

원저

桔梗藥鍼의 喘息抑制 및 免疫調節效果에 對한 實驗的 研究

박치영 · 김영일 · 홍권의

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Experimental Study on the Suppression Effect of Asthma and Immune Response Improvement of *Platycodi Radix* Herbal-acupuncture

Park Chi-young, Kim Young-il and Hong Kwon-eui

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Objectives : The aim of this study was to investigate the effect of Asthma-depression and Immunoregulation with PR-HAS(Herbal-acupuncture with *Platycodi Radix* infusion solution) injection at Joksamni(St36) on ovalbumin-induced asthma in mice.

Methods : C57BL/6 mice were sensitized and challenged with OVA(ovalbumin) for 12 weeks(once a week). The experimental group(OVA-PR-HA) was treated with concentrations(1%) of PR-HAS at Joksamni(St36) for the later 8 weeks(3times/week). The second experimental group(OVA-Needle prick) was treated with Needle-Prick at Joksamni(St36) for the later 8 weeks(3times/week).

Results : 1. The weight and total cells in the mice lung treated with PR-HA decreased significantly compared with that of control group.

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

3. The sticking of collagen on histological analysis of lung sections, the mice group treated with PR-HA decreased significantly compared with those of 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 PR-HA decreased significantly compared with those of control group.

· 접수 : 2005년 9월 12일 · 수정 : 2005년 11월 21일 · 채택 : 2005년 11월 21일
· 교신저자 : 홍권의, 대전광역시 중구 대흥동 대전대학교 대전한방병원 침구과
Tel. 042-229-6814 E-mail : hkeacu@dju.ac.kr

5. The number of Gr-1⁺/CD11b⁺ and CD11b⁺ cells in the lungs of the mice group treated with PR-HA decreased significantly compared with that of control group.

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

7. The mRNA expression of β -actin, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 in the mice group treated with PR-HA with RT-PCR decreased significantly compared with those of control group.

Conclusion : 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 PR-HA decreased significantly compared with those of control group. The number of Gr-1⁺/CD11b⁺ and CD11b⁺ cells in the lungs of the mice group treated with PR-HA decreased significantly compared with that of control group. The numbers of CCR3⁺ cells, CD4⁺ cells and CD8⁺ cells in the lungs, and CD3e⁺/CD69⁺ in the lungs of the mice group treated with PR-HA decreased significantly compared with those of control group. The mRNA expression of β -actin, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 in the mice group treated with PR-HA with RT-PCR decreased significantly compared with those of control group. These result suggests that Platycodi Radix Herbal-acupuncture at Joksamni(St36) in C57BL/6mice may be an effective part to OVA-induced asthma in C57BL/6 mice

Key words : OVA-induced asthma, PR(*Platycodi Radix*) Herbal acupuncture, Joksamni(St36)

I. 緒 論

알레르기성 질환 중 호흡기계 질환의 하나인 천식은 기도 내 염증반응에 의한 기도과민성과 가역적 기도폐쇄를 나타내는 질환이다¹⁾. 이러한 기도내의 염증반응은 천식반응 시 기도내로 유입되는 여러 가지 염증세포들의 활성화에 의해, 이들로부터 유리되는 여러 화학매개체들에 의해 이루어진다²⁾.

喘息은 韓醫學에서 呼吸急促, 喘鳴有聲을 特徴의 症候群으로 하는 哮喘證에 해당되며³⁾, 哮喘은 隋代 巢의 《諸病源候論》⁴⁾에서 上氣喉中如水鷄鳴과 呻嗽라는 症狀이 기재된 이후 많은 醫書⁵⁻⁶⁾에 언급되어 왔다.

桔梗은 도라지과(Campanulaceae)에 屬하는 多年生 草本인 도라지Platycodon grandiflorum (JACQ.) A. DC.의 根을 乾燥한 것으로 鎮咳, 祛痰, 排膿, 宣肺利咽 等に 治療藥으로 多樣하게 使用되고 있다(7-8). 藥性은 微溫, 有小毒하며, 味는 苦辛甘하고 歸經은 肺, 心, 腎, 胃로 記錄되어 있다(9-12).

桔梗에 관한 最近의 實驗的 研究는 金¹³⁾과 鄭¹⁴⁾, 陳¹⁵⁾등의 연구가 있었으나 아직까지 桔梗藥鍼에 대한 研究는 접하지 못하였다.

이에 著者는 桔梗藥鍼(PR-HAS)이 알레르기 喘息모델 생쥐의 喘息抑制 및 免疫調節效果를 알아보기 위하여, C57BL/6생쥐에 ovalbumin을 吸入시켜 알레르기 喘息病態를 誘發하고, 桔梗藥鍼을 足三里(St36)에 시술한 후 BALF 및 血清檢査를 통하여 喘息抑制效果에 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 動物

動物은 雌性인 4~5週齡의 C57BL/6 mouse를 大韓實驗센터에서 供給받아 實驗 當日까지 固型飼料(抗生劑 無添加, 三養飼料)와 물을 充分히 供給하고, 室溫 22±2℃를 維持하여 2週日 間 實驗室環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

2) 藥材

實驗에 使用된 桔梗(*Platycodi Radix*; 以下 PR)이

라 表現함)은 大田大學校 附屬韓方病院에서 구입한 것을 精選하여 使用하였다.

3) 藥鍼液의 製造

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

2. 方法

1) In vitro

천식이 유발된 생쥐에서 분리한 폐 조직을 잘게 절단한 후 collagenase를 가하여 shaking incubation을 통해 세포를 분리하였다. 분리해 낸 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 2.5mg/ml의 OVA/PBS 40 μ l을, 9-12주째까지는 5mg/ml의 OVA/PBS 40 μ l을 air compressor를 이용하여 30분간 주3회 노출시켰다.

(2) Classification of experimental animal groups

實驗群은 7마리를 1群으로 하여, 정상군(Normal), 對照群(OVA-Control), N.P群(OVA-Needle prick), 桔梗藥鍼群(OVA-PR-HA)등 4群으로 나누었다. 正常群(Normal)은 아무런 處置도 하지 않았고, 對照群(OVA-Control)은 喘息 誘發 후 아무런 處置도 하지 않았다. N.P群(OVA-Needle prick)은 喘息을 誘發하고 우측 족삼리(St36)에 주사기를 刺入 후 즉시 제거하였다. 桔梗藥鍼群(OVA-PR-HA)은 喘息 誘發 후 우측 족삼리(St36)에 1%의 桔梗 藥鍼液(100 μ l)을 주입하였다. N.P刺戟 및 桔梗藥鍼은 5주째부터 12주째까지 8주간 주 3회 시행하였다(Fig. 1).

