

# 三子地黃湯의 생쥐 모델에 대한 항천식 효과

김운길 · 박양춘\*

대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실

## Anti-asthmatic Effects of *Samjajihwang-tang* in OVA-induced Mice

Woon Kil Kim, Yang Chun Park\*

*Division of Respiratory System, Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University*

This study aimed to evaluate the anti-asthmatic effects of *Samjajihwang-tang* (SJT) using OVA-induced asthmatic mice model. Asthmatic mice model was conducted by repeated challenge of OVA using C57BL/6 mice. Each group was treated with distilled water, SJT (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract or cyclosporin A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. Penh (plethysmography and enhanced pause), immune cells subpopulation, eotaxin, IL-5, TNF- $\alpha$ , Anti-OVA-IgE in BALF (bronchoalveolar lavage), and lung tissue was analyzed. No cytotoxicity of SJT was shown on hFCs (human fibroblast cells). Administration of SJT significantly decreased Penh levels comparing to control group. SJT treatment significantly ameliorated the increase of total cells number and eosinophil including of immune cell subpopulation of CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, and B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> cells in BALF comparing to control group. Eotaxin, IL-5, TNF- $\alpha$ , and Anti-OVA-IgE level in BALF were significantly decreased by SJT treatment too. Histopathological finding verified the improvement of infiltration of inflammatory cells and collagen tissue in the SJT groups comparing to control group. These results strongly suggest that SJT would be a effective candidate for herbal-originated anti-asthmatic drug. However, this drug should be further studied for characterization of the accurate action and underlying mechanisms using variant disease model in the future.

**Key words :** *Samjajihwang-tang*, asthma, penh (enhanced pause), immune cells, cytokines, IgE

### 서론

기관지천식(이하 천식)은 전 세계적으로 유병률이 증가하고 이에 따른 사회경제적 부담이 증가하고 있어 각 나라마다 심각한 건강문제로 대두되고 있는 질환이다<sup>1)</sup>. 우리나라에서도 2006년도 국민건강보험 통계지표에 의하면 천식환자가 지난 2001년 보다 26.9%인 488,977명이 증가한 것으로 조사되었다<sup>2)</sup>.

천식은 韓醫學에서 呼吸急促하며 喉中有聲響한 것을 특징으로 하는 哮喘證의 범주에 해당되며 哮喘의 발병 원인 중 素因說에 의하면 夙根이라는 특수하게 내재된 素因을 가진 사람이 寒冷을 만나거나, 疲勞 혹은 勞力할 때 發한다고 하였는데 이는 알레르기에 의한 천식의 발생과 유사하다고 할 수 있다<sup>3)</sup>. 천식은 병리학적으로 항원, 비만세포 및 IgE가 관여하여 분비되는 다양한 화학매체의 직접적인 작용에 의하거나, 화학매체, 사이토카인

및 유착분자가 관여하여 기관지로 모여온 염증세포에 의하여 발생하는 기도의 만성 알레르기 염증성 질환으로 이해되고 있다<sup>4,5)</sup>. 따라서 한약처방을 대상으로 천식발병에 관여하는 면역세포, 관련 사이토카인, 화학매체에 미치는 영향을 평가하는 것은 천식 치료효과를 연구하는데 있어 중요한 목표가 될 수 있을 것이다.

三子地黃湯은 六味地黃元<sup>6)</sup>에 蘇子, 白芥子, 蘿菔子, 玉竹, 麥門冬, 桑白皮, 款冬花, 知母, 皂角子, 山楂肉, 砂仁을 가한 처방으로 기관지천식을 비롯한 호흡기질환에 대전대학교 부속 한방병원 5내과에서 다용하는 처방이다. 최근 천식과 관련하여 다양한 單味 및 處方을 이용한 염증반응이나 면역기능에 관한 실험 연구<sup>7,8)</sup>가 이루어지고 있고, 동물 천식 모델을 이용한 연구<sup>9-11)</sup>와 천식환자를 대상으로 한 임상연구<sup>12-14)</sup>도 활발하게 이루어지고 있으나 三子地黃湯에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 三子地黃湯의 천식에 대한 효능을 실험적으로 규명하고자 천식을 유발시킨 생쥐에서 whole body plethysmography를 이용하여 기도과민성을 측정하고, 기관지폐포세척액(Bronchoalveolar lavage fluid; BALF) 내의 총세포수,

\* 교신저자 : 박양춘, 충북 청주시 상당구 용담동 173-9 대전대 청주한방병원

· E-mail : omdpyc@dju.ac.kr, · Tel : 043-229-3704

· 접수 : 2008/10/13 · 수정 : 2009/03/05 · 채택 : 2009/03/16

호산구수, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> 세포수와 eotaxin, IL-5, TNF- $\alpha$ , Anti-OVA-IgE의 양을 측정하고, 폐조직의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에 사용된 실험용 동물은 체중 18-25 g, 암컷의 C57BL/6 코아텍 (주) 쥐로, 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

본 실험에 사용한 三子地黃湯 (*Samjajihwang-tang*, 이하 SJT)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였고 처방 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. The Compositions of *Samjajihwang-tang* (SJT)

본초명	생약명	용량 (g)
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	40
山藥	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	16
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	16
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	8
牡丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	8
白茯苓	<i>Poria</i>	8
蘇子	<i>Perillae Fructus</i>	8
白芥子	<i>Sinapis Semen</i>	8
蘿蔔子	<i>Raphani Semen</i>	8
玉竹	<i>Polygonati Odorati Rhizoma</i>	8
麥門冬	<i>Liriopsis Tuber</i>	8
桑白皮	<i>Mori Cortex</i>	8
款冬花	<i>Farfarae Flos</i>	8
知母	<i>Anemarrhenae Rhizoma</i>	8
皂角子	<i>Gleditsiae Spina</i>	8
山楂肉	<i>Crataegii Fructus</i>	8
砂仁	<i>Amoni Fructus</i>	8
Total amount		184

### 2. 방법

#### 1) 三子地黃湯 (*Samjajihwang-tang*, SJT) 추출

SJT 368 g에 증류수 1,500 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하였다. 추출액을 흡입 여과한 후 감압 증류장치 (rotary evaporator)로 농축하고, 다시 동결 건조기 (Freeze dryer)를 이용하여 34.5 g(수율 9.3%)의 분말을 얻었다. 완전 건조한 SJT을 냉동 (-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

#### 2) 세포 독성 검사

##### (1) Human fibroblast cells (hFCs) 배양

피부 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 이 tube에 RPMI 1640 {containing collagenase A (5 mg/ml, BM, USA), DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma, USA), antibiotics (penicillinm 10<sup>4</sup> U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25  $\mu$ g/ml)}를 넣고 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 hFCs를 2 시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하여 30 분간 배양하고, 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회

1,500 rpm에서 원심분리한 후 RPMI1640-10% FBS로 1주일 동안 배양하였다. 이를 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 분리하여 연속으로 1주일씩 3회 반복하여 살아있는 부착세포를 RPMI1640-10% FBS 배양액에서 배양하였다.

