

荊防敗毒散이 DNFB로 유발된 생쥐의 알레르기접촉피부염에 미치는 영향

박근희 · 임태형 · 박혜선

동신대학교 한의과대학 사상체질의학과

Abstract

Effects of Hyeongbangpaedok-san (HBPDS) on Allergic Contact Dermatitis (ACD) induced by DNFB in Mice

Geun-Hee Park, Tae-Hyung Lim, Hye-Sun Park

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, Graduate School of Dongshin University

Objectives

The present study was carried out to investigate effects of HBPDS on allergic contact dermatitis (ACD) induced by 2,4-Dinitro-1-fluorobenzene (DNFB) in mice.

Methods

In this experiment, effects of HBPDS on body weights, skin thicknesses, skin weights, histopathological changes, clinical aspects, erythema index, melanin index, production levels of cytokines in ACD mice were investigated. In addition, effects on proliferation rates, release of β -hexosaminidase and histamine were also investigated *in vitro*.

Results & Conclusions

- 1) HBPDS inhibited enlargement of skin thickness and weight significantly ($P < 0.05$).
- 2) HBPDS treatment prevented spongiosis, edema and immune cell infiltrations.
- 3) Erythema, desquamation and keratosis were diminished by oral administration of HBPDS.
- 4) Production levels of TNF-alpha and IFN-gamma in serum were decreased by HBPDS treatment *in vivo*.
- 5) More than 200 $\mu\text{g/ml}$ of HBPDS treatment decreased β -hexosaminidase release and more than 400 $\mu\text{g/ml}$ of HBPDS treatment also decreased histamine release *in vitro*.

Key Words: Hyeongbangpaedok-san, Allergic Contact Dermatitis, DNFB, Sasang Constitutional Medicine

Received May 07, 2014 Revised May 26, 2014 Accepted June 23, 2014

Corresponding Author Hye-Sun Park

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, Mokpo Oriental Hospital of Dongshin University,
313, Baengnyeong-daero, Mokpo-si, Jeollanam-do, 530-822, Republic of Korea
Tel: +82-10-4708-8640 Fax: +82-62-280-7788 E-mail: medic73@hanmail.net

© The Society of Sasang Constitutional Medicine.
All rights reserved. This is an open access article
distributed under the terms of the Creative
Commons attribution Non-commercial License
(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/)

I. 緒論

접촉피부염이란 외부 물질과의 접촉에서 발생하는 피부의 염증반응으로 발생 기전에 따라 자극접촉피부염 (Irritant contact dermatitis, ICD)과 알레르기접촉피부염 (Allergic contact dermatitis, ACD)으로 세분된다. 이 중 알레르기접촉피부염은 제 IV형 과민반응에 의한 세포매개 면역반응으로 항원에 대한 감각이 선행되어야 하는 알레르기 질환으로 임상상 홍반, 구진, 수포를 동반한 습진의 형태로 나타나는데¹ 한방에서는 濕瘡의 범위에 속한다².

荊防敗毒散 (Hyeongbangpaedok-san, HBPDS)은 이제마가 荊芥, 防風, 羌活, 獨活의 降表陰 작용과 生地黃, 車前子, 柴胡, 地骨皮의 清裏熱 작용을 이용하여 外寒包裹熱 된 少陽人 表寒病을 치료할 목적으로 龔信 『古今醫鑑』의 荊防敗毒散을 加減하여 少陽人의 脾受寒表寒病에 응용한 처방이다. 少陽人의 病證은 脾受寒表寒病과 胃受熱裏熱病으로 구별되는데 두 病證은 각각 陰氣의 升降 장애와 陰氣의 부족으로 유발되기 때문에 火熱 위주의 증상이 나타나기 쉽다³.

알레르기접촉피부염의 경우 병변이 국소적이고 홍반, 구진, 수포 등의 습진 형태로 나타나며 외부 자극이 있어야만 질병이 발현하므로¹ 少陽人의 경우 外邪에 의해 유발되는 脾受寒表寒病 傷寒 범주로 인식하는 것이 타당하다고 생각하였고 성질 상 ‘熱多寒少之病’인 것으로 이해하였다. 이에 알레르기접촉피부염의 제반 증상 완화에 降表陰 清裏熱하는 荊防敗毒散이 효과가 있을 가능성이 있다고 생각하여 본 연구를 기획하였다.

본 연구에서는 荊防敗毒散의 항 피부염 효과를 살펴보기 위하여 생쥐에 2,4-Dinitro-1-fluorobenzene (DNFB)을 이용하여 알레르기접촉피부염을 유발하고 荊防敗毒散을 구강 투여하여 생쥐의 체중, 병소에

발생하는 피부염의 정도, 홍반 지수, 멜라닌 지수, 피부 조직의 조직병리학적 변화 등을 관찰하였다. 또한 荊防敗毒散의 작용 기전을 살펴보기 위하여 *in vitro* 에서 비만세포주 (mast cell)에 대한 세포 독성 및 β -hexosaminidase와 histamine 분비에 미치는 영향을 관찰하였다. 위 실험 결과 荊防敗毒散이 알레르기접촉피부염에 미치는 영향에 대한 有意한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 研究方法

1. 재료

1) 동물

6주령 된 수컷 Balb/c 생쥐를 샴타코 (Incheon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 모든 실험동물은 일주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 온도와 습도가 조절되는 환경 (24±3°C, 12-hr light-dark cycle)에서 고형사료와 물을 마음껏 섭취하게 하며 실험에 사용하였다.

2) 세포주

흰쥐 유래 비만세포주 (mast cell line)인 RBL-2H3 cell은 한국세포주은행 (Seoul, Korea)으로부터 냉동상태로 구입하여 사용하였다.

3) 약재

본 실험에 사용된 荊防敗毒散 (Hyeongbangpaedok-san, HBPDS)은 羌活, 獨活, 荊芥, 防風, 生地黃, 茯苓, 前胡, 車前子, 地骨皮, 柴胡로 구성되며, 모든 약재는 동신대학교 부속 목포한방병원을 통하여 구입 정제하여 사용하였다. 荊防敗毒散 (HBPDS)의 처방구성은 『東醫壽世保元』 『新定 少陽人病 應用要藥 十七方』을 따랐다 (Table 1).

Table 1. The Composition of Prescription of Hyeongbangpaedok-san (HBPDS)

| Herb | Pharmaceutical name | Dose(g) |
|-------|-----------------------------|---------|
| 羌活 | Osteric Radix | 4.0 |
| 獨活 | Angelicae Pubescentis Radix | 4.0 |
| 荊芥 | Schizonepetae Spica | 4.0 |
| 防風 | Saposhnikovia Radix | 4.0 |
| 生地黃 | Rehmanniae Radix | 4.0 |
| 茯苓 | Poria | 4.0 |
| 前胡 | Peucedani Radix | 4.0 |
| 車前子 | Plantaginis Semen | 4.0 |
| 地骨皮 | Lycii Radicis Cortex | 4.0 |
| 柴胡 | Bupleuri Radix | 4.0 |
| Total | | 40.0 |

2. 방법

1) 약물의 준비

상기한 내용과 같이 조제된 荊防敗毒散 (HBPDS) 2첩(80g)을 물 1,000ml와 함께 전기약탕기 (대웅, 한국)로 3시간 동안 전탕한 다음, 찌꺼기를 제거하고 상층액을 여러 번 겹친 거즈를 이용하여 여러 차례 여과하였다. 여과된 추출액은 감압농축기 (EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축한 다음 동결 건조하였다. 최종적으로 얻어진 동결 건조 분말은 7.28g으로 수득율은 9.1 %였으며, 실험에 사용될 때까지 냉동 보관하였다.

