

香附子が 천식 관련 Th1/Th2 세포 관련 cytokine 분비에 미치는 영향

임종훈, 이형구, 정승기, 정희재
경희대학교 한의과대학 폐계내과학 교실

Studying of the Effects of *Cyperus rotundus* L. extract on Th1/Th2 Cell-derived Cytokines

David Jong-hoon Yom, Hyung-koo Rhee, Sung-ki Jung, Hee-Jae Jung

Division of Allergy & Respiratory System, Dept. of Internal Medicine College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Background and Objective : *Cyperus rotundus* L. (CR) is a commonly used herbal medicine in Asian countries such as Korea, China and Japan. The present study was designated to evaluate the direct effects of CR on helper T cell activities and on Th1/Th2 lineage development *in vitro*.

Materials and Methods : Spleen cells from 8 week BALB/c mice were cultured in CR extracts containing medium without activation for 24 hours and with activation for 48 hours. CD4+ T cells were isolated and analyzed for mRNA expression levels of INF- γ , IL-4, T-bet and GATA-3 by RT-PCR and secretion cytokines levels of INF- γ , IL-4, IL-5 and IL-10 by ELISA.

Results : The results demonstrated that CR had no mitogenic effects on unstimulated CD4+ T cells, but augmented CD4+ T-cell proliferation upon activation with anti-CD3/anti-CD28 antibodies in a dose-dependent manner. CR treatment significantly increased CD4+ T cell population and the INF- γ expression was significantly enhanced, while IL-4 expression was significantly decreased. In addition, *in vitro* Th1/Th2 polarization experiments revealed that CR enhanced INF- γ secretion in Th1 cells, but reduced the IL-4 in Th2 cells in a dose-dependent manner.

Conclusion : These results suggest that CR treatment could be a desirable alternative therapy for the prevention or correction of Th2 dominant pathological disorders, such as allergy and asthma.

Key words : *Cyperus rotundus* L. (CR), asthma, INF- γ , T-bet, GATA-3

1. 緒 論

香附子是 방동사니과(莎草科: Cyperaceae)에 속한 다년생 초목인 *Cyperus rotundus* L.의 根莖으로, 주요 정유 성분은 β -pinene, camphene, 1,8-cineol, limonene, cyperene 등이다. 性味는 平하고 辛微甘

苦하며, 歸經은 肝脾三焦이며 理氣解鬱 調經止痛의 효능을 가지고 있다. 肝經藥, 脾經藥, 肺經藥 및 命門藥으로 溫散작용이 있어 入肝開鬱散滯活血通經의 主治를 가지고 있으며, 理氣藥의 대표약으로 임상에서는 주로 氣滯로 인한 疼痛에 응용되며 여자의 月經痛과 肝氣鬱結로 인한 脇痛 등에 많이 사용 되고 있다¹.

천식의 병인에 관여하는 세포는 호산구 뿐만 아니라, 비만세포, 기도상피벽세포 등 여러 가지가

· 교신저자: 정희재 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 부속한방병원 한방5내과 의사실
TEL: 02-958-9147 FAX: 02-958-9148
E-mail: hanfish@khmc.or.kr

있지만 이 중에서 Th 림프구는 cytokine을 분비하여 기도의 염증반응을 조절하는 중요한 역할을 하고 있다. 최근 香附子は 호산구의 분화, 증식 및 활성을 증진시키며 T-cell에서 분비되는 lymphokine의 일종인 IL-5의 분비량을 감소시킨다는 결과가 보고되어², 香附子가 천식 치료에 도움이 될 것이라는 가능성을 제시하였다. 情緒不安과 지나친 긴장은 천식의 악화요인이며 또한 천식의 유발인자 중의 하나로 인식되므로³, 정신적 긴장 치료에 많이 사용되며 疏肝理氣하여 肝鬱氣滯와 疝氣痛을 解消하는 작용¹을 가진 香附子의 천식 치료효과를 밝혀낸다면 한약을 이용한 천식치료의 다양성을 확보할 수 있을 것으로 생각된다.

천식의 병리현상을 면역학적 발생기전과 관련하여 Th2 hypothesis를 기반으로 하여 연구를 진행하여 천식의 발병은 Th1/Th2의 균형 중심으로 설명되고 있다. 이는 1980대 후반 Mosmann⁴ 등이 마우스에서 면역반응을 일으키는 T help세포에는 IL-2, INF- γ 를 분비하는 Th1세포와 IL-4와 IL-5를 분비하는 Th2세포가 존재한다고 발표한 이후, 많은 연구에서 Th1 반응과 Th2 반응은 길항작용을 하면서 균형을 유지하고 있고, 천식의 면역학적인 병인과 관련하여 Th1/Th2 반응의 불균형이 핵심적인 요인 이라고 설명하고 있다.

韓醫學에서도 천식과 관련된 연구가 활발히 진행되고 있는데 分子生物學的인 분석방법으로 cytokine의 轉寫效果를 관찰한 연구⁵⁻⁸뿐만 아니라 임상연구⁹⁻¹¹와 관련된 많은 논문이 발표되었다. 加味淸上補下湯을 이용한 Th1/Th2 cell 환경에서 진행된 실험에서 加味淸上補下湯 물추출물은 Th2 세포 관련 IL-4의 발현량을 유의하게 감소시켰고, 加味淸上補下湯 에탄올추출물은 Th1 세포 관련 INF- γ 와 Th2 세포 관련 IL-4의 발현량을 모두 억제한 것으로 나타나¹², 加味淸上補下湯이 천식의 병리와 관련된 Th2 cell 관련 사이토카인을 억제하는 효과를 확인하였다.

이에 저자는 香附子가 Th1/Th2 cell 관련 cytokine

에 영향을 미칠 것으로 생각되어 INF- γ , IL-4와 전사인자인 T-bet, GATA-3의 mRNA 발현량을 RT-PCR (Real-time polymerase chain reaction)로 관찰하였고, INF- γ , IL-4, IL-5 및 IL-10의 분비량을 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 측정하여 비교 분석함으로써 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 動物 및 材料

1) 動物

실험동물은 생후 8주된 BALB/c 雌性 마우스이며 멸균 상태로 관리되어 온 것을 오리엔트 바이오(주)(서울,한국)에서 구입하였다. 사료는 방사선 멸균 처리한 실험동물용 사료를 정도산업(주)(서울,한국)에서 구입하여 공급하였으며, 음용수는 멸균처리 한 증류수를 사용하였다. 사료와 음용수는 충분히 공급하여 자유롭게 섭취시켰다.

