

牡丹皮가 喘息유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향

문성훈, 정희재, 정승기, 이형구
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

Moutan Cortex Radicis contributes to the chemotaxis of eosinophils and secretion of cytokines in A549 human epithelial cells

Sung-Hun Moon, 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: Airway inflammation is now regarded as a defining feature of asthma. The importance of eosinophils in the airway inflammation of asthma patients is widely recognized, and eosinophils mobilization in the respiratory epithelium is activated by chemoattractants and cytokines. This study was designed to examine the extent of the ability of Moutan Cortex Radicis to inhibit eosinophil chemotaxis of pulmonary epithelium after allergic stimulation.

Material and Methods: Water extracts of Moutan Cortex Radicis and pulmonary epithelial cell lines A549(human type II-like epithelial cells) and human eosinophils were used. Cytotoxic effects of Moutan Cortex Radicis were estimated via MTS assay, and the effects of Moutan Cortex Radicis on chemokines from prestimulated A549 cells were estimated by sandwich ELISA and RT-PCR. Chemotaxis assay on prestimulated eosinophils treated with Moutan Cortex Radicis was conducted.

Result: In this study we demonstrated that TNF- α and IL-4, IL-1 β induced the accumulation of chemokines' mRNA in the pulmonary epithelial cell lines A549 in a dose-dependent manner. Chemokines of eotaxin, ICAM-1, VCAM-1, IL-8, IL-16 were inhibited by Moutan Cortex Radicis in a dose dependent manner, but RANTES showed no inhibition due to Moutan Cortex Radicis. Eosinophil migration was inhibited at high concentrations of Moutan Cortex Radicis.

Conclusion: These findings are indicative of suppression of chemokines accomplished by Moutan Cortex Radicis treatment, demonstrating the potential therapeutic value of Moutan Cortex Radicis for treating diseases such as asthma.

Key Words: Moutan Cortex Radicis, eosinophil, eotaxin, asthma, cytokine

1. 緒 論

기관지 천식은 알레르겐, 비만세포 및 IgE가 관여하여 분비되는 화학매체의 직접적인 약리작용에 발병되거나, 화학매체와 사이토카인, 유착분자가 관여하여 기관지로 모여온 염증세포에 의해서 발병되

는 기도의 만성 알레르기 염증성 질환으로 이해되고 있다¹.

호산구는 천식환자의 기도염증에 중요한 작용인자로 알려져 있으며, 특히 호산구에서 유리된 독성 단백질과 지질인자는 기관지상피세포 손상과 기도폐쇄에 중요한 역할을 한다². 호산구는 혈관내피세포에 발현된 유착물질과 화학주성물질(chemoattractant) 및 chemokine에 의해 표적장기로 이동되고, 여러 세포에서 유리되는 화학매체와 자신에 의해 유리된 cytokine에 의해 활성화됨으로써 화학매체와 세포독

· 접수 : 2005. 2. 18 · 채택 : 2005. 2. 28
· 교신저자 : 정희재, 서울시 동대문구 회기동 1 경희의료원
한방5내과 의사실
(Tel. 02-958-9147 Fax. 02-958-9148
E-mail : hanfish@khmc.or.kr)

성단백을 유리하여 친식의 특징적인 기도수축반응과 기도내 염증반응을 유발시킨다³. 알레르기성 염증부위에 호산구의 침윤은 모세혈관에서 병변부위로 침윤되는 과정에서 호산구가 혈관내피세포에 유착하고, 화학주성물질의 농도에 반응하여 혈관내피세포를 빠져나와 호산구를 비롯한 백혈구가 병변부위로 이동하게 되는 두 단계를 필수적으로 거치게 된다⁴.

유착분자는 세포의 활성화, 이동 등에 작용함으로써 세포의 기능에 다양하게 영향을 미치고, 염증반응의 주된 매개인자로 특히 알레르기 질환의 염증반응에 중요한 역할을 담당하고 있다⁵.

Eotaxin은 기도상피세포, T 세포, 폐포대식세포 등에서 생산되며 특히 호산구 자체에서도 생산되어 국소적으로 호산구 집결에 관여하는 중요한 autocrine pathway를 형성한다⁶. 따라서 호산구 관련 cytokine과 IL-5, eotaxin 그리고 RANTES 와 같은 chemokine이 일반적 친식치료를 위한 주목표였다².

牡丹皮(Moutan Cortex Radicis, *Paonia suffruticosa* Andr.)는 微寒 苦辛한 性味를 가지며 淸熱涼血 活血祛瘀 작용이 있어 肝熱로 인한 發熱, 盜汗, 頭痛, 月經不順에 사용하고, 陰虛發熱, 血熱妄行, 打撲捻挫에 의한 瘀血에도 응용 되고 있다⁷.

牡丹皮와 관련된 연구로는 이⁸ 등은 비만세포의 histamine 생산억제작용과 혈액내 IgE 및 IgG1 항체 생산능의 억제작용을 통한 항알러지 작용에 대한 동물실험 결과를, 노⁹는 염증유발물질 PMA 자극에 의한 인간단핵구 U937 세포의 IL-8 및 MCP-1 chemokine 생성억제 작용을 牡丹皮의 淸熱涼血 活血行瘀 등의 효능과 연관하여 설명하였으나, 친식과 관련하여 호산구를 유도하는 chemokine과 관련된 연구는 없었다.

