

강활추출물이 OVA-induced Asthma Mouse Model의 면역조절에 미치는 영향

유지현¹, 배진현², 도은수², 장준복², 성낙술¹, 길기정^{2*}

1 : (재)금산국제인삼약초연구소 2 : 중부대학교 한방제약과학과

The Experimental study on the Immuno-regulatory effect of Notopterygii Rhizoma Extract on OVA-induced asthma in mice

Ji Hyun Yoo¹, Jin-Hyun Bae², Eun Soo Doh², Jun Pok Chang²,
Nak-Sul Seong¹, Ki Jung Kil^{2*}

1 : International Ginseng and Herb Research Institute Geumsan 312-804, Korea

2 : Department of Herbal Pharmaceutical Science, Joongbu University
Geumsan 312-402, Korea

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study was to investigate the asthma-suppressive and immuno-regulatory effect of Notopterygii Rhizoma(NR) extract on OVA(ovalbumin)-induced asthma in mice.

Methods : C57BL/6 mice out of all the experimental groups, except the Normal group and the NR I group, were sensitized and challenged with OVA. C57BL/6 mice were exposed to OVA three times a week for 12 weeks and analyzed by flow cytometer, ELISA, H&E stain.

Results : The concentrations of IL-4, IL-5, IL-13, IgE in serum of the OVA-NR II group decreased significantly compared with those of the OVA-Control group. The number of Gr-1⁺/CD11b⁺, CCR3⁺, CD3⁺/CD19⁺, CD3e⁺/CD69⁺ cells in the OVA-NR I group decreased significantly compared with those of the OVA-Control group. The collagen accumulation in the lung sections of the OVA-NR II group decreased significantly compared with that of the OVA-Control group.

Conclusions : These results suggest that Notopterygii Rhizoma(NR) would be a effective candidate for herbal-originated anti-asthmatic drug. However, this drug should be further studied for characterization of the accurate action and underlying mechanism using variant disease model in the future.

Key words : Notopterygii Rhizoma, OVA(ovalbumin)-induced asthma, immune cell

서 론

천식(asthma)은 기관지의 만성 재발성 염증질환으로 다양한 종류의 자극에 과민 반응하여 발작성수축을 일으키는 것을 특징으로 하며¹⁾ 이러한 증상이 저절로 혹은 치료로 호전되는 가역성 기류폐쇄를 나타내는 질환이다²⁾. 치료법은 원인 알레르겐 및 악화 인자를 회피하는 환경요법, 원인 알레르겐을 소량씩 피하주사로 반복 시행하여 원인 알레르겐에 대한 감수성을 약화시켜 증상의 호전을 유도하는 면역요법 등이 있으며 최종

단계로 스테로이드를 경구 투여하는 방법을 사용한다³⁾.

기관지천식(이하 천식)은 가장 흔한 만성 염증성질환의 하나로 세계적으로 약 3억명 정도가 앓고 있으며 최근 15~20년 사이에 약 1억 명 정도가 새로 발생한 것으로 추정된다⁴⁾.

우리나라에서도 국민건강보험 통계에 따르면 2007년도 인구 1,000명당 치료 유병율이 13.6명에 이르는 것으로 조사되었다⁵⁾.

강활(Notopterygii Rhizoma)은 미나리과(繖形科 : Umbelliferae)에 속한 다년생 초본인 강활 *Ostericum*

*교신저자 : 길기정. 중부대학교 한방제약과학과.

· Tel : 041-750-6225. · E-mail : kildosa@joongbu.ac.kr.

· 접수 : 2011년 11월 9일 · 수정 : 2011년 11월 28일 · 채택 : 2011년 12월 16일

koreanum Maximowicz의 뿌리로 중국에서는 미나리과(繖形科: Umbelliferae)에 속한 중국강활(羌活) *Notopterygium incisum* Ting 혹은 관엽강활(寬葉羌活) *N. forbesii* Boissier의 뿌리 줄기 및 뿌리를 기원으로 한다^{5,6)}.

