

Original Article / 원저

## 馬齒莧이 DNCB로 유발된 생쥐의 알레르기성 접촉피부염에 미치는 영향

이종철 · 박수연 · 최정화 · 김종한  
동신대학교 한의과대학 한방안이비인후과학교실

### Effects of *Portulacae Herba* (PH) on Allergic Contact Dermatitis (ACD) Induced by DNCB in Mice

Jong-Cheol Lee · Soo-Yeon Park · Jung-Hwa Choi · Jong-Han Kim  
Dept. of Oriental Medicine Graduate School of Dongshin University

#### Abstract

**Objective** : *Portulacae Herba* (PH) can clear away heat, detoxicate, cool down blood heat. The present study was designed to investigate the effects of PH on ACD induced by 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) in mice.

**Method** : In this experiment, the effects of PH on changes in body weights, thicknesses and weights of ear, thicknesses of dorsum skin, degree of symptoms on the dorsum skin, histopathological changes of ear and dorsum skin, spleen weights, TNF- $\alpha$  and IL-10 in serum were observed. And the effects on the proliferation rates of splenocytes were also investigated *in vitro* and *in vivo*.

- Results** :
1. PH spread (PHS) group and PH spread plus administered (PHS+Adm) group didn't show any changes in weight and thickness of ear.
  2. But in PHS and PHS+Adm group, thickness of dorsum skin decreased significantly.
  3. And PHS and PHS+Adm group showed meaningful effectiveness on ACD symptoms like erythema, desquamation and keratinization.
  4. In histopathological observation, hyperplasia and edema of spongy tissues were remarkably diminished in PHS and PHS+Adm group.
  5. And PH reduced the proliferation rates of splenocytes *in vivo* and *in vitro* study.

© 2014 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Conclusions** : PH effectively decreased symptoms of ACD in this study, therefore PH can be one of medicinal ingredients to treat ACD.

**Key word** : *Portulacae Herba* (PH); Allergic Contact Dermatitis (ACD); 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCEB); TNF- $\alpha$ ; IL-10

## 1. 서 론

알레르기성 접촉 피부염 (Allergic Contact Dermatitis)은 알레르겐에 의한 지연성 과민반응 (제4형 세포면역)으로 정상인에게는 피부병이 발생하지 않으나 원인 물질에 감작 (sensitization)된 사람에게만 증상이 유발되는 독특한 특이성을 나타낸다<sup>1)</sup>.

알레르기성 접촉 피부염의 피부 증상은 대부분 소양, 홍반, 구진, 소수포의 형태로 나타나며, 치료로는 스테로이드제, 항히스타민제가 주로 사용되며 기타 회피요법, 광선치료, 면역조절제, 장벽크림, 탈감작요법 등이 활용되고 있다<sup>2)</sup>.

한의학적으로 알레르기성 접촉 피부염은 피부가 취약한 상태에서 風, 濕, 熱, 蟲 등과 같은 外邪가 침입하여 발생하는 것으로, 漆瘡, 馬桶癬, 膏藥風, 狐尿刺 등의 범주에 속한다<sup>3)</sup>. 알레르기성 접촉 피부염의 한의학적 치료는 消風清熱, 涼血解毒의 치법이 기본이 되며, 급성기에는 清熱解毒, 祛風燥濕하고, 만성기에는 活血養血하는 것을 원칙으로 한다<sup>3,4)</sup>.

馬齒莧 (*Portulacae Herba*)은 쇠비름과에 속한 일년생 본초인 쇠비름 *Portulaca oleracea L.*의 지상부로 清熱藥類에 속하며, 清熱解毒, 涼血止痛하는 효능이 있어 다양한 염증성 피부질환에 활용될 수 있으며<sup>5-7)</sup>, 주요 성분으로 대량의 noradrenaline과 다량의 칼륨염을 함유하고, 그 외 vitamin B<sub>1</sub> 및 C, saponin, tannin, CH<sub>3</sub>COOK, flavonoid 등이 보고되어 있다<sup>8-10)</sup>.

최근 馬齒莧에 대한 선행 연구로 항산화 및 항염증

효과<sup>11,12)</sup>, 항소양 효과<sup>13)</sup>, 지방분해효과<sup>14)</sup>, 자궁경부암에 대한 치료 효과<sup>15)</sup>, 위염에 대한 항산화 작용<sup>16)</sup> 등, 주로 항산화 및 항염증 작용에 근거한 연구가 보고되어 왔으나, 馬齒莧이 알레르기성 접촉 피부염에 미치는 영향에 대한 직접적인 연구는 보고되지 않았다.

이에 저자는 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCEB)로 알레르기성 접촉 피부염이 유발된 생쥐의 체중, 귀의 두께와 무게, 등 피부의 두께와 피부염 증상 발현 정도, 귀와 등 조직의 조직병리학적 소견, 비장의 무게와 비장세포 증식을, 혈청내 TNF- $\alpha$ 와 IL-10의 수치 변화를 관찰함으로써 馬齒莧이 알레르기성 접촉 피부염에 미치는 영향을 연구하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시료

본 실험에 사용된 馬齒莧 (*Portulacae Herba*, PH)은 쇠비름과 (馬齒莧科 : *Portulacaceae*)에 속한 一年生 草本인 쇠비름 (*Portulaca oleracea L.*)의 地上部로 동신대학교 순천한방병원에서 구입하여 정선 후 사용하였다.

#### 2) 실험 동물

동신대학교 실험동물윤리위원회의 승인을 거친 후 6주령의 수컷 Balb/c 마우스를 동물실험 전문 업체 (Samtako, Korea)에서 구매하였다. 식품의약품안전청에서 고시한 동물실험시설 규정에 적합한 사육시설에서 1주일 간 적응시켰다. 적응시간 중에는 고휘사료

교신저자 : 박수연, 전남 순천시 조례동  
동신대학교 부속 순천한방병원 한방안이비인후피부과  
(Tel : 061-729-7122, E-mail : swallow92@hanmail.net)  
• 접수 2014/7/15 • 수정 2014/8/8 • 채택 2014/8/15



도포군 (PH spread group, PHS)은 ACD를 유발하고, 증류수 경구투여 및 PH 용액을 도포한 군으로 설정하였으며, PH 도포 및 경구투여군 (PH spread and administer group, PHS+Adm)은 ACD를 유발하고 PH의 경구투여와 도포를 동시에 시행한 군으로 설정하였다. 각각의 개체 수는 군별로 모두 10마리였다.

### 5) 체중, 귀 및 비장 무게의 측정

사육장에서의 적응 기간을 끝낸 후 실험을 시작하기 전에 측정된 체중을 기준으로 ACD를 유발한 시점의 체중과 희생시키기 전 체중 변화를 측정하여 이를 관찰하였다. 체중의 측정은 측정일 오후 2시에 전자저울 (HANA, KC-200, Korea)을 이용하여 실시하였고 귀와 비장의 무게는 실험 마지막날 생쥐를 희생시킨 후, 귀와 비장을 적출한 다음 미량 저울 (OHAUS, USA)을 이용하여 측정하였다. 귀의 경우, 정확한 측정을 위하여 귀를 절제한 다음 수동형 편치기를 이용하여 직경 5 mm의 둥근 절편을 만들어 무게를 비교하였다.

### 6) 귀 및 등 피부 두께의 측정

ACD가 유발된 생쥐에서 시료의 도포 및 투약으로 변화된 귀 두께와 등 피부 두께를 측정하기 위하여 실험 마지막 날 생쥐를 희생시킨 후 등과 귀의 피부를 절제한 후 디지털 캘리퍼 (Mitutoyo, Japan)를 이용하여 각각의 두께를 측정하였다.

