

## 쥐 비만세포 (RBL-2H3)와 OVA/alum 감작 마우스에서 치자 추출물의 알레르기 염증 억제 효과

김경리 · 이진화 · 김은진 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

### Abstract

#### The Effects of *Gardenia jasminoides* J.Ellis on Allergic Inflammation in RBL-2H3 Mast Cells and OVA/alum-sensitized Mice

Kim Kyeong Ri · Lee Jin Hwa · Kim Eun Jin · Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Korean medicine, Dajeon University

#### Objectives

The purpose of this study is to investigate the effects of *Gardenia jasminoides for. grandiflora* extracts' (GAJ) anti-inflammatory effect on RBL-2H3 mast cells and OVA/alum-sensitized mice.

#### Methods

In this study, IL-4 and IL-13 production was measured via ELISA analysis, and mRNA expressions of GM-CSF, IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$ , IL-6 were analyzed by real-time PCR. In addition, MAPKs and NF- $\kappa$ B p65 transcription factors were examined using western blotting, and ELISA was used to understand IgE, IL-4, and IL-13 production in ovalbumin-allergic mice in *in vitro* study.

#### Results

As a result of this study,

1. GAJ were observed to suppress the mRNA expression of GM-CSF, IL-4, IL-13, IL-5, TNF- $\alpha$ , IL-6 in comparison to PMA 50 ng/ml, ionomycin 0.5  $\mu$ M (PI) control group.
2. GAJ also inhibited the IL-4, IL-13 production in comparison to PI control group.
3. Western blot analysis showed decrease on the expression of mast-cell-specific transcription factors, including MAPKs (ERK, JNK, p38) and NF- $\kappa$ B p65.
4. Orally-administered GAJ group in OVA/alum induced Balb/c mice showed decreased level of OVA-specific IgE in the serum. This group also has shown decreased the level of IL-4, IL-13 in the splenocyte culture supernatant.

#### Conclusions

Obtained results suggest that GAJ may regulate the allergic inflammation by transcription factors MAPKs (ERK, JNK, p38) and NF- $\kappa$ B p65 causing inhibition of Th2 cytokines in mast cells and OVA/alum-sensitized mice.

**Key words:** *Gardenia jasminoides for. grandiflora* extracts (梔子), RBL-2H3 mast cell, OVA/alum-sensitized mice, Th2 cytokines, Balb/c mice, Allergic inflammation

## I. Introduction

梔子 (*Gardenia jasminoides for. grandiflora*)는 꼭두서니과 (Rubiaceae)에 속하는 梔子나무 (*Gardenia jasminoides* Ellis)의 열매로 三焦 (上焦, 中焦, 下焦)의 火熱을 瀉하고 涼血止血調經, 淸肝하는 약재로서 淸熱瀉火藥으로 분류되고 性味는 苦寒<sup>1)</sup>하다. 또한 해열작용, 이뇨작용, 담즙분비 촉진작용, 소염작용 및 항염, 항산화<sup>2)</sup>, 항균, 항바이러스<sup>3)</sup>, 항불안<sup>4)</sup> 등을 나타내어 황달, 간질환을 비롯한 충혈, 출혈 등의 소염 치료에 임상적으로 사용되어 왔다<sup>5)</sup>. 최근에는 梔子 엑기스 및 분말을 사용한 피부 외용제 제품 개발 및 연구가 진행되어 여러 제품이 소염 치료제로 허가되어 판매되고 있다<sup>6)</sup>.

아토피성 질환은 제 1형 과민반응에 속하는 알레르기 질환으로 대표적으로 두드러기, 아토피 피부염, 천식, 알레르기 비염, 아나필락시스 등이 있다. 이 질환들은 표적기관에 염증이 발생하고 이로 인한 과반응 증상이 나타나 임상적으로 유사한 증상이 재발하며 만성화하는 특징이 있다<sup>7)</sup>. 조사에 따르면 국내의 알레르기성 질환의 유병율은 증가하는 추세이며 이 질환은 증상이 반복되고 만성화 되는 경향으로 긴 시간 치료가 필요하여 환자의 삶의 질을 저하시키고 있다<sup>8)</sup>.

아토피, 알레르기 질환의 원인은 아직 정확히 밝혀지지 않았으나 환경 요인, 유전 요인, 환경 요인, 외부 항원에 대한 면역 요인 등이 복합적으로 연관된다고 알려져 있다<sup>9)</sup>. 알레르기의 4가지 분류 중 아토피 질환은 제 1형 즉시형 과민반응으로 그 전형적인 경과 특징은 IgE 항체의 생산과 Th2 세포의 활성화이다<sup>10)</sup>. 특히 급성 아토피 피부염은 면역학 적으로 IgE 증가, 호산구 증가, T 세포면역 반응 중 TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-13, IL-16, IL-10, L-3, IL-5, IL-4 등의 cytokine을 분비하는 Th2 반응의 우세가 핵심 요인으로 보고되어 있다<sup>11,12)</sup>.

기존에 아토피 질환에서 梔子의 항염 효과는 대식세포 cytokine에 미치는 영향에 대한 연구<sup>13)</sup>와 梔子의 조절 T 세포에 미치는 영향을 통한 항알레르기 염증반응에 대한 보고<sup>14)</sup>가 있었으나 Th2 cytokine 염증매개 물질의 일부만을 확인하였고 항염 및 항알레르기 억제 신호전달 기전에 대한 연구는 찾아보기 어려웠다.

이에 저자는 梔子 추출물의 RBL-2H3 비만세포에서 다양한 Th2 cytokine 활성 억제를 확인하고, 그 기전을 알아보기 위하여 cytokine 유전자의 발현에 연관된 신

호전달 물질 활성화에 대하여 알아보았다. 梔子 추출물을 RBL-2H3 비만세포에 처리하여 Real-Time PCR을 통해 Th2 cytokine GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-5, IL-4, IL-6 유전자 발현에 미치는 효과를 분석하였고 ELISA를 통해 IL-4, IL-13 단백질 생성 억제 효과를 분석하였다. 또한 Th2 cytokine 발현 억제 기전을 알아보기 위하여 western blot으로 MAKPs (ERK, JNK, p38), NF- $\kappa$ B p65 전사인자 단백질 발현 억제를 관찰하였으며 OVA/alum에 의해 감작된 생쥐에서 OVA-specific IgE와 IL-4, IL-13의 생성 억제를 분석하여 유의미한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## II. Materials and Methods

### 1. 재료

#### 1) 시약 및 기기

##### (1) 시약

Ethyl alcohol, Methyl alcohol은 Merck Millipore사 (U.S.A.)에서, Minimal essential medium (MEM), Fetal bovine serum (FBS), Trypsin-EDTA, Antibiotics (penicillin, streptomycin)는 Gibco-BRL사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, ovalbumin (OVA), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Collagenase A, DNase type I, Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Ionomycin, Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Diethyl pyrocarbonate (DEPC), Chloroform, Isopropanol, Ethanol, Nonidet P-40, RPMI-1640 배양액, Ethidium bromide (EtBr), Polyacrylamide, magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>), ovalbumin, aluminium hydroxide (Al(OH)<sub>3</sub>)는 Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였다. Trizol은 Ambion사 (U.S.A.) 제품을, EZ-Cytox kit는 Daeil Lab. co. (Korea) 제품을, Deoxynucleoside triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사 (Japan) 제품을, Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, RNAzolB는 Tel-Test사 (U.S.A.) 제품을, primary antibody (pERK 1/2, ERK 1/2, pp38, p38, pJNK, JNK, NF- $\kappa$ B p65)는 Santa-Cruz사 (U.S.A.) 제품을 사용하였다. ECL-Hybond film은 Amersham사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, SYBR master mix는 Applied Biosystems사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, IL-4, IL-13 ELISA kit는

R&D system사 (U.S.A) 제품을 사용하였고, OVA-IgE ELISA kit는 CHONDREX사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

(2) 기기

기기는 열탕추출기 (대웅, DWT-1800T, Korea), 감압 증류장치 (Rotary vacuum evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), CO<sub>2</sub> 배양기 (Forma scientific Co., U.S.A.), 원심분리기 (한일과학, Korea), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Bio-freezer (Sanyo, Japan), quantitative Real-Time PCR (Applied Biosystems, U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A.)를 사용하였다.

2) 동물

수컷 6주령의 21 g Balb/c 생쥐는 중앙실험동물(주)에서 공급받았다. 동물은 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2 °C, 습도 55 ± 15%, 12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다 (동물실험 승인번호 DJUAR2017-020).

3) 세포 배양 및 약물분리

(1) 세포 배양

본 실험에 사용된 RBL-2H3 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구매하였으며 minimal essential medium (MEM)에 15% fetal bovine serum (FBS)과 penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml을 첨가하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

(2) 시료조제

본 실험에 사용한 梔子 (*Gardenia jasminoids for. grandiflora*) 시료는 ○○대학교 △△ 한방병원 약제과에서 구입 정선하여 사용하였다.

(3) 梔子 추출물 분리

梔子 500 g에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 梔子 추출물 (이하 GAJ)을 냉동 보관 (-84 °C)한 후에 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) *In vitro* 실험

(1) 세포독성 측정

① RBL-2H3 세포주 배양

생쥐의 RBL-2H3 비만세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구매하였으며, 세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

② 세포독성 측정

세포독성 측정방법은 EZ-Cytox assay<sup>15)</sup>을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. RBL-2H3 비만세포는 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 배양한 후 GAJ (농도 50, 100, 200, 400, 800 µg/ml)를 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 6시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 µl씩 3개의 well에 가하고 실험 종료 시까지 배양하였다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, U.S.A)에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA LEADER (molecular devices, U.S.A)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 과정을 2번 반복하여 6개의 well의 평균 값을 구하였다.

(2) Real-Time PCR

RBL-2H3 cell을 6-well plate에 2.5×10<sup>5</sup> cells/ml로 2 ml씩 분주하고 무처리한 군을 정상군 (Only cells), 24시간 동안 PMA 50 ng/ml와 ionomycin 0.5 µM (이하 PI)만으로 자극한 것을 대조군 (PI-CTL)으로 사용하였다. 3시간 후 GAJ (100, 50 µg/ml)와 Cyclosporin A (이하 CsA) 10 µg/ml를 처리하고 1시간 후에 PI로 자극한 뒤 6시간 후에 세포를 얻어 GAJ로 처리한 것을 실험군 (PI+GAJ\_100,50), CsA로 처리한 것을 양성대조군 (PI+CsA\_10)으로 하였다.

