

# 寒多熱少湯의 항Allergy 및 항염증 효과

김재원 · 신상우<sup>1</sup> · 이영선<sup>2</sup> · 이금홍 · 박종현\*

대구한의대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 부산대학교 한의학전문대학원, 2: 성덕대학 전통건강자원개발과

## Anti-Allergic Effect of Handayeolso-Tang

Jae Won Kim, Sang Woo Shin<sup>1</sup>, Young Sun Lee<sup>2</sup>, Geum Hong Lee, Jong Hyun Park\*

Department Pathology, College of Oriental Medicine, DeaguHaany University,  
1: Pusan National University, 2: College of Sung Duks

Handayeolso-Tang(HDT) has been used as traditional medicine for the treatment of Taeumin TaeYang-Hanguel. The present study was conducted to investigate the anti-allergic activity of Handayeolso-Tang(HDT). We investigated the anti-allergic effects of HDT in RBL-2H3 basophilic leukemia cells by compound48/80, a mast cell degranulator and compound 48/80 induced anaphylactic shock in mice. HDT significantly inhibited  $\beta$ -hexosaminidase and histamine release from compound 48/80 stimulated RBL-2H3 cells. In addition, HDT effectively inhibited anaphylactic shock in mice by 45% at a dose 120 mg/mouse versus PBS treated control after the I.p injection(8 mg/kg) of compound 48/80. The *in vitro* anti-inflammatory activities of HDT in LPS-stimulated RAW 264.7 cells were investigated. HDT inhibited NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells and effectively dowregulated the expression of iNOS mRNA and iNOS protein expression in LPS -stimulated RAW 264.7 cells. These result provide evidences that HDT may be beneficial in the treatment of allergic inflammtory disease.

Key words : Handayeolso-Tang, compound48/80,  $\beta$ -hexosaminidase, histamine release, nitric oxide

### 서 론

알레르기성 비염은 최근 환경오염과 공해의 증가 등에 따라 세계적으로 점차 증가 추세에 있으며, 알레르기성 비염이 아토피 질환 중 가장 흔한 질환에 속한다고 보고되고 있다<sup>1)</sup>.

알레르기 비염은 발작성이고 반복적인 噴嚏, 水樣性 鼻漏, 鼻閉塞 및 鼻癢痒感, 眼痒 등을 주요 증상으로 하는 鼻粘膜의 염 증성 질환으로, 화분, 집먼지, 비듬, 깃털, 음식물 등의 흡인성 및 식이성 항원에 의해 유발되는 제 I 형 과민 반응의 일종이다<sup>2)</sup>. 서양 의학적 치료 방법으로는 원인 항원에 대한 회피 요법과 약물 요법이 사용되고 있으나 아직까지도 병을 완치시킬 수 있는 약제가 없고, 대부분의 약제가 장기간 사용할 경우 효과가 떨어지는 등의 한계에 직면해 있어<sup>3)</sup> 한의학적인 치료 방법이 알레르기 질환 치료에 시도되고 있으며, 또한 체질과의 관련성을 중요하게 생각하는 경향이 높아지고 있다<sup>4)</sup>.

한의학에서 알레르기 비염은 鼻飢, 噴嚏, 鼻涕 등의 범주에

속하는데<sup>5)</sup>, 폐가 外感六淫, 특히 風寒에 傷하였을때 발생하거나, 內鬱七情으로 장부기혈에 영향을 미쳤을 때 발생한다고 보고 있다<sup>6)</sup>. 그동안 알레르기 비염에 관한 한의학적 연구로는 강 등<sup>7)</sup>, 신 등<sup>8)</sup>을 비롯한 많은 후세방의 실험적 혹은 임상적 연구는 물론, 최근에는 사상체질 관점에서의 연구도 활발히 진행되어 황<sup>9)</sup>은 사상의학적 치료가 알레르기성 비염에 효과가 있다고 보고하였고, 고 등<sup>9)</sup>도 알레르기성 비염 환자의 사상체질 분류와 치료가 임상적으로 효과가 있다고 보고 하였으며, 사상체질의 항알레르기 작용에 대한 실험연구 결과도 보고되고 있다<sup>10-12)</sup>.

寒多熱少湯은 李<sup>13)</sup>의 『東醫壽世保元』에 처음으로 收載되어 太陰人의 太陽寒厥症에 사용된 처방으로, 실제 임상에서 肺虛한 상태에서 風寒邪가 침입하여 발생하는 알레르기성 鼻炎에도 활용되고 있으나 이에 대한 연구보고는 아직 없었다.

이에 著者は 寒多熱少湯의 항알레르기 효과에 관한 과학적인 증거를 제시하고자 정상세포 증식에 미치는 영향, 알레르기 반응의 주요 세포인 비만세포와 상동성이 높은 RBL-2H3 basophilic leukemia 세포주를 이용하여 알레르기 반응 시 이들 세포의 탈과립 지표로 알려진  $\beta$ -hexosaminidase 및 histamine 분비 억제에 미치는 영향, 비면역자극제인 compound 48/80 자

\* 교신저자 : 박종현, 대구시 수성구 상동 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : moguri@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2248

· 접수 : 2008/01/23 · 채택 : 2008/02/14

극에 의한 anaphylatic shock에 미치는 영향과 RAW 264.7 대식 세포주를 이용하여 염증반응과 관련된 Nitric Oxide 생성 및 조절기전에 미치는 영향 등을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 검액의 준비

실험에 사용한 藥材는 옴니허브에서 구입하여 良質의 것을 精選하여 사용하였으며, 처방은 『東醫壽世保元<sup>13)</sup>』에 收載된 寒多熱少湯으로서 내용 및 1첩 분량은 다음과 같다.

