

葛根解肌湯의 항 Allergy 및 항염증 효과

김형갑 · 신상우¹ · 박종현*

대구의한대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 부산대학교 한의학전문대학원

Inhibitory Effect of Galgeunhaegi-Tang on Compound48/80 Stimulated Allergic Reaction

Hyung Kap Kim, Sang Woo Shin¹, Jong Hyun Park*

Department Pathology, College of Oriental Medicine, Deagu Haany University, 1:Pusan National University

The present study was conducted to investigate the anti-allergic activity of Galgeunhaegi-Tang(GHT). We investigated the anti-allergic effects of GHT in RBL-2H3 basophilic leukemia cells by compound48/80, a mast cell degranulator and compound 48/80 induced anaphylactic shock in mice. GHT significantly inhibited β-hexosaminidase and histamine release from compound 48/80 stimulated RBL-2H3 cells. In addition, GHT effectively inhibited anaphylactic shock in mice by 40% at a dose 100 mg/mouse versus PBS treated control after the i.p injection(8 mg/kg) of compound 48/80. The in vitro anti-inflammatory activities of GHT in LPS-stimulated RAW 264.7 cells were investigated. GHT inhibited NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells and effectively dowregulated the expression of iNOS mRNA and iNOS protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. These result provide evidences that GHT may be beneficial in the treatment of allergic inflammtory disease.

Key words : Galgeunhaegi-Tang, compound 48/80, β-hexosaminidase, histamine release, nitric oxide

서론

알레르기성 鼻炎은 코가 여러 가지 자극에 대해 과잉기능을 보여 콧물, 코막힘, 재채기, 코가려움증 및 후비루 등의 증상을 일으키는 질환으로, IgE 매개 염증 반응으로 인하여 생기는 코 점막의 질환이다¹⁾. 최근 들어 급증하고 있으며, 도시의 발병률이 더 높기 때문에 도시생활과 관련된 환경적인 영향과 매우 밀접한 연관이 있다고 보고 있으며²⁾, 선진국의 경우 최고 30%의 소아들이 이러한 증상들을 겪는 것으로 보고되었다³⁾.

서양의학에서 알레르기 질환의 치료법은 증상을 관리하는 것에 국한되어 항히스타민제, leukotriene receptor 길항제, 또는 스테로이드 제제에 의존하는 실정이다⁴⁾. 이런 약물은 염증세포들의 초기 단계보다는 진행단계를 차단하는 작용만을 가지기 때문에 항원에 감작되거나 Th2 cell로 분화하는 단계를 차단하여 면역을 증강시키는 약물의 개발이 더 근본적인 것이라 할 수 있다.

한의학에서 면역의 개념은 正氣와 邪氣의 관계 및 그 내용

에서 찾아볼 수 있다. 『素問·上古天真論』의 “眞氣從之, 精神內守, 病安從來” 『素問·刺法論』의 “正氣存內, 邪不可干”, 『素問·評熱病論』의 “邪之所湊, 其氣必虛”에서 표현한 것처럼⁵⁻⁷⁾, 正氣란 邪氣에 대항하는 인체 내의 방어능력을 총칭하는 것으로 면역개념의 대표적인 韓醫學적인 개념이라고 할 수 있다. 또한 김⁸⁾은 난치병의 치료방법을 연구하기 위해서는 서양의학적인 면역의 개념과 韓醫學에서의 衛氣, 宗氣, 元氣의 작용과 四象醫學에서의 체질적 차이를 연구해야 하고, 四象醫學의 이론이 면역조절작용과 類似性을 지니고 있다고 하였다.

최근 들어 한약을 통하여 알레르기 질환을 치료하려는 많은 연구가 이루어지고 있으며, 실험적으로도 그 효과가 증명되고 있다. 은 등⁹⁾은 加味清鼻飲이 mast cell내로 Ca²⁺ 유입을 차단하여 histamine 유리를 억제함으로써 알레르기성 비염에 효과적으로 작용한다고 보고 하였고, 김 등¹⁰⁾은 加味生料四物湯 추출물이 비만세포의 탈과립과 histamine 분비를 억제하며 알레르기 염증과 관련된 tumor necrosis factor (TNF)-α, IL-6의 발현을 억제한다고 하였고, 이 등¹¹⁾은 黃連解毒湯이 제 1형과 제 4형 알레르기에 효과가 있다고 보고 하였고, 이외에도 小青龍湯, 補中益氣湯 등이 아토피 피부염이나 알레르기 천식, 알레르기 비염을 치료하

* 교신저자 : 박종현, 대구시 수성구 상동 대구한의대학교 한의과대학

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

· 접수 : 2009/03/20 · 수정 : 2009/03/31 · 채택 : 2009/04/10

는 효과가 있다고 보고되어 있다.

四象醫學에서 太陰人에 사용되는 葛根解肌湯은 이제마의 『東醫壽世保元¹²⁾』에 기재된 太陰人 新定方으로 葛根, 黃芩, 藁本, 桔梗, 升麻, 白芷 등으로 구성되어 太陰人 肝受熱裏熱病에 응용할 목적으로 입방된 처방이며, 송¹³⁾은 太陰人 肝燥熱을 치료 한다고 하였다.

본 연구는 알레르기 비염에 대표적 사상체양중 하나인 葛根解肌湯의 항 알레르기비염에 대한 효과를 알아보기 위하여 정상 세포 증식에 미치는 영향, 알레르기 반응의 주요 세포인 비만세포와 상동성이 높은 RBL-2H3 basophilic leukemia 세포주를 이용하여 알레르기 반응 시 이들 세포의 탈과립 지표로 알려진 β-hexosaminidase 및 histamine 분비 억제에 미치는 영향, 비면역 자극제인 compound48/80 자극에 의한 anaphylatic shock에 미치는 영향, RAW264.7 대식세포주를 이용하여 염증반응과 관련된 Nitric Oxide 생성 및 조절기전에 미치는 영향 등을 관찰하여 유의적인 결과를 얻었기에 보고 하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 檢液의 준비

실험에 사용한 藥材는 읍니허브에서 구입하여 良質의 것을 精選하여 사용하였으며, 처방은 『東醫壽世保元¹²⁾』에 收載된 葛根解肌湯으로서 내용 및 1첩 분량은 다음과 같다.

