

피부세포에서 아토피 피부염의 유발과 관련된 PAR-2 및 사이토카인의 발현을 감소시키는 한약재 탐색

박선민* · 이정복¹ · 김다솔

호서대학교 자연과학대학 기초과학연구소 식품영양학과, 1: 소니메디(주)

Screening of Herbal Extracts to Reduce PAR-2 and Cytokine Expression Related to Atopic Dermatitis in Keratocytes

Sunmin Park*, Jung Bok Lee¹, Da Sol Kim

Department of Food and Nutrition, College of Natural Science, Basic Science Institutes, Hoseo University, 1: Sonimedi, Wonju-Si

The prevalence of atopic dermatitis has markedly increased in recent years but the mechanism has not been clearly revealed. Recent study exhibited that atopic dermatitis was exacerbated by the increase of proteinase-activated receptor (PAR)-2 expression, which activated I κ B kinase --> nuclear factor kappa B. Therefore, we determined whether the allergens of dust mites induced the expression of PAR-2, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, adhesion molecule), interleukins (IL)-6 in HaCaT keratocytes and which herbal 1,3-butylene glycol extracts (Mori Cortex Radicis, Sanguisorba officinalis L., Arctium lappa Linne, Torilis japonica DC, Melia azedarach Linne var. japonica Makino) suppressed their expression. Dust mite allergen increased PAR-2, ICAM-1 and IL-6 expression in HaCaT cells in a dose-dependent manner up to 3 μ g/mL but their expression reached the plateau over the dosages. The allergen (3 μ g/mL) also secreted more cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α and IL-6 into the media. Among five different herbal extracts (50 μ g/mL), Mori Cortex Radicis and Sanguisorba officinalis L. suppressed the PAR-2, ICAM-1 and IL-6 expression in HaCaT cells, which was activated by dust mite allergen (3 μ g/mL) and they also reduced the secretion of TNF- α and IL-6 into the media. In conclusion, Mori Cortex Radicis and Sanguisorba officinalis L. can effectively reduce the prevalence and progression of atopic dermatitis by dust mite allergen.

Key words : atopic dermatitis, PAR-2, cytokines, ICAM-1, HaCaT cells

서 론

아토피 피부염은 심한 가려움증을 나타내는 재발성 만성 피부염으로, 어린이의 약 10~15%가 아토피성 피부염을 가지고 있으며, 90%는 5년 내 저절로 호전되는 것으로 보고되어 있다¹⁾. 이러한 아토피 피부염은 성인기에는 대체로 호전되어 약 30~40%는 외관상으로 피부염이 재발되지 않으나, 나머지는 성인이 되어서도 피부 건조, 자극성 물질에 의한 피부자극, 주부습진 등의 피부염이 나타나는 것으로 알려져 있다. 또한, 민감성 피부의 경우, 수분 보유력 및 그 회복력이 낮고, 피부 각질화, 가려움증 등이 나타나기 쉽기 때문에 아토피성 피부염을 유발할 확률이 높다.

* 교신저자 : 박선민, 아산시 배방면 서출리 165, 호서대학교

· E-mail : smpark@hoseo.edu, · Tel : 041-540-5633

· 접수 : 2011/02/08 · 수정 : 2011/03/25 · 채택 : 2011/04/11

아토피 피부염의 정확한 병리 생리는 아직까지 완전히 이해되고 있지 않지만 유전적 소인과 함께 면역학적, 비면역학적 기전이 관여한다고 보고 있다²⁾. 아토피 피부염의 대부분을 차지하는 외인성 아토피 피부염은 면역 글로브린 E (IgE)와 연관된 면역 기전에 의해 발생되는데 특정 알러젠(allergen)에 대한 즉시형 면역 반응보다는 T세포 이상에 의한 지연성 면역 반응이 관여한다는 보고들이 많다. 또한, 요즘은 B세포로부터 IgE의 생성을 유도하는 interleukin (IL)-4 등 Th2 관련 사이토카인 (cytokine)들이 아토피 피부염의 원인이라고 보고되고 있다^{3,4)}. 그러므로 아토피 피부염의 가장 큰 문제는 면역 기능의 비정상적인 활성화로 염증 반응이 항진되어 사이토카인의 발생이 증가하는 것이다. 최근의 연구에서 피부세포막에 존재하는 단백질분해효소 활성화 수용체인 프로티네이즈-활성화 리셉터-2 (proteinase-activated receptor-2; PAR-2)의 발현이 증가하고 활성화되면 세포내의 I κ B

