

當歸飲子와 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향

송성필 · 손대범 · 황치환 · 송승현 · 황충연*

원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

Effects of *Danggwieumja* Administration along with *Samhwangseje-gamibang* on NC/Nga Atopic Mice

Seung Phil Song, Dae Beom Son, Chi Hwan Hwang, Seung Hyeon Song, Chung Yeon Hwang*

Department of Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Recently Atopic Dermatitis(AD) is increasing along with allergic disease. At present, there is no infallible cure for AD. Then AD patients undergo great suffering. This study is carried out to see whether or not the administering *Danggwieumja*(DG) along with *Samhwangseje-gamibang*(SG) as a medicine for external application, is effective in treating atopic dermatitis. To examine the effectiveness of the above prescription, the author made an observation of diverse immune responses. through the model of NC/Nga atopic mice. Results provided evidence that the DG administration along with SG can be used as a treatment means to atopic dermatitis. The results are as follows: The extent of Clinical skin severities in 13 and 16 week old NC/Nga mice treated with DG and SG, were reduced by 50.9%, 53.9% respectively, compared to the control NC/Nga mice with no drug treatment. IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IgM and IgG1 levels in the serum of the NC/Nga mice treated with DG and SG were significantly decreased compared to those of the untreated control mice. In contrary, to the IFN- γ level, significantly increased. The spleen weight of the NC/Nga mice treated with DG and SG significantly decreased compared to those of the untreated control mice. CCR3 gene expression in the skin tissue of NC/Nga mice treated with DG and SG were highly decreased, and the IL-6 expression significantly decreased, and the IFN- γ gene expression increased compared to those of the untreated control mice. Histological observation of the ear and dorsal skin tissue of the NC/Nga mice treated with DG and SG, showed that the extents of inflammation and infiltrated immune cells in the epidermal tissue and dermis, were highly reduced compared to those of the untreated control mice. In the model inducing COX-2 activity in RAW 264.7 cell, the denser DG became, the more COX-2 activity was inhibited, compared to those of the untreated control group. IL-1 β , and TNF- α , IL-6 gene expression in RAW 264.7 cell with DG, significantly decreased, compared to those of the untreated control group. According to the assessment of cell toxicity in L929 cell, the rate of cell multiplication increased by 3% in consistency to 100ppm of DG compared to the untreated control group and in more than the 200 ppm consistency, cell toxicity was occurred.

Key words : Atopic dermatitis, *Danggwieumja*(DG), *Samhwangseje-gamibang*(SG) External treatment, NC/Nga mouse

서 론

문명이 발달함에 따라 최근 알레르기 질환이 급증하고 있으며 아토피 피부염 환자도 증가하고 있다¹⁾. 대한 소아 알레르기

* 교신저자 : 황충연, 광주시 남구 주월동 원광대학교 부속광주한방병원

· E-mail : hwangida@wonkwang.ac.kr, · Tel : 062-670-6434

· 접수 : 2007/08/21 · 채택 : 2007/09/20

및 호흡기학회에서 2000년에 전국의 초등학생과 중학생 43,045명을 대상으로 설문 조사한 결과에 의하면 초등학생의 24.9%, 중학생의 12.8%가 아토피 피부염을 진단 받은 것으로 조사되었다²⁾.

아토피 피부염은 1892년 besnier가 처음으로 기술한 만성 또는 재발성의 습진성 피부염으로 비정상적인 피부혈관 반응이나 면역학적 반응을 동반하고 紅斑, 浮腫, 심한 癢症, 滲出, 부스럼 딱지와 鱗屑을 특징으로 하는 염증성 피부질환이다^{3,4)}.

현대의학에서는 아토피 피부염이 유전학적 소인, 환경적 소인, 약리학적 이상, 면역학적 요인 등과 같은 여러 가지 인자간의 상호작용으로 발생한다고 보고 있는데 최근에는 각질층 지질 성분의 변형으로 피부장벽 결손이 생겨 아토피 피부염이 발생한다는 연구도 있다⁹⁾.

韓醫學에서는 아토피 피부염을 奶癬, 胎癬, 胎敏瘡 등으로 표현하였는데 隨代 巢⁶⁾는 小兒의 面部에 癬皮가 甲錯되고 乾燥하게 되는 것을 乳癬이라 하여 嬰兒濕疹과 유사한 것으로 보았다. 清代 吳⁷⁾는 아토피 피부염에 대해 胎敏瘡이라 하여 그 중 嬰兒 頭面이나 눈썹 끝에 나타나는 것을 奶癬이라 하였는데 瘡痒과 鱗屑이 있고 형태는 奶疥와도 같다 하였다.

아토피 피부염의 한의학적 원인으로서는 風熱, 血熱, 血虛, 脾胃運化機能 失調에 의한 胎火濕熱, 風濕熱의 侵入 등을 들 수 있으며, 이외에도 기온의 변화, 음식물, 불규칙한 수유습관, 의복 마찰, 寒冷의 변화 등의 자극이 관여 된다⁸⁾. 주로 임신 중에 五辛 炙博을 섭취함으로써 아기에게 열이 전해져 생후에 風熱 邪氣를 감수하여 발생하거나 혹은 稟性不耐하여 脾胃不和하니 濕熱이 內生하여 발생한다고 하였다⁹⁾.

當歸飲子是 嚴의 《濟生方》¹⁰⁾에 “治心血凝滯 內蘊風熱 發生遍身瘡疥 或腫或痒 或膿水侵淫 或發赤疹瘡”라 하여 처음 기록된 이래 血燥와 風熱로 인한 瘡疥, 피부 소양증, 만성 두드러기 등의 치료에 응용되고 있다¹¹⁾.

三黃洗劑加味方은 外傷科學에서 각종 無滲出性 皮膚炎과 滲出性 皮膚癢症에 사용되는 三黃洗劑¹²⁾에 清熱解毒하는 金銀花, 連翹, 馬齒莧을 넣은 外用劑이다.

當歸飲子에 대한 연구로는 건선에 활용되는 加味當歸飲子에 대한 실험적 연구¹³⁾ 및 임상적 고찰¹⁴⁾, 當歸飲子 추출액이 항 allergy 반응과 mouse의 면역세포기능에 미치는 영향¹⁵⁾, 當歸飲子 加減方의 처방별 아토피성 알레르기 반응 조절 효과 비교 연구¹¹⁾ 등이 있다.

三黃洗劑에 대한 연구로는 元¹⁶⁾의 三黃洗劑加減方의 항균, 항염 및 항알레르기효과에 대한 실험적 연구가 있다.

아토피에 대한 한의학적 연구로 공 등³⁾은 아토피 피부염의 동서 의학적 문헌 고찰을, 尹¹⁷⁾은 아토피 피부염 환자의 한의학적 임상분류에 대한 연구를 보고하였다. 단일 한약재에 대한 실험적 연구로는 金¹⁸⁾은 桑葉이, 韓¹⁹⁾은 牛蒡子가, 金²⁰⁾은 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향을 보고 하였으며, 처방에 대한 연구로는 朴²¹⁾은 連翹散, 朴²²⁾은 柴胡清肝湯을 시료로 면역조절 작용을 통한 항아토피 효과를 규명하였다. 최근에는 내복약과 외용제를 併用하였을 때의 면역학적 연구가 보고 되고 있는데²³⁾ 當歸飲子和 三黃洗劑加味方을 병용한 연구는 아직 접하지 못하였다.

