한방안이비인후피부과학회지 제18권 제3호(2005년 12월)
The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology &
Otolaryngology & Dermatology 2005;18(3):1-17

小青龍湯이 생쥐의 肺 大食細胞 Cytokine 遺傳子 발현에 미치는 영향

박인기 · 심성용 · 변학성 · 김경준
경원대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

Effects of *Sochungyong-tang* on Cytokine Gene Expression in Mouse Alveolar Macrophage

In-gi Park · Sung-yong Sim · Hak-sung Byun · Kyung-jun Kim

Department of Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermotology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

In many recent studies, molecular biological methods have been used to investigate the role of cytokines in pathogenesis of lung disease. This Experiment was conducted to investigate the effects of Sochungyong-tang on gene expressions in Mouse Alveolar Macrophage. For this purpose, we observed the cytokines (IL-1β, IL-6, IL-10, iNOS, MIP-1α, MIP-1β, MIP-1γ, TGF-β, TNF-α). We picked the alveolar macrophage out of mice and cultured it. We analyzed the cytokine gene expression by reverse transcription-PCR.

The results obtained were as follows :

1. *Sochungyong-tang* showed inhibitory effects on IL-1β in time and concentration.
2. *Sochungyong-tang* showed inhibitory effects on IL-6 in time and concentration.
3. *Sochungyong-tang* showed inhibitory effects on IL-10 in concentration.
4. *Sochungyong-tang* showed inhibitory effects on iNOS.
5. *Sochungyong-tang* showed inhibitory effects on TGF-β in time and concentration.
6. *Sochungyong-tang* showed no inhibitory effects on MIP-1α, MIP-1β, MIP-1γ, TGF-β, TNF-α.

According to above results, it is supposed that *Sochungyong-tang* has the inhibitory effects on cytokine gene expression in mouse alveolar macrophage and can be usefully applied for curing inflammatory process of lung disease. Advanced studies are required to investigate the cure mechanism of *Sochungyong-tang* in the future.

Key words: Sochungyongtang, Cytokine, Gene Expression, Alveolar Macrophage

교신저자: 김경준, 서울시 송파구 송파동 20-8 경원대학교 부속서울한방병원 안이비인후피부과
(Tel: 02-425-3456, E-mail: kkjo215@hanmail.net)

서 론

최근 환경오염물질의 증가로 각종 기관지 및 폐 질환이 급증하고 있다.[1] 각종 호흡기계 질환의 원인로는 흡연, 환경오염으로 인한 오존의 증가, 자동차 매연에 포함된 알데히드, 황산화물, 질소산화물 등이 있다.[2] 이들 외부 환경물질에 대한 호흡기계의 방어기전은 크게 특이적인 면역반응과 비특이적 면역반응으로 나타나는데 이 중 대식세포는 비특이적 면역반응을 담당하며, 유독물질이나 감염성 세균의 침입시 일차적인 방어를 담당한다.[3] 대식세포는 superoxide anion, hydroxyl radical, protease, lysozyme 등을 분비하여 이물질을 분해하여 제거하며[4],이 과정에서 폐세포의 상해를 포함한 다양한 병리학적 현상들이 나타날 수 있으며, 대부분의 호흡기계 질환에서는 염증반응이 수반되어 나타나게 된다. 염증반응의 초기에는 국소적으로 혈관계의 투과성이 증가되며 동시에 면역관련 세포들이 모여들게 된다.[5] 이중 대식세포는 식작용을 통해 활성화되는 과정에서 arachidonic acid 대사물질인 prostaglandin과 complement factor, PAF 등을 유리시킨다. 또한 대식세포는 soluble protein growth factors와 각종 cytokines(IL-1 계열, interferon 계열, TNF 계열, IL-6, IL-8 등)을 합성하여 유리시킴으로써, 혈관 상피세포의 투과성을 변화시키고 호중구를 활성화시켜 염증과정을 증폭시킬 수 있다.[6,7,8]

肺의 생리적인 기능은 主氣, 主宣發, 主肅降 通調水道하는 것으로 기능을 失調하면 呼吸機能과 水液代謝에 영향을 미쳐 水濕의 停留를 유발하게 된다.[9] 특히 風寒邪의 침범을 받으면 肺氣가 上逆하여 咳嗽와 寒痰이 생겨난다.[10] 小青龍湯은 解表散寒, 溫肺化痰, 止咳平喘하는 효능이 있어서 風寒客表하고 內有水飮停滯하여 나타나는 惡寒發熱, 無汗, 頭面四肢浮腫, 身體疼痛, 胸痞, 乾嘔, 咳嗽喘息 등에 사용되었다. 기존의 연구 중 安 등[11]과 趙 등[12]에 의하면 小青龍湯은 기관지 천식의 완화, 鎭痛 및 抗痙攣效果, 기관지 平滑筋 收縮抑制, 鎭咳, 祛痰作用이 있다고 알려 졌다.

최근의 小青龍湯에 관련된 연구들이 cytokine을 중심으로 활발하게 이루어지고 있는데 그 중에서도 車 등[13], 李[14], 裵 등[15], 鄭[16], 鄭[17] 등에 의한 연구가 주로 천식에 초점을 맞춘 cytokine 연구였으며 폐의 면역기전에서 중요한 역할을 하는 폐포의 대식세포를 중심으로 한 연구는 없었다. 이에 연구자는 小青龍湯이 폐 대식세포의 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하고자 IL-1β, IL-6, IL-10, iNOS, MIP-1α, MIP-1β, MIP-1γ, TGF-β, TNF-α의 발현에 미치는 영향을 측정하여 그 결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 동물 및 재료

1) 동물

실험 동물은 25g 내외의 雄性 C57BL/6J mice 〈(주)샘타코 BIO KOREA〉 를 구입하여 일주일간 실험실에 적응시킨 다음 사용하였다. 사육장 실내 온도는 22℃ 내외를 유지하였고, 전등을 12시간 간격으로 점등하였다. 사료와 급수는 제한하지 않았다.

2) 재료

實驗에 사용된 處方은 《東醫寶鑑》[18]에 준하였으며 藥材는 慶園大學校附屬韓方病院 調劑室에서 제공받아 使用하였다. 처방 내용과 용량은 Table 1과 같다

Table 1. Contents of Sochungyong-tang

韓藥名	生藥名	重量(g)
麻黃	Ephedrae Herba	5.62
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	5.62
五味子	Schizandrae Fructus	5.62
半夏	Pinelliae Rhizoma	5.62
細辛	Asari Herba Cum Radice	3.75
乾薑	Zingiberis Rhizima	3.75
桂枝	Cinnamomi Ramulus	3.75
甘草	Glycyrrhizae Radix	3.75
	Total amount	37.48

3) 시약 및 기기

시약으로는 penicillin(Sigma, USA) Streptomycin (Sigma, USA) RPMI-1640 (Gibco BRL, USA) LPS(10 ㎍/㎖, sigma, USA) TRIzol reagent (Invitrogen, USA) oligo (dT)12-18 (Promega, USA) dNTP (Biotools, Spain) M-MLV-RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega) Taq polymerase (Biotools, spain)을 사용하였으며 기기로는 microtiter plate(Falcon, USA)가 이용되었다.

2. 방법

1) 폐포 대식세포의 분리

폐포 대식세포는 Chandler 등의 bronchoalveolar lavage 법에 의해 다음과 같이 분리하였다. Etylether로 마취시켜 개복한 다음, 복대 동맥으로부터 최대한의 혈액을 취하여 실혈 치사시켰다. 흉강을 열어 기도를 cannulation 시키고 폐를 분리한 다음, cold PBS(13.6mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4, 1.8mM KH_2PO_4, PH 7.4)를 three-way cock 의 한쪽으로 조금씩 넣어 조금씩 맛사지하면서 다른 쪽에서는 lavage한 액을 취하였다. 이 액 600g을 5분간 원심분리 시켜 침전물을 얻고 여기에 100U/㎖ penicillin(Sigma, USA)와 100㎍/㎖ Streptomycin (Sigma, USA)이 함유된 RPMI-1640 (Gibco BRL, USA)를 가하여 재현탁시켰다. 세포수와 생존율은 hematocytometer를 사용하여 trypan blue exclusion 법으로 결정하였다. 24 weii microtiter plate(Falcon, USA)에 5×10 cells/well을 가하고 37℃ CO_2 incubator에서 2시간 동안 배양하여 세포가 plate 바닥에 부착되도록 하였다.

