대한한방내과학회지 제27권 1호(2006년 3월)
Korean J.Orient.Int. Med. 2006:27(1):40-54

加味淸上補下湯의 물과 에탄올 추출법에 따른 抗알레르기 效果에 對한 硏究

허태석, 고은정*, 정희재, 이형구, 배현수*, 정승기

경희대학교 한의과대학 폐계내과학 교실, 경희대학교 한의과대학 생리학교실*

Studying of the Effects of Gamichungsangboha-tang water-extract and ethanol-extract on IFN-γ, IL-4, T-bet, GATA-3, c-maf in Asthma Model

Tae-seok Heo, Eun-jung Ko*, Hee-jae Jung, Hyung-koo Rhee, Hyun-su Bae*, Sung-ki Jung

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

Objective : This study aimed to identify the different effects of GMCSBHT water-extract and ethanol-extract on Th1/Th2 differentiation by monitoring Th1/Th2 specific cytokine secretion patterns and the transcriptional activities of T-bet, GATA-3, c-maf, INF-γ and IL-4.

Materials and Methods : Spleen cells from eight week-old BALB/c mice were cultured in GMCSBHT extracts containing medium without activation for 24 hours and with activation for 48 hours. CD4+ T cells were isolated and mRNA expression levels of INF-γ, IL-4, T-bet, GATA-3, c-maf by RT-PCR and secretion cytokines levels of INF-γ, IL-4 by ELISA were analyzed.

Results : GMCSBHT extracts didn't have mitogenic effects on the unstimulated CD4+ T cells. In Th1 skewed condition, GMCSBAHT water extract had no significant effects on mRNA expression levels of INF-γ, T-bet and c-maf, but inhibited mRNA expression levels of IL-4, GATA-3. It showed significantly increased secretion cytokine levels of INF-γ, but had no significant effect on secretion cytokine levels of IL-4. In Th2 skewed condition, GMCSBHT ethanol extract inhibited mRNA expression levels of INF-γ, IL-4, GATA-3 and c-maf significantly, but had no significant effects on mRNA expression levels of T-bet. It had no significant effects on secretion cytokine levels of INF-γ, but showed remarkable inhibitory effects on secretion cytokine levels of IL-4.

Conclusion : Results suggest that on Th1/Th2 deviation, GMCSBHT water extract has both amplifying effects on Th1 differentiation and inhibitory effects on Th2, but GMCSBHT ethanol extract has stronger inhibitory effects on Th2 differentiation than on Th1.

Key Words: Gamichoungsangboha-tang(Jiaweiqingshangbuxia-tang), asthma. water-extract/ethanol-extract, INF-γ, IL-4, T-bet, GATA-3, c-maf

Ⅰ. 緖 論

기관지천식은 야간이나 이른 아침에 심해지는 반복적인 천명, 호흡곤란, 흉민, 기침을 일으키는 기도과민성의 증가를 야기시키고 자발적이거나 치료로 인한 가역적인 기도폐색[1]을 특징으로 하며 allergen, mast cell 및 IgE가 관여하여 분비되는 화학매체의 직접적인 약리작용에 의하거나 화학매체와 cytokine, 유착분자가 관여하여 기관지로 모여온 염증세포에 의해서 발병하는 기도의 만성 알레르기 염증성질환

· 접수 : 2006. 2. 15. · 채택 : 2006. 2. 24.
· 교신저자 : 정승기, 서울시 동대문구 회기동 1
경희의료원 한방5내과 의사실
(Tel. 02-958-9147, Fax. 02-958-9148
E-mail : jskes@unitel.co.kr)

으로 이해되고 있다[2]. 특히 T helper cell(이하 Th cell)은 cytokine을 분비하여 기도의 염증반응을 조절하는 중요한 역할을 하게 된다[3].

Th cell에 의하여 생산된 cytokine은 여러 전사인자(transcriptional factor)와 함께 naive T helper cell을 Th1 cell과 Th2 cell의 아형으로 분화시킬 수 있다. Th1 cytokine인 Interferon-γ(INF-γ)는 Th1 cell로의 분화를 촉진시키며 Th2 cytokine인 Interleukin-4(IL-4)는 Th2 cell로의 분화를 촉진시킨다. 전사인자인 T-box expressed in T-cell(T-bet)은 Th1 cell로의 분화를 촉진시키며 GATA-binding protein 3(GATA-3)와 c-maf는 Th2 cell로의 분화를 촉진시킨다[4-6]. Th1/Th2 균형에서 Th2 cell로의 과도한 활성화는 기관지 천식 등의 알레르기 질환을 발생시킨다[7].

加味淸上補下湯[8]은 기관지천식 및 여러 호흡기 질환에 응용되고 있는 처방으로 분자생물학적 실험연구로 金 등[9]은 淸上補下湯이 IL-4, IL-5 및 IL-6의 전사를 억제하는 효능이 있음을 보고하였으며 Roh 등[10]은 淸上補下湯 투여가 만성천식이 유발된 생쥐의 기도 염증 및 재생의 진행을 효과적으로 지연시킬 수 있음을 보고하였다. 임상연구로는 崔 등[8]이 加味淸上補下湯이 천식환자의 폐기능 및 삶의 질을 호전시켰으나 IL-4의 유의한 상승을 보고하여 Th2 가설에 의문을 제기하였으며, 鄭 등[11]은 加味淸上補下湯의 투여 용량을 줄인 액기스제제(AF-365)가 완해기 천식환자의 지속적인 관리에 유용함을 보고하였다.

전통적으로 한의학에서는 천연물인 한약재를 복용하는 방법에 있어서 湯劑, 散劑, 丸劑, 膏劑, 丹劑, 酒劑 등의 제형방법이 사용되고 있다[12]. 현재 有效性, 安定性, 품질의 均一性 및 유효기간의 설정 등 의약품으로서 갖추어야 할 기본적 요소를 확보하기 위하여 물 추출물을 사용하고 있으나[13] 보다 효능이 향상된 제품개발이 필요할 것으로 생각된다.

이에 저자는 BALB/c 웅성 마우스의 비장세포를 이용하여 천식치료에 있어 임상적 효과가 인정되는 加味淸上補下湯을 추출방법에 따른 효능을 연구하기 위하여 물과 에탄올을 이용하여 추출하고 각각에 대하여 Th1/Th2 cell의 분화과정에 중요한 영향을 미치는 cytokine인 IFN-γ, IL-4와 전사인자인 T-bet, GATA-3, c-maf의 mRNA 발현량을 RT-PCR(Real-time polymerase chain reaction)로 관찰하였고, IFN-γ와 IL-4의 분비량을 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 측정하여 비교분석함으로써 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 動物 및 材料

1) 動物

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 8주된 BALB/c 雌性 마우스이며 멸균 상태로 관리되어 온 것을 샘타코 코리아(주)에서 구입하였다. 사료는 방사선 멸균처리한 실험동물용 사료를 퓨리나(주)에서 구입하여 공급하였으며 음용수는 멸균 처리한 증류수를 사용하였다. 사료와 음용수는 충분히 공급하여 자유롭게 섭취시켰다.

2) 試料의 製造

본 실험에 사용된 加味淸上補下湯의 약재는 한국생약협회(한국)로부터 구입하여 엄선하고 3차 증류수로 세척하여 사용하였다. 加味淸上補下湯 처방의 구성은 Table 1에 표기된 것과 같고 5첩 분량인 총 335g을 분말한 후 sonicator(Branson, USA)를 이용하여 70% 에탄올로 추출하고 상층액은 수집한 후 침전물을 다시 80%, 90%, 100% 에탄올에서 같은 방법으로 추출하였다. 전체 상층액을 모아 60℃에서 감압농축 후 동결 건조하여 81.54g(yield:21.4%)의 에탄올 추출 분말 시료를 얻었다. 물 추출물은 5첩 분량인 총 335g을 3차 증류수를 넣고 3시간 동안 끓인 후 상층액을 모아 60℃에서 감압농축 후 동결 건조하여 51.08g(yield:15.5%)의 물 추출분말 시료를 얻었다. 加味淸上補下湯 추출물은 실험에 사용하기 전에 3차 증류수에 녹여 0.22㎛ syringe filter로 여과하여 사용하였다.

