

# 구판의 LPS로 유도된 염증 반응 억제 효과

백영미 · 최정은 · 이철우<sup>1</sup> · 전영석<sup>1</sup> · 한진택<sup>1</sup> · 장성일 · 유화승\*

대전대학교 둔산한방병원 동서암센터, 1: 동서비교한의학회

## Effects of *Chinemys reevesii* on Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Reactions

Young Mi Baek, Jung Yen Choi, Cheol Woo Lee<sup>1</sup>, Young Seok Jeon<sup>1</sup>, Jin Taek Han<sup>1</sup>,  
Sung Il Jang, Hwa Seung Yoo\*

East-West Cancer Center, Dunsan Oriental Hospital of Daejeon University,  
1: East-West Comparing Oriental Medicine Society

This study is to investigate the effects of *Chinemys reevesii* (CR) on allergic inflammation mechanism related chronic dermatitis. To investigate the effects of CR, we study inhibitory effect of CR on the levels of pro-inflammatory cytokines released from RAW 264.7 cell stimulated with lipopolysaccharide (LPS), and EoL-1, THP-1, Jutkat cell stimulated with Dermatophagoides pteronyssinus (DP), and LPS induced acute inflammatory BALB/c mouse model. CR reduced the levels of IL-1 $\beta$  released from RAW 264.7 cell stimulated with LPS at 20 ug/ml, 10 ug/ml concentration. CR significantly reduced the levels of MCP-1 released from EoL-1 cell, IL-6 from THP-1 cell, and IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  from Jutkat cell stimulated with DP at all the concentration. CR significantly reduced the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , in LPS induced inflammatory BALB/c mouse model, in a dose-dependent manner. These results suggested that CR has suppressive effects on pro-inflammatory cytokines in various inflammation related cell lines through the regulation of immune system. CR could be a therapeutic agent for treatment of chronic inflammatory dermatitis in the future.

Key words : *Chinemys reevesii*, anti-inflammation, cytokines, chronic dermatitis

### 서 론

피부와 점막은 해부학적으로 외부와의 경계부에 위치하여 개체에 손상을 줄 수 있는 미생물, 화학물질들뿐만 아니라 열, 한랭, 자외선 및 기계적 자극과 같은 물리적 인자들에 항상 노출되어 있다. 피부와 점막은 외부로부터 유입되거나 또는 내부에서 생겨난 유해한 인자들로부터 개체를 보호하는 임무를 수행하고 있고, 개체를 보호하는 임무의 대부분이 면역반응과 직접 또는 간접적으로 관련되어 있다. 따라서 피부와 점막은 다양한 형태의 면역반응들과 그와 관련된 염증 반응이 매우 흔히 표출되는 대표적 장기이다<sup>1)</sup>.

염증반응은 생체 내로의 이물질의 침입, 대사 장애, 화상, 기계적 화학적 외상 등을 입었을 때 일어나는 정상적인 생체 반응

으로서 병인 요소를 무독화하거나 손상 받은 조직을 회복시키는 역할을 한다. 이 염증반응기간 동안에 피부 손상을 극소화시키고, 손상된 부위를 복구시키려는 일련의 생체과정으로서 혈관 확장, 세포막 유동성 증가, 부종 등의 생리 현상이 수반된다. 이는 피부 염증에서 일어나는 대표적인 반응이기도 하며, 이 반응을 억제하는 효과를 실험적으로 검증함으로써 특정 약리 물질의 항염 효능을 실험적으로 증명할 수 있다<sup>2)</sup>.

구판은 남생이과에 속한 동물인 남생이 *Chinemys reevesii*(Gray)의 腹甲을 채취하여 잔육을 제거하고 晒乾한 것으로, 性은 微寒 無毒하고, 味는 甘鹹하고 肝, 腎經으로 歸經한다. 구판은 滋陰, 潛陽, 補腎, 健骨하는 효능이 있어 腎陰不足, 骨蒸 勞熱, 吐血, 衄血, 久咳, 遺精, 崩漏, 帶下, 腰痛, 骨痿, 陰虛風動, 久痢, 久瘡, 小兒凶門不合을 치료한다<sup>3)</sup>.

만성 염증성 피부 질환은 정혈휴손, 음허, 혈조 등이 그 원인으로 알려지고 있는 바<sup>4)</sup>, 滋陰하는 효능에 맞추어 구판을 이러한 질환에도 응용할 수 있을 것으로 추측된다.

\* 교신저자 : 유화승, 대전시 서구 둔산동 1136, 둔산한방병원 동서암센터

· E-mail : altyhs@dju.kr, · Tel : 042-470-9132

· 접수 : 2011/12/09 · 수정 : 2012/02/13 · 채택 : 2012/02/17

이에 저자는 구관(CR; *Chinemys reevesii*) 추출물의 염증 반응 조절능과 이에 따른 만성적인 염증성 피부질환 치료제로서의 효과를 객관적으로 증명하고자 *in vitro*에서 LPS (lipopolysaccharide) 처리한 RAW 264.7 세포주와 집먼지진드기 (Dp; *Dermatophagoides pteronyssinus*)의 미세분말액을 처리한 EoL-1, THP-1, Jurket 세포에서의 사이토카인 생성량과, *in vivo*에서 LPS로 유도된 염증 생쥐모델에서의 사이토카인을 측정, 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료

본 실험에 사용한 구관은 대전대학교 둔산한방병원에서 구입(원산지: 인도네시아, 수입·제조원: 한솔제약)한 후 정선하여 사용하였다. 구관(CR)을 분쇄한 분말 50 g을 80 % 에탄올 500 ml에 넣고 냉각 콘덴서가 달린 환류 추출기에서 5시간 동안 추출한 다음, 100 메쉬 여과포로 여과하여 구관 추출물을 얻었다. 상기 구관 추출물은 상온에서 화트만(whatman) 여과지로 여과하여 불용성물질을 제거하였다.

### 2. 동물

실험동물로는 대한실험동물센터에서 구입한 Balb/c계 생쥐를 각 군당 6마리로 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22 ± 2 °C, 1일 중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료로서는 고형사료(조단백질 22.1 % 이상, 조지방 8.0 % 이하, 조섬유 5.0 % 이하, 조회분 8.0 % 이하, 칼슘 0.6 % 이상, 인 0.4 % 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

### 3. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약 중 LPS (lipopolysaccharide)는 Sigma (Sigma Co., USA) 제품을, normal saline은 중외제약 제품을, Dp는 연세대학교에서, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, ELISA kit는 BD사 (USA) 제품을 사용했으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 Centrifuge (Beckman Co., USA), roller Mixer (Gowon scientific technology Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), ELISA reader (Molecular Devices, Co., USA) 등이다.

### 4. 실험방법

#### 1) In vitro 실험

##### (1) RAW 264.7 세포주에서의 사이토카인 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 24well plate에 분주하고 세포에 over night 한 다음 LPS (1 ug/ml) 처리하여 한 시간 후 구관 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 배양한 후 상청액을 취하여 ELISA법을 이용하여 사이토카인을 측정하였다.

##### (2) EoL-1, THP-1, Jurket 세포에서의 사이토카인 생성량 측정

EoL-1 세포를 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 분주하고 집먼지진드기(Dp) 1 μg/ml을 처리하여 6시간 후 구관을 농도별로 처리하고 24시간 배양한 후에 상청액을 취하여 ELISA법을 이용하여 사이토카인을 측정하였다. THP-1, Jurket 세포를 각각 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 분주하고 집먼지진드기(mite) 1 μg/ml을 처리하여 6시간 후 구관 추출물을 농도별로 처리하고 16시간 배양한 후에 상청액을 취하여 ELISA법을 이용하여 사이토카인을 측정하였다.

