

천식모델을 이용한 호도, 파고지 및 두 배합약물의 실험적 연구

권택현², 이영철², 이장천^{1*}

1: 부산대학교 한의학전문대학원 2: 상지대학교 한의과대학

The Synergistic Effect of *Juglans sinensis*, *Psoralea corylifolia*, and Their Combination on the Asthmatic Murine Model

Taek-Hyun Kwon², Young-Cheol Lee², Jang-Cheon Lee^{1*}

1: School of Oriental Medicine, Pusan National University

2: College of Oriental Medicine, Sangji University

ABSTRACT

Objectives : To clarify the possible effect of JS (*Juglans sinensis*), PCF (*Psoralea corylifolia* L.), and J+P(JS +PCF), we examined their influence on the development of pulmonary eosinophilic inflammation in the asthmatic murine model.

Methods : All mice were immunized on two different days (21 days and 7 days before inhalational exposure) by intraperitoneal injections of 0.2 ml alum-precipitated Ag containing 100 µg of OVA bound to 4 mg of aluminum hydroxide in PBS. Seven days after the second sensitization, mice were exposed to aerosolized ovalbumin for 30 minutes/day on 3 days/week for 8 weeks (at a flow rate of 250 L/min, 2.5% ovalbumin in normal saline) and, JS, PCF and J+P (200 mg/kg, 400 mg/kg) were orally administered 3 times per week for 8 weeks.

Results : The suppressive effects of JS, PCF, and J+P were demonstrated by the accumulation of eosinophils into airways, with the reduction of eosinophils and lung leukocytes. These were correlated with the marked reduction of IL-4, IL-5, IL-13 levels in the BALF and serum. OVA-specific IgE levels were also decreased in serum and BAL from these mice. And also JS, PCF, and J+P decreased eosinophilic CCR3 and CD11b expression in lung tissue.

Conclusions : These results indicate that JS, PCF, and J+P have deep inhibitory effects on airway inflammation and hyper-responsiveness in the asthmatic murine model. The suppression of IL-5, IgE, and eosinophils and the increase of IFN-γ production in BALF seem to contribute to these effects. Specially, eosinophils and TNF-α in J+P combination group were significantly reduced in BALF and lung tissue. Hence, the results indicated that JS, PCF, and J+P could act as an immuno-modulator which possesses anti-inflammatory and anti-asthmatic property by modulating the imbalance between Th1 and Th2 cytokines.

Key words : *Juglans sinensis*, *Psoralea corylifolia*, anti-inflammation, anti-asthmatic property, Th1, Th2

서론

胡桃 및 破古紙가 들어있는 처방은 《東醫寶鑑》의 靑娥元에서 찾아볼 수 있고 처방의 약물은 杜冲, 破古紙, 胡桃, 生薑으로 구성되어 있으며 효능은 “溫腎益精하여

上部로는 喘嗽를 치료하고 下部로는 腰脚을 강하게 한다. 고로 腎不納氣者의 哮喘證에 적용할 수 있다”¹⁾라 하여 虛證性 喘息에 靑娥元이 사용되고 있음을 보여주고 있다.

靑娥元의 구성약물 중 이 실험에 사용된 破古紙와 胡

* 교신저자 : 이장천, 경남 양산시 물금읍 범어리 부산대학교 한의학전문대학원

· Tel : 051-510-8459 · E-mail : jcl7788@pusan.ac.kr

· 접수 : 2009년 5월 15일 · 수정 : 2009년 6월 17일 · 채택 : 2009년 6월 22일

桃의 효능을 살펴보면, 破古紙는 補腎壯陽, 固精縮尿, 溫脾止瀉 등의 효능이, 胡桃는 補腎益精, 強腰膝 斂肺定喘 潤腸 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다²⁾.

喘息은 한의학의 哮喘에 해당되며³⁾ 呼吸急促者 謂之喘 喉中有聲響者 謂之哮라 구분하기도 하나, 清代 이후로는 哮喘에는 喘促症이 겸하여 나타난다 하여 哮喘證을 하나의 證候로 보았다⁴⁾.

그 치료법은 外感風寒 痰濕內盛 등으로 인한 實證과, 肺虛 心腎虛損 上實下虛 등으로 인한 虛證으로 구분하여 치료하게 되는데, 實證은 祛風散寒 宣肺定喘 燥濕化痰 降氣定喘시키고, 虛證은 養肺定喘 納氣定喘시켜 치료한다⁵⁾.

반면에 현대 의학에서는 천식을 환경적 요인과 유전적 요인이 복합적으로 작용되어서 나타나는 증상으로 설명하고 있는데⁶⁾, 그로 인하여 기관지평활근의 수축이 증가되고 기관지벽이 붓게 되면서 점액물질이 생성되어, 호산구 및 염증세포가 침윤되어 기도저항이 증가되어 기침이 나오면서 호흡이 곤란해져 천명증이 유발되는 것으로 말하고 있다⁷⁾. 여기서 호산구는 조직손상과 기도 과민반응을 포함한 천식의 임상적 특징을 유발하는 원인이 되어 기관지 수축 및 염증매개물질로 알려진 histamine, leukotriens 등의 분비를 야기하는 것으로 알려져 있다⁷⁾.

즉 이것은 type 1 helper cell (Th1) cytokine인 IFN- γ 에 비해 type 2 helper cell (Th2) cytokines인 IL-4, IL-5 등의 과다한 생성으로 유발되는 기관지점막의 만성 염증성질환으로 설명된다.

한편 胡桃, 破古紙에 대한 연구보고를 보면, 胡桃는 감기치료에 효과적이며 암과 위통치료에도 사용되며⁸⁾, LDL (low density lipoprotein)을 낮추고⁹⁾ 항산화¹⁰⁾ 등의 작용이 있는 것으로 나타나 있고, 破古紙는 phyto-estrogen의 일종인 genistein이 추출되는데¹¹⁾ 이것은 estrogen이 부족한 골조직 소실을 방지할 수 있으며¹²⁾, 또한 破古紙의 추출물(extract)이 골조직에 도움을 준다는 보고¹³⁾ 외 간기능장애, 신장질환의 치료에 사용되고¹⁴⁾ 항산화작용¹⁵⁾, 건선의 치료¹⁶⁾ 면역조절능력¹⁷⁾ 등이 있다고 보고 되어 있다. 이와 같이 胡桃, 破古紙에 대한 연구보고는 많으나 동물모델을 이용한 항 천식효과에 관한 실험보고는 찾을 수 없었다.