Table 1. Components of Galgeunhaegi-Tang(GHT)

Oriental Crude Drug	Crude Drug	Scientific name	Dose (g)
葛根	<i>Pueraria thunbergiana</i>	<i>Puerariae Radix</i>	12
黃芩	<i>Scutellaria baicalensis</i>	<i>Scutellariae Radix</i>	6
藁本	<i>Ligusticum Sinense</i>	<i>Ligustici Rhizoma</i>	6
升麻	<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	4
白芷	<i>Angelica dahurica</i>	<i>Angelicae dahuricae Radix</i>	4
桔梗	<i>Platycodon grandiflorum</i>	<i>Platycodi Radix</i>	4
총량			36

葛根解肌湯 10첩 분량 360 g을 증류식 약탕기 (CME 592, 미강기업, Korea)에 전탕 하였다. 전탕 후 얻어진 3 L를 rotary evaporator (Eyela N-11, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan)를 이용하여 30℃에서 감압농축 하여 750 mL를 얻었다. 葛根解肌湯의 농축액은 -70℃에서 하루 동안 동결시킨 뒤 동결건조기 (VFDT0005-3085, Biocros, Korea)를 이용하여 -70℃에서 동결건조 시켰다. 농축시 당도는 15.07brix 이고, 동결건조 후 무게는 76.21 g(수율 21.2%)으로 PBS에 녹여 2.5 μm와 0.45 μm의 membrane filter (Milipore Co., USA)로 여과하여 실험에 사용 하였다.

2) 실험동물

무균 환경에서 사육된 5주령의 수컷 ICR 마우스와 6주령의 암컷 마우스를 (주)오리엔트 (경기도 가평, 한국)에서 구입하여 각 실험에 사용하였다. 마우스는 사료와 물을 무제한으로 공급하

면서 실험 전 약 1주간 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 조명은 12시간씩 dark/light 주기로 실시하였고, 온도는 22±2℃, 습도는 55±2%를 유지하였다.

2. 방법

1) 비장세포 분리

마우스를 경추 탈골시킨 후 무균적으로 비장을 적출하여 주위 조직을 제거하였다. Slide glass로 부드럽게 압착하여 비장을 분쇄한 후 4℃ Hanks Balanced Salt Solution (GibcoBRL, NY, U.S.A)용액으로 2회 세척하였다. Ficoll-paque (Amersham Biosciences, Sweden)을 이용하여 1,800rpm 에서 30분 원심 분리하여 입과구 층을 수거한 후, RPMI 1640 (GibcoBRL, NY, U.S.A) media로 1회 더 세척하고 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 RPMI 1640에 현탁 시켰다. 현탁된 세포는 일정액을 취하여 0.4% trypan blue에 동량으로 혼합한 후 hemacytometer를 이용하여 세포수를 산정하였다.

2) 세포주 배양

마우스 대식세포 세포주 RAW 264.7 (America Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A)은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GibcoBRL, NY, U.S.A)에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (GibcoBRL, NY, U.S.A)과 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/mL penicillin, 50 μg/mL streptomycin (GibcoBRL, NY, U.S.A)을 첨가하여 100 mm dish에 80% 세포의 밀도를 유지하면서 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. Rat의 basophilic 세포주인 RBL-2H3 세포주는 RPMI 1640 Medium (GibcoBRL, NY, U.S.A)에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (GibcoBRL, NY, U.S.A)과 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/mL penicillin, 50 μg/mL streptomycin (GibcoBRL, NY, U.S.A)을 첨가하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

3) 비장세포의 증식능 측정

마우스 비장세포를 2×10⁶cells/mL 세포가 되게 세포수를 조정하여 96 well culture plate에 100 μL 분주한 다음 각 well에 시료를 농도별로 첨가한 후 37℃, 5% CO₂ incubator에 넣어 48시간 배양하였다. 배양 후 배양액 100 μL에 세포 증식능 시약을 20 μL를 첨가한 후 37℃, 5% CO₂ incubator에 1시간 30분 배양한 후 490 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 입과구 증식능을 측정하기 위해 CellTiter 96® Aqueous one solution cell proliferation assay kit (Promega, Madison, WI, U.S.A) 시약을 사용하였다.

4) β-hexosaminidase의 측정

RBL-2H3 세포를 수거하여 Tyroid buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.1mM MgCl₂, 11.9 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 5.6 mM glucose, PH 7.2)로 1회 세척하였다. 5×10⁵cells/mL 로 조절한 후 Tyroid buffer에서 부유시켰다. 부유된 세포에 농도별로 葛根解肌湯을 첨가하여 37℃ 배양기에서 15분간 반응시킨 후 compound 48/80 (1 mg/mL, Sigma, U.S.A)을 첨가하고 37℃ 배양기에서 20분간 반응시켰다. 배양 후 RBL-2H3 세포주를 4℃에서 10분간 방치하여 반응을 종결시키고 상층액을

회수하였다. 상층액에 동량의 1 mM p-nitrophenyl- β -acetyl-glucosamide를 넣고 37°C 배양기에서 1시간 동안 반응시킨 후 2배량의 sodium bicarbonate (PH 10.2)의 첨가로 반응을 종결시키고 407 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. β -hexosaminidase의 분비지표(release index)는 다음과 같이 계산하였다.

