

삼仁이 천식관련 chemokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향

주창엽, 정희재, 정승기, 이형구
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

Armeniacae Amarum Semen Contributes to the Chemotaxis of Eosinophils and Secretion of Chemokines in A549 Human Epithelial Cells

Chang-yeop Ju, 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

Objective : Eosinophils are typically characterized by a bilobar nucleus with highly condensed chromatin and cytoplasm containing two major types of granules, specific and primary granules, and lipid bodies. The role of inflammation in asthma and other allergic diseases of the airways is widely appreciated, and airway inflammation is now included as a defining feature of asthma. The importance of the presence of eosinophils in the airways of patients with fetal asthma has long been recognized, but the mechanism by which these cells are recruited and retained in the lungs are only now being elucidated. Eotaxin is a potent and specific eosinophil chemoattractant that is mobilized in the respiratory epithelium after allergic stimulation.

Methods : Water extracts of Armeniacae Amarum Semen(AAS) and pulmonary epithelial cell lines A549(alveolar type II epithelial cells) and human eosinophils were used.

Cytotoxic effects of AAS and MTS assay were estimated, as well as the effects of AAS on chemokines from prestimulated A549 cells by sandwich ELISA and RT-PCR. Chemotaxis assay was conducted on prestimulated eosinophils treated with AAS.

Results : In this study it is demonstrated that TNF- α , IL-4 and IL-1 β induced the accumulation of chemokine mRNAs in the alveolar epithelial cell lines A549 in dose-dependent manner. Eotaxin and IL-8 were inhibited by AAS in dose-dependent manner($p < 0.05$). Eosinophil migration was inhibited at high concentrations of AAS($p < 0.05$).

Conclusions : These findings are indicative of suppression of eotaxin and IL-8, and suggest that this is accomplished through AAS treatment. This raises the possibility that AAS is of therapeutic value in diseases such as asthma.

Key Words: Armeniacae Amarum Semen, eosinophil, eotaxin, IL-8, asthma

1. 緒 論

기관지 천식은 비만세포, 호산구, T 림프구, 대식세포, 호중구, 상피세포 등 많은 세포와 그 구성요소들이 작용하는 기도의 만성 염증성 질환이며, 한의학

의 呼吸急促, 喘鳴有聲을 특징적인 증상으로 나타내는 哮喘證에 해당 한다¹. 천명, 호흡곤란, 흉민, 기침 등의 증상이 반복적으로 나타나며, 이러한 증상은 광범위하고 다양한 기류폐쇄가 원인이 되고, 이러한 기류폐쇄는 치료에 의해 혹은 치료 없이도 가역적으로 회복된다. 기도의 염증은 다양한 자극원에 대한 기도 과민성 증가를 유발 한다².

호산구는 천식을 비롯하여 알레르기성 비염, 호산구성 폐렴, 호산구성 장염, 혈액성·조직성 과호산

· 접수 : 2006. 2. 21. · 채택 : 2006. 2. 27.
· 교신저자 : 주창엽, 서울시 용산구 이촌1동 300-27
한강쇼팽센터 경희미담한의원
(Tel. 02-798-8275, Fax. 02-798-8276
E-mail : carpalis@yahoo.co.kr)

구증 등에서 기도 및 장관, 기타 조직에 염증을 유발하는 염증세포이다. 호산구성 기도 염증은 천식의 가장 특징적인 병태생리적 현상이며 천식환자의 기도 점막에 호산구가 선택적으로 침윤되어 있음이 관찰된다³. 호산구에서는 천식의 병태생리에 작용하는 많은 물질들이 분비되는데 이러한 독성단백질과 지질인자는 외인성 천식과 내인성 천식환자의 기도에 존재하면서 기관지상피세포 손상과 기도폐쇄에 중요한 역할을 한다⁴. 호산구는 알레르기성 염증 부위에 두 단계를 거쳐 침윤한다. 첫째 단계는 모세혈관에서 병변부위로 침윤되는 과정에서 호산구가 혈관내피세포에 유착하는 것이고, 두 번째 단계는 화학주성물질(chemoattractants)의 농도에 반응하여 호산구가 혈관내피세포를 빠져나와 병변부위로 이동하는 것이다⁵.

호산구 화학주성과 관련된 chemokine으로는 eotaxin, IL-8, IL-16, regulated on activation in normal T cells expressed and secreted(RANTES) 등이 있고, 세포유착분자 중 immunoglobulin superfamily 계로 분류되는 intercellular adhesion molecule(ICAM), vascular cell adhesion molecule(VCAM)은 혈관내피세포에 발현되어 존재하면서 호산구를 유착시켜서 혈관 외로 이동시키는 역할을 한다⁶. Eotaxin은 기도 내로 호산구를 유입시키는데 있어서 결정적 역할을 하고⁷, IL-8은 활성화(priming)된 상태의 호산구 화학주성에 작용 한다⁸. IL-16은 호산구가 세포외 기질 구성요소를 통과하여 이동하는데 강력한 촉진 작용을 하며⁹, RANTES는 호산구를 활성화시켜 eosinophil cationic protein(ECP)의 분비를 유도하고 respiratory burst도 야기하는 작용을 한다⁵.

杏仁(Armeniaca Amarum Semen)은 장미과 낙엽 교목인 살구 *Prunus armeniaca L. var. ansu Maxim.* 및 동속 近緣 식물의 성숙한 과실의 종자로 性은 微溫 有小毒하고, 味는 苦微辛하다. 肺經과 大腸經으로 귀경하며, 降氣止咳平喘의 효능으로 咳氣喘, 胸滿痰多를 치료 한다¹⁰.

杏仁과 관련된 연구로, 정 등¹¹은杏仁이 흉선세포의 증식과 복강 macrophage에서 생성되는 nitric oxide

(NO)를 억제하고 흉선세포의 apoptosis를 증가시킨다는 보고를 하였으며, 정 등¹²은 RBL-2H3 세포주에杏仁 추출물을 투여하여 IL-4, IL-5, IL-6에 대한 전사를 억제한다는 보고를 하였고, 황 등¹³은 생쥐에杏仁을 투여하여 BALF내에 호산구가 감소함을 보고 하였으며, 이 등¹⁴은杏仁 단미가 아닌杏仁半夏湯으로 guinea pig에서 기관지평활근 수축 억제작용을 보고하였다.

