大田大學校 韓醫學硏究所 論文集
第17卷 第2號 2008年 12月 31日

淸蒸補肺湯의 免疫調節能을 통한 抗喘息 效能

박종광·최학주·김선빈·김동희*

Immunological Modulation Mechanism of Chungzeungbopyetang(CBPT) in Asthma Induced Animal Model

Park Jong-Kwang, Choi Hak-Joo, Gim Seon-Bin, Kim Dong-Hee
Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

In order to validate the objective efficacy of CBPT on anti-asthma and to develop effective therapeutics for asthma treatments, immunological modulatory mechanism was studied using animal model using OVA-Alum. The results are listed below.

When treated with CBPT, survival rate of hFCs at 250 ug/ml was above 90%. AST and ALT, indicators of liver function measurements were in the normal range.

Compared to the control group, CBPT treated group showed significant reduction in liver weights at both 400 and 200 mg/kg, and significant decrease of total liver cells at 400 mg/kg.

Significant increase in CD4+ and CD8+ cells in DLN was observed in the CBPT treated group. Slight increase in CD3+, CD4+/CD25+ cells were also observed. On the other hand, CBPT significantly reduced the CD3+/CD69+ cell numbers at both concentrations. Slight decrease of CD19+ cells was also observed.

CBPT significantly reduced the CD3e+/CD69+, CCR3+ and CD11b+/Gr-1+ cells in lung tissues at both doses. However, significant decrease of CD3e+ and B220+/IgE+ cells was only observed at 400 mg/kg dosed group.

The results above strongly suggest the anti-asthmatic effect of CBPT through immunological modulation. By using various concentrations of CBPT, broader clinical applications of CBPT on anti-asthmatic treatment can be developed. The EBM database should provide valuable information in the development of drugs for asthma treatments.

Key words : Chungzeungbopyetang, anti-asthma, immunological modulation.

I. 緖 論

기관지천식은 만성기관지염 또는 폐기종과 함께 肺塞性 장해를 공통 특징으로 하는 질환으로[1-4], 인구의 5%에 해당하는 유병율이 보고되고 있으며, 이로 인한 의료비 지출은 커다란 사회 문제가 되고 있다[5].

기관지천식은 항원의 인식 또는 감작으로부터

* 대전대학교 한의과대학 병리학교실
· 교신저자 : 김동희 · E-mail : dhkim@dju.kr

IgE 항체 생산, 흡입 항원에 대한 알레르기 반응, 화학매개체, 사이토카인의 유리 그리고 만성 기도 염증과 기도 민감성 항진으로부터 천식 발작이라는 복잡한 과정으로 인하여 각각 이들 인자들의 차단에 관여하는 약물이 다양하게 연구 개발되고 있다[6-12].

韓醫學에서 喘息은 肺의 宣發·肅降 기능 실조로 나타나는 일련의 증상으로, 咳喘, 喘促, 咳嗽, 喘咳 및 哮喘 등이 喘息의 범주로 해석되고 있으나[13-17], 이 중 '哮喘'이 가장 근접한 개념으로 인식되고 있다. 『內經』[18]에서도 喘息, 喘呼, 喘鳴, 喘逆, 喘咳 등 다양한 유관적 기술이 있고, 『金匱要略 痰飮咳嗽病篇』[19]에서는 "膈上痰病 滿喘咳吐 發則寒熱 背痛腰疼 …必有伏飮"이라 하여 伏痰이 哮喘의 원인이며, 寒熱이 유발 인자임을 설명하였다. ≪巢氏諸病源候論≫[20]에서는 "隨嗽動息呼吸有聲爲之呻嗽"라 하여 哮喘의 증상을 기술하였고, 『景岳全書·喘促』[21]에서는 기존의 이론을 종합하여 '哮喘'의 병인과 치료법을 비교적 자세하게 제시하였다. 특히 "喘有夙根, 遇寒卽發或遇怒卽發者 亦名哮喘"이라 하여 '夙根'이라는 유전적인 인자에 대하여 언급한 바가 있다.

이에 대한 치법은 타 질환과 동일하게 虛實 辨證에 따라 치료가 이루어지는데, 虛證에는 肺의 宣發·肅降 기능을 증진시키는 補肺法과 腎의 納氣 작용을 조절하는 益腎補精法이, 實證에는 祛風寒, 淸熱, 溫肺, 化痰 및 降氣法이 기본 치법으로 이루어지고 있다[13-17].

최근 이와 관련된 실험 및 임상 보고가 다양하게 이루어지고 있는데, 단일 약물로는 杏仁 등 주로 肺經에 입하여 폐의 기능 실조를 조절하는 약물 중심으로 항염증 및 항천식 효능에 대한 검색[22-25]이 이루어졌다. 처방에 대한 검색은 임상 방을 중심으로 본 실험과 동일한 동물 병태를 이용하여 각종 관련 면역세포, 사이토카인 및 조직학적 변화 등 주로 면역 조절능에 관한 연구[26-29]가 보고되었다.

淸蒸補肺湯은 滋陰淸熱, 宣肺平喘 효능으로 급만성 咳嗽, 喘息 증상과 더불어 부인과 영역에서는 산후 骨蒸, 咳嗽 증상에 활용되는 처방이다[30]. 攻補兼法의 약물로 구성되어 肺氣陰虛, 虛熱上炎으로 인한 호흡기 증상에 응용되는 처방으로, 구성 약물 중 黃芪[31], 知母[32], 桔梗[33] 등은 염증 및 천식 관련 인자를 중심으로 연구가 보고된 바가 있으나, 본 처방에 대한 실험 및 임상 연구는 보고된 바가 없다.

이에 본 연구에서는 임상 활용 처방인 淸蒸補肺湯의 객관적인 효능 검증과 더불어 보다 유효한 항천식 치료제 개발을 위하여 OVA-Alum을 이용한 천식 모델의 DLN (Draining lymph nodes)과 폐 조직 내 면역세포 변화를 검색하였다.

Ⅱ. 實 驗

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 淸蒸補肺湯 (Cheongzeungbopyetang 이하 CBPT)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였다.

Table 1. The Prescription of CBPT

韓 藥 名	生 藥 名	用 量(g)
黃 芪	Astragali Radix	20
鱉 甲	Carapax Amydae	20
天門冬	Asparagi Tuber	20
地骨皮	Licii Radicis Cortex	10
秦 艽	Gentianae Macrophyllae	10
白茯苓	Poria	10
柴 胡	Bupleuri Radix	10
知 母	Anemarrhenae Rhizoma	10
半 夏	Pinelliae Tuber	10
生地黃	Rhemaniae Radix	10
白芍藥	Paeoniae Radix	10
桑白皮	Mori Radicis Cortex	10
甘 草	Glycyrrhizae Radix	10
人 蔘	Ginseng Radix	5.6
桔 梗	Platycodi Radix	5.6
桂 皮	Cinnamomi Cortex	5.6
生 薑	Zingiberis Siccatum Rhizoma	4
總 量		176.8

2) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 18~25 g의 웅성인 BALB/c 생쥐를 코아텍 (수원. Korea)으로부터 공급받아, 실험 당일까지 고형 사료 [(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4%이상 (삼양사 Co., Korean)]와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃, 상대 습도 50 ± 10%, 조명 시간 12시간 (07:00~19:00), 조도 150~300 Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약은 DNase type Ⅰ, aluminum potassium sulfate (Alum), chicken egg ovalbumin (OVA., Grade IV), 3-(4, 5-dimethylthiazo l-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), cyclosporine A, methacholine, collagenase RBC lysis solution, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehy-de, RPMI-1640 배양액은 Sigma사 (USA) 제품을, fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone사 (USA) 제품을, anti-CD3e-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluores-cein isothiocyanate), anti-Gr1-PE, anti-CD8-FITC, anti -CD25+ -PE, anti-B220-PE, anti-CD11b-FITC, anti-IgE-FITC anti-CCR3-PE, anti -CD69-FITC, propidium iodide (PI)와 RNase는 Pharmingen사 (USA) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

기기는 열탕추출기 (대웅 Co., Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), chemical balance (Cas Co., Korea), CO2 incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo Co., Japan), micro-pipet (Gilson Co., France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimazue Co., Japan), centrifuge (Sigma Co., USA), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), chemical balance (Cas Co., Korea), homogenizer (OMNI Co., USA), plate shaker (Lab-Line Co., USA) 및 ELISA reader (Molecular Devices Co., USA), flow cytometry (Becton Dickinson Co., USA) 등을 사용하였다.

