

원저

## 刺五加皮 藥針液의 抗알러지 效果에 대한 實驗的 研究

윤종태\*, 설인찬\*\*, 김동희\*\*\*, 김성훈\*\*\*\*, 김한성\*

\* 대전대학교 한의과대학 경혈학교실

\*\* 대전대학교 한의과대학 심계내과학교실

\*\*\* 대전대학교 한의과대학 병리학교실

\*\*\*\* 경희대학교 동서의학대학원 중앙연구팀

### Abstract

#### An experimental study of Antiallergic activity of Medicinal Acupunture Solution of *Acanthopanax senticosus*(Rupr. et Maxim.)

Yoon, Jong-Tae\* · Seol, In-Chan\*\* · Kim, Dong-Hee\*\*\* · Kim, Sung-Hoon\*\*\*\* · Kim, Han-Sung\*

\* Department of Meridian, College of Oriental Medicine, Dae Jeon University

\*\* Department of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dae Jeon University

\*\*\* Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Dae Jeon University

\*\*\*\* Department of Oncology, Graduate School of East-West Medicine, Kyung Hee University

**Objetives** : This study was done to evaluate the antiallegic effect of medicinal acupunture solution of *Acanthopanax senticosus*(Rupr. et Maxim;abbreviated as ASMA), studies were done experimentally.

**Methods** : For this aim MTT assay, anaphylaxis reaction, DTH, histamine release, IgE production and vascular permability was evaluated.

**Results** : ASMA didn't show an effective cytotoxicity on the mouse lung fibroblast. It insignificantly suppressed histamine release from mast cells induced by compound 48/80, while it significantly reduced IgE production and SRBC-challenged DTH(Delayed type hypersensitivity). ASMA effectively suppressed anaphylactic reaction induced by compound 48/80. However, it didn't inhibit vascular permeability and contact dermatitis significantly.

· 이 논문은 보건복지부 한방치료기술과제(HNP99-5-11-0003-B)의 지원을 받아 수행되었습니다.

· 접수 : 3월 8일 · 수정 : 3월 16일 · 채택 : 3월 22일

· 교신저자 : 김동희, 대전광역시 동구 용운동 대전대학교 한의과대학 병리학교실(TEL. 042-280-2643)

E-mail : dhkim@dragon.taejon.ac.kr

Conclusion: Medicinal acupuncture solution had antiallergic effects.

Acanthopanax senticosus medical acupuncture depress the allergy reaction. Especially in anaphylactic type, the effect was good.

## I. 서론

藥針療法는 經絡學說의 原理에 立脚하여 刺戟과 藥物作用을 通하여 生體 機能을 調節하고 病理 狀態를 改善시켜 疾病을 治療하는 新鍼療法의 하나로<sup>1)</sup>, 이에 對한 效能은 많은 實驗 및 臨床을 通하여 檢證되고 있으며<sup>2~6)</sup>, 最近에는 痼疾의인 疾患이나 難治性 疾患에 이르기까지 藥針 效能에 대한 研究가 多樣하게 이루어지고 있다<sup>7,8)</sup>.

알러지(Allergy)란 免疫系의 防禦機能이 人體에 有害하게 反應하는 生物學的 現狀으로<sup>9)</sup>, 이는 生體가 同一한 抗原에 反復적으로 接觸함으로써 異常反應을 일으키는 狀態이며, 近來에는 過敏反應이라는 用語와 混用되어 使用되고 있다<sup>9,10)</sup>.

알러지 反應은 주로 免疫 글로불린이 抗原과 反應하여 放出하는 化學傳達物質이나 T 淋巴球에 의한 各種 化合物에 의해 發生되는데<sup>9,11)</sup>, 最近 環境 및 食生活의 變化로 인해 많은 알러지 患者가 發生하고 있음에도, 根本的 治療 對策이 없어 醫學界의 課題로 남아있다.

이러한 現實의 背景으로 인하여 韓醫學界에서도 韓藥 및 韓方 處方을 中心으로 알러지에 대한 實驗 및 臨床 研究가 活發하게 進行되고 있다<sup>12~15)</sup>.

刺五加皮(Acanthopanax senticosus(Rupr. et Maxim.) Harms)는 五加(Araliaceae)科에 屬한 落葉灌木 및 同屬 近緣植物의 根皮로, 益氣健脾 補腎安

神의 效能이 있어 補益藥類로 認識되고 있다<sup>16)</sup>.

藥理 作用에 대한 研究로 中樞神經系興奮, 抗疲勞, 抗炎, 解毒, 內分泌調節, 組織再生 및 抗腫瘍作用 등의 報告가 있고<sup>17~19)</sup>, 最近 免疫 調節作用에 대한 研究가 이루어져 網狀內皮細胞系統에 대한 食食 能力 및 抗體生成 能力增強 등의 研究가 報告된 바가 있다<sup>20,21)</sup>.

이에 著者는 免疫調節 作用의 異常으로 認識되고 있는 알러지에 대한 刺五加皮 藥鍼의 活用 可能性을 檢索하기 위하여 먼저 刺五加皮 물추출액의 細胞毒性, histamine 遊離 및 IgE 生成 抑制 效果를 살펴보고, 和胃氣, 化濕滯, 理中焦, 調升降, 寬中の 穴性を 가진 中脘<sup>22)</sup>을 選擇하여 I, IV型의 알러지에 관한 多様な 實驗을 實施하였던 바 若干의 至見을 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 材料

#### 1) 動物

本 實驗에 使用된 實驗 動物은 體重 20~25g의 4~5 週齡의 BALB/C mouse와 體重 180~220g의 Sprague-Dawley系(SD rat, 韓國化學研究所) 雄性 rat로 實驗 當日까지 固形飼料(粗蛋白質 22.1%以上, 粗脂肪 8.0%以下, 粗纖維 5.0%以下, 粗灰分 8.0%以下, 칼슘 0.6%以上, 磷 0.4%以上 三養社 配合 飼料)와 물을 충분히 供給하였다. 動物

室 環境은 溫度  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 相對濕度  $50 \pm 10\%$ , 照明 時間 12時間(07:00~19:00), 照度 150~300 Lux 로 設定하여 2週日간 實驗室 環境에 適應시켜 體重 變化가 一定하고 健康한 白鼠만을 選別하여 實驗에 使用하였다.

