

배 에탄올 추출물이 난황에 의하여 유발된 생쥐의 천식에 미치는 영향

정희진, 정영민, 최유진, 신동선, 김형우, 조수인*

부산대학교 한의학전문대학원

Effects of pear ethanol extract on asthma induced by ovalbumin in mice

Hee Jin Chung, Young Min Joung, Eu Gene Choi, Dong Sung Shin,
Hyung Woo Kim, Su In Cho*

School of Korean medicine, Pusan National University

ABSTRACT

Objectives : In the theory of Korean medicine, Pear has long been considered to protect throat, bronchus and lung. Pear has been believed to remove sputum in Korean people. This study was conducted to investigate the effect of pear ethanol extract (PEE) on asthma induced by ovalbumin in mice.

Methods : We investigated the effects of PEE on airway hyperresponsiveness to methacholine, production levels of ovalbumin (OVA) specific total immunoglobulin G (IgG), IgG1, IgG2a and IgE in serum and histopathological changes of lung tissues in asthmatic mice.

Results : PEE decreased airway hyperresponsiveness to methacholine significantly compared to non-treated asthmatic mice ($P < 0.05$). Level of OVA specific IgE in serum was lowered by oral administration of PEE effectively ($P < 0.05$). In histopathological observation, administration of PEE reduced infiltration of immune cells into lung tissue.

Conclusion : These results suggest that pear has anti-asthmatic action and related mechanisms are involved in anti-inflammatory action such as reducing level of OVA specific IgE and immune cell infiltration.

Key words : Pear, IgE, airway hyperresponsiveness, anti-inflammation, Asthma

서론

공기 및 환경 오염, 바람직 하지 못한 식이 습관, 과도한 스트레스 등으로 인하여, 천식 (asthma)은 21세기에 접어들어 가장 빠른 속도로 그 유병률이 증가하고 있는 질환 중 하나로써 동·서양을 막론하고 많은 관심을 가지고 있는 연구 분야 중의 하나이다¹⁾. 알러지 질환의 하나인 천식은 특정한 항원에 감작된 개인에게서 발생하며, 특정한 항원과 재접촉에 의하여 기관지 수축, 분비물의 증가 등 가역적인 반응성의 증가를 특징으로 하는 기도 질환의 일종이다. 천식 환자는 일반적으로 기도 (airway)의 광범위한 수축을 보이며, 임상적으로 발작적인 호흡 곤란이나 기침, 천명음을 발생시킨다²⁾. 면역학적인 측면에서 천식의 형태는 Th2 반응에 기인하는 기도의 만성 염증 질환 (chronic inflammatory disorder)에 속하며, 이러한 만성 염증 질환에서 IgE 의존성 비만세포 (mast cell)

의 활성화 과정이 매우 중요한 것으로 알려져 있다^{3,4)}.

배 (梨, Pear)는 기원상으로 돌배 (일본배, 沙梨, *Pyrus pyrifolia* Nakai.)로부터 기원 했으며, 우리나라의 가장 대표적인 식용 과일 중의 하나이다. 1954년 “신고” 품종의 도입을 시작으로 교배 육종을 시작하여 현재, 신고, 단배, 황금배, 추황배 등 십여종의 개량종이 재배되고 있다⁵⁾. 배는 한의학적으로 味는 甘微酸, 性은 寒하여, 潤肺養心, 消痰降火, 清熱解毒의 효능이 있어 예로부터 喘息, 咳嗽 등과 酒毒을 해소하는데 사용되어왔다⁶⁾.

최근 연구에 의하여 배에서 추출된 펙틴의 항고혈압 작용⁷⁾, 심근비대 방지 작용⁸⁾이 알려졌으며, 배에서 추출된 페놀성 화합물 및 펙틴의 항당뇨 작용⁹⁾과 항천식 작용^{10,11)} 또한 보고되었다. Lee 등¹⁰⁾과 나 등¹¹⁾은 그들의 보고서에서 각각 배에서 추출한 펙틴과 페놀성 화합물의 항천식활성을 검증 하였으며, 기관지 평활근의 장력이나, 호산구 침윤, cytokine

*교신저자 : 조수인. 경남 양산시 물금읍 부산대학로 49번지, 626-870 부산대학교 한의학전문대학원.
· Tel : 051-510-8457, · Fax : 051-510-8420, · E-mail : sicho@pusan.ac.kr.
· 접수 : 2011년 12월 7일 · 수정 : 2012년 1월 3일 · 채택 : 2012년 1월 13일

등에 미치는 영향을 조사하였다.

