

결명자 추출물의 난알부민 감작으로 천식이 유발된 마우스에서의 개선 효과

서범수^{1#}, 박용기^{1,2*}

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 동국대학교 한방신약개발센터

Effect of Cassiae semen extract on ovalbumin-induced allergic asthma in mice

Beom-Su Seo^{1#}, Yong-Ki Park^{1,2*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea

2 : Korean Medicine R&D center, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : In this study, we investigated the effect of *Cassia obtusifolia* Linne (Cassiae Semen; CS) extract on ovalbumin (OVA)-induced allergic asthma in mice.

Methods : CR was extracted with 70% ethanol. For *in vitro* study, HMC-1, human mast cells were treated with CS extract at 0.2 and 0.5 mg/ml for 1 h, and then stimulated with compound (C) 48/80 for 30 min. Primary spleenocytes were isolated from the spleen of mice, treated with CS extract for 1 h, and then stimulated with ConA for 24 h. For *in vivo* study, mice were sensitized at day 0, 7 and 14 with 0.2% OVA and then airway challenged using neublizer at day 21, 23, 25, and 27 to induced allergic asthma. CS extract at doses of 100 and 300 mg/kg body weight was orally administered during OVA challenge once per a day. The levels of allergic mediators such as histamine, OVA-specific IgE, IL-4, and IFN- γ were measured in the sera of mice or culture supernatants by EIA and ELISA, respectively. The expression of IL-4 and IFN- γ gene was determined by RT-PCR. The histopathological change of lung tissues was observed with hematoxylin and eosin (H&E) and Periodic acid Schiff (PAS) staining.

Results : The treatment of CS extract in HMC-1 cells significantly inhibited C48/80-induced degranulation, and histamine release. The treatment of CS extract in spleenocytes suppressed the expression of IL-4 and IFN- γ mRNA. The administration of CS extract in OVA-induced asthmatic mice significantly decreased the levels of OVA-specific IgE, and IL-4 in a dose-dependent manner with OVA-control group. In addition, CS extract inhibited the infiltration of inflammatory cells and bronchiolar damage with epithelial thickening in lung tissues of OVA-induced asthma mice, and also mucin accumulation.

Conclusions : These results indicate that CS extract prevents asthmatic damage through regulating the allergic immune response.

Key words : *Cassia obtusifolia* Linne, Cassiae Semen, asthma, ovalbumin, mast cell, histamine, immunoglobulin E, IL-4, IFN- γ

서 론

결명자(決明子)는 콩과(豆科: Leguminosae)에 속한 일년

생 초본인 결명(決明) *Cassia obtusifolia* L. 긴강남차(小決明) *C. tora* L.와 성숙한 종자(種子)를 가을철에 채취하여 건조한 것으로 성질(性)은 약간 차고(微寒) 맛(味)은 달고(甘) 쓰

*Corresponding author : Yong-Ki Park, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea

· Tel : +82-54-770-2661 · E-mail : Yongki@dongguk.ac.kr

#First author : Beom Su Seok, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea

· Tel : +82-54-770-2647 · E-mail : inmang@hanmail.net

· Received : 29 December 2014 · Revised : 30 January 2015 · Accepted : 02 February 2015

고(苦) 짜며(鹹), 肝을 맑게 하고 눈을 밝게 하며(淸肝明目), 肝風을 平息시키고 肝陽을 억제하며(平肝潛陽), 腸을 潤기나게 하여 변(便)을 통하게 하며(潤腸通便), 눈이 붉고 꺾고 아픈 것(目赤澀痛)과 눈을 못 뜨고 눈물이 많은 것(羞明多淚), 두통(頭痛)이나 현훈(眩暈), 눈이 어둡고 밝지 않는 것(目暗不明), 대변이 굳고 단단한 것(大便秘結)에 효과가 있다고 알려져 있다¹⁾.

최근 급격한 주거 및 작업 환경의 변화에 따른 지속적인 항원의 노출과 호흡기 감염의 증가, 환경오염으로 인해 천식을 비롯한 각종 알레르기 질환 환자가 급증하고 있다. 알레르기 질환 중 가장 높은 발병률을 보이는 기관지 천식은 대표적인 만성 질환으로 간헐적으로 기관지가 좁아짐에 따라 숨이 차고 쉼쉼거리는 천명 소리가 나거나 발작적인 기침 증상이 나타나는 질환이다²⁾. 기관지 천식은 매우 흔한 질환으로 최근 우리나라 40세 이후 성인 인구의 약 10%가 천식증상을 경험하고 있으며, 한번 발생되면 자연 치유되어 없어지는 경우가 극히 드물며 폐 기능이 점차 감소함에 따라 결국 호흡 장애를 초래하게 된다. 그러나 현재까지 기관지 천식을 완치하는 치료법은 없으며 높은 유병률과 입원 및 사망의 증가 경향, 그리고 만성 질환의 특성 상 개인 뿐 아니라 사회적으로 부담이 되고 있는 질환이다. 천식 치료제는 기도폐쇄의 증상을 부분 내 완화시켜 천식 발작을 빨리 멈추게 하는 증상 완화제와 기관지 염증을 억제하여 천식 발작을 예방하는 질병 조절제로 구분할 수 있다³⁾. 천식과 같은 알레르기 질환은 복잡하고 다양한 기전으로 인해 발생하기 때문에 그 동안 기전 연구를 통한 다양한 치료제 개발을 위한 노력이 이루어져 오고 있으나 아직도 치료제 개발의 필요성을 완전히 채워주고 있지 않은 실정이다.

기관지 천식은 항체 중 IgE에 의해 매개되는 제1형 과민반응(알레르기 반응)을 주요 발병기전으로 보며 비만세포(mast cell)나 호염구(eosinophil)와 같이 IgE의 Fc 부분에 대한 강한 친화력이 있는 수용체(Fcε RI)를 갖는 면역세포들의 활성화를 통해 분비되는 화학매체들(Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis, neutrophil chemotactic factor, prostaglandin, leukotriene)에 의해 유발되고 만성 염증반응을 통해 가속화되게 된다⁴⁾. 특히 비만세포는 세포질 내 다양한 알레르기 반응 매개물질들이 들어 있는 과립들을 함유하고 있으며, 혈중에 존재하는 호염구와 달리 외부 항원과 접촉하는 부위인 피부표면, 기도, 위장관 점막, 림프관 주변, 혈관 주위, 장막 등에 주로 존재하고, 제1형 과민반응 유발에 중심 역할을 한다⁴⁾. 한편 천식 환자의 후기반응이 알려지면서 제1형 과민반응 외 세포-매개성 면역반응이 알레르기성 염증반응 발생에 중요한 것으로 인식되면서 천식의 초기 제1형 과민반응은 비만세포에서 분비되는 화학매개체에 의해 발생하고, 후기 알레르기성 염증반응은 Iva2 아형 과민반응으로써 CD4⁺ type 2(Th2) T 세포로부터 분비되는 사이토카인들에 의한 호산구, 호염구 등의 염증세포 침윤을 특징으로 하게 된다²⁾.

