

## 太陰人 清心蓮子湯의 抗allergy 作用에 對한 實驗的 研究

박승찬\*

### Abstract

#### Effects of CheongSimYeonJaTang(CSYJT) on Control of Immune-function in highly purified mouse B cells and Mast cell

Park Seung Chan\*

Dept. of Oriental Medicine Graduate School, Taejon University

In order to evaluate the antiallergic effects of CSYJT, studies were done. We measured the cytotoxic activity for cytokines transcript expression, production of IL-4, IgE, IFN- $\gamma$ , proliferation of B cell in HRF plus anti-CD40mAb plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells. and cytokines transcript expression of IgE in Mast cell

The results were obtained as follows:

1. CSYJT decreased the expression of IL-4 in mast cell significantly.
2. CSYJT decreased the production of IL-4 significantly.
3. CSYJT decreased the expression of IgE in mast cell significantly.
4. CSYJT decreased the production of IgE significantly.
5. CSYJT increased the appearance of IFN- $\gamma$ .

The facts above prove that CSYJT is effective against the allergy. Thus, I think that we should study on this continuously.

### I. 緒 論

Allergy 반응은 무해한 항원, 즉 allergen 에 반응하여 생성된 Immunoglobulin E

(이하 IgE) 항체를 지닌 개인이 계속하여 동일 allergen에 노출되었을 때 일어나는 것으로 최근에는 '여러 다양하고 무해한 항원에 대한 면역계의 반응으로 발생하는 질병'과 같

\* 대전대학교 한의학과 사상체질의학과학전공

교신저자 : 박승찬 주소) 대전시 동구 판암동 678-28 박승찬 한의원 전화) 042)284-8478

E-mail : ii1075@korea.com

이 보다 제한된 의미로 정의되고 있다<sup>1)</sup>.

IgE 매개 mast cell 활성화 후 일어나는 염증반응은 histamine, prostaglandin 등의 매개물질의 활성화에 의해서 일어나는데, 이들 매개 물질들은 혈관투과성을 증가시키고 평활근을 수축시킨다. 또한 활성화된 mast cell이 leukotriene, chemokine 그리고 cytokine 등의 매개물질을 합성하고 분비하여 호산구와 Th2(T helper 2) cell을 포함한 백혈구를 염증 장소로 집합시킨다. 이러한 과정을 거쳐 평활근 수축, 지속적인 부종, 그리고 allergy 천식의 주요한 증상 중의 하나인 histamine과 같은 비특이적 기관지 수축 물질에 대한 기관지 과민반응이 발생한다<sup>2)</sup>.

過敏免疫反應을 말하는 allergy에 대해서는 《素問·四時刺逆從論》<sup>3)</sup>에 “少陰有餘 皮癬隱軫”, 《諸病源候論》<sup>4)</sup>에 “漆有毒 人有稟性畏毒 但見漆便中其毒 亦有性者耐者 終日燒者 境不爲害也”라 하여 皮膚의 過敏反應에 對한 言及이 있었다.

四象醫學에서의 疾病 治療에 對한 觀點은 體質에 對한 臟腑의 相互關係를 正常化하고 均衡을 회복하는 것이 곧 人間의 抗病力을 제공하는 根幹이 된다고 하여 主로 扶正의 方法을 使用하여 疾病을 治療하고 있다<sup>5)</sup>.

淸心蓮子湯은 元<sup>6)</sup>의 《東醫四象新編》에 “治虛勞夢泄無度 腹痛泄瀉 舌卷中風 食滯 胸腹痛”이라고 主治證이 처음으로 記述된 후 많은 醫書<sup>7-10)</sup>에서 淸心蓮子湯을 太陰人의 虛勞와 中風, 心臟疾患, 神經性 疾患, allergy 性 鼻炎 등에 活用됨을 說明하고 있다. 이에 關한 研究로는 朴<sup>11)</sup>의 臨床的 研究, 洪 등<sup>12)</sup>의 抗스트레스 效果에 關한 實驗的 研究, 金 등<sup>13)</sup>의 免疫反應과 抗알러지 效果에 關한 實驗的 研究 등이 있었으나, 抗allergy 效果의 分子免疫學的인 機轉에 對한 研究 報告는 接하지 못하였다.

이에 저자는 淸心蓮子湯의 抗allergy 作用에 對한 效能을 實驗的으로 糾明하고자, 생쥐

비장B 세포에서 interleukin-4(이하 IL-4), interferon- $\gamma$ (이하 IFN- $\gamma$ )의 유전자발현 그리고 정량적으로 IL-4, IFN- $\gamma$ , IgE 생성에 미치는 효과 및 생쥐 복강mast cell에서 IgE의 유전자발현 등을 측정한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 動物

실험동물은 18-20g의 BALB/c 생쥐를 한국 화학연구소에서 공급받아 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사 Co., Korea)와 정제수를 충분히 공급하고 2주일간 실험실환경(온도 23±2°C, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300Lux)에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 藥材

본 실험에 사용한 약제는 《東醫壽世保元》<sup>14)</sup>에 수록된 淸心蓮子湯으로 대전대학교 부속 한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며 처방 내용과 1첩의 용량은 다음과 같다.

Prescription of CheongSimYunJaTang(CSYJT)

構成藥物	生藥名	用量(g)
蓮子肉	<i>Nelumbinis Semen</i>	8.0
山藥	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	8.0
天門冬	<i>Asparagi Radix</i>	4.0
麥門冬	<i>Liriodis Tuber</i>	4.0
遠志	<i>Polygalae Radix</i>	4.0
石菖蒲	<i>Acori Gramineae Rhizoma</i>	4.0
酸棗仁	<i>Zizyphi Spinosae Semen</i>	4.0
龍眼肉	<i>Longanae Arillus</i>	4.0
柏子仁	<i>Biotae Semen</i>	4.0
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	4.0
蘿藦子	<i>Raphani Semen</i>	4.0
甘菊花	<i>Chrysanthemi Flus</i>	2.0
Total Amount		54.0

### 3) 試料製造

상기한 CSYJT 2첩 분량을 각각 3,000ml round flask에 증류수 2,000ml와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착시키고 2시간 동안 가열하여 여과한 여액을 rotary vacuum evaporator(Büchi B-461, Switzerland)에서 감압 농축하고, -84°C deep freezer(Sanyo, Japan)에서 24시간 동안 방치한 후 freeze dryer(Eyela, Japan)로 12시간을 동결 건조하여 14.5g의 분말을 얻어, 검액으로 제조하여 사용하였다. 실험시에는 증류수에 용해시켜 syringe filter(0.22 $\mu$ m, Falcon)로 여과하여 사용하였다.