Table 1. Components of Handayeolso-tang(HDT)

Oriental Crude Drug	Crude Drug	Scientific name	Dose (g)
薏苡仁	Coicis Semen	Coix Lachryma-jobi L.	12
乾栗	Castaneae Semen	Castanea crenata Siebold et Zuccarini	12
萊菔子	Raphani Semen	Raphanus sativus L.	8
杏仁	Armeniaca Semen	Prunus armeniaca var. ansu Maxim	4
黃芩	Scutellariae Radix	Scutellaria baikalensis Georgi	4
麻黃	Ephedrae Herba	Ephedra sinica Stapf	4
麥門冬	Ophiopogonis Radix	Liriope platyphylla Wang. et Tang	4
桔梗	Platycodi Radix	Platycodon grandiflorum	4
총량			52

寒多熱少湯의 10첩 분량 520 g을 증류식 약탕기 (CME 592, 미강기업, Korea)에 전탕 하였다. 전탕 후 얻어진 3 L를 rotary evaporator (Eyela N-11, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan)를 이용하여 30℃에서 감압농축 하여 750 ml를 얻었다. 寒多熱少湯의 농축액은 -70℃에서 하루 동안 동결시킨 뒤 동결건조기(VFDT0005-3085, Biocros, Korea)를 이용하여 -70℃에서 동결건조 시켰다. 농축시 당도는 21.21brix이고, 동결건조 후 무게는 75.48 g(수율 14.5%)으로 PBS에 녹여 2.5 μm와 0.45 μm의 membrane filter (Milipore Co., USA)로 여과하여 실험에 사용하였다.

#### 2) 실험동물

무균 환경에서 사육된 5주령의 수컷 ICR 마우스와 6주령의 암컷 마우스를 (주)오리엔트 (경기도 가평, 한국)에서 구입하여 각 실험에 사용하였다. 마우스는 사료와 물을 무제한으로 공급하면서 실험 전 약 1주간 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 조명은 12시간씩 dark/light 주기로 실시하였고, 온도는 22±2℃, 습도는 55±2%를 유지하였다.

### 2. 방법

#### 1) 비장세포 분리

마우스를 경추 탈골시킨 후 무균적으로 비장을 적출하여 주위 조직을 제거하였다. Slide glass로 부드럽게 압착하여 비장을 분쇄한 후 4℃ Hanks Balanced Salt Solution (GibcoBRL, NY, U.S.A)용액으로 2회 세척하였다. Ficoll-pague (Amersham Biosciences, Sweden)을 이용하여 1,800rpm 에서 30분 원심 분리하여 임파구 층을 수거한 후, RPMI 1640 (GibcoBRL, NY, U.S.A)

media로 1회 더 세척하고 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 RPMI 1640에 현탁 시켰다. 현탁된 세포는 일정액을 취하여 0.4% trypan blue에 동량으로 혼합한 후 hemacytometer를 이용하여 세포수를 산정하였다.

#### 2) 세포주 배양

마우스 대식세포 세포주 RAW 264.7 (America Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A)은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GibcoBRL, NY, U.S.A)에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (GibcoBRL, NY, U.S.A)과 1mM sodium pyruvate, 100 IU/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin (GibcoBRL, NY, U.S.A)을 첨가하여 100 mm dish에 80% 세포의 밀도를 유지하면서 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. Rat의 basophilic 세포주인 RBL-2H3 세포주는 RPMI 1640 Medium (GibcoBRL, NY, U.S.A)에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (GibcoBRL, NY, U.S.A)과 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin (GibcoBRL, NY, U.S.A)을 첨가하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

#### 3) 비장세포의 증식능 측정

마우스 비장세포를 2×10<sup>6</sup>cells/ml 세포가 되게 세포수를 조정하여 96 well culture plate에 100 μl 분주한 다음 각 well에 시료를 농도별로 첨가한 후 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 넣어 48시간 배양하였다. 배양 후 배양액 100 μl에 세포 증식능 시약을 20 μl를 첨가한 후 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 1시간 30분 배양한 후 490 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 임파구 증식능을 측정하기 위해 CellTiter 96® AQueous one solution cell proliferation assay kit (Promega, Madison, WI, U.S.A) 시약을 사용하였다.

#### 4) β-hexosaminidase의 측정

RBL-2H3 세포를 수거하여 Tyroid buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 11.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6mM glucose, PH 7.2)로 1회 세척하였다. 5×10<sup>5</sup>cells/ml 로 조절한 후 Tyroid buffer에서 부유시켰다. 부유된 세포에 농도별로 寒多熱少湯을 첨가하여 37℃ 배양기에서 15분간 반응시킨 후 compound 48/80 (1 mg/ml, Sigma, U.S.A)을 첨가하고 37℃ 배양기에서 20분간 반응시켰다. 배양 후 RBL-2H3 세포주를 4℃에서 10분간 방치하여 반응을 종결시키고 상층액을 회수하였다. 상층액에 동량의 1mM p-nitrophenyl-β-acetylglucosamide를 넣고 37℃ 배양기에서 1시간 동안 반응시킨 후 2배량의 sodium bicarbonate (PH 10.2)의 첨가로 반응을 종결시키고 407 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. β-hexosaminidase의 분비지표(release index)는 다음과 같이 계산하였다.

$$\beta\text{-hexosaminidase release index} = \frac{(\text{O.D at 470nm of sample})}{(\text{O.D at 470nm of positive control})} \times 100$$

#### 5) Histamine의 측정

RBL-2H3 세포를 수거하여 Tyroid buffer(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 11.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4

mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucose, pH 7.2)로 1회 세척하였다. 세포 수를 5×10<sup>5</sup>cells/ml 로 조절한 후 Tyroid buffer에서 부유시켰다. 부유된 세포에 농도별 寒多熱少湯을 첨가하여, 37℃ 배양기에서 15분간 반응시킨 후 compound 48/80 (1 mg/ml, Sigma, U.S.A)를 첨가하고 37℃ 배양기에서 20분간 반응시켰다. 배양 후 RBL-2H3 세포주를 4℃에서 10분간 방치하여 반응을 종결시킨 후 상층액을 회수하였다. Histamine의 정량은 Shore가 보고한 fluorometer를 이용한 측정방법을 사용하였다. 간단히 설명하면, 회수한 상층액 1 ml에 0.2 ml의 1N NaOH, 0.1 ml의 1% OPA (o-phthalaldehyde)를 첨가하고 실온에서 5분간 방치하였다. 여기에 1N HCl 0.2 ml 첨가하여 반응을 종결시킨 다음, fluorometer (Genios, Tecan, Austria)를 사용하여 360 nm의 excitation 파장과 450 nm의 emission 파장을 사용하여 측정하였다.

#### 6) Nitric oxide 측정

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 Griess (Sigma)시약을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μl와 Griess 시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% n-naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 100 μl를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 농도는 sodium nitrite를 사용하여 만든 표준곡선에 의해 산출하였다.

