

렛트 복강 비만세포와 화학항원 유도 알레르기 마우스에서 황금과 금은화 추출물의 항가려움 및 항염증 상승효과

목지에¹ · 전인화² · 김현수¹ · 신준호² · 박용균^{2,3} · 장선일^{1,2,4,*}

1: 전주대학교 보건관리학과, 2: 아토피엔에이 연구소,
3: 전주비전대학교 방송영상디자인학과, 4: 전주대학교 아토피·건강전문연구소

Synergic Anti-Pruritic and Anti-Inflammatory Effects of Scutellariae Radix plus Flos Loncerae Extracts in Rat Peritoneal Mast Cell and Chemical Antigen-Induced Mice

Ji Ye Mok¹, In Hwa Jeon², Hyeon Soo Kim¹, Jun Ho Shin², Yong Gyoung Park^{2,3}, Seon Il Jang^{1,2,4,*}

1: Department of Health Science, Jeonju University, 2: Ato Q&A Incorporation,
3: Department of Broadcasting & Visual Design, Jeonju Vision University,
4: Jeonju University Atopy & Health Research Institute

Pruritus is a unpleasant symptom in the skin that provokes the act of or desire to scratch. Mast cells are important effector cells in allergic reactions such as pruritus and inflammation. The purpose of this study was undertaken to investigate the synergic anti-pruritic and anti-inflammatory effects of Scutellariae Radix (SB) plus Flos Loncerae (FL) extracts in rat peritoneal mast cells (RPMCs), pruritogen-induced scratching mice and 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced allergic mice. We investigated the effect of SB, FL and SB plus FL extracts on the production of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , and histamine in RPMCs, on the scratching behavior in ICR mice, and skin clinical severity and inflammatory mediators in DNFB-induced allergic hairless mice. RPMCs stimulated with PMA plus A23187 or compound 48/80 significantly increased TNF- α , IL-1 β or histamine production compared with media control. However, TNF- α IL-1 β or histamine levels increased by PMA plus A23187 or compound 48/80 treatment were significantly inhibited by SB, FL in a dose-dependent manner. Especially, SB plus FL pretreatment had a synergic inhibitory effects on stimulator-induced cytokines (TNF- α and IL-1 β) and histamine production. Moreover, SB plus FL administration had a synergic inhibitory effects on the scratching behavior induced by pruritogen (compound 48/80, histamine, serotonin, substance P) in ICR mice. Furthermore, SB plus FL administration had a synergic inhibitory effects on skin damage, inflammatory mediators, leukocyte and mast cell infiltration induced by DNFB in hairless mice. These results suggest that SB plus FL administration has a potential use as a medicinal plant for treatment against itching and inflammation-related skin disease.

Key words : Scutellariae Radix, Flos Loncerae, mast cells, antipruritus, anti-inflammation, synergic effects

서 론

가려움증은 피부 질환의 핵심 증상으로 이는 신체 전반에 걸친 전신 질환이 있는 경우에도 나타날 수 있으며, 피부를 긁거

* 교신저자 : 장선일, 전주시 완산구 효자 3가 1200 전주대학교 보건관리학과

· E-mail : sonjiang@jj.ac.kr, · Tel : 063-220-3124

· 접수 : 2013/01/21 · 수정 : 2013/02/15 · 채택 : 2013/02/14

나 문지르고 싶은 충동을 일으키는 불유쾌한 감각이라고 할 수 있다^{1,2)}. 가려움증은 개인에 따라 매우 다양하게 나타나며, 같은 사람에서도 동일한 자극이라도 때에 따라 정도가 다른 가려움증을 일으킬 수 있다.

일반적으로 가려움증은 내부 및 외부의 가벼운 자극에 의해서도 일어날 수 있지만, 심각한 가려움증은 식품(주로 고단백 함유), 병원성 미생물 및 집먼지 진드기 등과 같은 생물학적 항원

(biological allergen)³⁾과 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)과 같은 화학항원(chemical allergen)⁴⁾에 노출되었을 때 유발될 수 있다.

피부 가려움증은 두드러기, 아토피피부염, 접촉피부염, 화폐상 습진, 신경 피부염, 건선, 피부 건조증, 노인 가려움증, 피부의 악성 림프종인 균상식육종 등이 있으며 침범된 부위와 환자의 감수성에 따라 그 정도가 다르게 나타날 수 있다⁵⁻⁷⁾. 특히 알레르겐(allergen)에 의해 유발되는 가려움증은 염증을 동반할 수 있는데, 어린 시기에 알레르겐에 의해 유발되는 아토피 피부염의 경우 심각한 가려움과 동시에 염증이 동반되면서 그 증상이 악화 및 완화가 반복적으로 일어나 삶의 질을 훼손하는 난치성 피부 질환으로 인식되고 있다^{8,9)}.

어린시기에 유발되는 아토피 피부염은 적절한 예방과 관리가 이루어지지 않으면, 알레르기성 비염, 천식 및 결막염 등 알레르기성 질환으로 이어질 수 있다. 이와 같이 알레르겐에 의해 아토피 피부염이 유발될 경우 알레르기성 질환이 연속적으로 일어나게 될 수 있는데, 이것을 아토피 또는 알레르기 행진(atopic or allergic march)이라 한다^{10,11)}. 즉, 피부에 알레르겐이 감작(sensitization)되면, 피부발진과 가려움을 통해 염증반응이 가속되어 아토피 피부염이 유발될 수 있는데, 계속적으로 피부와 호흡기에 알레르겐이 감작되면 천식을 비롯한 알레르기성 비염 등 호흡기 질환이 발생할 수 있으며, 안구주위에 전이되어 알레르기성 결막염을 야기할 수 있다¹¹⁾.

그러므로 알레르겐 노출에 의해 발생할 수 있는 가려움증과 염증을 차단하는 것이 매우 중요하다. 일반적으로 가려움증과 염증을 완화시키는데 사용되는 약물은 항히스타민과 스테로이드 제제를 들 수 있는데, 장기적으로 복용 또는 피부에 도포할 경우 부작용이 일어날 수 있다¹²⁾. 따라서 가려움증과 염증을 효과적으로 제어할 수 있고 부작용이 최소화된 약물의 개발이 필요하다.

황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 초본으로서 주피를 벗긴 뿌리를 생약(Scutellariae Radix)으로 이용하는데, 약리작용을 하는 주요 성분은 flavonoid계 화합물(baicalin, baicalein 및 wogonin 등)¹³⁾들로 항히스타민¹⁴⁾, 항염작용¹⁵⁾ 및 항암작용¹⁶⁾ 등이 밝혀졌으며, 최근에 황금 유래 wogonin는 Th2 케모카인 CCL17을 효과적으로 억제하여 AD 피부염의 증상을 완화시킬 수 있다는 보고가 있다¹⁷⁾. 그러나 황금의 약성미는 차갑고 매우 쓴 맛이 있고 장기간 사용하면 부작용을 초래할 수 있다¹⁸⁾.