(3) Bronchoalveolar lavage fluid(BALF) isolation

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

(4) Photomicrographs

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

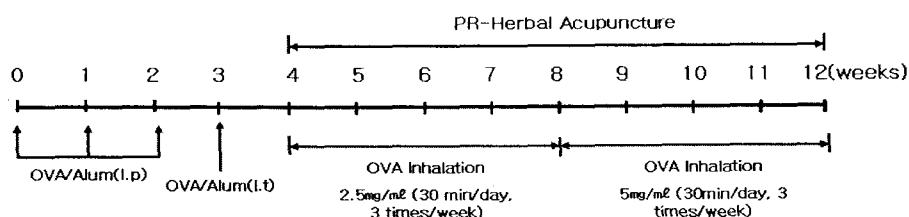


Fig. 1. OVA-induced mouse asthma model

(5) Fluorescence activated cell sorter(FACS)

생쥐에서 분리해낸 폐 조직을 잘게 자른 후 collagenase를 가하여 incubation을 통해 분리해 낸 세포에 표식항체를 반응시켜 Flow cytometer로 분석하였다.

(6) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

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

(7) RT-PCR

① Total RNA의 추출

각 실험군의 생쥐에서 떼어낸 폐 조직을 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 RNAzol^B(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 그량을 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 10mM dNTPs, 1 μ l의 random sequence hexanucleotides (25pmole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l의 RNasin (20U/ μ l), 1 μ l의 100mM DTT 및 4 μ l의 5 \times RT buffer(250mM Tris-Cl, pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 혼합한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 추가한 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恒温水槽에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA

를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 放置하여 M-MLV RT를 不活性化시키고 즉시 얼음으로 옮겼다. 이렇게 합성이 완료된 first-strand cDNA는 PCR (Polymerase Chain Reaction)에 사용하였다.

③ cDNA의 PCR 증폭

PCR은 Primus 96 Legal PCR system(with high pressure lid, MWG in Germany)을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 1 μ l의 first-strand cDNA를 주형으로 사용하였다. 주형에 대한 β -actin, TNF- α , IL-1b, IL-5, IL-4, IL-13에 대한 sense primer(20pmole/ μ l)와 antisense primer (20pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 추가하고, 다시 3 μ l 2.5mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂) 및 0.18 μ l Taq polymerase (5U/ μ l)를 추가한 다음 최종 부피가 30 μ l 되도록 멸균증류수를 추가하고 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. 統計處理

통계는 independent student's t-test로 하였다

III. 結果

1. *In vitro*

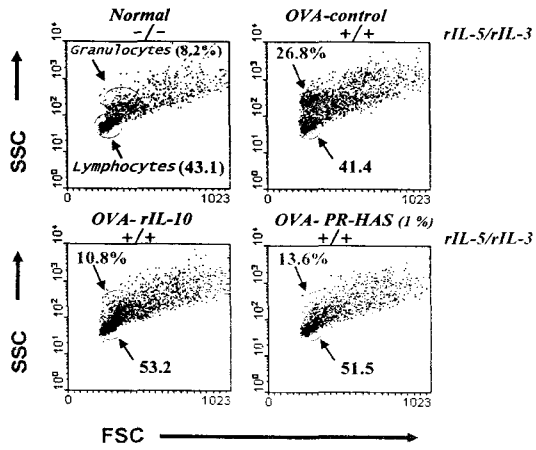
1) FACS analysis

① Granulocytes/lymphocytes

肺細胞中 Granulocytes의 比率이 Normal에서는 8.2%이었으나 Control에서는 26.8%로 증가하였고 PR-HAS에서는 13.6%로 減少하였다(Fig. 2).

② CD3e⁻/CCR3⁺

肺細胞中 CD3e⁻/CCR3⁺細胞의 比率이 Normal에서는 77.1%이었으나 Control에서는 92.2%로 증가



(A) Granulocytes/Lymphocytes population (%)

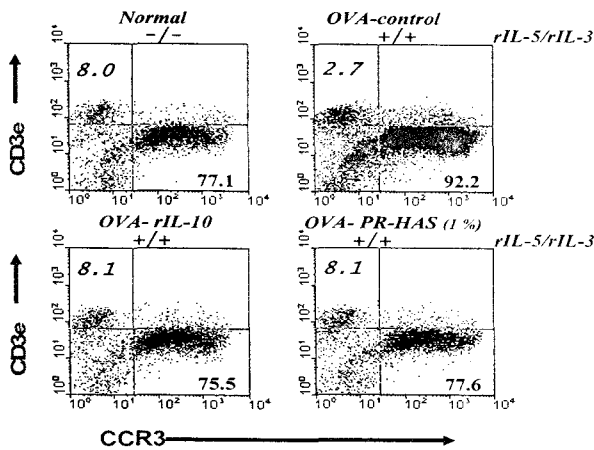
하였고 PR-HAS에서는 77.6%로 減少하였다(Fig. 2).

③ CD69⁺/CD3e⁺

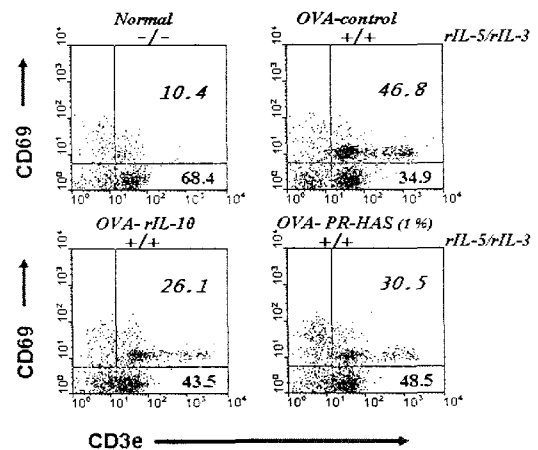
肺細胞中 CD69⁺/CD3e⁺의 비율이 Normal에서는 10.4%이었으나 Control에서는 46.8%이었고 PR-HAS에서는 30.5%로 抑制되었다. CD69⁺/CD3e⁺의 비율은 Normal에서는 68.4%이었으나 Control에서는 34.9%이었고 PR-HAS에서는 48.5%로 增加했다 (Fig. 2).

④ CD4⁺ 및 CD8⁺

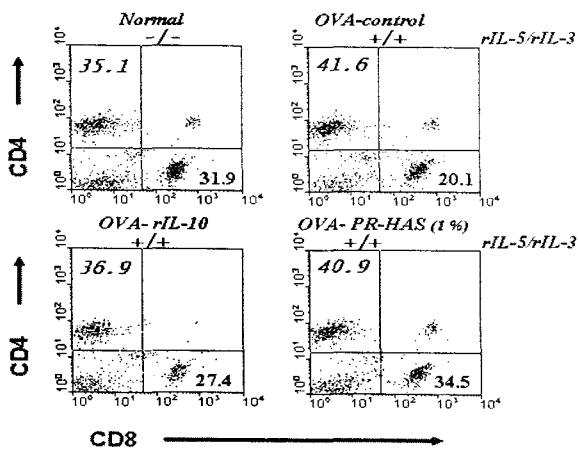
肺細胞中 CD4⁺細胞의 비율이 Normal에서는 35.1%이었으나 Control에서는 41.6%이었고 PR-HAS에서는 40.9%로 감소했다. CD8⁺의 비율은 Normal에서는 31.9%이었으나 Control에서는 20.1%이었고 PR-HAS에서는 34.5%로 增加했다(Fig. 2).



