

不換金正氣散이 마우스 Th1/Th2 分化 및 알레르기 염증 반응 조절에 미치는 효과

임강민 · 강 희 · 박성민 · 심범상 · 김성훈 · 최승훈 · 안규석*

경희대학교 한의과대학 병리학교실, 경희대학교 한의학연구소

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

Kang-Min Lim, Hee Kang, 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 Bulhwangeumjeonggi-san (BS) 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 BS extract were measured as well as the amount of β -hexosaminidase in RBL-2H3 cells and the levels of TNF- α and IL-6 secretion in Raw264.7 cells. BALB/c mice were orally administered with BS 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- γ , 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 BS extract, it increased proliferation of CD4 cells by 14% in 50 $\mu\text{g/ml}$ concentration but it showed an inhibition in higher concentrations. CD4 T cells under Th1/Th2 polarizing conditions for 3 days with BS resulted in mild decrease of IFN- γ in Th1 cells and mild increase of IL-4 in Th2 cell at 50 $\mu\text{g/ml}$ but the level of IL-4 decreased by 18% at 100 $\mu\text{g/ml}$. BS extract had a dose-dependent inhibitory effect on antigen-induced release of β -hexosaminidase in RBL-2H3 cells. Treatment of BS extract on LPS stimulated Raw 264.7 cells showed dose-dependent decrease in TNF- α production. Oral administration of BS extract on OVA-induced allergic mice showed an inhibitory effect on the levels of total serum IgE and OVA-specific IgE by 50% and 55%, respectively. Culture of spleen cells with OVA resulted in significant increase of IFN- γ by 25% and significant decrease of IL-4 and IL-5 by 53%, and 38%, respectively. The results show that BS 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 : Bulhwangeumjeonggi-san, Th1/Th2, IL-4, IFN- γ , allergy

서 론

알레르기(allergy)는 과민증이라고 하는데 생체가 자기 성분 이외의 이물질이 恒常性을 저해하는 것을 막기 위한 免疫反應을 일으킨 결과로 생체에 나타난 이상반응이다¹⁾. 알레르기 반응에

는 IgE 항체가 관여하는 즉시형 알레르기 반응과 항체가 관여하지 않는 지연형 알레르기 반응이 있는데 이들 중 세 가지 유형(Type I, II, III)은 항체 또는 항원-항체 복합체에 의해 매개되는 것이고, 네 번째 유형이 T-lymphocyte에 의해 중개되는 세포성 면역이다²⁾.

알레르기 질환은 알레르기 鼻炎, 알레르기 결막염, 알레르기 喘息 및 아토피 皮膚炎 등이 있으며 선진국의 경우 최고 30%의 소아들이 이러한 증상들을 겪는 것으로 보고되었다³⁾.

알레르기 염증에 관여하는 T cell 중 대다수를 차지하는 세

* 교신저자 : 안규석, 서울시 동대문구 회기동1, 경희대학교 한의과대학

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

· 접수 : 2006/10/20 · 수정 : 2006/11/20 · 채택 : 2006/12/04

포는 T helper cell로 抗原提示細胞 표면에 부착된 major histocompatibility complex (MHC)와 연결된 항원과 접촉함으로써 활성화가 진행되며⁴⁾, 주변에 존재하는 cytokine에 의해 1형 T helper cell (Th1 cell)과 2형 T helper cell (Th2 cell)로 분류되는데 Interferon- g (IFN- g)가 많이 존재하면 Th1 cell로 분화하고 Interleukin-4 (IL-4)가 많이 있으면 Th2 cell로 분화한다⁵⁾. Th1 cell이 과도하게 많아지면 류마티스 관절염이나 루푸스와 같은 자가면역 질환이 발생하며, Th2 cell이 상대적으로 많아지면 이들 세포가 분비하는 IgE라는 항체를 과도하게 형성함으로써 알레르기 질환이 발생하게 된다.

한의학에서 면역의 개념은 正氣와 邪氣의 관계 및 그 내용에서 찾아볼 수 있다. 《素問·上古天眞論》의 “眞氣從之, 精神內守, 病安從來”와 《素問·刺法論》의 “正氣存內, 邪不可干”, 《素問·評熱病論》의 “邪之所湊, 其氣必虛”에서 표현한 것처럼⁶⁻⁸⁾, 正氣란 邪氣에 대항하는 인체 내의 방어적 힘을 총칭하는 말로서 한의학적 면역개념의 대표 개념이라고 할 수 있다.

알레르기 질환에 이용되는 한약물에 관한 연구보고를 살펴보면 은 등⁹⁾은 加味清鼻飲이 mast cell 내로 Ca²⁺ 유입을 차단하여 histamine 유리를 억제함으로써 알레르기성 鼻炎에 효과적으로 작용한다고 보고하였고, 김 등¹⁰⁾은 加味生料四物湯 추출물이 비만세포의 탈과립과 histamine 분비를 억제하며 알레르기 염증과 관련된 tumor necrosis factor (TNF)-a, IL-6 의 발현을 억제한다고 하였고, 이 등¹¹⁾은 黃連解毒湯이 제 1형과 제 4형 알레르기에 효과가 있다고 보고하였고, 이외에도 小青龍湯, 補中益氣湯 등이 아토피 皮膚炎이나 알레르기 喘息, 알레르기 鼻炎을 치료하는 효과가 있다고 보고되어 있다.

不換金正氣散은 《太平惠民和劑局方》에 처음 수록된 처방으로 平胃散에 芳香化濁, 開胃止嘔하는 藿香과 化痰止嘔, 燥濕降逆하는 半夏를 가한 處方이며 四時 傷寒으로 인한 嘔吐, 泄瀉, 腹痛 등의 증상을 치료한다¹²⁾. 실험적으로 임 등¹³⁾은 위액분비 억제, 위장관 평활근 이완 및 항아세틸콜린 작용을 보고하였고, 허 등¹⁴⁾은 평위산, 향사평위산 및 不換金正氣散이 모두 항아세틸콜린, 항barium chloride 및 항histamine 작용이 있으며 痙攣抑制, 鎮痛, 睡眠時間延長 등에 유의한 효과가 있다고 보고하였다. 양 등¹⁵⁾은 藿香正氣散이 消化障礙를 동반한 食慾不振과 여름이나 비가 오는 濕한 날씨에 악화되는 濕性 아토피 皮膚炎에 유의한 효과가 있다고 보고하였다. 임상적으로 소화기 증상을 개선시켜 正氣의 작용을 돕는 방제들이 알레르기 질환에도 유용하게 활용되고 있고 한의학적으로 알레르기 질환의 병태가 濕에 의해 벌어지는 경우가 많아서 본 연구에서는 除濕, 理氣作用的 不換金正氣散을 선택하여 연구하였다.

본 연구에서는 不換金正氣散의 T 세포에 대한 면역조절과 항알레르기 효과를 알아보기 위해 마우스의 비장에서 CD4 T cell을 분리하여 인위적으로 Th1 cell과 Th2 cell로 분화시켜 이를 조절하는 능력을 측정하였고, RBL-2H3 cell과 Raw 264.7 cell을 이용하여 항염증 효과를 확인하였으며, 아울러 마우스에게 不換金正氣散 물 추출물을 경구 투여하여 ovalbumin (OVA)으로 알레르기 염증을 유발하였을 때 혈청의 IgE와 cytokine 변화를 측

정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

不換金正氣散(Bulhwangeumjeonggi-san:BS)의 구성약물과 용량은 東醫寶鑑에 준하였으며(Table 1), 이들 약물은 경희대학교 한의과대학 부속 한방병원 약제과에서 구입하였다.

