

白屈菜가 천식유발 생쥐의 폐조직에서 호산구 증식과 면역 세포 활성화에 미치는 영향

노성수*#

대구한의대학교 한의과대학 본초학교실

The Effects of Chelidonii Herba on the Proliferation of Eosinophils and Activation of Immuno-cells in Asthma-induced Mouse

Seong-Soo Roh*#

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Abstract

Objectives : The present study was to investigate the effect of extract of Chelidonii herba (ECH) on the proliferation and activation of eosinophils which were prepared from lung cells of asthma-induced mouse by ovalbumin (OVA) treatment.

Methods : C57BL/6 mouse was exposed to OVA three times a week for 6 weeks. The mouse lung tissues were dissected out, chopped and dissociated with collagenase (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Eosinophils were activated by rIL-3/rmIL-5 co-treatments. The lung cells were treated with ECH, incubated for 48 hr at 37°C, and analyzed by flow cytometry, ELISA, RT-PCR, and immuno-histochemical analysis.

Results : In FACS analysis, number of granulocyte/lymphocyte, CD3e⁻/CCR3⁺, CD3e⁺/CD69⁺, CD4⁺ and CD23⁺/B220⁺ in asthma-induced lung cells were significantly decreased by ECH treatment compared to the control group. And mRNA expression for IL-4, IL-5, IL-13, CCR3 and eotaxin in asthma-induced lung cells, which was induced by rIL-3 plus rmIL-5 treatments, was significantly decreased by ECH treatment. In ELISA analysis, production levels of IL-3, IL-5, IL-13 and histamine in asthma-induced lung cells, which were induced by rIL-3 plus rmIL-5 co-treatment, were significantly decreased by ECH treatment.

ECH treatments significantly inhibited the proliferation of eosinophils prepared from asthma-induced mouse lung tissues compared to the non-ECH treated control cells. Immunohistochemical analysis revealed that ECH treatment significantly decreased the levels of eosinophil activation compared to non-treated cells.

Conclusions : The present data suggested that Chelidonium majus L. may have an effect on the inhibition of parameters associated with asthma responses in eosinophils, and thus implicate the possibility for the clinical application of Chelidonium majus L.

Key words : OVA-induced asthma, Chelidonii herba, Eosinophil, CCR3, Eotaxin, Immunocytochemistry

*# 제1저자, 교신저자 : 노성수, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 053-770-2255 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

· 접수 : 2008년 5월 16일 · 수정 : 2008년 6월 11일 · 채택 : 2008년 6월 20일

서론

천식의 발생은 서구화된 사회에서 지난 20년간 두 배 이상 증가되었는데, 이는 고도의 산업화에 따른 새로운 항원의 출현 및 환경공해 특히 대기오염, 흡연인구의 증가 등으로 인해 사망률도 증가하고 있는 추세이며, 특히 소아천식의 발생이 두드러지게 증가하였다¹⁻³⁾. 따라서 천연물을 이용한 천식치료제 개발 연구가 한의학에서 활발히 진행되고 있다.

白屈菜는 양속과 식물인 白屈菜 *Chelidonium majus* L.의 초본이며, 꽃이 피었을 때 채취하는데 지상 부분만을 취하여 曬乾하거나 또는 鮮用한다^{4,5)}.

白屈菜의 화학 성분에는 chelidinin, protochin, stylopin, allocryptopin, chellirubin, sanguinarin, coptisine, berberine, corysamine, sparteine, hydroxysanguinarine, homochelidoniin, celidoniol, choline, methylamine, tyramine, canadine 등이 있어, 중추 신경계에 대한 작용으로 중추신경을 억제하고, 鎮痛作用과 鎮靜作用, 催眠作用이 있으며, 平滑筋에 대한 抗痙攣作用, 鎮咳, 祛痰 및 平喘作用, 抗炎症作用, 抗菌, 抗病毒作用, 抗腫瘤作用 등이 있다^{5,6)}.

천식은 기도의 과민 반응을 동반한 알레르기 질환으로, 주요 병리적 소견이 기도 및 기관지의 염증이며, 항염증 약물요법으로 서양의학에서 clometasone, triamcinolone, flunisolide, fluticasone, cromolyn, nedocromil 등의 약물을 사용하고 있다⁷⁾.

白屈菜는 한의학적으로 苦味이면서 涼性으로 泄熱할 수 있으며, 鎮痛, 止咳, 利尿, 解毒作用이 있어, 胃痛, 腹痛, 腸炎, 痢疾, 慢性氣管支炎, 百日咳, 咳嗽, 黃疸, 水腫, 腹水, 疥癬, 瘡腫, 毒蛇咬傷에 사용된다⁵⁾.

이러한 白屈菜의 祛痰鎮咳作用, 抗炎症作用으로 임상에서 百日咳, 慢性氣管支炎에 응용되고 있는 것으로 보아, 喘息의 만성적인 기침과 기관지 염증에 유의성이 있을 것으로 사료된다.

이에 白屈菜가 천식의 병태에 주요하게 관여하는 호산구 및 면역세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 *in vitro* 실험을 수행한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 雄性 4주령의 C57BL/6 생쥐 20수를

한국생명공학연구원에서 공급받아 실험당일까지 고형 사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

① 시약

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate (DEPC), 3-4,5-dimethyl-thiazol-2,5-carboxymethoxy phenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), complete adjuvant, chloroform, collagenase, RPMI-1640 培養液, isopropanol, 적혈구용혈액, ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, lamide, magnesium chloride (MgCl₂), 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV), 10% (w/v) aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma), 는 Sigma 사 (USA) 제품을 사용하였으며, 牛胎兒血清 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, USA) 제품을, anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-Gr1-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD25-PE, anti-CD28-PE, anti-CD11b-FITC, anti-IgE-FITC anti-B220-PE, anti-CD69-FITC, propidium iodide (PI)와 RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, USA) 제품을, [methyl-3H] thymidine (Amersham, USA), anti-mouse IL-5R α-chain polyclonal antibody (AF553, R&D system) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

② 기기

본 실험에 사용된 기기는 熱湯抽出器 (대웅, Korea), 감압증류장치 (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (Eyela FDU-540, Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench, water bath, vortex mixer, ice-maker (Vision scientific Co., Korea), autoclave, deep-freezer (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, USA), Thermocycler system (MWG Biotech., Germany), homogenizer (Omni, USA), plate shaker (Lab-Line, USA) 및 ELISA reader (Molecular Devices, USA), cytopsin (한일과학, Korea), 형광광학현미경 (Nikon, Japan), 세포수집기 (Cell Harvester, USA), 방사선 측정기 (Liquid Scintillation Counter, LKB) 등을 사용하였다.