Table 1. Contents of GMCSBHT (*Gamichungsangboha-tang*)

藥名	生藥名	用量(g)
熟地黃	Rehmannia Radix Vaporata	8.0
山 藥	Disocoreae Radix	6.0
山茱萸	Corni Fructus	6.0
白茯苓	Hoelen	4.0
牧丹皮	Moutan Cortex Radicis	4.0
澤 瀉	Alismatic Radix	4.0
五味子	Maximowiczziae Fructus	3.0
天門冬	Asparagi Radix	3.0
麥門冬	Liripis Tuber	3.0
貝 母	Fritillarriae Rhizoma	3.0
瓜蔞仁	Trichosanthis Semen	3.0
杏 仁	Ansu Seman	3.0
半夏(薑製)	Pinelliae Rhizoma	3.0
枳 實	Aurantii Immaturus Fructus	3.0
桔 梗	Platycodi Radix	3.0
黃 芩	Scutellariae Radix	3.0
黃 連	Coptidis Rhizoma	3.0
甘 草	Glycyrrhizae Radix	2.0
Total amount		67.0g

3) Antibody와 medium

본 실험에서는 anti-CD3e(clone:145-2C11), anti-CD28(clone:37.51), recombinant mouse IL-4, recombinant mouse IL-12, anti-mouse IL-4, anti-mouse IL-12(BD Bioscience, USA), magnetic cell sorting CD4(L3T4) microbeads(Miltenyi Biotec, Germany), mouse IFN-γ, IL-4 ELISA set 등이 사용되었다.

본 실험에서 세포배양을 위하여 사용된 media는 10% fetal bovine serum(FBS, JRH BIOSCIENCES, USA), 1% penicillin/streptomycin(BD Bioscience, USA) 10mM HEPES(JRH BIOSCIENCES, USA), 2g sodium bicarbonate(JRH BIOSCIENCES, USA)가 포함된 RPMI-1640(BD Bioscience, USA)을 사용하였다.

2. 方法

1) 비장 림프구 준비

적출한 BALB/c 마우스의 비장을 멸균된 주사기로 파쇄한 후 cell strainer(BD Biosciences, USA)로 걸러내었다. 균질화된 비장세포에 적혈구 제거를 위하여 5㎖ Pharm Lyse(BD Bioscience, USA)를 넣고 5분간 반응시킨 다음 cell이 부유되어 있는 tube에 5㎖의 media를 첨가한 후 1,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 남은 cell pellet은 1㎖의 media로 suspension 한 후 trypan blue로 staining하여 세포수를 측정하였다.

2) CD4+ T cell 분리

비장 림프구 1×10^7cells/90㎕ 농도당 10㎕의 magnetic cell sorting CD4(L3T4) microbeads(Miltenyi Biotec, USA)를 첨가하여 15분간 4℃에서 반응하였다. 1,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 5㎖의 media로 washing하였다. 남은 cell pellet에 1×10^8cell/500㎕의 농도가 되도록 media를 넣고 resuspension하였다. Ls separation column(Miltenyi Biotec, USA)을 varioMACS separator(Miltenyi Biotec, USA)에 장치한 후 3㎖의 buffer(phosphate buffered saline(PBS) with 2mM EDTA and 0.5% bovine serum albumin(BSA))로 column을 통과시키고 세포부유액을 column안으로 주입하였다. 세포부유액이 column을 통하여 빠져나가면 다시 2㎖의 buffer로 column을 3번 헹구었다. Column을 separator에서 분리해 낸 후 5㎖의 buffer를 넣고 plunger를 눌러서 CD4+ T cell을 elution하였다.

3) 생존률 및 증식능 측정

Mitogen으로 자극 받지 않은 비장 임파구의 생존율을 측정하기 위해 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega, USA)의 protocol를 이용하되 2)의 방법을 이용하여 CD4+ T cell을 분리 한 후 4×10^5 cells/㎖의 농도로 100㎕씩 flat bottomed 96-well plate에 seeding하였다. CD4+ T cell이 seeding 된 plate에 加味淸上補下湯 물과 알코올 추출물을 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100㎍/㎖ 농도로 첨가하고 2㎍/㎖ anti-CD3e(clone:145-2C11, BD

Bioscience, USA)가 coating된 plate에서 2㎍/㎖ anti-CD28(clone:37.51, BD Bioscience, USA)로 costimulation하였다. 이상의 혼합물을 48시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator(Nuaire, USA)에서 배양하였다.

4) CD4+ T cell을 Th1/Th2 cell로 분화

2㎍/㎖ anti-CD3e가 coating된 12-well plates에 CD4+ T cell을 1×106cells/㎖로 seeding 한 후 2㎍/㎖ anti-CD28로 costimulation하고, 물과 에탄올로 추출한 加味淸上補下湯 0, 1, 10㎍/㎖의 농도에서 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. Th1 cell plate는 50U rIL-2(Sigma, USA)와 10ng/㎖ rIL-12, 10㎍/㎖ anti-IL-4(BD Biosciences, USA)를 투여하고, Th2 cell plate에는 50U rIL-2와 10ng/㎖ rIL-4, 10㎍/㎖ anti-IL-12(BD Biosciences, USA)를 첨가하여 각각 배양하고 4일 후에 cell을 PBS로 washing한 후 2㎍/㎖ anti-CD3e와 2㎍/㎖ anti-CD28로 restimulation한 후 24시간 동안 배양하였다.

5) Real-time PCR을 이용한 cytokine 및 전사인자 발현 측정

(1) Total RNA isolation

CD4+ T cell을 분리하여 Th1/Th2 cell로 분화한 pellet을 PBS로 washing하고 trizol solution(Invitrogen Life Technologies, USA)에 제조사의 protocol에 준하여 total RNA를 분리하였다. Cell pellet은 pellet pestle을 이용하여 균질화하였다. 균질화된 용액에 500㎕의 trizol solution을 첨가하고 가볍게 vortex한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 이 용액에 다시 100㎕의 chloroform을 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 3분간 반응시킨 다음 4℃에서 12,000×g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮기고 여기에 250㎕의 isopropanol을 첨가하여 10분간 실온에서 반응시켰다가 다시 4℃에서 12,000×g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 pellet을 500㎕의 75% ethanol로 세척한 후 4℃에서 7.500×g로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 pellet을 건조하여 50㎕의 DEPC (diethylpyrocabonate)로 처리한 증류수에 RNA를 녹인 다음 spectrophotometer (DU530, Beckman Instruments Inc, USA)를 이용하여 정량하였다.

(2) cDNA의 합성

cDNA의 합성(reverse transcription)은 M-MLV Reverse Transcriptase(Invitrogen Life Technologies, USA)을 이용하였다.

