Korean Journal of Acupuncture Vol.29, No.3, pp.406~420, 2012

반지련 약침 추출물의 RBL-2H3 세포 탈과립과 염증매개물질 분비 억제 효과

권혁상 · 송춘호

동의대학교 한의과대학 경락경혈학교실

Effect of *Scutellaria barbata* Pharmacopuncture Extract on Degranulation and Inflammatory Mediator Release in RBL-2H3 Cells

Hyuk-Sang Kwon, Choon-Ho Song

Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

Abstract

Objectives : *Scutellaria barbata* has been widely used in oriental medicine used for treatment of acute and chronic inflammatory diseases. In this study, to investigate the protective effect of *Scutellaria barbata* on type I allergic response, we determined whether *Scutellaria barbata* inhibits early or late allergic responses.

Methods : To assess the effect of *Scutellaria barbata* Pharmacopuncture Extract(SB) in RBL-2H3 cells, we investigated the levels of the markers of degranulation such as β-hexosaminidase and histamine, inflammatory mediator such as IL-4, TNF-α, PGE2 and cysLT, and mRNA expression of cytokines and enzymes. In addition, we determined the levels of intracellular ROS by DCFH-DA assay and the free radical scavenging activity by DPPH method.

Results : We found that SB suppressed the release of β-hexosaminidase and histamine and the production of IL-4, TNF-α, PGE2 and cysLT in RBL-2H3 by the antigen stimulation. SB also significantly inhibited the enzyme mRNA expressions, such as HDC2, COX-1, COX-2, 5-LOX and iNOS2, along with reduced cytokine mRNA expressions, such as IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF-α and GM-CSF in RBL-2H3. In addition, SB suppressed the levels of intracellular ROS.

Conclusions : Our results indicate that SB protects against type I allergic response and exert an anti-inflammatory effect through the inhibition of degranulation, inflammatory mediator release and mRNA expression of cytokines and enzymes.

Key words : *Scutellaria barbata*, pharmacopuncture, type I allergic response, degranulation, inflammatory mediator, RBL-2H3 cells

Ⅰ. 서 론

알레르기란 그리스어의 allos(change)+ergo(action), 즉 생체의 변화된 반응이라는 뜻의 합성어에서 유래되었다[1]. 정상적인 경우 인체에 해를 끼치지 않는 물질에 대해 면역체계가 이상반응을 일으키는 것을 말하며, 현대에 와서 그 발생이 더 많아졌다[2].

· Corresponding author: Choon-Ho Song, Department of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University, San 45 Yangjeong-dong, Busanjin-gu, Busan 614-052, Korea
Tel: +82-51-850-8643, Fax: +82-51-853-4036
E-mail: chsong@deu.ac.kr
· Received August 24, 2012, Revised September 10, 2012, Accepted September 10, 2012
This work was supported by Dong-Eui University Foundation Grant(No. 2011AA114).

20세기 후반에 들어 전 세계적으로 알레르기 질환 발병률이 증가되고 있고, 우리나라도 여러 산업과 문명의 발달로 인해 아토피 피부염, 알레르기 비염, 기관지 천식 등 알레르기 질환이 증가하는 추세이다. 알레르기 질환은 환경적, 유전적 문제가 복잡하게 연관되어 발병되는데 아직까지 명확한 치료법이 제시되지 못하고 있는 실정이다[1].

半枝蓮(*Scutellaria barbata* D. Don)은 꿀풀과 식물 半枝蓮의 全草이다. 性味는 맛은 맵고 성질은 平하다. 淸熱解毒, 活血, 驅瘀血, 化瘀利尿, 消腫解毒, 抗癌, 解熱, 鎭痛, 止血, 解毒 作用을 하고[3], 腫瘤, 闌尾炎, 肝炎, 肝硬化腹水, 肺膿瘍 등을 主治한다[4].

藥鍼療法은 韓醫學的 이론을 토대로 本草方劑學的 약리작용과 經絡經穴의 치료작용을 배합시켜 형성된 치료요법으로, 임상 치료 효과가 뛰어나 최근 들어 그 임상 응용범위가 확대되고 있다[5].

현재에는 벌의 毒을 이용한 蜂藥鍼, 胎盤 抽出物인 紫何車, 鹿茸藥鍼, 山蔘藥鍼, 증류추출식 한약제제 등 다양한 藥鍼이 연구 및 개발되어 사용되고 있다[6].

半枝蓮을 이용한 실험적 연구는 항암치료 분야에서 난소암 및 자궁암 세포 성장 억제효과, HeLa cell 증식억제와 사멸 및 항암활성에 관한 연구 등이 검토되었고, 半枝蓮·大蒜·白花蛇舌草 複合藥鍼이 腫瘍 및 免疫反應에 미치는 영향, 半枝蓮 抽出物이 대식세포에 미치는 영향에 대한 연구 등[7-12]이 있었으나, 알레르기와 관련된 세포 탈과립과 염증매개물질 분비 억제에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 세포 탈과립과 염증매개물질 분비 억제에 대한 半枝蓮 藥鍼 抽出物(이하 SB)의 활용 가능성을 살펴보고 응용범위를 넓히기 위해 SB의 RBL-2H3 세포 탈과립과 염증매개물질 분비 억제 효과를 살펴보았다.

실험 과정에서 RBL-2H3에 β-hexosaminidase release assay, Histamine release assay, IL-4 and TNF-α secretion assay, PGE2 and cysLT secretion assay, RNA extraction and RT-PCR을 이용한 실험적 알레르기 반응의 관찰, 세포내 ROS 생산에 미치는 영향 관찰 등을 통해 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

본 실험에 사용된 anti-dinitrophenyl(DNP) immunoglobulin E(IgE), DNP-HSA는 Sigma(USA)로부터, Dulbecco's modification Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin 및 trypsin-EDTA solution은 Gibco BRL로부터, tetrazolium bromide salt(MTT) 및 dimethylsulfoxide(DMSO)는 Amresco로부터, PGE2와 cysLT kit는 Cayman Chemical로부터, Interleukin(IL)-4와 tumor necrosis factor alpha(TNF-α) kit는 BD Biosciences Pharmingen으로부터, RT-PCR kit(one-step RT-PCR PreMix kit)는 iNtRON Biotechnology, Inc.로부터 구입하여 사용하였다.

2. 시료의 추출

본 실험에 사용된 半枝蓮(*Scutellaria barbata* D. Don)은 옴니허브(대구, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 半枝蓮 100 g을 증류수로 水洗하여 1 L의 75% Ethanol을 加하여 incubator(iNtRON BIOTECHNOLOGY, Korea)에서 60°C, 90 rpm 조건하에서 24시간 동안 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 분리하고, 0.2 mm 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 200 ml가 되도록 減壓濃縮한 후 냉동 건조하여 10.3 g의 半枝蓮 藥鍼 抽出物을 얻었다. -20°C에 보관하였다가 실험 직전 생리식염수나 배지에 희석하여 0.2 μm syringe filtering 후 실험에 사용하였다.

3. 세포배양

RBL-2H3(rat basophilic leukemia cell line)은 한국 세포주은행(Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양 받아 배양하였다. 세포의 배양을 위하여 10% heat-inactivated FBS(Gibco BRL, USA)과 1% penicillin 및 streptomycin(Gibco BRL, USA)을 포함한 DMEM(Gibco BRL, USA) 배양액에서

배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO_2 조건하에서 배양하였고, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution(Gibco BRL, USA)을 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대 배양하였다.

