

苦蔘이 알러지성 염증 반응에 미치는 영향

우무륜·구영선*·김동희**

Effects of Sophorae Radix (SFR) on Allergic Inflammation related Atopy Dermatitis

Mao - Lun Yu, 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

Sophorae Radix (SFR) is known as a therapeutic drug that has been used in Oriental traditional medicine for the treatment of skin and mucosal ulcers, gastrointestinal hemorrhage, diarrhea, inflammation and arrhythmia. In the present study, we examined the effects of the aqueous extract of SFR on anti-inflammation, anti-allergic and anti-oxidant effect in various cell lines; they include mouse lung fibroblast cells (hFCs), human mast cells (HMC-1), human monocytic cells (THP-1), and RAW 264.7 cells. Treatment with SFR extract at a concentration of 250 $\mu\text{g/ml}$ for 24h showed no significant decrease in the survival rate of the hFCs. SFR decreased the mRNA expression of IL-8, TNF- α , and IL-6 in HMC-1 cells. SFR extract treatment significantly inhibited the protein expression of IL-6 and IL-8 induced by mite in THP-1 cells and it also did MCP-1 expression. We examined the alternation of histamine release in HMC-1 cells for investigating anti-allergic effect of SFR. Histamine secretion decreased after the treatment with SFR. In addition, SFR extract treatment at a concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, and 200 $\mu\text{g/ml}$ lowered the β -hexosaminidase to 10.3%, 21.7%, and 50.8%, respectively. IC50 of SFR extract in RBL-2H3 cells was 196.85 $\mu\text{g/ml}$. Both activity of NF- κB promoter in RBL-2H3 cells significantly diminished after the dose-dependent treatment of SFR. Therefore, our results indicate that SFR has anti-inflammatory and it may be useful for treating allergic diseases such as atopy dermatitis.

key words : Sophorae Radix (SFR), anti-inflammation, HMC-1, THP-1, RAW 264.7 cells, Cytokines, chemokines

1. 緒 論

韓醫學에서 皮膚瘙癢症은 極烈한 皮膚 瘙癢으로 인하여 抓痕, 血痂, 皮膚肥厚, 苔癬樣變 등의 皮膚

病變을 發生하는 皮膚病이다¹⁻³⁾. 이러한 瘙癢症은 症狀 自體도 問題이지만, 同伴되는 失眠, 精神障礙 등의 理由로 인하여 삶의 質이 크게 低下됨으로써 醫學界의 解決 課題로 擡頭되고 있다.

皮膚瘙癢症은 西洋醫學 側面에서 보면 많은 皮膚科 疾患과 糖尿病, 肝膽系 疾患 등에서 發生하는 하나의 症狀이며, 最近 急激한 增加率로 社會적으로 問題視 되고 있는 아토피 皮膚염의 主 症狀이

* 대전대학교 한의과 대학 청주혜화의원

** 대전대학교 한의과대학 병리학교실

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

· 채택일 : 2006년 12월 15일

기도 하다.

아토피 피부염은 이러한 심한 皮膚瘙癢症을 동반한 紅斑性 丘疹과 鱗屑로 시작하여 水泡 및 漿液性的 滲出物과 痂皮를 보이는 遺傳的 素因이 강한 慢性 혹은 再發性 皮膚 疾患이다^{4,5}. 이는 高血清 IgE 濃度, 環境 抗原에 대한 特異 IgE 濃度 增加와 組織과 末梢 血液의 好酸球增加와 關聯이 있어⁶⁻⁸, IgE 媒介 炎症 反應이 病理 機轉에 重要的 役割을 하는 것으로 알려져 있다⁹.

아토피 피부염은 스테로이드 系統의 藥劑를 통해 治療가 되나, 慢性化되면서 組織의 變成 및 纖維化로 스테로이드 製材에 대한 耐性を 보이게 됨으로써, 組織의 變性 및 纖維化는 아토피 피부염의 治療에 있어서 重要的 障礙 要因이 된다^{10,11}.

韓醫學에서 아토피 피부염은 最近 遺傳過敏性 皮炎, 遺傳過敏性 濕疹, 異位性 皮炎 등으로 言及되어 지며^{12,13}, 歷代 文獻中에 나타난 胎敎瘡, 奶癬, 四彎風 등의 病名과 類似한 것으로 認識되고 있다¹²⁻¹⁶. 特히 『醫宗金鑑·外科心法要結』¹⁷에 나타난 “此證生嬰兒頭頂, 或生眉端, 又名奶癬. 痒起白屑 形如癬疥, 由胎中血熱 …… 皮膚起粟 瘙癢無道 黃水浸潤 延及遍身 卽成濕斂” “此證生在兩腿彎 脚彎, 每月一發 形如風癬 …… 其痒無道 搔破津水形如濕癬”은 症狀과 時期面에서 매우 아토피 피부염과 類似하게 記述되어 있다. 이 밖에도 皮膚 疾患에 관한 歷代 韓醫書에서 오늘날 아토피 피부염과 類似한 症狀를 쉽게 發見할 수 있어, 治療劑 開發을 위한 基礎的 資料가 되고 있다. 特히 胎熱이 嬰兒 아토피 피부염과 同一한 用語로 使用되는 것은 이러한 理由에 起因한다.

