

## 현삼이 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉성 피부염에 미치는 영향

송진수 · 이종철 · 최정화 · 김종한 · 박수연  
동신대학교 한의과 대학 안이비인후피부과학 교실

### Effects of *Scrophulariae Radix* (SR) on Allergic Contact Dermatitis (ACD) induced by DNCB in mice

*Jin-Soo Song · Jong-Cheol Lee · Jung-Hwa Choi · Jong-Han Kim · Soo-Yeon Park*

**Objective** : In the theory of Korean medicine, *Scrophulariae Radix* (SR) can clear away heat and cool the blood, nourish yin and promote the production of the body fluids, relieve toxin and benefit the throat. The present study was carried out to investigate effects of SR on allergic contact dermatitis (ACD) induced by 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) in mice.

**Methods** : In this experiment, effects of SR on clinical aspects on the skin, histopathological changes such as spongiosis, mast cell distribution, immune cell infiltration in tissue, spleen / body ratio and production levels of serum cytokines were investigated *in vivo*. In addition, effects on cell viability and release of b-hexosaminidase and histamine were also investigated *in vitro*.

**Results** : SR treatment diminished erythema, desquamation and keratosis which were induced by repeated painting of DNCB. Spongiosis and edema were diminished by painting of SR in histopathological observation, infiltrations of mast cell and monocytes were also decreased in SR group. In addition, spleen / body ratio was lowered compared to ADC control group. Production level of IFN- $\gamma$  in serum was decreased, but level of IL-4 did not affected by SR. Finally, more than 400  $\mu\text{g/ml}$  of SR treatment groups showed decreased cell viabilities in RBL-2H3 cells. Treatment with over 200  $\mu\text{g/ml}$  of SR decreased b-hexosaminidase release, and treatment with over 400  $\mu\text{g/ml}$  decreased histamine release *in vitro*.

**Conclusion** : these data suggest that SR can decrease symptoms of ACD, then SR is useful to treat patient with ACD.

---

**Key words** : *Scrophulariae Radix* (SR), allergic contact dermatitis (ACD), DNCB

## I. 서 론

접촉성 피부염이란, 원발성 자극성 접촉성 피부염 (Primary Irritant contact dermatitis, ICD), 알레르기성 접촉성 피부염(Allergic contact dermatitis, ACD) 등으로 나눌 수 있다<sup>1)</sup>. ACD는 지연성 과민반응에 의해 발현이 되며 감작된 물질에 대해서는 피부염을 일으키지만 감작되지 않은 물질에 대해서는 전혀 반응을 보이지 않는 독특한 특성을 나타나게 된다<sup>2)</sup>.

서양의학의 ACD의 치료제로는 항히스타민제와 스테로이드제가 가장 광범위하게 사용되고 있지만 일시적인 진정효과 및 염증 완화작용은 뛰어난 반면 중추신경계를 자극하는 부작용과 장기간 투여 시 다양한 부작용을 일으킬 수 있기 때문에<sup>3)</sup> DNCB<sup>4,6)</sup>로 유발한 ACD에 관한 최근의 한의학 연구에서는 개별 한약재<sup>7-13)</sup>나 처방<sup>14-27)</sup>을 이용한 다양한 연구들이 이루어지고 있다.

玄蔘(Scrophulariae Radix, SR)은 陰을 滋養하고 火를 내리며 煩躁를 제거하고 解毒하는 효능이 있어 發斑(皮膚發赤)등을 치료하는 약효가 있는 약물로<sup>28)</sup> 변 등<sup>29)</sup>과 고 등<sup>30)</sup>은 SR이 항염증반응이 있음을 증명하였고, 여 등<sup>31)</sup>은 Hairless mice를 이용한 실험을 통하여 SR이 자극에 의한 피부염에 대하여 억제 효과가 있음을 증명하였지만 아직까지 SR을 이용한 ACD에 대한 치료효과를 실험한 연구가 없었다.

이를 기반으로 清熱解毒하고 항염증반응의 효과가 있는 SR이 DNCB로 유발되는 ACD를 호전 시킬 수 있으리라는 가설을 세우고 본 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 SR의 항알레르기 효능을 in vivo에서 알아보기 위하여 생쥐에 DNCB를 이용하여 ACD를 유발하고 체중변화, 피부 표면의 알레르기 증상, 피부 조직 비후 및 비만세포의 분포, 비장 무게에 미치는 영향 및 cytokine 분비에 미치는 영향을 관찰하고, SR의 항알레르기 기전을 살펴보기 위하여 in vitro에서 비만 세포주에 대하여 세포독성 및 b-hexosaminidase와 histamine 분비에 미치는 영향

을 관찰한 결과 유의한 결과가 도출되어 이에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

6주령된 수컷 Balb/c 생쥐를 샐타코(인천, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 모든 실험동물은 일주일 이상 실험실환경에 적응시킨 후(24 ± 3℃, 12-hr light-dark cycle) 고형사료와 물을 마음껏 섭취하게 하며 실험에 사용하였다.

#### 2) 세포주

흰쥐 유래 비만 세포주(mast cell line)인 RBL-2H3 cell은 한국세포주은행(서울, 한국)으로부터 냉동상태로 구입하여 사용하였다. 분주 받은 세포주는 해동되어 배양액 속에 분주 된 후, 3회 이상 계대 배양하여 실험실 환경 및 기타 배양 환경에 충분히 적응 시킨 후 증식률(Doubling Time)이 구입처에서 제공한 자료와 거의 일치하게 되었을 때, 충분히 적응하였다고 생각하고 실험에 사용하였다.

#### 3) 약제

본 실험에 사용된 玄蔘(Scrophulariae Radix, SR)은 玄蔘科(현삼과 : Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 草本인 玄蔘(北玄蔘 : Scrophularia buergeriana Miq.)의 根으로 동신대학교 부속 순천한방병원을 통하여 구입 정제하여 사용하였다.

#### 4) 시약 및 기기

ACD 유발을 위하여 사용된 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), RBL-2H3 cell을 활성화 하기 위하여 사용된 PMA와 A23187은 Sigma(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였다. 비만세포 염색을 위하여 alcian

blue(Muto pure chemicals, Japan)과 Nuclear fast red solution(Sigma, USA)을 구입하였으며, 혈청 내의 IL-4 및 IFN- $\gamma$  함량 분석을 위하여 각각의 전용 kit(Raybiotech, USA)를 구입하여 사용하였다. 측정을 위해 사용된 기기는 형광측정기(Molecular Devices, USA), Micro-plate reader(Bio-rad, CA), 광학 현미경(Olympus, Japan)등이며, 시료의 조제를 위하여 원심 분리기(Vision, 한국), 감압농축기(EYELA, Japan), 동결건조기(삼원, 한국)가 사용되었다.

## 2. 방법

### 1) 약물의 준비

세척되고 세절된 상태로 구입된 SR 100 g을 분쇄기로 분쇄한 다음, 에탄올 1,000 ml를 이용하여 상온에서 24시간 추출한 다음, 다시 1,000 ml의 에탄올을 부어 환류 추출하였다. 모아진 추출액을 원심분리하여 찌꺼기는 버리고 상층액을 모은 다음, 와트만 지(현대마이크로, No.20, 한국)를 이용하여 2회 반복 여과 하였다. 여과가 끝난 추출액은 감압농축기(EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축된 다음 동결 건조 되었다. 최종적으로 얻어진 동결 건조 분말은 35.2 g으로 수율은 35.2%였으며, 실험에 사용될 때까지 냉동 보관 되었다.

### 2) 알레르기성 접촉성 피부염의 유발

ACD 유발을 위하여 acetone과 olive oil(AOO)을 4대 1로 섞은 AOO에 DNCB를 0.5~1%로 희석하여 사용하였다. 먼저 Animal clipper(Oster, USA)를 이용하여 생쥐의 등을 가볍게 제모한 후, 제모제를 이용하여 잔털을 깨끗이 제거한 다음 상처 치유를 위하여 24시간 방치 하였다. 24시간이 지난 후부터 3일간(day 1~3) 1% DNCB 용액 50  $\mu$ l를 1일 1회 등 부위에 도포하여 감각하였다. 3일간의 감각이 끝난 후, 4일간 방치하였다가 실험 8일째(day 8)부터 2일 1회로 총 4회 0.5% DNCB 용액 50  $\mu$ l를 등 부위에

도포하여 ACD를 유발하였다. 대체적인 실험 과정을 Fig. 1에 제시하였다.