이에 본 연구는 胡桃, 破古紙 및 두 배합약물의 천식 억제효과를 알아보기 위하여, C57BL/6 생쥐에 ovalbumin으로 천식을 유발한 후 기관지폐포세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)에 존재하는 총 백혈구수, 총 호산구수, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , Eotaxin, IgE 유출량과 혈청에서 IgE와 histamine 유출량과 폐조직내 CD3, CD19, CD3/CD69, CD4, CD8, Gr-1/CD11b 발현세포와 IL-5, IL-13, TNF- α 의 유전자 발현분석을 하였으며 조직학적으로 H&E, M-T 염색법을 통한 폐 세포조직의 관찰을 통하여 유의성 있는 효능을 확인할 수 있었

기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약물

실험에 사용된 약제는 胡桃(*Juglans sinensis* DODE. : JS), 破古紙(*Psoralea corylifolia* L. : PCF)이며, 대한민국 대전체화건재사에서 구입하여 상지대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정한 후 정선하여 사용하였다.

2) 동물

동물은雌性인 5주령의 C57BL/6 생쥐 45수를 (주) 대한바이오링크(충북 음성, *대한민국*)에서 공급받아 실험 당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2°C를 유지하여 2주간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 시약

diethylpyrocarbonate (DEPC), MTS, 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), complete adjuvant, chloroform, collagenase, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구용혈액(RBC lysis solution), ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formalin, lamide, magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma사 (USA), 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Hyclone), anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-Gr1-PE, anti-CD8- FITC, anti-CD11b-FITC, anti-IgE-FITC anti-CD69- FITC, propidium iodide (PI)와 RNase는 Pharmingen사, rIL-5는 R & D system사의 제품을 이용하였다.

2. 방법

1) 시료의 추출

胡桃, 破古紙 및 두 배합약물(1:1)을 각각 200 g에 각각 증류수 2,000 ml를 가한 뒤 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압증류장치(rotary vacuum evaporator, BUCHI B-480, *Switzerland*)로 농축하고, 다시 동결 건조기(freeze dryer, EYELA FDU-540, *Japan*)를 이용하여 완전건조한 시료 26, 24, 25 g을 냉동(-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 천식 생쥐모델

500 μ g/ml의 난알부민(ovalbumin : OVA)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma)를 PBS로 용해한 후 혼합한다. 이 혼합물을 10 N NaOH로 pH를

6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750 xg에서 5분동안 원심분리하였다. 이 침전물(pellet)에 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후 100 µg OVA를 0.2 ml로 조정하여 복강내로 주사하여 전신감작을 시키고, 이후 14일째에 생쥐를 마취한 후 OVA (500 µg/ml) 100 µl를 기도 투여(i.t)하였다. 21일째부터 분무기를 이용하여 2.5 mg/ml OVA용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 8주 동안 비강 및 기도내로 흡입시켰다. 이때 정상군은 PBS만을 주사, 흡입시켰다.

3) 시료의 경구투여

OVA로 전신감작시킨 후 21일째부터 胡桃(200 mg/kg, 400 mg/kg; JS 200, JS 400), 破古紙(200 mg/kg, 400 mg/kg; PCF 200, PCF 400) 및 두 배합약물의 추출물(200 mg/kg, 400 mg/kg; J+P 200, J+P 400)을 일주일에 3회 경구투여 하였다. 정상군(Normal, WT)에는 증류수를 동량 경구 투여하였으며, OVA로 전신감작시킨 후 약물을 처리하지 않은 구를 대조군(Control, Con)으로 사용하였다. CsA그룹은 면역억제제인 cyclosporin A (CsA, 2 mg/kg)를 8주간 복강주사 하였다.

4) 기도의 과민반응(airway hyperreactivity : AHR) 측정

한약제 투여군의 폐기능 검사를 위하여 전신 체적변동 기록법(Whole body plethysmograph, model Biosystem XA; Buxco Electronics Inc, Troy, New York, USA)을 이용하여 메타콜린에 의한 기도 협착을 유발하여 기도의 과민 반응을 측정하였다.

메타콜린 반응의 측정은 최종 흡입 후 생쥐를 각각의 chamber bias에 넣고 30분 후 안정화가 되면 메타콜린을 3분간 흡입시키고 1분간 dry한 후에 10분간 기록을 하고 데이터를 10초 간격으로 자동 합산하여 나타내며, 본 실험에서는 기록 후 5-6분 동안 기록한 데이터를 합산한 결과이다. 메타콜린은 3.125 mg/ml에서 50 mg/ml까지 농도를 증가하면서 Penh값을 측정하였다. Penh값은 다음과 같은 공식에 의하여 측정하였다.

$$\text{Penh} = \text{Pause} \times \text{PIF}/\text{PEF},$$

$$\text{Pause} = (\text{Te}-\text{Tr})/\text{Tr} \quad (\text{PIF, peak inspiratory flow; PEF: peak expiratory flow; Te, expiratory time; Tr, relaxation time}).$$

5) 기관지 폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid: BALF) 분리 및 분석

6주 후 천식생쥐의 눈에서 혈액을 분리한 후 목부분을 해부하여 BALF로부터 세포를 분리하기 위해 10 % FBS/DMEM 배양액 1 ml을 넣은 주사기를 기관지(trachea)에 주입시키고 끈으로 묶어 고정된 후 3회 순환시켜 분리한 후 ACK용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04 % trypan

blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다.

BALF로부터 세포를 분리한 후 cytospin (한일과학)에서 1000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 slide를 건조하였다. 건조된 슬라이드는 Diff-Quick 용액(Baxter Healthcare, Miami, FL)을 이용하여 염색한다. 이 슬라이드로부터 세포의 모양과 염색특징 등으로 면역세포의 type을 결정한다. 광학현미경(Nikon, Japan) 400x에서 호산구 수를 측정하였다.

6) 유세포 분석(flow cytometry analysis)

폐조직에서 세포표면 분자들에 대한 항체를 이용하여 면역염색하기 위하여 $2^{-5} \times 10^5$ 세포로 조정하여 염색 완충용액(1% 우태아 혈청, 0.01% NaN_3 가 포함된 인산염 완충용액, pH 7.4)으로 1회 세척하였다. 이를 FITC (fluoresceinated isothiocyanate) 또는 PE (phycoerythrin) 형광물질이 결합된 CD_3 , CD_4 , CD_8 , CD_{69} , CD_{11b} , Gr^{-1} 등의 항체를 시료에 가하여 4에서 40분간 반응시키고 염색 완충용액으로 2회 세척한 후 세포표면 분자들의 발현을 유세포분석기(FACScan, BD Biosciences, USA)로 분석하였다.

