

石紫解肌湯이 아토피피부염 유관 인자인 산화적 손상과 염증 인자에 미치는 영향

정대웅¹ · 최학주² · 김선빈² · 이기무³ · 김동희¹ *

Effect of SHT on the anti-oxidant activity and atopic dermatitis related inflammatory cytokines

Jung Dae-Woong¹ · Choi Hak-Joo² · Gim Seon-Bin² · Lee Ki-Moo³ · Kim Dong-Hee¹ *

¹Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

²Traditional and Biomedical Research Center(TBRC), Daejeon University

³Doori Cosmetics

In order to investigate the possibility of SHT as therapeutic for the treatment of atopic dermatitis (AD), cytotoxicity, anti-oxidant activity, modulatory and suppression activities of SHT were tested. 90% or higher cell viability was observed in all tested groups from 25 to 200 ug/ml using Raw 264.7 cells. SHT showed dose-dependent DPPH scavenging activity, with more than 80% scavenging activities at 400 and 800 ug/ml concentrations. SHT showed dose-dependent suppression activity of ROS production, especially at 200 ug/ml of 57.4%. SHT decreased NO production activity dose dependently, especially at 200 ug/ml of 28.8%. IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α production rate were decreased by 45.7%, 15.5%, 8.9%, 16.5% respectively when Raw 264.7 cells were treated with LPS and with SHT of 200 ug/ml. However, only IL-6 and TNF- α showed significant changes. The results above indicate that SHT significantly reduces the effect of oxidative and inflammatory cytokines. The use of SHT in dermatitis can be widely suggested.

Key words : SHT(Seokjahaekitang), atopic dermatitis, oxidative damages, inflammation, cytokine

I. 서 론

최근 증가 추세에 있는 아토피피부염은 가려움을 동반한 습진을 주 병변으로 하는 만성 피부염증질환이다¹⁾. 이는 피부 건조와 피부 장벽의 기능, 피부 염증 등 피부의 생리학적 이상을 동반한 다양한 비특이적 자극 반응 또는 특이적 알레

르기 반응이 관여하는 것으로 알려져 있다²⁻⁶⁾.

아직 원인이 명확히 밝혀지지 않았기에 현재 치료 대책은 유전적 요인을 포함한 여러 가지 요인을 고려한 원인과 악화 인자의 탐색과 제거, 스킨케어, 약물 치료가 기본적으로 행해지고 있다⁷⁾. 그 중 약물 치료가 주로 이루어지고 있으며, 스킨케어는 주로 스테로이드 외용제나 타크로림스 연고가 이용되고 있으나 치료약에 대한 저항성, 피부 수축과 일과성 자극감 그리고 그에 따른 증상의 심화 및 재발 등의 다양한 부작용이 보고되

* 교신저자 : 김동희, 대전대 한의과대학 병리학교실

투고일 : 2011년 12월23일 수정일 : 2012년 1월31일

확정일 : 2012년 2월2일

고 있다^{8,9)}.

韓醫學에서 疾病은 邪氣와 사람과의 상호 작용의 과정으로, 病者의 整體的 反應 상태와 病邪의 特徵에 따라 다양한 양상을 나타낸다고 인식하고 있다. 특히 皮膚 疾患에서 자주 기술되고 있는 ‘司外揣內’ ‘皮膚病雖發于外 本于內’ ‘沒有內亂 不得外患’ ‘外治之理 卽內治之理’ 등은 整體的 觀點에서 臟腑와의 상관성을 제시하고 있다.

皮膚病의 辨證은 크게 內外治를 불문하고, 邪氣의 특징이 분명하면 六淫辨證, 表裏의 특징이 분명하면 六經辨證, 發疹性 熱性病에는 衛氣營血辨證, 濕熱病, 濕病에는 三焦辨證을, 병 발생 부위가 특징적이면 經絡辨證을, 생리기능과 정신과의 상관성이 있을 때에는 臟腑辨證을 응용한다¹⁰⁻¹⁴⁾.

아토피피부염 역시 상기한 이론에 의해 치료가 이루어지고 있으며, 실험적 연구 역시 전통적인 피부과 질환 처방, 임상 활용방 및 단일 약제에 대한 연구¹⁵⁻²⁴⁾가 지속적으로 이루어지고 있다.

本 試料인 ‘石紫解肌湯’은 ‘瀉胃湯’과 ‘荊芥連翹湯’을 합방하여 가감한 처방으로 현재 임상에서 아토피피부염을 비롯한 소양증이 심한 피부질환에 다용되고 있는 임상방이다. ‘瀉胃湯’ ‘荊芥連翹湯’ 모두 공통적으로 四物湯加減方인데, 本 試料는 보다 發散力과 解毒力을 높이기 위하여 四物湯類를 빼고, 生地黃, 魚腥草, 紫草, 石膏를 加味함으로써 補陰清熱, 疎散風熱, 消腫排膿 效능을 증가시켜 임상에서 實證性 皮膚 증상에 활용되고 있다.

부작용이 없는 치료제, 특히 천연물 유래의 치료제 개발에 관심이 집중되고 있는 시점에서 비록 단일 물질이 아닌 복합 처방이지만 실제 임상에서 활용되는 처방에 대한 효능 규명은 고의서 유래 처방의 효능 규명보다 보다 실용적이고 의미 있는 연구라 사료된다.

따라서 본 연구에서는 임상적 유용성을 지닌 처방의 객관적인 효능 규명을 통하여 EBM(Evidence based medicine)을 구축함과 동시에 임상에서의 활용성 제고를 위한 기초적 자료를 제공하기 위하여 ‘石紫解肌湯’을 시료로 산

화적 손상과 기본적인 염증 유관 인자에 미치는 영향을 검색하고자 하였다. 최근 보고된 아토피 피부염에 대한 효능 평가에서 산화적 손상과 염증 유관인자에 대한 효능 평가는 기본적인 검색 방법으로 사용되고 있어, 본 실험에서는 동물 실험에 앞서 in vitro에서 기본적인 검색을 통한 객관적인 효능 규명에 중점을 두었다.

