

黑芝麻가 알러지성 염증 반응에 미치는 영향

고홍윤·구영선*·김동희**

Effects of Sesami Semen on Anti-Allergic Inflammation Mechanism related with Atopic Dermatitis

Hong-Yun Ko, Young Sun Koo, Dong-Hee Kim

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

1. Department of internal Medicin., College of Oriental Medicine, Daejeon University

This study aimed to investigate the effects of Sesami Semen on the itching and anti-allergic inflammation mechanism related with cytokine, chemokine, histamine, β -hexosaminidase, NF- κ B, and free radical, and it was concluded as follows :

1. Sesami Semen did not show any cytotoxicity at the range of concentration (1-250 μ g/ml) on the human fibroblast cell (hFCs).
2. Sesami Semen reduced the gene expressions of IL-8, TNF- α , IL-6 mRNA comparing with control.
3. Sesami Semen reduced the levels of IL-6, IL-8, MCP-1 within THP-1 cell depending on the concentration, and especially significantly reduced the the levels of IL-6, MCP-1 at all the concentration.
4. Sesami Semen significantly decreased the histamine secretion on HMC-1 at all the concentration.
5. Sesami Semen decreased the β -Hexosaminidase secretion 6.2% at 10 μ g/ml conc., 58.3% at 100 μ g/ml conc. and 63.2% at 200 μ g/ml conc., respectively. And IC50 (μ g/ml) was 158.25 μ g/ml.
6. Sesami Semen significantly suppressed the activity of NF- κ B promoter depending on the concentration.
7. Sesami Semen decreased the production of reactive oxygen species (ROS) and DPPH generation depending on the concentration.

As judged with above results, the effects of Sesami Semen on the anti-allergic inflammation would be recognized, and it could be applied on the medicinal sources for prevention or treatment of several allergy disease. And more studies are needed furthermore with the seperation of effective materials.

key words : sesami Semen, anti-allergy, histamine, free radical, Cytokine, chemokine

I. 緒論

아토피 피부염은 다양한 환경 요인에 대하여 피

부의 과반응이 나타나는 습진성 만성 피부질환이다¹⁾. 발생 빈도는 산업화된 나라에서 상대적으로 높으며, 청소년 이전은 10-15%, 성인은 13% 내외로 보고되고 있다²⁾. 아토피 피부염의 병인과 병리는 아직 완전히 밝혀지지 않았지만, 최근 연구는 여러 방면의 면역학적인 부분과 이와 관련된 염증성 경로 및 활성화에 집중되어 있다³⁾.

* 대전대학교 한의과 대학 청주해화의원

** 대전대학교 한의과대학 병리학교실

· 교신저자 : 김동희 · E-mail : dhkim@dju.ac.kr

· 채택일 : 2006년 12월 15일

면역 반응은 과도한 형태나 비정상적인 형태로 일어날 때, 과민반응 (hyper-sensitivity)라는 용어를 사용하는데, 원인은 개인에 따라 다양하다. Coombs와 Gell은 4가지 유형의 과민 반응 (I, II, III 그리고 IV형)을 기술하였는데, 임상에서는 각 유형이 필연적으로 독립되어 나타나지는 않는다. 앞의 3가지 유형은 항체매개 반응이고, 4번째는 T 세포와 대식세포에 의해 주로 매개된다³⁻⁵⁾.

아토피 상태에서는 혈중 높은 IgE 레벨과 호산구 증가가 특징적으로 나타남으로써, 아토피와 관련된 피부염, 알러지 비염 및 천식은 모두 이들의 병리와 밀접한 관계가 있다^{4,5)}.

한의학에서 본 병의 병기는 기본적으로 稟賦不足, 脾胃虛弱, 氣血不足 등의 상태에서 여러 가지 원인으로 濕熱毒邪가 더해짐으로써 虛實錯雜의 복잡한 병기를 형성한다⁶⁻⁹⁾. 증상을 기준으로 살펴보면 皮疹色紅, 혹 糜爛, 滲出, 痛痒極烈 등이 나타나는 급성기는 주로 濕熱證에 해당되고, 苔癬化, 皮損肥厚, 波痕血痂, 脫屑 등의 증상이 나타나는 만성기는 脾虛濕阻, 혹은 血虛風燥證에 해당된다. 아울러 皮疹色素沈着, 肥厚 등의 증상이 나타나는緩解期는 氣虛脾虛證에 해당된다고 할 수 있다⁹⁻¹²⁾.

이에 대한 치료법으로는 辨證施治를 기본으로 清熱解毒, 健脾化濕, 養血潤膚, 祛風止痒, 活血化瘀 등의 다양한 치법이 활용되고 있으나, 濕熱證이 나타나는 초기에는 주로 攻法이 후기에는 攻邪兼法이 다용된다⁶⁻¹²⁾. 이⁹⁾는 영아기는 清熱, 除濕, 解毒法을, 아동기에는 除濕健脾, 滋陰養血法을, 성인기에는 養血潤燥, 祛風除濕, 活血化瘀法을 활용해야 한다며, 분기별에 대한 처방을 제시한 바가 있다.

보다 유의성있는 처방과 치료제 개발을 위한 실험 연구에서는 桑葉¹³⁾, 紫草¹⁴⁾, 牛蒡子¹⁵⁾, 丹蔘¹⁶⁾, 黃芩¹⁷⁾ 등의 공법 위주의 단일 약물이 검색되었고, 복합처방에서는 消風散¹⁸⁾ 등의 攻法處方과 加味當歸飲子¹⁹⁾ 등의 攻邪兼法 처방이 동물 병태 모델을 통하여 효능이 검색되었다.

이 밖에 임상적 연구로 정²⁰⁾은 “加味熱多寒少湯 투여 후 아토피 피부염 환자의 임상상 변화에 대한 연구”를, 조²¹⁾는 “內消和中湯加味方의 아토피 피부염 치료 효과에 관한 임상적 연구”를, 양²²⁾은

수증 한약 처방이 아토피 피부염 환자의 SCORAD 및 Cytokine 변화에 미치는 영향을 각각 보고한 바가 있다.

본 시료인 黑芝麻 (Sesami Semen Nigrum)은 참깨과 (호마과 : Pedaliaceae)에 속한 일년생 초목인 참깨 *Sesamum indicum* L.의 흑색 종자로, 8-9월에 채취하여 조금씩 묶어서 세워 말린 후 종자를 채취한다. 性味는 平甘하고, 補肝腎, 益精血, 潤腸燥 작용으로 眩暈, 眼花, 耳鳴, 腸燥便秘 등을 治한다²³⁾. 이 밖에도 임상에서 진액부족으로 인한 다양한 병증에 사용되고 있으며, 민간에서는 피부 건조를 동반한 소양증에 활용되고 있으나, 아직 단일 약물로써 항염증 및 항아토피 효과가 입증된 바가 없다.