동의보감에서는 천식(喘息)을 풍한천(風寒喘), 담천(痰喘), 기천(氣喘), 화천(火喘), 수천(水喘), 구천(久喘), 위허천(胃虛喘), 음허천(陰虛喘) 등으로 구분하였다. 천(喘)은 화기(火氣)가 심하고 기(氣)가 성(盛)하여 숨이 가쁜 것이며, 천급(喘急)은 기(氣)에 화(火)가 몰려 걸쭉한 담(痰)이 폐(肺)와 위(胃)에 생겨서 된 것이고, 효(哮)는 목구멍에서 소리가 나는 것이다.

천식은 풍한(風寒)이 폐(肺)를 상(傷)한 것이 아니면 담화(痰火)가 폐를 불어나게 하여 생기는 것이니, 풍한(風寒)이면 발산(發散)하는 약을 쓰고 담화(痰火)면 통(通)하게 하여 내보내는 약을 사용하며, 천식(喘息)이나 기침으로 기(氣)가 치밀어 오르는 것은 신(腎)이 허(虛)한 때문으로 인식하고 있다⁵⁾.

결명자의 미한(微寒)한 성미(性味)가 해열(解熱), 소염(消炎), 진정(鎮靜), 강화(降火), 지혈(止血), 사하(瀉下)하는 작용을 하여 알레르기 반응으로 유발된 기관지 점막의 염증을 해소하고, 장조(腸燥)에 사용하는 윤(潤)한 성미(性味)가 기관지 점막의 건조한 상태를 윤(潤)하게 하여 기관지 회복을 촉진하며, 감고함(甘苦鹹)¹⁾의 미(味)가 기역(氣逆)으로 인한 천식, 기관지가 건조해서 발생하는 염증 및 점막 부종, 그리고 기관지 근육 경련을 완화 하는데 효과가 있을 것으로 사료된다.

결명자에 대한 실험연구로는 고지방식이 streptozotocin (STZ)-유도 당뇨병 흰쥐에서의 허혈성 심장손상억제효과⁶⁾, STZ-유도 당뇨병성 신증 흰쥐에서의 최종당화산물생성 억제효과⁷⁾, 6-OHDA와 MPTP-유도 파킨슨 마우스에서의 뇌신경 보호효과⁸⁾, 허혈성 뇌졸중 흰쥐에서의 뇌신경보호 및 기억력 개선효과⁹⁾, 고지방식이 비만유도 흰쥐에서의 체중감소효과¹⁰⁾, dextran sulfate sodium-유도 궤양성 대장염 마우스에서의 개선효과¹¹⁾, D-galatosamine-유도 간 손상 흰쥐에서의 억제효과¹²⁾, 고지방식이-유도 비만 흰쥐¹³⁾와 당뇨병 환자¹⁴⁾에서의 콜레스테롤과 중성지방 감소효과, carbon tetrachloride-유도 간 손상 마우스에서의 개선효과¹⁵⁾ 등이 보고되었다.

따라서 본 연구에서는 결명자의 천식개선 및 알레르기 과민반응에 대한 조절 효능을 알아보기 위해 결명자의 70% 에탄올추출물을 제조하고 난알부민 감작(sensitization)과 흡입(airway challenge)으로 알레르기성 천식이 유발된 마우스에 투여한 후 천식 개선 효능을 확인하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 결명자는 결명(*Cassia obtusifolia* L.)의 잘 익은 씨(Cassiae Semen; CS)로서 식품의약품안전처 한약재품질표준화연구사업단의 부경대학교 최재수교수님(14A1001-B01JXX1204)으로부터 70% 에탄올 추출물을 제공받아 사용하였다. 즉, 결명자 100 g을 70% 에탄올로 95°C에서 3시간 씩 2회 추출하였으며(수율 : 18.4%), 동결 건조한 추출물은 냉동보관하면서 실험직전 멸균수에 녹여 시료로 사용하였다.

2) 세포배양

사람의 비만세포주인 HMC-1 세포는 1% penicillin/streptomycin과 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 배양액으로 37°C 세포배양기(5% CO₂)에서 충분히 배양하여 실험에 사용하였다. 비장세포(spleenocyte)는 마우스로부터 비장(spleen)을 분리한 후 나일론망을 이용하여 분쇄하고 RPMI 배지에 희석하여 2,000 rpm에서 10분 간 원심 분리하였다. 세포침전물을 수거하고 ACK lysis buffer를 이용하여 실온에서 3

분 동안 반응시킴으로써 적혈구를 용해시킨 후 원심 분리하여 비장세포를 분리하였다. 분리된 비장세포는 RPMI를 배양액으로 30mm 배양접시에 분주하고 37°C 세포배양기(5% CO₂)에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

3) 실험동물

실험동물은 6주령 BALB/c계 수컷 마우스(mouse, 20 ± 2g)를 (주)샘타코(경기도, 한국)로부터 구입하였으며, 고형사료와 물을 제한 없이 공급하면서 온도(23 ± 2°C)와 습도(55 ± 5%)를 일정하게 유지되고, 12시간 낮과 밤의 주기를 유지하는 환경에서 사육하였다. 모든 실험동물은 동물보호법 규정에 따라 관리하였다.

