

신수혈의 침자극과 황기약침이 실험용 생쥐의 면역활성물질인 cytokine의 IL-6 발현에 미치는 영향

김중수 · 신상섭* · 김철호** · 박선동*** · 박원환*

ABSTRACT

Effects of Acupuncture and Radix Astragali aqua-acupuncture at Sinsu(BL23) on transcriptional expression of mouse cytokine IL-6

Jong-Soo Kim, Sang-Sup Sin*, Cheul-Ho Kim**, Sun-Dong Park***, Won-Hwan Park*

*Dept. of Diagnostics, Oriental Medical College, Dongguk University

**Dept. of Biochemistry, Oriental Medical College, Dongguk University

***Dept. of Bangjehak, Oriental Medical College, Dongguk University

Acupuncture and Radix Astragali aqua-acupuncture stimuli have long been used to cure human diseases. However, it still remains to be unknown on its action mechanism, physiological and biochemical aspects. Thus, many attempts were made to show the scientific background covering the above mentioned mechanisms. Most recent studies show that these tests improve blood circulatory system and increase leucocyte counts.

In this study, we have applied the acupuncture stimuli to mouse Sinsu(BL-23), which is a stimulative point of oriental medicine, to see if cytokine such as IL-6 can be detected. Mice were treated with lipopolysaccharide(LPS) for inflammation induction, and then reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) using each primer set was performed to trace the amounts of mRNA.

The results are summarized as follows ;

1. IL-6 was not temporarily expressed in normal mice 15 min after the acupuncture was pulled out. But, it started to show a feeble expression at 30 min after the removal of acupuncture and it started to reduce at 1h. after the acupuncture was pulled out

2. IL-6 was specifically expressed in LPS-treated mouse 30 min after the acupuncture was pulled out. The transcriptional expressions of LPS-treated mice were more effective than those of normal mice at 30 min after the removal of acupuncture

3. IL-6 was not temporarily expressed in normal mice 15 min after Radix Astragali aqua-acupuncture. But it expressed most highly at 30 min, and the transcriptional expressions of IL-6 was continued to 3 h.

4. IL-6 was not expressed in all the time after Radix Astragali aqua-acupuncture in LPS-treated mice.

Therefore, a follow-up of cytokine IL-6 can be used not only a basis of the effect of acupuncture and Radix Astragali aqua-acupuncture but a diagnosis guide through the immunological action of thats.

And, it is suggested that cytokine's expression by Acupuncture and Radix Astragali aqua-acupuncture stimulation should be continuously elucidated.

key word : acupuncture, Radix Astragali aqua-acupuncture, sinsu(BL-23), cytokine, IL-6, lipopolysaccharide(LPS), RT-PCR, mRNA, immunological action

*東國大學校 韓醫科大學 診斷學教室

**東國大學校 韓醫科大學 生化學教室

***東國大學校 韓醫科大學 方劑學教室

I. 서론

생체의 방어기전에는 선천성 방어기전과 후천성 방어기전이 있는데, 면역반응의 실체가 되는 것은 후천성 방어기전이다. 후천성 방어기전은 특이하게 자극되기 전까지는 아무런 활동을 하지 않고 있다가 적당한 자극이 있으면 이에 대비하여 활성화 될 수 있는 준비상태에 놓이게 된다.²⁻¹⁾ 이와같이 생체는 외사의 침습에 대하여 그 내부환경을 항상적으로 유지하는 방어기전을 발동하여 생체를 방어하고 있다. 이러한 침습에 대하여 조기에 대응하는 면역활성조절물질로는 interleukin-1 α , interleukin-1 β , interleukin-6, 종양괴사인자(TNF) 등을 들 수 있다. 이들은 그 생물학적 작용의 다양성, 생성세포의 다양성으로 생체의 항상성을 유지시키는 기본적인 호르몬의 일종일 것으로 생각되고 있다.³⁾

그리고 한의학에서는 인체의 각종 질병에 대하여 침과 약침재를 이용한 치료가 광범위하게 이루어져 오고 있다. 특히 침구치료는 인체에 흐르고 있는 경락과 경혈들을 침으로 자극하여 체내의 신경과 기혈을 원활히 순환시킴으로써 질병의 치료는 물론, 예방에 높은 효과를 나타내고 있다. 특히 최근 연구에 의하면 침자극은 병균에 대한 면역 물질인 백혈구를 만들고 증가시킴으로써 그 비율을 적절히 조절하여 여러 신체 기관의 운동, 분비, 흡수 및 자양 등의 기능에 도움을 주어 질병의 예방과 치료효과를 나타내게 한다.^{1,2,3)}

특히, IL-6는 면역 세포인 B-cell과 T-cell의 증식과 분화를 촉진시키며 면역계와 조절계에 다양한 기능을 나타낸다. 또한 cytokine의 적절한 발현이 생체의 항상성유지에 작용하지만 과잉의 또는 장기적인 생성은 역으로 조직의 파괴나 병적상태의 악화로 연결될 가능성이 있으며 그 생성조절은 엄밀한 제어하에 있는 것으로 보인다. 그러나 많은 생물 활성이 *in vitro*계에서 검출된 것으로서 실제 *in vivo*계에서 일어나는 생체반응에 대한 생물활성과 2개의 cytokine이 협동적으로 작용하는 경우에 보이는 생체반응등에 대해서는 불명확한 상태에 있다.^{3,8)}