Table 1. The Composition of Bulhwangeumjeonggi-san.

Herbal name	Chinese name	Amount
<i>Atractylodis Rhizoma</i>	蒼朮	7.5 g
<i>Magnoliae Cortex</i>	厚朴	3.75 g
<i>Citri Pericarpium</i>	陳皮	3.75 g
<i>Pogostemonis Herba</i>	藿香	3.75 g
<i>Pinelliae Rhizoma</i>	半夏	3.75 g
<i>Glycyrrhizae Radix</i>	甘草	3.75 g
<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	生薑	3.75 g
<i>Jujubae Fructus</i>	大棗	3.75 g
Total amount		33.75 g

2) 세포

사용된 암세포는 Rat basophilic leukemia-2H3 (RBL-2H3) cell line과 Raw264.7 macrophage cell line이며 한국 세포주은행에서 분양 받았다.

3) 동물

본 실험에 사용된 실험용 마우스는 생후 8주된 BALB/c 수컷 마우스이며 오리엔트(주)에서 구입하였다. 고형사료와 물은 제한 없이 공급하면서 낮 12시간, 밤 12시간의 생활리듬을 주었으며 항온 항습 상태에서 1주간 적응시킨 후 사용하였다.

4) 배지 및 시약

Fetal bovine serum (FBS)과 OVA-grade V, recombinant IL-2 (rIL-2), anti-dinitrophenol (DNP)-IgE, DNP-human serum albumin (HSA), bovine serum albumin (BSA)은 Sigma(U.S.A.)에서 구입하였으며 antibiotic-antimycotic과 RPMI 1640, DMEM은 Invitrogen Life Technology(U.S.A.)에서 구입하였다. Magnetic cell sorting CD4 (L3T4) microbeads는 Miltenyi Biotec (U.S.A.)에서 구입하였다. anti-CD3e antibody, 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 Pharmingen(U.S.A.)에서 구입하였으며 Biotin NHS는 Vector Laboratories에서 구입하였다.

2. 방법

1) 시료 제조

不換金正氣散 구성약물을 유리로 된 추출용기에 담고 충분히 잠기도록 물을 넣어 하루 동안 냉침 한 다음 50℃에서 한 시간씩 2회 초음파세척기로 물리적 자극을 가하여 약물의 용해를 촉진하였다. 이 용액을 filter paper로 여과한 다음 rotary

vacuum evaporator(Eyela, Japan)로 감압 농축한 뒤 1000ml round flask에 옮겨 freezing dryer(Eyela, Japan)로 24시간 동안 동결 건조하여 건조된 분말을 不換金正氣散 물 추출물 시료로 사용하였다(yield: 5.46%).

2) 비장세포 부유액의 준비

비장을 마우스로부터 적출하여 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic이 함유된 RPMI-1640으로 세척하였다. Micro slide glass로 비장을 잘게 으갠 뒤 0.40 μ m nylon cell strainer로 여과하였다. 1000 rpm, 10분간 원심분리 한 후 RBC lysis buffer로 적혈구를 파괴하였다. 2회 원심분리 한 후 비장세포를 trypan blue exclusion assay를 통해 생존율을 확인한 후 세포 수를 측정하였다.

3) CD4 T cell의 분리

비장임파구를 1×10^7 cells/90 μ l의 농도에 10 μ l의 MACS CD4 (L3T4) microbeads를 첨가하여 15분간 4°C에 incubation하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 나서 500 μ l의 배지에 cell pellet을 resuspension한다. Positive selection column 을 MACS separator (Miltenyi Biotec, U.S.A.)에 삽입한 후 세포부유액을 column 안으로 통과시켰다. column 안에 부착된 CD4 T cell은 플러저로 elution하여 분리하였다.

4) 생존 및 증식을 측정

비장의 CD4 T cell을 mitogen으로 자극 받았을 때의 증식능을 측정하기 위해 CellTiter 96 TM non-radioactive cell proliferation assay(Promega, U.S.A.)의 protocol에 준하되 4×10^5 cells/200 μ l의 농도로 anti-CD3(10 μ g/ml)가 coating된 96-well plate에 seeding하였다. 여기에 anti-CD28(2 μ g/ml)를 넣고 co-stimulation하였다. 不換金正氣散 물 추출물은 0, 10, 50, 100, 200 및 400 μ g/ml의 농도로 48시간 37 °C, 5% CO₂ incubator에 배양한 후 CellTiter 96R aqueous one solution reagent를 첨가하였다. Raw264.7 cell의 세포독성 검사를 위해서 먼저 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic이 함유된 DMEM으로 배양한 후 2×10^4 cells/100 μ l의 농도로 96-well plate에 seeding하여 24시간을 배양한 후 배양액을 갈아주었다. 교체한 모든 배양액에는 50, 100, 200 및 400 μ g/ml의 농도로 不換金正氣散 물 추출물을 처리하여 20시간을 배양한 후에 동일한 reagent를 첨가하였다. Formazan product는 microplate reader(Tecan, Austria)를 이용하여 optical density 490-650 nm에서 reading하였다.

5) In vitro Th1/Th2 polarization

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

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

RBL-2H3 cell (5×10^5 cells/ml)을 24-well plate에 seeding한 후 mouse monoclonal DNP-specific IgE (1 μ g/ml)를 첨가하여 3 시간 감작하였다. 배지를 걷어내고 Tyrode buffer (135 mM

NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose, 1 mg/ml BSA, 20 mM Hepes-NaOH: pH 7.2)로 2번 washing하였다. 항원인 DNP-HSA(1 μ g/ml)를 첨가하고 37 °C에서 한 시간 배양하였다. 전체 β -hexosaminidase 양을 측정하기 위해서 1% Triton X-100으로 lysis하였다. 상층액을 원심분리 한 후 96-well plate에 상층액 0.05 ml과 citrate buffer(0.1 M, pH 4.5)에 녹인 1 mM p-NAG(p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide) 0.05 ml를 37 °C에서 1 시간 반응시켰다. 그리고 나서 0.2 M glycine 0.2 ml을 첨가하여 반응을 정지한 후 microplate reader 405 nm에서 optical density를 측정하였다.

7) Raw264.7 macrophage cell에서의 염증 cytokine 측정

염증반응과 관련한 不換金正氣散의 영향을 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 2×10^5 을 seeding하였다. overnight incubation한 후 medium을 갈아준 후에 不換金正氣散 물 추출물을 농도별로 가하고 동시에 lipopolysaccharide(1 μ g/ml)를 처리하였다. 18시간이 지난 후에 상층액을 harvest하여 -20 °C에 보관하였다.

8) 不換金正氣散 물 추출물 경구 투여 및 알레르기성 鼻炎 유발
不換金正氣散 물 추출물을 phosphate buffered saline (PBS)에 1.0 g/kg의 용량으로 마우스에게 4주간 일주일에 세 번씩 경구투여 하였다. 정상군과 대조군은 동량의 PBS를 투여하였다. Al(OH)₃와 PBS를 동량으로 섞은 용액에 0.1%의 OVA를 넣은 후 실험 시작 0일, 7일, 14일째 복강내에 투여하여 감작하였으며 정상군은 PBS를 복강내에 투여하였다. 항원 유발을 위해 마지막 복강투여 1주일 후 7일간 대조군과 실험군 마우스의 비강에 OVA 용액을 20 μ l씩 점적하였다. 28일째에 마우스를 마취시킨 후 심장체혈하여 혈액을 채혈한 후 응고시켰다. 원심분리하여 혈청은 분리한 후 -20 °C에 보관하였다. 채혈 후 마우스에서 비장 조직을 떼어 비장 세포 부유액으로 만들었다.