7) 천식생쥐 폐조직의 Quantitative real-time PCR

(1) RNA 추출

적출한 폐조직을 조직분쇄기로 폐조직(0.1 g)과 RNAzolB 500 µl를 넣고 용해될 때까지 분쇄한다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl_3) 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 °C에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction : RT-PCR)

역전사 반응은 준비된 total RNA 3 µg을 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×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2)를 가한 후, 1 µl의 M-MLV RT (200 U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다. 이 20 µl의 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 합

성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(3) cDNA PCR

Real time quantitative PCR은 Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 수행하였다.

반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형과 SYBR Green PCR Mastermix (ABI)를 사용하였으며, 주형에 대한 primer는 β -actin, IL-5, IL-13, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 유전자를 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 가했다. Pre-denaturation: 95 $^{\circ}$ C, 5분, denaturation: 95 $^{\circ}$ C, 5분, annealing: 55 $^{\circ}$ C, 1분, elongation: 72 $^{\circ}$ C, 1분을 25 cycles한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. Mouse oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Primers used in real time PCR

Gene	Primer	Sequence
TNF- α	sence	5'-TGGGAGGAAAGGGTCTAAG-3'
	antisence	5'-ACCTACGACGTGGGCTACAG-3'
IL-5	sence	5'-AACCTTACTGAACTCAGATTGTTAG-3'
	antisence	5'-TAAGTCAGTTTAAATGCTTAGGG-3'
IL-13	sence	5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAAT-3'
	antisence	5'-ACCGATACAGTACAGTACAGTA-3'
β -actin	sence	5'-TGGAAATCCTGTGGTCCATGAAAC-3'
	antisence	5'-GTCACAGTCAGCTGTATAGGG-3'

8) ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 분석

생쥐에서 분리한 폐포세척액과 혈청에서 각 cytokine량을 측정하기 위해 IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , Eotaxin, IgE, Histamine (Endogen, USA)와 IL-13(R&D system) ELISA kits를 이용하였다.

9) 조직 병리검사

BALF 채취 후에, 왼편 폐의 기관은 제거되었고 10% formalin에서 24 h 고정하였다. 조직을 파라핀으로 포매하여 5 μ m 부분의 두께로 조직절편을 만들었으며, hematoxyline/eosin (H&E)로 염색하였고, 조직의 손상 정도를 관찰하기 위하여 Masson/trichrome (M-T) 염색을 동시에 시행하여 관찰하였다.

10) 통계처리

모든 실험은 5회 반복하였으며, 총 45 마리의 생쥐로부터 얻은 결과를 종합하여 mean \pm standard error값

으로 나타내었다. 대조군과 실험군 간의 차이에 대한 통계학적 유의성 검증은 Student's T-test 방법으로 하였다.

결 과

1. 기도과민 측정 (ARH)

기도 과민반응의 억제 효과를 확인하기 위하여 Penh값을 측정한 결과 OVA를 투여하지 않은 대조군(Normal control)에 비해 OVA를 투여한 대조군(Control)의 Penh값이 메타콜린 농도에 비례하여 증가되었으며, OVA군에 비하여胡桃(JS), 破古紙(PCF) 및 병용투여군(J+P)에서 모두 Penh값이 메타콜린 농도에 비례하여 유의적으로 감소되었다(Fig. 1).

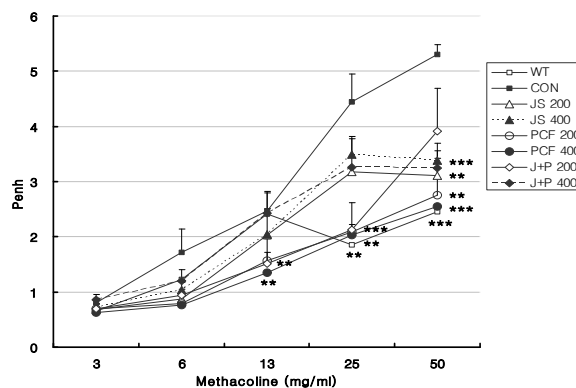


Fig. 1. Effects of JS, PCF and J+P on methacholine-induced AHR

JS 200 : OVA + JS (200 mg/kg). JS 400 : OVA + JS (400 mg/kg).

PCF 200 : OVA + PCF (200 mg/kg). PCF 400 : OVA + PCF (400 mg/kg).

J+P 200 : OVA + J+P (200 mg/kg). J+P 400 : OVA + J+P (400 mg/kg).

** : $p < 0.01$. *** : $p < 0.001$, compare to Con.

2. In vivo 실험

1) BALF 내의 총 백혈구 및 호산구 수

OVA를 감작시키지 않은 정상군에 비해 OVA를 투여한 대조군에서 BALF 내 백혈구의 수와 호산구 수가 모두 현저히 증가되었으며, OVA 대조군에 비하여 PCF ($P < 0.05$) 및 고용량 병용투여군에서만 유의한 감소를 보이고 있는 반면, 호산구는 JS, PCF, 병용투여군에서 유의한 감소를 보이고 있다. 특히 고용량 병용투여군(J+P 400)에서 다른 군에 비하여 현저한 감소를 보이고 있다($p < 0.01$)(Fig. 2).

2) 유세포 형광염색 분석

폐조직내 T세포인 CD3+세포수는 고용량 PCF 단독투여군과 고용량 J+P인 병용투여군(400mg/kg)에서 현저한 감소를 보였으며, B세포인 CD19+는 JS와 PCF 단독투여군과 병용투여군에서 모두 유의한 감소가 있었다.

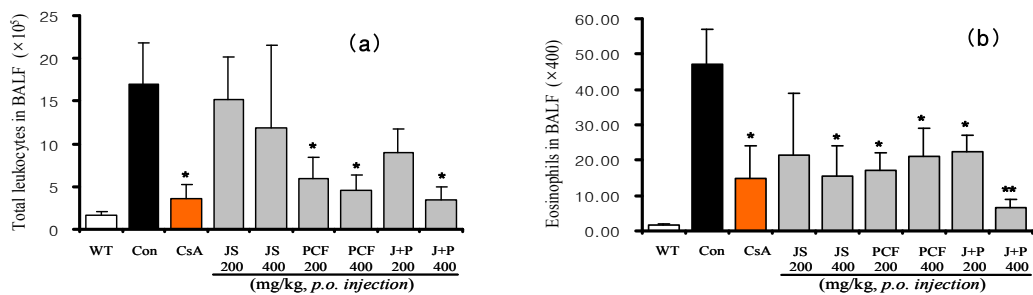


Fig. 2. Effect of JS, PCF and J+P on total leukocytes(a), eosinophils(b) in BALF in murine OVA-induced asthma

* : $p < 0.05$. ** : $p < 0.01$. compared to Con.

