

## 金銀花가 喘息유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향

정광진, 정희재, 정승기, 이형구  
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

### Lonicerae Flos contributes to the chemotaxis of eosinophils and secretion of cytokines in A549 human epithelial cells

Kwang-Jin Chung, Hee-Jae Jung, Sung-Ki Jung, Hyung-Koo Rhee

Dept. of Internal Medicine Oriental Medicine, Kyunghee University Seoul, Korea

**Objective:** Asthma is known as chronic airway inflammatory disease. This inflammation is conducted by various inflammatory cells including eosinophil. Chemotaxis is one way that circulating inflammatory cells invade a specific lesion. This study examines the degree to which Lonicerae Flos inhibits eosinophil chemotaxis at pulmonary epithelium after allergic stimulation.

**Material and Methods:** Water extracts of Lonicerae Flos and pulmonary epithelial cell lines A549(human type II-like epithelial cells) and human eosinophils were used.

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

**Result:** In this study TNF- $\alpha$  and IL-4, IL-1 $\beta$  were seen to induced the accumulation of chemokines mRNA in the pulmonary epithelial cell lines A549 in a dose-dependent manner. Chemokines were inhibited by Liripois Tuber in a dose-dependent manner and especially, IL-8 and ICAM-1 were inhibited considerably at 100 $\mu$ g/ml concentration of Lonicerae Flos. The eosinophil migration is inhibited in high concentration of Lonicerae Flos in a dose-dependent manner.

**Conclusion:** These findings indicate that the suppression of the expression of chemokines can be accomplished by Lonicerae Flos treatment, raising the possibility that Lonicerae Flos might be of therapeutic value in diseases such as asthma.

**Key Words:** Lonicerae Flos, eosinophil, eotaxin, asthma, cytokine

### 1. 緒 論

기관지 천식(이하 천식)은 지속적인 기침, 천명음, 기도과민증 및 가변적인 기도폐색을 특징으로 하는 질환이다. 천식환자의 BALF(bronchoalveolar lavage fluid)에서는 염증소견과 함께 점액과다분비,

상피세포와 기관지평활근의 비대를 볼 수 있으며, 염증세포로는 백혈구, 호산구, 비만세포, 호중구 그리고 antigen presenting cell 등이 있다<sup>1</sup>.

호산구는 천식을 비롯한 여러 질환에서 발견되는 염증세포이다. 호산구성 기도염증은 천식의 가장 특징적인 병태 생리적 현상이며 천식환자의 기도점막에 호산구가 선택적으로 침윤되어 있음이 관찰된다<sup>2</sup>. 호산구가 알레르기 반응이 일어나는 곳으로 선택적으로 모여드는 현상은 호산구의 화학주성 및 혈관내피세포와 세포외기질에 호산구가 선택적으로

· 접수 : 2005. 1. 31 · 채택 : 2005. 2. 27  
· 교신저자 : 정희재, 서울시 동대문구 회기동 1 경희의료원  
한방5내과 의사실  
(Tel. 02-958-9147 Fax. 02-958-9148  
E-mail : hanfish@khmc.or.kr)

유착됨으로써 일어나며 이때 cytokine은 골수에서 호산구 생산을 촉진하고 호산구의 혈관내피세포 유착을 유도하고 화학주성을 촉진하고 세포활성화를 전치치하며, 조직 내에서 생존을 연장시킴으로써 알레르기 염증을 유발한다<sup>3</sup>.

Eotaxin은 염증부위에 호산구 유인시 핵심적 역할을 할 뿐만 아니라 호산구의 염증유발 기능을 활성화시킴으로써 조직 손상에도 기여하고, eotaxin mRNA의 발현은 천식환자의 기도 생검에서 탐지되었다<sup>4</sup>.

세포유착분자는 세포간, 세포-기질간 상호작용을 증대하는 세포표면 수용체로서 염증반응 및 면역학적 반응, 상처치유, 응고, 종양전이, 세포성장 및 분화 등 다양한 병태생리학적 과정에 중요한 역할을 한다. 유착분자의 분류중 Immunoglobulin superfamily계는 한 개 이상의 immunoglobulin과 유사한 extracellular domain을 갖고 있는 세포유착분자군으로 대부분이 면역학적 반응 및 염증반응에 관여하며 ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) 등의 유착분자가 포함된다<sup>5</sup>.

金銀花는 清熱解毒작용이 있으며 膿瘍, 癰, 癤 등으로 發赤, 腫脹, 熱感疼痛의 증상에 사용되고, 感冒나 감염성 질환의 發熱, 惡寒, 頭痛, 咽喉痛에 사용되는 銀翹散의 방제에 포함된다<sup>6</sup>.

金銀花에 관련된 실험적 연구로 우<sup>7</sup>는 histamine에 의하여 유발된 모세혈관투과성 억제작용과 mouse 망내계의 탐식작용을 증강하는 작용을 보고하였고, 한<sup>8</sup>은 염증으로 인한 혈관 투과성 항진 억제작용과 진통작용을 보고하였다. 또한 정<sup>9</sup>은 金銀花가 인간기관지 상피세포의 cytokine 발현에 대한 연구를 보고하였다.

喘息과 관련된 韓藥의 치료효과를 研究한 實驗論文으로는 cytokine 발현과 관련하여 小青龍湯<sup>10,11</sup>, 六味地黃湯合瀉白散<sup>12</sup>, 瀉白散<sup>13</sup>, 麻杏甘石湯<sup>14</sup> 등의 處方과, 桑白皮<sup>12</sup>, 桔梗<sup>14,16</sup>, 麥門冬과 五味子<sup>15</sup>, 杏仁<sup>16</sup> 등의 연구가 보고되었다.

그러나 金銀花가 천식의 주요 염증세포인 호산구와 호산구의 화학주성과 밀접하게 관련 있는 cytokine에 관한 연구가 없었기에, 호산구와 eotaxin을 중심으로 실험을 진행하였고, 또한 IL-8 (Interlukin-8), IL-16, ICAM-1, VCAM-1, RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) 등의 mRNA 측면에서 金銀花의 효과를 확인한 결과를 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용된 金銀花 (Lonicerae Flos, Lonicera japonica THUNB)는 Sun Ten Phatmaceutical Co., Taiwan에서 수입한 물 추출 엑기스를 사용하였다.