2) 알레르기접촉피부염의 유발

알레르기접촉피부염 유발을 위하여 acetone과 olive oil을 4대 1로 섞은 용액에 2,4-Dinitro-1-fluorobenzene (DNFB)을 0.1~2%로 희석하여 사용하였다. 실험 첫 날부터 3일간 30 μ l의 0.1 % 2,4-Dinitro-1-fluorobenzene (DNFB) 용액을 양측 귀에 1일 1회씩 도포해 줌으로써 감작 (Sensitization)을 시행하였고, 생체 내의 알레르기 반응을 위하여 3일 동안 방치하였다. 실험 7일 째에 Animal clipper (Oster, USA)를 이용하여 생쥐의 등을 가볍게 제모하고 제모제를 이용하여 잔털을 깨끗이 제거한 다음 상처 치유를 위하여 24시간 방치하였다. 24시간이 지난 후 (day 8)부터 제모된 등에 50 μ l의 0.2 % 2,4-Dinitro-1-fluorobenzene (DNFB) 용액을 2일 간격으로 총 4회 도포하여 알레르기접촉피부염을 유발

(Challenge)하였다 (Figure 1).

3) 약물 투여 및 실험군 분류

상기한 방법대로 제조된 荊防敗毒散 (HBPDS)은 실험 시작 9일째 (day 9)부터 1일 1회씩 총 6일간 Oral zonde를 이용하여 구강 투여하였다 (Figure 1). 투여 용량은 성인의 1일 복용량을 기준으로 kg당 1일 복용량을 계산한 다음 생쥐의 체중과 비교하여 저농도 투여군의 경우 10mg/day, 고농도 투여군의 경우 100mg/day의 농도로 60kg 성인 투여 농도의 4배 및 40배를 투여하였다. 실험군은 아래와 같다.

- (1) 정상군 (NOR) : DNFB 대신 ACO를 도포하고, 荊防敗毒散 (HBPDS) 대신 증류수를 투여한 군 (n=6).
- (2) 알레르기접촉피부염 대조군 (CTL) : DNFB로 알레르기접촉피부염을 유발하고 증류수를 투여한 군 (n=8).
- (3) 荊防敗毒散 (HBPDS) 저농도군 (LOW) : DNFB로 알레르기접촉피부염을 유발하고 10mg/day의 荊防敗毒散 (HBPDS)을 투여한 군 (n=8).
- (4) 荊防敗毒散 (HBPDS) 고농도군 (HIGH) : DNFB로 알레르기접촉피부염을 유발하고 100mg/day의 荊防敗毒散 (HBPDS)을 투여한 군 (n=8).

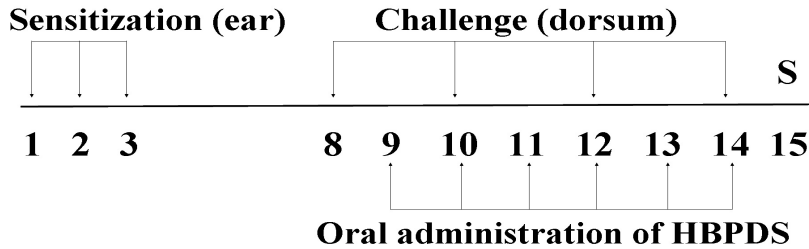


Figure 1. Experimental design.

All animals except normal group were received 0.1% of DNFB (30 μ l in each ear) in AOO on day 1, 2, 3. Then CTL, HBPDS LOW and HBPDS HIGH group of mice received 0.2% of DNFB on day 8, 10, 12, 14. All animals were treated without HBPDS in AOO on 6 consecutive days (day 9-14). Mice were sacrificed on day 15.

S : sacrifice, HBPDS : Hyeongbangpaedok-san

4) 체중 측정

실험시작일 (day 1) 측정된 체중을 기준으로 2주 동안 체중 변화를 관찰하였다. 체중 측정은 측정일 오후 2시에 전자저울 (Tanita, Japan)을 이용하여 실시하였다.

5) 피부의 두께 및 무게 관찰

실험 마지막 날, 생쥐로부터 얻어진 피부 조직을 버니어 캘리퍼스 (Mitutoyo, Japan)를 이용하여 두께를 측정하고, 직경 5 mm의 동일한 원형 크기로 잘라 미량 저울 (Sartorius, 한국)을 이용하여 무게를 측정하였다.

6) 피부 조직의 조직병리학적 변화 관찰

실험 마지막 날, 생쥐로부터 얻어진 피부 조직을 10% 포르말린에 고정한 후, 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 미세절단기 (Leica, Germany)를 이용하여 4 μ m 두께로 잘라 슬라이드 글라스에 부착하였다. 부착된 조직으로부터 파라핀을 제거하고 hematoxylin과 eosin을 이용하여 염색한 후 광학현미경 (Olympus, Japan)으로 관찰하였다 (x 100).

7) 피부 표면의 육안적 관찰

알레르기 접촉피부염의 유발 정도를 전반적으로 관찰하기 위하여 실험 마지막 날 생쥐를 희생시킨 다음, 알레르기 접촉피부염이 유발된 등 부위를 Digital cam-

era (Olympus, Japan)로 촬영하여 제시하였다.

8) 피부의 홍반 지수 및 멜라닌 지수에 미치는 영향 관찰

실험 마지막 날, 생쥐의 등에 발생한 병변 부위에서 홍반 지수 (erythema index) 및 멜라닌 지수 (melanin index)를 Color meter (Cortex tech., Denmark)를 이용하여 측정하였다. 홍반 지수 및 멜라닌 지수는 생쥐의 등에서 3번씩 각각 서로 다른 부위를 측정된 후 평균 값을 대푯값으로 사용하였다.

9) Cytokine 분비에 미치는 영향 관찰

가장 대표적인 Th1 skewing cytokine인 TNF-alpha와 IFN-gamma의 혈액 내 농도를 측정하였다. 실험 마지막 날, 심장 채혈로 얻어진 생쥐의 혈액을 원심분리기를 이용하여 1500 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 상층액을 채취하여 cytokine 측정에 사용하였다. 혈청 중 TNF-alpha와 IFN-gamma의 농도는 각각의 ELISA kit (Raybiotech, USA)를 사용하여 측정하였으며, 모든 측정 절차는 제조사에서 제시한 가이드라인에 따라 진행되었다.

10) 세포주 배양 환경

비만 세포주 (mast cell line)인 RBL-2H3 cell의 생육 배지로는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium,

high glucose, Gibco) 배지에 10% fetal bovine serum (Gibco, FBS)과 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)을 첨가하여 사용하였고, 세포주의 계대 배양은 2일 간격으로 시행하였다. 부착세포의 탈착을 위해서 Trypsin-EDTA (Sigma)를 사용하였으며, 5% CO_2 가 공여되는 배양기 속에서 37°C를 유지하며 배양되었다.

