

# 溫清飲과 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향

홍철희 · 서은성 · 원영호 · 김영근 · 황충연\*

원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

## Effects of Onchung-eum Administration along with Samhwangseze-gamibang on Treatment Atopic Dermatitis Development in NC/Nga Mice

Chul-Hee Hong, Eun-Sung Seo, Young-Ho Weon, Yeong-Geun Kim, Chung-yeon Hwang\*

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

The purpose of this study is to examine closely effect that Onchung-eum(OC) and Samhwangseze-gamibang(SG) used to atopic dermatitis disease patient get in atopy eruption control experimentally. Atopic dermatitis(AD) of molecular mechanism underlying it's effectiveness is unknown. We analyzed the expression the clinical severities in 13 and 16 weeks old NC/Nga mice, and the spleen weight of OC with SG treated NC/Nga mice, and mRNA expression levels of IL-4, IL-5, and CCR3 in the skin tissues of OC with SG treated NC/Nga mice, and IL-1β, TNF-α, IL-6 express of gene, and Histological observation of the ear and skin tissues, and than IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IgM, IgG1 levels in the serum of OC with SG treated NC/Nga mouse group compared to the untreated control mouse group. Also, We examined cell toxicity that of OC is safety the strength of 10, 50, 100ppm and inflammatory RAW 264.7 in the serum of OC. Thus in these present study diverse immune responses in terms of chemical mediators related to AD were investigated using an atopic mouse model NC/Nga after OC along with SG. At the result that OC along with SG treat is can effective use for the treatment of atopic dermatitis(AD).

Key words : Onchung-eum(溫清飲: OC), Samhwangseje-gamibang(三黃洗劑加味方; SG), External treatment, Atopic dermatitis, NC/Nga mouse

### 서 론

아토피(atopy)란 1925년 Coca가 음식물과 흡입성 물질에 대한 알레르기 반응의 결과로 피부염이나 천식, 고초열(枯草熱)이 나타나는 경향을 아토피라고 기술한 이후부터 사용되었으며<sup>1)</sup>, 아토피 피부염은 한 해에 태어나는 신생아 중 20%가 앓는다는 보고가 나올 정도로 매우 흔한 피부병이며, 이 중 5%는 어른이 되어도 지속되는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 최근 우리나라에서도 알레르기 질환의 급증과 함께 아토피 피부염 환자가 증가하고 있어 의료계의 해결 과제로 대두되고 있다<sup>3)</sup>.

아토피 피부염의 발병원인은 확실히 밝혀지지 않았으나, 유

전적, 환경적, 면역학적 그리고 정신적인 인자들에 의한 다인적 인 피부질환으로 생각되어지고 있다<sup>4,5)</sup>.

아토피성 피부염은 한의학적으로는 奶癬, 嬰兒濕疹, 浸淫瘡, 胎疥癩, 血風瘡, 四彎風 등의 범주에 해당하며<sup>6)</sup>, 隋대에 巢<sup>7)</sup>의 《諸病源候論》에 “小兒面上癬皮如甲錯起乾燥, 謂之乳癬.”이라는 記錄 以來로, 明대·陳<sup>8)</sup>의 《外科正宗》에서는 “因兒在胎中, 母食五辛, 父餐炙博, 遺熱與兒”가 原因이 되고, 임상표현은 “頭面遍身發奶癬, 流滋成片, 睡臥不安, 瘙癢不絕”이라고 하였다.

溫清飲<sup>9)</sup>은 明代 龔廷賢<sup>10)</sup>의 “萬病回春”에 처음 收錄된 血熱 血風生風으로 인한 피부 질환에 응용되는 처방이다.

최근 아토피에 대한 연구로 朴<sup>11)</sup>은 아토피 피부염의 동·서의학적 문헌고찰, 尹<sup>12)</sup>은 아토피 피부염 환자의 한의학적인 임상유형 분류에 대한 문헌 연구를 보고한 바가 있으며, 실험 연구로는 金 등<sup>13-15)</sup>이 단일 한약재를, 朴 등<sup>16-19)</sup>은 피부 질환에 사용되는 처방으로 아토피 효과를 규명한 바가 있다. 민<sup>20)</sup>은 내·외

\* 교신저자 : 황충연, 광주시 남구 주월동 543-8 원광대학교 부속한방병원

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

· 접수 : 2007/04/05 · 채택 : 2007/05/18

치 병용치료가 아토피 생쥐 병태 모델에 미치는 영향에 대한 실험적 시도를 하였다.

아토피 피부염에 대한 다양한 한의학적 접근이 시도되었으나, 그간 한방적인 연구나 치료 방법이 주로 내복약에 의존하였고, 외치에 대한 연구가 부족하였을 뿐 아니라 실제 임상에서 응용되고 있는 내외치 병용 치료에 대한 연구 또한 많지 않은 실정이다.

저자는 溫清飲과 三黃洗劑加味方의 병용치료 연구로 NC/Nga 생쥐 병태 모델을 이용, 다양한 면역학적 기전을 관찰하였던 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물 및 약제

웅성(雄性) 6주령의 Balb/c, NC/Nga mouse를 중앙실험동물에서 공급받아 실험당일까지 고품사료와 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 溫清飲(OC)과 三黃洗劑加味方(SG)의 약제는 원광대 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 溫清飲 1점 및 三黃洗劑加味方의 내용과 구성은 다음과 같다(Table 1, 2).

Table 1. Prescription of OC.

Hrbal Name	Scientific Name	Dose(g)
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	5
黃柏	<i>Phellodendri Cortex</i>	5
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	5
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	5
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	5
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	5
白芍藥	<i>Paeonia Radix Alba</i>	5
熟地黃 九蒸	<i>Rehmanniae Radix</i>	5
枳實	<i>Ponciri Fructus</i>	5
苦參	<i>Sophorae Radix</i>	5
Total Amount		50

Table 2. Prescription of SG.

Hrbal Name	Scientific Name	Dose(g)
大黃	<i>Rhei Rhizoma</i>	120
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	120
黃柏	<i>Phellodendri Cortex</i>	120
苦參	<i>Sophorae Radix</i>	120
金銀花	<i>Lonicera japonica Thunb</i>	120
連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	120
馬齒莧	<i>Portulaca oleracea</i>	120
Total Amount		840

#### 2) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약으로 DEPC, NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>EDTA, complete adjuvant, chloroform, collagenase IV, RPMI-1640, isopropanol, 적혈구용혈액, EtBr, D-PBS, DMEM, MgCl<sub>2</sub>, agarose, FBS, RNase inhibitor, Taq polymerase, random primer, dNTP, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, IL-4, 5, 6, IFN- $\gamma$ 의 ELISA kit, IgE, IgM, IgG1의 ELISA kit, RNazolB는 invitrogen을 사용하였고, 그 외 사용된

시약은 Duksan(korea)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 시료 제조

溫清飲 7첩(350 g)에 증류수 1000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 전탕 후 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류 장치로 농축하였다.

외치방인 三黃洗劑加味方은 840 g에 증류수 3000 ml를 가하여 약한 불로 3시간 전탕한 후, 증류하여 1.5 L로 만들어 분무기에 넣어 사용하였다.