2) 세포 배양

폐포 대식세포는 3% FCS와 1% penicillin-streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. FCS는 잔존하는 보체성분을 불활성화 시키기 위해 실온에서 녹인 후 heat inactivation (56℃ water bath에서 30분간 가열)하여 사용하였으며 배지는 0.2 ㎛ membrane filter로 여과 후 사용하였다. 세포 배양액에 LPS(10㎍/㎖, sigma, USA)와 각각의 약물을 농도별로 가하여 20시간 배양하였다. 세포를 회수할 때는 trypsin-EDTA 1 ㎖을 가하여 37℃에서 1분간 반응시킴으로써 부착된 세포를 분리하고 배지 4㎖을 넣고 원심분리(1000 rpm, 3분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

3) 총 RNA 분리

배양하고 있는 대식 세포에 1㎖ TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA에 100 ㎕ phenol과 100 ㎕ chloroform : isoamylalcohol (24:1)을 넣고 잘 섞은 후 원심 분리하는 과정을 2번 반복함으로써 상층액을 분리하였다. 0.5㎖ isopropyl alcohol을 이용하여 RNA를 침전시킨 후, 70% ethanol로 세척하고 자연 건조시켰다. RNase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free DNase를 첨가하고 -70℃에서 저장하였다.

4) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

oligo (dT)12-18 (Promega, USA), reaction buffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, pH 8.3), 1 mM dNTP (Biotools, Spain)과 200

unit M-MLV-RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega)를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 15 ㎕에 10X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 pmole의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA와 1.25 unit의 Taq polymerase (Biotools, spain)을 넣어 PCR을 시행하였다. PCR 조건은 94℃ 5분, 20-25 cycles의 [94℃ (30초), 59℃ (30초), 72℃ (1분)], 72℃ 10분이었다(Perkin Elmer, USA) 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에서 전기영동하였다. 전기영동 결과 나타난 band의 강도는 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1를 이용하여 구했으며 GAPDH는 Control로 사용하였다.

Table 2. Sequence of Primers That Used for RT-PCR Analysis

Gene		Sequence	Annealing temperature (℃)	PCR product (bp)
IL-1β	F	5'-gCA ACT gTT CCT gAA CT-3	55	810
	R	5'-TTA ggA AgA CAC AgA TTC-3		
IL-6	F	5'-ATg AAg TTC CTC TCT gCA Ag-3	55	302
	R	5'-ggT TTg CCg AgT ACA TCT CA-3		
IL-10	F	5'-CTg gAC AAC ATA CTg CTA ACC gAC-3	61	301
	R	5'-ATT CAT TCA Tgg CCT·TGT AgA CAC C-3		
TNF-α	F	5'-Cgg gAT CCA TgA gCA CAg AAA gCA T-3	65	708
	R	5'-CCC AAg CTT TCA CAg AgC AAT gAC TCC-3		
iNOS	F	5'-CgA AgT gTC AgT ggC TTC CA-3	65	151
	R	5'-AgC TCA TgC ggC CTC CTT-3		
MIP-1α	F	5'-gCg CCA TAT ggA gCT gA-3	55	174
	R	5'-TCA ggC ATT CAg TTC CAg-3		
MIP-1β	F	5'-gCA CCA ATg ggC TCT gA-3	55	174
	R	5'-TCA gTT CAA CTC CAA gTC ACT-3		
MIP-1γ	F	5'-ATg AAg CCT TTT CAT ACT-5	55	369
	R	5'-TTA TTg TTT gTA ggT CCg-3		
TGF-β	F	5'-AgA Cgg AAT ACA ggg CTT TCg ATT CA-3	61	493
	R	5'-CTT ggg CTT gCg ACC CAC gTA gTA-3		
GAPDH	F	5'-AgC CTC gTC CCg TAg ACA AA-3	59	632
	R	5'-CAC gAC ATA CTC AgC ACC ggC-3		

(iNOS : inducible nitric oxide synthase, MIP : macrophage inflammatory protein, TGF : transforming growth factor, GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

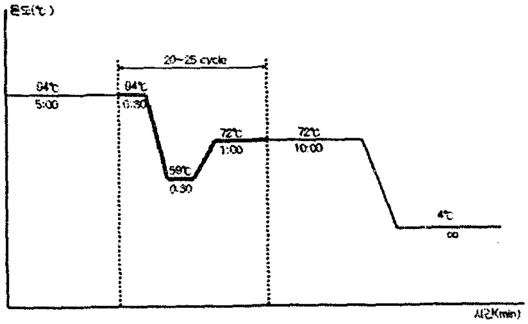


Fig. 1 Schemes for RT-PCR Analysis

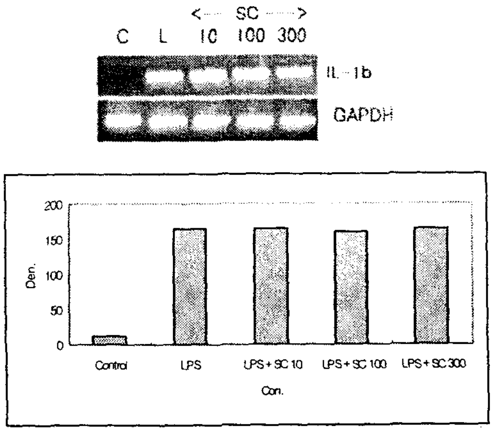
결 과

1. IL-1β 유전자 발현에 미치는 영향

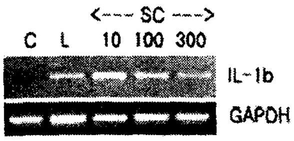
IL-1β은 천식 환자의 기도에서 발현이 증가되는 proinflammatory cytokine으로[19], 많은 염증 유전자의 발현을 활성시키는 것으로 알려졌다.[20] SC는 LPS로 자극된 macrophage에서 실험한 결과 25 cycle의 PCR에서는 IL-1β의 발현에서 미세한 차이를 보였지만 20 cycle의 PCR에서는 LPS만 처리한 경우와 비교해서 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다.

1) SC 농도에 따른 효과

(1) 25 cycle



(2) 20 cycle



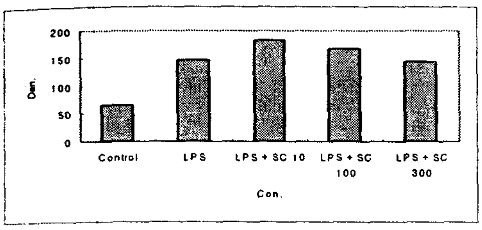
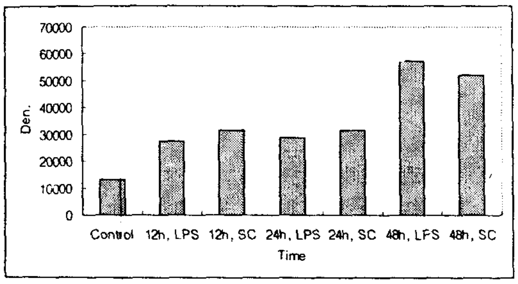


Fig. 2 Effect of SC on IL-1β expression in macrophage cells. RT-PCR assay of IL-1β mRNA in macrophage cells cultured in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in the presence of SC(24 hrs). LPS is a cytokine inducer. Expression of mRNA for GAPDH, a housekeeping gene, was also detected as a positive control.

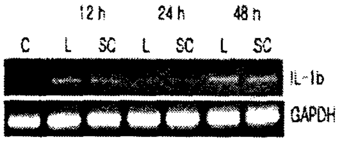


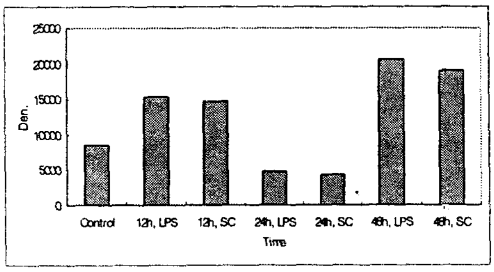
SC 10 : treated with Sochungyongtang 10㎍/㎖
SC 100 : treated with Sochungyongtang 100㎍/㎖
SC 300 : treated with Sochungyongtang 300㎍/㎖

2) SC 처리 시간에 따른 효과

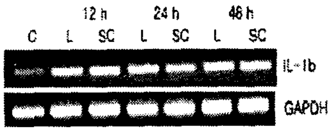
SC은 LPS로 자극된 macrophage에서 25cycle의 경우 12시간, 24시간, 48시간 모두에서 유전자 발현을 억제 하였으며 30cycle의 경우 24시간에서만 유전자 발현이 감소되었다.