##### (2) Cell viability 측정

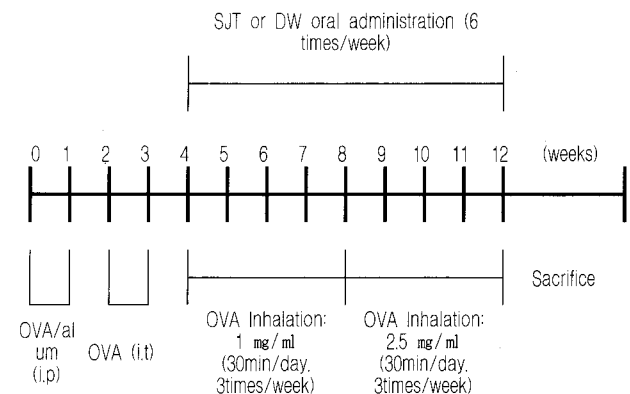
Cell viability 측정은 MTT assay로 하였다. 배양한 hFCs를 96 wells plate에 2 × 10<sup>4</sup> cells 씩 분주한 후 배양하고, 24시간 후 SJT를 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ( $\mu$ g/ml)의 농도를 투여하였다. 다시 48시간 배양 후 부유 액을 제거하고, 각 well에 MTT solution 100  $\mu$ l 씩 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 부유 액을 제거하고 각 well에 100  $\mu$ l의 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)를 첨가하여 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 30분 동안 반응 시킨 후 ELISA reader를 사용하여 wave length 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

##### 3) 기관지 천식 생쥐 모델 제작

500  $\mu$ g/ml의 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) Alum을 PBS로 용해한 후 혼합하였다.

이 혼합물을 10 N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750 × g 에서 5분 동안 원심분리 하였다.

원심 분리한 OVA/ Alum 침전물을 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후, 100  $\mu$ g OVA를 0.2 ml로 조정하여 복강 내로 주사하여 전신 감작시켰다. 이후 2주째에 생쥐를 마취한 후, 난알부민 (500  $\mu$ g/ml) 100  $\mu$ l를 기도 투여하였다. 3주째부터 분무기를 이용하여 1 mg/ml을 4주간, 2.5 mg/ml을 4주간 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3 회씩 8주 동안 비강 및 기도내로 흡입시켰다. 이 때 대조군으로써 PBS 또는 Alum 만을 주사, 흡입시켰다(Scheme 1).



Scheme 1. Asthma OVA-Induce Mouse Model

#### 4) 약물 투여

OVA/ Alum로 전신 감작 시킨 후 4주째부터 SJT (400, 200 mg/kg)을 일주일에 6회 경구 투여 하였다. 대조군에는 증류수를 동량 경구 투여하였고, 양성대조군에는 cyclosporine(20 mg/kg)을 복강주사 하였다.

#### 5) 실험군의 구분

암컷의 C57BL/6 mouse, 총 30마리를 6마리 한 군으로 하여 정상군(Normal), 대조군(Control), 양성대조군(CsA 투여군), 200 mg/kg의 SJT 추출물을 투여한 실험군(SJT200군), 400 mg/kg의

SJT 추출물을 부여한 실험군 (SJT400군)의 5개 군으로 하였다 (Table 2).

Table 2. Experimental Grouping

Group ID	Treatment	Dosage
Normal	Distilled Water	
Control	OVA + Distilled Water	
CsA	OVA + Cyclosporin A	20 mg/kg
SJT200	OVA + SJT Extract	200 mg/kg
SJT400	OVA + SJT Extract	400 mg/kg

OVA: 1 × 2.5 mg/ml OVA/albumin irradiation, SJT Extract: *Samjijihwang-tang* Extract.

6) 기도과민성 측정

기도과민성의 측정은 whole body plethysmography인 Biosystem XA 장비를 사용하여 Finotto 등<sup>15)</sup>의 방법에 따라 실시하였다. 즉 기도과민성의 지표인 enhanced pause (Penh) 값은 다음과 같으며 Biosystem XA software 를 이용하여 분석하였다.

$$Penh = pause - \frac{PEP}{PIP} \quad Pause = \frac{Te - Tr}{Tr}$$

PEP: peak expiratory pressure, PIP: peak inspiratory pressure Te: expiratory time, Tr: relaxation time

기관지 천식 생쥐 모델 (Scheme 1)의 마지막 OVA inhalation 시행 24시간 후에 농도별 methacholine 수용액을 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 mg/ml의 농도로 aerosol하고, 각각의 농도에 대한 기도의 반응성은 10분 동안 연속적으로 모니터링하여 측정하였다.

7) 기관지폐포세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 분리

기관지폐포세척액 (BALF)은 37℃에서 주사기로 10% FBS DMEM 배양액을 기도에 반복하여 주의 깊게 넣고 빨아들여서 얻었으며, 이 과정을 3회 반복하였다. 이 BALF의 세포를 Cytospin centrifuge (Hanil, Korea)를 이용하여 슬라이드 글라스 위에 도말하고 Diff-Quik로 염색하여 호산구의 세포수를 조사하였다. BALF의 상층액은 -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

8) BALF의 총 세포수와 호산구 세포수 측정

BALF에 ACK 용액 (8.3 g NH<sub>4</sub>Cl, 1 g KHCO<sub>3</sub>, in 1 ℓ of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 37℃에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시켰다. 이를 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색하여 총 세포수와 호산구 세포수를 측정하였다.