最近 아토피 피부염에 대한 治療劑 開發을 위하여 韓醫學界에서도 韓藥材 및 關聯 處方을 中心으로 實驗 및 臨床 領域에서 多樣한 努力이 進行되어 왔다.

本 試料인 苦蔘 (Sophorae Radix)은 콩과에 속한 多年生 初本인 苦蔘의 周皮를 벗긴 根으로 苦骨, 牛蔘, 地蔘 등의 異名이 있다. 性は 寒하고, 味는 苦하며, 淸熱燥濕, 祛風殺蟲, 利尿 作用으로 熱痢, 便血, 赤白帶下, 陰痒, 濕疹, 皮膚瘙癢 등을 治한다¹⁸. 이에 대한 實驗的 研究로 正¹⁹은 “抗酸化

活性成分”을, 晄²⁰은 “抗癌 및 免疫反應”을, 金²¹은 “腎臟細胞 保護活性”을, 辛²²은 “脊髓와 脊髓神經節의 CGRP 免疫反應 神經에 미치는 影響”을 각각 報告한 바가 있으며, 金²³과 正²⁴은 알리지 效能을 報告한 바가 있다.

이에 本 研究에서는 瘙癢症의 內, 外治에 頻用되는 苦蔘을 試料로 向後 治療 物質 開發의 基礎的 資料를 提供하고자, 아토피 피부염의 炎症性 機轉에 關與하는 有關 사이토카인 케모카인, histamine, β-hexosaminidase, NF-κB 및 活性酸素 등에 미치는 影響을 檢索하였다.

II. 實驗方法

1. 재료

1) 약물

본 실험에 사용한 苦蔘 (SFR)은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량은 다음과 같다.

韓藥名	生藥名
苦蔘	<i>Sophorae Radix (SFR)</i>

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-tetrazolim (MTS), RPMI-1640 배양액, trichloroacetic acid, isopropanol, ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), EtOH, LPS, magnesium chloride (MYHYBT12), A23187, PMA (phorbol 12-myristate13-acetate), p-nitrophenyl-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 system사 (U.S.A.) 제품을, LipofectamineTM2000 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 vaccum evaporator, vaccum 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 (Shimazue, 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 (SFR) 300 g에 methanol 2,000 ml을 가

하여 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 (penicillinm 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)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 μ g/ml)}를 넣고 37℃ 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℃, 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 SFR (최종 농도 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml, 31.2 µg/ml 15.6 µg/ml, 7.8 µg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액 (PBS)로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 µl를 가하여 1 시간 동안 4°C에 방치하였다. 이 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 µl/well로 가하고, 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM tris base로 100 µl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, U.S.A)에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA reader (Molecular devices, U.S.A) 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Real Time Quantitative RT-PCR

(1) Human mast cell line (HMC-1) 배양

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

(2) RNA 추출

HMC-1 세포를 24 well plate에 5 x 10⁴ 세포로 각 well에 분주하고, 여기에 추출물 (200, 100, 10 µg/ml)과, 양성대조군으로 CsA (10 µg/ml)를 처리하고 1시간 후 PMA (50 ng/ml)와 A23187 (0.5 µM)를 각각의 well에 첨가하여 CO₂ 배양기에 24시간에 배양한 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNazolB 500 µl를 넣고 용해될 때까지

혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 µl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 µl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 µl와 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 µl의 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 µg을 DNase I (10 U/µl) 2U/tube를 37°C heating block에서 30분간 반응한 후 75°C에서 10분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 µl 10 mM dNTPs mix, 1 µl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 µl), RNA inhibitor로서 1 µl RNase inhibitor (20 U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5 µl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 µl의 M-MLV RT (200 U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다.

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

(4) Real Time Quantitative RT-PCR

HMC-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 transcription하였다.

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

Human interleukin-6	AGCCCTGAGAAAGAGACATGTAACAGAG TAACA
Human interleukin-8 (G3PDH)	AGAGCTCTGTCTGGACCCCAAGGAAAAC CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC
Human TNF-alpha	TGGCCCCAGGCAGTCAGATCATC

$y = x(1+e)^n$, x = starting quantity y = yield, n = number of cycles

e = efficiency로 계산하여 RQ (relative quantitative)를 측정하였다.

5) MCP-1, IL-6, IL-8 생성량 측정

THP-1 세포를 0.5% FBS가 든 RPMI 배지에 2.0×10^6 /ml로 24 well plate에 분주한 후 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 16시간 배양하였다. 배양 후 SFR (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 단백질 MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), IL-6, IL-8의 양을 측정하였다.

6) Histamine 분비량 측정

HMC-1 세포를 24 well plate에 5×10^4 세포로 각 well에 분주하고, 여기에 추출물 (200, 100,

10 µg/ml)과, 양성대조군으로 CsA (10 µg/ml)를 처리하고 1시간 후 PMA (50 ng/ml)와 A23187 (0.5 µM)를 각각의 well에 첨가하여 CO₂ 배양기에 24시간에 배양한 후, 각 항체 anti-IgE 를 coating 완충 용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 30분 방치한 후, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) β-Hexosaminidase 분비량 측정

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

8) NF-κB promoter 활성 측정

48well plate에 RBL-2H3 cell을 5×10^5 cell/ml로 18시간 배양한 뒤 FBS와 antibiotics를 제거한 배양액으로 바꿔준 후, NF-κB 부위가 3 copy로 되어있는 NF-κB-Luc vector와 b-galactosidase assay를 통해 형질 전환의 비율을 측정할 수 있도록 pCMV-β-Luc vector를 4시간 형질전환 시켰다. 세포에 FBS와 antibiotics가 함유된 배양액으로 바꿔준 후 시료와 양성대조군인 PMA를 18시간 처리하고 lysis buffer를 이용하여 세포를 lysis 시켰다. 3차례의 급속 냉동-해동을 거쳐 세포를 파괴하고, 12,000 xg, 5분간 원심분리하여 세포 추출물을 얻어 luciferase substrate와 반응시켜 NF-κB promoter 활성을 측정하였다.