본 논문은 신수혈의 침자극과 황기약침을 이용하여 생체내에서 일어나는 유전자반응을 관찰한 것으로서, 실험용 생쥐의 면역활성물질인 cytokine

의 IL-6 발현을 추적하였다. 신수혈(B-23)은 신장의 유혈로 신장의 기능을 왕성하게 하여 그 결과 생명력이 고무되고 일신이 강건해지는 혈이고, 황기(Radix Astragali)는 補脾昇陽, 益衛固表, 益氣昇陽, 托瘡生肌의 효과가 있어 기허를 치료하는 약으로 이용되고 있다.^{5,6,7,17)}

이에 저자는 신수혈의 침자극과 황기약침을 이용하여 면역체계의 Interleukin-6의 유전자 발현능역을 관찰하였던 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 실험방법

1. 재료

1) Primer

IL-6-5' 5'-ATCCTCGACGGCATCTCAGCC-3'
IL-6-3' 3'-CTACATTTGCCGAAGAGCCCT-5'

2) 약침약물

2-1) 약재

상품화된 약재를 동국대학교 부속한방병원에서 구입하여 사용하였다.

황기 (*Radix Astragali*)

300g

2-2) 제조방법^{6,7)}

상기의 약재 300g 분량을 3000ml 등근 플라스크에 증류수 2,000ml과 함께 넣은 다음 냉각기를 부착시켜 2시간 동안 전탕하여 여과하였다. 여액은 rotary evaporator로 감압농축하고 농축액에 증류수를 가하여 전량을 200ml이 되도록 한 다음, 실온까지 냉각하고 ethanol(Hayman limited, Witham, England)을 가하여 75% ethanol 용액으로 되게 한 다음, 교반하고 냉장상태로 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 rotary evaporatory로 감압농축한 농축액에 증류수 100ml을 가하고 용해시킨 후, ethanol을 가하여 85% ethanol 용액으로 되게 한 다음 교반하고 냉장상태로 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 rotary evaporatory로 감압농축한 농축액에 증류수 100ml을 가하고 용해시킨 후, ethanol을 가하여 95% ethanol 용액으로 되게 한

다음 교반하고 냉장상태에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 rotary evaporatory로 감압농축하여 생성된 농축액에 생리식염수를 加하고 1N NaOH로 pH 6-7로 조절하여 전량이 1,000ml이 되게 한 다음, 냉장상태에서 24시간 방치한 후 membrane filter (0.2 μ m, ϕ 47mm, Whatman, England)로 여과한 후 가압멸균하여 약침액으로 사용하였다.

3) 약침기

1.0 ml의 1회용 주사기(26G, Bobin Medica Co., Korea)를 사용하였다.

4) 생쥐

체중 25-30g의 ICR계 웅성 생쥐를 물과 고형사료(실험동물생쥐용, 삼양유지)를 충분히 공급하면서 2주 이상 실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 침치치 및 혈액채취

생쥐를 고정시킨후 인체의 신수혈(BL23)에 해부학적으로 상응하는 부위를 골도법에 의하여 취혈하였다. 침자극원에 대한 반응을 실험하기 위하여, 신수혈에 자침만 하는 경우와 LPS 전치치 후 자침을 하는 경우의 두가지로 나누어서 실험을 실시하였으며 5분간 유침을 하였다. 또한 자침하기전을 control로 하고 발침 후 15분, 30분, 1시간, 3시간 단위로 생쥐의 동공에서 혈액을 채취하였다. LPS 전치치는 lipopolysaccharide 20 μ g/mouse을 투여하였고 12시간이 경과 된 다음 자침을 실시하였다.

황기약침에 대한 반응도 침자극원에 대한 반응처럼 약침만 치치하는 경우와 LPS전치치후 약침치치를 하는 경우의 두 가지로 나누어서 실험을 하였다. 약침만을 치치하는 경우는 생쥐를 고정시키고 신수혈에 황기약침액 0.1 ml/mouse을 처치한 다음 15분, 30분, 1시간, 3시간 단위로 혈액을 생쥐의 동공에서 채취한 것이고, LPS 전치치후 약침치치를 하는 경우는 LPS (20 μ g/mouse)를 처치한 다음 12시간이 경과한 후에 생쥐를 고정시키고, 신수혈에 황기약침액 0.1 ml/mouse을 처치한 다음 15분, 30분, 1시간, 3시간 단위로 혈액을 채취한 것이다.