11) 세포 증식율에 미치는 영향 측정

세포증식율의 측정은 수용성 tetrazolium salt를 이용하여 살아있는 세포를 정량하는 방법을 이용한 Cell Counting Kit-8 (CCK-8)을 이용하여 수행하였다. 먼저 96-well plate에 측정하고자 하는 대상 세포주를 well당 5×10^3 개의 분량으로 분주 하고, 37°C, 5% CO_2 가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 상기한 방법으로 제조한 荊防敗毒散 (HBPDS)을 인산완충액 (phosphate buffered saline, PBS)에 녹이고 0.45 μm 크기의 syringe filter를 이용하여 거르는 것으로 부유된 거대분자를 제거한 다음, 최종 농도 800, 400, 200, 100, 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고 24시간 동안 배양 하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 각 well당 10 μl 의 CCK-8 용액을 첨가하고 37°C, 5% CO_2 가 공여되는 환경에서 3시간 동안 방치하였다. 3시간 후, Micro-plate reader (Bio-rad, CA)를 이용하여 450 nm파장에서 흡광도를 측정하였다. 정상 대조군으로는 약물을 첨가하지 않은 well을 사용하였고, 결과는 정상 대조군에 대한 백분율로 환산하여 나타내었다.

12) β -hexosaminidase 유리 억제에 미치는 영향 측정

비만세포의 탈과립에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 β -hexosaminidase 유리능에 미치는 영향을 관찰하였다. 먼저 96-well plate에 비만 세포주를 well당 2×10^4 개의 분량으로 분주하고, 37°C, 5% CO_2 가 공여되는 환경에서 24시간 동안 배양하여 부착 및 안정화를

시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 800, 400, 200, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 荊防敗毒散 (HBPDS)을 1시간 동안 처리한 이후 배양액을 깨끗이 씻어 내고, serum-free media에 50 nM의 PMA와 1 μM 의 A23187을 첨가하고 30분 뒤 상층액을 취하였다. 얻어진 상층액은 3000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 유리된 β -hexosaminidase 농도 측정에 사용하였다. 세포내에 존재하는 β -hexosaminidase의 총량 측정을 위하여 원심분리가 끝난 pellet에 triton X-100을 처리하여 세포를 파괴한 다음 세포내에 존재하는 β -hexosaminidase의 총량을 측정하였다. 상층액과 cell lysate에 1 mM의 p-NAG를 0.1 M citrate buffer (pH 5)에 녹여 처리한 다음 37°C, 5% CO_2 가 공여되는 환경에서 1시간 동안 반응시키고 난 후, 200 μl 의 carbonate buffer를 더하여 반응을 종료시켰다. β -hexosaminidase의 농도 측정은 Micro-plate reader (Bio-rad, CA)를 이용하여 405 nm파장에서 흡광도 (Optical density, OD)를 측정하여 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

β -hexosaminidase release (%)

$$= \text{OD}_{\text{sup.}} / (\text{OD}_{\text{sup.}} + \text{OD}_{\text{pellet}}) \times 100$$

$\text{OD}_{\text{sup.}}$: 상층액에서 얻어진 흡광도

$\text{OD}_{\text{pellet}}$: Cell pellet을 녹여서 얻어진 흡광도

13) Histamine 분비 억제에 미치는 영향 측정

Histamine 분비 억제에 미치는 영향을 측정하기 위해 먼저 24-well plate에 비만 세포주를 well당 5×10^4 개의 분량으로 분주하고, 37°C, 5% CO_2 가 공여되는 환경에서 24시간 동안 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간 동안 배양한 후 약물을 처리하고, 비만 세포를 활성화 한 후 배양액 500 μl 를 취하여 0.1 M HCl 450 μl 와 60% 과염소산 용액 50 μl 를 혼합한 후 2000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취하였다. 다시 상층액 800 μl 를 5 M NaOH 용액 500 μl , 증류수 3ml, n-butanol 10ml, NaCl 1.2g을 혼합한 시험관에 넣고 잘 흔들어준 뒤 원심분리하였다. 원심분리한 후, n-butanol층 8ml를 취해 0.1 M HCl 3ml, n-heptane

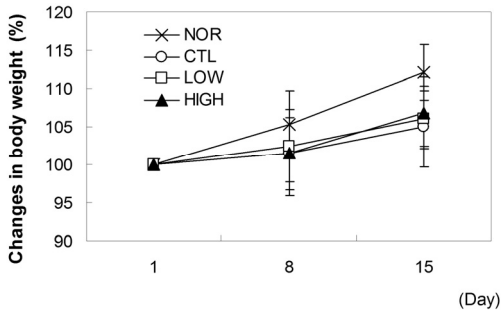


Figure 2. Effects of HBPDS on changes in body weights in ACD mice.

Body weights were measured once in a week. Changes in body weights were represented as average weights, which were expressed as percentages of weight on day 1. NOR : naive group, CTL : ACD group, LOW : 10mg/day of HBPDS treated ACD group, HIGH : 100mg/day of HBPDS treated ACD group. Values are represented as mean±SD (n=8).

HBPDS : Hyeongbangpaedok-san, ACD : allergic contact dermatitis

10ml를 더하여 잘 흔들어 준 후 재차 원심분리하였다. 여기서 얻어진 수층 2ml에 1M NaOH 400µl, 1% o-phthalaldehyde 용액 100µl를 가하여 혼합 하고 2분 동안 방치한 다음 emission 438 nm, excitation 353 nm에서 형광강도 (fluorescence intensity, FI)를 측정하였다. 측정된 형광강도 값은 PMA와 A23187을 이용하여 황산화시킨 군에 대한 백분율로 나타내었다.

3. 통계 처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 SAS (The SAS System for Windows, ver. 6.12, SAS Institute, U.S.A.)를 이용하였다. 실험 성적은 평균±표준편차로 나타내었으며, 각 실험군 간 평균 차이를 검정할 때에는 Mann-Whitney test로 검정하여 P값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

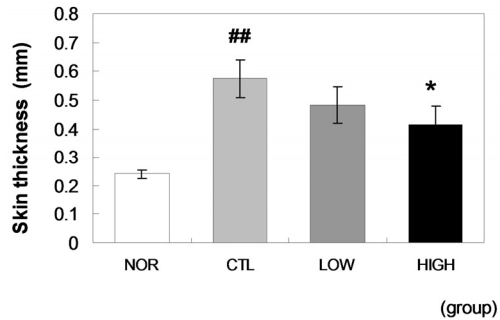


Figure 3. Effects of HBPDS on skin thickness changes in ACD mice.

Skin thicknesses were measured using vernier calipers on day 15. NOR : naive group, CTL : ACD group, LOW : 10mg/day of HBPDS treated ACD group, HIGH : 100mg/day of HBPDS treated ACD group. Values are represented as mean±SD. ##P < 0.01 vs. non-treated naive (NOR) group, *P < 0.05 vs. ACD (CTL) group, (n=8).

HBPDS : Hyeongbangpaedok-san, ACD : allergic contact dermatitis

1. 체중 변화에 미치는 영향

2주 동안 체중 변화를 관찰한 결과 정상군 (NOR)은 12.1%의 체중 증가를 보인 반면, 대조군 (CTL)은 5.0%, 荊防敗毒散 (HBPDS) 저농도군 (LOW)은 6.1%, 荊防敗毒散 (HBPDS) 고농도군 (HIGH)은 6.8%의 체중 증가를 보였다. 알레르기접촉피부염이 유발된 모든 실험군에서 정상군 (NOR)에 비해 체중 증가율이 감소되는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다 (Figure 2).

