

## RBL-2H3 비만세포의 알레르기 염증 반응에 미치는 生料四物湯의 영향

손미주 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

### Abstract

#### Suppressive Effect of *SaengRyoSaMulTang* on Activated RBL-2H3 Mast Cells

Son Mi Ju, Han Jae Kyung, Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daejeon University

##### Objectives

*SaengRyoSaMulTang* is a herbal formula in Oriental Medicine, known anti-allergens. However, its mechanism and cellular targets have not been found yet. Thus the study has developed to investigate the suppressive effect of *SaengRyoSaMulTang*.

##### Methods

In the study, cellular viability, IL-4, IL-13 mRNA expression, IL-4, IL-13 production, manifestations of GATA-1, GATA-2, NF-AT1, NF-AT2, AP-1 and NF-κB p65 transcription factors were examined by Real-Time PCR, ELISA analysis and western blotting.

##### Results

As a result of treating with *SaengRyoSaMulTang* extract(SRSMT), the study has shown that the amount of Th2 cytokines, which include PI induced IL-4 and IL-13, plays a significant role in suppressing effect. RBL-2H3 mast cells significantly suppressed the PI-induced Th2 cytokine production including IL-4 and IL-13 in a dose dependent manner. PI-induced IL-4 and IL-13 production was significantly suppressed by SRSMT intervention. Western blot analysis of transcription factors involving IL-4 and IL-13 expression also revealed a prominent decreases of mast cell's specific transcription factors including GATA-1, GATA-2, NF-AT2, c-Jun and c-Fos, but NF-κB p65.

##### Conclusions

The study suggests that the anti-allergenic activities of SRSMT may regulate the transcription factors GATA-1, GATA-2, NF-AT2, c-Jun and c-Fos inhibiting Th2 cytokines IL-4 and IL-13 in mast cells.

**Key words** : *SaengRyoSaMulTang*(生料四物湯), RBL-2H3 mast cell, IL-4, IL-13, Anti-allergic effect

## I. 서론

아토피 피부염은 소양감을 특징으로 하는 만성 재발성 염증성 피부질환으로 대개 유·소아기에 발병하며,

천식이나 알레르기 비염으로 진행되는 알레르기 행진(allergic march)의 첫 신호이기도 하다<sup>1-3)</sup>.

아토피 피부염은 제 I형 알레르기 반응의 일종으로<sup>4)</sup>, 발병기전은 불확실하지만 비만세포의 탈과립, 혈중 히

■투 고 : 2011년 3월 21일, 수 정 : 2011년 4월 19일, 채 택 : 2011년 4월 22일  
■교신저자 : 김윤희, 대전광역시 서구 둔산동 1136번지 대전대학교 부속 둔산한방병원 소아청소년센터  
(Tel : 042-470-9138, E-mail : unia67@dju.kr)

스타민의 유리, 1,2형 helper T 세포에서 분비되는 면역 조절 cytokine 간의 불균형 및 IgE 증가에 따른 면역학적 결핍 등으로 야기되는 것으로 알려져 있다<sup>9)</sup>.

아토피 피부염의 한의학적 치료는 그 진행 양상에 따라 急性-濕熱型, 亞急性-脾虛濕盛型, 慢性-陰虛血燥型으로 나눌 수 있으며, 急性期(濕熱型)에는 升麻葛根湯, 消風散, 仙方敗毒散 등이, 亞急性期(脾虛濕盛型)에는 平胃散 등이, 慢性期(陰虛血燥型)에는 生料四物湯, 當歸飲子, 溫清飲 등이 활용된다<sup>6)</sup>.

慢性期 陰虛血燥型 아토피 피부염에 대응되는 生料四物湯은 《小兒科秘方·胎毒門》<sup>7)</sup>에 수록된 처방으로 清熱, 涼血, 補血, 行血, 活血, 消腫, 祛風 효과가 있어<sup>8-9)</sup> 血虛生風하여 발생한 피부질환에 임상적으로 광범위하게 활용되고 있다.

최근 生料四物湯의 항알레르기 효과를 입증하기 위한 실험연구가 다각적으로 진행되었는데, 최<sup>8)</sup>는 히스타민 및 48 시간 homologous PCA, SRBC에 의한 지연성 足浮腫 반응에 유의성 있는 억제효과가 있음을 발표하였고, 김<sup>9)</sup>은 加味生料四物湯과 止痒膏를 이용하여 비만세포의 탈과립 및 히스타민 분비 억제 효과, TNF- $\alpha$  및 IL-6 발현 측면에서 hydrocortisone에 비해 우수한 효과가 있음을 밝혔으나, 生料四物湯이 비만세포에서 발현하는 IL-4, IL-13에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 生料四物湯이 알레르기 염증 반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 RBL-2H3 비만세포를 이용하여 Real-time PCR과 ELISA로 비만세포에서 발현하는 IL-4와 IL-13을 조절할 수 있는지를 분석하였고, western blot으로 GATA-1, GATA-2, NF-AT1, NF-AT2, c-Fos, c-Jun, p-c-Jun, NF- $\kappa$ B p65 전사인자의 발현을 억제하는지 분석하였으며, 이를 통해 生料四物湯이 비만세포에서 어떤 신호전달 기전을 제어함으로써 활성이 억제되어 IL-4와 IL-13의 발현을 억제하는지를 실험적으로 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약 및 기기

##### (1) 시약

Minimal essential medium(MEM), Fetal bovine se-

rum(FBS), Trypsin-EDTA, Antibiotics(penicillin, streptomycin)는 Gibco-BRL (U.S.A.) 제품을 사용하였고, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(D-PBS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), Collagenase A, DNase type I, Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), Ionomycin, Phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), Diethyl pyrocarbonate(DEPC), Chloroform, Isopropanol, Ethanol, Nonidet P-40, RPMI-1640 배양액, Ethidium bromide(EtBr), Polyacrylamide, magnesium chloride(MgCl<sub>2</sub>)는 Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였다. Trizol은 Ambion사 (U.S.A.) 제품을, EZ-Cytox kit는 Daeil Lab. co. (Korea) 제품을, Deoxynucleoside triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사 (Japan) 제품을, Molecy Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega 사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, RNAzol<sup>B</sup>는 Tel-Test사 (U.S.A.) 제품을, primary antibody(NF-AT1, NF-AT2, c-Jun, c-Fos, p-c-Jun, GATA-1, GATA-2, NF- $\kappa$ B p65)는 Santa-Cruz사 (California, U.S.A.) 제품을 사용하였다. ECL-Hybond film은 Amersham 사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, SYBR master mix는 Applied Biosystems사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, IL-4 ELISA kit는 BD bioscience사 (U.S.A.) 제품을, IL-13 ELISA kit는 Biosource 사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

#### (2) 기기

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

### 2) 세포 배양 및 약물 분리

#### (1) 세포 배양

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

Table 1. Composition of *SaengRyoSaMulTang*

韓藥名	生藥名	量(g)
生地黃	<i>Rebmanniae Radix Crudus</i>	4
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	4
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	2
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	2
防風	<i>Saposhnikoviae Radix</i>	2
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	2
薄荷	<i>Menthae Herba</i>	2
蟬退(去毒)	<i>Cicadidae Periostracum</i>	1.5
Total amount		19.5

## (2) 生料四物湯 조제

본 실험에 사용한 生料四物湯은 《小兒科秘方》<sup>7)</sup>에 근거하여 대전대학교 둔산한방병원에서 구입, 정선하여 사용하였고, 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다 (Table 1).