저자는 當歸飲子和 三黃洗劑加味方을 병용하여 NC/Nga mice를 이용한 in vivo 실험에서 IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IgM, IgG1, IFN- γ 의 혈청 수준을 측정하였으며, 피부조직에서 IL-4, IL-5, CCR3 유전자 발현을 조사하였으며 귀와 등의 피부를 조직 검사하였다. 또한 當歸飲子の 항염증 효과를 규명하기 위해서 in vitro 실험에서 RAW 264.7 cell에 當歸飲子를 농도별 처리하였을 때 COX-2발현과 IL-1 β , TNF- α , IL-6 등의 cytokine들을 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물및 약재

웅성(雄性) 6주령의 Balb/c, NC/Nga mouse를 중앙실험동물에서 공급받아 실험당일까지 고형사료와 물을 공급하고 실온 22±2℃, 상대습도 50~65%, 조도 200 lux(8시 점등, 20시 소등)를 계속 유지하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

본 실험에 사용한 當歸飲子(DG)와 三黃洗劑加味方(SG)의 약제는 건재약방에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, DG 1첩 및 SG의 내용과 구성은 다음과 같다(Table 1, 2).

Table 1. Prescription of Danggwieumja(DG).

Herbal name	Pharmacognostic name	Dose(g)
當歸	Angelicae gigantis Radix	6
生地黃	Rehmaniae Radix	6
芍藥	Paeonia Radix Alba	4
川芎	Cnidii Rhizoma	4
白茯苓	Tribuli Fructus	4
防風	Ledebouriellae Radix	4
白何首烏	Cynanchum wilfordii	4
荊芥	Schizonepetae Herba	3.2
黃芪	Astragali Radix	3.2
甘草	Glycyrrhizae Radix	2
生薑	Zingiberis Rhizoma	3
大棗	Zizyphi Fructus	4
Total Amount		47.4

Table 2. Prescription of Samhwangseje-gambang(SG).

Herbal name	Pharmacognostic name	Dose(g)
大黃	Rhei Rhizoma	120
黃芩	Scutellariae Radix	120
黃柏	Phellodendri Cortex	120
苦參	Sophorae Radix	120
金銀花	Lonicera japonica Thunb	120
連翹	Forsythiae Fructus	120
馬齒莧	Portulaca oleracea	120
Total Amount		840

2. 방법

1) 시료 제조

내복약인 DG는 7첩 분량의 약제 331.8 g에 증류수 1.5 l를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 전탕 후 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류 장치로 농축하였다. 외용제인 SG는 약제 840 g에 증류수 3 l를 가하여 약한 불로 3시간 전탕한 후, 증류하여 1.5 l로 만들어 분무기에 넣어 사용하였다.

2) 염증 유발 및 약물 투여

아토피 피부염은 1-chloro 2,4-dinitrobenzene(DNCB)을 이용하여 유발하였다. 먼저 NC/Nga mice의 등 부위를 깨끗이 제모한 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 실험 4일 전 1% DNCB용액(acetone:olive oil=3:1) 200 μ l를 등 부위에 도포하고 실험 시작일 부터 종료일까지 8주간 일주일에 2번 0.2% DNCB용액 150 μ l를 등 부위에 도포하였다. 실험 시작일 부터 NC/Nga mice 실험군에 DG를 8주간 주 3회(월, 수, 금) 경구투여(250 mg/kg) 하였으며, 외용제인 SG는 매일 2회 등 부위를 충분히 적실 정도로 분무하였다. NC/Nga mice 대조군은 생

리식염수를 DG와 같은 용량, 용법으로 경구 투여하였으며, 외용제 또한 생리식염수를 실험군과 같은 방법으로 도포하였다.

3) 피부 손상 정도²⁴⁾ 측정

NC/Nga mice의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하였다. 육안평가 결과는 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타낸다. 평가항목은 홍반(erythema), 가려움과 건조피부(Pruritus & Dry Skin), 부종과 혈종(Edema & excoriation), 미란(Erosion), 그리고 태선화(Lichenification)로 나누어진다. 이 각각의 항목은 없음(0), 약함(1), 중증도(2), 심함(3)으로 나누어서 채점하였다.

4) 혈청내 IgE, IL-4, 5, 6, IFN- γ , IgM, IgG1 정량

혈청내 IgE, IL-6 량은 8주, 10주, 13주, 16주에 mice의 눈에서 capillary tube를 이용하여 약 100 μ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기로 혈청을 분리하여 IgE 량을 ELISA Kit로 측정하였다. DG를 투여 8주째 NC/Nga mice를 ethyl ether로 마취한 후 심장 전자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리한 후 혈청 중 IL-4, 5, INF- γ , IgM, IgG1 량을 ELISA kit로 정량하였다.

5) 피부 조직에 대한 RT-PCR(역전사-중합효소 연쇄반응) 분석

PCR은 GeneAmp PCR system 2400을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, IL-4, IL-5, CCR3, IFN- γ 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmol/ μ l)와 antisense primer (20 pmol/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5 mM dNTPs, 4 μ l 10xPCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 0.18 μ l Taq polymerase (5 U/ μ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 40 μ l가 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5분, denaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5분, annealing; 55 $^{\circ}$ C, 1분, elongation; 72 $^{\circ}$ C, 1분을 25cycle한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR product는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

6) 피부 세포내 IL-6 정량

NC/Nga mice의 등 부위를 제모한 뒤 피부 조직을 1 g 떼어 내어 DMEM 배양액으로 수세하여 미세조각으로 잘게 썬 후 10% FBS-DMEM으로 Petri-dish에서 7일간 배양하였다. 이 후 배양 상층 액을 제거하고 다시 10% FBS-DMEM으로 교체하였다. 이를 7일간 배양하여 배양 상층 액을 분리한 후 배양액내의 IL-6 분비량을 ELISA kit로 측정하였다.

7) 조직 병리 검사

실험 종료 후에, 왼쪽 귀 끝부분과 등 쪽 피부를 떼어 내어 10% paraformaldehyde에서 24시간 동안 포르말린에 고정하였다. 24시간 후 ethanol에 차례로 조직을 담아서 탈수를 하였다. xylene 처리 후 파라핀에 조직을 담아서 24시간 동안 52 $^{\circ}$ C incubator에 보관하고 조직을 임베딩 틀에 고정하여 파라핀이 충분히 굳은 후에 조직을 5 μ m로 절편하여 슬라이드 글라스에 붙여서 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 두어 조직이 슬라이드 글라스에 완전히 접착되도록 하였다. 슬라이드 글라스를 xylene에 담가 파라핀을 녹인 후 ethanol로 재수화시켜 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다.

8) 세포배양

RAW 264.7(1 \times 10⁶ cell) 세포를 60 mm plate에서 배양한 후 LPS(1 μ g/ml)를 처리한 후 DG를 10, 50, 100 ppm을 24시간 처리한다. 24시간 처리 후 배양액을 제거하고 세포를 RIPA buffer에 protease inhibitors와 phosphatase inhibitor(Na₃VO₄) 처리하고, cell scraper로 세포를 모은 후, 얼음에서 30분간 반응 후, 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm에서 원심 분리하여, 상층 액을 따서 BCA 방법으로 단백질 정량을 한다. 10% SDS-PAGE gel에 각 샘플 30 μ g의 단백질을 전기 영동한다. 전기영동 후 NC membrane에 transfer한다. transfer된 NC membrane에 primary antibody COX-2 로 12시간 incubation한다. secondary Ab (1:2000)로 2시간 동안 incubation 한다. ECL 방법으로 COX-2 band를 detection한다.

