

三子養親湯 물抽出物이 마우스 Th1/Th2 분화 및 알레르기 염증 반응 조절에 미치는 효과

박종수 · 강 희 · 명유진 · 박성민 · 심범상 · 김성훈 · 최승훈 · 안규석*

경희대학교 한의과대학 병리학교실

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

Joung Su Park, Hee Kang, Eu Gene Myung, Sung Min Park, Bum Sang Shim, Sung Hun Kim, Seung Hoon Choi, Kyoo Seok Ahn*

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

This study was to evaluate the effect of Samjyangchin-tang (STYCT) 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 STYCT 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 STYCT 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 STYCT extract, it decreased proliferation of CD4 cells. CD4 T cells under Th1/Th2 polarizing conditions for 3 days with STYCT resulted in mild decrease of IFN- γ in Th1 cells and significant decrease of IL-4 in Th2 cells. STYCT extract had a dose-dependent inhibitory effect on antigen-induced release of β -hexosaminidase in RBL-2H3 cells. Treatment of STYCT extract on LPS stimulated Raw 264.7 cells showed dose-dependent decrease in IL-6 production. Oral administration of STYCT extract on OVA-induced allergic mice showed an inhibitory effect on the levels of total serum IgE and OVA-specific IgE by 53% and 44%, respectively. Culture of spleen cells with OVA resulted in significant increase of IFN- γ by 54% and significant decrease of IL-4 and IL-5 by 42%, and 29%, respectively. The results show that STYCT 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 : STYCT, Th1/Th2, IL-4, IFN- γ , allergy

서 론

알레르기 질환이란 알레르기 鼻炎, 알레르기 結膜炎, 알레르기 喘息, 아토피 皮膚炎을 일컫는데 선진국의 경우 최고 30%의 소아들이 이러한 증상을 겪는 것으로 보고되었다¹⁾.

알레르기 질환은 최근 들어 급증하고 있으며, 도시의 발병률이 더 높고 경제적 수준이 높은 가정에서 발병률이 높기 때문에 도시생활과 관련된 환경적인 영향과 매우 밀접한 연관이 있다고 보고 있다²⁾.

현재 흔히 사용되는 알레르기 질환의 치료법은 증상을 관리하는 것에 국한되어 항히스타민제, leukotriene receptor拮抗제, 또는 스테로이드 제제에 의존하는 설정이다³⁾. 이러한 약물은 알레르기의 effector 단계에 유리되는 chemical mediator를 억제하여 바로 증상을 완화할 수 있지만, 염증세포들의 초기 단계보다

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

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

· 접수 : 2006/04/18 · 수정 : 2006/05/29 · 채택 : 2006/06/12

는 진행단계를 차단하는 작용만을 가지기 때문에 항원에 감작되거나 Th2 cell로 분화하는 단계를 차단하는 약물의 개발이 더 근본적인 것이라 할 수 있다.

최근 韓藥을 통하여 알레르기질환을 치료하려는 많은 연구가 이루어지고 있으며, 실험적으로도 그 효과가 증명이 되고 있다. 피부염과 혈청내 IgE level에 미치는 補中益氣湯의 효과⁴⁾, 항알레르기 효과에 있어서 Th2의 분화에 미치는 小青龍湯 연구⁵⁾, cytokine 조절작용에 대한 加味治哮散의 영향⁶⁾, 奴哮飲이 알레르기 반응과 폐손상에 미치는 영향⁷⁾, 알레르기喘息에 대한 加味解表二陳湯의 효과⁸⁾, 十全大補湯이 알레르기 반응에 미치는 영향⁹⁾, 면역반응에 미치는 加味清鼻飲¹⁰⁾의 효과, 加味生料四物湯의 항염증 효과¹¹⁾ 등이 그 예이다.

三子養親湯은 명나라 韓懋의 저서인 <韓氏醫通>에 소개된 처방으로 蘇子, 蘿蔞子, 白芥子로 구성되어 順氣降逆 消食化痰하는 효능으로 咳嗽喘逆 痰多胸悶 食少難消한 증상을 치료하는 처방이다. 노인의 食少痰多 咳嗽喘逆 등을 치료하기 위하여 입방되었으며 만성 기관지염, 기관지천식, 폐기종 등의 痰氣不利로 나타나는 咳嗽喘逆 증상에 三子養親湯을 가감하여 응용하고 있다¹²⁾. 본 연구에서는 三子養親湯의 T cell에 대한 면역조절과 항알레르기 효과를 알아보기 위해 마우스의 spleen에서 CD4⁺ T cell을 분리하여 Th1 cell과 Th2 cell로 분화시켜 이것을 조절하는 능력을 측정하였고, RBL-2H3 cell과 Raw 264.7 cell을 이용하여 항염증 효과를 확인하였으며 아울러 마우스에게 三子養親湯을 경구 투여하여 ovalbumin으로 알레르기염증을 유발하였을 때 혈청의 IgE와 cytokine 변화를 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

三子養親湯(Samjayangchin-Tang; SJYCT)의 구성약물과 용량은 《方藥合編》에 준하였으며(Table 1) 이들 약물은 경희의료원 약제과에서 구입하였다.

Table 1. The Composition of Samjayanchin-Tang

Herbal name	Chinese name	Amount
Sinapis albae Semen	白芥子	3.75 g
Perillae Fructus	蘇子	3.75 g
Raphani Semen	蘿蔞子	3.75 g
Total amount		11.25g

2) 세포주

사용된 세포주는 Rat basophilic leukemia-2H3(RBL-2H3) cell line과 Raw264.7 macrophage cell line이며 한국세포주은행에서 분양받았다.

3) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 생후 8주된 BALB/c 수컷 마우스이며 무균상태로 관리되어 온 것을 오리엔트(주)에서 구입하였다. 실험동물은 12시간 낮 12시간 밤의 생활리듬을 주었으며

항온 환습 상태에서 일주일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 飼料는 방사선 멀균처리한 실험동물용 사료를 정도산업(주)에서 구입하여 공급하였으며, 飲用水는 멀균처리한 종류수를 사용하였다. 사료와 음용수는 충분히 공급하여 자유롭게 섭취시켰다.

