

# 連翹敗毒散 물 抽出物의 마우스 Th1/Th2 사이토카인 調節에 의한 항알레르기 효과

곽노규 · 강 희 · 명유진 · 박성민 · 심범상 · 김성훈 · 최승훈 · 안규석\*

경희대학교 한의과대학 병리학교실, 경희대학교 한의학연구소

## Effect of Yeongyupaedog-san on Cytokine Levels of Mouse Th1/Th2 Cells and Anti-allergic Activity in Ovalbumin-sensitized Allergic Inflammation Model

Nyo-Gyu Khwag, Hee Kang, Eu Gene Myung, Sung Min Park, Bum Sang Shim, Sung Hoon Kim, Seung Hoon Choi, Kyoo Seok Ahn\*

Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University, Institute of Oriental Medicine, Kyunghee University

This study was to evaluate the effect of Yeongyupaedog-san (YGPDS) on mouse Th1 and Th2 cells' differentiation and ovalbumin (OVA)-induced allergic inflammation. The proliferation of mouse CD4 T cells and the secretion of Th1/Th2 cytokines under the influence of YGPDS extract were measured as well as the amount of  $\beta$ -hexosaminidase in RBL-2H3 cells and the levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 secretion in Raw264.7 cells. BALB/c mice were orally administered with YGPDS extract and simultaneously inoculated with OVA to induce allergic reaction and measure the level of total IgE, OVA-specific IgE and the production of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 by the spleen cells. When mouse CD4 T cell were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 for 48 hours in various concentrations of YGPDS extract, it increased proliferation of CD4 cells by 11% in 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration but it showed an inhibition by 37% at 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . CD4 T cells under Th1/Th2 polarizing conditions for 3 days with YGPDS resulted in mild decrease of IFN- $\gamma$  in Th1 cells and significant decrease of IL-4 in Th2 cells at 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  by 18% and 21%, respectively. YGPDS extract had a dose-dependent inhibitory effect on antigen-induced release of  $\beta$ -hexosaminidase in RBL-2H3 cells. Treatment of YGPDS extract on LPS stimulated Raw 264.7 cells showed dose-dependent decrease in TNF- $\alpha$  production. Oral administration of YGPDS extract on OVA-induced allergic mice showed an inhibitory effect on the levels of total serum IgE and OVA-specific IgE by 25% and 34%, respectively. Culture of spleen cells with OVA resulted in significant increase of IFN- $\gamma$  by 44% and significant decrease of IL-4 and IL-5 by 56%, and 24%, respectively. The results show that YGPDS does not strongly induce mouse T cells to transform into Th1 or Th2 but it has an anti-allergic effect in vitro, and that it also corrects the unbalance between the reactions of Th cells in allergic diseases.

Key words : Yeongyupaedog-san, Th1/Th2, IL-4, IFN- $\gamma$ , allergy

### 서 론

알레르기질환은 histamine, serotonin 등에 의해 혈관이 확장되거나 점액의 분비, 평활근이 수축되면서 염증을 일으키는 질환

\* 교신저자 : 안규석, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학

· E-mail : ahnks@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0335

· 접수 : 2006/07/03 · 수정 : 2006/07/24 · 채택 : 2006/08/14

환으로 알레르기 鼻炎, 알레르기 喘息, 알레르기 結膜炎, 아토피 皮膚炎 등이 대표적이다<sup>1)</sup>. 알레르기는 문명의 발달과 더불어 발병률이 증가하고 있으며<sup>2,3)</sup> 유아기의 과도한 항생제 복용 또한 immunoglobulin E (IgE)의 생산을 증가시켜 알레르기 질환의 발병을 증가시키고 있다<sup>1)</sup>.

알레르기 반응 중 다양한 종류의 꽃가루, 균류의 포자, 동물의 비듬, 진드기 배설물 등을 흡입하거나 피부에 접촉했을 때, 그

리고 특정한 음식이나 약물, 벌침 같은 독소에 의해서 발생하는 것을 제 I 형 과민증이라 한다. 이러한 과민증은 특정 항원으로 감작된 개체에서 특히 IgE가 mast cell의 수용체에 결합되어 있을 때 다시 특정 항원이 개체에 들어오면 mast cell은 histamine, serotonin, leukotrienes 등을 분비하고 eosinophil과 neutrophil은 chemotactic factor 등을 포함하는 과립을 분비하여 발생하는 生體反應 현상을 말한다<sup>4)</sup>.

Histamine 등의 과립에 의해 생기는 알레르기 炎症에 관여하는 주된 입과구는 T cell이며 그 중에서도 T helper cell(Th cell)이 중요하다. Th cell은 주변에 어떤 사이토카인이 있는가에 따라 1형 T helper cell (Th1 cell)과 2형 T helper cell (Th2 cell)로 분화된다<sup>5)</sup>. Th1 cell이 Th2 cell에 비해 과도하게 많아지면 류마티스 관절염이나 루푸스와 같은 자가면역 질환이 발생하며 Th2 cell이 상대적으로 많아지면 이들 cell이 분비하는 interleukine(IL)-4가 과도하게 IgE의 형성을 촉진함으로써 알레르기 질환이 발생하게 되는 것이다.

최근 韓藥의 알레르기질환에 대한 효과를 증명하는 연구들이 많이 진행되고 있는데 이미 加味麥門冬湯<sup>6)</sup>, 加味生料四物湯<sup>7)</sup>, 加味清鼻飲<sup>8)</sup>, 補中益氣湯<sup>9-13)</sup> 등과 단방으로 黃芪<sup>14)</sup>, 桔梗<sup>15)</sup> 등이 아토피 皮膚炎, 알레르기성 喘息, 알레르기성 鼻炎을 치료하는 효과가 있다는 것이 실험적으로 검증되었다.

連翹敗毒散은 龔信的 『古今醫鑑』에 처음 수재된 이래 王肯堂의 『六科證治準繩』에 다시 수록되었다. 連翹敗毒散은 人蔘敗毒散에 祛風熱하는 荊芥, 防風을 넣어 扶正解表하는 功效를 높인 荊防敗毒散<sup>16)</sup>에 다시 金銀花와 連翹를 넣은 方劑이다. 人蔘敗毒散은 風寒에 傷한 병을 治療하는 처방으로 皮膚에 있는 風寒의 邪氣를 解散시킨다<sup>17)</sup>. 連翹敗毒散은 熱毒이 있는 癰疽, 瘡毒, 無名腫毒, 發頤毒을 治療하는 清熱解毒의 效能이 있다<sup>18-21)</sup>.

連翹敗毒散의 기본방인 人蔘敗毒散은 肺損傷에 대한 效能<sup>22)</sup>, 진통과 해열의 效能<sup>23)</sup>, 腎組織病變에 대한 效能<sup>24)</sup>, 통풍에 대한 효과<sup>25)</sup>가 보고 되어 있으며, 連翹敗毒散은 염증상태의 면포에 效果의이며<sup>26)</sup> 抗菌作用이 있고<sup>27)</sup>, 알레르기성 접촉皮膚炎에 效果的이라는 보고<sup>28-29)</sup>가 있다. 하지만 항알레르기 작용기전을 Th1/Th2 사이토카인과 관련하여 in vitro와 in vivo에서 보고된 바는 아직 없다.

