

# 三子蔘柏湯이 알러지피부염 유발 NC/Nga 생쥐의 피부 병변 면역 관련 인자에 미치는 영향

장선영 · 한은희<sup>1</sup> · 정혜광<sup>1</sup> · 김동희\*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 조선대학교 약학대학

## Effects of SJSBT on Various Immunological Factors in Skin Related to Pathogenesis of Allergic Dermatitis in DNCB Treated NC/Nga Mice

Sun Young Jang, Eun Hee Han<sup>1</sup>, Hye Gwang Jeong<sup>1</sup>, Dong Hee Kim\*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University,  
1: Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

This study was investigated the anti-allergic effect of SJSBT on DNCB induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. We summerized as the follow. SJSBT significantly decreased the clinical manifestations of atopic dermatitis including itching, dryness, edema, hemorrhage, and lichenification in dose dependent manner. SJSBT markedly suppressed invasion and edema of leukocytes and mast cell in dorsal skin and ear tissue. SJSBT significantly reduced the number of CD11b+/Gr-1 cell compared with positive control, but it had no affect the number of CD3+ and CCR3+/CD3+ cell. SJSBT markedly suppressed the expression of cytokine and chemokine such as IL-6, TNF- $\alpha$ , eotaxin and CCR3 compared with positive control group. SJSBT significantly decreased the invasion of CD4+ and CCR3+ cell in ear and dorsal skin tissue compared with positive control group by using immunohistochemical staining. Taken together, these findings suggested that SJSBT has an anti-allergic activity and this might be useful for the clinical application to treat allergic diseases such as atopic dermatitis.

Key words : Atopic dermatitis, NC/Nga mice, SJSBT, Cytokine, Chemokine, Dorsal skin, Ear tissue.

### 서 론

아토피피부염은 만성·습진성 피부염으로 심한 소양감을 특징으로 하는 대표적인 알레르기성 질환이며, 전 인구의 약 10-20%를 차지하는 것으로 추정되고 있다<sup>1,2)</sup>.

최근 산업화에 따른 환경 공해 등에 의해 공기 매개성 알레르겐의 증가로 아토피피부염 유병율은 계속 증가 추세에 있다<sup>1,3)</sup>. 이는 유아나 소아에게 주로 발생하며 대부분 사춘기에 이르러 소실되는 임상 결과를 보이지만, 소수의 환자들은 성인기에 이르기까지 만성적인 피부염이 지속되어 사회 생활에 지장을 초래하기도 한다<sup>3,4)</sup>.

아직까지 아토피피부염의 기전은 완전히 밝혀지지 않았지만, 단순포진이나 종두증과 같은 바이러스 감염에 대한 취약성과 특정 미생물 항원에 대한 지연형 면역 반응의 감소, IgE의 생산

증가, 접촉 알레르겐에 대한 감수성 감소, 분열 촉진제와 항원에 대한 인과구의 반응 감소, 과립구와 단핵구의 화학주성 감소 등 여러 가지 면역학적인 이상 소견들이 보고되어 있다<sup>2,4)</sup>.

최근 아토피피부염의 치료는 국소적인 스테로이드제로 항히스타민제인 cyto- closporin A, tacrolimus가 사용되고 있으며, 면역 억제제로 pimecrolimus가 이용되고 있다<sup>5)</sup>. 그러나 스테로이드제는 장기간 투여할 경우 피부의 위축이나 소아 환자에서 성장 지연의 가능성 등의 여러 가지 부작용이 문제시 되고 있으며, 스테로이드를 함유하지 않는 pimecrolimus을 이용한 치료법은 소아 환자에 효과적인 요법이나 피부에 도포하였을 때 홍반, 가려움과 건조 피부, 부종과 혈종, 짓무름, 그리고 태선화 등의 부작용과 면역력의 약화가 단점이다<sup>6)</sup>. 따라서 이를 보완하기 위한 다양한 접근이 이루어지고 있으며, Th1 세포 Th2 세포의 불균형이 아토피피부염에 관여한다고 알려져 있어 이를 바탕으로 한 천연물에서의 새로운 치료법 개발이 중요한 관심사가 되고 있다.

한의학에서 아토피피부염은 肘窩, 膈窩 등에 등의 지체 관절

\* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용문동 96-3 대전대학교 한의과대학

· E-mail : djkim@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2623

· 접수 : 2007/09/29 · 채택 : 2007/10/12

내측 만곡처에 빈발한다는 점과 風邪에 의해 호발된다는 점에서 四彎風과 유사하며, 심한 癢癢, 結疔, 滲出 등의 병변이 동반된다는 점에서 浸淫瘡, 奶癬, 血風瘡 등과도 유사하다<sup>7,15)</sup>. 중국에서는 이를 過敏性 變應性皮膚病 중의 하나인 異位性皮炎으로 언급되고 있으며, 대부분 本虛表實證으로 病機를 인식하고 있다<sup>7,17)</sup>. 本虛는 주로 脾虛, 陰血不足을, 表實은 濕熱內蘊과 血毒을 주 요인으로 인식하고 있다. 특히 소양증이 주 증상이라는 점에서 風邪역시 주 요인으로 보고 있다.

따라서 최근 한의학 임상에서 활용되고 있는 아토피피부염 치료제 대부분은 상기 이론에 따라 초기 실증에 祛風清熱除濕 약물과 처방을 응용하는 경우가 많으며, 기존 실험 연구도 대부분 이들 약물을 중심으로 이루어졌다.

본 연구의 시료인 三子蓼柏湯 (SJSBT)은 蒼耳子, 蛇床子, 地膚子 등을 포함한 祛風除濕清熱 작용이 있는 8종의 약물이 배합된 처방으로, 癢癢症이 심하면서 심한 염증 소견이 보이는 급성기 피부 질환에 광범위하게 응용되는 처방이다. 구성 약물중 蒼耳子は “IC 세포에 대한 항알러지 효과”<sup>18)</sup>, “면역글로블린 E 생성억제 효과”<sup>19)</sup>가 보고된 바가 있고, 蛇床子<sup>20)</sup>는 “항염증작용”이 보고된 바가 있으며, 黃柏, 苦參, 大黃, 白鮮皮 등은 다양한 처방에 포함되어 피부염 관련 실험 및 임상에서 효능이 규명된 바가 있으나<sup>21-24)</sup>, 이들 약물로 구성된 三子蓼柏湯의 면역 조절작용을 통한 항아토피 효능은 실험적으로 검색된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 이미 임상에서 소양증에 광범위하게 활용되고 있는 三子蓼柏湯의 아토피피부염 억제 효과를 실험적으로 입증하고자, 이를 시료로 Nc/Nga mouse 알러지 염증 모델을 이용하여 피부에서의 임상 변화와 다양한 면역 관련 인자들의 변화를 검색하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약물