저자는杏仁이, 천식의 병태생리에서 중심적인 역할을 하는 염증유발 세포인 호산구의 화학주성에 관련된 ICAM, VCAM 등 세포유착분자 및 Eotaxin, IL-8, IL-16, RANTES 등 chemokine을 억제하는지 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된杏仁(*Armeniaca Amarum Semen*, *Prunus armeniaca* Linne.)은 Sun Ten Pharmaceutical Co.(Taiwan)에서 수입한 물 추출 엑기스를 사용하였다.

2) 세포주

본 실험에 사용된 A549 cell (human alveolar type II epithelial cell)은 한국 세포주 은행으로부터 분양 받은 세포주이다.

2. 방법

1) 세포배양 및 세포 독성 확인

세포 배양을 위하여 사용된 배지는 10% fetal bovine serum(Hyclone, Logan, U.S.A.), 1% penicillin/streptomycin(Invitrogen Life Technologies, Rorkville, U.S.A.), 10mM HEPES(JRH Biosciences, Lenexa, U.S.A.), 11mM sodium bicarbonate(JRH Bioscience)가 포함된 RPMI-1640(Invitrogen Life Technologies)을 사용하였다. 먼저杏仁에 대한 세포 독성을 측정하기 위하여 배양한 세포를 96-well plate(Corning, U.S.A.)에 2×10^4 cells/well로 seeding한 다음 24시간

동안 배양한 후 약제를 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.01 μ g/ml 농도별로 배지에 희석하여 100 μ l 씩 well에 첨가하였다. 24시간 동안 방치한 후 MTS solution(Promega, Madison, U.S.A.)을 20 μ l 씩 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 다음 흡광도 490nm에서 흡광도를 측정하였고 각 실험은 triplicate로 3회에 걸쳐 확인하였다.

2) Eotaxin ELISA Assay

배양한 A549 cell을 5x10⁵ cells/well로 12-well plate (Corning, U.S.A.)에 plating하여 24시간 배양한 후 serum free media로 교체한 다음 24시간 방치하고 eotaxin을 stimulation시키는 cytokine인 TNF- α (Biosource, Camarillo, U.S.A.) 100ng/ml과 IL-4 (Biosource, Camarillo, U.S.A.) 100ng/ml을 3시간 동안 처리하였다. 또한 RANTES를 유도하는 IL-1 β (Biosource, Camarillo, U.S.A.) 10ng/ml과 TNF- α (Biosource) 100ng/ml을 첨가하여 24시간 동안 배양한 다음 참나무이를 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.01 μ g/ml의 농도로 희석하여 48시간 동안 처리한 후 상등액을 취하여 human eotaxin ELISA Kit(BD Bioscience, U.S.A.)를 이용하여 sandwich ELISA를 실시하였다.

3) RT-PCR을 이용한 chemokine 발현량 측정

(1) Total RNA의 분리

각 12-well로부터 획득한 cell pellet에 Trisoil Reagent (Invitrogen Life Technologies)를 300 μ l 씩 첨가하여 용해시킨 후 200 μ l 씩 가하여 vortex한 다음 실온에서 5분간 방치한 후 100 μ l chloroform을 첨가하여 15초간 흔들어준 후 상온에서 3분간 방치한 다음 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상등액을 취해서 옮긴 후 250 μ l isopropanol을 첨가한 다음 10분간 실온에 방치하였다가 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 RNA pellet을 획득하였다. 75% 에탄올을 500 μ l 가하여 세척해 준 다음 상온에서 건조시킨 후 20 μ l DEPC-DW에 녹여 1: 50으로 희석한 다음 spectrophotometer를 이용하여 농도를 측정하였다.

(2) 1st strand cDNA의 합성

분리한 total RNA를 이용하여 first-strand complementary DNA(cDNA)를 합성하였는데 3 μ g의 RNA에 500 μ g/ μ l oligo-dT primer(Invitrogen Life Technologies, USA) 1 μ l를 첨가한 후 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 다음 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었고 5X synthesis buffer(250mM Tris-HCl, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, pH 8.3) 5 μ l, 10mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP) 1 μ l, 40U/ μ l RNase inhibitor 0.5 μ l를 섞어 최종 부피를 25 μ l로 맞추어 25 $^{\circ}$ C 2분간 반응시켰다. 이 반응액에 200U/ μ l Moloney murine leukemia virus(M-MLV) reverse transcriptase 1 μ l를 첨가하여 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시키고 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 enzyme을 불활성화한 다음 획득한 cDNA를 RT-PCR에 사용하였다.

(3) Reverse transcriptase PCR analysis

Total RNA로부터 합성한 cDNA는 reverse transcriptase PCR과 real time PCR에 모두 사용하였다. 2 μ l의 cDNA, 0.2 μ m primer 2 μ l, 10 μ l premix taq polymerase(Takara, Japan)를 혼합하여 최종 부피 20 μ l로 맞춘 다음 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 denaturaion 하고, 95 $^{\circ}$ C에서 45초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension하여 35회 반복하여 유전자를 증폭하였다. 그 후 전기영동으로 발현량을 측정하되, control로 GAPDH의 발현량을 이용해서 표준화하여 RANTES, IL-16에 대한 발현량을 일차적으로 확인하였으며 PCR에 사용한 specific primer는 Table 1.에 기록하였다.

(4) cDNA를 이용한 real-time PCR반응

RT-PCR시 GeneAmp 5700 Sequence Detector (Applied Biosystems)를 사용하여 합성한 각 sample의 template을 1:10으로 희석하여 그중 2 μ l를 취하여 0.2 μ m primer 2 μ l와 12.5 μ l SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK)를 최종 부피를 25 μ l 양으로 혼합한 다음 real time PCR을 실시하였다. 먼저 cDNA는 각각 1, 1/10, 1/100으로 serial dilution한 후 농도 당 3개씩 PCR하여 평균값을 사용하였다. 각 반응액의 증폭이 threshold에 도달한

cycle number(Ct)를 기준으로 standard curve를 그려서 정량하였고 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 표준화하였다. PCR 반응의 종료 후 60-95℃사이에서의 온도별 signal을 측정하여 dissociation curve를 작성하였다. PCR 조건은 95℃에서 10분간 denaturaion 하고, 95℃에서 15초, 60℃에서 1분간 40회 반복하였고 이때 사용된 primer는 RANTES, ICAM-1, VCAM-1, IL-8, IL-16으로 각 primer의 sequence는 Table 1.과 같다.

