

桑葉藥鍼의 喘息抑制效果에 대한 실험적 연구

신성찬² · 김영일² · 홍권의² · 임윤경¹ · 이 현² · 이병렬²

대전대학교 한의과대학 ¹경혈학교실, ²침구학교실

The Effects of *Mori Folium* herbal acupuncture at St36 on ovalbumin-induced asthma in C57BL mouse

Sung-Chan Shin², Young-Il Kim², Kwon-Eui Hong², Yun-Kyoung Yim¹, Hyun Lee², Byung-Ryul Lee²
Dept. of ¹Meridian & Acupoint, ²Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

Objective : The aim of this study was to investigate the effect of *Mori Folium* herbal acupuncture at St36 on ovalbumin-induced asthma in mice.

Methods : C57BL/6 mice were sensitized and challenged with OVA (ovalbumin) for 12 weeks (once a week) Two experimental groups were treated with different concentrations (1%, 0.1%) of *Mori Folium* herbal acupuncture at Chok-samni (St36) for the later 8 weeks (3times/week).

Result : 1. Lung weight of the mice group treated with *Mori Folium* herbal acupuncture decreased significantly compared with that of control group.

2. Total Leukocytes in BALF of the mice group treated with *Mori Folium* herbal acupuncture decreased significantly compared with those of control group.

3. The number of Eosinophils in BALF of the mice group treated with *Mori Folium* herbal acupuncture decreased significantly compared with that of control group.

4. The number of Gr-1⁺/CD11b, CCR3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3e⁺/CD69⁺, IgE⁺/B220⁺ cells in the lungs of the mice group treated with *Mori Folium* herbal acupuncture decreased significantly compared with that of control group.

5. The concentration of IgE, IL-13, IL-4 in serum of the mice group treated with *Mori Folium* herbal acupuncture decreased significantly compared with that of control group.

6. The concentration of IL-4 in BALF of the mice group treated with *Mori Folium* herbal acupuncture decreased significantly compared with that of control group.

Conclusion : We conclude that *Mori Folium* herbal acupuncture is effective on OVA-induced asthma of C57BL/6 mouse.

Key words : OVA-induced asthma, *Mori Folium*, Herbal acupuncture

I. 서 론

喘息이란 다양한 자극에 대한 氣管支의 반응

•교신저자: 이병렬, 대전 동구 용운동 963 대전대학교 한의과대학 침구학교실, Tel. 042-280-2641, Fax. 042-274-2600, E-mail : acup@dju.ac.kr

•접수 : 2004/06/02 •수정 : 2004/06/12 •채택 : 2004/09/17

성 증가를 특징으로 하는 氣道 疾患이다. 喘息은 생리적으로 공기 통로의 광범위한 수축을 나타내고 이는 자연적으로 또는 치료의 결과로 해소되기도 하며, 또한 喘息은 임상적으로 發作的인 呼吸 困難, 기침, 喘鳴音 등의 소견을 보인다¹⁾.

喘息의 정확한 원인은 불명확하나 氣道の 炎症細胞의 浸潤 (Th2세포, 好酸球, 肥滿細胞 등) 이 공통적으로 나타나며 氣道の 평활근 수축, 기도 점막상피의 비후, 기도내의 점액의 존재 등이 喘息의 기도폐색에 관여하는 것으로 고려된다²⁾.

한의학적으로 喘息은 氣息이 연속적으로 促急하여 호흡곤란한 것을 喘이라 하고, 喉中에서 소리가 나는 것을 哮라고 하는데, 哮症, 喘症, 痰飲의 範疇로 看做하고 있으며, 임상상 哮는 喘을 반드시 兼하므로 通稱 哮喘이라 한다³⁾.

喘息의 원인은 隋代巢의 《諸病源候論》⁴⁾에 처음 기술된 이후 寒冷說, 心因說, 痰因說, 素因說, 感染說, 過敏性反應, 肺腎의 呼吸機能障礙等의 原因으로 분류하며, 潤肺 祛痰, 定喘補陰시키는 약물과 침구치료를 위주로 치료하고 있다.

韓藥이 喘息에 미치는 영향에 관한 실험적 연구로는 李⁵⁾가 五拗湯의 鎮靜, 鎮痛, 鎮咳, 抗 Histamine, 기관지 평활근 이완 효과를 보고하였고, 權 등⁶⁾이 五拗湯이 咳嗽, 喘息 및 咽痛에 효능이 있음을 연구 보고하였으며, 鄭 등⁷⁾이 加味清上補下湯과 定喘湯이 喘息에 미치는 영향을 연구 보고하였고, 金 등⁸⁾은 解表二陳湯이 allergy喘息의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향을, 沈 등⁹⁾은 清肺散이 免疫係의 Th1세포의 기능을 증가시키고 Th2세포의 기능을 억제시킬 수 있다고 보고하였으나, 去風清熱, 涼血明目하고 肺熱로 因한 咳嗽와 風痺, 癩疹, 下肢上皮腫을 다스린다¹⁰⁾는 桑葉에 대한 연구는 접하지 못하였다.

이에 著者는 桑葉藥鍼의 喘息抑制效果를 알아보기 위하여 ovalbumin (OVA)로 減作된 생쥐에게 OVA를 吸入시켜 알레르기 喘息을 誘發시키고, 足三里에 桑葉藥鍼液을 注入한 后 喘息抑制效果에 대한 실험을 하여 유의성 있는 결과를

얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 材料

1) 動物

動物은 雌性인 4~5週齡의 C57BL/6생쥐를 대 한실험센터에서 供給받아 實驗 當日까지 固型飼料 (抗生劑 無添加, 三養飼料)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃를 유지하여 2주일 간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 藥材

實驗에 사용된 桑葉 (*Mori Folium*; 以下 MF라 表現함)은 대전대학교 부속한방병원에서 購入한 것을 精選하여 사용하였다.

3) 藥鍼液의 製造

桑葉 55g을 粉碎機를 이용해서 분말로 하여 圓形三角 flask에 넣고 蒸溜水 500ml을 加하여 3時間 동안 shaking water bath에서 流出하고 濾過한 다음, 이 沈澱物을 濾過 paper로 3回 濾過한 后 rotary evaporator에 降壓 濃縮 하였다. 桑葉 濃縮液에 95% ethyl alcohol 30 ml을 加하여 室溫에서 교반한 后 방치하여 生成된 침전물을 여과하여 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 生成된 沈澱物을 餘別 하였다. 餘液을 다시 85% ethyl alcohol 30ml를 加하여 잠시 攪拌 后 放置하여 生成된 沈澱物을 餘別하고 다시 餘液을 75% ethyl alcohol 30 ml를 加한 后 같은 操作을 2回 反覆한 다음 餘液 중 ethyl alcohol을 減壓 제거하여 殘渣全量을 20g이 되게 하고 1N NaOH로 pH6.8으로 조절하여 저온에서 12시간 방치한 后 미량의 浮游液을 餘別한 后 滅菌하여 藥鍼液을 PBS로 1%와 0.1%로 稀釋하여 사용하였다.

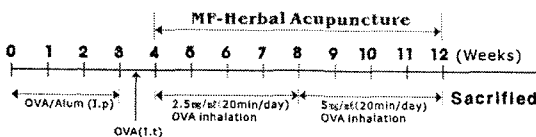
2. 方法

1) *In vitro* FACS analysis

喘息이 유발된 생쥐에서 분리해 낸 폐조직을 잘게 切斷한 후 collagenase를 加하여 shaking incubation을 통해 細胞를 분리하였다. 分離해 낸 細胞에 rIL-3/rIL-5를 加하여 incubation하여 活性化 시켰다. 활성화된 세포에 藥鍼液을 加하여 48時間 동안 培養 시킨 후 標式抗體를 反應시켜 FACS 분석하였다.

