

원 저

## 清上補下湯의 抗酸化 效果, Interleukin-4 抑制 및 cDNA chip을 이용한 遺傳子發顯에 미치는 影響

이동생, 정희재, 정승기, 이형구  
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

### The Antioxidant Effect, Inhibition of Interleukin-4 and the Effect on the Gene Expression by Using cDNA Chip of *Chungsangboha-tang*(*Qingshangbuxia-tang*)

Dong-Seng Lee, Hee-Jae Jung, Sung-Ki Jung, Hyung-Koo Rhee

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

**Backgrounds & Objectives :** In many recent studies, molecular biological methods have been used to investigate the role of cytokines in pathogenesis and new therapeutic targets of asthma. Recently, as a method of research on the gene expression, they are applying another method which assays multiple gene expressions at the same time by the microarray. In this study, the antioxidant effect, the inhibitory effect against interleukin-4 and the effect on the CD/cytokine gene expression in PBMC (peripheral blood mononuclear cells) was evaluated by using cDNA microarray chip of *Chungsangboha-tang*.

**Methods :** Experimental studies were performed for the antioxidant effect of *Chungsangboha-tang* on DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) solution, for the IL-4-inhibiting effect on BALB/c mouse spleen, and for the gene expression effect on PBMC (peripheral blood mononuclear cells) with microarray.

**Results :** *Chungsangboha-tang* showed antioxidant effect dose-dependently. *Chungsangboha-tang* inhibited interleukin-4 dose-dependently and showed significant difference in 10ug/ml and 100ug/ml of test groups. There was no 2 more times upregulated genes than in the control group by using cDNA microarray chip of *Chungsangboha-tang*, but there were 140%-200% upregulated genes. There was no 2 more times downregulated genes than in the control group by using cDNA microarray chip of *Chungsangboha-Tang*, but there was 50%-75% downregulated genes.

**Conclusions :** This study showed that *Chungsangboha-tang* has an antioxidant effect and inhibition of Interleukin-4, but further studies are necessary with microarray. (*J Korean Oriental Med* 2003;24(2):148-158)

**Key Words:** Antioxidant Effect, Interleukin-4, cDNA chip, *Chungsangboha-tang*

## 서 론

기관지천식(이하 천식)은 가역적인 기도폐색과 기관지과민성, 기도의 부종, 호산구성-림파구성 염증을 특징으로 하는 임상적 증후군을 말하며<sup>1)</sup>, 임상적으로는 발작적인 呼吸困難, 기침, 喘鳴音 등의 소견을 보이는 질환으로<sup>2)</sup>, 韓醫學에서는 呼吸急促 喉中有聲響

· 접수 : 2003년 3월 5일 · 논문심사 : 2003년 3월 19일  
· 채택 : 2003년 4월 27일  
· 교신저자 : 정승기, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 한방병원 5내과 의사실  
(Tel. 02-958-9147, Fax. 02-958-9148, E-mail: matiss@freechal.com)

한 症狀을 특징적으로 나타내는 哮喘證 哮喘證의 範疇에 속하는 질환에 해당된다<sup>3)</sup>.

淸上補下湯은 龔<sup>4)</sup>의 壽世保元에 최초로 수록된 淸上補下丸을 湯劑로 복용 가능하도록 用量을 조절한 處方으로 補陰 潤肺化痰 清熱降氣 시키는 效能이 있어<sup>3)</sup>, 上氣 喘息 咳嗽 痰涎上壅 등의 증상이 있는 호흡기질환 치료에 많이 응용되고 있다<sup>5)</sup>.

淸上補下湯의 free radical을 제거하는 抗酸化效果와 喘息과 관련된 cytokine의 하나인 interleukin-4(IL-4) 抑制 效能 및 淸上補下湯이 PBMC(peripheral blood mononuclear cells)의 CD/cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 microarray를 통해 관찰하여 대량의 유전자 발현 정보를 동시에 획득, 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 실 험

1. 藥材 實驗에 사용된 藥材는 慶熙大學校 韓醫科大學 附屬韓方病院에서 구입하였다.

淸上補下湯의 1첩의 內容과 分量은 다음과 같다.

Composition and Dosage of Chungsangboha-tang

Herb	Scientific Name	Dose(g)
熟地黃	<i>Rehmannia Radix Vaporata</i>	4.0
山藥	<i>Disocoreae Radix</i>	4.0
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	4.0
白茯苓	<i>Hoelen</i>	4.0
牡丹皮	<i>Moutan Cortex Radicis</i>	4.0
澤瀉	<i>Alismatic Radix</i>	4.0
五味子	<i>Maximowicziaae Fructus</i>	3.0
天門冬	<i>Asparagi Radix</i>	3.0
麥門冬	<i>Liripis Tuber</i>	3.0
貝母	<i>Fritillarriae Rhizoma</i>	3.0
瓜蒌仁	<i>Trichosanthis Semen</i>	3.0
杏仁	<i>Ansu Seman</i>	3.0
半夏(薑製)	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	3.0
枳實	<i>Aurantii Immaturus Fructus</i>	3.0
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	3.0
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	3.0
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	3.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2.0
Total amount		59.0g

## 2. 方法

1) 檢液의 조제 - 淸上補下湯 177g을 플라스크에 넣고 증류수 1000cc를 가한 후 3시간 煎湯하고 여과

한 여액을 동결건조하여 淸上補下湯액기스 55g(수득율 31.07%)을 만들었다.

