

## 瓜蒌仁藥鍼이 Ovalbumin-induced Asthma Mouse Model에 미치는 影響

심재철, 김정현, 백경민, 이현의, 김종원, 오병열, 조현경, 유호룡, 김윤식, 설인찬  
대전대학교부속한방병원 내과학교실

### The Effects of *Trichosanthis Semen* Herbal-acupuncture in ovalbumin-induced asthma mouse model

Jae-chul Shim, Jung-hyun Kim, Kyung-min Baek, Hyun-eui Lee, Jong-won Kim,  
Byeong-yeol Oh, Hyun-kyung Jo, Ho-rhyong Yoo, Yoon-sik Kim, In-chan Seol

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea.

**Objectives** : The aim of this study was to investigate the effect of *Trichosanthis Semen* Herbal-acupuncture(TS-HA) at Joksamni(ST36) on ovalbumin-induced asthma in mice.

**Methods** : C57BL/6 mice were sensitized and challenged with ovalbumin(OVA) once a week for twelve weeks. The experimental group was treated with 1% concentrations of TS-HA at Joksamni(ST36) three times a week for the last eight weeks.

**Results** :

1. The weight and total lung cells of the mice in the group treated with TS-HA decreased significantly compared with those of control group.
2. Total leukocytes and eosinophils in Bronchoalveolar-lavage fluid(BALF) of the mice in the group treated with TS-HA decreased significantly compared with those of control group.
3. Eosinophils in BALF of the mice in the group treated with TS-HA in photomicrographs decreased significantly compared with those of control group.
4. According to histological analysis of lung sections, adhesion of collagen in TS-HA decreased significantly compared with that of control group.
5. The concentration of IgE, IL-4, IL-5 in BALF and IL-4, IL-5, IL-13 in serum of the mice in the group treated with TS-HA decreased significantly compared with that of control group.
6. The number of Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> cells in the lungs of the mice in the group treated with TS-HA decreased significantly compared with those of control group.

**Conclusion** : These results suggest that *Trichosanthis Semen*-herbal acupuncture at Joksamni(ST36) done on C57BL/6 mice is effective in part in relieving OVA-induced asthma in C57BL/6 mice.

**Key Words**: OVA-induced asthma, *Trichosanthis Semen*, Herbal acupuncture

### 1. 緒 論

喘息은 주로 호흡기감염, stress, 공기오염, 체내

항체반응 등으로 일어나는 일종의 Allergy 반응으로서, 발작성의 好氣性 呼吸困難, 喘鳴, 기침, 폐의 過呼吸, 囉音(rales), 咯痰 등을 특징으로 하는 가역적, 발작적인 고도의 기도폐색을 동반하는 병증이다<sup>1,2</sup>.

喘息은 임상적으로는 가역적인 기도폐색의 증상을 보이고, 병태 생리적으로는 기도의 과민성이 존재하며, 병리학적으로는 기도의 염증성 반응을 보이는

· 접수: 2005. 6. 8. · 채택: 2005. 7. 1.  
· 교신저자: 심재철, 대전광역시 중구 대흥동 22-5번지  
대전대학교부속한방병원 순환기내과  
(Tel. 042-229-6756, Fax. 042-254-3403  
E-mail : calvaria0714@hanmail.net)

만성 폐쇄성 폐질환이며, 전형적으로 모든 활동성 喘息 환자들은 여러 가지 사소한 자극에도 과도한 기관지 경련반응을 보이는 기도 과민성을 갖고 있고, 기도 분비물에는 많은 염증 매개 물질들이 기관지 경련, 점액분비, 미세혈관 누출 등에 관여한다. 喘息의 기도 폐쇄는 기도 평활근의 연속, 기도 점막의 부종, 점액 분비의 증가, 호산구 및 림프구 등의 염증 세포들의 기도 침윤, 기도 상피 세포의 손상 및 탈락 등의 복합적인 요인들로 초래된다<sup>3,4</sup>.

喘息의 임상양상은 한의학적으로 볼 때 哮喘證과 유사한데 哮은 喉中有聲響한 것을 말하며 喘은 呼吸急促한 것을 말한다<sup>5</sup>. 哮喘證의 발생에 대해서는 寒冷說, 心因說, 痰因說, 素因說, 感染說, 過敏性反應, 肺腎의 呼吸機能障礙 등으로 설명되고 있으며, 치료에 있어서는 外感風寒, 痰濕內盛 등의 實證과 肺虛, 心腎虛損, 上實下虛 등의 虛證으로 나누어 韓藥과 鍼灸治療를 병행한다<sup>2</sup>.

喘息에 대한 최근의 실험적 연구로는 조<sup>6</sup>가 加味淸金降火湯과 加味六味地黃湯이, 황<sup>7,8</sup>이 淸上補下湯과 加味貝母湯이, 김<sup>9</sup>이 麥門冬湯과 定喘化痰降氣湯이, 정<sup>10</sup>이 杏仁과 桔梗이 喘息에 미치는 영향을 보고하였다. 또한 藥鍼療法을 이용한 喘息에 대한 연구가 있었는데, 박<sup>11</sup>은 羌活藥鍼이, 신<sup>12</sup>은 桑葉藥鍼이, 김<sup>13</sup>은 升麻藥鍼이, 김<sup>14</sup>은 細辛藥鍼이, 송<sup>15</sup>은 沙蔘藥針이 喘息의 억제와 면역조절효과에 대한 실험적 연구를 보고하였다.

이에 저자는 상기한 약물보다 임상상 喘息에 활용도가 높고 潤肺化痰의 효능이 있는 瓜蒌仁으로 藥鍼液을 제조하여 Ovalbumin(OVA)으로 알레르기 喘息 병태가 유발된 C57BL/6생쥐의 足三里穴(ST36)에 藥鍼療法을 시행한 후 생쥐의 폐 무게, 폐내 총 세포수, Bronchoalveolar-lavage fluid(BALF)내 총 leukocyte수 및 eosinophil수, 폐내 Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포수의 변화를 측정하고, BALF내 IgE, IL-4, IL-5, 혈청내 IL-4, IL-5, IL-13 등을 定量하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗

### 1. 재료

#### 1) 동물

동물은 雌性인 4~5週齡의 C57BL/6생쥐를 대한 실험센터에서 공급받아 실험 당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃를 유지하여 2주일간 실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 약재

실험에 사용된 瓜蒌仁(Trichosanthis Semen; 이하 TS)은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