#### 7) RT-PCR을 이용한 iNOS 유전자 분석

RNA분리는 RNA-Bee (TEL-TEST, INC, U.S.A)를 이용하여 분리하였다. 마우스 비장세포에서 RNA를 분리하기 위하여 0.1% DEPC (diethyl pyrocarbonate)가 첨가된 PBS로 비장세포를 3회 세척 후 RNA-Bee 900 μl를 첨가하여 균질화시켰다. 여기에 클로로포름 100 μl를 넣고 15분간 얼음에 정치시켰다. 그 후 4℃, 12,000rpm에서 15분간 원심 분리하고 상등액을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20℃에서 45분간 정치한 후 원심 분리하여, 70% DEPC-Ethanol로 1회 세척하였다. RNA를 실온에서 건조시킨 후 DEPC가 첨가된 증류수에 일정량 희석하여 spectrophotometer로 농도를 측정하였다. 5× RT buffer 2 μl (10 mM dATP 0.25 μl, 10 mM dGTP 0.25 μl, 10 mM dTTP 0.25 μl, 10 mM dCTP 0.25 μl, MMLV reverse transcriptase (200 U/μl) 0.25 μl, RNase inhibitor (28 U/μl) 0.25 μl, 50 uM oligo dT primer 0.5 μl, DEPC-distilled water 4 μl)를 PCR tube에 넣어 42℃에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였다. PCR은 10× PCR buffer 3 μl (25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.8 μl, 10 mM dATP 0.3 μl, 10 mM dGTP 0.3 μl, 10 mM dTTP 0.3 μl, 10 mM dCTP 0.3 μl, 50 uM sense 및 antisense primer 0.25 μl, Tag polymerase (5 U/μl, Promega Co.) 0.25 μl)를 혼합하고, 여기에 증류수로 최종 부피가 20 μl 되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 산물을 5 μl 첨가하여 혼합한 뒤 PCR 장치에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 94℃에 3분간 1 cycle 반응 후 94℃ 45초, 57℃ 45초, 72℃ 45초간 35 cycle 반응시켰으며, 72℃에서 10분간 extension을 시행한 후 반응을 완료시켰다. 증폭된 산물은

1.2% agarose gel에 전기 영동하여 Gel Doc (Bio Lad, Italy)를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이오니아사 (Bioneer Co, Choongbook)에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 아래 표(Table 2)와 같다.

Table 2. Primer sequences of iNOS gene expression

	Oligonucleotide sequence
G3PDH	5' -CCA CCC AGA AGA CTG TGG ATG GC-3'
	3' -CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-5'
iNOS	5' -GAC AAG CTG CAT GTG ACA TC-3'
	3' -GCT GGT AGG TTC CTG TTG TT-5'

#### 8) Western blotting을 이용한 iNOS 단백질 발현 분석

세포를 차가운 PBS로 3회 수세한 다음 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 10 μg/ml leupeptin, 2 mM PMSF, 2 μg/ml aprotinin 10 μg/ml Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10μg/ml Na<sub>5</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)를 가하여 (100 μl/1×10<sup>6</sup>cells) 균질화하고 단백질을 추출한 다음 4℃에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 모았다. BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, U.S.A)로 정량한 후 동일량의 단백질 (30 또는 40 μg)을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, nitrocellulose membrane (NC, Schleicher & Schuell BioScience, Germany)에 transfer하였다. 이 NC를 3% non-fat dry milk를 함유한 Tris buffered saline-Tween (TBS-T; 10mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 1시간 동안 반응 시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단하고 anti-iNOS 항체와 반응시킨 후 2차 항체인 anti-mouse IgG로 1시간 30분 반응시켰다. 각 반응사이에 TBS-T로 10분씩 3회 30분 동안 수세하였다. 이어서 항체에 대한 대응 단백질 band를 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK) detection 방법으로 확인하였다.

#### 9) Compound 48/80 에 의한 전신성 아나필락시스 측정

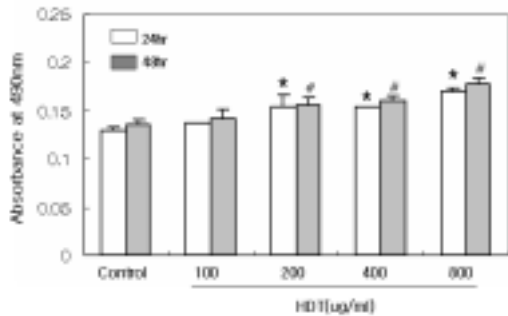
비만세포의 탈과립제로 compound 48/80 8 mg/kg을 생쥐의 복강 내에 주사하였으며, 寒多熱少湯을 1, 20, 40 및 80 mg/mouse 용량으로 compound 48/80 주사 1시간 전에 경구 투여하였다. 치사율 실험은 아나필락시스 쇼크를 유발시킨 후 1시간 동안 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 비장세포 증식능에 미치는 영향

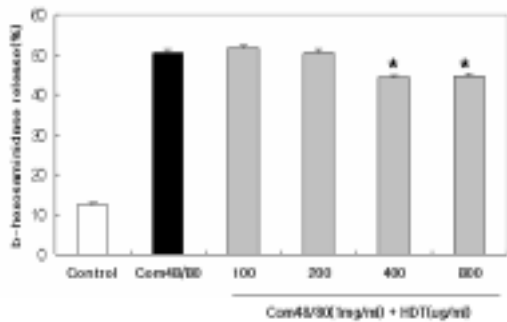
寒多熱少湯이 면역계에 미치는 영향을 조사하기 위하여 마우스 비장세포 증식능에 미치는 효과를 관찰하였다. 한달열소탕 열수추출액을 농도별(100, 200, 400, 800 μg/ml)로 분리된 마우스 비장세포에 처리하여 24시간, 48시간 세포 증식능을 관찰하였다. 그 결과 24시간 배양 후 마우스 비장세포의 증식능은 한달열소탕 처리 농도에 따라 0.138±0, 0.154±0.013, 0.154±0.001 및 0.17±0.003 으로 대조군 0.13±0.003 에 비해 200, 400, 800 mg/ml 에서 유의한 세포 증식능이 관찰되었다. 48시간 배양 후 마우스 비장세포의 증식능은 한달열소탕 처리 농도에 따라 0.142±0.01,

0.156±0.007, 0.161±0.004, 0.177±0.007의 결과를 보였고 200, 400, 800µg/ml 에서 유의한 세포 증식능이 관찰되었다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Effect of on the cell proliferation in mouse spleen cells. Mouse spleen cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured with 100, 200, 400, 800 mg/ml of Handayeolso-tang(HDT) for 24hr and 48hr. Control group was incubated with RPMI1640 medium only. Results are expressed as means + S.D in triplicate cultures. \*, # significant difference from control( $P < 0.05$ ).