4) 호산구 chemotaxis assay

A549 cell을 cytokine assay에서와 같은 방법으로 IL-4와 TNF-α를 첨가하여 eotaxin을 자극한 후杏仁 100, 1, 0.01μg/ml 농도로 24시간 동안 처리한 다음 상등액을 취하여 48-well multiwell chemotaxis chamber (NeuroProbe Inc, USA)의 아래 well에 28μl 씩 채웠다. 그 위에 pore size 5μm의 polycarbonate filter (NeuroProbe)를 덮고 윗 well에 분리한 사람 호산구를 1x10⁵/ml로 56μl씩 넣은 chamber를 37℃, 5% CO₂ incubator에서 90분간 배양하였다. Top well에서 호산구를 제거한 후 여과막을 Diff-Quik Kit를 사용하여 chemotaxis activity에 의해 여과막으로 이동한 호산구의 수를 400배 현미경으로 계산하였다.

III. 結果

1. 세포 독성 확인

杏仁의 세포 독성을 알아보기 위해 농도별로 처리한 결과 농도에 따른 세포 생존율에 큰 차이가 없는 것으로 보아 A549 cell에 대해 독성은 갖지 않는 것으로 나타났고 본 실험에서 세포 생존율 10%이내의 오차는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보았다 (Fig. 1).

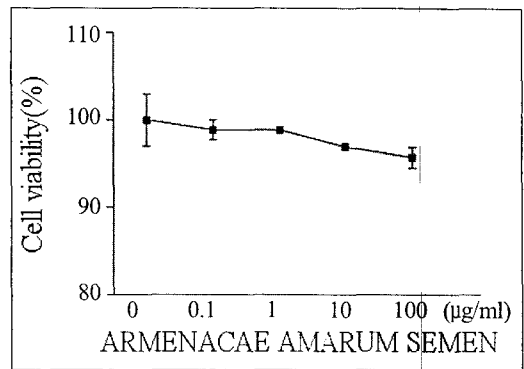


Fig. 1. Identification of A549 cell cytotoxicity for ARMENACAE AMARUM SEMEN.

Each concentration was assayed in triplication and were measured at 490nm using fluorescence microplate reader. Error bar means ±S.E.M.

Table 1. Sequences of Primer Used for Real-Time PCR

Gene	Oligonucleotide sequences
GAPDH	FW 5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3'
	RV 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3'
RANTES	FW 5'-CTG CCT CCC CAT ATT CCT CGG-3'
	RV 5'-GAG TTG ATG TAC TCC CGA ACC C-3'
ICAM-1	FW 5'-TGA GGA GAG ATC ACC ATG GAGC-3'
	RV 5'-GCC AGG GAA CAG ACC ACG GT-3'
VCAM-1	FW 5'-GAG AAC CCA GAT AGA CAG CCC-3'
	RV 5'-TTC ACG AGG CCA CCA CTC ATC-3'
IL-8	FW 5'-ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG-3'
	RV 5'-TGT GTT GGC GCA GTG TGG TC-3'
IL-16	FW 5'-CTC GCT CAA CCT TTC AGA GCT-3'
	RV 5'-GAC ATG GAT GCC GTC TAA TTG C-3'

2. Eotaxin assay 결과

A549 cell을 Th2 계통의 IL-4, TNF- α , IL-1 β cytokine으로 자극한 후杏仁을 농도별로 처리한 결과 10 μ g/ml, 100 μ g/ml에서 eotaxin이 20%만 분비되어 80%의 현저한 감소효과를 나타내었다($p < 0.05$). 세포 독성 실험에서杏仁이 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 것으로 확인했기 때문에 eotaxin에 대한 저해효과가 있는 것으로 판단할 수 있었다(Fig. 2).

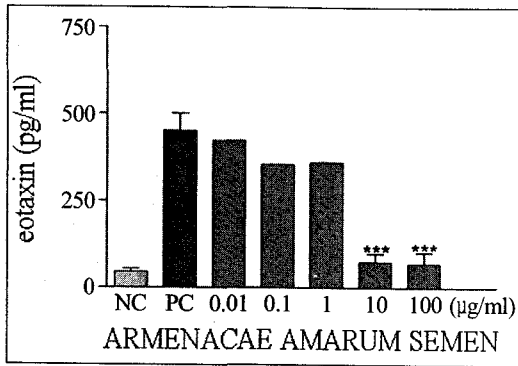


Fig. 2. Cytokine inhibition assay of ARMENIACAE AMARUM SEMEN from stimulated A549 cell.

NC: negative control(only medium)
 PC: positive control(IL-4, IL-1 β , TNF- α stimulated A549 cell)
 The asterisks denotes a significant difference compared with PC group($p < 0.05$).
 Error bar means \pm S.E.M.

3. RT-PCR을 이용한 chemokine 발현량 결과

1) GAPDH

각각의 유전자 발현량을 normalization 하기 위하여 control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 (Ct)값을 기준으로 standard curve를 작성하였다. Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석결과 R^2 는 0.9986으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

2) RANTES

RANTES 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve를 구하였다. Dissociation curve상 확인해 본 결과 nonspecific PCR

product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R^2 는 0.9964으로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의 RANTES 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 표준화 하였다.

杏仁을 0.01 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 μ g/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 RANTES에 대한 mRNA의 발현량이 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도에서 positive control에 비하여 5% 감소하였으나 통계적 유의성은 없는 것으로 나타났다.

3) ICAM-1

ICAM-1 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve를 구하였다. Dissociation curve상 확인한 결과 nonspecific PCR product 나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R^2 는 0.9930으로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의 ICAM-1 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 표준화 하였다.

Chemokine 자극이 유도된 A549 cell에杏仁을 0.01 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 μ g/ml의 세가지 농도로 처리하여 ICAM-1 mRNA 발현량이 positive control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 어느 농도에서도 영향이 없는 것으로 나타났다.

4) VCAM-1

VCAM-1 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve를 구하였다. Dissociation curve상 확인한 결과 nonspecific PCR product 나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R^2 는 0.9960으로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의 VCAM-1 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 표준화 하였다.