## 2) 藥材

本 實驗에 使用한 刺五加皮는 (주) 진생 코리아 에서 購入한 後 大田大學校 本草學 敎室에서 外部 形態를 比較 調查하여 確認한 後 實驗에 使用하였다.

韓 藥 名	學 名
刺五加皮	Acanthopanax senticosus (Rupr. et Maxim.) Harms

## 3) 試藥 및 機器

Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride( $\text{MgCl}_2$ )은 Sigma사(U.S.A.) 製品을 使用하였으며, Taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa (Japan)사 製品을, 逆轉寫酵素(Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega 사(Madison, U.S.A.) 製品을, RNAzol<sup>B</sup>는 Tel-Test 사(U.S.A.) 製品을, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Logan, U.S.A.)은 Hyclone 사(Logan, U.S.A.) 製品을 購入하였으며, 其他 一般 試藥은 特級 試藥을 使用하였다.

## 2. 方法

### 1) 檢液의 製造

刺五加皮(AS) 300g에 각각 蒸溜水 2000ml을 가하여 熱湯 抽出器에서 3時間 抽出하여 얻은 액을 吸入 濾過하여 이를 減壓 蒸溜 裝置(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 濃縮한 後, 이를 다시 凍結 乾燥器(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 完全 乾燥하여 112g의 추출액기스를 냉동( $-84^{\circ}\text{C}$ ) 保管하면서 適當한 濃度로 稀釋하여 使用하였다.

### 2) 藥鍼液의 製造

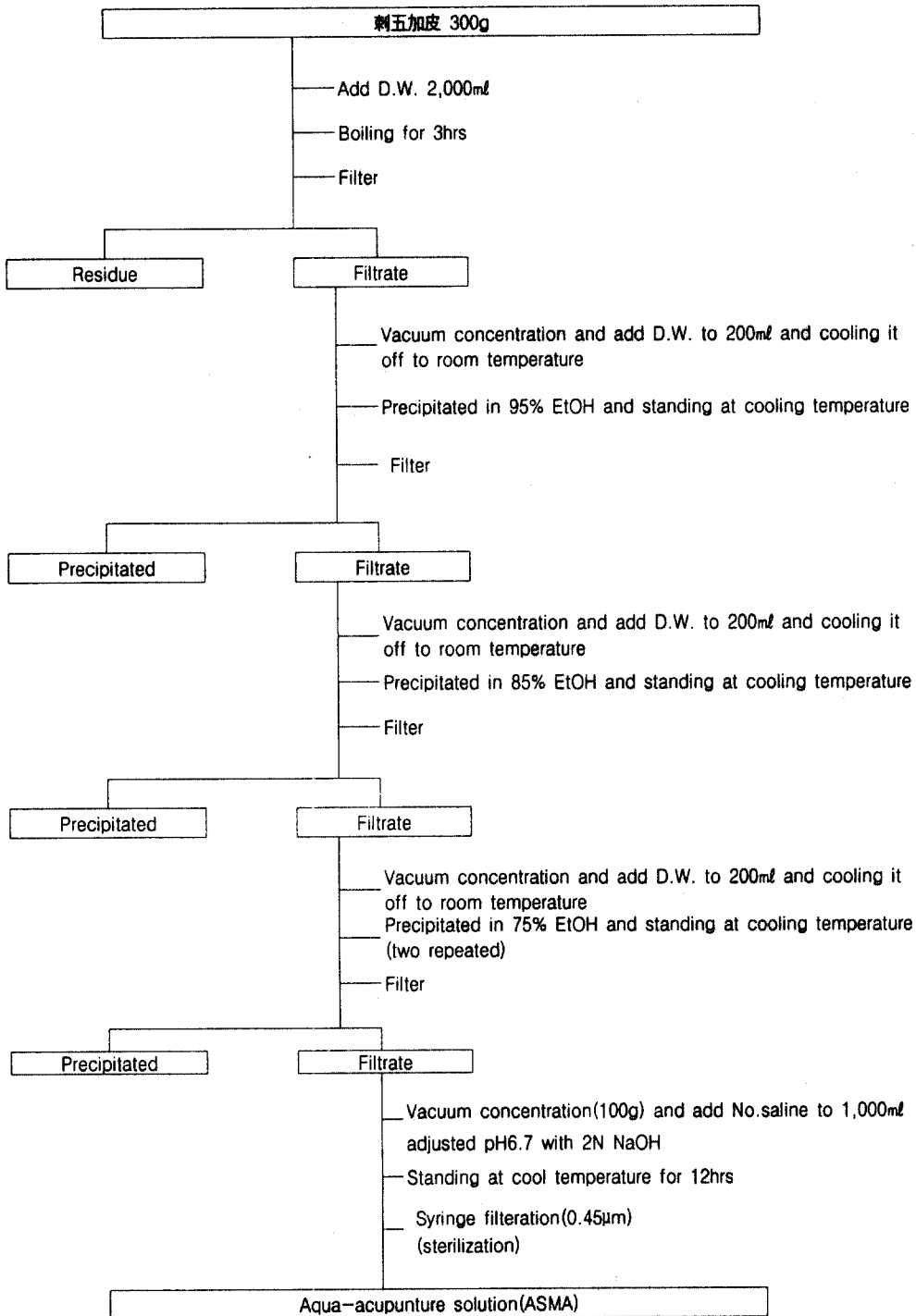
刺五加皮(AS) 275 g을 粗末로하여 圓形 flask에 넣고 蒸溜水 2000ml을 가하여 3時間 水浴에서 流出하고 濾過한 後, 이 濾過液을 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 全量을 200ml로 하였다. 室溫까지 冷却하고 95% ethyl alcohol 100ml을 가하여 室溫에서 攪拌한 後 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하고, 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 85% ethyl alcohol 100ml를 가하여 잠시 攪拌하고 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하고, 다시 濾液을 75% ethyl alcohol 100ml를 加한 後 같은 操作을 2回 反復한 後 濾液中 ethyl alcohol을 減壓留去하여 殘渣全量을 100g이 되게 한 後 生理食鹽水 1,000ml를 加하고 3% 鹽酸으로 pH6.7로 調節하여 低溫에서 12時間 放置 後 微量의 浮遊液을 濾別하고 高壓 滅菌하여 藥鍼液 20%(ASMA)를 實驗에 使用하였다(Scheme 1).