### 3) 약물의 처리 및 실험군 분류

SR을 등 부위에 도포하기 위하여 동결 건조된 SR을 에탄올에 다시 녹인 다음, AOO와 1:4로 희석하였으며 최종 농도는 10 mg/ml이었다. 상기한 바대로 제조된 SR 용액은 실험 9일째부터 생쥐를 희생시키기 하루 전날(day 14)까지 6일간 매일 등 부위에 50  $\mu$ l씩 도포 되었다. DNCB 처리와 겹치는 날 (day 10, 12, 14)은 SR과 DNCB의 직접적인 간섭을 최소화하기 위하여 DNCB 처리 이후 최소 4시간 이상 경과 후에 SR을 도포하였다. 대체적인 실험 과정을 Fig. 1에 제시하였다. 실험군은 아래와 같다.

- ① 정상군(normal group, NOR) : 제모 후에 DNCB와 SR이 함유되지 않은 vehicle (AOO)만을 처리한 군. (n=8)
- ② ACD 대조군(control group, CTL) : 제모 후에 DNCB로 ACD를 유발하고 SR이 포함되지 않은 vehicle만을 처리한 군. (n=8)
- ③ SR 처리군(SR group, SR) : 제모 후에 DNCB로 ACD를 유발하고 SR을 처리한 군. (n=8)

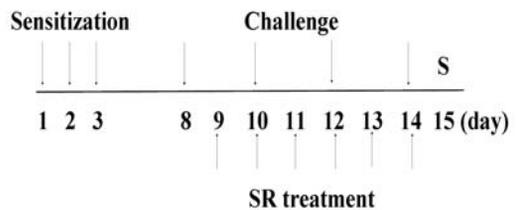


Fig. 1. Experimental design

All animals except normal group were received 1% of DNCB in AOO on day 1,2,3. Then CTL and SR group of mice received 0.5% of DNCB on day 8, 10, 12, 14. All animals were treated with/out SR in AOO on 6 consecutive days (day 9~14). Mice were sacrificed on day 15. S : sacrifice, SR : Scrophulariae Radix.

#### 4) 체중 및 비장 무게의 측정

실험시작일(day 1) 측정한 체중을 기준으로 2주간 체중 변화를 관찰하였다. 체중의 측정은 측정일 오후 2시에 전자저울(Tanita, Japan)을 이용하여 실시하였다. 비장의 무게는 실험 마지막날 생쥐를 희생시킨 후, 비장을 적출한 다음 미량 저울(sartorius, 한국)을 이용하여 측정하였으며, 희생 직전 측정한 체중에 대한 비율로 제시하였다.

#### 5) 피부 표면의 육안적 관찰

ACD의 유발 정도를 전반적으로 관찰하기 위하여 실험 마지막날 생쥐를 희생시킨 다음, ACD가 유발된 등 부위를 Digital camera(Olympus, Japan)으로 촬영하여 제시하였으며, 자세한 병변 부위 관찰을 위하여 피부 영상 분석 시스템(Skin NBT, 한국)으로 근접 촬영하여 제시하였다(x 30).

#### 6) 피부 조직의 조직병리학적 소견 관찰

생쥐로부터 얻어진 피부 조직을 10% 포르말린에 고정한 후, 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 미세절단기(Leica, Germany)를 이용하여 4  $\mu$ m 두께로 잘라 슬라이드 글라스 위에 부착하였다. 부착된 조직으로부터 파라핀을 제거하고 hematoxylin과 eosin을 이용하여 염색한 후 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다(x 200).

#### 7) 피부 조직의 비만세포 분포 관찰

조직병리학적 소견 관찰과 동일한 과정을 통하여 만들어져 슬라이드 글라스위에 부착된 조직을 alcian blue stain법을 통하여 비만세포를 염색하여 관찰하였다. 파라핀을 제거하고 수분을 공급한 조직을 3% glacial acetic acid에 1분간 친화시킨 다음, alcian blue(Muto pure chemicals, Japan) 용액에서 20분간 염색을 시행하였다. 20분간의 염색이 끝난 다음 3% acetic acid로 탈색시키고 대조염색(Nuclear fast red solution, Sigma, USA)을 시행하였다. 대조 염색이

끝난 후, 탈수과정을 거쳐서 완성된 조직은 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰되었다(x 200).

#### 8) Symptom score에 미치는 영향 관찰

실험이 끝난 후, 생쥐의 등에 발생한 병변의 정도를 관찰하여 수치로 나타내었다. 피부 병변은 피부 부종과 종창의 정도에 따라 다음과 같이 판정하였다.

- 0점 : 피부병변이 없는 정상인 상태
- 1점 : 경미한 착색이 있는 상태
- 2점 : 짙은 착색 및 홍반이 있는 상태
- 3점 : 홍반과 낙설이 동반된 상태
- 4점 : 홍반과 낙설, 혈흔이 존재하는 상태
- 5점 : 홍반과 낙설, 혈흔이 뚜렷한 상태
- 6점 : 홍반과 낙설, 혈흔이 매우 심한 상태

#### 9) Cytokine 분비에 미치는 영향 관찰

가장 대표적인 Th2 cytokine인 IL-4와 Th1 cytokine인 IFN- $\gamma$ 의 혈청 내 농도를 측정하였다. 실험 마지막날, 심장 채혈을 통하여 얻어진 생쥐의 혈액은 원심분리기를 이용하여 1500 rpm에서 10분간 원심분리 된 후, 상층액을 채취하여 cytokine 측정에 사용하였다. 혈청 중 IL-4와 IFN- $\gamma$ 의 농도는 각각의 ELISA kit(Raybiotech, USA)을 사용하여 측정하였으며, 모든 측정 절차는 제조사에서 제시한 가이드라인에 따라 진행되었다.

#### 10) 세포주 배양 환경

비만 세포주(mast cell line)인 RBL-2H3 cell의 생육 배지로는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium, high glucose, Gibco) 배지에 10% fetal bovine serum(Gibco, FBS)와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100  $\mu$ g/ml)을 첨가하여 사용하였고, 세포주의 계대 배양은 2일 간격으로 시행하였다. 부착세포의 탈착을 위해서 Trypsin -EDTA(Sigma)를 사용하였으며, 5% CO<sub>2</sub>가 공여되는 배양기 속에서 37 $^{\circ}$ C를 유지하며 배양되었다.

### 11) 세포 독성에 미치는 영향 측정

Highly water-soluble tetrazolium salt, WST -8 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt를 사용하여 살아있는 세포를 정량하는 방법을 사용하였다. 먼저 96-well plate에 측정하고자 하는 대상 세포주를 웰당  $5 \times 10^3$ 개의 분량으로 분주 하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 상기한 방법으로 제조된 SR을 DMSO(Dimethyl sulfoxide, Sigma, USA)에 녹인 다음, 최종 농도 800 µg/ml, 400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml 50 µg/ml이 되게 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 24시간 동안 배양 하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 각 well당 10 µl의 CCK-8 용액을 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공여되는 환경에서 3시간 동안 방치하였다. 3시간 후, Micro-plate reader(Bio-rad, CA)를 이용하여 450 nm파장에서 흡광도를 측정하였다. 정상 대조군 으로는 약물을 첨가하지 않은 well을 사용하였고, 결과는 정상 대조군에 대한 백분율로 환산하여 나타내 었다.