Chemokine 자극이 유도된 A549 cell에杏仁을

0.01 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 μ g/ml의 세 가지 농도로 처리하여 VCAM-1에 대한 mRNA 발현량이 positive control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1 μ g/ml과 100 μ g/ml 농도에서 각각 5%, 3.8% 감소하였으나 발현량에는 영향을 없는 것으로 나타났다.

5) IL-8

IL-8 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve를 구하였다. Dissociation curve상 확인한 결과 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형회귀 분석결과 R²는 0.9929으로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의 IL-8 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 표준화 하였다.

Chemokine 자극이 유도된 A549 cell에 썬仁을 0.01 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 μ g/ml의 세 가지 농도로 처리하여 IL-8에 대한 mRNA 발현량이 positive control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1 μ g/ml 농도에서는 10%의 감소를 보였고 100 μ g/ml의 농도에서는 11%로 감소하여 유의성 있는 감소를 보였다 (p<0.05)(Fig. 3).

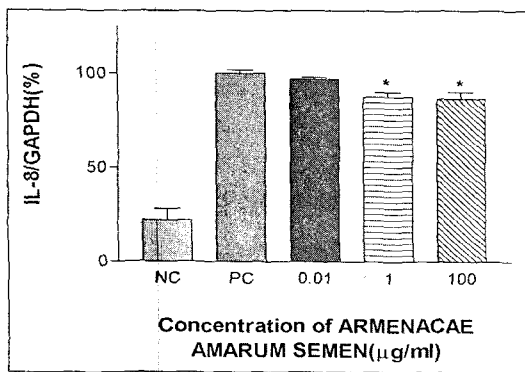


Fig. 3. Expression level of IL-8

NC: negative control(only medium)
 PC: positive control(IL-4, IL-1 β , TNF- α stimulated A549 cell)
 The asterisk denotes a significant difference compared with PC group(p<0.05)
 Error bar means \pm S.E.M.

6) IL-16

IL-16 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve를 구하였다. Dissociation curve상 확인한 결과 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형회귀 분석결과 R²는 0.9934로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의 IL-16 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 표준화 하였다.

Chemokine 자극이 유도된 A549 cell에 썬仁을 0.01 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 μ g/ml의 세 가지 농도로 처리하여 IL-16에 대한 mRNA 발현량이 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 어느 농도에서도 positive control에 비해 감소 효과를 보이지 않았다.

4. 사람 혈액으로부터 호산구의 분리 결과

사람의 혈액으로부터 lymphoprep을 이용하여 2 \times 10⁸개의 lymphocyte를 분리하였고 이를 CD3와 CD16 immunomagnetic bead로 selection하여 1 \times 10⁵개의 호산구를 획득하였다. 이 세포는 Diff-Quick Kit를 이용하여 염색한 후 hemocytometer로 숫자를 확인하였고 purity는 97.2 \pm 0.34%이었으며 trypanblue 염색을 하여 관찰한 결과 생존율은 98.7%였다.

5. 호산구 chemotaxis assay 결과

분리한 호산구를 chemotaxis chamber에 넣고 세포 이동성을 확인하였다. Chemoattractant에 의해 호산구가 투과막상의 구멍(화살표)으로 이동하게 되고 이를 Diff-Quick Kit를 이용하여 염색한 후 현미경으로 관찰한 결과 전한 점으로 보이는 것이 투과막을 통과한 세포이고 희미한 점들은 통과하지 못하고 반대쪽에 비특이적으로 붙어있는 세포를 보여준다. 썬仁 농도가 0.01 μ g/ml과 1 μ g/ml에서는 control에 비해 차이가 없었고 100 μ g/ml에서만 호산구의 이동성이 189 \pm 21개로 유의성(p<0.05)있게 저해되는 것을 알 수 있었다(Table 2, Fig. 4).

Table 2. Cell Counting of Migrated Eosinophils from A549 Cell Monolayers in Response to TNF- α , IL-4 by ARMENIACAE AMARUM SEMEN.

	Migrated Eosinophils per High-Power Field				
	NC	PC	ARMENIACAE AMARUM SEMEN (0.01 μ g/ml)	ARMENIACAE AMARUM SEMEN (1 μ g/ml)	ARMENIACAE AMARUM SEMEN (100 μ g/ml)
TNF- α +IL4	90 \pm 37	296 \pm 19	289 \pm 16	277 \pm 24	189 \pm 21*

Data are presented as mean \pm SEM of cells/high-power field.

NC: negative control(only medium)

PC: positive control(IL-4, IL-1 β , TNF- α stimulated A549 cell)

The asterisk denotes a significant difference compared with PC(p<0.05)

