

원 저

定喘湯과 定喘湯加減方이 알레르기 천식모델 흰쥐의 BALF內 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향

염중훈, 정희재, 정승기, 이형구
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

The Effects of *Jungchun-tang* and *Jungchuntanggagambang* on Immune Cell & Serum IgE in BALF in a Rat Asthma Model

David Jong-Hoon Yom, Hee-Jae Jung, Sung-Ki Jung, Hyung-Koo Rhee

Division of Respiratory System, Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine,
Kyung Hee University, Seoul, Korea

Background : Allergic asthma is thought to be mediated by CD4⁺ T lymphocytes producing the Th2-associated cytokines. According to investigations of lung biopsies and respiratory secretions from patients, CD4⁺ T cells and eosinophils are the main features of the inflammatory process.

Object : This study aimed to find an inhibition effect on allergens induced by JCT (*Jungchun-tang*) and JCTG (*Jungchuntanggagambang*) through the change of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells in BALF of rat, and to see the change of IgE in serum.

Materials and Methods : Laboratory rats were primary sensitized with OA (ovalbumin); on day 1, rats of a control group and a sample group (SBP group) were systemically immunized by subcutaneous injection of 1mg OA and 300mg of A1(OH)3 in a total volume of 2ml saline. The rats of the sample group were orally administered with an SBP water extract for 14 days after primary immunization. On day 14 after the systemic immunization, rats received local immunization by inhaling 0.9% saline aerosol containing 2%(wt/vol) OA. A day after local immunization, BAL fluid and serum were collected from the rats. Total cells, lymphocytes, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and CD4⁺/CD8⁺ ratio in the BALF, and IgE level in serum were measured and evaluated.

Results :

1. Total cell in BALF of rat: JCT was observed to be significantly reduced but JCTG had no significant difference in comparison with the control group.
2. Lymphocytes in BALF of rat: JCT and JCTG were observed to be significantly reduced in comparison with the control group.
3. CD4⁺T cells in BALF of rat: JCT was observed to be more significantly reducing than JCTG in comparison with the control group.
4. CD8⁺T cells in BALF of rat: JCT and JCTG were observed not to be significantly different than in the control group.
5. CD4⁺/CD8⁺ ratio in BALF of rat: JCT and JCTG were observed not to be significantly different than in the control group.
6. The IgE level in serum: JCT and JCTG were observed to be significantly reduced in comparison with the control group.

Conclusion : This study shows that JCT inhibits allergen-induced specially select CD4⁺T cell channel in BALF of rat. (J Korean Oriental Med 2003;24(1):169-180)

Key Words: *Jungchun-tang* (*Dingchuan-tang*), asthma, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, IgE

서론

기관지천식(이하 천식)은 항원이나 비만세포 및 IgE가 관여하여 분비되는 화학매체의 직접적인 작용에 의해서 또는 화학매체와 cytokine, 유착분자 등이 관여하여 기관지로 모여진 염증세포에 의해서 발병되는 기도의 만성 알레르기 염증성 질환으로 이해되고 있다¹⁾. 천식에 대한 서양의학적 치료로는 기관지 확장제, 부신피질호르몬(스테로이드)제, 예방적 약물 등이 사용되며 속효성이 뛰어나 급한 증상을 치료하는 데는 유효하나 완치나 예방에는 한계가 있고 부작용이 심각하게 나타나기도 한다²⁾.

한의학에서 천식은 呼吸促急, 喘鳴有聲을 특징적인 症候群으로 하는 哮喘證에 該當되며^{3,4)} 치료는 주로 虛實을 구별하여 實證에는 祛風寒, 燥濕, 清熱, 溫肺, 化痰, 降氣宣肺, 定喘의 治法으로, 虛證에는 補肺, 益心腎을 기본으로 하여 化痰, 定喘의 治法을 加하여 사용한다⁵⁾.

천식과 관련된 치료 처방으로 BALF내 면역세포의 변화를 관찰한 연구로는 小青龍湯⁶⁾, 麥門冬과 定喘化痰降氣湯⁷⁾ 등이 보고된바 있으며, BEAS-2B 인간기관지 상피세포에서 IL-6, IL-16 그리고 GM-CSF의 mRNA 發現에 대한 연구 처방으로는 麥門冬清肺飲⁸⁾, 喘四君子湯과 水蛭의 효능⁹⁾ 등에 대한 보고가 있었다.

定喘湯은 徐¹⁰⁾의 古今醫統大典에 처음으로 收錄된 處方으로 三拗湯을 基礎로 하여 이에 桑白皮, 黃芩, 半夏, 蘇子, 款冬花, 銀杏을 배합하여 이루어진 方劑¹¹⁾로 宣肺平喘 清熱化痰 清降肺氣 定喘化痰하는 효능이 있어 諸喘久不愈 哮喘 哮吼 喘急 哮喘痰聲 등 症의 治療에 應用된다¹²⁾. 定喘湯의 효능에 관한 실험연구로 정¹³⁾은 천식에 미치는 영향에 대하여 연구 報告하였고 왕 등¹⁴⁾은 천식 발작시 나타나는 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향을 관찰하였고, 김 등¹⁵⁾은 asthma model내의 cytokine에 미치는 영향에 대해 보고하였다.

定喘湯加減方은 定喘湯에서 麻黃을 빼고 水蛭을 가한 처방으로, 水蛭은 活血祛瘀의 효능을 가진 약물

로¹⁶⁾ 최근에는 抗炎症 효과가 보고¹⁷⁾되어 水蛭이 인체에서 염증반응을 억제할 수 있다는 가능성을 보여 기관내 염증성 질환의 일종인 기관지천식치료에도 효과가 있으리라 생각되어 活血祛瘀 작용이 뛰어난 水蛭과 기관지 이완효과를 가진 麻黃을 함께 炒한 후 麻黃은 버리고 水蛭만을 택하여 水蛭(麻黃炒)을 실험에 이용하였다¹⁸⁾.

천식에서 가장 중심적인 병리적 양상은 기도의 폐색, 기도의 과민성, 그리고 호산구, 임파구, 비만세포, 호중구 및 단핵구 등으로 구성된 광범위한 염증으로 나타나고¹⁹⁾ 기도의 염증과 과민반응에 관련된 지표로서 CD4⁺T cell, CD8⁺T cell, IgE가 중요한 것으로 생각되어진다.

