

## 山楂가 DNCB로 유발된 생쥐의 알레르기성 접촉피부염에 미치는 영향

유수향 · 채중원

동신대학교 한의과대학 소아과학교실

### Abstract

#### Effects of *Crataegus Pinnatifida* (CP) on Allergic Contact Dermatitis (ACD) Induced by DNCB in Mice

Ryu Su Hyang · Chae Jung Won

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongshin University

Allergic contact dermatitis (ACD) is a type IV delayed hypersensitivity reaction that results from exposures and subsequent sensitization to an environmental chemical. *Crataegus Pinnatifida* (CP) is commonly used to improve spleen function, remove retention of food, and promote blood circulation. This study is designed to investigate the effects of CP on ACD induced by 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) in mice. In this experiment, the effects of CP on changes in body weights, ear and dorsum skin thicknesses, ear weights, clinical aspects on the dorsum skin, histopathological changes, spleen weights, cytokines were investigated. In addition, the effects on the proliferation rates of splenocytes were also investigated *in vivo* and *in vitro* study.

In results, CP spread (CPS) group and CP spread and administered (CPS+Adm) group showed decrease in spleen weights. In CPS+Adm group, dorsum skin thicknesses were decreased significantly compared to control group. CP treatment diminished erythema, desquamation and keratosis which were induced by repeated painting of DNCB. In histopathological observation, spongiosis and edema were diminished in CPS and CPS+Adm group. CP led to decrease in the proliferation rates of splenocytes *in vivo* and *in vitro*.

In conclusion, these data suggest that CP can decrease symptoms of ACD, so CP is useful to treat patient with ACD.

**Key words** : Allergic contact dermatitis (ACD), *Crataegus Pinnatifida* (CP), 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), Proliferation rates of splenocytes.

## I. Introduction

알레르기는 과민증 (hypersensitivity)으로 나타나는 면역반응 중 하나로 다양하고 무해한 항원에 대한 면역계의 반응으로 발생하는 질병이라 정의한다<sup>1)</sup>. 최근에는 환경오염이 가속화되고 합성물질의 사용이 늘어나면서 알레르기성 질환이 급증하는 추세이다.

알레르기성 접촉피부염 (Allergic contact dermatitis, ACD)은 제IV형 면역반응의 하나로 외부 항원에 감각된 T 림프구에 의해 나타나는 습진성 피부질환이다. 항원에 이미 감각된 개체가 다시 특정항원에 접촉되었을 때 발적, 가려움증, 비늘, 구진, 소수포 등의 반응이 나타나는데, 이 과정에서 각종 cytokine이 분비된다<sup>2)</sup>.

DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene)는 ACD를 유발시키는 물질로 피부손상, 해면화 (spongiosis), T 림프구의 증가 등을 일으킨다<sup>3)</sup>.

山楂 (*Crataegus pinnatifida*, CP)는 味는 酸甘, 性은 微溫하고 脾, 胃, 肝經에 들어가며 消食健脾胃, 行氣散瘀, 驅條蟲의 효능이 있다<sup>5)</sup>. 《本草求真》<sup>6)</sup>에 “痘瘡不起, 方能以發”라 하여 痘瘡이 용이하게 透出되지 않을 경우 發疹시키는 효능이 있어 피부질환에 활용할 수 있다. CP에 대한 연구로는 혈관 이완 작용<sup>7-10)</sup>, 고지혈증<sup>11,12)</sup>과 간 손상<sup>12,13)</sup>에 대한 보호 효과, 기억력 개선 및 치매의 치료<sup>14)</sup> 등에 관한 다양한 보고가 있으며, 항산화 효과에 대한 여러 연구<sup>10,15,16)</sup>가 있다.

한의학에서 脾臟은 諸濕腫滿皆屬于脾<sup>17)</sup>. 脾虛生濕으로 濕疹과 같은 濕爛性 皮膚病과 밀접한 관계가 있다<sup>18)</sup>.

이에 健脾胃하면서 行氣散瘀하여 피부에 영향을 미치는 CP가 ACD를 호전시킬 수 있으리라는 가설을 세우고 본 연구를 진행하였다.

본 실험은 ACD를 유발한 생쥐에 대한 CP의 치료 효과를 확인하기 위해 체중 변화, 비장과 귀의 무게, 귀와 등 피부의 두께, 혈중 IL-10과 TNF- $\alpha$  함량을 측정하였으며, *in vivo*와 *in vitro*에서 비장세포 증식율에 미치는 영향을 알아보았다. 또한 등 피부 증상 및 조직병리학적 소견을 관찰한 결과 유의성이 있었기에 보고하는 바이다.

## II. Materials and methods

### 1. 재료

#### 1) 동물

6주령된 雄性 BALB/c 생쥐를 동물실험 전문 업체 (Samtako, Korea)에서 구입한 후, 항온항습 장치가 구비된 사육장 (실내온도  $24 \pm 2$  °C, 습도  $55 \pm 5$  %, 12시간 명암주기)에서 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 일주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용된 山楂는 장미과에 속하는 낙엽교목인 산사나무 (*Crataegus pinnatifida* Bunge)의 果實로 동신대학교 목포한방병원에서 구입, 정제하여 사용하였다.

#### 3) 알레르기성 접촉피부염 유발 약물

ACD 유발을 위하여 DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene)를 전문시약 업체인 Sigma (시약 번호 : 237329, USA)에서 구매하여 사용하였으며, 1% DNCB를 acetone 과 olive oil을 4대 1로 섞은 혼합액 (AOO)에 섞어서 사용하였다<sup>19)</sup>.

### 2. 방법

#### 1) 시료의 제조

CP 100 g을 D/W 1,500 ml를 이용하여 100 °C에서 4시간 추출한 다음, 원심분리로 찌꺼기를 제거한 상층액을 모았다. 이를 감압농축기 (EYELA, Japan)를 이용하여 농축하고 동결 건조기 (Samwon, Korea)로 동결 건조하였다. 이 때, 최종적으로 얻어진 동결 건조 분말은 27.25 g으로 수득율은 27.25%였다.

#### 2) 알레르기성 접촉피부염의 유발 약물 도포 방법

ACD의 유발을 위해서는 제모가 필요하였다. 제모를 위해 동물 마취제인 zoletile (Virbac, France)을 PBS (phosphate buffered saline)에 1:100 비율로 희석한 혼합액을 생쥐 20 g 기준으로 100  $\mu$ l를 복강 주사하여 10분 정도 지속되도록 마취하였다. 마취한 후 생쥐 등을 전기 면도기를 사용하여 엉덩이 쪽부터 가볍게 제모한 후 제모제 (세화, Korea)를 조금 바르고 도포용 주걱을 이용하여 넓게 도포한 후 5~10분 방치하였다. 이 후 온수를 거즈에 묻혀 깨끗이 닦아 내고 상처 치유를 위해 24시간 방치하여 약물 도포를 위한 제모를 완료하

였다.

24시간이 지나고 isoflurane (중외제약, Korea)을 마취통에 1.5 ml 넣어 호흡을 통해 마취시킨 후 등과 귀에 DNCB를 도포하였다. 귀는 pipet (yellow tip)을 이용하여 1일 1회, 3일간 1% DNCB 용액 30  $\mu$ l를 도포하였다. 등 부위는 1일 1회, 3일간 1% DNCB 용액 50  $\mu$ l를 도포하였다. 3일간 관찰 후 약물 도포 기간에는 이틀에 한번씩 1% DNCB 용액 50  $\mu$ l를 도포하여 ACD를 유발하였다.

### 3) 시료 투여 및 도포

경구 투여는 CP 동결 건조 분말을 증류수에 희석하여 투여하였고, 10 g/kg/day의 농도로 14일간 투여하였다.