II. 실험

1. 재료

1) 약물

본 실험에 사용한 ‘石紫解肌湯’ (Seokjahaekitang ; 이하 SHT)의 구성 약제들은 대전대학교 난치성면역질환의 동서생명의학연구소 센터 (TBRC)에서 구입하여 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량 (1첩)은 다음과 같다.

Table 1. The Composition of Seokjahaekitang (SHT)

Common name	Botanical origin	Amount (g)
荊芥	Schizonepetae Spica	4
連翹	Forsythiae Fructus	4
防風	Saposhnikovia Radix	4
柴胡	Bupleuri Radix	4
枳殼	Aurantii Fructus	4
黃芩	Scutellariae Radix	4
梔子	Gardeniae Fructus	4
白芷	Angelicae Dahuricae Radix	4
桔梗	Platycodi Radix	4
生地黃	Rehmanniae Radix	8
牡丹皮	Moutan Cortex Radicis	8
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	8
石膏	Gypsum	28
魚腥草	Houttuyniae Herba	10
紫草	Lithospermi Radix	10
Total		108

2) 시약

실험에 사용된 시약 중 trypan-EDTA, acetic acid, tris-base, tris-HCl, dulbecco's

phosphate buffered saline (D-PBS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) 등은 Sigma (USA)사 제품을, MTT assay kit (EZ CyTox)는 Daeil Lab Service (Korea)사 제품을, NO assay kit는 인트론 바이오 (Korea)사 제품을, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α , IFN- γ Milliplex panel (IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α)은 Millipore (USA)사 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

3) 기기

본 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (EYELA Co, Japan), CO₂ incubator (Sanyo Co, Japan), autoclave, deep-freezer (Nihon Co, Japan), clean bench, water bath, vortex mixer, heating block, Ice Flaker Machine (Icematic Co, Italy), plate shaker (Lab-line Co, USA), flow cytometer (Becton Dickinson, USA), centrifuge (Hanil Co, Korea), 48well microchamber (Neuroprobe, Gaithersburg, MD, USA), ELISA reader (Molecular Devices, Co, USA), Luminex (Millipore, Co, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료

시료 추출 방법은 SHT 2침을 한약 유출기에 넣고, 증류수 1200 ml와 같이 혼합하여 3시간 열탕하여 추출한 후 흡입 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 SHT를 분리한 후, 다시 동결 건조기에서 24시간 동결 건조하여 분말 18.7 g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80℃)에서 보관하면서, 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) Raw 264.7 세포에 대한 세포독성 측정

SHT의 세포독성 여부를 확인하기 위해 Raw 264.7 세포를 이용하여 세포독성을 확인하였다. Raw 264.7 세포는 1×10^4 cells/100 μ l의 농도로 96 well plate에 분주한 다음 SHT를 25, 50, 100, 200 μ g/ml 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μ l의 WST solution을 첨가한 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에 30분 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 wave length 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 항산화 활성 측정

(1) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 측정

150 mM DPPH/EtOH 150 μ l에 SHT를 25, 50, 100, 200, 400, 800 μ g/ml 농도로 희석하여 100 μ l씩 첨가한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 이를 ELISA reader를 이용하여 wave length 517nm에서 흡광도를 측정 후 아래의 방법으로 계산하였다.

DPPH 소거능 (%) =

$$\left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{SHT투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

(2) 세포내 reactive oxygen species (ROS) 활성 측정

Raw 264.7 세포 내에서 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 이용하였다. 48 well plate에 Raw 264.7 세포를 2×10^5 /well/400 μ l씩 첨가하고 LPS 1 μ g/ml 및 SHT 50, 100, 200 μ g/ml 농도를 처리한 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCF-DA 10 μ M을 처리하여 15분 동안 빛이 차단된 상온에서 배양한 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400 μ l를 부유시켜 유세포 분석기(Flow cytometer)를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 ROS를 측정하였다.

(3) Total Nitric oxide (NO) 생성 억제 효과 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 세포를 96 well plates에 1×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후, SHT 각각의 농도를 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하고, LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer를 50 μl 를 각 well에 처리한 후, 10분간 상온에서 암소반응 후, N2 buffer 50 μl 를 각 well에 처리하고, 10분간 반응시킨 후, 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

4) Raw 264.7 세포에서의 사이토카인 생성량 측정

6 well culture plates에 Raw 264.7 세포를 3×10^5 cells/ml로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후, SHT 각각의 농도를 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하고, LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포배양액을 수거하여 배양액에 함유된 IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α 를 custom-made 4-plex cytokine Milliplex panel을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. Well에 Raw 264.7 세포배양액을 25 μl 씩 분주하고 assay buffer 및 matrix buffer, antibody-immobilized Beads를 각 25 μl 씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 실온에서 반응시키고 washing buffer를 이용하여 2회 세척하였다. 이를 다시 25 μl 의 detection antibody를 가하여 1시간 동안 실온에서 암소 반응시키고 추가로 25 μl 의 Streptavidin-Phycoerythrin을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 washing buffer를 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 PBS를 150 μl 넣고 5분간 shaking한 후 Luminex를 이용하여 측정하였다.

3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm

standard error (S.E.)로 기록하였고, 유의성 검증은 Student 's t-test 분석법을 이용하여 결정하였다.

III. 실험 성적

1. Raw264.7 cells에서의 세포독성에 미치는 영향

세포독성을 관찰한 결과 Raw 264.7 세포에서는 대조군의 세포생존율 100 ± 0.0 (%)에 대하여, SHT의 25, 50, 100, 200 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 각각 137.3 ± 10.8 , 118.5 ± 12.0 , 109.3 ± 8.7 , 112.7 ± 10.0 (%)으로 나타났다 (Fig. 1).