9) OVA로 비장세포 배양

알레르기를 유발한 마우스의 비장세포를 24-well plate에 5×10^6 cells/ml로 seeding한 후 OVA(1 mg/ml)와 함께 72시간 37 °C, 5% CO₂ incubator에 배양하였다. Cell harvest를 한 후 상층액은 원심분리 후 -20 °C에 보관하였다.

10) ELISA 측정

96-well plate의 각 well에 capture antibody를 4°C에서 overnight으로 coating하였다. OVA-specific IgE를 위해서는 capture IgE antibody(2 μ g/ml)를 well에 coating하였다. 10% FBS가 함유된 PBS를 200 μ l/well씩 넣고 1시간 상온에 둔 채 blocking하였다. 3회 washing하여 blocking buffer를 완전히 제거한 후 standard IgE, standard cytokine과 샘플을 적당량 희석하여 100 μ l씩 분주하여 2시간 상온에 두었다. 5회 washing후 각각의 biotinylated detection antibody를 넣고 한 시간 상온에 두었다. 다시 7회 washing한 후 horse reddish peroxidase-conjugated streptavidin을 100 μ l씩 분주한후 1시간 상온에 두었다. Biotinylated OVA는 Biotin NHS와 OVA를 혼합한 후 투석하여 제조한 후 사용하였다.

7회 washing 후 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine substrate reagent 100 μ l를 가한 후 30분이 지나서 1M H₂SO₄ 50 μ l를 첨가하였다. Microplate reader (Molecular Devices, US)로 파장 450-570 nm에서 optical density를 측정하였다.

11) 통계분석

실험결과는 평균값으로 표시하였으며 SPSS 12.0을 이용하여 Student's t-test와 ANOVA로 처리하였다.

실험성적

1. 不換金正氣散 물 추출물이 CD4 T cell의 proliferation에 미치는 영향

不換金正氣散 물 추출물을 농도별로 넣고 마우스 CD4 T cell을 anti-CD3 및 anti-CD28로 48시간 자극한 결과 50 μ g/ml에서 약제를 넣지 않은 세포보다 14%의 증가율을 보여주었다(Fig. 1). 200 μ g/ml 이하부터는 세포증식을 억제하는 경향이 약간 나타났는데 400 μ g/ml에서도 12%의 억제율만을 보여주어 비교적 고농도에서도 세포증식을 억제하는 부작용은 나타나지 않았으나 통계적으로 유의성은 없었다.

Table 2. Proliferation of CD4 T cells stimulated with anti-CD3/CD28 in Medium Containing Various Concentrations of BS Extract After 48 Hours Incubation.

BS (μ g/ml)	Optical density(490-650)
Medium	0.234 \pm 0.015
0	0.646 \pm 0.028
10	0.669 \pm 0.083
50	0.738 \pm 0.043
100	0.703 \pm 0.080
200	0.603 \pm 0.072
400	0.571 \pm 0.055

Data are expressed as mean \pm S.D. of optical density(O.D.).

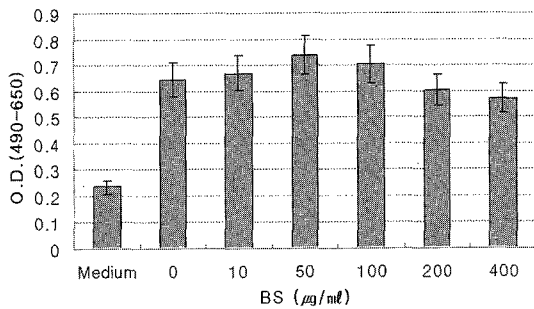


Fig. 1. Proliferation of CD4 T cells in medium containing various concentrations of BS extract after 48 hours incubation. Sorted CD4 T cells were stimulated with anti-CD3e/anti-CD28 antibodies for 48h. Cell proliferation was quantified by the ability to reduce the tetrazolium dye MTS. Data are expressed as mean \pm S.D. of optical density (O.D.).

2. 不換金正氣散 물 추출물이 마우스 Th1/Th2 분화에 미치는 영향

마우스 CD4 T cell을 Th1 cell과 Th2 cell로 polarization한 후 3일간 배양하여 얻은 상층액의 IFN- γ 와 IL-4를 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. Th1 세포의 경우 不換金正氣散 물 추출

물을 처리했을 때 IFN- γ 의 양은 평균치가 약간 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 3). 그러나 Th2 세포에서는 IL-4 값이 50 μ g/ml에서는 약간 증가하였으나 100 μ g/ml에서 18% 정도 감소하였다(p=0.005).

Table 3. The Effect of BS on Cytokine Levels of Mouse Th1/Th2 Cells.

BS (μ g/ml)	IFN- γ (ng/ml)	IL-4 (pg/ml)
0	467.40 \pm 25.71	9993.05 \pm 37.95
50	420.11 \pm 34.44	10385.23 \pm 480.74
100	412.92 \pm 23.57	8183.96 \pm 531.34*

*p=0.005

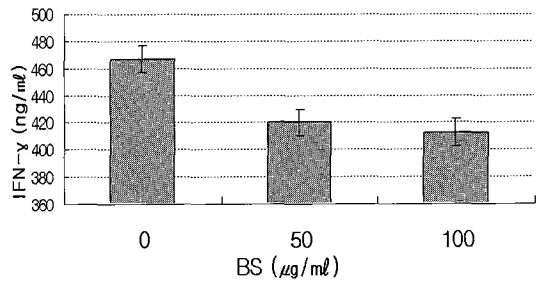


Fig. 2. The Effect of BS on IFN-g levels in mouse Th1/Th2 cells. CD4 T cells were stimulated in vitro under Th1/Th2 polarizing conditions for 3 days. BS was added at the beginning of culture.

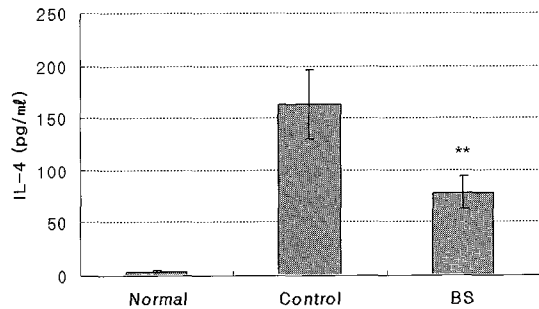


Fig. 3. The effect of BS on IL-4 levels in mouse Th1/Th2 cells. CD4 T cells were stimulated in vitro under Th1/Th2 polarizing conditions for 3 days. BS was added at the beginning of culture. **P<0.05.

3. 不換金正氣散 물 추출물이 RBL-2H3세포의 β -hexosaminidase 유리에 미치는 영향

RBL-2H3 세포를 IgE와 항원으로 유도하여 β -hexosaminidase를 유리시키는 반응에 대해 不換金正氣散 물 추출물이 억제하는 효과를 알아보았다. 不換金正氣散 물 추출물은 50 μ g/ml에서 21%, 100 μ g/ml에서는 26%, 200 μ g/ml에서는 37%, 400 μ g/ml에서는 42%의 억제율을 보여주었다(Fig. 4).