#### 2) 세포주

본 실험에 사용된 A549(human type II-like epithelial cells) cell은 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.), 10 mM HEPES (JRH Biosciences, Lenexa, U.S.A.), 11mM sodium bicarbonate (JRH Bioscience)가 포함된 RPMI-1640 (Invitrogen Life Technologies)를 사용하였다. 먼저 金銀花 (Sun Ten Phatmaceutical Co., Taiwan)에 대한 세포 독성을 측정하기 위해 배양한 세포를 96-well plate (Corning, U.S.A.)에  $2 \times 10^4$  cells/well로 seeding한 다음 24시간 동안 배양한 후 약제를 농도 별로 100, 10, 1, 0.1, 0.01  $\mu\text{g/ml}$  로 배지에 희석하여 100  $\mu\text{l}$ 씩 well에 첨가하였다. 24시간 동안 방치한 후 MTS solution (Promega, Madison, U.S.A.)을 20  $\mu\text{l}$

씩 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 다음 흡광도 490에서 흡광도를 측정하였고 각 실험은 triplicate로 3회에 걸쳐 확인하였다.

## 2) Cytokine 처리 조건에 따른 eotaxin과

### RANTES의 발현량 확인

배양한 A549 cell을  $5 \times 10^5$  cells/well로 12-well plate(Corning, U.S.A.)에 plating하여 24시간 배양한 후 serum free media로 교체한 다음 24시간 방치하고 TNF- $\alpha$ (Biosource, Camarillo, U.S.A.) 50ng/ml과 IL-4(Biosource, Camarillo, U.S.A.) 50ng/ml, IL-1 $\beta$ (Biosource, Camarillo, U.S.A.) 10ng/ml을 최적 농도로 동시에 처리하여 24시간과 48시간 동안 배양하는 조건, eotaxin과 RANTES를 전후에 자극하는 방법, 배지를 교체 여부에 따른 차이로 조건을 실험하였다. 획득한 상등액을 취하여 eotaxin ELISA kit를 이용하여 sandwich ELISA를 실시하였고 RANTES의 mRNA 발현 농도는 RT-PCR(Reverse Transcriptase PCR) 방법으로 확인하였다.

## 3) Sandwich ELISA

96-well plate(Costar, USA)에  $100 \mu\text{l}$ /well anti-human eotaxin(BD Bioscience, USA)을 coating하여 4°C에서 O/N 배양하고 0.05% PBS-tween 20으로 3회 세척한 후  $200 \mu\text{l}$  Pharmingen's Assay Diluent(BD Bioscience, USA)로 실온에서 1시간 동안 blocking시켰다. 3회 세척 후 Pharmingen's Assay Diluent에 희석한 standard나 sample을  $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 실온에서 2시간 동안 배양한 다음 3회 세척 후  $100 \mu\text{l}$  anti-eotaxin detection antibody와 Avidin-horseradish peroxidase conjugate를 가하여 1시간 동안 실온에 방치하였다. 7회 세척한 후  $100 \mu\text{l}$  Tetramethylbenzidine과 Hydrogen peroxide(Pharmingen's TMB Substrate Reagent set, BD Bioscience, USA)를 첨가하여 30분간 실온에 반응시킨 다음 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $50 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 반응을 정지시키고 30분 이내에 450, 570 흡광도에서 ELISA reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 측정하였다.

## 4) Eotaxin Assay

배양한 A549 cell을  $5 \times 10^5$  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- $\alpha$ (Biosource, Camarillo, U.S.A.) 100ng/ml과 IL-4(Biosource, Camarillo, U.S.A.) 100ng/ml을 3시간 동안 처리하였다. 또한 RANTES를 유도하는 IL-1 $\beta$ (Biosource, Camarillo, U.S.A.) 10ng/ml과 TNF- $\alpha$ (Biosource) 100ng/ml을 첨가하여 24시간 동안 배양한 다음 金銀花를 100, 10, 1, 0.1, 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석하여 48시간 동안 처리한 후 상등액을 취하여 human eotaxin ELISA Kit를 이용하여 sandwich ELISA를 실시하였고 cell pellet로 RT-PCR을 실시하였다.

## 5) RT-PCR을 이용한 chemokine 발현량 측정

### (1) Total RNA의 분리

각 12-well로부터 획득한 cell pellet에 Trisol Reagent(Invitrogen Life Technologies)을  $300 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 용해시킨 후  $200 \mu\text{l}$ 씩 가하여 vortex한 다음 실온에서 5분간 방치한 후  $100 \mu\text{l}$  chloroform을 첨가하여 15초간 흔들어준 후 상온에서 3분간 방치한 다음 4°C, 12,000rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상등액을 취해서 옮긴 후  $250 \mu\text{l}$  isopropanol을 첨가한 다음 10분간 실온에 방치하였다가 4°C, 12000rpm에서 10분간 원심분리하여 RNA pellet을 획득하였다. 75% 에탄올을  $500 \mu\text{l}$  가하여 세척해 준 다음 상온에서 건조시킨 후  $20 \mu\text{l}$  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  $3 \mu\text{g}$ 의 RNA에  $500 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  Oligo dT primer (Invitrogen Life Technologies, USA)  $1 \mu\text{l}$ 를 첨가한 후 70°C에서 5분간 반응시킨 다음 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차 구조를 풀어주었고 5X synthesis buffer  $5 \mu\text{l}$ , 10mM dNTPs  $1 \mu\text{l}$ , 40U/ $\mu\text{l}$  RNase inhibitor  $0.5 \mu\text{l}$ 를 섞어

최종 부피를 25 $\mu$ l로 맞추어 25 $^{\circ}$ C 2분간 반응시켰다. 이 반응액에 200U/ $\mu$ l M-MLV reverse transcriptase 1 $\mu$ l를 첨가하여 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시키고 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 enzyme을 불활성화한 다음 획득한 cDNA를 RT-PCR에 사용하였다.