2) 혈액으로부터 RNA 분리

Total RNA는 RNA isolation kit (TaKaRa, Co., Japan)를 이용하여 생쥐의 혈액으로부터 추출하였다. 생쥐로부터 100 μ l의 혈액을 채취한 다음, catrimox-14TM이 담겨져 있는 microtube에 첨가하였다. 이때 sample을 격렬하게 혼합해 주고, 상온에서 10분 이상 놓아둔 후, 12,000rpm에서 5분 동안 원심분리를 하였다. 현탁액은 버리고 1 ml의 멸균수를 가지고 조심스럽게 침전물을 씻어 주었다. 0.5 ml lithium reagent을 첨가하여 pellet을 씻어준 후 잘 혼합해 주었다. 탁상용 원심분리기를 이용하여 15,000rpm에서 5분 동안 원심분리를 하였다. 이때 현탁액은 버리고 침전물만을 취하여 차가운 70% ethanol을 가지고 씻어 주었다. Speed bag을 이용하여 pellet을 건조시킨 후, 0.1% DEPC가 들어 있는 멸균수 20 μ l로 RNA를 용해시켰다. 가능하다면 바로 다음 실험에 이용하고, 저장시에는 -70°C에 보관하여 사용하였다.

3) Reverse Transcription-Polymerization Chain Reaction (RT-PCR)

Reverse transcription은 생쥐의 혈액을 취한 후, reverse transcriptase (TaKaRa Co, Japan)를 이용하여 실시하였다. 각 sample의 total RNA은 50 pM random 9 mer, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 1 U/ μ l RNase inhibitor, 0.25 U/ μ l reverse transcriptase를 1 x PCR buffer에 혼합하고, 이 reverse transcriptase solution을 위에서 분리된 RNA 9.5 μ l (\leq 1 μ g total RNA)와 잘 혼합하였고 탁상용 원심분리기를 이용하여 몇초 동안 원심 분리하였다. cDNA를 만들기 위한 반응 조건으로 30°C에서 10분, 42°C에서 30분, 99°C에서 5분 동안 incubation시켰다. Reverse transcription의 반응 종결은 5°C에서 5분 동안 놓아 둬으로써 끝냈다. 위에서 얻어진 complementary DNA (cDNA)는 PCR에 이용되었다.

PCR은 2.5 mM MgCl₂, 2.5 U/ μ l Tag polymerase (TaKaRa Co., Japan)와 각각의 10 pmol primer를 reverse transcription에서 얻어진 cDNA 10 μ l와 잘 혼합한 다음, 전체 부피 20 μ l를 가지고 PCR을 수행하였다. PCR은

Perkin-Elmer DNA thermal cycler 480을 이용하였다. 초기 denaturation을 위해서 94°C에서 5분 동안 1 cycle을 하였고, 94°C에서 1분, primer annealing을 위해서 50°C에서 1분 그리고 elongation을 위해서는 72°C에서 2분으로 하여 50 cycle로 수행하였다. 72°C에서 2분 동안 최종적인 extension을 하였다. 각각의 PCR 생성물은 1 µg/mL ethidium bromide를 포함하고 있는 1×TBE buffer 내에서 1% agarose gel을 이용하여 전기영동 하였다.

다른 방법으로는 생쥐의 동공으로부터 100 µl의 혈액을 채취하여 위와 같은 방법으로 total RNA를 분리한 후 첫 번째 strand cDNA로 역전사시켰다. Avian transcriptase (TaKaRa Co., Japan)에 대한 primer는 50 pM의 농도를 가진 random 9 mer를 이용하였으며, reverse transcription에 사용된 reaction solution은 5 mM MgCl₂, 1 U/µl RNase inhibitor, 1 mM dNTP, 0.25 U/µl reverse transcriptase로 수행하였다. Transcription reaction은 30°C에서 10분, 42°C에서 30분, 99°C에서 5분 동안 실시하였으며, 반응의 종결을 위하여 5°C에서 5분 동안 놓아 두었다. 그런 후 동일 tube에 RNase H, DNA polymerase, primer를 넣고 37°C에서 10분 간 반응시켜 두번째 strand를 합성했다. cDNA stock은 RT-PCR에 이용될 때 까지 -20°C에 보관하여 사용하였다. PCR은 2.5 mM MgCl₂, 2.5 U/µl Tag polymerase, 각각의 primer의 10 pmol을 1× PCR buffer에 넣어, 전체부피 20 µl로 만들어서 수행하였다. 각각의 tube에, 알려지지 않은 농도의 cDNA 10 µl와 IL-1α를 발현시키는 발현 vector 1 µl를 첨가하였다. PCR은 94°C에서 5분 동안 denaturation시킨후, 50 cycle로 Perkin-Elmer DNA thermal cycler 480을 이용하여 수행하였다. 각 cycle의 증폭은 94°C에서 1분, primer annealing을 위해서 50°C에서 1분 그리고 elongation을 위해서는 72°C에서 2분으로 구성하였다. 최종적으로 생성된 PCR 생성물들은 ethidium bromide (0.5 µg/µL)를 가지고 염색된 1% agarose gel에 loading하여 전기영동하였다. 그리고 UV light를 이용하여 primer 쌍을 이용하여 증폭된 DNA fragment의 450 bp의 band를 확인하였다.

