四物湯이 알러지 염증반응에 미치는 영향

김은경 · 김은영 · 이현삼 · 정혁상 · 박성규[1] · 손영주[2] · 손낙원*

경희대학교 한의과대학 해부학교실, 1:처방제형학교실, 2:상지대학교 한의과대학 부인과학교실

Effect of Samul-Tang on the Allergic Inflammatory Response

Eun Kyoung Kim, Eun-Young Kim, Hyun-Sam Lee, Hyuk-Sang Jung,
Seong Kyu Park[1], Youngjoo Sohn[2], Nak-Won Sohn*

Department of Anatomy, 1:Department of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University,
2:Department of Gynecology, College of Oriental Medicine, Sangji University

Samul-Tang (SMT) has been used for nourishing of the blood, hematopoiesis as a herbal medicine history. The purpose of this study is to find out anti-allergic inflammatory reaction of SMT. To clarify the mechanism, the effect of SMT on vascular permeability of rat cutaneous tissue and histamine and cytokines (IL-6, IL-8, TNF-α) release from mast cells were observed. The results are the pretreatment with SMT significantly decreased the compound 48/80-induced degranulation and histamine release from RPMC, SMT also inhibited the anti-DNP IgE-induced increment of vascular permeability of rat cutaneous tissue. SMT significantly reduced the PMA plus A23187-induced increment of expression of IL-6, IL-8, and TNF-α in HMC-1 Cell. The Present study provide evidence that SMT inhibits mast cell-derived inflammatory allergic reactions by blocking histamine release and pro-inflammatory cytokine expression, and suggest the mechanisms of action. Furthermore, in vivo and in vitro anti-allergic effect of SMT suggests a possible therapeutic application of this agent in inflammatory allergic diseases.

Key words : Samul-Tang(四物湯), mast cell, histamine, passive cutaneous anaphylaxis (PCA), cytokine

서 론

생활환경의 변화로 알레르기성 비염 (allergic rhinitis), 기관지 천식 (bronchial asthma), 아토피성 피부염 (atopy dermatitis), 접촉성 피부염 (contact dermatitis) 등의 알레르기 질환은 계속 증가하는 추세이다. 일반적으로 알레르기는 (allergy)는 제 I형 과민반응 (type I hypersensitivity)과 동일시 되는데, allergen이라고 부르는 특정한 항원에 대하여 나타나는 반응으로, 그 항원에 대해 특이적인 IgE 항체가 mast cell에 결합되어 유도되는 반응이다[1].

비만세포는 아토피 피부염 (atopic dermatitis), 기관지 천식, 알레르기성 비염 등을 일으키는 세포로, 흰쥐복강 내에서 분리하기가 쉽고 다른 세포와 달리 크고 굵은 이염색성의 과립을 함유하고 있다. 면역학적 또는 비면역학적 자극에 의하여 활성화 된 비만세포는 세포질 과립에 저장된 매개물질들 (히스타민, 헤파린 세로토닌, 가수분해효소 등)과 많은 cytokine (TNF-α, IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13등)을 분비하여 여러 면역반응과 염증반응에 관여한다[2,3]. 또한 비만세포는 각 장기와 조직에서 그 수의 증감과 탈과립 과정을 통해 과민반응 (hypersensitivity), 자가면역질환 (autoimmune diseases), 관절염 (arthritis), 종양 (neoplasia) 등의 많은 질병의 병태생리에 관여한다[4]. 염증은 각종 유해한 손상에 대한 초기반응으로서, 세포 상해를 유발하는 다양한 자극에 대해 생체 조직에 보이는 복합적인 반응이다. 이러한 염증반응에 의한 조직손상의 기전은 염증매개 cytokine에 의해 나타나는 것으로 알려져 있다. 비만세포에서 이런 사이토카인들의 분비 조절은 알러지 질환을 치료 할 수 있는 원인적 방법이 될 수 있다.

四物湯 (Samul-tang, SMT)은 宋代 《太平惠民和劑局方》에 "調益榮衛 滋養氣血"하는 處方으로 처음 記載되었으며[5], 辛溫한 性味의 當歸 (Angelicae gigantis Radix)가 補血活血하여 血中의 主藥으로, 酸寒한 性味의 白芍藥 (Paoniae Radix Alba)은 補血平肝하여 陰分藥으로, 甘寒한 性味의 熟地黃 (Rehmanniae Radix

* 교신저자 : 손낙원, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학
· E-mail : sohnnw@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-9449
· 접수 : 2007/04/13 · 채택 : 2007/05/15

Preparat)은 滋陰補血하여 血中의 血藥으로, 辛散한 性味의 川芎(Cnidii Rhizoma)은 活血行氣작용을 하여 血中의 氣藥으로서 補血·造血·活血 및 調血하는 效能이 있다[6].

四物湯에 관한 實驗的 硏究로는 溶血性 貧血[7], 血壓降下[8], 造血效果[9] 등으로, 주로 血流의 變化 및 血流性狀에 관한 연구는 많으나 비만세포와 관련된 매개물질과 cytokine 의 발현에 관한 세포면역학적 보고는 없었다. 따라서 저자는 염증반응과 알레르기성 질환의 병태생리에 중요한 역할을 하는 비만세포의 항알레르기 약리효과를 규명하기 위하여 compound 48/80에 의한 흰쥐 복강 비만세포 (Rat peritoneal mast cell)의 탈과립, 히스타민 유리 및 혈관투과성의 증가에 사물탕이 미치는 영향을 알아보고, 사물탕이 Human Mast Cell line (HMC-1 Cell) 에서 PMA plus A23187 의한 IL-6, IL-8, TNF-α의 분비에 어떠한 영향을 미치는지를 밝히기 위하여 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 샘타코 (주)에서 구입한 체중 200-300 g의 Sprague-Dawley (SD)계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 물과 사료는 자유롭게 먹도록 하였으며, 사육실의 온도는 21-23℃, 습도는 40-60%로 유지하였고, 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였다.

2. 약물

1) 검액의 제조

본 실험에 사용된 약물은 四物湯 (SMT)으로 그 구성은 아래의 Table 1과 같다. 사물탕 285 g을 3 L 둥근 플라스크에 넣고 2,850 ml의 증류수를 가하여 냉각기가 부착된 전탕기에서 2시간 동안 가열한 후 여과지로 여과하였다. 여과액을 vacuum rotary evaporator에서 감압 농축한 후 동결건조 하여 63.75 g의 추출물을 얻었다. in vitro 실험의 경우 검액 (SMT)을 saline에 다양한 농도 (0.1, 1 또는 5 ㎎/ml)로 희석하여 사용하였으며, in vivo 실험의 경우에는 실험동물 체중 100 g당 14.91 mg을 1 ml의 증류수에 녹여 구강 투여하였다.