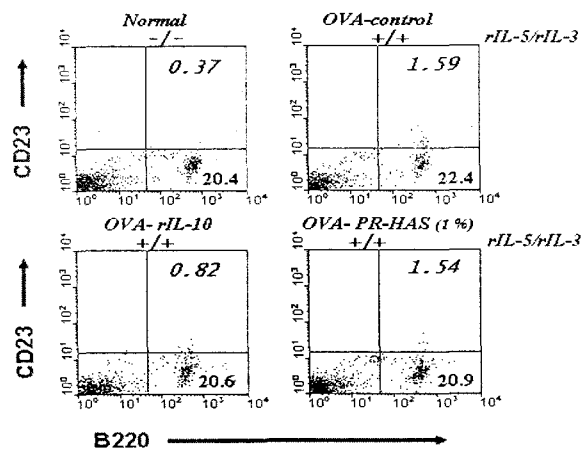
(B) CD3e⁻/CCR3⁺ population (%)



(C) CD69⁺/CD3e⁺ population (%)



(D) CD4⁺ and CD8⁺ population (%)



(E) CD23⁺/B220⁺ population (%)

Fig. 2. FACS analysis

⑤ CD23⁺/B220⁺

肺細胞中 CD23⁺/B220⁺의 비율이 Normal에서는 0.37%이었으나 Control에서는 1.59%이었고 PR-HAS에서는 1.54%로 抑制되었다(Fig. 2).

2. In vivo

1) Lung weight

폐의 무게를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 무게가 유의성있게 減少하였다(p<0.05)(Fig. 3).

2) Cell count

① Total cells in Lung

총 폐 세포수를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성있게 減少하였다(p<0.01)(Fig. 4).

② Total Leukocyte in BALF

Leukocyte를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성있게 減少하였다(p<0.01)(Fig. 4)

③ Eosinophils in BALF

好酸球수를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성있게 減少하였다(p<0.001)(Fig. 4).

3) Photomicrographs of Eosinophil in BALF

Control群에서는 好酸球가 다량으로 관찰 되었으며 PR-HA군에서는 好酸球가 현저하게 減少하였다(Fig.5).

4) Histological analysis of lung sections

PR-HA群에서는 Control群에 비해 collagen의 부착이 현저하게 감소하였다(Fig. 6).

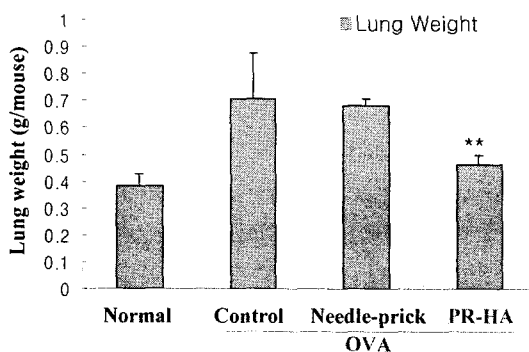
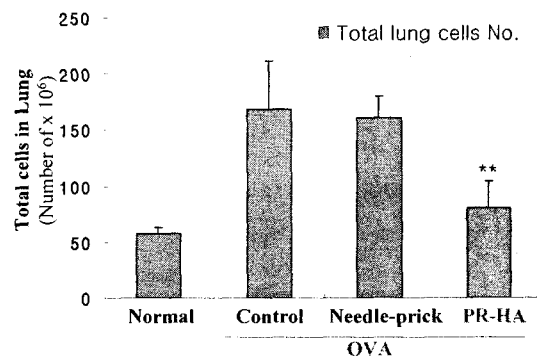
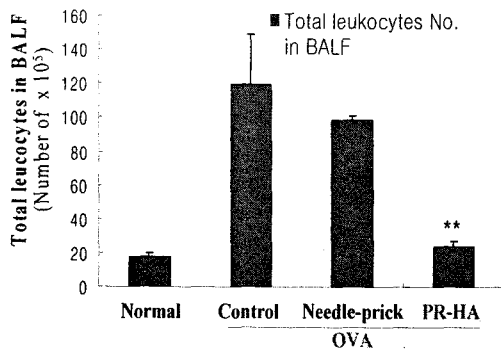


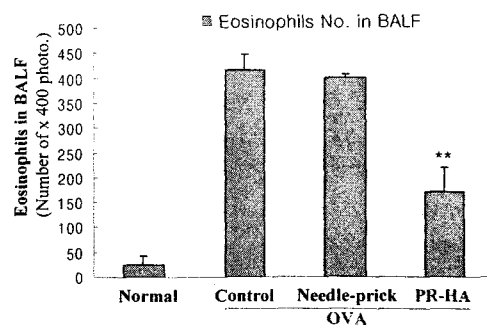
Fig. 3. Lung weight



(A) Total cells in Lung



(B) Total leukocytes in BALF



(C) Eosinophils in BALF

Fig. 4. Cell count

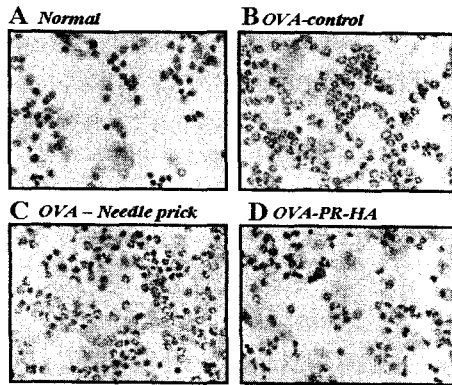


Fig. 5. Photomicrographs of cytopins in BALF

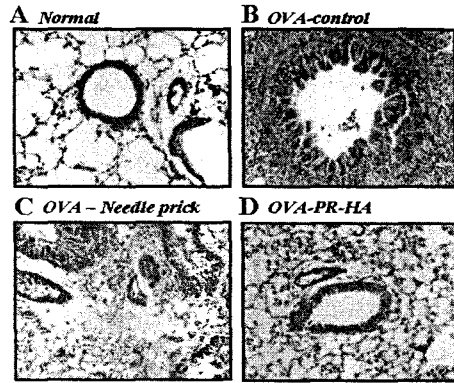
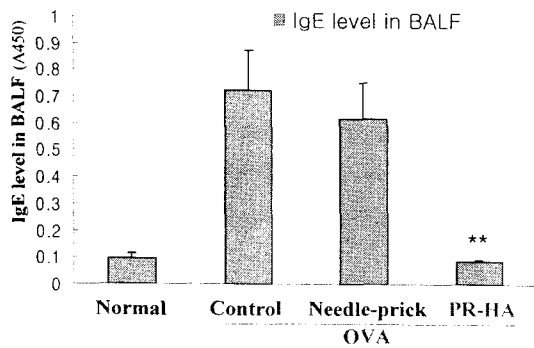
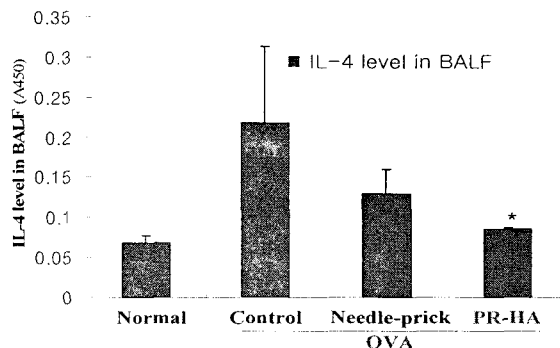