4) 배지 및 시약

Fetal bovine serum (FBS), ovalbumin (OVA; grade V), recombinant interleukin-2 (rIL-2), anti-dinitrophenol (DNP)-IgE, DNP-human serum albumin (HSA)과 bovine serum albumin (BSA)는 Sigma에서 구입하였으며 antibiotic-antimycotic와 RPMI 1640, DMEM은 Invitrogen Life Technology에서 구입하였다. Magnetic cell sorting CD4 (L3T4) microbeads는 Miltenyi Biotec (U.S.A.)에서 구입하였다. Anti-CD3e, anti-CD28, anti-mouse IL-4, anti-mouse IL-12, rIL-4, rIL-12와 IL-4, IL-5, IFN- γ 및 total IgE의 ELISA 측정에 사용된 OPT EIA set는 BD Pharmingen에서 구입하였으며 IL-6의 ELISA 측정에 사용된 DuoSet는 R&D Systems (U.S.A)에서 구입하였고 Biotin N hydroxysuccinimide ester-Water Soluble (BNHSws)는 Vector Laboratories에서 구입하였다.

2. 방법

1) 약재 추출물 제조

三子養親湯 구성약물을 유리로 된 추출용기에 넣고 물에 잠기도록 충분히 넣어 각각 하루 동안 상온에 水浸한 다음 50 °C에서 한 시간씩 2회 초음파세척기로 물리적 자극을 가하여 시료의 용해를 촉진하였다. 이 용액을 여과자로 여과한 다음 rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan)로 감압 농축한 뒤 1000 ml round flask에 옮겨 freezing dryer (Eyela, Japan)로 24시간 동안 동결건조하여 건조된 분말을 실험에 사용하였다 (yield: 1.62 %).

2) 脾臍세포 부유액의 준비

비장을 생쥐로부터 적출하여 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic이 함유된 RPMI-1640으로 세척하였다. Micro slide glass로 spleen을 잘게 으깬 뒤 0.40 μm nylon cell strainer로 여과하였다. 1000 rpm, 10분간 원심분리한 후 RBC lysis buffer로 적혈구를 파괴하였다. 2회 원심분리한 후 비장 세포를 trypan blue exclusion assay를 통해 생존률을 확인한 후 cell 수를 측정하였다.

3) CD4⁺ T cell의 분리

비장임파구를 1×10^7 cells/ $90 \mu\text{l}$ 의 농도에 $10 \mu\text{l}$ 의 MACS CD4 (L3T4) microbeads를 첨가하여 15분간 4 °C에 incubation하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 나서 $500 \mu\text{l}$ 의 배지에 cell pellet을 resuspension하였다. Positive selection column을 MACS separator (Miltenyi Biotec, U.S.A.)에 삽입한 후 cell suspension을 column 안으로 통과시켰다. Column 안에 부착된 CD4⁺ T cell은 plunger로 elution하여 분리하였다.

4) 增殖率 测定

비장의 CD4⁺ T cell을 mitogen으로 자극받았을 때의 증식능을 측정하기 위해 CellTiter 96 TM non-radioactive cell proliferation assay (Promega, U.S.A.)의 protocol에 준하여 4×10^5 cells/ $200 \mu\text{l}$ 의 농도로 anti-CD3e ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)가 coating된 96-well

plate에 seeding하였다. 여기에 anti-CD28 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 넣고 co-stimulation하였다. 三子養親湯 물 추출물을 0, 1, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 48시간 37 °C, 5% CO₂ incubator에 배양한 후 cell titer 96R aqueous one solution reagent를 첨가하였다. Formazon product는 microplate reader (Tecan, Austria)를 이용하여 optical density 490-650 nm에서 비색 측정하였다.

5) In vitro Th1/Th2 polarization

Anti-CD3e ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)가 coating된 12-well plate에 $1 \times 10^6 \text{ cells}/\text{ml}$ 의 농도로 CD4⁺T cell을 seeding하고 anti-CD28 및 rIL-2 ($5 \text{ ng}/\text{ml}$)을 첨가하였다. Th1 polarizing condition을 만들기 위해에서는 rIL-12 ($5 \text{ ng}/\text{ml}$)과 anti-IL-4 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 넣었으며 Th2 polarizing condition을 위해에서는 rIL-4 ($5 \text{ ng}/\text{ml}$)과 anti-IL-12 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 추가한 후 3일간 배양하였다.

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

RBL-2H3 cell $5 \times 10^5 \text{ cells}/\text{ml}$ 를 24-well plate에 seeding한 후 mouse monoclonal DNP-specific IgE ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 3시간 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 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하고 동시에 三子養親湯 물 추출물을 넣고 37 °C에서 한 시간 배양하였다. 전체 β -hexosaminidase 양을 측정하기 위해선 1% Triton X-100으로 lysis하였다. 상등액을 원심분리한 후 96-well plate에 상등액 0.05 ml과 citrate buffer (0.1 M, pH 4.5)에 녹인 1 mM p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide 0.05 ml를 37 °C에서 1시간 반응시켰다. 0.2 M glycine 0.2 ml을 첨가하여 반응을 정지한 후 microplate reader 405 nm에서 比色 측정하였다.

7) Raw264.7 macrophage cell에서의 炎症 cytokine 측정

염증반응과 관련한 三子養親湯의 효과를 알아보기 위해 Raw 264.7 macrophage cell을 사용하였다. Raw 264.7 macrophage cell을 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic이 함유된 DMEM으로 배양한 후 24-well plate에 2×10^5 의 세포를 seeding하였다. 12시간 배양후 세로운 배양액에 三子養親湯 물 추출물을 농도별로 가하고 동시에 lipopolysaccharide $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가하였다. 18시간이 지난 후에 상층액을 수거하여 -20 °C에 보관하였다.

