

원저

## 足三里 電鍼刺戟이 알러지모델 생쥐의 免疫能에 미치는 影響 및 機轉에 관한 研究

김정신 · 김용석 · 남상수

경희대학교 강남경희한방병원 침구과

### Abstract

#### The Mechanism of Immunomodulatory Effect by Electro-acupuncture in 2,4-Dinitrophenylated Keyhole Limpet Protein Immunized Mice

Kim Jeung-shin, Kim Yong-suk and Nam Sang-soo

Department of Acupuncture & Moxibustion, Kangnam Korean Hospital, Kyung-Hee University

**Objects** : The aim of the study is to investigate the effect of electro-acupuncture (EA) on ST36 to modulate immune reaction in BALB/c mice immunized intraperitoneally with 2,4-dinitrophenylated keyhole limpet protein(DNP-KLH).

**Methods** : Experimental mice were divided into four groups : 1) Normal group was not performed by any operation. 2) IM(Immunized) group was immunized intraperitoneally with DNP-KLH and aluminum hydroxide without electro-acupuncture stimulation. 3) IM-EA(immunized-electro-acupuncture) group was performed by successive electro-acupuncture on the ST36 acupoint after immunization. 4) IM-NA(immunized-naloxone) group was performed by immunization and electro-acupuncture with same method, but naloxone was injected intraperitoneally 30 minutes before electro-acupuncture to inhibit the opiate receptor in spleen. Serum total immunoglobulin E(IgE) and antigen-specific IgE was measured in each group. The expression of interferon- $\gamma$  and interleukin-4 mRNA in spleen was researched by real-time RT-PCR.

**Results** : Serum total-IgE and antigen-specific IgE were significantly decreased only in IM-EA group. The expression of interleukin-4 in spleen cell was significantly reduced not only in IM-EA group, but also in IM-NA group.

- 접수 : 2005년 1월 22일 · 수정 : 2005년 5월 14일 · 채택 : 2005년 5월 14일  
· 교신저자 : 김정신, 서울특별시 강남구 대치2동 994-5 경희대학교 강남경희한방병원 의사실  
Tel. 02-3457-9180 Fax. 02-3457-9111 E-mail : hanimind@nate.com

**Conclusions** : Above results indicate that the mechanism of immunomodulatory effect of electro-acupuncture is related to opioid system especially in B-cell immune reaction. Further research on the T-cell immunity is necessary to explain the mechanism of immunomodulatory effect of electro-acupuncture.

**Key words** : Electro-acupuncture, DNP-KLH, Th2, IgE, Opioid system

## I. 緒 論

면역(Immunity)이란 생체가 자기와 비자기를 구별하여 외부로부터 침입하는 미생물, 동종의 조직 또는 체내에 생긴 불필요한 산물 등과 특이하게 반응하는 항체를 생산하여 이를 통해 외부물질과 체내 부산물을 제거하여 그 개체의 항상성을 유지하는 현상이다<sup>1)</sup>.

한의학적으로는 『黃帝內經』의 《素問·上古天眞論》<sup>2)</sup>에 “眞氣從之, 精神內守, 病安從來”, 《靈樞·百病始生篇》<sup>3)</sup>에 “風雨寒熱, 不得虛, 邪不能獨傷人”, 《素問·刺法論》<sup>2)</sup>에 “正氣存內, 邪不可干”, 《素問·評熱病論》<sup>2)</sup>에 “邪氣所湊, 其氣必虛”라 하여 질병은 인체의 正氣와 病邪가 서로 다투는 과정이며, 正氣가 虛弱하면 邪氣가 그 틈을 타서 침범하여 질병이 발생하게 되는 내적 근거가 된다고 하였다. 이에 침 치료는 《靈樞·刺節眞邪篇》<sup>3)</sup>에 “用鍼之類 在於調氣”, 《素問·寶命全形論》<sup>2)</sup>에 “凡刺之眞, 必先治神”이라 하여 調氣治神의 과정을 통해 補虛瀉實의 방법으로 생체의 각 기관 조직의 正氣를 강화시키고 외부에 대한 면역기능을 증강시켜 항상성을 유지하게 한다<sup>4)</sup>.