kinase (IKK) --> nuclear factor kappa B (NF-κB)의 기전을 활성화시켜 염증 반응을 증가시키고 그 결과 다양한 염증 물질인 사이토카인 (tumor necrosis factor (TNF)-α, IL-6, IL-10)과 cyclooxygenase (COX)-2, cytokine-inducible nitric oxide synthases (iNOS), adhesion molecules의 발현을 증가시켜 아토피 피부염을 악화시키는 것이 보고되었다^{5,6)}. 즉, PAR-2 활성화는 피부염증과 색소침착, 간지러움 등을 유발하므로 이것을 억제하는 것이 아토피 피부염의 호전에 도움이 될 것으로 사료된다. 최근 연구에 따르면 PAR-2 억제제가 임상에서 국소도포제로 사용하였을 때 아토피 피부염을 임상적으로 호전시킨다는 것이 보고되어서⁷⁾, PAR-2 억제제가 국소도포제로 개발될 수 있는 가능성이 높다.

이러한 아토피 피부염을 치료하기 위하여, 종래 세라마이드, 리놀레산, 식물유 또는 광물성 오일 등의 성분들, 하이드로코르티손 (hydrocortisone) 등의 스테로이드 (steroid) 제제 또는 이들에 항균 및 항염 기능을 강화한 물질, 자외선 요법을 통한 DNA 합성 억제제, 세포 과증식 억제제, 염증 및 가려움증 억제제 등이 제안된 바 있다. 그러나, 상기 스테로이드 제제는 표피의 성장억제나 부작용 등의 역효과를 유발할 수 있으며, 우레아 퍼록사이드 등은 피부의 과다 자극을 야기할 수 있고, 항히스타민제 등의 항생물질은 균의 내성 및 광과민 등의 부작용을 유발할 가능성이 높은 문제점이 있다⁸⁾. 이에 최근에는 아토피 피부염에 효과를 갖는 천연물질을 탐색하는데 초점을 맞추고 있다. 대표적으로, 감잎, 신나무 잎, 마황, 자초, 상황버섯, 참소리쟁이 물 추출물 등이 효과가 있다고 알려졌지만 아직까지 그 기전이 알려지지 않은 상태⁹⁻¹⁴⁾. 그러므로 본 연구에서는 피부 세포인 HaCaT cell line에서 집먼지진드기 추출물이 PAR-2의 발현과 IKK-->NF-κB의 기전의 활성화의 결과인 사이토카인의 발현을 증가시키는 지를 조사하고 한약재중 상백피, 지유, 천련자, 사상자, 우방자의 1,3-butylene glycol 추출물이 PAR-2의 발현을 억제하는 지를 조사하여 아토피 피부염의 억제에 효과적인 한약재를 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 추출물 제조

상백피 (Mori Cortex Radicis), 지유 (Sanguisorba officinalis L.), 우방자 (Arctium lappa Linne), 사상자 (Torilis japonica DC.), 천련자 (Melia azedarach Linne var. japoinka Makino)는 각각 1kg에 1,3-butylene glycol을 300 g 넣고 60도에서 2시간 초음파 추출기 (소니메디, 원주)로 추출한 후 여과하여 제조하였다. 이 한약재는 모두 광명당제약 (울산)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) HaCaT cell 배양 및 약물처리