#### 3) 藥鍼液의 제조

瓜蒌仁 55g을 분쇄기를 이용해서 분말로 만들어 원형 삼각 flask에 넣고 증류수 500ml를 加하여 3시간 동안 shaking water bath에서 유출하고 여과한 침전물을 여과지로 3회 여과한 후 rotary evaporator에 降壓濃縮 하였다. 瓜蒌仁 농축액에 95% ethyl alcohol 30ml를 加하여 실온에서 교반한 후 방치하여 생성된 침전물을 여과하여, 여액을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮하여 생성된 침전물을 여과하였다. 濾液을 다시 85% ethyl alcohol 30ml를 加하여 잠시 교반 후 방치하여 생성된 침전물을 여별하고, 다시 여액을 75% ethyl alcohol 30ml를 加하는 조작을 2회 반복하고, 여액 중 ethyl alcohol을 減壓 제거하여 잔사전량을 20g이 되게 하고, 1N NaOH로 pH6.8로 조절하여 저온에서 12시간 방치한 후, 미량의 부유액을 여별한 후 멸균하여, 藥鍼液을 PBS로 1% 희석하여 사용하였다

### 2. 方法

#### 1) Asthma mouse model 作成

실험 1주째 200 $\mu$ l의 OVA/alum(500 $\mu$ g/ml)을, 2~3주째에는 100 $\mu$ l OVA/alum(500 $\mu$ g/ml)을 생쥐의 복강에 투여하였다. 4주째에는 마취 후에 100 $\mu$ l의 OVA/alum(500 $\mu$ g/ml)을 기도에 투여(i.t)하였다. 5~8주는 2.5mg/ml의 OVA/PBS 40 $\mu$ l을, 8~12주는 5mg/ml

의 OVA/PBS 40 $\mu$ l을 air compressor를 이용하여 30분간 주 3회 노출시켰다. 5주째부터 12주째까지 8주간 주 3회 足三里穴에 1%의 瓜蒌仁藥鍼液(100 $\mu$ l)을 注入하였다. 足三里穴의 위치는 Mouse의 오른쪽 뒷다리에서 사람의 足三里穴에 상응하는 부위로 정하였다.

2) Control군의 분류

- ① WT군: Normal C57BL/6 mice
- ② OVA-control군: OVA inhalation으로 천식을 유발하고 아무런 처치를 하지 않았다.
- ③ OVA-Needle-prick: OVA inhalation으로 천식을 유발하고 우측 족삼리혈(ST36)에 주사기를 刺入한 후 즉시 제거하였다. Needle prick 자극은 5주째부터 12주째까지 8주간 주 3회 시행하였다

3) BALF 분리

생쥐를 마취하여 흉포를 열고 기도에 10% FBS/DMEM medium을 넣은 주사기를 삽입하고 끈으로 묶어 고정한 후 10% FBS/DMEM medium 3회 순환시켜 분리하였다

4) Photomicrographs

분리된 BALF를 세척해서 Cytospin centrifuge에 1000rpm으로 5분간 원심 분리하여 고정시킨 후 blood smears staining set(Merck Germany)를 사용하여 염색 하였다. 공기 중에서 건조시킨 후 bright microscope(Nikon, Japan;  $\times 400$ )로 측정하였다.

5) Histological analysis

조직은 Masson's Trichrome 염색을 하였다. 폐 조직의 일부를 Cryotome을 이용하여 절편한 후, 시판 Masson's Trichrome stain system(Dako, Japan)을 사용하여 염색하였다

6) Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) Analysis

시판 ELISA Kit를 사용하여, 생쥐에서 분리한 BALF와 Serum에서 각 cytokine량을 측정하였다. Serum은 주사기를 사용해서 마취한 생쥐로부터 채혈하여 실온에서 3시간 보존한 후 6500rpm으로 20분간 20 $^{\circ}$ C에서 원심 분리하여 사용했다. 抗 cytokine

항체가 코팅된 96 well plate에 BALF 또는 Serum을 加하여 반응 시킨 후 4번 세척하고, biotin이 標式된 抗cytokine 항체를 加하여 반응 시킨 후 4번 세척한 다음 여기에 straptavidin-HRP를 加하여 ELISA reader를 이용하여 측정하였다.

7) Fluorescence activated cell sorter(FACS) Analysis

생쥐에서 분리해낸 폐 조직을 잘게 절단한 후 collagenase를 加하고 incubation하여 분리해 낸 세포에 標式抗體를 반응시켜 flow cytometer로 분석하였다.

8) 통계처리

통계는 student's t-test로 하였다

III. 結 果

1. Lung weight

Lung weight가 OVA-TS-HA(OVA inhalation and TS-HA)군은 0.387g으로, WT군의 0.382g와 거의 차이가 없었고, OVA-control군의 0.704g, OVA-Needle-prick군의 0.613g에 비해 유의성(P<0.01) 있게 감소하였다(Fig. 1.).

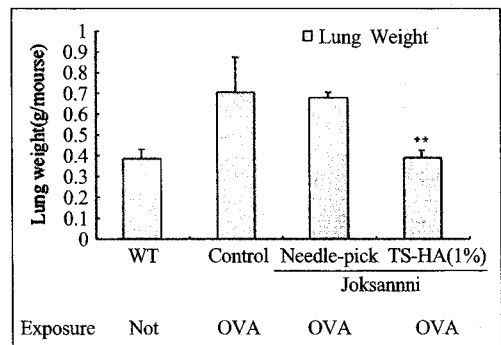


Fig. 1. Effect of TS-HA on lung weight in mice with OVA-induced asthmatic mouse lung weight.

Values represent the means  $\pm$  SEM of 7mice(\*\*: p<0.01).

2. Cell count

① Total cells in Lung

폐에서의 총 세포 수가 OVA-TS-HA군은  $63.7 \times 10^6$ 로, WT군의  $57.5 \times 10^6$ 보다 증가했고, OVA-control

군의  $169 \times 10^6$ , OVA-Needle-prick군의  $161 \times 10^6$ 에 비해 유의성( $P < 0.01$ ) 있게 감소했다(Fig. 2.).

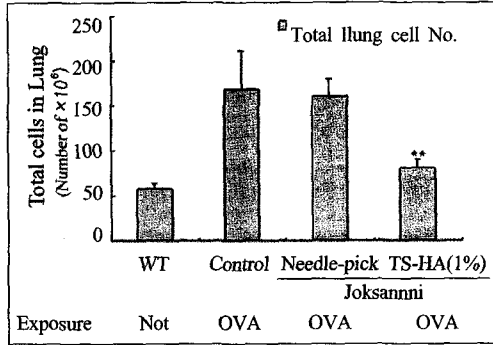


Fig. 2. The number of total cells in OVA-induced asthmatic mouse lung tissue.