## (3) 生料四物湯 추출물 분리

生料四物湯 2 첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2 시간 동안 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 生料四物湯 추출물(이하 SRSMT) 8.86 g을 냉동 보관 (-84℃)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

## 2. 방법

## 1) 세포 독성 측정

## (1) Human Fibroblast cells(hFCs) 배양

Human Fibroblast cells(hFCs)는 충남대학교 부속병원에서 제공받아 cool D-PBS로 3 회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5 분간 원심분리하고, tube에 DMEM {containing collagenase A (5 mg/ml)와 DNase type (0.15 mg/ml), antibiotics (penicillin 10<sup>4</sup> U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 μg/ml)}를 넣고 37℃ CO<sub>2</sub> 배양기에서 2 시간 동안 배양하였고, 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 1,500 rpm에서 약 2 회 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 2 주일 동안 배양하였다. 2 주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 hFCs세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

## (2) 세포 독성(cytotoxicity) 측정

세포독성 측정방법은 EZ-Cytox assay법<sup>10)</sup>을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. hFCs 세포는 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1 시간 배양한 후 SRSMT (최종 농도 1 μg/ml, 10 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml)을 48 시간 동안 처리하였고, 배양 종료 6 시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 μl씩 각 well에 가하여 실험 종료 시까지 배양하였다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA LEADER 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 2) Real-time PCR

RBL-2H3 세포를 6-well plate에 2.5×10<sup>5</sup>/ml로 2 ml씩 분주하고 24 시간 동안 배양한 다음 무처리한 군은 정상군(Nr)으로 사용하였으며, PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5 μM) 만으로 자극한 군은 대조군(PI-CT)으로 사용하였다. 배양 후 Cyclosporin A(이하 CsA, 10 μg/ml)와 SRSMT(50 μg/ml, 100 μg/ml)으로 처리하고 1 시간 후에 PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5 μM)으로 자극한 뒤 6 시간 후에 세포를 얻어 각각 양성대조군(PI-CsA)과 실험군(PI-SRSMT)으로 사용하였다. 배양 후 세포에 Trizol을 1 ml넣고 eptube에 넣은 후 클로로포름을 100 μl 넣었다. 얼음에 17 분 동안 두고 13,000 rpm으로 15 분 동안 원심분리 하였다. 층이 분리되면 eptube에 상층액을 옮겨 담고, 동량으로 이소프로판올을 넣어 얼음에 10 분 정도 두었다가 13,000 rpm으로 15 분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 80% 에탄올로 세척하고 13,000 rpm으로 10 분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 완전히 제거하고 투명해질 때까지 말린 후 DEPC water로 cell의 양에 따라 20~30 μl 넣어 녹였으며 원심분리기로 액을 모아서 75℃로 데워진 전

Table 2. Primer Sequence for Real-time PCR Analysis

Target gene	Primer	Sequences
IL-4	Forward	5'-GGATGTAACGACAGCCCTCT-3'
	Reverse	5'-GTGTTCCITGTTGCCGTAAG-3'
IL-13	Forward	5'-CAGTTGCAATGCCATCCACA-3'
	Reverse	5'-AGCCACATCCGAGGCCTTT-3'
β-actin	Forward	5'-AGCAGATGTGGATCAGCAAG-3'
	Reverse	5'-AACAGTCCGCCTAGAAGCAT-3'

기가열장치에 5 분 동안 두었다가 얼음으로 재빨리 옮겼다. 일부는 RNA를 정량하고 나머지는 만들어 놓은 cDNA cocktail에 정량한 양을 계산해서 넣고 37°C에서 1 시간 동안 두고 95°C로 데워진 전기가열장치에 5 분 동안 두었다가 얼음으로 옮겨서 cDNA를 합성하였다. IL-4, IL-13, β-actin primer를 적정 농도로 각각 희석하여 넣고 SYBR Green과 cDNA를 넣은 후 Real-time PCR을 95°C 3 분 실행 후 95°C 15 초, 60°C 15 초, 72°C 20 초로 40 회 실행시켰다.

### 3) ELISA 측정

RBL-2H3 세포를 48-well plate에  $4 \times 10^5$ /ml로 250  $\mu$ l 씩 분주하고 24 시간 동안 배양한 다음 무처리한 군은 정상군(Nr)으로 사용하였으며, PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5  $\mu$ M) 만으로 자극한 군은 대조군(PI-CT)으로 사용하였다. 배양 후 CsA(10  $\mu$ g/ml)와 SRSMT(50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml)으로 각 well에 처리하고 1 시간 후에 PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5  $\mu$ M)으로 자극한 뒤 24 시간 후에 상층액을 얻어 각각 양성대조군(PI-CsA)과 실험군(PI-SRSMT)으로 사용하였다.

Rat IL-4, IL-13 ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 코팅 antibody를 microwell에 100  $\mu$ l 씩 분주하고 4°C에서 16 시간 두었다. 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200  $\mu$ l 씩 넣어서 1 시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상층액을 20 배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상층액을 100  $\mu$ l 씩 넣었다. 2 시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100  $\mu$ l 씩 넣고 1 시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. Microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100  $\mu$ l 씩 넣고 30 분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. Stop solution을 각 well에 50  $\mu$ l 씩 넣고 microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 측정하였다.

### 4) Western blot

RBL-2H3 세포를 100×20 mm plate에  $4 \times 10^5$ /ml로 10 ml 씩 분주하고 24 시간 동안 배양한 다음 무처리한 군은 정상군(Nr)으로 사용하였고, PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5  $\mu$ M) 만으로 자극한 군은 대조군(PI-CT)으로 사용하였다. 배양 후 CsA(10  $\mu$ g/ml)와 SRSMT(10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml)으로 처리하고 1 시간 후에 PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5  $\mu$ M)으로 자극한 뒤 6 시간 후에 cool PBS로 세척한 후 scraper로 세포를 얻고 원심분리하여 상층액을 버린 후 각각 양성대조군(PI-CsA)과 실험군(PI-SRSMT)으로 사용하였다.

- 1) whole cell lysate : Lysis buffer (RIPA buffer 98  $\mu$ l + protease inhibitor cocktail lysis solution (100×) 1  $\mu$ l + PMSF (100 mM) 1  $\mu$ l) 100  $\mu$ l로 얼음에서 15~20 분간 배양한 후 상층액을 얻었다.
- 2) nuclear extract lysate : Nuclear extract kit를 사용하여 Hypotonic buffer를 넣고 얼음에서 15 분간 배양한 후 원심분리하여 상층액 (cytoplasmic fraction)을 모았다.