4) 시약 및 기기

실험에 사용되어진 시약으로는 ovalbumin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), DSCG(Sigma-Aldrich), Al(OH)₃ gel(InvitrogenTM, Carlsbad, CA, USA), H&E 염색약(Seoulin Biosciences Co., Seoul, South Korea), Histamine enzyme immunoassay(EIA) kit(Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA), Sandwich ELISA using OptEIA Set mouse OVA-specific IgE Kit(BD Biosciences, San Jose, CA, USA), murine IL-4 또는 IFN-γ ELISA development Kit(PeproTech Inc., London, UK), ConA, Compound 48/80(Sigma-Aldrich)를 사용하였으며, 실험기기로는 nebulizer(Devilbiss Healthcare LLC, Somerset, PA, USA), microplate reader(ASYS Group Asia Pte. Ltd., Hwaseong-si, South Korea), light microscope(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), BioDoc-it imaging system(Upland, CA, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 세포모델 제작

HMC-1 세포(1×10⁶/ml)를 24-well 또는 30 mm 배양용기에 접종하고 여러 농도의 결명자추출물을 처리하여 1시간 배양한 후 compound 48/80(5 μg/ml)를 처리하여 37°C 세포배양기에서 24시간 동안 반응시켰다. 비장세포(1×10⁷/ml)는 30 mm 배양접시에 분주하여 하룻밤 배양한 후 결명자추출물을 처리하여 1시간 배양하고 ConA(1 μg/ml)를 처리하여 37°C 세포배양기에서 24시간 반응시켰다.

2) 세포독성 평가

결명자추출물의 HMC-1 세포와 마우스 비장세포에서의 독성을 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 즉, 각 세포를 24-well 배양접시에 분주하여 하룻밤 배양한 후 결명자추출물을 여러 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 여기에 10 μl MTT(5 mg/ml) 용액을 넣어 37°C 세포배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후 상층액을 제거하고 100 μl DMSO를 첨가하여 용해시켰다. 반응액의 흡광도를 microplate reader기를 이용하여 570 nm에서 측정하였다. 세포생존도(%)는 정상세포에서의 생존률을 100%로 하여 결명자추출물 처리군의 생존율을 상대적으로 계산하였다.

3) 탈과립 관찰 및 히스타민 측정

HMC-1 세포 배양액에 compound 48/80을 처리하여 30분 간 배양한 후 탈과립 정도를 현미경으로 관찰하였으며, 세포 배양액을 수거하여 히스타민의 양을 anti-histamine enzyme immunoassay kit를 이용하여 측정하였다. 즉 anti-histamine antibody가 부착된 plate에 세포배양액을 넣고 실온에서 1시간 반응시킨 후 1× washing buffer를 이용하여 3회 세척하였다. 여기에 anti-histamine 항체에 특이적으로 작용하는 기질효소가 부착된 2차 항체를 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 이를 1× washing buffer를 이용하여 3회 세척한 후 발색시약을 넣고 실온에서 20분 동안 암실조건으로 반응시켰다. 반응 종료 후 정지액을 50 μl씩 넣어 효소반응을 정지시킨 후 microplate reader의 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포배양액 내 histamine의 농도는 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

4) RT-PCR

마우스 비장세포(primary spleenocytes)에 ConA를 처리하여 24시간 배양한 후 세포를 수집하고 Trizol reagent를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 DEPC에 녹인 후 Nano-Drop을 이용하여 정량하였으며 5 μg RNA에 5× RT buffer, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, oligo-dT, RTase를 넣고 25°C 10분, 42°C 60분, 72°C 15분 조건으로 cDNA를 합성하였다. PCR을 위해 cDNA를 template로 PCR mixture(MyTaq™ HS DNA polymerase, Biotline)와 primer(표 1)를 이용하여 혼합액을 만든 후 94°C 30초, 57~63°C 30초, 72°C 60초 조건을 30회 반복하여 유전자를 증폭시켰다. PCR 반응산물은 EtBr이 함유된 2% agarose gel에서 100V 조건으로 20분 간 loading 한 후 UV 하에서 확인하였다.

Table 1. Primer sequences for PCR

Cytokine		Sequence (5'→ 3')
IL-4	Forward	CCTCACAGCAACGAAGAACA
	Reverse	ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT
IFN-γ	Forward	GCTCTGAGACAATGAACGCT
	Reverse	AAAGAGATAATCTGGCTCTGC
GAPDH	Forward	GTGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC
	Reverse	GATGATGACCCGTTTGCTCC

5) 동물모델 제작

알레르기성 천식 동물모델을 제작하기 위해 마우스(Balb/c)에 난알부민(ovalbumin, OVA) 용액 1 mg을 생리식염수와 수산화알루미늄 겔[Al(OH)₃ gel]을 혼합한 용액(1:1)으로 용해한 후 0.3 ml을 실험 시작일로부터 7일 간격으로 0일, 7일, 14일에 복강 주사(sensitization)하였다. 마지막 복강 주사 7일 후 마우스를 50×15×50 cm 크기의 아크릴 상자 안에 넣은 후 OVA 용액(2%)을 뉴블라이저(nebulizer) 기기를 이용하여 격일 간격(21일, 23일, 25일, 27일)으로 하루 3회 15분씩 분사(challenge)하였다. 실험군은 생리식염수를 투여한 정상군(Normal), 난알부민(OVA)-유도 천식 유발군(OVA-Control), 천식 유발군에 결명자 70% 에탄올추출물(CS)을 100 mg/kg/body weight(bw)와 300 mg/kg bw 용량으로 투여한 실험군

(OVA+CS 50, OVA+CS 100), 그리고 대조약물인 disodium cromoglycate (DSCG)를 50 mg/kg i.p 투여한 대조군(OVA+DSCG 50)으로 나누었다. 실험 최종일에 모든 동물을 희생시키고 심장에서부터 혈액을 수집하였으며, 수집된 혈액은 6,000 rpm에서 10분간 2회 원심 분리함으로써 혈청을 분리하였다. 또한 폐의 조직학적 변화를 관찰하기 위해 각 군으로부터 폐 조직을 수집하여 파라핀(paraffin) 블록을 제작하였다.