침의 알러지 억제 효과는 현대 과학적으로도 입증되어 알러지성 비염 및 천식<sup>5)</sup>에 대한 임상적 효과가 인정되고 있으며, 실험적으로도 interferon- $\gamma$ 와 interleukin-2 분비의 증가 그리고  $\beta$ -endorphin의 분비 증가에 의한 natural killer(NK) cell 활성의 증강 등<sup>6-7)</sup>이 밝혀졌다. 또한 박 등<sup>8)</sup>은 알러지 반응의 주요기전으로 주목받고 있는 T helper cell의 분화에 영향을 미치

는 cytokine 발현 변화에 대해 연구하여 침의 IgE 생산조절 및 TH1/TH2 평형조절능을 보고한 바 있다. 그러나 현재까지의 연구는 cytokine level에만 머물러 그 상위기전에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다.

침의 작용기전에 대한 연구는 진통효과에 치우쳐 침의 진통기전에 대해서는 opioid peptide, 특히 met-enkephalin에 의한 하행성 통각 조절을 통해서 이루어지는 것으로 알려지고 있다<sup>9-10)</sup>. 일부 연구에서 침의 진통작용이 면역조절 작용과도 관련된 것으로 보고<sup>11)</sup>하고 있어 침의 면역조절 효과의 기전과 진통기전이 연관되어 있을 것으로 보고 침의 항염증작용과 opioid system과의 관계를 연구한 보고<sup>12-13)</sup>는 있었으나 아직 알려지지 않은 모델을 대상으로 침의 면역조절 기전과 opioid system의 연관성에 대해 연구한 보고는 없다.

이에 본 연구에서는 전침자극이 면역계의 TH1/TH2 분화평형에 미치는 영향과 opioid system과의 관계를 알아보고자 2,4-dinitrophenylated keyhole limpet protein (DNP-KLH)의 자극을 통해 immunoglobulin E(IgE) 매개 알러지 반응모델을 구축하고, 足三里에 전침자극과 opioid receptor antagonist인 naloxone을 이용한 차단을 시행한 후 혈청 total immunoglobulin E(IgE), antigen-specific IgE의 증감을 측정하고 Real time Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (real-time RT-PCR)을 통해 interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) 및 interleukin-4(IL-4) mRNA 발현량의 변화를 조사한 결과 유의한 성적을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 實驗動物

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 8주된 BALB/c 암컷 마우스(샘타코 코리아(주), Korea)이며 멸균환경에서 관리되어 온 것을 이용하였다. 사료는 방사선 멸균 처리한 실험동물용 사료(퓨리나(주), Korea)를 공급하였으며 飲用水는 멸균 처리한 증류수를 사용하였다. 사료와 飲用水는 충분히 공급하면서 사육하였고 사육시설은 일반적인 조명과 22±1℃의 온도 및 55±5%의 습도를 유지시켰다.

### 2. 實驗群 設定

實驗動物은 각각 正常群(Normal group), 對照群(Control group, Immunized group, IM group), 電鍼群(Immunized-electroacupuncture group, IM-EA group), Naloxone群(Immunized-naloxone group, IM-NA group)으로 분류하였다.

1) 正常群(Normal group) : 실험시작 7일째 되는 날부터 실험종료일까지 100ul phosphate-buffered saline(PBS; Invitrogen Life Technologies Inc., U.S.A.) 복강 주사를 시행하고, 침자극 없이 20분간 아크릴 홀더에 넣어 홀더 스트레스만 준 군

2) 對照群(IM group) : 실험시작 첫날 및 7일째 되는 날 모두 2회에 걸쳐 4ug의 DNP-KLH(Calbiochem, U.S.A.)와 4mg의 aluminum hydroxide(Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 복강 주사하여 면역화 한 후, 실험종료일까지 100ul PBS 복강 주사를 시행하고, 침자극 없이 20분간 아크릴 홀더에 넣어 홀더 스트레스만 준 군