9) DG의 처리농도 및 시간별 처리

추출한 DG를 처리 당일 FBS가 첨가되지 않은 DMEM에 희석하여 처리농도별로 사용한다. 처리농도는 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000ppm로 처리하고, 처리시간은 24시간으로 실시하였다.

10) MTT 정량

Mosmann²⁵⁾의 방법에 따라 배양한 세포주를 각각 5 \times 10³ cell/ml이 되도록 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 이들 세포를 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000ppm 농도의 DG가 포함된 배양액에서 24시간 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 DMSO를 100 μ l/well씩을 넣어 5분간 실온에 방치하며 Formazan을 용해한 후 microplate Reader로 흡광도 570 nm에서 측정한다.

11) 역전사중합연쇄반응 (RT-PCR)

RT-PCR은 RT kit romega, Madison USA)와 PCR kit를 이용하여 실시하였다. 즉 rapid guanidium isothiocyanate 방법으로 마우스 대식세포주로부터 추출한 0.5 μ g의 total RNA를 역전사반응액 과 혼합하여 42 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

12) 통계학적 분석

통계학적 유의성 검증은 one-way ANOVA(Analysis of Variance) 방법을 사용하였으며, 유의수준 p<0.01 의 범위 내에서 그 결과들은 평균에 대한 표준 편차로 나타낸다.

결 과

1. 피부 손상 정도에 미치는 영향

DG의 구강 투여와 SG의 분무를 8주령부터 실시하여 NC/Nga mice의 피부손상정도를 관찰한 결과, NC/Nga mice가 자연적으로 피부염으로 유발된 conventional 조건에서는 10주 이후 IgE와 피부 발진이 유발된 것을 알 수 있었다(Fig. 1A) Conventional 조건에서는 8주부터 16주까지 2, 3, 3주(10, 13, 16 주) 간격으로 피부 손상정도를 측정한 결과 대조군은 10주에 4.71 \pm 0.80, 13주에 7.28 \pm 0.78로 급격한 증가를 나타내었으며, 실험 종료 전 16주령은 9.40 \pm 0.83로 나타났다. 이에 반해 실험군은 10주까지는 대조군에 비하여 40% 정도 감소한 2.87 \pm 0.74로 관찰되었고, 13주와 16주에는 각각 3.57 \pm 0.66와 4.33 \pm 0.73으로 나타나 대조군에 비하여 현저한 피부손상정도지표(Clinical skin severity score) 감소를 나타냈다(Fig. 1B).

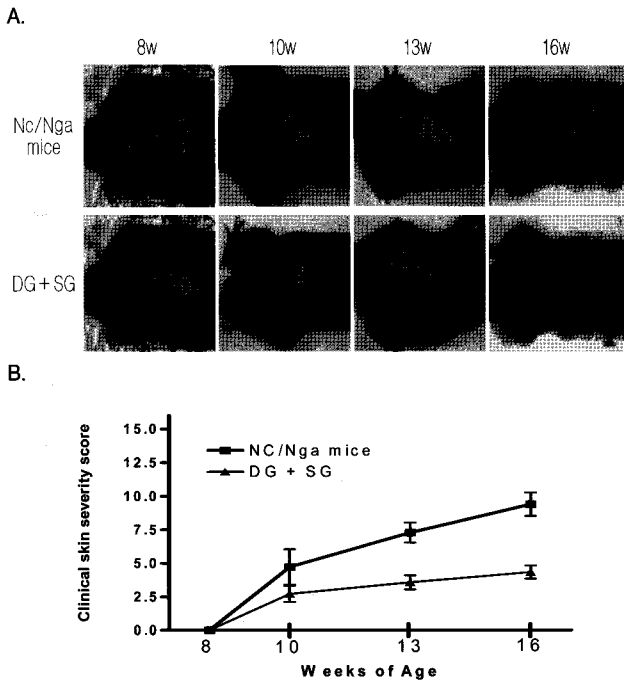


Fig. 1. A: Clinical skin features of dermatitis in NC/Nga mice. B: Clinical skin severity of dermatitis in NC/Nga mice.

2. 혈청 중 IgE와 IL-6 발현에 미치는 영향

IgE 생성량은 대조군의 8주와 10주에서 각각 4.1±0.95, 56.2±5.04 ng/ml로 나타났고, 실험군은 각각 3.6±0.8, 28.2±3.8 ng/ml로 나타났다. 대조군의 13주와 16주에서는 각각 304.1±31.45, 419.3±38.1 ng/ml로 나타났고, 실험군은 각각 95.4±10.5, 130.2±16.4 ng/ml로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.01) 감소했다(Fig. 2A). IL-6 수준은 대조군의 8주와 10주에서 각각 81.4±8.9, 307±25.6 pg/ml로 나타났고, 실험군은 각각 76.8±7.4, 152.2±25.1 pg/ml로 나타났다. 대조군의 13주와 16주에서는 각각 735.2±27.0, 800.0±50.4 pg/ml로 나타났고, 실험군은 각각 238.6±41.3, 287.6±25.3 pg/ml로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 2B).

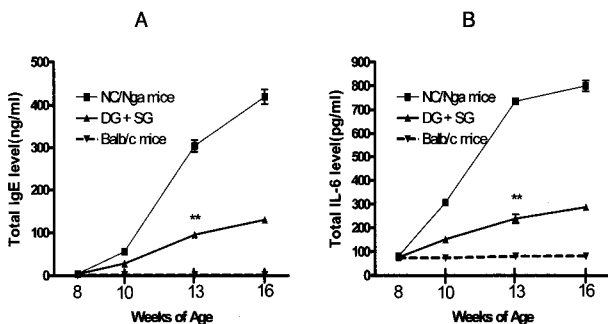


Fig. 2. A: Serum IgE elevation and development of dermatitis in NC/Nga mice. B: Serum IL-6 elevation and development of dermatitis in NC/Nga mice.

3. 혈청 중 IL-4, IL-5 발현에 미치는 영향

IL-4 수준은 최종 16주령에서 정상군은 16.5±1.2 pg/ml로

NC/Nga mice 대조군은 74.3±7.1 pg/ml로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였고, 실험군은 34.2±5.8 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 3A). IL-5 수준은 최종 16주령에서 정상군은 47.8±7.1 pg/ml, NC/Nga mice 대조군은 257.8±16.3 pg/ml로 나타난 반면, 실험군은 133.0±5.4 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 3B).

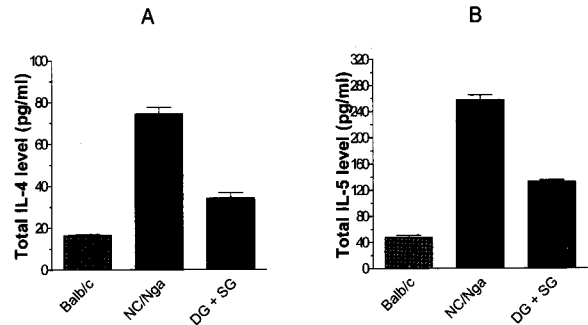


Fig. 3. A: Serum IL-4 elevation and development of dermatitis in NC/Nga mice. B: Serum IL-5 elevation and development of dermatitis in NC/Nga mice.

