

원 저

腎俞穴의 침자극과 황기약침이 실험용 생쥐의 면역활성물질 IL-1 β 의 유전자발현에 미치는 영향

손수곤, 김종수, 박원환
동국대학교 한의과대학 진단학교실

Effects of Acupuncture and *Radix Astragali* Aqua-acupuncture on Transcriptional Expression of Mouse Cytokines IL-1 β

Su-Gon Son, Jong-Soo Kim, Won-Hwan Park

Department of Diagnostics, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objective : Acupuncture and *Radix Astragali* aqua-acupuncture stimuli have long been used to cure human diseases. However, the exact physiological and biochemical mechanisms involved remain undiscovered. Thus, many attempts have been made to show the scientific mechanisms involved. The effects of acupuncture and *Radix Astragali* aqua-acupuncture, which was known to date, as follow; effective circulation of body blood system and proliferation of leucocytes.

Methods : In this study, we have applied acupuncture and *Radix Astragali* aqua-acupuncture stimuli to mouse on Sinsuhyul, a stimulative point of oriental medicine, to see effects on the expression of cytokine IL-1 β . Mice were treated with lipopolysaccharide(LPS) for inflammation induction and then reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) using each primer set were performed to trace the amounts of mRNA.

Results : 1. IL-1 β was not expressed in LPS-nontreated mice at 15 to 60 min after acupuncture-stimuli. However, expression occurred after 3hrs.

2. IL-1 β was specifically expressed in LPS-treated mice at 30 min after acupuncture-stimuli.

3. IL-1 β was expressed in LPS-nontreated mice at 30 min after *Radix Astragali* aqua-acupuncture stimuli, however, not expressed at 60, 180 min.

4. IL-1 β was gradually expressed in LPS-treated mice at 15 to 180 min after *Radix Astragali* aqua-acupuncture stimuli.

Conclusions : IL-1 β in LPS-treated mice was more effective than that of LPS-nontreated mice. We are now in the process of elucidating the immunological action mechanism of acupuncture and *Radix Astragali* aqua-acupuncture stimuli.

And cytokine IL-1 β can be used not only as a basis of the effects of acupuncture and *Radix Astragali* aqua-acupuncture but also as a diagnosis guide through the immunological actions of those.(J Korean Oriental Med 2000;21(4):16-25)

Key Words: Acupuncture, *Radix Astragali* aqua-acupuncture, Sinsuhyul, Cytokine IL-1 β , Lipopolysaccharide(LPS), RT-PCR, mRNA

· 접수 : 2000년 9월 27일 · 채택 : 12월 5일
· 교신저자 : 박원환, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의
과대학 진단학교실
(Tel. 054-770-2373 H · P : 011-562-2373 E-mail :
diapwh@mail.dongguk.ac.kr)

서론

생체는 미생물 또는 외부물질의 침습에 대항하여

체내의 환경을 항상적으로 유지하는 기구를 발동하여 생체 자신을 방어하고 있다. 이러한 외부의 침습에 대하여 조기에 대응하는 cytokine으로써 IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, TNF 등을 들 수 있다¹⁾. 이들의 생물학적 작용은 매우 다양하며 이들을 생성하는 세포 또한 다양하므로 생체의 항상성을 유지시키는 기본적인 호르몬의 일종일 것으로 생각되고 있다²⁾. IL-1은 미생물감염, 외상에 의한 조직의 손상, 암이나 면역이상과 같은 내외적인 자극이나, 생체의 항상성을 교란시키는 자극을 받을 때 주로 대식세포가 생성하는데, IL-1α와 IL-1β라는 두 가지 형태가 있으며 순환계에서 발견되는 대부분의 IL-1 활성은 IL-1β에 의한 것으로 알려져 있다³⁾.

한의학에서는 “正氣存內, 邪不可干”, “邪之所湊, 其氣必虛”⁴⁾라고 하여 인체의 내적인 正氣 손상이 선행함으로써 외부의 邪氣가 침입하여 질병이 발생할 수 있다고 하였는데, 이러한 관점은 현대 면역학의 이론과도 부합되는 것으로 생각된다⁵⁾. 현재 한의학적 치료법이 가지는 면역증강작용에 대한 많은 연구가 현재 진행되고 있는데⁶⁻⁹⁾, 특히 약침요법의 면역증강 효과에 대해서는 김¹⁰⁾, 주¹¹⁾, 이¹²⁾, 임¹³⁾, 이¹⁴⁾, 김¹⁵⁾ 등에 의하여 연구가 진행되었다.

약침요법은 한의학의 경락이론을 바탕으로 특정 수혈에 單味 혹은 複方으로 된 한약제를 주입하여 精神氣血, 오장육부의 기능을 조절하여 질병을 치료하는 방법으로써, 약물이 위장관을 통하여 흡수되는 과정에서 분해 및 대사과정을 거치지 않으므로 소량으로도 원하는 효과를 얻을 수 있으며 효과가 직접적이라는 장점이 있다¹⁶⁻¹⁸⁾.

腎俞穴(BL23)은 腎의 背俞穴로 제 2 요추의 棘突起下 兩方 각 1寸 5분에 위치하며 滋補腎陰, 振氣化, 去水濕, 強腰脊, 益水壯火, 益清明目하는 효능이 있으며¹⁹⁻²¹⁾, 약침요법에 상용되는 穴位 가운데 하나이다^{16,17)}.

