大韓本草學會誌 제28권 제6호(2013년 11월)
Kor. J. Herbology 2013 ; 28(6) : 15-23

ISSN 1229-1765
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2013.28.6.15.

백개자, 나복자 및 두 배합 약물의 천식 동물 모델에 대한 효과

김창민[1#], 이영철[1], 이장천[2*]

1 : 상지대학교 한의과대학, 2 : 부산대학교 한의학전문대학원 약물의학부

The Effects of Sinapis Semen, Raphani Semen, and mixture decoction on the Asthmatic Mouse Model

Chang-Min Kim[1#], Young Cheol Lee[1], Jang-Cheon Lee[2*]

1 : College of Korean Medicine, Sangji University 2 : School of Korean Medicine, Pusan National University

ABSTRACT

Objectives : To clarify the possible effects of Sinapis Semen and Raphani Semen on the development of pulmonary eosinophilic inflammation in a asthmatic mouse model.

Methods : BALBav/c mice were sensitized to OVA followed intratracheally and by aerosol allergene challenges. We investigated the effect of Sinapis Semen and Raphani Semen on airway hyperresponsiveness, eosinophiic infitratio, immune cell phenotype, The2 cytokine product, and OVA-spedific IgE production.

Results : Total lung cells, eosinophils, and lung leukocytes, OVA specific IgE levels, and Th 2cytokine levels such as IL-5, IL-13, IL-17, TNF-alpha, and eotaxin in BALF were reduced compared with those of OVA sensitized asthma mice (control). The absolute numbers of $CD3^+$, $CD3^+/CD69^+$, $CD3^-/CCR3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $Gr-1^+/CD11b^+$, $B220^+/CD22^+$, $B220^+/IgE^+$ cells in lung tissiues significantly reduced compared to those of control. Specially total lung cells in BALF and the absolute number of $CD3^+/CD69^+$ and, $B220^+/IgE^+$ cells in lung tissiue effectively reduced in Sinapis Semen plus Raphani Semen compared to those of Sinapis Semen and Raphani Semen.

Conclusions : These results indicate that Sinapis Semen plus Raphani Semen has deep inhibitory effects on airway inflammation and hyperresponsiveness in asmatic mouse model and also has effect of suppression of IL-5, IL-13, IL-17, OVA specific IgE production in BALF. The results verified that Sinapis Semen, Raphani Semen, and Sinapis Semen plus Raphani Semen could act as a immunomodulator which possess anti-inflammatory and anti-asthmatic property by modulating the relationship of Th1/Th2 cytokine imbalance.

Key words : Sinapis Semen, Raphani Semen, Asthma

서 론

천식은 Th2 cytokines인 IL-4, IL-5, IL-13 등의 과다한 생성으로 유발되는 기관지 점막의 만성 염증성 질환[1)]으로 환경적 요인과 유전적 요인이 복합적으로 작용하여 발생되는 것으로 알려져 있다[2)]. 기관지 평활근의 수축, 기관지벽의 부종, 염증세포의 침윤 및 기관지강내의 점액물질이 기관지 협착을 야기하며, 이는 다시 기침, 호흡곤란, 천명의 3대 증상을 유발한다. 또한 기도 상피세포의 손상으로 기관지 수축 반사가 증가되고, 점액 분비선의 증가, 점막과 점막하 부종, 호산구 및 염증세포의 침윤 등으로 기도 저항이 증가되어 천식이 유발되는 것으로 알려져 있다. 호산구와 Th2 아형의 $CD4^+$ T 세포는 조식손상과 기도 과민반응을 포함한 알러지성 천식의 임상적 특징을 유발하는 주 원인이 되며, 또한 기관지 수축 및 염증매개물질로 알려진 histamine, leukotriens 등의 분비를 야기하는 것으로 알려져 있다[3-7)].

*교신저자 : 이장천. 경남 양산시 물금읍 범어리 부산대학교 한의학전문대학원
· Tel : 051-510-8459 · E-mail : jcl7788@pusan.ac.kr
#제1저자 : 김창민. 강원도 원주시 우산동 상지대학교 한의과대학
· Tel : 010-5189-6840 · E-mail : sangjiyakja@sangji.ac.kr
· 접수 : 2013년 10월 23일 · 수정 : 2013년 11월 08일 · 채택 : 2013년 11월 12일

한의학에서 천식은 哮喘證에 해당하며 外感風寒, 痰濕內盛 등에 의한 實證과 肺虛, 心腎虛損, 上實下虛 등에 의한 虛證으로 구분되며, 實證은 祛風散寒, 宣肺定喘, 燥濕化痰, 降氣定喘 등의 치료법이 사용되며, 虛證은 養肺定喘, 納氣定喘 등의 치료법이 사용되고 있다.

白芥子와 萊菔子의 배오는 三子養親湯(白芥子 蘇子 萊菔子)에서 찾아 볼 수 있으며, 구성 약물인 白芥子는 辛溫하고 肺經에 歸經하며 溫肺祛痰, 利氣散結 등의 효능이 있다. 萊菔子는 辛甘平하고 肺、脾、胃經에 작용하며 消食除脹, 降氣化痰 등의 효능으로 咳嗽氣喘, 痰多 등을 치료 한다[8]. 白芥子와 萊菔子에 대한 연구보고로 白芥子의 대장암 억제효과[9], L1210 및 P388 암세포주에서 증식 억제효과[10], 萊菔子의 항산화효과[11], 항당뇨효과[12], 혈관 평활근 증식 억제효과[13] 등이 보고되었다.

이와 같이 白芥子와 萊菔子에 대하여 연구가 보고되었으나 이들 및 배합약물에 대한 면역학적 천식 억제 기전 및 항천식 효과에 관한 실험보고는 미비한 실정이다.

이에 본 저자는 白芥子와 萊菔子 및 두 배합약물의 천식 억제 효과를 알아보기 위하여, Balb/c 생쥐에 OVA로 알레르기성 천식을 유발한 후 기관폐포세척액 (Bronchoalveolar lavage fluid : BALF)에 존재하는 각 세포수와 TNF-α, IL-5, IL-13, IL-17, eotaxin, OVA specific IgE 분비량 및 폐조직에서의 CD3, CD4, CD8, CCR3, B220, CD11b, CD22, CD69, Gr-1을 발현하는 세포수의 변화를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약은 diethylpyrocarbonate (DEPC), 3-4,5-dimethyl-thiazol-2,5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolim (MTS), 2,7,-dichlorodihydrofluorescin diacettate (DCFH-DA), complete adjuvent, chloroform, collagenase, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구용혈액 (RBC lysis solution), ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, lamide, magnesium chloride ($MgCl_2$)는 Sigma 사 (U.S.A) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, U.S.A) 제품을, anti-CD3-PE(phycoerythrin), anti-CD4-FITC(fluoresceinated isothiocyanate), anti-Gr1-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD25-PE, anti-CD28-PE, anti-CD11b-FITC, anti-IgE-FITC anti-B220-PE, anti-CD69-FITC, propidium iodide (PI)와 RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, U.S.A) 제품을, rIL-3, rIL-5는 R & D system 社 (Minneapolis, U.S.A) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), rotary vaccum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO_2 incubator (Forma scientific Co., U.S.A), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimazue, Japan), centrifuge (Sigma, U.S.A), deep-freezer (Sanyo, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, U.S.A), plate shaker (Lab-Line, U.S.A), 유세포분석기 (FACScan, BD Biosciences) 및 ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A) 등을 사용하였다.

