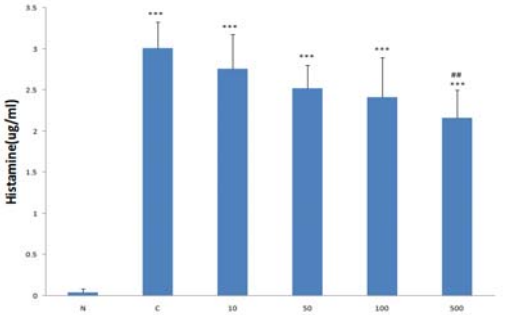

Fig. 7. The effect of *Gyejijakyakjimo-tang* on the compound 48/80-induced histamine release from RPMC.

N : no treatment
C : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 treated group
10 : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 and 10 ㎍/㎖

Gyejijakyakjimo-tang treated group
50 : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 and 50 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
100 : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 and 100 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
500 : 1 ㎎/㎖ compound 48/80 and 500 ㎍/㎖ *Gyejijakyakjimo-tang* treated group
Values are represented as mean ± SD.(n=4)
*** : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as $p<0.001$
: Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Tukey test as $p<0.01$

Ⅳ. 고 찰

최근 산업발달로 인하여 합성물질의 범람과 환경오염이 가속화되면서 여러 가지 면역과민반응을 유발시키는 알레르겐이 급증하는 추세이다[37].

외국의 경우 접촉피부염 환자는 전체 피부질환의 4%~7%를 차지하고 있으며[1], 국내의 경우 은[38]의 보고에 의하면 종합병원에 내원한 환자들에 있어서 접촉 피부염의 발생빈도는 5.3%~13.1%로 보고되고 있다. 이와 같은 측면을 볼 때 접촉피부염에 대한 임상적 연구의 중요성은 실로 크다고 할 수 있다.

알레르기성 접촉피부염은 항원에 이미 감작된 개체가 재차 항원에 접촉될 때 접촉된 국소부위에 발적, 구진, 소수포, 소양 등의 염증반응을 일으키는 제 Ⅳ형 지연형 과민반응(Delayed type hypersensitivity)에 속하는 면역질환이다[39-41].

발병기전은 알레르겐이 피부에 접촉되어 피부에 침투한 뒤 피부단백과 결합되어 완전한 항원으로 작용을 하게 되는데, 이것은 Langerhans Cell(LC)와 접촉하여 T세포에 전달되며, 이러한 T세포들 중 일부가 기억세포로 체내에 남아 있게 된다. 이러한 상황에서 재차 항원이 피부를 침투하게 되면 기억세포가 이를 감지하여 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, INF-γ, TNF-α, GM-CFS 등과 같은 각종 화학물질이 분비되며, 이를 매개로 염증이 발생된다[40,42].

모든 물질들이 항원이 될 수 있으며, 특히 니켈, 크롬을 포함하여 옻나무의 pentadecylcatechol, 은행나무 열매의 gingkolic acid 등이 항원성이 높다. 이 외에도 화장품의 방향성 화합물, 염색약에 포함된 paraphenylenediamine, 매니큐어 성분, 합성수지를 고분자화 하기 전의 중간물질이나 촉매제제, 농약 등이 항원으로 종종 작용한다[40,42].

알레르기성 접촉피부염은 한의학적인 범주로서 발생 부위와 원인 물질에 따라 漆瘡[5-7], 狐尿刺[8,9], 馬桶癬[10], 膏藥風[11], 粉花瘡[12] 등에 해당한다. 漆瘡은 漆의 辛熱之毒이 원인이 되어 面部에 발생하며, 狐尿刺는 螳螂의 分泌物, 狐狸의 排泄物로 인하여 手足肢節에 생긴다. 馬桶癬은 새로 옻칠한 변기와 접촉하여 臀部에 생기고, 膏藥風은 外用藥의 藥毒으로 인해 접촉한 부위 위주로 생기며, 粉花瘡은 鉛粉을 이용한 花粧으로 인해 面部에 발생하는 것이다. 상기 질환들은 內因으로 腠理가 치밀하지 못하거나 체질적으로 素因이 있는 동시에 外因으로 작용하는 風, 濕, 熱, 蟲이나 有毒한 물질에 접촉되어 발생되는 것으로 보며, 병의 증상과 경과는 대부분 유사하고 접촉하는 항원의 종류만 달라 현대의학의 알레르기성 접촉피부염과 유사하다[43].