#### 2) In vivo 실험

##### (1) LPS로 유도된 염증 생쥐 모델 및 사이토카인 측정

정상군은 마리당 saline 200 ul를 경구투여하고, 구관 추출물 투여군은 생쥐 마리당 200 mg/kg, 100 mg/kg을 oral zonde를 이용하여 하루에 1회씩 7일간 경구 투여하였다. 7일 후 LPS 1 mg/kg을 복강에 주사한 후 90분 후에 ethyl ether로 마취하고 심장 천자법으로 채혈하였다. 채혈 후 혈청을 분리하여 IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량을 ELISA법으로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100 μl (1/100 dilution) 씩 분주한 후 antibody-biotin conjugated 100 μl를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody avidin-HRP conjugated 100 μl를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 μl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error로 기록하였으며, Student's t-test 분석 방법을 이용하여 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 1. In vitro

#### 1) RAW 264.7 세포에서 사이토카인 생성량에 미치는 영향

##### (1) GM-CSF에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 LPS에 의해 유도된 GM-CSF의 생성량은 미처리군(media)에서 11.765 ± 0.969 pg/ml, 대조군(LPS)에서 5715.727 ± 546.714 pg/ml, 구관 추출물 20 ug/ml 농도 처리군에서 5446.537 ± 245.049 pg/ml, 10 ug/ml 농도 처리군에서 6013.193 ± 553.709 pg/ml, 5 ug/ml 농도 처리군에서 5745.337 ± 460.926 pg/ml로 나타나, 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 (p<0.001) 증가하였으나, 구관 추출물 투여군에서 GM-CSF의 생성량은 대조군과 큰 차이를 보이지 못했다(Fig. 1).

##### (2) IL-1β에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 LPS에 의해 유도된 IL-1β의 생성량은 미처리군(media)에서 2.533 ± 0.777 pg/ml, 대조군(LPS)에서 47.155 ± 0.544 pg/ml, 구관 추출물 20 ug/ml 농도 처리군에서 15.92 ± 5.421 pg/ml, 10 ug/ml 농도 처리군에서 30.027 ± 5.043 pg/ml, 5 ug/ml 농도 처리군에서 57.413 ± 5.067 pg/ml로 나타

나 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 증가하였고, 구판 추출물 투여군에서는 20 ug/ml, 10 ug/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 2).

(3) IL-6에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 LPS에 의해 유도된 IL-6의 생성량은 미처리군(media)에서  $9.493 \pm 3.588$  pg/ml, 대조군(LPS)에서  $16137.04 \pm 1937.244$  pg/ml, 구판 추출물 20 ug/ml 농도 처리군에서  $14193.65 \pm 108.6987$  pg/ml, 10 ug/ml 농도 처리군에서  $14966.31 \pm 587.57$  pg/ml, 5 ug/ml 농도 처리군에서  $16858 \pm 1806.509$  pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 증가하였고, 구판 추출물 투여군에서는 20 ug/ml, 10 ug/ml 농도에서 대조군에 비하여 감소하였으나 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 3).

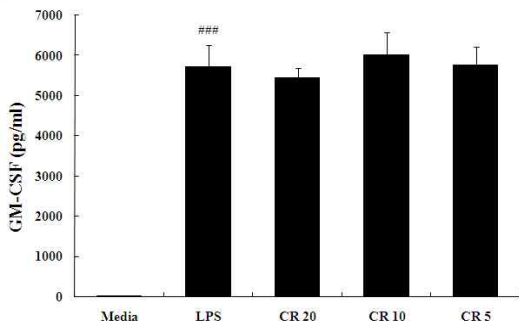


Fig. 1. Effects of CR on the levels of GM-CSF in the culture sup. of LPS-induced RAW 264.7 cells. : CR did not affected levels of GM-CSF released from RAW 264.7 cell stimulated with LPS. Media : RAW 264.7 cell, LPS : RAW 264.7 cell + LPS (1 ug/ml), CR 20 : RAW 264.7 cell + CR (20 ug/ml), CR 10 : RAW 264.7 cell + CR (10 ug/ml), CR 5 : RAW 264.7 cell + CR (5 ug/ml). The results are the mean  $\pm$  S.D. Statistically significant value compared with normal by t-test (### $p < 0.001$ ). CR : *Chinemys reevesii* LPS : lipopolysaccharide

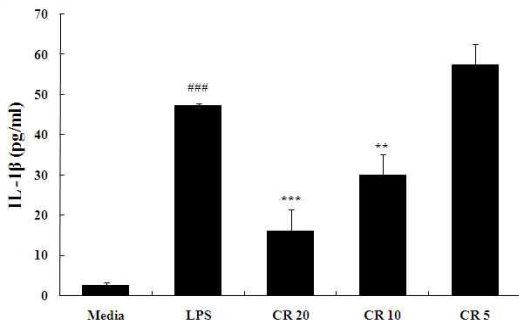


Fig. 2. Effects of CR on the levels of IL-1β in the culture sup. of LPS-induced RAW 264.7 cells. : CR reduced the levels of IL-1β released from RAW 264.7 cell stimulated with LPS at 20 ug/ml, 10 ug/ml concentration. Media : RAW 264.7 cell, LPS : RAW 264.7 cell + LPS (1 ug/ml), CR 20 : RAW 264.7 cell + CR (20 ug/ml), CR 10 : RAW 264.7 cell + CR (10 ug/ml), CR 5 : RAW 264.7 cell + CR (5 ug/ml). The results are the mean  $\pm$  S.D. Statistically significant value compared with normal by t-test (### $p < 0.001$ ). Statistically significant value compared with control by t-test (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

2) EoL-1 세포에서 사이토카인 생성량에 미치는 영향

(1) MCP-1에 미치는 영향

EoL-1 세포주에서 집먼지진드기에 의해 유도된 MCP-1의 생성량은 미처리군(media)에서  $39 \pm 6.406$  pg/ml, 대조군(Dp)에서

$96 \pm 2.365$  pg/ml, 양성대조군(Dexa)  $45 \pm 3.355$  pg/ml, 구판 추출물 0.1 ug/ml 농도 처리군에서  $55 \pm 3.405$  pg/ml, 1 ug/ml 농도 처리군에서  $60 \pm 5.481$  pg/ml, 10 ug/ml 농도 처리군에서  $52 \pm 6.711$  pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 증가하였고, 양성 대조군에서 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 감소하였으며, 구판 추출물 투여군에서도 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 4).

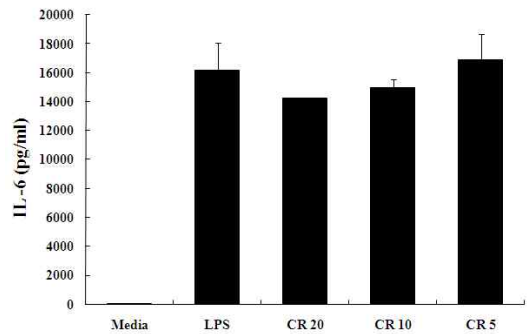


Fig. 3. Effects of CR on the levels of IL-6 in the culture sup. of LPS-induced RAW 264.7 cells. : CR reduced the levels of IL-6 released from RAW 264.7 cell stimulated with LPS at 20 ug/ml, 10 ug/ml concentration, but results are not significant. Media : RAW 264.7 cell, LPS : RAW 264.7 cell + LPS (1 ug/ml), CR 20 : RAW 264.7 cell + CR (20 ug/ml), CR 10 : RAW 264.7 cell + CR (10 ug/ml), CR 5 : RAW 264.7 cell + CR (5 ug/ml). The results are the mean  $\pm$  S.D. Statistically significant value compared with normal by t-test (### $p < 0.001$ ).

