

# 肺俞 羌活藥鍼이 OVA-induced Asthma Mouse Model의 免疫調節에 미치는 영향

장석근<sup>1</sup> · 홍권의<sup>1</sup> · 이병렬<sup>1</sup>

<sup>1</sup>대전대학교 한의과대학 침구학교실

## The Experimental Study on the Immuno-regulatory effect of Notopterygii Rhizoma Herbal-acupuncture at Pyesu(BL13) on OVA-induced asthma in mice.

Suk-Geun Jang<sup>1</sup>, Kwon-Eui Hong<sup>1</sup>, Byung-Ryul Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Daejeon Univ.

### Abstract

**Objectives** : The aim of this study was to investigate the asthma-suppressive and immuno-regulatory effect of NR-HA(*Notopterygii Rhizoma* Herbal-acupuncture) at Pyesu(BL13) on OVA(ovalbumin)-induced asthma in mice.

**Methods** : C57BL/6 mice out of all the experimental groups, except the Normal group and the NR-HA group, were sensitized and challenged with OVA. The mice in the NR-HA group and the OVA-NR-HA group were treated with NR-HA(1%) at Pyesu(BL13). The mice in the OVA-Saline group were injected with saline at Pyesu(BL13). The mice in the OVA-Needle-Prick group were treated with a single prick with an injection needle at Pyesu(BL13). NR-HA, saline injection and needle prick were administered for 8 weeks, three times a week.

### Results :

in vitro

1. The populations of granulocytes, CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> cells, CD69<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> cells, CD4<sup>+</sup> cells and CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> cells in the OVA-induced asthmatic mouse lungs decreased significantly by NR-HAS(*Notopterygii Rhizoma* Herbal-acupuncture solution).

2. The lung weight and total cells in lung of the OVA-NR-HA group decreased significantly compared with those of the OVA-Control group.

3. Total leukocytes and eosinophils in BALF of the OVA-NR-HA group decreased significantly compared with those of the OVA-Control group.

4. The collagen accumulation in the lung sections of the OVA-NR-HA group decreased significantly compared with that of the OVA-control group.

5. The concentrations of IL-4, IL-5, IL-13, IgE in BALF and serum of the OVA-NR-HA group decreased significantly compared with those of the OVA-Control group.

6. The numbers of Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> cells in the OVA-NR-HA group decreased significantly compared with those of the OVA-Control group.

· 교신저자 : 이병렬, 대전광역시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학 침구학교실, Tel. 042-280-2641, Fax. 042-280-2610,  
E-mail : kolbr@hanmail.net

· 접수 : 2005/05/30 · 수정 : 2005/06/20 · 채택 : 2005/06/21

7. The mRNA expressions of TNF- $\alpha$ , IL-5, IL-4 and IL-13 in lung of the OVA-NR-HA group decreased significantly compared with those of the OVA- Control group.

8. The NR-HA group did not show any considerable difference from the Normal group. The OVA-saline group and the OVA-Needle prick group showed suppressive effects on OVA-induced asthma however they were not statistically significant.

**Conclusion** : These results suggest that NR-HA at Pyesu(BL13) is considered to be effective in treating asthma and to be put to practical use in the future asthma clinic.

**Key words** : *Notopterygii Rhizoma*, Herbal-acupuncture, BL13, OVA(ovalbumin)-induced asthma

## I. 緒 論

최근 산업사회의 발달과 더불어 環境汚染 특히, 大氣汚染, 吸煙, 生活樣式的 變化 및 食生活의 西歐化 등으로 인한 呼吸器 疾患이 늘어나고 있는 가운데 특히, 喘息의 경우, 세계적으로 有病率과 死亡率이 점점 증가하고 있는 趨勢이므로 喘息에 대한 새로운 인식과 치료법이 강조되고 있다<sup>1)</sup>.

喘息이란 臨床的으로는 可變的인 氣道閉塞의 증상을 보이고, 病態生理學的으로는 氣道の 過敏性이 存在하고, 病理學的으로는 氣道の 炎症性 反應을 보이는 疾患을 의미 한다<sup>2)</sup>.

喘息의 原因에 대해서는 알레르겐, 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 등을 들 수 있으며, 主要 症狀은 發作的 呼吸困難, 喘鳴, 기침, 肺의 過吸氣, 羅音, 喀痰 등이다<sup>2)</sup>.

韓醫學에서 喘息은 呼吸急促하고 喘鳴有聲을 특징적인 증후군으로 하는 哮喘證과 유사하며<sup>3,4)</sup>, 隋 시대 巢의 「諸病源候論」<sup>5)</sup>에 “上氣喉中如水鷄鳴과 呻嗽”라 하여 그 특징적 증상이 기술된 이후, 많은 醫書들에 언급되고 있다.

喘息은 潤肺, 祛痰, 定喘, 補陰시키는 藥物과 鍼灸治療를 위주로 治療하고 있으며<sup>3,4)</sup>, 최근에는 喘息에 效果가 있다고 기록된 方劑 및 本草를 이용한 喘息의 抑制效果를 밝히는데 主力하고

있다.

五拗湯, 加味清上補下湯과 定喘湯, 清肺散이 喘息에 미치는 영향을 보고 되었고, 升麻葛根湯 加味方, 熊膽 및 우루소데옥시콜린산, 桂薑棗草黃辛附湯, 冬蟲夏草를 이용하여 항알레르기 반응에 대하여 연구하였으나, 肺俞 羌活藥鍼이 喘息抑制 및 免疫系의 調節에 미치는 영향에 대해 보고한 바는 없는 실정이다.

이에 著者는 C57BL/6 mouse를 ovalbumin에 노출시켜 알레르기 喘息病態를 誘發하고, 散表寒, 祛風濕, 止痛의 效能<sup>6)</sup>이 있는 羌活로 藥鍼液을 製造, 調肺氣, 補勞損, 清虛熱, 和營血하는 肺俞(BL13)<sup>7)</sup>에 藥鍼施術한 후, in vitro 및 in vivo 實驗을 통해 喘息抑制 및 免疫調節에 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 材料

#### 1) 動物

動物은 雌性인 4~5週齡의 C57BL/6 mouse를 大韓實驗센터에서 공급받아 實驗 당일까지 固型 飼料(抗生劑 無添加, 三養飼料)와 물을 充分히 供給하고, 室溫 22±2℃를 유지하여 2주일간 實驗室環境에 適應시킨 후 實驗에 사용하였다.

## 2) 藥材

實驗에 사용된 羌活(notopterygii radix;NR)은 大田大學校 附屬韓方病院에서 購入한 것을 精選하여 使用하였다.

## 4) 藥鍼液의 製造

분쇄기를 이용하여 羌活 55 g을 분쇄하여 粉末로 만들어, 원형삼각플라스크에 넣고, 蒸溜水 500 ml를 加하여 3시간 동안 shaking water bath에서 流出한 후, 流出液을 濾過하였다. 이 濾過液을 濾過紙로 3回 濾過한 후, rotary evaporator로 減壓濃縮 하였다. 이 濃縮液에 95 % ethyl alcohol 30 ml를 加하고, 室溫에서 攪拌한 후 방치하여, 沈澱物이 生成되게 한 후 濾過하였다. 이 濾過液을 rotary evaporator로 減壓濃縮한 후, 濃縮液을 다시 濾過하였다. 이 濾過液에 85 % ethyl alcohol 30 ml를 加하고 잠시 攪拌한 후 방치하여, 沈澱物이 生成되게 한 후 濾過하였다. 濾過液에 75 % ethyl alcohol 30 ml를 加하고 攪拌한 후 방치하였다가 濾過하는 조작을 2회 반복하였다. 濾過液중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 減壓 제거하고, 남은 濃縮液이 20ml가 되게 하였다. 1N NaOH를 이용하여 濃縮液을 pH6.8이 되도록 조절하고, 저온에서 12시간 방치한 후 滅菌하였다. 滅菌된 濃縮液에 PBS를 加하여 1 %로 희석하여 藥鍼液으로 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) in vitro

喘息이 유발된 mouse에서 분리한 肺 조직을 잘게 절단한 후 collagenase를 가하여 shaking incubation을 통해 細胞를 分利하였다. 分利해 낸 細胞에 rIL -3/rIL-5를 가하여 incubation하여 活性化 시켰다. 活性化된 細胞에 藥鍼液을 가하여 48시간 동안 배양시킨 후 표식항체를 반응시켜

FACS 분석하였다.