2) DPPH 소거 효과 측정 - 淸上補下湯과 대조약물군으로는 항산화물질인 Vit. C를 3차 증류수에 100mM로 녹여 보관하였다. DPPH 용액은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)을 무수 에탄올에 녹여 540nm에서 흡광도가 0.96-0.97이 되는 농도로 희석하였다. 淸上補下湯과 Vit. C를 에탄올에 10mM과 100uM로 희석하였다. 반응은 96well plate에 에탄올 40μl, 시약 10μl를 넣은 후 위에 조성한 DPPH 용액을 50μl를 넣어 100μl로 만들어(최종농도가 1mg/ml, 0.1mg/ml가 되도록 함) Vortex로 균일하게 혼합한 다음, 실온에서 1시간 방치한 후, ELISA reader를 이용하여 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) Interleukin-4(IL-4) 억제 효과 측정 - 생쥐(BALB/c)의 spleen을 적출하여 RPMI 1640 media를 첨가하고 무균상태에서 균질화하고 65um mesh로 걸른 후에 1200rpm에서 4℃로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 세포 pellet에 멸균된 삼차증류수를 900μl를 첨가한 후 10x PBS를 넣어 RBC를 용혈시키고 다시 1200rpm에서 4℃로 5분간 원심분리하였다. 65um mesh로 죽은 세포들을 여과한 후 hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였다. 24well plate의 well 당 1.5 x 10<sup>6</sup>개의 세포를 2ml의 RPMI 1640 media에 분주하였으며 IL-4를 자극하기 위하여 2ug/ml의 농도로 Concavalin A를 처치하였다. 동시에 청상보하탕을 최종농도가 1ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml가 되도록 농도별로 처리하였다. 배양 48시간 후에 상층액을 취하여 다음 IL-4의 농도를 측정할 때까지 -70℃에 보관하였다. ELISA plate에 capture antibody를 100μl/well을 가하고 실온에서 하룻밤 코팅하였다. Wash buffer (0.05% Tween 20 in PBS, pH7.4)로 3번 세척하고 깨끗이 제거하였다. 비특이 반응을 억제하기 위하여 1% BSA(Bovine Serum Albumin)를 포함하는 PBS를 300μl 가하고 실온에서 적어도 한시간 이상 반응시켰다. 다시 Wash buffer로 3번 세척하고 깨끗이 말린 후, plate를 사용

할 때까지 4-8℃에 보관하였다. Sample과 standard 용액을 96 well plate에 100 $\mu$ l 가하고 가볍게 섞은 후 실온에서 2시간동안 반응 시켰다. Wash buffer (0.05% Tween 20 in PBS, pH7.4)로 3번 세척하고 깨끗이 제거하였다. Biotinylated detection antibody를 100 $\mu$ l 가하고 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. Wash buffer (0.05% Tween 20 in PBS, pH7.4)로 3번 세척하고 깨끗이 제거하였다. Streptavidin HRP (R & D Systems)를 100 $\mu$ l 가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. Wash buffer (0.05% Tween 20 in PBS, pH7.4)로 3번 세척하고 깨끗이 제거하였다. Substrate solution [1:1 mixture of Color Reagent A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and Color Reagent B (tetramethylbenzidine) (R & D Systems)]을 50 $\mu$ l 첨가하고 잘 섞은 후 30분 이내에 microplate reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4) cDNA chip상 遺傳子 發顯 實驗

##### (1) 시약 및 재료

배양액 RPMI, fetal bovine serum(FBS), Human Cot-1 DNA, Ribonuclease Inhibitor, Superscript II reverse transcriptase, 100ug/ml penicillin and 100ug/ml streptomycin 등은 GibcoBRL(USA)에서, RNAzol B는 Tel-Test(USA)를 사용하였다. poly(dA), oligo(dT), dNTP 등은 Pharmacia(USA), Cy3-dUTP, Cy5-dUTP 등은 Amersham(USA) 제품을 사용하였다. Hybridization cassette은 Telechem(USA)에서 구입하였다. 일반시약은 Sigma(USA) 제품을, Microarray chip(Crea Hi380-DC101)은 CreaGene Co.(한국)제품을 사용하였다. Confocal laser-scanning microscope Scan Array 5000은 Affimetrix(USA)를 사용하였다.

##### (2) 세포 배양

본 실험에는 PBMC(peripheral blood mononuclear cells)를 이용하였다. PBMC는 건강한 자원자로부터 유래되었으며, 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin이 포함된 RPMI 1640 media용액에 배양하였다. 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 37℃ 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하고, 배양액은 주 3회, 2-3일마다 교환하였다. 우선 건강한 지원자에게서 정맥혈을 50 ml 채혈하고 멸균된 PBS로 1:2로 희석하였다. 50ml conical

tube에 HISTOPAQUE-1077 (Sigma Diagnostics Inc.)를 20ml 가한후 실온에 방치하였다. 희석한 혈액 20ml를 조심스럽게 HISTOPAQUE-1077 위에 첨가하고 실온에서 정확히 30분간 400×g로 원심분리하였다. 원심분리한 후, 조심스럽게 Pasteur pipet을 이용하여 plasma가 모여 있는 상층액을 분리한 후 깨끗한 다른 conical tube에 모여있는 중간층을 옮겼다. 20ml의 PBS를 첨가하여 잘 섞은 후 250×g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 10ml PBS를 첨가한 후 잘 섞은 후 250×g에서 10분간 원심분리하였다. 다시 상층액을 제거한 후 1ml PBS를 첨가하고 잘 섞은 후에 250×g에서 10분간 원심분리하여 PBMC를 분리하였다.

##### (3) 淸上補下湯의 處置

實驗群에는 淸上補下湯 (100 $\mu$ g/ml)을 투여하고 對照群에는 동량의 vehicle을 처치하였다. 24시간이 지난 후 각각 RNA를 추출하여 Fluorescence probe 합성 과정을 밟았다.

##### (4) RNA의 추출

淸上補下湯 혹은 vehicle을 처치한 實驗群과 對照群 각각에서 원심분리기를 이용하여 세포를 harvest하여 상층액을 제거하고 다시 세포를 suspension하였다. 세포 10<sup>7</sup>개당 2ml의 RNAzol을 사용하여 lysis시키고 상온에서 10분간 방치하였다. 세포 10<sup>7</sup>개당 0.2ml의 chloroform을 첨가하여 15초간 흔들어 잘 섞어준 후 5분간 상온에서 방치하였다. 4℃에서 12000×g로 15분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube로 옮겨 동량의 isopropanol을 첨가하고 10분간 상온에서 방치하였다. 다시 4℃에서 12000×g로 10분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 80% 에탄올 1ml을 첨가하여 원심분리하였다. 에탄올을 제거하고 적당량의 DEPC-DW를 첨가하여 녹여 total RNA를 준비하였다.

##### (5) Fluorescence probe의 합성

총 RNA 100ug(total)인 22 $\mu$ l를 500ug/ml의 oligo dT 2 $\mu$ l와 혼합하여 70℃에서 10분 반응시킨 후 얼음에 방치하였다. 이 용액에 5X reaction buffer 10 $\mu$ l, 10X dNTP(즉 5mM d(ACG)TP와 2mM TTP) 5 $\mu$ l,

fluorescent nucleotide(對照群은 1mM Cy3-dUTP, 淸上補下湯群은 1mM Cy5-dUTP) 2 $\mu$ l, 1.5 $\mu$ l RNasin, 2.5 $\mu$ l의 superscript II reverse transcriptase(200 U/ $\mu$ l)을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시켰다. 이 반응액에 3N NaOH 6 $\mu$ l를 첨가하고 65 $^{\circ}$ C에서 30분 반응시켜 RNA를 제거하고, 다시 1M Tris · HCl(pH 7.5) 20 $\mu$ l, 1N HCl 12 $\mu$ l를 첨가하여 NaOH를 중화시켰다. 이 용액을 Biospin 6 column에 옮겨 1000 $\times$ g로 4분간 원심분리하고, Microcon 30 tube로 옮겨 12000 $\times$ g로 3분간 다시 원심분리하였다.