이에 저자는 친식 발병의 주요원인으로 작용하는 호산구의 유도를 활성화 시키는 chemokine의 생산 및 생산 경로에 대한 牡丹皮의 효능을 연구하고자 호산구에 가장 주요하게 작용하는 eotaxin을 중심으로 실험을 진행하였고 또한 IL-8, IL-16, ICAM-1, VCAM-1, RANTES와 같은 chemokine들에 대해서

도 mRNA 측면에서 牡丹皮의 효과를 확인하여 결과를 보고하고자 한다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 牡丹皮(Moutan Cortex Radicis, *Paonia suffruticosa* ANDR.)는 Sun Ten Phatmaceutical Co., Taiwan에서 수입한 물추출 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

세포배양을 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 牡丹皮(Sun Ten Phatmaceutical Co., Taiwan)에 대한 세포 독성을 측정하기 위해 배양한 세포를 96-well plate (Corning, U.S.A.)에 2×10^4 cells/well로 seeding한 다음 24시간 동안 배양한 후 약재를 농도별로 牡丹皮 100, 10, 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 로 배지에 희석하여 100 μl 씩 well에 첨가한다. 24시간 동안 방치한 후 MTS solution(Promega, Madison, U.S.A.)을 20 μl 씩 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 다음 O.D.=490에서 흡광도를 측정하였고 각 실험은 triplicate로 3회에 걸쳐 확인하였다.

2) Cytokine 처리 조건에 따른 eotaxin과 RANTES의 발현양 확인

배양한 A549 cell을 5×10^5 cells/well로 12-well

plate(Corning, U.S.A.)에 plating하여 24시간 배양한 후 serum free media로 교체한 다음 24시간 방치하고 TNF- α (Biosource, Camarillo, U.S.A.) 50ng/ml과 IL-4(Biosource, Camarillo, U.S.A.) 50ng/ml, IL-1 β (Biosource, Camarillo, U.S.A.) 10ng/ml을 최적 농도로 동시에 처리하여 24시간과 48시간 동안 배양하는 조건, cotaxin과 RANTES를 전후에 자극하는 방법, 배지를 교체 여부에 따른 차이로 조건을 실험하였다. 획득된 상등액을 취하여 Human cotaxin ELISA Set(BD Bioscience, U.S.A.)를 이용하여 sandwich ELISA를 실시하였고 RANTES의 발현 농도는 mRNA 측면에서 RT-PCR(Reverse Transcriptase PCR) 방법으로 확인하였다.

3) Sandwich ELISA

96-well plate(Costar, USA)에 100 μ l/well anti-human eotaxin(BD Bioscience, USA)을 coating하여 4 $^{\circ}$ C에서 O/N 배양하고 0.05% PBS-tween 20으로 3회 세척한 후 200 μ l Pharmigen's Assay Diluent(BD Bioscience, USA)로 실온에서 1시간 동안 차단시켰다. 3회 세척 후 Pharmingen Assay Diluent에 희석한 표준시료를 100 μ l씩 첨가하여 실온에서 2시간 동안 배양한 다음 3회 세척 후 100 μ l anti-cotaxin detection antibody와 Avidin-horseradish peroxidase conjugate를 가하여 1시간 동안 실온에 방치하였고, 7회 세척한 후 100 μ l Tetramethylbenzidine과 Hydrogen peroxide(Pharmingen's TMB Substrate Reagent set, BD Bioscience, USA)를 첨가하여 30분간 실온에 반응시킨 다음 2N H₂SO₄ 50 μ l를 첨가하여 반응을 정지시키고 30분 이내에 O.D.= 450, 570에서 ELISA reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

4) Eotaxin Assay

배양한 A549 cell을 5 \times 10⁵ 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 牡丹皮를 100, 10, 1, 0.1, 0.01 μ g/ml의 농도로 희석하여 48시간 동안 처리한 후 상등액을 취하여 human eotaxin ELISA Kit를 이용하여 sandwich ELISA를 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 μ l씩 첨가하여 lysis 시킨 후 200 μ l씩 가하여 vortex한 다음 실온에서 5분간 방치한 다음 100 μ l chloroform을 첨가하여 15초간 흔들어준 후 상온에서 3분간 방치한 다음 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 취해서 옮긴 후 250 μ l Isopropanol을 첨가한 다음 10분간 실온에 방치했다가 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm에서 10분간 원심분리하여 RNA pellet을 획득한 후 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 이차 구조를 풀어주었고 5X synthesis buffer 5 μ l, 10mM dNTPs 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 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 tranriptase PCR analysis

Total RNA로부터 합성한 cDNA는 reverse transcriptase PCR과 real time PCR에 모두 사용하

었는데 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 맞추는 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.Ccontrol로 GAPDH의 발현량을 이용하여 표준화하였고 RANTES, IL-16에 대한 발현량을 일차적으로 확인하였으면 PCR에 사용한 specific primer는 Table 1에 기록하였다.

(4) cDNA를 이용한 real-time PCR반응

RT-PCR 시 GeneAmp 5700 Sequence Detector (Applied Biosystems)를 사용하여 합성한 각 sample의 templete을 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 $^{\circ}$ 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 다음과 같다(Table 1).

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 혈액위에 lymphoprep을 섞이지 않도록 조심스럽게 첨가한 후 800g에서 20분간, 실온에서 원심분리 한 다음 sample과 medium의 중간층인 mononuclear cell을 분리해 냈다. 0.9% NaCl로 희석하여 250g에서 10분간 실온에서 원심분리 한 후 cell counting을 실시하여 정확한 세포수를 계산한 다음 eosinophil isolation buffer로 세척하였다.

(2) Lymphocyte로부터 호산구의 분리

5x10⁷ cell에 50 μ l의 MACS CD3 immunomagnetic beads(Miltenyi Biotec,Germany)를 혼합하여 6 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양한 후 SuperMACS seperation system을 이용하여 magnetic 부분에 분리관을 설치하고 세포와 bead 혼합을 통과시켜 bead와 결합한 세포를 positive selection한 다음 CD16 immunomagnetic bead를 다시 혼합하여 10 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 후 SuperMACS seperation system을 이용하여 magnetic 부분에 분리관을 설치하고 세포와 bead 혼합을 통과시켜 bead와 결합하지 않은 호산구만을 획득하는

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'

negative selection을 통해 호산구를 분리하였다. 분리한 세포는 Diff-Quik(Sysmex Corporation, Japan) staining 방법을 통해 분리된 세포 수와 purity를 확인하였다.