8) 三子養親湯 경구 투여 및 알레르기성 鼻炎 유발

三子養親湯 물 추출물은 phosphate buffered-saline (PBS)에 1 mg/g의 농도로 마우스에 4주간 일주일에 세 번씩 경구투여하였다. 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 鼻腔에 OVA 용액을 20 μl 씩 점적하였다. 28일째에 마우스를 마취시킨 후 심장에서 혈액을 채혈한 후 응고시켰다. 이것을 원심분리하여 혈청을 채취한 후 -20 °C에 보관하였다. 채혈 후 마우스에서 비장조직을 떼어 비장세포 부유액을 만들었다.

9) OVA로 脾臟세포 배양

알레르기를 유발한 마우스의 비장세포를 24-well plate에 $5 \times 10^6 \text{ cells}/\text{ml}$ 로 seeding한 후 OVA $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 과 함께 72시간 37 °C, 5% CO₂ incubator에 배양하였다. Cell harvest를 한 후 상층액을 원심분리 하여 -20 °C에 보관하였다.

10) ELISA 측정

96-well plate의 각 well에 capture antibody를 4 °C에서 overnight으로 coating하였다. OVA-specific IgE를 위해서는 capture IgE antibody ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 well에 coating하였다. 10% FBS가 함유된 PBS를 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 넣고 1시간 상온에 둔 채 blocking 하였다. 3회 washing하여 blocking buffer를 완전히 제거한 후 standard IgE, standard cytokine과 샘플을 적당량 희석하여 100 μl 씩 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 μl 씩 분주한 후 1시간 상온에 두었다. Biotinylated OVA는 BNHSws과 OVA를 혼합한 후 투석하여 제조한 후 사용하였다. 7회 washing후 TMB substrate reagent 100 μl 를 가한 후 30분이 지나서 1M H₂SO₄ 50 μl 를 첨가하였다. Microplate reader (Tecan, Austria)로 파장 450-570 nm에서 비색 측정하였다.

11) 통계분석

실험결과는 평균값으로 표시하였으며 SPSS 11.0을 이용하여 Student's t-test로 처리하였다.

실험성적

1. 三子養親湯 물抽出物이 CD4⁺T cell의 증식에 미치는 效果

三子養親湯 물 추출물을 농도별로 넣고 마우스 CD4⁺T cell을 anti-CD3 및 anti-CD28로 48시간 자극한 결과 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약재를 넣지 않은 세포보다 약 14%의 증가율을 보여주었다. 그러나 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이상부터는 CD4⁺T cell 증식을 억제하는 경향이 나타났으며 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 약 45%의 억제율을 보여주었으며 통계적으로 유의성이 있었다(Fig. 1). (p=0.006).

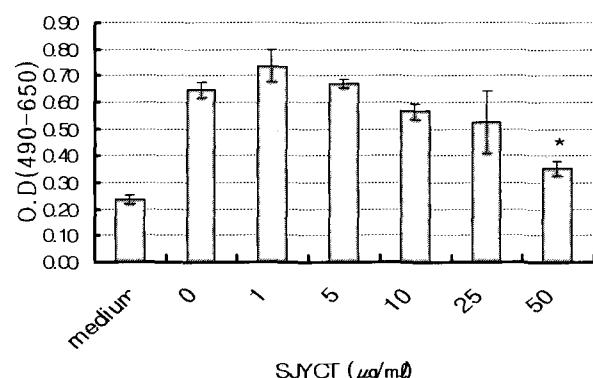


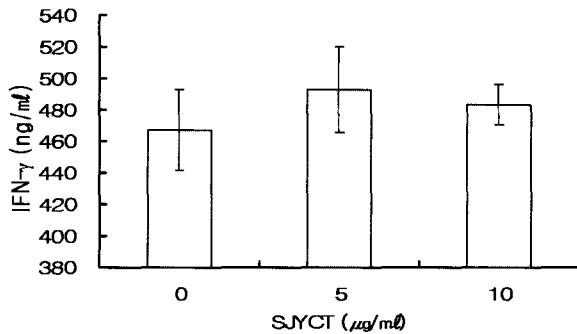
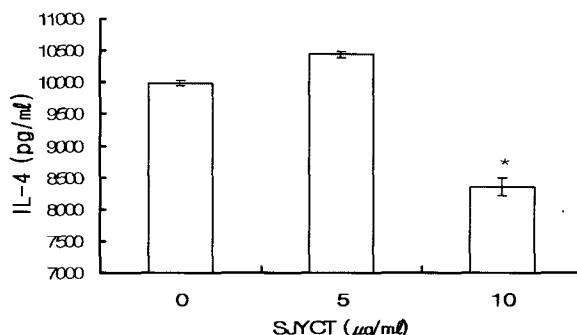
Fig. 1. Proliferation of CD4⁺T cells in medium containing various concentrations of Samjyangchin-Tang (SJYCT) extract after 48 hours incubation. Sorted CD4⁺T cells were stimulated with anti-CD3e/anti-CD28 antibodies for 48hours. Cell proliferation was quantified by the ability to reduce the tetrazolium dye MTS. Data are expressed as means \pm S.D. of O.D.(optical density). *: p <0.05

2. 三子養親湯 물 추출물이 마우스 Th1/Th2 분화에 미치는 影響
마우스 CD4⁺T cell을 Th1 cell과 Th2 cell로 polarization한 후 3일간 배양하여 그 상층액의 IFN- γ 과 IL-4를 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. Th1 cell의 경우 三子養親湯 물 추출물을 처리했을 때 IFN- γ 의 양에 약간의 증가가 보였으나 통계적으로 유의성이 있지는 않았다. 그러나 Th2 cell에서는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 IL-4 값이 유의성 있게 감소하였다(Table 2, Fig. 2, 3).

