

大薊의 주성분인 Silibinin이 알레르기 염증반응에 미치는 效果

김범락 · 김경준

경원대학교 한의과대학 안이비인후피부과학 교실

The Effect of Silibinin Extracted from *Cirsium Japonicum* on Allergic Inflammation

Beom-Rak Kim · Koung-Jun Kim

Silibinin is the major active molecule of silymarin, the mixture of flavonolignans extracted from *Cirsium japonicum* (CJ). It has been used for treatment of hepatitis and inflammation related diseases. The aim of this study was to prove whether Silibinin has effectiveness for allergic inflammation. Silibinin processes the inflammatory reaction in phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) plus calcium ionophore A23187 (PMA plus A23187) stimulated human mast cell line (HMC-1). Its effect was examined by ELISA, RT-PCR, Western blot, and Luciferase assay. The results were Silibinin inhibited the expression of histamine, TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-6 (interleukin-6), and IL-8 (interleukin-8). Silibinin suppressed NF- κ B (nuclear factor kappa B) activation in stimulated HMC-1 (human mast cell-1). This effect was mediated through inhibition of phosphorylation and degradation of I κ B α , an inhibitor of NF- κ B. Silibinin significantly inhibited induction of NF- κ B promoter mediated Luciferase assay. These results suggest that Silibinin has a potential molecule for therapy of mast cell-derived allergic inflammatory diseases.

Key words : Silibinin, *Cirsium Japonicum*, Allergic Inflammation

1. 서론

알레르기 질환은 인체의 부적절한 과민성 염증 반응에서 발생하며 급격한 환경오염, 공해의 증가, 석유화학제품의 범람, 식품첨가제 등의 사용이 늘어남에 따라 전세계적으로 점진적으로 증가 추세

교신저자 : 김경준, 인천광역시 중구 용동 117번지 경원대학교 부속
길한방병원 한방안이비인후피부과
(Tel. 032-770-1215, E-mail : kkjo215@hanmail.net)

• 접수 2010/03/06 • 수정 2010/04/01 • 채택 2010/04/09

* 이 논문은 2010년도 경원대학교 교내연구비 지원에 의하여 수행되었음.

를 보이고 있다¹⁾. 특히 아토피피부염, 기관지천식, 알레르기비염은 어릴 때부터 순차적으로 발생하는 질환으로 상호 밀접한 관계를 가지고 있으며 이중 알레르기 비염은 유병율이 전인구의 약 10에서 25%에 까지 이르고 있다²⁾.

인체의 모든 염증반응은 대식세포에서 분비하는 cytokine과 염증매개물들의 국소혈관에 대한 효과로 야기된다³⁾. 그런데, 부적절한 염증반응인 알레르기 염증반응에서도 IgE의 생성과 비만세포의 활성화에 의해 분비되는 cytokine과 많은 염증매개물질들은 중요한 역할을 담당한다.

알레르기 염증반응은 외부로부터 항원이 침입하여 인체가 Immunoglobulin E (IgE)를 생성하고 이로 인해 비만세포가 활성화되면 활성화된 비만세포는 세포밖으로 histamine, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukine-6 (IL-6), interleukine-8 (IL-8), nuclear factor kappa b (NF- κ B)와 같은 염증매개물질들을 방출하는 것으로부터 시작된다.

이중 histamine은 비만세포 내 과립에 저장되어 있다 방출되며, 표적세포에 있는 H1 수용체와 결합하여 내장과 기관지 평활근의 수축, 세정맥의 투과성 증가, 배상세포에 의한 점막분비 증가의 기능을 하고⁴⁾, TNF- α 는 비만세포, 대식세포, T세포의 알레르기 메카니즘에서 분비되어^{5,6)}, 혈관내피세포에 유착인자의 발현을 야기하며 백혈구를 축적시켜 염증반응을 나타내게 한다. 또한 IL-6는 T세포의 활성을 증가시켜 IgE의 생산을 유도함으로써 만성염증반응을 초래하고⁷⁾ IL-8 (chemokines cxcl 8)은 호중구, 호산구, T-림파구와 같은 세포에 화학적 주성인자로 작용하여 염증반응을 활성화하게 된다⁸⁾. 그리고, NF- κ B는 TNF- α , IL-6와 같은 목적 유전자의 프로모터 부위에 NF- κ B의 결합부위가 존재함으로써 염증성 사이토카인 (TNF- α , IL-6)과 케모카인 (IL-8등)의 발현을 조절하는 전사인자로서의 기능을 가진다^{9,10)}.

이와 같이 알레르기 염증반응에서 histamine, TNF- α , IL-6, IL-8, NF- κ B의 분비는 염증을 시발하고 지속시키는 핵심적인 사항이며 한편으로 이들의 분비량에 대한 적절한 조절여부는 항염증작용의 유무를 가르는 중요한 기준이 된다. 따라서 이들 인자에 대한 조절여부는 알레르기 염증반응의 발생과 지속에 지대한 영향을 미쳐 알레르기 질환의 치료에 중요한 관건이 될 것으로 사료된다.

大薊 (*Cirsium japonicum*, CJ)는 국화과에 속하는 영경귀를 말하며 silibinin(silybin), silydianin, silychristin¹¹⁾ 등의 주요성분을 함유하고 있다. 한의학에서는 消腫약물로 분류되어¹²⁾ 소화기 비뇨생식기의 염증 증상을 치료하고 각종 외과질환 및 염증성 질환의 치료에 이용되고 있으며¹³⁾ 大薊 약침액은 항산화작용이 큰 것으로 보고된 바 있다¹⁴⁾. 아울러 그 주성분의 하나인 Silibinin은 간질환 및 염증에 의한 여러 질환 치료제로 이용되고 있는 점에¹⁵⁻¹⁷⁾ 착안하여 大薊추출물과 大薊 주성분인 Silibinin이 각종 염증질환뿐만 아니라 알레르기 염증질환에도 효과가 있을 것이라 기대되어 염증반응 및 알레르기 염증반응에서 공통적으로 중요한 역할을 담당하는 histamine, TNF- α , IL-6, IL-8, NF- κ B 등의 분비량 조사를 통해 大薊추출물과 Silibinin의 항염증작용을 검증하고자 본 실험에 임하게 되었다.