### 2) in vivo

#### ① Asthma mouse model

실험 1주째 200  $\mu$ l의 OVA/alum(500  $\mu$ g/ ml)을, 2-3주째에는 100  $\mu$ l OVA/alu m(500  $\mu$ g/ ml)을 생쥐의 腹腔에 투여(i.p)하였다. 4주째는 마취 후에 100  $\mu$ l의 OVA/alum(500  $\mu$ g/ ml)을 氣道 투여(it) 하였다. 5-8주째는 2.5 mg/ ml의 OVA/P BS 40  $\mu$ l를, 9-12주째는 5 mg/ ml의 OVA/PBS 40  $\mu$ l를 air compressor를 이용하여 30분간 주 3회 노출시켰다. 그리고 5주째부터 12주째까지 8주간 주 3회 肺俞(BL13)에 1 %의 羌活藥鍼液(100  $\mu$ l)을 주입하였다. 實驗群은 10마리를 1群으로 하여, 正常群(Normal), 羌活藥鍼群(NR-HA), 對照群(OVA-Control), Saline群(OVA-Saline), N.P群(OVA-Needle prick), 羌活藥鍼治療群(OVA-NR-HA) 등 6群으로 나누었다. 正常群(Normal)은 아무런 處置도 하지 않았고, 羌活藥鍼群(NR-HA)은 喘息을 誘發하지 않은 正常 mouse의 肺俞(BL13)에 羌活藥鍼을 시행하였다. 對照群(OVA-Control)은 喘息 誘發 후 아무런 處置도 하지 않았고, Saline群(OVA-Saline)은 喘息을 誘發하고 肺俞(BL13)에 100  $\mu$ l의 Saline을 주입하였으며, N.P群(OVA-Needle prick)은 喘息을 誘發하고 肺俞(BL13)에 주사기를 刺入 후 즉시 제거하였다. 羌活藥鍼治療群(OVA-NR-HA)은 肺俞(BL13)에 1%의 羌活藥鍼液(100  $\mu$ l)을 주입하였다. Saline注入, N.P刺戟 및 羌活藥鍼은 5주째부터 12주째까지 8주간 주 3회 시행하였다(Fig.1).

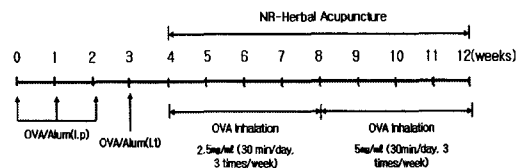


Fig. 1. OVA-induced asthma mouse model

② BALF(Bronchoalveolar lavage fluid) 분리

Mouse를 마취한 후 表皮를 열고 氣道에 주사기를 삽입하고 끈으로 묶어 고정한 후, 10% FBS/DMEM medium 3회 순환시켜 분리하였다.

③ Photomicrographs

분리된 BALF를 세척해서 1,000 rpm으로 5분간 cytopspin한 후, Hemacolor rapid staining set (Merck Germany)를 사용하여 염색하였다. 공기 중에서 건조시킨 후 Bright microscope(Nikon, Japan ;× 400)로 측정하였다.

④ FACS(Fluorescence activated cell sorter)

Mouse에서 분리해낸 肺 조직을 잘게 자른 후 collagenase를 가하여 incubation을 통해 분리해낸 細胞에 표식항체를 반응시켜 Flow cytometer로 분석하였다.

⑤ ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)

ELISA Kit를 사용하여, mouse에서 분리한 BALF와 serum에서 각 cytokine량을 측정하였다. 抗cytokine 항체가 코팅된 96well plate에 BALF 또는 serum을 가하여 반응시킨 후 4번 세척하였다. 그 후 biotin이 표식된 抗cytokine 항체를 가하여 반응시킨 후 4번 세척하고 여기에 straptavidin-HRP를 가하여 ELISA-reader를 이용하여 측정하였다.

⑥ RT-PCR

① Total RNA의 추출

각 實驗群의 mouse에서 떼어낸 肺 조직을 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 RNAzolB (Tel-Test, USA)를 이용하여 total RNA를 추

출하였다. 추출한 RNA는 DEPC(Diethyl Pyrocarbonate)를 처리한 20  $\mu$ l의 蒸溜水에 용해시켜 定量하고, RNA를 확인하기 위하여 RNA 4  $\mu$ g을 EtBr이 들어있는 formaldehyde buffer와 섞어 70  $^{\circ}$ C에서 10분간 denaturation시킨 후, formaldehyde를 넣은 1.5% agarose gel에 loading dye와 함께 loading하여 그 量을 확인하였다. 확인한 RNA는 RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)에 사용하였다.

② cDNA 합성

역전사 반응은 준비된 total RNA 3 $\mu$ g에 해당하는 量을 75 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 denaturation시키고, 이 denaturated total RNA 3  $\mu$ g에 2.5  $\mu$ l의 10 mM dNTPs, 1  $\mu$ l의 random sequence hexanucleotides(25pmole/25  $\mu$ l), RNA inhibitor로서 1  $\mu$ l의 RNasin(20U/  $\mu$ l), 1 $\mu$ l의 100 mM DTT 및 4  $\mu$ l의 5 $\times$  RT buffer (250 mM Tris-Cl, pH8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 혼합한 후, 1  $\mu$ l의 M-MLV RT(200U/ $\mu$ l)를 첨가한 뒤 DEPC 처리된 蒸溜水를 더하여 최종 부피가 20  $\mu$ l가 되도록 하였다. 이 20  $\mu$ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 遠心分離하여 37  $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95  $^{\circ}$ C에서 10분 동안 방치하여 M-MLV RT를 不活性化 시키고 즉시 얼음으로 옮겼다. 이렇게 합성이 완료된 first-strand cDNA는 PCR(polymerase chain reaction)에 사용하였다.

③ cDNA의 PCR 증폭

PCR은 Primus 96 Legal PCR system(with high pressure lid, MWG in Germany)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 1  $\mu$ l의 first-strand cDNA를 주형으로 사용하였다. 주형에 대한  $\beta$ -actin, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-4,

肺俞 羌活藥鍼이 OVA-induced Asthma Mouse Model의 免疫調節에 미치는 영향

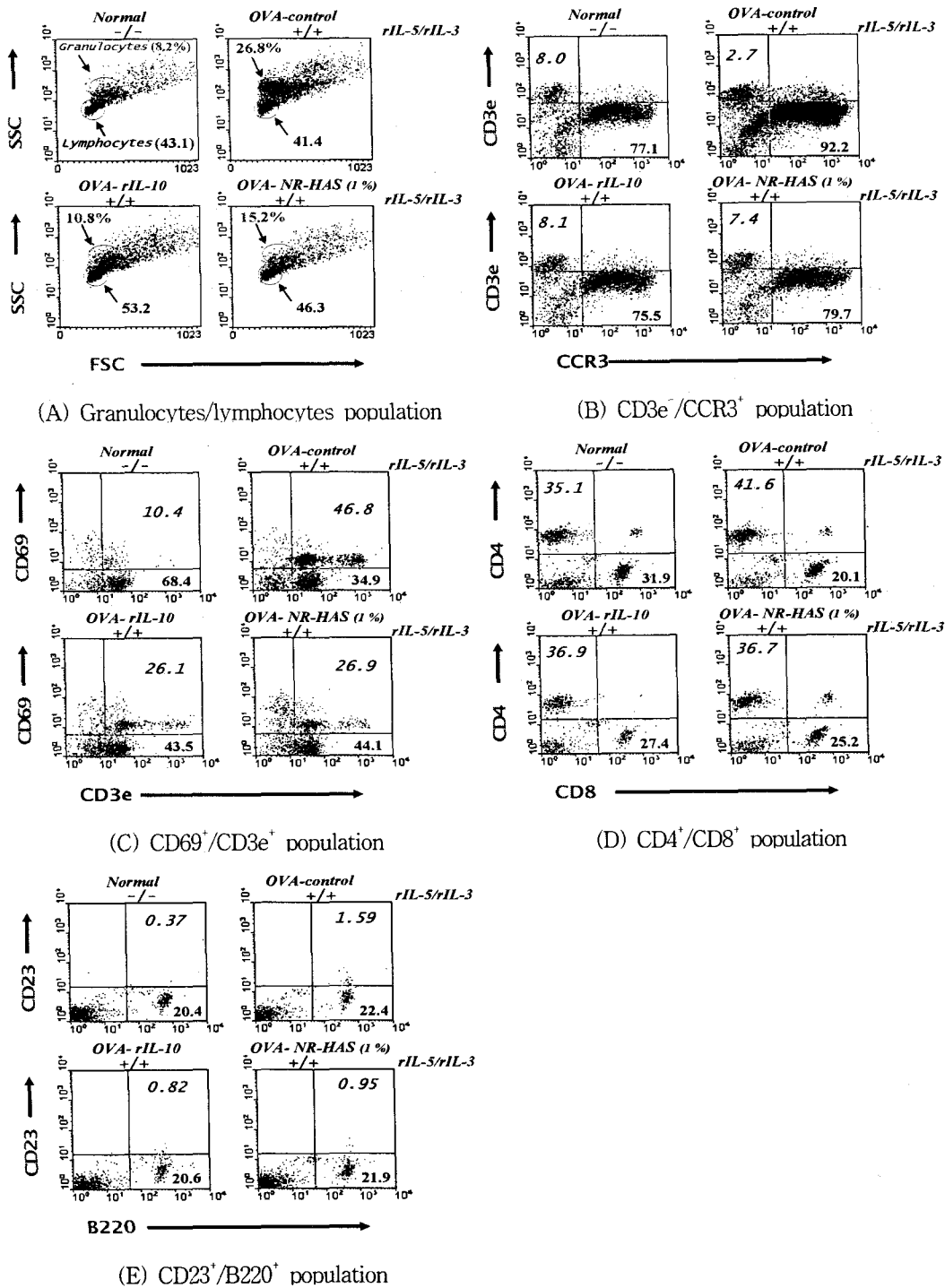


Fig. 2. FACS analysis

IL-13에 대한 sense primer(20pmole/  $\mu$ l)와 antisense primer(20pmole/  $\mu$ l)를 혼합하여 1  $\mu$ l를 가하고, 다시 3  $\mu$ l 2.5 mM dNTPs, 3  $\mu$ l 10 $\times$  PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH8.3, 500 mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>) 및 0.18  $\mu$ l Taq polymerase(5U/  $\mu$ l)를 첨가한 다음, 최종 부피가 30  $\mu$ l가 되도록 멸균증류수를 가하고 predenaturation: 95  $^{\circ}$ C, 5분, denaturation: 74  $^{\circ}$ C, 5분, annealing: 55  $^{\circ}$ C, 1분, elongation: 72  $^{\circ}$ C, 1분을 25cycle한 뒤 postelongation을 72  $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20  $\mu$ l씩 1.2 % agarose gel에 loading하여 50 V 조건에서 30분간 전기영동하여 분석하였다.

