

원 저

補精定喘湯의 Cytokine 및 IgE에 대한 調節效果

권혁성, 정주호*, 김성훈**, 정승기

경희대학교 한의과대학 폐계내과학 교실, *경희대학교 의과대학 약리학 교실, **경희대학교 동서의학대학원 동서종양학교실

Effects of *Bojeongjeongcheon-tang* on Cytokines and Immunoglobulin E in B Cells

Hyuk-Sung Kwon, Joo-Ho Jung*, Sung-Hoon Kim**, Sung-Ki Jung

Division of Respiratory system, Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University Seoul, Korea,

*Dept. of Pharmacology, Kyunghee University Seoul, Korea

**Dept. of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University Yongin, Korea

Objectives : To evaluate experimentally the clinical effect of *Bojeongjeongcheon-tang*, we observed the cytokines (IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , IFN- γ) and what effect they have on IgE in B cells of a rat.

Methods : First of all, we extracted the spleens of healthy Balb/c mice and separated B cells from them. These B cells were cultured with anti-CD40 mAb (500 ng/ml), rIL-4 (500 U/ml), *Bojeongjeongcheon-tang* (100 ug/ml, 10 ug/ml, 1 ug/ml). We used rIL-10 (50 ng/ml) as a control group. Furthermore, we analyzed the expression of IgE, CD23, CD69 and the coherence of HRF in B cells using a flow cytometer. We also analyzed the cytokine gene expression in B cells by reverse transcriptase-PCR. We also measured B cells proliferation using the Liquid Scintillation Counter.

Results : In this study, the *Bojeongjeongcheon-tang* treated group showed a tendency to decrease depending on the density compared with the control group in the expression of IgE+, CD23+, CD69, HRF. All of the *Bojeongjeongcheon-tang* treated group showed inhibitory effects with IL-1 β , IL-4, IL-5 and proliferating effects with IL-6, IL-10, and IFN- γ on cytokines transcript expression depending on the density. Meanwhile, TNF- α increased in all density. In IgE production, there was inhibitory effect on *Bojeongjeongcheon-tang* (both 100 ug/ml and 10 ug/ml) of significance ($p < 0.01$, $p < 0.05$). Also in B cell proliferation, the result revealed an inhibitory effect of *Bojeongjeongcheon-tang* (both 100 ug/ml and 10 ug/ml), of significance ($p < 0.001$, $p < 0.01$).

Conclusions : This study shows that *Bojeongjeongcheon-tang* has an inhibitory effect on the production and activity of B cells. Also it inhibited CD23, IL-4 activity and IgE production and activation.

It is obvious that *Bojeongjeongcheon-tang* treats asthma by inhibiting the production of histamine and HRF, IL-5 and proliferating IL-10. Also *Bojeongjeongcheon-tang* has some preventive effects on bronchial change by inhibiting TGF- β , which stimulates the bronchial transformation.

Key Words: asthma, *Bojeongjeongcheon-tang*, cytokine, IgE, CD23, CD69

· 접수 : 2004년 2월 14일 · 논문심사 : 2004년 2월 29일
· 채택 : 2004년 3월 9일
· 교신저자 : 정승기, 서울시 동대문구 회기동 1 경희의료원 한
방5내과 의사실
(Tel. 02) 02-958-9147, Fax : 02) 02-958-9148 E-
mail: orientdoc@freechal.com)

서론

1859년 Henry Hide Salter는 처음으로 氣管支喘息 (이하 喘息)을 가변적인 기도폐색 질환으로 규정한 이래, 1960년에는 기관지 과민성이 있는 것으로 정의

되었고, 1997년 국제 심장, 폐, 혈액학회에서 천식을 비만세포, 호산구, T림프구 같은 많은 세포들의 역할에 의해 발생하는 “기도의 만성 염증성 질환”으로 정의하였다¹⁾. 최근 알레르기 면역반응을 Th1과 Th2의 균형에 의해 그 기전을 설명하고 있는데, 천식은 Th2 반응의 우세로 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13과 같은 cytokine이 분비되어 호산구의 유도과 비만세포의 활성화, B 림프구에서 IgE 생성에 관여함으로써 유발된다고 설명하고 있다^{2,7)}. B세포는 항체매개면역반응의 항체를 생산하는 세포로 골수에서 성숙되어 이차림프기구로 이동된다. B세포의 증식과 분화에는 T세포가 관여하는데 T세포가 단백질 항원에 반응하여 cytokine이 분비되며, 이러한 cytokine의 자극에 의하여 B세포가 증식되고 여러 동형의 항체를 생산하게 된다. B세포의 IgE는 알레르기 천식과 관련된 항체이며, IgE에 의해 비만세포가 활성화되고 비만세포에서 histamine과 알레르기 천식발작에 관여하는 cytokine (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α , GM-CSF 등)이 생산되어 기관지 평활근의 비대와 氣管支過敏性を 유발시켜 천식을 발작시킨다^{8,9)}.

韓醫學에서 氣管支喘息은 呼吸急促하고 喘鳴有聲한 症狀을 主症狀으로 하는 哮喘證의 범주에 속한다¹⁰⁾. 최근 한의계에서는 천식과 그와 관련된 cytokine에 대한 韓藥의 치료효과를 研究한 實驗論文과¹³⁻¹⁷⁾, 臨床研究論文¹⁸⁻²⁰⁾들이 지속적으로 발표되고 있는 추세이다.

補精定喘湯은 경희의료원 한방병원 폐계 (알레르기·면역·호흡기)내과에서 創方하여 사용하고 있는 處方으로 肺腎을 補하고, 祛痰止咳平喘, 下氣등의 作用^{21,22)}에 의해 哮喘證에 사용되고 있다.

이에 저자는 천식에 대한 補精定喘湯의 임상효과를 실험적으로 검증하기 위하여 생쥐 B세포에서 염증관련 cytokine들 (IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , IFN- γ)과 IgE의 발현에 미치는 영향을 觀察하여 結果를 보고하는 바이다.

Table 1. Composition and Dosage of *Bojeongjeongcheon-tang*

Herb	Scientific Name	Dose(g)
麥門冬	<i>Liriodopsis Tuber</i>	12.0
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	8.0
山藥	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	8.0
白果	<i>Ginkgo Semen</i>	8.0
天門冬	<i>Asparagi Radix</i>	4.0
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	4.0
薏苡仁	<i>Coicis Semen</i>	4.0
杏仁	<i>Ansu Seman</i>	4.0
桑白皮	<i>Mori Cortex</i>	4.0
款冬花	<i>Farfarae Flos</i>	4.0
鹿茸	<i>Cervi Cornu Parvum</i>	4.0
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	4.0
蘿菈子	<i>Raphani Semen</i>	4.0
麻黃	<i>Ephedrae Herba</i>	4.0
Total amount		76.0

재료 및 방법

1. 材料

1) 動物

實驗動物은 雄性 4주령의 BALB/C 생쥐를 韓國化學研究所에서 供給받아 實驗當日까지 固形飼料 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 供給하고 室溫 22 \pm 2 $^{\circ}$ C를 계속 維持하면서 2 週日間 實驗室環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

2) 藥材

本 實驗에 使用한 補精定喘湯을 시중 건재 한약국에서 구입한 後 精選하여 사용하였으며 내용과 1첩의 분량은 다음과 같다 (Table 1).

3) 試料製造

(1) 煎湯液

5첩 분량인 380 g을 증류수 1300 ml을 가하여 열탕 추출기 (대웅, DWT-1800T)에서 3시간 가열하여 얻은 추출액을 KIMTEX로 여과한 後 減壓 蒸溜裝置 (Rotary evaporator, Buchi B-480, Switzerland)로 濃縮하고, 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 얻은 완전 건조된 분말 (88 g)을 冷凍 (-84 $^{\circ}$ C) 保管하면서 適當한 濃度로 희석하여 사용하였다.

(2) 試藥 및 器械

Diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), magnesium chloride (MgCl₂)은 Sigma 社(USA)제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa 社 (Japan) 제품을, 역전사효소 (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase : MMLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega 社 (Madison, USA) 제품을, RNazol[®]는 Tel-Test 社 (USA) 제품을, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 社 (Logan, USA) 제품, 그리고 agarose (FMC, USA)등을 사용하였고, 유세포 형광분석에 사용된 phycoerythrin (PE)-anti-rat conjugate Ig, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD23, anti-IgE, anti-CD40, anti-B220-FITC는 Pharmingen 社 (Torreyana, USA)의 제품을, 3H-thymidine, Sephadex G-10은 Amersham Pharmacia 社 (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

本 研究에 使用된 機器는 bright microscope (Nikon, Japan), inverted microscope (Nikon, Japan), flow cytometry (Becton Dickinson, USA) spectrophotometer (Shimadzu, Japan), CO₂ incubator (Napco, Germany), imager II photo-system (Bioneer, Korea), 遠心分離器 (Centrikon, Sigma), bio-freezer (Sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision科學) 및 homogenizer (OMNI, USA) 등의 것을 使用하였다.