4) LPS처치에 의한 염증유발^{8,9,11,18,19)}

용성 생쥐 100마리를 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자원센터에서 구입하여 200 µl의 증류수에 최종적으로 10µg/20µl LPS농도 (*Escherichia coli* LPS 0111, B4; Difco Labs. Detroit, MI, USA)가 되도록 조정하여 관절부위 (knee joint)에 주사하였다. 한편, 여러가지 양이 다르게 재조합한 IL-6 (Pfizer Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan의 polymyxin B를 10 U/ml 함유)를 주사하였다. 주사후 시간별로 관절부위를 1 ml의 saline으로 닦은뒤 부어오른 관절에 주사기를 사용하여 관절액(joint fluid)를 모았다. 이를 4°C 6,000rpm에서 60분간 eppendorf 원심분리한 뒤, cell-free synovial fluid(SF), 즉 관절염증부 유액을 모아 -70°C에 보존하며 분석에 사용하였다. 이때 전체 leucocyte (synovial exudate cells, SEC수)와 세포분석을 하였다.

III. 실험결과

IL-6은 inflammatory, metabolic, physiological, haematopoietic과 immunological 활성도와 같은 여러가지 특성을 소유하고 있다. 그 중에서 병태성 세포의 억제기능은 항암연구에 널리 이용되고 있는 요소이다. 본 연구에서는 침에 의해서 면역활성물질인 IL-6가 생쥐내에서 증강되는지를 알아보기 위해서, 생쥐의 신수혈에 5분 동안 유침을 한 후 발침을 하였다. 그리고 발침 후 각각 0분 (control), 15분, 30분, 1시간과 3시간 단위로 생쥐의 동공에서 혈액을 채취하여 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 이용하여 DNA의 양을 비교하였다.

1. LPS처치 전의 침자극이 생쥐 IL-6유전자발현에 미치는 효과

Fig. 1에서 보여주는 것처럼, IL-6는 450 bp에서 RT-PCR에 의해 검출되었다. Control에서는 약간의 양이 검출되고 있으나 발침 후 15분에서는 오히려 IL-6의 생성이 일시적으로 억제되었으며 발침 후 30분에서는 약간의 발현이 인정되었으나 1시간 이후에서는 그 양이 점차로 감소하여 정상때와 같은 양으로 안정화되었다.

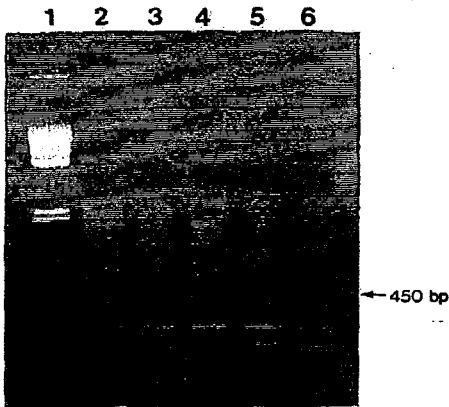
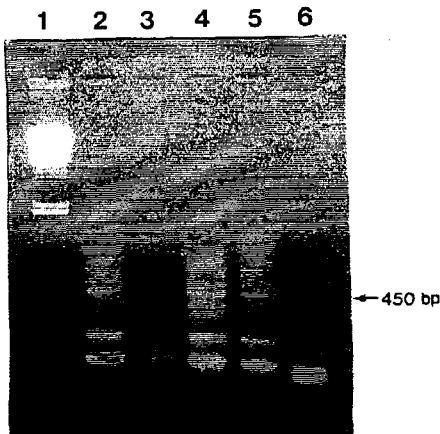


Fig. 1. LPS처치 전의 침자극이 생쥐 IL-6 유전자 발현에 미치는 효과
 Lane 1. DNA marker Hind III digest
 Lane 2. 0 min (control)
 Lane 3. 15 min after acupuncture
 Lane 4. 30 min after acupuncture
 Lane 5. 1 hr after acupuncture
 Lane 6. 3 hr after acupuncture

2. LPS처치 후의 침자극이 생쥐 IL-6 유전자 발현에 미치는 효과

LPS로 생쥐의 면역력을 약화시키거나 염증상태를 인공적으로 유발한 후에 침자극이 미치는 효과를 검토하였다. Fig.2에서 나타내었듯이 control에서는 약간의 양이 검출되며 발침 후 30분에는 최대의 양이 발현되었으며 병태유발전의 경우와 유사한 결과를 보였다. 다만 그 발현양이 과잉발현됨으로서 병태증상을 회복시키려는 생체면역계의 활성화작용을 시사한다고 볼 수 있다.