3) 약재

실험에 사용된 白屈菜 (*Chelidonium majus* L. ; *chelidonii herba*)는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 대전대학교 한의과 대학 본초학교실에서 대한 약전 기준에 부합되는 것만을 정선하여 사용하였다.

4) 白屈菜 추출물 분리

白屈菜 추출물(extract of *chelidonii herba* ; ECH) 분리는 우선 白屈菜 200 g에 각각 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 白屈菜 추출물을 냉동 (-84℃) 보관하면서 실험시에 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 기관지 천식 생쥐 모델

500 µg/ml의 난알부민 (ovalbumin : OVA)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate (Alum)를 PBS로 용해한 후 혼합한다. 이 혼합물을 10 N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750×g 에서 5분 동안 원심분리한다. 이 OVA/Alum 침전물을 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후 100 µg OVA를 0.2 ml로 조정하여 복강 내로 주사하여 전신감작을 시킨다. 이후 2주째에 생쥐를 마취한 후 난알부민 (500 µg/ml) 100 µl를 기도투여(i.t.)한다. 3주째부터 분무기를 이용하여 2.5 mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 6주 동안 비강 및 기도내로 흡입시킨다. 이때 대조군으로써 PBS 또는 Alum 만을 주사, 흡입시킨다.

2) 천식모델 생쥐의 폐에서 호산구 세포 분리

C57BL/6 생쥐에 500 µg/ml의 OVA와 10% (w/v) aluminum potassium sulfate를 0.2 ml (100 µg)을 복강내로 주사하여 전신감작을 시킨 후 2주째에 생쥐를 마취한 후 난알부민 (500 µg/ml) 100 µl를 기도투여(i.t.)한다. 3주째부터 분무기를 이용하여 2.5 mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 6주 동안 비강 및 기도내로 흡입시킨다. 천식이 유발된 생쥐의 폐를 적출하여 폐조직을 잘게 절편 한 후 2% 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI 1640 배지에 1 µg/ml의 collagenase IV를 가한 용액 15 ml로 37℃, shaking 배양기에서 30분 동안 5회 이상 조직을 분해 (digestion) 하여 폐 세포를

분리한다. 분리된 폐 세포는 배지로 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거한다. 이들 세포들로부터 ACK 용액을 37℃에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정한다.

3) 폐세포 배양

24 well plate에 폐세포 (2×10⁶cells)를 배양하고 白屈菜 추출물 (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)를 처리하고 1시간 후 rIL-3 (recombinant interleukin-3, 30 U/ml)와 rmIL-5 (recombinant mouse interleukin-5, 10 µg/ml)로 호산구 활성화 유발을 위하여 각각의 well에 첨가하여 48 시간 배양하였다.

4) 유세포 형광분석

배양 후 호산구 세포를 인산완충생리식염수 (3% 우태아혈청, 0.1% NaN₃)로 2회 수세하였고, 4℃에서 면역 형광염색을 실시하였다. 각각에 phycoerythrin (PE)-anti-mouse CD69, anti-mouse IgE, anti-CD3e-FITC, anti-CCR3-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE, anti-B220-PE 그리고 fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-mouse CD23등을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기로 생쥐 폐 세포에서 CD3e, CD4, CD8, CD69, CCR3, B220, CD23 (Fce) 그리고 CD69의 발현을 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램으로 CD69/CD3e, CD3e/CCR3, CD23/B220, 그리고 CD4/CD8의 비율 (gated, %)을 산출하였다.

5) 기관지천식생쥐의 폐조직의 역전사-중합효소 연쇄반응

(1) RNA 추출

배양한 호산구 세포에 RNAzolB 500 µl를 넣고 용해될 때까지 분쇄한다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 µl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 µl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 µl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성

화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(2) 역전사-증합효소 연쇄반응

역전사 반응은 준비된 total RNA 3 μg 을 75°C에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μl 10 mM dNTPs mix, 1 μl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor (20 U/ μl), 1 μl 100 mM DTT, 4.5 μl 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μl 의 M-MLV RT (200 U/ μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl 가 되도록 하였다. 이 20 μl 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 초간 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 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(3) cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in germany)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μl 의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), cyclooxygenase-2, 그리고 NOS-II 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/ μl)와 antisense primer (20 pmole/ μl)를 혼합하여 1 μl 를 가하고, 다시 3 μl 2.5 mM dNTPs, 3 μl 10 \times PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 μl Taq polymerase (5 U/ μl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μl 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation: 95°C, 5분, denaturation: 95°C, 5분, annealing: 55°C, 1분, elongation: 72°C, 1분을 25 cycles한 뒤 post-elongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μl 씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

6) ELISA analysis

생쥐 호산구 세포를 분리하여 96 well plate의 각 well에 2 \times 10⁵세포씩 분주하고, ECH (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)등을 처리했고, 약물처리 1시간 후 rIL-3나 rmIL-5를 48시간 동안 동시 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수하여 ELISA에 사용하였다. ELISA는 IL-4, IL-5, IgE, Histamine, IFN- γ

enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, USA))와 IL-13는 ELISA kit (R&D system, USA)을 48 시간 동안 배양 후 측정하였다. 각 항체 (antibody)를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 호산구 세포 배양상층액 (culture supernatant)을 100 μl 씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μl 를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μl 씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 μl 의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 생쥐 호산구 세포 증식

