

內托千金散이 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉피부염에 미치는 영향

김준정·김희택

세명대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

The effects of Naetakchunkeum-san on the Allergic Contact Dermatitis induced by DNCB

Joon-Jeong Kim · Hee-Taek Kim

Background and Objectives : Allergic Contact Dermatitis is the disease affected by industrialization. The more industrialization advanced, the more materials that could induce the allergic contact dermatitis have been increased. Therefore in oriental medicine, various studies have been performed. The objective of this study is to investigate the effects of Naetakchunkeum-san on the Allergic Contact Dermatitis induced by 2,4-dinitro-chlorobezene(DNCB).

Material and Methods : Twenty eight mice were divided into four groups ; normal, control, experimental group A and B. Control and experimental group were induced allergic contact dermatitis by DNCB. Experimental group A was orally administered the Naetakchunkeum-san and experimental group B was orally administered the prednisolone. In this study, ear thickness measurement, observation auricle microphotograph, Myeloperoxidase(MPO) activity measurement, Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) analysis of the mRNA level of $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $INF-\gamma$ were performed on these four groups. In addition, the effect of Naetakchunkeum-san on cell viability and the effect of Naetakchunkeum-san on the compound 48/80-induced histamine release from HMC and RPMC were measured.

Results : 1. In contact hypersensitivity assay, experimental group A and B showed decreased ear thickness compared with control group. 2. In experimental group A, pathological lesion of dermatitis were alleviated. In addition, the numbers of infiltrated cells were reduced, and cleft was not shown compared with control group. In experimental group B, similar results were shown. 3. There was a significant increase in MPO activity in control group compared with normal group. Experimental group A and B significantly inhibited the increase in MPO activity compared with control group. 4. The level of expression of $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $INF-\gamma$ in experimental group A and B were significantly lower than those in control group. As the internal control, cyclophilin mRNA was also reverse-transcribed and amplified. 5. In MTT assay, there were no statistically significant differences in 100 $\mu g/ml$, 200 $\mu g/ml$, 500 $\mu g/ml$, 1000 $\mu g/ml$ Naetakchunkeum-san

treated group from 0 $\mu\text{g/ml}$ Naetakchunkeum-san treated group as determined by the Tukey test. 6. Naetakchunkeum-san dose-dependently inhibited the compound 48/80-induced histamine release from both HMC and RPMC.

Conclusions : According to above experiments, Naetakchunkeum-san may be applied to allergic contact dermatitis.

Key words : Naetakchunkeum-san, DNCB, MPO, TNF- α , IL-1 β , INF- γ , histamine, allergic contact dermatitis

1. 서 론

접촉피부염이란 외부 물질과의 접촉에 의하여 발생하는 피부염¹⁾으로, 최근 공해 및 환경오염의 가속화로 인해 과민 체질을 가지고 있는 사람들에게 알레르겐으로 작용할 수 있는 각종 합성물질들이 증가하면서 알레르기성 접촉피부염의 발병빈도가 증가하고 있는 추세이다²⁾.

알레르기성 접촉피부염의 치료로는 부신피질 호르몬제, 항히스타민제 등이 주로 사용되고 있으나 부작용과 일시적인 진정작용 때문에 근본적인 치료제로는 부적합한 실정이다. 최근에는 과민한 세포성 면역에 의한다는 점에 착안하여 면역억제 약물인 cyclosporin A와 FK 506을 이용하여 이를 억제하는 연구³⁻⁶⁾가 이루어지고 있으나 부작용으로 인하여 사용에 한계가 있는 실정이다.

한의학에서 알레르기성 접촉피부염은 漆瘡⁷⁻⁹⁾, 狐尿刺⁹⁻¹¹⁾, 馬桶癬¹²⁾, 膏藥風¹³⁾, 粉花瘡¹⁴⁾ 등의 범주에 속하는데, 그 원인으로는 腠理가 不密한 身體狀態 혹은 체질적 소인이 있는 상태에서 風, 濕, 熱, 蟲이나 有毒한 물질에 접촉되어 발생되는 것으로 보았다.

DNCB(2,4-dinitrochlorobenzene)는 동물실험에서 알레르기성 접촉피부염을 유발시키는데 사용되는 대표적인 유발물질로 과민한 세포성 면역반응

을 일으켜 피부손상 즉, 홍반, 해면화, 상피세포 과형성, 비만세포와 T림프구의 증가 등을 일으킨다¹⁵⁻²¹⁾. 최근 DNCB 감각 후 개별 한약제²¹⁻²⁵⁾나 처방^{26,27)}의 항알레르기 및 소염효과를 살펴보는 연구들이 이루어지고 있다.

內托千金散은 明代 陳⁸⁾의 《外科正宗》에 최초로 기재되어 있으며, 《東醫寶鑑》²⁸⁾에서는 “治一切癰疽惡瘡 能內托”이라 하여 氣血不足과 함께 나타나는 癰疽에 扶正祛邪하는 의미가 있는 처방으로 알레르기 질환의 치료법과 유사성을 갖고 있다. 지금까지 內托千金散에 관한 연구 보고로는 김 등²⁹⁻³¹⁾의 연구가 있는데 이러한 연구들은 주로 면역조절작용^{29,30)}, 항종양효과 기전³¹⁾ 등의 실험 연구로서 알레르기성 접촉피부염에 관한 연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는 DNCB를 이용하여 알레르기성 접촉피부염을 유발한 mouse에 內托千金散과 양약 중 prednisolone을 각각 경구 투여하는 실험을 진행하였으며 귀의 부종 변화 측정, 귀의 병리조직학적 변화 관찰, 호중구의 침착정도 평가, 전염증성 사이토카인의 유전자 발현 관찰, MTT assay를 통한 內托千金散의 세포독성 여부 파악, 사람의 비만세포와 흰쥐 복강 비만세포에서의 histamine 유리량을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

교신저자 : 김희택, 충북 제천시 신월동 산21-11번지
세명대학교 부속 제천한방병원 한방안이비인후피부과
(Tel : 043-649-1817, E-mail : kht8725c@semyung.ac.kr)
• 접수 2009/03/03 • 수정 2009/03/24 • 채택 2009/04/03

II. 실험 방법

1. 실험동물, 세포배양 및 재료

1) 실험동물

실험동물은 체중 20 g 내외의 6주령 female BALB/c mouse (오리엔트, Korea) 28마리와 6주령 체중 220 g의 male SD(Sprague-Dawley)계 rat 1마리를 사용하였다. 전 실험기간 동안 충분한 고품질 사료와 음수를 공급하여 자유 섭취케 했으며, 온도는 20±2℃, 습도 50±5%, 밤낮주기(12시간 light/12시간 dark)로 조정된 항온항습사육장치(대종기기상사, Korea)가 갖추어진 사육실에서 사육하였다.

2) 세포배양

실험에 사용된 세포는 Human mast cell line(HMC)을 세명대학교 본초학교실에서 분양 받아 사용하였다. 10% Fetal bovine serum(FBS)과 1% 항생제가 포함된 Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM)의 배지를 사용하여 37℃, 5% CO2 배양기에서 배양하였다.

