

馬兜鈴藥鍼의 喘息抑制 및 免疫調節效果에 對한 實驗的 研究

박정준¹ · 김영일¹ · 이 현¹

¹대전대학교 한의과대학 침구학교실

The Experimental Study on the Suppressive Effect of Aristolochiae Fructus Herbal-acupuncture at St36 on OVA-induced Asthma and the Regulatory Effect on Immune Response

Jung-Jun Park¹, Young-Il Kim¹, Hyun Lee¹

¹Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

Objectives: The aim of this study was to investigate the Asthma-suppressive and Immuno-regulatory effect of AF-HA(Aristolochiae Fructus Herbal-acupuncture) at Joksamni(St36) in OVA(ovalbumin)-induced asthma mouse model.

Methods: C57BL/6 mice were sensitized and challenged with OVA(ovalbumin) for 12 weeks(once a week). The mice in the OVA-AF-HA group were treated with AF-HA at St36 for the later 8 weeks(3times/week). The mice in the OVA-Needle-Prick group were treated with single prick with an injection needle at St36 for the later 8 weeks(3times/week).

Results: 1. The lung weight and the total cells in lung of the mice treated with AF-HA at St36 decreased significantly compared with those of the OVA-control group.

2. Total leukocytes and eosinophils in BALF of the mice group treated with AF-HA at St36 decreased remarkably compared with those of the OVA-control group.

3. The collagen accumulation in lung of OVA-AF-HA group decreased significantly compared with that of the OVA-control group.

4. The concentrations of IL-4, IL-5, IgE in BALF, and IL-4, IL-5, IL-13 in serum of the mice group treated with AF-HA at St36 decreased significantly compared with those of the OVA-control group.

5. The numbers of Gr-1⁺/CD11b⁺ and CD11b⁺ cells in lung of the mice group treated with AF-HA at St36 decreased significantly compared with those of the OVA-control group.

6. The numbers of CCR3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD3e⁺/CD69⁺ cells in lung of the mice group treated with AF-HA at St36 decreased significantly compared with those of the OVA-control group.

7. The mRNA expressions of TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 in lung of the mice group treated with AF-HA at St36 decreased significantly compared with those of the OVA-control group.

· 교신저자: 이현, 대전광역시 동구 용운동 963 대전대학교 한의과대학
침구학교실, Tel. 042-280-2641, Fax. 042-280-2610,
E-mail: lh2000@dju.ac.kr

· 접수: 2005/07/18 · 수정: 2005/09/06 · 채택: 2005/09/20

Conclusion : These results suggest that *Aristolochiae Fructus* Herbal-acupuncture at Joksamni(St36) may be an effective therapeutic method to treat asthma.

Key words : OVA-induced asthma, AF(*Aristolochiae Fructus*) Herbal acupuncture, Joksamni(St36)

I. 서론

喘息은 가역적인 기도의 폐쇄, 염증 및 과민성으로 특징 지워지는 호흡기 질환으로¹⁾, 기도가 과민하게 되어 점막부종, 분비물의 증가, 기관지의 수축이 일어난다. 증상은 발작성 호흡곤란, 빈호흡, 기침, 호흡시 천명, 그리고 기도저항 증가와 호기의 지연 등으로 특징지어진다.²⁾ 喘息의 원인에 대해서는 알레르기, 감염, 일상의 스트레스에 대한 心因性 生理反應, 空氣汚染, 自律神經失調 등을 들고 있으나, 아직까지는 대부분 알레르기로 알려져 있다^{3~5)}.

喘息은 한의학에서 哮喘證, 喘證, 痰飲의 범주로 간주하고 있으며, 喘이란 呼吸急促한 것을, 哮喘 喉中有痰聲響한 것을 말한다. 임상에서는 哮와 喘을 통칭 哮喘이라 하며^{6,7)}, 潤肺, 祛痰, 定喘, 補陰시키는 약물과 鍼灸治療를 위주로 치료하고 있다⁸⁾.

馬兜鈴(*Aristolochiae Fructus*)은 馬兜鈴科(귀방울과)에 속한 多年生蔓本인 귀방울의 果實로, 性은 寒無毒하며 味는 苦하여 散風熱, 宣肺氣, 治咳嗽, 祛痰結, 開聲音하고, 肺와 腎으로 들어가 清熱降氣의 要藥이 되며 風熱咳嗽, 肺炎咯血, 失音氣喘, 痰多不利, 百日咳에 사용되고 있다.⁹⁾

馬兜鈴에 관한 연구로 朴^{10,11)}의 보고가 있었으나, 喘息과 관련된 연구는 아직까지 접하지 못하였다.

이에 저자는 알레르기 천식모델 생쥐에 대하여 마두령약침이 미치는 영향을 알아보기 위하여, C57BL/6생쥐에 ovalbumin으로 알레르기 천식병태를 유발하고, 調和氣血, 扶正培元, 祛邪防病的

穴性을 가진 足三里(St36)^{12~16)}에 마두령약침을 시술하여 천식억제 및 면역조절효과에 대해 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 材料

1) 動物

동물은 雌性인 4~5週齡의 C57BL/6생쥐를 대한실험센터에서 공급받아 실험 당일까지 固型飼料(抗生劑 無添加, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22± 2 °C를 유지하여 2주일 동안 실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 藥材

실험에 사용된 馬兜鈴(*Aristolochiae Fructus*; 以下 AF이라 표현함)은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

3) 藥鍼液의 제조

분쇄기를 이용하여 羌活 55 g을 분쇄하여 분말로 만들어, 원형삼각플라스크에 넣고, 증류수 500 ml을 가하여 3시간 동안 shaking water bath에서 유출한 후, 유출액을 여과하였다. 이 여과액을 여과지로 3회 여과한 후, rotary evaporator로 감압농축 하였다. 이 농축액에 95 % ethyl alcohol 30 ml을 가하고, 실온에서 교반한 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후, 농축액을 다시 여과하였다. 이 여과액에 85 % ethyl alcohol 30 ml를 가하고 잠시 교반한

후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 75 % ethyl alcohol 30 ml를 가지고 교반한 후 방치하였다가 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액 중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20 ml가 되게 하였다. 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 저온에서 12시간 방치한 후 멸균하였다. 멸균된 농축액에 PBS를 가하여 1 %로 희석하여 약침액으로 사용하였다.

2. 方法

1) In vitro

천식이 유발된 생쥐에서 분리한 폐 조직을 잘게 절단한 후 collagenase를 가하여 shaking incubation을 통해 세포를 분리하였다. 분리해낸 세포에 rIL-3/rIL-5를 가하여 incubation하여 활성화 시켰다. 활성화된 세포에 약침액을 가하여 48시간 동안 배양 시킨 후 표식항체를 반응시켜 FACS 분석하였다.

2) In vivo

(1) Asthma mouse model

실험 1주째 200 μ l의 OVA/alum(500 μ g/ml)을, 2,3주째에는 100 μ l OVA/alum (500 μ g/ml)을 생쥐의 복강에 투여(i.p)하였다. 4주째에는 마취 후에 100 μ l의 OVA/alum (500 μ g/ml)을 기도투여(i.t)하였다. 5-8주째까지는 2.5 mg/ml의 OVA/PBS 40 μ l을, 9-12주째까지는 5 mg/ml의 OVA/PBS 40 μ l을 air compressor를 이용하여 30분간 주3회 노출시켰다.