(1) 25 cycle





(2) 30 cycle



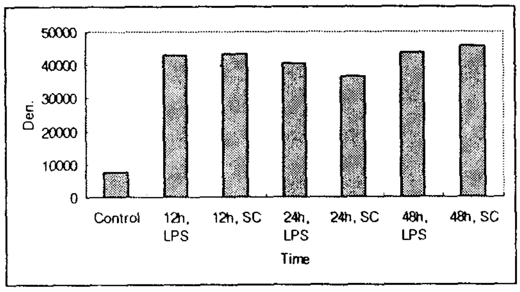


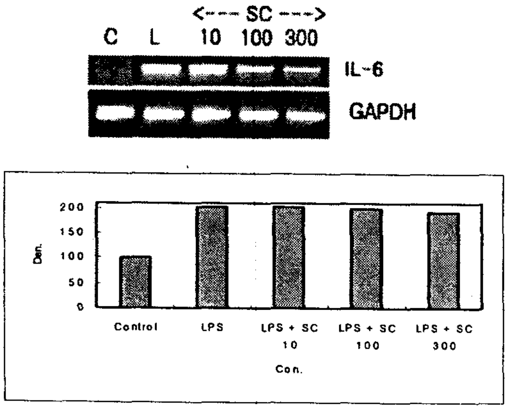
Fig. 3 Effect of SC on IL-1β expression in macrophage cells
RT-PCR assay of IL-1β mRNA in alveolar macrophage cells cultured in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in thepresence of SC (12, 24, 48h). LPS is a cytokine inducer. Expression of mRNA for GAPDH, a housekeeping gene, was also detected as a positive control.

2. IL-6 유전자 발현에 미치는 영향

1) SC 농도에 따른 효과

IL-6은 T cell에서 분비되는 IL-4의 작용을 도와 천식을 일으키는 것으로 알려졌다.[7] 이번 실험에서 SC는 LPS로 자극된 macrophage에서 25cycle과 20cycle 모두에서 농도의존적으로 유전자 발현을 억제하였다.

(1) 25 cycle



(2) 20 cycle

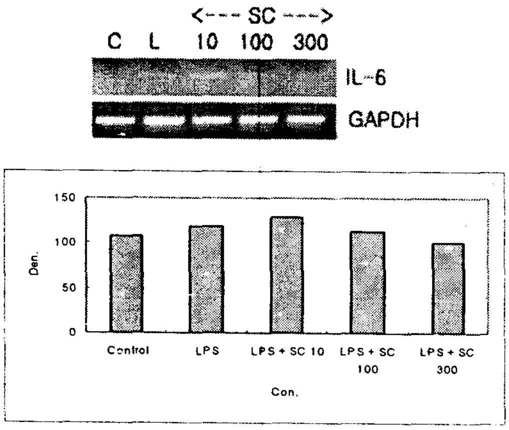


Fig. 4 Effect of SC on IL-6 expression in macrophage cells.
RT-PCR assay of IL-6 mRNA in alveolar macrophage cells cultured in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in the presence of SC (24h). LPS is a cytokine inducer. Expression of mRNA for GAPDH, a housekeeping gene, was also detected as a positive control.

SC 10 : treated with Sochungyongtang 10㎍/㎖

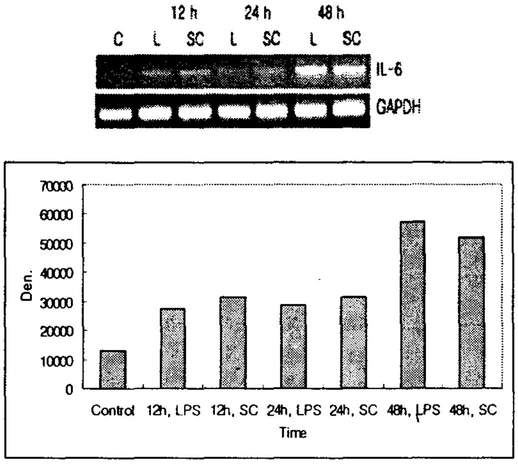
SC 100 : treated with Sochungyongtang 100㎍/㎖

SC 300 : treated with Sochungyongtang 300㎍/㎖

2) SC 처리시간에 따른 효과

SC은 LPS로 자극된 macrophage에서 25cycle의 경우 12시간, 24시간 처리했을 경우 IL-6의 유전자 발현이 증가되었으며 48시간 처리하였을 때 비로소 감소하였다. 그리고 30cycle의 경우 12시간 처리했을 경우는 억제 효과가 없었으나 24시간, 48시간 처리했을 경우에는 유전자 발현이 억제되었다.

(1) 25 cycle



(2) 30 cycle

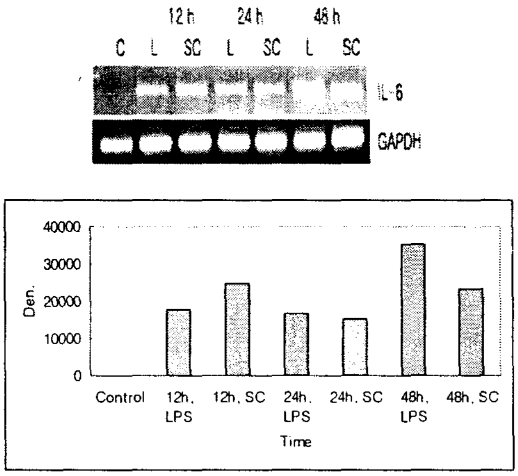


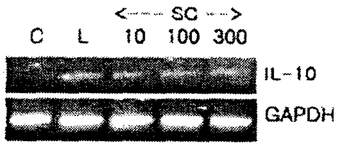
Fig. 5 Effect of SC on IL-6 expression in macrophage cells. RT-PCR assay of IL-6 mRNA in alveolar macrophage cells cultured in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in the presence of SC (12, 24, 48h). LPS is a cytokine inducer. Expression of mRNA for GAPDH, a housekeeping gene, was also detected as a positive control.

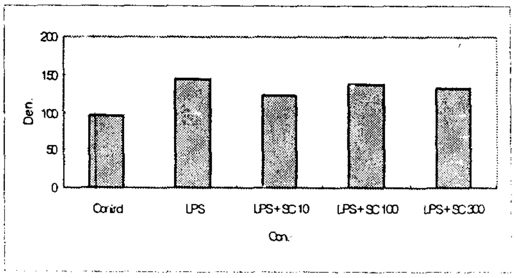
3. IL-10 유전자 발현에 미치는 영향

1) SC 농도에 따른 효과

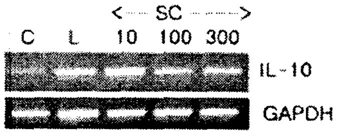
천식을 억제하는 것으로 알려진 cytokine은 염증 반응에서 항염증 작용을 하는 cytokine으로 특히 IL-10은 천식에서 증가되는 여러 염증 cytokine인 TNF-α, GM-CSF와 염증 효소인 iNOS의 합성을 억제하는 것으로 알려졌다.[21] 이번 실험에서 SC은 LPS로 자극된 macrophage에서의 IL-10의 발현은 20 cycle PCR에서 10 ㎍/㎖을 처리했을 경우에만 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 다른 농도에서는 별다른 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다.

(1) 25 cycle





(2) 20 cycle



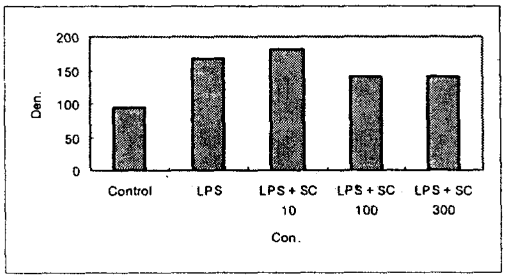


Fig. 6 Effect of SC on IL-10 expression in macrophage cells. RT-PCR assay of IL-10 mRNA in alveolar macrophage cells cultured in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in the presence of SC (24h). LPS is a cytokine inducer. Expression of mRNA for GAPDH, a housekeeping gene, was also detected as a positive control.

SC 10 : treated with Sochungyongtang 10㎍/㎖

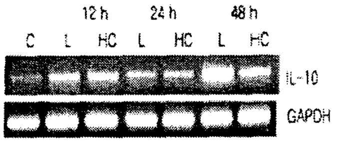
SC 100 : treated with Sochungyongtang 100㎍/㎖

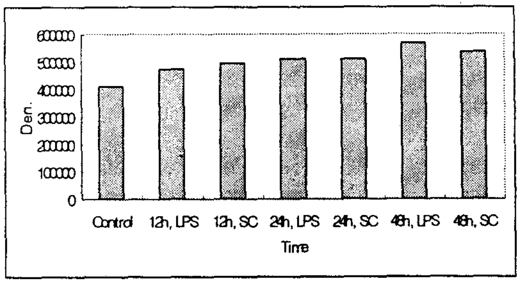
SC 300 : treated with Sochungyongtang 300㎍/㎖

2) SC 처리시간에 따른 효과

SC은 LPS로 자극된 macrophage에서의 각각 12시간, 24시간, 48시간을 처리하여 IL-10의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과 25cycle과 28cycle 모두 48시간을 제외한 12시간, 24시간에서 IL-10 유전자 발현을 증가시켰다.