이에 본 실험에서는 항아토피 치료제 개발을 위한 일환으로, 黑芝麻를 시료로 먼저 세포독성을 측정한 후 아토피 염증 기전과 관련한 염증성 사이토카인, 케모카인, histamine, β -hexosaminidase, NF- κ B 등에 미치는 영향을 검색하였던바 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗方法

1. 재료

1) 약물

본 실험에 사용한 黑芝麻(SS)는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량은 다음과 같다.

韓藥名	生藥名
黑芝麻	<i>Sesami Semen</i>

2) 시약

실험에 사용된 시약 중 Diethyl pyrocarbonate (DEPC), trypsin-0.2% EDTA, 3-4, 5-dimethylthiazol-2, 5- carboxymethoxypheny 1-2, 4-sulfophenyl -2H-tetrazolim

(MTS), RPMI-1640 배양액, trichloroacetic acid, isopropanol, ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), EtOH, LPS, magnesium chloride (MYHYBT12), A23187, PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), p-nitrophenyl-N-acetyl-b-glucosamide, o-phthalaldehyde, dexamethasone 등은 Sigma 사 (U.S.A) 제품을, Taq polymerase 와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa 사 (Japan) 제품을, 역전사효소 (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 CsA (cyclosporin A)는 중외제약 제품을, RNase inhibitor는 Promega 사 (Madison, U.S.A) 제품을, 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, U.S.A) 제품을, DMEM은 Gibco 사 (Gaithersburg, MD, U.S.A) 제품을, RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, U.S.A) 제품을, 인간 재조합 IL-6, IL-8, TNF- α , histamine kit는 R & D system사 (U.S.A.) 제품을, LipofectamineTM 2000 Reagent는 Invitrogen 사 (Carlsbad, U.S.A) 제품을, Luciferase assay kit는 Promega 사 (Madison, U.S.A) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

3) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), microwave oven (LG, Korea), rotary vacuum evaporator, vacuum pump (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Co., Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Co., Japan), micro-pipet (Gilson, Co., France), water bath (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line, Co., U.S.A), vortex mixer, heating block (Vision scientific. Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Co., Japan), centrifuge (한일, Korea), deep-freezer (Sanyo, Co., Japan), plate shaker (Lab-Line, U.S.A),

ice-maker (Vision scientific Co., Korea), ELISA reader (Molecular Devices, Co., U.S.A.), 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Co., U.S.A.), flow cytometer (Becton Dickinson, U.S.A) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

호마인 (SS) 300 g에 methanol 2,000 ml을 가하여 추출기에서 3시간 추출을 2회 반복하였다. 이를 흡입 여과하여 감압 증류장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하였다. 농축된 시료 15.0 g을 냉동 (-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

2) 세포 배양

RBL-2H3 (Rat basophil leukemian cell line; Korea cell line bank) 5.0 x 10⁵/ml 세포를 DMEM, antibiotics (penicillin 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 μ g/ml)과 10% FBS를 넣고, 37°C CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다. 사람의 단핵구인 THP-1 (human acute monocytic leukemia cell; 미국세포주은행) 2.0 x 10⁵/ml로 맞추어 RBL-2H3 세포의 배양 방법과 동일하게 3일간 배양하였다.

Human fibroblast cell (hFCs) 배양은 피부 조직을 Cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 이 tube에 DMEM {containing collagenase A(5mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma Co., U.S.A), antibiotics (penicillin 104U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25 μ g/ml)}를 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 hFCs를 2 시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하여 30 분간 배양하고, 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양하였다. 이를 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA로

분리하여 연속으로 1주일씩 3회 반복하여 살아있는 부착세포를 DMEM-5% FBS에서 배양하였다.

3) SRB assay

세포독성 측정은 hFCs에 대하여 SRB assay법을 약간 변형하여 사용하였다. hFCs는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 자란 것을 trypsin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어낸 후, 2.0 x 10⁴개 세포로 96 well plate에 분주한 후 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 2시간 배양하였다. 배양 후 SS (최종 농도 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml, 31.2 µg/ml, 15.6 µg/ml, 7.8 µg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액 (PBS)로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 µl를 가하여 1 시간 동안 4°C에 방치하였다. 이 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 µl/well로 가하고, 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM tris base로 100 µl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, U.S.A)에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA reader (Molecular devices, U.S.A) 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Real Time Quantitative RT-PCR

(1) Human mast cell line (HMC-1) 배양

HMC-1 (Human mast cell line; J. H. Butterfield, Mato Clinic, Rochester, MN) 2.0 x 10⁶/ml 세포를 DMEM {containing collagenase A (5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, U.S.A)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma, U.S.A), antibiotics (penicillin 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)}과 4M 2-mercaptoethanol을 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다.

(2) RNA 추출

HMC-1 세포를 24 well plate에 5 x 10⁴ 세포로 각 well에 분주하고, 여기에 추출물 (200, 100, 10 µg/ml)과, 양성대조군으로 CsA (10 µg/ml)를 처리하고 1시간 후 PMA (50 ng/ml)와 A23187 (0.5 µM)를 각각의 well에 첨가하여 CO₂ 배양기에 24시간에 배양한 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNazolB 500 µl를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 µl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심분리한 후 약 200 µl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 µl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 µg을 DNase I (10 U/µl) 2U/tube를 37°C heating block에서 30분간 반응한 후 75°C에서 10분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 µl 10 mM dNTPs mix, 1 µl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 µl), RNA inhibitor로서 1 µl RNase inhibitor (20 U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5 µl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 µl의 M-MLV RT (200 U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다.

이 20 µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37°C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 이를 다시 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction

(PCR)에 사용하였다.

(4) Real Time Quantitative RT-PCR

HMC-1으로부터 총 RNA는 TRI 시약으로 분리하고, DNase I (Life Technologies, Grand Island, NY)로 염색체의 DNA를 제거하기 위해 digested 하였다. 75℃에서 20분 동안 DNase과 5 ug을 넣어 total RAN은 First Strand cDNA Synthesis kit (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)로 cDNA으로 transcription하였다.

기술된 것에 따라 Real-Time PCR은 Applied (Applied Biosystems, U.S.A)을 사용하면서 수행되었다. probes는 6-carboxy-fluorescein으로 라벨을 붙이고, beta-actin cDNA는 모든 cDNA과 같은 양을 포함한 각 cDNA 표본을 AmpliTaq Gold DNA Polymerase을 포함시켜 TaqMan Universal PCR로 증폭시켰다. PCR 조건은 40 cycles를 위한 50℃에서 2분, 95℃과 10분, 60℃에서 15초 수행하였다. 사용된 probe는 아래와 같다.