Table 1. The Amount and Composition of Naetakchunkeum-san

韓藥名	生藥名	用量/貼 (g)
金銀花	LONICERAE FLOS	4
人參	GINSENG RADIX	4
黃芪	ASTRAGALI RADIX	4
赤芍藥	PAEONIA RADIX RUBRA	4
當歸	ANGELICAE GIGANTIS RADIX	4
川芎	CINDII RHIZOMA	4
瓜蒌根	TRICHOSANTHIS RADIX	4
白芷	ANGELICAE DAHURICAE RADIX	4
桂皮	CINNAMOMI CORTEX	4
桔梗	PLATYCODI RADIX	4
防風	LEDEBOURIELLAE RADIX	4
甘草	GLYCYRRHIZAE RADIX	4
合計		48

3) 약재

본 실험에 사용한 內托千金散(Naetakchunkeum-san)은 동의보감에 근거하여 구성 약물을 (주)한의원통에서 구입하여 사용하였다(Table 1.).

2. 실험방법

1) 실험군 설정

BALB/c mouse 28마리를 각각 7마리씩 다음과 같이 4군으로 분류하여 실험하였다.

- ① 정상군(Normal, N) : 어떠한 처치도 하지 않은 군.
- ② 대조군(Control, C) : 2,4-dinitro-chlorobezene (DNCB)을 처치하여 알레르기 피부염을 유발군.
- ③ 실험군 A(Sample A, SA) : DNCB를 처치하여 알레르기 피부염을 유발시키고, 內托千金散을 경구투여한 군.
- ④ 실험군 B(Sample B, SB) : DNCB를 처치하여 알레르기 피부염을 유발시키고, prednisolone을 경구투여한 군.

2) 알레르기성 접촉피부염의 유발

알레르기성 접촉피부염의 유발은 Kim³²⁾등의 방법을 변형하여 다음과 같이 시행하였다. 알레르기성 접촉피부염 유발 항원으로 2,4-dinitro-chlorobezene(DNCB; sigma, USA)을 acetone과 olive oil의 혼합액(4:1)에 용해한 후 사용하였다. 1차 감작은 마우스의 복부를 제모한 후 1주일 간 3회에 걸쳐 0.5%의 DNCB 용액 50 μl을 도포하여 시행하였으며, 연이어서 3주간 총 6회에 걸쳐 1.5%의 DNCB 용액 15 μl을 마우스의 우측 귀 안쪽면에 도포하여 2차 감작을 시켰다.

3) 시료의 제조 및 투여

內托千金散 6첩 분량에 해당하는 288 g을 3차 증류수 2 l와 혼합하여 2시간 동안 100℃로 열탕

한 후 상층액을 여과지로 여과하고 이 여과액을 rotary evaporator(EYELA, NE-1001, Japan)를 이용하여 200 ml로 농축시킨 후, -80℃에서 동결시켰다. 이 농축액을 다시 freezer dryer system(Labconco, USA)를 이용하여 7일 간 동결건조시킨 후 최종적으로 55.9 g의 분말을 얻었다. 이 분말을 3차 증류수에 용해시켜 1차 감작 시작일부터 2차 감작 종료일까지 1일 1회 1.5 g/kg의 농도로 총 20회 경구 투여했으며, Prednisolone(sigma, USA)은 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt(in 0.05M PBS) 용액에 용해시킨 후 1차 감작일 부터 2차 감작 종료일까지 1일 1회 3 mg/kg의 농도로 총 20회 경구 투여했다.

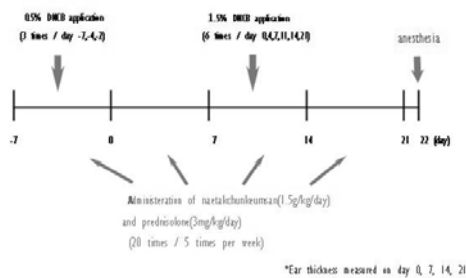


Fig. 1. Experimental Procedure in this study

4) 귀의 부종 변화 측정

0, 7, 14, 21일에 DNCB 도포 4시간 후 digital calipper (Mitutoyo, CD-15CP, Japan)를 이용하여 마우스의 우측 귀(이개, auricle)를 3회 측정 후 평균을 구하였다.

5) 귀의 조직학적 분석

최종 DNCB 도포 24시간 후 마우스를 희생하고 우측 이개(auricle)를 적출하여 10% 중성 포르마린 용액에 1일간 고정한 후 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하고 5 μm 두께의 이개 절단면 박절편을 제작하였다. 박절편을 Hematoxylin &

Eosin 염색하여 광학현미경으로 병리조직학적 변화를 관찰하였다.

6) Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

최종 DNCB 도포 24시간 후 마우스를 희생하여 마우스의 spleen을 떼어내고, pH 7.4 Phosphate bufferde saline(PBS)로 washing한 후 RNA later(QIAGEN)에 보관 후 RNA isolation을 수행하였다.

Spleen에서 TRI reagent(Molecular Research Center, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하고, 각각의 RNA를 동량으로 하여 cDNA를 합성한 후, cDNA template 1 μl, 10pM primer, 10mM dNTP mix, 1,25U EF-Taq DNA polymerase, 10X EF-Taq buffer(Solgent, Korea)로 total volume 50 μl가 되게 하여 pre-denaturing phase 95℃ 2min, 1 cycle ; denaturing phase 95℃ 20sec, annealing phase 58℃ 40sec(IL-1β 60℃), elongation phase 72℃ 20sec 40 cycle ; post-elongation phase 72℃ 5min, 1 cycle 조건에서 PCR을 수행하였다. 이에 따른 product를 10 μl씩 ethidium bromide(EtBr)가 포함된 1.5% agarose gel에 100V에서 20분 전기영동한 후, UV로 관찰하였다.

Table 2. Primer Sequences used in this study

Gene name	Primer sequence
Cyclophilin (299bp)	Forward : 5'-CATTGGCCATGGACAAGATG-3' Reverse : 5'-ACCCCACCGTGTCTTCGAC-3'
TNF-α (118bp)	Forward : 5'-TCAGCGAGGACAGCAAGGG-3' Reverse : 5'-CAGTGAGTGAAAGGACAGAACC-3'
IL-1β (124bp)	Forward : 5'-TACATCAGCACCTCACAAGCAG-3' Reverse : 5'-CATTAGAAACAGTCCAGCCCATAC-3'
IFN-γ (129bp)	Forward : 5'-GAACTGGCAAAGGATGGTGAC-3' Reverse : 5'-AGGTGTGATTCAATGACGCTTATG-3'

7) Myeloperoxidase(MPO) activity

MPO activity는 Han³³⁾ 등의 방법을 수정 보완하여 다음과 같이 시행하였다. 마우스를 희생시키고 우측 귀를 일정한 크기로 잘라서 PBS에 담귀 washing한 귀조직을 Protein Extraction solution (iNtRON, Korea)과 Protease inhibitor cocktail (Pierce, USA)이 50 mM PBS(pH 7.4)에 각각 1% 농도가 되도록 만든 혼합액에 넣어 homogenizer (IKA, T10 basic, Germany)를 이용하여 tissue를 분쇄하였다. 이때 얻어진 Homogenates를 4℃에서 13200 rpm, 30min 동안 원심분리를 수행하고 상층액을 얻었다. 이 상층액 30 μ 를 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide(in 50 mM potassium phosphate, pH 6.4), 0.165 mg/ml *o*-dianisidine dihydrochloride, 0.0015% H₂O₂를 포함하는 반응액 170 μ 에 넣고 상온에서 30분간 방치한 후 ELISA reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정했다.