(2) Classification of experimental animal groups

실험군은 7마리를 1군으로 하여, normal군,

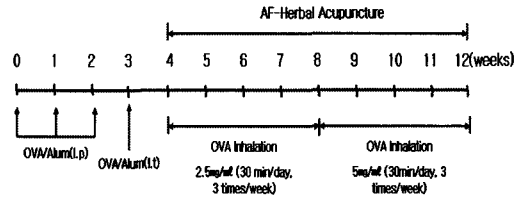


Fig.1. OVA-induced mouse asthma model

control군, needle prick군, AF-HA군 등 4군으로 나누었다. normal군은 아무런 처치도 하지 않았고, control군은 천식 유발 후 아무런 처치도 하지 않았다. needle prick군은 천식을 유발하고 족삼리(St36)에 주사기를 자입 후 즉시 제거하였다. AF-HA군은 천식 유발 후 족삼리(St36)에 1 %의 마두령약침액(100 μ l)을 주입하였다. needle prick자극 및 마두령약침은 5주째부터 12주째까지 8주간 주 3회 시행하였다(Fig. 1).

(3) BALF isolation

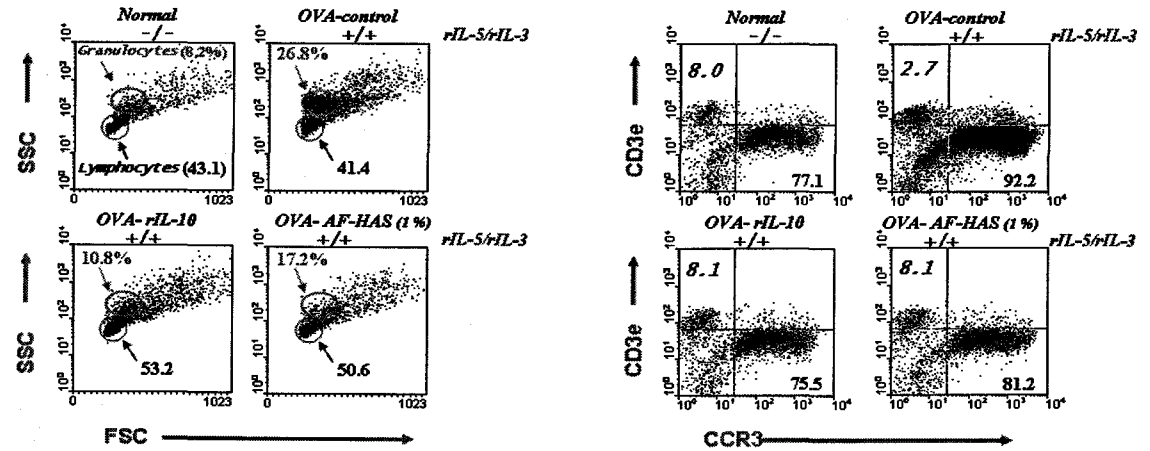
생쥐를 마취한 후 표피를 열고 기도에 주사기를 삽입하고 끈으로 묶어 고정된 후, 10 % FBS/DMEM medium을 3회 순환시켜 분리하였다.

(4) Photomicrographs

분리된 BALF를 세척해서 1,000rpm으로 5분간 cytopspin한 후, Hemacolor rapid staining set (Merck, Germany)를 사용하여 염색하였다. 공기중에서 건조시킨 후 bright microscope (Nikon, Japan ; \times 400)로 측정하였다.

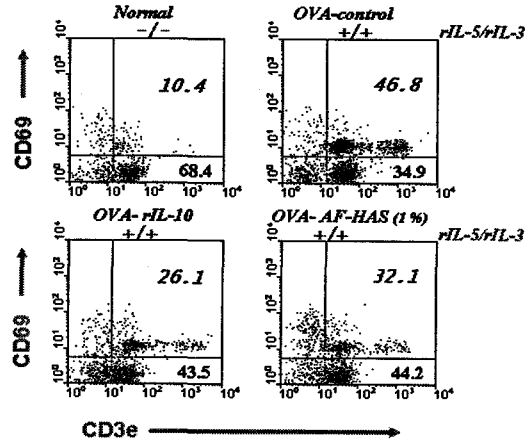
(5) Fluorescence activated cell sorter (FACS)

생쥐에서 분리해낸 폐 조직을 잘게 자른 후 collagenase를 가하여 incubation을 통해 분리해낸 세포에 표식항체를 반응시켜 Flow cytome-

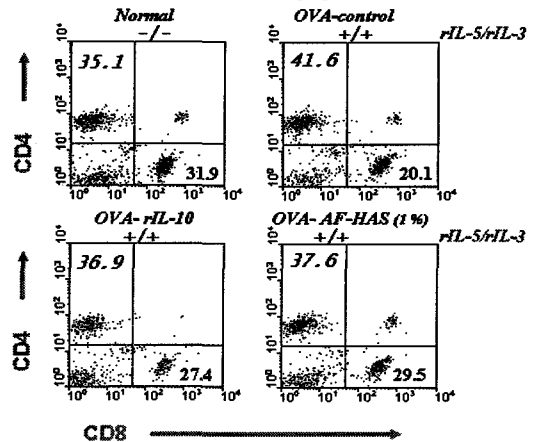


(A) Granulocytes/lymphocytes population (%)

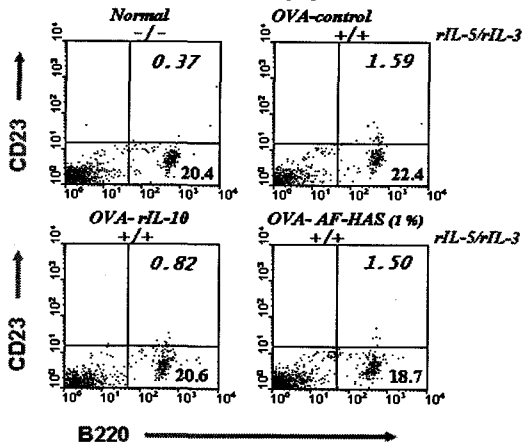
(B) CD3e⁺/CCR3⁺ population (%)



(C) CD69⁺/CD3e⁺ population (%)



(D) CD69⁺/CD3e⁺ population (%)



(E) CD23⁺/B220⁺ population (%)

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

Fig. 2. FACS (Fluorescence activated cell sorter) analysis

ter로 분석하였다.

(6) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

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

(7) RT-PCR analysis

① Total RNA의 抽出

각 실험군의 생쥐에서 떼어낸 폐 조직을 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 RNAzolB(Tel-Test, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC(Diethyl Pyrocarbonate)를 처리한 20 μ l의 증류수에 용해시켜 정량하고, RNA를 확인하기 위하여 RNA 4 μ g을 EtBr이 들어있는 formaldehyde buffer와 섞어 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 denaturation 시킨 후, formaldehyde를 넣은 1.5 % agarose gel에 loading dye와 함께 loading 하여 그 양을 확인하였다. 확인한 RNA는 RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)에 사용하였다.

② cDNA 합성

역전사 반응은 준비된 total RNA 3 μ g에 해당하는 양을 75 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 denaturation시키고, 이 denaturated total RNA 3 μ g에 2.5 μ l의 10 mM dNTPs, 1 μ l의 random sequence hexanucleotides (25 pmole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l의 RNasin(20U/ μ l), 1 μ l의 100 mM DTT 및 4 μ l의 5 \times RT buffer(250 mM

Tris-Cl, pH8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 혼합한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 첨가한 뒤 DEPC 처리된 증류수를 더하여 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 원심분리하여 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시키고 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 (MWG, Germany)을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 1 μ l의 first-strand cDNA를 주형으로 사용하였다. 주형에 대한 β -actin, IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α , 에 대한 sense primer (20 pmole/ μ l)와 antisense primer (20 pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5 mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 및 0.18 μ l Taq polymerase (5U/ μ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μ l 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 μ l씩 1.2 % agarose gel에 loading하여 50V 조건에서 30분간 전기영동을 통하여 분석하였다

3. 통계처리

통계는 Student's t-test로 하였다

III. 결 과

1. In vitro screening

1) FACS analysis

① Granulocytes/lymphocytes population (%)

肺細胞中 granulocytes의 比率이 normal群에서는 8.2 %이었으나 control群에서는 26.8 %로 증가하였고 AF-HAS群에서는 17.2 %로 감소하였다(Fig.2).