한의학적 辨證에 있어서 瘙痒感, 紅斑, 煩痛, 丘疹, 水泡 등의 증상이 나타나는 급성기는 증상과 病程에 따라 風熱, 濕熱, 熱毒으로 나누며, 瘙痒感, 皮膚肥厚, 苔癬化의 증상이 나타나는 만성기는 熱毒으로 인하여 津液이 손상된 血燥로 辨證된다[13].

한의학적 치료에 있어 시대적으로 관찰해보면 淸代까지의 문헌들에는 外治法을 위주로 기술하고 있으며 현대에 와서 內治法이 병용되고 있다. 內治法의 경우 급성기의 경우에는 淸熱解毒, 祛風, 利濕, 凉血이 위주가 되며, 만성기에는 祛風, 養血을 위주로 하여 증상의 발현 부위나 표현 형태에 따라 治法의 偏重과 약물의 加減을 하게 된다. 外治

法을 살펴보면 病程 시기에 따라 급성기에는 淸熱燥濕하는 약물들이, 만성기에는 活血養血하는 약물들이 사용되었다. 劑型 또한 급성기에는 丘疹 위주이거나 水疱가 터지지 않았을 경우에는 洗劑, 散劑를, 水疱가 터져 삼출물이 있는 경우는 煎湯液, 洗劑, 散劑를, 滲出液이 없는 경우와 糜爛하거나 結痂를 이룬 경우 또는 만성기에는 膏劑를 사용하였다[13,44].

최근 DNCB로 유발한 알레르기성 접촉피부염에 관한 한의학 연구들은 개별 한약재[17-19]나 처방[20-27]을 이용한 연구들이 이루어지고 있다. 이 연구들을 한의학적 辨證 및 치료법[13]으로 나누어 보면, 凉血을 목적으로 한 生地黃 추출물[17], 丹蔘[19], 凉血四物湯加味方[21]의 연구, 淸熱解毒을 위주로 한 金銀花 화장수[18], 四妙勇安湯[20], 散風苦蔘丸[22], 椒甘湯[23], 牛芳解肌湯[24]의 연구, 淸熱凉血祛風의 치법인 消風散 추출물[25], 內托千金散[27]의 연구, 祛風養血을 목적으로 한 人蔘養榮湯[26]의 연구로 나누어 볼 수 있다.

桂枝芍藥知母湯은 〈金匱要略〉72條에 나오는 處方으로 "諸肢節疼痛 身體尪羸 脚腫如脫 頭眩 短氣 溫溫欲吐 桂枝芍藥知母湯主之"라 하며[28-30], 桂枝, 芍藥, 知母, 麻黃, 防風, 白朮, 附子, 甘草, 生薑으로 구성된 風濕性 歷節病에 의미가 있는 처방이다. 알레르기성 접촉피부염의 한의학적 치료법은 급성기에는 淸熱解毒, 祛風, 利濕, 凉血이 위주가 되며, 만성기에는 祛風, 養血을 목표로 하는데 桂枝芍藥知母湯의 祛風, 利濕, 凉血의 효능이 급성기의 알레르기성 접촉피부염의 치료법과 유사성을 갖고 있어 본 연구에 사용할 처방으로 선택하였다.

지금까지 桂枝芍藥知母湯에 관한 연구 보고로는 이 등[31-33]의 연구가 있는데, 이러한 연구들은 주로 관절염[32], 복통에 대한 효과[33]등의 실험 연구로서 알레르기성 접촉피부염에 관한 연구는 접하지 못하였다. 따라서 이번 연구를 통해 알레르기성 접촉피부염에 관한 효과를 살펴보고자 하였다.

이를 위해 BALB/c mouse 28마리를 각각 7마리씩 정상군, 대조군과 함께 실험군을 A, B로 나누어 각기 桂枝芍藥知母湯과 prednisolone을 경구투여하도록 하였으며, 알레르기성 접촉피부염의 인위적인 유발을 위해서는 유발 항원으로 다양한 실험에 이용되었던 DNCB를 적정 농도로 용해한 후 1, 2차에 걸쳐 감작시켜 유발하여 귀의 부종 변화 측정, 귀의 병리조직학적 변화 관찰, 호중구의 침착정도 평가, 전염증성 사이토카인의 유전자 발현 관찰, MTT assay를 통한 桂枝芍藥知母湯의 세포독성 여부, 사람의 비만세포와 흰쥐 복강 비만세포에서의 histamine 유리량 측정을 실시하였다.