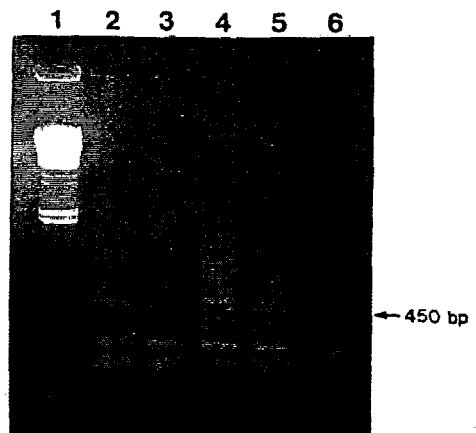


3. LPS처치 전의 황기약침이 생쥐 IL-6 유전자 발현에 미치는 효과

Fig. 2. LPS처치 후의 침자극이 생쥐 IL-6 유전자 발현에 미치는 효과
 Lane 1. DNA marker Hind III digest
 Lane 2. 0 min (control)
 Lane 3. 15 min after acupuncture
 Lane 4. 30 min after acupuncture
 Lane 5. 1 hr after acupuncture
 Lane 6. 3 hr after acupuncture

3. LPS처치 전의 황기약침이 생쥐 IL-6 유전자 발현에 미치는 효과

Fig. 3에서 보여주는 것처럼, IL-6는 450 bp에서 RT-PCR에 의해 검출되었다. Control에서는 약간의 양이 검출되고 있으나 약침후 15분에서는 오히려 IL-6의 생성이 일시적으로 억제되었다. 약침후 30분에서 가장 많은 양의 IL-6가 발현되었으며, 3시간까지 발현이 지속되어 침자극에 의한 효과와 유사하였다.



3. LPS처치 전의 황기약침이 생쥐 IL-6 유전자 발현에 미치는 효과

Fig. 3. LPS처치 전의 황기약침이 생쥐 IL-6 유전자 발현에 미치는 효과
 Lane 1. DNA marker Hind III digest
 Lane 2. 0 min (control)
 Lane 3. 15 min after acupuncture
 Lane 4. 30 min after acupuncture
 Lane 5. 1 hr after acupuncture
 Lane 6. 3 hr after acupuncture

4. LPS처치 후의 황기약침이 생쥐 IL-6 유전자발현에 미치는 효과

Fig. 4에서 보여주는 것처럼, IL-6는 450 bp에서 RT-PCR에 의해 검출되었다. Control에서는 약간의 양이 검출되고 있으나 약침 자극을 행하고 전체 검출과정에서 IL-6의 생성은 인정되지 않았다. 이는 황기약침의 경우 LPS처치에 의한 IL-6의 활성화의 반응에 크게 기여하지 못함을 의미하며, LPS처치를 하지 않은 면역활성화에는 효과적임을 의미한다.

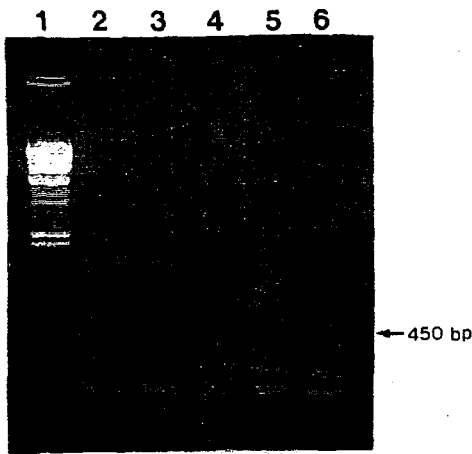


Fig. 4. LPS처치 후의 황기약침이 생쥐 IL-6유전자 발현에 미치는 효과

- Lane 1. DNA marker Hind III digest
- Lane 2. 0 min (control)
- Lane 3. 15 min after acupuncture
- Lane 4. 30 min after acupuncture
- Lane 5. 1 hr after acupuncture
- Lane 6. 3 hr after acupuncture

IV. 고 찰

한의학에서는 인체의 각종 질병에 대하여 침과 약침제재를 이용한 치료가 광범위하게 이루어져 오고 있다. 특히 침구치료는 인체에 호르고 있는 경락과 경혈들을 침으로 자극하여 체내의 신경과 기혈을 원활히 순환시킴으로써 질병의 치료는 물론, 예방에 높은 효과를 나타내고 있다. 침구치료는 혈액 순환을 도와주는 매개체로서 혈관의 기능이 약해져 있을 때 해당하는 부위에 기혈 순환

을 원활하게 하는 효과를 가지고 있다. 특히 최근 연구에 의하면 침자극은 병균에 대한 면역 물질인 백혈구를 만들고 증가시킴으로써 그 비율을 적절히 조절하여 여러 신체 기관의 운동, 분비, 흡수 및 자양 등의 기능에 도움을 주어 질병의 예방과 치료 효과를 나타내게 한다.^{1,2,4)}

생체는 외사의 침습에 대하여 그 내부 환경을 항상적으로 유지하는 기구를 발동하여 생체를 방어하고 있다. 이러한 침습에 대하여 조기에 대응하는 면역활성조절물질로는 interleukin-1 α , interleukin-1 β , interleukin-6, 종양괴사인자(TNF) 등을 들 수 있다. 이들은 그 생물학적 작용의 다양성, 생성세포의 다양성으로 생체의 항상성을 유지시키는 기본적인 호르몬의 일종일 것으로 생각되고 있다. 이러한 cytokine은 일반적으로 외부에서 오는 여러 자극에 대하여 한 개체의 세포와 유기적 내지는 종합적 반응을 나타내는데 필요한 세포 상호간의 작용을 매개하는 역할을 한다. 조절 작용, 면역 반응, 일반적 염증 과정, 등에 관련된 모든 세포들의 작용을 조절하며 이와 같은 작용과 연관하여 최근에 여러가지 병리학적인 기전에도 깊은 관련을 가진다는 사실이 밝혀지고 있다. 위에서도 언급했듯이 최근 cytokine들을 hormone으로 취급하고 있다. 이들이 다른 endocrine성 hormone과 다른 점은 특별한 gland가 아닌 여러 종류의 세포에서 같은 종류의 물질이 생산될 수 있으며 한가지 cytokine이 한가지 이상의 표적세포에 작용하여 그 표적세포의 고유한 기능의 향진을 유발함으로써 여러가지 차원의 병리생리학적 조건이 도출된다는 것이다.³⁾