(3) Reverse tranriptase PCR anaylysis

Total RNA로부터 합성한 cDNA는 reverse transcriptase PCR과 real time PCR에 모두 사용하였다. 2 $\mu$ l의 cDNA, 0.2 $\mu$ m primer 2 $\mu$ l, 10 $\mu$ l premix taq polymerase(Takara, Japan)를 혼합하여 최종 부피 20 $\mu$ 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. Control로 GAPDH의 발현량을 이용하여 표준화하였고 RANTES, IL-16에 대한 발현량을 일차적으로 확인하였으며 PCR에 사용한 specific primer는 Table 1에 기록하였다.

(4) cDNA를 이용한 real-time PCR반응

RT-PCR시 GeneAmp 5700 Sequence Detector(Applied Biosystems)를 사용하여 합성한 각 sample의 templete을 1:10으로 희석하여 그중 2 $\mu$ l를 취하여 0.2 $\mu$ m primer 2 $\mu$ l와 12.5 $\mu$ l SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK)를 최종 부피를 25 $\mu$ l 양으로 혼합한 다음 real time PCR을 실시하였다. 먼저 cDNA는 각각 1, 1/10,

1/100으로 serial dilution한 후 농도당 3개씩 PCR하여 평균값을 사용하였다. 각 반응액의 증폭이 threshold에 도달한 cycle number(Ct)를 기준으로 standard curve를 그려서 정량 하였고 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 표준화하였다. PCR 반응의 종료 후 60-95 $^{\circ}$ C사이에서의 온도별 signal을 측정하여 dissociation curve를 작성하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 denaturaion 하고, 95 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분간 40회 반복하였고 이때 사용된 primer는 RANTES, ICAM-1, VCAM-1, IL-8, IL-16으로 각 primer의 sequence는 Table 1과 같다.

6) 사람 혈액으로부터 호산구의 분리

(1) 사람 혈액으로부터 lymphocyte의 분리

EDTA가 첨가되어 있는 tube에 사람 혈액을 섞어 채취한 혈액이 응고되지 않도록 한 다음 0.9% NaCl을 동량으로 첨가하여 혈액을 희석해 주었다. 혈액과 lymphoprep을 2:1의 비율로 혈액 위에 lymphoprep을 섞이지 않도록 조심스럽게 첨가한 후 800g에서 20분간, 실온에서 원심분리 한 다음 sample과 medium의 중간층인 mononuclear cell을 분리해 내었다. 0.9% NaCl로 희석하여 250g에서 10분간 실온에서 원심분리 한 후 cell counting을 실시하여 정확한 세포수를 계산한 다음 eosinophil isolation buffer로 세척하였다.

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) Lymphocyte로부터 호산구의 분리

$5 \times 10^7$  cell에  $50 \mu\text{l}$ 의 MACS CD3 immunomagnetic bead(Miltenyi Biotec, Germany)를 혼합하여  $6^\circ\text{C}$ 에서 15분간 배양한 후 SuperMACS separation system을 이용하여 magnetic 부분에 분리관을 설치하고 세포와 bead 혼합을 통과시켜 bead와 결합한 세포를 positive selection한 다음 CD16 immunomagnetic bead를 다시 혼합하여  $10^\circ\text{C}$ 에서 30분간 배양한 후 SuperMACS separation system을 이용하여 magnetic 부분에 분리관을 설치하고 세포와 bead 혼합을 통과시켜 bead와 결합하지 않은 호산구만을 획득하는 negative selection을 통해 호산구를 분리하였다. 분리한 세포는 Diff-Quik Kit(Sysmex Corporation, Japan)를 사용하여 분리된 세포 수와 purity를 확인하였다.

## (3) 호산구의 Diff-Quik염색

분리한 호산구  $5 \mu\text{l}$ 를 microscope 슬라이드에 떨어뜨린 다음 또 다른 슬라이드를 이용하여 넓게 폈다. 실온에서 약 15분 정도 건조시킨 슬라이드를 고정액에 10초간 담가 고정시키고 Solution 1에 20초 동안 담가 고정된 슬라이드를 염색시킨 다음 Solution 2에 20초 동안 담가 착색시킨 슬라이드를 증류수로 닦아 내고 실온에서 건조시킨 후 건조된 슬라이드를 커버슬라이드로 덮어 현미경으로 관찰하였다.

## 7) 호산구 chemotaxis assay

A549 cell을 cytokine assay에서와 같은 방법으로 IL-4와 TNF- $\alpha$ 를 첨가하여 eotaxin을 자극한 후 金銀花 100, 1,  $0.01 \mu\text{g/ml}$  농도로 24시간 동안 처리한 다음 상등액을 취하여 48-well multiwell chemotaxis chamber (NeuroProbe Inc, USA)의 아래 well에  $28 \mu\text{l}$  씩 채웠다. 그 위에 pore size  $5 \mu\text{m}$ 의 polycarbonate filter (NeuroProbe)를 덮고 윗 well에 분리한 사람 호산구를  $1 \times 10^5/\text{ml}$ 로  $56 \mu\text{l}$ 씩 넣은 chamber를  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  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

金銀花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).

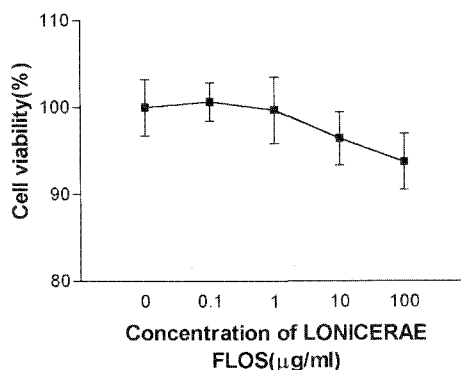


Fig. 1. Identification of A549 cell cytotoxicity for Lonicerae Flos. Each concentration was assayed in triplication and were measured at 490nm using fluorescence microplate reader.