9) 통계처리

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

III. 實驗結果

1. 세포독성에 미치는 영향

SFR의 세포독성을 측정한 결과, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 µg/ml 농도에서 생존율이 각각 55.11 ± 0.15, 77.21 ± 0.13, 101.65 ± 0.13, 112.82 ± 0.22, 125.56 ± 0.16, 122.44 ± 0.20, 119.06 ± 0.69, 111.53 ± 0.13 %로 나타나, 250 µg/ml 이하 농도에서는 유의성 있는 감소는 나타나지 않았다 (Fig. 1).

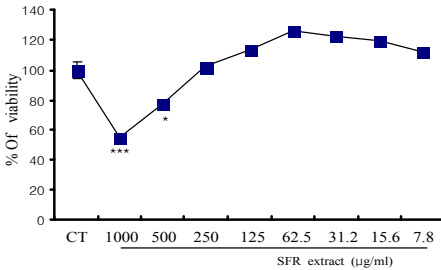


Fig. 1. Effects of SFR on the viability of mouse lung fibroblast

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

2. 사이토카인 발현에 미치는 영향

1) HMC-1에서 IL-8 mRNA 발현에 미치는 영향

HMC-1에서 IL-8 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때, CsA는 0.609, SFR는 200, 100, 50 µg/ml 농도 투여군에서는 각각 0.050, 0.346, 0.054로 나타났다 (Fig. 2).

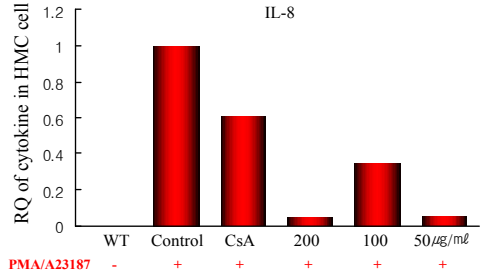


Fig. 2. Inhibitory effects of SFR on IL-8 mRNA gene expression in HMC-1

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

2) HMC-1에서 TNF-α mRNA 발현에 미치는 영향

HMC-1에서 TNF-α mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때, CsA는 0.153, SFR는 200, 100, 50 µg/ml 농도 투여군에서는 각각 0.052, 0.363, 0.038로 나타났다 (Fig. 3).

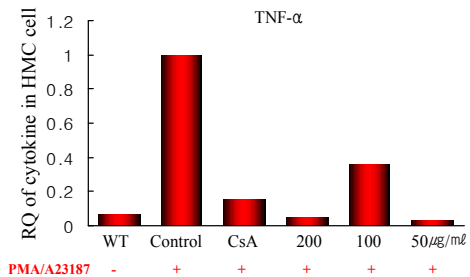


Fig. 3. Inhibitory effects of SFR on TNF-α mRNA gene expression in HMC-1.

Human mast cell line were stimulated with PMA (50 ng/ml) and A23187 (0.5 µM), co-cultured SFR concentration (200, 100, 50 µg/ml) and cyclosporin A (10 µg/ml) for 6 h,

and real-time PCR was used to determine relative TNF- α mRNA expression compared with control. The amount of SFR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration.

3) HMC-1에서 IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

HMC-1에서 IL-6 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때, CsA는, 0.245, SFR는 200, 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여군은 각각 0.394, 0.418, 0.959로 나타났다 (Fig. 4).

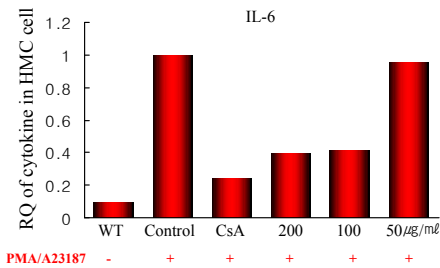


Fig. 4. Inhibitory effects of SFR on IL-6 mRNA gene expression in HMC-1.

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

4) THP-1 세포에서 IL-6 생성량에 미치는 영향

사람의 단핵구인 THP-1 세포에서 IL-6 생성을 측정 한 결과, 정상군은 106.25 \pm 11.5 pg/ml , 대조군은 995.0 \pm 23.0 pg/ml , 양성대조군인 dexamethasone 투여군은 92.5 \pm 22.5 pg/ml , SFR는 200, 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여군은 58.75 \pm 16.5, 167.5 \pm 13.1, 257.5 \pm 23.6 pg/ml 로

대조군에 비하여 큰 폭으로 생성량이 감소되었고, 모든 농도에서 유의성 있게 (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$) IL-6의 생성을 억제하였다 (Fig. 5).