튜브에 남아있는 핵에 complete lysis buffer를 넣고 30 초 동안 얼음에서 배양한 후 원심분리하여 상층액 (nuclear fraction)을 얻었다. 얻은 단백질은 BCA 단백질 정량법으로 정량하였다. 10% SDS-PAGE gel을 만들어서 running buffer를 채운 뒤 20 분 동안 pre-running시키고 그 사이에 단백질을 loading buffer로 희석하고 끓는 물에 5 분 동안 끓여서 단백질이 꼬인 것을 풀어주었다. Gel의 첫 번째 빈칸은 띄우고 두 번째 칸에 단백질 마커를 넣고 그 다음 칸부터 샘플을 넣어 120 V로 내렸다. 다 내린 gel을 크기에 맞게 자르고 20 분 동안 transfer buffer에 담가 놓고, 그 사이에 membrane을 gel의 크기에 맞게 자르고 transfer buffer에 미리 담귀 두었다. Transfer buffer로 가득 채우고 뜨거워지지 않게 얼음을 넣은 후 150 V로 1 시간 30 분 동안 membrane으로 이동시켰다. Membrane을 크기에 맞게 자르고 5% skin milk (TBS/T buffer)로 1 시간 동안 blocking 해주었다.

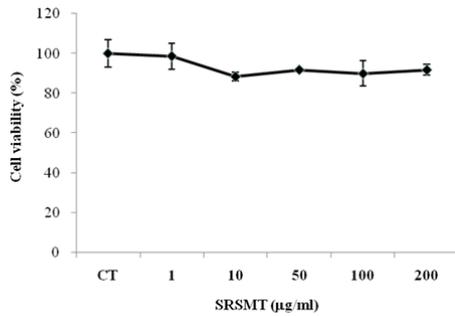


Fig. 1. Cytotoxic effects of SRSMT on human fibroblast cells (hFCs)

hFCs were pretreated with various concentration SRSMT. The results are expressed the mean±S.E. (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T-test.

Primary antibody (GATA-1, GATA-2, NF-AT1, NF-AT2, c-Fos, c-Jun, p-c-Jun, NF-κB p65, β-actin)로 4°C에서 하루를 반응시키고 다음날 secondary antibody를 1 시간 동안 실온에서 반응시켰다. 암실에서 ECL Detection 용액을 사용하여 필름에 옮기고 현상용액에 담궈 현상하고 고정액에 고정시켜 건조시켰다.

3. 통계 처리

각 실험군 결과 값은 unpaired Student's T-test 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였고, P<0.05 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

III. 성적

1. 세포 독성

SRSMT의 세포독성을 측정한 결과, 1 µg/ml에서 200 µg/ml까지의 모든 농도에서 세포독성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 1).

2. Real-time PCR analysis

SRSMT이 비만세포에서 IL-4, IL-13 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, RBL-2H3 세포에 CsA와 다양한 농도의 SRSMT을 처리한 후 PMA-Ionomycin (이하 PI)으로 자극한 뒤 6 시간 후 Real-time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석하였다.

1) IL-4 mRNA 유전자 발현

IL-4 mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.223±0.026이었고, 대조군은 1.053±0.053으로 정상군에 비하여 약

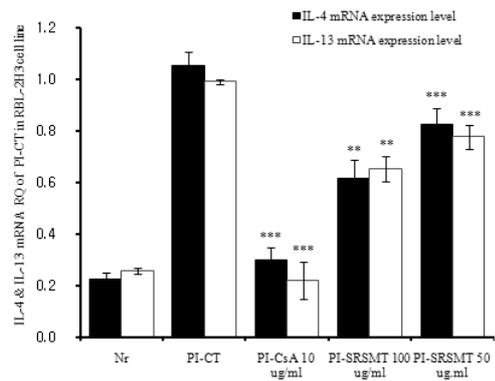


Fig. 2. Suppressive effects of SRSMT on IL-4 and IL-13 mRNA expression

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or SRSMT (50, 100 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. The expression of IL-4 and IL-13 mRNA was analyzed by real-time PCR. The amount of SYBR 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. Values are expressed as means±S.E. from two-independent experiments(\*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001).

4.7 배 정도 유전자 발현 증가가 나타났다. 양성대조군은 0.297±0.052로 대조군에 비하여 약 3.5 배 정도 유의성 있게(p<0.001) 억제하였다. 실험군의 IL-4 mRNA 유전자 발현은 100 µg/ml에서는 0.615±0.100으로 대조군에 비하여 약 1.7 배 정도 유의성 있게(p<0.01) 억제하였으며, 50 µg/ml에서는 0.824±0.046으로 대조군에 비하여 약 1.3 배 정도 유의성 있게(p<0.001) 억제하였다(Fig. 2).

2) IL-13 mRNA 유전자 발현

IL-13 mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.259±0.011이었고, 대조군은 0.989±0.011로 정상군에 비하여 약 3.8 배 정도 유전자 발현 증가가 나타났다. 양성대조군은 0.221±0.073으로 대조군에 비하여 약 4.5 배 정도 유의성 있게(p<0.001) 억제하였다. 실험군의 IL-13 mRNA 유전자 발현은 100 µg/ml에서는 0.652±0.104로 대조군에 비하여 약 1.5 배 정도 유의성 있게(p<0.01) 억제하였으며, 50 µg/ml에서는 0.776±0.026으로 약 1.3 배 정도 유의성 있게(p<0.001) 억제하였다(Fig. 2).

3. ELISA analysis

SRSMT이 비만세포에서 IL-4, IL-13 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, RBL-2H3 세포에 CsA와 다양한 농도의 SRSMT을 처리한 후 PI로 자극한 뒤 24 시간

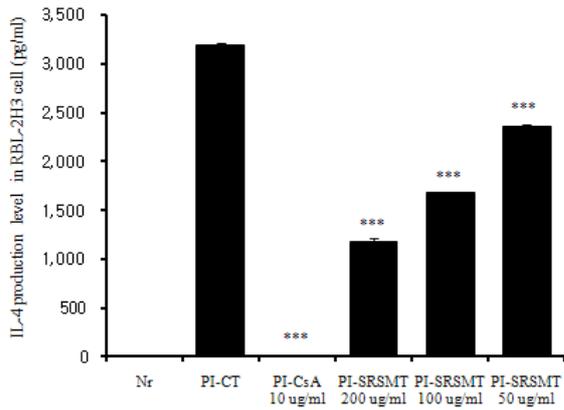


Fig. 3. Suppressive effects of SRSMT on IL-4 production

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or SRSMT (50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 hour, and then stimulated with PI for 24 hours. IL-4 levels were measured by ELISA. Values are expressed as means $\pm$ S.E. from two-independent experiments (\*\* $p < 0.001$ ).