이에 본 研究는 連翹敗毒散 물 抽出物의 T cell에 대한 면역 조절과 항알레르기 효과를 알기위해 마우스의 脾臟에서 CD4 T cell을 분리하여 Th1 cell과 Th2 cell로 分化시켜 이것을 조절하는 능력을 측정하였고 RBL-2H3 cell과 Raw 264.7 cell을 이용하여 抗炎症效果를 확인하였으며 아울러 마우스에게 連翹敗毒散 물 抽出液을 경구투여하여 ovalbumin(OVA)으로 알레르기 炎症을 유발시킨 후 혈청의 IgE와 cytokine 변화를 測定하였던 바, 유의성 있는 結果를 얻었기에 이에 보고하는 바이다

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

連翹敗毒散(Yeongyupaedog-san : YGPDS)의 구성약물과 용량은 方藥合編에 준하였으며(Table 1) 이들 약물은 경희의료원 약제과에서 구입하였다.

Table 1. The Composition of Yeongyupaedog-san

| Hebal name                         | Chinese name | Amount  |
|------------------------------------|--------------|---------|
| <i>Ginseng Radix</i>               | 人蔘           | 3.75 g  |
| <i>Bupleuri Radix</i>              | 柴胡           | 3.75 g  |
| <i>Peucedani Radix</i>             | 前胡           | 3.75 g  |
| <i>Ostericii Radix</i>             | 羌活           | 3.75 g  |
| <i>Angelicae Pubescentis Radix</i> | 獨活           | 3.75 g  |
| <i>Aurantii Fructus</i>            | 枳殼           | 3.75 g  |
| <i>Platycodi Radix</i>             | 桔梗           | 3.75 g  |
| <i>Cnidii Rhizoma</i>              | 川芎           | 3.75 g  |
| <i>Poria Rubra</i>                 | 赤茯苓          | 3.75 g  |
| <i>Glycyrrhizae Radix</i>          | 甘草           | 3.75 g  |
| <i>Schizonepetae Herba</i>         | 荊芥           | 3.75 g  |
| <i>Saposhnikovia Radix</i>         | 防風           | 3.75 g  |
| <i>Forsythiae Fructus</i>          | 連翹           | 3.75 g  |
| <i>Lonicerae Flos</i>              | 金銀花          | 3.75 g  |
| <i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>   | 生薑           | 3.75 g  |
| <i>Menthae Herba</i>               | 薄荷           | 1.88 g  |
| Total amount                       |              | 58.13 g |

### 2) 동물

본 실험은 생후 8주된 BALB/c 수컷 마우스로 멸균상태로 관리된 것을 오리엔트(주)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 12시간 낮 12시간 밤의 생활리듬을 주었으며 항온 항습 상태에서 일주일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 飼料는 방사선 멸균처리한 실험동물용 사료를 정도산업(주)에서 구입하여 공급하였으며, 飲用水는 멸균처리한 증류수를 사용하였다. 飼料와 飲用水는 충분히 공급하여 자유롭게 섭취시켰다.

### 3) 세포주

세포주는 Rat basophilie leukemia-2H3 (RBL-2H3) cell line과 Raw264.7 macrophage cell line이며 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다.

### 4) 배지 및 시약

Fetal bovine serum (FBS)와 OVA (grade V), recombinant IL-2 (rIL-2), anti-dinitrophenol(DNP)-IgE, DNP-human serum albumin (HSA), bovine serum albumin (BSA)는 Sigma에서 구입하였으며 antibiotic-antimycotic와 RPMI 1640, DMEM은 Invitrogen Life Technology에서 구입하였다. Magnetic cell sorting CD4(L3T4) microbeads는 Miltenyi Biotec (U.S.A.)에서 구입하였다. anti-CD3e, anti-CD28, anti-mouse IL-4, anti-mouse IL-12, rIL-4, rIL-12와 IL-4, IL-5, IFN-g 및 total IgE의 ELISA 측정에 사용된 OPT EIA set는 BD Pharmingen에서 구입하였으며 Biotin NHS는 Vector Laboratories에서 구입하였다.

## 2. 방법

### 1) 약재 추출물 제조

連翹敗毒散 구성약물을 유리로 된 추출용기에 물에 잠기도록 넣고 하루 동안 냉침한 다음 50℃에서 한 시간씩 2회 초음파 세척기로 물리적 자극을 가하여 시료의 용해를 촉진하였다. 이

용액을 filter paper로 여과한 다음 rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan)으로 감압 농축한 뒤 1000ml round flask에 옮겨 freezing dryer (Eyela, Japan)로 24시간 동안 동결건조하여 건조된 분말(yield: 9.95 %)을 실험에 사용하였다.

2) spleen cell 부유액의 준비

脾臟을 생쥐로부터 적출하여 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic이 함유된 RPMI-1640으로 세척하였다. Micro slide glass로 脾臟을 잘게 으갠 뒤 0.40 μm nylon cell strainer로 여과하였다. 1000 rpm, 10분간 원심분리한 후 RBC lysis buffer로 적혈구를 파괴하였다. 2회 원심분리한 후 spleen cell을 trypan blue exclusion assay를 통해 生存率을 확인한 후 세포수를 측정하였다.

3) CD4 T cell의 분리

脾臟임파구를 1×10<sup>6</sup> cells/90μl의 농도에 10 μl의 MACS CD4(L3T4) microbeads를 첨가하여 15분간 4℃에 incubation하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 나서 500 μl의 배지에 cell pellet을 resuspension하였다. Positive selection column을 MACS separator (Miltenyi Biotec, U.S.A.)에 삽입한 후 cell 부유액을 column 안으로 통과시켰다. column 안에 부착된 CD4 T cell은 플러저로 elution하여 분리하였다.

4) 생존 및 增殖率 測定

脾臟의 CD4 T cell을 mitogen으로 자극받았을 때의 증식능을 測定하기 위해, CellTiter 96 TM non-radioactive cell proliferation assay (Promega, U.S.A.)의 protocol에 준하되 4×10<sup>5</sup> cells/200 μl의 농도로 anti-CD3e (10 μg/ml)가 coating된 96-well plate에 seeding하였다. 여기에 anti-CD28 (2μg/ml)를 넣고 co-stimulation하였다. 약물은 0, 10, 50, 100, 200, 400 μg/ml의 농도로 48시간 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 배양한 후 cell titer 96R aqueous one solution reagent를 첨가하였다. Raw264.7 cell의 세포독성 검사를 위해서 먼저 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic 이 함유된 DMEM으로 배양한 후 2×10<sup>4</sup> cells/100 μl의 농도로 96-well plate에 seeding하여 24시간을 배양한 후 배양액을 갈아 주었다. 교체한 모든 배양액에는 50, 100, 200, 400 μg/ml의 농도로 약물을 처리하여 20시간을 배양한 후에 동일한 시약을 첨가하였다. Formazan product는 microplate reader (Tecan, Austria)를 이용하여 optical density 490-650 nm에서 측정하였다.

5) In vitro Th1/Th2 polarization

Anti-CD3e (10 μg/ml)가 coating된 12-well plate에 1×10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 CD4 T cell을 seeding하고 anti-CD28 및 rIL-2 (5 ng/ml)을 첨가하였다. Th1 polarizing condition을 만들기 위해서는 rIL-12 (5ng/ml)과 anti-IL-4 (10μg/ml)을 넣었으며 Th2 polarizing condition을 위해서는 rIL-4 (5ng/ml)과 anti-IL-12 (10 μg/ml)을 추가한 후 3일간 배양하였다.

