

The Inhibitory Effects of Lactose- β -sitosterol on the Inflammatory Responses of HMC-1 Cells and EoL-1 Cells

Eun Ju Yang¹ and In Sik Kim^{2,†}

¹Department of Clinical Laboratory Science, Daegu Haany University, Gyeongsangbuk-do 712-715, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, School of Medicine, Eulji University, Daejeon 301-746, Korea

β -sitosterol glucoside exists in a variety of plants and have anti-tumor, anti-microbial, and immunomodulatory activities. Mast cells and eosinophils play important roles in a variety of inflammatory diseases, specifically asthma and atopic dermatitis. In the present study, we used lactose- β -sitosterol (L-BS) and investigated the effect of L-BS on inflammatory responses of the human mast cell line, HMC-1 and the human eosinophilic leukemia cell line, EoL-1. In HMC-1 cells, L-BS significantly inhibited cell migration in response to stem cell factor without cytotoxicity. However, the mRNA expression of CC chemokine receptors (CCRs), including CCR1-5, were not altered after L-BS treatment in HMC-1 cells. LPS-induced IL-4 production was also suppressed by L-BS in a dose-dependent manner. In EoL-1 cells, the concentration ranging from 0.1 μ M to 10 μ M of L-BS had no cytotoxicity and had no effect on mRNA expression of major protein-mediators derived from activated eosinophils. However, 100 μ M of L-BS induced the apoptosis of EoL-1 cells in a time-dependent manner. This finding indicates the possibility of L-BS as a potential therapeutic molecule in inflammatory diseases and may contribute to the need to improve current therapeutic drugs.

Key Words: Lactose- β -sitosterol, Anti-inflammatory effect, HMC-1 cells, EoL-1 cells

서 론

β -sitosterol (BS)은 다양한 식물 추출물에 존재하는 phyosterols의 한 종류로 과일 및 야채를 섭취한 사람에게서도 미량인기는 하나 검출되기도 한다 (Pegel, 1997). BS-글루코시드 (glucoside)는 BS가 당원질화된 물질로 말초혈액 림프구와 자연살해세포의 증식 및 활성화에 관여하고, 혈액 콜레스테롤 함량 및 인슐린 분비를 조절한다고 알려져 있다 (Gupta et al., 1980; Ivorra et al., 1988; Bouic et al., 1996; Fernandez and Vega-Lopez, 2005). 이러한 기존 연구들을 통해 BS-글루코시드가 중앙 질환, 심혈관 질환, 폐결핵 및 다양한 면역관련 질환에서 치료효능을 가진 물질로서의 가능성을 보여준다 (Bouic and Lamprecht,

1999). 특히, BS-글루코시드는 알러지성 염증과 같은 면역 질환에 관여할 것으로 사료되나 아직 그에 관한 연구들이 많이 미흡한 실정이다. 천식, 알러지성 비염 등이 포함된 알러지성 염증 질환에는 다양한 면역세포들이 관여하고, 그 중에서도 비만세포, 호산구, Th2 림프구가 주로 작용한다. Th2 사이토카인인 인터루킨 (IL)-4, IL-5가 B 림프구에서 면역글로불린 E (IgE) switching을 유도하고 이는 병변부위로 비만세포와 호산구의 침윤 및 다양한 염증매개물질의 분비를 증가시킨다 (Kay, 2001). 세포의 이동에는 케모카인과 그에 대응하는 케모카인 수용체의 작용으로 발생하는데, 비만세포의 이동은 주로 stem cell factor (SCF)에 의해서 유도된다 (Nilsson et al., 1994; Okumura et al., 1996). 침윤된 비만세포는 항원이 들어오면 감염부위로 이동한 다음 히스타민, 사이토카인, 프로스타글란딘 등의 다양한 염증매개물질을 분비하여 질병을 악화시킨다 (Bisset and Schmid-Grendelmeier, 2005). 또한 호산구는 손상 및 감염부위로 이동하여 eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil-driven neurotoxin (EDN), major basic protein (MBP)와 같은 특이 과립 단백질이나 활성산소종 (reactive oxygen species)을 분비하여 외부 항

*접수일: 2011년 9월 26일 / 수정일: 2011년 9월 28일

채택일: 2010년 9월 28일

†Corresponding author: In Sik Kim, Department of Biomedical Laboratory Science, School of Medicine, Eulji University, 143-5, Yeuongdu-dong, Jung-gu, Daejeon 301-746, Korea.