Table 2. Cytokine Levels of Mouse Th1/Th2 Cells.

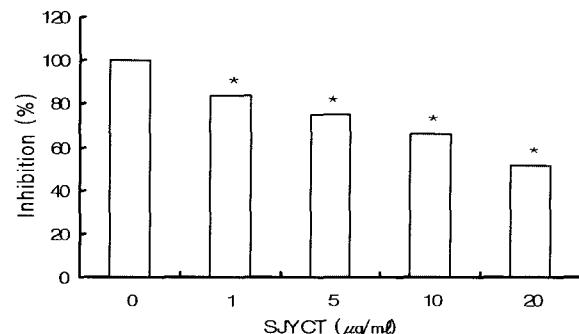
SJYCT ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	IFN- γ (ng/ml)	IL-4 (pg/ml)
0	467.40 ± 25.71	9993.00 ± 537.95
5	492.80 ± 27.55	10435.84 ± 50.60
10	483.32 ± 12.55	8348.42 ± 139.16*

*: P<0.05

Fig. 2. IFN- γ levels of mouse Th1/Th2 cells. CD4⁺T cells were stimulated in vitro under Th1/Th2 polarizing conditions for 3 days. SJYCT was added at the beginning of culture.Fig. 3. IL-4 levels of mouse Th1/Th2 cells. CD4⁺T cells were stimulated in vitro under Th1/Th2 polarizing conditions for 3 days. SJYCT was added at the beginning of culture. *P<0.05

3. 三子養親湯 물 추출물이 RBL-2H3 cell의 β -hexosaminidase 유리에 미치는 影響

RBL-2H3 cell을 IgE와 항원으로 유도하여 β -hexosaminidase 를 유리시키는 반응에 대해 三子養親湯 물 추출물이 억제하는 효과를 알아보았다. 三子養親湯 물 추출물은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약 17%, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 약 26%, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 약 35%, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 약 49%의 억제율을 보여 비교적 낮은 농도에서도 유의성 있게 억제했다(Fig. 4).

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

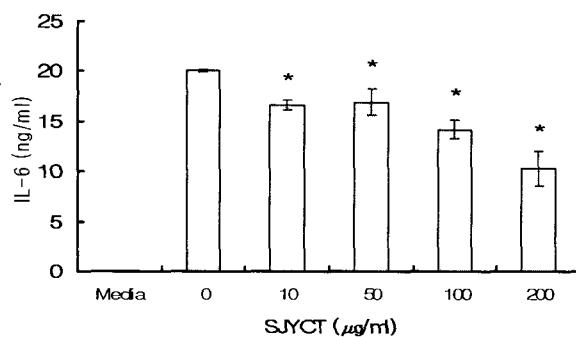
4. 三子養親湯 물 추출물이 Raw 264.7 macrophages 의 IL-6 합성에 미치는 影響

LPS만을 처리한 군은 20.05 ± 0.12 ng/ml이었으나 三子養親湯 을 처리한 군은 농도 의존적으로 감소하였는데 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 16.62 ± 0.51 ng/ml으로 대조군에 비해 약 18% 감소하였으며 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 14.16 ± 0.90 ng/ml으로 약 30% 감소하였고 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 10.27 ± 1.75 ng/ml으로 약 49% 감소하였다 (Table 3, Fig. 5).

Table 3. Effects of SJYCT on IL-6 in Raw 264.7 Cells.

SJYCT ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	10	50	100	200
IL-6 (ng/ml)	20.05±0.12	16.62±0.51*	14.16±1.29*	14.16±0.90*	10.27±1.75*

*: P < 0.05

Fig. 5. Effects of SJYCT on IL-6 in Raw 264.7 cells. Cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) plus SJYCT extract for 18 hours. Data are expressed as means ± S.D. *: P < 0.05

5. 三子養親湯 물 추출물 경구투여가 OVA으로 유도한 마우스의 total IgE와 OVA-specific IgE에 미치는 影響

三子養親湯 물 추출물을 경구투여한 마우스의 total IgE는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. Total IgE의 경우 혈청을 400배로 희석하여 측정했을 때 정상군은 804.38 ± 80.76 ng/ml 이었고 대조군은 5433.08 ± 2054.14 ng/ml이었으며 三子養親湯

물 추출물을 투여한 군은 2565.63 ± 586.60 ng/ml로 약 53% 감소하였다(Table 4, Fig. 6). OVA-specific IgE는 O.D.값이 정상군은 0.059 ± 0.008 로 거의 검출되지 않았으나 대조군은 0.650 ± 0.187 였고 三子養親湯 물 추출물 투여군은 0.287 ± 0.149 로 약 44%나 감소하였다(Table 5, Fig. 7).

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

	Normal	Control	SJYCT
Total IgE (ng/ml)	804.38 ± 80.76	5433.08 ± 2054.14	$2565.63 \pm 586.60^*$

*: P<0.01

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

	Normal	Control	SJYCT
OVA-IgE (O.D.)	0.060 ± 0.008	0.650 ± 0.187	$0.287 \pm 0.149^*$

*: P<0.01

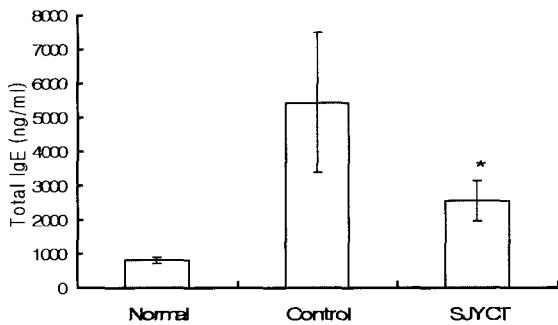


Fig. 6. Effect of in vivo administration of SJYCT on serum IgE levels. All mice were intraperitoneally immunized with OVA on days 0, 7, 14, and subsequently inoculated intranasally with OVA from days 21 to 28. The mice were orally administered with SJYCT (1 mg/g) or PBS (normal and control groups) three 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 means \pm S.D. of 5 animals. *: P<0.01