피부 세포를 cell line으로 만든 human keratocytes인 HaCaT cells을 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml

penicillin 와 100 μg/ml streptomycin/penicilin을 포함하는 RPMI media에서 배양하였다. HaCaT cell은 suspension cell이어서 특정 assay를 하기 전에는 plate 바닥에 세포를 고정시키는 것이 필요하므로 세포를 고정시키기 위한 Matrigel Basement Membrane Matrix (BD, Franklin Lakes, NJ)를 도포한 12 well plate에 1 x 10⁶ 세포를 옮겨 배양하였다. 12 well plate로 옮긴 지 2일 후 0.2% (w/v) BSA를 첨가한 FBS-free RPMI으로 바꾸어 주고 이때 실험하고자하는 집먼지진드기 추출물 (연세대 의용절지 동물소재은행, 서울)이나 한약재 추출물을 첨가하여 8시간 동안 배양하였다. 직후에 각각의 well에 미디어에 처리한 것과 같은 것을 함유한 Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) buffer (115 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.28 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 8.4% NaHCO₃, (wt/vol), 1 mg/mL BSA, pH 7.2)으로 바꾸어 주었다. 2시간 동안 배양한 후 각각의 well로 부터 KRB 용액을 수집하고, 모든 KRB 용액내의 inflammatory cytokines인 TNF-α와 IL-6의 농도를 ELISA kits (R&D system, Minneapolis, MN)로 측정하였다. KRB 용액을 제거한 후 세포는 PBS로 세척한 후 total RNA를 추출하였다.

2) 세포내 mRNA의 발현 측정

HaCaT 세포에서 total RNA를 Trizol reagent (Gibco-BRL, Rockville, MD)로 추출하고 isopropyl alcohol로 침전시켜 분리하였다. 분리한 total RNA에 올리고 dT primer, superscript III reverse transcriptase, Taq DNA polymerase를 첨가하여 cDNA를 제작하였다. 제작한 cDNA에 sybergreen mix (BioRad, Richmond, CA)와 측정하고자 하는 특정 유전자의 primer를 혼합하여 realtime PCR 기기 (BioRad, Richmond, CA)로 유전자 발현을 측정하였다. Real-time PCR의 조건은 94℃에서 15초, 60℃에서 15초 및 72℃에서 33초 40 cycle을 수행하였다. 증폭산물의 특이적 반응은 녹는점을 확인하였으며, housekeeping gene으로는 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 이용하였으며 이 유전자를 기준으로 대조군과 대비하여 특정 유전자의 발현 정도를 산출하였다. 측정하고자 하는 유전자는 PAR-2, IL-6, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, 와 GAPDH이었고 이들의 primer는 mRNA와 genomic DNA로부터 생성된 생성물들을 구분하기 위해서 적어도 하나의 인트론이 끼워지도록 지도로 제작하였다. 이 유전자들의 primer 배열은 다음과 같았다.

PAR-2 forward 5'-GAAGCCTTATTGGTAAGGTTG-3',

reverse 5'-CAGAGAGGAGGTCAGCCAAG;

ICAM-1 forward 5'-CTGGCAGACGAGAAGGTGGT-3',

reverse 5'-GCTCGCTCAGGGTCAGGTT-3';

IL-6 forward 5' -GGTACATCCTCGACGGCATCT-3 ';

reverse primer:

5' -GT GCCTCTTTGCTGCTTTCAC-3 ';

GAPDH forward 5'-CTCCACTCACGGCAAATTCAAC-3 ';

reverse 5'-ACTCCACGACATACTCAGCACC-3 ';

3. 통계처리

모든 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 통계처리는 SAS 통계분석 프로그램으로 분석하였다. 통계적 유의성은 one-way 분산 분석 (ANOVA) 방법으로 통계처리하였다. 군들 사이에 유의적 차이가 있을 경우 Tukey test로 군들 사이에 차이를 측정하였다. 통계적 유의성은 P<0.05로 정하였다.

결 과

1. 집먼지진드기 알러젠의 PAR-2, ICAM-1과 IL-6 발현

집먼지진드기 알러젠 0, 0.3, 3, 30, 300 µg/mL를 HaCaT cell에 첨가한 후 세포내에 PAR-2의 발현과 adhesion molecule의 하나인 ICAM-1과 사이토카인의 하나인 IL-6의 발현을 측정하였을 때 PAR-2, ICAM-1, IL-6의 발현이 용량 의존적으로 3 µg/mL까지 증가하고 3 µg/mL 보다 높은 농도에서는 차이가 없었다 (Fig. 1A). 또한, 미디어로 분비된 사이토카인인 TNF-α와 IL-6의 농도도 집먼지진드기 알러젠 3 µg/mL까지는 용량 의존적으로 증가하였고 그 보다 높은 농도에서는 더 이상 증가하지 않았다 (Fig. 1B).