β -hexosaminidase release index

$$= \frac{\text{O.D at 470nm of sample}}{\text{O.D at 470nm of positive control}} \times 100$$

5) Histamine의 측정

RBL-2H3 세포를 수거하여 Tyroid buffer(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.1 mM MgCl₂, 11.9 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 5.6 mM glucose, PH 7.2)로 1회 세척하였다. 세포수를 5×10⁵cells/ml 로 조절한 후 Tyroid buffer에서 부유시켰다. 부유된 세포에 농도별 葛根解肌湯을 첨가하여, 37°C 배양기에서 15분간 반응시킨 후 compound 48/80 (1 mg/ml, Sigma, U.S.A)를 첨가하고 37°C 배양기에서 20분간 반응시켰다. 배양 후 RBL-2H3 세포주를 4°C에서 10분간 방치하여 반응을 종결시킨 후 상층액을 회수하였다. Histamine의 정량은 Shore가 보고한 fluorometer를 이용한 측정방법을 사용하였다. 간단히 설명하면, 회수한 상층액 1 ml에 0.2 ml의 1 N NaOH, 0.1 ml의 1% OPA (o-phthalaldehyde)를 첨가하고 실온에서 5분간 방치하였다. 여기에 1 N HCl 0.2 ml 첨가하여 반응을 종결시킨 다음, fluorometer (Genios, Tecan, Austria)를 사용하여 360 nm의 excitation 파장과 450nm의 emission 파장을 사용하여 측정하였다.

6) Nitric oxide 측정

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로써 Griess (Sigma)시약을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상층액 100 μ l와 Griess 시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H₂O) 100 μ l를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻의 농도는 sodium nitrite를 사용하여 만든 표준곡선에 의해 산출하였다.

7) RT-PCR을 이용한 iNOS 유전자 분석

RNA분리는 RNA-Bee (TEL-TEST, INC, U.S.A)를 이용하여 분리하였다. 마우스 비장세포에서 RNA를 분리하기 위하여 0.1% DEPC (diethyl pyrocarbonate)가 첨가된 PBS로 비장세포를 3회 세척 후 RNA-Bee 900 μ l를 첨가하여 균질화시켰다. 여기에 클로로포름 100 μ l를 넣고 15분간 얼음에 정치시켰다. 그 후 4°C, 12,000rpm에서 15분간 원심 분리하고 상층액을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 45분간 정치한 후 원심 분리하여, 70% DEPC-Ethanol로 1회 세척하였다. RNA를 실온에서 건조시킨 후 DEPC가 첨가된 증류수에 일정량 희석하여 spectrophotometer로 농도를 측정하였다. 5 \times RT buffer 2 μ l (10 mM dATP 0.25 μ l, 10 mM dGTP 0.25 μ l, 10 mM dTTP 0.25 μ l, 10 mM dCTP 0.25 μ l, MMLV reverse transcriptase (200

U/ μ l) 0.25 μ l, RNase inhibitor (28 U/ μ l) 0.25 μ l, 50 uM oligo dT primer 0.5 μ l, DEPC-distilled water 4 μ l)를 PCR tube에 넣어 42°C에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였다. PCR은 10 \times PCR buffer 3 μ l (25 mM MgCl₂ 1.8 μ l, 10 mM dATP 0.3 μ l, 10 mM dGTP 0.3 μ l, 10 mM dTTP 0.3 μ l, 10 mM dCTP 0.3 μ l, 50 uM sense 및 antisense primer 0.25 μ l, Tag polymerase (5 U/ μ l, Promega Co.) 0.25 μ l)를 혼합하고, 여기에 증류수로 최종 부피가 20 μ l 되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 산물을 5 μ l 첨가하여 혼합한 뒤 PCR 장치에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 94°C에 3분간 1 cycle 반응 후 94°C 45초, 57°C 45초, 72°C 45초간 35 cycle 반응시켰으며, 72°C에서 10분간 extension을 시행한 후 반응을 완료시켰다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에 전기 영동하여 Gel Doc (Bio Lad, Italy)를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이오니아사 (Bioneer Co, Choongbook)에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 아래 Table 2와 같다.

Table 2. Primer sequences of iNOS gene expression

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

8) Western blotting을 이용한 iNOS 단백질 발현 분석

세포를 차가운 PBS로 3회 수세한 다음 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 10 μ g/ml leupeptin, 2 mM PMSF, 2 μ g/ml aprotinin 10 μ g/ml Na₃VO₄, 10 μ g/ml Na₅P₂O₇)를 가하여 (100 μ l/1×10⁶cells) 균질화하고 단백질을 추출한 다음 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 모았다. BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, U.S.A)로 정량한 후 동일량의 단백질 (30 또는 40 μ g)을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, nitrocellulose membrane (NC, Schleicher & Schuell BioScience, Germany)에 transfer하였다. 이 NC를 3% non-fat dry milk를 함유한 Tris buffered saline-Tween (TBS-T; 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 1시간 동안 반응 시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단하고 anti-iNOS 항체와 반응시킨 후 2차 항체인 anti-mouse IgG로 1시간 30분 반응시켰다. 각 반응 사이에 TBS-T로 10분씩 3회 30분 동안 수세하였다. 이어서 항체에 대한 대응 단백질 band를 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK) detection 방법으로 확인하였다.

9) compound 48/80 에 의한 전신성 아나필락시스 측정

비만세포의 탈과립제로 compound 48/80 8 mg/kg을 생쥐의 복강 내에 주사하였으며, 葛根解肌湯을 1, 20, 40, 80 및 100 mg/mouse 용량으로 compound 48/80 주사 1시간 전에 경구 투여하였다. 치사율 실험은 아나필락시스 쇼크를 유발시킨 후 1시간 동안 관찰하였다.

결 과

1. 비장세포 증식능에 미치는 영향

葛根解肌湯이 면역계에 미치는 영향을 조사하기 위하여 마우스 비장세포 증식능에 미치는 효과를 관찰하였다. 葛根解肌湯 열수추출액을 농도별(100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 분리된 마우스 비장세포에 처리하여 24시간, 48시간 세포 증식능을 관찰하였다. 그 결과 24시간 배양시 마우스 비장세포의 증식능은 葛根解肌湯 처리 농도에 따라 0.164 ± 0.006 , 0.169 ± 0.007 , 0.174 ± 0.002 및 0.191 ± 0.001 로 대조군 0.13 ± 0.003 에 비해 유의한 세포 증식능이 관찰되었다. 48시간 배양시 마우스 비장세포의 증식능은 葛根解肌湯 처리 농도에 따라 0.153 ± 0.005 , 0.159 ± 0.003 , 0.189 ± 0.004 , 0.19 ± 0.004 로 유의한 세포 증식능을 보였다(Fig. 1).