2) 약재

실험에 사용된 백개자(*Sinapis alba* L.의 성숙한 種子. 이하 SA라 한다.), 나복자(*Raphanus sativus* L. 또는 기타 동속 식물의 익은 種子. 이하 RS라 한다.)는 감정한 후 정선하여 사용하였다.

3) 동물

동물은 雌性인 5주령의 Balb/c mouse 45수를 (주)대한바이오링크(충북 음성)에서 공급받아 실험 당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃를 유지하여 2주일 간 실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 정상군, 대조군, 실험군으로 나누고, 각군은 5마리씩을 배정하였다. 대조군과 실험군은 난알부민으로 천식을 유도하였고, 정상군은 PBS 만을 주사, 흡입시켰다.

4) 시료의 추출

백개자, 나복자 및 두 배합약물 각 200 g에 각 각 증류수 2,000 ㎖를 가한 뒤 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 전탕액을 흡입 여과한 후 감압 증류장치로 농축하였으며, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 시료를 만들었다. 이와 같이 만든 백개자(24.1g. 수율 12.1%), 나복자(26.3g, 수율 13.2%), 백개자、나복자 배합약물(22.4g, 수율 11.2%)를 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 기관지 천식 생쥐 모델

500 μg/ml의 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)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 x g 에서 5분 동안 원심분리한다. 이 OVA/Alum 침전물에 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후 100 μg OVA를 0.2 ml로 조정하여 복강내로 주사하여 전신감작을 시킨다. 이후 2주째에 마우스를 마취한 후 난알부

민 (500 ug/ml) 100 ㎕를 기도투여한다. 3주째부터 분무기를 이용하여 2.5 mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 6주 동안 비강 및 기도내로 흡입시킨다.

2) 시료의 경구 투여

OVA/Alum로 전신 감작 시킨후 3주 째부터 백개자(200, 400 mg/kg), 나복자(200, 400 mg/kg), 그리고 두 배합약물(200, 400 mg/kg)을 일주일에 5회 경구 투여 하였다. 대조군에는 증류수를 동량 경구투여 하였다. 또한 양성대조군으로 1주일에 3회 면역억제제인 cyclosporin A (CsA, 20 mg/kg)를 8주간 복강주사 하였다.

3) BALF, 폐 분리 및 분석

8주후 기관지천식 마우스의 눈에서 혈액을 분리한 후 목부분을 해부하여 폐포세척액으로부터 세포를 분리하기 위해 10% FBS/DMEM 배양액 1ml을 넣은 주사기를 기관지에 주입시키고 끈으로 묶어 고정한 후 3회 순환 시켜 분리한 후 ACK 용액을 37℃에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 분리된 BALF 세포를 1000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 슬라이드를 건조하여 Diff-Quick 용액 (Baxter Healthcare, Miami, FL)을 이용하여 염색한 뒤 광학현미경(400×, Nikon, japan)으로 관찰하여 호산구 수를 측정하였다. 다시 폐를 적출하여 무게를 측정한 후 폐조직을 잘게 절편하고 2% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에 1 mg/ml의 collagenase IV를 가한 용액 3 ml로 37℃, 진탕배양기에서 30분 동안 5회 이상 조직을 분해하여 폐세포를 분리한 뒤 cell strainer 로 조직이나 불순물을 제거한 뒤 세포수를 측정하였다.

4) PenH 값 측정을 통한 폐기능 측정

한약재 투여군의 폐기능 검사를 위하여 전신 체적변동기록법(Whole body plethysmograph, model Biosystem XA; Buxco Electronics Inc, Troy, New York, USA)을 이용하여 메타콜린에 의한 기도 협착을 유발하여 기도의 과민 반응을 측정하였다. PenH 값은 다음과 같은 공식에 의하여 측정하였다.

Penh = Pause × PEF/PIF,

Pause = (Te-Tr)/Tr (PIF, peak inspiratory flow; PEF: peak expiratory flow; Te, expiratory time;Tr, relaxation time).

메타콜린 반응의 측정은 최종 흡입시키고 30분 후 마우스가 안정화가 되면 메타콜린을 3분간 흡입시키고 1분간 건조한 후에 10분간 레코딩을 하고 레코딩 데이타를 10초 간격으로 자동 합산하여 나타내며, 본 실험에서는 레코딩 후 5-6분 동안 레코딩한 데이타를 합산한 결과이다. 메타콜린은 3.125 mg/ml에서 50 mg/ml 까지 농도를 증가하면서 PenH 값을 측정하였다.

5) 유세포 분석

폐조직으로부터 분리한 세포에서 여러가지 세포표면 분자들에 대한 항체를 이용하였으며, 면역염색하기 위하여 2-5x10^5 세포로 조정하고 염색 완충용액 (1% FBS, 0.01% NaN_3가 포함된 인산염 완충용액, pH 7.4)으로 1회 세척하였다. 이를 FITC 또는 PE 형광물질이 결합된 CD3, CD4, CD8, CD22, CCR3, CD11a, CD11b, Gr-1, B220, IgE등의 항체를 시료에 가하여 4℃에서 40분간 반응시키고, 염색 완충용액으로 2회 세척한 후 세포표면 분자들의 발현을 유세포분석기로 분석하였다.

6) ELISA 분석

마우스에서 분리한 폐포세척액과 혈청에서 Eotaxin, IL-5, IL-7, IgE (Endogen, USA) 및 IL-13 (R&D system)을 측정하기 위해 ELISA kit를 이용하였다.

7) 조직병리검사

적출된 폐를 10% paraformaldehyde에서 24시간 고정한 뒤 알코올로 탈수 후 xylene으로 알코올을 제거하였다. 조직을 파라핀으로 포매하여 5 μm 부분의 두께로 조직절편을 만들었으며, hematoxyline/eosin (H&E)으로 염색하였고, 조직의 손상 정도를 관찰하기 위하여 Masson/trichrome (M-T) 염색을 동시에 시행하여 관찰하였다.