본 연구에서는 定喘湯과 定喘湯加減方을 이용하여 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 total cell, lymphocyte, CD4⁺T cell 및 CD8⁺T cell의 수, CD4⁺/CD8⁺의 비율의 변화, 혈청내의 IgE변화 등을 살핀 결과 유의성 있는 결과를 관찰하였기에 보고하는 바이다.

실험

1. 동물 및 재료

1) 동물

체중 200±20g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 (대한바이오링크, 한국)를 사용하였으며, 고형사료(구성성분: 조단백질 21.1% · 조지방 3.5% · 조섬유 5.0% · 조회분 8.0% · 칼슘 0.6% · 인 0.6%)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에서 2주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약제

약제는 경희의료원 약제과에서 엄선한 것을 사용하였으며 定喘湯과 定喘湯加減方 한 칩의 내용과 분량은 다음과 같다¹⁸⁾.(Table 1, Table 2)

2. 방법

1) 실험군 설정

실험군은 한 군에 10마리씩 배정하여 정상군(Nor-

Table 1. Composition and Dosage of *Jungchun-tang*(定喘湯)

Herb	Scientific Name	Dose(g)
麻 黃	<i>Ephedra Herba</i>	12.0g
杏 仁	<i>Armeniaca Amarum Semen</i>	6.0g
黃 芩	<i>Scutellariae Radix</i>	4.0g
半 夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	4.0g
桑白皮	<i>Mori Cortex</i>	4.0g
蘇 子	<i>Perillae Semen</i>	4.0g
款冬花	<i>Farfarae Flos</i>	4.0g
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0g
銀 杏	<i>Ginko Semen</i>	15.0g
總 量		57.0g

Table 2. Composition and Dosage of *Jungchuntang-gagambang*(定喘湯加減方)

Herb	Scientific Name	Dose(g)
水 蛭(麻黃炒)*	<i>Whitmania Pigra Whitman</i>	12.0g
杏 仁	<i>Armeniaca Amarum Semen</i>	6.0g
黃 芩	<i>Scutellariae Radix</i>	4.0g
半 夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	4.0g
桑白皮	<i>Mori Cortex</i>	4.0g
蘇 子	<i>Perillae Semen</i>	4.0g
款冬花	<i>Farfarae Flos</i>	4.0g
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0g
銀 杏	<i>Ginko Semen</i>	15.0g
總 量		57.0g

*水蛭은 滑石 70g을 볶을 수 있는 용기에 넣고 180-200℃ 정도의 열로 달군 다음 淨制와 切制의 과정을 거쳐 曬乾한 生水蛭 100g을 넣어 3-4분 정도 볶는다. 일정한 시간이 지나면 水蛭이 노랗게 색을 띠면서 부풀어오르는데 이때 滑石은 버리고 水蛭만을 취한 후 다시 麻黃을 넣어 갈색이 되도록 炒한 후 麻黃은 버리고 水蛭만 취하여 실험에 이용하였다.

mal group), 대조군(Control group), 定喘湯群(JCT group), 定喘湯加減方群(JCTG group)으로 설정하였다. 정상군(Normal group)은 고형사료와 물만을 충분히 공급하였고, 대조군은 정상군과 동일한 환경에서 알레르기 천식을 유발하였고, 定喘湯群과 定喘湯加減方群은 대조군과 동일한 방법으로 알레르기 천식을 유발한 후 각각 定喘湯 전탕액과 定喘湯加減方 전탕액을 투여하였다.

2) 알레르기 천식 유발

알레르기 천식 유발은 Bellofiore 등의 방법¹⁹⁾에 따라서 첫째 날 ovalbumin(OA) 1mg과 Al(OH)3 300mg의 0.9% saline 2ml에 녹여 피하 주사하고, 6×10⁸ B. pertussis를 포함한 0.9% saline 1ml를 복막내로 주입하여 immunization을 시켰다. 전신적인 immunization 후 14일째, 동물들은 2% (wt/vol) OA를 함유한 0.9% saline aerosol을 흡입시킴으로써 항원 감작에 의한 천식을 유발시켰다. Aerosol은 ultrasonic nebulizer (Samsung, 한국)에 의해 만들어졌고, 20분간 흡입시켰다.

3) 검액의 준비

定喘湯과 定喘湯加減方 각각 5첩 분량인 285.0g과 285.0g을 5,000cc의 둥근 플라스크에 3,000cc의 증류수와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착하고 3시간 동안 전탕하여 0.2µm filter로 여과한 여액을 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 -80℃ deep freezer(SANYO, Japan)에서 한 시간 방치한 후 freezer dryer(EYELA, Japan)로 24시

간 동안 동결건조하여 定喘湯 엑기스 47.0g과 定喘湯加減方 45.0g 을 얻어 이를 실험에 필요한 농도로 증류수에 녹여 조정하여 50ml cornical tube(Falcon, USA)에 넣어 2-4℃의 냉장고에 보관하였으며, 사용할 때 water bath에 넣어 gel상태를 완전히 녹여 사용하였다.

4) 검액 투여

알러지 천식을 유발한 다음 이틀째 되는 날부터 定喘湯 추출물은 62.0mg/200g의 비율로 定喘湯加減方 추출물은 60.0mg/200g 검액을 증류수로 희석하여 실험군의 흰쥐에 1일 1회 14일간 일정한 시각에 1ml 씩 경구 투여하였다. 대조군은 동량의 식염수를 경구 투여하였다.

5) 채혈

천식유발 24시간 후인 15일째 클로로포름으로 마취시킨 다음 심장천자하여 혈액을 EDTA가 들어 있는 병에 넣고 잘 섞어 응고를 방지한 뒤 사용하였다.

6) Broncho-alveolar lavage(BAL)과 BAL fluid (BALF) 내의 세포판찰

기관지의 염증반응을 조사하기 위해서 OA aerosol 흡입 다음날에 폐기관지세척을 시행하였다. 0.1% EDTA 2Na를 포함한 PBS(Phosphate buffered saline; Sodium chloride 8g, Pottassium chloride 0.2g,

Disodium hydrogen phosphate 1.15g, Pottassium dihydrogen phosphate 0.2g, Calcium chloride 0.0005g, Magnesium chloride 0.0005g) 4ml를 3번 주입하여 폐 기관지를 세척한 후에 BALF를 얻었다. 부피는 원래 부피의 대략 평균 80%로 전체 세포수는 hemocytometer를 사용해서 측정하였다. 임파구수는 BALF에 lymphoprep (1.077±0.0001 g/ml, Nycomed Pharma As, Oslo, Norway)를 첨가하여 25분 동안 550G에서 원심 분리(HERMLE, Germany)한 후 상층을 버리고, 중간에 하얗게 부유해 있는 lymphocyte를 분리한 다음 PBS에 부유시켜 220G에서 10분간 3회 원심 세척한 후, RPMI 1640 medium에 부유시키고, 광학 현미경 (Olympus, Japan)을 이용하여 Trypan blue exclusion으로 세포수를 측정하였다.