후 ELISA로 IL-4와 IL-13 생산량을 측정하였다.

1) IL-4 단백질 생성

IL-4 생산량은 정상군은 IL-4 생산이 전혀 없었고, 대조군은 3192.21 $\pm$ 26.46 (pg/ml)으로 정상군에 비해 증가하였다. 양성대조군은 3.68 $\pm$ 0.18 (pg/ml)로 대조군에 비하여 약 867 배 정도 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 억제하였다. 실험군의 IL-4 생산량은 200  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 1177.41 $\pm$ 36.68 (pg/ml)으로 대조군에 비하여 약 2.7 배 정도 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 억제하였고, 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 1674.76 $\pm$ 19.98 (pg/ml)으로 대조군에 비하여 약 1.9 배 정도 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 억제하였으며, 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 2352.40 $\pm$ 26.98 (pg/ml)으로 대조군에 비하여 약 1.36 배 정도 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 억제하였다(Fig. 3).

2) IL-13 단백질 생성

IL-13 생산량은 정상군은 28.01 $\pm$ 3.07 (pg/ml)이었고, 대조군은 462.55 $\pm$ 8.43 (pg/ml)로 정상군에 비하여 약 16.5 배 정도 증가하였다. 양성대조군은 32.58 $\pm$ 11.39 (pg/ml)로 대조군에 비하여 약 14.2 배 정도 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 억제하였다. 실험군의 IL-13 생산량은 200  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 392.08 $\pm$ 31.48 (pg/ml)으로 대조군에 비하여 약 1.18 배 정도 유의성 있게( $p < 0.05$ ) 억제하였으나, 100  $\mu\text{g/ml}$ 과 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 각각 548.15 $\pm$ 26.48 (pg/ml)과 484.92 $\pm$ 14.15 (pg/ml)로 대조군과 차이가 나타나지 않았다(Fig. 4).

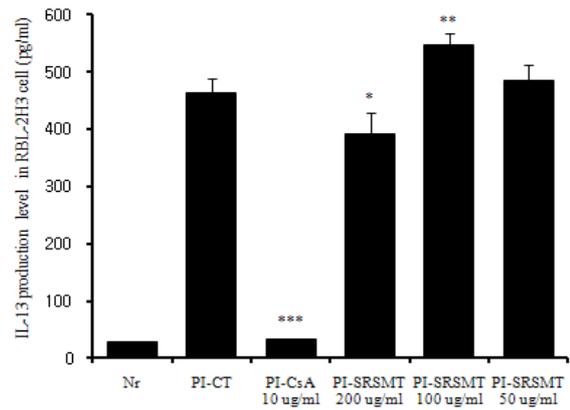


Fig. 4. Suppressive effects of SRSMT on IL-13 production

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or SRSMT (50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 hour, and then stimulated with PI for 24 hours. IL-13 levels were measured by ELISA. Values are expressed as means $\pm$ S.E. from two-independent experiments (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

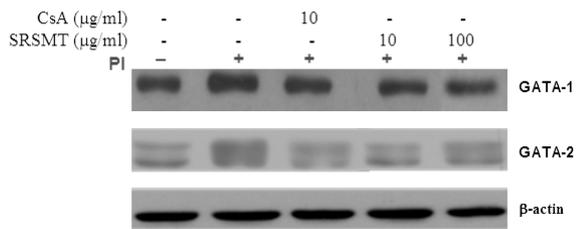


Fig. 5. Effect of SRSMT on GATA-1 and GATA-2 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or SRSMT (10, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with GATA proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of GATA proteins were selected as the positive controls for Anti-GATA-1 and Anti-GATA-2, respectively.

4. Western blot analysis

SRSMT이 비만세포에서 GATA-1과 GATA-2, NF-AT1과 NF-AT2, c-Jun, c-Fos 및 p-c-Jun, NF- $\kappa$ B p65 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, RBL-2H3 세포에 CsA와 다양한 농도의 SRSMT을 처리한 후 PI로 자극한 뒤 6 시간 후 western blot으로 GATA-1과 GATA-2, NF-AT1과 NF-AT2, c-Jun, c-Fos 및 p-c-Jun, NF- $\kappa$ B p65의 단백질 발현을 측정하였다.

1) GATA-1, GATA-2 신호전달 기전

GATA-1과 GATA-2 단백질 발현은 정상군에 비하여 대조군에서 현저하게 증가하였고(Fig. 5, GATA-1과

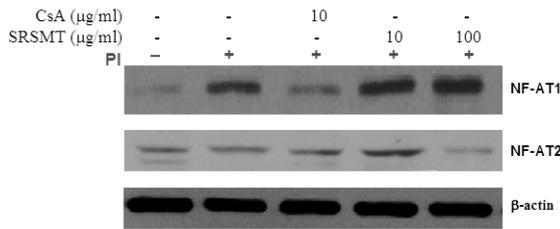


Fig. 6. Effect of SRSMT on NF-AT signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or SRSMT (10, 100 μg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with NF-AT proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of NF-AT proteins were selected as the positive controls for Anti-NF-AT1 and Anti-NF-AT2, respectively.

GATA-2, lane 2), 양성대조군은 대조군에 비하여 현저하게 억제되었다 (Fig. 5, GATA-1과 GATA-2, lane 3). 그리고 실험군의 GATA-1과 GATA-2 단백질 발현은 대조군에 비하여 10 μg/ml과 100 μg/ml 농도에서 농도구배에 따라 단백질 발현을 억제하였다 (Fig. 5, GATA-1과 GATA-2, lane 4-5).

2) NF-AT 신호전달 기전

NF-AT1 단백질 발현은 정상군에 비하여 대조군에서 현저하게 증가하였고 (Fig. 6, NF-AT1, lane 2), 양성대조군은 대조군에 비하여 현저하게 억제되었다 (Fig. 6, NF-AT1, lane 3). NF-AT2 단백질 발현은 정상군에 비하여 대조군에서 약간 증가하였고 (Fig. 6, NF-AT2, lane 2), 양성대조군은 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 6, NF-AT1과 NF-AT2, lane 3). 그리고 실험군의 NF-AT2 단백질 발현은 100 μg/ml에서 대조군에 비하여 단백질 발현을 억제하였다 (Fig. 6, NF-AT2, lane 5). 그러나 실험군의 NF-AT1 단백질 발현은 10 μg/ml과 100 μg/ml 농도에서 대조군에 비하여 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 6, NF-AT1, lane 4-5).