본 연구진은 이전 연구에서 배의 씨방과 과피를 알콜 발효하여 제조된 음료가 항천식 작용이 있음¹²⁾을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 과육과 과피, 씨방 등이 모두 포함된 배의 에탄올 추출물 (Pear ethanol extract, PEE)이 생쥐에 유발된 천식에서 나타나는 기도 저항 및 면역 글로불린 생성량과 폐 조직의 조직병리학적 소견에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

8 주령된 암컷 Balb/c 생쥐를 샘타코 (인천, 한국)에서 구입하여, 일주일간 실험실환경에 적응시킨 후 온도와 습도가 조절되는 환경 (24 ± 3°C, 12-hr light-dark cycle) 에서 고형사료와 물을 마음껏 섭취하게 하며 실험에 사용하였다. 실험동물은 정해진 규정에 의하여 다루었으며, 실험 프로토콜은 실험동물 위원회의 승인을 득하였다 (PNU-2009-0029).

2) 시료

본 연구에 사용된 배는 시중 (전남, 나주, 한국)에서 10월 초경 수확된 배를 구입, 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제

300 g의 배를 잘게 부수어 1 l의 100% 에탄올에 넣고 실온에서 3일간 추출한 후, 상층액을 와트만지 (No. 20)로 걸러 추출액을 얻었다. 얻어진 추출액을 감압 농축기 (EYELA, Japan)를 이용하여 농축한 다음, 동결건조하여 최종 17.2 g의 PEE를 얻었다.

2) 천식 유발과 실험군 선정

20 µg의 OVA와 2 mg의 alum hydroxide를 100 µl의 인산완충액 (PBS)에 녹여 3일간 복강으로 주사하여 감작하였다. 마지막 감작일로부터 5일 후, 생쥐를 zoletil (15 mg/kg) 과 rompun (5 mg/kg)을 복강 주사하여 마취시킨 다음 10 µg의 OVA를 30 µl의 PBS에 녹여 비강내 점적 (intra-nasal instillation)하였다. 실험 16, 17, 20, 21일 째에 10 µg의 OVA를 동일한 방법으로 생쥐에 반복 투여하여 천식을 유발하였다. PEE는 실험 16일째부터 21일까지 6일간 600 mg/kg/day 분량으로 1일 1회 구강투여 되었으며, prednisolone (Sigma, USA)은 6일간 5 mg/kg/day 분량으로 1일 1회 복강 주사 되었다 (Fig. 1). 실험군은 다음과 같다.

- ① 정상군 (Naive group) : 천식을 유발하지 않고 용매(증류수)만 투여한 군
- ② 천식 대조군 (Experimental control group) : 천식을 유발시키고, 용매(증류수)만 투여한 군.
- ③ 배 에탄올 추출물 투여군 (PEE group) : 천식을 유발시키고 배 에탄올 추출물을 구강투여한 군.
- ④ 프레드니솔론 투여군 (PD group) : 천식을 유발하고 프레드니솔론을 복강주사한 군.

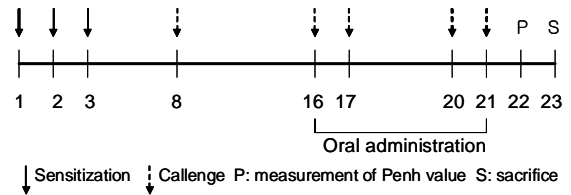


Fig. 1 Experimental schedule All experimental groups, except normal control group, were sensitized intra-peritoneally on days 1, 2, and 3 and challenged intranasally on days 8, 17, 20 and 21. Animals were treated with SCRT and/or PD from days 16 until 21. Airway hyper-responsiveness was measured on day 22. All animals were sacrificed on day 23. P: enhanced pause, S: sacrifice