실험군 B에는 부신피질호르몬의 일종인 prednisolone을 사용하였다. 그 효능은 모든 염증과정에서 효과를 나타내어 발열, 홍반, 부종 및 압통을 감소시키고, 염증 반응에 있어서 초기의 반응인 부종, fibrin 침착, 호중구 이동 및 식작용 등과 후기 반응인 collagen 합성과 침착 같은 반응진행을 지연시킨다. 현재까지 연구 보고된 부작용은 감염에 대한 신체의 반응력이 저하되어 감염이 심각해지는 것 또는 위궤양, 당뇨, 골다공증 등이 있다. 또한 다양한 체액과 전해질 불균형, 부신기능부전증, 녹내장, 인격장애, 자살과 정신이상 유발, 월경불순, AIDS 환자의 Kaposi's sarcoma의 활성화, 여드름, 비만 등이 나타나기도 한다[46]. 따라서 이와 같은 부작용으로 인해 부작용의 위험도는 적고 높은 효과를 기대할 수 있는 다른 치료법의 연구가 요구되고 있다.

접촉성 과민반응으로 인한 부종 감소를 알아보기 위해 0, 3, 6일에 DNCB 도포 4시간 후 digital calipper를 이용하여 마우스의 우측 귀의 두께를 3회 측정한 후 평균을 구하였다. 대조군과 실험군 A, B는 모두 DNCB를 반복 도포할수록 부종이 증가하는 양상을 보였으나, 그 증가 정도에 있어 대조군의 부종 증가폭이 가장 컸다. 실험군 A는 통계적으로 유의하지는 않지만($p > 0.05$) 대조

군에 비해 부종 증가폭이 적었고, 실험군 B는 대조군에 비해 부종의 증가폭이 유의한 수준($p<0.01$)으로 적었다. 이러한 결과는 桂枝芍藥知母湯이 prednisolone에 비해 효과는 적지만 접촉성 과민반응으로 인한 부종을 감소시킴을 의미한다.

귀의 병리조직학적 변화를 관찰한 결과 대조군의 이개는 염증성 부종으로 현저히 두터워져 있었으며, DNCB를 도포한 속피부를 포함하여 바깥피부에서도 화농성 염증이 관찰되었다. 표피세포의 유극세포층 증식소견이 여러 부위에서 관찰되었으며, 부위에 따라 이개연골이 괴사되고 붕괴되어 연골이 단절된 소견도 관찰되었다. 진피표피 경계부(dermoepidermal junction)는 틈새가 형성되어 있었으며, 모세혈관의 확장이 두드러지게 관찰되었다. 침윤된 염증세포는 대부분 호중구 및 림프구가 혼재되어 있었으며 또한 많은 수의 호염구도 침윤되어 있었다.

실험군 A에서 이개의 염증성 부종이 대조군과 유사한 정도로 관찰되었으나, 바깥피부 진피에서의 염증세포 침윤은 관찰되지 않았고, 속피부에서의 염증세포 침윤정도는 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었다. 실험군 B에서 이개의 염증성 부종은 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었고, 바깥피부 진피에서의 염증세포 침윤은 관찰되지 않았다. 또한 속피부에서의 염증세포 침윤정도는 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었다.

Myeloperoxidase(MPO)는 산화수소(Hydrogen peroxide)에 의해 여러 가지 기질들의 산화 반응에 촉매역할을 하는 효소인 Peroxidase의 일종이며, 호중구와 호중구 전구세포, 호염기구와 전구세포, 호산구와 전구세포에 존재한다[46]. 호중구의 침착정도를 평가하기 위해 호중구 과립에 존재하는 marker enzyme인 MPO activity를 측정하였다. 대조군의 MPO양은 크게 증가하였으나 실험군 A와 실험군 B는 대조군에 비해 상대적으로 MPO의 증가폭이 적어 桂枝芍藥知母湯이 MPO activity를 억제하였다.