② CD3e⁻/CCR3⁺ population (%)

CD3e⁻/CCR3⁺ 세포의 비율이 normal群에서는 77.1 %이었으나 control群에서는 92.2 %로 증가하였고 AF-HAS群에서는 81.2 %로 감소하였다(Fig.2).

③ CD69⁺/CD3e⁺ population (%)

肺細胞中 CD69⁺/CD3e⁺의 비율이 normal群에서는 10.4 %이었으나 control群에서는 46.8 %이었고 AF-HAS群에서는 32.1 %로 감소되었고, CD69⁺/CD3e⁺의 비율은 normal群에서는 68.4 %이었으나 control群에서는 34.9 %이었고 AF-HAS群에서는 44.2 %로 증가했다(Fig.2).

④ CD4⁺ 및 CD8⁺ population (%)

肺細胞中 CD4⁺ 세포의 비율이 normal群에서는 35.1 %이었으나 control群에서는 41.6 %이었고 AF-HAS群에서는 37.6 %로 감소하였다. CD8⁺의 비율은 normal群에서는 31.9 %이었으나 control群에서는 20.1 %이었고 AF-HAS群에서는 29.5 %로 증가했다(Fig.2).

⑤ CD23⁺/B220⁺ population (%)

肺細胞中 CD23⁺/B220⁺의 비율이 normal群에

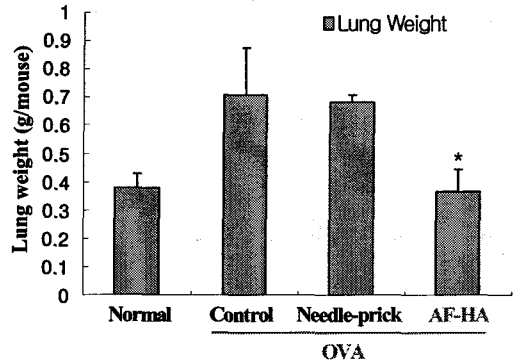


Fig. 3. Lung weight

서는 0.37 %이었으나 control群에서는 1.59 %이었고 AF-HAS群에서는 1.50 %로 감소되었다(Fig.2).

2. In vivo

1) Lung weight

肺의 무게를 測定한 결과, control群에서는 normal群에 비하여 증가하였고, AF-HA群에서는 control群보다 무게가 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$)(Fig.3).

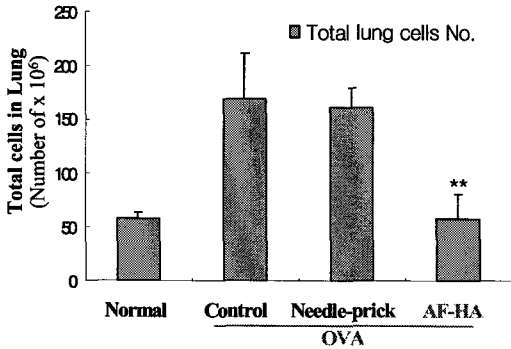
2) Cell count

① Total cells in lung

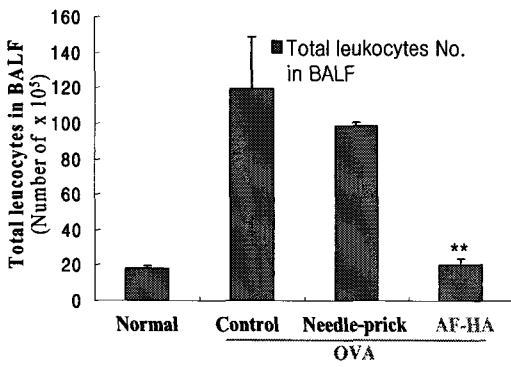
총 肺 세포수를 측정된 결과, control群에서는 normal群에 비하여 증가하였고, AF-HA群에서는 control群보다 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig.4).

② Total leukocyte in BALF

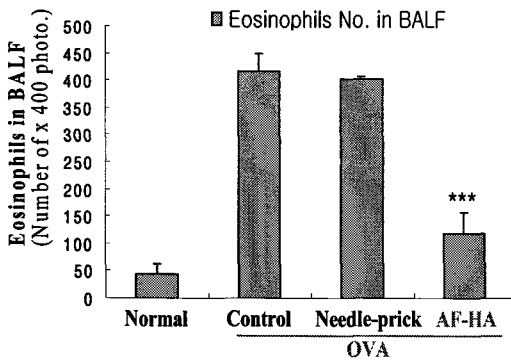
BALF內 leukocyte수를 측정된 결과, control群에서는 normal群에 비하여 증가하였고, AF-HA群에서는 control群보다 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig.4).



(A) Total cells in lung



(B) Total leukocytes in BALF



(C) Eosinophils in BALF

Fig. 4. Cell count

③ Eosinophils in BALF

BALF內 eosinophil수를 측정한 결과, control

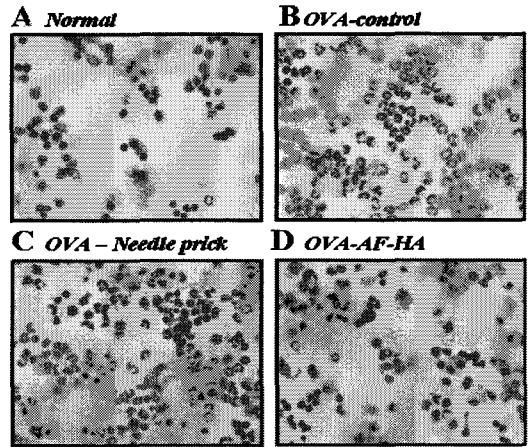


Fig. 5. Photomicrographs of Eosinophil in BALF

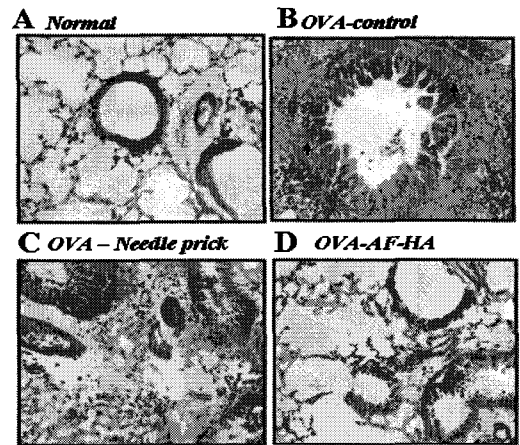
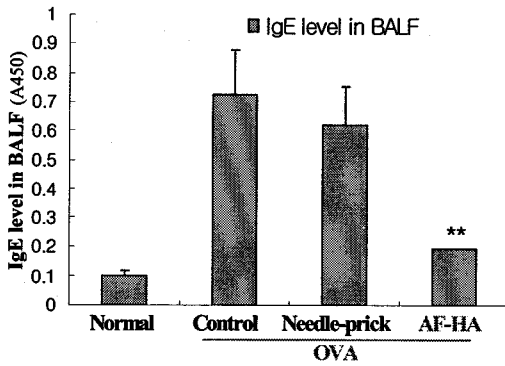


Fig. 6. Histological analysis of lung sections from mice

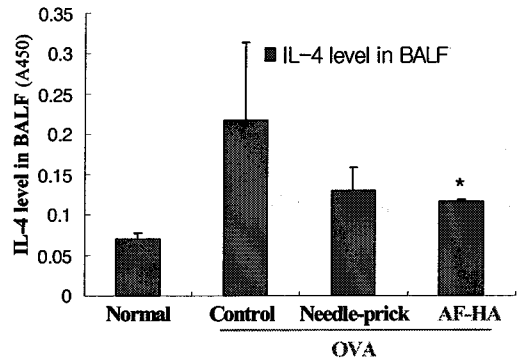
群에서는 normal群에 비하여 증가하였고, AF-HA群에서는 control群보다 유의성 있게 감소하였다($p < 0.001$)(Fig.4).