7) 폐기관지세척액(BALF) 내의 CD4⁺ T-cell과 CD8⁺ T-cell 측정

RPMI 1640에 부유시킨 각 임파구 세포를 media A (pH 7.2 PBS + 5 % normal serum of host species + 2 M sodium azide)에 2×10^7 cells/ml의 농도로 세포를 재 부유시키고, 시험관에 세포부유액 50 μ l씩 넣어서 시험관마다 1×10^6 개의 세포가 존재하게 하였다. 각 시험관에 FITC anti-rat CD4⁺ monoclonal antibody (Cedarlane, Ontario, Canada)와 PE anti-rat CD8⁺ monoclonal antibody (Cedarlane, Ontario, Canada)를 각각 0.5 μ g씩 가하고, vortex mixer로 잘 섞은 다음 이 혼합액을 빛이 차단되도록 알루미늄 호일로 씌우고 4 $^{\circ}$ C에서 30 분간 실험실에서 배양한 뒤, 4 $^{\circ}$ C에서 PBS로 2회 세척하고, 50 μ l의 ice cold media B (pH 7.2 PBS + 0.5 % bovine serum albumin + 2 M sodium azide)에서 cell pellet을 재 부유시킨 후 형광현미경을 이용하여 임파구에 대한 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포율을 측정하였다. 세포수는 산출된 lymphocyte에 CD4⁺, CD8⁺의 비율을 곱하여 계산하였다.

8) 말초 혈액내 CD4⁺ T-cell 比의 변화

심장채혈된 혈액을 EDTA tube에 담고, 12 × 75 시험관에 100 μ l를 넣었다. FITC anti-rat CD3 monoclonal antibody를 1 μ l 가하고, 다시 PE anti-rat CD4 monoclonal antibody를 5 μ g 가한 다음 vortex mixer로

잘 섞고 암소에서 30분간 방치한 후, lysing solution (FACS lysing solution, Becton dickinson, USA) 2ml를 가하여 잘 섞은 다음 다시 15분간 암소에 방치하였다. Lysis를 확인하고 원심분리기에서 1000rpm, 5분간 원심분리 한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 washing solution(PBS)을 가한 후 다시 1000rpm, 5분간 원심분리한 다음 상층액을 버리고 500 μ l의 PBS를 가하여 vortex mixer로 잘 섞은 후 flow cytometer(Becton dickinson, USA)로 분석하였다.

9) 말초 혈액내 CD8⁺ T-cell 比의 변화

심장채혈된 혈액을 EDTA tube에 담고, 12 × 75 시험관에 100 μ l을 넣었다. FITC anti-rat CD3 monoclonal antibody를 0.1 μ l 가하고, 다시 PE Anti-Rat CD8 Monoclonal Antibody를 0.5 μ g 가한 다음 vortex mixer로 잘 섞고 암소에서 30분간 방치한 후, lysing solution(FACS lysing solution, Becton dickinson, USA) 2ml를 가하여 잘 섞은 다음 다시 15분간 암소에 방치하였다. Lysis를 확인하고 원심분리기에서 1000rpm, 5분간 원심분리 한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 washing solution(PBS)을 가한 후 다시 1000rpm, 5분간 원심분리한 다음 상층액을 버리고 500 μ l의 PBS를 가하여 vortex mixer로 잘 섞은 후 flow cytometer(Becton dickinson, USA)로 분석하였다.

10) OA-specific IgE Ab Assay

Serum은 15일째에 심장천자를 통해 얻었다. Microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark)는 24시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 100 μ l/well of anti-rat IgE monoclonal Ab (Zymed, CA., USA, 5 μ g/ml in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.5)로 coating한 후에 0.05% Tween 20 (PBSTW)를 함유한 PBS로 4번 세척하였고, 그 다음 1% bovine serum albumin (BSA)를 포함한 PBSTW로 실온에서 1시간동안 2-fold serial dilution 100 μ l의 standard serum이나 적절하게 희석된 sample serum과 함께 배양하였다. PBSTW로 세척한 후에, PBSTW (with 1% BSA)에 100 μ l biotinylated OA(50 μ g/ml)를 녹여 각각의 well에 가해서 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 세척 후에 100 μ l horseradish peroxidase-streptavidin(0.5 μ l/ml in

PBSTW with 1% BSA, Zymed)은 각 well에 plate하였다. PBSTW로 마지막 세척을 한 후에, 0.035% H₂O₂를 포함한 100 μ l *o*-phenylenediamine solution (1.5mg/ml in citrate-phosphate buffer, pH 5.0, Zymed, CA., USA)을 각 well에 가하였다. 효소 반응은 50 μ l 4N H₂SO₄를 가함으로써 정지되고, 490nm에서 흡광도를 측정하였다. titer는 standard curve로 결정하였다. 1:100으로 희석된 Standard serum의 흡광도는 임의로 1 μ l/ml로 하였다.

3. 통계분석

모든 통계분석은 윈도우용 SPSS(ver. 8.0)를 이용하여 실시하였다. 기술통계학적 분석을 통해 각 집단에서의 측정값을 평균 \pm 표준편차로 요약하였으며, 각 집단간의 유의성은 ANOVA test with multiple comparisons (Duncan's method)으로 분석하였고. 유의수준은 0.05로 하였다.

성적

1. 폐기관지 세척액(BALF)내 총세포 수의 변화

폐기관지 세척액(BALF)내의 총세포 수를 측정 한 결과 정상군은 9.13 \pm 1.32($\times 10^6$ /ml), 대조군은 22.83 \pm 1.62($\times 10^6$ /ml), 定喘湯群은 16.30 \pm 1.26($\times 10^6$ /ml), 定喘湯加減方에서는 18.36 \pm 2.11($\times 10^6$ /ml)로 집단간 총세포수는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 (F=12.552, p=0.0001, ANOVA test), 다중 비교

(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 定喘湯群에서는 대조군에 비하여 有意한 감소효과를 나타내었으나 定喘湯加減方에서는 대조군에 비하여 有意한 차이가 나타나지 않았다 (Table 3).