#### 2) 약물 투여 및 염증 유발

NC/Nga 실험군은 溫清飲을 8주간 주 3회(월, 수, 금) 경구 투여(250 mg/kg) 하였으며, 三黃洗劑加味方은 매일 2회 등 부위를 충분히 적실 정도로 분무하였다. NC/Nga 대조군은 생리식염수를 溫清飲과 같은 용량, 용법으로 경구 투여하였으며, 외용제 또한 생리식염수를 실험군과 같은 방법으로 도포하였다.

아토피 피부염은 1-chloro 2,4-dinitrobenzene(DNCB)을 이용하여 유발하였다. 먼저 NC/Nga 마우스의 등부위를 깨끗이 제모한 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 실험 4일 전 1% DNCB용액(acetone:olive oil=3:1) 200  $\mu$ l를 등 부위에 도포하고 실험 시작일 부터 종료일까지 8주간 일주일에 2번 0.2% DNCB용액 150  $\mu$ l를 등 부위에 도포하였다.

#### 3) 피부 손상 정도 측정

NC/Nga 마우스의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하였다. 육안평가 결과는 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타낸다. 평가항목은 홍반(erythema), 찰상(Abrasion), 부종과 혈종(Edema & excoriation), 짓무름(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- $\gamma$ , IgM, IgG1 정량화

혈청내 IgE 량은 8주, 10주, 13주, 16주에 생쥐의 눈에서 capillary tube를 이용하여 약 100ul의 혈액을 채혈한 후 원심분리기로 혈청을 분리하여 IgE 량을 ELISA Kit로 측정하였다. 溫清飲을 투여 8주째 NC/Nga 생쥐를 ethyl ether로 마취한 후 심장천자법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리한 후 혈청 중 IL-4, 5, 6, INF- $\gamma$ , 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  $\mu$ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는  $\beta$ -actin, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, CCR3, IFN- $\gamma$  유전자를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmol/ $\mu$ l)와 antisense primer (20 pmol/ $\mu$ l)를 혼합하여 1  $\mu$ l를 가하고, 다시 3  $\mu$ l 2.5 mM dNTPs, 4  $\mu$ l 10xPCR buffer, 0.18  $\mu$ l Taq polymerase (5 U/ $\mu$ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 40  $\mu$ l가 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation; 95℃, 5분, denaturation; 95℃, 5분, annealing; 55℃, 1분, elongation; 72℃, 1분을 25 cycle한 뒤 post-elongation을 72℃에서 3분 동안의 조건

으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR product는 20  $\mu$ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

6) 피부 세포내 IL-6 정량

NC/Nga 생쥐의 얼굴과 목 부위를 제모한 뒤 피부 조직을 각각 1 g씩 떼어내어 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) 항염증 실험 및 세포독성 실험

(1) Western Blot of COX-2

RAW 264.7( $1 \times 10^6$  cell)을 60mm plate에서 배양한 후 LPS(1  $\mu$ g/ml)를 처리한 후 溫清飲(OC) 10, 50, 100 ppm을 24시간 처리한다. 24시간 처리 후 배양액을 제거하고 세포를 lysis bufer(RIPA buffer에 protease inhibitors 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  $\mu$ g의 단백질을 전기 영동한다. 전기영동 후 NC membrane에 transfer한다. transfer된 NC membrane에 primary antibody COX-2 로 12시간 incubation한다. secondary Ab (1:2000)로 2 시간 동안 incubation 한다. ECL 방법으로 COX-2 band를 detection한다.

(2) 溫清飲의 처리농도 및 시간별 처리

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

(3) MTT 정량

Mosmann<sup>25)</sup>의 방법에 따라 배양한 세포주를 각각  $5 \times 10^3$  cell/ml이 되도록 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 이들 세포를 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000 ppm 농도의 溫清飲이 포함된 배양액에서 24시간 배양 후 MTT 200  $\mu$ l/ml 가 포함된 배양액을 well 당 200  $\mu$ l씩 넣은 후 다시 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 DMSO를 10  $\mu$ l/well씩을 넣어 5분간 실온에 방치하며 Formazan을 용해한 후 microplate Reader로 흡광도 570 nm에서 측정한다.

(4) 역전사중합연쇄반응 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction ; RT-PCR)

역전사중합연쇄반응은 역전사 kit와 중합연쇄반응 kit를 이용하여 실시하였다. 즉 rapid guanidium isothiocyanate 방법으로 마우스 대식세포주로부터 추출한 0.5  $\mu$ g의 total RNA를 역전사반응액 과 혼합하여 42 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA 1 $\mu$ l(0.01  $\mu$ l), cytokine 혹은  $\beta$ -actin primers 각각 1  $\mu$ l(25 pg), 그리고 중합연쇄반응액 17  $\mu$ l을 혼합한 후 Perkin elmer 를 이용하여 95  $^{\circ}$ C에서 30 초, 62  $^{\circ}$ C에서 30 초, 72  $^{\circ}$ C에서 30 초 동안 30회 반복 실시하여 증폭된 cDNA는 1.2% agarose gel에서 전기영동하였다. Cytokines의 mRNA/ $\beta$ -actin mRNA 양은 ethidium bromide로 염색한 band density를

Fluor-STM Imager 로 측정하여 정량하였다.

8) 조직 병리 검사

실험 종료 후에, 왼쪽 귀 끝부분과 등쪽 피부를 떼어 내어 10% paraformaldehyde에서 24시간 동안 포르말린에 고정한뒤 24시간 후 ethanol에 탈수화 하였다. xylene 처리 후 파라핀에 조직을 담고 조직을 고정하여 파라핀이 충분히 굳은 후에 조직을 5  $\mu$ 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(H&E) 염색을 실시하였다.

9) 통계학적 분석

통계학적 유의성 검정은 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

溫清飲을 구강 투여하고, 三黃洗劑加味方 분무를 8주령부터 일 2회 실시하여 NC/Nga mice의 피부손상정도를 관찰한 결과, NC/Nga 생쥐가 자연적으로 피부염으로 유발된 conventional 조건에서는 10주 이후 피부 발진이 유발된 것을 알 수 있었다(Fig. 1A).

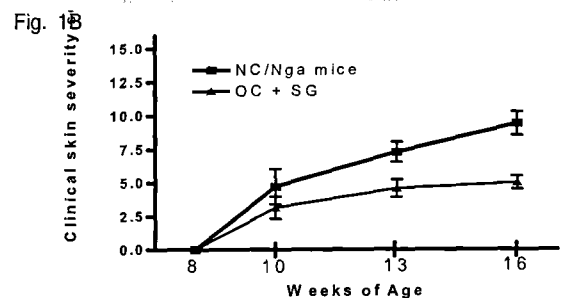
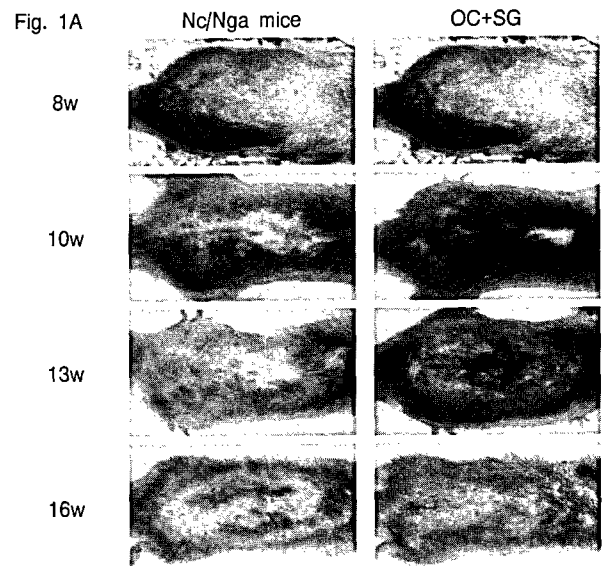


Fig. 1. Clinical skin features and severity of dermatitis in NC/Nga mice.