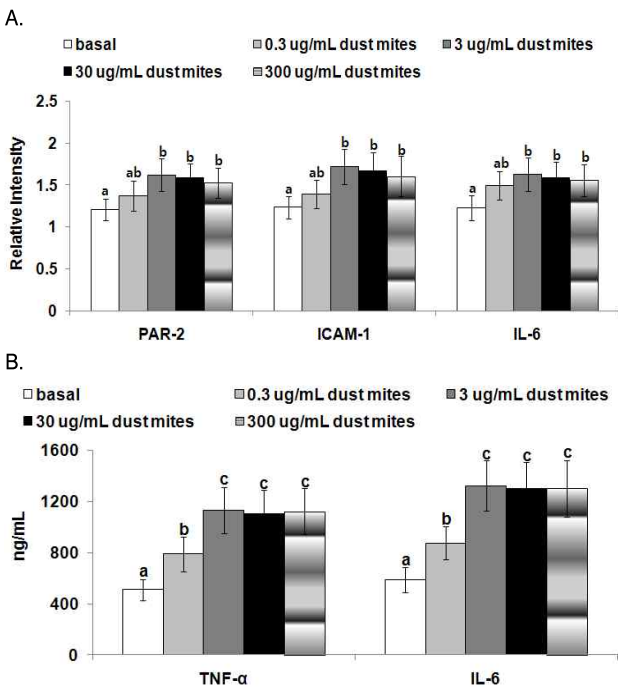


Fig. 1. Cellular PAR-2, ICAM-1 and IL-6 expression (A) and cytokine release into the media (B) by different dosages of dust mites allergens in human HaCaT cells. The HaCaT cells were treated with different dosages of dust mite allergens (0, 0.3, 3, 30, and 300 µg/mL) for 8 hours and proteinase-activated receptor-2 (PAR-2), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), and interleukin-6 (IL-6) expression was measured by realtime PCR in the cells. The levels of cytokines, tumor necrosis factor-α (TNF-α) and IL-6 released to the media were also determined. ^{a,b,c}Means on the bars with different superscripts were significantly different at p<0.05.

2. 한약재 추출물의 PAR-2, ICAM-1과 IL-6 발현 억제

상백피, 지유, 우방자, 사상자, 천련자의 1,3-butylene glycol 추출물을 5 µg/mL를 처리하였을 때는 1,3-butylene glycol을 처리한 대조군과 세포내에 PAR-2, ICAM-1과 IL-6의 발현에 통계

적으로 유의한 차이가 없었다 (no data shown). 그러나 HaCaT 세포에 첨가하는 상백피, 지유, 우방자, 사상자, 천련자의 1,3-butylene glycol 추출물을 50 µg/mL로 증가시켰을 때 상백피와 지유가 대조군에 세포내의 PAR-2 발현을 저해하였으며 이와 함께 ICAM-1과 IL-6 발현을 억제하였다(Fig. 2A). 이들은 집먼지진드기 알러젠을 처리하지 않은 군과도 유사하게 억제되었다. 또한, 집먼지진드기 알러젠을 처리한 군들에서 상백피와 지유 추출물을 처리한 군들이 대조군에 비해 미디어로 분비하는 사이토카인인 IL-6와 TNF-α의 발현을 억제시켰다(Fig. 2B).