4. 혈청 중 IFN-γ 발현에 미치는 영향

혈청 중 IFN-γ 수준은 최종 16주령 정상군에서는 13.2±2.8 pg/ml, NC/Nga mice 대조군에서 516.6±93.7 pg/ml, 실험군에서 905.8±36.0 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.01) 증가를 나타냈다(Fig. 4).

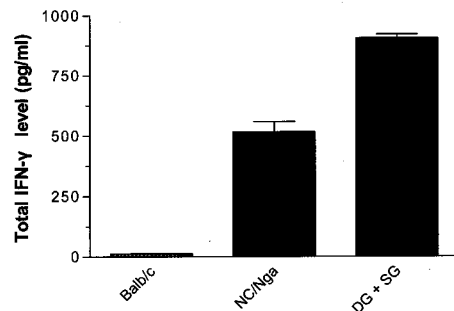


Fig. 4. Serum IFN-γ in NC/Nga mice.

5. 혈청 중 IgM 발현에 미치는 영향

IgM 수준은 최종 16주령에서 정상군은 62.2±11.3 μg/ml, NC/Nga mice 대조군은 629.2±56.6 μg/ml로 나타난 반면, 실험군은 368.0±56.9 μg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 5).

6. 혈청 중 IgG1 발현에 미치는 영향

IgG1 수준은 최종 16주령 정상군에서 604.8±52.4 μg/ml로 나타났고, NC/Nga mice 대조군에서 3,415.0±137.7 μg/ml로 나타났다. 이에 비해 실험군에서는 1,908.8±124.4 μg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 6).

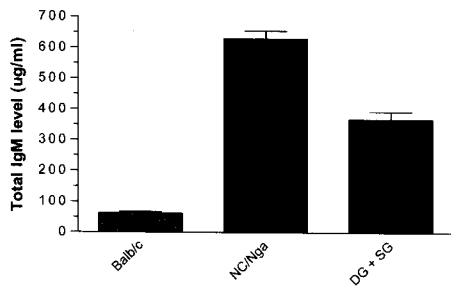


Fig. 5. Immunoglobulin M in NC/Nga mice.

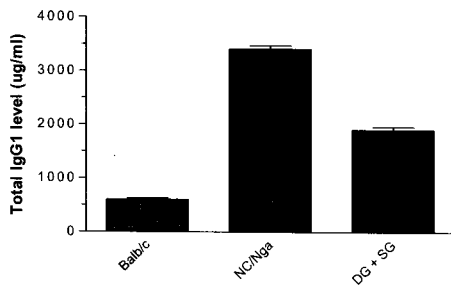


Fig. 6. Immunoglobulin G1 in NC/Nga mice.

7. 비장 무게 변화에 미치는 영향

NC/Nga mice의 비장을 16주령 후에 적출하여 무게를 측정 한 결과, 정상군은 0.156 ± 0.017 g, NC/Nga mice 대조군은 0.162 ± 0.029 g, 실험군은 0.131 ± 0.019 g로 유의성 있는 ($p < 0.05$) 감소를 나타냈다(Fig. 7).

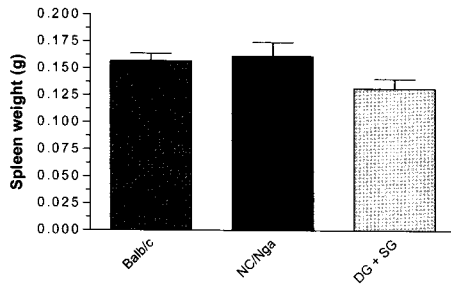


Fig. 7. Spleen weight in NC/Nga mice.

8. Dorsal skin lesion에서 IL-4, IL-5, IFN- γ 및 CCR3 발현에 미치는 영향

IL-4 mRNA 발현량(IF)은 정상군이 1(Index Fold, IF), NC/Nga mice 대조군이 2.11(IF)로 나타났으며, 이에 반해 실험군은 1.45(IF)로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 8). IFN- γ mRNA 발현은 정상군이 1(IF), NC/Nga mice 대조군이 1.10(IF)로 나타났고, 실험군이 4.8(IF)로 나타나 대조군에 비하여 현저히 증가하였다(Fig. 9). IL-5 mRNA 발현은 정상군이 1(IF), NC/Nga mice 대조군이 1.78(IF)로 나타났고, 실험군이 1.12(IF)로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 10). Chemokine인 CCR3 mRNA 발현은 정상군이 1(IF), NC/Nga mice 대조군이 1.92(IF)로 나타났고, 실험군이 0.84(IF)로 나타나

대조군에 비하여 현저히 감소하였다(Fig. 11).

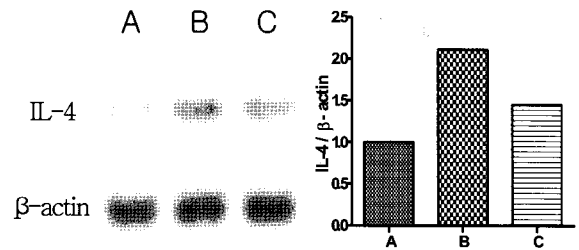


Fig. 8. IL-4 RT-PCR on dorsal biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Normal Balb/c mice skin (A), NC/Nga mouse skin control (B), DG + SG (c). The numbers above each bar denotes the IF value for the treatment.

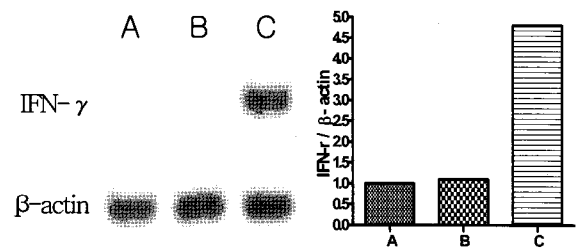


Fig. 9. IFN- γ RT-PCR on dorsal biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Normal Balb/c mice skin (A), NC/Nga mice skin control (B), DG + SG (c). The numbers above each bar denotes the IF value for the treatment.

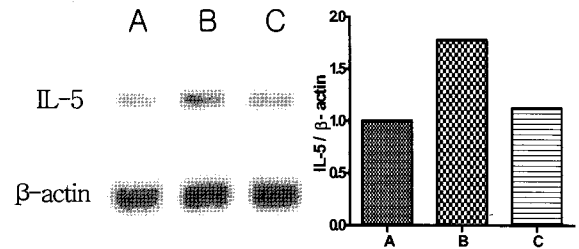


Fig. 10. IL-5 RT-PCR on dorsal biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Normal Balb/c mice skin (A), NC/Nga mice skin control (B), DG + SG (c). The numbers above each bar denotes the IF value for the treatment.