6) RBL-2H3 cell을 이용한 β-hexosaminidase 활성 측정

RBL-2H3 cell (5×10<sup>5</sup> cells/ml)을 24-well plate에 seeding한 후 mouse monoclonal DNP-specific IgE (1 μg/ml)를 첨가하여 3시간 감작하였다. 배지를 걷어내고 Tyrode buffer (135mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 5.6 mM glucose,

1mg/ml BSA, 20mM Hepes-NaOH: pH 7.2)로 2번 washing하였다. 항원인 DNP-HSA (1 μg/ml)를 첨가하고 37℃에서 한 시간 배양하였다. 전체 β-hexosaminidase 양을 측정하기 위해서 1% Triton X-100으로 lysis하였다. 상층액을 원심분리한 후 96-well plate에 상층액 0.05ml과 citrate buffer(0.1M, pH 4.5)에 녹인 1mM p-NAG (p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide) 0.05ml를 37℃에서 1시간 반응시켰다. 그 후 0.2M glycine 0.2ml을 첨가하여 반응을 정지한 후 microplate reader 405 nm에서 optical density를 측정하였다.

7) Raw264.7 macrophage cell에서의 염증 cytokine 측정

염증반응과 관련한 連翹敗毒散 물 抽出物의 효과를 알아보기 위해 Raw 264.7 macrophage cell을 사용하였다. Raw 264.7 macrophage cell을 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic이 함유된 DMEM으로 배양한 후 24-well plate에 2×10<sup>5</sup>을 seeding하였다. Overnight incubation한 후 medium을 갈아준 후에 약물을 농도별로 가하고 동시에 lipopolysaccharide (LPS) 1 μg/ml을 처리하였다. 18시간이 지난 후에 상층액을 harvest하여 -20℃에 보관하였다.

8) 連翹敗毒散 물 抽出物의 경구 투여 및 알레르기성 鼻炎 유발

連翹敗毒散 물 抽出物을 phosphate buffered saline (PBS)에 1g/kg의 농도로 마우스에게 일주일에 세 번씩 4주간 경구투여하였다. 정상군과 대조군은 동량의 PBS를 투여하였다. Al(OH)<sub>3</sub>와 PBS를 동량으로 섞은 용액에 0.1%의 OVA를 넣은 후 실험 시작 0일, 7일, 14일째 복강 내에 투여하여 감작하였으며 정상군은 PBS를 복강 내에 투여하였다. 항원 유발을 위해 마지막 복강투여 1주일 후부터 다시 7일간 對照群과 실험군 마우스의 비강에 OVA 용액을 20 μl씩 점적하였다. 28일째에 마우스를 마취시킨 후 심장 채혈하여 혈액을 채혈한 후 응고시켰다. 원심분리하여 혈청은 분리한 후 -20℃에 보관하였다. 채혈 후 마우스에서 脾臟 조직을 떼어 spleen cell 부유액으로 만들었다.

9) OVA 으로 spleen cell 배양

알레르기를 유발한 마우스의 spleen cell을 24-well plate에 5×10<sup>6</sup> cells/ml로 seeding한 후 OVA 1mg/ml과 함께 72시간 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 배양하였다. Cell을 수거한 후 상층액은 원심분리 후 -20℃에 보관하였다.

10) ELISA 측정

96-well plate의 각 well에 capture antibody를 4℃에서 overnight으로 coating하였다. OVA-specific IgE를 위해서는 capture IgE antibody(2μg/ml)를 well에 coating하였다. 10% FBS가 함유된 PBS를 200μl/well씩 넣고 1시간 상온에 둔 채 blocking하였다. 3회 washing하여 blocking buffer를 완전히 제거한 후 standard IgE, standard cytokine과 샘플을 적당량 희석하여 100 μl씩 분주하여 2시간 상온에 두었다. 5회 washing후 각각의 biotinylated detection antibody를 넣고 한 시간 상온에 두었다. 다시 7회 washing한 후 horseradish-peroxidase(HRP) conjugated streptavidin을 100 μl씩 분주한 후 1시간 상온에 두었다. Biotinylated OVA은 biotin N hydroxysuccinimide ester-water soluble과 OVA를 혼합한 후 투석하여 사용하였다. 7

회 washing 후 tetramethylbenzidine substrate reagent 100  $\mu$ l를 가하고 30분이 지나서 1M  $\cdot$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50  $\mu$ l를 첨가하였다. Microplate reader (Tecan, Austria)로 파장 450-570 nm에서 optical density를 측정하였다.

11) 통계분석

實驗結果는 평균값으로 표시하였으며 SPSS 11.0을 이용하여 Student's test로 처리하였다.

실험성적

1. 連翹敗毒散 물 抽出物이 CD4 T cell의 proliferation에 미치는 효과

連翹敗毒散 물 抽出物을 농도별로 넣고 마우스 CD4 T cell을 anti-CD3 및 anti-CD28로 48시간 자극한 結果 100  $\mu$ g/ml보다 낮은 농도에서는 藥材를 넣지 않은 cell과 유의한 차이가 없었으나 100  $\mu$ g/ml에서 11%의 增加率을 보여주었다. 그러나 200  $\mu$ g/ml에서 세포증식이 37% 유의하게 減少하였다(p=0.029)(Fig. 1).

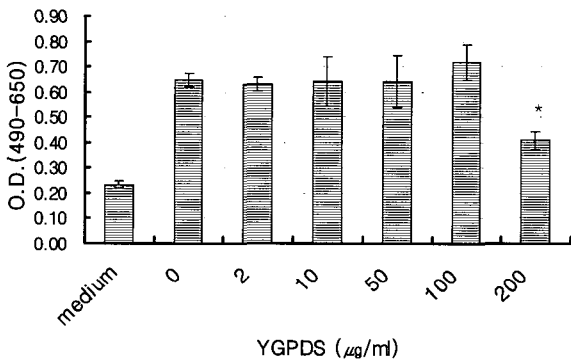


Fig. 1. Effect of YGPDS extraction on the proliferation of CD4 T cell. Proliferation of CD4 T cells in medium containing various concentrations of YGPDS extract after 48 hrs incubation. Sorted CD4 T cells were stimulated with anti-CD3e/anti-CD28 antibodies for 48 hrs. Cell proliferation was quantified by the ability to reduce the tetrazolium dye MTS. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of optical density (O.D.). \*: p<0.05 compared with 0  $\mu$ g/ml.

2. 連翹敗毒散 물 抽出物이 마우스 Th1/Th2 分化에 미치는 영향

마우스 CD4 T cell을 Th1 cell과 Th2 cell로 polarization한 후 3일간 배양하여 그 상층액의 IFN-g과 IL-4를 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. Th1 cell의 경우 약물을 처리했을 때 IFN-g의 양은 약간 減少하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나 Th2 cell에서는 IL-4 값이 50  $\mu$ g/ml에서 18%, 100  $\mu$ g/ml에서 21% 정도 減少하여 Th2 cell 分化를 유의하게 減少시켰다(Table 2, Fig. 2, 3).

Table 2. Cytokine Levels of Mouse Th1/Th2 Cells

| YGPDS ( $\mu$ g/ml) | IFN-g (ng/ml)      | IL-4 (pg/ml)           |
|---------------------|--------------------|------------------------|
| 0                   | 467.40 $\pm$ 25.71 | 9993.05 $\pm$ 37.95    |
| 50                  | 458.98 $\pm$ 0.15  | 8259.87 $\pm$ 227.72*  |
| 100                 | 444.60 $\pm$ 37.80 | 7930.94 $\pm$ 910.87** |

\*: P<0.05 \*\*: P<0.001

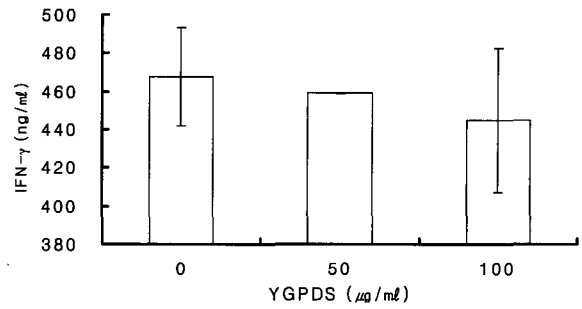


Fig. 2. IFN-g levels of mouse Th1/Th2 cells. CD4 T cells were stimulated in vitro under Th1/Th2 polarizing conditions for 3 days. YGPDS was added at the beginning of culture.