Human interleukin-6	AGCCCTGAGAAAGAGACATGTAACAA GAGTAACA
Human interleukin-8	AGAGCTCTGTCTGGACCCCAAGGAAA AC
G3PDH	CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC
Human TNF-alpha	TGGCCCCAGGCAGTCAGATCATC

$y = x(1+e)n$, $x =$ starting quantity $y =$ yield, $n =$ number of cycles
 $e =$ efficiency로 계산하여 RQ (relative quantitative)를 측정하였다.

5) MCP-1, IL-6, IL-8 생성량 측정

THP-1 세포를 0.5% FBS가 든 RPMI 배지에 $2.0 \times 10^6/ml$ 로 24 well plate에 분주한 후 배양기 (37℃, 5% CO₂)에서 16시간 배양하였다. 배양 후 SS (최종 농도 200 µg/ml, 100 µg/ml, 5 µg/ml)을 24시간 동안 처리한 후 집먼지 진드기 (House dust mite; HDE) (1 µg/ml)를 각각 24시간 동안 처

리한 다음, ELISA를 이용하여 상층액에서 단핵구 화학유인물질 MCP-1 (monocyte chemoattractant protein -1, MCP-1), IL-6, IL-8의 양을 측정하였다.

6) Histamine 분비량 측정

HMC-1 세포를 24 well plate에 5×10^4 세포로 각 well에 분주하고, 여기에 추출물 (200, 100, 10 µg/ml)과, 양성대조군으로 CsA (10 µg/ml)를 처리하고 1시간 후 PMA (50 ng/ml)와 A23187 (0.5 µM)를 각각의 well에 첨가하여 CO₂ 배양기에 24시간에 배양한 후, 각 항체 anti-IgE 를 coating 완충 용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4℃에서 30분 방치한 후, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) β-Hexosaminidase 분비량 측정

48 well plate에 RBL-2H3 cell을 5×10^5 cell/ml로 18시간 배양한 뒤 tyroid buffer로 세포의 배양액을 세척하고, tyroid buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.4 mM NaH₂PO₄, 5.6 mM glucose)로 배양액을 바꿔주었다. 시료를 농도별로 1시간 전처리하고 양성대조군으로 10 µM의 A23187을 처리한 15분 뒤 상층을 얻었다. 얻은 상층액 50 µl와 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 녹인 1 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-glucosamide 50 µl를 30분 동안 인큐베이터에서 반응시켰다. 반응을 정지시키기 위해 1N HCl을 넣은 후 405 nm에서 β-hexosaminidase의 방출량을 측정하였다.

8) NF-κB promoter 활성 측정

48 well plate에 RBL-2H3 cell을 5×10^5 cell/ml로 18시간 배양한 뒤 FBS와 antibiotics를 제거한 배양액으로 바꿔준 후, NF-κB 부위가 3 copy로 되어있는 NF-κB-Luc vector와 b-galactosidase assay를 통해 형질 전환의 비율을 측정할 수 있도록 pCMV-β-Luc vector를 4시간 형질전환 시켰다. 세포에 FBS와 antibiotics가 함유된 배양액으로 바꿔준 후 시료와 양성대조군

인 PMA를 18시간 처리하고 lysis buffer를 이용하여 세포를 lysis 시켰다. 3차례의 급속 냉동-해동을 거쳐 세포를 파괴하고, 12,000 × g, 5분간 원심분리하여 세포 추출물을 얻어 luciferase substrate와 반응시켜 NF-κB promoter 활성을 측정하였다.

9) 통계처리

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

III. 實驗結果

1. 세포독성에 미치는 영향

Human fibroblast cell(hFCs)에 대한 세포독성을 측정한 결과, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 μg/ml 농도에서 생존율이 각각 51.34 ± 0.07, 96.26 ± 0.33, 95.45 ± 0.44, 110.70 ± 0.55, 100.67 ± 0.02, 117.51 ± 0.31, 110.70 ± 0.22, 117.11 ± 0.11 %로 나타나, 500 μg/ml 이하 농도에서는 세포독성이 발현되지 않았다 (Fig. 1).

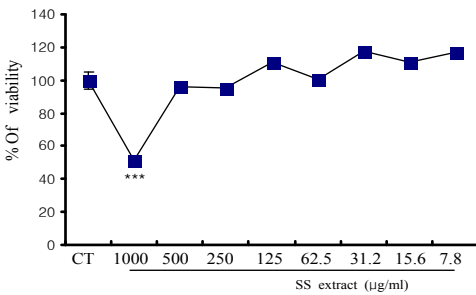


Fig. 1. Effects of SS on the viability of mouse lung fibroblast

Human fibroblast cell (hFCs) were cultured with various concentration of SS extract for 48 hr and the cell viability was measured by SRB method. The results were presented by the mean ± S.E (N=6).

2. 사이토카인 발현에 미치는 영향

1) HMC-1에서 IL-8 mRNA 발현에 미치는 영향

HMC-1에서 IL-8 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때, 양성대조군 CsA는 0.609, SS는 200, 100, 50 μg/ml 농도 투여군에서는 각각 0.125, 0.267, 0.603로 나타났다 (Fig. 2).

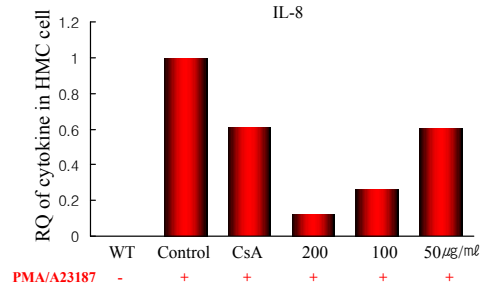


Fig. 2. Inhibitory effects of SS on IL-8 mRNA gene expression in HMC-1.

Human mast cell line were stimulated with PMA (50 ng/ml) and A23187 (0.5 μM), co-cultured SS concentration (200, 100, 50 μg/ml) and cyclosporin A (10 μg/ml) for 6h, and real-time PCR was used to determine relative IL-8 mRNA expression compared with control. The amount of SS Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration.

2) HMC-1에서 TNF-α mRNA 발현에 미치는 영향

HMC-1에서 TNF-α mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때, 양성대조군 CsA는 0.153, SS는 200, 100, 50 μg/ml 농도 투여군에서는 각각 0.290, 0.223, 0.174로 나타났다 (Fig. 3).

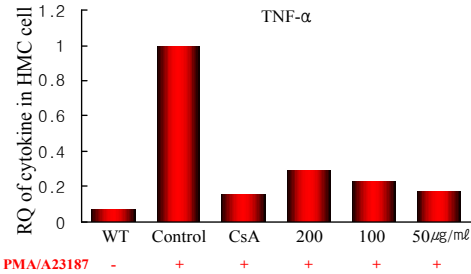


Fig. 3. Inhibitory effects of SS on TNF-α mRNA gene expression in HMC-1.