4. MTT assay

RBL-2H3 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT법을 사용하였다. RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 48 well plate(Cornig, USA)에 5×10^4 cells/ml의 세포 수가 되도록 분주하여 37°C 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. SB를 농도별(0, 1, 5, 10, 15 및 20 mg/ml)로 처리한 후 1시간 동안 반응시켰다. 배양액을 제거한 후 5 mg/ml의 MTT를 각 well에 넣고 잘 섞어 준 후 4시간 37°C incubator에서 배양한 후 tetrazolium bromide salt를 제거하고 DMSO를 150 μl씩 분주하여 well에 생성된 formazin이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 모두 녹인 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 평균값과 표준 편차를 구하였다.

5. β-hexosaminidase release assay

알레르기 즉시반응의 지표인 탈과립에 대한 억제효과를 살펴보기 위하여 β-hexosaminidase의 분비를 측정하였다. RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate(Corning, USA)에 5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE(30 ng/ml)로 감작하고 37°C 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM $MgCl_2$, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH7.2)로 2번 세척한 다음 각 well당 5.6 mM glucose, 1 mM $CaCl_2$와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가하고 SB를 농도별(0, 5 및 10 mg/ml)로 1시간 동안 37°C 5% CO_2 incubator에서 배양한 후 DNP- HSA(10 μg/ml)로 처리하여 1시간 동안 반응시키고 ice bath에서 10분 동안 방치한 후 반응을 종결시켰다. 상층액 20 μl를 96 well plate에 옮기고 substrate buffer(4-*p*-Nitrophenyl-*N*-acetyl-b-D-glucosaminide 1 mM, sodium citrate 0.05 M, pH4.5) 80 μl를 넣고 37°C에서 30분 배양시킨 다음 각 well당 stop solution 200 μl를 첨가하여 반응을 종결시켰다. Microplate reader(Molecular Devices Co. Ltd., USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. SB 처리군과 대조군의 흡광도 값으로 다음 식에 의해 inhibition(%)를 산출하였다.

Inhibition(%) = (1-T/C)×100

C : Cell(+), DNP-HSA(+), test sample(-)

T : Cell(+), DNP-HSA(+), test sample(+)

6. Histamine release assay

알레르기 즉시반응의 지표인 탈과립에 대한 억제효과를 살펴보기 위하여 histamine의 분비를 측정하였다. RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate(Corning, USA)에 5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE(30 ng/ml)로 감작하고 37°C 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM $MgCl_2$, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH7.2)로 2번 세척한 다음 각 well당 5.6 mM glucose, 1 mM $CaCl_2$와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가하고 SB를 농도별(0, 5 및 10 mg/ml)로 1시간 동안 37°C 5% CO_2 incubator에서 배양한 후 DNP-HSA(10 μg/ml)로 처리하여 1시간 동안 반응시키고 ice bath에서 10분 동안 방치한 후 반응을 종결시켰다. 배양된 RBL-2H3 세포를 4°C에서 5분 동안 2,000 rpm으로 원심 분리하여 그 상층액을 시료로 사용하였다. e-tube에 시료 25 μl를 넣고 0.1 N HCl 22.5 μl, 60% $HClO_4$ 2.5 μl를 넣고 혼합 후 원심분리하여 그 상층액 40 μl를 5 N NaOH용액 25 μl, n- butanol 500 μl 및 NaCl 0.06 g을 혼합한 튜브에 넣고 진탕 후 원심분리(2000 rpm, 10 min)하였다. Butanol층 400 μl를 새 e-tube에 넣고 0.1 N HCl용액 150 μl, n-heptane 0.5 ml를 가하여 진탕

후 원심분리(2,000 rpm, 10 min)하였다. 여기에서 얻어진 수층 100 μl에 1 N NaOH 용액 200 μl와 OPT (o-phthaldialdehyde) 용액 5 μl를 넣고 혼합 후 37°C에서 3분 동안 반응시킨 후 3 N HCl 용액 10 μl를 넣고 혼합하여 2분 동안 방치한 후 360 nm(excitation)과 450 nm(emission)에서 fluorometer(SPECTRAMAX M2, Molecular Devices Co. Ltd. USA)로 형광도를 측정하였다. SB 처리군과 대조군의 흡광도 값으로 다음 식에 의해 inhibition(%)를 산출하였다.

Inhibition(%) = (1-T/C)×100

C: Cell(+), DNP-HSA(+), test sample(-)

T: Cell(+), DNP-HSA(+), test sample(+)

7. IL-4 and TNF-α secretion assay

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate(Corning, USA)에 5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE(30 ng/ml)로 감작하고 37°C 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 배지교환 후 SB(0, 5 및 10 mg/ml)를 처리하여 1시간 동안 37°C 5% CO_2 incubator에서 배양한 후 DNP-HSA(10 μg/ml)를 처리하여 4시간 동안 자극시키고 ice bath에서 10분 동안 방치하여 반응을 종결시켰다. 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 IL-4와 TNF-α ELISA kit(BD Biosciences Pharmingen, USA)를 사용하여 측정하였다. Microplate reader(Molecular Devices Co. Ltd., USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 IL-4와 TNF-α의 양을 계산하였다.

8. PGE2 and cysLT secretion assay

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate(Corning, USA)에 2×10^6 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE(30 ng/ml)로 감작하고 37°C 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 배지교환 후 SB(0, 5 및 10 mg/ml)를 처리하여 1시간 동안 37°C 5% CO_2 incubator에서 배양한 후 DNP-HSA(10 μg/ml)를 처리하여 30분 동안 자극시키고 ice bath에서 10분 동안 방치하여 반응을 종결시켰다. 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 PGE2와 cysLT ELISA kit(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 측정하였다. Microplate reader(Molecular Devices Co. Ltd., USA)를 사용하여 405~420 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 PGD2와 cysLT의 양을 계산하였다.

9. RNA extraction and RT-PCR

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 6 well plate(Corning, USA)에 1×10^6 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti DNP-IgE(30 ng/ml)로 감작하고 37°C 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 새로운 DMEM배지로 교환한 후 SB를 농도별(0, 5 및 10 mg/ml)로 세포에 처리하여 1시간 동안 배양한 후 PBS로 2회 세척한 다음 DNP-HSA(10 μg/ml)을 4시간 동안 처리하여 면역반응을 유도하였다. 상층액을 제거한 후 1 ml의 TRizol을 넣고 2분간 방치한 후 chloroform을 넣고 10초간 vortexing하고 5,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합하여 흔들어 주었다. 13,000 rpm에서 25분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 DEPC(diethyl pyrocarbonate)-DW 20 μl에 녹여 -20°C에 보관하였다가 실험에 사용하였다. RT-PCR은 one-step RT-PCR PreMix kit(iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 45°C에서 30분, 94°C에서 5분간 반응시킨 후 94°C에서 30초간 denaturation시키고, 55°C에서 30초간 annealing시킨 다음, 72°C에서 1분간 extension시키는 cycle을 32회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72°C에서 5분간 PCR machine(GeneAmp, PCR system 9,700, USA)에서 수행하였다. 각 PCR products는 2% agarose gel에 loading하여 100 V 조건에서 30분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

10. 세포내 ROS(reactive oxygen species) 측정

RBL-2H3 cells는 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 96 well plate(Corning, USA)에 5×10^5 cells/ml이 되도록 분주하고 anti-DNP-IgE(30 ng/ml)로 감작한 후 37°C 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. anti-DNP-IgE(0.5 μg/ml)로 감작된 RBL-2H3 cells은 37°C에서 30분 동안 10 μM H2DCF-DA로 배양되었다. 그 후 PBS로 배지에 남아 있는 H2DCF-DA를 제거한 후 SB(0, 5 및 10 mg/ml)를 처리하여 30분 동안 배양하고 DNP-HSA(10 μg/ml)에 10분 동안 자극하였다. 그 후 얼음 위에서 반응을 정지시킨 후 490 nm(excitation)과 530 nm(emission)에서 fluorometer(SPECTRAMAX M2, Molecular Devices Co. Ltd. USA)를 사용하여 ROS에 의해 산화된 DCF의 양을 측정하였으며, 다음 식에 의해 계산하였다.