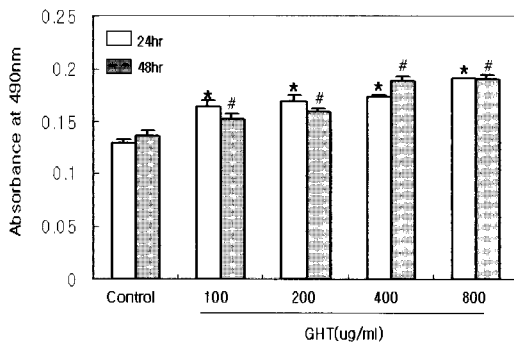


Fig. 1 Effect of on the cell proliferation in mouse spleen cells. Mouse spleen cells (2×10^6 cells/ml) were cultured with 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Galgeunhaegi-tang(GHT) for 24hr and 48hr. Control group was incubated with RPMI1640 medium only. Result are expressed as means + S.D.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

2. RBL-2H3 세포에서 β -hexosaminidase 분비억제에 미치는 영향

葛根解肌湯의 항알러지 효과를 살펴보기 위해 비만세포나 호염구 세포의 분비과립에 초래하는 β -hexosaminidase 분비에 미치는 영향을 RBL-2H3 basophilic 세포주에서 관찰하였다. RBL-2H3 세포에 탈과립을 유도하기 위하여 세포내 칼슘 유입을 증가시켜 세포내 탈과립을 유도할 수 있는 compound 48/80을 사용하였다. 실험결과, compound 48/80 자극에 의한 β -hexosaminidase 분비가 compound 48/80 단독처리 $50.4 \pm 0.9\%$ 에 비해 葛根解肌湯 처리시 농도별에 따라 44.7 ± 1 , 43.6 ± 1.1 , 40.1 ± 0.6 , $31.6 \pm 2.2\%$ 로 유의하게 β -hexosaminidase 분비가 억제되었다(Fig. 2).

3. RBL-2H3 세포에서 Histamine 분비억제에 미치는 영향

葛根解肌湯의 항알러지 효과를 살펴보기 위해 알레르기 반응의 원인세포로 알려진 비만세포나 호염구 세포의 분비 과립에 존재하는 histamine의 분비에 미치는 영향을 RBL-2H3 basophilic 세포주를 이용하여 관찰하였다. RBL-2H3 세포에 탈과립을 유도하기 위해 compound 48/80을 사용하였다. 실험결과, compound 48/80 자극에 의한 histamine 분비가 compound 48/80 단독처리 $66.5 \pm 0.7\%$ 에 비해 葛根解肌湯 처리에 의해 histamine 분비가

63.2 ± 3.3 , 60.2 ± 1.3 , 57.6 ± 0.6 , $59.5 \pm 0.3\%$ 의 결과를 보였으며 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의하게 억제 되었다(Fig. 3).

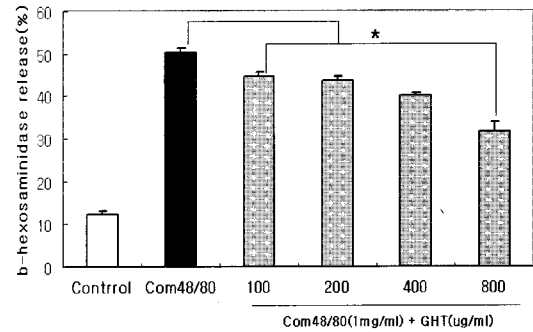


Fig. 2. Inhibitory effect of Galgeunhaegi-tang(GHT) on the β -hexosaminidase released from RBL-2H3 cells by compound 48/80. β -hexosaminidase release (%) induced by compound 48/80. All values are means \pm S.D. from three experiments. * significant difference from compound 48/80 alone (P<0.05)

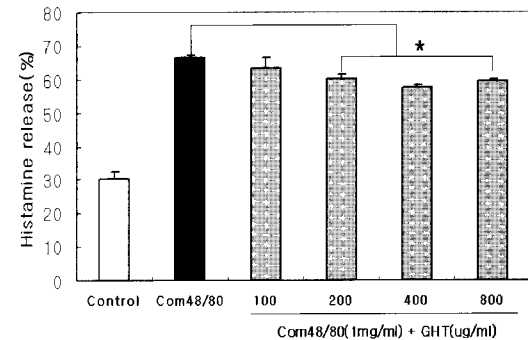


Fig. 3. Inhibitory effect of Galgeunhaegi-tang(GHT) on the histamine released from RBL-2H3 cells by compound 48/80. Results were expressed as % release of histamine. All values are means \pm S.D. from three experiments. * significant difference from compound 48/80 alone (P<0.05)

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

葛根解肌湯의 항염증성 효과를 관찰하기 위해 LPS로 자극된 RAW 264.7 마우스 대식세포주를 이용하여 NO 생성 조절에 미치는 영향을 조사하였다. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 유도된 NO 생성 $38.2 \pm 0.47(\mu\text{M}/\text{ml})$ 은 葛根解肌湯의 처리 농도별에 33.8 ± 0.47 , 34.9 ± 0.48 , 22.6 ± 0.2 , $10.5 \pm 0.13(\mu\text{M}/\text{ml})$ 으로 유의하게 억제되었다(Fig. 4).