금은화(*Flos Lonicerae*)는 인동(*Lonicera japonica* Thunberg)의 꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃을 지칭하는데, 약리작용을 하는 주요성분은 flavonoid¹⁹⁾, iridoid²⁰⁾, saponin²¹⁾ 및 polyphenol²²⁾ 화합물들로 항염증 및 항암 등 다양한 기능이 알려졌다. 그러나 금은화의 비만세포(mast cell)에서 항염증 및 항히스타민 작용은 매우 높은 농도(500 mg/mL 이상)에서 생물학적 효과²³⁾가 있기 때문에 약물로 사용하기 어려운 단점도 있다. 그러므로 한방에서는 황금과 금은화에 다른 여러 가지 한약재를 복합처방하여 항염증 및 아토피 피부염 개선에 대한 보고가 있다^{24,25)}. 그러나 이들 처방은 일반적으로 5가지 이상의 약물이 혼합된 것으로 장기간 복용 시 부작용이 있을 수 있다. 그러므로

황금과 금은화 추출물의 각각에 대한 생물학적 효능을 적용하여 최소화된 농도로 최대의 효과를 나타낼 수 있는 연구가 필요하지만, 이에 대한 연구보고는 없다.

따라서 본 연구는 황금과 금은화를 80% 에탄올로 추출하여 각각의 추출물과 이들 약물을 동시에 투여하는 방법으로 랫트 복강 비만세포(rat peritoneal mast cells, RMPCs)의 염증성 사이토카인과 히스타민의 생성에 미치는 효과와 ICR 마우스를 대상으로 가려움 유발물질로 유도된 항 가려움 효과 및 hairless 마우스를 대상으로 DNFB 유도 피부염과 관련 분자의 억제효과를 조사하였다. 그 결과 황금과 금은화를 동시에 처리할 경우 염증성 사이토카인과 염증 매개물을 현저히 억제하는 동시에 모델 마우스에서 가려움증 및 피부염이 현저히 개선되는 이들 약물의 상승작용에 대한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1), histamine 등 ELISA kit은 R&D Systems사(Minneapolis, USA)로부터 구입하였으며, compound 48/80, histamine, serotonin, substance P, percoll, compound 48/80, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), calcium ionophore A23187, 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), dimethyl sulfoxide (DMSO), penicillin/streptomycin, hematoxylin & eosin (H&E), toluidine blue와 기타 시약은 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

2) 황금과 금은화의 에탄올 추출

실험에 사용한 황금(*Scutellariae Radix*)과 인동(*Flos Lonicerae*)는 전라북도 진안군 한방약초센터에서 구입한 후 우석대학교 한의과대학 방제학교실의 김홍준 교수에게 의뢰하여 동정하였고, 황금표본(#2012-15)과 인동표본(#2012-16)은 전주대학교 대체의학대학 건강관리 연구실에 보관하고 있다. 잘 건조된 시료는 200 g를 분말로 제조하여 80% 에탄올 2 L를 주입하고 밀봉하여 7일간 방치한 후 용액을 취하여 3,000 rpm으로 원심침전 시키고 상층액을 취하여 0.45 μ m 필터를 사용하여 여과하였다. 여과된 시료는 회전진공농축기(Eyela A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축하고 회수한 후 동결건조기(Eyela FDU-2100, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)에서 건조하여 약 40 g를 회수한 다음 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

3) 실험동물

무균환경에서 사육된 7주령의 수컷 hairless 와 ICR 마우스 그리고 10주령의 Sprague Dawley 랫트는 중앙실험동물(주)(서울시, 대한민국)에서 구입하였고, 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 낮과 밤의 주기를 12시간씩 하였고, 온도(20-22°C)와 습도(50-60%)는 일정하게 유지하였으며, 실험동물위원회 의 규정에

준하여 실험하였다.

2. 방법

1) RPMCs 분리 및 약물처리

건강한 수컷 Sprague Dawley 랫트로부터 복강비만세포(rat peritoneal mast cells, RPMCs)의 분리는 Martynova 등²⁶⁾의 방법에 따라 분리하였다. 요약하면, 에테르(ether)로 마취시킨 다음 calcium-free HEPES-Tyrode buffer (10 mM Hepes, 113 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.13 mM MgCl₂, 0.6 mM NaH₂PO₄, 10 mM glucose, pH 7.4)를 10 mL을 복강에 주입시켜 약 90초간 복강을 부드럽게 마사지한 후 복강을 주의 깊게 열어 Pasteur pipette을 사용하여 세포부유액을 취하고 percoll density gradient법으로 RPMCs를 얻었다. 특별히 본 실험 목적에 따라 충분한 세포를 확보하기 위해서 5-10마리 랫트에서 얻은 복강비만세포를 혼합하여 사용하였다. 여러 가지 농도의 황금, 금은화 또는 황금 플러스 금은화 추출물은 RPMCs (5×10⁵)에 10분 또는 2시간 동안 전처리한 후 compound 48/80이나 PMA와 A23187로 자극하여 히스타민과 전염증성 사이토카인 측정에 사용하였다.

2) RPMCs에서 히스타민 방출량의 측정

RPMCs (5×10⁵/mL)는 여러 가지 농도의 황금, 금은화 또는 황금 플러스 금은화 추출물을 37°C에서 10분간 전처리한 다음 compound 48/80 (0.5 µg/mL)으로 자극하여 30분간 방치 반응을 중지시키기 위하여 배양튜브를 빙수에 넣어 충분히 냉각시킨 후 1,200 rpm으로 15분간 원심전전시키고 상층액을 얻었다. 상층액으로부터 히스타민을 측정하였다. 요약하면, anti-histamine antibody (ab)를 활용하여 상기와 같이 얻은 상층액 시료에 반응시키고, anti-histamine ab에 특이적으로 작용하는 기질효소가 부착된 2차 항체를 주입한 후 발색시켜 R&D사가 제공하는 각 사이토카인에 대한 ELISA 방법에 준하여 측정하고 정량하였다.

3) 사이토카인 및 IgE의 측정

RPMCs로부터 사이토카인의 측정은 추출물을 2시간동안 전처리한 후 PMA (30 ng/mL)와 A23187 (10 µM)로 동시에 자극한 다음 12시간 후에 세포 상층액으로부터 TNF-α와 IL-1β를 측정하였다. 한편 DNFB로 감작한 마우스의 IL-4와 IgE 측정은 추출물 투여 종료 후 5시간에 혈청을 취하고 혈청으로부터 IgE, IL-4를 측정하였다. TNF-α, IL-1β, IL-4와 IgE 등은 anti-mouse TNF-α, anti-mouse IL-1β, anti-mouse IL-4와 anti-mouse IgE 등 항체를 사용하여 각각에 특이적으로 작용하는 ELISA kit을 사용하여 R&D Systems사가 제공하는 방법에 준하여 측정하고 정량하였다. 요약하면, 세포상층액 또는 5배 희석 혈청 100 µL을 각각의 항체가 코팅된 plate에 주입하고 반응시킨 후 잘 세척한 다음 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체를 주입하고 반응시킨 후 발색 기질을 주입하고 반응시켜 ELISA reader (Molecular Devices, USA)로 측정하였으며, 각 물질에 대한 정량은 각각의 물질을 농도별로 처리하여 반응시켜 표준곡선을 정하고 세포상층액 또는 혈청에 함유된 물질의 양을 계산하였다.