3) AP-1 신호전달 기전

c-Jun, c-Fos 및 p-c-Jun의 단백질 발현은 대조군 및 양성대조군은 정상군에 비하여 별다른 차이가 나타나지 않았고 (Fig. 7, c-Jun, c-Fos 및 p-c-Jun, lane 2-3), 실험군의 c-Jun, c-Fos 단백질 발현은 100 μg/ml 농도에서 대조군에 비하여 단백질 발현을 억제하였다 (Fig. 7, c-Jun 및 c-Fos, lane 5). 그러나 실험군의 p-c-Jun 단백질 발현

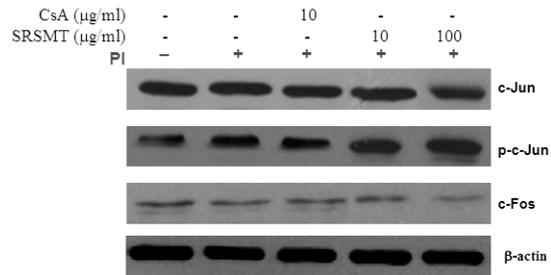


Fig. 7. Effect of SRSMT on AP-1 proteins in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or SRSMT (10, 100 μg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with AP-1 proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of AP-1 proteins were selected as the positive controls for anti-c-Jun, anti-c-Fos and anti-phospho-c-Jun, respectively.

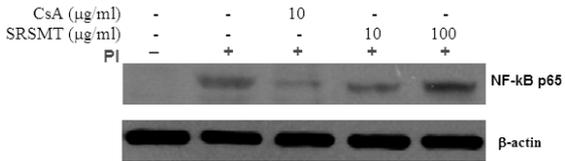


Fig. 8. Effect of SRSMT on NF-κ B p65 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or SRSMT (10, 100 μg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with NF-κB p65 protein. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of NF-κB p65 proteins were selected as the positive controls for Anti-NF-κB p65, respectively.

은 10 μg/ml과 100 μg/ml 농도에서 대조군에 비하여 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 7, p-c-Jun, lane 4-5).

4) NF-κ B p65 신호전달 기전

NF-κB p65 단백질 발현은 정상군에 비하여 대조군에서 현저하게 증가하였고 (Fig. 8, NF-κB p65, lane 2), 양성대조군은 대조군에 비하여 현저하게 억제되었다 (Fig. 8, NF-κB p65, lane 3). 그리고 실험군의 NF-κB p65 단백질 발현은 대조군에 비하여 10 μg/ml 농도에서 단백질 발현을 억제하였으나 100 μg/ml 농도에서는 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 8, NF-κB p65, lane 4-5).

IV. 고찰

아토피 피부염은 주로 영유아기에 시작하는 소양감,

홍반성 구진, 부종, 삼출, 가피와 인설 등의 증상을 동반하는 만성 재발성 습진 질환으로<sup>1,2)</sup>, 특히 장기간의 치료를 요하며 완치가 어렵고 주로 노출된 부위에 발생하여 삶의 질 저하에 많은 영향을 미치고 있다<sup>11)</sup>.

최근 전세계적으로 아토피 피부염의 유병률이 증가하는 추세이며<sup>12)</sup>, 특히 영유아기를 시작으로 소아기 및 청소년기의 알레르기 질환의 유병률은 성인보다 높고 이전에 비해 꾸준히 증가하는 경향을 보이고 있어<sup>13-5)</sup> 국내외에서 심각한 문제로 대두되고 있다.

현재 아토피 피부염의 치료는 습진에 대한 스테로이드 외용약, 면역억제 외용약 등의 외용요법과 가려움에 대한 항히스타민제 등의 내복요법이 주를 이루고 있으나<sup>16)</sup>, 환자들은 반복되는 질환의 경과에 따른 서양 의학적 치료의 반복에 만족하지 못하고 한방치료를 통해 근본적인 치료를 하고자 하는 수요가 증가하고 있다<sup>17)</sup>.

이에 따라 생약 및 한약 제제의 아토피 피부염 치료 효능을 입증하는 다양한 실험논문들이 보고되고 있으며, 그 중 *in vitro* 실험에서는 U266B1 세포주, RBL-2H3 세포주, Raw264.7 세포주, HaCaT 세포주 등을 이용한 효력 시험이 보고되었는데, 최근에 노<sup>18)</sup>는 U266B1 세포주를 이용하여 魚腥草 抽出物이 IgE 생성을 억제한다는 것을 밝혔고, 유<sup>19)</sup>는 Raw264.7 세포주를 이용하여 감잎 추출물이 항산화 및 항알레르기 효능이 있다는 연구결과를 발표하였으며, 장<sup>20)</sup>은 HaCaT 세포주를 이용하여 Wogonin의 항알레르기 효과를 밝혀냈다. 또한 RBL-2H3 세포주를 이용하여 升麻葛根湯이 히스타민 농도와 IL-4, GM-CSF mRNA 발현을 억제한다는 연구결과<sup>21)</sup> 및 茵陳蒿湯이 알레르기와 관련된 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-4를 억제한다는 연구 결과<sup>22)</sup> 등이 보고되었다.

아토피 피부염은 한의학적으로 胎熱, 胎癬, 浸淫瘡, 胎斂瘡, 奶癬, 濕疹, 濕瘡, 四彎風 등의 범주에 속하며<sup>23)</sup>, 風熱, 血熱, 血虛, 脾胃濕熱 등이 원인으로<sup>24-6)</sup>, 치료는 증상의 경과에 따라 清熱利濕, 涼血清熱利濕, 健脾除濕, 涼血祛風, 清熱化濕, 清熱止痒祛風 등의 治法을 사용한다<sup>25-7)</sup>.

生料四物湯은 《小兒科秘方·胎毒門》<sup>7)</sup>에 수록된 처방으로 熟地黃, 白芍藥, 當歸, 川芎으로 구성된 四物湯에서 熟地黃 대신 生地黃으로 바꾸고, 祛風清熱하는 防風, 黃芩, 薄荷 등을 配合하여, 소아의 稟受胎熱 또는 乳母飲食의 毒, 七情之火의 所致로 兩耳眉梢 또는 耳前後髮際, 額, 頰頰, 兩脇及四肢等處에 瘡瘍을

發하여 처음에는 乾癬과 같다가 나중에는 膿水淋漓 또는 結靨成片케 되는 胎毒을 치료하려는 목적으로 立方된 처방이다.

피부가 갈수록 얇아지고 갈라지면서 건조해지는 피부소양증과 같은 증상이 나타나며 구진, 血癬가 동반되는 아토피 피부염<sup>6,28)</sup>에 生料四物湯을 투여하여 임상적으로 그 효과가 인정되었으나, 이러한 치료반응이 어떠한 기전을 통해 나타나는가에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 사료되었다.

이에 저자는 다양한 종류의 항원에 유도된 포괄적인 면역학적 연구에 좋은 모델로 알려져 있는<sup>29)</sup> RBL-2H3 비만세포를 이용하여 生料四物湯이 알레르기 염증 반응의 억제에 미치는 영향을 알아보았다.