2.5㎍의 total RNA에 1.1㎕의 10×DNase I Reaction buffer, 1㎕의 1U/㎕ DNase I(Invitrogen Life Technologies, USA)를 첨가한 후 DEPC 처리 증류수를 넣어 반응액이 11㎕이 되게 한 후 실온에서 15분간 배양하여 오염되었을지 모를 DNA를 제거하였다. 반응 후 1㎕의 반응액을 따로 분리하여 두고 후에 DNA가 남아있는지 확인하기 위하여 PCR 반응을 하였다. 10㎕의 반응액에 1㎕의 0.5㎍/㎕ Oligo(dT)12-18 primer(Invitrogen Life Technologies, USA)를 첨가한 후 70℃에서 15분 동안 반응시킨 후 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 반응액에 4㎕의 5× first strand buffer, 1㎕의 10mM each dNTPs, 2㎕의 0.1M Dithiothreitol, 1㎕의 200U/㎕ M-MLV Reverse Transcriptase, 0.5㎕의 40U/㎕ RNase inhibitor(Invitrogen Life Technologies, USA), 5.5㎕ DEPC 처리 증류수를 첨가하여 최종 부피를 20㎕로 만들고 37℃에서 60분간 배양하여 single strand cDNA를 합성하였다. 반응이 끝난 반응액은 72℃에서 15분간 배양하여 enzyme을 불활성화 하였다.

(3) cDNA의 RT-PCR 반응

각각의 특이유전자 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 RT-PCR을 실시하였다. 1㎕의 cDNA에 12.5㎕의 2×SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, UK), 각각 1.5㎕의 5μM sense, antisense primer(Genotech, Korea), 8.5㎕의 증류수를 넣어 25㎕가 되게 한 후 Gene Amp 5700 Sequence Detection System(PE Biosystems, UK)에서 PCR하였다.

PCR 조건은 95℃에서 10분간 최초 denaturation한 후 95℃ 15초, 60℃ 60초를 40 cycle 반복하였다. GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), IFN-γ, IL-4, T-bet, GATA-3, c-maf 유전자의 primer

sequence는 Table 2와 같다.

cDNA는 각각 1, 1/10, 1/100로 serial dilution한 후 각 농도당 3개씩 PCR하여 평균값을 사용하였다. 각 반응액의 amplification이 threshold에 도달한 cycle number(Ct)를 기준으로 standard curve을 그려서 정량하였고 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 normalization하였다. PCR 반응의 종료 후 60~95℃ 사이에서의 온도별 signal을 측정하여 dissociation curve를 작성하였다.

6) ELISA 방법을 이용한 cytokine 발현량 측정

앞에서 언급한 4)의 방법을 이용하여 분화한 Th1/Th2 cell의 상층액에서 IFN-γ, IL-4 발현량을 측정하기 위하여 OptEIA Mouse IFN-γ Set, OptEIA Mouse IL-4 Set(BD Biosciences, USA)의 protocol을 이용하되 capture antobody(anti-mouse IFN-γ 또는 IL-4)를 coating buffer(0.1M Carbonate, pH 9.5)로 희석하여 96-well plate에 100㎕ 씩 분주한 후 4℃에 overnight 동안 coating하였다. Coating한 plate를 wash buffer (PBS/Tween-20 0.05%)로 3번 washing한 후 assay diluent(BD Biosciences, USA)를 200㎕/well 씩 분주한 후 실온에서 1시간 동안 blacking하였다. 다시 wash buffer로 3번 washing하고 Standard와 Sample을 100㎕씩 분주한 후 실온에서 2시간 반응시켰다. Wash buffer로 5번 washing하고 working detector (Detection antibody+Avidin-HRP) 100㎕씩 각 well에 첨가하였다. 실온에서 1시간 반응 후 wash buffer로 10번 washing 한 후 substrate solution(TMB Substrate Reagent; Pharmingen, BD Biosciences, USA) set를 각 well 마다 100㎕씩 첨가하였다. 실온의 어두운 곳에서 30분 동안 반응 한 후 2N H_2SO_4를 50㎕ 첨가한 후 30분 안에 micropalte reader(Molecular Devices, USA)로 450nm/570nm에서 읽었다.

7) 統計分析

본 실험 data는 mean±SEM(Standard error of the mean)으로 표시하였고 결과의 유의성 평가는 Prism 3.02 software(GraphicPad Software, USA)를 이용하여 Student's t-test를 실시하였다.

III. 結 果

1. 加味淸上補下湯이 분리된 CD4+ T cell의 생존 및 증식에 미치는 영향

加味淸上補下湯이 주변의 APC(antigen presenting cell)가 없이도 직접적으로 CD4+ T cell 생존에 영향을 미치는지 확인하여 위해 CD4+ T cell을 분리한 후 加味淸上補下湯을 농도별로 투여하고 48시간동안

Table 2. Sequences of Primer Used for RT-PCR

Gene		Oligonucleotide Sequence
GAPDH	RV	5'- GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA -3'
	FW	5'- TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC -3'
IL-4	RV	5'- ACA GGA GAA GGG ACG CCA T -3'
	FW	5'- GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA -3'
IFN-γ	RV	5'- TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA -3'
	FW	5'- TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG -3'
T-bet	RV	5'- GCC AGG GAA CCG CTT ATA TG -3'
	FW	5'- GAC GAT CAT CTG GGT CAC ATT -3'
GATA-3	RV	5'- GAA GGC ATC CAG ACC CGA AAC -3'
	FW	5'- ACC CAT GGC GGT GAC CAT GC -3'
c-maf	RV	5'- ATC CGA CTG AAG CAG AAG -3'
	FW	5'- TCC TTG TAG GCG TCC CTT -3'

배양한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4+ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 다만 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation시켰을 때에는 加味淸上補下湯 물 추출물과 에탄올 추출물에서 1㎍/㎖과 10㎍/㎖에서 높은 생존율을 나타내었고 1㎍/㎖ 이상의 농도에서는 농도 의존적으로 생존율이 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 1).

2. Real-time PCR을 이용한 cytokine 및 전사인자 발현효과

加味淸上補下湯을 투여하고 CD4+ T cell을 5일 동안 분화한 Th1/Th2 cell에서 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 real-time PCR을 시행함으로써 유전자의 발현량을 평가한 결과는 다음과 같다.

1) GAPDH

각각의 유전자의 발현량을 normalization하기 위하여 internal control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct값을 기준으로 작성된 standard curve는 Fig. 2와 같다. Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석결과 R^2는 0.9966으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

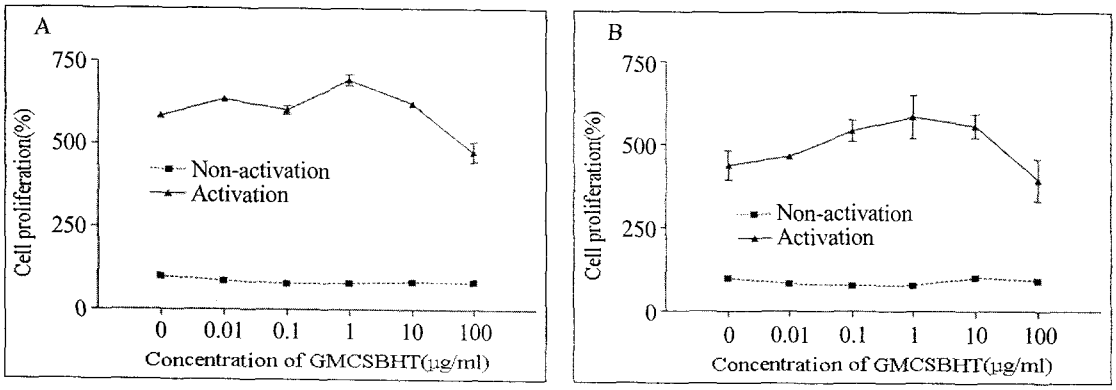

Fig. 1. Proliferation of CD4+ T cell in medium containing various concentration of GMCSBHT extract after 48 hrs incubation.

Sorted CD4+ T cells were treated with anti-CD3e/anti-CD28 antibodies to activate T cell, or not. Cell proliferation was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M. A : H_2O extract, B : EtOH extract.