### 3. 통계처리

통계는 Student's t-test로 하였다.

## III. 成 績

### 1. in vitro

#### 1) FACS analysis

##### ① Granulocytes 및 lymphocytes population

肺細胞中顆粒球의 비율이 OVA-NR-HAS은 15.2 %로, Normal의 8.2 %, OVA-rIL-10의 10.8 %에 비해 增加했고, OVA-Control의 26.8 %보다는 減少했다(Fig.2).

##### ② CD3e<sup>-</sup>/CCR3<sup>+</sup> population

肺細胞中 CD3e<sup>-</sup>/CCR3<sup>+</sup>細胞의 비율이 OVA-NR-HAS은 79.7 %로, Normal의 77.1 %, OVA-rIL-10의 75.5%에 비해 增加했고, OVA-Control의 92.2 %보다 減少했다(Fig.2).

##### ③ CD69<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> population

肺細胞中 CD69<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup>細胞 비율이 OVA-NR-HAS은 26.9 %로, Normal의 10.4 %, OVA-rIL-10의 26.1 %에 비해 增加했고, OVA-Control의 46.8 %보다 減少했다(Fig.2).

##### ④ CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> population

肺細胞中 CD4<sup>+</sup>細胞 비율이 OVA-NR-HAS은 36.7 %로, Normal의 35.1 %, OVA-rIL-10의 36.9 %와 큰 차이가 없었고, OVA-Control의 41.6%보다 減少했다(Fig.2).

##### ⑤ CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> population

肺細胞中 CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>細胞 비율이 OVA-NR-HAS은 0.95%로, Normal의 0.37 %에 비해 增加했고, OVA-rIL-10의 0.82 %, OVA-Control의 1.59%보다 減少했다(Fig.2).

### 2. in vivo

#### 1) Lung weight

Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群에 비해 肺의 質量이 增加했으나, OVA-Control群보다는 有意性 있게 減少하였다(Fig.3).

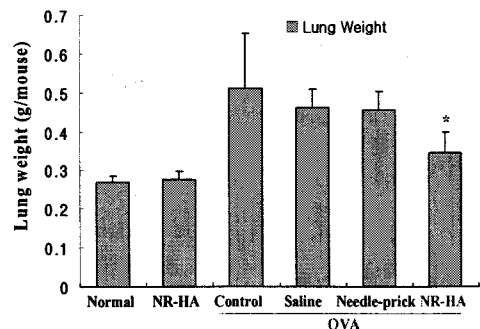
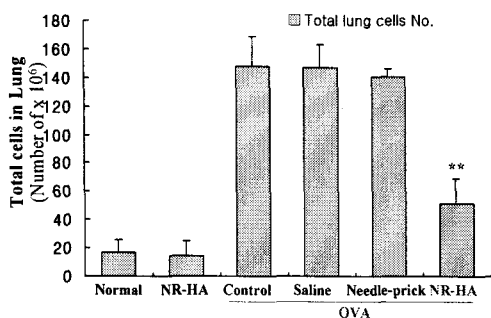
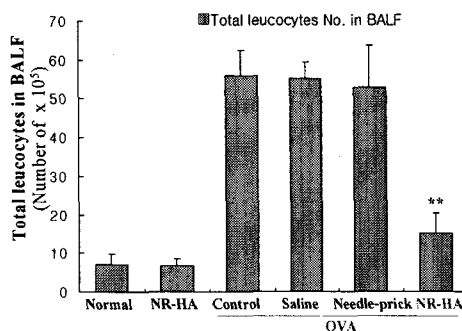


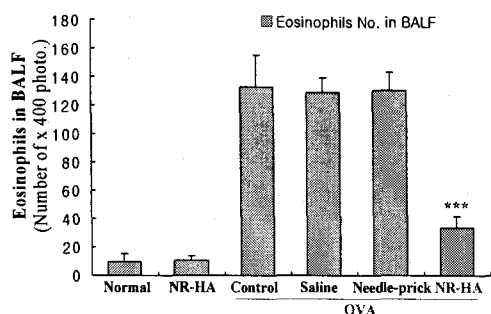
Fig. 3. Lung weight



(A) Total cells in lung



(B) Total leucocytes in BALF



(C) Eosinophils in BALF

Fig. 4. Cell count

## 2) Cell count

### ① Total cells in lung

Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群보다 肺의 總細胞數가 增加했으나, OVA-Control群에 비해 매우 有意性 있게 減少했다(Fig.4).

### ② Total leucocytes in BALF

Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群보다 BALF의 leucocytes 數가 增加했으나, OVA-Control群에 비해 매우 有意性 있게 減少했다(Fig.4).

### ③ Eosinophils in BALF

Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었

고; OVA-NR-HA群은 Normal群보다 BALF의 好酸球 數가 增加했으나, OVA-Control群에 비해 매우 有意性 있게 減少했다(Fig.4).

### 3) Photomicrographs of eosinophils in BALF

Normal群과 NR-HA群은 好酸球 數의 차이가 거의 없었고, OVA-NR-HA群은 OVA-Control群에 비해 현저하게 減少했다(Fig.5).

### 4) Histological analysis of lung sections

Normal群과 NR-HA群은 큰 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群보다 조직에 collagen의 附着과 好酸球 數가 增加된 것이 관찰되었으나, OVA-Control群에 비해 현저하게 減少하였다(Fig.6).

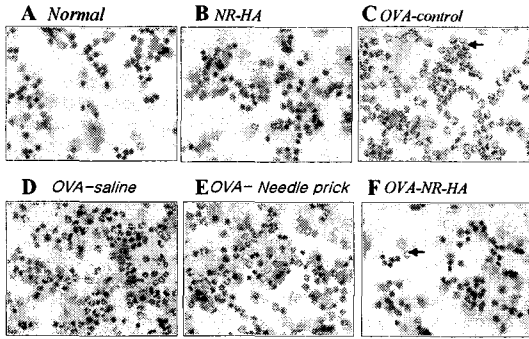


Fig. 5. Photomicrographs of eosinophils in BALF.

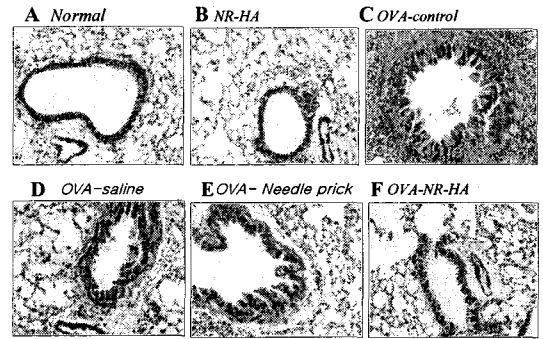


Fig. 6. Histological analysis of lung sections.

## 5) ELISA

### ① IL-4 in BALF

Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群보다 BALF의 IL-4 量이 增加했으나, OVA-Control群에 비해 매우 有意性 있게 減少했다(Fig.7).

### ② IL-5 in BALF

Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群보다 BALF의 IL-5 量이 增加했으나, OVA-Control群에 비해 매우 有意性 있게 減少했다(Fig.7).

### ③ IL-13 in BALF

Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群보다 BALF의 IL-13 量이 增加했으나, OVA-Control群에 비해 매우 有意性 있게 減少했다(Fig.7).

### ④ IgE in BALF

Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群보다 BALF의 IgE 量이 增加했으나, OVA-Contro群에 비해 有意性 있게 減少했다(Fig.7).

### ⑤ IL-4 in serum

Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群보다 serum의 IL-4 量이 增加했으나, OVA-Control群에 비해 매우 有意性 있게 減少했다(Fig.7).

### ⑥ IL-5 in serum

Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群보다 serum의 IL-5 量이 增加했으나, OVA-Control群에 비해 매우 有意性 있게 減少했다(Fig.7).