Human mast cell line were stimulated with PMA (50 ng/ml) and A23187 (0.5 μM), co-cultured SS concentration (200, 100, 50 μg/ml) and cyclosporin A (10 μg/ml) for 6 h, and real-time PCR was used to determine relative TNF-α mRNA expression compared with control. The amount of SS Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration.

3) HMC-1에서 IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

HMC-1에서 IL-6 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때, 양성대조군 CsA는, 0.245, SS는 200, 100, 50 μg/ml 농도 투여군은 각각 0.277, 0.352, 0.758로 나타났다 (Fig. 4).

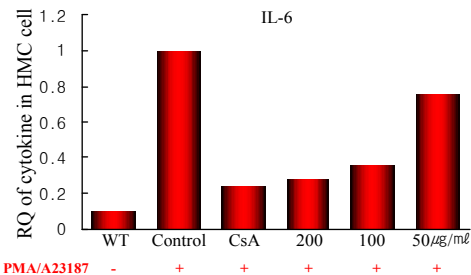


Fig. 4. Inhibitory effects of SS on IL-6 mRNA gene expression in HMC-1.

Human mast cell line were stimulated with PMA (50 ng/ml) and A23187 (0.5 μM), co-cultured SS concentration (200, 100, 50 μg/ml) and cyclosporin A (10 μg/ml) for 6h, and real-time PCR was used to determine

relative IL-6 mRNA expression compared with control. The amount of SS Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration.

4) THP-1 세포에서 IL-6 생성량에 미치는 영향

사람의 단핵구인 THP-1 세포에서 IL-6 생성량을 측정된 결과, 정상군은 106.25 ± 11.5 pg/ml, 대조군은 995.0 ± 23.0, 양성대조군인 dexamethasone 투여군은 92.5 ± 22.5 pg/ml, SS는 200, 100, 50 μg/ml 농도 투여군은 66.25 ± 12.5, 116.25 ± 20.1, 333.75 ± 25.6 pg/ml 로 대조군에 비하여 큰 폭으로 생성량이 감소되었고, 모든 농도에서 유의성 있게 (**p < 0.01) IL-6의 생성을 억제하였다 (Fig. 5).

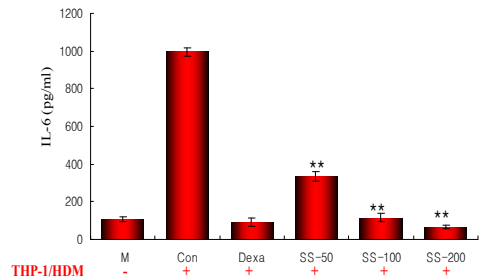


Fig. 5. Inhibitory effects of SS on HDM induced IL-6 release in THP-1 cells.

Serum starved human monocyte cell line THP-1 cells were stimulated with HDM (1 ug/ml), co-cultured SS concentration (200, 100, 50 μg/ml) and dexamethasone (10 μg/ml) for 24 h. The culture supernatant was collected and the concentration of IL-6 was measured by ELISA. Data are expressed as means ± SD. *p < 0.05, **p < 0.01 ***p < 0.001 is assessed as a significant difference between control and dose-dependent SFR-treated group.

5) THP-1 세포에서 IL-8 생성량에 미치는 영향

사람의 단핵구인 THP-1 세포에서 IL-8 생성을

측정한 결과, 정상군은 103.3 ± 24.1 pg/ml, 대조군은 3532.5 ± 50.4 pg/ml, 양성대조군인 dexamethasone 투여군은 82.5 ± 24.1 pg/ml, SS는 200, 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여군은 1603.3 ± 125.1 , 3124.1 ± 224.0 , 3674.1 ± 132.1 pg/ml로 대조군에 비하여 생성량이 감소되었고, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있게 (** $p < 0.01$) IL-8의 생성을 억제하였다 (Fig. 6).

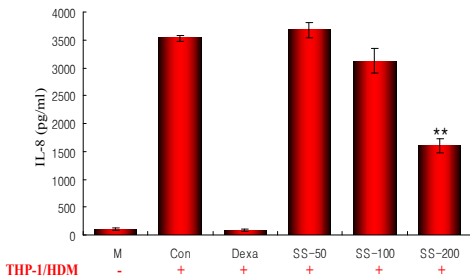


Fig. 6. Inhibitory effects of SS on HDM induced IL-8 release in THP-1 cells.

Serum starved human monocyte cell line THP-1 cells were stimulated with HDM (1 $\mu\text{g/ml}$), co-cultured SS concentration (200, 100, 50 $\mu\text{g/ml}$) and dexamethasone (10 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. The culture supernatant was collected and the concentration of IL-8 was measured by ELISA. Data are expressed as means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ is assessed as a significant difference between control and dose-dependent SFR-treated group.

6) THP-1 세포에서 MCP-1 생성량에 미치는 영향

사람의 단핵구인 THP-1 세포에서 MCP-1 생성을 측정한 결과, 정상군은 27.8 ± 5.2 (pg/ml), 대조군은 1177.8 ± 20.1 pg/ml, 양성대조군인 dexametha -sone 투여군은 17.8 ± 10.4 pg/ml, SS 는 200, 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여군은 21.1 ± 11.5 , 91.16 ± 24.1 , 531.1 ± 51.1 pg/ml로 대조군에 비하여 큰 폭으로 생성량이 감소되었고, 모든 농도에서 유의성 있게 (** $p < 0.01$) MCP-1의 생성을 억제하였다 (Fig. 7).

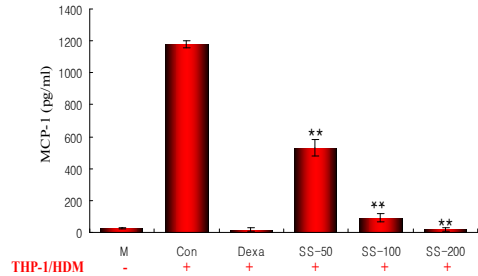


Fig. 7. Inhibitory effects of SS on HDM induced MCP-1 release in THP-1 cells.

Serum starved human monocyte cell line THP-1 cells were stimulated with HDM (1 $\mu\text{g/ml}$), co-cultured SS concentration (200, 100, 50 $\mu\text{g/ml}$) and dexamethasone (10 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. The culture supernatant was collected and the concentration of MCP-1 was measured by ELISA. Data are expressed as means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ is assessed as a significant difference between control and dose-dependent SFR-treated group.