Conventional 조건에서는 8주부터 16주까지 2, 3, 3주(10, 13, 16주) 간격으로 피부 손상정도를 측정한 결과 대조군은 10주에 4.71±0.80, 13주에 7.28±0.78로 급격한 증가를 나타내었으며, 실험 종료 전 16 주령은 9.40±0.83로 나타났다. 이에 반해 실험군은 10 주까지는 대조군과 약간 감소한 3.14±0.77로 관찰되었고, 13주와 16주에는 각각 4.57±0.74와 5.00±0.76으로 나타나 대조군에 비하여 현저한 피부손상정도지표(Clinical skin severity score) 감소를 나타냈다(Fig. 1B).

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 3.74±0.65, 34.52±7.35 ng/ml로 나타났다. 대조군의 13주와 16주에서는 각각 304.1±31.45, 419.3±38.1 ng/ml 로 나타났고, 실험군은 각각 107.8±16.3, 145.6±19.1 ng/ml 로 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/ml 로 나타났고, 실험군은 각각 77.8±7.3, 155.0±20.8 pg/ml 로 나타나 12주에 대조군에 비하여 IL-6 수치가 크게 감소되었다. 대조군의 13주와 16주에서 각각 735.2±27.0, 800.0±50.4 pg/ml로 나타났고, 실험군은 각각 248.6±43.6, 294.2±61.1 pg/ml 로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 (p<0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 2B).

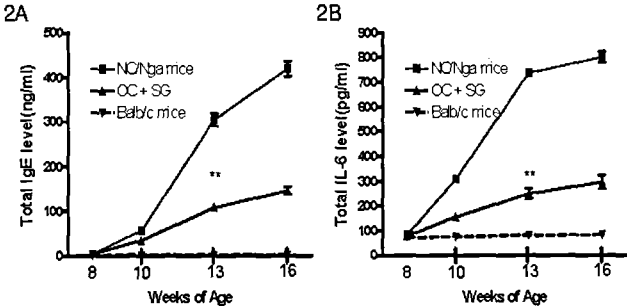


Fig. 2. Serum IgE and IL-6 elevation and development of dermatitis in NC/Nga atopy dermatitis model mice.

3. 혈청 중 IL-4, IL-5 발현에 미치는 영향

IL-4 수준은 최종 16주령에서 정상군은 16.5±1.2 pg/ml 로, NC/Nga 대조군은 74.3±7.1 pg/ml로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였고, 실험군은 38.7±6.0 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 대조군은 257.8±16.3 pg/ml로 나타난 반면, 실험군은 137.8±8.1 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 3B).

4. 혈청 중 IFN-γ 발현에 미치는 영향

혈청 중 IFN-γ 수준은 최종 16주령 정상군에서는 13.2±2.8 pg/ml, NC/Nga 대조군에서 516.6±93.7 pg/ml, 실험군에서 888.2±75.2 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는

(p<0.01) 증가를 나타냈다(Fig. 4).

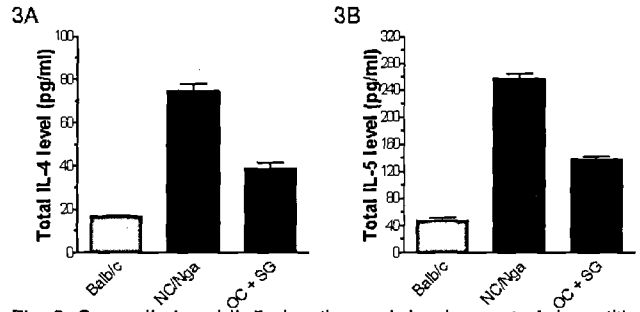


Fig. 3. Serum IL-4 and IL-5 elevation and development of dermatitis in NC/Nga atopy dermatitis model mice.

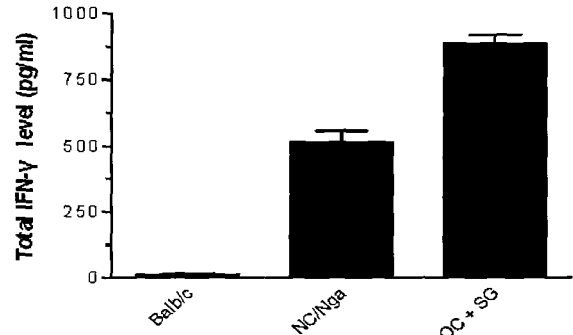


Fig. 4. Serum IFN-γ in NC/Nga atopy dermatitis model mice.

5. 혈청 중 IgM 발현에 미치는 영향

IgM 수준은 최종 16주령에서 정상군은 62.2±11.3 μg/ml, NC/Nga 대조군은 629.2±56.6 μg/ml로 나타난 반면, 실험군은 381.6±64.7 μg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (p<0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 5).

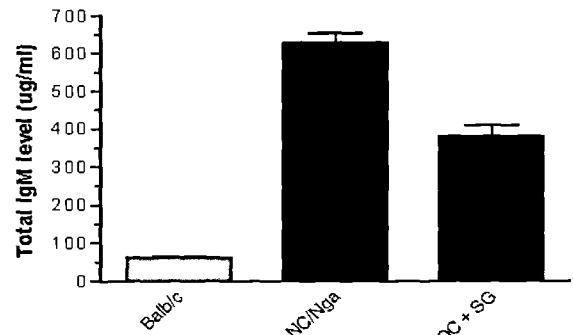


Fig. 5. Immunoglobulin M in NC/Nga atopy dermatitis model mice.

6. 혈청 중 IgG1 발현에 미치는 영향

IgG1 수준은 최종 16주령 정상군에서 604.8±52.4 μg/ml로 나타났고, NC/Nga 대조군에서 3,415.0±137.7 μg/ml로 나타났 다. 이에 비해 실험군에서는 1,922.2±141.0 μg/ml로 나타나 대조 군에 비하여 유의성 있는 (p<0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 6).

7. 비장 무게 변화에 미치는 영향

NC/Nga 생쥐 16주령 후 비장을 적출하여 무게를 측정하 고, 정상군은 0.156±0.017 g, NC/Nga 대조군은 0.162±0.029 g,

실험군은 0.137±0.027 g로 유의성 있는 (p<0.05) 감소를 나타냈다 (Fig. 7).