(1) 25 cycle





(2) 28 cycle

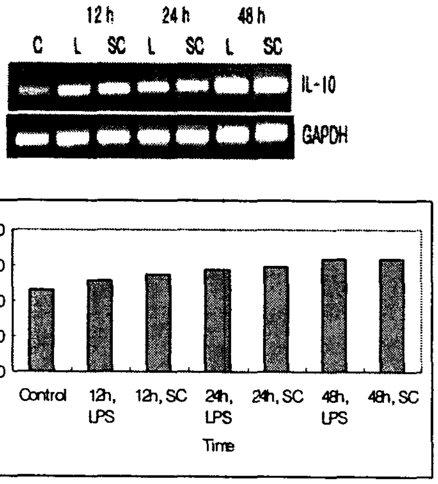
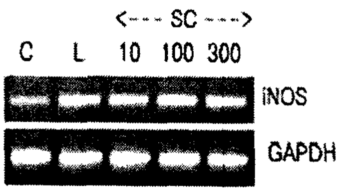


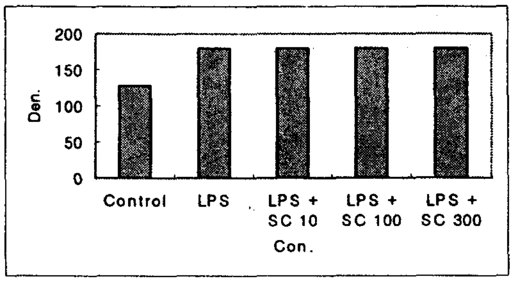
Fig. 7 Effect of SC on IL-10 expression in macrophage cells. RT-PCR assay of IL-10 mRNA in alveolar macrophage cells cultured in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in the presence of SC (12, 24, 48h). LPS is a cytokine inducer. Expression of mRNA for GAPDH, a housekeeping gene, was also detected as a positive control.

4. iNOS 유전자 발현에 미치는 영향

대식세포에서 생성되는 효소로 천식을 촉진하는 것으로 알려진 것으로 iNOS가 존재한다.[7] 이번 실험에서 SC는 LPS로 자극된 macrophage에서의 유전자 발현에서 25 cycle의 PCR에서는 약간의 iNOS 발현 감소 경향을 보였고 20 cycle PCR의 경우에서는 SC100과 SC300의 경우 iNOS의 발현이 현저하게 감소되었다.

(1) 25 cycle





(2) 20 cycle

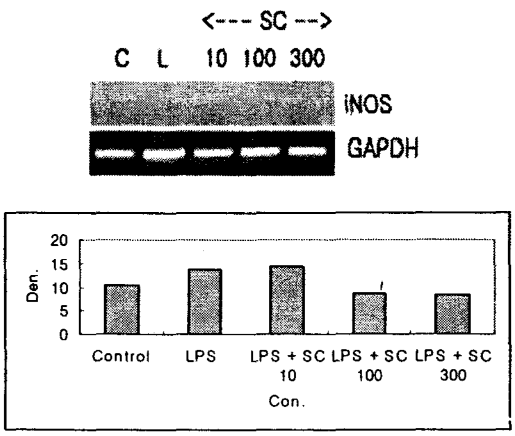


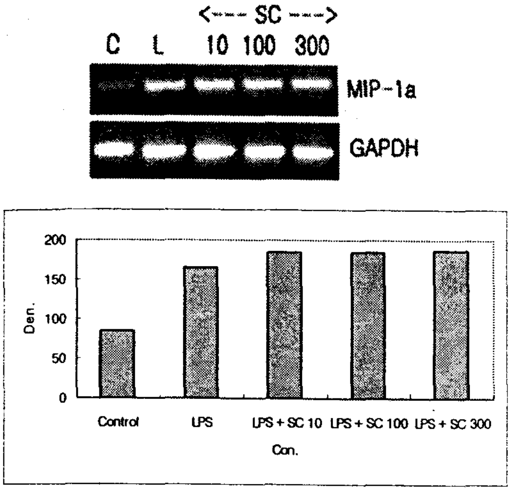
Fig. 8 Effect of SC on iNOS expression in macrophage cells. RT-PCR assay of iNOS mRNA in alveolar macrophage cells cultured in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in the presence of SC (24h). LPS is a cytokine inducer. Expression of mRNA for GAPDH, a housekeeping gene, was also detected as a positive control.

SC 10 : treated with Sochungyongtang 10㎍/㎖
SC 100 : treated with Sochungyongtang 100㎍/㎖
SC 300 : treated with Sochungyongtang 300㎍/㎖

5. MIP-1α 유전자 발현에 미치는 영향

대식세포에서 생성되는 cytokine 중 MIP-1α는 염증을 촉진하는 것으로 알려졌다.[7] 이번 실험에서는 SC는 LPS로 자극된 macrophage에서의 MIP-1α의 발현에 크게 영향을 미치지 않은 것으로 보인다.

(1) 25 cycle



(2) 20 cycle

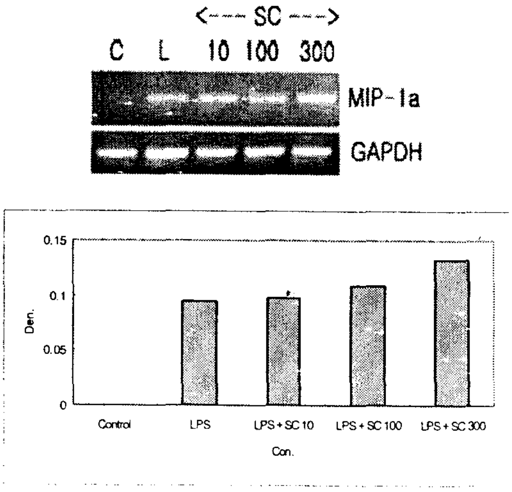


Fig. 9 Effect of SC on MIP-1α expression in macrophage cells. RT-PCR assay of MIP-1α mRNA in alveolar macrophage cells cultured in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in the presence of SC (24h). LPS is a cytokine inducer. Expression of mRNA for GAPDH, a housekeeping gene, was also detected as a positive control.

SC 10 : treated with Sochungyongtang 10㎍/㎖

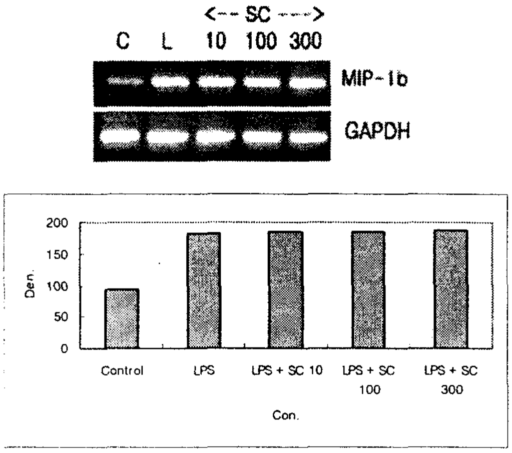
SC 100 : treated with Sochungyongtang 100㎍/㎖

SC 300 : treated with Sochungyongtang 300㎍/㎖

6. MIP-1β 유전자 발현에 미치는 영향

SC은 LPS로 자극된 macrophage에서의 MIP-1β 유전자 발현을 억제하지 못하는 것으로 나타났다.

(1) 25 cycle



(2) 20 cycle

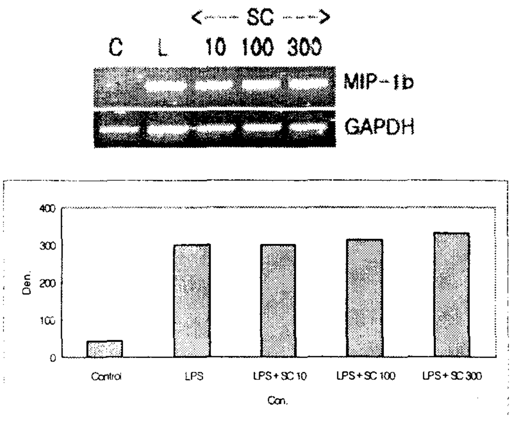


Fig. 10 Effect of SC on MIP-1β expression in macrophage cells. RT-PCR assay of MIP-1β mRNA in alveolar macrophage cells cultured in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in the presence of SC (24h). LPS is a cytokine inducer. Expression of mRNA for GAPDH, a housekeeping gene, was also detected as a positive control.