DCF oxidation(%) = (T-C)/C×100,

C : control, T : test sample

11. DPPH 라디칼 소거능 측정

항산화활성을 측정하기 위하여 DPPH 라디칼 소거활성법은 Itoh T, Umekawa H, Furuichi Y13)의 방법에 따라 수행되었다. 간략하게 설명하면 0.5 mM DPPH 라디칼 용액 0.1 ml, 99% 에탄올 0.8 ml과 SB 용액 0.1 ml의 반응 혼합물로 측정하였다. 각 용액을 잘 혼합한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군으로 Vitamin C(L-ascorbic acid)가 사용되었다. DPPH 라디칼 소거활성은 억제율로 나타내었으며, 다음 식에 의해 계산하였다.

Inhibition(%) = (C-T)/C×100,

C : control, T : test sample

12. 통계처리

成績은 SPSS 17.0K for Windows 통계 프로그램 패키지를 사용하여 평균치±표준편차로 나타내었고 유의수준은 $p<0.05$로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 one way-ANOVA와 Dunett test 검정을 실시하였다.

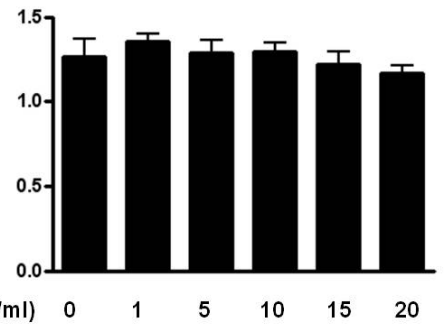

Fig. 1. Effects of SB on the cell viability and cytotoxicity of RBL-2H3 cells.
RBL-2H3 cells(5×10^4 cells/ml) were treated with the indicated concentrations(0, 1, 5, 10, 15, and 20 mg/ml) of SB for 1h. Cell viability was evaluated using a colorimetric assay based on MTT assay. Results represent as the mean±SD. The absorbance was measured at 570 mn using ELISA reader.

III. 결 과

1. 세포생존 및 증식에 미치는 영향

RBL-2H3 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 알아본 결과 SB를 처리하지 않은 세포는 1.27±0.20의 흡광도를 나타내었고, SB를 농도별(1, 5, 10, 15 및 20 mg/ml)로 처리한 세포에서 각각 1.36±0.08, 1.29±0.15, 1.30±0.10, 1.22±0.14, 및 1.17±0.09의 흡광도를 나타내어 20 mg/ml 농도 이하에서 세포생존 및 증식 데이터의 결과가 유의성이 없었으므로 독성작용이 없는 것으로 나타났다(Fig. 1).

2. Degranulation에 미치는 영향

항원-항체 반응에 의한 β-hexosaminidase 분비에 미치는 SB의 효과를 살펴본 결과 SB 5 mg/ml 농도에서 65.83±3.19%의 억제효과를 나타내었고, SB 10 mg/ml 농도에서 95.79±4.42%의 억제효과를 나타내 농도의존적으로 유의성 있는 억제효과를 나타내었다(Fig. 2A). 또한 histamine 분비에 미치

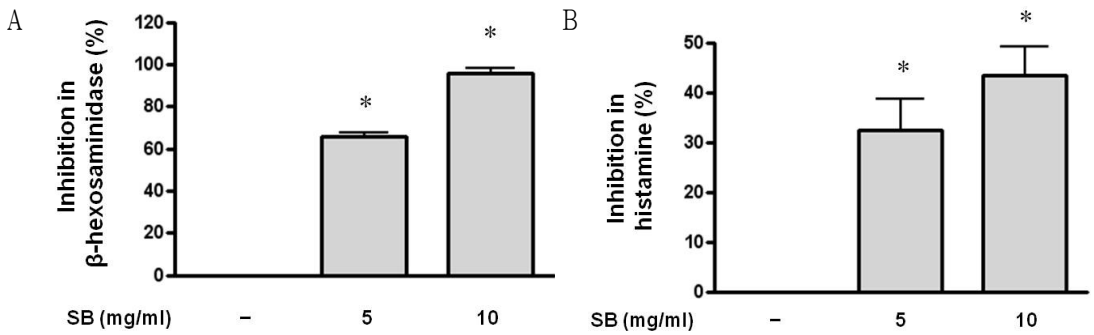

Fig. 2. Inhibition effect of SB on the markers of degranulation, β-hexosaminidase(A) and histamine(B) release from RBL-2H3.

The cells(5×10^5 cells/ml) were sensitized with IgE(30 ng/ml) overnight and treated with SB(5 and 10 mg/ml) for 1 h prior to their DNP-HSA stimulation. (A) The absorbance was measured at 405 nm with a microplate reader. (B) The fluorescence intensity was measured with excitation at 360 nm and emission at 450 nm with a fluorometer. Results represent as the mean±SD of the inhibition of β-hexosaminidase(A) and histamine(B) release. $^*p<0.05$ vs stimulated group.

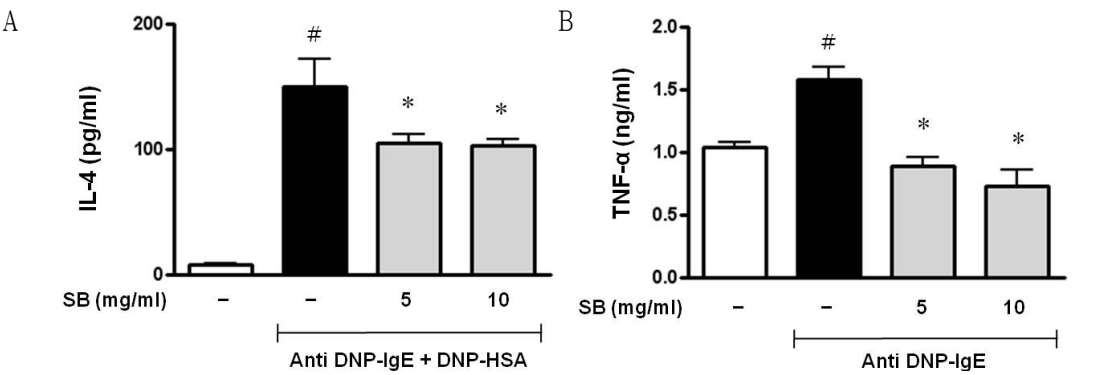

Fig. 3. Effects of SB on the production of IL-4(A) and TNF-α(B) cytokine in RBL-2H3 cells.

The cells(5×10^5 cells/ml) were sensitized with anti-DNP IgE(30 ng/ml) for 24 h and stimulated by DNP-HSA(10 μg/ml). SB(5 and 10 mg/ml) was pretreated for 1 h prior to DNP-HSA stimulation for 4 h. IL-4 and TNF-α concentration was measured from cell supernatant using ELISA method. The absorbance was measured at 450 nm with a microplate reader. Results represent as the mean±SD. $^{\#}p<0.05$ vs vehicle group, $^*p<0.05$ vs stimulated group.