아토피 피부염은 알레르기 질환의 일종으로<sup>2)</sup>, 알레르기 질환은 대부분 IgE 매개에 의한 즉시형 과민반응시 분비되는 화학매개체의 생물학적 작용에 의해 유발되는데, 알레르기 반응은 이들 화학 매개체에 의해 조기반응과 후기반응으로 나타난다. 조기반응은 비만세포-IgE 매개에 의해 분비되는 강력한 매개체들인 히스타민, 프로스타글란딘 D2, 류코트리엔 등에 의해 일어나는 반면 후기반응은 염증세포의 증가가 특징이며, 호산구 이외에도 다양한 cytokine들에 의해 여러 세포들의 염증 작용이 일어나 지속적인 후기반응이 유발된다<sup>30-1)</sup>.

비만세포는 세포질 내에 과립을 풍부하게 가지고 있는 세포로서 주로 결체조직과 점막에 존재하면서 알레르기 염증 반응에 관여한다<sup>32)</sup>. 이 세포는 IgE-Fc $\epsilon$ RI 반응에 의해 과립 내의 화학매개체와 cytokine 등을 분비하면서 조직손상, 점막부종, 점액 분비 증가 등을 일으킨다<sup>31)</sup>.

IgE가 Fc $\epsilon$ RI에 결합하면 비만세포는 감각되고 알레르기 항원과 만나면 반응할 수 있도록 태세를 갖추게 된다<sup>33)</sup>. 알레르기 항원에 재차 노출되면 비만세포는 활성화되어 즉시형 과민반응의 병리학적 반응을 담당하는 매개인자와 IL-4 및 IL-13 등과 같은 Th2 cytokine을 분비하고 이들은 알레르기 반응을 확장하는 역할을 한다<sup>34)</sup>. 비만세포에서 생산되는 IL-4와 IL-13은 계속해서 Th2 면역 반응을 확장하고 IgE의 생산을 증가시킴으로서 만성 알레르기 반응에 기여한다. 그러므로 비만세포가 발현하는 IL-4와 IL-13을 조절 할 수 있다면 알레르기 반응을 경감시키거나 알레르기 반응이 만성으로 확장되는 것을 억제할 가능성이 있다.

따라서 본 실험에서는 RBL-2H3 비만세포를 이용하

여 Real-time PCR과 ELISA로 비만세포에서 발현하는 IL-4와 IL-13을 조절 할 수 있는지를 분석하였고, western blot으로 GATA-1, GATA-2, NF-AT1, NF-AT2, c-Fos, c-Jun, p-c-Jun, NF- $\kappa$ B p65 전사인자의 발현을 억제하는지 분석하였으며, 이를 통해 生料四物湯이 비만세포에서 어떤 신호전달 기전을 제어함으로써 활성이 억제되어 IL-4와 IL-13의 발현을 억제하는지를 실험적으로 규명해 보고자 하였다.

실험 결과를 살펴보면, hFCs를 배양하여 SRSMT의 세포독성을 측정된 결과, 모든 농도에서 세포독성이 거의 나타나지 않았다 (Fig. 1).

RBL-2H3 세포에 CsA와 다양한 농도의 SRSMT을 처리한 후 PI로 자극한 후 Real-time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석한 결과 SRSMT이 IL-4와 IL-13 mRNA 유전자 발현을 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였고(Fig. 2), ELISA로 IL-4, IL-13 단백질 생산량을 측정된 결과 IL-4와 IL-13 단백질 생산을 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였다 (Fig. 3-4).

이는 알레르기 반응에 있어서 SRSMT이 비만세포가 발현하는 IL-4, IL-13의 생성을 억제하여 Th2 면역 반응을 차단함으로써 알레르기 염증 반응을 효과적으로 조절한다고 할 수 있다.

Fig. 3의 결과에서 정상군은 IL-4 생산이 전혀 없었는데, 이는 IL-4가 IL-13과 달리 알레르기 반응의 초기에 발현하는 cytokine으로서 자극으로 활성화 되지 않는 상태에서는 유전자 발현이 거의 되지 않기 때문<sup>35)</sup>으로 추측된다.

CsA는 칼슘의존성 T 세포의 신호전달 과정을 차단하는 면역억제제로써<sup>36)</sup> NF-AT 신호전달 기전을 차단한다<sup>37)</sup>. Fig. 3과 Fig. 4의 결과에서 양성대조군은 대조군에 비하여 IL-4, IL-13 생산을 현저하게 억제시켰는데, 이는 NF-AT 신호전달 기전이 IL-4, IL-13의 생산에 중요한 역할을 한다는 것을 추측해 볼 수 있다.

활성화된 비만세포의 cytokine 생산은 새로이 유도된 cytokine 유전자의 전사결과이다. 비만세포에서 IL-4와 IL-13의 발현은 선택적으로 발현되는 GATA-1, GATA-2, PU.1과 같은 인트론 부위에 결합하는 전사인자<sup>38)</sup> 및 NF-AT를 포함하는 여러 전사인자와의 협동에 의해 조절된다<sup>39)</sup>. Fc $\epsilon$ RI의 교차결합 반응으로 여러 가지 어댑터 분자와 키나아제의 보충과 활성화는 NF-AT 및 NF- $\kappa$ B의 핵전이와 c-Jun 아미노 말단 키나아제와 같은 단백질 키나아제에 의한 AP-1의 활성화에 이르게 한다<sup>40)</sup>.

비만세포에서 IL-13의 발현이 어떻게 조절되는지는 아직까지 많이 알려지지 않았지만 다수의 전사인자가 IL-13의 프로모터에 작용하여 조절되는 것으로 확인되고 있다. IL-13의 생산은 NF-AT, GATA, AP-1을 포함하는 여러 전사인자와의 협동에 의해 조절된다<sup>41)</sup>. NF-AT2는 GATA와 협력하여 IL-13 전사 조절에 수반되는 가장 중요한 전사인자이다<sup>39)</sup>. GATA-2는 IL-13에 결합하는 AP-1 결합을 유도할 뿐만 아니라 비만세포에서 IL-13 생성을 증가시킨다<sup>42)</sup>.

SRSMT이 비만세포에서 GATA-1과 GATA-2의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot으로 GATA-1과 GATA-2 단백질 발현을 측정된 결과, SRSMT이 GATA-1과 GATA-2 단백질 발현을 현저하게 억제하였다 (Fig. 5, GATA-1과 GATA-2, lane 4-5).

전사인자 NF-AT은 비활성화 상태에서 인산화된 형태로 세포질에 존재하며 항원 수용체의 자극에 의해서 유도된 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가로 calcineurin이 활성화되어 NF-AT의 탈인산화를 일으킨다. 탈인산화된 NF-AT은 핵 내로 이동하여 활성화된 T 세포에서 IL-2 promoter에 존재하는 antigen receptor response element에 결합함으로써 면역세포들에서 면역반응의 유도와 조절에 필수적인 여러 cytokine 유전자(IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ )와 세포표면인자(CD40L, FasL, IL-2R $\alpha$ )등의 발현에 중요한 역할을 한다<sup>43)</sup>.