황기(Radix Astragali)는 補脾升陽, 益衛固表, 益氣升陽, 托瘡生肌의 효과가 있어 氣虛證를 치료하는 약으로 이용되고 있으며^{22,23)}, 황기 약침이 인체 면역력을 증강한다는 吳²⁴⁾, 李²⁵⁾ 등의 보고가 있었다.

그러나 약침요법의 면역증강 효과에 대한 기존의 연구에서는 cytokine의 발현에 대한 검증이 주로 *in vitro*에서 항원항체반응법이 주로 이용되고 있다²⁶⁻²⁸⁾.

이에 본 논문에서는 침자극과 약침요법의 면역증강 효과를 *in vivo*에서 확인하기 위하여, 생쥐를 실험 모델로 腎俞穴(BL23)을 취혈하여 침자극과 황기 약침으로 생체 내에서 일어나는 IL-1β의 유전자 발현과정을 RT-PCR법(Reverse Transcription-Polymerization Chain Reaction)을 통하여 검증하고자 한다.

재료 및 실험방법

1. 재료

1) Primers for IL-1β (sense/antisense)

Sense primer	5' -AGGAAAGAATCTATACCTGT-3'
Antisense primer	5' -ATGGTGAAGTCAATTATGTC-3'

2) 약침약물

2-1) 약재

약재는 동국대학교 부속한방병원에서 구입하여 사용하였다.

황기 (Radix Astragali)	300g
----------------------	------

2-2) 제조방법¹⁶⁻¹⁸⁾

상기의 약재 300g 분량을 3,000ml 등근 플라스크에 증류수 2,000ml과 함께 넣은 다음 냉각기를 부착시켜 2시간 동안 전탕하여 여과하였다. 여액은 rotary evaporatory로 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 가하고 1N NaOH로 pH 6-7로 조절하여 전량이 1,000ml이 되게 한 다음, 냉장상태에서 24시간 방치한 후 membrane filter (0.2 μm, 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.

5) 시약 및 기구

Primer는 TaKaRa co.(Tokyo, Japan)에서 합성주문하여 사용하였다. Agarose, Ethidium bromide, DEPC, 등 실험에 사용한 시약들은 SIGMA사에서 구입한 특급품을 사용하였고, RT-PCR kit는 TaKaRa사의 제품을 사용했다. 실험에 사용한 증류수는 모두 멸균된 3차 증류수를 사용하고 RT-PCR 시 모든 시약 및 기구를 DEPC-H₂O로 처치 하여 사용하고 전과정을 polyglove를 착용한 상태에서 실시했다.

2. 실험방법

1) LPS 처치에 의한 염증유발²⁹⁾

웅성 생쥐 100마리를 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자원센터에서 구입하여 200 l의 증류수에 최종적으로 10 g/20 l LPS농도 (Escherichia coli LPS 0111, B4; Difco Labs. Detroit, MI, USA)가 되도록 조정하여 관절부위(knee joint)에 주사하였다.

2) 침 처치 및 혈액 채취

생쥐를 고정시킨후 인체의 腎俞穴(BL23)은 高³⁰⁾의 방법에 의하여 취혈하였다. 침자극원에 대한 반응을 실험하기 위하여, 腎俞穴에 자침만 하는 경우와 LPS 전처치 후 자침을 하는 경우의 두가지로 나누어서 실험

을 실시하였으며 5분간 유침을 하였다. 또한 자침하기전을 control로 하고 발침 후 15분, 30분, 1시간, 3시간 단위로 생쥐의 동공에서 혈액을 채취하였다. LPS 전처치는 lipopolysaccharide 20ug/mouse을 투여하였고 12시간이 경과 된 다음 자침을 실시하였다.

황기약침에 대한 반응도 침자극원에 대한 반응처럼 약침만 처치하는 경우와 LPS전처치후 약침처치를 하는 경우의 두 가지로 나누어서 실험을 하였다. 약침만을 처치하는 경우는 생쥐를 고정시키고 腎俞穴에 황기약침액 0.1 ml/mouse을 처치한 다음 15분, 30분, 1시간, 3시간 단위로 혈액을 생쥐의 동공에서 채취한 것이고, LPS 전처치후 약침처치를 하는 경우는 LPS (20 μg/mouse)를 처치한 다음 12시간이 경과한 후에 생쥐를 고정시키고, 腎俞穴에 황기약침액 0.1 ml/mouse을 처치한 다음 15분, 30분, 1시간, 3시간 단위로 혈액을 채취한 것이다.

3) 혈액으로부터 RNA 분리

Total RNA는 RNA isolation kit (TaKaRa, Co., Japan)을 이용하여 생쥐의 혈액으로부터 추출하였다. 생쥐로부터 100 μl의 혈액을 채취한 다음, catrimox-14TM이 담겨져 있는 microtube에 첨가한다. 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 침전물을 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 vac을 이용하여 침전물을 건조시킨 후, 0.1% DEPC가 들어 있는 멸균수 20 μl로 RNA를 용해시켰다. 가능하면 바로 다음 실험에 이용하고, 저장시에는 -70℃에 보관하여 사용하였다.