본 실험에 사용한 三子蓼柏湯 (SJSBT)의 구성 약재들은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. The compositions of SJSBT

| 韓藥名          | 生藥名                            | 用量 (g) |
|--------------|--------------------------------|--------|
| 蒼耳子          | <i>Xanthii Fructus</i>         | 8      |
| 蛇床子          | <i>Cnidii Fructus</i>          | 8      |
| 地膚子          | <i>Kochiae Fructus</i>         | 8      |
| 黃柏           | <i>Phellodendri Cortex</i>     | 8      |
| 白鮮皮          | <i>Dictamni Radicis Cortex</i> | 8      |
| 蒼朮           | <i>Atractylodis Rhizoma</i>    | 8      |
| 苦參           | <i>Sophorae Radix</i>          | 8      |
| 生大黃          | <i>Rhei Radix et Rhizoma</i>   | 4      |
| Total amount |                                | 60     |

#### 2) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 Diethyl pyrocarbonate (DEPC),

heparin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 3-4, 5-dimethylthiazol-2, 5-carboxy methoxyphenyl-2, 4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), ethyl ether, collagenase, RNazol<sup>B</sup>, chloroform (CHCl<sub>3</sub>), paraformaldehyde, 2-propanol, ACK, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), antibody biotin-conjugated, antibody Avidin-HRP conjugated, antibody biotin-IgE conjugated, TMB, EtOH, magnesium chloride (MKPJSTI<sub>2</sub>), citrate buffer, Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> 등은 Sigma 사 (U.S.A) 제품을, CsA (cyclosporin A)는 중외제약 제품을, 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, U.S.A) 제품을, DMED은 Gibco 사 (Gaithersburg, MD, U.S.A) 제품을, rat anti-mouse CD4 mAb (RM4-5; PharMingen, San Diego, CA), rat anti-mouse CCR3 mAb (53-6.7; Becton Dickinson, Mountain View, CA), SYBR Green PCR Master mix (ABI), RNase inhibitor, PE-anti-CD3e, PE-anti-CCR3, PE-anti-CD11b+, PE-anti-Gr-1의 RNase는 Pharmingen사 (Torreyana, U.S.A.) 제품을, LSAB kit (ScyTek, USA), PE-conjugated goat anti-rat IgG (PharMingen), Tris-buffered saline, Tween 20 (TBST; Dako, Carpinteria, CA), mouse IL-6 TNF-α, eotaxin, CCR3는 R & D system사 (U.S.A), 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

#### 3) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), microwave oven (LG, Korea), rotary vacuum evaporator, vacuum pump (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Co., Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Co., Japan), micro-pipet (Gilson, Co., France), enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, USA), water bath (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line, Co., U.S.A), vortex mixer, microwave oven, heating block (Vision scientific Co., Korea), enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Biosource, USA), spectrophotometer (Shimadzu, Co., Japan), centrifuge (한일, Korea), deep-freezer (Sanyo, Co., Japan), plate shaker (Lab-Line, U.S.A), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), flow cytometer (Becton Dickinson, U.S.A), Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA), probe-on plus slide (Fisher Scientific, U.S.A), 형광위상차현미경 (contrast fluorescence microscope, Nikon, Japan) 등을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 시료 추출

三子蓼柏湯 (SJSBT) 4첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여, 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하였다. 농축액을 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 16.0 g을 냉동

보관 (-80℃) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 피부염 유도 및 시료처리

11주령이 된 NC/Nga 생쥐의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후 제모가 끝나면 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 그리고 1% DNCB 용액 (아세톤:올리브오일=3:1) 200 μl를 등 부위에 도포하였고, 4일 후, 1주일에 2~3번씩 0.2% DNCB 용액 150 μl를 등 부위에 도포하였다(12주부터 16주). 4주 처리한 다음 피부염이 충분히 유발되어 등 부위의 가피가 모두 벗겨지고, 이 부위에 새로운 피부염이 형성되면서 긁는 행동이 심화되면 DNCB 처리를 중단하고, 관능 평가를 실시하였다.

3) 관능평가

NC/Nga 생쥐의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하였다. 육안평가 결과는 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타내었다. 평가 항목은 홍반 (Erythema), 가려움과 건조피부 (Pruritus & Dry Skin), 부종과 혈종 (Edema & escoriation), 짓무름 (Erosion), 그리고 태선화 (Lichenification)로 나누었다. 이 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점하였다. 따라서 최소 0점에서, 최고 15점 사이의 점수를 얻을 수 있다. 일반적으로 DNCB를 이용해 피부염을 유발할 경우, 약 12-13 점이면 피부염이 최고조에 달했다고 판단하였다.

4) 약물 처리 및 치료 평가

피부염이 유발된 생쥐를 2개의 그룹으로 나누고, 대조군에는 생리식염수를, 실험군에는 SJSBT를 6.7 mg/25 g/day의 농도로 8주간 (12주에서 20주까지) 경구 투여하였다. 그리고 약물 처리 4주 간격으로, 관능 평가를 실시한 다음 혈액을 취하고 등 부위의 피부를 절제하여 10% 포르말린 용액에 담아 보관하였다.

5) 피부 (dorsal skin)의 총세포수 측정

NC/Nga 생쥐에 DNCB를 이용하여 8주간 유발시키고, 실험군에는 SJSBT를 6.7 mg/25 g/day의 농도를 8주간 투여하여 실험을 종료하고, 실험 동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 배부의 일정량 피부 조직을 분리하여 총 면역세포수를 측정하였다.

6) 피부 조직에서 형광유세포 분석

16주 후 실험을 종료한 후 DNCB로 유발된 NC/Nga 생쥐에 배부의 일정량 피부 조직을 잘게 chopping한 후 collagenase 1mg/ml (in 2% FBS + RPMI1640)을 넣고 37℃ shaker (180 rpm, 20min) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이들 세포들을 ACK 용액 (8.3 g NH<sub>4</sub>Cl, 1 g KHCO<sub>3</sub>, in 1 L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 측정된 피부 조직 침윤세포를 5 × 10<sup>5</sup> 세포로 조정한 후 4℃에서 면역형광염색 (Immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 PE-anti-CD3e, PE-anti-CCR3, PE-anti-CD11b+, PE-anti-Gr-1을 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰으며, 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세하였다. 이를 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램에 이용하여 CD3, CCR3+, CD11b+/Gr-1 세포수를 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적

용하여 각 조직에서의 절대세포수 (Absolute number)를 산출하였다.

