

## 벼집 (稻草)이 DNCB로 유발된 생쥐의 알레르기성 접촉성 피부염에 미치는 영향

박젹마 · 채중원

동신대학교 한의과대학 소아과학교실

### Abstract

#### Effects of Rice Straw (RS) on Allergic Contact Dermatitis (ACD) Induced by DNCB in Mice

Park Jem Ma · Chae Joong Won

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongshin University

#### Objectives

In the theory of Korean medicine, rice straw (RS) has been used effectively as treatments for dyspepsia, diarrhea, enteritis, inflammatory epigastric diseases and various dermatitis. However, the theory has not been studied intensively yet about anti-inflammatory effects for human. This study was to investigate effects of RS for a treatment of allergic contact dermatitis (ACD) induced by 2,4-dinitrochlorobezene (DNCB) in mice.

#### Methods

In this experiment, effects of RS were investigated on changes in body weights, dorsum skin thickness, clinical aspects on the dorsum skin, spleen and body weight among these four groups; normal group (NOR), control group (CON), RS spread group (RSS) and RS spread and administer group (RSS+Adm). In addition, the effects on proliferations of splenocytes were also investigated in vitro and in vivo study.

#### Results

RSS group and RSS+Adm group showed increasing in body weights, diminished dorsum skin thickness and treated dermatitis on dorsum skin. In RSS+Adm group, spleen weights were lowered significantly compared to CON group.

#### Conclusions

In conclusion, these data suggest that RS can decrease symptoms of ACD significantly, and it shows the anti-inflammatory and immunosuppressant effect as well. Therefore, RS can be useful to treat patients with ACD.

**Key words** : Allergic contact dermatitis (ACD), *Oryza sativa* L., RiceStraw (RS), 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)

## I. Introduction

산업발달로 인하여 합성물질의 범람과 환경오염이 가속화되면서 여러 가지 면역 과민반응을 유발시키는 알레르겐이 급증하고 있다<sup>1)</sup>. 이런 외부환경에 노출된 피부질환 중 알레르기성 접촉성 피부염 (Allergic contact dermatitis, ACD)은 접촉된 항원에 노출되어 발생하는 염증성 질환으로서 제 4형 지연성 과민반응에 속하는 면역질환이며<sup>2)</sup> 감각된 물질에 대해서는 피부염을 일으키지만, 감각되지 않은 물질에 대해서는 전혀 반응을 보이지 않는 독특한 특성을 갖고 있다<sup>3)</sup>. 서양의학에서는 ACD 치료제로 부신피질 호르몬, 항히스타민제, 항생제와 스테로이드제 등을 광범위하게 사용하고 있다. 이 제제들은 일시적인 진정효과와 염증완화작용은 뛰어나나 장기간 투여할 경우 다양한 부작용을 일으킬 수 있기 때문에<sup>4)</sup> 치료효과도 높고 부작용이 적은 單味<sup>5-8)</sup> 및 처방<sup>9-12)</sup>을 이용한 다양한 한의학적 연구가 이루어지고 있다.

RS는 화본과에 속한 벼짚의 줄기와 잎으로 性은 平하고, 味는 甘하며 脾·肺經에 歸經하여 寬中, 下氣, 消食積하는 작용이 있어 食道癌, 反胃, 食滯, 泄瀉, 腹痛, 消渴證, 黃疸, 白濁, 痔疾, 火傷을 치료한다<sup>13)</sup>. 기존의 논문과 연구보고에서 RS는 주로 환경, 축산이나 열분해에 관한 주제로 다루지면서 식물의 성장을 촉진시키고 항균효과가 있으며<sup>14)</sup> 적은 밀도에 비해 강한 휘발성을 가진 에너지원이라는 결과가 밝혀져 있다<sup>15)</sup>. 한의학적 연구에 의하면 淸熱解毒, 涼血祛風 시키는 약제와 방제들이 항allergy와 免疫反應抑制에 유의한 효과가 있어 알레르기성 피부질환에 임상적 활용가능성이 있음이 보고되었으나<sup>12,16-8)</sup> 寬中, 下氣, 消食積작용이 있는 RS의 ACD 치료효과에 관한 구체적인 연구는 접하지 못하였다. 특히 소아에게 생기는 아토피와 알레르기성 피부질환이 주로 식품항원과 연관성이 높다는 점을 고려해 볼 때<sup>19-20)</sup> RS의 寬中, 下氣, 消食積하는 작용이 항allergy와 면역반응억제에 유의한 작용을 할 수 있을 것이라는 가설을 세우고 본 연구를 진행 하였다.

본 연구에서는 RS의 ACD 치료에 대한 효과를 살펴 보기 위하여 생쥐에 DNCB를 반복 도포하여 ACD를 유발하고 체중변화, 등의 두께 변화와 비장을 적출하여 비장의 체중 및 비장세포의 증식률에 미치는 영향을 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다. 산업발달로 인하여 합성물질의 범람과 환경

오염이 가속화되면서 여러 가지 면역 과민반응을 유발시키는 알레르겐이 급증하고 있다<sup>1)</sup>. 이런 외부환경에 노출된 피부질환 중 알레르기성 접촉성 피부염 (Allergic contact dermatitis, ACD)은 접촉된 항원에 노출되어 발생하는 염증성 질환으로서 제 4형 지연성 과민반응에 속하는 면역질환이며<sup>2)</sup> 감각된 물질에 대해서는 피부염을 일으키지만, 감각되지 않은 물질에 대해서는 전혀 반응을 보이지 않는 독특한 특성을 갖고 있다<sup>3)</sup>. 서양의학에서는 ACD 치료제로 부신피질 호르몬, 항히스타민제, 항생제와 스테로이드제 등을 광범위하게 사용하고 있다. 이 제제들은 일시적인 진정효과와 염증완화작용은 뛰어나나 장기간 투여할 경우 다양한 부작용을 일으킬 수 있기 때문에<sup>4)</sup> 치료효과도 높고 부작용이 적은 單味<sup>5-8)</sup> 및 처방<sup>9-12)</sup>을 이용한 다양한 한의학적 연구가 이루어지고 있다.