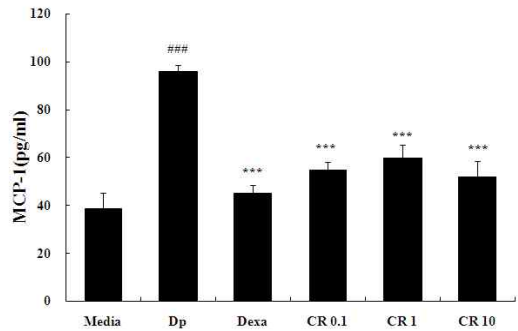
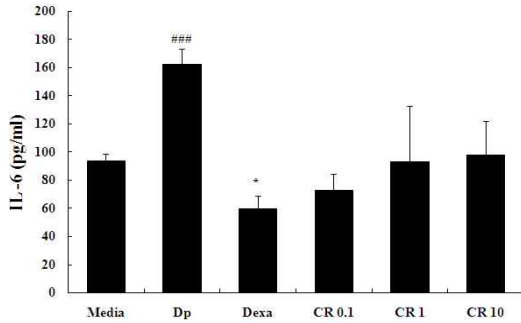


Fig. 4. Effects of CR on the levels of MCP-1 in the culture sup. of Dp crude-induced EoL-1 cells. : CR significantly reduced the levels of MCP-1 released from EoL-1 cell stimulated with DP at all the concentration. Media : EoL-1 cell, Dp : EoL-1 cell + Dp (10 ug/ml), Dexa : EoL-1 cell + Dexamethasone (1 ug/ml), CR 0.1 : EoL-1 cell + CR (0.1 ug/ml), CR 1 : EoL-1 cell + CR (1 ug/ml), CR 10 : EoL-1 cell + CR (10 ug/ml). The results are the mean  $\pm$  S.D. Statistically significant value compared with normal by t-test (### $p < 0.001$ ). Statistically significant value compared with control by t-test (\*\*\* $p < 0.001$ ).

(2) IL-6에 미치는 영향

EoL-1 세포주에서 집먼지진드기에 의해 유도된 IL-6의 생성량은 미처리군(media)에서  $94 \pm 4.243$  pg/ml, 대조군(Dp)에서  $162.5 \pm 10.607$  pg/ml, 양성대조군(Dexa)  $59.5 \pm 9.192$  pg/ml, 구판 추출물 0.1 ug/ml 농도 처리군에서  $73 \pm 11.314$  pg/ml, 1 ug/ml 농도 처리군에서  $93 \pm 39.598$  pg/ml, 10 ug/ml 농도 처리군에서  $98 \pm 24.042$  pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 증가하였고, 양성 대조군에서 유의성 있게 ( $p < 0.05$ ) 감소하였다. 구판 추출물 투여군에서는 대조군에 비

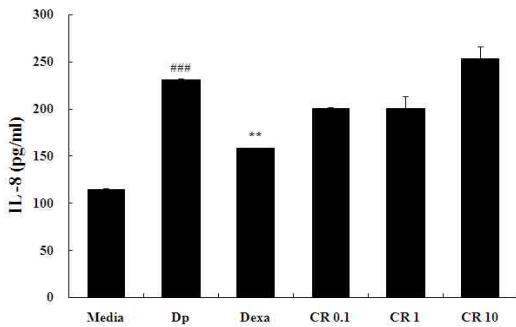
하여 감소하기는 하였으나, 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 5).



**Fig. 5. Effects of CR on the levels of IL-6 in the culture sup. of Dp crude-induced EoL-1 cells.** : CR reduced the level of IL-6 released from EoL-1 cell stimulated with DP, but results are not significant. Media : EoL-1 cell, Dp : EoL-1 cell + Dp (10 ug/ml), Dexa : EoL-1 cell + Dexamethasone (1 ug/ml), CR 0.1 : EoL-1 cell + CR (0.1 ug/ml), CR 1 : EoL-1 cell + CR (1 ug/ml), CR 10 : EoL-1 cell + CR (10 ug/ml). The results are the mean  $\pm$  S.D. Statistically significant value compared with normal by t-test (###p<0.001). Statistically significant value compared with control by t-test (\*p<0.05).

(3) IL-8에 미치는 영향

EoL-1 세포주에서 집먼지진드기에 의해 유도된 IL-8의 생성량은 미처리군(media)에서  $115 \pm 0.943$  pg/ml, 대조군(Dp)에서  $231 \pm 0.825$  pg/ml, 양성대조군(Dexa)  $159 \pm 0.00$  pg/ml, 구관 추출물 0.1 ug/ml 농도 처리군에서  $200 \pm 1.179$  pg/ml, 1 ug/ml 농도 처리군에서  $201 \pm 12.139$  pg/ml, 10 ug/ml 농도 처리군에서  $253 \pm 13.199$  pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 증가하였고, 양성 대조군에서 유의성 있게 ( $p<0.01$ ) 감소하였으며, 별갑 추출물 투여군에서는 0.1 ug/ml, 1 ug/ml 농도에서 대조군에 비하여 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 6).

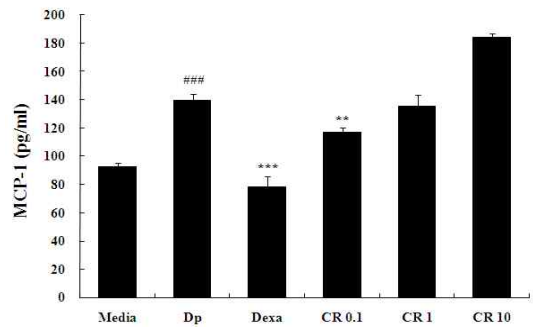


**Fig. 6. Effects of CR on the levels of IL-8 in the culture sup. of Dp crude-induced EoL-1 cells.** : CR reduced the level of IL-8 released from EoL-1 cell stimulated with DP at 0.1 ug/ml, 1 ug/ml concentration, but results are not significant. Media : EoL-1 cell, Dp : EoL-1 cell + Dp (10 ug/ml), Dexa : EoL-1 cell + Dexamethasone (1 ug/ml), CR 0.1 : EoL-1 cell + CR (0.1 ug/ml), CR 1 : EoL-1 cell + CR (1 ug/ml), CR 10 : EoL-1 cell + CR (10 ug/ml). The results are the mean  $\pm$  S.D. Statistically significant value compared with normal by t-test (###p<0.001). Statistically significant value compared with control by t-test (\*\*p<0.01).

3) THP-1 세포에서 사이토카인 생성량에 미치는 영향

(1) MCP-1에 미치는 영향

THP-1 세포주에서 집먼지진드기에 의해 유도된 MCP-1의 생성량은 미처리군(media)에서  $93 \pm 2.776$  pg/ml, 대조군(Dp)에서  $140 \pm 4.221$  pg/ml, 양성대조군(Dexa)  $78 \pm 7.618$  pg/ml, 구관 추출물 0.1 ug/ml 농도 처리군에서  $117 \pm 3.339$  pg/ml, 1 ug/ml 농도 처리군에서  $135 \pm 8.228$  pg/ml, 10 ug/ml 농도 처리군에서  $184 \pm 2.835$  pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 증가하였고, 양성 대조군에서 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 감소하였으며, 구관 추출물 투여군에서는 0.1 ug/ml 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $p<0.01$ ) 감소하였다(Fig. 7).