3. Histamine 분비량에 미치는 영향

HMC-1에서 histamine양을 측정한 결과, 정상군은 5.2 ± 0.8 nmol로 나타난 반면, 대조군 79.7 ± 4.9 nmol로 나타나 큰 폭으로 증가하였다. 반면 양성대조군인 CsA 투여군은 23.6 ± 2.1 nmol로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었고, SS는 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여군에서는 각각 24.6 ± 4.3 , 27.2 ± 7.4 , 57.6 ± 9.0 nmol로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있게 (** $p < 0.001$, * $p < 0.05$) 감소하였다 (Fig. 8).

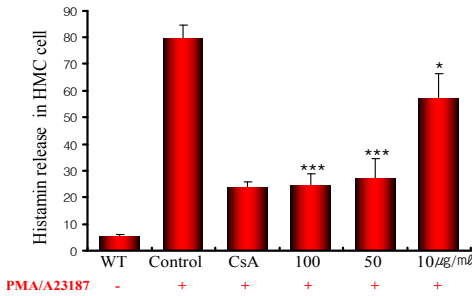


Fig. 8. Effect of SS extract on histamine release in HMC-1.

Human mast cell line were stimulated with PMA (50 ng/ml), A23187 (0.5 μM), co-cultured SS concentration (100, 50, 10 μg/ml) and cyclosporin A (10 μg/ml) for 6 h, histamine release level for analyzed by ELISA kit. The results are expressed the mean ± S.E. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

4. β-Hexosaminidase 분비량에 미치는 영향

SS에 의한 β-Hexosaminidase 분비량을 측정 한 결과, 대조군인 A23187에 의해 방출되는 β-Hexosaminidase 분비량의 SS에 의한 inhibition 비율이 SS는 10 μg/ml 농도에서는 26.2%, 100 μg/ml 농도에서는 58.3%, 200 μg/ml 농도에서는 63.2%로 유의성 있게 증가하였다. SS에 의한 β-Hexosaminidase IC50 값은 158.3 μg/ml로 나타났다 (Table 1).

Table 1. Inhibitory Effects of SS on A23187-induced Release of β-hexosaminidase

Compound	Inhibition (%)				IC ₅₀ (μg/ml)
	0 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml	200 μg/ml	
SS	0 ± 0.5	26.2 ± 2.4*	58.3 ± 5.7*	63.2 ± 6.1*	158.3 ± 17

Each value represents the mean ± SD *p<0.05 significantly different from the control

5. NF-κB promoter 활성에 미치는 영향

SS에 의한 NF-κB promoter 활성을 조사한 결과, 정상군에 비해 대조군인 PMA는 4배 증가하였으며, SS는 10, 100, 200 μg/ml 농도 의존적으로 감소하였다. SS는 10 μg/ml 농도에서 대조군에 비하여 약 25%, 100 μg/ml 농도에서 약 50%, 200 μg/ml 농도에서 약 60% 정도 유의성 있게 (*p<0.05) 감소되었다 (Fig. 9).

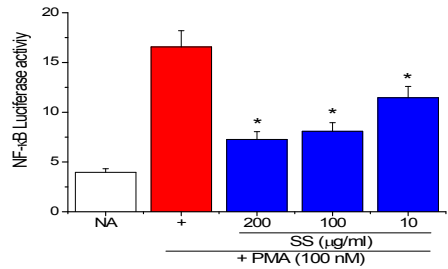


Fig. 9. Effects of SS on NF-κB dependent luciferase gene expression. Cells were transiently co-transfected with pGL-3-NF-κB, and pCMV-β-gal. After 18 h, cells were treated with vehicle, PMA, PMA plus SS. Values are expressed as means± S.D. of three independent experiments, performed in triplicate. *P < 0.05, significantly different from the PMA.

IV. 考 察

서양 인구의 30% 내외가 알레르기 질환에 노출되어 있으며, 이로 인한 엄청난 공중 보건 비용이 소모되고 있다. 이 같은 경향은 점차 서구화되고 있는 국내에서도 마찬가지이다.

1906년 von Pirquet가 항원에 환자가 정상적이지 못한 변형된 반응을 나타내는 경우를 일컬어 알러지 (allergy)라는 용어를 사용하기 시작한 이래, 오늘날에는 과민성 면역 반응으로 표적 기관에 염증이 형성되어 발생하는 질환을 알러지 질환으로 정의하게 되었다^{24,25)}.

일반적으로 알러지는 (allergy)는 제 I형 과민반응 (type I hypersensitivity)과 동일시되는데, 제 I형 과민반응은 allergen이라고 부르는 특정한 항원

에 대하여 나타나는 반응으로 그 항원에 대해 특이적인 IgE 항체가 mast cell에 결합되어 유도되는 반응이다²⁶⁾. Allergen에 특이적인 IgE 항체가 많이 만들어지면, 이들 항체는 mast cell 표면에 있는 Fc 수용체와 결합하게 되며, 여기에 allergen이 결합하게 됨으로써, 이들 세포가 활성화 된다. 이로 인하여 여러 가지의 생리 활성 물질이 분비되어 혈관 확장, 혈관 침투성 증가, 평활근 수축, 염증 반응 등이 유발된다²⁷⁾.

Ehrlich (1877)에 의해 처음 명명된 비만세포는 즉시형 과민 반응에서 일어나는 염증 반응에서 핵심적인 역할을 수행한다. 사람의 비만세포는 많은 과립을 함유한 세포로, 세포막의 FcεRI과 IgE의 결합을 통해 즉각적으로 발생하는 알러지 반응을 유발하며, 면역학적 또는 비면역학적 자극에 의하여 세포질 과립에 저장된 히스타민류코트리엔, 프로스타글란딘, TNF-α, IL, GM-CSF 등의 매개물질들과 많은 사이토카인들을 분비하여 여러 면역 반응과 염증 반응 등에 관여한다²⁸⁻³¹⁾. 특히 사이토카인들은 결과적으로 neutrophil과 eosinophil을 모으는 역할을 하며 염증 반응을 일으키는데 있어서 중요한 역할을 담당 한다³²⁾. 비만세포의 활성을 통한 염증성 사이토카인들의 생성은 많은 염증성 질환과 알러지 질환들을 일으키는 원인이 되기 때문에 최근의 모든 알러지에 관한 실험들은 이들의 생리, 병리 기전 규명에 초점을 맞추고 있다.

IL-8은 LPS 자극에 의한 말초 혈액단핵구나 대식 세포가 생성하는 호중구증 주활성을 갖는 단백질로, 호중구를 혈관 내피세포를 통과시켜 조직내에 유주시킴으로서 지연형 알러지 증상을 야기시킨다. 이는 단핵구나 대식세포에서 뿐만 아니라 사람 비만세포에서도 생성된다고 보고되었으며, 이로 인해 생성된 염증세포 (neutrophils, macrophage, T lymphocytes)는 아토피 피부염 환자들에서도 발견되고 있다³³⁻³⁵⁾.