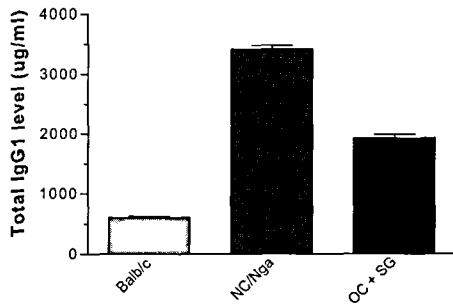


Fig. 6. Immunoglobulin G1 in NC/Nga atopy dermatitis model mice.

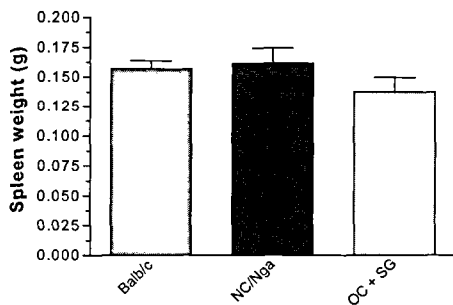


Fig. 7. Spleen weight in NC/Nga atopy dermatitis model mice.

8. Facial skin lesion에서 IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  및 CCR3 발현에 미치는 영향

IL-4 mRNA 발현량(IF)은 정상군이 1 (Index Fold, IF), NC/Nga 대조군이 2.11 (IF)로 나타났으며, 이에 반해 실험군은 1.33 (IF)으로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 8).

IFN- $\gamma$  mRNA 발현은 정상군이 1 (IF), NC/Nga 대조군이 1.10 (IF)로 나타났고, 실험군이 4.11 (IF)으로 나타나 대조군에 비하여 현저히 증가하였다(Fig. 9).

IL-5 mRNA 발현은 정상군이 1 (IF), NC/Nga 대조군이 1.78 (IF)로 나타났고, 실험군이 1.06 (IF)으로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 10).

Chemokine인 CCR3 mRNA 발현은 정상군이 1 (IF), NC/Nga 대조군이 1.92 (IF)로 나타났고, 실험군이 0.60 (IF)으로 나타나 대조군에 비하여 현저히 감소하였다(Fig. 11).

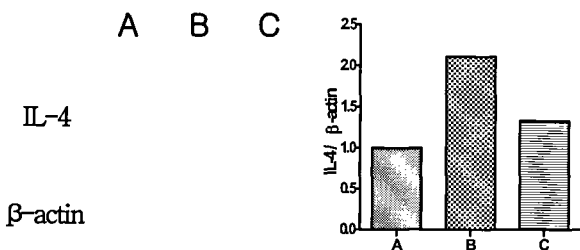


Fig. 8. IL-4 RT-PCR on facial biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Normal Balb/c mouse Skin (A), NC/Nga mouse skin control (B), OC + SG (c).

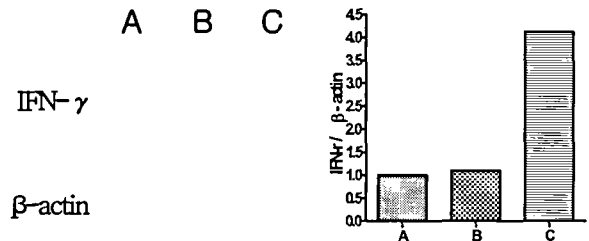


Fig. 9. IFN- $\gamma$  RT-PCR on facial biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Normal Balb/c mouse Skin (A), NC/Nga mouse skin control (B), OC + SG (c).

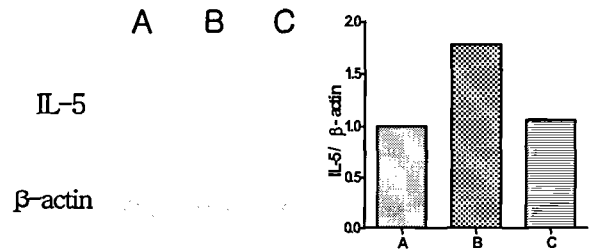


Fig. 10. IL-5 RT-PCR on facial biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Normal Balb/c mouse Skin (A), NC/Nga mouse skin control (B), OC + SG (c).

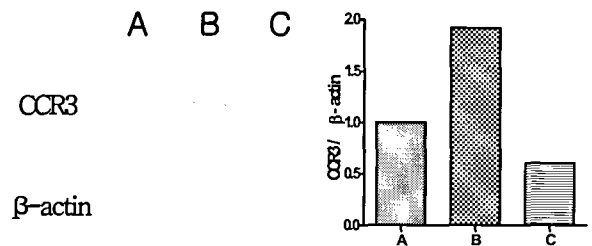


Fig. 11. CCR3 RT-PCR on facial biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Normal Balb/c mouse Skin (A), NC/Nga mouse skin control (B), OC + SG (c).

9. NC/Nga dermatitis skin lesion에서의 IL-6 발현에 미치는 영향.

IL-6 수치는 정상군이 6.38±1.2 pg/ml, NC/Nga 대조군이 59.9±5.8 pg/ml로 나타났고, 실험군이 38.8±7.2 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (p<0.01) 감소를 나타냈다(Fig. 12).

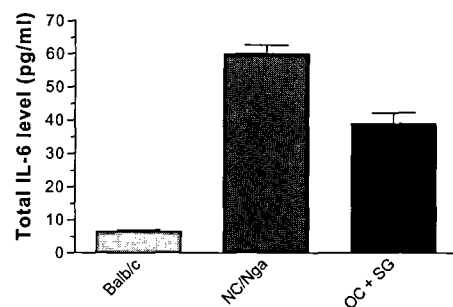


Fig. 12. Culture supernatant IL-6 production in facial skin biopsy of atopy dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice.

10. MTT 정량에 의한 세포생존률 측정

MTT 정량방법을 이용하여 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000ppm 농도의 溫清飲을 포함한 배양액에서 L929 세포를 24시간 배양 후 세포증식률을 측정하여 대조군과 비교하였다(Fig. 13). 溫清飲이 10, 50, 100ppm농도에서는 세포증식률이 대조군에 비해 변화가 없었으며, 200ppm과 300ppm에서는 세포생존률 대조군에 비해 13, 25%이하로 감소하였다. 이는 溫清飲이 L929 세포에 200ppm 농도 이상에서 세포 독성을 유발됨을 알 수 있었다.

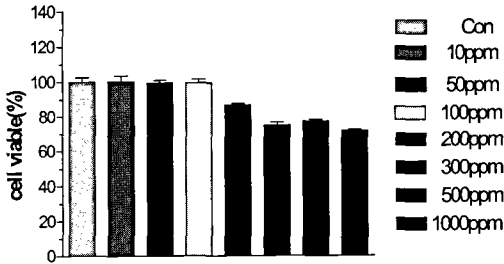


Fig. 13. Cell viability as assessed by the MTT assay for L929 cell line pretreated for 24h with OC. The data are presented as the arithmetic mean percent of the control ± S.D.

11. RAW 264.7 세포에서 염증성 Cytokines 발현도에 대한 溫清飲의 효과.

염증반응의 중요한 cytokine들인 IL-1β, TNF-α, IL-6의 발현도를 분석하기 위해서 마우스 대식세포주 RAW 264.7에 溫清飲을 10, 50, 100ppm으로 LPS(0.1μg/ml)로 자극하기 30분 전에 처리하고 20시간 배양하였다(Fig. 14).