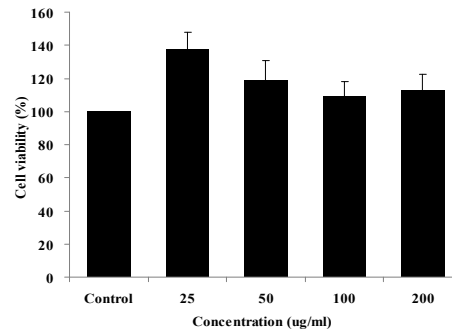


Fig. 1. Effects of SHT on the viability of Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were cultured with various concentration of SHT for 24 hr and the cell viability was measured by cytotoxicity assay. The result were presented by the mean \pm S.E.

2. 항산화 활성에 미치는 영향

1) DPPH 소거능에 미치는 영향

DPPH의 소거 활성은 SHT의 25, 50, 100, 200, 400, 800 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 각각 16.2 ± 0.4 , 41.4 ± 0.5 , 54.8 ± 0.7 , 65.4 ± 4.1 , 90.8 ± 1.0 , 92.9 ± 0.4 (%)로 의 소거 활성 효과를 나타내었다 (Fig. 2).

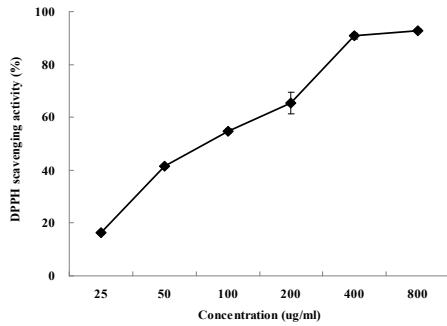


Fig. 2. Scavenging activity of SHT.

SHT were reacted with DPPH for 30 minutes at 37°C, and the absorbance at 517 nm due to DPPH radical was determined. The result are the mean ± S.E.

2) ROS 생성에 미치는 영향

Raw 264.7 세포내 생성되는 ROS 양을 측정한 결과, 대조군(B)의 ROS 생산율이 100 (%) 일 때 SHT(C,D,E) 처리군의 50, 100, 200 (µg/ml) 농도에서 대조군에 비하여 각각 66.7, 64.8, 57.4 (%)로 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 3).

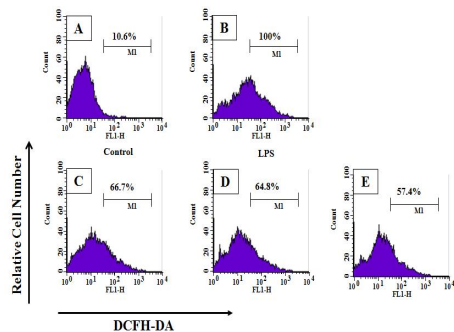


Fig. 3. Inhibitor effects of SHT on the ROS production in Raw 264.7 cells.

The Raw 264.7 cells were stimulated with LPS and treated with medium (Control, B), SHT (50, 100, 200 µg/ml, C-E) for 24 hours. The ROS production was analysed following incubation with DCFH-DA by flow cytometry.

3) Total Nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향
Griess Reagent System을 이용하여 Raw 264.7 세포 내 생성되는 NO 양을 측정한 결과, 대조군을 100 %로 나타냈을 때 정상군이 20.8 ± 1.1 % 로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++, p<0.001) 증가를 나타내었고, SHT 투여군은 50, 100, 200 (µg/ml) 농도에서 각각 79.6 ± 1.1, 73.9 ± 2.8, 71.2 ± 1.6 (%) 로 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있는 (***, p<0.001) 감소를 나타내었다 (Fig. 4).

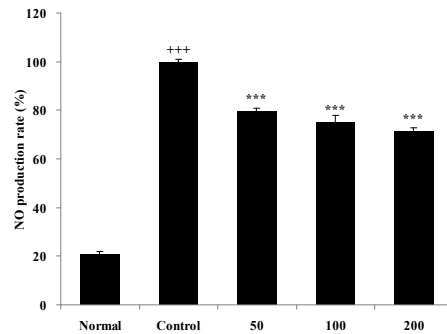


Fig. 4. Inhibition of lipopolysaccharide-induced NO production by SHT in RAW 264.7 cells.

The Raw 264.7 cells were stimulated with LPS (1 µg/ml) and treated with medium, SHT (50, 100, 200 µg/ml) for 24 hours. The results were represented by the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by student's t-test (+++, p<0.001). Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (***, p<0.001).

3. Raw 264.7 cells에서 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-1β 생성량에 미치는 영향

IL-1β 생성량을 측정한 결과, 대조군을 100 (%)로 나타냈을 때 SHT 처리군은 50, 100, 200 (µg/ml) 농도에서 각각 50.0 ± 5.0, 67.5 ± 2.5,

66.7 ± 17.7 (%)로 나타났으며, SHT 처리군의 50($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (**, $p < 0.01$) 감소를 나타내었다 (Fig. 5).

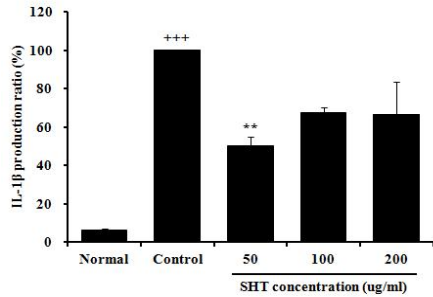


Fig. 5. Effects of SHT on IL-1 β release by LPS in Raw 264.7 cells.

The levels of IL-1 β were determined using a commercially available ELISA kit. The result were presented by the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (**, $p < 0.01$).

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 100 (%)로 나타냈을 때 SHT 처리군은 50, 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 각각 79.63 ± 7.1, 79.1 ± 3.8, 69.0 ± 0.3 (%)로 나타났으며, SHT 처리군의 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군에 비하여 각각 유의성 있는 (*, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$) 감소를 나타내었다 (Fig. 6).

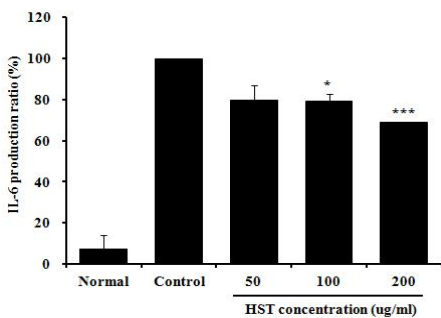


Fig. 6. Effects of SHT on IL-6 release by LPS in Raw 264.7 cells.