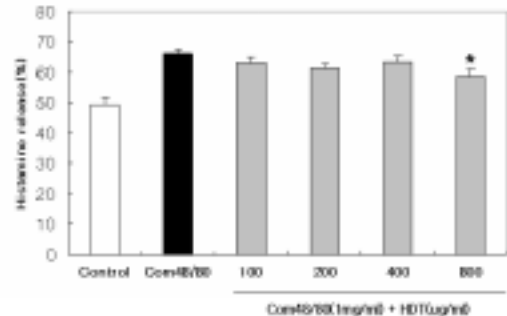
2. RBL-2H3 세포에서 β-hexosaminidase 분비억제에 미치는 영향  
寒多熱少湯의 항알러지 효과를 살펴보기 위해 비만세포나 호염구 세포의 분비과립에 초래하는 β-hexosaminidase 분비에 미치는 영향을 RBL-2H3 basophilic 세포주에서 관찰하였다. RBL-2H3 세포에 탈과립을 유도하기 위하여 세포내 칼슘 유입을 증가시켜 세포내 탈과립을 유도할 수 있는 compound 48/80을 사용하였다. 실험결과, compound 48/80 자극에 의한 β-hexosaminidase 분비가 compound 48/80 단독처리 50.4±0.9%에 비해 한다열소탕 처리시 농도별에 따라 51.7±0.8, 50.5±1.0, 44.2±0.9, 44.7±0.4%의 결과가 관찰 되었고 400, 800 µg/ml 에서 유의하게 β-hexosaminidase 분비가 억제 되었다(Fig. 2).



**Fig. 2.** Inhibitory effect of Handayeolso-tang(HDT) on the β-hexosaminidase released from RBL-2H3 cells by compound 48/80. β-hexosaminidase release (%) induced by compound 48/80. All values are means ± S.D from three experiments. \* significant difference from compound 48/80 alone ( $P < 0.05$ )

3. RBL-2H3 세포에서 Histamine 분비억제에 미치는 영향  
한다열소탕의 항알러지 효과를 살펴보기 위해 알레르기 반응의 원인세포로 알려진 비만세포나 호염구 세포의 분비 과립에 존재하는 histamine의 분비에 미치는 영향을 RBL-2H3 basophilic 세포주를 이용하여 관찰하였다. RBL-2H3 세포에 탈과립을 유도하기 위해 compound 48/80을 사용하였다. 실험결

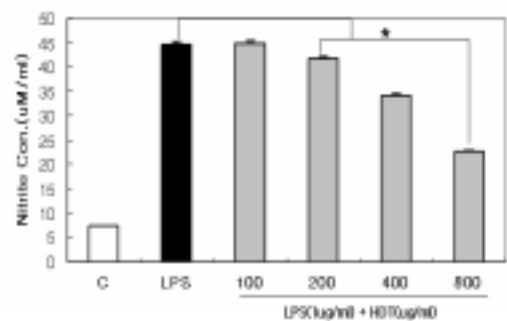
과, compound 48/80 자극에 의한 histamine 분비가 compound 48/80 단독처리 66.1±1.5%에 비해 한다열소탕 처리에 의해 histamine 분비가 62.9±2.3, 61.6±1.2, 63.6±1.7, 58.5±2.6%로 나타나 800 µg/ml에서 유의하게 억제 되었다(Fig. 3)



**Fig. 3.** Inhibitory effect of Handayeolso-tang(HDT) on the histamine released from RBL-2H3 cells by Compound 48/80. Results were expressed as % release of histamine. All values are means ± S.D from three experiments. \* significant difference from compound 48/80 alone ( $P < 0.05$ )

4. LPS로 자극된 RAW 264.7 마우스 대식세포에서 NO 생성 억제에 미치는 영향

한다열소탕의 항알러지 효과를 살펴보기 위해 알레르기 반응의 원인세포로 알려진 비만세포나 호염구 세포의 분비 과립에 존재하는 histamine의 분비에 미치는 영향을 RBL-2H3 basophilic 세포주를 이용하여 관찰하였다. RBL-2H3 세포에 탈과립을 유도하기 위해 compound 48/80을 사용하였다. 실험결과, compound 48/80 자극에 의한 histamine 분비가 compound 48/80 단독처리 66.1±1.5(µM/ml)에 비해 한다열소탕 처리에 의해 histamine 분비가 62.9±2.3, 61.6±1.2, 63.6±1.7, 58.5±2.6(µM/ml)으로 나타나 800µg/ml에서 유의하게 억제 되었다(Fig. 4)



**Fig. 4.** Effect of Handayeolso-tang(HDT) on production by LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with lipopolysaccharide (LPS ; 1 µg/ml) for 24hr in the presence or absence of HDT at indicated doses. The amount of NO released by cells were measured by the method of Griess. All values are means ± S.D from three experiments. \* significant difference from LPS alone ( $P < 0.05$ )

5. LPS로 자극된 RAW 264.7에서 iNOS mRNA 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향.

한다열소탕에 의한 RAW 264.7 마우스 대식세포에서 NO 생성의 억제가 iNOS mRNA 유전자 발현 및 iNOS 단백질 발현과

의 관련성을 조사하기 위해 RAW 264.7 마우스 대식세포주에 LPS와 한달열소탕을 처리한 후 iNOS mRNA 유전자 발현과 iNOS 단백질 발현을 RT-PCR 과 Western blotting 으로 관찰하였다. 실험결과, LPS 단독 처리시 iNOS mRNA 유전자 발현이 강하게 유도됨이 관찰되었으며, 이러한 유전자 발현은 한달열소탕 처리에 의해 감소됨이 관찰되었으며, iNOS 단백질 발현 또한 한달열소탕 처리에 의해 감소됨이 관찰되었다(Fig. 5, 6).