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

葛根解肌湯에 의한 RAW 264.7 마우스 대식세포에서 NO 생성의 억제가 iNOS mRNA 유전자 발현 및 iNOS 단백질 발현과의 관련성을 조사하기 위해 RAW 264.7 마우스 대식세포주에 LPS와 葛根解肌湯을 처리한 후 iNOS mRNA 유전자 발현과 iNOS 단백질 발현을 RT-PCR 과 Western blotting 으로 관찰하였다. 실험결과, LPS 단독 처리시 iNOS mRNA 유전자 발현이 강하게 유도됨이 관찰되었으며, 이러한 유전자 발현은 葛根解肌

湯 처리에 의해 감소됨이 관찰되었으며, iNOS 단백질 발현 또한 葛根解肌湯 처리에 의해 감소됨이 관찰되었다(Fig. 5, 6).

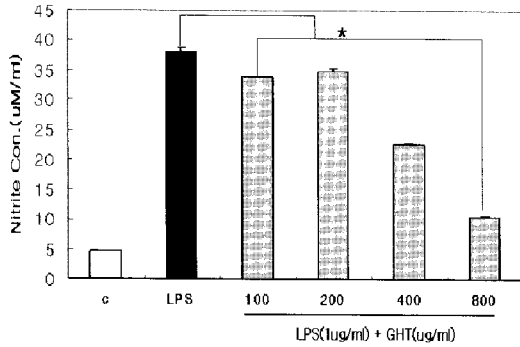


Fig. 4. Effect of Galgeunhaegi-tang(GHT) on production by LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with lipopolysaccharide (LPS; 1 µg/ml) for 24hr in the presence or absence of GHT at indicated doses. The amount of NO released by cells were measured by the method of Griess. All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

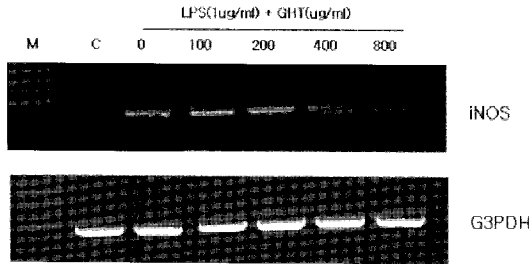


Fig. 5. Effect of Galgeunhaegi-tang(GHT) on iNOS mRNA expression by LPS-stimulated with LPS (1 µg/ml) in the presence or absence of various concentration of GHT for 24hr. After stimulation, total RNA was isolated from cultured cells using RNA-Bee and RT-PCR performed. G3PDH was used control genes. M: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

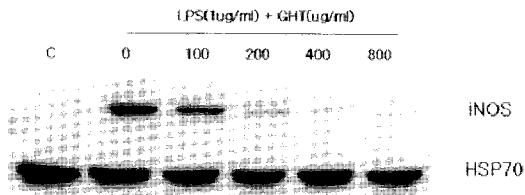


Fig. 6. Effect of Galgeunhaegi-tang(GHT) on iNOS protein expression by LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS; 1 µg/ml) in the presence or absence of various concentration of GHT for 24hr. The protein extracts were prepared, and the samples analyzed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

6. Compound 48/80 에 의해 유도된 아나필락시스 반응에 미치는 영향

葛根解肌湯의 즉시형 과민반응에 미치는 영향을 조사하기 위해 비면역학적 자극물질인 compound 48/80을 사용하여 전신성 아나필락시스를 유도후 치사율을 관찰하였다. compound 48/80을 복강에 투여 후 치사율을 관찰한 결과, 생리식염수를 경구 투여한 대조군은 100% 치사율이 관찰되었다. 그러나 compound 48/80 복강투여 1시간 전 葛根解肌湯을 1, 20, 40, 80, 100(mg/mouse)를

경구 투여군에서는 40, 80 mg/mouse 에서 80% 치사율과 100 mg /mouse에서 치사율이 60%로 감소되었다(Table 3).

Table 3. Compound48/80-induced systemic anaphylaxis

Dose(mg/mouse)	compound 48/80(8 mg/kg)	Mortality(%)
Saline	+	100
GHT	+	100
	20	100
	40	80
	80	80
	100	60
	100	0

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

고찰

서양의학에서 알레르기 鼻炎은 가장 흔한 아토피성 疾患으로 증상 발현의 시기에 따라 통년성과 계절성으로 구별하는데, 통년성 알레르기 鼻炎은 症狀이 특정한 季節에 국한되어 나타나지 않고 1년 내내 증상이 나타나거나 지속되는 경우를 말한다. 主要原因은 실내에 있는 알레르기 유발물질이다. 집먼지 진드기가 가장 중요한 알레르기 유발물질이고, 그 외 동물의 비듬, 바퀴벌레, 곰팡이 포자 등도 중요하다. 主要 症狀은 코가 가렵고, 발작적으로 재채기를 하며 물같이 맑은 콧물을 흘리고 때로는 코막힘을 호소한다. 症狀이 慢性的이고 持續的이어서 患者는 항상 입을 벌리고 호흡을 하거나, 코를 골거나 무비염염 또는 감기를 달고 산다는 표현을 하기도 한다. 코 이외에도 인후, 눈, 귀 등도 가려워 하며, 눈물을 흘리거나 눈가에 부종이 있다¹⁴⁾.

韓醫學에서 알레르기 鼻炎은 鼻飢, 噴涕, 鼻涕, 飢涕 등의 범주로 볼 수 있는데^{15,16)}, 『素問玄機原病式·六氣爲病編』¹⁷⁾에서는 “飢爲鼻出清涕也”, “涕, 鼻中因痒而氣噴作于聲也”라 하여 ‘飢’는 알레르기성 鼻炎의 水楊性 鼻漏의 症狀과 ‘涕’는 발작성 噴涕의 症狀과 유사하다. 그 發病 原因에 대해서는 歷代 醫家의 見解가 同一하지 않은데, 內經時代와 金元時代에서는 주로 ‘火熱’과 肺氣와의 關係를 언급하였으며, 明代前後로부터는 風寒邪가 皮毛, 鼻竅로의 侵入과 肺氣와의 關係를 主要 原因으로 보고 있다. 또 風寒邪가 시간이 경과할 경우 鬱熱肺伏火邪, 內化變發의 病理變化가 發生한다고 하였다^{15,16)}.