(3) 호산구의 Diff-Quik염색

분리한 호산구 5 μ l를 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 건조시켰다. 건조된 슬라이드는 mounting를 거쳐 커버슬라이드를 덮어 현미경으로 관찰하였다.

7) 호산구 chemotaxis assay

A549 cell을 cytokine assay에서와 같은 방법으로 IL-4와 TNF- α 를 첨가하여 eotaxin을 자극한 후 牡丹皮 100, 1, 0.1 μ g/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 다음 상등액을 취하여 48-well multiwell chemotaxis chamber (NeuroProbe Inc, USA)의 아래 well에 28 μ l 씩 채웠다. 그 위에 pore size 5 μ m의 polycarbonate filter (NeuroProbe)를 덮고 윗 well에 분리한 호산구를 1x10⁵/ml로 56 μ l씩 넣은 chamber를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 90분간 배양하였다. Top well에서 호산구를 제거한 후 여과막을 Diff-Quik 염색하여 chemotaxis activity에 의해 여과막으로 이동한 호산구의 수를 400배 현미경으로 계산하였다.

III. 結果

1. 세포 독성 확인

牡丹皮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).

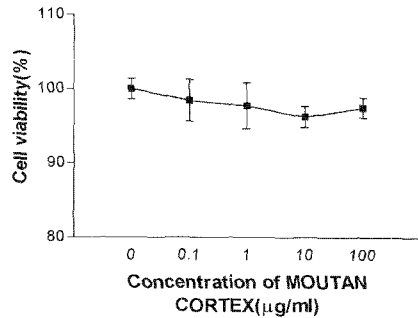


Fig. 1. Identification of A549 cell cytotoxicity for Moutan Cortex. Each concentration was assayed in triplication and were measured at 490nm using fluorescence microplate reader.

2. Eotaxin assay 결과

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

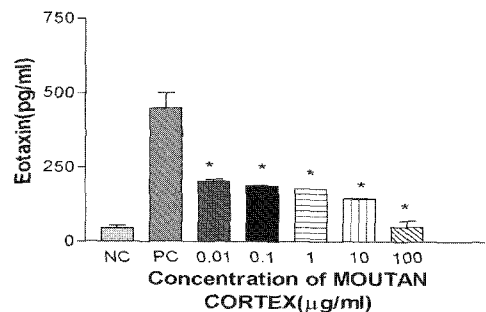


Fig. 2. Eotaxin inhibition assay of Moutan Cortex from stimulated A549 cell.

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

The asterisk denotes a significant difference (p<0.05)

3. RT-PCR을 이용한 chemokine 발현량 결과

1) GAPDH

각각의 유전자 발현량을 normalization 하기 위하여 control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct값을 기준으로 작성된 standard curve는 Fig. 3과 같다. Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석결과 R²는 0.9986으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

2) RANTES

RANTES 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve를 구하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고, 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R²는 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).

牡丹皮를 0.01, 1, 100 µg/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 RANTES에 대한 mRNA에 수준에서 발현량이 control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인

한 결과 모든 농도에서 발현량이 감소하지 않는 것으로 나타났다.

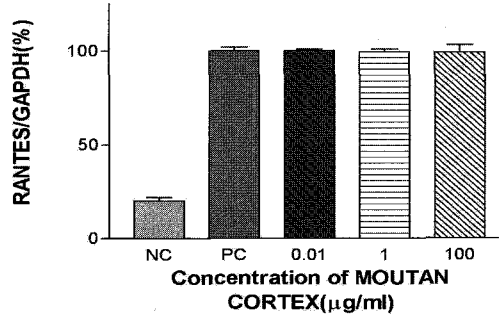


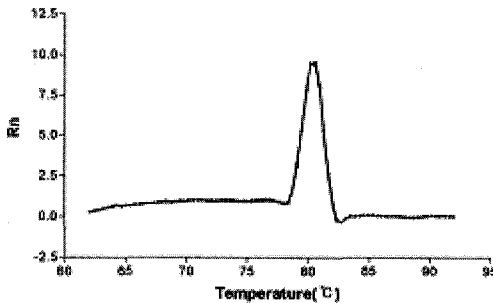
Fig. 4. Expression level of RANTES

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

3) ICAM-1, VCAM-1

ICAM-1 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve를 구하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R²는 0.9930으로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의

A. Dissociation curve of GAPDH



B. Standard curve of GAPDH

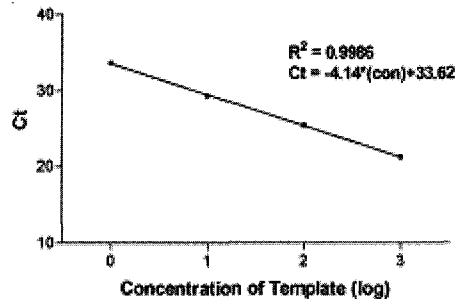


Fig. 3. Dissociation and standard curve of GAPDH as internal control

A: After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 78 to 83°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.

ICAM-1 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 표준화 하였다(Fig. 5).

牡丹皮를 0.01, 1, 100 μ g/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 ICAM-1에 대한 mRNA에 수준에서 발현량이 control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1 μ g/ml에서 9.7%, 100 μ g/ml 농도에서 11.5%가 감소하였다.

VCAM-1 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve를 얻었다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형 회귀분석결과 R²는 0.9960으로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의 VCAM-1 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 표준화하였다(Fig. 5).