8) MTT assay

內托千金散의 세포내 독성 유발 여부를 판단하기 위해 MTT assay를 시행하였다. HMC를 24well plate에 4×10^5 cells/ml로 분주하고, 12시간 incubation 시킨 후 內托千金散을 0, 100, 200, 500, 1000 μ g/ml로 처치하였다. 다시 24시간 incubation 시킨 후에 cell proliferation kit I(Roche, USA)을 각 well에 10 μ 씩 넣어 4시간 incubation 시키고, 최종적으로 얻어진 cell을 모아 원심분리 후 dimethyl sulfoxide(Sigma, USA)에 녹여 ELISA reader(Bio-Tek, USA)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 사람 비만세포(HMC)에서 histamine 유리량 측정

HMC를 24well plate에 4×10^5 cells/ml로 분주하고, 3시간 incubation 후에 內托千金散을 100,

200, 500, 1000 μ g/ml로 처치하였다. 30분 후 Normal군을 제외한 나머지 군에 compound 48/80(Sigma, USA) 1 mg/ml 농도로 처치하였다. 15분 경과 후 상층액을 96well plate에 duplicate로 옮겨 1M NaOH를 50 μ 씩 넣고, 이어서 1 mg/ml의 *o*-phthaldialdehyde(in EtOH)를 100 μ 씩 넣은 후 ELISA reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 excitation(360/40), Emission(460/40) 조건에서 형광값을 측정하였다.

10) 흰쥐 복강 비만세포(RPMC)에서 histamine 유리량 측정

Kanemoto 등³⁴⁾ 방법을 따라 8주령 male SD Rat을 경추 탈골하여 마취 시킨 후, Tyrode buffer B(137 mM NaCl, 5.6mM glucose, 12 mM NaHCO₃, 2.7 mM KCl, 0.3 mM NaH₂PO₄, 0.1% gelatin; pH 7.4) 20 ml을 복강에 넣고 90초간 마사지하고, 복강을 열어 pasteur pipette으로 cell을 모아서 150 \times g, 10분 원심분리를 시행하였다. 이어서 상층액을 버리고 Tyrode buffer B 1 ml를 넣고 셀을 부유시킨 뒤, iodixanol 1.5 ml와 3차 증류수 0.5 ml의 혼합액을 추가하고 다시 400 \times g, 15분 원심분리를 시행하였다. 원심 분리 후 상층액을 버리고 Tyrode buffer A(10 mM HEPES, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1 mM MgCl, 5.6 mM glucose, 0.1% BSA; pH7.4)를 1 ml 넣고, 1200 rpm 2분 원심분리 하였다. 상층액을 버리고, 최종적으로 얻어진 pellet에 Tyrode buffer A 13 ml을 넣고 24well plate에 3×10^5 cells/ml로 분주하였으며, 이후의 실험 방법은 10)과 동일하게 시행하였다.

11) 통계처리

- ① 본 실험의 결과를 분석함에 있어 모든 통계적 분석은 SPSS version 12.0을 이용하였으며, 모든 측정값은 평균값 \pm 표준편차(Mean \pm SD)

로 나타내었고, 유의확률(p-value)은 $p < 0.05$ 로 하였다.

- ② 모든 Data는 Kolmogorov-Smirnov test를 사용하여 정규분포 검정을 하였다.
- ③ 각 실험군 간의 성적 차이를 비교하기 위해 one-way ANOVA test를 시행하였으며, 사후 검정법으로는 Tukey test를 이용하였다.

III. 실험 성적

1. 귀의 부종 변화에 미치는 영향

대조군, 실험군 A, 실험군 B는 모두 DNCB의 도포를 반복할수록 부종이 증가하는 양상을 보였으나, 그 증가 정도에 있어 대조군에 비해 실험군 A, 실험군 B의 부종 변화 폭이 적었다(Table 3, Fig. 2).

2. 병리조직학적 변화

정상군(Fig. 3)에 비해 대조군에서는 염증성 부종으로 이개의 두께가 현저히 두꺼워져 있었고, 심한 화농성 피부염의 소견이 관찰되었다. 표피 세포층의 증식으로 인한 가시극세포증(acanthosis), 진

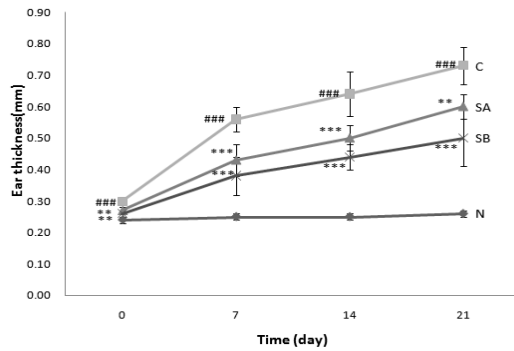


Fig. 2. The changes of Ear thickness induced by repeated application of DNCB. Repeated application of DNCB induced an increase in ear thickness through day 0 to 21. Group SA and SB significantly suppressed the increase in ear thickness compared with group C.

N : Normal group

C : Control group (DNCB-treated group)

SA : Sample A group (DNCB and Naetakchunkeum-san treated group)

SB : Sample B group (DNCB and Prednisolone treated group) Values are represented as mean \pm SD.(n=7)

, * : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Tukey test as $p < 0.01$, $p < 0.001$

: Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as $p < 0.001$

Table 3. The changes of Ear thickness induced by repeated application of DNCB

	0	7	14	21 (day)
N	0.24 \pm 0.01	0.25 \pm 0.01	0.25 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01
C	0.30 \pm 0.01 ^{###}	0.56 \pm 0.04 ^{###}	0.64 \pm 0.07 ^{###}	0.73 \pm 0.06 ^{###}
SA	0.27 \pm 0.01 ^{**}	0.43 \pm 0.05 ^{###}	0.50 \pm 0.04 ^{###}	0.60 \pm 0.04 ^{**}
SB	0.26 \pm 0.02 ^{**}	0.38 \pm 0.06 ^{###}	0.44 \pm 0.04 ^{###}	0.50 \pm 0.09 ^{###}

N : Normal group

C : Control group (DNCB-treated group)

SA : Sample A group (DNCB and Naetakchunkeum-san treated group)

SB : Sample B group (DNCB and Prednisolone treated group) Values are represented as mean \pm SD.(n=7)

, * : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Tukey test as $p < 0.01$, $p < 0.001$

: Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as $p < 0.001$

피표피 경계부(dermoepidermal junction)에 많은 수의 염증세포의 침윤이 있었으며 이로 인해서 경계부의 틈새(cleft)가 형성되어 있었으며, 혈관의 확장이 관찰되었다. 침윤된 세포는 대부분 호중구였으며, 림프구도 상당히 침윤되어 있었다(Fig. 4).

실험군 A에서 이개의 염증성 부종 및 염증세포의 침윤 등이 관찰되었으나, 침윤된 세포의 수가 현저히 감소되었으며, 호중구의 집락 및 경계부의 틈새 형성은 관찰되지 않았다(Fig. 5). 실험군 B에서의 병리조직학적 소견은 실험군 A에서와 유사한 정도로 관찰되었다(Fig. 6).