#### (6) Microarray Hybridization

형광물질과의 결합반응을 준비하기 위해 prehybridization buffer인 6X SSC, 0.2% SDS, 5X Denhardt's solution, 1mg/ml salmon sperm solution 등을 microarray에 떨어뜨리고 22mm $\times$ 22mm의 cover glass로 덮어 glue로 봉합한 후 2시간 상온에서 방치하였다. 이후 봉합을 열고 2X SSC, 0.2X SSC로 세척하고 50ml 튜브에서 3000rpm으로 2분간 원심분리하였다. Fluorescence probe 28.2 $\mu$ l, poly(dA)(4mg/ml in TE) 1 $\mu$ l, yeast tRNA(4mg/ml) 1 $\mu$ l, human Cot I DNA(Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA)(10mg/ml) 1 $\mu$ l, 10% SDS 0.8 $\mu$ l, 20 x SSC 8 $\mu$ l를 혼합하여 99 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치하였다. 실온에서 5분 방치 후 반응액은 12000 $\times$ g로 2분간 원심분리하고 microarray에 점적하여 microarray를 62 $^{\circ}$ C에서 overnight 반응시켰다. Hybridization된 microarray는 1SSC, 0.1% SDS 용액으로 세척하였다. 0.1X SSC, 0.1% SDS 용액으로 50 $^{\circ}$ C에서 10분간 세척한 후 0.1X SSC 용액으로 10분간 세척하였다.

#### (7) Scanning and Data Analysis

Hybridization이 끝난 microarray는 confocal laser-scanning microscope(Scan Array 5000)으로 scan하여 영상을 얻었다. Cy3(GHeNe laser)는 543nm을, Cy5(RHeNe laser)는 632nm를 사용하였다. ImaGene 과 ScanAnalyze를 이용하여 각각의 spot에 대한 data를 저장한 후 median값을 사용하여 각 spot의 pixel intensity에서 local background intensity를 감하고 microarray상의 house-keeping gene의 intensity 값을

이용하여 녹색과 적색 과정에서 두 형광영상을 normalization한 후 淸上補下湯群과 對照群 사이에서 각 microarray상의 각 gene의 발현정도에 대한 ratio를 얻었다. 淸上補下湯群과 對照群에서의 신호강도의 차이가 2배 이상 차이나는 것을 유의한 차이가 있는 것으로 보았다.

### 3. 統計學的 處理

통계분석은 Statistical Package for Social Science software SAS (version 6.1.2)를 사용하였으며 DATA 분석은 Student's *t*-test를 이용하였고 통계적인 有意性은  $P < 0.05$ 로 하였다. 모든 실험은 독립적으로 3번 이상 반복하였고 mean  $\pm$  standard errors of means (SEM)로 나타내었다.

## 결 과

### 1. DPPH 소거 효과

淸上補下湯에 대한 抗酸化活性 效果를 확인하고자 1mg/ml과 0.1mg/ml의 濃度로 1시간 동안 측정하였다. 본 실험 결과 무처치한 對照群의 경우 抗酸化活性이 거의 없었으나, 강력한 항산화제인 Vit. C를 투여한 群에서는 시간이 지남에 따라 抗酸化活性이 높게 유지되었다(10분후 56.95 $\pm$ 5.98%, 20분후 52.35 $\pm$ 6.06%, 30분후 49.73 $\pm$ 6.12%, 60분후 42.84 $\pm$ 6.17%). 한편 淸上補下湯群에서 濃度依存的으로 抗酸化活性이 높게 나타났다. 1mg/ml의 淸上補下湯群에서는 抗酸化活性이 10분후 17.40 $\pm$ 7.77%, 20분후 16.80 $\pm$ 11.76%, 30분후 15.72 $\pm$ 9.24%, 60분후 17.69 $\pm$ 10.08%로 나타났고, 0.1mg/ml의 淸上補下湯群에서는 抗酸化活性이 10분후 -0.77 $\pm$ 6.23%, 20분후 -0.96 $\pm$ 5.90%, 30분후 0.12 $\pm$ 6.27%, 60분후 0.68 $\pm$ 6.31%로 나타났다(Fig. 1).

### 2. Interleukin-4 抑制 效果

淸上補下湯의 IL-4 抑制 效果를 확인하고자 淸上補下湯 최종濃도가 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml가 되도록 濃度別로 처리하였다. 배양 48시간 후에 상층액만

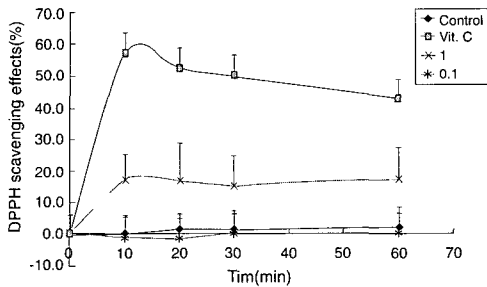


Fig. 1. Scavenging Effect of *Chungsangboha-tang* on DPPH radical.

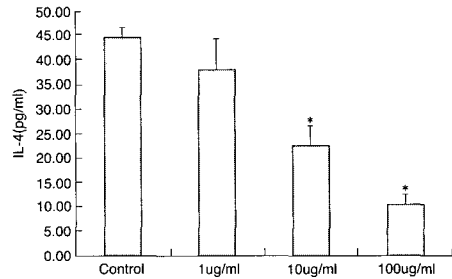


Fig. 2. Inhibitory effect of *Chungsangboha-tang* on IL-4. \* ; significantly different from control group ( $P < 0.05$ )

Table 1. Genes Upregulated in *Chungsangboha-tang* Treated PBMC Cells

Gene	ID	Normalized Ratio of Medians
integrin, alpha M (complement component)	kribb63	1.40
CD33 (gp67)	kribb31	1.40
CD34	kribb55	1.40
CD135	hak98	1.42
cDNA FLJ10823 fis (Crea4)	hak273	1.42
IL-3	hak269	1.47
immunoglobulin (CD79A) binding protein 1	kribb19	1.48
CD167a	hak126	1.51
CD123	hak91	1.54
CD38 (p45)	kribb71	1.56
CD201	hak139	1.57

현이 항진된 유전자로는 순서대로 integrin, alpha M, CD33 (gp67), CD34, CD135, cDNA FLJ10823 fis (Crea4), IL-3, immunoglobulin (CD79A) binding protein 1, CD167a, CD123, CD38 (p45), CD201 등이 있었다(Table 1).