RS는 화본과에 속한 벼짚의 줄기와 잎으로 性은 平하고, 味는 甘하며 脾·肺經에 歸經하여 寬中, 下氣, 消食積하는 작용이 있어 食道癌, 反胃, 食滯, 泄瀉, 腹痛, 消渴證, 黃疸, 白濁, 痔疾, 火傷을 치료한다<sup>13)</sup>. 기존의 논문과 연구보고에서 RS는 주로 환경, 축산이나 열분해에 관한 주제로 다루지면서 식물의 성장을 촉진시키고 항균효과가 있으며<sup>14)</sup> 적은 밀도에 비해 강한 휘발성을 가진 에너지원이라는 결과가 밝혀져 있다<sup>15)</sup>. 한의학적 연구에 의하면 淸熱解毒, 涼血祛風 시키는 약제와 방제들이 항allergy와 免疫反應抑制에 유의한 효과가 있어 알레르기성 피부질환에 임상적 활용가능성이 있음이 보고되었으나<sup>12,16-8)</sup> 寬中, 下氣, 消食積작용이 있는 RS의 ACD 치료효과에 관한 구체적인 연구는 접하지 못하였다. 특히 소아에게 생기는 아토피와 알레르기성 피부질환이 주로 식품항원과 연관성이 높다는 점을 고려해 볼 때<sup>19-20)</sup> RS의 寬中, 下氣, 消食積하는 작용이 항allergy와 면역반응억제에 유의한 작용을 할 수 있을 것이라는 가설을 세우고 본 연구를 진행 하였다.

본 연구에서는 RS의 ACD 치료에 대한 효과를 살펴 보기 위하여 생쥐에 DNCB를 반복 도포하여 ACD를 유발하고 체중변화, 등의 두께 변화와 비장을 적출하여 비장의 체중 및 비장세포의 증식률에 미치는 영향을 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다. 산업발달로 인하여 합성물질의 범람과 환경오염이 가속화되면서 여러 가지 면역 과민반응을 유발시키는 알레르겐이 급증하고 있다<sup>1)</sup>. 이런 외부환경에 노출된 피부질환 중 알레르기성 접촉성 피부염 (Allergic contact dermatitis, ACD)은 접촉된 항원에 노

출되어 발생하는 염증성 질환으로서 제 4형 지연성 과민반응에 속하는 면역질환이며<sup>2)</sup> 감각된 물질에 대해서는 피부염을 일으키지만, 감각되지 않은 물질에 대해서는 전혀 반응을 보이지 않는 독특한 특성을 갖고 있다<sup>3)</sup>. 서양의학에서는 ACD 치료제로 부신피질 호르몬, 항히스타민제, 항생제와 스테로이드제 등을 광범위하게 사용하고 있다. 이 제제들은 일시적인 진정효과와 염증완화작용은 뛰어나나 장기간 투여할 경우 다양한 부작용을 일으킬 수 있기 때문에<sup>4)</sup> 치료효과도 높고 부작용이 적은 單味<sup>5-8)</sup> 및 처방<sup>9-12)</sup>을 이용한 다양한 한의학적 연구가 이루어지고 있다.

RS는 화본과에 속한 벼짚의 줄기와 잎으로 性은 平하고, 味는 甘하며 脾·肺經에 歸經하여 寬中, 下氣, 消食積하는 작용이 있어 食道癌, 反胃, 食滯, 泄瀉, 腹痛, 消渴證, 黃疸, 白濁, 痔疾, 火傷을 치료한다<sup>13)</sup>. 기존의 논문과 연구보고에서 RS는 주로 환경, 축산이나 열분해에 관한 주제로 다루어지면서 식물의 성장을 촉진시키고 항균효과가 있으며<sup>14)</sup> 적은 밀도에 비해 강한 휘발성을 가진 에너지원이라는 결과가 밝혀져 있다<sup>15)</sup>. 한의학 연구에 의하면 淸熱解毒, 涼血祛風 시키는 약제와 방제들이 항allergy와 免疫反應抑制에 유의한 효과가 있어 알레르기성 피부질환에 임상적 활용가능성이 있음이 보고되었으나<sup>12,16-8)</sup> 寬中, 下氣, 消食積작용이 있는 RS의 ACD 치료효과에 관한 구체적인 연구는 접하지 못하였다. 특히 소아에게 생기는 아토피와 알레르기성 피부질환이 주로 식품항원과 연관성이 높다는 점을 고려해 볼 때<sup>19-20)</sup> RS의 寬中, 下氣, 消食積하는 작용이 항allergy와 면역반응억제에 유의한 작용을 할 수 있을 것이라는 가설을 세우고 본 연구를 진행 하였다.

본 연구에서는 RS의 ACD 치료에 대한 효과를 살펴 보기 위하여 생쥐에 DNCB를 반복 도포하여 ACD를 유발하고 체중변화, 등의 두께 변화와 비장을 적출하여 비장의 체중 및 비장세포의 증식률에 미치는 영향을 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. Materials and methods

### 1. 재료

#### 1) 동물

6주령된 수컷 Balb/c 타입 생쥐를 동물실험 업체 (샘

타코, 한국)에서 구매하여 사용하였다. 구매한 동물은 항온항습 장치가 구비된 사육장에서 고품사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간의 적응 실내온도 24±2 °C, 습도 55±5%, 12시간 명암주기시간을 둔 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 약제

본 실험에 사용된 RS는 화본과에 속한 *Oryza sativa* L.의 줄기와 잎으로 동신대학교 목포한방병원에서 구입 정제하여 사용하였다.

#### 3) 시약

알레르기성 접촉성 피부염 (Allergic Contact Dermatitis, ACD) 유발을 위하여 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) 시약 업체인 Sigma (시약번호 : 237329, USA)에서 구매하여 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 시료의 제조 및 투여

RS 100 g을 D/W 1,500 ml를 이용하여 100 °C에서 4시간 추출한 다음, 원심분리 후 찌꺼기를 제거한 상층액을 모아 감압농축기 (EYELA, Japan)를 이용하여 농축한 후, 동결건조기 (삼원, 한국)를 이용하여 동결 건조 하였다. 이 때, 최종적으로 얻어진 동결 건조 분말은 5.65 g으로 수득률은 5.65%였으며, 이를 증류수에 희석하여 농도별로 투여하였다.