그 세포에 Trizol (Ambion) 시약을 1 ml 넣고 eppendorf tube에 넣은 후 Chloroform을 100 µl 넣었다. 얼음에 17분 동안 두고 13,000 rpm 으로 15분 동안 원심분리 하였다. 층이 분리되면 eppendorf tube에 상층액을 옮겨 담고, 동량으로 Isopropanol을 넣어 얼음에 10분 정도 두었다가 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하였다. 이 때 상층액은 버리고 80% Ethanol로 세척한 후 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 완전히 제거하고 투명해질 때까지 말린 후 DEPC water로 cell의 양에 따라 20~30 µl를 넣어 녹였다.

원심분리기로 액을 모아서 75 °C로 데워진 전기가

열장치 (BARNSTEAD)에 5분 동안 두었다가 얼음으로 재빨리 옮겼다. 일부는 RNA를 정량하고 나머지는 만들어 놓은 cDNA cocktail에 정량한 양을 계산해서 넣고 37 °C에서 1시간 동안 두고 95 °C로 데워진 전기가열 장치에 5분 동안 두었다가 얼음으로 옮겨서 cDNA를 합성하였다. IL-4, IL-13,  $\beta$ -actin primer를 적정 농도로 각각 희석하여 넣고 Sybr Green (Bio-rad)과 cDNA를 넣은 후 Real-time PCR (Corbett research)을 95 °C 3분 실행 후 95 °C 15초, 60 °C 15초, 72 °C 20초로 40회 실행시켰다 (Table 1).

Table 1. Rat Primer Sequence for Real-Time PCR Analysis

Target gene	Primer	Sequences
rat IL-6	Forward	5'-ACCCAGAGCGTATCATCCTTCAC-3'
	Reverse	5'-TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC-3'
rat TNF- $\alpha$	Forward	5'-AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC-3'
	Reverse	5'-TCTGCTTGGTGGTTTGTCTACGAC-3'
rat IL-13	Forward	5'-CAGTTGCAATGCCATCCACA -3'
	Reverse	5'-AGCCACATCCGAGGCCITT-3'
rat IL-4	Forward	5'-ACCTTGCTGTACCCCTGTTCTGC-3'
	Reverse	5'-GTTGTGAGCGTGGACTCATTCACG-3'
rat IL-5	Forward	5'-TGCTTCTGTGCTTGAACGTTCTAAC-3'
	Reverse	5'-TTCCTTTTTGTCCGTCAATGTATTTTC-3'
rat GM-CSF	Forward	5'-GGCCCTGGAAGCATGTAGAT-3'
	Reverse	5'-GGTAGTGGCTGGCTATCATG-3'
rat $\beta$ -actin	Forward	5'-AAGTCCCTCACCCCTCCAAAAG-3'
	Reverse	5'-AAGCAATGCTGTACCTTCCC-3'

### (3) ELISA 측정

RBL-2H3 cell을 48-well plate에  $4 \times 10^5$  cells/ml로 250  $\mu$ l씩 분주하고 무처리한 군을 정상군 (Only cells)으로, 24시간 동안 배양한 다음 PI만으로 자극한 군을 대조군 (PI\_CTL)으로 하였다. 3시간 후 대조군에 GAJ (100, 200, 400  $\mu$ g/ml)와 CsA 10  $\mu$ g/ml로 각 well에 처리하고 1시간 후에 PI로 자극한 뒤 16시간 후에 상층액을 얻었다. GAJ로 처리한 것을 실험군 (PI+GAJ\_100, 200, 400), CsA로 처리한 것을 양성대조군 (PI+CsA)으로 하였다.

Rat IL-4, IL-13 ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 코팅 antibody를 microwell에 100  $\mu$ l씩 분주하고 4 °C에서 16시간 두었다. 각 well을 wash buffer로 세척하고 Assay diluent를 200  $\mu$ l씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상층액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상층액을 100  $\mu$ l씩 넣었다. 2시간 동안 well

을 막은 후 실온에서 배양하였다. Microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였고, microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. Stop solution을 각 well에 50  $\mu$ l씩 넣고 microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 측정하였다.

### 4) MAKPs의 인산화 수준과 전사인자 NF- $\kappa$ B p65 translocation 확인

RBL-2H3 cell을 100 $\times$ 20 mm plate에  $4 \times 10^5$ /ml로 10 ml씩 분주하고 무처리한 군을 정상군 (Only cells)으로, 24시간 동안 배양한 다음 PI로 자극한 군을 대조군 (PI\_CTL)으로 하였다. 그리고 CsA 10  $\mu$ g/ml와 GAJ (50, 100  $\mu$ g/ml)로 처리하고 1시간 후에 PI로 자극한 뒤 6시간 후에 차가운 PBS로 세척한 후 scraper로 세포를 얻고 원심분리 하여 상층액을 버린 후 각각 양성대조군 (PI+CsA)과 실험군 (PI+GAJ 50, 100)으로 하였다.

세포의 whole cell lysate를 lysis buffer (RIPA buffer 980  $\mu$ l + protease inhibitor cocktail lysis solution (100 $\times$ ) 10  $\mu$ l + PMSF (100 mM) 10  $\mu$ l) 1000  $\mu$ l로 얼음에서 15~20분간 배양한 후 상층액을 얻었다. 그리고 nuclear extract kit를 사용하여 hypotonic buffer를 넣고 얼음에서 15분간 배양한 후 원심분리 하여 상층액 (cytoplasmic fraction)을 모았다. Tube에 남아있는 핵에 Complete Lysis buffer를 넣고 30초 동안 얼음에서 배양한 후 원심분리 하여 상층액 (nuclear fraction)을 얻었다. 얻은 단백질은 BCA 단백질 정량법으로 정량하였다. 10% SDS page gel을 만들어서 running buffer를 채운 뒤 20분 동안 pre-running시키고 그 사이에 단백질을 loading buffer로 희석하고 끓는 물에 5분 동안 끓여서 단백질이 꼬인 것을 풀어주었다. Gel의 첫 번째 빈칸은 띄우고 두 번째 칸에 단백질 마커를 넣고 그 다음 칸부터 샘플을 넣어 120 V로 내렸다. 다 내린 Gel을 크기에 맞게 자르고 20분 동안 transfer buffer에 담가 놓고, 그 사이에 membrane을 Gel의 크기에 맞게 자르고 transfer buffer에 미리 담가 두었다. Transfer buffer로 가득 채우고 뜨거워지지 않게 얼음을 넣은 후 150 V로 90분 동안 membrane으로 이동시켰다. Membrane을 크기에 맞게 자르고 5% skin milk (TBS/T buffer)로 1시간 동안 blocking 해주었다. primary antibody (pERK 1/2, ERK 1/2, pp38, p38, pJNK, JNK, NF- $\kappa$ B p65)로 4 °C에서

하루를 반응시키고 다음날 secondary antibody를 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 암실에서 ECL Detection 용액을 사용하여 필름에 옮기고 현상용액에 담가 현상하고 고정액에 고정시켜 건조시켰다. 결과에 대한 밴드 밀도 (band densities)는 beta-actin, YY-1과 비교하여 Image-Rab densitometer를 사용하여 측정 분석하였다.

2) *Ex vivo* 실험

(1) OVA-specific IgE 측정

알레르기 과민반응은 IgE에 의해 매개되며 한약재 추출물이 Th2 cytokine IL-4와 IL-13을 억제하는 것으로 나타남에 따라 GAJ가 Th1/Th2 cytokine 평형조절을 통하여 OVA-specific IgE 생성을 억제할 수 있는지를 관찰하고자 하였다. 6주령의 Balb/c 수컷에 50 µg ovalbumin을 200 µg Al(OH)<sub>3</sub> (이하 OVA/alum)에 흡착하여 Balb/c 수컷 (n=5)에 0, 2, 6, 10, 13주에 복강주사하여 IgE 생성을 유도하였다. OVA/alum 주사 후 24시간 후부터 매일 11시에 GAJ 200 mg/kg을 경구 투여 하였다. 각 군은 6주령의 Balb/c 수컷 무처리군 (Nr, n=5), OVA/alum 주사만 처리한 대조군 (OVA\_CTL, n=5), OVA/alum 주사 후 GAJ를 투여한 실험군 (OVA\_GAJ, n=5)으로 분류하였다. 2주와 14주에 각 군에서 혈액 중 OVA-specific IgE를 ELISA로 측정하였다.

(2) Th2 cytokine IL-3, IL-13 측정

OVA/alum을 복강주사하고 GAJ를 투여한 Balb/c 수컷을 13주 후 각각의 생쥐에서 비장세포를 분리하여 96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well 분주하고 OVA/alum을 10 µg/ml 농도로 처리하였다. 48시간 후 배양 상층액에서 IL-4와 IL-13의 생산량을 ELISA로 측정 분석하였다. 13주간 무 처리 Balb/c 수컷의 비장세포 군 (Only cells) 과 13주간 무 처리 후 분리한 비장세포에 OVA/alum coating 처리한 군 (Nr), 13주간 OVA/alum으로 자극 후 비장세포를 분리 배양하여 OVA/alum coating 재 자극을 한 대조군 (OVA-CTL), 13주 동안 OVA/alum의 자극과 GAJ 투여 후 분리 배양한 비장세포에 OVA/alum coating 한 실험군 (OVA-GAJ)으로 분류하였다.

3. 통계처리

각 실험군 결과값은 mean ± standard deviation (SD)으로 나타내었으며, 동물실험에서는 SPSS 11.0 software (IBM-SPSS Inc., Chicago, IL)를 이용하여 일원배치 분산

분석 (One-way analysis of variance; ANOVA) 후에 Duncan's multiple comparison tests로 유의성을 검증하였고, 세포실험에서는 독립표본 T-검정 (Independent samples T-test)을 이용하여 유의성을 검증하였다. P 값이 0.05, 0.01 혹은 0.001 보다 작은 경우를 구분하여 분석하였으며, 각 경우에 해당 시 통계적으로 유의적 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. Results

1. *In vitro*

1) 세포독성 측정

GAJ의 세포독성을 측정된 결과 대조군에 비하여 50, 100, 200, 400, 800 µg/ml의 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1).