8) 통계분석

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

결 과

1. PenH 값 측정및 폐 중량에 미치는 영향

기도 과민반응의 억제 효과를 확인하기 위하여 PenH값을 측정한 결과 OVA를 투여하지 않은 정상군에 비해 OVA로 감작시킨 대조군의 PenH값이 메타콜린 농도에 비례하여 증가되었으며, 고용량 (400 mg/kg)의 SA, RS와 고용량의 병용투여군에서 PenH값이 대조군에 비하여 현저히 감소되었다. (Fig. 1).

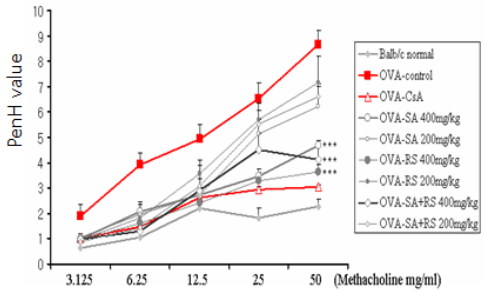

Fig. 1. Effects of SA, RS and SA+RS on methacholine-induced airway hyperresponsiveness in OVA-induced asthma mice. PenH was measured in a Buxco box, as previously described(in Maerials and methods). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's T-test. (*p 〈 0.05, **p 〈 0.01, ***p 〈0.001).
SA: OVA + SA(400 mg/kg), OVA + SA(200 mg/kg), RS: OVA + RS(400 mg/kg), OVA + RS(200 mg/kg), SA+RS: OVA + SA+RS(400 mg/kg), OVA + SA+RS(200 mg/kg)

2. 폐중량 및 폐포세척액에서의 폐세포 영향

1) 폐중량 및 폐포 세척액(BALF)에서의 각종세포에 미치는 영향

폐 중량은 정상군에 비하여 OVA로 감작시킨 대조군에서 폐의 무게는 증가하였으며 저용량(200 mg/kg)과 고용량(400 mg/kg)의 SA, RS 및 병용처리군에서 모두 유의성 있게 감소되었다(Fig. 2A).

총 세포 수는 정상군에 비하여 OVA로 감작시킨 대조군에서 유의하게 증가되었으며, 저용량 및 고용량의 SA, RS 그리고 병용 투여군에서 모두 유의성 있게 감소되었다. 특히 고용량의 SA, RS 투여군에 비하여 고용량의 병용 투여군에서 유의성 있는 총 폐세포수 감소를 관찰할 수 있었다(Fig. 2B).

총 백혈구 수는 OVA로 감작시킨 대조군에서 현저히 증가되어 있으며, 저용량 병용 투여군을 제외한 SA, RS 그리고 고용량 병용 투여군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 2C).

총 호산구 수는 정상군에 비하여 OVA를 감작시킨 대조군에서 유의하게 증가되었으며, SA, RS 그리고 병용 투여군에서 모두 감소되었고, 특히 고용량(400 mg/kg) 병용 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 2D).

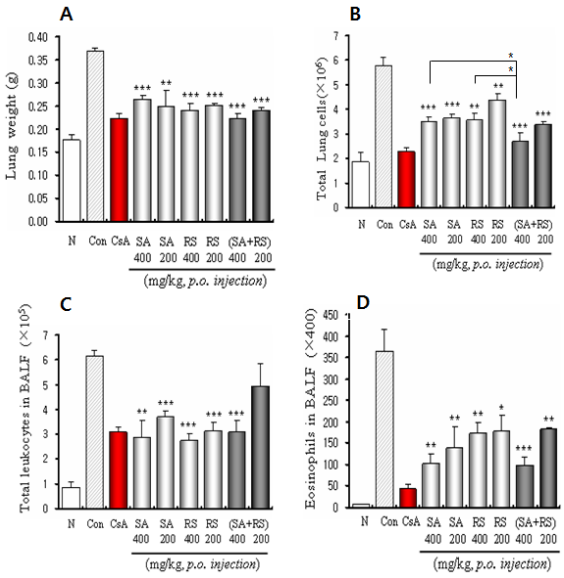

Fig. 2. Effect of SA, RS and SA + RS on lung weight (A), total cells (B), Eosinophiles (C), and Leucocytes (D) in BALF in OVA-induced asthma mice.
Balb/c mice were injected, inhaled and sprayed with OVA three times a week for 8 weeks for asthma induction. One experimental group was treated with extract of SA, RS and SA+RS for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mouse lungs were dissected out and weighted. The results are expressed the mean ± S.E.M. (N=5). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's T-test. (**p 〈 0.01, ***p 〈 0.001)
N: Normal Balb/c mice, Con: Ovalbumin inhalation (control), SA: OVA + SA(400 mg/kg), OVA + SA(200 mg/kg), RS: OVA + RS(400 mg/kg), OVA + RS(200 mg/kg), SA+RS: OVA + SA+RS(400 mg/kg), OVA + SA+RS(200 mg/kg)

3. 폐조직에서의 유세포 형광분석

T세포인 $CD3^+$ 세포수는 정상군에서 $6.9\pm2.1(\times10^4)$인 반면, 천식을 유발한 대조군에서의 세포수는 $33.9\pm2.6(\times10^4)$로 유의성 있는 증가를 보였다 ($p<0.001$). SA, RS 그리고 병용 투여군의 $CD3^+$ 세포수는 각각 $18.4\pm0.1(\times10^4)$(SA 400 mg/kg), $16.6\pm4.0(\times10^4)$(SA 200 mg/kg), $17.1\pm0.9(\times10^4)$(RS 400 mg/kg), $22.6\pm1.6(\times10^4)$(RS 200 mg/kg), $13.4\pm2.0(\times10^4)$(SA+RS 400 mg/kg), $15.6\pm3.5(\times10^4)$(SA+RS 200 mg/kg)로 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 3A).

$CD3^+/CD69^+$인 활성 T 세포수는 OVA를 투여하지 않은 정상군에서 $0.79\pm0.1(\times10^4)$인 반면, 대조군에서의 세포수는 $16.58\pm0.4(\times10^4)$로 유의성 있는 증가를 보였다 ($p<0.001$). SA, RS 그리고 병용 투여군의 $CD3^+/CD69^+$ 세포수는 각각 $4.89\pm1.0(\times10^4)$(SA 400 mg/kg), $5.37\pm1.1(\times10^4)$(SA 200 mg/kg), $6.71\pm0.5(\times10^4)$(RS 400 mg/kg), $7.17\pm0.7(\times10^4)$(RS 200 mg/kg), $2.97\pm0.6(\times10^4)$(SA+RS 400 mg/kg), $6.34\pm0.4(\times10^4)$(SA+RS 200 mg/kg)로 대조군에 비해 유의성있게 감소되었다. 특히 고용량의 SA, RS에 비하여 고용량의 병용투여가 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 3B).