3) 기도 과민성 측정

Methacholine에 대한 기도 과민성은 실험 22일째에 whole body plethysmograph (OCP 3000, Allmedicus, Korea)를 이용하여 측정되었다. 실험 과정을 간단히 요약하면, 생쥐는 nebulizer (HARVARD73-1963, HARVARD, Massachusetts, USA)를 이용하여 각각 0, 12.5, 25, 50 mg/ml 농도로 PBS에 용해된 methacholine에 150초간 노출된 다음, 즉시 chamber로 이동되어 150초 동안의 호흡 양상이 모니터링 되었다. Penh 값은 150초 동안 측정된 expiration time, relaxation time, peak expiratory flow rate, peak inspiratory flow rate를 이용하여 계산되었으며, 계산식은 아래와 같다.

$$\text{Penh} = (\text{Te}/\text{RT}-1) \times \text{PEF}/\text{PIF}$$

Te : expiration time (sec)

RT : relaxation time (sec)

PEF : peak expiratory flow rate (ml/s)

PIF : peak inspiratory flow rate (ml/s)

4) 혈청에서 항원 특이 항체량의 측정

혈장 내의 항원 특이 전체 항체, IgE, IgG1, IgG2a isotype 함량의 측정은 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)의 방법을 사용하였다. 간단히 실험과정을 요약하자면, 채취된 혈액을 고속원심분리기로 220 g에서 5분 동안 원심분리하여 serum을 얻어 내었다. ELISA를 위하여 1%의 스킴 밀크 (skim milk)와 0.05%의 Tween 20을 Phosphate buffer saline (PBS)에 녹인 blocking solution에 50 mg/ml의 용량으로 난황 (OVA, grade V, Sigma-Aldrich)을 녹인 다음, 96-well plates (Nunc, USA)에 각각 50 µl씩 분주하고 실온에서 3시간 동안 방치한 다음, 4°C에 다음날 까지 방치하여 plate 표면에 난황을 부착시켰다. 반응이 끝난 후, 난황이 담긴 blocking solution을 제거하고 다시 blocking solution을 첨가하여 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 반응이 끝난 후, 100 µl의 희석된 혈청 (1:20)을 각 well에 분주해 준 다음 실온에서 2시간 동안 반응 시켰다. 반응이 끝난 후, 희석된 혈청을 제거하고, 세척액 (washing buffer, PBST)으로 3번 잘 씻어준 다음 alkaline phosphatase가 부착된 anti-mouse immunoglobulin을 각 well에 분주한 다음 4°C에 다음날까지 반응 시켰다. 반응이 끝난 후, 세척액(washing buffer, PBST)로 3번 잘 씻어준 다음, p-NPP (Amresco, USA)를 넣어 반응을 종결 시켰다.

Optical density (OD) 값은 microplate spectrophotometer (BioTek, VT, USA)를 이용하여 405 nm에서 측정 하였다. 사용된 2차 항체는 각각 goat anti-mouse polyvalent antibody (Sigma, 1:1000), goat anti-mouse IgG1 antibody (Southern Biotech, 1:1000), goat anti-mouse IgG2a antibody (Southern Biotech, 1:1000), and rat anti-mouse IgE antibody (Southern Biotech, 1:500)이었다. 기준 혈장으로는 이전 실험에서 동일 계열 동일 주령의 생쥐에 천식을 유발하여 얻은 혈청을 사용하였고, 모든 결과 값은 이 기준 혈청의 값에 대한 상대값으로 표시 하였다.

5) 조직병리학적 소견 관찰

생쥐로부터 적출된 폐 조직은 10% formaldehyde 용액 내에서 고정된 후, 탈수 과정을 거쳐 파라핀 왁스에 포매 되었다. 포매된 조직은 microtome (Leica, Wetzler, Germany)을 이용하여 4 μm 두께로 절편된 다음, slide glass 위에 올려지고, hematoxylin과 eosin을 이용하여 염색되었다. 염색된 조직은 광학 현미경 (Olympus, Japan)를 이용하여 관찰되었다 (x200).