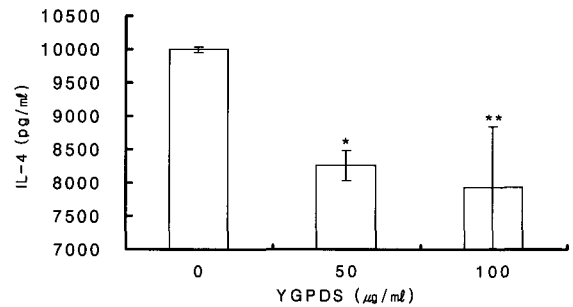


Fig. 3. IL-4 Levels of Mouse Th1/Th2 cells. CD4 T cells were stimulated in vitro under Th1/Th2 polarizing conditions for 3 days. YGPDS was added at the beginning of culture.

3. 連翹敗毒散 물 抽出物이 RBL-2H3cell의  $\beta$ -hexosaminidase 유리에 미치는 영향

RBL-2H3 cell을 IgE와 항원으로 유도하여  $\beta$ -hexosaminidase를 유리시키는 반응에 대해 連翹敗毒散 물 抽出物이 억제하는 효과를 측정하였다. 連翹敗毒散 抽出物은 농도 의존적으로  $\beta$ -hexosaminidase 유리를 유의하게 抑制하였는데 50  $\mu$ g/ml에서 26%, 100  $\mu$ g/ml에서는 23%, 200  $\mu$ g/ml에서는 27%, 400  $\mu$ g/ml에서는 55%의 抑制率을 보여주었다(Fig. 4).

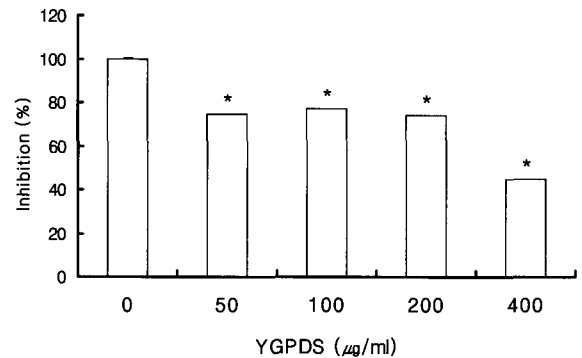


Fig. 4. Inhibitory effect of YGPDS on antigen-induced release of  $\beta$ -hexosaminidase in RBL-2H3 cells. Cells were pre-incubated with DNP-specific IgE for 3 hrs followed by change of medium and incubation for 1 hr with DNP-HSA plus YGPDS extract. Standard deviations are too small to represent. \*: P<0.05

4. 連翹敗毒散 물 抽出物이 Raw 264.7 macrophage cell의 TNF-α 合成에 미치는 영향

Raw 264.7 macrophage cell에 LPS 처리한 후 連翹敗毒散 물 抽出物을 동시에 처리하여 18시간 배양한 후에 pro-inflammatory cytokine인 TNF-α의 함량을 ELISA로 측정 한 결과, LPS만을 처리한 군은 7418.52 ± 301.96 pg/ml이었으나 連翹敗毒散 물 抽出物을 처리한 군은 농도 의존적으로 減少하였는데 100 μg/ml에서는 4557.30 ± 483.14 pg/ml으로 대조군에 비해 39% 減少하였으며 200 μg/ml에서는 2208.54 ± 60.39 pg/ml으로 71% 減少하였고 400 μg/ml에서는 1995.01 ± 60.39 pg/ml으로 74% 減少하였으며 모두 유의성이 있었다(Table 3, Fig. 5).

Table 3. Effects of YGPDS on TNF-α secretion in Raw 264.7 Cells

| YGPDS (μg/ml) | Media  | 0                | 100               | 200              | 400              |
|---------------|--------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| TNF-α (pg/ml) | 286.82 | 7418.52 ± 301.96 | 4557.30 ± 483.14* | 2208.54 ± 60.39* | 1995.01 ± 60.39* |

\* P < 0.05

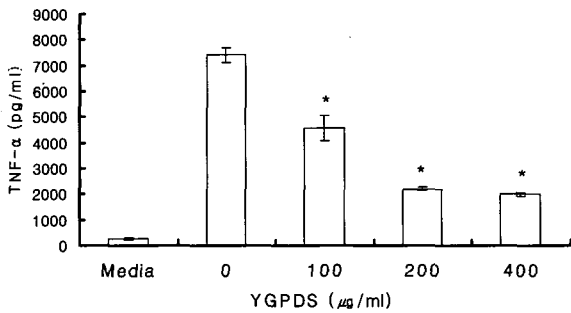


Fig. 5. Effects of YGPDS on TNF-α secretion in Raw 264.7 cells. Cells were treated with LPS (1 μg/ml) plus YGPDS extract for 18 hrs. Data are expressed as mean ± S.D. \* P < 0.05

5. 連翹敗毒散 물 抽出物 경구투여가 OVA로 알레르기를 유도한 마우스의 total IgE와 OVA-specific IgE에 미치는 영향

Total IgE와 OVA-specific IgE는 28일간 連翹敗毒散 물 抽出物을 경구 투여 후 마우스를 심장 채혈하여 얻은 혈청에서 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 連翹敗毒散 물 抽出物을 경구 투여한 마우스의 total IgE는 대조군에 비해 減少하였으나 통계적으로 유의성은 없었다. Total IgE의 경우 혈청을 400배로 희석하여 측정했을 때 정상군은 804.38 ± 80.76 ng/ml이었고 대조군은 5433.08 ± 2054.14 ng/ml이었으며 連翹敗毒散 물 抽出物을 투여한 군은 4087.02 ± 783.44 ng/ml로 25% 減少하였다(Table 4, Fig. 6). OVA-specific IgE는 O.D. 값이 정상군은 0.059 ± 0.008로 거의 검출되지 않았으나 대조군은 0.650 ± 0.187였고 連翹敗毒散 물 抽出物 투여군은 0.431 ± 0.016로 34% 減少하였으며 통계적으로 유의성이 있었다(Table 5, Fig. 7).

Table 4. Effect of In Vivo Administration of YGPDS on Serum IgE Levels

|                   | Normal       | Control         | YGPDS          |
|-------------------|--------------|-----------------|----------------|
| Total IgE (ng/ml) | 804.38±80.76 | 5433.08±2054.14 | 4087.02±783.44 |

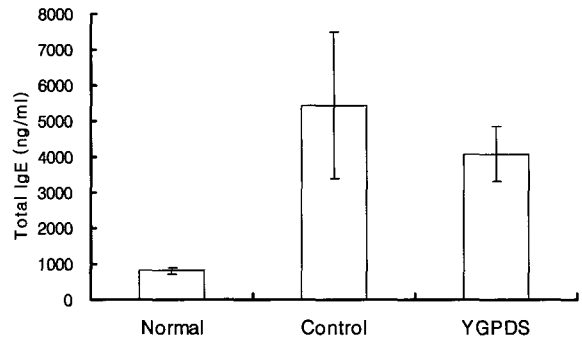


Fig. 6. Effect of in vivo administration of YGPDS on serum IgE levels. All mice were intraperitoneally immunized with OVA on day 0th, 7th, 14th, and subsequently inoculated intranasally with OVA from day 21th to 28th. The mice were orally administered with YGPDS (1g/1kg) or PBS (Normal and Control) three times a week for 4 weeks and serum was obtained on day 28th. The levels of total IgE are calculated by reference to standard curves of purified mouse IgE. Each value represents the mean ± S.D. of 5 animals.