### 4) 試藥 및 機器

시약은 RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), Minimum essential medium (MEM), sodium dodecyl sulfate(SDS), trypsin, EDTA, phorbol myristate acetate (PMA), A23187, red blood cell lysis buffer, penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, acetic acid, trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma 제품, ethanol, HCl은 Merck 제품, sodium bicarbonate는 Gibco 제품을 사용하였다. RNAzolB는 Tel- Test사 제품을, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 Takara(Japan)사 제품을, 역전 사효소(Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase: M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 promega사 제품을, 그리고 agarose는 FMC사 제품을 사용하였으며, 유세포분석에 사용된 antibody는 pharmingen (U.S.A.)사의 제품을 사용하였다.

기기는 CO2 incubator(vision scientific Co., Model VS-9108 MS), clean bench (vision scientific Co., KMC-14001), centrifuge (Beckman Co.,GS-6R), inverted microscope

(Nikon Co, Japan), bright microscope (UFX- DX, Nikon), imager system (Kodak, U.S.A.), microcentrifuge(한일과학), UV-Vis spectro- photometer (Shimadzu, Japan), Turbo Thermalcyler™ (Bioneer Co., Korea), ELISA-reader (Emax, U.S.A), FACScan (Becton dickinson, U.S.A.), rotary vacuum evaporator (Büchi 461), autoclave (Hirayama, Japan), micro-pipet (Gilson, U.S.A), titer plate shaker(labline Inst., U.S.A), autoclave (Hirayama, Japan), culture flask (Falcon 3024), multiwell plate(96-well, Falcon), conical tube, disposable pipet(5ml, 10 ml, 25ml, Falcon) 및 syringe filter (0.22  $\mu$ m, Falcon)등을 使用하였다.

## 2. 方法

### 1) 세포의 배양

Rat leukemia cell line RBL-2H3 세포를 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 MEM (Minimum Essential Medium)에 2.2g/L sodium bicarbonate, 10% Fetal bovine serum(FBS) 그리고 Antibiotic-Antimycotic (GibcoBRL, 15240-062)을 1%가 되게 첨가하여 bottle top filter를 사용하여 멸균하여 사용하였다.

RBL-2H3 cell은 100 mm dish와 T-75 flask에 seeding하여 5% CO<sub>2</sub>가 포함된 혼합가스로 채워진 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 1주에 2회씩 계대 배양을 하였다

### 2) IL-4 발현 분석을 위한 RT-PCR

#### (1) 약재의 처리

RBL-2H3 세포는 Trypsin-EDTA를 처리하여 배양용기에서 떼어 낸 후 1,500 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 세포를 수득하고, 배지 5 ml에 재 현탁 후 12 well plate에 8 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml로 분주하여 o/n 배양하

였다.

o/n 배양 후 CSYJT의 농도가 0, 100, 200, 300, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 처리하여 다시 o/n 배양한 후 1000 nM A23187과 50 nM PMA를 처리한 다음 4시간 후에 cells를 수득하였다.

### (2) Total RNA의 추출

배양종료 후 상층액을 제거한 후 RNAzolB를 이용하여 생쥐 B 세포막을 터트린 후 mRNA를 추출하는 방법을 택하였다. RNAzolB를 1/10양으로 chloroform을 넣은 후 15초간 vortex로 혼합하고 얼음에서 15분간 방치하였다. 고속원심분리기(4°C)로 15,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 동량의 iso-propanol과 혼합하고 천천히 흔들어서 주었다. 그리고 고속원심분리기로 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고, 1ml의 80% EtOH/DEPC D.W를 넣고 혼합한 후 15,000rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 다시 제거하고 speed-vac으로 건조시켰다. DEPC/D.W(0.05%)추출한 total RNA는 DEPC를 처리한 20 $\mu\text{l}$ 의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

### (3) 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

역전사(Reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 $\mu\text{g}$ 을 75°C에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이에 2.5 $\mu\text{l}$  10mM dNTPs mix, 1 $\mu\text{l}$  random sequence hexanucleotides (25pmole/25 $\mu\text{l}$ ), RNAinhibitor로서 1 $\mu\text{l}$  RNase inhibitor(20U/ $\mu\text{l}$ ), 1 $\mu\text{l}$  100mM DTT, 4.5 $\mu\text{l}$  5 $\times$ RT buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 $\mu\text{l}$ 의 M-MLV RT(200U/ $\mu\text{l}$ )를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 이 20 $\mu\text{l}$ 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 9

5°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

### (4) cDNA의 PCR증폭

PCR은 Primus 96 Legal PCR system을 이용하여 역전사-중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 $\mu\text{l}$ 의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 IL-4, GAPDH를 증폭하기 위하여 sense primer (10pmole/ $\mu\text{l}$ )와 antisense primer (10pmole/ $\mu\text{l}$ )를 혼합하여 1 $\mu\text{l}$ 를 가하고, 다시 3 $\mu\text{l}$  2.5mM dNTPs, 3 $\mu\text{l}$  10 $\times$ PCR buffer (100mM Tris- HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18 $\mu\text{l}$  Taq. polymerase(5U/ $\mu\text{l}$ )를 첨가한 다음 최종 부피가 30 $\mu\text{l}$ 가 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation(95°C, 5분), denaturation (95°C, 1분), annealing(55°C, 1분), elongation (72°C, 1분)을 30회한 뒤 post- elongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 $\mu\text{l}$ 씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다(Table II).

Table II. Oligonucleotide Sequences of Primers Used for Quantitative RT-PCR

Gene	Primer	Sequence
IL-4	sense	5'-ACCTTGCTGTCACCCGTGTC-3'
	antisense	5'-TTGTGAGCGTGGACTCATTG-3'
GAPDH	sense	5'-CTGACTTCAACAGCGACA-3'
	antisense	5'-ACATGACAAGGTGCGCG-3'

PCR product의 양은 Windows 1D main program을 이용하여 최고값 (height ; Ht)으로 측정하였다.