### ⑦ IL-13 in serum

NR-HA群과 Normal群은 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal보다 serum의 IL-13 量이 增加했으나, OVA-Control群에 비해 매우 有意性 있게 減少했다(Fig.7).

### ⑧ IgE in serum

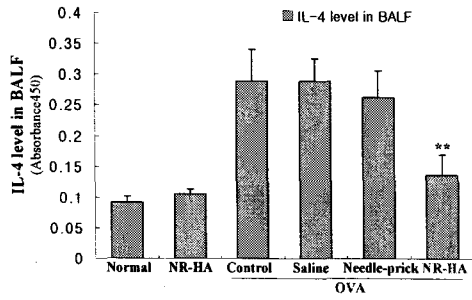
Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群보다 serum의 IgE 量이 增加했으나, OVA-Control에 비해 매우 有意性 있게 減少했다(Fig.7).

## 6) FACS

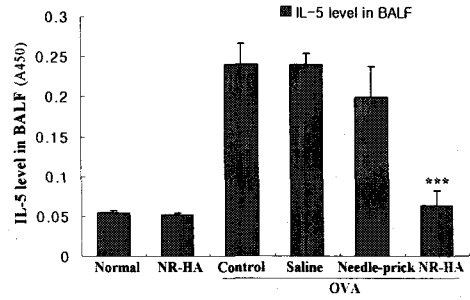
FACS分析에 의해 각 細胞 數를 測定하였다.



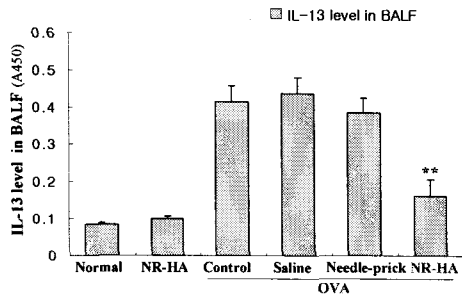
肺俞 羌活藥鍼이 OVA-induced Asthma Mouse Model의 免疫調節에 미치는 영향



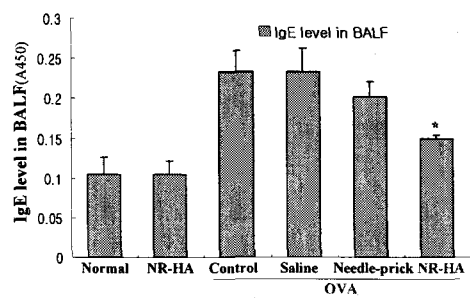
(A) IL-4 in BALF



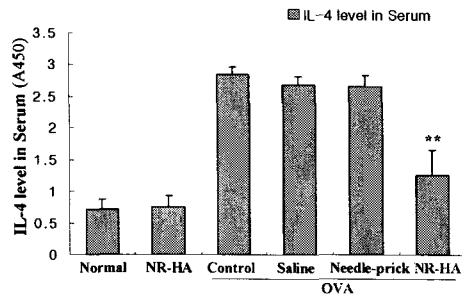
(B) IL-5 in BALF



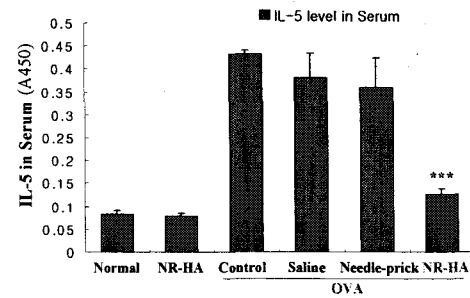
(C) IL-13 in BALF



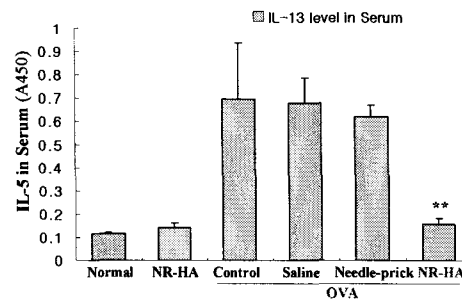
(D) IgE in BALF



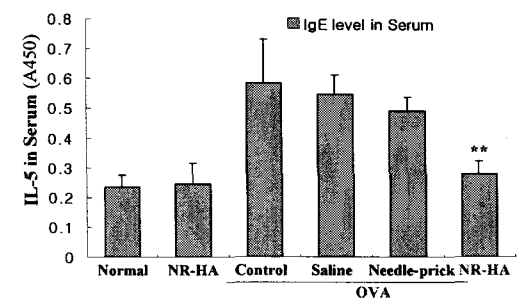
(E) IL-4 in serum



(F) IL-5 in serum



(G) IL-13 in serum



(H) IgE in serum

Fig. 7. ELISA analysis

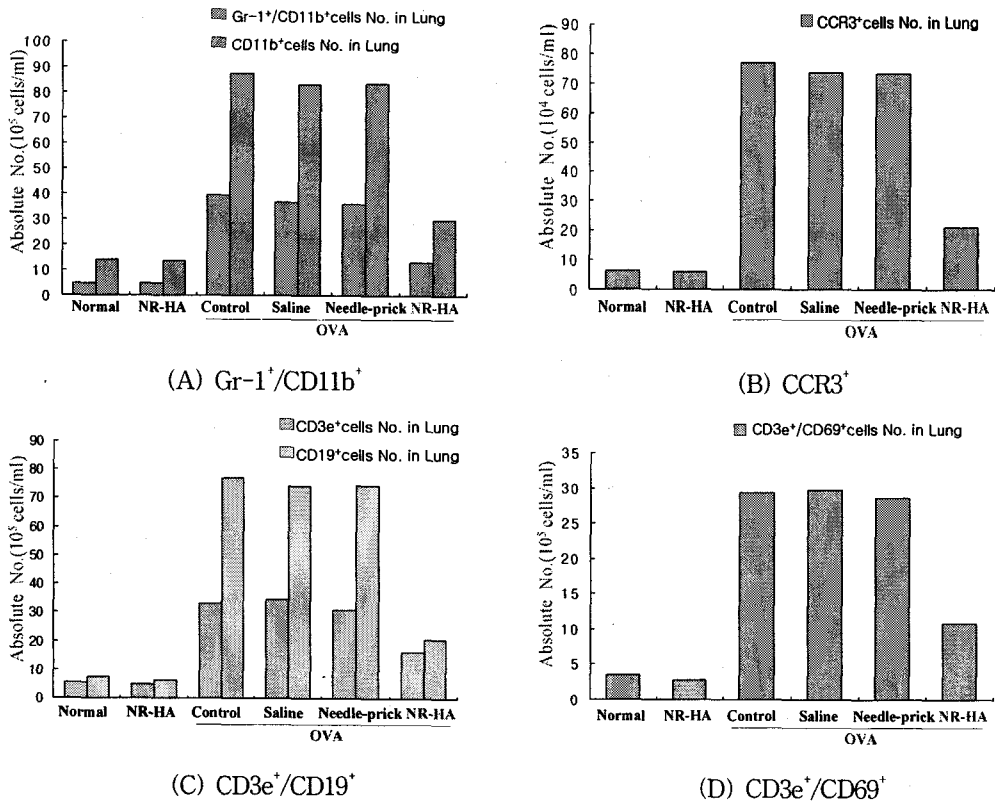


Fig. 8. FACS analysis

① Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>

Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, CD11<sup>+</sup>細胞 數는 Normal群과 NR-HA群에서 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群보다 增加했으나, OVA-Control群에 비해 減少했다(Fig.8).

② CCR3<sup>+</sup>

CCR3<sup>+</sup>細胞 數는 Normal群과 NR-HA群에서 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群보다 增加했으나, OVA-Control群에 비해 減少했다(Fig.8).

③ CD3e<sup>+</sup> 및 CD19<sup>+</sup>

CD3e<sup>+</sup> 및 CD19<sup>+</sup>細胞 數는 Normal群과 NR-HA群은 거의 차이는 없었고, OVA-NR-HA群

은 Normal群보다 增加했으나, OVA-Control群에 비해 減少했다(Fig.8).

④ CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>

CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>細胞 數는 NR-HA群과 Normal群은 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群보다 增加했으나, OVA-Control群에 비해 減少했다(Fig.8).

7) RT-PCR

喘息 유발과 관련된 여러 cytokine들의 mRNA 發顯을 관찰한 結果, TNF- $\alpha$ , IL-5, IL-4, IL-13 등의 mRNA 發顯이 Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群은 Normal群보다 增加했으나, OVA-Control群에 비해

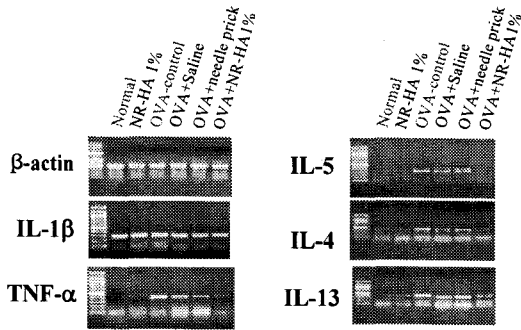


Fig. 9. RT-PCR

減少하였다(Fig.9).