2. 方法

1) 細胞 培養

생쥐의 정상 lung fibroblast 세포 (mLFC)는 BALB/c 생쥐의 폐 (lung) 조직을 cool D-PBS로 3회 세척하여 작은 조각으로 절단한 후 conical tube (15 ml)에 넣어 1400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. Tube에 DMEM {containing collagenase A (5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)와 DNase type I (0.15

mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin 10⁴ U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)}를 넣고 37℃ CO₂ 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양한다. 배양 후 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2 회 1500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1 주일 동안 배양하였다. 1 주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC 세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵ 세포/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

2) 세포독성 측정 (in vitro)

(1) 세포독성 (cytotoxicity) 측정

세포독성방법은 SRB assay법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. 생쥐의 mLFCs 세포는 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후 補精定喘湯 (최종 농도 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)을 48 시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액 (PBS)으로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 µl를 가하고 1 시간 동안 4℃에 방치하였다. 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 µl/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris base로 100 µl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, USA)에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA Reader (molecular devices, USA)에서 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 생쥐 B 세포분리 및 배양

Balb/c 생쥐에서 비장을 분리하여 비장세포 (spleen cell)를 채취하여 2000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포를 회수하였다. 이에 적혈구용 혈액 (Sigma) 2 ml을 넣고 37℃ 항온수조에 5 분간 방치하였다. 그리고 나서 즉시 10 ml의 D-PBS를 첨가하여 2000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 사용하였다. 분리한 비장세포에 J1J, OK153, M1/70 배양상층액 (1 ml/10⁸ 세포) 그리고 Thy-1.2 (CD90.2) 40 µl을 처리한 후 얼음에서 30

분간 반응시켰다. 반응 후 2회 D-PBS로 수세한 후 rabbit complement lyophilised (Serotec. UK) 0.5 ml을 처리한 후 37°C 항온수조에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 5회 complete medium으로 수세하고 Sephadex G-10 column (Amersham Pharmacia, USA)에 통과시켜 B 세포를 분리하였다. B세포 함량을 측정하기 위하여 α -B220-FITC를 이용하여 유세포형광분석기 (flow cytometry)로 분석하였다.

3) IgE와 CD23 및 CD69 발현분석

생쥐 B 세포를 24 well plate에 5×10^5 세포/well로 분주하고 anti-CD40 mAb (500 ng/ml)과 rmIL-4 (500 U/ml), 그리고 補精定喘湯 抽出物 (100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml) 등을 가하여 48시간 (CD23과 CD69 측정) 과 68 시간 (IgE측정) 배양하였고, 양성대조군으로 rmIL-10 (50 ng/ml)을 사용하였다. 배양 후 B 세포를 인산완충생리식염수 (3% 우태아혈청, 0.1% NaN3)로 2회 수세하였고, 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 goat'-phycoerythrin (PE)-anti-rat conjugate Ig, anti-mouse IgE, 그리고 fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-mouse CD23 등을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기 (flow cytometer, Becton Dickinson, USA)로 생쥐 B세포에서 IgE, CD23 (Fce), 그리고 CD69의 발현을 분석하였다. 분석프로그램은 Cell Quest 프로그램으로 IgE⁺/B220⁺, CD23⁺/B220⁺ 그리고 CD69⁺/B220⁺의 비율 (gated, %)을 산출하였다.

4) 생쥐 B 세포에서 싸이토카인 유전자발현 분석

(1) 補精定喘湯 추출물처리

생쥐 B세포를 분리하여 24 well plate의 각 well에 1×10^6 세포씩 분주하고, 補精定喘湯 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)등으로 처리하였고, 약물처리 1시간 후 anti-CD40 mAb (500 ng/ml)과 rmIL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 500 U/ml, PharMingen)를 동시 배양하였다. 그리고 rmIL-10 (recombinant mouse interleukin-10, 50 ng/ml, Endogen)을 양성대조군으로 사용하였다. 각 補精定喘湯추출물과 anti-CD40 mAb과 rmIL-4를 동시 배양하여 6시

간 후 배양 상등액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

① RNA 추출

배양종료 후 상층액을 제거하고 RNAzol[®]를 이용하여 생쥐 B세포막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. RNAzolB를 1/10 양으로, CHCl₃ (chloroform) (40 μ l/400 μ l RNAzol[®])을 넣은 후 15초간 vortex로 혼합하고 얼음에서 15분간 방치하였다. 고속원심분리기 (4°C)로 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 동량의 isopropanol과 혼합하고 천천히 흔들어 주었다. 그리고 고속원심분리기 (4°C)로 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고, 1 ml의 80% EtOH/DEPC (diethyl pyrocarbonate) D.W.를 넣고 살짝 vortex후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 다시 제거한 후 speed-vac으로 건조시켰다. DEPC/D.W (0.05%) 추출한 total RNA는 DEPC를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

② 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 75°C에서 5분 동안 변성 (denaturation) 시키고, 이에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT (200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-mlV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

③ cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in Germany)를 이용하여 역전사-중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한

primer는 β -actin, interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) interleukin-13 (IL-13), IFN- γ , tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/ μ l)와 antisense primer (20 pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5 mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 μ l Taq polymerase (5 U/ μ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μ l 되도록 멸균증류수를 가하고 predenaturation : 95 $^{\circ}$ C, 5분, denaturation : 95 $^{\circ}$ C, annealing : 55 $^{\circ}$ C, 1분, elongation : 72 $^{\circ}$ C, 1분을 25 cycles한 뒤 postelongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

PCR product의 양은 Windows ID main program (AAB, USA)을 이용하여 최고값 (height, Ht)으로 측정하였다.

5) IFN- γ , IL-4, IL-10 및 IgE 생산량 측정

생쥐 B세포를 분리하여 96 well plate의 각 well에 2 \times 10⁵ 세포씩 분주하고, 補精定喘湯 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml)등으로 처리하였고, 약물처리 1시간 후 anti-CD40 mAb (500 ng/ml)과 rmIL-4 (500 U/ml, PharMingen)를 10일과 48시간 동안 동시 배양하였다. 그리고 rmIL-10 (50 ng/ml, Endogen)을 양성대조군으로 사용하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수하여 ELISA에 사용하였다. ELISA는 IFN- γ , IL-4, IL-10 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Endogen, USA)을 48 시간, 그리고 IgE ELISA kit (PharMingen, USA)으로 분비량은 10 일 동안 배양 후 측정하였다. 각 항체 (antibody)를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 B 세포 배양상층액 (culture supernatant)을 100 μ l씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음

antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA Reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 생쥐 B세포 증식

생쥐 B세포의 증식을 측정하기 위하여 96 well plate의 각 well에 2 \times 10⁵ 세포씩 분주하고, 補精定喘湯 추출물 (100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)등으로 처리하였다. 약물처리 1시간 후 anti-CD40 mAb (500 ng/ml)과 rmIL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 500 U/ml, PharMingen)를 72시간 동안 동시 배양하였다. 그리고 rmIL-10 (recombinant mouse interleukin-10, 50 ng/ml, Endogen)을 양성대조군으로 사용하였다. 동시배양 40시간 배양 후 50 μ Ci/ml의 [methyl-³H] Thymidine (Amersham, USA)을 첨가한 후 최종 48시간 배양하였다. 세포내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 세포만을 세포수집기 (Cell Harvester, USA)를 사용하여 유리섬유여지 (Glass microfiber filter, Whatman)위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기 (Liquid Scintillation Counter, LKB)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

7) Histamine-release factor binding assay

생쥐 비장세포를 24 well plate에 1 \times 10⁶ 세포/well로 분주하고 anti-CD40 mAb (500 ng/ml)과 rmIL-4 (500 U/ml), 그리고 補精定喘湯 抽出物 (100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)등을 가하였고, 양성대조군으로 rHRF (10 μ g/ml)를 처리한 후 24시간 배양하였고, 배양 후 비장세포를 인산완충생리식염수 (3% 우태아혈청, 0.1% NaN₃)로 2회 수세하였고, 4 $^{\circ}$ C에서 면역형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-HRF Ab등을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 수세 후 FITC-label anti-conjugated mouse IgG Ab를 30분간 얼음에서 반응시킨 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세하고 PE-label anti-B220 Ab를 처리한 후 유세포 형광분석기 (flow cytometer, Becton Dickinson, USA)로 생쥐 비장세포에서 HRF의 결합능을 분석하였다.

Table 2. Cytotoxicity Effects of *Bojeongjeongcheon-tang* on Mouse Lung Fibroblast Cells(mLFCs).