#### 4. 淸上補下湯 처치시 發顯이 저하된 CD/cytokine 유전자

발현강도가 2배 이상 차이나는 것을 유의한 것으로 했을 때 PBMC 세포에 淸上補下湯 처치시 대조군에 비해 유의하게 발현이 저하되는 CD/cytokine 유전자는 관찰되지 않았다. 다만, 60%-100% 범위로 발현이 저하된 유전자로는 순서대로 alpha-tubulin mRNA, major histocompatibility complex class, HNF-1  $\alpha$ , CD37, CD124, transcription factor-4 (TCF-4) mRNA, monocyte chemotactic and activating factor, CD115, CD100, no match (Crea8), 5-lipoxygenase activating protein (FLAP), TNF-beta 등이 있었다 (Table 2).

## 고 찰

기관지천식(이하 천식)은 가역적인 기도폐색과 기관지과민성, 기도의 부종, 호산구성-임파구성 염증을 특징으로 하는 임상적 증후군을 말하며, 임상적으로는 발작적인 호흡곤란, 기침, 천명음 등의 소견을 보이는 질환이다. 韓醫學에서는 呼吸急促 喉中有聲響

취하여 IL-4의 濃度를 측정하였다. 對照群의 경우  $44.24 \pm 2.26 \text{ pg/ml}$ 이었으나 淸上補下湯群에서는 濃度依存的으로 IL-4가 강하게 抑制되었다. 즉  $1 \mu\text{g/ml}$ ,  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$ 의 淸上補下湯群에서 IL-4는 각각  $37.72 \pm 6.38 \text{ pg/ml}$ ,  $22.32 \pm 4.22 \text{ pg/ml}$ ,  $10.39 \pm 2.06 \text{ pg/ml}$ 로 나타났으며  $10 \mu\text{g/ml}$ 와  $100 \mu\text{g/ml}$  淸上補下湯群에서 유의성이 나타났다( $P < 0.05$ )(Fig. 2).

#### 3. 淸上補下湯 처치시 發顯이 항진된 CD/cytokine 유전자

발현강도가 2배 이상 차이나는 것을 유의한 것으로 했을 때 PBMC 세포에 淸上補下湯 처치시 對照群에 비해 유의하게 발현이 항진되는 CD/cytokine 유전자는 관찰되지 않았다. 다만, 140%-200% 범위로 발

**Table 2. Genes Downregulated in *Chungsangboha-tang* Treated PBMC Cells**

Gene	ID	Normalized Ratio of Medians
alpha-tubulin mRNA	hak302	0.67
major histocompatibility complex, class	hak310	0.69
HNF-1 $\alpha$	hak270	0.72
CD37	kribb2	0.73
CD124	Ahn49	0.73
transcription factor-4 (TCF-4), mRNA	hak304	0.74
monocyte chemotactic and activating factor	hak328	0.74
CD115	Ahn44	0.75
CD100	Ahn36	0.75
no match (Crea8)	hak282	0.75
5-lipoxygenase activating protein (FLAP)	hak326	0.75
TNF-beta	hak254	0.75

한 증상을 특징적으로 나타내는 哮喘證 哮喘證의 범주에 속하는 질환에 해당되며, 발병 원인으로는 寒冷, 心因, 痰因, 素因, 感染, 過敏性反應, 肺腎의 呼吸機能障礙 등이 있다<sup>3)</sup>. 淸上補下湯은 龔<sup>4)</sup>의 壽世保元에 최초로 수록된 淸上補下丸을 湯劑로 복용 가능하도록 用量을 조절한 處方으로 補陰 潤肺化痰 清熱降氣<sup>3)</sup> 시키는 효능이 있어 上氣 喘息 咳嗽 痰涎上壅<sup>3,5)</sup> 등의 증상이 있는 呼吸器疾患 治療에 많이 응용되고 있다. 淸上補下湯에 대한 연구로는 孫 등<sup>6)</sup>은 實驗的肺損傷에 미치는 영향을, 鄭 등<sup>7)</sup>은 SO<sub>2</sub>에 의한 呼吸器損傷에 미치는 영향을, 朴 등<sup>8)</sup>은 燥熱한 공기로 유발된 實驗的肺損傷에 미치는 영향을, 權 등<sup>9)</sup>은 알레르기 천식의 호흡기 양상과 기관조직에 미치는 영향을, 김 등<sup>10)</sup>은 Ashma model내의 Cytokine에 미치는 영향을, 鄭<sup>5)</sup>은 加味淸上補下湯이 천식에 효과가 있음을 실험적 연구와 임상적 관찰을 통하여 보고 하였다. 韓醫學에서 천식에 대한 연구로는 單味 또는 處方을 이용하여 염증이거나 면역기능에 미치는 효능을 실험동물을 통하여 연구하거나<sup>10-14)</sup>, 분자생물학적인 실험기법을 도입하여 천식유발과 관련되리라 판단되는 cytokines이나 chemokines에 대한 연구<sup>15-18)</sup>가 이루어지고 있다.

최근에는 유전자 발현에 관한 정보를 연구하는 방법으로서 microarray를 이용함으로써 대량의 유전자 발현 정보를 동시에 평가하는 방법이 시도되고 있다<sup>19)</sup>.

이에 淸上補下湯의 치료 작용기전을 보다 깊이 이해하고 임상적 응용의 폭을 넓히는 데에 도움이 되는 기초자료로 쓰일 수 있도록 淸上補下湯의 free radical을 제거하는 抗酸化效果와 천식과 관련된 cytokine의 하나인 interleukin-4(IL-4) 抑制 效能 및 淸上補下湯이 PBMC(peripheral blood mononuclear cells)의 CD/cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 microarray를 통해 관찰함으로써 대량의 유전자 발현 정보를 동시에 획득, 분석하였다.