#### IV. 考 察

喘息의 發生은 산업화되고 西歐化된 사회에서 지난 20년간 두 배 이상 늘어났고, 최근의 研究에서는 小兒와 靑少年에서 세계적으로 5-6%의 비율로 增加하고 있다고 한다<sup>1)</sup>. 高度의 산업화에 따른 새로운 抗原의 出現 및 環境公害 특히 大氣汚染, 吸煙人口의 增加 등으로 인해 최근 10년간 喘息의 有病率 및 死亡率 또한 늘어가고 있는 趨勢이다<sup>1)</sup>.

喘息은 臨床的으로 可變的인 氣道閉塞의 증상을 보이고, 病態生理學的으로는 氣道の 過敏性이 존재하고, 病理學的으로 氣道の 炎症性 反應을 보이는 疾患을 말한다<sup>2)</sup>.

喘息의 臨床病理學的 3대 증상은 可逆的 呼吸氣道 閉塞, 好酸球에 의한 慢性 氣管支 炎症 및 氣管支 收縮物質에 의한 氣管支 平滑筋의 收縮이고<sup>2)</sup>, 임상적인 주된 증상은 發作的인 기침, 呼吸困難, 羅音이지만, 重症보다 輕症이 많아서 지속적인 기침, 胸部壓迫感, 咽喉의 異物感 등과 같은 단순한 증상만을 호소하는 경우가 더 많다<sup>2)</sup>.

喘息의 西洋醫學的인 治療는 回避療法, 藥物療法, 免疫療法로 나눌 수 있는데<sup>8,9)</sup>, 回避療法은

喘息의 原因이 되는 알레르겐 즉, 개나 고양이 털, 집먼지 진드기, 꽃가루, 자극성 물질 등의 접촉을 피하는 것으로 특히, 알레르기성 喘息에 효과적이거나 일반적으로 藥物治療를 동시에 실시하여야 효과적이다<sup>8,9)</sup>.

藥物療法은 일반적으로 氣管支를 확장시켜 喘息증상을 완화시켜주는 氣管支 擴張劑를 사용하는데, 藥物의 종류로는 교감신경 자극제, 테오필린 제제, 부교감신경 차단제 등이 있다. 특히, 교감신경 자극제의 경우 사용 즉시 효과를 느낄 수 있어 환자들이 선호하나 原因이 되는 氣管支의 炎症을 가라앉히지 못하고 藥物에 대한 耐性이 생긴다는 문제점으로 인해, 抗炎症 藥劑인 부신피질호르몬을 주로 사용한다. 부신피질호르몬 제제는 炎症을 가라앉히는 효과는 뛰어나지만 고혈압, 당뇨, 골다공증, 백내장, 녹내장 등의 심각한 부작용을 초래할 수 있다<sup>8,9)</sup>.

免疫療法은 原因抗原의 回避가 불가능하고, 藥物治療로 호전이 없을 때 사용하는 방법으로 原因抗原에 따라 개개인 환자에 맞는 免疫주사를 투여하는 방법이다. 일반적으로 輕症 내지 重症의 氣管支 喘息 환자에게만 사용하는 것이 바람직하며 發病的 原因이 꽃가루나 집먼지 진드기처럼 원인물질이 확실한 경우 시행하는 것이 가장 바람직하다<sup>8,9)</sup>.

현재까지의 喘息治療는 여러 가지 한계와 부작용이 있고, 최근 喘息에 대한 定意가 氣道の 慢性 炎症性 疾患으로 새롭게 정립되면서 氣管支 喘息에 關한 研究는 氣道の 炎症發顯에 關與하는 細胞와 分子水準의 機轉에 초점이 맞추어지고 있다<sup>2)</sup>.

免疫學的 觀點에서, 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 최근의 研究를 통해서 氣道內 炎症反應은 주로

好酸球에 의해 일어난다는 것이 밝혀져 好酸球은 細胞毒性炎症細胞로 인식이 전환되었다<sup>10)</sup>. 그 밖에 T細胞는 여러 cytokine들을 分泌하고, B細胞는 抗體를 분비하는 細胞로 分化함으로써 氣道の 炎症反應을 조절하는 重要的 役割을 하고 있다<sup>10)</sup>.

抗原이 氣道를 통해 들어오면 抗原提示細胞(APC)에 의해 抗原이 提示되어지고 提示된 抗原이 T細胞에 인식되어지면 T細胞가 신호를 받아서 IL-4, IL-13이 分泌되어 B細胞를 刺戟하여 B細胞에서 IgE를 생성하게 된다. IgE가 肥滿細胞와 結合하면 여러 가지 chemical mediator들이 細胞밖으로 遊離되며, 이들 중 Histamine, PGD2(prostaglandin D2) 및 Leukotrien C4, Leukotrien D4 등은 수분 내에 氣道收縮을 일으키고, 30~60분 후에 소실되는 早期喘息反應을 일으킨다. 이런 과정이 반복되면 活性化된 T細胞와 好酸球이 氣道 주변에 모여들면서 더욱 活性化되어, 3~4시간 후에는 氣管支 收縮反應을 나타내기 시작하고, 4~8시간에 최고치에 달하며, 12~24시간 이후에 소실되는 後期喘息反應을 일으킨다<sup>9,10)</sup>.

韓醫學的에서는 疾病의 發生 및 進行을 正邪抗爭의 過程으로 인식하고 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 유지함에 있어서 가장 중요한 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 있다.

喘息 中 氣息이 連續的으로 促急하여 呼吸困難한 것을 喘이라 하고, 喉中에서 소리가 나는

것을 哮라고 하여 哮症, 喘症, 痰飲의 範疇로 간주하고 있으며, 臨床상 哮는 喘을 반드시 兼하므로 統稱 哮喘이라 한다<sup>3,4)</sup>.

喘症은 일반적으로 呼吸困難 혹은 氣息이 促急하여 헐떡거리며 呼吸이 頻數하여 입을 벌리고 어깨를 들먹거리게 되며,甚하면 身體와 肚腹을 動搖하는 症이라 하였다<sup>3,4)</sup>. 《素問調經論篇》에 “氣有餘則 喘咳上氣 不足則 息利少氣”라 하였고, 《素問藏氣法時論篇》에 “肺病者 喘咳逆氣”라 하였으며, 《靈樞五閱五使》에 “肺病者 喘息鼻張”이라 하여 喘症에 대하여 처음으로 言及한 以來 喘症은 흔히 볼 수 있는 呼吸器 疾患의 하나임을 인식하여 왔다. 특히, 「金匱要略」<sup>11)</sup>에 氣喘 肩息하고 不能平臥하는 病候를 “上氣”라 定義하고 喉中水鷄聲하는 哮症과 咳而上氣하는 “肺脹證”을 여기에 包括한다고 하여 上氣, 肺脹까지 包含시켰고, 「諸病源候論」<sup>5)</sup>에서는 上氣喉中如水鷄鳴과 呻嗽라는 症狀이 처음 기재되었다. 明代 이후에 王<sup>12)</sup>, 吳<sup>13)</sup> 등은 哮는 喉中有痰聲響하고, 喘은 呼吸急促한 것으로 定意하여 哮와 喘을 區分하였으나, 清代의 葉<sup>14)</sup>가 哮와 喘을 구분하지 않고 단지 症狀의 輕重, 緩急이 서로 다르다고 한 이후, 哮喘證은 喘鳴有聲, 呼吸急促한 하나의 症候群으로 인식되어왔다<sup>15)</sup>.

哮喘의 原因으로는 朱<sup>16)</sup>는 대부분 飲冷說, 驚恐의 所致로 보아 寒冷說, 心因說을 주장하였고, 朱<sup>17)</sup>, 龔<sup>18)</sup>, 李<sup>19)</sup>, 王<sup>4)</sup> 등은 痰으로 인하여 발생한다고 하여 痰因說을 주장하였다. 痰因說에 대하여 李<sup>19)</sup>은 痰火鬱於內한데 風寒이 侵入하거나, 혹은 坐臥寒濕하여 積火薰蒸하여 발생한다고 하였고 李<sup>19)</sup>, 王<sup>4)</sup>, 林<sup>20)</sup>, 沈<sup>21)</sup> 등은 痰은 酸, 鹹, 恬味를 過食함으로 인해 積熱이 內生하여 발생한다고 하여 痰火內鬱을 중요시하였다. 張<sup>22)</sup>은 ‘夙根’이라 하여 특수한 內的素因을 가진 사람이 寒冷, 痰勞 등을 받아 발생한다하여 素因說

에 관하여 언급하고 있고, 葉<sup>23)</sup>은 初感外邪한데 實於表邪하면 邪氣가 肺俞에 머물면서 頻發, 頻止한다하여 感染說을 주장하였다. 우리나라의 경우, 許<sup>3)</sup>가 風寒喘, 痰喘, 氣喘, 火喘, 水喘, 久喘, 胃虛喘, 陰虛喘의 8種으로 구분하기 시작한 후, 現在는 주로 寒冷, 心理的要因, 遺傳的素質, 痰, 過敏反應, 脾, 肺, 腎 등의 呼吸臟腑의 機能障礙로 보고 있다<sup>3,4)</sup>.