SRSMT이 비만세포에서 NF-AT1과 NF-AT2의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot으로 NF-AT1과 NF-AT2 단백질 발현을 측정된 결과, 실험군의 NF-AT2 단백질 발현이 대조군에 비하여 억제되었다(Fig. 6, NF-AT2, lane 5).

이는 SRSMT이 GATA, NF-AT 신호전달 기전을 차단하여 IL-4, IL-13의 생성을 억제함으로써 알레르기 염증 반응을 조절하는 것으로 사료된다.

c-Jun과 c-Fos는 AP-1 단백질 복합체의 중요한 구성원으로서 heterodimer의 형태로 AP-1 결합 부위를 통해 전사를 조절한다<sup>42)</sup>.

SRSMT이 비만세포에서 c-Jun, c-Fos 및 p-c-Jun의 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, western blot으로 c-Jun, c-Fos 및 p-c-Jun의 단백질 발현을 측정하였다. 그 결과 SRSMT이 실험군의 c-Jun 및 c-Fos 단백질 발현은 억제하였으나 (Fig. 7, c-Jun 및 c-Fos, lane 5), p-c-Jun 단백질 발현은 대조군에 비하여 10  $\mu$ g/ml과 100  $\mu$ g/ml 농도에서 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 7, p-c-Jun, lane 4-5).

이러한 결과는 c-Jun, c-Fos 단백질 발현을 억제하여 AP-1 신호전달 기전을 제어함으로써 알레르기 염증 반응을 제어한다고 할 수 있다.

NF- $\kappa$ B는 면역기능, 염증반응, 혈관 내피세포의 활성화, 세포성장 등에 관여하는 전사인자로서 거의 모든 세포에 존재한다. NF- $\kappa$ B는 구조상 같은 계열(Rel family)에 속한 단백질 heterodimer나 혹은 homodimer 형태로 존재하는데 가장 대표적인 것이 p50과 p65의 heterodimer 형태이다. 기저상태에서 I $\kappa$ B와 결합하여 세포질 내에 비활성화 상태로 존재하는 NF- $\kappa$ B는 바이러스 감염, 내독소, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  등의 염증매개 cytokine에 의해 활성화된다. 즉, 외부 자극에 의해 I $\kappa$ B가 분해되면 세포질에 존재하던 NF- $\kappa$ B가 핵 속으로 이동되어 여러 유전자의  $\kappa$ B element에 결합하여 그 유전자의 전사를 가져온다. 이런 경로를 통해 전사가 활성화되는 대표적인 염증매개 물질로는 TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, lymphotoxin, GM-CSF,  $\beta$ -IFN, adhesion molecule 등을 들 수 있다<sup>44)</sup>.

SRSMT이 비만세포에서 NF- $\kappa$ B p65의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot으로 NF- $\kappa$ B p65 단백질 발현을 측정된 결과, 실험군의 NF- $\kappa$ B p65 단백질 발현은 대조군에 비하여 10  $\mu$ g/ml 농도에서 억제되었으나 100  $\mu$ g/ml 농도에서는 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 8, NF- $\kappa$ B p65, lane 4-5).

이는 비만세포에서 특이적으로 10  $\mu$ g/ml에서 발현되는 농도 의존의 가능성, 또는 실험상의 오류로 추정되며 추가적인 연구를 통해 NF- $\kappa$ B 신호전달에 작용하는 기전을 파악하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

이상의 결과로 미루어 보아 生料四物湯은 활성화된 비만세포에서 발현하는 IL-4, IL-13의 생성을 억제함으로써 알레르기 염증 반응을 제어하는 것으로 판단되며, 그 중 GATA-1, GATA-2, NF-AT2, c-Jun, c-Fos 전사인자의 활성을 억제함으로써 GATA, NF-AT, AP-1 신호전달 기전을 차단하여 IL-4, IL-13의 발현을 억제하는 것으로 사료된다.

이로써 生料四物湯이 임상에서 아토피 피부염을 포함하는 알레르기 질환에 적용이 가능할 것으로 판단되며, 향후 아토피 피부염의 치료제로서의 가능성을 알아보기 위해 아토피 피부질환 모델인 NC/Nga mouse를 이용한 동물 실험 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## IV. 결 론

RBL-2H3 비만세포를 이용하여 生料四物湯이 비만세포의 IL-4, IL-13 cytokine 발현 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과 다음과 같다.

1. 生料四物湯은 정상 hFCs에서 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다.
2. 生料四物湯은 RBL-2H3 비만세포에서 IL-4와 IL-13 mRNA 유전자 발현을 억제하였다.
3. 生料四物湯은 RBL-2H3 비만세포에서 IL-4와 IL-13 단백질 생성을 억제하였다.
4. 生料四物湯은 RBL-2H3 비만세포에서 전사인자인 GATA-1 및 GATA-2 단백질 발현을 억제하였다.
5. 生料四物湯은 RBL-2H3 비만세포에서 전사인자인 NF-AT2 단백질 발현을 억제하였다.
6. 生料四物湯은 RBL-2H3 비만세포에서 전사인자인 c-Fos 및 c-Jun 단백질 발현을 억제하였다.

## V. 參考文獻

1. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피부과학. 제5판. 서울:여문각. 2008:170-1.
2. 안효섭. 홍창의 소아과학. 제9판(보정판). 서울:대한교과서주식회사. 2007:1104-43.
3. Andrew H. Liu. The Allergic March of Childhood. medical scientific update. 2006;23(1):1-12.
4. 이승연. 木瓜 추출물이 항알레르기 및 항산화 작용에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2010;24(2):126-36.
5. 강석영. 알레르기 질환의 진단과 치료. 서울:일조각. 1995:241-52.
6. 김기봉, 김덕곤, 김윤희, 김장현, 민상연, 박은정, 백정환, 유선애, 이승연, 이진용, 이해자, 장규태, 채중원, 한윤정, 한재경. 한방소아청소년의학. 서울:도서출판 의성당. 2010:756.
7. 崔奎憲. 小兒科秘方(全). 대전:도서출판 초락당. 2005: 55.
8. 최창규, 박은정, 정규만. 牛黃抱龍丸 去雄黃朱砂方 및 生料四物湯의 항알레르기에 관한 實驗的 研究.