2) Asthma mouse model

실험 1주째 200 μ l의 OVA/alum (500 μ g/ml)을, 2.3주째에는 100 μ l OVA/alum (500 μ g/ml)을 생쥐의 腹腔에 投與 (i.p)하였다. 4주째에는 痲醉 후에 100 μ l의 OVA/alum (500 μ g/ml)을 氣道投與 (i.t)하였다. 5-8주째까지는 2.5mg/ml의 OVA/PBS 40 μ l을, 8-12주째까지는 5mg/ml의 OVA/PBS 40 μ l을 air compressor를 利用하여 20분간 露出시켰다. 그리고, 5주째부터 8주간 주 3회 足三里 穴에 1%와 0.1%의 桑葉 藥針液 (100 μ l)을 注入하였다.



3) Bronchoalveolar-lavage fluid (BALF) 分離

생쥐를 痲醉한 후 表皮를 열고 氣道에 10% FBS/DMEM medium을 넣은 注射器를 挿入하고 끈으로 묶어 固定한 후, 10% FBS/DMEM medium 3回 循環시켜 分離하였다.

4) Photomicrographs

分離된 BALF를 洗滌 해서 Cytospin centrifuge에 1000rpm으로 5分間 遠心分離하여 固定시킨 후, blood smears staining set (Merck

Germany)를 使用하여 染色 하였다. 空氣中에서 乾燥시킨 후 bright microscope (Nikon, Japan ; 400 \times)로 測定하였다.

5) Fluorescence activated cell sorter (FACS) Analysis

생쥐에서 分離해낸 肺 組織을 잘게 切斷한 후 collagenase를 加하여 incubation 통해 分離해 낸 細胞에 標式抗體를 反應시켜 Flow cytometer로 分析하였다.

6) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis

市販 ELISA Kit를 使用하여, 생쥐에서 分離한 BALF와 serum에서 各 cytokine량을 測定하였다. 抗cytokine 항제가 코팅된 96well plate에 BALF 또는 serum을 加하여 反應 시킨 후 4번 洗滌하였다. 그 후 biotin이 標式된 抗cytokine 항제를 加하여 反應 시킨 후 4번 洗滌하고 여기에 straptavidin-HRP를 加하여 Elisa-reader를 利用하여 測定하였다.

7) mRNA 遺傳子 分析

① Total RNA의 抽出

各 實驗群의 생쥐에서 떼어낸 肺組織을 homogenizer를 利用하여 分碎한 後 RNAzol^B (Tel-Test, USA)를 利用하여 total RNA를 抽出하였다. 抽出한 RNA는 DEPC (Diethyl Pyrocarbonate)를 處理한 20 μ l의 蒸溜水에 溶解시켜 定量하고, RNA를 確認하기 위하여 RNA 4 μ g을 EtBr이 들어있는 formaldehyde buffer와 섞어 70 $^{\circ}$ C에서 10分間 denaturation 시킨 後, formaldehyde를 넣은 1.5% agarose gel에 loading dye와 함께 loading 하여 그 量을 確認하였다. 確認한 RNA는 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)에 使用하였다.

② cDNA 合成

逆轉寫 反應은 準備된 total RNA 3 μ g에 該當 하는 量을 75 $^{\circ}$ C에서 10分 동안 denaturation 시 키고, 이 denaturated total RNA 3 μ g에 2.5 μ l의 10mM dNTPs, 1 μ l의 random sequence hexanucleotides (25pmole/25 μ l), RNA inhibitor 로서 1 μ l의 RNasin (20U/ μ l), 1 μ l의 100mM DTT 및 4 μ l의 5 \times RT buffer (250mM Tris-Cl, pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 混合한 後, 1 μ l의 M-MLV RT (200U/ μ l)를 添加한 後 DEPC 處理된 蒸溜水를 더하여 最終 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 反應 混合液을 잘 섞은 後 遠心分離하여 37 $^{\circ}$ C 恒溫 水槽에서 60分 동안 反應시켜 first-strand cDNA를 合成 한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 10分 동안 放置하여 M-MLV RT를 不活性化시키고 즉시 얼음으로 옮겼다. 이 렇게 合成이 完了된 first-strand cDNA는 PCR (Polymerase Chain Reaction)에 使用하였다.

③ cDNA의 PCR 增幅

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in Germany)를 利用 하여 修行하였다. 反應은 이미 合成된 1 μ l의 first-strand cDNA를 主型으로 使用하였다. 主 型에 대한 β -actin, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-1 β , TNF- α , 및 INF- γ 에 대한 sense primer (20pmole/ μ l)와 antisense primer (20pmole/ μ l)를 混合하여 1 μ l를 加하고, 다시 3 μ l 2.5mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂) 및 0.18 μ l Taq polymerase (5U/ μ l)를 添加한 다음 最終 부피가 30 μ l 되도록 滅菌蒸溜水를 加하고 predenaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5分, denaturation; 7 4 $^{\circ}$ C, 5分, annealing; 55 $^{\circ}$ C, 1分, elongation; 7 2 $^{\circ}$ C, 1分을 25cycle한 後 postelongation을 72 $^{\circ}$ C

에서 3分 동안의 條件으로 PCR을 修行하였다. 各 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel 에 loading하여 50V 條件에서 30分間 電氣泳動 을 通하여 分析하였다.

Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다.

β -actin	sense oligonucleotide	5'-TGGAATCCTGATCCATGAAC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAGTCCG-3'
IL-4	sense oligonucleotide	5'-AGCCATATCCACGGATGCGAC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GCATGGTGGCTCAGTACTACG-3'
IL-5	sense oligonucleotide	5'-GCTCCTCAGGAATCTGTTC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GGCTCATGTACTTTCATGAG-3'
IL-6	sense oligonucleotide	5'-ATGAACTCCTTCTCCA CAAGCGC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'
IL-13	sense oligonucleotide	5'-GCCGGGATGGGCATTC CACGTGTG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GGACGCCAAGGTCAAG AACAGTTG-3'
IL-1 β	sense oligonucleotide	5'-CCTCTTCTTGAGCTTG CAAC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-AGCCATGAGTTCCAT TCAC-3'
TNF- α	sense oligonucleotide	5'-AGCGGCTGACTGTCAG ATTGTTAG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTTTCAGCT GTATAGGG-3'
INF- γ	sense oligonucleotide	5'-AGCGGCTGACTGAACT CAGATTGTAG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTTTCAGCT GTATAGGG-3'

8) 統計處理

統計는 student's t-test로 하였다.

III. 결 과

1. *in vitro* FACS analysis

1) Granulocytes/lymphocytes population (%)

肺細胞中 과립구의 比率이 control에서는 26.8%이었고 MF-HAS에서는 11.9%로 減少하였다(Fig.1).

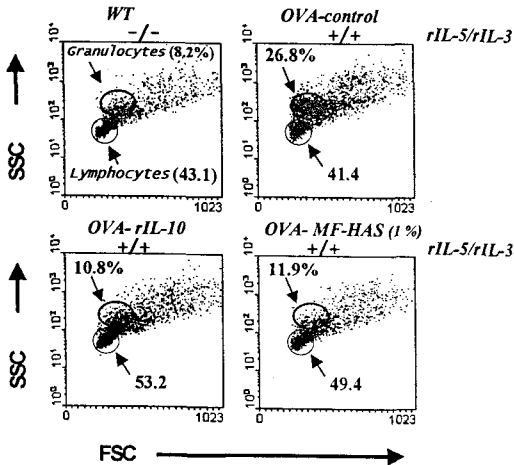


Fig. 1. Effect of MF-HAS on granulocytes/lymphocytes population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells.

C57BL/6 mice were injected with OVA for 6weeks (I.p:3times, I.t: 9times). The mice lungs were taken out, chopped and disposed with collagenase. Eosinophils were activated by rIL-3/rIL-5. The lung cells were treated with MF-HAS (1%) and incubated for 48hr at 37°C, and analyzed by flow cytometer.

WT : Normal C57BL/6 mice.

OVA-Control : OVA-induced asthma lung cells.

OVA-MF-HAS (1%) : OVA inhalation and MF-HAS (1%).

OVA-rIL-10 : Positive control.

2) CD3e⁺/CCR3⁺

肺細胞中 CD3e⁺/CCR3⁺細胞의 比率이 Control에서는 92.2%이었으나 MF-HAS에서는

80.7%로 낮아졌다 (Fig.2).