3. 방법

1) 추출물 분리

CBPT 2첩 분량을 각각 증류수 1, 500 ㎖를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하였다. 추출액을 흡입 여과한 후 감압 증류장치 (Buchi B-480 Co., Switzerland)로 농축하고, 다시 동결 건조기 (EYELA FDU -540 Co., Japan)를 이용하여 21.5 g의 분말을 얻었다. 완전 건조한 CBPT을 냉동 (-80℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) In vitro

(1) 세포독성 측정

음경 표피 조직을 cool D-PBS로 3회 세척하여 작은 조각으로 절단한 후, conical tube (15 ㎖)에 넣어 1, 400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 버리고 tube에 RPMI 1640 {containing collagenase A (5 ㎎/㎖, BM, Indianapoilis, IN, USA)와 DNase type (0.15 ㎎/㎖, Sigma. Co., USA.), antibiotics (penicillinm 104 U/㎖, streptomycin 10 ㎎/㎖, amphotericin B 25 ㎍/㎖)}를 넣고 37℃ CO2 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하여 30 분간 배양하고, 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1, 500 rpm에서 세척한 후 RPMI1640-10% FBS를 가하여 1주일 동안 배양하였다. 이를 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 분리하여 연속

으로 1주일씩 3회 반복하여 살아있는 부착세포를 RPMI1640-10% FBS 배양액에서 배양하였다. 세포독성 측정은 MTT assay로 하였다. 배양한 human fibroblast cells을 96 well plate에 2×104 cell 씩 분주하여 배양하고, 24시간 후 CBPT를 31.25, 62.5, 125, 250, 500 ㎍/㎖ 농도로 각각 투여하였다. 다시 48시간 배양 후 부유액을 제거하고, 각 well에 MTT solution을 5 ㎎/㎖ 씩 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 부유액을 제거하고 각 well에 100 ㎕의 DMSO를 첨가하여 37℃ CO2 배양기에서 30분 동안 반응 시킨 후 ELISA reader를 사용하여 wave length 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

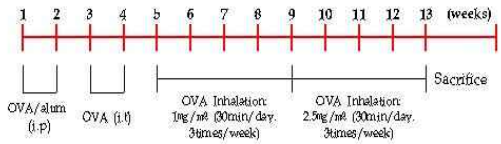
(2) 간 기능 측정

실험 종료 후 심장 채혈을 통해 혈액을 취하였다. 혈액을 4, 000rpm에서 20분간 원심분리한 후 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청에서 AST, ALT를 생화학 분석기기를 이용하여 측정하였다.

3) In vivo

(1) 기관지 천식 생쥐 모델

500 ㎍/㎖의 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma. Co., USA)를 PBS로 용해한 후 혼합하였다. 이 혼합물을 10 N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750 x g 에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심 분리한 OVA/ Alum 침전물을 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후, 100 ㎍ OVA를 0.2 ㎖로 조정하여 1, 2주에 복강 내로 주사 (i.p)하여 전신 감작시켰다. 이 후 3, 4주에 생쥐를 마취한 후 난알부민 (500 ㎍/㎖) 100 ㎕를 기도 투여 (i.t)하였다. 5주부터 8주 까지는 분무기를 이용하여 1 ㎎/㎖을, 9주째부터 12주째까지는 2.5 ㎎/㎖ 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3 회씩 8주 동안 비강 및 기도내로 흡입시켰다 (Scheme 1).



Scheme 1. OVA-induce asthma mouse model

(2) 약물 투여

OVA/Alum로 전신 감작 시킨 후 5주째부터 CBPT (400, 200 ㎎/㎏)을 일주일에 6회 경구 투여 하였다. 대조군에는 증류수를 동량 경구 투여하였다.

(3) 혈액 분리

실험 종료 후 ethyl ether로 마취한 상태에서 혈액을 심장 채혈법으로 포집하고, 4, 000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 혈청을 얻어 -80℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 혈액 성분과 효소들의 활성도 측정은 생화학 분석기를 이용하여 측정하였다.

(4) 폐 무게 측정

총 폐의 무게는 폐를 모두 절취한 후 페이퍼 타올을 이용하여 물기를 없앤 다음 0.01 g 까지 측정 가능한 chemical balance 로 측정하였다.

(5) 폐, DLN 세포 분리 및 총세포수 측정

잘게 절편한 폐 조직을 2% FBS가 포함된 RPMI 1640 배양액에 넣어 1500 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 버렸다. 이를 다시 5 ㎖의 RPMI1640 배양액에 현탁한 다음 50 ㎕의 collagenase IV (100 ㎍/㎖)를 가한 후 37oC shaking 배양기에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후 2분간 방치하고 상층액을 분리하여 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배양액에 세포를 포집하였다. 이를 5회 반복하여 폐 세포를 분리한 후 이를 배지로 세척하고 0.04% trypan blue로 염색하여 총 폐 세포수를 측정하였다. DLN 세포는 목부위에서 적출한 후 mesh를 이용하여 분리하였다. 분리한 세포에 ACK 용액 (8.3 g NH4Cl, 1 g KHCO3, in 1L of demineralized

water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시켰다. D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색하여 세포수를 측정하였다.

(6) 유세포 분석

폐 세포를 5 x 105 세포수로 조정한 후 4℃에서 면역 형광염색 을 실시하였다. 각각에 anti-CD3e-PE, anti-CD4-FITC, anti-Gr1-PE, anti-CD8-FITC, anti-B220-PE, anti-CD11b -FITC, anti-IgE-FITC anti-CCR3-PE, anti-CD69-FITC, anti-CD25+ -PE를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3e+, CD4+, CD8+, CD3e+/CD69+, B220+/IgE+, CCR3+, CD11b+/Gr-1+, CD4+/CD25+를 측정하여 세포수를 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대세포수 (absolute number)를 산출하였다.

(7) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과를 ANOVA (JAVA, Bonferroni Ver 1.1)로 분석하여 p값을 구하였다. 각 대조군을 정상군과, 실험군을 대조군과 비교하여 $p<0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 成 績

1. 안전성 검사

1) 세포독성에 미치는 영향

hFCs에 대한 세포독성에서는 대조군의 세포생존율이 100 ± 0.4%에 비하여, CBPT의 31.25, 62.5, 125, 250, 500 ㎍/㎖ 농도에서는 각각 100.3 ± 2.1, 97.6 ± 1.9, 94.4 ± 2.4, 92.7 ± 2.7, 84.5 ± 3.8 (%)로 나타났다 (Fig. 1).

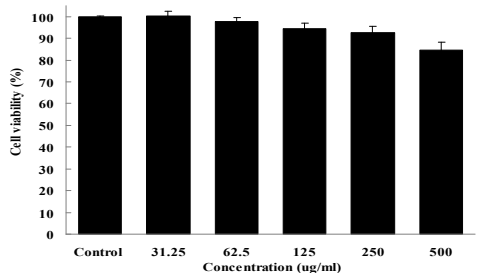


Fig. 1. Cytotoxity of CBPT on Human Fibroblast Cells (hFCs) Human fibroblast cells (hFCs) were treated with various concentration (31.25, 62.5, 125, 250, 500 ㎍/㎖) of the CBPT extract.

2) 간 독성에 미치는 영향

간 기능 측정의 지표 성분인 AST는 정상군, 대조군, CBPT 400 투여군, CBPT 200 투여군이 각각 88.2 ± 3.9 I.U/L, 114.6 ± 1.6 I.U/L, 103.3 ± 14.0I.U/L, 그리고 109.9 ± 9.2 I.U/L로 나타났으며, ALT는 각각 32.5 ± 3.0 I.U/L, 46.7 ± 5.7 I.U/L, 45.5 ± 1.8 I.U/L, 44.4 ± 6.6 I.U/L로 나타났다 (Fig. 2).