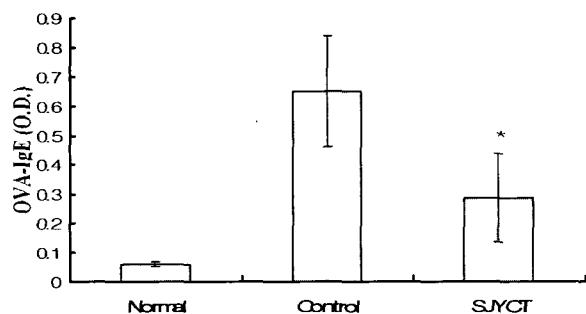


Fig. 7. Effect of in vivo administration of SJYCT on serum OVA-specific IgE. The methods are described in Figure 6. The levels of OVA-specific IgE are expressed as the O.D. at 450-570 nm. *: P<0.01

6. 三子養親湯 물抽出物 경구투여가 OVA로 알레르기를 유도한 마우스의 IFN-g 分泌에 미치는 影響

정상군 마우스로부터 얻은 비장세포의 IFN-g는 $1553.94 \pm$

311.76 pg/ml이었으며 대조군의 경우 5295.74 ± 826.22 pg/ml이었으며 三子養親湯 물 추출물을 투여군은 8177.73 ± 1180.25 pg/ml로서 유의성있게 증가하였다(Table 7, Fig. 8).

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

	Normal	Control	SJYCT
IFN-g (pg/ml)	1553.94 ± 311.76	5295.74 ± 826.22	$8177.73 \pm 1180.25^*$

*: P<0.001

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

	Normal	Control	SJYCT
IL-4 (pg/ml)	3.98 ± 3.34	163.44 ± 56.89	$96.15 \pm 75.11^*$

*: P<0.05

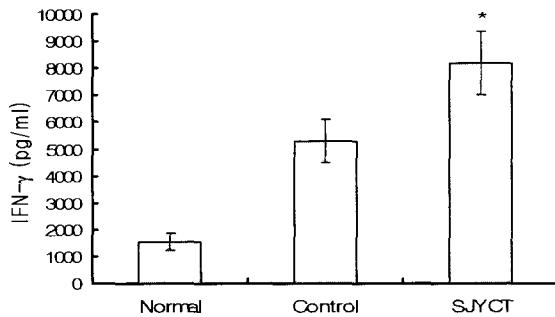


Fig. 8. Effect of in vivo SJYCT administration on IFN-g production in spleen cell culture. All mice were intraperitoneally immunized with OVA on days 0, 7, 14, and subsequently inoculated intranasally with OVA from days 21 to 28. The mice were orally administered with SJYCT (1 mg/g) or PBS (normal and control groups) 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 \pm S.D. of 5 animals. *: P<0.001

7. 三子養親湯 물抽出物 경구투여가 OVA로 알레르기를 유도한 마우스의 IL-4, IL-5 分泌에 미치는 影響

OVA로 감작된 마우스를 치사시킨 후 얻은 비장세포를 OVA로 72시간 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 三子養親湯 물 추출물을 투여군은 96.15 ± 75.11 pg/ml로서 유의성있게 감소하였다(Table 7, Fig. 9). IL-5의 경우 3.27 ± 1.076 pg/ml이었으며 대조군의 경우 946.81 ± 194.22 pg/ml이었으며 三子養親湯 물 추출물을 투여군은 676.08 ± 311.13 pg/ml로서 유의성있게 감소하였다(Table 8, Fig. 10).

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

	Normal	Control	SJYCT
IL-5 (pg/ml)	3.27 ± 1.07	946.81 ± 194.22	$676.08 \pm 311.13^*$

*: P<0.05

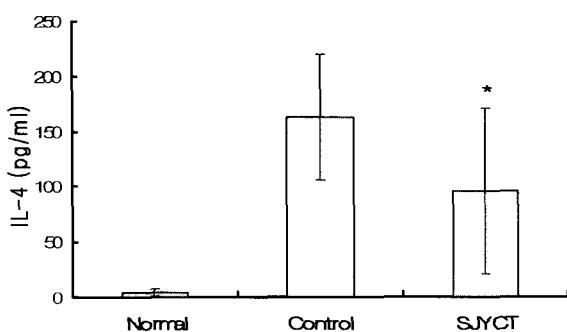


Fig. 9. Effect of in vivo SJYCT administration on IL-4 production in spleen cell culture. The methods are described in the legend to Fig. 6. Each value represents the mean \pm S.D. of 5 animals. *: P<0.05

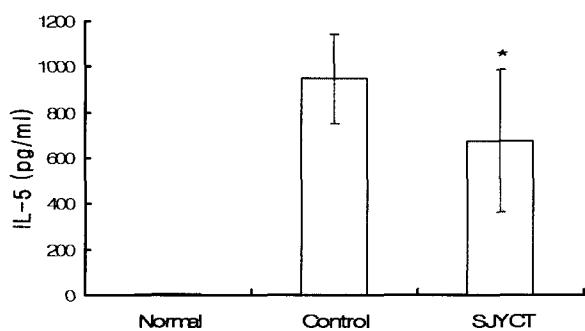


Fig. 10. Effect of in vivo SJYCT administration on IL-5 production in spleen cell culture. The methods are described in the legend to Fig. 6. Each value represents the mean \pm S.D. of 5 animals. *: P<0.05

고 찰

면역이란 외부의 미생물 또는 체내에 생긴 불필요한 산물 즉 抗原과 특이하게 반응하여 抗體를 만들어 제거함으로써 개체에 恒常性을 유지하는 현상이다. 즉 인체 내에서 어떤 요인으로 인해 이들이 침범하거나 변이 세포가 발생했을 때 이러한 이물과 변이세포를 非自己(non-self)로 인식하여 처리하는 방식을 말한다¹³⁾. 인간의 면역반응은 크게 두 가지로 구분되는데 하나는 體液性 免疫反應이라고 하며 항원 자극에 의해 B cell이 항체를 만들어 내는 반응을 말하며, 다른 하나는 항원 자극을 받은 T cell이 다른 cell들과 작용하여 직접 반응을 하거나 여러 가지 cytokine, chemokine을 만들어내어 非自己인 물질을 처리하는 반응으로 細胞性 免疫反應이라고 한다.