### 7) 피부 표면의 육안적 관찰 및 Symptom score 판정

약물투여에 따른 ACD의 유발 정도를 관찰하기 위하여 실험 마지막날 생쥐를 희생시킨 다음, ACD가 유발된 등 부위를 Digital camera (Samsung, Korea)로 촬영한 후, 생쥐의 등에 발생한 피부질환의 병변 정도를 육안으로 관찰하여 수치화하였으며 피부 부종과 종창의 정도를 다음의 기준에 따라 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

### 8) 조직학적 관찰 (Histological assessment)

#### (1) H & E 염색 (Hematoxylin & Eosin stain)

실험을 최종적으로 마친 후 생쥐로부터 얻어진 등 부위 피부 조직을 10% 포르말린에 고정한 후, 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 미세절단기 (Sakura, Japan)를 이용하여 4 μm 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시킨 뒤 탈수와 투명 (cleansing) 과정을 거쳐 흐르는 물에 침전시켰다. 탈파라핀 과정을 거친 조직 절편은 Hematoxylin (HHS32, SIGMA)과 Eosin (HT110232, SIGMA)으로 염색한 후, 과염색된 부분은 흐르는 수돗물에 5분 정도 수세하고, 다시 탈수 및 투명과정을 거쳐 봉입 (mounting)하여 광학현미경 (× 100)으로 관찰하였다.

#### (2) Toluidine blue 염색 (Toluidine blue stain)

실험을 마친 생쥐로부터 얻어진 등 피부 조직을 10% 포르말린에 고정한 후, 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 미세절단기 (Sakura, Japan)를 이용하여 4μm 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시킨 뒤 탈수와 투명 (cleansing) 과정을 거쳐 흐르는 물에 침전시켰다. 탈파라핀 과정을 거친 조직 절편은 통상적인 toluidine blue 염색을 실시한 후, 과염색된 부분은 흐르는 수돗물에 5분 정도 수세하고, 다시 탈수 및 투명과정을 거쳐 봉입 (mounting)하여 광학현미경(× 100)으로 관찰하였다.

### 9) 비장세포 증식률에 미치는 영향

#### (1) *in vitro* 실험

정상 생쥐의 비장 세포 부유액을 RPMI 1640

배지로 희석하고 96 well plate에  $1.0 \times 10^6$  cells/ml 농도로 접종한 후 비장 세포에 Lipopolysaccharide (LPS) 5  $\mu\text{g/ml}$ 와 PH를 농도별 (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0  $\text{mg/ml}$ )로 주입하였다. 이후 Ez-cytox 15  $\mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 2시간 정도 배양한 후 각 well의 흡광도를 Microplate Reader로 450 nm에서 측정하였다.

(2) *in vivo* 실험

실험이 종료된 다음 normal, control, PHS, PHS+Adm 각 군의 생쥐를 희생하여 비장을 적출한 뒤 비장 세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에  $1.0 \times 10^6$  cells/ml 농도로 접종한 후, Ez-cytox 15  $\mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 2시간 정도 배양한 후 각 well의 흡광도를 Microplate Reader로 450nm에서 측정하였다.

10) Cytokine 측정

(1) 채혈 및 혈청분리

모든 처치를 마친 생쥐를 동물 마취제인 Zoletile (Virbac, France) 희석액을 생쥐 20 g 기준으로 100  $\mu\text{l}$  복강주사로 마취시킨 후 심장을 통해 채혈하였다. 채혈한 혈액을 plastic tube에 담아 실온에 30분 정도 방치하였다가 3,000 rpm으로 30분간 원심분리시켜 상층의 혈청만을 분리하였다.

(2) Tumor necrosis factor- alpha (TNF- $\alpha$ ) 양 측정

혈청 내에서 생성되는 TNF- $\alpha$  양을 mTNF- $\alpha$  ELISA kit (Invitrogen, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다. 이 때 Kit 각각의 96 well plate에 혈청 및 standards를 100  $\mu\text{l}$ 를 넣었으며, 실온에서 2시간 동안 incubation한 다음 washing buffer로 4회 세척하였다.

Biotin conjugate 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하고 1시간 실온에서 incubation한 다음 washing buffer로 4

회 세척하고, 준비해 놓은 streptavidin-HRP를 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 다음 실온에서 30분 동안 incubation한 후 washing buffer로 4회 세척하였다. 그 다음 stabilized chromogen을 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 빛이 차폐된 실온에서 30분 동안 incubation한 후 stop solution을 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 주입한 다음 Microplate Reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다.

(3) Interleukin (IL-10) 양 측정

혈청내 IL-10 양을 측정하기 위해서 혈청 50  $\mu\text{l}$ 를 standard diluent buffer 50  $\mu\text{l}$ 와 혼합한 solution 100  $\mu\text{l}$ 를 96 well plate에 분주한 다음 Biotin conjugate 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가하고 2시간 실온에서 incubation한 다음 다시 washing buffer로 4회 세척하였다. 희석하여 준비해 놓은 streptavidin-HRP를 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 다음 다시 실온에서 30분 동안 incubation한 후 washing buffer로 4회 세척하고, stabilized chromogen을 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 빛이 차폐된 실온에서 30분 동안 incubation한 후 stop solution을 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 다음 Microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다.

3. 통계 처리

수집된 데이터 중 group이 3개 이상인 것은 one-way ANOVA 기법을 활용하였고 통계적으로 유의한 경우 사후검정은 Tukey 방법을 시행하였다. 2개의 군간의 평균비교는 independent sample t-test를 사용하였으며, p-value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 인정하였다. 사용한 통계프로그램 IBM SPSS Statistics 21을 사용하였다.

### III. 성 적

#### 1. 체중 변화에 미치는 영향

3주간 체중 변화를 관찰한 결과 normal군을 제외한 나머지 군들에서 체중이 감소하는 경향이 보였지만 control군, PHS군, PHS+Adm군 사이에 유의한 차이는 없었다 (Table. 1, Fig. 1).

Table 1. The Changes of Body Weight in ACD Mice

	0 Week	1 Week	3 Week
Normal	23.14 ± 0.39	23.28 ± 0.62	23.18 ± 0.83
Control	23.06 ± 0.50	22.67 ± 0.61	19.62 ± 0.74
PHS	23.28 ± 1.01	23.12 ± 0.40	20.38 ± 0.86
PHS+Adm	22.98 ± 0.85	22.59 ± 0.96	19.56 ± 1.09

Normal : naive group, Control : only ACD group, PHS : PH spread group, PHS+Adm : PH spread and administered group. Values are represented as mean±SD. All groups data were expressed as mean±SD of 10 experiments.

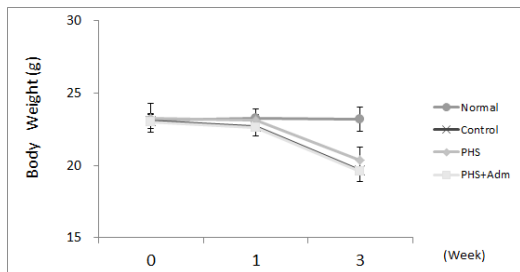


Fig. 1. The changes of body weight in ACD mice

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

#### 2. 귀 무게에 미치는 영향

실험 매뉴얼대로 도포 및 투여를 마친 후 일정한 크기로 귀를 도려낸 다음 무게를 측정하여 각 군을 비교한 결과 control군에 비해서 PHS+Adm군이 다소 감소하는 경향이 보였으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다 (Table. 2, Fig. 2).

Table 2. The Changes of Ear Weight in ACD Mice

	Ear weight (mg)
Normal	22.57 ± 6.53
Control	35.26 ± 2.44
PHS	35.24 ± 1.20
PHS + Adm	32.16 ± 2.17

Normal : naive group, Control : only ACD group, PHS : PH spread group, PHS+Adm : PH spread and administered group. Values are represented as mean±SD. All group data were expressed as mean±SD of 10 experiments.

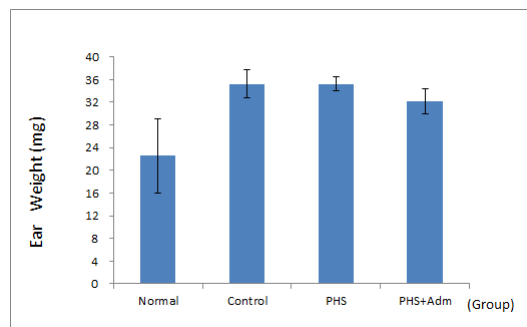


Fig. 2. The changes of ear weight in ACD mice

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

#### 3. 귀 두께에 미치는 영향

군 간을 비교한 결과 control군에 비해서 PHS군과 PHS+Adm군 모두에서 유의한 차이를 보이지는 않았다 (Table. 3, Fig. 3).