2. 피부의 두께 변화에 미치는 영향

실험 마지막 날, 생쥐로부터 피부 조직을 적출하여 피부 두께를 관찰한 결과 ACD를 유발한 대조군의 평균 피부 두께는 정상군에 비하여 유의한 수준으로 증가하였다 (P < 0.01). 고농도(HIGH)의 荊防敗毒散 (HBPDS) 투여는 이러한 피부 두께의 증가를 유의한 수준으로 감소시켰으며 (P < 0.05), 저농도군(LOW)은 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다 (Figure 3).

III. 結果

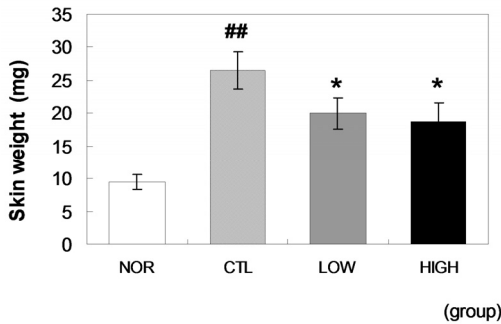


Figure 4. Effects of HBPDS on skin weight changes in ACD mice.

Skin weights were measured using micro balance on day 15. NOR : naive group, CTL : ACD group, LOW : 10mg/day of HBPDS treated ACD group, HIGH : 100mg/day of HBPDS treated ACD group. Values are represented as mean±SD. ##*P* < 0.01 vs. non-treated naive (NOR) group, **P* < 0.05 vs. ACD (CTL) group, (n=8).

HBPDS : Hyeongbangpaedok-san, ACD : allergic contact dermatitis

3. 피부의 무게 변화에 미치는 영향

실험 마지막 날, 생쥐로부터 피부 조직을 적출하여 피부 무게를 관찰한 결과 알레르기 접촉피부염을 유발한 대조군 (CTL)의 평균 피부 무게는 정상군 (NOR)에 비하여 유의한 수준으로 증가하였다 (*P* < 0.01). 저농도 또는 고농도의 荊防敗毒散 (HBPDS) 투여는 이러한 피부 무게의 증가를 유의한 수준으로 감소시켰다 (*P* < 0.05), (Figure 4).

4. 피부 조직의 조직병리학적 변화에 미치는 영향

Vehicle만을 처리한 정상군 (NOR)의 피부 조직은 특별한 이상 소견이 발견되지 않은 반면 (Figure 5A), 대조군 (CTL)의 피부 조직에서는 비후된 스폰지 조직 (spongiosis)과 부종 (edema), 면역세포의 침윤이 관찰되었다 (Figure 5B). 저농도와 고농도의 荊防敗毒散 (HBPDS) 투여군에서는 스폰지 조직 (spongiosis)과 면역세포 침윤이 줄어드는 경향을 보였다 (Figure 5C, D).

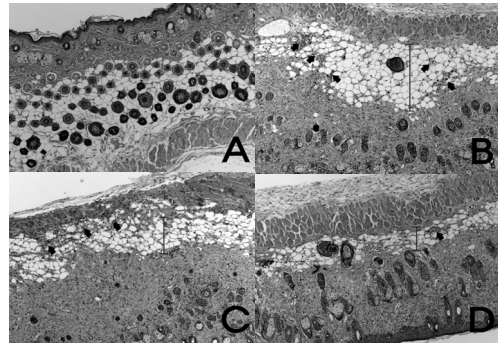


Figure 5. Effects of HBPDS on histopathological changes in ACD tissue.

Skin tissues were stained with hematoxylin and eosin, then observed using microscope. (A) NOR, (B) CTL, (C) LOW, (D) HIGH. Filled arrows mean infiltration site of immune cells. Blue bars mean range of spongiosis (x100).

HBPDS : Hyeongbangpaedok-san, ACD : allergic contact dermatitis

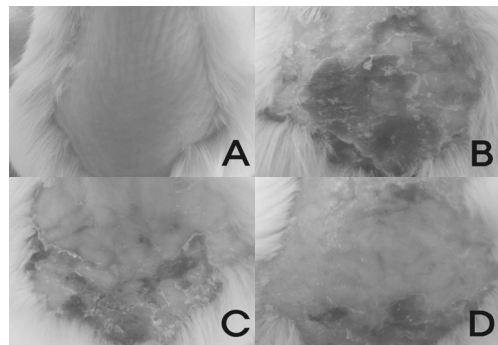


Figure 6. Effects of HBPDS on clinical aspect in ACD mice.

Clinical aspects of skin lesions were observed using digital camera on day 15. (A) NOR, (B) CTL, (C) LOW, (D) HIGH.

HBPDS : Hyeongbangpaedok-san, ACD : allergic contact dermatitis

5. 피부의 증상 변화에 미치는 영향

Vehicle만을 처리한 정상군 (NOR)의 피부에서는 특별한 변화를 관찰할 수 없었고 (Figure 6A), 반복되는 DNFB 접촉이 이루어진 대조군의 피부에서는 홍반, 낙설 등 중등도 이상의 알레르기 접촉피부염 증상이 관찰되었다 (Figure 6B). 저농도와 고농도의 荊防敗毒散 (HBPDS) 처리는 상기한 알레르기 접촉피부염

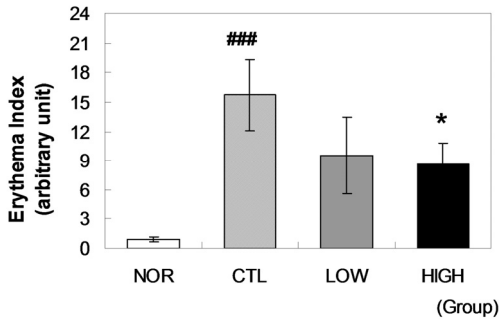


Figure 7. Effects of HBPDS on erythema index in ACD mice. Erythema index were measured using color meter on day 15. NOR : naive group, CTL : ACD group, LOW : 10mg/day of HBPDS treated ACD group, HIGH : 100 mg/day of HBPDS treated ACD group. Values are represented as mean±SD. ###*P* < 0.001 vs. non-treated naive (NOR) group, **P* < 0.05 vs. ACD (CTL) group, (n=8). HBPDS : Hyeongbangpaedok-san, ACD : allergic contact dermatitis

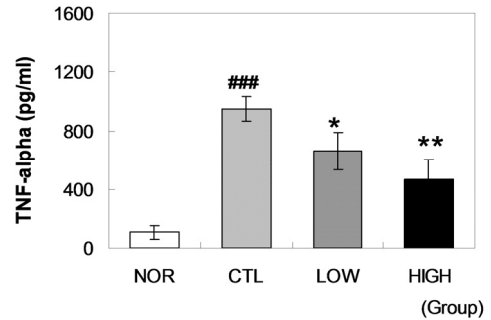


Figure 9. Effects of HBPDS on serum level of TNF-alpha in ACD mice. Level of TNF-alpha in serum was measured using ELISA method. NOR : naive group, CTL : ACD group, LOW : 10mg/day of HBPDS treated ACD group, HIGH : 100mg/day of HBPDS treated ACD group. Values are represented as mean±SD. ###*P* < 0.001 vs. non-treated naive (NOR) group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. ACD (CTL) group, (n=8). HBPDS : Hyeongbangpaedok-san, ACD : allergic contact dermatitis