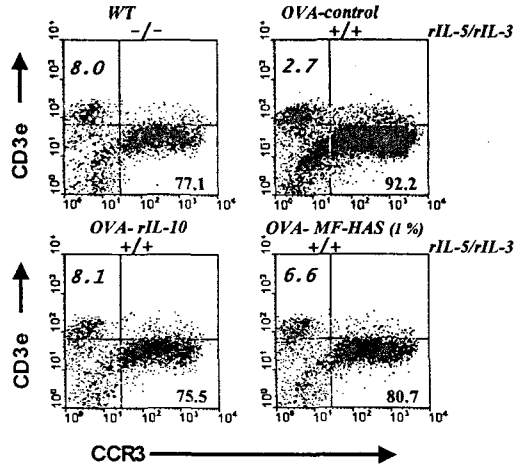


Fig. 2. Effect of MF-HAS on the percentage of CD3e⁺/CCR3⁺ population (%) in mouse OVA-induced asthma lung.

3) CD69⁺/CD3e⁺

肺細胞中 CD69⁺/CD3e⁺의 比率이 Control에서는 46.8%이었으나 MF-HAS에서는 29.1%로 抑制되었고, CD69⁺/CD3e⁺의 比率은 Control에서는 34.9%이었으나 MF-HAS에서는 42.9%로 增加했다 (Fig.3).

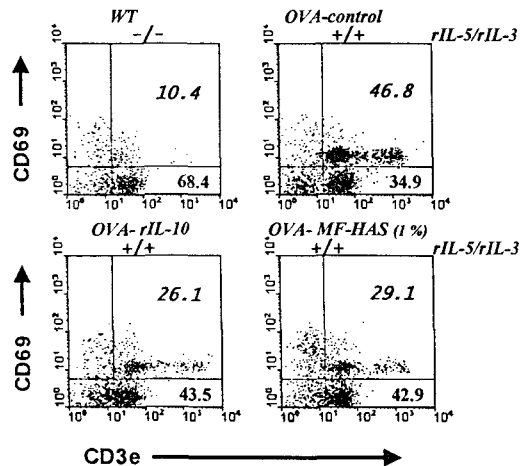


Fig. 3. Effect of MF-HAS on the percentage of CD69⁺/CD3e⁺ population (%) in mouse OVA-induced asthma lung.

4) CD4⁺ 및 CD8⁺

肺細胞 中 CD4⁺의 比率이 Control에서는 41.6%이었으나 MF-HAS에서는 40.2%로 減少했고, CD8⁺의 比率은 Control이 20.1%이었으나 MF-HAS에서는 26.3로 增價했다 (Fig.4).

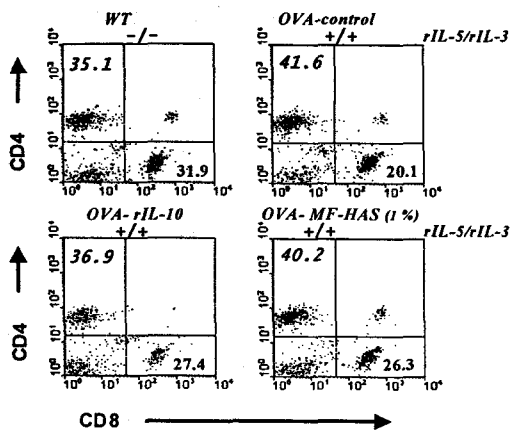


Fig. 4. Effect of MF-HAS on the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells.

5) CD23⁺/B220⁺

肺細胞 中 CD23⁺/B220⁺의 比率이 Control에서는 1.59%이었으나 MF-HAS에서는 0.87%로 抑制되었다 (Fig.5).

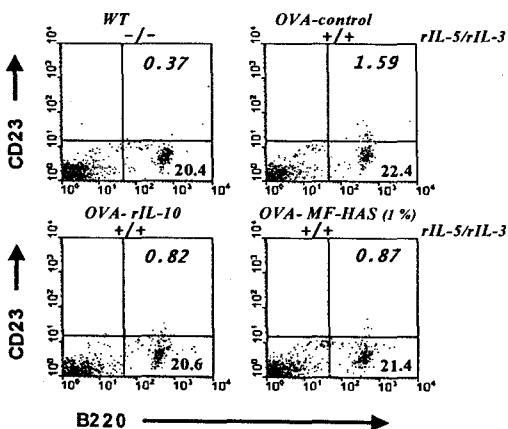


Fig. 5. Effect of MF-HAS on the percentage of CD23⁺/B220⁺ population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells.

2. *in vivo*

1) Lung weight

생쥐에서 肺를 摘出하여 여지로 水分을 除去한 后 測定하였다. 그 結果 MF-HAS에서는 control에서보다 weight가 減少했다 (Fig.6).

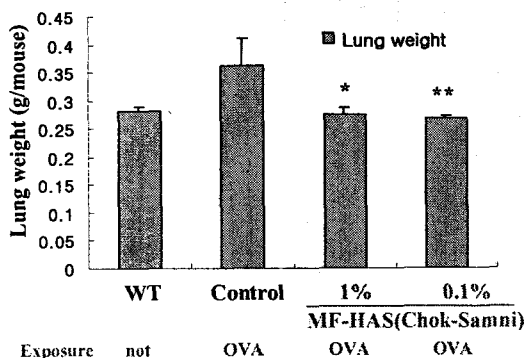


Fig. 6. Effect of MF-HAS on lung weight in mice with OVA-induced asthmatic mouse lung weight. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (once a week). Two experimental groups were treated with different concentrations of MF-HAS at Chok-samni (St36) for the later 8 weeks (3times/week). At the end of the total experimental procedure, the mice lungs were taken out and weighed.

WT : Normal C57BL/6 mice.
OVA-Control : Ovalbumin inhalation (control).

OVA-MF-HAS (1%) : OVA inhalation and MF-HAS (1%).

OVA-MF-HAS (0.1%) : OVA inhalation and MF-HAS (0.1%).

Values represent the means ± SEM of 2-3mice (* : p<0.01, ** : p<0.001).

2) Cell count

① Total cells in Lung

생쥐에서 摘出した Lung을 collagenase를 加해서 incubation을 통해 얻은 細胞를 RBC lysis buffer를 利用해서 赤血球를 除去한 后 count 하였다 그 結果 MF-HAS에서는 총세포수가 control에서 보다 減少했다 (Fig.7).

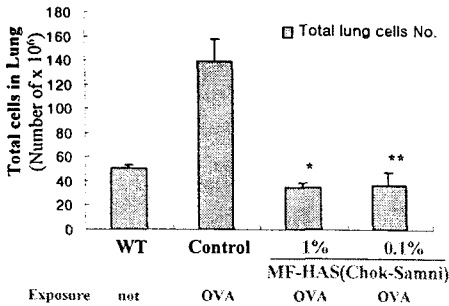


Fig. 7. The number of total cells in OVA-induced asthmatic mouse lung tissue.

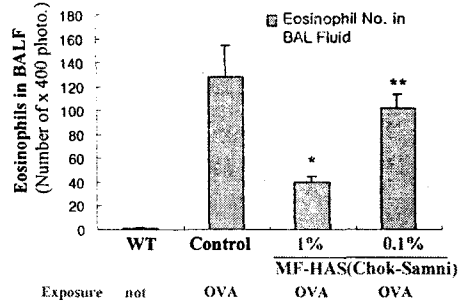


Fig. 9. The number of eosinophil in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

② Total leukocyte in BALF

BALF의 RBC를 除去한 cell을 count하였다 그 結果 countol에 比하여 MF-HAS에서 leukocyte가 顯著하게 減少했다 (Fig.8).

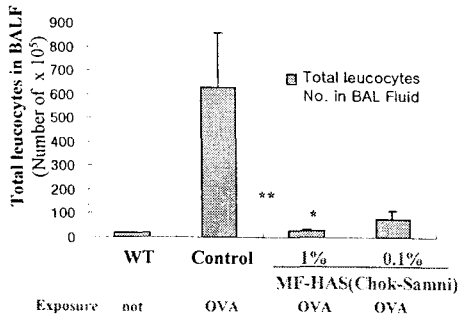


Fig. 8. The number of Total leucocytes in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

③ Eosinophils in BALF

BAL Fluid에 含有된 eosinophils의 數를 count 하였다. 그 結果 MF-HAS에서 control에 比較해서 eosinophils의 數가 減少했다 (Fig.9).