Table 1. Contents of Samul-tang

韓藥名	生藥名	重量
熟地黃	*Rehmanniae Radix Preparat*	5.0 g
白芍藥	*Paeoniae Radix Alba*	5.0 g
當歸	*Angelicae gigantis Radix*	5.0 g
川芎	*Cnidii Rhizoma*	5.0 g
總量		20.0 g

2) 시약

HEPES-Tyrode 완충용액 (10 mM HEPES, 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2.75 mM $MgCl_2$, 5.6 mM glucose, 11 mM $NaHCO_3$, 0.6 mM NaH_2PO_4, 1.0 ㎎/ml bovine serum albumine을 3차 증류수에 녹인 후 pH 7.4로 적정), compound 48/80 (5 ㎍/ml : Sigma Chemical Co., St. Louis Mo), anti-DNP IgE (0.5 ㎍[50 ㎕] ; Sigma Chemical Co., St. Louis Mo), DNP-human serum albumine (HSA) (100 ㎍[100 ㎕] ; Sigma Chemical Co., St. Louis Mo), saline, Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Grand Island, NY, USA), PMA, Calcium ionophore A23187 (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo), 3-[4,5-dimetylthizol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo), avidin-HRP, 2,2-azio-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo), Anti-humam TNF-α antibody (Ab), biotinylated anti-human TNF-α Ab, recombinant human TNF-α (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), Anti-human IL-8 Ab, biotinylated anti-human IL-8, recombinant human IL-8 (PharMingen, Sandiego, CA, USA), Anti-human IL-6 Ab, biotinylated anti-human IL-6, recombinant human IL-6 (PharMingen, Sandiego, CA, USA)

3. in vivo study

1) PCA 반응

PCA 반응은 Kim 등[10]의 방법을 수정, 보완하여 사용하였다. 먼저 anti-DNP IgE 에 의한 PCA반응을 유발하기 위하여 pentothal sodium (중외제약, 대한민국) 로 마취 후 수컷 흰쥐의 등쪽 털을 제거한 다음 진피내로 anti-DNP IgE 0.5 ㎍ (50 ㎕)을 주입하였다. 주사한 48시간 후에 DNP-human serum albumin 100 ㎍ (100 ㎕)을 포함하는 4% Evans blue (1:4) 를 음경등쪽정맥 내로 주입하였다. DNP-HSA로 감작 (challenge) 시키기 1시간 전에 SMT 14.91 mg/100g 을 1 ml의 D.W에 녹여 구강 투여하였다. 피부반응 유발여부와 양성반응 관정은 4% Evans blue 용액을 주입하고 30분이 경과한 뒤 등쪽 피부를 절개하여 주사한 부위의 진피에서 파란색 반점이 나타나는지의 여부를 관찰하였다. 그리고 파란색 반점이 나타난 주사부위의 피부를 절취하여 3-4 mm정도의 작은 조각으로 세절하고 5 ml의 formamide 용액에 넣어 40℃ oven에서 24시간 (overnight) 동안 Evans blue 용액을 유출시켰다. 유출시킨 Evans blue density을 spectrophtometer (backman instruments Inc, DU530, U.S.A.)로 620 nm에서 측정한 후 Evans blue 표준곡선에 준하여 농도를 산출하였다.

4. in vitro study

1) SD 흰쥐 복강비만세포의 탈과립 및 histamine 유리 분석

(1) SD-Rat 복강 비만세포의 수확

김 등[11]의 방법을 사용하여 다음과 같이 복강에서 비만세포를 얻었다. 흰쥐를 에테르로 치사시킨 후 약 10 ml의 HEPES-Tyrode buffer (완충용액)을 흰쥐의 복강 내에 주입하고 90초간 복벽을 가볍게 맛사지 하였다. 복벽 중앙선을 절개하고 복강 세척액을 스포이드로 채취하여 800 rpm에서 10분 동안 원심분리 시킨 후 상층액을 버리고, 동일 HEPES-Tyrode 완충용액으로 비만세포수가 1×10^6 cells/ml이 되도록 복강 부유액을 만들어 실험에 이용하였다.

(2) SD-Rat 비만세포의 형태관찰

복강 비만세포 부유액 200 ㎕에 HEPES-Tyrode 완충용액 25

㎕ 또는 SMT 25 ㎕를 넣어 37℃ 항온수조 에서 10분 동안 반응시켰다. SMT가 compound 48/80에 의한 비만세포의 활성화 억제 정도를 알아보기 위하여 비만세포를 SMT에 10분 반응시킨 후 compound 48/80용액 25 ㎕를 비만세포 부유액에 넣어 20분 동안 반응시켰다.

(3) SD-Rat 비만세포의 탈과립 관찰 및 탈과립율 산출

위상차도립현미경상으로 비만세포의 형태를 관찰하기 위하여 반응이 끝난 비만세포 부유액 200 ㎕중 50 ㎕를 위상차도립현미경 재물대 위에 놓여진 슬라이드글라스 (slide glass, 22×60 mm)위에 떨어뜨려 비만세포들이 침전될 수 있도록 실온에서 5분 동안 정지시켰다. 1,000배의 배율 하에서 비만세포를 위상차도립현미경 (Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 정상 비만세포의 형태는 대부분 원형 또는 난원형으로 세포윤곽이 뚜렷하고, 세포질 내에는 많은 과립들이 충만되어 있었다. 복강비만세포의 직경은 대략 10~20 ㎛ 정도로 복강 부유액의 다른 세포들 (림프구 또는 호중성백혈구)에 비해 2배 이상 컸다. 비만세포의 형태가 원형 또는 난원형으로 세포윤곽이 뚜렷하고 세포질 내에 광굴절이 높은 과립들로 충만된 상태를 정상형 비만세포로 구분하였다. 반면에 세포윤곽이 불분명하고 세포질내 과립들이 세포표면으로 돌출되거나 세포 주위에 흩어져 있는 경우를 탈과립형으로 구분하여 그 수를 실험군 당 임의로 선택한 5시야에서 계수하고, 탈과립율을 계산하였다.

비만세포 탈과립율(%)

= (탈과립된 비만세포 수/비만세포 총수)×100

(4) SD-Rat 비만세포로부터 유리된 histamine 양의 측정

위에서 기술한 방법으로 흰쥐 복강 비만세포를 분리한 다음 부유액 내 세포수가 1×10^6 cells/ml가 되도록 조절한 후 그 중 200 ㎕를 취하였다. 정상 비만세포에서 유리되는 histamine 양을 측정하기 위하여 비만세포 부유액 200 ㎕에 HEPES-Tyrode 완충용액 25 ㎕를 처리하였고, compound 48/80 용액에 의한 histamine 유리율을 측정하기 위하여 HEPES-Tyrode 완충용액 25 ㎕를 처리한 10분 후에 compound 48/80 (최종농도 : 0.5 ㎍/ml) 25 ㎕을 첨가하여 반응시켰다. SMT가 단독으로 비만세포의 histamine 을 유리시키는지 알아보기 위하여 SMT (최종농도 : 0.1, 1 또는 5 ㎎/ml) 25 ㎕를 비만세포 부유액에 투여한 10분 후에 HEPES-Tyrode 완충용액 25 ㎕를 첨가하여 반응시켰다. 또한 SMT의 compound 48/80 용액에 의한 histamine 유리 억제작용을 알아보기 위하여 비만세포 부유액에 상기 농도의 SMT 25 ㎕을 전처리 한 10분 후 역시 compound 48/80 (0.5 ㎍/ml) 25 ㎕을 첨가하여 반응시켰다. 반응이 끝난 후 4℃에서 3000 rpm으로 원심분리 하여 상층액 내의 histamine 양을 Enzyme Immunoassay for Histamine kit (Oxford, USA)를 이용하여 측정하였다.

2) Human mast cell에서 MTT assay 및 cytokine 분비 분석

(1) 세포 배양

Human mast cell line (HMC-1 Cell)은 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 ㎍/ml streptomycin이 포함된 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)를 배양액으로 CO_2 incubator (5% CO_2, 37℃)에서 배양하였고, 배양액은 2-3일 간격으로 교환해주었다. HMC-1 Cells (3×10^5 cells/500 ㎕)를 24 well plate 에 분주하고 CO_2 incubator (5% CO_2, 37℃)에서 30분 정도 안정화 시킨 후 SMT (0.1, 1 또는 5 ㎎/ml) 을 1시간 전처리 하였다. 25 nM PMA plus 1 μM A23187 로 7시간 동안 stimulation 시킨 후 3000 rpm, 4℃, 5분 원심분리하여 상층액을 얻었다.