The levels of IL-6 were determined using a commercially available ELISA kit. The result were presented by the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (*, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$).

3) MCP-1 생성량에 미치는 영향

MCP-1 생성량을 측정한 결과, 대조군을 100 (%)로 나타냈을 때 SHT 처리군은 50, 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 각각 102.2 ± 2.2, 94.2 ± 1.2, 95.1 ± 2.6 (%) 으로 나타났으며, SHT 처리군의 100($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (*, $p < 0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 7).

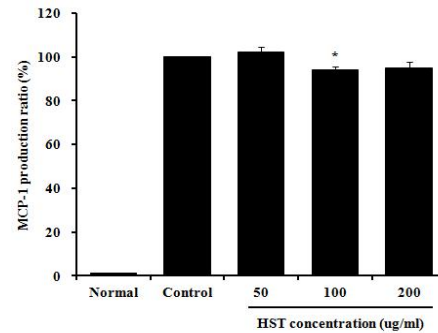


Fig. 7. Effects of SHT on MCP-1 release by LPS in Raw 264.7 cells.

The levels of MCP-1 were determined using a commercially available ELISA kit. The result were presented by the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (*, $p < 0.05$).

4) TNF- α 생성량에 미치는 영향

TNF- α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 100 (%)로 나타냈을 때 SHT 처리군은 50, 100, 200($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도는 102.2 ± 2.2, 98.6 ± 2.9, 92.9 ± 1.9 (%)로 나타났으며, SHT 처리군의 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (*, $p < 0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 8).

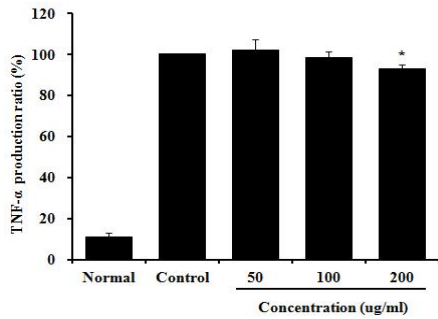


Fig. 8. Effects of SHT on TNF-α release by LPS in Raw 264.7 cells.

The levels of TNF-α were determined using a commercially available ELISA kit. The result were presented by the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by student's t-test (*, p<0.05).

IV. 고찰

아토피피부염은 악화와 완화를 반복하며, 가려움을 동반한 습진을 주 병변으로 하는 만성피부질환으로 이는 피부의 건조와 피부 장벽의 기능 이상 등 피부의 생리학적 이상을 동반한 다양한 비특이적 자극 반응 또는 특이적 알레르기 반응이 관여하는 것으로 알려져 있다²⁾.

아토피피부염의 치료에는 원인과 악화인자의 제거, 스킨케어 또는 약물치료가 있으며, 염증에 대해서는 스테로이드 외용제과 타크로림스 연고, 피부장벽 기능 이상에는 외용보습제, 가려움에 대해서는 항히스타민제와 항알레르기약이 사용되고 있다⁸⁾. 그러나 스테로이드 외용제는 부작용의 위험성이 높아 적절한 사용이 요구되며, 타크로림스 연고는 얼굴 부위의 피부에 대해 스테로이드제 대용제로서 많이 사용되고 있다. 또한 항히스타민제와 항알레르기약은 가려움증의 일부를 억제하는 정도로 사용되고 있어 근본적인 치료 효과에 있어서는 한계성을 드러내고 있다^{9,25,26)}. 따라서 부작용이 없고 안전한 치료제에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 특히 천

연물 유래의 약재로 이루어진 한약 및 한방 처방에 대한 관심이 높아져 가고 있다. 한의학계에서도 이러한 시대적 요구와 임상적 한계에 대한 공유 인식에 따라 다양한 한약과 처방에 대한 검색을 꾸준히 실시하고 있다.

本 試料인 ‘石紫解肌湯’은 기본방인 ‘荊芥連翹湯’에서 發散力과 解毒力을 높이기 위하여 四物湯類를 빼고, 生地黃, 魚腥草, 紫草, 石膏를 加味한 처방이다. 이미 기존에 荊芥連翹湯에 다양한 약물을 가미한 加味荊芥連翹湯을 시료로 본 연구와 유관한 연구가 진행된 바가 있는데, 박²⁷⁾은 加味荊芥連翹湯이 알레르기 反應 및 비만세포로부터 히스타민의 분비와 면역학적 자극제인 항 DNP IgE 항체에 의한 수동적 피부 알레르기 反應을 억제하고, 염증성 세포 활성물질인 TNF-α 와 IL-6의 생성을 모두 억제하여 알레르기성 비염이나 중이염에 효과적임을 언급하였다. 李²⁸⁾ 역시 加味荊芥連翹湯이 중이강 내의 염증 반응에 관여하는 IL-2, IL-4, IL-6, TNF-α 등의 세포 활성물질 조절능을 보고한 바가 있다.

또한 박²⁹⁾은 荊芥連翹湯加味方의 아토피피부염 病態 모델에서의 免疫調節能에 관한 研究에서 시료의 피부염 개선효과는 세포간의 균형을 유지시킴으로서 면역조절 작용의 회복을 도모하고, 염증세포의 활성화를 억제하여 IL-6, TNF-α 및 RANTES 와 같은 사이토카인과 케모카인의 발현을 감소시켜 호산구와 과립구의 분화 및 침윤을 억제함으로써 이루어진다고 언급한 바가 있다. 이 밖에 李³⁰⁾는 加味荊芥連翹湯의 면역 증강 효과에서 인체 면역반응에서 중요한 위치를 차지하는 T 세포의 증식과 IL-2, IL-4, IFN-γ의 생성 및 mouse의 대식세포에 있어서 TNF-α, IL-12의 생성에 긍정적인 영향을 미쳐서, 체내의 면역력을 증가시킴으로써 만성 중이염이나 만성 부비동염 등을 치료하는 처방으로 사용될 수 있음을 보고하였다.