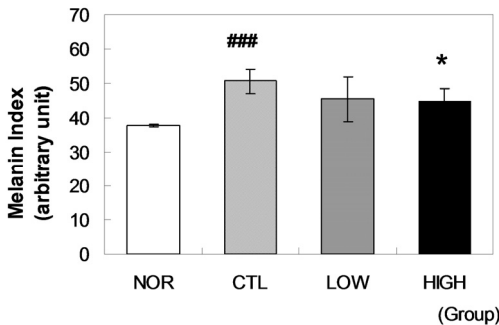


Figure 8. Effects of HBPDS on melanin index in ACD mice. Melanin index were measured using color meter on day 15. NOR : naive group, CTL : ACD group, LOW : 10mg /day of HBPDS treated ACD group, HIGH : 100mg/day of HBPDS treated ACD group. Values are represented as mean±SD. ###*P* < 0.001 vs. non-treated naive (NOR) group, **P* < 0.05 vs. ACD (CTL) group, (n=8). HBPDS : Hyeongbangpaedok-san, ACD : allergic contact dermatitis

증상을 감소시키는 경향을 보였다 (Figure 6C, D).

6. 피부의 홍반 지수에 미치는 영향

실험 마지막 날, 생쥐의 피부 병소로부터 홍반 지수 (erythema index)를 측정된 결과 대조군 (CTL)에서 홍반

지수가 유의한 수준으로 상승 하였고 (*P* < 0.001), 고농도군 (HIGH)의 고농도 荊防敗毒散 (HBPDS) 투여는 이러한 홍반 지수 상승을 유의한 수준으로 억제하였다 (*P* < 0.05). 저농도군 (LOW)은 홍반 지수가 하강하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다 (Figure 7).

7. 피부의 멜라닌 지수에 미치는 영향

실험 마지막 날, 생쥐의 피부 병소로부터 멜라닌 지수 (melanin index)를 측정된 결과 대조군 (CTL)에서 멜라닌 지수가 유의한 수준으로 상승 하였고 (*P* < 0.001), 고농도군 (HIGH)의 고농도 荊防敗毒散 (HBPDS) 투여는 이러한 멜라닌 지수 상승을 유의한 수준으로 억제하였다 (*P* < 0.05). 저농도군 (LOW)은 멜라닌 지수가 하강하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다 (Figure 8).

8. 혈중 TNF-alpha 함량에 미치는 영향

실험 마지막 날, 심장 채혈로 얻은 혈청에서 TNF-alpha의 농도를 분석한 결과 대조군 (CTL)에서 TNF-alpha의 농도가 유의한 수준으로 증가하였으며

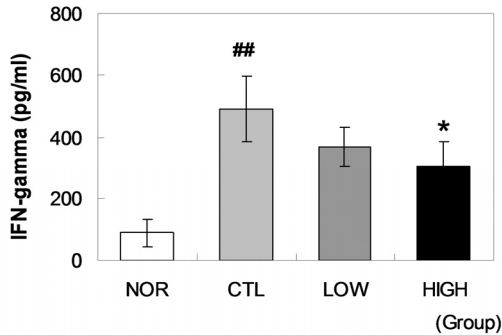


Figure 10. Effects of HBPDS on serum level of IFN-gamma in ACD mice.
 Level of IFN-gamma in serum was measured using ELISA method. NOR : naive group, CTL : ACD group, LOW : 10mg/day of HBPDS treated ACD group, HIGH : 100mg/day of HBPDS treated ACD group. Values are represented as mean±SD. ^{##} $P < 0.01$ vs. non-treated naive (NOR) group, ^{*} $P < 0.05$ vs. ACD (CTL) group, (n=8).
 HBPDS : Hyeongbangpaedok-san, ACD : allergic contact dermatitis

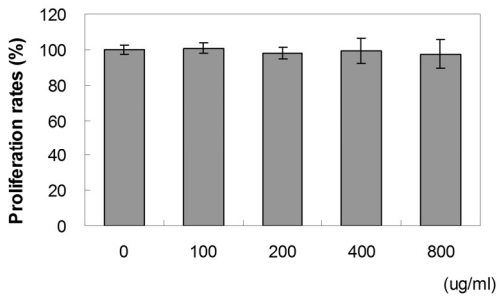


Figure 11. Effects of HBPDS on proliferation rates of RBL-2H3 cells *in vitro*.
 Proliferation rates were measured using highly water-soluble tetrazolium salt in various concentrations. Values were represented as mean±SD.
 HBPDS : Hyeongbangpaedok-san, ACD : allergic contact dermatitis

($P < 0.001$), 荆防敗毒散 (HBPDS) 투여는 이러한 증가를 농도 의존적으로 감소시켰다 (LOW, $P < 0.05$; HIGH, $P < 0.01$), (Figure 9).

9. 혈중 IFN-gamma 함량에 미치는 영향

실험 마지막 날, 심장 채혈로 얻은 혈청에서 IFN-gamma의 농도를 분석한 결과 대조군 (CTL)에서

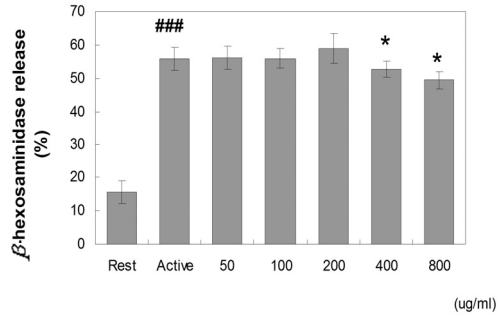


Figure 12. Effects of HBPDS on β -hexosaminidase release of RBL-2H3 cells *in vitro*.
 Cells were pre-treated with HBPDS in indicated concentrations, then activated using 50 nM of PMA and 1 μ M of A23187. β -hexosaminidase release was measured using spectrophotometric method (resting) RBL-2H3 cells, Active : 50 nM of PMA and 1 μ M of A23187 treated (activated) RBL-2H3 cells (control). Values were represented as mean±SD. ^{###} $P < 0.001$ vs. non-treated naive (Rest) group, ^{*} $P < 0.05$ vs. non-treated control (Active) group of three independent experiments.
 HBPDS : Hyeongbangpaedok-san, ACD : allergic contact dermatitis

IFN-gamma의 농도가 유의한 수준으로 증가하였으며 ($P < 0.01$), 고농도군 (HIGH)의 고농도 荆防敗毒散 (HBPDS) 투여는 이러한 증가를 유의한 수준으로 감소시켰다 ($P < 0.05$). 저농도군 (LOW)의 IFN-gamma 농도는 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다 (Figure 10).

10. 비만세포주의 증식율에 미치는 영향

비만세포주인 RBL-2H3 cell에 荆防敗毒散 (HBPDS)을 최종 농도 800, 400, 200, 100, 0 μ g/ml로 처리하고 24시간 동안 배양한 후, 세포 증식율에 미치는 영향을 관찰한 결과 荆防敗毒散 (HBPDS)은 투여한 모든 농도에서 RBL-2H3 cell의 증식에 특별한 영향을 미치지 않았다 (Figure 11).