9) 유세포 분석

분리한 BALF 세포들에 ACK 용액을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 총 세포수를 측정하였다. 측정된 cell을 5×10<sup>5</sup> 세포로 조정 한 후 4℃에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD19, PE-anti-CCR3, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-B220, FITC-anti-IgE 을 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3 회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의

Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup> 세포수를 백분율(%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

10) BALF 내 eotaxin, IL-5, TNF-α, Anti-OVA-IgE 측정

천식 생쥐에서 분리한 BALF에서 eotaxin, IL-5, TNF-α, Anti-OVA-IgE를 측정하기 위하여 ELISA kit (R&D system)로 생산량을 측정하였다. 각 항체를 coating 완충 용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4℃에서 overnight하였다. 각 well을 3 회 washing 완충 용액으로 세척한 후 혈청 (100배 희석)을 100 μl씩 분주하였다. 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μl를 처리하고, 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다.

여기에 TMB 기질을 100 μl씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50 μl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

11) 조직병리검사

폐를 떼어내어 즉시 10% formaldehyde 용액에 고정 한 후 세절하여 흐르는 물에 8 시간 수세한 다음, epoxy에 포매하고, 이것을 microtome으로 절편을 만들어 표준방법에 의하여 Hematoxylin & Eosin (H & E)과 collagen deposition염색인 Masson-Trichrome (M-T) 염색을 수행하였다<sup>16)</sup>.

12) 통계처리

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

결 과

1. SJT의 세포 독성

세포독성을 관찰한 결과 hFCs에서는 대조군의 세포생존율 100 ± 0.2%에 대하여, SJT의 500, 250, 125, 62.5, 31.25 (μg/ml) 농도에서 각각 81.6 ± 1.8, 92.4 ± 3.2, 93.7 ± 1.3, 95.2 ± 4.6, 97.3 ± 3.2 (%)로 나타났다(Fig. 1).

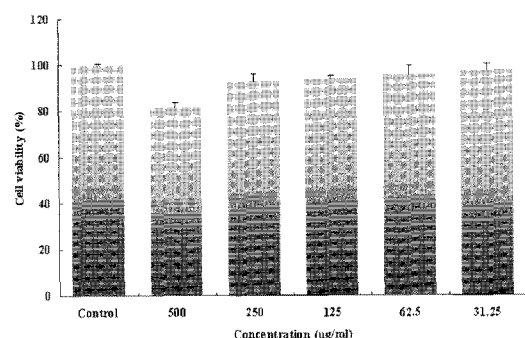


Fig. 1 Cytotoxicity of SJT on human fibroblast cells (hFCs). hFCs were treated with various concentration (500, 250, 125, 62.5, 31.25 μg/ml) of the SJT extract. Control was not treated.

2. 항기도과민성 효과

Penh 값을 측정한 결과, 모든 농도에서 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있게 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ) 증가하였다. CsA 투여군은 6.25 mg/ml 이상의 농도에서 유의성 있게 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ) 감소하였다. SJT200군은 3.125와 12.5 mg/ml 농도를 제외하고 유의성 있게 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ) 감소하였고, SJT400군은 3.125 mg/ml 농도를 제외하고 유의성 있게 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ) 감소하였다 (Table 3, Fig. 2).

Table 3. Anti-asthmatic Effect of SJT on Methacholine-challenged Respiratory Resistance

Group	Conc. of Methacholine (mg/ml)				
	3.125	6.25	12.5	25	50
Normal	0.63±0.04	1.04±0.06	2.21±0.32	1.81±0.38	2.28±0.26
Control	1.89±0.44 <sup>+++</sup>	3.91±0.46 <sup>+++</sup>	4.94±0.59 <sup>+++</sup>	6.52±0.65 <sup>+++</sup>	8.66±0.58 <sup>+++</sup>
CsA	1.02±0.17	1.47±0.17 <sup>***</sup>	2.61±0.21 <sup>*</sup>	2.94±0.09 <sup>***</sup>	3.06±0.07 <sup>***</sup>
SJT200	1.22±0.18	1.91±0.17 <sup>***</sup>	3.11±0.72	3.93±0.54 <sup>*</sup>	3.97±0.46 <sup>***</sup>
SJT400	0.86±0.07	1.25±0.18 <sup>***</sup>	1.89±0.19 <sup>*</sup>	3.06±0.51 <sup>*</sup>	4.29±0.27 <sup>***</sup>

Normal, Control, CsA and SJT were listed in Table 2. Values represent the means ± SD (n=6). +++:  $P < 0.001$ , ++:  $P < 0.01$  compared with normal group. \*\*\*\*:  $P < 0.001$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*:  $P < 0.05$  compared with control group.

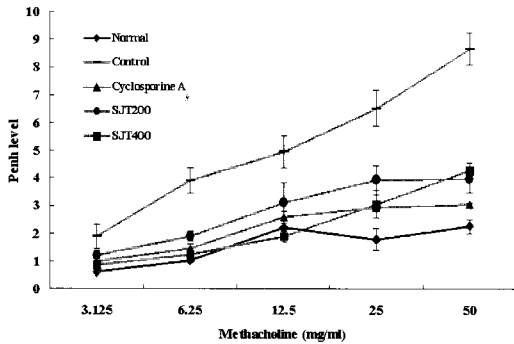


Fig 2. Anti-asthmatic Effect of SJT on Methacholine-challenged Respiratory Resistance. After of asthmatic model was conducted by OVA-sensitization for 8 weeks (3 times a week) using C57BL/6 mice, then Penh level was measured by Finotto' method. Values are expressed as mean ± SD (n=6).

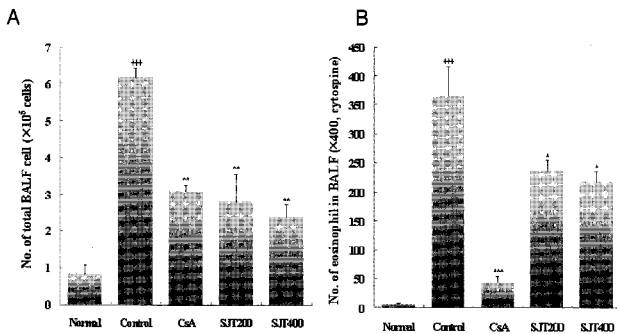


Fig. 3. The number of total cells (A) and eosinophil cells (B) in BALF of OVA-induced asthmatic mouse. After of asthmatic model was conducted by OVA-sensitization for 8 weeks (3 times a week) using C57BL/6 mice, then total cells and eosinophil cells in BALF were counted using trypan blue staining. Values are expressed as mean ± SD (n=6). +++:  $P < 0.001$  compared with normal group. \*\*\*\*:  $P < 0.001$ , \*\*:  $P < 0.01$  compared with control group, \*:  $P < 0.05$  compared with control group.