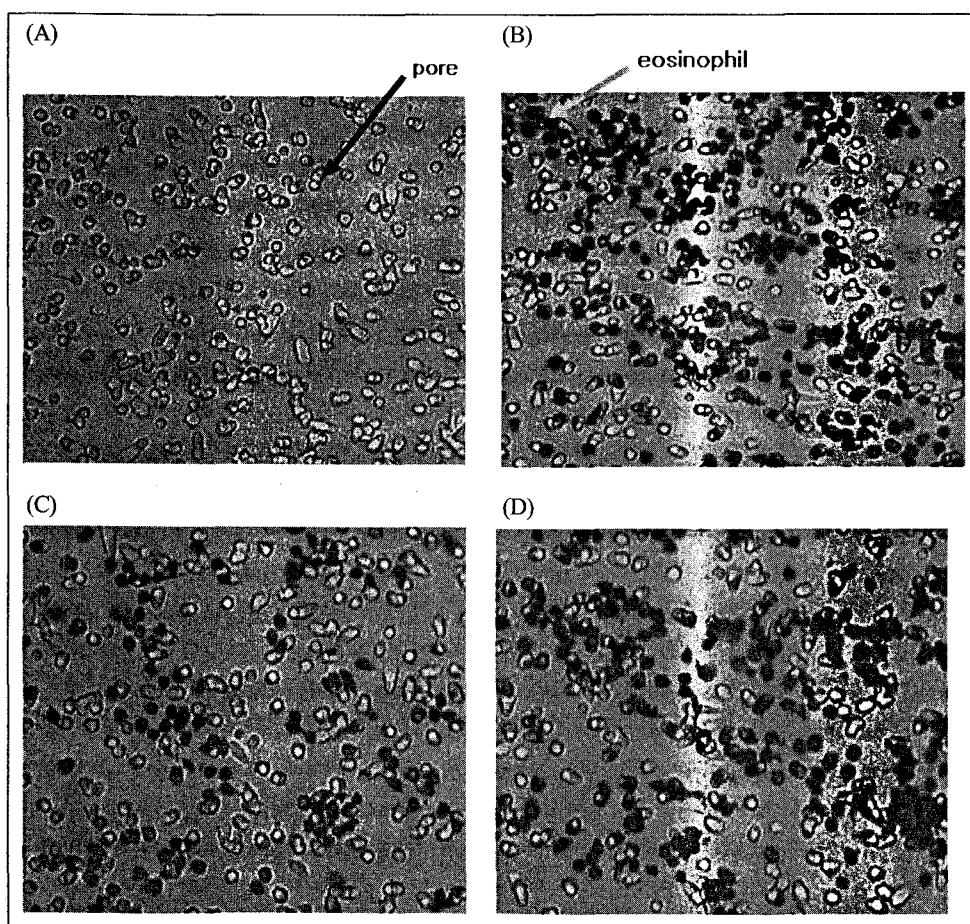


Fig. 4. Cell morphology of eosinophil on polycarbonate filter.

(A) membrane only

(B) eosinophil on the membrane (positive control)

(C) ARMENIACAE AMARUM SEMEN 1 μ g/ml

(D) ARMENIACAE AMARUM SEMEN 100 μ g/ml

IV. 考 察

본 실험에 사용된 A549(alveolar type II epithelial cell line)와 같은 기관지 상피세포는 기계적 장벽으로서 뿐만 아니라 점막섬모 체계를 통해 기도 방어 구조에서 필수적 역할을 하고 있다. 최근 연구에서 상피세포는, 기도 질환의 발병에 중요한 IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, RANTES, eotaxin, IL-16과 같은 cytokine이나 chemokine들을 생산 분비하는 것으로 알려졌다¹⁵.

호산구는 천식에서 기도과민성과 점액 축적을 유발하며, 기도 개형(airway remodelling)에 관여하는 세포들에 대해 결정적인 역할을 한다.

호산구의 부적절한 축적과 호산구에서 분비되는 염증 전구 매개체는 천식 및 다른 알레르기 질환의 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다. 호산구는 특히 천식에서 면역 반응의 조율에 특별한 역할을 한다는 것이 점차 분명해지고 있다. 따라서 호산구가 유발하는 독성을 제한하거나 예방하는 치료법에 관심이 집중되고 있다. 골수로부터 분화되어 나온 후, 선택적으로 혈관내피세포에 유착되고, 내피세포를 통과하여 특정한 화학주성 매개체에 반응하여 조직으로 이동하고, 자연사멸(apoptosis)을 지연시켜 생존기간을 연장하는 등 호산구가 기도주위 조직에 축적되는 기전은 복잡적이다¹⁶.

호산구에서 분비되는 과립형 염증 매개체에는 major basic protein(MBP), eosinophil cationic protein(ECP), eosinophil-derived neurotoxin(EDN), 그리고 eosinophil peroxidase(EPO) 등이 있다. 그 중 MBP는 천식 환자 기도의 상피세포, 점막 및 점막하에 많이 분포되어 있으며, 기도의 상피세포를 파괴하고, 기도과민성을 증가시키고, 호산구의 탈과립을 유도하고, IL-8을 생성시킨다. ECP는 쥐에서 비만세포를 활성화시킨다. EPO는 비만세포를 탈과립시키며, 기도 수축과 과민반응을 일으키고, 호산구 탈과립 작용이 있다. 활성화된 호산구는 arachidonic acid, leukotriene C4(LTC4) 그리고 platelet activating factor(PAF) 등 지질 대사물질을 새로 형성하고 합성한다. LTC4는 강

력한 기도 수축 작용이 있다. PAF는 기도를 수축시키고 기도과민성을 증가시킨다¹⁷.

호산구를 직접적으로 유인하거나 유인을 도와주는 화학주성 활성분자로 PAF, C5a, leukotrien B4(LTB4), LTC4, N-formyl-met-leu-phe(fMLP)등이 있고, cytokine으로는 IL-2, IL-3, IL-5, IL-16, GM-CSF등이 있으며, chemokine으로는 eotaxin, eotaxin-2, MCP(Monocyte chemoattractant proteins)-3, MCP-4, RANTES, MIP(Macrophage inflammatory protein)-1 α , IL-8등이 있다⁵.

杏仁은 장미과 낙엽교목인 살구 및 동속 近緣 식물의 성숙한 과실의 종자로, 杏核仁, 杏子, 木落子, 苦杏仁, 杏梅仁, 話梅 등의 異名이 있으며, 性은 微溫 有小毒하고, 味는 苦微辛하다. 肺經과 大腸經으로 귀경하며, 降氣止咳平喘, 潤腸通便의 효능으로 外感咳嗽, 寒喘, 喘滿, 傷燥咳嗽, 腸燥便秘를 치료한다¹⁰.

본 연구에서는 A549 폐포 상피세포주를 사용하여, 호산구가 기도주위 조직에 축적되는 일련의 과정 중에서 특히 호산구가 혈관내피세포에 유착하는데 중요한 역할을 하는 ICAM-1, VCAM-1 등 세포유착분자와 호산구가 조직으로 이동하는데 중요한 역할을 하는 eotaxin, RANTES, IL-8, IL-16 등 chemokine의 발현을杏仁추출물이 억제할 수 있는지를 관찰하였다.

우선杏仁의 세포독성을 알아보기 위해杏仁추출물을 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도별로 처리한 결과, 농도에 따른 세포생존율에 큰 차이가 없는 것으로 보아杏仁은 폐포 상피세포 A549에 대해 독성을 갖지 않는 것으로 나타났다.