Table 3. The Changes of Ear Thickness in ACD Mice

	Ear thickness (mm)
Normal	0.02 ± 0.01
Control	0.09 ± 0.01
PHS	0.09 ± 0.01
PHS + Adm	0.09 ± 0.02

Normal : naive group, Control : only ACD group, PHS : PH spread group, PHS+Adm : PH spread and administered group. Values are represented as mean±SD. All group data were expressed as mean±SD of 10 experiments.

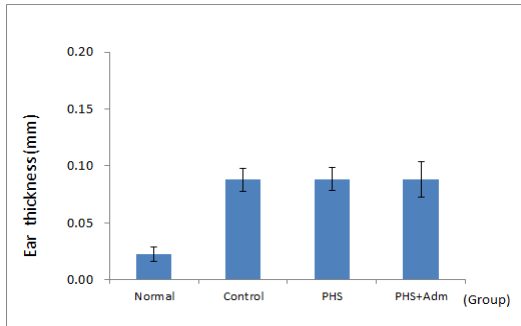


Fig. 3. The changes of ear thickness in ACD mice

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

Table 4. The Changes of Thickness of Dorsum Skin in ACD Mice

	Back thickness (mm)
Normal	0.43 ± 0.05
Control	0.72 ± 0.07
PHS	0.63 ± 0.04 *
PHS + Adm	0.50 ± 0.06 **

Normal : naive group, Control : only ACD group, PHS : PH spread group, PHS+Adm : PH spread and administered group. Values are represented as mean±SD. All group data were expressed as mean±SD of 10 experiments.

\* : Statistically significance compared with control group (\* ; P<0.05 by Tukey HSD).

\*\* : Statistically significance compared with control group (\*\* ; P<0.01 by Tukey HSD).

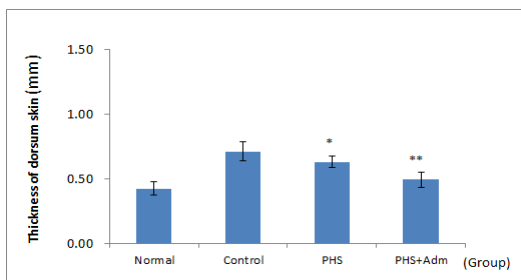


Fig. 4. The changes of thickness of dorsum skin in ACD mice

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

\* : Statistically significance compared with control group (\* ; P<0.05 by Tukey HSD).

\*\* : Statistically significance compared with control group (\*\* ; P<0.01 by Tukey HSD).

#### 4. 등 피부 두께에 미치는 영향

Control군에 비해 PHS군 ( $P < 0.05$ )과 PHS + Adm 군 모두에서 통계적으로 유의하게 ( $P < 0.01$ ) 얇아진 것을 확인할 수 있었다 (Table. 4, Fig. 4).

#### 5. 등 피부 증상에 미치는 영향

5점 척도로 등 피부의 증상의 정도를 수치화하여 육안적으로 관찰한 normal 군의 등 피부에서는 특별한 변화를 관찰할 수 없었고, control군의 등 피부에서는 피부 홍반, 낙설 등의 증상이 관찰되었다. PHS 군 PHS+Adm 군에서는 이러한 ACD 증상이 유의성 있게 감소되었다 (Table. 5, Fig. 5-6).

Table 5. Effects of PH on Symptom Score in ACD Mice

	Symptom score
Normal	0.00 ± 0.00
Control	4.38 ± 0.52
PHS	2.38 ± 0.52 **
PHS + Adm	2.25 ± 0.46 **

Normal : naive group, Control : only ACD group, PHS : PH spread group, PHS+Adm : PH spread and administered group. Values are represented as mean±SD. All group data were expressed as mean±SD of experiments. Control, PHS and PHS + Adm groups data were expressed as mean±SD of 10 experiments.

\*\* : Statistically significance compared with control group (\*\* ; P<0.01 by Tukey HSD).

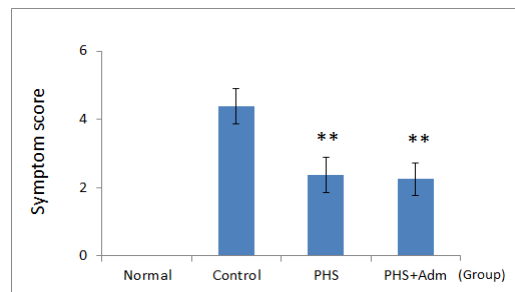


Fig. 5. Effects of PH on symptom score in ACD mice

Symptom scores were estimated in each animal respectively. Normal : naive group, Control : only ACD group, PHS : PH spread group, PHS+Adm : PH spread and administered group. Values are represented as mean±SD (n=10).

\*\* : Statistically significance compared with control group (\*\* ; P<0.01 by Tukey HSD).

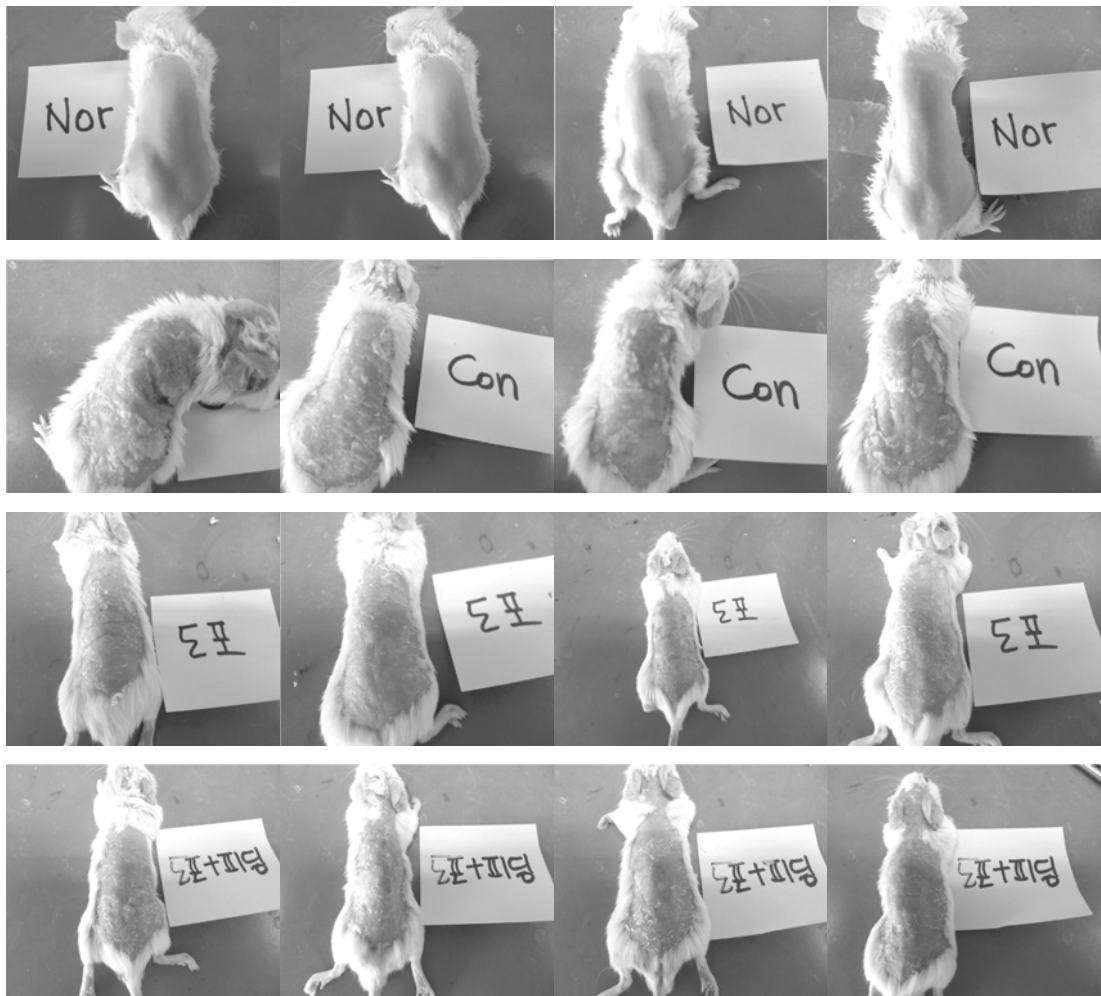


Fig. 6. Effects of PH on clinical aspect in ACD mice

Clinical aspect of dorsum skin in ACD mice were observed using digital camera at the end of the day. Top : normal group, Second : control group, Third : PHS group, Bottom : PHS + Adm group.