3. Myeloperoxidase(MPO) activity에 미치는 영향

호중구의 침착 정도를 평가하기 위해 호중구 과립에 존재하는 marker enzyme인 MPO activity를 측정하였다(Table 4.). 정상군에 비해 대조군의 MPO양이 현저히 증가하였으며, 실험군 A와 실험군 B는 대조군에 비해 상대적으로 MPO이 증가한 폭이 적었다(Fig. 7).

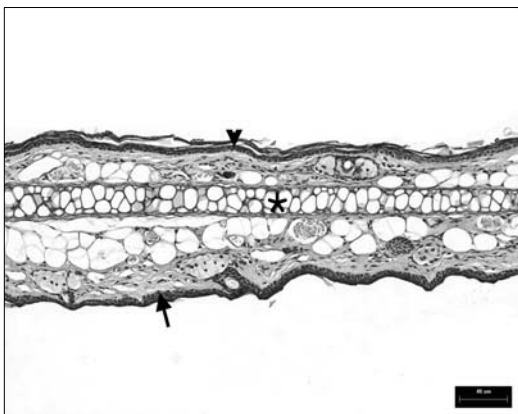


Fig. 3. Microphotograph of auricle from Normal group. The histological structure of external skin(arrow head), internal skin(arrow) and cartilage(asterisk) of auricle are intact. H&E stain, Bar=40 μ m

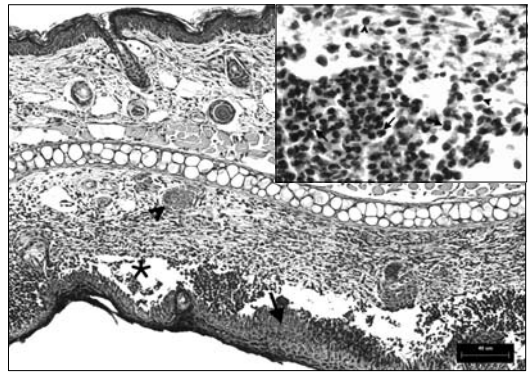


Fig. 4. Microphotograph of auricle from Control group. Severe suppurative dermatitis are occurred. Inflammatory cells are severely infiltrated into dermoepidermal junction. Infiltrated cells are mainly neutrophils and some lymphocytes(insert). Acanthosis(arrow), cleft of dermoepidermal junction(asterisk), and dilation of vessels(arrow head) are prominent. Notice the edematous swelling of auricle. H&E stain, Bar=40 μ m

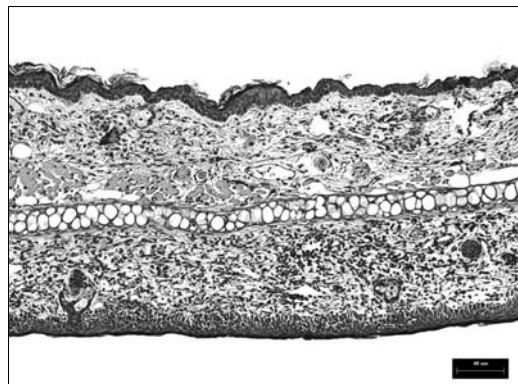


Fig. 5. Microphotograph of auricle from Naetakchunkeum-san treated group. Pathological lesions of dermatitis are alleviated. The numbers of infiltrated cells are reduced, and cleft is not shown. Compare with Fig. 2 and Fig. 3. H&E stain, Bar=40 μ m

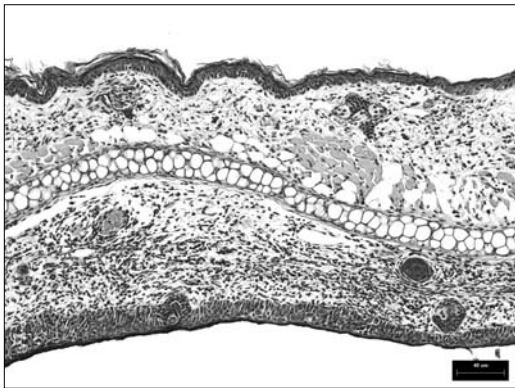


Fig. 6. Microphotograph of auricle from prednisolone treated group. Pathological lesions of dermatitis are alleviated. The severity of dermatitic lesions is similar with Naetakchunkeum-san treated group. Compare with Fig. 3, H&E stain, Bar=40 μm

Table 4. The effect of Naetakchunkeum-san on Myeloperoxidase activity

	Absorbance(450nm)
N	0,081 ± 0,005
C	0,472 ± 0,194 ^{###}
SA	0,212 ± 0,081 ^{**}
SB	0,197 ± 0,070 ^{**}

N : Normal group

C : Control group (DNCB-treated group)

SA : Sample A group (DNCB and Naetakchunkeum-san treated group)

SB : Sample B group (DNCB and Prednisolone treated group) Values are represented as mean ± SD.(n=7)

** : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Tukey test as p<0,01

: Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as p<0,001

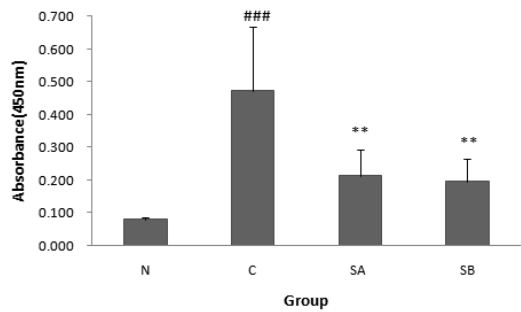


Fig. 7. The effect of Naetakchunkeum-san on Myeloperoxidase activity.

Myeloperoxidase activity in the supernatant of the homogenized ear tissue was measured. There was a significant increase in MPO activity in the group C compared with the group N. Group SA and SB significantly inhibited the increase in MPO activity.

N : Normal group

C : Control group (DNCB-treated group)

SA : Sample A group (DNCB and Naetakchunkeum-san treated group)

SB : Sample B group (DNCB and Prednisolone treated group) Values are represented as mean ± SD.(n=7)

** : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Tukey test as p<0,01

: Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as p<0,001

4. 전염증성 사이토카인의 유전자 발현에 미치는 영향

전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)인 TNF-α, IL-1β, INF-γ의 발현 양상을 확인하기 위해 면역장기인 spleen을 적출하여 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 정상군에서는 TNF-α, IL-1β, INF-γ가 거의 발현되지 않았으며, 대조군에 비해 실험군 A와 실험군 B에서 TNF-α, IL-1β, INF-γ의 발현이 억제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

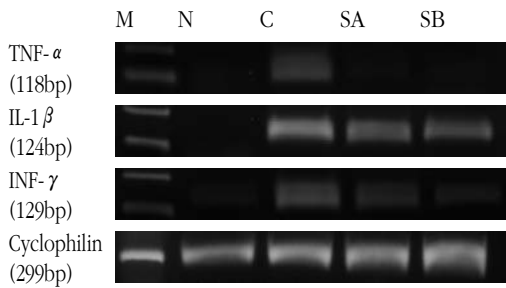


Fig. 8. Results of RT-PCR analysis of the mRNA levels of TNF- α , IL-1 β , INF- γ . The level of expression of TNF- α , IL-1 β , INF- γ in the group SA and SB was significantly lower than that in the group C. As the internal control, cyclophilin mRNA was also reverse-transcribed and amplified.