생쥐 호산구세포의 증식을 측정하기 위하여 96 well plate의 각 well에 2 \times 10⁵ 세포씩 분주하고, ECH (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)등을 처리했다. 약물처리 1시간 후 rIL-3와 rmIL-5를 72시간 동안 동시 배양하였다. 동시배양 40시간 배양 후 50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 의 [methyl-3H] thymidine을 첨가한 후 최종 48시간 배양하였다. 세포내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 세포만을 세포수집기를 사용하여 유리섬유여지 위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

8) IL-5R α -chain의 immunocytochemistry

생쥐 호산구 세포를 분리하여 24 well plate의 각 well에 2 \times 10⁵ 세포씩 분주하고, ECH (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)등을 처리했고, 약물처리 1시간 후 rIL-3와 rmIL-5를 24시간 동안 동시 배양하였다. 배양 종료 후 호산구 세포를 인산완충생리식염수 (3% 우태아혈청, 0.1% NaN₃)로 2회 수세하였고, 4°C에서 면역 형광염색을 실시하였다. 각각에 anti-mouse IL-5R α -chain polyclonal antibody를 넣고 얼음에서 30분간 반응시켰다. 1,700 rpm에서 5분간 수세한 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-goat IgG등을 넣고 다시 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 cytopsin에서 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 slide를 건조하였다. 이 슬라이드로부터 세포의 모양과 형광염색특징 등으로 면역세포의 type을 결정한다. 형광광학 현미경으로 400 \times 배율에서 관찰하여 IL-5R positive한 활성 호산구를 측정하였다.

9) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

결 과

1. 유세포 형광 분석

1) 과립구 및 림프구 분석

정상군에서의 과립구가 21.4%인 반면, rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서는 36.7%로 증가되었다. 반면에 rmIL-5/rIL-3와 ECH을 함께 처리한 실험군에서는 31.4%로 세포수가 감소되었다(Fig. 1).

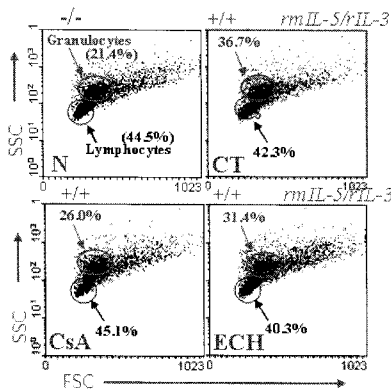


Fig. 1. Inhibitory effect of ECH on granulocytes/ lymphocytes population(%) in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 plus rmIL-5.

C57BL/6 mouse were exposed to OVA three times a week for 6 weeks. The mouse lungs were dissected out, chopped and dissociated with collagenase (1 μg/ml). Eosinophils were activated by rIL-3/rmIL-5 co-treatment. The lung cells were treated with extract of chelidonium herba (ECH), incubated for 48hrs at 37°C, and analyzed by flow cytometer.

N: Normal C57BL/6 mice.

CT: OVA-induced asthma lung cells.

CsA: Cyclosporin A (10 μg/ml)

ECH: OVA inhalation and ECH (100 μg/ml)

2) CD3e⁻/CCR3⁺ 호산구와 CD3e⁺/CCR3⁻ T 세포 수 분석

CD3e⁻/CCR3⁺ 호산구 수가 rmIL-5/rIL-3를 처리한 대조군은 정상군에 비해 20.8%로 증가된 반면, rmIL-5/rIL-3와 ECH을 함께 처리한 실험군에서는 12.7%로 세포수가 감소되었다(Fig. 2).

CD3e⁺/CCR3⁻ T 세포수가 rmIL-5/rIL-3를 처리한 대조군은 정상군에 비해 28.1%로 감소되었고, rmIL-5/rIL-3와 ECH을 함께 처리한 실험군에서는 35.1%로 세포수가 증가되었다(Fig. 2).

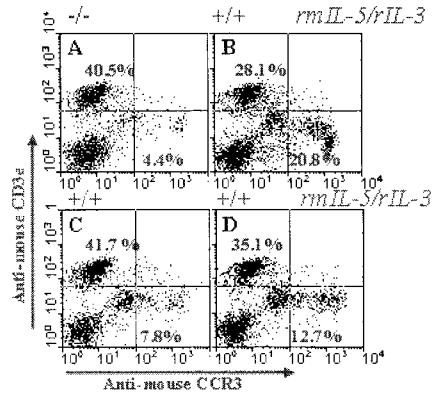


Fig. 2. Inhibitory effect of ECH on CD3e⁻/CCR3⁺ lymphocytes population(%) in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 plus rmIL-5

A: Normal C57BL/6 mice.

B: OVA-induced asthma lung cells.

C: Cyclosporin A(10 μg/ml)

D: OVA inhalation and ECH(100 μg/ml)

3) CD3e⁺/CD69⁺ T 세포, CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, CD23⁺/B220⁺ B 세포수 분석

CD3e⁺/CD69⁺ 세포수가 정상군에서는 7.8%였으며, rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서는 56.7%로 증가되었고, rmIL-5/rIL-3와 ECH을 함께 처리한 실험군에서는 38.2%로 감소되었다(Table 1).

Table. 1. The Effects of ECH on Lymphocytes Population (%) in Asthma-induced Lung Cells.

Group(%)	N	CT	CsA	ECH
CD3e ⁻ /CD69 ⁺	7.8	56.7	12.3	38.2
CD4 ⁺	19.3	58.4	32.4	42.7
CD8 ⁺	19.2	32.5	33.4	34.6
CD23 ⁺ /B220 ⁺	11.5	29.1	13.4	23.2

N: Normal C57BL/6 mice.

CT: OVA-induced asthma lung cells.