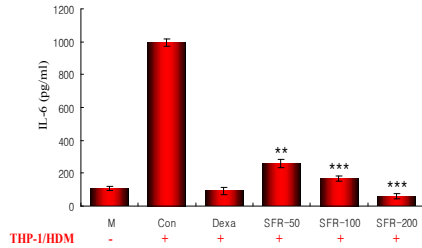


Fig. 5. Inhibitory effects of SFR on HDM induced IL-6 release in THP-1 cells.

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

5) THP-1 세포에서 IL-8 생성량에 미치는 영향

사람의 단핵구인 THP-1 세포에서 IL-8 생성을 측정 한 결과, 정상군은 103.3 \pm 24.1 pg/ml , 대조군은 3532.5 \pm 50.4 pg/ml , 양성대조군인 dexamethasone 투여군은 82.5 \pm 24.1 pg/ml , SFR는 200, 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여군은 1240.83 \pm 124.1, 2549.1 \pm 124.0, 3240.8 \pm 132.1 pg/ml 로 대조군에 비하여 큰 폭으로 생성량이 감소되었고, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있게 (* $p < 0.05$) IL-8의 생성을 억제하였다 (Fig. 6).

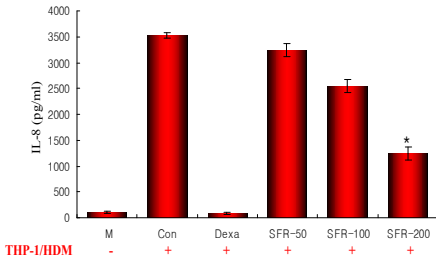


Fig. 6. Inhibitory effects of SFR on HDM induced IL-8 release in THP-1 cells.

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

6) THP-1 세포에서 MCP-1 생성량에 미치는 영향

사람의 단핵구인 THP-1 세포에서 MCP-1 생성을 측정 한 결과, 정상군은 27.8 ± 5.2 (pg/ml), 대조군은 1177.8 ± 20.1 (pg/ml), 양성대조군인 dexamethasone 투여군은 17.8 ± 10.4 pg/ml, SFR는 200, 100, 50 ug/ml 농도 투여군은 21.1 ± 12.1, 439.5 ± 32.1, 781.1 ± 23.1 pg/ml로 대조군에 비하여 큰 폭으로 생성량이 감소되었고, 모든 농도에서 유의성 있게 (***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05) MCP-1의 생성을 억제하였다 (Fig. 7).

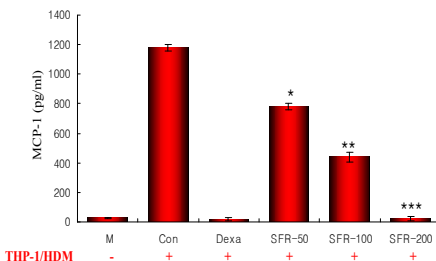


Fig. 7. Inhibitory effects of SFR on HDM

induced MCP-1 release in THP-1 cells.

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

3. Histamine 분비량에 미치는 영향

HMC-1에서 histamine양을 측정 한 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, SFR는 100, 50, 10 ug/ml 농도 투여군에서는 각각 21.9 ± 4.3, 40.1 ± 8.6, 56.0 ± 1.7 nmol로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있게 (***p < 0.001) 감소하였다 (Fig. 8).

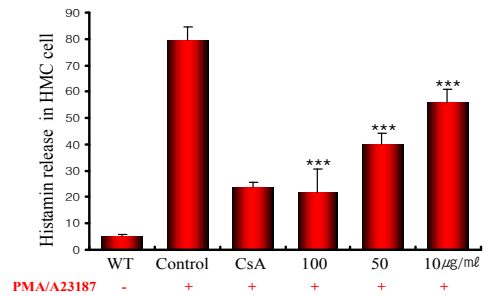


Fig. 8. Effect of SFR extract on histamine release in HMC-1.

Human mast cell line were stimulated with PMA (50 ng/ml), A23187 (0.5uM), co-cultured SFR concentration (100, 50, 10 ug/ml) and cyclosporin A (10 ug/ml) for 6 h, histamine release level for analyzed by ELISA kit. The results are expressed the mean ± S.E. Statistically significant value compared with

control group data by T test (***p < 0.001).

4. β-Hexosaminidase 분비량에 미치는 영향

SFR에 의한 β-Hexosaminidase 분비량을 측정 한 결과, 대조군인 A23187에 의해 방출되는 β-Hexosaminidase 분비량의 SFR에 의한 inhibition 비율이 SFR 10 μg/ml 농도에서는 10.3%, 100 μg/ml 농도에서는 21.7%, 200 μg/ml 농도에서는 50.8%로 유의성 있게 증가하였다. SFR에 의한 β-Hexosaminidase IC50 값은 196.9 μg/ml로 나타났다 (Table 1).

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

Com pound	Inhibition (%)				IC ₅₀ (μg/ml)
	0 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml	200 μg/ml	
SFR	0 ± 0.5	10.3 ± 1.1*	21.7 ± 1.9*	50.8 ± 4.9*	196.9 ± 18

Each value represents the mean ± S.D. *p < 0.05 significantly different from the control

5. NF-κB promoter 활성화에 미치는 영향

SFR에 의한 NF-κB promoter 활성화 억제 효과를 검색한 결과, 정상군에 비해 대조군인 PMA는 4배 증가하였으며, SFR 10, 100, 200 μg/ml 투여 군에서는 농도 의존적으로 감소하였다. SFR 10 μg/ml 농도에서 대조군에 비하여 약 30%, 100 μg/ml 농도에서 약 50%, 200 μg/ml 농도에서 약 80% 정도 유의성 있게 (*p < 0.01) 감소되었다 (Fig. 9).