는 SB의 효과를 살펴본 결과 SB 5 mg/ml 농도에서 32.49±15.38%의 억제효과를 나타내었고, SB 10 mg/ml 농도에서 43.52±13.87%의 억제효과를 나타내 농도의존적으로 유의성 있는 억제효과를 나타내었다(Fig. 2B).

3. IL-4와 TNF-α cytokine 생산에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 분비된 IL-4의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 7.62±2.38 pg/ml이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 149.80±44.53 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한($p<0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 SB를 농도별(5 and 10 mg/ml)로 처리한 세포에서 각각 104.30±

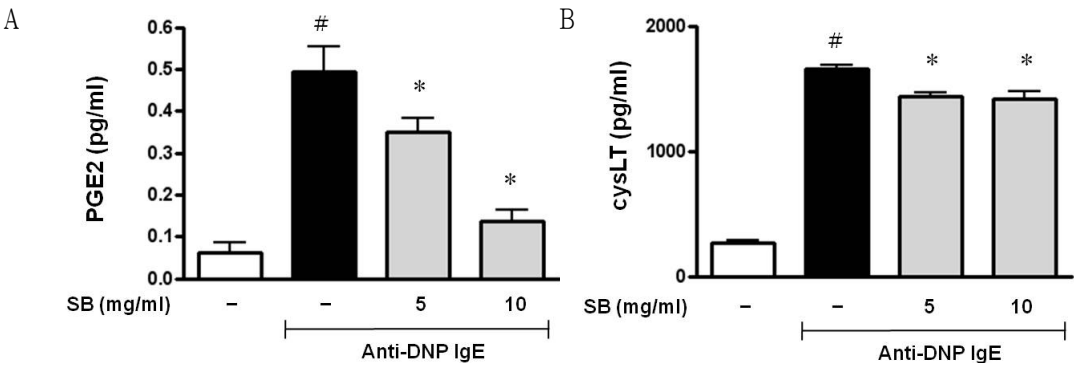

Fig. 4. Effects of SB on the production of PGE2(A) and cysLT(B) in RBL-2H3 cells.
The cells(2×10^6 cells/ml) were sensitized with anti-DNP IgE(30 ng/ml) for 24 h and stimulated by DNP-HSA(10 μg/ml). SB(5 and 10 mg/ml) was pretreated for 1 h prior to DNP-HSA stimulation for 30 min. PGE2 and cysLT concentration was measured from cell supernatant using ELISA method. The absorbance was measured at 405 nm with a microplate reader. Results represent as the mean±SD. $^{\#}p<0.05$ vs vehicle group, $^{*}p<0.05$ vs stimulated group.

15.42 pg/ml과 102.60±11.19 pg/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한($p<0.05$) 감소를 보였다(Fig. 3A). 또한 RBL-2H3 cells에서 분비된 TNF-α의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 1.04±1.06 ng/ml이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 1.58± 0.22 ng/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한($p<0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 SB를 농도별(5 and 10 mg/ml)로 처리한 세포에서 각각 0.89±0.16 ng/ml과 0.83±0.19 ng/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한($p<0.05$) 감소를 보였다(Fig. 3B).

4. PGE2와 cysLT 생산에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 분비된 PGE2의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 0.06±0.05 pg/ml이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 0.49±0.10 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한($p<0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 SB를 농도별(5 and 10 mg/ml)로 처리한 세포에서 각각 0.35±0.07 pg/ml과 0.14±0.05 pg/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한($p<0.05$) 감소를 보였다(Fig. 4A). 또한 RBL-2H3 cells에서 분비된 cysLT의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 267.20±44.69 pg/ml이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 1,658.00±50.52 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한($p<0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 SB를 농도별(5 and 10 mg/ml)로 처리한 세포에서 각각 1,432.00±64.88 pg/ml과 1,414.00±101.70 pg/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한($p<0.05$) 감소를 보였다(Fig. 4B).

5. Cytokine 유전자 발현에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 cytokine 유전자의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF-α과 GM-CSF mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, SB(5 and 10 mg/ml)를 처리한 세포에서 모든 mRNA의 발현이 현저히 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

6. Enzyme 유전자 발현에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 비만세포 과립내 L-histidine을 histamine으로 전환시키는 효소인 HDC2 유전자의 발현을 조사한 결과 항원으로 자극한 세포에서 HDC2 mRNA의 발현이 현저히 증가하였으나 SB(5 and 10 mg/ml)처리에 의해 농도의존적으로 발현이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 prostaglandin과 leukotriene 등의 지질대사물의 생산에

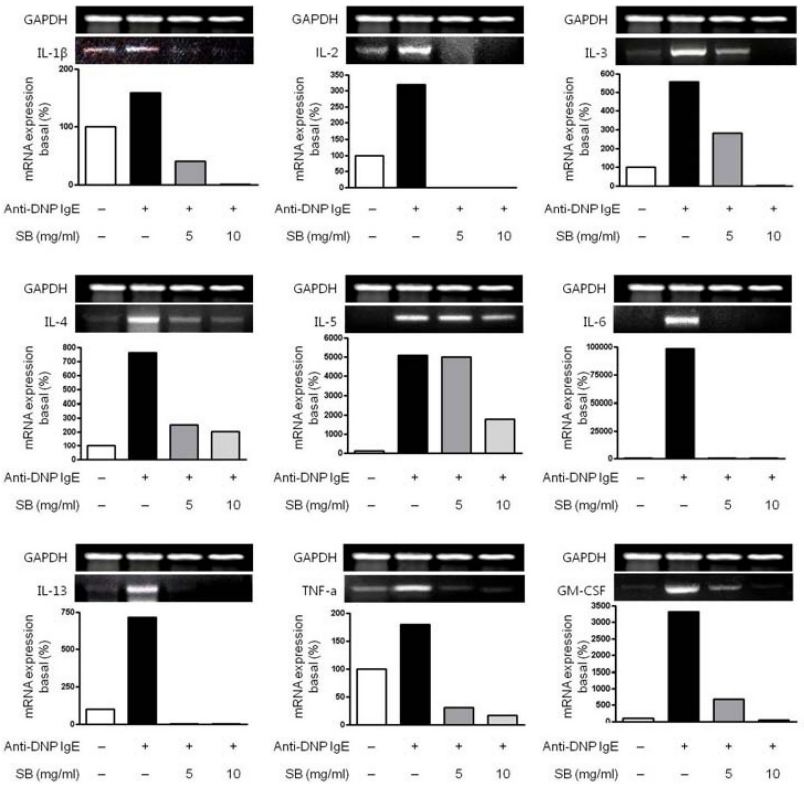

Fig. 5. Effects of SB on the expression of IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF-α and GM-CSF mRNA in the anti-DNP IgE-sensitized RBL-2H3.
Detection of cytokines secretion was examined by RT-PCR analysis. GAPDH was used as internal control genes.

관여하는 염증성 enzyme 유전자의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 COX-1, COX-2, 5-LOX와 iNOS mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, SB(5 and 10 mg/ml)를 처리한 세포에서 mRNA의 발현이 농도의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6).