SC 10 : treated with Sochungyongtang 10㎍/㎖

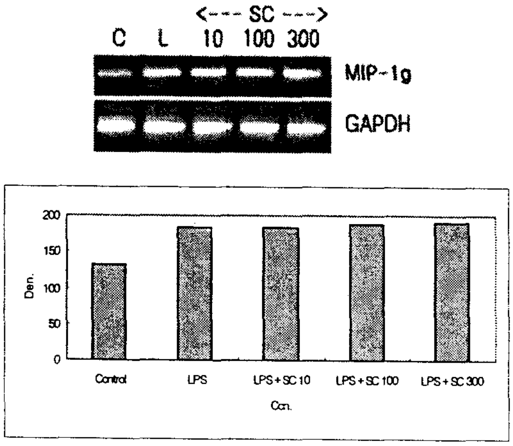
SC 100 : treated with Sochungyongtang 100㎍/㎖

SC 300 : treated with Sochungyongtang 300㎍/㎖

7. MIP-1γ 유전자 발현에 미치는 영향

SC은 LPS로 자극된 macrophage에서의 MIP-1γ 유전자 발현을 억제시키지 못하는 것으로 나타났다.

(1) 25 cycle



(2) 20 cycle

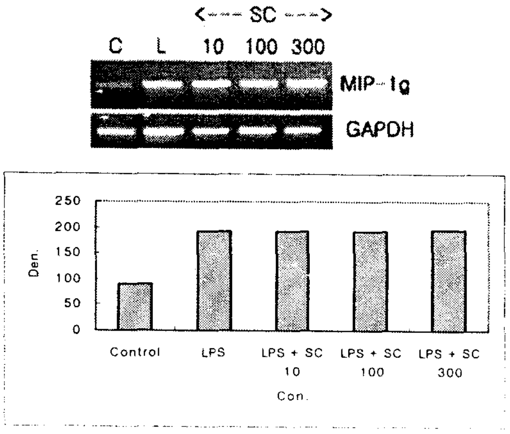


Fig. 11 Effect of SC on MIP-1γ expression in macrophage cells. RT-PCR assay of MIP-1γ mRNA in alveolar macrophage cells cultured in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in the presence of SC (24h). LPS is a cytokine inducer. Expression of mRNA for GAPDH, a housekeeping gene, was also detected as a positive control.

SC 10 : treated with Sochungyongtang 10㎍/㎖

SC 100 : treated with Sochungyongtang 100㎍/㎖

SC 300 : treated with Sochungyongtang 300㎍/㎖

8. TGF-β 유전자 발현에 미치는 영향

TGF-β는 항염증작용을 하는 cytokine으로 T cell에서 분비되는 IL-4의 작용을 억제하여 천식을 억제하는 것으로 알려졌다.[7] 이번 실험에서 SC은 LPS로 자극된 macrophage에서의 TGF-β 유전자 발현을 증가시켰다.

1) SC 농도에 따른 효과

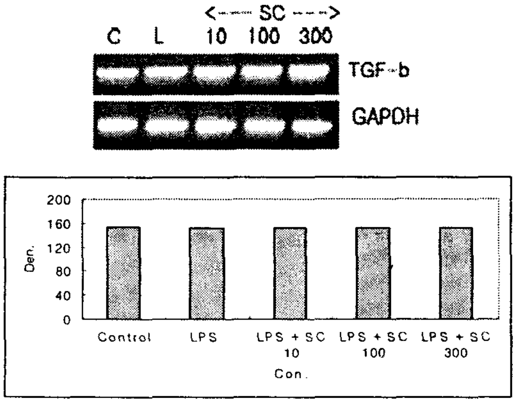


Fig. 12 Effect of SC on TGF-β expression in macrophage cells. RT-PCR assay of TGF-β mRNA in alveolar macrophage cells cultured in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in the presence of SC (24h). LPS is a cytokine inducer. Expression of mRNA for GAPDH, a housekeeping gene, was also detected as a positive control.

SC 10 : treated with Sochungyongtang 10㎍/㎖

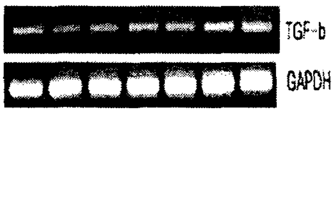
SC 100 : treated with Sochungyongtang 100㎍/㎖

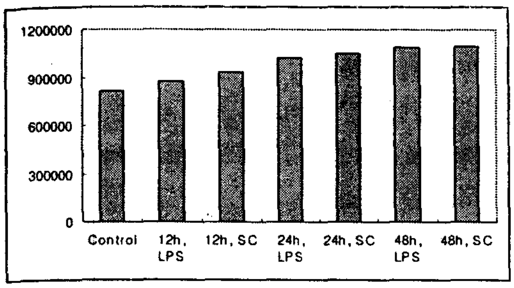
SC 300 : treated with Sochungyongtang 300㎍/㎖

2) SC 처리시간에 따른 효과

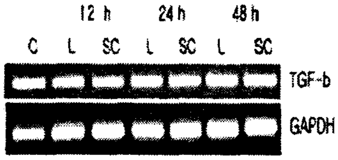
SC은 LPS로 자극한 대식세포에서의 TGF-β 유전자 발현을 농도 의존적으로 현저하게 증가시켰다.

(1) 25 cycle





(2) 28 cycle



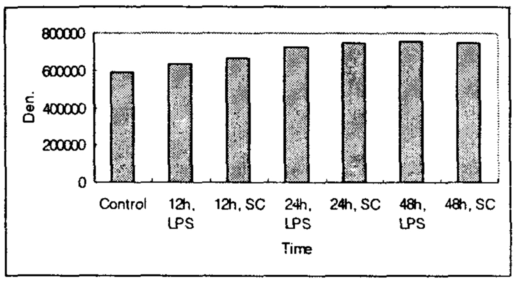
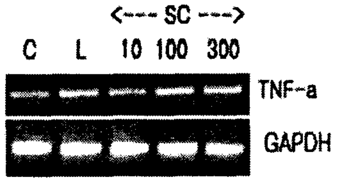


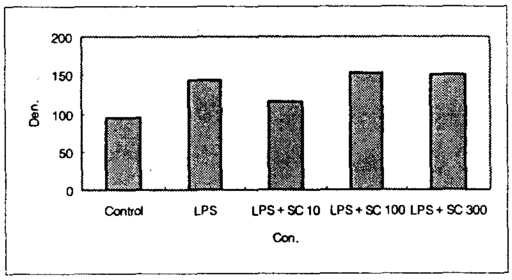
Fig. 13 Effect of SC on TGF-β expression in macrophage cells. RT-PCR assay of TGF-β mRNA in alveolar macrophage cells cultured in DMEM, supplemenied with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in the presence of SC (0, 12, 24, 48h). LPS is a cytokine inducer. Expression of mRNA for GAPDH, a housekeeping gene, was also detected as a positive control.

9. TNF-α 유전자 발현에 미치는 영향

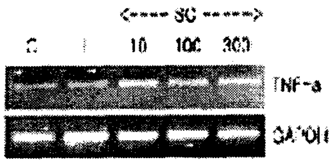
TNF-α는 천식환자의 기도에서 발현되며, 이는 NF-kB, AP-1, 다른 전사인자의 활성을 통해 천식에서의 염증 반응을 증가시키는데 작용하는 것으로 알려졌다.[22] 이번 실험에서 SC은 LPS로 자극된 macrophage에서의 TNF-α 유전자 발현에 있어 25cycle의 10μg/mℓ을 제외하고는 별다른 영향을 나타내지 않았다.

(1) 25 cycle





(2) 20 cycle



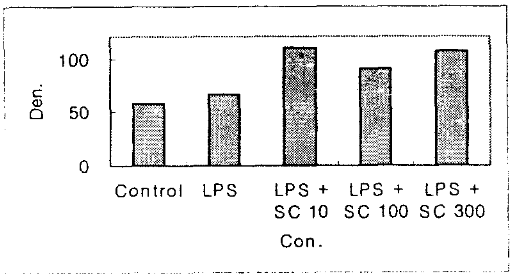


Fig. 14 Effect of SC on TNF-α expression in macrophage cells. RT-PCR assay of TNF-α mRNA in alveolar macrophage cells cultured in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in the presence of SC (24h). LPS is a cytokine inducer. Expression of mRNA for GAPDH, a housekeeping gene, was also detected as a positive control.