가미된 약물에 대한 연구로 주 등³¹⁾은 자초 뿌리의 아토피피부염 관련 연구 현황에서 항균, 항염증 및 아토피 개선에 관한 다양한 연구가 있음을 소개하였다. 실험적 연구로 김 등³²⁾은 자초 추

출물 극성 성분의 보습 증진 및 아토피피부염 호전 효과를 검색한 실험에서 세라마이드 함량이 큰 쪽으로 증가하고 표피 과증식을 억제하여 혈청 IgE 감소 및 소양증 완화에 효과적임을 보고하였으며, 金³³⁾은 자초가 비만세포의 탈과립과 히스타민 유리에 유의성 있는 억제 효과가 있음을 보고한 바가 있다.

黃³⁴⁾은 여성초 물 추출물의 항염 효능에서 본 논문과 유사하게 여성초를 치료로 RAW 세포를 LPS로 자극하여 IP-10, PDGF-BB, KC, VEGF, IL-4,5의 생성 증가에 미치는 영향을 조사하여 모든 실험군에서 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 유의성 있는 억제 효과가 있음을 보고한 바가 있다. 아울러 鄭³⁵⁾은 아토피성 피부염 유발 NC/Nga mice 동물 모델에 있어 三白草, 魚腥草, 紫草로 구성된 복합 처방이 임상지수, IgE 농도, 비만세포, 호산구수 등에서 유의성 있게 감소함을 보고하였다. 이 밖에 두³⁶⁾는 5% 여성초 추출물 수용액의 외용요법이 여드름에 미치는 임상적 연구를 통하여 단지 도포만으로도 유의적인 결과가 도출될 수 있음을 보고한 바가 있다.

또한 김³⁷⁾은 생지황 약침이 아토피 동물병태에 미치는 영향에서 임상지수, 비만세포수, CCR3, 호산구 등을 유의성 있게 감소시킨 반면, CD4+ 세포의 발현을 강하게 증가시킴을 보고하였으며, 김³⁸⁾은 PI3K-Akt, COX-2를 통한 세포생존 및 염증관련 단백질의 발현도 조절하여 신생혈관 억제에 관여하며, NO생성 저해능을 통한 항염 효과를 보고하였다.

본 연구에서 먼저 기본적인 실험으로 실시한 세포독성에 관한 실험에서는 Raw 264.7 세포에 대하여 25, 50, 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 모두 100%의 이상의 세포 생존율을 보여 SHT가 세포독성이 없는 것으로 나타났다 (Fig. 1).

염증성 질환에 있어 산화적 스트레스의 관여는 널리 알려져 있으며 산화적 스트레스나 항산화 작용은 의학 분야에서 염증, 감염면역, 어혈변화, 암 등 많은 분야에서 거론되고 있다³⁹⁾. 특히 아토피, 천식 등 알레르기성 염증성 질환에서 그 원인으로써 질환 부위에 모여든 호산구, 호중구, 대식

세포, 림프구 등의 활성화된 염증세포로부터 방출되는 활성산소종 (reactive oxygen species ; ROS)을 원인으로 하고 있다⁴⁰⁾. 산화적 스트레스는 생체의 내인성 또는 외인성의 요인에 의해 생성되는 활성산소를 충분히 처리하지 못하기 때문에 일어나는 상태로, 활성산소에는 superoxide(O₂⁻), 과산화수소 (H₂O₂), hydroxy radical (OH), 일중산소(1O₂) 등 4종류가 있으며, 이들 활성산소종 (ROS)이 세포를 공격하여 산화 시킨다^{41,42)}. 산화적 스트레스는 다양한 경로로 출현하기 때문에 생체는 항상 무엇인가로부터 산화적 스트레스를 받고 있는 상태이다. 산화적 스트레스에 의한 조직 손상이나 세포사가 일어나는 과정에서 어떠한 원인에 의해 염증이 일어나고 세포의 시그널 전달계의 활성 또는 억제에 의해 사이토카인, 케모카인의 생산과 관련하여 염증의 직접적인 원인이 되며 세포사는 활성산소에 의한 DNA 손상에 의한 것으로 보고되고 있다^{43,44)}.

본 연구에서는 산화적 손상에 대한 효능 평가를 위하여 DPPH radical의 소거능을 측정된 결과, 25, 50, 100, 200, 400, 800 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 각각 16.2 ± 0.4 , 41.4 ± 0.5 , 54.8 ± 0.7 , 65.4 ± 4.1 , 90.8 ± 1.0 , 92.9 ± 0.4 (%)로 SHT가 농도 의존적으로 DPPH radical의 소거 활성 효과를 나타내었다 (Fig. 2). 또한 Raw 264.7 세포내 생성되는 ROS 양을 측정된 결과 대조군에 비하여 50, 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도의 SHT 처리군에서 33.3, 35.2, 42.6% 감소하는 것으로 나타나 (Fig. 3), SHT가 염증 유관 인자로 인식되고 있는 산화적 스트레스에 대하여 유의성이 있음을 객관적으로 확인할 수 있었다.