6) 통계 처리

모든 통계학적 비교는 Student-t-test를 통하여 이루어졌고, 이때에 SigmaPlot (Ver. 11.0, USA)이 사용되었다. 본 연구의 결과는 평균±표준편차의 형태로 표기 되었으며, P 값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

성 적

1. Methacholine에 대한 기도 과민성에 미치는 영향

재료 및 방법에서 논술한 것과 같이 methacholine에 대한 기도 과민성을 측정할 결과 천식대조군 (control group)에서 메타콜린 농도 의존적인 Penh 값의 증가가 관찰되었다. PEE의 투여는 이러한 Penh 값 증가를 유의한 수준으로 억제하였으며, 프레드니솔론 처치군 (PD group)과 유사한 양상을 보였다.

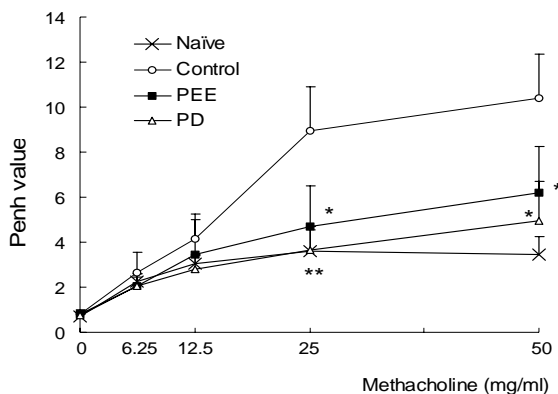


Fig. 2 Effects of PEE on airway hyperresponsiveness Airway hyperresponsiveness was measured as measuring enhanced pause (Penh) at day 22. Naive : non-asthmatic mice, Control : asthma induced control mice, PEE : 600 mg/kg/day of PEE administered asthmatic mice, PD : 5 mg/kg/day of Prednisolone injected asthmatic mice. Results were represented as mean±SD. *P < 0.05, **P < 0.01 as compared to control group (n=6).

2. 항원 특이 항체에 미치는 영향

생쥐의 혈청으로부터 ELISA방법을 이용하여 항원 특이 전체 항체, IgG1, IgG2a 및 IgE의 함량을 측정 하였다. 반복되는 난황의 비강 내 점적에 의하여 천식을 유발한 결과 혈장 내에서 항원 특이 전체 항체 및 각각의 항원 특이 isotype 항체들 모두 대폭 증가하였다. PEE는 항원 특이 IgE 항체만을 유의한 수준으로 감소시켰으며 (Fig. 4B), 항체 총량 및 IgG1, IgG2a 항체에 대하여서는 특별한 영향을 미치지 않았다 (Fig. 4C,D). PD는 항원 특이 항체 총량을 유의한 수준으로 감소시켰다 (Fig. 4A).

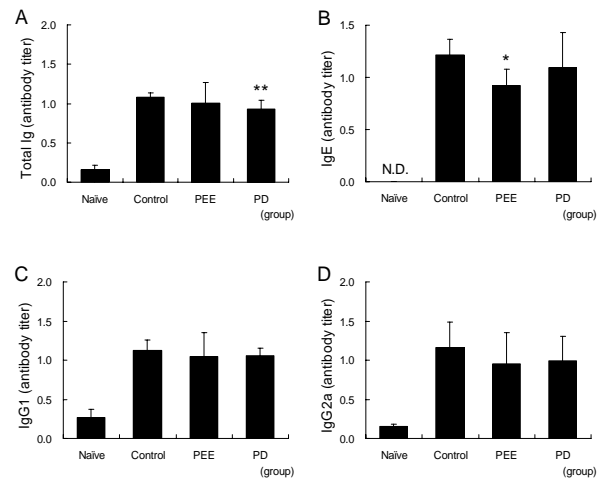


Fig. 3 Effects of PEE on antigen-specific antibody productions in serum, OVA-specific antibodies in serum were measured using ELISA method. Naive : non-asthmatic mice, Control : asthma induced control mice, PEE : 600 mg/kg/day of PEE administered asthmatic mice, PD : 5 mg/kg/day of Prednisolone injected asthmatic mice. (A) OVA-specific total antibody, (B) OVA-specific IgE, (C) OVA-specific IgG1, (D) OVA-specific IgG2a. Results were represented as mean±SD. *P < 0.05, **P < 0.01 as compared with control group (n=6).