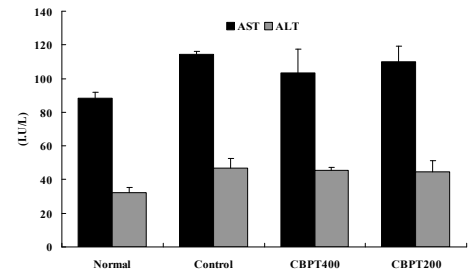


Fig. 2. Effect of CBPT on the AST and ALT in OVA-induced asthma mice. BALb/c mice were injected, inhaled and sprayed (3 times a week/for 8 weeks) with OVA for 12 weeks. Two treatment groups were treated with CBPT (400, 200 ㎎/㎏) for the 8 weeks (6 times /week). Normal : Normal BALb/c mice. Control : OVA-induced asthma model mice. CBPT 400, CBPT 200 : OVA inhalation and oral administration of CBPT 400 ㎎/㎏ and 200 ㎎/㎏. Values represent the means ± SD.

2. 폐 무게에 미치는 영향

OVA/Alum으로 유발한 기관지 천식 동물 모델에서 폐 무게를 측정한 결과, 정상군은 0.18 ± 0.01 g으로 나타난 반면, 대조군은 0.37 ± 0.01 g으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있게 (+ p<0.05) 증가하였다. CBPT 400, CBPT 200 투여군에서는 각각 0.21 ± 0.01 g과 0.26 ± 0.01 g으로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 (*p<0.05) 감소를 나타내었다 (Fig. 3).

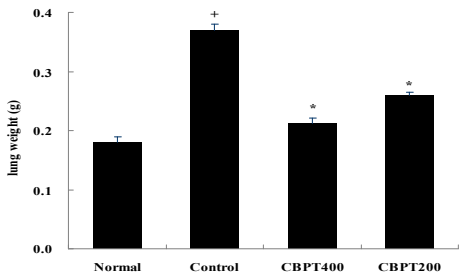


Fig. 3. Effect of CBPT extract on lung weight in OVA-induced asthma mice. BALb/c mice were injected, inhaled and sprayed with sprayed (3 times a week/for 8 weeks) with OVA for 12 weeks. Two treatment groups were treated with CBPT (400, 200 ㎎/㎏) for the 8 weeks (6 times /week). At the end of the total experimental procedure, the mice lungs were taken out and weighted. Normal : Normal BALb/c mice. Control : OVA-induced asthma model mice. CBPT 400, CBPT 200 : OVA inhalation and oral administration of CBPT 400 ㎎/㎏ and 200 ㎎/㎏. Values represent the means ± SD. +: P<0.05 compared with normal group. *: P<0.05 compared with control group.

3. Lung 총 세포수에 미치는 영향

폐 조직에서 분리한 총 세포수는 정상군은 1.86 ± 0.38 (x106), 대조군은 5.8 ± 0.32 (x106)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있게 (++: P<0.01) 증가하였다. CBPT 400, CBPT 200 투여군은 각각 3.91 ± 0.33 (x106), 4.75 ± 0.73 (x106)로 나타나 CBPT 400 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (*: P<0.05) 감소를 나타내었다 (Fig. 4).

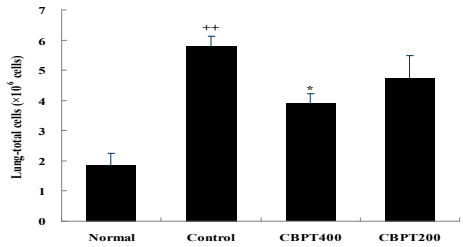


Fig. 4. The number of CBPT on total cells of lung tissue in OVA- induced asthmatic mice. BALb/c mice were injected, inhaled and sprayed with sprayed (3 times a week/for 8 weeks) with OVA for 12 weeks. Two treatment groups were treated with CBPT (400, 200 ㎎/㎏) for the 8 weeks (6 times /week). At the end of the total experimental procedure, the mice lungs were taken out, chopped and disposed with collagenase. And then the total number of lung cells was calculated. Normal : Normal BALb/c mice. Control : OVA-induced asthma model mice. CBPT 400, CBPT 200 : OVA inhalation and oral administration of CBPT 400 ㎎/㎏ and 200 ㎎/㎏. Values represent the means ± SD. ++: P<0.01 compared with normal group. *: P<0.05 compared with control group.

4. DLN 면역 세포에 미치는 영향

1) CD19+ 세포에 미치는 영향

CD19+ 세포수는 정상군은 7.9 ± 0.6 (x104), 대조군은 9.7 ± 0.2 (x104)로 나타났고, CBPT 400 투여군은 8.1 ± 1.3 (x104), CBPT 200 투여군은 8.9 ± 2.4 (x104)로 나타나 모두 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 5).

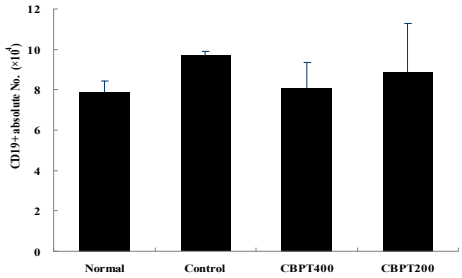


Fig. 5. Effect of CBPT on the CD19+ absolute No. of DLN in OVA-induced asthma mice. BALb/c mice were injected, inhaled and sprayed (3 times a week/for 8 weeks) with OVA for 12 weeks. Two treatment groups were treated with CBPT 400 ㎎/㎏ and CBPT 200 ㎎/㎏ for the 8 weeks (6 times a week). The cell population were analyzed by cell cytometery. Normal : Normal BALb/c mice. Control : OVA-induced asthma model mice. CBPT 400, CBPT 200 : OVA inhalation and oral administration of CBPT 400 ㎎/㎏ and 200 ㎎/㎏. Values represent the means ± SD.

2) CD3e+ 세포에 미치는 영향

CD3e+ 세포수는 정상군은 27.8 ± 0.9 (x104)로 나타난 반면, 대조군은 23.6 ± 1.4 (x104)로 나타나 정상군에 비하여 감소를 나타냈다. CBPT 400, CBPT 200 투여군은 각각 26.3 ± 3.6 (x104), 24.9 ± 1.5 (x104)로 나타나 대조군에 비하여 증가 하였다 (Fig. 6).

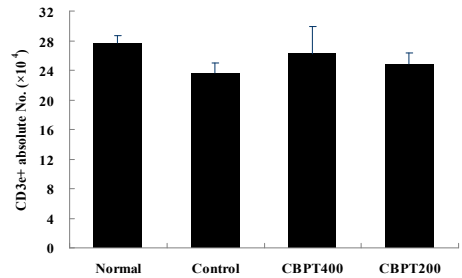


Fig. 6. Effect of CBPT on the CD3e+ absolute No. of DLN in OVA- induced asthma mice. Normal : Normal BALb/c mice. Control : OVA-induced asthma model mice. CBPT 400, CBPT 200 : OVA inhalation and oral administration of CBPT 400 ㎎/㎏ and 200 ㎎/㎏. Values represent the means ± SD.

3) CD4+ 세포에 미치는 영향

CD4+ 세포수는 정상군은 13.2 ± 0.4 (x104)로 나타난 반면, 대조군은 9.3 ± 0.1 (x104)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (++: P<0.01) 감소를 나타냈다. CBPT 400, CBPT 200 투여군은 각각 14.1 ± 1.6 (x104), 15.5 ± 3.9 (x104)로 나타나 CBPT 400 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 (**: P<0.01) 증가하였다 (Fig. 7).

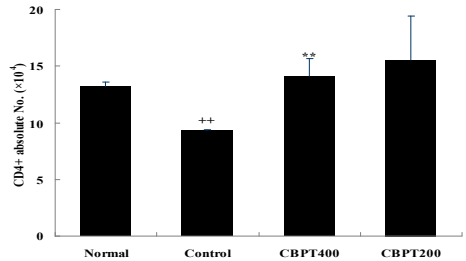


Fig. 7. Effect of CBPT on the CD4+ absolute No. of DLN in OVA- induced asthma mice. Normal : Normal BALb/c mice. Control : OVA-induced asthma model mice. CBPT 400, CBPT 200 : OVA inhalation and oral administration of CBPT 400 ㎎/㎏ and 200 ㎎/㎏. Values represent the means ± SD. ++: P<0.01 compared with normal group. **: P<0.01 compared with control group.