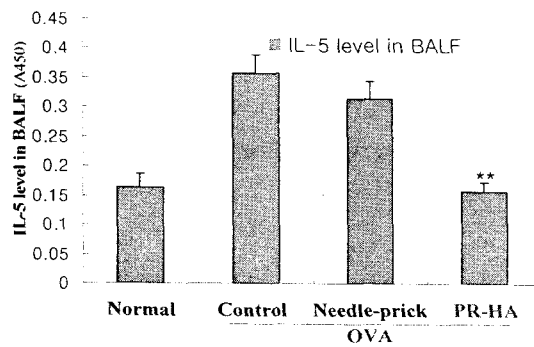
Fig. 6. Histological analysis of lung sections



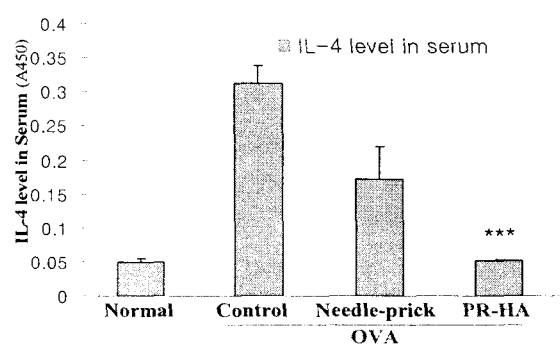
(A) IgE in BALF



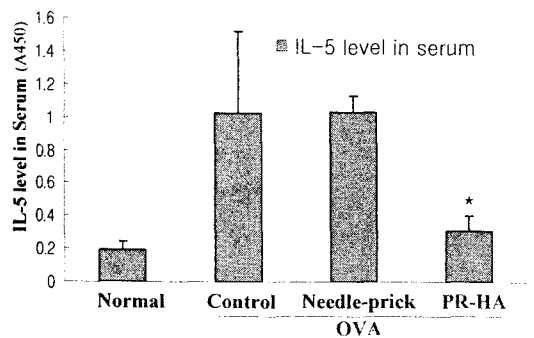
(B) IL-4 in BALF



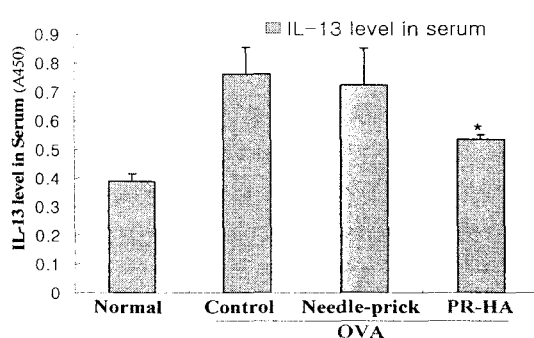
(C) IL-5 in BALF



(D) IL-4 in serum



(E) IL-5 in serum



(F) IL-13 in serum

Fig. 7. ELISA analysis

5) ELISA

① IgE in BALF

IgE의 양을 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성있게 減少하였다($p < 0.001$)(Fig. 7).

② IL-4 in BALF

IL-4의 양을 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성있게 減少하였다($p < 0.05$)(Fig. 7).

③ IL-5 in BALF

IL-5의 양을 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성있게 減少하였다($p < 0.01$)(Fig. 7).

④ IL-4 in Serum

IL-4를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다

유의성있게 減少하였다($p < 0.001$)(Fig. 7).

⑤ IL-5 in Serum

IL-5를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성 있게 減少하였다($p < 0.05$)(Fig. 7).

⑥ IL-13 in Serum

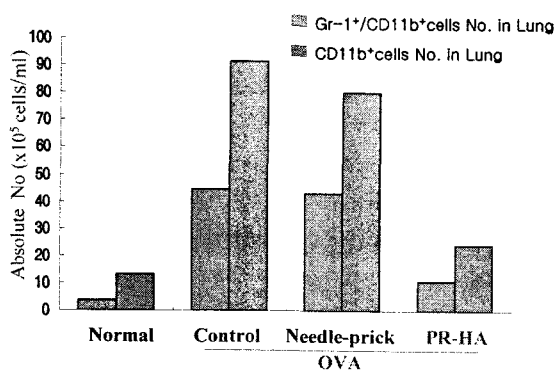
IL-13을 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성있게 減少하였다($p < 0.05$)(Fig. 7).

6) FACS

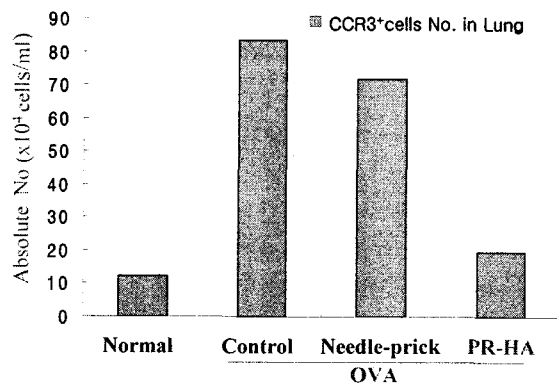
FACS分析에 의해 각 細胞 수를 測定하였다.

① Gr-1⁺/CD11b⁺

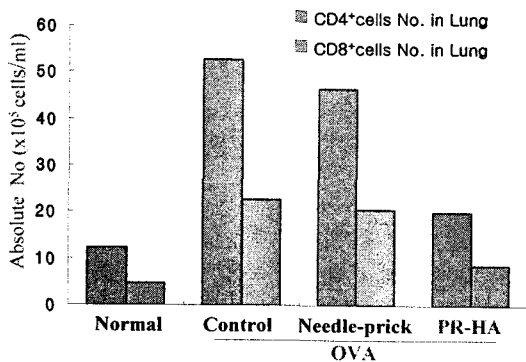
Gr-1⁺/CD11b⁺ 세포 수를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성있게 減少하였다(Fig. 8).