특히, IL-6은 면역 세포인 B-cell과 T-cell의 증식과 분화를 촉진시키며 면역계와 조혈계에 다양한 기능을 나타낸다.¹⁰⁾ 또한 cytokine의 적절한 발현이 생체의 항상성 유지에 작용하지만 과잉의 또는 장기적인 생성이 역으로 조직의 파괴나 병적 상태의 악화로 연결될 가능성이 있으며 그 생성조절은 엄밀한 제어하에 있는 것으로 보인다. B-cell에 대한 작용으로는 분화의 마지막 단계에서 중요한 물질로 작용하며 mitogen에 의해 자극된 B-cell의 immunoglobulin의 생산을 증가시키며, Anti-cancer의 작용을 한다. 그러나 이러한 유전자의 mRNA는 그 반감기가 다른 단백질을 생산하는 것에 비해 매우 짧아 연구에 많은 어려

음이 있고^{6),7)}, 많은 생물 활성이 *in vitro*계에서 검색된 것으로서 실제 *in vivo*계에서 일어나는 생체반응에 대한 생물활성과 2개의 cytokine이 협동적으로 작용하는 경우에 보이는 생체반응 등에 대해서는 불명확한 상태에 있다.^{3,8)}

그러므로 실제 *in vivo*계에서 일어날 수 있는 생체면역반응을 확인하기 위하여, 생체의 항상성 유지와 체내의 면역력증가를 위해 많이 응용되는 자침요법을 실험동물인 생쥐의 실험을 통하여 생체면역기전에 미치는 유전자적 반응을 관찰하였다.

자침혈위는 인체의 신수혈(BL23)에 해부학적으로 상응하는 부위를 골도법에 의하여 취혈한 부위로서, 신장의 수혈이며 신장의 기능을 왕성하게 하여 그 결과 생명력이 고무되고 일신이 강건해지는 혈이고, 補腎臟, 振氣化, 祛水濕, 強腰脊, 益水壯火, 明耳目 등의 穴性이 있어서, 허로, 신허, 유정, 尿頻, 요폐, 유뇨, 두통, 신열, 耳聾, 이명, 현훈, 야맹증, 腰寒, 요배통, 수종, 食不化, 황달, 소갈, 신경쇠약, 당뇨병, 신염 등의 여러 질환에 효과가 있다. 또한 신수혈의 응용 범위는 대단히 넓은데, 현대 의학적으로 부신기능에 해당하며 이곳에서 신체의 상태를 살필수 있다고 하였다. 즉 이 부위에 응어리나 압통이 없으면 건강한 증거이고, 그 반대라면 과로경향이라는 것이다. 이러한 때는 정력이 감퇴하고 다리가 부어오르며, 혈압이 높아지는 증상이 나타나는 것이다. 여성이라면 생리불순, 요통, 하지냉 등의 증상이 나타난다. 따라서 신수혈을 처치하면 전신적인 생명력, 기력, 의욕이 넘쳐 건강해지는 것이다. 그러므로 신수혈을 사용하는 질환은 생식기 질환, 비뇨기 질환, 호흡기 질환, 순환기 질환, 신경계 질환, 부인과 질환, 대사 질환 등 대단히 폭이 넓다. 황기(Radix Astragali)는 補脾昇陽, 益衛固表, 益氣昇陽, 托瘡生肌의 효과가 있어 기허를 치료하는 약으로 이용되고 있다.^{1,2,4,5,6,7)}

이에 본 논문은 신수혈의 침자극과 황기약침을 이용하여 생체내에서 일어나는 면역체계의 interleukin-6의 유전자 발현능을 관찰한 것으로서, 실험용 생쥐의 면역활성물질인 cytokine의 IL-6 발현을 RT-PCR을 통해 실험한 바 다음과 같은 지견을 얻었다.

LPS처치 전의 침자극이 생쥐 IL-6유전자 발

현에 미치는 효과는 fig. 1에서 보여주는 것처럼, IL-6는 450 bp에서 RT-PCR에 의해 검출되었다. Control에서는 약간의 양이 검출되고 있으나 발침 후 15분에서는 오히려 IL-6의 생성이 일시적으로 억제되었으며 발침 후 30분에서는 약간의 발현이 인정되었으나 1시간 이후에서는 그 양이 점차로 감소하여 정상 때와 같은 양으로 안정화되었다. 이는 침에 의해 IL-6의 생성이 촉진되다가 침자극의 효과가 30분 정도에서 최대임을 나타낸 것으로 면역력이 약화될 시에는 주기적인 침자극이 효과적임을 나타낸다고 사료된다.