(2) MTT assay

세포독성을 알아보기 위하여 MTT colorimetric assay를 실행하였으며, 그 방법[12]은 다음과 같다. HMC-1 Cells (3×10^5 cells/500 ㎕)를 24 well plate 에 분주하고 CO_2 incubator (5% CO_2, 37℃)에서 30분 정도 안정화 시킨 후 SMT (0.1, 1 또는 5 ㎎/ml) 을 24시간 동안 전처리 했다. 각 well에 MTT assay solution 50 ㎕을 첨가하여 37℃에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 13,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 MTT solution을 조심스럽게 제거한 다음 각 well에 500 ㎕의 DMSO를 첨가하여 15-20분 정도 plate shaker로 흔들어 주었다. 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan의 검출은 ELISA reader를 사용하여 wave length 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Cytokine assay

TNF-α, IL-6, IL-8의 정량은 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay 을 이용하여 측정하였다. 96-well ELISA plate (Nunc, Denmark)에 각각의 anti-human TNF-α, IL-6, IL-8 monoclonal antibody (1.0 ㎍/ml)을 100 ㎕씩 분주하여 coating 하였다 (TNF-α : RT, overnight, IL-6, IL-8 : 4℃, overnight). Well plate를 0.05% Tween-20이 포함된 PBS로 washing 한 후 1% BSA, 5% sucrose, 0.05% NaN3가 포함된 PBS 180 ㎕를 첨가하여 1시간 동안 Blocking 하였다. SMT sample과 TNF-α, IL-6, IL-8의 standards 100 ㎕을 첨가 한 후 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. Well plate를 PBS로 다시 washing 하고 TNF-α, IL-6, IL-8 각각의 biotinylated detection Ab 을 100 ㎕씩 첨가 한 후 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. Well plate을 washing 하고 avidin-peroxidase을 첨가하여 37℃에서 30분 반응시켜 주고 다시 washing 한 후 ABTS substrate 을 첨가 한 후 실온에서 10분 정도 반응시켰다. ELISA reader를 사용하여 wave length 405 nm에서 O.D 값을 측정하였다.

5. 통계처리

실험결과는 통계 프로그램 SPSS® for windows (version 10.0, SPSS, Inc., Chicago, U.S.A.)를 사용하여 약물의 농도에 따른 지표의 발현수치를 비교할 경우 oneway ANOVA를 실시하였으며, 유의수준 P value<0.05인 경우 유의성이 있다고 평가하였고 post hoc test로서 Scheffe's test를 시행하였다.

실험결과

1. 비만세포의 형태와 탈과립 관찰

1) HEPES-Tyrode 완충용액에 부유된 정상 비만세포

비만세포의 크기는 복강 부유액내 림프구의 두 배 정도였으

며, 구형 또는 난원형 이었다. 세포막이 뚜렷하고 세포질에는 광굴절율이 강한 과립들로 채워져 있어 핵이 분명하게 관찰되지 않는 정상비만세포 소견을 보여주었다 (Fig. 1A). 위상차도립현미경 유침 하에서 비만세포를 정상형과 탈과립형으로 구분하여 산출한 결과, 정상형의 비만세포는 94.0% 였으며 탈과립 된 비만세포는 6.0%로 대부분의 비만세포가 정상이었다 (Fig. 2).

2) SMT 처리 후 비만세포의 변화

SMT 추출물 (0.1, 1 또는 5 mg/ml)을 정상비만세포 부유액에 첨가하였을 때 비만세포의 형태, 크기, 표면윤곽 등이 정상 비만세포와 별다른 소견을 보이지 않았으며, 첨가 후 30분 동안 탈과립 현상은 보이지 않았다 (Fig. 1B, 1C, 1D). 이때 비만세포의 탈과립율은 각각 8.0%, 6.0%, 10.0% 이었다 (Fig. 2).

3) Compound 48/80용액 처리 후 비만세포의 형태변화

비만세포 부유액에 compound 48/80용액 (0.5 μg/ml)을 첨가한 후 수분 이내에 비만세포 세포질내 과립들의 광굴절율이 약해지기 시작했으며, 비만세포의 가장자리가 불규칙하게 되면서 일부 과립들이 세포표면으로 돌출되어 나와 있는 모습을 관찰 할 수 있었다. 또한 시간이 경과되면서 세포가 점차 커지고 동시에 광굴절율이 약화된 과립들이 세포표면으로 돌출되는 탈과립 현상을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 1E). 비만세포의 탈과립율을 산출한 결과 98.0%로 탈과립된 비만세포는 현저하게 증가하였다 (Fig. 2).

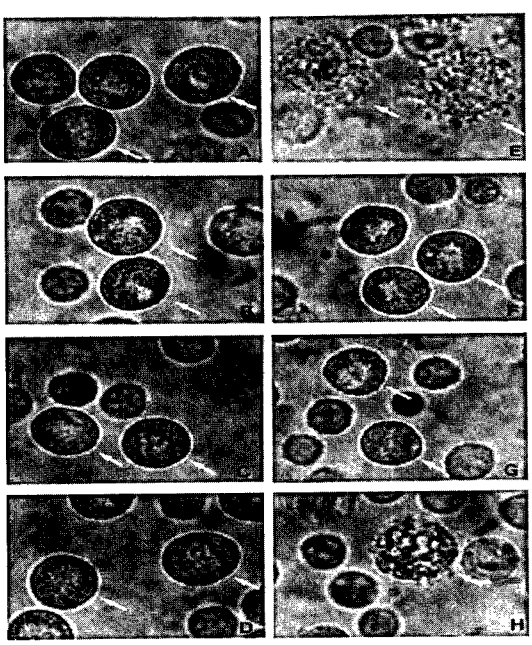

Fig. 1. Inverted light micrographs of rat peritoneal mast cells (RPMC) in HEPES-Tyrode buffered solution. A: The normal RPMC (arrows) in HEPES-Tyrode buffered solution show clear, smooth outline, spherical shape and central located nucleus, and contain many refractive granules in their cytoplasm. ×1000. B, C, D: The RPMC (arrows) obsered within 10 minutes after the addition of SMT solution (B: 5 mg /ml, C: 1 mg/ml, D: 0.1 mg/ml) show similar findings as seen in A. ×1000. E: The RPMC (arrows) observed within 5 minutes after the addition of compound 48/80 show swelling, severe irregular and disrupted boundary and beside the granules, vacuoles are present, which are interpreted as degranulation of mast cell. ×1000. F, G: The RPMC (arrows) pretreated with SMT (B: 5 mg/ml, C: 1 mg/ml,) observed within 10 minutes after the addition of compound 48/80, show similar findings as seen in B and C. ×1000. H: The RPMC (arrows) pretreated with SMT (D: 0.1 mg/ml) observed within 10 minutes after the addition of compound 48/80, show similar findings as seen in E. ×1000.