太陰人 葛根解肌湯을 構成하고 있는 각 藥物들의 效能을 살펴 보면, 葛根은 陽明經의 邪를 升散시켜 胃氣를 動하게 하고 止渴生津하며 辛涼解肌 透疹止瀉하고, 黃芩은 肺熱을 清하며 陽明經 以外의 中上焦에 있는 實火와 濕熱을 瀉하고, 藁本是 祛風寒 濕하고 發散風寒하여 治 頭項顛頂痛하고, 桔梗은 開提氣血하면서 表散寒邪하고 胸膈心經之滯를 開하며 陽明邪熱이 더 이상 留滯할 수 없게 하며 清熱開發和解 開宣肺氣 祛痰 하고, 升麻는 手足太陰陽明經의 鬱火를 升散시켜 氣血의 通行之路를 열어주며, 白芷는 散風除濕하며 解表之力을 더하고 肺 胃 大腸經의 餘邪를 清提하는 效能이 있다¹⁸⁻²⁰⁾.

그동안 葛根解肌湯에 대한 實驗的 研究로는 禹²¹⁾는 葛根解

肌湯이 免疫機能을 充進시키는 效能이 있다고 報告하였고, 韓²²⁾은 細胞性 免疫을 增加시키는 效果가 있음을 報告 하였으며, 李²³⁾는 鎮痛, 鎮靜, 抗痙攣作用이 있다고 보고 하였다.

본 연구에서는 葛根解肌湯의 항알레르기 효과를 조사하기 위해 葛根解肌湯이 정상면역세포에 미치는 영향, 알레르기 반응의 주요 세포인 비만세포 및 호염구에서 알레르기 반응 시 탈과립 지표로 알려진 β -hexosaminidase 및 histamine 분비 억제에 미치는 영향, 비면역자극제인 compound 48/80 자극에 의한 Anaphylactic shock에 미치는 영향, RAW264.7 대식세포주를 이용한 염증반응과 관련된 Nitric Oxide 생성 및 조절기전에 미치는 영향등을 관찰하였다.

비장세포는 2차 면역장기로 대식세포와 많은 적혈구로 구성되어 있고 노화된 적혈구가 파괴되고 제거되는 곳으로 면역반응에 중요한 역할을 하는 곳으로 알려져 있다³³⁾. 따라서 본 실험에서는 소아 알레르기성 鼻炎에 대응되는 葛根解肌湯을 시간별(24시간, 48시간) 농도별(100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 마우스 비장세포에 증식에 미치는 영향을 관찰하였다. 실험 결과 처리시간 24시간에서는 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군에 비해 세포증식능이 유의성 있게 증가하였고, 48시간 배양시 마우스 비장세포의 증식능은 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의한 세포 증식이 관찰되었다. 이는 葛根解肌湯이 면역 세포를 활성화하여 주로 기능이 저하되고 허약한 太陰인에게 사용됨으로 저하된 기능을 강화 시켜 줄 수 있음을 알 수 있었다.

염증반응에 관여하는 면역세포로는 대식세포, 비만세포, 호염구등이 알려져 있지만 특히 알레르기 염증반응의 대표적인 세포로는 비만세포와 호염구가 알려져 있다^{24,27,42)}. 비만세포는 즉시형 과민 반응에서 일어나는 염증 반응에서 핵심적인 역할을 수행할 뿐 아니라 그 외 다른 염증 과정이나 생리적인 면역의 진행과 조절에 주도적인 역할을 하고 있음이 알려져 있다^{25-26,28,42)}. Histamine 과 β -hexosaminidase는 이들 세포에서 탈과립의 지표로 알려져 있어 알레르기 억제물질의 생물활성 측정에 유용하게 사용되고 있다^{24,28,39,41)}. 본 연구에서는 Rat 점막 비만세포와 상동성이 높은 Rat RBL-2H3 basophilic leukemia 세포주인 RBL-2H3 세포주를 지시세포로 사용하여 비만세포의 탈과립을 유도하는 compound 48/80을 사용하여 탈과립을 유도 하였다. compound 48/80은 비만세포내로 칼슘 유입을 증가시켜 세포내 칼슘 수준을 증가시키고 세포내 cAMP phosphodiesterase를 활성화시켜 세포내 cAMP 수준을 감소시킴으로써 비만세포의 탈과립을 일으키는 비면역학적 자극제로 알려져 있다^{26,27)}. compound 48/80은 고농도에서 비만세포로부터 약 90%의 히스타민을 유리시키는 것으로 알려져 있으며 적당량의 compound 48/80은 아나필락시스의 기전을 연구하기 위한 히스타민 유리 촉진제로서 사용되고 있다^{26,36,42)}. 따라서 본 실험에서는 葛根解肌湯의 항알레르기 효과를 알아보기 위해 RBL-2H3 세포주에 비면역자극제인 compound 48/80로 자극 후 이들 세포의 분비과립에 존재하는 β -hexosaminidase와 histamine 분비에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과, β -hexosaminidase 분비가 葛根解肌湯 처리시 농도 모두에서 유의하게 억제됨이 관찰 되었으며, histamine 분비 또한 처

리시 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의하게 억제됨이 관찰 되었다. 이러한 결과는 葛根解肌湯이 비만세포의 탈과립으로 촉발되는 알레르기 염증질환에 매우 효과적일 것이라는 것을 시사하였다.