4) 추출물 처리 및 가려움증 유발 시험

스트레스가 해소된 ICR 마우스는 실험군당 5마리의 마우스

를 각각 투명 아크릴 케이지(20×26×13 cm)에 한 마리씩 넣고, 안정을 위해 30분 동안 동일한 실험환경에 방치하였다. 그 후 대조군은 생리식염수를 경구투여 하였고, 실험군은 황금, 금은화 또는 황금 플러스 금은화 추출물을 경구투여하고 60분 후에 compound 48/80 (50 µg/site), 히스타민(100 µg/site), 세로토닌 (100 µg/site), substance P (100 µg/site)의 농도로 0.10 mL씩 마우스 등의 양쪽 어깨 사이 높이에 피하주사(s.c injection)하였다.

5) 가려움증 판정 시험

가려움증 유발물질을 주사한 마우스는 곧바로 Mihara²⁷⁾의 방법을 따라 micro-camera (ONCCTV, 서울, 대한민국)를 사용하여 60분 동안 녹화하였으며, 뒷발로 가려움증 유발물질이 주입된 부위를 긁는 횟수를 이중맹검법으로 계수하여 평가하였다. 각 유발물질에 따른 실험은 각각 다른 날에 진행되었으며 매 실험에 사용된 마우스는 1회 사용되었다.

6) DNFB 유도 피부염 모델

화학항원 유도 아토피 피부염 모델 동물을 유도하기 위해서 acetone과 olive 오일을 3:1로 제조된 용매에 0.15% DNFB를 제조하여 1일과 4일에 각각 등 쪽 피부(100 µL)에 감작하였다. 두 번째 감작일인 4일부터 대조군은 생리식염수 만 복강에 하루에 한번 실험 종료일까지 주사하였고, 실험군은 추출물을 복강에 하루에 한번 실험 종료일인 13일까지 주사하였다. 첫 번째 감작일로부터 7일, 10일과 13일에 3일 간격으로 0.2% DNFB를 감작시킨 부위에 같은 용량으로 공격(challenge)을 하였다.

7) 혈청 및 조직의 두께 측정

마지막 공격 후 5시간 후에 마우스의 간 문맥으로부터 혈액을 채취하여 혈청을 얻고, 등 피부조직의 두께는 digital caliper (Mitutoyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

8) 피부병변의 평가

피부상태는 0주째부터 1주 간격으로 4주 동안 사진을 찍어 조사하였다. 피부의 건조상태(dryness)와 스케링(scaling) 그리고 미란(erosion), 찰과상(excoriation), 출혈 등을 체크하여 병변이 없는 상태를 0점(none), 가벼운 상태를 1점(mild), 중간 상태를 2점(moderate), 심한상태를 3점(severe)을 주었고 각 단계별로 총 점수부여하여 평가하였다.

9) 피부조직

실험 과정에 따라 대조군과 실험군을 대상으로 희생시키고, 피부조직 약 5×5 mm를 적출하여 4% paraformaldehyde(pH 7.4)로 고정하고 일련의 과정을 통하여 파라핀 블록을 제작한 후, 5 µm 간격으로 피부조직을 종단면으로 절편 하였다. 조직학적 검사와 백혈구 침윤을 검사하기 위해 H&E 또는 toluidine blue로 염색하고 저배율(40×)에서 관찰하고 확대하면서 40 또는 400× 현미경 시야에서 사진을 찍어 제시하였고, 백혈구의 침윤을 확인하기 위해 400× 현미경 시야에서 검경하였다(Olympus, Japan).

10) 통계처리

모든 실험값은 평균±표준편차로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리하였으며, 유의성 한계는 p<0.05로 정하였다.

결 과

1. 황금과 금은화 추출물의 전 염증성 사이토카인 생성 억제에 대한 상승효과

본 연구는 먼저 황금과 금은화 에탄올 추출물이 항염증효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RPMCs (5×10^5 /mL)를 접종하고 각각의 추출물을 25-200 μ g/mL 농도로 2시간 전 처리한 다음 PMA (30 ng/mL)와 A23187 (10 μ M)을 동시에 처리하고 12시간 후 배양액에 측정된 TNF- α 와 IL-1 β 양을 측정하였다. 그 결과 PMA와 A23187를 처리한 대조군은 아무런 약물을 처리하지 않은 정상 대조군에 비해서 TNF- α (Fig. 1A)와 IL-1 β (Fig. 1B)의 생성이 현저히 증가($p < 0.001$)한 반면, 황금과 금은화 추출물을 처리한 실험군은 농도 의존적으로 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성이 억제되었다. 황금은 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성 억제에 대한 최소농도가 50 μ g/mL ($p < 0.05$)으로 금은화(100 μ g/mL, $p < 0.05$)에 비해 그 효과가 좋았다. 이와 같이 황금과 금은화의 추출농도에 따른 전 염증성 사이토카인 생성 억제를 확인한 후에 황금의 유의한 최소농도를 50 μ g/mL와 억제경향을 보인 금은화의 50 μ g/mL의 농도를 선택하여 RPMCs에 동시에 처리한 실험군과 황금(100 μ g/mL)과 금은화(100 μ g/mL)를 각각 처리한 실험군에서 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성 억제에 대한 상승효과가 있는지 조사하였다. 그 결과 황금플러스 금은화를 처리한 실험군은 각각의 추출물을 처리한 실험군에 비해서 TNF- α (Fig. 2A)와 IL-1 β (Fig. 2B)의 생성을 현저히 억제하는 상승효과가 있었다($p < 0.001$). 즉, 황금(50 μ g/mL) 플러스 금은화(50 μ g/mL) 처리군은 Fig. 1에서 나타낸 이들 약물의 최대농도(200 μ g/mL)처리군 보다 더 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성을 억제시켰다.