7) Quantitative real-time-PCR 측정

(1) Dorsal skin 조직에서 RNA 분리

NC/Nga 생쥐의 배부 피부 조직을 떼어내어 피부 조직 (0.1 g)과 RNAzolB 500 μl를 넣고 용해될 때까지 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl<sub>3</sub>) 50 μl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고, 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μl의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μg을 DNase I (10 U/μl) 2 U/tube를 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μl 10 mM dNTPs mix, 1 μl random sequence hexanucleotides (25 pmole/25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor (20 U/μl), 1 μl 100 mM DIT, 4.5 μl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 μl의 M-MLV RT (200 U/μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl가 되도록 하였다. 이 20 μl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37℃ heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 이를 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(3) Real Time Quantitative RT-PCR22

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다.

|  |             |                                |
|--|-------------|--------------------------------|
| Mouse IL-6                                       | sence       | 5' tccagttgcctctctggac 3'      |
|  | anti- sence | 5' gtgtaattaagcctccgacttg 3'   |
| Mouse CCR3                                       | sence       | 5' ttcaaatgagattgttgggaaat 3'  |
|  | anti- sence | 5' accgatacagtagctacagta 3'    |
| Mouse TNF-alpha                                  | sence       | 5' tgggaggaaaggggictaag 3'     |
|  | anti- sence | 5' acctacgacgtgggctacag 3'     |
| mouse Eotaxin 2                                  | sence       | 5' tcaagtggcatagatgtggaagaa 3' |
|  | anti- sence | 5' tggctctgaggattttcag 3'      |
| glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) | sence       | 5' tgcgctctagaaaaacctgccaa 3'  |
|  | anti- sence | 5' gcccccaggctcaagggtg 3'      |

염증 사이토카인 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard를 G3PDH를 사용하였고, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은: pre-denaturation은 2 min at 50℃, 10 min 94℃, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95℃, 1 min at 60℃에서 수행하였다. SJSBT 투여군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 target group의 Quantitative PCR

$y = x(1+e)^n$      $x =$  starting quantity  
 $y =$  yield         $n =$  number of cycles  
 $e =$  efficiency 로 계산하여 RQ (relative quantitative)을 측정하였다.

8) 조직 검사

실험 종료 후에, 왼쪽 귀 (ear) 끝부분, 림프절(DLN)과 배부 피부를 떼어내어 10% paraformaldehyde에서 24 h 동안 포르말린에 고정하였다. 그 조직을 파라핀으로 포매하였고 5 µm 부분의 두께로 block을 만들었다. 조직 부분은 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils/eosinophil 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline/eosin (H&E) 염색과 비만세포 (mast cells)를 염색하는 toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤을 관찰하였다.

9) 면역화학조직염색 (Immunohistochemical stainings)

모든 NC/Nga 생쥐는 연령의 16 주에서의 면역화학조직염색을 왼쪽 귀 (ear) 끝부분, 림프절과 배부 복부부의 피부를 적출하여 10% 포르말린 용액에 고정한 후 파라핀 블록을 만든 후 rat anti-mouse CD4 mAb (RM4-5; PharMingen, San Diego, CA),와 rat anti-mouse CCR3 mAb (53-6.7; Becton Dickinson, Mountain View, CA) 단일항체를 사용하였다. 조직 절편을 4 µm 두께로 세절한 후 probe-on plus slide (Fisher Scientific, USA)에 부착시켜 건조시켰다. 그리고 탈파라핀 (Deparaffinized) 후 함수시키고 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)를 이용해 microwave oven에 15분간 전처리 하였다. 조직내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 10분간 처리한 후, 조직내의 항원과 비특이적 단백질결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시켰다. 그리고 일차 단일항체에 1시간 동안 부착시킨 다음 완충액으로 수세하였다. LSAB kit (ScyTek, USA)를 이용하여 PE-conjugated goat anti-rat IgG (PharMingen)에 30분간 반응시켰다. 3회 Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST; Dako, Carpinteria, CA) 용액으로 수세한 후 잘 건조하였다. 현미경은 형광위상차현미경(contrast fluoroseince microscope, Nikon, Japan)을 사용하여 x100 배율로 관찰하였다.

10) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석법을 이용하여 결정하였다.

결 과

1. NC/Nga 생쥐에서의 임상 지수

DNCB를 제모한 피부에 도포하여 피부염을 유발한 후, 대조군에는 생리식염수를, 실험군에는 SJSBT를 매일 6.7 mg/25 g/day의 농도로 경구 투여하여 피부염 지수를 측정하였다. Fig. 1A는 8 주령이 된 NC/Nga 생쥐의 등 부위를 깨끗하게 제모한 사진이며, Fig. 1B는 제모한 후 DNCB 용액을 1주간 도포한 후 사진으로, 가피가 모두 벗겨지고 피부 염증이 나타나기 시작하였다. Fig. 1C는 DNCB를 4주간 도포한 결과로 피부염과 긁는 행동이 심화되었다. 이에 반해 SJSBT를 8주부터 12주간 경구 투여한 실험군

(Fig. 1D)은 대조군에 비하여 긁는 행동이 상대적으로 감소하였으며, 4주마다 피부염의 심화 정도를 실험 방법에 난 방법에 따라 측정 한 결과, 정상군은 0.3±0.33, 대조군은 11.7±0.33, CsA 투여군은 4.3±0.3, SJSBT 투여군은 6.0±0.58으로 아토피피부염에서 나타날 수 있는 소양, 건조, 부종, 혈종, 짓무름, 태선화 등의 증상이 대조군에 비하여 유의적으로 (\*\*\*) 줄어들었다(Fig. 2).

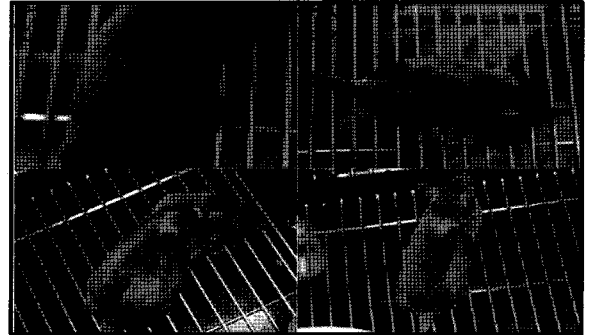


Fig. 1. Comparison of skin manifestation in NC/Nga mice between control and experimental group. Atopic dermatitis was induced by DNCB treatment in the dorsal skin. A: before the treatment of DNCB, B: DNCB treatment for 1 weeks, C: DNCB treatment for 4 weeks, D: DNCB treatment for 4 weeks with oral administration of SJSBT.