M : marker
 N : Normal group
 C : Control group (DNCB-treated group)
 SA : Sample A group (DNCB and Naetakchunkeum-san treated group)
 SB : Sample B group (DNCB and Prednisolone treated group)

Table 5. The Effect of Naetakchunkeum-san on Cell Viability

	Cell Viability (%)
N	100.00 ± 0.93
100	96.02 ± 5.88
200	99.54 ± 1.79
500	97.64 ± 3.80
1000	92.68 ± 3.23

N : 0 $\mu\text{g/ml}$ Naetakchunkeum-san treated group
 100 : 100 $\mu\text{g/ml}$ Naetakchunkeum-san treated group
 200 : 200 $\mu\text{g/ml}$ Naetakchunkeum-san treated group
 500 : 500 $\mu\text{g/ml}$ Naetakchunkeum-san treated group
 1000 : 1000 $\mu\text{g/ml}$ Naetakchunkeum-san treated group
 Values are represented as mean \pm SD.(n=3)

5. MTT assay

內托千金散의 세포독성 여부를 파악하기 위해 Human mast cell line(HMC)을 이용하여 MTT

assay를 시행하였다. 內托千金散을 각각 0, 100, 200, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과 그 생존율에 있어 유의한 차이가 발생하지 않았다 (Table 5, Fig. 9).

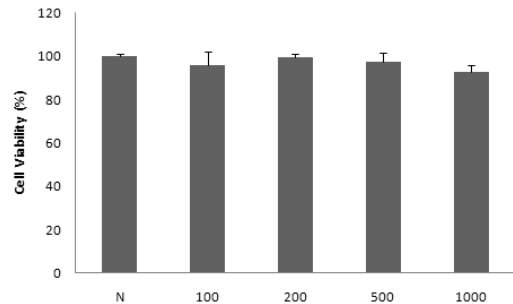


Fig. 9. The effect of Naetakchunkeum-san on cell viability. HMC cells are treated with the 0 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ Naetakchunkeum-san, then further incubated for 24 hours and measured by the MTT assay. There are no statistically significant differences in 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ Naetakchunkeum-san treated group from 0 $\mu\text{g/ml}$ Naetakchunkeum-san treated group as determined by the Tukey test.

N : 0 $\mu\text{g/ml}$ Naetakchunkeum-san treated group
 100 : 100 $\mu\text{g/ml}$ Naetakchunkeum-san treated group
 200 : 200 $\mu\text{g/ml}$ Naetakchunkeum-san treated group
 500 : 500 $\mu\text{g/ml}$ Naetakchunkeum-san treated group
 1000 : 1000 $\mu\text{g/ml}$ Naetakchunkeum-san treated group
 Values are represented as mean \pm SD.(n=3)

6. 사람 비만세포와 흰쥐 복강 비만세포에서 histamine의 유리량에 미치는 효과

알레르기 반응을 유발하는 histamine의 분비 억제효과를 확인하기 위하여 사람 비만세포(HMC)와 흰쥐 복강 비만세포(RPMC)에 compound 48/80을 처리하여 histamine 분비를 유도하고 內托千金散을 농도별로 처리하였다. Compound 48/80만을

처치했을 때에 비해 內托千金散을 함께 처치한 경우 內托千金散의 농도가 높아질수록 단계적으로 histamine 유리량이 감소하였다(Table 6, Fig. 10, Fig. 11).

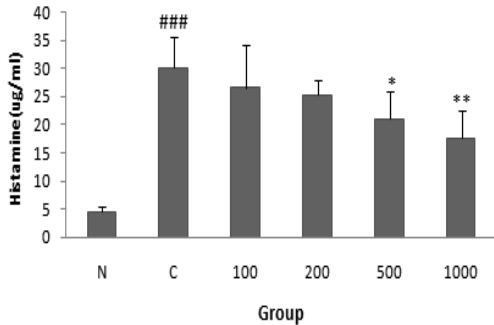


Fig. 10. The effect of Naetakchunkeum-san on the compound 48/80-induced histamine release from HMC. Naetakchunkeum-san dose-dependently inhibited the compound 48/80-induced histamine release. In the group 100 and 200, Naetakchunkeum-san has a little effect on the inhibition of histamine release. But in the group 500 and 1000, Naetakchunkeum-san significantly inhibited histamine compared with group C.

N : no treatment
 C : 1 mg/ml compound 48/80 treated group
 100 : 1 mg/ml compound 48/80 and 100 μ g/ml Naetakchunkeum-san treated group
 200 : 1 mg/ml compound 48/80 and 200 μ g/ml Naetakchunkeum-san treated group
 500 : 1 mg/ml compound 48/80 and 500 μ g/ml Naetakchunkeum-san treated group
 1000 : 1 mg/ml compound 48/80 and 1000 μ g/ml Naetakchunkeum-san treated group
 Values are represented as mean \pm SD.(n=6)
 *, **, *** : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Tukey test as $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$
 ### : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as $p < 0.001$

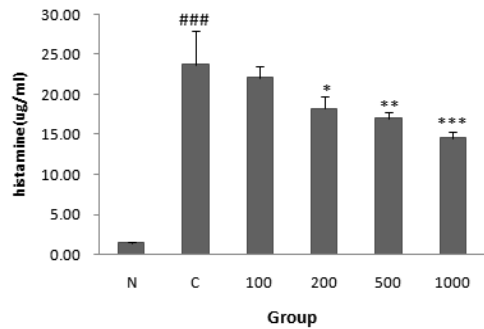


Fig. 11. The effect of Naetakchunkeum-san on the compound 48/80-induced histamine release from RPMC. Naetakchunkeum-san dose-dependently inhibited the compound 48/80-induced histamine release. In the group 100, Naetakchunkeum-san has a little effect on the inhibition of histamine release. But in the group 200, 500 and 1000, Naetakchunkeum-san significantly inhibited histamine compared with group C.

N : no treatment
 C : 1 mg/ml compound 48/80 treated group
 100 : 1 mg/ml compound 48/80 and 100 μ g/ml Naetakchunkeum-san treated group
 200 : 1 mg/ml compound 48/80 and 200 μ g/ml Naetakchunkeum-san treated group
 500 : 1 mg/ml compound 48/80 and 500 μ g/ml Naetakchunkeum-san treated group
 1000 : 1 mg/ml compound 48/80 and 1000 μ g/ml Naetakchunkeum-san treated group
 Values are represented as mean \pm SD.(n=4)
 *, **, *** : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Tukey test as $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$
 ### : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as $p < 0.001$

IV. 고 찰

World Allergy Organization에 따르면 산업화된 나라의 직업군에게서 발생한 직업관련 피부 질환의 85~95%가 접촉피부염 때문이라고 한다. 산

업이 발달함에 따라 항원으로 작용할 수 있는 물질들이 증가하고 있기 때문에 결과적으로 알레르기성 접촉피부염의 발병빈도는 증가하고 있는 추세이다. 따라서 이에 대한 임상적 연구의 중요성은 더욱 강조될 수밖에 없다²⁾.