2. 황금과 금은화 추출물의 히스타민 방출 억제에 대한 상승효과

한편 본 연구는 황금과 금은화 추출물이 가려움증 유발 핵심 물질인 히스타민 방출에 대한 억제 영향을 알아보기 위하여 RPMCs (5×10^5 /mL)를 접종하고 각각의 추출물을 25-200 μ g/mL 농도로 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 전 처리한 다음 compound 48/80 (0.5 μ g/mL)으로 자극하여 히스타민의 양을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3A과 같이 RPMCs를 compound 48/80로 자극할 경우 히스타민 방출량은 정상 대조군에 비해서 현저히 증가하였다($p < 0.001$). 그러나 황금과 금은화 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 히스타민의 생성이 억제되었다. 전염증성 사이토카인 생성 억제와 유사하게 황금 추출물은 금은화 추출물 보다 히스타민 방출 억제효과가 우수하였다. 따라서 황금과 금은화의 추출농도에 따른 히스타민 방출 억제를 확인한 후에 황금의 유의한 최소농도를 50 μ g/mL와 억제경향을 보인 금은화의 50 μ g/mL의 농도를 선택하여 RPMCs에 동시에 처리한 실험군과 황금(100 μ g/mL)과 금은화(100 μ g/mL)를 각각 처리한 실험군에서 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성 억제에 대한 상승효과가 있는지 조사하였다. 그 결과 Fig. 3B와 같이 황금과 금은화를 동시에 처리한 실험군은 각각의 추출물을 처리한 실험군에 비해서 히스타민의 방출을 현저히 억제하는 상승효과가 있었다($p < 0.001$). 즉, 황금(50 μ

g/mL) 플러스 금은화(50 μ g/mL) 처리군은 Fig. 2A에서 나타낸 이들 약물의 최대농도(200 μ g/mL)처리군 보다 더 히스타민 방출을 억제시켰다.

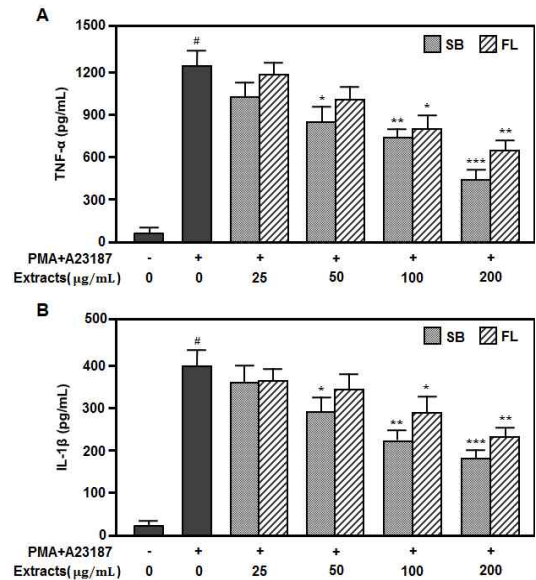


Fig. 1. Effect of Scutellariae Radix (SB) and Flos Lonicerae (FL) on PMA plus A23187-Induced TNF- α (A) and IL-1 β (B) production. RPMCs cells (5×10^5 /mL) were pre-treated with or without SB and FL at indicated concentrations for 2 h, and then stimulated with or without PMA (30 ng/mL) plus A23187 (10 μ M) for 12 h. Cytokine concentrations were measured in cell supernatants using the ELISA method. Values represent the means \pm SD of three independent experiments. [#] $p < 0.001$ versus the non-treated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.01$ versus PMA plus A23187 alone group.

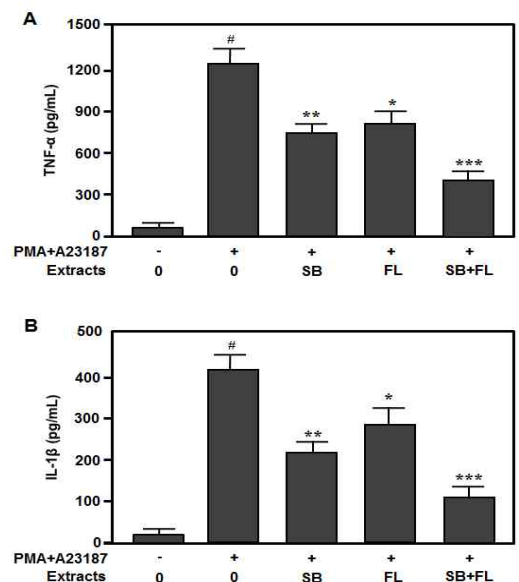


Fig. 2. Synergistic effect of SB plus FL on PMA plus A23187-Induced TNF- α (A) and IL-1 β (B) production. RPMCs cells (5×10^5 /mL) were pre-treated with or without SB (100 μ g/mL), FL (100 μ g/mL) and SB (50 μ g/mL) plus FL (50 μ g/mL) for 2 h, and then stimulated with or without PMA (30 ng/mL) plus A23187 (10 μ M) for 12 h. Cytokine concentrations were measured in cell supernatants using the ELISA method. Values represent the means \pm SD of three independent experiments. [#] $p < 0.001$ versus the non-treated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.01$ versus PMA plus A23187 alone group.

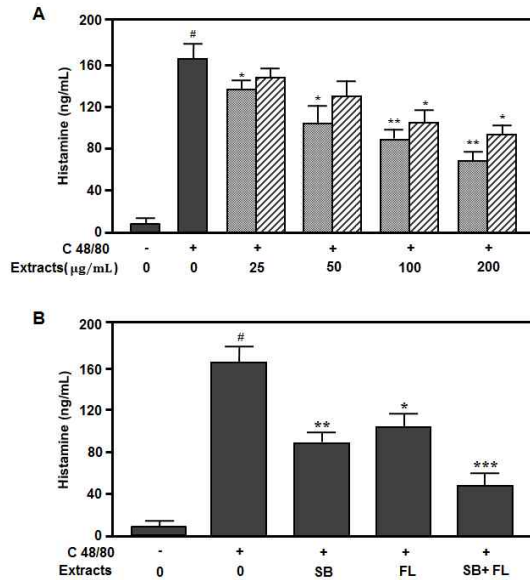


Fig. 3. Synergic effect of SB plus FL on histamine release from RPMCs cells activated with compound 48/80 (C 48/80). RPMCs cells (5×10^5 /mL) were pre-treated with or without SB or FL at indicated concentrations (A) and SB (100 µg/mL), FL (100 µg/mL) and SB (50 µg/mL) plus FL (50 µg/mL) (B) for 2 h, and then stimulated with or without compound 48/80. Histamine assay was performed by ELISA method on supernatant from RPMCs. Values represent the means \pm SD of three independent experiments. #p<0.001 versus the non-treated control group. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 versus compound 48/80 alone group.