Values represent the means  $\pm$  SEM of 7mice(\*\* :  $p < 0.01$ )

② Total Leukocytes in BALF

BALF에서의 Total Leukocyte가 OVA-TS-HA군은  $21.3 \times 10^5$ 으로, WT군의  $17.9 \times 10^5$ 보다 증가했고, OVA-control군의  $119.0 \times 10^5$ , OVA-Needle-prick군의  $98.5 \times 10^5$ 에 비해 매우 유의성( $P < 0.001$ ) 있게 감소했다(Fig. 3.).

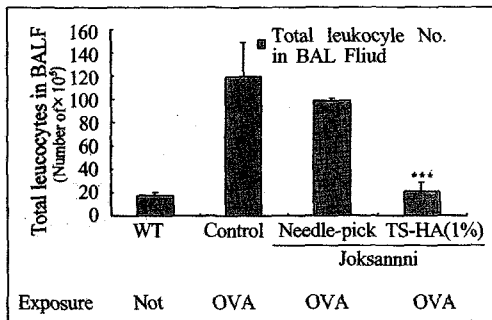


Fig. 3. The number of total leukocytes in bronchoalveolar lavage fluid(BALF).

Values represent the means  $\pm$  SEM of 7mice(\*\*\*:  $p < 0.001$ ).

③ Eosinophils in BALF

BALF에서의 Eosinophil이 OVA-TS-HA군은 136.7로, WT군의 24.3보다 증가했고, OVA-control군의

416.7, OVA-Needle-prick군의 402.0에 비해 유의성( $P < 0.01$ ) 있게 감소했다(Fig. 4.).

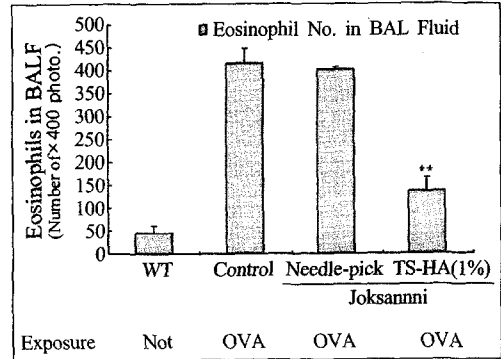


Fig. 4. The number of eosinophil in bronchoalveolar lavage fluid(BALF).

Values represent the means  $\pm$  SEM of 7mice(\*\*:  $p < 0.01$ ).

3. Photomicrographs of Eosinophil in BALF

OVA-control군 및 OVA-needle-prick군에서는 Eosinophil이 다량으로 관찰되었으며 OVA-TS-HA군에서는 Eosinophil이 현저하게 감소했다(Fig. 5.).

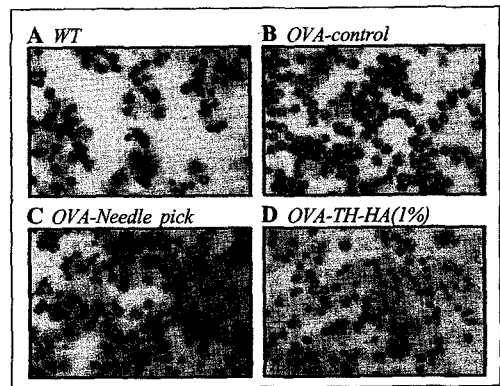


Fig. 5. Photomicrographs(original magnification,  $\times 400$ ) of BALF cytopins from mice.

4. Histological analysis of lung sections

OVA-control군 및 OVA-needle-prick군에서는 collagen이 조직에 다량으로 부착되어 있는 것이

관찰되었으며 OVA-TS-HA군에서는 collagen의 부착이 현저하게 감소했다(Fig. 6.).

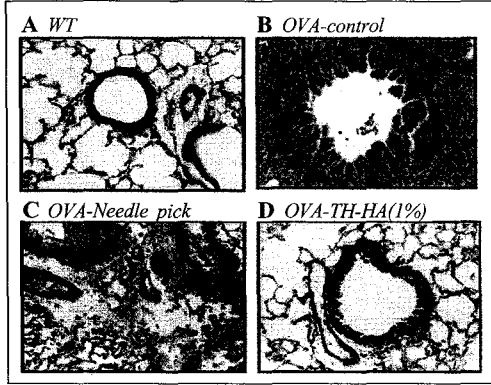


Fig. 6. Histological analysis of lung sections from mice

5. ELISA analysis

① IgE in BALF

BALF에서 IgE의 흡광도가 OVA-TS-HA군은 0.146Abs로, WT군의 0.098Abs보다 증가했고, OVA-control군의 0.724Abs, OVA-needle-prick군의 0.620 Abs에 비해 유의성(P<0.01) 있게 감소했다(Fig. 7.).

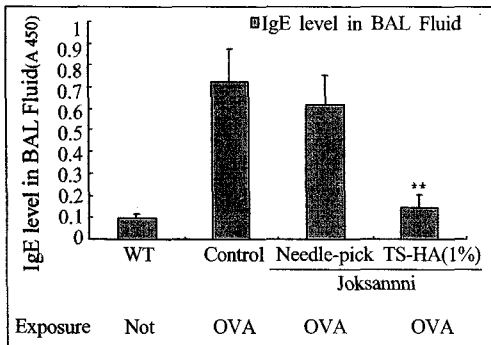


Fig. 7. The level of IgE in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

Values represent the means ± SEM of 5mice (\*\*: p<0.01).

② IL-4 in BALF

BALF에서 IL-4의 흡광도가 OVA-TS-HA군은

0.072Abs로, WT군의 0.069Abs보다 증가했고, OVA-control군의 0.217Abs, OVA-needle-prick군의 0.129Abs에 비해 감소(P<0.05)했다(Fig. 8.).

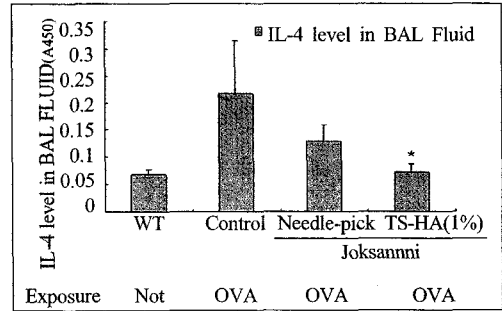


Fig. 8. The level of IL-4 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

Values represent the means ± SEM of 5mice (\*: p<0.05).