2) 試料의 製造

香附子 (Cyperus rotundus L.; CR) 추출액은 썬텐제약 (Lot No. 242608, Taipei, Taiwan)으로부터 구입하여 10mg/ml이 되도록 물을 넣고 24시간 동안 녹인 다음, 3000rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 syringe filter로 여과한 후 실험에 이용하였다.

3) 試藥

試藥인 anti-CD3e (clone:145-2C11), anti-CD28 (clone:37.51), anti-mouse IL-4 (BVD4-1D11), anti-mouse IL-12 (C17.8), FITC-conjugated anti-CD4 antibody, recombinant mouse IL-4 (rIL-4), recombinant mouse IL-12 (rIL-12)(BD Biosciences, USA)와 Magnetic cell sorting CD4 (L3T4) microbeads, mouse IL-4 secretion assay detection Kit, mouse INF- γ secretion assay detection Kit (Miltenyi Biotec, USA) 및 OptEIA mouse INF- γ set, OptEIA mouse IL-4 set, OptEIA mouse IL-5 set, OptEIA

mouse IL-10 set(BD Biosciences, USA) 등을 구입 사용하였다.

세포배양을 위하여 사용된 media는 10% defined Fetal Bovine Serum (Hyclone, USA), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen Life Technologies, USA) 10 mM HEPES (JRH Biosciences, USA), 11 mM sodium bicarbonate (JRH Bioscience, USA)가 포함된 RPMI-1640 (Invitrogen Life Technologies, USA)를 사용하였다.

2. 方法

1) 비장 임파구 준비

적출한 BALB/c 마우스의 비장을 멸균된 주사기로 파쇄 한 후 cell strainer (BD Biosciences, USA)로 걸러내었다. 균질화 된 비장세포에 적혈구 제거를 위하여 5ml PharM Lyse (BD Bioscience, USA)를 넣고 5분간 반응시킨다. Cell이 부유 되어 있는 tube에 5ml의 culture media를 첨가한 후 300xg에서 10분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 남은 cell pellet은 1ml의 media로 suspension 한 후 세포수를 측정하였다.

2) CD4+ T cell 분리

비장임파구 1×10^7 cells/ $90 \mu\text{l}$ 농도당 $10 \mu\text{l}$ 의 magnetic cell sorting CD4+ (L3T4) microbeads (Miltenyi Biotec, USA)를 첨가하여 15분간 4°C에서 반응한 후, 300xg에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 제거하고 5ml의 media로 washing 하였다. 남은 cell pellet에 $1 \times 10^8/500 \mu\text{l}$ 의 농도가 되도록 media를 넣고 resuspension하였다. Ls separation column (Miltenyi Biotec, USA)을 varioMACS separator (Miltenyi Biotec, USA)에 장치한 후 3ml의 buffer (PBS with 2mM EDTA and 0.5% BSA)로 column을 통과시키고 세포부유액을 column안으로 주입하였다. 세포부유액이 column을 통하여 빠져나가면 다시 2ml의 buffer로 column을 3번 반복하였다. Column을 separator에서 분리해 낸 후 5ml의 buffer를 넣고 plunger를 눌러서 CD4+ T cell을 elution하였다.

3) 생존률 및 증식능 측정

Mitogen으로 자극받지 않은 비장 임파구의 생존율을 측정하기 위해 CellTiter 96 TM Aqueous One solution cell proliferation assay (Promega, USA.)의 protocol를 이용하되 CD4+ T cell을 분리 한 후 4×10^5 cells/ml의 농도로 $100 \mu\text{l}$ 씩 flat bottomed 96-well plate에 seeding 하였다. CD4+ T cell가 seeding 된 plate에 香附子 추출액을 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, $1000 \mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가하고 $10 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3e (clone:145-2C11, BD Bioscience, USA)가 coating 된 plate에서 $2 \mu\text{g/ml}$ anti-CD28 (clone:37.51, BD Bioscience, USA)로 costimulation하였다. 이상의 혼합물을 48시간동안 37°C, 5% CO2 incubator (Nuair, USA)에서 배양하였다.

4) CD4+ T cell을 Th1/Th2 cell로 분화

$10 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3e가 coating된 12-well plates에 CD4+ T cell을 Th1 cell 분화에서는 2×10^6 cells/ml로 seeding, Th2-cell 분화에서는 1×10^6 cells/ml로 seeding 한 후, $2 \mu\text{g/ml}$ anti-CD28로 costimulation 하고, 香附子 추출액을 0, 0.1, 1, $10 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 24시간 동안 37°C, 5% CO2 incubator에서 배양하였다. Th1 cell plate는 50U rIL-2 (Sigma, USA)와 10ng/ml rIL-12, $10 \mu\text{g/ml}$ anti-IL-4 (BD Biosciences, USA)를 첨가하여 배양하고, Th2 cell plate에는 50U rIL-2 (Sigma, USA)와 10ng/ml rIL-4, $10 \mu\text{g/ml}$ anti-IL-12 (BD Biosciences, USA)를 첨가하여 배양하였다. Th1 cell 분화에서는 72시간 후, Th2 cell 분화에서는 48시간 후에 cell을 PBS로 washing 한 후 $10 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3e와 $2 \mu\text{g/ml}$ anti-CD28로 restimulation한 후 24시간동안 배양하였다.

5) Th1/Th2 cell의 CD4+ T cell 분화 분포도 측정

CD4+ T cell을 4)의 방법과 같이 분화하여 cell을 harvest하여 wash buffer (PBS, FBS1%, Sodium Azide 0.1%) 2ml에 부유 시킨 후 300xg에서 5분간 원심분리 한 후 wash buffer로 2번 washing하였다. Cold medium를 cell 106당 $450 \mu\text{l}$ 가 되도록 cell

pellet을 resuspension 하였다. Catch reagent (Miltenyi Biotec, USA)를 cell 106당 $50\mu\text{l}$ 를 첨가하고 4°C 에서 5분간 incubation하고 warm medium으로 cell 수가 105가 되도록 희석하여 37°C 에서 45분간 incubation 한다. Incubation 한 tube에 cold buffer 5ml 를 투여하고 $300\times\text{g}$ 에서 10분간 원심 분리하고, 상층액을 제거 한 후 cold buffer를 cell 106당 $450\mu\text{l}$ 넣고 cell pellet을 resuspension하였다. 여기에 PE-conjugated Detection antibody, FITC-conjugated anti-CD4 antibody를 첨가 한 후 4°C 에서 10분간 incubation하였다. Cold wash buffer로 2번 washing 한 후 FACSscan (Becton Dickinson, BD biosciences, USA)으로 분석하였다.