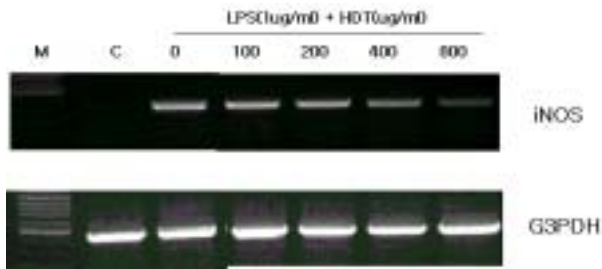


Fig. 5. Effect of Handayeolso-tang(HDT) on iNOS mRNA expression by LPS-stimulated with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of various concentration of HDT for 24hr. After stimulation, total RNA was isolated from cultured cells using RNA-Bee and RT-PCR performed. G3PDH was used control genes. M: 100bp site marker.

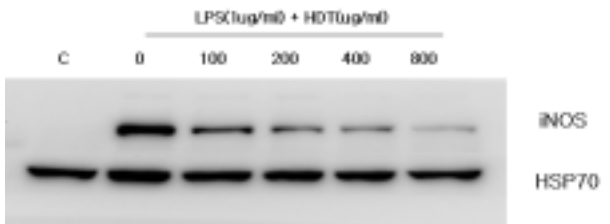


Fig. 6. Effect of Handayeolso-tang(HDT) on iNOS protein expression by LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS ; 1 μg/ml) in the presence or absence of various concentration of HDT for 24hr. The protein extracts were prepared, and the samples analyzed for iNOS expression by western blotting as described in the method. HSP70 was control protein.

Table 3. Compound48/80-induced systemic anaphylaxis

Dose(mg/mouse)	Compound 48/80(8 mg/kg)	Mortality(%)
Saline	+	100
HDT	+	100
1	+	100
20	+	100
40	+	100
80	+	100
120	+	55
120	-	45

Saline or Handayeolso-tang(HDT) was orally administrated at various doses 1hr before the compound 48/80 i.p injection. Mortality (%) within 2hr following compound 48/80 injection was represented as the number of dead mice×100/total mice of experimental mice. Each group consists of 10 mice.

6. Compound48/80 에 의해 유도된 아나필락시스 반응에 미치는 영향

한달열소탕의 즉시형 과민반응에 미치는 영향을 조사하기 위해 비면역학적 자극물질인 Compound 48/80을 사용하여 전신성 아나필락시스를 유도후 치사율을 관찰하였다. Compound 48/80을 복강에 투여 후 치사율을 관찰한 결과, 생리식염수를 경구 투여한 대조군은 100% 치사율이 관찰되었다. 그러나

Compound 48/80 복강투여 1시간 전 한달열소탕을 1, 20, 40, 80, 100, 120(mg/mouse)를 경구 투여군에서는 120 mg/mouse 에 서만 치사율이 55% 로 감소되었다(Table 3).

고찰

비염은鼻腔을 싸고 있는 粘膜의 염증이라고 정의되며 이러한 鼻腔粘膜의 염증이 알레르기 抗原에 대한 過敏反應에 의해 유발될 경우를 알레르기성 鼻炎이라고 말하는데<sup>14,15</sup>, 증상 발현의 시기에 따라 通年性和 季節性으로 구별한다. 通年性 알레르기성 鼻炎은 코가 가렵고, 발작적으로 재채기를 하며 물같이 맑은 콧물을 흘리고 때로는 코 막힘을 호소하는데, 症狀이 慢性的이고 持續的이어서 患者는 항상 입을 벌리고 호흡을 하거나, 코를 골거나 부비동염 또는 감기를 달고 산다는 표현을 하기도 한다. 季節性 알레르기성 鼻炎은 원인 抗原과 접촉이 있는 특정한 계절에만 증상이 나타나는 것으로 재채기가 주로 나타나고, 코 가려움증, 물 같은 콧물, 코 막힘 등의 전형적인 알레르기성 鼻炎의 症狀 외에도 결막, 인두, 위장관 기타 다양한 症狀이 동반될 수 있으며, 심하면 천식이 동반될 수 있다<sup>16</sup>.

알레르기성 비염에 대한 서양의학적인 치료으로는 회피요법, 대증요법, 그리고 면역요법이 있다. 회피요법이란 알레르기를 일으킬 수 있는 인자로부터의 회피를 말하는 것으로 봄, 여름에는 꽃가루와의 접촉을 피하기 위해 창문을 닫아 두거나 겨울에는 공기 건조를 막기 위해 적정 습도를 유지해 주며 자주 공기를 정화하고 진드기가 많은 카펫 등을 제거하는 등의 방법이다. 대증요법은 약물요법과 수술요법이 있는데 회피요법이 곤란한 경우 시행하게 되며, 수술요법은 하비갑개 조각술인 신경절단술이 있다. 위의 방법으로 치료되지 않는 경우에는 면역요법을 시도하게 된다. 면역요법은 기인성 항원을 찾아내어 이를 면역학적으로 처리하는 탈감작 요법이 시행되고 있다. 이렇듯 알레르기성 비염의 서양의학적 치료가 여러 측면에서 연구 검토되고 있고 치료효과도 현저하게 나타나지만 이것이 일시적이고 그 부작용으로 인하여 장기 투여할 수 없다는 것이 한계이다<sup>17</sup>.

한의학에서 알레르기 鼻炎은 鼻飧, 噴嚏, 鼻涕, 飧涕 등의 범주에 해당되는데<sup>18</sup>, 『素問玄機原病式·六氣爲病編』<sup>19</sup>에서는 “飧爲鼻出清涕也”, “嚏,鼻中因痒而氣噴作于聲也”라 하여 “飧”은 알레르기 鼻炎의 水樣性 鼻漏의 증상과 “嚏”는 발작성 噴嚏의 증상과 유사하다는 것을 알 수 있으며, 한의학적으로 볼 때 肺氣가 虛弱한 상태에서 風寒에 外感되어서 肺의 宣發肅降 기능이 실조되거나, 脾肺陽氣가 虛한 상태에서 寒冷한 기운에 노출되거나, 生冷한 음식물에 손상을 받아 水濕이 犯肺하여 鬱滯하거나 腎陽이 虛損되어 肺失溫照하게 되는 경우에 나타나는 질환이다<sup>20</sup>.