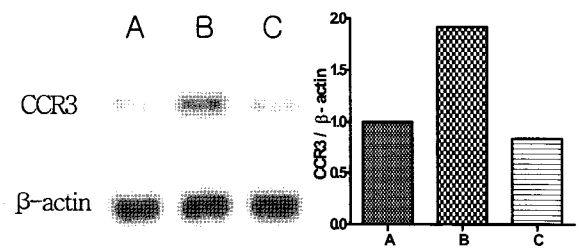


Fig. 11. CCR3 RT-PCR on dorsal biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Normal Balb/c mice skin (A), NC/Nga mice skin control (B), DG + SG (c). The numbers above each bar denotes the IF value for the treatment.

9. NC/Nga dermatitis skin lesion에서의 IL-6 발현에 미치는 영향
 IL-6 수치는 정상군이 6.38±1.2 pg/ml, NC/Nga mice 대조군이 59.9±5.8 pg/ml 로 나타났고, 실험군이 35.7±5.7 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p<0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 12).

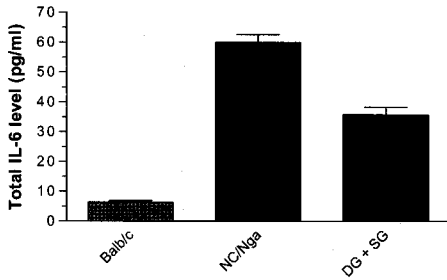


Fig. 12. Culture supernatant IL-6 production in dorsal skin biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice.

10. NC/Nga dermatitis ear lesion의 조직 검사

정상 Balb/c mice의 조직에서는 표피, 진피, 그리고 연골이 뚜렷하게 관찰되었으나, NC/Nga mice 대조군은 표피와 진피의 확장 및 선세포의 비대가 관찰되었다. 실험군에서는 대조군에 비하여 표피와 진피의 두께가 다소 줄어들었고, 표피의 각질화도 심하지 않은 것으로 관찰되었다(Fig. 13).

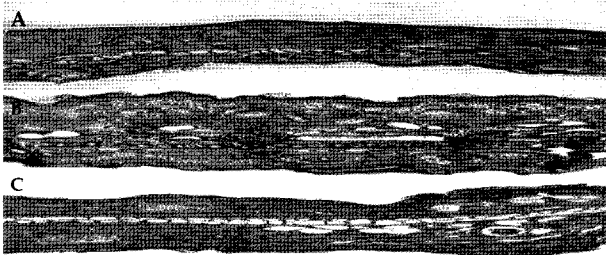


Fig. 13. Histologic features of ear lesion in NC/Nga mice. A: ear tissues from Balb/c mice. B: ear tissues from NC/Nga mice with no treatment. C: ear tissues from NC/Nga mice with DG and SG treatment.

11. NC/Nga dermatitis skin lesion의 조직 검사

정상 Balb/c mice의 조직에서는 표피, 진피, 그리고 기저부선이 관찰되나, NC/Nga mice 대조군에서는 표피가 전반적으로 확장되었으며, 진피의 부종이 심하고 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 반면, 실험군은 대조군에 비하여 표피의 각화와 진피의 부종이 심하지 않고, 염증세포의 침윤도 덜 관찰되었다(Fig. 14).



Fig. 14. Histologic features of skin lesion in NC/Nga mice. A: skin tissues from Balb/c mice. B: skin tissues from NC/Nga mice with no treatment. C: skin tissues from NC/Nga mice with DG and SG treatment.

12. MTT 정량에 의한 세포생존률 측정

MTT 정량방법을 이용하여 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000 ppm 농도의 DG를 포함한 배양액에서 L929 세포를 24시간 배양 후 세포증식률을 측정하여 대조군과 비교하였다(Fig. 15). DG 100 ppm 농도에서는 세포증식률이 대조군에 비해 3%로 증가됨을 확인하였다. 200 ppm과 300 ppm에서는 세포생존률 대조군에 비해 7, 10%이하로 감소하였다. 이러한 결과를 통하여 DG는 L929 세포에 200ppm 농도 이상에서 세포 독성을 유발함을 알 수 있었다.

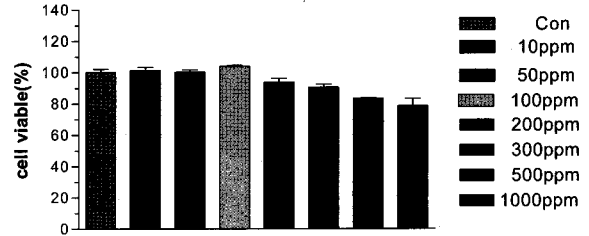


Fig. 15. Cell viability as assessed by the MTT assay for L929 cell line pretreated for 24h with DG. The data are presented as the arithmetic mean percent of the control ± S.D.

13. RAW 264.7 세포에서 염증성 Cytokines 발현도에 대한 DG의 효과

염증반응의 중요한 cytokine들인 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 발현도를 분석하기 위해서 마우스 대식세포주 RAW 264.7 세포에 DG를 10, 50, 100ppm으로 LPS(0.1 μ g/ml)로 자극하기 30분 전에 처리하고 20시간 배양하였다(Fig. 16). 배양후 RNA를 분리한 후 이를 이용하여 cDNA를 합성하여 LPS에 의해 생성된 cytokine의 측정하기 위해서 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 결과 IL-1 β 은 House keeping gene인 β -actin의 양과 비교 측정 시 DG를 10, 50, 100 ppm의 처리하였을 때 IL-1 β 의 발현량이 LPS에 비해 76.6%, 54%, 51.8%로 나타나 DG 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다. TNF- α 은 House keeping gene인 β -actin의 양과 비교 측정 시 DG를 10, 50, 100 ppm의 처리하였을 때 TNF- α 의 발현량이 LPS에 비해 87.2%, 76.8%, 63.2%로 나타나 DG 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다. IL-6은 House keeping gene인 β -actin의 양과 비교 측정 시 DG를 10, 50, 100 ppm의 처리하였을 때 IL-6의 발현량이 LPS에 비해 79.5%, 52.8%, 50.7%로 나타나 DG 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다.

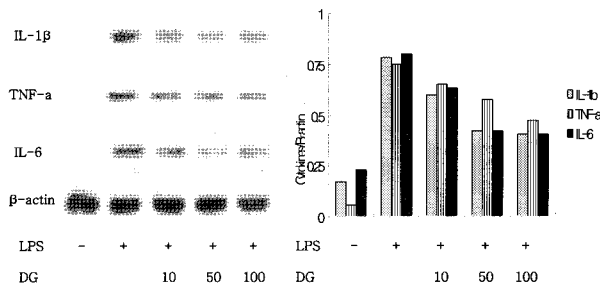


Fig. 16. LPS-induced expression of IL-1 β , TNF- α and IL-6 mRNA is inhibited by DG in RAW 264.7 cells.

14. RAW 264.7 세포에서 COX-2의 발현에 대한 DG의 효과

LPS(1 µg/ml)를 사용하여 대식세포주인 RAW 264.7(1×10⁶ cell) 세포의 COX-2 활성을 유도한 모델에서 DG를 10, 50, 100ppm 농도로 24시간 처리하여 COX-2 발현 정도를 Western Blot을 수행하여 분석하였다. LPS 단독 처리군에 비해 DG를 처리한 실험군에서 DG 농도존적으로 COX-2 발현 정도가 억제됨을 확인하였다. Fig. 17에서 같이 DG를 10 ppm, 50 ppm을 처리한 군에서 35, 50% 정도 발현 억제 효과가 나타남을 확인하였고, 100 ppm에서는 60% 정도의 COX-2 발현 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

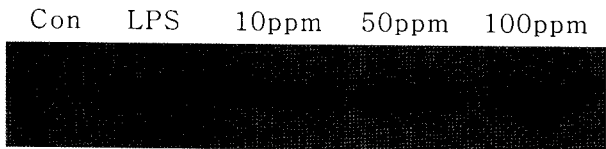


Fig. 17. Effects on COX-2 expression from LPS-induced RAW 264.7 cells(Western blot). The same amount of protein(30µg) was loaded in each lane.