淸上補下湯에 대하여 抗酸化活性 效果를 확인하고자 1mg/ml과 0.1mg/ml의 농도로 1시간 동안 측정하였다. 본 실험 결과 無處置群의 경우 抗酸化活性이 거의 없었으나 강력한 항산화제인 Vit. C가 투여된 군에서는 시간이 지남에 따라 항산화활성이 높게 유지되었다(10분후 56.95 ± 5.98%, 20분후 52.35 ± 6.06%, 30분후 49.73 ± 6.12%, 60분후 42.84 ± 6.17%). 한편 淸上補下湯群에서는 濃度依存的으로 抗酸化活性이 높게 나타났으며, 1mg/ml의 淸上補下湯群에서는 60분후 17.69 ± 10.08%로 나타났고, 0.1mg/ml의 淸上補下湯群에서는 60분후 0.68 ± 6.31%로 가장 높게 나타났다(Fig. 1). 이러한 결과는 활성산소에 의해 생성된 여러 가지 체내 과산화물의 세포 산화적 파괴로 인한 각종 기능장애로 야기된 노화와 질병에 대하여 淸上補下湯이 抑制 效果가 있는 것으로 생각된다.

IL-4는 IgE 및 mast cell, eosinophil 매개성 면역의 조절자이며 휴지기 상태의 B림파구에서 항원을 발현을 시키고 나아가 즉시형 과민반응의 매개물인 IgE의 생성을 촉진시키는 기능을 한다<sup>23,24)</sup>. 淸上補下湯의 IL-4 억제 효과를 확인한 결과 淸上補下湯群에서 濃度依存的으로 IL-4가 강하게 억제되었다. 즉 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml의 淸上補下湯群에서 IL-4는 각각 37.72 ± 6.38pg/ml, 22.32 ± 4.22pg/ml, 10.39 ± 2.06pg/ml로 나타났고, 특히 10  $\mu$ g/ml와 100  $\mu$ g/ml 투여군에서 유의성이 나타났다(P<0.05)(Fig. 2).

Microarray 기술은 DNA sequencing, 변이 분석, 새로운 유전자 발견, 유전자 발현 분석 등의 분야에 활용되어 왔다<sup>25)</sup>. 유전자 발현의 연구에 있어서 microarray를 이용하면 많이 존재하는 mRNA를 관찰함으로써 유전자 발현을 신속히 정량적으로 평가할 수 있으며 특히 수많은 유전자를 동시에 측정할 수 있다는 장점이 있다. mRNA는 DNA로부터 직접 전사되어 나오므로 mRNA는 유전자의 발현양상을 반영하게 된다. 이렇게 수많은 유전자를 동시에 정량적으로 평가함으로써 생리적인 혹은 병리적인 과정에 대해 보다 다각도의 정확한 정보를 얻을 수 있게 되었다. 즉 microarray는 수천 또는 수만개의 유전자에 대해 그 발현을 동시에 관찰할 수 있도록 하는 기술로 응용성이 매우 넓으며 동시에 수천~1만개 수준의 유전자 해석이 가능해졌고 전통적인 "단일 유전자" 연구 방법과 비교할 수 없는 매우 큰 장점을 지니고 있다<sup>19,26)</sup>.

淸上補下湯을 처치한 cDNA chip을 이용한 유전자 발현에 미치는 영향을 보면, 對照群에 비해 2배 이상 증가된 遺傳子는 관찰되지 않았으나 140%-200% 범위로 발현이 항진된 유전자에는 integrin, alpha M, CD33, CD34, CD135, cDNA FLJ10823 fis, IL-3, immunoglobulin, binding protein 1, CD167a, CD123, CD38, CD201 등이 있었고, 對照群에 비해 2배 이상 저하된 遺傳子는 관찰되지 않았으나 60%-100% 범위로 발현이 저하된 유전자는 alpha-tubulin mRNA, major histocompatibility complex class, HNF-1 $\alpha$ , CD37, CD124, transcription factor-4 mRNA, monocyte chemotactic and activating factor, CD115, CD100, no match (Crea8), 5-lipoxygenase activating protein (FLAP), TNF-beta 등이 있었다.

백혈구는 염증상태가 아닌 경우에는 혈관벽과 거의 반응이 일어나지 않지만, 염증상태에서는 백혈구가 정맥모세혈관의 내피세포와 지속적인 부착반응이 일어난다<sup>27)</sup>.

부착분자에는 구조에 따라 크게 selectin 계열, integrin 계열과 Ig supergene 계열 등 3가지로 나는데, integrin은 linked  $\alpha$ 와  $\beta$ chain을 가지고 있으며 세포의 기질과 연결 작용을 한다<sup>27)</sup>. 백혈구는 13개의 integrin

을 발현하는데 주로 내피세포와 기질분자의 결합을 조절하며, 내피세포의 부착과 관련된 중요한 integrin은  $\beta$ 1,  $\beta$ 2와  $\beta$ 7 이다.  $\beta$ 2 integrin은 백혈구에서 많이 발현되며,  $\alpha$ m $\beta$ 2(Mac-1)과  $\alpha$ L $\beta$ 2(LFA-1) 등으로 나누며, 백혈구가 C5a와 같은 화학주성 분자에 노출되면 내피세포와 부착이 증가된다<sup>27)</sup>.

Mac-1은 중성구, 단핵식균세포와 mast cell에서 발현되며, 세포표면 receptor로 작용하는 integrin 계열이다. 중성구와 단핵구의 Mac-1은 ICMA-1과 결합하며, 백혈구가 내피세포와 안정된 부착작용을 하게 한다. 이 결합은 염증상태나 손상부위에 백혈구 결집을 야기한다<sup>28)</sup>.

CD34의 주요 발현처는 조혈세포의 전구물질과 고내피소정맥의 내피세포이며, 역할은 세포와 세포의 부착역할과 L-selectin 과 결합하는 내피세포 리간드이다<sup>26)</sup>. Selectin은 렉틴 부착 분자라 불리우기도 하는데, 백혈구와 내피세포의 유착을 매개하는 세 종류의 연관성 있는 단백질을 말한다. L-selectin은 림프구가 HEV를 통해 림프절로 분포하도록 하는 귀소수용체로 작용하는데, 호중구에 발현된 L-selectin은 염증부위에서 사이토카인에 (TNF- $\alpha$ , IL-1 및 INF- $\gamma$ )의해 활성화된 내피세포에 이들 세포가 부착되도록 한다. L-selectin은 세포간 결합의 초기 단계만을 매개하여 혈류를 따라 흘러가던 호중구를 내피세포 표면을 따라 구르게 만든다. 특히 L-selectin은 백혈구 미세용모 돌출 부위 침단에 발현되어 있기 때문에 내피세포에 있는 리간드와 잘 접촉할 수 있다. 호중구는 내피세포의 ICMA-1과 강하게 결합하고, 곧이어 LFA-1에 의해 내피세포들 사이를 통해 혈관 밖으로 빠져나오게 된다<sup>29)</sup>.