Tel: 042-259-1753, Fax: 042-259-1759

e-mail: orientree@eulji.ac.kr

원에 대한 방어를 하지만, 지나치게 되면 오히려 염증반응을 더 악화시키는 결과를 초래하게 된다 (Rothenberg and Hogan, 2006).

이에 본 연구에서는 BS-글루코시드 중 lactose-BS (L-BS)가 염증반응에서 억제효과가 있는지 확인하고자 사람 비만세포주인 HMC-1 세포와 사람 호산구성 백혈병 세포주인 EoL-1 세포를 이용하였다. 우선 L-BS의 농도별 세포독성 효과를 확인한 후 독성효과가 보이지 않은 농도로 각 세포에 처리하여 세포이동, 사이토카인의 발현 및 케모카인 수용체의 발현변화를 확인하였다. 또한 EoL-1 세포에서 호산구가 분비하는 염증매개물질인 특이 과립 단백질의 발현을 확인하고, 세포고사를 유도하는지 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양

사람의 비만세포주인 HMC-1 세포는 Dr. Butterfield (Rochester, MN)으로부터 분양 받았으며, Iscove's 배지 (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD)에서 배양하였다. 또한 사람 호산구성 백혈병 세포주인 EoL-1 세포 (Riken cell bank, Tsukuba, Japan)는 RPMI 1640 배지 (Invitrogen Life Technologies)에서 배양하였다. 각각의 배지는 10% 소태아혈청 (fetal bovine serum, FBS), 100 U/ml의 페니실린, 100 µg/ml의 스트렙토마이신 (Life technologies, Inc., Gaithersburg, MD)이 포함되었고 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

MTT 측정법

L-BS의 세포독성 효과가 있는지 확인하기 위해 MTT 측정법 (Roche, Penzberg, Germany)을 이용하였다. 각각의 세포는 5×10⁴ cells/100 µl의 농도로 배양액에 부유하여 96 well plate에 분주한 다음 다양한 농도의 L-BS (0.1~10 µM)를 24시간 동안 처리하였다. 이후 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 10 µl 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간을 배양한 다음 100 µl의 MTT 용해액을 추가로 첨가하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 하루 동안 방치한 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포유주운동 측정법

L-BS가 HMC-1 세포의 이동에 관여하는지 확인하기

위해 48-well 마이크 챔버 (Neuroprobe, Gaithersburg, MD)를 이용한 세포유주운동을 측정하였다. 마이크 챔버의 아래쪽 well에는 SCF (100 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 28 µl로 채워준 후 8 µm 크기의 구멍이 있는 polyvinylpyrrolidone 필터 (Neuroprobe)를 그 위에 놓았다. 필터 막은 피브로넥틴 (fibronectin) (sigma, St. Louis, MO)을 100 µg/ml로 포함한 RPMI 1640 배지에 넣고 4°C에서 하루 동안 미리 코팅을 시켜놓았다. 위 쪽 부위의 well에는 1% 소태아 알부민 (bovine serum albumin, BSA)과 30 mM HEPES를 포함하는 RPMI 1640 배지에 5×10⁶ cells/ml의 농도로 부유시켜 놓은 HMC-1 세포를 50 µl씩 채웠다. 그 뒤 37°C에서 5시간 방치한 후 필터 막을 따로 제거하여 위쪽 표면에 부착되어 있는 세포들을 필터 와이퍼로 제거하였다. 건조시킨 필터 막을 메탄올 고정 후 Diff-Quick (Baxter, McGaw Park, IL)으로 염색을 하였다. 각 well에 해당하는 필터 막 부위에서 무작위로 다른 두 군데의 부위를 선택하여 Axiovert 25 (Carl Zeiss, Jena, Germany)와 Visus 이미지 분석계 (Foresthill Products, Foresthill, CA)를 이용해 세포의 수를 측정하였다.

역전사 중합효소연쇄반응 (Reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

L-BS에 의해 염증관련 유전자들의 발현변화를 관찰하고자 RT-PCR을 실시하였다. 각 세포에 L-BS를 농도 별로 처리한 다음 24시간 동안 배양시켰다. 세포에서 Trizol 시약 (Invitrogen Life Technologies)을 이용하여 RNA를 추출하였고 추출한 RNA를 cDNA로 합성하기 위해 cDNA synthesis kit (Promega, Madison, WI)를 이용하여 RNA 2 µg을 37°C에서 90분 동안 반응시켰다. 합성된 cDNA는 94°C, 5분간 변성시키고, 표적유전자를 증폭시키기 위해 변성단계 94°C, 1분, 결합단계 58°C, 1분, 연장단계 75°C, 1분으로 구성된 과정을 30회 반복하였다. 반복이 끝난 다음 마지막 연장을 위해 75°C, 5분 동안 반응시켰다. 본 연구에서 사용된 각각의 프라이머는 Table 1에 나와 있다. GAPDH는 각 PCR 반응의 대조군으로 사용하였다. 생성된 PCR 산물을 1% 아가로스 젤에서 전기영동하였고 ethidium bromide (EtBr) 염색을 통해 확인하였다.

