

## Human mast cell에서 升麻葛根湯의 항염증 효과에 대한 연구

금준호<sup>‡</sup>, 서운수, 강옥화, 최장기, 권동렬<sup>\*</sup>

원광대학교 약학대학 한약학과, 원광한약연구소, 원광생명공학연구소

### Anti-inflammatory effect of Seungmagalgeun-tang extract in human mast cells.

Joon-Ho Keum<sup>‡</sup>, Yun-Soo Seo, Ok-Hwa Kang, Jang-Gi Choi, Dong-Yeul Kwon<sup>\*</sup>

Dept. of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, and Institute of Biotechnology, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, 570-749, Korea.

### ABSTRACT

**Objectives** : Seungmagalgeun-tang (SMGGT) is traditional medicine widely used for inflammatory disease and flu. But SMGGT exhibits potent anti-inflammatory activity with an unknown mechanism. To elucidate the molecular mechanisms of SMGGT water extract on pharmacological and biochemical actions in inflammation, we examined the effect of SMGGT on pro-inflammatory mediators in Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)+A23187-stimulated mast cells.

**Methods** : In the present study, pro-inflammatory cytokine production was determined by performing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and western blot analysis to measure the activation of MAPKs. Cells were treated with SMGGT 1 h prior to the addition of 50 nM of PMA and 1  $\mu$ M of A23187. Cell viability was measured by MTS assay. The investigation focused on whether SMGGT inhibited the expressions of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in PMA+A23187-stimulated mast cells.

**Results** : SMGGT has no cytotoxicity at examined concentration (100, 250, and 500  $\mu$ g/ml). Also, gene expression of IL-6 and IL-8 in HMC-1 cells stimulated by PMA+A23187 was down regulated by SMGGT. Furthermore, SMGGT suppressed the PMA+A23187-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-jun N-terminal Kinase(JNK). But, SMGGT could not regulate phosphorylation of p38 MAPK.

**Conclusions** : These results suggest that SMGGT has inhibitory effects on PMA+A23187-induced IL-6 and IL-8 production. These inhibitory effects occur through blockades on the phosphorylation of ERK and JNK.

**Key words** : Seungmagalgeun-tang(SMGGT); anti-inflammatory activity; Human mast cell ;mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

## 서론

升麻葛根湯은宋代錢乙이 저술한 小兒藥証直訣의 閻氏小兒方論에 처음 수록된 처방이다. 小兒藥証直訣에는 傷寒, 溫疫, 風熱, 壯熱, 頭痛, 肢體痛, 瘡疹 등에 사용한다고 했고, 東醫寶鑑에는 溫疫만이 아니라 癩疹, 癰疹 등에 사용한다고 하였다<sup>1,2)</sup>. 傷寒, 溫疫, 癩疹, 癰疹 등의 증상은 주로 염증과

알러지성 증상으로 변화하는 경우가 많다. 여러 연구에 따르면, 升麻葛根湯은 항산화, 항균, 항바이러스 효과가 보고되었다<sup>3-6)</sup>. 하지만 升麻葛根湯의 human mast cell에 대한 항염증 효과와 그 기전은 밝혀져 있지 않다.

염증반응은 생체에 이물질이 침입하였을 때 방어 기전으로서 나타난다. 염증 반응이 나타난 경우 histamine, serotonin,

\*교신저자 : 권동렬, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 약학대학 한약학과 본초학교실  
· Tel : 063-850-6802 · E-mail : sssimi@wku.ac.kr  
#제1저자 : 금준호, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 약학대학 한약학과 본초학교실  
· Tel : 063-850-6802 · E-mail : wizmasia@gmail.com  
· 접수 : 2013년 8월 15일 · 수정 : 2013년 9월 3일 · 채택 : 2013년 9월 22일

prostaglandins, leukotrine 등과 같은 혈관 활성 물질이 혈관을 확장시키고, 그로 인해 혈액투과성이 증대되며, 백혈구가 혈관벽을 투과하여 조직으로 침투하게 된다. 염증 반응이 지속되면 점막조직이 손상되어 암으로 진행되기도 한다<sup>7,8)</sup>.