③ IL-5 in BALF

BALF에서 IL-5의 흡광도가 OVA-TS-HA군은 0.185Abs로, WT군의 0.164Abs보다 증가했고, OVA-control군의 0.358Abs, OVA-needle-prick군의 0.314 Abs에 비해 유의성(P<0.01) 있게 감소했다(Fig. 9.).

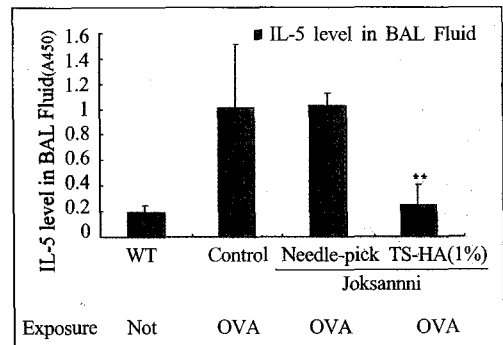


Fig. 9. The level of IL-5 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

Values represent the means ± SEM of 5mice (\*\*: p<0.01).

④ IL-4 in Serum

Serum에서 IL-4의 흡광도가 OVA-TS-HA군은 0.054Abs로, WT군의 0.050Abs보다 증가했고, OVA-

control군의 0.312Abs, OVA-needle-prick군의 0.171 Abs에 비해 매우 유의성(P<0.001) 있게 감소했다 (Fig. 10).

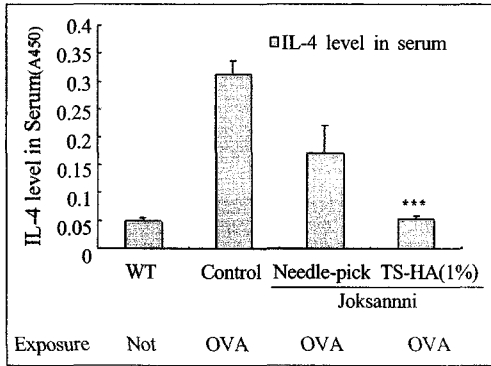


Fig. 10. The level of IL-4 in C57BL/6 mouse Serum. Values represent the means ± SEM of 5mice(\*\*\*: p<0.001).

⑤ IL-5 in Serum

Serum에서 IL-5의 함량이 OVA-TS-HA군은 0.269Abs로, WT군의 0.191Abs보다 증가했고, OVA-control군의 1.018Abs, OVA-needle-prick군의 1.027 Abs에 비해 유의성(P<0.01) 있게 감소했다(Fig. 11).

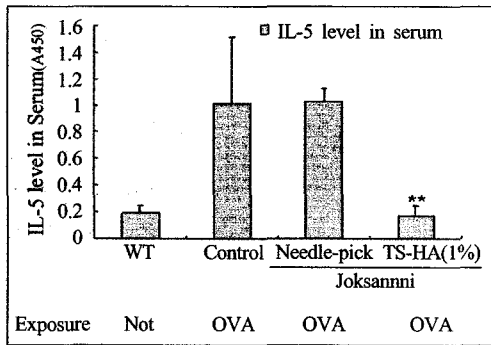


Fig. 11. The level of IL-5 in C57BL/6 mouse Serum. Values represent the means ± SEM of 5mice(\*\*: p<0.01).

⑥ IL-13 in Serum

Serum에서 IL-13의 함량이 OVA-TS-HA군은 0.343Abs로, WT군의 0.390Abs보다 감소했고, OVA-

control군의 0.760Abs, OVA-needle-prick군의 0.724 Abs에 비해 유의성(P<0.01) 있게 감소했다(Fig. 12).

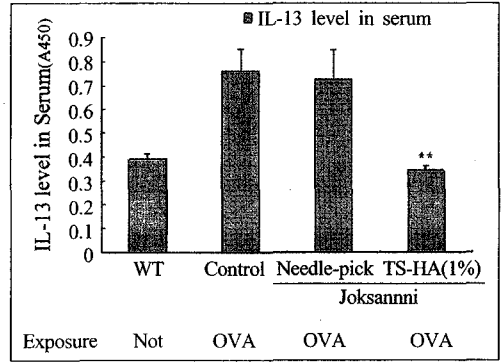


Fig. 12. The level of IL-13 in C57BL/6 mouse Serum. Values represent the means ± SEM of 5mice(\*\*: p<0.01)

6. FACS analysis

FACS분석에 의해 각 세포를 계수하였다.

① Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> cell number

Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> 세포수는 OVA-TS-HA군은 9.1 × 10<sup>5</sup>로, WT군의 3.7 × 10<sup>5</sup>보다 증가했고, OVA-control군의 44.4 × 10<sup>5</sup>, OVA-needle-prick군의 42.9 × 10<sup>5</sup>에 비해 감소했다. CD11b<sup>+</sup> 세포수는 OVA-TS-HA군은 20.3 × 10<sup>5</sup>으로, WT군의 13.3 × 10<sup>5</sup>보다 증가했고, OVA-control군의 91.4 × 10<sup>5</sup>, OVA-needle-prick군의 80.3 × 10<sup>5</sup>에 비해 감소했다(Fig. 13).

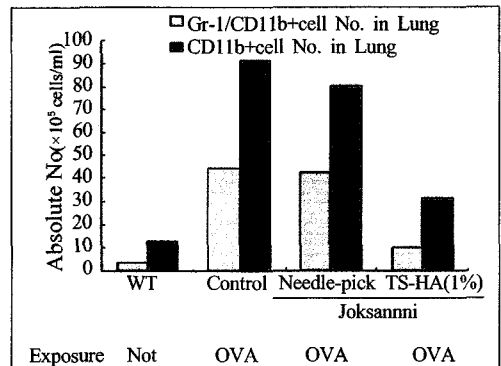


Fig. 13. Effect of TS-HA on Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

② CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> cell number

OVA-TS-HA군은 19.3×10<sup>4</sup>으로, WT군의 12.4×10<sup>4</sup>보다 증가했고, OVA-control군의 83.4×10<sup>4</sup>, OVA-needle-prick군의 71.7×10<sup>4</sup>에 비해 감소했다(Fig. 14).