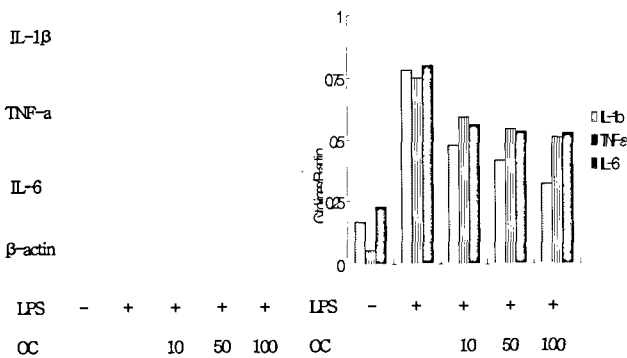


Fig. 14. LPS-induced expression of IL-1β, TNF-α and IL-6 mRNA is inhibited by OC in RAW 264.7 cells.

배양 후 RNA를 분리한 후 이를 이용하여 cDNA를 합성하여 LPS에 의해 생성된 cytokine의 측정하기 위해서 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 결과 IL-1β은 House keeping gene인 β-actin의 양과 비교 측정시 Table 3. 에서 같이 溫清飲을 10, 50, 100ppm의 처리하였을 때 IL-1β의 발현량이 LPS에 비해 60.7%, 53%, 40.5%로 나타나 溫清飲의 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. TNF-α은 House keeping gene인 β-actin의 양과 비교 측정시 Table 4에서 같이 溫清飲을 10, 50, 100ppm의 처리하였을

때 TNF-α의 발현량이 LPS에 비해 78.6%, 72.1%, 67.6%로 나타나 溫清飲의 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. IL-6은 House keeping gene인 β-actin의 양과 비교 측정시 Table 5. 에서 같이 溫清飲을 10, 50, 100ppm의 처리하였을 때 IL-6의 발현량이 LPS에 비해 69.6%, 66%, 65%로 나타나 溫清飲 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다.

12. RAW 264.7 세포에서 COX-2의 발현에 대한 溫清飲의 효과

LPS(1μg/ml)를 사용하여 대식세포주인 RAW 264.7(1×10<sup>6</sup> cell)의 COX-2 활성을 유도한 모델에서 溫清飲을 50, 100, 200ppm 농도로 24시간 처리하여 COX-2 발현 정도를 Western Blot 수행하여 분석하였다. LPS 단독 처리군에 비해 溫清飲을 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. Fig. 15.에서 같이 10, 50ppm을 처리한 군에서 33, 40% 정도 발현 억제 효과를 확인하였고, 100ppm에서는 55%정도의 COX-2 발현 억제 효과가 있는 것으로 나타났었다(Fig. 15).

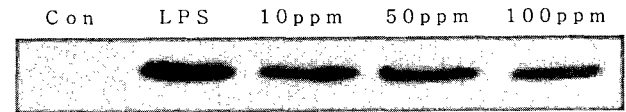


Fig. 15. Effects on COX-2 expression from LPS-induced RAW 264.7 cells(Western blot). The same amount of protein(30μg) was loaded in each lane.

13. NC/Nga dermatitis ear & skin lesion의 조직 검사

정상 Balb/c 생쥐의 귀 조직에서는 표피, 진피, 그리고 연골이 뚜렷하게 관찰되었으나, NC/Nga 대조군은 표피층이 두꺼워져 있고, 진피층은 콜라겐의 부종이 있고, Fibroblast의 증식 및 혈관의 확장이 관찰되었다. 실험군에서는 대조군에 비하여 표피와 진피의 두께가 다소 줄어들었고, 표피의 각질화도 심하지 않은 것으로 관찰되었다(Fig. 16).

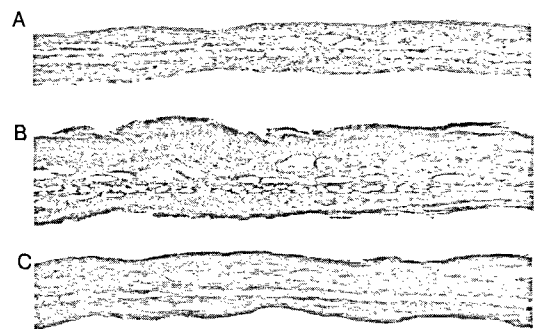


Fig. 16. Histologic features of ear lesion in NC/Nga mice. A: ear tissues from Balb/c mouse. B: ear tissues from NC/Nga mouse with no treatment. C: ear tissues from NC/Nga mouse with OC and SG treatment. \*The optical microscope: 400 magnifications

정상 Balb/c 생쥐의 피부 조직에서는 표피, 진피, 그리고 기저부선이 관찰되나, NC/Nga 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. 17).

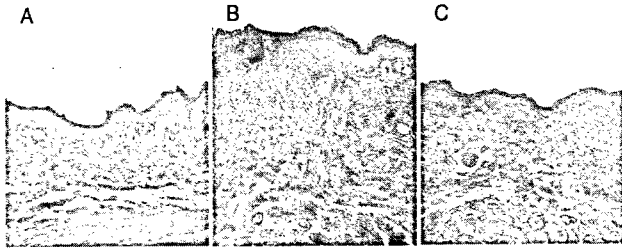


Fig. 17. Histologic features of skin lesion in NC/Nga mice. A : skin tissues from Balb/c mouse. B : skin tissues from NC/Nga mouse with no treatment. C : skin tissues from NC/Nga mouse with OC and SG treatment. \*The optical microscope: 400 magnifications

## 고찰

알레르기(Allergy)란 용어는 1906년 프랑스 학자 파케르가 처음으로 사용하였는데 어떤 사람에게는 두드러기나 천식 등의 이상 과민 반응을 일으키는 것을 말한다<sup>1)</sup>.

이 알레르기 반응중 아토피성 피부염은 알레르기성 비염, 천식과 함께 대표적인 알레르기성 질환으로, 알레르기성 습진, 소아 습진, 굴절부 습진, 범발 신경 피부염 등으로 불리며, 유아 습진에서부터 소년기, 사춘기, 성인에 나타나는 전형적 태선화 피부염에까지 다양한 임상 및 조직학적 진행 과정을 보여주는 질환이다<sup>3,21)</sup>.

한의학에서 奶癬, 胎風, 胎赤, 嬰兒濕疹, 浸淫瘡, 胎皴瘡, 血風瘡, 四彎風 등이 아토피성 피부염의 범주에 속한다<sup>22)</sup>.