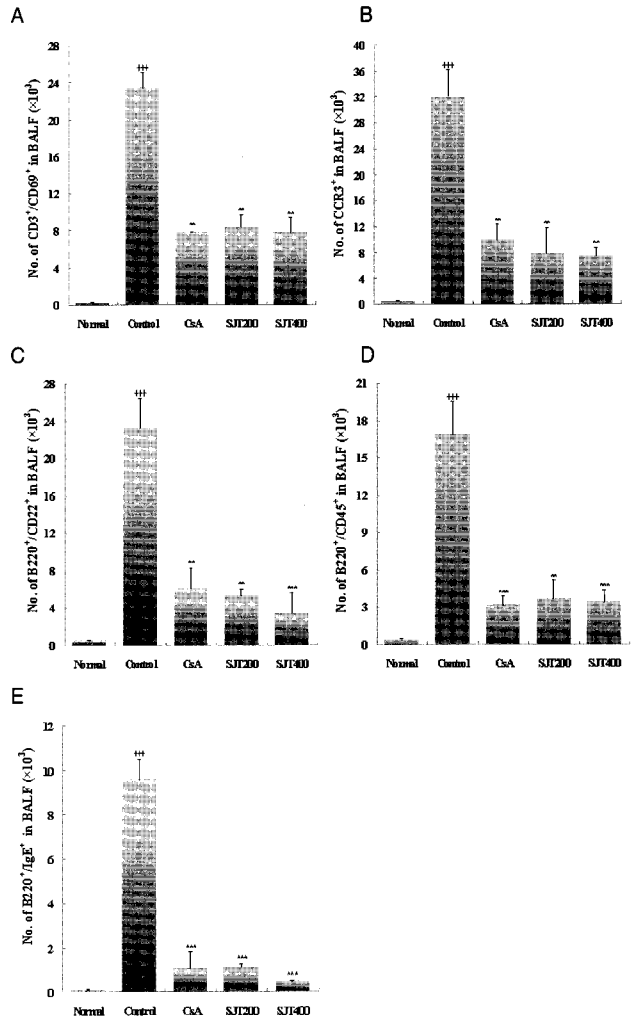


Fig. 4. The number of CD3+/CD69+ (A), CCR3+ (B), B220+/CD22+ (C), B220+/CD45+ (D), B220+/IgE+ (E) cells in BALF of OVA-induced asthmatic mouse. After of asthmatic model was conducted by OVA-sensitization for 8 weeks (3 times a week) using C57BL/6 mice, then the number of CD3+/CD69+, CCR3+, B220+/CD22+, B220+/CD45+, B220+/IgE+ cells in BALF was analyzed using FACS system. Values are expressed as mean ± SD (n=6). +++:  $P < 0.001$  compared with normal group. \*\*\*\*:  $P < 0.001$ , \*\*:  $P < 0.01$  compared with control group.

3. 면역세포에 미치는 영향

1) BALF 총 세포수와 eosinophil 세포수에 미치는 영향

BALF 총 세포수를 count 한 결과 SJT200군과 SJT400군은 각각  $2.8 \pm 0.8$ 과  $2.4 \pm 0.4$  ( $\times 10^5$  cells)로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.01$ ) 감소하였고(Fig. 3A), BALF 내 eosinophil 세포수를 count 한 결과 SJT200군과 SJT400군은 각각  $266.5 \pm 19.5$ 와  $217.5 \pm 18.5$  cells로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.05$ ) 감소하였다(Fig. 3B).

2) CD3+/CD69+ 세포수, CCR3+ 세포수, B220+/CD22+ 세포수, B220+/CD45+ 세포수, B220+/IgE+ 세포수에 미치는 영향

BALF 내 CD3+/CD69+ 세포수를 count한 결과 SJT200군과 SJT400군은 각각  $8.5 \pm 1.3$ 과  $7.7 \pm 1.7$  ( $\times 10^3$  cells)로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.01$ ) 감소하였고(Fig. 4A), BALF 내 CCR3+ 세포수를 count 한 결과 SJT200군과 SJT400군은 각각  $7.88 \pm 3.90$ 과  $7.35 \pm 1.38$  ( $\times 10^3$  cells)로 나타나 대조군에

비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.01$ ) 감소하였으며(Fig. 4B), BALF 내 B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup> 세포수를 count 한 결과 SJT200군과 SJT400군은 각각  $5.32 \pm 0.65$ 와  $3.49 \pm 2.15$  ( $\times 10^3$  cells)로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 4C). BALF 내 B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> 세포수를 count 한 결과 SJT 200군과 SJT 400군은 각각  $3.67 \pm 1.44$ 와  $3.35 \pm 0.99$  ( $\times 10^3$  cells)로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ) 감소하였고(Fig. 4D), BALF 내 B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> 세포수를 count한 결과, SJT200군과 SJT400군은 각각  $1.10 \pm 0.11$ 과  $0.50 \pm 0.03$  ( $\times 10^4$  cells)로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 4E).

4. IgE 및 사이토카인에 미치는 영향

BALF 내 eotaxin 양을 측정된 결과 SJT200군과 SJT400군은 각각  $31.6 \pm 3.0$ 과  $26.2 \pm 4.9$  pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) 감소하였고(Fig. 5A), BALF 내 IL-5 양을 측정된 결과 SJT200군과 SJT400군은 각각  $13.25 \pm 0.65$ 와  $12.55 \pm 0.25$  pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.01$ ) 감소하였으며(Fig. 5B), BALF 내 TNF- $\alpha$  양을 측정된 결과 SJT200군과 SJT400군은 각각  $77.8 \pm 19.4$ 와  $74.6 \pm 17.3$  pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.001$ ) 감소고(Fig. 5C), BALF 내 Anti-OVA-IgE 양을 측정된 결과 SJT200군과 SJT400군은 각각  $14.3 \pm 5.4$ 와  $13.1 \pm 3.1$   $\mu$ g/ml로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 5D).