### 3) Mast cell activation 표면 IgE 발현 분석

#### (1) 복강mast cell의 분리

BALB/c 생쥐를 치사시킨 후 Tyrode 용액(NaCl 137mM, KCl 2.7mM, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4mM, NaHCO<sub>3</sub> 12mM, glucose 5.5mM BSA)을 복강 내에 주입하고, 90초간 복벽을 가볍게 마사지 한 후 복벽을 소절개하여 복강 세척액을 스포이드로 채취하여 3,000 r.p.m에서 5분간 원심분리하여 얻어진 peritoneal cells를 1ml의 Tyrode 용액에 부유시킨다. Peritoneal cells로부터 mast cell을 얻는 과정은 Yurt et al<sup>1)</sup>의 방법을 따랐다. Peritoneal cells를 부유시킨 Tyrode 용액 1ml를 0.225g/ml metriamide(density 1.120g/ml, Sigma) 2ml 표면 위에 loading하여 원심분리(400×g, 15min, RT)하였다. 버퍼와 metrizamide 사이에 있는 cells층을 잘 수거하여 Tyrode buffer로 2~3차례 세척한 후 1ml에 부유시켜 실험에 사용하였다.

#### (2) 생쥐 복강 mast cell에서 IgE 발현분석

생쥐 복강 비만 세포를 24 wells plate에 5×10<sup>5</sup> 세포/well로 분주하고 histamine-releasing-factor(HRF)(500ng/ml), PMA(100ng/ml) 그리고 CSYJT 추출물(10 μg/ml)을 가하여 72시간 배양하였다. 배양 후 비만 세포를 인산완충생리식염수로 2회 수세하였고, 4℃에서 면역형광염색을 실시하였다. 각각에 FITC-anti-mouse IgE를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기로 생쥐 복강 비만 세포에서 IgE 발현을 분석하였다.

#### 4) 생쥐 B 세포분리 및 배양

BALB/c 생쥐에서 비장을 분리하여 비장세포를 채취하여 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 이에 적혈구 용혈액 2ml을 넣고 37℃ 항온수조에 5분간 방치

하였다. 그 후 즉시 10ml의 D-PBS를 첨가하여 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 사용하였다. 분리한 비장세포에 J<sub>1</sub>J<sub>10</sub>, GK1.5.3, M1/70 배양 상층액(1ml/10<sup>8</sup>세포)을 처리한 후 얼음에서 30분간 반응시켰다(Table 1). 반응 후 2회 D-PBS로 수세하고 rabbit complement lyophilised 0.5ml을 처리한 후 37℃ 항온수조에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 5회 complete medium으로 수세하고 Sephadex G-10 column에 통과시켜 B 세포를 분리하였다. B 세포 함량을 측정하기 위하여 α-B220-FITC를 이용하여 유세포 형광분석기로 분석하였다(Fig. 1).

#### 5) IFN-γ, IL-4, IgE 생산량 측정

생쥐 B 세포를 분리하여 96 wells plate의 각 well에 2×10<sup>5</sup>세포씩 분주하고, CSYJT를 농도별로 처리하였고, 약물처리 1시간 후 HRF(500ng/ml), anti-CD40 mAb(500ng/ml)과 rmIL-4를 10일과 72시간 동안 동시 배양하였다. 그리고 rmIL-10을 처리하여 양성대조군으로 사용하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 ELISA에 사용하였다. IFN-γ, IL-4, IL-10 ELISA를 72시간, 그리고 IgE ELISA kit로 분비량은 10일 동안 배양 후 측정하였다. 각 항체를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4℃에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 B 세포 배양상층액을 100μl씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody avidin-HRP conjugated 100μl를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100μl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50μl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

### III. 成 績

1. PMA-A23187로 활성화시킨 RBL- 2H3 세포주에서 IL-4 발현 억제에 미치는 효과

다양한 농도의 CSYJT(400 $\mu$ g/ml, 300 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml)을 처리한 실험군의 IL-4 발현률이 대조군에 비하여 78, 88, 97, 98%로 농도에 따라 억제되었다(Table 1, Fig.1).

Table 1. Effects on the cells stimulated with PMA and A23187

농도	gene	IL-4(Ht)	GAPDH(Ht)	IL-4/GAPDH	% of control
Normal		58	120	0.48	29
Control (PMA/A23187)		189	115	1.64	100
C1		170	133	1.28	78
C2		183	127	1.44	88
C3		180	113	1.59	97
C4		190	119	1.60	98

C1 : 400 $\mu$ g/ml CSYJT+PMA-A23187  
 C2 : 300 $\mu$ g/ml CSYJT+PMA-A23187  
 C3 : 200 $\mu$ g/ml CSYJT+PMA-A23187  
 C4 : 100 $\mu$ g/ml CSYJT+PMA-A23187.

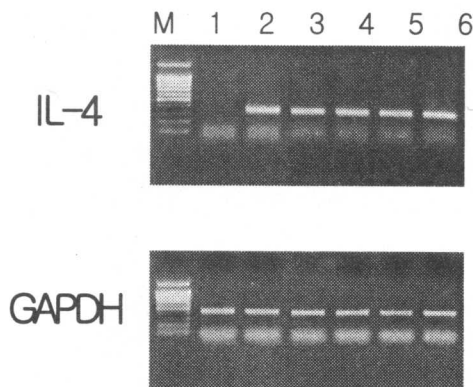


Fig.1 Effects of CSYJT on the cells stimulated with PMA and A23187

Cells were incubated overnight in the presence of various concentrations of CSYJT and were stimulated with PMA-A23187. Cells were harvested 4h later for assessment of IL-4 mRNA levels

Lane M ; 100bp ladder  
 lane 1 ; media control  
 lane 2 ; PMA-A23187  
 lane 3 ; 400 $\mu$ g/ml CSYJT+PMA-A23187  
 lane 4 ; 300 $\mu$ g/ml CSYJT+PMA-A23187  
 lane 5 ; 200 $\mu$ g/ml CSYJT+PMA-A23187  
 lane 6 ; 100 $\mu$ g/ml CSYJT+PMA-A23187.