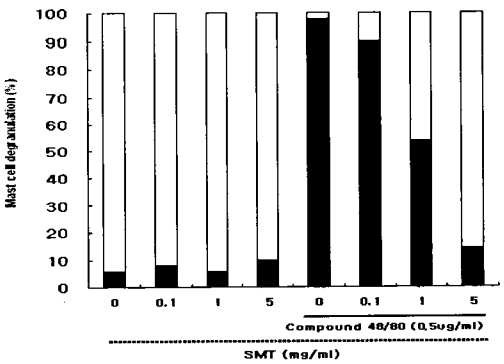

Fig. 2. Inhibitory effects of SMT on compound 48/80-induced degranulation of rat peritoneal mast cells. Rat peritoneal mast cell (RPMC) suspension (2×10^5 cells) was treated with various concentrations (0.1, 1, 5 mg/ml) of SMT at 37℃ for 10 min prior to incubation with compound 48/80. Counted number (%) of RPMC in 10 Fields (×400).

4) SMT 전처리 후 compound 48/80용액 첨가 시 비만세포의 형태변화

정상 비만세포 부유액에 SMT 추출물 (0.1, 1 또는 5 mg/ml)을 10분 정도 전 처리한 후 compound 48/80용액 (0.5 μg/ml)을 첨가하였을 때도 형태, 크기, 표면윤곽 등에서 정상 세포와 다른 소견을 관찰할 수 없었다. 그러나 20분이 경과한 후 비만세포의 일부 세포막의 가장자리가 불규칙해졌으며 약간의 굴절율 감소를 보였고, 몇몇의 과립들이 돌출 되어 보였지만 compound 48/80용액에 의한 비만세포의 현저한 탈과립 현상은 관찰되지 않았다 (Fig. 1F, 1G). 그러나 저농도의 SMT (0.1 mg/ml)을 처리한 경우 Fig. 1E와 같이 탈과립되는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 1H).

이상의 형태적인 결과로 탈과립율을 계산해 본 결과 SMT 추출물을 전처리 한 후 compound 48/80용액을 처리한 비만세포의 탈과립율은 SMT 추출물의 최종농도가 0.1 mg/ml 일 때 90.0%, 1 mg/ml 일 때 54.0%, 5 mg/ml일 때 14.0% 이었다 (Fig. 2). SMT 전처리에 의하여 compound 48/80용액에 의한 비만세포 탈과립이 현저히 억제됨을 알 수 있었다.

2. 비만세포로부터 유리된 histamine 양의 측정 결과

복강 비만세포 부유액에 compound 48/80용액 (0.5 μg/ml) 처리 하였을 때 비만세포로부터 유리된 histamine 양은 10.08±0.36 μg 이었으나, 상기 농도의 SMT 추출물을 전처리 한 후 compound 48/80용액을 첨가하였을 때 비만세포로부터 유리된 histamine 양은 각각 8.76±0.44 μg, 3.00±0.34 μg, 0.74±0.06 μg 이었다. Compound 48/80용액에 의한 비만세포로부터의 histamine 유리가 SMT 추출물에 의하여 농도 의존적으로 억제되었으며 특히 SMT 1 및 5 mg/ml 에서는 현저한 histamine 유리 억제를 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

3. SMT 전처리 후 PCA 피부반응 억제 효과

PCA 유발실험에 대한 SMT의 억제효과를 구명하기 위하여 피부반응 (파란색 반점)을 관찰하고 Evans blue의 농도를 측정한 결과는 다음과 같다. 수컷 흰쥐의 등쪽 피부 진피내로 anti-DNP IgE 0.5 μg (50 $\mu\ell$)을 주입하고 주사 한 48시간 후에 DNP-HSA

100 ㎍ (100 ㎕)를 주입 한 control 그룹의 Evans blue patch의 면적은 220.6±13.0 mm, 무게는 1.6±0.0 g 이었으며 산출된 Evans blue 농도는 8223.3±533.1 ㎍/ml이었다. 반면, DNP-HSA 100 ㎍ (100 ul)를 주입하기 1시간 전에 SMT을 구강 투여한 그룹의 Evans blue patch의 면적은 131.5±14.5 mm, 무게는 1.1±0.1 g으로 control 그룹과 비교해서 면적이나 무게가 작아졌으며 면적과 무게에서 모두 유의성 (P<0.001)을 보였다. 또한 산출된 Evans blue 농도가 4914.8±732.0 ㎍/ml으로 control 보다 현저하게 혈관투과성이 억제되었다 (Table 2, Fig. 4, Fig. 5).

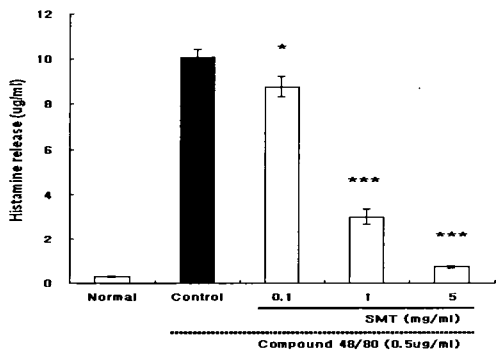

Fig. 3. Inhibitory effects of SMT on compound 48/80-induced Histamine release of rat peritoneal mast cells. Rat peritoneal mast cell (RPMC) suspension (2×10^5 cells) was treated with various concentrations (0.1, 1, 5 mg/ml) of SMT at 37℃ for 10 min prior to incubation with compound 48/80. The histamine content was measured using the enzyme immunoassay in the histamine kit. The data represents the mean±S.E.M. of three independent experiments. * P<0.05, *** P<0.001 compared with the control group.

Table 2. Inhibitory Effect of SMT following Administration Routes on PCA in Rat.

SMT addition (mg/g)[a]	Amount of dye (ug/ml)[b]	ArKyung Hee Universityea/min(mm)[c]	Weight (g)[c]	Inhibition (%)
None	356.4±50.2			
Control	8223.3±533.1	220.6±13.0	1.6±0.0	
SMT(18.97mg)	4914.8±732.0**	131.5±14.5***	1.1±0.1***	59.8%

a) Anti-DNP IgE was injected into dorsal skin sites. After 48 h, SMT (14.91 mg/100g) was administered orally 1 h prior to the challenge with antigen (DNP-HSA). b) Each amount of dye is presented as the mean±S.E.M. three independent experiments. c) The patch of evans blue was measured 30 min after antigen (DNP-HSA) injection. d) Weight of evans blue patch was measured 30 min after antigen (DNP-HSA) injection. ** p<0.01, *** p<0.001 compared with the control group (Anti-DNP IgE plus DNP-HSA).

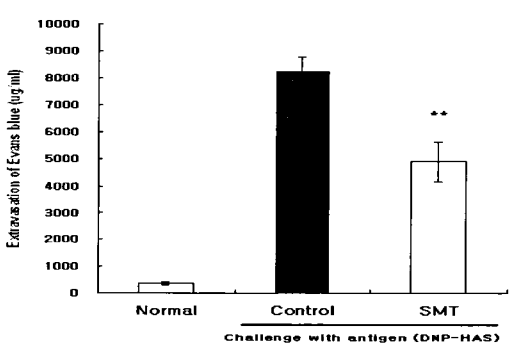

Fig. 4. Inhibitory effects of SMT on 48 h passive cutaneous anaphylaxis in the rat. Anti-DNP IgE was injected into dorsal skin sites. After 48 h, SMT (14.91 mg/100g) was administered orally 1 h prior to the challenge with antigen (DNP-HSA). Each amount of dye is presented as the mean±S.E. three independent experiments. ** P<0.01 compared with the control group (Anti-DNP IgE plus DNP-HSA).