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

Reverse transcription은 생쥐의 혈액을 취한후, reverse transcriptase (TaKaRa Co, Japan)을 이용하여 분리하였다. 각 sample의 total RNA는 50 pM random

9 mer, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 1 U/ μ RNase inhibitor, 0.25 U/ μ reverse transcriptase를 1 x PCR buffer에 혼합하고, 이 reverse transcriptase solution을 위에서 분리된 RNA 9.5 μ l (1 μ g total RNA)와 잘 혼합하였고 탁상용 원심분리기를 이용하여 몇초 동안 원심 분리하였다. cDNA를 만들기 위한 반응 조건은 30 $^{\circ}$ C, 에서 10분, 42 $^{\circ}$ C 에서 30분, 99 $^{\circ}$ C 에서 5분 동안 incubation시켰다. Reverse transcription의 반응 종결은 5 $^{\circ}$ C 에서 5분 동안 놓아 둬으로써 끝냈다. 위에서 얻어진 complementary DNA (cDNA)는 PCR에 이용되었다. IL-1 β 의 Sense primer는 5' -AGGAAA GAATCTATACCTGT-3' 이고, Antisense primer는 5' -ATGGTGAAGTCAATTATGTC-3' 이다. 이 primer는 260 bp의 단편들을 얻을 수 있었다. PCR은 2.5 mM MgCl₂, 2.5 U/ μ l Tag polymerase (TaKaRa Co., Japan)와 각각의 100 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 $^{\circ}$ C 에서 5분 동안 1 cycle을 하였고, 94 $^{\circ}$ C 에서 1분, primer annealing을 위해서 50 $^{\circ}$ C 에서 1분 그리고 elongation을 위해서는 72 $^{\circ}$ C 에서 2분으로 하여 50 cycle로 수행하였다. 72 $^{\circ}$ C 에서 2분 동안 최종적인 extension을 하였다. 각각의 PCR 생성물은 1 μ g/mL ethidium bromide을 포함하고 있는 1 x TBE buffer 내에서 1% agarose gel을 이용하여 전기영동 하였다.

다른 방법으로는, 생쥐의 동공으로부터 100 μ l을 채취하여 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/ μ l RNase inhibitor, 1 mM dNTP, 0.25 U/ μ l reverse transcriptase로 수행하였다. Transcription reaction은 30 $^{\circ}$ C, 에서 10분, 42 $^{\circ}$ C 에서 30분, 99 $^{\circ}$ C 에서 5분 동안 실시하였으며, 반응의 종결을 위하여 5 $^{\circ}$ C 에서 5분 동안 놓아 두었다. cDNA stock은 RT-PCR에 이용될 때 까지 -20 $^{\circ}$ C 에 보관하여 사용하였

다. PCR은 2.5 mM MgCl₂, 2.5 U/ μ l Tag polymerase, 각각의 primer의 100 pmol를 1 x PCR buffer에 넣어, 전체부피 20 μ l로 만들어서 수행하였다. 각각의 tube에, 알려지지 않은 농도의 cDNA 10 μ l와 IL-1 β 를 발현시키는 발현 vector 1 μ l를 첨가하였다. PCR은 94 $^{\circ}$ C 에서 5분 동안 denaturation시킨후, 50 cycle로 Perkin-Elmer DNA thermal cycler 480을 이용하여 수행하였다. 각 cycle의 증폭은 94 $^{\circ}$ C 에서 1분, primer annealing을 위해서 50 $^{\circ}$ C 에서 1분 그리고 elongation을 위해서는 72 $^{\circ}$ C 에서 2분으로 구성하였다. 최종적으로 생성된 PCR 생성물들은 ethidium bromide (0.5 μ g/ μ l)을 가지고 염색된 1% agarose gel에 loading하여 전기영동하였다. 그리고 UV light을 이용하여 primer 쌍을 이용하여 증폭된 DNA fragment의 260 bp의 band를 확인하였다.

실험결과

1. LPS 처치 전에 침자극이 생쥐 IL-1 β 생성에 미치는 효과

침자극이 면역활성 물질인 IL-1 β 가 생쥐내에서 증가되는지를 알아보기 위해서, 생쥐의 방광경 腎俞穴에 자침하고 5분 동안 유침한 후 발침하였다. 그리고 발침 후 각각 0분 (control), 15분, 30분, 3시간 단위로 생쥐의 동공에서 혈액을 채취하여 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 이용하여 DNA의 양을 비교하였다. Fig. 1에서 보여주는 것처럼, IL-1 β 는 260 bp에서 발현되었다. 우선 LPS 처치전 침자극이 생쥐의 IL-1 β 유전자 발현에 미치는 영향을 알아본 결과 정상 생체에서는 침자극에 따른 IL-1 β 의 260 bp DNA fragment가 control, 15분, 30분, 1시간에서는 거의 관찰되지 않았으며, 3시간 후에 일정량의 발현이 관찰되었다(Fig. 1).

2. LPS 처치 후에 침자극이 생쥐 IL-1 β 생성에 미치는 효과

LPS 처치 후 초기에는 큰 변화가 보이지 않았으나 30분에서 1시간사이에 많은 발현량이 보였다. 그러나, 3시간이후에는 거의 생성되지 않음으로써 염증유

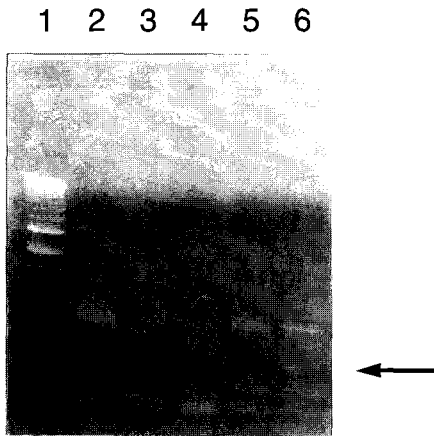


Fig. 1. Effects of acupuncture on transcriptional expression of mouse cytokine IL-1 β before treatment of LPS
 Lane 1. DNA marker (BM co. X marker)
 Lane 2. 0 min after acupuncture
 Lane 3. 15 min after acupuncture
 Lane 4. 30 min after acupuncture
 Lane 5. 1 hr after acupuncture
 Lane 6. 3 hrs after acupuncture