등 부위에 도포하기 위한 CP의 도포액은 100% 에탄올에 CP 200 g을 넣어 24시간 추출한 다음 농축, 동결 건조하여 사용하였다. 추출물을 에탄올에 녹인 후, 이를 AOO에 희석하여 용액을 제조하였다. 제조된 시료를 등 부위에 적절히 도포하였으며, 같은 날 처리하는 경우에는 DNCB를 바르는 시간과 최소 4시간 이상 차이를 두었다. 도포 용량은 최종 혼합액을 기준으로 50  $\mu$ l였으며 11일간 매일 도포하였다.

### 4) 실험군 분리

실험을 위해 정상군, 대조군, 산사 도포군, 산사 도포 및 경구투여군으로 나누었다. 정상군 (normal group, Normal)은 ACD를 유발하지 않고, 증류수를 투여하고, AOO를 도포한 군이며, 대조군 (control group, Control)은 ACD를 유발하고, 증류수를 경구투여하고, AOO를 도포한 군으로 설정하였다. 산사 도포군 (CP spread group, CPS)은 ACD를 유발하고, 증류수를 경구투여하고, 산사 용액을 도포한 군으로 설정하였으며, 산사 도포 및 경구투여군 (CP spread and administer group, CPS + Adm)은 ACD를 유발하고 산사의 경구투여와 도포를 동시에 시행한 군으로 설정하였다. 각각의 개체 수는 정상군은 5마리였고, 나머지 군들은 모두 9마리였다.

### 5) 체중, 귀 및 비장 무게의 측정

실험 시작일에 측정된 체중을 기준으로 ACD를 유발한 체중과 희생시키기 전 체중 변화를 측정하여 이를 관찰하였다. 체중의 측정은 측정일 오후 2시에 전자 저울 (HANA, KC-200, Korea)을 이용하여 실시하였다.

귀와 비장의 무게는 실험 마지막 날 생쥐를 희생시킨 후, 귀와 비장을 적출하고 미량 저울 (OHAUS, USA)을 이용하여 측정하였다. 귀는 정확한 측정을 위하여 병변이 유발된 부위를 절제한 다음, 직경 5 mm의 둥근 절편으로 만들어 무게를 비교 하였다.

### 6) 귀 및 등 피부 두께의 측정

ACD가 유발된 생쥐에서 시료의 도포 및 투약으로 변화된 귀와 등 피부 두께를 측정하였다. 측정은 실험 마지막 날 생쥐를 희생시킨 후, 등 피부와 귀를 절제하고 Digital caliper (Mitutoyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

### 7) 피부 표면의 육안적 관찰

ACD의 유발 정도를 관찰하기 위하여 실험 마지막 날 생쥐를 희생시키고 ACD가 유발된 등 부위를 Digital camera (Samsung, Korea)로 촬영하였다.

### 8) Symptom score 판정

실험이 종료된 후 생쥐의 등에 발생한 병변의 정도를 육안으로 관찰하여 수치로 나타내었으며, 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

### 9) 피부 조직의 조직병리학적 소견

생쥐로부터 얻은 등 피부 조직을 10% 포르말린에 고정된 후, 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 미세 절단기 (Sakura, Japan)를 이용하여 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시킨 뒤 탈수와 투명 (cleansing) 과정을 거쳐 흐르는 물에 침전시켰다. 탈파라핀 과정을 거친 조직 절편은 Hematoxylin (HHS32, SIGMA, USA) 과 Eosin (HT110232, SIGMA, USA)으로 염색한 후, 과염색된 부분은 흐르는 물에 씻어내고, 다시 탈수 및 투명 과정을 거쳐 봉입 (mounting)하여 광학현미경 ( $\times 100$ ) (Olympus BX50, Japan)으로 관찰하였다.

## 10) 비장세포 증식율에 미치는 영향

(1) *in vitro*

분리된 비장 세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에  $1.0 \times 10^6$  cells/ml 농도로 접종하였다. 이후 비장 세포에 LPS (lipopolysaccharide) (Sigma, USA) 5  $\mu\text{g/ml}$  및 CP를 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 첨가하였다. 차광상태에서 2시간 더 배양한 후, 발색된 각 well의 흡광도를 Microplate Reader (Bio-RAD, Japan)로 450 nm에서 측정하였다.

(2) *in vivo*

생체 내 비장세포 증식율의 측정은 실험이 종료된 다음, 생쥐 6마리를 희생시켜 비장 세포를 분리한 후 *in vitro*의 방법과 동일하게 측정하였다.

## 11) Cytokine 측정

## (1) 채혈 및 혈청분리

실험이 종료된 생쥐를 zoletile로 마취시킨 후 심장 채혈하였다. 채혈한 혈액을 plastic tube에 담아 실온에 30분 정도 방치하였다가 3,000 rpm으로 30분간 원심 분리시켜 상층의 혈청만을 분리하였다.

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

혈청을 분리한 후 혈청 내의 TNF- $\alpha$  양을 mTNF- $\alpha$  ELISA kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 측정하였다. Kit 각각의 96 well plate에 혈청 및 standards를 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣었다. 실온에서 2시간 동안 incubation한 다음 washing buffer로 4회 세척하였다.

Biotin conjugate 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하고 1시간 실온에서 incubation한 다음 다시 washing buffer로 4회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해 놓은 streptavidin-HRP를 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 다음 다시 실온에서 30분 동안

incubation한 후 washing buffer로 4회 세척하였다. 그 다음 stabilized chromogen을 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30분 동안 incubation한 후 stop solution을 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주하고 Microplate reader (Bio-RAD, Japan)를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다.

## (3) Interleukin (IL-10) 양 측정

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 후 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 세척하였다. stabilized chromogen을 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30분 동안 incubation하고 stop solution을 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 다음 Microplate reader (Bio-RAD, Japan)를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다.

## 3. 통계 처리

수집된 데이터의 통계처리는 SPSS 12 (SPSS, USA)를 이용하였다. 3군 이상이 ANOVA로 통계적으로 유의한 경우 Tukey 방법으로 사후검정을 시행하였고, 2군 간의 비교는 independent sample t-test를 사용하였다. p-value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 인정하였다.

## III. Results

## 1. 체중 변화에 미치는 영향

3주간 체중 변화를 관찰한 결과 정상군을 제외한 나머지 군들에서 체중이 감소하는 경향이 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었으며, 각 군들의 전후 비

Table 1. The Changes of Body Weight in ACD Mice

	0 Week	1 Week	3 Week
Normal	22.72 $\pm$ 0.40	23.40 $\pm$ 0.98	23.68 $\pm$ 0.70
Control	22.99 $\pm$ 1.05	22.74 $\pm$ 0.10	22.61 $\pm$ 1.10
CPS	22.79 $\pm$ 0.69	22.67 $\pm$ 0.57	21.80 $\pm$ 0.90
CPS+Adm	23.40 $\pm$ 0.72	22.93 $\pm$ 0.92	22.23 $\pm$ 1.05

Normal : naive group, Control : only ACD group, CPS : CP spread group, CPS+Adm : CP spread and administered group. Values are represented as mean  $\pm$  SD. Normal group data were expressed as mean  $\pm$  SD of 5 experiments. Control, CPS and CPS+Adm groups data were expressed as mean  $\pm$  SD of 9 experiments.