Drug	Dose($\mu\text{g/ml}$)	%of Control mLFC
Control	0	100 \pm 2.7
	1	100.4 \pm 5.9
	10	101.4 \pm 4.9
<i>Bojeongjeongcheon-Tang</i>	50	98.8 \pm 4.7
	100	94.2 \pm 5.1
	200	86.5 \pm 6.8*

Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) were pretreated with various concentration *Bojeongjeongcheon-Tang*. The results are expressed the mean \pm S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (* p <0.05).

8) 統計處理

多樣的 實驗으로부터 얻은 結果는 mean \pm standard error로 記錄하였고, 有意性 檢證은 Student's *t*-test 分析方法을 利用하여 決定하였다.

결 과

1. 補精定喘湯이 Mouse lung fibroblast cells (mLFCs)의 세포독성에 미치는 영향

Mouse lung fibroblast cells (mLFCs)에 補精定喘湯群 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서 各各 100.4 \pm 5.9 (%), 101.4 \pm 4.9 (%), 98.8 \pm 4.7 (%), 94.2 \pm 5.1 (%), 86.5 \pm 6.8 (%)로 나타나 대체로 약한 細胞毒性을 보였다 (Table 2).

2. 補精定喘湯이 IgE와 CD23, CD69의 발현에 미치는 영향

1) 補精定喘湯이 CD23⁺/B220⁺ 발현에 미치는 영향
Cell Quest 프로그램으로 CD23⁺/B220⁺ 비율 (gated, %)을 산출한 결과 정상 B cell(A)은 45.9 \pm 4.22 (%)로 나타났지만 rmIL-4 처리群(B)은 48.4 \pm 3.13 (%), anti-CD40 mAb 처리群 (C)은 51.8 \pm 3.97 (%), anti-CD40 mAb 와 rmIL-4를 동시에 처리한 群 (Control, D)에서는 62.1 \pm 4.07 (%)로 가장 유의하게 증가 하였다. 따라서 anti-CD40 mAb 와 rmIL-4를 동시에 처리한 群을 對照群으로 하였으며, IL-10으로

처리한 陽性對照群 (E)은 2.7 \pm 0.33 (%), 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ (F)은 49.7 \pm 3.42 (%), 10 $\mu\text{g/ml}$ (G)은 50.4 \pm 4.67 (%), 1 $\mu\text{g/ml}$ (H)은 57.4 \pm 6.75 (%)로 각각 나타나 대조군에 비해 濃度 依存的으로 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig.1).

2) 補精定喘湯이 IgE⁺/B220⁺ 발현에 미치는 영향

對照群 (Control, C)은 45.5 \pm 3.51 (%), IL-10 으로 처리한 陽性對照群 (D)은 30.8 \pm 3.07 (%), 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ (E)은 32.5 \pm 3.05 (%), 10 $\mu\text{g/ml}$ (F)은 38.7 \pm 2.66 (%)로 各各 나타나 대조군에 비해 濃度 依存的으로 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig.2).

3) 補精定喘湯의 CD69⁺/B220⁺ 발현에 미치는 영향

對照群 (Control, D)은 16.2 \pm 3.46 (%), 陽性對照群 (E)은 1.2 \pm 0.25 (%), 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ (F)은 10.6 \pm 3.01 (%), 10 $\mu\text{g/ml}$ (G)은 11.2 \pm 3.55 (%), 1 $\mu\text{g/ml}$ (H)은 16.2 \pm 4.12 (%)로 各各 나타나 對照群에 비해 濃度 依存的으로 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig.3).

3. 補精定喘湯이 IL-1 β , IL-4, IL-5, TNF- α 傳寫에 미치는 影響 (Table 3)

Interleukin-1 β (IL-1 β) 전사에 대하여 Anti-CD40 mAb 와 rmIL-4를 동시에 처리한 對照群은 95 (HT), IL-10 으로 처리한 陽性對照群은 75 (HT), 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 은 84 (HT), 10 $\mu\text{g/ml}$ 은 91 (HT), 1 $\mu\text{g/ml}$ 은 88 (HT)로 各各 나타나 모든 濃度에서 감소하는 경향을 나타내었다 (Table III). Interleukin-4 (IL-4) 전사에 대하여 對照群群은 134 (HT), 陽性對照群은 45 (HT), 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 은 40 (HT), 10 $\mu\text{g/ml}$ 은 37 (HT), 1 $\mu\text{g/ml}$ 은 86 (HT)로 各各 나타나 對照群에 비해 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 모두에서 濃度 依存的으로 감소하는 경향을 나타내었다. Interleukin-5 (IL-5)의 전사에 대하여 對照群은 87 (HT), 陽性對照群은 63 (HT), 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 은 32 (HT), 10 $\mu\text{g/ml}$ 은 65 (HT), 1 $\mu\text{g/ml}$ 은 64 (HT)로 各各 나타나 對照群에 비해 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 모두에서 濃度 依存的으로 감소하는 경향을 나타내었다. Tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 전사에 대하여 對照群은 132 (HT), 陽性對照群은

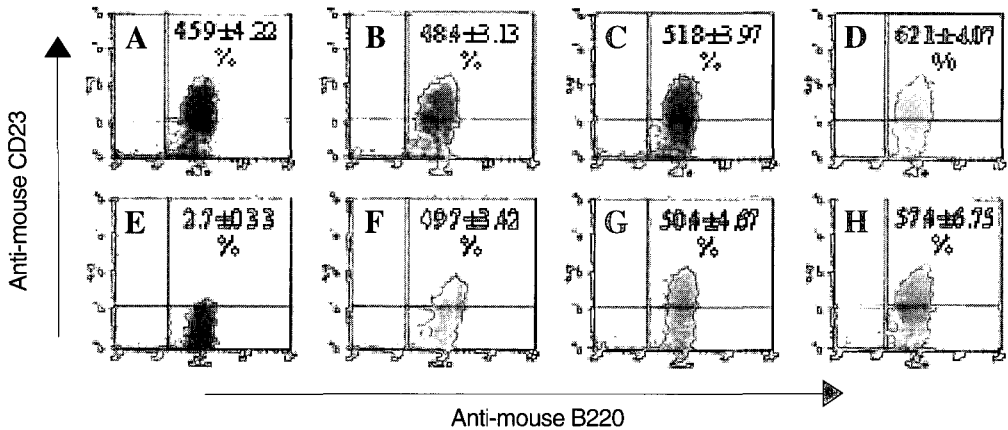


Fig. 1. Inhibitory effect of *Bojeongjeongcheon-tang* on CD23+/B220+ expression in B cells stimulated by anti-CD40 mAb and rIL-4.

B cells (A) were cocultured with rIL-4 (B) or anti-CD40 mAb (C), anti-CD40 mAb plus rIL-4 (Control, D), plus rIL-10 (E), and with anti-CD40 mAb plus rIL-4 plus *Bojeongjeongcheon-tang* (100 mg/ml (F), 10 mg/ml (G), and 1 mg/ml (H) for 48 hrs. After 48 h, the cells were harvested, and assayed for CD23+/B220+ expression by flow cytometry, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

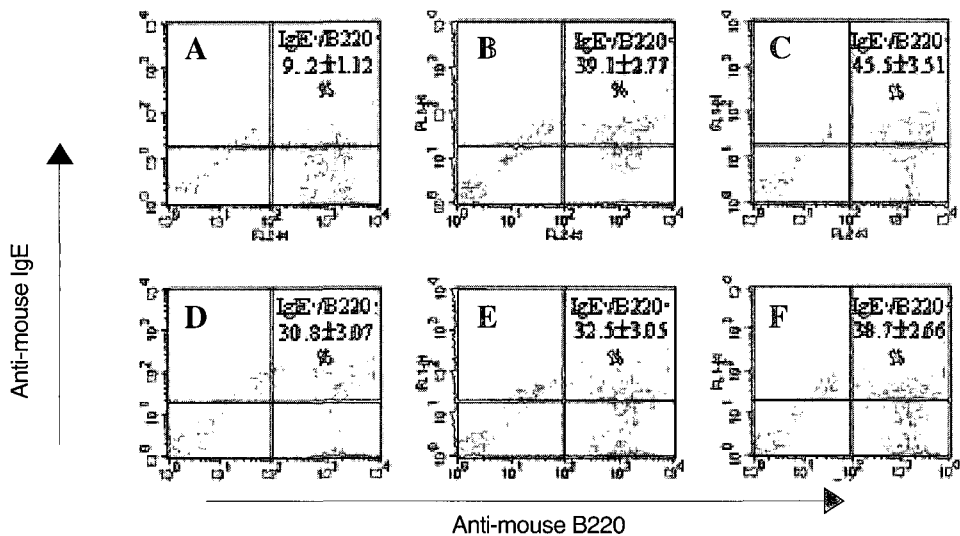


Fig. 2. Inhibitory effect of *Bojeongjeongcheon-tang* on IgE+/B220+ expression in B cells stimulated by anti-CD40 mAb and rIL-4.