강활은 性味が 辛苦, 溫하고 歸經은 肺, 膀胱, 腎經 이며 효능은 散寒, 祛風, 除濕, 止痛으로 外感風寒과 風濕에 의한 頭身疼痛과 風寒濕邪로 인한 關節疼痛을 치료하므로 感冒나 關節질환에 상용되고 있는 한약재이다^{5,6)}. 따라서 실제임상에서는 感冒로 인한 解熱뿐 아니라 鼻塞, 咳嗽, 頭痛, 全身疼痛에 사용되고 있으며 關節疾患으로 각종 痺證에 사용되고 皮膚瘙癢症에도 응용되고 있다. 강활의 성분으로는 isoimperatorin, imperatorin, cnidilin, notopteron, marnesin, noda-kenetin 등의 coumarin 계열화합물들과 p-hydro-xylphenethylanisate, ferulic acid 등 페놀류 β -sitosterol glucoside, β -sitosterol 등의 스테롤화합물 등이 보고되어있다⁵⁾.

본 연구에서는 강활추출물의 천식억제효과를 알아보기 위하여, C57BL/6 생쥐에 ovalbumin으로 천식을 유발한 후 유세포 형광염색한 폐조직내 Gr-1⁺/CD11b⁺, CCR3⁺, CD3⁺/CD19⁺, CD3e⁺/CD69⁺와 ELISA 분석에서 혈청내의 IL-4, IL-5, IL-13, IgE 그리고 H&E 염색방법으로 폐세포 조직을 분석하면서 모든 결과를 관찰을 통하여 천식 생쥐 모델에서 기관지 염증 억제에 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 강활(*Notopterygii Rhizoma*; NR)은 경동시장(경북, 한국)에서 구입하여 중부대학교 본초학교실에서 감정한 후 정선하여 4°C에서 냉장 보관하면서 시료로 사용하였다.

2) 실험동물 및 사육환경

동물은 자성인 4주령의 C57BL/6 생쥐를 대한실험센터에서 공급받아 2주일 간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 물과 사료는 충분히 자유롭게 먹도록 하였으며, 사료 성분은 조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 항생제가 첨가되지 않은 고품사료를 사용하였다. 실험 동물은 온도가 22±2°C로 일정하게 유지되고, 12시간은 200~300 Lux로 조명되며, 12시간은 조명이 차단되는 conventional system으로 조절되는 환경에서 사육하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

강활 100g에 증류수 1000 mL를 가하여 약탕기에 넣고 3시간 동안 전탕하여 추출한 후 여과하고 감압증류기를 이용하여 농축한 다음 Phosphate Buffered Saline (PBS)를 사용하

여 남은 추출액이 20 mL이 되게 하여 -80°C depp freezer에 4시간 정지하고 12시간 동안 동결건조하여 10g을 얻어 4°C에 보관하여 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 기관지 천식 생쥐 모델

500 μ g/mL의 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma, Co., USA)를 PBS로 용해한 후 혼합하였다. 이 혼합물을 10 N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750 x g에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심 분리한 OVA/ Alum 침전물에 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후, 100 μ g OVA를 0.2 mL로 조정하여 실험 시작 1, 2주에 복강 주사 (i.p)하여 전신 감각시켰다. 이후 3, 4주에 생쥐를 마취한 후 난알부민 (500 μ g/mL) 100 μ L를 기도 투여 (i.t)하였다. 5주부터 8주까지는 분무기를 이용하여 1 mg/mL를, 9주째부터 12주째까지는 2.5 mg/mL를 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 8주 동안 비강 및 기도내로 흡입시켰다.