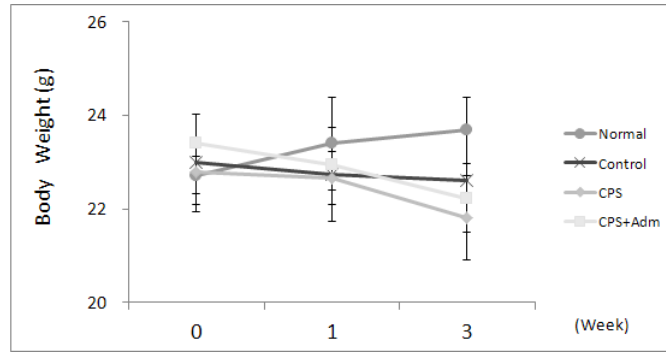


Fig. 1. The changes of body weight in ACD mice

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

Table 2. The Changes of Spleen Weight in ACD Mice

	Spleen weight (g)
Normal	0.09 ± 0.01
Control	0.15 ± 0.01
CPS	0.13 ± 0.01 *
CPS+Adm	0.13 ± 0.01 *

Normal : naive group, Control : only ACD group, CPS : CP spread group, CPS+Adm : CP spread and administered group. Values are represented as mean ± SD. Normal group data were expressed as mean ± SD of 5 experiments. Control, CPS and CPS+Adm groups data were expressed as mean ± SD of 9 experiments.

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

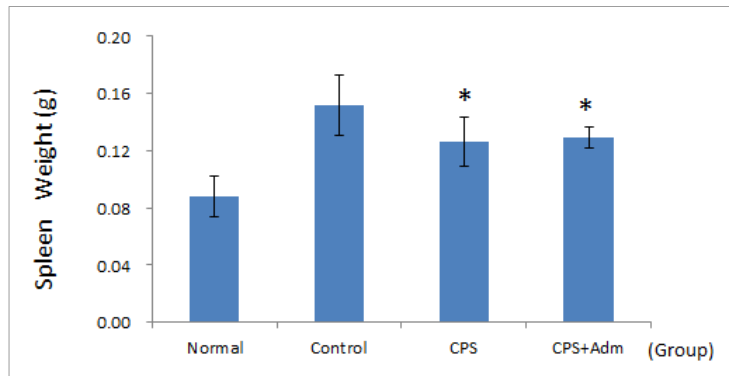


Fig. 2. The changes of spleen weight in ACD mice

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

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

교에서도 유의한 차이를 보이지는 않았다 (Table 1, Fig. 1).

## 2. 비장 무게에 미치는 영향

모든 실험을 마친 후 비장을 적출하여 각 군의 무게를 비교한 결과, 대조군에 비해 CPS군과 CPS + Adm군 (P<0.05)에서 유의하게 감소하였다 (Table 2, Fig. 2).

## 3. 귀 무게에 미치는 영향

모든 실험을 마친 후 일정한 크기로 귀를 도려낸 다음 무게를 측정하여 각 군을 비교한 결과, 대조군에 비해 CPS군과 CPS + Adm군이 무게가 적어진 경향이 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 3, Fig. 3).

Table 3. The Changes of Ear Weight in ACD Mice

	Ear weight (mg)
Normal	9.80 ± 1.06
Control	11.84 ± 2.98
CPS	10.41 ± 1.48
CPS+Adm	9.68 ± 1.80

Normal : naive group, Control : only ACD group, CPS : CP spread group, CPS+Adm : CP spread and administered group. Values are represented as mean ± SD. Normal group data were expressed as mean ± SD of 5 experiments. Control, CPS and CPS+Adm groups data were expressed as mean ± SD of 9 experiments.

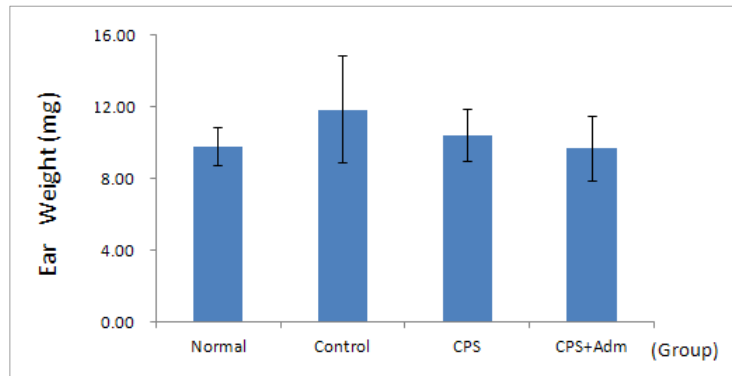


Fig. 3. The changes of ear weight in ACD mice

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

Table 4. The Changes of Ear Thickness in ACD Mice

	Ear thickness (mm)
Normal	0.21 ± 0.01
Control	0.23 ± 0.03
CPS	0.22 ± 0.02
CPS+Adm	0.22 ± 0.02

Normal : naive group, Control : only ACD group, CPS : CP spread group, CPS+Adm : CP spread and administered group. Values are represented as mean ± SD. Normal group data were expressed as mean ± SD of 5 experiments. Control, CPS and CPS+Adm groups data were expressed as mean ± SD of 9 experiments.

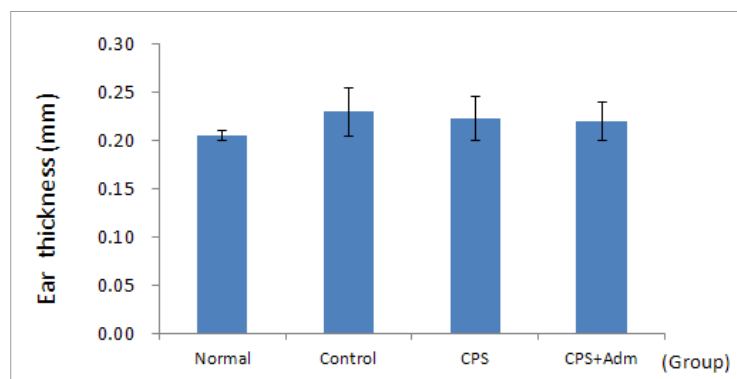


Fig. 4. The changes of ear thickness in ACD mice

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

Table 5. The Changes of Thickness of Dorsum Skin in ACD Mice

	Thickness of dorsum skin (mm)
Normal	0.54 ± 0.04
Control	1.06 ± 0.15
CPS	0.89 ± 0.13
CPS+Adm	0.80 ± 0.20 **

Normal : naive group, Control : only ACD group, CPS : CP spread group, CPS+Adm : CP spread and administered group. Values are represented as mean ± SD. Normal group data were expressed as mean ± SD of 5 experiments. Control, CPS and CPS+Adm groups data were expressed as mean ± SD of 9 experiments.

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

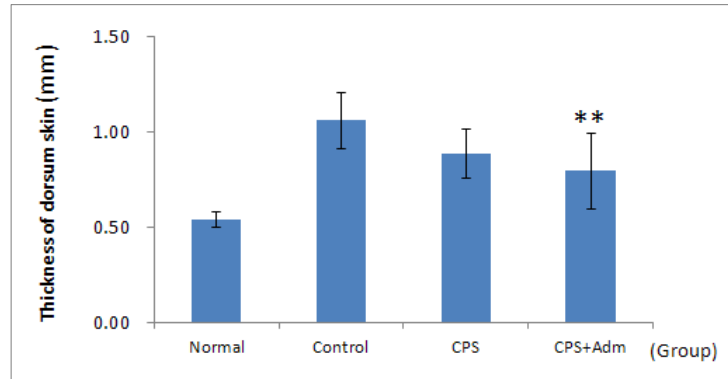


Fig. 5. The changes of thickness of dorsum skin in ACD mice

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

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

#### 4. 귀 두께에 미치는 영향

모든 실험을 마친 후 디지털 캘리퍼를 이용하여 생쥐의 귀 두께를 측정하여 각 군을 비교한 결과, 대조군에 비해 CPS군과 CPS + Adm 군에서 얇아진 경향이 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 4, Fig. 4).