2. 폐기관지 세척액(BALF)내 lymphocyte 수의 변화
폐기관지 세척액(BALF)내의 lymphocyte 수를 측정 한 결과 정상군은 5.33 \pm 1.03($\times 10^6$ /ml), 대조군은 15.81 \pm 1.22($\times 10^6$ /ml), 定喘湯群은 9.66 \pm 0.64($\times 10^6$ /ml), 定喘湯加減方에서는 12.18 \pm 1.16($\times 10^6$ /ml)개로 집단간 lymphocyte 수는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=18.092, p=0.0001, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 定喘湯群과 定喘湯加減方에서는 대조군에 비하여 有意한 감소효과를 나타내었다(Table 4).

3. 폐기관지 세척액내 CD4⁺ T-cell 수의 변화

폐기관지 세척액(BALF)내의 CD4⁺ T-cell 수를 측정 한 결과 정상군은 3.83 \pm 0.81($\times 10^6$ /ml), 대조군은 14.13 \pm 1.08($\times 10^6$ /ml), 定喘湯群은 9.97 \pm 0.77($\times 10^6$ /ml), 定喘湯加減方에서는 11.75 \pm 1.40($\times 10^6$ /ml)개로 집단간 CD4⁺ T-cell 수는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=17.692, p=0.0001, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 定喘湯群에서는 대조군에

Table 3. Effects of *Jungchun-tang* & *Jungchuntanggagambang* on the Total Cell in Broncho-alveolar Lavage Fluid of Ovalbumin Induced Asthmatic Rat

Group	No. of animal	Total cells in BALF($\times 10^6$ /ml)	Duncan Grouping
Normal	10	9.13 \pm 1.32 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	22.83 \pm 1.62	C
JCT	10	16.30 \pm 1.26	B
JCTG	10	18.36 \pm 2.11	BC

F-value: 12.552*

1) Mean \pm Std. Error

2) Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test
* calculated by ANOVA test

Control: Group sensitized with ovalbumin.

JCT: treated with *Jungchun-tang* (62.0mg/200g) for 14 days

JCTG: treated with *Jungchuntanggagambang* (60.0mg/200g) for 14 days

Table 4. Effects of *Jungchun-tang* & *Jungchuntanggagambang* on Lymphocytes in Broncho-alveolar Lavage Fluid of Ovalbumin Induced Asthmatic Rat

Group	No. of animal	lymphocytes in BALF($\times 10^3/ml$)	Duncan Grouping
Normal	10	5.33 \pm 1.03 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	15.81 \pm 1.22	C
JCT	10	9.66 \pm 0.64	B
JCTG	10	12.18 \pm 1.16	B

F-value: 18.092*

1) Mean \pm Std. Error
 2) Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test
 * calculated by ANOVA test
 Control: Group sensitized with ovalbumin.
 JCT: treated with *Jungchun-tang* (62.0mg/200g) for 14 days
 JCTG: treated with *Jungchuntanggagambang* (60.0mg/200g) for 14 days

Table 5. Effects of *Jungchun-tang* & *Jungchuntanggagambang* on CD4⁺ T-cell in Broncho-alveolar Lavage Fluid of Ovalbumin Induced Asthmatic Rat

Group	No. of animal	CD4 ⁺ T-cell in BALF($\times 10^3/ml$)	Duncan Grouping
Normal	10	3.83 \pm 0.81 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	14.13 \pm 1.08	C
JCT	10	9.97 \pm 0.77	B
JCTG	10	11.75 \pm 1.40	BC

F-value: 17.692*

1) Mean \pm Std. Error
 2) Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test
 * calculated by ANOVA test
 Control: Group sensitized with ovalbumin.
 JCT: treated with *Jungchun-tang* (62.0mg/200g) for 14 days
 JCTG: treated with *Jungchuntanggagambang* (60.0mg/200g) for 14 days

비하여 유의한 감소효과를 나타내었고 定喘湯加減方에서는 감소하는 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 5).

4. 폐기관지 세척액(BALF)내 CD8⁺ T-cell 수의 변화

폐기관지 세척액(BALF)내의 CD8⁺ T-cell 수를 측정한 결과 정상군은 8.86 \pm 0.86($\times 10^3/ml$), 대조군은 10.98 \pm 1.31($\times 10^3/ml$), 定喘湯群은 11.47 \pm 0.83($\times 10^3/ml$), 定喘湯加減方에서는 9.50 \pm 1.06($\times 10^3/ml$)개로 집단 간 CD8⁺ T-cell 수는 통계적으로 有意한 차이가 없었다(F=1.400, p=0.259, ANOVA test) (Table 6).

5. 폐기관지 세척액내 CD4⁺/CD8⁺ 비율의 변화

폐기관지 세척액(BALF)내 CD4⁺/CD8⁺의 비율을 계산한 결과 정상군은 5.04 \pm 1.30, 대조군은 9.31 \pm 1.23, 定喘湯群은 7.23 \pm 1.04, 定喘湯加減方에서는

9.26 \pm 1.53로 집단 간 CD4⁺/CD8⁺의 비율은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=2.468, p=0.048, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 대조군은 정상군에 비하여 유의한 증가를 보였고 定喘湯群과 定喘湯加減方에서는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 7).

6. 혈청내 IgE 量的 변화

혈청내 IgE 量을 측정한 결과 정상군은 1.13 \pm 0.16(U/ml), 대조군은 2.93 \pm 0.46 (U/ml), 定喘湯群은 1.83 \pm 0.28(U/ml), 定喘湯加減方에서는 1.95 \pm 0.26(U/ml)로 집단 간 혈청내 IgE 量은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=5.722, p=0.003, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단 간 차이의 유의성을 검정한 결과 定喘湯群과 定喘湯加減方 모두 대조군에 비하여 유의한 감소효과를 나

Table 6. Effects of *Jungchun-tang* & *Jungchuntanggagambang* on CD8⁺ T-cell in Broncho-alveolar Lavage Fluid of Ovalbumin Induced Asthmatic Rat

Group	No. of animal	CD8 ⁺ T-cell in BALF(×10 ⁷ /ml)	Duncan Grouping
Normal	10	8.86±0.86 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	10.98±1.31	A
JCT	10	11.47±0.83	A
JCTG	10	9.50±1.06	A

F-value: 1.400*

1) Mean±Std. Error

2) Means with the same letter are not significantly different at α=0.05 level by Duncan test

* calculated by ANOVA test

Control: Group sensitized with ovalbumin.