이에 본 연구에서는 비만세포에 PMA와 A23187로 염증을 유도한 후 大薊추출물과 大薊의 주성분인 Silibinin의 효과를 알아보기 위하여 염증반응 시 세포에서 분비되는 histamine, TNF- α , IL-6, IL-8, NF- κ B 등의 수치를 비교 측정하고, 이를 다시 mRNA의 발현도를 측정함으로써 분자생물학적인 관점에서 검증하였다. 그 결과 大薊의 주성분인 Silibinin이 histamine, TNF- α , IL-6, IL-8의 분비량을 감소시키고, NF- κ B의 활성을 막음으로써 염증성 매개물질의 분비에 대한 억제효과를 기대 할 수 있으며 높은 세포생존율을 나타

내는 유의한 결과를 확인 할 수 있었다. 이에 이 결과로 大薊의 주성분인 Silibinin이 각종 알레르기 질환의 치료에도 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각되어 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 大薊은 옴니허브 (Korea)에서 구입하여 100 g을 정량 후 80% 에탄올을 가하여 30분 동안 2회에 걸쳐 초음파진동을 이용하여 추출액을 획득하였다. 지름 185 mm 종이여과지 (Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압 여과 하였다. 그 후 감압 농축기(Eyela, Japan)를 사용하여 농축한 다음, 동결 건조기 (Freezedryer, Matsushita, Japan)로 동결 건조하여 분말을 얻어 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였다.

2) 시약

세포배양액인 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)은 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), A23187, Silibinin은 Sigma aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, MTS는 Promega (Madison, UI, USA)에서 Histamine assay kit는 Oxford Biomedical Research (Oxford, MI, USA)에서 각각 구입하였다. Anti-human TNF- α 항체, Biotinylated anti-human TNF- α 항체, 그리고 재조합 human TNF- α 는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. Anti-human IL-6/IL-8 항체, Biotinylated anti-human IL-6/IL-8 항체, 재조합 human

IL-6/IL-8 단백질은 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

Western blot 분석에 사용된 NF- κ B, I κ B, p-I κ B 항체는 Santacruz Biotechnology (CA, USA)에서 구입하였다. 또한 Luciferase assay를 위해 사용된 Luciferase assay system은 Promega (Madison, UI, USA)에서 구입하였다.

3) 세포주

HMC-1 (Human Mast Cells)

사람 비만세포인 HMC-1 cell은 10% Fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)에 100 U/ml Penicillin과 100 μ g/ml Streptomycin (P-S)을 첨가한 배지에서 2~3일 마다 배양액을 교환해 주었으며, 배양 환경은 37 $^{\circ}$ C 포화 습도로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. HMC-1 세포는 24 well 배양용기에서 배양한 후 각 농도의 대계 추출물 및 Silibinin을 1 시간 전 처리한 후 PMA와 A23187을 처리하여 세포를 얻어 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) MTS assay

HMC-1 세포에 大薊추출물 및 Silibinin을 농도 별로 처리했을 때 생존율을 MTS assay로 조사하였다. 세포를 24 well culture plate에 각각 1 \times 10⁶개가 되도록 심어준 후 大薊추출물 및 Silibinin을 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml로 1시간 전 처리 후 25 nM PMA와 1 μ M A23187을 24시간 처리한 후 MTS를 최종농도 0.25 mg/ml로 넣어 2 시간 반응하였다. 490 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 세포증식효과에 대한 영향을 조사하였다.

2) 히스타민 측정

HMC-1세포에 Silibinin을 0.1 mg/ml과 0.2 mg/ml의 농도로 1시간 전처리 후 PMA와 A23187로 6시간동안 반응시켰다. 그 다음 배양된 배지를 얻어 Histamine assay kit을 사용하여 히스타민을 측정하였다.

3) TNF- α , IL-6, IL-8 측정

배양된 HMC-1 세포의 배지 내에서 TNF- α , IL-6, 그리고 IL-8을 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)방법을 이용하여 실험하였다. 즉 Anti-human TNF- α , IL-6, IL-8 capture 단클론 항체를 96 well plate에 각각 2 μ g/ml 로 코팅하고 4 $^{\circ}$ C에서 12시간동안 반응시켰다. 코팅 후 비특이성 반응을 막기 위해서 10% Fetal bovine serum (FBS)를 함유한 Phosphate-buffered saline (PBS)로 구성된 blocking solution을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응하였다. 다시 0.05% tween 20을 함유한 PBS인 washing buffer로 4회씩 세척한 후 표준이 되는 재조합 단백질 TNF- α , IL-6, IL-8을 적절한 농도로 계대 희석하여 준비하고, 각 한약재의 배양 상청액을 희석하여 각 well에 100 μ l씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시켰다. 다시 washing buffer로 4회씩 세척한 후 Biotinylated anti-human TNF- α , IL-6, IL-8을 blocking solution을 이용하여 300 ng/ml의 농도로 희석한 후 각 well에 100 μ l씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 washing buffer로 4회 세척한 후 Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate enzyme을 2.5 μ g/ml 농도로 각 well에 처리한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응한 후 4회 세척하였다. 기질액을 각 well에 50 μ l씩 가하여 20분간 발색을 유도한 다음 2N 황산을 이용하여 반응을 멈추고 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 TNF- α , IL-6, IL-8의 단백질 양을 측정하였다.

4) Reverse transcription-PCR

Harvest한 세포를 PBS로 세척한 후 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하여 모으고 Easy Blue (Intron, Korea) 1 ml을 가하고 상온에서 5분간 반응시킨 다음 0.2 ml의 클로로포름을 첨가하여 15초간 완전히 섞은 뒤, 4 $^{\circ}$ C 12,000 \times g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 0.4 ml의 binding buffer를 섞었다. 상온에서 1분간 반응시키고 column에 옮긴 후, 12,000 \times g에서 1분간 원심분리하였다. RNA 침전물을 75% 에탄올로 세척하고, 상온에서 건조시킨 다음 Diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리한 증류수에 녹였다. 정제된 RNA를 GeneQuant Pro (Amersham Biosciences)로 정량하고, Ethidium bromide를 넣은 한천 겔에 전기영동하여 RNA의 integrity와 정확한 quantification을 재확인하였다.

분리된 총 RNA 2 μ g에 Random hexamer 2.5 μ g (Amersham Biosciences, USA)과 DEPC를 처리한 물을 가하고 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 뒤 얼음에서 2분간 식혔다. 5 \times first strand buffer와 0.1 M DTT, 10 mM dNTP, 200 unit M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, USA) 그리고 DEPC 처리한 증류수를 가하여 총 30 μ l가 되게 하고 42 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시켰다. 다시 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 뒤 cDNA를 만들었다. Polymerase chain reaction (PCR)은 2.5 μ l cDNA 주형, TNF- α (5' TGA GCA CTG AAA GCA TGA TCC 3' 5'ATC ACT CCA AAG TGC AGC AG 3'), IL-6 (5' AAC CTT TCC AAA GAT GGC TGA A 3' 5'CAG GAA CTG GAT CAG GAC TTT 3'), IL-8 (5' TCA GTG CAT AAA GAC ATA CTC C 3' 5'TGG CAT CTT CAC TGA TTC TTG 3'), 그리고 GAPDH (5' CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA 3' 5' CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT 3')와 같은 특이적인 primer 25 uM, 1 \times PCR buffer, 2.5

mM MgCl₂ 그리고 2.5 unit Taq. DNA polymerase (TaKaRa Korea, Seoul, Korea)를 혼합하여 시행하였다. PCR 조건은 95°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 하였다. 반응액 중 cycle 별로 각각 5 μl를 취해서 2.0% 한천겔에 전기영동하고 Ethidium bromide로 염색하여 PCR 산물을 확인하였다.