#### 5. 등 피부 두께에 미치는 영향

모든 실험을 마친 후 등 피부를 절제하고 두께를 비교한 결과, 대조군에 비해 CPS + Adm군에서 유의하게 (P<0.01) 감소한 것을 확인할 수 있었다 (Table 5, Fig. 5).

#### 6. 등 피부 증상에 미치는 영향

제모만을 시행한 정상군의 등 피부에서는 특별한 변화를 관찰할 수 없었고, ACD 유발 후 도포와 약물 투여를 하지 않은 대조군의 등 피부에서는 피부 홍반, 낙설 등 중등도 이상의 증상이 관찰되었다. ACD 유발 후 산사를 도포한 CPS군과 산사 도포와 약물 투여를 병행한 CPS + Adm군에서는 이러한 알레르기성 접촉

피부염 증상이 감소되는 경향을 보였으며, CPS군보다 CPS + Adm군에서 더 호전되었다 (Fig. 6).

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

등 피부의 증상을 5점 척도를 활용하여 수치로 나타낸 결과, 대조군에 비해 CPS군과 CPS + Adm군에서 모두 유의한 수준 (P<0.01)으로 ACD의 증상 정도가 감소되었다 (Table 6, Fig. 7).

#### 8. 등 피부의 조직병리학적 소견에 미치는 영향

제모만을 시행한 정상군의 피부조직은 특별한 이상 소견이 발견되지 않은 반면, 등 부위에 ACD를 유발한 생쥐에서 H&E 염색을 한 대조군의 피부는 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, 백혈구의 침윤도 관찰되었다. 실험군에서는 대조군에 비하여 epidermis와 dermis의 두께가 감소하는 양상을 보이기 시작했으며, 백혈구의 침윤도 현저히 감소하여 부종이 거의 발생하지 않은 것을 확인할 수 있는데, CPS군보다 CPS + Adm군에서 더 호전되었다 (Fig. 8).

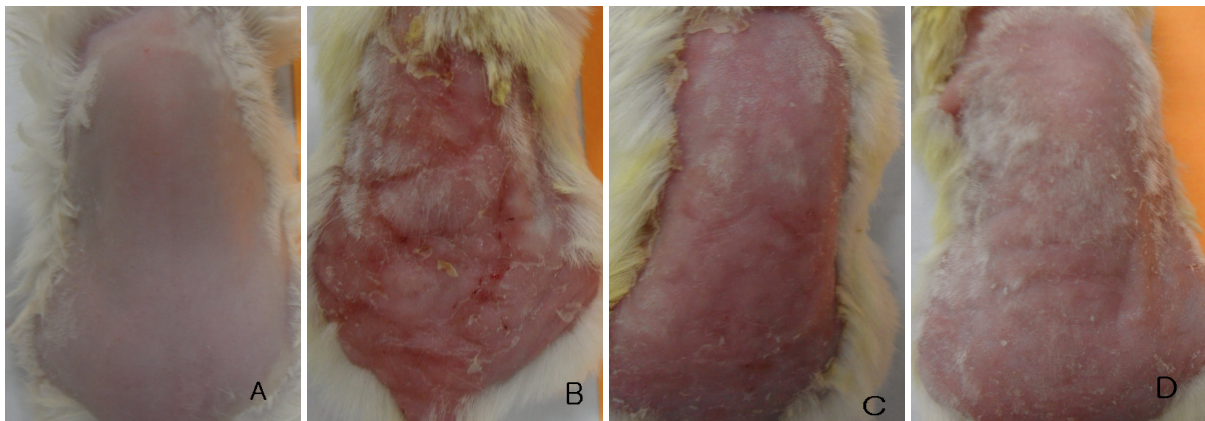


Fig. 6. Effects of CP on clinical aspect in ACD mice

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) : CPS group, (D) : CPS+Adm group.

Table 6. Effects of CP on Symptom Score in ACD Mice

	Symptom score
Normal	0.00 ± 0.00
Control	4.43 ± 0.53
CPS	2.88 ± 0.99 **
CPS+Adm	2.13 ± 0.83 **

Normal : naive group, Control : only ACD group, CPS : CP spread group, CPS+Adm : CP spread and administered group. Values are represented as mean ± SD. Normal group data were expressed as mean ± SD of 5 experiments. Control, CPS and CPS+Adm groups data were expressed as mean ± SD of 9 experiments.

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

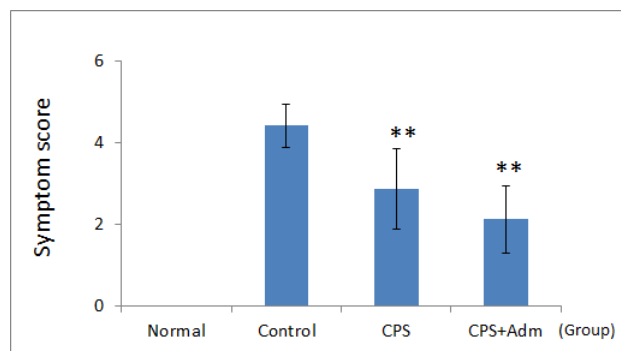


Fig. 7. Effects of CP on symptom score in ACD mice

Symptom scores were estimated in each animal respectively. Normal : naive group, Control : only ACD group, CPS : CP spread group, CPS+Adm : CP spread and administered group. Values are represented as mean ± SD (n=9).

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

### 9. 생체 내 (*in vivo*) 비장세포 증식율에 미치는 영향

모든 실험을 마친 후 생쥐에서 비장을 적출하고 비장 세포를 분리하여 증식율을 측정하였다. 측정값은 LPS(-) normal군을 기준하여 백분율로 표시하였다. LPS를 처리하지 않은 LPS(-)와 LPS를 처리한 LPS(+) 모두에서 대조군에 비해 CPS군과 CPS + Adm군이 통계적으로 유의하게 (P<0.01) 비장세포의 증식율이 낮아진

것을 확인할 수 있었다 (Table 7, Fig. 9).

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

정상 생쥐로부터 비장 세포를 분리하여 CP를 처리하고 증식율을 관찰한 결과, 농도가 증가됨에 따라 증식율이 감소하는 경향을 보였으며, 0.5 mg/ml (P<0.05) 과 1 mg/ml (P<0.01)에서 유의하게 비장세포 증식율이



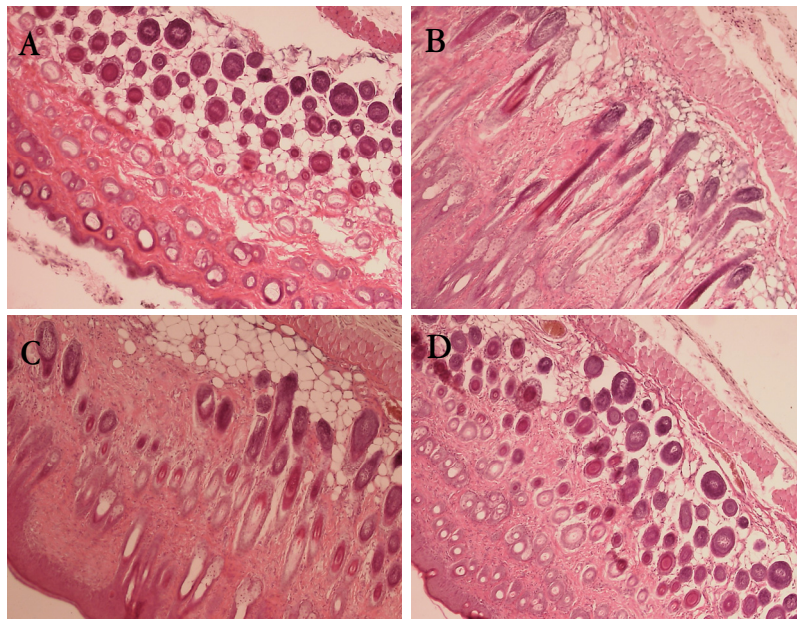


Fig. 8. Effects of CP on histopathological observation of dorsum skin in ACD mice

Dorsum skin was stained with hematoxylin and eosin and observed light microscope. (A) : normal group, (B) : control group, (C) : CPS group, (D) : CPS+Adm group. Closed arrow : immune cell infiltration, open arrow (x100).