알레르기성 접촉피부염은 개체가 이미 항원에 감각된 이후 다시 동일한 항원에 접촉될 때 접촉된 국소부위에 염증반응을 일으키는 지연형 과민반응(Delayed type hypersensitivity)에 속하는 면역 질환이다³⁵⁻³⁷⁾. 이를 일으키는 단순화학 물질인 합텐(hapten)은 매개 단백질과 결합하여 완전한 항원으로써 Langerhans Cell(LC)과 접촉하여 감각을 일으킨다. 일단 감각된 사람에게는 재차 항원이 피부에 침투하게 되면 기억세포가 이를 감지하고 INF- γ , IL-2 등의 화학매체가 분비되어 염증을 일으킨다. 이론적으로 모든 물질들이 항원이 될 수 있으며 특히 항원성이 높은 예로는 니켈, 크롬을 포함하여 옻나무의 pentadecylcatechol, 은행나무 열매의 ginkgolic acid 등이 있다. 이 외에도 화장

품의 방향성 화합물, 염색약에 포함된 parphenylenediamine, 매니큐어 성분, 합성수지를 고분자화 하기 전의 중간 물질이나 촉매제제, 농약 등이 종종 원인 물질로 작용한다^{1,38)}.

알레르기성 접촉피부염은 한의학적인 범주로서 발생 부위와 원인 물질에 따라 漆瘡⁷⁻⁹⁾, 狐尿刺⁹⁻¹¹⁾, 馬桶癬¹²⁾, 膏藥風¹³⁾, 粉花瘡¹⁴⁾ 등에 해당한다. 漆瘡은 漆의 辛熱之毒이 원인이 되어 面部에 발생하며, 狐尿刺는 螻蛄의 分泌物, 狐狸의 排泄物로 인하여 手足肢節에 생긴다. 馬桶癬은 새로 옷칠한 변기와 의 접촉하여 臀部에 생기고, 膏藥風은 外用藥의 藥毒으로 인해 접촉한 부위 위주로 생기며, 粉花瘡은 鉛粉을 이용한 化粧으로 인해 面部에 발생하는 것이다. 이 모두 腠理가 不密한 身體狀態, 혹은 체질적 소인이 있는 상태에서 風, 濕, 熱, 蟲이나 有毒한 물질에 접촉되어 발생되는 것으로 보며, 접촉하는 항원의 종류만 다를 뿐 병의 증상과 경과에 대 동소이하여 현대의학의 알레르기성 접촉피부염과 유사하다.

Table 6. The effect of Naetakchunkeum-san on the compound 48/80-induced histamine release from HMC and RPMC

	HMC	RPMC
	histamine($\mu\text{g}/\text{ml}$)	histamine($\mu\text{g}/\text{ml}$)
N	4.66 \pm 0.78	1.51 \pm 0.04
C	30.08 \pm 5.42 ^{###}	23.70 \pm 4.29 ^{###}
100	26.54 \pm 7.75	22.05 \pm 1.55
200	25.26 \pm 2.58	18.27 \pm 1.45 [*]
500	21.10 \pm 4.80 [*]	17.08 \pm 0.83 ^{**}
1000	17.60 \pm 5.06 ^{**}	14.64 \pm 0.79 ^{###}

N : no treatment

C : 1 mg/ml compound 48/80 treated group

100 : 1 mg/ml compound 48/80 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Naetakchunkeum-san treated group 200 : 1 mg/ml compound 48/80 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Naetakchunkeum-san treated group

500 : 1 mg/ml compound 48/80 and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Naetakchunkeum-san treated group

1000 : 1 mg/ml compound 48/80 and 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Naetakchunkeum-san treated group

Values are represented as mean \pm SD.(HMC n=6; RPMC n=4)

^{*}, ^{**}, ^{###} : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Tukey test as p<0.05, p<0.01, p<0.001

^{###} : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as p<0.001

한의학적 치료에 있어서 清代까지의 문헌들에는 外治法을 위주로 기술하고 있으며, 현대에 와서 內治法이 병용되고 있다. 內治法의 경우 급성기의 경우에는 清熱解毒, 祛風, 利濕, 涼血이 위주가 되며, 만성기에는 祛風, 養血을 위주로 하여 증상의 발현 부위나 표현 형태에 따라 치법의 偏重과 약물의 加減을 하게 된다. 外治法을 살펴보면 병정 시기에 따라 급성기에는 清熱燥濕하는 약물들이, 만성기에는 活血養血하는 약물들이 다용되었으며 劑型 또한 급성기에는 丘疹 위주이거나 水疱가 터지지 않았을 경우에는 洗劑, 散劑를 다용하고 水疱가 터져 삼출물이 있는 경우는 煎湯液, 洗劑, 散劑를 다용하고 滲出液이 없는 경우와 糜爛하거나 結痂를 이룬 경우나 만성기에는 膏劑를 다용하였다^{39,40}.

최근 한의학적인 연구로서 DNCB 감각 후 개별 한약재²¹⁻²⁵나 처방^{26,27}의 항알레르기 및 소염효과를 살펴보는 연구들이 이루어지고 있다. 그러나 대부분이 清熱, 涼血, 解毒, 消風 등에 치중하였기에 만성적이고 지속적인 경과를 보이는 알레르기성 접촉피부염에 있어 正氣를 보강할 필요가 있을 것이라 생각되어 內托千金散을 선택하게 되었다. 본 처방은 〈東醫寶鑑〉²⁸에서 “治一切癰疽惡瘡 能內托”이라 하여 氣血不足과 함께 나타나는 癰疽에 扶正祛邪하는 의미가 있는 처방으로 알레르기 질환의 치료법과 유사성을 갖고 있다. 그러나 지금까지 주로 면역조절작용^{29,30}, 항종양효과 기전³¹ 등의 위주로 본 처방에 대한 연구가 진행되었기에 이번 연구를 통해 알레르기성 접촉피부염에 관한 효과를 살펴보고자 하였다.

이를 위해 BALB/c mouse 28마리를 각각 7마리씩 정상군, 대조군과 함께 실험군을 A, B로 나누어 각기 內托千金散과 prednisolone을 경구 투여하도록 하였으며 알레르기 피부염의 인위적인 유발을 위해서는 유발 항원으로 다양한 실험에 이용되었던 DNCB를 적정 농도로 용해한 후 1, 2차에 걸쳐 감각시켜 유발하여 귀의 부종 변화 측정,

귀의 병리조직학적 변화 관찰, 호중구의 침착정도 평가, 전염증성 사이토카인의 유전자 발현 관찰, MTT assay를 통한 內托千金散의 세포독성 여부, 사람의 비만세포와 흰쥐 복강 비만세포에서의 histamine 유리량 측정을 실시하였다.

실험군 B에 적용되는 약물인 prednisolone은 단 시간형 당질코르티코스테로이드로서 염증의 모든 과정을 차단하여 발열, 홍반, 부종 및 압통을 감소하고 염증 반응에 있어서 부종, fibrin 침착, 호중구 이동 및 식작용 등으로 대표되는 초기 요소들과 collagen 합성과 침착과 같은 후기 요소의 진행을 지연시킨다. 그러나 그 부작용으로 감염에 대해 신체가 매우 둔감하게 반응하여 감염이 심각해지거나 위궤양, 당뇨, 골다공증을 유발하기도 한다. 또한 녹내장, 인격장애, 자살과 정신이상 유발, 다양한 체액과 전해질 불균형, 부신기능 부전증, 여드름과 지방조직의 축적을 통한 비만, 월경불순, AIDS 환자의 Kaposi's sarcoma의 급속화 혹은 활성화 등이 나타나기도 한다⁴¹. 따라서 이와 같은 부작용을 최소화하면서 효과를 발휘할 수 있는 다른 치료법의 개발이 필요한 실정이다.