고찰

아토피 피부염은 소아기에서 가장 먼저 나타나는 알레르기성 질환으로 흔히 영아습진, 알레르기성 습진이라고도 하며 임상적으로는 紅斑, 浮腫, 심한 癢痒症, 滲出, 부스럼 딱지와 鱗屑을 특징으로 하며, 조직학적으로는 면역세포의 침윤을 특징으로 하는 만성적으로 재발하는 염증성 피부질환이다^{26,28)}.

아토피 피부염의 원인에 대해서는 확실한 원인은 밝혀지지 않고 있으나 유전학적, 면역학적 요인, 이상 약물반응, 환경요인, 생활습관, 음식물이나 미생물 등이 관여할 것이라 보고 있다²⁹⁾. 이 질환은 처음에는 소양증이 특징이고 삼출, 부스럼딱지 등은 소양증으로 인해 얼굴을 비비고 긁는 행위에 의해 외상으로 수포와 딱지가 생기는 것으로 이는 2차적인 속발진의 증상이라고 할 수 있다. 소양증과 피부 건조증은 아토피 피부염의 주증상으로 비정상적인 피부질환 반응이나 면역학적 반응을 동반한다³⁾. 소양증 유발과정에 여러 가지 염증 유발인자 및 cytokine 등이 관여하는 것으로 생각된다^{30,31)}.

치료방법으로는 전신 및 국소 치료법으로 히스타민의 유리를 억제하는 항히스타민제, 면역억제제로서 염증반응을 감소시키는 작용을 하는 부신피질호르몬제, 포도상구균 등의 발생을 감소시키기 위한 항균제를 사용하고 있다, 또한 첩포 검사나 단자 검사, 혈청특이 IgE 등의 검사상 양성반응을 보인 환원에 대하여 미량의 항원을 투여하면서 증량 투여하는 탈감작요법, 자외선이 증상호전에 기여한다고 추정하여 시행하는 UVA, PUVA요법, 혈청 IgE의 증가가 IL-4와 IFN-γ의 불균형에 의하여 기인하므로 IFN-γ를 치료하는 면역요법 등이 시행되고 있지만 일부 환자에서는 반응하지 않는 경우도 많고, 증상이 완화된다고 하더라도 지속적으로 재발하기도 한다고 하였다^{32,33)}. 결국 아토피 피부염이 아토피 질환일 뿐만 아니라 유전적 요인, 환경적 요인, 정신적요인, 피부감염 등 여러 요인에 의하여 영향을 받는 다인자적 질환이기 때문에, 의학적인 완치보다는 증상의 완화를 통해 관해를 적극적으로

로 유도해 주는 것이 가장 올바른 치료법으로 알려져 있다³⁴⁾.

韓醫學에서 아토피 피부염은 奶癬, 胎癬, 胎熱, 胎熱丹毒, 胎毒瘡疥, 胎熱瘡, 濕疹, 濕瘡, 赤遊丹, 赤遊風, 四驚風 등의 범주에 속할 수 있으며 일반적으로 胎熱로 알려져 있다³⁵⁻³⁷⁾. 文獻을 살펴보면 巢³⁶⁾는 《諸病源候論·癬候》에서 風邪가 血氣와 서로 어울려 皮膚 사이에서 흠어지지 않으면 粟粒狀 隱疹이 생기고 이것이 오래되면 진물이 흐르는데 이를 癬이라 하여 아토피 피부염의 病理과 症狀에 대해 최초로 언급을 하였고 아울러 소아의 얼굴에 癬이 생기면 피부가 胎癬化, 乾燥해지는데 이를 乳癬이라 하여 嬰兒濕疹과도 유사한 것으로 보았다. 또한 吳⁷⁾는 《醫宗金鑑·外科心法要訣·嬰兒部》에서 아토피 피부염에 대해 胎熱瘡이라 하고 그 중 嬰兒 頭面이나 눈썹 끝에 나타나는 것을 奶癬이라 하였는데 癢痒과 鱗屑이 있고 형태는 奶疥와도 같다 하였다. 이는 모두 胎中風熱이 원인이라 하였으며 증상에 따라 피부가 마른 풀과 같은 모양이면 乾癢, 粟粒狀으로 매우 가렵고 누른 진물이 온몸에 두루 있으면 濕癢이라 하였다.

아토피 피부염의 病因病機로는 주로 稟賦不足하여 風, 濕, 熱의 邪氣에 感受되기 쉽게 되어 脾胃運化機能이 損傷을 받게 되면 피부의 영양실조로 발생하게 되는 것으로 보고 風熱, 濕熱, 血熱, 血虛 등을 원인으로 들었다^{35,38)}. 그에 따른 治法은 內治法으로 祛風清熱, 涼血解毒, 健脾燥濕, 養血祛風이 있고 外治法으로 祛風止痒, 潤燥하는 약물을 사용한 敷貼法, 洗滌法, 油膏法 등이 있다³⁾.

當歸飲子是 嚴¹⁰⁾의 《濟生方》에 當歸引子로 처음 기록된 처방으로 危³⁹⁾는 當歸飲으로 別名하였다. 心血이 凝滯되고 안으로 風熱이 쌓이면 피부에 瘡疥가 발생하며 혹은 붓거나 소양감이 있고 膿水가 浸淫하거나 또는 피부가 發赤하여 두드러기가 생기는 것을 치료할 목적으로 立方되었다^{40,41)}. 四物湯에 瘡疥를 다스리는 藥材로 구성되어 있어서 血虛, 血熱, 血燥로 因하여 오래도록 낫지 않는 皮膚癢痒症에 사용하였다⁴²⁾.

三黃洗劑는 外傷科學에서 각종 無滲出性 皮膚炎과 滲出性 皮膚癢痒症등에 사용되는 처방¹²⁾으로 大黃, 黃柏, 黃芩, 苦參으로 구성되어 있으며 이후에도 黃水瘡, 赤白遊風, 乳發 등의 병증에 외치약으로 사용되는 처방이다. 본 실험에 사용된 三黃洗劑加味方은 三黃洗劑에 清熱解毒의 작용이 있는 金銀花, 連翹, 馬齒莧을 加味하였다.