B cells were cocultured with rIL-4 (A) or anti-CD40 mAb (B), anti-CD40 mAb plus rIL-4 (Control, C), plus rIL-10 (D), and with anti-CD40 mAb plus rIL-4 plus *Bojeongjeongcheon-tang* (100 mg/ml (E), and 10 mg/ml (F) for 68 hrs. After 68 h, the cells were harvested, and assayed for IgE +/B220+ expression by flow cytometry, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

Table 3. Inhibitory Effects of *Bojeongjeongcheon-tang* on Cytokines Transcript Expression in B Cells Stimulated by Anti-CD40 mAb and rIL-4

a-CD40	rIL-4	rIL-10	<i>Bojeongjeongcheon-Tang</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Cytokines m-RNA expression (HT)			
				IL-1b	IL-4	IL-5	TNF-a
	RPMI1640-media		0	56	62	49	152
-	+	-	0	67	47	63	159
+	-	-	0	72	87	58	163
+	+	-	0	95	134	87	132
+	+	+	0	75	45	63	135
+	+	-	100	84	40	32	150
+	+	-	10	91	37	65	161
+	+	-	1	88	86	64	158

Mouse B cells from healthy Balb/c mice were either stimulated with anti-CD40 mAb (500 ng/ml) and recombinant interleukin-4 (500 U/ml) or treated with *Bojeongjeongcheon-Tang* (100, 10, 1 mg/ml) or rIL-4 plus anti-CD40mAb plus *Bojeongjeongcheon-Tang* or rIL-10 (50 ng/ml). B cells were cultured or cocultured with anti-CD40 mAb and *Bojeongjeongcheon-Tang* for 6 hrs. The gene expression of productive IL-1b, IL-4, IL-5 and TNF-a transcripts was evaluated by reverse transcriptase-PCR. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis (HT) was used to 1D-density program (USA). The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

Table 4. Effects of *Bojeongjeongcheon-tang* on Cytokines Transcript Expression in B Cells Stimulated by Anti-CD40 mAb and rIL-4

a-CD40	rIL-4	rIL-10	<i>Bojeongjeongcheon-tang</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Cytokines m-RNA expression (HT)			
				IL-1b	IL-10	TGF-b	IFN-g
	RPMI1640-media		0	35	59	222	48
-	+	-	0	67	44	236	40
+	-	-	0	72	73	238	21
+	+	-	0	95	58	244	18
+	+	+	0	75	55	242	76
+	+	-	100	84	137	221	128
+	+	-	10	91	135	225	82
+	+	-	1	88	81	234	45

Mouse B cells from healthy Balb/c mice were either stimulated with anti-CD40 mAb (500 ng/ml) and recombinant interleukin-4 (500 U/ml) or treated with *Bojeongjeongcheon-Tang* (100, 10, 1 mg/ml) or rIL-4 plus anti-CD40mAb plus *Bojeongjeongcheon-Tang* or rIL-10 (50 ng/ml). B cells were cultured or cocultured with anti-CD40 mAb and *Bojeongjeongcheon-Tang* for 6 hrs. The gene expression of productive IL-6, IL-10, TGF-b and IFN-g transcripts was evaluated by reverse transcriptase-PCR. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis (HT) was used to 1D-density program (USA). The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

135 (HT), 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 은 150 (HT), 10 $\mu\text{g/ml}$ 은 161 (HT), 1 $\mu\text{g/ml}$ 은 158 (HT)로 각各 나타나 모든 濃度에서 증가하는 경향을 나타내었다.

4. 補精定喘湯이 IL-6, IL-10, TGF- β , IFN- γ 傳寫에 미치는 영향 (Table 4)

Interleukin-6 (IL-6)의 전사에 대하여 對照群은 58 (HT), 陽性對照群은 55 (HT), 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 은 137 (HT), 10 $\mu\text{g/ml}$ 은 135 (HT), 1 $\mu\text{g/ml}$ 은 81 (HT)

로 각各 나타나 對照群에 비해 濃度依存的으로 증가하는 경향을 나타내었다. Interleukin-10 (IL-10)의 전사에 대하여 對照群은 85 (HT), 陽性對照群은 175 (HT), 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 은 142 (HT), 10 $\mu\text{g/ml}$ 은 102 (HT), 1 $\mu\text{g/ml}$ 은 82 (HT)로 각各 나타나 對照群에 비해 濃度依存的으로 증가하는 경향을 나타내었다. TGF- β 의 전사에 대하여 對照群은 244 (HT), 陽性對照群은 242 (HT), 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 은 221 (HT), 10 $\mu\text{g/ml}$ 은 225 (HT), 1 $\mu\text{g/ml}$ 은 234 (HT)로 각

각 나타나 對照群에 비해 모든 濃度에서 감소하는 경향을 나타내었다. IFN- γ 의 전사에 대하여 對照群은 18 (HT), 陽性對照群은 76 (HT), 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 은 128 (HT), 10 $\mu\text{g/ml}$ 은 82 (HT), 1 $\mu\text{g/ml}$ 은 45 (HT)로 각 각 나타나 對照群에 비해 濃度依存的으로 증가하는 효과를 나타내었다(Table 4).

5. 補精定喘湯이 IL-4 생산량에 미치는 효과

IL-4의 생산량은 anti-CD40 mAb (500 ng/ml)과 rIL-4 (500 U/ml)로 처리된 對照群에서는 236.1 ± 15.1 (pg/ml)로 나타났으며 rIL-10 (50 ng/ml)을 투여한 陽性對照群에서는 88.3 ± 7.5 pg/ml ($p < 0.001$)로 나타났고 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 93.9 ± 9.4 pg/ml ($p < 0.001$), 補精定喘湯群 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 133.1 ± 18.7 pg/ml ($p < 0.01$)로 유의성 있는 생산 억제효과가 나타났다.

6. 補精定喘湯이 IL-10의 생산량에 미치는 영향

IL-10의 생산량은 anti-CD40 mAb (500 ng/ml)과 rIL-4 (500 U/ml)로 처리된 對照群에서는 187 ± 17.7 pg/ml로 나타났으며 rIL-10 (50 ng/ml)을 투여한 陽性對照群에서는 2329 ± 201.7 pg/ml ($p < 0.001$)로 나타났고 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 771 ± 53.2 pg/ml ($p < 0.001$), 補精定喘湯群 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 325 ± 25.9 pg/ml ($p < 0.01$)로 유의성 있는 생산 증가효과가 나타났다.

7. 補精定喘湯이 IFN- γ 의 생산량에 미치는 효과

IFN- γ 의 생산량은 anti-CD40 mAb (500 ng/ml)과 rIL-4 (500 U/ml)로 처리된 對照群에서는 12.5 ± 0.9 pg/ml로 나타났으며 rIL-10 (50 ng/ml)을 투여한 陽性對照群에서는 34.2 ± 7.3 pg/ml ($p < 0.01$)로 나타났고 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 211.7 ± 18.5 pg/ml ($p < 0.001$), 補精定喘湯群 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 57.9 ± 12.4 pg/ml ($p < 0.01$)로 유의성 있는 생산 증가효과가 나타났다.

8. 補精定喘湯이 IgE의 생산량에 미치는 효과

IgE의 생산량은 anti-CD40 mAb (500 ng/ml)과 rIL-4 (500 U/ml)로 처리된 對照群에서는 86.1 ± 8.1 pg/ml로 나타났으며 rIL-10 (50 ng/ml)을 투여한 陽性對照群에서는 12.8 ± 2.3 pg/ml ($p < 0.001$)로 나타났고 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 31.6 ± 9.4 pg/ml ($p < 0.01$), 補精定喘湯群 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 55.6 ± 16.7 pg/ml ($p < 0.05$)로 유의성 있는 생산 억제효과를 나타냈다.

9. 補精定喘湯의 생쥐 B세포 증식 억제효과

anti-CD40 mAb(500 ng/ml)과 rIL-4(500 U/ml)로 처리된 對照群의 B 세포 생산량은 31228 ± 2455 cpm이었으나 rIL-10을 투여한 陽性對照群에서는 14505 ± 1120 cpm ($p < 0.001$)으로 나타났고, 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 14864 ± 1763 cpm ($p < 0.001$), 補精定喘湯群 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 18766 ± 2363 cpm ($p < 0.01$), 補精定喘湯群 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 27986 ± 2550 cpm으로 나타나 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의성 있는 증식 억제효과가 나타났다.