3) 약물 투여

OVA/alum로 전신 감각시킨 4주째부터 강활 추출물을 매일 1회 200 mg/kg 농도로 경구투여 하였다. 실험은 7마리를 한 군으로 하여 정상군(nomal group: 천식을 유발하지 않고 증류수만 투여한 군), 대조군(control group: 천식을 유발시키고 증류수 투여한 군), 실험군 I (NR I: 천식을 유발하지 않고 강활투여군), 실험군 II (NR II: 천식을 유발시키고 강활 투여군)으로 나누었다.

4) 유세포 분석 (Flow cytometry analysis)

실험 종료 후 적출한 폐에서 면역세포를 측정하기 위해 100mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1,700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 이를 잘게 썬 후 collagenase를 가하여 배양을 통해 분리해 낸 세포에 인산완충생리식염수(3% 우태아혈청, 0.1% NaN₃)로 2회 수세하였고, 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence stainig)을 실시하였다. 각각에 Anti-CD3-PE, Anti-CD4-FITC, Anti-CD8-FITC, Anti-CD25-PE, Anti-CD28-PE, Anti-B220-PE, Anti-CD69-FITC 등을 넣고 30분간 4°C에서 반응시켰다. 반응 후 3회 인산완충생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 CellQuest 프로그램을 이용하여 Gr-1⁺/CD11b⁺, CCR3⁺, CD3⁺/CD19⁺, CD3e⁺/CD69⁺ 세포수를 백분율(%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수(absolute number)를 산출하였다.

5) ELISA 분석(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

생쥐에서 분리한 혈청에서 IL-4, IL-5, IL-13, IgE를 ELISA Kit를 사용하여 생산량을 측정하였다. 각각의 사이토카인 및 면역글로블린에 대한 항체를 coating 완충용액에 희석하여 96 well plate에 100 μ L씩 분주하여 4°C에서 overnight 하였다. 각 well을 4번 완충용액으로 세척한 다음 1시간 동안 실온에서 assay buffer 100 μ L을 분주하여 반응

시킨 후 4번 완충용액으로 세척하였다. 그 후 혈청을 100 uL씩 분주하여 2시간 동안 실온에서 반응시킨 후 4번 완충용액으로 세척한 다음 straptavidin-HRP를 100 uL 가하여 분주하고, 30분 반응 시킨 후 4번 완충용액으로 세척한 다음 TMB기질을 50 uL씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 uL씩 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 조직병리검사

생쥐에서 폐 조직을 떼어낸 후에 10% 포르말린에 고정시키고, 조직을 파라핀으로 포매하여 6µm 부분의 두께로 조직절편을 만들었으며 Hemacolor rapid staining set (Merck Germany)를 사용하여 염색하였다. 공기 중에서 건조시킨 후 bright microscope (Nikon, Japan ; ×400)로 측정하였다.

7) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과를 student's t-test (JAVA, Bonferroni Ver 1,1)로 분석하여 p값을 구하였다. 각 실험군을 대조군 및 정상군과 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 혈청 내 IL-4, IL-13, IL-5에 미치는 영향

혈청 내 IL-4 생성량을 측정한 결과, 정상군과 NR I 군은 거의 차이가 없었고 OVA-NR II 군 668.4±94.2 pg/mL으로 나타나 OVA-Control군 1910.7±80.5 pg/mL에 비하여 유의성 있게 감소하였고(Fig. 1A), IL-5 생성량을 측정한 결과, 정상군과 NR I 군은 거의 차이가 없었고 OVA-NR II 군은 74.8±5.5 pg/mL으로 나타나 OVA-Control군 256.7±5.1 pg/mL에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1B). 또한 IL-13 생성량을 측정한 결과, 정상군과 NR I 군은 거의 차이가 없었고 OVA-NR II 군은 125.7±5.5 pg/mL으로 나타나 OVA-Control군 419.1±146.4 pg/mL에 비하여 IL-13가 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1C).