4. 不換金正氣散 물 추출물이 Raw 264.7 macrophage cell의 TNF- α 합성에 미치는 영향

Raw 264.7 macrophage cell에 LPS와 不換金正氣散 물 추출물을 동시에 처리한 후 18시간 배양한 후에 pro-inflammatory cytokine인 TNF- α 의 합성량을 ELISA로 측정한 결과, LPS만을

처리한 군은 7418.52 ± 301.96 pg/ml이었으나 不換金正氣散 물 추출물을 처리한 군은 농도 의존적으로 감소하였는데 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 5539.51 ± 362.36 pg/ml으로 대조군에 비해 26% 감소하였으며 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 4301.07 ± 543.54 pg/ml으로 43% 감소하였고 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 2422.06 ± 120.78 pg/ml으로 68% 감소하였으며 모두 유의성이 있었다(Table 4, Fig. 5).

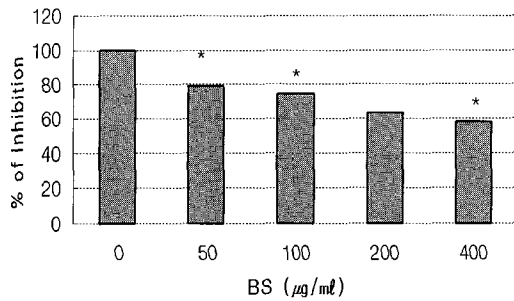


Fig. 4. Inhibitory effect of BS on antigen-induced release of β -hexosaminidase in RBL-2H3 cells. Cells were pre-incubated with DNP-specific IgE for 3 h followed by change of medium and incubation for 1 h with DNP-HSA plus BS extract. Standard deviations are too small to represent. *: $P < 0.05$.

Table 4. The Effects of BS on TNF- α in Raw 264.7 Cells

BS ($\mu\text{g/ml}$)	TNF- α (pg/ml)
Media	286.82
0	7418.52 ± 301.96
100	$5539.51 \pm 362.36^*$
200	$4301.07 \pm 543.54^*$
400	$2422.06 \pm 120.78^*$

*: $P < 0.05$

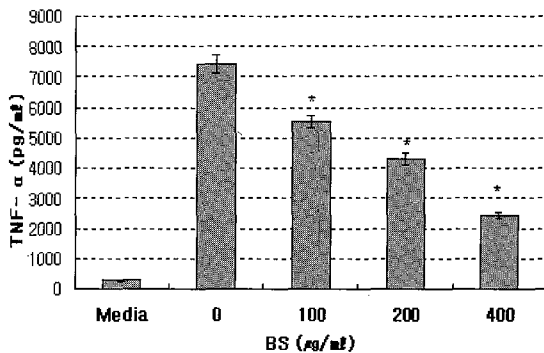


Fig. 5. The effects of BS on TNF- α in Raw 264.7 cells. Cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) plus BS extract for 18 h. Data are expressed as mean \pm S.D. *: $P < 0.05$.

5. 不換金正氣散 물 추출물 경구투여가 OVA로 알레르기를 유도한 마우스의 total IgE와 OVA-specific IgE에 미치는 영향

Total IgE와 OVA-specific IgE는 不換金正氣散 물 추출물을 1.0 g/kg의 용량으로 4주간 1을 가지고 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 不換金正氣散 주일에 세 번씩 경구투여 후 마우스를 심장 채혈하여 얻은 혈청을 450-570 nm 파장에서 측정하여 얻은 혈청 IgE를 경구 투여한 마우스의

total IgE는 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. Total IgE의 경우 혈청을 400배로 희석하여 측정했을 때 정상군은 804.38 ± 80.76 ng/ml이었고 대조군은 5433.08 ± 2054.14 ng/ml이었으며 不換金正氣散 물 추출물을 투여한 군은 2702.31 ± 674.58 ng/ml로 약 50% 감소하였다(Table 5, Fig. 6). OVA-specific IgE는 O.D. 값이 정상군은 0.059 ± 0.008 로 거의 검출되지 않았으나 대조군은 0.650 ± 0.187 였고 不換金正氣散 물 추출물 투여군은 0.294 ± 0.054 로 55% 감소하였다(Table 6, Fig. 7).

Table 5. The Effect of In Vivo Administration of BS on Serum IgE Levels.

OVA	BS (1 g/kg)	Total IgE (ng/ml)
-	-	804.38 ± 80.76
+	-	5433.08 ± 2054.14
+	+	$2702.31 \pm 674.58^*$

** $P < 0.005$

Table 6. The Effect of In Vivo Administration of BS on Serum OVA-specific IgE Levels.

OVA	BS (1 g/kg)	OVA-IgE (O.D.)
-	-	0.060 ± 0.008
+	-	0.650 ± 0.187
+	+	$0.294 \pm 0.054^*$

* $P < 0.05$

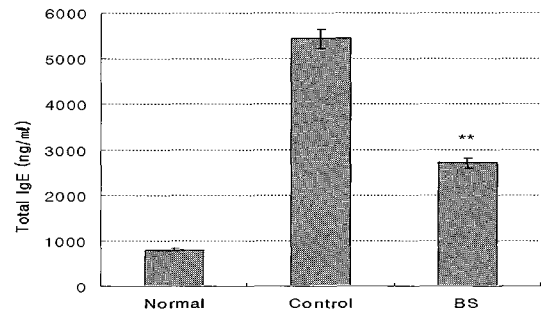


Fig. 6. The effect of BS on serum IgE levels in mice. All mice were intraperitoneally immunized with OVA on days 0, 7, 14, and subsequently inoculated intranasally with OVA from days 21 to 28. The mice were orally administered with BS extract (1.0 g/kg) or PBS (normal and control group) three times per week for 4 weeks and serum was obtained on day 28. The levels of total IgE are calculated by reference to standard curves of purified mouse IgE. Each value represents the mean \pm S.D. of 5 animals. ** $P < 0.005$.

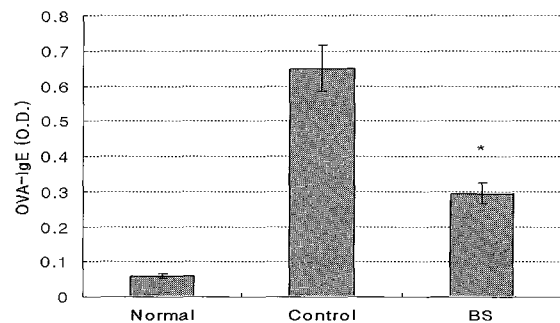


Fig. 7. The effect of BS on serum OVA-IgE levels. The methods are described in Fig. 4. The data are expressed as the mean \pm S.D. optical density at 450-570 nm. * $P < 0.05$.

6. 不換金正氣散 물 추출물 경구투여가 OVA로 알레르기를 유도한 마우스의 IFN- g 분비에 미치는 영향

OVA로 감염된 마우스를 치사시킨 후 얻은 비장세포를 72시간 OVA로 자극하여 그 상층액을 ELISA로 측정하였다. 정상군 마우스로부터 얻은 비장세포의 IFN- g는 1553.94 ± 311.76 pg/ml였으며 대조군의 경우 5295.74 ± 826.22 pg/ml였으며 不換金正氣散 물 추출물 처리군은 6698.62 ± 1339.44 pg/ml로 약 25% 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다($p=0.053$)(Table 7, Fig. 8).