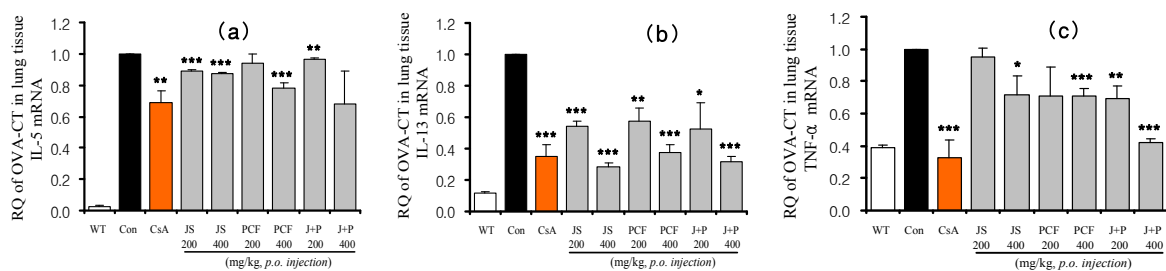


Fig. 3. Effect of JS, PCF and J+P on IL-5 mRNA(a), IL-13 mRNA (b), TNF- α mRNA(c) gene expression in murine OVA-induced asthma mouse lung tissue

* : $p < 0.05$. ** : $p < 0.01$. *** : $p < 0.001$. compared to Con.

Table 2. Effect of JS, PCF and J+P on CD3⁺, CD19⁺, CD3⁺/CD69⁺, CD4⁺, CD8⁺, Gr-1⁺/CD11b⁺ Absolute Number of Lung Cells in Murine OVA-induced Asthma

	Lung absolute Number($\times 10^6$)					
	CD3 ⁺	CD19 ⁺	CD3 ⁺ /CD69 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Gr-1 ⁺ /CD11b ⁺
WT	24.50 \pm 4.10	34.12 \pm 4.33	0.63 \pm 0.18	16.49 \pm 3.25	2.96 \pm 0.01	8.52 \pm 1.39
Con	80.10 \pm 26.20	58.91 \pm 0.25	4.40 \pm 0.04	54.76 \pm 22.30	8.11 \pm 3.51	45.79 \pm 3.54
CsA	32.90 \pm 1.11	37.22 \pm 5.65**	3.09 \pm 1.38	19.74 \pm 1.79	2.96 \pm 0.25	20.87 \pm 2.81
JS200	48.20 \pm 2.80	43.63 \pm 1.64***	3.65 \pm 0.94	28.97 \pm 1.30	3.59 \pm 0.15	21.76 \pm 7.67*
JS400	47.00 \pm 10.90	42.70 \pm 7.33*	2.99 \pm 0.16***	25.84 \pm 8.71	3.78 \pm 0.59	24.00 \pm 4.00**
PCF200	35.30 \pm 6.70	41.70 \pm 3.35**	2.38 \pm 0.78*	22.60 \pm 4.59	2.36 \pm 1.34	25.49 \pm 10.42
PCF400	25.90 \pm 1.30*	32.82 \pm 6.60**	2.51 \pm 1.32	17.96 \pm 0.06	2.47 \pm 0.31	26.33 \pm 14.30
J+P200	39.40 \pm 14.90	56.37 \pm 15.63	2.22 \pm 0.71*	21.10 \pm 8.14	3.63 \pm 1.29	15.23 \pm 2.64***
J+P400	23.60 \pm 2.90*	36.40 \pm 5.15**	2.76 \pm 0.33**	13.68 \pm 2.74	2.75 \pm 1.31	18.16 \pm 5.59**

* : $p < 0.05$. ** : $p < 0.01$. *** : $p < 0.001$. compared to Con.

Table 3. Effect of JS, PCF and J+P on IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , Eotaxin, IgE Level in BALF in Murine OVA-induced Asthma

	Production in BALF (pg/ml)					
	IL-4	IL-5	IL-13	IFN- γ	Eotaxin	IgE
WT	12.54 \pm 1.02	2.19 \pm 1.10	10.30 \pm 2.30	44.75 \pm 3.08	20.55 \pm 6.05	1.24 \pm 12.10
Con	118.75 \pm 18.63	254.5 \pm 36.80	221.30 \pm 18.60	29.85 \pm 6.19	80.45 \pm 0.81	170.45 \pm 1.59
CsA	51.10 \pm 2.97**	112.44 \pm 15.70**	54.50 \pm 18.70***	40.00 \pm 6.86	59.65 \pm 9.58	47.50 \pm 2.26*
JS200	82.30 \pm 7.00	219.47 \pm 24.30	136.50 \pm 36.10*	77.95 \pm 5.48***	57.65 \pm 2.37	17.60 \pm 24.04***
JS400	56.90 \pm 9.05*	113.21 \pm 36.50*	88.60 \pm 29.70**	124.55 \pm 18.28***	43.10 \pm 1.20	60.90 \pm 5.94***
PCF200	66.30 \pm 11.46*	173.40 \pm 11.20*	179.60 \pm 30.60	73.50 \pm 0.64***	60.40 \pm 1.13	96.65 \pm 12.48***
PCF400	45.35 \pm 4.99**	117.62 \pm 19.00**	155.20 \pm 21.10*	112.85 \pm 2.02***	48.35 \pm 0.74	54.50 \pm 12.87***
J+P200	106.70 \pm 17.25	201.40 \pm 20.10	199.60 \pm 26.40	76.25 \pm 4.42***	38.35 \pm 4.28	89.60 \pm 7.00***
J+P400	58.50 \pm 8.20*	123.20 \pm 17.60**	146.30 \pm 32.30*	120.95 \pm 8.87***	38.60 \pm 1.41	44.25 \pm 3.64***

* : $p < 0.05$. ** : $p < 0.01$. *** : $p < 0.001$. compared to Con.