### 3) 細胞培養

#### (1) 생쥐의 lung fibroblast 細胞 培養

생쥐의 정상 lung fibroblast 細胞(mLFC)는 BALB/c 생쥐의 肺組織을 cool D-PBS로 3회 洗滌한 後 작은 조각으로 切斷하여 conical tube(15 ml)에 넣고, 1,400 rpm에서 5분간 遠心分離 하였다. Tube에 다시 DMEM (containing collagenase A(5mg/ml, BM, Indianapolis, IN, U.S.A.)와 D-

Scheme 1. The manufacturing procedure of aqua-acupuncture solution of AS by water-alcohol method.



Nase type I (0.15mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillinm  $10^4$ U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25 $\mu$ g/ml)를 넣고 37 °C CO<sub>2</sub> 培養器에서 2時間 동안 培養하였다. 0.5% trypsin -0.2% EDTA를 添加한 후 30 분간 계속 培養 후 인산 완충 生理食鹽水(PBS)로 약 2회 1,500 r.p.m에서 遠心分離한 후 DMEM-10% FBS에 1 주일 동안 培養하였다. 1 주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC 細胞를 分離하여 DMEM-5% FBS 培養液에  $10^5$ cells/ml 濃도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

#### (2) 생쥐의 脾臟細胞에서 B 細胞 分離

BALB/c 생쥐에서 脾臟을 分離하여 脾臟細胞(spleen cell)를 採取하여 2,000 r.p.m에서 5분간 遠心分離하여 細胞를 回收하였다. 여기에 赤血球 溶血液(Sigma) 2 ml을 넣고 37 °C 恒溫水槽에 5분간 방치하였다. 그리고 나서 즉시 10ml의 D-PBS를 添加하여 2,000 r.p.m에서 5분간 遠心分離하였다. 分離한 脾臟細胞에 anti-Thy 1.2 assites(200 $\mu$ l/ $10^8$ cells, Pharmin- gen, U.S.A.)를 處理한 후 얼음에서 30분간 反應시켰다. 反應 後 2회 D-PBS로 수세한 후 rabbit complement lyophilised (Serotec., U.K) 0.5ml을 處理하고 37 °C 恒溫水槽에서 1시간 동안 培養하였다. 培養 後 5회 complete medium으로 水洗하고, sephadex G-10 column(Amersham Pharmacia, U.S.A.)에 通過시켜 B 細胞를 分離하였다. B 細胞 含量을 測定하기 위하여  $\alpha$ -B220-FITC를 이용하여 流細胞螢光分析器(flow cytometry)로 分析하였다.

#### (3) IC-2 細胞 培養

IC-2 細胞(RCB 0102, Koyasu, Shigeo, Japan)는 10U/ml의 rIL-3(R&D system)를 RPM I1640 10% FBS 培養液에 處理하여 37 °C, 5%

CO<sub>2</sub> incubator에서 培養하였다. IC-2 細胞( $2.0 \times 10^6$ 개)를 24 well plate에 분주하고 AS 抽出物을 處理한 후 培養器에서(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 6時間 培養하였다.

#### 4) 細胞毒性(cytotoxicity) 測定

細胞毒性 測定方法은 SRB assay法<sup>23)</sup>을 약간 變形하여 實驗에 使用하였다. Mouse lung fibroblast cell(mLFC)는 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 자란 것을 trypsin-EDTA 溶液으로 單一 細胞들이 되도록 떼어낸 후,  $1.5 \times 10^4$ 개의 細胞를 96 well plate에 분주하고 培養器(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 2時間 培養한 후 AS 抽出物(最終 濃度 200  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml)을 48時間 동안 處理하였다. 培養 終了 後에 培養液을 버리고 인산 완충용액(PBS)로 2회 洗滌하였다. 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid)를 50 $\mu$ l를 가하고 1時間 동안 4 °C에 방치하였다. 蒸溜수로 5회 洗滌한 다음 well plate를 공기중에서 乾燥하고 SRB(0.4%/1% acetic acid) 溶液을 100  $\mu$ l/well로 가한 후 室溫(RT)에서 30분간 染色하였다. 그리고 0.1% acetic acid solution으로 약 4~5회 洗滌한 다음 공기중에서 乾燥하고, 10mM Tris-Base로 100 $\mu$ l/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker(Lab-Line, U.S.A.)에서 3.5 speed로 5분간 shaking한 후, ELISA leader (molecular devices, U.S.A.)로 540nm에서 absorbance를 測定하였다.

#### 5) In vitro에서의 histamine 遊離 實驗<sup>24)</sup>

##### (1) 腹腔 肥滿細胞의 分離

흰쥐를 에테르로 致死시킨 후 tyrode 용액(NaCl 137mM, KCl 2.7mM, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4mM, NaHCO<sub>3</sub> 12mM, glucose 5.5mM BSA) 6ml/100g을 흰쥐의 腹腔內에 注入하고 2時間 腹壁를 가볍게 맞사지 하였다. 맞사지 후 腹壁에

소절개를 가한 다음 腹腔 세척액을 스포이드로採取하여 3,000 r.p.m에서 5분간 원심시킨 후 상층 부유액을 버리고 BSA가 없는 tyrode 용액으로 2번 遠心 洗滌後 細胞를 浮遊시켰다.

(2) 腹腔 肥滿細胞에서의 histamine 遊離實驗

再浮遊시킨 肥滿細胞 浮遊液 1ml를 37°C incubator에서 10분간 安定化시킨 후 histamine releaser인 compound 48/80(Sigma Co., 10 µg/ml) 250µl, AS 250µl와 thyrode 1ml을 넣고 20분간 incubation시켰다. Histamine 遊離 反應은 試驗管을 얼음으로 冷却하여 中斷하고 3,000 r.p.m에서 5분간 遠心分離하여 上清液과 pellet으로 分離하였다. Histamine은 Shore法에 따라 上清液을 이용하여 有機層-水層의 抽出을 통해 抽出하고 0.2% o-phthalehyde 100µl를 넣고 室溫에서 5분간 방치하면서 反應을 進行하였다. 0.5N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 140µl을 가해 反應을 停止하였다. 反應 生成物의 濃度는 야기 파장 360nm, 측정파장 440nm에서의 螢光 強度를 測定하였다. Histamine 표준액은 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1µg/ml를 使用하여 同一한 方法으로 反應하였다. 遊離量은 AS를 가하지 않고 實驗한 tube에서의 反應을 100%로 하고 相對的인 沮害濃度를 計算하였다.