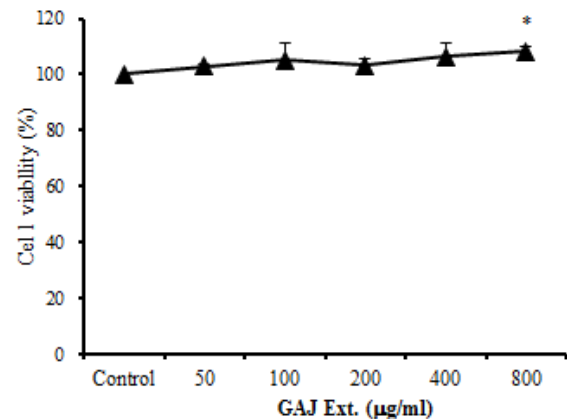


Fig. 1. Cytotoxic effects of GAJ on RBL-2H3 mast cells

RBL-2H3 cells were pretreated with various concentration GAJ. The results are expressed the mean ± S.E. (n=6). Statistically significant value compared with control group data by T-test. \*P<0.05 versus the control group.

Abbreviation. GAJ; *Gardenia jasminoides for. grandiflora* extracts

2) Real-Time PCR analysis

GAJ가 비만세포에서 GM-CSF mRNA, IL-4 mRNA, IL-13 mRNA, IL-5 mRNA, TNF-α mRNA, IL-6 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, RBL-2H3 cell에 GAJ (50, 100 µg/ml)를 처리한 후 PI로 자극한 뒤 6시간 후 Real-Time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석하였다.

(1) GM-CSF mRNA 유전자 발현

GM-CSF mRNA 유전자 발현은 정상군은  $0.440 \pm 0.115$  이었고, PI만으로 자극한 대조군은  $0.938 \pm 0.063$  로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가하였다. 양성대조군인 CsA처리군은  $0.312 \pm 0.084$  로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 억제하였다. GAJ 처리 후 PI로 자극한 실험군의 GM-CSF mRNA 유전자 발현은  $100 \mu\text{g/ml}$ 에서는  $0.598 \pm 0.090$  으로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.01$ ) 억제하였으며  $50 \mu\text{g/ml}$ 에서는  $0.847 \pm 0.150$  로 억제되었으나 유의성은 없었다 (Fig. 2).

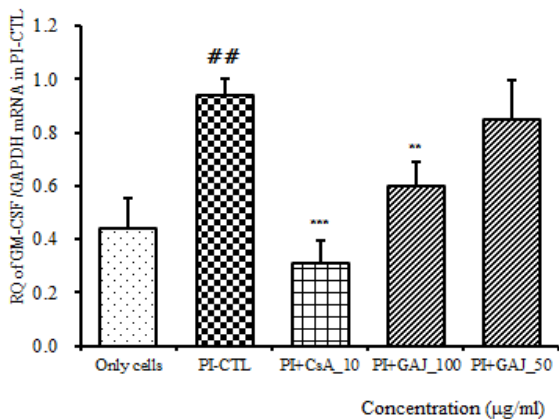


Fig. 2. Suppressive effects of GAJ on GM-CSF mRNA expression

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) or GAJ ( $100, 50 \mu\text{g/ml}$ ) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. The expression of GM-CSF mRNA was analyzed by real-time PCR. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M ( $n=6$ ). ## $P < 0.001$  versus the normal group; \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  versus the PI-CTL group. Abbreviations: Only cells; normal group, CTL; control, CsA; cyclosporine A, GAJ; *Gardenia jasminoides* for. *grandiflora* extracts

(2) IL-4 mRNA 유전자 발현

IL-4 mRNA 유전자 발현은 정상군은  $0.585 \pm 0.138$  이었고, PI만으로 자극한 대조군은  $1.113 \pm 0.113$  로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가하였다. 양성대조군인 CsA처리군은  $0.513 \pm 0.113$  로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.01$ ) 억제하였다. GAJ 처리 후 PI로 자극한 실험군의 IL-4 mRNA 유전자 발현은  $100 \mu\text{g/ml}$ 에서는  $0.691 \pm 0.094$  으로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.01$ ) 억제하였으며  $50 \mu\text{g/ml}$ 에서는  $0.956 \pm 0.069$  로 억제되었으나 유의성은 없었다 (Fig. 3).

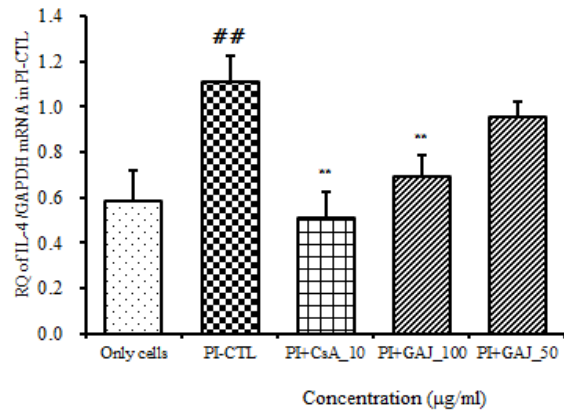


Fig. 3. Suppressive effects of GAJ on IL-4 mRNA expression

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) or GAJ ( $100, 50 \mu\text{g/ml}$ ) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. The expression of IL-4 mRNA was analyzed by real-time PCR. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M ( $n=6$ ). ## $P < 0.001$  versus the normal group; \*\* $P < 0.01$  versus the PI-CTL group. Abbreviations same as Fig. 2.

(3) IL-13 mRNA 유전자 발현

IL-13 유전자 발현은 정상군은  $0.371 \pm 0.045$  이었고, PI만으로 자극한 대조군은  $0.959 \pm 0.041$  로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가하였다. 양성대조군인 CsA처리군은  $0.312 \pm 0.084$  로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 억제하였다. GAJ 처리 후 PI로 자극한 실험군의 IL-13 유전자 발현은  $100 \mu\text{g/ml}$ 에서는  $0.603 \pm 0.036$  으로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 억제하였으며  $50 \mu\text{g/ml}$ 에서는  $0.847 \pm 0.075$  로 억제되었으나 유의성은 없었다 (Fig. 4).

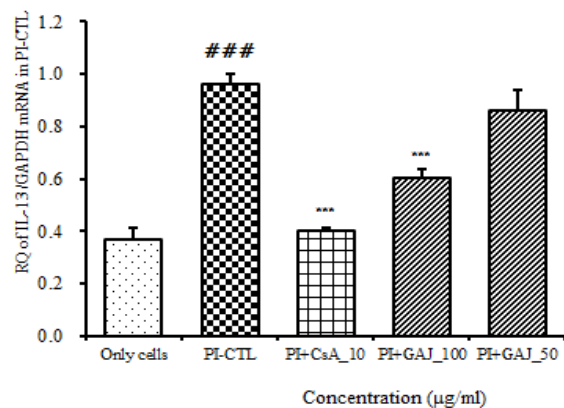


Fig. 4. Suppressive effects of GAJ on IL-13 mRNA expression

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) or GAJ ( $100, 50 \mu\text{g/ml}$ ) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. The expression of IL-13 mRNA was analyzed by real-time PCR. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M ( $n=6$ ). ### $P < 0.0001$  versus the normal group; \*\*\* $P < 0.001$  versus the PI-CTL group. Abbreviations same as Fig. 2.

(4) IL-5 mRNA 유전자 발현

IL-5 유전자 발현은 정상군은  $0.162 \pm 0.054$  이었고, PI만으로 자극한 대조군은  $0.939 \pm 0.062$  로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가하였다. 양성대조군인 CsA 처리군은  $0.221 \pm 0.106$  로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 억제하였다. GAJ 처리 후 PI로 자극한 실험군의 IL-5 유전자 발현은  $100 \mu\text{g/ml}$ 에서는  $0.471 \pm 0.056$  으로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 억제하였으며  $50 \mu\text{g/ml}$ 에서는  $0.718 \pm 0.031$  로 유의성 있게 ( $p < 0.01$ ) 억제하였다 (Fig. 5).

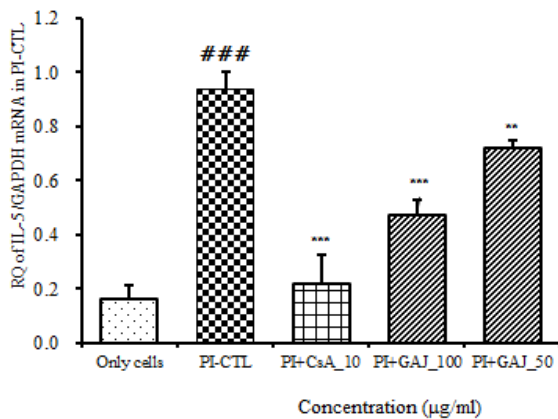


Fig. 5. Suppressive effects of GAJ on IL-5 mRNA expression

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) or GAJ ( $100, 50 \mu\text{g/ml}$ ) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. The expression of IL-5 mRNA was analyzed by real-time PCR. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M ( $n=6$ ).  $###P < 0.0001$  versus the normal group;  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$  versus the PI-CTL group. Abbreviations same as Fig. 2.

(5) TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현

TNF- $\alpha$  유전자 발현은 정상군은  $0.303 \pm 0.145$  이었고, PI만으로 자극한 대조군은  $0.929 \pm 0.072$  로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가하였다. 양성대조군인 CsA 처리군은  $0.596 \pm 0.115$  로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.05$ ) 억제하였다. GAJ 처리 후 PI로 자극한 실험군의 TNF- $\alpha$  유전자 발현은  $100 \mu\text{g/ml}$ 에서는  $0.711 \pm 0.076$  으로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.05$ ) 억제하였으며  $50 \mu\text{g/ml}$ 에서는  $0.888 \pm 0.020$  로 억제하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 6).

