

養血潤膚湯의 免疫 調節作用을 통한 항알러지 效能

이경미·구영선*·김동희**

Inhibitory Effects of Yanghyelyoonbutang (YHYBT) on Allergic Reaction and Pro-Inflammatory Cytokines in Various Cell Lines

Kyoung-Mee Lee, Young Sun Koo, Dong-Hee Kim

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

This study saw the anti-allergy effect by the immunity regulation action of Yanghyelyoonbotang (YHYBT) consists 12 kinds of herbal medicine agents. Consequently, YHYBT controlled the amount of secretion of various inflammatory cytokines, chemokine, monocyte chemotactic protein and histamine from cells (HMC-1, THP-1, EoL-1) stimulated by PMA, A23187 or HDM.

1. YHYBT did not show cytotoxicity on cultured human fibroblast cells under 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration.
2. YHYBT suppressed IL-8, TNF- α , IL-6 mRNA expression in the HMC-1 cell stimulated with PMA and A23187.
3. YHYBT significantly suppressed IL-6 release in the THP-1 and EoL-1 cell stimulated with HDM.
4. YHYBT significantly suppressed histamine release in the HMC-1 cell stimulated with PMA and A23187 in a dose-dependent.
5. YHYBT significantly suppressed β -Hexosaminidase release in the HMC-1 cell stimulated with A23187 in a dose-dependent.
6. YHYBT suppressed NF- κB gene expression in the RBL-2H3 cell stimulated with PMA in a dose-dependent.

These results suggested that YHYBT has suppressive effects on allergic reaction and pro-inflammatory cytokines in various cell lines through the regulation of immune system. YHYBT has potential to use as an anti-allergic agents.

key words : Yanghyelyoonbotang, anti-allergy, histamine, Cytokine, chemokine

I. 서론

아토피피부염 (atopic dermatitis)은 環的要因에 대해 誘發되는 因子들에 대해 皮膚의 過敏 反應을

보이는 慢性 皮膚疾患으로¹⁾, 1800년대 처음 아토피피부염이라 命名되었다.

臨床 症狀은 慢性 再發性 經過를 보이며, 瘙癢症, 乾燥症, 濕疹性 病變, 그리고 角質 등을 特徵으로 하고, 대부분 1세 이하에서 發病하며 成長하면서 症狀이 好轉되나, 喘息과 鼻炎이 뒤따르는 경우가 頻繁하다²⁾.

* 대전대학교 한의과 대학 청주해화의원
** 대전대학교 한의과대학 병리학교실
· 교신저자 : 김동희 · E-mail : dhkim@dju.ac.kr
· 채택일 : 2006년 12월 15일

아토피피부염의 皮膚 周圍는 多様な 炎症性 사이토카인 (IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -11,-13, TNF-a, GM-CSF)과 케모카인들 (IL-8, RANTES, macrophage inflammatory protein-1a [MIP-1a], monocyte chemotactic protein-1 [MCP-1], MCP-3, MCP-4, eotaxin) 등이 증가되어 있다³⁻⁵⁾. 특히 거주세포 (각질세포, 비만세포, 수상돌기세포 등)로부터 TNF-a와 IL-1 사이토카인은 血管內皮細胞 (vascular endothelium)의 수용체와 결합하여 NF-κB 經路를 통해 血管內皮細胞點着分子 (vascular endothelial cell adhesion molecules)를 증가시킨다⁶⁻⁸⁾.

韓醫學에서 아토피피부염에 該當되는 正確한 用語는 없지만 發顯되는 臨床 症狀이 浸淫瘡, 奶癬, 四彎風 旋耳瘡 등과 類似한 점이 많다⁹⁻¹³⁾. 全身 浸潤 症狀과 滲出이 많다는 점은 浸淫瘡과 類似하며, 嬰幼兒에게 주로 나타난다는 점은 奶癬과 類似하고, 肘關節部에 發生한다는 점은 四彎風과 類似하며, 患者들의 耳部 一部에 發生한다는 점에서 旋耳瘡과 類似하다.

아토피피부염의 症狀을 中心으로 韓醫學的 病因, 病機를 살펴보면 特히 風, 濕, 熱邪와 密接한 關係가 있다⁹⁻¹⁵⁾. 이는 모든 皮膚科 疾患에 대한 共通 病機이기도 하다.

風邪가 皮膚에 影響을 미치면 瘙痒感和 浸潤이 汎發하고, 濕熱이 甚하면 皮膚에 焮紅, 腫脹, 灼熱感이 發生하며, 濕의 粘膩的이고 重濁한 性質로 인하여 病情이 오래가고 反復發作하고, 濕熱이 오래되어 蓄積되면 耗血傷陰과 脾虛血燥를 誘發하여 肥厚, 乾燥, 破裂症이 發生한다. 또한 正邪相爭의 過程인 免疫反應에서 '正氣虛' '邪氣實'을 招來함으로써 過敏性 體質을 誘發한다⁹⁻¹⁵⁾.

II. 實驗 方法

1. 재료

1) 약물

본 실험에 사용한 養血潤膚湯 (YHYBT)의 구성 약재들은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선

하여 사용하였고, 그 내용과 분량은 다음과 같다.