Eotaxin은 CC chemokines에 속하며 최근 Eotaxin-2의 유전자도 분리되었는데, 특정 수용체의 결합능과 기능은 eotaxin과 거의 같은 것으로 알려졌다. 좀 더 최근에는 eotaxin-3가 분리되었는데 eotaxin보다 수용체를 활성화시키는 능력이 10배 이상 약하다¹⁸. Eotaxin은 폐에서의 항원 유발 호산구 반응과 관련되어 있다. 유전적으로 eotaxin-1, 2를 모두 결여시킨 쥐에 천식을 유발시켰을 때 기도나 혈관주위의 호산구 축적이 없는 것으로 보아, 기도 내로 호산구를

유입시키는데 있어서 eotaxin이 결정적 역할을 하는 것으로 보인다⁷. 이러한 호산구 활성화의 분자적 근거는 eotaxin에 특이적 수용체인 CCR-3를 호산구가 발현하는데 있다. CCR-3 mRNA는 천식환자의 기도 생검시 호산구에서 주도적으로 탐지된다. 천식은 기도평활근의 부피가 증가하고 평활근층과 상피세포와의 거리가 감소하는 특징이 있다. 기도평활근 세포의 CCR3 수용체 표현은 천식환자에서 증가되어 있으며 CCR3의 배합체인 eotaxin은 기도 평활근 세포의 이주를 유발한다. 그러므로 eotaxin이 CCR3를 활성화시켜 기도평활근의 부피를 증가시키는 것으로 생각된다. Eotaxin은 호산구가 혈관내피세포와 유착하는 과정에도 관여하는데, eotaxin-1은 혈관내피세포 표면을 구르는(rolling) 호산구를 강하게 결합시킨다¹⁹.

Eotaxin mRNA의 발현은 TNF- α 와 IL-4와 같은 proinflammatory cytokines에 의해서 상피세포와 혈관내피세포에서 유도된다⁷.

Eotaxin의 분비량에 대한 본 실험에서 A549 cell을 Th2 계통의 IL-4, TNF- α , IL-1 β cytokine으로 자극한 후杏仁을 0.01 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도별로 처리한 결과 10 μ g/ml와 100 μ g/ml의 농도에서 positive control에 비해 eotaxin이 20%만 분비되어 80%의 억제효과를 나타냈다(p<0.05).

염증 부위에 호산구 유입시 핵심적 역할을 할 뿐만 아니라 호산구의 염증 유발 기능을 활성화시킴으로써 조직 손상에도 기여하는 eotaxin을杏仁이 유의성있게 억제한다는 본 실험 결과는 천식 치료에 사용되는杏仁의 치료 기전을 설명할 수 있을 뿐만 아니라 임상활용도를 더욱 높이는 데에도 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

Chemokine 중 RANTES는 eotaxin, eotaxin-2, eotaxin-3, IL-8과 마찬가지로 호산구 화학주성인자로 알려졌다. 호산구 모집에 대한 최근의 연구는 eotaxin에 주로 집중되어 있지만, 호산구 모집은 하나의 단일 인자에 의해 일어나는 현상이 아니라 많은 다양한 인자들이 협조하여 이루어진다. IL-5, RANTES, IL-8에 대한 항체가 모두 꽃가루 알레르기 환자의

BALF에서 화학주성 활성을 억제하는 것으로 보아, 이들은 BALF에서 주된 호산구 화학주성인자이며 이러한 cytokine들은 각자의 기능을 발휘하기 위해서 서로 의지하고 있다는 것을 알 수 있다²⁰.

RANTES는 CC chemokine으로 주로 T림프구에 의해 생성되어 단핵구, CD4+, CD5RO+ memory, 호산구에 대해 화학주성 활성을 보유하고 있어서 이들 염증관련 세포의 조직침윤에 기여할 뿐 아니라, 호산구를 활성화시켜 ECP의 분비를 유도하고 respiratory burst도 야기한다. 인체의 순환 혈액내에 있는 호산구는 RANTES에 노출되지 않았던 것으로 보아 RANTES는 염증부위에서만 국소적으로 생산되는 것으로 보인다²¹.

杏仁을 0.01 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 μ g/ml의 세 가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 RANTES에 대한 mRNA의 발현량이 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도에서 positive control에 비하여 5% 감소하였으나 통계적 유의성은 없는 것으로 나타났다.

한약을 이용하여 시행한 RANTES에 대한 실험을 살펴보면 calcium inophore로 처리된 인간비만세포주(HMC-1)에서 地黄平喘湯²²과 白蓮治哮喘湯²³은 농도 의존적으로 RANTES mRNA 발현을 억제하였다.

白蓮治哮喘湯의 구성 약재 중에杏仁 4g이 포함되었으나杏仁을 사용한 본 실험에서는 RANTES 발현에 대한 억제 효과가 없는 것으로 보아 白蓮治哮喘湯의 RANTES 발현 억제 효과는杏仁보다는 다른 약재와 관련이 있는 것으로 생각된다.

세포유착분자는 세포간, 세포-기질간 상호작용을 증대하는 세포표면 수용체로서 염증반응 및 면역학적 반응, 상처치유, 응고, 종양전이, 세포성장 및 분화 등 다양한 병태생리학적 과정에 중요한 역할을 한다⁶. 최근 역동학적 실험모형을 이용한 연구로부터 백혈구의 혈관의 유출기전이 구체적으로 규명되었다. IL-1이나 TNF- α 에 의해 혈관 내피세포가 활성화되면 혈관 내피세포에 E-selectin이나 P-selectin이 발현되어 호산구 표면에 존재하는 L-selectin과 유착하여 제 1단계인 rolling이 일어난다. Rolling 후

호산구 표면의 LFA-1 (lymphocyte function associate antigen-1)이나 MAC-1(Macrophage-1) 등이 혈관내피세포의 ICAM과 유착하거나, 호산구 표면에만 존재하는 VLA-4(very late antigen)가 IL-4에 의해 혈관내피세포에서 생성되는 VCAM과 강하게 유착된다. 이후 주로 ICAM에 의해 transendothelial 이동이 일어나 호산구는 혈관 밖으로 이동하여 결체 조직으로 유입된다²⁴.

杏仁을 0.01 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 μ g/ml의 세 가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 ICAM-1과 VCAM-1에 대한 mRNA 발현량이 positive control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과,杏仁은 ICAM-1과 VCAM-1 모두에서 유의성있는 억제효과를 나타내지 못하였다.