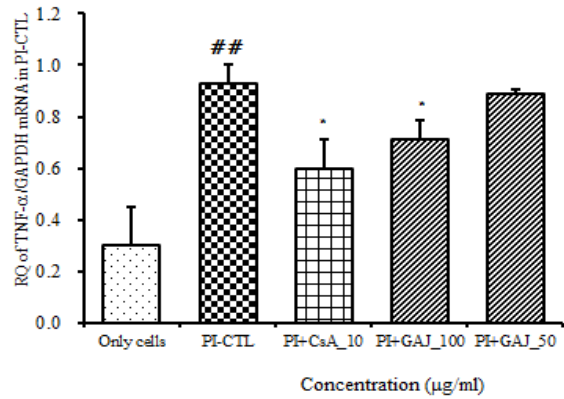


Fig. 6. Suppressive effects of GAJ on TNF- $\alpha$  mRNA expression

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) or GAJ ( $100, 50 \mu\text{g/ml}$ ) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. The expression of TNF- $\alpha$  mRNA was analyzed by real-time PCR. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M ( $n=6$ ).  $###P < 0.001$  versus the normal group;  $*P < 0.05$  versus the PI-CTL group. Abbreviations same as Fig. 2.

(6) IL-6 mRNA 유전자 발현

IL-6 유전자 발현은 정상군은  $0.200 \pm 0.055$  이었고, PI만으로 자극한 대조군은  $1.144 \pm 0.144$  로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가하였다. 양성대조군인 CsA 처리군은  $0.311 \pm 0.034$  로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 억제하였다. GAJ 처리 후 PI로 자극한 실험군의 IL-6 유전자 발현은  $100 \mu\text{g/ml}$ 에서는  $0.556 \pm 0.118$  으로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.01$ ) 억제하였으며  $50 \mu\text{g/ml}$ 에서는  $0.838 \pm 0.070$  로 유의성 있게 ( $p < 0.05$ ) 억제하였다 (Fig. 7).

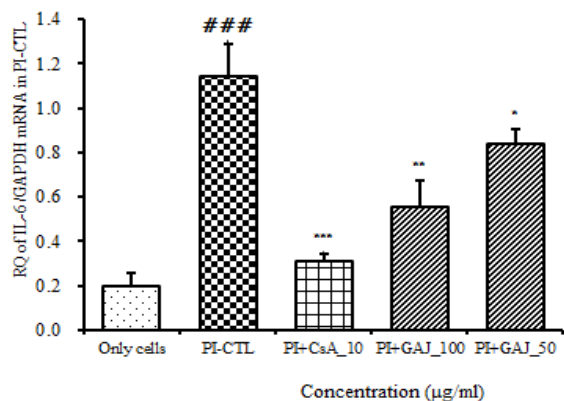


Fig. 7. Suppressive effects of GAJ on IL-6 mRNA expression

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) or GAJ ( $100, 50 \mu\text{g/ml}$ ) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. The expression of IL-6 mRNA was analyzed by real-time PCR. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M ( $n=6$ ).  $###P < 0.0001$  versus the normal group;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$  versus the PI-CTL group. Abbreviations same as Fig. 2.



3) ELISA analysis

GAJ가 비만세포에서 IL-4, IL-13 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 RBL-2H3 cell에 100, 200, 400 µg/ml 농도의 GAJ를 처리하고 PI로 자극한 뒤 16시간 후 ELISA로 IL-4, IL-13 생성량을 측정하였다.

(1) IL-4 단백질 생성

IL-4 생산량은 정상군은 188.9 ± 14.27 pg/ml 이었고, 대조군은 358.6 ± 50.66 pg/ml으로 정상군에 비해 증가하였다. 양성대조군은 196.3 ± 21.47 pg/ml 으로 대조군에 비하여 억제되었다 (p<0.01). 실험군의 IL-4 생산량은 100 µg/ml에서는 296.5 ± 20.16 pg/ml으로 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.05) 억제하였고 200 µg/ml에서는 192.5 ± 13.44 pg/ml으로 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.01) 억제하였고, 400 µg/ml에서는 163.4 ± 10.88 pg/ml으로 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.05) 억제하였다 (Fig. 8).

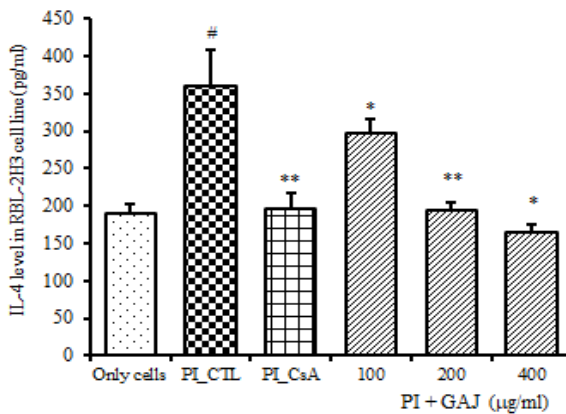


Fig. 8. Suppressive effects of GAJ on IL-4 production

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or GAJ (100, 200, 400 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 24 hours. IL-4 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Values are expressed as mean ± S.E.M (n=6). #P<0.005 versus the normal group; \*P<0.05 and \*\*P<0.01 versus the PI-CTL group. Abbreviations same as Fig. 2.

(2) IL-13 단백질 생성

IL-13 생산량은 정상군은 510.3 ± 51.53 pg/ml 이었고, 대조군은 868.9 ± 103.19 pg/ml으로 정상군에 비해 증가하였다. 양성대조군은 496.8 ± 50.04 pg/ml으로 대조군에 비하여 억제되었다 (p<0.05). 실험군의 IL-4 생산량은 100 µg/ml에서는 698.8 ± 44.38 pg/ml으로 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.05) 억제하였고 200 µg/ml에서는 586.0 ± 55.42 pg/ml으로 대조군에 비하여

유의성 있게 (p<0.05) 억제하였고, 400 µg/ml에서는 403.0 ± 60.45 pg/ml으로 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.05) 억제하였다 (Fig. 9).

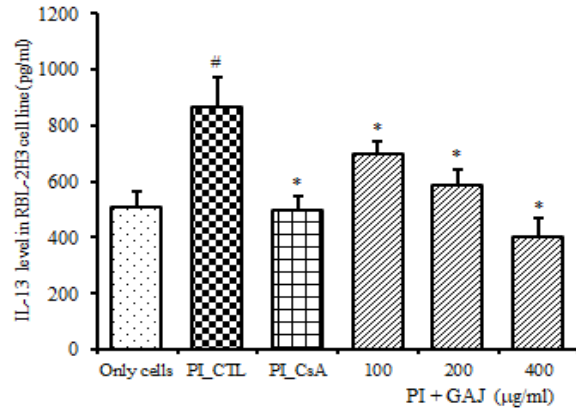


Fig. 9. Suppressive effects of GAJ on IL-13 production

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or GAJ (100, 200, 400 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 24 hours. IL-13 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Values are expressed as mean ± S.E.M (n=6). #P<0.005 versus the normal group; \*P<0.05 versus the PI-CTL group. Abbreviations same as Fig. 2.

4) Western blot analysis

GAJ가 비만세포에서 MAPKs와 NF-κB p65 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, RBL-2H3 세포에 PI로 자극한 뒤 CsA와 100 µg/ml, 50 µg/ml 농도의 GAJ를 처리한 후 6시간 후 western blot으로 ERK1/2, p38, JNK, NF-κB p65의 단백질 발현을 측정하였다.

(1) ERK 인산화 신호전달 기전

pERK 단백질 발현을 ERK 전사인자와 비교하여 분석하였다. pERK 단백질 발현은 정상군에서 pERK/ERK fold induction (이하 FI)이 1로 나타났고 (Fig. 10, pERK band lane 1), 대조군에서 3.47로 정상군에 비하여 증가하였으며 (Fig. 10, pERK band lane 2), 양성대조군의 FI는 1.55로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 10, pERK band lane 3). 실험군의 GAJ 100 µg/ml에서 FI는 2.55로 대조군에 비하여 pERK 단백질 발현이 억제되었다 (Fig. 10, pERK band lane 4). 실험군의 GAJ 50 µg/ml에서 FI는 3.20로 대조군에 비하여 pERK 단백질 발현이 억제되었다 (Fig. 10, pERK band lane 5).

(2) p38 인산화 신호전달 기전

pp38 단백질 발현을 p38 전사인자와 비교하여 분석하였다. pp38 단백질 발현은 정상군에서 pp38/p38 FI



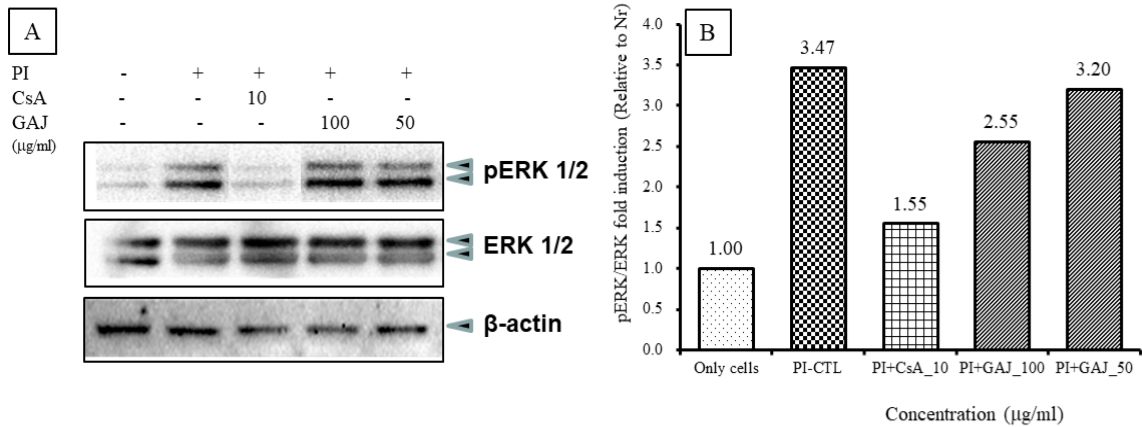


Fig. 10. Effects of GAJ on ERK phosphorylation in PI-induced RBL-2H3 mast cells

RBL-2H3 mast cells were treated with GAJ for 1 h, then treated with PI [PMA (50 ng/ml) and ionomycin (0.5 μM)] for 0.5 h. (A) The phosphorylation levels of ERK1/2 were analyzed by western blot. β-actin were used as internal controls for the nuclear proteins, and (B) relative amounts of each protein were determined by Image J. **Abbreviations.** Only cells; only RBL-2H3 mast cells, CTL; control, CsA; cyclosporine A, GAJ; *Gardenia jasminoides for. grandiflora* extracts, MAPK/ERK; mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases

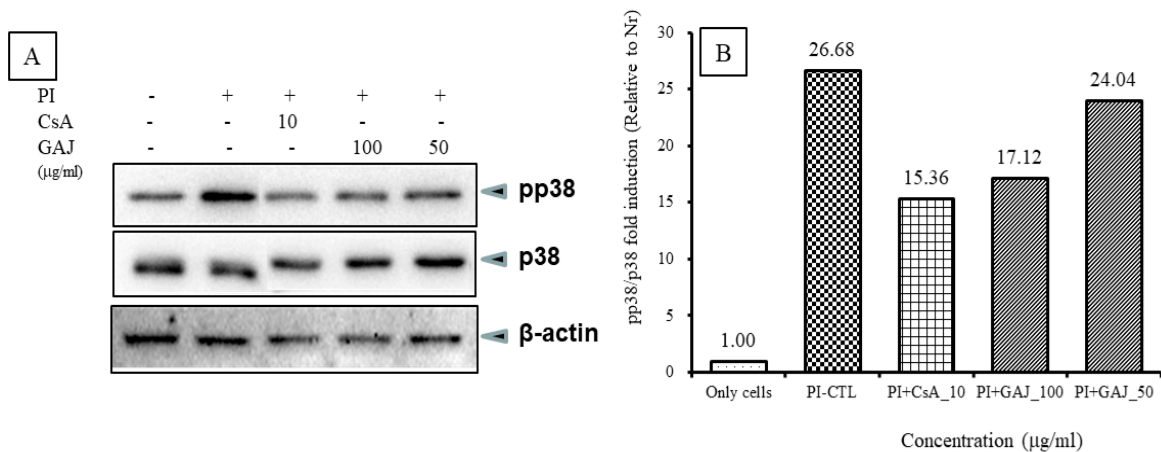


Fig. 11. Effects of GAJ on p38 phosphorylation in PI-induced RBL-2H3 mast cells

RBL-2H3 mast cells were treated with GAJ for 1 h, then treated with PI [PMA (50 ng/ml) and ionomycin (0.5 μM)] for 0.5 h. (A) The phosphorylation levels of p38 were analyzed by western blot. β-actin were used as internal controls for the nuclear proteins, and (B) relative amounts of each protein were determined by Image J. **Abbreviations.** Only cells; only RBL-2H3 mast cells, CTL; control, CsA; cyclosporine A, GAJ; *Gardenia jasminoides for. grandiflora* extracts

가 1로 나타났고 (Fig. 11, pp38 band lane 1), 대조군에서 26.68로 정상군에 비하여 증가하였으며 (Fig. 11, pp38 band lane 2), 양성대조군의 FI는 15.36로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 11, pp38 band lane 3). 실험군의 GAJ 100 μg/ml에서 FI는 17.12로 대조군에 비하여 pp38 단백질 발현이 억제되었다 (Fig. 11, pp38 band lane 4). 실험군의 GAJ 50 μg/ml에서 FI는 24.04로 대조군에 비하여 pp38 단백질 발현이 억제되었다 (Fig. 11, pp38 band lane 5).

### (3) JNK 인산화 신호전달 기전

pJNK 단백질 발현을 JNK 전사인자와 비교하여 분석하였다. pJNK 단백질 발현은 정상군에서 pJNK/JNK FI가 1로 나타났고 (Fig. 12, pJNK band lane 1), 대조군에서 34.18로 정상군에 비하여 증가하였으며 (Fig. 12, pJNK band lane 2), 양성대조군의 FI는 14.70로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 12, pJNK band lane 3). 실험군의 GAJ 100 μg/ml에서 FI는 15.54로 대조군에 비하여 pJNK 단백질 발현이 억제되었다 (Fig. 12, pJNK band lane 4). 실험군의 GAJ 50 μg/ml에서 FI는 21.30

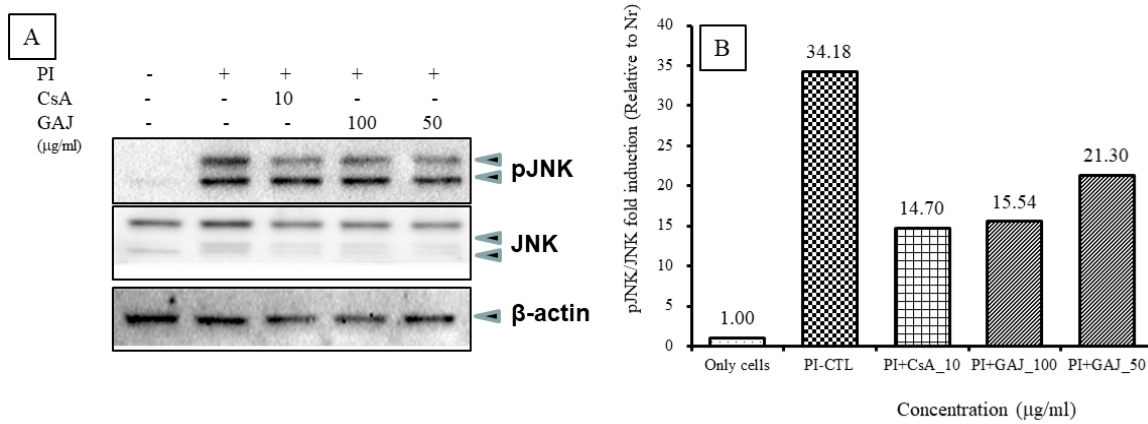


Fig. 12. Effects of GAJ on JNK phosphorylation in PI-induced RBL-2H3 mast cells

RBL-2H3 mast cells were treated with GAJ for 1 h, then treated with PI [PMA (50 ng/ml) and ionomycin (0.5 μM)] for 0.5 h. (A) The phosphorylation levels of JNK were analyzed by western blot. β-actin were used as internal controls for the nuclear proteins, and (B) relative amounts of each protein were determined by Image J. Abbreviations: Only cells; only RBL-2H3 mast cells, CTL; control, CsA; cyclosporine A, GAJ; *Gardenia jasminoides* for. *grandiflora* extracts, JNK; c-Jun N-terminal kinase

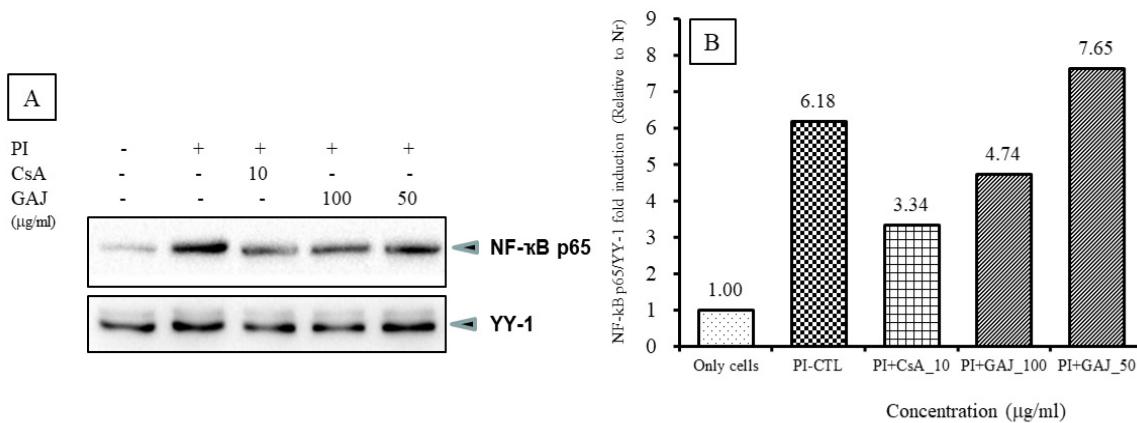


Fig. 13. Effects of GAJ on the nuclear translocation of NF-κB p65 in PI-induced RBL-2H3 mast cells

RBL-2H3 mast cells were treated with CAJ for 1 h, then treated with PI [PMA (50 ng/ml) and ionomycin (0.5 μM)] for 20 min. (A) Nuclear, cytosolic proteins were separated. Translocation of NF-κB p65 to the nucleus, as determined by western blot analysis. YY-1 were used as internal controls for the cytosolic and nuclear proteins, and (B) relative amounts of each protein were determined by Image J. Abbreviations same as Fig. 11.

로 대조군에 비하여 pJNK 단백질 발현이 억제되었다 (Fig. 12, pJNK band lane 5).

(4) NF-κB p65 신호전달 기전

NF-κB p65 단백질 발현은 정상군에서 FI이 1로 나타났고 (Fig. 13, NF-κB p65 band lane 1), 대조군에서 6.18로 정상군에 비하여 증가하였으며 (Fig. 13, NF-κB p65 band lane 2), 양성대조군의 FI는 3.34로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 13, NF-κB p65 band lane 3). 실험군의 GAJ 100 μg/ml에서 FI는 4.74로 대조군에 비하여 NF-κB p65 단백질 발현이 억제되었다 (Fig. 13,

NF-κB p65 band lane 4). 실험군의 GAJ 50 μg/ml에서 FI는 7.65로 대조군에 비해 억제되지 못하였다 (Fig.13, NF-κB p65 band lane 5).

2. Ex vivo

1) OVA-specific IgE 측정

GAJ가 Th2 cytokine IL-4, IL-13을 조절하여 감작항원에 의해 유도된 Th2 면역반응에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Balb/c 수컷에 OVA/alum을 복강주사하여 IgE 생성을 유도하고 GAJ 200mg/kg을 경구 투여한 뒤 2주와 14주에 혈액 중 OVA-specific IgE를 ELISA로 측

정하였다.