3) Photomicrographs of Eosinophil in BALF

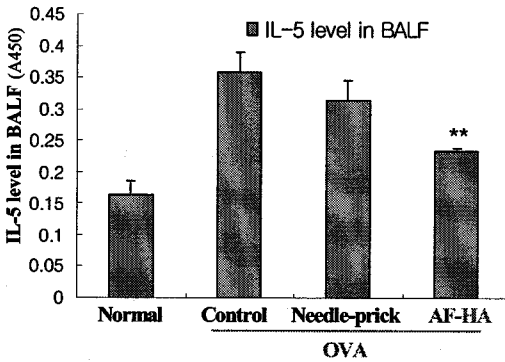
Control群에서는 eosinophil이 다량으로 관찰되었으며 AF-HA를 시술한 群에서는 eosinophil이 현저하게 감소하였다(Fig.5).



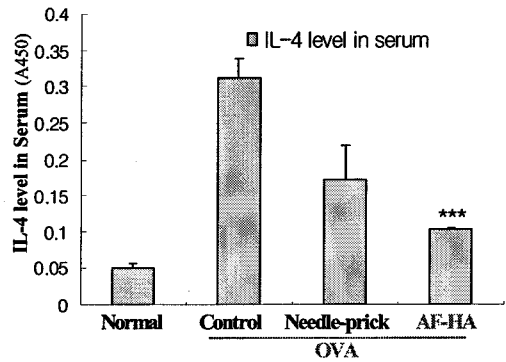
(A) IgE in BALF



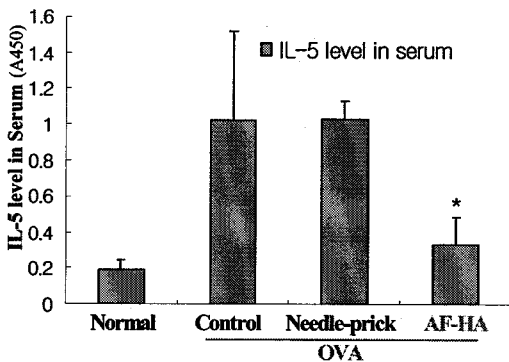
(B) IL-4 in BALF



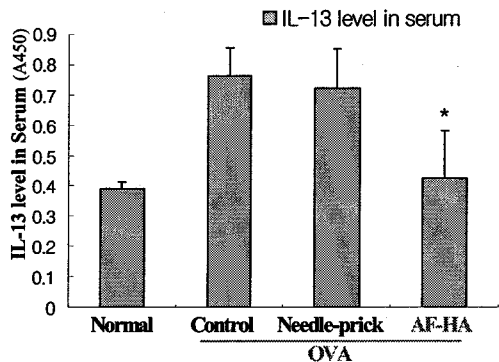
(C) IL-5 in BALF



(D) IL-4 in Serum



(E) IL-5 in Serum



(F) IL-13 in Serum

Fig. 7. ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)

馬兜鈴藥鍼의 喘息抑制 및 免疫調節效果에 對한 實驗的 研究

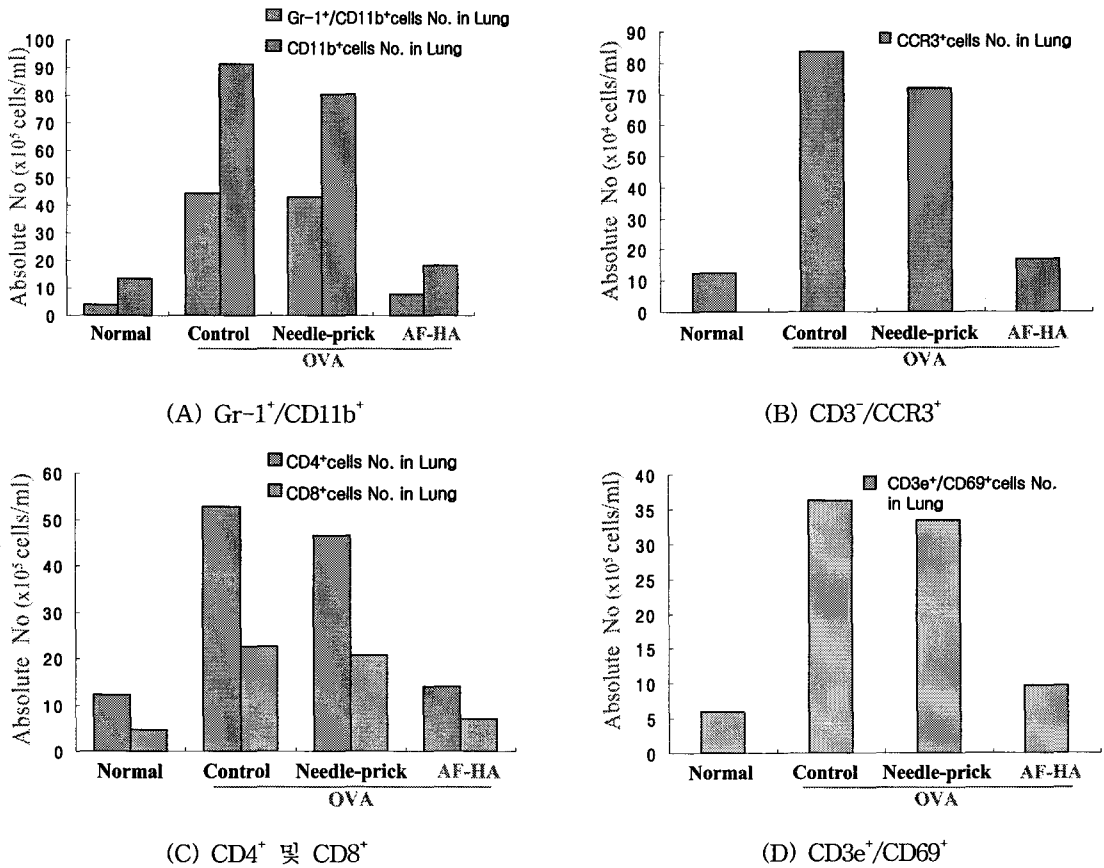


Fig. 8. FACS(Fluorescence activated cell sorter)

4) Histological analysis of lung sections

AF-HA群에서는 control群에 비해 collagen의 부착이 현저하게 감소하였다(Fig.6).

5) ELISA

① IgE in BALF

BALF內 IgE의 양을 측정한 결과, control群에서는 normal群에 비하여 증가하였고, AF-HA群에서는 control群보다 유의성 있게 감소하였다($p < 0.001$)(Fig.7).