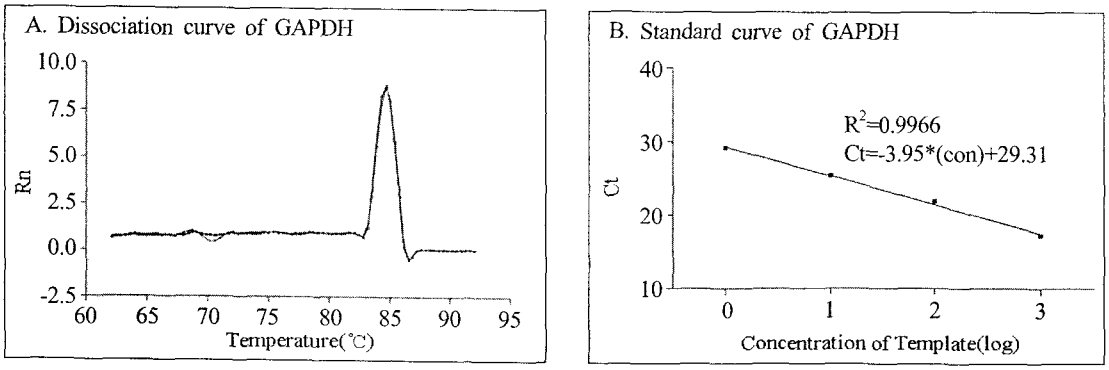

Fig. 2. Dissociation and standard curve of GAPDH as internal control.

A : After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 60 to 93℃ were detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer. Rn : Normalized reporter.

B : Serially diluted cDNA(1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers(Ct) of each concentration were used to make standard curve.

2) IFN-γ에 미치는 효과

IFN-γ 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R^2는 0.9928로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 IFN-γ 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다. Th1 skewed 상황에서 IFN-γ의 mRNA 발현량은 加味淸上補下湯 물 추출물 투여군은 control군과 비교하여 1㎍/㎖에서 22% 증가하였고 10㎍/㎖에서는 18.5% 감소하였으나 모두 유의성은 없었다. 에탄올 추출물 투여군은 control군과 비교하여 1㎍/㎖에서 54.9%의 감소효과를 유의성($P<0.05$) 있게 나타내었으며 10㎍/㎖에서는 30% 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

3) IL-4

IL-4 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer

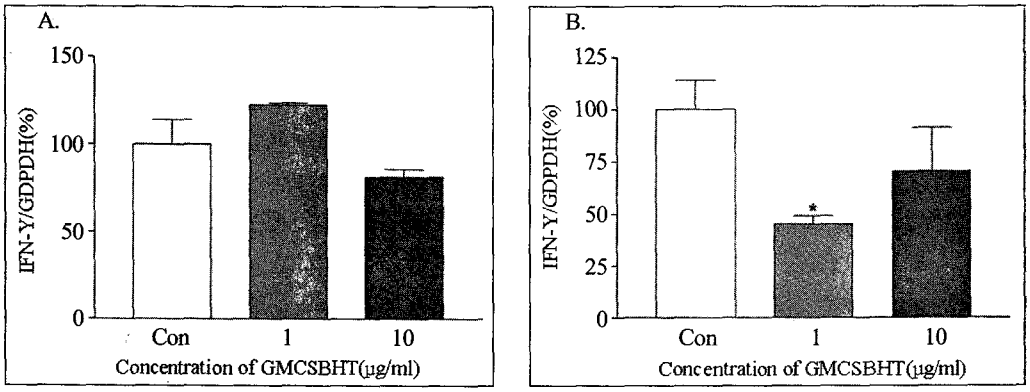

Fig. 3. Expression level of IFN-γ.

Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.
Con : Cells were incubated in medium without GMCSBHT extract as control.
GMCSBHT : Cells were incubated in medium containing 1, 10 ㎍/㎖ GMCSBHT extract.
* $p<0.05$. A : H_2O extract, B : EtOH extract.

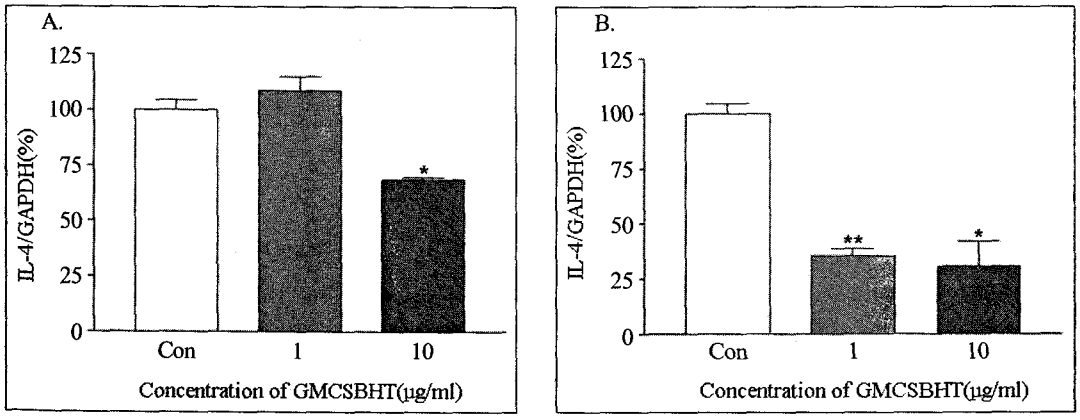

Fig. 4. Expression level of IL-4.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$. A : H_2O extract, B : EtOH extract.

의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R^2는 0.9992로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 IL-4 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다. Th2 skewed 상황에서 IL-4의 mRNA 발현량은 加味淸上補下湯 물 추출물 투여군은 control군과 비교하여 1㎍/㎖에서 8.6% 증가하였으나 유의성은 없었으며 10㎍/㎖에서는 31.3% 감소효과를 유의성($P<0.05$) 있게 나타내었다. 에탄올 추출물 투여군은 control군과 비교하여 1㎍/㎖에서는 64.6%, 10㎍/㎖에서는 69.4% 감소효과를 유의성($P<0.01$, $P<0.05$) 있게 나타내었다(Fig. 4).

4) T-bet

T-bet 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R^2는 0.9946으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 T-bet

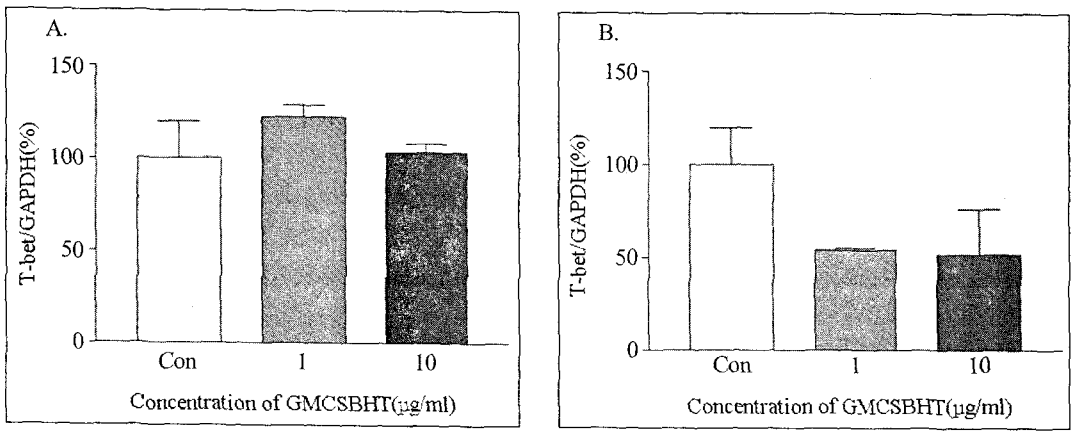

Fig. 5. Expression level of T-bet.

A : H_2O extract, B : EtOH extract.