NC/Nga mice는 사람의 아토피 피부염을 연구하기 위한 좋은 동물모델로⁴³⁾ 1957년 나고야 대학의 Dr. Kondo에 의해 처음으로 확립된 inbred mice이다. Specific pathogen free(SPF) 상태에서는 건강한 상태를 유지하지만 non-sterile(NS) 상태에서는 8주 정도에 습진이 생겨나고, 17주 정도에 부종, 출혈, 부식, 건조, 탈모 증상들이 쥐의 목, 등, 귀, 얼굴에 나타난다. 또한 인간의 아토피 피부염에서 관찰되는 것과 마찬가지로 skin lesion에는 CD4 T세포의 infiltration 및 대식세포, 호산구, 비만세포가 발견된다. IgE는 8주부터 급격히 증가하여 16-18주엔 IgE의 농도가 최고에 달하며, 증가된 IgE는 B세포, CD40 ligand, IL-4의 sensitivity를 증가시킨다. 반면 IgG는 12주까지 별다른 영향을 끼치지 않는다. NC/Nga mice에서의 증상들은 hyperkeratosis, acanthosis, parakeratosis로 사람의 아토피 피부염 환자에게서 관찰되는 증

상들과 유사하다. 그러므로 NC/Nga mice는 아토피 피부염에 있어 좋은 동물 모델로 알려져 있다.

본 실험은 아토피 치료에 사용되는 DG와 SG를 이용하여 in vivo 실험으로 아토피 유발 모델인 NC/Nga mice에 대해 항알레르기 효과를 알아보고 더불어 in vitro 실험으로 RAW 264.7 세포에 DG를 농도별로 처리하였을 때 항염증 효과를 알아보기 위해 시행되었다.

먼저 NC/Nga mice에 8주부터 16주까지 2, 3, 3주(10, 13, 16주) 간격으로 NC/Nga mice의 피부 손상 정도를 측정한 결과 대조군은 10주에 4.71 ± 0.80 , 13주에 7.28 ± 0.78 로 급격한 증가를 나타내었으며, 실험 종료 전 16주령은 9.40 ± 0.83 로 나타났다. 이에 반해 실험군은 10주까지는 대조군과 40% 정도 감소한 2.87 ± 0.74 로 관찰되었고, 13주와 16주에는 각각 3.57 ± 0.66 과 4.33 ± 0.73 으로 나타나 대조군에 비하여 현저한 피부손상 정도 지표(Clinical skin severity score) 감소를 나타냈다(Fig. 1B).

조직학적 분석에서 염증을 일으키는 면역세포, 이완된 세포, 염증 표피, 그리고 각화과다로 인한 표피의 두께가 감소된 점(Fig. 13, 14)은 본 시료의 항알레르기 작용에 대한 유의성을 실험적으로 증명해 준다.

DG와 SG를 처리한 NC/Nga mice의 혈액에서 IgE 수치는 13주와 16주에서 대조군에 비하여 약 68%와 69%의 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타내었고(Fig. 2), 혈중 IL-6 수치 역시 대조군에 비하여 16주에서 64%의 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 2).

실험군의 혈중 IL-4 수치는 최종 16주령에서 대조군에 비하여 54%(Fig. 3), IL-5 수치는 48%(Fig. 3)의 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타내었다.

Dorsal skin lesion에서의 IL-4, IL-5의 발현(Fig. 8, 9)과 NC/Nga dermatitis skin lesion에서의 IL-6 발현(Fig. 12)에서 유의성 있는($p < 0.01$) 감소 역시 상기 결과와 부합됨을 입증해 주고 있다.

IL-5와 더불어 피부 염증 부위에 만성으로 침윤이 일어나는 Th2세포, 호산구, 중성구 및 비만세포 등에서 발현되는 CCR3 발현 또한 대조군에 비하여 2.3배 정도 발현이 감소하였다(Fig. 11).

본 실험에서 혈청 중 IFN- γ 수준은 대조군에 비하여 약 1.75배로 유의성 있는 ($p < 0.01$) 증가를 나타냈고(Fig. 4), dorsal skin lesion의 발현 결과에서는, IL-4 발현은 대조군에 비하여 약 1.45배(Fig. 8) 감소, IFN- γ 발현은 NC/Nga mice 대조군에 비하여 4.3배 증가(Fig. 9), IL-5는 대조군에 비하여 약 1.5배 감소(Fig. 10)하였다. 이 같은 결과는 본 시료가 Th2세포에서 분비되는 IFN- γ 를 증가시켜 면역 반응에 관여하는 Th2세포를 억제함으로써 Th2세포에서 Th1세포로의 전환 작용을 발휘함을 알 수 있다.

본 실험에서 IgE의 생산과 관련되는 IgM과 B세포 분화 중에 비례적으로 증가되는 치환된 면역 글로블린인 IgG1의 변화에서 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 감소로(Fig. 5, 6), IgE 발현 결과와 부합됨으로써, DG와 SG가 Th2 세포 활성화 억제와 더불어 IgE 생산에 관련된 B세포 분화를 억제하는 작용이 있음을 알 수 있다.

DG의 안전성을 확인한 실험으로 세포 독성 평가는 DG 100 ppm 농도에서는 세포 증식률이 대조군에 비해 3%로 증가됨을 확인하였다. 200 ppm과 300 ppm에서는 세포 생존률 대조군에

비해 7, 10%이하로 감소하였다. 이는 DG는 L929 세포에 200ppm 농도 이상에서 세포 독성을 유발됨을 알 수 있었다. 좀 더 안전성을 확인하기 위해서는 경구 아급성 독성, 급성 독성 등의 in vivo 실험을 수행해야 할 것으로 사료된다.

DG의 염증성 cytokine들의 발현도에 대한 효과(Fig. 16)는 IL-1 β 는 DG를 10, 50, 100 ppm의 처리 시 LPS에 비해 76.6%, 54%, 51.8%로 나타나 DG의 농도 의존적으로 억제되었으며(Table 5), TNF- α 에서는 10, 50, 100 ppm의 처리 시 LPS에 비해 87.2%, 76.8%, 63.2%로 나타나 DG의 농도 의존적으로 억제되었으며(Table 6), IL-6에서도 10, 50, 100 ppm의 처리 시 LPS에 비해 79.5%, 52.8%, 50.7%로 나타나 DG의 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다(Table 7).

본 실험에서는 LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)를 사용하여 대식세포주인 RAW 264.7(1×10^6 cell)의 COX-2 활성을 유도한 모델에서 당귀음자는 LPS 단독 처리군에 비해 DG의 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다.

종합적으로 DG는 RAW 264.7 세포에 농도별 처리하였을 때 COX-2 발현을 억제하고 염증성 cytokine인 IL-1 β , TNF- α , IL-6을 감소시킴으로 항염증 효과가 있음을 알 수 있다. 또한 DG와 SG를 병용하였을 때 Th1세포에서 생산되는 IL-4, IL-5 등을 억제하며, Th2세포에서 생산되는 INF- γ 를 증가시켰다. 그리고 조직검사에서 표피와 진피의 염증 정도와 침윤된 염증 면역 세포 등이 대조군에 비하여 현저하게 감소하였다. 이러한 결과로 DG와 SG의 병용이 면역질환 중의 하나인 아토피 피부염의 치료제로 가능성이 있을 것으로 사료된다. 또한 향후 약물 독성 평가(in vivo) 등의 안정성에 관한 연구가 필요하리라 사료된다.

결 론

當歸飲子和 三黃洗劑加味方の 항아토피 치료 기전을 규명하고자, NC/Nga mice를 이용하여 다양한 면역 반응을 관찰하였던 바, 다음과 같은 결론을 얻었다.