측정한 결과, OVA-specific IgE 생산량은 정상군은 2주와 14주에 각각  $63.7 \pm 18.7$  ng/ml,  $213 \pm 50.9$  ng/ml 이었고, 대조군은 2주와 14주에 각각  $2822.5 \pm 340.1$  ng/ml,  $7538 \pm 254.1$  ng/ml 으로 정상군에 비하여 증가하였다. 실험군의 OVA-specific IgE 생산량은 2주와 14주에서 각각  $1287.6 \pm 106.5$  ng/ml,  $4259 \pm 500.1$  ng/ml 으로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 억제되었다 (Fig. 14).

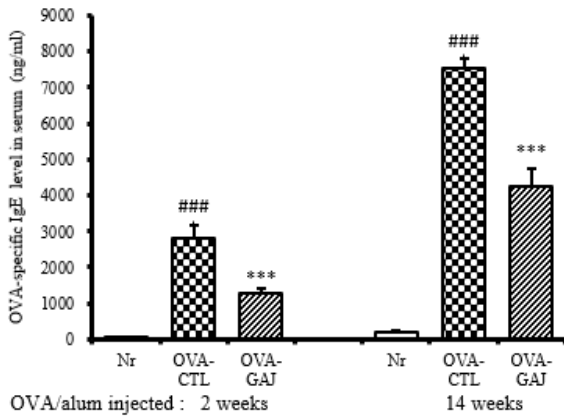


Fig. 14. Effect of GAJ on OVA-specific IgE release in OVA challenged allergic mouse model

Mice were treated with GAJ (200 mg/kg) for 13 weeks. Balb/c mice were challenged with OVA as described in the experimental section. Blood samples were collected after 2 weeks and 14 weeks for OVA-specific IgE measurement and serum was prepared. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=5).  $###P < 0.0001$  versus the Nr group;  $***P < 0.001$  versus the OVA-CTL group. Abbreviations. Nr; Balb/c mice, OVA; OVA/albumin, CTL; control

## 2) Th2 cytokine 생성 억제 효과

GAJ가 Th2 cytokine IL-4와 IL-13 생산에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, OVA/alum을 복강주사하고 GAJ를 투여한 Balb/c 수컷에서 비장세포를 분리하여 OVA/alum로 재자극하고 48시간 동안 배양한 뒤 배양상층액에서 분비된 IL-4와 IL-13 생산량을 ELISA로 측정하였다.

### (1) IL-4 단백질 생성

IL-4 생산량은 정상군은  $4.27 \pm 1.67$  pg/ml 이었고, 대조군은  $78.33 \pm 5.96$  pg/ml 으로 정상군에 비하여 증가하였다. 실험군의 IL-4 생산량은  $44.06 \pm 3.94$  pg/ml 으로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 억제되었다 (Fig. 15).

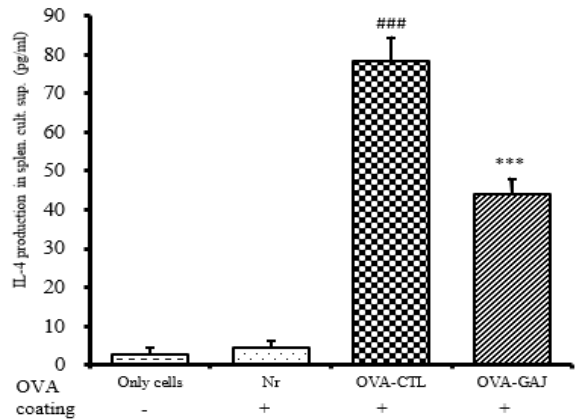


Fig. 15. Effect of GAJ on IL-4 release in release in OVA challenged isolated splenocytes

Mice were treated with GAJ (200 mg/kg) for 13 weeks. Splenocytes from Balb/c mice were isolated following ovalbumin challenge *ex vivo* as described in the experimental section. Cultured splenocytes were then incubated with  $10 \mu\text{g/ml}$  OVA peptide or with saline (Only cells) for 48 hours and IL-13 levels were measured in cell culture supernatant. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=5).  $###P < 0.0001$  versus the Nr group;  $***P < 0.001$  versus the OVA-CTL group. Abbreviations. Only cells; Balb/c mice, Nr; Only cells coated OVA-alum, OVA; OVA-alum, CTL; control

### (2) IL-13 단백질 생성

IL-13 생산량은 정상군은  $4.27 \pm 1.98$  pg/ml 으로 대조군은  $45.1 \pm 4.71$  pg/ml 으로 정상군에 비하여 증가하였다. 실험군의 IL-13 생산량은  $23.54 \pm 5.11$  pg/ml 으로 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p < 0.01$ ) 억제되었다 (Fig. 16).

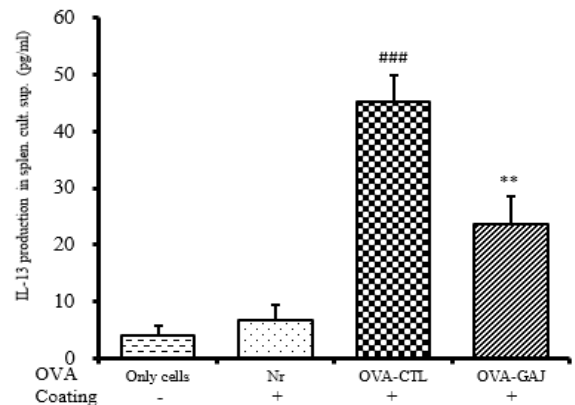


Fig. 16. Effect of GAJ on IL-13 release in release in OVA challenged isolated splenocytes

Mice were treated with the GAJ (200 mg/kg) for 13 weeks. Splenocytes from Balb/c mice were isolated following ovalbumin challenge *ex vivo* as described in the experimental section. Cultured splenocytes were then incubated with  $10 \mu\text{g/ml}$  OVA peptide or with saline (Only cells) for 48 hours and IL-13 levels were measured in cell culture supernatant. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=5).  $###P < 0.0001$  versus the Nr group;  $**P < 0.01$  versus the OVA-CTL group. Abbreviations same as Fig. 15.

#### IV. Discussion

아토피 피부염 (Atopic dermatitis)은 濕疹, 苔癬, 胎熱 등으로도 불리며 피부 발적, 피부 감염, 피부 소양감, 태선화 등의 임상소견을 나타낸다<sup>16,17</sup>.

2015년 아토피 피부염의 유병율은 국민건강보험공단에서 조사한 통계에 따르면 12세 미만 아동에서는 약 49%, 20대 이상 성인에서 약 39% 정도를 차지하는 것으로 보고되며 난치성 질환으로 분류되어 사회적 관심이 증가하고 있다<sup>18</sup>.

아토피 피부염의 현대 의학적 치료는 국소 및 전신 스테로이드, 항생제, 항히스타민제, Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), Thymopentin, Cyclosporine, Tacrolimus, Methotrexate, Azathioprine, Mycophenolate mofetil (MMF) 등의 투여 및 광선요법을 사용하여 증상을 경감시키거나 제어하고 있다<sup>19</sup>. 한편 최근 연구에서 아토피 피부염에 대체 요법을 사용하는 비율은 71.5%로 조사되었다<sup>20</sup>. 이는 스테로이드 치료 시 내성, 신독성, 간독성, 세균 및 진균 감염의 유발 등의 문제가 발생할 수 있어 이러한 부작용이 비교적 적고, 지속적으로 사용 가능한 한약 치료 등의 보완 대체 의학에 대한 수요가 많기 때문으로 분석할 수 있다<sup>21-23</sup>.

아토피 피부염의 원인은 아직까지 정확하게 규명하지 못하고 있으나 유전적인 요소, 면역 기능의 불균형, 피부 보호막의 이상 및 환경적 요인 등 복합적 인자가 관련되어 있는 것으로 추정된다<sup>24</sup>.

아토피 피부염의 면역학적 요인에서 여러 가지 연구들로부터 추정되는 아토피 피부염의 대략적 병태 생리 기전은 다음과 같다. 알레르겐을 IgE가 인식하면 랑게르한스세포 표면에 있는 IgE 부착 Fc 수용체에 알레르겐이 유착되어 T 림프구에 항원이 전달됨으로서 T 림프구가 활성화 되게 된다. 정상적인 사람은 알레르겐 접촉 시 다수에서 Th1 세포의 증식이 나타나지만, 알레르기 소인을 가진 사람은 Th2 세포가 활발히 증식된다. 즉, 아토피 피부염의 피부 병변에 주로 침윤되는 염증 세포는 Th2 세포로서 IL-16, IL-13, IL-10, IL-5, IL-4 등의 cytokine을 생성하며, 이들 중 IL-4와 IL-13은 B 림프구 세포에서 혈중 IgE의 상승을 촉진하고, IL-5는 호산구의 증가를 유도하여 즉시형 아토피 반응에 관여한다<sup>25</sup>. 이러한 아토피 피부염에서 Th1의 기능 감소는 Th1 증식이 억제되어 결국 세포 매개성 면역 저하를 불러온다. 이러한 상태가 지속한 만성 시기의 침

윤된 T 세포는 Th2 cytokine 성향이 약해져 Th1과 Th2 cytokine이 함께 존재하게 된다<sup>26</sup>. 이로써 아토피 피부염은 Th2 면역 반응에 의해 개시되고 점차 만성적인 Th1 면역 반응으로 변환된다고 알려져 있다<sup>24</sup>. 따라서 급성기의 과활성화된 Th2 반응의 조절을 통하여 아토피 질환의 만성화를 억제시킬 수 있다<sup>27</sup>.

梔子 (*Gardenia jasminoides* for. *grandiflora*)는 치자나무 및 동속식물 열매로 性味는 苦寒하며 淸熱利濕, 淸熱瀉火除煩, 消腫止痛, 養血止血 등의 효과가 있어 黃疸이나 衄血, 吐血, 血痢, 目赤, 咽痛, 癩病, 消渴熱毒創傷 등에 사용된다<sup>28</sup>.