6) ELISA를 이용한 Cytokine 분비량 측정

Flow cytometry에서와 같은 조건으로 분화한 Th1/Th2 cell의 상층액에서 IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 분비량을 측정하기 위하여 OptEIA Mouse IFN- γ Set, OptEIA Mouse IL-4 Set, OptEIA Mouse IL-5 Set, OptEIA Mouse IL-10 Set (BD Biosciences Pharmingen)의 protocol을 이용하되 capture antibody (anti-mouse IFN- γ , anti-mouse IL-4, anti-mouse IL-5)를 coating buffer (0.1 M carbonate, PH 9.5)로 capture antibody (anti-mouse IL-10)를 coating buffer (0.2 M carbonate, PH 9.5)로 희석하여 96-well plate에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 4°C 에 12시간 동안 coating하였다. Coating 한 plate를 wash buffer (PBS/Tween20, 0.05%)로 세척한 후 Assay Diluent (BD Biosciences Pharmingen)를 $200\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 분주한 후 실온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 다시 wash buffer로 세척하고 Working Detector (Detection antibody+Avidin-HRP) $100\mu\text{l}$ 씩 각 well에 첨가한 후 실온에서 1시간 반응 뒤 wash buffer로 세척한 후 Substrate Solution (TMB Substrate Reagent; BD Biosciences Pharmingen) set을 각 well 마다 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 그 뒤 실 온상태의 어두운 곳에서 30분 동안 반응시킨 후 2N H₂SO₄를 $50\mu\text{l}$ 첨가한 후 30분 안에 Microplate

reader (Molecular Devices, Sunnyvale, U.S.A.)로 $450\text{nm}/570\text{nm}$ 에서 읽었다.

7) Real-time RT-PCR을 이용한 cytokine 발현 측정

(1) Total RNA Isolation

CD4+ T cell을 분화한 Th1/Th2 cell를 적출하여 PBS로 washing하고 Trizol solution (Invitrogen Life Technologies, USA)에 제조사의 protocol에 준 하여 total RNA를 분리하였다.

Cell pellet은 pellet pestle을 이용하여 균질화 하였다. 균질화 된 용액에 $500\mu\text{l}$ 의 Trizol solution을 첨가하고 가볍게 vortex한 후 실온에서 5분간 반응 시켰다. 이 용액에 다시 $100\mu\text{l}$ 의 chloroform을 첨 가하여 잘 섞은 후 실온에서 3분간 반응시킨 다음 4°C 에서 $12,000\times\text{g}$ 로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮기고 여기에 $250\mu\text{l}$ 의 Isopropanol을 첨가하여 10분간 실온에서 반응시켰다가 다시 4°C 에서 $12,000\times\text{g}$ 로 15분간 원심분리 하였다. 상층 액을 제거한 후 pellet을 $500\mu\text{l}$ 의 75% ethanol로 세 척한 후 4°C 에서 $7,500\times\text{g}$ 로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 pellet을 건조하여 $50\mu\text{l}$ 의 DEPC (diethylpyrocabonate) 처리한 증류수에 RNA를 녹인 다음 spectrophotometer (DU500, Beckman Instruments Inc. Fullerton, USA)를 이용하여 정량 하였다.

(2) cDNA의 합성

cDNA의 합성 (reverse transcription)은 M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, USA)을 이용하였다.

$2.5\mu\text{g}$ 의 total RNA에 $1.1\mu\text{l}$ 의 $10\times$ DNase I Reaction buffer, $1\mu\text{l}$ 의 1 Unit/ μl DNase I (Invitrogen Life Technologies, Rochville, USA)를 첨가한 후 DEPC 처리 증류수를 넣어 반응액이 $11\mu\text{l}$ 이 되게 한 후 실온에서 15분간 배양하여 오염되었는지 모 를 DNA를 제거하였다. 반응 후 $1\mu\text{l}$ 의 반응액을 따로 분리하여 두고 후에 DNA가 남아있는지 확인 하기 위하여 PCR 반응을 하였다. $10\mu\text{l}$ 의 반응액에

1 μ l의 0.5 μ g/ μ l Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen Life Technologies, USA)를 첨가한 후 70 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응시킨 후 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 반응액에 4 μ l의 5 \times first strand buffer, 1 μ l의 10mM each dNTPs, 2 μ l의 0.1M Dithiothreitol, 1 μ l의 200U/ μ l M-MLV Reverse Transcriptase, 0.5 μ l의 40U/ μ l RNase inhibitor (Invitrogen Life Technologies, USA), 5.5 μ l DEPC 처리 증류수를 첨가하여 최종 부피를 20 μ l로 만들고 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 배양하여 single strand cDNA를 합성하였다. 반응이 끝난 반응액은 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양하여 enzyme을 불활성화 하였다.

(3) cDNA의 Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) 반응

각각의 특이 유전자 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 Real-time PCR을 실시하였다. 1 μ l의 cDNA에 12.5 μ l의 2 \times SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK), 각각 1.5 μ l의 5 μ M sense, antisense primer (Genotech co. Korea), 8. μ l의 증류수를 넣어 25 μ l가 되게 한후 Gene Amp 5700 Sequence Detection System (PE Biosystems, UK)에서 PCR하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 최초 denaturation한 후 95 $^{\circ}$ C 15초, 60 $^{\circ}$ C 60초를 40 cycle 반복하였다. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), IFN- γ (Interferon- γ), IL-4 (Interleukin-4) 유전자의 primer sequence는 Table 1과 같다.

cDNA는 각각 1, 1/10, 1/100로 serial dilution한 후 각 농도당 3개씩 PCR 하여 평균값을 사용하였다. 각 반응액의 amplification이 threshold에 도달한 Cycle number (Ct)를 기준으로 standard curve을 그려서 정량 하였고 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 normalization하였다. PCR 반응의 종료 후 60-95 $^{\circ}$ C 사이에서의 온도별 signal을 측정하여 dissociation curve를 작성하였다.

Table 1. Sequences of Primer Used for Real-time RT-PCR

Gene	Oligonucleotide sequence
GAPDH	RV 5'- GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA -3'
	FW 5'- TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC -3'
IL-4	FW 5'- ACA GGA GAA GGG ACG CCA T -3'
	RV 5'- GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA -3'
IFN- γ	FW 5'- TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA -3'
	RV 5'- TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG -3'
T-bet	FW 5'- GCC AGG GAA CCG CTT ATA TG -3'
	RV 5'- GAC GAT CAT CTG GGT CAC ATT -3'
GATA-3	FW 5'- GAA GGC ATC CAG ACC CGA AAC -3'
	RV 5'- ACC CAT GGC GGT GAC CAT GC -3'

8) 統計分析

통계처리는 pose-hoc test (Newman-Keuls Multiple Comparison Test)를 포함한 one-way ANOVA test로 유의성을 측정하였다. 통계 분석은 SAS program (SAS 8.0 for windows)으로 수행하였으며, 통계적 유의성 차이는 * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001로 정의 하였다.