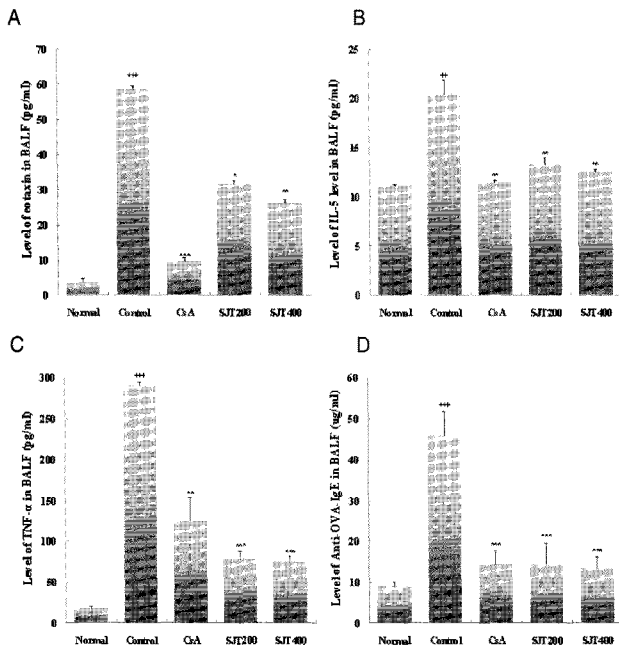


Fig. 5. The level of eotaxin (A), IL-5 (B), TNF- $\alpha$  (C), Anti-OVA-IgE (D) cells in BALF of OVA-induced asthmatic mouse. After of asthmatic model was conducted by OVA-sensitization for 8 weeks (3 times a week) using C57BL/6 mice, then the level of eotaxin, IL-5, TNF- $\alpha$ , Anti-OVA-IgE cells in BALF were measured using ELISA kit. Values are expressed as mean  $\pm$  SD (n=6). +, +, +:  $P < 0.001$  compared with normal group. \*\*:  $P < 0.001$ , \*:  $P < 0.01$ , :  $P < 0.05$  compared with control group.

5. 폐조직의 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 폐조직을 H & E 염색하여 관찰한 결과 대조군에서 폐 조직부위의 염증세포의 침윤이 증가하였고, 기도의 염증도 증가하였다. 반면 CsA투여군, SJT200군 그리고 SJT400군에서 염증세포의 침윤과 기도의 염증이 모두 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6A). M-T염색하여 관찰한 결과에서는 대조군에서는 collagen 침착 정도가 증가하였으나 CsA투여군, SJT400군, SJT200군에서는 감소한 것으로 나타났다(Fig. 6B).

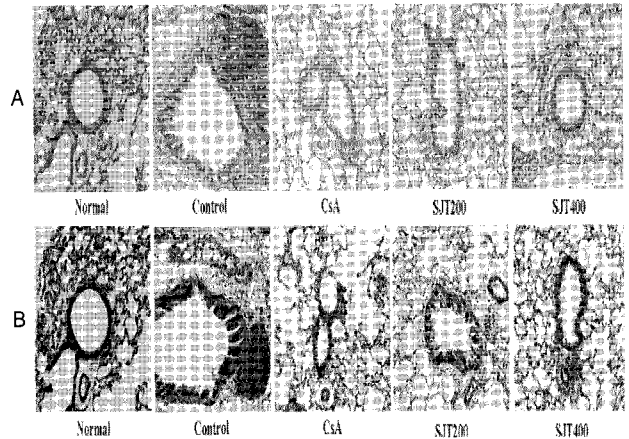


Fig. 6. The histological analysis of OVA-induced asthmatic mouse lung tissue. After of asthmatic model was conducted by OVA-sensitization for 8 weeks (3 times a week) using C57BL/6 mice, then the histological analysis of lung tissue was analyzed using Hematoxylin & Eosin staining (A) and Masson-Trichrome staining (B).

고찰

공해, 스트레스, 부적절한 식생활 등의 생활환경 변화는 당뇨, 고혈압과 같은 만성질환 환자를 증가시켜왔으며 앞으로 더욱 가속화될 것으로 생각된다. 천식도 만성질환으로 생활환경 변화로 인한 신체의 부조화가 원인으로 생각되어지며, 전 세계적으로 유병률이 증가하고 이에 따른 사회경제적 부담이 증가하고 있어 각 나라마다 심각한 건강문제로 대두되고 있는 상황이며<sup>1)</sup>, 우리나라에서도 천식환자 증가율이 점점 높아지고 있다<sup>2)</sup>.

천식은 韓醫學에서 呼吸急促, 喉中有響하는 哮喘證의 範疇에 해당하는데, 그 原因을 寒冷說, 心因說, 痰因說, 素因說, 感染說, 過敏性反應 등으로 정리하고 있다<sup>3,17)</sup>. 哮喘證의 치료에 있어 外感風寒은 宣肺定喘하고, 痰濕內盛은 化痰定喘하고, 肺虛는 養肺定喘하고, 心腎虛損은 補益心腎 納氣定喘하고, 上實下虛는 瀉肺化痰 補益腎元하는 治법을 사용한다<sup>3)</sup>.

三子地黃湯은 六味地黃元을 기본으로 하고 11종의 약재를 가하여 만든 처방으로, 降氣消痰하는 약물인 三子(蘇子, 白芥子, 蘿菔子), 養陰潤肺하고 止咳化痰하는 효능을 가진 玉竹, 麥門冬, 款冬花, 瀉肺平喘하는 효능의 桑白皮, 滋陰降火하는 知母, 消腫排膿하는 皂角子, 胃腸機能을 돕는 山楂肉, 砂仁<sup>18)</sup>을 가하여 기 관지천식을 비롯한 호흡기질환에 대전대학교 부속한방병원 5내과에서 적용하는 처방이다. 최근 천식과 관련하여 동물 천식 모델을 이용한 연구<sup>7,8)</sup>와 천식환자를 대상으로 한 임상연구<sup>9,11)</sup>, 다

양한 單味 및 處方을 이용한 염증반응이나 면역기능에 관한 실험<sup>12-14)</sup>도 활발하게 이루어지고 있으나 三子地黃湯에 대한 연구는 없었다.