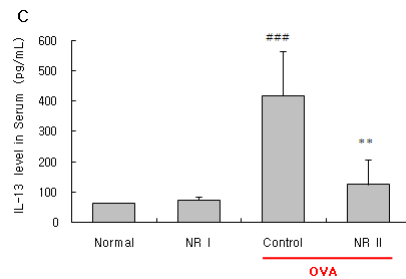
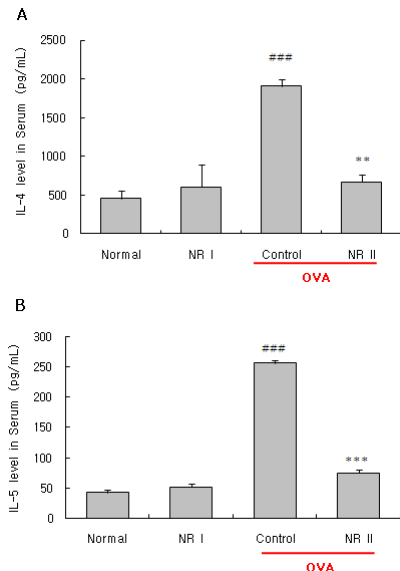


Fig. 1. The level of IL-4, IL-5 and IL-13 in C57BL/6 mouse serum. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12weeks(3times a week) for asthma sensitization and challenge. At the end of the total experimental procedure, serum was obtained from each group of mice. The concentration of IL-4 in mice serum was measured using ELISA. Values represent the means ± SEM of 7 mice. Normal : Normal C57BL/6 mice. NR I : Normal C57BL/6 mice and oral administration of NR extract. control : OVA-induced asthma model mice. NR II : OVA inhalation and oral administration of NR extract. * : p<0.05, ** : p<0.01 compared to control group.

2. 혈청 내 IgE에 미치는 영향

혈청 내 IgE 생성량을 측정한 결과, 정상군과 NR I 군은 거의 차이가 없었고 OVA-NR II 군 30.6±3.7 pg/mL으로 나타나 OVA-Control군 66.2±17.9 pg/mL에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

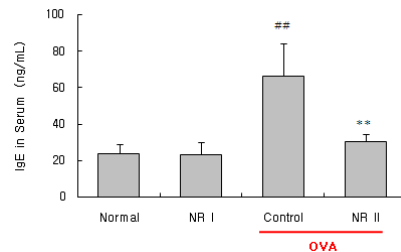


Fig. 2. The level of IgE in C57BL/6 mouse serum. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12weeks(3times a week) for asthma sensitization and challenge. At the end of the total experimental procedure, serum was obtained from each group of mice. The concentration of IgE in mice serum was measured using ELISA. Values represent the means ± SEM of 7 mice. Normal : Normal C57BL/6 mice. NR I : Normal C57BL/6 mice and oral administration of NR extract. control : OVA-induced asthma model mice. NR II : OVA inhalation and oral administration of NR extract. * : p<0.05, ** : p<0.01 compared to control group.

3. 폐 세포에 미치는 영향

폐 세포 내 Gr-1⁺/CD11b⁺ 세포 수는 정상군과 NR I 군에서 거의 차이가 없었고, OVA-NR II 군은 정상군보다 증가하였으나 OVA-Control에 비해 감소하였고(Fig. 3-A.), CCR3⁺ 세포수는 정상군과 NR I 군에서 거의 차이가 없었고, OVA-NR II 군은 정상군보다 증가하였으나 OVA-Control에 비해 감소하였다(Fig. 3-B.). 또한 세포수는 정상군과 NR I 군에서 거의 차이가 없었고, OVA-NR II 군은 정상군보다 증가하였으나 OVA-Control에 비해 감소하였고(Fig.3-C.) CD3e⁺/CD69⁺ 세포수는 정상군과 NR I 군에서 거의 차이가 없었고, OVA-NR II 군은 정상군보다 증가하였으나 OVA-Control에 비해 감소하였다(Fig. 3-D.).