淸上補下湯群에서 integrin, alpha M(complement component: 보체 성분)과 CD34의 발현증가현상은 정상적인 경우에는 림프구가 HEV를 통해 림프절로 분포하도록 하는 귀소수용체 역할이 강화되고, 말초 염증상태에서는 혈관내 백혈구가 혈관 밖으로 빠져나오는 것을 용이하게 하여 정상적 면역반응이 일어나도록 유도하는 현상으로 해석할 수 있다.

IL-3은 CD4+세포에서 생산되고 모든 성숙 혈액세

포 종류의 미성숙 골수 progenitor의 확산을 증진하는 역할을 한다<sup>28)</sup>. 또한 IL-5 및 GM-CSF와 함께 여러 계통의 조혈세포를 자극하는 기능을 가지고 있으며, 미성숙 골수 전구세포들을 증식시키어 여러 종류의 세포로 분화시키고, 마우스에서는 IL-4와 같이 mast cell의 분화 증식을 촉진한다<sup>24)</sup>.

CD123의 주요 발현처는 monocyte, macrophage, 골수 조혈전구세포이며 IL-3과 결합하는 작용을 가지며, CD131과 협조하여 IL-3의 생물학적 효능을 조절한다<sup>28)</sup>.

CD135의 주요 발현처는 골수와 B cell 전구생식세포(progenitor cells)이며 주요 작용은 조절작용과 관련된 growth factor receptor로서 작용한다<sup>28)</sup>. CD135는 Flt 3 ligand (FL)의 receptor의 작용을 하며, FL의 작용은 초기 조혈세포를 증식시키는 것으로 알려져 있고<sup>30,31)</sup>, FL은 IL-7 혹은 stem cell factor(SCF)의 협동으로 초기 B cell progenitor를 유지하며<sup>32)</sup>, 또한 흉선 T cell precursor의 분화와 증식을 조절하는 역할도 제시되고 있다<sup>33)</sup>.

淸上補下湯에 의해 발현이 증가된 IL-3, CD123, CD135는 조절작용을 자극하는 사이토카인들이며, 이들은 골수 원조세포의 성장과 분화에 강력한 자극자로서 작용하여, 백혈구를 소비하는 면역반응과 염증반응시 염증세포와 대체될 새로운 백혈구를 생산한다. 이러한 현상은 淸上補下湯의 인체 면역기능의 강화작용과 관련하여 해석할 수 있을 것으로 생각된다.

CD33의 주요 세포발현처는 monocyte와 골수양생식전구세포이며, 역할은 sialic acid와의 결합과 골수세포에서 신호조절 역할이 있다<sup>28)</sup>. CD33은 sialic acid와 결합하고 inhibitory signal을 보내며, 세포분화를 억제하고, CD34+ 골수 전구세포에서 CD33의 결합은 수지상세포로의 분화를 억제하고 apoptosis를 유발한다<sup>34)</sup>.

CD79A의 주요 발현처는 성숙 B 세포이며, B cell의 antigen receptor complex(항원수용체 복합체)에 의한 신호 전달과 표면 발현에 필요하다<sup>26)</sup>. Immunoglobulin (CD79A) binding protein 1은 B cell의 항원수용체 복합체의 작용과 관련될 것으로 생각된다.

CD38은 초기상태 또는 활성화된 B 세포와 활성화된 T 세포에서 발현되고<sup>28)</sup>, 신호전달 분자이며 cyclic ADP-ribose(cADPR)의 합성과 저해뿐만 아니라 유효한 Ca<sup>2+</sup> 동원인자를 촉매하는 체외효소(ectoenzyme)이다<sup>35)</sup>.

T cell에서는 CD38의 신호에 의해 Raf-1/MAP kinase, CD-3 $\zeta$ -associated protein(ZAP:zeta-associated protein)-70/phospholipase C(PLC)- $\gamma$ 1 pathway와 Ca<sup>2+</sup>의 동원을 활성화시키고, apoptosis를 유도한다<sup>36,37)</sup>. B cell에서는 CD38의 신호에 의해 B cell의 분화를 방해하고 B 전구세포의 apoptosis를 유도하나, 성숙 B cell에서는 CD38의 신호에 의해 분화작용이 일어나고 apoptosis를 방지하는 현상이 나타나는데 CD38과 BCR의 협력작용에 의한 것으로 보인다<sup>38,39)</sup>.

淸上補下湯의 CD33 발현증가는 종양억제효과를 추정할 수 있으며, CD38의 발현증가는 B cell과 T cell의 활성화작용과 immunoglobulin (CD79A) binding protein 1은 B cell의 항원수용체 복합체의 작용과 관련될 것으로 생각된다.

주조직적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC)는 고도의 다형성을 갖는 유전자 부위이며, 이로 생성되는 분자들은 여러 세포의 표면 위에 발현된다. MHC 유전자는 단백질 항원에 대한 면역반응에서 중심적인 역할을 하는데, 이는 항원 특이 T 림프구가 단독 혹은 수용액 상태의 항원을 인식하는 것이 아니라 MHC 유전자 산물과 비공유결합된 단백질 항원(펩타이드)부위를 인식하기 때문이다.

MHC 유전자로부터 생성되는 산물에는 class I MHC와 class II MHC 두가지 형태의 분자가 있는데, 특정한 T림프구는 오직 한 개의 특정 class I MHC 또는 class II MHC 분자에 결합된 외래항원만을 인식할 수 있다. 따라서 MHC 분자는 펩타이드 항원을 제공할 뿐만 아니라 T림프구가 항원을 인식하는데 다리를 놓아주는 중요한 부분이라 할 수 있다<sup>29)</sup>.

CD124의 주요 발현처는 B cell과 T cell, 내피세포 및 조혈전구세포이다. 역할은 IL-4 receptor의 cytokine 연결 아집단이며, 또한 IL-13 receptor 아집단이다<sup>28)</sup>.



Leukotriente은 lipoxigenase pathway를 통하여 생성된 지질 염증 매개자이다. Mast cell은 아라키돈산에서 LTC4, LTD4, LTE4와 같은 세가지 종류의 LT를 전환 시킨다. 이 물질은 평활근 근육세포의 특정 수용체에 결합하여 지속적 기관지 수축을 야기한다. Leukotriente은 소위 아나필락시스의 완속 반응물질(slow-reacting substance of anaphylaxis)이라 하였고, 현재 천식성 기관지수축의 가장 주된 매개자로 생각하고 있다<sup>28)</sup>.