寒多熱少湯은 李<sup>13</sup>의 『東醫壽世保元』에 처음 기재된 처방으로, 薏苡仁, 麥門冬, 萊菔子, 桔梗, 麻黃, 黃芩 및 杏仁으로 구성되어 太陰人 太陽寒厥症에 응용되어 왔는데<sup>21</sup>, 李<sup>13</sup>는 단지 惡寒만 있고 發熱이 없는 것을 厥이라고하고 太陰人 寒厥症의 原因을 勞心焦思之餘에 胃脘이 衰弱해서 表局이 虛한 틈을 寒邪가 外被하여 正邪相爭하는 形勢로 나타난 것이라 하였다.

寒多熱少湯을 구성하고 있는 약재들의 효능을 살펴보면, 薏苡仁은 涼無毒 味甘淡으로 利水滲濕, 除濕痺, 清肺排膿, 健脾止瀉하고, 麥門冬은 寒無毒 味甘微苦로 滋陰清熱, 潤肺生津, 強心利尿하며, 萊菔子是 平無毒 味辛甘으로 行滯消食, 降氣祛痰하고, 桔梗은 平無毒 味苦辛으로 宣肺祛痰, 排膿利氣하며, 麻黃은 溫無毒 味辛苦로 發汗解表, 宣肺平喘, 利水하고, 黃芩은 寒無毒 味苦로 清熱燥濕, 止血安胎하며, 杏仁은 溫有小毒 味苦로 止咳定喘, 潤腸通便하고<sup>22)</sup>, 乾粟은 溫無毒 味鹹으로 厚腸胃, 補腎氣한다. 따라서 上記 處方이 發汗시켜 表寒之邪를 풀어주며 潤肺祛痰시켜 肺의 清陽을 升提<sup>23)</sup>시켜 주는 藥物들로 구성되어 있음을 알 수 있으며, 肺虛한 상태에서 風寒邪가 침입하여 발생하는 알레르기성 鼻炎에도 유효하다는 것을 알 수 있다.

이에 본 연구에서는 寒多熱少湯의 항알레르기 효과를 조사하기 위해 寒多熱少湯이 정상 면역세포에 미치는 영향, 알레르기 반응의 주요 세포인 비만세포 및 호염구에서 알레르기 반응시 탈과립 지표로 알려진  $\beta$ -hexosaminidase 및 histamine 분비 억제에 미치는 영향, 비면역자극제인 compound 48/80 자극에 의한 Anaphylactic shock에 미치는 영향, RAW264.7 대식세포주를 이용염증반응과 관련된 Nitric Oxide 생성 및 조절기전에 미치는 영향 등을 관찰하였다.

비장세포는 2차 면역장기로 대식세포와 많은 적혈구로 구성되어 있고 노화된 적혈구가 파괴되고 제거되는 곳으로 면역반응에 중요한 역할을 하는 곳으로 알려져 있다<sup>33)</sup>. 따라서 본 실험에서는 한달열소탕을 시간별(24시간, 48시간) 농도별(100, 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 처리하여 마우스 비장세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하였다. 실험 결과, 처리시간 24시간과 48시간 양쪽 모두에서 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군에 비해 세포증식능이 유의성 있게 증가하였다. 이는 寒多熱少湯이 면역세포를 활성화하여 저하된 면역기능을 강화시켜 줄 수 있음을 알 수 있었다.

염증반응에 관여하는 면역세포로는 대식세포, 비만세포, 호염구 등이 알려져 있지만 특히 알레르기 염증반응의 대표적인 세포로는 비만세포와 호염구가 알려져 있다<sup>24,27,42)</sup>. 비만세포는 즉시형 과민 반응에서 일어나는 염증 반응에서 핵심적인 역할을 수행할 뿐 아니라 그 외 다른 염증 과정이나 생리적인 면역의 진행과 조절에 주도적인 역할을 하고 있음이 알려져 있다<sup>25,26,28,42)</sup>. Histamine 과  $\beta$ -hexosaminidase는 이들 세포에서 탈과립의 지표로 알려져 있어 알레르기 억제물질의 생물활성 측정에 유용하게 사용되고 있다<sup>24,28,39,41)</sup>. 본 연구에서는 랫드 점막 비만세포와 상동성이 높은 랫드 RBL 2H3 basophilic leukemia 세포주인 RBL-2H3 세포주를 지시세포로 사용하여 비만세포의 탈과립을 유도하는 compound 48/80을 사용하여 탈과립을 유도 하였다. Compound 48/80은 비만세포내로 칼슘 유입을 증가시켜 세포내 칼슘 수준을 증가시키고 세포내 cAMP phosphodiesterase를 활성화시켜 세포내 cAMP 수준을 감소시킴으로써 비만세포의 탈과립을 일으키는 비면역학적 자극제로 알려져 있다<sup>26,27)</sup>. Compound 48/80은 고농도에서 비만세포로부터 약 90%의 히스타민을 유리시키는 것으로 알려져 있으며 적당량의 compound 48/80은 아나필락시스의 기전을 연구하기 위한 히스

타민 유리 촉진제로서 사용되고 있다<sup>26,36,42)</sup>. 따라서 본 실험에서는 寒多熱少湯의 항알레르기 효과를 알아보기 위해 RBL-2H3 세포주에 비면역자극제인 compound 48/80로 자극 후 이들 세포의 분비과립에 존재하는  $\beta$ -hexosaminidase와 histamine 분비에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과,  $\beta$ -hexosaminidase 분비가 寒多熱少湯 처리 시 400, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의하게 억제됨이 관찰되었으며, Histamine 분비는 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의하게 억제됨이 관찰되었다. 이러한 결과는 寒多熱少湯이 비만세포의 탈과립으로 촉발되는 알레르기 염증질환에 효과적일 것이라는 것을 시사하였다.