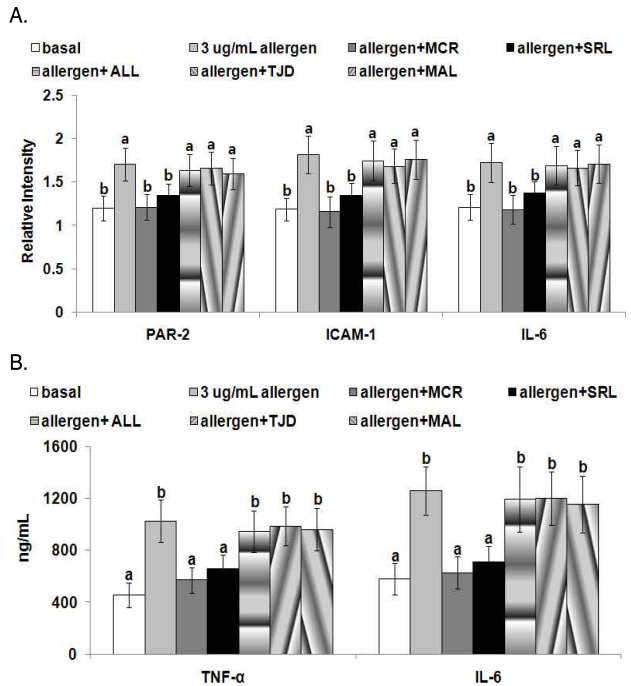


Fig. 2. The suppression of PAR-2, ICAM-1, IL-6 in HaCaT cells (A) and TNF-α and IL-6 in the media (B). The HaCaT cells were treated with 3 µg/mL dust mite allergens and 1,3-butylene glycol extracts (50 µg/mL) of Mori Cortex Radicis (MCR), Sanguisorba officinalis L. (SOL), Arctium lappa Linne (ALL), Torilis japonica DC (TJD), Melia azedarach Linne var. japonica Makino (MAL) for 8 hours and proteinase-activated receptor-2 (PAR-2), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), and interleukin-6 (IL-6) expression was measured by realtime PCR in the cells. The levels of cytokines, tumor necrosis factor-α (TNF-α) and IL-6 released to the media were also determined. ^{a,b}Means on the bars with different superscripts were significantly different at p<0.05.

고 찰

아토피 피부염은 아직까지 원인은 알려져 있지 않지만 집먼지진드기 알러젠이 아토피 피부염을 유발시킨다는 것이 알려져 있다. PAR-2는 피부의 basal, spinous, and granular layer의 막에 존재하고¹⁵⁾, PAR-2는 염증, 면역반응, 방어기전, 사이토카인 발현과 세포의 재생과 세포 사멸등과 관련이 있다는 것이 알려져 있다^{16,17)}. 상피세포에서 염증 물질인 TNF-α, IL-1α와 lipopolysaccharide이 PAR-2의 발현을 증가시켰고¹⁸⁾, PAR-2의 활성화는 상피세포에서 IL-6 and IL-8의 분비를 증가시키며 가려움증과 통증 유발과 관련이 보고되었다¹⁹⁾. 한편, 피부세포에 집먼지진드기 알러젠이 아토피 피부염, 염증 반응 및 피부 질환을

악화시킨다는 것이 알려졌다²⁰⁾. 이러한 연구 결과들을 바탕으로 본 연구에서는 사람의 피부세포인 HaCaT 세포에서 집먼지진드기 알레젠이 PAR-2 발현을 증가시키는지와 이것이 염증 반응을 유발시키는지를 조사하였고 아토피 피부염의 치료제로서의 가능성이 있는 한약재를 알아보기 위해서 상백피, 지유, 천련자, 사상자, 우방자의 1,3-butylene glycol 추출물이 PAR-2의 발현이나 사이토카인의 발현을 억제하는지를 조사하였다. 상백피와 지유 추출물은 피부세포에 처리하였을 때 효과적으로 PAR-2의 발현을 억제하였고, 아토피 발생과 관련이 있는 adhesion molecule인 ICAM-1와 사이토카인인 IL-6의 발현을 억제하였다. 또한 상백피와 지유 추출물은 미디어로 분비되는 TNF- α 와 IL-6의 양도 감소시켰다.