유세포 분석기

L-BS가 EoL-1 세포에서 세포고사를 유도하는지 확인하기 위해 세포에 L-BS를 농도별로 처리한 다음 annexin V-FITC와 propidium iodide (PI) (BD bioscience, San Diego,

Table 1. Primer sequences for RT-PCR

Gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
CCR1	CTC TTC CTG TTC ACG CTT CC	CCA AAT GTC TGC TCT GCT CA
CCR2	AAC TCC TGC CTC CGC TCT AC	TCA CTG CCC TAT GCC TCT TC
CCR3	TCT TCC TCG TCA CCC TTC CA	GCT TCG TCC GCT CAC AGT CA
CCR4	CTT CCT GCC CCC ACT GTA TT	TCT TCA CCG CCT TGT TCT TC
CCR5	TCC TGC CTC CGC TCT ACT	GAA CTT CTC CCC GAC AAA
IL-4	GGA CAC AAG TGC GAT ATC ACC	ATT TCT CTC TCA TGA TCG TC
IL-5	GAA ATT CCC ACA AGT GCA TTG	CTT TCT ATT ATC CAC TCG GTG TTC
ECP	CTC ACA GGA GCC ACA GC	GGG CAG CGT ATA CTT TGG
EDN	GGA TCA GTT CTC ACA GGA GCT ACA	CCC AAC AGA GAG AGC AGA CAA A
MBP	AGT GGT GGG CAT CCC TGG	GGC CAC GCA GTG ACC ACC
GAPDH	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

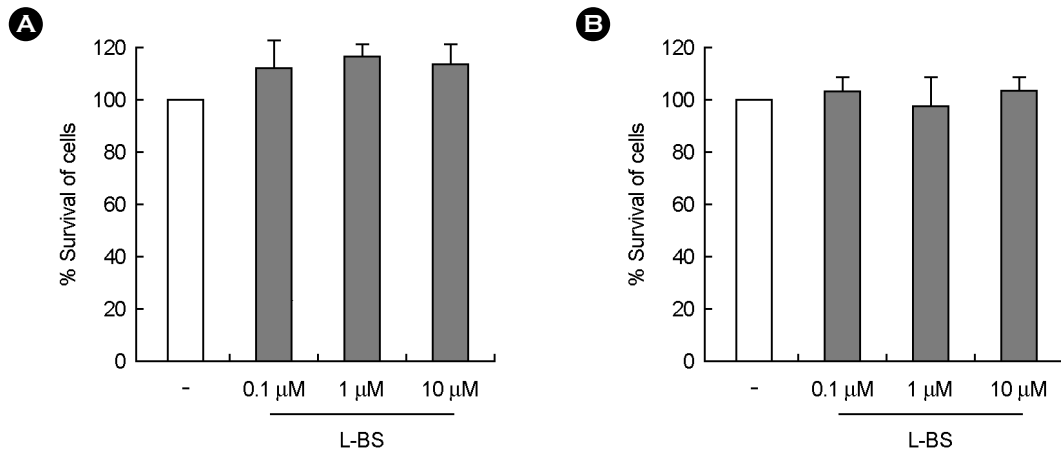


Fig. 1. Cytotoxic effect of L-BS on HMC-1 cells and EoL-1 cells. HMC-1 cells (A) and EoL-1 cells (B) were incubated with the L-BS at the indicated concentrations for 24 h. The survival rate was measured by performing MTT assay as described in the materials and methods section. The data are expressed as the relative ratio to the absorbance of the untreated cells, which were set at 100%. Three replicate measurements are included in a single experiment. The data are expressed as means \pm SD of three independent experiments.

CA)를 첨가하여 실온에서 15분간 방치하였다. 그 후 염색된 세포는 유세포 분석기 (FACSCalibur, BD bioscience)를 통해 세포고사가 진행된 세포를 측정하였다. Annexin V가 염색된 모든 세포를 세포고사가 일어난 세포로 정의하고 각 샘플당 총 10,000개의 세포를 분석하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 통계적인 유의성을 측정하기 위해 대조군과 L-BS 처리군의 결과를 SPSS 통계분석프로그램 (SPSS Inc., Chicago, IL)을 이용하여 Student's *t*-test로 분석하였고, 각 통계 처리의 *P* 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있다고 해석하였다.