② IL-4 in BALF

BALF內 IL-4의 양을 측정한 결과, control群

에서는 normal群에 비하여 증가하였고, AF-HA群에서는 control群보다 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$)(Fig.7).

③ IL-5 in BALF

BALF內 IL-5의 양을 측정한 결과, control群에서는 normal群에 비하여 증가하였고, AF-HA群에서는 control群보다 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig.7).

④ IL-4 in Serum

Serum內 IL-4를 측정한 결과, control群에서는 normal群에 비하여 증가하였고, AF-HA群에

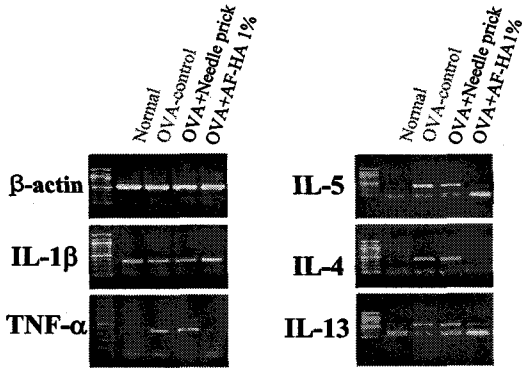


Fig. 9. RT-PCR(reverse transcriptase polymer chain reaction)

서는 control群보다 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.001$)(Fig.7).

⑤ IL-5 in Serum

Serum內 IL-5를 측정한 결과, control群에서는 normal群에 비하여 증가하였고, AF-HA群에서는 control群보다 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$)(Fig.7).

⑥ IL-13 in Serum

Serum內 IL-13을 측정한 결과, control群에서는 normal群에 비하여 증가하였고, AF-HA群에서는 control群보다 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$)(Fig.7).

5) FACS

FACS分析에 의해 각 細胞 수를 測定하였다.

① Gr-1⁺/CD11b⁺

肺內 Gr-1⁺/CD11b⁺ 세포 수를 측정한 결과, control群에서는 normal群에 비하여 증가하였고, AF-HA群에서는 control群보다 유의성 있게 감소하였다(Fig.8).

② CD3⁻/CCR3⁺

肺內 CD3e⁻/CCR3⁺ 세포 수를 측정한 결과, control群에서는 normal群에 비하여 증가하였고, AF-HA群에서는 control群보다 유의성 있게 감소하였다(Fig.8).

③ CD4⁺ 및 CD8⁺

肺內 CD4⁺ 세포수와 CD8⁺ 세포수를 측정한 결과, control群에서는 normal群에 비하여 증가하였고, AF-HA群에서는 control群보다 유의성 있게 감소하였다(Fig.8).

④ CD3e⁺/CD69⁺

肺內 CD3e⁺/CD69⁺ 세포 수를 측정한 결과, control群에서는 normal群에 비하여 증가하였고, AF-HA群에서는 control群보다 유의성 있게 감소하였다(Fig.8).

6) RT-PCR

RT-PCR을 이용하여 천식 유발과 관련된 여러 cytokine 들의 mRNA 발현을 관찰한 결과, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 등의 mRNA 발현이 control群에 비하여 AF-HA群에서 현저히 감소하였다(Fig.9).

IV. 考 察

喘息은 가역적인 기도폐쇄, 염증 및 기도 과민성으로 특징 지워지는 호흡기 질환으로, 그 결과 점막부종, 분비물의 증가, 기관지의 수축이 일어난다^{1,2)}.

喘息의 병인에 대해서는 아직까지 충분히 규명되어 있지 않으며, 최근엔 기관지천식을 기도의 亞急性炎症疾患으로 간주하는 경향이 있다. 가역성 기도폐쇄에는 여러 가지 복잡한 기전이

關與한다. 조직비만세포, 호산구, T 림프구, 대식세포와 다른 폐세포에서 유래한 많은 사이토카인이 喘息反應의 시작과 지속에 증대한 역할을 한다. 감각된 조직비만세포는 탈과립(degranulation)되어 히스타민, 브라디키닌, 화학유주인자, PAF(platelet activating factor)와 아라키돈산의 대사물인 프로스타글란딘과 류코트리엔 등의 매개체(mediator)를 분비함으로써 喘息反應에서 증추적 역할을 하여 神經因子가 이 과정에서 반응을 증폭시킨다. 이런 매개체가 국소적으로 작용하여 기관지수축, 세포침윤, 혈소판 활성화, 혈관투과성 증가, 부종 및 점액분비增加 등이 일어나게 된다. 비만세포 외에도 호산구, 호중구, 림프구 등의 다른 肺細胞들도 喘息에서 氣道炎症의 免疫病因論에서 중요한 役割을 한다. 氣道の 狹窄은 평활근 경련, 기도의 부종과 염증 및 점액감입에 의해 복합적으로 발생 한다^{17,18)}.

喘息(asthma)의 臨床病理學的 3대 증상은 가역적 호흡기도 폐쇄, 호산구에 의한 만성 기관지염증 및 기관지 수축물질에 의한 기관지 평활근의 과반응(수축)이다¹⁹⁾. 대부분은 重症보다 輕症이 많아서 발작적인 기침, 呼吸困難 및 喘鳴의 전형적인 3대 증상이 다 나오는 경우보다 지속적인 기침, 흥부압박감, 인후의 이물감 같은 단순한 증상만을 호소하는 경우가 더 많다. 통상 달리기 등의 운동 후에 喘鳴이 나타나거나 상기도담 후에 호흡곤란이 발생하는 경우가 많다. 그러나 生命을 위협하는 심한 급성 천식발작으로 즉각적인 응급치료 및 입원이 절대적으로 필요한 경우도 적지 않다²⁰⁾.

한의학적으로 喘息에 대하여는 《黃帝內經》에 최초로 언급되었다. 《素問調經論篇》²¹⁾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》²¹⁾에 “肺病者 喘咳逆

氣”라 하였으며, 《靈樞五閱五使》²²⁾에 “肺病者 喘息鼻張”이라 하였고, 《金匱要略》²³⁾에서는 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 哮證과 咳而上氣하는 “肺脹證”을 여기에 包括한다고 하여 上氣, 肺脹까지 포함시켰으며, 隋代 巢의 《諸病源候論》²⁴⁾에서 上氣喉中如水鷄鳴과 呻嗽라는 증상이라 하였다. 또한, 明代 이후 王²⁵⁾, 吳²⁶⁾ 등은 哮은 喉中有痰聲響하고, 喘은 呼吸急促한 것이므로 哮와 喘을 구분하였으나, 清代의 葉²⁷⁾이 哮와 喘을 구분하지 않고 단지 증상의 輕重, 緩急이 서로 다르다고 한 이후, 哮喘證은 喘鳴有聲, 呼吸急促한 하나의 증후군으로 인식되어왔다²⁸⁾.

喘息의 原因으로 許²⁹⁾는 風寒喘, 痰喘, 氣喘, 火喘, 水喘, 久喘, 胃虛喘, 陰虛喘의 8종으로 구분하였고, 최근에는 주로 寒冷, 心理的要因, 遺傳的素質, 痰, 過敏反應과 脾, 肺, 腎 등의 呼吸臟腑의 機能障礙로 인식하고 있다^{30,31)}.