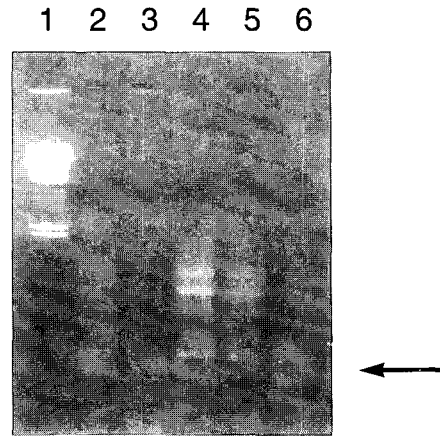


Fig. 2. Effects of acupuncture on transcriptional expression of mouse cytokine IL-1 β , after treatment of LPS
 Lane 1. DNA marker (Stratagene co. 1 Kb ladder)
 Lane 2. 0 min after acupuncture
 Lane 3. 15 min after acupuncture
 Lane 4. 30 min after acupuncture
 Lane 5. 1 hr after acupuncture
 Lane 6. 3 hrs after acupuncture

발후 초기에 효과적임을 시사하였다(Fig. 2).

3. LPS 처치 전에 황기약침이 생쥐 IL-1 β 생성에 미치는 효과

약침이 LPS로 염증이 발현된 생쥐의 면역활성 물질인 IL-1 β 생성에 미치는 효과를 검정하기 위하여 LPS처치전 생쥐의 방광경 腎俞穴에 황기약침을 실시하였다. 황기약침 후 각각 0분 (control), 15분, 30분, 1시간, 3시간 단위로 생쥐의 동공에서 혈액을 채취하여 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 이용하여 DNA의 양을 비교하였다. Fig. 3에서 보여주는 것처럼 IL-1 β 는 260 bp에서 발현되었다. Control에서는 일정량이 생성되다가 15분이후 점차로 생성량이 감소되었다가 다시 30분에서 약간의 회복능을 나타내었다(Fig. 3).

4. LPS 처치 후에 황기약침이 생쥐 IL-1 β 생성에 미치는 효과

LPS로 염증을 유발시킨 후 황기약침에 의해서 면

역활성 물질인 IL-1 β 가 생쥐체내에서 발현되는지를 알아보기 위해서, 생쥐의 방광경에 해당하는 腎俞穴에 황기약침을 시행하였다. LPS처치전과 같은 방법으로 황기약침후 각각 0분 (control), 15분, 30분, 1시간, 3시간 단위로 생쥐의 동공에서 혈액을 채취하여 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 이용하여 DNA의 양을 비교하였다. Fig. 4에서 보여주는 것처럼 IL-1 β 는 260 bp에서 발현되었다. LPS처치 후의 황기약침은 생쥐의 IL-1 β 의 유전자 발현에 대하여 control, 15분, 30분, 1시간에서 점차적으로 많은 양이 발현되고 있음이 관찰되었다(Fig. 4).

고 찰

생체는 病邪의 침습에 대하여 그 내부 환경의 항상성을 유지하는 생체방어체계를 가지고 있다¹⁾. 한의학에서는 인체의 다양한 질병을 陰陽의 평형조절 불균형에 두고 있으며, 근본적인 질병으로부터의 예

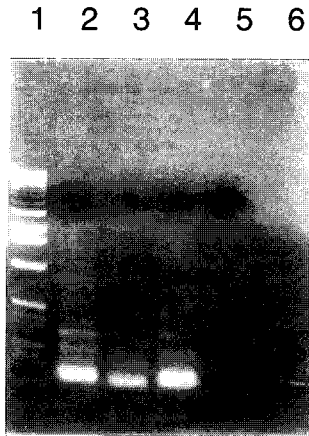


Fig. 3. Effects of *Radix Astragali aqua*-acupuncture on transcriptional expression of mouse cytokine IL-1 β before treatment of LPS.

Lane 1. DNA marker (BM co. marker X)
 Lane 2. 0 min after *Radix Astragali aqua* acupuncture
 Lane 3. 15 min after *Radix Astragali aqua* acupuncture
 Lane 4. 30 min after *Radix Astragali aqua* acupuncture
 Lane 5. 1 hr after *Radix Astragali aqua* acupuncture
 Lane 6. 3 hrs after *Radix Astragali aqua* acupuncture

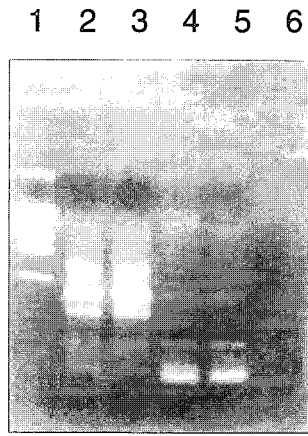


Fig. 4. Effects of *Radix Astragali aqua*-acupuncture on transcriptional expression of mouse cytokine IL-1 β after treatment of LPS.