10. 補精定喘湯의 HRF⁺/B220⁺ 발현 억제 효과

정상 B cell (A)은 79.7 ± 5.67 (%)로 나타났지만 rIL-4 처리群 (B)은 83.8 ± 5.18 (%), anti-CD40 mAb 처리群 (C)은 85.6 ± 7.53 (%), anti-CD40 mAb 와 rIL-4를 동시에 처리한 群 (Control, D)에서는 90.2 ± 5.66 (%)로 가장 유의하게 증가 하였다. 따라서 anti-CD40 mAb 와 rIL-4를 동시에 처리한 群을 對照群으로 하였으며, rHRF로 처리한 陽性對照群 (E)은 93.2 ± 4.57 (%), 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ (F)에서 63.47 ± 5.66 (%), 10 $\mu\text{g/ml}$ (G)에서 65.2 ± 4.75 (%), 1 $\mu\text{g/ml}$ (H)에서 85.3 ± 5.06 (%)로 각 각 나타나 對照群에 비해 濃度依存的으로 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 4)

고 찰

喘息을 포함한 알레르기 질환은 전인구의 35%에서 관찰될 정도로 흔한 疾患으로 최근 들어 선진국을 중심으로 전 세계적으로 계속 증가하는 추세에 있다.

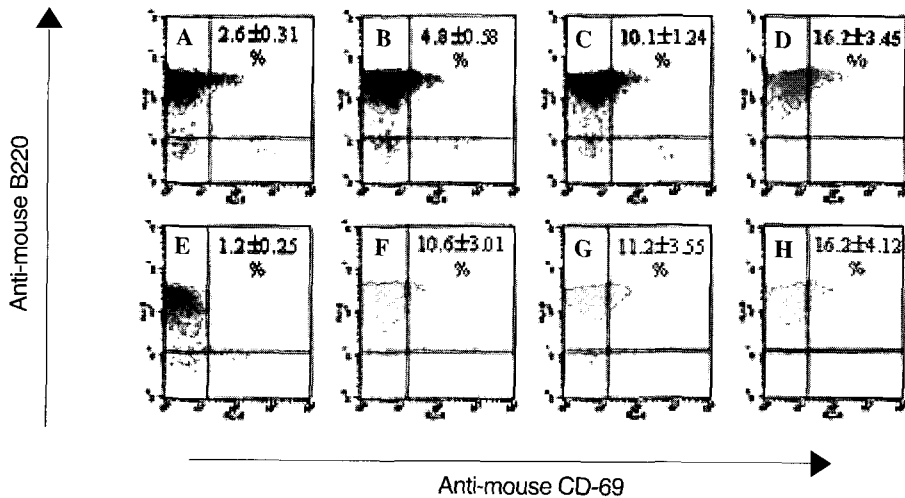


Fig. 3. Inhibitory effect of *Bojeongjeongcheon-tang* on CD69+/B220+ expression in B cells stimulated by anti-CD40 mAb and rIL-4.

B cells (A) were cocultured with rIL-4 (B) or anti-CD40 mAb (C), anti-CD40 mAb plus rIL-4 (Control, D), plus rIL-10 (E), and with anti-CD40 mAb plus rIL-4 plus *Bojeongjeongcheon-Tang* (100 mg/ml (F), 10 mg/ml (G), and 1 mg/ml (H) for 48 hrs. After 48 h, the cells were harvested, and assayed for CD69+/B220+ expression by flow cytometry, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

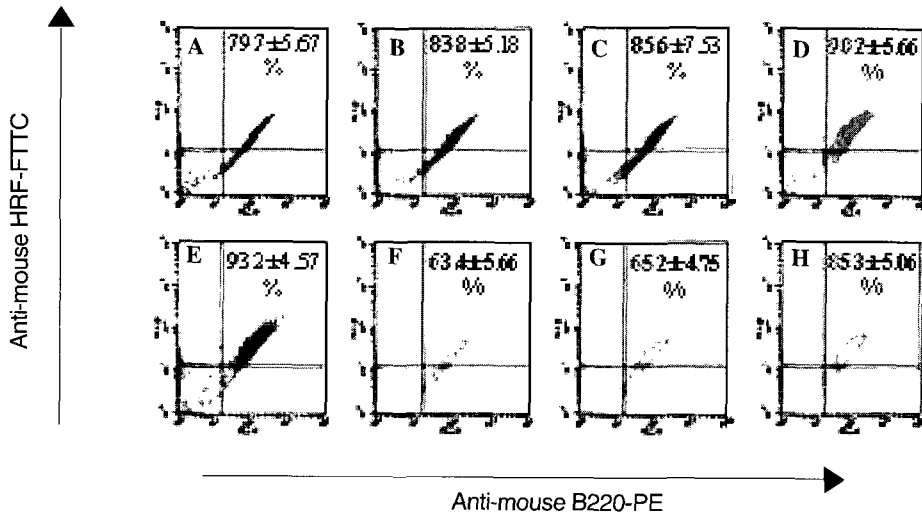


Fig. 4. Inhibitory effect of *Bojeongjeongcheon-tang* on HRF+/B220+ expression in B cells stimulated by anti-CD40 mAb and rIL-4.

B cells (A) were cocultured with rIL-4 (B) or anti-CD40 mAb (C), anti-CD40 mAb plus rIL-4 (Control, D), plus rHRF (positive control, E), and with anti-CD40 mAb plus rIL-4 plus *Bojeongjeongcheon-Tang* (100 mg/ml (F), 10 mg/ml (G), and 1 mg/ml (H) for 24 hrs. After 24 h, the cells were harvested, and assayed for HRF expression by flow cytometry, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

이러한 喘息의 유병률 증가는 室內生活의 증가를 비롯한 生活樣式의 변화, 大氣汚染을 비롯한 환경 내 毒物物質의 증가 등 여러 가지로 설명하고 있으며 특히 영유아기 때의 감염은 알레르기 반응을 억제하는 Th1 면역 반응을 항진시켜 아토피질환의 발생을 억제하게 되는데 최근 예방 백신의 개발과 위생상태의 개선으로 영유아의 감염이 감소하여 Th1 분화에 필요한 자극을 받지 못하여 Th2 면역반응이 항진되어 알레르기 질환이 증가된다고 보고되었다^{23,24)}.

韓醫學에서 氣管支 喘息은 呼吸急促하고 喘鳴有聲한 症狀을 主症狀으로 하는 哮喘證에 해당된다¹²⁾. 哮喘證 및 氣管支喘息과 관련된 한의학적인 研究로는 鄭 등²⁵⁾이 哮喘의 原因과 治法의 研究를 통하여 기관지천식의 韓醫學의 治療方法을 제시하였고, 鄭 등¹³⁾, 李 등¹⁶⁾, 鄭 등¹⁷⁾은 천식관련 cytokine의 변화에 대하여 研究報告하였다. 최근 臨床研究가 활발히 이루어지고 있는데, 黃 등²⁰⁾, 鄭 등^{18,19)}은 기관지천식환자에게 한약을 투여한 후 臨床效果를 객관적으로 觀察하였으며, 黃 등²⁶⁾은 淸上補下湯의 기관지천식환자에 대한 스테로이드 질약효과에 대한 보고가 있었다.

喘息은 可逆的인 氣道閉塞, 호산구 침윤을 특징으로 하는 氣道の 炎症反應, 氣道の 過敏反應을 특징으로 하는 疾患이다^{8,12)}. 氣管支 過敏性은 喘息의 중요한 병태생리로서 여러 가지 비특이적인 자극에 반응하여 기도 수축이 발생하는 상태로 과민성을 유발시키는 기전으로는 기도의 염증과 기도 상피세포의 손상, 자율신경계조절의 이상과 기도 평활근의 증식과 비후 등이 있으며 특히 氣道 炎症이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{8,10,11)}.

천식의 만성 염증 반응은 호산구, 대식세포, T림프구 등 여러 염증세포의 상호작용 및 이들 염증세포에서 분비되는 cytokine에 의해서 주로 야기되는데, 천식과 관련되어 T helper (Th) 림프구가 중요하게 다루어진다. T helper 림프구는 cytokine의 분비 양상에 따라 Th1, Th2 림프구로 나뉜다. Th1은 주로 IL-2, IL-12, IFN- γ 를 생산하며 지연형 과민반응, 결핵균이나 바이러스에 대한 방어작용, 종양에 대한 숙주 반응에 관여한다. Th2는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을

생산하며 즉시형 과민반응, 氣管支喘息과 같은 allergy성 질환, 기생충 감염에 대한 방어작용 등에 관여한다. Th1과 Th2는 서로 길항작용을 나타내어 Th1의 기능이 항진되면 Th2의 기능이 억제되는 현상이 관찰되었는데, Th2의 증가와 Th1의 감소가 천식을 유발한다고 설명하였다¹⁵⁾.

補精定喘湯은 鹿茸, 五味子, 麥門冬, 天門冬, 山藥의 補肺腎陰하는 作用과 白果, 杏仁, 桑白皮, 款冬花, 麻黃의 止咳平喘하는 作用과 黃芩, 蘿菈子의 淸熱下氣시키는 作用^{11,22)}의 藥料로 構成되어 기관지천식 治療에 응용되어 效果를 나타내고 있어, 著者는 천식에 대한 補精定喘湯의 임상효과를 실험적으로 검증하기 위하여 생쥐 B세포에서 cytokine들 (IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , IFN- γ)과 IgE의 발현에 미치는 영향을 실험 관찰하였다.