隋 巢元方の《諸病源候論·小兒雜病諸候·癬候》<sup>7)</sup>에서 “小兒面上癬皮如甲錯起乾燥, 謂之乳癬, 言兒飲乳, 乳汁潰汚兒面, 變生此症”, 《外科正宗》<sup>23)</sup>에서 “奶癬, 因兒在胎中, 母食五辛, 父餐炙博, 遺熱與兒”가 原因이 되고, 臨床表現은 “生後頭面遍身發奶癬, 流滋成片, 睡臥不安, 瘙癢不絕”이라고 하고, 治療는 “治以文蛤散.”라 하였다. 《外科大成》<sup>24)</sup>에서 “胎赤者, 初生月里, 皮膚忽然發未如丹, 由胎熱所致”, “四彎風, 生于腿彎脚彎, 一月一發, 痒不可忍, 形如風癬, 搔破成瘡”, 《醫宗金鑑》<sup>25)</sup>에서 “此證初生頭頂, 或生尾端 痒起白屑, 形如疥癬, 由服中血熱, 落草受風 鑽線, 此即乾皴瘡, 有誤用湯火洗皮膚起粟粟 瘙癢無度, 黃水淫淫, 延及遍身, 即成濕皴瘡”라고 기술하여 오늘날 아토피 피부염의 증상 및 원인 등에 대해 기술하고 있다.

일반적으로 아토피 피부염은 稟性不耐, 濕熱內蘊한 상태에서 다시 風濕熱邪의 浸淫을 받아, 內外邪氣가 相搏하여, 肌膚에 발생하는 것이 本病의 病因病機의 特徵이라 하겠다<sup>11)</sup>.

변증에 따라 급성기에는 風, 濕, 熱의 협감의 양상에 따라 증상이 발현하며, 病邪의 편중에 따라 風濕偏盛형, 熱重于濕형, 濕重于熱형으로 구분하였다. 風濕偏盛형은 丘疹, 水疱爲主, 劇痒無時, 潰破流水하는 것이 특징이 되고, 熱重于濕형은 紅斑, 丘疹爲主, 潰破滲血水, 伴心煩, 口渴하는 것이 특징이 되고, 濕重于熱형은 水疱, 丘疹較多, 糜爛, 滲水가 특징이 된다. 만성기에는 脾虛濕熱內蘊형, 陰傷血燥血熱형으로 구분하며 脾虛濕熱內蘊형은 斑疹散在, 有少量水疱或丘疹, 偶有少量脂水滲溢, 結痂, 時而劇痒을 특징으로 하며, 陰傷血燥血熱형은 局部皮損浸潤肥厚, 皮膚粗糙, 抓痕累累, 結痂或鱗屑或局部少量滲水 을 특징으로 한다<sup>11)</sup>.

치료에 있어서는 內治法으로 濕熱型은 清熱利濕, 養血祛風 하며 生地黃, 淡竹葉, 防風, 蒼朮, 白鮮皮, 燈心草, 赤芍藥, 連翹, 車前子, 蟬蛻 등의 약물이 주로 사용되고, 脾虛濕盛型은 健脾利濕, 消導清熱하며 白朮, 茯苓, 白扁豆, 薏苡仁, 澤瀉, 地膚子, 牡丹皮 등의 약물이 주로 사용되고 血燥型은 養血潤燥, 清熱解毒하며 生地黃, 牡丹皮, 當歸, 梔子, 黃柏, 麥門冬, 白茅根, 紫草 등의 약물이 주로 사용된다<sup>26)</sup>. 多用되는 外治法으로는 敷貼法, 洗滌法, 油膏法 등이 있고 清熱, 解毒, 祛風, 殺蟲, 止痒의 효과가 있는 黃連, 黃柏, 苦參, 蛇床子, 枯礬 등의 약물이 많이 사용된다<sup>27)</sup>.

아토피에 대한 한의학적 연구로 朴<sup>11)</sup>은 아토피 피부염의 동. 서의학적 문헌 고찰을, 尹<sup>12)</sup>는 아토피 피부염 환자의 한의학적인 임상유형분류에 대한 연구를 보고하였고, 단일 한약제에 대한 실험적 연구로 金<sup>13)</sup>은 桑葉이, 韓<sup>14)</sup>은 牛蒡子, 金<sup>15)</sup>은 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향을 보고하였으며, 처방에 대한 연구로 金<sup>16)</sup>은 “加味生料四物湯”, 朴<sup>17)</sup>은 “消風散”, 金<sup>18)</sup>은 “沆瀣丹”, 朴<sup>19)</sup>은 “消風清營湯加味方”을 시료로 면역 조절작용을 통한 항아토피 효과를 규명한 바가 있으며, 민<sup>20)</sup>은 내·외치 병용치료가 아토피 생쥐 병태 모델에 미치는 영향에 대한 연구를 하였다.

본 연구에서, 내복약으로 사용된 溫清飲<sup>9)</sup>은 血熱血燥生風으로 인한 피부 질환에 응용되는 처방으로 明代 龔廷賢(A. D. 1522~1619年)<sup>10)</sup>의 “萬病回春”에 처음 收錄된 處方으로 康<sup>28)</sup>, 裊<sup>29)</sup> 등은 血熱로 인한 諸症, Behçet 證候群, 諸出血症, 搔痒症 등에 광범위하게 응용된다 하였다.

溫清飲<sup>9)</sup>은 黃連解毒湯에 四物湯을 합방을 한 處方으로서, 黃連解毒湯은 黃連을 비롯한 네 가지 약물로 구성된 처방으로 熱毒을 解除한다는 뜻이 있다. 熱毒은 火邪며, 熱毒이 陽에 入하면 狂하고, 心을 所擾하면 煩躁하고, 津液을 枯渴시키면 口燥, 咽乾하고, 熱毒이 上逆하면 乾嘔하고, 神을 昏하면 錯語하고, 胃에 入하면 發斑하고, 血을 通하여 上行하면 吐血衄血하며, 肌肉에 入하면 瘙痒感을 느끼게 된다.

黃連解毒湯은 熱毒을 解除하는 까닭에 狂躁煩心, 口燥, 咽乾, 乾嘔, 錯語, 吐血, 衄血, 發斑 등을 다스린다. 여기에 通治血病을 하는 四物湯을 合方하고 苦參, 枳實을 가미 하여 血熱, 血燥로 인한 皮膚病에 사용할 수 있다고 하였다.

저자는 또한, 苦寒無毒하여 瀉火解毒, 清熱燥濕의 효능이 있어<sup>30,31)</sup> 內服藥과 外用藥으로 피부과 질환에 多用하는 大黃, 黃芩, 黃柏과 苦參, 金銀花, 連翹, 馬齒莧등의 清熱解毒, 殺菌止痛 약물을 가미하여 1.5 L의 증류한약으로 만들어 분무하며 외용제로 사용하였다. 이용하여 외용제로 사용하였다.

현재 알레르기 질환의 대표적 치료법은 원인 항원과 악화 요인의 회피를 위한 환경관리, 약물요법 및 면역요법 등이 있으며, 이중 약물요법으로 Glucocorticoid, Antihistamine, Antiallergic drugs, Tarolimus, 교감신경자극제, 스테로이드 제제 등이 다용되고 있으나<sup>4,32-35)</sup>, 장기 사용 시 나타나는 여러 부작용<sup>21)</sup>으로 인하여 최근에는 보다 효과적이며 안전하게 치료할 수 있는 약물에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다.