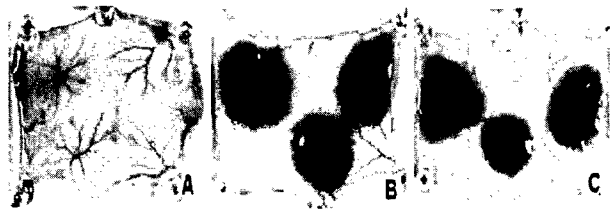

Fig. 5. The challenge with antigen (DNP-HSA) after the photogram of the internal surface in rat skin. A: Normal, B: Control, C: SMT

4. HMC-1 Cells 에 대한 SMT 추출물의 세포독성 측정 결과

SMT의 HMC-1 Cell에 미치는 독성을 알아보기 위하여 실시한 실험 결과 대조군에 비하여 세포생존율은 SMT 추출물 0.1, 1, 5 mg/ml의 투여용량에 대하여 각각 98±4.0, 99±3.7, 97±2.7 (%)로 세포독성은 나타나지 않았다 (Fig. 6)

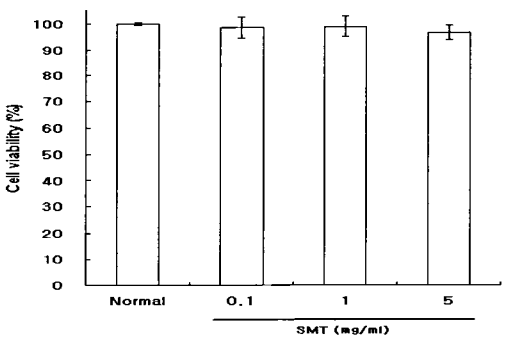

Fig. 6. Effect of SMT on the cell viability in HMC-1 Cells. The cells (3×10^5 cells/500 ㎕) viability was evaluated using MTT colorimetric assay for 24 h incubation after pretreated with various concentration (0.1, 1, 5 mg/ml) of SMT. The data represents the mean±S.E.M. of three independent experiments. Data compared with the untreated control. (% fo control data).

5. IL-6 분비에 있어서 SMT 추출물의 효과

PMA plus A23187로 stimulation 한 대조군의 IL-6 분비는 0.44±0.02 ng/ml 으로 정상세포군의 0.08±0.01 ng/ml 비해 현저히 증가되었음을 보였다. SMT 추출물 (0.1, 1, 5 mg/ml)로 전처리 한 후 PMA plus A23187로 stimulation 한 실험군 에서는 SMT 추출물의 최종농도가 0.1, 1, 5 mg/ml 에서 각각 0.37±0.02 ng/ml, 0.42±0.01 ng/ml, 0.11±0.02 ng/ml 으로 PMA plus A23187 에 의한 HMC-1 Cells 에서의 IL-6 분비가 SMT 추출물에 의하여 유의하게 (0.1, 1, 5 mg/ml P<0.001) 억제되었음을 알 수 있었다 (Fig. 7A).

6. TNF-α 분비에 있어서 SMT 추출물의 효과

PMA plus A23187로 stimulation 한 대조군의 TNF-α 분비는 0.88±0.09 ng/ml 으로 정상세포군의 0.02±0.00 ng/ml 비해 현저히 증가되었음을 보였다. SMT 추출물 (0.1, 1, 5 mg/ml)로 전처리 한 후 PMA plus A23187로 stimulation 한 실험군 에서는 SMT 추출물의 최종농도가 0.1, 1, 5 mg/ml 에서 각각 0.61±0.05 ng/ml, 0.30±0.03 ng/ml, 0.27±0.04 ng/ml 으로 PMA plus A23187 에 의한 HMC-1 Cells 에서의 TNF-α 분비가 SMT 추출물에 의하여 유의하게 (0.1 mg/ml P<0.05 1 및 5 mg/ml,

P<0.001) 억제되었음을 알 수 있었다 (Fig. 7B).

7. IL-8 분비에 있어서 SMT 추출물의 효과

PMA plus A23187로 stimulation 한 대조군의 IL-8 분비는 8.86±0.31 ng/ml 으로 정상세포군의 0.03±0.00 ng/ml 비해 현저히 증가되었음을 보였다. SMT 추출물 (0.1, 1, 5 mg/ml)로 전처리 한 후 PMA plus A23187로 stimulation 한 실험군 에서는 SMT 추출물의 최종농도가 0.1, 1, 5 mg/ml에서 각각 7.41±0.58 ng/ml, 7.40±0.55 ng/ml, 6.75±0.50 ng/ml 으로 PMA plus A23187 에 의한 HMC-1 Cells 에서의 IL-8 분비는 SMT 추출물에 의하여 유의하게 (0.1 mg/ml P<0.05 ,1 mg/ml P<0.01, 5 mg/ml P<0.001) 억제되었다 (Fig. 7C).

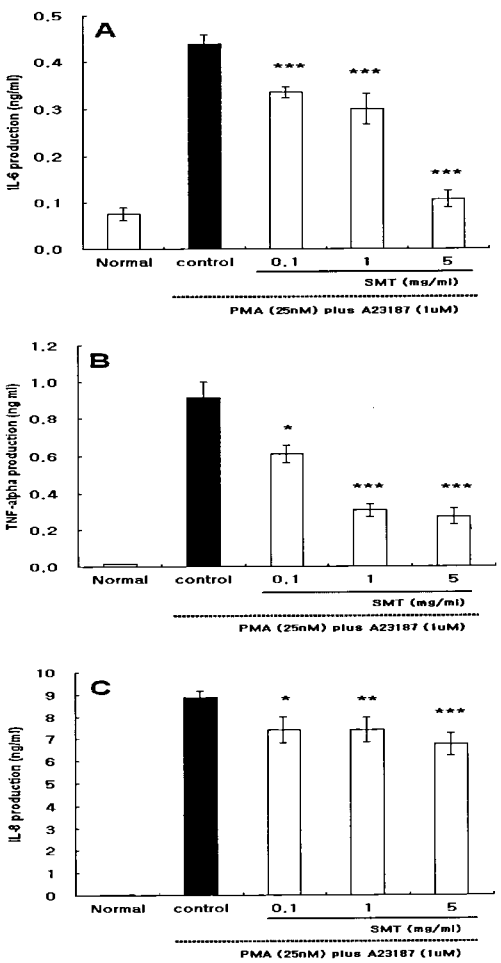

Fig. 7. Effect of SMT on PMA plus A23187-induced cytokine production (A; IL-6, B; TNF-α, C; IL-8) in HMC-1 cells. The cells (3×10^5 cells/500 μl) were pretreated with various concentration (0.1, 1, 5 mg/ml) of SMT for 1 h and then stimulated for 7 h incubation with PMA (25 nM) plus A23187 (1 μM). The level of cytokine in the supermatant was measured using ELISA. The data represents the mean±S.E.M. of three independent experiments. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 compared with the control group (PMA plus A23187 stimulated control group).

고 찰

알레르기는 염증성 질환의 한 종류로서, 지난 십여년 동안 알레르기성 염증반응에 관계되는 많은 종류의 세포들 (비만세포, 호중성백혈구, 림프구, 호산성백혈구 등)로부터 여러 종류의 매개물질들 (leukotriene, 혈소판 활성인자, 히스타민 등)과 cytokines (TNF-α, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12, IL-13 등)이 유리되고, adhesion molecules (ICAM-1, 2, VCAM-1 등)과 transcription factor (nuclear factor kappa B, AP-1, NF-AT, STAT 등)의 발현이 중요한 역할을 하며, 이들의 상호 관련성에 관한 연구가 비약적으로 이루어졌다. 일반적으로 알레르기는 (allergy)는 제 I 형 과민반응 (type I hypersensitivity)과 동일시 되는데, IgE 항체와 비만세포 (mast cell)에 의해서 일어나며 그 발생 기전은 다음과 같다.