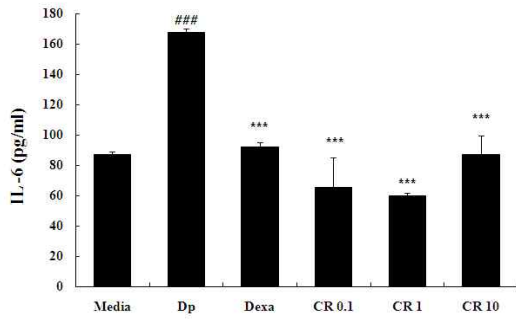
**Fig. 7. Effects of CR on the levels of MCP-1 in the culture sup. of Dp crude-induced THP-1 cells.** : CR significantly reduced the levels of MCP-1 released from THP-1 cell stimulated with DP at 0.1 ug/ml concentration. Media : THP-1 cell, Dp : THP-1 cell + Dp (10 ug/ml), Dexa : THP-1 cell + Dexamethasone (1 ug/ml), AS 0.1 : THP-1 cell + AS (0.1 ug/ml), AS 1 : THP-1 cell + AS (1 ug/ml), AS 10 : THP-1 cell + AS (10 ug/ml). The results are the mean  $\pm$  S.D. Statistically significant value compared with normal by t-test (###p<0.001). Statistically significant value compared with control by t-test (\*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01).

(2) IL-6에 미치는 영향

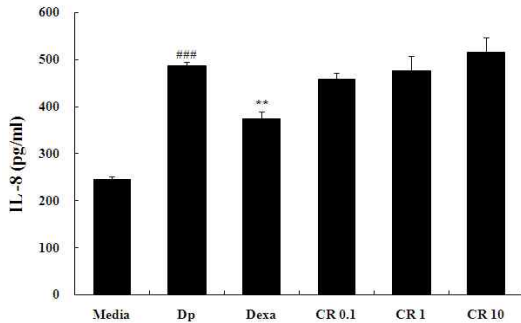
THP-1 세포주에서 집먼지진드기에 의해 유도된 IL-6의 생성량은 미처리군(media)에서  $87.333 \pm 1.528$  pg/ml, 대조군(Dp)에서  $168 \pm 1.732$  pg/ml, 양성대조군(Dexa)  $92.333 \pm 2.517$  pg/ml, 구관 추출물 0.1 ug/ml 농도 처리군에서  $65.333 \pm 19.604$  pg/ml, 1 ug/ml 농도 처리군에서  $60 \pm 1.414$  pg/ml, 10 ug/ml 농도 처리군에서  $87.333 \pm 12.014$  pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 증가하였고, 양성 대조군에서 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 감소하였으며, 구관 추출물 투여군에서는 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 감소하였다(Fig. 8).

(3) IL-8에 미치는 영향

THP-1 세포주에서 집먼지진드기에 의해 유도된 IL-8의 생성량은 미처리군(media)에서  $246 \pm 3.768$  pg/ml, 대조군(Dp)에서  $486 \pm 7.362$  pg/ml, 양성대조군(Dexa)  $374 \pm 14.607$  pg/ml, 구관 추출물 0.1 ug/ml 농도 처리군에서  $459 \pm 12.066$  pg/ml, 1 ug/ml 농도 처리군에서  $476 \pm 30.627$  pg/ml, 10 ug/ml 농도 처리군에서  $517 \pm 29.361$  pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 증가하였고, 양성 대조군에서 유의성 있게 ( $p<0.01$ ) 감소하였으나, 구관 추출물 투여군에서 IL-8의 생성량은 대조군과 큰 차이를 보이지 못했다(Fig. 9).



**Fig. 8.** Effects of CR on the levels of IL-6 in the culture sup. of Dp crude-induced THP-1 cells. : CR significantly reduced the level of IL-6 released from THP-1 cell stimulated with DP at all the concentration. Media : THP-1 cell, Dp : THP-1 cell + Dp (10 ug/ml), Dexa : THP-1 cell + Dexamethasone (1 ug/ml), CR 0.1 : THP-1 cell + CR (0.1 ug/ml), CR 1 : THP-1 cell + CR (1 ug/ml), CR 10 : THP-1 cell + CR (10 ug/ml). The results are the mean  $\pm$  S.D Statistically significant value compared with normal by t-test (###p<0.001). Statistically significant value compared with control by t-test (\*\*\*p<0.001).



**Fig. 9.** Effects of CR on the levels of IL-8 in the culture sup. of Dp crude-induced THP-1 cells. : CR did not affected levels of IL-8 released from THP-1 cell stimulated with DP. Media : THP-1 cell, Dp : THP-1 cell + Dp (10 ug/ml), Dexa : THP-1 cell + Dexamethasone (1 ug/ml), CR 0.1 : THP-1 cell + CR (0.1 ug/ml), CR 1 : THP-1 cell + CR (1 ug/ml), CR 10 : THP-1 cell + CR (10 ug/ml). The results are the mean  $\pm$  S.D Statistically significant value compared with normal by t-test (###p<0.001). Statistically significant value compared with control by t-test (\*\*p<0.01).

4) Jurkat 세포에서 사이토카인 생성량에 미치는 영향

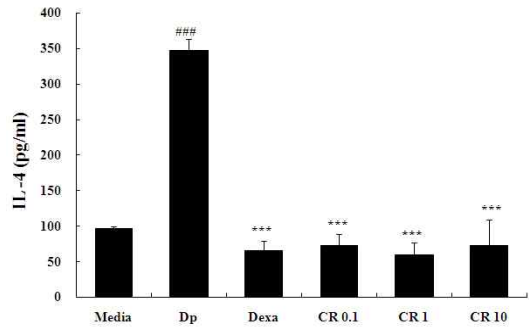
(1) IL-4에 미치는 영향

Jurkat 세포주에서 집먼지진드기에 의해 유도된 IL-4의 생성량은 미처리군(media)에서  $97 \pm 2.835$  pg/ml, 대조군(Dp)에서  $347 \pm 15.983$  pg/ml, 양성대조군(Dexa)  $65 \pm 13.503$  pg/ml, 구관 추출물 0.1 ug/ml 농도 처리군에서  $72 \pm 16.586$  pg/ml, 1 ug/ml 농도 처리군에서  $60 \pm 17.063$  pg/ml, 10 ug/ml 농도 처리군에서  $73 \pm 36.555$  pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 증가하였고, 양성 대조군에서 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 감소하였으며, 구관 추출물 투여군에서도 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 감소하였다(Fig. 10).