6) 난알부민-특이 IgE 농도 측정

혈청 내 난알부민-특이 IgE 항체(OVA-specific IgE)의 농도를 측정하기 위해 mouse OVA-specific IgE ELISA kit를 이용하였다. 먼저 capture antibody가 부착된 96-well plate에 10% bovine serum albumin(BSA)이 함유된 1×PBS를 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Plate를 1×PBS를 이용하여 3회 세척하고 각 well에 혈청을 100 μ l씩 넣고 실온에서 2시간 반응시킨 후 1× washing buffer를 이용하여 5회 세척하였다. 여기에 peroxidase가 결합된 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 항체를 넣고 실온에서 1시간 반응시킨 후 1× washing buffer를 이용하여 5회 세척하고, 기질용액인 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine(TMB) 용액을 넣어 10분 동안 암실조건으로 실온에서 반응시켰다. 반응이 끝나 발색이 일어난 plate의 각 well에 정지액을 50 μ l씩 넣어 효소반응을 정지시킨 후 microplate reader의 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈청 내 IgE의 농도는 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

7) 사이토카인 농도 측정

혈청과 비장세포배양액에서의 IL-4와 IFN- γ 의 양을 mouse IL-4 또는 IFN- γ ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 즉, 96-well flat-bottom ELISA plate에 0.1 M sodium carbonate 용액으로 희석한 capture antibody를 100 μ l씩 넣은 후 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. Plate를 1× washing buffer로 3회 세척한 후 10% BSA가 함유된 1× PBS를 각 well에 넣어 실온에서 1시간 동안 정지함으로써 blocking하였다. 각 well에 혈청을 100 μ l씩 넣어 실온에서 2시간 반응시킨 후 5회 1× washing buffer로 세척하고 peroxidase가 결합된 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 항체를 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 5회 세척한 다음 기질용액(TMB)을 넣어 10분 동안 암실조건에서 반응시킴으로써 발색을 유도하였다. 반응종료 후 각 well에 정지액을 50 μ l씩 넣어 효소반응을 정지시킨 후 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈청 내 IL-4와 IFN- γ 의 농도는 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

8) 비강조직 염색

각 실험동물을 희생하여 폐 조직을 수집하고 4% formaldehyde 용액에 고정된 후 파라핀으로 포매하여 블록을 제작하였으며, microtome을 이용하여 3 μ m 두께의 절편을 제작하였다. 폐 조직의 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 위해 파라핀 절편을 60°C에서 30분 간 말린 다음 자일렌(xylene)으로 15분간 탈파라핀 시키고 100%, 95%, 80%, 75% 알코올 순서대

로 함수시켰다. 준비된 조직 슬라이드를 hematoxylin 용액을 떨어뜨려 3분간 반응시키고 증류수로 1분씩 3회 세척한 후 eosin 용액으로 10분간 반응시키고 증류수로 세척하였다. 이를 Permount로 마운팅(mounting)한 후 광학현미경을 이용하여 폐조직의 구조적 변화를 관찰하였다. 이때 hematoxylin은 염기성 염색약(basic stain)으로 세포 핵 내 염색질과 핵막을 염색하여 보라색으로 나타나며, 산성 염색약인 eosin(acid stain)은 염기를 띠는 세포질 단백질과 콜라겐 등과 결합하여 분홍색으로 관찰된다.

9) 통계학적 검증

모든 실험 결과는 GraphPad Prism 5.0 통계 프로그램(GraphPad Software Co., La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차(mean \pm SD)를 이용하여 계산하였으며, 각 그룹 간 비교를 위해 one-way ANOVA를 실시하고, $p < 0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 비만세포에서의 탈과립 및 히스타민 분비에 대한 효과

결명자추출물의 비만세포에서의 히스타민 분비 억제효과를 확인하기 위해 HMC-1 세포에 결명자추출물을 처리하고 compound 48/80 자극으로 활성화시킨 후 탈과립(mast cell degranulation) 정도와 세포배양액 내 히스타민의 양을 측정하였다. 그 결과, compound 48/80을 처리하였을 때 비만세포의 탈과립 현상이 관찰되었으며, 히스타민의 생성 역시 현저히 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 1). 또한 결명자추출물은 비만세포에서의 탈과립 현상을 억제하고, 이를 통해 히스타민 양의 증가를 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다.

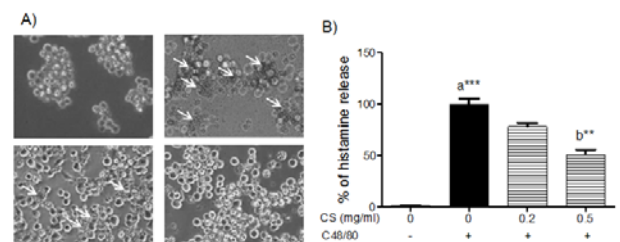


Fig 1. Effect of CS extract on the cell degranulation and histamine release in compound 48/80-stimulated HMC-1 cells. Cells were cultured with CS extract at 0.2 and 0.5 mg/ml for 1 h and then stimulated with compound 48/80 for 30 min. (A) The cell degranulation was observed by microscope ($\times 100$). (B) Histamine levels were measured in culture media by EIA. Data were presented as mean \pm SD of three independent experiments. ^{**} $P < 0.01$ and ^{***} $P < 0.001$ vs. normal (a) or compound 48/80 alone (b).

2. 비장세포에서의 IL-4 및 IFN- γ 유전자 발현에 대한 효과

결명자추출물의 T 세포에서의 면역조절효과를 확인하기 위해 마우스 비장세포에 결명자추출물을 처리하고 ConA 자극

으로 활성화시킨 후 세포배양액 내 면역조절 사이토카인인 IL-4와 IFN- γ 의 양을 측정하였다. 그 결과, ConA를 처리하였을 때 비장세포에서 IL-4와 IFN- γ 의 유전자 발현과 세포배양액 내 농도가 증가하는 것을 관찰하였다. 또한, ConA 자극으로 활성화된 비장세포에 결명자추출물을 처리하였을 때 IL-4와 IFN- γ 의 유전자 발현과 세포배양액으로의 분비가 모두 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

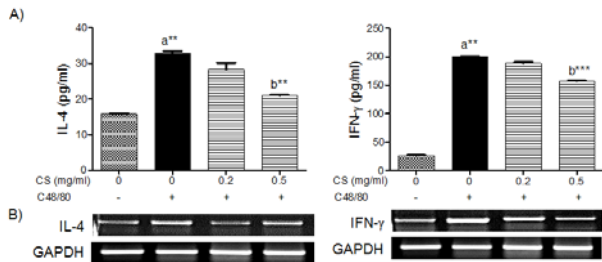


Fig 2. Effect of CS extract on the expression of IL-4 and IFN- γ in ConA-stimulated spleenocytes. Primary spleenocytes were cultured with CS extract at 0.2 and 0.5 mg/ml for 1 h and then stimulated with ConA for 24 h. (A) The levels of IL-4 and IFN- γ were measured in culture supernatants by ELISA. Data were presented as mean \pm SD of three independent experiments. ** P < 0.01 and *** P < 0.001 vs. normal (a) or ConA alone (b). (B) The expression of IL-4 and IFN- γ mRNA was determined by RT-PCR.