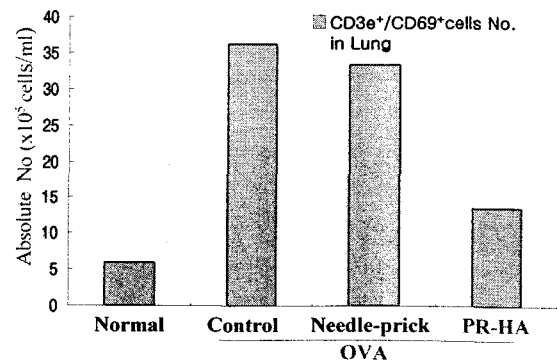
(A) Gr-1⁺/CD11b⁺



(B) CCR3⁺



(C) CD4⁺/CD8⁺



(D) CD3e⁺/CD69⁺

Fig. 8. FACS analysis

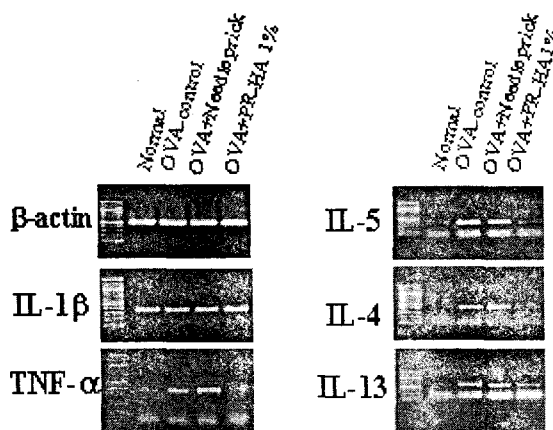


Fig. 9. RT-PCR

② CD3⁺/CCR3⁺

CD3⁺/CCR3⁺ 세포 수를 측정된 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성있게 減少하였다(Fig.8).

③ CD4⁺ 및 CD8⁺

CD4⁺ 세포수와 CD8⁺ 세포 수를 측정된 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성있게 減少하였다(Fig.8).

④ CD3e⁺/CD69⁺

CD3e⁺/CD69⁺ 세포 수를 측정된 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성있게 減少하였다(Fig.8).

7) RT-PCR

RT-PCR을 이용하여 喘息 유발과 관련된 여러 cytokine 들의 mRNA 發顯을 관찰한 結果, β-actin, TNF-α, IL-5, IL-4, IL-13 등의 mRNA 發顯이 Control群에 비하여 PR-HA에서 현저히 減少하였다(Fig.9).

IV. 考 察

알레르기성 질환 중 호흡기계 질환의 하나인 천식은 기도 내 염증반응에 의한 기도과민성과 가역적 기도폐쇄를 나타내는 질환이다¹⁾. 이러한 기도의

염증반응은 천식반응 시 기도내로 유입되는 여러 가지 염증세포들의 활성화에 의해, 이들로부터 유리되는 여러 화학매개체들에 의해 이루어진다²⁾.

喘息의 原因에 대해서는 알레르기, 感染, 日常의 스트레스에 對한 心因性 生理反應, 空氣汚染, 自律神經失調 등을 들고 있으나, 아직까지는 알레르기로 大部分 받아들여지고 있다³⁾.

喘息(asthma)의 臨床病理學的 3가지 증상은 間歇的呼吸氣道 閉塞, 好酸球(eosinophil)에 의한 慢性氣管支 炎症 및 氣管支 收縮物質에 의한 氣管支 平滑筋의 過反應)이다¹⁶⁾.

韓醫學으로 喘息은 氣息이 連續的으로 促急하여 呼吸困難한 것을 喘이라 하고, 喉中에서 소리가 나는 것을 哮라고 하는데, 哮症, 喘症, 痰飲의 範疇로 간주하고 있으며, 臨床상 哮는 喘을 반드시 兼하므로 統稱 哮喘이라 한다^{3,17)}.

喘症은 일반적으로 呼吸困難 혹은 氣息이 促急하여 혈떡거리며 呼吸이 頻數하여 입을 벌리고 어깨를 들떡거리게 되며, 甚하면 身體와 肚腹을 動搖하는 症이라 하였다¹⁸⁻¹⁹⁾.

《素問·調經論篇》²⁰⁾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》²⁰⁾에 “肺病者 喘咳逆氣”라 하였으며, 《靈樞·五閱五使》²¹⁾에 “肺病者 喘息鼻張”이라 하여 喘症에 對하여 言及한 以來 喘症은 흔히 볼 수 있는 呼吸器 疾患의 하나임을 認識하여 왔다. 특히, 《金匱要略》²²⁾에 氣喘 肩息하고 不能平臥하는 病候를 “上氣”라 定義하고 喉中水鷄聲하는 哮症과 咳而上氣하는 “肺脹證”을 여기에 包括한다고 하여 上氣, 肺脹까지 包含시켰고 그 以外에 哮喘, 喘促, 喘急, 氣喘 등으로 表現되고 있다.

哮喘은 隋代 巢의 《諸病源候論》⁴⁾에서 上氣喉中如水鷄鳴과 呻嗽라는 症狀이 기재된 이후에 많은 醫書에 언급되어 왔는데, 明代 이후에 王²³⁾, 吳²⁴⁾ 등은 哮는 喉中有痰聲響하고, 喘은 呼吸急促한 것이므로 哮와 喘을 區分하였으나, 清代의 葉²⁵⁾이 哮와 喘을 구분하지 않고 단지 症狀의 輕重, 緩急이 서로 다르다고 한 이후, 哮喘證은 喘鳴有聲, 呼吸急促한 하나의 症候群으로 認識되어왔다²⁶⁾.

哮喘證의 韓醫學的 治療는 虛證과 實證으로 辨證하여 治療한다³⁾. 實證의 特徵은 病勢가 急迫하고 呼吸은 深長하며 餘裕가 있고 呼出이 빠르고 音이 거칠고 크며 脈數 有力하고, 虛證은 病勢가 緩慢하고 숨이 차 呼吸이 계속되지 못하며 吸氣가 빠르고 움직이면 呼吸困難이 加重되고 語聲에 힘이 없으며 脈

微弱 또는 無力하다. 哮喘은 發作性的 疾患이며 發作後에는 반드시 正氣가 虛해 있으므로 緩解期에는 扶正祛邪를 해야 한다. 實證은 風寒痰濁 등의 病邪가 爲主가 되므로 外感風寒은 祛風散寒, 宣肺定喘, 痰濕은 燥濕化痰, 降氣定喘, 寒痰은 溫肺散寒, 定喘化痰의 治法으로 治療하고, 虛證은 肺虛 腎虛 등이 爲主가 되므로 肺虛는 涼肺定喘, 心身虛損은 補益心身, 納氣定喘, 上實下虛에는 瀉肺化痰, 補益身元시키는 治法으로 治療한다^{3,27)}.

藥鍼療法(Herbal acupuncture)은 經絡療法과 藥物療法の 原理를 바탕으로 研究된 新鍼治療 中의 하나이다. 疾病과 有關한 部位인 經穴, 阿是穴등의 陽性反應點에 精製한 各種 韓藥物을 選擇 注入함으로써 經穴과 藥物이 疾病에 對해 綜合的인 作用을 충분히 發揮하여 疾病을 豫防하고 治療하는 方法으로²⁸⁾, 免疫系疾患의 豫防 및 治療등에 有效하다는 報告가 最近에 많이 있으며, 臨床에서도 各種 疾患에 널리 應用되고 있다²⁹⁾.

桔梗은 도라지과에 속하는 多年生 根草의 도라지 *Platycodon grandiflorum* (JACQ.) A. DC.의 根을 乾燥한 것으로 그 效能은 神農本草經 下品에 “味辛 微溫 主胸脇痛如刀刺 腹滿腸鳴幽幽 驚恐悸氣”라고 收錄된 以來로 後世 醫家들에 의하여 治療藥으로 研究되어 왔다⁷⁻⁸⁾.