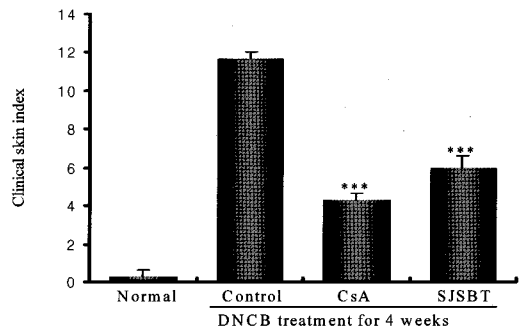


Fig. 2. Effects of SJSBT on clinical skin features and severity in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. Clinical skin index of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe) for each of five signs and symptoms (itch, erythema/hemorrhage, edema, excoriation/erosion and scaling /dryness). Symptoms were evaluated by skin dryness, eruption and wound on the three parts of the body: ear, face and head, and back. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT mice group by t-test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

2. 피부 조직에 미치는 영향

실험 종료 후 배부 피부와 귀의 일부를 절단한 후 H&E 염색과 toluidine 염색을 하여 관찰하였다. 귀의 조직 염색에서도 피부에서의와 같이 SJSBT 투여군 (Fig. 3D)에서 백혈구와 비만세포의 침윤이 현저히 감소된 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3). H&E 염색을 한 대조군의 피부는 epidermis와 dermis가 부종으로 현저하게 확장되었고, 백혈구의 침윤도 관찰된 반면 SJSBT 투여군 (Fig. 4D)에서는 대조군에 비하여 조직의 부종과 백혈구의 침윤이 현저히 감소하였다. 비만세포 (mast cell)를 염색하는 toluidine 염색에서도 대조군 (Fig. 5B)은 dermis 주변에 비만세포 (화살표)가 많이 침윤된 것을 알 수 있다. 그러나 SJSBT 투여군 (Fig. 4D)에서는 대조군에 비하여 비만세포 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

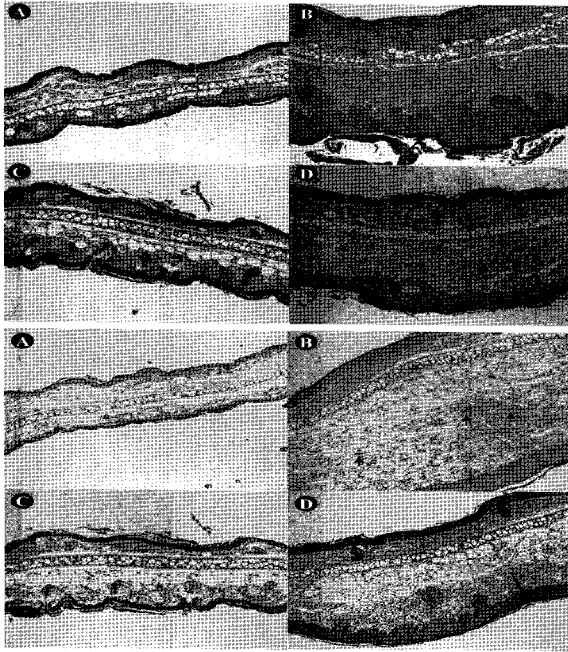


Fig. 3. Histologic examination of ear lesion in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. The animals were administrated with saline (control) or SJSBT (6.7 mg/25 g/day) for 8 weeks. Ear biopsy was stained with hematoxylin and eosin (H&E) and toluidine blue (A: normal, B: control, C: CsA, D: SJSBT) for examining inflammatory cells and mast cell (B, arrow), respectively. Bright microscopy (Nikon, Japan, original magnification, x100).

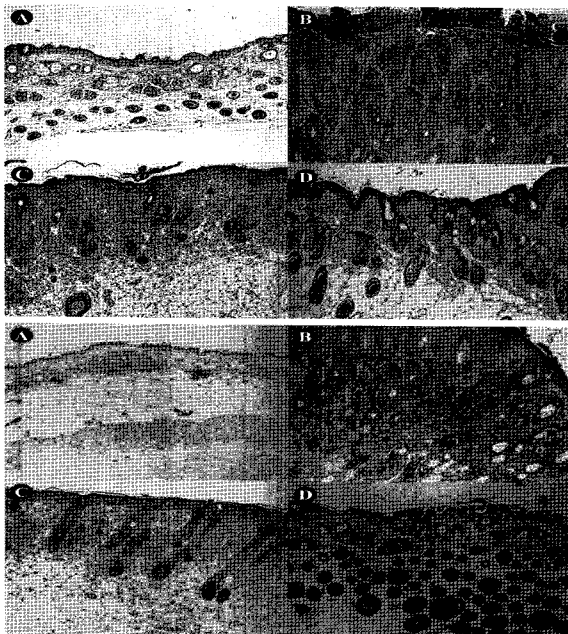


Fig. 4. Histologic examination of skin lesion in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. The animals were administrated with saline (control) or SJSBT (6.7 mg/25 g/day) for 8 weeks. Skin biopsy was stained with hematoxylin and eosin (H&E) (A: normal, B: control, C: CsA, D: SJSBT) and toluidine blue for examining inflammatory cells and mast cell (B, arrow), respectively. Bright microscopy (Nikon, Japan, original magnification, x100).

### 3. 배부(背部) 피부에서의 총 면역세포 수 변화

NC/Nga 생쥐에 8주간 SJSBT (6.7 mg/25 g/day)을 경구 투여한 후 배부 피부에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, 정상군은  $5.85 \pm 1.65$  ( $\times 10^5$ /g), 대조군은  $11.85 \pm 0.75$  ( $\times 10^5$ /g), CsA 투여

군은  $5.65 \pm 0.25$  ( $\times 10^5$ /g), SJSBT 투여군은  $11.85 \pm 0.31$  ( $\times 10^5$ /g)로 나타났다(Table 2, Fig. 5).

Table 2. Total Cell Number of Skin in DNCB-induced NC/Nga Mice

|                   | Sample  | ( $\times 10^5$ /g)   |
|-------------------|---------|-----------------------|
| Total cell number | Normal  | $5.85 \pm 1.65$       |
|                   | Control | $11.85 \pm 0.75$      |
|                   | CsA     | $5.65 \pm 0.25^{***}$ |
|                   | SJSBT   | $11.85 \pm 0.31$      |

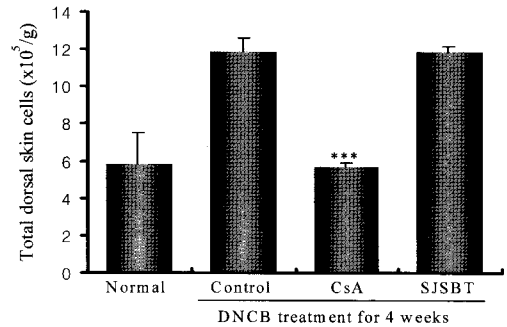


Fig. 5. Effect of SJSBT extract on total cell number of skin in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of SJSBT (6.7 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, dorsal skin ( $\times 10^5$ /g) were removed and total cell absolute number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean $\pm$ SE. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT (control) mice group data by T test.

### 4. 배부 피부내 면역 세포수 변화

#### 1) CD3+ 세포 수

Skin에서의 CD3+ 세포 수는 정상군이  $5.1 \pm 1.1$  ( $\times 10^4$ ), 대조군이  $6.8 \pm 0.9$  ( $\times 10^4$ ), CsA 투여군이  $8.2 \pm 1.2$  ( $\times 10^4$ ), SJSBT 투여군이  $6.6 \pm 1.4$  ( $\times 10^4$ )로 나타났다(Table 3, Fig. 6).