5) 핵 및 세포질 단백질 분리

얻어진 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 10 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 그리고 0.2 mM PMSF로 조성된 버퍼를 100 μl 넣고 섞어준다. 얼음에서 5분간 반응시킨 후 5,000 rpm에서 4분간 원심분리하여 pellet만을 얻는다. 그 후 10 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% NP-40, 0.5 mM DTT, 그리고 0.2 mM PMSF가 포함된 버퍼 60 μl를 넣고 15분간 반응시킨 후 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 얻는다. 다음으로 남겨진 pellet에 20 mM Hepes, pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 25% Glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 그리고 0.2 mM PMSF가 포함된 버퍼 40 μl를 넣고 30분간 반응시킨 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻는다. 분리하여 얻은 세포질과 핵단백질은 Brad-ford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) 방법을 이용하여 정량하여 사용하였다.

6) Western blot analysis

얻어진 세포를 차가운 PBS로 두 번 세척한 후 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA, 120 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ and P1 cocktail이 포함된 lysis buffer를 사용하여 vortexing하여 섞어 준 후 얼음에서

30분간 반응시켰다. 그리고 난 후 4°C, 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하여 총 단백질을 얻었다. 얻은 총 단백질을 Brad-ford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) 방법을 이용하여 정량한 다음 40 μg의 단백질을 15% acrylamide gel에 전기영동하였다. 이것을 Nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Germany)에 transfer하여 PBST에 1% skim milk와 1% BSA가 든 blocking 용액에서 1시간 동안 blocking한 후 PBST로 5분간 2회 세척하였다. Anti-NF-κB, Anti-p-IκB, Anti-IκB, Antibodies (Santa Cruz, California)를 이용하여 1차 항체반응을 4°C에서 16시간 반응 시킨 다음 PBST로 2차 항체반응을 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 10분, 15분, 30분간 세척한 후 ECL (Amersham Biosciences, UK)로 발광하여 X-ray film에 노출시켜 단백질 발현 분석을 실시하였다.

7) Luciferase assay

세포에 유전자 도입을 위해 transfection을 수행하였다. 우선 HMC-1세포를 1×10⁶으로 12 well에 접종시킨 후 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 pNF-κB luciferase (LUC) (Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 혈청이 없는 배지 상태에서 일시적으로 transfection하였다. 6시간 후 혈청이 있는 배지로 갈아주고, 24시간을 배양하였다. 그 후 약제를 1시간 전 처리한 후 25 nM PMA와 1 μM A23187을 24시간동안 반응시켰다. 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 lysis buffer (Luciferase Reporter Assay System; Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 세포를 용해시켰다. vortexing하여 세포를 섞은 다음, 12,000 rpm, 4°C, 3분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻은 상층액은 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다. Luciferase assay를 위해

보관 중인 세포용해된 상층액 100 μ l를 상온에서 Luciferase substrate 20 μ l씩 불투명한 96 well에 넣어 Luminometer (1420 luminescence counter, Perkin Elmer)로 측정하였다. Luciferase activity는 측정값을 총 단백질량으로 나누어 수치를 구한 뒤 (relative light units per milligram of protein), transfection된 정상세포를 기준으로 fold 값을 구하였다.

8) 데이터 통계분석

본 실험에서 결과는 측정값의 평균±표준편차값을 기준으로 통계분석 하였다. 실험 결과값의 통계적 분석을 위해 Independent t-tests를 사용하여 각 실험군 간의 유의성을 분석하였고, 그 유의수준은 p<0.05로 하였다.

III. 결 과

1. HMC-1세포에서 大薊추출물 및 Silibinin에 의한 Histamine 분비 및 세포생존율에 대한 효과

Silibinin을 농도별로 처리하였을 때 histime의 분비에 0.2 mg/ml의 농도에서 억제효과를 보였다 (Fig. 1B). 또한 세포생존을 결과에서도 정상세포

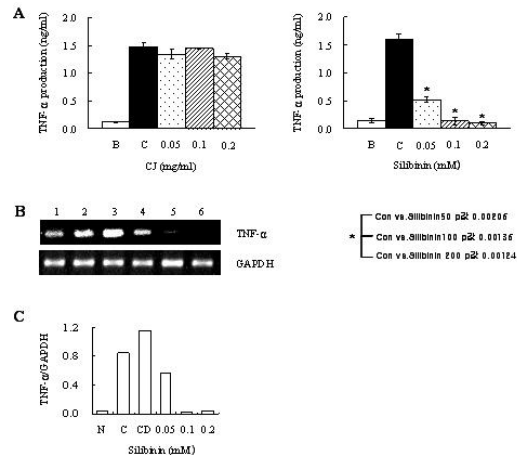


Fig. 2. Effect of CJ and Silibinin on PMA plus A23187-stimulated TNF- α expression levels. The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) incubated with various concentrations of CJ (0.05 mg/ml to 0.2 mg/ml) or Silibinin (0.05 mM to 0.2 mM) for 1h and then treated with PMA plus A23187 for 4h. (A, B)

The TNF- α secreted protein levels in the supernatant were measured with the ELISA assay. B, Normal cells; C, control cells. (A)

The TNF- α mRNA levels were measured with the RT-PCR analysis. (B) The TNF- α mRNA levels were measured by densitometry. 1, Normal cells; 2, control cells; 3, DMSO control cells; 4, Silibinin (0.05 mM)+PMA plus A23187; 5, Silibinin (0.1 mM)+PMA plus A23187; 6, Silibinin (0.2 mM)+PMA plus A23187. (C)

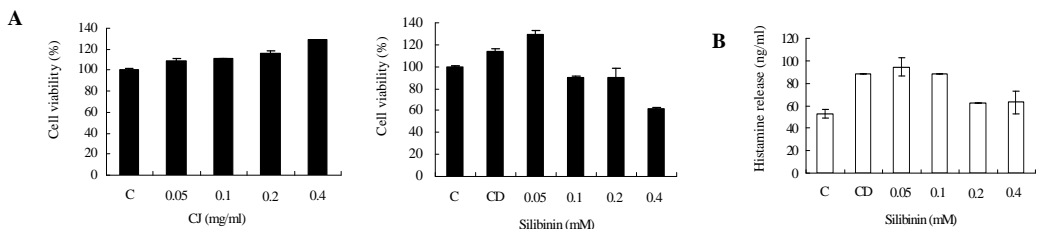


Fig. 1. Effect of CJ and Silibinin on cell viability and histamine release of activated mast cells. The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) were treated with indicated concentration of CJ (0.05 mg/ml to 0.4 mg/ml) or Silibinin (0.05 mM to 0.4 mM) for 1h and then treated with PMA plus A23187 for 6h (A) or 24h (B).