따라서 韓醫學的 治療法 역시 이들 病因, 病機에 準하여 이루어지고 있는데, 皮¹⁶⁾는 『皮膚病中醫治法與方劑』에서 內治法으로 22종의 治法과 이에 相應하는 症狀 및 常用 藥物을 紹介한 바가 있다. 現在 臨床에서 使用되는 아토피피부염 治療法 역시 皮¹⁶⁾의 記述과 크게 벗어나지 않는다. 특히 임상에서 韓醫院에 來院하는 患者의 大部分이 慢性으로 극심한 瘙痒感和 더불어 肥厚, 乾燥, 破裂症이 發生함으로써 22種의 治法中 養血潤燥止痒法이 多用된다.

養血潤膚湯은 數種의 臨床處方을 試料로 in vitro에서 TNF-a를 中心으로 한 抗炎症 作用 檢索에서 有意性있는 結果가 導出된 處方으로, 四物湯에 活血化瘀, 祛風止痒 藥物을 加味하여 임상에서는 주로 血熱遍盛으로 인한 瘙痒感和 皮膚乾燥症에 使用된다. 이에 本 實驗에서는 現在 臨床에서 活用도가 높은 養血潤膚湯을 試料로 먼저 細胞毒性을 測定한 후, 아토피피부염의 炎症性 機轉과 有關한 사이토카인 및 케모카인, histamine, β-hexosaminidase, NF-κB 등에 미치는 影響을 檢索하여 本 試料의 免疫 調節作用을 糾明하고자 하였다.

The compositions of Yanghyelyoonbutang (YHYBT)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
當歸	Angelicae Radix	5
川芎	Ligustici Rhizoma	5
白何首烏	Cynanchi Wilfordii Radix	15
鷄血藤	Mucunae Caulis	15
丹參	Salviae Radix	8
白芍藥	Paeoniae Radix	8
熟地黃	Rhemaniae Radix	8
白茯苓	Poria	8
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	5
白鮮皮	Dictamni Radix	15
苦參	Sophorae Flavescentis Radix	5
豬苓	Polyporus Umbellatus	8
Total amount		105

2) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 Diethyl pyrocarbonate (DEPC), trypsin-0.2% EDTA, 3-4, 5-dimethylthiazol-2, 5-carboxy methoxyphenyl - 2, 4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), RPMI-1640 배양액, trichloroacetic acid, isopropanol, ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), EtOH, LPS, magnesium chloride (MYHYBT12), A23187, PMA (phorbol12-myristate13-acetate), p-nitro-phenyl- N-acetyl-b-glucosamide, o-phtaldialdehyde, dexamethasone 등은 Sigma 사 (U.S.A) 제품을, Taq polymerase와 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, DMED은 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 system (U.S.A) 제품을, Lipofec-tamineTM 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

蕎麥 (YHYBT) 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 18.4 g을 냉동 (-84℃) 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℃ CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다. 사람의 단핵구인 THP-1 (human acute monocytic leukemia cell; 미국 세포주은행)과 사람의 호산구인 EoL-1 (eosinophilic leukemia cell, 일본 세포주은행)은 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(5 mg/ml,

BM, Indianapolis, IN, U.S.A)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma Co., U.S.A), antibiotics (penicillinm 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)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 1,500 rpm에서 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 YHYBT (최종 농도 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 31.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 15.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 7.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액 (PBS)로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 μl 를 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 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 가하고, 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM tris base로 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 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), antibiotics (penicillinm 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)}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 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과, 양성대조군으로 CsA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)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 μl 를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μl 를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μl 의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μl 와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μl 의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μg 을 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 \times RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μl 의 M-MLV RT (200 U/

μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl가 되도록 하였다.

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

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 cDAN 표본을 AmpliTaq Gold DNA Polymerase을 포함시켜 TaqMan Universal PCR로 증폭시켰다. PCR 조건은 40 cycles를 위한 50°C에서 2분, 95°C과 10분, 60°C에서 15초 수행하였다. 사용된 probe 는 아래와 같다.

Human interleukin-6	AGCCTGAGAAAAGAGACATGTA CAAGAGTAACA
Human interleukin-8	AGAGCTCTGTCTGGACCCCAAGGA AAAC
(G3PDH)	CAAGCTTCCC GTTCTCAGCC
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-1과 EoL-1 세포를 0.5% FBS가 든 RPMI 배지에 2.0 x 10⁶/m로 24 well plate에 분주한 후 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 16시간 배양하였다. 배양 후 YHYBT (최종 농도 200 μg/ml, 100 μg/ml, 50 μg/ml)을 24시간 동안 처리한 후 집먼지 진드기 (HDM-1 μg/ml)를 각각 24시간 동안 처리한 다음, ELISA를 이용하여 상층액에서 단핵구 화학 유인물질 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 x 10⁴ 세포로 각 well에 분주하고, 여기에 추출물 (200, 100, 10 μg/ml)과, 양성대조군으로 CsA(10μg/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°C에서 30분 방치한 후, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) β-Hexosaminidase 분비량 측정

48well plate에 RBL-2H3 cell을 5 x 10⁵ 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

48well plate에 RBL-2H3 cell을 5 x 10⁵

cell/ml로 18시간 배양한 뒤 FBS와 antibiotics를 제거한 배양액으로 바꿔준 후, NF- κ B 부위가 3 copy로 되어있는 NF- κ B-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 양성대조군인 PMA를 18시간 처리하고 lysis buffer를 이용하여 세포를 lysis 시켰다. 3차례의 급속 냉동-해동을 거쳐 세포를 파괴하고, 12,000 X g, 5분간 원심 분리하여 세포 추출물을 얻어 luciferase substrate와 반응시켜 NF- κ B promoter 활성을 측정하였다.