## 6. H & E 염색 소견

Normal군의 피부조직은 특별한 이상 소견이 발견되지 않은 반면, control군에서는 epidermis와 dermis의 배열이 불규칙적이며 부종으로 인해 피부의 두께가 확장되었고 백혈구의 침윤이 관찰되었다. 이에 비해 PHS군과 PHS+Adm군에서는 control군에 비하여 epidermis와 dermis의 두께가 감소하는 양상을 보였으며, 면역세포들의 침윤 또한 control군에 비

해 감소하였다. 이 중 PHS+Adm군에서는 소량의 염증세포가 일부 구간 관찰되었으나 PHS군에 비하여 더 나은 예후가 관찰되었다 (Fig. 7).

## 7. Toluidine blue 염색 소견

Normal군의 피부조직은 특별한 이상 소견이 발견되지 않은 반면, control군에서는 mast cell의 분포와 탈과립 정도가 심한 것으로 관찰되었다. 이에 비해



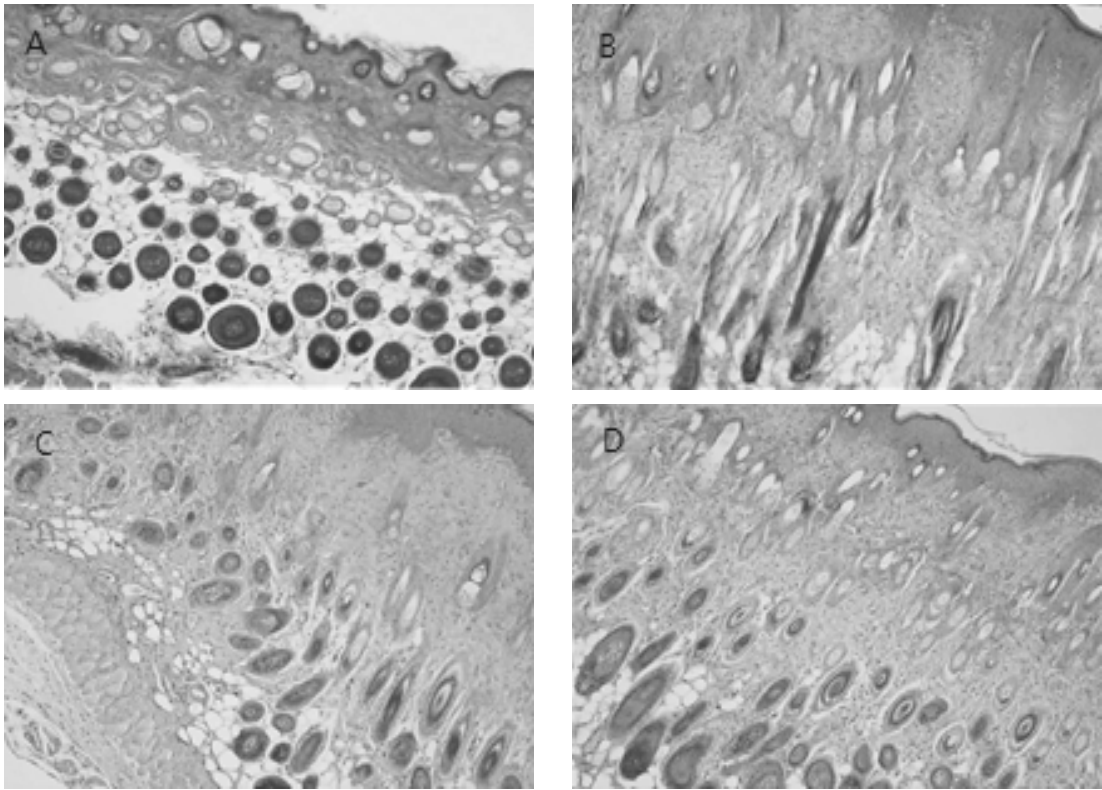


Fig. 7. Histologic examination of skin lesion in PH-induced dermatitis model of mice. Skin biopsy was stained with hematoxylin and eosin (H&E). (A : normal group, B : control group, C : PHS group, D : PHS + Adm group  $\times 100$ ).

PHS군과 PHS+Adm군에서는 control군에 비하여 mast cell의 분포와 탈과립 정도가 경미함을 확인할 수 있었다 (Fig. 8).

### 8. 비장무게에 미치는 영향

모든 실험을 마친 후 비장을 적출하여 무게를 측정하여 각 군간을 비교한 결과 control군, PHS군, PHS+Adm군 사이에서 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table. 6, Fig. 9).

### 9. 생체 내 (*In vivo*) 비장세포 증식률에 미치는 영향

실험 매뉴얼 대로 도포 및 투여를 마친 후 생쥐에서 비장을 적출한 후 비장 세포를 분리하여 비장세포

증식률을 측정하였다. 측정값은 normal 군을 100(%)로 환산하여 표시하였다. 그 결과 control군에 비해 PHS, PHS+Adm군에서 유의한 변화는 관찰되지 않았다 (Table. 7, Fig. 10).

Table 6. The Changes of Spleen Weight in ACD Mice

	Spleen weight (g)
Normal	0.02 $\pm$ 0.01
Control	0.14 $\pm$ 0.02
PHS	0.14 $\pm$ 0.02
PHS + Adm	0.14 $\pm$ 0.03

Normal : naive group, Control : only ACD group, PHS : PH spread group, PHS+Adm : PH spread and administered group. Values are represented as mean $\pm$ SD. All group data were expressed as mean $\pm$ SD of 10 experiments.

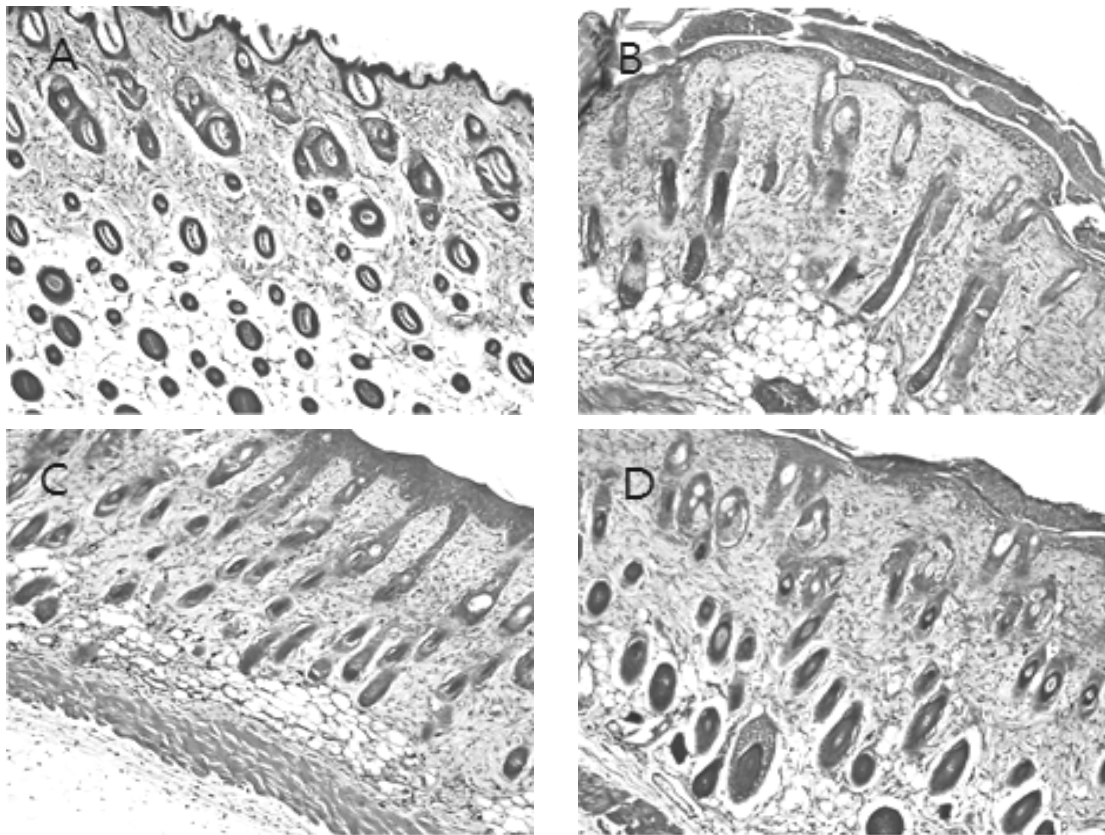


Fig. 8. Histologic examination of skin lesion in PH-induced dermatitis model of mice. Skin biopsy was stained with toluidine blue. (A : normal group, B : control group, C : PHS group, D : PHS + Adm group × 100).