비만세포는 피부나 점막조직에서 발견되는데 염증과 급성 알러지 반응에 중요한 역할을 한다<sup>9)</sup>. HMC-1 세포는 염증성 자극을 받으면 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6, IL-8, IL-13과 같은 염증성 cytokine과 염증 매개 물질인 histamine, leukotrienes, serotonin, prostaglandins (PGs) 등을 분비한다<sup>9-12)</sup>. IL-6, IL-8과 같은 cytokine은 염증반응에 있어 중요한 역할을 한다. 이러한 cytokine의 발현은 염증 반응을 확인할 수 있는 수단 중 하나이다<sup>13)</sup>. IL-6는 염증 반응의 매개인자인 T cell, macrophage, monocyte, synovial fibroblast에서 주로 생성된다. IL-8은 비만세포에서 분비되어 neutrophil, T-lymphocyte, eosinophil과 같은 주변의 세포에 영향을 주고, 염증성 세포의 활성화에 중요한 역할을 한다<sup>14)</sup>. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)는 동물 세포에서 염증성 물질을 조절하는데 중요한 역할을 한다<sup>15)</sup>.

이에 본 연구는 升麻葛根湯 물추출물의 항염증 활성을 조사하기 위하여 protein kinase C activator인 PMA와 Calcium Ionophore인 A23187로 자극된 HMC-1 세포가 방출하는 IL-6, IL-8의 생성과 그것을 억제하는 기전을 밝히 고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

升麻葛根湯에 들어가는 약재인 승마, 갈근, 작약, 감초는 대한약국 (익산, 한국)에서 구입하였다. HMC-1 mast cell은 ATCC(VA, USA)에서 구입하였으며, Phorbol\_12-myristate\_13-acetate (PMA)와 Calcium Ionophore A23187은 SIGMA (St. Louis, USA)사에서 구입하였고, 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, FBS)은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사로부터 구입하였다. IMDM 배지와 항생제는 Hyclone (Hyclone Labs Logan, UT)에서 구입하였다. Cell culture dish와 plate는 SPL (SPL Life Science, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. IL-6, IL-8 은 효소결합면역측정 (ELISA) 키트를 R&D Systems (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였으며, COX-2, MAPKs (ERK, JNK, p38) 항체 및 Peroxidase conjugated 2차 항체는 Santa Cruz (CA, USA)사에서 구입하였다.

#### 2) 세포 배양

Human mast cell-1 (HMC-1)은 항생제 (100 U/mL Penicillin, 100 U/mL Streptomycin)를 첨가하고 불활성화된 FBS가 10% 비율로 함유된 IMDM 배지에서 온도 37°C 이산화탄소 5% 조건에서 배양하였다.

### 3) Primer 준비

RT-PCR을 위해 여러 개의 primer를 사용하였다. Primer의 구성은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Primer Sequences for RT-PCR

cDNA		Sequences
IL-6	Forward	GATGGATGCTTCCAATCTGGAT
	Reverse	AGTTCTCCATAGAGAACAACATA
IL-8	Forward	TGTGCTCTCCAAATTTTTTACTG
	Reverse	CTCTCTTTCTCTTTAATGTCCAGC
GADPH	Forward	CCATGTTGTCATGGGTGTGAACCA
	Reverse	GCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTTC

## 2. 방법

### 1) 시료의 조제방법

升麻葛根湯 물추출물은 구성 약재를 원 처방과 같은 비율로 100 g을 취하여 증류수를 용매로 하여 2 시간 고온으로 추출하여 준비했다<sup>2)</sup>. 추출액을 0.45  $\mu$ m 필터로 여과한 후에 감압 동결 건조를 하였으며, 4°C에 보관하였다. 실험을 하기 위해 추출물은 PBS (phosphate buffered saline)에 녹였다. 升麻葛根湯은 승마, 갈근, 작약, 감초로 구성되어 있다 (Table 2).

Table 2. The Composition of Seungmagalgeun-tang

Herb	Scientific Name	Latin Name	Weight (g)
升麻	<i>Cimicifuga dahurica</i> Max.	Cimicifugae Rhizoma	3,75
葛根	<i>Pueraria lobata</i> Ohwi	Puerariae Radix	7,5
芍藥	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	Paeoniae Radix	3,75
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	3,75

### 2) MTS 분석

세포 독성은 MTS assay를 이용하여 확인하였다. 먼저 HMC-1을 같은 수 ( $1 \times 10^4$  cells)로 준비한 후 30분이 지나서 升麻葛根湯 물추출물을 농도별로 처리하였다. 升麻葛根湯 물추출물을 처리한 후 24시간이 지나서 20  $\mu$ L의 MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), 5 mg/mL) 용해액을 첨가한 후 37°C에서 1시간 배양한 후 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) ELISA

먼저 HMC-1을 IMDM 배지를 이용하여 24 well plate에  $5 \times 10^5$  cells/mL로 분주한 후, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 30분 배양 하였다. 이후 升麻葛根湯 물추출물 (100, 250, and 500  $\mu$ g/mL)을 1시간 동안 처리한 후, PMA (50 nM)와 A23187 (1  $\mu$ M)로 HMC-1을 8시간 자극한 후 세포 부유액을 원심분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 IL-6, IL-8 생성량을 ELISA kit를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법인 Sandwich ELISA법대로 정량하여 분석하였다.