### 2) 알레르기성 접촉성 피부염의 유발

ACD는 acetone과 olive oil (AOO)을 4대 1로 섞은 혼합액에 1%의 DNCB가 함유된 용액을 이용하여 유발하였다. 먼저 zoletile (Virbac, France)을 PBS에 1:100의 비율로 희석시키고 100 μl를 복강 주사하여 생쥐를 마취시켰다. 마취된 생쥐의 등에 제모제 (세화, 프리모 크림)를 넓게 도포하여 5 ~ 10분 방치한 후 거즈에 온수를 묻혀 닦아내고 잔털을 깨끗이 제거한 다음 상처 치유를 위하여 24시간 방치하였다. 24시간이 지난 후 흡입 마취제인 isoflurane (중외제약, 한국)을 이용하여 가볍게 다시 마취시키고 등 부위에 1일 1회 3일간 ACD 유발 약물인 1% DNCB (AOO가 섞인) 용액 50 μl을 도포하였다. 3일이 지난 후 2일 1회 간격으로 4회에 걸쳐 1% DNCB 용액 50 μl을 도포하여 ACD를 유발하였다.

## 3) 약물의 처리 및 실험군 분류

경구 투여하는 방법은 RS를 물로 추출하여 농축한 후 동결 건조하여 사용하였으며 투여량은 0.1 g/kg 농도였고, 약물 투여 기간은 8일이었다.

- 1) 정상군 (normal group, NOR): ACD를 유발하지 않고, 증류수를 경구 투여하고, AOO만 도포한 군 (n=5)
- 2) 대조군 (control group, CON): ACD를 유발하고, 증류수를 경구 투여하고, AOO를 도포한 군 (n=8)
- 3) RS 도포군 (RS spread group, RSS): ACD를 유발하고, 증류수를 경구투여하고, RS 용액을 도포한 군 (n=8)
- 4) RS 도포 및 경구투여군 (RS spread and administer group, RSS+Adm): ACD를 유발하고 RS의 경구투여와 도포를 동시에 시행한 군 (n=8)

## 4) 체중, 비장 무게의 측정

실험시작일 (day 1)에 측정된 체중을 기준으로 ACD를 유발한 후와 희생시키기 전 체중 변화를 전자저울 (HANA, KC-200, Korea)을 이용하여 실시하였다. 비장의 무게는 실험 마지막 날 생쥐를 희생시킨 후, 비장을 적출한 다음 미량 저울 (OHAUS, USA)을 이용하여 측정하였다.

## 5) 등 피부 두께의 측정

ACD 유발 후 각 군별 실험기간 동안 변화된 등 피부 두께를 측정하기 위하여 실험 마지막 날 생쥐를 희생시킨 후 등 피부를 절제하여 디지털 캘리퍼 (Mitutoyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

## 6) 피부 표면의 육안적 관찰 및 증상 정도에 미치는 영향

ACD의 유발 정도를 전반적으로 관찰하기 위하여 실험 마지막 날 생쥐를 희생시킨 후, ACD가 유발된 등 부위를 Digital camera (Samsung, Korea)로 촬영하여 육안적으로 증상을 관찰하였고, 실험 종료 후 아래와 같은 Symptom score를 적용하여 각 군별 피부 병변을 관찰하였다.

- 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

## 7) 비장세포 증식률에 미치는 영향

(1) *in vitro*

분리된 비장 세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에  $1.0 \times 10^6$  cells/ml 농도로 접종한 다음 비장 세포에 LPS (Lipopolysaccharide) 5  $\mu\text{g/ml}$  및 RS를 농도별 (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml)로 첨가한 후 Ez-cytox 15  $\mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 2시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 Microplate Reader로 450 nm에서 측정하였다.

(2) *in vivo*

생체 내 비장세포 증식률은 측정은 실험이 종료된 다음 생쥐를 희생시켜 비장 세포의 분리한 후 비장세포의 증식률을 *in vitro*의 방법과 동일하게 측정하였다.

## 3. 통계 처리

수집된 데이터의 통계처리 방법으로는 SPSS 12 (SPSS, U.S.A.)를 활용하였다. 실험 성적은 평균±표준편차 (mean±SD)로 나타내었으며, 군이 3개 이상인 것은 ANOVA로 실시한 다음 통계적으로 유의한 경우 Tukey 방법으로 사후검정을 하였고, 2개의 군 간의 비교는 independent sample t-test를 사용하여 p-value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 인정하였다.

## III. Results

## 1. 체중 변화에 미치는 영향

3주간 체중 변화를 관찰한 결과 정상군은 꾸준히 증가하는 경향을 보였고, 도포와 투약을 병행한 RSS+Adm 군은 감소하다가 증가하는 경향을 보였으며, 대조군과 RSS 군은 증가하다가 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다 (Table 1, Fig. 1).

## 2. 등 피부 두께에 미치는 영향

모든 실험을 마치고 희생시킨 생쥐의 등 피부를 절제한 후, 디지털 캘리퍼를 이용하여 등 피부의 두께를 측정된 다음 군 간을 비교한 결과 대조군에 비해 RSS 군 ( $p < 0.01$ )과 RSS+Adm 군 ( $p < 0.05$ )에서 통계적으로 유의하게 얇아진 것을 확인할 수 있었다 (Table 2, Fig. 2).

Table 1. The Changes of Body Weight in ACD Mice

	0 Week	1 Week	3 Week
Normal	21.00 ± 1.04	21.66 ± 0.87	22.18 ± 0.79
Control	21.04 ± 0.61	21.68 ± 0.77	21.65 ± 0.50
RSS	21.74 ± 0.72	22.67 ± 0.80	21.56 ± 0.70
RSS + Adm	21.07 ± 0.88	20.51 ± 0.60	21.44 ± 0.60

Normal : naive group, Control : only ACD group, RSS : RS spread group, RSS+Adm : RS spread and administered group. Values are represented as mean±SD. Normal group data were expressed as mean±SD of 5 experiments. Control, RSS and RSS+Adm groups data were expressed as mean±SD of 8 experiments.

Table 2. The Changes of Thickness of Dorsal Skin in ACD Mice

	Back thickness (mm)
Normal	0.70 ± 0.06
Control	0.63 ± 0.06
RSS	0.54 ± 0.54 **
RSS + Adm	0.55 ± 0.05 *

Normal : naive group, Control : only ACD group, RSS : RS spread group, RSS+Adm : RS spread and administered group. Values are represented as mean±SD. Normal group data were expressed as mean±SD of 5 experiments. Control, RSS and RSS+Adm groups data were expressed as mean±SD of 8 experiments.