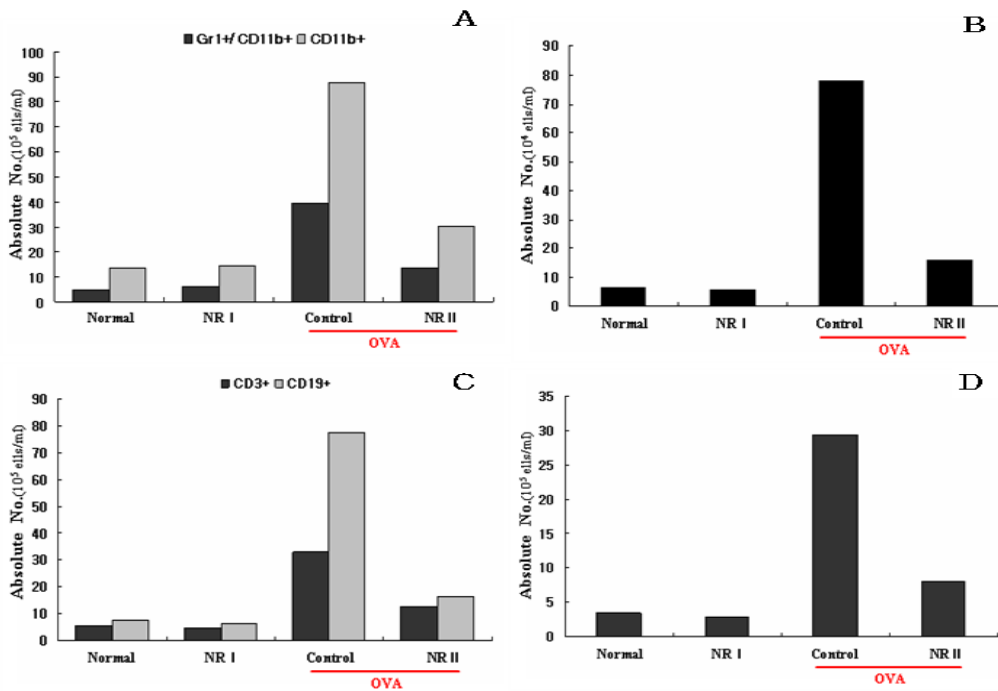


Fig. 3. Effect of NR extract on CD3 and CD19 cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (3times a week). The mice in the prophylaxis/ treatment group were treated with NR extract for the later 8weeks (3times /week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer. The numbers of CD3+/CD19+ cells and CD19+cells were measured.
 Normal : Normal C57BL/6 mice,
 NR I : Normal C57BL/6 mice and oral administration of NR extract,
 Control : OVA-induced asthma model mice,
 NR II : OVA inhalation and oral administration of NR extract.

4. 폐 조직의 변화에 미치는 영향

기관지 천식 유발 마우스에 NR 투여가 폐조직의 변화에 미치는 영향에 대하여 비교하였다. 정상군과 NR I군에서는 기도가 선명하고 염증세포의 침윤

이 보이지 않으나(Fig. 4A, B), 대조군에서는 기도의 협착과 기도벽의 두께가 증가되어 있고 염증세포의 침착이 현저하게 증가 되어 있다(Fig. 4C). OVA-NR II 군에서는 대조군에 비해 기도의 협착과 기도벽의 두께와 침윤된 염증세포의 침착이 현저히 감소된 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 4D).