이러한 면역반응에서 가장 중추적인 역할을 하는 cell은 T cell인데 이들은 골수의 줄기세포(stem cell)에서 만들어져서 胸腺으로 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 접촉함으로써 면역이라는 임무를 시작하게 된다¹⁴⁾. T cell은 주로 peptide로 구성된 항원을 주로 인지하는데 T cell 표면에 있는 T cell receptor (TCR)과 CD3로 이루어진 TCR/CD3 complex가 이

러한 항원을 인지하는 직접적인 구조물이다¹⁵⁾. 항원의 인식이 이루어지면 이들 T cell은 클론 확장(clonal expansion)을 통해 충분한 증식이 이루어지며 아울러 감염된 cell을 죽이거나 macrophage를 활성화함으로써 직접적으로 cell내 병원체를 파괴한다¹⁶⁾.

이러한 T cell은 T helper cell과 T cytotoxic cell로 나누는데 전자는 표면에 CD4라는 단백질이 발현되므로 CD4⁺ T cell이라고 하며 후자는 CD8이 발현되므로 CD8 T cell이라고 한다. 특히 T helper cell은 주변의 cytokine에 따라 1형과 2형으로 나누는데 IL-12가 많이 존재하면 1형 T cell(Th1 cell)로 분화하며 이러한 Th1 cell은 주로 IFN- γ 를 분비하고 세포성 면역반응을 담당하며 cell내 세균을 목표로 한다¹⁷⁻¹⁹⁾. IL-4가 많이 존재하면 2형 T helper cell(Th2 cell)로 분화하며 이러한 Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13를 주로 분비하는데 체액성 면역반응에 관여한다. Th1 cell이 병적으로 많이 존재하는 경우 자가면역 질환을 유발할 수 있으며 Th2 cell이 상대적으로 우세하면 알레르기질환을 야기할 수 있다²⁰⁾.

알레르기질환에 대해 살펴보면 IL-4, IL-13이 B cell의 isotype switching을 유도하여 IgE를 다양으로 생산하게 한다^{21,22)}. 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 발생한다²³⁻²⁵⁾. 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 cell이 major basic protein, toxic basic protein, leukotriene, platelet-activating factor 등을 만들어내므로 염증을 가속화한다²⁶⁾.

한의학에서 면역의 개념은 나를 지키는 능력 즉 衛氣라 하는데 《靈樞·營衛生會篇》에서 “營出中焦 衛出下焦(영기는 중초에서 나오고 위기는 하초에서 나온다)”²⁷⁾라 하여 인체의 가장 낮은 곳에 위치한 신장의 골수에서 만들어짐을 알 수 있다. 면역물질은 줄기세포에서 분화하는데 한의학에서 이런 물질적 기초가 되는 것이 精이며 가장 自己化되고 농축된 에너지원이 精이 되는 것이다. 韓醫學에서 免疫反應은 正邪相爭이라고 볼 수 있는데, 《素問·上古天真論》의 “真氣從之, 情神內守, 痘安從來”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”에 잘 표현되어 있다²⁸⁻³⁰⁾. 여기에서 真氣와 正氣는 각종 장부, 조직, 기관의 기능 및 활동을 정상적으로 유지하게 하고 내외로부터 오는 痘邪에 대하여 저항하는 능력을 말해주는 것으로 질병의 발생이 정기의 부족으로 인해 야기되므로 인체의 抗病力を 강화하는 것이 바로 면역기능을 높이는 것이다. 邪氣는 인체에 병을 일으키는 각종 발병요인을 말하는데 六淫뿐만 아니라 인체의 陰陽失調로 말미암아 야기된 병리변화 및

飲食, 労倦, 痰飲, 瘀血 등의 병리적 산물들을 포함하는데 이러한 사기를 제거하는 것도 면역기능의 하나라고 볼 수 있다³¹⁾. 즉 정기는 면역계통의 결합과 효능을 개괄하고 면역평형을 발휘하여 면역안정의 작용을 증강시키는 반면, 邪氣는 면역파괴능력을 지칭하고 면역안정의 요인을 교란시키는 것을 의미한다. 알레르기 반응이란 항원항체반응의 결과 생체에 나타난 이상반응이므로 정기의 저항력 약화와 사기의 침해로 인한 인체 생리의 실조로 알레르기 반응이 나타나며, 扶正祛邪의 治法으로 접근할 수 있다.

三子養親湯의 '三子'란 理氣 化痰 定喘效能이 있는 蘇子 蕤子 白芥子 3種의 종자를 말하며 이를 병용하여 痰을 融解하고 消食하며 氣를 순조롭게하여 咳嗽 氣急을 제거한다는 의미가 있다. 養親은 부모를 돌봄의 의미가 있으니 오행상 土生金의 경우 金의 母는 土이니 子金을 治하여 母土를 돌봄이 '養親'의 의미이다. 즉 除痰 消食 下氣의 功效로써 子金主氣를 治하여 母土主痰을 돌보아서 喘滿 咳嗽 懶食등의 증상을 치료한다³²⁾. 本方은老人의 食少痰多 咳嗽喘逆 등의 증을 치료하기 위하여 입방되었다.³³⁾

본 연구에서는 三子養親湯의 T helper cell에 대한 선택적 면역 조절 작용과 아울러 항알레르기 작용이 있는지 알아보기 위해 마우스 및 RBL-2H3와 Raw 264.7 cell line을 이용하여 실험하였다.