3) 電鍼群(IM-EA group) : 對照群과 같은 방법으로 면역화 후, 실험 7일째부터 실험종료일까지 매일 100ul PBS 복강주사 및 매일 20분씩 아크릴 홀더에 넣은 상태에서 電鍼刺戟을 준 군

4) Naloxone群(IM-NA group) : 對照群과 같은 방법으로 면역화 후, 실험 7일째부터 실험종료일까지 매일 실험동물 무게 kg 당 3mg의 naloxone(Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 복강주사하고 30분 뒤 電鍼群과 같은 電鍼刺戟을 준 군

### 3. 電鍼刺戟

Yu<sup>6)</sup>의 방법에 따라 아크릴 홀더에 넣은 상태에서 멸균된 stainless still 호침(diameter 0.25mm, length 30mm, Dong Bang Acupuncture Co., Korea)으로 骨度分寸法에 준하여 인체의 足陽明胃經 足三里에 상응하는 부위<sup>14)</sup>와 足三里 下 5mm 부위를 兩極性으로 刺針한 후 전침자극기(PG-6,

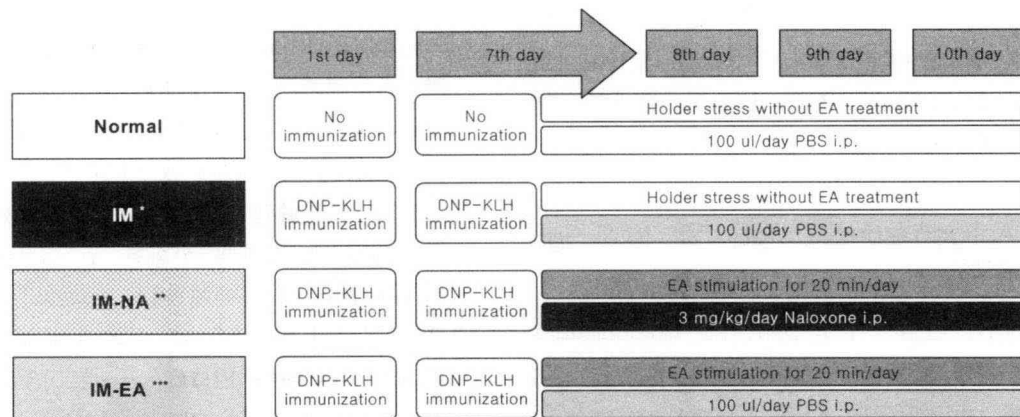


Fig. 1. Experimental schedule

Normal : Non-immunized group

\* IM(control) : Immunized only group

\*\* IM-NA : Immunization with naloxone i.p. injection before electro-acupuncture group

\*\*\* IM-EA : Immunization with electro-acupuncture group

Ito Co., Japan)를 사용하여 3-5V 전압, 지속시간 0.25msec, 2Hz의 저주파로 자극하되 전침강도는 근육의 수축이 육안으로 확인되는 정도의 세기로 전압을 조정하였다.

실험 일정은 다음과 같다(Fig. 1).

#### 4. DNP-KLH immunization, serum 및 비장의 적출

Normal군을 제외한 모든 군은 실험 개시일 및 7일째 되는 날 2회에 걸쳐 4 $\mu$ g의 DNP-KLH와 4mg의 aluminum hydroxide를 복강 주사하였다. 2회째의 immunization 직후부터 각 군별 처치를 시행하고 실험시작 10일째 되는 날 각 군의 생쥐를 희생시켜 그 serum을 추출하여 -20°C 냉동실에 보관한 후 total IgE 및 antigen-specific IgE를 측정하였다. 또한 희생 직후 비장을 적출하여 재빨리 액체질소에서 동결시켜 -80°C deep freezer에 보관 후 real-time RT-PCR에 이용하였다.