Table 7. The Effect of In Vivo BS Administration on IFN-g Production in Spleen Cell Culture.

OVA	BS (1 g/kg)	IFN- g (pg/ml)
-	-	1553.94 ± 311.76
+	-	5295.74 ± 826.22
+	+	6698.62 ± 1339.44

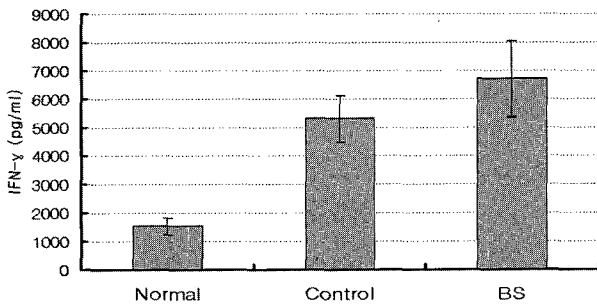


Fig. 8. The effect of BS on IFN-g production in spleen cell culture. All mice were intraperitoneally immunized with OVA on days 0, 7, 14, and subsequently inoculated intranasally with OVA from days 21 to 28. The mice were orally administered with BS(1g/kg) or PBS (normal and control group) three times per week from days 0 to 27. Spleen cells were obtained from day 28 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±S.D. of 5 animals.

7. 不換金正氣散 물 추출물 경구투여가 OVA로 알레르기를 유도한 마우스의 IL-4, IL-5 분비에 미치는 영향

OVA로 감염된 마우스를 치사시킨 후 얻은 비장세포를 72시간 OVA로 자극하여 그 상층액을 ELISA로 측정하였다. 정상군 마우스로부터 얻은 비장세포의 IL-4는 3.98 ± 3.34 pg/ml이었으며 대조군의 경우 163.44 ± 56.89 pg/ml이었으며 不換金正氣散 물 추출물 처리군은 77.87 ± 14.22 pg/ml 로써 유의성있게 감소하였다(Table 8, Fig. 9). IL-5의 경우 3.27 ± 1.076 pg/ml이었으며 대조군의 경우 946.81 ± 194.22 pg/ml이었으며 不換金正氣散 물 추출물 처리군은 587.59 ± 160.79 pg/ml로 유의하게 감소하였다 (Table 9, Fig. 10).

Table 8. The Effect of BS Administration on IL-4 Production in Spleen Cell Culture.

OVA	BS (1 g/kg)	IL-4 (pg/ml)
-	-	3.98 ± 3.34
+	-	163.44 ± 56.89
+	+	$77.87 \pm 14.22^{**}$

**P<0.005

Table 9. The Effect of BS Administration on IL-5 Production in Spleen Cell Culture.

OVA	BS (1 g/kg)	IL-5 (pg/ml)
-	-	3.27 ± 1.07
+	-	946.81 ± 194.22
+	+	$587.59 \pm 160.79^{**}$

**P<0.005

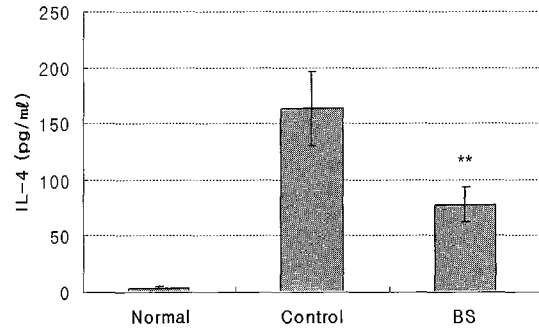


Fig. 9. The effect of BS administration on IL-4 production in spleen cell culture. The methods are described in the legend to Fig. 6. Each value represents the mean ±S.D. of 5 animals. **: P<0.005.

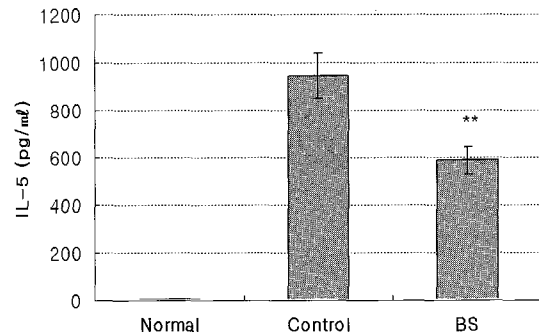


Fig. 10. The effect of BS administration on IL-5 production in spleen cell culture. The methods are described in the legend to Fig. 6. Each value represents the mean ± S.D. of 5 animals. **: P<0.005.

고찰

면역이란 어떤 요인으로 인해 자기성분 이외의 물질이 침범하거나 변이 세포가 발생했을 때 이러한 異物과 변이 세포를 非自己(non-self)로 인식하여 처리하는 방식을 말한다¹⁶⁾.

인간의 면역반응은 크게 두 가지로 구분되는데 하나는 體液性 免疫反應(humoral immunity)으로 항원 자극에 의해 B cell이 항체를 만들어 내는 반응을 말하며, 다른 하나는 항원 자극을 받은 T cell이 다른 세포들과 작용하여 직접 반응을 하거나 여러 가지 cytokine, chemokine을 만들어내어 非自己인 물질을 처리하는 반응으로 細胞性 免疫反應(cellular immunity)이라고 한다²⁾.

이러한 면역반응에서 가장 중추적인 역할을 하는 세포는 T 세포로 이들은 骨髓의 幹細胞(stem cell)에서 만들어져서 흉선으로 이동하여 분화와 발육을 거친 후 혈액내로 들어가 말초 림프계로 이동한다. 여기에서 T cell은 macrophage, B cell, dendritic cell과 같은 抗原提示細胞(antigen presenting cell)의 MHC (Major Histocompatibility Complex)에 붙어 있는 항원과 접촉함

으로써 면역이라는 임무를 시작하게 된다⁴⁾. T cell은 peptide로 구성된 항원을 주로 인지하는데 T cell 표면에 있는 T cell receptor (TCR)과 CD3로 이루어진 TCR/CD3 complex가 이러한 항원을 인지하는 직접적인 구조물이다¹⁷⁾. 항원의 인식이 이루어지면 이들 T cell은 클론 확장(clonal expansion)을 통해 충분한 증식이 이루어지며 아울러 감염된 세포를 죽이거나 macrophage를 활성화함으로써 직접적 또는 간접적으로 세포내 병원체를 파괴한다¹⁸⁾.

이러한 T 세포는 T helper cell과 T cytotoxic cell로 나누는데 전자는 표면에 CD4라는 단백질이 발현되므로 CD4 T cell이라고도 하며 후자는 CD8이 발현되므로 CD8 T cell이라고 한다. 특히 T helper cell은 주변의 cytokine에 따라 1형과 2형으로 나누는데 IL-12가 많이 존재하면 Th1 cell로 분화하며 이러한 Th1 cell은 주로 IFN- γ 를 분비하고 細胞性 免疫反應을 담당하며 세포내 세균을 목표로 한다¹⁹⁻²¹⁾. IL-4가 많이 존재하면 Th2 cell로 분화하며 이러한 Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13를 주로 분비하는데 體液性 免疫反應에 관여한다. Th1 cell이 병적으로 많이 존재하는 경우 자가면역 질환을 유발할 수 있으며 Th2 cell이 상대적으로 우세하면 알레르기 질환을 야기할 수 있다²²⁾.