4) CD8+ 세포에 미치는 영향

CD8+ 세포수는 정상군은 8.6 ± 0.3 (x104)로 나타난 반면, 대조군은 6.0 ± 0.2 (x104)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (++: P<0.01) 감소를 나타냈다. CBPT 400 투여군과 CBPT 200 투여군은 각각 8.6 ± 1.2 (x104)와 6.1 ±

0.9 (x104)로 나타나 대조군에 비하여 CBPT 400 투여군에서 유의성 있게 (*: P<0.05) 증가하였다 (Fig. 8).

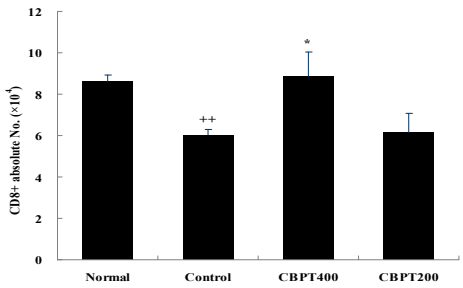


Fig. 8 Effect of CBPT on the CD8+ absolute No. of DLN in OVA- induced asthma mice. Normal : Normal BALb/c mice. Control : OVA-induced asthma model mice. CBPT 400, CBPT 200 : OVA inhalation and oral administration of CBPT 400 ㎎/㎏ and 200 ㎎/㎏. Values represent the means ± SD. ++: P<0.01 compared with normal group. *: P<0.05 compared with control group.

5) CD3+/CD69+ 세포에 미치는 영향

CD3+/CD69+ 세포수는 정상군은 1.5 ± 0.4 (x104)로 나타난 반면, 대조군은 6.2± 0.7 (x104)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (++: P<0.01) 증가를 나타냈다. CBPT400, CBPT 200 투여군은 각각 3.4 ± 0.3 (x104)와 4.1 ± 0.5 (x104)로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 (*: P<0.05) 감소하였다 (Fig. 9).

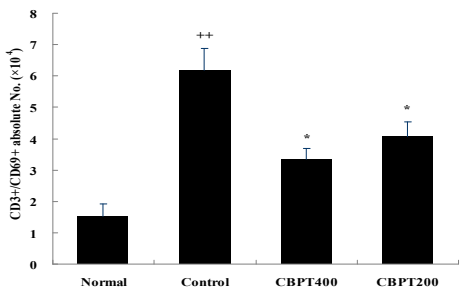


Fig. 9. Effect of CBPT on the CD3+/CD69+ absolute No. of DLN in OVA-induced asthma mice. Normal : Normal BALb/c mice. Control : OVA-induced asthma model mice. CBPT 400, CBPT 200 : OVA inhalation and oral administration of CBPT 400 ㎎/㎏ and 200 ㎎/㎏. Values represent the means ± SD. ++: P<0.01 compared with normal group. *: P<0.05 compared with control group.

6) CD4+/CD25+ 세포에 미치는 영향

CD4+/CD25+ 세포수는 정상군은 1.9 ± 0.4 (x104)로 나타난 반면, 대조군은 1.6 ± 0.3 (x104)로 나타나 정상군에 비하여 감소를 나타냈다. CBPT 400, CBPT 200 투여군은 각각 2.5 ± 0.6 (x104)와 2.2 ± 0.8 (x104)로 나타나 대조군에 비하여 증가하였다 (Fig. 10).

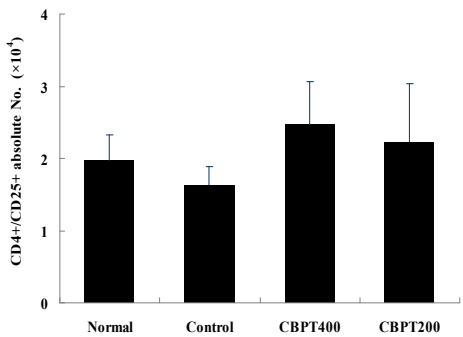


Fig. 10. Effect of CBPT on the CD4+/CD25+ absolute No. of DLN in OVA-induced asthma mice. Normal : Normal BALb/c mice. Control : OVA-induced asthma model mice. CBPT 400, CBPT 200 : OVA inhalation and oral administration of CBPT 400 ㎎/㎏ and 200 ㎎/㎏. Values represent the means ± SD.

5. Lung 세포에 미치는 영향

1) CD3e+ 세포에 미치는 영향

CD3e+ 세포수는 정상군에서 6.9 ± 2.1

(x104 cells)로 나타난 반면, 대조군은 33.9 ± 2.6 (x104 cells)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++: P<0.001) 증가를 나타냈다. CBPT 400, CBPT 200 투여군은 각각 21.0 ± 0.4 (x104 cells), 27.9 ± 1.7 (x104 cells)로 나타나 CBPT 400 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 (*: P<0.05) 감소하였다 (Fig. 11).

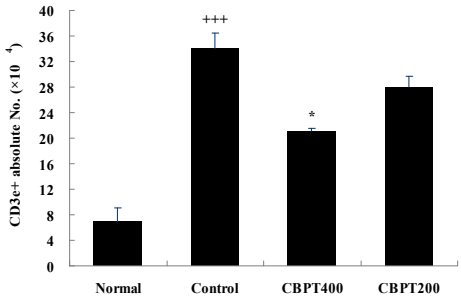


Fig. 11. Effect of CBPT on the CD3e+ absolute No. of lung cells in OVA -induced asthma mice. BALb/c mice were injected, inhaled and sprayed (3 times a week/for 8 weeks) with OVA for 12 weeks. Two treatment groups were treated with CBPT 400 ㎎/㎏ and CBPT 200 ㎎/㎏ for the 8 weeks (6 times a week). Each cells absolute number were analyzed by cell cytometery. Normal : Normal BALb/c mice. Control : OVA-induced asthma model mice. CBPT 400, CBPT 200 : OVA inhalation and oral administration of CBPT 400 ㎎/㎏ and 200 ㎎/㎏. Values represent the means ± SD. +++: P<0.001 compared with normal group. *: P<0.05 compared with control group.

2) CD3e+/CD69+ 세포에 미치는 영향

CD3e+/CD69+ 세포수는 정상군에서 0.8 ± 0.1 (x104 cells)로 나타난 반면, 대조군은 16.6 ± 0.4 (x104 cells)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++: P<0.001) 증가를 나타냈다. CBPT 400, CBPT 200 투여군은 각각 5.4 ± 1.4 (x104 cells), 8.7 ± 1.7 (x104 cells)로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 (**: P<0.01, *: P<0.05) 감소하였다 (Fig. 12).

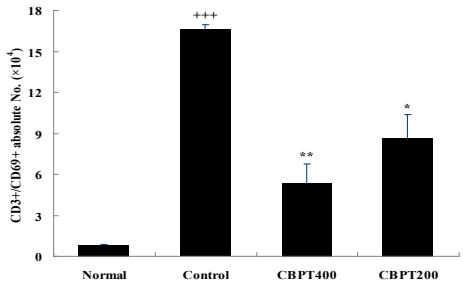


Fig. 12. Effect of CBPT on the CD3e+/CD69+ absolute No. of lung cells in OVA-induced asthma mice. Normal : Normal BALb/c mice. Control : OVA-induced asthma model mice. CBPT 400, CBPT 200 : OVA inhalation and oral administration of CBPT 400 ㎎/㎏ and 200 ㎎/㎏. Values represent the means ± SD. +++: P<0.001 compared with normal group. **: P<0.01, *: P<0.05 compared with control group.

3) B220+/IgE+ 세포에 미치는 영향

B220+/IgE+ 세포수는 정상군에서 0.1 ± 0.1 (x104 cells)로 나타난 반면, 대조군은 4.9 ± 0.2 (x104 cells)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++: P<0.001) 증가를 나타냈다. CBPT 400, CBPT 200 투여군은 각각 2.6 ± 0.3 (x104 cells), 3.2 ± 0.3 (x104 cells)로 나타나 CBPT 400 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 (*: P<0.05) 감소하였다 (Fig. 13).