2. Eotaxin assay 결과

A549 cell을 Th2 계통의 IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  cytokine으로 자극한 후 金銀花로 0.01-100 $\mu$ g까지 농도별로 처리한 결과 10 $\mu$ g/ml에서 50% 감소하였고 100 $\mu$ g/ml에서는 70%이상의 현저한 감소를 나타냈다. 세포 독성 실험에서 金銀花가 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 것으로 확인했기 때문에 eotaxin에 대한 저해효과가 있는 것으로 판단할 수 있었다(Fig. 2).

3. RT-PCR을 이용한 chemokine 발현량 결과

1) GAPDH

각각의 유전자 발현량을 normalization 하기 위하여 control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve 와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct값을 기준으로 작성된 standard curve는 Fig. 3과 같다. Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석결과 R<sup>2</sup>는 0.9986으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

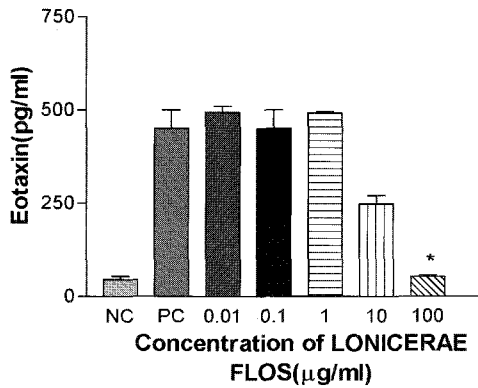
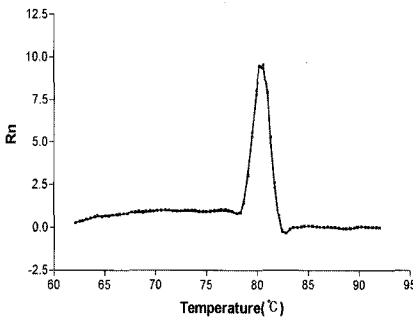


Fig. 2. Cytokine inhibition assay of Lonicerae Flos from stimulated A549 cell.

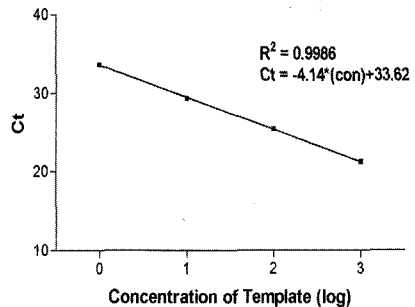
NC: only medium

PC: stimulation Eotaxin release into the medium was measured by an ELISA.

The asterisk denotes a significant difference ( $P < 0.05$ )



A. Dissociation curve of GAPDH



B. Standard curve of GAPDH

Fig. 3. Dissociation and standard curve of GAPDH as internal control

A: After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 78 to 83 $^{\circ}$ C were detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer.

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) RANTES

RANTES 유전자에 대한 real time PCR 결과로 dissociation curve와 standard curve를 구하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형 회귀분석결과  $R^2$ 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(Fig. 4).

金銀花를 0.01, 1, 100 $\mu$ g/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 RANTES에 대한 mRNA의 발현량이 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 100 $\mu$ g/ml 농도에서만 positive control에 비하여 5% 감소하였다.

## 3) ICAM-1, VCAM-1

ICAM-1 유전자에 대한 real time PCR 결과로 dissociation curve와 standard curve를 구하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형 회귀분석결과  $R^2$ 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.

金銀花를 0.01, 1, 100 $\mu$ g/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 ICAM-1에 대한 mRNA 발현량이 control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1 $\mu$ g/ml에서 14% 감소 하였고, 100 $\mu$ g/ml 농도에서는

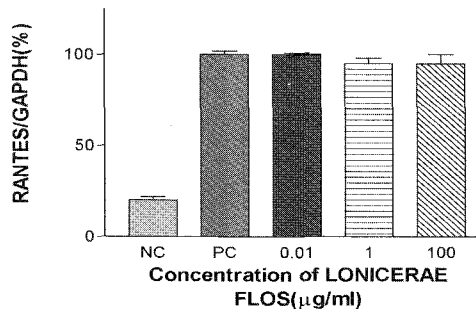


Fig. 4. Expression level of RANTES

NC: negative control (only A549 cell) PC: positive control (cytokine stimulated A549 cell)

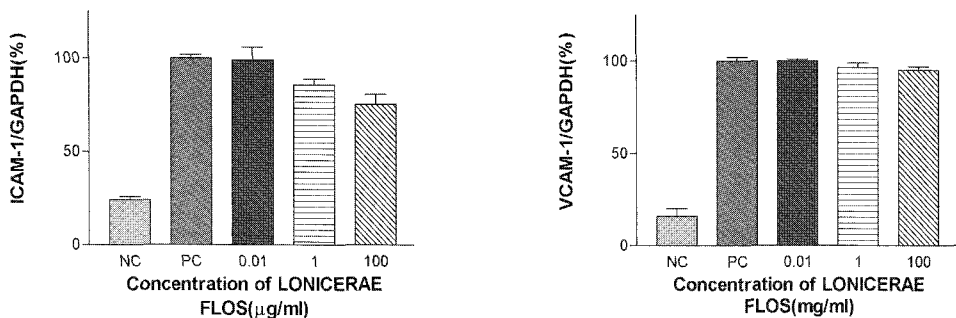


Fig. 5. Expression level of ICAM-1 and VCAM-1

NC: negative control (only A549 cell) PC: positive control (cytokine stimulated A549 cell)

24.5%가 감소하는 것을 확인 하였다(Fig. 5).

VCAM-1 유전자에 대한 real time PCR 결과로 dissociation curve와 standard curve를 구하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형 회귀분석결과  $R^2$ 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.

金銀花를 0.01, 1, 100 $\mu$ g/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 VCAM-1에 대한 mRNA 발현량이 control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 100 $\mu$ g/ml 농도에서도 3.8%만 감소하는 것을 확인 하였다(Fig. 5).

#### 4) IL-8

IL-8 유전자에 대한 real time PCR 결과로 dissociation curve와 standard curve를 구하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형 회귀분석결과  $R^2$ 는 0.9929으로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의 IL-8 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용

하여 나눔으로써 표준화 하였다(Fig. 6).