3. 천식 마우스에서의 히스타민 분비에 대한 효과

결명자추출물의 천식에서의 알레르기 면역반응에 대한 조절효과를 확인하기 위해서 난알부민(OVA) 감작(sensitization / challenge)으로 알레르기성 천식이 유발된 마우스에 결명자추출물을 100 mg/kg와 300 mg/kg를 투여한 후 혈청 내 히스타민의 농도를 측정하였다. 그 결과 천식이 유발된 대조군(OVA- Control)에서는 정상군(Normal)에 비해 혈청 히스타민의 농도가 유의적으로 증가되었으며, 결명자추출물을 투여한 군(CS100, CS300)에서는 모두 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다(Fig. 3). 또한 혈청 히스타민의 농도는 대조약물인 DSCG 투여군(DSCG50)에서도 다소 감소하는 것으로 나타났다.

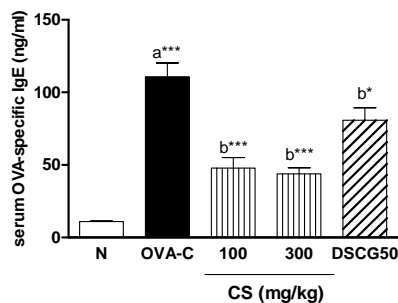


Fig 3. Effect of CS extract on histamine levels in the sera of OVA-induced asthma mice. CS extract was administrated orally at 100 and 300 mg/kg in asthma mice. Serum levels of OVA-specific IgE were measured by ELISA. Results are expressed as the mean \pm SD (n=6 per a group). * P < 0.05 and *** P < 0.001 vs. normal (a) or OVA-control group (b). N, normal group; OVA-C, control group; CS, Cassiae Semen extract 100 and 300 mg/kg-administrated group; and DSCG50, DSCG 50 mg/kg-administrated group.

4. 천식 마우스에서의 면역반응조절 사이토카인 분비에 대한 효과

결명자추출물의 천식에서의 알레르기 면역반응에 대한 조절효과를 확인하기 위해서 난알부민(OVA) 감작(sensitization / challenge)으로 알레르기성 천식이 유발된 마우스에 결명자추출물을 100 mg/kg와 300 mg/kg를 투여한 후 혈청 내 사이토카인의 농도를 측정하였다. 그 결과 천식이 유발된 대조군(OVA- Control)에서는 정상군(Normal)에 비해 혈청 IL-4와 IFN- γ 의 농도가 유의적으로 증가되었으며, 결명자추출물을 투여한 군(CS100, CS300)에서는 300 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 4). 또한 대조약물인 DSCG 투여군(DSCG50)에서는 IL-4는 유의적으로 감소하는 반면 IFN- γ 는 감소시키지 않는 것으로 나타났다.

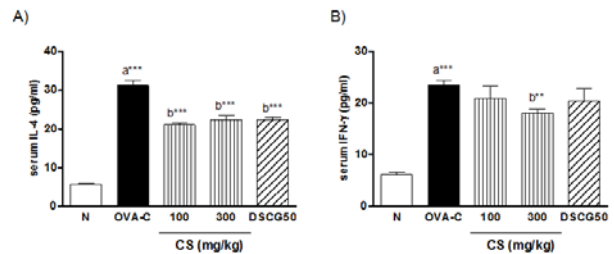


Fig 4. Effect of CS extract on the production of IL-4 and IFN- γ in the sera of OVA-induced asthma mice. CS extract was administrated orally at doses of 100 and 300 mg/kg in asthma mice. Serum levels of IL-4 and IFN- γ were measured by ELISA. Results are expressed as the mean \pm SD (n=6 per a group). ** P < 0.01 and *** P < 0.001 vs. normal (a) or OVA-control group (b). N, normal group; OVA-C, control group; CS, CS extract 100 and 300 mg/kg-administrated group; and DSCG50, DSCG 50 mg/kg-administrated group.

5. 폐 조직 손상에 대한 효과

결명자추출물의 천식에서의 폐 조직 손상에 대한 억제효과를 확인하기 위해서 난알부민(OVA) 감작(sensitization / challenge)으로 알레르기성 천식이 유발된 마우스에 결명자추출물을 100 mg/kg와 300 mg/kg를 투여한 후 폐 조직을 수집하여 H&E와 PAS 염색하였다. 먼저, H&E 염색결과에서 정상군(Normal)의 폐 조직에서는 세기관지(bronchi)와 폐포낭(Alveolar sac)의 형태가 잘 보존되어 있는 것을 확인하였으며, 천식이 유발된 대조군(OVA-Control)에서는 폐 조직에서는 세기관지 내 상피세포층의 손상과 세기관지와 폐포 주변의 염증세포 침윤 및 세기관지 면적이 좁아지고 벽이 두꺼워지는 염증손상이 관찰하였다(Fig. 5). 또한 결명자추출물을 투여한 군에서는 대조군에 비해 두 용량 투여군 모두 폐 조직의 염증손상을 억제하는 것으로 나타났다.

한편, PAS 염색결과에서는 정상군에 비해 대조군의 세기관지 내 상피세포층에서 술잔세포 증식에 따른 무신 분비가 증가하는 것을 관찰하였으며 이는 결명자추출물 300 mg/kg 투여군에서 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

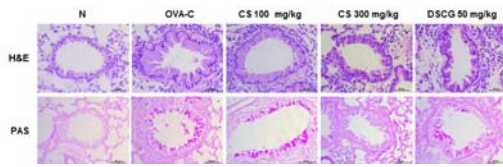


Fig 5. Effect of CS extract on the histopathological change in lung tissues of OVA-induced asthma mice. Lung tissues were stained with H&E and PAS ($\times 200$). N, normal group; OVA-C, control group; CS, Cassiae Semen extract 100 and 300 mg/kg-administrated group; and DSCG50, DSCG 50 mg/kg-administrated group.