III. 結果

1. 香附子가 분리된 CD4+ T cell의 생존에 미치는 영향

香附子가 주변의 APC (antigen presenting cell)가 없이도 직접적으로 CD4+ T cell 생존에 영향을 미치는지 확인하기 위해 CD4+ T cell을 분리한 후 香附子 추출액을 농도별로 투여하고 48시간동안 배양한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4+ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 다만 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation 시켰을 때에는 1 μ g/ml에서 CD4+ T cell의 생존율이 증가하였다(Fig. 1).

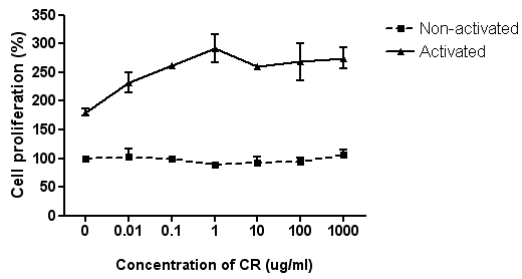


Fig. 1. Proliferation of CD4+ T cell in medium containing various concentration of CR extract after 48 hrs incubation.

Sorted CD4+ T cell were treated with anti-CD3 ϵ /anti-CD28 antibodies to activate T cell. Cell proliferation was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M.

2. 香附子가 Th1 cell 관련 cytokine에 미치는 효과

1) Flow cytometry을 이용한 IFN- γ 분포도 결과

Naive CD4+ T cell에 香附子 추출액을 0.1, 1, 10 μ g/ml 투여하고 50 U rIL-2, 10 μ g/ml anti-IL-4, 10ng/ml rIL-12을 이용하여 5일 동안 Th1 cell로 분화한 후 CD4+ T cell 분화 분포도를 Flow cytometry로 확인한 결과 Th1 cell 분화 상황에서 대조군에 비하여 IFN- γ 의 분포량이 0.1 μ g/ml에서 2.58% 증가, 1 μ g/ml에서 4.34% 증가, 10 μ g/ml에서 0.28% 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2).

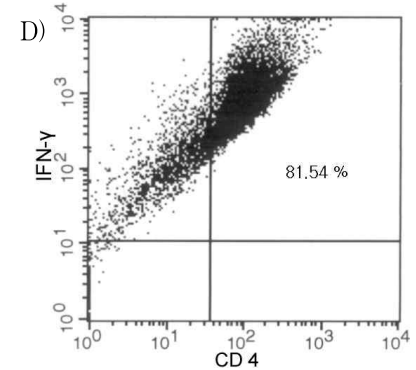
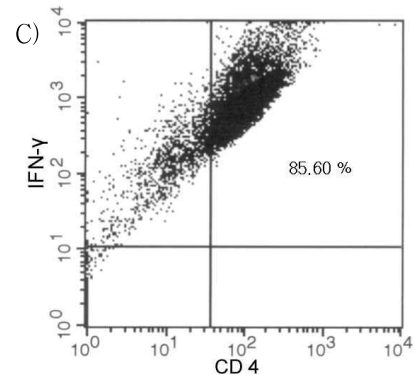
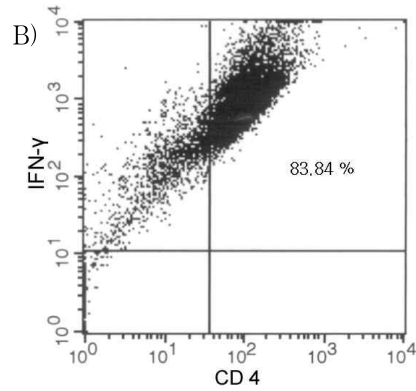
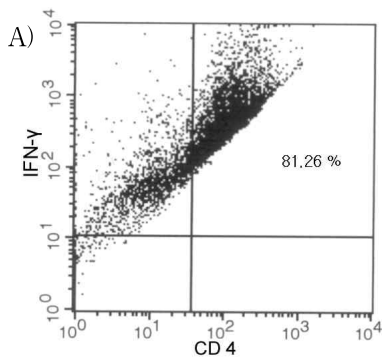


Fig. 2. Analysis population of cytokine polarized Th1 cell into Th0.

Sorted CD4+ T cells were treated with rIL-12 antibodies to polarized CD4+ T cell for 5days. Cells were stained with FITC-conjugated anti-IL-4 and PE-conjugated anti-CD4 antibodies. A; Cells were incubated in medium without CR as control. B,C,D; Cells were incubated in medium containing 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml CR extract.

2) ELISA법을 이용한 IFN- γ 분비량 결과

Naive CD4⁺ T Cell에 香附子 추출액을 0.1, 1, 10 μ g/ml 투여하고 50U rIL-2, 10 μ g/ml anti-IL-4, 10ng/ml rIL-12를 이용하여 5일동안 Th1 Cell로 분화한 후 상층액에서 cytokine 분비량을 ELISA 방법을 이용하여 측정된 결과, 대조군에 비하여 IFN- γ 의 분비량은 香附子 0.1 μ g/ml에서 57.9% 증가(p<0.01), 1 μ g/ml에서 49.4% 증가(p<0.01), 10 μ g/ml에서 123.6% 증가하여(p<0.001) 모든 농도에서 유의성있는 증가를 보였다(Fig. 3).

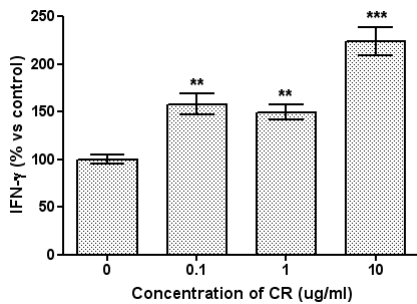


Fig. 3. Comparison of secreted cytokine from Th1 cell.

Sorted CD4⁺ T cell were treated with rIL-12 antibodies to polarized CD4⁺ T cell 5 days. ELISA assay of the IFN- γ expression in polarizing condition on 5 days. con; Cells were incubated in medium without CR extract as control. CR; Cells were incubated in medium containing 0.1, 1, 10 μ g/ml extract. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by pose-hoc test (Newman-Keuls Multiple Comparison Test); ** P <0.01, *** P <0.001 vs control group.

3) Real-time PCR을 이용한 IFN- γ 와 T-bet 발현량 결과

香附子 추출액을 투여하고 CD4⁺ T cell을 5일 동안 분화한 Th1 cell에서 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 real-time PCR으로 유전자 발현량을 평가한 결과는 다음과 같다.