TNF-α는 면역 반응의 초기에 분비되는 전염증기 cytokine으로, 여러 가지 질환에서의 염증반응 조절에 관여한다. 이는 종양의 혈관을 손상시킴으로써 종양괴사를 유발시키거나 말라리아 또는 레지오넬라에 의한 감염 몇몇 바이러스 혹은 기생충

에 의한 감염에 대하여 숙주의 저항성을 유도시키기도 하지만, 중요한 염증 매개인자 중 하나로서 프로스타글란딘 E2의 생산과 골 손상을 일으키고 패혈증에서 맥관내피염을 초래하여 septic shock을 일으키는 인자로도 알려져 있다^{36,37)}. 특히 비만세포에서 유리된 TNF-α는 국소의 혈관내피세포에 작용하여 ELAM-1의 발현 및 백혈구의 혈관의 유주를 유도하는 것으로써, 알러지 국소의 염증 반응에 중요한 역할을 하고 있다³⁸⁾.

IL-6는 숙주 방어에 중심적인 역할을 하는 다기능 cytokine으로, 면역 반응과 세포 손상에 대한 숙주의 반응을 조절한다. 감염이나 손상 등에 급성 반응을 보이며, 면역 반응에 관여하는 세포의 성장과 분화에 관여 한다³⁹⁾.

알러젠과 특히 IgE 항체의 결합에 의한 항원항체 반응은 비만세포의 탈과립을 일으킬 뿐만 아니라 세포막 인지질에서 유리된 아라키돈산 대사과정을 통하여 류코트리엔과 프로스타글란딘과 같은 염증매개물질을 생성하여 사이토카인 분비, T-임파구 활성을 초래하여 혈류를 통하여 조직으로 빠르게 확산되어 혈관확장, 혈관투과성증가, 말초신경계 종말을 자극하여 증상을 일으킨다. 상기한 바와 같이 이러한 과정중 히스타민은 비만세포 과립에 저장되었다가 유리되는 가장 주된 염증 매개물질이다⁴⁰⁾.

본 실험에서 사용된 HMC-1 세포는 백혈병을 갖은 환자의 말초 혈액으로부터 만들어진 미성숙 세포주⁴¹⁾, PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate) 및 calcium ionophore A23187을 가하여 배양하면 FcεRI의 발현, 세포내 tryptase, 히스타민 증가 등 비만세포의 특징을 증가시킨다는 연구 보고가 있다⁴²⁾. 비만세포의 탈과립을 유도하는 인자 PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate) 및 calcium ionophore A23187는 phosphatidylinositol (PI) cycle과 protein kinase C (PKC) 활성화, 또는 calcium mobilization 시키는 물질로 비만세포를 자극시켜 생리 활성 물질을 세포 밖으로 분비하게 한다⁴³⁾. 이러한 비만세포 탈과립을 일으키는 여러 인자들의 대부분은 세포 밖으로부터 세포안으로 Ca²⁺ 유입을 증가시킴으로써 비만세포내의 Ca²⁺

의 양을 증가시키며, 증가된 자유 Ca^{2+} 이 세포내 Ca^{2+} binding protein인 calmodulin과 결합하여 Ca^{2+} -calmodulin 복합체를 형성하게 되고, 이것이 세포내 myosin light chain kinase를 활성화시킨다. 그 결과 세포내 골격 및 세포내 이동에 관여하는 미세소관과 미세섬유가 활성화되어 비만세포의 과립을 세포막 가까이로 이동시켜 결과적으로 세포막융합을 일으키게 됨으로써 비만세포 탈과립 및 히스타민 유리현상이 일어난다고 알려졌다⁴⁴⁾.

본 실험에서 quantitative real-time PCR로 검색한 IL-8/IL-6/TNF- α mRNA 발현은 모두 대조군에 비하여 감소하였다 (Fig. 2-4). 특히 IL-8/IL-6 mRNA 발현은 농도 의존적으로 억제되었으며, IL-8 mRNA 발현은 양성대조군인 CsA (10 μ g/ml) 투여군보다 효과적이었다. HDM (House dust mite)로 자극한 THP-1 세포에서의 IL-8 생성량 역시 농도 의존적으로 억제되었으며, 200 μ g/ml 농도에서 유의성 있게 (**p < 0.01) 억제됨으로써 (Fig. 6), 부합되는 결과가 나타났다.

사람의 단핵구 (monocyte)인 THP-1 (human acute monocytic leukemia cell; 미국세포주은행)는 골수에서 생성되어 혈행을 타고 도는 불완전하게 분화된 pre-immune cell이다. 자극을 받게 되면 monocyte들은 proatherogenic molecule들에 의해 circulation, adhesion, transmigration 등의 작용을 통해 endothelium 안으로 들어가 macrophage로 분화되어 면역작용을 하게 된다⁴⁴⁻⁴⁶⁾.

아토피에 의한 염증에 대한 본 시료의 효능을 평가하기 위하여, 자극 인자로 집먼지 진드기 (house dust mite)를 사용하였다. 집먼지 진드기는 호흡기 알레르기 질환의 가장 흔한 원인으로 밝혀져 있고, 알레르기 질환의 원인이라는 사실은 1921년 Kern에 의해 처음 제시되었다^{47,48)}.

집먼지 진드기의 주 항원인 Der f1과 Der p1은 주로 배설물에 존재 하는데, 이들이 비만세포 표면에 붙어있는 면역글로불린 IgE와 결합하게 되면 히스타민 등 화학 매체가 분비된다. 이렇게 하여 알레르기 천식, 알레르기 비염, 아토피 피부염 등

을 유발한다⁴⁹⁾.

THP-1 세포에서 HDM (House dust mite)로 자극한 실험군의 IL-6/IL-8 생성량은 정상군에 비하여 대조군에서 큰 폭으로 증가하였다. 이에 비해 양성대조군인 dexamethasone 투여군은 대조군에 비하여 큰 폭으로 감소하였고, SS 투여군은 모든 농도에서 유의성 있게 생성을 억제하였다 (Fig. 5, 6). 상기한 바와 같이 이 같은 결과는 HMC-1 세포에서 나타난 결과와 부합된다.

MCP-1은 chemokine family의 한 종류로 단핵구와 대식세포의 화학 주성에 특이성이 있으며⁵⁰⁾, 대식세포에서 IL-1 또는 IL-6 같은 cytokine의 형성과 integrin 같은 표면 부착 인자의 발현 및 대식세포의 기능 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. 대식세포의 침윤은 모든 형태의 염증성 및 비-염증성을 나타내는 가장 대표적인 특징의 하나로 알려져 있다⁵¹⁾. MCP-1 유전자의 활성화에는 여러 신호 전달 체계가 관여하는 것으로 보고되고 있으며, 특히 protein kinase C (PKC) 혹은 protein tyrosine kinase (PTK) 등의 세포내 kinase를 통해 전사 인자인 NF- κ B, 혹은 MAP-1이 활성화됨으로써 유전자 활성이 이루어진다^{52,53)}.