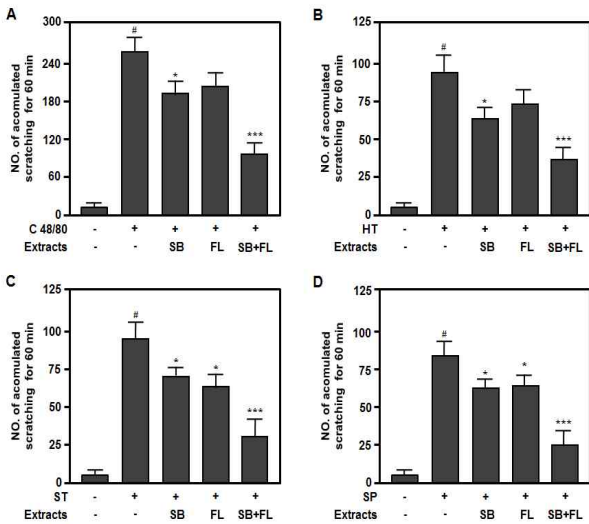


Fig. 4. Synergic antipruritic effects of SB plus FL extract on the scratching behavior induced by pruritogens in ICR mice. SB (100 mg/kg), FL (100 mg/kg) or SB 50 mg/kg plus FL (50 mg/kg) was administered orally 1 hour before the pruritogen injection and then 50 µg/site compound 48/80 (C 48/80), 100 µg/site histamine (HT), 100 µg/site serotonin (ST) or 100 µg/site substance P (SP) was injected into rostral back, and scratching of the injected site by the hind paw was counted for 1 h. Values represent the means \pm SD of 5 individuals. #p<0.001 versus normal control group. *p<0.01 and ***p<0.001 versus C 48/80, HT, ST or SP alone group.

3. 황금과 금은화 추출물의 항 가려움증에 대한 상승효과

본 연구는 황금과 금은화 추출물이 항가려움증 효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 황금, 금은화 또는 황금 플러스 금은화 추출물을 ICR 마우스에 경구투여하고 1시간 후에 가려움 유발물질 을 마우스 등의 양쪽 어깨 사이 높이에 피하주사 하였다. 그 결과

Fig. 4와 같이 compound 48/80, 히스타민, 세로토닌 또는 substance P를 피하에 주입한 결과 정상 대조군에 비해서 긁는 횟수가 현저히 증가하였다(p<0.001). 그러나 황금 추출물(100 mg/kg)은 compound 48/80, 히스타민, 세로토닌 또는 substance P로 유발한 가려움 유발 모델 마우스에서 가려움 경감 효과가 있었고(p<0.05), 금은화 추출물(100 mg/kg)을 투여한 실험군은 compound 48/80 또는 히스타민 유도 모델 마우스에서 가려움 경감 효과는 없었지만, 세로토닌 또는 substance P는 황금 추출물과 유사하게 가려움 경감 효과가 있었다(p<0.05). 특히 황금(50 mg/kg) 플러스 금은화 (50 mg/kg) 추출물을 투여한 실험군의 경우 compound 48/80, 히스타민, 세로토닌 또는 substance P 유도 가려움 모델 마우스에서 가려움증을 현저히 억제시키는 상승효과가 있었다(p<0.001).

4. DNFB 염증모델 마우스에서 황금과 금은화 추출물의 항염증에 대한 상승효과

본 연구는 황금 플러스 금은화 추출물이 DNFB 유도 염증 모델 마우스에서 항염증에 대한 상승효과가 있는 지 알아보기 위하여 황금 또는 금은화 추출물의 효과와 비교 조사하였다. 먼저 DNFB로 첫째 날과 4일에 감작한 후 황금 또는 금은화 추출물을 각각 마우스 체중 kg 당 100 mg과 황금(50 mg/kg) 플러스 금은화(50 mg/kg) 추출물을 하루에 1회씩 시험 종료 시까지 투여하였다. 그리고 첫 번째 감작한 후 7일부터 3일 간격으로 DNFB로 공격하였다. 최종 약물과 공격 후 6시간 지난 후 마우스 피부부변의 조사와 함께 피부조직을 H&E 및 toluidine으로 조직을 염색하여 면역세포의 침윤상태를 조사하였으며, 혈청으로부터 IgE와 IL-4의 생성량을 조사하였다. 그 결과 정상대조군은 실험 종료 후 피부조직의 변화가 없었지만, DNFB로 감작과 공격한 대조군에서는 심각한 피부부변과 염증이 동반되어 있었고 (Fig 5와 Fig. 6A), 피부조직은 극세포증(acanthosis), 각질증식증(hyperkeratosis), 상처 및 출혈 수준이 매우 심각하였고(Fig. 5) 그 두께가 현저히 증가되었다(Fig. 6B). 그러나 DNFB로 유도되고 황금 또는 금은화 추출물이 투여된 실험군에서는 DNFB로만 감작한 대조군에 비해서 그 증상이 완화되었다. 특히 황금 플러스 금은화 추출물을 투여한 실험군은 그 증상이 현저히 개선되는 상승 효과가 있었다. 또한 백혈구 및 비만세포 침윤에 미치는 황금 플러스 금은화 추출효과를 알아보기 위해 H&E와 toluidine blue로 조직을 염색하여 400배 현미경 시야에서 검경한 결과 DNFB로만 감작한 대조군은 백혈구 침윤(Fig. 5B)과 비만세포의 활성화 및 탈과립 (Fig. 5)이 매우 높았으나, 황금 또는 금은화 추출물을 처리한 실험군은 백혈구 침윤과 비만세포 활성화 및 탈과립이 현저히 억제되는 상승효과가 있었다.

마지막으로 황금 플러스 금은화 추출물이 DNFB 유도 염증 모델 마우스에서 혈청으로부터 염증 및 과민반응 주요물질인 IL-4와 IgE 생성 억제에 대한 상승효과가 있는 지 알아보기 위하여 황금 또는 금은화 추출물의 효과와 비교 조사하였다. 그 결과 Fig. 6C와 D와 같이 DNFB로만 감작과 공격한 대조군에서는 IL-4와 IgE의 생성이 매우 증가한 반면, 황금 또는 금은화 추출물

이 투여된 실험군에서는 대조군에 비해서 IL-4와 IgE의 생성이 현저히 억제되었다. 특히 황금 플러스 금은화 추출물을 투여한 실험군은 그 증상이 현저히 개선되는 상승효과가 있었다($p < 0.001$).

고찰

비만세포는 아토피 피부염을 비롯한 대부분의 가려움증을 동반하는 알레르기성 질환에서 급성 및 만성 염증 질환과 가려움증을 일으키는데 핵심적으로 참여하는 세포로 28-30, anti-IgE, A23187, PMA, 히스타민과 compound 48/80과 같은 자극원에 의해 활성화 되어 TNF- α , IL-1 β , IL-6과 IL-8 등 염증성 사이토카인의 생성뿐만 아니라 히스타민과 같은 가려움 유발물질 (pruritogen)을 방출하여^{30,31} 가려움증을 더욱 촉진시켜 피부장벽을 붕괴시키는 원인이 된다³². 따라서 본 연구는 먼저 RPMCs에 황금과 금은화 추출물을 농도별(25-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 전 처리한 후에 A23187과 PMA로 자극하여 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성에 미치는 영향을 조사한 후 이들 사이토카인의 생성 억제에 미치는 황금의 유의한 최소농도(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 억제 경향을 보인 금은화의 농도(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 선택하여 이들을 동시에 투여한 실험군과 황금과 금은화 각각의 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 투여군과 비교 조사한 결과 각각의 추출물을 투여한 실험군에 비해서 이들 약물을 동시에 투여한 실험군에서 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성을 현저히 억제시키는 효과가 있었을 뿐만 아니라 본 연구에서 사용한 각 약물의 최대 농도인 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군보다 그 효과가 우수하여 염증성 사이토카인 생성 억제에 대한 뚜렷한 상승효과가 있음을 발견하였다(Fig. 2).