金銀花를 0.01, 1, 100 $\mu$ g/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 IL-8에 대한 mRNA 발현량이 control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1 $\mu$ g/ml 농도에서는 15%의 감소를 보였고 100 $\mu$ g/ml의 농도에서는 25.5%의 큰 저해 효과를 확인하였다.

#### 5) IL-16

IL-16 유전자에 대한 real time PCR 결과로 dissociation curve와 standard curve를 구하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형 회귀분석결과  $R^2$ 는 0.9934으로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의 IL-16 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 표준화 하였다.

金銀花를 0.01, 1, 100 $\mu$ g/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 IL-16에 대한 mRNA 발현량이 control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 어느 농도에서도 control에 비해 전혀 감소 효과를 보이지 않았다.

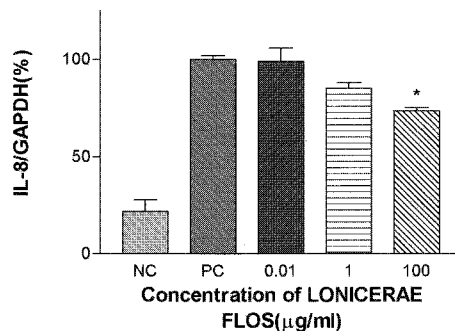


Fig. 6. Expression level of IL-8

NC: negative control (only A549 cell) PC: positive control (cytokine stimulated A549 cell)  
The asterisk denotes a significant difference ( $P < 0.05$ )



## 4. 사람 혈액으로부터 호산구의 분리 결과

사람의 혈액으로부터 lymphoprep을 이용하여  $2 \times 10^8$ 개의 lymphocyte를 분리하였고 이를 CD 3와 CD 16 immunomagnetic bead로 selection하여  $1 \times 10^5$ 개의 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 진한 점으로 보이는 것을 투과막을 통과한 세포로 보고 희미한 점들은 통과하지 못하고 반대쪽에 비특이적으로 붙어있는 세포로 간주하였다. 金銀花 농도가 0.01과  $1 \mu\text{g/ml}$ 에서는 control에 비해 차이가 없었고  $100 \mu\text{g/ml}$ 에서만 호산구의 이동성이  $165 \pm 16$ 개로 유의성( $p < 0.05$ )있게 저해되는 것을 알 수 있었다(Table 2).

## Ⅳ. 考 察

韓醫學에서 천식과 유사한 病證으로는 呼吸急促하고 喘鳴有聲한 증상을 특징으로 하는 哮喘證이 해당되며, 분류는 虛症과 實證으로 나누고 實症은 外感風寒 痰濕內盛으로, 虛症은 肺虛, 心腎虛損, 上

實下虛로 나누어 치료하고 있다<sup>17,18</sup>.

호산구는 천식에서 기도의 염증변화를 일으키는 중요한 세포로 MBP(major basic protein), ECP(eosinophilic cationic protein), EDN(eosinophil-derived neurotoxin), 그리고 EPO(eosinophil peroxidase) 등을 분비하여 여러 염증반응을 매개한다<sup>19</sup>.

호산구의 조절에는 helper T 세포가 중심적인 역할을 수행한다. 호산구의 성장과 분화는 helper T 세포가 분비하는 cytokine인, IL-5에 의해 촉진되며 IL-5는 호산구의 생성도 촉진하는 것으로 알려져 있다. 활성화된 T cell이 분비하는 cytokine은 기생충감염이나 알레르기 반응이 일어난 병소에 호산구를 chemotaxis, tissue localization 시키는 데에도 기여하는 것으로 알려져 있다. 또한 일반적인 염증반응의 후기에도 helper T cell과 호염기구에서 분비된 IL-4가 혈관의 내피세포에서 VCAM-1과 eosinophil-selective chemokine을 만들도록 자극하여 호산구를 염증에 있는 조직에 끌어들이는 것으로 밝혀졌다<sup>20</sup>.

Eotaxin, MCP-3(macrophage chemotactic protein), MIP-1a 그리고 RANTES가 알레르기 반응시 생성 분비되어 호산구의 유인에 결정적 역할을 수행하고 이중에서 eotaxin은 호산구에 선택적으로 작용하여 호산구염증의 병리에 결정적 역할을 한다. 또한 CCR-3는 호산구의 주된 수용체이기 때문에 호산구염증의 치료제 개발에 있어 주된 목표중 하나임이 분명하다<sup>21</sup>.

실험에 사용된 金銀花의 氣味는 甘寒, 歸經은 肺

Table 2. Cell Counting of Migrated Eosinophils from A549 Cell Monolayers in Response to TNF- $\alpha$ , IL-4 by Lonicerae Flos

	Migrated Eosinophils per High-Power Field				
	NC	PC	Lonicerae Flos (0.01 $\mu\text{g/ml}$ )	Lonicerae Flos (1 $\mu\text{g/ml}$ )	Lonicerae Flos (100 $\mu\text{g/ml}$ )
TNF- $\alpha$ +IL4	90 $\pm$ 37	296 $\pm$ 19	278 $\pm$ 13	307 $\pm$ 22	165 $\pm$ 16*

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

NC: negative control PC: positive control

\*  $p < 0.05$  compared with the PC.

胃心脾經 이며, 清熱解毒작용과 清肺熱 解癰毒寒熱의 주치를 가지고 있어 膿瘍, 癰, 癤 등으로 發赤, 腫脹, 熱感疼痛의 증상에 사용된다. 臨床에서는 感冒나 감염성 질환의 發熱, 惡寒, 頭痛, 咽喉痛에 응용되며, 약리작용은 항균, 항바이러스, 항진균 작용과 이뇨작용 등이 있다<sup>6,22</sup>.

천식환자에서 기관지의 염증을 치료하는 것이 기관지천식치료에 있어 근원적 접근법이라 생각할 수 있으며, 기관지염증의 발생을 예방하면 기관지천식의 발병과 악화를 방지할 수 있을 것이다<sup>23</sup>.