결 과

HMC-1 세포 및 EoL-1 세포에 대한 L-BS의 독성효과

HMC-1 세포와 EoL-1 세포에 L-BS를 농도별로 24시간 동안 처리하여 MTT 측정법을 통해 세포생존율을 확인하였다. 그 결과 L-BS를 처리하였을 때 각 세포의 생존율에 전혀 영향을 주지 않았다 (Fig. 1). 이를 통해 L-BS가 각 세포에 대한 독성효과가 없음을 확인하고 이후 실험에도 본 농도로 처리하여 결과를 확인하였다.

HMC-1 세포의 유주운동에 대한 L-BS의 효과

비만세포가 케모카인에 의해 병변부위로 이동하는 유

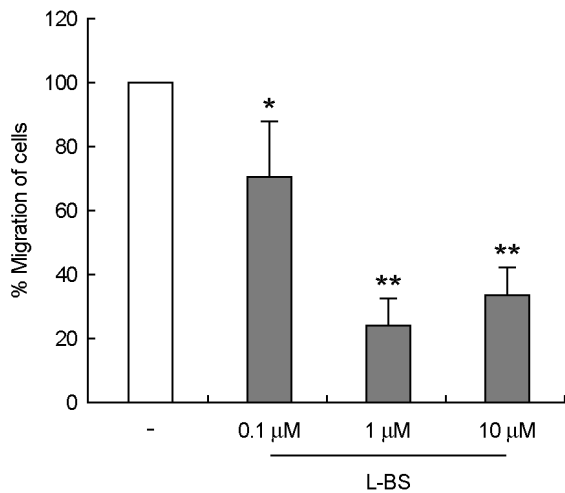


Fig. 2. Effect of L-BS on the SCF-induced cell migration. HMC-1 cells were pre-incubated in the absence (Con) or presence of L-BS at the indicated concentrations for 24 h. The cells were applied to 100 ng/ml SCF in a 48-well microchamber and they were allowed to migrate for 5 h. The number of cells that migrated was counted microscopically in six individual wells. The data are expressed as means \pm SD in relation to the negative control, which was set at 100 %. * P <0.05 and ** P <0.01 were considered a significant difference between the untreated group and L-BS-treated group.

주운동은 체내 면역반응에서 중요한 기전으로 작용한다. 본 연구에서도 HMC-1 세포의 유주운동이 L-BS에 의해 변화하는지 확인하고자 L-BS를 처리한 다음 비만세포의 유주운동을 유도하는 케모카인인 SCF에 의한 세포 이동을 관찰하였다. 그 결과, SCF에 의해 HMC-1 세포의 이동이 증가한 대조군과 비교했을 때, L-BS를 처리한 세포는 농도의존적으로 세포이동을 감소시키고, 그 결과가 통계적으로 유의한 것을 확인하였다 (Fig. 2).

HMC-1 세포 내 염증인자의 발현에 미치는 L-BS의 효과

L-BS가 염증관련인자의 발현에 작용하는지 확인하기 위해 각 염증매개물질의 mRNA 발현변화를 확인하였다. 특히, 알러지성 질환에서 중요하게 작용하는 IL-4와 IL-5의 발현변화를 확인하고자 염증유발인자인 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하였다. 그 중, IL-4는 L-BS에 의해 발현이 크게 감소된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A). 반면, IL-5는 큰 변화를 보이지 않았다 (Fig. 3A). 또 다른 염증반응을 관찰하기 위해 케모카인에 의한 세포이동 시 작용하는 케모카인 수용체의 발현을 확인하였다. 특히, CC 케모카인 수용체의 발현을 측정할 결과, L-BS에 의해 HMC-1 세포 내의 CC 케모카인 수용체의 발현변화는 보이지 않았다 (Fig. 3B). 본 결과를 통해, L-BS가 IL-4