7. 세포내 ROS(reactive oxygen species) 생산에 미치는 영향

세포내 ROS의 양은 H2DCF-DA fluorescent probe(Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA)를 사용하여 측정하였다. H2DCF-DA는 ROS 측정에 특이적인 세포에 침투가 가능한 형광 탐촉자이다. 형광을 띠지 않는 H2DCF-DA는 세포내 에스테르 활성에 의해 디아세틸화되고 ROS에 의한 세포내 산화를 통해 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)로 형광을 띠게 된다. RBL-2H3 cells에서의 세포내 ROS의 생산에 미치는 영향에 대해 조사한 결과, anti-DNP IgE와 DNP-HSA로 항원-항체 면역반응을 유도한 세포에서 시간에 따라 ROS 생산이 증가하였으며, SB(0, 5 and 10 mg/ml)을 처리한 세포에서 농도의존적으로 세포내 DCF 산화를 감소시켜 ROS의 생산이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 7).

8. DPPH 라디칼 소거활성

DPPH 라디칼 소거활성에 대해 조사한 결과, vitamin C에서 5, 10 and 15 mg/ml의 농도에서 각각 80.73%, 81.07%와 81.05%의 소거활성을 나타내었고, 반면 SB는 5, 10 and 15 mg/ml의 농도에서 각각 31.10%, 19.29%와 3.24%의 소거활성을 나타내어 농도가 증가할수록 free radical 소거활성이 감소함을 보였다(Fig. 8).

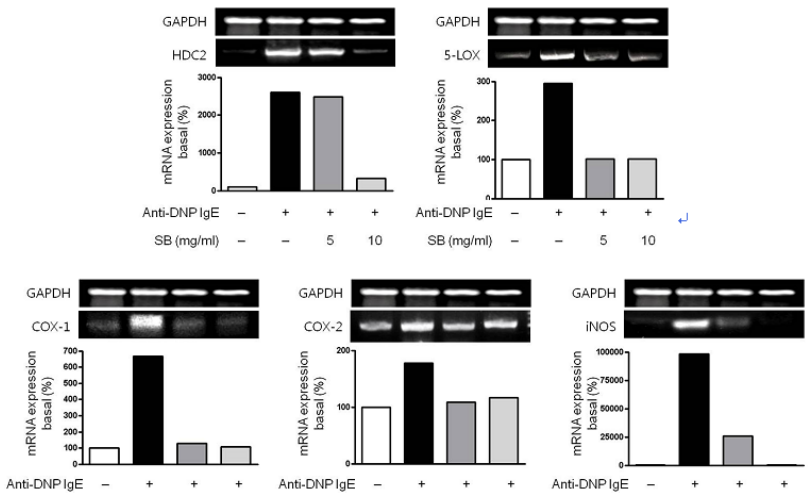

Fig. 6. Effects of SB on the expression of HDC2, COX-1, COX-2, 5-LOX and iNOS mRNA in the anti-DNP IgE-sensitized RBL-2H3.
Detection of cytokines secretion was examined by RT-PCR analysis. GAPDH was used as internal control genes.

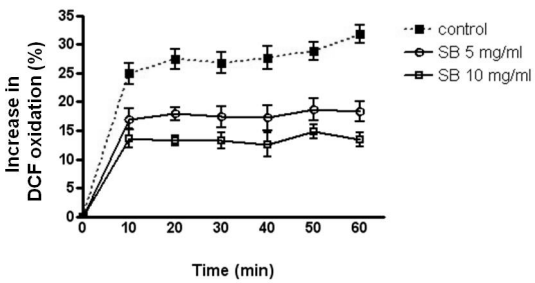

Fig. 7. Effects of SB on FcεRI-triggered ROS production in RBL-2H3 cells.
IgE-sensitized RBL-2H3 cells were pre-incubated with SB(5 and 10 mg/ml) and 10 μM of H2DCF-DA for 30 min, washed twice with PBS, and resuspended in Siraganian buffer. H2DCF-DA-loaded cells were stimulated with DNP-HSA(10 μg/ml) for 10 min, and ROS-mediated DCF oxidation was measured with excitation at 490 nm and emission at 530 nm with a fluorometer. The data are expressed as the percent increase in DCF oxidation above the unstimulated controls.

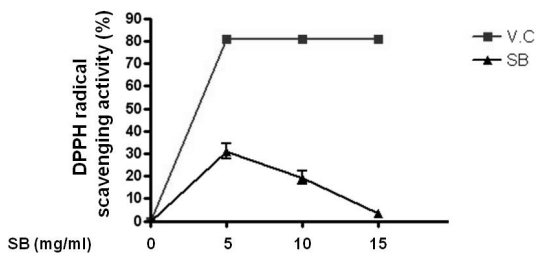

Fig. 8. DPPH radical scavenging activity of SB.
The reaction mixture contained 0.1 ml of 1 mM DPPH radical solution, 0.8 ml of 99% ethanol, and 0.1 ml of SB. The scavenging capacity was measured by monitoring the decrease in absorbance at 517 nm. All data are expressed as % inhibition of the inhibition of DPPH radical. Inhibition(%)=(C-T)/C×100, C : control, T : test sample.

Ⅳ. 고 찰

알레르기란 항원에 대한 면역반응이 정상적이 아닌 필요 이상의 면역반응이 일어나는 패턴을 말한다. 과민한 면역응답을 보이는 것을 과민증이라고 하는데, 과민한 면역응답은 바로 필요 이상의 면역반응을 보이는 것이므로, 과민증은 알레르기와 거의 같은 의미로 간주되고 있다[14].

알레르기의 대표적인 3대 질환은 아토피, 비염, 천식이다. 이외에도 두드러기 등 원인을 알 수 없는 특발성 질환도 알레르기 범주에 속한다. 피부에 과민반응을 보일 때는 아토피, 코 점막에 과민반응을 보일 때는 비염, 기관지 점막에 과민반응을 보일 때는 천식으로 나타난다[15].

제I형 알레르기는 비만세포의 막표면에 있는 IgE 항체에 항원이 결합되어, 세포에서 histamine, leukotriene을 비롯한 화학전달물질이 유리된다. 항원은 꽃가루이거나, 집먼지 진드기가 되기도 한다. 정상적인 사람은 꽃가루나 집먼지 진드기에 과민반응을 일으키지 않으나, 제I형 알레르기인 사람은

과민반응을 보인다. 항원이 체내에 재차 들어오면 이들 세포와 결합한 IgE는 항원과 특이적으로 결합하여 receptor의 변화를 일으키고 마침내 탈과립을 일으킨다. 이 화학적 매개물질들은 혈관투과성 항진, 평활근수축, 점액분비항진을 일으키고 특유의 제I형 알레르기 질환을 유발한다. 제I형 알레르기는 항원과 접촉해서 증상이 발현하기까지의 시간이 짧기 때문에 즉시형 알레르기 또는 anaphylaxis형 알레르기라고 한다. Anaphylaxis에는 전신성과 국소성이 있는데 전자는 항원 주입 후 수분만에 호흡곤란, 전신성 경련 등의 쇼크증상을 일으키고 결국에는 사망하게 되며, 후자는 항원주사 부위에 발적, 종창 등을 일으킨다[14,16].

비만세포(mast cell)는 1879년 독일의 Paul Ehrlich가 개구리의 mesentery에서 toluidine blue나 alcine blue와 같은 aniline계 염기성색소에 특이적인 이염성을 나타내는 과립들을 가지고 있는 세포를 발견하고 과립이 세포질 내로 포식된 것으로 생각하여 Mastzellen이라는 용어를 사용한 것에서 유래한다. 지금은 비만세포의 과립이 포식의 결과가 아니라 그 속에 많은 생물학적 유효물질을 포함하는 많은 기능을 가지고 있는 중요 면역세포로 인식되고 있다.