6) In vitro에서의 IgE 生成 測定 實驗

(1) Mesentric lymph node와 spleen lymphocyte 培養

BALB/c에서 mesentric lymph node와 spleen lymphocyte를 分離하고 1×10<sup>6</sup>cells/ml로 24plate에 분주한 후 AS를 첨가한 후 24시간 培養하였다. 이 培養液을 IgE 生成 測定에 使用하였다.

(2) IgE 生成量 測定

Sandwich ELISA method<sup>25)</sup>에 의해 測定하였다.

IgE 抗體를 50mM carbonate-bicarbonate buffer (pH9.6)로 1000배 稀釋하여 96 well plate에 100 µl씩 분주하고 1시간 동안 37°C에서 培養시켰다. 0.05% Tween 20(in PBS)로 3번 洗滌後, Block Ace를 이용하여 4°C에서 over-night 시켰다. 洗滌後 培養한 上層液을 100µl씩 분주한 후 37°C에서 2시간 培養시킨 후 다시 세척하였다. 여기에 Biotin을 2000배 稀釋하여 100µl씩 분주한 후 37°C에서 2시간 培養 후 다시 洗滌하고 4000배 稀釋한 avidin을 100µl씩 분주한 후 37°C에서 30분 培養시켰다. 이를 다시 세척 후 substrate solution[0.006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(in 0.2M citrate buffer, pH 4.0) : D.W : 2,2'-azio-bisC3-ethylbens-thiazoliune -6-sulfonic acid = 10:9:1]을 100 µl을 넣고 發色시킨 다음 1.5% oxalic acid로 정지시킨 후 ELISA reader을 이용하여 405nm에서 吸光度를 測定하였다.

7) SD를 이용한 動物實驗

(1) Chemical Mediator에 의한 血管 透過性에 대한 反應

SD 5마리를 1군으로 하여 對照群과 實驗群으로 나누고, 實驗群에는 藥針液을 中脘에 注射하였고, 對照群에는 生理食鹽水를 經口 投與하였다. ASMA를 中脘에 注射하고 30분 후에 각 動物에 1% Evans blue 生理食鹽水 1ml을 尾靜脈 注射하였다. 즉시 전모한 배부에 histamin(10µg)을 함유하는 生理食鹽水 0.1ml을 각각 皮內 注射하였다. 30분 후에 放血하고 皮膚를 剝離하여 臍結부의 漏出色素量을 Katayama등의 方法<sup>26)</sup>에 따라 測定하였다. 臍結부를 세절한 후 1.2N KOH에 皮膚板을 24시간 동안 溶解시키고 0.6N-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>와 acetone을 5 : 13의 比率로 混合한 액을 가하여 24시간 동안 Evans blue를 抽出하여 620nm에서 吸光度를 測定하여, 미리 Evans blue 標準溶液으로 작성한 檢索線으로

부터 算出하였다.

(2) 遲延型 allergy性 皮膚炎症 反應

抗原으로는 picryl chloride(PC, Sigma사)를 사용하였고, 감각 항원으로는 7% PC의 ethanol 용액을, 유발 항원으로는 1% PC의 olive 유용액을 각각 조제하여 使用하였다. PC에 의한 接續性 皮膚炎 誘發은 Asherson and Ptak의 方法<sup>27)</sup>에 準하여 생쥐 10마리를 1군으로 하여 對照群과 實驗群으로 나누고 實驗群은 犧牲前 3일간 1일 1회 中腕穴에 藥鍼하였다. 생쥐의 복부에 7% PC의 ethanol 용액 0.1ml을 도포하여 감각시킨 후 다시 7일 후 兩耳介에 1% PC olive 유용액 0.02ml을 도포하여 24시간 후의 耳介 두께를 dial thickness gauge를 사용하여 測定하여 誘發 전 耳介 두께와 比較하였다.

(3) 遲延型 allergy性 足浮腫 反應<sup>28)</sup>

抗原으로 사용된 綿羊赤血球(SRBC)는 頸動脈으로부터 채혈 후 alsever 溶液(Dextrose 20.5g/L, Sod. Citrate 8.0g/L, Citric acid 0.55g/L, Sod. Chloride 4.2g/L)을 가하여 4℃에서 保存하였으며, 보존 1주일 이내의 것만 使用하였다. SRBC에 의한 足浮腫 誘發은 5마리를 1군으로 하여 對照群과 實驗群으로 나누고, SRBC  $10^6$  cells/0.2ml을 靜脈內에 投與하여 감각시킨 후 4일째에 SRBC  $2.5 \times 10^6$  cells를 생쥐의 양측 족적 피하에 투여하여 염증을 유발시켰다. 유발전 및 24시간 후의 족적 두께 차이를 dial thickness gauge로 측정하였다. AS 藥針液은 3일간 1일 1회 中腕穴에 ASMA를 藥針하고 炎症 誘發 直前과 誘發 6時間 後에 각각 2회 藥針하였다.

(4) 呼吸器 損傷 誘發 實驗<sup>29)</sup>

實驗 動物을 1군에 10마리씩 配定하여 正常群, 對照群, 實驗群으로 구분하였다. 對照群의 肺浮腫

誘發은 소창의 方法에 따라 2% xylene- ethanol 溶液을 實驗 動物 100g 당 0.1ml씩 尾靜脈을 통하여 극히 서서히 注入하였고, 實驗群은 對照群에서와 같이 前處理 하고 3시간 후에 ASMA를 藥針하였다. 이 후 室溫에서 3時間 동안 방치시킨 다음 무마취 상태에서 후두 탈골법으로 犧牲시키고 나서 肺를 적출한 후 兩肺의 氣管支를 除去한 2g의 肺重量을 測定하여 實驗에 使用하였다. Lung thiobarbituric acid (TBA)值 測定은 탈혈한 폐장 0.5g을 취하여 0.05M Phosphate buffer(pH7.4) 5ml를 사용하여 homogenizer에 옮겨 homogenate를 microtube에 보관하고, clean test tube에(std. , cytosol, serum or homogenate(lung), blank) 200ul를 넣었다. 여기에 다시 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution 200ul를 가하고 5초 동안 vortex mixer로 mixing하고, 20% acetic acid 1.5ml을 가한 후 다시 5초 동안 vortex mixer로 mixing하였다. 마지막으로 1.2% Thiobarbituric acid solu.을 각각의 1ml씩 tube에 더하고, clean dry marble(유리구슬)로 덮은 후, 30분간 water bath에서 끓였다. 그 후 실온에서 30분간 冷却하고 2,000 r.p.m에서 10분간 遠心分離하여 上層液을 532nm에서 吸光度를 測定하였다.