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

알레르기는 발생기전에 따라 I-IV 형으로 나누는데 제 I형 과민 면역반응의 특징은 감각된 개체가 동일한 항원에 다시 노출되면 즉시 알레르기 반응이 일어나는데 이러한 반응을 아나필락시스라 한다^{27,38)}. I형 알레르기의 대표적 반응인 전신 아나필락시스 쇼크는 비만세포의 세포질에 칼슘농도를 증가시켜 histamine을 유리하는 물질인 compound 48/80을 복강 내 주입하여 비만세포의 탈과립을 유도하면 제 I형 알레르기는 순간적인 histamine 방출에 의해서 혈관 확장되어 저혈압 등으로 사망을 유발시키는 것으로 알려져 있다. In vivo에서 葛根解肌湯의 아나필락시스 쇼크에 미치는 효과를 살펴보기 위해 비면역학적 자극물질인 compound 48/80을 사용하여 전신성 아나필락시스를 유도 후 치사율을 관찰한 결과, 대조군은 100% 치사율이 관찰되었다. 葛根解肌湯을 1, 20, 40, 80, 100(mg/mouse)를 경구 투여군에서는 40, 80 mg/mouse 에서 80% 치사율과 100 mg/mouse 에서 치사율이 60%로 감소되었다. 따라서 葛根解肌湯이 아나필락시스 쇼크에 효과가 있음이 입증되었다.

이상의 결과는 葛根解肌湯이 항알레르기 및 항염증효과가 알레르기 반응 시 비만세포 세포의 탈과립 지표로 알려진 β -hexosaminidase 및 histamine 분비 억제, 염증반응과 관련된 NO 생성 조절등이 관여됨이 관찰되었으며 추후 葛根解肌湯의

항알레르기 및 항염증에 효과적인 활성물질의 분리 정체가 수행된다면 새로운 항알레르기성, 항염증성 기능 물질로 이용될 수 있을 것이라 생각한다.

결론

葛根解肌湯의 항알레르기 효과를 관찰하기 위하여 葛根解肌湯이 정상세포의 증식에 미치는 영향, 알레르기 반응의 주요 세포인 비만세포와 상동성이 높은 RBL-2H3 basophilic leukemia 세포주를 이용하여 이들 세포의 탈과립 지표로 알려진 β -hexosaminidase 및 histamine 분비 억제에 미치는 영향, 비면역 자극제인 compound 48/80 자극에 의한 Anaphylactic shock에 미치는 영향, RAW264.7 대식세포주를 이용하여 염증반응과 관련된 NO 생성 및 조절기전에 미치는 영향 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

葛根解肌湯이 정상면역세포에 미치는 영향을 살펴보기 위해 2차 면역장기인 비장의 세포증식능을 조사한 결과, 葛根解肌湯을 처리에 의해 비장세포증식능이 유의성 있게 증가되었다. 葛根解肌湯의 항알레르기 효과를 측정하기 위하여 비만세포의 탈과립을 일으키는 비면역학적 자극제인 compound 48/80을 사용 β -hexosaminidase 분비에 미치는 영향을 관찰한 결과, 葛根解肌湯의 처리에 의해 β -hexosaminidase 분비가 유의하게 억제되었다. 葛根解肌湯의 항알레르기 효과를 측정하기 위하여 비만세포의 탈과립을 일으키는 비면역학적 자극제인 compound 48/80을 사용 Histamine 분비에 미치는 영향을 관찰한 결과, 葛根解肌湯의 처리에 의해 Histamine 분비가 유의하게 억제되었다. 葛根解肌湯의 항염증 효과를 관찰하기 위해 급·만성 염증시 과도한 생성되는 NO 조절에 미치는 영향을 조사한 결과 葛根解肌湯이 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 유도된 NO 생성을 유의하게 감소되었으며 iNOS mRNA 유전자 발현 및 iNOS 단백질 발현 또한 억제시켰다. 葛根解肌湯의 아나필락시스 쇼크에 미치는 효과를 살펴보기 위해 비면역학적 자극물질인 compound 48/80을 사용하여 전신성 아나필락시스를 유도 후 치사율을 관찰한 결과 대조군에 비해 감소되었다.

이상의 결과로 보아 葛根解肌湯은 알레르기 반응 세포의 탈과립 지표인 β -hexosaminidase 및 histamine 분비 억제와 염증반응과 관련된 NO 생성 억제를 통해 염증과 관련된 알레르기 질환에 유용하게 사용될 수 있을 것이라 생각되며, 추후 葛根解肌湯의 항알레르기 및 항염증에 효과적인 활성물질의 분리 정체가 수행된다면 새로운 항알레르기성, 항염증성 기능 물질로 이용될 수 있을 것이라 사료된다.