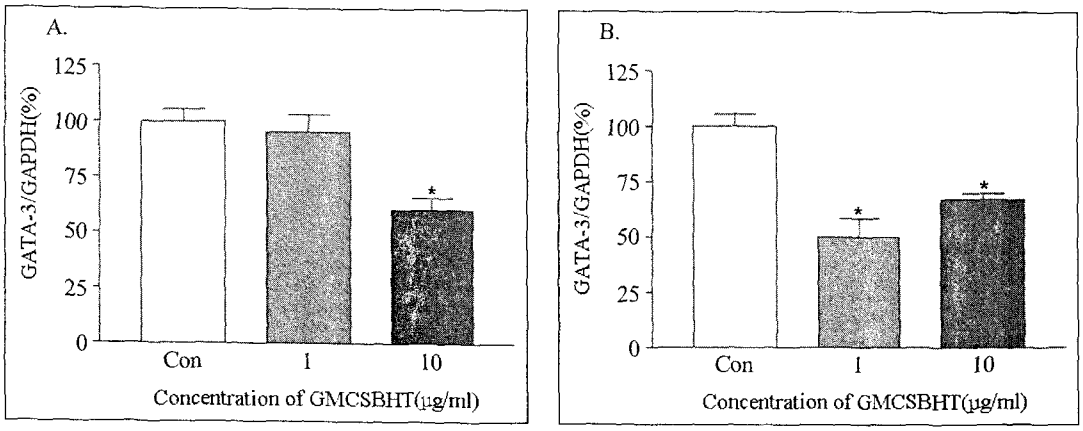

Fig. 6. Expression level of GATA-3.

* $p<0.05$. A : H_2O extract, B : EtOH extract.

유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다. Th1 skewed 상황에서 T-bet의 mRNA 발현량은 加味淸上補下湯 물 추출물 투여군은 control군과 비교하여 1㎍/㎖에서는 22.5%, 10㎍/㎖에서는 3.4% 증가하였으나 유의성은 없었다. 에탄올 추출물 투여군은 control군과 비교하여 1㎍/㎖에서는 45.8%, 10㎍/㎖에서는 48.2% 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5).

5) GATA-3

GATA-3 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R^2는 0.9983으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 GATA-3 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다. Th2 skewed 상황에서 GATA-3의 mRNA 발현량은 加味淸上補下湯 물 추출물 투여군은 control군과 비교하여 1㎍/㎖에서는 4.5% 감소하였으나 유의성은 없었고 10㎍/㎖에서는 39.5% 감소효과를 유의성($P<0.05$) 있게 나타

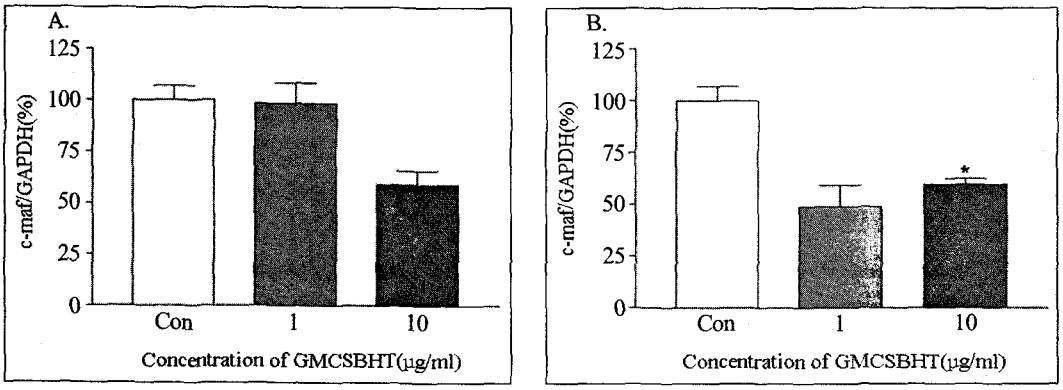

Fig. 7. Expression level of c-maf.

* $p<0.05$. A : H_2O extract, B : EtOH extract.

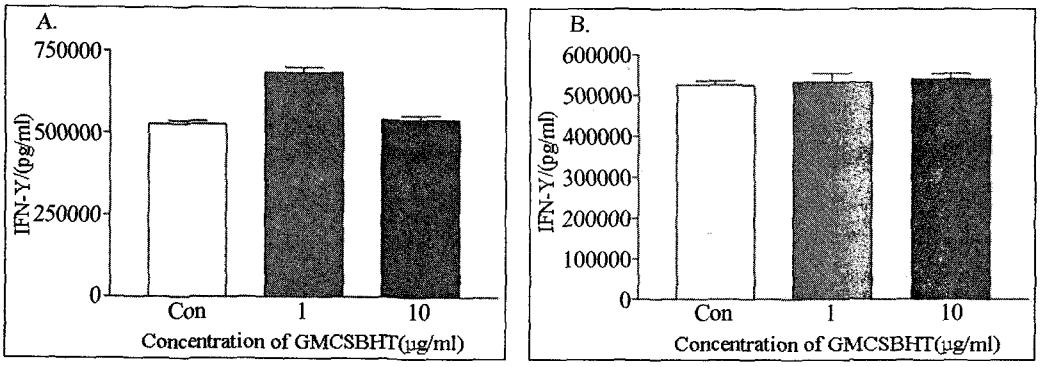

Fig. 8. Analysis expression of cytokine polarized Th1 cell into Th0.

Sorted CD4+ T cells were treated with anti-IL-4, rIL-12 antibodies to polarized CD4+ T cell for 5days. Afer 5 days, the IFN-γ expression was measured by ELISA.
Con : Cells were incubated in medium without GMCSBHT extract as control.
GMCSBHT : Cells were incubated in medium containing 1, 10 ㎍/㎖ GMCSBHT extract.
** $p<0.01$. A : H_2O extract, B : EtOH extract.

내었다. 에탄올 추출물 투여군은 control군과 비교하여 1㎍/㎖에서는 50%, 10㎍/㎖에서는 33% 감소효과를 유의성(각각, $P<0.05$) 있게 나타내었다(Fig. 6).

6) c-maf

c-maf 유전자에 대한 Realtime PCR 결과 dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R^2는 0.9986으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 c-maf 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다. Th2 skewed 상황에서 c-maf의 mRNA 발현량은 加味淸上補下湯 물 추출물 투여군은 control군과 비교하여 1㎍/㎖에서는 1.8% 감소하였고 10㎍/㎖에서는 40.9% 감소하였으나 모두 유의성은 없었다. 에탄올 추출물 투여군은 control군과 비교하여 1㎍/㎖에서는 50.9% 감소하였으나 유의성은 없었고, 10㎍/㎖에서는 40.3% 감소효과를 유의성($P<0.05$) 있게 나타내었다(Fig. 7).

3. ELISA법을 이용한 cytokine 분비량에 미치는 효과

1) IFN-γ에 미치는 효과

Naive CD4+ T cell에 加味淸上補下湯 물 추출물과 에탄올 추출물 1㎍/㎖, 10㎍/㎖를 투여하고 50U rIL-2, 10㎍/㎖ anti-IL-4, 10ng/ml rIL-12를 이용하여 5일 동안 Th1 cell로 분화한 후 상층액에서 cytokine 분비량을 측정하였다. Th1 cell skewed 상황에서 IFN-γ의 분비량은 加味淸上補下湯 물 추출물 투여군은 control군과 비교하여 1㎍/㎖에서는 30% 증가효과를 유의성($P<0.01$) 있게 나타내었으며 10㎍/㎖에서는 2.9% 증가하였으나 유의성은 없었다. 반면에 에탄올 추출물 투여군은 control군과 비교하여 1㎍/㎖와 10㎍/㎖에서 각각 1%, 2.9% 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 8).