비만세포는 생체 내에 고르게 분포되어 한 사람이 약 1,012개의 비만세포를 가지고 있고, 골수에 존재하는 progenitor cell로부터 기원하며, 세포핵 내에 50~200개 정도의 많은 과립이 있고, 외부 환경과 접촉이 많은 부위에서 다량의 비만세포가 발견된다. 사람에게서 비만세포는 폐의 폐포 주위, 비강점막, 결막, 장관점막 등의 상피층과 결합하고 있어 기생충의 침입 등에 대한 최초 방어선의 역할을 하고 있지만 한편으로는 진드기와 같은 allergen과 상호 작용하여 알레르기를 일으키는 원인이 되기도 한다. 비만세포로부터 여러 종류의 cytokine이 발견됨으로써 알레르기 염증 반응의 작용 기전과 치료에 많은 영향을 끼쳤다[17].

항체의 본체는 immunoglobulin이라고 하는 단백질이고, IgE, IgA, IgG, IgM, IgD의 다섯 종류가 있으며, 알레르기의 대부분은 IgE에 의하여 일어난다. 몸의 조직 중 비만세포는 장기 등을 형성하지 않고 각각 단독으로 존재한다. 비만세포나 호염기구는 그 표면에 붙은 항원과 반응하면 탈과립이라고 하는 현상을 일으킨다. 과립 속에는 histamine을 비롯한 화학물질이 가득 차 있다. Histamine과 leukotriene을 비롯한 화학전달물질은 IgE 항체에 알레르겐이 결합했을 때에 비만세포로부터 방출된다. Histamine, leukotriene은 기도수축, 모세혈관투과성 항진, 모세혈관 확장, 기도점액분비 항진 등의 공통된 생리작용을 가진다[14,18].

Cytokine이란 우리 몸에서 면역 반응이나 염증반응이 일어날 때 세포에서 분비되는 단백활성물질로, 세포간의 정보전달에 관여한다. 알레르기 반응이 일어나면 여러 종류의 세포들이 분화, 증식과 성장, 활성화, 화학적 매개물질들의 분비 및 유입으로 염증 반응을 일으키며, 이때 여러 종류의 cytokine이 직접, 간접적으로 관여하게 된다. Cytokine에는 몇 종류가 있어, interleukin, interferon, tumor necrosis factor, colony stimulating factor, growth factor 등이 cytokine에 포함된다. 그들은, 또 몇 개의 subclass로 분류된다. 면역반응에서는 세포들끼리 cytokine이라는 명령서를 이용하여, 흥분시키거나 억제시키는 작용을 하고 있다. Interleukin은 IL-18까지 보고되어 있고, 생물활성은 복잡하다[14,17].

半枝蓮은 脣形科 黃芩屬의 植物 半枝蓮을 기원으로 하며, 全草로 藥에 넣어 쓴다[4]. 중국의 江蘇, 廣西, 廣東, 四川, 河北, 山西, 陝西, 湖北, 安徽, 江西, 浙江, 福建, 貴州, 雲南, 河南 등지에 분포하고, 臺灣에서도 자생한다. 吐血, 鼻出血, 血淋, 赤痢, 黃疸, 咽喉痛, 肺癰, 疔瘡, 瘰癧, 瘡毒, 癌腫瘍, 打撲傷, 칼에 베인 傷處, 毒蛇에 물린 咬傷 등을 치료한다. 南京民間藥草에서 破血通經하고, 廣西藥植圖誌에서 消痰, 散瘀, 止血. 治打撲傷, 血痢하며, 南寧市藥物誌에서 消腫, 止痛. 治打撲, 刀傷, 瘡瘍하고, 泉州本草에서 淸熱, 解毒, 祛風, 散血, 行氣, 裏水, 通絡, 破瘀, 止痛. 內服主血淋, 吐血, 衄血, 外用治毒蛇咬傷, 癰疽, 疔瘡, 無名腫毒하며, 廣州民間 常用中草藥手册에서 淸熱解毒, 治蘭尾炎, 肝炎하고, 成都 常用草藥治療手册에서 治食道癌, 胃癌, 子宮癌이라고 하였다[3].

중국에서 半枝蓮은 전통적으로 간, 폐, 직장암의 치료에 사용되었으며[19], 최근 연구에서 半枝蓮은

항바이러스, 항박테리아 효과를 나타내는 것으로 보고되었다[20,21].

藥鍼療法은 韓醫學的 기본이론을 토대로 經絡, 穴位의 치료작용을 激發시키고 근대의학중의 약물의 약리작용과 주사방법을 결합하여 형성된 일종의 독특한 요법이다. 약물이 經絡系統을 따라 病所에 直達하게 되고, 이로 인하여 穴位와 약물의 치료효과가 더욱 증강된다[22].

藥鍼療法은 효과가 빠르고 용량이 정확하며 약물이 위장관에서 파괴되는 것을 방지할 수 있고, 內服하기 힘든 환자에게 사용할 수 있는 장점이 있어, 내과, 외과, 부인과, 소아과, 오관과 등 그 임상 응용범위가 확대되고 있다[23,24].

半枝蓮을 이용한 실험적 연구는 항암치료 분야에서 난소암 및 자궁암 세포 성장 억제효과, HeLa cell의 증식억제와 사멸에 미치는 영향, 항암활성에 관한 연구 등이 검토되었고, 半枝蓮·大蒜·白花蛇舌草 複合藥鍼이 腫瘍 및 免疫反應에 미치는 영향에 대한 연구, 半枝蓮 抽出物이 lipopolysaccharide에 의해 활성화된 대식세포에 미치는 영향에 대한 연구 등[7-12]이 있다.

이에 저자는 세포 탈과립과 염증매개물질 분비억제에 대한 半枝蓮 藥鍼 抽出物의 활용가능성을 살펴보고 응용범위를 넓히기 위해 SB가 RBL-2H3 세포생존 및 증식에 미치는 영향, degranulation에 미치는 영향, IL-4와 TNF-α cytokine 생산에 미치는 영향, PGE2와 cysLT 생산에 미치는 영향, cytokine 유전자 발현에 미치는 영향, enzyme 유전자 발현에 미치는 영향, 세포내 ROS 생산에 미치는 영향, DPPH 라디칼 소거활성을 살펴보았다.

세포생존 및 증식에 미치는 영향에서 RBL-2H3 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 알아본 결과 SB를 농도별로 처리한 세포는 20 mg/ml 농도 이하에서 세포생존 및 증식 데이터의 결과가 유의성이 없었으므로 독성작용이 없는 것으로 나타났다(Fig. 1).

β-hexosaminidase는 비만세포의 분비과립에 저장되어 있다가, 비만세포가 면역학적으로 활성화될 때 histamine과 함께 부수적으로 분비되므로 β-hexosaminidase의 활성화는 비만세포 탈과립의 표지인자로서 사용된다[25].

Degranulation에 미치는 영향에서 항원-항체 반응에 의한 β-hexosaminidase 분비에 미치는 SB의 효과를 살펴본 결과 SB는 농도의존적으로 유의성 있는 억제효과를 나타내었고(Fig. 2A), 또한 histamine 분비에 미치는 SB의 효과를 살펴본 결과 SB는 농도의존적으로 유의성 있는 억제효과를 나타내었다(Fig. 2B).