六味地黃元은 腎水不足을 치료<sup>19)</sup>하는 대표적인 처방으로 下焦의 腎水가 부족해지면 虛熱이 상승하여 發熱, 咳嗽<sup>20)</sup> 등의 증상을 나타내는데 천식의 증상과 유사하다. 천식의 원인 중 心腎虛損은 補益心腎 納氣定喘의 治法<sup>3)</sup>이 사용되며, 上實下虛는 瀉肺化痰 補益腎元하는 治法<sup>3)</sup>을 사용하므로 이는 補益腎水하는 六味地黃元의 적응증에 해당한다고 할 수 있다. 따라서 六味地黃元이 腎水不足으로 인한 上焦의 燥熱을 다스림과 동시에 가미한 11종의 약재들이 瀉肺化痰, 止咳平喘의 작용을 하여 천식의 치료 효과를 증대시킬 수 있으리라 생각되었다.

이에 저자는 三子地黃湯이 천식에 대하여 동물실험에서 어떠한 반응을 보이는지 알아보기 위하여 상기와 같은 실험을 하였다. 세포독성, 항기도과민성, 면역세포, IgE 및 사이토카인에 미치는 영향을 규명하고자 기관지천식 생쥐모델을 대상으로 三子地黃湯을 400 mg/kg과 200 mg/kg로 8주간 투여한 뒤에 세포독성검사, 기도과민성, BALF 내 총세포수, eosinophil, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> 세포수, eotaxin, IL-5, TNF- $\alpha$ , Anti-OVA-IgE의 양을 측정하고, H&E, M&T 염색법으로 폐조직 병리검사를 수행하였다.

첫째로 세포독성에 관해 살펴보면 hFCs에서는 대조군의 세포생존율 100  $\pm$  0.2%에 대하여, 실험군의 모든 농도에서 80% 이상의 생존율을 나타냈다. 이는 500  $\mu$ g/ml 의 고농도에서도 높은 생존율을 보인 것으로 인체에 투여하여도 큰 독성을 나타내지 않는 안전한 처방으로 볼 수 있다(Fig. 1).

둘째로 기도과민성의 변화를 살펴보면 실험 종료 후 Penh 값을 측정한 결과, 모든 농도에서 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있게 (P<0.001~P<0.01) 증가하였으나 실험군에서는 SJT200군의 3.125, 12.5 mg/ml 농도와 SJT400군은 3.125 mg/ml 농도를 제외하고 유의성 있게 (P<0.001~P<0.05) 감소하였다 (Table 3, Fig. 2). 따라서 三子地黃湯이 기도과민성을 감소시켜 천식에 효과를 나타낼 것으로 생각되어 진다.

셋째로 BALF 총 세포수와 eosinophil, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> 세포수를 count 한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 유의성 있게 (P<0.001~P<0.01) 증가하였으나, 실험군은 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 (P<0.01~P<0.05) 감소하였다(Fig. 3, 4).

BALF 총 세포수와 eosinophil 세포수의 증가는 비만세포, 호산구, 림프구, 대식세포 등의 천식을 일으키는 면역세포들이 증식하거나 활성화됨으로써 나타나는데<sup>21,22)</sup>, 대조군의 BALF 총 세포수와 eosinophil 세포수의 증가에 비하여 실험군에서 三子地黃湯의 투여로 총 세포수와 eosinophil 세포수가 감소한 것은 三子地黃湯이 폐와 기관지뿐만 아니라 천식적인 알레르기 염증반응을 감소시키는 효과가 있는 것으로 생각할 수 있다.

CD3은 T세포 표면분자이고 CD69는 활성화된 B세포, T세포, 대식세포, 세포독성 세포에 존재하는 표면분자로 T세포의 초기 활성화를 나타내며, 활성화된 호산구에서 분비되므로 천식환

자의 기도에서 호산구침윤의 표지로 사용될 수 있다<sup>23)</sup>. 실험군에서 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포의 수가 대조군에 비하여 감소하는 것은 三子地黃湯이 T세포의 활성화를 억제하고 호산구의 기도내 침윤을 억제하는 작용이 있음을 시사 하는 것으로 생각할 수 있다. 케모카인은 화학주성을 갖는 사이토카인을 말하는데, CCR3은 주로 호산구에서 발하는 케모카인 수용체로 호산구가 혈관 내피세포와 결합한 후 조직 내로 침투하도록 한다<sup>24-26)</sup>. 따라서 CCR3의 발현을 조절함으로써 천식에 효과를 나타내는 치료제의 가능성이 모색되고 있는데<sup>23,27)</sup>, 실험군에서 CCR3<sup>+</sup> 세포의 수가 대조군에 비하여 감소한 것은 三子地黃湯이 호산구의 활성화를 억제하여 호산구의 기도조직 내 유입을 감소시킴으로써 천식에 대한 효과를 나타낼 수 있다는 가능성을 보여준다고 생각된다.

CD22, CD45는 B세포 일부, 단핵구, 수상돌기세포, 호산구, 혈소판에 발현하는 단백질로써, 대식세포와 호산구에 의한 세포독성을 매개하고, 활성화시에는 IgE를 분비하여 호산구를 자극하며, B220은 쥐의 B세포 표면에 있는 표식자로, B세포의 면역증가를 의미한다<sup>28,29)</sup>. 또한 B세포에서 생산된 IgE는 비만세포 표면에 결합하게 되고, 같은 항원에 재 노출하게 되면 비만세포 표면에 부착된 IgE 항체와 항원이 결합하여 비만세포로부터 여러 화학매체들을 분비하게 되는 제1형 과민반응이 일어난다<sup>29)</sup>. 따라서 실험군에서 B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup>의 세포수가 대조군보다 감소한 것은 三子地黃湯이 B세포의 성장과 IgE의 분비를 조절하는 작용을 나타낼 가능성을 의미하는 것으로 생각된다.

넷째로 BALF 내 eotaxin, IL-5, TNF- $\alpha$ , Anti-OVA-IgE양에 미치는 영향을 살펴보면, 대조군은 정상군에 비하여 유의성 있게 (P<0.001~P<0.05) 증가하였으나, 三子地黃湯을 400, 200 mg/kg 을 투여한 실험군 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있게 (P<0.001~ P<0.05) 감소하였다(Fig. 5).