(1) GAPDH

각각의 유전자의 발현량을 normalization하기 위하여 internal control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct값을 기준으로 standard curve를 작성하였다. Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석결과 R²는 0.9966으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

(2) IFN- γ

IFN- γ 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve를 작성하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R²는 0.9928로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

Standard curve를 이용하여 얻은 香附子 농도별 IFN- γ 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다. Th1 cell 분화 상황에서 IFN- γ 발현량은 대조군에 비하여 香附子 0.1 μ g/ml에서 3.2% 증가, 1 μ g/ml에서 23.3% 감소, 10 μ g/ml에서 17.6% 감소하였으나, 통계적 유의성은 없었다.

(3) T-bet

T-bet 유전자에 대한 Realtime PCR 결과 dissociation curve와 standard curve를 작성하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R²는 0.9946으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 T-bet 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다. Th1 cell 분화상황에서 T-bet 발현량은 대조군에 비하여 香附子 0.1 μ g/ml에서 37.6% 감소(p<0.01), 1 μ g/ml에서 51.0% 감소(p<0.01), 10 μ g/ml에서 50.3% 감소하여(p<0.01) 모든 농도에서 유의성있는 감소를 보였다(Fig. 4).

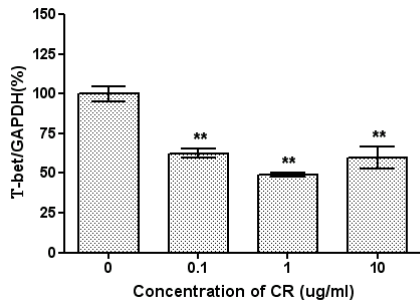


Fig. 4. Expression level of T-bet.

Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH. con : control, CR : 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ extract. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by pose-hoc test (Newman-Keuls Multiple Comparison Test); ** $p < 0.01$ vs control group.

3. 香附子가 Th2 cell 관련 cytokine에 미치는 효과

1) Flow cytometry을 이용한 IL-4 분포도 결과

Naive CD4+ T cell에 香附子 추출액을 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$ 투여하고 50 U rIL-2, 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-IL-12, 10ng/ml rIL-4을 이용하여 4일 동안 Th2 cell로 분화한 후 CD4+ T cell 분화 분포도를 Flow cytometry로 확인한 결과, 대조군에 비하여 IL-4의 분포량이 香附子 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 1.74% 감소, 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 4.41% 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5).

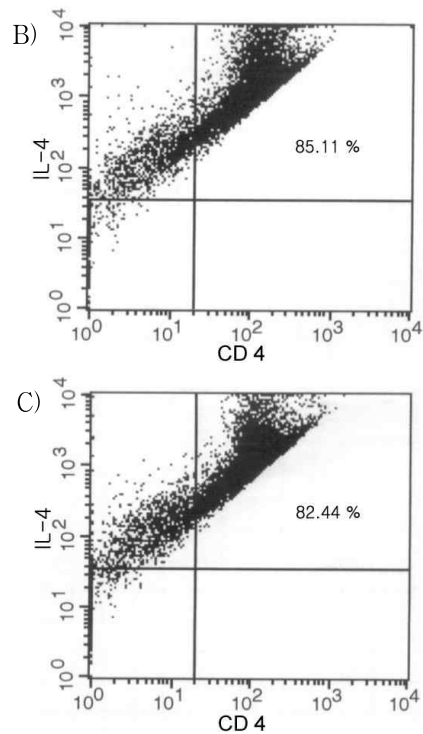
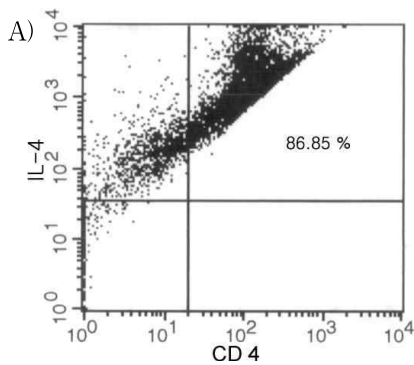


Fig. 5. Analysis population of cytokine polarized Th2 cell into Th0. Sorted CD4+ T cells were treated with rIL-4 antibodies to polarized CD4+ T cell for 4days.

Cells were stained with FITC-conjugated anti-IFN- γ and PE-conjugated anti-CD4 antibodies. A; Cells were incubated in medium without CR as control. B,C; Cells were incubated in medium containing 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$ CR extract.

2) ELISA법을 이용한 IL-4, IL-5 및 IL-10 분비량 결과

Naive CD4+ T Cell에 香附子 추출액을 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$ 투여하고 50U rIL-2, 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-IL-12, 10ng/ml rIL-4을 이용하여 4일 동안 Th2 Cell로 분화한 후 상층액에서 cytokine 분비량을 ELISA 방법을 이용하여 측정된 결과, 대조군에 비하여 IL-4의 분비량은 香附子 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 17.6% 감소($p < 0.001$), 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 40.8% 감소($p < 0.001$)시켰으며, IL-5의 분비량은 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 2.5% 증가, 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 22.3% 감

소시켰고, IL-10의 분비량은 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 14.8% 감소($p < 0.001$), 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 41.1% 감소($p < 0.001$)시켰다. 전체적으로 IL-4, IL-5, IL-10의 분비량은 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였으나, 단지 IL-4와 IL-10의 분비량변화에서만 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 6).

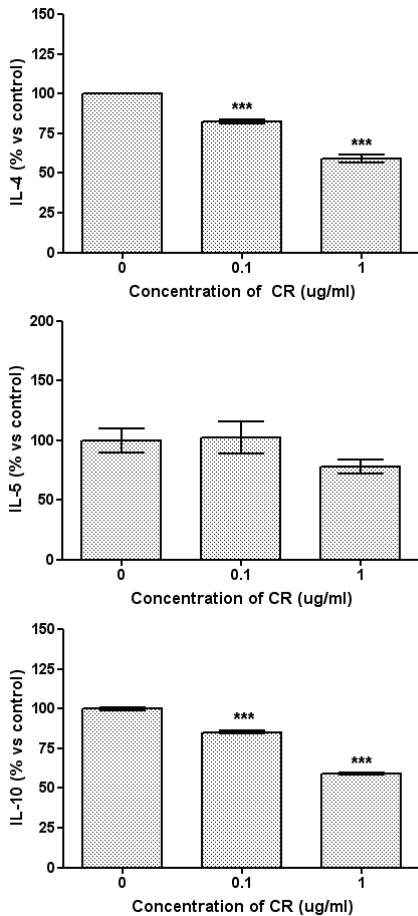


Fig. 6. Comparison of secreted cytokine from Th2 cell.