3) Photomicrographs of eosinophil in BALF

Blood smears staining set을 利用하여 BALF를 染色하여 觀察한 結果 control에서 eosinophil이 多量으로 觀察 되었으며, 桑葉藥鉞群 (MF-HAS)에서 얻은 BALF에서는 eosinophil이 顯著하게 減少했다 (Fig.10).

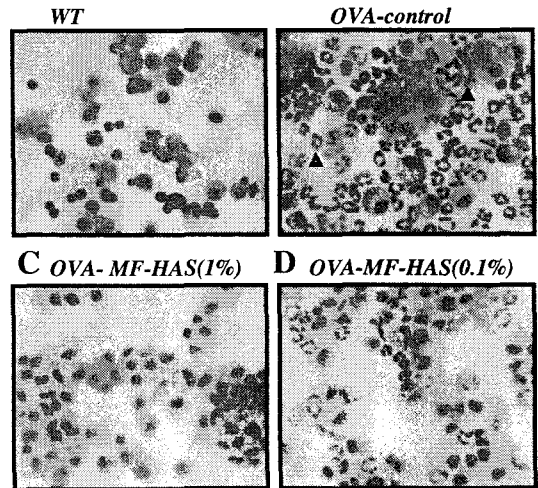


Fig. 10. Photomicrographs (original magnification, × 400) of BALF cytopins from mice

4) ELISA

① IL-13 in Serum

注射器를 使用해서 痲醉한 생쥐로부터 採血하여 室溫에서 3時間 保存한 后 6500rpm으로

20分間 20℃에서 圓心 分離하여 serum을 分離했다. 分離한 serum을 市販 IL-13 ELISA kit (R&D Systems, U.S.A)를 利用하여 分析하였다. 그 結果 control에 比較해서 MF-HAS에서 IL-13의 分泌가 抑制되었다 (Fig.11).

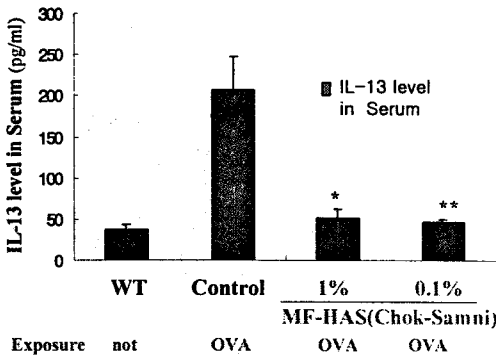


Fig. 11. The level of IL-13 in C57BL/6 mouse Serum.

② IgE in Serum

注射器를 使用해서 痲醉한 생쥐로부터 採血하여 室溫에서 3時間 保存한 后 6500rpm으로 20分間 20℃에서 圓心 分離하여 serum을 分離했다. 分離한 serum을 市販 IgE ELISA kit (Shibayagi, Japan)를 利用하여 分析하였다. 그 結果 control에 比較해서 MF-HAS에서 IgE의 分泌가 抑制되었다 (Fig.12).

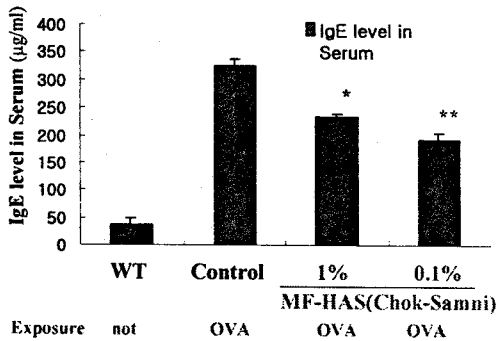


Fig. 12. The level of IgE in C57BL/6 mouse serum.

③ IL-4 in Serum

注射器를 使用해서 痲醉한 생쥐로부터 採血하여 室溫에서 3時間 保存한 后 6500rpm으로 20分間 20℃에서 圓心 分離하여 serum을 分離했다. 分離한 serum을 市販 IL-4 ELISA kit (Biosource, U.S.A)를 利用하여 分析하였다. 그 結果 control에 比較해서 MF-HAS에서 IL-4의 分泌가 抑制되었다 (Fig.13).

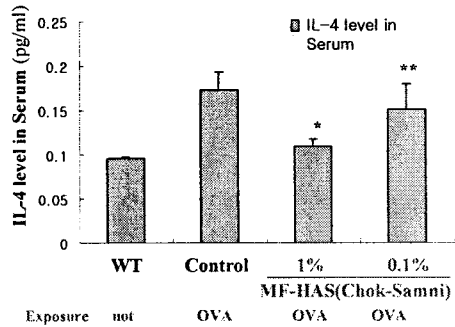


Fig. 13. The level of IL-4 in C57BL/6 mouse serum.

④ IL-4 in BALF

생쥐의 Lung에서 分利한 BAL Fluid를 市販 IL-4 ELISA kit (Biosource, U.S.A)를 利用하여 分析하였다. 그 結果 control에 比較해서 MF-HAS에서 IL-4의 分泌가 抑制되었다 (Fig.14).

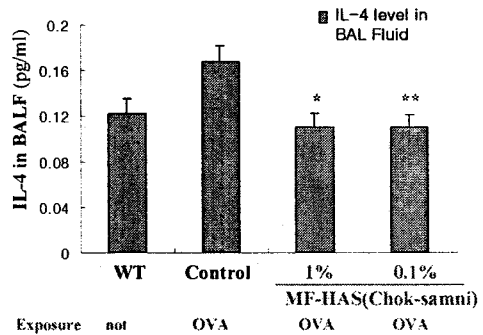


Fig. 14. The level of IL-4 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

5) FACS

FACS分析에 의해 各 細胞數를 測定하였다.

① Gr-1⁺/CD11b⁺

Gr-1⁺/CD11b⁺細胞와 CD11b⁺細胞는 對照群에 비하여 AHCR-HAS에서 減少하였다 (Fig. 15).

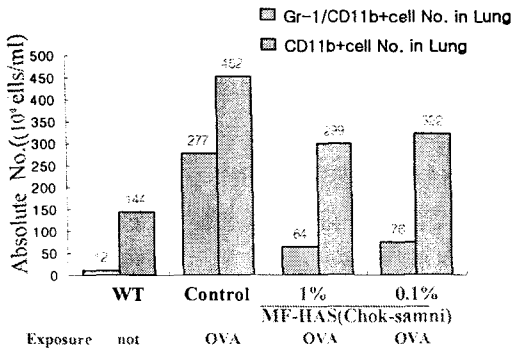


Fig. 15. Effect of MF-HAS on Gr-1⁺/CD11b⁺ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

② CD3⁺/CCR3⁺

CCR3⁺cell은 control에 비하여 MF-HAS에서 減少하였다 (Fig.16).

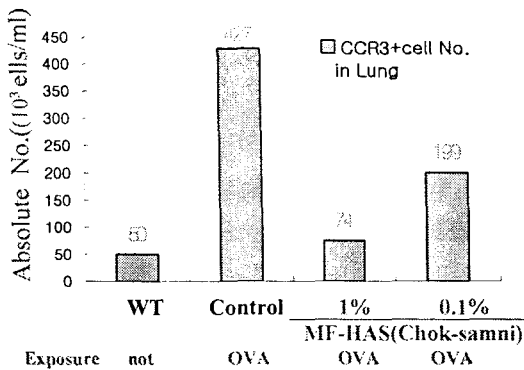


Fig. 16. Effect of MF-HAS on CCR3⁺ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

③ CD4⁺ 및 CD8⁺

CD4⁺cell과 CD8⁺cell은 control에 비하여 MF-HAS에서 減少하였다 (Fig.17).