8) Compound 48/80에 의한 anaphylaxis 反應 抑制 實驗<sup>30)</sup>

Anaphylaxis 反應 誘導는 6 주령의 ICR 마우스에 ASMA를 藥針하고 30분 후에 160µg의 compound 48/80을 腹腔 注射하고, anaphylaxis 抑制 效果를 測定하였다.

### III. 성적

1. 細胞毒性에 미치는 影響

細胞毒性 評價에서는 1, 10, 50, 100, 200µg/ml

의 濃度에서 各各 103.9±4.0, 103.69±4.6, 98.8±5.4, 89.8±2.7, 48.5±3.2로 나타나 50µg/ml 以下の 濃度에서는 正常 細胞에 대하여 細胞毒性이 나타나지 않았다(Table 1).

Table 1. Cytotoxicity of AS Extract on the Mouse Lung Fibroblast Cells(mLFCs)

Drug	Dose (µg/ml)	Percent of control data(%)
		Mouse lung fibroblast cells
Control		100.0±4.0
ASMA	1	103.9±4.0
	10	103.69±4.6
	50	98.8±5.4
	100	89.8±2.7
	200	48.5±3.2

Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) were pretreated with various concentration AS. The results were expressed the mean±S.E(N=6).

## 2. Histamine 遊離 抑制 效果

Rat의 腹腔 肥滿細胞에서 脫顆粒 誘發 物質 {Compound 48/80(10µg/ml)}에 의해 誘導된 histamine의 遊離 抑制에 對한 實驗에서는 濃度에 比例하여 histamine의 遊離量이 陽性對照群에 비해 減少하였으나 有意性은 나타나지 않았다(Table 2).

Table 2. Effects of AS Extracts on Histamine Release from Mast Cells Induced by Compound 48/80

Group	Conc. (µg/ml)	Histamine release conc.(nM)
Negative con. IC-2 B cell		122.70±8.54
Positive con. CD40+rIL-4		132.63±7.28
ASMA	10	128.64±6.24
	100	127.85±3.65

ASMA : CD40, rIL-4 and AS treated group

## 3. IgE 生成量 抑制 效果

Mesenteric lymph node(MLN)과 spleen lymphocyte를 Con A(2.5µg/ml)와 LPS(10µg/ml)로 자극시킨 후 IgE 生成量を 測定한 結果, mesenteric lymph node(MLN)에서 ConA(2.5µg/ml)로 자극시킨 다음 AS를 添加한 경우는 對照群에 비하여 모든 實驗 濃度에서 25% 내외로 有意性있는 IgE 生成 抑制 效果를 나타내었고, LPS(10µg/ml)로 刺戟시킨 경우는 對照群에 비하여 15~25%의 抑制 效果를 나타내었다(Table 3).

Spleen lymphocyte에서 ConA(2.5µg/ml)로 자극시킨 다음 AS를 添加한 경우는 對照群에 비하여 모든 實驗 濃度에서 15~26%, LPS(10µg/ml)로 刺戟시킨 경우는 對照群에 비하여 8~17%의 有意性 있는 抑制效果를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Inhibitory Effect of AS Extracts on IgE Production

Lymphocyte Stimulator	Conc. (µg/ml)	% of Control
Mesenteric lymph node	125	74.96±1.11***
	250	76.38±1.46***
	500	75.85±0.99***
	1000	76.74±0.76***
Spleen lymphocyte	125	74.85±1.45***
	250	76.97±3.33***
	500	77.40±0.94***
	1000	85.54±1.25**
Mesenteric lymph node	125	73.83±0.96***
	250	74.55±0.35***
	500	77.03±1.56***
	1000	84.34±0.15***
Spleen lymphocyte	125	83.24±0.99***
	250	82.84±0.88***
	500	86.68±1.79**
	1000	92.19±1.60

a) : Means ± Standard error

Statistically significant as compared with data of control(100%)

(\* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001)



4. SD를 이용한 動物實驗

1) Chemical mediator에 의한 血管透過性에 대한 效果

Histamine을 rat 皮內로 投與하여 evans blue의 組織內 殘留量을 測定한 結果 對照群에는 26.98 ± 2.82 μg/ml이었고, ASMA를 투여한 경우는 23.94 ± 1.11 μg/ml으로 나타나 對照群에 비하여 減少하였으나 有意性은 나타나지 않았다(Table 4).

Table 4. Effect of ASMA on Vascular Permeability Responses to Intradermal Histamine in Rat

Group	Concentration	Dye exudation(μg/ml)
Control	-	26.98 ± 2.82 <sup>a)</sup>
ASMA	20%	23.94 ± 1.11

a) : Means ± Standard error  
Control : Saline treated group

2) 遲延型 알러지性 皮膚炎症 抑制 效果

Picryl chloride에 의하여 誘發된 遲延性 皮膚炎症 反應은 귀의 두께 變化를 測定하였다. 對照群에서는 0.030 ± 0.010mm로 ear swelling이 測定되었고, ASMA 投與群은 0.016 ± 0.002mm으로 나타났다(Table 5).

Table 5. Effect of ASMA on Picryl Chloride-induced Contract Dermatitis in Rat

Group	Concentration	Ear swelling(mm)
Control	-	0.030 ± 0.010
ASMA	20%	0.016 ± 0.002

a) Means ± standard error

3) 遲延型 알러지性 足浮腫 抑制 效果

遲延型 過敏反應은 對照群의 족척 부종율이 4.80 ± 0.59인데 비해 ASMA 投與群에서는 3.16 ± 0.42로 對照群에 비해 有意性있는 抑制를(p<0.05) 나타내었다(Table 6).