Table 7. Effects of CP on Proliferation Rates of Splenocyte *in vivo*

	LPS(-) (%)	LPS(+) (%)
Normal	100.00 ± 6.51	199.48 ± 16.77
Control	136.82 ± 11.44	224.52 ± 16.61
CPS	108.60 ± 9.35 **	165.53 ± 38.77 ##
CPS+Adm	121.45 ± 6.52 **	171.40 ± 11.49 ##

Normal : naive, Control : only ACD, CPS : CP spread, CPS+Adm : CP spread and administered. Values are represented as mean ± SD (n=6).

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

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

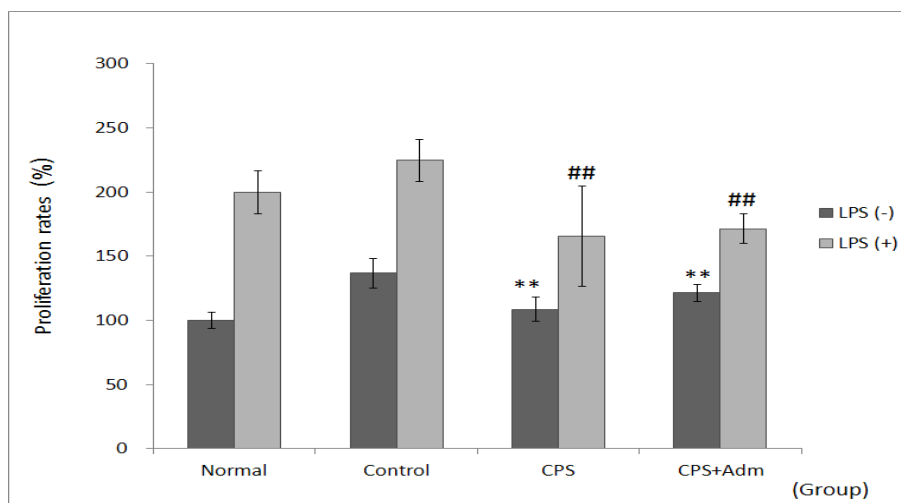


Fig. 9. Effects of CP on proliferation rates of splenocyte *in vivo*

LPS(-): without LPS group, LPS(+): 5 ug/ml of LPS treated control. Values are represented as mean ± SD (n=6).

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

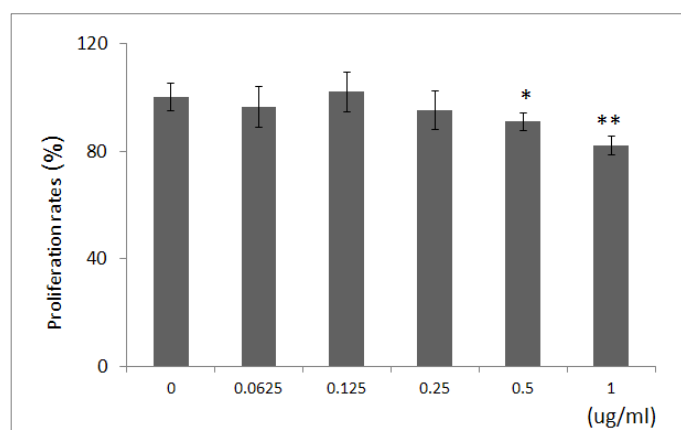
## : Statistically significance compared with control LPS(+) group (## ; P<0.01).

Table 8. Effects of CP on Proliferation Rates of Splenocyte *in vitro*

	Proliferation rates (%)
0 mg/ml	100.00 ± 5.19
0.0625 mg/ml	96.53 ± 7.56
0.125 mg/ml	101.96 ± 7.20
0.25 mg/ml	95.24 ± 7.16
0.5 mg/ml	91.02 ± 3.30 *
1 mg/ml	81.93 ± 3.51 **

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

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

Fig. 10. Effects of CP on proliferation rates of splenocyte *in vitro*

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

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

Table 9. Effects of CP on Serum Levels of IL-10 in ACD Mice

	IL-10 (pg/ml)
Normal	0.078 ± 0.008
Control	0.081 ± 0.012
CPS	0.078 ± 0.009
CPS+Adm	0.080 ± 0.005

Normal : naive group, Control : only ACD group, CPS : CP spread group, CPS+Adm : CP spread and administered group. Values are represented as mean ± SD. Normal group data were expressed as mean ± SD of 5 experiments. Control, CPS and CPS+Adm groups data were expressed as mean ± SD of 9 experiments.

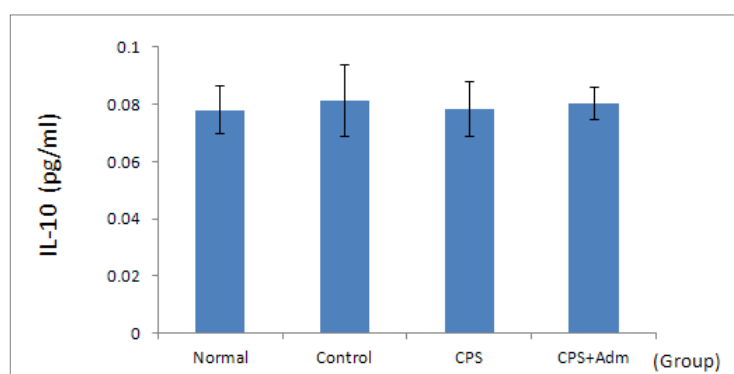


Fig. 11. Effects of CP on serum levels of IL-10 in ACD mice

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

Table 10. Effects of CP on Serum Levels of TNF- $\alpha$  in ACD Mice

	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
Normal	0.103 $\pm$ 0.003
Control	0.106 $\pm$ 0.018
CPS	0.103 $\pm$ 0.016
CPS+Adm	0.109 $\pm$ 0.012

Normal : naive group, Control : only ACD group, CPS : CP spread group, CPS+Adm : CP spread and administered group. Values are represented as mean  $\pm$  SD. Normal group data were expressed as mean  $\pm$  SD of 5 experiments. Control, CPS and CPS+Adm groups data were expressed as mean  $\pm$  SD of 9 experiments.

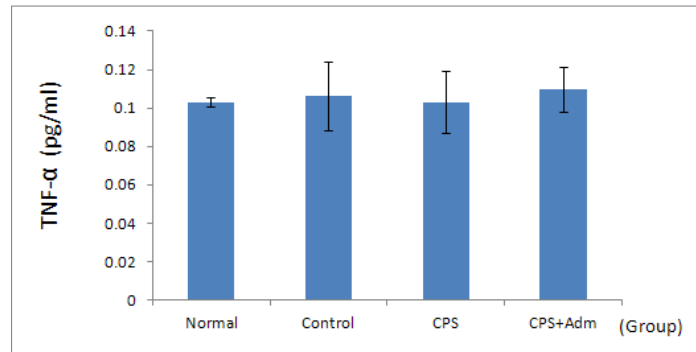


Fig. 12. Effects of CP on serum levels of TNF- $\alpha$  in ACD mice

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

감소되었다 (Table 8, Fig. 10).

### 11. 혈중 IL-10 함량에 미치는 영향

혈청을 분리하여 혈청 내 IL-10의 함량을 측정된 결과, 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 나타나지는 않았다 (Table 9, Fig. 11).