Table 3. Effect of SJSBT Extract on CD3+ Absolute Cell Number of Skin in DNCB-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

|                         | Normal        | Control       | CsA           | SJSBT         |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| CD3e+ ( $\times 10^4$ ) | $5.1 \pm 1.1$ | $6.8 \pm 0.9$ | $8.2 \pm 1.2$ | $6.6 \pm 1.4$ |

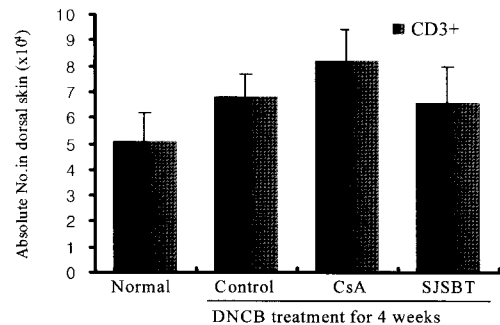


Fig. 6. Effect of SJSBT extract on CD3+ absolute cell number of skin in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of SJSBT (6.7 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice skin ( $\times 10^4$ ) were removed and CD3+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean $\pm$ SE. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT (control) mice group data by T test.

2) CCR3+/CD3+ 세포 수

피부에서의 CCR3+/CD3+ 세포 수는 정상군이 7±1.8 (x10<sup>4</sup>), 대조군이 17.2±2.8 (x10<sup>4</sup>), CsA 투여군이 8.2±2.3 (x10<sup>4</sup>), SJSBT 투여군이 20.3±1.3 (x10<sup>4</sup>)로 나타났다(Table 4, Fig. 7).

Table 4. Effect of SJSBT Extract on CCR3+/CD3+ Absolute Cell Number of Skin in DNCB-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

|                                 | Normal  | Control  | CsA       | SJSBT    |
|---------------------------------|---------|----------|-----------|----------|
| CCR3+ /CD3+ (x10 <sup>4</sup> ) | 7.0±1.8 | 17.2±2.8 | 8.2±2.3** | 20.3±1.3 |

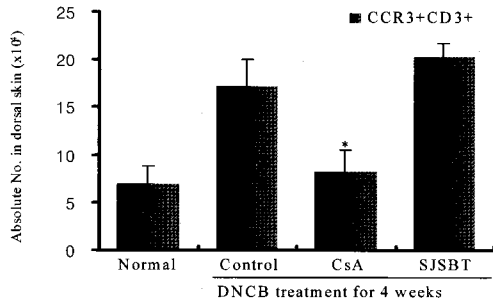


Fig. 7. Effect of SJSBT extract on CCR3+/CD3+ absolute cell number of skin in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of SJSBT (6.7 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice skin (x10<sup>4</sup>) were removed and CCR3+/CD3+ absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean±SE. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT (control) mice group data by test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

3) CD11b+/Gr-1 세포 수

피부에서의 CD11b+/Gr-1 세포 수는 정상군이 1.7±1.6 (x10<sup>4</sup>), 대조군이 8.6±0.5 (x10<sup>4</sup>), CsA 투여군이 1.2±0.8 (x10<sup>4</sup>), SJSBT 투여군이 2.6±0.9 (x10<sup>4</sup>)로 나타나, CsA 투여군과 SJSBT 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*\*p<0.001, \*\*\*p<0.001) 감소 효과를 나타내었다(Table 5, Fig. 8).

Table 5. Effect of SJSBT Extract on CD11b+/Gr-1 Absolute Cell Number of Skin in DNCB-induced Dermatitis Model of NC/Nga Mice

|                                   | Normal  | Control | CsA        | SJSBT      |
|-----------------------------------|---------|---------|------------|------------|
| CD11b+ /Gr-1+ (x10 <sup>4</sup> ) | 1.7±1.6 | 8.6±0.5 | 1.2±0.8*** | 2.6±0.9*** |

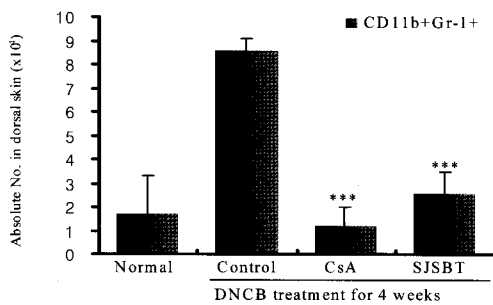


Fig. 8. Effect of SJSBT extract on CD11b+/Gr-1 absolute cell number of skin in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. NC/Nga mice model followed by the administration of SJSBT (6.7 mg/25 g/day) for 8 weeks. At the end of the experiment, the mice skin (x10<sup>4</sup>) were removed and CD11b+/Gr-1 absolute cell number were measured by analyzed by flow cytometer. Each point represents the mean±SE. Statistically significant value compared with NC/Nga-CT (control) mice group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

5. 사이토카인 생성량 변화

1) IL-6 mRNA 생성량

배부 피부에서의 IL-6 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1 일때, CsA 투여군은 0.572, SJSBT 투여군은 0.669로 나타났다(Fig. 9).

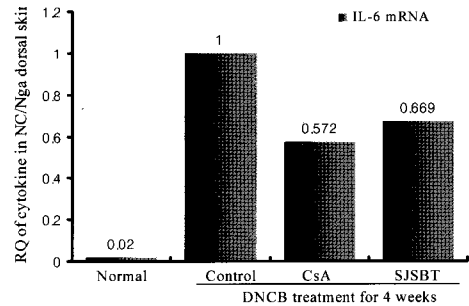


Fig. 9. Effect of SJSBT extract on the IL-6 mRNA levels of cytokine in the skin of DNCB-induced NC/Nga Mice

2) TNF-α mRNA 생성량

배부 피부에서의 TNF-α mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1 일때, CsA 투여군은 0.245, SJSBT 투여군은 0.625로 나타났다(Fig. 10).

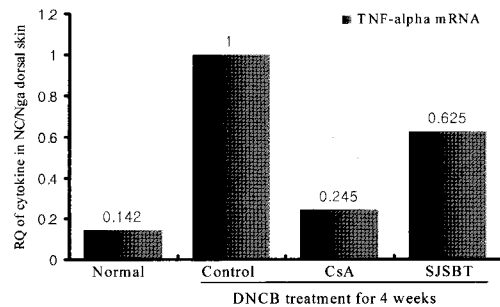


Fig. 10. Effect of SJSBT extract on the TNF-α mRNA levels of cytokine in the skin of DNCB-induced NC/Nga Mice.

3) Eotaxin 2 mRNA 생성량

배부 피부에서의 Eotaxin 2 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1 일때, CsA 투여군은 0.338, SJSBT 투여군은 0.348로 나타났다(Fig. 11).