The percentage from each treatment were relative to the control. (PMA plus A23187, 100%) (B)

와 비교하였을 때 大薊추출물은 농도별로 아무런 영향이 없는 것을 알 수 있었다. 반면 Silibinin은 0.2 mM까지는 정상세포와 비교하여 90%정도의 세포생존율을 나타내어 0.2mM까지 실험에 사용하였다(Fig. 1A).

2. HMC-1세포에서 PMA와 A23187로 유도된 TNF-α 에 대한 大薊추출물과 Silibinin의 효과

大薊추출물에서는 TNF-α의 생성에 변화가 없었다. 하지만 Silibinin에서는 농도의존적으로 TNF-α의 생성이 현저하게 감소되었다(Fig. 2A). 또한, mRNA의 발현에서도 PMA (25 ng/ml)와 A23187 (1 uM)로만 유도된 TNF-α의 발현량보다 Silibinin으로 처리한 것에서 낮은 발현량을 나타냄을 보여주었다(Fig. 2B, 2C).

Table I TNF-α production (단위 ng/ml)

Group	B	C	0.05	0.1	0.2
CJ (mg/ml)	0.118	1.463	1.329	1.445	1.298
Silibinin (m/M)	0.141	1.599	0.513	0.132	0.097

B : Normal cells C : Control cells

3. HMC-1세포에서 PMA와 A23187로 유도된 IL-6에 대한 大薊추출물과 Silibinin의 효과

大薊추출물의 0.05에서 0.2 mg/ml의 모든 농도에서 PMA와 A23187로 유도된 IL-6의 생성 억제 현상은 관찰되지 않았다(Fig. 3A, 왼쪽). 하지만 Silibinin에서는 IL-6의 생성이 PMA와 A23187만 단독으로 처리한 0.434±0.012 ng/ml의 생성을 보다 0.05 mM에서는 0.248±0.005 ng/ml, 0.1 mM에서는 0.189±0.006 ng/ml, 0.2 mM에서는 0.117±0.003 ng/ml의 수치로 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 3A, 오른쪽). 또한, 그 mRNA 발현을

에서도 0.05 mM에서 0.1 mM까지 모든 농도에서 농도 의존적으로 발현을 억제현상이 나타남을 알 수 있었다(Fig. 3B, 3C).

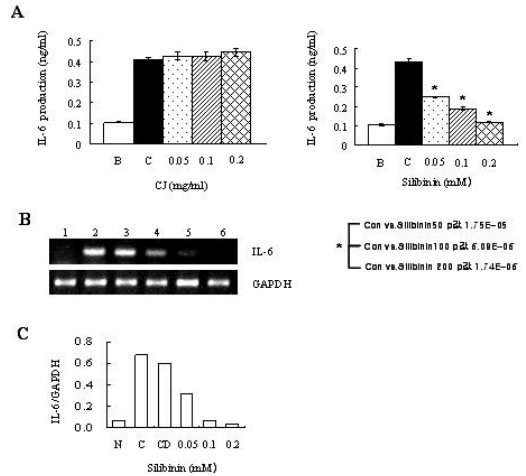


Fig. 3. Effect of CJ and Silibinin on PMA plus A23187-stimulated IL-6 expression levels. The HMC-1 cells (1×10⁶ cell/ml) incubated with various concentrations of CJ (0.05 mg/ml to 0.2 mg/ml) or Silibinin (0.05 mM to 0.2 mM) for 1h and then treated with PMA plus A23187 for 4h. (A, B)

The IL-6 secreted protein levels in the supernatant were measured with the ELISA assay. B, Normal cells; C, control cells. (A)

The IL-6 mRNA levels were measured with the RT-PCR analysis. (B)

The IL-6 mRNA levels were measured by densitometry. 1, Normal cells; 2, control cells; 3, DMSO control cells; 4, Silibinin (0.05 mM)+PMA plus A23187; 5, Silibinin (0.1 mM)+PMA plus A23187; 6, Silibinin (0.2 mM)+PMA plus A23187. (C) *p<0.05; significantly different from the control value.

Table II IL-6 production (단위 ng/ml)

Group	B	C	0.05	0.1	0.2
CJ (mg/ml)	0.106	0.406	0.429	0.423	0.444
Silibinin (m/M)	0.106	0.434	0.248	0.189	0.117

B : Normal cells C : Control cells

4. HMC-1세포에서 PMA와 A23187로 유도된 IL-8에 대한 大薊추출물 및 Silibinin의 효과

大薊추출물의 0.05 mg/ml부터 0.2 mg/ml의 모든 농도에서 PMA와 A23187로 유도된 IL-8의 생성 억제현상은 관찰되지 않았다(Fig. 4A, 왼쪽). 반면 Silibinin에서는 IL-8의 생성율이 PMA와 A23187만 단독으로 처리한 21.412±0.323 ng/ml의 생성을 보다 0.05 mM에서는 17.893±0.648 ng/ml, 0.1 mM에서는 12.727±0.235 ng/ml, 0.2 mM에서는 8.259±0.236 ng/ml의 수치로 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 4A, 오른쪽). 또한, 그 mRNA 발현율에서는 0.1 mM과 0.2 mM의 농도에서 발현을 억제현상이 나타남을 알 수 있었다(Fig. 4B, 4C).

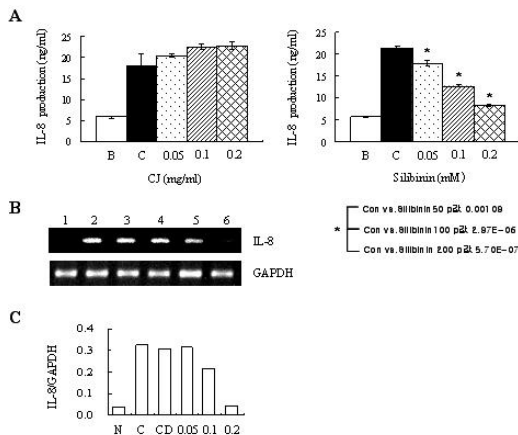


Fig. 4. Effect of CJ and Silibinin on PMA plus A23187-stimulated IL-8 expression levels. The HMC-1 cells (1×10⁶ cell/ml) incubated with various concentrations of CJ (0.05 mg/ml to 0.2 mg/ml) or Silibinin (0.05 mM to 0.2 mM) for 1h and then treated with PMA plus A23187 for 4h. (A, B)

The IL-8 secreted protein levels in the supernatant were measured with the ELISA assay. B. Normal cells; C. control cells. (A)

The IL-8 mRNA levels were measured with the RT-PCR analysis. (B)

The IL-8 mRNA levels were measured by densitometry. 1. Normal cells; 2. control cells; 3.