$CD3^-/CCR3^+$인 세포수는 정상군에서 $1.0\pm0.2(\times10^4)$인 반면, 대조군에서의 세포수는 $10.77\pm0.5(\times10^4)$로 유의성 있는 증가를 보였다 ($p<0.001$). SA, RS 그리고 병용 투여군의 $CD3^-/CCR3^+$인 세포수는 각각 $1.93\pm0.3(\times10^4)$(SA 400 mg/kg), $2.23\pm0.2(\times10^4)$(SA 200 mg/kg), $3.06\pm1.5(\times10^4)$(RS 400 mg/kg), $4.86\pm0.9(\times10^4)$(RS 200 mg/kg), $1.77\pm0.7(\times10^4)$(SA+RS 400 mg/kg), $2.38\pm0.1(\times10^4)$(SA+RS 200 mg/kg)로 대조군에 비해 모든 군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 3C).

$CD4^+$인 보조 T 세포수는 정상군에서 $6.1\pm1.4(\times10^4)$인 반면, 대조군에서의 세포수는 $5.2\pm0.7(\times10^4)$로 현저히 증가되었다. SA, RS 그리고 병용 투여군의 $CD4^+$인 보조 T 세포수는 각각 $11.2\pm3.5(\times10^4)$(SA 400 mg/kg), $11.1\pm2.6(\times10^4)$(SA 200 mg/kg), $12.8\pm2.2(\times10^4)$(RS 400 mg/kg), $16.8\pm1.1(\times10^4)$(RS 200 mg/kg), $9.8\pm0.9(\times10^4)$(SA+RS 400 mg/kg), $10.0\pm1.4(\times10^4)$(SA+RS 200 mg/kg)로 대조군에 비해 모든 군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 3D).

$CD8^+$인 세포독성 T 세포수는 정상군에서 $1.45\pm0.4(\times10^4)$인 반면, 대조군에서의 세포수는 $5.33\pm0.4(\times10^4)$로 유의성 있는 증가를 보였다 ($p<0.001$). SA, RS 그리고 병용 투여군의 $CD8^+$인 세포독성 T 세포수는 각각 $2.05\pm0.3(\times10^4)$(SA 400 mg/kg), $1.87\pm0.8(\times10^4)$(SA 200 mg/kg), $2.18\pm0.5(\times10^4)$(RS 400 mg/kg), $1.79\pm0.3(\times10^4)$(RS 200 mg/kg), $1.28\pm0.2(\times10^4)$(SA+RS 400 mg/kg), $1.95\pm0.6(\times10^4)$(SA+RS 200 mg/kg)로 대조군에 비해 모든 군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 3E).

$Gr-1^+/CD11b^+$인 세포수는 정상군에서 $1.35\pm0.2(\times10^4)$인 반면, 대조군에서의 세포수는 $14.16\pm4.1(\times10^4)$로 유의성 있는 증가를 보였다 ($p<0.001$). SA, RS 그리고 병용 투여군의 $Gr-1^+/CD11b^+$ 세포수는 각각 $4.15\pm1.1(\times10^4)$(SA 400 mg/kg), $6.16\pm2.8(\times10^4)$(SA 200 mg/kg), $4.40\pm0.7(\times10^4)$(RS 400 mg/kg), $6.96\pm2.2(\times10^4)$(RS 200 mg/kg), $3.47\pm0.4(\times10^4)$(SA+RS 400 mg/kg), $5.09\pm1.3(\times10^4)$(SA+RS 200 mg/kg)로 저용량의 SA, RS에서는 유의성 있는 감소가 보이지 않았으며, 저용량의 SA+RS군에서는 유의성있게 감소하였다. 모든 고용량 투여군

에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 3F).

$B220^+/CD22^+$인 B 세포수는 정상군에서 $0.25\pm0.0(\times10^4)$인 반면, 천식을 유발한 대조군에서의 세포수는 $4.35\pm0.4(\times10^4)$로 유의성 있는 증가를 보였다 ($p<0.001$). SA, RS 그리고 병용 투여군의 $B220^+/CD22^+$ 세포수는 각각 $1.49\pm0.3(\times10^4)$(SA 400 mg/kg), $1.96\pm0.3(\times10^4)$(SA 200 mg/kg), $2.04\pm0.7(\times10^4)$(RS 400 mg/kg), $2.53\pm0.9(\times10^4)$(RS 200 mg/kg), $1.34\pm0.2(\times10^4)$(SA+RS 400 mg/kg), $2.03\pm0.3(\times10^4)$(SA+RS 200 mg/kg)로 대조군에 비해 저용량의 RS군을 제외한 모든 투여군에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3G).

$B220^+/IgE^+$인 B 세포수는 정상군에서 $0.13\pm0.1(\times10^4)$인 반면, 대조군에서의 세포수는 $4.97\pm0.2(\times10^4)$로 유의성 있는 증가를 보였다 ($p<0.001$). SA, RS 그리고 병용 투여군의 $B220^+/IgE^+$ 세포수는 각각 $1.3\pm0.3(\times10^4)$(SA 400 mg/kg), $1.89\pm0.2(\times10^4)$(SA 200 mg/kg), $1.15\pm0.3(\times10^4)$(RS 400 mg/kg), $2.8\pm0.6(\times10^4)$(RS 200 mg/kg), $0.66\pm0.0(\times10^4)$(SA+RS 400 mg/kg), $1.29\pm0.5(\times10^4)$(SA+RS 200 mg/kg)로 대조군에 비해 모든 군에서 유의성 있게 감소되었다. 특히 저고용량 SA, RS에 비하여 병용투여군에서 두드러졌다. 특히 고용량의 SA, RS에 비하여 고용량의 병용투여가 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 3H).