2) IL-4에 미치는 효과

Naive CD4+ T cell에 加味淸上補下湯 물 추출물과 에탄올 추출물 1㎍/㎖, 10㎍/㎖를 투여하고 50U rIL-2, 10㎍/㎖ anti-IL-12, 10ng/ml rIL-4를 이용하여 5일 동안 Th2 cell로 분화한 후 상층액에서 cytokine 분비량을 측정하였다. Th2 cell skewed 상황에서 IL-4의 분비량은 물 추출물 투여한 군은 control군과 비교하여 1㎍/㎖와 10㎍/㎖에서 각각 8.3%, 8% 감소하였으나 유의성은 없었다. 에탄올 추출물 투여군은 control군과 비교하여 1㎍/㎖에서는 56.8% 10㎍/㎖에서는 62.2% 감소효과를 유의성(각각 $P<0.001$) 있게 나타내었다(Fig. 9).

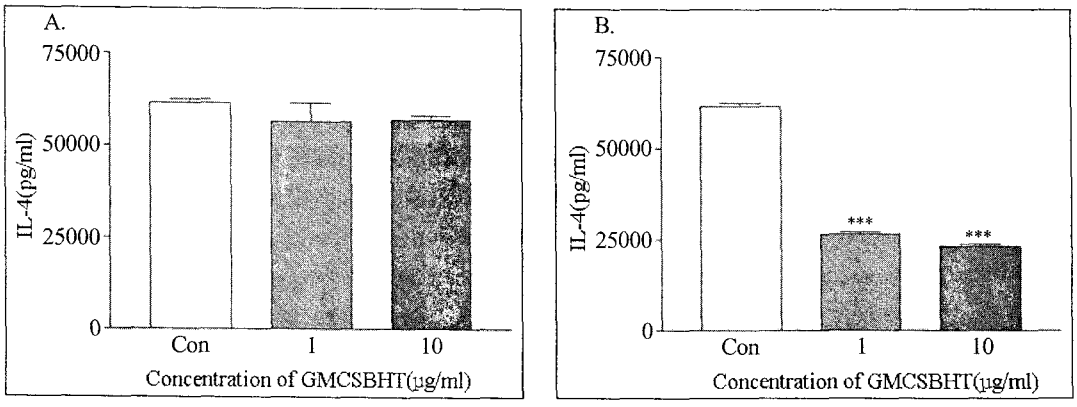

Fig. 9. Analysis expression of cytokine polarized Th2 cell into Th0.

Sorted CD4+ T cells were treated with anti-IL-4, rIL-12 antibodies to polarized CD4+ T cell for 5days. Afer 5 days, the IL-4 expression was measured by ELISA.

*** $p<0.001$.

A : H_2O extract, B : EtOH extract.

Ⅳ. 考 察

기관지천식은 기도의 만성 염증성 질환으로서 폐내 기도의 가역적 혹은 간헐적 협착에 의해 호흡곤란, 기침 혹은 천명의 증상이 반복적으로 발생하는 질병의 상태로서[14] 임상적으로는 가변적인 기도폐색의 증상을 보이고 병태생리학적으로는 기도의 과민성이 존재하며 병리학적으로 기도의 염증성 반응을 보이는 질환을 말한다[15].

기관지천식은 allergen, mast cell 및 IgE가 관여하여 분비되는 화학매체의 직접적인 약리작용에 의해서 또한 화학매체와 cytokine, 유착분자가 관여하여 기관지로 모여온 염증세포에 의해서 발병하는 기도의 만성 알레르기 염증성 질환으로 이해되고 있다[2]. 대표적인 Th2 cytokine인 IL-5는 천식에서 흔히 발견되는 호산구성 염증에 관여하기 때문에 주목을 받아왔으나 IL-5에 대한 항체를 이용한 치료는 실패하였다[16]. 이는 기관지 천식이 하나의 cytokine만에 의하여 특징지어지지 않음을 의미한다. 즉, 기관지 천식의 발병에 다른 여러 가지 기전이 관여하며 Th2 염증반응의 측면에서도 다른 Th2 cytokine들이 중요하다.

천식의 기도염증에 대하여 T lymphocyte에 의하여 생산된 cytokines은 여러 전사인자와 함께 naive Th cell을 Th1 cell과 Th2 cell의 아형으로 분화시킬 수 있다. Th1 cell은 INF-γ, TNF-β, IL-12를 분비하여 Th2 cell의 IL-4을 억제하고 B lymphocyte에 의한 IgG의 생산을 증진시킨다. 반대로, Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13을 주로 생산하여 호산구성 염증반응을 증진시키는데 IL-4는 B lymphocyte를 자극하여 IgE를 생산케 하며 Th1 cell의 활동을 억제한다. 알레르기 천식환자에 있어 IL-4, IL-5는 증가되어 있고 INF-γ는 감소되어있음이 여러 연구에서 보고되었다[17,18]. Th1 cell의 감소와 Th2 cell의 증가가 천식을 일으킨다는 Th2 가설이 Mosmann에 의해 제안된 이후 천식 염증에 대한 핵심이론으로 자리 잡게 되었다[19]. 한편으로는 이 가설과 상반되는 여러 결과에 대한 연구가 있었으며[20] 최근 加味淸上補下湯에 대한 임상연구에서도 Th2 가설에 대한 의문점을 제기하는 결과가 보고 되기도 하였다[8].

Th1 cell과 Th2 cell은 서로 길항작용을 나타내는데 Th1 cell의 기능의 활성화가 지나치면 류마티스 관절염, 다발성 경화증, Ⅰ형 당뇨병과 같은 자가면역질환을 발생시키고, Th2 cell의 기능이 지나치게 활성화되면 기관지 천식 등의 알레르기성 질환을 발생시킨다[7].

IFN-γ는 Th1 cell에서 생성되어 naive CD4+ T cell의 Th1 cell로의 분화를 촉진시키며 Th2 cell의 증식을 억제한다. 또한 IL-4의 작용을 길항하여 IgE 생성을 억제한다고 알려져 있다[21].

IL-4는 B세포 활성화와 isotype switching, 특히, IgE 항체의 발생에 있어서 중요한 역할을 한다. IL-4는 naive CD4+ T cell을 Th2 cell로의 분화를 촉진시켜 IL-4의 보다 많은 생산을 도와주며, 항체 형성을 증진시키고, 지연형 과민성 반응을 억제하는 IFN-γ에 대한 길항작용으로 생산을 억제한다[22].

최근 naive Th cell을 Th1 cell과 Th2 cell의 아형으로 분화시키는데 있어 cytokine과 함께 중요한 조절인자인 전사인자들이 여러 연구에서 보고되었다[4,23,24].

Th1 cell로의 분화는 T-bet, signal transducer and activator of transcription 1(STAT1), STAT4 등의 전사인자들이 IL-12, IL-23, IL-27, IFN-γ 등과 함께 조절에 관여하게 되며, Th2 cell로의 분화는 STAT-6, GATA-3, c-maf, nuclear factor of activated T cell (NFAT)등의 전사인자들이 IL-4와 함께 조절에 관여하게 된다[4]. 그 중에서도 T-bet과 GATA-3는 Th cell이 분화될 때 그 타입을 결정하는 핵심적인 전사인자로서, T-bet은 Th1 cell로의 분화를 촉진하며 GATA-3는 Th2 cell로의 분화를 촉진한다[5,6]. Th1/Th2 cell의 분화과정에 있어 GATA-3나 T-bet은 이들 전사인자가 활성화 또는 표현되면 크로마틴의 변형과정을 통하여 유전자의 전사를 조절하는 기능이 있는 것으로 알려지고 있다. 즉 GATA-3의 경우 Th2 cytokine이 있는 유전자부위의 크로마틴 구조를 열어주어 활성화된 여러 가지 다른 전사인자들에 의해 IL-4, IL-5, IL-13 등의 전사가 일어날 수 있도록 하며, T-bet의 경우는 반대로 Th1 cytokine이 있는 유

전자 부위를 열어주어 IFN-γ의 전사가 일어날 수 있는 토대를 마련해 주게 되는 것이다. NFAT, activating protein-1(AP-1), nuclear factor-κB(NF-κB) 등의 전사인자가 각각의 유전자 부위에 작용을 하기 위해서는 크로마틴 구조의 변형을 유도해 주는 전사인자의 작용이 선행되어야 하는 것인데 이런 의미에서 GATA-3와 T-bet은 다른 전사인자와 달리 신호전달 과정에서 상위에 위치하는 전사인자로서 전체적인 Th cell의 분화를 조절하는 핵심적인 전사인자가 되는 것이다25. 기관지 천식은 Th2 염증성 질환으로 Th2 cell의 분화에 관여하는 GATA-3, c-maf, STAT-6 등이 발현된 세포가 기관지 천식 환자의 유도객담에서 증가되어있음이 보고되었다[26].