본 실험에서는 호산구가 혈관에서 조직으로 유입되는데 필수적 역할을 하는 ICAM-1과 VCAM-1 발현에 대한杏仁의 억제효과를 관찰하고자 하였으나, positive control에 비해杏仁 1 μ g/ml에서 VCAM-1 5%, 100 μ g/ml에서 VCAM-1 3.8%의 감소를 보였을 뿐 억제효과는 유의성이 없었다. 세포유착분자와 관련된 연구로 정 등²⁵은 金銀花 100 μ g/ml에서 ICAM-1 발현량 25.5% 억제효과를 보고하였고, 문 등²⁶은 牡丹皮 100 μ g/ml에서 ICAM-1 발현량 11.5%, VCAM-1 발현량 13.5% 억제효과를 보고하였으나,杏仁은 호산구가 혈액에서 조직으로 이동하는데 관여하는 유착분자의 발현에는 영향을 미치지 못하는 것으로 관찰되었다.

IL-8은 CXC chemokine으로 분류되며 주로 호중구에 작용하지만 호산구에는 특정한 상황에서 선택적으로 작용한다. IL-8은 안정상태의 비활성 호산구에는 영향을 미치지 못하고 활성화된 상태의 호산구에만 작용한다⁸. IL-8은 IL-5로 전 처리하여 활성화된 호산구에서 칼슘의 세포내 증가, actin의 중합화, 화학주성을 나타내기 때문에, 역시 이러한 cytokine들이 병존하는 알레르기 염증이 존재하는 질병상태에서 호산구에 작용할 수 있음을 시사한다⁵.

Chemokine 수용체는 어떤 종류의 chemokine과 결합하는가에 따라 CCR 또는 CXCR로 명명된다.

CXC 수용체 중 IL-8에 대한 수용체인 CXCR-2가 활성화된 호산구에서 발견되었다. 혈관내피세포를 따라 rolling하는 호산구에 대해 IL-8은 일시적인 결합을 유도하고, 이어서 eotaxin이 작용하여 강력한 고 장기적인 결합이 이루어진다²⁷.

杏仁을 0.01 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 μ g/ml의 세 가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 IL-8에 대한 mRNA 발현량이 positive control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1 μ g/ml 농도에서는 10%의 감소효과를 보였고 100 μ g/ml의 농도에서는 11%의 감소효과를 보여 유의성있는 억제를 보였다($p < 0.05$).

한약을 이용하여 시행한 IL-8에 대한 실험을 살펴보면 calcium inophore로 처리된 인간비만세포주(HMC-1)에서 地黃平喘湯²²과 白蓮治哮喘湯²³은 농도의존적으로 IL-8 mRNA 발현을 억제하였다. 또한 TNF- α 로 처리된 기관지상피세포주(BEAS-2B)에서 小青龍湯²⁸과 瀉白散²⁹도 IL-8 mRNA의 발현을 유의성있게 억제하였다. 白蓮治哮喘湯의 구성 약재 중에 본 실험에서 사용된 약재인杏仁 4g이 포함되어있으며, 본 실험에서도杏仁이 IL-8 mRNA 발현을 억제하는 것으로 나타나 유사한 결과를 얻었다.

IL-16은 CD4+T cell과 CD4-bearing 호산구에 대해 매우 강력한 화학주성인자로서, 호산구가 세포외 기질 구성요소를 통과하여 이동하는데 강력한 촉진 작용을 한다¹². IL-16은 T 세포, B 세포, 수지상 세포, 호산구, 비만세포, 상피세포에서 생산되며, 천식의 병태생리에 관여하는 것으로 생각된다. 실제로 IL-16의 표현은 천식환자의 기관지 생검에서 증가되어 있으며, 천식환자의 기도 상피를 침윤한 CD4+세포의 수와 비례한다. 더욱이 항원 유발 검사는 기도에서 IL-16의 표현을 증가시키며 BALF에서도 IL-16의 분비를 증가시킨다. CD4는 IL-16에 대한 신호 전달 수용체의 역할을 하며, CD4의 발현이 림프구에 대한 IL-16의 작용을 매개하는데 필요하다³⁰.

杏仁을 0.01 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 μ g/ml의 세 가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 IL-16에 대한 mRNA 발현량이

positive control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 어느 농도에서도 positive control에 비해 감소 효과를 보이지 않았다.

IL-16과 관련하여 TNF- α 로 처리된 BEAS-2B 기관지상피세포에 水蛭(麻黃炒)³¹, 桔梗³², 麥門冬³³을 처리하여 IL-16 mRNA의 발현을 유의하게 억제하였다는 보고가 있었다.

호산구 chemotaxis assay 결과杏仁 100 μ g/ml에서 호산구의 이동성이 positive control 296 \pm 19 개에 비해 189 \pm 21 개로 유의성(p<0.05)있게 저해되는 것을 확인하였다. 따라서杏仁은 호산구의 이동을 억제하는 효과가 있으며, 본 연구의 결과 이 기전은杏仁이 호산구 화학주성 chemokine인 eotaxin의 분비와 IL-8의 발현을 억제하기 때문인 것으로 생각된다.

V. 結 論

杏仁이 A549 human alveolar epithelial cell에서 발현하는 eotaxin, RANTES, ICAM-1, VCAM-1, IL-8, IL-16과 같은 chemokine에 미치는 영향을 알아보기 위해 sandwich ELISA, RT-PCR을 이용하여 chemokine 저해 효과에 대한 실험을 실시하였고, 호산구에 미치는 영향을 알아보기 위해 chemotaxis assay를 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. A549 인간 폐포 상피세포에 대한杏仁의 세포독성을 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도 별로 관찰한 결과 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.
- 2.杏仁 0.01 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도로 처리한 결과 eotaxin의 분비량이 10 μ g/ml와 100 μ g/ml의 농도에서 20%로 감소(80% 억제)되어 유의하게 억제되는 것을 확인하였다(p<0.05).
- 3.杏仁은 RANTES, ICAM-1, VCAM-1, IL-16 mRNA에 대한 억제효과는 없었으나,杏仁 1 μ g/ml와 100 μ g/ml 농도에서 IL-8 mRNA의 발현을 각각 10%, 11% 억제하였다(p<0.05).
4. 호산구를 이용하여 chemotaxis assay를 실시한

결과杏仁 100 μ g/ml 농도에서 유의성있는 감소를 나타내어 고농도杏仁의 chemoattractant에 대한 억제 효과를 확인하였다(p<0.05).