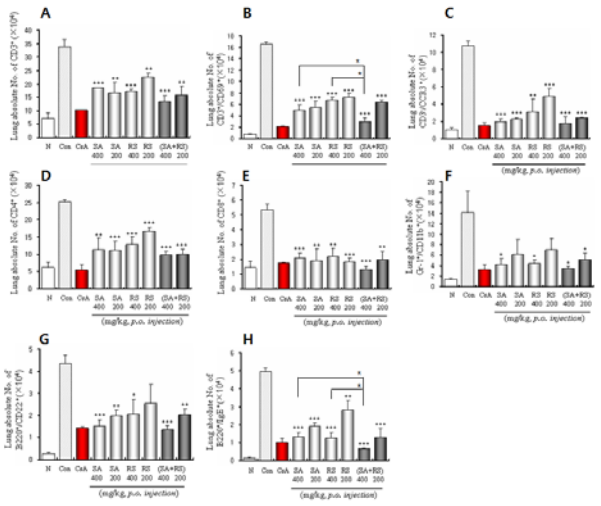

Fig. 3. Effect of SA, RS and SA+RS on absolute number of $CD3^+$ (A), $CD3^+/CD69^+$ (B), $CD3^-/CCR3^+$ (C), $CD4^+$ (D), $CD8^+$ (E), $Gr-1^+/CD11b^+$ (F), $B220^+/CD22^+$(G), $B220^+/IgE$(H) cell in lung of OVA-induced asthma mice. Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's T-test. (*p 〈 0.05, **p 〈 0.01, ***p 〈0.001).
N: Normal Balb/c mice, Con: Ovalbumin inhalation (control), SA: OVA + SA(400 mg/kg), OVA + SA(200 mg/kg), RS: OVA + RS(400 mg/kg), OVA + RS(200 mg/kg), SA+RS: OVA + SA+RS(400 mg/kg), OVA + SA+RS(200 mg/kg)

4. ELISA 분석

1) BALF내에서 Eotaxin, IL-5, IL-13, TNF-alpha 및 IL-17 분석

Eotaxin은 정상군에 비해 OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군의 BALF내에서 유의하게 증가되었다. SA, RS 및 병용 투여군에서의 BALF내 eotaxin이 대조군에 비해 모든 군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4A).

IL-5은 정상군에 비해 OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군의 BALF내에서 유의하게 증가되었다. SA 투여군을 제외한 모든 군에서 유의성있게 감소하였다(Fig. 4B).

IL-13은 천식을 유발시키지 않은 정상군에 비해 OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군의 BALF 내에서 유의하게 증가되었다. 저용량 RS 투여군을 제외한 모든 군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4C).

TNF-α 는 천식을 유발시키지 않은 정상군에 비해 OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군에서 유의하게 증가되었다. TNF-alpha가 고용량 SA, 고용량 RS 투여군에서만 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4D).

IL-17은 천식을 유발시키지 않은 정상군에 비해 OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군의 BALF내에서 유의하게 증가되었다. 저용량 RS 및 병용투여군을 제외한 모든 군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4E).

OVA specific IgE 분비는 천식을 유발시키지 않은 정상군에 비해 OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군의 BALF내에서 IgE 유출량이 유의하게 증가되었다. 모든 군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4F).

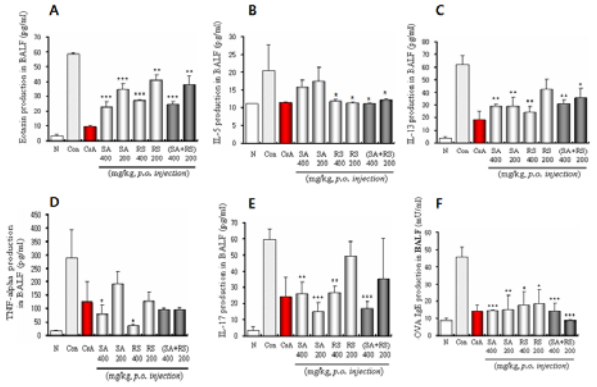

Fig 4. Effect of SA, RS and SA+RS on Eotaxin (A), IL-5 (B), IL-13 (C), TNF-alpha (D), IL-17(E), OVA-IgE (F) levels in BALF in OVA-induced asthma ice. Cytokines were assayed by ELISA kit (R&D system). The results are expressed as mean ± S.E.M. (N=5). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's T-test (*p 〈 0.05, **p 〈 0.01, ***p 〈0.001).
N: Normal Balb/c mice, Con: Ovalbumin inhalation (control), SA: OVA + SA(400 mg/kg), OVA + SA(200 mg/kg), RS: OVA + RS(400 mg/kg), OVA + RS(200 mg/kg), SA+RS: OVA + SA+RS(400 mg/kg), OVA + SA+RS(200 mg/kg)

5. 폐조직의 조직학적 검사

H&E 염색에서 정상군에 비해 OVA로 유발된 천식 대조군에서 폐포 주위에 호산구 같은 천식유발 염증세포의 침윤이 다량으로 존재하는 것이 관찰되었다. 그러나 SA, RS 및 병용 투여군에서는 폐포 주위에 침윤된 염증세포들이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 대조군에 비하여 SA, RS 및 병용 투여군에서 조직손상이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

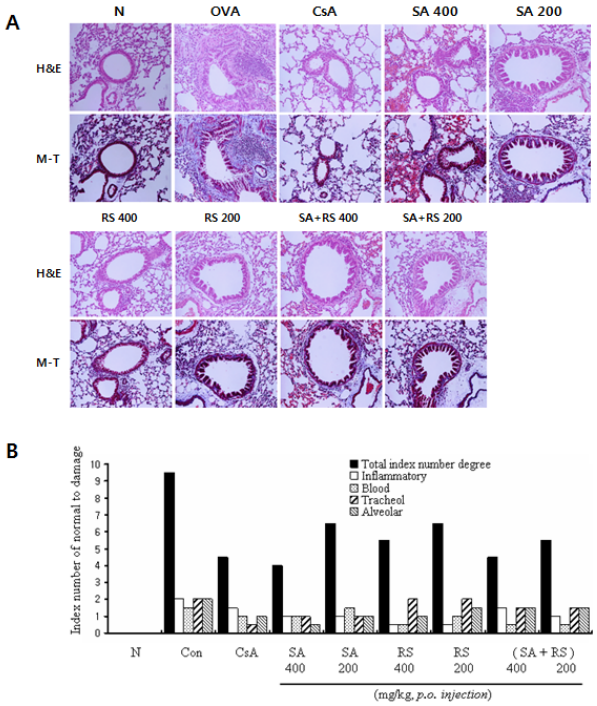

Fig. 5. Effect of SA, RS and SA+RS on histology of lung tissue (H&E and Masson trichrome staininig) in murine OVA- indued asthma lung cells. Balb/c mice were injected, inhaled and sprayed with OVA three a week for 12 weeks for asthma induction. One experimental group was treated with extract of SA, RS and SA+RS for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice lungs were dissected out and analyzed histology.
N: Normal Balb/c mice, Con: Ovalbumin inhalation (control), SA: OVA + SA(400 mg/kg), OVA + SA(200 mg/kg), RS: OVA + RS(400 mg/kg), OVA + RS(200 mg/kg), SA+RS: OVA + SA+RS(400 mg/kg), OVA + SA+RS(200 mg/kg).