Lane 1. DNA marker (BM co. marker X)
 Lane 2. 0 min after *Radix Astragali aqua* acupuncture
 Lane 3. 15 min after *Radix Astragali aqua* acupuncture
 Lane 4. 30 min after *Radix Astragali aqua* acupuncture
 Lane 5. 1 hr after *Radix Astragali aqua* acupuncture
 Lane 6. 3 hrs after *Radix Astragali aqua* acupuncture

방· 치료적인 방법으로써 체내의 기혈순환대사의 평형조절이 중시되고 있다⁹⁾. 이에 인체의 각종 질병에 대하여 침과 약침제재를 이용하여 기혈순환대사를 유지· 활성화시키는 방법이 광범위하게 이용되고 있으며, 특히 침구 치료는 인체에 흐르고 있는 經絡과 經穴들을 침으로 자극하여 체내의 氣血을 원활히 순환시킴으로써 질병의 치료는 물론, 예방에 높은 효과를 나타내고 있다^{19,21)}.

서의학에서는 인체에 침입한 여러 가지 질병에 대하여 면역계에 관련된 여러 종류의 면역활성조절물질들이 조기에 대응하여 생체의 항상성을 유지시킨다고 하였다²⁾. 이에 해당하는 면역 활성 조절 물질로는 interleukin-1 α , interleukin-1, interleukin-6, TNF, IFN 등을 들 수 있다^{26,27)}. 이들은 그 생물학적 작용의 다양성, 생성세포의 다양성으로 생체의 항상성을 유지시키는 기본적인 호르몬의 일종일 것으로 생각되고 있다^{1,29)}. 특히 최근 연구에 의하면 침자극은 병균에 대해 저항을 하는 물질인 백혈구를 만들고 증가시킴으

로써 그 비율을 적절히 조절하여 여러 신체 기관의 운동, 분비, 흡수 및 자양 등의 기능에 도움을 주어 질병의 예방과 치료 효과를 나타내게 한다^{19,21)}. 특히 IL-1 β 은 면역 세포인 B-cell과 T-cell의 증식과 분화를 촉진시키며 면역계와 조혈계에 다양한 기능을 나타낸다. 또한 cytokine의 적절한 발현이 생체의 항상성 유지에 작용하지만 과잉의 또는 장기적인 생성이 역으로 조직의 파괴나 병적상태의 악화에 연결되는 가능성이 있으며 그 생성조절은 엄밀한 제어 하에 있는 것으로 보인다. 그러나 많은 생물 활성이 *in vitro* 계에서 검색된 것으로 실제 *in vivo* 계에서 어떠한 생물 활성이 생체 반응에 대응하고 있는지와 2개의 cytokine이 협동적으로 작용하는 경우에 보이는 반응은 어떠한 것인가하는 것 등은 불명확한 상태에 있다^{28,31)}. 또한 IL-1 β 은 생체 방어 반응에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있으며 여기에는 여러 종류의 생성 조절 기구가 존재하여 미묘한 균형이 존재하고 있다. 그러나 일단 이 균형이 깨지면 cytokine의 positive

feed-back기구가 작동하여 그 생성 저지가 조절이 안 되어 여러가지 생체내 물질들이 생성되어 본래는 생체의 항상성에 작용하는 cytokine이 몇가지 질환이나 병태에서도 중심적인 역할을 하게된다^{1,2,27}. 그 구체적인 예로서는 IL-1 β 가 서로 생성을 유도시켜 상승적으로 작용하여 병태의 진행에 있어서 중심적인 역할을 하게 되는 것으로 생각된다. IL-1 β 생성의 negative feed-back 기작으로서는 steroid hormone, transforming growth factor (TGF), IL-1 α , IL-1 receptor antagonist (IL-1 α), 가용성 TNF receptor 등을 들 수 있지만, 생체내에서의 그 상세한 생성 조절 기구 작용에 대해서는 미흡한 단계이다^{1,27,28}. IL-1의 생성세포에는 monocyte, macropage, keratinocyte, cupper cell, 랑겔한스 세포, B림과구, 호중구, 섬유아세포, 성상세포, 내피세포 등이 있고, 생리작용으로는 발열, 쇼크, 하수체 ACTH상승, 급성기단백질유도, lipoprotein lipase유도, 인슐린상승, 접착분자유도, T세포분열유도, B세포활성화, 매크로파지항종양활성, NK세포활성화, 호중구활성화, 선유아세포증식, 골흡수, 연골흡수, 근조직분해, cytokine 유도등이 있다. 또한 IL-1과 TNF의 상반되는 작용에는 생체 방어 작용과 생체 침습 작용이 있는데, 먼저 생체 방어 작용에는 ACTH 상승, 항염증반응, T,B세포활성화, 항종양작용, 조절작용 등이 있고, 생체 침습 작용에는 발열반응, 염증, 조직파괴, 쇼크 등이 있다^{1,27,28}. 염증성 cytokine으로써의 기능은 IL-1과 TNF의 염증성 cytokine으로써의 역할에 대해서는 여러 보고가 있으나 염증 발생 과정에서 cytokine이 어떻게 생성되어 염증화하는가와 cytokine의 역할을 해명하는대는 cytokine이 어떠한 염증상태에서 생성되는가를 고찰할 필요가 있다. 다음으로 염증장소에서 검출되는 IL-1 β 가 염증반응에 어느 정도 관여하고 있는가를 알기위해 LPS투여 전, 후에 침착극과 약침에 의해 어떻게 억제되는지를 IL-1 β 의 유전자발현, 즉 mRNA생성량을 RT-PCR로서 수행하였다. 그 결과 LPS에 의한 세포 침윤 유도과정에서 IL-1 β 가 세포침윤을 일으키는데 중요한 역할을 담당하고 있으며, LPS염증에 있어서 세포 침윤은 이들 cytokine에 거의 전면적으로 의존하고 있을 것으로

생각된다.