본 실험에서는 천식의 주요 발병원인으로 작용하는 호산구와 호산구의 화학주성과 밀접하게 관련있는 eotaxin을 중심으로 실험을 진행하였고, 또한 IL-8, IL-16, ICAM-1, VCAM-1, RANTES와 같은 chemokine들에 대해서도 mRNA 측면에서 金銀花의 효과를 확인하였다.

세포독성을 알아 보기위해 金銀花를 농도별로 처리한 결과 농도에 따른 세포 생존율에는 큰 차이가 없는 것으로 나타나 A549 cell에 대해 세포독성을 갖지 않는 것으로 나타났다.

Eotaxin발현에 대한 저해효과는 A549 cell을 IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  cytokine으로 자극 후 金銀花 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu$ g까지 농도별로 처리한 실험에서 金銀花 10 $\mu$ g/ml에서 eotaxin 발현이 50% 감소하였고 金銀花 100 $\mu$ g/ml에서는 eotaxin의 발현이 70%이상의 현저한 감소를 나타냈다.

Eotaxin은 염증부위에 호산구 유인시 핵심적 역할을 할 뿐만 아니라 호산구의 염증유발 기능을 활성화시키므로써 조직 손상에도 기여하는데 이러한 호산구에 대한 선택적 활성화의 분자적 근거는 eotaxin 수용체인 CCR-3를 호산구가 발현하는데 있다<sup>24</sup>.

Eotaxin 유전자가 제거된 생쥐에서 말초혈액의 호산구 감소가 관찰되었고, 알레르기겐에 대한 천식 반응이 지연되거나 완화되는 양상을 보였고<sup>25</sup>, 임상 연구에서 eotaxin mRNA는 천식증상이 있으면서 특별한 치료 없이 지낸 환자의 기도에서 제일 높게 발현되었으며, 정상대조군과 스테로이드 치료를 받으면서 천식증상이 없고 폐기능이 정상을 유지하는

환자에서는 발현되지 않았고 또한 cotaxin mRNA의 발현과 기도내 호산구 침착의 정도와는 상관관계가 있었다. 스테로이드를 사용하고 있으면서 정상 폐기능을 유지하고 있는 환자에서는 cotaxin이 발현되지 않아 스테로이드는 eotaxin mRNA의 발현을 억제하는 것으로 사료된다. 따라서 천식에서 eotaxin은 호산구의 조직내 침착을 유도하는 화학주성 물질이며 천식 발병의 중요한 물질로 사료된다<sup>26</sup>.

이처럼 호산구의 유인과 염증유발에 중요한 역할을 하는 eotaxin의 발현을 金銀花가 억제한다는 실험결과는 천식치료에 응용되는 金銀花의 치료기전을 추측할 수 있으며 임상 활용도를 더욱 높일 수 있을 것으로 생각된다.

A549 cell의 RANTES 발현에 대한 실험에서는 金銀花 0.01, 1, 100 $\mu$ g/ml의 농도중 100 $\mu$ g/ml 농도에서만 positive control에 비하여 RANTES의 mRNA 발현량이 5% 감소하였다.

RANTES는 기억형 CD4 T 임파구와 호산구에 화학주성을 가지고 있으며 호산구 및 호염기구의 활성화에 관여하는데, 기관지염증반응의 단계 중에서 호산구 등의 염증세포들이 혈관벽을 통과한 후 염증부위로의 이동 및 활성화에 관여 한다<sup>27</sup>. 이처럼 RANTES는 호산구 화학주성과 호산구를 활성화 시키는 chemokine이다. 기관지상피세포에서 여러 가지 cytokine(TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  등)에 의해 RANTES가 분비되고, 이러한 RANTES는 천식과 비염의 기관지 염증반응에 관여하게 되나, glucocorticoids에 의해서는 RANTES의 분비가 저해되는 결과를 보였는데 이는 이러한 약물의 치료 기전의 하나로 보았다<sup>28</sup>. 따라서 기관지천식 환자의 병인에 RANTES농도의 증가가 중요한 역할을 하며, 특히 천식의 만성 염증성 변화에 깊이 관여한다고 생각된다.

그러나 본 연구에서는 RANTES에 대한 金銀花의 발현억제 효능이 미약하여 金銀花의 주 치료 기전이 RANTES와 관련이 없는 것으로 생각된다.

A549 cell의 ICAM-1 발현은 金銀花 0.01, 1, 100 $\mu$ g/ml의 농도중 1 $\mu$ g/ml에서 14% 감소하였고, 100 $\mu$ g

/ml 농도에서는 24.5%가 감소하였다.

A549 cell의 VCAM-1 발현은 金銀花 0.01, 1, 100 $\mu$ g/ml의 농도중 100 $\mu$ g/ml 농도에서만 3.8% 감소하였다.

최근 역동학적 실험모형을 이용한 연구로부터 백혈구의 혈관외 유출기전이 구체적으로 규명되었는데, postcapillary 혈관의 국소이완은 염증부위에 말단부위의 혈류의 속도를 감소시키고, 결국은 백혈구가 혈관 쪽으로 치우치는 결과를 일으키게 된다. 이때 P-selectin 및 E-selectin이 혈관 쪽으로 치우친 비활동성 백혈구를 포착하여 혈관의 내피세포벽을 따라 구르게(rolling) 된다. 그 후 주변세포로부터 분비된 cytokine 혹은 PAF(platelet activating factor) 등의 신호를 통해 백혈구가 활성화되어 LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1) 혹은 VLA(very late antigens of activation) 등의 백혈구 유착분자의 부착기능이 상승하게 된다. 활성화된 백혈구는 VLA-4/VCAM-1 혹은 LFA-1/ICAM-1 경로를 통해 강하게 결합한 다음, 혈관밖으로 유출하게 된다<sup>5</sup>.

최<sup>29</sup> 등은 기관지 천식환자에서 IL-6, ICAM-1의 혈중농도가 올라가 있으면 폐기능 장애를 동반한 기도염증이 있다는 것을 나타내며, 호산구의 화학주성과 관련하여 eotaxin에 의한 호산구의 상피조직 이동에는 MAC/ICAM-1과 VLA-4/VCAM-1의 상호작용이 중요하다고 하였다<sup>30</sup>.