Sorted CD4⁺ T cell were treated with rIL-12 antibodies to polarized CD4⁺ T cell 4 days. ELISA assay of the IL-4, IL-5, IL-10 expression in polarizing condition on 4 days. con; Cells were incubated in medium without CR extract as control. CR; Cells were incubated in medium containing 0.1, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ extract.

Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by pose-hoc test (Newman-Keuls Multiple Comparison Test);*** $p < 0.001$ vs control group.

3) Real-time PCR을 이용한 IL-4와 GATA-3 발현량 결과

香附子 추출액을 투여하고 CD4⁺ T cell을 4일 동안 분화한 Th2 cell에서 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 real-time PCR함으로써 유전자의 발현량의 평가한 결과는 다음과 같다.

(1) GAPDH

각각의 유전자의 발현량을 normalization하기 위하여 internal control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct값을 기준으로 standard curve를 작성하였다. Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석결과 R²는 0.9966으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

(2) IL-4

IL-4 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve를 작성하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R²는 0.9992로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 IL-4 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다. Th2 cell 분화 상황에서 IL-4의 발현량은 대조군에 비해서 香附子 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 26.9% 감소, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 37.7% 감소하는 양상을 보였으나 유의성은 없었다.

(3) GATA-3

GATA-3 유전자에 대한 Realtime PCR 결과 dissociation curve와 standard curve를 작성하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도 별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R²는 0.9983로 나타

나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 GATA-3 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다. Th2 cell 분화 상황에서는 GATA-3 발현량은 대조군에 비하여 香附子 0.1 μ g/ml에서 23.4% 감소, 1 μ g/ml에서 20.7% 감소하는 양상을 보였으나 유의성은 없었다.

IV. 考 察

알레르기 반응에 의해 유발되는 천식은 기관지 과민성, 기도의 부종, 가역적인 기도폐색과 호산구 성-임파구성 염증을 특징으로 하는 임상 증후군을 말한다¹³. 천식의 특징적인 병리소견중 하나는 기관지내에 호산구의 수가 증가되어있으며, 활성화된 호산구는 세포사멸(apoptosis)이 억제된 상태가 되고, 또한 활성화된 호산구에 의해 유리된 많은 양의 염증매개체는 혈관과 기도평활근에 작용하여 알레르겐 흡입 유발 시에 알레르기의 조기반응과 후기반응이 일어나게 한다¹⁴.

천식은 전세계적으로 유병률이 증가하고 있으며, 국내에서 천식 유병률은 20-45세 성인의 경우 12.8%로 역학 조사로 밝혀졌다¹⁵.

韓醫學에서 呼吸急促하며 喉中有聲響한 症狀을 나타내는 哮喘證, 哮吼證의 범주³에 속하는 천식치료에 대한 韓醫學的 연구가 활발하게 진행되고 있다. 천식치료법의 개발 및 객관화를 위하여 哮喘證과 喘證의 치료에 응용되는 處方중 천식 치료에 臨床的 效果가 있는 處方과 個別 韓藥材를 중심으로 연구가 되어 왔는데, 分子生物學的인 분석방법으로 喘息에서 나타나는 氣道 炎症反應에 관여하는 cytokine의 轉寫效果를 관찰한 연구가 이루어졌는데 處方은 解表二陳湯⁵, 小青龍湯⁶, 瀉白散⁷ 등이었으며, 단미제제는 杏仁과 桔梗⁸⁸ 등이었으며, 대부분의 韓藥들이 천식치료 효능이 있는 것으로 나타났다.

천식과 관련된 임상논문은 주로 清上補下湯⁹ 및 加味貝母湯¹⁰에 대한 연구였으며, 특히 清上補下湯은 임상적 효과뿐만 아니라, 천식환자의 虛實辨證에 따른 효과 및 스테로이드절약효과 등의 내용을 보고⁹하였고, 加味貝母湯은 객담배출 용이도에 따른 임상적 효과¹⁰와 환자의 IgE, 호산구 및 cytokine의 변화¹¹ 등의 다양한 결과들을 보고하였다.

香附子와 관련된 실험논문을 살펴보면 香附子是 호산구의 분화, 증식 및 활성을 증진시키며 T-cell에서 분비되는 lymphokine의 일종인 IL-5의 분비량을 감소시킨다는 결과가 보고되어², 香附子가 천식 치료에 도움이 될 것이라는 가능성을 제시하였다. 그 외에 香附子는 대식세포의 NO 생성을 적절하게 유도 할 수 있으며, 과도하게 생성되는 NO 양을 조절하여 항상성을 유지시키는데 중요한 역할을 하는 생물활성조절자 뿐만 아니라, NO 생성 저해제의 후보 물질로 작용할 수 있다고 하였으며, 이러한 NO 생성 및 억제에는 iNOS 유전자 발현 및 IL-1 사이토카인 유전자 발현이 관여한다고 보고 하였다¹⁶. 또한 香附子는 자궁근층세포에 작용하여 성장을 억제시키고 사멸을 촉진시키며, MAP kinase activity를 감소시켜 세포의 활성도를 감소시키고 그 결과 cell apoptosis를 유도하는 효과가 있는 것으로 나타나 부인과 질환의 자궁근층을 치료하는데 응용할 수 있는 효과적인 약물이라고 보고 하였다¹⁷. 또한 香附子는 LPS에 의해 유도되는 Nitric oxide 생합성 저해활성에서 hexane 분획에서 유의성 있는 저해작용을 확인 할 수 있었고 hexane 분획중 cyperol, α -cyperone, cyperotundone 은 농도 의존적으로 NO 생합성을 저해하였으며, cyperotundone 이 가장 강한 활성을 나타낸다고 하였다¹⁸.

천식의 병리에 대하여 살펴보면 Th1 cell의 감소와 Th2 cell의 증가가 천식을 일으킨다는 Th2 가설(Th2 hypothesis)이 제안⁴된 이후 천식 병리에 중요 이론으로 받아들여지고 있다. Th1 cell은 INF- γ , TNF- β , IL-12를 분비하여 세포성면역을 담당하고, Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13을 주

로 생산하고 체액성 면역을 주로 담당한다. Th1 와 Th2 반응은 상호 길항작용을 하며, IL-12와 IFN- γ 는 Th2 cell의 활동을 방해하는 반면에 IL-4 와 IL-10은 Th1 cell의 반응을 억제한다. IL-4 와 IL-10가 체액성 면역을 증진시키는데 비만세포와 호산구의 성장과 활성을 자극하고 IgE 항체 생성 B 림프구로 분화시키고 Th 1 cell 반응과 관련된 대식세포의 활성과 T 세포의 분화를 억제하기도 한다¹⁹. 실제로 알레르기 천식환자에 있어 IL-4, IL-5는 증가되어 있고 INF- γ 는 감소되어있음이 여러 연구에서 보고되었다²⁰.