NO는 L알긴산으로부터 일산화질소 합성효소 (NOS)에 의해 생산 된다³⁸⁾. 피부에 있어 NO는 감염, 자외선, 항원자극 등에 의해 생산되어 염증이나 통증의 악화 등에 관여 하며^{45,46)}, 극심한 가려움을 동반한 아토피피부염이나 건선 등의 피부에서 NO 생성이 증가하는 것으로 보고되고 있다^{47,48)}. NO의 가려움증 유발은 정확하게 알려져 있지 않으나, Bull HA 등⁴⁹⁾은 substance P가

NOS 발현 세포에 작용하여 NO가 생성되는 것으로부터 substance P에 의해 급기 행동을 유발하는 것으로 보고하고 있다. Substance P에 의한 급기 행동은 비선택적 NOS 저해제나 NOS (NOS1) 선택적 저해제에 의해 억제되는 것으로 보고되었는데⁵⁰⁾, Andoh T 등⁵¹⁾은 구성 약물면에서 본 처방과 유사한 구성을 가지고 있는 溫清飲도 NOS1의 발현 억제에 관여하여 substance P에 의한 급기 행동을 억제하는 것으로 보고하고 있다. 또한 아토피성 피부염 동물모델 마우스 (NC/Nga)의 자발적인 급기 동작에도 NO가 관여하는 것으로 알려져 있다^{52,53)}. 결과적으로 NO는 활성산소종 중에 가려움의 증강에 깊이 관여하고 있는 것으로 보여, NO 억제는 아토피 등의 피부염의 유발뿐만 아니라 악화 등을 억제할 수 있을 것으로 생각되어 진다.

본 연구에서는 Griess Reagent System을 이용하여 Raw 264.7 세포에 LPS를 처리하여 생성되는 NO 양을 측정 한 결과, 50, 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도 투여에서 각각 20.4, 25.0, 28.7 %로 유의성 있게(***, $p < 0.001$) 감소하는 것으로 나타나 (Fig. 4), SHT가 NO 생성으로 인한 병리학적 변화에 유의성이 있음을 확인할 수 있었다.

염증은 여러 가지 외부 요인과 내부 요인에 의한 생체의 국소성 또는 전신성 반응으로, 염증의 발병에 관여하는 사이토카인을 염증성 사이토카인이라고 한다. 염증성 사이토카인의 대부분은 단구나 마크로파지계의 세포에 의해 생산되지만, 섬유아세포, 혈관내피세포 등의 조직 간질을 구성하는 세포나 염증 과정에서 침윤되는 호중구 등에서도 생산된다. 감염 등 염증이 일어나면 호중구 등의 염증세포의 침윤이 일어난다⁵⁴⁻⁵⁶⁾. 이는 골수내 SCF (stem cell factor), IL-1, IL-6, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)나 IL-3가 작용해서 골수계 세포의 증식 분화를 일으키며, 여기에 GM-CSF 나 G-CSF (granulocyte colony stimulating factor)가 작용하여 증가한 호중구 등이 국소에 침윤하기 때문에 염증세포와 혈관 내피세포상의 각각에 대응하는 접착인자가 발현하여 상호

receptor와 regand의 관계로 작용 한다^{57,58)}. 이 혈관 내피세포의 접착분자의 증가는 IL-1, TNF- α 등의 사이토카인에 의해 증가한다. 침윤한 염증세포의 종류를 결정하는 인자로써 세포주화(走化)인자가 중요하며 사이토카인 중에 강력한 주화인자인 chemokine이라 한다. 호중구나 T 세포의 침윤에는 IL-8이 있으며, 단구나 마크로파지의 침윤에는 MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), RANTES (regulated on activation normal T expressed and secreted) 등이 관여하며, 침윤한 세포는 IL-1, TNF- α 등의 사이토카인에 의해 활성화된다. 급성 염증에서는 CRP (C-reactive protein) 등의 급성 염증단백질이 유도되는데 이는 염증의 정도를 나타내는 지표로 이용되고 있다. 급성 염증단백질의 생성을 유도하는 사이토카인으로는 IL-1, TNF- α , IL-6 등이 알려져 있다⁵⁹⁻⁶²⁾.

본 연구에서는 생쥐 마크로파지 세포주인 raw 264.7 세포를 LPS로 자극하여 생산 유도된 염증성 사이토카인 생성량을 측정 한 결과, IL-1 β 생성량이 50, 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 각각 50, 32.5, 33.3 % 감소하였으며 50($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 유의성 있는 (**, $p < 0.01$) 감소를 나타냈다 (Fig. 5). IL-6 생성량은 각각 20.4, 20.9, 31 % 감소하였고 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군에 비하여 각각 유의성 있는 (*, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$) 감소를 나타내었다 (Fig. 6). MCP-1 생성량은 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 5.8, 4.9 % 감소하였고, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (*, $p < 0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 7). 또한 TNF- α 의 생성량은 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 1.4, 7.1 % 감소하였고, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (*, $p < 0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 8).

이상의 결과를 통하여 ‘石紫解肌湯’ (SHT)이 항산화 활성과 LPS에 의해 유도된 Raw 264.7 세포내 사이토카인 생성량에 대하여 유의성 있는 억제를 나타냄으로써 기본적인 항염증 효능이 객관적으로 입증되었다.

V. 결론

石紫解肌湯(SHT)이 아토피피부염 치료제로써의 가능성 및 효과를 살펴보기 위하여 세포독성 및 항산화 효능 평가, in vitro에서 염증 반응 조절 및 억제 효과를 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

SHT은 Raw 264.7 cells에 대한 세포독성에서 25, 50, 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도 처리군에서 모두 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었다.

SHT은 DPPH 소거 활성에서 농도 의존적으로 소거 활성을 나타내었으며, 특히 400 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)와 800 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도에서 80% 이상의 소거 활성 효과를 나타내었다.

SHT은 ROS 생성율을 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소시켰으며, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도에서는 57.4% 억제 효과를 나타내었다.

SHT은 NO 생성율을 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소시켰으며, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도 처리군에서는 28.8%의 유의성 있는 감소가 나타났다.

SHT은 LPS를 처리한 Raw 264.7 cells의 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군에 비해 IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α 생성량을 각각 32.3%, 31.0%, 4.9%, 7.1% 감소시켰으나, IL-6와 TNF- α 에서만 유의성이 나타났다.

이상의 결과로 보아 石紫解肌湯(SHT)의 염증 반응 조절 및 억제 효과가 실험적으로 검증되어 임상에서 항아토피 치료제로써의 활용이 제고될 것으로 기대되며, 향후 이를 기본방으로 가감을 통한 염증 질환에 다양하게 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

<감사의 글>

본 연구는 지식경제부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동태생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것입니다.