LPS처치 후의 침자극이 생쥐 IL-6유전자 발현에 미치는 효과는 LPS로 생쥐의 면역력을 약화시키거나 염증 상태를 인공적으로 유발한 후에 침자극이 미치는 효과를 검토하였다. fig.2에서 나타내었듯이 control에서는 약간의 양이 검출되며 발침 후 30분에서는 최대의 양이 발현되었으며 LPS처치 전의 경우와 유사한 결과를 보였다. 다만 그 발현양이 과잉 발현됨으로서 병태 증상을 회복시키려는 생체 면역계의 활성화작용을 시사하였다. 발현의 지속은 1시간동안 지속되어 면역 회복에 효과적임을 알 수 있다. 즉, LPS 처치 후 RT-PCR에 의해 생성된 DNA의 양을 비교해보면 오히려 시간이 더 길어졌다.

LPS처치 전의 황기약침이 생쥐 IL-6유전자 발현에 미치는 효과는 fig. 3에서 보여주는 것처럼 IL-6는 450 bp에서 RT-PCR에 의해 검출되었다. Control에서는 약간의 양이 검출되고 있으나 약침 후 15분에서는 오히려 IL-6의 생성이 일시적으로 억제되었으며 약침 후 30분에서 가장 많은 양의 IL-6가 발현되었으며 3시간까지 발현이 지속되어 침자극에 의한 효과와 유사하였다. 그러나 3시간 이후에서는 그 양이 점차로 감소하여 정상 때와 같은 양으로 안정화되었다. 이는 황기약침에 의해 IL-6의 생성이 촉진되어 그 효과가 3시간까지 지속되지만, 3시간 이후에는 IL-6의 생성이 감소되는 것으로 보아 생체내 면역력이 약화되는 경향으로 볼 수 있으며, 계속된 IL-6의 생성을 위해서는 주기적인 약침이 필요할 것으로 사료된다.

LPS처치 후의 황기 약침이 생쥐 IL-6유전자 발현에 미치는 효과는 fig. 4에서 보여주는 것처럼 IL-6는 450 bp에서 RT-PCR에 의해 검출되었다. Control에서는 약간의 양이 검출되고 있으나 약침

자극 후 전체 검출 과정에서 IL-6의 생성은 인정되지 않았다. 이는 황기약침의 경우 LPS처치에 의한 면역 활성화의 반응에 크게 기여하지 못함을 의미하며, LPS처치를 하지 않은 면역 활성화에는 효과적임을 의미한다. 또한 황기약침에 의한 IL-6의 생성량은 일반 침자극에 의한 생성량보다 더 미량임을 고려하면 IL-6를 목표로 한 면역 강화를 수반하는 치료에는 효과적이지 않음을 시사한다.

이와같이 신수혈의 침자극과 황기약침이 면역 증강작용을 나타내는 cytokine IL-6의 생성에 기여함이 큰 것으로 보아 cytokine IL-6의 추적은 침자극과 황기약침의 효과의 유무에 대한 근거와 생체의 면역반응정도의 관찰을 통해 질병의 진행상태를 확인하는 진단지표로서의 활용 가능성을 고양시킬 수 있을 것으로 사료된다

V. 결 론

신수혈의 침자극과 황기약침을 이용하여 면역 증강작용을 나타내는 cytokine IL-6의 발현능력을 관찰하기 위하여 RT-PCR을 통해 실험한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. IL-6는 450 bp에서 RT-PCR에 의해 검출되었다. LPS 처치 전 침자극에 의한 발현은 control에서는 약간의 양이 검출되고 있으나 발침 후 15분에서는 오히려 IL-6의 생성이 일시적으로 억제되었으며 발침 후 30분에서는 약간의 발현이 인정되었으나 1시간 이후에서는 그 양이 점차로 감소하여 정상때와 같은 양으로 안정화되었다.
2. LPS 처치 후 침자극에 의한 IL-6의 발현은 control에서는 약간의 양이 검출되며 발침 후 30분에 최대의 양이 발현되었다.
3. LPS 처치 전의 황기약침에 의한 IL-6의 발현은 control에서는 약간의 양이 검출되고 있으나 약침 후 15분에서는 오히려 IL-6의 생성이 일시적으로 억제되었으며 약침 후 30분에서 가장 많은 양의 IL-6가 발현되었으며 3시간까지 발현이 지속되다가 점차 감소하여 정상때와 같은 양으로 안정화되었다.
4. LPS 처치 후 황기약침에 의한 IL-6의 발현은 control에서는 약간의 양이 검출되고 있으나

약침 자극후 전체 검출과정에서 크게 나타내지 못하였다.