9) 통계처리

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

III. 實驗 結 果

1. 세포독성에 미치는 영향

YHYBT의 세포독성을 측정한 결과, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 μ g/ml 농도에서 생존율이 각각 64.8 \pm 0.2, 88.4 \pm 0.2, 104.7 \pm 0.3, 100.4 \pm 0.2, 113.2 \pm 0.3, 99.6 \pm 0.4, 97.6 \pm 0.3, 103.5 \pm 0.1 %로 나타나, 250 μ g/ml 이하 농도에서는 유의성 있는 감소는 나타나지 않았다 (Fig. 1).

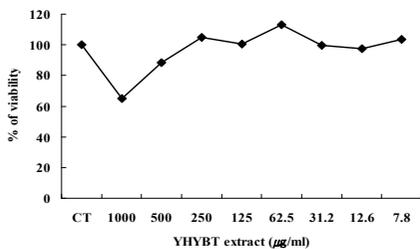


Fig. 1. Effects of YHYBT on the viability of human fibroblast cells. Human fibroblast cells (hFCs) were cultured with various

concentration of YHYBT extract for 48 hr and the cell viability was measured by SRB method. The results were presented by the mean \pm S.D. (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 일 때, CsA는 0.609, YHYBT는 200, 100, 50 μ g/ml 농도 투여군에서는 각각 0.272, 0.260, 0.258로 나타났다(Fig. 2).

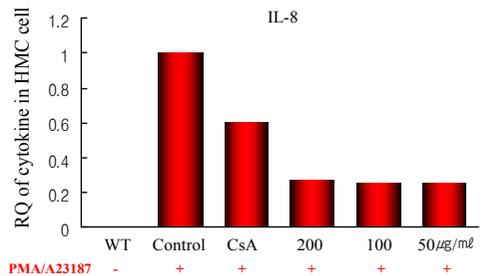


Fig. 2. Inhibitory effects of YHYBT on IL-8 mRNA gene expression in HMC-1. Human mast cell line were stimulated with PMA (50 ng/ml) and A23187 (0.5 μ M), co-cultured YHYBT (200, 100, 50 μ g/ml) and cyclosporin A (10 μ g/ml) for 6 h, and real-time PCR was used to determine relative IL-8 mRNA expression compared with controls. The amount of YHYBT 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 RQ 값이 1 일때, CsA는 0.153, YHYBT는 200, 100, 50 μ g/ml 농도 투여군에서는 각각 0.204, 0.137, 0.244로 나타났다 (Fig. 3).

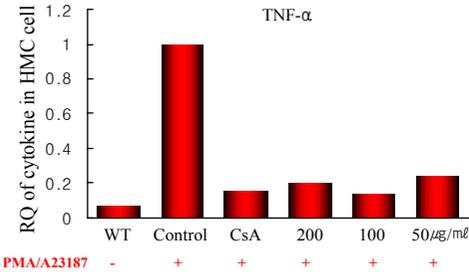


Fig. 3. Inhibitory effects of YHYBT on TNF-α mRNA gene expression in HMC-1

3) HMC-1에서 IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향
 HMC-1에서 IL-6 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때, CsA는, 0.245, YHYBT는 200, 100, 50 μg/ml 농도 투여군은 각각 0.216, 0.533, 0.515로 나타났다 (Fig. 4).

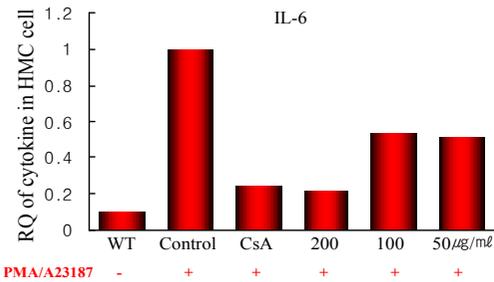


Fig. 4. Inhibitory effects of YHYBT on IL-6 mRNA gene expression in HMC-1

4) THP-1, EoL-1 세포에서 IL-6 생성량에 미치는 영향
 사람의 단핵구인 THP-1 세포와 호산구인 EoL-1에서 IL-6 생성을 측정한 결과, 양성대조군인 dexamethasone 투여군에서는 대조군에 비하여 큰 폭으로 생성량이 감소되었고, YHYBT 투여군에서는 모두 농도 의존적으로 IL-6의 생성량을 억제되었다. 특히 호산구인 EoL-1 세포에서는 모든 실험 농도에서 유의성 있는 결과가 나타났다 (Fig. 5, 6).