3. 조직병리학적 소견에 미치는 영향

생쥐의 폐조직을 염색하여 관찰한 결과, Naive군에서는 특별한 이상 소견이 발견되지 않는데 반해 (Fig. 4A), Control군에서는 작은 혈관에서 폐 실질로 다량의 염증세포가 침윤되는 현상이 관찰되었다 (Fig. 4B). PEE군에서는 이러한 염증세포 침윤이 감소하는 경향을 보였으며, 비교적 큰 혈관 주위에서만 염증 세포 침윤을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 4C). PD군의 폐 조직은 거의 정상군에 가까울 정도로 미량의 염증세포 침윤을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 4D).

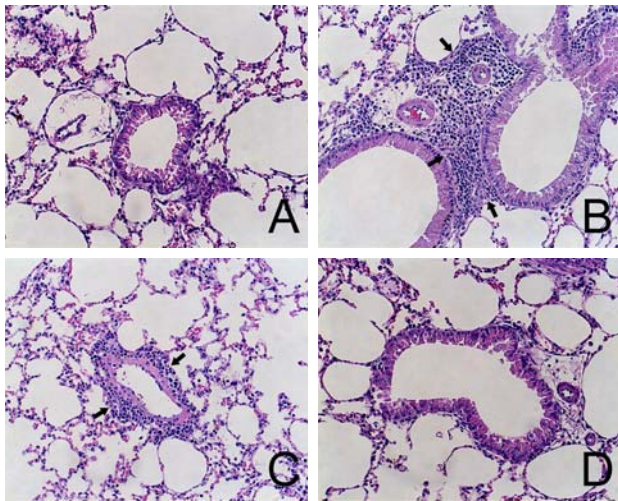


Fig. 4 Effects of PEE on histopathological changes in lung tissue. Lung tissues were stained with hematoxylin-eosin and examined using photomicroscope. A: naïve group, B: control group, C: PEE group, D: PD group. Filled arrows indicate infiltrated inflammatory cells into connective tissue around vessels (x200).

고찰

천식의 전형적인 증상인 기침, 호흡곤란, 천명음 등은 기도 과민성 (airway hyperresponsiveness, AHR)과 연관이 깊으며¹³⁾, 천식 진단에 AHR 측정이 도움이 되기 때문에, 천식이 의심되는 환자들을 대상으로 메타콜린에 의한 AHR을 흔히 측정한다¹⁴⁾. AHR은 기도 특히, 기관지의 수축에 의해 기도가 정상인보다 예민하게 반응하고, 심하게 좁아지는 성질을 말한다. AHR은 가역적 기도 폐쇄와 폐 조직의 만성 호산구 성 염증이라는 병리 소견과 더불어 천식의 진단 및 경과, 치료 결과 판정에 흔히 이용된다^{15,16)}.

천식은 호산구 침윤으로 대표되는 만성 염증 질환의 특징을 지닌다. 특히 이러한 염증 반응은 전통적으로 Th2 반응으로 인식되고 있으며, 염증의 정도는 천식의 호전과 악화에 직접적으로 관련이 있다¹⁷⁾. 일반적으로 천식환자의 객담과 폐 조직에서는 호산구가 증가되어 있다¹⁸⁾.

천식의 악화와 호전에 있어서 IgE의 생성 레벨 또한, 매우 중요한 인자 중 하나이다. IgE는 mast cell의 high-affinity IgE receptor인 Fcε RI에 결합하여 비만 세포의 활성화를 통해, 여러 가지 천식 증상과 관련된 인자들을 배출시키는데 중요한 역할을 한다¹⁹⁾. 따라서 이전부터 천식의 치료에 있어서 IgE의 생성레벨은 매우 중요한 치료적인 목표로 여겨져 왔다²⁰⁾. 항원 특이 IgE와 기도 과민성 간에는 밀접한 관계가 존재함이 알려져 있다. 최근 연구를 통하여 IgE와 비만세포 의존 반응에 의하여 AHR이 유발됨이 보고되었으며, IgE를 제거한 동물 모델에서 AHR이 극적으로 감소함 또한 보고되어 있다²¹⁻²³⁾.