우선 三子養親湯 물 추출물이 anti-CD3/CD28로 CD4⁺T cell을 자극했을 때 미치는 영향을 확인하기 위해 농도별로 투여한 후 48시간 배양하여 MTS assay를 한 결과 1 µg/ml에서 三子養親湯 물 추출물을 넣지 않은 cell보다 약 14%의 증가율을 보여주었다. 그러나 5 µg/ml 이하부터는 세포증식을 억제하는 경향이 나타났으며 50 µg/ml에서는 약 45%의 억제율을 보여주었다.

Th1 cell의 경우 三子養親湯 물 추출물을 처리했을 때 IFN-g의 양에 약간의 증가가 보였으나 통계적으로 유의성이 있지는 않았으나 Th2 cell에서는 10 µg/ml에서 IL-4 값이 유의성 있게 감소하여 Th2 cell 분화를 억제하는 경향이 나타남으로써 三子養親湯 물 추출물이 in vitro에서는 Th2 cell로 분화하는 것을 억제하는 경향이 있음을 확인할 수 있었다.

β -hexosaminidase는 mast cell이나 basophil의 과립내에 존재하는 물질인데 이들 cell들이 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 三子養親湯 물 추출물 처리후 β -hexosaminidase의 유리되는 양을 측정한 결과 三子養親湯 물 추출물이 낮은 농도에서도 in vitro에서 항원으로 유도되는 탈과립을 억제하는 항알레르기 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

알레르기 염증에서 histamine 분비와 같은 탈과립은 항원 자극후 수분 내에 발생하지만 자극후 4-6시간 내에는 IL-6, TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인이 분비되면서 endothelial cell adhesion과 inflammatory cell recruitment가 증가하여 염증이 활발하게 일어남으로써 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 三子養親湯 물 추출물을 처리한 결과 대표적

인 염증성 cytokine의 하나인 IL-6가 농도의존적으로 유의성 있게 감소하였다.

본 연구에서는 BALB/c mouse를 이용하여 알레르기성 면역 반응을 연구하는데 매우 유용한 OVA 모델을 통해 三子養親湯 물 추출물이 면역반응을 어떻게 조절하는지 살펴보았다³⁶⁻³⁸⁾. 마우스에게 三子養親湯 물 추출물을 4주간 직접 경구투여하면서 동시에 OVA로 알레르기를 유발하여 혈청내의 total IgE와 OVA-specific IgE를 측정하였고 아울러 이들 마우스의 spleen cell을 분리하여 OVA를 넣고 배양한 후에 이들 cell이 분비하는 Th1 및 Th2 cytokine의 양을 측정해 본 결과 三子養親湯 물 추출물은 매우 우수한 항알레르기 효과가 있음이 in vivo 실험을 통해 증명되었다. IgE는 1형 알레르기 반응에서 매우 중요한 역할을 하기 때문에 IgE 생산의 조절은 림상적으로 매우 중요하다. 三子養親湯 물 추출물을 경구투여한 마우스의 total IgE는 대조군에 비해 약 53% 감소하였으며 OVA-specific IgE도 대조군에 비해 약 44% 감소하였는데 모두 통계적으로 유의성이 있었다. 또한 IgE의 생산은 IL-4와 IL-5를 만들어내는 Th2 cell에 의해 증가하거나 IFN-g에 의해 IgE 형성을 촉진시키는 IL-4를 길항적으로 억제하는데³⁹⁻⁴⁰⁾ 三子養親湯 물 추출물을 투여한 마우스의 spleen cell에서 분비되는 IFN-g, IL-4, IL-5를 보면 IFN-g의 경우 대조군보다 약 54% 증가하였고 IL-4는 약 42% 감소하였으며 IL-5는 약 29% 감소하였으며 모두 통계적으로 유의성이 있었다. 또한 三子養親湯 물 추출물을 OVA 감작과 동시에 마우스에게 경구투여 했을 때 항원으로 유도된 IgE 반응을 감소시키고 Th1 반응을 유도하면서 Th2 반응을 감소시킴을 확인하였다. 따라서 三子養親湯 물 추출물은 불균형한 Th2 cell로의 분화를 억제함으로써 Th1 cell을 증가하는 방법을 통해 항알레르기 작용을 가진 것으로 사료된다.

이러한 Th1/Th2 cytokine의 불균형을 조절하는 효과는 한약을 통해 알레르기 질환이 발생하는 근본적인 문제점을 교정할 수 있음을 시사해준다. 따라서 三子養親湯 물 추출물의 항알레르기 효과는 한약을 통해 불균형한 1형, 2형 T cell의 상태를 교정해 줌으로써 알레르기 질환을 근본적으로 치료한다는데 의의가 있다고 볼 수 있다.

요컨대 본 연구에서는 三子養親湯 물 추출물이 in vitro에서는 마우스 T cell을 Th2 cell로 유도하는 것을 억제하는 경향이 있음을 확인하였고 아울러 알레르기 반응에 관여하는 cell의 탈과립과 염증성 사이토카인의 합성을 억제하는 작용이 있음을 알 수 있었다.