IL-4는 제I형 알레르기 반응의 매개체인 IgE와 비만세포 매개성 면역반응의 조절자로 IL-4의 증가는 알레르기의 발생에 중추적인 것으로 알려져 있다[26]. TNF-α는 전구염증인자로서 비만세포와 대식세포 등에서 생성되어 많은 염증반응을 유발하는 인자로 알려져 있으며, 비만세포에서 유리된 TNF-α는 국소의 혈관내피세포에 작용하여 국소 알레르기 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다[27].

IL-4와 TNF-α cytokine 생산에 미치는 영향에서 RBL-2H3 cells에서 분비된 IL-4의 양은 SB를 농도별로 처리한 세포에서 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한($p<0.05$) 감소를 보였다(Fig. 3A). 또한 RBL-2H3 cells에서 분비된 TNF-α의 양은 SB를 농도별로 처리한 세포에서 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한($p<0.05$) 감소를 보였다(Fig. 3B).

PGE2와 cysLT는 prostaglandin과 leukotriene의 대표적 염증매개물질 중 하나로, 비만세포에서 방출되는 화학전달물질로서 histamine, serotonin, proteoglycan 등과 함께 방출되며, cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase 및 여러 가지 cytokines에 의해 활성화된다[28].

PGE2와 cysLT 생산에 미치는 영향에서 RBL-2H3 cells에서 분비된 PGE2의 양은 SB를 농도별로 처리한 세포에서 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한($p<0.05$) 감소를 보였다(Fig. 4A). 또한 RBL- 2H3 cells에서 분비된 cysLT의 양은 SB를 농도별로 처리한 세포에서 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한($p<0.05$) 감소를 보였다(Fig. 4B).

비만세포가 활성화되어 세포막 인지질 유래 전구물질인 arachidonic acid로부터 다양한 염증효과를 나타내는 지질 유래 매개물질이 만들어지는데, 이는 cyclooxygenase 활성을 거쳐 prostaglandin을 생성하는 경로와 lipoxygenase 활성을 거쳐 leuko-

triene을 생성하는 경로로 크게 나누어진다[29]. 또한 지질 매개물과 함께 Th2의 후기반응을 지속시키는 IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 및 GM-CSF와 같은 추가적인 cytokine들도 새로이 전사, 합성 및 분비된다[30].

Cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 보면 RBL-2H3 cells에서 cytokine 유전자의 발현에 대해 조사한 결과, 항원으로 자극한 세포는 IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF-α과 GM-CSF mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, SB를 처리한 세포는 모든 mRNA의 발현이 현저히 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

HDC는 히스티딘 탈카르복시화 효소로 히스티딘에서 히스타민을 생성하는 반응을 촉매한다. 히스타민의 합성은 비만세포 자극 후 HDC mRNA의 발현 증가와 관련된다[31].

Cyclooxygenase(COX) family는 prostacyclin과 thromboxane 뿐만 아니라 PGs의 형성에 역할을 담당하고 있다. COX는 arachidonic acid를 PGs로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2로 존재하는데 COX-2의 억제는 염증과 통증의 증상을 감소할 수 있고[32], 5-LOX는 몇몇 알레르기와 피부 염증 질환에 관련한다고 알려져 있다[33].

적절한 NO의 생산은 평활근 이완, 혈소판 억제, 신경전달, 면역조절과 혈관 확장에 필요하지만 지속적인 NO의 생산은 관절염, 기관지염, 위염, 다발성 경화증과 같은 염증성 질환을 포함하는 병리적 상황과 관련된다. NO는 척추동물에서 NO synthase(NOS)에 의해 생산되는데, endothelial NOS와 neuronal NOS는 지속적으로 발현되는 반면 inducible NOS(iNOS)는 주로 자극된 macrophages에 의해 생산되어 NO의 염증 조건을 제공한다. 과도한 NO 생산이 세포독성, 염증, 암 발생, 자가면역질환들을 초래할 수 있다는 점에서 NO 생산과 iNOS 발현의 억제가 염증질환을 예방할 수 있다[34,35].

Enzyme 유전자 발현에 미치는 영향을 보면 RBL-2H3 cells에서 비만세포 과립내 L-histidine을 histamine으로 전환시키는 효소인 HDC2 유전자의 발현을 조사한 결과, 항원으로 자극한 세포는 HDC2 mRNA의 발현이 현저히 증가하였으나 SB 처리에 의해 농도의존적으로 발현이 감소하는 것으로 나타났고, prostaglandin과 leukotriene 등의 지질대사물의 생산에 관여하는 염증성 enzyme 유전자의 발현에 대해 조사한 결과, 항원으로 자극한 세포에서 COX-1, COX-2, 5-LOX와 iNOS mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, SB를 처리한 세포에서 mRNA의 발현이 농도의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6).

산화스트레스의 증가는 알레르기 염증에 중요한 역할을 한다. 5-Lipoxygenase는 비만세포에서의 ROS 생산과 관련된 주된 효소이고, 생산된 ROS는 세포 degranulation과 cytokine 분비를 촉진시켜 알레르기가 유발된다[36,37].

항산화 활성은 ROS와 DPPH 소거활성의 측정을 통해서 조사하였다. 세포내 ROS의 생산에 미치는 영향에서 anti-DNP IgE와 DNP-HSA로 항원-항체 면역반응을 유도한 세포는 시간에 따라 ROS 생산이 증가하였으며, SB를 처리한 세포에서 농도의존적으로 세포내 DCF 산화를 감소시켜 ROS의 생산이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 7).

DPPH 소거활성의 측정에서 vitamin C와 SB를 비교하여 볼 때 SB의 농도가 증가할수록 free radical 소거활성이 감소함을 보이는데(Fig. 8), 이러한 결과로 유추할 때 SB에 의한 세포내 ROS 생산의 억제는 radical scavenging activties에 기인한 것이 아니고 다른 기전이 관여하는 것으로 생각된다.

이상을 종합해서 보면 半枝蓮 藥鍼 抽出物은 MTT assay에서 세포생존 및 증식에 영향을 미치지 않았고, β-hexosaminidase release assay와 histamine release assay에서 탈과립을 유의성 있게 억제시켰으며, IL-4와 TNF-α secretion assay에서 IL-4와 TNF-α의 생산을 유의성 있게 억제시켰고, PGE2와 cysLT secretion assay에서 PGE2와 cysLT의 생산을 유의성 있게 억제시켰으며, RNA extraction and RT-PCR에서 cytokine 및 enzyme mRNA의 발현량을 유의성 있게 억제시켰고, 세포내 ROS 측정에서 세포내 DCF 산화를 감소시켜 ROS의 생산을 감소시켰음을 알 수 있었다.

이상의 실험 결과를 총괄해서 볼 때, 半枝蓮 藥鍼 抽出物이 RBL-2H3 세포 탈과립과 염증매개물질의 분비를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났으므로, 제I형 알르레기 반응을 유의하게 억제하는

효과가 있는 것으로 생각된다.

V. 결 론

RBL-2H3 세포를 이용하여 半枝蓮 藥鍼 抽出物이 제I형 알레르기 반응에 미치는 영향을 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 半枝蓮 藥鍼 抽出物은 세포생존 및 증식에 영향을 미치지 않았다.
2. 半枝蓮 藥鍼 抽出物은 β-hexosaminidase와 histamine의 분비를 억제시켰다.
3. 半枝蓮 藥鍼 抽出物은 IL-4와 TNF-α의 생산을 억제시켰다.
4. 半枝蓮 藥鍼 抽出物은 PGE2와 cysLT의 생산을 억제시켰다.
5. 半枝蓮 藥鍼 抽出物은 cytokine 및 enzyme mRNA의 발현량을 억제시켰다.
6. 半枝蓮 藥鍼 抽出物은 세포내 ROS의 생산을 억제시켰다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 半枝蓮 藥鍼 抽出物은 세포 탈과립과 염증매개물질 분비 억제효과가 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

This work was supported by Dong-Eui University Foundation Grant(No. 2011AA114).