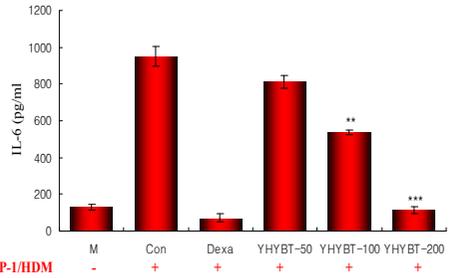


Fig. 5. Inhibitory effect of YHYBT on HDM induced IL-6 release in THP-1 cells. Serum starved human monocyte cell line THP-1 cells were stimulated with HDM (1 ug/ml), co-cultured YHYBT concentration (200, 100, 50 μg/ml) and dexamethasone (10 μg/ml) for 24 h. The culture supernatant was collected and the concentration of IL-6 was measured by ELISA. Data are expressed as means ± S.D. Statistically significant value compared with control data by T test (**p<0.01, ***p<0.001).

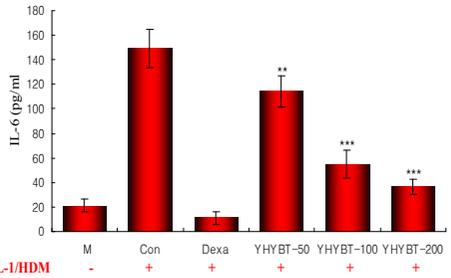


Fig. 6. Inhibitory effects of YHYBT on HDM induced IL-6 release in EoL-1 cells. The results are expressed the mean ± S.D. Statistically significant value compared with control data by T test (**p<0.01, ***p<0.001).

5) THP-1, EoL-1 세포에서 IL-8 생성량에 미치는 영향
 사람의 단핵구인 THP-1 세포에서 IL-8 생성량은 dexamethason을 투여한 양성대조군에서 큰 폭으로 감소한 반면, YHYBT 투여군은 각 농도에 대한 변화가 없었고 (Fig. 7), 호산구인 EoL-1 세포에서는 오히려 증가하여 대조군과는 큰 차이가 없

었다(Fig. 8).

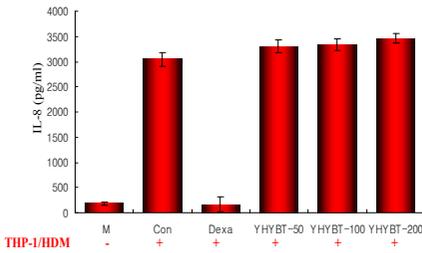


Fig. 7. Inhibitory effects of YHYBT on HDM induced IL-8 Release THP-1 cells. Each value represents the mean \pm S.D.

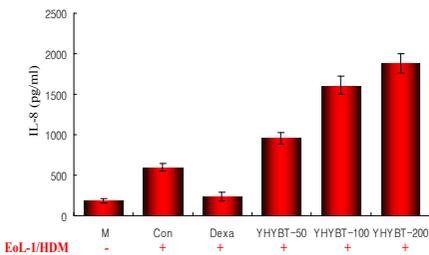


Fig. 8. Inhibitory effects of YHYBT on HDM induced IL-8 release in EoL-1 cells. Each value represents the mean \pm S.D.

6) THP-1, EoL-1 세포에서 MCP-1 생성량에 미치는 영향

THP-1 세포에서 MCP-1 생성량은 dexamethason을 투여한 양성대조군에서 큰 폭으로 감소한 반면, YHYBT 투여군은 각 농도에 대한 변화가 없었고 (Fig. 9), 호산구인 EoL-1 세포에서는 THP-1 세포에서 나타난 결과와 유사하게 나타나 이 역시 유의성이 없었다(Fig. 10).

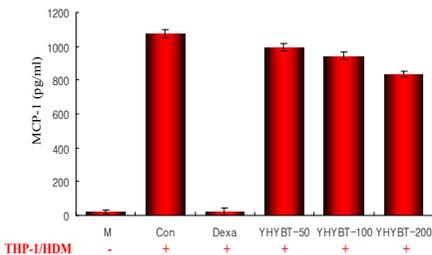


Fig. 9. Inhibitory effect of YHYBT on HDM

induced MCP-1 release in THP-1 cells. Each value represents the mean \pm S.D.

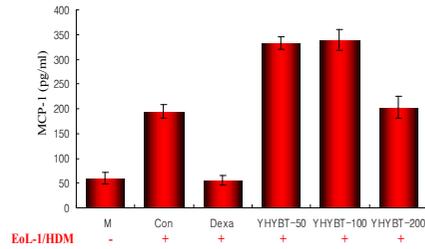


Fig. 10. Inhibitory effect of YHYBT on HDM induced MCP-1 release in EoL-1 cells. Each value represents the mean \pm S.D.

3. Histamine 분비량에 미치는 영향

HMC-1에서 histamine 분비량을 측정한 결과, 정상군은 5.2 ± 0.8 nmol로 나타난 반면, 대조군 79.7 ± 4.9 nmol로 나타나 큰 폭으로 증가하였다. 반면 비교대조군인 CsA 투여군은 23.6 ± 2.1 nmol로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었고, YHYBT 100, 50, 10 μ g/ml 농도 투여군에서는 각각 43.0 ± 7.2 , 44.1 ± 7.6 , 72.9 ± 5.5 nmol로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 50 μ g/ml 이상의 농도에서 유의성 있게 (**p < 0.001) 감소되었다 (Fig. 11).