사람의 단핵구인 THP-1 세포에서 MCP-1 생성 측정에서는 IL-6/IL-8 생성량 결과와 동일한 양상으로 정상군에 비하여 대조군에서 큰 폭으로 증가하였으며, SS 투여군에서는 모든 농도에서 유의성 있게 생성을 억제하였다(Fig. 7). 비록 실험 세포주는 다르지만 RBL-2H3 세포에서 나타난 NF- κ B promoter 활성 결과와도 부합된다.

RBL-2H3 세포는 Rat basophil leukemian cell 유래된 세포로, 비만 세포와 호염기성구와 같은 기능을 가지며, 여러 가지 자극을 주었을 때, 히스타민, 세로토닌과 β -hexosaminidase을 방출한다고 알려져 있다⁵⁴⁾. 특히 β -hexosaminidase는 비만세포의 탈과립 방출량을 측정하는 지표가 된다. 히스타민에서 언급한 바와 같이 비만세포가 탈과립되었을 때는 아토피 피부염을 일으키는 중요한 화학적 매개물질인 히스타민이 유리되며, 히스타민의 방출로 일어나는 반응들은 NF- κ B 전사 조절인자들을 활성화시키는

것으로 알려져 있다. NF- κ B가 활성화되면 아토피 피부염에 관여하는 이들 IL-6, IL-8, TNF- α 의 유전자 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다⁵⁵⁾. 따라서 본 실험에서는 β -Hexosaminidase 분비량과 NF- κ B promoter 활성에 관하여 검색하였는데, 대조군인 A23187에 의해 방출되는 β -Hexosaminidase 분비량은 SS 투여군에서 농도 의존적으로 억제되었고, IC50 값은 158.25 μ g/ml로 나타났다 (Table 1).

SS에 의한 NF- κ B promoter 활성 억제 효과에서는 정상군에 비해 대조군인 PMA는 4배 증가하였으며, SS 투여군에서는 10 μ g/ml 농도에서 대조군에 비하여 약 25%, 100 μ g/ml 농도에서 약 50%, 200 μ g/ml 농도에서 약 60% 정도 유의성 있게 (* p <0.01) 감소시켰다 (Fig. 9). 이 같은 결과는 본 시료가 NF- κ B의 활성을 억제하여 IL-6, IL-8, TNF- α 사이토카인 유전자의 promoter에 결합을 저해함으로써, 아토피 피부염 염증에 관여하는 β -hexosaminidase, 히스타민, 면역 관련 사이토카인 IL-6, IL-8, TNF- α 의 분비를 억제시킴을 간접적으로 증명해주고 있다.

이상의 결과로 보아 黑芝麻의 알러지 염증 작용에 대한 효능이 인정되어, 임상에서 여러 가지 알러지 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 적합한 약물로써 응용될 수 있을 것으로 사료된다. 향후 유효 물질 분리를 통한 지속적인 연구가 기대된다.

V. 結 論

黑芝麻가 瘙癢과 알러지성 염증 기전에 관여하는 사이토카인 및 케모카인, histamine, β -hexosaminidase, NF- κ B 등에 미치는 영향을 검색하였던바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 黑芝麻는 Human fibroblast cell (hFCs)에 대하여 250 μ g/ml 이하 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 黑芝麻는 HMC-1에서 IL-8, TNF- α , IL-6 mRNA 발현을 대조군에 비하여 억제하였다.
3. 黑芝麻는 THP-1 세포에서 IL-6, IL-8, MCP-1 생성량을 대조군에 비하여 농도 의존

적으로 억제하였으며, 특히 IL-6, MCP-1 생성량은 모든 농도에서 유의성 있게 억제하였다.

4. 黑芝麻는 HMC-1에서 histamine 분비량을 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있게 감소시켰다.
5. 黑芝麻는 β -Hexosaminidase 분비량을 10 μ g/ml 농도에서는 6.2%, 100 μ g/ml 농도에서 58.3%, 200 μ g/ml 농도에서 63.2% 억제하였으며, IC50 (μ g/ml)은 158.25 μ g/ml로 나타났다.
6. 黑芝麻는 NF- κ B promoter 활성을 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰다.

감사의 글

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

VI. 參考文獻

1. Leung, D.Y., and Bieber, T. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2003.361:151-160.
2. Spergel, J.M., and Paller, A.S. Atopic dermatitis and the atopic march. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003.112:S128 -S139.
3. Novak, N., Bieber, T. and Leung, D.Y.M. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003.112:S128-S139.
4. 안효섭, 홍창의, 소아과학 제 8판. 서울. 대한 교과서. 2004:1166-8
5. Douglas S. Robinson, Mark Larché, and Stephen R. Durham. Tregs and allergic disease. *J. Clin. Invest.*, Nov 2004;114:1389-1397.
6. 장지레 : 장지레피부병임상경험집요, 중