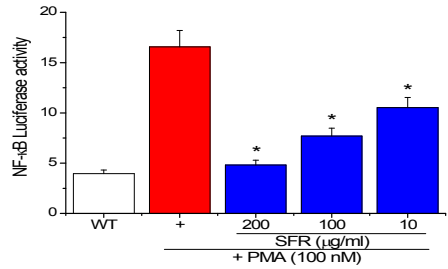


Fig. 9. Effects of SFR on NF-κB dependent luciferase gene expression.

Cells were transiently co-transfected with pGL-3-NF-κB, and pCMV-β-gal. After 18 h, cells were treated with vehicle, PMA, PMA plus SFR. Values are expressed as means ± S.D. of three independent experiments, performed in triplicate. *P < 0.01, significantly different from the PMA.

IV. 考 察

아토피 피부염은 癢痒症에 대한 역치가 낮아져 심한 癢痒感を 呼訴하는 매우 흔한 疾患이다. 臨床的으로는 濕疹型 皮膚病變을 특징으로 하는 嬰兒型으로부터 태선 병변이 주로 형성되는 成人型까지 환자의 年齡에 따라 多樣한 臨床 經過를 보인다^{4,5}. 최근 아토피 疾患이 飲食 첨가제나 環境汚染의 影響 등으로 증가하는 추세이며, 정확한 病因은 알려져 있지 않지만 遺傳的, 環境的, 免疫學的 요인이 복잡하게 연관되어 발병하는 것으로 추정되고 있다.

특히 아토피 피부염은 陽有餘 陰不足한 生理的 특징이 있는 소아에게 많이 발생하며 대개 4세 이후 자연 치유가 되었으나, 최근 산업화로 인한 여러 환경적인 인자와 잘못된 식습관 및 스트레스 등으로 약 50% 정도가 만성화되어 成人型 아토피 피부염으로 진행되고 있다.

韓醫學에서 아토피 피부염은 乳癬, 奶癬, 胎癬, 胎斂瘡, 濕疹, 濕瘡 등에 해당되며, 風熱, 血虛生風, 脾胃氣虛, 濕熱, 肝腎陰虛, 熱毒 등이 주요 병인 병기에 관여한다¹²⁻¹⁷. 특히 가장 많은 비율을 차지하고 있는 영아기 아토피 피부염 병인에 대해

曹²⁵⁾는 “此因在胎 母受時氣邪毒 或外感風熱 誤服湯劑 食五辛薑麵過多 …… 名曰胎熱”, 王²⁶⁾은 “兒在胎中 母多驚恐 或食熱毒之物”이라 하여 임신 중 잘못된 섭생으로 인한 胎熱 형성을 주원인으로 언급하였다.

이에 대한 치료법은 상기한 병인 병기에 따라 다양한 치법이 언급되었으나, 공통적으로 급성기 및 영아기 습진 발작기에는 淸熱·利濕·祛風 치료법이, 만성기 및 영아기 습진의 반복 발작기에는 健脾·燥濕·養血·祛風 치료법이 각각 응용되고 있다^{2,3,12-16)}.

본 시료인 苦蔘 (Sopora Radix)은 豆科에 속한 多年生本草인 苦蔘의 根을 乾燥한 것으로 性은 寒 無毒하고, 味는 苦하고 淸熱燥濕, 祛風殺蟲의 효능이 있어 특히 임상에서는 皮膚疥癬, 濕疹, 膿疱瘡 등의 피부과 치료에 다용 된다¹⁸⁾. 이는 여러 종류의 alkaloids와 flavonoids 화합물을 함유하고, 消炎, 利尿, 強心, 鎮定, 抗癌, 抗腦水腫, 항바이러스, 抗菌, 항원충작용과 항알레르기 작용 등의 藥理作用이 알려져 있는데, 특히 苦蔘의 oxymatrine은 제1형~제4형 過敏反應 모두에 抑制作用을 나타낸다^{18,27)}.

관련 면역 실험에 앞서 본 실험에서는 먼저 SFR가 세포독성에 미치는 영향을 측정한 결과 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하 농도에서는 세포독성이 나타나지 않아, 이보다 낮은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도를 최고 농도로 설정하였다(Fig. 1).

아토피 피부염 및 만성적 염증성 알레르기성 반응에서는 다양한 세포를 통해 섬유화에 관련된 종양성장인자 (tumor growth factor- β , TGF- β), IL-4, IL-13 등의 사이토카인을 분비한다. 이를 통해 섬유모세포 (fibroblast)를 활성화시키는 IL-6의 분비를 증가시켜 많은 섬유모세포의 분화·증식을 초래하며, 세포외기질 (extra cellular matrix)의 생산을 과생산하여 세포 및 조직의 변형과 섬유화를 야기시킨다. 따라서 아토피 피부염 및 만성적 염증성 알레르기성 질환이 스테로이드 계열의 약제를 통해 치료가 되나, 만성화되면서 조직의 변성 및 섬유화로 스테로이드 제제에 대한 내성을 보이게 되는 것이다²⁸⁾.