SC 10 : treated with Sochungyongtang 10μg/mℓ

SC 100 : treated with Sochungyongtang 100μg/mℓ

SC 300 : treated with Sochungyongtang 300μg/mℓ

고 찰

한의학에서 肺의 생리적인 기능은 主氣, 主宣發, 主肅降 通調水道하는 것으로 그 기능을 失調하면 呼吸機能과 水液代謝에 영향을 미쳐 水濕의 停留를 유발하게 된다.[9] 특히 風寒邪의 침범을 받으면 肺氣가 上逆하여 咳嗽와 寒痰이 생겨난다.[10]

최근 환경오염의 증가로 폐질환이 급증하고 있는데 흡연, 오존의 증가, 자동차 매연으로 인한 알데히드, 황산화물, 질소산화물이 큰 원인이 되고 있다.[2] 이들에 대한 호흡기의 방어기전은 면역 특이적인 반응과 면역 비특이적 반응으로 나타난다. 여기서 免疫이란 生體가 외부에서 침입하는 微生物 등의 해로운 異物, 同種의 세포 혹은 生體 내에서 생긴 異常物質, 노폐물 등에 특이하게 반응하여 體液性 抗體나 感作性 임파구를 생산하여 異物을 배제하고 자기의 恒常性을 유지하는 것을 말한다.[23,24]

免疫反應은 크게 體液性 免疫과 細胞性 免疫으로 나뉜다. 體液性 免疫은 抗原特異性 分子인 抗體에 의하여 이루어지며 細胞보다는 血淸內에 존재하며 신체 각부위에서 전달되는데 이러한 抗體는 T細胞의 도움을 받아 B細胞에 의해 생산된다. 細胞性 免疫反應은 주로 T細胞에 의하여 이루어지며 경우에 따라서는 T細胞도 B細胞도 아닌 임파구, 多型核 白血球, 大食細胞에 의하여 이루어진다.[25]

免疫學的 反應을 일으키는 것으로 인체에 有害하게 작용하는 것이 알려진 反應으로 免疫글로불린이 抗原과 반응하여 방출하는 화학전달물질이나 T임파구에 의한 각종 화합물에 의해 血管의 擴張, 毛細血管의 透過性 亢進, 平滑筋의 收縮과 痙攣, 粘液의 增加 및 粘膜의 浮腫과 炎症이 유발되는 것이 특징이다.[5]

최근의 연구는 細胞의 炎症 발현에 관여하는 세포와 分子水準의 機轉에 맞추어져 細胞段階의 炎症 免疫反應에서 각종 cytokine이 어떻게 관여하고 역할을 하고 있는지 계속적으로 보고되고 있으며 그러한 메카니즘에 변화를 초래하는 機轉들을 구체적으로 제시하고 있다.[8,26]

Cytokine이란 先天免疫(innate immunity)과 適應免疫(adaptive immunity)에 관여하는 세포에서 분비되는 단백질로서 그 세포의 여러 기능을 조절하는데 先天免疫에 관여하는 cytokine을 monokine이라 부르며 適應免疫에 관여하는 cytokine들은 대부분 T림프구에서 분비하므로 lymphokine이라 부른다. Lymphokine은 抗原과 반응하여 활성화된 림프구가 생성, 방출하는 물질로서 다른 세포에 작용하게 하는 활성물질이며 interleukin (IL) 으로 칭하기도 하고 macrophage가 생성하는 동일한 활성물질인 monokine은 monocyte의 억제작동물질을 의미하는 것이다.[25,27]

Cytokine은 어떤 한가지 抗原에 특이적인 적은 수의 림프구로 하여금 그 항원을 제거하는 다양한 실행기전을 활성화시키도록 하는 증폭기전을 제공하므로 cytokine의 과도한 생성과 작용은 조직상해를 유발하거나 괴사를 일으킬 수 있다.[28,29]

韓醫學에 있어서 《素問·上古天眞論》에 "眞氣從之 精神內守 病安從來", 《素問·刺法論》에 "五疫之至....正氣存內 邪不可干", 《素問·評熱病論》에 "邪之所湊 其氣必虛", 《素問·玉機眞藏論》에는 "邪氣勝者 正氣衰也 故病甚"이라 하였으며 《靈樞·百病始生》에 "風雨寒熱 不得虛 邪不能獨傷人", 《靈樞·口問》에는 "故邪之所在 皆爲不足"이라 하여[30] 서양의학의 면역이라는 개념과 유사성을 보이고 있다.

小靑龍湯은 漢代 張의 《傷寒論》[31]에 처음 기재된 처방으로 "傷寒表不解 心下有水氣 乾嘔 發熱而咳 或渴 或利 或小便不利 小腹滿 或喘者 小靑龍湯主之", "傷寒 心下有水氣 咳而微喘 發熱不渴 服湯已渴者 此寒去欲解也 小靑龍湯主之"라 하여 解表散寒, 溫肺化痰, 止咳平喘하는 효과[32]가 있는 것으로 알려져 있다.

小靑龍湯이라는 處方은 太陽이 命門火에 근거를 둔 三焦의 氣化作用과 心火가 水와 交합과 그 上昇

力이 氣化作用으로 化하는데 힘입어 寒水의 氣를 全身의 肌表로 운행하여 陽을 敷布하는 것이므로 이 表가 不利하면 또한 全身의 氣化作用도 不利하게 되어 水毒이 停滯하게 되는 것이니 이 小靑龍湯은 水毒이 心下에 停滯하여 여러 가지 病變을 일으키는 것을 치료하는 處方인 것이다.[34]

그 구성약물을 각각 살펴보면 麻黃은 辛苦溫하여 發汗散寒, 宣肺平喘, 利水消腫하며 白芍藥은 苦酸微寒하여 養血柔肝, 緩中止痛, 斂陰收汗하고 五味子는 酸甘溫하여 斂肺, 滋腎, 生津, 收汗, 澁精하며 半夏는 辛溫하여 燥濕化痰, 降逆止嘔, 消痞散結하는 효능이 있다. 또 細辛은 辛溫하여 祛風散寒, 通竅止痛, 溫肺化飮하며 乾薑은 辛熱하여 溫中逐寒, 回陽通脈하고 桂枝는 辛甘溫하여 發汗解肌, 溫經通脈하며 甘草는 甘平하여 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥의 효능이 있다.[33]

이상을 요약하면 小靑龍湯 處方중의 麻黃과 桂枝는 發汗解表하고 宣肺平喘하며 白芍藥은 桂枝와 배합하여 營衛를 調和하고 乾薑과 細辛은 溫肺化飮하고 辛散風寒하며 五味子는 溫斂肺氣하고 止咳하여 肺氣의 耗散을 방지하며 半夏는 燥濕化痰하고 甘草는 諸藥을 調和하여 傷寒兼裏水飮證에 散寒解表하고 化飮平喘하는 方劑가 된다.[33]

임상적으로는 外感風寒으로 水飮이 內停하게 되어 惡寒發熱하나 渴症이 나지않고 無汗하며 浮腫, 身體疼重, 胸痞, 乾嘔, 咳喘하고 脈이 浮한 증상을 치료하며 咳嗽하며 痰이 맑고 묽으며 白色으로 거품이 있으며 舌은 淡하고 舌苔는 白色이며 滑한 증상에 응용할 수 있어[35] 慢性氣管支炎, 氣管支喘息, 알러지성 鼻炎, 肺炎 및 알러지 疾患에 폭넓게 응용되고 있다.[36]

小靑龍湯에 대한 연구는 金[37]이 鎭痛, 抗痙攣效果를, 安[11]은 氣管支 平滑筋 收縮反應, 鎭咳祛痰作用을, 趙[12]는 알러지 喘息의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향을, 李[38]는 알러지 喘息모델 흰쥐의 BALF내 免疫細胞에 미치는 영향을 보고하였다.

또 車[13]는 小靑龍湯이 asthma model 내의 cytokine IL-1, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF-α 에 미치는 영향을, 李[14]는 小靑龍湯과 加味小靑龍湯이 I 형 및 IV 형 allergy반응과 肺浮腫에 미치는 영향을, 裵[15]는 생쥐의 B cell에서 IgE의 분비와 cytokine 생산에 대한 小靑龍湯의 효과를 보고하였다.

그리고 免疫反應에서 help T cell 의 활성에 小靑龍湯이 미치는 영향에 관한 연구로 徐[39]가 있다. 鄭[16]은 小靑龍湯이 분화된 Th1 cell 및 Th2 cell cytokine profile에 미치는 영향을, 또 鄭[17]이 小靑龍湯과 小靑龍湯加沙蔘이 BEAS-2B 人間氣管支 상피세포의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF mRNA level에 미치는 영향에 관하여 연구하였다.