접촉성 과민반응으로 인한 부종 감소를 알아보기 위해 0, 7, 14, 21일에 DNCB 도포 4시간 후 digital caliper를 이용하여 마우스의 우측 귀의 두께를 3회 측정 후 평균을 구하였다. 대조군과 실험군 A, B는 모두 DNCB를 반복 도포할수록 부종이 증가하는 양상을 보였으나, 그 증가 정도에 있어 대조군에 비해 실험군 A, B의 부종 변화 폭이 적었다. 이는 內托千金散과 prednisolone이 접촉성 과민반응으로 인한 부종을 감소시킴을 의미하는데, 內托千金散이 prednisolone과 비슷한 부종 감소 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

귀의 병리조직학적 변화를 관찰한 결과 대조군에서 염증성 부종으로 이개의 두께가 현저히 두꺼워지고 심한 화농성 피부염의 소견이 관찰되었다. 즉, 표피 세포층의 증식으로 인한 가시극세포증

(acanthosis), 진피표피경계부(dermoepidermal junction)에 많은 수의 염증세포 침윤이 있었으며 이로 인해 경계부의 틈새(cleft)와 혈관 확장이 관찰되었다. 침윤된 세포는 대부분 호중구였으나 림프구도 발견되었다. 실험군 A와 실험군 B에서는 유사한 정도의 이개의 염증성 부종 및 염증 세포의 침윤 등이 관찰되었으나 대조군에 비해 침윤된 세포의 수가 현저히 감소되었으며, 호중구의 집락 및 경계부의 틈새 형성은 관찰되지 않았다.

MPO는 골수계의 세포가 갖고 있는 peroxidase라는 의미로 1차 과립에 포함되어 있기 때문에 전 골수구의 시기에 출현하여 그 이후 성숙 호중구에 도달할 때까지 갖게 되는 것이다⁴²⁾. 호중구의 침착 정도를 평가하기 위해 호중구 과립에 존재하는 marker enzyme인 MPO activity를 측정된 결과 대조군의 MPO양은 현저히 증가하였으나 실험군 A와 실험군 B는 대조군에 비해 상대적으로 MPO의 증가폭이 적었다. 이러한 결과로 丙托千金散이 prednisolone과 비슷한 수준의 MPO activity 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

전염증성(pro-inflammatory) 사이토카인은 다른 사이토카인의 보조 없이 조직에 백혈구 침윤을 야기할 수 있는 모든 반응의 시작을 유발할 수 있으며 TNF(α , β)와 IL-1(α , β)이 이에 속한다. TNF(Tumor Necrosis Factor)- α 는 염증반응 때 일어날 수 있는 대부분의 변화를 유도할 수 있으며 LC나 다른 APC(Antigen Presenting Cell)가 국소 림프절로 이주하는데도 관여한다. IL-1 β 는 LC나 단핵세포/대식세포의 주된 사이토카인으로서 IL-1 β 는 표피로부터 LC가 이주하는데 관여하고 있다. INF- γ 는 T세포의 MHC class I, II와 같은 당단백의 합성을 유도하여 항원 전달의 효율성을 높이고, 대식세포를 활성화하여 강력한 항균 기능을 발휘할 수 있게 한다⁴³⁾. 본 연구에서는 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , INF- γ 의 발현 양상을 확인하기 위해 면역장기인 spleen을 적출하

여 RT-PCR을 시행한 결과, 대조군에 비해 실험군 A, B에서 이들의 발현이 억제되었다.

부작용 없는 안전한 치료책으로서 丙托千金散을 연구하고자 세포독성 여부를 파악하기 위해 Human mast cell line(HMC)을 이용하여 MTT assay를 시행하였다. 丙托千金散을 각각 0, 100, 200, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과 그 생존율에 있어 유의한 차이가 발생하지 않아 세포독성이 없었다.

Histamine은 항원에 의해 자극된 비만세포의 탈과립으로 세로토닌, 뉴코트리엔, 헤파린 등 혈관확장과 단백질 유출을 유도하는 많은 화학물질들과 함께 유리되어 제 I형 아나필락시스 과민반응을 일으킨다³⁶⁾. 본 연구에서는 알레르기 반응을 유발하는 histamine의 분비 억제효과를 확인하기 위하여 사람 비만세포와 흰쥐 복강 비만세포에 compound 48/80을 처리하여 histamine 분비를 유도하였고, 丙托千金散을 농도별로 처리하여 그 분비량을 측정하였다. Histamine 유리량은 compound 48/80만을 처리했을 때에 비해 丙托千金散을 함께 처리한 경우 그 농도가 높아질수록 단계적으로 감소하여 억제 효과를 확인하였다.

이상의 실험결과로 볼 때 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉피부염에 대해 丙托千金散은 prednisolone의 효과와 거의 비슷하게 작용함을 알 수 있었다. 병리조직학적 변화에서도 대조군에 비해 실험군 A, B 모두 이개의 염증성 부종 및 염증세포의 침윤 등이 관찰되긴 하였으나 침윤된 세포의 수가 현저히 감소되었으며, 호중구의 집락 및 경계부의 틈새 형성은 관찰되지 않았다. 또한 염증 과정에서 분비되는 호중구의 침착 정도를 평가하기 위한 MPO activity 측정과 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , INF- γ 의 발현이 대조군에 비해 실험군 A와 실험군 B에서 발현이 억제되었음을 확인할 수 있었다. 또한 MTT assay를 시행한 결과 丙托千金散은 세포독성이 없었고, 알레르기 반응을 유발하는 histamine의 유리량 역시

농도 의존적으로 억제하였다.

이를 종합하면 內托千金散은 prednisolone과 달리 부작용 없이 알레르기성 접촉피부염에 효과적임을 확인하였으며, 향후 알레르기성 접촉피부염 환자에 대해 효과적인 임상 활용이 가능할 것으로 판단된다. 또한 內托千金散이 알레르기성 접촉피부염의 발현에 있어서 어떠한 기전으로 효과를 발휘하였는지에 대해서는 본 연구에서는 밝히지 못하였기에 차후 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

DNCB를 이용하여 알레르기성 접촉피부염을 유발한 mouse에 內托千金散을 경구 투여하여 귀의 부종 변화와 병리조직학적 변화, 호중구의 침착 정도, 전염증성 사이토카인의 유전자 발현, 內托千金散의 세포독성 여부, 사람의 비만세포와 흰쥐 복강 비만세포에서의 histamine 유리량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 실험군에서 귀의 부종 감소 효과를 보였다.
2. 실험군에서 염증성 부종 및 염증세포의 침윤 등이 현저히 감소되었으며, 호중구의 집락 및 경계부의 틈새 형성 역시 관찰되지 않았다.
3. 內托千金散은 prednisolone과 비슷한 수준의 MPO activity 억제효과가 있었다.
4. 실험군에서 대조군에 비해 TNF- α , IL-1 β , INF- γ 의 발현이 억제되었다.
5. 內托千金散은 실험에 사용한 농도에서 세포독성이 없었다.
6. 內托千金散은 histamine의 유리량을 농도 의존적으로 억제하였다.

본 연구는 지식경제부의 지역혁신센터사업으로 수행되었음 (RIC-07-06-01).