다음은 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성 억제에 효과적인 농도를 선택하여 각각의 추출물과 이들 추출물을 동시에 전 처리한 실험군에서 compound 48/80으로 자극된 RPMCs의 히스타민 생성 억제를 조사하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 각각의 추출물을 투여한 실험군에 비해서 이들 약물을 동시에 투여한 실험군에서 히스타민의 생성을 현저히 억제시키는 효과가 있었을 뿐만 아니라 본 연구에서 사용한 각 약물의 최대 농도인 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군보다 그 효과가 우수하여 가려움 매개물질인 히스타민의 생성 억제에 대한 뚜렷한 상승효과가 있음을 확인할 수 있었다.

일반적으로 황금은 본 연구와 다른 연구의 보고와 같이 TNF- α 와 IL-1 β 과 같은 전 염증성 사이토카인과 가려움 매개물질인 히스타민 생성에 대한 억제에는 비만세포에서 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하에서도 그 효과가 있었다. 그러나 금은화 추출물은 본 연구에서는 100-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 그 효과가 있었으나, 다른 연구자²³는 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서 그 효과가 있는 것으로 보고하였다. 그런데 지금까지 황금과 금은화를 동시에 처리하여 전 염증성 사이토카인이나 히스타민 생성 억제에 대한 보고는 없었다. 따라서 본 연구는 황금과 금은화를 조합한 전염증성 사이토카인과 히스타민을 효과적으로 제어할 수 있는 결과를 처음 제공하였다.

한편 compound 48/80은 비만세포를 자극하여 활성화시키는 강력한 물질이며, 여러 항원에 의해 자극된 비만세포는 히스타민, 세로토닌 또는 substance P와 같은 가려움증 매개물질을 분비한다³³. 이러한 비만세포에서 분비되는 물질로 인해 유발되는 가려움증은 아토피 피부염 등 알레르기성 피부질환 환자에서 흔히 발견되는 가려움증과 유사한 증상을 유발한다. 이러한 가려움 유발물질에 대한 효과를 실험하기 위해서 ICR, ddY,

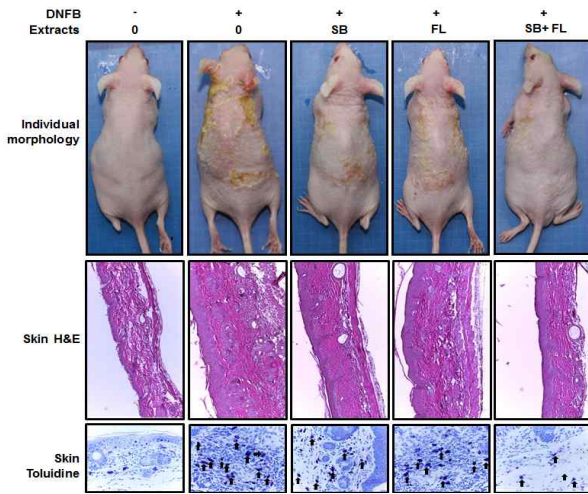


Fig. 5. Synergistic inhibitory effects of SB plus FL extract on DNFB-induced skin disease and inflammation in hairless mice. Mice were sensitized on skin with and without 100 μl (dorsal skin) of 0.15 % DNFB on day 1 and 4. On day 7, 10, and 13, mice were challenged with or without 100 μl (dorsal skin) of 0.2 % DNFB on the dorsum of ears and dorsal skin. Control group received only saline with intraperitoneal injection (ip) for 10 days from 4 to 13 days. Experimental groups received SB (100 mg/kg), FL (100 mg/kg) or SB 50 mg/kg plus FL (50 mg/kg) with ip for 10 days from 4 to 13 days. Epidermal skin tissue was stained by H&E or toluidine blue as described in the section of materials and methods. Magnification: $\times 40$ (H&E stained tissue), $\times 400$ (toluidine stained tissue).

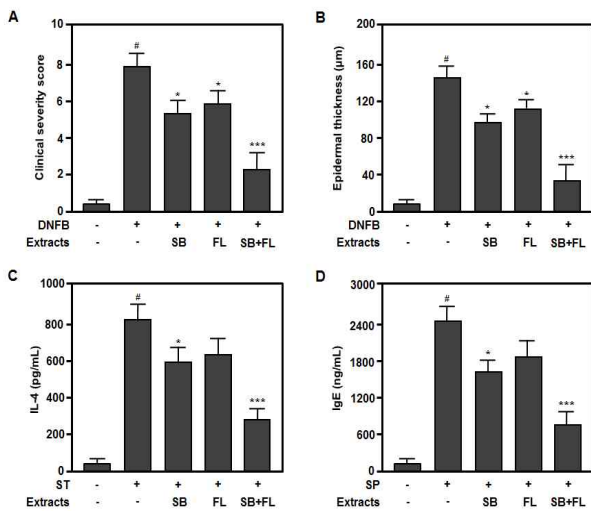


Fig. 6. Synergistic inhibitory effects of SB plus FL extract on clinical severity, epidermal thickness, IL-4 and IgE production induced by DNFB in hairless mice. Mice were sensitized on skin with and without 100 μl (dorsal skin) of 0.15 % DNFB on day 1 and 4. On day 7, 10, and 13, mice were challenged with or without 100 μl (dorsal skin) of 0.2 % DNFB on the dorsum of ears and dorsal skin. Control group received only saline with intraperitoneal injection (ip) for 10 days from 4 to 13 days. Experimental groups received SB (100 mg/kg), FL (100 mg/kg) or SB 50 mg/kg plus FL (50 mg/kg) with ip for 10 days from 4 to 13 days. Clinical severity or epidermal thickness was measured by visual inspection or vernier calipers as described in the section of materials and methods. IL-4 and IgE levels were measured in sera using the ELISA method. (A) clinical severity, (B) epidermal thickness, (C) IL-4 and (D) IgE. Values represent the means \pm SD of five individuals. $^{\#}p < 0.001$ versus the non-treated control group. $^*p < 0.01$ and $^{***}p < 0.001$ versus control group treated with DNFB alone group.