牡丹皮를 0.01, 1, 100 μ g/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 VCAM-1에 대한 mRNA에 수준에서 발현량이 control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1 μ g/ml에서 9.8%, 100 μ g/ml 농도에서 13.5% 감소하였다.

5) IL-8, IL-16

IL-8 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve를 구하였다.

Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형 회귀분석결과 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(Fig. 6).

牡丹皮를 0.01, 1, 100 μ g/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 IL-8에 대한 mRNA에 수준에서 발현량이 control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1 μ g/ml 농도에서는 5%의 감소를, 100 μ g/ml의 농도에서는 12.5%의 감소를 보였다.

IL-16 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve를 구하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형 회귀분석결과 R²는 0.9934으로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의 IL-16 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 표준화하였다(Fig. 6).

牡丹皮를 0.01, 1, 100 μ g/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 IL-16에 대한 mRNA에 수준에서 발현량이 control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1 μ g/ml 농도에서는 3.5%의 감소를, 100 μ g/ml

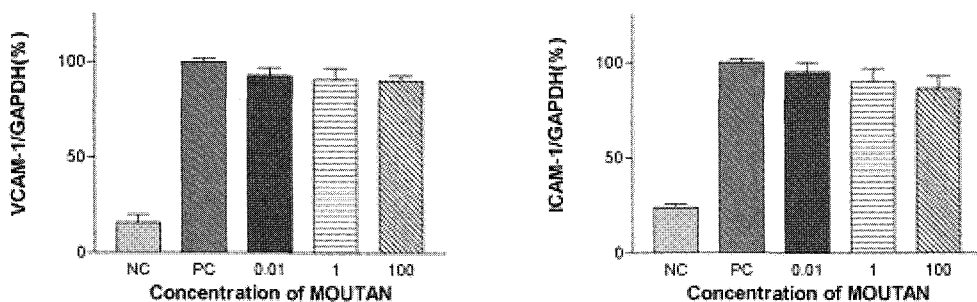


Fig. 5. Expression level of ICAM-1 and VCAM-1

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

의 농도에서는 5%의 감소를 보였다.

4. 사람 혈액으로부터 호산구 분리결과

사람의 혈액으로부터 lymphoprep을 이용하여 2×10^8 개의 lymphocyte를 분리하였고 이를 CD 3와 CD 16 immunomagnetic bead로 selection하여 1×10^5 개의 호산구를 획득하였다. 이 세포는 Diff-Quick staining 방법으로 염색하여 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. 화학주성물질에 의해 호산구가 막상의 구멍(화살표)으로 이동하게 되고 이를 Diff-Quick Kit를 이용하여 염색한 후 현미경으로

관찰한 결과 진한 점으로 보이는 것이 막을 통과한 cell이고 희미한 점들은 통과하지 못하고 반대쪽에 비특이적으로 붙어있는 세포를 보여준다. 牡丹皮 농도가 0.01과 $1 \mu\text{g/ml}$ 에서는 control에 비해 차이가 없었고 $100 \mu\text{g/ml}$ 에서만 호산구의 이동성이 197 ± 27 개로 유의성($p < 0.05$)있게 저해되는 것을 알 수 있었다(Table 2).

IV. 考 察

기관지 천식이 기도내 염증반응에 의한 기도과민성질환으로 알려지면서 염증반응을 일으키는 세포에 관한 연구가 지속적으로 진행되어, 기도내 염증반응은 주로 호산구에 의해 일어난다는 것이 밝혀짐으로써 호산구는 종래의 유익한 세포에서 세포독성 염증세포로 인식이 전환되었다³.

알레르기도 결국 염증반응이며, 염증이란 백혈구

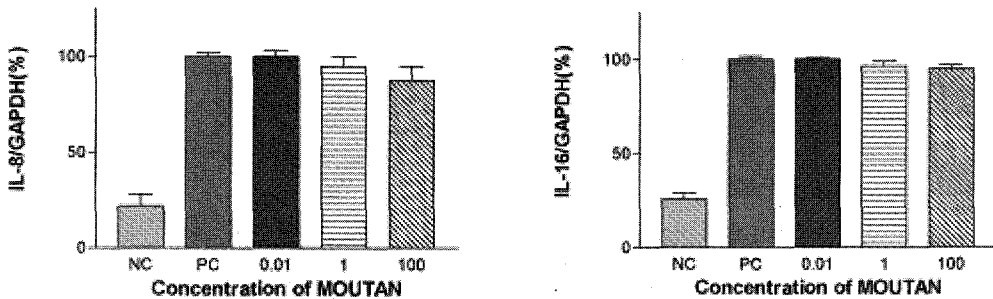


Fig. 6. Expression level of IL-8 and IL-16

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

Table 2. Cell Counting of Migrated Eosinophils Released from A549 Cell Monolayers in Response to TNF- α , IL-4 by MOUTAN CORTEX

	Migrated Eosinophils per High-Power Field				
	NC	PC	Moutan Cortex (0.01 $\mu\text{g/ml}$)	Moutan Cortex (1 $\mu\text{g/ml}$)	Moutan Cortex (100 $\mu\text{g/ml}$)
TNF- α +IL4	90 \pm 37	296 \pm 19	321 \pm 28	288 \pm 41	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.

를 위주로 하는 세포가 혈관에서 조직으로 침윤되어 병원체 혹은 염증반응을 유발하는 인자에 대한 반응으로서 이러한 과정을 세분하면 염증세포의 혈관내피세포와의 유착, 혈관벽을 뚫고 나오는 누출, 염증부위로의 세포이동 및 세포의 활성화, 세포-세포간의 반응 등으로 구분할 수 있다. 이러한 모든 단계에서 세포-세포 또는 세포-기질간의 유착과 이의 조절이 필요하고, 이는 세포표면의 유착분자 발현에 의해 이루어진다¹⁰.