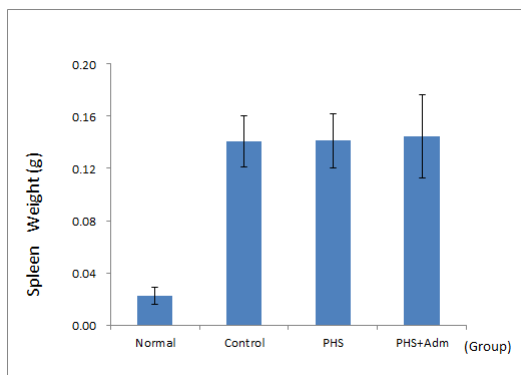


Fig. 9. The changes of spleen weight in ACD mice

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

Table 7. Effects of PH on Proliferation Rates of Splenocyte in vivo

	Proliferation rates (%)
Normal	100.00 ± 4.16
Control	180.04 ± 19.02
PHS	180.73 ± 7.60
PHS + Adm	174.33 ± 27.32

Normal : naive group, Control : only ACD group, PHS : PH spread group, PHS+Adm : PH spread and administered group. Values are represented as mean±SD (n=10).

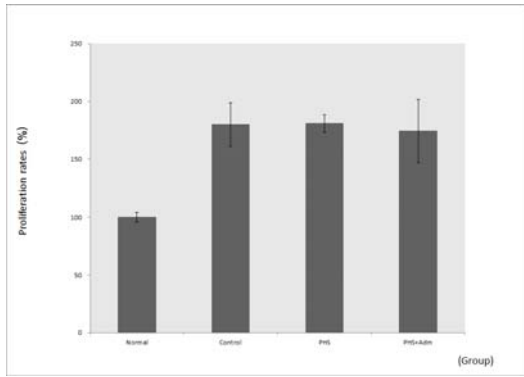


Fig. 10. Effects of PH on proliferation rates of splenocyte in vivo

Proliferation rates of splenocyte were measured using Ez-cytox kit described in materials and methods. Values are represented as mean±SD (n=10).

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

생쥐로부터 비장 세포를 분리하여 PH를 처리하고 투여 농도에 따른 비장세포 증식률을 관찰한 결과, 농도가 증가됨에 따라 증식률이 감소하는 경향을 보였으며, 모든 투여 농도에서 유의한 수준(P<0.01)의 비장세포 증식률 감소가 보였다 (Table. 8, Fig. 11).

Table 8. Effects of PH on Proliferation Rates of Splenocyte in vitro

	Proliferation rates (%)
0 mg/ml	100.00 ± 9.25
0.0625 mg/ml	77.00 ± 14.77 **
0.125 mg/ml	62.92 ± 7.69 **
0.25 mg/ml	57.92 ± 8.00 **
0.5 mg/ml	60.29 ± 10.28 **
1 mg/ml	56.48 ± 2.84 **

Values are represented as mean±SD (n=10).

\*\* : Statistically significance compared with 0mg/ml group (\*\* ; P<0.01 by Tukey HSD).

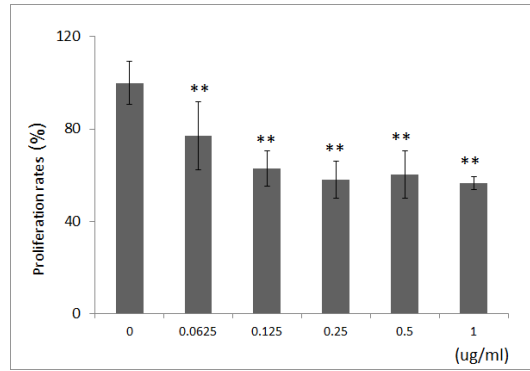


Fig. 11. Effects of PH on proliferation rates of splenocyte in vitro

Proliferation rates of splenocyte were measured using Ez-cytox kit described in materials and methods. Values are represented as mean±SD (n=10).

\*\* : Statistically significance compared with 0mg/ml group(\*\* ; P<0.01 by Tukey HSD).

### 11. 혈중 TNF-α 에 미치는 영향

혈청 내 TNF-α의 농도를 측정된 결과, control군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 나타나지는 않았다 (Table. 9, Fig. 12).

### 12. 혈중 IL-10에 미치는 영향

혈청 내 IL-10의 농도를 측정된 결과, control군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 나타나지는 않았다 (Table. 10, Fig. 13).

Table 9. Effects of PH on Serum Levels of TNF-α in ACD Mice

	TNF-α (pg/ml)
Normal	0.0554 ± 0.0038
Control	0.0596 ± 0.0043
PHS	0.0555 ± 0.0052
PHS + Adm	0.0625 ± 0.0085

Normal : naive group, Control : only ACD group, PHS : PH spread group, PHS+Adm : PH spread and administered group. Values are represented as mean±SD. All data were expressed as mean±SD of 10 experiments.

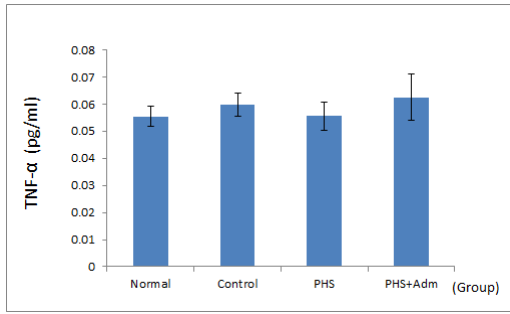


Fig. 12. Effects of PH on serum levels of TNF- $\alpha$  in ACD mice

Levels of TNF-a in serum were measured using ELISA methods. Normal : naive group, Control : only ACD group, PHS : PH spread group, PHS+Adm : PH spread and administered group. Values are represented as mean $\pm$ SD.

Table 10. Effects of PH on Serum Levels of IL-10 in ACD Mice

	IL-10 (pg/ml)
Normal	0.0405 $\pm$ 0.0026
Control	0.0416 $\pm$ 0.0028
PHS	0.0428 $\pm$ 0.0033
PHS + Adm	0.0409 $\pm$ 0.0024

Normal : naive group, Control : only ACD group, PHS : PH spread group, PHS+Adm : PH spread and administered group. Values are represented as mean $\pm$ SD. All data were expressed as mean $\pm$ SD of 10 experiments.

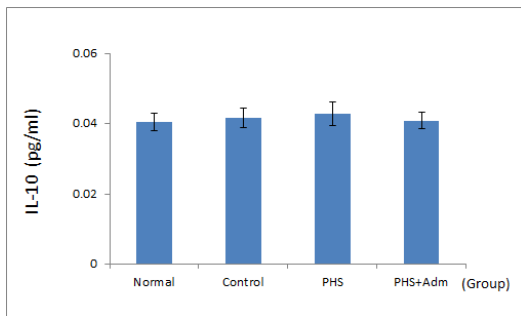


Fig. 13. Effects of LC on serum levels of IL-10 in ACD mice

Levels of IL-10 in serum were measured using ELISA methods. Normal : naive group, Control : only ACD group, PHS : PH spread group, PHS+Adm : PH spread and administered group. Values are represented as mean $\pm$ SD.

#### IV. 고 찰

알레르기성 접촉 피부염 (Allergic Contact Dermatitis, ACD)은 알레르겐 또는 항원에 의한 지연성 과민반응 (제4형 세포면역)으로 병변이 발현되는데 정상인에게는 피부병이 발생하지 않으나 원인 물질에 감작 (sensitization)된 사람에게만 증상이 유발되는 독특한 특이성을 나타낸다<sup>1)</sup>.