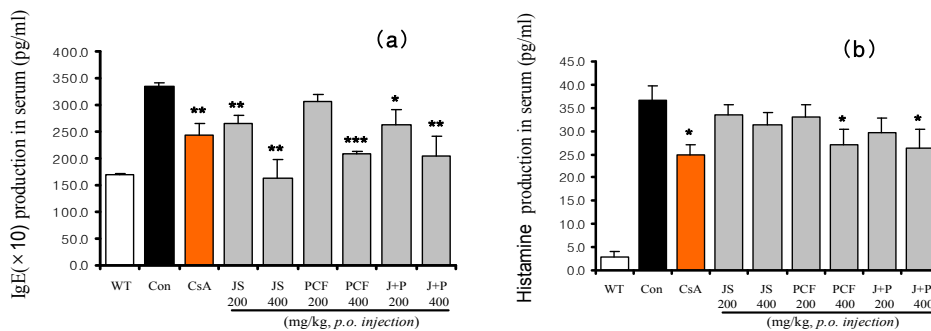


Fig. 4. Effect of JS, PCF and J+P on IgE level(a), Histamine release(b) in serum in murine OVA-induced asthma.

* : $p < 0.05$. ** : $p < 0.01$. *** : $p < 0.001$. compared to Con.

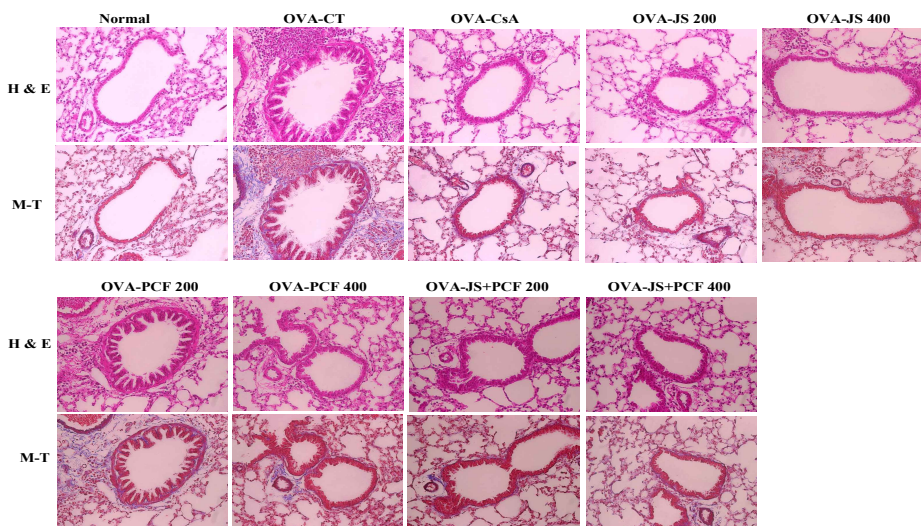


Fig. 5. Effect of JS, PCF and J+P on histology of lung tissue (H&E and M-T staining) in murine OVA-induced asthma lung cells

또한 폐조직내의 세포수를 보면 폐조직내 Gr-1+/CD11b+의 세포수는 JS와 병용투여군에서 현저한 감소를 보였다(Table 2).

3) Quantitative real-time PCR

Th2 세포에서 발현되는 IL-5, IL-13과 염증성 사이토카인인 TNF- α 유전자 발현은 모든 투여군에서 유의적으로 감소하였으며, 고용량 단독처리군과 비교하여 고용량 병용군에서 IL-13과 TNF- α 의 감소폭이 컸다.

4) BALF 내 IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , eotaxin, IgE ELISA 분석

IL-4,IL-5,IL-13은 JS, PCF와 병용투여 고농도에서 유의적으로 감소하였으며, IgE와 IFN- γ 은 모든 투여군에서 감소하였다, 특히 INF- γ 면역억제제 처리된 CsA 그룹에서는 증가하지 않은 반면에 모든 투여군에서 증가를 보였다(Table 3).

5) 혈청 내 IgE와 Histamine level

혈청내 IgE가 JS, PCF 및 병용투여군에서의 고농도 (400 mg/kg) JS 투여군에서 현저한 감소를 보였으나, 혈청내 Histamine 유출량은 PCF 및 병용투여군에서 유의한 감소를 보이고 있다(Fig. 4).

6) Histological analysis in lung section

H&E(hemoxilyn & eosin)의 염색에서 정상군에 비해 OVA로 유발된 천식대조군에서 폐포 주위에 호산구 같은 천식유발 염증세포의 침윤이 다량으로 존재하는 것이 관찰되었다. 그러나 JS, PCF및 병용투여군에서는 폐포 주위에 침윤된 염증세포들이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, M-T(masson trichrome)염색은 폐포조직의 주위에 collagen이 침착된 것을 자주색으로 염색하여 조직의 손상정도를 관찰하는 것으로 대조군에 비하여 JS, PCF및 병용투여군에서 조직손상이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

고찰

한의학에서는 哮喘證을 外氣의 刺戟으로 外感遺熱이 氣管支에 몰려서 痰液이 氣道를 狹小시켜 呼吸이 困難해지고 때로 氣管支의 痙攣 또는 痰液의 氣管支 閉塞으로 인하여 呼吸時에 辛苦를 하며 吹笛聲을 發하는 매우 苦痛스러운 症狀으로 표현하고 있으며, 현대의학에서는 기도의 만성염증으로 인해서 기도가 과민해짐으로써 수축이 발생하여 기침과 호흡곤란 증상이 유발되는 질환으로 설명하고 있다. 일부에서는 기도의 염증과 기관지 과민증 그리고 기도의 가역적 폐쇄라는 세가지 요소가 충분한 근거가 될 수 없다는 반론도 제기되고 있으며, 외부 환경에 존재하는 알레르겐이 원인이 되어 발생된다고도 설명하고 있다. 그러나 최근에는 호산구와 T세포의 침윤, 비만세포, 호염기구 및 상피세포의 활성화 등 모든 면역체계가 관여하는 염증성 질환으로 밝혀지면서, 기도 과민성(Airway hyperreactivity)과 폐쇄(obstruction)가 증상 발현에 중요한 것으로 알려졌으며, 특히 BALF에서는 Th2 림프구의 기능 활성화가 관찰된다고 보고하고 있다⁶⁾.

한의학에서는 이러한 哮喘證을 實證과 虛證으로 구분하여 治療하게 되는데 주로 虛證 환자를 治療하는 臨床例가 많아 이에 저자는 虛證性 喘息治療에 주로 應用된 胡桃, 破古紙 및 두 배합약물이 喘息治療에 어느 정도의 효능이 있는지를 免疫學的인 실험을 통해 연구해 보고자 C57BL/6 생쥐에 ovalbumin으로 천식을 유발한 후 BALF에 존재하는 총 폐세포수, 총 백혈구수, 총 호산구수, 그리고 유세포형광염색한 폐조직 내 CD3, CD19, CD3/CD69, CD4, CD8, Gr-1/CD11b와 Quantitative real-time PCR에 의한 IL-5, IL-13, TNF- α 의 유전자 발현분석과 그리고 BALF 내의 IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , Eotaxin, IgE 그리고 혈청 내의 IgE와 histamine 유출량의 변화와 마지막으로 H&E, M-T 두가지 염색법으로 폐 세포 조직을 분석 관찰하게 되었다.