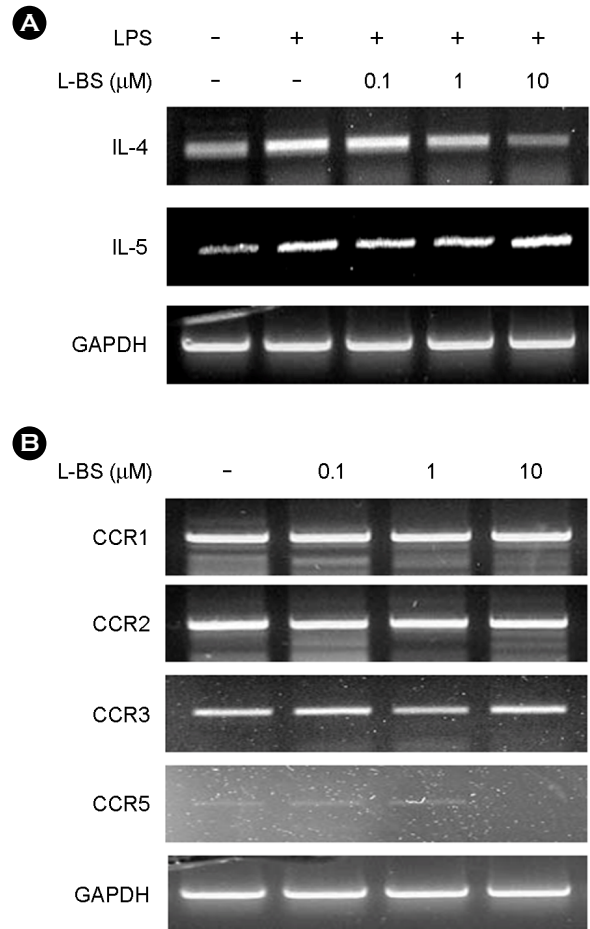


Fig. 3. Effect of L-BS on expressions of IL-4, IL-5 and CC chemokine receptors (CCRs) in HMC-1 cells. (A) HMC-1 cells were pre-treated at the indicated concentration of L-BS for 1 h, and were then stimulated with 10 μ g/ml LPS. The cells were incubated for 24 h. (B) HMC-1 cells were incubated in the absence or presence of L-BS at the indicated concentrations for 24 h. The mRNA expressions of IL-4, IL-5 and CCRs were analyzed by RT-PCR as described in the materials and methods section. The bands were normalized with GAPDH. The data are expressed as representative of three independent experiments.

의 mRNA 발현을 감소시켜 염증반응 약화에 관여하지만, CC 케모카인 수용체의 발현에는 아무런 영향을 주지 않았음을 알 수 있다.

EoL-1 세포의 염증반응에 미치는 L-BS의 효과

염증부위의 호산구는 활성화되고 다양한 염증매개물질인 특히 과립 단백질을 분비하여 염증을 더욱 악화시킨다. 또한 활성화된 호산구는 정상적인 세포고사를 통해 제거되지 않고 지속적으로 생존하면서 염증반응에 관여한다. L-BS가 이런 염증반응에 작용하는지 확인하기 위해 사람 호산구성 백혈병 세포주인 EoL-1 세포를 이용하여

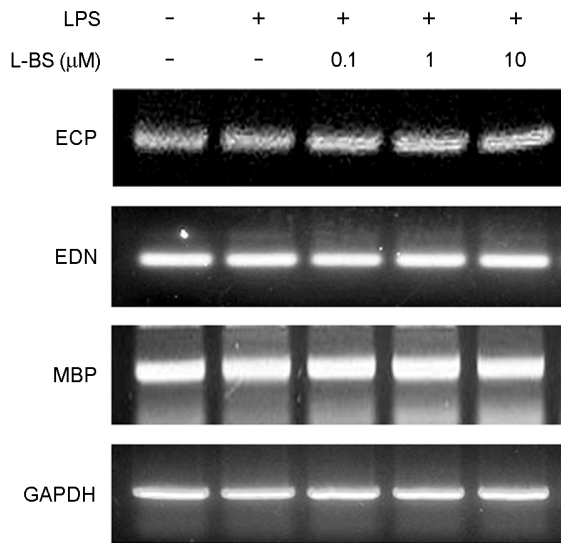


Fig. 4. Effect of L-BS on expressions of ECP, EDN and MBP in EoL-1 cells. EoL-1 cells were pre-treated at the indicated concentration of L-BS for 1 h, and were then stimulated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS. The cells were incubated for 24 h. The mRNA expressions of ECP, EDN and MBP were analyzed by RT-PCR as described in the materials and methods section. The bands were normalized with GAPDH. The data are expressed as representative of three independent experiments.