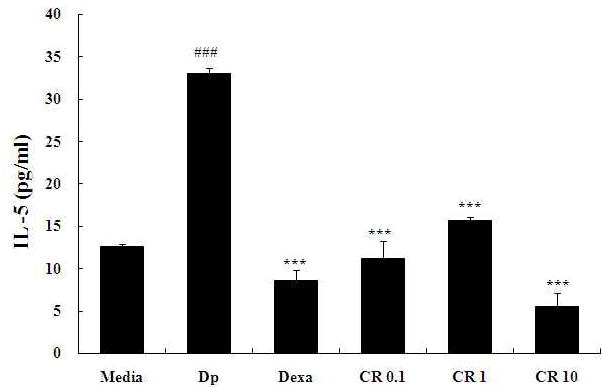
(2) IL-5에 미치는 영향

Jurkat 세포주에서 집먼지진드기에 의해 유도된 IL-5의 생성량은 미처리군(media)에서  $13 \pm 0.289$  pg/ml, 대조군(Dp)에서  $33 \pm 0.577$  pg/ml, 양성대조군(Dexa)  $9 \pm 1.155$  pg/ml, 구관 추출물 0.1 ug/ml 농도 처리군에서  $11 \pm 1.984$  pg/ml, 1 ug/ml 농도

도 처리군에서  $16 \pm 0.354$  pg/ml, 10 ug/ml 농도 처리군에서  $6 \pm 1.528$  pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 증가하였고, 양성 대조군에서 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 감소하였으며, 구관 추출물 투여군에서도 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 감소하였다(Fig. 11).



**Fig. 10.** Effects of CR on the levels of IL-4 in the culture sup. of Dp crude-induced Jurkat cells. : CR significantly reduced the levels of IL-4 released from Jurkat cell stimulated with DP at all the concentration. Media : Jurkat cell, Dp : Jurkat cell + Dp (10 ug/ml), Dexa : Jurkat cell + Dexamethasone (1 ug/ml), CR 0.1 : Jurkat cell + CR (0.1 ug/ml), CR 1 : Jurkat cell + CR (1 ug/ml), CR 10 : Jurkat cell + CR (10 ug/ml). The results are the mean  $\pm$  S.D Statistically significant value compared with normal by t-test (###p<0.001). Statistically significant value compared with control by t-test (\*\*\*p<0.001).



**Fig. 11.** Effects of CR on the levels of IL-5 in the culture sup. of Dp crude-induced Jurkat cells. : CR significantly reduced the levels of IL-5 released from Jurkat cell stimulated with DP at all the concentration. Media : Jurkat cell, Dp : Jurkat cell + Dp (10 ug/ml), Dexa : Jurkat cell + Dexamethasone (1 ug/ml), CR 0.1 : Jurkat cell + CR (0.1 ug/ml), CR 1 : Jurkat cell + CR (1 ug/ml), CR 10 : Jurkat cell + CR (10 ug/ml). The results are the mean  $\pm$  S.D Statistically significant value compared with normal by t-test (###p<0.001). Statistically significant value compared with control by t-test (\*\*\*p<0.001).

(3) TNF-a에 미치는 영향

Jurkat 세포주에서 집먼지진드기에 의해 유도된 TNF-a의 생성량은 미처리군(media)에서  $5 \pm 2.950$  pg/ml, 대조군(Dp)에서  $21 \pm 1.902$  pg/ml, 양성대조군(Dexa)  $8 \pm 0.082$  pg/ml, 구관 추출물 0.1 ug/ml 농도 처리군에서  $6 \pm 0.502$  pg/ml, 1 ug/ml 농도 처리군에서  $12 \pm 2.771$  pg/ml, 10 ug/ml 농도 처리군에서  $4 \pm 0.795$  pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 증가하였고, 양성 대조군에서 유의성 있게 ( $p<0.001$ ) 감소하였으며, 구관 추출물 투여군에서도 대조군에 비하여 모든

농도에서 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 12).

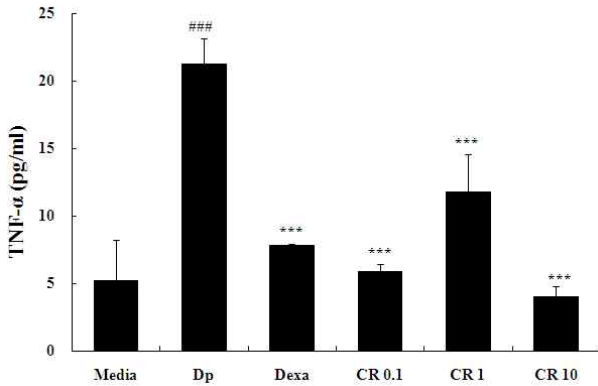


Fig. 12. Effects of CR on the levels of TNF- $\alpha$  in the culture sup. of Dp crude-induced Jurkat cells. : CR significantly reduced the levels of TNF- $\alpha$  released from Jurkat cell stimulated with DP at all the concentration. Media : Jurkat cell, Dp : Jurkat cell + Dp (10 ug/ml), Dexa : Jurkat cell + Dexamethasone (1 ug/ml), CR 0.1 : Jurkat cell + CR (0.1 ug/ml), CR 1 : Jurkat cell + CR (1 ug/ml), CR 10 : Jurkat cell + CR (10 ug/ml). The results are the mean  $\pm$  S.D. Statistically significant value compared with normal by t-test (### $p < 0.001$ ). Statistically significant value compared with control by t-test (\*\*\* $p < 0.001$ ).

2. In vivo

1) TNF- $\alpha$

BALB/c 생쥐에 7일간 구관 추출물을 투여한 후 LPS로 유도된 급성 염증모델에서 혈청을 분리하여 TNF- $\alpha$ 를 측정된 결과 정상군은  $603.2 \pm 11.5$  pg/ml, 대조군이  $1786.6 \pm 136.5$  pg/ml, 구관 추출물 100 mg/kg 투여군은  $1271.2 \pm 52.7$  pg/ml, 구관 추출물 200 mg/kg 투여군은  $859.8 \pm 65.7$  pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 (### $p < 0.001$ ) 증가하였고 구관 추출물 투여군에서는 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성 있게 (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 13).

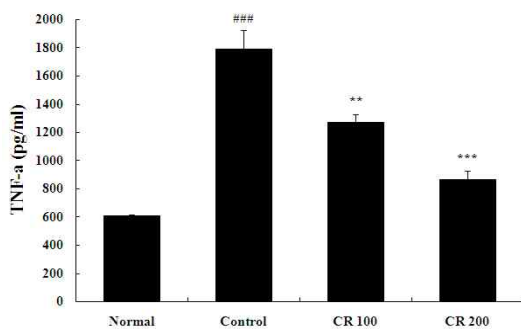


Fig. 13. The effect of CR on TNF- $\alpha$  production in serum following LPS co-treatment. : CR significantly reduced the levels of TNF- $\alpha$  in LPS induced acute inflammatory BALB/c mouse model, in a dose-dependent. Female mice were co-treatment with CR (200, 100 ul/kg) and LPS (1 mg/kg). Total TNF- $\alpha$  levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit.(n=6) Normal : BALB/c + saline (200 ul/mouse), Control : BALB/c + LPS (1 mg/kg), CR 100 : BALB/c + LPS (1 mg/kg) + CR (100 ul/kg), CR 200 : BALB/c + LPS (1 mg/kg) + CR (200 ul/kg). Statistically significant value compared with normal by t-test (### $p < 0.001$ ). Statistically significant value compared with control by t-test (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

2) IL-6

BALB/c 생쥐에 7일간 구관 추출물을 투여한 후 LPS로 유도된 급성 염증모델에서 혈청을 분리하여 IL-6를 측정된 결과 정상군은  $781.2 \pm 39.7$  pg/ml, 대조군이  $3624.8 \pm 165.4$  pg/ml, 구관 추출물 100 mg/kg 투여군은  $3143.0 \pm 347.7$  pg/ml, 구관 추출물 200 mg/kg 투여군은  $2487.8 \pm 147.6$  pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 (### $p < 0.001$ ) 증가하였고 구관 추출물 투여군에서는 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성 있게 (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 14).