질병에 대한 IL-1과 TNF는 염증성 cytokine으로써의 역할만이 아니라 여러가지 생물 작용을 가지고 있으며, 여기에는 대표적인 병적 상태에 대해 IL-1, TNF의 관여에 대해서 설명하면 다음과 같다. 첫째, 패혈증성 쇼크로서 생체 안에 들어간 endotoxin과 LPS에 의하여 일어나는 다장기부전을 수반하는 질환이다. 동물에 IL-1, TNF를 투여하면 쇼크상태가 재현되고 IL-1이나 TNF의 항체를 투여하면 쇼크상태나 치사율이 개선되며, 실제 쇼크 환자의 혈청에서 보이는 생체 반응이 IL-1이나 TNF의 *in vitro*에서의 생물 작용과 같다는 점으로부터 endotoxin으로 유도되는 IL-1, TNF가 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 생각된다. IL-1, TNF로 유도되는 쇼크상태는 이들 cytokine을 동시에 투여한 경우 증대되며 2개의 cytokine이 각각을 유도시키는 사실로부터 실제 쇼크 상태에서는 3개의 cytokine이 상승 작용을 할 것으로 기대된다. 둘째, 발열질환으로써 IL-1은 가장 중요한 내인성 발열인자로서 생각되고 있다. IL-1은 매우 미량(2-3ng/kg체중)으로 발열을 일으키며 IL-1에 의한 발열은 IL-1 β 에 의해서 억제된다. 즉, 생쥐 복막염모델에서 보이는 발열현상은 이때의 복막염증세포에 의한 IL-1 생성동태와 매우 잘 일치하는 사실로부터 해명되었다. 한편, 염증 및 IL-1에 의한 발열은 cyclooxygenase 저해제로 저해되는 점, IL-1이 뇌혈관관문을 통과하지 못하는 점을 생각하면 말초에서 생성된 IL-1은 순환혈액중에 들어가 제 3 뇌실주위에 분포하는 organ vasculosum laminae terminalis 에 작용하여 PGE₂ 생성을 유도하여 이것이 시상전야에 작용하여 발열을 일으킬 것으로 생각된다. 셋째, Rheumatoid arthritis 로써 관절활막을 염증의 주요 위치로 하는 만성염증성 질환으로 활막에는 혈관신생, 임과구 침윤, 활막 세포의 증식이 보인다. 이들 병태에 관한 cytokine으로써 IL-1, TNF등의 염증성 cytokine을 들 수 있다. 실제로 IL-1, TNF가 RA환자의 활막조직이나 활막조직을 primary로 배양한 배양상청액, 관절액에서 검출되어 면역조직학적으로도 활막에 존재함이 확인되었다. 나아가서 활막 세포나

활막 조직에서의 IL-1, TNF유전자의 발현도 확인되고 있다.^{127,28)} 또한 관절액 및 혈청중의 이들 생성양은 관절염의 진행정도를 나타내는 진단 지표로서의 가능성도 확인되었다.

이에 본 논문은 腎俞穴의 침자극과 황기약침을 이용하여 실험용 생쥐의 생체내에서 일어나는 면역활성물질인 cytokine의 IL-1β 발현능을 관찰한 것으로서, 실험에 활용한 腎俞穴은 腎의 背俞穴이며 신장의 기능을 왕성하게 하여 그 결과 생명력이 고무되고 신체가 강건해지는 穴이고, 補腎臟·振氣化·祛水濕·強腰脊·益水壯火 등의 穴성이 있어서, 虛勞·腎虛·遺精·尿閉·遺尿·頭痛·身熱·眩暈·腰背痛·食不化·黃疸·消渴·腎炎 등의 여러 질환에 효과가 있다. 또한 腎俞穴의 응용 범위는 대단히 넓은데, 현대 의학적으로 부신 기능에 해당하며 이곳에서 신체의 상태를 살필수 있다고 하였다. 즉 이 부위에 응어리나 압통이 없으면 건강한 증거이고, 그 반대라면 과로경향과 정력이 감퇴하고 다리가 부어오르며, 혈압이 높아지는 증상이 나타난다고 하였으며, 여성이라면 생리불순, 요통, 하지냉 등의 증상이 나타난다고 하였다. 따라서 腎俞穴을 처치하면 전신적인 생명력과 의욕이 넘쳐 강건해지는 것이다. 그러므로 腎俞穴을 사용하는 질환은 생식기 질환, 비뇨기 질환, 호흡기 질환, 순환계 질환, 신경계 질환, 부인과 질환, 대사 질환 등 대단히 폭이 넓다^{19,21)}.

약침의 재료로 사용한 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 있을 뿐만 아니라 생체의 外邪침입에 대한 면역력의 증가에도 활용되고 있으므로 실험 약침액의 재료로 사용하였다^{16,22)}. 그 결과 다음과 같이 관찰되었다.