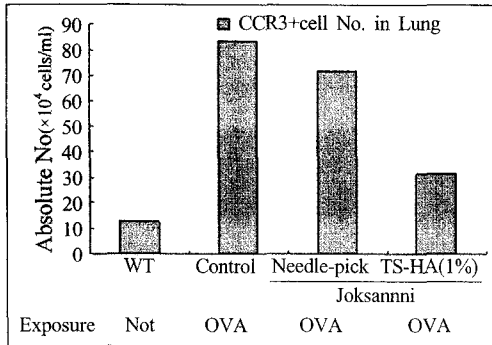


Fig. 14. Effect of TS-HA on CCR3<sup>+</sup> cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

③ CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> cell number

CD4<sup>+</sup> 세포수는 OVA-TS-HA군은 16.3×10<sup>5</sup>로, WT군의 12.2×10<sup>5</sup>보다 증가했고, OVA-control군의 52.8×10<sup>5</sup>, OVA-needle-prick군의 46.4×10<sup>5</sup>에 비해 감소했다. CD8<sup>+</sup> 세포수는 OVA-TS-HA군은 6.6×10<sup>5</sup>로, WT군의 4.6×10<sup>5</sup>보다 증가했고, OVA-control군의 22.6×10<sup>5</sup>, OVA-needle-prick군의 20.7×10<sup>5</sup>에 비해 감소했다(Fig. 15).

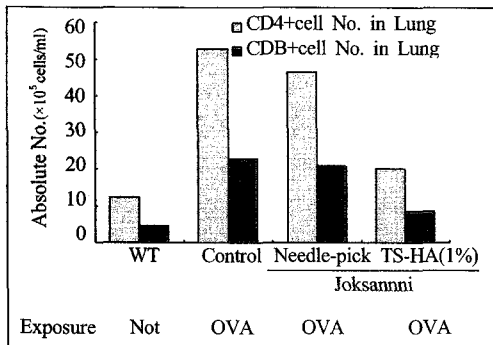


Fig. 15. Effect of TS-HA on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

④ CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> cell number

OVA-TS-HA군은 10.9×10<sup>5</sup>로, WT군의 6.0×10<sup>5</sup>보다 증가했고, OVA-control군의 36.3×10<sup>5</sup>, OVA-needle-prick군의 33.4×10<sup>5</sup>에 비해 감소했다(Fig. 16).

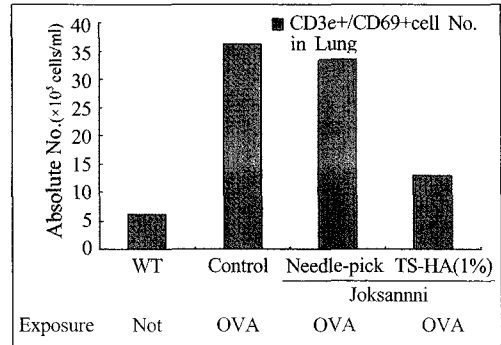


Fig. 16. Effect of TS-HA on CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

IV. 考 察

喘息이란 다양한 자극에 대한 기관지 반응의 증가를 특징으로 하며, 생리적으로는 저절로 혹은 치료에 의해 해소되는 기도의 광범위한 수축이 나타나고, 임상적으로는 발작적인 호흡곤란, 기침 및喘鳴 등이 나타나며 급성 악화와 무증상 기간이 산발적으로 나타나는 일종의 발작적 질환이다<sup>16</sup>.

일반적으로 기도의 과민성은 알레르겐, 불안, 상기도 감염, 흡연 또는 기타의 환경적 독물 또는 운동 등에 의해 유발되며, 이러한 반응은 찬 공기 등에 의해서 악화되며 그보다 드물게는 따뜻하고 습한 공기에 의해서도 유발될 수 있다. 그 결과 점막 부종, 분비물 증가, 기관지 수축이 일어나며 이에 따라 기도저항이 증가되고 호흡 기류를 방해하게 된다<sup>17</sup>.

喘息은 지난 10년간 수많은 연구를 통하여 초기 기도 평활근 수축의 질환으로 인식되었던 개념이 염증매개체, 신경계, 각종 효과세포의 복합적 상호작용에 의한 개념으로 변화 되어왔다. 특히 병리적 개념에서 기도염증에 대하여 초점을 맞춰왔다.喘息

에서 기도의 염증은 필수적인 병리과정이며 염증반응은 기도의 과민성과 기도폐쇄를 가속화시키는 촉진제 역할을 한다<sup>18</sup>.

병태 생리학적으로 喘息은 알레르겐, 비만 세포 및 IgE가 관여하여 분비되는 화학매체의 직접적인 약리작용에 의해서 또 화학매체와 cytokine, 유착분자가 관여하여 기관지로 모여온 염증 세포에 의해서 발병하는 기도의 만성 알레르기 염증성 질환으로 이해되고 있다<sup>19</sup>. 특징적으로 기관지속에 호산구가 증가하는데 기도내로 유입된 호산구가 활성화되면, 세포막으로부터 생성되는 혈소판 활성인자, leukotriens 등의 화학매체들은 기도 수축, 객담 생성, 혈관투과성 증가, 부종 등을 발생시키고, 더불어 화학주성이 있어 지속적으로 호산구를 비롯한 염증 세포들을 기도내로 유입시킬 뿐 아니라 기도과민성을 생성하거나 증가시키며, 세포질로부터 유리된 세포독성단백은 기도상피를 박탈시킨다<sup>20,21</sup>.

喘息의 치료에는 원인 알레르겐 및 악화 인자를 회피하도록 하며, 원인 알레르겐을 소량씩 피하주사로 반복 시행하여 원인 알레르겐에 대한 감수성을 약화시켜 증상의 호전을 유도하기도 한다. 이러한 치료법에 효과가 없을 때 약물 요법을 시행하는데 喘息에 사용하는 약제는 기도 폐쇄를 단시간 내에 완화시키는 증상완화제와 기도 염증반응을 억제하고 喘息발작을 예방하는 질병조절제로 구분한다. 증상완화제는 주로 기도 평활근에 작용하여 좁아진 기도를 단시간 내에 확장시키는 속효성 베타2 항진제, 항콜린제, 속효성 테오필린, 경구 및 주사용 부신피질 스테로이드제가 있다. 질병 조절제에는 흡입용과 경구용 부신피질 스테로이드제, 크로몰린과 네도크로밀, 서방형 테오필린, 지속성 베타2 항진제가 있다<sup>19</sup>.

瓜蒌는 葫蘆科(박과;Cucurbitaceae)에 속한 다년생 草質藤本인 하늘타리 *Trichosanthes kirilowii* MAXIM.와 同屬 近緣植物의 成熟한 果實을 乾燥한 것으로, 10월 하순부터 11월 상순 사이에 果實이 익어서 果皮에 白粉이 나오고, 淡黃色이 되었을 때 채취하여 晒乾한다<sup>22</sup>.