참고문헌

1. Jung KM. Allergy and oriental medicine. Seoul : Jeilro. 1993 : 15, 59.
2. Clough J, Hong CS. Allergies. Seoul : Academya, 2005 : 7.
3. Kim CM, Shin Mk, An DK, Lee KS. The encyclopedia of oriental herbal medicine. Seoul : Jungdam. 2004 : 1502-4.
4. Jeongukjoongchoyakhoipyeonpyeonsajo. Joongchoyakhoipyeon. Beijing : People's Medical Publishing House Cooperation, 1996 : 228-9.
5. Korean pharmacopuncture institute. Pharmacopuncture therapy treatment guidelines. Seoul : Hansunginswae. 1999 : 13.
6. Korean pharmacopuncture institute scholarship committee, Pharmacopuncture medicine laboratory. Pharmacopuncturology. 2nd ed. Seoul : Elsevierkorea. 2011 : 5.
7. Seo JW, Lee TK, Park WH, Kim CH, Kim DI. A study on inhibitory effects of the *Scutellaria barbata* Don water-extracts on the growth of human ovarian carcinoma cells. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 1999 : 151-60.
8. Lee YJ, Lee TK, Kim JK, Kim CH, Kim DI. A study on inhibitory effect of the *Scutellaria barbata* Don water-extracts on the growth of uterine cervical cancer. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 1999 : 185-96.
9. Ha JY, Cho JH, Jang JB, Lee KS. Inhibitory effects of *Scutellaria barbata* D. Don on the cell proliferation of HeLa cells. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2006 : 47-60.
10. Yoon JW, Lee TK, Kim DI. A study of anti-cancer activity of the Scutellaria bardata D. Don. water-extracts. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2005 : 26- 39.
11. Song HS, Hwang HS, Kim KH. Effect of Scutellariae barbatae herba·Alli bulbus·Oldenlandiae herba Complex herbal acupuncture on tumor and immune response. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibusion Society. 2002 : 56-73.
12. Shen T, Lee YJ, Cho JY. Effect of hot water extract from *Scutellaria barbata* on the macrophages activated by lipopolysaccharide. Korean Journal Medicinal Crop Sciences. 2008 : 313-9.

13. Itoh T, Umekawa H, Furuichi Y. Potential ability of hot water adzuki(Vigna angularis) extracts to inhibit the adhesion, invasion, and metastasis of murine B16 melanoma cells. Bioscience Biotechnology, and Biochemistry. 2005; 69(3): 448-54.
14. Hong CS. Steps to internal medicine, immune & allergy disease. Seoul : Jungdam. 2002 : 10-2, 43-4, 46.
15. Cho YJ. Allergy revolution. Seoul : Realmedi. 2007 : 12.
16. Moon HJ, Kwon HH. Basic immunology. Seoul : Daehakseorim. 1992 : 134-5.
17. Shin TY. Allergy & herbal medicine. Seoul : Shinilsangsa. 2001 : 15-6, 61.
18. Cho IW. Allergic diseases are cured by herbal medicine. Seoul : Hansungsa. 1999 : 29-33.
19. Wong BY, Lau BH, Jia TY, Wan CP. Oldenlandia diffusa and *Scutellaria barbata* augment macrophage oxidative burst and inhibit tumor growth. Cancer Biotheraphy & RadiopharMaceuticals. 1996 ; 11(1) : 51-6.
20. Guo SS, Shi YJ, Gao YJ, Su D, Cui XL. The cytology mechanism of anti-parainfluenza virus infection of total flavone of Scutellaria barbata. Yao Xue Xue Bao Acta Pharmaceutica Sinica. 2009 ; 44(12) : 1348-52.
21. Sato Y, Suzaki S, Nishikawa T, Kihara M, Shibata H, Higuti T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin- resistant Staphylococcus aureus. J Ethnopharmacol. 2000 ; 72(3) : 483-8.
22. Korean pharmacopuncture institute. Pharmacopuncture and clinical applications. Seoul : Korean Pharmacopuncture Institute. 1997 : 3.
23. Lee MH. Pharmacopuncture therapy. Seoul : Iljoongsa. 1999 : 17.
24. Department of acupuncture & moxibusion, meridian & acupuncture, college of national oriental medicine. The acupuncture and moxibustion. Seoul : Jibmoondang. 1991 : 483.
25. Mastuda H, Morikawa T, Ueda K, Managi H, Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-induced degranulation, TNF-alpha and IL-4 production from RBL-2H3 cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2002 ; 10(10): 3123-8.
26. Iikura M, Yamaguchi M, Hirai K, Miyamasu M, Yamada H, Nakajima T, et al. Regulation of surface FcepsilonRI expression on human eosinophils by IL-4 and IgE. International Achives of Allergy & Immunology. 2001 ; 124(4) : 470-7.
27. Govan A, Macfarlane P, Callander R, Lee JD. Pathology illustrated. 2nd ed. Seoul : Koryeohwahak. 1991 : 29.
28. Li X, Lu Y, Yang JH, Jin Y, Hwang SL, Chang HW. Natural vanadium-containing Jeju groundwater inhibits immunoglobulin E-mediated anaphylactic reaction and suppresses eicosanoid generation and degranulation in bone marrow derived-mast cells. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 2012 ; 35(2) : 216-22.
29. Taketomi Y, Murakami M. Lipid networks in mast cell biology. Yakugaku Zasshi. 2011 ; 131(1) : 73-84.
30. Deo SS, Mistry KJ, Kakade AM, Niphadkar PV. Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. Lung India. 2010 ; 27(2) : 66-71.
31. Shin BK, Lee EH, Kim HM. Suppression of L-histidine decarboxylase mRNA expression by methyleugenol. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1997 ; 232(1) : 188-91.
32. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT,

Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, et al. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994 ; 91(8) : 3228-32.
33. Kwon OS, Choi JS, Islam MN, Kim YS, Kim HP. Inhibition of 5-lipoxygenase and skin inflammation by the aerial parts of Artemisia capillaris and its constituents. Archives of Pharmacal Research. 2011 ; 34(9) : 1561-9.
34. Kim KW, Ha KT, Park CS, Jin UH, Chang HW, Lee IS, et al. Polygonum cuspidatum, compared with baicalin and berberine, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions in RAW 264.7 macrophages. Vascular Pharmacology. 2007 ; 47(2-3) : 99-107.
35. Förstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 1995 ; 352(4) : 351-64.
36. Matsui T, Suzuki Y, Yamashita K, Yoshimaru T, Suzuki-Karasaki M, Hayakawa S, et al. Diphenyleneiodonium prevents reactive oxygen species generation, tyrosine phosphorylation, and histamine release in RBL-2H3 mast cells. Biochemical and BiophySical Research Communications. 2000 ; 276(2) : 742-8.
37. Swindle EJ, Coleman JW, DeLeo FR, Metcalfe DD. FcεRI- and Fcγ receptor-mediated production of reactive oxygen species by mast cells is lipoxygenase- and cyclooxygenase-dependent and NADPH oxidase-independent. Journal of Immunology. 2007 ; 179(10) : 7059-71.