참 고 문 헌

1. 대한피부과학회. 피부과학. 서울:여문각, 2001: 166-74.
2. 권오성, 김진택, 박인식, 안상현, 이해풍, 김호현, 강운호. 連翹敗毒散加味方이 알러지성 접촉피부염에 미치는 影響. 東國韓醫學研究所論文集. 1999;8(1):77-91.
3. 이기영, 김규연. 알레르기의 진료. 서울:한국의학사. 2001;3-7, 529-43.
4. Nishioka K. Antiallergic Therapy. 대한피부과연구학회지. 1994;1:1-6.
5. Homey B, Assmann T, Vohr HW, Ulrich P, Lauerma AI, Ruzicka T, Lehmann P, Schuppe HC. Topical FK506 Suppresses Cytokine and Costimulatory Molecule Expression in Epidermal and Local Draining Lymph Node Cells During Primary Skin Immune Responses. The Journal of Immunology. 1998;160:5331-40.
6. 최성민. 알레르기질환 치료의 새로운 접근. 동국의학. 2001;8:115-30.
7. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 서울:大成出版社. 1992: 258.
8. 陳實功. 外科正宗. 北京:人民衛生出版社. 1983: 259.
9. 吳謙. 醫宗金鑑. 瀋陽:遼寧科學技術出版社. 1997: 649, 693, 698.
10. 陳仕鐸. 洞天奧旨. 北京:中醫古籍出版社. 1999: 148.
11. 趙佶. 聖濟總錄. 北京:人民衛生出版社. 1995: 1557-9, 1610-11.
12. 傅景華. 中醫外科學. 北京. 中醫古籍出版社. 1994:340-42.
13. 顧伯康. 中醫外科學. 北京. 人民衛生出版社. 1987:15-23, 257, 275.

14. 顧世澄, 瘍醫大全. 北京:人民衛生出版社, 1987: 475.
15. 김진택, 안상현, 박인식, 정재만, 김호현. 알러지성 접촉피부염 유발 피부 주변 림프질에서의 세포성 면역 활성화에 관한 면역조직화학적 연구 - T 림프구와 IL-2 수용기의 분포 변화를 중심으로. 東國韓醫學研究所論文集. 1998;7(1): 33-41.
16. 김진택, 박인식, 안상현. DNCB에 의한 생쥐 복강피부의 지연형 과민반응에 관한 연구. 東國韓醫學研究所論文集. 1997;6(1):117-28.
17. Yoon TJ, Kim JK, Oh CW, Kim TH. Contact Urticaria due to Dinitrochlorobenzene. 대한피부과학회지. 1997;9(3):191-3.
18. Gunnes G, Jorundsson E, Tverdal A, Landsverk T, Press CM. Accumulation of CD25+ CD4+T-cells in the draining lymph node during the elicitation of DNCB-induced contact hypersensitivity in lambs. Research in Veterinary Science. 2004; 77:115-22.
19. Kataranovski M, Vlaški M, Kataranovski D, Tošić N, Mandić, Radić., Todorović, V. Immunotoxicity of epicutaneously applied anticoagulant rodenticide warfarin : evaluation by contact hypersensitivity to DNCB in rats. Toxicology. 2003;188:83-100.
20. Okamura T, Morimoto M, Yamane G, Takahashi S. Langerhans' cells in the murine oral mucosa in the inductive phase of delayed type hypersensitivity with 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene. Clin Exp Immunol. 2003;134:188-94.
21. 이재령, 최경임, 박숙자, 권영규, 변성희. 금은화 화장수가 DNCB로 유발된 접촉성피부염에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 2006;21(1): 9-15.
22. 김윤희, 박영숙. 오가피열수추출물이 DNCB로 유도된 알레르기성 접촉피부염 흰쥐의 지질대사, 항산화능 및 표피회복능에 미치는 영향. 한국식품과학회지. 2006;38(5):668-73.
23. 백윤하. DNCB(dinitrochlorobenzene)로 자극한 NC/Nga 생쥐에서 丹蔘의 아토피 억제 효과. 경원대학교 박사학위논문. 2006.
24. 손미예, 남상해. 두충 추출물이 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉피부염과 산화적 손상에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 2007;36(12):1517-22.
25. 申枕湜. 生地黃抽出物이 DNCB로 誘導된 생쥐의 Allergy性 接觸皮膚炎에 미치는 影響. 東國大學校大學院. 2000.
26. 박숙자, 이상곤, 백정환, 변성희, 김상찬. 소풍 산추출물이 DNCB로 유발된 접촉성피부염에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(3): 623-8.
27. 변성희, 이병욱, 김상찬. 四妙勇安湯 물추출물이 DNCB로 유발된 접촉성피부염에 미치는 영향. 大韓韓醫學方劑學會誌. 2005;13(2):59-69.
28. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:법민문화사. 1999:1416, 1418.
29. 金喜澤, 盧石善. 內托千金散加味方이 3-MCA로 誘發된 皮膚癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響. 大韓外官科學會誌. 1999;12(2):20-52.
30. 梁起豪, 鄭鉉雨, 崔政和. 內托千金散 및 그 加味方이 마우스의 免疫細胞 및 癌細胞에 미치는 效果. 大韓外官科學會誌. 2000;13(1):44-59.
31. 김상돈, 권강범, 신병철, 박태용, 박종하, 권영달, 송용선. 人間白血病 細胞株에서 內托千金散의 抗腫瘍 效果 및 機轉에 관한 研究. 韓方再活醫學科學會誌. 2006;16(3):49-64.
32. Kim HH, Kim DH, The effect of Yunkyopaedoksangamibang on allergic contact

- dermatitis. J. Institute Orient Medicine, Semyung Univ. 2001;3:67-80.
33. Mi Hwa Han, Won Kee Yoon, Hyunju Lee, Sang-Bae Han, Kiho Lee, Song-Kyu Park, Kyu-Hwan Yang, Hwan Mook Kim, Jong Soon Kang. Topical application of silymarin reduces chemical-induced irritant contact dermatitis in BALB/c mice. *International Immunopharmacology*. 2007;7: 1651-8.
 34. Kanemoto, T., Kasugi, T., Yamatodani, A., Ushio, H., Mochizuki, T. k., Kimura, M., Nishimura, M. and Kitamura, Y(1993) Supernormal histamine release and normal cytotoxic activity of being rat mast cells with giant granules. *Int. Arch. Allergy Immunol*, 100:99-106.
 35. Shintani Futoshi, *Step To Internal Medicine - 면역알레르기질환*. 도서출판 정담. 2005:44-7.
 36. 대한피부과학회. *피부과학*. 서울:여문각. 2001: 76-7.
 37. 康晰榮 편저. 알레르기질환 임상실제. 서울:일조각. 1997:301-6.
 38. 강원형. *피부질환 이틀라스*. 서울:한미의학. 2003:89-93.
 39. 全宰弘, 金賢兒, 姜允皓. 接觸性皮膚炎에 關한 文獻의 考察. *韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌*. 1997; 10(1):263-83.
 40. 全宰弘, 金賢兒, 姜允皓. 接觸性皮膚炎에 外治에 關한 文獻의 考察. *韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌*. 1998;11(1):197-218.
 41. 한국약학대학협의회 약물학분과회. *약물학*. 신일북스. 2007:566-77.
 42. Shintani Futoshi, *Step To Internal Medicine - 혈액질환*, 도서출판 정담. 2005:72-8.
 43. 대한피부과학회. *피부과학*. 서울:여문각. 2001: 64-8.
 44. 대한피부과학회. *피부과학*. 서울:여문각. 2001: 92-3.