CsA: Cyclosporin A (10 μg/ml)

ECH: OVA inhalation and ECH (100 μg/ml)

CD4⁺:CD8⁺ 세포의 비율이 정상군에서 19.3% : 19.2%인 반면, rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서는 58.4% : 32.5%로 증가되었고, rmIL-5/rIL-3와 ECH을 함께 처리한 실험군에서는 42.7% : 34.6%로

CD4⁺ : CD8⁺ 비율이 감소되었다(Table 1).

CD23⁺/B220⁺ 세포의 비율이 정상군에서는 11.5% 인 반면, rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서는 29.1%로 증가되었다. rmIL-5/rIL-3와 ECH을 함께 처리한 ECH을 처리한 실험군에서는 23.2%로 감소되었다(Table 1).

2. RT-PCR 분석

유전자 발현 정도를 측정할 수치를 HT값이라 하며, IL-4의 그룹별 HT값을 측정할 결과, rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서의 값이 85인 반면, rmIL-5/rIL-3와 ECH을 각각 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml씩 처리한 실험군의 HT값이 54, 72, 92로 감소되었다(Fig. 3).

IL-5의 그룹별 HT값을 측정할 결과, rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서의 HT값이 120인 반면, rmIL-5/rIL-3와 ECH을 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml씩 각각 처리한 실험군의 HT값이 30, 54, 98로 감소되었다(Fig. 3).

IL-13의 그룹별 HT값을 측정할 결과, rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서의 HT값이 68로 증가된 반면, rmIL-5/rIL-3와 ECH을 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml씩 각각 처리한 실험군의 HT값이 41, 74, 73으로 감소되었다(Fig. 3).

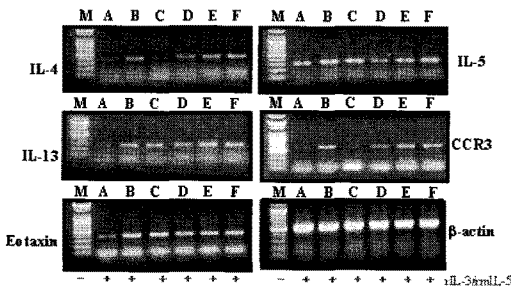


Fig. 3. Effect of ECH on IL-4, IL-5, IL-13, CCR3, eotaxin mRNA gene expression in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 plus rmIL-5

C57BL/6 mice were exposed to OVA three times a week for 6 weeks. The mouse lungs were dissected out, chopped and dissociated with collagenase (1 μ g/ml). Eosinophils were activated by rIL-3/rmIL-5 co-treatment. The lung cells were treated with extract of chelidonium majus L. (ECH), incubated for 6 hr at 37°C, and analyzed by RT-PCR. A: Normal C57BL/6 mice. B: rIL-3/rmIL-5 + OVA-induced asthma lung cells. C: rIL-3/rmIL-5 + cyclosporin A (CsA 100 μ g/ml). D: rIL-3/rmIL-5 + OVA inhalation and ECH (100 μ g/ml). E: rIL-3/rmIL-5 + OVA inhalation and ECH (10 μ g/ml). F: rIL-3/rmIL-5 + OVA inhalation and ECH (1 μ g/ml). Internal loading control: β -actin and DNA 100 bp marker (M).

CCR3의 그룹별 HT값을 측정할 결과, rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서의 HT값이 정상군에 비해 60으로 증가된 반면, rmIL-5/rIL-3와 ECH을 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml 농도로 각각 처리한 실험군의 HT값이 24, 38, 49로 감소되었다(Fig. 3).

Eotaxin의 그룹별 HT값을 측정할 결과, rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서의 HT값이 정상군에 비해 120으로 증가된 반면, rmIL-5/rIL-3와 ECH을 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml 농도로 각각 처리한 실험군의 HT값이 46, 78, 75로 감소되었다(Fig. 3).

3. ELISA analysis

IL-4의 분석결과, 정상군에 비해 rmIL-5/rIL-3를 처리한 대조군에서 증가되었고, rmIL-5/rIL-3와 CsA, ECH를 100 μ g/ml 농도로 처리한 실험군에서 유의성있게 감소되었다(Fig. 4).

IL-5의 분석 결과, 정상군에 비해 rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서 증가되었고, rmIL-5/rIL-3와 CsA, ECH를 100 μ g/ml 농도로 함께 처리한 실험군은 감소되었으나 유의성있게 감소되었다(Fig. 4).

IL-13의 분석결과, 정상군에 비해 rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서 증가되었고, rmIL-5/rIL-3와 CsA, ECH를 100 μ g/ml 농도로 함께 처리한 실험군은 유의성있게 감소되었다(Fig. 4).

Histamine release를 살펴본 결과, 정상군에 비해 rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서 증가되었고, rmIL-5/rIL-3와 CsA, ECH를 100 μ g/ml 농도로 함께 처리한 실험군은 유의성있게 감소되었다(Fig. 4).

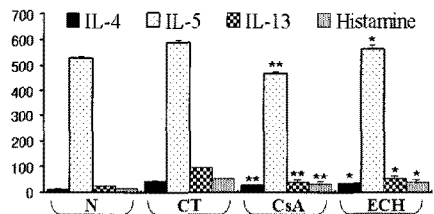


Fig. 4. Effect of ECH on IL-4, IL-5, IL-13, histamine production levels in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 and rmIL-5

The results are expressed the mean \pm S.E.M. (N=5). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's paired test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% and 99% or higher(*p<0.05, **p < 0.01). N : Normal C57BL/6 mice. CT : rIL-3/rmIL-5 + OVA-induced asthma lung cells. CsA : rIL-3/rmIL-5 + OVA inhalation and cyclosporin A (10 μ g/ml). ECH : rIL-3/rmIL-5 + OVA inhalation and ECH (100 μ g/ml).