본 연구뿐만 아니라 다른 연구에서도 피부세포막에 존재하는 PAR-2는 아토피를 발생시키고 또한 더 악화시키는데 그 과정에서 PAR-2 활성화시키면 염증 반응인 IKK \rightarrow NF- κ B의 기전을 활성화시켜 염증을 증가시킨다는 것을 보여 주었다²¹⁾. 또한 바퀴벌레 알레젠으로 아토피를 유발한 동물 모델에서 피부 세포내의 Ca²⁺ 농도를 증가시키고 이는 피부 세포막의 두께가 증가시켜 아토피의 치료를 지연시키는 역할을 했다는 보고가 있었다²²⁾. 그러므로 아토피의 유발과 증세에 PAR-2의 발현이나 활성화가 관여하며 PAR-2의 발현 증가가 염증 반응을 활성화시킨다는 것을 알 수 있었다^{21,22)}. 그러므로 항아토피의 발현을 억제하는 한약재를 탐색하는데 피부 세포에서 PAR-2의 발현을 억제하는지를 조사하는 것이 적절할 것을 사료된다.

상백피는 티로시나제의 작용을 저하시켜 멜라닌 합성을 억제하는 효과가 있어 미백효과가 좋고²³⁾, 여드름을 발생시키는 Propionibacterium acnes의 미생물 작용 억제시켜 여드름 방지 효과가 우수하는 것이 알려졌다²⁴⁾. 또한, 대식세포에서 상백피는 TNF- α , IL-1과 nitric oxide의 발생을 억제하는 효과가 있다는 것이 보고되었기 때문에²⁵⁾ 항아토피 효과가 있을 것으로 생각되지만, 아직까지 상백피 추출물의 항아토피 효과를 조사한 것은 없었다. 본 연구 결과에서 상백피 추출물이 항아토피 효과가 있다는 것을 보여 주었다. 지유는 혈의 열을 내리고 지혈과 설사를 멈추게 하는 효과가 있다는 것이 알려져 있으며 항균 및 항바이러스에 효과가 있고 또한 항산화효과가 있다는 것이 보고되었다^{26,27)}. 그러나 상백피와 지유가 항아토피에 대한 연구가 발표된 적이 없었지만, 본 연구 결과로 보면 항아토피 효과가 있을 것으로 사료된다. 사상자는 사상자의 맛은 맵고 쓰며 성질은 따뜻하고 무독하고 콩팥을 덥히고 풍을 제거하고 습한 것을 건조하게 하며 항염작용이 있다고 알려졌다²⁸⁾ 섬유아세포에서 matrix metalloproteinase-I과 프로콜라겐 합성에 관여한다고 보고되어 피부세포에서도 작용할 것으로 사료된다²⁹⁾. 그러나 본 연구에서 PAR-2 발현을 억제하는 효과는 발견되지 않았다. 우방자는 우영의 과실을 건조한 것으로 풍과 열을 발산시키고 열을 내리고 해독하는 효능과 함께 중기에도 효과적이라는 기록이 있다. 또한 우방자 추출물은 항알러지와 항균 효과가 있다는 보고는 있었으나^{30,31)} 본 연구에서는 피부세포에 처리하였을 때 PAR-2 발현을 억제하는 효과는 없었다. 천련자도 항균 및 항염효과가 있다는

것이 보고되었지만³²⁾ 본 연구나 다른 연구에서 항아토피 효과는 없었다.