### 5) RNA 분리 및 RT-PCR

升麻葛根湯 물추출물에 의한 IL-6, IL-8 mRNA 발현과의 상관성을 알아보기 위하여 RT-PCR로 mRNA 발현을 조사하였다. HMC-1을 6 well plate에  $5 \times 10^6$  cells로 분

주한 다음, 30분간 안정화 시켰다. 이 세포에 升麻葛根湯 물추출물을 처리한 후, PMA (50 nM)와 A23187 (1  $\mu$ M)로 처리하고 6시간 후에 세포를 모아 PBS로 세척하여 이지 블루 (easy blue, Intron) 1 mL를 가하여 실온에서 교반하였다. 클로로포름 200  $\mu$ L를 넣고 다시 교반하여 13,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리한 다음, 상등액 400 $\mu$ L에 isopropanol을 가하여 다시 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. 여기서 얻어진 RNA에 역전사 효소 (reverse transcriptase), 1mM dNTP 0.5 $\mu$ g을 넣어 cDNA를 만들었다. 여기에 IL-6, IL-8, GAPDH Primer를 넣고 유전자 증폭기(thermal cycler)를 이용하여 증폭시켰다. 이때 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 58 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 반응시켰다. 만들어진 RNA를 2% Agarose Gel에 전기영동시켜 EtBr을 사용하여 UV 검출기로 확인하였다.

### 6) Western blot analysis

배양이 끝난 세포를 수집하여 2-3회 PBS로 세척 한 후 1 mL의 lysis buffer을 첨가하여 30분간 lysis한 후 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 20-30  $\mu$ g의 lysate를 8-12% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (0.1% Tween 20 + TBS) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. MAPKs의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse p-ERK, p-JNK, p-p38 (1 : 1000)과 anti-rabbit ERK, JNK, p38 (1 : 1000)을 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG와 anti-rabbit IgG를 1 : 5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL Substrate로 3분 간 반응 후 ImageQuant<sup>TM</sup> LAS 4000 mini을 이용하여 Chemiluminescence을 촬영하였다.

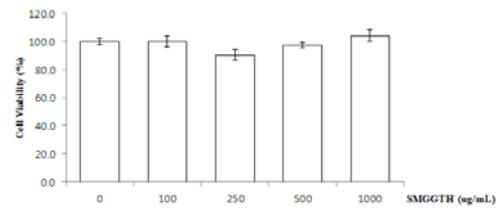
### 7) 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치 $\pm$ 표준편차 (Mean $\pm$ SD)를 구했으며, 그 유의성은 Student's t-test 분석법을 이용하여 신뢰수준 95% 이상 ( $p < 0.05$ )에서 통계적 유의성을 평가하였다.

## 결 과

### 1. 升麻葛根湯 물추출물이 세포생존율에 미치는 영향

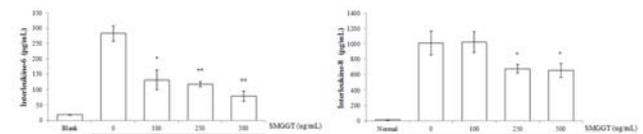
升麻葛根湯 물추출물이 세포의 생존에 미치는 영향을 측정하기 위해 MTS를 사용한 분석법을 이용하였다. 升麻葛根湯 물추출물은 500  $\mu$ g/mL 이하 농도에서 90%이상의 생존율을 보여 세포의 생존에 큰 영향을 미치지 않았다 (Figure 1).