항원 즉 Allergen이 점막표면을 통해 인체내로 들어가 TH2 반응을 유도한다. Allergen에 자극 되지 않는 특이 T 세포들은 IL-4의 존재하에서 TH2로 발전하게 되고 이러한 Allergen 특이 TH2세포들은 B cell로터 특이적인 IgE 항체를 생성케 하고, 생성된 IgE는 mast cell 표면에 있는 IgE에 대한 고도의 친화력을 갖는 Fc 수용체 (FcεRI)와 결합 하여 IgE 생성을 증폭시킨다. 다시 동일한 allergen에 재 노출되면 allergen과 IgE가 서로 교차결합 (cross link)하게 되고 이렇게 교차결합이 형성되면 FcεRI의 β chain과 γ chain에 관련된 protein tyrosine kinase (PTK)가 활성화되고, 이들 인산화효소가 γ chain의 ITAM 지역 및 β chain과 phospholipase C를 인산화시킨다. 이러한 인산화 과정이 나타나면 곧 세포막 인지질의 methylation이 유도되어 세포막의 유동성이 변화 하고 세포막에 Ca^{2+} channel이 형성된다. 그 결과 세포질 내에 Ca^{2+}의 농도가 높아지게 되고, 결국에는 세포막의 지질대사에 영향을 미치어 prostaglandin과 leukotrien 등의 지질매개물질을 생산하다. 또한 Ca^{2+}의 농도의 상승은 세포의 세포골격 구조에 변화를 유도하여 세포내 과립의 이동이 시작되며, 세포막의 adenylate cyclase의 활성을 증가시켜 세포내에 cAMP의 양이 늘어나게 된다. cAMP는 다시 cAMP dependent protein kinase C (PKC)를 활성화 시켜 세포내 과립의 투과성을 변화시켜 과립의 분해를 촉진한다. 이렇게 하여 세포내 과립의 방출 (degranualtion)이 나타나게 되고, 과립내 저장된 히스타민 (histamine)등이 유리되어 혈관확장, 혈관투과성의 항진, 기관지 평활근의 수축이나 분비 항진등을 야기시킨다[13].

한편 알러지 질환의 병태생리에 중요한 역할을 하는 비만세포는 Ehrlich[14]에 의해 처음 관찰, 명명된 이래 탈과립 유발 인자들과 억제인자들에 대한 연구를 통하여 아토피성 피부염, 기관지 천식 및 알러지 비염등 여러 가지 알러지 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 적합한 약물을 개발하는데 많이 이용되고 있다. 비만세포는 결합조직에 널리 분포하고 있으며 다른 세포와 달리 크고 굵은 이염색성의 과립을 함유하고 있고, 면역학적 또는 비면역학적 자극에 의하여 세포질 과립에 저장된 매개물질들 (히스타민, histamine; 헤파린, heparin; 프로테이즈; 가수분해효소 등)과 많은 사이토카인들을 분비하여 여러 면역반응과 염증반응 등에 관여한다[2,3].

비만세포를 활성화 시키는 중요한 인자로는 항원, IgE 항체, IgE 수용체에 대한 항체, Con A, polyamine, compound 48/80, polylysine polypeptides, alpha-chymotrypsin, porcine

pancreatic phospholipase A2 등의 효소들의 자극[15] 및 Ca^{2+} coupled stimulation secretion 기전에 의하여 분비되는 경우[16], cyclic nucleotide level에 의한 분비, protein kinase의 활성화에 따른 phosphorylation 증가, 비만세포의 세포골격인 액틴미세섬유와 중간미세섬유, 미세소관 등을 변형시키는 경우[17] 등이 있다.

본 실험에서는 상기의 여러 가지 비만세포의 탈과립을 유도하는 인자들 중 compound 48/80을 사용하였는데, 이는 혼합 다당체 성분으로 세포내 칼슘을 증가 시키거나, 세포막을 통하여 세포밖으로 부터 세포내로 칼슘의 이동을 자극하여 세포질내 칼슘의 농도를 증가시키는 인자로서의 기능을 가지고 있으며, 비만세포막 수용체에 작용하여 세포내로의 칼슘 유입을 증가시키고 세포내 cAMP-phosphodieterase 의 파괴를 억제하여 세포내 cAMP 양을 증가시킨다고 알려졌다[18]. 또 PMA(phorbol 12-myristate-13-acetate) 및 calcium ionophore A23187는 phosphatidylinositol (PI) cycle과 protein kinase C (PKC) 활성화, 또는 calcium mobilization 시키는 물질로 비만세포를 자극시켜 생리활성물질을 세포 밖으로 분비하게 한다[2].

이러한 비만세포 탈과립을 일으키는 여러인자들의 대부분은 세포밖으로부터 세포안으로 Ca^{2+} 유입을 증가시킴으로써 비만세포내의 Ca^{2+}의 양을 증가시키며, 증가된 자유 Ca^{2+}이 세포내 Ca^{2+} binding protein인 calmodulin과 결합하여 Ca^{2+}-calmodulin 복합체를 형성하게 되고 이것이 새포내 myosin light chain kinase 를 활성화 시킨다. 그결과 세포내 골격 및 세포내 이동에 관여하는 미세소관과 미세섬유가 활성화되어 비만세포의 과립을 세포막 가까이로 이동시켜 결과적으로 세포막 융합을 일으키게 됨으로써 비만세포 탈과립 및 히스타민 유리현상이 일어난다고 알려졌다[16].

반면, 비만세포의 탈과립을 억제하는 물질들에 대한 연구도 많은데 이들은 세포막의 인지질 대사를 변화시키는 물질[19] cAMP 수준변동과 Ca^{2+} 이동에 관계하는 물질[11,20], cromoglycate 와 flavonoids, protease 억제제[21,22], 세포 골격계에 작용하는 물질 및 스테로이드 등이 있다[23].

이번 연구 결과 사물탕은 compound 48/80에 의한 흰쥐 비만세포의 탈과립을 억제하였으며, 또한 흰쥐 복강 비만세포의 히스타민 유리를 측정한 결과, compound 48/80에 의한 히스타민 유리율이 사물탕 추출물 전처리에 의해서 현저히 억제 되었음을 관찰할 수 있었다.

히스타민 (Histamine) 은 비만세포내 과립에 저장되어 있는 화학적 매개물질 중의 하나로 비만세포의 탈과립 인자에 의하여 가장 빠르게 유리 및 방출되어 말초혈관에 대한 투과성 항진과 확장작용, 기관지 평활근에 대한 수축작용, 점막 표면에 대한 선세포의 분비 항진 작용 등을 나타내어 즉시형 알러지 및 염증반응을 일으키는 물질로 알려져 있다[24,25]. 흰쥐 복강 비만세포에서의 실험결과 사물탕이 비만세포의 탈과립을 억제함과 동시에 히스타민 유리를 억제하였다. 이는 비만 세포 탈과립과 vasoactive amine의 유리를 억제하는 작용이 있어 알러지 질환에 주로 사용되는 항히스타민제나 스테로이드 호르몬제와 비슷한 효과를 보이는 것으로, 다만 사물탕이 이러한 약물과 같이 히스타민을 직접적으로 길항하기 보다는 상백피처럼 비만세포의 세포막에 작용하여 칼슘의 세포질내 유입을 억제하거나 phosphodiesterase 의 작용에 관여하여 비만세포 세포질내의 cAMP가 증가되어 비만세포 탈과립이 억제되는 것으로 추정되는 것처럼 다른 기전으로 억제하고 있을 것으로 생각된다.