杏仁은 호산구 화학주성 chemokine 중 eotaxin과 IL-8에 대한 억제효과가 있으며, 이 효과는 호산구의 이동을 억제하는 결과를 보였다.

參考文獻

1. 전국한의과대학폐계내과학교실 편저. 동의폐계내과학. 서울: 도서출판 국진; 2004, p.192-9, 320-31.
2. National Asthma Education and Prevention Program: Expert Panel Report 2. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. NIH Publication No. 97-4051. Bethesda, Md: National Institutes of Health; 1997, p.3.
3. Rothenberg ME. Eosinophilia. N Engl J Med. 1998;338:1592-600.
4. Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. Clin Exp Allergy. 2000; 30(suppl.1):22-7.
5. 정일엽, 박춘식. 호산구와 관련된 chemokine에 대한 새로운 조명. 천식 및 알레르기. 2001;21(2):161-72.
6. 이양근. 알레르기 질환에서의 유착분자. 중앙의학. 1995;60(7):568-72.
7. Pope SM, Zimmermann N, Stringer KF, Karow ML, Rothenberg ME. The Eotaxin Chemokines and CCR3 Are Fundamental Regulators of Allergen-Induced Pulmonary Eosinophilia. J Immunol. 2005;175(8):5341-50.
8. Schweizer RC, Welmers BA, Raaijmakers JA, Zanen P, Lammers JW, Koenderman L. RANTES- and interleukin-8-induced responses in normal human eosinophils: effects of priming with interleukin-5. Blood. 1994;83(12):3697-704.

9. Ferland C, Flamand N, Davoine F, Chakir J, Laviolette M. IL-16 activates plasminogen-plasmin system and promotes human eosinophil migration into extracellular matrix via CCR3-chemokine-mediated signaling and by modulating CD4 eosinophil expression. *J Immunol.* 2004;173(7):4417-24.
10. 新文豊出版公司 편. 신편 중약대사전. 재판. 대북: 新文豊出版公司; 1985, p.898-900.
11. 정현우, 문한주. 황기와 행인이 면역세포의 Apoptosis 및 Nitric Oxide에 미치는 효과. *방제학회지.* 1998;6(1):175-86.
12. 정욱, 정희재, 정승기, 이형구. 행인과 길경이 Asthma model 내의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 영향. *대한한방내과학회지.* 2000;21(1):31-8.
13. 황대룡, 강영성, 김성수, 김대한, 신민교, 송호준. 행인의 알레르기 천식 효과에 대한 연구. *대한본초학회지.* 2003;18(2):201-8.
14. 이영자, 신조영. 행인반하탕이 GUINEA PIG의 기관지평활근에 미치는 영향. *대한한방내과학회지.* 1992;13(1):124-34.
15. Takizawa H. Bronchial epithelial cells in allergic reactions. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4(3):305-11.
16. Walsh GM, Al-Rabia M, Blaylock MG, Sexton DW, Duncan CJ, Lawrie A. Control of eosinophil toxicity in the lung. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4(4):481-6.
17. 이양근. 호산구와 천식. *결핵 및 호흡기질환.* 1999;46(1):5-16.
18. Kitaura M, Suzuki N, Imai T, Takagi S, Suzuki R, Nakajima T et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine (Eotaxin-3) that is a functional ligand of CC chemokine receptor 3. *J Biol Chem.* 1999;274(39):27975-80.
19. Ulfman LH, Alblas J, van Aalst CW, Zwaginga JJ, Koenderman L. Differences in Potency of CXC Chemokine Ligand 8-, CC Chemokine Ligand 11-, and C5a-Induced Modulation of Integrin Function on Human Eosinophils. *J Immunol.* 2005;175(9):6092-9.
20. Lampinen M, Carlson M, Hakansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy.* 2004;59(8):793-805.
21. Erger R, Casale TB. Interleukin-8 is a potent mediator of eosinophil chemotaxis through endothelium and epithelium. *Am J Physiol* 1995;268:117-22.
22. 이경기, 정희재, 이형구, 정승기. 사람 비만細胞 膜에서의 케모카인에 對한 地黃平喘湯의 效果. *대한한방내과학회지.* 2002;23(3):375-85.
23. 이형철, 정희재, 이형구, 정승기. 사람 Mast cell 에서의 케모카인에 對한 白蓮治哮喘湯의 效果. *대한한방내과학회지.* 2004;25(4-2):356-63.
24. Lebedeva T, Dustin ML, Sykulev Y. ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(3):251-8.
25. 정광진, 정희재, 정승기, 이형구. 금은화가 천식 유발 cytokine 분비화 호산구 chemotaxis에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2005;26(1):129-42.
26. 문성훈, 정희재, 정승기, 이형구. 목단피가 천식 유발 cytokine 분비화 호산구 chemotaxis에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2005;26(1):199-212.
27. Ulfman LH, Alblas J, van Aalst CW, Zwaginga JJ, Koenderman L. Differences in Potency of CXC Chemokine Ligand 8-, CC Chemokine Ligand 11-, and C5a-Induced Modulation of Integrin Function on Human Eosinophils. *J Immunol.* 2005;175(9):6092-9.
28. 정진용, 정희재, 정승기, 이형구. 小青龍湯과 小青龍湯加沙參이 BEAS-2B 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. *대한한방학회지.* 2003;24(1):74-83.
29. 정광진, 정희재, 정승기, 이형구. 瀉白散과 瀉白

- 散加沙蔘이 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF 발현에 미치는 영향. 대한한방내과 학회지. 2002;23(1):15-24.
30. Lynch EA, Heijens CA, Horst NF, Center DM, Cruikshank WW. Cutting edge: IL-16/CD4 preferentially induces Th1 cell migration: requirement of CCR5. *J Immunol.* 2003;171(10):4965-8.
31. 한동하, 정희재, 정승기, 이형구. 천사군자탕과 수질(마황초)가 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;22(4):604-12.
32. 박상현, 정희재, 정승기, 이형구. 麻杏甘石湯과 桔梗이 인간기관지 상피세포의 Cytokine에 미치는 영향. *경희의학.* 2001;17(2):230-41.
33. 정해준, 정희재, 정승기, 이형구. 麥門冬清肺飲과 麥門冬이 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. 대한한의 학회지 2002;23(1):11-23.