補精定喘湯은 Mouse Lung Fibroblast Cells에 대한 실험에서 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서는 毒性이 나타나지 않아 실험농도를 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 정하였다.

補精定喘湯이 CD23 $^+$ /B220 $^+$ 발현에 미치는 영향에 대한 실험에서 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 투여한 경우 對照群에 비해 濃度 依存的으로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig.1). 또한 IgE $^+$ /B220 $^+$ 발현에 미치는 영향에 대한 실험에서 對照群에 비해 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig.2). 그리고 CD69 $^+$ /B220 $^+$ 발현에 미치는 영향에 대한 실험에서 對照群에 비해 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서만 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 3). CD23은 45kD의 세포표면분자로 알레르기 비염이나 알레르기 천식등 알레르기질환에서 IgE 생성 및 염증반응에 연관된다. 항원에 의해 유도되는 IgE 합성이 알레르기 질환의 중심적 양상이고, 뒤따르는 IgE와 항원의 상호작용은 알레르기에 연관된 증상과 관계있다. IgE 생성은 다양한 활성을 보이는 세포표면분자 CD23에 의해 조절된다. CD23을 통한 allergen-loaded IgE에 의해 세포들이 활성화되면 pro-inflammatory cytokine인 IL-1, IL-6, TNF- α 가 생성된다²⁷⁾.

B세포의 IgE는 알레르기 천식과 관련된 항체이며, IgE에 의해 비만세포가 활성화되고 비만세포에서 histamine과 알레르기 천식발작에 관여하는 cytokine (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α , GM-CSF 등)이 생산되어 기관지 평활근의 비대와 氣管支過敏性을 유발시켜 천식을 발작시킨다^{8,9)}.

CD69²⁸⁾는 60kD의 막당단백체로 Th1세포 분화에 연관되어 있는 초기 T세포활성의 지표이다. T세포에서 CD69의 발현은 IL-2, TNF- α 및 INF- γ 를 포함한 Th1 cytokine 생산과 연관되어있다.

CD23, IgE 및 CD69의 발현실험과 관련하여 補精定喘湯의 천식 치료효과는 알레르기 천식과 관련된 B세포의 IgE 생성 및 활성억제와 관련이 있으며, 특히 IgE의 생성에 영향을 미치는 CD23의 생성억제를 통하여 천식치료에 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

B 세포에서 분리된 IL-1 β 의 傳寫에 미치는 영향에 관한 實驗에서 對照群에 비해 補精定喘湯群 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml 모두 감소하는 경향을 나타내었다 (Table 3).

IL-1 β 는 분자량이 15-17kD이며 주로 활성화된 단핵식균세포에서 분비되고 그 생물학적 활성의 중요한 점은 lymphocyte activating factor로서 CD4⁺ T 림프구의 활성화와 증식 및 INF- γ 분비를 촉진하며 혈관내피세포를 활성화하여 염증과 응고 작용을 하며 시상하부에 작용하여 내인성 발열원이 되며 간에서 급성단계 혈장 단백질의 합성을 유도한다. 이처럼 IL-1은 염증성 질환에서 매우 중요한 역할을 하며 allergy 질환에서도 I 형 과민반응에 깊게 관여한다²³⁾.

補精定喘湯의 IL-4의 傳寫에 미치는 영향에 관한 實驗에서 對照群에 비해 補精定喘湯群 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml 모두 감소하는 경향을 나타내었다 (Table 3).

IL-4는 분자량이 20kD이고 CD4⁺ T세포와 活性化된 비만세포에서 分泌되며, 주로 B림프구의 增殖 및 分化因子로 作用한다. 喘息의 發病에 있어서 核心的인 役割을 하는 cytokine으로 B세포에서 IgE 생성을 증가시키고, 비만세포를 활성화시켜며, T세포에서 Th2를 분화 증식 하므로 천식의 유발 및 아토피의

발생에 중요한 역할을 한다^{8,23)}.

補精定喘湯의 IL-5 傳寫에 미치는 영향에 관한 實驗에서 補精定喘湯群 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml에서 濃度 依存的으로 감소하는 경향을 나타내었다 (Table 3).

IL-5는 분자량이 40-50kD 이다. CD4⁺ T 림프구의 Th2 세포와 활성화된 비만세포에 의해 생성되며 호산구의 증식, 분열, 활성화 및 수명 연장 등에 관여하는 cytokine이다⁹⁾. 또한 IL-5는 B 림프구의 성장과 분화를 자극하기 위하여 IL-2, IL-4와 상승작용을 한다⁹⁾. 호산구의 생산, 성숙 및 활성화에 IL-3, GM-CSF, IL-5가 함께 관여하는 것으로 나타났으나 *in vivo*에서는 IL-5가 가장 중추적인 cytokine으로 밝혀졌다⁹⁾. Anti-IL-5 antibody에 의해 IL-5로 인한 호산구의 폐조직 침윤이 감소하면 기관지 과민반응이 억제되는 것으로 밝혀졌다²⁹⁾. 따라서 IL-5를 target으로 하는 치료제 개발은 喘息 뿐 아니라 기타 알레르기질환에도 효과가 있을 것이다. 즉 IL-5의 합성을 억제하거나 IL-5의 작용에 길항함으로써 喘息을 치료할 수 있다는 새로운 전략이 유용하게 된 것이다³⁰⁾.

補精定喘湯의 TNF- α 傳寫에 미치는 영향에 대한 實驗에서 對照群에 비해 補精定喘湯群이 오히려 TNF- α 傳寫가 모두 증가하는 경향을 나타내었다 (Table 3). TNF- α 는 17kD (kilodalton)의 분자로 주요 기능은 저농도에서는 백혈구와 내피세포에 작용하여 국소염증을 유도하며 IL-1의 분비를 유도하며, 중등도 정도의 농도에서는 뇌의 시상하부에 있는 세포에 작용하여 열이 생기도록 함으로 내재성 발열원이라고 부른다. 간에 작용하여 급성단계 단백질을 유도하며, 고농도에서는 패혈증 쇼크의 병리학적 이상을 초래한다⁶⁾.

B 세포의 인터루킨 전사도와 관련된 실험에서 IL-1 β , IL-4, IL-5의 전사도는 감소하는 경향을 보였고, TNF- α 의 전사도는 증가하는 경향을 보였다.

IL-1 β 는 CD4⁺ 림프구의 활성화와 증식과 밀접한 관련이 있으며, IL-4는 B세포에서 IgE 생성을 증가시키고, 비만세포를 활성화시키는 중요한 역할을 하며, IL-5는 호산구의 생산 성숙 및 활성화에 중요한 역할을 하므로, 補精定喘湯은 IL-1 β , IL-4, IL-5의 조절을 통

하여 CD4⁺림프구 활성화와 IgE 생성 및 비만세포 및 호산구에 대한 억제 작용으로 천식의 치료효과를 나타낸다고 볼 수 있다.

補精定喘湯의 IL-6 傳寫효과에 관한 실험에서 對照群에 비해 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 모두에서는 증가하는 경향을 나타내었다 (Table 4). IL-6는 분자량이 19-26kD의 크기로 선천면역과 적응면역 모두에 작용한다. IL-2와 협동하여 선천면역에서 간세포의 급성단계 단백질 합성을 자극하며, IL-3와 협동하여 조혈세포 성장을 촉진시킨다³¹⁾. Myelomas에 대한 성장인자로 작용하며 자율적으로 성장하는 수많은 골수종 세포들은 자기분비적 성장인자로서 IL-6를 분비한다. 喘息의 一般的인 特徵인 氣道粘膜의 과증식과 이상분비물 增加에 관여하는데, 급성 천식 반응을 보이는 환자에서 폐포 대식 세포로부터 IL-6가 많이 만들어지며, 천식환자의 기관지 상피세포에서 IL-6의 유전자와 단백질의 표현이 증가한다고 보고가 있다³²⁾.

補精定喘湯의 IL-10 傳寫효과에 관한 실험에서는 對照群에 비해 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 모두에서는 증가하는 경향을 나타내었다 (Table 4). IL-10은 분자량이 30-40kD의 크기로 처음에는 마우스에서 Th2에서 분비되어 Th1 세포 INF- γ 분비를 억제하는 것으로 발견되었다. 이후 사람에서 Th2 뿐만 아니라 Th1 림프구, 대식세포나 단핵세포, CD8⁺림프구, B림프구, 비만세포 등에서도 생성되는데 대식세포와 단핵세포에서 가장 많이 생성됨이 밝혀졌다³³⁾. IL10은 T림프구에 작용하여 Th1 림프구의 INF- γ , IL-2의 생성을 억제하여 세포면역을 억제하고, 대식세포, NK 세포에서의 inflammatory cytokine 생성을 억제하여 항염증 작용을 나타낼 뿐만 아니라 Th2 림프구에서의 IL-4, IL-5, IL-13 분비를 억제시키기 때문에 allergy성 염증반응을 방해하기도 한다. 또한 기관지 천식에 중요한 호산구에 대해서는 apoptosis를 유도하고 IgE 항체 형성을 억제한다^{2,9,29,34)}. 실제로 喘息 환자에 있어서는 IL-10의 합성이 감소하는 경향을 보이며³⁵⁾, 이와 대조적으로 喘息의 치료제인 corticosteroid 흡입시 IL-10은 증가한다³⁴⁾.