喘息의 치료에 대해서는, 발작이 일어나기 前에는 正氣扶養을 위주로 하고, 이미 발작하였을 때는 攻邪를 위주로 하여야 하며, 虛實과 寒熱을 감별하여 實證에는 祛邪에, 虛證에는 扶養正氣에 중점을 두어야 하며, 冷哮에는 溫肺散寒, 化痰平喘의 治法을, 熱哮에는 宣肺降逆, 清熱化痰의 治法을 사용하여야 한다. 哮喘症의 治療에 吐法을 사용할 때 涼劑와 熱劑의 사용을 禁하고 風寒을 피하고 厚味를 節制하여야 한다.³²⁾

西洋 醫學의인 治療는 回避療法, 藥物療法, 免疫療法으로 나눌 수 있는데, 回避療法은 喘息의 원인이 되는 알레르기적 접촉을 피하는 것으로 특히, 알레르기성 喘息에 효과적이거나 일반적으로 약물치료를 동시에 실시하여야 효과적이다. 藥物療法은 주로 氣管支를 확장시켜 喘息증상을 완화시켜주는 기관지 확장제를 사용하며, 면역요법은 원인항원의 회피가 불가능하고, 약물치

료로 호전이 없을 때 사용하는 방법으로 원인항원에 따라 개개인 환자에 맞는 면역주사를 투여하는 방법이다³³⁾.

약침요법(Herbal acupuncture)은 경락요법과 약물요법의 원리를 바탕으로 연구된 新鍼療法の 하나이다. 질병과 유관한 부위인 經穴, 阿是穴 등의 陽性 반응점에 정제한 각종 韓藥物을 선택 注入함으로써 經穴과 藥物이 疾病에 대해 종합적인 작용을 충분히 발휘하여 질병을 예방하고 치료하는 방법이다³⁴⁾.

馬兜鈴은 馬兜鈴科(귀방울과 Aristolochiaceae)에 속한 多年生 蔓草인 馬兜鈴(Aristolochia Fructus)의 成熟果實을 乾燥한 것으로³⁵⁾, 性은 寒無毒하고 味는 苦하여 散風熱, 宣肺氣, 治咳嗽, 祛痰結, 開聲音하고, 成熟하면 開竅하여 肺를 象하고, 清熱降氣의 要藥이 되어 風熱咳嗽, 肺炎咯血, 失音氣喘, 痰多不利, 百日咳에 適用된다⁹⁾.

足三里는 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元, 祛邪防病하고, 主治는 氣脹, 浮腫, 貧血, 高血壓, 水氣, 鼻塞 등이다¹²⁾.

In vitro에서 FACS분석을 통하여, granulocytes/lymphocytes population(%)을 살펴보면, 肺 細胞 中 顆粒球의 比率이 control群에서는 26.8 %였으나 AF-HAS群에서는 17.2 %로 減少되었다(Fig.2).

Granulocytes는 과립성 백혈구, 과립구라고 하는 것으로, 건조 후의 염색성에 따라서 호산성, 호중성, 호염기성으로 나눌 수 있다. 호중구는 백혈구 중 식균작용이 강력하여 식세포라고도 하며, 호산구는 기생충의 감염이나 알레르기성 질환일 경우에 증가하고, 호염기구는 혈액내에서 혈액이 응고하는 것을 막아준다^{38,39)}. 따라서 AF-HAS群에서 肺 細胞內의 과립구의 감소는 肺內 炎症이나 알레르기 반응의 감소를 나타

낸다.

肺細胞 中 CD3e⁻/CCR3⁺ 비율은 control群에서는 92.2 %이었으나 AF-HAS群에서는 81.2 %로 감소되었다(Fig.2).

CD3는 T細胞의 결정표식인자이며, CCR3는 호산구의 활성화와 탈과립화에 관여하는 것으로 보인다^{36,37)}. 따라서 AF-HAS群에서 CD3e⁻/CCR3⁺ 비율의 감소된 것은 염증과 알레르기 반응을 일으키는 호산구의 감소를 나타낸다.

肺細胞 中 CD69⁺/CD3e⁺ 비율은 control群에서 46.8 %이었으나 AF-HAS群에서는 32.1 %로 감소되었고 CD69⁻/CD3e⁺ 비율은 control群에서는 34.9 %이었으나 AF-HAS群에서는 48.2 %로 증가했다(Fig.2).

CD69는 활성화된 B세포, T세포, 대식세포에 분포하는 것으로, 림프구의 신호전달에 관여하고, CD3e는 T세포 결정표식인자로, AF-HAS群에서의 CD69⁺/CD3e⁺의 비율의 감소는 염증과 알레르기 반응 중의 T세포의 감소를 나타낸다^{36,37)}.

肺細胞 中 CD4⁺細胞의 比率이 control群에서는 41.6 %이었으나 AF-HAS群에서는 37.6 %로 감소했고, CD8⁺細胞의 比率은 control群에서는 20.1 %이었으나 AF-HAS群에서는 29.5 %로 증가했다(Fig.2). CD4는 B세포와 Tc세포의 활성화와 성숙을 촉진시키고 비만세포를 자극함으로써 만성염증반응에 대한 알레르겐을 통제하는 Th 세포 밀도의 표지자이다^{36,37)}. 따라서 AF-HAS群에서의 CD4⁺ 세포 비율의 감소는 염증과 알레르기 반응 중의 T세포의 감소를 나타낸다.

肺細胞 中 CD23⁺/B220⁺의 비율이 control群에서는 1.59 %이었으나 AF-HAS群에서는 1.50 %로 減少되었다(Fig.2). CD23은 B세포일부, 단구, 수상돌기세포, 호산구, 혈소판에 발현하는 세포로, 대식세포와 호산구에 의한 세포독성을 매개

한다. B220은 쥐의 B세포 표면에 있는 표식자로, B세포의 免疫增加를 意味한다^{36,37}. 따라서 AF-HAS群에서의 CD23⁺/B220⁺ 비율의 감소는 염증과 알레르기 반응 중의 B세포의 감소를 나타낸다.

이상의 In vitro에서 과립구, CD3e⁻/CCR3⁺, CD69⁺/CD3e⁺, CD4⁺, CD23⁺/B220⁺의 비율이 AF-HAS群에서 control群에 비해 감소한 것으로 보아, 馬兜鈴藥鍼液이 喘息抑制 및 免疫調節作用이 있는 것으로 사료된다.

이에 著者는 散風熱, 宣肺氣하는 效능⁹을 지니고 있는 馬兜鈴으로 藥鍼液을 製造한 후, 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元, 祛邪防病 등의 穴性을 가진^{12~16}이 있는 足三里에 藥鍼施術하여, 알레르기 천식모델 생쥐에서 천식 억제 및 면역 조절에 미치는 영향을 알아보기 위하여, ovalbumin을 흡입시켜 감작된 생쥐에 알레르기 喘息 病態를 유발시키고, 馬兜鈴藥鍼液을 足三里에 刺入한 후 생쥐의 폐무게, 폐의 총세포수, BALF內 total leukocyte수, BALF內 eosinophil 수, ELISA 분석에 의한 BALF內 IgE, IL-4, IL-5 및 serum內 IL-4, IL-5, IL-13을 測定하고, FACS 분석에 의해 Gr-1⁺/CD11b⁺ 세포수, CD3⁺/CCR3⁺ 세포수, CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포수, CD3e⁺/CD69⁺ 세포수의 변화를 측정하였다. 또한 RT-PCR을 利用하여 喘息 유발과 관련된 여러 cytokine 들의 mRNA 발현을 관찰하였다.

實驗動物의 肺 무게 측정 결과, AF-HAS群에서 control群에 比하여 肺의 무게가 감소하였다(Fig.3). 肺의 質量增加는 肺와 氣管支의 炎症에 의한 collagen의 合成에 기인한 것으로 肺와 氣管支의 병리적 변화를 의미하는데, AF-HAS群에서 肺의 質量 감소는 collagen의 합성 감소를 나타낸다. 따라서, AF-HA가 肺와 氣管支의 炎症의 減少에 效果가 있는 것으로 사료된다.