梔子의 구성은 carotenoid계 crocetin의 COOH기에 여러 당이 결합된 배당체로, 그 중 crocetin digentiobioside인 crocin이 주성분이다<sup>2,25,29</sup>. crocin과 crocetin은 치자의 붉은 빛의 원인 성분으로 치자 황색소로 부른다. 이 성분은 샤프란에서 처음 발견되었는데 항-죽상경화증, 항염증, 항암, 신경보호 효과 등이 보고된다<sup>30</sup>. 또한, 치자에는 iridoid 화합물인 geniposide, geniposidic acid, gardenoside, methyl deacetyl asperuloside, gardoside, genipins, hanzhiside 등과 vanillic acid 4-O- $\beta$ -D-(6'-sina-poyl) glucopyranoside, flavonoids 계열의 gardanin, quinic acid와 그 유도체, caffeic acid 등이 함유되어 있다고 보고되었다<sup>31,32</sup>.

기존의 梔子에 대한 연구로는 內疏黃連湯의 구성 약물들의 항균 활성에 관한 연구 중 梔子의 항균 효과에 대한 보고<sup>33</sup>가 있었고, 梔子 수용성 추출액의 결핵균 외 기타 Mycobacteria에 대한 항균 작용에 대한 보고<sup>34</sup>가 있었다. 또한 梔子 엑기스의 항염과 진통완화 효과<sup>35</sup>, 梔子 엑스제 항염 효과 및 피부 투과<sup>6</sup>, 梔子の 항산화 활성 성분에 대한 보고 연구<sup>36</sup>, 梔子 추출물의 monoamine oxidase 저해 활성 효과<sup>37</sup>를 보고하였다. 또한 梔子 에탄올 추출물은 carrageenan로 유도된 rat paw edema에서 항염 작용에 대한 연구<sup>38</sup>, 梔子が 배양된 human umbilical vein endothelia cell에서 NO를 통하여 항염 효과를 나타낸다는 연구<sup>39</sup>, 梔子の 조절 T 세포의 억제기능 효과로 인한 항염증 및 항알레르기 효과에 대한 연구<sup>40</sup>가 있었다.

이에 저자는 梔子の 항알레르기 효과를 알아보기 위하여 생쥐 RBL-2H3 비만세포에서 梔子の Th2 사이토카인의 생성 억제 효과를 확인하고, 그 억제 기전에 대한 연구를 위하여 Th2 cytokine의 유전자 발현에 영향을 주는 신호전달 물질의 활성에 대하여 *in vitro* 실험을 통해 알아보았다. 그리고 梔子が OVA/alum에 의해

알레르기 반응이 유발된 Balb/c 수컷에서 또한 동일한 항염증 효과를 나타내는지 관찰하기 위하여 *ex vivo* 실험을 진행하였다.

먼저 梔子 추출물의 세포독성을 확인한 결과 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도, 모두에서 대조군에 비해 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1).

비만세포는 Th2를 유도하는 GM-CSF, IL-13, IL-5, IL-4 등의 cytokine과 염증을 유도하는 IL-6, TNF- $\alpha$  등 cytokine을 분비한다<sup>40,41</sup>. 특히 IL-13, IL-4는 비만세포에서 생산되는 Th2 cytokine이며 알레르기 염증 초기에 작용하는 중요한 매개체다. 또한, B 세포를 활성화시키며 형질세포로 분화시켜 IgE를 생성하는데 작용한다<sup>41</sup>.

이에 RBL-2H3 비만세포에 CsA와 梔子 추출물 (100, 50  $\mu\text{g/ml}$ )을 처리하고 PI로 자극하여 활성화 상태를 만든 후 Real-time PCR을 이용하여 mRNA 유전자 발현을 분석한 결과, GM-CSF, IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$ 의 mRNA 유전자 발현이 치자추출물 100  $\mu\text{g/ml}$  처리 시 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었고 (Fig. 2, 3, 4, 6), IL-5, IL-6 유전자 발현은 梔子 추출물 100, 50  $\mu\text{g/ml}$  모두에서 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 5, 7). 또한 CsA와 梔子 추출물 (100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ )을 처리하고 PI로 자극한 뒤 ELISA를 통해 IL-4, IL-13의 단백질 발현을 측정된 결과 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 8, 9). 이 두 결과를 통해 梔子 추출물이 Th2 cytokine 분비를 억제함으로써 아토피 피부염에서 Th1과 Th2 cytokine 반응의 평형을 유지하여 치료 효과를 나타낼 수 있고 특히 梔子 추출물이 알레르기 염증 초기에 작용하는 IL-4, IL-13 생성을 유의하게 억제하여 IgE 생성을 억제할 수 있다고 판단되었다.

Cytokine과 mRNA는 유전자 발현의 결과물로 비만세포내의 신호전달 체계에 의해 생성된다. 이러한 일련의 신호전달 과정에서 梔子の 작용부위를 알아내기 위하여 western blot을 통해 전사인자의 단백질 발현을 연구하였다.

전사인자 NFAT (Nuclear factor of activated T-cells)는 세포질 내에서는 인산화 된 형태로 존재하다가 항원 수용체의 자극을 받으면 탈인산화가 되어 핵 내로 이동하고, 탈인산화된 NFAT는 핵 내로 이동하고 활성화된 T 세포 내에서 IL-2 promoter에 존재한 antigen receptor response element에 결합하여 염증반응에 필요한 cytokine (GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-4, IL-3)과 세포 표면 인자 (IL-2R $\alpha$ , CD40L, FasL) 등의 발현에 주

요 역할을 한다<sup>42</sup>.

NFAT 전사전달계에서는 MAP kinase 활성화를 이루는데 MAP kinase인 ERK, JNK, p38은 인산화 된 형태 (pERK, pJNK, pp38)가 활성화된 상태이다. JNK와 p38의 결합 복합체는 인산화를 통하여 c-jun을 활성화 하며, ERK는 Elk-1의 인산화를 통하여 c-fos 활성화를 유도한다. c-jun와 c-fos는 결합 후 활성화 전사인자 AP-1이 형성되고 이 AP-1은 T림프구의 여러 유전자의 전사를 증진시켜 Th2 cytokine 발현에 영향을 미친다<sup>43</sup>. 즉 MAPKs (ERK, JNK, p38)는 TNF- $\alpha$ , IL-4와 같은 cytokine의 생성에 필수적인 신호로 작용한다<sup>44</sup>.

梔子 추출물이 비만세포에서 ERK, JNK, p38 단백질 발현에 미치는 효과를 관찰하기 위해 western blot을 통해 ERK, JNK, p38 단백질 발현의 측정 결과는 100  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  농도의 모든 실험군에서 인산화를 억제하였다 (Fig. 10, 11, 12). 이러한 결과는 梔子 추출물이 비만세포에서 MAPKs (ERK, JNK, p38) 발현을 억제하여 NFAT 신호전달 기전을 제어함으로써 알레르기 염증반응을 억제한다고 볼 수 있다.

NF- $\kappa$ B는 면역기능, 혈관 내피세포의 활성화, 세포 성장, 염증반응 등에 관여하는 전사인자로 거의 모든 세포에 존재한다. NF- $\kappa$ B 중 가장 대표적인 것이 p65와 p50의 heterodimer 형태이다. NF- $\kappa$ B p65는 IL-6와 TNF- $\alpha$  유전자의 프로모터 부위에 있는 DNA에 부착하여 TNF- $\alpha$ 와 IL-6을 포함한 염증성 세포활성 물질의 전사를 개시하는데 관여한다. 이런 경로를 통해 전사가 활성화되는 대표적인 염증매개 물질로는 IL-8, IL-6, IL-2, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , lymphotoxin, adhesion molecule 등을 들 수 있다<sup>45</sup>. 천식, 만성 염증 등과 같은 질병의 세포모델이나 조직에서 NF- $\kappa$ B p65의 활성의 증가가 보고되어 있다<sup>46</sup>.

梔子 추출물이 비만세포에서 NF- $\kappa$ B p65 단백질 발현에 미치는 영향을 western blot을 통해 측정된 결과 梔子 추출물 100  $\mu\text{g/ml}$  농도 실험군에서 대조군에 비해 NF- $\kappa$ B p65 단백질 발현이 억제되었으나 梔子 추출물 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 대조군에 비해 억제되지 못하였다 (Fig. 13). 이는 梔子 추출물이 농도 의존적으로 NF- $\kappa$ B p65의 단백질 발현을 억제함으로써 신호전달 기전을 제어하여 항염 효과와 알레르기 반응 억제 효과를 나타낸다고 볼 수 있다.

Th2 세포에서 생성되는 IL-4와 IL-13은 IgE 생성을 자극하고 IgE는 비만세포를 활성화하여 알레르기 반응을 매개한다<sup>47</sup>. 이에 梔子 추출물이 Th2 cytokine IL-4,

IL-13 조절을 통해 감작항원으로 유도된 Th2 면역반응에 미치는 영향을 연구하기 위하여 OVA/alum 감작 생쥐에서 2주와 14주에 OVA-specific IgE 생성을 ELISA를 통해 측정된 결과 실험군의 OVA-specific IgE 생성이 2주와 14주 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 14).

또한 13주 후에 비장세포를 분리하여 OVA/alum로 재자극하고 48시간 동안 배양한 뒤, 배양 상층액에서 분리된 IL-4와 IL-13 생성량을 ELISA로 측정된 결과, 梔子 추출물이 Th2 cytokine IL-4와 IL-13 생성을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다 (Fig. 15, 16). 이러한 결과는 梔子 추출물이 Th2 cytokine IL-4, IL-13을 억제하여 OVA-specific IgE의 생성을 조절하고, IL-4, IL-13의 생성을 감소시켜 감작항원으로 유도된 Th2 면역반응을 억제함으로써 결과적으로 Th1/Th2 면역평형에 기여할 것으로 추론할 수 있다.