참고문헌

1. 의학교육연수원편. 가정의학. 서울, 서울대학교출판부, pp 945-955, 2001.
2. Schultz-Larsen, F., hanifin, J.M. Epidemiology of atopic dermatitis. Immunol Allergy Clin North Am 22: 1-24, 2002.
3. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic dermatitis: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering committee. Lancet 351(9111):1225-1232, 1998.
4. Inagaki, N., Nagai, H. Drugs for the treatment of allergic disease. Jpn J Pharmacol. 86: 257-280, 2001.
5. 張介賓. 類經. 34(上). 418(下1). 서울, 대성문화사, p 28, 1986.
6. 旺機. 黃帝內經素問今譯. 서울, 성보사, p 8, 125, 146, 412, 1995.
7. 최승훈. 내경병리학, 서울, 통나무, p 223, 229, 1993.
8. 김경요. 난치병과 면역 그 사상의학적 접근, 사상의학회지 7(2):113-128, 1995.
9. 은재순, 이동희, 전용근, 권영안, 권진. 加味清鼻飲이 免疫反應에 미치는 影響, 동의생리병리학회지 18(5):1391-1396, 2003.
10. 김진정, 양성완, 손낙원, 안규석. 加味生料四物湯의 抗炎症效果와 止痒膏의 아토피皮膚炎손상 및 止痒效果에 미치는 影響. 동의생리병리학회지 17(3):428-435, 2003.
11. 이건호, 방상용, 류종훈. 黃連解毒湯의 항알레르기 효과. 서울 경희대학교대학원 석사학위논문, 2004.
12. 이제마. 東醫壽世保元. 서울, 행림출판사, pp 112-113, 120, 123, 1986.
13. 송일병. 알기쉬운 사상의학. 서울, 하나미디어, p 221, 1993.
14. 이해자, 박은정. 알레르기성 鼻炎의 임상적 연구. 대한한방소아과학회지 15(2):167-175, 2001.
15. 김윤자, 김장현. 알레르기성 鼻炎에 관한 文獻의 考察. 대한한방소아과학회지 10(1):17-34, 1996.
16. 양재하 외. Allergy성 비염에 대한 양·한방적 고찰. 제한동의학술원 논문집 4(1):436-448, 1994.
17. 유완소. 素問玄機原病式. 沈陽, 遼寧科學技術出版社, p 6, 1999.
18. 신민교. 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, pp 308-309, 368-369, 392-393, 463-464, 506-508, 513-514, 537-538, 540-541, 564-566, 1986.
19. 이상인. 本草學, 서울, 修書院, pp 174-175, 195-198, 222-224, 228-229, 295-297, 329-330, 338-339, 505-507, 1981.
20. 新文豐出版公司編. 新編中藥大辭典. 臺北, 新文豐出版公司, pp 113-116, 309-312, 574-577, 898-901, 1491-1492, 2092-2097, 2236-2239, 2401-2403, 2741-2743, 1982.
21. 우정순. 葛根解肌湯 마우스의 免疫反應에 미치는 영향. 대한한의학회지 11(2):180-201, 1990.
22. 한주석, 고병희, 송일병. 태음인 갈근해기탕이 면역방응 및 NK세포 활성도에 미치는 영향. 대한한의학회지 11(2):106-114, 1990.
23. 이준우. 太陰人 葛根解肌湯의 효능에 관한 실험적 연구. 사상 의학회지 2(1):123-133, 1990.
24. 최선필, 감미영, 남석현. 생화학, 분자생물학: 호염구세포주와 복강 비만세포에서 유색미 겨 추출물의 알레르기 염증 억제활

- 성. 한국응용생명화학회지(구 한국농화학회지) 48(4):315-321, 2005.
25. 조정제, 임강현. 사람 비만세포주에서 사이토카인발현에 대한 다엽 주성분 Epigallocatechin - 3 - Gallate 의 억제효과. 대한본초학회지(본초분과학회지) 16(2):57-63, 2001.
 26. 김성화, 김대근, 채병숙, 신태용. 원보: 비만세포 매개 즉시형 알레르기 반응에 대한 연명초의 억제 효과. 생약학회지 34(2):132-137, 2003.
 27. 박은수, 신민교, 송호준. 자작나무 및 벗나무 껍질추출물이 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구. 대한본초학회지(본초분과학회지) 13(2):57-68, 1998.
 28. Eun-Kyung Park, Min-Kyung Choo, Myung Joo Han, Dong-Hyun Kim. Ginsenoside Rh1 possesses antiallergic and anti-inflammatory activities Arch Allergy Immunol. 133(2):113-120, 2004.
 29. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지 39: 52-63, 1999.
 30. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide iosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life Sci. 69: 625-635, 2001.
 31. Roitt. 김주덕 의 譯. 로이트 필수면역학. 서울, 고문사, pp 35-62, 1991.
 32. 류혜숙, 김현숙. 생강 추출물 투여가 마우스 면역세포활성에 미치는 영향. 한국영양학회지 37(1):23-30, 2004.
 33. Young Sun Lee, Ok Kyung Han, Chan Woo Park, Tae Won Jeon, Wang Keun Yoo, Seong Ho Kim, Hyo Jung Kim. Pro-inflammatory cytokine gene expression and nitric oxide regulation of aqueous extraced Astragali radix in RAW 264.7 macrophage cells. Journal of Ethnopharmacology. 100: 289-294, 2005.
 34. 이영선, 이금홍, 김상찬, 권영규, 신상우. 건강 열수추출액이 Methotrexate에 의해 유도된 마우스 면역억제 조절에 미치는 영향. 대한동의생리병리학회지 20(4):896-901, 2006.
 35. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two b-carboline alkaloids extracted from Melia azedarach. Eur J Pharmacol 406: 301-309, 2000.
 36. Ikarashi, Y., Yuzurihara, M., Sakakibara, I., Takahashi, A., Ishimaru, H. and Maruyama, Y. Effects of an oriental herbal medicine, "Saiboku-to", and its constituent herbs on compound 48/80-induced histamine release from peritoneal mast cells in rats. Phytomedicine 8: 8-15, 2001.
 37. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Kwon, T.O., Yun, Y.G., Kim, N.Y., Chung, H.T. Inhibitory effects of methanol extract of Cyperus rotundus rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol 76: 59-64, 2001.
 38. Shin, H.Y., Yun, Y.B., Kim, J.Y., Moon, G., Shin, T.Y., Kim, H.S. and Kim, H.M. Inhibitory effect of mast cell-mediated acute and chronic allergic reactions by Dodutang. Immunopharmacol Immunotoxicol 24: 583-594, 2002.
 39. Shin, T.Y. and Lee, J.K. Effect of Phlomis umbrosa root on mast cell-dependent immediate-type allergic reactions by anal therapy. Immunopharmacol Immunotoxicol 25: 73-85, 2003.
 40. Daikonya, A., Katsuki, S. and Kitanaka, S. Antiallergic Agents from Natural Sources 9. Inhibition of Nitric Oxide Production by Novel Chalcone Derivatives from Mallotus philippinensis (Euphorbiaceae). Chem Pharm Bull. 52: 1326-1329, 2004.
 41. C. JcFowler, M. Sandberg and G. Tiger. Effect of water-soluble cigarette smoke extracts upon the release of β -hexosaminidase from RBL-2H3 basophilic leukaemia cells in response to substance P, compound 48/80, concanavalin A and antigen stimulation. Infalamm. res. 52: 461-469, 2003.
 42. Venarske, D., deShazo, R.D. Molecular mechanisms of allergic disease. South Med J. 96(11):1049-1054, 2003.