加味淸上補下湯은 淸上補下湯에서 補腎滋陰하는 효능을 가진 약물들을 증량한 처방으로 효능은 補陰, 潤肺化痰, 淸熱降氣하여 上氣, 喘息咳嗽, 痰涎上壅 등의 症이 있는 폐질환에 활용되고 있다[14]. 淸上補下湯에 대한 실험연구에서 金 등[9]은 Th2와 관련되는 사이토카인의 억제효과를 보고하였고 李 등[27]은 淸上補下湯의 항산화 효과 및 IL-4 억제 및 cDNA chip을 이용한 遺傳子發顯에 미치는 영향을 보고하였으며 Roh 등[10]은 淸上補下湯이 기도 염증 및 재생의 진행을 효과적으로 지연시킬 수 있음을 보고하였다. 加味淸上補下湯에 대한 연구에서 崔 등[28]은 虛證 喘息에 대한 삶의 질 향상 및 유지효과와 폐기능 개선 효과를 보고하였으며, 鄭 등[29]은 加味淸上補下湯 엑기스제가 GINA guideline의 중증도 분류에 따른 지속형 천식환자의 폐기능 및 삶의 질 향상효과가 있음을 보고 하였다. 鄭 등[11]은 加味淸上補下湯의 투여용량을 줄인 엑기스제가 완해기 천식환자의 지속적인 관리에 유용함을 보고하였다.

전통적으로 한의학에서는 천연물인 한약재를 복용하는 방법에 있어서 湯劑, 散劑, 丸劑, 膏劑, 丹劑, 酒劑 등의 제형방법이 사용되어 왔다. 그 중 한약재를 혼합하여 물에 넣어 끓인 다음 찌꺼기를 제거하고 즙을 취하는 탕제는 고금을 막론하고 가장 널리 사용되고 있다[12]. 종래의 韓方製劑는 調劑의 어려움, 服用의 곤란함, 保管의 불편함 등 여러 단점을 지니고 있고, 有效性, 安定性, 품질의 均一性 및 유효기간의 설정 등 의약품으로서 갖추어야 할 기본적 요소를 확보하는데 어려움이 있다[13]. 이에 본인은 보다 효능이 향상된 제품 개발의 필요성과 extract의 활용도와 중요성이 점차 증대되는 점 등을 감안하여 加味淸上補下湯을 물을 용매로 하는 일반적인 탕전방법에 따른 방법과 에탄올을 용매로 하는 방법을 이용하여 추출액을 추출하였다. 각각의 추출액을 감압농축 후 동결건조하여 extract 제제를 만들어 BALB/c 웅성 마우스의 비장세포를 이용하여 분화과정 주요 인자의 전사억제 및 촉진에 대한 효과를 알아보기 위하여 IFN-γ, IL-4, T-bet, GATA-3, c-maf mRNA의 발현량을 RT-PCR로 관찰하였다. 또한 물 추출물과 에탄올 추출물 투여군에 대하여 분화된 Th1/Th2 cell이 각각 분비하는 IFN-γ, IL-4의 분비량을 ELASA 방법으로 측정 비교분석하여 加味淸上補下湯의 각각의 추출방법에 따른 기관지 천식에 대한 영향에 대하여 연구하였다.

본 연구에서는 우선 加味淸上補下湯 물 추출물과 에탄올 추출물이 CD4+ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인한 후, 加味淸上補下湯 물 추출물과 에탄올 추출물이 Th cell의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RT-PCR을 이용한 IFN-γ, IL-4, T-bet, GATA-3, c-maf mRNA의 발현량을 관찰한 결과와 ELISA 방법으로 IFN-γ, IL-4의 분비량을 측정한 결과를 비교분석하였다.

연구 결과를 보면 加味淸上補下湯 물 추출물은 Th1 cell로의 분화과정에서는 주요인자의 전사를 촉진시킴으로서 Th1 cell의 분화 및 활성을 증진시키고 있음을 알 수 있으며 Th2 cell로의 분화과정에서는 IL-4 mRNA에 대한 1㎍/㎖에서의 작용을 제외하고는 IL-4, GATA-3, c-maf mRNA의 발현을 억제하는 효과가 관찰되었으며 특히 10㎍/㎖에서의 IL-4, GATA-3 mRNA의 발현에 관하여 유의한 억제효과가 나타났다. 또한 secretion cytokine인 IL-4 분비량에 있어서 통계적 유의성은 없었으나 감소시키는 경향을 보이고 있어 淸上補下湯 물 추출물은 Th1 cell로의 분화를 촉진시키고 Th2 cell로의 분화를 억

제함으로서 기관지 천식에 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

이에 비하여 加味淸上補下湯 에탄올 추출물은 RT-PCR을 이용한 발현측정에서는 IFN-γ, T-bet mRNA의 전사를 억제하는 효과를 보이고 있으나 ELISA법을 이용한 실험에서는 합성되어 분비된 IFN-γ이 control군과 비교하여 통계적 유의성은 없지만 오히려 약간 증가하였음을 알 수 있다. 이는 Th1 cell로의 분화과정에서 다양한 경로가 존재하고 많은 변수가 관여하는데 加味淸上補下湯 에탄올 추출물이 IFN-γ, T-bet mRNA의 발현억제 효과에도 불구하고 이후 IFN-γ의 합성에는 차이가 나타나지 않는 것은 다른 과정에서도 작용함으로써 실제 Th1 cell로의 분화에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 이에 반하여 Th2 cell로의 분화과정의 주요 인자에 대하여는 mRNA 발현량의 현저한 감소를 보여 유의성 있는 전사억제효과를 나타내며 IL-4의 분비를 유의하게 감소시킴을 보여주고 있다. 이는 加味淸上補下湯 에탄올 추출물이 Th2 cell로의 분화과정에 주로 작용하여 효과적으로 분화를 억제함으로서 Th2 의존적인 염증질환인 기관지 천식에 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 보면 加味淸上補下湯 물 추출물과 에탄올 추출물은 Th2 cell 보다 Th1 cell이 우세하도록 작용함으로서 기관지 천식에 효과적인 작용을 보이고 있다. 그러나 효과를 나타내는 기전에 있어서는 차이가 있어 加味淸上補下湯 물 추출물은 Th1 cell로의 분화를 촉진시키고 Th2 cell로의 분화를 억제하는 효과를 나타냄에 비하여 에탄올 추출물은 주로 Th2 cell로의 분화를 현저히 억제하는 작용을 나타내었다. 加味淸上補下湯 에탄올 추출물의 Th2 cell의 현저한 억제작용은 천식의 염증반응에 대해 보다 직접적인 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다. 기존의 임상연구에서는 물로 추출한 加味淸上補下湯이 만성 허증천식의 치료에 보다 효과적으로 작용한다고 보고 되었다[28]. 이에 비하여 加味淸上補下湯 에탄올 추출물은 급성기 염증반응으로 인한 실증천식에서 보다 효과적인 치료효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 효과기전의 차이는 물을 용매로 한 추출물과 에탄올을 용매로 한 추출물의 추출성분의 물리화학적 조성의 차이로 인한 것으로 추정된다. 특히 기존의 연구에 의하면 천식치료에 사용되는 corticosteroid 제제는 Th1 cell과 Th2 cell반응 모두를 억제함으로서 천식에 대한 효과를 나타내지만 동시에 면역을 저하시키며 여러 부작용을 나타낸다[30]. 이에 비하여 加味淸上補下湯 에탄올 추출물은 주로 Th2 cell에 대하여 현저한 억제작용을 나타냄으로서 추후 연구결과에 따라 스테로이드를 대체할 수 있는 약제개발에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

앞으로 구체적인 후속연구를 통하여 加味淸上補下湯의 에탄올 추출방식에 따른 효과를 임상적으로 검증함으로서 보다 치료효과가 향상된 제품개발 및 제형변화를 위한 토대를 마련할 수 있을 것으로 기대된다.