DMSO control cells; 4. Silibinin (0.05 mM)+PMA plus A23187; 5. Silibinin (0.1 mM)+PMA plus A23187; 6. SFA (0.2 mM)+PMA plus A23187. (C)

Table III IL-8 production (단위 ng/ml)

Group	B	C	0,05	0,1	0,2
CJ (mg/ml)	5.783	18.175	20.528	22.538	22.823
Silibinin (m/M)	5.783	0.434	17.893	12.727	8.259

B : Normal cells C : Control cells

5. HMC-1세포에서 PMA와 A23187로 유도된 NF-κB에 대한 Silibinin의 효과

NF-κB의 분비양은 PMA와 A23187로 유도하였을 때 현저히 증가한 반면, Silibinin을 0.05 mM부터 0.2 mM의 농도로 처리하였을 때 0.05 mM부터 0.2 mM의 농도까지 NF-κB 단백질이 뚜렷하게 감소되어 있음을 확인하였다. 또한 세포질 내에서 NF-κB와 결합하여 NF-κB의 작용을 막는 IκB의 발현은 세포질 내에서 PMA와 A23187로만 유도하였을 때와 비교하여 Silibinin으로 IκB의 발현을 유도하였을 때 증가됨을 알 수 있었다. 이에 반해 인산화된 IκB (p-IκB)의 발현은 IκB와는 반대로 0.1 mM과 0.2 mM의 농도에서 감소됨을 관찰 할 수 있었다(Fig. 5A).

다음으로 NF-κB의 프로모터 활성은 transfection만 된 세포에 비해 PMA와 A23187로 유도된 transfection세포에서는 NF-κB의 프로모터 활성이 10배 이상 증가한 반면, Silibinin 0.1 mM과 0.2 mM의 농도로 처리하여 transfection된 세포에서는 NF-κB의 프로모터 활성이 현저히 감소됨을 관찰 할 수 있었다(Fig. 5B, p < 0.05).

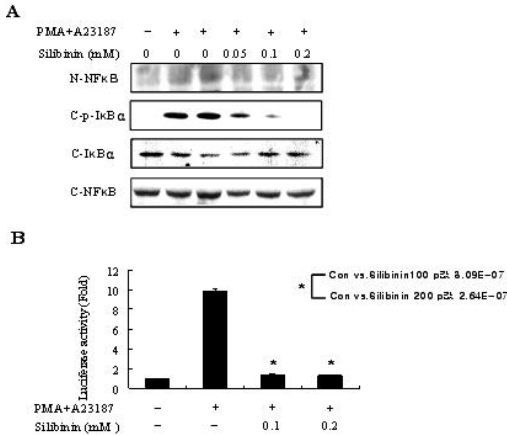


Fig. 5. Effect of Silibinin on PMA plus A23187-stimulated NF-κ B activation and Iκ Bα phosphorylation and degradation. The HMC-1 cells (1×10⁶ cell/ml) were incubated with Silibinin (0.05 mM to 0.2 mM) for 1h and then stimulated with PMA plus A23187 for 2h. Nuclear and cytoplasmic proteins were isolated by lysis buffer and examined for NF-κ B, pIκ Bα, and Iκ Bα with Western blot analysis. N, nuclear extract; C, cytosol extract. (A)

The HMC-1 cells (1×10⁶ cell/ml) were treated with Silibinin (0.1 mM to 0.2 mM) for 1h and then stimulated with PMA plus A23187 for 4h. The NF-κ B activity was examined with a luciferase assay. (B) *p < 0.05; significantly different from the control value.

Table IV Luciferase activity (단위 ng/ml)

Group	B	C	SIN 0.1	SIN 0.2
Relative light unit	9528	94643	13119	12785
Fold	1,000	9.878	1,369	1,334

B : Normal cells C: Control cells SIN : Silibinin (mM) P < 0.05

IV. 고 찰

大薊은 菊花科 (Compositae)에 속한 다년생 宿根本草인 영경귀 및 동속 근연식물의 帶根全草를

말한다. 건조한 것을 약물로 사용하며 性味는 甘苦凉하고 肝, 脾經에 歸經하여 祛瘀消腫, 凉血止血的 효능이 있고¹²⁾ 東醫寶鑑에서는 性이 平하고 苦味를 가지고 있어 癰腫과 疥癬을 치료하고 瘀血과 吐血, 衄血을 다스린다고 하였다¹⁸⁾.

현대 약리학적으로는 전초에 ciryneol A-E, linarin, pectolarin 등을 함유하고 있고 소염, 살균작용으로 폐결핵, 화상 등의 염증 질환에 응용하고 있다¹⁹⁾. 또한 그 주성분의 하나인 Silibinin은 항산화 작용이 있어 간세포의 변화를 방지함으로 간장을 보호하고 간기능 손상, 간독물 투여시 간세포 보호, 급만성 간염, 간경화 등의 질환에 이용되고 있다²⁰⁾. 이와 같이 대개는 한의학적으로 각종 염증 질환에 사용되어 왔고, 이에 대한 연구로는 김과 박의^{21,22)} 연구가 보고된 바 있다. 또한 주성분인 Silibinin은 현대의학적으로도 항염증, 항산화의 효능이 있음이 여러 연구에서 보고된 바 있다. 이점에 주목하여 大薊추출물과 大薊의 주성분인 Silibinin이 염증반응에서 분비되는 cytokine과 NF-κ B의 발현율을 조절하는 항염증작용이 있음을 구체적으로 확인함으로써 알레르기 염증에서도 발현되는 cytokine, NF-κ B 등의 염증매개물질 분비를 조절하는 효과가 있을 것으로 판단되어 PMA와 A23187로 염증을 유발한 HMC-1세포에 大薊추출물과 Silibinin을 투여하여 염증반응에 미치는 영향을 실험하였다.

염증반응은 감염이나 조직의 손상에 의하여 비특이적인 연쇄반응을 유발하며 감염 장소의 통증, 발적, 열, 종창에 의하여 특징지어지고, 부가적인 효과 분자들을 감염 장소로 이동 시키고 미세혈관을 응고 시켜 대식세포 반응에 의한 손상된 조직의 복구가 주된 목표인 인체 내 면역반응이다³⁾. 그런데 이러한 정상적인 면역반응이 종종 인체에 해로운 작용을 하여 오히려 조직손상을 심하게 하거나 심지어 죽음에 이르기까지 하는 경우가 있다. 이러한 부적절한 면역반응을 과민반응 또는 알레

르기라고 하고 IgE에 의한 제1형, 항체에 의한 제2형, 면역복합체에 의한 제3형, 세포성 면역 반응에 의한 지연형 과민반응 (DTH)인 제4형으로 구별한다⁴⁾.

이중 제1형에 속하는 천식, 알레르기 비염, 아토피피부염, 과민증 등의 질병은 외부항원에 반응하여 면역체계의 이상이 초래되어 발생하고, 현대사회로의 발전과 함께 증가하고 있는 난치병으로 치료의 중요성이 차츰 부각되고 있다. 따라서 알레르기의 복잡하고 연쇄적인 반응기전을 정확히 파악하는 것은 치료에 있어 중요한 관건이 될 것이다.