이상에서 본 바와 같이 최근의 小靑龍湯에 관한 연구들이 cytokine을 중심으로 활발하게 이루어지고 있는데 주로 알러지성 천식에 초점을 맞춘 연구가 다수였으며 폐의 면역기전에서 중요한 폐포의 대식세포를 중심으로 한 연구는 없었다. 따라서 본 실험에서는 小靑龍湯이 IL-1β, IL-6, IL-10, iNOS, MIP-1α, MIP-1β, MIP-1γ, TGF-β, TNF-α 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

호흡기 방어기전에 관여하는 세포로는 폐포의 대식세포 (alveolar macrophage), 중성구 (neutrophil), 림프구 (lymphocyte), 호산구 (eosinophil), 호염기구 (basophil) 및 비반세포 (mast cells)이 있는데 그중에서 폐포의 대식세포는 골수간세포에서 유래된 세포로 혈액내 단핵구를 거쳐서 alveolar epithelium의 표면에 부착해 있거나 LSLM에 잠겨있으며 폐조직내에서 주변으로 이동성이 활발하다. IgG Fc수용체 및 C3b수용체를 지니고 있고 lysosomal granule이 많으며 염증반응의 매개체를 분비한다.[4]

IL-1β 는 주로 활성화된 단핵식균세포에서 분비되며 그 생물학적 활성의 중요한 점은 lymphocyte activating factor로서 CD4+ T 임파구의 활성화와 증식 및 IFN-γ 의 분비를 촉진하며 혈관내피세포를 활성화하여 백혈구의 부착을 일으키는 것이다.[25,28,29] 즉 면역 및 염증의 매개물로서 급성기에 반응하여 면역반응을 증폭시키는 기능을 하는데[41,42] B전구세

포의 성숙과 항원자극을 받은 B세포증식을 유도한다.[25] 그리고 IL-1β은 천식 환자의 기도에서 발현이 증가되는 proinflammatory cytokine으로[19], 본 실험에서는 小青龍湯 농도에 따른 효과를 실험한 결과 25 cycle의 PCR에서는 IL-1β의 발현에서 미세한 차이를 보였지만 20 cycle의 PCR에서는 LPS만 처리한 경우와 비교해서 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다. 또 처리 시간에 따른 효과면에서는 25cycle의 경우 12시간, 24시간, 48시간 모두에서 유전자 발현을 억제 하였으며 30cycle의 경우 24시간에서만 유전자 발현이 감소되었다.

IL-6은 활성화된 T세포에서 생성되며 B세포가 항체 생산세포로 분화하는 최종단계를 유도하는 물질로 알려져있다. 항원과 반응한 T세포에도 작용하며 IL-2 수용체를 표출시켜 IL-2를 생성시켜서 증식을 초래하기도 하고 살해 T세포의 발현도 보조한다.[23,43] 또 IL-6은 T cell에서 분비되는 IL-4의 작용을 도와 천식을 일으키는 것으로 알려졌다.[7] 본 실험에서는 小青龍湯 농도에 따른 효과를 실험한 결과 25cycle과 20cycle 모두에서 농도의존적으로 유전자 발현을 억제하였다. 또 처리시간에 따른 효과면에서는 25cycle의 경우 12시간, 24시간 처리했을 경우 IL-6의 유전자 발현이 증가되었으며 48시간 처리하였을 때 비로소 감소하였다. 그리고 30cycle의 경우 12시간 처리했을 경우는 억제 효과가 없었으나 24시간, 48시간 처리했을 경우에는 유전자 발현이 억제되었다.

IL-10은 36kDa homodimeric cytokine으로 활성화된 대식세포 및 림프구에서 분화되며 cytokine synthesis inhibitory factor로 알려져왔다. Th1 림프구에서의 IFN-γ, IL-2의 생성을 억제하고 단핵식세포에서 IL-1, IL-6, IL-8 의 염증성 cytokine 생성을 억제할 뿐 아니라 Th2 림프구에서의 IL-4, IL-5, IL-13 분비를 억제하기 때문에 알러지성 염증반응을 방해하기도 한다.[8,25,43,45] B세포 증식에는 제한적으로 작용하지만 B세포가 plasma세포로 분화한 다음에 고도로 면역글로불린의 생산을 가져온다.[46] 따라서 염증반응에서 항염증 작용을 하는 cytokine으로 특히 IL-10은 천식에서 증가되는 여러 염증 cytokine인 TNF-α, GM-CSF와 염증 효소인 iNOS의 합성을 억제하는 것으로 알려졌다.[21] 본 실험에서 농도에 따른 효과는 20 cycle PCR에서 10㎍/㎖을 처리했을 경우에만 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 다른 농도에서는 별다른 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다. 또 처리 시간에 따른 효과는 25cycle과 28cycle 모두 48시간을 제외한 12시간, 24시간에서 IL-10 유전자 발현을 증가시켰다.

대식세포에서 생성되는 효소로 천식을 촉진하는 것으로 알려진 것으로 iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase) 가 존재한다.[7] 이것은 대식세포가 초기면역반응에서 중요한 역할을 할 때 작용하며 종양발생에 관여하는 Nitrosamine을 생성하고 DNA를 손상시키며 만성염증과 관련된 조직손상의 매개체이다. 본 실험에서 25 cycle의 PCR에서는 약간의 iNOS 발현 감소 경향을 보였고 20 cycle PCR의 경우에서는 SC100과 SC300의 경우 iNOS의 발현이 현저하게 감소되었다.

대식세포에서 생성되는 cytokine 중 MIP-1α는 염증을 촉진하는 것으로 알려져있다.[7] 본 실험에서는 小青龍湯이 MIP-1α의 발현에 크게 영향을 미치지 않은 것으로 보인다. 그리고 MIP-1β의 경우는 小青龍湯이 유전자 발현을 약간 증가시키는 것으로 나타났다. 또 MIP-1γ의 경우 역시 유전자 발현을 약간 증가시키는 것으로 나타났다.

TGF-β는 전환성장인자로서 IL-10과 더불어 면역억제 cytokine의 일종으로 Regular T cell에 의해 분비된다.[49] 慢性 好酸球性炎症, 氣道의 纖維化 등의 氣道構造의 변형과 관련되며 특히 기관지천식의 氣道改形(airway remodeling)의 진행에 중요한 역할을 한다고 알려져있다.[50,51] 즉 TGF-β는 항염증작용을 하는 cytokine으로 T cell에서 분비되는 IL-4의 작용을 억제하여 천식을 억제하는 것으로 알려졌다.[7] 본 실험에서 농도에 따른 효과면에서는 약간 증가하였으며 처리시간에 따른 효과면에서는 25cycle과

28cycle 모두에서 TGF-β 유전자 발현이 증가되었다.

TNF-α는 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 활성된 식균세포에서 주로 분비되며 그 외 T세포, 비만세포, NK세포에서 생산되고 IL-1의 기능과 중복되나 항암 기능이 더 뛰어나다. 단핵식세포 자극으로 IL-1, IL-6, IL-8 생산을 항진하고 T세포활성과 B세포 항체생산 항진 보조인자로 작용한다.[25] 또한 증가된 histamine의 분비와 기도내의 염증을 유발하는 cytokine으로 염증세포가 기도벽에 이입되는 것을 촉진하고 상피하에서 섬유화를 촉진시킨다.[47,48] 그리고 화학주성물질을 자극하여 하부호흡기계로 염증세포를 유입시켜 육아종을 형성하고 세포분화와 식균작용을 촉진시킨다. 또한 급만성 염증의 개시를 매개하며 IL-1, IL-6 등을 유도하여 특이면역반응과 급성염증반응의 중요한 연결자가 된다.[25,28,40,44] TNF-α는 천식환자의 기도에서 발현되며, 이는 NF-kB, AP-1, 다른 전사인자의 활성을 통해 천식에서의 염증 반응을 증가시키는데 작용하는 것으로 알려졌다.[22] 본 실험에서는 소청룡탕이 25cycle PCR에서 10㎍/㎖을 처리했을 경우를 제외하고는 TNF-α 유전자 발현에 별다른 영향을 나타내지 않았다.