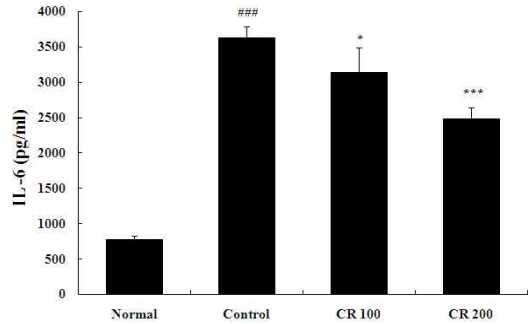


Fig. 14. The effect of CR on IL-6 production in serum following LPS co-treatment. : CR significantly reduced the levels of IL-6 in LPS induced acute inflammatory BALB/c mouse model, in a dose-dependent. Female mice were co-treatment with CR (200, 100 ul/kg) and LPS (1 mg/kg). Total IL-6 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit.(n=6) Normal : BALB/c + saline (200 ul/mouse), Control : BALB/c + LPS (1 mg/kg), CR 100 : BALB/c + LPS (1 mg/kg) + CR (100 ul/kg), CR 200 : BALB/c + LPS (1 mg/kg) + CR (200 ul/kg). Statistically significant value compared with normal by t-test (### $p < 0.001$ ). Statistically significant value compared with control by t-test (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

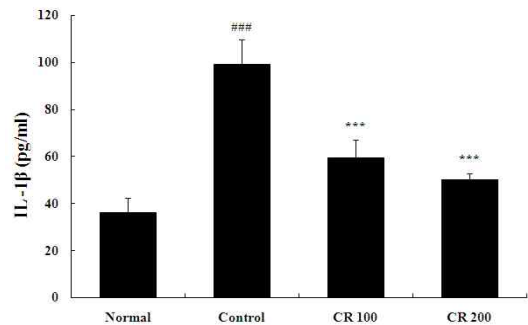


Fig. 15. The effect of CR on IL-1 $\beta$  production in serum following LPS co-treatment. : AS significantly reduced the levels of IL-1 $\beta$  in LPS induced acute inflammatory BALB/c mouse model, in a dose-dependent. Female mice were co-treatment with CR (200, 100 ul/kg) and LPS (1 mg/kg). Total IL-1 $\beta$  levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit.(n=6) Normal : BALB/c + saline (200 ul/mouse), Control : BALB/c + LPS (1 mg/kg), CR 100 : BALB/c + LPS (1 mg/kg) + CR (100 ul/kg), CR 200 : BALB/c + LPS (1 mg/kg) + CR (200 ul/kg). Statistically significant value compared with normal by t-test (### $p < 0.001$ ). Statistically significant value compared with control by t-test (\*\*\* $p < 0.001$ ).

3) IL-1 $\beta$

BALB/c 생쥐에 7일간 구관 추출물을 투여한 후 LPS로 유도된 급성 염증모델에서 혈청을 분리하여 IL-1 $\beta$ 를 측정된 결과 정상군은  $36.2 \pm 6.1$  pg/ml, 대조군이  $99.2 \pm 10.4$  pg/ml, 구관 추출물 100 mg/kg 투여군은  $59.4 \pm 7.4$  pg/ml, 구관 추출물 200

mg/kg 투여군은  $56.8 \pm 6.0$  pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 (### $p < 0.001$ ) 증가하였고 구판 추출물 투여군에서는 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성 있게 (\*\* $p < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 15).

## 고 찰

피부와 점막은 외부와 직접 맞닿아 있는 기관으로, 외부로부터 개체를 보호하는 역할을 하고 있어 다양한 형태의 면역반응들과 그와 관련된 염증 반응이 매우 흔히 표출되는 장기이다<sup>1)</sup>. 염증반응은 생체 조직이 손상에 대해 반응하는 능동적인 과정으로, 손상을 극소화하고, 손상된 부위를 수복시키려는 일련의 국소적 반응이다. 피부에서 일어나는 염증 반응에서는 혈관 확장, 세포막 유동성 증가, 부종 등의 생리 현상이 수반된다<sup>2)</sup>.

인체를 외부환경으로부터 보호하고 손상을 회복시키기 위해 이러한 면역반응과 염증반응이 꼭 필요한 기능이지만, 이러한 반응이 다양한 원인에 따라 지나치거나 비정상적인 형태로 일어났을 때에는 병리적으로 문제를 일으키게 된다.

피부의 과도한 면역반응으로 인한 염증반응을 나타내는 대표적인 질환으로 아토피 피부염을 들 수 있다. 아토피 피부염은 심한 소양감, 건조증, 습진성 병변, 각질 등의 증상이 특징적으로 나타나며, 만성적 재발성 경과를 보이는 피부 질환이다<sup>5)</sup>. 아토피 피부염의 정확한 원인은 알려져 있지 않으나, 아토피 피부염의 피부 주위에 다양한 염증성 사이토카인 (IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -11, -13, TNF- $\alpha$ , GM-CSF)과 케모카인들(IL-8, RANTES, MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ), MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), MCP-3, MCP-4, eotaxin) 등이 증가되어 있으며, 이러한 사이토카인과 케모카인의 복합적인 상호작용으로 인하여 아토피 피부염이 발생하는 것으로 알려져 있다<sup>6-8)</sup>.

소양감, 은진, 홍반, 수포, 건조 등의 증상은 아토피 피부염 외에도 여러 가지 원인의 피부 면역반응과 관련되어 나타난다<sup>1)</sup>. cytokine은 세포에서 분비되는 중요한 'messenger' 단백질이다. 이들은 선천적 혹은 특이적 면역반응의 기능을 조절하는 세포의 신호 전달망의 일부로 바이러스 감염, 조직 손상 등에 따른 염증반응에 깊이 관여한다<sup>9)</sup>. 따라서 이들의 분비 변화를 관찰하여 염증 및 면역반응의 상태를 추정해 볼 수 있다.

구판은 남생이과에 속한 동물인 남생이 *Chinemys reevesii*(Gray)의 腹甲을 채취하여 잔육을 제거하고 晒乾한 것으로, 性은 微寒 無毒하고, 味는 甘鹹하고 肝, 腎經으로 歸經한다.

구판은 滋陰, 潛陽, 補腎, 健骨하는 효능이 있어 腎陰不足, 骨蒸勞熱, 吐血, 衄血, 久咳, 遺精, 崩漏, 帶下, 腰痛, 骨痿, 陰虛風動, 久痢, 久癩, 小兒凶門不合을 치료한다<sup>3)</sup>. 구판에 대해서 기존에 연구된 바를 살펴보면 제<sup>10)</sup>등은 골다공증에 대한 문헌적 연구를, 남<sup>11)</sup>은 갑상선 기능 항진증에 미치는 영향에 관하여 보고하였으며, 하<sup>12)</sup>등은 이명 난청 질환에 미치는 영향에 대하여 보고하였고, 김<sup>13)</sup>은 관절염 치료의 가능성에 대하여 보고하였다. 이러한 효과는 구판의 滋陰, 補腎, 健骨 작용으로 인한 것이라고 볼 수 있는데, 滋陰하는 효능에 초점을 맞추어 피부의 염증성 질환

에도 응용할 수 있을 것으로 추측된다.