JCT: treated with *Jungchun-tang* (62.0mg/200g) for 14 days

JCTG: treated with *Jungchuntanggagambang* (60.0mg/200g) for 14 days

Table 7. Effects of *Jungchun-tang* & *Jungchuntanggagambang* on CD4⁺/CD8⁺ cell ratio in Broncho-alveolar Lavage Fluid of Ovalbumin Induced Asthmatic Rat

Group	No. of animal	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio in BALF	Duncan Grouping
Normal	10	5.04±1.30 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	9.32±1.23	B
JCT	10	7.23±1.04	AB
JCTG	10	9.26±1.53	B

F-value: 2.468*

1) Mean±Std. Error

2) Means with the same letter are not significantly different at α=0.05 level by Duncan test

* calculated by ANOVA test

Control: Group sensitized with ovalbumin.

JCT: treated with *Jungchun-tang* (62.0mg/200g) for 14 days

JCTG: treated with *Jungchuntanggagambang* (60.0mg/200g) for 14 days

Table 8. Effects of *Jungchun-tang* & *Jungchuntanggagambang* on IgE Level in Serum of Ovalbumin Induced Asthmatic Rat

Group	No. of animal	OA-specific IgE levels(U/ml)	Duncan Grouping
Normal	10	1.13±0.16 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	2.93±0.46	B
JCT	10	1.83±0.28	A
JCTG	10	1.95±0.26	A

F-value: 5.722*

1) Mean±Std. Error

2) Means with the same letter are not significantly different at α=0.05 level by Duncan test

* calculated by ANOVA test

Control: Group sensitized with ovalbumin.

JCT: treated with *Jungchun-tang* (62.0mg/200g) for 14 days

JCTG: treated with *Jungchuntanggagambang* (60.0mg/200g) for 14 days

타내었다(Table 8).

고찰

천식은 한의학의 哮喘에 해당하는 질환으로 갑작스레 반복 발작하는 喘促上氣, 喉中有水鷄聲의 증상을 특징으로 갖는 질병으로 반드시 喘이 겸하여 발

생하기 때문에 哮喘이라고도 한다²⁰⁾. 哮喘은 隋代 巢²¹⁾의 巢氏諸病源候論에서 “上氣鳴息” “呷嗽”라고 칭하였는데에서 그 유래를 찾아 볼 수 있으며, 그 病位를 肺의 장기적 機能失調로 보았다. 이후 唐代의 千金方과 宋代의 聖濟總錄등에서 咳와 喘에 대한 논의가 있었으며, 金元代의 朱¹¹⁾에 의해 하나의 독립된 질병으로 설정되어 哮와 喘이 나뉘게 되었다. 明清代에

여러 의가에 의해 증상에 따라 더욱 세분화되었으나 오늘날에는 哮, 喘의 구별 없이 하나의 증후군으로 인식되고 있다²¹⁾.

哮喘의 원인으로 巢²¹⁾는 痰氣相擊이라 하였고, 孫思邈은 大逆上氣라 하였으며, 朱登¹⁴⁾은 痰으로 인하여 발병한다고 하였다. 또한 張²²⁾은 夙根이라 하여 그內的素因이 痰濕한 사람이 過寒과 過勞시 나타난다고 보았다. 林²³⁾은 원인에 따라 冷哮, 熱哮, 鹹哮, 糖哮, 酒哮로 세분화하였다.

哮喘의 치료는 朱¹¹⁾의 補陰, 降心化, 降痰下氣의 처방과, 王肯堂은 證治準繩에서 外邪와 攝生에 대한 주의 그리고 張²²⁾의 허실판별에 의한 扶正氣, 攻邪氣의 처방을 기본으로 하였다.

定喘湯은 徐⁹⁾의 古今醫統大典에 처음으로 收錄된 處方으로 그 藥物構成은 麻黃, 杏仁, 黃芩, 半夏, 桑白皮, 蘇子, 款冬花, 甘草, 銀杏으로 이루어져 있으며, 效能은 宣肺平喘 清熱化痰 清降肺氣, 定喘化痰등으로 風寒外束 痰熱內蘊의 哮喘證의 治療에 使用되고 있다¹²⁾. 本方은 外感實證으로 因한 氣管支에 炎症이 招來하게 되는 同時에 痰聲 發熱 咳嗽 喘息 等症을 수반하는 경우에 使用하며, 處方構成 藥物 中 麻黃, 杏仁, 桑白皮, 黃芩은 肺熱을 除하고 外感을 發散시키며, 銀杏, 款冬花는 溫肺 收斂의 作用을 하며, 蘇子是 降氣시키고, 半夏는 祛痰 健胃作用을 하며, 甘草는 諸藥을 中和시킨다²⁴⁾.

水蛭은 환형동물에 속하며, 약성은 性平 微寒 有毒하며, 味는 鹹, 苦하여, 肝經으로 入한다¹⁶⁾. 效能은 逐惡血瘀血, 破血積聚, 經閉不妊, 利水道에 쓰이며¹⁶⁾, 妊婦나 血虛者, 經中이나 出血傾向이 있는 者는 禁한다¹⁶⁾. 水蛭이 응용된 처방으로는 低當湯(金匱要略), 地黃通經丸(婦人良方), 奪命散(濟生方), 接骨如神散(普濟方) 등에서 瘀血로 인한 月經不順이나 產後惡露, 打撲, 骨切疼痛 등에 쓰였다¹⁶⁾.

천식의 최근 연구경향 중 한약과 관련된 연구를 살펴보면, 단미에 대한 연구로는 五味子, 黃連, 甘草, 桔梗, 麥門冬, 水蛭 그리고 杏仁에 대한 보고가 있으며, 처방에 대한 연구로는 小青龍湯, 麥門冬清肺飲, 定喘化痰降氣湯, 麥門冬湯, 瀉白散, 解表二陳湯加減

方, 定喘湯과 清上補下湯의 효능에 대해 보고된 바 있다.

천식의 임상적 정의는 폐내 기도의 가변적 혹은 간헐적인 협착에 의해 호흡곤란, 기침 혹은 喘鳴의 증상이 반복적으로 발생하는 질병상태를 말하나 최근에는 기도 remodeling을 특징으로 하는 만성 염증성 질환으로 이해되고 있다²⁵⁾. 기도 재구성은 혈관의 수와 크기의 증가, 배상세포의 증생, 기도의 부종, 상피세포의 파괴, 그리고 상피세포 아래 기저막 콜라겐 층의 두꺼워 지는 등의 증상이 나타난다²⁶⁾.