그러므로 본 연구결과를 종합해 보면 피부세포에서 상백피와 지유의 1,3-butylene glycol 추출물은 PAR-2의 발현과 adhesion molecule인 ICAM-1의 발현을 억제하고 염증인자인 사이토카인의 합성과 분비를 억제하여 항아토피 효과가 있는 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 산학공동기술개발지원사업에 의하여 수행된 연구 결과이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Oh, J.W., Kim, B.S., Lee, J.H., Lee, S.C., Kim, Y.K. The environment and lifestyles of atopic dermatitis patients. *Kor J Dermatol.* 37: 983-991, 1999.
- Sator, P.G., Schmidt, J.B., Honningsmann, H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad dermatol* 48: 352-358, 2003.
- Matsukura, H., Watanabe, N., Geba, G.P., Sperl, J., Tsudzuki, M., Hiroi, J., Matsumoto, M., Ushio, H., Saito, S., Askenase, P.W., Ra, C. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* 3: 461-466, 1996.
- Park, S.H., Jin, M.R., Koo, Y.S., Kim, D.H. Effect of BHOSB on various immunological factors related to pathogenesis of atopic dermatitis in DNCB treated NC/Nga mice. *J Kor Orien Physiol & Pathol.* 21: 849-855, 2007.
- Kato, T., Takai, T., Fujimura, T., Matsuoka, H., Ogawa, T., Murayama, K., Ishii, A., Ikeda, S., Okumura, K., Ogawa, H. Mite serine protease activates protease-activated receptor-2 and induces cytokine release in human keratinocytes. *Allergy.* 64: 1366-1374, 2009.
- Tsujii, K., Andoh, T., Ui, H., Lee, J.B., Kuraishi, Y. Involvement of tryptase and proteinase-activated receptor-2 in spontaneous itch-associated response in mice with atopy-like dermatitis. *J Pharmacol Sci.* 109: 388-395, 2009.
- Lee, Y.H., Kim, M.J., Kong, I.D., Ryu, J.S., Jang, M.Y., Lee, C.G., Choi, E.H. Clinical improvement of atopic dermatitis by a topical cream containing a protease-Activated Receptor-2 (PAR-2) inhibitor "Pal-KTTKS peptide". *Kor J Dermatol.* 48: 966-974, 2010.
- Guin, J.D. Complications of topical hydrocortisone. *J Am Acid Dermatol.* 4: 417-422, 1981.
- Heo, J.C., Lee, K.Y., Lee, B.G., Choi, S.Y., Lee, S.H., Lee,