### 12. 혈중 TNF- $\alpha$ 함량에 미치는 영향

혈청 내 TNF- $\alpha$ 의 함량을 측정된 결과, 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 나타나지는 않았다 (Table 10, Fig. 12).

## IV. Discussion

현대 사회에 들어오면서 이전과는 다른 양상의 질환들이 증가하고 있다. 생활환경의 변화, 환경오염 물질의 급증과 함께 과민성 면역질환 또한 해마다 증가하여 심각한 문제로 대두되고 있다.

알레르기성 접촉피부염 (Allergic contact dermatitis, ACD)은 세포매개성 면역반응으로 외부 항원에 감작된

T 림프구에 의해 매개, 유지되는 습진성 피부질환이다. 습진은 표재성 피부염으로 조직학적으로 표피의 해면화를 동반하고, 진피에는 혈관 주변에 염증세포가 침윤되며 임상적으로는 홍반, 소양, 인설과 굳집된 구진, 수포를 보이는 피부질환 군을 말한다<sup>4)</sup>.

습진은 대부분 飮食不節로脾胃를傷하게되어 일어난다.脾가健運을失하여脾虛生濕,濕熱內蘊한데다風,濕,熱邪를感受하고,內因과外因이相搏하여腠理가閉塞되면서發病하는것이다.특히만성습진에 해당하는脾虛濕盛型의 경우에는병의경과가길고피부는거칠어지면서두터워지는증상이나타나는데,健脾燥濕,養血潤膚의治法을쓰게된다<sup>21)</sup>.선행연구를살펴보면소화기계처방에피부에작용하는약물을加味한內消和中湯加味方<sup>22)</sup>,加減平胃散<sup>23)</sup>,脾虛蘊濕方<sup>24)</sup> 등이濕性의피부염에효과가있었다.

山植 (*Crateagus pinnatifida*, CP)는味는酸甘하고,性은微溫하면서脾,胃,肝經에들어간다.消食健脾胃,行氣散瘀,驅條蟲의효능이있어肉積,痰飲,痞滿,吞酸,瀉痢,腸風,小兒乳食停滯,癥瘕,產後兒枕痛,惡露不盡,腰痛,疝氣 등을치료한다<sup>9)</sup>.또한強心,血壓降下,冠狀動脈擴張作用이있으므로高脂血症,粥狀動脈硬化證 등에응용한다<sup>25)</sup>.《本草求真》<sup>6)</sup>에“痘瘡不

起, 方能以發”라 하여 痘瘡이 용이하게 透出되지 않을 경우 發疹시키는 효능이 있어 피부질환에 활용할 수 있다. CP에 대한 연구로는 혈관 이완 작용<sup>7-10</sup>, 고지혈 증<sup>11,12</sup>과 간 손상<sup>12,13</sup>에 대한 보호 효과, 기억력 개선 및 치매의 치료<sup>14</sup> 등에 관한 다양한 보고가 있으며, 항산화 효과에 대한 여러 연구<sup>10,15,16</sup>가 있다. 《新修本草》에 “洗頭及身上瘡瘍”이라 하여 CP가 피부 질환에 외용약으로도 사용되어 왔음을 알 수 있다<sup>26</sup>.

ACD를 일으키는 알레르겐은 대부분 화학물질이며 그 자체는 불안정한 항원으로 hapten이라 한다. 본 실험에서 사용한 DNCB 역시 대표적인 hapten이며 옷나무의 pentadecylcatechol, 은행의 ginkgolic acid, 니켈, 크롬뿐만 아니라 화장품의 방향성 화합물이나 머리 염색약 등도 항원으로 작용한다. 이 hapten은 표피에 들어와 운반 단백질과 결합하여 완전한 항원이 된 다음, 랑게르한스 세포와 접촉하게 되고 국소 림프절로 이동하여 T 림프구에 항원을 제공하게 된다. 특정 항원에 감작된 사람이 동일 항원에 재차 노출되면 대개 48시간 이내에 과민반응이 일어난다. 항원제공세포와 만난 T 림프구는 활성화되면서 항원 특이 T 림프구의 클론성 증식으로 숫자가 급격히 늘어나고 각종 cytokine을 분비한다<sup>27</sup>.

이 과정에서 cytokine은 상호간에 네트워크를 형성하여 ACD를 유발하고 염증반응을 촉진시키는 cytokine과 반대로 염증반응을 완화시켜주는 cytokine 간에 균형을 유지하는 것으로 알려져 있다<sup>4</sup>.

서양의학의 ACD의 치료제로는 항히스타민제와 스테로이드제가 사용되고 있다. 항히스타민제는 염증 완화작용은 뛰어나지만 일시적이며 중추신경계를 자극하는 부작용이 있고, 스테로이드제는 소염과 면역억제 작용을 하나 장기간 투여할 경우 월경불순, 여드름, 고혈압, 당뇨병, 소화성 궤양, 골다공증 등의 부작용을 일으킬 수 있다<sup>28</sup>.

한의학적으로 ACD는 漆瘡, 馬桶癬, 膏藥風, 狐尿刺 등의 범주에 속하며, 皮毛膜理가 緻密하지 못한 상태에서 風, 濕, 熱, 蟲이나 有毒한 물질에 접촉되어 발생하는 것으로 보았다<sup>18</sup>. 그리하여 內治法으로는 급성기의 경우에 清熱解毒, 祛風, 利濕, 涼血이 위주가 되고, 만성기에는 祛風, 養血을 위주로 한다. 外治法으로는 급성기에 清熱燥濕, 만성기에 活血養血하는 약물을 多用하였다<sup>29</sup>.

최근의 연구에서 ACD의 치료에 사용된 한약제<sup>30-33</sup>나 처방<sup>34-37</sup>을 살펴보면 주로 清熱, 涼血, 解毒, 消風

등에 치중되었다. 이에 만성적인 경과를 보이며 염증 반응과 함께 각화, 낙설의 증상을 보이는 ACD에 있어 健脾시키면서 活血祛瘀하여 능히 發疹시킬 수 있는 CP가 치료에 효과가 있을 것이라는 가설 하에 연구를 진행하였다.

이를 위해 DNCB를 이용하여 알레르기성 접촉피부염을 유발한 생쥐에 CP를 도포한 군, 도포와 경구 투여를 병행한 군으로 나누어 실험하였다.

3주간의 체중 변화를 관찰한 결과 정상군을 제외한 나머지 군들에서 체중이 감소하는 경향이 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. 이는 ACD의 증상 발현과 함께 나타나는 일반적인 체중 감소로 해석되며 CP의 도포나 경구 투여가 체중에 큰 영향을 미치지 않았다 (Table 1, Fig. 1).

ACD가 발현하는 국소 부위의 일차적인 반응으로 부종을 들 수 있는데, ACD 동물 모델은 귀의 부종뿐만 아니라 귀 피부 조직의 비후로 동일 면적 대비 귀 무게도 증가하는 경향이 있다. 이러한 증가 정도는 약물의 항염증 작용을 평가하는 척도로 여겨진다<sup>38</sup>.

귀 무게를 측정된 결과, 대조군에 비해 CPS군과 CPS + Adm군의 무게가 감소하였으나 유의한 차이는 없었다 (Table 3, Fig. 3). 생쥐의 귀 무게를 측정된 결과도 대조군에 비해 CPS군과 CPS + Adm군에서 얇아진 경향을 보였으나 유의한 차이는 없었다 (Table 4, Fig. 4).

등 피부에서는 두께뿐만 아니라 피부염 증상을 직접적으로 관찰하고, 조직병리학적으로도 평가하였다.