哮喘은 일반적으로 虛症과 實症으로 나누어 治療한다<sup>5)</sup>. 實症의 特徵은 病勢가 急迫하고 呼吸은 深長하며 여유가 있고 呼出이 빠르고 흡이 거칠고 크며 脈數하고 有力한데 반해, 虛症은 病勢가 緩慢하고 숨이 차 呼吸이 계속되지 못하며 吸氣가 빠르고 움직이면 呼吸困難이 가중되고 語聲에 힘이 없으며 脈微弱 또는 無力하다. 實症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의, 痰濕은 燥濕化痰, 降氣定喘의, 寒痰은 溫肺散寒, 定喘化痰의 治法으로 治療하고, 虛症은 肺虛腎虛 등이 爲主가 되므로 肺虛는 涼肺定喘의, 心身虛損은 補益心身, 納氣定喘의, 上實下虛에는 瀉肺化痰, 補益身元의 治法으로 治療하는데, 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<sup>5)</sup>.

氣管支 喘息에 대한 既存의 韓醫學 研究는 文獻的, 實驗的, 臨床的 研究方法을 통해 報告되어 왔다. 文獻的인 研究로 鄭 등<sup>24)</sup>은 哮喘의 原因과 治法을, 吉村 등<sup>15)</sup>은 알레르기성 喘息을 東西醫學的으로 比較, 考察하여 정리하였고, 鄭<sup>25)</sup>은 알레르기 질환의 韓方療法에 관하여 정리하였으며, 金 등<sup>26)</sup>은 水喘, 火喘 및 心臟性 喘息의 治法, 處方에 관하여 정리하였다. 實驗的 研究로 五拗湯의 鎮靜, 鎮痛, 鎮咳, 抗 Histamine, 氣管支 平滑筋 弛緩效果를 보고 되었고, 五拗湯이 알레르기 喘息의 呼吸 樣相과 氣管 組織에 미치는 影響 등

을 연구하여 咳嗽, 喘息 및 咽痛에 효능이 있음이 보고 되었으며, 加味清上補下湯과 定喘湯이 喘息에 미치는 영향을, 清肺散이 마우스의 면역 및 과민반응에 미치는 영향에서 清肺散이 면역계의 Th1細胞의 기능을 增加시키고, Th2細胞의 기능을 抑制시킬 수 있다고 보고 되었다. 또한 항알레르기 반응에 대한 實驗研究로는 升麻葛根湯加味方의 마우스의 항알레르기 및 免疫반응에 미치는 영향을, 熊膽 및 우루소데옥시콜린산의 항알레르기 효과를, 桂薑棗草黃辛附湯의 항알레르기 효과를, 冬蟲夏草 藥鍼과 口腔投與가 Ovalbumin으로 유발된 Asthma에 미치는 영향을 보고 되었다. 臨床 研究로, 조 등<sup>34)</sup>은 哮喘證의 臨床 研究, 허 등<sup>35)</sup>은 哮喘證에 대한 清上補下湯의 臨床的 效果에 대하여 보고한 바 있다.

羌活(Ostericum koreanum)은 繖形科(Umbelliferase) 羌活의 根莖을 乾燥한 것으로<sup>6)</sup>, 性은 溫, 無毒하고, 味는 辛苦하며, 性味가 極烈하여 上升發表시키는 作用이 强하고, 散表寒, 祛風濕, 利關節의 效能<sup>27)</sup>이 있어, 感冒風寒, 頭痛無汗, 風寒濕痺, 項強筋急, 骨節酸痛, 風水浮腫, 癰疽瘡毒 등의 증상에 효과가 있으며<sup>6)</sup>, 膀胱經에 들어가 肌表에 있는 風寒의 邪氣를 發散시키는 作用이 있으므로 風寒表證에 頭痛身痛을 겸한 증상에 좋은 治療效果가 있다<sup>6)</sup>. 또한, 羌活의 主要成分은 furanocoumarin계 물질 즉, imperatorin, oxypeuce danin, isoimperatorin 등<sup>28)</sup>으로 최근의 李 등<sup>29)</sup>의 동물실험연구를 통해 抗炎症, 解熱, 鎮痛, 抗浮腫 등에 有意한 효능이 나타났다<sup>28)</sup>.

藥鍼療法(Herbal acupuncture)은 經絡療法과 藥物療法의 原理를 바탕으로 研究된 新鍼治療 중의 하나이다. 疾病과 有關한 部位인 經穴, 阿是穴 등의 陽性 反應點에 精製한 各種 韓藥物을 選擇 注入함으로써 經穴과 藥物이 疾病에 대해

綜合的인 作用을 충분히 發揮하여 疾病을 豫防하고 治療하는 方法으로<sup>30)</sup>, 국내에서도 동물실험을 통해 免疫系 疾患의 豫防 및 治療 등에 有效하다는 보고가 최근에 많이 있으며, 臨床에서도 各種 疾患에 널리 응용되고 있다<sup>30)</sup>.

肺俞(BL13)는 肺의 俞穴로서, 第3胸椎 棘突起 兩傍 各 1.5寸에 위치한다<sup>7)</sup>. 調肺氣, 補勞損, 清虛熱, 和營血 등의 效能이 있어 주로 肺炎, 肺結核, 咳嗽, 哮喘, 氣管支炎, 自汗, 盜汗 등의 疾患에 응용한다<sup>7)</sup>. 해부학적으로 健脊上神經, 胸叢神經, 健脊叢神經, 副神經 등이 분포하여, 嚴 등<sup>31)</sup>은 肺俞穴의 자극은 上·中·下 神經節의 刺戟傳導를 조절함으로써 肺臟의 生理的 作用에 영향을 미치는 것으로 추정하였다.

本 實驗에서는 C57BL/6 mouse를 ovalbumin에 노출시켜 알레르기 哮喘病態를 誘發하고, in vitro 및 in vivo 실험을 통해 肺俞 羌活藥鍼이 哮喘抑制 및 免疫調節作用에 미치는 영향을 살펴보았다.

in vitro에서, FACS 分析을 통해 羌活藥鍼이 granulocytes 및 lymphocytes 비율에 미치는 영향을 살펴본 결과, 肺 細胞 中 顆粒球의 비율은 OVA-NR-HAS은 15.2 %로, Normal의 8.2 %, OVA-rIL-10의 10.8 %에 비해 增加했고, OVA-Control의 26.8 %보다는 減少했다(Fig.2). granulocytes는 과립성 백혈구, 즉 顆粒球로서, 건조 후의 染色性에 따라서 好酸性, 好中性, 好鹽基性으로 나눌 수 있다. 好中球은 白血球 中 食菌作用이 강력하여 食細胞라고도 하며, 好酸球은 기생충의 感染이나 알레르기성 疾患일 경우에 增加하고, 好鹽基球은 血液 內에서 血液이 凝固하는 것을 막아준다<sup>9,32)</sup>. 따라서 本 實驗의 결과는 羌活藥鍼液이 OVA-induced asthma에서 肺內 炎症細胞의 增加를 抑制할 가능성을 시사하고 있다.

肺 細胞 中 CD3e<sup>-</sup>/CCR3<sup>+</sup>細胞의 비율은, OVA-NR-HAS에서 79.7 %로, Normal의 77.1 %, OVA-rIL-10의 75.5 %에 비해 增加했고, OVA-Control의 92.2 %보다 減少했다(Fig.2). CCR3는 好酸球에서 가장 높게 나타나고, 그 외 好鹽基球, Th2細胞, 喘息 환자 의 氣道上皮細胞에서 보이며, 好酸球의 活性化와 脫顆粒化에 관련한다<sup>9,32,33)</sup>. 本 實驗에서 羌活藥鍼液에 의해 CD3e<sup>-</sup>/CCR3<sup>+</sup>細胞 비율이 減少한 것은 羌活藥鍼液이 OVA-induced asthma에서 好酸球의 活性 및 脫顆粒을 抑制할 가능성이 있는 것으로 여겨진다.

肺 細胞 中 CD69<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup>細胞의 비율은 OVA-NR-HAS에서 26.9 %로, Normal의 10.4 %, OVA-rIL-10의 26.1 %에 비해 增加했고, OVA-Control의 46.8%보다 減少했다(Fig.2). CD3는 T細胞 決定標識因子로, T細胞 抗原 수용체에 抗原이 결합된 신호를 細胞 안으로 전달하고<sup>9,32,33)</sup>, CD69는 活性化된 B細胞와 T細胞, 大食細胞, NK細胞에 分布한다<sup>9,32,33)</sup>. 本 實驗에서 羌活藥鍼液에 의해 CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>細胞 비율이 減少한 것은 羌活藥鍼液이 OVA-induced asthma에서 T細胞의 活性를 抑制할 가능성이 있는 것으로 여겨진다.