또한 사물탕은 in vivo 실험에서 anti-DNP IgE에 의한 피부반응 (PCA)을 억제 하였는데, 이는 사물탕 추출물이 복강 비만세포의 탈과립과 히스타민 유리를 억제한 결과로 미루어 구강내로 투여한 사물탕 추출물이 비만세포를 안정화 시킨 뒤에 투여된 anti-DNP IgE에 의한 혈관 투과성을 억제하여 Evans blue의 혈관 밖으로의 유출을 방지함으로써 진피내로의 파란색 반점의 출현을 억제한 것으로 생각된다. 그러나 아직까지 진피내로 투여된 anti-DNP IgE가 비만세포를 제외한 결합조직내의 여러 가지 세포들에 어떠한 영향을 주는 지에 대한 연구도 미비한 실정이어서 정확한 억제기전을 밝히기 위해서는 이 부분에 대한 연구도 보강되어야 할 것으로 생각된다.

알러지 반응은 mast cell과 eosinophil이 만들어내는 cytokine의 작용에 의하여 더욱 더 복잡해지며, 일부 증세는 이들 cytokine의 작용에 기인한다. 염증반응에 나타나는 특징적인 증후는 발적, 발열, 종창, 동통 및 기능상실로 정리 할 수 있으며, 염증 반응시에 생산된 cytotoxin과 cytokine의 작용에 의해 다양한 전신 증상이 일어나게 된다[26]. cytokine은 알러지 질환과 알러지성 염증반응에 있어서 병인학적으로 중심적인 역할을 담당하고 있다. 인간의 mast cell은 TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 등의 cytokine을 만들어내는데, 이들 cytokine들은 궁극적으로 neutrophil과 eosinophil을 모으는 역할을 하며 염증반응을 일으키는 데 있어서 중요한 역할을 담당한다.

IL-6는 숙주 방어에 중심적인 역할을 하는 다기능 cytokine으로서 림프계세포와 골수성 림프계세포에서 생성되며 면역반응과 세포손상에 대한 숙주의 반응을 조절한다. 그리고 감염이나 손상 등에 의한 급성 반응을 보이며 면역반응에 관여하는 세포의 성장과 분화에 관여한다[27]. 또한 IL-6는 IL-1, PDGF 및 TNF-α 등 성장인자의 자극이나 박테리아, 바이러스 감염에 의하여 생성되기도 한다[28]. 이번 연구에서는 사물탕 추출물이 IL-6 생산에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 in vitro 실험을 진행한 결과 HMC-1 Cell 을 PMA plus A23187 로 stimulation 한 control 군에서 IL-6의 분비가 현저하게 증가되었고, 사물탕 추출물 전처리로 인하여 PMA plus A23187 로 유발된 IL-6의 분비가 유의하게 억제되었다.

TNF-α는 면역반응의 초기에 분비되는 전염증기 cytokine으로 천식이나 류마티스관절염 등 여러 가지 질환에서의 염증반응 조절에 관여하는 것으로 알려져있다[29]. TNF-α는 생체내에서 단독으로 또는 다른 cytokine들과 협력 작용하여 몇몇 종양의 혈관을 손상시킴으로써 종양 괴사를 유발 시키거나 말라리아 또는 레지오넬라에 의한 감염, 몇몇 바이러스 혹은 기생충에 의한 감염에 대하여 숙주의 저항성을 유도시키기도 하지만, TNF-α는 중요한 염증 매개인자 중 하나로서, 어떤 환경에서는 생체에 매우 해로운 영향을 미칠수 있다. 또 TNF-α는 염증질환에서 프로스타

글란딘 E2의 생산과 골손상을 일으키고 패혈증에서 맥관내피염을 초래하여 septic shock.을 일으키는 인자로 알려져 있다[30]. 특히 비만세포에서 유리된 TNF-α는 국소의 혈관내피세포에 작용하여 ELAM-1의 발현 및 백혈구의 혈관외 유주를 유도하는 것으로써 특히 알러지 국소의 염증반응에 중요한 역할을 하고있다[26]. 이번 연구에서는 사물탕 추출물이 TNF-α 생산에 미치는 영향을 관찰하기 위해 in vitro 실험을 진행한 결과 HMC-1 Cell 을 PMA plus A23187 로 stimulation 한 control 군에서는 TNF-α 분비가 현저하게 증가되었고, 사물탕 추출물 전처리로 인하여 PMA plus A23187 로 유발된 TNF-α의 분비가 유의하게 억제되었다. 따라서 사물탕 추출물이 TNF-α의 발현을 억제하여 염증을 억제하는 기전을 가지고 있음을 알 수 있다.

IL-8은 폴리펩타이드성의 주화성 세포활성물질 (chemotactic cytokine)로써 1970년대 초에 활성화 백혈구 유래의 백혈구 주화성 인자로 발견되어 LPS 자극에 의한 말초 혈액 단핵구나 대식세포가 생성하는 호중구 주화활성을 갖는 단백질임이 밝혀졌다[31,32]. 따라서 IL-8은 호중구를 혈관내피세포를 통과하여 조직내에 유주시킴으로서 지연형 알러지 증상을 야기시킨다. 최근에 IL-8은 단핵구나 대식세포에서 뿐만아니라 사람 비만세포에서도 생성 된다고 보고 되었으며[33], IL-8에 의해 생성된 염증세포 (neutrophils, macrophage, T lymphocytes)는 아토피 피부염 환자들에서도 발견되었다[34]. IL-8 생산에 미치는 영향을 관찰하기 위해 in vitro 실험을 진행한 결과 HMC-1 Cell 을 PMA plus A23187 로 stimulation 한 control 군에서는 IL-8 분비가 현저하게 증가되었고, 사물탕 추출물 전처리로 인하여 PMA plus A23187 로 유발된 IL-8의 분비가 유의하게 억제되었다.

본 실험 결과 사물탕 추출물은 저농도와 고농도 (0.1, 1, 5 mg/ml) 모두에서 세포독성이 나타나지 않았으며, PMA plus A23187 유발에 의해 증가 된 IL-6, TNF-α, IL-8의 분비를 모두 현저히 억제하였다.

이상의 결과로 미루어 사물탕이 항알러지 및 항염증성 물질을 함유하고 있다고 생각된다.

결 론

사물탕 (SMT)이 알러지 염증 반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 in vitro에서 비만세포 활성화시 분비되는 히스타민 유리와 cytokine (IL-6, IL-8, TNF-α) 분비에 미치는 영향을 관찰하였고 in vivo에서 anti-IgE에 의한 혈관투과성을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Compound 48/80 에 의한 흰쥐 복강 비만세포의 탈과립은 수분이내에 관찰 되었고, 이러한 비만세포 탈과립율은 사물탕 추출물 전처리로 억제되었으며, 또한 compound 48/80 에 의한 흰쥐 복강 비만세포로 부터의 히스타민 유리율이 사물탕 추출물 전처리로 유의하게 억제되었다.

Human Mast Cell line (HMC-1 Cell) 에서 PMA plus A23187 의해 증가되었던 IL-6, IL-8, TNF-α의 분비가 사물탕 추출물 전처리로 유의하게 억제 되었다.

혈관투과성의 증가에 사물탕이 미치는 영향을 알아보기 위한 in vivo 실험결과, 흰쥐 피부에 anti-IgE에 의한 피부반응 (PCA 반응) 유도시 증가된 혈관 투과성이 사물탕 추출물 전처리로 현저하게 억제되었다.