고 찰

기관지 천식은 기도의 만성염증으로 기도가 과민해짐으로써 가역적인 기도의 수축이 발생하여 기침과 호흡곤란 증상이 유발되는 질환으로 알려져 있다. 그러나, 일부에서는 아직도 기도의 염증과 기관지 과민증 그리고 기도의 가역적 폐쇄라는 세 가지 요소가 충분한 근거가 될 수 없다는 반론도 제기되고 있다. 전통적으로 외부 환경에 존재하는 알레르겐이 원인이 되어 발생된다고 믿어져 왔던 천식이, 최근에는 호산구와 T 세포의 침윤, 비만세포, 호염기구 및 상피세포의 활성화 등 모든 면역체계가 관여하는 염증성 질환으로 밝혀지면서, 기도 과민성(Airway hyperreactivity)과 기도 폐쇄(Airway obstruction)가 증상 발현에 중요한 것으로 알려져 있다[2]. 특히, 기관지 폐포세척액에서는 Th2 림프구의 기능 활성화가 관찰되고 있다[1,2].

천식 모델에서 BALF 세포를 연구하는 것은 천식 병리기전에 있어 중요한 연구방법으로 여겨지고 있으며, 다른 염증 매개 인자들을 제외하더라도 OVA로 유발된 이들 염증 매개 인자들은 BALF내 세포에서 분비된다. 또한 이들 세포는 천식의 병리기전에 있어 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다[14].

현재까지 연구결과에 의하면 호산구는 喘息에서 기도 염증을 일으키는데 가장 중요한 역할을 담당하는 세포이며, Th2 세포에 의해 매개되는 염증 및 IL-13을 활성화시켜 喘息 발생에 있어서 중요한 역할을 하였다고 알려져 있다[15-17].

본실험에서 SA, RS 및 병용 투여군이 총 폐 무게에 미치는 영향을 살펴보면, 정상군에 비해 대조군 (OVA)의 폐 무게가 유의성 있게 증가되었고, SA, RS 및 병용 투여군에서는 각각 폐 무게가 감소하였다. 이는 OVA로 유발된 기관지 염증으로 인한 각종 면역세포의 증가와 관련이 있는 것으로 생각되며, 즉 이들 약재에 의하여 염증작용이 억제된 것으로 생각된다.

BALF내에서 SA, RS 및 병용 투여군이 총 폐 세포수에 미치는 영향을 살펴보면, 대조군에 비하여 SA, RS 및 병용 투여군에서는 유의성 있게 세포수가 감소되었다. 이는 폐조직 내 호산구, 림프구, 대식세포, 비만세포 등의 염증 유발 세포들이 기도에 많이 침착되어 있거나, 기도 및 기관지의 부종 및 점액 분비 과다를 의미한다. 천식 대조군에서 각종 면역 관련 세포를 포함하는 총 폐 세포수가 증가되었고, SA, RS 및 병용투여군에서 총 폐 세포수가 유의성 있게 감소됨으로써 SA, RS 및 병용 투여군이 기도내 염증세포의 증가를 억제하고, 이들 세포에 의한 염증 반응을 억제하는 작용이 있는 것으로 생각된다.

BALF내에서 SA, RS 및 병용 투여군이 총 백혈구 수에 미치는 영향을 살펴보면, 폐 내 세포수와 유사한 양상을 보이고 있으며, 이는 폐 자체의 염증과 관련한 면역세포의 수가 증가했음을 의미한다. SA, RS 및 병용 투여군에서 유의성 있게 대조군에 비해 백혈구가 감소되었는데, 이는 천식 모델의 기도 내 염증세포의 증가를 억제하고, 이들 세포에 의한 염증 반응을 억제하는 작용이 있는 것으로 생각된다.

BALF내에서 SA, RS 및 병용 투여군이 호산구 수에 미치는 영향을 살펴보면, 대조군에 비해 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 이는 SA, RS 및 병용 투여군이 호산구 증가에 의한 천식 기전을 억제하는 작용이 있음을 시사한다.

유세포 형광분석에서 $CD3^+$는 T 세포 모두에 존재하는 표면분자이며, CCR3 receptor는 주로 호중구, 호산구, 비만세포 및 Th2 세포에서 발현된다[18]. 폐조직 내 $CD3^+$ 세포수를 살펴보면 SA, RS 및 병용 투여군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소된 것을 확인 할 수 있었다.

CD69는 T 세포, 대식세포, 호산구, 호중구 등에서 발현되는데 세포의 활성화 marker로서 알려져 있으며[21,22], T 세포의 초기 활성화를 나타내며, 활성화된 호산구에서 발현되므로 천식 모델에서 호산구 침윤의 표지로 사용될 수 있다. $CD3^+/CD69^+$ 세포수를 분석한 결과, 폐세포에서 SA, RS 및 병용투 여군에서 유의성있게 감소되었다. 특히 고용량 병용 투여군에서 폐조직 내 $CD3^+/CD69^+$ 세포의 감소를 보이고 있다.

$CD3^-/CCR3^+$는 폐세포 중 호산구 등에서 발현되는데, 특히 호산구에서 가장 높게 발현되어 호산구의 활성화와 탈 과립화에 관여하는 것으로 보여진다[19]. 본 실험의 천식 모델 폐조직 내에서 $CD3^-/CCR3^+$는 대조군에 비해 SA, RS 및 병용 투여군에서는 유의성 있게 감소되었다. 이는 천식 반응에 주요하게 관여하는 호산구의 분포양상이 SA, RS 및 병용 투여군에서 유의성 있게 감소되었음을 의미한다.

$CD4^+$ T 세포는 호산구와 함께 천식 모델의 기도벽에 침윤되는 대표적인 세포인데, 천식 모델에서 증가된다. 또한,

$CD4^+$ Th2 세포는 천식을 유발하고 유지시키는 대표적인 세포로 알려져 있다[23]. 이 세포는 IL-17을 또한 생성하여 호산구성 기도 염증을 일으키기도 한다[20]. 본 실험에서 $CD4^+$은 대조군에 비해 SA, RS 및 병용 투여군에서는 유의성 있게 감소되었다.

$CD8^+$ T 세포는 $CD4^+$ T 세포와 마찬가지로 천식 유발 cytokines인 IL-4, IL-5, IL-13을 분비하는 것으로 알려져 있다[24,25]. 본 실험에서 대조군에 비해 SA, RS 및 병용 투여군에서의 유의성 있는 감소는 BALF내의 IL-5와 IL-13 감소와 관련되어 있다.