본 연구에서는 호산구의 분화, 증식 및 활성을 증진시키며 T-cell에서 분비되는 lymphokine의 일종인 IL-5의 분비량을 감소시키는 효능을 지닌 香附子의 천식치료효과를 확인하기 위하여 천식과 관련된 면역 반응 중 Th1/Th2 cell 관련 cytokine 인 IFN- γ , IL-4와 전사인자인 T-bet, GATA-3의 mRNA 발현량을 RT-PCR로 관찰하였고, IFN- γ 와 IL-4의 분비량을 ELISA 방법으로 측정하여 비교분석하여 香附子가 Th1 cell의 감소와 Th2 cell의 증가라는 천식의 병리상태에 미치는 영향을 분석하는 방법으로 실험을 진행하였다.

香附子의 Th1 관련 사이토카인 실험결과를 분석해보면, Flow cytometry 분석에서 香附子는 IFN- γ 의 분포량을 증가시켰고, ELISA 분석에서도 IFN- γ 의 분비량을 유의성 있게 증가시켰으나, Real-time RT PCR 분석에서는 香附子 농도가 증가하면서 IFN- γ 의 발현량은 오히려 감소하는 경향을 보였고, Th1 cell로의 분화를 촉진하는 전사인자인 T-bet의 경우 香附子는 오히려 유의성 있는 발현량 감소효과를 보였다. 실험결과 중 T-bet가 Th1 세포중 하나인 IFN- γ 의 가장 중요한 전사인자이라는 이전의 연구결과는 Real-time RT PCR 분석에서 T-bet의 발현량과 동시에 IFN- γ 의 발현량이 감소하여 IFN- γ 의 발현량이 감소는 T-bet과 관련 있는 것으로 확인할 수 있었으나, Flow cytometry 분석과 ELISA 분석에서 나타난 IFN- γ

의 분포량과 분비량 증가와는 상반된 결과가 나와 이번의 실험결과로 香附子가 Th1 세포 관련 사이토카인의 변화에 미치는 정확한 효능을 판단하기는 어려울 것 같다.

加味清上補下湯의 물 추출물도 RT PCR 분석법에서는 IFN- γ 발현량이 농도의존적으로 억제하는 양상을 보였고, ELISA 분석법에서는 IFN- γ 분비량이 증가하는 양상을 보여, 위와 비슷한 결과가 보고되어 좀 더 다각적인 분석이 필요할 것 같다.

香附子의 Th2 관련 사이토카인 실험결과를 분석해 보면, Flow cytometry 분석에서 香附子는 IL-4의 분포량을 감소시켰고, ELISA 분석에서는 IL-4 뿐만 아니라 IL-5, IL-10의 분비량도 감소시켰으나 IL-4와 IL-10에서는 유의성을 보였다. Real-time RT PCR 분석에서 香附子는 IL-4와 GATA-3의 발현량 모두 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

IL-4의 발현량 감소는 Th2 cell로의 분화를 촉진하는 전사인자인 GATA-3의 발현량 감소와 연관이 있는 것으로 추측되며, Flow cytometry, ELISA Real-time RT PCR 방법에서 香附子는 모두 Th2 사이토카인에 대한 억제작용을 확인할 수 있었다. IL-4와 IL-5의 발현량이 감소하여 천식의 병리과정에 중요한 역할을 하는 IgE, 비만세포 및 호산구 관련 사이토카인 억제작용을 확인할 수 있었으나, T 림프구 증식을 억제하며, INF- γ 의 생성을 감소시키는 IL-10의 발현량 억제결과는 의외의 결과였다. 아마도 香附子는 Th2 사이토카인에 대한 선택적인 작용이 아니라 전체적으로 억제하는 작용이 있는 것으로 추측되며, 이러한 결과는 천식의 병리상태를 호전시키는 효능이 있을 것으로 생각된다.

천식에서 Th1/Th2형에 관한 사이토카인 양상에 대하여 많은 논의의 여지가 있어 왔는데, “천식의 Th2 가설”은 급성기 천식에서 Th2 세포 사이토카인인 IL-4, IL-5 또는 IL-13 등의 상대적 증가와 Th1 세포 사이토카인인 INF- γ 의 감소에 의한다고 보고 있다. 그러나 최근의 연구들에서 “Th2 가설”

은 너무 단순하다고 제시 되었다²⁰. 최근의 몇몇 동물실험 결과는 Th1 세포는 Th2에 의한 효과를 억제하지 않으며 오히려 기도 염증을 악화시킨다고 보고된 논문도 있다²¹. 또한 몇몇 인간에 대한 시험 연구에서는 천식환자에서 INF- γ 가 의미있게 상승하며, 배양한 기관지 폐포세포의 상청액에선 IL-4 생산에 차이가 없다고 보고 되었다²². 최²³는 기관지천식환자군에서 오히려 INF- γ 의 수치가 높았고, 가미청상보하탕의 치료후 PFT가 의미있는 호전을 보였으나 오히려 IL-4의 유의한 상승을 보고하였다.

또한 다른 연구에서 천식환자의 기도에서 INF- γ 를 생산하는 CD8⁺T 세포가 오히려 증가하였으며, INF- γ 치는 천식의 중증도, 기도 과민성, 그리고 혈액내 호산구증과 비례함을 관찰하였다²⁴. 따라서 위의 관찰들은 Th1사이토카인이 천식환자에서 감소한다는 개념에 의문을 제기한다. 그리고 천식의 병리상태에서 호산구 활동과 밀접한 관련이 있는 IL-5의 역할에 대한 연구에서 항IL-5 항체 투여가 기도내 호산구를 50%만 감소시킴을 관찰하였고, 더욱이 호산구 탈과립의 증거인 기도 내 MBP치가 항 IL-5 치료로 변화하지 않음이 관찰되어 IL-5가 천식에 대한 역할이 이전에 고려해 왔던 만큼 강력하지 않은 것으로 의문시 되고 있다²⁵.

그러나 여전히 Th1 cell의 감소와 Th2 cell의 증가가 천식을 일으킨다는 Th2 가설(Th2 hypothesis)이 천식병리에 중요 이론으로 받아들여지고 있으므로 이러한 Th1/Th2 균형이론을 중심으로 香附子の 효능을 평가하여야 할 것으로 생각된다.