11. beta-hexosaminidase 유리 억제에 미치는 영향

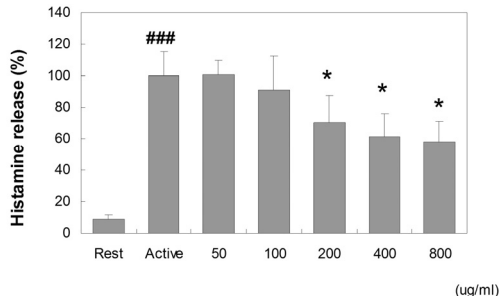


Figure 13. Effects of HBPDS on histamine release of RBL-2H3 cells *in vitro*.

Cells were pre-treated with HBPDS in indicated concentrations, then activated using 50 nM of PMA and 1 μ M of A23187. histamine release was measured using fluorescence detecting method in various concentrations. Rest : non-treated (resting) RBL-2H3 cells, Active : 50 nM of PMA and 1 μ M of A23187 treated (activated) RBL-2H3 cells (control). Values were represented as mean \pm SD. ### P < 0.001 vs. non-treated naive (Rest) group, * P < 0.05 vs. non-treated control (Active) group of three independent experiments.

HBPDS : Hyeongbangaepdok-san, ACD : allergic contact dermatitis

비만세포주의 활성화에 의하여 세포내에 저장된 β -hexosaminidase의 유리가 유의한 수준으로 증가하였고 (P < 0.001), RBL-2H3 cell에 荊防敗毒散 (HBPDS)을 농도별로 처리하고 β -hexosaminidase 유리에 미치는 영향을 관찰한 결과, 400 μ g/ml 이상의 荊防敗毒散 (HBPDS) 처리에 의하여 β -hexosaminidase 유리가 유의한 수준으로 감소하였다 (P < 0.05) (Figure 12).

12. Histamine 유리 억제에 미치는 영향

비만세포주의 활성화에 의하여 정상군 (NOR)에 비하여 10배 이상 증가된 histamine 유리를 보였고 (P < 0.001), RBL-2H3 cell에 荊防敗毒散 (HBPDS)을 농도별로 처리하고 histamine 유리에 미치는 영향을 관찰한 결과 200 μ g/ml 이상의 荊防敗毒散 (HBPDS) 처리에 의하여 histamine 유리가 유의한 수준으로 감소하였다 (P < 0.05) (Figure 13).

IV. 考 察

접촉피부염의 경우 알레르기접촉피부염 (ACD)의 발생 빈도는 약 20%로 추측되나 접촉피부염의 대부분을 차지하는 자극접촉피부염 (ICD)의 경우 대개 일과성으로 경미한 경우가 많아 치료 현장에서는 상대적으로 알레르기접촉피부염을 접할 기회가 많은 것으로 보인다. 양방에서는 알레르기접촉피부염의 치료를 위해 면역억제제와 스테로이드제를 사용하는데 국소적인 경우 외용 스테로이드제를 국소 도포하고 전신적인 경우에는 스테로이드제를 전신 투여한다⁴. 하지만 스테로이드제 복용으로도 완치가 안 되는 경우 다른 치료가 불가능하고 3주 이상의 스테로이드제 복용은 중단 후 최고 1년까지 뇌하수체-부신피질 억제제를 나타낼 수도 있기 때문에⁵ 기존 치료를 대체할 수 있는 새로운 치료법이 필요한 실정이다.

少陽人은 脾大腎小한 특징을 지닌 체질로 脾局의 熱氣가太過하기 쉽다. 脾受寒表寒病의 경우 脾局의 熱氣太過로 中上焦의 陰氣가 下焦로 하강하지 못하고 背表에 囚滯되어 초기에는 惡寒, 發熱, 關節痛 등의 寒性 증상이 나타나지만 險危證으로 진행되면 便閉, 發狂, 譫語, 動風 등의 熱性 증상이 나타나게 된다. 이는 少陽人 發病의 근본 원인이 과도한 裏熱이기 때문에 表寒病이라도 겉으로는 熱性 증상이 뚜렷하게 표현되는 것이다³. 이제마가 『甲午本』에서 裏熱病으로 인식한 陽毒發斑證을 『辛丑本』에서는 表寒病 ‘熱多寒少之病’으로 改抄한 것⁵과도 一脈相通한다. 알레르기접촉피부염 증상의 경우 항원 자극에 의해 국소적인 습진 형태로 나타나며 외부 항원 자극이 있어야만 발현되므로 少陽人의 경우 裏熱病보다 表寒病 ‘熱多寒少之病’으로 인식하는 것이 적합하다고 생각하였다.

荊防敗毒散을 이용한 최근 연구로는 이⁶와 민⁷의 노화 관련 연구가 있었고 폐렴에 응용한 한⁸의 증례 보고가 있었다. 또한 알레르기접촉피부염에 대해서는 단일 약제^{9,16}와 처방¹⁷⁻²⁰을 이용한 다양한 연구가 있었지만 체질적으로 접근한 연구로는 알레르기접촉피부

염을 熱性 病證으로 인식하고 접근한 조³⁰와 김³¹의 연구가 있을 뿐이었다.

본 연구에서는 T세포의 제4형 과민 반응 유발을 위해 사용되는³² 2,4-Dinitro-1-fluorobenzene (DNFB)을 Balb/c 생쥐에 반복적으로 도포하여 중등도 이상의 피부염 소견이 유발된 알레르기접촉피부염 동물 모델을 만들었다. 이러한 반복적인 DNFB의 처리는 피부 조직의 두께와 무게를 유의한 수준으로 증가시켰는데 이는 알레르기접촉피부염에서 볼 수 있는 염증 반응에 의한 조직 내 부종 (edema), 면역세포 침윤, 조직 내 부종의 흔적인 스펀지 조직 형성 (spongiosis) 및 각질화세포 (keratinocyte)와 섬유아세포 (fibroblast)의 과다 증식으로 조직 비후가 일어난 것으로³³ 荊防敗毒散 (HBPDS)의 투여가 피부 조직 비후를 유의하게 억제시켰음을 알 수 있다 (Figure 3, 4). 또한 荊防敗毒散 (HBPDS)의 투여로 알레르기접촉피부염 발생 조직의 스펀지 조직 형성 (spongiosis) 및 면역세포의 침윤이 감소되는 경향을 보였다 (Figure 5). 대조군의 피부 조직에서는 스펀지 조직의 비후 소견과 헤마톡실린에 의하여 푸른 점상으로 염색된 단핵구들이 증가하는 소견이 관찰되었으나 (Figure 5B), 荊防敗毒散 (HBPDS) 투여군에서는 스펀지 조직 및 부종이 줄어드는 경향을 보였으며, 염증 조직 내로 침윤된 단핵구도 감소하는 경향을 보였다 (Figure 5C, D). 저농도 荊防敗毒散 (HBPDS) 투여군에서의 스펀지 조직은 대조군에 비해 감소하였으나 단핵구 침윤은 상당 부분 진행되어 있었다 (Figure 5C). 그러나 고농도 荊防敗毒散 (HBPDS) 투여군에서는 스펀지 조직 감소 효과 뿐만 아니라 면역 세포 침윤 억제효과도 있는 것으로 나타났다 (Figure 5D). 위의 결과를 종합하여 보면, 荊防敗毒散 (HBPDS)이 조직 내에서 면역세포 침윤, 부종, 스펀지 조직 비후 등을 억제시켜 피부 조직의 비후를 감소시킨 것을 알 수 있었다.