고찰

기관지 천식은 우리나라 성인에서 약 5%를 차지할 정도로 가장 흔한 질환이며 여러 가지 약물이 개발되어 사용하고 있음에도 불구하고 사망률이 별로 줄어들지 않고 있고 오히려 산업화된 국가일수록 소아나 성인 모두에서 환자 수가 증가하고 있어 경제적으로 문제가 되고 있는 질환이다¹⁶. 천식은 외부 물질이나 어떤 원인에 의해서 기관지 안쪽에 있는 점막에 염증이 생기고 이로 인해 여러 가지 자극에 대해 기관지가 예민해지거나 좁아져서 공기가 드나들기 어렵게 되는 질환으로 치료의 목표는 약물로 인한 부작용의 최소화를 통한 증상완화이다. 현재 천식의 치료제로는 스테로이드제, 지속형 베타2항진제, 서방형 테오필린, 류코트리엔 조절제 등의 조절제와 속효성 베타2항진제, 항콜린제, 에피네프린 주사 등의 증상개선제가 사용되고 있다¹⁷. 천식의 위험인자로는 아토피, 기도과민성, 성별, 인종 등의 유전적 소인과 알레르겐(allergen), 흡연, 공해, 호흡기 감염 등의 환경적 인자들이 있다¹⁸. 천식은 반복적인 악화를 동반하는 기도의 만성 염증 질환으로 염증반응은 기도 상피조직의 손상과 회복 과정을 통해 기도개형(airway remodeling)이라는 구조적, 기능적 변화를 야기하고, 기도염증(airway inflammation), 기도개형, 신경학적 조절의 변화는 천식의 악화와 영구적 기도폐쇄를 유발하게 된다¹⁹. 또한 급성 기관지 수축, 기도벽 부종, 만성적 점액막개 형성, 기도개형을 통해 천식의 특징인 기류장애에 의한 호흡곤란 증상을 나타내게 된다.

한의학에서 천식은 효천(哮喘)이라고 하며 효(哮)는 숨을 쉴 때 기도에서 그르렁 거리는 소리가 나는 것이고(喉中有聲響), 천(喘)은 호흡이 급하고 촉박한 것(呼吸急促)으로 기관지 천식, 천식성 기관지염, 폐기종, 심장성 천식 등 많은 병증을 포함하며 폐장(肺腸)과 신장(腎臟)의 정기(精氣) 부족으로 인한 면역력 약화로 보고 있다. 효천(哮喘)의 주요 원인은 담(痰)으로 보아 외부의 풍한(風寒)의 나쁜 기운을 받거나 인체 내부의 폐 또는 심신(心身)이 허약해져서 생긴 담(痰)이 움직여서 생기는 질병으로 생각하고 있다. 한의학에서 천식(喘息)은 본허표실(本虛標實)이라 하여 근본 원인인 폐와 기관지의 면역력을 강화시켜야 한다고 보며, 호흡곤란의 원인을 풍한(風寒), 담탁(痰濁), 담열(痰熱)로 구분하여 치료하고, 찬기운이 원인인 한성효천(寒性哮喘), 열로 인한 열성효천(熱性哮喘), 가래를 포함하는 기관지의 비정상적 노폐물인 담음(痰飲)으로 인한 담성효천(痰性哮喘)으로 구분하여 치료하게 된다⁵. 풍한(風寒)으로 인한 천식(喘息)에는 마황산(麻黃散), 인삼윤폐탕(人蔘潤肺湯), 오미자탕(五味子湯)등에서 풍한을 발산하는

마황(麻黃)을 군약(君藥)으로 하고 행인(杏仁) 패모(貝母) 길경(桔梗) 아교(阿膠) 오미자(五味子)등 윤폐(潤肺)의 약재를 신(臣), 좌약(佐藥)등으로 배오하여 사용 하였으며, 담천(痰喘)에는 천민탕(千縉湯), 천민도담탕(千縉導痰湯), 패모산(貝母散)등에서 반하(半夏), 패모(貝母)등 담(痰)을 삭히는 약을 군약(君藥)으로 하고 행인(杏仁) 오미자(五味子) 등을 배오하였으며, 화천(火喘)에는 백호탕(白虎湯), 도담탕(導痰湯), 가감사백산(加減瀉白散)등에서 화열(火熱)을 내리는 황금(黃芩) 황련(黃連) 석고(石膏) 상백피(桑白皮) 지골피(地骨皮) 등의 약재를 사용 하였다²⁰.

결명자는 결명의 성숙한 종피를 가을철에 채취하여 건조한 것으로 간을 맑게 하고 눈을 밝게 하며(淸肝明目), 간풍(肝風)을 평식(平息)시키고 간양(肝陽)을 억제하며(平肝潛陽), 장(腸)을 윤기 나게 하여 변을 통하게 하며(潤腸通便), 눈이 붉고 쉼없고 아픈 것(目赤澀痛)과 눈을 못 뜨고 눈물이 많은 것(羞明多淚), 두통(頭痛) 현훈(眩暈)과 눈이 어둡고 밝지 않는 것(目暗不明), 대변이 굳고 단단한 것(大便秘結)에 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹. <동의보감>에는 성질은 평(平)하고 미한(微寒)하며, 맛이 짜고(鹹) 쓰며(苦), 독이 없고, 간기(肝氣)를 돕고 정수(精水)를 보태어 주며, 베게를 만들어 사용하면 두 풍증을 없애고 눈을 밝게 한다(本草)고 기술되어 있다²¹. 본 연구에서는 결명자의 미한(微寒)하고 평간잠양(平肝潛陽)한 성질이 해열(解熱), 소염(消炎), 진정(鎮靜), 강화(降火)하는 작용을 하여 외부 항원으로 부터 유발되는 기관지 점막의 염증과 부종을 해소하고, 씨앗류들이 가지고 있는 윤(潤)한 특성이 기관지 점막의 건조한 상태를 윤(潤)하게 하여 기관지의 정상 생리의 회복에 도움이 되며(潤肺), 감고함(甘苦鹹¹)의 미(味)가 기역(氣逆)으로 인한 천식과 기관지 건조로 인해 발생하는 염증과 점막 부종, 그리고 기관지 근육 경련을 완화하는데 효과가 있을 것으로 기대되어 천식에서의 증상개선 뿐 아니라 천식 발병의 핵심 면역세포인 비만세포와 T 세포에서의 과민성 면역반응 조절에 대한 효과를 조사하였다. 다만, 동의보감에서와 같이 천식(喘息)은 한 가지 병인(病因)으로만 유발되는 질환이 아니므로 신허(腎虛)로 인해 숨이 잘 경우에는 보간신약(補肝腎藥)을 겸하고, 해수(咳嗽)와 담(痰)을 겸한 천식의 경우 화담지해평천약(化痰止咳平喘藥)을 겸하며, 외감풍한(外感風寒)으로 인한 풍한천(風寒喘)에는 표(表)를 풀어주는 약을 동시에 사용하는 것이 바람직 할 것으로 추측되므로 기타 약물과의 병행 연구가 이루어진다면 더욱 좋을 것으로 생각된다.