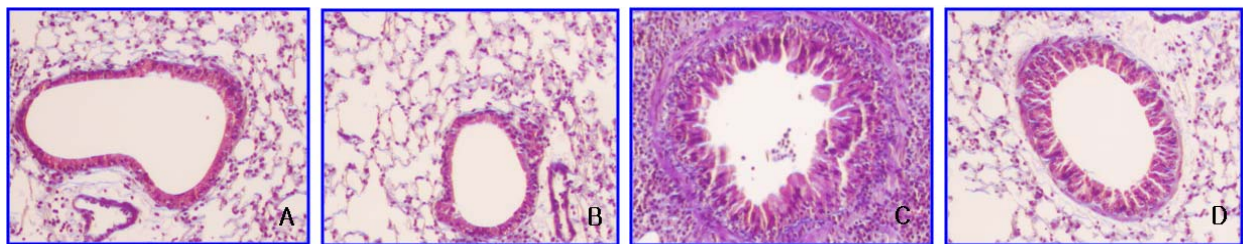


Fig. 4. Histological analysis of lung sections from mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12weeks (3times a week). The mice in the prophylaxis/treatment group were treated with NR extract for the later 8weeks(3times /week). Tissues were sliced and embedded in paraffin, and 6um sections were stained with masson's trichrome (blue : collagen)
 A. Normal : Normal C57BL/6 mice,
 B. NR I : Normal C57BL/6 mice and oral administration of NR extract
 C. Control : OVA-induced asthma model mice,
 D. NR II : OVA inhalation and oral administration of NR extract

고찰

천식(asthma)은 기관지의 만성 재발성 염증질환으로 다양한 종류의 자극에 과민반응하여 발작성수축을 일으키는 것을

특징으로 하며¹⁾ 이러한 증상이 저절로 혹은 치료로 호전되는 가역성 기류폐쇄를 나타내는 질환이다. 주로 어릴 때 많이 발생하는데 성인의 약 5%, 소아의 7~10%가 앓고 있다²⁾.

천식은 Th1 cytokines에 비해 Th2 cytokines인 IL-4,

IL-5, IL-13 등의 과다한 생성으로 유발되는 기관지 점막의 만성염증성질환이며, 호산구는 조직손상과 기도과민반응을 포함한 알레르기성 천식의 임상적 특징을 유발하는 원인이 되며, 또한 기관지수축 및 염증매개물질로 알려진 히스타민 leukotriens 등의 분비를 야기하는 것으로 알려져 있다.

IL-4는 주로 Th2세포에서 생성되어 B세포의 분화와 증식을 촉진하여 B세포 활성화와 IgE항체의 발생에 있어서 중요한 역할을 한다^{9,10}. IL-5는 Th2세포 및 활성화된 비만세포에 의해 생산되며 호산구의 성장과 분화를 자극하고 성숙한 호산구를 활성화한다^{9,10}. IL-13은 주로 Th2세포에서 생산되며 IL-4와 기능적으로 유의하여 Th2세포의 생성 및 IgE의 생산을 촉진한다. IgE는 주로 IL-4, IL-13, IFN- γ 에 의해 조절되고 비만세포나 호염기구의 세포표면에 강력히 결합하여 히스타민과 세로토닌 등 독성 아민화합물을 분비함으로써 심한 과민증상을 일으키게 하므로 알레르기 반응에서 중요한 요건이 된다^{9,10}.

본 실험 결과 혈청에서 IL-4, IL-5, IL-13, IgE의 level을 측정된 결과, 정상군과 NR I군은 거의 차이가 없었고, OVA-NR II군에서는 OVA-Control군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1).

이러한 결과 강활추출물이 IL-4, IL-5, IL-13의 생산을 억제함으로써 B세포와 호산구의 활성화 및 IgE의 생산을 억제하여 천식에서 염증 및 알러지 반응을 억제하는 효능이 있음을 의미한다.