면역 관련 실험으로 본 실험에서는 먼저 아토피

피부염 및 알레르기성 질환에 관여되는 비만세포 HMC-1에 PMA (50 ng/ml)와 A23187을 처리하여 활성화 시킨 뒤 SFR을 농도 별로 처리하여 염증성 사이토카인 TNF- α /IL-8/IL-6 에 대한 mRNA 유전자 발현을 통해 분석한 결과, 모두 대조군에 비하여 감소하였다. 특히 SFR 투여군의 TNF- α /IL-8 발현은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 양방에서 이미 알려진 면역억제제 cyclosporin A 보다 더 높은 억제 효과를 보였다(Fig. 2, 3, 4).

아토피 피부염의 병인 기전은 아직 완전하게 밝혀지지 않았지만, 환경 내에서 흔한 물질 (알레르기)에 대한 과민한 면역반응 (알레르기 반응)으로 인하여 피부에 만성적인 염증 반응을 유발하여 발생한 것으로 알려져 왔다^{29,30)}. 특히 그 근거로 집먼지 진드기에 노출된 양과 아토피 피부염의 발병 빈도간의 상관성을 보이며³¹⁾, 아토피 피부염의 중증도와도 유의한 상관관계를 보인다고 알려져 있다³²⁾. 또한 환경 내에서 집먼지 진드기에 대한 노출을 줄임으로써 아토피 피부염의 중증도를 감소시킬 수 있다고 알려져 있다. 본 실험에서는 사람의 단구세포인 THP-1 세포에 집먼지 진드기로 활성화시킨 뒤 SFR로 처리하여 집먼지 진드기에 유도되는 염증성 사이토카인에 대한 특이적 억제능을 보았는데, 활성화된 단핵구에서 생산된 MCP-1, IL-6, IL-8 생성량은 농도 의존적으로 억제 되었다(Fig. 5, 6, 7).

특히 IL-8을 제외한 MCP-1 및 IL-6는 스테로이드 제제인 dexamethasone을 대조군으로 하였을 때 유의한 수준의 억제 효과를 보였다. MCP-1은 CCR2에 결합하며 MCP-1 유전자가 제거된 생쥐는 monocytes에 대한 화학주성이 손상을 받고, 특정 균의 감염에 저항성이 약화되는 것이 관찰되었으며³³⁾, 이러한 현상은 CCR2 유전자가 제거된 동물에서 관찰되는 증상과 유사하다고 보고되었다. 이 밖에도 MCP-1은 시험관에서 Th 0 cells 을 Th 2 cytokines을 분비하는 세포로 전환시킨다는 보고가 있다³⁴⁾. 그리고 이를 정맥주사 하였을 때 IL-12의 생성은 감소되고 IL-4의 생성이 증가함으로써, 간접적으로 IgE-의존적 알레르기 염증을 악화시킬 수 있음이 밝혀졌다. IL-8은 초기 염증

반응에 중요하고, 기도 상피세포에서 분비되는 중요한 염증성 케모카인으로서³⁵⁾, IL-8에 의해 기관지 과민성이 유발되고³⁶⁾, 알레르기 비염이나 기관지 천식에서 증가되며³⁷⁻³⁸⁾ 스테로이드에 의해 억제된다. 주로 호중구에 작용하지만 호산구에는 특정한 상황에서 선택적으로 작용한다. 예를 들어서 정상인이 아닌 아토피 환자로부터 분리된 호산구는 IL-8에 대하여 반응한다. 생체 밖에서 IL-5가 호산구를 자극하면 IL-8의 수용체인 CXCR2의 발현이 상향 조절되어 IL-8에 반응을 할 수 있게 된다. 이 때 IL-8은 IL-5로 전 처리된 호산구에서 칼슘의 세포내 증가, actin의 중합화, 화학주성을 나타내기 때문에^{39,40)}, 이러한 cytokines이 병존하는 알레르기 염증이 존재하는 질병 상태에서 호산구에 작용할 수 있음을 시사해 주고 있다.

따라서 MCP-1, IL-6 및 IL-8에 대한 억제 효능은 상기 한 바와 같이 SFR가 단핵구 뿐만 아니라 호중구, 호산구에도 영향을 미치는 다양한 사이토카인을 억제함으로써 알레르기 염증에 대한 강력한 면역 억제제로서의 가능성을 시사해 주고 있다.

알레르기성 과민 반응은 비만세포가 특정 항원 및 알러젠에 의해 비만세포의 탈과립 현상을 통해 주로 히스타민 및 β -Hexosaminidase 외 다양한 과립을 분비하게 된다. 이 중 히스타민은 생체 조직에 널리 분포되어 있으며, 혈관 확장과 모세혈관의 혈장 삼출을 유도한다. 또한 미세혈관의 확장을 일으키는 신경반사에 의한 신경 혈관 반응을 유발하여 임파구와 호산구를 활성화시킴으로써 팽진과 발진을 일으킨다. 따라서 히스타민 유리는 과민반응 및 알레르기, 아토피 피부염 등에서 나타나는 주요 가려움증의 원인이 되어 이에 대한 억제는 치료상에서 매우 중요한 의미를 지닌다⁴¹⁾.