이와 같이 桔梗의 效能을 보면 開宣肺氣作用, 祛痰作用, 排膿作用, 提氣解鬱作用, 疏通腸胃作用 등이 있다.⁹⁻¹²⁾

桔梗에 관한 最近의 實驗的 研究로 金13)과 鄭14), 陳15)등의 研究가 있었으나 아직까지 桔梗藥鍼에 對한 研究는 접하지 못하였다.

*In vitro*에서 FACS분석을 통하여, granulocytes/lymphocytes population(%)을 살펴보면, 肺 細胞 中 granulocytes의 比率이 control에서는 26.8%였으나 PR-HAS群에서는 13.6%로 減少되었다(Fig. 2).

Granulocytes는 顆粒性 白血球, 顆粒球라고 하는 것으로, 건조 후의 染色性에 따라서 호산성, 호중성, 호염기성으로 나눌 수 있다. 호중구는 白血球 中 食菌作用이 강력하여 食細胞라고도 하며, 호산구는 寄生蟲의 感染이나 알레르기성 疾患일 경우에 增加하고, 호염기구는 血液內에서 血液이 凝固하는 것을 막아준다^{37,39)}. 따라서 PR-HAS群에서 肺 細胞內의 顆粒球의 減少는 肺內 炎症이나 알레르기 反應의 減少를 나타낸다.

肺細胞 中 CD3e⁺/CCR3⁺ 比率은 control에서는 92.2%

이었으나 PR-HAS群에서는 77.6%로 낮아졌다(Fig. 2).

CD3는 T細胞의 결정표식인자이며, CCR3는 호산구의 活性化와 탈과립화에 關與하는 것으로 보인다³⁵⁻³⁶⁾. 따라서 PR-HAS群에서 CD3e⁺/CCR3⁺ 비율의 감소된 것은 炎症과 알레르기 反應을 일으키는 호산구의 減少를 나타낸다.

肺細胞 中 CD69⁺/CD3e⁺ 비율은 control에서 46.8%이었으나 PR-HAS群에서는 30.5%로 억제되었고 CD69⁺/CD3e⁺비율은 control에서는 34.9%이었으나 PR-HAS群에서는 48.5%로 증가했다(Fig. 2).

CD69는 활성화된 B세포, T세포, 대식세포에 분포하는 것으로, 림프구의 신호전달에 關與하고, CD3는 T세포 결정표식인자로, PR-HAS群에서의 CD69⁺/CD3e⁺의 비율의 減少는 厭症과 알레르기 反應 中의 T세포의 減少를 나타낸다³⁵⁻³⁶⁾.

肺細胞 中 CD4⁺細胞의 比率이 control에서는 41.6%이었으나 PR-HAS群에서는 40.9%로 減少했고, CD8⁺細胞의 比率은 control이 20.1%이었으나 PR-HAS群에서는 34.5%로 增加했다(Fig. 2-4). CD4는 B 세포와 Tc세포의 활성화와 成熟을 촉진시키고 비만세포를 자극함으로써 慢性厭症反應에 對한 알레르겐을 통제하는 Th 세포 밀도의 표지자이다³⁵⁻³⁶⁾. 따라서 PR-HAS群에서의 CD4 세포 비율의 감소는 염증과 알레르기 반응중의 T세포의 減少를 나타낸다.

肺細胞 中 CD23⁺/B220⁺의 比率이 control에서는 1.59%이었으나 PR-HAS群에서는 1.54%로 抑制되었다(Fig. 2). CD23은 B세포일부, 단구, 수상돌기세포, 호산구, 혈소판에 발현하는 세포로, 대식세포와 호산구에 의한 細胞毒性을 매개한다. B220은 쥐의 B세포 표면에 있는 표식자로, B세포의 免疫增加를 意味한다³⁵⁻³⁶⁾. 따라서 PR-HAS群에서의 CD23⁺/B220⁺ 比率의 減少는 염증과 알레르기 反應 中의 B세포의 減少를 나타낸다.

이상의 *In vitro*에서, 과립구, CD3e⁺/CCR3⁺, CD69⁺/CD3e⁺, CD4⁺, CD23⁺/B220⁺의 비율이 PR-HAS群에서 Control群에 비해 減少한 것으로 보아, 桔梗藥鍼液이 喘息 抑制 및 免疫 調節作用이 있는 것으로 思料된다.

이에 著者는 宣肺利咽, 祛痰排膿하는 效能⁸⁾을 지니고 있는 桔梗으로 藥鍼液을 製造한 후, 疏風化濕, 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元, 祛邪防病 등의 效能³⁰⁻³⁴⁾이 있는 足三里에 藥鍼施術하여, 足三里-桔梗藥鍼이 알레르기 喘息모델 생쥐에서 喘息 抑制 및 免疫 調節에 미치는 影響을 알아보기 위하여, ovalbumin을

吸入시켜 감각된 생쥐에 알레르기 喘息 病態를 誘發시키고, 桔梗藥鍼液을 우측 足三리에 刺入한 후 생쥐의 폐무게, 폐의 총세포수, BALF內 total leukocyte 수, BALF內 eosinophil 수, ELISA 分析에 의한 BALF內 IgE, IL-4, IL-5 및 serum內 IL-4, IL-5, IL-13을 測定하고, FACS 分析에 의해 Gr-1⁺/CD11b⁺ 세포수, CD3⁺/CCR3⁺ 세포수, CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포수, CD3e⁺/CD69⁺ 세포수의 變化를 測定하였다. 또한 RT-PCR을 利用하여 喘息 誘發과 關聯된 여러 cytokine 들의 mRNA 發顯을 觀察하였다.

In vivo 에서 實驗動物의 肺의 무게 측정 結果, PR-HAS群에서 Control群에 比하여 폐의 무게가 減少하였다(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 病理的 變化를 意味하는데, PR-HA群에서 肺의 質量 減少는 collagen의 合成 減少를 나타낸다. 따라서, PR-HA가 肺와 氣管支의 炎症의 減少에 效果가 있는 것으로 思料된다.

肺의 총세포수는, control群에 比하여 PR-HA群에서 有意하게 減少하였다(Fig. 4). 천식모델 생쥐의 폐내 총세포수 增加는 비만세포, 호산구, 림프구, 대식세포 등의 喘息을 일으키는 免疫細胞들이 增殖이나 활성화되어 氣管支 및 肺에 침착, 침윤되어 있음을 意味하며, 肺內 細胞數가 PR-HA에 의해 減少된 것은 桔梗藥鍼이 免疫細胞의 침착 및 침윤과 염증에 있어서 有意한 效果가 있는 것으로 思料된다.

BALF內의 leukocyte의 數는 control群에 比하여 PR-HA群에서 顯著하게 減少하였다(Fig. 4). BALF內의 leukocyte의 數의 減少는 肺의 炎症이나 氣管支 喘息反應의 減少를 뜻하므로, 桔梗藥鍼으로 인해서 림프구수의 減少는 喘息 및 免疫調節에 效果가 있는 것으로 思料된다.