**Figure 1.** Effect of SMGGT extract on cell viability in HMC-1 cells. Cell viability was evaluated with the MTS assay. Data represent the means  $\pm$  SD. of duplicate determinations from three separate experiments. \*\* $P < 0.005$

### 2. 升麻葛根湯 물추출물이 Pro-inflammatory cytokine IL-6, IL-8의 생성에 미치는 영향

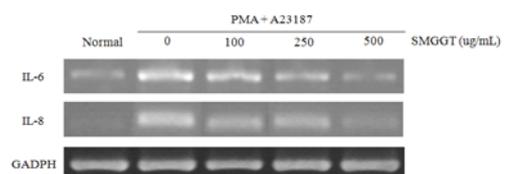
HMC-1의 염증성 cytokine 분비를 확인하기 위해 IL-6, IL-8을 ELISA를 하였다. 실험 결과, PMA와 A23187을 병용 투여한 HMC-1 세포에서 IL-6과 IL-8 가 발현 되었으며, 升麻葛根湯 물추출물이 투여된 HMC-1에서는 IL-6의 발현이 농도 의존적으로 억제되었으며, IL-8의 발현도 억제되었음을 확인할 수 있다 (Figure 2).



**Figure 2.** Effect of SMGGT on PMA+A23187-induced IL-6 and IL-8 production. HMC-1 cells were pretreated with the indicated concentrations of SMGGT for 1 hour before being incubated with PMA (50 nM)+A23187 (1  $\mu$ M) for 8 hours. Production of IL-6 and IL-8 was measured by ELISA. Data are mean  $\pm$  SD values of duplicate determinations from three separate experiments. \* $P < 0.05$ . \*\* $P < 0.005$

### 3. 升麻葛根湯 물추출물이 Pro-inflammatory cytokine IL-6, IL-8 mRNA의 전사에 미치는 영향

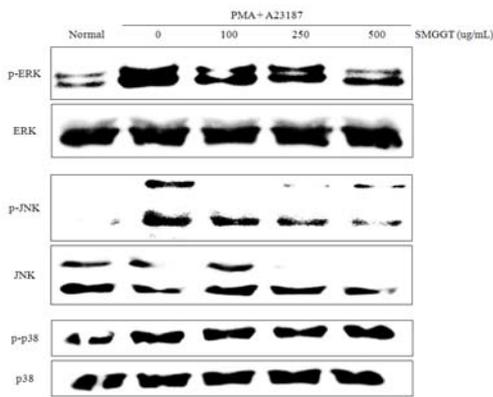
염증성 cytokine인 IL-6, IL-8의 gene의 발현을 확인하기 위해 IL-6, IL-8 mRNA의 전사를 RT-PCR을 통해 확인 하였다. 실험 결과, PMA와 A23187을 병용 투여한 HMC-1 세포에서 IL-6과 IL-8의 mRNA가 발현되었으며, 升麻葛根湯 물추출물이 투여된 HMC-1에서는 IL-6와 IL-8의 mRNA의 발현이 억제되었음을 확인할 수 있다 (Figure 3).



**Figure 3.** Effect of Seungmagalgen-tang (SMGGT) on PMA + A23187-induced IL-6 and IL-8 mRNA expression. IL-6 and IL-8 mRNA was assessed by RT-PCR in HMC-1 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of SMGGT for 30 minutes before being incubated with PMA (50 nM)+A23187 (1  $\mu$ M) for 6 hours. The GADPH mRNA was assayed in parallel to confirm equivalency of the cDNA preparation.

### 4. 升麻葛根湯 물추출물이 MAPKs 인산화에 미치는 영향

PMA + A23187의 자극 경로를 확인하기 위해 MAPKs (ERK, JNK, p38)의 인산화를 Western blot을 통해 확인하였다. 실험 결과, 실험 결과, PMA와 A23187을 병용 투여한 HMC-1 세포에서 ERK, JNK, p38이 인산화되었으며, 升麻葛根湯 물추출물이 투여된 HMC-1에서는 ERK, JNK의 인산화가 억제되었음을 확인 할 수 있었고, p38은 변화가 없었다 (Figure 4).



**Figure 4.** Effect of SMGGT on the phosphorylation (P-) of MAPKs in PMA + A23187-stimulated HMC-1 cells. HMC-1 cells were treated with the indicated concentrations of SMGGT for 30 minutes before being incubated with PMA (50 nM) + A23187 (1 µM) for 30 minutes. Whole-cell lysates were analyzed by western blot analysis. The experiment was repeated three times, and similar results were obtained.