肺의 총세포수는, control群에 比하여 AF-HA群에서 有意하게 減少하였다(Fig.4). 천식모델 생쥐의 폐내 총세포수 증가는 비만세포, 호산구, 림프구, 대식세포 등의 喘息을 일으키는 免疫細胞들이 증식이나 활성화되어 기관지 및 肺에 침착, 침윤되어 있음을 의미하며, 肺內 細胞數가 AF-HA에 의해 감소된 것은 馬兜鈴藥鍼이 免疫細胞의 침착 및 침윤과 염증에 있어서 유의한 효과가 있는 것으로 사료된다.

BALF內 leukocyte의 數는 control群에 比하여 AF-HA群에서 현저하게 감소하였다(Fig.4). BALF內 leukocyte의 數의 감소는 肺의 염증이나 기관지 천식반응의 감소를 뜻하므로, 馬兜鈴藥鍼으로 인해서 림프구수의 감소는 喘息 및 면역조절에 효과가 있는 것으로 사료된다.

BALF內 eosinophil의 數는 control群에 比하여 AF-HA群에서 유의하게 감소하였다(Fig.4). BALF內 eosinophil의 수의 감소는 肺의 염증이나 기관지 천식반응의 감소를 나타내므로, AF-HA에 의한 호산구 수의 감소는 마두령약침이 염증 및 알레르기 반응에 효과가 있음을 나타낸다.

Blood smears staining set로 BALF를 염색하여 관찰한 결과, OVA-control群에 비해 OVA-AF-HA群의 BALF에서 호산구가 현저하게 감소하였다(Fig.5). 호산구는 즉시형 과민 후기단계 반응의 염증성 침윤내에 풍부하게 들어있는 골수 유래 顆粒球로서, 알레르기성 疾患의 많은 病理過程에 關與하므로⁴⁰, 마두령약침이 알레르기 천식의 병리과정에서 염증성 세포의 肺內 응집 및 침윤에 대한 억제효과가 있음을 나타낸다.

Masson's Trichrome stain system(Dako, Japan)을 이용하여 肺 조직을 염색하여 관찰한 결과, OVA-control群에서는 肺와 기관지의 염증으로 인하여 collagen이 조직에 多量으로 부

착되고 주변의 호산구도 多量으로 增加되었음이 관찰된 것에 비해 OVA-AF-HA群에서는 collagen의 沈着 및 호산구가 감소되어, 馬兜鈴藥鍼의 肺, 氣管支內 collagen 沈着 및 호산구 이동에 대한 억제효과가 있다고 사료된다(Fig.6).

ELISA 분석결과, BALF에서 IgE는 control群은 nomal群에 비해 유의하게 분비양이 증가한 반면, AF-HA群은 control群 보다 有意하게 分泌量이 감소되었다(Fig.7). IgE는 특정 항원 분자와 反應하는 항체 특성을 가진 혈청 글로불린으로, 항원이 氣道內에 들어오면, 生成되어 비만세포나 호염기구 등의 수용체에 달라붙어서 알레르기 반응에 중요하게 관여하는 면역글로불린이다^{36,37}). 따라서, BALF에서 IgE의 감소는 염증과 알레르기 반응의 감소를 나타낸다.

Serum과 BALF내 IL-4는 control群에서 nomal群에 비해 유의하게 分泌量이 增加한 반면, AF-HA群에서는 control群에 比하여 有意하게 분비양이 감소되었다(Fig.7). IL-4은 세포간의 정보를 傳達하는 cytokine으로, Th림프구에서 生成하여 B림프구의 분화와 증식을 촉진한다.^{38,39}) 따라서 Serum과 BALF에서 IL-4의 감소는 염증과 알레르기 반응의 감소를 나타낸다.

Serum과 BALF내 IL-5 분석 실험 또한 control群에서 nomal群에 비해 有意하게 增加한 반면, AF-HA群에서는 control群에 比하여 유의하게 감소되었다(Fig.7). IL-5는 Th2세포 및 활성화된 비만세포에 의해 生成되며 호산구의 성장과 분화를 자극하고 성숙한 호산구를 활성화하므로⁴⁰), 따라서 Serum과 BALF에서 IL-5의 감소는 염증과 알레르기 반응의 감소를 나타낸다.

Serum내 IL-13는 control群에서는 nomal群에 비해 有意하게 增加한 반면, AF-HA群은 control群보다 분비가 유의하게 감소하였다.(Fig.7).

IL-13은 세포간의 정보를 전달하는 cytokine으로, Th세포에서 生成하여 대식세포를 표적으로 하여, 염증유발 cytokine을 활성화하고, 유리를 抑制하는 機能을 지닌 cytokine이다. 따라서 serum에서 IL-13의 減少는 염증과 알레르기 反應의 減少를 나타낸다^{36,37}).

위의 실험을 통하여 ELISA 分析 결과 IL-4, IL-5, IL-13와 같은 cytokine과 IgE 등이 마두령 약침실험군에서는 control群보다 유의하게 감소한 것은 AF-HA가 喘息으로 인한 염증성 세포의 增殖과 활성화를 억제시켜 천식 억제 및 면역조절에 有効한 것으로 사료된다.

FACS 분석 결과, AF-HA群에서 Gr-1⁺/CD11b⁺세포수와 CD11b⁺세포수는 모두 control群에 比하여 nomal群에 가깝게 감소하였다(Fig.8). Gr-1은 과립구에서 발현하는 分子이고, CD11⁺는 과립구, 단구, NK세포, 대식세포에 발현하는 분자로, Mac-1의 복합체의 일부이다⁴⁰). Gr-1⁺/CD11b⁺세포수의 감소는 알레르기 반응을 나타내는 과립구의 감소를 의미한다.

CD3⁺/CCR3⁺세포수는 control群에 比하여 AF-HA群에서 減少하였다(Fig.8). CCR3⁺는 호산구의 活性化와 탈과립화에 關與하는 것으로^{36,37}), CD3⁺/CCR3⁺細胞數의 減少는 알레르기 反應을 나타내는 면역세포 중 호산구의 감소로 나타난다.

CD4⁺세포수 및 CD8⁺세포수는 control群에 比하여 CD4⁺세포수는 AF-HA群에서 감소하였으나, CD8⁺세포수는 control群에 比하여 AF-HA群에서 유의성있는 감소를 보이지는 않았다(Fig.8). CD4와 CD8는 모두 세포유착 분자 기능과 세포자극의 전달 등의 두 가지 중요한 기능을 가지는데, 모두 T세포의 활성화 및 억제를 나타내는 표지가 되는 세포로, CD4⁺세포수 및 CD8⁺세포수의 감소는 알레르기 반응을 일으키

는 면역세포 중의 T세포의 감소를 나타낸다^{36,37)}.

CD3e⁺/CD69⁺세포 수는 control群에 比하여 AF-HA群에서 감소하였다(Fig.8). CD3e는 T세포에 발현하여 TCR과 함께 CD3e복합체를 이루고, T세포의 신호전달을 하는 기능을 나타내고, CD69는 활성화된 B세포, T세포, 대식세포에 분포하는 것으로, 림프구의 신호전달에 관여한다.^{36,37)} 따라서 CD3e⁺/CD69⁺세포수의 비율 감소도 또한 알레르기 반응을 나타내는 면역세포 중의 T세포의 감소를 의미한다고 할 수 있다.