유전성 소인을 가진 사람이나, 반복적으로 항원에 노출되면 인체는 IgE라 불리는 특이성 type의 항체를 만들기 시작하고 IgE항체는 세포표면에 그 항체를 받아들이는 FcεRI 수용체를 가진 비만세포, 호염구 와 결합하게 된다^{23,24)}. 이를 “感作되었다”라고 하고 이렇게 감작된 비만 세포에 다시 같은 항원이 노출되면 비만세포의 세포막에 붙어 있던 IgE의 교차결합이 발생되고 이로 인해 세포막내의 인지질들의 메틸화가 촉진되고 막의 유동성이 증가 된다. 이렇게 되면 세포내로의 Ca²⁺의 유입이 증가하고 Ca²⁺의 증가는 세포내의 탈과립을 유발하게 된다. 그 결과 과립으로부터 많은 염증매개체들이 방출하게 되고 이러한 화학적 물질들의 작용인 혈관확장, 점액분비 증가, 평활근 수축 등의 작용에 의하여 신체 부위에 국소적 또는 전신적 영향을 미쳐 천식, 비염, 아토피피부염 등의 알레르기 질환이 발생하게 된다. 이때 탈과립화는 IgE의 교차 결합에 의해서만 발생되지 않고 calcium ionophore A23187, compound 48/80 및 아나필락시스 독소 (anaphylatoxins C3a, C4a, C5a)와 같은 약리학적 복합물들에 의해서도 발생하게 된다⁴⁾.

또한 NF-κB는 정상적 상태에서는 세포질에 inhibitor kappa b (IκB)와 결합하여 있거나 p50의 전구체인 p105/p65의 형태로 불활성 상태로 존

재한다. 그런데, 다양한 외부자극이 세포에 가해지면 inhibitor kappa kinase (IKK)가 활성화되고 활성화된 IKK가 먼저 IκB-α를 인산화하여 proteasome에 의해 IκB-α가 단백질 분해되어 자유형태의 NF-κB (p65)를 생성하고, 다시 생성된 NF-κB를 핵안으로 이동시키게 된다²⁵⁻³⁰⁾. 이때 단백질 키나제 C는 NF-κB로부터 억제인자인 IκB를 유리시켜 NF-κB가 핵내로 들어가는 것을 허용하는 역할을 한다⁴⁾. 이후 핵내로 들어간 p65 NF-κB는 DNA의 promotor에 있는 κB 인지부위에 결합하여 전사를 일으킨다³¹⁾. 이렇게 하여 NF-κB가 활성화 되고 세포내 분비량이 증가되며, activator protein-1 (AP-1 : T세포 활성화 전사인자) 등과 함께 각종 염증매개물을 합성하도록 유도하는 전사인자로서의 기능을 가지게 된다³²⁾. 이는 NF-κB가 다양한 종류의 유전자 발현을 조절하고, 발현 유전자중 많은 수가 면역 혹은 염증 반응에 관계되어 있다는 것을 의미한다. 물론 이들 유전자들은 NF-κB에 의해서만 조절되는 것은 아니나 TNF-α, IL-6, IL-8과 같은 단백질의 발현에 있어 NF-κB가 이들을 조절하는 중요한 역할을 담당한다는 뜻이다⁴⁾.

또한, 염증반응을 촉진하고 지속시키는 cytokine (IL-6, IL-8, TNF-α)은 T세포에 의해 주로 분비되며 염증반응을 촉진하고 인체에 국소적, 전신적 효과를 미친다. TNF-α는 국소적으로 혈관내피세포를 활성화하고 혈관투과성을 증가하여 세포와 조직에서 IgG보체의 침투를 높이는데 기여하고 림프절로의 fluid drainage를 증가 시키며 전신적으로는 발열과 대사산물총격을 기동한다. IL-6는 국소적으로 림프구 활성화와 항원생산을 증가시키며 전신적으로는 발열과 급성기 단백질생산을 유발한다. IL-8은 화학조성인자로서 국소적으로 호중구, 호염구, T세포를 감염된 부위로 모으는 작용을 한다³⁾.

위에서 살펴본 바와 같이 알레르기에 의한 염증

은 복합적이고 연쇄적인 기전에 의하여 발생하며 TNF- α , IL-6, IL-8, NF- κ B 등의 물질들의 분비가 염증반응에 중요한 역할을 하고 이들 물질들의 분비량 조절이 항염증효과에 밀접한 관련이 있음을 추측 할 수 있었다. 이중 특히 NF- κ B의 세포내 분비량은 보다 중요한 의미를 가지는데 그것은 NF- κ B가 염증매개물질의 합성을 유도하는 전사인자의 기능을 가지기 때문이다. 그런데 이처럼 중요한 NF- κ B의 발현량은 I κ B의 분비량에 반비례하여 나타나게 된다. 따라서 항염증제의 역할은 염증 발생시 세포내로 분비되는 염증매개물질과 NF- κ B의 발현량을 감소시키고 I κ B의 양을 증가시키는 데 중요성이 있다고 할 수 있다. 이와 같은 항염증제의 작용은 Corticosteroid라는 대표적인 항염증제의 연구 결과에서 살펴 볼 수 있다. 즉 Corticosteroid가 I κ B의 전사를 증가시키고 발현된 I κ B가 세포질의 NF- κ B와 결합하게 되면 NF- κ B의 핵내로의 이동이 제한되어, NF- κ B에 의한 T세포 활성화와 사이토카인 합성관련 유전자들의 활성화가 방지되어 항염증효과를 발생한다는 것이다⁴⁾.

이에 본 실험에서는 大薊추출물과 그 주성분인 Silibinin의 항염증 효과를 알아보기 위하여 histamine, TNF- α , IL-6, IL-8과 함께 NF- κ B와 I κ B의 발현도 조사도 병행하게 된 것이다. 그리고 실험에서 A23187과 PMA를 동시에 사용한 이유는 calcium ionophore인 A23187는 비만세포의 활성화를 통해 탈과립을 유도하고, PMA는 단백질 키나제 C에 직접 작용하는 분열 촉진제이지만 PMA 단독으로는 비만세포의 탈과립을 유도 할 수 없기 때문에 A23187과 PMA를 모두 사용하였다.

실험세포로 비만세포를 사용하였는데 그 이유는 다음과 같다. 비만세포는 소혈관과 후모세혈관 세정맥 근처에 존재하며 酸性 프로테오글리칸 (proteoglycan)이 풍부한 과립을 내포하고 있고 과립내에는 케모카인, 사이토카인, 프로스타글란딘,

류코트리엔, 혈소판 활성화인자 (PAF)들과 같은 다양한 염증매개물질 또는 유도체를 함유하고 있다. 이러한 비만세포는 여러 가지 염증자극에 의하여 활성화되고 탈과립을 통해 히스타민, 비만세포 키나제, 트립타제 등의 효소들과 TNF- α , 케모카인, IL을 분비하여 알러지 반응을 일으키고 지속시킨다. 아울러 알레르기 염증반응에 반응하는 호산구, 호염구, 림프구 등의 다양한 세포들을 연결하는 매개물과 수용체를 분비하여 염증성 연쇄반응을 주도하고 조율하는 중심적인 세포의 역할을 한다. 따라서 본 실험에서 대상 조직으로 사용하였다³⁾.