瓜蒌仁의 性味는 甘寒으로 潤滑作用이 있으며 淸熱潤燥하고, 氣滯로 발생한 痞證의 제거와 氣의 上逆을 降下하고 滌痰하는 作用이 있으므로 熱痰으로 인한 咳嗽, 粘稠하고 黃色인 痰을 吐하는 등의 咳吐不利한 증상을 다스리며 滯腸通便하는 效능을 발휘하여 腸燥便秘를 치료한다. 약리학적으로 瓜蒌仁은 saponin, 지방유 등을 함유하고 祛痰作用이 있다. 체외실험에 따르면 抗癆作用이 있으며, 그 효과는 瓜蒌皮쪽이 더욱 양호하다. 또한 60%의 알코올 추출물은 抗癆作用이 가장 강하며, 腹水中의 암 세포를 사멸시킬 수 있다. 또한 비교적 강한 下痢를 시키는 물질을 함유하며 大腸菌, 赤痢菌, 腸티프스菌, 綠膿菌, 콜레라菌에 대하여 모두 억제 작용이 있고 이 약의 水浸劑(1:2)는 抗皮膚真菌作用이 있다<sup>22,23</sup>.

足三里穴은 인체에서 足陽明胃經上의 經穴로 犢鼻穴에서 解谿穴까지 1尺 6寸의 骨度法으로 산정하여 犢鼻穴下 3寸에 취하는데, 利脾胃, 調中氣, 和腸消滯, 疏風化濕, 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元, 強健脾胃하는 效능을 지닌다<sup>24</sup>.

藥針療法은 穴位 注射 療法이라고도 하는데, 질병을 근거로 穴位의 치료작용과 藥物의 藥理作用을 살핀 다음 상응하는 愈穴과 藥物을 선택하고 藥液을 愈穴 내에 주입하여 愈穴과 藥物이 질병에 대해 종합적인 작용을 나타나게 함으로써 鍼灸學的 效能과 本草學的 效能의 장점이 동시에 발휘되는 치료법이다<sup>24,25</sup>.

최근에는 이러한 藥鍼療法을 이용하여 喘息에 대한 실험적 연구가 활발히 이루어졌으며, 그 약물로는 羌活<sup>11</sup>, 桑葉<sup>12</sup>, 升麻<sup>13</sup>, 細辛<sup>14</sup>, 沙蔘<sup>15</sup> 등이 있으나 임상상 喘息에 반응되는 瓜蒌仁이 喘息에 미치는 영향에 관한 연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는 In vivo 실험을 통해, Ovalbumin에 노출되어 알레르기 喘息이 유발된 생쥐에게 瓜蒌仁 藥鍼이 미치는 영향을 살펴보았다. C57BL/6 mouse로 OVA-induced asthma 모델을 작성하고 足三里穴에 瓜蒌仁藥鍼을 시술한 후 폐의 무게, 폐의 총 세포수, BALF내 총 leukocyte 및 eosinophil을 측정하였으며, BALF를 염색하여 eosinophil의 분포를 관찰



하였고, 폐 조직을 염색하여 collagen 조직의 부착 정도를 관찰하였다. 또한 ELISA analysis를 통하여 BALF내 IgE, IL-4, IL-5와, serum내 IL-4, IL-5, IL-13의 분비량을 측정하였으며, FACS analysis를 통하여 폐내 Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포수를 측정하였다.

폐의 무게는 OVA-control군은 0.704g이었으나, OVA-TS-HA군은 0.387g로 유의성(P<0.01) 있게 감소하였다(Fig. 1.). 폐의 질량증가는 폐와 기관지의 염증으로 collagen의 합성이 이루어진 결과로 인한 것으로 폐와 기관지의 병리학적인 변화를 의미한다. 따라서 본 실험에서 OVA-TS-HA군의 폐 질량 감소는 瓜蒌仁藥鍼이 기도나 기관지의 염증억제로 인해 collagen의 합성이 적어져 섬유화의 진행을 억제하는 것으로 사료된다. 이는 조직학적 검사에서도 확인되는데, 폐 조직을 염색하여 관찰한 결과 OVA-control군에서는 collagen이 조직에 다량으로 부착되어 있는 것이 관찰되었으며 OVA-TS-HA군에서는 collagen의 부착이 현저하게 감소하였다(Fig. 6.).

폐의 총 세포수는 OVA-control군은  $169 \times 10^6$ 였으나, OVA-TS-HA군은  $63.7 \times 10^6$ 로 유의성(P<0.01) 있게 감소하였다(Fig. 2.). 폐내 총 세포수가 높다는 것은 비만 세포, 호산구, 림프구, 대식 세포 등의喘息의 만성 염증성 병리를 일으키는 세포들이 증식, 활성화되어 기도나 기관지, 폐에 많이 침착, 침윤되어 있다는 것을 의미한다. 따라서 본 실험에서 OVA-TS-HA군의 폐내 총 세포수 감소는 瓜蒌仁藥鍼이喘息병태에서 폐내 면역 세포의 증가 및 침윤을 억제하는 것으로 사료된다.

BALF내의 총 leukocyte수는 OVA-control군은  $119.0 \times 10^5$ 이었으나, OVA-TS-HA군은  $21.3 \times 10^5$ 으로 매우 유의성 있게(P<0.001) 감소했다(Fig. 3.). BALF내의 eosinophil은 OVA-control군은 416.7이었으나 OVA-TS-HA군은 136.7로 유의성(P<0.01) 있게 감소했다(Fig. 4.). 이러한 호산구의 감소는 BALF를 염색하여 관찰한 photomicrographs에서도 확인된다(Fig. 5.). 호산구는 기관지천식에서 지연 반응에 관여하며 기관지 상피 세포를 박리시켜 구심성 신경

을 노출시킴으로써 기도의 반응성을 향진시킨다<sup>26</sup>. 따라서 본 실험에서 OVA-TS-HA군의 폐내 총 leukocyte수와 eosinophil수의 감소는 瓜蒌仁藥鍼이 폐내 염증이나喘息 반응을 억제하는 것으로 사료된다.

ELISA 분석결과, BALF에서 IgE의 레벨은 OVA-control군은 0.724Abs이었으나, OVA-TS-HA군은 0.146Abs로 유의성(P<0.01) 있게 감소했고, IL-4의 레벨은 OVA-control군은 0.217Abs이었으나, OVA-TS-HA군은 0.072Abs로 감소했으며(P<0.05), IL-5의 레벨은 OVA-control군은 0.358Abs이었으나, OVA-TS-HA군은 0.185Abs로 유의성(P<0.01) 있게 감소했다(Fig. 7, 8, 9.).