VI. 참고문헌

1. Furue M, Saeki H, Furukawa F, Hide M, Ohtsuki M, Katayama I, Sasaki R, Suto H, Takehara K : Guidelines for management of atopic dermatitis, *J Dermatol*, 36(10):563-77, 2009.
2. Tengvall Linder M, Johansson C, Scheynius A, Wahlgren C : Positive atopy patch test reactions to *Pityrosporum orbiculare* in atopic dermatitis patients, *Clin Exp Allergy*, 30(1):122-31, 2000.
3. Wahlgren CF : Itch and atopic dermatitis: an overview. *J Dermatol*, 26(11):770-9, 1999.
4. Koblenzer CS : Itching and the atopic skin, *J Allergy Clin Immunol*, 104 (3 Pt 2):S109-13, 1999.
5. Ikoma A, Rukwied R, Ständer S, Steinhoff M, Miyachi Y, Schmelz M : Neuronal sensitization for histamine-induced itch in lesional skin of patients with atopic dermatitis, *Arch Dermatol*, 139(11):1455-8, 2003.
6. Tobin D, Nabarro G, Baart de la Faille H, van Vloten WA, van der Putte SC, Schuurman HJ : Increased number of immunoreactive nerve fibers in atopic dermatitis, *J Allergy Clin Immunol*, 90(4 Pt 1):613-22, 1992.
7. 富板美奈子, 河野陽一 : アトピー性皮膚炎. *臨床と研究*, 85 : 177-181, 2008.
8. Smith EW : Four decades of topical corticosteroid assessment, *Curr Probl Dermatol*, 22:124-31, 1995.
9. 古江増隆, 古川福実, 秀道広, 竹原和彦 : 日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎治療ガイドライン, 改訂版, *日本皮膚科学会雑誌*, 114:135-142, 2004.

10. 왕보방 외 : 피부병중의진료학, 인민위생 출판사, pp.20-28, 2000.
11. 황영청 외 : 부녀피부병진료, 광동과기출판사, pp.8-10, 2011.
12. 왕평장창 : 중의피부과주치의생748문, 중국협화의과대학출판사, pp.1-17, 2010.
13. 지선영 편저 : 동의피부과학, 일증사, pp.23-24, 1996.
14. 윤화정 외 : 아토피 피부염 환자의 유형 분류에 대한 임상적 연구, 동의한의연구, 5:43-57, 2001.
15. 정의령 외 : 平胃散加味方이 아토피피부염을 유발한 NC/Nga mouse에 미치는 영향, 한방안이비인후피부과학회지, 24(2):16-27, 2011.
16. 황윤규 외 : 荊芥連翹湯加味醱酵方의 항아토피피부염 효능에 관한 실험적 연구, 대전대학교 한의학연구소논문집, 19(2):85-100, 2011.
17. 서희연 외 : 理中湯이 Mite Antigen으로 유발된 NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염에 미치는 영향, 대한한방소아과학회지, 25(1):1-27, 2011.
18. 김선빈 외 : 排毒丸醱酵方의 면역조절작용을 통한 항아토피 효능, 대전대학교 한의학연구소논문집, 19(2):101-118, 2011.
19. 심태경 외 : 별갑이 아토피 피부염에서의 알러지성 염증 반응에 미치는 영향, 대전대학교 한의학연구소논문집, 20(1):69-83, 2011.
20. 원영호 외 : 托裏消毒飲 合 黃連解毒湯의 아토피피부염에 대한 실험적 연구, 한방안이비인후피부과학회지, 24(1):121-141, 2011.
21. 최명진 외 : 2,4-Dinitrochlorobenzene으로 유도된 아토피 피부염 동물모델에서 비파업 및 삼백초 추출발효물의 항아토피 활성, 한국식품영양과학회지, 39(11):1611-1618, 2010.
22. 윤채성 외 : 四物消風飲과 Prednisolone이 NC/Nga mice의 아토피 피부염에 미치는 영향, 한방안이비인후피부과학회지, 23(1):59-74, 2010.
23. 김계은 외 : 牛蒡子の 아토피 피부염에 대한 효과, 대한한방내과학회지, 31(2):201-211, 2010.
24. 한달수 외 : 아토피樣 피부염 NC/Nga 생쥐에서 消風導赤湯加味와 아토피크림, 紫雲膏 및 消風導赤湯加味の 병용투여가 피부염에 미치는 영향, 대한한방소아과학회지, 24(1):9-35, 2010.
25. Furue M, Terao H, Moroi Y, Koga T, Kubota Y, Nakayama J, Furukawa F, Tanaka Y, Katayama I, Kinukawa N, Nose Y, Urabe K : Dosage and adverse effects of topical tacrolimus and steroids in daily management of atopic dermatitis, J Dermatol, 31:277-283, 2004
26. Assmann T, Homey B, Ruzicka T : Topical tacrolimus for the treatment of inflammatory skin diseases, Expert Opin Pharmacother, 2(7):1167-75, 2001.
27. 박영주 : 加味荊芥連翹湯의 肥胖細胞 매개성 알레르기성 염증 反應 억제 效果, 圓光大學校大學院, 2001.
28. 李恩美 : 小兒 再發性 滲出性 中耳炎에 加味荊芥連翹湯이 中耳滲出液內 細胞活性物質에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 1999.
29. 박중익 : 小兒 再發性 滲出性 中耳炎에서 RANTES 發現에 關한 研究, 圓光大學校大學院, 2001.
30. 李恩美 : 加味荊芥連翹湯의 면역 증강 效果, 圓光大學校大學院, 2002.
31. 주지훈 외 : 자초 뿌리의 함유성분 및 아토피피부염 관련 연구현황, 생약학회지, 41(2):73-88, 2010.
32. 김영란 외 : 자초 추출물 극성 성분의 피부 보습 증진 및 아토피 피부염 호전 효과, 한국식품과학회지, 41(5):547-551, 2009.