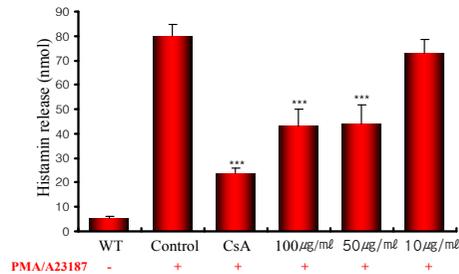


Fig. 11. Effect of YHYBT extract on histamine release in HMC-1. Human mast cell line were stimulated with PMA (50 ng/ml), A23187 (0.5 μ M), co-cultured YHYBT concentration (100, 50, 10 μ g/ml) and cyclosporin A (10 μ g/ml) for 6 h, histamine release level for analyzed by ELISA kit. The results are expressed the mean \pm S.D. Statistically significant value compared with control data by T test (**p < 0.001).

4. β -Hexosaminidase 분비량에 미치는 영향

YHYBT에 의한 β -Hexosaminidase 분비량을 측정 한 결과, 대조군인 A23187에 의해 방출되는 β -Hexosaminidase 분비량 억제 비율이 YHYBT 10 μ g/ml 농도에서는 24.7%, 100 μ g/ml 농도에서는 39.9%, 200 μ g/ml 농도에서는 58.9%로 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였다. IC50 값은 169.78 μ g/ml으로 나타났다 (Fig. 12).

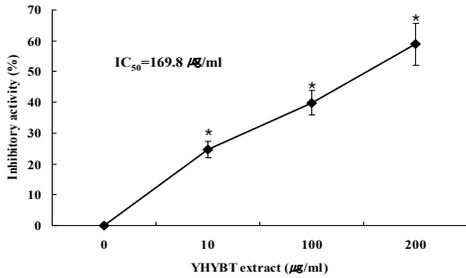


Fig. 12. Inhibitory Effect of YHYBT on the Release of β -hexosaminidase from RBL-2H3 cell line. RBL-2H3 cell were stimulated with A23187 (10 μ M), co-cultured YHYBT concentration (0, 10, 100, 200 μ g/ml) and 1 mM p- nitrophenyl-N-acetyl- β -glucosamide (50 μ l) for 30min. The results are expressed the mean \pm S.D. Statistically significant value compared with control data by T test (*p < 0.05).

5. NF- κ B promoter 활성화에 미치는 영향

YHYBT에 의한 NF- κ B promoter 활성화 효과 를 검색한 결과, 정상군에 비해 대조군인 PMA 는 4배 증가하였으며, YHYBT 10, 100, 200 μ g/ml 농도에서는 농도 의존적으로 감소하였다. 특히 YHYBT 200 μ g/ml 농도에서 대조군에 비하여 약 30% 정도 유의성 있게 (*p < 0.05) 감소되었다 (Fig. 13).

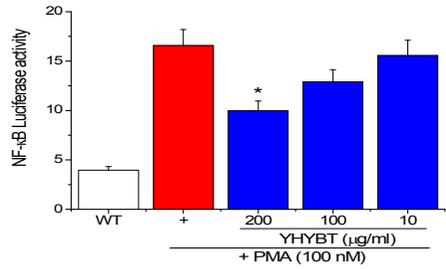


Fig. 13. Effects of YHYBT on NF- κ B dependent luciferase gene expression. Cells were transiently co-transfected with pGL-3-NF- κ B, and pCMV- β -gal. After 18 h, cells were treated with vehicle, PMA, PMA plus YHYBT. Values are expressed as means \pm S.D. of three independent experiments, performed in triplicate. Statistically significant value compared with PMA data by T test (*p < 0.05).

IV. 考 察

韓醫學에서 아토피피부염은 沈淫瘡, 奶癬, 胎熱, 胎癬, 胎斂瘡, 濕疹, 등의 범주에 속한다고 볼 수 있으며⁹⁻¹³, 특히 胎熱이 아토피피부염과 같은 범주로 언급되어 先天之精의 중요성이 강조되고 있다. 임상에서 치료는 크게 風熱濕邪를 제거하는 약물과 이로 인한 血熱血燥의 병리 상태를 개선시키는 養血潤燥 약물을 중심으로 이루어지고 있다. 최근 실험 연구들을 살펴보면 上記 범주의 복합 처방이나 단일 약물을 시료로 IgE 및 Th2 사이토카인의 생산을 효과적으로 억제하는지에 대한 검색^{17,18}이 주를 이루고 있으며, 임상적으로는 전문화된 병원을 중심으로 한의학적 치료 방법에 의한 다양한 임상 변화에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 본 시료 역시 苔癬化, 慢性化로 인하여 瘙癢, 皮膚層起, 筋燥, 爪乾, 血出 등의 증상이 나타나는 환자에게 다용되는 처방으로, 이미 임상적으로 효능이 증명된 바가 있다.

아토피피부염은 여러 환경적인 요인에 의해서 나타나는 피부의 과민성 반응으로서, 아이들의 10-20%, 성인의 1-3%가 가지고 있는 염증 질환

이다. 환자의 70-80%는 IgE를 매개로 하는 외인성 형태이며, 나머지는 IgE와 관련이 없는 염증 질환으로 분류 된다^{19,20}. 아토피 피부염은 비만세포, 호산구, 단핵구와 같은 백혈구의 조직으로의 이동을 통한 염증 반응과 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α 과 같은 Th2 사이토카인 또는 염증성 사이토카인을 비롯하여 IL-8, MCP-1, eotaxin과 같은 유주성 케모카인의 복합적인 상호 작용으로 인하여 발병하는 것으로 알려져 있다^{3,5}.