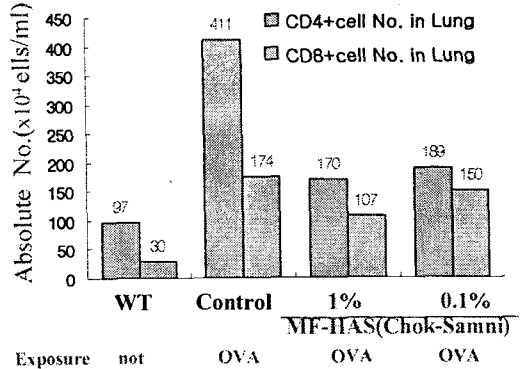


Fig. 17. Effect of MF-HAS on CD4⁺ and CD8⁺ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

④ CD3e⁺/CD69⁺

CD3e⁺cell 과 CD69⁺cell은 control에 비하여 MF-HAS에서 減少함을 알 수 있다 (Fig.18).

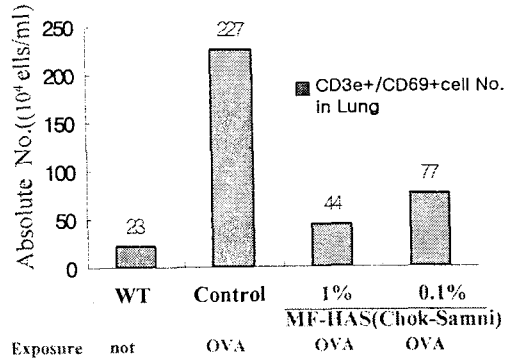


Fig. 18. Effect of MF-HAS on CD3e⁺/CD69⁺ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

⑤ IgE⁺/B220⁺

IgE⁺/B220⁺cell과 B220⁺cell은 control에 비하여 MF-HAS에서 減少함을 알 수 있다 (Fig.19).

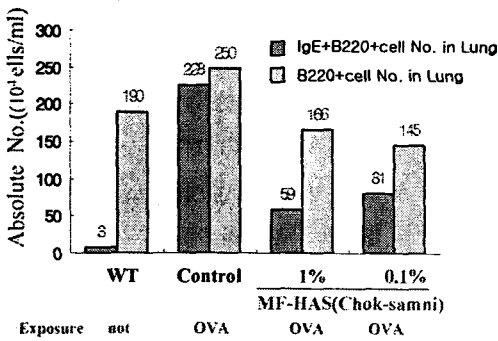


Fig. 19. Effect of MF-HAS on IgE⁺/B220⁺ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

6) RT-PCR

RT-PCR을 移用하여 喘息 誘發과 關聯된 여러 cytokine 들의 mRNA發顯을 觀察한 結果, TNF- α , INF- γ , IL-5, IL-4 등의 mRNA 發顯이 桑葉藥鉞實驗群 (MF-HAS)에서 control에 比하여 顯著히 減少하였다 (Fig.20).

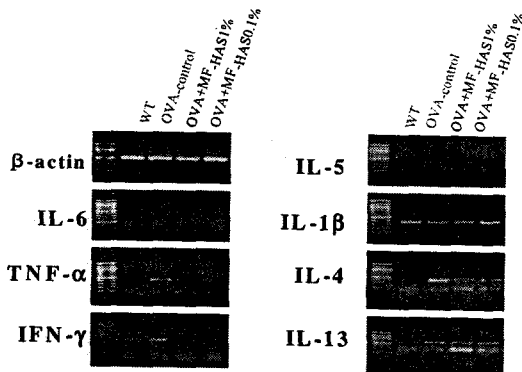


Fig. 20. mRNA expression of β -actin, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, and IL-13 in the lung.

IV. 고 찰

喘息은 氣道炎症으로 特徵 지워지는 慢性 閉鎖性 肺疾患으로 一般的으로 알레르겐, 不安, 上氣道 感染, 吸煙 또는 其他의 環境의 “毒物” 또

는 運動 等에 依해 誘發되는 氣道 過敏性的 結果로 나타난다. 最近에는 臨床적으로 可變的 氣道閉塞, 病態生理學的으로 氣道の 過敏性, 病理學的으로 氣道の 炎症性 反應을 보이는 疾患으로 定意한다^{2,3)}. 過去에는 氣管支喘息은 단순히 氣管支平滑筋의 異常收縮에 依한 疾患으로 생각하였으나, 最近에는 氣管支喘息에 對한 概念이 氣道の 慢性炎症性疾患으로 새로이 定立되었다¹¹⁾. 喘息의 原因에 대해서는 알레르기, 感染, 日常의 스트레스에 對한 心因性 生理反應, 空氣汚染, 自律神經失調 等を 들고 있으나, 아직까지는 알레르기로 大部分 받아들여지고 있다²⁾.

韓醫學에서의 喘息은 呼吸急促, 喘鳴有聲이 特異症狀으로 나타나는 哮喘증에 該當되며, 隋時代 巢의 《諸病原候論》⁴⁾에 呻嗽라 하여 그 特徵的 症狀이 記述된 以後 많은 醫書들에 言及되고 있다. 歷代 醫家들 중 王肯堂, 吳謙, 林佩琴 등은 哮와 喘의 概念을 區別하여 哮란 喉中有痰聲한 것을 말하며, 喘이란 呼吸急促한 것을 말한다 고 하였으나, 근래에 와서는 哮喘이라 並稱하여 喘鳴有聲하고 呼吸急促한 것을 特徵으로 하는 症候群으로 인식하고 있다¹²⁾.

鄭 等¹³⁾은 哮喘의 原因을 첫째 冷한 飲料나 혹은 鹹, 酸, 甘味를 지나치게 嗜食하게 되면 積痰蘊熱하여 發生하게 되며, 둘째 外感病邪를 初期에 表散시키지 못하여 餘邪가 肺絡에 潛伏해 있다가 다시 外邪가 侵犯하면 發病하게 되며, 셋째 內在된 素因을 가지고 있는 사람이 寒冷疲勞 等 어떤 誘因을 만나서 發生하게 되며, 넷째 特定의 냄새, 飲食에 對한 過敏反應으로도 發生되며, 다섯째 臟器의인 原因으로 肺腎의 呼吸機能 低下로 發生하게 된다고 整理하였다.

哮喘證의 韓醫學的 治療는 虛證과 實證으로 辨證하여 治療한다²⁾. 實證의 特徵은 病勢가 急迫하고 呼吸은 深長하며 餘裕가 있고 呼出이 빠

르고 흡이 거칠고 크며 脈數 有力하고, 虛證은 病勢가 緩慢하고 숨이 차 呼吸이 계속되지 못하며 吸氣가 빠르고 움직이면 呼吸困難이 加重되고 語聲에 힘이 없으며 脈微弱 또는 無力하다. 哮喘은 發作性的 疾患이며 發作後에는 반드시 正氣가 虛해 있으므로 緩解期에는 扶正祛邪를 해야 한다. 實證은 風寒痰濁 등의 病邪가 爲主가 되므로 外感風寒은 祛風散寒, 宣肺定喘, 痰濕은 燥濕化痰, 降氣定喘, 寒痰은 溫肺散寒, 定喘化痰의 治法으로 治療하고, 虛證은 肺虛 腎虛 등이 爲主가 되므로 肺虛는 涼肺定喘, 心身虛損은 補益心身, 納氣定喘, 上實下虛에는 瀉肺化痰, 補益身元시키는 治法으로 治療한다²⁾.

桑葉 (*Mori Folium*)은 桑科 (뽕나무과: *Moraceae*)에 屬한 落葉喬木인 뽕나무 (*Morus alba* Linne.) 및 同屬 近緣植物의 잎을 乾燥한 것으로¹⁴⁾, 秦·漢代의 《神農本草經》¹⁵⁾에 “葉主除寒熱出汗”이라 記載된 以來, 中藥大辭典¹⁰⁾에서는 性味가 苦甘, 寒하고 肺와 肝으로 歸經하여 去風清熱, 涼血明目的 作用이 있어 風溫發熱, 頭痛, 目赤, 口渴을 다스리며, 肺熱로 인한 咳嗽와 風痺, 癩疹, 下肢上皮膚腫을 다스린다고 하였다.