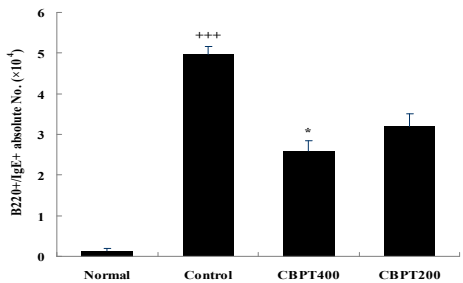


Fig. 13. Effect of CBPT on the

B220+/IgE+ absolute No. of lung cells in OVA-induced asthma mice. Normal : Normal BALb/c mice. Control : OVA-induced asthma model mice. CBPT 400, CBPT 200 : OVA inhalation and oral administration of CBPT 400 ㎎/㎏ and 200 ㎎/㎏. Values represent the means ± SD. +++: P<0.001 compared with normal group. *: P<0.05 compared with control group.

4) CCR3+ 세포에 미치는 영향

CCR3+ 세포수는 정상군에서 1.0 ± 0.2 (x104 cells)로 나타난 반면, 대조군은 10.8 ± 0.5 (x104 cells)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++: P<0.001) 증가를 나타냈다. CBPT 400, CBPT 200 투여군은 각각 3.8 ± 1.1 (x104 cells), 5.2 ± 1.4 (x104 cells)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (**: P<0.01, *: P<0.05) 감소하였다 (Fig 14).

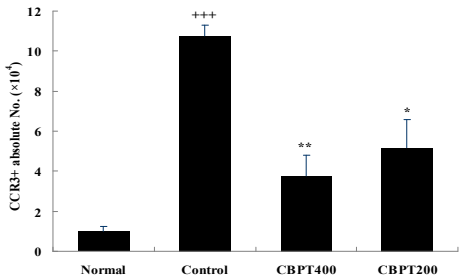


Fig. 14. Effect of CBPT on the CCR3+ absolute No. of lung cells in OVA-induced asthma mice. Normal : Normal BALb/c mice. Control : OVA-induced asthma model mice. CBPT 400, CBPT 200 : OVA inhalation and oral administration of CBPT 400 ㎎/㎏ and 200 ㎎/㎏. Values represent the means ± SD. +++: P<0.001 compared with normal group. **: P<0.01, *: P<0.05 compared with control group.

5) CD11b+/Gr-1+ 세포에 미치는 영향

CD11b+/Gr-1+ 세포수는 정상군에서 1.4 ± 0.2 (x104 cells)로 나타난 반면, 대조군은 14.2 ± 2.1 (x104 cells)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++: P<0.001) 증가를 나타냈다. CBPT 400, CBPT 200 투여군은 각각 7.2 ± 1.8 (x104 cells), 8.8 ± 0.9 (x104 cells)로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 (*: P<0.05) 감소하였다 (Fig. 15).

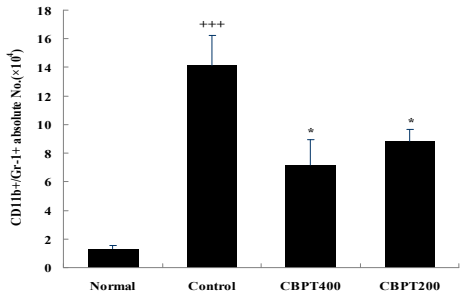


Fig. 15 Effect of CBPT on the CD11b+/Gr-1+ absolute No. of lung cells in OVA-induced asthma mice. Normal : Normal BALb/c mice. Control : OVA-induced asthma model mice. CBPT 400, CBPT 200 : OVA inhalation and oral administration of CBPT 400 ㎎/㎏ and 200 ㎎/㎏. Values represent the means ± SD. +++: P<0.001 compared with normal group. *: P<0.05 compared with control group.

Ⅳ. 考 察

喘息은 유발 요인의 복잡성과 다양한 병리적 과정으로 인하여 동서의학을 불문하고 치료의 난해성을 제공하고 있다.

韓醫學에서 喘息 치료는 타 질환과 동일하게 急性期, 緩解期로 나누어, 急性 發作期에는 祛邪위주로, 緩解期는 扶正 위주의 치법을 사용한다. 發作期에서도 寒熱을 구분하여 降逆平喘法을 기본으로 熱症인 경우 淸肺化痰法을, 寒症인 경우 溫肺化痰法을 다용한다[13-17].

본 시료인 淸蒸補肺湯은 부인과 영역에서 産後陰虛, 血虛로 나타날 수 있는 骨蒸, 咳嗽 증상에

활용되는 처방이다[30]. 二陳湯, 八物湯 구성 약물에 滋陰淸熱, 宣肺平喘 약물이 가미됨으로써 攻補兼法 치료 처방으로 구성되어 있다. 고 등[34]은 천식 치료 처방에 대한 37권의 문헌적 고찰을 통하여 치료 처방으로는 小靑龍湯, 定喘湯, 金匱腎氣丸이, 약물 효능면에서는 化痰止咳, 補氣, 解表, 補陰, 利水滲濕, 理氣藥이, 약재로는 炙甘草, 白茯苓, 半夏, 杏仁, 生薑, 天門冬, 人蔘, 陳皮, 五味子, 熟地黃, 麻黃, 當歸, 桔梗 등이 다빈도로 사용되었음을 보고하였는데, 본 처방 구성도 고 등의 보고34)와 크게 벗어나지 않음을 확인할 수 있다.

처방에 대한 최근 실험 연구를 살펴보면 상기한 천식에 관한 기본 처방을 시료로 ovalbumin으로 유발된 천식 동물 모델에서의 면역 조절능에 대한 연구[26-29]와 더불어 다년간의 임상 활용 처방의 EBM 구축을 위한 연구가 다양하게 이루어지고 있다. 임상 연구로 김[35]은 사상체질 처방 투여를 통한 천식 환자의 개선 정도를 보고하면서, 천식을 비롯한 현대의학에서 나타나는 난치성 질환은 체질적 접근이 매우 유의성이 있음을 제언한 바 있다. 이 밖에 남 등[36-38]은 絲瓜絡, 麻黃, 五拗湯 약침을 이용하여 천식 관련 면역 인자에 미치는 영향을 보고한 바가 있다.

본 처방의 구성 약물 역시 대부분이 천식에 대한 면역학적 조절능과 다양한 면역 인자에 대한 길항 작용이 보고3[1, 32, 40-48]되었다는 점에서 본 처방의 유의성 있는 면역 조절능이 기대된다.

기관지천식은 가역적인 기도폐색, 기도 반응성 항진, 기도 염증의 3가지 특징을 갖는 질환이나 최근에는 기도 염증에 관심이 증가하고 있다. 천식의 기도 염증 특징은 호산구를 중심으로 관련 세포의 침윤이 나타난다. 기관지천식에서 보이는 염증에는 T 세포, 호산구, 비만세포, 호염기구 등의 국소에의 침윤과 세포군, 혈관 내피세포, 기도 상피세포, 섬유아세포 등의 조직의 구성 세포간에 복잡한 상호 작용에 의해 형성 된다[49-51].