TNF(α, β)와 IL-1(α, β)은 다른 사이토카인의 보조 없이 조직에 백혈구 침윤을 야기하는 등의 모든 염증반응을 유발할 수 있는 전염증성(pro-inflammatory) 사이토카인이다. TNF(Tumor Necrosis Factor)-α는 대부분의 염증반응을 유도할 수 있으며, LC나 다른 APC(Antigen Presenting Cell)의 국소 림프절로의 이주에도 작용한다. LC나 단핵세포/대식세포의 주된 사이토카인인 IL-1β는 표피로부터 LC가 이주하는데 관여하고 있다[40]. 본 연구에서는 전염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β의 발현 양상을 확인하기 위해 면역장기인 spleen을 적출하여 RT-PCR을 시행하였다. 대조군에 비해 실험군 A, B에서 이들의 발현이 억제되어 桂枝芍藥知母湯이 전염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β의 발현을 억제함을 확인하였다.

桂枝芍藥知母湯의 세포독성 여부를 파악하기 위해 Human mast cell line(HMC)을 이용하여 MTT assay를 시행하였다. 桂枝芍藥知母湯을 각각 0, 10, 50, 100, 500 $\mu g/ml$의 농도로 처리한 결과 농도가 높아질수록 생존율이 증가하였는데 이러한 결과는 桂枝芍藥知母湯의 세포독성이 없음을 의미한다.

Histamine은 항원-항체 반응에 의해 비만세포가 자극될 때, 비만세포의 과립에서 세로토닌, 뉴코트리엔, 헤파린 등의 많은 화학물질들과 함께 유리되는데, 혈관확장과 단백의 유출을 유도하여 가려움증, 발적, 홍반, 팽진 등을 야기하고 제Ⅰ형 아나필락시스 과민반응을 일으킨다[40]. 본 연구에서는 histamine의 분비 억제효과를 확인하기 위하여 사람 비만세포와 흰쥐 복강 비만세포에 compound 48/80을 처리하여 histamine 분비를 유도하였고, 桂枝芍藥知母湯을 농도별로 처리하여 그 분비량을 측정한 결과, compound 48/80만을 처치했을 때에 비해 桂枝芍藥知母湯을 함께 처치했을 때에 농도

의존적으로 histamine 유리량이 감소되어 억제효과를 확인하였다.

이상의 실험결과로 볼 때 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉피부염에 대해 桂枝芍藥知母湯은 유효한 효과가 있음을 알 수 있었다. 병리조직학적 변화에서도 실험군 A는 대조군에 비해 염증성 부종은 비슷하였으나, 속피부에서의 염증세포 침윤정도는 미약하였고 바깥피부 진피에서의 염증세포 침윤은 관찰되지 않았다. 실험군 B는 대조군에 비해 이개의 염증성 부종 및 속피부에서의 염증세포 침윤정도는 미약하였으며, 바깥피부 진피에서의 염증세포 침윤은 관찰되지 않았다. 그리고 염증 과정에서 분비되는 호중구의 침착 정도를 평가하기 위한 MPO activity와 전염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β의 발현이 대조군에 비해 실험군 A와 실험군 B에서 억제되었음을 확인할 수 있었다. 또한 MTT assay를 시행한 결과 桂枝芍藥知母湯은 세포독성이 없었고, 알레르기 반응을 유발하는 histamine의 유리량 역시 농도 의존적으로 억제하였다.

이를 종합하면 桂枝芍藥知母湯은 특별한 부작용 없이 알레르기성 접촉피부염에 효과가 있음을 확인하였다. 그러나 선행 연구[27] 결과와 비교하면 실제 임상활용에 있어서 부족한 부분이 있을 것으로 생각된다. 그 이유는 선행 연구에 사용된 內托千金散이 淸熱解毒, 發散解表, 祛風, 養血, 補氣 등 다양한 治法을 목표로 扶正祛邪의 의미가 있는 처방인데 비하여 본 연구에 사용한 桂枝芍藥知母湯은 祛風濕에 중점을 두고 있기 때문으로 판단된다. 따라서 향후 桂枝芍藥知母湯을 알레르기성 접촉성피부염 환자에 사용할 경우 단독 처방이 아닌 淸熱解毒, 養血, 補氣 등의 효능이 있는 약물이나 혹은 처방과 병용한다면 더욱 효과적일 것으로 사려된다. 또한 桂枝芍藥知母湯의 알레르기성 접촉피부염에 대한 작용 기전 규명에 대해서 본 연구에서는 밝히지 못하였기에 추후 이에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결 론