한편 결명자는 현대약리실험에서 당뇨병성 심장손상 억제⁶, 비만에서의 체중감소¹⁰, 콜레스테롤과 중성지방 감소에 의한 비만과 당뇨병 개선^{13,14}, 당뇨병성 신증 개선⁷, 허혈성 및 독성물질에 대한 뇌신경보호^{8,9}, 궤양성 대장염 개선¹¹, 간 손상 억제¹² 등의 다양한 효과가 보고되었다. 그러나 천식에서의 개선효과는 본 논문에서 처음 소개하였다.

Disodium cromoglycate(DSCG)는 임상에서 천식 및 알레르기 치료에 사용하는 약물로 비만세포에서의 탈과립에 의하여 유도되는 P-selectin과 C18에 의존적인 백혈구의 이동(rolling)과 부착(adhesion)을 억제함으로써 비만세포를 안정화하는 것으로 알려져 있다²². DSCG는 난알부민-유도 알레르기성 천식 마우스에서 항원에 의한 천식의 후기 반응이 진행되는 동안 기도 내 뮤신(intraluminal mucus)의 분비와

축적을 억제하는 것으로 보고되었다²³⁾. 본 연구에서 DSCG는 결명자의 대조약물로 사용되었으며 난알부민-유도 알레르기성 천식 마우스에서 항원-특이 IgE와 Th2 type 사이토카인인 IL-4의 유의적인 감소 및 기도 내 염증반응 억제 효과를 나타내었다.

비만세포는 골수에서 기원하여 혈관 내에서 단핵구(CD34⁺) 형태로 순환하며 기도 내 점막 하로 이동하여 성숙하게 되는데 비만세포에 부착되는 IgE에 알레르기 항원이 결합하면 탈과립을 통해 세포 내 존재해 있던 히스타민과 류코트리엔을 방출하게 됨으로써 천식의 급성 및 만성 염증에 기여하게 된다²⁴⁾. 실제 천식 환자에서 기도 내로 항원이 들어오면 비만세포로부터 히스타민과 류코트리엔 등이 분비되면서 기관지 수축이 일어나는데 이 반응은 알레르기 항원 유입 후 초기(early phase)에 나타나며 기도 내 다양한 염증세포로부터 사이토카인들이 분비되어 후기반응(late phase)이 나타나게 된다. 본 연구에서 결명자추출물은 비만세포 활성화에 의한 탈과립 현상을 억제함으로써 히스타민 분비를 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 이는 결명자추출물이 비만세포를 안정화시킴으로써 세포 내 초기 알레르기 반응을 매개하는 화학물질들의 방출을 막아 알레르기성 천식의 발생을 제어할 수 있음을 의미한다.

한편 알레르기 면역반응에서 조력 T 세포(helper T cell, Th)는 IL-2, IFN- γ 등을 분비하는 Th1 type 세포와 IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 등을 분비하는 Th2 type 세포로 나눌 수 있으며 이전 연구에서 Th1과 Th2 반응은 서로 길항작용을 하며 균형을 유지하고 있고 이들의 불균형이 천식을 발생시키는 것으로 보고 있다. 또한 알레르기성 천식은 IgE 생성과 관련되는데 Th0 세포가 Th2 세포로 분화되어 Th2 type 사이토카인들을 분비하면 이들은 각 종 세포들을 자극하여 IgE와 염증성 물질들을 다량 분비시킴으로써 기관지 과민성 반응과 기도폐쇄를 일으킴으로써 천식의 초기 발생에 기여하게 된다. 특히 B 세포로부터 생성된 IgE는 혈관을 타고 순환하다 기도하의 비만세포와 만나서 비만세포 표면에 있는 high-affinity IgE 수용체(FC ϵ RI)와 결합하여 비만세포를 활성화시킴으로써 탈과립을 통한 히스타민, 류코트리엔, 각종 염증성 사이토카인 등의 분비를 통한 기도 염증반응에 관여하게 된다. 따라서 천식에서의 치료약물은 증상 개선 뿐 아니라 Th1과 Th2 면역반응의 불균형을 해소시키고 비만세포 뿐 아니라 각 종 면역세포들의 활성을 조절함으로써 알레르기성 면역반응을 조절하는 약물 개발이 중요한 전략이 될 수 있다. 본 연구에서 결명자추출물은 마우스의 비장으로부터 분리한 비장세포로부터 Th1 type 사이토카인인 IL-4의 분비를 억제할 뿐 아니라, 난알부민-유도 알레르기성 천식 마우스에서 항원-특이 IgE의 생성과 IL-4의 분비를 억제하였으며 이는 결명자추출물이 알레르기 면역반응으로의 진행을 막음으로써 항상성 회복을 통해 천식을 개선시킬 수 있음을 의미한다.

천식에서의 기도 염증은 비만세포, 림프구, 호산구 뿐 아니라 대식세포, 호중구, 기도 상피세포 등 다양한 염증세포들의 기도 내 침윤으로부터 시작되며 염증세포로부터 합성·분비되는 다양한 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF)이나 케모카인, 염증효소(iNOS, COX-2) 등이 천식의 만성 염증반응에 기여하게 된다. 실제 천식 환자의 기도 염증은 기도개형으로부터 폐 기능의 지속적인 이상소견을 초

래하는 것으로 알려져 있고, 폐의 조직학적인 변화로 기관지와 혈관 주변으로의 염증세포 침윤과 기관지상피세포의 술잔세포 증식(goblet cell hyperplasia), 기도 내강으로의 점액 분비와 부종 소견 이 관찰된다. 본 연구에서 결명자추출물은 난알부민-유도 천식 마우스에서 폐 조직 내 세기관지 주변으로의 염증세포 침윤과 기도 상피세포층 손상, 기관지 벽의 비후, 부종 및 점액 분비 등의 구조적 손상을 억제시키는 것으로 나타났다. 이는 결명자추출물이 천식에서의 알레르기성 염증반응에 의한 폐와 기관지의 구조적 손상을 억제함으로써 기도 확보를 통해 천식증상을 개선시킬 수 있음을 의미한다.