RT-PCR을 이용하여 喘息 유발과 관련된 여러 cytokine 들의 mRNA 발현을 관찰한 결과, β -actin, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 등의 mRNA 발현이 control群에 比하여 AF-HA群에서 현저히 감소하였다(Fig.9). TNF- α 는 종양괴사인자로 대식세포의 활동을 증가시키고, 항바이러스작용이 있으며, IL-5는 활성화된 B세포를 증식시키고 IgM과 IgA의 생산을 촉진한다. 이들은 모두 염증과 알레르기 반응과 관계있는 cytokine으로, 이들의 mRNA 발현의 감소는 천식유발인자 감소를 나타낸다.^{36,37)}

上記 실험결과, Gr-1⁺/CD11b⁺세포수, CD3⁺/CCR3⁺세포수, CD4⁺ 및 CD8⁺세포수, CD3e⁺/CD69⁺세포수가 감소한 것은 알레르기 및 염증세포의 감소를 의미하며, BALF와 Serum內 IgE, IL-4, IL-5, IL-13의 減少 및 β -actin, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 등의 mRNA 발현의 감소는 마두령약침이 천식억제 및 면역 기능 조절에 유효함을 나타낸다. 향후 천식의 치료에 있어서 마두령약침에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 結 論

알레르기 천식모델 생쥐에 대해 족삼리-마두령약침의 천식 억제 및 면역 조절 효과를 관찰

한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 폐의 무게와 총세포수는 OVA-AF-HA군에서 OVA-control군에 比하여 유의하게 감소하였다.
2. BALF내의 총 lymphocyte수와 eosinophil 수는 OVA-AF-HA군에서 OVA-control군에 比해 현저하게 감소하였다.
3. AF-HA군에서는 control군에 比해 폐내 collagen 부착이 현저하게 감소하였다.
4. BALF내 IgE와 IL-4, IL-5와 Serum내 IL-4, IL-5와 IL-13이 AF-HA군에서 control군에 比하여 유의하게 감소되었다.
5. 폐내 Gr-1⁺/CD11b⁺와 CD11b⁺ 세포수는 AF-HA군에서 control군에 比해 유의하게 감소하였다.
6. 폐내 CCR3⁺세포수, CD4⁺ 및 CD8⁺세포수, CD3e⁺/CD69⁺ 세포수는 AF-HA군에서 control군에 比해 유의하게 감소하였다.
7. 폐내 TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 등의 cytokine 들의 mRNA 발현이 AF-HA군에서 control군에 比해 현저하게 감소하였다.

참 고 문 헌

1. Mark H, BEERS MD, Robert berkow MD. The Merck Manual. 서울 : 한우리. 2002 : 602.
2. 전국의과대학 임상교수편. 임상진단학. 서울 : 한미의학. 2002 : 392-3.
3. 李珩九, 鄭昇杞. 東醫肺系內科學. 서울 : 民瑞出版社. 1990 ; 189 : 192-3, 196-9.
4. 문명곤, 김영근, 권정남. 천식의 원인에 관한 동서의학적 고찰. 한의학연구소동의한의연. 2000 ; 12 : 85-105.
5. 이봉교. 증상감별치료. 서울 : 성보사. 1992 : 358-9.
6. 白東鎮, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九. Allergy性呼

1. 吸器疾患에 對한 文獻의 考察. 大韓韓方內科學會誌. 1998 ; 19(1) : 338-9.
7. 王肯堂. 六科准繩. 서울 : 柳林社. 1975 ; 143.
8. 李珩九. 동의폐계내과학. 서울 : 도서출판아트동방. 1993 ; 105-12, 162-5.
9. 신길구. 신씨본초학, 서울 : 수문사. 1988 : 462-3.
10. 朴鎬煥, 丁奎萬. 馬兜鈴의 主治 및 呼吸器疾患 應用例에 關한 文獻의 考察. 大韓韓方小兒科學會誌. 1993 ; 7(1) : 77-84.
11. 朴鎬煥, 丁奎萬. 馬兜鈴의 흰쥐 간염 억제 效 果에 關한 실험적 연구. 大韓韓方小兒科學會誌. 1995 ; 9(1) : 237-56.
12. 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.
13. 李 丁. 鍼灸經穴辭典. 서울 : 高麗醫學. 1989 : 138-9, 397-8.
14. 安榮基. 經穴學叢書. 서울 : 成輔社. 1986 : 196-7, 678-9, 694-5.
15. 上海中醫學院. 鍼灸學. 香港 : 商務印書館香港分館. 1982 ; 114, 89-90, 211-6.
16. 蔡禹錫. 經穴集成. 서울 : 大星文化社. 1995 : 83-4, 404-5.
17. 해리슨 번역 편찬위원회. HARRISON'S 내과학. 서울 : 정담. 1997 : 1258-64.
18. Lawrence M 外. 오늘의 진단과 치료. 서울 : 한우리. 2000 : 287-97.
19. 이양근. 好酸球와 喘息. 結核 및 呼吸器疾患. 1999 ; 46(1) : 5-16.
20. 한용철. 臨床呼吸器學. 서울 : 일조각. 1994 : 208-9.
21. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울 : 東洋醫學研究會. 1981 : 16-7, 24, 31, 58, 66, 72-3, 86, 89, 112, 114, 119, 127, 145, 162, 170, 180, 184-5, 213, 216, 224, 248, 252, 254, 267, 296, 312.
22. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울 : 東洋醫學研究會. 1981 : 69, 79, 81, 124, 128, 134, 139, 151, 176, 186, 213, 241, 314.
23. 張仲景. 金匱要略. 서울 : 醫道韓國社. 1975 : 57-61.
24. 巢元方. 諸病源候論(卷13,14). 서울 : 大星文化社. 1992 : 106-17.
25. 王肯堂. 證治準繩(一). 北京 : 人民衛生出版社. 1991 : 229-31.
26. 吳謙. 醫宗金鑒(中). 서울 : 大星文化社. 1991 : 390-91.
27. 葉天士. 臨證指南醫案. 서울 : 成輔社. 1982 : 299-300.
28. 吉村永星, 黃義玉, 鄭昇杞, 李珩九. 알레르기性喘息에關한文獻의考察(東西醫學的比較考察). 大韓韓醫學會誌. 1990 ; 11(1) : 39-70.
29. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂. 1998 : 145, 474-80.
30. 康旼榮. 알레르기 疾患의 診斷과 治療. 서울 : 一潮閣. 1987 : 129-51.
31. 李文鎬 外. 內科學(下). 서울 : 學林社. 1986 : 2043-47.
32. 허승철, 박광은, 정승기, 이형구. 哮喘證에 對한 淸上補下湯의 臨床的 觀察. The 8th INT'L Congress of oriental medicine. 1995.
33. 대한 천식 및 알레르기학회. 천식과 알레르기 질환. 서울 : 군자출판사. 2002 : 31-44, 59-67, 237-326.
34. 大韓藥鍼學會 編撰. 藥鍼製劑와 臨床應用. 서울 : 大韓鍼灸學會. 1997 : 1-5.
35. 李尙仁. 本草學. 서울 : 修書院. 1982 : 536-37.
36. Ivan Roitt 外. Immunology 6th. Newyork : Mosby. 2002 : 125-27.
37. Ivan Roitt. Essential immunology 9th USA : Blackwell science. 1994 : 179-200, 151-67.

馬兜鈴藥鍼의 喘息抑制 및 免疫調節效果에 對한 實驗的 研究

38. 김세중. 면역학. 서울 : 고려의학. 1994 : 3, 8, 138, 25-32.
39. Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. Nat Rev Immunol. 2001(1) : 108-16.
40. 강재성 譯. 세포분자면역학. 서울 : 범문사. 2004 : 477-522.