Serum에서 IL-4의 레벨은 OVA-control군은 0.312 Abs이었으나, OVA-TS-HA군은 0.054Abs로 매우 유의성(P<0.001) 있게 감소했고, IL-5의 레벨은 OVA-control군은 1.018Abs이었으나, OVA-TS-HA군은 0.269Abs로 유의성(P<0.01) 있게 감소했으며, IL-13의 레벨은 OVA-control군은 0.760Abs이었으나, OVA-TS-HA군은 0.343Abs로 유의성(P<0.01) 있게 감소했다(Fig. 10, 11, 12.).

IgE 항체의 생성에는 항원제시 세포에 의한 항원제시 및 Th 세포의 도움이 필요하다. 우선 항원에 노출되어 생산된 IgE 항체가 비만 세포 표면에 결합하게 되고, 같은 항원에 재노출하게 되면 비만 세포 표면에서 부착된 IgE항체와 항원이 결합하여 비만 세포로부터 histamine 등의 알레르기반응 물질이 방출된다. 또한 IgE는 기생충질환에 있어서 체액면역반응에 중요한 역할을 하며 과민 반응시 염증부위로 백혈구, 항체, 보체 등이 들어갈 수 있도록 하는데 중요한 역할을 하며, 기생충과 야토피성 질환에서는 이러한 IgE가 현저하게 증가한다<sup>19,28,29</sup>.

IL-4는 휴지기의 B 세포를 활성화하여 항원과 반응하기 쉽게 해주고 IgE의 생산에 요구되며 heavy chain isotype으로 B 세포가 전환되는 것을 자극하며, T 세포 특히 Th2 세포에 대한 성장 및 분화 인자이며, VCAM-1 등의 부착 분자의 발현을 자극하여 림프구, 단핵구, 호산구의 결합을 증진하며 IL-3와

상승 작용하여 비만 세포의 성장인자로서의 역할을 한다. IL-5는 호산구의 성장과 분화를 자극하며, 성숙한 호산구로 하여금 기생충을 죽일 수 있도록 활성화 시킨다. 또한 IL-2, IL-4와 함께 B 세포의 분화와 성장을 자극한다<sup>30,31</sup>. IL-13은 활성화된 T 세포에서 합성되는 단백질로 IL-4와 유사하게 대식 세포에서 항염증작용을 하고, B 세포 기능을 조절하는 역할을 하며 호산구의 분화와 생존연장에 관여하여 알레르기 질환에서 중요한 역할을 한다<sup>16,29</sup>.

따라서 본 실험에서 BALF내의 IgE, IL-4, IL-5와 serum내의 IL-4, IL-5, IL-13이 OVA-TS-HA군에서 OVA-control군보다 유의성 있게 분비량이 억제되었다는 것은 瓜蒌仁藥鍼이 喘息으로 인한 염증성 세포의 증식과 활성화가 억제되어 喘息 및 免疫調節에 있어서 효과가 있음을 나타낸다고 할 수 있다.

특히 Serum내의 IL-4는 羌活藥鍼<sup>11</sup>, 桑葉藥鍼<sup>12</sup>, 細辛藥鍼<sup>14</sup>, 沙蔘藥鍼<sup>15</sup>의 연구에 비해 두드러지게 감소했는데, 瓜蒌仁藥鍼이 B 세포의 분화, T 세포의 활성화 및 증식 및 비만 세포의 증식을 촉진하는 IL-4의 분비를 억제하는 작용이 상기한 약물보다 효과적인 것으로 나타났다.

FACS 분석 결과, Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> 세포수는 OVA-control군은 44.4×10<sup>5</sup>이었으나 OVA-TS-HA군은 9.1×10<sup>5</sup>로 감소했고, CD11b<sup>+</sup> 세포수는 OVA-control군은 91.4×10<sup>5</sup>이었으나 OVA-TS-HA군은 20.3×10<sup>5</sup>로 감소했다(Fig. 13.). Gr-1은 granulocyte에 많고, CD11b는 細胞癒着分子(Mac-1)로서, 림프구, 대식 세포의 표면에서 발현되며, 호산구가 표적장기로 流入할 때 內皮細胞와 강하게 유착하여 結核조직으로 流入되는데 Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> 세포와 CD11b<sup>+</sup> 세포의 감소로 볼 때 瓜蒌仁藥鍼이 호산구의 내피 세포 유착에 의한 結核조직으로 유입되는 것을 감소시키는 것으로 사료된다.

CD3e/CCR3<sup>+</sup> 세포수는 OVA-control군은 83.4×10<sup>4</sup>이었으나 OVA-TS-HA군은 19.3×10<sup>4</sup>로 감소했다(Fig. 14.). CD3는 T 세포에서 발현되는 표면분자이며<sup>32</sup>, CCR3는 호산구에서 가장 높게 나타나고, 호염기구, Th2 세포, 喘息환자의 기도 상피세포에서

보이며, 호산구의 활성화와 탈과립화에 관여하는 것으로 보인다<sup>27</sup>. 따라서 瓜蒌仁藥鍼이 호산구수의 감소와 활성화 및 탈과립을 감소시키는 것으로 사료된다.

CD4<sup>+</sup> 세포수는 OVA-control군은 52.8×10<sup>5</sup>이었으나 OVA-TS-HA군은 16.3×10<sup>5</sup>로 감소했으며 CD8<sup>+</sup> 세포수는 OVA-control군은 22.6×10<sup>5</sup>이었으나 OVA-TS-HA군은 6.6×10<sup>5</sup>로 감소했다(Fig. 15.). CD4와 CD8은 모두 세포유착 분자 기능과 세포자극의 전달 등의 두 가지 중요한 기능을 가지는데, 모두 T 세포의 활성화 및 억제를 나타내는 표지가 되는 세포이다. 따라서 本實驗에서의 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 세포수의 감소는 알레르기 반응을 일으키는 면역 세포 중 T 세포의 감소를 나타낸다.

CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포수는 OVA-control군은 36.3×10<sup>5</sup>이었으나 OVA-TS-HA군은 10.9×10<sup>5</sup>로 감소했다(Fig. 16). CD3는 T 세포 決定標識因子로, T림프구 항원 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달하고<sup>19</sup>, CD69는 활성화된 B 세포와 T 세포, 대식 세포, NK 세포에 分布한다<sup>33</sup>. 따라서 瓜蒌仁藥鍼이 T 세포의 활성화를 감소시키는 것으로 사료된다.