기관지 천식 환자에서는 자극에 노출될 때 기관지 수축이 정상인 보다 예민하고 심하게 일어나는데, 이러한 현상을 기관지과민성 또는 기도과반응성이라 한다¹⁾.

과민반응은 제1형-제4형까지 있는데 이중 천식의 과민반응은 제1형에 속하며, 제1형 반응은 이미 생성된 항체에 감작된 조직세포와 원인항원간의 반응으로 여러 가지 항체 중 IgE에 의해 매개되는 반응이다. 항원에 노출되어 생성된 IgE 항체가 비만세포 표면에 결합하게 되고, 같은 항원에 재노출 하게 되면 비만세포 표면에서 부착된 IgE 항체와 항원이 결합하여 비만세포로부터 히스타민등 다양한 화학매체들이 분비되어 기도 수축이 일어나는 것으로 생각하여 왔다¹⁾.

그러나 천식환자에서 원인 항원으로 기관지 유발 시험을 하였을 때 후기 반응이 일어난다는 사실이 알려지면서, 제1형 과민반응 이외의 기전도 알레르기 염증반응의 발생에 중요하다고 생각하게 되었다¹⁾. 1970년대와 1980년대를 거치면서 기관지점막 생검이나 기관지 섬유경을 통해 기관지 천식환자에게서 호산구와 림프구의 침윤 및 기도내 염증 반응이 있음이 관측되어지면서부터 천식의 특징적 소견으로 비특이적 기도과민성 만성기도염증 및 상피탈락성 기관지 만성호산구 염증을 포함시키고 있다¹⁾. 1990년대에 기관지 내시경으로 가벼운 천식에서 기관지 생검시 기도염증이 있음을 알게 되어 천식의 가역성 기류 폐쇄와 기도 과민성이라는 기능성 변화가 호산구성 기도염증에 동반하여 나타나는 것으로 재인식

되어 현재 천식은 기존의 가역적인 기도 폐색과 기관지 과민성 이외에 만성 호산구성 기도 염증 질환으로 인식되고 있다²⁾.

최근에는 천식이 allergy에 대한 면역반응으로 이해되어 지면서 Th1과 Th2 세포들의 기능에 관심이 집중되고 있다. 1986년 Mosmann 등²⁷⁾은 쥐의 T-림프구에서 IL-2와 IL-12 IFN- γ 를 생성하는 Th1 세포와 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등을 생성하는 Th2 세포를 보고하였다. Th1 세포는 지연성 과민반응이나 결핵균 또는 바이러스에 대한 방어작용, 종양에 대한 숙주반응에 관계하며, Th2 세포는 IgE 항체의 생성을 증가시키며, 즉시형 과민반응 즉 기관지 천식과 같은 allergy성 질환이나 기생충 감염에 대한 방어 작용에 관여한다. 이중 알레르기 염증반응에 주로 관여하는 세포는 Th2세포로, Th2 세포로의 반응이 주도적으로 유도되는 경우는 IL-4가 증가된 상황이나 아주 고농도나 저농도의 항원을 투여했을 때이다. 또는 저농도의 항원을 항원제시세포로 B-림프구를 이용한 경우 Th2 반응이 특히 잘 유도되며, 반면에 적당량의 항원을 단핵구와 같이 반응시키면 Th1 반응이 잘 유도된다.

Th2 세포는 β -chemokine들을 생성하여 호산구류 기도 내로 유도하며, IL-5, IL-3 및 GM-CSF를 분비하여 호산구의 분화, 성숙, 활성화 및 생존을 증가에 관계한다. 기도에 침윤된 호산구에서는 myelin basic protein(MBP), eosinophil cationic protein(ECP), eosinophil-derived neurotoxin 등이 분비되어 기도 손상을 유발시킨다²⁸⁾. IL-4는 IgE 합성을 촉진하고 비만세포를 자극하여 단핵구의 주요 조직 적합복합체(major histocompatibility complex, 이하 MHC라함) 클래스 II 항원을 증가시키는 등 T-cell이 CD4⁺ Th2의 형질을 띠는데 중요한 역할을 한다.

따라서 본 연구에서는 定喘湯 및 定喘湯加減方을 이용하여 감작된 흰쥐에 ovalbumin을 흡입시켜 allergy 천식 병태를 유발시키고 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF 내의 total cell, lymphocyte, CD4⁺ T cell 및 CD8⁺ T cell의 수, CD4⁺/CD8⁺의 비율의 변화를 측정하고, 혈청 IgE량의 변화 등을 살펴 定喘湯 및 定喘湯加減方이 알레르기 천식에 미치는 영향에 대해

확인하고자 한다.

BALF 내의 total cell 수와 lymphocyte 수는 기관지 내 염증의 정도를 살펴본 것이다. Total cell 수는 정상군은 $9.13 \pm 1.32 (\times 10^5/ml)$, 대조군은 $22.83 \pm 1.62 (\times 10^5/ml)$ 로 나타나 ovalbumin으로 감작시킨 대조군에서 현저한 증가를 보였으며, 定喘湯群은 $16.30 \pm 1.26 (\times 10^5/ml)$, 定喘湯加減方群은 $18.36 \pm 2.11 (\times 10^5/ml)$ 으로 定喘湯群에서는 대조군에 비하여 유의한 감소효과를 나타내었으나, 定喘湯加減方群에서는 대조군에 비하여 감소효과를 보였으나 유의한 차이가 나타나지 않았다(Table 3). 이 결과들로부터 천식의 기전에 있어서 定喘湯과 定喘湯加減方이 염증세포를 억제함으로써 천식의 증상을 완화할 수 있는 것으로 추정된다.

또한 lymphocyte 수는 정상군은 $5.33 \pm 1.03 (\times 10^4/ml)$, 대조군 $15.81 \pm 1.22 (\times 10^4/ml)$ 로 나타나 ovalbumin으로 감작시킨 대조군에서 현저한 증가를 보였으며, 定喘湯群은 $9.66 \pm 0.66 (\times 10^4/ml)$, 定喘湯加減方群은 $12.18 \pm 1.16 (\times 10^4/ml)$ 으로 대조군에 비해 유의한 감소효과를 보였다(Table 4). 알레르기성 염증 반응에서 T-림프구는 알레르기성 염증 반응의 양상을 결정하는 조정자의 역할을 담당하며 주로 T-림프구에서 생성되는 cytokine을 통해 이루어진다²⁹⁾. 그리고 활성화된 호산구에서는 여러 가지 화학매체를 분비하여 알레르기 후기 반응시 평활근을 수축시키고 혈관투과성을 증가시켜 피하조직 부종 등의 염증반응을 유발시켜 기관지의 손상을 유도한다³⁰⁾. 이로 볼 때 定喘湯群과 定喘湯加減方群이 lymphocyte의 수를 효과적으로 감소시키므로 인해서 염증반응으로 인한 기관지 손상을 막을 수 있는 것으로 사려된다.