桑葉의 主成分은 少量의 有機酸을 含有하며, 外感風熱로 인한 輕度의 發熱, 咳嗽 目赤에 菊花 連翹 등과 配合한다 하였고, 肺熱, 風熱로 인한 乾咳, 燥咳에는 枇杷葉, 麥門冬, 沙蔘 등과 配合하여 使用한다 하였다¹⁶⁾.

桑葉에 對한 研究 論文으로는 曹의 桑葉의 抗老化 作用에 對한 實驗的 研究와¹⁷⁾, 李의 Strep-tozotocin誘導 糖尿 動物모델에서 桑葉抽出物의 抗糖尿效果와 機傳 研究¹⁸⁾, 李의 桑葉 水層分割의 自律神經系 및 인슐린 分泌에 미치는 影向과¹⁹⁾, 郭의 桑枝, 桑葉, 桑白皮 및 桑椹子의 抗脂血效果에 關한 研究와²⁰⁾, 許의 桑葉 長期 攝取時 自然發生性 高血壓 白鼠의 高血壓 發生過程에

關한 研究²¹⁾ 등이 있었으나, 桑葉의 喘息과 關聯된 研究 論文은 찾아 볼 수 없었다.

喘息의 鍼灸治療에 對한 文獻 考察 結果, 手太陰肺經과 任脈, 足陽明胃經, 足太陽膀胱經의 肺俞 天突 合谷 足三里 風門 등이 多用되었고, 施灸에서는 肺俞 天突 風門 膻中 膏肓 등이 主로 使用되었으나¹²⁾, 喘息의 鍼灸治療에 對한 臨床 및 實驗 研究를 考察해 보면 肯定的인 面과 否定的인 面이 報告되고 있어 아직까지 喘息의 鍼灸治療에 對한 效果는 不明確하다⁵⁾는 주장이 있으나 이에 대한 더 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

韓醫學의인 免疫의 概念은 《素問》²²⁾ <刺法論>의 “正氣存內, 邪不可干”, <上古天真論>의 “真氣從之, 精神內守, 病安從來”, <評熱病論>의 “邪氣所溘, 其氣必虛”, 《靈樞》²³⁾ <口問>의 “邪氣所在, 皆爲不足”, <百病始生>의 “風雨寒熱不得虛, 邪不能獨傷人” 등에 나타나며, 이들은 疾病의 發生 및 進行을 正邪의 抗爭의 過程으로 認識하고 疾病發生을 正氣의 虛弱으로 보았다. 즉, 正氣는 人體 內에서 一切의 疾病에 抵抗하는 免疫과 類似한 概念으로 邪氣는 一切의 疾病을 일으키는 原因要素의 總稱으로 보아, 疾病을 豫防하고 健康한 狀態를 維持함에 있어서 가장 重要한 것은 正氣를 調養하는 것이라고 하였다. 그러므로 治法은 人體의 抵抗力을 調節하고 安定性을 增強하는 扶正法과 免疫機能을 破壞하는 要素를 除去하는 去邪法이 重要視되고 있다²⁴⁾.

氣管支喘息의 病因에 關與하는 細胞는 T細胞, B細胞, 大食細胞, 好酸球, 肥滿細胞, 氣道上皮細胞 등 여러 가지가 있지만 이중 Th 림프구는 cytokine을 分泌하여 氣道의 炎症反應을 調節하는 重要한 役割을 하고 있다²⁵⁾.

T림프구는 CD3를 表面分子로 가지며, CD4⁺

Tcell, CD8⁺Tcell, cytotoxic Tcell, inducer Tcell 등이 있는데, 이 중 CD4⁺Tcell과 CD8⁺Tcell은 免疫機轉에서 重要な 役割을 擔當한다²⁶⁾. CD4⁺Tcell 은 活性化되었을 때 分泌하는 cytokine 에 따라 Th1細胞와 Th2細胞로 分類된다.

Th1細胞는 주로 CCR5 受容體를 가지고, IL-2, IL-12, IFN (interferon)- γ 를 生産하며 遲延型 過敏反應, 結核菌이나 바이러스에 對한 防禦作用, 腫瘍에 對한 宿主反應에 關與한다. Th2細胞는 CCR3, CCR4, CCR8 受容體를 가지고, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 등을 生産하여 即時型 過敏反應, 氣管支喘息과 같은 알레르기성 疾患, 寄生蟲 感染에 對한 防禦作用 등에 關與한다²⁷⁾. Th1과 Th2細胞는 相互拮抗作用을 통해 免疫均衡을 維持하며²⁸⁾, 알레르기성 氣管支喘息患者의 BALF에서는 Th2細胞의 機能이 活性化됨이 觀察되고 있다²⁹⁾.

CD8⁺Tcell은 class I MHC (抗原提示細胞)와 結合하여 virus나 特定 細菌에 의한 感染이나 惡性腫瘍에 대하여 身體를 保護하는 役割을 한다³⁰⁾.

Th2 cytokine인 IL-4, IL-13은 B細胞를 刺戟하여 IgE 形成을 促進시키고³¹⁾, IL-5는 IL-4의 作用을 도울 뿐만 아니라 骨髓에서 好酸球 分化를 促進하고, 氣道內로 移動하여 氣道內 好酸球를 活性化시키는 役割을 하여 氣管支 喘息 病態 生理에 매우 重要な 役割을 한다.³²⁾

IL-4는 B 細胞 活性化와 IgE 抗體의 發生에 있어서 重要な 役割을 한다. 機能性 IL-4 遺傳子가 缺乏된 생쥐는 IgE를 生産할 수 없다. 免疫反應 初期段階에서 IL-4의 出現은 反應의 性質에 重要な 影響을 준다. IL-4는 抗體 形成을 增進시키고, 遲延型 過敏性 反應을 抑制하는 IFN- γ 의 生産을 抑制한다³³⁾.

IL-13은 Th2細胞에서 주로 生産하며, IL-4와 機能적으로 類似하여, IgE의 生産을 促進한다. 이에 對한 受容體는 大食細胞, 好酸球 好鹽氣球, 肥滿細胞, 內皮細胞 등에 發顯되며, T細胞에는 發顯되지 않는다³³⁾.

알레르기 炎症反應에서 好酸球의 役割을 살펴 보면, 吸入된 抗原은 氣道內 肥滿細胞와 Th2細胞를 活性化시켜서, 炎症을 일으키는 chemokine mediator와, IL-4, IL-5같은 cytokine의 生産을 惹起한다. 好酸球가 여러 가지 cytokine들과 chemokine들의 影響을 통해 氣道組織으로 들어가면, 그들의 生存은 IL-3, IL-5, GM-CSF등에 의해 延長된다. 活性化狀態에서 好酸球는 leukotrien이나 granule protein같은 炎症媒介物을 放出하여 氣道組織에 病變을 일으킨다. 아울러 好酸球는 GM-CSF를 生産하여 그들의 生命을 延長시키고 持續的인 氣道炎症反應에 影響을 준다³²⁾.

藥鍼療法은 經絡學說의 原理에 依據하여 選擇된 藥物을 疾病과 有關한 穴位, 壓痛點 및 陽性反應點에 注入하여 刺鍼과 藥物作用을 통하여 生體의 機能을 測定하고 疾病을 治療하는 新鍼療法으로 體液系統, 免疫系統, 神經系統의 調節作用, 神經傳導, 協調陰陽, 疏通經絡, 調和榮衛氣血 등의 效果가 있다³⁴⁾, 疾病에 따라 選擇된 藥物의 藥液을 經絡學說에 依하여 有關한 穴位 또는 壓痛點에 注入하여 鍼과 藥物의 併合된 效果를 통하여 生體의 機能을 調整하고 病理形態를 變化시켜 鎮痛, 腫瘍誘發抑制등의 治療效果가 있는 것으로, 藥物의 吸收가 빠르고, 經口投與가 不可能한 境遇에 處置할 수 있으며, 患處에 處置할 수 있는 등의 長點이 있다³⁵⁾.

喘息에 觀한 藥鍼의 研究로는 李等⁵⁾이 五拗湯 藥鍼研究, 金等³⁶⁾의 冬蟲夏草 藥鍼研究가 報告되었다.