### 12) b-hexosaminidase 유리 억제에 미치는 영향 측정

비만세포의 탈과립에 미치는 영향을 관찰하기 위 하여 b-hexosaminidase 유리능에 미치는 영향을 관 찰하였다. 먼저 96-well plate에 비만 세포주를 well 당  $2 \times 10^4$ 개의 분량으로 분주 하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 800 µg/ml, 400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml 50 µg/ml 농 도의 SR을 1시간 동안 처리한 이후 배양액을 깨끗이 씻어 내고, serum-free media에 50 nM의 PMA와 1 µM의 A23187을 첨가하고 30분 뒤 상층액을 취하 였다. 얻어진 상층액은 3000 rpm에서 20분간 원심

분리하여 유리된 b-hexosaminidase 농도 측정에 사 용하였다. 세포내에 존재하는 b-hexosaminidase의 총량 측정을 위하여 원심분리가 끝난 pellet에 triton X-100을 처리하여 세포를 파괴한 다음 세포내에 존 재하는 b-hexosaminidase의 총량을 측정하였다. 상 층액과 cell lysate에 1 mM의 p-NAG를 100 mM citrate buffer(pH 5)에 녹여 처리한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공여되는 환경에서 1시간 동안 반응시키고 난 후, 200 µl의 carbonate buffer를 가한 후에 반응을 종료시켰다. b-hexosaminidase의 농도 측정은 Micro-plate reader(Bio-rad, CA)를 이용하여 405 nm파장에 서 흡광도(Optical density, OD)를 측정하여 다음 과 같은 공식으로 계산하였다.

$$\text{b-hexosaminidase release (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{sup.}}}{\text{OD}_{\text{sup.}} + \text{OD}_{\text{pellet}}} \times 100$$

OD<sub>sup.</sub> : 상층액에서 얻어진 흡광도

OD<sub>pellet</sub> : Cell pellet을 녹여서 얻어진 흡광도

### 13) Histamine 분비 억제에 미치는 영향 측정

b-hexosaminidase 유리능에 미치는 영향에서의 동 일하게 약물을 처리하고, 비만 세포를 활성화 한 후, 배양액 500 µl를 취하여 0.1 M HCl 450 µl와 60% 과염소산 용액 50 µl를 혼합한 후 2000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 다시 상층액 800 µl를 5 M NaOH 용액 500 µl, 증류수 3 ml, n-butanol 10 ml, NaCl 1.2 g을 혼합한 시험관에 넣 고 잘 흔들어준 후 원심분리하였다. 원심분리 한 후, n-butanol층 8 ml를 취해 0.1 M HCl 3 ml, n-heptane 10 ml를 가하여 잘 흔들어 준 후 재차 원 심분리하였다. 여기서 얻어진 수층 2 ml에 1 M NaOH 400 µl, 1% o-phthalaldehyde 용액 100 µl를 가하여 혼합 하고 2분 동안 방치한 다음 emission 438 nm, excitation 353 nm에서 형광강도 (fluorescence intensity, FI)를 측정하였다. 측정된 FI 값은 PMA와 A23187을 이용하여 활성화 시킨 군에 대한 백분율로 나타내었다.

### 3. 통계 처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 SAS(The SAS System for Windows, ver. 6.12, SAS Institute, U.S.A.)를 이용하였다. 실험 성적은 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 각 실험군 간 평균의 차이를 검정할 때에는 ANOVA로 검정하여 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## III. 성 적

### 1. 체중 변화에 미치는 영향

2주간 체중 변화를 관찰한 결과 정상군은 12%, 대조군은 11%, SR군은 14% 정도 증가하였으나 모든 군에서 특별한 유의성은 관찰되지 않았다(Fig. 2).

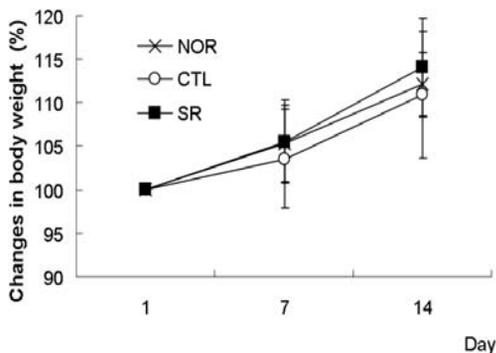


Fig. 2. Effects of SR on changes of body weights in ACD mice

Body weights were measured once in a week. Changes of body weight were represented as average weights, which were expressed as percentages of weight on day 1. NOR : naive group, CTL : ACD group, SR : SR treated ACD group. Values are represented as mean±SD (n=8).

### 2. ACD mice의 피부 증상에 미치는 영향

Vehicle만을 처리한 정상군의 피부에서는 특별한 변화를 관찰 할 수 없었고(Fig. 3A), 반복되는 DNCB

접촉이 이루어진 대조군의 등 피부에서는 피부 홍반, 낙설 등 중등도 이상의 ACD 증상이 관찰되었다(Fig. 3B). SR을 10 mg/ml 농도로 회석하여 50 μl씩 6일간 처리해준 SR군의 피부에서는 이러한 알레르기 성 접촉성 피부염 증상의 감소가 관찰되었다(Fig. 3C).

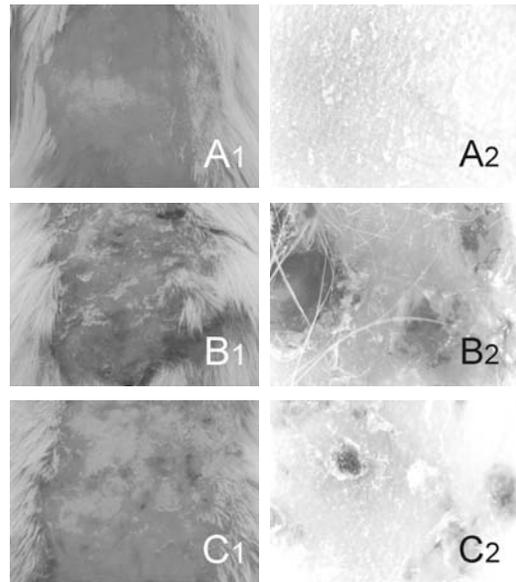


Fig. 3. Effects of SR on clinical aspect in ACD mice  
Any abnormal views were not found in normal group (A1,2). Repeated treatment with DNCB made erythema and desquamation in ACD group (B1,2). SR treatment group diminished erythema and desquamation compared to CTL group (C1,2). A2, B2 and C2 are figures of 30x magnifications.

### 3. 피부의 조직병리학적 소견에 미치는 영향

Vehicle만을 처리한 정상군의 피부조직은 특별한 이상 소견이 발견되지 않은 반면(Fig. 4A), 대조군의 피부 조직에서는 비후된 스폰지조직(spongiosis)과 부종(edema), 면역세포의 증가가 관찰되었다(Fig. 4B). SR군에서는 스폰지조직과 부종이 줄어드는 경향을 보였다(Fig. 4C).

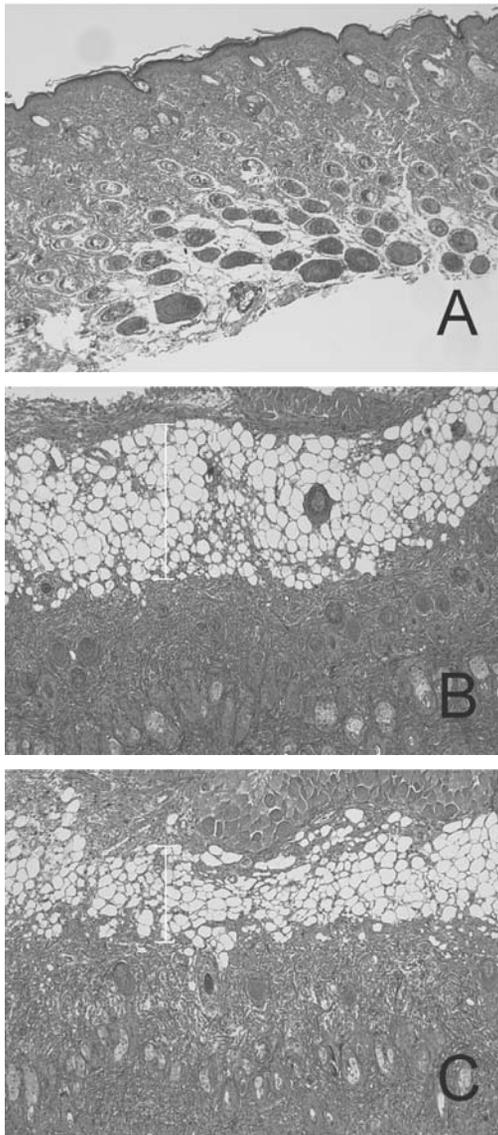


Fig. 4. Effects of SR on histopathological observation in ACD tissue

Any abnormal views were not found in normal group (A). Repeated treatment with DNCB made epidermal spongiosis, edema and dermal inflammatory cellular infiltration in ACD group (B). SR treatment group diminished epidermal spongiosis and edema compared to CTL group (C), (x200).