肺 細胞 中 CD4<sup>+</sup>細胞 비율은 OVA-NR-HAS에서 36.7 %로, Normal의 35.1 %, OVA-rIL-10의 36.9 %와 큰 차이가 없었고, OVA-Control의 41.6 %보다 減少했다(Fig.2). CD4는 보조 T細胞와 단구 일부, 피질 가슴샘세포 일부에 發顯하는 것으로, TCR과 함께 MHC class II를 인지하여<sup>9,32,33)</sup>, 세포유착 과 세포자극 전달의 중요한 기능을 가지면서, T細胞의 活性 및 抑制를 나타내는 표지가 된다<sup>9,32,33)</sup>. 本 實驗에서 羌活藥鍼液에 의해 CD4<sup>+</sup>細胞가 減少한 것은, 羌活藥鍼液이 OVA-induced asthma에서 보조 T細胞를 抑制

할 가능성을 의미한다.

肺 細胞 中 CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>細胞 비율이 OVA-NR-HAS에서 0.95 %로, Normal 의 0.37 %에 비해 增加했고, OVA-rIL-10의 0.82 %, OVA-Control의 1.59 %보다 減少했다(Fig.2). CD23은 B細胞 일부, 好酸球, 단구, 수상돌기세포, 혈소판에 발현하는 細胞로, 大食細胞와 好酸球에 의한 細胞毒性을 媒介한다<sup>9,32,33</sup>. B220은 사람에게 없지만 쥐의 B細胞 표면에 있는 표식자로, B220<sup>+</sup>細胞 數의 增加는 전반적인 體液性 免疫의 增加를 나타낸다<sup>9,32,33</sup>. 本 實驗에서 羌活藥 鍼液에 의한 CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>細胞의 減少는 羌活藥 鍼液이 OVA-induced asthma에서 B細胞의 活性을 抑制할 가능성이 있는 것으로 思料된다.

이상의 screening결과를 근거로, 羌活藥 鍼의 喘息抑制와 免疫調節作用을 in vivo에서 알아보기 위하여 C57BL/6 mouse로 OVA-induced asthma 모델을 작성하고, 調肺氣, 補勞損, 淸虛熱, 和營血의 작용이 있는 肺俞(BL13)<sup>7</sup>에 羌活藥 鍼을 시술하였다.

C57BL/6 mouse 10마리를 1群으로 하여, 正常群(Normal), 羌活藥 鍼群(NR-HA), 對照群(OVA-Control), Saline群(OVA-Saline), N.P群(OVA-Needle prick), 羌活藥 鍼治療群(OVA-NR-HA) 등 실험군을 6群으로 나누었다. 正常群(Normal)은 아무런 處置도 하지 않았고, 羌活藥 鍼群(NR-HA)은 喘息을 誘發하지 않은 正常 mouse의 肺俞(BL13)에 羌活藥 鍼을 시행하였다. 對照群(OVA-Control)은 喘息 誘發 후 아무런 處置도 하지 않았고, Saline群(OVA-Saline)은 喘息을 誘發하고 肺俞(BL13)에 100 $\mu$ l의 Saline을 주입하였으며, N.P群(OVA-Needle prick)은 喘息을 誘發하고 肺俞(BL13)에 주사기를 刺入 후 즉시 제거하였다. 羌活藥 鍼治療群(OVA-NR-HA)은 肺俞(BL13)에 1%의 羌活藥 鍼液(100 $\mu$ l)을 주입하였다.

肺質량 측정결과, NR-HA群은 Normal群과 거의 차이가 없었다. OVA-Control群에서는 Normal群에 비하여 肺質량의 增加가 관찰되었고, OVA-NR-HA群에서는 OVA-Control群에 비하여 肺質량이 減少하였다(Fig.3). 喘息에서 肺의 質量增加는 肺와 氣管支의 炎症으로 인한 collagen의 合成結果 발생한 것으로, 肺와 氣管支의 病理學的인 변화를 의미한다<sup>32,33</sup>. 本 實驗에서 OVA-NR-HA群의 肺質량 減少는, OVA-induced asthma에서의 肺內 collagen 合成 및 蓄積에 대한 肺俞 羌活藥 鍼의 抑制效果에 의한 것으로 思料된다. 肺內 總 細胞數는, Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-NR-HA群에서는 Normal群보다 增加하였으나, OVA-Control群에 비해 減少했다(Fig.4). 本 實驗에서 OVA-Control群의 肺內 總 細胞數 增加는 肥滿細胞, 好酸球, 淋巴球, 大食細胞 등 喘息을 일으키는 免疫細胞들이 增加되어 氣管支 및 肺에 沈着, 浸潤되어 있음을 의미하고, OVA-NR-HA群의 肺內 總 細胞數 減少는 肺俞 羌活藥 鍼이 喘息病態에서 肺內 免疫細胞의 增加 및 浸潤을 抑制한 것으로 思料된다.

BALF 內의 leukocytes와 eosinophils의 數는, Normal群과 NR-HA群에서 거의 차이가 없었고, OVA-Control群에서는 Normal群에 비하여 有意하게 增加하였으나, OVA-NR-HA群에서는 OVA-Control群에 비해 현저하게 減少하였다(Fig.4). Blood smears staining set로 BALF를 染色하여 관찰 한 결과에서도, OVA-NR-HA群의 BALF에서 OVA-Control群에 비해 好酸球가 減少한 것을 확인할 수 있었다(Fig.5). 好酸球는 즉시형 과민 후기단계 반응의 炎症性 浸潤內에 풍부하게 들어있는 골수 유래 顆粒球로서, 알레르기성 疾患의 많은 病理過程에 參與한다<sup>33</sup>. 本 實驗의 결과는 肺俞 羌活藥 鍼이 알레르기 喘息

의 병리과정에서 염증성 세포의 肺內 凝集 및 浸潤에 대한 抑制效果가 있음을 나타낸 것으로 思料된다.

組織學的 檢査결과, OVA-Control群에서는 肺와 氣管支의 炎症으로 인하여 collagen이 조직에 다량으로 附着되고 주변의 好酸球도 다량으로 增加되었음을 알 수 있었다. 이에 비해 OVA-NR-HA群에서는 collagen의 沈着 및 好酸球가 減少되어, 肺俞 羌活藥鍼의 肺, 氣管支內 collagen 沈着 및 好酸球 移動에 대한 抑制效果를 확인할 수 있다(Fig.6).

IL-4는 주로 Th2細胞에서 생성되어 B細胞의 分化와 增殖을 促進하며, B細胞 活性化와 IgE 抗體의 발생에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>32,33</sup>. IL-5는 Th2 細胞 및 活性化된 肥滿細胞에 의해 生産되며 好酸球의 成長과 分化를 자극하고 성숙한 好酸球를 活性化한다<sup>32,33</sup>. IL-13은 주로 Th2細胞에서 生産되며, IL-4와 機能的으로 類似하여 Th2細胞의 生成 및 IgE의 生産을 促進한다<sup>32,33</sup>. IgE는 주로 IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$ 에 의해 調節되고, 肥滿細胞나 好鹽基球의 細胞表面에 강력히 結合하여 히스타민과 세로토닌 등 毒性 아민화합물을 分泌함으로써 심한 過敏症狀을 일으키게 하므로 알레르기 반응에서 중요한 요건이 된다<sup>32,33</sup>. TNF- $\alpha$ 는 주로 活性化된 단핵 大食細胞에 의해 生産되는 cytokine으로, 感染부위로 호중구 및 단핵구의 보충을 자극한다<sup>33</sup>. IL-1 $\beta$ 는 주로 活性化된 단핵 大食細胞에 의해 生産되는 cytokine으로, 선천면역에서 숙주의 炎症반응을 媒介하는 기능이 있다<sup>33</sup>.

BALF와 serum에서 IL-4, IL-5, IL-13, IgE의 level을 측정한 결과, Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-Control群에서는 Normal群에 비하여 有意한 增加를 보였으나, OVA-NR-HA群에서는 OVA-Control群에 비해

有意性 있게 減少하였다(Fig.7). 또한, RT-PCR을 이용하여 喘息 유발과 관련된 여러 cytokine들의 mRNA 發顯을 관찰한 결과, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-4, IL-13 등의 mRNA 發顯이 Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-Control群에서는 Normal群에 비하여 增加하였으나, OVA-NR-HA群에서는 OVA-Control群에 비해 減少하였다(Fig.9). 이러한 결과는, 肺俞 羌活藥鍼이 IL-4, IL-5, IL-13의 生産을 抑制함으로써 B細胞와 好酸球의 活性化 및 IgE의 生産을 抑制하며, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-4, IL-13 등의 mRNA 發顯을 抑制하여, 喘息에서 炎症 및 알레르기 반응을 抑制하는 效能이 있음을 의미한다.