DNFB 처리로 유발된 낙설과 홍반, 각질화된 가피 (Figure 6B) 등은 荊防敗毒散 (HBPDS)의 투여로 피부병변이 감소되는 경향을 보였다 (Figure 6C, D). 이는 荊防敗毒散 (HBPDS)에 의한 조직병리학적 변화와

도 서로 통하는 결과로 부종, 해면화, 면역세포 침윤 등을 억제함으로써 피부 표면에 나타나는 증상도 완화 시켰음을 알 수 있었다. 육안적 관찰을 객관적인 수치로 분석하기 위하여 color meter를 이용하여 피부의 홍반 지수와 멜라닌 지수를 측정된 결과 저농도 荊防敗毒散 (HBPDS) 투여군에서는 홍반지수와 멜라닌 지수가 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었고, 고농도 荊防敗毒散 (HBPDS) 투여군에서는 홍반 지수와 멜라닌 지수가 유의한 수준으로 감소하였다 (Figure 7, 8). 또한, 홍반 지수는 급성 염증 상태 및 출혈반 등에 기인하여 증가하고, 멜라닌 지수는 만성 피부염의 특징 중에 하나인 태선화 (lichenification) 과정에 의한 멜라닌 색소 침착으로 증가함³⁴을 감안하면, 荊防敗毒散 (HBPDS)이 두 가지 과정을 모두 억제할 수 있다는 가설을 세울 수 있었다.

TNF-alpha와 IFN-gamma는 대표적인 Th1 skewing reaction에 관여하는 염증성 cytokine으로 DNFB에 의한 피부염 모델에서 유의한 수준으로 증가됨이 알려져 있다³⁵. 연구에 사용한 동물 모델의 피부 병변에서는 출혈반이 거의 발생하지 않았으므로 (Figure 6B) 본 연구에서의 홍반 지수 증가는 염증 반응과 관련될 가능성이 높은 것으로 해석 될 수 있었다. 이를 확인하기 위하여 대표적인 염증성 cytokine인 TNF-alpha와 IFN-gamma의 혈액 내 함량을 조사하였고, 그 결과 荊防敗毒散 (HBPDS)이 효율적으로 TNF-alpha와 IFN-gamma의 혈액 내 농도를 낮춘 것을 확인할 수 있었으며 (Figure 9, 10), 荊防敗毒散 (HBPDS)이 Th1 계열과 관련된 염증 반응을 억제하는 작용이 있음을 알 수 있었다.

비만 세포는 다양한 자극에 의하여 탈과립이 일어나 피부 염증 반응에서 가려움증을 유발하며^{36,37}, 염증성 cytokine인 TNF-alpha를 분비하여 피부염 증상의 악화에 관여하는 것으로 알려져 있다³⁸. 본 연구에서 비만 세포주에 荊防敗毒散 (HBPDS)을 최고 농도 800 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 결과 비만 세포주의 세포 증식율에 특별한 변화는 보이지 않았다 (Figure 11). 또한 최고 농도 800 $\mu\text{g/ml}$ 범위 내에서 荊防敗毒散

(HBPDS)이 비만 세포의 탈과립 작용에 미치는 영향을 β hexosaminidase와 histamine 유리능에 미치는 영향을 통하여 살펴본 결과 β hexosaminidase 유리는 400 μ g/ml 이상에서, histamine 유리는 200 μ g/ml 이상 농도에서 유의한 수준으로 억제 되었으며 반응은 농도 의존적이었다 (Figure 12, 13). 이러한 결과는 荊防敗毒散 (HBPDS)이 비만세포의 탈과립 작용을 억제함으로써 조직의 염증 반응 및 피부 증상을 완화시킨 것으로 해석된다.

이상을 정리하면 荊防敗毒散 (HBPDS)이 피부 조직 비후와 알레르기접촉피부염의 주요 증상인 홍반, 낙설, 각질화 등을 효과적으로 완화하였으며, TNF- α 와 IFN- γ 와 같은 염증성 cytokine의 생성을 억제하여 Th1 계열의 염증 반응을 감소시켰고, 비만 세포의 탈과립 억제를 통해 병변의 염증 반응을 억제하여 가려움을 방지하였음을 알 수 있었다.

V. 結 論

荊防敗毒散 (HBPDS) 열수 추출물이 DNFB에 의하여 유발된 알레르기접촉피부염에 미치는 영향 및 비만 세포주의 탈과립에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 알레르기접촉피부염 유발에 의하여 발생한 피부의 무게 증가와 두께 증가를 유의하게 감소시켰다.
2. 피부 조직에서 발생한 스폰지 조직의 비후와 부종 및 면역세포 침윤을 감소시키는 경향을 보였다.
3. 알레르기접촉피부염 유발에 의하여 발생한 홍반, 낙설, 각화 등의 피부 증상을 감소시키는 경향을 보였다.
4. 알레르기접촉피부염 유발에 의하여 증가된 홍반 지수와 텔라린 지수를 유의하게 감소시켰다.
5. Th1 반응의 대표적인 cytokine인 TNF- α 와

IFN- γ 의 혈액 내 함량을 대조군과 비교하여 유의하게 감소시켰다.

6. 400 μ g/ml 이상에서 비만 세포주의 β hexosaminidase 유리를 유의한 수준으로 감소시켰다.
7. 200 μ g/ml 이상에서 비만 세포주의 histamine 유리를 유의한 수준으로 감소시켰다.

이상의 결과로부터 少陽人 脾受寒表寒病에 응용되는 荊防敗毒散 (HBPDS)이 알레르기접촉피부염의 치료에 도움을 줄 수 있음을 알 수 있었다.

VI. References

1. Jung JY, Han KH. Allergic Contact Dermatitis in Korea. Seoul:MD world publisher. 2008:20-26, 28-34, 264-275. (Korean)
2. National federation of department of dermatologic surgery, colleges of oriental medicine. Dermatologic surgery. Pusan:Sunwoo publisher. 2007:352-355. (Korean)
3. National federation of department of sasang constitutional medicine. Sasang constitutional medicine. Seoul:Jipmoondang. 2008:200-201, 253, 391. (Korean)
4. Professors of medical college in Korea, New Today's therapy 2007. Seoul:Daeyoung publisher. 2007: 1130-1131. (Korean)
5. Kim SH, Kim YH, Jang HS, Lee JH, Ko BH. A study of Soyangin's Delirious speaking bad disease in exterior cold disease induced from spleen affected by cold. J Sasang Constitut Med. 2008;20(3):14-20. (Korean)
6. Lee SY, Ahn TW. Effects of Hyeongbangpaedok-san and Dokhwajihwang-tang that Get Weight, Hematology, Biochemistry Change by Wistar rat's aging. J Sasang Constitut Med. 2005;17(3):91-102. (Korean)
7. Min KH, Ahn TW. Anti-Oxidative Effect of Soyangin Hyeongbangpaedok-san Decoction in Kidney and