혈액내 호산구의 비율이 극히 적음에도 불구하고 알레르기성 염증반응에서 조직내 침윤세포의 대부분이 호산구라는 사실은 호산구에 특이한 화학주행물질의 역할이나 호산구에 특이한 유착분자가 내피세포와 호산구의 반응에 주된 역할을 하리라는 것을 시사하고 있으며 T 세포가 선택적인 누가현상(recruitment)에 중요한 역할을 한다. 이 반응의 초기단계는 백혈구가 화학주행물질에 의해 경내피이동을 일으키기 전 혈관내피세포와의 유착이 선행된다⁵.

기도 상피세포는 천식을 비롯한 기도의 염증질환에서 단순한 방어벽의 기능만을 가진 세포가 아니며, 능동적으로 다양한 화학매체들과 cytokine들을 생산하고 분해함으로써, 다양한 염증세포들과의 상호작용을 거쳐 기도 염증반응을 조절하는 역할을 할 뿐만 아니라, 기도 평활근의 기능을 조절함으로써 기도의 반응성을 조절하는 기능을 가지는 능동적인 역할을 하는 세포이다¹¹.

기도의 알레르기성 질환에서는 기도점막에서 발생하는 염증 특히 호산구의 집결 및 침윤의 역할이 중요하다. Eotaxin은 CC chemokine으로서 호산구에만 선택적으로 작용하여 조직으로의 호산구의 집결을 유도한다. 호산구의 조절에는 helper T cell이 중심적인 역할을 수행한다. 호산구의 성장과 분화는 IgE의 생성에도 관여하는 helper T cell이 분비하는 cytokine인 IL-5에 의해 촉진되며, 활성화된 T cell이 분비하는 cytokine은 기생충감염이나 알레르기 반응이 일어난 병소에 호산구를 chemotaxis, tissue localization 시키는데에도 기여하는 것으로 알려져

있다. 또한 일반적인 염증반응의 후기에도 helper T cell과 호염기구에서 분비된 IL-4가 혈관의 내피세포에서 VACM-1과 eosinophil-selective chemokine의 생산을 자극, 호산구를 염증에 있는 조직에 끌어들이는 것으로 밝혀졌다¹². 천식에 있어 병변부위로 이동한 호산구는 독성이 강한 과립성 물질을 배출, 과민성 반응을 유도하고 기도점막을 파괴한다. 따라서 호산구의 조직이동 차단은 알레르기 질환의 중요 치료전략이며, 호산구의 선택적 침윤기전의 규명은 천식분야의 핵심연구과제이다⁴.

최근 역동학적 실험모형을 이용한 연구로부터 백혈구의 혈관의 유출기전이 구체적으로 규명되었다. Postcapillary 혈관의 국소이완은 염증부위에 말단부위의 혈류의 속도를 감소시키고, 결국은 백혈구가 혈관쪽으로 치우치게 하는데 이때 P-selectin 및 E-selectin이 혈관쪽으로 치우친 비활동성 백혈구를 포착하여 혈관의 내피세포벽을 따라 구르게 된다. 그 후 주변세포로부터 분비된 cytokine 혹은 PAF 등의 신호를 통해 백혈구가 활성화되어 LFA-1 혹은 VLA 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.

牡丹皮(Moutan Cortex Radicis, *Paeonia suffruticosa* Andr.)의 氣味는 苦寒하고 歸經은 肝, 腎, 心, 肺, 命門, 血分이고 瀉腎血分實熱治無汗骨蒸 通經의 主治¹³를 가지고 있으며, 淸熱涼血 活血祛瘀 작용이 있어 肝熱로 인한 發熱, 盜汗, 頭痛, 月經不順에 사용하고, 陰虛發熱, 血熱妄行, 打撲捻挫에 의한 瘀血에도 응용된다⁷. 藥理作用에는 抗菌, 降壓작용이 있으며, 동물의 자궁점막을 충혈시켜 월경의 通經작용도 있다⁷.

牡丹皮의 알레르기기에 관련된 실험논문을 살펴보면 이⁸가 牡丹皮 물 추출분획과 ethylacetate 분획의 투여로 비만세포로부터 compound 48/80에 유도되는 histamine 생산을 유효하게 억제하는 결과와 牡丹皮 물 추출분획의 마우스의 혈액내 IgE 및 IgG1 항체 생산능을 대조군에 비하여 유효하게 억제하는

효과를 보고하였으며, 장¹⁴은 牡丹皮 추출물의 B cell의 증식억제효과와 IL-4발현량 억제효과, IgE와 histamin 생성감소효과 등의 항알러지 효과를 보고하였고, 노⁹는 牡丹皮 methanol 추출물이 염증유발 물질 PMA 자극에 의한 인간단핵구 U937 세포의 IL-8 및 MCP-1 chemokine 생성을 농도 의존적으로 억제시킨 결과를 牡丹皮의 清熱涼血 活血行瘀 등의 효능과 연관하여 설명하였다.

이번 실험은 천식 발병의 주요원인으로 작용하는 호산구를 유도하는 chemokine의 생산과 생산 경로를 저해하거나 차단하는 치료법을 연구하고자 호산구에 가장 주요하게 작용하는 eotaxin을 중심으로 실험을 진행하였고 또한 IL-8, IL-16, ICAM-1, VCAM-1, RANTES와 같은 chemokine들에 대해서도 mRNA 측면에서 牡丹皮의 효과를 보고자 하였다.