\*\* : Statistically significant compared with control group (\*\*; p<0.01).

\* : Statistically significant compared with control group (\*; p<0.05).

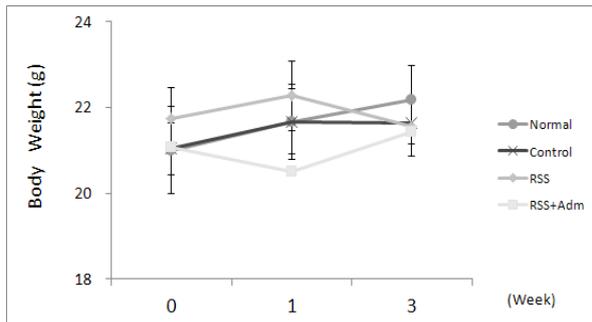


Fig. 1. The changes of body weight in ACD mice

Normal : naive group, Control : only ACD group, RSS : RS spread group, RSS+Adm : RS spread and administered group. Values are represented as mean±SD.

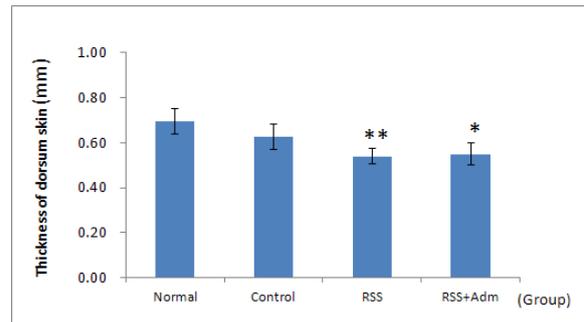


Fig. 2. The changes of thickness of dorsum skin in ACD mice

Normal : naive group, Control : only ACD group, RSS : RS spread group, RSS+Adm : RS spread and administered group. Values are represented as mean±SD.

\*\* : Statistically significance compared with control group (\*\*; p<0.01).

\* : Statistically significance compared with control group (\*; p<0.05).

### 3. 등 피부 표면의 육안적 관찰

모든 실험을 마친 후 제모만 시행한 정상군의 피부에서는 특별한 변화를 관찰할 수 없었고, ACD 유발 후 아무런 처치를 하지 않은 대조군의 등 피부에서는 피부 홍반, 낙설 등 중등도 이상의 증상이 관찰되었다. ACD 유발 후 RS 시료를 도포한 RSS 군 및 시료도포와 약물투여를 병행한 RSS+Adm 군에서는 ACD 증상이 감소되는 경향을 보였으며, RSS 군보다 RSS+Adm 군에서 더 좋은 효과가 관찰되었다 (Fig. 3).

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

실험방법에서 언급한 바와 같이 5점 척도를 사용하여 등 피부의 증상을 5점 척도를 활용하여 수치로 나타낸 결과, 대조군에 비해 RSS 군과 RSS+Adm 군에서 모두 유의한 수준 (p<0.01)으로 알레르기성 접촉피부염의 증상 정도가 감소됨이 관찰되었다 (Table 4, Fig. 4).

### 5. 비장 무게에 미치는 영향

모든 실험을 마친 후 비장을 적출하여 무게를 측정하여 각 군 간을 비교한 결과 대조군에 비해 RSS 군과

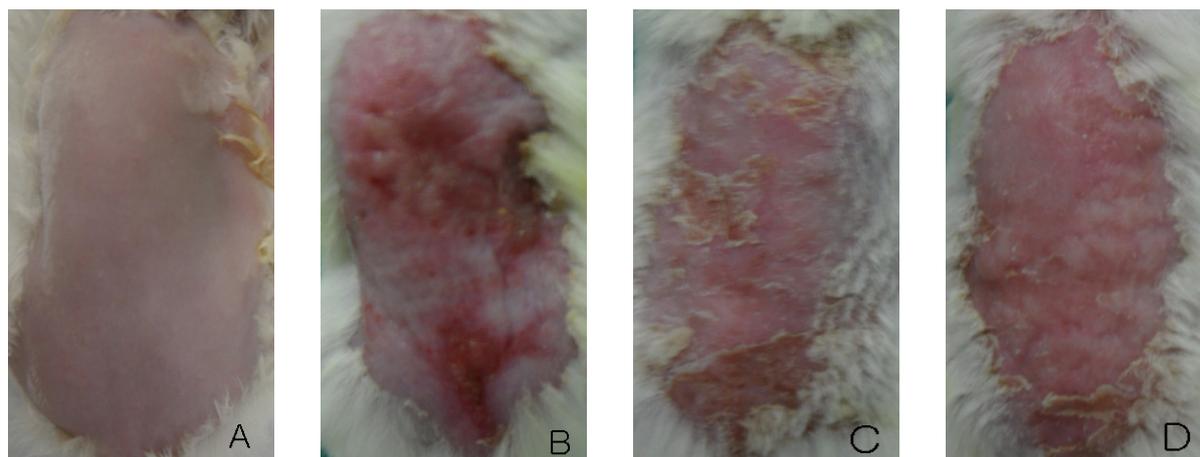


Fig. 3. Effects of RS on clinical aspect in ACD mice

Clinical aspect of dorsum skin in ACD mice were observed using digital camera at the end of the day. (A) : normal group, (B) : control group, (C) : RSS group, (D) : RSS + Adm group.

Table 4. Effects of RS on Symptom Score in ACD Mice

	IL-10 (pg/ml)
Normal	0.00 ± 0.00
Control	4.29 ± 0.76
RSS	3.00 ± 0.76
RSS + Adm	2.12 ± 0.35

Normal : naive group, Control : only ACD group, RSS : RS spread group, RSS+Adm : RS spread and administered group. Values are represented as mean±SD. Normal group data were expressed as mean±SD of 5 experiments. Control, RSS and RSS + Adm groups data were expressed as mean±SD of 8 experiments.

Table 5. The Changes of Spleen Weight in ACD Mice

	Spleen weight (g)
Normal	0.12 ± 0.02
Control	0.16 ± 0.02
RSS	0.13 ± 0.02 **
RSS + Adm	0.14 ± 0.02 **

Normal : naive group, Control : only ACD group, RSS : RS spread group, RSS+Adm : RS spread and administered group. Values are represented as mean±SD. Normal group data were expressed as mean±SD of 5 experiments. Control, RSS and RSS + Adm groups data were expressed as mean±SD of 8 experiments.