알레르기성 염증은 호산구를 주체로 한 병증 세포 침윤을 특징으로 호산구의 특이과립단백과 지질 메디에이터에 의한 조직 상해가 일어난다. 최근 알레르기성 염증의 국소에서는 호산구의 침윤에 더해서 CD4+ 세포의 침윤이 보이는 것으로부터 염증 국소의 조직 내 호산구 침윤에 CD4+ 세포가 관여하고 있을 가능성이 큰 것으로 알려져 있다. 알레르기성 염증의 특징인 IgE 항체 생산과 호산구 침윤에는 IL-4와 IL-5가 중요한 역할을 하며, Th2 세포가 선택적으로 활성화된 병태로 나타난다. 실제로 기관지천식이나 알레르기성 비염의 기도 국소에서 Th2 세포가 증가하고 있는 것으로 알려져 있다[52-54]. 또한 Kay 등55)은 아토피 환자 피부의 알레르기성 염증의 국소에서 CD4+ T세포가 증가하고, 그에 따라 호산구의 분화와 증식을 유도하는 사이토카인인 IL-3, IL-5, GM-CSF의 mRNA가 증가하는 것으로 나타나 염증 국소에서 CD4+ T세포로부터 생산되는 이들 사이토카인이 조직 호산구 침윤을 일으킬 가능성을 시사했다. 또한 천식 환자의 폐포세척액 (BALF) 중에서도 IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF의 mRNA를 발현하는 T 세포가 특이적으로 증가하고 있는 것으로 밝혀졌으며, 중증의 천식 환자의 기관지 점막에서만 IL-5의 mRNA를 검출했다고 보고하고 있다. Sedgwick 등[56]도 알레르기성 비염 환자에 항원챌린지를 실시한 직후 BALF 액중에는 비만세포로부터의 히스타민, 트립타제가 검출되지 않지만 48시간 후의 BALF에서는 호산구, 호산구 과립단백, 로이코드리엔 C4와 함께 IL-5의 상승을 보고하고 있다.

비만세포가 알레르겐에 의해 활성화되면 히스타민, 로이코트랜C4(LTC4), 프로스타그란딘D2(PGD2) 등의 케미칼메디에이터가 기도에 작용해서 기도 평활근의 수축, 혈관 투과성 항진, 점액분비 항진 등의 조직 반응을 일으켜 즉시형 천식 반응을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 또한 비만세포는 알레르겐의 자극에 의해 IL-4, IL-13, TNF-a 등의 사이토카인을 생산 분비하는 것으로 보고되고 있다[56-58]. 이 중 IL-4는 혈관 내피세포에 선택적으로 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)을 발현시킨다. VCAM-1의 백혈구상의 리간드인 very late antigen-4 (VLA-4)는 호산구, 호염기구, T 림

프구, 단구에는 발현하고 있으나, 호중구에는 발현하고 있지 않다. 따라서 비만세포로부터 유리한 IL-4가 혈관 내피세포에 VCAM-1을 유도하고, 백혈구가 VLA-4를 통해서 거기에 결합하는 기전을 생각하면 알레르기성 염증의 특징인 호산구 주체의 세포 침윤을 설명할 수 있을 것으로 보여진다[59, 60].

기도 국소에 집적한 염증 세포는 LTC4를 포함한 각종 메디에이터를 유리해서 만성형 천식 반응을 일으킨다. 기관지천식에는 기도 점막에의 호산구의 집적, 객담, 말초혈의 호산구 증가가 확인되었다[61, 62]. 호산구는 다능성 간세포로부터 유도되지만, 그것에는 T 세포에서 생성되는 IL-13, T 세포를 시작으로 하는 각종 세포로부터 생산되는 GM-CSF, Th2 세포에서 생산되는 IL-5가 관여하고 있다. 또한 천식에 있어서 호산구는 IL-3, IL-5, GM-CSF 등에 의해 활성화되고, 활성화 호산구는 LTC4, O2- 생산의 증가, 세포 상해 작용의 증강, 생존 기간 연장 등으로 강한 염증 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다[63-65].

알레르기성 기관지 천식 치료는 기전에 따라 다양한 치료약과 치료법이 개발되어 왔고, 기존 약물에 대한 치료 효과 증대를 위한 노력들이 이어져 오고 있다.

이에 본 연구에서는 임상에서 다양하게 사용되고 있는 CBPT를 이용하여 천식 실험 모델로 널리 알려져 있는 OVA-alum을 이용한 기관지천식 동물 모델을 통하여 항천식 작용을 실험적으로 입증하여 임상에서의 활용도를 높이고자 하였다.

먼저 CBPT 의 독성 확인을 위해 실시한 세포독성 검사에서는 250 ㎎/㎖ 이하의 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타내 세포독성이 없는 것으로 나타났고, 동물 실험 후 혈청을 분리하여 실시한 간 기능 검사에서는 AST와 ALT 수치 역시 모두 정상 범위 내로 나타났다 (Fig. 1, 2).

상기한 바와 같이 기관지천식 환자의 폐 조직에서 호산구를 주로 하는 호염기구, 비만세포, 림프구 등을 동반한 염증성 세포의 침윤이 보인다. 그 외에 상피세포의 박리와 탈락, 상피 기저막의 비후, 기관지 평활근의 비대와 수축, 점액전의 형성, 기관지선의 비대 등의 소견이 확인되었다[66-69].

본 연구에서 폐 무게 측정에서는 대조군에 비하여 CBPT 두 가지 농도 투여군 모두에서 유의성 있는 감소를 나타내었고, 폐 조직의 세포 침윤에서도 대조군에 비해 CBPT 투여군에서 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig 3, 4). 이는 호산구를 비롯한 면역세포의 폐 조직에의 침윤이 폐의 무게와 면역세포의 증가를 초래한 것으로 사료되며, CBPT를 통해서 이러한 병리적 과정이 억제된 것으로 보여 진다.

기도 상피세포는 혈관 내에서 기도 점막하 또는 기도 상피에 유리된 호산구에 의하여 기도 상피의 박리와 탈락이 일어난다. 아울러 기도 상피세포는 상해를 받을 뿐 아니라 각종 생리 활성 인자를 생산하게 되어 알레르기성 염증에 관여한다. 기도 상피세포는 IL-6, IL-8, GM-CSF 등의 사이토카인과 transforming growth factor-b (TGF-b), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 등의 성장 인자 그리고 MCP-1, regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) 등의 케모카인을 생산하는 것으로 알려져 있다. IL-6은 T 림프구 활성화 작용이 있고, IL-8에는 호중구 유주와 활성화 그리고 T 림프구의 유주, 호산구의 유주 등에 작용한다. 또 GM-CSF는 호산구의 증식 인자이며 활성화와 수명 연장 작용을 갖고 있다. 더불어 케모카인에는 유주 활성을 주체로 하는 다양한 작용이 있다.

호산구는 기도 국소에 집적하여 분비형 IgA, platelet activating factor (PAF), IL-5 등에 의해 자극을 받아 major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil-derived neurotoxin (EDN), eosinophil peroxidase (EPO) 등의 과립단백질을 방출해서 기도 상피세포의 박리와 탈락 등의 조직 상해를 일으킨다[70-74]. 더불어 호산구는

LTC4와 PAF 등의 염증성지질 메디에이터를 생산하고 유리시켜 기도 수축, 혈관 투과성 항진, 점액 분비 항진을 일으킨다. 또한 호염기구는 호산구 등과 함께 국소에 집적되는 과정에서 IL-3, IL-5, GM-CSF 등에 의해 자극을 받아 활성화된다. 호염기구는 국소에서 MCP-1 등의 케모카인의 작용을 통해서 히스타민 등의 메디에이터를 유리시켜 만성 천식 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다[75-77].

본 연구에서는 DLN의 면역세포의 변화를 관찰한 결과 천식 유발에 따라 B 세포인 CD19+ 세포는 증가하였으나, CBPT 투여를 통하여 감소 효과를 나타내었고, CD3+, CD4+, CD8+ 그리고 CD4+/CD25+ 등의 T세포는 CBPT의 투여를 통해 증가하는 효과를 나타내었다. 반면 활성화된 T세포인 CD3+/ CD69+ 세포는 CBPT 투여 후 세포 활성이 억제됨으로써 (Fig. 5-10), DLN 내 면역세포에 대한 밸런스 유지 효능을 나타내었다.

폐 조직의 면역세포 변화 측정에서는 천식 발증으로 인하여 대조군에서 CD3+ 세포와 CD3+/CD69+ 세포수가 증가하였으나, CBPT 투여군에서는 두 농도 모두에서 유의성 있게 감소하였다. 아울러 B220+/IgE+ 세포와 호산구를 나타내는 CCR3+ 세포 그리고 과립구를 나타내는 CD11b+/Gr-1 세포수 역시 비롯 고농도이지만 CBPT 투여로 세포수가 유의성 있게 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 11-15).