이와같이 신수혈의 침자극과 황기약침에 의한 cytokine IL-6의 발현이 관찰되고 있는 것으로 보아 cytokine IL-6의 추적은 침자극과 황기약침의 효과에 대한 근거를 알 수 있을 뿐만 아니라 생체의 면역반응정도를 통해 질병의 진행상태를 나타내는 진단지표로서의 활용가능성이 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 金賢濟 외 3인, 最新鍼灸學, 서울:成輔社, 1983, p. 214.
- 2.-1. 서울대학교의과대학, 면역학, 서울: 서울대학교출판부, 1989, pp.1-12.
2. 安榮基, 經穴學叢書, 서울:成輔社, 1986, pp. 362-363.
3. 정태호, 김정철, 김문규, 최신 면역학 강의, 대구: 경북대학교출판부, 1996, pp. 211-225.
4. 崔容泰, 李秀鎬, 精解鍼灸學, 서울:행림출판사, 1985, pp. 358-359.
5. 常敏毅, 抗癌本草, 湖南省: 湖南科技, 1987, pp. 256-257.
6. 劉建洪, 何冬梅, 穴位藥物注射療法, 江西城:江西科技, 1989, pp. 32-33.
7. 錢百炎, 中草藥注射劑, 上海: 上海科技, 1981, pp. 71-132.
8. たけうち つとむ; リウマチ性疾患におけるT細胞機能異常と細胞内シグナル傳達, BIOclinica 9, 1994, pp. 35-39.
9. みやさか にぶゆき: リウマチの成因に關與する接着分子, BIOclinica 9, 1994, pp. 116-120.
10. Yasuhiro Suzuki, Sailaja Rani, Oliver Liesenfeld, Toshiyuki Kojima, Samantha Lim, Thu A. Nguyen, Stacie A. Dalrymple, Richard Murray and Jack S. Remington, Impaired Resistance to the Development of Toxoplasmic Encephalitis in Interleukin-6-Deficient Mice, The Journal of Infection And Immunity, Vol. 65, No.6, 1997, pp. 2339-2345.
11. Cavaillon, J-M., Catherine F. and Haeffner-

- Cavillon, N., Recombinant C5a enhance interleukin 1 and tumor necrosis factor release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes and macrophages *Eur. J. Immunol.* 20, 1990, pp. 253-257.
12. Dinarello, C.A., The interleukin-1 family: 10 years of discovery, *The FASEB Journal* 8, 1994, pp. 1314-1325.
 13. Dominique Durand, Odile Bertaux, Thierry Fournier, Dominique Porquet, Richard Valencia and Genevieve Durand, Interleukin 1 β modulates hepatic synthesis of α 1-acid glycoprotein in the fetal rat, *FEBS LETTERS*, Vol. 263, No.1, 1990, pp.109-112.
 14. Evans, D.B., Bunning, R.A.D. and Russell, R.G.G., The effects of recombinant human interleukin-1 β on cellular proliferation and the production of prostaglandin E₂, plasminogen activator, osteocalcin and alkaline phosphatase by osteoblast-like cells derived from human bone., *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 166, 1990, pp. 208-216.
 15. Hazuda, D. J., Strickler, J., Hueppers, F., Simon, P.L. and Young, P. R., Processing of precursor Interleukin 1 β and inflammatory disease, *PA. J. Biol. Chem.*, 265, 1990, pp. 6318-6322.
 16. Heasman, P.A., Collins, J.G., and Offenbacher, Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 β , leukotriene B₄, prostaglandin E₂, thromboxane B₂ and tumor necrosis factor α in experimental gingivitis in humans, *J Periodont Res.* 28, 1993, pp. 241-247.
 17. Hong Wang, Kuan-Yan Li, Gen-Cheng Wu, Xiao-Ding Cao, C-Fos Expression in spinal cord and brainstem following noxious stimulation and electroacupuncture plus noxious stimulation, *Acupuncture & Electro-Therapeutics Res., Int. J.*, Vol. 20, 1995, pp.163-172.
 18. H. Russell Onishi, Barbara A. Pelak, Lynn S. Gerckens, Lynn L. Silver, Frederick M. Kahan, Meng-Hsin Chen, Arthur A. Patchett, Susan M. Galloway, Sheryl A. Hyland, Matt S. Anderson, Christian R. H. Raetz, Antibacterial Agents That Inhibit Lipid A Biosynthesis, *SCIENCE*, Vol. 274, 1996, p.980.
 19. Lesa J. Beamer, Stephen F. Carroll, David Eisenberg, Crystal structure of Human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution, *SCIENCE*, Vol.276, 1997, p.1861.
 20. Peter F. Barnes, Delphi Chatterjee, John S. Abrams, Shuzhuang Lu, Erica Wang, Masahiro Yamamura, Patrick J. Brennan, and Robert L. Modlin, Cytokine Production induced by *Mycobacterium tuberculosis* Lipoarabinomannan, *The Journal of Immunology*, Vol. 149, No. 2, 1992, pp.541-547.
 21. Re, F., Mengozzi, M., Muzio, M., Dinarello, C.A. Mantovani, A. and Colotta, F., Expression of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) by human circulating polymorphonuclear cells, *Eur. J. Biochem.* 23, 1993, pp. 570-573, 257