本 試料인 養血潤膚湯 (YHYBT)은 四物湯에 活血化痰, 祛風止痒 약물을 가미하여 주로 血熱遍盛으로 인한 瘙癢感和 皮膚乾燥症에 使用된다. 임상에서 이미 사용되고 있는 處方으로 瘙癢症을 비롯한 다양한 피부 증상에 응용되고 있다.

이에 본 실험에서는 현재 임상에서 활용도가 높은 YHYBT를 시료로 객관적인 효능 규명을 위하여 비만세포, 호산구, 단핵구세포의 IL-6, IL-8, MCP-1, histamine의 발현에 대한 효과와 염증 신호 전달에 중요한 역할을 하는 전사인자인 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험에 사용된 YHYBT의 최고의 농도는 Fig. 1에서 보여준 결과와 같이 세포독성에 영향을 주지 않는 200 μ g/ml를 사용하였다.

IL-8은 CXCR1과 CXCR2에 결합하는 CXC chemokine으로서 주로 호중구의 유주 운동과 세포증식에 작용하며, 호산구, 단핵구, 림프구에는 작용하지 않는 것으로 알려져 있다²¹⁻²³. 그러나 호산구에는 결합하는 수용체의 증식과 같은 특정한 자극 또는 질환이 있는 상황에서 선택적으로 작용한다²⁴.

본 실험에서 PMA/A23187로 자극시킨 HMC-1에서 IL-8의 mRNA 발현은 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, YHYBT 투여군에서는 증가된 IL-8 발현을 강하게 억제시켰다 (Fig. 2). 그러나 진드기 항원으로 자극시킨 THP-1과 EoL-1에서는 일치된 결과가 나타나지 않았다. THP-1 세포에서는 변화가 없었으며, EoL-1에서는 오히려 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 7, 8). 결과적으로 YHYBT는 IL-8 발현에 있어서 자극하는 인자와 세포에 따라 다른 양상을 보여주

었다고 할 수 있다. 이 같은 결과는 실질적인 임상에서의 종합적인 측면 (net effect)을 생체 외 (in vitro) 실험으로 판단하기는 어려운 단점을 보여주는 일례로 볼 수 있다. 하지만, YHYBT가 세포 또는 자극제 마다 다양한 효과를 보인다는 것은 체내의 다양한 면역 반응에 능동적으로 대처할 수 있는 장점뿐만 아니라, 다른 부작용이나 치료 효과를 제어할 수 있는 가능성을 내포하고 있음을 시사하고 있다.

IL-6는 일반적으로 급성 염증성 단백질로 알려져 있으나, 최근에는 B 세포분화와 T cell 활성화를 일으켜서 만성 염증성 질환에 작용하는 것으로 보고되었다²⁵. 최근에는 면역 초기의 중성구 활성화에서 이어지는 단핵구의 활성화 또는 전환에 핵심 인자로 밝혀져 급성과 만성 염증 질환에 중요한 매개역할을 하는 사이토카인으로 생각되고 있다²⁶. 또한 분비된 IL-6의 증가는 섬유모세포의 분화·증식을 초래하여, 세포외 기질 (extracellular matrix)의 생산을 크게 증가시킴으로써 세포 및 조직의 변형과 섬유화를 초래한다^{27,28}.

본 연구에서는 PMA/A23187 또는 진드기항원으로 자극시킨 HMC-1, THP-1, EoL-1 세포에서 IL-6의 mRNA 또는 단백질 발현에 대한 효과를 관찰하였는데, YHYBT 투여군이 농도 의존적으로 IL-6의 발현을 감소시켰다 (Fig. 4-6). 이는 YHYBT가 아토피질환과 같은 만성 염증성 질환뿐만 아니라 급성 염증성 질환에서의 치료 효과 가능성을 나타내는 것으로서, 특히 IL-8 발현에 대한 효과에서는 세포마다 다른 결과를 나타낸 반면에, IL-6 발현에 대한 효과에서는 측정된 모든 세포에서 감소시켰다. 이러한 결과는 YHYBT가 IL-6의 발현에 특이적으로 작용하는 것으로 사료되며, 이러한 발현에 관여하는 특이 신호 전달 단백질을 억제할 것으로 생각된다.

이상의 결과를 바탕으로 섬유화에 대한 정확한 YHYBT의 효과를 측정하기 위해서 HMC-1과 THP-1에서의 TNF- α 과 MCP-1의 발현을 각각 측정하였다. TNF- α 는 염증성 사이토카인으로서 급성 또는 만성 염증 질환에서 중요한 인자로 알려져 있으며, MCP-1은 단핵구를 화학주성으로 유

주 운동시키는 chemokine으로서 IL-8과는 달리 CC chemokine에 속한다. 보편적인 염증 유발 기능 이외에도 최근에는 TNF- α 와 MCP-1이 섬유화에 관련된다는 보고가 있다^{29,30}.

본 실험에서 PMA/A23187로 자극을 준 HMC-1의 TNF- α 발현은 YHYBT에 의해서 완전하게 억제되어 대조세포의 발현 정도로 감소된 반면, 진드기 항원에 의해서 크게 증가했던 MCP-1 양은 큰 변화가 없었다(Fig. 3, 9, 10). IL-6, TNF- α 에서 나타난 결과와 MCP-1에서 나타난 결과는 상호 부합되지 않으나, 동일 세포에서 이루어지지 않는 점으로 볼 때, 이에 대한 보충 연구를 통한 분석이 필요할 것으로 보인다.