유착분자인 ICAM-1과 VCAM-1에 대한 실험결과는 金銀花의 치료기전이 ICAM-1의 발현억제와도 관련 있다는 것을 추측할 수 있으며, 이러한 결과는 金銀花의 천식과 관련된 다양한 치료기전을 생각해 볼 수 있었다.

A549 cell의 IL-8 발현은 金銀花 0.01, 1, 100 $\mu$ g/ml의 농도중 1 $\mu$ g/ml 농도에서는 15%의 감소를 보였고 100 $\mu$ g/ml의 농도에서는 25.5%의 저해 효과를 보였다.

IL-8은 CXC chemokine로 분류되어 주로 호중구에 작용하지만 호산구에는 특정한 상황에서 선택적으로 작용한다. 예를 들어 정상인이 아닌 아토피환

자로부터 분리된 호산구는 IL-8에 반응한다<sup>21,31</sup>. 그러나 CXC chemokine인 IL-8은 호산구의 알러지 염증부위 유입에 별다른 관여를 하지 않는다는 보고도 있다<sup>32</sup>.

金銀花가 IL-8의 발현을 억제한다는 결과는 호산구 뿐만 아니라 만성 천식환자에서 볼 수 있는 호중구의 증가현상에도 유익한 치료효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

A549 cell의 IL-16 발현은 金銀花 0.01, 1, 100 $\mu$ g/ml의 농도중 어느 농도에서도 control에 비해 전혀 감소 효과를 보이지 않았다.

IL-16은 histamine, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  등의 자극을 통하여 기관지 상피세포에서 발현되고, 기도내 염증유발 세포의 축적에 중요한 역할을 담당한다<sup>33</sup>. 또한 IL-16은 CD4+에 대한 강력한 화학주성(chemoattractant) cytokine으로 분류되며, 호산구와 비만세포 그리고 기도의 상피세포에서 생산된 후 CD4+T cell을 모이게 하고 활성화시킨다<sup>34</sup>. 그 외 IL-16과 eotaxin의 차단으로 70%의 호산구 화학주성 억제효능을 보였고, anti-RANTES 항체는 단지 30%의 호산구 화학주성을 억제 효능을 보였다<sup>35</sup>.

IL-16과 관련된 연구로는 TNF- $\alpha$ 로 처리된 BEAS-2B 기관지상피세포를 이용하여 喘四君子湯, 水蛭(麻黃炒) 100 $\mu$ g/ml 농도에서 각각 55%와 67%의 유의한 IL-16 mRNA 발현량 억제를 확인하였고<sup>36</sup>, 박<sup>14</sup>은 桔梗 100 $\mu$ g/ml, 정<sup>37</sup>은 麥門冬 100 $\mu$ g/ml 농도에서 농도에서 IL-16 mRNA 발현량이 56.8%, 27%의 유의성 있는 억제를 확인하였으나, 金銀花의 IL-16의 억제를 확인할 수 없었는데, 이는 염증발현 대상인 기관지상피세포의 차이와 관련 있는 것으로 생각된다.

A549 cell을 이용한 호산구 chemotaxis의 실험결과는 金銀花 100 $\mu$ g/ml 농도에서만 eotaxin이 감소하여 호산구의 이동성이 저해되는 것을 알 수 있었는데, 이동한 호산구의 수가 대조군의 273 $\pm$ 13개에 비해서 165 $\pm$ 16개로 유의성(p<0.05) 있는 감소효과를 보였다. 金銀花가 호산구의 chemotaxis에 미치는 영향에 대해서는 추가적인 연구가 더 필요할 것으로

사료된다.

金銀花의 清熱解毒 清肺熱 解癰毒寒熱의 작용과 실험으로 확인된 모세혈관투과성 억제작용 및 mouse 망내계의 탐식증강작용 등을 통하여 다양한 효능을 확인할 수 있었는데, 이번 실험으로 통해 金銀花의 호산구의 이동성 억제작용을 확인함으로써 감염에 의한 염증뿐 만 아니라 천식과 같은 면역체계의 이상으로 나타난 염증에도 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 특히 金銀花의 천식 치료기전은 호산구의 이동성 억제와 관련이 있으며, 이 중 eotaxin 과 IL-8 및 ICAM-1의 발현억제를 통한 호산구의 화학주성을 조절하는 것으로 확인되었다.

## V. 結 論

A549 human lung epithelial cell에서 金銀花가 eotaxin, RANTES, ICAM-1, VCAM-1, IL-8, IL-16 과 같은 chemokine과 eosinophil에 미치는 영향을 알아보기 위해 金銀花에 대한 세포 독성 실험, sandwich ELISA, RT-PCR을 이용한 chemokine 저해 효과에 대한 in vitro 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. A549 인간기관지 상피세포를 이용하여 金銀花의 세포독성을 농도별로 관찰한 결과 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.
2. A549 인간기관지 상피세포에 chemokine의 발현을 유도한 다음 金銀花를 100, 10, 1, 0.1, 0.01 $\mu$ g/ml 농도로 처리한 결과 eotaxin의 생산량이 金銀花 농도 의존적으로 저해되는 것을 확인하였다.
3. RANTES, ICAM-1, VCAM-1, IL-8, IL-16의 mRNA 발현량의 저해 효과를 real time PCR 기법을 통해 확인하였고, 100 $\mu$ g/ml에서 IL-8과 ICAM-1 발현량이 각각 24%와 25.5% 저해된 효과를 확인하였다.
4. 호산구를 이용하여 chemotaxis assay를 실시한 결과 100 $\mu$ g/ml에서 유의성있는 감소를 나타내어 고농도 金銀花의 chemoattractant에 대한 저해 효과를 확인하였다.