足三里 (St36)는 足陽明胃經의 合土穴로 臨床에서 가장 많이 活用되는 穴로서^{34,37)}, 疏風化濕 通調經絡 調和氣血 等の 效能이 있어 消化, 循環, 呼吸, 泌尿生殖系統 病症 等に 良好한 效果를 나타낸다³⁷⁾. 陳等³⁸⁾은 哮喘症에 足三里 免疫療法을 研究한 結果 血清 IgE의 減少와 IgA의 上昇, 好酸球의 減少 效果를 報告하였다.

이에 著者는 桑葉藥鍼이 생쥐의 알레르기 喘息에 미치는 影響을 알아보기 위하여, 생쥐에 ovalbumin을 腹腔 投與 및 吸入시켜 알레르기 喘息 病態를 誘發하고, 桑葉 藥鍼液을 足三里에 注入한 後 in vitro screening에서는 FACS analysis를 통해 Granulocytes/lymphocytes 수, CD3e/CCR3⁺ 세포수, CD69⁺/CD3e⁺ 세포수, CD4⁺ 세포수, CD8⁺ 세포수, CD23⁺/B220⁺ 세포수를 측정하였고, in vivo 실험에서는 lung weight 와, total lung cells, total leukocyte in BALF, eosinophils in BALF를 측정하였으며, ELISA analysis를 통하여 혈청내 IL-13, IgE, IL-4의 분비량, BALF內 IL-4의 분비량을 측정하였다. 또한, FACS analysis를 통하여 肺內 Gr-1⁺/CD11b⁺ 세포수, CD3/CCR3⁺ 세포수, CD4⁺ 세포수, CD8⁺ 세포수, CD3e⁺/CD69⁺ 세포수, IgE⁺/B220⁺ 세포수를 측정하고, RT-PCR을 이용하여 喘息 誘發과 關聯된 여러 cytokine들의 mRNA發現을 觀察하였다.

In vivo 實驗에서 肺의 무게, 肺의 總細胞數, BALF內 총림프구수와 호산구수는 MF-HAS에서 control에 비해 보다 減少하였다 (Fig.2-1, 2-2, 2-3, 2-4). 또한, Blood smears staining set을 利用하여 BALF를 染色하여 顯微鏡으로 觀察한 結果 eosinophil이 MF-HAS에서 顯著하게 減少하였다 (Fig.2-5). 肺의 質量增加는 氣道 및 氣管支의 浮腫을 意味하고, 洗滌液內 總細胞數가 높다는 것은 好酸球, 림프구, 大食細胞 等 喘息의 慢

性 炎症性 病理를 일으키는 細胞들이 氣道에 많이 沈着되어있다는 것을 意味한다. 桑葉藥鍼群에서 肺質量, 總細胞數, 총림프구수, 好酸球數가 抑制된 것으로 보아 桑葉藥鍼이 免疫細胞의 氣道內 凝集 및 浸潤에 抑制效果가 있는 것으로 보인다.

ELISA分析에서는 血清內의 IL-13, IgE, IL-4의 分泌量, BALF內의 IL-4의 分泌量이 MF-HAS에서 control에 비해 抑制되었다 (Fig 2-6, 2-7, 2-8, 2-9). IL-4, IL-13은 B細胞를 刺戟하여 IgE 形成을 促進시키고, 好酸球의 凝集을 惹起하고, Th2細胞의 生成을 돕는다.²⁵⁾ 따라서 IL-13, IL-4, IgE 분비량의 減少를 볼 때 桑葉藥鍼이 IL-4, IL-13의 生産을 抑制함으로써 B림프구의 活性化 抑制와 IgE의 生産을 抑制하는 效能을 하여 氣管支喘息에 效果가 있을 것으로 思料된다.

In vitro FACS analysis 結果, 肺細胞中 Granulocytes의 比率이 Control에서는 26.8%이었으나 MF-HAS에서는 11.9%로 減少하였고 (Fig.1-1), CCR3⁺/CD3e⁺細胞의 比率은 Control에서는 92.2%이었으나 MF-HAS에서는 80.7%로 낮아졌다 (Fig.1-2). CD69⁺/CD3e⁺의 比率은 Control에서는 46.8%이었으나 MF-HAS에서는 29.1%로 抑制되었고, CD69⁺/CD3e⁺의 比率은 Control에서는 34.9%이었으나 MF-HAS에서는 42.9%로 增加했다 (Fig.1-3). CD4⁺의 比率은 Control에서는 41.6%이었으나 MF-HAS에서는 40.2%로 減少했고, CD8⁺의 比率은 Control이 20.1%이었으나 MF-HAS에서는 26.3로 增價했다 (Fig.1-4). CD23⁺/B220⁺의 比率은 Control에서는 1.59%이었으나 MF-HAS에서는 0.87%로 抑制되었다 (Fig.1-5).

in vivo 실험을 통한 FACS分析에서도 肺內 Gr-1⁺/CD11b 세포수, CD3/CCR3⁺ 세포수, CD4/

CD8세포수, CD3e⁺/CD69⁺세포수, IgE⁺/B220⁺세포수가 control에 비하여 MF-HAS에서 減少하였다 (Fig.2-10, 2-11, 2-12, 2-13, 2-14).

Gr-1은 顆粒敎에 많고, CD11b는 細胞癒着分子 (Mac-1)로서, 림프구, 大食細胞의 表面에서 發顯되며, 好酸球가 標的臟器로 流入할 때 內皮細胞와 강하게 癒着하여 結締組織으로 流入되는데 Gr-1⁺/CD11b cell 과 CD11b cell의 減少로 볼때 桑葉藥鍼이 好酸球의 內皮細胞癒着에 의한 結締組織으로 流入되는 것을 減少시키는 것으로 思料된다. CCR3는 好酸球에서 가장 높게 나타나고, 好鹽基球, Th2細胞, 喘息환자의 氣道上皮細胞에서 보이며 CCR3 受容體는 好酸球의 活性化와 脫顆粒化에 關與하는 것으로 보인다³⁹. CD3는 T細胞에서 發顯되는 表面分子이다. 따라서 本實驗에서 CD3⁺/CCR3⁺細胞가 桑葉藥鍼에서 減少함을 볼 때 桑葉藥鍼이 好酸球數를 減少시키는 것으로 思料된다. CD4⁺Tcell은 여러 種類의 cytokine을 生産하여 B림프구가 효율적으로 抗體를 生産하도록 도와 주고 免疫反應의 行動細胞를 活性化시키는 役割을 하므로 CD4⁺Tcell의 比率는 一般的으로 免役力의 指標로도 廣範圍하게 應用되고 있다³⁰. 따라서 桑葉藥鍼에 의한 CD4⁺Tcell수의 減少는 過敏한 免疫反應을 調節하는 效果가 있음을 알 수 있다. 또한 CD4⁺Tcell 과 拮抗關係에 있는 CD8⁺Tcell數는 對照群에 비하여 有意한 差異를 보이지 않았다. CD3는 Tcell 決定標識因子로, T림프구 抗原 受容體에 抗原이 結合된 信號를 細胞안으로 傳達하고, CD69는 活性化된 B細胞와 T細胞, 大食細胞, NK細胞에 分布하는 것으로⁴⁰ 本實驗에서 CD3e⁺/CD69⁺細胞가 對照群에 비하여 桑葉藥鍼에서 減少함을 볼 때 桑葉藥鍼이 T細胞의 活性化를 減少시키는 것으로 思料된다.

RT-PCR을 移用하여 喘息 誘發과 關聯된 여러 cytokine 들의 mRNA發顯을 觀察한 結果, TNF-α,

INF-γ, IL-5 등의 mRNA 發顯이 桑葉藥鍼實驗群 (MF-HAS)에서 control에 비하여 顯著히 減少하였다 (Fig.2-15).

以上の 實驗 結果를 綜合하여 보면 桑葉藥鍼施術이 喘息의 病態生理에서 重要한 役割을 하는 T細胞의 活性化를 抑制하고, 炎症誘發 Cytokine인 IL-4, IL-13의 發顯을 抑制함으로써 B림프구의 活性化를 抑制하여 IgE의 生産을 抑制하고, 好酸球의 細胞癒着에 의한 組織 및 氣管支內로의 移動 및 浸潤을 抑制하는데 效果가 있으므로, 臨床의으로도 一定한 效果를 期待할 수 있을 것으로 思料된다.