우선 牡丹皮의 독성효과를 알아보기 위하여 농도별로 처리한 결과, 농도에 따른 세포 생존율에 큰 차이가 없는 것으로 보아 인간 기관지 상피세포 A549 cell에 대해 독성은 갖지 않는 것으로 나타났고 본 실험에서 세포 생존율 10%이내의 오차는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Eotaxin의 발현에 대한 牡丹皮의 영향을 알아보기 위해 인간 기관지 상피세포인 A549 cell을 Th2 계통의 IL-4, TNF- α , IL-1 β cytokine으로 자극한 후 牡丹皮로 0.01-100 μ g까지 농도별로 처리한 결과 10 μ g/ml에서 50% 감소하였고 100 μ g/ml에서는 70%이상의 현저한 감소를 나타냈다. 이 농도에서는 牡丹皮가 세포의 생존에 영향을 미치는 독성효과와 관련이 없기 때문에 牡丹皮가 eotaxin에 대한 저해효과가 있는 것으로 판단할 수 있었다.

염증부위에 호산구 유인시 핵심적 역할을 하는 eotaxin의 호산구에 대한 선택적 활성화의 분자적 근거는 eotaxin 수용체인 CCR-3를 호산구가 발현하는데 있으며¹⁵, TNF- α 와 IL-4는 기관지상피세포의 eotaxin생성을 조절하는데 eotaxin mRNA의 발현을 증진시키고¹⁶, 인간 기관지상피세포에서도 CCR-3의 발현이 보고되어, 기관지상피세포도 중요 역할을 하

는 것으로 추측된다¹⁷.

김¹⁸은 만성기침환자에서 eotaxin치는 객담내 호산구 지표들과 폐기능과 좋은 상관관계를 보이고, 기도내 호산구 유입과 탈과립과정에서 IL-5보다 eotaxin이 더 중요한 역할을 한다는 가설을 지지하였으며, eotaxin 발현을 억제하는 약제의 개발이 만성기침 환자의 증상 개선에 도움이 될 수 있을 것으로 보고하였고, 인¹⁹은 eotaxin mRNA는 천식증상이 있으면서 치료없이 지낸 환자의 기도에서 제일 높게 발현되었으며, eotaxin mRNA의 발현과 기도내 호산구 침착의 정도와는 상관관계가 있다고 보아 eotaxin은 천식환자의 기도내에 발현되며, 호산구 화학 주성인자라는 것을 알 수 있다고 하였다.

RT-PCR을 이용한 RANTES의 발현량에 관련된 실험에서 牡丹皮를 0.01, 1, 100 μ g/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 자극이 유도된 A549 cell에서 RANTES에 대한 mRNA 발현량이 control에 비해 모든 농도에서는 발현량이 감소하지 않는 것으로 나타났다.

RANTES(regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted)는 호산구에 대하여 작용하는 것으로 알려진 첫 번째 CC chemokine이다. RANTES는 주로 T 림프구에 의해 생성되어 단핵구와 CD4+, CD5RO+ memory 세포에 대하여 화학 주성활성을 지닌다. RANTES는 호산구에 대하여 화학주성활성을 소유하고 있을 뿐아니라 호산구를 활성화시켜 ECP(eosinophil cationic protein)의 분비를 유도하고 respiratory bust도 야기한다⁴. 또한 후기 알레르기반응에서 활성화된 T 세포에서 RANTES의 생산은 호산구와 CD4+림프구의 조직 침윤에 기여할 것으로 생각된다¹⁰. 또한 기관지염증 반응의 단계중에서도 호산구 등의 염증세포들이 혈관벽을 통과한후 염증부위로의 이동 및 활성화에도 관여한다²⁰.

이처럼 牡丹皮에 의해 호산구집결에 중요한 역할을 하는 eotaxin의 발현이 억제 되었으나 RANTES의 발현에는 영향을 미치지 못했다는 결과는 牡丹皮가 천식의 치료제로 개발될 가능성을 제시하고

있으며 특히 eotaxin과 관련된 작용과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다.

RT-PCR을 이용한 ICAM-1과 VCAM-1의 발현량에 관련된 실험에서 牡丹皮를 0.01, 1, 100 μ g/ml의 세가지 농도로 처리하고 cytokine에 의해 자극이 유도된 A549 cell에서 ICAM-1에 대한 mRNA 발현량이 control에 비해 1 μ g/ml에서 9.7%, 100 μ g/ml 농도에서 11.5%가 감소하였으며, VCAM-1의 경우는 1 μ g/ml에서 9.8%, 100 μ g/ml 농도에서 13.5% 저해하는 효과를 나타내었는데 이는 유착분자중 ICAM-1과 VCAM-1에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)과 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)은 Immunoglobuline Supergene Family에 속하는 유착분자이다. ICAM-1은 섬유아세포, 각질형성세포 및 혈관내피세포 표면에 발현되는 분자량 90-114kDad의 유발성 표면 단백질이고, VCAM-1은 주로 혈관내피세포에서 발현되며, 대식세포, 수지상세포, 골수기질세포, 기도상피세포에서도 발현되며, 림프구와 호산구, 단구의 유착을 위한 배위자로 작용하며, 혈관내피세포에 대한 악성 흑색종세포의 유착을 증가하여 종양전이에도 관여한다¹. 염증성 매개체로서 내피세포를 활성화시키면 시간에 따라서 다양한 유착분자의 표현이 증가한다. ICAM-1과 VCAM-1의 유도는 새로운 단백질합성을 필요로 하며 시작이 늦고 비교적 장시간 유지되기 때문에 만성염증 침윤에 역할을 하는 것으로 생각된다²¹.

유착분자는 알레르기 질환의 염증반응에 중요한 역할을 담당하고 있으며, 유착분자가 염증반응의 주된 매개인자라는 사실이 알려지면서 자극된 세포의 유착분자의 표현을 억제하거나 예방하는 관점으로 치료가 시도되기 시작하였고, 많은 연구가 진행중이다⁵. 호산구와 기관지상피세포의 상호작용은 천식병리의 중요관점으로 생각되었고, 상피세포는 전구염증매개체의 제공처이면서 호산구 매개 손상의 목표이기도 하다. TNF α , IFN γ , IL-1에 처리된 BEAS-2B에서는 호산구 결합이 의미있게 증가되었는데 이것

은 ICAM-1과 VCAM-1의 전사증가와 관련 있는 것으로 보았다²².