2. CD40과 IL-4 및 HRF를 함께 처리한 B cell에서 IL-4 생성 억제에 미치는 효과

실험군 중 B cell 자극인자인 CD40과 IL-4 및 HRF를 함께 처리한 경우 아무 것도 처리하지 않은 음성 대조군에 비해 15배 가량 증가됨으로 B cell이 충분히 활성화되었음을 확인 할 수 있으며, 또한 IL-4 생산의 suppressor로 작용하는 IL-10과 처리 시 IL-4의 생산은 103.7 $\pm$ 7.54pg/ml로 현저히 감소하였다. 또한 본 실험에 사용한 CSYJT을 IL-10대신 사용하여 IL-10과 비교 하였을 때 농도에 따른 유의성 있는 억제 효과가 관찰되었다(Table 2)

Table 2. Inhibition effect of IL-4 production on splenic B cells that stimulated with anti-CD40mAb, and rIL-4

Group	CSYJT ( $\mu$ g/ml)	IL-4 production (pg/ml)
Normal (N)	0	21.3 $\pm$ 6.21 <sup>a)</sup>
Control (C)	0	330.2 $\pm$ 16.10
rIL-10 (r)	0	103.7 $\pm$ 7.54***
CSYJT1 (C1)	100	189.7 $\pm$ 6.55***
CSYJT2 (C2)	10	286.8 $\pm$ 13.10*

N : Non-treated group.  
 C : Anti-CD40 + rIL-4 + HRF treated group.  
 r : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + rIL-10 treated group.

C1 : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + CSYJT(100 $\mu$ g/ml) treated group.

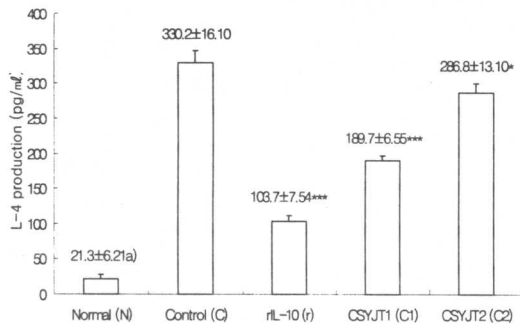
C2 : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + CSYJT(10 $\mu$ g/ml) treated group.

a) : Means $\pm$ standard error.

\* P-value : Statistically significant value compared with control data.

(\* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001).

Fig.2 Inhibition effect of IL-4 production on splenic B cells that stimulated with anti-CD40mAb, and rIL-4.



N : Non-treated group.

C : Anti-CD40 + rIL-4 + HRF treated group.

r : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + rIL-10 treated group.

C1 : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + CSYJT(100 $\mu$ g/ml) treated group.

C2 : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + CSYJT(10 $\mu$ g/ml) treated group.

a) : Means $\pm$ standard error.

\* P-value : Statistically significant value compared with control data.

(\* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001).

### 3. Mast cell 표면 IgE 발현에 미치는 영향

CSYJT이 mast cell surface IgE 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, CSYJT 10  $\mu$ g/ml 농도로 처리한 실험군의 IgE 발현이 대조군에 비해 감소하였음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

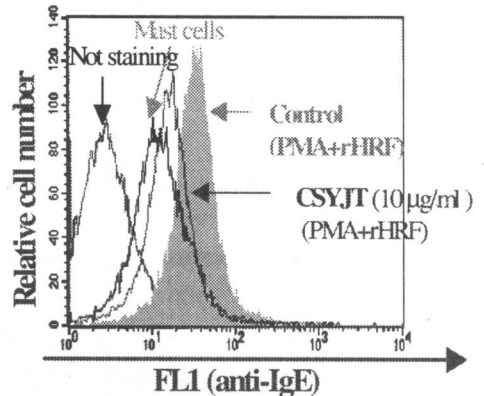


Fig. 3 Inhibitory effect on mast cell surface IgE expression

Mast cells from healthy BALB/c mice were either stimulated with PMA and recombinant HRF or treated with PMA and recombinant HRF plus CSYJT (10  $\mu$ g/ml). Binding of IgE on mouse mast cells for 24 h. After 24 h, the cells were harvested, and assayed for IgE expression by flow cytometry, and the other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

### 4. B cell의 IgE 생산에 미치는 효과

실험군 중 B cell 자극인자인 CD40과 IL-4 및 HRF를 함께 처리한 경우 아무 것도 처리하지 않은 陰性 대조군에 비해 4배 가량 증가됨으로써 B cell이 충분히 활성화 되었음을 확인 할 수 있으며, 또한 IgE 생산의 suppressor로 작용하는 IL-10과 처리시 IgE의 생산은 현저히 감소하였다. 또한 본 실험에 사용한 CSYJT을 IL-10과 비교하기 위하여 IL-10 대신 사용한 결과 농도에 따른 유의성 있는 억제 효과가 관찰되었다 (Table 3).

**Table 3. Inhibition effect of IgE production on splenic B cells that stimulated with anti-CD40mAb, and rIL-4**

Group	CSYJT ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	IgE production ( $\text{ng}/\text{ml}$ )
Normal (N)	0	11.5 $\pm$ 1.40 <sup>a)</sup>
Control (C)	0	49.9 $\pm$ 2.51
rIL-10 (r)	0	11.3 $\pm$ 1.30***
CSYJT1 (C1)	50	24.4 $\pm$ 2.55***
CSYJT2 (C2)	10	26.5 $\pm$ 1.29***

N : Non-treated group.

C : Anti-CD40 + rIL-4 + HRF treated group.

r : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + rIL-10 treated group.

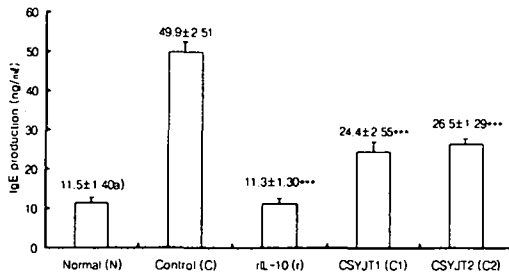
C1 : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + CSYJT(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) treated group.

C2 : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + CSYJT(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) treated group.

a) : Means $\pm$ standard error.

\* P-value : Statistically significant value compared with control data.

(\* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001).



**Fig. 4 Inhibition effect of IgE production on splenic B cells that stimulated with anti-CD40mAb, and rIL-4**

N : Non-treated group.

C : Anti-CD40 + rIL-4 + HRF treated group.

r : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + rIL-10 treated group.

C1 : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + CSYJT(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) treated group.

C2 : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + CSYJT(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) treated group.

a) : Means $\pm$ standard error.

\* P-value : Statistically significant value compared with control data.

(\* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001).