- Spleen cells of Aged Rats. *J Sasang Constitut Med.* 2010;22(1):49-58. (Korean)
8. Han DY, Shim KH, Kim JY, Kim DL. A clinical study of the treatment prescribed Hyeongbangpaedok-San for Aspiration Pneumonia concurred in Soyangin with Stroke. *J Sasang Constitut Med.* 2003;15(2):75-83. (Korean)
 9. Son MY, Nam SH. Effect of *Eucommia ulmoides* Extracts on Allergic Contact Dermatitis and Oxidative Damage induced by repeat elicitation of DNCB. *J of The Korean Society of Food Science and Nutrition.* 2007;36(12):1517-1522. (Korean)
 10. Kim SC, Lee JR, Choi KI, Park SJ, Kwon YK, Byun SH. Effect of *Lonicerae Flos*-Skin on contact hypersensitivity induced by repeat elicitation of DNCB. *J of The Korea Association of Herbology.* 2006;21(1):9-15. (Korean)
 11. Kim YH, Park YS. Effect of *Acanthopanax cortex* water extract on antioxidative activity, lipid profile and epidermal thickness in DNCB-induced Allergic Contact Dermatitis animal model. *J of Korean Society of Food Science and Technology.* 2006;38(5):668-673. (Korean)
 12. Son MY. Effect on Onion(*Allium cepa* L.) extracts on Allergic Contact Dermatitis and oxidative damage induced by repeat elicitation of DNCB. *J of Korean Society of Food Science and Technology.* 2007;12(2):44-50. (Korean)
 13. Song JS, Lee JC, Chol JH, Kim JH, Park SY. Effects of *Scrophulariae Radix*(SR) on Allergic contact Dermatitis(ACD) induced by DNCB in mice. *J of The Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology.* 2011;24(3):1-16. (Korean)
 14. Kim CJ, Kim YB, Koo YH, Nam HJ. The effects of *Sophorae Radix* and *Coptidis Rhizoma*-Iontophoresis in Allergic Contact Dermatitis. *J of The Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology.* 2005;18(1):199-220. (Korean)
 15. Shin KS, Son JS, Kim DE, Jeon WJ, Jung SH, Shin KJ, et al. Effect of *Rhemanniae Radix* extract on Allergic Contact Dermatitis on mice induced by DNCB. *J of The Korean Academy of Oriental Medicine Prescription.* 2000;8(1):257-279. (Korean)
 16. Kim YH, Park YS. Effect of *Scutellaria baicalensis* water extract on antioxidative activity and epidermal thickness in DNCB-induced Allergic Contact Dermatitis animal model. *J of The Korean Society of Food Science and Nutrition.* 2006;35(5):543-548. (Korean)
 17. Hwang SY, Lee KY, Lee SH, Kim HJ. The ameliorative effects of *Gagam-Gongjin-dan*(WSY-1075) in contact dermatitis-induced animal model. *J of The Korean Academy of Oriental Medicine Prescription.* 2013;21(1):131-141. (Korean)
 18. Park EH, Yoon MY, Kim SB, Kim DH. Effects of GP extract on oxidative stress and contact dermatitis in NC/Nga mice induced by DNCB. Dept. of Physiology, College of Korean Medicine, Daejeon University. 2007;16(2):131-145. (Korean)
 19. Bae EY, Kim DH. Effect of *Geopungjeseupbang* on contact dermatitis induced by DNCB. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology.* 2007;21(6):1491-1498. (Korean)
 20. Kim SH, Kim HT. The effects of *Gyejjakyakjimo-Tang* on the Allergic Contact Dermatitis induced by DNCB. *J of The Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology.* 2010;23(1):8-22. (Korean)
 21. Ahn JY, Lim IL, Kim JH, Shin MG, Kwon SW, Kim DK, et al. Inhibitory effect of *Gamigunggui-Tang* on Allergic Contact Dermatitis. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology.* 2010;24(2):290-295. (Korean)
 22. Byun SH, Lee BW, Kim SC. Effect of *Samyotongan-*

- Tang on Contact hypersensitivity induced by repeat elicitation of DNCB. *J of The Korean Academy Of Oriental Medicine Prescription*. 2005;13(2):59-69. (Korean)
23. Nam BS, Kim YB. The effects of Sanpunggosam-Hwan on the Allergic Contact Dermatitis. *J of The Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology*. 2005;18(2):10-27. (Korean)
 24. Park SJ, Lee SG, Baek JH, Byun SH, Kim SC. Effect of Sopung-San on contact hypersensitivity induced by repeat elicitation of DNCB. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*. 2006;20(3):623-628. (Korean)
 25. Kim NH, Kim KJ. The anti-inflammatory effects of Woobanghaegi-Tang on the Allergic Contact Dermatitis. *J of The Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology*. 2006;19(2):59-70. (Korean)
 26. Kim BA, Yang JC, Park CI. Effect of Hwangryunhaedok-Tang extracts on DNCB-induced Allergic Contact Dermatitis. *J of The Korea Association of Herbology*. 2009;24(2):1-5. (Korean)
 27. Kim JJ, Kim HT. The effects of Naetakchunkeum-San on the Allergic Contact Dermatitis induced by DNCB. *J of The Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology*. 2009;22(1):46-61. (Korean)
 28. Kim CH, Kim KJ. The effects of Yanghyulsamul-Tang-Gamibang to Allergic Contact Dermatitis. *J of The Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology*. 2005;18(1):13-26. (Korean)
 29. Kim YB, Yoon HS, Park OS, Kim HJ, KIM KS. Effects of Chogam-Tang on rat skin induced the Allergic Contact Dermatitis. *J of The Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology*. 2005;18(3):44-54. (Korean)
 30. Jo SW. Effects of Yangkyuksanhwa-Tang on the Allergic Contact Dermatitis. *J of Korean Medical Institute of Dermatology & Aesthetics*. 2005;1(1):16-40. (Korean)
 31. Kim MS, Park SS. Effects of Yuldahanso-Tang on rat skin occurred the Allergic Contact Dermatitis. *J Sasang Constitut Med*. 2002;14(3):97-113. (Korean)
 32. Hopkins JE, Naisbitt DJ, Kitteringham NR, Dearman RJ, Kimber I, Park BK. Selective haptenation of cellular or extracellular protein by chemical allergens: association with cytokine polarization. *Chem Res Toxicol*. 2005;18(2):375-381.
 33. Saint-Mezard P, Rosieres A, Krasteva M, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, et al. Allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol*. 2004;14(5):284-295.
 34. Korean Dermatological Association. *Dermatology*. Seoul:Ryomoongak. 2008:166-169. (Korean)
 35. Hayashi M, Higashi K, Kato H, Kaneko H. Assessment of Preferential Th1 or Th2 Induction by Low-Molecular-Weight Compounds Using a Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Method: Comparison of Two Mouse Strains, C57BL/6 and Balb/c. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2001;177:38-45.
 36. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne. *Kuby immunology*. New York:W. H. Freeman and Company. 2006:8-16.
 37. Lee SY, Kang KH, Lee HE, Yoo SA, Kim HB, Ryu JH. The comparative study on the difference of anti-allergic effects based on different form of Seunggal-Tang. *J of Korean Oriental Pediatrics*. 2008;22(1):103-111. (Korean)
 38. Castells M. Mast cell mediators in allergic inflammation and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006;26(3):465-485.