\*\* : Statistically significance compared with control group (\*\* ; p<0.01).

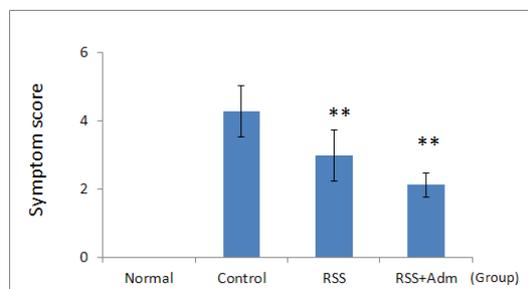


Fig. 4. Effects of RS on symptom score in ACD mice

Symptom scores were estimated in each animal respectively. Normal : naive group, Control : only ACD group, RSS : RS spread group, RSS+Adm : RS spread and administered group. Values are represented as mean±SD (n=8).

\*\* : Statistically significance compared with control group (\*\* ; p<0.01).

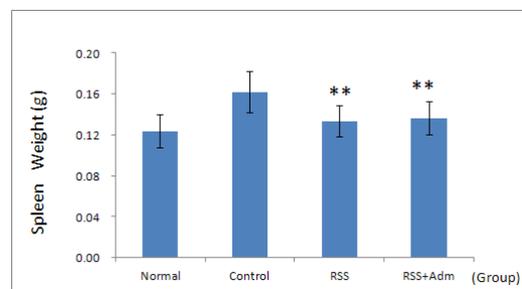


Fig. 5. The changes of spleen weight in ACD mice

Normal : naive group, Control : only ACD group, RSS : RS spread group, RSS+Adm : RS spread and administered group(n=8). Values are represented as mean±SD.

\*\* : Statistically significance compared with control group (\*\* ; p<0.01).

Table 6. Effects of RS on Proliferation Rates of Splenocyte *in vivo*

	LPS (-) (%)	LPS (+) (%)
Normal	100.00 ± 12.97	172.64 ± 20.03
Control	110.477 ± 10.90	218.83 ± 24.66
RSS	83.73 ± 8.72 **	135.28 ± 11.74 ##
RSS + Adm	73.28 ± 7.24 **	122.52 ± 5.72 ##

Normal : naive group, Control : only ACD group, RSS : RS spread group, RSS+Adm : RS spread and administered group. Values are represented as mean±SD (n=8).

\*\* : Statistically significance compared with control LPS (-) group (\*\* ; p<0.01).

## : Statistically significance compared with control LPS (+) group (## ; p<0.01).

Table 7. Effects of RS on Proliferation Rates of Splenocyte *in vitro*

	Proliferation rates (%)
0 mg/ml	100.00 ± 7.14
0.0625 mg/ml	63.78 ± 4.16 **
0.125 mg/ml	67.76 ± 3.71 **
0.25 mg/ml	74.33 ± 3.85 **
0.5 mg/ml	84.41 ± 6.02 **
1 mg/ml	94.25 ± 5.48

Normal : naive group, Control : only ACD group, RSS : RS spread group, RSS+Adm : RS spread and administered group. Values are represented as mean±SD (n=8).

\*\* : Statistically significance compared with control group (\*\* ; p<0.01).

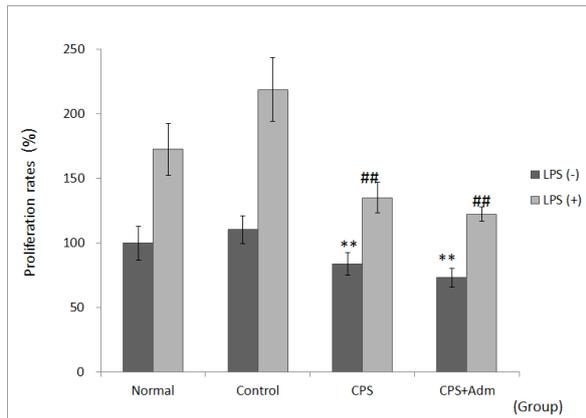


Fig. 6. Effects of RS on proliferation rates of splenocyte *in vivo*

Proliferation rates of splenocyte were measured using modified MTT method described in materials and methods. LPS (-): without LPS group, LPS (+) : 5 ug/ml of LPS treated control. Values are represented as mean±SD (n=8).

\*\* : Statistically significance compared with control LPS (-) group (\*\* ; p<0.01).

## : Statistically significance compared with control LPS (+) group (## ; p<0.01).

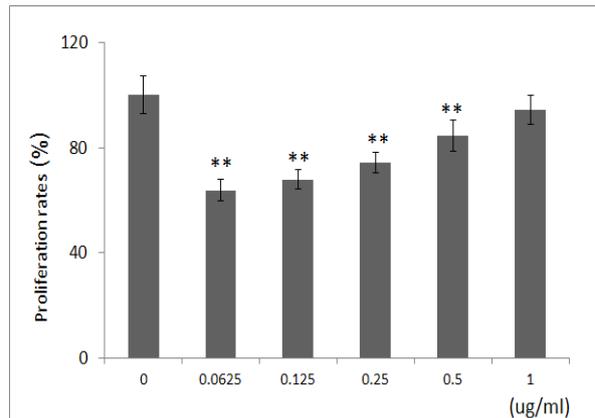


Fig. 7. Effects of RS on proliferation rates of splenocyte *in vitro*

Proliferation rates of splenocyte were measured using modified MTT method described in materials and methods. Normal : naive group, Control : only ACD group, RSS : RS spread group, RSS+Adm : RS spread and administered group. Values are represented as mean±SD (n=8).

\* : Statistically significance compared with control group (\* ; p<0.05).

\*\* : Statistically significance compared with control group (\*\* ; p<0.01).

RSS+Adm 군 (p<0.01) 군에서 유의한 차이를 관찰할 수 있었다 (Table 5, Fig. 5).

6. 생체 내 (*in vivo*) 비장세포 증식률에 미치는 영향

모든 실험을 마친 후 생쥐를 희생시킨 후 비장을 적출하고, 비장 세포를 분리하여 증식률을 측정하였다.