- 국의약과학기술출판사, 2002.pp.247-251. 7. 서삼문 외 : 중국피부병비방전서, 과학기술문헌출판사, 2003. pp. 333-336.
8. 마소요 : 실용중의피부병학, 상해중의약대학출판사, 1995. pp. 231-238.
9. 이원문 외 : 피부성병수책, 인민위생출판사, 2004. pp. 193-1990.
10. 서의후 외 : 피부병중의진료학, 인민위생출판사, 1997. pp. 254-256.
11. 진휘 : 피부과학, 학원출판사, 2003. pp. 299-300.
12. 피선명 외 : 피부병중의치료여방제, 과학기술문헌출판사, 1997. pp. 45-58. 13. 김기훈 외 : 桑葉이 아토피 피부염에 미치는 영향, 慶熙醫學, 2004.Vol.20.No.1, pp. 37-45.
14. 박대원 외 : 생쥐의 B 세포에서 anti-CD40과 rIL-4로 유도된 싸이토카인 생산에 대한 紫草의 효과, 大韓本草學會誌, 2003.Vol.18 No.4, pp. 73-81.
15. 유한철 외 : 牛蒡子の 抗알리지 效果에 對한 研究, 大韓本草學會誌, 2001. Vol.16 No.1, pp. 111-128.
16. 백윤하 : DNCB(dinitrochlorobenzene)로 자극한 NC/Nga 생쥐에서 丹參의 아토피 억제 효과, 원광대학교대학원, 2005.
17. 박수남 : 활성산소의 유해작용에 대한 黃芩 성분의 생체 보호작용에 관한 연구, 서울산업대학교논문집, 1997.Vol.45 No.1, pp. 189-199.
18. 박성남 : 消風散이 BALB/c Mouse를 이용한 Atopy 피부염 Model에 미치는 영향, 경희대학교대학원, 2003.
19. 한재경 : 加味當歸飲子가 아토피 동물 모델에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 2004.
20. 정한수 : 加味熱多寒少湯 투여후 아토피 피부염 환자의 임상상 변화에 대한 연구, 경희대학교 대학원, 2002.
21. 조백건 : 內消和中湯加味方의 아토피 피부염 치료효과에 관한 임상적 연구, 경희대학교 대학원, 2002.
22. 양성완 : 수종 한약 처방이 아토피 피부염 환자의 SCORAD 및 Cytokine 변화에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 2002.
23. 전국한의과대학공통교재편찬위원회 : 본초학, 영림사, pp. 666-667, 2004.
24. Kapp, A. et al. Long-term management of atopic dermatitis in infants with topical pimecrolimus, a nonsteroid anti-inflammatory drug. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002.110: 277-284.
25. Boguniewicz, M., Eichenfield, L.F., and Hultsch, T. Current management of atopic dermatitis and interruption of the atopic march. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003.112:S140-S150.
26. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 6th ed. Mosby. 2001: 323- 83
27. 강형재 외 : 피부과학, 서울, 대한 피부과학회 교과서 편찬위원회, 1994. pp. 21~25, 133~138.
28. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol. Rev.*, 77, 1997. 1033-1079.
29. Galli SJ, Hammel I. Mast cell and basophil development. *Curr.* 1994.
30. Galli SJ. *Allergy, Curr. Biol.*, 2000.10,R93-95.
31. Hamelmann E, Tateda K, Oshiba A, Gelfand EW. Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyper-responsiveness. *Allergy*, 1999.54,297-305. *Op in. Haematol.*, 1,33-39.
32. Bradding P, Holgate ST. Immunopathology and human mast cell cytokines. *Curr. Rev. Oncol. Hematol.*, 1999.31,119-133.
33. Möller A, Lippert U, Lessmann D, Kolde G, Hamann K, Welker P, Schadendorf D, Rosenbach T, Luger T, Czarmetzki BM. Human mast cells produce IL-8. *J. Immunol.*, 1993.151,3261-3266.

34. Grützkau A, Krüger-Krasagakes S, Kögel H, Möller A, Lippert U, Henz BM. Detection of intracellular interleukin-8 in human mast cells: Flow cytometry as a guide for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cy tochem.*, 1997.45,935 -945.
35. Na HJ, Moon PD, Ko SG, Lee HJ, Jung HA, Hong SH, Seo Y, Oh JM, Lee BH, Choi BW, Kim HM. Sargassum hemiphyllum Inhibits Atopic Allergic Reaction via the Regulation of Inflammatory Mediators. *J Pharmacol Sci* 2005;97 (2):219-26.
36. Kim SH, Shin TY. Amomum xanthiodes inhibits mast cell-mediated allergic reactions through the inhibition of histamine release and inflammatory cytokine production. *ExpBiol Med* (Maywood). 2005. Oct;230(9):681 -7.
37. 김완수 : rHRF로 유발로 활성화된 생쥐의 B 임과구와 비만세포에서 辛夷 추출물의 항알러지 작용에 관한 연구. 동의학리병리학회지. 2001;15(6):917-26.
38. 김형민 : 면역과 알레르기. 서울. 신일상사 1998:159-73.
39. 김대식 외 : 면역생물학. 라이프사이언스. 2001:493-50.
40. Meltzer EO. Role for cysteinyl leukotriene receptor antagonist therapy in asthma and their potential role in allergic rhinitis based on the concept of "on linked airway disease". *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;84: 176-87.
41. Li L, Krilis SA. Mast cell growth and differentiation. *Allergy*, 1999.54, 306-312.
42. Nilsson G, Blom T, Kusche-Gullberg M, Kjellen L, Butterfield JH, Sundström C, Nilsson K, Hellman L. Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1. *Scand. J.Immunol.* 1994.39, 489-498.
43. Moon PD, Na JJ, Jeong HJ, Hong SH, Kim SJ, Chae HJ, Kim HR, Choi JO, Lee SH, Shin JY, Kim HM. Inhibitory effect of Gamibojungik aitag extract on mast cell-mediated allergic reaction in murine Model. *J Pharm Pharm Sci* 2005; 8(1):94-101.
44. Sullivan TJ, Parker CW. Possible role of arachidonic acid and its metabolites in mediator release from rat mast cells. *J Immunol* 1979; 122(2):431-6.
45. Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte- macrophage differentiation. *Experientia*, 1991.47:22~31.
46. Auwerx J, Stael F, Ceuppens JL. Changes in IgG Fc receptor expression induced by phorbol 12-myristate 13-acetate treatment of THP-1 monocyte leukemia cells. *Leukoc. Res.*, 1992.16:317~327.
47. Voorhorst R, Spijksma FTM, Varekamp N. House dust mite atopy and allergens it produce: identity with the house dust allergen. *J Allerg* 1967;3:325-9.
48. Boner AL, Niero E, Antolini I, Valletta EA, Gaburro D. Pulmonary function and bronchial reactivity in asthmatic children with house dust mite allergy during prolonged stay in the Italian Alps. *Ann Allergy* 1985;54:42-5.
49. Wong CK, Li ML, Wang CB, Ip WK, Tian YP, Lam CW. House dust mite allergen Der p 1 elevates the release of inflammatory cytokines and expression of adhesion molecules in co-culture of human eosinophils and bronchial epithelial cells. *Int Immunol.* 2006.Aug;18(8):1327 -35. Epub 2006.Jun 23.
50. Saitoh A, Suzuki Y, Takeda M, Kubota K, Itoh K, Tomino Y. Urinary levels of monocyte chemo-attractant protein

- (MCP)-1 and disease activity in patients with IgA nephropathy. *J Clin Lab Anal* 1998; 12 (1):1-5.
51. Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* .1992. 148: 2423-2428.
52. Wilson HM, Walbaum D, Rees AJ. Macrophages and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004;13(3): 285-90.
20. Atkins RC. Macrophages in renal injury. *Am J Kidney Dis*. 1998;31(1).
53. Shyy YJ, Li YS, Kolattukudy PE. Activation of MCP-1 gene expression is mediated through multiple signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 ;192(2): 693-9.
54. Bae EA, Park EK, Yang HJ, Baek NI, Kim DH. Hinokiresinol inhibits IgE-induced mouse passive cutaneous anaphylaxis reaction. *Planta Med*. 2006.Nov;72 (14): 1328-30.
55. Penido C, Costa KA, Costa MF, Pereira Jde F, Siani AC, Henriques MG. Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetra-nortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/ eotaxin and NF kappa B activation. *Int Immunopharmacol*. 2006 .Feb; 6(2): 109-21. Epub 2005.Aug.10.