결론

본 연구에서는 결명자추출물의 항알레르기 및 천식 개선효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 결명자추출물은 비만세포(HMC-1 cells)에서 compound 48/80 자극에 의한 탈과립과 히스타민 분비를 유의적으로 억제하였다.
2. 결명자추출물은 마우스 비장세포(primary spleenocytes)에서 ConA 자극에 의한 IL-4와 IFN- γ 의 분비를 유의적으로 감소시켰다.
3. 결명자추출물은 난알부민-유도 알레르기성 천식 마우스에서 혈청 내 항원-특이 IgE와 IL-4 및 IFN- γ 의 분비를 유의적으로 감소시켰다.
4. 결명자추출물은 난알부민-유도 알레르기성 천식 마우스의 폐 조직에서 기관지 주변으로의 염증세포 침윤을 막고 기도조직의 병리적 구조손상을 억제하였다.

본 연구결과로부터 결명자추출물은 알레르기 면역반응 조절과 염증반응 억제를 통해 천식을 개선시킬 수 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2014년도 식품의약품안전처의 연구개발비(12172MFDS989)지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Professors of herbology in colleges of oriental medicine, Herbology, Seoul : Yeonglimsa, 2004 : 76-8, 549-50.
2. PG Holt, C Macaubas, PA Stumbles, PD Sly, The role of allergy in the development of asthma, Nature 1999; 402; B12-17
3. Koo IH, Development trend of asthma medicine, Korean

- Drug Development Fund.
4. Schwartz RS. A new element in the mechanism of asthma. *N Engl J Med* 2002 ; 346(11) : 857-8.
 5. Oriental medicine research institute, Donguibogam, Seoul : Yeogang publisher, 1994 : 1725-6, 1747.
 6. Fu F, Tian F, Zhou H, Lv W, Tie R, Ji L, Li R, Shi Z, Yu L, Liang X, Xing W, Xing J, Yu J, Sun L, Zhu H, Zhang H. Semen cassiae attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury in high-fat diet streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Am J Chin Med*. 2014 ; 42(1) : 95-108.
 7. Kim YS, Jung DH, Sohn E, Lee YM, Kim CS, Kim JS. Extract of Cassiae semen attenuates diabetic nephropathy via inhibition of advanced glycation end products accumulation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 2014 ; 21(5) : 734-9.
 8. Ju MS, Kim HG, Choi JG, Ryu JH, Hur J, Kim YJ, Oh MS. Cassiae semen, a seed of *Cassia obtusifolia*, has neuroprotective effects in Parkinson's disease models. *Food Chem Toxicol*. 2010 ; 48(8-9) : 2037-44.
 9. Kim DH, Yoon BH, Kim YW, Lee S, Shin BY, Jung JW, Kim HJ, Lee YS, Choi JS, Kim SY, Lee KT, Ryu JH. The seed extract of *Cassia obtusifolia* ameliorates learning and memory impairments induced by scopolamine or transient cerebral hypoperfusion in mice. *J Pharmacol Sci*. 2007 ; 105(1) : 82-93.
 10. Junbao Y, Long J, Jiangbi W, Yonghui D, Tianzhen Z, Songyi Q, Wei L. Inhibitive effect of Semen Cassiae on the weight gain in rats with nutritive obesity. *Zhong Yao Cai*. 2004 ; 27(4) : 281-4.
 11. Kim SJ, Kim KW, Kim DS, Kim MC, Jeon YD, Kim SG, Jung HJ, Jang HJ, Lee BC, Chung WS, Hong SH, Chung SH, Um JY. The protective effect of *Cassia obtusifolia* on DSS-induced colitis. *Am J Chin Med*. 2011 ; 39(3) : 565-77.
 12. Hong KH, Um MY, Ahn J, Ha TY. Effect of Cassia tora extracts on D-Galactosamine-induced liver injury in Rats. *Korean J Food Nutr*. 2012 ; 25(3) : 546-53.
 13. Ha TY, Cho IJ, Seong KS, Lee SH. Effect of Cassia tora ethanol extract on the lipid levels of serum liver in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2001 ; 30(6) : 1171-6.
 14. Cho SH, Kim TH, Lee NH, Son HS, Cho IJ, Ha TY. Effects of Cassia tora fiber supplement on serum lipids in Korean diabetic patients. *J Med Food*. 2005 ; 8(3) : 311-8.
 15. Ha TY, Cho IJ, Lee HY. Effect of *Cassia tora* ethanol extracts on carbon tetrachloride-induced liver injury rats. *Korean J Food Sci Technol*. 2001 ; 33(6) : 789-94.
 16. Medical index commission of the korean academy of tuberculosis and respiratory diseases. Medical index of bronchial asthma. The korean academy of tuberculosis and respiratory diseases. 2005.
 17. Aldington S, Beasley R. Asthma exacerbations. 5: assessment and management of severe asthma in adults in hospital. *Thorax*. 2007 ; 62(5) : 447-58.
 18. Holgate ST. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 ; 104(6) : 1139-46.
 19. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med*. 2012 ; 18(5) : 684-92.
 20. Oriental medicine research institute, Donguibogam, Seoul : Yeogang publisher, 1994 : 1726-36.
 21. Oriental medicine research institute, Donguibogam, Seoul : Yeogang publisher, 1994 : 2737.
 22. Gaboury JP, Johnston B, Niu XF, Kubes P. Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion *in vivo*. *J Immunol*. 1995 ; 154(2) : 804-13.
 23. Koyama H, Tokuyama K, Nishimura H, Mizuno T, Mayuzumi H, Ohki Y, Arakawa H, Mochizuki H, Morikawa A. Effect of disodium cromoglycate on airway mucus secretion during antigen-induced late asthmatic responses in a murine model of asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005 ; 138(3) : 189-96.
 24. Brandenburg AH, van Beek R, Moll HA, Osterhaus ADME, Claas EC. G protein variation in respiratory syncytial virus group A does not correlate with clinical severity. *J Clin Microbiol*. 2000 ; 38(10) : 3849-52.