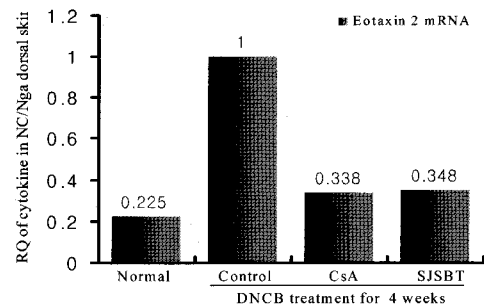


Fig. 11. Effect of SJSBT extract on the Eotaxin 2 mRNA levels of cytokine in the skin of DNCB-induced NC/Nga Mice.

4) CCR3 mRNA 생성량

배부 피부에서의 CCR3 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값이 1 일때, CsA 투여군은 0.684, SJSBT 투여군은 0.798로 나타났다(Fig. 12).

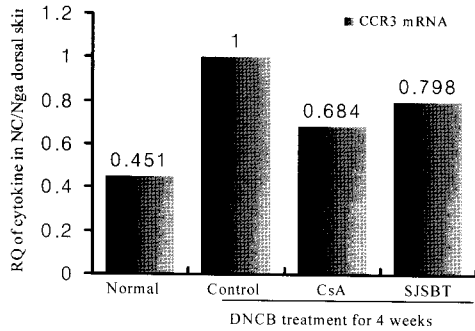
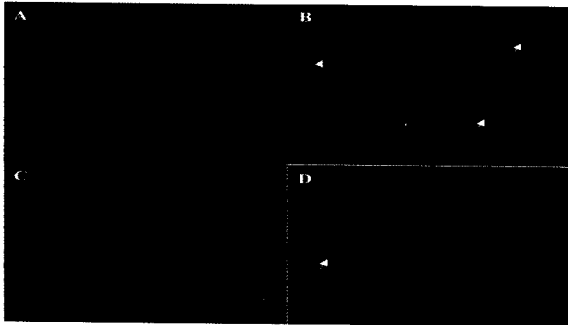


Fig. 12. Effect of SJSBT extract on the CCR3 mRNA levels of cytokine in the skin of DNCB-induced NC/Nga Mice.

6. 조직(귀, 배부)내의 면역세포 변화

면역 조직 화학 염색을 하여 귀 조직 (Fig. 13)과 배부 조직 (Fig. 14)에서 CD4+와 CCR3+ 세포를 분석한 결과, CD4+ 세포 염색을 한 대조군 (Fig. 13, 14B)은 CD4+ Th 세포가 등 피부 조직에 침윤되어 관찰된 반면, SJSBT 투여군 (Fig. 13, 14D)에서는 대조군에 비하여 CD4+ Th 세포가 거의 관찰되지 않았다. CCR3+ 세포 염색에서도 역시 대조군 (Fig. 13, 14B)에 비하여 CCR3+ 세포 발현이 현저하게 줄어든 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 13, 14D).

CD4



CCR3

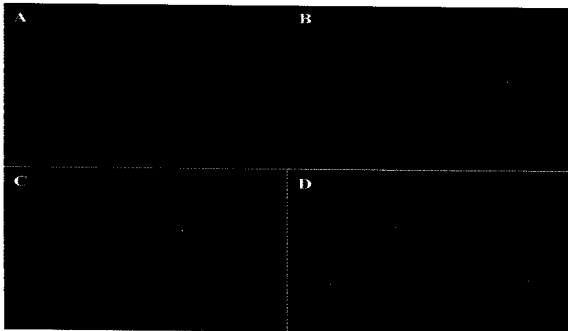
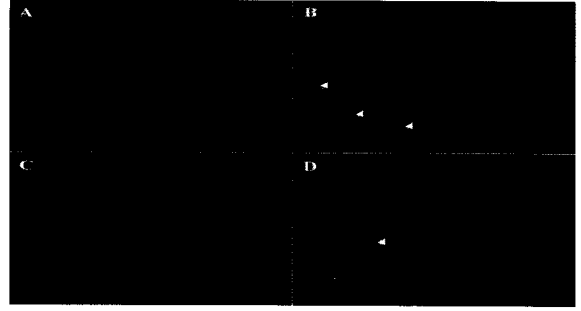


Fig. 13. Immunohistochemical staining of ear of DNCB-induced dermatitis in NC/Nga mice. Following 8 weeks administration of SJSBT, mouse ear biopsy were stained with PE-rat anti-mouse CD4 mAb and PE-rat anti-mouse CCR3 mAb, respectively.

CD4



CCR3

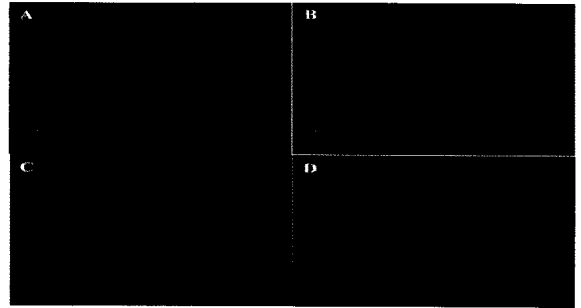


Fig. 14. Immunohistochemical staining of dorsal skin lesion in DNCB-induced dermatitis model of NC/Nga mice. The animals were. Following 8 weeks administration of SJSBT, mouse dorsal skin biopsy were stained with PE-rat anti-mouse CD4 mAb and PE-rat anti-mouse CCR3 mAb, respectively.

고찰

피부는 인체의 한 부분으로, 유기체적 관점에서 이론이 발달한 한의학 입장에서 보면 五臟 六腑와의 상호 연관성을 통하여 생리·병리 반응을 나타낸다. 따라서 피부염의 치료는 국소적인 면이 아닌 病因論的 觀點과 臟腑相應論적 觀點에서 포괄적으로 이루어진다. 《靈樞·本臟第四十七》<sup>25)</sup>에 나타난 “肺應皮, 皮厚者 大腸厚, 皮滑者 大腸直 …粗理薄皮者 三焦膀胱薄, 皮急而無毫毛者 三焦膀胱急”이라는 기술은 피부와 장부와의 상관관계를 잘 설명하여 주고 있다.

피부병의 주 병인으로는 六淫侵襲, 感染毒邪, 飲食不節, 房勞損傷, 七情鬱結 등으로, 이들의 錯雜으로 인하여 風·濕·熱이 체내에 울체되면서 다양한 피부 증상이 유발된다<sup>7-17,26,27)</sup>. 따라서 체내의 風·濕·熱邪와 이로 인한 병변 반응을 얼마나 적절하게 제거하는가가 치료의 관건이 된다. 아토피피부염에서 가장 문제 시되고 있는 소양증에 대하여 《靈樞·刺節真邪》<sup>25)</sup>에서 “邪氣……搏于皮膚之間, 其氣外發, 腠理開, 毫毛搖, 氣往來行, 則爲痒”이라 하여 淫氣往來를 언급하였는데, 특히 淫氣중 風·濕·熱邪가 주 원인이 된다. 따라서 최근 한의학 입장에서 활용되고 있는 아토피피부염 치료제 대부분은 상기 이론에 따라 祛風清熱 除濕 藥物과 처방을 기본방으로 응용하는 경우가 많다.