4. Eosinophil proliferation

호산구 증식 억제 작용에 미치는 영향을 살펴보면, rIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서 eosinophil proliferation은 18847±1527인 반면, 양성 대조군인 CsA 처리군은 4676±972으로 감소되었다. rIL-5/rIL-3와 ECH을 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml 농도로 함께 처리한 실험군에서의 eosinophil proliferation은 7709±549, 16839±1403, 16385±1723으로 나타났다(Fig. 5).

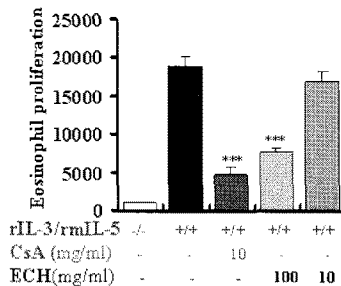


Fig. 5. Effect of ECH on eosinophil proliferations in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 plus rIL-5

The results are expressed the mean ± S.E.M. (N=5). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's paired test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 99.9% or higher (***) p < 0.001.

5. IL-5R α-chain의 Immunocytochemistry

rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군(B)에서 호산구의 활성화도가 높을 것을 볼 수 있으며, rIL-3/rmIL-5와 ECH을 100 µg/ml 농도로 함께 처리한 실험군(D)에서 호산구의 활성이 저하되었음을 볼 수 있다(Fig. 6).

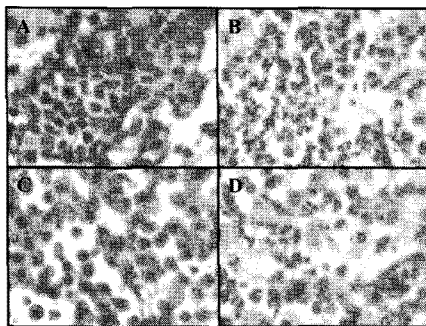


Fig. 6. Effect of ECH on immunohistological eosinophils in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 plus rIL-5

- A: Normal C57BL/6 mice.
- B: rIL-3/rmIL-5 + OVA-induced asthma lung cells.
- C: rIL-3/rmIL-5 + Cyclosporin A (CsA, 10 µg/ml).
- D: rIL-3/rmIL-5 + OVA inhalation and ECH (100 µg/ml).

고찰

천식이란 기관지가 정상인보다 민감해서 조그마한 자극에도 쉽게 반응하기 때문에 생기는 질병으로,喘鳴을 동반한 발작적인 호흡곤란의 증상으로 정의하는데,喘息의 유발인자로 서양의학에서는 allergy, 식품 또는 식품 첨가물, 아스피린 또는 다른 약제들, 감정, 자극물질, 기후 조건 및 대기 오염, 감기와 같은 호흡기 감염, 운동 등을 들고 있는데, 알러지와 기관지염, 운동이나 스트레스 등의 원인으로 발병, 공기가 폐로 들어가는 통로인 기관지나 세기관지가 부어오르고 분비물(痰)이 늘어나 기관지나 세기관지가 경련을 일으키기 때문에 나타난다고 알려져 있다.

哮喘의 한의학적 유발 원인으로는 寒冷說, 心因說, 痰因說, 素因說, 感染說, 과민성 반응, 肺腎의 呼吸機能障礙가 있다고 알려져 있고, 哮喘의 종류로는 水哮, 冷哮, 寒包熱哮, 風痰哮, 食哮, 醋酸哮가 있다²⁾.

喘息의 증상 중에서 가장 특징적인 것은喘鳴을 동반한 발작적인 기침과 호흡곤란이 심하게 나타나는 것이며 청색증이 나타나기도 하고, 그 증상이 말도 잘 못할 정도로 심하며, 심한 피로증세를 동반하여 불안, 혼란 등의 정신적인 변화까지 일으킬 수 있다.

한의학적인 치료 방법은 實證의 증상에는 病邪를 제거하는 치료방법을 응용하며, 虛證의 증상에는 肺虛, 腎虛의 정기가 虛한 증상을 치료하는 방법을 응용한다. 치료 원칙은 발작기에는 宣肺豁痰하는 것이 중점이 되며, 완해기에는 肺, 脾, 腎의 근본을 치료하여야 하며, 補益脾肺하거나 肺腎을 雙補한다³⁾. 발작기이며 實證일 경우에는喘息의 발작전 상태로 회복시키는 것이다. 발작기에는 風寒, 痰濁, 肺熱 등의 원인을 없애주는 치료를 하는 것이고, 風寒型에는 小青龍湯, 痰濁型은 三子養親湯, 葶藶大棗瀉肺湯, 肺熱型은 解表二陳湯, 麻杏甘石湯 등을 응용하여 체질에 맞게 치료한다. 완해기이며, 虛證일 경우에는 체질적인 素因도 개선시키는 치료를 하게 된다. 肺虛에는 生脈散이나 補肺湯, 脾虛에는 六君子湯, 腎虛에는 金匱腎氣丸, 金水六君煎 등의 처방으로 치료한다⁸⁾.

이와 관련된 한의학 실험 연구로는 李 등⁹⁾이 五拗湯의 진정, 진통, 진해, 항 histamine, 기관지 평활근 이완효과를 보고하였고, 權 등¹⁰⁾이 五拗湯이 알러지 천식의 호흡 양상과 기관 조직에 미치는 영향을 보고하였으며, 姜 등¹¹⁾이 소염의 천식 억제 효과를 연구 보고 하였으며, 金 등¹²⁾이 동충하초 약침과 구강투여가 OVA 감작으로 유발된 천식에 효과가 있음을 보

고하였고, 金 등¹³⁾이 conalbumin으로 유도된 알레르기성 염증 반응에 억제 효과가 있음을 보고하였으며, 杏仁 추출물이 BALF내에 존재하는 총세포수, 호산구수, IgE 항체 등을 대조군에 비해 감소시킨다는 연구 보고¹⁴⁾와 忍冬 추출물이 과민 반응에 의한 적출기관지 수축, 비만세포에서의 histamine 유리 그리고 폐기관지내의 총 백혈구 수 및 호산구 증가를 억제시킨다는 연구 보고¹⁵⁾가 있다.