천식 모델에서 BALF 세포를 연구하는 것은 천식 병리기전에 있어 중요한 연구방법으로 여겨지고 있으며, 다른 염증매개인자들을 제외하더라도 OVA로 유발된 이들 염증매개인자들은 BALF 세포에서 분비되며 이들 세포는 천식의 병리기전에 있어 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾.

현재까지 연구결과에 의하면 호산구는 천식에서 기도 염증을 일으키는데 가장 중요한 역할을 담당하는 세포이며, Th2 세포에 의해 매개되는 염증 및 IL-13을 활성화시켜 천식 발생에 있어서 중요한 역할을 하였다고 알려져 있다¹⁹⁾.

In vivo 실험을 고찰해보면 첫째 JS, PCF 및 병용투여군이 총 폐세포수에 미치는 영향을 살펴보면, 투여군에서는 유의성 있게 세포수가 감소되었다. 이는 폐내 호산구, 림프구, 대식세포, 비만세포 등의 염증유발 세

포들이 기도에 많이 침착되어 있거나, 기도 및 기관지의 부종 및 점액 분비과다를 의미한다. 천식대조군에서 각종 면역 관련 세포를 포함하는 총 폐세포수가 증가되었고, 고농도(400 mg/kg) 투여군에서 총 폐세포수가 유의성 있게 감소됨으로써 고농도(400 mg/kg) 투여군이 기도내 염증세포의 증가를 억제하고, 이들 세포에 의한 염증반응을 억제하는 작용이 있는 것으로 생각된다.

또한 BALF내 총 백혈구 수에 미치는 영향을 살펴보면, 폐내 세포수와 유사한 양상을 보이고 있으며, 이는 폐 자체의 염증과 관련한 면역세포의 수가 증가했음을 의미한다. 대조군에 비해 백혈구가 감소되었는데, 이는 천식 모델의 기도내 염증세포의 증가를 억제하고, 이들 세포에 의한 염증반응을 억제하는 작용이 있는 것으로 생각된다.

마지막으로 BALF 내 호산구 수에 미치는 영향을 살펴보면, 정상군에 비해 대조군에서 호산구수가 현저하게 증가된 것을 관찰할 수 있으며, 투여군에서 대조군에 비해 현저하게 호산구수가 감소된 것을 확인할 수 있었다. 이는 투여군이 호산구 증가에 의한 천식 기전을 억제하는 작용이 있음을 시사한다.

유세포 형광분석에서 CD3는 T세포 모두에 존재하는 표면분자이며, CCR3+ receptor는 주로 호중구, 호산구, 비만세포 및 Th2세포에서 발현된다²⁰⁾. 폐조직에서 CD3⁺의 세포수를 살펴보면 정상군에 비해 대조군에서 CD3⁺의 세포수가 현저하게 증가된 것을 관찰할 수 있으며, JS, PCF 및 병용투여군에서 대조군에 비해 CD3⁺의 세포수가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 특히 폐조직 내에서는 고농도(400 mg/kg) PCF 단독투여군과 고농도(400 mg/kg) 병용투여군에서, BALF 내에서는 고농도(400 mg/kg) 병용투여군에서 현저한 감소를 보였다.

한편 CD19는 B세포에서 발현하는 주요 marker로²¹⁾, 폐조직과 BALF 내 CD19⁺의 세포수를 살펴보면 정상군에 비해 대조군에서 CD19⁺의 세포수가 현저하게 증가된 것을 관찰할 수 있으며, 투여군에서 대조군에 비해 CD19⁺의 세포수가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 특히 폐조직과 BALF 내에서는 고농도(400 mg/kg) PCF 단독투여군과 고농도(400 mg/kg) 병용투여군에서 현저한 감소를 보였다.

또 CD69는 T세포, 대식세포, 호산구, 호중구 등에서 발현하는데 세포의 활성화 marker로 알려져 있으며²²⁾, T세포의 초기 활성화를 나타내며, 활성화된 호산구에서 발현되므로 천식모델에서 호산구 침윤의 표지로 사용될 수 있다. 본 실험에서 폐조직 내 CD3⁺/CD69⁺의 세포수를 살펴보면 정상군에 비해 대조군에서 CD3⁺/CD69⁺의 세포수가 현저하게 증가된 것을 관찰할 수 있으며, 투여군에서 대조군에 비해 CD3⁺/CD69⁺의 세포수가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 특히 폐조직 내에서는 저농도(200 mg/kg) 병용 투여군이 현저한 감소를 보였

다. CD4⁺ T세포는 호산구와 함께 천식 모델의 기도벽에 침윤되는 대표적인 세포인데, 천식모델에서 증가되고, 활성화 marker인 CD25를 발현하는 것으로 알려져 있다. 또한 CD4⁺ Th2세포는 천식을 유발하고 지속시키는 대표적인 세포로 알려져 있다²³⁾. CD8⁺ T세포는 CD4⁺ T세포와 마찬가지로 천식 유발 cytokines인 IL-4, IL-5, IL-13을 분비하는 것으로 알려져 있다^{24,25)}.

본 실험에서 정상군에 비해 대조군에서 폐조직 내 CD4⁺의 세포수가 현저하게 증가된 것을 관찰할 수 있으며, 투여군에서 대조군에 비해 CD4⁺의 세포수가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 폐조직내 고농도(400 mg/kg) JS 단독투여군, BALF 내에서는 고농도(400 mg/kg) PCF 단독투여군과 병용투여군에서 현저한 감소를 보였다.

정상군에 비해 대조군의 폐조직의 세포수가 현저하게 증가된 것을 관찰할 수 있으며, 투여군에서 대조군에 비해 폐조직 내 CD8⁺의 세포수는 모든 농도의 PCF 단독투여군과 고농도(400 mg/kg) 병용투여군에서, BALF 내에서는 고농도(400 mg/kg) PCF 단독투여군과 병용투여군에서 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 특히 고농도(400 mg/kg) JS 단독투여군에서 현저한 감소를 보였다.

CD11b는 천식환자의 호중구나 호산구에서 특이적으로 높게 발현되는 세포유착분자이며²⁶⁾, Gr-1은 과립구의 표지자로서 과립구의 분화, 성숙에 관여하며²⁷⁾, Gr-1⁺/CD11b⁺는 성숙된 과립구, 단핵구를 표현하며 myeloid suppressor 세포에서 발현되는 marker이기도 하다. 이들은 종양이나 감염 등에서 사이토카인을 분비하여 면역기전에 작용하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾.