#### 4. 피부 증상 정도 (symptom score)에 미치는 영향

6점 척도를 사용하여 피부 증상 정도를 수치로 나타낸 결과 정상군은 0 점으로 특별한 증상을 나타내지 않았고, 대조군에서는 평균 증상정도  $4.1 \pm 0.83$  점으로 증상이 평가되었다. SR군에서는  $2.3 \pm 0.7$  점으로 평가되어 증상 정도가 유의한 수준으로 감소함이 관찰 되었다(Fig. 5).

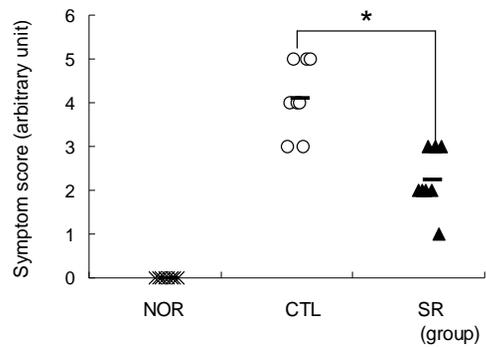


Fig. 5. Effects of SR on symptom score in ACD mice  
Symptom scores were estimated in each animal respectively. NOR : naive group, CTL : ACD group, SR : SR treated ACD group. Bar means the average in each group. \*P < 0.05 vs. ACD (CTL) group, (n=8).

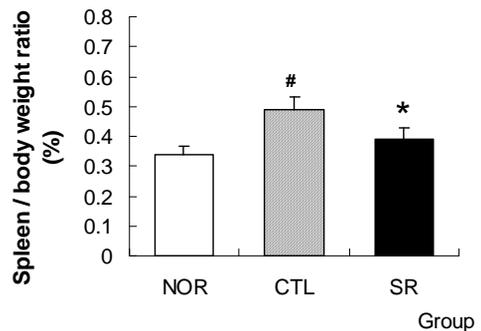


Fig. 6. Effects of SR on spleen / body weight ratio in ACD mice

Spleen and body weights were measured on day 15. NOR : naive group, CTL : ACD group, SR : SR treated ACD group. #P < 0.05 vs. naive (NOR) group, \*P < 0.05 vs. ACD (CTL) group, (n=8).

### 5. 비장/체중 비에 미치는 영향

실험 마지막 날, 비장을 적출하여 무게를 측정하고 이를 체중과의 비율로 나타낸 결과 정상군에서는  $0.34 \pm 0.03\%$ 로 나타났는데 비하여 대조군에서는  $0.49 \pm 0.04\%$ 로 나타나 유의한 증가를 보였다. SR군에서는  $0.39 \pm 0.04\%$ 로 나타나 대조군에서 보이는 비장/체중 비의 증가를 유의성있게 억제하였다(Fig. 6).

### 6. 혈중 IL-4 함량에 미치는 영향

실험 마지막 날, 심장 채혈을 통하여 얻은 혈청에서 IL-4의 농도를 분석한 결과 모든 군에서 유사한 수준의 IL-4 농도가 관찰되었으며, 각 군간의 유의성은 관찰되지 않았다(Fig. 7).

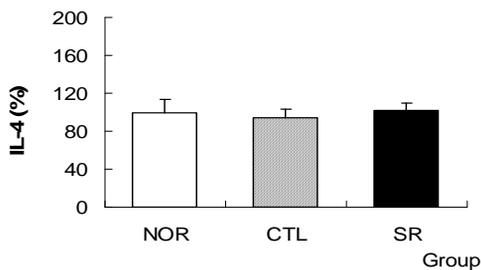


Fig. 7. Effects of SR on serum level of IL-4 in ACD mice

Level of IL-4 in serum was measured using ELISA method. NOR : naive group, CTL : ACD group, SR : SR treated ACD group (n=8).

### 7. 혈중 IFN- $\gamma$ 함량에 미치는 영향

실험 마지막 날, 심장 채혈을 통하여 얻은 혈청에서 IFN- $\gamma$ 의 농도를 분석한 결과 대조군에서 정상군에 비하여  $354.0 \pm 15.2\%$  증가된 IFN- $\gamma$  농도가 관찰되었으며, SR군에서는 정상군의  $289.4 \pm 22.3\%$ 로 나타나 대조군에 비하여 유의한 수준으로 감소한 IFN- $\gamma$  농도를 보였다(Fig. 8).

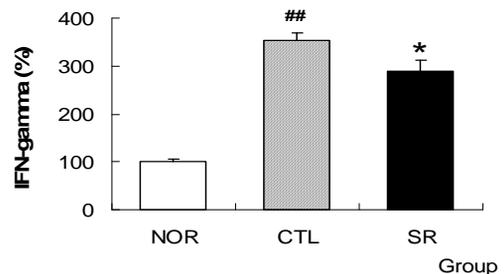


Fig. 8. Effects of SR on serum level of IFN- $\gamma$  in ACD mice

Level of IFN- $\gamma$  in serum was measured using ELISA method. NOR : naive group, CTL : ACD group, SR : SR treated ACD group. ##P < 0.01 vs. naive (NOR) group, \*P < 0.05 vs. ACD (CTL) group, (n=8).

### 8. 피부 조직의 비만세포 분포에 미치는 영향

Vehicle만을 처리한 정상군의 피부조직에서는 비만세포가 매우 드물게 관찰되는 반면(Fig. 9A), 대조군의 피부 조직에서는 비만세포의 증가가 관찰

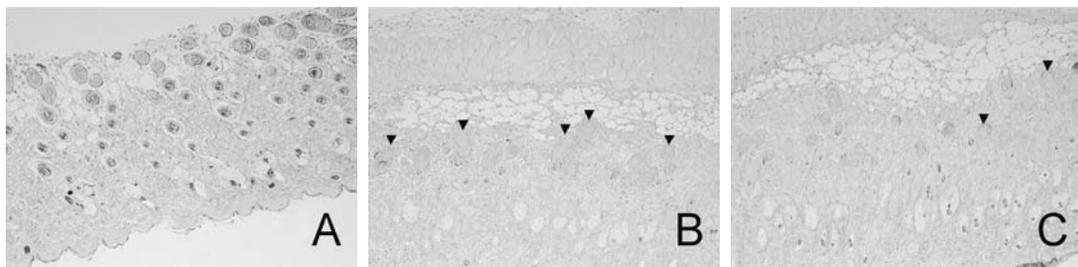


Fig. 9. Effects of SR on mast cell distribution in ACD tissue

Any abnormal views were not found in normal group (A). Marked increase of mast cells were found in ACD group (B). SR group diminished number of mast cells compared to CTL group (C). Filled wedges mean mast cells (x200).

되었다(Fig. 9B). SR군에서는 비만세포가 줄어드는 경향을 보였다(Fig. 9C).

### 9. 비만세포주의 생존율에 미치는 영향

RBL-2H3 cell에 SR을 농도별로 처리하고 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰한 결과 200  $\mu\text{g/ml}$  이하 농도에서는 유의한 세포 생존율의 감소는 관찰되지 않았고, 400  $\mu\text{g/ml}$ 에서  $85.8 \pm 3.4\%$ , 800  $\mu\text{g/ml}$ 에서  $77.6 \pm 8.2\%$ 의 생존율을 보여 400  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 세포 생존율의 감소를 보였다(Fig. 10).

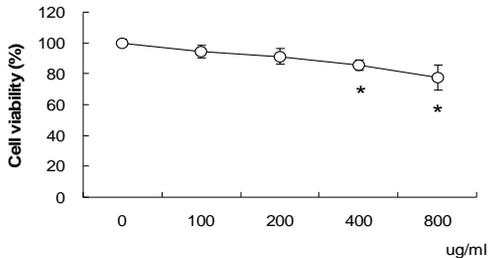


Fig. 10. Effects of SR on viability of RBL-2H3 cells in vitro

Cell viability was measured using highly water-soluble tetrazolium salt in various concentrations. Values were represented as mean  $\pm$  SD. \*P < 0.05 vs. non-treated control of three independent experiments.