그런데 아직까지 白屈菜의 천식에 대해 미치는 연구가 이루어지지 않았고, 白屈菜의 平喘, 解毒消炎하는 본초학적 효능이 천식 치료에 유의성이 있을 것으로 생각되어 *in vitro* 실험을 행하였다.

1986년 Mosmann 등¹⁶⁾은 설치류의 T-림프구 클론에서 IL-2와 IFN- γ 를 생성하는 Th1 세포와 IL-5, IL-6 및 IL-10 등을 생성하는 Th2 세포가 존재함을 보고하였다.

Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며 즉시형 과민반응, 예를 들어 喘息과 같은 알러지성 질환, 기생충 감염에 대한 방어작용에 관여한다¹⁷⁾. Th1 세포와 Th2 세포는 서로 길항 작용을 나타내어 기능이 억제되는 현상이 관찰되며 알러지성 喘息 환자의 폐포 세척액에는 Th2 세포의 기능이 활성화됨이 관찰되고 있다¹⁸⁾.

알러겐이 점막을 통과하여 면역계에 노출되고, 노출된 극소량으로 Th2-유도 IgE 반응들을 시작하는 특히 IgE 항체 생성에는 IL-4와 IL-13을 생성하는 Th2 세포를 필요로 하며, IFN- γ 를 생성하는 Th1 세포에 의하여 억제될 수 있다. 수지상 세포들은 단백질 항원들을 매우 능률적으로 잡아들이고 조각하며, 이 과정 중에 세포들이 활성화된다. 이어서 활성화된 세포는 지역 림프절로 이동하여 공통 자극성 능력을 갖는 전문적인 항원제시세포들로 분화되는데, 이들 분화된 세포는 Th2 세포들의 분화를 유도한다¹⁹⁾.

B 세포들이 IgE를 생성하도록 클래스 전환하는 것은 Th2 세포들에 의해서 제공되는 각기 다른 두가지 신호들에 의해서 유도되어진다. 첫 번째 신호는 B 세포표면에 있는 수용체들과 상호작용을 하는 IL-4나 IL-13과 같은 cytokine들에 의해 제공된다. 두 번째 신호는 B 세포 표면에 있는 CD40과 관련된 T 세포 표면의 CD40리간드 사이의 공통자극 작용이다. 이들 상호 작용은 모든 항체들의 클래스 전환에 기본이 된다.

IgE 반응이 일단 시작되면 IgE 생성을 일으킬수 있는 호염구, 비만세포, 활성화된 호산구에 의해 훨씬 더 증폭될 수 있다. 비록 호산구는 활성화 될 때만

Fc ϵ RI를 발현하지만, 세 종류의 세포는 모두 Fc ϵ RI를 표현한다. 이러한 특화된 과립구들의 Fc ϵ RI결합 IgE가 항원에 의한 교차결합으로 활성화되면 그들은 세포 표면에 CD40을 표현할 수 있게 되고 IL-4를 분비한다. 따라서 Th2 세포들과 마찬가지로 이들(호염구, 비만세포, 활성화된 호산구)은 클래스 전환을 일으킬 수 있으며, B 세포들에 의해 IgE를 생성할 수 있게 된다¹⁹⁾. 이처럼 喘息은 결합한 IgE와 재차 접촉된 알러겐과 상호작용에 의하여 이러한 세포들이 활성화되어 매개물질들 즉 histamine 등을 방출하고 이 분비된 매개 물질들에 의하여 즉시형 과민 반응이 일어난다²⁰⁾.

Th2 세포는 eotaxin, RANTES, MIP-1a와 MCP-3과 같은 β -chemokine들을 생성하여, 호산구를 기도 내로 주유하며, IL-5, IL-3 및 GM-CSF를 분비하여 호산구의 분화, 성숙, 활성화 및 생존을 증가에 관계한다. 기도의 침윤된 호산구 내에서는 MBP, ECP, eosinophil-derived neurotoxin 등이 분비되어 기도 손상을 유발한다²¹⁾.

이에 저자는 C57BL/6 생쥐를 이용하여 OVA로 천식을 유발시킨 뒤, 폐세포를 분리하여, 白屈菜가 호산구 및 면역세포에 미치는 영향을 유세포 분석(FACS), RT-PCR 유전자 분석, ELISA 분석, 면역형광염색 분석을 통해 알아보았다.

FACS 분석을 통한 과립구 및 림프구 분포양상을 보면, 정상군에서 21.4%를 보였고, mL-5/rIL-3을 처리한 대조군에서는 증가하여 36.7%를 보이고 있다. 이에 비해 ECH를 투여한 실험군에서는 31.4%로 과립구 숫자가 감소되었다. 이는 白屈菜가 기관지 및 기도에서 발생하는 만성염증 유발시키는 세포의 활동을 억제하는 작용이 있음을 나타낸다(Fig. 1).

CD3는 T 세포 결정표식인자로, T 세포 항원 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포안으로 전달한다²¹⁾. CCR3는 호산구에서 가장 높게 발현이 되고, 호염기구, Th2 세포, 천식 환자의 기도 상피 세포에서 보이며, 호산구의 활성화와 탈과립화에 관여하는 것으로 보여진다²²⁾.

喘息 유발 생쥐의 기관지 폐포 세척액에서 FACS 분석 결과 CD3 ϵ /CCR3⁺ 세포는 대조군에서 20.8%, ECH 투여군은 12.7%로 감소되었다(Fig. 2). 이는 과민성 알러지 반응에 주요하게 관여하는 Th2 세포의 분포양상이 ECH 투여군에서 감소되었음을 의미한다.