CD11b는 천식환자의 호중구나 호산구에서 특이적으로 높게 발현되는 세포유착분자이며[26,27], Gr-1은 과립구의 표지자로서 과립구의 분화、성숙에 관여하며[28], $Gr-1^+/CD11b^+$는 성숙된 과립구, 단핵구를 표현하며 myeloid suppressor 세포에서 발현되는 marker이기도 하다. 이들은 종양이나 감염 등에서 사이토카인을 분비하여 면역기전에 작용하는 것으로 알려져 있다[29].

본 실험에서 OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군에 비하여 SA, RS 및 병용 투여군에서의 $Gr-1^+/CD11b^+$의 세포수가 감소됨을 보여주고 있다.

$B220^+/CD22^+$은 활성화된 B세포로, 본 실험에서 대조군에 비해 SA, RS 및 병용 투여군에서는 유의성 있게 감소되었다. 특히 $B220^+/IgE^+$세포에서 고용량의 SA, RS에 비하여 고용량 병용 투여군에서 군에서 유의적인 감소가 관찰되었다.

BALF내 cytokine분석을 살펴보면 IL-4는 순환 호산구를 내피세포로 유착시키는 작용이 있으며, IL-5, chemokines의 작용에 의해서 염증 목표 조직으로의 유도를 이끄는 작용이 있는 것으로 알려져 있다[30,31]. 또한 항원에 특이적인 IgE 생성을 유도하여 기도 과민 반응에도 관여하는 것으로 알려져 있다. IL-5는 기도의 호산구 과다증을 유발하는 결정적인 cytokine이며[32-35], IL-13은 점막세포에서의 점액분비를 유도하며[36], IL-4와 같이 작용하여 점막 섬유세포의 성장과 화학주성을 자극하는 것으로 알려져 있다[37,38].

본 연구에서의 BALF내에서 생성되는 eotaxin은 호산구를 활성화 시키며 SA, RS 및 병용 투여군에서 유의성 있게 감소하였다. IL-5 수준은 SA를 제외한 RS와 병용 투여군에서 유의적으로 감소하였으며, IL-13은 저용량의 RS를 제외한 모든 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다. IL-17은 저용량의 RS와 저용량의 병용 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다. IgE는 저용량 및 고용량 SA, RS 및 병용 투여군에서 유의성 있게 감소하였다. 이는 SA, RS 및 병용투여군이 기관지 천식 염증에 관여하는 호산구, Th2세포의 증식, 분화를 억제할 수 있음을 나타낸다. 이는 SA, RS 및 병용 투여군이 천식 반응에 있어서 유의성 있는 억제 작용이 있음을 시사한다.

폐조직 단면의 조직학적인 분석을 살펴보면, OVA를 지속적으로 분무한 대조군에서 폐기관지벽에 collagen이 다량으로 유착되어 만성 염증소견을 나타내며, 반면에 SA, RS 및 병용 투여군에서는 collagen 유착이 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

이처럼 SA, RS 및 병용투여군은 천식 모델에 있어서 호산구의 세포증식 억제, 폐세포의 CCR3 발현억제, BALF내의 IL-5, IL-13, IL-17, OVA specific IgE 생성억제, 염증성 cytokine인 TNF-alpha의 생성억제를 통하여 기도의 염증반응 및 과민반응을 억제시키고, 결국 천식 증상을 완화하는 것으로 생각된다.

이는 SA, RS가 배합된 병용 투여군이 천식의 주요발생 기전 및 유병 원인인 Th1/Th2 균형 조절에 깊이 관여하는 것으로 생각되며, 앞으로 본 연구를 배경으로 SA, RS 및 병용 투여군의 기관지 천식 억제 효과에 대한 보다 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 특히 SA, RS의 단독 투여시보다 두 약재를 배합한 병용 투여군에서 $CD3^+/CD69^+$과 IgE를 생성하는 $B220^+/IgE^+$ 세포를 효과적으로 억제함을 보여주고 있다. 이는 초기에 T세포가 분화되는 것을 억제하며 IgE를 생성하는 B세포를 효과적으로 억제하고 있다고 여겨진다.

결 론

SA, RS 및 병용 투여군의 OVA로 감작된 천식 마우스 모델에서의 항천식 효과를 알아보기 위해, Balb/c 마우스에 OVA로 알레르기성 천식을 유발한 후 BALF 내에서 총 세포수, 호산구수, 백혈구수 및 각종 cytokine 수준과 폐조직에서 존재하는, CD3, CD4, CD8, CD69, CCR3, B220 세포 등의 변화,를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 백개자, 나복자 및 병용투여군에서 폐 무게, BALF 내 총 세포, 호산구 및 백혈구가 대조군에 비하여 유의하게 감소되었다. 특히 고용량 병용 투여군에서 BALF 내 총 세포가 고용량의 백개자, 개복자 와 비교하여 유의성 있는 감소가 관찰되었다. 또한 BALF내의 각종 cytokines인 eotaxin, IL-5, IL-13, IgE가 유의하게 억제됨을 알 수 있었다.

2. 폐조직내의 $CD4^+$, $CD3^+/CD69^+$, $CD3^-/CCR3^+$, $CD8^+$, $Gr-1^+/CD11b^+$, $B220^+/CD22^+$, $B220^+/IgE^+$ 세포의 수는 대조군에 비하여 백개자, 나복자 및 병용투여군에서 유의성 있는 감소가 관찰되었다. 특히 고용량 병용투여군에서 고용량의 백개자, 나복자투여군에 비하여 초기 T세포 분화마커인 $CD3^+/CD69^+$과 IgE를 생성하는 B세포($B220^+/IgE^+$세)의 유의성 있는 감소를 보여주고 있으며, 이는 병용투여군에서 T세포 초기활성과 IgE 생성 B세포를 효과적으로 억제하고 있음을 보여주고 있다.

3. 조직학적 검사에서 백개자, 나복자 및 병용투여군은 염증세포의 침윤정도와 collagen 부착 정도가 대조군에 비해 감소되었다.

이상의 결과로 부터 백개자, 나복자 및 병용투여군은 OVA로 감작하여 천식을 유발시킨 천식 모델의 마우스에서 호산구의 세포증식 억제, 폐세포의 CCR3 발현억제, 기관지 폐포 세척액과 혈청내의 Th2 cytokine인 IL-5, IL-13, IL-17 등의 생성 억제 등에 의한 작용을 통하여 기도의 염증반응 및 과민반응을 억제시켜 천식 증상을 완화하는 것으로 생각된다. 특히 백개자나 나복자의 단독 투여시보다 병용 투여군에서 폐조직내의 $CD3^+/CD69^+$, $B220^+/IgE^+$ 등을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었으며, T세포와 B세포의 분화를 효과적으

로 억제하는 것이라고 할 수 있다.