Table 6. Effect of ASMA on the Delayed Type Hypersensitivity in SRBC-challenged Rat

Group	Concentration	FPSI
Control	-	4.80 ± 0.59 <sup>a)</sup>
ASMA	20%	3.16 ± 0.42*

a) : Means ± Standard Error

Statistically significant as compared with data of control (\* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001)

Footpad thickness was measured immediately before challenge and 24hr

Footpad swelling index(FPSI)

$$= \frac{T24 - T0}{T0} \times 100$$

where T0 is the left hind footpad thickness immediately before

challenge T24 is the left hind footpad thickness 24hr after challenge.

4) 肺浮腫(Lung TBA ; Thiobarbituric acid) 抑制 效果

2% xylene ethanol로 肺浮腫을 일으킨 후 肺中 含有된 TBA 反應生成物을 測定한 結果, 對照群에서는 3.10 ± 0.08 μg/ml으로 나타났고, ASMA 投與群에서는 對照群에 비해 有意性있는 減少를(p<0.01) 나타내었다(Table 7).

Table 7. Effect of ASMA on the Lung TBA Values in Lung Damage of Rat Induced by Xylene

Group	Concentration	Lung weight /body weight	TBA(μg/ml)
Normal	-	0.053 ± 0.00002	2.45 ± 0.08 <sup>a)</sup>
Control	-	0.0067 ± 0.0007	3.10 ± 0.09
ASMA	20%	0.0064 ± 0.0002	2.34 ± 0.11**

a) : Means ± Standard Error

Statistically significant as compared with data of control (\* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001)

5. Compound 48/80에 의한 anaphylaxis

### 反應 抑制 效果

Anaphylaxis 反應 抑制 效果에서는 對照群은 100% 死亡하였으나, ASMA 投與群은 24時間 後에도 5마리 모두 生存하였다(Table 8).

Table 8. Effect of ASMA on Compound 48/80-Induced Systemic Anaphylactic Reaction

Treatment	Dose (mg/head)	Mortality(%) after injection of compound(160 $\mu$ g/head)			
		0.5hr	1hr	2hr	24hr
Control	PBS	100	100	100	100
ASMA	5	0	0	0	0

## IV. 고찰

藥鍼療法은 經絡學說의 理論에 準하여 穴位, 壓痛點 및 陽性反應點 등에 精製된 各種藥物을 注入하여 刺鍼效果和 藥物의 藥理作用을 동시에 발휘함으로써 疾病을 治療하는 新鍼療法이다<sup>1)</sup>.

다른 治療법보다 藥物이 胃腸管에서 破壞되는 것을 피할 수 있으며 內服하기 힘든 患者에게 使用할 수 있는 長點이 있어<sup>1,7)</sup>, 最近에는 痼疾의인 疾患이나 難治性 疾患에 이르기까지 藥針의 效能 研究가 多樣하게 이루어지고 있다<sup>7,8)</sup>.

免疫이란 特定한 感染 疾病에 대하여 抵抗하기 위한 身體의 防禦機能으로, 特異하게 抗體를 形成하여, 外部 病原菌의 除去, 毒性物質의 無毒化와 癌細胞를 破壞시키는데, T 細胞, B 細胞 및 大食細胞間의 相互作用이 免疫反應의 中心을 이루고 있다.

多様な 免疫性 疾患은 大개 正常 恒常性(homeostasis)을 파괴하는 면역적격(immunocompetent) 세포나 이들 産物의 缺乏, 또는 過多에 의해 招來되는 病理學의 不均衡에 의하여 發生된다<sup>31)</sup>.

免疫 反應의 異常으로 言及되어지는 알러지는 異物質 抗原(allergen)에 對한 免疫媒介性 反應(IgE)으로 인해 血管의 擴張, 毛細血管의 透過性 亢進,

平滑筋의 收縮과 痙攣, 粘液의 增加 및 粘膜의 浮腫과 炎症 등 組織 炎症과 器官 障礙를 일으키는 疾病으로 定義된다<sup>9-11)</sup>. 알레르겐(allergen)이 주로 環境에서 由來된 異物質이기 때문에 皮膚와 呼吸器에 가장 頻繁하게 나타나고, 血管系, 胃腸官系 및 기타 內臟에도 局部的으로 생긴다.

最近 알레르기反應에 대한 實驗研究로는 加味清上補下湯, 定喘湯, 補肺散 및 補肺散加味方, 瀉白散, 加減三奇湯, 當歸飲子, 清肌散 및 清肌散加味方, 仙方敗毒湯, 荊芥連翹湯, 蘇子降氣湯 및 蘇子導痰降氣湯 등을 試料로 알레르기 反應, 免疫機能 및 肺損傷에 對한 研究 結果가 報告된 바가 있으며, 藥針液의 抗알러지 效果에 대한 報告로는 張<sup>32)</sup>이 鬼箭羽 水鍼이 實驗的 血栓症과 알레르기 및 免疫 反應에 미치는 影響을, 盧<sup>33)</sup>가 桑白皮 藥針의 抗炎症 및 抗알레르기 活性에 관한 研究를 각각 報告한 바가 있다.

五加皮는 오갈피(五加: Araliaceae)科에 屬한 落葉灌木 및 同屬 近緣植物의 根皮이다<sup>16)</sup>. 五加皮의 基源 植物로는 五加科(Acanthopanax grailistylus W.W.Smith)와 蘿藦科가 있으며, 이 중 五加科가 가장 많이 言及되고 있으며<sup>16-19)</sup>, 刺五加皮(Acanthopanax senticosus(Rupr. et Maxim.) Harms)는 이 五加科로 分類된다. 우리나라에서는 추풍령, 광릉 및 강원도 이북에서 자라는 落葉 灌木으로서 높이가 2~3m에 달하며 전체에 가늘고 긴 가시가 발생하고 회갈색이며 掌狀復葉이다<sup>34)</sup>.

刺五加皮는 五加皮에 비하여 益氣健脾, 補腎安神시키는 補益性이 있어 體虛乏力, 食慾不振, 腰膝酸軟, 失眠, 多夢 등에 使用되고 있다<sup>16)</sup>.

藥理學적으로는 eleutheroside( $\beta$ -Sitossterol glucoside), syringine 등을 함유하여, 中樞神經系 調節, 抗疲勞, 抗炎, 白血球 增加 및 抗腫瘤 作用 등이 보고된 바가 있다<sup>17-19)</sup>. 또한 免疫機能에 대한 作用으로 網狀內皮 細胞系統에 대한 吞噬能力을 向上시키는 能力, 抗體를 生成시키는 能力 등이 報告<sup>20)</sup>된 바가

있어 刺五加皮가 免疫系의 機能調節과 매우 關聯이 있음을 알 수 있다.