본 연구의 시료인 三子參柏湯 (SJSBT)은 蒼耳子, 蛇床子, 地膚子 등을 포함한 祛風除濕清熱 작용이 있는 8종의 약물이 배합된 처방으로, 癢痒症이 심하면서 심한 염증 소견이 보이는 급성기 피부 질환에 광범위하게 응용되는 처방이다. 구성 약물중 蒼耳子は “IC 세포에 대한 항알러지 효과”<sup>18)</sup>, “면역글로블린 E 생

성억제 효과<sup>19)</sup>가 보고된 바가 있으며, 蛇床子<sup>20)</sup>는 “항염증작용”이 보고된 바가 있다. 이 밖에 구성 약물인 黃柏, 苦參, 大黃 역시 염증과 관련된 항산화작용이 규명된 바가 있다<sup>22-24)</sup>.

본 실험에서는 먼저 SJSBT의 직접적인 피부염 억제 작용을 검색하기 위하여 NC/Nga 생쥐에 DNCB를 이용하여 피부염을 유발시킨 후 임상 지수를 확인한 결과, 정상군에 비해 피부염이 유발된 대조군에서 피부 염증과 긁는 행동이 심화되었으며, SJSBT 투여군의 경우 대조군에 비해 피부 염증과 긁는 행동이 현저히 줄어들었다(Fig. 1). 또한 아토피피부염에서 나타날 수 있는 증상을 관능적 방법에 의하여 측정된 결과에서도 정상군에 비해 DNCB를 이용하여 피부염을 유발시킨 대조군에서는 소양, 건조, 부종, 혈종, 짓무름, 태선화 등의 증상이 심화되었으며, 음성 대조군인 CsA와 SJSBT 투여군에서는 상대적으로 이들 증상이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

NC/Nga 생쥐 귀의 일부를 절단한 후 H&E 염색과 toluidine 염색을 통한 검색에서는 정상군에 비해 피부염을 유발시킨 대조군에서 백혈구와 비만세포의 침윤 및 epidermis와 dermis의 부종이 증가하였으나, CsA와 SJSBT 투여군에서 대조군에 비해 비만세포의 침윤 및 부종이 상대적으로 감소하였다(Fig. 4). 또한 NC/Nga 생쥐 피부의 일부를 절단하여 확인한 결과에서도 피부염을 유발시킨 대조군에서 백혈구와 비만세포의 침윤 및 epidermis와 dermis의 부종이 증가한 반면, CsA와 SJSBT 투여군에서는 대조군에 비해 이들 병리 변화가 상대적으로 감소함으로써(Fig. 5), 본 시료가 아토피피부염에 대한 임상적 치료 효과를 가지고 있음을 보여주었다.

다음으로 이러한 결과가 어떠한 면역 기전에 의한 것인지를 검색하기 위하여 in vivo 실험동물에서의 면역 세포에 대한 영향을 조사하였다. 아토피 피부염과 같은 과도한 면역반응에는 여러 종류의 면역세포, 염증세포 및 화학 매개체들이 관여하며, 직접적으로 관여하는 주된 세포로는 T 림프구, B 림프구, 비만세포, 호산구 호중구 등이 알려져 있다<sup>28,29)</sup>.

본 실험에서는 먼저 NC/Nga 생쥐 피부에서의 총 면역세포 수를 관찰하였는데, 정상군에 비해 대조군에서 총 면역세포 수가 증가한 반면, CsA 투여군에서 총 면역세포 수가 감소하였으나, SJSBT 투여군은 아무런 영향이 없었다(Table 1, Fig. 3). 배부 피부 내 면역 세포중 T 림프구 항원 수용체에 의한 신호 전달을 수행하고 보조 T 림프구와 세포독성 T 림프구 세포 표면에 공통적으로 발현되는 CD3+ 세포 수와 호산구, 호염기구, T 림프구 등의 세포 표면에 존재하는 CCR3+ Th2 세포 수와 CD3+ 세포수 역시 SJSBT 투여군에서는 아무런 영향이 없었다 (Table 2, 3, Fig. 6, 7). 비록 단편적인 결과이지만 병소인 피부에서는 본 시료가 T 림프구 작용에 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 추측되어, 전체적으로 혈액, 비장, DLN 내 면역세포의 반응에 대한 논의가 필요할 것으로 사료된다.

이와는 달리 과립구에 많이 발현되는 Gr-1 세포와 림프구, 대식세포의 표면에서 발현되는 CD11b 세포에 대하여서는 CsA와 SJSBT 투여군에서 대조군에 비해 감소함으로써(Table 4, Fig. 8), 본 시료가 면역세포 중 과립구, 단핵구, 대식세포에서 발현되는

CD11b+/Gr-1 세포에 대하여 유의적으로 작용함을 알 수 있었다.

활성화된 대식세포, 내피세포, 섬유아세포와 같은 여러 유형의 세포로부터 생산되는 사이토카인인 IL-6<sup>30)</sup>와 감염 부위로 호중구 및 단핵구의 보충을 자극시키는 작용을 하며 활성화된 대식세포에서 주로 생성되는 사이토카인인 TNF- $\alpha$ <sup>31,32)</sup> mRNA 유전자 발현에서는 대조군에 비하여 모두 30% 이상 감소하였다(Fig. 9, 10). 아울러 호산구를 염증 부위로 모이도록 하는 케모카인인 eotaxin과 T 림프구, 호산구, 호염기구 등의 세포 표면에 존재하는 케모카인인 CCR3 역시 mRNA 유전자 발현이 대조군에 비하여 감소함으로써(Fig. 11, 12), 본 시료가 아토피피부염에서의 염증 발현과 밀접한 관련이 있는 IL-6와 TNF- $\alpha$  등의 사이토카인의 발현 억제와 동시에 eotaxin과 CCR3 등의 케모카인을 억제시킴을 확인할 수 있었다.

마지막으로 귀와 배부 피부를 이용하여 SJSBT에 의한 면역 세포의 변화를 조사하였는데, 정상군에 비해 CD4+ T 세포와 CCR3+ 세포가 피부 조직에 침윤된 대조군의 귀 조직에 비해 SJSBT 투여군에서는 CD4+ T 세포와 CCR3+ 세포 발현이 현저히 감소함으로써 (Fig. 13, 14), 상기 결과와 부합되는 결과가 나타났다. 지금까지의 동일 형식의 실험 논문 역시 조직학적 관찰에서 유사한 결과가 보고된 바가 있는데, 이는 시료가 다중 약제로 구성된 복합방이라는 특징에 기인한 것으로 보인다. 아울러 이같은 결과는 임상적으로 한의학적 치료가 효과적임을 객관적으로 보여주는 결과라 할 수 있다.