TNF- $\beta$ 는 TNF- $\alpha$ 와 동일한 수용체에 결합하며 유사한 생물학적 기능을 나타낸다. 암세포 파괴기능, 호중구 활성화로 염증반응 유도, 혈관내피세포에 작용하여 백혈구 부착 항진과 싸이토카인 생성유도 기능을 나타낸다.

Monocyte chemotactic and activating factor도 발현이 저하되었는데, 단핵식균세포계는 면역계에서 그 일차적 기능이 식균작용을 한다. 세포계의 모든 세포는 골수에서 기원하며 성숙과 계속적인 활성화 단계를 거친 후 형태적으로 변화된다. 골수를 나와 순환계로 들어간 맨 처음 세포는 완전히 분화되지 못하여 단핵구라고 불린다.

대식세포는 특이면역반응에서 항원제시세포의 기능을 가지고 있고, 세포성 면역반응의 작동세포 기능을 가지고 있고, 체액성 면역반응에서도 외래항원을 제거하는 역할을 한다.

HNF-1 $\alpha$ (hepatocyte nuclear factor-1a)의 경우, TNF는 hepatocyte가 어떠한 혈청단백(혈청 amyloid A 단백질, fibrinogen)의 합성을 증가시키도록 한다. TNF와 IL-1, IL-6 및 자연면역의 다른 싸이토카인에 의해 유도된 혈장단백의 조합물은 염증자극에 acute phase response를 만들어 낸다<sup>28)</sup>.

CD37의 주요 발현처는 B cell이며, 약간의 T cell과 myeloid cell에서도 발현되고 작용은 CD53, CD81, CD82와 MHC class II 분자와 membrane에서 복합체를 형성하며, 주로 신호전달을 한다<sup>28)</sup>. CD81은 B cell을 활성화시키며, CD19와 CD21과 더불어 coreceptor 복합체를 이루어 B cell의 antigen receptor 복합체로부터의 신호를 증강하여 전달한다<sup>28)</sup>.

TNF- $\beta$  즉 림프독신은 특이면역반응을 조절하는 사이토카인이며, FLAP은 leukotriente을 합성하는 첫 번째 단계를 촉매하고, 이러한 leukotriente은 천식성 기관지수축의 가장 주된 매개자로 인식되고 있으며, CD124는 특이면역반응을 조절하고 매개하는 사이토카인 IL-4와 IL-13과 관련이 있는데 바로 IL-4 receptor의 cytokine 연결 아집단이며, 또한 IL-13 receptor 아집단이다. MHC 분자는 펩타이드 항원을 제공할 뿐만 아니라 T 림프구가 항원을 인식하는데 중요한 부분이며, 대식세포는 특이면역반응에서 항원제시세포의 기능을 가지고 있고, 세포성 면역반응의 작동세포 기능을 가지고 있으며, CD37은 MHC class II 분자와 membrane에서 복합체를 형성하여 신호전달을 하며, hepatocyte에 유도된 혈장단백의 조합물은 염증자극에 acute phase response를 만들어 낸다.

이처럼 淸上補下湯에 의해 TNF- $\beta$ , FLAP, MHC, CD37, CD124, HNF-1 $\alpha$ (hepatocyte nuclear factor-1a), monocyte chemotactic and activating factor 유전자들이 발현감소된 현상은 이들 유전자가 주로 작용하는 특이면역반응과 관련되어 있을 것으로 생각되며, 淸上補下湯의 이러한 작용은 알레르기 반응의 치료에 효과가 있을 것으로 생각된다.

淸上補下湯에 의해 발현이 저하된 TCF-4와 CD100중 TCF-4는 colon tumor cell과 관련 있으며, 다른 유전자처럼 c-myc (종양유발 유전자)의 발현을 증가시키고, CD100은 B림프구와 T림프구의 활성화 뿐만 아니라 종양 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 현상은 淸上補下湯이 종양에 대한 치료 효과가 있을 것으로 추정된다.

淸上補下湯에 의해 CD115의 발현이 저하된 것은 골수 원조세포의 성장과 분화와 관련된 M-CSF의 기능저하로 볼 수 있는데 이는 IL-3, CD123, CD135 유전자의 발현증가와와는 반대 현상이 나타나므로 좀더 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과는 淸上補下湯의 치료 작용기전을 보다 깊이 이해하고 임상적 응용의 폭을 넓히는 데에 도움이 되는 기초자료로 쓰일 수 있을 것이다. 淸上補下湯의 free radical을 제거하는 항산화효능이 탁월

하였으며 천식과 관련된 cytokine의 하나인 IL-4를 강하게 억제함을 알 수 있었다. 또한 淸上補下湯은 microarray를 통해 관찰한 결과 PBMC의 CD/cytokine 유전자중 일부는 발현을 저하시키고 일부 유전자는 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 그러나 그 발현 정도에 대해 더 많은 반복 실험 및 심화 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결론

淸上補下湯의 抗酸化 效果와 IL-4(interleukin-4)抑制 및 cDNA chip을 이용한 遺傳子發顯에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 淸上補下湯은 濃度依存的으로 抗酸化活性이 높게 나타났다.
2. 淸上補下湯은 濃度依存的으로 IL-4가 강하게抑制되었으며 10ug/ml와 100ug/ml 投與群에서 有意性이 나타났다.
3. DNA chip을 이용한 遺傳子發顯 分析상 對照群에 비해 淸上補下湯群의 培養세포에서 2배 이상 增加된 遺傳子는 관찰되지 않았다. 다만, 140%-200% 범위로 발현이 항진된 유전자로는 순서대로 integrin, alpha M (complement component), CD33 (gp67), CD34, CD135, cDNA FLJ10823 fis (Crea4), IL-3, immunoglobulin (CD79A) binding protein 1, CD167a, CD123, CD38 (p45), CD201 등이 있었다.
4. DNA chip을 이용한 遺傳子發顯 分析상 對照群에 비해 淸上補下湯群의 培養세포에서 2배 이상 抑制된 遺傳子는 관찰되지 않았다. 다만, 60%-100% 범위로 발현이 저하된 유전자로는 순서대로 alpha-tubulin mRNA, major histocompatibility complex class, HNF-1 $\alpha$ , CD37, CD124, transcription factor-4 (TCF-4) mRNA, monocyte chemotactic and activating factor, CD115, CD100, no match (Crea8), 5-lipoxygenase activating protein (FLAP), TNF-beta 등이 있었다.