아토피피부염으로 증가된 IgE는 인체 내의 혈관 주위나 피부에 있는 비만세포의 표면에 붙어 있다가 재차 항원이 인체에 침투하면, 이 항원과 IgE가 결합하여 비만세포를 자극시켜 세포내에 저장되어 있는 histamine 등의 화학물질들을 방출시킨다. 비만세포의 활성화에 의해 분비된 histamine 등은 혈관과 피부를 자극하여 피부에 붉은 반점과 부종 그리고 가려움증을 일으켜 아토피피부염을 유발 또는 악화시키게 된다. 또한 histamine의 방출은 NF- κ B 전사 조절 인자들을 비정상적으로 활성화시켜 아토피 원인으로 작용하는 것으로 알려져 있다³¹⁻³³.

본 실험에서는 YHYBT가 PMA (phorbol 12-myristate 13 acetate)와 A23187 (calcium ionophore)에 의해 활성화된 HMC-1 세포의 histamine 분비량은 대조군에 비하여 50 μ g/ml 이상의 농도에서 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 11). 비만세포 탈과립 방출량 측정에서 지표가 되는 β -hexosaminidase 분비 역시 YHYBT 10 μ g/ml 농도에서는 24.7%, 100 μ g/ml 농도에서는 39.9%, 200 μ g/ml 농도에서는 58.9%로 농도 의존적으로 유의성 있게 억제 하였으며, IC50 값은 169.78 μ g/ml로 나타났다(Fig. 12). 이는 YHYBT가 histamine과 β -hexosaminidase 분비를 감소시켜 아토피피부염의 유발과 악화를 억제할 수 있음을 보여주는 결과로 볼 수 있다.

NF- κ B는 TNF- α , IL-1 β , LPS와 같은 염증성

인자들의 수용체를 통한 세포내 신호 전달에서 중요한 역할을 하는 전사인자이다³⁴. 자극하는 염증 인자에 따라서 상위기전이 다르기는 하지만, 일반적으로 TAK-1/TAB-1/ TAB-2/3 kinase complex를 형성하면, TAK-1이 IKK를 활성화시켜서 NF- κ B를 억제하고 있는 I κ -Ba를 인산화시킨다. 인산화된 I κ -Ba는 분해되고 NF- κ B는 핵으로 들어가서 염증 관련 인자들의 발현을 촉진시킨다³⁵. Fig 13에서는 YHYBT가 NF- κ B의 활성화에 영향을 미치는지 분석한 결과이다. NF- κ B가 결합하는 promotor를 transfection하고 PMA를 처리하여 활성화시킨 후 YHYBT에 의해서 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. 이 같은 결과는 YHYBT가 NF- κ B의 활성화를 억제시킴으로써, 다른 염증 분자에 의한 NF- κ B의 활성화에도 작용할 수 있음을 보여주고 있다.

이상의 결과로 YHYBT가 항염증 효과를 통해 알레르기성 질환 및 아토피피부염에 유용하게 사용될 수 있음이 실험적으로 규명되었다. 특히 일부 결과에서는 잘 알려진 양방의 면역억제제와 동일하거나 더 높은 수준의 억제 효과를 보임으로써, 스테로이드 제제가 가지는 부작용의 한계뿐만 아니라 치료 효과에서도 더 효과적인 치료제로서의 가능성을 제시하였다. 그러나 기존의 단일 약제에서 나타난 in vitro 결과와의 비교 분석에서는 비교 우위가 나타나지 않아 향후 동물 실험에서의 검증과 분석이 필요할 것으로 보인다.

V. 結 論

養血潤膚湯이 아토피피부염의 炎症性 機轉에 關與하는 有關 사이토카인, 케모카인, histamine, β -hexosaminidase, NF- κ B 및 活性酸素 등에 미치는 影響을 檢索하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 養血潤膚湯은 Human fibroblast cell (hFCs)에 대하여 250 μ g/ml 이하 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다.