이상의 결과로 보아 三子參柏湯은 주로 과립구나 대식세포 등에 작용하여 IL-6, TNF- $\alpha$  와 같은 사이토카인 뿐만 아니라 eotaxin과 CCR3의 발현을 억제시킴으로써 피부로 침윤되는 이들 세포의 수를 감소시킴을 알 수 있었다. 반면 T 세포에는 이 약물이 효과를 나타내지 않았으며, CCR3+인 T 세포의 수에도 영향을 주지 않은 것으로 미루어 피부에서 감소한 CCR3+세포는 주로 과립구 및 대식세포일 것으로 여겨진다. 따라서 三子參柏湯이 아토피 피부염을 유발시킨 실험 동물에서 나타내는 피부염 개선 효과는 주로 과립구나 대식세포 등의 활성을 감소시킴으로써 효능을 나타내는 것으로 판단된다. 최종 결과인 피부 병태 부위의 개선 효과는 임상에서의 효능을 객관적으로 보여주고 있어 향후 구성 약물 등의 개별적인 검색을 통하여 다양한 조합이 변증에 근거하여 이루어진다면, 임상에서 보다 유의성있는 항아토피 처방으로 활용이 기대된다.

## 결 론

三子參柏湯을 시료로 하여 DNCB로 유발시킨 아토피 피부염 동물모델을 이용하여 피부와 귀 조직에서의 면역세포 수의 변화 및 사이토카인과 케모카인의 발현에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

三子參柏湯은 대조군에 비하여 소양, 건조, 부종, 혈종, 짓무름, 태선화 등을 억제시킴으로써 임상지수를 유의성있게 감소시켰다. 三子參柏湯은 대조군에 비하여 피부와 귀 조직내의 백혈구와 비만세포의 침윤 및 부종을 감소시켰다. 三子參柏湯은 대조군



에 비하여 CD3+와 CCR3+/CD3+ 세포 수에는 아무런 영향이 미치지 못했으나, CD11b+/Gr-1 세포 수는 유의성있게 감소시켰다. 三子參柏湯은 대조군에 비하여 IL-6, TNF- $\alpha$  등의 사이토카인과 eotaxin, CCR3 등의 케모카인의 발현을 유의성있게 억제시켰다. 三子參柏湯은 면역 조직 화학 염색에서 대조군에 비하여 귀와 배부 피부에서의 증가된 CD4+와 CCR3+ 세포의 침윤과 부종을 감소시켰다.

이상의 결과로 三子參柏湯은 DNCB로 유발시킨 아토피 피부염 동물모델에서 면역 조절 작용을 통한 유의성있는 임상 증상 개선 효과를 나타냄으로써, 아토피 피부염의 치료제로서 효능이 인정된다. 향후 개별 약물의 검색을 통하여 구성 약물의 용량 조절에 대한 연구가 심도있게 이루어진다면, 임상에서 보다 효과적인 처방 구성이 도출될 수 있을 것으로 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 한국산업기술평가원에서 지원하는 지역협력연구센터인 대전대학교 난치성면역질환의 동서생명의학연구센터(TBRC, RRC04700, 2005)의 지원에 의해 수행되었음을 밝히며 이에 감사합니다.

### 참고문헌

1. Hanifin, J.M. Atopic dermatitis: broadening the perspective. *J. Am. Acad. Dermatol.* 51: 23-24, 2004.
2. Andrew, B., Sam, T.H., Mark, C.U. Allergic and immunologic disease of the skin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111: 560-570, 2003.
3. 은희철. 피부면역학. 서울대학교출판부, pp 27-34, 1999.
4. 김규환. 아토피피부염의 임상양상 및 치료. *알레르기*, 15: 10-15, 1995.
5. Graham-Brown, R.A. Therapeutics in atopic dermatitis. *Adv. Dermatol.* 13: 3-31, 1997.
6. D.S. Im. Linking Chinese medicine and G protein-coupled receptors, *Trends in Pharmacol, Sci.* 24: 2, 2003.
7. 이원문 외. 피부병. 인민위생출판사, pp 113-127, 2006.
8. 왕보방 외. 피부병중의진료학. 인민위생출판사, pp 11-17, 2000.
9. 황태강 외. 중의피부병성병학. 중국의학과학출판사, pp 7-11, 2000.
10. 구양환 외. 신편중의피부병학. 인민군출판사, pp 1-22, 1999.

11. 범서강. 중서의결합치료피부병성병. 광동인민출판사, pp 188-193, 2005.
12. 임준화 외. 현대명중의피부성병과절기. 과학기술문헌출판사, pp 134-135, 2002.
13. 장가. 張志禮皮膚病醫案選萃. 인민위생출판사, pp 130-133, 2000.
14. 장지례. 중서의결합피부성병학. 인민위생출판사, pp 62-73, 2000.
15. 장문강 외. 피부과권. 학원출판사, pp 299-300, 2004.
16. 오군 외. 중서의결합피부성병수책. 사천과학기술출판사, pp 276-279, 2003.
17. 양용재 외. 피부병변증논치요방. 과학기술문헌출판사, pp 232-236, 2007.
18. 서영배 외. 창이자의 IC-2 세포의 항알러지에 관한 연구. *대한분초학회지* 17(1):39-54, 2002.
19. 송호준 외. 창이자에 대한 면역글로블린 E 생성억제 효과. *대한분초학회지* 13(2):69-76, 1998.
20. 김상미 외. 사상자의 항염증 작용. *생약학회지* 29(4), 1998.
21. 김준기 외. 황백 열수추출물의 항산화활성과 아질산염 소거 작용에 관한 연구. *대한동의병리학회지* 13(1):112-118, 1999.
22. 박용기. 갈화와 울금 및 고삼의 항산화작용에 관한 비교연구. *대한분초학회지* 16(1):41-53, 2001.
23. 임철홍. 백선피가 항알레르기 작용에 미치는 영향. 경희대학교대학원, 1994.
24. 김성배. 대황, 유향, 몰약 도포가 화상 피부 치료에 미치는 영향. 동국대학교대학원, 2001.
25. 왕빙 주. 황제내경영주. *대만중화서국*, p 180, 265, 1982.
26. 경영 외. 피부병성병 임상증치. 과학기술문헌출판사, p 1, 73, 112, 2006.
27. 진희령 외. 피부의난병. 중의고적출판사, pp 49-60, 2000.
28. Thestrup-Pedersen, K. Immunology of atopic dermatitis. *Acta. Derm. Venereol. Suppl.* 151: 77-83, 1989.
29. Huber, H., Gattringer, C. Immunopathology of lymphatic systemic diseases *Wien Klin Wochenschr.* 95: 319-326, 1983.
30. Yoshimura, A. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci.* 97: 439-447, 2006.
31. Korobowicz, A. Biology of tumor necrosis factor type alpha (TNF-alpha). *Pol. Merkur. Lekarski.* 21: 358-361, 2006.
32. Malerba, G., Pignatti, P.F. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J. Appl. Genet.* 46: 93-104, 2005.