NC/Nga, hairless 등의 마우스가 사용되고 있으며, 그 중에서도 Hairless 마우스는 피부 표면이 인간과 유사한 털이 없는 종으로써 인위적인 피부병소를 유발하거나 피부 자극에 대한 반응을 볼 수 있으며, 또한 compound 48/80뿐 아니라 히스타민, 세로토닌 그리고 substance P와 같은 가려움증 유발 화학약물의 비만세포 자극을 통한 가려움증 유발 정도가 합리적인 것으로 나타났다³⁵⁾. 그러므로 본 연구는 황금과 금은화 추출물을 동시에 처리할 경우 가려움 경감에 미치는 상승효과가 있는지 조사한 결과 황금과 금은화 추출물을 투여한 실험군에서 각각의 추출물을 투여한 실험군 보다 compound 48/80, 히스타민, 세로토닌 또는 substance P 유도 가려움 모델 마우스에서 가려움증을 현저히 억제시키는 상승효과가 있었다(Fig. 4). 이와 같이 본 연구는 황금과 금은화를 동시에 투여할 경우 가려움을 경감시키는데 매우 효과적인 방법을 처음으로 제공하였다.

화학 아레르겐 중 DNFB는 산업화된 환경에 산재되어 인체에 쉽게 노출될 수 있다⁹⁾. 이러한 DNFB가 인체의 피부에 감작되면, 협조유도세포의 편향된 발달을 비롯한 비만세포의 과도한 활성화 등 면역불균형(immune disorder)에 의한 급성 및 만성 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 그러므로 본 연구는 hairless 마우스에 DNFB를 사용하여 감작과 공격을 통해 피부병변 및 염증을 유발하여 황금과 금은화 추출물의 피부병변 개선과 항염증 효과에 대한 상승작용이 있는지 조사하였다. 그 결과 정상대조군에 비해서 DNFB로 감작과 공격한 대조군은 극세포증, 각질증식증, 상처 및 출혈 등 심각한 피부병변과 염증이 동반되었다. 그러나 황금과 금은화 추출물을 투여한 실험군은 각각의 추출물을 투여한 실험군 보다 그 증상이 현저히 개선되는 상승효과가 있었다(Fig. 5). 또한 백혈구 및 비만세포 침윤에 미치는 황금과 금은화 추출물을 동시에 투여한 실험군은 백혈구 침윤과 비만세포 활성화 및 탈과립이 현저히 억제되는 상승효과가 있었다(Fig. 5).

마지막으로 본 연구는 황금 플러스 금은화 추출물이 DNFB 유도 염증 모델 마우스에서 혈청으로부터 염증 및 과민반응 주요물질인 IL-4와 IgE 생성 억제에 대한 상승효과가 있는지 알아본 결과 Fig. 6C와 D와 같이 DNFB로만 감작과 공격한 대조군에서는 IL-4와 IgE의 생성이 매우 증가한 반면, 황금과 금은화 추출물을 동시에 투여한 실험군에서는 각각의 추출물을 투여한 실험군보다 IL-4와 IgE의 생성이 현저히 억제되는 상승효과가 있었다.

이상의 결과를 종합해볼 때 황금과 금은화 추출물을 각각 처리할 경우보다 이들 약물을 동시에 처리할 경우 전염증성 사이토카인은 물론 가려움 유발 물질인 히스타민의 억제에 대한 효과가 우수하였다. 또한 가려움 유발 물질로 알려진 compound 48/80, 히스타민, 세로토닌 또는 substance P으로 유발한 가려움 모델 마우스에서 가려움증경감에 대한 상승효과가 있었다. 더욱이 황금과 금은화 추출물을 동시에 투여할 경우 DNFB로 감작된 피부질환 모델 마우스에서도 백혈구와 비만세포의 침윤을 억제함으로써 피부 병변과 염증 현저히 개선시키는 상승효과가 있음을 본 연구는 처음으로 제시하였다.

결론

가려움증은 피부건조 및 각종 알레르겐에 의해서 유발될 수 있는데, 아토피 피부염을 비롯한 알레르기성 피부질환에서 염증을 동반할 수 있기 때문에 현대인의 삶의 질을 크게 훼손하고 있다. 그러므로 본 연구는 황금 또는 금은화 추출물과 이들 추출물을 동시에 투여하여 가려움증 경감 및 항염증 효과에 대해서 조사하였다. 황금과 금은화 추출물을 각각 처리할 경우보다 이들 약물을 동시에 처리할 경우 전염증성 사이토카인은 물론 가려움 유발 물질인 히스타민의 억제에 대한 상승효과가 있었다. 또한 가려움 유발 물질인 compound 48/80, 히스타민, 세로토닌 또는 substance P으로 처리된 모델 마우스에서 가려움증 경감에 대한 상승효과가 있었다. 더욱이 황금과 금은화 추출물을 동시에 투여할 경우 DNFB로 감작된 피부질환 모델 마우스에서도 백혈구와 비만세포의 침윤을 억제함으로써 피부 병변과 염증 현저히 개선시키는 상승효과가 있음을 본 연구는 처음으로 제시하였다. 이와 같이 황금과 금은화를 동시에 투여할 경우 가려움과 염증이 동반되는 피부질환에 유용하게 활용할 수 있는 방법이라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 예비기술창업자 육성사업으로 중소기업청의 지원을 받아 연구되었다(과제번호 2012MT-02-00491-A-00030).

참고문헌

1. Metz, M., Grundmann, S., Ständer, S. Pruritus: an overview of current concepts. *Vet Dermatol.* 22: 121-131, 2011.
2. Pfaar, O., Raap, U., Holz, M., Hörmann, K., Klimek, L. Pathophysiology of itching and sneezing in allergic rhinitis. *Swiss Med Wkly.* 139: 35-40, 2009.
3. Casset, A., Braun, J.J. Relationships between indoor allergens, sensitization, and allergic asthma and rhinitis symptoms. *Rev Mal Respir.* 27: 913-920, 2010.
4. Kimber, I., Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Dearman, R.J. Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. *Toxicol Sci.* 120 Suppl 1: S238-268, 2012.
5. O'Neill, J.L., Chan, Y.H., Rapp, S.R., Yosipovitch, G. Differences in itch characteristics between psoriasis and atopic dermatitis patients: results of a web-based questionnaire. *Acta Derm Venereol.* 91: 537-540, 2011.
6. Kamo, A., Tominaga, M., Tengara, S., Ogawa, H., Takamori, K. Inhibitory effects of UV-based therapy on dry skin-inducible nerve growth in acetone-treated mice. *J Dermatol Sci.* 62: 91-97, 2011.
7. Shin, J.W., Jin, S.P., Lee, J.H., Cho, S. Analysis of