#### 5. B cell의 IFN- $\gamma$ 생산에 미치는 효과

지나친 B cell의 활성화를 억제하기 위한 cytokine으로 작용하는 IFN- $\gamma$ 의 생산 변화를 살펴보았다. 앞서 알아본 CSYJT에 의한 IgE나 IL-4의 억제 효과와는 다르게 IFN- $\gamma$ 는 증가되는 것을 관찰 할 수 있었다 (Table 4).

**Table 4. Effect on IFN- $\gamma$  production by HRF plus anti-CD40mAb plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells**

Group	CSYJT ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	IFN- $\gamma$ production ( $\text{ng}/\text{ml}$ )
Normal (N)	0	4.1 $\pm$ 0.42 <sup>a)</sup>
Control (C)	0	15.5 $\pm$ 2.31
rIL-10 (r)	0	8.7 $\pm$ 1.43
CSYJT1 (C1)	100	17.4 $\pm$ 2.25
CSYJT2 (C2)	10	15.2 $\pm$ 1.34

N : Non-treated group.

C : Anti-CD40 + rIL-4 + HRF treated group.

r : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + rIL-10 treated group.

C1 : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + CSYJT(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) treated group.

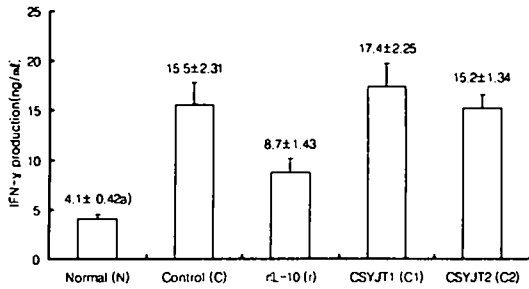
C2 : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + CSYJT(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) treated group.

a) : Means $\pm$ standard error.

**Fig. 5 Effect on IFN- $\gamma$  production by HRF plus anti-CD40mAb plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells**

N : Non-treated group.

C : Anti-CD40 + rIL-4 + HRF



treated group.

r : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + rIL-10 treated group.

C1 : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + CSYJT(100 $\mu$ g/ml) treated group.

C2 : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + CSYJT(10 $\mu$ g/ml) treated group.

a) : Means $\pm$ standard error.

#### IV. 考 察

Allergy라는 용어는 1906년 Clemens Von Pirquet에 의해 최초로 '이물질에 대한 신체의 잘못 변화된 능력'이라 하여 모든 면역학적 반응을 포함하는 극히 광범위한 정의였으나 최근에는 '다양하고 무해한 항원에 대한 면역계의 반응으로 발생하는 질병'과 같이 보다 제한된 의미로 정의되며, 종종 제 1형 과민반응(IgE에 의하여 매개되는 즉시형 과민반응)과 동일시된다<sup>1,15)</sup>.

Allergy 반응은 무해한 항원, 즉 allergen에 반응하여 생성된 IgE 항체를 지닌 개인이 계속하여 동일 allergen에 노출되었을 때 일어난다. Allergen은 이미 노출된 조직에 있는 IgE 결합 mast cell을 활성화시켜, allergy의 특징적인 반응들을 연속적으로 일

어나게 한다<sup>16,17)</sup>.

Allergy 반응은 면역 글로불린이 항원과 반응하여 방출하는 화학전달물질이나 T 세포에 의한 각종 화합물에 의해 혈관의 확장, 모세혈관의 투과성 항진, 평활근의 수축과 경련, 점액의 증가 및 점막의 부종과 염증 등이 유발되는 것으로 allergy성 기관지염, allergy성 기관지 천식, allergy성 비염 등의 질환을 일으키는데 특히 호흡기계에 심각한 영향을 주어 기침과 객담의 분비, 호흡곤란, 발열, 흉통, 흉민감, 천명 등을 일으킨다<sup>18,19)</sup>.

최근 allergy 연구가 세포의 염증 발현에 관여하는 세포와 분자수준의 기전에 초점이 맞추어지고 있다. 즉 세포단계의 염증 면역반응에서 각종 cytokine이 어떻게 관여하고 역할하고 있는지를 계속적으로 보고하고 있으며, 각종 치료 제제를 투여함으로써 그러한 mechanism에 변화를 초래하는 기전들을 구체적으로 제시하고 있다<sup>20)</sup>.

Allergy 질환에서의 염증반응은 IgE의 과도한 생성과 백혈구, 특히 호산구의 대량 유입으로 특징 지워진다. IgE를 발현시키는 B 세포의 분화는 세 가지 종류의 신호에 의한 다. 첫째로 B 세포의 항원 수용체를 통하여 이루어지는데 항원 특이적 반응을 결정하는데 중추적인 역할을 한다. 둘째는 Th2 세포에서 유래된 IL-4, IL-13 같은 cytokine에 의하여 제공된다. 셋째는 B 세포와 T 세포의 interaction에 의하여 제공된다<sup>2,19)</sup>.

Interleukin(IL)이란 항원과 반응하여 활성화된 림프구가 생성, 방출하는 물질로서 다른 세포에 작용하게 하는 활성물질이며 lymphokine으로 칭하기도 하며, macrophage가 생성하는 동일한 활성물질인 monokine은 monocyte의 억제작용물질을 의미하는데, 이 둘을 합하여 cytokine이라고 부른다<sup>19)</sup>. 이런 cytokine은 어떤 한 가지 항원에 특이적인 수의 림프구로 하여금 그 항원을 제거하는 다양한 실행기전을 활성화시키도록 하는 증폭기전을 제공하므로 cytokine의 과도한

생성 및 작용은 조직상해를 유발하거나 과사를 일으킬 수 있다. 그러므로 cytokine이나 저해제를 투여하는 것은 질병과 연관된 생물학적 반응을 변화시킬 잠재적인 접근 방법이 될 수 있다<sup>21,22)</sup>.