실험동물인 NC/Nga 생쥐는 일반적인 환경에서 사람의 아토피 피부염과 유사한 증상인 가려움, 심한 피부염증, 血脈, 체중

감소를 나타내는 실험동물 모델로 air-uncontrolled 상황 (conventional NC/Nga)에서 12주 이후 혈청 중 IgE 수준이 정상 100배 까지 기록되고 아토피성 피부 장애가 동반 된다.

아토피 피부염의 정확한 병리는 아직까지 완전히 이해되고 있지 않으나 유전적 소인과 함께 면역학적, 비면역학적 기전이 관여하리라고 생각되고 있다.

본 실험은 溫清飲과 三黃洗劑加味方을 이용하여 in vivo 실험으로 아토피 유발 모델인 NC/Nga mice 에 대해 아토피 유발 억제 및 항염증 효능에 대한 실험(in vitro)으로 溫清飲을 구강 투여하고, 三黃洗劑加味方 분무를 8주령부터 일 2회 실시하여 8주부터 16주까지 2, 3, 3주(10, 13, 16주) 간격으로 NC/Nga mice 의 피부 손상정도를 측정하였다. 그 결과 대조군은 10주에  $4.71 \pm 0.80$ , 13주에  $7.28 \pm 0.78$ 로 급격한 증가를 나타내었으며, 실험 종료 전 16 주령은  $9.40 \pm 0.83$ 로 나타났다. 이에 반해 실험군은 10주까지는 대조군과 약간 감소한  $3.14 \pm 0.77$ 로 관찰되었고, 13주와 16주에는 각각  $4.57 \pm 0.74$ 와  $5.00 \pm 0.76$ 로 나타나 대조군에 비하여 현저한 피부손상정도지표감소를 나타냈다(Fig. 1B).

溫清飲과 三黃洗劑加味方을 처리한 NC/Nga mice의 혈액에서 IgE 수치는 13주와 16주에서 대조군에 비하여 약 64%와 65.3%의 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소를 나타내었고(Fig. 2A), 혈중 IL-6 수치 역시 대조군에 비하여 16주에서 63.3%의 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 감소를 나타냈다(Fig. 2B)

또한 혈중 IL-4 수치는 최종 16주령에서 NC/Nga 대조군에 비하여 49%(Fig. 3A), IL-5 수치는 46.3%(Fig. 3B)의 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 감소를 나타냈으므로, 溫清飲이 B 세포 분화에 수반되는 IgE, IL-6 발현과 Th2에서 분비되는 IL-4, IL-5 발현을 억제함을 확인하였다.

NC/Nga dermatitis skin lesion 에서의 IL-6 발현(Fig. 12)에서 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 감소 역시 상기한 결과와 부합됨을 입증해 주고 있다.

IL-5와 더불어, 피부 염증 부위에 만성으로 침윤이 일어나는 Th2, 호산구, 중성구 및 mast 세포 등에서 발현되는 CCR3 발현 또한 대조군에 비하여 3배 정도 발현이 감소하였다(Fig. 11).

Th1 세포는 IFN- $\gamma$ 와 같은 Th type 1 사이토카인(Th1 cytokine ; proinflammatory cytokine)을 생산하여 박테리아 감염과 같은 intracellular pathogen에 대항하는 면역 반응에 관여한다. 특히 Th1 세포에서 분비되는 IFN- $\gamma$ 는 알레르기 반응을 일으키는 Th2 세포를 억제하는 것으로 알려져 있는데, 본 실험에서 혈청 중 IFN- $\gamma$  수준은 대조군에 비하여 약 1.7배 로 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 증가를 나타냈고(Fig. 4), skin lesion의 발현 결과에서는, IL-4 발현은 대조군에 비하여 약 1.5배(Fig. 8) 감소, IFN- $\gamma$  발현은 NC/Nga 대조군에 비하여 3.7배 증가(Fig. 9), IL-5은 대조군에 비하여 약 1.6배 감소(Fig. 10)하였으며, 역시 혈청 결과와 부합된 결과가 도출되었다.

알레르기는 항체의 기준 표본을 IgM 또는 IgG에서 IgE로 바꾸어주는 Th2 세포가 활성화되면서 시작되는데, 본 실험에서 IgE의 생산과 관련된 IgM과 B세포 분화 중에 비례적으로 증가되는 IgG1 등 치환된 면역 글로불린의 변화에서 모두 대조군에

비하여 유의성 있는 감소로(Fig. 5, 6), IgE 발현 결과와 부합됨으로써, 溫清飲과 三黃洗劑加味方 시료가 Th2 세포 활성화 억제와 더불어 IgE 생산에 관련된 B 세포 분화를 억제하는 작용에 대한 연구 결과를 얻을 수 있었다.

아토피 피부염의 염증반응은 손상에 대한 국소반응으로, 여러 종류의 염증세포와 염증성 cytokine 및 mediator 들이 관여한다. 특히 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6는 염증을 일으키는 주요한 cytokine 으로 보고되고 있다. 또한 이들 cytokine 유전자의 프로모터에 존재하는 NF- $\kappa$ B element는 cytokine 유전자 발현에 중요한 역할을 한다. 대식세포주인 RAW 264.7에서 LPS(Lipopolysaccharide)에 유도된 NF- $\kappa$ B의 활성화에 의해 생성되는 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6의 발현도를 측정하기 위해서 본 연구에서는 RT-PCR 방법을 이용하여 溫清飲에 대한 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6의 유전자 발현도 억제 효과를 확인하고자 하였다.

Eicosanoids의 생합성 과정 중 염증반응은 두 종류의 이성효소를 가지고 있는데, 생체내 장기의 항상성 유지 및 보호 작용들은 COX-1에 의하며, 염증성, 유도성 효과들은 주로 COX-2에 의한 것이다<sup>36)</sup>. COX-2에 의해 생성되는 PEG2 합성은 비스테로이드 항염증약(NSAIDs)에 의해 억제되나 여러가지 독성 및 부작용으로 사용이 제한되어 왔으므로, 독성이 낮고 부작용이 없는 새로운 약물이 요구되고 있다. 천연물에서는 문 등<sup>37)</sup>이 230여종의 생약에 대해 COX-2 활성 억제에 관하여 검색하였다. 본 연구에서는 溫清飲에 대한 COX-2 억제활성 효과를 확인하고자 하였다.

항염증 효과에 대한 실험에서는 LPS(1 $\mu$ g/ml)를 사용하여 대식세포주인 RAW 264.7( $1 \times 10^6$  cell)의 COX-2 활성을 유도한 모델에서 溫清飲은 LPS 단독 처리군에 비해 溫清飲의 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. Fig. 15.에서와 같이 溫清飲은 처리 농도별로 33-55% 정도의 COX-2 발현 억제 효과가 있는 것으로 사료된다.

溫清飲의 안전성을 확인한 실험으로 세포독성평가는 溫清飲이 10, 50, 100ppm농도에서는 세포증식률이 대조군에 비해 변화가 없었으며, 200ppm과 300ppm에서는 세포생존률 대조군에 비해 13, 25%이하로 감소하였다. 이는 溫清飲이 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.