RT-PCR을 이용한 IL-8과 IL-16의 발현량에 관련된 실험에서 牡丹皮를 0.01, 1, 100 μ g/ml의 세가지 농도로 처리하고 cytokine에 의해 자극이 유도된 A549 cell에서 IL-8에 대한 mRNA의 발현량이 control에 비해 1 μ g/ml 농도에서는 5%의 감소를 보였고 100 μ g/ml의 농도에서는 12.5%의 저해 효과를 보였다. IL-16의 경우에는 1 μ g/ml 농도에서는 3.5%의 감소를 보였고 100 μ g/ml의 농도에서는 5%의 저해 효과를 보였다.

폐내의 여러세포들에서 IL-1이나 TNF- α 로 자극될 때 IL-8이 생산되고 이는 호염구에 화학주행성과 histamine 유리를 증가시키며 호중구의 화학주행성과 LTB₄생산을 증가시킴으로서 알레르기성 염증반응에서 중요 역할을 한다. IL-8은 그 자체로 호산구에 화학주성을 나타내지는 않지만 호산구를 in vitro에서 GM-CSF나 IL-3로 priming한 경우에는 호산구에 화학주성을 나타낸다¹⁰. IL-8은 CXC chemokine로 분류되어 주로 호중구에 작용하지만 호산구에는 특정한 상황에서 선택적으로 작용한다. 예를 들어 정상인이 아닌 아토피환자로부터 분리된 호산구는 IL-8에 반응한다²³. IL-16은 CD4+에 대한 강력한 chemoattractant cytokine으로 분류되며, 호산구와 비만세포 그리고 기도의 상피세포에서 생산된 후 CD4+T cell을 모이게 하고 활성화시킨다²⁴. IL-16은 histamine, IL-1 β , TNF- α 등의 자극을 통하여 기관지 상피세포에서 발현되고, 기도내 염증유발세포의 축적에 중요한 역할을 담당 한다²⁵. 또 다른 실험 연구에서는 IL-16과 eotaxin의 차단으로 70%의 호산구 화학주성 억제효능을 보였고, anti-RANTES 항체는 단지 30%의 호산구 화학주성 억제 효능을 보였다²⁶.

IL-8 및 IL-16과 관련된 이전의 실험을 살펴보면 calcium ionophore로 처리된 사람의 비만세포주(HMC- ℓ)을 이용한 실험에서 地黃平喘湯 100 μ g/ml이 IL-8 mRNA 발현이 강하게 억제하였고²⁷, 白蓮治哮喘湯은 농도의존적으로 IL-8 mRNA 발현을 억제

하였다²⁸. TNF- α 로 처리된 BEAS-2B 기관지상피세포를 이용하여 喘四君子湯과 水蛭(麻黃炒) 100 μ g/ml 농도에서 IL-16 mRNA 발현량이 각각 55%, 67%의 유의성 있는 억제를 확인하였고²⁹, 桔梗 100 μ g/ml 농도에서 IL-16 mRNA 발현량이 56.8%의 유의성 있는 억제를 확인하였다³⁰.

牡丹皮 100 μ g/ml의 농도에서는 IL-8의 발현이 12.5%, IL-16의 발현이 5% 저해되는 결과를 보였으나 큰 의미는 없어 牡丹皮의 천식유발억제기전에는 영향을 주지 않는 것으로 추측된다.

인간 기관지 상피세포 A549 cell을 이용한 화학주성 실험에서 牡丹皮 100 μ g/ml의 농도에서 호산구 유입수가 165 \pm 16개로 나타나 대조군의 호산구수 321 \pm 28개보다 유의한 감소효과를 보였다.

호산구는 알레르기 염증에서 effector cell로도 작용하며, 활성화하면 스스로 호산구를 생산, 활성화 및 이동시키는 물질도 분비함으로써 autocrine loop를 형성한다. 호산구가 알레르기 반응이 일어나는 곳으로 선택적으로 모여드는 현상은 호산구의 화학주성 및 혈관내피세포와 세포외기질에 호산구가 선택적으로 유착됨으로써 일어난다. IL-3, IL-5, GM-CSF는 호산구 생존을 연장시키며 IL-5는 호산구의 apoptosis를 억제한다. 그러므로 사이토카인은 골수에서 호산구생산을 촉진, 호산구의 혈관내피세포 유착을 유도, 화학주성을 촉진, 세포활성화를 전처치하며, 조직내에서 생존을 연장시킴으로써 알레르기 염증을 유발한다¹.

清熱涼血 活血行瘀 등의 효능을 가진 牡丹皮가 호산구 유입을 억제하는 결과는 천식환자에서 흔히 보이는 호산구 결집을 방해하여 천식을 치료하는 치료제로서 가능성을 제시하였고, 또한 한약물의 고전적 효능과 관련하여 다양한 현대적 해석에 대한 연구가 요구된다. 牡丹皮의 호산구 유입억제기전은 현재 천식질환의 주요 인자로 인식되는 eotaxin의 발현억제와 관련이 있으며 보다 자세한 기전과 치료약으로 개발을 위해 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 結 論

A549 human lung epithelial cell에서 牡丹皮가 eotaxin, RANTES, ICAM-1, VCAM-1, IL-8, IL-16과 같은 chemokine과 호산구에 미치는 영향을 알아보기 위하여 牡丹皮에 대한 세포 독성 실험, sandwich ELISA, RT-PCR을 이용한 chemokine저해 효과 검증, 사람 혈액으로부터 직접 호산구를 분리하여 chemoattractant에 대한 *in vitro* 실험을 실시한 결과 다음의 결론을 얻었다.