이러한 IL-10의 면역억제 및 항염증 효과를 감안한다면 allergy 질환의 치료에 유용할 것이라는 예상이 가능해진다. 실제로 murine model 내에서 재조합된 IL-10의 비강 내 투여로 염증을 억제하는 효과를 얻은 것으로 보고 되었다³⁵⁾.

補精定喘湯의 TGF- β 傳寫에 미치는 영향에 관한 실험에서 補精定喘湯群이 對照群에 비해 모두 감소하는 경향을 나타내었다 (Table 4). TGF- β 는 20kD의 분자로서 조직 손상 후 재생과정에서 나타나는 cytokine의 하나로 대식세포, 상피세포, 섬유아세포, 그리고 호산구 등의 여러 세포에서 만들어진다. T세포와 B세포의 증식을 억제하고 창상치유 및 혈관 신생을 촉진시킨다⁸⁾. TGF- β 의 천식에서의 역할에 대해서 Wen 등³⁶⁾은 IL-4와 IL-13에 의해 증가된 TGF- β 가 IFN- γ 에 의해 억제됨을, McKay 등³⁷⁾은 TGF- β 가 기도의 근육층의 비대를 유발한다고 보고하였다.

補精定喘湯의 INF- γ 傳寫에 미치는 영향에 관한 실험에서는 補精定喘湯群이 對照群에 비해 濃度依存的으로 증가하는 효과를 나타내었다 (Table 4). INF- γ 는 50kD의 분자량인 cytokine이며, NK세포 CD4⁺ 및 CD8⁺ T세포에 의해 생성되는 단백질이다. 일반적으로 INF- γ 는 항원 특이적 면역반응의 주가 되는 IgE 생성을 억제하는 역할과 함께 바이러스 감염에 대한 저항을 유도하는 핵심적인 cytokine이며 이와 더불어 자연살해세포 (NK cell)와 CD8⁺ cytotoxic T 세포의 cytolytic activity를 자극하는데 매우 중요하다고 알려져 있다. INF- γ 의 알레르기성 천식에서의 역할에 대해서는 아직 논란이 되고 있다. Noma 등³⁸⁾은 중증 천식환자를 대상으로 집먼지 진드기 항원으로 자극시 말초단핵구에서 INF- γ 생성이 유의하게 감소됨을 보고 하였다. 최근에는 이와 반대로 알레르기 염증반응이 심한 경우 INF- γ 가 오히려 증가되어 INF- γ 가 표적기관에서 염증세포의 침윤을 촉진하는 염증 전구성 cytokine으로 작용하는 보고도 있다³⁹⁾.

B 세포의 인터루킨 전사도와 관련된 실험에서 IL-6와 IL-10, 및 INF- γ 의 전사도는 증가하는 경향을 보였고, TGF- β 의 전사도는 감소하는 경향을 보였다. IL-6는 喘息의 일반적인 특징인 氣道 粘膜의 過增殖

과 이상분비물 증가에 관여하며, IL-10은 cytokine synthesis inhibitory factor로 알려져 있으며 IL-4, IL-5, IL-13 분비를 억제할 통한 allergy성 염증반응을 방해하며, 호산구에 대한 apoptosis 유도작용과 IgE 항체 형성을 억제반응이 있으며, TGF- β 는 기도의 근육층의 비대를 유발하고 T세포와 B세포의 증식을 억제하는 역할을 하며, INF- γ 는 IgE 생성을 억제하는 역할을 하므로, 補精定喘湯은 알레르기성 염증 억제 작용을 하는 IL-10과 IgE 생성을 억제하는 INF- γ 를 증가시키고, 기도 근육층의 비대를 유발하는 TGF- β 를 감소시키는 작용을 통하여 천식치료에 효과가 있는 것으로 생각된다. 그러나 천식에서 나타나는 기도점막의 비가역적인 변화에 영향을 미치는 IL-6는 오히려 증가하는 경향을 보였다.

補精定喘湯의 천식치료효과를 알아보기 위해 ELISA법을 이용하여 INF- γ , IL-4, IL-10 및 IgE의 생산량을 측정된 결과, IL-10과 INF- γ 는 유의성 있는 증가 효과를 보였고, IL-4와 IgE는 유의성 있는 감소 효과를 보여 앞서 언급한 유전자 발현분석을 통한 실험고찰과 같은 결과가 나타나 補精定喘湯의 천식치료효과는 천식 유발을 유도하는 IL-4와 IgE의 작용을 억제하고, 천식 유발을 억제하는 IL-10과 INF- γ 의 작용은 활성화하는 기전을 통한 것으로 생각된다.

補精定喘湯이 생쥐 B세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 방사선동위원소를 이용한 실험에서 補精定喘湯群 모두에서 증식억제 효과가 나타났고 특히 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 증식억제 효과를 나타냈다.

補精定喘湯의 HRF⁺/B220⁺ 발현 효과에 대한 실험에서 補精定喘湯群은 對照群에 비해 濃度依存的으로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig.4). HRF (IgE-dependent histamin releasing factor)는 아토피 어린이의 림프구에 의해서 생산되는 펩티드로 알레르기 환자에서 나타난다. HRF는 호염기구에서 histamin, IL-4, IL-13을 배출시킨다고 설명하고 있으며, 최근 순수한 인체 호산구에서 IL-8의 분비와 칼슘반응을 촉진시키는 것으로 나타났다. 그러므로 HRF는 호산구와 호염기구를 조절하는 중요한 역할을 한다⁴⁰.

補精定喘湯은 B세포의 증식억제작용과 histamine 분비와 호산구와 호염기구를 조절하는 HRF의 감소효과를 통하여 천식치료효과가 있는 것으로 생각된다.

T helper (Th) 림프구의 Th1와 Th2 림프구의 상호작용과 관련하여, 補精定喘湯은 Th1과 관련된 IFN- γ 의 생성을 돕고 Th2와 관련된 IL-4, IL-5, IL-6의 생성을 억제하는 효과로 인하여 Th2의 기능증가와 Th1의 감소로 인한 천식 유발 병리기전을^{3,4,5} 차단하는 작용이 있을 것으로 생각된다.

천식에 가장 중요한 B 세포와 IgE에 대하여 補精定喘湯은 B 세포의 생성과 활성을 억제하는데 그중 CD4⁺의 활성화와 관련된 IL-1 β 를 통한 억제 작용을 보였고, IgE의 생성 및 활성 억제 작용은 CD23 및 IL-4의 활성억제작용과 INF- γ 의 생성증가작용과 관련이 있는 것으로 생각된다.

補精定喘湯의 천식치료효과는 천식의 염증반응과 관련된 histamine의 생성과 호산구 및 호염기구와 관련된 HRF의 생성억제작용, 특히 후기 염증반응과 관련된 호산구의 생성과 관련된 IL-5의 생성억제작용, 알레르기성 염증억제 작용을 가진 IL-10의 생성증가작용의 기전과 관련이 있는 것 같다.

또한 補精定喘湯은 기관지 근육층의 변화를 초래하는 TGF- β 의 생성을 억제하여 기관지변형을 예방하는 효과가 있는 것으로 생각된다. 이상의 결과는 천식치료에 임상효과가 인정된 補精定喘湯의 효과를 실험적으로 검증하였고, 나아가 補精定喘湯의 치료기전에 대한 연구를 위하여 보다 깊이 있는 후속연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결론

補精定喘湯이 생쥐의 B세포에서 anti-CD40과 rIL-4로 유도된 여러 cytokine (IL- β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , INF- γ)들과 IgE의 생산에 미치는 영향에 대하여 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Mouse Lung Fibroblast Cells (mLFCs)를 배양하여 세포독성을 측정된 결과 補精定喘湯 100 mg/ml 이하에서는 독성이 인정되지 않았다.