측정값은 LPS (-) normal 군을 기준하여 백분율로 표시하였으며, LPS를 처리하지 않은 LPS (-)와 LPS를 처리한 LPS (+) 모두 대조군에 비해 RSS 군 및 RSS+Adm 군에서 통계적으로 유의하게 (p<0.01) 비장세포의 증식률이 낮아진 것이 관찰되었다 (Table 6, Fig. 6).

## 7. 시험관 내 (*in vitro*) 비장세포 증식률에 미치는 영향

모든 실험을 마친 후 정상군의 비장 세포를 분리하여 배지에 배양한 후 RS 시료를 처리하고 농도에 따른 증식률을 관찰한 결과, 가장 저 농도인 0.0625 mg/ml에서 증식률이 감소하였다가 농도가 증가됨에 따라 증식률이 증가하는 경향을 보였으며, 1 mg/ml에서 제외하고는 모두 유의한 수준 ( $p < 0.01$ )의 비장세포 증식률 감소가 관찰되었다 (Table 7, Fig. 7).

## IV. Discussion

ACD는 개체가 이미 항원에 감작된 이후 동일한 항원에 재 접촉될 때 접촉된 국소부위에 發赤, 丘疹, 小水泡, 瘙癢 등의 염증반응을 일으키는 지연형 과민반응에 속하는 면역질환이다<sup>21-22</sup>. 서양의학에서 치료제로 항히스타민제와 스테로이드제를 광범위하게 사용하고 있는데, 항히스타민제는 염증 완화작용이 뛰어나지만 중추신경계를 자극하는 부작용과 일시적인 진정효과만 있고, 스테로이드제는 강력한 소염작용과 면역억제 작용이 있으나 장기간 투여 시 여드름, 월경불순, 성장장애, 고혈압, 당뇨병, 소화성 궤양, 골 연화 등의 부작용을 일으킬 수 있다<sup>23</sup>.

한의학에서 ACD는 ‘漆瘡’, ‘狐尿刺’, ‘粉花瘡’, ‘馬桶癬’ 등의 범주로 심한 소양증이 동반되는 질환으로서 ‘漆瘡’은 漆毒에 感受되어 발생하고, ‘狐尿刺’는 곤충의 체액에, ‘粉花瘡’은 약제의 부작용으로, ‘馬桶癬’은 새변기의 漆에 닿아 발생하는 피부염을 말한다. 이들은 모두 접촉하는 발생 부위와 항원의 종류만 다를 뿐 병의 증상과 경과를 비슷하여 현대의학의 ACD와 유사하다<sup>24-5</sup>.

본 연구에서 ACD 유발을 위하여 사용한 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)는 4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB)와 함께 동물 실험에서 ACD를 유발시키는데 사용되는 대표적인 유발물질로 과민한 세포성 면역반응을 일으켜 피부손상 즉 홍반, 해면화, 상피세포괴형성, 비만세포와 T림프구의 증가 등을 일으킨다<sup>26-7</sup>. DNCB로 유발시킨 ACD에 관하여 치료효과도 높고 부작용이 적은 單味<sup>5-8</sup> 및 처방<sup>9-12</sup>을 이용한 다양한 한의학 연구가 이루어지고 있는데 清熱解毒, 涼血祛風시키는 약제와 방제들이 항allergy와 免疫反應抑制에 유의한 효과가 있어 알레르기성 피부질환에 임상적 활

용가능성이 있음이 보고되었으나<sup>16-8</sup> 寬中, 下氣, 消食積작용이있는 RS의 ACD 치료효과에 관한 구체적인 연구는 접하지 못하였다.

소아에게 생기는 아토피와 알레르기성 피부질환은 주로 식품항원과 연관성이 높다고 계란, 우유, 땅콩, 밀, 대두 등이 주요 항원으로 알려져 있다<sup>19-20</sup>. 뿐만 아니라 모유수유를 통해 산모가 섭취한 식품항원이 아기에 전달되어 알레르기를 유발할 수 있다 하여 산모의 음식물 섭취의 제한도 필요하다 하였다<sup>28</sup>. 영아기 때는 우유와 이유식 같은 식품항원으로 인해 미숙한 소화관 점막을 통과한 이종단백에 노출되어 피부의 發疹, 濕疹과 泄瀉, 腹痛 등이 생긴다. 한의학적으로 알레르기 질환을 관리하는 방법은 脾, 肺, 腎을 補強하여 면역을 증강 시키고, 胃와 腸을 튼튼히 하여 후천면역을 증강하고 수액대사가 원만하여 痰이 생기지 않도록 하며, 行氣, 利水, 去濕, 補氣, 健脾 등의 방법으로 津液이 잘 운행되도록 하여 痰을 만들지 않도록 하는 것이다<sup>29</sup>. 이에 RS의 寬中, 下氣, 消食積하는 작용이 항allergy와 면역반응 억제에 유의한 작용을 할 것이라 사료되었다.

RS는 화본과에 속한 벼짚의 줄기와 잎으로 性은 平하고, 味는 甘하며 脾·肺經에 歸經하여 寬中, 下氣, 消食積하는 작용이 있어 食道癌, 反胃, 食滯, 泄瀉, 腹痛, 消渴證, 黃疸, 白濁, 痔疾, 火傷을 치료한다<sup>13</sup>.

RS에 대한 최초의 언급은 《滇南本草》에 고증되어 있는데 “小兒乳食結滯, 肚腹疼痛. 稻草節, 走周身經絡, 治痰火疼痛”이라 하여 RS가 소아 乳食積과 腹痛, 疼痛을 치료하는 증례를 제시하며 피부질환의 요소라 할 수 있는 痰, 火를 治療한다 하였고, 《衛生易簡方》에서는 태운 RS의 재를 화상으로 인하여 생긴 瘡에 발라 치료하는 내용을 언급하였다. 蘇醫《中草藥手冊》에서는 벼논에서 옴은 피부염의 치료에 RS를 달여서 明礬을 섞어 씻어냈다고 하였고, 《本草拾遺》에서는 “主黃病身作金色, 煮汁浸之.”라 하여 RS를 달인 즙에 담가 黃疸病으로 몸이 금빛이 되는 것을 치료 한다 하였다. 이러한 옛 문헌의 내용을 보면 RS가 피부질환에 유의하게 사용되어짐을 알 수 있다.