### 10. b-hexosaminidase 유리 억제에 미치는 영향

RBL-2H3 cell에 SR을 농도별로 처리하고 b-hexosaminidase 유리에 미치는 영향을 관찰한 결과 비만세포주의 활성화에 의하여 세포내에 저장된 b-hexosaminidase의  $55.8 \pm 3.5\%$ 가 유리되어 안정화 상태에 비하여 3배 이상 증가하였고, 200  $\mu\text{g/ml}$  이상의 SR처리에 의하여 유의한 수준으로 b-hexosaminidase 유리가 감소하였다. 200, 400, 800  $\mu\text{g/ml}$  농도 처리에 의하여 각각  $48.7 \pm 3.1\%$ ,  $46.7 \pm 2.3\%$ ,  $41.6 \pm 5.9\%$ 의 b-hexosaminidase의 유리가 억제되었다(Fig. 11).

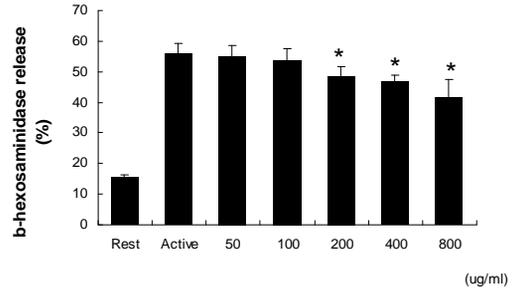


Fig. 11. Effects of SR on b-hexosaminidase release of RBL-2H3 cells in vitro

Cells were pre-treated with SR in indicated concentrations, then activated using 50 nM of PMA and 1  $\mu\text{M}$  of A23187. b-hexosaminidase release was measured using spectrophotometric method in various concentrations. Rest : resting RBL-2H3 cells, Active : activated RBL-2H3 cells. Values were represented as mean  $\pm$  SD. \*P < 0.05 vs. non-treated control of three independent experiments.

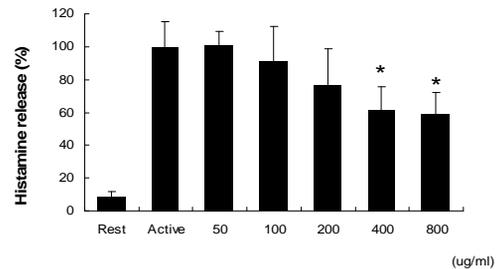


Fig. 12. Effects of SR on histamine release of RBL-2H3 cells in vitro

Cells were pre-treated with SR in indicated concentrations, then activated using 50 nM of PMA and 1  $\mu\text{M}$  of A23187. Histamine release was measured using fluorescence detecting method in various concentrations. Rest : resting RBL-2H3 cells, Active : activated RBL-2H3 cells. Values were represented as mean  $\pm$  SD. \*P < 0.05 vs. non-treated control of three independent experiments.

### 11. Histamine 유리 억제에 미치는 영향

RBL-2H3 cell에 SR을 농도별로 처리하고 histamine 유리에 미치는 영향을 관찰한 결과 비만 세포주의 활성화에 의하여 정상군에 비하여 8배이

상 증가된 histamine 유리를 보였고, 400  $\mu\text{g/ml}$  이상의 SR치리에 의하여 유의한 수준으로 histamine 유리가 감소하였다. 400  $\mu\text{g/ml}$  처리군의 histamine 유리는 대조군의 61.7 $\pm$ 14.1%로 감소하였고, 800  $\mu\text{g/ml}$  처리군은 58.9 $\pm$ 13.0%로 감소하였으며 반응은 농도의존적이었다(Fig. 12).

#### IV. 고 찰

알레르기는 과민반응(hypersensitivity reaction)이라 칭하는 면역계 반응들의 분류 중 하나로 최초 '이 물질에 대한 신체의 잘못된 변화된 능력'으로 정의되었는데, 이는 모든 면역학적 반응을 포함하는 극히 광범위한 정의였기 때문에 최근에는 '다양한 무해한 항원에 대한 면역계의 반응으로 발생하는 질병'과 같이 보다 많이 제한된 방식으로 정의된다<sup>32)</sup>.

알레르기성 질환에 대한 면역학적 기전에 대하여 1980년대 등장한 Th1/Th2 세포에 대한 이론을 Th2 세포의 항진 또는 Th1 세포의 감소로 인한 Th1/Th2 세포 면역반응의 불균형이 중요한 요인이라고 설명하였으며 현재까지 가장 인정 받는 가설이다<sup>33)</sup>.

접촉성 피부염이란, 외부 물질과의 접촉에 의하여 발생하는 피부염을 말하는 것으로 원발성 자극성 접촉성 피부염(Primary Irritant contact dermatitis, ICD), 알레르기성 접촉성 피부염(Allergic contact dermatitis, ACD), 광독성 및 광알레르기성 접촉성 피부염(Phototoxic, Photoallergic contact dermatitis), 접촉성 두드러기 증후군(Contact urticaria syndrome) 등으로 세분할 수 있다<sup>1)</sup>. ICD는 자극물에 노출되어 일어나는 피부의 비알레르기성 반응으로 모든 사람에게 생길 수 있는 반면 ACD는 항원에 이미 감작된 개체가 재차 항원에 접촉될 때 접촉된 국소부위에 발적, 구진, 소수포, 소양 등의 염증반응을 일으키는 제 IV형 지연형 과민반응에 속

하는 면역질환으로<sup>34)</sup> World Allergy Organization에 따르면 특정 합텐/단백질 복합체에 감작된 사람들에게 일어나는 Th1 우세 면역 반응으로 정의하고 있다<sup>35)</sup>.

발병기전을 살펴보면 어떤 물질이 피부에 접촉되면 이 물질의 극미량이 녹아서 피부로 들어가게 되어 피부단백과 결합하는데 이때의 피부단백을 운반단백이라 하며 이는 항체를 만드는 능력을 가진 완전항원이 된다. 완전항원은 랑겔한스세포와 접촉하여 T세포에 전달되며, 항원에 접촉된 T세포는 주위의 임파선에서 핵분열하여 이 중에서 일부의 세포가 기억세포로 남아있게 된다. 이 과정을 감작이라 하는데 항원성이 강한 것은 짧은 시간 내에 감작이 일어나나 보통은 수개월 내지 장기간의 접촉이 필요하다. 일단 감작된 사람에게 재차 항원이 피부에 침투하게 되면 기억세포가 이를 감지하고 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF 등과 같은 각종 화학물질이 분비되어 염증을 일으킨다<sup>36)</sup>. 염증이란, 세포손상을 일으키는 원인을 제거하거나 희석하기 위한 생체 방어로서, 혈관을 가진 결합조직에서 볼 수 있는 복합적 반응이다. 세포손상을 일으키는 자극은 모두 염증의 원인이 될 수 있다. 임상에서 흔히 보는 원인으로는 세균감염, 출혈을 일으키는 물리적 인자, 화학 물질, 면역반응 등이다. 염증은 일반적으로 급성과 만성으로 구분하는데, 급성염증은 비교적 기간이 짧아 수분, 수시간 또는 수일 지속되며, 혈장의 삼출과 백혈구(주로 중성구)의 이주를 특징으로 한다. 만성염증은 기간이 길고, 조직학적으로 림프구와 대식세포의 침윤 및 혈관과 결합조직의 증식을 특징으로 한다. 염증에 관여하는 세포로는 혈관내의 중성구, 단핵구, 호산구, 호염기구, 림프구, 혈소판 등과 결합조직내의 비만세포, 섬유모세포, 대식세포, 림프구 등이 염증에 관여한다<sup>37)</sup>.