이상의 결과로부터 CBPT가 기관지천식 유발 관련 면역세포의 변화에 관여함으로써 항천식 효과를 발휘함을 객관적으로 입증되었다. 그러나 향 후 다양한 사이토카인 및 조직학적 변화 등의 보완 실험을 통하여 보다 정확한 면역 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 보이며. 본 시료처럼 攻補兼法의 효능이 있는 처방이 攻法, 혹은 補法 처방과 치료 기전에 있어 어떤 차이가 있는지에 대한 정확한 분석이 요구된다.

V. 結 論

淸蒸補肺湯(CBPT)의 객관적인 항천식 효능 검증과 더불어 보다 유효한 항천식 치료제 개발을 위하여 OVA-Alum을 이용한 천식 모델에서의 면역 조절능을 검색한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

CBPT는 hFCs에 대하여 250 ug/ml 이하 농도에서 90% 이상의 세포생존율을 나타냈으며, 간기능 측정 지표 성분인 AST, ALT 수치도 정상범위로 나타났다.

CBPT는 대조군에 비하여 폐 무게를 두 가지 농도 모두에서 유의성 있게 감소시켰고, 폐 총세포수는 400mg/kg 투여군에서만 유의성 있게 감소시켰다.

CBPT는 대조군에 비하여 DLN 내의 CD4+, CD8+ 세포 수를 400 mg/kg 투여군에서 유의성 있게 증가시켰고, CD3+, CD4+/CD25+ 세포수는 증가시켰으나 유의성은 나타나지 않았다. 반면 CD3+/CD69+ 세포 수는 두 농도에서 유의성 있게 감소시켰으며, CD19+ 세포 수는 감소시켰으나 유의성은 나타나지 않았다.

CBPT는 대조군에 비하여 폐 조직 내의 CD3e+/CD69+, CCR3+ 및 CD11b+/Gr-1+ 세포 수를 두 농도 모두에서 유의성 있게 감소시켰으며, CD3e+, B220+/IgE+ 세포 수는 400 mg/kg 투여군에서만 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 淸蒸補肺湯의 면역 조절 작용을 통한 항천식 작용이 객관적으로 규명되어, 임상에서 다양한 가감을 통해 항천식 치료제로써 폭넓게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. Cockcroft DW, and Hargreave FE: Airway hyperresponsiveness: Definition, easurement and Clinical Relevance. In

Asthma: Its Pathology and Treatment, dited by Kaliner MA, Barnes PJ and Persson CGA, pp. 51-72., 1991.
2. Global Initiative For Asthma. In Definition, National Institute of Health, p. 2-8. 1995.
3. National Asthma Education Program, Expert Panel on the Management of Asthma, National Heart, Lung, and Blood Institute : Guidelines for the diagnosis and management of asthma. J Allergy Clin Immunol 89: 425, 1991.
4. Mossmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA and Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone: Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 136, 2348-2357. 1986.
5. Robinson DS, Ying S, Bentley AM, Meng Q, North J, Kay AB and Hamid Q: Relation- ships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expre ssing messenger ribonucleic acid for cytokines , asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. J Allergy Clin Im munol 92, 397-403. 1993.
6. 奥田稔他:鼻アレルギー(含花粉症)の診断 と治療, アレルギー疾患治療ガイドライン, 61, 監 修:牧野荘平, 1993.
7. Ying S, Durham SR, Corrigan CJ, Hamid Q and Kay AB: Phenotype of cells expressing mRNA for Th2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and T h1-type (interleukin 2 and interferon y) cytokine sin bronchoalveolar lavage and bronchial biopsiesfrom atopic asthmatics and normal control s ubjects. Am J Respir Cell Mol Biol 12, 477-487. 1995.
8. Aas K and Johansson SGO:The radioaller gosorbent test in the in vitro diagnosis of multiple reaginic allergy : Acomparison of diagnost approaches. J Allergy Clin Immunol 48:132, 1971.
9. Miki I, Kusano A, Ohta S, et al. Histamine enhanced the TNF--induced expression of Eselection and ICAM-"Pon vascular endothelial cells. Cell Immunol. 171:285-288. 1996.
10. Lanier BQ, Corren J, Lumry W, et al. Omalizumab is effective in the long-term control of severe allergic asthma. Ann Allergy Asthma Immunol. 91:154-159. 2003.
11. Fahy JV, Fleming E, Wong HF, et al. The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. Am J Resp Crit Care Med. 155:1828-1834. 1997.
12. Mosmann TR, Coffman RL : THl and TH2 cells : Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann Rev Immunol 7: 145, 1989.
13. 許建中 외 : 中西醫結合哮喘病學, 人民衛生出版社, pp14-20. 2001.
14. 李正木 외 : 支氣管炎與支氣管哮喘中西醫診療與調養, 廣東旅游出版社, p.123, pp.135-151. 2005.
15. 양사수 외 : 東醫臨床內科學(Ⅱ), 법인문화사, pp663-668. 1999.
16. 牛子范 외 : 咳喘奇效良方, 人民軍醫出版社, pp152-170. 2007.
17. 梁載協 : 臨床指南, 의성당, p.636. 2001.
18. 정사덕 외 : 素問注釋滙粹, 도서출판 일중사, p.124(상), p.245(상), p.428(상), p.474(상), p.136(하), 1987.
19. 張中景 : 금궤요략, 도서출판 鼎談, pp.60-67. 2000.

20. 南京中醫學院校釋 : 諸病源候論, 一中社, p.422. 1983.
21. 이지용 외 : 장경악의학전서, 중국중의약출판사, p.1117, 1999.
22. 이훈규 : 紫菀이 喘息 생쥐 모델에서 기도리모델링과 염증성 면역세포 억제에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 2006.
23. 김관수 : 天門冬이 氣管支 喘息 動物模型의 免疫反應에 미치는 影響, 상지대학교 대학원, 2002.
24. 황대룡 외 : 행인의 알레르기 천식 효과에 대한 연구, 大韓本草學會誌, Vol.18 No.2, pp.201-208, 2003.
25. 서창우 : 천식 동물모델을 이용한 地骨皮, 桑白皮 및 두 배합약물의 실험적 연구, 상지대학교 대학원, 2008.
26. 김형우 외 : 삼소음(蔘蘇飮)이 천식이 유발된 생쥐의 cytokine 분비에 미치는 영향, 大韓本草學會誌, Vol.22 No.2, pp.175-180, 2007.
27. 감철우 : 麻黃潤肺湯이 Ovalbumin으로 誘發된 Mouse의 喘息에 미치는 影響, 慶山大學校 大學院, 2001.
28. 이승용 : 補中益氣湯 및 補中益氣湯 加味方이 흰쥐의 알레르기 喘息에 미치는 影響, 東義大學校 대학원, 1999.
29. 이정은 : 三子化痰煎이 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 2008.
30. 송병기 : 한방부인과학, 행림출판사, p.611, 1984.
31. 이경민 외 : 황기 약침액의 NO, DPPH 消去 및 IL-4 抑制效果, 大韓鍼灸學會誌, Vol.20 No.2, pp.184-194, 2003.
32. 정근기 : 知母의 collagen 誘發 關節炎에 대한 消炎 效果 : DBA/1J mouse에서의 병태 관찰 및 RAW264.7에서의 cytokine 분비측정, 경희대학교 대학원, 2006.
33. 나창수 외 : 배(梨) 추출 Phenolic Compound 및 길경(桔梗) 행인(杏仁) 배합투여가 Ovalbumin으로 유발된 천식 동물모델에서 기관지 평활근 장력, 호산구 및 IL-4에 미치는 영향, 大韓本草學會誌, Vol.22 No.2, pp.25 -33, 2007.
34. 고재찬 외 : 哮喘治方에 關한 文獻的 考察, 惠和醫學, Vol.9 No.1, pp.258 -281, 2000.
35. 김정호 외 : 喘息 患者의 四象 투여 3例에 대한 臨床報告-少陰人, 少陽人, 太陰人, 사상체질의학회지, Vol.14 No.1, pp.112-117, 2002.
36. 남세현 외 : 사과락(絲瓜絡) 약침의 천식억제(喘息抑制) 및 면역조절효과에 대한 실험적 연구, 大韓鍼灸學會誌, Vol.22 No.4, pp.73-85, 2005.
37. 송형근 : 마황 약침의 천식억제 및 면역조절효과에 대한 실험적 연구, 大韓鍼灸學會誌, Vol.23 No.1, pp.1-14, 2006.
38. 이윤호 외 : 오요탕 약침이 알레르기 천식 흰쥐의 말초혈관내 T - cell과 혈청 IgE에 미치는 영향, 大韓鍼灸學會誌, Vol.18 No.1, pp.29-39, 2001.
39. 이민영 외 : 황기의 재배년차(栽培年差)에 따른 천식(喘息)의 면역학적 치료효과에 대한 비교연구, 大韓本草學會誌, Vol.23 No.2, pp. 2008.
40. 조미정 : 별갑 추출물의 효소적 가수분해 및 그들의 항산화 활성, 전남대학교 교육대학원, 2008.
41. 김관수 : 天門冬이 氣管支 喘息 動物模型의 免疫反應에 미치는 影響, 상지대학교 대학원, 2002.
42. 이명진 : 반하가 천식이 유발된 생쥐 폐조직의 유전자 발현에 미치는 영향, 동신대학교 일반대학원, 2008.
43. 정동환 : 반하가 난황으로 유발된 생쥐의 알레르기성 천식에 미치는 영향, 동신대학교 대학원, 2008.
44. 송재진 : 半夏가 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향, 大田大學