1형 과민반응에 속하는 알레르기는 음식이나 진드기, 약물, 화장품, 꽃가루, 곰팡이의 아포 등과 같은 항원에 의해 유도된다. 항원은 항원 구조에 특이적인 immunoglobulin E (IgE)라는 항체를 만들도록 유도하며 이렇게 항원과 결합한 항체들은 mast cell이나 basophil의 표면에 있는 수용체와 결합하여 이들 세포의 탈과립을 일으킨다. 1형 과민반응의 초기 반응은 수분 내에 일어나는데 mast cell과 basophil이 활성화되면서 이때 일어나는 탈과립으로 인해 조직으로 분비되는 histamine, serotonin과 같은 mediator에 의해 혈관확장, 점액분비, 소기관지의 평활근 수축을 일으키면서 알레르기 염증이 시작된다²³⁾. 초기 반응이 일어난 지 4-6시간이 경과하면 후기 반응이 시작하는데 이때는 TNF- α 나 다른 chemokine 등이 분비되어 혈관내피세포에 adhesion molecule을 많이 발현하게 하여 염증성 백혈구와 다른 림프구의 유입을 조장한다²⁴⁾.

알레르기 질환에 대해 살펴보면 IL-4, IL-13이 B cell의 isotype switching을 유도하여 IgE를 다량으로 생산하게 한다^{25,26)}. 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 발생한다²⁷⁻²⁹⁾. 또한 Th2 cell과 eosinophil, basophil, macrophage 등이 여러 가지 cytokine 및 chemokine을 분비하며 국소 부위에 염증을 일으킨다. 특히 항원을 제시해주는 dendritic cell은 지속적으로 Th2 cell을 활성화하여 알레르기 염증을 만성화로 진행시키기도 한다. 그 외 2형 cytokine인 IL-5는 eosinophil의 수명을 연장시킴으로써 이들 세포가 major basic protein, toxic basic protein, leukotriene, platelet-activating factor 등을 만들어내므로 염증을 가속화한다³⁰⁾.

韓醫學에서 免疫의 개념은 內經의 “眞氣從之, 精神內守, 病

安從來”와 “正氣存內, 邪不可干”, “邪之所湊, 其氣必虛”에 잘 표현되어 있다⁶⁻⁸⁾. 여기서 말한 《素問·上古天眞論》의 眞氣와 《素問·刺法論》의 正氣는 각종 장부, 조직, 기관의 기능 및 활동을 정상적으로 유지하게 하고 內外로부터 오는 病邪에 대하여 저항하는 인체의 抗病 능력을 지칭한다. 질병의 발생은 正氣의 不足으로 인해 야기되므로 인체의 抗病力을 강화하는 것이 바로 免疫機能을 강화하는 것임을 알 수 있다. 邪氣는 인체에 病을 일으키는 각종 발병요인을 말하는데, 六淫 뿐만 아니라 인체의 陰陽失調로 말미암아 야기된 병리변화 및 飮食, 勞倦, 痰飲, 瘀血 등의 병리적 산물들을 포함하는 개념으로서 이러한 邪氣를 제거하는 것 역시 免疫機能의 하나라고 볼 수 있다³¹⁾.

不換金正氣散은 《太平惠民和劑局方》에 최초로 수록된 처방으로서 土濕太過에 의해 土虛하여 痰과 食이 中焦에 정체하여 痞滿悶悶하거나 胃寒으로 구토하고 濕盛해서 설사하는 것을 다스리면서 胃弱한 傷寒陰證의 증상을 치료하는 방제로 응용되고 있다.

《靈樞·刺節眞邪篇》에 “眞氣者 所受於天 與穀氣并而充身也”라 하였고, 《靈樞·營衛生會篇》에 “中焦亦並胃中 出上焦之後 此氣者 泌糟粕 蒸津液 化其精微”라고 한 것을 보면, 天氣의 呼吸을 주관하는 肺와 飮食을 주관하는 中焦 脾胃의 작용을 거쳐 正氣가 생성됨을 알 수 있다. 飮食이 中焦에 들어와서 津液으로 바뀌는 과정이 잘못되면 濕이 발생한다. 또한 脾惡濕(陰陽應相大論)으로 濕은 脾의 정상적인 생리기능을 방해한다. 이러한 속성으로 인하여 濕은 正氣를 생성하고 운행하는 과정에서 중요한 병리적 요소로 작용한다. 正氣가 인체내에서 免疫機能을 발휘하기 위해서는 그 生成 및 運行이 정상적으로 이루어져야 하기 때문이다.

不換金正氣散의 구성 약물과 효능을 보면 燥濕健脾하는 蒼朮과 下氣除滿하는 厚朴과 理氣健脾하는 陳皮와 開胃止嘔하는 藿香과 燥濕化痰하는 半夏로 이루어져 있다³³⁾. 따라서 不換金正氣散은 濕을 除去하고 脾를 強健하게 하는 健脾燥濕의 작용을 가지고 있으며, 이를 통한 消導, 和中, 理氣作用을 兼하여 正氣의 生成 및 運行에 影響을 주어 免疫機能을 돕는 작용을 하는 처방이라 할 수 있다.

본 연구에서는 不換金正氣散의 消化機能의 향상 이외에도 T helper cell에 대한 선택적 免疫調節 작용과 아울러 항알레르기 작용이 있는지 알아보기 위해 마우스 및 RBL-2H3와 Raw 264.7 cell line을 이용하여 실험하였다.

우선 不換金正氣散 물 추출물이 anti-CD3/CD28로 자극한 CD4 T cell을 증가시켰는지 확인하기 위해 不換金正氣散 물 추출물을 농도별로 투여한 후 MTS assay를 한 결과 세포 증식률은 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 약재를 넣지 않은 세포보다 14%의 증가율을 보여 주었다. 200 $\mu\text{g/ml}$ 이하부터는 세포증식을 억제하는 경향이 나타났으며 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 12%의 억제율을 보여주어 비교적 고농도에서도 세포증식을 강하게 억제하는 부작용은 나타나지 않았다.

마우스 CD4 T cell을 Th1 cell과 Th2 cell로 polarization한 후 不換金正氣散 물 추출물과 더불어 3일간 배양하여 그 상층액의 IFN- γ 와 IL-4를 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. Th1 세포의 경우 不換金正氣散 물 추출물을 처리했을 때 IFN- γ 의 양은 약간 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나

Th2 세포에서는 IL-4 값이 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약간 증가하였으나 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 18% 정도 감소하였다. 不換金正氣散 물 추출물이 in vitro에서는 Th cell을 어느 한 쪽으로 강하게 유도하지 않음을 본 실험에서 확인할 수 있었다.