DNCB를 이용하여 알레르기성 접촉피부염을 유발한 mouse에 桂枝芍藥知母湯을 경구 투여하여 귀의 부종 변화와 병리조직학적 변화, 호중구의 침착정도, 전염증성 사이토카인의 유전자 발현, 桂枝芍藥知母湯의 세포독성 여부, 사람의 비만세포와 흰쥐 복강 비만세포에서의 histamine 유리량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 실험군에서 귀의 부종 감소 효과를 보였다.
2. 실험군에서 염증성 부종에 대한 효과는 적었으나, 염증세포의 침윤 등은 현저히 감소되었다.
3. 桂枝芍藥知母湯은 MPO activity 억제효과가 있었다.
4. 실험군에서 대조군에 비해 TNF-α, IL-1β의 발현이 억제되었다.
5. 桂枝芍藥知母湯은 실험에 사용한 농도에서 세포독성이 없었다.
6. 桂枝芍藥知母湯은 농도 의존적으로 histamine 유리량을 억제하였다.

참 고 문 헌

1. 안성구, 지혜구, 황상민, 정준, 장경훈. Common skin disease. 서울: 퍼시픽출판사. 2003:41-50.
2. 김규환. 아토피 피부염과 면역조절제. Update in Dermatology. 2003:31-33.
3. M.L. Pacor, G.Di Lorenzo, N.Martinelli et al. Comparing tacrolimus ointment and oral cyclosporine in adults patients affected by atopic dermatitis. A randomized study.

Clin Exp Allergy. 2004;34:639-45.
4. Amy Paller, Lawrence F. Eichenfield, Donald Y.M. Leung et al. A 12-week study of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in pediatric pationts. J Am Acad Dermatol. 2001; 44:S47-57.
5. 巢元方. 巢氏諸病源候論 서울:大成出版社. 1992: 258.
6. 陳實功. 外科正宗. 北京:人民衛生出版社. 1983: 259.
7. 吳謙. 醫宗金鑒. 瀋陽:遼寧科學技術出版社. 1997: 649, 693, 698.
8. 陳仕鐸. 洞天奧旨. 北京:中醫古籍出版社. 1999: 148.
9. 趙佶. 聖濟總錄. 北京:人民衛生出版社. 1995: 1557-9, 1610-1.
10. 傳景華. 中醫外科學. 北京. 中醫古籍出版社. 1994:340-2.
11. 顧伯康. 中醫外科學. 北京. 人民衛生出版社. 1987:15-23, 257, 275.
12. 顧世澄. 瘍醫大全. 北京:人民衛生出版社. 1987: 475.
13. 全宰弘, 金賢兒, 姜允皓. 接觸性皮膚炎에 關한 文獻的考察. 韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 1997;10(1):263-83.
14. Kataranovski M, Vlaš.ki M, Kataranovski D, Toš.ić. N, Mandić.-Radić., Todorović. V. Immunotoxicity of epicutaneously applied anticoagulant rodenticide warfarin : evaluation by contact hypersensitivity to DNCB in rats. Toxicology. 2003;188: 83-100.
15. Okamura T, Morimoto M, Yamane G, Takahashi S. Langerhans' cells in the murine oralmucosa in the inductive phase of delayed type hypersensitivity with 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene. Clin Exp Immunol. 2003;134:188-94.
16. Gunnes G, Jorundsson E, Tverdal A, Landsverk T, Press CM. Accumulation of CD25+ CD4+T-cells in the draining lymph node during the elicitation of DNCB-induced contact hypersensitivity in lambs. Research in Veterinary Science. 2004;77: 115-22.
17. 申桃湜. 生地黃抽出物이 DNCB로 誘導된 생쥐의 Allergy性 接觸皮膚炎에 미치는 影響. 東國大學校大學院. 2000.
18. 이재령, 최경임, 박숙자, 권영규, 변성희. 금은화 화장수가 DNCB로 유발된 접촉성피부염에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 2006;21(1): 9-15.
19. 백윤하. DNCB(dinitrochlorobenzene)로 자극한 NC/Nga 생쥐에서 丹蔘의 아토피 억제 효과. 경원대학교 박사학위논문. 2006.
20. 변성희, 이병욱, 김상찬. 四妙勇安湯 물추출물이 DNCB로 유발된 접촉성피부염에 미치는 영향. 大韓韓醫學方劑學會誌. 2005;13(2):59-69.
21. 김창환, 김경준. 凉血四物湯加味方이 Allergy性 接觸 皮膚炎에 미치는 影響. 韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2005;18(1):13-26.
22. 남봉수, 김윤범. 散風苦蔘丸이 알레르기성 접촉피부염에 미치는 영향. 韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2005;18(2):10-27.
23. 김윤범, 윤희성, 박외숙, 김희정, 김규석. 白鼠에 유도된 알러지성 피부염에 대한 椒甘湯의 효과. 韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2005;18 (3):44-54.
24. 김난희, 김경준. 牛芳解肌湯의 알러지성 接觸皮膚炎에 대한 消炎效果. 韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2006;19(2):59-70.