- MAST-CLA Results as a Diagnostic Tool in Allergic Skin Diseases. *Ann Dermatol.* 22: 35-40, 2010.
8. Kay, A.B. Overview of allergy and allergic diseases: with a view to the future. *Br Med Bull.* 56: 843-864, 2000.
 9. Casset, A., Braun, J.J. Relationships between indoor allergens, sensitization, and allergic asthma and rhinitis symptoms]. *Rev Mal Respir.* 27: 913-920, 2010.
 10. Spergel J.M. Epidemiology of atopic dermatitis and atopic march in children. *Immunol Allergy Clin North Am.* 30: 269-280, 2010.
 11. Spergel, J.M., Paller, A.S. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 112(6 Suppl):S118-127, 2003.
 12. Lasić, D., Cvitanović, M.Z., Uglešić, B., Višić, V., Hlevnjak, I. Exanthema medicamentosum as a side effect of promazine. *Psychiatr Danub.* 23: 194-197, 2011.
 13. Zhou, X.Q., Liang, H., Lu, X.H., Cai, S.Q., Wang, B., Zhao, Y.Y. Flavonoids from *Scutellaria baicalensis* and their bioactivities]. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 41: 578-584, 2009.
 14. Trinh, H.T., Joh, E.H., Kwak, H.Y., Baek, N.I., Kim, D.H. Anti-pruritic effect of baicalin and its metabolites, baicalein and oroxylin A, in mice. *Acta Pharmacol Sin.* 31: 718-724, 2010.
 15. Kim, E.H., Shim, B., Kang, S., Jeong, G., Lee, J.S., Yu, Y.B., Chun, M. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* extract via suppression of immune modulators and MAP kinase signaling molecules. *J Ethnopharmacol.* 126: 320-331, 2009.
 16. Kumagai, T., Müller, C.I., Desmond, J.C., Imai, Y., Heber, D., Koeffler, H.P. *Scutellaria baicalensis*, a herbal medicine: anti-proliferative and apoptotic activity against acute lymphocytic leukemia, lymphoma and myeloma cell lines. *Leuk Res.* 31: 523-530, 2007.
 17. Lee, B.S., Shim, S.M., Heo, J., Pae, H.O., Seo, B.Y., Han, S.Y., Sohn, D.H., Jang, S.I., Chung, H.T. Wogonin suppresses TARC expression induced by mite antigen via heme oxygenase 1 in human keratinocytes. Suppressive effect of wogonin on mite antigen-induced TARC expression. *J Dermatol Sci.* 46: 31-40, 2007.
 18. Mehendale, S., Aung, H., Wang, C.Z., Tong, R., Foo, A., Xie, J.T., Yuan, C.S. *Scutellaria baicalensis* and a constituent flavonoid, baicalein, attenuate ritonavir-induced gastrointestinal side-effects. *J Pharm Pharmacol.* 59: 1567-1572, 2007.
 19. Kumar, N., Singh, B., Bhandari, P., Gupta, A.P., Uniyal, S.K., Kaul, V.K. Biflavonoids from *Lonicera japonica*. *Phytochemistry.* 66: 2740-2744, 2005.
 20. Oku, H., Ogawa, Y., Iwaoka, E., Ishiguro, K. Allergy-preventive effects of chlorogenic acid and iridoid derivatives from flower buds of *Lonicera japonica*. *Biol Pharm Bull.* 34: 1330-1333, 2011.
 21. Kwak, W.J., Han, C.K., Chang, H.W., Kim, H.P., Kang, S.S., Son, K.H. Loniceroside C, an antiinflammatory saponin from *Lonicera japonica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 51: 333-335, 2003.
 22. Park, H.S., Park, K.I., Lee, D.H., Kang, S.R., Nagappan, A., Kim, J.A., Kim, E.H., Lee, W.S., Shin, S.C., Hah, Y.S., Kim, G.S. Polyphenolic extract isolated from Korean *Lonicera japonica* Thunb. induce G2/M cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells: involvements of PI3K/Akt and MAPKs. *Food Chem Toxicol.* 50: 2407-2416, 2012.
 23. Chan, B.C., Hon, K.L., Leung, P.C., Sam, S.W., Fung, K.P., Lee, M.Y., Lau, H.Y. Traditional Chinese medicine for atopic eczema: PentaHerbs formula suppresses inflammatory mediators release from mast cells. *J Ethnopharmacol.* 120: 85-91, 2008.
 24. 황치환, 윤채성, 송승현, 원영호, 황충연. 갈근해기탕가미방(葛根解肌湯加味方)과 삼황세제가미방(三黃洗劑加味方) 병용이 NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염에 미치는 영향. *대한외과과학회지* 21: 1-18, 2008.
 25. 허정훈, 송한나, 장선일. rSj26 또는 화학 항원 유도 아토피 피부염 마우스 모델에서 가감보중익기탕의 면역 매개물 조절 및 상처치료 효과. *대한본초학회지* 23: 53-61, 2008.
 26. Martynova, M.G., Bystrova, O.A., Moiseeva, O.M., Evdonin, A.L., Kondratov, K.A., Medvedeva, N.D. The presence of ANP in rat peritoneal mast cells. *Cell Res.* 15: 811-816, 2005.
 27. Mihara, K., Kuratani, K., Matsui, T., Nakamura, M., Yokota, K. Vital role of the itch-scratch response in development of spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. *Br J Dermatol.* 151: 335-345, 2004.
 28. Nakae, S., Suto, H., Kakurai, M., Sedgwick, J.D., Tsai, M., Galli, S.J. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell-derived TNF. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 6467-6472, 2005.
 29. Galli, S.J. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med.* 328: 257-265, 1993.
 30. Mekori, Y.A., Metcalfe, D.D. Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev.* 173: 131-140, 2000.
 31. Hosoda, M., Yamaya, M., Suzuki, T., Yamada, N., Kamanakam, M., Sekizawa, K., Butterfield, J.H., Watanabe, T., Nishimura, H., Sasaki, H. Effects of rhinovirus infection on histamine and cytokine production by cell lines from human mast cells and basophils. *J Immunol.* 169:1482-1491, 2002.
 32. Takai, T., Ikeda, S. Barrier dysfunction caused by environmental proteases in the pathogenesis of allergic diseases. *Allergol Int.* 60: 25-35, 2011.
 33. Jung, H.S., Kim, M.H., Gwak, N.G., Im, Y.S., Lee, K.Y., Sohn, Y., Choi, H., Yang, W.M. Antiallergic effects of

- Scutellaria baicalensis* on inflammation in vivo and in vitro. J Ethnopharmacol. 141: 345-349, 2012.
34. Benyon, R.C., Robinson, C., Church, M.K. Differential release of histamine and eicosanoids from human skin mast cells activated by IgE-dependent and non-immunological stimuli. Br J Pharmacol. 97: 898-904, 1989.
35. Takubo, M., Ueda, Y., Yatsuzuka, R., Jiang, S., Fujii, Y., Kamei, C. Characteristics of scratching behavior induced by some chemical mediators in hairless mice. J Pharmacol Sci. 100: 285-288, 2006.