Gr-1은 顆粒球에서 發顯하는 分子이고, CD11b는 顆粒球, 단구, NK細胞, 大食細胞에 發顯하는 세포유착분자(Mac-1)로<sup>9,32,33</sup>, 好酸球가 標的臟器로 유입할 때 Rolling 후 두 번째 단계에서 세포유착분자가 內皮에 發顯되어 있는 ICAM-1, 2(intercellular adhesion molecule 1, 2) 등과 癒着하여 內皮細胞와 강하게 결합한 후, PAF, LTB<sub>4</sub>, eotaxin(CCL11), RANTES 등의 化學走性因子에 의해 경피내 이동이 일어나 結締組織으로 유입된다<sup>32,33</sup>. 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, 好酸球의 活性化와 脫顆粒化에 関여한다<sup>9,32,33</sup>. FACS 측정결과, Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>細胞, CD11<sup>+</sup>細胞 및 CCR3<sup>+</sup>細胞는 Normal群과 NR-HA群에서는 거의 차이가 없었고, OVA-Control群에서는 Normal群에 비해 增加하였으나, OVA-NR-HA群에서는 OVA-Control群에 비해 減少하였다(Fig.8). 이는 肺俞 羌活藥鍼이 喘息病리과정에서 炎症細胞의 減少와 더불어, 好酸球의 內皮細胞癒着에 의한 경피내 이동 및 活性化를 抑制한 것으로 思料된다.



CD19는 대부분의 B細胞에 發顯하며 CD21 및 CD81과 공조수용체 복합체를 형성하여 B細胞 抗原 수용체 복합체로부터 오는 신호와 상호작용을 한다<sup>9,32,33</sup>. FACS 측정 결과, CD19<sup>+</sup>細胞數는 Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-Control群에서는 Normal群에 비하여 增加하였으나, OVA-NR-HA群에서는 OVA-Control群에 비하여 減少하였다(Fig.8). 이는 肺俞 羌活藥鍼이 알러지 반응을 나타내는 免疫細胞 중 B細胞를 減少시킨 것으로 思料된다.

CD69는 活性化된 B細胞와 T細胞, 大食細胞, NK細胞에 分布하며 림프구의 신호전달에 參與한다<sup>32,33</sup>. FACS 측정 결과, CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>細胞數는 Normal群과 NR-HA群은 거의 차이가 없었고, OVA-Control群에서는 Normal群에 비해 증가하였으나, OVA-NR-HA群에서는 OVA-Control群에 비하여 減少하였다(Fig.8). 이는 肺俞 羌活藥鍼이 T細胞의 活性을 抑制한 것으로 思料된다.

in vivo에서, 肺俞 羌活藥鍼이 喘息 病態에서의 免疫細胞 活性 및 cytokine 發顯을 抑制하는 것으로 나타났으나, Normal群과 NR-HA群에서는 거의 차이가 없었다. 이는 肺俞 羌活藥鍼이 正常狀態에서는 거의 작용하지 않고 病的인 狀態에서만 炎症 및 알러지 반응과 관련있는 因子들을 조절하는 것으로 판단되어진다. 또한 OVA-Saline群과 OVA-needle prick群은 OVA-Control群에 비해 有意한 차이가 없어 本 實驗에서의 喘息抑制 効果는 肺俞 羌活藥鍼에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

이상의 實驗結果를 綜合하면, 肺俞 羌活藥鍼 施術이 喘息의 病態生理에서 중요한 역할을 하는 Th2細胞의 活性化를 抑制하고, 炎症誘發 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-13의 發顯을 抑制함으로써 B細胞의 活性化 및 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 이동 및 浸潤을 抑制하는데 效果가 있으므로, 臨床적으로도 활용이 기대되며, 또한 肺俞 羌活藥鍼이 正常 및 病理狀態에 따라 免疫관련 因子들을 調節하는 作用이 있는 것으로 나타나 향후 이에 대한 지속적인 연구가 더욱 필요하리라 思料된다.

## V. 結 論

肺俞 羌活藥鍼이 正常 mouse와 알레르기 喘息이 유발된 mouse의 免疫機轉에 미치는 影響을 比較檢討하기 위하여 C57BL/6 mouse에 알레르기 喘息病態를 誘發하고 喘息이 誘發된 mouse와 正常 mouse의 肺俞(BL13)에 羌活藥鍼을 施術한 후, in vitro 및 in vivo 실험을 통해 肺俞 羌活藥鍼이 喘息抑制 및 免疫調節作用에 미치는 影響을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

in vitro

1. 肺內 granulocytes, CD3e<sup>-</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>細胞 비율은 有意性있게 減少하였다.

in vivo

2. 肺의 質量 및 總細胞數는 有意性있게 減少하였다.
3. BALF內의 總 淋巴球와 好酸球數가 有意性있게 減少하였다.
4. 組織學的 검사결과, collagen의 附着이 有意性있게 減少하였다.
5. BALF 및 serum 內 IL-4, IL-5, IL-13, IgE 量이 有意性있게 減少하였다.
6. 肺內 Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>細胞數가 有意性있게 減少하였다.
7. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5 IL-13 등의 mRNA 發顯이 有意性있게 減少하였다.

參 考 文 獻

1. Hartert TV, Peebles RS Jr. Epidemiology of asthma: the year in review. *Curr Opin Pulm Med.* 2000 ; 6(1) : 4-9.
2. 한용철. 臨床呼吸器學. 서울 : 일조각. 1994 : 208-9.
3. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂. 1998 : 145-480.
4. 王肯堂. 六科准繩. 서울 : 柳林社. 1975 : 143.
5. 巢元方. 諸病源候論(卷13,14). 서울 : 大星文化社. 1992 : 106-17.
6. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울 : 永林社. 1991 : 128-9.
7. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學(上, 下). 서울 : 集文堂. 1991 : 382-4.
8. Choudhury K J, Ffoulkes Crabbe DJO. Acupuncture for bronchial asthma. *Alternative Medicine.* 1989 ; 3 : 127-32.
9. 대한 천식 및 알레르기학회. 천식과 알레르기질환. 서울 : 군자출판사. 2002 : 1-44, 59-67, 237-326.
10. Ferreira MB, Carlos AG. Cytokines and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 1998 ; 8(3) : 141-8.
11. 張仲景. 金匱要略. 서울 : 醫道韓國社. 1975 : 57-61.
12. 王肯堂. 證治準繩(一). 北京 : 人民衛生出版社. 1991 : 229-31.
13. 吳謙. 醫宗金鑒(中). 서울 : 大星文化社. 1991 : 390-1.
14. 葉天士. 臨證指南醫案. 서울 : 成輔社. 1982 : 299-300.
15. 吉村永星, 黃義玉, 鄭昇杞, 李珩九. 알레르기성喘息에 관한 文獻의考察(東西醫學의比較考察). 대한한의학회지. 1990 ; 11(1) : 39-70.
16. 朱籊. 普濟方. 서울 : 翰成社. 1982 : 1900.
17. 朱震亨. 丹溪心法. 臺北 : 五州出版社. 1981 : 348.
18. 襲廷賢. 萬病回春. 서울 : 행림출판사. 1972 : 127-9.
19. 李挺. 醫學入門. 臺北 : 臺聯國風出版社. 1973 : 429-30.
20. 林珮琴. 類證治裁. 서울 : 成輔社. 1980 : 110.
21. 沈金鰲. 沈氏尊生書. 臺北 : 自由出版社. 1972 : 49.
22. 張介賓. 景岳全書. 臺北 : 臺聯國風出版社. 1972 : 348.
23. 葉天士. 臨證指南醫案. 서울 : 翰成社. 1982 : 299-300.
24. 鄭昇杞, 李珩九. 哮喘의 原因 및 治法에 관한 研究. 대한한의학회지. 1986 ; 7(1) : 60-7.
25. 鄭昇杞. 알레르기 질환의 한방요법(천식을 중심으로). 대한한의학회지. 1990 ; 11(2) : 11-5.
26. 김영태, 권혁성, 정승기, 이형구. 水喘, 火喘 및 心臟性 喘息의 治法, 處方에 관한 東西醫學의 文獻 考察. 대한한의학회지. 1995 ; 16(1) : 172-83.
27. 李時珍. 本草綱目. 臺北 : 鼎文書局. 1973 : 461-2.
28. 윤영석, 이상인. 한국산 羌活의 품질평가방법에 관한 연구. 경희한의대 논문집. 1989 ; 12(1) : 133-61.
29. 李尙仁. 漢藥臨床應用. 서울 : 成輔社. 1982 : 52-3.
30. 김대수. 삼종의 제법에 따른 人蔘水鍼이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. 경희의학. 1989 ; 5(1) : 97-105.
31. 嚴泰植. 五臟俞穴과 周圍神經關係에 대한 문헌적 고찰. 동의신경정신과학회지. 1991 ; 2(1) : 29-37.
32. Lukacs NW. Role of chemokines in the

- pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol.* 2001 ; 1(2) : 108-16.
33. Abul K Abbas, Andrew H Lichtman. 세포분자면역학. 서울 : 범문사. 2004 : 477-522.
34. 조영민, 정희재, 정승기, 이형구. 小青龍湯이 allergy喘息의 呼吸樣相과 氣管組織에 미치는 影響. *경희의학.* 1999 ; 15(1) : 78-89.
35. 허승철, 박광은, 정승기, 이형구. 哮喘證에 대한 淸上補下湯의 臨床的 觀察. *The 8th INT'L Congress of oriental medicine.* 1995.