2. 養血潤膚湯은 HMC-1에서 IL-8, TNF- α , IL-6 mRNA 발현을 대조군에 비하여 억제하였다.
3. 養血潤膚湯은 IL-6 생성량을 THP-1, EoL-1 세포에서 대조군에 비하여 농도 의존적으로 억제하였으며, 특히 EoL-1 세포에서는 모든 농도에서 유의성 있게 억제하였다.
4. 養血潤膚湯은 HMC-1에서 histamine 분비량을 대조군에 비하여 250 μ g/ml 이상의 농도에서 유의성 있게 감소시켰다.
5. 養血潤膚湯은 RBL-2H3 세포에서 β -Hexosaminidase 분비량을 농도 의존적으로 유의성 있게 억제하였으며, IC50 (μ g/ml)은 169.78 μ g/ml로 나타났다.
6. 養血潤膚湯은 NF- κ B promoter 활성을 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소시켰으며, 특히 200 μ g/ml 농도에서는 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. 2003. Atopic dermatitis. Lancet. 361 : 151-160.
2. Spergel, J.M., and Paller, A.S. 2003. Atopic dermatitis and the atopic march. J. Allergy Clin. Immunol. 112 : S128-S139.
3. Novak, N., Bieber, T., and Leung, D.Y.M. 2003. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol. 112 : S128-S139.
4. Hamid, Q., Boguniewicz, M., and Leung, D.Y. 1994. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. J. Clin. Invest. 94 : 870-876.
5. Ono, S.J., et al. 2003. Chemokines : roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. J. Allergy Clin. Immunol. 111:1185 -1199.
6. Leung, D.Y. 2003. Infection in atopic dermatitis. Curr. Opin. Pediatr. 15:399-404.
7. Tan BB, Weald D, Strickland I, Friedmann PS. Double-blind controlled trial of effect of house dust-mite allergen avoidance on atopic dermatitis. Lancet 1996;347:15-8.
8. Kino T, Chrousos GP. Tissue-specific glucocorticoid resistance hypersensitivity syndromes : multifactorial states of clinical importance. J Allergy Clin Immunol 2002 ; 109 : 609-13.
9. 이원문 외 : 皮膚性病手冊, 人民衛生出版社, 2004.p. 193.
10. 서선후 외 : 皮膚病中醫診療學, 人民衛生出版社, 1995.p. 254.p. 310.p. 316.
11. 가민 외 : 中醫皮膚科臨床實踐, 貴州科學出版社, 2002. p. 202.
12. 왕발우 편저 : 皮膚病性病簡易療法, 人民軍醫出版社, 2005. p. 212.
13. 범서강 : 中西醫結合治療皮膚病性病, 光東人民出版社, 2005. p.188.
14. 이박감 : 피과증치개요, 인민위생출판사, 1999. p 47-48.
15. 만력생 외 : 피부과증서의결합치료 기교, 광종과기출판사, 2005.p.171-178.
16. 피선명 : 피부병 증의치료여방제, 과학기술문헌출판사, 과학기술문헌 출판사, 2002, p. 45-48.
17. 유건국 외 : 신편피부병, 광동세계로서출판공사, 2003. p. 257-261.

18. 가신교 외 : 신편아과, 광동세계로서출판사, 2003. p. 635-645.
19. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2004 113 (5) : 651-7.
20. Jayapal M, Tay HK, Reghunathan R, Zhi L, Chow KK, Rauff M, Melendez AJ. Genome-wide gene expression profiling of human mast cells stimulated by IgE or FcepsilonRI-aggregation reveals a complex network of genes involved in inflammatory responses. *BMC Genomics.* 2006 Aug 16 ; 7 : 210.
21. Murphy PM. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. *Semin Hematol.* 1997 Oct;34 (4):311-8.
22. Isomoto H, Kanazawa Y, Nishi Y, Wen CY, Inoue K, Kohno S. Expression of CXC receptor 1 and 2 in esophageal mucosa of patients with reflux esophagitis. *World J Gastroenterol.* 2005 Mar 28;11 (12) : 1793-7.
23. Doroshenko T, Chaly Y, Savitskiy V, Maslakova O, Portyanko A, Gorudko I, Voitenok NN. Phagocytosing neutrophils down-regulate the expression of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Blood.* 2002 Oct 1 ; 100 (7):2668-71.
24. Heath H, Qin S , Rao P , Wu L , La Rosa G, Kassam N et al : Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest* 99 : 178-84, 1997.
25. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C : IL-6 : a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 2003, 24 : 25-29.
26. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2006 ; 8 Suppl 2 : S3.
27. Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ong YE, Levi-Schaffer F, Kay AB. Therelationship between allergen-induced tissue eosinophilia and markers of repair and remodeling in human atopic skin. *J Immunol* 2002 ; 169 : 4604-12.
28. Lacy P, Moqbel R. Immune effector functions of eosinophils in allergic airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001 ; 1 : 79-84.
29. Hogaboam CM, Steinhauser ML, Chensue SW, Kunkel SL. Novel roles for chemokines and fibroblasts in interstitial fibrosis. *Kidney Int.* 1998 54 (6) : 2152-9.
30. Chen K, Wei Y, Sharp GC, Braley-Mullen H. Decreasing TNF- α results in less fibrosis and earlier resolution of granulomatous experimental autoimmune thyroiditis. *J Leukoc Biol.* 2006 Oct 17
31. Bove PF, van der Vliet A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. *Free Radic Biol Med.* 2006 Aug 15;41(4):515-27. Epub 2006 May 26. Review.
32. Matthew S. Hayden and Sankar Ghosh, Signaling to NF-kB, *Genes & Development*, September 15, 2004.
33. Mitre E, Norwood S, Nutman TB. Saturation of immunoglobulin E (IgE) binding sites by polyclonal IgE does not explain the protective effect of helminth infections against atopy. *Infect Immun.* 2005 Jul;73 (7) : 4106 -11.
34. Amon U, Amon S, Manke-Heimann A. Pilot study on histamine release from basophils of atopic individuals with low specific IgE

serum levels against casein. *Inflamm Res*. 1999 Apr;48 Suppl 1:S43-4. No abstract available.

35. Jin S, Tian D, Chen JG, Zhu LP, Liu SY, Wang DX. Passive sensitization increases histamine-stimulated calcium signaling and NF-kappaB trans- cription activity in bronchial epithelial cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2006 Jun;27 (6):708-14.