Eotaxin은 케모카인의 일종으로 케모카인은 화학주성을 갖는 사이토카인을 말하는데, eotaxin같은 케모카인에 노출된 백혈구들은 케모카인 수용체를 발현하게 된다. 또한 eotaxin은 알레르기 질환에서 중요한 역할을 하는 호산구의 화학주성과 상피를 통한 migration에서 많은 역할을 한다<sup>30)</sup>.

IL-5는 IL-2 또는 IL-4의 B세포 분화성장엔 작용하여 IgE 생산을 자극시키는 작용을 하며, 호산구의 분화, 활성화, 생존 연장에서 중요한 역할을 한다. IL-4는 세포간의 정보를 전달하는 사이토카인으로, Th1세포에서 생성하여 B세포의 분화와 증식을 촉진시키고 Th2세포를 자극하여 IgE 생성을 증가시킨다<sup>31-34)</sup>.

TNF- $\alpha$ 는 lipopolysaccharide에 의해 활성화된 식균세포에서 주로 분비되며 많은 사이토카인 의존 염증반응에서 중요한 매개체로 알려져 있는데 adhesion molecules를 상향조정하고, 화학주성물질을 자극하여 하부호흡기계로 염증세포를 유입시켜 육아종을 형성하고 세포분화와 식균작용을 유도시켜 염증세포가 기도벽으로 이입되는 것을 촉진하며, 상피 하에서의 섬유화전단계를 활성화시킨다<sup>35)</sup>. 또한 급만성염증의 개시를 매개하며 IL-1, IL-6 등을 유도하여 특이 면역 반응과 급성 염증반응의 중요한 매개물질이 된다.

IgE는 특정 항원 분자와 반응하는 항체 특성을 가진 혈청 글

로블린으로, 항원이 기도내에 들어오면 생성되어, 비만세포나 호염기구 등의 수용체에 달라붙어서 알레르기 반응에 중요하게 관여하는 면역글로블린이다<sup>36)</sup>.

따라서 三子地黃湯이 Th2 경로의 항진에 관여하는 사이토카인인 IL-5의 분비를 억제하고, 염증세포의 호흡기 유입에 관여하는 eotaxin, TNF- $\alpha$ 의 분비를 억제하며, Anti-OVA-IgE의 분비를 감소시킴으로써 천식의 주요 병리기전인 알레르기성 염증반응을 억제하는 작용을 나타낸다고 생각된다.

다음으로 실험 종료 후 폐조직을 H & E 염색하여 관찰한 결과 대조군에서 폐 조직부위로의 염증세포의 침윤이 두드러지게 증가하였고, 기도의 염증 또한 현저하게 증가하였으나, 실험군에서는 염증세포의 침윤과 기도의 염증 모두 현저하게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6A). M-T염색하여 관찰한 결과에서는 대조군에서는 collagen 침착 정도가 증가하였으나 실험군은 모든 농도에서 감소한 것으로 나타났다(Fig. 6B).

천식은 호산구와 림프구의 침윤이 뚜렷하고, 중증도에 따라서 기도 염증 반응이 심해지며, 기도 상피세포의 탈락, 상피세포 기저막하 콜라겐 침착, 기도 평활근 및 점액선 증식 등의 병리조직학적 소견을 보이며<sup>37)</sup>, 진행된 천식 환자들에서는 만성적인 기관지 내벽의 염증으로 인하여 정상인에 비하여 기관지가 좁아지는 기도 개형(airway remodeling)을 초래하는데, 이는 기도의 수축에 현저한 영향을 미쳐 기도 과민반응에 기여하고, 지속적이고 불완전하게 가역적인 기도의 수축을 초래하며, 점액분비를 증폭하여 중증천식에서 기도를 막는 점액마개를 형성하는데 기여한다<sup>38,39)</sup>. 三子地黃湯 투여군에서 염증세포의 침윤, 기도의 염증, collagen 침착 정도가 감소된 소견을 보이는 것은 三子地黃湯이 기도손상을 감소시켜 천식의 진행을 억제하는 작용이 있음을 보여준다고 할 수 있다.

이상의 결과로 보아 三子地黃湯은 세포 독성이 없으며, 천식을 유발시킨 생쥐의 기도과민성과, BALF 내의 총세포수, 호산구수, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> 세포수 및 eotaxin, IL-5, TNF- $\alpha$ , Anti-OVA-IgE의 생성을 유의성 있게 감소시키는 효과를 나타내어 천식 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

三子地黃湯이 알레르기 천식 모델 생쥐의 기도과민성, 면역세포 및 사이토카인에 미치는 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

三子地黃湯은 human fibroblast cells에 대한 직접적인 독성은 없었다. 三子地黃湯은 알레르기 천식 모델 생쥐의 기도과민을 유의성 있게 감소시켰다. 三子地黃湯은 천식 모델 생쥐의 BAL 내에서 변화되는 총 세포수, 호산구수, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> 세포수를 대조군에 비하여 유의성 있게 개선하였다. 三子地黃湯은 천식 모델 생쥐의 BALF 내에서 변화되는 eotaxin, IL-5, TNF- $\alpha$ , Anti-OVA-IgE의 변화를 대조군에 비하여 유의성 있게 개선하였다. 三子地黃湯은 천식

모델 생쥐의 폐조직에서 유도되는 염증세포 침윤, 기도의 염증, collagen 침착을 대조군에 비하여 유의성 있게 개선하였다.