배는 한의학에서 뿐만 아니라 민간에서도 목의 보호와 감기 예방, 기침 치료 등의 목적으로 활용하여 왔으며⁶⁾, 배에서 추출된 펠레계 화합물과 펙틴이 항천식 효과가 있음^{10,11)}이 이미 알려져 있는데 착안하여, 본 연구에서는 껍질과 씨방을 포함한 배의 에탄올 추출물 (PEE)에 대하여 항 천식 효과를 검증하였다.

본 연구의 결과에서 반복되는 난황의 처리는 메타콜린에 대한 기도 과민성을 농도의존적으로 증가시켰다. PEE의 투여는 이러한 기도 과민성 증가를 유의한 수준으로 억제하였으며, PD와 유사한 수준의 결과를 보였다 (Fig. 2). 또한, 혈중 항원 특이 IgE 수준을 유의하게 감소시켰다 (Fig. 3B). 조직 병리학적 소견 관찰 결과 PEE는 면역세포의 침윤을 억제하는 경향을 보였다 (Fig. 4C). 난황을 사용하여 유발되는 Th2 천식 모델에서 폐 조직으로 침윤되는 면역 세포는 대부분 호산구로 알려져 있으며, 본 연구에서의 결과 역시 침윤된 대부분의 세포를 배율을 확대하여 확인한 결과 대부분 호산구임을 확인하였다 (data not shown).

이러한 결과는 PEE가 Th2 천식 모델에서 항염증 작용을 가짐으로써 면역세포의 침윤을 억제하였고, IgE 생성을 감소시켰으며, 이를 통하여 궁극적으로 AHR의 증가를 억제할 수 있었을 것으로 해석된다. 선행 연구를 통하여 IgE의 농도와 AHR의 관련성이 알려져 있는 것 뿐만 아니라²¹⁻²³⁾, IgE의 농도와 호산구의 침윤이 연관성이 있음이 알려져 있는 것을 감안하면²⁴⁾, 본 연구의 결과는 PEE가 항염증 작용을 보임으로써 천식의 주요한 인자인 항원 특이 IgE 생성을 억제하고, 그 결과 호산구 침윤을 방지하였으며, 궁극적으로 AHR을 억제한 것으로 해석 될 수 있다. 추후, 후속 연구를 통하여 이러한 가설의 타당성을 확인하여야 할 것으로 생각된다.

본 연구진의 이전 연구에서 배의 과피와 씨방을 알콜 발효하여 만들어진 음료는 동일한 동물 모델에서 항원특이 전체항체 총량과 IgE의 함량을 유의한 수준으로 감소시켰으며, 기도 과민성은 감소시키는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다¹²⁾. 본 연구의 결과와 비교하였을 때, 항염증 작용은 알콜 발효 음료가 더 우수하다고 할 수 있으나, 기도 과민성 측면에서 본 연구의 결과가 더 우수하다고 할 수 있다. 또한, 기존의 연구에서 확인되지 않았던 조직병리학적 소견이 본 연구에서는 확인 되었다.

본 연구에서 양성 대조군으로 사용한 프레드니솔론 (PD)은 기도 과민성 면에서 PEE와 유사한 결과를 보였으나 (Fig. 2), PEE는 항원 특이 IgE 항체만을 특이적으로 감소시킨 반면 (Fig. 3B), PD는 항원 특이 항체 전체를 유의한 수준으로 감소시켰으며 (Fig. 3A), 조직 내로의 면역세포 침윤을 PEE보다 효율적으로 방지 하였다 (Fig. 4D). 이는 PEE와 PD가 궁극적으로 AHR을 유사한 수준으로 회복시켰다 할 지라도 세부적인 기전은 서로 다를 수 있다는 점을 설명한다. PD는 천식에 사용되는 가장 대표적인 corticosteroid의 일종으로 전반적인 면역기능 억제 작용을 가지고 있다²⁵⁾. 본 연구의 결과에서도 PD군은 효율적인 항염증 작용으로 면역세포의 침윤을 억제하였고, 항원 특이 전체 항체 총량을 유의하게 감소시켰다. 이에 반하며, PEE는 면역세포 침윤에 미치는 영향은 PD에 미치지 못하였고, 항원 특이 전체항체 총량에는 특별한 영향을 미치지 못하였지만, 항원 특이 IgE 항체의 함량을 유의한 수준으로 낮추어 준 것이 차이점이라고 할 수 있다. 특히, 천식의 치료에서 항IgE 기능을 가지는 약물이 가장 안전하고 효과도 좋은 것으로 알려져 있으나 가격이 매우 비싸다는 점을 감안할 때²⁵⁾, PEE는 corticosteroid 투여에서 보이는 전반적인 면역 기능 감소 없이 효과적으로 천식의 치료에 도움을 줄 수 있는 약물인 항IgE 제제로서의 개발 가능성을 가진다고 할 수 있다.