2. 補精定喘湯의 CD23, IgE, CD69의 발현효과에서는 對照群에 비해 濃度 依存的으로 감소하는 경향을 나타내었다.
3. Cytokine (IL-1 β , IL-4, IL-5, TNF- α) 傳寫효과에서는 IL-1 β , IL-4 그리고 IL-5는 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 모두에서 濃度 依存的으로 감소하는 경향을 나타내었고 TNF- α 는 모든 농도에서 증가하는 경향을 나타내었다.
4. Cytokine (IL-6, IL-10, TGF- β , IFN- γ) 傳寫효과에서는 IL-6, IL-10 그리고 IFN- γ 는 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 모두에서 濃度 依存的으로 증가하는 경향을 나타내었고, TGF- β 는 모든 농도에서 약간의 감소하는 경향을 나타내었다.
5. IL-4 생산량 측정에서는 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 유의성 ($p < 0.001$, $p < 0.01$) 있는 생산 억제효과가 나타났다.
6. IL-10 생산량 측정에서는 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 유의성 ($p < 0.001$, $p < 0.01$) 있는 생산 증가효과가 나타났다.
7. IFN- γ 생산량 측정에서는 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 유의성 ($p < 0.001$, $p < 0.01$) 있는 생산 증가효과가 나타났다.
8. IgE 생산량 측정에서는 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 유의성 ($p < 0.01$, $p < 0.05$) 있는 IgE 생산 억제효과가 나타났다.
9. 생쥐의 B세포 증식능 측정에서는 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 유의성 ($p < 0.001$, $p < 0.01$) 있는 증식 억제효과가 나타났다.
10. HRF+/B220+ 발현효과에서는 補精定喘湯群 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 濃度 依存的으로 감소하는 경향을 나타내었다.

이상의 결과로 보아 補精定喘湯은 염증관련 cytokine 조절과 IgE 저해작용을 나타내어 알레르기성 천식 등에 활용 가능할 것으로 사료되나 기관지 천식에 관한 동물실험과 기전연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Donna E. Davies, James Wicks, Robert M. Powell, Sarah M. Puddicombe, and Stephen T. Holgate. Airway remodeling in asthma. J Allergy Clin Immunol. 2003;111:215-25.
2. Barnes PJ, Lim S. Inhibitory cytokines in asthma. Mol.Med.Today. 1998;4(10):452-8.
3. Busse WW. Inflammation in asthma-the cornerstone of the disease and target of therapy. J Allergy Clin Immunol. 1998;102:S17-22.
4. Asky JA, Brody AR. Interleukins involved in the pathogenesis of chronic airway inflammation. Resp Immunol. 1997;148(1):39-47.
5. Palma Carlos AG, Palma Carlos ML, Conceicao SM, Alcinda M. Cytokines and asthma. J Invest Allergol Clin Immunol. 1997;7(5):270-3.
6. Peter J. Barnes. Cytokine modulators for allergic diseases. Current Opin in Allergy and Clinical Immunology. 2001;1:555-60.
7. M. Branco Ferreira and A.G Carlos. Cytokines and asthma. allergol clin imunol. 1998;8(3):141-8.
8. 강재성 외 29명. 세포분자면역학. 서울: 범문사. 2002:440.
9. 김세종. 면역학. 서울: 고려의학. 2000:58-9,147-61,260-5.
10. 김우경. 일차 진료인을 위한 천식 및 알레르기에 대한 이해. 가정의학회지. 2002;23(10)1169-71.
11. 韓鏞徹. 臨床呼吸器學. 서울: 一潮閣. 1994:208-8
12. 전국한의과대학 폐계내과학교실 편저. 東醫肺系內科學. 서울: 한문회사. 2002:192-9,320-31.
13. 정광진, 정희재, 정승기, 이형구. 瀉白散과 瀉白散加沙蔘이 人間 氣管支上皮細胞의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF 發顯에 미치는 影響. 대한한방내과학회지. 2002;23(1):15-24.
14. 金大謙. 桑白皮가 제1형 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 影響. 석사학위논문: 경희대학교 한의과대학. 2002.
15. 李秉熙. 蒼耳子가 제1형 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 影響. 석사학위논문: 경희대학교 한의과대학. 2002.
16. 葉中훈, 정희재, 정승기, 이형구. 定喘湯과 定喘湯加減方이 알레르기 천식모델 흰쥐의 BALF內 면역세

- 포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2003; 24(1):169-180.
17. 정진용, 정희재, 정승기, 이형구. 小青龍湯과 小青龍湯加沙蔘이 BEAS-2B 人間 氣管支上皮細胞의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF mRNA level에 미치는 影響. 대한한의학회지. 2003;24(1):74-83.
 18. 정승기, 허태석, 황우석, 주창엽, 김영우, 정희재. 小青龍湯이 기관지천식 환자의 혈청 IL-4, IL-5, IFN- γ 변화에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2002;23(2):70-7.
 19. 정승기, 황우석, 주창엽, 이재성, 조일현, 정희재. 淸上補下湯의 기관지천식환자에 대한 임상적 효과. 대한한의학회지. 2002;23(4):151-60.
 20. 황우석, 정희재, 주창엽, 이재성, 이경기, 이형구, 정승기. 小青龍湯치료 기관지천식환자의 혈액내 호산구 수와 혈청IgE 및 T림프구아형의 변화. 대한한방내과학회지. 2002;23(1):83-9.
 21. 李龍城. 경약분류전. 서울: 정담. 2002:22-7.
 22. 전국한의과대학 본초학교수공편저. 본초학. 서울:영림사. 1995:121,178,306,373,460,478,482,484,487,537,545,588,589.
 23. 최인선. 대기오염과 천식(Air pollution and asthma). 천식 및 알레르기. 2000; 20(2):174-81.
 24. R. J. Davies, C. Rusznak, and J. L. Devalia. Why is allergy increasing - environmental factor. Clinical and Experimental Allergy. 1998;28:8-14.
 25. 鄭昇杞, 李珩九. 哮喘의 原因 및 治法에 關한 研究. 大韓韓醫學會誌. 1986;7(1):60-7.
 26. 황우석, 최준용, 이재성, 주창엽, 정희재, 이형구, 정승기. 淸上補下湯의 기관지천식환자에 대한 스테로이드 절약효과. 대한내과학회지. 2003;24(1):1-10.
 27. Lanny J. Rosenwasser, William W. Busse, Richard G. Lizambri, Teresa A. Olejnik, and Mark C. Totoritis. Allergic asthma and an anti-CD23 mAb(IDEC-152). J Allergy Clin Immunol. 2003;112:563-70.
 28. David M. Dorfman, and Aliakbar Shahafaei, MS. CD69 expression correlates with expression of other markers of Th1 Tcell differentiation in peripheral T cell lymphomas. Human Pathology. 2002;33(3):330-4.
 29. Sammy S. Nag, MSc Li Jing Xu, Qutayba Hamid, and Paolo M. Renzi. The effects of IL-5 on airway physiology and inflammation in rats. J Allergy Clin Immunol. 2003;111:558-566.
 30. Singh AD, Sanderson CJ. Anti-IL-5 strategies as a potential treatment for asthma. Thorax. 1997;52:483-5.
 31. 이경훈, 이용철, 천기태, 이홍범, 이양근. 급성 천식환자에서 혈중 IL-6 및 Soluble IL-6 수용체의 변화. 결핵 및 호흡기질환. 2000;48(4):464-70.
 32. S. Tavakoli, M.J. Cowan, T. Benfield, C. Logun, and J. H. Shelhamer. Prostaglandin E2-induced IL-6 release by a human airway epithelial cell line. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001;280:L127-33.
 33. De Waal M, Yssel RH, Roncarolo MG, Spits H, de Vries JE. Interlukine 10. Curr Opin Immunol. 1992;4:314.
 34. John M, Lim S, Seybold J et al. Inhaled corticosteroids increase IL-10 but reduce MIP-1 α , GM-CSF, and IFN- γ release from alveolar macrophages in asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1998;157:256-62.
 35. Zuany-Amorim C, Haile S, Leduc D et al. IL-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. J Clin Invest. 1995;95:2644-51.
 36. Wen FQ, Kohyama T, Liu X, Zhu YK, Wang H, Kim HJ et al. IL-4 and IL-13 enhanced transforming growth factor beta2 production in cultured human bronchial epithelial cells is attenuated by IFN- γ . Am I Respir Cell Mol Biol. 2002;26:484-90.
 37. Mckay S, de Jongste JC, Saxena PR, Sharma HS. Angiotensin II induces hypertrophy of human airway smooth muscle cell: expression of transcription factors and TGF- β . Am J Respir Cell Mol Biol. 1998;18:823-33.
 38. Noma T, Yoshizawa I, Kou K, Nakajima T, Kawano Y, Itoh M et al. Patten of cytokine production by T cells from adolescents with asthma in remission after stimulation with Deamtophagoides farinae antigen. Pediatr Res. 1995;38: 187-93.
 39. Magnan AO, Mely LG, Camilla CA, Badier MM, Montero-Julian FA, Guillot CM et al. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atropy and asthma : insreased IFN- γ producing CD8+ T cell in asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:1790-6.
 40. Kosuke Oikawa, Testsuya Ohbayashi, Junsei Mimura, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Shigetada Teshima, Kiyoshi Mukai, and Masahiko Kuroda. Dioxin Stimulates Synthesis and Secretion of IgE-Dependent Histamin-Releasing Factor. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2002;290:984-7.