Table 5. Effect of In Vivo Administration of YGPDS on Serum OVA-specific IgE Levels

|                | Normal      | Control     | YGPDS       |
|----------------|-------------|-------------|-------------|
| OVA-IgE (O.D.) | 0.060±0.008 | 0.650±0.187 | 0.432±0.03* |

\* P < 0.05

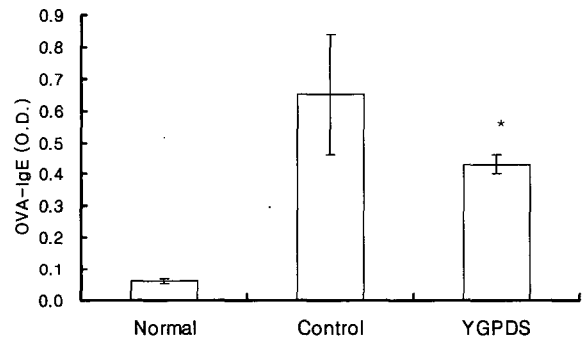


Fig. 7. Effect of in vivo administration of YGPDS on serum OVA-specific IgE levels. The methods were described in Fig. 6. The levels of OVA-specific IgE were expressed as the optical density at 450-570nm. \* P < 0.05

6. 連翹敗毒散 물 抽出物 경구투여가 OVA로 알레르기를 유도한 마우스의 IFN-g 分泌에 미치는 영향

OVA로 감염된 마우스를 치사시킨 후 얻은 spleen cell을 72 시간동안 OVA로 자극하여 그 상층액을 ELISA로 측정하였다. 정상군에서 얻은 spleen cell의 IFN-g는 1553.94 ± 311.76 pg/ml이었으며 대조군의 경우 5295.74 ± 826.22 pg/ml이었으며 連翹敗毒散 물 抽出物 처리군은 7664.13 ± 1188.61 pg/ml로서 유의하게 增加하였다(Table 6, Fig. 8).

Table 6. Effect of In Vivo YGPDS Administration on IFN-g Production in Spleen Cell Culture

|               | Normal         | Control        | YGPDS             |
|---------------|----------------|----------------|-------------------|
| IFN-g (pg/ml) | 1553.94±311.76 | 5295.74±826.22 | 7664.13±1188.61** |

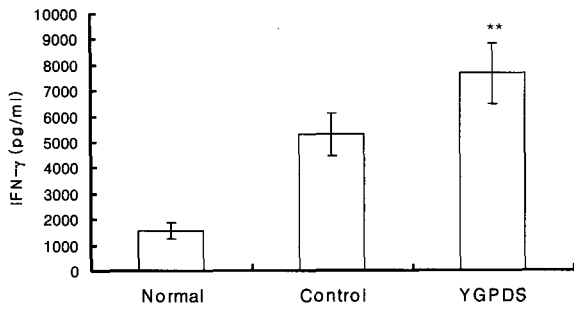


Fig. 8. Effect of in vivo YGPDS administration on IFN-g production in spleen cell culture. All mice were intraperitoneally immunized with OVA on day 0th, 7th, 14th, and subsequently inoculated intranasally with OVA from day 21th to 28th. The mice were orally administered with YGPDS (1g/1kg) or PBS (normal and control group) three times per week from day 0th to 27th. Spleen cells were obtained on day 28th and cultured in the presence of OVA. The levels of IFN-g are calculated by reference to standard curves of recombinant mouse standard IFN-g. Each value represents the mean  $\pm$ S.D. of 5 animals. \*\*: P<0.001

7. 連翹敗毒散 抽出液 경구투여가 OVA로 알레르기를 유도한 마우스의 IL-4, IL-5 분비에 미치는 영향

OVA로 감작된 마우스를 처사시킨 후 얻은 spleen cell을 72 시간동안 OVA로 자극하여 그 상층액을 ELISA로 측정하였다. 정상군에서 얻은 spleen cell의 IL-4는  $3.98 \pm 3.34$  pg/ml이었으며 대조군의 경우  $163.44 \pm 56.89$  pg/ml이었으며 連翹敗毒散 물 抽出物 처리군은  $72.88 \pm 24.90$  pg/ml로서 유의하게 減少하였다 (Fig. 7). IL-5의 경우  $3.27 \pm 1.08$  pg/ml이었으며 대조군의 경우  $946.81 \pm 194.22$  pg/ml이었으며 連翹敗毒散 물 抽出物 처리군은  $720.84 \pm 74.52$  pg/ml로서 유의하게 減少하였다 (Table 7, 8 and Fig. 9, 10).

Table 7. Effect of In Vivo YGPDS Administration on IL-4 Production in Spleen Cell Culture

|              | Normal          | Control            | YGPDS               |
|--------------|-----------------|--------------------|---------------------|
| IL-4 (pg/ml) | 3.98 $\pm$ 3.34 | 163.44 $\pm$ 56.89 | 72.88 $\pm$ 24.90** |

\*\* : P<0.005

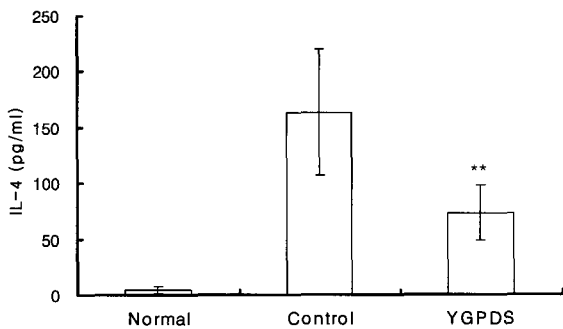


Fig. 9. Effect of in vivo YGPDS administration on IL-4 production in spleen cell culture. All mice were intraperitoneally immunized with OVA on day 0th, 7th, 14th, and subsequently inoculated intranasally with OVA from day 21th to 28th. The mice were orally administered with YGPDS (1g/1kg) or PBS (Normal and Control) three times per week from day 0th to 27th. Spleen cells were obtained on day 28th and cultured in the presence of OVA. The levels of each cytokine are calculated by reference to standard curves of recombinant mouse standard cytokine. Each value represents the mean  $\pm$ S.D. of 5 animals. \*\*: P<0.005

Table 8. Effect of In Vivo YGPDS Administration on IL-5 Production in Spleen Cell Culture

|              | Normal          | Control             | YGPDS               |
|--------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| IL-5 (pg/ml) | 3.27 $\pm$ 1.08 | 946.81 $\pm$ 194.22 | 720.84 $\pm$ 74.52* |

\* : P<0.05

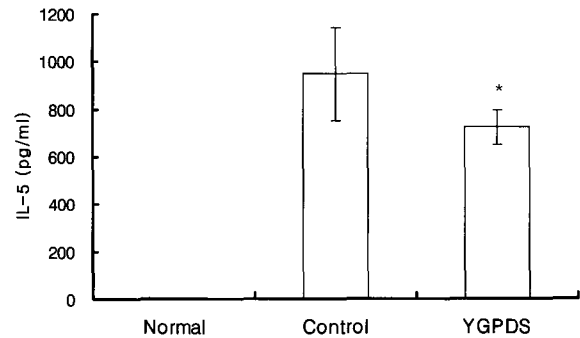


Fig. 10. Effect of in vivo YGPDS administration on IL-5 production in spleen cell culture. All mice were intraperitoneally immunized with OVA on day 0th, 7th, 14th, and subsequently inoculated intranasally with OVA from day 21th to 28th. The mice were orally administered with YGPDS (1g/1kg) or PBS (Normal and Control) three times per week from day 0th to 27th. Spleen cells were obtained on day 28th and cultured in the presence of OVA. The levels of each cytokine are calculated by reference to standard curves of recombinant mouse standard cytokine. Each value represents the mean  $\pm$ S.D. of 5 animals. \*: P<0.05

## 고찰

알레르기 질환의 주된 병변부위는 피부나 코, 기관지, 위장관 등이며 이 부위는 肺, 脾胃와 밀접한 관계가 있다. 이를 氣의 관점에서 본다면 피부에서 外邪를 방어하고<sup>30)</sup> 胸腹膜, 網膜, 腸膜을 돌면서<sup>31,32)</sup> 면역기능을 발휘하는 衛氣가 중요한 위치를 차지한다. 알레르기에 대해 유의성 있는 효과가 있다고 실험적 검증을 통해 보고 된 처방들인 加味生料四物湯, 加味清鼻飲, 補中益氣湯 등을 살펴보면 이 처방들의 해부학적 치료부위가 邪氣와 衛氣가 접하는 곳과 일치함을 확인할 수 있다.