결 론

배 에탄올 추출물 (PEE)의 구강투여는 난황과의 반복적인 접촉을 통하여 천식이 유발된 생쥐의 기도 과민성을 유의한 수준으로 낮추어 주었고, 혈액 내에서 천식의 전변과 악화에 있어서 매우 중요한 항원 특이 IgE 수준을 효과적으로 낮추었다. 또한, 조직병리학적 조건에서 면역 세포의 침윤을 감소시키는 경향을 보였다. 이러한 결과들로부터 본 저자들은 배 에탄올 추출물에 항천식 기능이 있음을 알 수 있었고, 천식 치료제로서의 개발 가능성 또한 알 수 있었다.

참고문헌

1. Kao ST, Wang SD, Wang JY, Yu CK, Lei HY. The effect of Chinese herbal medicine, xiao-qing-long tang (XQLT), on allergen-induced bronchial inflammation in mite-sensitized mice. *Allergy*. 2000 ; 55 : 1127-1133.
2. Kurt J, Isselbacher et al, Harrison's principles of internal medicine, 13th ed, Seoul : Jung Dam, 1997 : 1258.
3. Sugita M, Kuribayashi K, Nakagomi T, Miyata S, Matsuyama T, Kitada O. Allergic bronchial asthma : airway inflammation and hyperresponsiveness. *Intern Med*. 2003 ; 42(8) : 636-643.
4. Maezawa Y, Nakajima H, Kumano K, Kubo S, Karasuyama H, Iwamoto I. Role of IgE in Th2 cell-mediated allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003 ; 131 : 2-6.
5. Kwang-Sik Cho, Sam-Seok Kang, Hyeon-Mo Cho, Gab-Cheon Koh, Kyung-Hy Hong, Dong-Soo Son, Whee-Cheon Kim, Ki-Youl Kim. Breeding of a Very Soft, Juicy, Large Sized, and High Quality Mid-season Pear Cultivar 'Manpungbae' . *Korean journal of horticultural science & technology*. 2003 ; 21(1) : 25-28.
6. Chen Guiyan. Bonchogangmoktongseok. Peiching : Hakwon publishing company 1992 : 1449-1450.
7. Chang Su Na, Dae Hwan Youn, Dong Hee Choi, Jong Gil Jeong, Jong Bang Eun, Jeong Sang Kim. The Effect of Pear Pectin & Phenolic Compounds on Regional Cerebral Blood Flow, Mean Arterial Blood Pressure, Heart Rate and Cardiac Contractile Force in Hypertensive Rat Induced by 2K1C. *Kor. J. Herbology* 2003 ; 18(2) : 101-108.
8. Na Chang Su, Yun Dae Hwan, Choi Dong Hee, Kim Jeong Sang, Cao Chun Hua, Eun Jong Bang. The Effect of Pear Pectin on Blood Pressure, Plasma Renin, ANP and Cardiac Hypertrophy in Hypertensive Rat Induced by 2K1C. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2003 ; 32(5) : 700-705.
9. Kim Jeong Sang, Na Chang Su, Effect of Rehmanniae Radix and Pear Phenolic Compound on the STZ-Treated Mice for Induction of Diabetes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2004 ; 33(1) : 66-71.
10. Lee JC, Pak SC, Lee SH, Na CS, Lim SC, Song CH, Bai YH, Jang CH. Asian pear pectin administration during pre-sensitization inhibits allergic response to ovalbumin in BALB/C mice. *J Altern Complement Med*. 2004 ; 10(3) : 527-534.
11. Chang Su Na, Jong Gil Jeong, Dae Hwan Youn. The effects of pear phenolic compound and herbal drugs on tension of the tracheal smooth muscle, eosinophil and interleukin-4 in mouse model of allergic bronchial asthma induced by ovalbumin. *Kor. J. Herbology* 2007 ; 22(2) : 25-33.