IL-1β는 inflammatory, metabolic, physiological, haematopoietic과 immunological 활성도와 같은 여러 가지 특성을 소유하고 있다²⁷⁾. LPS처치전의 침자극에 의한 생쥐 IL-1β유전자의 발현에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 인체의 腎俞穴에 해당하는 생쥐의 부위에 자침하고 5분 동안 留鍼 한 후 拔鍼 하였으며, 拔鍼 후 각각 0분(control), 15분, 30분, 3시간 단위로 생

쥐의 동공에서 혈액을 채취하여 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 이용하여 DNA의 양을 비교하였다. Fig. 1에서 보여주는 것처럼, IL-1β는 260 bp에서 발현되었다. 우선 LPS 처치전 침자극이 생쥐의 IL-1β유전자 발현에 미치는 영향을 알아본 결과 정상 생체에서는 침자극에 따른 IL-1β의 260 bp DNA fragment가 control, 15분, 30분, 1시간에서는 거의 관찰되지 않았으며, 3시간 후에 일정량의 발현이 관찰되었다(Fig. 1). 이는 본 cytokine이 침자극에 의해 면역 증강 작용이 완만하게 나타나는 것으로서 침자극의 강도와 횟수에 따른 효과적인 방법을 강구해야 될 것으로 사료된다.

LPS처치 후의 침자극에 의한 생쥐 IL-1β유전자의 발현에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 LPS로 염증을 유발시키고 RT-PCR에 의해 생성된 DNA의 양을 비교해보았다. 그 결과, 초기에는 큰 변화가 보이지 않았으나 30분에서 1시간 사이에 많은 발현량이 보였다. 그러나, 3시간 이후에는 거의 생성되지 않음으로써 염증 유발후 초기에 효과적임을 시사하였다(Fig. 2). 이는 침자극에 의해 IL-1β의 생성이 촉진되다가 침자극의 효과가 30분에서 1시간사이에서 최대임을 나타낸 것으로 그후 면역력이 약화될 시에는 주기적인 침자극이 효과적임을 나타낸다고 사료된다. 그러므로 LPS로 생쥐의 면역력을 약화시키거나 염증 상태를 인공적으로 유발한 후의 침자극이 미치는 효과가 높다는 것을 알수 있었다. 그러나 염증 억제제를 침자극의 효과로 해석하는 데는 아직 그 기작이 밝혀지지 않았으며 분자 생화학적으로도 미지의 현상으로 남아 있으므로 그 기작을 명확하게 밝히기 위한 분자 생의학적인 접근이 요구된다.

LPS처치 전의 황기약침에 의한 생쥐 IL-1β유전자의 발현에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 인체의 腎俞穴에 해당하는 생쥐의 부위에 황기약침을 실시하였다. 황기약침 후 각각 0분(control), 15분, 30분, 1시간, 3시간 단위로 생쥐의 동공에서 혈액을 채취하여 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 이용하여 DNA의 양을 비교하였다. Fig. 3에서 보여주는 것처럼 IL-1β는 260 bp에서 발현되었다. Control에서는 일정량이

생성되다가 15분 이후 점차로 생성량이 감소되었다가 다시 30분에서 약간의 회복능을 나타내었다(Fig. 3). 이는 약침자극에 의해 면역증강작용을 나타내는 IL-1 β 의 생성은 정상적인 상태에서는 크게 기여하지 못함을 의미하며, 생체내 면역력이 약화되면서 회복되는 경향으로 보아 계속된 IL-1 β 의 생성을 위해서는 주기적인 약침이 필요할 것으로 사료된다.

LPS처치 후의 황기약침에 의한 생쥐 IL-1 β 유전자의 발현에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 인체의 腎俞穴에 해당하는 생쥐의 부위에 황기약침을 시행하였다. LPS처치전과 같은 방법으로 황기약침 후 각각 0분 (control), 15분, 30분, 1시간, 3시간 단위로 생쥐의 동공에서 혈액을 채취하여 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 이용하여 DNA의 양을 비교하였다. Fig. 4에서 보여주는 것처럼 IL-1 β 는 260 bp에서 발현되었다. LPS처치 후의 황기약침은 생쥐의 IL-1 β 의 유전자 발현에 대하여 control, 15분, 30분, 1시간에서 점차적으로 많은 양이 발현되고 있음이 관찰되었다(Fig. 4). 이는 황기약침이 LPS에 의해 유발된 염증소견에 대해서는 적극적인 반응을 나타내는 것으로서 면역증강작용을 나타내며 IL-1 β 의 생성에 크게 기여하고 있음을 의미한다.

이와 같이 腎俞穴의 침자극은 면역 증강 작용을 나타내는 cytokine IL-1 β 에 대한 반응이 관찰되었으나 LPS처치전인 정상상태보다는 LPS처치후의 염증상태에서의 면역증강작용이 명확하게 나타났다. 그러므로 腎俞穴을 이용한 cytokine IL-1 β 의 추적은 생체내 병태적인 상태에서의 침자극과 황기약침의 효과에 대한 근거를 추측할 수 있을 것이며, 뿐만 아니라 침자극과 황기약침에 의한 면역반응정도를 통해 질병의 진행상태를 나타내는 진단지표로서 활용가능성이 있을 것으로 사료된다.