33. 金德坤 : 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향, 慶熙大學校大學院, 2004.
34. 黃仁承 : 漁腥草 물추출물의 항염효능에 관한 연구, 暎園大學校大學院, 2010.
35. 鄭明我 : 아토피성 피부염 유발 NC/Nga mice 동물 모델에 있어 삼백초, 어성초, 자초로 구성된 복합처방의 항아토피 작용, 木浦大學校大學院, 2010.
36. 두인선 : 5% 어성초 추출물 수용액의 외용요법이 여드름에 미치는 임상적 연구, 원광대학교 대학원, 2003.
37. 김민철 : 소염 및 생지황 약침이 아토피 피부염 유발 NC/Nga 생쥐에 미치는 영향, 우석대학교 대학원, 2011.
38. 김성범 : 生地黃이 혈관신생, 세포생존 및 염증관련 단백질발현에 미치는 영향, 경원대학교 대학원, 2005.
39. Tsukahara H : Biomarkers for oxidative stress: clinical application in pediatric medicine, *Curr Med Chem*, 14(3):339-51, 2007.
40. Vachier I, Damon M, Le Doucen C, de Paulet AC, Chanez P, Michel FB, Godard P : Increased oxygen species generation in blood monocytes of asthmatic patients, *Am Rev Respir Dis*, 146(5 Pt 1):1161-6, 1992.
41. Wang J, Mochizuki H, Todokoro M, Arakawa H, Morikawa A : Does leukotriene affect intracellular glutathione redox state in cultured human airway epithelial cells? *Antioxid Redox Signal*, 10(4):821-8, 2008.
42. Reddy NM, Kleeberger SR, Bream JH, Fallon PG, Kensler TW, Yamamoto M, Reddy SP : Genetic disruption of the Nrf2 compromises cell-cycle progression by impairing GSH-induced redox signaling, *Oncogene*, (44):5821-32, 2008.
43. Ciencewicky J, Trivedi S, Kleeberger SR : Oxidants and the pathogenesis of lung diseases, *J Allergy Clin Immunol*, 122(3):456-68, 2008.
44. Zeyrek D, Cakmak A, Atas A, Kocyigit A, Erel O : DNA damage in children with asthma bronchiale and its association with oxidative and antioxidative measurements, *Pediatr Allergy Immunol*, 20(4):370-6, 2009.
45. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S : Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine, *Nature*, 16;333(6174):664-6, 1998.
46. Andoh T, Al-Akeel A, Tsujii K, Nojima H, Kuraishi Y : Repeated treatment with the traditional medicine Unsei-in inhibits substance P-induced itch-associated responses through downregulation of the expression of nitric oxide synthase 1 in mice, *J Pharmacol Sci*, 94(2):207-10, 2004.
47. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research, *Pharmacol Rev*, 49(2):137-42, 1997.
48. Ormerod AD, Weller R, Copeland P, Benjamin N, Ralston SH, Grabowksi P, Herriot R : Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis, *Arch Dermatol Res*, 290(1-2):3-8, 1998.
49. Taniuchi S, Kojima T, Hara Mt K, Yamamoto A, Sasai M, Takahashi H, Kobayashi Y : Increased serum nitrate levels in infants with atopic dermatitis, *Allergy*, 56(7):693-5, 2001.
50. Bull HA, Hothersall J, Chowdhury N, Cohen J, Dowd PM : Neuropeptides induce release of nitric oxide from human dermal microvascular endothelial cells, *J Invest Dermatol*, 106(4):655-60,

- 1996.
51. Andoh T, Kuraishi Y : Nitric oxide enhances substance P-induced itch-associated responses in mice, *Br J Pharmacol*, 138(1):202-8, 2003.
 52. Laskin JD, Heck DE, Laskin DL : Multifunctional role of nitric oxide in inflammation, *Trends Endocrinol Metab*, 5(9):377-82, 1994.
 53. 九十ウ九透仁, 他. *日薬理誌*, 114 補冊:17P-21P, 1999.
 54. Heyer G, Ulmer FJ, Schmitz J, Handwerker HO : Histamine-induced itch and alopecia (itchy skin) in atopic eczema patients and controls, *Acta Derm Venereol (Stockh)*, 75:348-352, 1995.
 55. Maggi CA : The effects of tachykinin on inflammatory and immune cells, *Regul Pept*, 70:75-90, 1997.
 56. Ohtani T, Aiba S, Mizuashi M, Kawamoto Y, Tagami H : Evaluation of the efficacy of antihistamines using human monocyte-derived dendritic cells stimulated with histamine. *J Am Acad Dermatol*, 49:234-242, 2003.
 57. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, et al : Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper responsiveness, and the late asthmatic response, *Lancet*, 356:21444-21448, 2000.
 58. Takamatsu S, Nkano K : Regulation of interleukin 6, macrophage colony stimulating factor mRNA level by histamins in stromal cell line. *Inflammation Res*, 47:221-226, 1998.
 59. Finnin M, Hamilton JA, Moss ST : Direct comparison of the effects of CSF-1 (M-CSF) and GM-CSF on human monocyte DNA synthesis and CSF receptor expression, *J Interferon Cytokine Res*, 19(4):417-23, 1999.
 60. He J, Wang T, Yao L, Chen A, Zhou B, et al : Construction and delivery of gene therapy vector containing soluble TNF alpha receptor-IgGFc fusion gene for the treatment of allergic rhinitis, *Cytokine*, 36 : 296-304, 2007.
 61. Castellani ML, De Lutiis MA, Toniato E, Conti F, Felaco P, Fulcheri M, Theoharides TC, Caraffa A, Antinolfi P, Conti P, Cuccurullo C, Ciampoli C, Felaco M, Orso C, Salini V, Cerulli G, Kempuraj D, Tetè S, Shaik B : Impact of RANTES, MCP-1 and IL-8 in mast cells, *J Biol Regul Homeost Agents*, 2010.
 62. Yamaguchi T, Kimura H, Kurabayashi M, Kozawa K, Kato M. Interferon-gamma enhances human eosinophil effector functions induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-5. *Immunol Lett*, 15;118(1) :88-95, 2008.