## 참고문헌

1. Busse WW, Horwitz RJ, Reed CE. Asthma In: Middleton E, Jr, Ellis EF, Yunginger JW, Reed CE, Adkinson NF, Jr, Busse WW. Allergy principles & practice. 5th ed. St. Louis: Mosby. 1998:838-858.
2. McFadden ER, Jr. Asthma In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, eds. Harrison's principles of internal medicine. 15th ed. International edition: McGraw-Hill. 2001:1456-1463.
3. 전국한의과대학폐계내과학교실 편저. 東醫肺系內科學. 서울. 한문회사. 2002:192-199, 320-331, 619.
4. 延賢 壽世保元 北京 人民衛生出版社 1994:169-170
5. 정승기. 加味淸上補下湯이 천식에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 大韓韓醫學會誌 1991;12(1):118-138.
6. 손종국, 이형구, 정승기. 淸上補下湯 및 淸上補下湯加鹿茸이 實驗的 肺損傷에 미치는 영향. 대한한의학회지 1993;14(2):216-228.
7. 정희재, 정승기, 이형구. 淸上補下湯 및 淸上補下湯合三子養親湯이 SO<sub>2</sub>에 의한 흰쥐의 呼吸器損傷에 미치는 영향. 慶熙韓醫大論文集 1997;20(1):90-115.
8. 박광은, 박종배, 이형구, 정승기. 淸上補下湯이 燥熱한 공기로 유발된 실험적 호흡기손상에 미치는 영향. 제 5회 한중학술대회 발표논문집 1999;69-96.
9. 권혁성, 정희재, 이형구, 정승기. 淸上補下湯이 알레르기 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향. 慶熙韓醫大論文集 1999;22(1):203-215.
10. 김영우, 정희재, 이형구, 정승기. 定喘湯과 淸上補下湯이 Asthm Model 내의 Cytokine에 미치는 영향. 大韓韓方內科學會誌 2001;22(3):367-378.
11. 이준우, 정희재, 정승기, 이형구. 小青龍湯이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포에 미치는 영향. 慶熙醫學. 2001;17(2):242-253.
12. 김진주, 정희재, 정승기, 이형구. 麥門冬湯과 定喘化痰降氣湯이 알레르기 천식모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청IgE에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌 2002;23(1):37-49.
13. 유옥상, 정희재, 정승기, 이형구. 麥門冬湯이 알레르기 喘息의 呼吸樣相과 氣管組織에 미치는 影響. 第5回 韓?中 學術大會發表 論文集 1999;3-13.
14. 조영민, 정희재, 정승기, 이형구. 小青龍湯이 알레르기 喘息의 呼吸樣相과 氣管組織에 미치는 影響. 慶熙醫學 1999;15(1):78-89.

15. 차은수, 정희재, 정승기, 이형구. 小青龍湯이 Asthma model 内の Cytokine에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集 2000;23(1):71-88.
16. 백동진, 정희재, 이형구, 정승기. 解表二陳湯加減方이 Asthma model 内の Cytokine에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 2000;21(3):3-13.
17. 주장엽, 황우석, 허태석, 정희재, 정승기, 이형구. 六味地黃湯合瀉白散과 桑白皮가 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-8, GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. 大韓韓方內科學會誌 2001;22(3):415-422.
18. 이형철. 사람 Mast cell에서의 케모카인에 대한 白蓮治哮湯의 效果. 慶熙大學校 大學院. 2002.
19. 유대열, 송창우, 유영춘, 박승용. 계능기능연구프로토콜. 서울. 월드사이언스 2001;25, 35.
20. 慶熙醫療院 韓方病院. 韓方基本處方集. 서울. 대성문화사, 1988:207.
21. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Arch Biochem Biophys. 1986;246:501-14.
22. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol. 1993;23:21-48.
23. 서울대학교 의과대학편. 면역학. 서울. 서울대학교출판부 1996:121-134.
24. 김세종. 면역학. 서울. 고려의학 1994:58-59, 147-161, 260-265.
25. Stuhlmuller B, Ungethum U, Scholze S, Martinez L, Backhaus M, Kraetsch H-G, Kinne RW, Burmester G-R. Identification of known and novel genes in activated monocytes from patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2000;43:775-790.
26. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001:A10.2
27. Stephen Th, Martin KC, Lawrence ml. Allergy(second edition). UK. Mosby. 2001:293-298, 303-304.
28. Abul KA, Andrew HL, Jordan SP. Cellular and Molecular Immunology(4th edition). U.S.A. W.B. Saunders Company. 2000:246, 325, 500-514
29. 김광혁 외 역. 세포·분자 면역학(3판). 서울. 정문각. 1998:41-60, 128, 298-329, 353-355.
30. Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ. Human Flt3/Flk2 gene:cDNA cloning and expression in hematopoietic cell. Blood 1993;82:1110-1119.
31. Small D, Levenstein M, Kim E. STK-1 Human homolog of FLK2/Flt3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. Proc Natl Acad Scien USA 1994;91:459-463.
32. Ray RJ, Paige CJ, Furlonger C, Lyman SD, Rottapel R. Flt3 ligand supports the differentiation of early B-cell progenitor in the presence of IL-11 and IL-7. Eur J Immunol 1996;26:1504-1510.
33. Freedman AR, Zhu H, Levine JD, Kalam S, Scadden DT. Generation of human T lymphocyte from bone marrow CD34+ cell in vitro. Nature Med 1996;2:46-51.
34. Ioannis A Voutsadakis. Gemtuzumab Ozogamicin (CMA-676, Mylotarg) for the treatment of CD33+ acute myeloid leukemia. Anti-Cancer Drugs 2002; 13(7):685-692.
35. Roberto M, Ada F, Mercedes Z, Germano B. Signaling through CD38 induces NK cell activation. International Immunology 2001;13(4):397-409.
36. Zubiaur M, Izquierdo M, Terhost C, malavasi F. CD38 ligation results in activation of Raf-1/mitogen-activated protein kinase and CD3- $\zeta/\zeta$ -associated protein-70 signaling pathways in Jurkat T lymphocytes. J. immunol 1997;159:193.
37. Morra M, Zubiaur M, Terhost C, Sancho J, Malavasi F. Cd38 is functionally dependent on TCR/CD3 complex in human T cells. FASEB J 1998;12:581.
38. Kumagai M, Coustan-Smith E, Murray D, Silvennolinen J. Ligation of CD38 suppresses human B lymphopoiesis. J. Exp.Med. 1995;181:1101.
39. Zupo S, Rugari E, Dono M, Taborelli G, Malavasi F, Ferrarini M. CD38 signaling by agonistic monoclonal antibody prevents apoptosis of human germinal center B cell. Eur. J. Immunol. 1994;24:1218.