본 실험에서 histamine 분비량은 Fig. 8에서 보는 바와 같이, 정상군이 5.2 ± 0.8 nmol로 나타난 반면, 대조군이 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, SFR는 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여군에서는 각각 21.9 ± 4.3 , 40.1 ± 8.6 , 56.0 ± 1.7 nmol로 나타나 이 역시

대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있게 (***) $p < 0.001$) 감소하였다. β -Hexosaminidase 분비량 역시 농도 의존적으로 억제되었으며, 196.85 ± 18 $\mu\text{g/ml}$ 의 IC50 값을 나타내었다 (Table 1).

상기한 염증성 사이토카인 및 과립들에 대한 세포의 활성화는 대부분 다양한 사이토카인들이 혈관 내피세포 (vascular endothelium) 의 수용체와 결합하여 NF- κ B 경로를 통해 이루어지며, 혈관 내피 세포점착분자 (vascular endothelial cell adhesion molecules)를 증가시킨다⁴²⁻⁴⁴⁾. 따라서 NF- κ B promoter 활성화 억제는 염증 억제의 중요한 의미를 내포하고 있어, 본 실험에서는 RBL-2H3 cell을 통하여 이를 검색하였다. 결과적으로 정상군에 비해 대조군인 PMA는 4배 증가하였으며, SFR 10, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여군에서는 농도 의존적으로 감소하였다. SFR 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군에 비하여 약 30%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 약 50%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 약 80% 정도 유의성 있게 (* $p < 0.01$) 감소되었다(Fig. 9).

이상의 결과로 보아 SFR가 항염증성 효과를 통한 알레르기성 질환 및 아토피 피부염에 대한 치료제로서의 가능성을 확인할 수 있었고, 특히 잘 알려진 양방의 면역억제제와 동일한 수준의 억제 효과를 보임으로써, 스테로이드 제제의 단점을 극복하고 효과적인 치료제로서의 가능성을 제시하였다.

V. 結 論

苦蔘이 아토피 피부염에서 瘙癢과 炎症性 機轉에 關與하는 유관 사이토카인, 케모카인, histamine, β -hexosaminidase, NF- κ B 등에 미치는 影響을 檢索하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 苦蔘은 Human fibroblast cell (hFCs)에 대하여 250 $\mu\text{g/ml}$ 이하 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 苦蔘은 HMC-1에서 IL-8, TNF- α , IL-6 mRNA 발현을 대조군에 비하여 억제하였으며, 특히 IL-6 mRNA 발현은 농도 의존적

로 억제하였다.

3. 苦蔘은 THP-1 세포에서 IL-6, IL-8, MCP-1 생성량을 대조군에 비하여 농도의존적으로 억제하였으며, 특히 IL-6, MCP-1 생성량은 모든 농도에서 유의성 있게 억제하였다.
4. 苦蔘은 HMC-1에서 histamine 분비량을 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있게 감소시켰다.
5. 苦蔘은 β -Hexosaminidase 분비량을 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 10.3%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 21.7%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 50.8% 억제하였으며, IC50 ($\mu\text{g/ml}$)은 196.85 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다.
6. 苦蔘은 NF- κ B promoter 활성을 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰다.

감사의 글

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

VI. 參考文獻

1. 진휘 외 : 皮膚科卷, 學苑出版社, 2002.pp.200-210.
2. 임준화 외 : 現代各中醫 皮膚性病科絶技, 科學技術文獻出版社, 2002.p.131.
3. 번중주외 : 外科與皮膚疾病千首妙方, 科學普及出版社, 1991.pp:422-428.
4. 안성구 역 : 소아피부질환, 고려의학, pp:23-24,2005.
5. Leung DY and Bieber T. Atopic dermatitis. Lancet. 2003.361:151-160.
6. Douglas S. Robinson, Mark Larché, and Stephen R. Durham. Tregs and allergic disease. J. Clin. Invest., Nov 2004; 114: 1389 - 1397.
7. Jonathan Corne, Ratko Djukanovic, Lynette Thomas, Jane Warner, Luigi Botta, Beatrice Grandordy, Daniel Gygax, Christoph Heusser, Francesco Patalano, William Richardson, Erich Kilchherr, Theophil Staehelin, Frances Davis, Wayne Gordon, Lee Sun, Ruey Liou, George Wang, Tse-Wen Chang, and Stephen Holgate. The Effect of Intravenous Administration of a Chimeric Anti-IgE Antibody on Serum IgE Levels in Atopic Subjects: Efficacy, Safety, and Pharmacokinetics. J. Clin. Invest., Mar 1997; 99: 879 - 887.
8. Ishizaka K. Regulation of IgE synthesis. Ann Rev Immunol 1984;2:159-182.
9. Peter J. Barnes. Corticosteroids, IgE, and atopy. J. Clin. Invest., Feb.2001;107: 265-266.
10. Aoyama H, Tabata N, Tanaka M, Uesugi Y, Tagami H. Successful treatment of resistant facial lesions of atopic dermatitis with 0.1% FK506 ointment. Br J Dermatol 1995;133:494-496.
11. Paller A, Eichenfield LF, Leung DYM, Stewart D, Appell M, the Tacrolimus ointment study group. A 12- week study of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in pediatric patients . J Am Acad Dermatol 2000.1;44: S47-S57
12. 이원문 외 : 皮膚性病手冊, 人民衛生出版社, 2004.p.193.
13. 서선후 외 : 皮膚病中醫診療學, 人民衛生出版社, 1995.p.254.p.310.p.316.
14. 가민 외 : 中醫皮膚科臨床實踐, 貴州科學出版社, 2002.p.202.
15. 왕발우 편저 : 皮膚病性病簡易療法, 人民軍醫出版社, 2005.p.212.
16. 범서강 : 中西醫結合治療皮膚病性病, 光東人民出版社, 2005.p.188.
17. 오겸 외 : 의중금감 하. 대성문화사.