CD69는 활성화된 B 세포와 T 세포, 대식 세포, NK 세포에 분포하며²²⁾, T 세포의 초기 활성화를 나타내며, 활성화된 호산구에서 분비되므로 喘息환자의

기도에서 호산구 침윤의 표지로 사용될 수 있다¹⁹⁾. CD3⁺/CD69⁺ 세포수를 분석한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 56.7%로 증가되었으며, ECH 투여군은 38.2%로 감소되었다. 이는 활성화 T 세포의 감소를 나타낸다(Table 1).

과민성 알레르기 피부염 환자의 생검에서 호산구와 CD4⁺ T 세포의 침윤이 특징적이고 이들 T 세포에서 Th2 세포 유형의 사이토카인이 분비된다고 하며, 폐 조직에서는 BALF에는 CD3⁺ T 세포, CD4⁺ T 세포, CD4⁺/CD8⁺의 비율이 증가한다. 정상인에서 CD4와 CD8의 비율은 대체로 1.5~2:1의 비율을 유지한다고 한다²³⁾. CD4⁺ T 세포는 여러 종류의 사이토카인을 생산하여 B 세포가 효율적으로 항체를 생산하도록 도와주고 면역반응의 행동세포를 활성화시키는 역할을 하므로 CD4⁺ T 세포의 비율은 일반적으로 면역력의 지표로도 광범위하게 응용되고 있다²²⁾.

FACS 분석에서 CD4⁺ 세포는 대조군에서 58.4%로 증가되었고, ECH 투여군은 42.7%로 감소되어 알러지 반응을 촉진시키는 CD4⁺ T 세포의 감소를 보였다(Table 1).

CD23은 성숙된 B 세포, 활성화된 대식세포, 호산구, 수지상 세포등에서 발현되며, IgE에 대해 낮은 친화력을 가지고 있고, IgE 합성을 조절하며, CD19, CD21, CD81에 대한 co-receptor를 위한 리간드이다¹⁹⁾.

B220는 생쥐의 B 세포의 표지분자(58)로 IgE 항체는 B 림프구에 의해 생성 된다²⁴⁾.

CD23⁺/B220⁺ 세포수의 변화가 정상군에 비해 대조군에서 29.1%로 증가되었으나, ECH을 처리한 실험군에서의 세포수는 23.2%로 감소되었다(Table 1). 이는 알레르기 반응에 주요하게 작용하는 B 세포의 활성이 억제되었음을 의미한다.

RT-PCR 분석을 살펴보면, IL-4는 Th2 세포에서 방출되어 여러 종류의 면역세포에 작용하여 다양한 면역조절기능을 나타내고 있는데 활성화된 B 세포, T 세포 및 thymocyte의 증식을 유도하며, monocyte의 증식을 유도하며, monocyte의 활성화 및 비만세포의 증식과 성숙을 촉진한다. 특히 B 세포의 분화에 관한 작용으로 IgE의 생성과 분비를 유도하고, II형 IgE 수용체인 FcεR II의 발현을 증가시킨다. 이러한 IL-4의 기능은 알레르기 반응의 주조절인자로서 중요하다²⁰⁾.

IL-5는 호산구의 분화증식을 항진시켜 호산구 매개염 증반응 조절에 관여하므로 IL-5의 억제제가 알레르기성 호흡기질환의 치료에 유용할 것으로 보고되고 있다¹⁸⁾.

IL-13은 Th2에서 분비되는 사이토카인으로 Th1

세포를 억제하며, IgE의 생성을 유도하여 알레르기성 염증 반응의 병인에 관여한다고 하였다^{19,25)}.

RT-PCR 분석에서, IL-13, IL-4, IL-5, IL-13의 HT값을 비교 분석한 결과 대조군에 비해 ECH 투여군에서 HT값이 유의성 있게 감소되었다(Fig. 3). 이는 ECH이 기관지 천식 염증에 관여하는 호산구, 대식세포, Th2세포의 발현양상이 감소됨을 의미하여 면역세포의 증식과 천식 억제 작용이 있음을 나타낸다.

Eotaxin은 CCR3를 수용체로 하며 호산구를 target cell로 하는 케모카인으로, RT-PCR 분석 결과 각각 ECH 추출 농도별로 HT값이 감소함을 볼 수가 있다(Fig. 3). 이는 호산구, Th2 세포의 활성이 억제되었음을 알 수가 있다.

ELISA 분석을 살펴보면, BALF 내 IL-4, IL-5, IL-13가 rIL-3, rmIL-5를 처리한 대조군에서는 현저하게 증가되는 것이 관찰되었고, ECH를 투여한 실험군에서는 유의성 있게 모두 감소되었다(Fig. 4). 히스타민의 혈관확장 작용에 의해 즉시형 과민반응의 구진과 발적 확장이 일어나게 되며, 히스타민 생성에 미치는 영향을 살펴보면, 대조군에 비해 ECH이 처리된 경우 히스타민 생성량이 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4). 이는 ECH이 알러지 반응에 주된 인자로 알려진 사이토카인과 히스타민의 생성 억제에 유의한 작용이 있음을 보여주며, 이는 RT-PCR 실험 결과와도 부합된다(Fig. 3).

호산구 증식에 미치는 白屈菜의 영향은 대조군의 호산구 증식세포수가 18847±1527인 반면, 양성 대조군인 CsA 처리군은 4676±972로 감소되었다. ECH을 100 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml 농도로 처리한 실험군의 호산구 증식세포수는 각각 7709±549, 16839±1403, 16385±1723로 나타났다(Fig. 5). 이는 ECH이 호산구 증식에 유의성 있게 억제 작용을 하고 있음을 알 수가 있다.

위의 내용을 요약해 보면, 白屈菜는 성질이 차고 청열하며 해독시켜 항염 작용이 있으며, 진해거담의 효능이 있으므로 천식 치료에 유의성이 있을 것으로 판단하고 *in vitro* 실험을 시행하였다. 그 결과 FACS, ELISA, RT-PCR, lymphokine assay, 면역형광 염색 실험 결과에서, 호산구 및 면역세포의 분화, 증식, 활성을 억제되었으며, 이에 *in vivo* 실험을 통해 효과기전을 규명할 필요가 있다고 사료된다.