NC/Nga mice의 피부 손상 정도는 13주와 16주에 실험군이 대조군에 비하여 각각 50.9%, 53.9% 감소하였다. NC/Nga mice의 혈중 IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IgM 및 IgG1 수준은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, IFN- γ 수준은 유의성 있게 증가하였다. NC/Nga mice의 비장 무게는 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. NC/Nga mice의 피부 조직 배양에서 IL-4, IL-5, CCR3 유전자 발현은 실험군이 대조군에 비하여 현저히 감소하였고, IL-6 발현량은 유의성 있게 감소하였으며, IFN- γ 의 유전자 발현은 대조군에 비하여 증가하였다. NC/Nga mice의 귀, 등 피부 조직 변화에서는 표피와 진피의 염증 정도와 침윤된 염증 면역 세포 등은 실험군이 대조군에 비하여 현저하게 감소되었다. RAW 264.7 세포에서 항염증 효과는 COX-2 활성을 유도한 모델에서 실험군이 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제되었다. RAW 264.7 세포에서 염증성 cytokine 발현도에 대한 효과는 IL-1 β , TNF- α , IL-6 유전자 발현은 실험군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 세포독성평가는 L929 세포에서 100ppm 농도에서는 세포증식률이 실험군 대조군에 비해 3% 증가되었으

며, 200ppm 농도 이상에서 세포 독성을 유발됨을 확인하였다.

이러한 결과로 볼 때 當歸飲子와 三黃洗劑加味方 병용이 Th1세포에서 생산 되는 IL-4, IL-5, IL-6 등을 억제하며, Th2세포에서 생산 되는 INF- γ 를 증가시키므로 Th1과 Th2의 면역반응의 불균형으로 발생하는 아토피 피부염 치료에 효과가 있는것으로 사료된다.

참고문헌

- 장호선. 아토피 피부염의 진단과 치료. 가정의학회지 23: 831-838, 2002.
- 이해성, 김중서, 편복양. 소아 아토피 피부염의 빈도와 원인의 변화 소아알레르기 및 호흡기학회지 12(4):263-270, 2002.
- 공남미, 지선영. 아토피 피부염의 양·한방적 고찰. 대한외과과학회지 12(1):241-253, 1999.
- 박윤기, 이승현, 이승구. 흔히 보는 피부질환 진단과 치료. 서울, 고려의학, pp 6-7, 1993.
- 박용민. 아토피피부염 병태생리에 대한 최신 지견. 소아알레르기 및 호흡기학회지 16(3):189-196, 2006.
- 巢元方. 諸病源候論. 上海, 集文書局, p 505, 1965.
- 吳謙. 醫宗金鑑(下). 北京, 人民衛生出版社, pp 443-444, 1982.
- 趙純修. 中醫皮膚病學, 北京, 科學出版社, pp 110-112, 1999.
- 김미정, 이승연. 소아 아토피 피부염에 대한 문헌적 고찰. 대한소아과학회지 14(2):169-184, 2000.
- 嚴用和. 濟生方. 中國醫學大系卷十一, 여강출판사, p 522, 1987.
- 朴旻勳. 當歸飲子 加減方の 처방별 (A, B) 아토피성 알레르기 반응 조절효과 비교 연구. 원광대학교 석사학위논문, 2004.
- 江克明, 包明憲. 방제대사전, 서울, 의성당, p 68, 1991.
- 이건학, 노석선. 건선에 활용되는 가미당귀음자에 대한 실험적 연구, 대한외과과학회지 19(2):113-142, 1999.
- 심상진, 김중환, 최정화. 당귀음자가감을 응용한 건선 환자 1례에 대한 임상적 고찰. 대한안이비인후피부과학회지 15(1):336-342, 2002.
- 盧石善. 當歸飲子 水抽出液이 抗 ALLERGY 反應과 MOUSE의 免疫細胞機能에 미치는 影響. 원광대학교대학원, 1990.
- 元泳皓. 三黃洗劑加味方の 항균, 항염 및 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구. 원광대학교 대학원, 2004.
- 尹華廷. 아토피 皮膚炎 患者의 韓醫學的인 臨床類型分類에 대한 研究. 동의대학교 석사학위논문, 2001.
- 金岐勳. 桑葉이 아토피 피부염에 미치는 영향. 경희대학교 석사학위논문, 2004.
- 韓奎哲. 牛蒡子가 아토피 피부염에 미치는 영향. 경희대학교 석사학위논문, 2004.
- 박지수, 김윤희, 강탁림. 連翹散이 아토피 동물 모델에 미치는 영향 동의생리학회지 20(1):58-64, 2006.
- 박민철, 최인화. 柴胡瀉肝散 투여가 아토피 피부염을 유발한 동물모델의 각질증 기능회복에 미치는 영향 25(3):137-148, 2004.
- 민영규, 최정화, 김중환, 박수연. 消風散加減方과 外治方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지 18(1):116-134, 2005.
- Heishi, M., Kagaya, S., Karsumuma, T., Nakajima, T., Yuki, K., kasawa, A., Maeda, M., Gunji, S., Sugita, Y., Tsujimoco, G., Sairo, H. High-density oligonucleotide array analysis of mRNA transcripts in peripheral blood cells of severe atopic dermatitis patients. Int Arch Allergy Immunol, 129: 57, 66, 2002.
- Schultz Larsen, F., Diepgen, T., Svensson, A. The occurrence of atopic dermatitis in north Europe, An international questionnaire study. J Am Academy Dermatology, 34: 760-764, 1996.
- 김덕곤 외 7명. 동의소아과학, 정담, pp 660-664, 2002.
- 홍창희. 小兒科學. 대한교과서주식회사, pp 1016-1018, 1997.
- Clark, R.A., Kristal, L. Atopic dermatitis, In: Sams, W.M., Lynch, P.J., editors, Principles and practice of dermatology, New York, Churchill Livingstone, pp 403-418, 1996.
- 정규만. 동의소아과학. 행림출판사, pp 567-568, 1985.
- 강병수. 한방임상 알레르기. 성보사, pp 196-201, 1988.
- 조용주, 채병윤. 아토피 피부염의 발생부위에 관한 고찰. 대한한의학회지 15(1):763-770, 1994.
- 강형재 외. 피부과학. 대한 피부과학회 교과서 편찬위원회, pp 21-25, 133-138, 1994.
- 대한피부과학회. 피부과학, 여문각, pp 133-138, 1994.
- 장호선. 아토피 피부염의 진단과 치료. 가정의학회지 23: 831-838, 2002.
- 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海, 上海科學技術出版社, pp 280-282, 461-463, 1985.
- 巢元方. 諸病源候論校釋. 北京, 人民衛生出版社, p 1383, 1982.
- 신광호, 한동하. Atopy性 皮膚炎 건선 지루성피부염의 감별 진단에 대한 동서 의학적 감별. 한의외치요법학회지 4(1):5-15, 2002.
- 陳實功. 校正外科正宗. 上海, 錦章圖書局, pp 11-13, 1860.
- 危亦林. 世醫得效方. 인민위생출판사, p 640, 1990.
- 이상인, 안덕균, 신민호, 노승현, 이영중, 김선희. 漢藥臨床應用. 成輔社, pp 90-91, 433-436, 107-108, 356-357, 68-72, 1998.
- 이상인. 방제학, 서울, 영림사, pp 171-172, 1990.
- 具本弘. 새韓方處方解說. 保健新報, pp 91-95, 1985.
- Rudikoff, D. and Lebwohl, M. Atopic dermatitis. Lancet, 351: 1715-1721, 1998.