이에 著者는 上記한 本草學의 效能과 實驗 結果를 바탕으로 免疫調節 作用의 異常으로 認識되고 있는 알러지에 대한 刺五加皮 藥鍼液(ASMA)의 效能을 實驗的으로 評價하기 위하여, 항알러지에 관한 多樣한 實驗을 實施하였다.

In vivo 實驗에서 取穴은 和胃氣, 化濕滯, 理中焦, 調升降, 寬中の 穴性으로 氣血의 根源인 中焦의 機能을 調節하는 中脘穴<sup>21)</sup>을 選擇하였다.

本 實驗에서는 먼저 in vitro 實驗을 위하여 AS의 細胞毒성을 평가하였는데, 50 $\mu$ g/ml 以下の 濃度에서는 正常 細胞에 대하여 細胞毒性이 나타나지 않았다(Table 1).

第一型 過敏反應에서 가장 중요한 化學媒介因子인 히스타민은 肥滿細胞 顆粒무게의 약 10%를 차지하고 있으며, 顆粒안에 만들어져 있다가 抗原의 刺戟에 의하여 顆粒이 破壞되면서 遊離되어 平滑筋 收縮과 血管透過力 增加 등을 일으켜, 알러지 實驗의 指標로 使用되는데<sup>9,10)</sup>, 本 實驗에서는 AS 投與群이 濃도에 比例하여 histamine의 遊離量이 陽性 對照群에 비해 有意적으로 減少하는 結果를 나타내었다(Table 2).

IgE는 알러지의 反應 分類중 제I형인 即時型 過敏反應에서 減作抗體로 肥滿細胞의 表面의 수용체에 부착한다. 알레르겐에 노출된 후 수분내에 肥滿細胞에서 血管 活性 및 炎症 反應 媒介 物質이 分泌되어 血管 弛緩, 腸管 平滑筋 收縮, 粘液腺 分泌物 刺戟을 일으킨다. 제 1 형 즉 IgE-매개성 알러지는 臨床的으로 크게 아토피와 아나필락시스가 있다<sup>35)</sup>.

本 實驗에서 IgE 生成量은 mesenteric lymph node과 spleen lymphocyte를 Con A와 LPS로 刺戟시킨 후 測定하였는데, AS 投與群은 最高 25% 內外로 有意性있는 IgE 生成 抑制效果를 나타내어,

히스타민 遊離量 實驗結果와 附合됨으로써 抗알러지 效果가 있음을 示唆하였다(Table 3).

Histamine을 rat 皮內로 投與하여 evans blue의 組織內 殘留量을 測定한 chemical mediator에 의한 血管透過性에 대한 反應에서는 對照群에 비하여 減少하였으나 有意성은 나타나지 않았다(Table 4).

Picrychloride에 의한 遲延型 알러지性 皮膚 炎症 反應에서는 對照群에 비하여 減少하였으나 有意性있는 結果는 나타나지 않았으나(Table 2, 3), 綿羊赤血球에 의하여 誘發된 遲延型 過敏 反應에 대한 생쥐의 足浮腫 反應에서는 有意性있는 감소를 나타내어 IV형의 알레지 反應에도 應用될 수 있을 것으로 보인다(Table 4).

肺浮腫은 肺毛細血管壓의 上升, 肺胞, 肺毛細管隔壁의 透過性의 亢進, 血液膠質滲透壓의 低下 및 肺 림과 循環의 障礙 등에 의해 肺의 血管外液이 肺毛細管으로부터 血管밖으로 水分이 漏出되어 肺胞內에 過剩으로 增加하는 狀態를 말하는데<sup>36)</sup>, 本 實驗에서는 폐중 含有된 TBA 反應 生成物 測定에서는 ASMA 投與群에서 有意性있는 減少를 보여 알레지 성 喘息 등의 알레르기性 呼吸器 疾患의 治療에 效果的으로 使用할 수 있을 것으로 보인다(Table 5).

아나필락시스는 全身性 알레르기의 가장 심한 상태로 광범위한 血管 弛緩에 의한 低血壓 또는 쇼크, 氣管支 收縮, 胃腸官 및 子宮 收縮, 두드러기 또는 血管 浮腫 등이 나타나며, 매우 致命的이다<sup>35)</sup>. Compound 48/80에 의한 anaphylaxis 反應에 대한 本 實驗에서는 對照群은 100% 사망하였으나, ASMA 投與群은 24시간 후에도 모두 生存하였는데 (Table 8), 이는 IgE 生成量 抑制 結果와 相互 附合되어 1型和 關係된 알러지 疾患에 보다 效果的으로 應用할 수 있을 것으로 思料된다.

以上の 結果를 綜合하면 刺오가피 藥針은 炎症 反應 및 浮腫을 抑制시키고 損傷된 肺를 回復시키는 效果가 있으며, 특히 即時型 알러지 反應을 抑制시

켜, 알레르기성 呼吸器 疾患 治療에 應用할 경우 效果의인 結果가 期待된다.

## V. 결론

免疫調節 作用의 異常으로 認識되고 있는 알러지에 대한 刺五加皮 藥鍼의 活用 可能性을 檢索하기 위하여 中腕을 선택하여 抗알러지에 관한 多樣한 實驗을 實施하였던 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 細胞毒性 評價에서는 刺五加皮 물추출액의 50  $\mu\text{g/ml}$  以下 濃度에서 正常 細胞에 대하여 細胞毒性이 나타나지 않았다.

2. Histamine 遊離 抑制 效果에서는 刺五加皮 물추출액은 濃度에 比例하여 histamine의 遊離量이 陽性對照群에 비해 有意적으로 減少하였다.

3. IgE 生成 抑制 效果에서는 刺五加皮 물추출액은 Con A와 LPS로 刺戟시킨 對照群에 비하여 8~26%의 抑制 效果를 나타내었다.

4. Chemical mediator에 의한 血管透過性에 대한 反應에서는 刺五加皮 藥針液 投與群은 對照群에 비하여 減少하였으나 有意성은 나타나지 않았다.

5. 遲延型 알러지성 耳介 浮腫 反應에서는 刺五加皮 藥針液 投與群은 對照群에 비하여 減少하였으나 有意성은 나타나지 않았다.