- 1991.502.
18. 전국한의과대학공동교재편찬위원회 : 본초학, 영림사, 2004.p.227.
 19. 정희진 : 고삼의 항산화 활성성분, 부경대학교 학위논문, 2005.
 20. 최원학 : 苦參藥鍼이 抗腫瘍 및 免逆反應에 미치는 影響, 대전대학교 학위논문, 1998.
 21. 김윤정 : 고삼의 신장세포 보호 활성 성분 분석, 서울대학교 학위논문, 2005.
 22. 신현중 : 실험적 관절염 흰쥐 모델에서 고삼 추출액이 척수와 척수신경절의 CGRP 면역반응 신경원에 미치는 영향, 우석대학교 학위논문, 2002.
 23. 김찬중 : Allergy性 接觸皮膚炎에 對한 苦蔘, 黃連의 iontophoresis 治療 效果, 경희대학교 학위논문, 2005.
 24. 정선영 : 苦參(Sophorae radix)이 생쥐의 B-cells에 미치는 항알레르기 효과, 경희대학교 학위논문, 2002.
 25. 曹世榮 : 活幼心書, 上海, 大東書局, 卷中(明本論), 1933.pp.2~8.
 26. 王肯堂 : 六科准繩(兒科), 서울, 成輔社, 1976.pp.1439~1440.
 27. Eun-Rhan Woo., Jong Hwan Kwak., Hyoung Ja Kim. and Hokoon Park.: A new prenylated Flavonol from the roots of *Sophora flavescens*. *J. Nat. Prod.*, 1998.61,1552-1554.
 28. O'Hara KA, Kedda MA, Thompson PJ, Knight DA. Oncostatin M: an interleukin-6-like cytokine relevant to airway remodelling and the pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(8):1026-32.
 29. Hanifin JM, Cooper KD, Ho VC, Kang S, Krafchik BR, Margolis DJ, et al. Guidelines of care for atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2004;50: 391-404
 30. Oh JW, Kim KE, Pyun BY, Lee HR, Choung JT, Hong SJ, et al. Nationwide study for epidemiological change of atopic dermatitis in school aged children between 1995 and 2000 and kindergarten aged children in 2003 in Korea. *Pediatr Allergy Respir Dis* 2003;13:227-37.
 31. Colloff MJ. Exposure to house dust mites in homes of people with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1992;127:322-7.
 32. Jeon SY, Yum HY, Rhu JW, Jeoung BJ, Kim KE, Lee KY. Correlation between house dust mite allergen concentrations in scalp dander and clinical severity of atopic dermatitis in children. *Pediatr Allergy Respir Dis* 1999;9:32-40.
 33. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL et al : Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 1998.187:601-8.
 34. Karpus WJ, Kennedy KJ : MIP - 1 alpha and MCP - 1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/ Th2 lymphocyte differentiation . *J Leukoc Biol* 1997.62:681-7.
 35. Harada A, Seikido N, Akahoshi T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 1994;56:559-64.
 36. Fujimura M, Xiu Q, Tsujiura M, Tachibana H, Myou S, Matsuda, et al. Role of leukotriene B4 in bronchial hyperresponsiveness induced by interleukin 8. *Eur Respir J* 1998;11:306-11.
 37. Kurashima K, Mukaida N, Fujimura M, Schroder JM, Matsuda T, Matsushima K. Increase of chemokine levels in sputum precedes exacerbation of acute asthma attacks. *J Leukoc Biol* 1996;59:313-6.

38. Nonaka M, Nonaka R, Jordana M, Dolovich J. GM-CSF, IL-8, IL-1R, TNF- α R, and HLA-DR in nasal epithelial cells in allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1675.
39. Marini M, Vittori E, Hollemborg J, Mattoli S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8 in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:1001.
40. Schweizer RC, Welmers BA, Raaijmakers JA, Zanen P, Lammers JW, Koenderman L. RANTES- and interleukin-8-induced responses in normal human eosinophils: effects of priming with interleukin-5. *Blood* 1994;83:3697-704.
41. 심정연 외 : 먼지진드기 항원을 이용한 고식적인 면역요법이 말초혈액 호염기구 히스타민 유리능에 미치는 영향, 대한 천식알레르기학회지 2000 ; 020(05) : 731-740.
42. Xia J, Song X, Bi Z, Chu W, Wan Y. UV-induced NF- κ B activation and expression of IL-6 is attenuated by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cultured human keratinocytes in vitro. *Int J Mol Med*. 2005;16(5):943-50.
43. Cataisson C, Pearson AJ, Torgerson S, Nedospasov SA, Yuspa SH. Protein kinase C α -mediated chemotaxis of neutrophils requires NF- κ B activity but is independent of TNF α signaling in mouse skin in vivo. *J Immunol*. 2005;174(3):1686-92.
44. van Hogerlinden M, Rozell BL, Toftgard R, Sundberg JP. Characterization of the progressive skin disease and inflammatory cell infiltrate in mice with inhibited NF- κ B signaling. *J Invest Dermatol*. 2004;123(1):101-8.