Gr-1은 과립구에서 발현하는 분자이고, CD11b는 과립구, 단구, NK세포, 대식세포에 발현하는 세포유착분자(Mac-1)로^{3,9,10} 호산구가 표적장기로 유입할 때 Rolling 후 두 번째 단계에서 세포유착분자가 내피에 발현되어 있는 ICAM-1,2(intercellular adhesion molecule 1,2) 등과 유착하여 내피세포와 강하게 결합한 후 PAF LTB4, eotaxin(CCL11), RANTES 등의 화학주성인자에 의해 경피내 이동이 일어나 결체조직으로 유입된다^{9,10}. CCR3는 호산구에서 가장 높게 나타나고 호염기구, Th2세포, 천식환자의 기도상피세포에서 보이며 호산구의 활성화와 탈과립화에 관여한다^{3,9,10}. 본 실험의 FACS 측정결과 Gr-1⁺/CD11b⁺세포, CD11⁺세포 및 CCR3⁺세포는 정상군과 NR I군에서는 거의 차이가 없었고, OVA-Control군에서는 정상군에 비해 증가하였으나 OVA-NR II군에서는 OVA-Control군에 비해 감소하였다. 이는 강활추출물이 천식병리과정에서 염증세포의 감소와 더불어 호산구의 내피세포유착에 의한 경피내 이동 및 활성을 억제한 것으로 사료된다.

CD19는 대부분의 B세포에 발현하며 CD21 및 CD81과 공조수용체 복합체를 형성하여 B세포작용을 한다^{3,9,10}. 본 실험 FACS 측정 결과 CD19⁺세포수는 정상군과 NR I군은 거의 차이가 없었고 OVA-Control군에서는 정상군에 비하여 증가하였으나, OVA-NR II군에서는 OVA-Control군에 비해 감소하였다. 강활추출물이 알러지 반응을 나타내는 면역세포 중 B세포를 감소시킨 것으로 사료된다.

CD69는 활성화된 B세포와 T세포, 대식세포, NK세포에 분포하며 림프구의 신호전달에 관여한다^{9,10}. 본 실험 유세포형광 분석결과 CD3e⁺/CD69⁺세포수는 정상군과 NR I군은 거의 차이가 없었고 OVA-Control군에서는 정상군에 비하여 증가하였으나, OVA-NR II군에서는 OVA-Control군에 비해

감소하였다. 강활 추출물이 T세포의 활성을 억제한 것으로 사료된다.

강활추출물이 천식 병태에서 면역세포 활성화 및 사이토카인 발현을 억제하는 것으로 나타났으나, 정상군과 NR I군에서는 거의 차이가 없었다. 이는 강활추출물이 정상상태에서는 거의 작용하지 않고 병적인 상태에서만 염증 및 알러지 반응과 관련 있는 인자들을 조절하는 것으로 판단되어진다.

이상의 실험결과를 종합하면, 강활추출물이 천식 모델에서 중요한 역할을 하는 Th2세포의 활성화를 억제하고 염증유발 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13의 발현을 억제함으로써 B세포의 활성화 및 IgE의 생산을 억제하고 호산구의 세포유착에 의한 조직 및 기관지내로의 이동 및 침윤을 억제하는데 효과가 있으므로 임상적으로도 활용이 기대되며 면역관련 인자들을 조절하는 작용이 있는 것으로 판단되어 향후 이에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

결론

강활추출물을 OVA로 감작된 천식동물모델에서의 항 천식 효과를 알아보기 위해, C57B/6 mouse에 ovalbumin으로 천식을 유발한 후 유세포 형광염색한 폐조직내 Gr-1⁺/CD11b⁺, CCR3⁺, CD3⁺/CD19⁺, CD3e⁺/CD69⁺와 ELISA 분석에서 혈청내의 IL-4, IL-5, IL-13, IgE 그리고 H&E염색방법으로 폐 조직을 분석하면서 모든 결과를 관찰한 후 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 강활추출물 투여군에서의 혈청 내 IL-4, IL-5, IL-13, IgE에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였다.
2. 조직학적 소견에서 정상군에 비하여 OVA 유발한 군에서 폐기관지 벽에 collagen이 조직에 다량으로 부착되어 있는 것에 비하여 강활추출물 처리군에서는 collagen부착이 현저하게 감소되었다.
3. 폐 조직 내에서의 OVA-Control보다 OVA-NR II에서 Gr-1⁺/CD11b⁺, CCR3⁺, CD3⁺ /CD19⁺, CD3e⁺/CD69⁺의 비율은 대조군에 비해 현저하게 감소되었다.