References

1. Djukanović R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howarth RH, Holgate ST. Mucosal inflammation in asthma. Am Rev Respir Dis. 1990 ; 142(2) : 434-57.
2. Factor P. Gene Therapy for Asthma. Molecular Therapy. 2003 ; 7(2) : 148-52.
3. Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity. Am Rev Respir Dis. 1988 ; 137 : 62-9.
4. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barne′on G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, Michel F-B. Eosinophilic inflammation in asthma. N Engl J Med. 1990 ; 323 : 1033-9.
5. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. J Allergy Clin Immunol. 1990 ; 85 : 422-36.
6. Lotvall J, Inman M, O'Byrne P. Measurement of airway hyperresponsiveness: new considerations. Thorax. 1998 ; 53 : 419-24.
7. Shaw RJ, Cromwell O, Kay AB. Preferential generation of leukotriene C4 by human eosinophils. Clin Exp Immunol. 1984 ; 56(3) : 716-22.
8. Herbology Editorial Committee Of Korean Medicine Schools. Herbology. Seoul : Younglimsa. 2004 : 418-9, 492-3.
9. Eskin NA, Raju J, Bird RP. Novel mucilage fraction of Sinapis alba L. (mustard) reduces azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci formation in F344 and Zucker obese rats. Phytomedicine. 2007 ; 14 : 479-85.
10. Lee CS, Ju JS, Hwang WI. The Inhibitory Effect of Water Extracts of the Trichosanthes semen and Sinapsis semen Against Some Cancer Cells Growing. Korea Univ Med J. 1983 ; 20(1) : 39-49.
11. Takaya Y, Kondo Y, Furukawa T, Niwa M. Antioxidant constituents of radish sprout (Kaiware-daikon), Raphanus sativus L. J Agric Food Chem. 2003 ; 51(27) : 8061-6.
12. Taniguchi H, Kobayashi-Hattori K, Tenmyo C, Kamei T, Uda Y, Sugita-Konishi Y, Oishi Y, Takita T. Effect of Japanese Radish (*Raphanus sativus*) Sprout (Kaiware-daikon) on Carbohydrate and Lipid Metabolisms in Normal and Streptozotocin-induced Diabetic Rats. Phytother Res. 2006 ; 20(4) : 274-8.
13. Suh SJ, Moon SK, Kim CH. Raphanus sativus and its isothiocyanates inhibit vascular smooth muscle cells proliferation and induce G1 cell cycle arrest. Int Immunopharmacol. 2006 ; 6(5) : 854-61.
14. Schwartz DA, Thorne PS, Jagielo PJ, White GE, Bleur SA, Frees KL. Endotoxin responsiveness and grain dust-induced inflammation in the lower respiratory tract. Am J Physiol. 1994 ; 267 : 609-17.
15. 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(5691) : 1773-6.
16. Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, Ghiran S, Gerard NP, Yu C, Orkin SH, Gerard C. A Critical Role for Eosinophils in Allergic Airways Remodeling. Science. 2004 ; 305(5691) : 1776-9.
17. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen NY, Cohn L, Hamid Q, Elias JA. Acidic Mammalian Chitinase in Asthmatic Th2 Inflammation and IL-13 Pathway Activation. Science. 2004 ; 304(5677) : 1678-82.
18. Boushey HA. New and Exploratory Therapies for Asthma. Chest. 2003 ; 123 : 439-45.
19. Mukae H, Kadota J, Kohno S, Matsukura S, Hara K. Increase of activated T-cells in BAL fluid of Japanese patients with bronchiolitis obliterans organizing pneumonia and chronic eosinophilic pneumonia. Chest. 1995 ; 108 : 123-8.
20. Marzio R, Mauel J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. Immunopharmacol Immunotoxicol. 1999 ; 21 : 565-82.
21. Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. Nature review. 2001 ; 1 : 108-16.
22. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. Annu Rev Immunol. 2004 ; 22 : 789-815.
23. Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S, Suto A, Watanabe N, Saito Y, Hatano M, Tokuhisa T, Iwakura Y, Puccetti P, Iwamoto I, Nakajima H.IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. Am J Respir Crit Care Med. 2008 ; 178 : 1023-32.
24. Marsland BJ, Le Gros G. CD8 + T cells and immunoregulatory networks in asthm. Springer Semin Immun. 2004 ; 25 : 311-23.

25. Kemp RA, Ronchese F. Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. J Immunol. 2001 ; 167(11) : 6497-502.
26. Berends C, Hoekstra MO, Dijkhuizen B, de Monchy JG, Gerritsen J, Kauffman HF. Expression of CD35 (CR1) and CD11b (CR3) on circulating neutrophils and eosinophils from allergic asthmatic children. Clin Exp Allergy. 1993 ; 23(11) : 926-33.
27. Yachie A, Toma T, Miyawaki T, Taniguchi N. Expression of surface CD11b antigen and eosinophil activation. Nippon Rinsho. 1993 ; 51(3) : 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(5) : 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 cell. Cancer Immunol Immunother. 2004 ; 53 : 64-7.
30. Romagnani S. T-cell responses in allergy and asthma. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology. 2001 ; 1 : 73-8.
31. Bochner BS, Schleimer RP. The role of adhesion molecules in human eosinophils and basophils recruitment. J Allergy Clin Immunol. 1994 ; 94 : 427-38.
32. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. J Exp Med. 1996 ; 183(1) : 195-201.
33. Wang J, Palmer K, Lǒtvall J, Milan S, Lei XF, Matthaei KI, Gauldie J, Inman MD, Jordana M, Xing Z. Circulating, but not local lung, IL-5 is required for the development of antigen-induced airways eosinophilia. J Clin Invest. 1998 ; 102(6) : 1132-41.
34. Kung TT, Stelts D, Zurcher JA, Watnick AS, Jones H, Mauser PJ, Fernandez X, Umland S, Kreutner W, Chapman RW, Egan RW. Mechanisms of allergic pulmonary eosinophilia in the mouse. J Allergy Clin Immunol. 1994 ; 94(6 Pt 2) : 1217-24.
35. 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(1) : 263-6.
36. 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.
37. Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghow R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin. J Clin Invest. 1992 ; 90 : 1479-85.
38. Sempowski GD, Beckmann MP, Derdak S, Phipps RP. Subsets of murine lung fibroblasts express membrane-bound and soluble IL-4 receptors. Role of IL-4 in enhancing fibroblast proliferation and collagen synthesis. J Immunol. 1994 ; 152(7) : 3606-14.