CD4⁺ T cell수는 정상군은 $3.83 \pm 0.81 (\times 10^4/ml)$, 대조군은 $14.13 \pm 1.08 (\times 10^4/ml)$ 로 나타나 ovalbumin으로 감작시킨 대조군에서 현저한 증가를 보였으며 定喘湯群은 $9.97 \pm 0.77 (\times 10^4/ml)$, 定喘湯加減方群은 $11.75 \pm 1.40 (\times 10^4/ml)$ 으로 定喘湯群에서는 대조군에 비하여 유의한 감소효과를 나타내었으나, 定喘湯加減方群에서는 감소하는 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 5). 최근 면역조절 방법은

천식을 치료하는 중요한 기전으로 면역반응 경향을 Th2로부터 Th1으로 전환 시키는 방법이 사용된다. 이는 정상인의 경우에는 같은 항원에 대해서 IFN- γ 를 분비하는 Th1 세포기능을 가지며, IFN- γ 가 vitro 안에서 IgE 항체 생성과 Th2 세포로의 분화를 억제하는 작용이 있고 알레르기 질환에서 IFN- γ 의 생성 저하가 있었으며³⁰ IFN- γ 흡입이 마우스에서 알레르기 감작을 억제한다는 연구보고에 근거를 두고 있다. 그러나 IFN- γ 가 호산구를 활성화하고 기도염증반응을 악화시키는 작용³¹이 있다는 결과들도 보고되고 있어 천식의 발생에 있어서 Th1/Th2의 역할에 대한 재평가가 필요하며, 현재 천식의 발생에 있어서 T림프구 특히 Th2 type의 cytokine을 분비하는 CD4⁺ T cell이 결정적 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다. 따라서 천식의 치료에 있어서 CD4⁺ T cell에 대한 조절이 중요하다³². 그래서 본 실험에서는 CD4⁺ T cell의 상태만을 살폈으며, 그 결과 定喘湯群에 있어서는 유의한 감소효과가 관찰되는 바 CD4⁺ T cell을 선택적으로 억제하여 천식에 대한 치료효과가 나타나는 것으로 사려된다.

CD8⁺ T cell 수는 정상군은 $8.86 \pm 0.86 (\times 10^3/ml)$, 대조군은 $10.98 \pm 1.31 (\times 10^3/ml)$, 定喘湯群은 $11.47 \pm 0.83 (\times 10^3/ml)$, 定喘湯加減方群에서는 $9.05 \pm 1.06 (\times 10^3/ml)$ 로, 집단 간 BALF 내의 CD8⁺ T cell 수는 통계적으로 유의한 차이가 인정되지 않았다(Table 6). 바이러스 감염이 천식의 발생과 증상 유발에 어떤 역할을 할 것이라는 것은 비교적 오래 전부터 추측되어 왔다. 그런데 최근에 바이러스 감염을 확인 할 수 있는 Polymerase chain reaction(PCR), conventional diagnostic methods 등의 면역학적 기법이 발달하면서 천식의 발생과 방어쇠인자로서의 역할이 확인되고 있다³³. 그 기전을 살펴보면 바이러스 감염 시 항원 제시 세포 내에서 바이러스 펩타이드 항원으로 분해된 뒤 MHC class I molecule과 함께 CD8⁺ T-림프구로 전달되며, CD8⁺ T-림프구도 CD4⁺ Th 세포와 마찬가지로 IL-2, IFN- γ 등을 분비하는 Tc1 세포와 IL-4, IL-5 등을 분비하는 Tc2 세포로 분류된다는^{33,34} 사실에 비추어 볼 때 천식의 악화과정에 CD8 세포 역할에

대해 최근 관심이 증대하고 있다.

Till 등은 천식 환자의 BALF내 세포에서 CD8⁺ T-림프구에서 IL-5가 생성되는 것을 보고하였으며, Ying 등은 천식 환자의 기도에서 CD8⁺ 세포가 IL-4와 IL-5를 동시에 생성하는 것을 보고하였다³⁵. 이상에서 CD8⁺ T-림프구도 천식의 알레르기성 염증 반응에 관계하리라고 생각된다.

CD4⁺/CD8⁺의 비율을 계산한 결과 정상군은 5.04 ± 1.30 , 대조군은 9.31 ± 1.23 으로 대조군에서 현저한 증가를 보인 반면 定喘湯群은 7.23 ± 1.04 , 定喘湯加減方群은 9.6 ± 1.53 로, 대조군은 정상군에 비하여 유의한 증가를 보였고 定喘湯群과 定喘湯加減方群에서는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 7).

혈청내 IgE 量的 변화에서는 정상군(Normal group)은 $1.13 \pm 0.16(U/ml)$, 대조군은 $2.93 \pm 0.46(U/ml)$, 定喘湯群은 $1.83 \pm 0.28(U/ml)$, 定喘湯加減方群에서는 $1.95 \pm 0.26(U/ml)$ 로, 定喘湯群과 定喘湯加減方群 모두 대조군에 비하여 유의한 감소효과를 나타내었다(Table 8).

定喘湯과 定喘湯加減方的 투여에 의한 total cell 수와 lymphocyte 수의 감소를 통해 ovalbumin으로 감작된 기관지내 염증 억제효과가 있음을 알 수 있으며 CD4⁺ T cell과 CD4⁺/CD8⁺의 비율의 감소와 혈청내 IgE의 감소를 통해 CD4⁺ T cell의 선택적인 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 이는 定喘湯과 定喘湯加減方이 CD4⁺ T cell을 선택적으로 억제하여 기도의 염증과 과민반응을 억제함으로써 천식에 대한 치료효과를 나타내는 것으로 사려된다.

아울러 定喘湯加減方的 유의성 있는 결과로부터 麻黃에 민감하게 반응하는 환자에게 麻黃대신 水蛭(癩黃炒)을 투여할 수 있는 임상적 의의를 생각해 볼 수 있으나, 이에 대한 지속적인 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사려된다.