이상의 결과로 강활추출물은 천식동물모델에 있어서 혈청내의 Th2 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-13, IgE의 생성억제에 의한 작용을 통하여 기도의 염증반응 및 과민반응을 억제시켜 천식증상을 완화시키는 것으로 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. The Korean Journal of Pathology, Pathology, Seoul : Koomoosa, 2004 : 458.
2. The Korean Association of Internal Medicine, 2006, Harrison's Principles of Internal Medicine, The publish MIP, 2003 ; 2 : 150.
3. Korean journal of asthma, allergy and clinical

- immunology. Asthma and allergic diseases, Seoul : Koonjapublisher., 2002 : 13-33, 244-50.
4. Masoli., Fabian, D., Holt, S., Beasley, R. The global burden of asthma : exrcutive summary of the Gina Dissemination Committee report. Allergy. 200 4 ; 59(5) : 469-478.
 5. National Health Insurance Corporation. 6 years (2002~2007) in recent times yellow sand relation spring season cluster lifestyle diseased health insurance medical institution user analysis(최근 6년 (2002~2007)간 황사관련 봄철 다발생 질환 건강보험 의 료기관 이용자 분석). <http://www.nhic.co.kr>
 6. Oriental medical university herbal medicine the National History Compilation Committee. Clinical Traditional Herbalogy. 2006. Seoul : Younglimsa.
 7. N o e D G (雷 載 權), J a n g J M (張 廷 模). Chinaclinicalpharmacy(中華臨床中藥學(上卷)). Beijing (北京) : InMinwisaengpublisher(人民衛生出版社). 199 8 : 204-9.
 8. Han YC(한용철). Clinicalneumología(임상호흡기학). Seoul : Ilchokak(일조각). 1995 : 208-25.
 9. Lukacs NW, Role of chemokines in the pathogenesis of asthma, Nat Rev Immunol. 2001 ; 1(2) : 108-16.
 10. Abul K Annas, Andrew H Lichtman. Cellular and Molecular Immunology. EPUBLIC. 2004 : 477-522.
 11. Korean journal of asthma, allergy and clinical immunology. Asthma and allergic diseases, Seou l : Koonjapublisher, 2002 : 1-44, 59-67, 237-326.
 12. The Korean Journal of Pathology. Pathology. Seoul : Komoonsa. 2004 : 458.
 13. Kim CM, Park YK. The Effects of Different Extracts of Ostericum koreanum on the Production of Inflammatory Mediators in LPS-stimulated RAW264,7 Cells. Kor. J. Herbology 2009 ; 24(1) : 169-178.
 14. Lee JG, Park YC. Effects of Seonpye-tang on OVA-Induced Asthmatic Mice, Korean J. Oriental Physiology & Pathology 2009 ; 23(2) : 457-463.
 15. Lee MJ, KimJH, Choi JH, Park SY. Effects of Pinelliae Rhizoma on Gene Expression of Lung Tissue from Asthma induced Mice. Korean J. Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2008 ; 21(3) : 36-51.
 16. Fink KB, Göothert M. 5-HT receptorregulation of neurotransmitter release. Pharmacol Rev. 2007 ; 59(4) : 360-417.
 17. 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.
 18. Kwon TH, Lee YC, Lee JC. The Synergistic Effect of Juglans sinensis, Psoralea corylifolia, and Their Combination on the Asthmatic Murine Model. Kor. J. Herbology. 2009 ; 24(2) : 39-48.
 19. Jang, SG, Hong, KE, Lee, BR. The Experimental Study on the Immuno-regulatory effect of Notopterygii Rhizoma Herbal-acupuncture at Pyesu(BL13) on OVA-induced asthma in mice. Kor. J. maridian & acupoint 2005 ; 22(2) : 107-125.
 20. 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.