β -hexosaminidase는 mast cell이나 basophil의 과립내에 존재하는 물질인데 이들 세포들이 활성화되면 histamine과 더불어 같이 유리된다³⁴⁾. 따라서 이 효소의 활성은 mast cell이나 basophil의 탈과립에 대한 marker로서 이용된다. Rat basophil leukemia cell (RBL-2H3)을 IgE로 감작하여 不換金正氣散 물 추출물을 처리 후 β -hexosaminidase의 유리되는 양을 측정된 결과 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 21%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 26%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 37%, 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 42%의 억제율을 보여주었다. 이로써 不換金正氣散 물 추출물이 항원으로 유도되는 탈과립을 억제하는 항알레르기 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

알레르기 염증에서 histamine 분비와 같은 탈과립은 항원 자극 후 수분 내에 발생하지만 자극 후 4-6시간 내에는 TNF- α 와 같은 염증성 cytokine이 분비되면서 endothelial cell adhesion과 inflammatory cell recruitment가 증가하여 염증이 활발하게 일어나므로써 조직의 손상을 유발하게 된다³⁵⁾. 따라서 일반적인 항알레르기 효과가 있는 약물들은 소염효과를 수반할 경우 알레르기 질환을 치료하는데 매우 유용하다. Raw 264.7 macrophage cell을 LPS로 자극하면 이러한 염증성 cytokine의 분비가 일어나는데 不換金正氣散 물 추출물을 처리한 결과 대표적인 염증성 cytokine의 하나인 TNF- α 가 농도 의존적으로 유의성있게 감소하였다.

본 연구에서는 BALB/c 마우스를 이용하여 알레르기성 면역 반응을 연구하는데 매우 유용한 OVA 모델³⁶⁻³⁸⁾을 통해 不換金正氣散 물 추출물이 면역반응을 어떻게 조절하는지 살펴보았다. 마우스에게 不換金正氣散 물 추출물을 4주간 직접 경구투여하면서 동시에 OVA로 알레르기를 유발하여 혈청내의 total IgE와 OVA-specific IgE를 측정하였고 아울러 이들 마우스의 비장세포를 분리하여 OVA를 넣고 배양한 후에 이들 세포가 분비하는 Th1 및 Th2 cytokine의 양을 측정해 본 결과 不換金正氣散은 매우 우수한 항알레르기 효과가 있음이 실험을 통해 증명되었다. IgE는 1형 알레르기 반응에서 매우 중요한 역할을 하기 때문에 IgE 생산의 조절은 임상적으로 매우 중요하다. 不換金正氣散 물 추출물을 경구투여 한 마우스의 total IgE는 대조군에 비해 50% 감소하였으며 OVA-specific IgE도 대조군에 비해 55% 감소하였는데 모두 통계적으로 유의성이 있었다. 또한 IgE의 생산은 IL-4와 IL-5를 만들어내는 Th2 cell에 의해 증가하거나 IFN- γ 에 의해 IL-4가 길항적으로 억제되어 IgE 양이 감소하는데^{39,40)}, 不換金正氣散 물 추출물을 투여한 마우스의 비장세포에서 분비되는 IFN- γ , IL-4, IL-5를 보면 IFN- γ 의 경우 대조군보다 25% 증가하였고 IL-4는 53% 감소하였으며 IL-5는 38% 감소하였으며 모두 통계적으로 유의성이 있었다.

Th1/Th2 cytokine의 불균형을 조절하는 효과는 한약을 통해 알레르기 질환이 발생하는 근본적인 문제점을 교정할 수 있음을 시사해준다. 기존의 알레르기 질환 치료방법을 살펴보면 allergen을 반복적으로 노출시키는 specific immunotherapy

(SIT)나 아미노산 배열을 다르게 만든 short allergen peptide를 사용함으로써 알레르기 감작 반응을 떨어뜨리는 방법이 있는데, 이것 또한 anaphylactic shock나 새로운 IgE 항체를 유도하는 부작용을 안고 있으며 adjuvant 자체가 강력한 Th2 유도현상을 나타내기도 한다⁴¹⁻⁴³⁾. 또한 Th2 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-13을 blocking하는 물질 등이 실험적으로 연구 중이나 이들 단백질에 대한 수용체가 한가지 이상 존재하기 때문에 만족스런 결과는 아직 미흡한 상태이며 IgE의 작용을 저해하는 anti-IgE 치료제는 매우 고가이기 때문에 유사 물질을 계속 탐색중이다⁴⁴⁻⁴⁷⁾. 알레르기 질환의 발병과정을 교정하는 치료법이 아직 초기 단계에 불과하기 때문에 현재 흔히 사용되는 치료법은 증상을 관리하는 것에 국한되어 항히스타민제, leukotriene receptor 길항제, 또는 스테로이드 제제에 의존하는 실정이다⁴⁸⁾. 이러한 약물은 염증세포들의 초기 단계보다는 진행단계를 차단하는 작용만을 가지기 때문에 항원에 감작되거나 2형 T cell로 분화하는 단계를 차단하는 약물의 개발이 더 근본적인 것이라 할 수 있다. 따라서 不換金正氣散 물 추출물의 항알레르기 효과는 한약 처방을 통하여 불균형한 1형, 2형 T cell의 상태를 교정해 줌으로써 알레르기질환을 근본적으로 치료할 수 있다는데 의의가 있다.

본 연구에서는 不換金正氣散 물 추출물이 in vitro에서는 마우스 T cell을 Th1이나 Th2로 강하게 유도하지는 않음을 확인하였고 아울러 탈과립을 억제하는 작용이 있음을 알 수 있었다. 또한 不換金正氣散 물 추출물을 OVA 감작과 동시에 마우스에게 경구투여했을 때 항원으로 유도된 IgE 반응을 감소시키고 Th1 반응을 유도하면서 Th2 반응을 감소시킴을 확인하였다. 따라서 不換金正氣散은 불균형한 Th 세포들의 반응을 교정하면서 항알레르기 작용을 가진 것으로 추정할 수 있다.

결 론

不換金正氣散이 마우스 면역세포의 Th1, Th2 반응과 OVA로 유도한 알레르기성 염증에 미치는 영향을 알아보기 위하여 不換金正氣散 물 추출물의 마우스 CD4 T cell의 세포증식 및 Th1/Th2 cytokine 분비량을 측정하였고 RBL-2H3 세포의 β -hexosaminidase 양과 Raw264.7 세포의 TNF- α 와 IL-6 분비량을 측정하였다. 또한 BALB/c 마우스에게 不換金正氣散 물 추출물을 경구투여하면서 동시에 OVA로 감작시킨 후 알레르기반응을 유도하여 total IgE와 OVA-specific IgE 및 비장세포의 IFN- γ , IL-4, IL-5 생산량을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

마우스 CD4 T cell을 anti-CD3 및 anti-CD28로 48시간동안 농도별로 자극한 결과 不換金正氣散 물 추출물은 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 14%의 증가율을 보여주었으며 그 이하의 농도에서는 약하게 억제하는 경향이 나타났다. 마우스 CD4 T cell을 Th1 cell과 Th2 cell로 polarization한 후 3일간 함께 배양한 결과 不換金正氣散 물 추출물은 Th1 세포의 경우 IFN- γ 의 양을 약간 감소시켰고, Th2 세포의 IL-4 값을 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약간 증가시켰으나 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 18% 정도 감소시켰다. RBL-2H3 세포를 IgE와 항원으로 감작했을 때 不換金正氣散 물 추출물은 β -hexosaminidase의 유

리를 농도의존적으로 억제시켰다. Raw 264.7 세포를 LPS로 자극한 후 不換金正氣散 물 추출물을 처리했을 때 TNF- α 의 합성이 농도의존적으로 감소하였다. OVA로 마우스의 알레르기성 반응을 유도하면서 不換金正氣散 물 추출물을 경구투여 한 결과 혈청의 total IgE를 50%로 감소시켰고, OVA-specific IgE를 55% 감소시켰으며, 비장세포를 분리하여 OVA로 배양한 결과 IFN- γ 는 25% 증가하였으며 IL-4는 53%, IL-5는 38% 감소하였다.