香附子는 Th1, Th2 림프구의 cytokine인 INF- γ 를 제외한 IL-4, T-bet, GATA-3 모두를 감소시키는 결과를 보였다. 香附子の INF- γ 의 조절 효과는 이번 실험 결과로는 판정하기는 어려움이 있기 때문에 지속적인 후속 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 이 실험으로 香附子가 Th2 cell 분화로 인한 알러지 반응에 중요한 조절능력이 있음을 입증할 수 있었고, in vitro 상에서 香附子가 Th1 response보다는 Th2 response에 강력하게 관여하는

것으로 추측할 수 있다. 따라서 본 연구를 통하여 香附子는 Th2 cell 반응에 적극적으로 관여함으로써 알러지성 천식의 염증반응을 억제하는 효능이 있음을 추측할 수 있었고, 지나친 긴장이 천식의 악화요인이라고 생각되는 천식환자에게 적극적으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 結 論

香附子가 천식과 관련된 면역 반응중 Th1/Th2 cell 관련 사이토카인에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Flow cytometry, ELISA 및 Real-time RT-PCR 방법으로 측정하여 비교분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CD4⁺ T cell을 분리한 후 香附子를 농도별로 투여하고 48시간동안 배양한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4⁺ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.
2. Flow cytometry로 CD4⁺ T cell 분화 분포도를 확인한 결과 Th1 cell 관련 INF- γ 의 분포량은 香附子 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml 및 10 μ g/ml에서 증가하는 양상을 보였고, Th2 cell 관련 IL-4의 분포량은 0.1 μ g/ml와 1 μ g/ml에서 감소하는 양상을 보였다.
3. ELISA 방법으로 측정한 결과, Th1 cell 관련 INF- γ 의 분비량은 香附子 모든 농도에서 유의성(p<0.01, p<0.001)있는 증가하는 양상을 보였고, Th2 cell 관련 IL-4, IL-5, IL-10의 분비량은 香附子 모든 농도에서 감소하는 경향을 보였으며, IL-4와 IL-10의 경우 유의성(p<0.001)을 보였다.
4. Real-time RT PCR 방법으로 측정한 결과, Th1 cell 관련 INF- γ 의 발현량은 香附子 농도의존적으로 감소하는 양상을 보였으며, T-bet은 항부자 모든 농도에서 유의성(p<0.01)있는 감소 양상을 보였다. Th2 cell 관련 IL-4와 GATA-3은

香附子 모든 농도에서 감소하는 경향을 보였다.

參考文獻

1. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현 이영종, 이선희. 한약임상응용. 서울: 전통의학연구소; 1986, p. 231-2.
2. 박동희, 이형구, 정승기, 정희재. High through screening(HTS)를 이용한 백서의 비장세포에서의 IL-5 분비조절 한약물 Screening. 대한한방내과학회지. 2006;27(2):394-406.
3. 전국한의과대학 폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울: 도서출판국진; 2004, p. 321-2, 329-31.
4. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol. 1986;136(7):2348-57.
5. 白東鎭, 鄭熙才, 李珩九, 鄭昇杞: 解表二陳湯加減方이 Asthma model 內의 Cytokine에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌. 2000;21(3):3-13.
6. 정진용, 정희재, 정승기, 이형구.小青龍湯과 小青龍湯加沙蔘이 BEAS-2B 人間 氣管支上皮細胞의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF mRNA level에 미치는 影響. 대한한의학회지. 2003;24(1):74-83.
7. Heo TS, Jung HJ, Kim HY, Jung SK, Rhee HK: The Effects of Sabaek-San and Glycyrrhizae Radix on IL-4, IL-5 and IL-6 in asthma model, Journal of Oriental Medicine. 2000;5(1):1-13.
8. 鄭旭, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九: 杏仁과 桔梗이 Asthma model 內의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響, 大韓韓方內科學會誌. 2000;21(1):31-8.
9. 황우석, 최준용, 이재성, 주창엽, 정희재, 이형구, 정승기. 청상보하탕의 기관지천식환자에 대한 스테로이드 절약효과. 대한한방내과학회지. 2003;24(1):1-10.
10. 최준용, 이재성, 황우석, 정희재, 이형구, 정승기. 가미패모탕의 기관지천식환자에 대한 객담배출 용이도에 따른 임상적 효과. 대한한방내과학회지. 2003;24(3):588-96.
11. 황우석, 최준용, 이재성, 정희재, 이형구, 정승기. 기관지천식환자에서 가미패모탕치료에 따른 IgE, 호산구 및 cytokine의 변화. 대한한방내과학회지. 2003;24(4):747-58.
12. 허태석, 고은정, 정희재, 이형구, 배현수, 정승기. 加味淸上補下湯의 물과 에탄올 추출법에 따른 抗알레르기 效果에 對한 研究. 대한한방내과학회지. 2006;27(1):40-54.
13. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. Lancet. 2000;356:2144-8.
14. Busse WW, et al. Allergy principles & practice. 5th ed. St. Louise: Mosby; 1998, p. 838-58.
15. 천식연구회, 한국보건사회연구원. 한국인 성인에서 천식양 증상의 빈도. 대한내과학회지. 2001;60:196-205.
16. 이영선, 한옥경, 신상우, 박중현, 권영규. 香附子 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2003;17(3):771-6.
17. 김동철, 백승희, 박중현, 이영선. 香附子가 자궁근종세포의 성장억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis 에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):18-33.
18. 김신기, 황방연, 강신정, 이정준, 노재섭, 이경순. 香附子의 성분 및 Nitric Oxide 생합성 저해효과. 생약학회지. 2000;31(1):1-6.
19. Mosmann TR. Sad S. The expanding universe

- of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol.* 1996;17:138-46.
20. Boushey HA, Fahy JV. Targeting cytokines in asthma therapy: round one. *Lancet.* 2000;356:2114-6.
21. Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest.* 1999;103(2):175-83.
22. Cembrzynska-Nowak M, Szklarz E, Inglot AD, Teodorczyk-Injeyan JA. Elevated release of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147(2):291-5.
23. 최준용, 정희재, 이재성, 조일현, 이진영, 정승연, 이형구, 정승기. 가미청상보하탕과 Th2 가설-미완의 천식이론. 2004 대한한방내과학회 춘계 학술대회 논문집. 2004;28-40.
24. Magnan AO, Mely LG, Camilla CA, Badier MM, Montero-Julian FA, Guillot CM, Casano BB, Prato SJ, Fert V, Bongrand P, Vervloet D. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(6):1790-6.
25. Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, Robinson DS. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(2):199-204.