대표적인 호산구의 특이 과립 단백질인 ECP, EDN, MBP의 유전자 발현변화를 관찰하였다. 그러나, EoL-1 세포에 염증유발인자인 LPS를 처리한 다음 L-BS를 처리하였지만 L-BS에 의해 아무런 변화도 보이지 않았다 (Fig. 4). 반면, 100 μM 의 L-BS를 EoL-1 세포에 처리하였을 때, 시간에 따라서 세포고사가 증가함을 관찰하였다 (Fig. 5). 본 결과를 통해, L-BS는 EoL-1 세포에서 특이 과립 단백질의 발현에는 영향을 미치지 못하지만 세포고사를 유도하여 염증반응 억제에 관여함을 알 수 있다.

고 찰

천식 및 아토피성 피부염 등을 포함한 알러지성 질환은 산업화가 진행될수록 급격히 증가하고 있는 질환이다. 이를 치료하기 위해 매년 스테로이드계, leukotriene 억제제, β -아드레날린 작용제 등의 다양한 약제들이 개발되고 사용하였지만, 명확한 치료효과를 기대하기 어려웠고 일부 부작용들이 발생하는 약제들도 있었다. 이에, 본 연구에서 L-BS의 효과를 확인하고자 하였다. L-BS는 β -

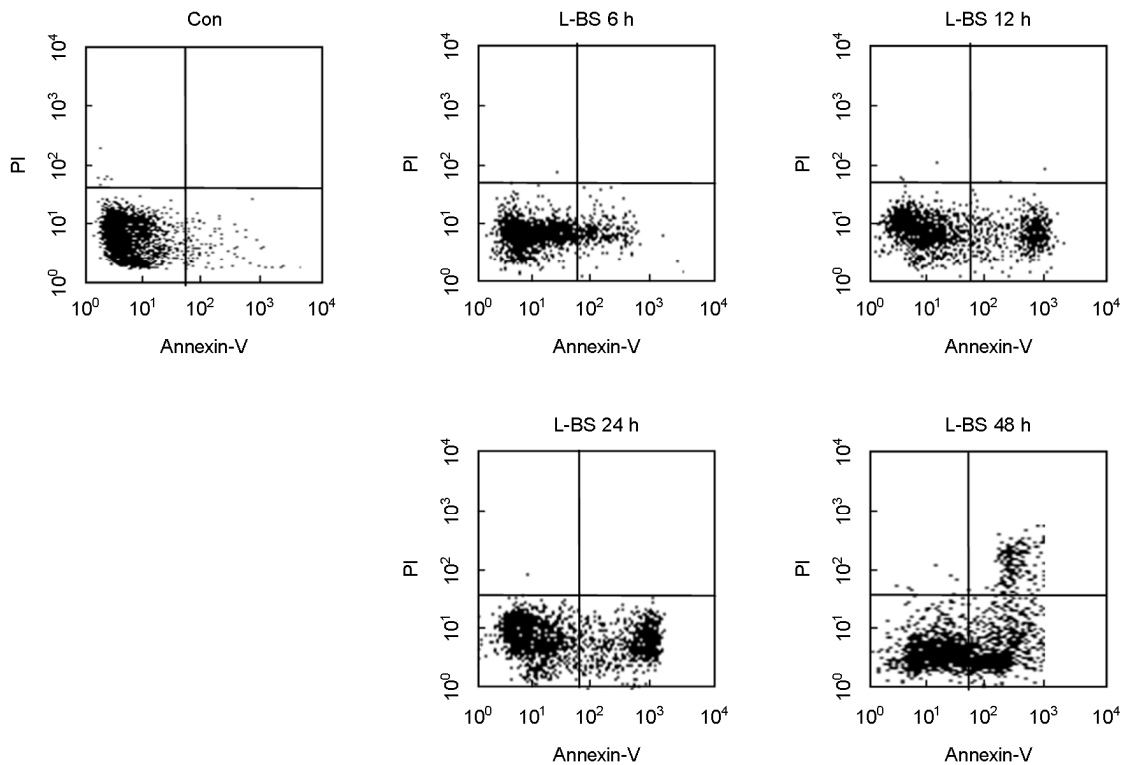


Fig. 5. Effect of L-BS on the apoptosis of EoL-1 cells. EoL-1 cells were incubated with 100 Mm L-BS for the indicated time. For the apoptosis assay, the cells were incubated with annexin V-FITC and PI, and analyzed by FACSCalibur using Cell Quest software as described in the materials and methods section. Data were displayed by dot plot and the dot plot represents the distribution of the events within the plots. The lower- and upper-right phase is the apoptotic cells.