참고문헌

- Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A. Kuby Immunology(4 th edition). New York:W H Freeman & CO., 2003.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. Cellular and Molecular Immunology(2ed). Saunders, p 5, 1994.
- Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic dermatitis: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering committee. Lancet. 351(9111):1225-1232, 1998.
- Tough, D.F., Sun, S., Zhang, X., Spent, J. Stimulation of naive and memory T cells by cytokines. Immunol Rev. 170:39-47, 1999.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. J Immunol. 175(1):5-14, 2005.
- 張介賓. 類經, 서울, 대성문화사. pp 28, 34(上), 418(下1), 1986.
- 旺機. 黃帝內經素問今譯, 서울, 성보사. p 8, 125, 146, 412, 1985.
- 최승훈. 내경병리학, 서울, 통나무. pp 223, 229, 1993.
- 은재순, 이동희, 전용근, 권영안, 권진. 加味清鼻散이 免疫反應에 미치는 影響, 동의생리병리학회지. 18(5):1391-1396, 2003.
- 김정진, 양성완, 손낙원, 안규석. 加味生料四物湯의 抗炎症效果와 止痒膏의 아토피皮膚炎 손상 및 止痒效果에 미치는 影響, 동의생리병리학회지. 17(3):428-435, 2003.
- 이건호, 박상용, 류종훈. 황련해독탕의 항알레르기 효과, 서울 경희대학교대학원 석사학위논문. 2004.
- 이상인. 방제학. 서울, 영림사. p 277, 278, 1990.
- 임성우, 류봉하, 박동원, 장인규, 류기원. 不換金正氣散의 효능에 관한 實驗的 研究, 대한한방내과학회지. 11(1):15-27, 1990.
- 허인무, 장인규, 전진권, 이형구, 민병순, 구본홍. 평위산, 향사평위산 및 不換金正氣散의 효능에 관한 實驗的 高찰, 경희대학교논문집. 13:427-461, 1990.
- 양성완, 손낙원, 정혁상, 김윤범, 이학인, 안규석. 수중 韓藥 처방이 아토피皮膚炎 환자의 SCORAD 및 Cytokine 변화에 미치는 影響, 서울, 경희대학교대학원 박사학위논문. 2004.
- 김연대. 최신면역, 서울, 집문당. 33, 1982.
- Cantrell, D. T cell antigen receptor signal transduction pathways, Annu Rev Immunol. 14:259-274, 1996.
- Akbar, A.N., Salmon, M. Cellular environments and apoptosis; tissue microenvironments control activated T cell death. Immunol Today. 18:72-76, 1997.
- 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.
- Jacobson, N.G., Szabo, S.J., Weber-Nordt, R.M., Zhong, Z., Schreiber, R.D., Darnell, J.E. et al. 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.
- 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.
- Rao, A., Avni, O. Molecular aspects of T cell differentiation. Br Med Bull. 56(4):969-984, 2000.
- Matsuda, H., Tewtrakul, S., Morikawa, T., Nakamura, A., Yoshikawa, M. Anti-allergic principles from Thai zedoary: structural requirements of curcuminoids for inhibition of degranulation and effect on the release of TNF- α and IL-4 in RBL-2H3 cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 12:5891-5898, 2004.
- 김대식 외. 면역생물학, 서울, 라이프사이언스. 468-472, 2000.
- Galli, S.J., Costa, J.J. Mast-cell-leukocyte cytokine cascades in allergic inflammation. Allergy. 50(11):851-862, 1995.
- 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.
- Busse, W.W., Lemanske, R.F. N Engl J Med. 344:350-362, 2001.
- Beallanti, J.A. Cytokine and allergic disease; clinical aspect. Allergy Asthma Proc. 19(6):337-341, 1988.
- Carlos, A.G., Carlos, M.L., Conceisao, S.M., Alcinda, M. Cytokines and asthma. J Invest Allergy Clin Immunol. 7(5):270-273, 1997.
- 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.
- 문준전, 안규석, 최승훈. 동의병리학. 서울, 고분사. pp 78-90, 1990.
- 신재용. 방약합편해설, 서울, 성보사. 109, 1998.
- 전국한의과대학 공동교재편찬위원회 편저. 본초학, 서울, 영림사. p 335, 337, 339, 393, 487, 2004.
- 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.
35. Hong, C.C., Shimomura-Shimizu, M., Muroi, M., Tanamoto, K. Effect of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α and nitric oxide production by mouse macrophage. *Biol Pharm Bull.* 27(7):1136-1139, 2004.
 36. Renz, H., Smith, H.R., Henson, J.E., Ray, B.S., Irvin, C.G., Gelfand, E.W. et al. Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J Allergy Clin Immunol.* 89:1127-1138, 1992.
 37. Herz, U., Braun, A., Ruckert, T., Renz, H. Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clin Exp Allergy.* 28:628-634, 1998.
 38. 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.
 39. Paludan, S.R. Interleukin-4 and interferone-gamma; the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand J Immunol.* 48:459-468, 1998.
 40. Boothby, M., Mora, A.L., Aronica, M.A., Youn, J., Sheller, J.R., Goenka, S. et al. IL-4 signaling, gene transcription regulation and the control of effector T cells. *Immunol Res.* 23:179-191, 2001.
 41. Von Garnier, C., Astori, M., Kettner, A., Dufour, N., Heusser, C., Corradin, G., Spertini, F. et al. Allergen-derived long peptide immunotherapy downregulates specific IgE response and protects from anaphylaxis. *Eur J Immunol.* 30:1638-1645, 2000.
 42. Arnicki, A.G., Tsuji, T., Thomas, W.R. Inhibition of mucosal and systemic Th2-type immune responses by intranasal peptides containing a dominant T cell epitope of the allergen Der p 1. *Int Immunol.* 13:1223-1231, 2001.
 43. Pedotti, R., Mitchell, D., Wedemeyer, J., Karpuj, M., Chabas, D., Hattab, E.M. et al. An unexpected version of horror autotoxins: anaphylactic shock to a self-peptide. *Nat Immunol.* 2:216-222, 2001.
 44. Borish, L.C., Nelson, H.S., Corren, J., Bensch, G., Busse, W.W., Whitmore, J.B. et al. Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 107:963-970, 2001.
 45. Mattes, J., Yang, M., Siqueria, A., Clark, K., MacKenzie, J., McKenzie, A.N. et al. IL-13 induces airways hyperreactivity independently of the IL-4R alpha chain in the allergic lung. *J immunol.* 167:1683-1692, 2001.
 46. Milgrom, H., Berger, W., Nayak, A., Gupta, N., Pollard, S., McAlary, M. et al. Treatment of childhood asthma with anti-immunoglobulin E antibody. *Pediatrics.* 108:E36, 2001.
 47. Casale, T.B., Condemi, J., LaForce, C., Nayak, A., Rowe, M., Watrous, M. et al. Effect of omalizumab on symptoms of seasonal allergic rhinitis: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc.* 286:2956-2967, 2001.
 48. Inagaki, N., Nagai, H. Drugs for the treatment of allergic disease. *Jpn J Pharmacol.* 86:275-280, 2001.