알레르기성 접촉 피부염을 일으키는 물질은 단순 화학 물질에 해당하는 합텐 (hapten)이며, 합텐은 침투 후에 표피에서 매개 단백질 (carrier protein)과 결합한 후에 완전한 항원으로 작용하며 랑게르한스 세포와 접촉 후 T세포에 항원이 전달된다. 이후에 항원에 접촉된 T세포는 주위의 림프절에서 핵분열하며, 이중에 일부의 세포가 기억세포 (memory cell)로 남아 있다. 이러한 감작의 과정을 거친 후 재차 항원이 피부에 침투하게 되면 기억세포가 이를 감지하고 다양한 화학매개체를 분비하여 염증을 일으킨다<sup>1,2)</sup>.

한의학적으로 ACD는 皮毛腠理가 緻密하지 못하거나 玄府가 不固한 상태에서 風, 濕, 熱, 蟲 등과 같은 외적인 邪毒이 침입하여 발생하는 것으로, 漆瘡, 馬桶癬, 膏藥風, 狐尿刺 등의 범주에 속한다<sup>3)</sup>. 따라서 ACD의 치료는 消風清熱, 涼血解毒을 원칙으로 내치법과 외치법을 응용함이 마땅하며, 급성기에는 清熱解毒, 祛風燥濕의 내치법과 洗劑, 散劑, 煎湯液의 외용제를 주로 사용하고, 만성기에는 活血養血의 내치법과 膏劑 위주의 외치법을 다용하였다<sup>3,4)</sup>.

산업의 발달과 더불어 항원으로 작용할 수 있는 물질들이 증가함에 따라 ACD의 발병빈도가 증가하고 있는 추세로 ACD의 치료에 대한 임상적 연구의 필요성이 더욱 강조되고 있는 실정이며<sup>18)</sup>, 최근의 연구에서 주로 黃芩<sup>19)</sup>, 生地黃<sup>20)</sup>, 金銀花<sup>21)</sup>, 玄參<sup>22)</sup>, 忍冬藤<sup>23)</sup>, 紫草<sup>24)</sup>, 黃連解毒湯<sup>25)</sup>, 疏風散<sup>26)</sup>, 散風苦蔘丸<sup>27)</sup>, 祛風燥濕解毒方<sup>28)</sup>, 加味芎歸湯<sup>29)</sup> 등의 祛風燥濕, 清熱解毒 涼血의 효능을 가지는 한약재 및 처방이 ACD의 치료에 좋은 효과가 있음이 보고되었고, 山楂<sup>30)</sup>, 杜仲<sup>31)</sup>,

內托千金散<sup>32)</sup> 등의 健脾, 扶正祛邪의 효능이 있는 한약재 및 처방 또한 ACD의 치료에 활용될 수 있음이 보고되었다.

馬齒莧 (*Portulacae Herba*, PH)은 쇠비름과에 속한 일년생 본초인 쇠비름 *Portulaca oleracea L.*의 지상부로 清熱藥類에 속하며, 性은 寒하고 味는 酸하다. 清熱解毒, 涼血止痛하는 효능이 있어 熱毒血痢, 癰腫疔瘡, 濕疹, 丹毒, 蛇蟲咬傷, 便血, 痔出血, 崩漏下血 등을 치료한다<sup>5)</sup>.

역대 문헌에는 PH의 殺蟲, 散血, 解毒작용에 대해 기술되어 있고<sup>33-36)</sup>, PH가 주로 외용제로써 腫癭尤目, 濕癬白禿, 癰瘡, 紅腫疼痛, 疔瘡, 惡瘡, 翻花瘡, 疔疽, 癩癧, 丹毒, 漆瘡 등의 다양한 피부질환에 활용도 높게 사용되어져 왔음이 언급되어 있다<sup>6-7)</sup>.

PH의 성분으로 대량의 noradrenaline과 다량의 칼륨염이 함유되어 있으며 아미노산으로서 alanine, aspartic acid 등이 있고 다당체로는 glucose, fructose, surcrose가 있으며, 유기산과 지방산으로 malic acid, oxalic acid, citric acid, glutamic acid, asparic acid, alanine 등이 보고되었으며, sterol로는 stigmasterol, campesterol이 있고, vitamin B<sub>1</sub> 및 C, saponin, tannin, flavonoid 등이 보고 되어 있다<sup>8-10)</sup>.

PH에 대한 선행연구로는 PH의 항산화 및 항염증 효과<sup>12,13)</sup>, 항소양 효과<sup>13)</sup>, 지방분해효과<sup>14)</sup>, 자궁경부암에 대한 치료 효과<sup>15)</sup>, 위염에 대한 항산화 작용<sup>16)</sup> 등이 보고되어 왔으며 주로 항염증 및 항산화 작용에 근거한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다.

이러한 선행 지식 및 연구를 바탕으로 본 저지는 清熱解毒, 涼血의 효능이 있는 PH가 ACD의 치료에 효과가 있을 것이라는 가설 하에 ACD를 유발한 생쥐의 체중 변화, 비장과 귀의 무게, 귀와 등 피부의 두께, 혈중 IL-10과 TNF- $\alpha$  함량을 측정하였으며, 피부의 조직병리학적 변화를 관찰하고, *in vivo*와 *in vitro*에서 비장세포 증식률을 측정하는 방법으로 연구를 진행하였다.

3주간의 체중 변화를 관찰한 결과 정상군을 제외한

나머지 군들에서 체중이 감소하는 경향을 보였으나, PH의 도포나 경구 투여가 control군에 비해 체중에 큰 영향을 미치지 않는다고 (Table 1, Fig. 1).

PH의 항염증 작용을 평가하기 위해 일차적으로 ACD가 유발된 mouse의 귀 무게와 두께의 변화를 측정하였다. ACD 동물 모델에서는 국소 부위의 염증 반응으로 부종과 그에 따른 동일 면적 대비 귀 무게가 증가하는 경향을 보이는데, 약물이 부종 정도와 무게 변화에 미치는 영향은 항염증 작용의 평가 척도로 사용되고 있다<sup>37)</sup>.

본 연구에서 귀 무게를 측정하여 각 군을 비교한 결과 control군에 비해서 PHS군은 특별한 변화 양상이 보이지 않았고, PHS+Adm군의 귀 무게가 다소 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다 (Table 2, Fig. 2). 귀의 두께 변화를 비교한 결과 control군에 비해서 PHS군과 PHS+Adm군 모두에서 유의한 차이를 보이지는 않았다 (Table 3, Fig. 3). 이상의 결과로 보아 귀는 PH의 도포가 이루어지지 않은 곳으로서, PH의 투여만으로 ACD가 유발된 생쥐의 귀 부위 염증을 억제하기는 어려운 것으로 생각된다.

등 피부 부위는 귀 부위와 다르게 비교적 면적이 넓어 피부염 증상의 육안적 관찰이 용이하므로 등 피부의 두께, 조직병리학적 소견과 함께 피부염 증상의 발현 정도 관찰을 병행하여 연구를 진행하였다.

등 피부의 두께를 비교해 본 결과 PHS군과 PHS + Adm 군 모두에서 control군에 비해 통계적으로 유의하게 얇아진 것을 확인할 수 있었으며 (Table 4, Fig. 4), PHS + adm군 ( $P < 0.01$ ) 이 PHS군 ( $P < 0.05$ )에 비해 피부 두께 증가를 더 나은 수준으로 억제하는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 DNCB로 ACD가 유발된 생쥐의 피부 두께 증가를 PH가 효과적으로 억제하고 있으며, ACD를 치료함에 있어 PH의 투여와 도포를 병행했을 때 더 좋은 효과를 기대할 수 있다는 것을 시사한다.

또한 5점 척도로 등 피부의 증상의 정도를 수치화

한 결과 normal 군의 등 피부에서는 특별한 변화가 없는데 반해, ACD 유발 후 control군의 등 피부에서는 중증도 이상의 피부염 증상이 관찰되었다. PHS 군 및 PHS+Adm 군에서는 홍반, 낙설과 같은 ACD 증상의 감소가 관찰되었으며 수치상으로도 유의성 있게 감소하였다(Table. 5, Fig. 5-6). 이러한 결과를 보면 PH가 ACD의 증상 발현을 직접적으로 억제하는 치료제로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

ACD로 인해 염증 반응이 발생한 피부에서는 조직 병리학적으로 해면조직의 비후 및 부종, 각종 면역세포의 침윤이 관찰되며<sup>38)</sup>, 염증반응을 일으키는 비만세포(mast cell)의 분포 및 탈과립이 촉진되는 양상을 보인다<sup>39)</sup>. 이에 본 연구에서는 ACD가 유발된 생쥐의 등 피부조직을 H & E (Hematoxylin & Eosin stain evaluation) 염색, Toluidine blue 염색을 통해 조직 병리학적인 변화를 관찰하여 PH의 효과를 입증하고자 하였다.