스테로이드가 당원질화물질로 이전에 β -스테로이드보다 L-BS가 천식 유발 마우스에서 더 뛰어난 항천식 효과가 있음을 관찰한 바가 있다 (Yuk et al., 2007). 또한 면역 질환에서 일부 치료효과가 보고되어 왔지만 (Bouic and Lamprecht, 1999), 명확한 기전까지 파악하기에는 연구가 많이 부족한 실정이다. 특히, 본 연구에서는 인체에서 유래된 세포 중 알러지성 질환에서 주요하게 작용하는 세포인 비만세포와 호산구의 작용기전에서 L-BS의 항염증 효과를 관찰하고자 하였다. 우선 치료효능을 확인하기 전에 L-BS의 세포독성 효과를 확인하고자 농도 별로 L-BS를 처리하여 확인하였는데 세포독성 효과는 보이지 않았다 (Fig. 1). 그 다음의 치료효능 실험을 진행하기에 적합한 물질임을 확인하였다.

비만세포는 조혈모세포에서 유래되어 결합조직에서 성숙한다. 성숙한 비만세포는 염증이 발생한 부위로 이동하여 히스타민, 사이토카인, 프로스타글란딘 등을 분비하여 면역반응에 관여하지만 과도하게 염증매개물질들을 분비하게 되면 오히려 질병의 악화를 가져온다 (Williams and Galli, 2000; Theoharides and Cochrane, 2004). 특히 SCF는 비만세포의 증식, 생존 및 유주운동에 관여하는 케모카인으로 비만세포 표면에 존재하는 수용체인 c-kit에 작용하는데 본 연구실에서 사람 비만세포주인 HMC-1 세포에서 SCF에 의해 세포이동이 유도됨을 확인한 바가 있다 (Kim et al., 2007). 그러나 L-BS는 SCF의 자극으로 인해 유도되는 HMC-1 세포의 이동을 농도가 높을수록 유의하게 감소시키는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 또한 케모카인에 의한 세포의 이동이 염증반응을 악화시키는데 중요한 기전으로 작용한다. 케모카인은 세포 표면에 발현되어 있는 케모카인 수용체와 반응하여 세포의 이동을 유도하게 되므로, 케모카인 수용체 발현이 증가하면 염증부위로의 세포유주운동이 증가함을 의미한다. 특히, CC 케모카인은 호산구와 Th2 세포 및 비만세포와 같이 다양한 면역세포에 작용하여 천식과 같은 알러지성 질환의 발병기전에 관여한다는 연구가 보고되어 왔다 (Lee et al., 2006; Choi et al., 2011). 그러나, L-BS가 비만세포에서 CC 케모카인 수용체의 발현을 감소시키지는 않았다 (Fig. 3B). 이는 L-BS가 SCF에 의한 비만세포의 유주운동을 억제하여 염증반응 감소에 관여하지만, CC 케모카인 수용체의 발현을 조절하지는 못함을 알 수 있다.

또한 비만세포에서 IL-4의 mRNA 발현 양이 L-BS에 의해 급격히 감소되었다 (Fig. 3A). IL-4는 Th2 사이토카인으로 상피세포, 대식세포, 비만세포 등 염증부위로 이

동한 세포들에 의해 분비되는 것으로, 특히, 알러지성 질환에서는 B 림프구에서 IgE switching 하고 점액 과분비, 다른 염증세포의 침윤을 유도한다 (Barnes et al., 1998; Kips, 2001). IL-5는 호산구의 활성화와 생존에 필수적으로 작용하는 사이토카인이지만 L-BS에 의해 억제되지 않는다 (Fig. 3A), EoL-1 세포를 이용하여 호산구에 직접적으로 L-BS가 작용하여 항염증 효과를 보일 수 있는지 관찰하였다. 호산구 또한 염증부위에 침윤하여 특이 과립 단백질 및 활성산소종을 분비하여 외부 항원제거에 작용하지만 반응이 계속적으로 지속되면 다른 염증세포의 활성화, 점액 분비, 근수축 등으로 인해 오히려 인체 조직 손상을 유발한다 (Tsuyuki et al., 1995; Henricks and Nijkamp, 2001). 특히, 호산구가 분비하는 ECP, EDN, MBP는 호염기구, 호중구, 혈소판 등의 면역세포의 활성을 유발하여 항원에 대한 강력한 독성효과를 보이지만 과다분비 및 장기간 지속 시 염증반응을 악화시켜 이 물질의 분비를 억제함으로써 항염증 효과를 보일 수 있다 (Kita et al., 1995). ECP, EDN, MBP의 발현에 대한 L-BS의 효과는 보이지는 않았지만 100 μ M의 L-BS를 EoL-1 세포에 처리하였을 때 세포고사가 유도되는 것을 관찰하였다 (Fig. 4, Fig. 5). 이 결과는 L-BS가 호산구의 염증매개물질 분비에는 관여하지 못하지만 세포고사를 유도함으로써 염증반응을 억제한다고 알 수 있다.