이상의 결과로 사물탕 추출물은 compound 48/80 및 PMA plus A23187 에 의한 비만세포 활성화와 혈관투과성을 억제하는 항 알러지 염증효과가 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 경희대학교 교내연구비지원 (20030879)과 BK 21 사업에 의해 지원되었음.

참고문헌

1. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. Immunology, 6th ed. U.S.A., Mosby. pp 323-383. 2001.
2. Moon, P.D., Na, J.J., Jeong, H.J., Hong, S.H., Kim, S.J., Chae, H.J., Kim, H.R., Choi, J.O., Lee, S.H., Shin, J.Y., Kim, H.M. Inhibitory effect of Gamibojungikaitang extract on mast cell-mediated allergicreaction in murine Model. J Pharm Pharm Sci 8(1):94-101, 2005.
3. Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grutzkau A, Henz BM. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing-active participants or innocent by standers. Experimental Dermatology 8: 1-16, 1998.
4. 이영훈, 한의혁, 송창호. 비만세포의 두얼굴. 천식 및 알레르기 20: 684-690, 2000.
5. 太平惠民和劑局方編. 太平惠民和劑局方. 북경, 인민위생출판사, pp 310-311, 1985.
6. 李尙仁. 天眞處方解說. 서울, 成輔社, pp 53-57, 1987.
7. 李相弦. 四物湯 構成藥物의 配合이 白鼠의 溶血性 貧血에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院 1993.
8. 姜昌洙. 四物湯 煎湯液이 家兎의 血壓降下에 미치는 影響. 圓光大學校 韓醫科大學 學位論文集 1: 381-398, 1981.
9. 金世吉. 四物湯이 貧血家兎의 造血效果에 미치는 影響. 圓光大學校 韓醫科大學 學位論文集 pp 143-152, 1982.
10. Kim, H.M., Park, Y.A., Lee, E.J., Shin, T.Y. Inhibition of immediate-type allergic reaction by Rosa davurica Pall. in a murine model. J Ethnnopharmacology 67: 53-60, 1999.
11. 김은경, 이광소, 채옥희, 송창호. 우방자 추출물의 compound 48/80 유도 비만세포 활성화와 혈관 투과성 억제효과. 대한체질인류학회지 17(1):55-65, 2004.
12. Kim, S.J., Lee, E.J., Song, Y.S., Jeong, H.J., Lee, K.M., Kim, H.R., Chae, H.J., Shin, T.Y., Kim, Y.K., Hong, S.H., Kim, H.M. Cheongyeolsaseuptang inhibits production of TNF-α, IL-6 and IL-8 as well as NF-kB activation in human mast cells. J Ethnopharmacol 97(1):83-88, 2005.

13. 김대식, 김소연, 김춘추, 민창기, 박수정, 서영훈, 엄현석, 정낙균, 정대철, 정태준, 진종률, 한치화. 면역생물학. 서울, 라이프사이언스 pp 461-488, 2001.
14. Ehrlich, P. Beitrage zur kenntnis der Anilinfarbunger und ihrer Verwendung in drmikroskopischen Technik. Arch Mikrosk Anast 13: 263-277, 1877.
15. Ennis, M., Pearce, F.L., Weston, P.M. Some studies on the release of histamine from mast cells stimulated with polylysine. Br. J. Pharmacol 70: 329-334, 1980.
16. 강경진, 전병득, 채옥희, 이무삼. 상백피가 흰쥐 복강 비만세포의 히스타민 유리와 Calcium uptake에 미치는 영향. 대한면역학회지 15: 91-99, 1993.
17. 채옥희, 이종인, 이무삼. 상백피의 colchicine 유도 비만세포 활성화 억제효과. 대한해부학회지 32: 735-747, 1999.
18. Dainaka, J., Ichikawa, A., Koibuchi, Y., Nakagawa, M., Tomita, K. Effect of the tridecamer of compound 48/80, a Ca^{2+}-dependent histamine releaser, on phospholipid metabolism during the early stage of histamine release from rat mast cells. Biochem Pharmacol 35(21):3739-3744, 1986.
19. Sullivan, T.J., Parker, C.W. Possible role of arachidonic acid and its metabolites in mediator release from rat mast cells. J Immunol 122(2):431-436, 1979.
20. Sullivan, T.J., Parker, K.L., Stenson, W., Parker, C.W. Modulation of cyclic AMP in purified rat mast cells. Ⅱ. Studies on the relationship between intracellular cyclic AMP concentrations and histamine release. J. Immunol 114: 1480-1485, 1975.
21. Theoharides, T.C., Sieghart, W., Greengard, P., Douglas, W.W. Antiallergic drug cromolyn may inhibit histamine secretion by regulating phosphorylation of a mast cell protein. Science 207(4426):80-82, 1980.
22. Sieghart, W., Theoharides, T.C., Douglas, W.W., Greengard, P. Phosphorylation of a single mast cell protein in response to drugs that inhibit secretion. Biochem Pharmacol 30(19):2737-2738, 1981.
23. Kawabe, H., Hayashi, H., Hayaishi, O. Differential calcium effects on prostaglandin D2 generation and histamine release from isolated rat peritoneal mast cells. Biochem Biophys Res Commun 143(2):467-474, 1987.
24. 김형민. 면역과 알레르기. 서울, 신일상사, pp 159-173, 1998.
25. Na, H.J., Jeong, H.J., Bae, H., Kim, Y.B., Park, S.T., Yun, Y.G., Kim, H.M.. Tongkyutang inhibits mast cell-dependent allergic reactions and inflammatory cytokine secretion. Clinica Chimica Acta 319: 35-41, 2002.
26. 이중달. 그림으로 설명한 병리학. 서울, 고려의학, P 29, 1991.
27. Ershlei, W.B., Keller, E.T. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life deseses, and frailty. Annu Rev Med 51: 245-270, 2000.
28. Zhang, Y.H., Lin, J.X., Vilcek, J. Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. Mol Cell Biol 10(7):3818-3823, 1990.
29. Stankiewicz, W., Dabrowski, M.P., Chcialowski, A., Plusa, T. Cellular and cytokine immunoregulation in patients with chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. Mediators Inflamm 11(5):307-312, 2002.
30. 김완수. rHRF로 유발로 활성화된 생쥐의 B 임파구와 비만세포에서 辛夷 추출물의 항알러지 작용에 관한 연구. 동의생리병리학회지 15(6):917-926, 2001.
31. Choi, I.Y., Koo, H.N., Lee, S.H., Shin, J.Y., Chae, H.J., Kim, H.R., Kim, C.H., Hong, S.H., Kim, H.M. Anti-inflmmatory activity of Korean folk medicine 'Sabeksan'. Exp Mol Pathol 78(3):257-262, 2005.
32. Salamon, P., Shoham, N.G., Gavrieli, R., Wolach, B., Mekori, Y.A. Human mast cells release Interleukin-8 and induce neutrophil chemotaxis on contact with activated T cells.Allergy 60(10):1316-1319, 2005.
33. Moller, A., Lippert, U., Lessmann, D., Kolde, G., Hamann, K., Welker, P., Schadendorf, D., Rosenbach, T., Luger, T., Czarnetzki, B.M. Human mast cells produce IL-8. J Immunol 151(6):3261-3266, 1993.
34. Na, H.J., Moon, P.D., Ko, S.G., Lee, H.J., Jung, H.A., Hong, S.H., Seo, Y., Oh, J.M., Lee, B.H., Choi, B.W., Kim, H.M. Sargassum hemiphyllum Inhibits Atopic Allergic Reaction via the Regulation of Inflammatory Mediators. J Pharmacol Sci 97(2):219-226, 2005.