### 고찰

升麻葛根湯은 승마, 갈근, 작약, 감초로 구성된 처방이고, 예로부터 마진뿐만 아니라 각종 傷寒, 溫病에 사용되어 왔다<sup>1,2)</sup>. 승마와 갈근은 배합되어 승마의 透疹解毒하는 효능과 갈근의 解肌透進하는 효능이 결합하여 肌表內外에 작용하여 升陽散邪, 透發疹毒하는 효과가 강해진다. 이 배합은 升麻葛根湯의 효능으로 확인할 수 있다<sup>16)</sup>. 승마 (Cimicifugae Rhizoma)는 甘辛하고 微寒해서 清熱解毒, 發表透疹, 升陽舉陷하는 효능이 있다<sup>17)</sup>. 갈근 (Puerariae Radix)은 甘辛하고 平해서 解肌透熱, 發表透疹, 生津止渴, 升陽止瀉하는 효능이 있으며, 항산화, 항염증 효능이 밝혀져 있다<sup>17-19)</sup>. 작약 (Paeoniae Radix)은 苦酸하고 微寒해서 養血和營, 緩急止痛, 斂陰平肝의 효능이 있으며 항염증 효능이 밝혀져 있다<sup>17,20)</sup>. 감초 (Glycyrrhizae Radix et Rhizoma)는 甘平해서 益氣補中, 緩急止痛, 潤肺止咳, 瀉火解毒, 調和諸藥하는 효능이 있으며 항염증, 항산화 등의 효능이 밝혀져 있다<sup>17)</sup>. 이러한 약재의 배합은 升麻葛根湯이 항염증 효능이 있을 것이라는 점을 암시한다.

비만세포는 histamine, heparin, proteinase, proteinase, leukotriene, cytokine과 같은 매개분자를 함유하고 있으며, 이것은 염증 과정에 주요한 역할을 한다<sup>9)</sup>. IL-6, IL-8는 염증성 자극에 의해 분비된다. IL-6의 분비가 증가한다는 것은 염증반응이 일어났다는 것을 뜻한다. 이번 연구에서 PMA

와 A23187에 의해 자극된 HMC-1에서 升麻葛根湯 물추출물이 IL-6와 IL-8의 분비와 전사를 억제한다는 것을 확인하였다.

Mitogen-activated protein (MAP) kinase (MAPKs)는 지금까지 잘 알려진 세포 내 신호전달체계 중 하나인데 그 경로들 중 extracellularregulated protein kinase (ERK), c-Jun NH2-protein kinase (JNK)/stress-activated protein kinase (SAPK), serine/threonine protein kinase인 p38 MAPK가 주요한 기전으로 밝혀져 있다. 세포 외에서 자극이 들어오면 반응해서 upstream MAPK kinase (MEK)에 의해 인산화가 일어남으로써 활성화된다. MAPKs는 활성화되어 다른 kinase, 전사인자들이 활성화 되도록 하고 표적유전자의 발현을 조절하고, 표적유전자 발현의 조절은 세포 소기관과 효소를 조절하는 역할을 한다<sup>21)</sup>. 이번 연구에서 HMC-1세포에 PMA와 A23187을 투여하였을 때 升麻葛根湯 물추출물이 ERK, JNK의 인산화를 억제하고, p38은 그렇지 않은 것으로 보아 升麻葛根湯 물추출물이 ERK, JNK 경로에 영향을 주고, p38경로에는 영향을 주지 않는다고 볼 수 있다.

요약하면, 升麻葛根湯 물추출물은 염증성 cytokine인 IL-6, IL-8의 분비를 억제하고, IL-6와 IL-8의 mRNA로의 전사 또한 억제하며, 이 억제는 MAPKs 중 ERK와 JNK의 인산화를 억제함으로써 나타난다고 할 수 있다. 이러한 연구 결과는 升麻葛根湯이 예로부터 傷寒, 溫病 등에 사용되어 온 것을 실험적으로 확인하는 것이며, 升麻葛根湯이 염증질환에 대한 유효한 치료 약물이 될 수 있다는 것을 알 수 있다.

### 결론

HMC-1 세포를 PMA+A23187로 자극하였을 때 升麻葛根湯의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 升麻葛根湯은 PMA + A23187로 유도된 HMC-1에서 염증성 사이토카인 IL-6과 IL-8의 발현을 억제하였다.
2. 升麻葛根湯이 PMA + A23187로 유도된 HMC-1에서 MAPKs 인산화를 저해 하는지 알아보기 위해 western blot으로 확인한 결과 MAPKs (ERK, JNK, but not p38), 인산화가 저해되었다.

이와 같은 결과로 보아 升麻葛根湯 물추출물은 염증성 cytokine인 IL-6, IL-8의 분비를 억제하고, IL-6와 IL-8의 mRNA로의 전사 또한 억제하며, 이 억제는 MAPKs 중 ERK와 JNK의 인산화를 억제함으로써 나타난다고 할 수 있다. 이러한 연구 결과는 升麻葛根湯이 예로부터 상한, 온병 등에 사용되어 온 것을 실험적으로 확인하는 것이며, 升麻葛根湯이 염증질환에 대한 유효한 치료 약물이 될 수 있다는 것을 알 수 있다.