25. 박숙자, 이상곤, 백정한, 변성희, 김상찬. 소풍산추출물이 DNCB로 유발된 접촉성피부염에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(3):623-8.
26. 남혜정. 人蔘養榮湯이 Allergy성 접촉피부염에 미치는 영향. 慶熙大學校大學院. 2006.
27. 김준정. 內托千金散이 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉피부염에 미치는 영향. 韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2009;22(1):46-61.
28. 채인식. 傷寒論譯詮 附臨床應用. 고문사. 1987;24:306-7.
29. 김정범 편저. 금궤요략변석 上. 韓醫文化社. 2000:144-5.
30. 大塚敬節 主編. 金匱要略講話. 醫方出版社. 2003:108-9.
31. 이인선. 계지작약지모탕의 효능에 관한 실험적 연구. 慶熙大學校大學院. 1990.
32. 신병희. 계지작약지모탕이 제2형 Collagen 유발 관절염의 항체에 미치는 영향. 慶熙大學校大學院. 1994.
33. 노희엽. 계지작약지모탕이 Acetic Acid에 의한 복통에 미치는 영향. 嶺園大學校大學院. 2008.
34. Kim HH, Kim DH, The effect of Yunkyopaedoksangamibang on allergic contact dermatitis. J. Institute Orient Medicine. Semyung Univ. 2001;3:67-80.
35. Mi Hwa Han, Won Kee Yoon, Hyunju Lee, Sang-Bae Han, Kiho Lee, Song-Kyu Park, Kyu-Hwan Yang, Hwan Mook Kim, Jong Soon Kang. Topical application of silymarin reduces chemical-induced irritant contact dermatitis in BALB/c mice. International Immunopharmacology. 2007;7:1651-8.
36. Kanemoto, T., Kasugi, T., Yamatodani, A., Ushio, H., Mochizuki, T. k., Kimura, M., Nishimura, M. and Kitamura, Y(1993) Supernormal histamine release and normal cytotoxic activity of being rat mast cells with giant granules. Int. Arch. Allergy Immunol. 100:99-106.
37. 이기영, 김규언. 알레르기의 진료. 서울:한국의학사. 2001:3-7, 529-43.
38. 은희철. 한국에서의 접촉피부염에 관한 임상 및 역학적 고찰. 대한피부학회지. 1995;33(2):209-24.
39. 康晰榮편저. 알레르기질환 임상의 실제. 서울:일조각. 1997:301-6.
40. 대한피부과학회. 피부과학. 서울:여문각. 2008:72-4, 78-80, 179-85, 234-5.
41. Shintani Futoshi, Step To Internal Medicine - 면역·알레르기질환. 도서출판 정담. 2005:44-7.
42. 강원형. 피부질환 아틀라스. 서울:한미의학. 2003:89-93.
43. 金倫範, 金中鎬, 蔡炳允. 接觸性皮膚炎에 對한 韓方的 考察. 韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 1992;5(1):113-20.
44. 全宰弘, 金賢兒, 姜允皓. 接觸性皮膚炎에 外治에 關한 文獻的考察. 韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 1998;11(1):197-218.
45. 한국약학대학협의회 약물학분과회. 약물학. 신일북스. 2007:566-77.
46. Shintani Futoshi, Step To Internal Medicine - 혈액질환, 도서출판 정담. 2005:72-8.