#### 5. DNP-KLH의 biotinylation

Biotinylation될 DNP-KLH를 100mM HEPES(Sigma-Aldrich, U.S.A.)에 10mg/ml 농도로 녹인 후 labeling을 위해서 40 $\mu$ l의 25mg/ml biotin N-hydroxysuccinimide ester (Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 1ml의 DNP-KLH 용액에 첨가하여 2시간 동안 상온에서 stirring을 통하여 혼합하였다. 이후 10mg의 glycine(Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 첨가하여 반응을 중단시켰고, biotylated protein을 2L의 PBS를 통하여 3번 dialysis하였다.

#### 6. Antigen-specific IgE 및 total IgE assay

Serum은 실험시작 10일째(최종 immunization 후 4일째)에 군별로 추출하였으며 측정 시까지 -20°C에 보관하였다. 혈청 중 antigen-specific IgE level은 ELISA에 의해 측정되었다. 먼저 anti-mouse IgE(BD Bioscience, U.S.A.)를 100 $\mu$ l/well로 microplate(Costar, U.S.A.)에 코팅

한 후 4°C에서 9시간 동안 incubation하였으며 이후 Pharmingen's Assay Diluent(BD Bioscience, U.S.A.)로 1시간동안 incubation함으로써 washing 및 blocking하였다. 농도별로 희석된 mouse anti-DNP IgE mAb(SPE-7, standard; BD Bioscience, U.S.A.) 및 serum sample을 100 $\mu$ l/well 분량으로 넣은 후 2시간 동안 상온에서 incubation하였다. 다시 washing 과정을 거친 후 biotinylated DNP-KLH-avidin -HRP conjugate(BD Bioscience, U.S.A.)를 각 well에 넣고 1시간 동안 상온에서 incubation하였다. 다시 washing 후 100 $\mu$ l의 tetramethylbenzidine 및 hydrogen peroxide (Pharmingen's TMB Substrate Reagent set, BD Bioscience, U.S.A.)를 각 well에 넣은 후 50 $\mu$ l의 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 반응을 중지시키고 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, U.S.A.)를 이용하여 450 및 570nm의 파장에서 효소활성을 측정하였다. 혈중 total IgE level은 OptEIA calibrated(BD Bioscience, U.S.A.)를 이용하여 BD Bioscience에서 제공하는 사용자 매뉴얼의 프로토콜에 따라 측정하였다.

#### 7. Real-time RT-PCR을 이용한 b cytokine 발현 측정

##### 1) Total RNA 분리

실험방법 4.과 같이 적출된 비장에서 trizol solution(Invitrogen Life Technologies, U.S.A.)을 이용, 제조사의 protocol에 준하여 total ribonucleic acid(total RNA)를 분리하였다.

세포침전물은 pellet pestle을 이용하여 균질화하였다. 균질화된 용액에 500 $\mu$ l의 trizol solution을 첨가하고 가볍게 선회한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 이 용액에 다시 100 $\mu$ l의 chloroform을 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 3분간 반응시킨 다음 4°C에서 12,000 × g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 여기에 250 $\mu$ l의 iso-propanol을 첨가하여 10분간 실온에서 반응시켰다가 다시 4°C에서 12,000 × g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후

pellet을 500 $\mu$ l의 75% ethanol로 세척한 후 4 $^{\circ}$ C에서 7,500  $\times$  g로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 pellet을 건조하여 50 $\mu$ l의 diethyl pyrocarbonate(DEPC, Calbiochem, San Diego, U.S.A.) 처리 증류수에 RNA를 녹인 다음 spectrophotometer(DU500, Beckman Instruments Inc., Fullerton, U.S.A.)를 이용하여 정량하였다.

### 2) cDNA의 합성

Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA)의 합성은 M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, U.S.A.)을 이용하여 제조사의 protocol에 준하여 실시하였다.