BALF內의 eosinophil의 數는 control群에 比하여 PR-HA群에서 有意하게 減少하였다(Fig. 4). BALF內 eosinophil의 수의 減少는 肺의 염증이나 氣管支 喘息反應의 減少를 나타내므로, PR-HA에 의한 好酸球 數의 減少는 桔梗藥鍼이 염증 및 알레르기 反應에 效果가 있음을 나타낸다.

Blood smears staining set로 BALF를 染色하여 관찰한 結果, OVA-Control群에 比하여 OVA-PR-HA群의 BALF에서 好酸球가 顯著하게 減少하였다(Fig. 5). 好酸球는 즉시형 과민 후기단계 反應의 炎症性 浸潤內에 풍부하게 들어있는 골수 유래 顆粒球로서, 알레르기성 疾患의 많은 病理과정에 關與하므로³⁹⁾,

桔梗藥鍼이 알레르기 喘息의 病理과정에서 炎症性 細胞의 肺內 凝集 및 浸潤에 대한 抑制效果가 있음을 나타낸다.

Masson's Trichrome stain system(Dako Japan)을 利用하여 肺 組織을 染色하여 觀察한 結果, OVA-Control群에서는 肺와 氣管支의 炎症으로 인하여 collagen이 組織에 多量으로 附着되고 주변의 好酸球도 多量으로 增加되었음이 觀察되었으며, 이에 比하여 OVA-NR-HA群에서는 collagen의 沈着 및 好酸球가 減少되어, 桔梗藥鍼의 肺, 氣管支內 collagen 沈着 및 好酸球 移動에 대한 抑制效果가 있다고 思料된다(Fig. 6).

ELISA 분석결과, BALF에서 IgE는 Control群은 정상군에 比하여 有意하게 增加한 반면, PR-HA群은 Control群보다 有意하게 抑制되었다(Fig. 7). IgE는 특정 항원 분자와 反應하는 항체 特性을 가진 혈청 글로불린으로, 항원이 氣道內에 들어오면, 生成되어 비만세포나 호염기구 등의 수용체에 달라붙어서 알레르기 反應에 重要하게 關與하는 면역글로불린이다³⁵⁻³⁶⁾. 따라서, BALF에서 IgE의 減少는 염증과 알레르기 反應의 減少를 나타낸다.

Serum과 BALF內 IL-4는 Control群에서 정상군에 比하여 有意하게 增加한 반면, PR-HA群에서는 Control群에 比하여 有意하게 抑制되었다(Fig. 7). IL-4는 세포간의 정보를 傳達하는 cytokine으로, Th림프구에서 生成하여 B림프구의 分化와 增殖을 促進하는 사이토카인이다³⁵⁻³⁶⁾. 따라서, Serum과 BALF에서 IL-4의 減少는 炎症과 알레르기 反應의 減少를 나타낸다.

Serum과 BALF內 IL-5의 양은 有意하게 增加한 반면, PR-HA群에서는 Control群에 比하여 有意하게 抑制되었다(Fig. 3-9, 3-11). IL-5는 Th2細胞 및 活性化된 肥滿細胞에 의해 生成되며 好酸球의 成長과 分化를 자극하고 성숙한 好酸球를 活性化 하므로³⁸⁻³⁹⁾, 따라서 Serum과 BALF에서 IL-5의 減少는 炎症과 알레르기 反應의 減少를 나타낸다.

Serum內 IL-13는 Control群에서는 정상군에 比하여 有意하게 增加한 반면, PR-HA群은 Control群보다 有意하게 減少하였다(Fig. 7). IL-13은 細胞間의 정보를 전달하는 cytokine으로, Th세포에서 生成하여 대식세포를 표적으로 하여, 炎症誘發 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 나타낸다³⁵⁻³⁶⁾.

위의 實驗을 통하여 ELISA 分析 結果 IL-4, IL-5

IL-13와 같은 cytokine과 IgE 등이 桔梗藥鍼實驗群에서는 대조군보다 有意하게 減少한 것은 PR-HA가 喘息으로 인한 염증성 세포의 增殖과 活性化를 抑制시켜 喘息 抑制 및 免疫調節에 有效한 것으로 思料된다.

FACS 分析 結果, PR-HA群에서 Gr-1⁺/CD11b⁺ 세포수와 CD11b⁺ 세포수는 모두 control群에 비하여 정상군과 유사하게 減少하였다(Fig. 8). Gr-1은 과립구에서 發顯하는 分子이고, CD11는 granulocytes, 단구, NK세포, 대식세포에 發顯하는 分子로, Mac-1의 複合體의 一部이다³⁹⁻⁴⁰. Gr-1⁺/CD11b⁺ 세포수의 減少는 알레르기 反應을 나타내는 과립구의 減少를 意味한다.

CD3⁺/CCR3⁺ 세포수는 control에 비하여 PR-HA群에서 減少하였다(Fig. 8). CCR3는 호산구의 活性化와 탈과립화에 關與하는 것으로³⁵⁻³⁶, CD3⁺/CCR3⁺ 細胞數의 減少는 알레르기 反應을 나타내는 면역세포 중 호산구의 減少로 나타낸다.

CD4⁺ 세포수 및 CD8⁺ 세포수는 control에 비하여 CD4⁺ 세포수는 PR-HA群에서 減少하였고, CD8⁺ 세포수는 PR-HA群에서 Control群보다 有意하게 減少하였다(Fig. 8). CD4와 CD8는 모두 細胞癒着 분자 機能과 세포자극의 전달 등의 두 가지 重要な 機能을 가지는데, 모두 T세포의 活性 및 抑制를 나타내는 표지가 되는 細胞로, CD4⁺ 세포수 및 CD8⁺ 세포수의 減少는 알레르기 反應을 일으키는 免疫細胞 중의 T세포의 減少를 나타낸다³⁵⁻³⁶.

CD3e⁺/CD69⁺ 세포 수는 control에 비하여 PR-HA群에서 減少하였다(Fig. 8). CD3는 T세포에 發顯하여 TCR과 함께 CD3복합체를 이루고, T세포의 신호전달을 하는 機能을 나타내고, CD69는 활성화된 B세포, T세포, 대식세포에 분포하는 것으로, 림프구의 신호전달에 關與한다³⁵⁻³⁶. 따라서, CD3e⁺/CD69⁺ 세포수의 比率 減少도 또한 알레르기 反應을 나타내는 면역세포 중의 T세포의 減少를 意味한다고 할 수 있다.

RT-PCR을 이용하여 喘息 유발과 관련된 여러 cytokine들의 mRNA 發顯을 관찰한 結果, β-actin, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-13 등의 mRNA 發顯이 Control群에 비하여 PR-HA群에서 顯著히 減少하였다(Fig. 2-17). TNF-α는 중앙괴사인자로 대식세포의 活動을 增加시키고, 항바이러스작용이 있으며, IL-5는 활성화된 B세포를 增殖시키고 IgM과 IgA의 生産을 促進한다. 이들은 모두 염증과 알레르기 反應과 관계있는 cytokine으로, 이들의 mRNA 발현의 減少

는 喘息誘發因子 減少를 나타낸다³⁵⁻³⁶.