결론

白屈菜가 천식 유발 생쥐의 폐세포에 미치는 영향

을 알아보기 위해, C57BL/6 정상 생쥐에 OVA를 감작시켜 천식을 유발시킨 뒤, 폐세포를 분리 배양하여 *in vitro* 실험을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. FACS 분석 결과, 정상군의 granulocytes, CD3e⁺/CCR3⁺, CD3e⁺/CD69⁺, CD4⁺, CD23⁺/B220⁺ 세포수에 비해, rmIL-5/rIL-3을 처리하여 배양한 대조군의 세포수가 증가되었다. 반면에 rmIL-5/rIL-3와 ECH을 함께 처리하여 배양한 실험군의 세포수는 유의성 있게 감소되었다.

2. RT-PCR 분석 결과, rmIL-5/rIL-3을 처리한 대조군의 IL-4, IL-5, IL-13, CCR3, eotaxin mRNA 유전자 발현량이 증가되었음을 확인할 수 있었다. rIL-3/rmIL-5와 ECH 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 함께 처리한 실험군의 mRNA 유전자 발현량은 대조군에 비해 감소되었다.

3. ELISA 분석 결과, rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군의 IL-4, IL-5, IL-13, histamine 발현량이 증가된 반면, rIL-3/rmIL-5와 ECH 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 함께 처리한 실험군의 발현량은 유의성있게 감소되었다.

4. rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군의 호산구 증식이 18847 ± 1527 로 증가되었고, rIL-3/rmIL-5와 ECH 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 함께 처리한 실험군의 호산구수는 7709 ± 549 , 16839 ± 1403 , 16385 ± 1723 로 나타나, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 유의성을 증식이 억제되었다.

5. Immunocytochemistry 분석 결과, rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군에서 호산구의 활성화도가 높을 것을 볼 수 있으며, rIL-3/rmIL-5와 ECH을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 함께 처리한 실험군의 호산구의 활성이 저하되었음을 볼 수 있다.

이상의 결과로 보아 白屈菜가 호산구 및 Th2 세포, B 세포의 분화, 성숙, 활성화에 억제 작용을 가지고 있으며, 이러한 작용으로 천식에 유효한 효과가 있을 것으로 생각되며, *in vivo* 실험연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Hartert. T.V., Peebles. R.S. Epidemiology of asthma: the year of review. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2000 ; 6 : 4-9.
2. 李珩九, 鄭昇杞. 동의학계내과학. 서울:아트동방.

1999 : 162-202.

3. 윤혜선, 차재국, 이해란. 소아 천식의 근황과 치료 경향에 관한 조사. 소아 알레르기 및 호흡기학회지. 1998 ; 8(2) : 167-178.

4. 全國韓醫科大學共同教材編纂委員會 編著. 本草學. 서울:永林社. 2004 : 728.

5. 中華本草編委會. 中華本草4卷. 上海: 上海科學技術出版社. 1999 : 113.

6. 川秀治 等譯. 生物學. 東京:東京廣川書店. 1972 : 262.

7. 전국의과대학교수역. 오늘의 진단 및 치료. 서울:한우리. 1999 : 287-295.

8. 方藥中外. 實用中醫內科學. 서울:醫聖堂. 1993 : 157-159.

9. 李珩九. 五拗湯이 해수, 천식에 미치는 영향. 서울. 경희대학교 대학원. 1982

10. 權純湖. 五拗湯이 알레르기 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향. 대한 한의학회지. 1999 ; 20(2) : 98-107.

11. 강영성, 이성철, 신호동, 신민교, 김재홍, 송호준. 소엽에 의한 알레르기 천식효과에 대한 연구. 대한본초학회지. 2004 ; 19(3) : 25-34.

12. 김재홍. 동충하초 약침과 구강투여가 Ovalbumin으로 유발된 asthma에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 ; 19(2) : 39-50.

13. 김성수, 이성철, 신호동, 신민교, 김재홍, 송호준. 길경에 대한 알레르기 천식 효과에 대한 연구. 대한본초학회지. 2004 ; 19(2) : 61-70.

14. 황대룡. 杏仁의 알레르기 천식 효과에 대한 연구. 대한본초학회지. 2003 ; 18(2) : 201-8.

15. 류근호. 忍冬 추출물의 항천식 효과. 생약학회지. 1999 ; 30(4) : 377-83.

16. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Gieldin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clones. *J. Immunol.* 1986 ; 136 : 2348-57.

17. 박수영, 조영주. 내인성 喘息 및 외인성 喘息 환자의 CD8양성세포에서 interleukin4 및 interferon gamma 생산. 喘息 및 알레르기. 2001 ; 21(1) : 66-7.

18. Kasakura S. A role for T helper type 1 and type 2 cytokine in the pathogenesis of various human diseases. *Rinsho Byori. Symp.* 1998 ; 46(9) : 915-21.

19. Charles A Janeway 著, 김태규외 10인譯. 면

역생물학(제5판). 서울:라이프사이언스. 2002 : 698, 703, 714.

20. Hida M. Histamine releasing mechanism from rat peritoneal mast cells by phospholipase. *Biochem. Pharmacol.* 1978 ; 27 : 2115-8.

21. Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB. T-lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet.* 1988 : 1129-32.

22. Nicolas W. Lukacs. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nature review.* 2001 ; (1) : 108-16.

23. 김세종. 면역학. 서울 : 고려의학. 1994 : 3, 8, 25, 26, 28, 31, 32.

24. Mehlhop PD, Van De Pijn M, Goldberg AB, Brewer JP, Kurup VP, Martin TR, Oett gen HC. Allergan-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma. *Immunology.* 1997 : 1344-9.

25. 이숙영, 송정섭, 김영균, 김관형, 문화식, 박성학. 기관지천식의 기도과민 반응과 기관지폐포세척액 소견. *대한내과학회지.* 1995 ; 48(2) : 171-80.