校 大學院, 2004.
45. 임홍진 외 : 마우스 모델을 이용한 상백피 추출물의 알러지성 천식 억제 효과, 한국전통의학지, Vol.14 No.1, pp.79-99, 2004.
46. 소병준 : Ovalbumin에 의한 기니픽 천식 유발시 폐의 조직 병리학적 변화에 미치는 상백피의 영향, 全北大學校 大學院. 1994.
47. 한영주 : 감초가 천식모델 생쥐의 BALF내 면역세포 및 Cytokine에 미치는 효과, 大田大學校 大學院, 2004.
48. 김성수 외 : 桔梗에 의한 알레르기 천식 효과에 대한 연구, 大韓本草學會誌, Vol.19 No.2, pp.25-33, 2004.
49. 이우진 : 천식 발작 환자에서 말초 혈액내 호산구와 호중구 증가에 따른 임상적 의의, 전남대학교 대학원, 2008.
50. 西堀正洋, 高橋英夫, 森秀治.ヒト末梢血単核球に おけるサイトカイン産生とヒスタミンによる調節. 日薬理誌. 118:29-35. 2001.
51. Ohtani T, Aiba S, Mizuashi M, Kawamoto Y, Tagami H. Evaluation of the efficacy of antihistamines using human monocyte-derived dendritic cells stimulated with histamine. J Am Acad Dermatol.49: 234-242. 2003.
52. Nakajima T, Matsumoto K, Suto H, et al. Gene expression screening of human mast cells and eosinophils using high-density oligonucleotide probe arrays: abundant expression of major basic protein in mast cells. Blood.98: 1127-1134. 2001.
53. Schoenberger SP. Peptide chemokines were initially thought to govern effector T cell migration to inflamed tissues. Several studies now show that leukotriene B4 is intimately involved in T cell homing. Nat Immunol. 4:937-939. 2003.
54. Pawankar R, Okuda M, Yssei H, Ra C. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the FcεR1, CD40, IL-4 and can induce IgE synthesis in B cells. J Clin Invest. 152: 1655-1665. 1996.
55. Kay AB, et al : Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, IL-3, IL-4, IL-5, and GM-CSF, in allergen- induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. J Exp Med 173: 775, 1991.
56. Sedgwick JB, et al : Immediate and late air way response of allergic rhinitis patients to segmental antigen challenge. Am Rev Respir Dis 144: 1274, 1991.
57. Hamid Q, et al: Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. J Clin Invest 87: 1541, 1991.
58. Nakajima H, et al : CD4' T lymphocytes and interleukin-5 mediate antigeninduced eosinophil infiltration into the mouse trachea. Am Rev Respir Dis 144: 374, 1992.
59. Boguniewicz M, et al : Recombinant gamma interferon in treatment of patients with atopic dermatitis and elevated IgE levels. Am J Med 88 : 365, 1990.
60. King CL, et al: Regulation of immunoglobulin production in」hyperimmunoglobulin E recurrent-infection syndrome by interferon f'Á. Proc Natl Acad Sci USA 86: 10085, 1989.
61. Iwamoto I, et al: Interferon-y regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. J Exp

Med 177: 573, 1993.
62. Miki I, Kusano A, Ohta S, et al. Histamine enhanced the TNF-induced expression of Eselection and ICAM-1 on vascular endothelial cells. Cell Immunol. 171: 285-288. 1996.
63. Reimert CM, Skov PS, Poulsen LK. A microtiter assay for activation of eosinophils. Simultaneous monitoring of eosinophil adhesion and degranulation. Allergy. Feb; 53(2):129-38. 1998.
64. Jagels MA, Daffern PJ, Zuraw BL, Hugli TE. Mechanisms and regulation of polymorphonuclear leukocyte and eosinophil adherence to human airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. Sep;21(3):418- 27. 1999.
65. Munoz NM, Douglas I, Mayer D, Herrnreiter A, Zhu XD and Leff AR: Eosinophil chemotaxis inhibited by 5-lipoxygenase blockade and leukotriene receptor antagonism. Am J Respir Crit Care Med 155, 1398-1403.1997
66. Underwood DC, Osborn RR, Newsholme SJ, Torphy TJ and Hay DWP: Persistent airway eosinophilia after leukotriene (LT) D4 admini stration in the guinea pig Modulation by the LTD4 receptor antagonist, pranlukast, or an interleukin 5 monoclonal antibody. Am J Respir Crit Care Med 154, 850-857.1996
67. Gleich GJ, Loegering DA, Maldonado JE. Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules. J Exp Med.Jun 1;137(6):1459-71. 1973
68. Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. Trends Immunol. Sep;25(9) :477-82. 2004.
69. Jong EC, Klebanoff SJ. Eosinophil-mediated mammalian tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system. J Immunol. Apr;124(4):1949-53. 1980.
70. Ishihara K, Satoh I, Mue S, Ohuchi K. Possible participation of a JAK2 signaling pathway in recombinant rat interleukin-5- induced prolongation of rat eosinophil survival. Biochim Biophys Acta. Apr 30;1536(1):73-84.2001
71. Wong MX, Roberts D, Barley PA, Jackson DE. Absence of platelet endothelial adhesion molecule-1(CD31) leads to increased severity of local and systemic IgE-mediated anaphylaxis and modulation of mast cell activation. J Immunol. 168:6455- 6462.2002.
72. Eda R, Sugiyama H, Hopp RJ, Bewtra AK, Townly RG. Effect of loratadine on human eosinophil function in vitro. Ann Allergy.71:373-378. 1993.
73. Lee SJ, Namkoong S, Ha KS, Nam WD, Kwon YG, Lee H, Yoon EY, Chang DJ, Kim SO, Kim YM. Colchicine-derived compound CT20126 promotes skin allograft survival by regulating the balance of Th1 and Th2 cytokine production. Exp Mol Med. Apr 30;39(2):230-8. 2007.
74. Kim DC, Hsu FI, Barrett NA, Friend DS, Grenningloh R, Ho IC, Al-Garawi A, Lora JM, Lam BK, Austen KF, Kanaoka Y. Cysteinyl leukotrienes regulate Th2 cell-dependent pulmonary inflammation.J Immunol. 1;176(7):4440-8. 2006.
75. Mossmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA and Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone: Definition according to profiles of lymphokine

activities and secreted proteins. J Immunology 136, 2348-2357. 1986.

76. Okada M, Terui T, Honda M, Tanaka M, Chikama R, Tabata N, Takahashi K, Tagami H. Cutaneous late phase reaction in adult atopic dermatitis patients with high serum IgE antibody to Dermatophagoides farinae: correlation with IL-5 production by allergen-stimulated peripheral blood mononuclear cells.J Dermatol Sci.Aug; 29(2): 73-84. 2002.
77. Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. The allergen-induced airway hyperresponsive-ness in a human-mouse chimera model of asthma is T cell and IL-4 and IL-5 dependent.J Immunol. Jun 1;166(11) :6982- 91. 2001.