이에 저자는 구판 추출물의 염증 반응 조절능과 이에 따른 만성 염증성 피부질환 치료제로서의 효과를 객관적으로 증명하고자 in vitro에서 LPS (lipopolysaccharide) 처리한 RAW 264.7 세포주와, 집먼지진드기의 미세분말액을 처리한 EoL-1, THP-1, Jurkat 세포에서의 사이토카인 생성량과, in vivo에서 LPS로 유도된 염증 생쥐모델에서의 사이토카인을 측정, 관찰하였다.

RAW 264.7 cell은 대식세포주이며, LPS는 병원균의 내독소로 대식세포를 활성화시켜 여러 가지 염증 중재물질이나 cytokines 등의 염증 매개체를 방출하게 하여 급성 염증반응을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>14-16)</sup>. EoL-1 cell, THP-1 cell, Jurkat cell은 각각 human eosinophil, monocyte, T cell의 leukemic cell line으로, 말초혈액의 eosinophil, monocyte, T cell과 유사한 특성을 가지고 있으며 실험실에서 이들 세포의 기능을 연구하는데 유용하다. eosinophil, monocyte, T cell은 각종 면역반응에 관여하는 세포들이며, 대식세포와 마찬가지로 자극에 의해 여러 가지 cytokine 등의 염증매개 물질을 방출하여 염증반응을 나타낸다<sup>17-21)</sup>.

이상의 세포주에 염증성 사이토카인 분비를 유도한 후 구판 추출물을 처리한 결과 구판은 RAW 264.7 cell에서 IL-1 $\beta$ 의 생성량과, EoL-1 cell에서 MCP-1의 생성량, THP-1 cell에서 IL-6의 생성량, Jurkat cell에서 IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$ 의 생성량을 유의성 있게 감소시키는 것으로 나타났다.

In vivo 실험에서는 BALB/c 생쥐에 7일간 구판을 투여한 후 LPS로 유도된 염증모델에서 혈청을 분리하여 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 를 측정한 결과 모두 구판 추출물 투여군에서 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다.

염증이 진행되고 있는 상태에서 몇몇 pro-inflammatory cytokine들, 예를 들어 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8 등이 활성화된 염증 및 면역관련 세포를 증가시키는데, 이로 인하여 염증상태는 확산, 지속된다<sup>22,23)</sup>. IL-1 $\beta$ 는 림프구와 대식세포를 활성화하고, 호중구의 내피세포 접착을 항진시키며, 급성기 단백질(acute phase protein) 합성과 분비를 유도하며, 발열과도 연관성이 있다. 또한, IL-8, MCP-1 등의 chemokine들을 유도함에 따라 염증 부위에 호산구, 단핵구, 혹은 림프구를 유주시켜 염증을 유발하는 작용이 있다<sup>9)</sup>.

MCP-1은 C-C chemokine family의 하나로, 단핵구의 유력한 화학주성 인자이다. MCP-1은 단핵구 및 대식세포, memory T cell, NK cell의 이주와 침윤을 조절하는 것으로 알려져 있는데, 천식, 류마티스 관절염 등 다양한 염증성 질환에 연루되어있음이 보고되었다<sup>24,25)</sup>. 또한 피부의 만성 염증성 질환인 만성 특발성 두드러기 환자를 대상으로 한 연구에서 MCP-1이 증가되어있는 것이 관찰되었으며, MCP-1의 발현으로 인해 단핵구의 반응성이 높아지면 전-염증성 환경을 조성하는데 기여하는 것으로 보고되었다<sup>26)</sup>.

IL-6는 활성화된 mast cell에서 분비되는 중요한 염증성 cytokine이며, 다기능 단백질로 선천 면역 반응에서는 급성기 단백질의 합성을 촉진하여 염증의 전신작용에 기여한다<sup>27)</sup>.

TNF- $\alpha$ 는 이차성 cytokine의 생산을 유발하여 면역 및 염증 반응을 확산시킨다<sup>28)</sup>. 특히 TNF- $\alpha$ 는 피부의 다양한 면역 질환에 결정적인 역할을 하는 것으로 생각 되어지고 있다<sup>29)</sup>. 각질 형성 세포에서 방출된 TNF- $\alpha$ 는 근접해있는 혈관내피세포에 adhesion molecules의 발현을 유도함으로써 염증세포의 축적을 촉진시키는데<sup>30)</sup>, 피부에서는 이런 작용의 결과로 인해 혈관이 확장되고 신생혈관형성이 증가된다. 그러므로 TNF- $\alpha$  와 같은 cytokine의 억제는 염증성 피부질환의 치료에 효과적인 방법이 될 것이라고 추측할 수 있다<sup>29)</sup>.

IL-4는 Th2 cell의 분화, IgE 생산, 호산구 모집에 영향을 미치는 Th2 cytokine으로, IL-4 발현의 변화는 항원 침입의 증가와 함께 방어막에 결함을 초래한다<sup>31)</sup>. CD4+ cord blood T cell 분석에서 IL-4 level의 증가는 아토피 피부염의 발생을 증가와 관계가 있음이 밝혀졌다<sup>32-34)</sup>.

IL-4, IL-5, IL-13이 과발현된 생쥐 모델에서는 IgE level이 상승하면서 감염과 피부병변이 증가하였으며 아토피 피부염이 자발적으로 발생하였음이 보고되었다<sup>35)</sup>. IL-5는 호산구의 생산, 생존, 확산과 연관된 cytokine으로<sup>36)</sup>, 항원에 노출된 곳에 호산구를 집합시킨다<sup>31)</sup>.

아토피 피부염 환자와 정상 대조군을 대상으로 한 연구에서는 아토피 피부염 환자의 말초혈액 단핵세포에서 생산된 IL-5의 level이 정상대조군보다 상승됨이 밝혀졌으며<sup>37)</sup>, 아토피 피부염 환자의 피부에서도 IL-5 level 상승이 관찰되었고, 이는 IgE level 과도 연관이 있음이 보고되었다<sup>38)</sup>.

구관은 상기 염증관련 사이토카인을 감소시켜 염증세포의 활성을 억제함을 알 수 있으며, 이에 따라서 표피 각질층의 염증 반응을 진정하여 홍반 감소, 소양감 소멸 등의 효과가 있을 것으로 사료된다.

이를 토대로 구관이 다양한 만성 염증성 피부 질환 치료에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 결 론

구관 추출물은 RAW 264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$ 의 생성을 20 ug/ml, 10 ug/ml 농도에서 유의성 있게 억제하였다. 구관 추출물은 EoL-1 세포주에서 MCP-1의 생성을 모든 농도에서 유의성 있게 억제하였다. 구관 추출물은 THP-1 세포주에서 MCP-1의 생성을 0.1 ug/ml 농도에서 유의성 있게 억제하였고, IL-6의 생성을 모든 농도에서 유의성 있게 억제하였다. 구관 추출물은 Jurkat 세포주에서 IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$ 의 생성을 모든 농도에서 유의성 있게 억제하였다. 구관 추출물은 LPS로 유도된 급성 염증 모델 BALB/c 생쥐에서 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  생성을 농도 의존적으로 유의성 있게 억제하였다.

## 감사의 글

한국기초과학지원연구원의 EAS를 활용하여 결과를 측정하였음.