ACD의 원인 물질은 보통 알레르겐 또는 항원이라 부르며 이는 정상인에게는 피부염을 일으키지 않으나 이 물질에 감작된 사람에게는 피부염을 일으키는 물질을 말한다. 이론적으로는 모든 물질들이 ACD의

항원이 될 수 있으며 특히 항원성이 높은 예로는 니켈, 크롬을 포함하여 옷나무의 pentadecylcatechol, 은행나무 열매의 ginkgolic acid 등이 있다. 이 외에도 화장품의 방향성 화합물, 염색약에 포함된 paraphenylenediamine, 매니큐어 성분, 합성수지를 고분자화 하기 전의 중간 물질이나 촉매제, 농약 등이 종종 원인 물질로 작용한다<sup>38,39)</sup>.

서양의학의 ACD의 치료제로는 항히스타민제와 스테로이드제가 가장 광범위하게 사용되고 있다. 항히스타민제는 H1, H2 수용체를 경쟁적으로 억제하여 염증 완화작용은 뛰어나지만 중추신경계를 자극하는 부작용과 일시적인 진정효과만 있으며, 스테로이드제는 강력한 소염작용과 면역억제 작용이 있으나 장기간 투여 시 여드름, 월경불순, 성장장애, 고혈압, 당뇨병, 소화성 궤양, 고혈압, 골연화 등의 부작용을 일으킬 수 있다<sup>3)</sup>.

접촉성 피부염은 한의학에서 '漆瘡', '狐尿刺', '馬桶癬', '粉花瘡' 등의 범주로 심한 소양증이 동반되는 것으로 기술되어 있다. 漆瘡은 漆의 辛熱한 毒에 感受되어 발생하는 피부염을 말하고, 狐尿刺는 사마귀와 같은 곤충의 체액에 접촉하여 발생하는 피부염을 말하고, 馬桶癬은 새 변기의 漆에 접촉하여 둔부에 발생하는 피부염을, 粉花瘡은 膏藥같은 약제를 사용 후 발생하는 피부염을 말한다. 이처럼 접촉하는 항원의 종류만 다를 뿐 병의 증상과 경과를 비슷하여 현대의학의 알레르기성 접촉성 피부염과 유사하다<sup>40-42)</sup>.

최근 한의학계에서도 杜仲<sup>7)</sup>, 金銀花<sup>8)</sup>, 丹參<sup>9)</sup>, 五加皮<sup>10)</sup>, 生地黃<sup>11)</sup>, 苦參과 黃連<sup>12)</sup>, 防風<sup>13)</sup> 등 개별 한약재나 內托千金散<sup>14)</sup>, 牛蒡解肌湯<sup>15)</sup>, 消風散<sup>16)</sup>, 四妙勇安湯<sup>17)</sup>, 涼血四物湯加減方<sup>18)</sup>, 散風苦參丸<sup>19)</sup>, 椒甘湯<sup>20)</sup>, 熱多寒少湯<sup>21)</sup>, 涼膈散火湯<sup>22)</sup>, 加味芎歸湯<sup>23)</sup>, 加減平胃散<sup>24)</sup>, 黃連解毒湯<sup>25)</sup>, 祛風燥濕解毒方<sup>26)</sup>, 桂枝芍藥知母湯<sup>27)</sup> 등 처방을 이용한 ACD 치료에 대한 다양한 연구들이 활발히 이루어지고 있다.

玄蔘(Scrophulariae Radix, SR)은 玄蔘科(현삼과 : Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 草本인 玄蔘(北

玄蔘 : Scrophularia buergeriana Miq.)의 根이다<sup>28)</sup>. 성분은 Alkaloid, 당류, sterol, amino acids, 지방산 (oleic acid, linoleic acid, stearic acid 등), 미량의 정유, carotene 등이 함유되어 있다. 그 밖에 iridoid 화합물로 구성되어 있고<sup>43)</sup> 性味는 苦, 甘, 寒 하며 清熱養陰, 散結解毒하는 효능이 있어<sup>44,45)</sup> 發斑(皮膚發赤)등을 치료하는 약효가 있는 약물로 변 등<sup>29)</sup>과 고 등<sup>30)</sup>은 SR이 항염증반응이 있음을 증명하였고, 여 등<sup>31)</sup>은 Hairless mice를 이용한 실험을 통하여 SR이 자극에 의한 피부염에 대하여 억제 효과가 있음을 증명하였음에도 불구하고 아직까지 SR의 항불안효과<sup>46)</sup> 치매치료효과<sup>47)</sup>, 혈압강하효과<sup>48)</sup>, 갑상선기능에 대한 효과<sup>49)</sup> 등에 대한 연구만 있을 뿐 ACD의 치료효과를 실험한 연구가 없었다.

본 연구에서 ACD 유발을 위하여 사용한 2,4-dinitrochlorobenzen(DNCB)는 4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB)와 함께 동물실험에서 ACD를 유발시키는데 사용되는 대표적인 유발물질로 과민한 세포성 면역 반응을 일으켜 피부손상 즉 홍반, 해면화, 상피세포 과형성, 비만세포와 T림프구의 증가 등을 일으킨다<sup>4-6)</sup>. 대부분의 사람이 DNCB에 노출되게 되면 T 세포의 type IV hypersensitivity reaction을 일으키게 된다<sup>50)</sup>.

본 연구에서 DNCB를 사용하여 만든 ACD 모델은 피부 홍반(erythema), 낙설(desquamation), 각화(keratosis) 등이 발생하고, 조직병리학적 소견에서 비후된 스펀지 조직(spongiosis) 등을 보여 인간에서 보이는 중등도 이상의 피부염 소견을 발현 시킨 것으로 평가 되었다.

본 연구의 결과에서 SR의 처리는 홍반, 낙설, 각화 등의 피부염 증상을 현저하게 감소시키는 경향을 보였다(Fig. 3). 대조군에서는 홍반과 심한 낙설, 각화 현상 뿐만 아니라 심한 경우 출혈반(Blood spot)도 관찰된데 반해(Fig. B1), SR 투여군에서는 대부분의 경우 경미한 점상 출혈의 흔적이나 경미한 낙설을 보이는 경우가 많았다(Fig. C1). 피부 분석시스템을

이용한 근접 촬영 결과(30배)에서 자세히 살펴본 결과 대조군에서는 홍반의 주변으로 각화가 진행되어 낙설이 발생하는 것을 볼 수 있고, 낙설의 크기가 컸고 큰데 반해(Fig. B2), SR 투여군에서는 작은 규모의 착색현상이 발생하고 낙설도 비교적 작은 것을 알 수 있다(Fig. C2). 이러한 경향을 6점 척도법으로 수치화 해본 결과 대조군의 경우 2마리가 3점, 3마리가 4점, 3마리가 5점으로 평균 4점 정도를 기록하였고, SR군은 ACD의 피부증상이 거의 사라지고 경미한 착색만이 있는 상태인 1점을 기록한 1마리를 비롯하여 4마리가 착색과 홍반만 있는 상태인 2점, 3마리가 경미한 홍반과 낙설이 동반된 상태인 3점을 기록하여 평균 2점 정도였으며 심한 증상에 해당하는 4점이나 5점에 해당하는 동물은 없었다(Fig. 5). 이러한 결과는 SR이 직접적으로 ACD의 피부 증상을 개선시킬 수 있음을 시사한다.

본 연구의 결과에서 SR의 투여는 피부 표면 증상의 완화 뿐 만 아니라 ACD 발생 조직의 조직병리학적 소견 역시 호전 시키는 경향을 보였다(Fig. 4). ACD가 발생한 조직의 가장 특징적인 변화는 스폰지 조직의 비후와 부종, 단핵구 및 각종 염증관련 면역세포의 침윤 등이라고 할 수 있다<sup>51)</sup>. 본 연구의 결과를 살펴보면, 대조군의 피부 조직에서 스폰지 조직의 비후소견과, 기저조직쪽에 헤마톡실린에 의하여 점상으로 염색된 단핵구들이 증가하는 소견이 관찰되었다(Fig. 4B). SR투여군에서는 스폰지조직 및 부종이 줄어드는 경향을 보였으며, 단핵구도 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4C). 이러한 결과 역시 피부 증상의 육안적 관찰 소견과 일맥상통하며 SR의 ACD에 대한 치료 효과를 입증하는 결과로 해석된다.