대식세포는 면역반응의 초기반응과 비특이적 면역반응을 담당하며, 생체내에서 감염, 염증 등의 반응에 중요한 역할을 하는데, 선천면역 뿐만 아니라 적응면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성 유지에 관여 하는 것으로 알려져 있다<sup>32-34,37,40)</sup>. 대식세포는 superoxide, hydrogen peroxide 및 NO와 같은 중간물질을 생산하며, 탐식된 이 물질을 분해 시킬 때 생성되는 IL-1, TNF- $\alpha$  및 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있는 것으로 보고 되고 있다. 그 중 산화질소 (nitric oxide; NO)는 주로 대식세포에서 생성되는 작고 불안정한 무기가스로 이중적 생물학적 성질을 가지고 있어서, 저농도의 NO는 신경전달물질 등과 같은 작용을 하나, 과도한 NO 생성은 급·만성 염증에 관여하여, 숙주세포의 파괴와 염증조직의 상해를 초래하는 것으로 보고 되어 있다. 이렇듯 NO는 상황에 따라서 세포, 조직 혹은 개체에 이로울 수도 있고 해로울 수도 있어서 상황에 맞게 NO 분비를 촉진시키거나 억제시킴으로써 인체 생리현상을 조절할 수 있으므로, NO 생성을 조절할 수 있는 물질을 찾고자 하는 많은 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>29,30,35)</sup>. 따라서 본 실험에서 寒多熱少湯의 항염증성 효과를 관찰하기 위해 LPS로 RAW 264.7 마우스 대식세포주를 자극하여 과도한 NO 생성을 유도한 후 寒多熱少湯의 NO 생성 조절에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과, LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 유도된 NO 생성은 寒多熱少湯의 처리 농도별에 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의하게 억제됨이 관찰되었으며 NOS mRNA 유전자 발현 및 iNOS 단백질 발현이 감소됨이 관찰되었다. 이러한 결과는 寒多熱少湯이 염증성 질환의 예방 및 치료에 효과적일 것으로 생각된다.

알레르기는 발생기전에 따라 I-IV 형으로 나누는데 제 I형 과민 면역반응의 특징은 감작된 개체가 동일한 항원에 다시 노출되면 즉시 알레르기 반응이 일어나는데 이러한 반응을 아나필락시스라 한다<sup>27,38)</sup>. I형 알레르기의 대표적 반응인 전신 아나필락시스 쇼크는 비만세포의 세포질에 칼슘농도를 증가시켜 histamine을 유리하는 물질인 compound 48/80을 복강 내 주입하여 비만세포의 탈과립을 유도하면 제 I형 알레르기는 순간적인 histamine 방출에 의해서 혈관 확장되어 저혈압 등으로 사망을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 寒多熱少湯의 아나필락시스 쇼크에 미치는 효과를 살펴보기 위해 비면역학적 자극물질인 compound 48/80을 사용하여 전신성 아나필락시스를 유도 후 치사율을 관찰한 결과, 120 mg/mouse 에서만 치사율이 55%로 감소되었다.

以上の 실험결과를 종합하여 볼 때 太陰人 寒多熱少湯의 항알레르기 및 항염증효과가 알레르기 반응 시 비만세포 세포의 탈과립 지표로 알려진  $\beta$ -hexosaminidase 및 histamine 분비 억제, 염증반응과 관련된 NO 생성 조절 등에 관여됨이 관찰되었으므로 새로운 항알레르기성, 항염증성 기능 물질로 이용될 수 있을 것이라 생각된다.

## 결론

寒多熱少湯의 항알레르기 효과를 관찰하기위하여 寒多熱少湯이 정상세포의 증식에 미치는 영향, 알레르기 반응의 주요 세포인 비만세포와 상동성이 높은 RBL-2H3 basophilic leukemia 세포주를 이용하여 이들 세포의 탈과립 지표로 알려진  $\beta$ -hexosaminidase 및 histamine 분비 억제에 미치는 영향, 비면역 자극제인 compound 48/80 자극에 의한 anaphylatic shock에 미치는 영향, RAW264.7 대식세포주를 이용하여 염증반응과 관련된 NO 생성 및 조절기전에 미치는 영향 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

寒多熱少湯이 정상면역세포에 미치는 영향을 살펴보기 위해 2차 면역장기인 비장의 세포증식능을 조사한 결과, 寒多熱少湯을 처리에 의해 비장세포증식능이 유의성 있게 증가되었다. 寒多熱少湯의 항알레르기 효과를 측정하기위하여 비만세포의 탈과립을 일으키는 비면역학적 자극제인 compound 48/80을 사용  $\beta$ -hexosaminidase분비에 미치는 영향을 관찰한 결과, 寒多熱少湯의 처리에 의해  $\beta$ -hexosaminidase 분비가 유의하게 억제되었다. 寒多熱少湯의 항알레르기 효과를 측정하기위하여 비만세포의 탈과립을 일으키는 비면역학적 자극제인 compound 48/80을 사용 histamine 분비에 미치는 영향을 관찰한 결과, 寒多熱少湯의 처리에 의해 Histamine 분비가 유의하게 억제되었다. 寒多熱少湯의 항염증 효과를 관찰하기위해 급·만성 염증이 과도한 생성되는 NO 조절에 미치는 영향을 조사한 결과 寒多熱少湯이 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 유도된 NO 생성을 유의하게 감소시킴이 관찰되었으며 iNOS mRNA 유전자 발현 및 iNOS 단백질 발현 또한 억제되었다.

이상의 결과로 보아 寒多熱少湯은 알레르기 반응 세포의 탈과립 지표인  $\beta$ -hexosaminidase 및 histamine 분비 억제와 염증반응과 관련된 NO 생성 억제를 통해 염증과 관련된 알레르기 질환에 유용하게 사용될 수 있을 것이라 생각되며 추후 새로운 항알레르기성, 항염증성 기능 물질로 이용될 수 있을 것이라 사료된다.