본 실험에서 OVA를 감작하여 천식을 유발시키지 않은 정상군에 비해 대조군에서 폐조직 내 Gr-1⁺/CD11b⁺의 세포수가 현저하게 증가된 것을 관찰할 수 있으며, 투여군에서 대조군에 비해 Gr-1⁺/CD11b⁺의 세포수가 감소하였고 특히 저농도(200 mg/kg) 병용 투여군에서 현저한 감소를 보였다.

천식은 Th1 cytokine에 비해 Th2 cytokines인 IL-4, IL-5, IL-13 등의 과다한 생성으로 유발되는 기관지 점막의 만성 염증성질환이며, 호산구는 조직손상과 기도 과민반응을 포함한 알레르기성 천식의 임상적 특징을 유발하는 원인이 되며, 또한 기관지수축 및 염증매개물질로 알려진 히스타민, leukotriens 등의 분비를 야기하는 것으로 알려져 있다.

IL-4는 순환 호산구를 내피세포로 유착시키는 작용이 있으며, IL-5, chemokines의 작용에 의해서 염증 목표 조직으로의 유도를 이끄는 작용이 있는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. 또한 항원에 특이적인 IgE 생성을 유도하여 기도 과민반응에도 관여하는 것으로 알려져 있다.

IL-5는 기도의 호산구 과다증을 유발하는 결정적인 cytokine이며³⁰⁾, IL-13은 점막세포에서의 점액분비를 유

도하며³¹⁾, IL-4와 같이 작용하여 점막 섬유세포의 성장과 화학주성을 자극하는 것으로 알려져 있다³²⁾. IFN- γ 는 Th2세포의 분화와 성장을 억제하며 이들 세포로부터 분비되는 Th2 cytokine들의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서의 Quantitative real-time PCR에 의한 IL-5, IL-13, TNF- α 에 대한 유전자발현 실험에서는 정상군에 비해 대조군의 IL-5, IL-13, TNF- α 유전자 발현은 현저히 증가하였고 JS, PCF 및 병용투여군에서 대조군에 비해 Th2세포에서 발현되는 IL-5, IL-13, TNF- α 유전자 발현이 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다. 특히 고농도(400 mg/kg) 병용투여군에서 현저한 감소를 보였다. 이는 투여군이 천식 염증에 관여하는 호산구, Th2세포의 증식, 분화를 억제할 수 있음을 나타낸다.

ELISA 분석을 살펴보면, BALF 내 IL-4, IL-5, IL-13, IgE, eotaxin이 대조군에서는 현저하게 증가되는 것이 관찰되었고, 투여군에서는 유의성있게 모두 감소되었으며, 특히 병용투여군에서 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 한편 IFN- γ 는 대조군에서는 감소되는 것이 관찰되었고, 투여군에서는 모두 증가되었다.

이는 투여군이 천식반응에 있어서 유의성 있는 억제작용이 있음을 시사한다. 히스타민은 prostacyclin (PGI₂)을 합성하게 하여 이들이 혈관확장을 일으킴으로써, 알레르기성 과민반응의 구진과 발적 확장이 일어나게 된다.

히스타민 생성에 미치는 영향을 살펴보면 본 실험에서 정상군에 비해 대조군의 혈청 내 히스타민 유출량이 현저히 증가하였고 투여군의 경우 히스타민 생성량이 감소하였다. 특히 고농도(400 mg/kg) 병용투여군에서 현저한 감소를 보였다. 이 결과는 투여군이 천식반응에 주된 인자로 알려진 히스타민의 생성 억제에 유의한 작용이 있음을 보여준다.

폐세포조직을 살펴보면, OVA를 지속적으로 분무한 대조군에서 폐포 주위에 호산구 같은 천식유발 염증세포의 침윤이 다량 존재하는 것이 관찰되었고, 반면에 투여군에서는 폐포 주위에 침윤된 염증 세포들이 감소된 것을 확인할 수 있었으며 M-T 염색결과 조직손상이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다.

이처럼 투여군은 천식모델에 있어서 호산구의 세포 증식억제, 폐세포의 CCR3 발현억제, BALF, serum 내의 Th2 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-13 등의 생성 억제, IFN- γ 의 생성증가 등에 의한 작용을 통하여 기도의 염증반응 및 과민반응을 억제시켜 천식 증상이 완화되는 것으로 생각된다. 특히 단독투여시보다 병용투여군에 의하여 총 폐무게, BALF에서의 호산구수, 폐세포에서의 CD3⁺/CCR3⁺, Gr-1⁺/CD11b⁺ 등의 세포수, IL-4 생성량, serum에서의 IL-5, IgE 생성량 억제 효과와 BALF에서의 IFN- γ 생성량의 증가가 높은 것으로 나타났다. 이는 병용투여군이 천식의 주요발생 기전 및

유병 원인인 Th1/Th2 밸런스 조절작용에 관계가 있는 것으로 사료되며, 차후 본 실험연구를 참조하여胡桃, 破古紙 및 두 배합약물의 천식 치료효과에 대해 더 심오한 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

결론

胡桃, 破古紙 및 두 배합약물을 OVA로 감작된 천식동물모델에서의 항 천식 효과를 알아보기 위해, C57BL/6 생쥐에 ovalbumin으로 천식을 유발한 후 폐조직 및 기관지폐포세척액에 존재하는 총 백혈구수, 총 호산구수와 유세포 형광염색한 폐 조직 내 CD3, CD19, CD3/CD69, CD4, CD8, Gr⁻¹/CD11b와 Quantitive real-time PCR에서 IL-5, IL-13, TNF- α 의 유전자 발현분석과 그리고 ELISA 분석에서 BALF 내의 IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , Eotaxin, IgE 그리고 혈청 내의 IgE와 histamine 유출량의 변화와 H&E, M-T 두 가지 염색방법으로 폐세포조직을 분석하면서 모든 결과를 관찰한 후 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상군에 비해 대조군의 폐조직 세포수, BALF 내 백혈구수, 호산구수가 현저하게 증가되었으며, 대조군에 비해胡桃, 破古紙 및 두 배합약물 투여군에서의 폐세포수, BALF 내 백혈구수, 호산구수가 현저하게 감소되었으며, 병용투여군에서 다른 처리군보다 유의한 감소를 보여주고 있다.
2. 폐조직 내에서는 정상군보다 대조군에서의 CD3⁺/CD69⁺, Gr⁻¹/CD11b⁺의 비율이 증가되었으며,胡桃, 破古紙 및 두 배합약물 투여군의 CD3⁺/CD69⁺, Gr⁻¹/CD11b⁺의 비율은 대조군에 비해 현저하게 감소되었다.
3. 폐조직의 CD4⁺, CD8⁺ T 세포는 정상군에 비해 대조군에 비해 세포수가 현저하게 증가된 것을 관찰할 수 있으며,胡桃, 破古紙 및 두 배합약물투여군에서 대조군에 비해 세포수가 현저하게 감소된 것을 확인 할 수 있었다.
- 4.胡桃, 破古紙 및 두 배합약물 투여군에서의 BALF IL-4, IL-5, IL-13와 혈청내 IgE, histamine이 대조군에 비해 현저히 감소되었다. 폐조직내에서는 IL-13 발현이 병용투여군에서 유의한 감소를 보였다.
- 5.胡桃, 破古紙 및 두 배합약물 투여군에서 염증세포의 침윤과 collagen 부착이 대조군에 비해 현저하게 감소 되었다.