비장은 조혈 작용 및 식작용, 적혈구의 재생 및 저장과 각종 면역작용에 관여하는 장기이다<sup>52)</sup>. 이러한 비장은 비교적 다양한 원인에 의하여 종대가 일어나는데, 대표적으로 종양, 빈혈, 문맥 고혈압증과 같은 경우가 있으며, 일반적으로 면역기능이 증가되는 경우 종대가 일어난다<sup>53)</sup>.

본 연구에서 DNCB를 반복적으로 처리하여 ACD를 일으킨 결과 비장/체중 비가 정상군에 비하여 44%정도 증가 하였다(Fig. 6). 이는 DNCB에 의하여 면역 반응이 활성화된 결과로 해석되며, SR투여군에서 유의한 비장/체중 비의 감소(Fig. 6)를 보인 것은 ACD 유발과정에서 발생하는 면역 반응을 효율적으로 억제했기 때문으로 생각된다.

생체 내에서 발생하는 면역 반응은 전통적으로 선천 면역(*innate immunity*)과 후천 면역 (*acquired immunity*)으로 나뉘고 후천 면역은 다시 세포 매개성 면역(*cell mediated immunity*)와 체액성 면역 (*humoral immunity*)로 나뉜다<sup>54)</sup>. 후천 면역에 관여하는 T 세포가 관여하는 면역 반응을 중심으로 분류해보면 Th1 반응과 Th2 반응으로 나누어 볼 수 있다<sup>55)</sup>. 일반적으로 세포 매개성 면역는 Th1 반응과 관련이 깊으며, 체액성 면역는 Th2 반응과 관련성이 있다<sup>55)</sup>. 이러한 일련의 반응에 수많은 cytokine들이 관여하는데 Th1과 Th2 반응에서 가장 대표적인 cytokine으로 IL-4와 IFN- $\gamma$ 를 들 수 있다<sup>55,56)</sup>. IL-4는 Th2 반응에 대표적인 cytokine이며, IFN- $\gamma$ 는 Th1 반응의 대표적인 cytokine이다. 따라서, 천식 (asthma)과 같은 질환은 Th2 반응이 위주가 되므로 IL-4를 비롯하여 IL-5, IL-6, IL-10과 같은 Th2 계열 cytokine이 증가되며<sup>55,56)</sup>, 본 연구에서 다루고 있는 DNCB에 의한 ACD는 Th1 반응이 위주가 되어 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  등의 cytokine이 증가하게 된다<sup>57)</sup>.

본 연구의 결과를 살펴보면, 대조군의 혈청에서 정상군의 350%에 달하는 IFN- $\gamma$ 가 검출되었다. 이러한 결과는 U937 세포를 이용한 연구에서 DNCB와 DNFB에 의하여 IFN- $\gamma$ 의 생성이 3배 이상 증가함을 보인 것과 동일 한 결과이다<sup>58)</sup>. SR의 처리는 증가된 혈중 IFN- $\gamma$  농도를 유의한 수준으로 감소 시켰다(Fig. 8). 이러한 결과는 비장/체중비의 결과와 동일하게 SR이 ACD 유발에 병행하여 일어나는 면역 반응을 효율적으로 억제 해 주었다는 의미로 해석된다. 또한, SR는 혈중 IL-4의 농도에는 특별한 영향을

미치지 않았다(Fig. 7). 이를 종합하여 보면, SR는 ACD 유발에 관여하는 Th1 반응을 선택적으로 억제하며, Th2 반응에는 관여할 가능성이 낮다는 사실을 알 수 있다.

비만 세포는 즉시형 면역 반응에서 매우 중요한 역할을 수행한다. 감각 단계는 비만 세포에 항원특이 항체, 특히 IgE가 부착되는 단계를 의미하며, 항체에 특이한 항원의 재감작에 의하여 비만 세포는 탈과립된다<sup>59)</sup>. 비만 세포로부터 탈과립된 물질들은 혈관 확장 및 혈관 투과성 증가 등 염증 반응을 매개하게 된다<sup>60)</sup>.

동물 실험의 결과에서, ACD 유발에 의하여 비만 세포의 개수가 증가하였고, SR 처리에 의하여 비만 세포가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 9). 또한, RBL-2H3 cell을 이용한 실험에서도 400  $\mu\text{g/ml}$  이상 농도에서 농도의존적인 세포 생존율의 감소가 관찰되었다(Fig. 10). 이러한 결과는 SR이 ACD의 증상을 개선하는 기전에 비만세포가 관여할 가능성으로 해석된다.

비만 세포의 탈과립 작용에 미치는 SR의 영향을 b-hexosaminidase와 histamine 유리능에 미치는 영향을 통하여 살펴본 결과 b-hexosaminidase 유리는 200  $\mu\text{g/ml}$  이상에서, histamine 유리는 400  $\mu\text{g/ml}$  이상 농도에서 유의한 수준으로 억제 되었으며 반응은 농도 의존적이었다(Fig. 11, 12). 단, 400  $\mu\text{g/ml}$  농도와 800  $\mu\text{g/ml}$  농도에서의 b-hexosaminidase 수치 감소는 세포사멸에 의하여 기인한 것으로 보인다. 일반적으로 구강투여를 통하여서는 표적 장기에서 200  $\mu\text{g/ml}$  농도에 도달하기는 힘들다고 보여진다. 그러나, 본 연구에서는 에탄올 추출물을 피부를 통하여 직접 처리하였기 때문에 피부 조직 내에서의 SR 농도는 구강투여 보다는 높을 것으로 유추하지만 어느 정도 수준일지에 대하여 아직까지 어떤 연구결과도 없는 실정이다. 따라서, 상기한 결과는 비록 시험관 내에서 유의한 결과가 도출되었다 할지라도, 생체 내에서 SR이 비만 세포의 탈과립을 방지하거나, 직접적으로

세포 생존율에 영향을 미칠 수도 있다는 개연성을 제시하는 수준으로 해석되는 것이 옳다. 추후, SR의 특정 성분을 측정하는 등의 방법을 통하여 피부 조직 내의 농도를 가늠할 수 있는 후속 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

玄蓼이 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉성 피부염에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. ACD 유발에 의하여 발생하는 홍반, 낙설, 각화 등의 증상을 유의하게 감소시켰다.
2. 피부 조직에서 발생하는 스폰지 조직의 비후와 부종을 감소시키는 경향을 보였다.
3. ACD 유발에 의하여 증가하는 비장/체중비를 유의한 수준으로 감소시켰다.
4. Th1 반응의 대표적인 cytokine인 IFN- $\gamma$ 를 대조군과 비교하여 유의하게 감소시켰다.
5. 대조군의 피부 조직 내에서 증가 소견을 보인 비만 세포를 감소시키는 경향을 보였다.
6. 400  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 비만 세포주의 세포 증식율의 유의한 수준으로 감소시켰다.
7. 200  $\mu\text{g/ml}$  에서 비만 세포주의 b-hexosaminidase 유리를 유의한 수준으로 감소시켰다.
8. 400  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 비만 세포주의 histamine 유리를 유의한 수준으로 감소시켰다.

## 참 고 문 헌

1. 대한피부과학회. 피부과학. 서울:여문각. 2008: 125-33.
2. 안성구, 이승현, 박윤기. 흔히보는 피부질환. 서울:고려의학. 2009:13-4.