## 參考文獻

1. Adamko D, Odemuyiwa SO, Moqbel R. The eosinophil as a therapeutic target in asthma: beginning of the end, or end of the beginning?. *Current Opinion in Pharmacology*. 2003;3(3): 227-32.
2. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Eng J Med*. 1998;338:1592-600.
3. 천식 및 알레르기 학회. 천식과 알레르기. 서울: 군자출판사; 2002, p.59-62, 237-56.
4. Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, Robinson DS, Macfarlane A, Humbert M, et al. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J Immunol*. 1999 Dec 1;163(11): 6321-9.
5. 이양근. 알레르기 질환에서의 유착분자. 대한천식 및 알레르기학회 춘계학술대회초록집 1995: 105-110.
6. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영중, 김선희. 韓藥臨床應用. 서울: 전통의학연구소; 2003, p.123-124.
7. 우종오. 金銀花엑기스의 Mouse 망내계의 탐식 화성화작용 및 모세혈관 투과억제작용에 관한 연구. 중앙대학교 대학원. 1986.
8. 한화연. 금은화의 항염증작용에 관한 연구. 숙명여자대학교 대학원. 1990.
9. 정희재, 박성규, 정승기, 이형구. 금은화와 백작약이 BEAS-2B 기관지상피세포의 Cytokine mRNA level에 미치는 영향. *대한한의학회지* 2003;24(3):145-54.
10. 정진용, 정희재, 정승기, 이형구. 小青龍湯과 小青龍湯加沙蔘이 BEAS-2B 人間 氣管支上皮細胞의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF mRNA level에 미

- 치는 影響. 대한한의학회지 2003;24(1):74-83.
11. 車恩秀, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九. 小青龍湯이 Asthma model 내의 Cytokine에 미치는 영향. 경희한의대논문집 2000;23(1):71-88.
  12. 주창엽, 황우석, 허태석, 정희재, 정승기, 이형구. 六味地黃湯合瀉白散과 桑白皮가 人間 氣管 支上皮細胞의 IL-6, IL-8, GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2001; 22(3):415-22.
  13. 정광진, 정희재, 정승기, 이형구. 瀉白散과 瀉白散加沙參이 人間 氣管支上皮細胞의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF 發顯에 미치는 影響. 대한한방내과학회지 2002;23(1):15-24.
  14. 박상현, 정희재, 정승기, 이형구. 麻杏甘石湯과 桔梗이 인간기관지 상피세포의 Cytokine에 미치는 영향. 경희의학 2001;17(2):230-41.
  15. 李同生, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九. 麥門冬과 五味子가 Asthma model 內의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響. 慶熙醫學 2000;16(2): 69-80.
  16. 鄭旭, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九. 杏仁과 桔梗이 Asthma model 내의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 영향. 大韓韓方內科學會誌 2000; 21(1):31-38.
  17. 전국한의과대학폐계내과교실편저. 東醫肺系內科學. 서울: 도서출판 국진; 2004, p.192-9, 329-31.
  18. 정희재, 정승기, 이형구. 臨床肺系內科學. 서울: 한문회사; 2003, p.138-40.
  19. 이양근. 호산구와 천식. 결핵 및 호흡기질환. 1999;46(1):5-16.
  20. 서울대학교 의과대학 내과학교실편. 최신지견 내과학II. 서울: 도서출판 고려의학; 2003, p.1275.
  21. 정일엽, 박춘식. 호산구와 관련된 chemokine에 대한 새로운 조명. 천식 및 알레르기. 2001; 21(2):161-72.
  22. 李龍城. 經藥分類典. 서울: 도서출판 정담; 2002, p.22.
  23. 고영률. 천식의 병태생리. 소아알레르기 및 호흡기. 2000;10(4):255-62.
  24. Dunzendorfer S, Kaneider NC, Kaser A, Woell E, Frade JM, Mellado M, et al. Functional expression of chemokine receptor 2 by normal human eosinophils. J Allergy Clin Immunol. 2001;108(4):581-7.
  25. Rothenberg ME, MacLean JA, Pearlman E, Luster AD, Leder P. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia, J Exp Med. 1997 Feb 17;185(4):785-90.
  26. 인광호, 조재연, 강세용, 이상엽, 심재정, 강경호 등. 천식환자의 기관지 조직에서 Eotaxin mRNA 발현에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환. 1998;45(4):697-704.
  27. Alam R, Stafford S, Forsythe P, Harrison R, Faubion D, Lett-Brown MA et al. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. J Immunol. 1993;150(8 Pt 1): 3442-8.
  28. 이양근, 김재현, 이용철. 기관지천식환자에서 기관지특이항원 유발검사후 RANTES농도의 변화. 결핵 및 호흡기질환. 1996;43(2):182-9.
  29. 최재선, 이병훈, 안창혁, 유지훈, 나문준, 김재열 등. 기관지 천식환자에서 혈청 IL-6, ICAM-1, RANTES 농도 측정의 임상적 의의. 대한내과학회지. 1998;55(5):847-53.
  30. Jia GQ, Gonzalo JA, Hidalgo A, Wagner D, Cybulsky M, Gutierrez-Ramos JC. Selective eosinophil transendothelial migration triggered by eotaxin via modulation of Mac-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 interactions. Int Immunol. 1999;11(1):1-10.
  31. Sehmi R, Cromwell O, Wardlaw AJ, Moqbel R, Kay AB. Interleukin-8 is a chemo-attractant for eosinophils purified from subjects with a

- blood eosinophilia but not from normal healthy subjects. *Clin Exp Allergy*. 1993;23(12): 1027-36.
32. Petering H, Gotze O, Kimmig D, Smolarski R, Kapp A, Elsner J. The biologic role of interleukin-8: functional analysis and expression of CXCR1 and CXCR2 on human eosinophils. *Blood*. 1999;93(2):694-702.
33. Arima M, Plitt J, Stellato C, Bickel C, Motojima S, Makino S et al. Expression of interleukin-16 by human epithelial cells. Inhibition by dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999 Dec;21(6):684-92.
34. Cruikshank WW, Center DM, Nisar N, Wu M, Natke B, Theodore AC, et al. Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91:5109-13.
35. Cheng G, Ueda T, Eda F, Arima M, Yoshida N, Fukuda T. A549 cells can express interleukin-16 and stimulate eosinophil chemotaxis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;25(2):212-8.
36. 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.
37. 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. *대한한의학회지* 2002;23(1):11-23.