현재까지 RS는 주로 환경, 축산이나 열분해에 관한 주제로 다루지면서 식물의 성장을 촉진시키고 항균효과가 있으며<sup>14</sup> 적은 밀도에 비해 강한 휘발성을 가진 에너지원이라는 결과가 밝혀져 있지만<sup>15</sup> 아직 ACD 치료에 관한 연구는 없었다. 이에 RS를 사용하여 ACD의 치료효과를 살펴보고자 실험에 착수하게 되었다.

이를 위해 Balb/c mouse 29마리를 정상군 5마리를 제외하고 각각 8마리씩 대조군, RSS 군, RSS+Adm 군으로 나누어 DNCB를 도포하여 ACD를 유발 시켰다. 동물을 이용한 실험에서 일반적으로 체중의 급격한 증가나 감소는 부작용의 가능성으로 인식되는데<sup>30)</sup> 실험 시작 후 3주간 체중 변화를 관찰한 결과 정상군은 꾸준히 증가하는 경향을 보였고, RSS+Adm 군은 감소하다가 2주째부터 증가하는 경향이 보였으며, 대조군과 RSS 군은 증가하다가 2주째부터 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다 (Fig. 1). 이러한 결과는 실험 초반에 보인 일시적인 체중감소가 ACD의 발현시작과 어느정도 일치하며, 중반기에 보인 체중 증가는 ACD 회복 시작시점과 어느 정도 일치할 것이라 생각된다.

ACD가 발현하는 국소 부위의 일차적인 급성 반응으로 부종을 들 수 있는데 대조군에 비해 RSS 군 ( $p<0.01$ )과 RSS+Adm 군 ( $p<0.05$ )에서 통계적으로 유의하게 얇아진 것을 확인할 수 있었으므로 RS가 이러한 등 피부 두께 증가를 효율적으로 억제한 것이라 생각된다 (Fig. 2).

본 연구에서 DNCB를 도포하여 만든 ACD 모델의 피부에도 인간과 같은 피부질환인 紅斑, 落屑 등 중등도 이상의 증상이 관찰되었다. 제모만 시행한 정상군의 피부에서는 특별한 변화는 없었고, ACD 유발 후 아무런 처치를 하지 않은 control 군의 등 피부에서는 紅斑, 落屑 등 중등도 이상의 증상이 관찰되었다. RSS 군 및 RSS+Adm 군에서는 ACD 증상이 감소되는 경향을 보였으며, RSS 군보다 RSS+Adm 군에서 더 좋은 효과가 있었다 (Fig. 3). 이를 5점 척도를 활용하여 수치로 나타낸 결과, 대조군에 비해 RSS 군과 RSS+Adm 군에서 모두 유의한 수준 ( $p<0.01$ )으로 ACD의 증상 정도가 감소되었다 (Fig. 4). 이 결과는 RS가 ACD의 증상을 개선시켜 주는 효과가 있음을 보여준다.

비장은 조혈작용 및 식작용, 적혈구의 재생 및 저장과 각종 면역작용에 관여하는 장기이다<sup>31)</sup>. 이러한 비장은 비교적 다양한 원인에 의하여 종대가 일어나는데 대표적으로 종양, 빈혈, 문맥 고혈압증과 같은 경우가 있으며, 일반적으로 면역기능이 증가되는 경우 종대가 일어난다<sup>32)</sup>.

본 연구에서 DNCB를 반복적으로 처리하여 ACD를 일으킨 결과 대조군의 비장무게가 정상군에 비하여 약 33.3%이상 증가하였다 (Fig. 5). 이는 DNCB에 의하여 면역 반응이 활성화 된 결과로 해석되며, 대조군에 비

해 RSS 군과 RSS+Adm 군 ( $p<0.01$ ) 군에서 비장무게의 감소를 보인 것은 ACD 유발 과정에서 발생하는 면역 반응을 효율적으로 억제했기 때문으로 생각된다. ACD로 인해 증가된 비장의 무게가 RS로 인해 감소된 것으로 보아 RS가 면역억제작용에도 효과적으로 기인하고 있다는 것을 알 수 있다.

모든 실험을 마친 후 생쥐를 희생시킨 다음 비장을 적출하고, 비장 세포를 분리하여 비장세포 증식률을 측정하였다. LPS를 처리하지 않은 LPS (-)와 LPS를 처리한 LPS (+) 모두 대조군에 비해 RSS 군 및 RSS+Adm 군에서 통계적으로 유의하게 ( $p<0.01$ ) 비장세포의 증식률이 낮아진 것이 관찰되었다 (Fig. 6). RSS 및 RSS+Adm 군 모두 비장 세포 증식이 감소된 것으로 보아 RS에 비장세포 증식을 억제하는 효과가 있다고 생각된다.

본 연구에서 정상 생쥐로부터 비장 세포를 분리하여 배지에 배양한 후 RS 시료를 처리하고 농도에 따른 증식률을 관찰한 결과, 가장 저 농도인 0.0625 mg/ml에서 증식률이 감소하였다가 농도가 증가됨에 따라 증식률이 증가하는 경향을 보였으며, 1 mg/ml에서 제외하고는 모두 유의한 수준 ( $p<0.01$ )의 비장세포 증식률 감소가 관찰되었다 (Fig. 7). 최고 농도인 1 mg/ml는 생체 내에서 도달하기 매우 힘든 농도이기 때문에 최고 농도에서 오히려 비장세포 증식률의 감소는 큰 의미를 갖지 못할 것으로 판단된다. 저 농도에서 비장세포 증식률의 감소를 확인할 수 있는 것으로 미루어 볼 때 RS는 저 농도 수준에서 사용해야 한다고 생각되며 더 효과적이고 안전한 치료제가 되기 위해 향후 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이상의 결과 RS는 ACD에 유의하게 항염증 반응과 면역억제 반응을 보였고 ACD를 치료하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 본 실험 결과를 토대로 RS는 ACD 치료에 광범위하게 이용될 수 있을 것으로 사료되며, 또한 더 효과적이고 안전성이 확보된 치료제로 개발되기 위해 향후 기존의 연구보다 더 심도 깊은 연구가 이루어져야 한다고 생각한다.