以上の 實驗結果 桔梗藥鍼에 의하여 Gr-1⁺/CD11b⁺ 세포수, CD3⁺/CCR3⁺ 세포수, CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포수, CD3e⁺/CD69⁺ 세포수가 減少한 것은 알레르기 및 炎症細胞의 減少를 意味하며, BALF와 Serum의 IgE, IL-4, IL-5, IL-13의 減少 및 β-actin, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-13 등의 mRNA 發顯의 減少는 桔梗藥鍼이 喘息抑制 및 免疫機能 調節에 有效함을 意味한다. 이에 臨床에서 喘息의 治療에 있어 桔梗藥鍼의 活用은 더 많은 研究가 必要하리라 思料된다.

V. 結 論

알레르기 喘息모델 생쥐에 대해 足三里-桔梗藥鍼의 喘息抑制 및 免疫調節效果를 관찰한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 肺의 무게와 총세포수는 OVA-PR-HA群에서 OVA-Control群에 비하여 有意하게 減少하였다.
2. BALF內的 총 lymphocyte수와 eosinophil수는 OVA-PR-HA群에서 OVA-Control群에 비해 顯著하게 減少하였다.
3. PR-HA군에서는 Control群에 비해 肺內 collagen의 부착이 현저하게 감소 하였다
4. BALF內 IgE와 IL-4, IL-5와 Serum內 IL-4, IL-5와 IL-13이 PR-HA群에서 Control群에 비하여 有意하게 減少되었다.
5. 肺內 Gr-1⁺/CD11b⁺와 CD11b⁺ 세포수는 PR-HA群에서 Control群에 비해 有意하게 減少하였다.
6. 肺內 CCR3⁺ 세포수, CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포수, CD3e⁺/CD69⁺ 세포수는 PR-HA群에서 Control群에 비해 有意하게 減少하였다.
7. 肺內 β-actin, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-13 등의 cytokine들의 mRNA 發顯이 PR-HA群에서 Control群에 비해 顯著하게 減少하였다.

VI. 參考文獻

1. 대한 천식 및 알레르기학회. 천식과 알레르기 질환. 서울: 군자출판사. 2002 : 31-44, 59-67, 237-326.
2. 전국의과대학 임상교수편. 임상진단학. 서울 : 한미의학. 2002 : 392-393.
3. 李珩九, 鄭昇杞. 東醫肺系內科學. 서울 : 아트동방. 1999 : 105-112, 162-202.
4. 巢元方. 諸病源候論(卷13,14). 서울 : 大星文化社. 1992 : 106-117.
5. 李 梴. 編註醫學入門. 서울 : 大星文化社. 1992 : 397-398.
6. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울 : 大星文化社. 1992 : 283-285, 261.
7. 李尙仁. 韓藥臨床應用. 서울 : 成輔社. 1982 : 470-473.
8. 李尙仁. 本草學. 서울 : 修書院. 1981 : 329-330.
9. 陳兆桓. 神農本草經. 臺北 : 文光圖書有限公司. 1992 : 212.
10. 唐慎微. 重修政和經史證類備用本草. 北京 : 人民衛生出版社. 1982 : 249.
11. 金昌謙. 本草從新. 서울 : 杏林書院. 1982 : 10.
12. 申估求. 申氏本草學. 서울 : 壽文社. 1973 : 456-461.
13. 김성수. 桔梗에 의한 알레르기 천식 효과에 대한 연구. 본초학회지. 2004 ; 19(2) : 61-70.
14. 정욱. 행인과 길경이 Asthma model 내의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 영향. 내과학회지. 2000 ; 21(1) : 31-38.
15. 진철용, 변부형. 길경이 고지방식으로 유발된 비만흰쥐의 체중 및 혈청중지질성분의 변화에 미치는 영향. 본초학회지. 2002 ; 17(2) : 19-28.
16. 해리슨 번역 편찬위원회. HARRISON'S 내과학. 서울 : 정담. 1997 : 1258-1264.
17. 이양근. 好酸球와 천식. 결핵 및 호흡기질환. 1999 ; 46(1) : 5-16.
18. 李京變. 東醫心系內科學(上). 서울 : 書苑堂. 1995 : 277-282.
19. 金定濟. 診療要鑑(卷上). 서울 : 大星文化社. 1983 : 586-594.
20. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울 : 東洋醫學研究會. 1981 : 16, 17, 24, 31, 58, 66, 72, 73, 86, 89, 112, 114, 119, 127, 145, 162, 170, 180, 184, 185, 213, 216, 224, 248, 252, 254, 255, 267, 296, 312.
21. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울 : 東洋醫學研究會. 1981 : 69, 79, 81, 124, 128, 134, 139, 151, 176, 186, 213, 241, 314.
22. 張仲景. 金匱要略. 서울 : 醫道韓國社. 1975 : 57-61.
23. 王肯堂. 證治準繩(一). 北京 : 人民衛生出版社. 1991 : 229-231.
24. 吳謙. 醫宗金鑒(中). 서울 : 大星文化社. 1991 : 390-391.
25. 葉天士. 臨證指南醫案. 서울 : 成輔社. 1982 : 299-300.
26. 吉村永星, 黃義玉, 鄭昇杞, 李珩九. 알레르기성 喘息에 關한 文獻의 考察(東西醫學의 比較考察). 大韓韓醫學會誌. 1990 ; 11(1) : 39-70.
27. 鄭昇杞, 李珩九. 哮喘의 原因 및 治法에 關한 研究. 大韓韓醫學會誌. 1986 ; 7(1) : 60-67.
28. 大韓藥鍼學會. 藥鍼製劑와 臨床應用. 서울 : 大韓藥鍼學會. 1997 : 1-5.
29. 김대수. 삼종의 제법에 따른 人蔘水鍼이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. 경희의학. 1989 ; 5(1) : 97-105.
30. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學(上,下). 서울 : 集文堂. 1991 : 382-384.
31. 李丁. 鍼灸經穴辭典. 서울 : 高麗醫學. 1989 : 138-139, 397-398.
32. 安榮基. 經穴學叢書. 서울 : 成輔社. 1986 : 196-197, 678-679, 694-695.
33. 上海中醫學院. 鍼灸學. 香港 : 商務印書館香港分館. 1982 : 114, 89-90, 211-216.
34. 蔡禹錫. 經穴集成. 서울 : 大星文化社. 1995 : 83-84, 404-405.
35. Ivan Roitt. Immunology. 6th. Mosby : Newyork. 2002 : 125-127.
36. Ivan Roitt. Essential immunology. 9th. U.S.A. : Blackwell science. 1994 : 179-200, 151-167.
37. 김세종. 면역학. 서울 : 고려의학. 1994 : 3, 8, 138, 25-32.
38. Nicholas WLukacs. Nature review : immunology. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. 2001 : 108-116.
39. Roitt IM. Roitt's Essential Immunology. Blackwell Science. 1997 : 95, 201-221, 363-367.

40. Ferreira MB, Palma Carlos AG. Cytokines
and asthma. J. of investigational allergology

and clinical immunology. 1998 ; 8(3) : 141-
148.