6. 遲延型 알러지성 足浮腫 反應에서는 刺五加皮 藥針液 投與群은 對照群에 비해 有意性있는 抑制를 나타내었다.

7. 肺中 含有된 TBA 反應生成물을 測定에서는 刺五加皮 藥針液 投與群은 對照群에 비해 有意性있는 減少를 나타내었다.

8. Compound 48/80에 의한 anaphylaxis 反應 抑制效果에서는 對照群은 100% 死亡하였으나, 刺五加皮 藥針液 投與群은 24時間 後에도 모두 生存하였다

以上の 結果로 보아 刺五加皮 藥針은 알러지 反應을 抑制시키는 效果가 認定되며, 특히 即時型 알러지 反應을 抑制시켜, 이에 대한 持續的인 研究가 必要하리라 思料된다.

## VI. 참고문헌

1. 候天印 : 中國藥鍼療學, 北京, 金循出版社, 1991, pp1~7.
2. 金 薰 : 薏苡仁分割藥鍼이 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響, 大田, 大田大碩士學位論文, 1997.
3. 金在圭 : Ethanol 中毒에 대한 鍼, 灸 및 人蔘水鍼이 解毒效果에 미치는 影響, 慶熙大學校博士學位論文, 1985.
4. 金在煜 : 人蔘 水鍼이 endotoxin으로 誘發된 血栓 動物 模型에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 13, 1990, 219~233.
5. 朴快煥 : 天麻 水鍼이 抗痙攣 效果에 미치는 影響, 慶熙大學校博士學位論文, 1988.
6. 朴快煥 : 當歸 水鍼이 鎮痛 效果에 미치는 影響에 關한 研究, 慶熙大學校論文集, 7, 1984, 261~271.
7. 盧宗植 : 鹿茸, 人蔘, 甘草 水鍼이 糖尿病에 대한 效果 및 免疫機能에 미치는 影響, 慶熙大學校 博士學位論文, 1988.

8. 李俊茂 외 : 蟾蟾 藥針의 抗癌作用에 對한 研究, 東醫病理學會誌, 14(2), 2000, pp.132~143.
9. 이기영 : 알러지의 진료, 서울, 한국의학사, 1992, p.3.
10. 丁奎萬 : 알레르기과 韓方, 서울, 圖書出版第一路, 1999, pp.15~26, 60~61.
11. 金周德 외 : 로이트 必須免疫學, 서울, 高文社, 1991, p.1, 17.
12. 李鍾年 : 麻黃定喘湯이 I型 및 IV型的 알러지 反應과 肺損傷에 미치는 影響, 大田, 大田大學校 大學院, 1997.
13. 宋在鎭 : 加味金水六君煎이 알러지反應과 肺損傷에 미치는 影響, 大田, 大田大學校大學院, 2000.
14. 金俊明 : 加味治哮喘散의 抗알러지 效果에 대한 實驗的 研究, 大田, 大田大學校大學院, 2000.
15. 康晰榮 : 알러지 질환의 임상적 실재, 서울, 一潮閣, 1988, pp.192~207, 242~251.
16. 辛民教 외 : 鄉藥(生藥)大辭典, 永林社, 서울, 1990, pp.432~435.
17. 王本祥 외 : 現代中藥藥理學, 天津科學技術出版社, 1997, pp.423~424.
18. 王浴生 외 : 中藥藥理與應用, 人民衛生出版社, 1983, pp.626~637.
19. 黃泰康 외 : 常用中藥成分與藥理手冊, 中國醫藥科技出版社, 1994, pp.518~524.
20. 中藥大辭典編纂委員會編 : 中藥大辭典(券上), 新文豐出版公司, 1979, pp.279~282.
21. 陰健郭力弓 외 : 中藥現代研究與臨床應用, 學苑出版社, 1994, pp.411~420.
22. 蔡禹錫 : 經穴集成, 大星出版社, 1995, p.404.
23. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monk, A., McMahon, J.D., Vistica, J., Warren, T., Kenney, S. and Boyd, M.R. ; New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J. Natl. Cancer Inst., 82(13), 1990, pp.1107~1112.
24. Shore P. A., Burkhalter A. and Gohen V. H., Jr. : A method for the fluorometric assay of histamine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1959, 127, 182~186.
25. Rajagopal D, Ganesh K., A., Subba Rao P., V. Modulation of allergen-specific immune responses to the major shrimp allergen, tropomyosin, by specific targeting to scavenger receptors on macrophages. Int Arch Allergy Immunol. ; 121(4), 2000, 308~16.
26. Katayama, S., Shionoya, h., Ohtake, S. : Microbiol, Immunol., 22, 1978, 89.
27. Asherson, G.L. and Ptak, W. : Immunology, 15, 1968, 405.
28. 大森健守 外 : 日藥理誌, 80號, 1987, pp.261~270.
29. 眞杉文紀 · 中村哲也 : Sodium laurylsulphate 可溶化による 肝チオバルビル酸値를 비타신소藥物에 의한 변動, 日本イーサイ株式會社 藥理研究所, 비타신소, 51(1), 1977, 21~29.
30. Shin TY, Park JH, Kim HM. Effect of Cryptotympana atrata extract on compound 48/80-induced anaphylactic reactions. J Ethno-pharmacol. 66(3), 1999, 319~25.
31. 서울대학교 의과대학 : 면역학, 서울대학교출판부, 1991, pp.59~63, 121~133.34.鄭

- 昇杞 : 加味清上補下湯이 喘息에 미치는 影響에 關한 實驗的 考察, 大韓韓醫學會誌, 12(1), 1991, 118~138.
32. 장일진 : 鬼箭羽 水鍼이 實驗的 血栓症과 알레르기 및 免疫 反應에 미치는 影響, 大韓針灸學會紙, 11(1), 1994, pp.405~429.
33. 노동일 외 : 상백피 약침의 항염증 및 항알레르기 활성, 大韓針灸學會紙, 15(1), 1998, pp.525~535.
34. 李昌福 : 大韓植物圖鑑, 鄉文社, 1982, pp.573~575.
35. 송계용 외 : 핵심병리학, 고려의학, 1998, pp.193~198.
36. Jay H. Stein : Internal medicine, Mosby-Year Book Inc, 1994, pp.1649~1655.