3. 정종영, 한경환. 한국에 흔한 피부질환. 서울:엠디월드. 2009;37-48.
4. 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.
5. Kataranovski M, Vlaski M, Kataranovski D, Tosic N. Immunotoxicity of epicutaneously applied anticoagulant rodenticide wafarin : evaluation by contact hypersensitivity to DNCB in rats. *Toxicology*. 2003;188:83-100.
6. Okamura T, Morimoto M, Yamance 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.
7. 손미예, 남상해. 두충 추출물이 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉피부염과 산화적 손상에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*. 2007;36(12):1517-22.
8. 이재령, 최경임, 박숙자, 권영규, 변성희. 금은화 화장수가 DNCB로 유발된 접촉성피부염에 미치는 영향. *대한보초학회*. 2006;21(1):9-15.
9. 백윤하. DNCB(dinitrochlorobenzen)로 자극한 NC/Nga 생쥐에서 丹蓼의 아토피 억제 효과. *경원대학교 박사학위논문*. 2006.
10. 김윤희, 박영숙. 오가피열수추출물이 DNCB로 유도된 알레르기성 접촉피부염 흰쥐의 지질대사, 항산화능 및 표피회복능에 미치는 영향. *한국식품과학회*. 2006;38(5):668-73.
11. 신광식 외. 生地黃 抽出物이 DNCB로 유발된 생쥐의 Allergy성 接觸皮膚炎에 미치는 影響. *대한방제학회지*. 2000;8(1):257-79.
12. 김찬중 외. Allergy性 接觸皮膚炎에 대한 苦蓼 黃連의 Iontophoresis 治療 效果. *한방안이비인후피부과학회지*. 2005;18(1):199-220.
13. 조용호 외. 植防風 莖葉이 白鼠에 유도된 알러지성 피부염에 미치는 영향. *경희대학교 대학원 한의학과 중간발표논문*. 2003.
14. 김준정. 내탁천금산이 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉피부염에 미치는 영향. *한방안이비인후피부과학회지*. 2009;22(1):46-61.
15. 감난희 외. 牛芳解肌湯의 알러지성 接觸皮膚炎에 대한 消炎效果. *한방안이비인후피부과학회지*. 2006;19(2):59-70.
16. 박숙자 외. 소풍산 추출물이 DNCB로 유발된 접촉성피부염에 미치는 영향. *동의생리병리학회지*. 2006;20(3):623-8.
17. 변성희 외. 四妙勇安湯 물추출물이 DNCB로 유발된 접촉성피부염에 미치는 영향. *대한한의학방제학회지*. 2005;13(2):59-69.
18. 김창환 외. 涼血四物湯加味方이 Allergy性 접촉 피부염에 미치는 影響. *한방안이비인후피부과학회지*. 2005;18(1):13-26.
19. 남봉수 외. 散風苦蓼丸이 알레르기성 접촉피부염에 미치는 영향. *한방안이비인후피부과학회지*. 2005;18(2):10-27.
20. 김윤범 외. 백서에 유도된 알러지성 피부염에 대한 椒甘湯의 효과. *한방안이비인후피부과학회지*. 2005;18(3):44-54.
21. 김만석 외. Allergy性 接觸皮膚炎이 유발된 白鼠의 손상피부에 熱多寒少湯 煎湯液이 미치는 影響. *사상체질의학회지*. 2002;14(3):97-113.
22. 조세왕 외. 涼膈散火湯이 Allergy性 接觸皮膚炎에 미치는 影響. *사상체질의학회지*. 2001;13(3):89-101.
23. 안지영 외. 알레르기성 접촉성 피부염에 대한 加味芎歸湯의 억제효과. *동의생리병리학회지*. 2010;24(2):290-5.
24. 박응호 외. 加減平胃散이 산화적 손상과 접촉성

- 피부염에서의 면역 조절작용에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2007;16(2):131-45.
25. 강운호 외. 黃連解毒湯이 알러지성 접촉피부염에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;25(3):508-17.
  26. 배은영 외. 祛風燥濕解毒方이 접촉성피부염 유발 NC/Nga 생쥐의 면역 관련 인자에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(6):1491-8.
  27. 김성호 외. 桂枝芍藥知母湯이 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉피부염에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2010;23(1):8-22.
  28. 전국한의과대학 본초학공동교재 편찬위원회. 本草學. 서울:영림사. 2011:235-6.
  29. 변성희, 양재하, 김상찬. 현삼메탄을 추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 nitric oxide 생성에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2005;20(2):7-16.
  30. 고우신 외. LPS-자극 생쥐 복막큰포식세포의 NF- $\kappa$ B 활동 억제를 통한 현삼(玄蔘)의 산화질소 생산 억제 효과. 대한동의생리학회지. 2002;16(6):1284-90.
  31. 여의주, 한재경, 김윤희. 玄蔘이 NC/Nga mice에서 유발된 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2007;21(2):13-34.
  32. 김대식 외 역. 면역생물학. 서울:라이프사이언스. 2005:461.
  33. Novak N, Bieber T, Leung DY. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2003 Dec;112(6 Suppl):S128-39.
  34. Shintani Futoshi, Step To Internal Medicine - 면역, 알레르기 질환. 서울:정담. 2005:44-7.
  35. Guterma J, Behrendt H, Ring J, Jakob T. Model of contact dermatitis and atopic eczema. Drug Discovery Today: Disease Model. 2005 summer;2(2):135-40.
  36. 서울대학교 의과대학 피부과학요실 편. 의대생을 위한 피부과학. 서울:고려의학. 2011:30.
  37. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 2003:71-3.
  38. 이해영 외. 피부과학. 서울:군자출판사. 2006:151.
  39. 강원형. 피부질환 이틀라스. 서울:한미의학. 2006:91.
  40. 吳軍 외. 中西醫結合皮膚性病手冊. 四川科學技術出版社. 2007:254-5.
  41. 萬力生 외. 皮膚科中西醫結合診療技巧. 廣東科技出版社. 2005:139-44.
  42. 王元松 외. 皮膚科金方. 河北科學技術出版社. 2003:1-17.
  43. 신민교, 정보섭. 鄉藥大事典. 서울:영림사. 2002:909-10.
  44. 안덕균. 한국본초도감. 서울:교학사. 2003:90.
  45. 이방원. 본초정요. 서울:일증사. 2002:152-4.
  46. 최윤희 외. Elevated Plus-Maze를 이용한 현삼의 항불안 효과 : GABA 신경계와의 관련성 연구. 동의생리병리학회지. 2010;24(3):476-83.
  47. 김진우 외. 玄蔘 水抽出物이 아밀로이드 前驅蛋白質로 形質變換된 초파리에 미치는 영향. 동의 신경정신과학회지. 2009;20(2):121-31.
  48. 박규하 외. 玄蔘의 유전자 분석 및 자발성 고혈압흰쥐의 혈압에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2008;23(2):213-23.
  49. 김대복 외. 玄蔘이 甲狀腺機能亢進症 誘發 흰쥐의 遺傳子 發顯에 미치는 影響. 대한본초학회지. 2007;22(4):9-19.
  50. Hopkins JE, Naisbitt DJ, Kitteringham NR, Dearman RJ, Kimber I, Park BK. Selective haptenation of cellular or extracellular protein by chemical allergens: association with cytokine polarization. Chem Res Toxicol. 2005;18(2):375-81.

51. Saint-Mezard P, Rosieres A, Krasteva M, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JF. Allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol.* 2004;14(5):284-95.
52. Burk RL, Ackerman N. *Small animal radiology and ultrasonography.* ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1996:410-4.
53. 정인조, 왕지환, 윤제웅, 이경우, 연성찬, 이효중, 이희천. 개에서 실험적으로 유발한 비장종대의 방사선학적 평가. *한국임상수의학회지.* 2006;23(3):263-66.
54. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne. *Kuby immunology.* New York:W. H. Freeman and Company, 2006:8-16.
55. 정혜영. 사이토카인 분자생물학. 서울:월드사이언스, 2002:51-5.
56. Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol.* 2001; 54(8):577-89.
57. Hayashi, M., Higashi, K., Kato, H., Kaneko, H. Assessment of Preferential Th1 or Th2 Induction by Low-Molecular-Weight Compounds Using a Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Method: Comparison of Two Mouse Strains, C57BL/6 and Balb/c. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001;177:38-45.
58. Hopkins JE, Naisbitt DJ, Kitteringham NR, Dearman RJ, Kimber I, Park BK. Selective haptenation of cellular or extracellular protein by chemical allergens: association with cytokine polarization. *Chem Res Toxicol.* 2005;18(2):375-81.
59. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne. *Kuby immunology.* New York:W. H. Freeman and Company, 2006:8-16.
60. 이승연, 강경화, 이해웅, 유선애, 김홍배, 류지효. 升葛湯의 제형변화에 따른 항알레르기 효과의 비교 연구. *대한한방소아과학회지.* 2008;22(1): 103-11.