連翹敗毒散은 癰疽 初期에 발현하는 憎寒壯熱, 腫痛, 發赤, 肢節痛 등 傷寒과 유사하게 나타나는 病症을 치료하는 清熱解毒의 효능에 있어 항균작용과 항염증작용에 대한 보고<sup>26,27)</sup>가 있으며, 그 본방인 人蔘敗毒散의 解表, 祛寒의 效能은 荊芥, 防風, 天麻, 蟬退, 薄荷, 生薑을 넣어 癰疹을 치료하는 清肌散<sup>17)</sup>으로 이어져 피부질환을 치료하는 처방으로 발전한다. 그래서 유<sup>33)</sup>는 과민성 皮膚炎에 清熱解毒하는 荊防敗毒散에 薄荷, 金銀花, 連翹, 黃芩 등의 약을 가한 처방을 쓰면 면역과민반응 억제효과가 있다고 하였다. 이런 人蔘敗毒散과 荊防敗毒散의 효능은 連翹敗毒散으로 이어져 連翹敗毒散에 蟬退를 가한 처방이 알레르기성 接觸性 皮膚炎으로 유도된 皮膚 上皮細胞의 손상을 완화시킨다는 보고가 있다<sup>28,29)</sup>.

최근 알레르기질환의 연구는 Th1/Th2 cell의 비율, 그리고 Th cell이 분비하는 사이토카인의 증가와 감소에 대해 이루어지고 있다. 면역세포인 T cell 중 cell 표면에 CD4이 있는 T helper cell은 주변의 cytokine에 따라 1형과 2형으로 나누는데 IL-12가 많이 존재하면 1형 T cell(Th1 cell)로 분화하며 이러한 Th1 cell

은 주로 IFN-g를 분비하고 세포성 면역반응을 담당하며 cell내 세균을 목표로 한다<sup>34,36</sup>. IL-4가 많이 존재하면 2형 T helper cell(Th2 cell)로 분화하며 이러한 Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13를 주로 분비하며 체액성 면역반응에 관여한다. Th1 cell이 병적으로 많이 존재하는 경우 자가면역 질환을 유발할 수 있으며 Th2 cell이 상대적으로 우세하면 알레르기 질환을 야기할 수 있다<sup>37</sup>.

알레르기 질환은 대체로 IL-4, IL-13이 B cell의 isotype switching을 유도하여 IgE를 다량으로 생산한다<sup>38,39</sup>. 특정 항원이 침입하면 이것에 특이적인 IgE가 mast cell, basophil과 결합하고 다시 반복적으로 이 항원에 노출되면 mast cell과 basophil의 탈과립이 일어나 histamine, serotonin 및 lipid derivative가 분비되어 vasodilation, edema, smooth muscle contraction 등이 일어나 喘息, 鼻炎, 皮膚炎 등이 발생한다<sup>40,41</sup>. 또한 Th2 cell과 eosinophil, basophil, macrophage 등이 여러 가지 cytokine 및 chemokine을 분비하며 국소 부위에 염증을 일으킨다. 그 외 2형 cytokine인 IL-5는 eosinophil의 수명을 연장시킴으로써 이들 cell이 major basic protein, toxic basic protein, leukotriene, platelet-activating factor 등을 만들어내므로 염증을 가속화한다<sup>42</sup>.

최근 Th1 cytokine인 IFN-g를 투여한 후 호산구의 유입이 의미있게 감소하였고 이런 알레르기 억제 현상은 Th2 cytokine인 IL-4의 현저한 저하와 연관되어 나타났으며 또 알레르기 반응이 IgE 반응 없이도 일어날 수 있다는 연구도 있다. 이는 그 동안 알레르기 질환의 기전으로 설명되던 차단항체의 개념이 정상적인 Th1/Th2 비율로 바뀌어 가고 있음을 보여준다<sup>43</sup>. 하지만 Th1 cytokine의 반응을 강화하는 것만으로는 알레르기 염증이 항상 감소하지 않는다<sup>44</sup>. 만성화된 알레르기성 喘息이나 아토피 皮膚炎에서 Th1 cell 분화를 촉진하는 IL-12(IFN-g의 강력한 유도물질) 투여로 인하여 Th2 염증반응이나 알레르기 증상을 악화시켰다는 보고들도 있다<sup>45-47</sup>.

본 연구에서는 連翹敗毒散의 항균작용과 알레르기성 접촉성 피부염에 대한 효과 이외에 T helper cell에 대한 선택적 면역조절 작용과 아울러 항알레르기 작용이 있는지 알아보기 위해 마우스 및 RBL-2H3와 Raw 264.7 cell line을 이용하여 실험하였다.

우선 連翹敗毒散 물 추출물이 anti-CD3/CD28로 CD4 T cell을 자극했을 때 미치는 영향을 확인하기 위해 連翹敗毒散 물 추출물을 농도별로 투여한 후 MTS assay를 한 결과, cell 增殖率은 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  미만의 농도에서는 藥材를 넣지 않은 cell과 유의한 차이가 없었으나 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 11%의 增加率을 보여주었다. 그러나 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 cell增殖을 37% 유의하게 抑制하였다.

마우스 CD4 T cell을 Th1 cell과 Th2 cell로 polarization한 후 검액과 더불어 3일간 배양하여 그 상층액의 IFN-g와 IL-4를 ELISA 방법을 이용하여 측정된 결과, 連翹敗毒散 抽出液이 in vitro에서는 Th2 cell로 分化하는 것을 抑制하는 경향이 있음을 확인할 수 있었다.

$\beta$ -hexosaminidase는 mast cell이나 basophil의 과립 내에 존재하는 물질인데 이들 cell들이 활성화되면 histamine과 더불어 같이 유리된다<sup>48</sup>. 따라서 이 효소의 활성화는 mast cell이나

basophil의 탈과립에 대한 marker로서 이용된다. Rat basophil leukemia cell (RBL-2H3)을 IgE로 감작하여 韓藥 처리후  $\beta$ -hexosaminidase의 유리되는 양을 측정된 결과, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 26%, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 23%, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 27%, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 55%의 抑制率을 보여주었다. 이로써 連翹敗毒散 抽出液이 in vitro에서 항원으로 유도되는 탈과립을 抑制하는 항알레르기 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

알레르기 염증에서 histamine 분비와 같은 탈과립은 항원 자극 후 수분 내에 발생하지만 자극 후 4-6시간 내에는 TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성 사이토카인이 분비되면서 endothelial cell adhesion과 inflammatory cell recruitment가 증가하여 염증이 활발하게 일어남으로써 조직의 손상을 유발하게 된다<sup>49</sup>. 따라서 일반적인 항알레르기 효과가 있는 약물들은 소염효과를 수반할 경우 알레르기 질환을 치료하는데 효과적이다. Raw 264.7 macrophage cell을 LPS로 자극하면 이러한 염증성 사이토카인의 분비가 일어나는데 連翹敗毒散 물 抽出物을 처리한 결과, 대표적인 염증성 사이토카인의 하나인 TNF- $\alpha$ 가 농도 의존적으로 유의성 있게 減少하였다.