Th 세포는 cytokine을 분비하여 기도의 염증반응을 조절하는 중요한 역할을 하고 있다. Th 세포는 cytokine의 분비 양상에 따라 Th1, Th2 세포로 나뉘어 진다. Th1 세포는 주로 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ 를 생산하며 지연형 과민반응, 결핵균이나 바이러스에 대한 방어작용, 종양에 대한 숙주반응에 관여한다. Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며 즉시형 과민반응, 기관지 천식과 같은 allergy성 질환, 기생충 감염에 대한 방어작용에 관여 한다. Th1 세포와 Th2 세포는 서로 길항작용을 나타내어 기능이 억제되는 현상이 관찰되며 allergy성 기관지 천식 환자의 기관지 폐포 세척액에서는 Th2 세포의 기능이 활성화됨이 관찰되고 있다. 즉, 항원에 의한 IgE 생성에 필수적인 요소인 IL-4를 분비하는 Th2 세포는 naive CD4+ T 세포가 IL-4의 영향으로 allergen과 반응시 분화되고 이때 IgE 생성을 방해하는 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 Th1 세포는 그 발달이 저해된다<sup>21, 23, 24, 25)</sup>.

그러므로 IL-4의 생성이 억제 되면 Th2 세포의 분화가 억제되고 B 세포에 의한 IgE의 생성이 역시 억제되어 mast cell의 표면에 IgE 항체의 발현이 적어질 것이며, IFN- $\gamma$ 의 생산의 증가는 곧 Th1 세포의 발달을 촉진하여 Th0 세포가 Th2 세포로 분화되는 것을 저해시켜 알레르기 반응이 일어나지 않게 될 것으로 예상이 된다.

太陰人에게 나타나는 疾病의 特徵은 表病證인 氣液之氣의 中濕證과 裏病證인 燥熱證으로 나누어 볼 수 있다. 表病證인 氣液之氣의 中濕證은 發散潤燥補肺하는 治法을 사용하며 裏病證인 燥熱證은 清肝熱潤燥하는 治法을 사용한다. 太陰人의 病證은 表裏를 막론하고 呼吸

之氣를 保命之氣로 調節해야 한다.<sup>26)</sup>

太陰人의 特性상 肝燥熱의 病證이 發生하면 肺局에 影響을 미쳐 肺의 粘膜組織을 乾燥하게 하여 진드기의 배설물, 미세 먼지, 꽃가루 등의 이물질에 과민한 반응을 일으킬 가능성이 커지게 되어 allergy性 氣管支炎이나 allergy性 氣管支 喘息이 발생하게 된다.

清心蓮子湯은 《東醫壽世保元》<sup>14)</sup> 草本券에는 기술되어 있지 않지만 甲午本과 辛丑版本에 處方의 構成만 기록되었다가 후대 학자인 元<sup>6)</sup>의 《東醫四象新編》에 “治虛勞夢泄無度 腹痛泄瀉 舌卷中風 食滯 胸腹痛”이라 기록되어 있으며, 많은 醫書<sup>7-10)</sup>에서 清心蓮子湯을 太陰人의 虛勞와 中風, 心臟疾患, 神經性疾患, allergy性 鼻炎 등에 활용됨을 설명하고 있다.

清心蓮子湯의 構成과 效能을 살펴보면, 蓮子肉은 開肺之胃氣하고, 山藥은 壯肺而有內守하고, 天門冬은 開皮毛하고, 麥門冬은 補肺和肺하고, 遠志는 醒肺之眞氣하고, 石菖蒲는 錯綜肺氣 하고, 酸棗仁은 安神定意하고, 龍眼肉은 開皮毛, 栝子仁은 補心益氣하고, 黃芩은 收斂肺元하고, 萊菔子是 喘欬下氣하고, 甘菊은 開皮毛하여, 補肺和肺, 壯肺, 收斂肺元, 安神補心<sup>14)</sup> 등으로 肺元을 補하고 和하는 藥物과 心神을 安定시키는 藥物로 構成된 處方으로 allergy性 氣管支炎, allergy性 氣管支 喘息에 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

清心蓮子湯에 대한 다양한 연구<sup>11-13)</sup>가 있어 왔으나, 清心蓮子湯의 抗allergy 效과의 分子免疫學的인 機轉에 대한 實驗的 研究는 아직 접해보지 못했다.

이에 저자는 清心蓮子湯의 抗allergy에 대한 效能을 實驗的으로 糾明하기 위해 B 세포에서 IL-4의 유전자발현과 IL-4, IgE의 생성 및 mast cell에서 IgE 발현, IFN- $\gamma$  생성에 미치는 효과 등을 측정하였다.

清心蓮子湯의 抗allergy 效과를 측정하기 위해, 清心蓮子湯을 투여한 실험군과 IL-10을 투여한 양성 대조군과 아무것도 투여하지

않은 대조군을 만들어 IL-4, IgE의 생성과 발현에 대한 실험과 IFN- $\gamma$ 의 생성에 대한 비교 실험을 수행하였다. 실험 결과와 의의는 다음과 같다.

淸心蓮子湯의 효능을 비교하기 위한 양성대조군은 IL-10을 이용하여 만들었다. 양성대조군으로 쓰인 IL-10은 분자량이 36kDa인 homodimeric cytokine(동종이량체 cytokine)으로 활성화된 대식세포 및 림프구에서 분비되며 cytokine synthesis inhibitory factor(cytokine 합성 억제인자)로 알려져 왔다. Th1 세포에서의 IFN- $\gamma$ , IL-2의 생성을 억제하고 단핵식세포에서 IL-1, IL-6, IL-8 등의 염증성 cytokine 생성을 억제할 뿐 아니라 Th2 세포에서의 IL-4, IL-5, IL-13 분비를 억제시키기 때문에 allergy성 염증반응을 방해하기도 한다.<sup>18,27,28</sup> 또한 호산구에 대한 apoptosis를 유도하고 IgE 항체 형성을 억제한다. 실제로 천식 환자에 있어서는 IL-10의 합성이 감소하는 경향을 보이며<sup>29,30</sup>, 이와 대조적으로 천식의 치료제인 corticosteroid 흡입 시 IL-10은 증가한다. 이러한 IL-10의 면역 억제 및 항염증 효과를 감안한다면 allergy 질환의 치료에 유용할 것이라는 예상이 가능해진다. 실제로 murine model 내에서 재조합된 IL-10의 비강 내 투여로 염증을 억제하는 효과를 얻은 것으로 보고 되었다<sup>29,31</sup>. 이에 따라 淸心蓮子湯의 효능을 비교 측정하기 위한 양성 대조군을 만들기 위해 IL-10을 사용했다.

PMA-A23187로 활성화시킨 RBL-2H3 세포주에서 淸心蓮子湯이 IL-4 발현 억제에 미치는 효과와 CD40과 IL-4 및 HRF를 함께 처리한 B cell에서 淸心蓮子湯이 IL-4 생성 억제에 미치는 효과를 측정하였다.