이상의 실험에서 小青龍湯이 폐 대식세포의 IL-1β, IL-6, IL-10, iNOS, MIP-1α, MIP-1β, MIP-1γ, TGF-β, TNF-α의 유전자 발현 억제에 대해 유의성 있는 결과를 보여 호흡기 내의 염증발현을 억제하는 효과가 있을 것으로 사료되었다. 따라서 소청룡탕이 폐질환 및 알러지 질환에 대한 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며 향후 지속적인 관련 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

최근 환경오염물질의 증가로 각종 기관지 및 폐질환이 급증하고 있어 이들 오염물질에 대한 방어기전을 통해 발생하는 염증반응과 관련하여 세포단계의 염증면역반응에 관여하는 Cytokine에 관한 연구가 활발해지고 있다. 이 논문에서는 폐질환 및 알러지 질환에 많이 사용되는 소청룡탕 처방이 폐 대식세포의 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 소청룡탕은 LPS로 자극된 폐 대식세포의 IL-1β의 경우 농도에 따른 효과와 처리시간에 따른 효과 모두에서 억제력을 보였다.
2. 소청룡탕은 LPS로 자극된 폐 대식세포의 IL-6의 경우 농도에 따른 효과와 처리시간에 따른 효과 모두에서 억제력을 보였다.
3. 소청룡탕은 LPS로 자극된 폐 대식세포의 IL-10의 경우 농도에 따른 효과에서 별다른 영향을 보이지 못하였으나 처리시간에 따른 효과에서는 증가함을 보여 염증억제를 기대할 수 있었다.
4. 소청룡탕은 LPS로 자극된 폐 대식세포의 iNOS의 경우 현저한 억제력을 보였다.
5. 소청룡탕은 LPS로 자극된 폐 대식세포의 TGF-β의 경우 농도에 따른 효과에서는 약간의 증가를 보였고 처리시간에 따른 효과도 모두에서 증가시키는 것으로 나타나 염증억제를 기대할 수 있었다.
6. 소청룡탕은 LPS로 자극된 폐 대식세포의 MIP-1α, MIP-1β, MIP-1γ, TNF-α의 경우 크게 영향을 미치지 못한 것으로 나타났다.

이상의 연구결과, 소청룡탕은 LPS로 유도한 폐 대식세포의 유전자 발현을 억제하는 경향성을 나타내어 호흡기 내의 염증 발현을 억제할 것으로 사료되었다.

참고 문헌

1. Umetsu D, McIntire J, Akbari O, Macaubas C, Dekruyf R. Asthma: An epidemic of dysregulated

immunity. Nature Immunol. 2002;3:715-720
2. 의학교육연수원 편. 가정의학. 서울. 서울대학교출판부. 1990:237
3. 中島泉. 신면역학입문. 서울. 지구문화사. 1997:67
4. 서울대학교의과대학 편. 호흡기학. 서울. 서울대학교출판부. 1994:43-50
5. 문희주. 면역혈청학. 서울. 대학서림. 1988:67-74
6. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. Thorax 1999;54:825-857
7. Lanny J. Rosenwasser. New immunopharmacologic approaches to asthma: Role of cytokine antagonism. J. Allergy Clin. Immunol. 2000;105:586-592
8. Lasky JA, Brody AR. Interleukins involved in the pathogenesis of chronic airway inflammation. Rsep. Immunol. 1997;148(1):39-47
9. 이형구, 정승기. 동의폐계내과학. 서울. 아트동방. 1996:12
10. 최승훈 편저. 한방병리학. 서울. 일중사. 1997:426
11. 안철, 채병윤. 小靑龍湯의 효능에 관한 실험적 연구. 경희한의대논문집. 1987;10:643-664
12. 조영민, 정희재, 정승기, 이형구. 小靑龍湯이 알러지 喘息의 呼吸樣相과 氣管組織에 미치는 영향. 경희의학. 1999;15(1):78-89
13. 차은수, 정희재, 정승기, 이형구. 小靑龍湯이 Asthma model 내의 cytokine에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 2000;23(1):71-88
14. 이혜향. 小靑龍湯과 加味小靑龍湯이 I형 및 IV형 allergy반응과 肺浮腫에 미치는 영향. 대전대 석사학위논문. 2003
15. 배한호, 이정은, 한영주, 박양춘. 생쥐의 B세포에서 IgE의 분비와 cytokine 생산에 대한 小靑龍湯의 효과. 대한한방내과학회지. 2003;24(2):249-259
16. 鄭煥準. 小靑龍湯이 분화된 Th1 cell 및 Th2 cell cytokine profile에 미치는 영향. 경희대학교 석사학위논문. 2004
17. 정진용. 小靑龍湯과 小靑龍湯加沙蔘이 BEAS-2B 人間氣管支상피세포의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2003;24(1):74-83
18. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울. 南山堂. 1991: 4
19. Sousa AR, Lane SJ, Nakhosteen JA, Lee TH, Poston RN. Expression of interleukin-1beta(IL-1β) and interleukin-1 receptor antagonist(IL-1ra) on asthmatic bronchial epithelium. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996;154:1061-1066
20. Peter J. Barnes. Cytokine modulators as novel therapies for asthma. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2002;42:81-98
21. Pretolani M, Goldman M. IL-10: a potential therapy for allergic inflammation? Immunol. Today 1997;18:277-280
22. Kips JC, Tavernier JH, Joos GF, Peleman RA, Pauwels RA. The potential role of tumor necrosis factor α in asthma. Clin. Exp. Allergy 1993;23:247-250
23. 서울대학교의과대학. 免疫學. 서울. 서울대출판부. 1987:123-141
24. 이연태. 최신면역학. 서울. 집문당. 1985:26-35, 367-388
25. 김세종. Immunology. 서울. 고려의학. 2000:1, 58-65, 154-156, 260-265
26. 윤형구. 알러지성 천식환자에 있어서 투베르쿨린 피부반응검사와 Cytokine의 변화. 결핵 및 호흡기질환. 1999;46(2):175-184
27. 강재성. 세포분자면역학. 서울. 범문사. 2002:440
28. Abbas AK, Lichman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Philadelphia. Saunders. 1997;250-277
29. Palma Carlos AG, Palma Carlos ML, Conceicao SM, Alcinda M. Cytokines and asthma. J. Invest.

Allergol. Clin. Immunol. 1997;7(5):270-273

30. 洪元植 編. 校訂黃帝內經. 서울. 東洋醫學研究院出版部. 1981:37, 38, 55, 57, 78, 82, 118, 119, 122, 181, 213, 249, 256, 304, 305, 319, 326, 347-378
31. 張仲景. 仲景全書. 서울. 大星文化社. 1989: 142-144
32. 吳謙等 編. 醫宗金鑑. 서울. 목과토. 2000:230
33. 李尙仁. 方劑學. 서울. 杏林社. 1987:51-52
34. 李正來. 東醫要諦眞詮. 대전. 도서출판 동양학술원. 1996:707-711
35. 全國韓醫科大學本草學敎室. 本草學. 서울. 永林社. 1991:21-125, 135-136, 334-335, 448-449, 540-541, 587-588, 581-582, 622-623
36. 文濬典. 傷寒論精解. 서울. 경희대학교출판국. 1996:125-127
37. 김기창, 이형구. 小靑龍湯의 鎭痛, 抗痙攣 및 흰 쥐의 폐손상에 미치는 영향. 경희한의대 논문집. 1985;(1):129-138
38. 이준우. 小靑龍湯이 알러지천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포에 미치는 영향. 경희대학교 석사학위논문. 2001
39. 서영호, 배현수, 신민규, 홍무창. 小靑龍湯이 Helper T cell의 활성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2002;16(4):693-700
40. 천선희. 폐결핵환자의 폐포 대식세포에서 TNF-α, IL-1β, IL-6 및 IL-8의 분비에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환. 1998;45(5):942-952
41. Palmi M, Meini A. Role of the nitric oxide/cyclic GMP/Ca^{2+} signaling pathway in the pyrogenic effect of interleukin-1beta. Mol Neurobiol. 2002;25(2):133-147
42. Watkins LR, Hansen MK, Nguyen KT, Lee JE, Maier SF. Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1beta: molecular biology for non-molecular biologists. Life Sci. 1999;65(5):449-481
43. 김주덕, 김성광 역. 면역학 입문, 서울, 의치학사. 1983:47-81
44. Roitt IM. Essential immunology. Chicago. Blackwell. 1988:193-199
45. 이숙영, 윤형규, 신윤. 기관지천식에서 기관지 폐포세척액내 IL-10과 기도염증정도의 연관성. 결핵 및 호흡기질환. 1999:46(1):44-52
46. Briere F, Bridon JM, Servet C, Rousset F, Zurawski g, Banchereau J. IL-10 and IL-13 as B cell growth and differentiation factors. Nouv Rev Fr Hematol. 1993;35(3):233-235
47. Ferreira MB, Palma Carlos AG. cytokines and asthma. Journal of investigational allergology and clinical immunology. 1998;8(3):141-148
48. Thomas PS. Tumor necrosis factor-alpha: the roll of this multifunctional cytokine in asthma. Immunol Cell Biol. 2001;79(2):132-140
49. 이정희. TGF-β 유전자도입된 EL4세포의 invitro와 invivo특성 연구. 강원대학교대학원. 1998
50. Nakao A. Is TGF-betal the key to suppression of human asthma? Trends Immunol. 2001;22(3): 115-118
51. Sagara H, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Ra C, Fukuda T, Nakao A. Activation of TGF-beta/Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 2002;110(2):249-254