본 연구에서는 BALB/c mouse를 이용하여 알레르기성 면역반응을 연구하는데 적합한 OVA 모델을 통해 連翹敗毒散 물 抽出物이 면역반응을 어떻게 조절하는지 살펴본바<sup>50-52</sup>. 마우스에게 連翹敗毒散 물 抽出物을 4주간 직접 경구투여하면서 동시에 OVA으로 알레르기를 유발하여 혈청내의 total IgE와 OVA-specific IgE를 측정하였고 아울러 이들 마우스의 spleen cell을 분리하여 OVA를 넣고 배양한 후에 이들 cell이 분비하는 Th1 및 Th2 cytokine의 양을 측정해 본 결과 連翹敗毒散 물 抽出物은 매우 우수한 항알레르기 효과가 있음이 in vivo 실험을 통해 증명되었다.

IgE는 1형 알레르기 반응에서 매우 중요한 역할을 하기 때문에 IgE 생산의 조절은 임상적으로 매우 중요하다. 連翹敗毒散 물 抽出物을 경구 투여한 마우스의 total IgE는 대조군에 비해 25% 減少하였으며 OVA-specific IgE도 대조군에 비해 34% 減少하였는데 모두 통계적으로 유의성이 있었다. 또한 IgE의 생산은 IL-4와 IL-5를 만들어내는 Th2 cell에 의해 增加하거나 IFN-g에 의해 IgE 형성을 촉진시키는 IL-4를 길항적으로 억제하는데<sup>53,54</sup> 連翹敗毒散 물 抽出物을 투여한 마우스의 spleen cell에서 분비되는 IFN-g, IL-4, IL-5를 보면 IFN-g의 경우 대조군보다 44% 增加하였고 IL-4는 56% 減少하였으며 IL-5는 24% 減少하였으며 모두 통계적으로 유의성이 있었다.

본 研究에서는 連翹敗毒散 물 抽出物이 in vitro에서는 마우스 T cell을 Th2 cell로 유도하는 것을 抑制하는 경향이 있음을 확인하였고 아울러 알레르기 반응에 관여하는 cell의 탈과립과 염증성 사이토카인의 합성을 抑制하는 작용이 있음을 알 수 있었다. 또한 連翹敗毒散 물 抽出物을 OVA 감작과 동시에 마우스에게 경구 투여했을 때 항원으로 유도된 IgE 반응을 減少시키고 Th1 반응을 유도하면서 Th2 반응을 減少시킴을 확인하였다. 따라서 連翹敗毒散 물 抽出物은 면역세포의 활성화저해를 유발하지 않으면서도 不均衡한 Th2 cell로의 分化를 抑制함으로써 Th1

cell을 增加하여 알레르기 질환을 발생하는 免疫不均衡을 調節하는 것으로 思料된다.

## 결 론

連翹敗毒散 물 抽出物이 마우스 면역세포의 Th1, Th2 반응과 OVA로 유도한 알레르기성 염증에 미치는 영향을 알아보기 위하여 連翹敗毒散 물 抽出物의 마우스 CD4 T cell의 증식을 및 Th1/Th2 cytokine 분비량을 측정하였고 RBL-2H3 cell의  $\beta$ -hexosaminidase 분비량과 Raw 264.7 cell의 TNF- $\alpha$  분비량을 측정하였다. 또한 BALB/c 마우스에게 連翹敗毒散 물 抽出物을 경구투여하면서 동시에 OVA으로 감작시킨 후 알레르기 반응을 유도하여 total IgE와 OVA-specific IgE 및 spleen cell의 IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 생산량을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

連翹敗毒散 물 抽出物은 마우스 CD4 T cell의 증식을 100  $\mu\text{g}$  /ml에서 11%의 增加시켰으나 200  $\mu\text{g}$ /ml에서는 37% 유의하게 억제하였다. 마우스 CD4 T cell을 Th1 cell과 Th2 cell로 분극화한 후 3일간 連翹敗毒散 물 抽出物과 함께 배양한 결과, Th1 cell에서 IFN- $\gamma$ 의量は 약간 減少하였으나 Th2 cell에서 IL-4 값은 50  $\mu\text{g}$ /ml에서 18%, 100  $\mu\text{g}$ /ml에서 21%로 유의하게 減少하였다. RBL-2H3 cell을 IgE와 抗原으로 감작했을 때 連翹敗毒散 물 抽出物은  $\beta$ -hexosaminidase를 유리를 유의하게 농도 의존적으로 抑制하였다. Raw 264.7 cell을 LPS로 자극한 후 連翹敗毒散 물 抽出物을 처리했을 때 TNF- $\alpha$ 의 合成이 유의하게 농도 의존적으로 抑制하였다. 連翹敗毒散 물 抽出物은 OVA으로 알레르기성 反應을 유도한 마우스 혈청의 total IgE, OVA-specific IgE를 유의하게 減少시켰고, 마우스의 spleen cell를 OVA 처리하여 배양한 결과, IFN- $\gamma$ 은 44% 유의하게 增加하였고, IL-4, IL-5는 각각 56%, 24% 유의하게 減少하였다.

이상의 결과로 보아 連翹敗毒散 물 抽出物은 Th1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 의 合成을 增加시키고 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5의 分泌를 減少시켜 항알레르기 작용을 나타내었다.

## 참고문헌

1. 타다 토미오著, 황상익譯. 면역의 의미론. 서울:한울, pp 145-148, 1998.
2. R.네스, G.윌리엄즈 共著, 최재천譯. 인간은 왜 질병에 걸리는가. 서울:사이언스북스, p 241, 1999.
3. 전필근, 권지영, 황은미, 편복양. 초기 유아기의 식이 형태와 알레르기 질환에 관한 조사. 小兒알레르기 및 호흡기, 13(1):33-46, 2003.
4. 정태호 등 共著. 최신 면역학 강의. 경북대학교 출판부, pp 332-334, 1996.
5. Stansfield, K.A. Th1 and Th2 cells in Health and Disease. The Journal of parasitology, 82(6):910, 1997.
6. 서창훈, 박동일. 加味麥門冬湯이 알레르기 喘息의 호흡양상 및 기관조직의 호산구 침윤에 미치는 影響. 동의한의연구, 4:19-31, 2000.