## 참고문헌

1. 신민호. 알레르기성 비염의 약물요법. 대한알레르기학회지 12(4):475-481, 1992.
2. 김선근. 알레르기성 비염에 있어 특이적 IgE측정법(MAST CLA)의 임상적 의의. 대한이비인후과학회지 38(9):1336-1342, 1995.
3. 민양기. 임상 비과학. 서울, 일조각, p 240, 2004.
4. 송일병. 사상체질의학과 allergy 질환. 사상체질학회지 14(2):

- 18-24, 2002.
5. 金璟濬, 蔡炳允. 桂枝湯加味方의 알레르기 비염에 대한 치험 보고. 대한외관과학회지 10(1):99-106, 1989.
6. 황경식. 알레르기비염에대한 사상의학적 치료. 대한한의학회지 14(2):414-417, 1993.
7. 강상훈 외. 辛荑清肺飲이 알레르기 비염에 미치는 효과에 대한 실험적 연구. 대한안이비인후과학회지 18(3):18-25, 2005.
8. 신경숙 외. 荊芥連翹湯 加味가 알레르기성 비염에 미치는 효과에 대한 임상보고. 혜화의학. 1(3):185-196, 1994.
9. 고우석외. allergy성 비염환자의 사상체질 분류와 치료에 대한 임상적 고찰. 맥진학회지 6: 75-87, 2001.
10. 안보국, 송정모. 소음인 광항정기산의 항 Allergy 작용. 대한외관과학회지 13(3):75-88, 2001.
11. 박승찬. 태음인 청심연자탕의 항 Allergy 작용에 관한 실험적 연구. 사상체질의학회지 15(2):166-179, 2003.
12. 서용. 소양인 荊防地黃湯의 항 Allergy 작용. 박사학위논문, 2003.
13. 李濟馬. 東醫壽世保元. 서울, 행림출판, pp 107-111, 123, 1986.
14. 盧寬澤. 耳鼻咽喉科學. 서울, 一潮閣, pp 203-204, 1996.
15. 柳慧定 外. 鼻塞症에 關한 文獻 考察, 大韓外官科學會誌 16(2):32, 1995.
16. 의학교육연수원편. 가정의학. 서울, 서울대학교출판부, pp 54-55, 2001.
17. 민양기, 최종욱, 김리석. 일차진료를 위한 이비인후과학임상. 서울, 일조각, pp 52-59, 2000.
18. 채병용. 동의안이비인후과학. 서울, 집문당, pp 321-328, 1994.
19. 劉完素. 河間三六書. 서울, 成輔社, pp 275-276, 1976.
20. 王凍應. 中醫耳鼻咽喉科學. 北京, 科學出版社, pp 132-136, 1993.
21. 전국 한의과대학 사상의학교실. 改訂增補 四象醫學. 서울, 集文堂, pp 287-288, 421, 2005.
22. 辛民敎. 原色臨床本草學. 서울, 永林出版社, p 232, 308, 392, 420, 516, 564, 578, 1998.
23. 王昂. 增補本草備要. 서울, 高文社, p 146, 1984.
24. 최선필, 강미영, 남석현. 생화학, 분자생물학. 호염구세포주와 북강 비만세포에서 유색미 겨 추출물의 알레르기 염증 억제활성. 한국응용생명화학회지(구 한국농화학회지) 48(4):315-321, 2005.
25. 조정제, 임강현. 사람 비만세포주에서 사이토카인발현에 대한 다엽 주성분 Epigallocatechin - 3 - Gallate 의 억제효과. 대한분초학회지(분초분과학회지) 16(2):57-63, 2001.
26. 김성화, 김대근, 채병숙, 신태용. 원보 : 비만세포 매개 즉시형 알레르기 반응에 대한 연명초의 억제 효과. 생약학회지 34(2):132-137, 2003.
27. 박은수, 신민교, 송호준. 자작나무 및 뽕나무 껍질추출물이 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구. 대한분초학회지(분초분과학회지) 13(2):57-68, 1998.
28. Eun-Kyung Park, Min-Kyung Choo, Myung Joo Han, Dong-Hyun Kim. Ginsenoside Rh1 possesses antiallergic and anti-inflammatory activities.nt Arch Allergy Immunol. 133(2):113-120, 2004.

29. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지 39: 52-63, 1999.
30. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide iosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life Sci. 69: 625-635, 2001.
31. Roitt. 김주덕 외 譯. 로이트 필수면역학. 서울, 고문사, pp 35-62, 1991.
32. 류혜숙, 김현숙. 생강 추출물 투여가 마우스 면역세포활성에 미치는 영향. 한국영양학회지 37(1):23-30, 2004.
33. Young Sun Lee, Ok Kyung Han, Chan Woo Park, Tae Won Jeon, Wang Keun Yoo, Seong Ho Kim, Hyo Jung Kim. Pro-inflammatory cytokine gene expression and nitric oxide regulation of aqueous extraced Astragali radix in RAW 264.7 macrophage cells. Journal of Ethnopharmacology. 100: 289-294, 2005.
34. 이영선, 이금홍, 김상찬, 권영규, 신상우. 건강 열수추출액이 Methotrexate에 의해 유도된 마우스 면역억제 조절에 미치는 영향. 대한동의생리병리학회지 20(4):896-901, 2006.
35. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two b-carboline alkaloids extracted from Melia azedarach. Eur J Pharmacol 406: 301-309, 2000.
36. Ikarashi, Y., Yuzurihara, M., Sakakibara, I., Takahashi, A., Ishimaru, H. and Maruyama, Y. Effects of an oriental herbal medicine, "Saiboku-to", and its constituent herbs on compound 48/80-induced histamine release from peritonealmast cells in rats. Phytomedicine 8: 8-15, 2001.
37. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Kwon, T.O., Yun, Y.G., Kim, N.Y., Chung, H.T. Inhibitory effects of methanol extract of Cyperus rotundus rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol 76: 59-64, 2001.
38. Shin, H.Y., Yun, Y.B., Kim, J.Y., Moon, G., Shin, T.Y., Kim, H.S. and Kim, H.M. Inhibitory effect of mast cell-mediated acute and chronic allergic reactions by Dodutang. Immunopharmacol Immunotoxicol 24: 583-594, 2002.
39. Shin, T.Y. and Lee, J.K. Effect of Phlomis umbrosa root on mast cell-dependent immediate-type allergic reactions by anal therapy. Immunopharmacol Immunotoxicol 25: 73-85, 2003.
40. Daikonya, A., Katsuki, S. and Kitanaka, S. Antiallergic Agents from Natural Sources 9. Inhibition of Nitric Oxide Production by Novel Chalcone Derivatives from Mallotus philippinensis (Euphorbiaceae). Chem Pharm Bull. 52: 1326-1329, 2004.
41. C. JcFowler, M. Sandberg and G. Tiger. Effect of water-soluble cigarette smoke extracts upon the release of  $\beta$ -hexosaminidase from RBL-2H3 basophilic leukaemia cells in response to substance P, compound 48/80, concanavalin A and antigen stimulation. Infalamm. res. 52: 461-469, 2003.
42. Venarske, D., deShazo, R.D. Molecular mechanisms of allergic disease. South Med J. 96(11):1049-1054, 2003.