이상의 결과로胡桃, 破古紙 배합약물은 천식동물모델에 있어서 호산구의 세포증식 억제, BALF와 혈청내의 Th2 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-13 등의 생성 억제, IFN- γ 의 생성증가 등에 의한 작용을 통하여 기도의 염증반응 및 과민반응을 억제시켜 천식 증상을 완화시

키는 것으로 확인 할 수 있었으며, 특히胡桃, 破古紙의 단독투여시보다 병용투여시 호산구수, IL-13와 염증성 마커인 TNF- α 에서 억제에 효과적임을 확인 할 수 있었다.

참고문헌

1. 이승혁. 임상약대론. 서울 : 醫聖堂. 2007 : 123-4.
2. 全國韓醫科大學 共同教材編纂委員會. 本草學. 서울. 도서출판 영림사. 2007 : 606-7, 615-6.
3. 原安徽中醫學院 編. 中醫臨床手冊. 서울 : 成輔社. 1983 : 115-6.
4. 上海中醫學院 編. 中醫內科學. 香港 : 商務印書館 香港分館. 1975 : 17-23.
5. 全國韓醫科大學 肺系內科學教室 編著. 東醫肺系內科學. 서울 : 도서출판 文華社. 2002 : 320-31.
6. Factor P. Gene Therapy for Asthma. Mol Ther. 2003 ; 7(2) : 148-52.
7. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. N Engl J Med. 1990 ; 323 : 1033-9.
8. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. J Allergy Clin Immunol. 1990 ; 85 : 422-36.
9. Perry LM. Medicinal Plants of East and Southeast Asia. Cambridge : MIT Press. 1980.
10. Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. J Nutr. 2001 ; 131 : 2837-42
11. Fukuda T, Ito H, Yoshida T. Antioxidative polyphenols from walnuts(*Juglans regia* L.). Phytochemistry. 2003 ; 63 : 795-801.
12. Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C, Takeda A, Ikegami S. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. Biochem Biophys Res Commun. 2000 ; 274 : 697-701.
13. Miura H, Nishida H, Linuma M. Effect of crude fractions of *Psoralea corylifolia* seed extract on bone calcification. Planta Med. 1996 ; 62 : 150-3.
14. Chakraborty DP, Roy S, Chakraborty AK. Vitiligo, psoralen, and melanogenesis: some observations and understanding. Pigment Cell Res. 1996 ; 9 : 107-16.
15. Haraguchi H, Inoue J, Tamura Y, Mizutani K. Antioxidative components of *Psoralea corylifolia* (Leguminosae). Phytother Res. 2002 ; 6 : 539-44.

16. Zhao LH, Wu MH, Xiang BR. Analysis of *Psoralea corylifolia* L. Fruits in Different Regions. *Chem Pharm Bull.* 2005 ; 53 : 1054-7.
17. Latha PG, Evans DA, Panikkar KR, Jayavardhanan KK. Immunomodulatory and antitumour properties of *Psoralea corylifolia* seeds. *Fitoterapia.* 2000 ; 71 : 223-31.
18. Schwartz DA, Thorne PS, Jagielo PJ, White GE, Bleuer SA, Frees KL. Endotoxin responsiveness and grain dust-induced inflammation in the lower respiratory tract. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1994 ; 267 : 609-17
19. Lee JJ, Dimina D, Macias MP, Ochkur SI, McGarry MP, O'Neill KR, Protheroe C, Pero R, Nguyen T, Cormier SA, Lenkiewicz E, Colbert D, Rinaldi L, Ackerman SJ, Irvin CG, Lee NA. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science.* 2004 ; 305 : 1773-6.
20. Boushey HA. New and Exploratory Therapies for Asthma. *CHEST.* 2003 ; 123 : 439S-45S.
21. Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol.* 2001 ; 1 : 108-16.
22. Otero DC, Anzelon AN, Rickert RC. CD19 function in early and late B cell development: I. Maintenance of follicular and marginal zone B cells requires CD19-dependent survival signals. *J Immunol.* 2003 ; 170 : 73-83.
23. Marzio R, Mauël J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1999 ; 21 : 565-82.
24. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. ASTHMA: Mechanisms of Disease Persistence and Progression. *Annu Rev Immunol.* 2004 ; 22 : 789-815.
25. Marsland BJ, Le Gros G. CD8⁺ T cells and immunoregulatory networks in asthma. *Springer Semin Immunopathol.* 2004 ; 25 : 311-23.
26. Kemp RA, Ronchese F. Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. *J Immunol.* 2001 ; 167 : 6497-502.
27. Yachie A, Toma T, Miyawaki T, Taniguchi N. Expression of surface CD11b antigen and eosinophil activation. *Nippon Rinsho.* 1993 ; 51 : 593-7.
28. Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol.* 1993 ; 151 : 2399-408.
29. Serafini P, De Santo C, Marigo I, Cingarlini S, Dolcetti L, Gallina G, Zanovello P, Bronte V. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 ; 53 : 64-72.
30. Bochner BS, Schleimer RP. The role of adhesion molecules in human eosinophils and basophils recruitment. *J Allergy Clin Immunol.* 1994 ; 94 : 427-38.
31. Gulbenkian AR, Egan RW, Fernandez X, Jones H, Kreutner W, Kung T, Payvandi F, Sullivan L, Zurcher JA, Watnick AS. Interleukin-5 modulates eosinophil accumulation in allergic guinea pig lung. *Am Rev Respir Dis.* 1992 ; 146 : 263-6.
32. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest.* 1999 ; 103 : 779-88.