7. 김정진, 양성완, 손낙원, 안규석. 加味生料四物湯의 抗炎症 효과와 止痒膏의 아토피피부염 손상 및 止痒효과에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 17(3):428-435, 2003.
8. 은재순, 이동희, 전용근, 권영안, 권진. 加味清鼻飲이 면역반응에 미치는 영향. 동의생리병리학회지, 18(5):1391-1396, 2004.
9. Kobayashi, H., Mizuno N., Kutsuna H., Teramae H., Ueoku S., Onoyama J., Yamanaka K., Fujita N., Ishii M. Hochu-ekki-to suppresses development of dermatitis and elevation of serum IgE level in NC/Nga mouse. Drug Exp Clin Res. 29(2):81-84, 2003.
10. Suzuki T., Takano I., Nagai F., Ushiyama K., Okubo T., Seto T., Ikeda S., Kano I. Suppressive effects of Hochu-ekki-to, a traditional Chinese medicine on IgE production and histamine release in mice immunized with ovalbumin. Biol. Pharm. Bull. 22:1180-1184, 1999.
11. Kaneko Metal. Suppression of IgE production in mice treated with a traditional Chinese medicine, bu-zhong-yi-qi-tang (Japanese name: hochu-ekki-to). Immunopharmacology, 36(1):79-857, 1997.
12. 이태영, 강희, 명유진, 심법상, 최승훈, 김성훈, 안규석. The effect of Bojunggikitang-Chunbang on Activity of CD4+ T cell. 동의생리병리학회지, 18(2):580-585, 2004.
13. Ikeda Y., Kaneko A., Yamamoto M., Ishige A., Sasaki H. Possible involvement of suppression of Th2 differentiation in the anti-allergic effect of Sho-seiryu-to in mice. Jpn. J Pharmacol, 90:328-336, 2004.
14. 강희, 김윤범, 안규석. 황기의 알러지 비염 동물실험에 대한 면역조절 효과. 동의생리병리학회지, 19(3):612-617, 2005.
15. 김성수. 길경에 의한 알레르기 천식효과에 대한 연구. 대한본초학회지, 19(2):61-70, 2004.
16. 이상인 외. 방제학. 서울:영림사, pp 63-64, 1990.
17. 허준. 東醫寶鑑. 서울:대성문화사; 雜病編 卷之二 傷寒 p 269, 外形篇 卷之三 皮 p 395, 1985.
18. 龔信. 古今醫鑑. 江西科學技術出版社, p 416, 1994.
19. 王肯堂. 六科證治準繩. 上海科學技術出版社, 卷七 傷寒 p 311, 1995.
20. 汪昂. 醫方集解. 文光圖書有限公司; 中화민국 72년, pp 65-67.
21. 이한구. 패독산에 대한 문헌적 고찰. 대한한의학회지, 8(1):79-81, 1987.
22. 이한구, 정승기, 이형구. 人蔘敗毒散의 效能에 관한 實驗的 研究. 경희의학, 4(2):142-149, 1988.
23. 심재연, 김병운. 人蔘敗毒散과 가미패독산의 진통, 해열 및 백서손상. 경희한의대논문집 7:323-334, 1984.
24. 임영해. 오령산, 육미지황탕, 補中益氣湯, 人蔘敗毒散이 Gentamicin Sulfate로 손상시킨 백서의 신조직병변에 미치는 影響. 경희대학교 석사논문, 1995.
25. 김태희, 두호경. 人蔘敗毒散이 Microcrystalline Sodium Urate로 유발된 흰쥐의 통풍에 미치는 影響. 경희의학, 5(1):87-96, 1985.



26. 김성범, 김경준. 連翹敗毒散加味方이 炎症상태의 면포에 미치는 影響. 대한한의학회 인이비인후과부과학회, 15(1):50-62, 2002.
27. 정진탁. 連翹敗毒散의 抗菌作用에 대한 實驗的 研究. 경희대학교 석사논문, 1976.
28. 권오성, 김진택, 박인식 외. 連翹敗毒散加味方이 DNCB로 유도된 생쥐의 알레르기성 접촉피부염에 미치는 影響. 동국대 논문집, 8(1):77-91, 1999.
29. 김호현, 김동환. 連翹敗毒散加味方이 알레르기성 접촉피부염에 미치는 影響 2. 세명대학교 韓醫學研究所 논문집 3:67-80, 2001.
30. 河北醫學院. 靈樞經校釋. 人民衛生出版社 pp 48-52(下), 1982.
31. 낙화생著, 안덕근譯. 번역과 한방. 서울: 열린 책들, p 23, 1992.
32. 程士德 주편. 素問注釋匯粹. 人民衛生出版社, pp 622-627(上), 1982.
33. 유태섭. 헝개연교탕이 항알레르기작용에 관한 實驗的 效果. 대한한방소아과학회지, 4(1):20-29, 1990.
34. Singh, V.K., Mehrotra, S., Agarwal, S.S. The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: its relevance to autoimmunity and allergy. *Immunol Res*, 20:147-161, 1990.
35. Jacobson, N.G., Szabo, S.J., Weber-Nordt, R.M., Zhong, Z., Schreiber, R.D., Darnell, J.E. Interleukin 12 signaling in T helper type 1(Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med*, 181(5):1755-1762, 1995.
36. Abehsira-Amar, O., Gibert, M., Jolij, M., Theze, J., Jankovic, D.L. IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells. *J Immunol*, 148(12):3820-3829, 1992.
37. Rao, A., Avni, O. Molecular aspects of T cell differentiation. *Br Med Bull*, 56(4):969-984, 2000.
38. Williams, C.M., Galli, S.J. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 105(5):847-859, 2000.
39. Beallanti JA. Cytokine and allergic disease; clinical aspect. *Allergy Asthma Proc*, 19(6):337-341, 1988.
40. Carlos, A.G., Carlos, M.L., Conceisao, S.M., Alcinda, M. Cytokines and asthma. *J Invest Allergy Clin Immunol*, 7(5):270-273, 1997.
41. Hogan, S.P., Koskinen, A., Matthaei, K.I., Young, I.G., Foster, P.S. IL-5 producing CD4 T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity and lung damage in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 157(1):210-218, 1998.
42. 최성민. 알레르기疾患 治療의 새로운 접근. *동국의학*, 8:115-130, 2001.
43. Lewis, D.B. Allergy immunotherapy and inhibition of Th2 immune responses: a sufficient strategy. *Current Opinion in Immunology*, 14:644-651, 2002.
44. Spergel, J.M., Mizoguchi, E., Oettgen, H., Bhan, A.K., Geha, R.S. Roles of Th1 and Th2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. *J Clin Invest*, 103:1103-1111, 1999.
45. Hofstra, C.L., Van Ark, I., Hofman, G.I., Nijkamp, F.P., Jardieu, P.M., Van Oosterhout, A.J. Differential effects of endogenous and exogenous interferon-gamma on immunoglobulin E, cellular infiltration, and airway responsiveness in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 19:826-835, 1998.
46. Tsitoura, D.C., Blumenthal, R.L., Berry, G., Dekruyff, R.H., Umetsu, D.T. Mechanisms preventing allergen-induced airways hyperreactivity: role of tolerance and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol*, 106:239-246, 2000.
47. Tanaka, Y., Takagaki, Y., Nishimune, T. Effects of metal elements on beta-hexosaminidase release from rat basophilic leukemia cells(RBL-2H3). *Chem. Pharm. Bull*, 39(8):2072-2076, 1991.
48. Hong, C.C., Shimomura-Shimizu, M., Muroi, M., Tanamoto, K. Effect of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production by mouse macrophage. *Biol Pharm Bull*, 27(7):1136-1139, 2004.
49. Renz, H., Smith, H.R., Henson, J.E., Ray, B.S., Irvin, C.G., Gelfand, E.W. Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J Allergy Clin Immunol*, 89:1127-1138, 1992.
50. Herz, U., Braun, A., Ruckert, T., Renz, H. Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clin Exp Allergy*, 28:628-634, 1998.
51. Jarmann, E.R., Kuba, A., Montermann, E., Barlett, R.R., Reske-Kunz, A.B. Inhibition of murine IgE and immediate cutaneous hypersensitivity responses to ovalbumin by the immunomodulatory agent leflunomide. *Clin Exp Immunol*, 115:221-228, 1999.
52. Paludan, S.R. Interleukin-4 and interferone-gamma; the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand J Immunol*, 48:459-468, 1998.
53. Boothby, M., Mora, A.L., Aronica, M.A., Youn, J., Sheller, J.R., Goenka, S. IL-4 signaling, gene transcription regulation and the control of effector T cells. *Immunol Res*, 23:179-191, 2001.