A23187과 PMA로 자극된 HMC-1 세포에서 세포생존율을 살펴 보기위하여 MTS assay를 실행한 결과 大薊추출물은 큰 영향이 없는 것으로 관찰되었고 Silibinin은 정상세포와 비교하여 약 90%정도의 세포생존율을 보였다(Fig. 1). 또한, 염증반응 조절효과를 관찰하기 위해 ELISA 방법으로 大薊추출물 및 Silibinin을 1시간 전 처리한 비만세포의 배양액으로부터 hitamine, TNF- α , IL-6, 그리고 IL-8의 생성량을 측정하였다. 그 결과 hitamine, TNF- α 의 생성량은 大薊추출물에서는 변화하지 않았지만, Silibinin에서는 현저한 생성량 감소를 보였다(Fig. 1, 2). IL-6의 분비량은 Silibinin으로 처리한 것에서 PMA와 A23187로만 처리한 것에 비해 농도 의존적으로 생성량이 억제되는 것이 관찰되어 약 70%정도의 높은 저해율을 나타내었다(Fig. 3). IL-8의 생성량의 경우는 Silibinin에서 농도 의존적으로 감소하여 PMA와 A23187로 단독 처리한 것에 비해 약 50%이상의 높은 저해율을 보였다(Fig. 4). 그리고 mRNA의 발현도를 확인하기 위하여 RT-PCR을 시행한 결과 TNF- α , IL-6, IL-8 의 mRNA 발현율도 Silibinin으로 처리한 것에서 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 2, 3, 4). NF- κ B의 발현도는 Silibinin으로 처리한 HMC-1 세포에서 발현양이 현저히 저해되었고 NF- κ B의 작용을 저해하는 I

κ B의 발현량은 증가되었다. 아울러 인산화된 I κ B (p-I κ B)의 발현은 감소됨이 관찰되었으며, Luciferase assay를 이용해 NF- κ B의 DNA 프로모터 활성을 조사해본 결과 Silibinin으로 처리한 것에서 프로모터 활성이 현저히 감소된 결과가 관찰 되었다(Fig. 5).

결과적으로 비만세포에서 분비되는 histamin, TNF- α , IL-6, IL-8과 같은 염증성 물질과 NF- κ B같은 전사인자의 발현율이 Silibinin에 의하여 감소됨을 관찰하였고 그에 대한 검증을 mRNA 수준에서도 관찰하여 높은 발현을 감소할 수 있었다(Fig. 2, 3, 4). 하지만, 大薊추출물에서는 염증성물질의 억제효과를 볼 수 없었는데 이러한 결과의 원인은 大薊추출물에 함유된 Silibinin의 양이 약효 발현치에 미달하여 그 효과를 기대할 수 없었던 것으로 사료된다. 앞으로의 연구에서는 大薊추출물의 0.2 mg/ml의 농도보다 높은 농도에서의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 염증반응에서 TNF- α , IL-6, IL-8과 같은 염증성 cytokein은 NF- κ B나 AP-1 등과 같은 전사인자에 의해 발현이 주도적으로 조절되고, NF- κ B의 전사활성은 염증매개물질 (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8등)의 유전자 발현을 유도함으로써 염증을 불러일으키는 중요한 역할을 하게 되는데^{33, 34)} HMC-1 세포에서 일어나는 NF- κ B에 대한 Silibinin의 효과는 I κ B의 인산화와 proteosome에 의한 단백질분해를 억제함으로써 NF- κ B의 발현을 억제하는 것임을 알 수 있었다. 또한 Silibinin이 NF- κ B의 DNA 프로모터 활성을 억제함으로써 NF- κ B의 생성을 억제함을 알 수 있었다. 이 결과들은 Silibinin이 탈과립화된 비만세포에서 I κ B/NF- κ B 경로의 발현을 조절함으로써 이에 수반되는 TNF- α , IL-6, IL-8의 생성을 억제하는 효과가 있음을 의미함을 이번 실험 결과가 보여주고 있는 것이다.

위의 결과들은 大薊추출물은 알레르기 염증 유

발 시 분비되는 여러 가지 cytokine, histamine, NF- κ B의 분비량에 큰 영향을 미치지 못하나, 大薊의 주성분인 Silibinin은 염증발생시 증가되는 cytokine의 발현율을 낮추고 동시에 NF- κ B의 발현을 감소시킴으로써 항염증에 대한 효능이 있음을 분자 생물학적으로 보여주는 것이다. 즉 大薊의 주성분인 Silibinin이 염증부위에 작용하여 소염작용을 함으로써 항염증효과를 가질 수 있음을 의미하는 것이다. 따라서 이번 실험 결과는 현대 사회에서 급성장세에 있는 알레르기 질환에서 일어나는 염증에 대한, 항염증 물질을 제시함으로써 大薊의 주성분인 Silibinin이 알레르기에 의한 다양한 염증성 질환인 천식, 알레르기 비염, 아토피 피부염 등의 치료에 중요한 약물로서 활용될 수 있음을 보여주는 것이라 생각된다.

V. 결 론

大薊의 주성분인 Silibinin의 알러지성 염증에 대한 항염증작용을 규명하기 위하여 PMA와 A23187로 염증이 유도된 HMC-1에 大薊추출물과 Silibinin을 농도별로 처리하고 정상군과 대조군에서 histamine, TNF- α , IL-6, IL-8, NF-kB, I κ B, mRNA의 수치를 측정하고 세포생존율을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. histamine의 분비는 Silibinin의 0.2 mg/ml의 농도에서 억제효과가 있었고 세포생존율에서는 정상세포와 비교시 大薊추출물은 영향이 없었으나 Silibinin은 0.2 mM까지 세포생존율은 90% 이었다.
2. 大薊추출물에서는 TNF- α 의 생성양 억제효과가 나타나지 않았으나 Silibinin에서는 농도 의존적으로 TNF- α 의 생성양이 현저하게 감소했다. 또한 mRNA의 발현율에서도 Silibinin에서

농도의존적으로 억제현상이 나타났다.

3. 大薊추출물에서는 IL-6의 생성양 억제현상이 나타나지 않았으나 Silibinin에서는 0.05~0.2 mM 에서 농도 의존적으로 생성양이 감소했다. 또한 mRNA의 발현율에서도 농도 의존적으로 억제 현상이 나타났다.
4. 大薊추출물에서는 IL-8의 생성양 억제현상이 나타나지 않았으나 Silibinin에서는 0.05~0.2 mM 에서 농도 의존적으로 생성양이 감소했다. 또한 mRNA의 발현율에서도 농도 의존적으로 억제 현상이 나타났다.
5. NF- κ B의 생성양은 Silibinin 0.05~0.2 mM 사이에서 뚜렷이 감소하였고 IkB의 생성양은 증가 되었고 반대로 인산화된 I κ B (p-I κ B)의 생성양은 감소되었다. 또한 NF- κ B의 DNA 프로모터 활성이 현저히 감소하였다.