1. 牡丹皮를 농도별로 처리하여 MTS assay를 실시한 결과 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다.
2. Chemokine의 발현을 유도한 다음 여러 농도로 처리하여 ELISA를 실시한 결과 eotaxin의 생산량이 牡丹皮의 농도에 의존적으로 저해되는 것을 확인하였다.
3. 천식 관련 인자중 ICAM-1, VCAM-1, IL-8, IL-16이 牡丹皮 100 μ g/ml에서 각각 11.5%, 13.5%, 12.5%, 5%의 발현량을 저해하는 것을 확인하였으나, RANTES에서는 저해 효과를 보이지 않았다.
4. 사람의 혈액으로부터 호산구를 분리한 결과 1×10^5 개의 호산구를 획득하였고 purity는 97.2 \pm 0.34% 이었으며 trypanblue 염색을 하여 관찰한 결과 생존율은 98.7%였다.
5. 호산구를 이용하여 chemotaxis assay를 실시한 결과 0.01 μ g/ml와 1 μ g/ml에서는 유의한 감소가 나타나지 않았고, 100 μ g/ml에서는 유의성 있는 감소를 나타내어 고농도에서는 牡丹皮가 화학주성 인자에 대한 저해 효과가 있는 것을 확인하였다.

參考文獻

1. 대한 천식 및 알레르기 학회. 천식과 알레르기. 서울: 군자출판사; 2002, p.59-62, 237-56.
2. Sampson. AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. Clinical and Experimental Allergy. 2002;3(sup.1);22-7.

3. 김미경. 천식과 호산구. *알레르기* 1996;16(1): 8-14.
4. 정일엽, 박춘식. 호산구와 관련된 chemokine에 대한 새로운 조명. *천식 및 알레르기* 2001; 21(2):161-72.
5. 이양근. 알레르기 질환에서의 유착분자. *대한천식 및 알레르기학회 춘계학술대회초록집* 1995; 105-10.
6. Lamkhioued B, Renzi PM, Abi-Younes S, Garcia-Zepada EA, Allakhverdi Z, Ghaffar O, et al. Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *J. Immunol.* 1997;159:4593-601.
7. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영종, 김선희, 韓藥臨床應用. 서울: 전통의학연구소; 1993, p.108-10.
8. 이석원, 김동희, 설인찬, 김성훈. 牡丹皮 추출물 및 EA분획의 항알러지 작용에 대한 연구. *동의생리병리학회지* 2001;15(4):631-5.
9. 노영득. 牡丹皮의 항염효과에 관한 연구. *원광대학교 대학원*. 2003.
10. 고영률. 유착분자(adhesion molecule). *알레르기* 1993;13(4):441-59.
11. 최동철. 기도염증과 기관지상피세포. *알레르기* 1996;16(3):261-78.
12. 서울대학교의과대학 내과학교실편. *최신지견내과학II*. 서울: 도서출판 고려의학; 2003, p.1275.
13. 李龍城. 經藥分類典. 서울: 도서출판 정담; 2002, p.4.
14. 장성익, 진속창, 이한배, 김성균, 이승희, 서영배 등. B세포포와 비만세포에서 목단피 추출물의 항알러지 작용에 관한 연구. *대한한방내과학회지* 2003;24(1):33-43.
15. Duzendorfer 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.
16. Atasoy U, Curry SL, Lopez de Silanes I, Shyu AB, Casolaro V, Gorospe M, et al. Regulation of eotaxin gene expression by TNF-alpha and IL-4 through mRNA stabilization: involvement of the RNA-binding protein HuR. *J Immunol.* 2003 Oct 15;171(8):4369-78.
17. Stellato C, Brummet ME, Plitt JR, Shahabuddin S, Baroody FM, Liu MC, et al. Expression of the C-C chemokine receptor CCR3 in human airway epithelial cells. *J Immunol.* 2001;166(3): 1457-61.
18. 김창근, Hirohito Kita, 유진호, 고영률. 기도내 호산구성 염증에서 IL-5와 Eotaxin의 역할. *천식 및 알레르기* 2004;24(1):127-36.
19. 인광호, 조재연, 강세용, 이상엽, 심재정, 강경호 등. 천식환자의 기관지 조직에서 Eotaxin mRNA 발현에 관한 연구. *결핵 및 호흡기질환* 1998;45(4):697-704.
20. 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.
21. Argenbright LW, Barton RW. Interactions of leukocyte integrins with intercellular adhesion molecule 1 in the production of inflammatory vascular injury in vivo. The Schwartzman reaction revisited. *J Clin Invest.* 1992 Jan; 89(1):259-72.
22. Sanmugalingham D, De Vries E, Gauntlett R, Symon F.A, Bradding P, Wardlaw A.J, Interleukin-5 enhances eosinophil adhesion to bronchial epithelial cells, *Clinical & Experimental Allergy* 2000;30(2):255-63.
23. Schmi 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.
24. Cruikshank WW, DM Center, N Nisar, M Wu, B Natke, AC Theodore, et al. 1994. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 이경기, 정희재, 이형구, 정승기. 사람 비만細胞柱에서의 케모카인에 對한 地黃平喘湯의 效果. 대한한방내과학회지. 2002;23(3):375-85.
28. 이형철. 사람Mast cell에서의 케모카인에 대한 白蓮治哮湯의 效果. 경희대학교 대학원. 2002.
29. 한동하, 정희재, 정승기, 이형구. 喘四君子湯과 水蛭(麻黃炒)가 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2001;22(4):604-12.
30. 박상현, 정희재, 정승기, 이형구. 麻杏甘石湯과 桔梗이 인간기관지 상피세포의 Cytokine에 미치는 영향. 경희의학 2001;17(2):230-41.