H & E 염색을 통해 등 피부 조직의 형태학적 관찰 및 피부조직의 재생과 염증세포의 침윤을 관찰한 결과, Normal 군의 피부조직은 특별한 이상 소견이 발견되지 않은 반면, ACD를 유발한 control군에서는 epidermis와 dermis의 배열이 불규칙적이며 부종으로 인해 피부의 두께가 확장되었고 백혈구의 침윤이 관찰되었다. 이에 비해 PHS군과 PHS+Adm군에서는 control군에 비하여 epidermis와 dermis의 두께가 감소하는 양상을 보였으며, 면역세포들의 침윤 또한 control군에 비해 감소하였다. 이 중 PHS+Adm군에서 PHS군에 비하여 더 나은 예후가 관찰되었다 (Fig. 7).

Toluidine blue 염색을 통해 등 피부 조직의 비만세포(mast cells)의 발현 정도 및 면역세포들의 침윤을 관찰한 결과, normal군의 피부조직은 특별한 이상 소견이 발견되지 않은 반면, control군에서는 비만세포의 과분포와 탈과립 정도가 심한 것으로 관찰되었다. 이에 비해 PHS군과 PHS+Adm군에서는 control군에 비하여 비만 세포의 분포와 탈과립 정도가 경미

함을 확인할 수 있었고, PHS+Adm군에서 PHS군에 비하여 더 나은 예후가 관찰되었다 (Fig. 8).

이와 같은 조직병리학적 결과는 PH가 피부조직 내에서 염증 반응을 효과적으로 억제하는 항염증작용을 가진다는 것을 시사하며, 상기한 등 피부 두께 증가 억제 효과와 ACD 증상 발현 억제 효과의 근거가 될 수 있다. 또한 PHS+Adm군에서의 상대적으로 양호한 결과로 보아 PH의 도포와 투여의 병행이 피부조직내 항염증작용의 상승효과를 가져올 수 있을 것으로 생각된다.

비장은 말초 림프조직으로, T 림프구와 B림프구가 성숙하고 기능 수행을 하는 중요한 장소이다<sup>40)</sup>. 비장은 대표적인 기능으로 조혈작용, 식작용, 적혈구의 재생 및 저장작용이 있으며 형질세포, 림프구, 림프성 결절과 같은 림프성 요소들을 포함하여 혈액 속의 이물질을 제거하고 항체를 만들어 면역반응을 일으키는 데 중요한 역할을 한다<sup>41,42)</sup>. 따라서 면역반응 증가와 감소를 판단하는 하나의 지표로 비장세포 증식률을 사용할 수 있으며<sup>42)</sup>, 주로 염증성 변화, 종양, 빈혈, 비정상 세포 및 물질의 침윤 등의 면역반응이 증가되는 경우에 비장 종대가 일어나는 것으로 알려져 있다<sup>43)</sup>.

본 연구에서 모든 실험을 마친 후 비장을 적출하여 무게를 측정하여 각 군을 비교한 결과 control군, PHS군, PHS+Adm군 사이에서는 유의한 차이를 보이지는 않았으며 (Table 6, Fig. 9), 실험을 마친 생쥐의 비장세포 증식률을 측정된 결과 control군에 비해 PHS군과 PHS+Adm군에서 유의한 변화가 관찰되지 않았다 (Table 7, Fig. 10). 그러나 정상 생쥐로부터 비장 세포를 분리하여 PH를 처리하고 시료 투여에 따른 비장세포 증식률을 관찰한 결과, PH의 농도가 증가됨에 따라 증식률이 감소하는 경향을 보였으며, 모든 투여 농도에서 유의한 수준(P < 0.01)의 비장세포 증식률 감소가 보였다 (Table 8, Fig. 11). 이상의 결과를 토대로 PH가 비장의 무게에 직접적인 영향을 미치지 못하였으나, 비장세포의 증식률을 억제하는데 관여하여 염증 반응을 포함한 면역반응을 완화시

키는 역할을 한다고 유추해볼 수 있다.

TNF- $\alpha$ 는 Th1 cytokine의 일종으로 다양한 원인에 의한 염증 반응시 급성 반응 단백 유전자를 자극하여 단백을 생산하고 혈구성장인자들을 자극하여 염증반응을 촉진시킨다<sup>40,44</sup>. IL-10은 Th2 cytokine에 속하며 TNF 등의 Th1 cytokine에 길항적으로 작용하여 염증 반응을 억제시키는 강력한 항염증 작용이 있는 것으로 알려져 있다<sup>45,46</sup>.

모든 실험이 끝나고 희생시킨 생쥐에서 혈청을 분리하여 혈청 내 TNF- $\alpha$ 의 농도를 측정된 결과, control군에 비해 PHS군과 PHS+Adm군에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table 9, Fig. 12). 혈청 내 IL-10의 농도를 측정된 결과 또한 control군에 비해 PHS군과 PHS+Adm군에서 통계적으로 유의한 차이가 나타나지는 않았다 (Table 10, Fig. 13). 이러한 결과로 보아 상술한 실험에서 나타난 PH의 항염증 작용은 TNF- $\alpha$ 나 IL-10과는 무관한 다른 기전을 통해 염증반응을 억제시키는데 관여한다고 생각되며, 이를 규명하기 위한 후속연구가 필요할 것으로 사료된다.

이상의 결과로부터 PH는 어떠한 기전에 의한 항염증 작용을 통해 ACD가 발생한 피부조직내 염증반응을 억제하여 피부염 증상 발현을 억제 및 개선하는 효과가 있다는 것을 알 수 있다. 따라서 향후 다각도의 후속연구가 뒷받침된다면 PH는 ACD의 증상을 개선하고 치료함에 있어 임상적으로 활용도 높은 치료제가 될 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 결 론

馬齒莧이 DNCB로 유발된 ACD에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PHS 및 PHS+Adm군에서 체중 변화는 control군과 유의한 차이가 없었다.
2. PHS 및 PHS+Adm군에서 귀의 무게와 두께에 유의한 변화는 없었다.
3. PHS 및 PHS+Adm군에서 등 피부 두께가 유의하게 감소되었다.
4. PHS 및 PHS+Adm군 모두에서 피부 증상 발현을 효과적으로 억제하였으며, 5점 척도 수치 또한 통계적으로 유의하게 감소되었다.
5. PHS 및 PHS+Adm군에서 피부조직 비후와 면역세포 침윤이 감소하였고, 비만세포의 분포 및 탈과립의 정도가 경미하였으며, PHS+Adm 군에서 더 좋은 예후가 관찰되었다.
6. PHS 및 PHS+Adm군에서 유의한 비장무게의 변화는 관찰되지 않았다.
7. *in vivo* 상 control군에 비해 PHS군과 PHS+Adm군에서 유의한 변화가 관찰되지 않았다.
8. *in vitro* 상 PH의 농도가 증가함에 따라 비장세포 증식률이 감소되었으며 모든 군에서 유의한 감소가 관찰되었다.
9. PHS 및 PHS+Adm군에서 혈청 TNF- $\alpha$ 와 IL-10 함량에는 유의한 변화가 없었다.