이상의 실험결과를 종합하면 瓜蒌仁藥鍼이 T 세포의 활성화를 억제하여 염증유발 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-13의 분비를 감소시켜 B 세포의 활성화와 IgE의 생산을 억제하고, 호산구의 분화와 성장을 억제하여 喘息에 유효한 효과를 나타내므로 향후 瓜蒌仁藥鍼에 대한 임상상 활용을 통한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

瓜蒌仁藥鍼이 Ovalbumin으로 유발된 알레르기 喘息 모델 생쥐에 미치는 영향을 알아보기 위한 In vivo 실험을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 폐의 무게와 총 세포 수를 측정한 결과, 대조군에 비하여 TS-HA 처치군에서 有意하게(각각 P<0.01, P<0.01) 감소하였다.
2. BALF내의 총 leukocyte와 eosinophil을 측정한

결과, 대조군에 비하여 TS-HA 처치군에서 有意하게(각각 P<0.001, P<0.01) 감소하였다.

3. Photomicrographs에서 대조군에서는 호산구가 다량으로 관찰되었으며 TS-HA 처치군에서는 호산구가 현저하게 감소하였다.
4. 폐 조직을 염색하여 관찰한 결과, 대조군에서는 collagen이 조직에 다량으로 부착되어 있는 것이 관찰되었으며 TS-HA 처치군에서는 collagen의 부착이 현저하게 감소하였다.
5. BALF내의 IgE, IL-4, IL-5와 serum내의 IL-4, IL-5, IL-13을 측정된 결과 대조군에 비하여 TS-HA 처치군에서 有意하게(각각 P<0.01, P<0.05, P<0.01, P<0.001, P<0.01, P<0.01) 감소하였다.
6. 폐내의 Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포 수를 측정된 결과, 대조군에 비하여 TS-HA 처치군에서 有意하게 감소하였다.

이상의 결과로 보아 瓜蒌仁藥鍼은 ovalumin으로 유발된 생쥐의 喘息에 유효한 것으로 사료되며 앞으로 이에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

### 參考文獻

1. 전국한의과대학 심계내과학교실 편. 심계내과학. 서울: 서원당; 1999, p.119-28.
2. 李珩九, 鄭昇杞. 東醫肺系內科學. 서울: 아트동방; 1999, p.105-12, 162-5, 187-202.
3. 서울대학교 의과대학 편. 호흡기학. 서울: 서울대학교 출판부; 1994, p.231-7.
4. 강세윤 외 역. 머크매뉴얼 제 17판. 서울: 한우리; 2002, p.602-15.
5. 허준. 동의보감. 서울: 범인문화사; 1999, p.1247-64.
6. 조영민. 加味淸金降火湯 및 加味六味地黃湯이 Allergy 喘息 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 박사학위논문. 2003.

7. 황우석. 기관지천식환자에서 淸上補下湯의 임상적 효과 및 혈중 Cytokine에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 석사학위 논문. 2003.
8. 황우석. 기관지천식 환자에서 加味貝母湯치료에 따른 IgE, 호산구 및 Cytokine의 변화. 대한한방내과학회지 2003;24(4):747-58.
9. 김진주. 麥門冬湯과 定喘化痰降氣湯이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 박사학위논문. 2001.
10. 정욱. 杏仁과 桔梗이 Asthma model 내의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2000;21(1):31-8.
11. 박영수. OVA-induced Asthma Mouse Model을 이용한 羌活藥鍼의 喘息에 관한 影響. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2004.
12. 신성찬. 桑葉藥鍼의 喘息抑制效果에 對한 實驗的 研究. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2004.
13. 김보균. 升麻藥鍼의 喘息 및 免疫에 미치는 實驗的 研究. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2004.
14. 김일구. 細辛藥鍼의 喘息抑制 및 免疫調節效果에 對한 實驗的 研究. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2004.
15. 송민식. 沙蔘藥鍼의 喘息抑制 및 免疫調節效果에 對한 實驗的 研究. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2004.
16. 대한내과학회 해리슨내과학 편집위원회 역. HARRISON'S 내과학. 서울: MIP; 2003, p.1500-8.
17. 전국의과대학 임상교수편. 임상진단학. 서울: 한미의학; 2002, p.392-3.
18. Middleton E, Jr, Ellis EF, Yunginger JW, Reed CE, Adkinson NF, Jr, Busse WW. Allergy principles & practice 5th edition. St. Louis: Mosby; 1998, p838-58.
19. 대한 천식 및 알레르기학회. 천식과 알레르기 질환. 서울: 군자출판사; 2002, p.21-4, 31-44,

- 59-67, 237-56, 279-91.
20. Frigas E, Gleich GJ. The eosinophil and pathology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986;77:527-37.
  21. 이양근. 호산구와 천식. 결핵 및 호흡기질환 1999;46(1):5-16.
  22. 康秉秀 외. 本草學. 서울: 永林社; 1991, p.461-3.
  23. 康秉秀 외. 방제의 체계적 구성을 위한 임상배합본초학. 서울: 永林社; 1994, p.586-8.
  24. 대한약침학회. 약침요법 시술 지침서. 서울: 대한약침학회; 1999, p.17-9, 87.
  25. 대한약침학회. 약침제제와 임상응용 I. 서울: 대한약침학회; 1997, p.1-2.
  26. 新谷太 저, 고윤웅 역. Pathophysiology로 이해하는 내과학 part1 혈액질환. 서울: 정담; 2002, p.69-71, 78-9.
  27. Nicholas W. Lukacs. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nature review: immunology*; 2001, 108-116, 2001.
  28. 新谷太 저 홍세규 역. Pathophysiology로 이해하는 내과학 part7 면역·알레르기질환. 서울: 정담; 2002, p.5-12.
  29. 대한임상병리학회. 임상병리학. 서울: 고려의학; 2001, p.417-22.
  30. 이현철 외. 면역 및 알레르기학. 광주: 전남대학교 출판부; 1999, p.19-29.
  31. 권명상 외. 임상 면역학. 서울: 고려의학; 1998, p.163-77.
  32. Roitt IM. *Roitt's Essential Immunology*. Blackwell Science; 1997 p.95, 201-21, 363-7.
  33. 김세중. 면역학. 서울: 고려의학; 1994, p.3, 8, 25, 26, 28, 31, 32, 134.