결론

定喘湯과 定喘湯加減方이 알레르기 천식 모델 흰

쥐의 BALF내 total cell, lymphocyte, CD4⁺T cell 및 CD8⁺T cell의 수, CD4⁺/CD8⁺의 비율의 변화, 혈청내의 IgE변화 등을 관찰하여 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BALF내의 총세포수에서는 대조군에 비하여 定喘湯群은 유의한 감소효과를 나타내었으나, 定喘湯加減方群에서는 감소하는 경향이 나타났으나 유의성은 없었다.
2. BALF내의 lymphocyte 수에서는 대조군에 비하여 定喘湯群과 定喘湯加減方群 모두 유의한 감소효과를 나타내었다.
3. BALF내의 CD4⁺ T-cell 수에서는 대조군에 비하여 定喘湯群은 유의한 감소효과가 나타났으나, 定喘湯加減方群에서는 감소하는 경향은 나타났으나 유의성은 없었다.
4. BALF내의 CD8⁺ T-cell 수에서는 대조군에 비하여 定喘湯群과 定喘湯加減方群 모두 유의성이 없었다.
5. BALF내의 CD4⁺/CD8⁺의 비율에서는 대조군에 비하여 定喘湯群과 定喘湯加減方群 모두 유의성이 없었다.
6. BALF내의 IgE 변화는 대조군에 비하여 定喘湯群과 定喘湯加減方群에서 모두 유의한 감소효과를 나타내었다.

참고문헌

1. 대한천식 및 알레르기학회. 천식과 알레르기 질환. 서울:군자출판사. 2002:13,28,29,33,87,244-250, 259.
2. Nathan Rabinovitch, Erwin W. Gelfand. New approaches to the treatment of childhood asthma. Pulmonology10. 1998:243-249.
3. 전국한의과대학 폐계내과학교실. 東醫肺系內科學. 서울:한문회사. 2002:178-199.
4. 金完熙, 崔達永. 臟腑辨證論治. 서울:成補社. 1985:257-259.
5. 上海中醫學院. 中醫內科學. 上海:商務印書館香港分館. 1983:17-23.
6. 이준우, 정희재, 정승기, 이형구. 小青龍湯이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포에 미치는 영향.

慶熙醫學. 2001;17(2):242-253.

7. 김진주, 정희재, 정승기, 이형구. 麥門冬湯과 定喘化痰降氣湯이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌. 2002;23(1):37-49.
8. 정해준, 정희재, 정승기, 이형구. 麥門冬清肺飲과 麥門冬이 BEAS-2B 人間 氣管支上皮細胞의 IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌. 2002;23(1):11-23.
9. 한동하, 정희재, 정승기, 이형구. 喘四君子湯 과 水蛭(麻黃炒)가 BEAS-2B 人間 氣管支上皮細胞의 IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. 大韓韓醫方內科學會誌. 2001;22(4):604-612.
10. 徐春甫. 古今醫統大全(上冊). 北京:人民衛生出版社. 1991:1312-1313.
11. 朱震亨. 丹溪心法附餘. 서울:大星文化社. 1993:328-333.
12. 上海中醫學院. 方劑學. 香港:商務印書館. 1977:196-197.
13. 정승기. 定喘湯이 천식에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 大韓韓醫學會誌. 1991;2(1):118-38.
14. 왕중권, 정희재, 정승기, 이형구. The Effects of *Jung-chun-tang*(定喘湯) on Respiratory Patterns and Tracheal Tissues in Allergic Asthma. The 10th ICOM 자료집. 1999:102.
15. 김영우, 정희재, 이형구, 정승기. 定喘湯과 清上補下湯이 asthma model內的 cytokine에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;22(3):367-377.
16. 國家中醫藥管理局(中華本草)編委會. 中華本草. 上海:上海科學技術出版社. 1998:2352-57.
17. P.M Obyrne. Airway inflammation and astma. Alimnt Pharmacol Ther.1996;(Suppl.2):18-24.
18. 慶熙醫療院 漢方病院. 慶熙漢方處方集. 서울:트윈기획. 1997:181,198.
19. Bellofiore S, Di Maria GU, Martin JG. Changes in upper and lower airway resistance after inhalation of antigen in sensitized rats. The American Review of Respiratory Disease. 1987;136(2):363-368.
20. 揚思樹, 張樹生, 傅景華, 李長勳. 東醫臨床內科學Ⅱ. 서울:法人出版社. 1999:683-699.
21. 巢元方. 諸病源候論校注. 北京:人民衛生出版社. 1991:389-397,424-438.
22. 張介賓. (國譯)景岳全書. 서울:一中社. 1992:354-364. 1992

23. 林佩琴. 類證治裁. 서울:成輔社. 1980:110.
24. 李龍城. 經藥分類典. 서울:壽文社. 1979:11,29,41, 47,54.
25. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(5):1720-45.
26. Karen O mckay, James C hogg. The contribution of airway structure to early childhood asthma. *MJA* 2002;177(6 Suppl):s45-s47.
27. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Gieldin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clones. *J Immunol.* 1986;136:2348-57.
28. Kay AB, Frew AJ, Corrigan CJ, Robinson DS. The T-cell hypothesis of chronic asthma. In kay AB ed. *Allergy and allergic diseases.* Blackwell Science. 1997:45-48
29. 전남대학교의과대학면역및알레르기학편찬위원회. 면역 및 알레르기학. 광주:전남대학교출판부. 1999:161-162.
30. Maggi E, Parronchi P, Manetti R. Reciprocal regulatory effects of IFN γ and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol.* 1992;148: 2142-7.
31. Wegner CD, Gundel RH, Reilly P, Haynes N, Letts LG, R Rothlein. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science.* 1990; 247:456.
32. Maggi E. The TH1/TH2 paradigm in allergy. *Immunotechnology.* 1998;3(4):233-44.
33. Stanciu L., J. Shute, S.T. Holgate, and R. Djukanovic. Production of IL-8 and IL-4 by positively and negatively selected CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ human T cells following a four-step cell separation including magnetic cell sorting(MACS). *J Immunol Methods.* 1996;189: 107-14.
34. Croft M, L. Carter, S.L. Swain, and R.W. Dutton. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin(IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J. Exp. Med.* 1994;180:1715.
35. Till S, Li B, Durham S. Secretion of eosinophil-active cytokines interleukin-5, granulocyte/macrophage colony stimulating factor and interleukin-3 by bronchoalveolar lavage CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cell lines in atopic asthmatics, and atopic and non-atopic controls. *Eur J Immunol.* 1995;25:2727-31.