## 참고문헌

1. Braman, S.S. The global burden of asthma. *Chest* 130(1 Suppl):4S-12S, 2006.
2. 건강보험심사평가원. 2006년 건강보험통계지표. [http://www.hira.or.kr/cms/rg/rgc/pds\\_02/1186060\\_1278.html](http://www.hira.or.kr/cms/rg/rgc/pds_02/1186060_1278.html).
3. 전국한의과대학 폐계내과학교실. 東醫肺系內科學. 서울, 한문회사, pp 329-331, 2002.
4. 홍천수, 김규언. 기관지천식-병인 및 역학. 대한 천식 및 알레르기학회, 천식과 알레르기 질환, 서울, 군자출판사, pp 244-245, 2002.
5. Muro, S., Minshal, E.M., Hamid, Q.A. The pathology of chronic asthma. *Clin Chest Med* 21(2):225-244, 2002.
6. 錢乙. 小兒藥證直訣. 남경, 강소과학기술출판사, pp 5-6, 1983.
7. Ko, E., Rho, S., Cho, C., Choi, H., Ko, S., Lee, Y., Hong, M.C., Shin, M.K., Jung, S.G., Bae, H. So-Cheong-Ryong-Tang, traditional Korean medicine, suppresses Th2 lineage development. *Biol Pharm Bull* 27(5):739-743, 2004.
8. 유선웅, 박양춘. 생쥐의 B세포에서 anti-CD40과 rIL-4로 유도된 Cytokine 생산과 IgE, Histamine에 대한 唘哮丸의 효과. 대한한방내과학회지 25(2):245-257, 2004.
9. 염종훈, 정희재, 정승기, 이형구. 定喘湯과 定喘湯加減方이 알레르기 천식모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 대한한의학회지 24(1):169-180, 2003.
10. 조영민, 정희재, 정승기, 이형구. 加味清金降火湯 및 加味六味地黃湯이 Allergy 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 대한한의학회지 24(3):1-10, 2003.
11. 한영주, 박양춘. 감초(Glycyrrhiza uralensis Fisch, GLU)가 천식모델 생쥐의 BALF내 면역세포 및 Cytokine에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 25(3):408-417, 2004.
12. 정승기, 황우석, 이재성, 최준용, 정희재, 이형구. 加味貝母湯의 기관지천식환자의 중증도에 따른 임상효과. 대한한의학회지 24(3):155-164, 2003.
13. 정승기, 정희재, 이재성, 이견영, 정승연, 이형구, 최준용. 加味清上補下湯역기스제의 기관지천식환자의 중증도에 따른 임상효과. 대한한의학회지 25(2):110-118, 2004.
14. 최준용, 이재성, 정승연, 이견영, 이경기, 정희재, 이형구, 정승기. 虛實辨證과 加味清上補下湯의 임상효과. 대한한방내과학회지 25(3):379-387, 2004.
15. Finotto, S., De Sanctis, G.T., Lehr, H.A., Herz, U., Buerke, M., Schipp, M., Bartsch, B., Atreya, R., Schmitt, E., Galle, P.R., Renz, H., Neurath, M.F. Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J*

- Exp Med 193(11):1247-1260, 2001.
16. 전국임상병리교수협의회. 조직검사학. 서울, 고려의학, pp 111-126, 2006.
  17. 정승기, 이형구. 효천의 원인 및 치법에 관한 연구. 대한한의학회지 7(1):60-67, 1986.
  18. 전국한의과대학 본초학교실. 本草學. 서울, 영림사, pp 162-163, 295-296, 370-374, 441-453, 482-484, 589-593, 1991.
  19. 두호경 편저. 東醫腎系內科學. 서울, 동양의학연구원, p 1434, 1993.
  20. 조세형. 素虛後世處方學. 서울, 계축문화사, p 68, 1984.
  21. Boot, h B.W., Newcomb, D.C., McKane, S.A., Crews, A.L., Adler, K.B., Bonner, J.C., Martin, L.D. Proliferation of the airway epithelium in asthma are inflammatory cells required? Chest, 123(3 Suppl):384-385, 2003.
  22. Nomura, A., Uchida, Y., Sakamoto, T., Ishii, Y., Masuyama, K., Morishima, Y., Hirano, K., Sekizawa, K. Increases in collagen type I synthesis in asthma: the role of eosinophils and transforming growth factor-beta. Clin Exp Allergy 32(6):860-865, 2002.
  23. Erin, E.M., Williams, T.J., Barnes, P.J., Hansel, T.T. Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 1(2):201-214, 2002.
  24. Murdoch, C., Finn, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. Blood 95(10):3032-3043, 2000.
  25. Ying, S., Meng, Q., Zeibecoglou, K., Robinson, D.S., Macfarlane, A., Humbert, M., Kay, A.B. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. J Immunol 163(11):6321-6329, 1999.
  26. 김태윤. 알레르기 염증반응에서 사이토카인과 케모카인. 대한 천식 및 알레르기학회, 천식과 알레르기 질환. 서울, 군자출판사, pp 55-58, 2002.
  27. Gangur, V., Birmingham, N.P., Thanavorakul, S., Joseph, S. CCR3 and CXCR3 as drug targets for allergy. principles and potential. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2(1):53-62, 2004.
  28. Nakamura, T., Kloetzer, W.S., Brams, P., Hariharan, K., Chamat, S., Cao, X., LaBarre, M.J., Chinn, P.C., Morena, R.A., Shestowsky, W.S., Li, Y.P., Chen, A., Reff, M.E. In vitro IgE inhibition in B cells by anti-CD23 monoclonal antibodies is functionally dependent on the immunoglobulin Fc domain. Int J Immunopharmacol 22(2):131-141, 2000.
  29. 조상현. IgE 항체 생성과 조절. 알레르기 13: 460-464, 1993.
  30. Forssmann, U., Uguccioni, M., Loetscher, P., Dahinden, C.A., Langen, H., Thelen, M., Baggiolini, M. Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. J Exp Med 185(12):2171-2176, 1997.
  31. Hamelmann, E., Gelfand, E.W. IL-5-induced airway eosinophilia-the key to asthma. Immunol Rev 179: 182-191, 2001.
  32. Greenfeder, S., Umland, S.P., Cuss, F.M., Chapman, R.W., Egan, R.W. Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. Respir Res 2(2):71-79, 2001.
  33. Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B.G., de Vries, J.E. Role of interleukin-4 and interleukin-13 in synthesis of IgE and expression of CD23 by human B cells. Allergy 49(8):576-586, 1994.
  34. Steinke, J.W., Borish, L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4. its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. Respir Res 2(2):66-70, 2001.
  35. Thomas, P.S. Tumour necrosis factor-alpha. the role of this multifunctional cytokine in asthma. Immunol Cell Biol 79(2):132-140, 2001.
  36. Oettgen, H.C., Geha, R.S. IgE in asthma and atopy. cellular and molecular connections. J Clin Invest 104(7):829-835, 1999.
  37. 최인선. 천식의 병리. 대한 천식 및 알레르기학회, 천식과 알레르기 질환. 서울, 군자출판사, pp 257-264, 2002.
  38. Elias, J.A., Zhu, Z., Chupp, G., Homer, R.J. Airway remodeling in asthma. J Clin Invest 104(8):1001-1006, 1999.
  39. 김관형. 기도 개형. 결핵 및 호흡기질환 60(6):608-624, 2006.