결 론

腎俞穴(BL23) 침자극과 황기 약침이 IL-1 β 의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 LPS처치에 의한 염증을 유발시킨 생쥐를 이용하여 실험한

후 RT-PCR법에 의하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. LPS 처치 전의 침자극은 생쥐의 IL-1 β 유전자 발현에 대하여 control, 15분, 30분, 1시간에서는 영향을 미치지 않았으며, 3시간 후에 일정량의 발현을 유발함이 관찰되었다.
2. LPS 처치 후의 침자극은 생쥐의 IL-1 β 유전자 발현에 대하여 자침후 30분에 가장 높은 발현이 관찰되었다.
3. LPS처치 전의 황기약침은 생쥐의 IL-1 β 의 유전자 발현에 대하여 약침자극 후 30분까지 발현되었으며, 1시간, 3시간에서는 발현되지 않았다.
4. LPS처치 후의 황기약침은 생쥐의 IL-1 β 의 유전자 발현에 대하여 control, 15분, 30분, 1시간에서 점차적으로 많은 양이 발현되고 있음이 관찰되었다.

그러므로 LPS 처치전보다 처치후에서 IL-1 β 의 유전자 발현이 증가하였으며, 황기 약침은 IL-1 β 의 발현을 더욱 증가시킴을 알 수 있다. 또한 IL-1 β 의 추적은 침자극과 황기 약침의 효과에 대한 근거를 알 수 있을 뿐만 아니라 생체의 면역반응정도를 통해 질병의 진행상태를 나타내는 진단지표로서의 활용가능성이 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 정태호, 김정철, 김문규. 최신 면역학 강의. 대구:경북대학교출판부. 1996:211-225.
2. 서울대학교의과대학. 면역학. 서울:서울대학교출판부. 1989:1-12.
3. 王琦 外 3人. 素問今釋. 貴州省:貴州人民出版社. 1981:164,412.
4. 崔昇勳. 內經病理學. 서울:소나무. 1996:221-240.
5. 안덕균 역. 면역과 한방. 서울:열린책들 1998:19-45,56-60,121-146.
6. 고병희, 김광호, 송일병. 四種 鹿茸의 免疫學的 效能에 관한 實驗的 研究. 大韓韓醫學會誌. 1991;12:187-202.
7. 김봉성, 정규만. 人蔘養胃湯의 면역 증강효과에 관한 연구. 大韓韓方小兒科學會誌. 1994;8:1-12.

8. 朴恩貞. 歸脾湯과 歸脾湯加味方이 마우스의 過敏反應 및 免疫反應 및 免疫細胞의 機能에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1990;11:149-169.
9. 박혜준, 고우신. 八物湯이 抗癌 및 免疫 機能에 미치는 實驗的 效果. 大韓韓醫學會誌. 1998;19:327-338.
10. 김광호 등. 삼중의 제법에 따른 人蔘水鍼이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 免疫反應에 미치는 영향. 慶熙醫學. 1989;5:97-105.
11. 주정주 외. 拱辰丹 藥鍼刺戟이 血液 및 各 免疫 조직의 淋巴球와 CD4+ T세포에 미치는 영향. 大韓針灸學會誌. 1999;16:179-203.
12. 이승덕, 김갑성. 牛膝 및 蜂毒藥鍼이 생쥐의 LPS 유발관절염의 細胞性免疫反應에 미치는 영향. 大韓針灸學會誌. 1999;16:287,29
13. 임사비나 외. 人蔘藥鍼과 Lidocaine을 첨가한 人蔘藥鍼이 腫瘍 및 免疫機能에 미치는 영향. 東西醫學. 1995;20:21-41.
14. 이정화. 瓦松藥鍼의 抗癌作用 및 免疫效果에 대한 實驗的 研究. 大韓針灸學會誌. 1999;16:175-213.
15. 金鍾屹, 李俊茂. 人蔘白朮 藥鍼이 免疫調節作用에 미치는 영향. 慶熙大學校大學院 博士學位論文. 1988.
16. 劉建洪, 何冬梅. 穴位葯物注射療法. 江西城:江西科技 1989:1-8,32-33.
17. 錢百炎. 中草藥注射劑. 上海:上海科技. 1981:71-132.
18. 大韓藥鍼學會. 藥鍼療法施術指針書. 서울:大韓藥鍼學會. 1999;13,17-19,82.
19. 金賢濟 外 3人. 最新鍼灸學. 서울:成輔社. 1983:214.
20. 安榮基. 經穴學叢書. 서울:成輔社. 1986:362-363.
21. 崔容泰, 李秀鎬. 精解鍼灸學. 서울:행림출판사. 1985:358-359.
22. 常敏毅. 抗癌本草. 湖南省:湖南科技. 1987:256-257.
23. 李尙仁. 本草學. 서울:修書堂. 1975:54-56.
24. 吳旻哲 등. 황기 및 當歸의 免疫增強效果에 관한 研究. 慶熙韓醫大論文集. 1986;9:343-354.
25. 李裁東. 鹿茸, 황기, 當歸水鍼이 放射線被曝에 의한 免疫機能低下에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集. 1994;17:119-140.
26. Abul KA et al. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia:W.B. Saunders Co., 1997:4-5,250,262-263.
27. Hazuda DJ, Strickler J, Hueppers F, Simon PL, Young PR. Processing of precursor Interleukin 1 β and inflammatory disease PA. J. Biol. Chem., 1990; 265:6318-6322.
28. Fontana A, Costam d, Frei K, et al. Cytokines and defense against CNS infection. London:CRC Press. 1996:187-220.
29. 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 1994;9:35-39.
30. 高炯均. 흰쥐에서의 골도 분촌에 의한 상응혈위. 대한침구학회지. 1999;16:115-122.
31. 中根明夫. サイトインからみに感染と宿主防禦. 日本細菌學雜誌. 1996;49:699-718.