V. 結 論

물과 에탄올 추출방법에 따른 加味淸上補下湯의 기관지 천식에 미치는 효과의 차이를 알아보고자 BALB/c 웅성 마우스의 비장세포를 이용하여 Th1/Th2 cell의 분화과정에 중요한 영향을 미치는 cytokine인 IFN-γ, IL-4와 전사인자인 T-bet, GATA-3, c-maf의 mRNA 발현량을 RT-PCR로 관찰하고 ELISA 방법으로 IFN-γ와 IL4의 분비량을 측정하여 비교관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味淸上補下湯 물 추출물은 IFN-γ mRNA의 발현을 1㎍/㎖에서는 증가시켰고 10㎍/㎖에서는 억제하였으며 T-bet의 mRNA의 발현은 두 농도 모두 증가시켰으나 유의성은 없었다. 한편 IL-4와 GATA-3 mRNA의 발현을 10㎍/㎖에서 유의하게($P<0.05$) 억제하였고, c-maf mRNA의 경우 두 농도 모두에서 억제하였으나 유의성은 없었다.
2. 加味淸上補下湯 물 추출물은 ELISA 방법을 이용한 IFN-γ 분비량 측정에서 1㎍/㎖에서 유의하게

(P<0.01) 증가하였으며, IL-4의 분비량 측정에서는 두 농도 모두 감소하였으나 유의성은 없었다.

3. 加味淸上補下湯 에탄올 추출물은 IFN-γ mRNA의 발현을 1㎍/㎖에서 유의하게(P<0.05) 억제하였으며 T-bet의 mRNA의 발현은 두 농도 모두 억제하였으나 유의성은 없었다. 한편 IL-4 mRNA의 발현을 10㎍/㎖와 1㎍/㎖ 모두에서 유의하게(P<0.01, P<0.05) 억제하였으며 GATA-3 mRNA의 발현을 두 농도 모두 유의하게(P<0.05) 억제하였고, c-maf mRNA의 발현을 10㎍/㎖에서 유의하게(P<0.05) 억제하였다.
4. 加味淸上補下湯 에탄올 추출물은 ELISA 방법을 이용한 IFN-γ의 분비량 측정에서 두 농도 모두에서 거의 차이가 없었으며 IL-4의 분비량 측정에서는 두 농도 모두 유의하게(P<0.001) 감소하였다.

參考文獻

1. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Bethesda (MD): National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute; 2004:2-8.
2. 대한 천식 및 알레르기학회. 천식과 알레르기질환. 서울: 군자출판사; 2002, p.244-56.
3. Holgate ST. Asthma and allergy-disorders of civilization? *QJM*. 1998;91(3):171-84.
4. Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'shea JJ et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol*. 2003;23:147-61.
5. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in Th1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science*. 2002;295(5553):338-42.
6. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997;89(4):587-96.
7. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implication for health and disease. *Altern Med Rev*. 2003;8(3):223-46.
8. 최준용, 정희재, 이재성, 조일현, 이건영, 정승연 등. 加味淸上補下湯과 Th2 가설-미완의 천식이론. 대한한방내과학회 춘계학술대회 논문집. 2004: 28-40.
9. 김영우 정희재 이형구 정승기. 定喘湯과 淸上補下湯이 asthma model 내의 cytokine에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;22(3):367-77.
10. Roh GS, Seo SW, Yeo S, Lee JM, Choi JW, Kim E et al. Efficacy of a traditional Korean medicine, Chung-Sang-Bo-Ha-Tang, in a murine model of chronic asthma. Int Immunopharmacol. 2005;5(2):427-36.
11. 정승연, 이재성, 최준용, 이건영, 정희재, 이형구, 배현수, 정승기. 천식 완해기 유지치료로서 AF-365의 임상적 효과. 대한한방내과학회지. 2005; 26(1):1-11.
12. 이상인, 김동걸, 노승현, 이영종, 주영승. 方劑學. 서울: 영림사; 1992, p.29-36.
13. 李尙仁. 새로운 한약제제의 개발에 관한연구(-淸熱解毒湯 忍冬藤의 제형화에 관한연구-)보고서. 한국한의학연구원; 1998, p.106-7.
14. 전국한의과대학 폐계내과학교실 편저. 東醫肺系內科學. 서울: 한문화사; 2002, p.192-9, 320.
15. 한용철. 임상호흡기학. 서울: 일조각; 1998, p. 208-10. 279.
16. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*. 2000;356:2144-8.
17. Hoekstra MO, Hoekstra Y, De Reus D, Rutgers B, Gerritsen J, Kauman HF. Interleukin-4, inter-

ferongamma and interleukin-5 in peripheral blood of children with moderate atopic asthma. *Clin Exp Allergy*. 1997;27:1254-60.

18. Tang MLK, Coleman J, Kemp AS. Interleukin-4 and interferon-gamma production in atopic and non-atopic children with asthma. *Clin Exp Allergy*. 1995;25:515-21.
19. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.
20. Salvi SS, Babu KS, Holgate ST. Is asthma really due to a polarized T cell response toward a helper T cell type 2 phenotype? *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(8 Pt 1):1343-6.
21. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. Philadelpia: W.B Saunders; 2000, p.260-1.
22. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producting phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:635-73.
23. Ray A, Cohn L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest*. 1999;104(8):985-93.
24. Robinson DS, Lloyd CM. Asthma: T-bet--a master controller? *Curr Biol*. 2002;12(9):322-4.
25. Yates A, Callard R, Stark J. Combining cytokine signalling with T-bet and GATA-3 regulation in Th1 and Th2 differentiation: a model for cellular decision-making. *J Theor Biol*. 2004; 231(2):181-96.
26. Taha R, Hamid Q, Cameron L, Olivenstein R. T helper type 2 cytokine receptors and associated transcription facotrs GATA-3, c-Maf, and signal transducer and activator of transcription factor 6 in induced sputum of atopic asthmatic patients. *Chest*. 2003;123:2074-82.
27. 이동생, 정희재, 정승기, 이형구. 淸上補下湯의 抗酸化 效果, Interleukin-4 抑制 및 cDNA chip을 이용한 遺傳子發顯에 미치는 影響. 대한한의학회지. 2003;24(2):148-58.
28. 최준용, 황우석, 이재성, 정희재, 이형구, 정승기. 기관지천식환자의 허실변증에 따른 淸上補下湯의 임상효과. 대한한방내과학회 추계학술대회. 2003:91-9.
29. 정승기, 정희재, 이재성, 이건영, 정승연, 이형구 등. 加味淸上補下湯엑기스제의 기관지천식환자의 중증도에 따른 임상효과. 대한한의학회지. 2004; 25(2):110-8.
30. Hamelmann E, Schleimer RP. Corticosteroid treatment in bronchial asthma: For better or for worse? J Allergy Clin Immunol. 2003;111(2): 248-50.