V. 결 론

桑葉藥鍼이 알레르기 喘息에 미치는 影響을 알아보기 위하여, 생쥐에 ovalbumin을 腹腔投與 및 氣道吸入시켜 알레르기 喘息 病態를 誘發하고, 桑葉藥鍼液을 足三里 注入한 後 觀察한 結果, 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 肺의 무게는 實驗群에서 對照群에 비하여 有意하게 減少하였다.
2. 肺의 總細胞數는 實驗群에서 對照群에 비해 統計적으로 有意한 差異를 보이지 않았다.
3. BALF內의 總 Lymphocyte數와 eosinophil數는 實驗群에서 對照群에 비하여 統計적으로 有意하게 減少하였다.
4. 肺內의 Gr-1⁺/CD11b細胞數, CD3/CCR3⁺細胞數는 實驗群에서 對照群에 비하여 統計적으로 有意하게 減少하였다.
5. 肺內의 CD4/CD8細胞數를 測定한 結果, CD4⁺T細胞數는 實驗群에서 對照群에 비해 有意하게 減少하였고, CD8⁺T細胞數는 實驗群에서 對照群에 비해 有意한 差異를 보이지 않았다.

6. 肺內的 CD3e⁺/CD69⁺細胞數, IgE⁺/B220⁺細胞數는 實驗群에서 對照群에 比하여 統計的으로 有意하게 減少하였다.
7. 血清內 IgE量, IL-13, IL-4는 實驗群에서 對照群에 比해 有意하게 減少하였다.
8. BALF內 IL-4는 實驗群에서 對照群에 比해 有意하게 減少하였다.
9. 喘息 關聯 cytokine들의 mRNA 發顯을 觀察한 結果, TNF- α , INF- γ , IL-5 등의 mRNA 發顯이 實驗群에서 對照群에 比하여 顯著히 減少하였다.

참고 문헌

1. 해리슨 번역 편찬위원회. HARRISON'S 내과학. 서울 : 정담. 1997 : 1258-64.
2. 李珩九, 鄭昇杞. 東醫肺系內科學. 서울 : 아트동방. 1999 : 162-202.
3. 전국의과대학 임상교수편. 임상진단학. 서울 : 한미의학. 2002 : 392-3.
4. 巢元方. 諸病源候論(卷13,14). 서울 : 大星文化社. 1992 : 106-17.
5. 李珩九. 五拗湯이 咳嗽, 喘息에 미치는 影響. 경희한의대논문집. 1982 ; 5 : 175-90.
6. 權純湖. 五拗湯이 알레르기 喘息의 呼吸 樣相과 氣管 組織에 미치는 影響. 대한한의학회지. 1999 ; 20(2) : 98-107.
7. 鄭昇杞. 加味清上補下湯이 喘息에 미치는 影響에 관한 實驗的 研究. 대한한의학회지. 1991 ; 12(1) : 118-38.
8. 김승수, 정희재, 정승기, 이형구. 解表二陳湯이 allergy喘息의 呼吸樣相과 氣管組織에 미치는 影響. 대한한방내과학회지. 1999 ; 19(2) : 59-73.
9. 심문경. 清肺散이 마우스의 면역 및 과민반응에 미치는 영향. 대한소아과학회지. 1997 ; 10(1) : 265-97.
10. 中藥大辭典編纂委員會編. 中藥大辭典(券中). 臺北 : 新文豐出版公司. 1982 : 1482-3.
11. 김영균, 공복철. 細辛根의 항알레르기 效果에 대한 實驗的 研究. 한방성인병학회지. 1998 ; 4(1) : 86-97.
12. 이성환, 김창환, 이운호. 천식의 침구치료에 관한 문헌적 고찰. 대한침구학회지. 2000 ; 17(3) : 37.
13. 鄭昇杞, 李珩九. 哮喘의原因 및 治法에 關한 研究. 大韓韓醫學會誌. 1986 ; 7(1) : 60-7.
14. 李尙仁. 本草學. 서울 : 修書阮. 1981 : 219.
15. 孫星衍輯. 神農本草經. 臺北 : 文光圖書有限公司. 1979 : 167.
16. 李尙仁, 安德均, 辛民教, 盧昇鉉, 李暎鍾, 金先熙. 漢藥臨床應用. 서울 : 成輔社. 1990 : 56-7.
17. 조주형, 김동희. 상엽의 면역 조절 작용에 대한 실험적 연구. 대전대학교한의학연구소논문집. 2001 ; 9(2) : 123-34.
18. 이광해. Streptozotocin유도 당뇨동물모델에서 상엽의 항당뇨 효과 및 기전. 경희약대는문집. 2000 ; 28 : 87-99.
19. 이주선. 상엽 수층분획의 자율신경계 및 인슐린 분비에 미치는 영향. 경희대 대학원. 1998.
20. 곽형. 상지, 상엽, 상백피 및 상심자의 항지혈 효과에 관한 연구. 경희대 대학원. 1992.
21. 허균. 상엽 장기 섭취시 자연발생성 고혈압 백서의 고혈압 발생 과정에 관한 연구. 한양대 대학원. 1983.
22. 洪元植. 精校黃帝內經素門. 서울 : 東洋醫學研究院出版部. 1985 : 11, 124, 285.
23. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울 : 東洋醫學研究院出版部. 1985 : 159, 211, 249. 286-7, 317, 331.
24. 全國韓醫科大學鍼灸經穴學教室. 鍼灸學(上).

- 서울 : 集文堂. 1998 : 382-4, 730-2.
25. Corrigan CJ, Hamid Q, North J, Barkans J, Moqbel R, Durhams S, Gemou-Engesaeth V, Kay AB. Peripheral Blood CD4 but not CD8 T-lymphocytes in patients with exacerbation of asthma transcribe and translate messenger RNA encoding cytokines which prolong eosinophil survival in the context of a Th2- type pattern : Effect of glucocorticoid therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995 ; 12 : 567.
 26. 황상익. 면역의 의미론. 서울 : 한울. 1998 : 143-55.
 27. Bacharier LB, Jabara H, Geha RS. Molecular mechanisms of IgE regulation. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998 ; 115 : 257-69.
 28. Kasakura S : A role for T-helper type 1 and 2 cytokines in the pathogenesis of various human diseases. *Rinsho Byori.* 1998 ; 46(9) : 915-21.
 29. 김대겸. 桑白皮가 제 I 형 알레르기喘息 모델 흰쥐의 BALF내 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 影響. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 2002.
 30. Roitt IM. *Roitt's Essential Immunology.* Blackwell Science. 1997 : 95, 201-21. 363-67.
 31. Ferreira MB, Palma Carlos AG. Cytokines and asthma. *J of investigational allergology and clinical immunology.* 1998 ; 8(3) : 141-8.
 32. Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med.* 2001 ; 344(5) : 350-62.
 33. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax.* 1999 ; 54 : 825-57.
 34. 金定濟 醫. 最新針灸學. 서울 : 成輔社. 1979 : 405.
 35. 崔政燮. 水鍼療法에 關한 考察. 大韓韓醫學會誌. 1990 ; 11(1) : 315-6, 324-6.
 36. 김재홍, 조명래, 유충열, 채우석. 冬蟲夏草藥鍼과 口腔投與가 ovalbumin으로 誘發된 asthma에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2002 ; 19(2) : 39-50
 37. 오계홍. 足三里에 대하여, 韓國의 鍼灸社. 韓國의 鍼灸. 1995 : 19-25.
 38. 陳良良, 李安生, 陶建寧, 陳衛星, 唐蓉芳. 足三里穴位免疫療法防治過敏性哮喘臨床及實驗研究. 中國中西醫結合雜誌. 1996 ; 16(12) : 32-5.
 39. Nicholas WL. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nature review. immunology.* 2001 : 1 : 108-16.
 40. 김세종. 면역학. 서울 : 고려의학. 1994 : 3, 8, 25, 26, 28, 31, 32, 134.