## V. Conclusion

RS가 DNCB로 유발된 ACD에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. RSS+Adm 군에서 실험 초반에 ACD로 인한 체중감소를 보였지만, 회복기에 접어들면서 체중이 유의성 있게 증가하였다.
2. 대조군에 비해 RSS 및 RSS+Adm 군의 등 피부 두께 증가를 유의성 있는 수준으로 억제하였다.
3. RSS 군 및 RSS+Adm 군에서 알레르기성 접촉피부염 증상인 홍반, 낙설 등이 호전되었고, RSS 군과 RSS+Adm 군에서 모두 유의성 있는 수준으로 알레르기성 접촉피부염의 증상 정도가 감소됨이 관찰되었으며, RSS+Adm 군에서 더 좋은 효과가 나타났다.
4. ACD로 인해 면역 반응이 활성화되어 증대된 비장의 무게가 RSS 군과 RSS+Adm 군에서 유의성 있게 감소되었다.
5. LPS (-)와 LPS (+)의 결과 모두 대조군에 비해 RSS 군 및 RSS+Adm 군에서 비장세포의 증식률이 유의성 있게 감소하였다.
6. 가장 낮은 농도로 RS 처리를 한 시험관 내에서 비장 세포 증식률이 유의성 있게 감소되었으나, 향후 추가적으로 RS 농도에 대한 심도 있는 연구가 필요하다.

## References

1. Lee KY, Kim GU. treatment of allergies. Seoul: Korean M.B. 2001;3-7, 529-43.
2. Publication committee of Korea Dermatology Society. Dermatology. Seoul: Youmoongak. 2001;166-73.
3. An SG, Lee SH, Park YK. Common Dermatitis. Seoul: Goryeo medicine. 2009;13-4.
4. Kataranovski M, Vlaski M, Kataranovski D, Tomic N. Immunotoxicity of epicutaneously applied anticoagulant rodenticide wafarin: evaluation by contact hypersensitivity to DNCB in rats. Toxicology. 2003;188:83-100.
5. Son MY, Nam SH. Effects of Eucommia ulmoides OLIV. extract on Allergic Contact Dermatitis (ACD) and oxidative damage induced by DNCB. Korea Department of Food and Nutrition journal. 2007;36(12):1517-22.
6. Lee JL and the 4 others. Effects of Lonicera flower tonic on Allergic Contact Dermatitis (ACD) induced by DNCB. Korea medical herbs Society. 2006;21(1):9-15.
7. Sin GH and the others. Effects of Rehmannia glutinosa extract on Allergic Contact Dermatitis (ACD) induced by DNCB in mice. Korea medicine Society journal. 2008;8(1):257-79.
8. Kim CJ and the others. Treatment effect of Sophora Flavescens Ait., Coptis japonica on Allergic Contact Dermatitis (ACD). Korea ENT Society journal. 2005;18(1):199-220.
9. Kim JS. Effect of 'Naetaekchungumsan' on Allergic Contact Dermatitis (ACD) induced by DNCB. Korea ENT Society journal. 2009;22(1):46-61.
10. Kim NH and the others. Effect of 'Woobanghaegi-tang' on Allergic Contact Dermatitis (ACD). Korea ENT Society journal. 2006;19(2):59-70.
11. Kim CH and the others. Effect of 'Lyanghyulsamool-tang' on Allergic Contact Dermatitis (ACD). Korea ENT Society journal. 2005;18(1):13-26.
12. Nam BS and the others. Effect of 'Sanpoonggosam-hwan' on Allergic Contact Dermatitis (ACD). Korea ENT Society journal. 2005;18(2):10-27.
13. Kim CM, Sin MG. Chinese herbal unabridged Dictionary. Jungdam:1043-44.
14. Gang HY and the 4 others. Influence and antibacterial effect of Rice Straw extract to plant growth. Korea Environment health Society journal. 2009;35(3):178-86.
15. Im DG. Investigation on pyrolysis dynamic characteristics of Rice Straw. Master of Science's thesis. 2006.
16. An JY and the 13 others. Effect of 'Gamigoonggui-tang' on Allergic Contact Dermatitis (ACD). Oriental Physiopathology journal. 2010;24(2):290-5.
17. Sin GS. Effect of Rehmannia glutinosa extract on Allergic Contact Dermatitis (ACD) induced by DNCB. Donggook University Graduate school. 2000.
18. Kim SH. Effect of 'Gyejjakyakjimo-tang' on Allergic Contact Dermatitis (ACD). Semyung University Graduate school. 2010.
19. Son JM, Kim HT, Hong SW. Question investigation study about Atopy Dermatitis of elementary school students at Jechun City. Korea ENT journal. 2009;22(2):163-75.
20. Kim YH. Study about dietetic treatment of Children's Atopy Dermatitis. Daejun University Korea medicine lab thesis. 2005;14(1).
21. Shintani Futoshi, Step To Internal Medicine - Immunity, Allergic diseases. Jungdam. 2005:44-7.

22. Korea Dermatology Society. Dermatology. Seoul: Yeomoongak. 2008;72-4, 78-80, 179-85, 234-5.
23. Jung JY, Han kyung hwan. Common dermatitis in Korea. Seoul:MD world. 2009;37-48.
24. O G and the others. Integrated Traditional and Western Dermatology Manual. Sichuan Science and Technology Publishing. 2007:254-5.
25. Man LS and the others. Integrated Traditional and Western Dermatology Clinic Techniques. Guangdong Science and Technology Publishing. 2005:139-44.
26. 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.
27. Okamura T, Morimoto N, Yamance G, Takahashi S. Langerhans-cells in the murine oral mucosa in the inductive phase of delayed type hypersensitivity with 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene. Clin Exp Immunol. 2003;134:188-94.
28. Han YS, Jung SJ, An GM, Lee GS, Choi HM, Lee SI. Sensitization on food allergen from Atopy Dermatitis by mother's milk. Korea Society Community of Nutrition journal. 2005;10(3):264-70.
29. Kim KB and the 14 others. Korea child and adolescent medicine. Eusungdang. Seoul:2010:721-69.
30. De blaauw I, Schols AM, Kkoerts-deLang E, Wouters EF, Deutz NE. De novo glutamine synthesis induced by corticosteroids in vivo in rats is secondary to weight loss. Clin Nutr. 2004;23(5):1035-42.
31. Burk RL, Ackerman N. Small animal radiology and ultrasonography. ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1996;410-4.
32. Jung IJ and the 6others. Radiological assessment of the splenomegaly that induced experimentally to dog. Korea Clinical Veterinary journal. 2006;23(3):263-6.