실험에서 반복되는 DNCB의 처리는 등 피부 두께의 증가를 유발하였고 CP는 이러한 증가를 효율적으로 억제하였다. 대조군에 비해 CPS군에서도 감소를 확인할 수 있었지만 CPS + Adm군에서 유의하였다 ( $P < 0.01$ ) (Table 5, Fig. 5). CP의 도포보다 도포와 경구투여를 병행한 군이 더 효과가 있음을 짐작할 수 있다.

등 피부를 관찰한 결과, CP의 처리는 홍반, 낙설, 각화 등의 피부염 증상을 현저하게 감소시켰다. 제모만을 시행한 정상군의 등 피부에서는 특별한 변화를 관찰할 수 없었고, ACD를 유발한 대조군의 등 피부에서는 피부 홍반, 낙설 등 중등도 이상의 증상이 관찰되었다. CP를 처리한 군에서는 이러한 증상이 감소되었으며, CPS군보다 CPS + Adm군에서 더 효과가 좋았다 (Fig. 6). 이러한 결과를 5점 척도를 활용하여 수치로 나타낸 결과도 대조군에 비해 CPS군과 CPS + Adm군에서 모두 유의한 수준 ( $P < 0.01$ )으로 ACD의 증상 정도가 감소함이 관찰되었다 (Table 6, Fig. 7). 이는 CP가

직접적으로 ACD의 피부 증상을 개선할 수 있음을 시사한다.

ACD가 발생한 조직의 특징적인 변화는 해면화 및 부종, 염증 관련 세포의 침윤 등이라고 할 수 있다<sup>39)</sup>. 정상군의 피부 조직은 이상 소견이 발견되지 않은 반면, 등 부위에 ACD를 유발한 생쥐에서 H&E 염색을 한 대조군의 피부는 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, 백혈구의 침윤도 관찰되었다. CP를 처리한 군에서는 대조군에 비하여 epidermis와 dermis의 두께가 감소하는 양상을 보이기 시작했으며, 백혈구의 침윤도 현저히 감소하여 부종이 거의 발생하지 않은 것을 확인할 수 있는데, CPS군보다 CPS + Adm군에서 더 나은 예후가 관찰되었다 (Fig. 8). 이러한 결과는 피부 증상의 육안적 관찰 소견과 일치하며 CP의 ACD에 대한 치료 효과를 입증한다. 또한 CP의 도포만을 시행하는 것보다 경구투여를 병행하는 것이 더욱 효과가 있다는 것을 확인하였다.

비장은 혈액 순환계 내의 가장 큰 말초 림프조직으로, T 림프구와 B 림프구가 항원제공세포와 접촉하여 성숙하고 기능을 수행하는 장소로서 중요하다<sup>27)</sup>. 비장의 내부 조직은 백색속질과 적색속질로 나누어진다. 백색속질은 혈질세포, 림프구, 비장의 여포라 불리는 림프성 결절과 같은 전형적인 림프성 요소들을 포함하고 있어 혈류 속의 미생물 및 다른 항원들에 반응한다. 적색속질은 혈액으로 가득 차 있는 도관들의 그물망으로 손상되거나 오래된 적혈구를 제거한다. 적색속질과 백색속질에 존재하는 식세포들은 혈액 속의 이물질을 제거하고 면역반응을 일으켜서 항체를 만들어내는데 도움을 준다<sup>40)</sup>. 비장 종대는 염증성 변화, 림프세망내피 과형성, 울혈성, 비정상 세포 또는 물질의 침윤 등 다양한 원인에 의해 일어나는데, 일반적으로 면역기능이 증가되는 경우에 관찰할 수 있다<sup>41)</sup>.

모든 실험을 마친 후 비장을 적출하여 대조군과 비교한 결과, CPS군과 CPS + Adm군에서는 유의하게 비장 무게가 줄었다. 이는 CP의 도포 및 경구투여가 ACD 유발과정에서 발생하는 면역반응을 효율적으로 억제했기 때문으로 생각된다 (Table 2, Fig. 2).

림프구가 밀집되어 있는 비장의 크기 및 세포 수는 면역반응과 밀접한 관련이 있으므로 면역증진을 관찰하기 위한 지표로 비장세포 증식능을 평가한다<sup>2)</sup>. 표 등<sup>3)</sup>은 Mancozeb에 노출될 경우 비장세포수와 LPS에 의한 비장세포 증식이 감소되어 면역계를 억제하는 영향을 미칠 수 있음을 연구하였다.

본 실험에서는 CP가 비장세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 B 림프구 분열촉진인자인 LPS를 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 흡광도를 측정하였다. 측정값은 LPS(-) normal군을 기준하여 백분율로 표시하였다. LPS를 처리하지 않은 LPS(-)와 LPS를 처리한 LPS(+) 모두에서 대조군에 비해 CPS군과 CPS + Adm군이 통계적으로 유의하게 비장세포의 증식율이 낮아진 것을 확인할 수 있었다 ( $P < 0.01$ ) (Table 7, Fig. 9).

또한 정상 생쥐의 비장 세포에 LPS를 처리하고 CP의 농도에 따른 증식율 변화를 관찰한 결과, 농도가 증가됨에 따라 증식율이 감소하는 경향을 보였다. 특히, 0.5 mg/ml ( $P < 0.05$ )과 1 mg/ml ( $P < 0.01$ )에서 유의한 수준의 비장세포 증식율 감소가 관찰되었다 (Table 8, Fig. 10). 이처럼 *in vivo*와 *in vitro* 모두에서 유의하게 비장세포 증식율이 감소하였는데 ACD의 치료에 있어서 중요한 면역반응 억제에 CP가 비장에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

TNF- $\alpha$ 는 염증 반응을 일으키는 중요한 cytokine으로 급성 반응 단백질 유전자를 자극하여 단백을 생산하고 혈구성장인자들을 자극하여 염증세포들을 활성화한다<sup>27)</sup>. IL-10은 ACD의 다른 cytokine과 달리 IFN의 생성이나 항원표출을 막고 TNF 등을 만드는 대식세포의 생성을 억제하여 염증 반응을 줄이는 중요한 역할을 한다<sup>42)</sup>.

본 실험에서 혈청 내 TNF- $\alpha$  (Table 10, Fig. 12)와 IL-10 (Table 9, Fig. 11)의 함량을 측정하였으나 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 나타나지는 않았다. 이러한 결과는 CP가 면역 반응을 억제하고 염증을 완화시키는데 있어서 TNF- $\alpha$ 나 IL-10의 조절이 아닌 다른 기전으로 작용하고 있다는 것을 유추할 수 있다.

이상을 종합하면 산사는 알레르기성 접촉피부염에 효과가 있음을 확인하였으며, 도포만을 시행한 군보다 도포와 경구투여를 병행한 군에서 더욱 효과적이었다. 향후 알레르기성 접촉 피부염 환자의 처방 운용에 있어서 활용이 가능할 것으로 생각된다. 그러나 산사의 작용 기전에 있어서 TNF- $\alpha$ 나 IL-10와 같은 cytokine 양의 조절이 아닌 비장세포에 작용하여 면역반응을 억제하는 것으로 유추할 수 있으나 어떠한 기전으로 효과를 발휘하는지 밝히지 못하였기에 추후 이에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것이다.