IL-4는 여러 종류의 세포에 다양한 기능을 나타내는 분자량 20kD의 cytokine이다. 활성화된 CD4+ T 세포가 주된 IL-4 생성 세포이나 활성화된 mast cell도 생성한다. 또한 IL-4는 T 세포와 mast cell의 증식을 촉

진하며 대식세포의 식작용을 항진시킨다. IgE는 제 I 형 과민면역반응을 일으키는 중요한 인자이므로 IL-4 생산의 항진은 allergy 반응에 중요한 역할을 하게 된다. IL-4는 T 세포에 대해서도 작용을 하며 항원과 반응한 T 세포의 증식을 보조하기도 한다<sup>18</sup>.

PMA-A23187로 활성화시킨 RBL-2H3 세포주에서 淸心蓮子湯이 IL-4 발현 억제에 미치는 효과에서 다양한 농도의 淸心蓮子湯(400 $\mu$ g/ml, 300 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml)을 처리한 실험군의 IL-4 발현률이 대조군에 비하여 78, 88, 97, 98%로 농도에 따라 억제되었다(Table 1, Fig.1). CD40과 IL-4 및 HRF를 함께 처리한 생쥐 비강의 B cell에서 淸心蓮子湯이 IL-4 생성 억제에 미치는 효과에서 실험군 중 B cell 자극 인자인 CD40과 IL-4 및 HRF를 함께 처리한 경우 아무 것도 처리하지 않은 음성 대조군에 비해 15배가량 증가됨으로 B cell이 충분히 활성화되었음을 확인 할 수 있으며, 또한 IL-4 생산의 suppressor로 작용하는 IL-10과 처리 시 IL-4의 생산은 103.7 $\pm$ 7.54pg/ml로 현저히 감소하였다. 또한 본 실험에 사용한 淸心蓮子湯을 IL-10대신 사용하여 IL-10과 비교 하였을 때 농도에 따른 유의성 있는 억제 효과가 관찰되었다(Table 2)

淸心蓮子湯이 B cell의 IgE 생산에 미치는 효과와 mast cell 표면에서 IgE 발현에 미치는 영향을 측정하였다.

IgE 항체가 제 I 형 과민반응의 중심 역할을 한다. IgE가 결합하는 Fc 수용체(Fc $\epsilon$ R)는 여러 세포에서 발현되는데 주로 mast cell, 호흡기에서 현저하다. 이들 세포의 Fc $\epsilon$ R에 IgE가 결합된 다음에 항원이 결합되면 활성화, 탈과립을 거쳐 과민반응 매개 인자를 분비한다<sup>17,18</sup>.

Mast cell 표면에 IgE가 결합되어 있는 상태에서 allergen이 교차결합하게 되면 탈과립화가 발생하며, 다양한 종류의 염증성 매개물질들이 분비된다. Histamine은 대표적

인 매개물질로서 국소적인 혈류량과 혈관투과성을 즉시 증가시키며, 조직의 세포간질을 깨뜨려서 조직을 파괴시키고, 평활근을 수축시키고, 혈관투과성과 점액 분비를 증가시키며, 백혈구의 유입과 활성화를 유도한다. Allergy에서 mast cell의 활성화에 의해서 유발되는 급성 그리고 만성 염증반응은 환경 항원에 대한 allergy 반응과 관련된 질병들에서 보는 것처럼 중요한 병리생리학적 결과를 가져올 수 있다<sup>1)</sup>.

Histamine은 즉시형 allergy 반응을 주도하며 mast cell과 basophil에서 유래하는 cytokine이다. Histamine은 혈관투과성을 증대시키며 평활근을 수축시켜 allergy를 일으키는 작용을 한다. Histamine을 피부에 주사하면 allergy 반응이 일어날 수 있는데, 이것은 histamine이 평활근을 수축시키고 혈관의 투과성을 높이는 작용이 있기 때문이다. 이 평활근은 내장 이외에 기관이나 기관지, 피부의 입모근에도 있다. 따라서 기관지에서 histamine이 작용하면 기관지벽이 붓고 분비물도 증가되어 더욱 더 기관지가 좁아지게 되고 평활근이 수축되어서 천식 발작 등이 일어나는 것이다<sup>32)</sup>. B cell의 IgE 생산과 mast cell 표면 IgE 발현이 억제 되면 histamine의 분비도 감소할 것으로 예상된다.

淸心蓮子湯이 B cell의 IgE 생산과 mast cell 표면 IgE 발현에 미치는 효과를 알아본 결과, 淸心蓮子湯이 B cell의 IgE 생산에 미치는 효과는 IL-10과 비교하여 농도에 따른 유의성 있는 억제 효과가 관찰되었다(Table 3). 淸心蓮子湯을 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한

실험군의 IgE 발현이 대조군에 비해 감소하였음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

淸心蓮子湯이 B cell의 IFN- $\gamma$  생산에 미치는 효과를 측정하였다.

IFN- $\gamma$ 는 세포매개 Th1 면역반응의 유도에서 결정적 매개 인자로 작용하고 B 세포의 분화와 증식을 억제하는데 Th1과 Th2 분화의 주요 조절 인자이다. 따라서 IL-4 작용과 길항작용을 보여 IL-4에 의한 IgE 생성을 억제한다<sup>33)</sup>. IFN- $\gamma$ 의 생성을 증가시키면 TH2 세포의 분화를 억제하여 IL-4의 생성이 억제되고 따라서 B 세포의 IgE 생성이 함께 억제된다<sup>1)</sup>.

淸心蓮子湯이 B cell의 IFN- $\gamma$  생산에 미치는 효과를 측정한 결과, 대조군에 비해 IL-10 처리군과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 淸心蓮子湯 투여군 모두 IFN- $\gamma$  발현이 증가되었다(Table 4).

이상의 결과를 종합해 보면, 淸心蓮子湯은 생쥐 비장 B 세포와 복부 mast cell의 유전자 수준과 세포 분자수준에서 IL-4의 발현을 억제하고, IFN- $\gamma$ 의 발현을 증가시켜 B 세포의 IgE 합성 억제와 mast cell에서의 histamine의 생산을 저해함으로써 염증 매개물질의 분비를 저해하여, 기도 점막의 과증식과 이상분비물 증가를 감소시키는 抗allergy 효과를 갖는 것으로 사료된다.