이상의 결과로 미루어 보아 梔子 추출물은 RBL-2H3 비만세포에서 발현하는 GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현을 억제하고 IL-4, IL-13의 단백질 생성을 억제함으로써 알레르기 염증반응을 제어하는 것으로 판단되며, 그 중 MAKPs (ERK, JNK, p38), NF- $\kappa$ B p65 전사인자를 억제하여 염증성 cytokine의 발현에 핵심적인 NFAT, NF- $\kappa$ B p65 신호전달 기전을 차단하는 것으로 볼 수 있다. 이와 같은 결과는 최근 연구결과를 통해 알려진 아토피 피부염 같은 피부질환에서의 梔子의 활용뿐만 아니라 제 1형 과민반응에 해당하는 알레르기 아토피 질환 치료에 두루 적용할 수 있는 근거가 되리라 생각된다. 하지만 본 연구는 *ex vivo*까지의 한정된 연구로 임상 적용을 위해 향후 아토피 질환 모델을 이용한 *in vivo* 실험을 통하여 임상적 효과를 확인하는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. Conclusion

梔子 추출물의 항알레르기 효능을 알아보기 위하여 RBL-2H3 비만세포 및 OVA/alum 감작 마우스에서 Th2 cytokine 발현 억제에 미치는 효과와 신호전달 기전을 실험적으로 규명하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

### I. RBL-2H3 비만세포에서 梔子 추출물의 효과

1. Real-Time PCR에서 GM-CSF, IL-4, IL-13, IL-5, TNF- $\alpha$ , IL-6 mRNA 유전자 발현을 억제하였다.
2. ELISA에서 IL-4, IL-13 단백질 생성을 억제하였다.
3. Western blot에서 전사인자 MAKPs (ERK, JNK, p38), NF- $\kappa$ B p65 단백질 발현을 억제하였다.

### II. OVA/alum 감작 생쥐에서 梔子 추출물의 효과

1. OVA-specific IgE 생성을 억제하였다.
2. Th2 cytokine IL-4와 IL-13 생성을 억제하였다.

## References

1. Korean Medicine University Herbal Medicine Commission. Herbal medicine. Seoul: Yeongrim Publishing Co. 2008:208-9.
2. Debnath T, Park PJ, Deb Nath NC, Samad NB, Park HW, Lim BO. Antioxidant activity of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit extracts. Food Chem. 2011;128(3):697-703.
3. Lin YJ, Lai CC, Lai CH, Sue SC, Lin CW, Hung CH, Lin TH, Hsu WY, Huang SM, Hung YL, Tien N, Liu X, Chen CL, Tsai FJ. Inhibition of enterovirus 71 infections and viral IRES activity by *Fructus gardeniae* and geniposide. Eur J Med Chem. 2013;62:206-13.
4. Toriizuka K, Kamiki H, Ohmura NY, Fujii M, Hori Y, Fukumura M, Hirai Y, Isoda S, Nemoto Y, Ida Y. Anxiolytic effect of *Gardeniae Fructus*-extract containing active ingredient from Kamishoyosan (KSS), a Japanese traditional Kampo medicine. Life Sci. 2005;77(24):3010-20.
5. Min DH, Kim DK, Lim JP, Yang JH. Transdermal drug delivery & therapeutic effect of the preparations of *Litbospermi Radix* and *Gardeniae Fructus* extracts on the burn & wound healing. J Kor Pharm Sci. 2005;35(4):255-63.
6. Yang JH, Lee NH. Skin permeation and anti-inflammatory effects of hydrolyzed products of *Gardeniae Fructus* extracts. J Kor Pharm Sci. 2004;34(2):115-23.
7. An HS. Textbook of pediatrics. 9th ed. Seoul: Korea Textbook Publishing Co. 2010:1104-21.
8. Kang KY, Kim YH, Han JK. The suppressive effect on Th2 cytokines expression and the signal transduction



- mechanism in MC/9 mast cells by PRAL. J Pediatr Korean Med. 2014;28(2):23-39.
9. Park Y. Moisturizers in atopic dermatitis. J Skin Barrier Res (Korean). 2007;9(1):37-40.
  10. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular & molecular immunology. 6th ed. Seoul: Epublic Publishing Co. 2008:451-71.
  11. Kim JW. Atopic dermatitis at allergic and immunological aspects. J Korean Dermatol Assoc. 2003;41(6):687-9.
  12. Renz H, Jujo K, Bradley KL, Domenico J, Gelfand EW, Leung DY. Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma. J Invest Dermatol. 1992;99(4):403-8.
  13. Cha JH, Lim EM. Effects of *Gardeniae Fructus* on cytokines in mouse macrophage. J Korean Obstet Gynecol. 2014;27(1):1-16.
  14. Sea S. Research for the effect of *Gardeniae Fructus* on regulatory T cell stimulation. Master Dissertation, Kyung Hee University, 2010.
  15. Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. Talanta. 1997;44(7):1299-305.
  16. Leung DY, Guttman-Yassky E. Deciphering the complexities of atopic dermatitis: shifting paradigms in treatment approaches. J Allergy Clin Immunol. 2014;134(4):769-79.
  17. Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, Guy RH, Macgowan AL, Tazi-Ahni R, Ward SJ. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. J Invest Dermatol. 2009;129(8):1892-908.
  18. National Health Insurance Corporation. Environment day right environment -related diseases health insurance representative 3 payment data analysis [Internet]. Available from: <http://www.datanews.co.kr/news/article.html?no=94723>.
  19. Jang HS. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis. J Korean Acad Fam Med. 2002;23(7):831-40.
  20. Korea Centers for Disease Control and Prevent, Hanrim University College of Medicine Seongsim Hospital Pediatrics. The use of alternative medicine and management in children with atopic dermatitis. Korean J Pediatr. 2008;18(2):148-57.
  21. Chin HW, Jang HS, Jang BS, Jo JH, Kim MB, Oh CK, Kwon KS, Kwon YW. A study on utilization of alternative medicine for patients with atopic dermatitis. Korean J Dermatol. 2005;43(7):903-11.
  22. Kim SH. The use of oriental and complementary alternative medicine in children with atopic dermatitis. Master Dissertation, University of Cha Medical University, 2007.
  23. Koh DJ, You HJ, Lee JY, Kim DG. Clinical assessment of efficacy, safety and usefulness of traditional herbal medicine (THM) on atopic dermatitis. J Korean Orient Pediatr. 2006;20(2):129-37.
  24. Kang TJ, Lee SR. Causes and treatment management of atopic dermatitis. BioWave. 2010;12(3):1-25.
  25. Izuhara K, Shirakawa T, Adra CN, Hamasaki N, Hopkin JM. Emerging therapeutic targets in allergic disease. Pharmacol Ther. 2005;25(3):381-9.
  26. Gibbs BF, Haas H, Wolff HH, Grabbe J. Early IgE-dependent release of IL-4 and IL-13 from leukocytes is restricted to basophils: a comparison with other granulocytes and mononuclear cells. Inflamm Res. 2000;49(Suppl1):S9-10.
  27. Valent P, Spanblöchl E, Sperr WR, Sillaber C, Zsebo KM, Agis H, Strobl H, Geissler K, Bettelheim P, Lechner K. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. Blood. 1992;80(9):2237-45.
  28. Kim HC. Korean medicine pharmacology. Seoul: Jibmun Publishing Co. 2001:125-7.
  29. Lee CB. Coloured flora of Korea. Seoul: Hyangmunsa. 2003.
  30. Alavizadeh SH, Hosseinzadeh H. Bioactivity assessment and toxicity of crocin: a comprehensive review. Food Chem Toxicol. 2014;64:65-80.
  31. Shin YW, Kim DW, Kim NJ. Studies on the processing of crude drugs (VII) -on the constituents and biological activities of *Gardeniae Fructus* by processing-. Korean J Pharmacogn. 2003;34(1):45-54.
  32. Kim HJ, Kim EJ, Seo SH, Shin CG, Jin C, Lee YS. Vanillic acid glycoside and quinic acid derivatives from *Gardeniae Fructus*. J Nat Prod. 2006;69(4):600-3.

33. Chun SC, Jee SY, Lee SK. The antimicrobial activity of *Naesohwangryuntang* and its composition oriental medicine. *Kor J Herbology*. 2004;19(4):51-60.
34. Choi CS, Sin SS, Chung SI, Yang YT. Antibacterial activity of soluble extracts of *Gardenia jasminoides* against mycobacteria other than Tubercle Bacilli. *J Korea Soc Microbiol*. 1986;21(1):53-62.
35. Kim MJ, Nam YO, Yang JH. Anti-inflammatory and sedative effect of rat by the gel containing ketorolac and hydrolysis products of *Gardeniae Fructus*. *J Korean Acad Dent Health*. 2004;28(4):464-72.
36. Han YN, Oh HK, Hwang KH, Lee MS. Antioxidant components of *Gardenia Fruit*. *Kor J Pharmacogn*. 1994; 25(3):226-32.
37. Hwang KH, Park TK. Inhibitory activity of the fruit extract of *Gardenia jasminoides* on Monoamine Oxidase. *Kor J Pharmacogn*. 2007;38(2):108-12.
38. Koo HJ, Lim KH, Jung HJ, Park EH. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *J Ethnopharmacol*. 2006;103(3):496-500.
39. Wang GF, Wu SY, Rao JJ, Lü L, Xu W, Pang JX, Liu ZQ, Wu SG, Zhang JJ. Genipin inhibits endothelial exocytosis via nitric oxide in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2009;30(5): 589-96.
40. Prieschl EE, Gouileux-Gruart V, Walker C, Harrer NE, Baumruker T. A nuclear factor of activated T cell-like transcription factor in mast cells is involved in IL-5 gene regulation after IgE plus antigen stimulation. *J Immunol*. 1995;154(11):6112-9.
41. Aversa G, Punnonen J, Cocks BG, de Waal Malefyt R, Vega F Jr, Zurawski SM, Zurawski G, de Vries JE. An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. *J Exp Med*. 1993;178(6):2213-8.
42. Lee IS, Dat NT, Cai XF, Shen G, Kim YH. Inhibitory effects of natural products against NFAT (nuclear factor of activated T cells) transcription factor. *Korean J Pharmacogn*. 2003;34(2):150-5.
43. Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal*. 2001;13(11):777-85.
44. Cheung PF, Wong CK, Ho AW, Hu S, Chen DP, Lam CW. Activation of human eosinophils and epidermal keratinocytes by Th2 cytokine IL-31: implication for the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Int Immunol*. 2010;22(6):453-67.
45. Park GY, Lee SH, Hwangbo B, Yim JJ, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS, Yoo CG. Pro-inflammatory cytokine expression through NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B pathway in lung epithelial cells. *Tuberc Respir Dis*. 2000;49(3):332-42.
46. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999;18(49):6853-66.
47. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. *Basic Immunology*, 3th ed. Seoul: Seoul: Epublic Publishing Co. 2009:104-11,205-12.