### 감사의 글

This study was supported by the Grant of the

Traditional Korean Medicine R&D project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (No. B120069).

## References

1. Qian Yi, Soayakjeungjikkeol, 1st ed. Korea : Uisungdang, 2002 : 221.
2. Heo J, Donguibogam, 3rd ed. Korea : Yeokang publication, 2007 : 209-10.
3. Lyu JH, Lyo SA, Yoon HJ, Ko WS, Anti-allergic Effect of Seungmagalgeun-tang through Suppression of NF- $\kappa$ B and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in the RBL-2H3 Cells, *Kor J Ori Med Physiol Pathol*, 2008 ; 22(6) : 1572-8.
4. Lee JY, Bae HJ, Park TS, Kim TW, Moon DH, Kwon OJ, Son JH, Lee CE, Park GH, Kim HH, An BJ, Anti-oxidant and Anti-microbial Activities of Seungmakalgeuntang, *J Appl Biol Chem*, 2010 ; 53(1) : 13-20.
5. Chang JS, Wang KC, Chiang LC, Sheng-Ma-Ge-Gen-Tang inhibited Enterovirus 71 infection in human foreskin fibroblast cell line, *J Ethnopharmacol*, 2008 ; 119(1) : 104-8.
6. Wang KC, Chang JS, Chiang LC, Lin CC, Sheng-Ma-Ge-Gen-Tang (Shoma-kakkon-to) inhibited cytopathic effect of human respiratory syncytial virus in cell lines of human respiratory tract, *J Ethnopharmacol*, 2011 ; 135(2) : 538-44.
7. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby Immunology, 5th ed, Newyork : W.H. Freeman, 2000 : 412-28.
8. Willoughby DA, Heberden Oration, 1974, Human Arthritis Applied to Animal Models, Towards a Better Therapy, *Ann Rheum Dis*, 1975 ; 34(6) : 471-8.
9. Amin K, The role of mast cells in allergic inflammation, *Respir Med*, 2012 ; 106(1) : 9-14.
10. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA, Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production, *J Clin Invest*, 1999 ; 103(6) : 779-88.
11. Stassen M, Müller C, Arnold M, Hültner L, Klein-Hessling S, Neudörfl C, Reineke T, Serfling E, Schmitt E, IL-9 and IL-13 production by activated mast cells is strongly enhanced in the presence of lipopolysaccharide: NF- $\kappa$ B is decisively involved in the expression of IL-9, *J Immunol*, 2001 ; 166(7) : 4391-8.
12. Royer B, Varadaradjalou S, Saas P, Gabiot AC, Kantelip B, Féger F, Guillosson JJ, Kantelip JP, Arock M, Autocrine regulation of cord blood-derived human mast cell activation by IL-10, *J Allergy Clin Immunol*, 2001 ; 108(1) : 80-6.
13. Barnes PJ, Adcock I, Spedding M, Vanhoutte PM, Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms, *Trends Pharmacol Sci*, 1993 ; 14(12) : 436-41.
14. Mukaida N, Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation, *Int J Hematol*, 2000 ; 72(4) : 391-8.
15. Azzolina A, Bongiovanni A, Lampiasi N, Substance P induces TNF- $\alpha$  and IL-6 production through NF $\kappa$ B in peritoneal mast cells, *Biochim Biophys Acta*, 2003 ; 1643(1-3) : 75-83.
16. Lee SH, Imsangyakdaeron, 1st ed. Korea : Uisungdang, 2007 : 35-36.
17. Seo BI, Lee JH, Choi HY, Kwon DY, Bu YM, Hanyakbonchohak, 2nd ed. Korea : Younglimsa, 2006 : 165.
18. Jin SE, Son YK, Min BS, Jung HA, Choi JS, Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from Pueraria lobata roots, *Arch Pharm Res*, 2012 ; 35(5) : 823-37.
19. Kim SJ, Park C, Kim HG, Shin WC, Choe SY, A Study on the Estrogenicity of Korean Arrowroot (Pueraria thunbergiana), *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2004 ; 33(1) : 16-21.
20. He DY, Dai SM, Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of paeonia lactiflora pall., a traditional chinese herbal medicine, *Front Pharmacol*, 2011 ; 2 : 10.
21. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH, Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, *Endocr Rev*, 2001 ; 22(2) : 153-83.