12. Young Min Joung, Hyung Woo Kim, Hee Jin Chung, Eu Gene Choi, Yoon Ho Do, Jeong Sik Choi, Su In Cho. Effects of Pear Alcoholic Fermentation Beverage on Airway Hyperresponsiveness and Immunoglobulin Production in Asthmatic Mice. *Kor. J. Herbology* 2009 ; 24(4) : 107-113.
13. Bohadana AB, Teculescu DB, Megherbi SE, Pham QT. Bronchial hyperresponsiveness in farmers : relation to respiratory symptoms, lung function, and atopy. *Lung* 1999 ; 177 : 191-201.
14. Young Il Kim, Inseon S. Choi, Dong Jin Park, Yeon Joo Kim, Dae Ho Cho, Soo Yeong Jee, Joon Seok Choi, Eui Ryoung Han. Etiologic Factors for Methacholine Upper Airway Hyperresponsiveness and Upper Airway Obstruction. *Asthma and allergy* 2010 ; 30(1) : 21-29.
15. Hargreave FE, Ryan G, Thomson NC, O'Byrne PM, Latimer K, Juniper EF, et al. Bronchial responsiveness to histamine or methacholine in asthma : measurement and clinical significance. *J Allergy Clin Immunol* 1981 ; 68 : 347-55.
16. Gun Ha Kim, Kang Jin Seo, Jung Hye Byeon, Dae Jin Song, Young Yoo, Ji Tae Choung, Young Yull Koh. Changes in Bronchial Hyperresponsiveness in Children with Asthma. *Pediatr. Allergy Respir. Dis. (Korea)*. 2007 ; 17(3) : 196-205.
17. Marshall BG, Wilkinson RJ, Davidson RN. Pathogenesis of tropical pulmonary eosinophilia : parasitic alveolitis and parallels with asthma. *Respir Med*. 1998 ; 92(1) : 1-3.
18. Ulińska D, Szmiedt M. Usefulness of the eosinophil count in induced sputum of asthmatic patients. *Pneumonol Alergol Pol.* 2001 ; 69(9-10) : 581-589.
19. Ochiai K, Wang B, Rieger A, Kilgus O, Maurer D, Födinger D, Kinet J, Stingl G, Tomioka H. A review on Fc epsilon RI on human epidermal Langerhans cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994 ; 104(1) : 63-64.

20. Balzar S, Strand M, Rhodes D, Wenzel SE. IgE expression pattern in lung : relation to systemic IgE and asthma phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*, 2007 Apr ; 119(4) : 855-862.
21. Martin TR, Takeishi T, Katz HR, Austen KF, Drazen JM, Galli SJ. Mast cell activation enhances airway responsiveness to methacholine in the mouse. *J. Clin. Invest.* 1993 ; 91 : 1176-1182.
22. Hamelmann E, Cieslewicz G, Schwarze J, Ishizuka T, Joetham A, Heusser C, Gelfand EW. Anti-interleukin 5 but not anti-IgE prevents airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999 ; 160 : 934-941.
23. Maezawa Y, Nakajima H, Kumano K, Kubo S, Karasuyama H, Iwamoto I. Role of IgE in Th2 cell-mediated allergic airway inflammation. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 2003 ; 131(1) : 2-6.
24. Dhar S, Malakar R, Chattopadhyay S, Dhar S, Banerjee R, Ghosh A. Correlation of the severity of atopic dermatitis with absolute eosinophil counts in peripheral blood and serum IgE levels. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2005 ; 71(4) : 246-249.
25. Ho Joo Yoon. Treatment Guideline of Bronchial Asthma, Tuberculosis and Respiratory Diseases. 2006 ; 60(6) : 601-607.