따라서 淸心蓮子湯은 allergy性 氣管支炎, allergy性 氣管支 喘息 등의 질환에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 지속적인 관련 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

清心蓮子湯의 抗allergy 작용을 규명하기 위하여, IL-4 生成과 發顯 抑制에 미치는 效果와 IgE 生成과 發顯에 미치는 影響 및 IFN- $\gamma$ 의 分泌 등을 觀察한 바, 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 清心蓮子湯은 IL-4 발현을 유의성 있게 억제하였다.
2. 清心蓮子湯은 IL-4 분비를 유의성 있게 억제하였다.
3. 清心蓮子湯은 IgE 발현을 유의성 있게 감소시켰다.
4. 清心蓮子湯은 IgE 분비를 유의성 있게 감소시켰다.
5. 清心蓮子湯은 IFN- $\gamma$ 의 분비를 증가시켰다.

以上の 結果로 보아 清心蓮子湯은 抗allergy 效果가 認定되며 앞으로 이에 대한 持續的인 研究가 必要하리라 思料된다.

## VI. 參考文獻

1. 김태규 외 10인 역 : 면역생물학 5판, 서울, 라이프사이언스, pp.493~524, 2002.
2. 金周德, 金聖光 역 : 免疫學入門, 서울, 醫齒學社, pp.47~81, 1983.
3. 洪元植 : 黃帝內經校釋, 서울, 고문사, p.236, 358, 1974.
4. 巢元方 : 諸病源候論校釋, 북경, 인민위생출판사, pp.18~20, 170~172, 1983.
5. 朴性植 외 : 太陰人 葛根解肌湯과 元持常의 葛根解肌湯이 免疫反應에 미치는 影響, 四象醫學會誌 9(1), pp.315~337,

- 1997.
6. 元持常 : 東醫四象新編, 서울, 文友社, 太陰人要藥, 劑方 p.2, 1929.
7. 李泰浩 : 東醫四象診療醫典, 서울, 행림출판, p187, 1978.
8. 朴寅相 : 改訂版 東醫四象要訣, 서울, 소나무, p.155, 1997.
9. 李廷燦 : 新四象醫學論, 서울, 목과도, pp.264~265, 2001.
10. 韓東錫 : 東醫壽世保元註釋, 서울, 성리회출판사, pp.300~302, 1967.
11. 朴性植 : 清心蓮子湯의 效能과 活用に 대한 臨床的 研究, 四象醫學會誌, 10(1), pp.235~252, 1998.
12. 洪錫喆, 高炳熙, 宋一炳 : 太陰人 清心蓮子湯의 抗스트레스 效果에 관한 實驗的 研究, 四象醫學會誌, 7(2), pp.227~240, 1995.
13. 金達來, 高炳熙, 宋一炳 : 太陰人 清心蓮子湯과 淸肺瀉肝湯의 免疫反應과 抗알레르기 效果에 관한 實驗的 研究, 慶熙韓醫大論文集, 14(2), pp.131~160, 1991.
14. 崔炳一 : 李濟馬 遺作 文獻集, 서울, 파란들, p.170, pp.7~182, 235~237, 2002.
15. 김하원 : 면역학사전, 서울, 서울시립대학교 출판부, p13, 2001.
16. 서울대학교의과대학 : 면역학, 서울, 서울대출판부, pp.123~141, 1987.
17. 이연태 : 최신면역학, 서울, 집문당, pp.26~35, 367~388, 1985.
18. 김세종 : IMMUNOLOGY, 서울, 고려의학, p.1, 65, pp.154~156, 260~265, 2000.
19. 文希柱 : 免疫血清學, 서울, 대학서림, pp.67~74, 1988.
20. 윤형구, 신윤, 이상학 외 : 알레르기성 천식환자에 있어서 투베르쿨린 피부반응 검사와 Cytokine의 변화, 결핵 및 호흡기질환, 46(2), pp.175~184, 1999.

21. Abbas AK, Lichman AH, Pober JS : Cellular and molecular immunology, Philadelphia, Saunders, pp.250-277, 1997.
22. Palma Carlos AG, Palma Carlos ML, Conceicao SM, Alcinda M : Cytokines and asthma, J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 7(5), pp.270~273, 1997.
23. 조상헌, 송숙희, 김윤근, 지영구, 최동철, 윤호주등. 아토피 환자에서의 IgE항체 생성조절기전 : 말초혈액림프구의 IL-4, IFN- $\gamma$  생성의 불균형. 알레르기, 15(2), pp.210-212, 1995.
24. 어수택, 정성환, 이상우, 김현태, 김용훈, 박춘식 : 천식환자의 기도내 cytokines 표현에 대한 연구, 결핵 및 호흡기질환, 42(1), pp.2~3, 1995.
25. 박수영, 조영주 : 내인성 천식 및 외인성 천식환자의 CD8 양성세포에서 nterlukin-4 및 interferon gamma 생산, 천식 및 알레르기, 21(1), pp.66~67, 2001.
26. 宋一炳 : 誠泉 宋一炳 教授 華甲紀念論文集, 서울, 誠泉 宋一炳 教授 華甲紀念論文集 刊行委員會, p.451~463, 2000.
27. Roitt IM : Essential immunology, Chicago, Blackwell, pp.193~199, 1988.
28. 이숙영, 윤형규, 신윤 외 : 기관지천식에 서 기관지폐포 세척액내 IL-10과 기도염증정도의 연관성, 결핵 및 호흡기질환, 46(1), pp.44~52, 1999.
29. 차은수, 정희재, 정승기, 이형구 : 소청룡탕이 Asthma model 내의 cytokine 에 미치는 영향, 경희한의대논문집, 23(1), pp.71~88, 2000.
30. Barnes PJ, Lim S : Inhibitory cytokines in asthma, Mol. Med. Today, 4(10):452~458, 1998.
31. Zuany-Amorim C, Haile S, Leduc D et al. : IL-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice, J. Clin. Invest., 95:2644~2651, 1995.
32. 鄭奎萬 : 알레르기와 韓方, 서울, 第一路, p.15, 31, 1990.
33. O'Neil D, Swanton C, Jones A, Medd PG, Rayment N, Chain B : IFN-gamma down-regulates MHC expression and antigen processing in a human B cell line J Immunol. 162(2):791~798, 1999.