## V. Conclusion

DNCB를 이용하여 알레르기성 접촉피부염을 유발한 생쥐에 산사를 도포한 군과 도포, 경구 투여를 병행한 군으로 나누어 실험하여 체중 변화, 비장과 귀의 무게, 귀와 등 피부의 두께, *in vivo*와 *in vitro* 상에서의 비장세포 증식율, 혈중 IL-10과 TNF- $\alpha$  함량, 등 피부 증상 및 조직병리학적 소견을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CPS 및 CPS + Adm군에서 비장 무게는 유의하게 감소되었다.
2. CPS + Adm군에서 등 피부 두께 증가는 유의성 있게 억제되었다.
3. CPS 및 CPS + Adm군에서 등 피부 증상 및 조직병리학적 소견이 호전되었다.
4. CPS 및 CPS + Adm군 모두 *in vivo* 상에서 비장세포 증식율이 유의하게 감소되었다.
5. CP의 농도가 증가함에 따라 *in vitro* 상에서 비장세포 증식율이 감소되었으며 0.5 mg/ml와 1 mg/ml의 농도에서 유의하게 감소되었다.
6. CPS 및 CPS + Adm군에서 혈중 IL-10과 TNF- $\alpha$  함량의 변화에는 유의성이 없었다.

## References

1. Janeway CA. Immunobiology 6th. Seoul: Lifescience. 2005:461.
2. Ryu HS, Kim J, Park SC, Kim HS. Enhancing effect of *Zingiber Officinale Roscoe* extracts on mouse spleen and macrophage cells activation. Korean J Nutr. 2004; 37(9):780-5.
3. Pyo MY, Cheong AH. Effects of subacute oral administration of mancozeb on the immunopathological parameters and splenocytes proliferation in mice. J Environ Toxicol. 2004;19(4):367-73.
4. Korean dermatological association. Dermatology 5th. Seoul: Ryomoongak. 2008:63-84, 165-70, 179-85.
5. Lee BW. Bonchojeongyo. Seoul: Iljoongsa. 2002:346-8.
6. Hwang KS. Bonchogujin. Seoul: Uiseongdang. 1993:202.
7. Chae JK, Kim GW, Shin HM. Crataegi Fructus-induced vascular relaxation through release of endothelial nitric oxide. Korean J Orient Physiol Pathol. 2003;17(1): 146-50.
8. Liou JL, Choi HJ, Kim GW, Shin HM. Vasorelaxation effect of butanol fraction of Crataegi Fructus due to LC20 dephosphorylation via increase of myosin phosphatase activity. Korean J Orient Physiol Pathol. 2003;17(2): 461-6.
9. Choi HJ, Shin DH, Kim GW, Shin HM. Vasodilatory effect of the fractions from Crataegus pinnatifida and isolation of the active component. Korean J Orient Physiol Pathol. 2003;17(5):1236-42.
10. Son CW, Chae JK, Kim GW, Shin HM. Effects of Crataegi Fructus on the vascular relaxation and anti-oxidative status. Korean J Orient Physiol Pathol. 2002; 16(1):67-71.
11. Kwon SH, Kim JB. Effects of Crataegii Fructus on the diet-induced hyperlipidemia in rats. Korean J Orient Physiol Pathol. 2010;24(1):67-73.
12. Seo BI. Preventive effects of water extracts from Crataegi Fructus on hyperlipiderma and liver damage induced by alcohol. Korea J Herbology. 2005;20(1):35-43.
13. Shin JH, Jo MJ, Park SM, Park SJ, Kim SC. Hepatoprotective activity of Crataegii Fructus water extract against cadmium-induced toxicity in rats. Korean J Orient Physiol Pathol. 2010;24(2):249-57.
14. Wang SB, Ahn EM, Jung JW. The fruits of Crataegus Pinnatifida Bunge ameliorates learning and memory impairments induced by scopolamine. Korea J Herbology. 2009;24(4):165-71.
15. Lim YM, Kim BR, Hong GY. Antioxidant effect of Crataegi Fructus extract on the oxidative stress of reactive oxygen species in cultured human skin fibroblast. Korean J Orient Physiol Pathol. 2008;22(1):115-9.
16. Kim KH, Lee SS, Baek JW, Lee SJ, Kim KH. Effect of Crataegii Fructus on antioxidant capacity in D-galactose induced aging rats. Korean J Orient Prev Med Soc. 2004; 8(2):65-80.
17. Yoon CY, Lee NG, Kim SH. Huangdi's internal classics plain questions. Daejeon: Joomin. 2004:531.
18. Oriental medicine university dermatology & surgery. Text of traditional korean dermatology & surgery. Busan: Sunwoo. 2007:65, 352, 536.

19. 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.
20. Kim PR, Ko SK, Pyo MY. Effects of hot water extract of chaga mushroom on the proliferation and cytokines production of mouse splenocytes in vitro. *Yakhak Hoeji.* 2010;54(3):187-92.
21. Ryu JY. Differentiation of syndromes and treatments in surgery & dermatology. Seoul: Seowandang. 1987:209-11.
22. Cho BG, Lee JY, Kim DG. A Clinical study on the treatment of atopic dermatitis using Naesowhajungtang-gamibang. *J Pediatr Korean Med.* 2005;19(1):131-41.
23. Park EH, Yun MY, Kim SB, Kim DH. Effects of GP extract on oxidative stress and contact dermatitis in NC/Nga mice induced by DNCB. *Daejeon university oriental medicine institute.* 2007;16(2):131-45.
24. Kim JH, Choi JJ, Koo YS, Roh SS, Kim DH. Suppression of DNCB-induced dermatitis in NC/Nga murine model by Biheoonsupbang. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2007;21(3):714-20.
25. Oriental medicine university herbology. *Herbology.* Seoul: Younglimsa. 2004:415.
26. Kim Jae Ik. Clinical herbology lecture. Seoul: Daesung. 2000:521.
27. Shin Tae Yong. Allergy and oriental medicine. Seoul: Shinil. 2001:3, 29, 139-47.
28. Jeong JY, Han KH. Common skin disease in korea. Seoul: MD world. 2009:37-48.
29. Jeon JH, Kim HA, Kang YH. A literature study on the external therapy of contact dermatitis. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 1998;11(1):197-218.
30. Kim SC, Lee JR, Choi KI, Park SJ, Kwon YK, Byun SH. Effect of Ionicerae flos-skin on contact hypersensitivity induced by repeat elicitation of DNCB. *Korea J herbology.* 2006;21(1):9-15.
31. Shin KS, Son JS, Kim DE, Jeon WJ, Jeong SH, Shin GJ, Lee WC. The effect of Rhemanniae radix extract on allergic contact dermatitis on mice induced by DNCB. *Herbal Formula Sci.* 2000;8(1):257-79.
32. 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 Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2011;24(3):1-16.
33. Jun JH, Kang YH. The effects of Scutellaria baicalensis GEORGI on allergic contact dermatitis induced by DNCB in mice. *Dongguk university oriental medicine institute.* 1998;7(1):119-33.
34. Kang YH, Kim JT, Kim SA. The effects of Hangryun-haedocktang on allergic contact dermatitis based on the morphological changes in epidermal damage in mice. *J Korean Orient Intern Med.* 2004;25(3):508-17.
35. 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):623-8.
36. Nam BS, Kim YB. The effects of Sanpunggosamhwan on the allergic contact dermatitis. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2005;18(2):10-27.
37. Bae EY, Kim DH. Effect of Geopungjeseupbang on contact dermatitis induced by DNCB. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2007;21(6):1491-8.
38. 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.* 2012;35(1):183-91.
39. 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.
40. Kim IS, Moon HJ. *Core immunology.* Seoul: Daihakseolim. 2010:24-5.
41. Jung IJ, Wang JH, Yun JW, Lee KW, Yeon SC, Lee HJ, Lee HC. Radiographic estimation of experimentally induced splenomegaly in dogs. *J Vet Clin.* 2006;23(3):263-6.
42. Kwon HH, Kim EJ, Kim IT, Park KH, Yang MG, Eom YB, Lee YJ, Lee JS, Jeong WB. *Clinical immunology.* Seoul: Koreamedicalbook. 2010:166.