이상의 연구결과 大薊추출물은 알레르기 염증 유발 시 분비되는 여러 가지 cytokine (TNF- α , IL-6, IL-8)과 histamine, NF- κ B의 분비량에 큰 영향을 미치지 못하나, 大薊의 주성분인 Silibinin 은 염증발생시 증가되는 cytokine의 발현율을 낮춤과 동시에 NF- κ B의 억제제인 I κ B의 증가와 p-I κ B의 감소를 동시에 유발하여 염증매개물질의 전사인자인 NF- κ B의 발현을 감소시킴으로써 항염증에 대한 효능이 있음을 분자 생물학적으로 확인할 수 있었다. 이에 알레르기 염증질환에도 항염증 효과가 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. 白萬基. 最新耳鼻咽喉科學. 서울. 一潮閣. 1999:192-95.
2. 大韓耳鼻咽喉科學會 編. 耳鼻咽喉科學. 서울. 一潮閣. 2005:269.
3. Janeway, C. A. Jr., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. 면역생물학 (Immunobiology 6th edition). 김선영 외 14인 역. 서울: 라이프사이언스. 2005:13, 46-7, 78-80, 564-6.
4. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., & Kuby, J. KUBY 면역학 (Kuby immunology). 강호영 외 12인 역. 서울: 월드사이언스. 2006:263, 419-20, 398-423, 417-8, 405.
5. Thomas, P. S. Tumor necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. Immunol Cell Biol. 2001;79(2): 132-40.
6. Naka, S., Suto, H., Kakurai, M., Sedgwick, J. D., Tsai, M., & Galli, S. J. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell-derived TNF. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;10:6467-72.
7. Bodreau, R. T., Hoskin, D. W., & Lin, T. J. Phosphatase inhibition potentiates IL-6 production by mast cells in response to Fc ϵ RI-mediated activation: involvement of p38 MAPK. J Leukoc Biol. 2004;76(5): 1075-81.
8. Murayama, T., Mukaida, N., Sadanari, H., Yamaguchi, N., Khabar, K. S., Tanaka, J., Matsushima, K., Mori, S., & Eizuru, Y. The immediate early gene 1 product of human cytomegalovirus is sufficient for up-regulation of interleukin-8 gene expression. Biochem Biophys Res Commun. 2000;279(1):298-304.
9. Kuprsh, D. V., Udalova, I. A., Turetskaya, R. L., Rice, N. R., & Nedospasov, S. A. Conserved kappa B element located downstream of the tumor necrosis factor alpha gene: distinct NF-kappa B binding

- pattern and enhancer activity in LPS activated murine macrophages. *Oncogene*. 1995;11(1):97-106.
10. Galien, R., Evans, H. F., & Garcia, T. Involvement of CCAAT/enhancer-binding protein and nuclear factor-kappa B binding site in interleukin-6 promoter inhibition by estrogens. *Mol Endocrinol*. 1996;10(6):713-22.
 11. 國家中醫藥管理局 編委會. 中華本草. 上海科學技術出版社. 1995:7962-3.
 12. 辛民教. 原色臨床本草學. 서울:永林出版社. 1988: 433-4.
 13. 江蘇新醫學院 編. 中藥大辭典. 서울:成輔社. 1982:115-6.
 14. 李廷周. 大薊약침액이 Reactive oxygen species 소거 활성 및 항산화에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2006.
 15. Schumann, J., Prockl, J., Kiemer, A. K., Vollmar, A. M., Bang, R., & Tiegs, G. Silibinin protects mice from T cell-dependent liver injury. *Journal of hepatology*. The journal of the European Association for the Study of the Liver. 2003;39(3):333-40.
 16. Kang, SN., Lee, MH., Kim, KM., Cho, D., & Kim, TS. Induction of human promyelocytic leukemia HL-60 cell differentiation into monocytes by Silibinin : involvement of protein kinase C1. *Biochemical Pharmacology*. 2001;1(12):1487-95.
 17. Singh, R. P., & Agarwal, R. Mechanisms and preclinical efficacy of silibinin in preventing skin cancer. *European journal of cancer*. 2005;41(13):1969-79.
 18. 許浚. 原本東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1989:730.
 19. 김호철. 한약약리학. 서울:집문당. 2004:298.
 20. 한국약학대학협의회 약물학분과회. *pharmacology (약물학)*. 서울:도서출판 신일북스. 2007:443.
 21. 김영선. 大薊 LPS로 유도된 Mouse BV2 Microglial cells의 염증반응에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 2008.
 22. 박홍주. 大薊 및 飛廉의 항염활성 비교. 경희대학교 대학원. 2008.
 23. Williams, C. M. M., & Galli, S. J. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J Exp Med*. 2000;192(3):455-62.
 24. Ptak, W., Geba, G. P., & Askenase, P. W. Initiation of delayed-type hypersensitivity by low doses of monoclonal IgE antibody: Mediation by serotonin and inhibition by histamine. *J. Immunol*. 1991;170:3929-36.
 25. Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., & Li, J., et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I-kappa B kinases essential for NF-kappa B activation. *Science*. 1997;278:860-6.
 26. Regnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z., & Rothe, M. Identification and characterization of an IKappa kinase. *Cell*. 1997;90:373-83.
 27. Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., & Karin, M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*. 1997;91:243-52.
 28. Chen, F. E., Huang, D-B., Chen, Y-Q., & Ghosh, G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. *Nature*. 1998;391:410-3.

29. Beg, A. A., & Baldwin, A. S. Jr. The I kappa B protein: multifunctional regulators of Re 1/NF-kappa B transcription factor. *Genes Dev.* 1993;7(11):2064-70.
30. Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L., & Maniatis, T. The ubiquitinproteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell.* 1994;78(5):773-85.
31. Baldwin, A. S. Jr. The transcription factor NF-kB and human disease. *J Clin Invest.* 2000;107:3-6.
32. Barnes, P. J., & Karin, M. Nuclear factor-kB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1997;336:1066-71.
33. Rao, A. NF-ATp : a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today.* 1994;15(6):274-81.
34. Fiorini, E., Marchisio, P. C., Scupoli, M. T., Poffe, O., Tagliabue, E., Brentegani, M., Colombatti, M., Santini, F., Tridente, G., & Ramarli, D. Adhesion of immature and mature T cells induces in human thymic epithelial cells (TEC) activation of IL-6 gene transcription factor (NF-kappaB and NF-IL6) and IL-6 gene expression : role of alpha3beta1 and alpha6beta4 integrins. *Dev Immunol.* 2000;7:195-208.