결 론

三子養親湯 물 추출물이 마우스 면역세포의 Th1, Th2 반응과 OVA로 유도한 알레르기성 염증 반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스 CD4⁺ T cell의 세포증식 및 Th1/Th2 cytokine 분비량을 측정하였고 RBL-2H3 cell의 β -hexosaminidase 양과 Raw264.7 cell의 IL-6 분비량을 측정하였다. 또한 BALB/c 마우스에게 OVA로 알레르기 반응을 유도하고 三子養親湯을 경구투여

하면서 혈청 total IgE와 OVA-specific IgE 및 spleen cell의 IFN-g, IL-4, IL-5 생산량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

三子養親湯 물 추출물을 농도별로 투여하고 마우스 CD4⁺ T cell을 anti-CD3 및 anti-CD28로 48시간 자극한 결과, 세포증식을 억제하는 경향이 나타났다. 마우스 CD4⁺ T cell을 Th1 cell과 Th2 cell로 polarization한 후 3일간 三子養親湯 물 추출물과 함께 배양한 결과 Th1 cell의 경우 IFN-g의 양은 약간 증가하였으나 유의성이 있지는 않았으며 Th2 cell에서는 IL-4 값이 유의성 있게 감소하여 Th2 cell로 분화하는 것을 억제하는 경향이 있었다. RBL-2H3 cell을 IgE와 항원으로 감작했을 때 三子養親湯 물 추출물은 β -hexosaminidase의 유리를 유의성 있게 농도의존적으로 억제시켰다. Raw 264.7 cell을 LPS로 자극한 후 三子養親湯 물 추출물을 처리했을 때 IL-6의 합성이 농도의존적으로 유의성 있게 감소하였다. 마우스에게 三子養親湯 물 추출물을 경구투여하면서 동시에 OVA로 알레르기성 반응을 유도한 결과 혈청의 total IgE 수준은 약 53% 감소하였고 OVA-specific IgE는 약 44% 감소하였으며 마우스의 spleen cell을 분리하여 OVA로 배양한 결과 IFN-g는 약 54% 증가하였으며 IL-4는 약 42%, IL-5는 약 29% 감소하였는데 모두 유의성이 있었다.

이러한 실험결과를 정리하면 三子養親湯 물 추출물은 in vitro 실험에서 마우스 T helper cell이 Th2로 분화하는 것을 억제하면서 탈과립 및 염증성 사이토카인의 합성을 억제하는 작용이 있었으며 이러한 항알레르기 효과는 마우스에게 알레르기를 유발한 동물실험에서도 불균형한 Th cell들의 반응을 교정하면서 항원으로 유도된 IgE를 감소시킴으로써 증명되었다. 따라서 三子養親湯은 Th2 cell로의 분화를 억제하여 Th1 cell의 활성을 유도하는 항알레르기 작용을 보여주었기 때문에 단순한 소염작용 이외에도 근본적인 면역 불균형을 개선하는 효능이 있음을 유추 할 수 있다.

참고문헌

- 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.
- Schultz-Larsen, F., Hanifin, J.M. Epidemiology of atopic dermatitis. Immunol Allergy Clin North Am 22, 1-24, 2002.
- Inagaki, N., Nagai, H. Drugs for the treatment of allergic disease. Jpn J Pharmacol 86, 275-280, 2001.
- Kobayashi, H., Mizuno, N., Kutsuna, H., Teramae, H., Ueoku, S., Onoyama, J., Yamanaka, K., Fujita, N., Ishii, M. Hochu-ekki-to suppresses development of dermatitis and elevation of serum IgE level in NC/Nga mice. Drug Exp Clin Res 29(2):81-84, 2003.
- Ikeda, Y., Kaneko, A., Yamamoto, M., Ishige, A., Sasaki, H. Possible involvement of suppression of Th2 differentiation in the anti-allergic effect of Sho-seiryu-to in mice. Jpn J Pharmacol 90, 328-336, 2002.
- 김준명, 박양춘, 김병정, 김성훈. 加味治哮散의 알레르기 사이토카인 調節作用에 대한 研究. 대한동의생리병리학회지 14(2):80-90, 2000.
- 권강주, 박양춘, 김병탁, 김동희. 寧哮飲이 알레르기 반응과 폐손상에 미치는 影響. 대한동의생리병리학회지 15(1):150-159, 2001.
- 김민수, 박동일. 加味解表二陳湯이 알레르기 喘息 백서의 호흡양상과 기관 조직에 미치는 影響. 대한동의생리병리학회지 16(3):557-562, 2002.
- 박동일, 박봉규, 김원일. 十全大補湯이 알레르기 반응에 미치는 影響. 대한동의생리병리학회지 17(2):308-315, 2003.
- 은재순, 이동희, 전용근, 권영안, 권진. 加味清鼻飲이 免疫反應에 미치는 影響. 대한동의생리병리학회지 18(5):1391-1396, 2004.
- 김정진, 양성환, 손낙원, 안규석. 加味生料四物湯의 항염증효과와 止痒膏의 아토피피膚炎 손상 및 止痒효과에 미치는 影響. 대한동의생리병리학회지 17(3):428-435, 2003.
- 이상인 외, 방제학, 영림사, 서울, p 310-311, 1990.
- 김연대. 최신면역, 집문당, 서울, p 33, 1982.
- Tough, D.F., Sun, S., Zhang, X., Spent, J. Stimulation of naïve and memory T cells by cytokines. Immunol Rev 170, 39-47, 1999.
- 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. 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., Joliy, 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.
- 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.
25. Carlos, A.G., Carlos, M.L., Conceisao, S.M., Alcinda, M. Cytokines and asthma. J Invest Allergy Clin Immunol 7(5):270-273, 1997.
26. 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.
27. 陣夢雷, 蔣廷錫 외. 도서집성의부전록3, 대성문화사, 서울, p 214, 1986.
28. 張介賓, 類經, 34(上), 418(下1), 대성문화사, 서울, p 28, 1986.
29. 旺機 黃帝內經素問今譯, 성보사, 서울, p 8, 125, 146, 412, 1985.
30. 張隱奄, 馬元對注. 黃帝內經素問. 臺聯國風出版社, 臺北, p 25, 269, 1986.
31. 문준전, 안규석, 최승훈. 동의병리학, 고문사, 서울, p 78-90, 1990.
32. 신재용편저, 방약합편해설, 전통의학연구소, 서울, p 132, 1993.
33. 黃宮繢纂, 本草求真 宏業書局有限公司, 대만, p 74, 105, 125-126, 1981.
34. 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. 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. IL-4 signaling, gene transcription regulation and the control of effector T cells. Immunol Res 23, 179-191, 2001.