## References

1. Korean Dermatological Association Textbook Compilation Committee, Text of Dermatology 5th ed, Seoul:Yeomoongak 2008:63-84, 165-70, 179-85.
2. Ahn SG, Jang GH, Song JW, Cheon SH. COMMON SKIN DIESEASE. Seoul:Doctor's book, 2009:173-90.
3. The National College of Oriental Medicine Dermatology Textbook Compilation Committee, Text of Korean Dermatology. Busan:Sunwoo Publisher, 2007:65, 352, 536.
4. Jeon JH, Kim HA, Kang YH. A Literature

- study on the external therapy of contact dermatitis. *J Orient Med Surge Ophthalmol Otolaryngol*. 1997;10(1):263-83.
5. The National College of Oriental Medicine Herbology Classroom. *Herbology*. Seoul: Youngrimsa, 2008 :251-2.
  6. Shin MG. *Clinial Traditional Herbology*. Seoul:Youngrimsa, 2002:417-8.
  7. Lee GJ. *Chinese medicine Dictionary*. Soeul:Jeong Dam, 1999:1193-7.
  8. Feng PC, Haynes LJ, Magnus KE. High Concentration of (-)-Noradrenaline in *Portulaca oleracea* L. *Nature*. 1961;191:1108.
  9. Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. Phytosterols, phytostnols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 2002;41(6):457-500.
  10. Nam GD, Lee JP. Pharamacological studies have been carried out with the methanol extract of the whole plant of *Portulaca oleracea*(Portulacaceae). *Woosuk Journal of the Institute of Oriental Medicine*. 1986;8: 75-87.
  11. Kim CH, Park PB, Choe SR, Kim TH, Jeong JK, Lee KG, Lee CH, Jeong HS. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects of *Protulaca Oleracea* on the LPS-stimulated AGS Cells. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology*. 2009;23(2):488-93.
  12. Joo JG. Anti-inflammatory Effect of *Portulacae Herba* Water Extract on Lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 Macrophages. *KyungWon Journal of the Institute of Oriental Medicine*, 2011.
  13. Lim YY, Kim HM, Park WS, Kim JH, Shin HJ, Kim MN, Kim BJ. Anti-inflammatory and Anti-pruritic Effects of *Portulaca oleracea* L. Extract Using In Vitro and In Vivo Inflammation Model: LPS-treated Raw264.7 Cells, Keratinocytes, NC/Nga Mice and Hairless SKH-1 Mice. *Allergy Asthma Respir Dis*. 2011;31(3):199-206.
  14. Lee MS, Kim CT, Kim CJ, Cho YJ, Kim YH. Effects of *Portulaca Oleracea* L. Extract on Lipolysis and Hormone Sensitive Lipase (HSL) Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes. *The Korean Journal of Nutrition*. 2006;39(8):742-7.
  15. Eum JO, Kang BH, Kim YH, Yoo SK. *Herba Portulacae* induced Apoptosis in Human Cervical Carcinoma HeLa Cells. *The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology*. 2005;18(1):29-44.
  16. Kim CH. The Inhibitory Effects of *Portulaca oleracea* L. on HCl-ethanol Induced Gastritis in Rats. *The Korea Journal of Herbology*. 2009;24(1):35-40.
  17. Yuan XY, Liu W, Zhang P, Wang RY, Guo JY. Effects and mechanisms of aloperine on 2,4-dinitrofluorobenzene-induced allergic contact dermatitis in BALB/c mice. *Eur J Pharmacol*. 2010;629(1-3):147-52.
  18. Yang JM. An Epidemiological Study of Contact Dermatitis. *The Korean Journal of Dermatology*. 1983;21(2):165-9.
  19. Jun JH, Kang YH. The Effects of *Scutellaria baicalensis* GEORGI on Allergic contact dermatitis induced by DNCB in Mice. *DongGuk Journal of the Institute of Oriental Medicine*. 1998;7(1):119-33.
  20. Shin GS, Son JS, Kim DE, Jeon WJ, Jeong SH, Sin GJ, Lee WC. The effect of



- Rhemanniae radix extract on allergic contact dermatitis on Mice induced by DNCB. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription, 2000;8(1):257-79.
21. Kim SC, Lee JR, Choi KI, Park SJ, Kwon YK, Byun SH. Effect of Lonicerae Flos-Skin on Contact Hypersensitivity induced by Repeat Elicitation of DNCB. Korea J Herbol, 2006;21(1):9-15.
  22. Song JS, Lee JC, Choi JH, Kim JH, Park SY. Effects of Scrophulariae Radix (SR) on Allergic Contact Dermatitis (ACD) induced by DNCB in mice. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2011;24(3):1-16.
  23. Lee YJ. Effects of Lonicerae Caulis (LC) on Allergic Contact Dermatitis (ACD) induced by DNCB in mice. DongShin Journal of the Institute of Oriental Medicine, 2012.
  24. Kim HN, Kim MY, Choi CH, Kim BJ, Kim KY, Kim GY, Jeong HW, Kim HW. Effect of Lithospermi Radix on Contact Dermatitis Induced by Dinitrofluorobenzene in Mice. Journal of Korean Institute of Herbal-Acupuncture, 2012;15(2):7-10.
  25. Kang YH, Kim JT, Kim SA. The Effects of Hangryunhaedocktang on Allergic Contact Dermatitis Based on the Morphological Changes in Epidermal Damage in Mice. J Korean Orient Int Med, 2004;25(3):508-17.
  26. Park SJ, Lee SG, Baek JH, Byun SH, Kim SC. Effect of Sopung-san on Contact Hypersensitivity induced by Repeat Elicitation of DNCB. Korean J. Orient Physiol Pathol, 2006;20(3):623-28.
  27. Nam BS, Kim YB. The Effects of Sanpunggosamhwan on the Allergic Contact Dermatitis. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2005;18(2):10-27.
  28. Bae EY, Kim DH. Effect of Geopungjeseupbang on Contact Dermatitis induced by DNCB. Korean J Orient Physiol Pathol, 2007;21(6):1491-8.
  29. Ahn JY, Im LR, Kim JH, Xin MJ, Kwon SU, Kim DK, Song BS, Song BJ, Jung HJ, Hong SH, Kwon DY, Kim YK, Kim DK, Lee YM. Inhibitory Effect of Gamigunggui-tang on Allergic Contact Dermatitis. Korean J Orient Physiol Pathol, 2010;24(2):290-5.
  30. Ryu SH. Effects of Crataegus Pinnatifida (CP) on Allergic Contact Dermatitis (ACD) Induced by DNCB in Mice. DongShin Journal of the Institute of Oriental Medicine, 2013
  31. Shon MY, Nam SH. Effect of Eucommia ulmoides Extracts on Allergic Contact Dermatitis and Oxidative Damage Induced by Repeat Elicitation of DNCB. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2007;36(12):1517-22.
  32. Kim JJ, Kim HT. The effects of Naetakchunkeum-san on the Allergic Contact Dermatitis induced by DNCB. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2009;22(1):46-61.
  33. So JG. ShinnongBoncho. Taiwan: Shinhwa-Bookstore, 1981:129.
  34. Lee SJ. Boncho Gangmok, Seoul: Gomoonsa, 1983:41.
  35. Heo Jun. Donguibogam, Seoul: Namsandang, 1983:715.
  36. Hwang DY. Jeungmaek-Bangyak Happyeon, Seoul: Namsandang, 1984:257.
  37. Kim JK, Kim YH, Lee HH, Lim SS, Park

- KW. Effect of Scrophularia buergeriana Extract on the Degranulation of Mast Cells and Ear Swelling Induced by Dinitrofluorobenzene in Mice. *Inflammation*, 2011 Feb 12.
38. 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.
39. Eun HC. *Dermal Immunology*. Seoul:Seoul University Publisher, 1999:27-3.
40. Shin TY. *Allergy and Oriental Medicine*. Seoul:Shinil Sangsa, 2001:3, 29, 139-47.
41. Burk RL, Ackerman N. *Small animal radiology and ultrasonography*. ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1996;410-4.
42. Kim IS, Moon HJ. *Essential Immunology*. Seoul:Daehak Seolim, 2010:24-5.
43. Jung IJ, Wang JH, Yun JW, Lee KW, Yeon SC, Lee HJ, Lee HC. Radiographic Estimation of Experimentally Induced Splenomegaly in Dogs. *Journal of Veterinary Clinics*, 2006;23(3):263-6.
44. Stasiuk LM, Abehsira-Amar O, Fournier C. Collagen-induced arthritis in DBA/1 mice ; cytokine gene activation following immunization with type II collagen. *Cell Immunol*, 1996;173:269-75.
45. Maeda A, Schwarz A, Bullinger A, Morita A, Peritt D, Schwarz T. Experimental extracorporeal photopheresis inhibits the sensitization and effector phases of contact hypersensitivity via two mechanisms: generation of IL-10 and induction of regulatory T cells. *J Immunol*, 2008;181(9):5956-62.
46. Gwon HH, Kim EJ, Kim IT, Park KH, Yang MK, Yum YB, Lee YJ, Lee JS, Jeong WB. *Clinical Immunology*. Seoul:Korea Medicine, 2010:166.