결과적으로 본 시료가 Th1 세포의 IFN- $\gamma$  생성 증가와 더불어 관련 면역세포 활성화를 통해 Th2 세포를 억제함으로써 IL-4, 5 등의 염증 관련 사이토카인 생성을 억제하고 이로 인해 IgE 생성 역시 억제됨으로써 조직 사진에서 나타난 바와 같은 유의성 있는 결과가 도출된 것으로 사료된다. 이 같은 결과는 기존의 면역학적 작용 기전과 부합됨으로써, 본 시료의 면역 조절 작용을 통한 항알러지 효과가 인정되며, 향후 약물 독성 평가(in vivo) 등의 안정성에 관한 연구가 필요하다 사료 된다.

## 결 론

溫清飲과 三黃洗劑加味方의 아토피 치료 기전을 규명하고자, NC/Nga 생쥐의 동물 병태 모델을 이용하여 다양한 면역 반



응을 관찰하였던 바, 다음과 같은 결론을 얻었다.

NC/Nga 생쥐의 피부 손상 정도는 13주와 16주에 실험군이 대조군에 비해 각각 37.2%, 46.8% 감소하였다. NC/Nga 생쥐의 혈중 IgE, IL-4, IL-5, IL-6, IgM 및 IgG1 수준은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, IFN-r 수준은 실험군이 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다. NC/Nga 생쥐의 비장 무게는 실험군이 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. NC/Nga 생쥐의 피부 조직 배양에서 IL-4, IL-5, CCR3 유전자 발현은 실험군이 대조군에 비하여 현저히 감소하였고, IL-6 발현량은 유의성 있게 감소하였으며, IFN- $\gamma$ 의 유전자 발현은 실험군이 대조군에 비해 증가하였다. NC/Nga 생쥐의 귀등 피부 조직 변화에서는 표피와 진피의 염증 정도와 침윤된 염증 면역 세포 등은 실험군이 대조군에 비해 현저하게 감소되었다. RAW 264.7에서 염증성 Cytokines 발현도에 대한 효과는 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 유전자 발현은 실험군이 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. RAW 264.7에서 항염증 효과는 COX-2 활성을 유도한 모델에서 실험군이 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제되었다. 세포독성평가는 L929 세포에서 10, 50, 100 ppm 농도에서는 세포증식률은 실험군이 대조군에 비해 변화가 없었으며, 200 ppm 농도 이상에서 세포 독성을 유발됨을 확인하였다.

### 감사의 글

본 연구는 2006년 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었음.

### 참고문헌

1. Bonini, S., Ruffilli, A. The genetics of atopy, *Acta Microbiol Immunol Hung*. 45(1):3-13, 1998.
2. Leung, D.Y.M. Atopic dermatitis. new insights and opportunities for therapeutic intervention, *J Allergy Clin Immunol* 105: 860-876, 2000.
3. 도영민. 아토피란 무엇인가?(아토피의 실상과 배독법의 이해). 마크로. pp 16-18, 20030
4. 피부과학 원색도감 편찬위원회 편. 피부과학 원색도감. 서울, 도서출판 정담. pp 54-63, 1999.
5. 김정원. 아토피 피부염. 대한한의사협회지 39(7):851-856, 1996.
6. 葛洪. 肘後備急方(四庫全書). 大星文化社. p 479, 734, 478, 1995.
7. 巢元方 編著. 巢氏諸病源候論. 大星文化社, pp 251-253, 1992.
8. 孫思邈. 備急千金要方. 大星文化社, pp 408-409, 1989.
9. 龔廷賢. 增補萬病回春(下卷). 台北, 大中國圖書公司, p 83, 1967.
10. 洪元植. 中國醫學史. 서울, 東洋醫學研究院, p 259, 1984.
11. 박민철, 김진만, 홍철희. 아토피 피부염의 동·서의학적 문헌 고찰. 대한안이비인후피부과학회지 15(1):226-252, 2002.
12. 윤화정, 고우신. 아토피 피부염 환자의 韓醫學的인 臨床類型分類에 대한 연구. 대한한의학회지 22(2):319-326, 2001.

13. 金岐勳. 桑葉이 아토피 피부염에 미치는 영향. 경희대학교 석사학위논문집, 2004.
14. 韓奎哲. 牛蒡子가 아토피 피부염에 미치는 영향. 경희대학교 석사학위논문집, 2004.
15. 金施慧. 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향. 경희대학교 석사학위논문집, 2004.
16. 김정진, 양성환, 손낙원, 안규석. 加味生料四物湯의 抗염증효과와 地黃고의 아토피 피부염 손상 및 地黃효과에 미치는 影響. 동의생리병리학회지 17(2):231-248, 2002.
17. 박성남. 消風散이 BALB/c mouse를 이용한 Atopy 피부염 Model 에 미치는 영향. 경희대학교 박사학위논문집, 2003.
18. 김우연. 沈瀝丹이 아토피 피부염 환자 단핵세포의 Cytokine 분비 능에 미치는 영향. 경희대학교 박사학위논문집, 2000.
19. 박응식. 아토피 피부염을 유발한 동물모델에서 消風清營湯加味方이 각질층 기능 회복에 미치는 영향. 동국대학교 석사학위논문집, 2004.
20. 민영규. 消風散加減方과 外治方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지 26(4):116-134, 2005.
21. 전국의과대학교수 역. 오늘의 진단과 치료. 도서출판 한우리, pp 132-134, 1999.
22. 양성완. 한방으로 잡는 아토피 피부염. 시공사, p 63, 2003.
23. 陳實功. 外科正宗. 瀋陽, 遼寧科學技術出版社, p 115, 1977.
24. 祁坤. 外科大成. 對北, 文光圖書有限公司, p 198, 365, 1987.
25. 吳謙. 醫宗金鑑(下). 北京, 人民衛生出版社, p 443, 1982.
26. 김미정, 이승연. 소아 아토피 피부염에 대한 문헌적 고찰. 대한한방소아과학회지 14(2):169-184, 2000.
27. 박혜선, 지선영, 구덕모. 아토피 피부염의 중의 외치법 고찰. 대한외관과학회지 14(1):32-41, 2001.
28. 康秉秀. 漢方臨床알레르기. 서울, 成輔社, p 189, 1988.
29. 裴元植. 增補最新漢方臨床學. 서울, 南山堂, pp 589-593, 741, 1982.
30. 신민교. 임상본초학. 영림사, p 400, 405, 785, 1997.
31. 신풍출판공사(편집). 중약대사전. 신풍출판공사, p 158, 1982.
32. 전국의과대학교수 편. Katzung's 임상약리학. 한우리, pp 1049-1068, 1998
33. 이유신. 임상피부과학. 서울, 여문각, pp 19-25, 327, 1987.
34. 김규한. 아토피피부염의 임상양상 및 치료. 알레르기 15(1):11-25.
35. 김정원. 아토피피부염의 진단과 치료. 알레르기 제 13권 별호, p 87, 88, 1993.
36. Golden, B.D., Abramson, S.B. Selective cyclooxygenase -2 inhibitor, *Rheumatic Disease Clinics of North America* 25: 359-378, 1999.
37. 문태철, 정규찬, 손건호, 김현표, 강삼식, 장현욱. 천연물로부터 사이클로옥시나아제-2 저해제 검색. 약학회지 42(2): 214-219, 1998.