본 연구에서 확인한 바와 같이, L-BS는 세포독성 없이 비만세포가 염증부위로 이동하여 사이토카인을 분비하지 못하게 억제하고, 호산구의 세포고사를 유도하여 과도한 염증반응이 발생하는 것을 차단한다. 이는 L-BS가 세포마다 특이적으로 작용하여 조절하는 것을 나타내고, 항염증 효과로 인해 다양한 염증질환, 특히, 알러지성 질환에서 좀 더 효율적인 치료제 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

REFERENCES

- Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev.* 1998. 50: 515-596.
- Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Current Opinion Pulmonary Medicine* 2005. 11: 35-42.
- Bouic PJ, Etsebeth S, Liebenberg RW, Albrecht CF, Pegel K, Van Jaarsveld PP. Beta-Sitosterol and beta-sitosterol glucoside

- stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *Int J Immunopharmacol*. 1996. 18: 693-700.
- Bouic PJ, Lamprecht JH. Plant sterols and sterolins: a review of their immune-modulating properties. *Altern Med Rev*. 1999. 4: 170-177.
- Choi E, Yang EJ, Kim D-H, Lee J-S, Kim IS. CCR expression of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) neutrophils and chemotactic activity of BALF. *J Exp Biomed Sci*. 2011. 17: 89-93.
- Fernandez ML, Vega-Lopez S. Efficacy and safety of sitosterol in the management of blood cholesterol levels. *Cardiovasc Drug Rev*. 2005. 23: 57-70.
- Gupta MB, Nath R, Srivastava N, Shanker K, Kishor K, Bhargava KP. Anti-inflammatory and antipyretic activities of β -sitosterol. *Planta Med*. 1980. 39: 157-163.
- Henricks PA, Nijkamp FP. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Ther*. 2001. 14: 409-420.
- Ivorra MD, D'Ocon MP, Paya M, Villar A. Antihyperglycemic and insulin releasing effects of β -sitosterol 3- β -D-glycoside and its aglycone β -sitosterol. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1988. 296: 224-231.
- Kay AB. Allergy and allergic diseases, first of two parts. *N Engl J Med*. 2001. 344: 30-37.
- Kim IS, Kim J-H, Kim JS, Yun C-Y, Kim D-H, Lee J-S. The inhibitory effect of *Houttuynia cordata* extract on stem cell factor-induced HMC-1 cell migration. *J Ethnopharmacol*. 2007. 112: 90-95.
- Kips JC. Cytokines in asthma. *Eur Respir J Suppl*. 2001. 34: 24-33.
- Kita H, Abu-Ghazaleh RI, Sur S, Gleich GJ. Eosinophil major basic protein induces degranulation and IL-8 production by human eosinophils. *J Immunol*. 1995. 154: 4749-4758.
- Lee J-S, Yang EJ, Ryang Y-S, Kim IS. Chemotactic effect of leukotactin-1/CCL15 on human neutrophils. *J Exp Biomed Sci*. 2006. 12: 145-151.
- Nilsson G, Butterfield JH, Nilsson K, Siegbahn A. Stem cell factor is a chemotactic factor for human mast cells. *Journal of Immunology* 1994. 153: 3717-3723.
- Okumura N, Tsuji K, Ebihara Y, Tanaka I, Sawai N, Koike K, Komiyama A, Nakahata T. Chemotactic and chemokinetic activities of stem cell factor on murine hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996. 87: 4100-4108.
- Pegel KH. The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition. *SA J Sci*. 1997. 93: 263-268.
- Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annual Review of Immunology* 2006. 24: 147-174.
- Theoharides TC, Cochrane DE. Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *J Neuroimmunol*. 2004. 146: 1-12.
- Tsuyuki S, Bertrand C, Erard F, Trifilieff A, Tsuyuki J, Wesp M, Anderson GP, Coyle AJ. Activation of the Fas receptor on lung eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways. *J Clin Invest* 1995. 96: 2924-2931.
- Williams CM, Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2000. 105: 847-859.
- Yuk JE, Woo JS, Yun C-Y, Lee J-S, Kim J-H, Song G-Y, Yang EJ, Hur IK, Kim IS. Effect of lactose- β -sitosterol and β -sitosterol on ovalbumin-induced lung inflammation in actively sensitized mice. *Int Immunopharmacol*. 2007. 7: 1517-1527.