- 대한한방소아과학회지. 1993;7(1):1-16.
9. 김정진, 양성완, 손낙원, 안규석. 加味生料四物湯의 抗炎症 효과와 止痒膏의 아토피피부염 손상 및 止痒 효과에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2003;17(2): 428-35.
  10. Munetaka Ishiyama, Yoko Miyazono, Kazumi Sasamoto, Yosuke Ohkura and Keiyu Ueno. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*. 1997;44(7): 1299-305.
  11. Finlay AY. Quality of life in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45:S64-S66.
  12. 오재원, 김규언, 편복양, 이혜란, 정지태, 홍수중, 박강서, 이수영, 송상욱, 김철홍, 안강모, 남승연, 손명현, 김우경, 이미희, 권병철, 최성연, 이소연, 이하백, 이상일, 이준성. 1995년과 2000년의 학동기와 2003년 학동전기 소아에서의 아토피피부염의 역학적 변화에 관한 전국적인 연구. 소아 알레르기 및 호흡기학회지. 2003;24(4):227-37.
  13. Lee SI, Shin MH, Lee HB, Lee JS, Son BK, Koh YY, Kim KE, Ahn YO. Prevalences of Symptoms of Asthma and Other Allergic Diseases in Korean Children: A Nationwide Questionnaire Survey. *J Korean Med Sci*. 2001;16(2):155-64.
  14. Beasley R, Crane J, Lai CK, Pearce N. Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105: 466-72.
  15. 이하백, 신수아, 오재원. 아시아 국가의 소아천식의 유행률의 새로운 패턴 : ISAAC Phases I 과 III. 소아알레르기및호흡기학회지. 2008;18(1):70-7.
  16. 연세대학교 의과대학 소아과학교실. 세브란스 소아 진료 매뉴얼. 제3판. 서울:연세대학교 출판부. 2009:279-82.
  17. 서민수, 김경준. 대한안이비인후피부과학회지에 게재된 아토피 피부염 관련논문에 관한 고찰. 한방안이비인후피부과학회지. 2009;22(3):108-21.
  18. 노병규, 신민교, 송호준. 魚腥草 抽出物의 抗알레르기 효과에 관한 研究. 대한분초학회지. 1998;13(2):77-89.
  19. 유기환, 정중문. 감잎(*Diospyros kaki* Thunb) 추출물의 항산화 및 항알레르기 효과. 한국식품영양과학회지. 2009;38(12):1691-8.
  20. SI Jang. Wogonin inhibits Cytokine-induced TARC/CCL17 Expression by Suppression of NF- $\kappa$ B activation via p38 MAP kinase Signaling Pathways in HaCaT Keratinocytes. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2007;21(4):1017-24.
  21. 김홍배, 김원일, 이승연. 升麻葛根湯의 항히스타민 효과 및 IL-4와 GM-CSF 발현에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2006;20(1):69-83.
  22. 어경정, 류지효, 유선애, 윤화정, 고우신. RBL-2H3 cells에서의 茵陳蒿湯의 항 알레르기 효과. 한방안이비인후피부과학회지. 2009;22(1):89-99.
  23. 공남미, 지선영. 아토피피부염의 양·한방적 고찰. 대한외관과학회지. 1999;12:241-53.
  24. 吳謙. 醫宗金鑑. 北京:人民衛生出版社. 1998:908-11.
  25. 江育仁, 張奇文 主篇. 實用中醫兒科學. 上海:上海科學技術出版社. 1996:760-2.
  26. 陳實功. 外科正宗. 上海:上海科學技術出版社. 1985: 461-3.
  27. 김기봉, 민상연, 김장현. 最新 臨床研究를 중심으로 한 아토피 피부염에 관한 方法論的 研究. 대한한방소아과학회지. 2006;20(2):151-64.
  28. 김갑성, 김명동, 김윤범, 김장현, 김중호, 이원철, 임양근, 정찬길. 實用 東西醫學 臨床總書. 第6卷 皮膚科. 서울:도서출판 정담. 2001:48.
  29. Feng Huang, Kouya Yamaki, Xiaoyun Tong, Lianqing Fu, Ronghua Zhang, Yu Cai, Rie Yanagisawa, Ken-ichiro Inoue, Hirohisa Takano, Shin Yoshino. Inhibition of the antigen-induced activation of RBL-2H3 cells by sinomenine. *International Immunopharmacology*. 2008;8 :502-7.
  30. 이현희. 알레르기 염증반응에서 Siglecs의 기능. 소아 알레르기 호흡기. 2006;16(3):197-205.
  31. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. 최신 면역학입문. 3판. 서울:이퍼블릭. 2009:205-12.
  32. Katz HR, Stevens RL, Austen KF. Heterogeneity of mammalian mast cells differentiates *in vivo* and *in vitro*. *J Allergy Clin Immunol*. 1985;76:250-9.
  33. Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (FceRI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol*. 1999;17: 931-72.
  34. Matsubara M, Masaki S, Ohmori K, Karasawa A, Hasegawa K. Differential regulation of IL-4 expression and degranulation by anti-allergic olopatadine in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochem Pharmacol*. 2004;67(7):1315-26.

35. Zhonglin Wu, David R. Turner, David B. G. Oliveira.  
IL-4 gene expression up-regulated by mercury in rat mast cells : a role of oxidant stress in IL-4 transcription. *International Immunology*. 2001;13(3):297-304.
36. 이종선, 윤숙정, 이지범, 김성진, 원영호, 이승철. 아토피 피부염 환자에서 Cyclosporin의 치료 효과. *대한피부과학회지*. 2008;46(2):224-30.
37. Mina Lee, Jungchan Park. Regulation of NFAT Activation: a Potential Therapeutic Target for Immunosuppression. *Mol. Cells*. 2006;22(1):1-7.
38. Harigae H, Takahashi S, Suwabe N, Ohtsu H, Gu L, Yang Z, Tsai FY, Kitamura Y, Engel JD, Yamamoto M. Differential roles of GATA-1 and GATA-2 in growth and differentiation of mast cells. *Genes Cells*. 1998;3(1):39-50.
39. Hansjörg Schild, Edgar Schmitt and Michael Stassen Bopp, Valeska Heib, Marc Becker, Christian Taube, Palmetshofer, Edgar Serfling, Christine Tertilt, Tobias. Cytokines Expression of Mast Cell-Derived NFAT Transcription Factors in the Expression of Mast Cell-Derived Cytokines. *J. Immunol*. 2006;177:6667-74.
40. Abul k. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. 세포분자면역학. 6판. 서울:이퍼블릭. 2008:459.
41. Akio Masuda, Yasunobu Yoshikai, Hiroaki Kume and Tetsuya Matsuguchi. The Interaction between GATA Proteins and Activator Protein-1 Promotes the Transcription of IL-13 in Mast Cells. *The Journal of Immunology*. 2004;173:5564-73.
42. Lewin I, Nechushtan H, Ke Q, Razin E. Regulation of AP-1 expression and activity in antigen-stimulated mast cells: the role played by protein kinase C and the possible involvement of Fos interacting protein. *Blood*. 1993;82(12):3745-51.
43. 이임선, 윈디엔닷, 채홍복, 심광해, 김영호. NFAT(nuclear factor of activated T cells) 전사인자에 대한 천연물의 저해활성. *생약학회지*. 2003;34(2):150-5.
44. 박계영, 이승희, 황보빈, 임재준, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수, 유철규. 폐 상피세포에서 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로에 의한 염증매개 사이토카인의 발현. 결핵 및 호흡기 질환. 2000;49(3):332-42.