- S.H. Anti-allergic activities of ultra-fine powder from persimmon. *Kor J Food Presev.* 17: 145-150, 2010.
10. Shin, Y.K., Heo, J.C., Lee, J.H., Lee, S.H. Analysis of the anti-allergic activities of active components produced by solid fermentation of *Phellinus baumii* and *Ephedra sinica*. *Kor J Food Presev.* 17: 297-300, 2010.
 11. Ju, J.H., Cho, H.H., Lee, Y.S. Progress on phytochemical and atopic dermatitis-related study of the root of *Lithospermum erythrorhizon*. *Kor J Pharmacog.* 41: 73-88, 2010.
 12. Kim, J.Y., Jeong, M.S., Choi, S.E., Kim, J.Y., Park, K.Y., Park, K.H., Lee, D.I., Joo, S.S., Lee, C.S., Bang, H.W., Lee, M.K. The effects of *Acer ginnala* leaves extraction on the atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Kor J Dermatol.* 48: 913-918, 2010.
 13. Joo, Y.H., Won, C.H., Kim, J.Y., Cho, K.H., Min, K.U., Kim, K.H. Developing an atopic dermatitis model and the effects of *Actinidia* extract on dermatitis in NC/Nga mice. *Kor J Dermatol.* 47: 1105-1112, 2009.
 14. Ahn, J.Y., Im, L.R., Kim, J.H., Park, J.H., Kim, D.K., Lee, Y.M. Effects of *Rumecis Radix* water extract on development of atopic dermatitis in BALB/c mice. *Kor J Pharmacog.* 40: 218-223, 2009.
 15. D'Andrea, M.R., Derian, C.K., Leturcq, D., Baker, S.M., Grunmark, A., Ling, P., Darrow, A.L., Santulli, R.J., Brass, L.F., Andrade-Gordon, P. Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 46: 157-164, 1998.
 16. Sharlow, E., Paine, C., Babiarz, L., Eisinger, M., Shapiro, S., Seiberg, M. The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J Cell Sci.* 113: 3093-3101, 2000.
 17. Rattenholl, A., Steinhoff, M. Role of proteinase-activated receptors in cutaneous biology and disease. *Drug Dev Res.* 59: 408-416, 2003.
 18. Nystedt, S., Ramakrishnan, V., Sundelin, J. The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells: comparison with the thrombin receptor. *J Biol Chem.* 271: 14910-14915, 1996.
 19. Holzhausen, M., Spolidorio, L., Vergnolle, N. Roles of protease-activated receptor-2 in inflammation, and its possible implications as a putative mediator of periodontitis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100: 177-180, 2005.
 20. Darsow, U., Laifaoui, J., Kerschenlohr, K., Wollenberg, A., Przybilla, B., Wuthrich, B., Brönnimann, M., Braathen, L.R., Didierlaurent, A., André, C., Ring, J. The prevalence of positive reactions in the atopy patch test with aeroallergens and food allergens in subjects with atopic eczema: a European multicenter study. *Allergy* 59: 1318-1325, 2004.
 21. Lee, S.E., Jeong, S.K., Lee, S.H. Protease and protease-activated receptor-2 signaling in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Yonsei Med J.* 51: 808-822, 2010.
 22. Jeong, S.K., Kim, H.J., Youm, J.K., Ahn, S.K., Choi, E.H., Sohn, M.H., Kim, K.E., Hong, J.H., Shin, D.M., Lee, S.H. Mite and cockroach allergens activate protease-activated receptor 2 and delay epidermal permeability barrier recovery. *J Invest Dermatol.* 128: 1930-1939, 2008.
 23. Park, S.Y., Kim, J.S., Lee, B.H., Lim, S.C., Lee, S.N., Leem, K.H., Lee, K.M. Whitening effects of *Mori ramulus*, *Mori cortex radiceis* and *Mori folium* herbal-acupuncture solution after fermentation and heating. *J Korean Acumoxa Soc.* 26: 91-98, 2009.
 24. Yu, J.Y., Park, S.H., Jo, S.J., Heo, C.H., Yun, S.U., Park, G.C. A Clinical study on the effect of a cream containing *Ramulus mori* extract and tea tree oil on acne vulgaris and aerobic skin flora. *Kor J Dermatol.* 41: 1136-1141, 2003.
 25. Yoon, C.Y., Shin, D.H., Hong, C.M., Lee, W.K., Jang, D.D., Cho, J.C., Ahn, J.K., Ahn, D.K., Lee, M.S. The suppressive effects of cortex *Mori* on NO, TNF- α and IL-1 production by macrophage. *Kor J Vet Public Health.* 22: 281-292, 1998.
 26. An, B.J., Lee, S.A., Son, J.H., Gwag, J.H., Park, J.M., Lee, J.Y. Cytotoxic and antibacterial activities of *Sanguisorba officinalis* L. *J Appl Biol Chem.* 47: 141-145, 2004.
 27. An, B.J., Lee, J.T., Lee, S.A., Kwak, J.H., Park, J.M., Lee, J.Y., Son, J.H. Antioxidant effects and application as natural ingredients of Korean *Sanguisorba officinalis* L. *J Appl Biol Chem.* 47: 244-250, 2004.
 28. Lee, E.B., Cho, S.I., Kang, S.S., Kim, K.R., Kim, T.H. Isolation of Torilin from *Torilis japonica* fruit and its analgesic and anti-inflammatory activities. *Kor J Pharmacog.* 30: 137-144, 1999.
 29. Koo, B.S., Hwang, E.I., So, S.H., Lee, S.K., Han, G.H., Kim, N.M. Effect of *Torilis fructus* on procollagen biosynthesis and activity of matrix metalloproteinase-I(MMP-1) in human dermal fibroblast. *Kor J Pharmacog.* 38: 349-353, 2007.
 30. Yoo, H.C., Kim, S.H., Kim, D.H. An experimental study of *Arctii Fructus* on the anti-allergic effect. *Kor J Herbology.* 16: 111-128, 2001.
 31. Shin, D.W., Kim, M.S., Han, J.S. Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionates against food-borne bacteria. *Kor J Food Sci.* 29: 808-816, 1997.
 32. Yi, H.S., Heo, S.K., Yun, H.J., Kim, B.W., Park, S.D. Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of *Melia toosendan* in mouse macrophage cells. *Kor J Hebalogy.* 23: 121-134, 2008.