## 참고문헌

1. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회 편저. 피부과학 제5판. 서울, 여문각, 2008.
2. 대한병리학회. 병리학. 서울, 고문사, pp 67-68, 1995.
3. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울, 영림사, pp 601-603, 1991.
4. 노석선. 원색피부과학. 서울, 아이비씨기획, pp 223, 229-230, 492, 547, 2006.
5. Spergel, J.M., Paller, A.S. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 112(6):118-127, 2003.
6. Novak, N., Bieber, T., Leung, D.Y. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 112(6):128-139, 2003.
7. Hamid, Q., Boguniewicz, M., Leung D.Y. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 94(2):870-876, 1994.
8. Ono, S.J., Nakamura, T., Miyazaki, D., Ohbayashi, M., Dawson, M., Toda, M. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol.* 111(6):1185-1199, 2003.
9. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. Immunology sixth edition. London, Mosby, p 119, 128, 441, 2002.
10. 제정진, 정석희, 이종수, 김성수, 신현대. 용골, 모려, 구관, 별갑, 아교가 골다공증에 미치는 영향에 관한 문헌적 고찰. 한방재활의학과학회지 7(1):73-91, 1997.
11. 남태선. 구관이 Sodium Levothyroxine으로 유발된 흰쥐의 갑상선기능항진증에 미치는 영향. 우석대학교대학원 석사학위논문. 1996.
12. 하미경, 구영희, 최인화. 구관 합 조구등 추출액에 살리실산 나트륨으로 유발된 와우의 형태학적 변화에 미치는 영향. 대한한의학회지 25(3):160-168, 2004.
13. 김동열. 구관이 fibroblast cell line인 L929 세포에서 cyclooxygenase-2 발현에 미치는 영향. 경희대학교대학원 석사학위논문. 2003.
14. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. Immunology. 5th ed. London, Mosby, pp 229-232, 1998.
15. Bomalaskim, J.S., Ford, T., Hudson, A.P., Clark, M.A. Phospholipase A2-activating protein induces the synthesis of IL-1 and TNF in human monocyte. *J Immunol.* 154(8):4027-4031, 1995.
16. Noyori, K., Okamoto, R., Takagi, T., Hyodo, A., Suzuki, K., Koshino, T. Experimental induction of arthritis in rats immunized with Escherichia coli 0:14 lipopolysaccharide. *J Rheumatol.* 21(3):484-488, 1994.
17. Mayumi, M. EoL-1, a human eosinophilic cell line. *Leuk Lymphoma.* 7(3):243-250, 1992.
18. Wong, C.K., Ho, C.Y., Lam, C.W., Zhang, J.P., Hjelm, N.M.



- Differentiation of a human eosinophilic leukemic cell line, EoL-1: characterization by the expression of cytokine receptors, adhesion molecules, CD95 and eosinophilic cationic protein (ECP). *Immunol Lett.* 68(2-3):317-323, 1999.
19. Auwerx, J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia.* 47(1):22-31, 1991.
  20. Auwex, J., Stael, F., Ceuppens, J.L. Changes in IgG Fc receptor expression induced by phorbol 12-myristate 13-acetate treatment of THP-1 monocyte leukemia cells. *Leuk Res.* 16(3):317-327, 1992.
  21. Singh, V.K., Mehrotra, S., Agarwal, S.S. The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: its relevance to autoimmunity and allergy. *Immunol Res.* 20(2):147-161, 1990.
  22. Church, M.K., Levi-Schaffer, F. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol.* 99(2):155-160, 1997.
  23. Metcalfe, D.D., Baram, D., Mekori, Y.A. Mast cells. *Physiol Rev.* 77(4):1033-1079, 1997.
  24. Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 29(6):313-326, 2009.
  25. Hussain, R., Ansari, A., Talat, N., Hasan, Z., Dawood, G. CCL2/MCP-I genotype-phenotype relationship in latent tuberculosis infection. *PLoS One.* 6(10):e25803, 2011.
  26. Santos, J.C., de Brito, C.A., Futata, E.A., Azor, M.H., Orii, N.M., Maruta, C.W., Rivitti, E.A., Duarte, A.J., Sato, M.N. Up-regulation of chemokine C-C ligand 2 (CCL2) and C-X-C chemokine 8 (CXCL8) expression by monocytes in chronic idiopathic urticaria. *Clin Exp Immunol.* 167(1):129-136, 2012.
  27. Baumann, H., Jahreis, G.P., Sauder, D.N., Koj, A. Human keratinocytes and monocytes release factors which regulate the synthesis of major acute phase plasma proteins in hepatic cells from man, rat, and mouse. *J Biol Chem.* 259(11):7331-7342, 1984.
  28. Nickoloff, B.J., Karabin, G.D., Barker, J.N., Griffiths, C.E., Sarma, V., Mitra, R.S., Elder, J.T., Kunkel, S.L., Dixit, V.M. Cellular localization of interleukin-8 and its inducer, tumor necrosis factor-alpha in psoriasis. *Am J Pathol.* 138(1):129-140, 1991.
  29. Kalyan Kumar, G., Dhamotharan, R., Kulkarni, N.M., Mahat, M.Y., Gunasekaran, J., Ashfaq, M. Embelin reduces cutaneous TNF- $\alpha$  level and ameliorates skin edema in acute and chronic model of skin inflammation in mice. *Eur J Pharmacol.* 662(1-3):63-69, 2011.
  30. Nickoloff, B.J., Turka, L.A. Keratinocytes: key immunocytes of the integument. *Am J Pathol.* 143(2):325-331, 1993.
  31. Brandt, E.B., Sivaprasad, U. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *J Clin Cell Immunol.* 10;2(3). pii: 110, 2011.
  32. Chan, L.S., Robinson, N., Xu, L. Expression of interleukin-4 in the epidermis of transgenic mice results in a pruritic inflammatory skin disease: an experimental animal model to study atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 117(40):977-983, 2001.
  33. Chen, L., Martinez, O., Overbergh, L., Mathieu, C., Prabhakar, B.S., Chan, L.S. Early up-regulation of Th2 cytokines and late surge of Th1 cytokines in an atopic dermatitis model. *Clin Exp Immunol.* 138(3):375-387, 2004.
  34. Chen, L., Lin, S.X., Overbergh, L., Mathieu, C., Chan, L.S. The disease progression in the keratin 14 IL-4-transgenic mouse model of atopic dermatitis parallels the up-regulation of B cell activation molecules, proliferation and surface and serum IgE. *Clin Exp Immunol.* 142(1):21-30, 2005.
  35. Lee, G.R., Flavell, R.A. Transgenic mice which overproduce Th2 cytokines develop spontaneous atopic dermatitis and asthma. *Int Immunol.* 16(8):1155-1160, 2004.
  36. Simon, D., Braathen, L.R., Simon, H.U. Eosinophils and atopic dermatitis. *Allergy.* 59(6):561-570, 2004.
  37. Simon, D., Von Gunten, S., Borelli, S., Braathen, L.R., Simon, H.U. The interleukin-13 production by peripheral blood T cells from atopic dermatitis patients does not require CD2 costimulation. *Int Arch Allergy Immunol.* 132(2):148-155, 2003.
  38. Jeong, C.W., Ahn, K.S., Rho, N.K., Park, Y.D., Lee, D.Y., Lee, J.H., Lee, E.S., Yang, J.M. Differential in vivo cytokine mRNA expression in lesional skin of intrinsic vs. extrinsic atopic dermatitis patients using semiquantitative RT-PCR. *Clin Exp Allergy.* 33(12):1717-1724, 2003.