2.5 $\mu$ g의 total RNA에 1.1 $\mu$ l의 10  $\times$  DNase I Reaction buffer, 1 $\mu$ l의 1Unit/ $\mu$ l DNase I(Invitrogen Life Technologies, U.S.A.)를 첨가하고 DEPC 처리 증류수를 넣어 반응액이 11 $\mu$ l가 되게 한 후 실온에서 15분간 배양하여 오염되었을지 모를 DNA를 제거하였다. 반응 후 1 $\mu$ l의 반응액을 따로 분리하여 두고 후에 DNA가 남아있는지 확인하기 위하여 PCR 반응을 하였다.

10 $\mu$ l의 반응액에 1 $\mu$ l의 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l Oligo(dT) 12-18 primer(Invitrogen Life Technologies, U.S.A.)를 첨가하고 70 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응시킨 후 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다.

반응액에 4 $\mu$ l의 5  $\times$  first strand buffer, 1 $\mu$ l의 10mM each dNTPs, 2 $\mu$ l의 0.1 M Dithiothreitol, 1 $\mu$ l의 200U/ $\mu$ l M-MLV Reverse Transcriptase, 0.5 $\mu$ l의 40U/ $\mu$ l RNase inhibitor (이상 Invitrogen Life Technologies, U.S.A.), 5.5  $\mu$ l DEPC 처리 증류수를 첨가하여 최종 부피를

20 $\mu$ l로 만들고 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 배양하여 single strand cDNA를 합성하였다. 반응이 끝난 반응액은 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양하여 효소를 불활성화 하였다.

### 3) cDNA의 Real-time PCR 반응

각각의 특이 유전자 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 Real-time PCR을 실시하였다.

1 $\mu$ l의 cDNA에 12.5 $\mu$ l의 2  $\times$  SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, U.K.), 각각 1.5 $\mu$ l의 5 $\mu$ M sense, antisense primer(Genotech Co., Korea), 8.5 $\mu$ l의 증류수를 넣어 25 $\mu$ l가 되게 한 후 GeneAmp<sup>®</sup> 5700 Sequence Detection System(PE Biosystems, U.K.)에서 PCR하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 최초 denaturation한 후 95 $^{\circ}$ C 15초, 60 $^{\circ}$ C 60초를 40회 반복하였다.

GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), IL-4(Interleukin-4), IFN- $\gamma$ (Interferon-gamma) 유전자의 primer sequence는 Table I과 같다.

cDNA는 각각 1, 1/10, 1/100로 serial dilution한 후 각 농도 당 3개씩 PCR하여 평균값을 사용하였다. 각 반응액의 amplification이 역치에 도달한 Cycle number(Ct)를 기준으로 표준곡선을 그려서 정량하였고, 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 표준화하였다.

PCR 반응의 종료 후 60-95 $^{\circ}$ C 사이에서의 온도별 신호를 측정하여 해리곡선을 작성하였다.

### 8. 통계처리

본 연구에서 Data는 mean $\pm$ S.D.(standard deviation)으로 표시하였다. 모든 실험 결과의 유

Table 1. Sequence of Primers Used for Real-time RT-PCR

Gene	Oligonucleotide sequence	
GAPDH	RV	5'- GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA -3'
	FW	5'- TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC -3'
IL-4	FW	5'- ACA GGA GAA GGG ACG CCA T -3'
	RV	5'- GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA -3'
IFN- $\gamma$	FW	5'- TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA -3'
	RV	5'- TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG -3'

의성 평가는 one-way ANOVA를 시행하였으며, 이에 P value가 0.05 이하인 경우 Dunnett's multiple comparison test를 통하여 사후검증을 수행하였다. RT-PCR결과의 선형회귀분석을 포함한 모든 통계처리는 GraphicPad PRISM 3.02(GraphicPad software Inc., U.S.A.)를 이용하였다.

### III. 結 果

#### 1. Total IgE assay 결과

두 번째 DNP-KLH를 주입한 후 4일째 되는 날 total IgE level을 측정된 결과, 定常群은 3724.8±123.11, 對照群은 6323.2±292.96, Naloxone群은 6061.8±742.89, 電鍼群은 3091.5±2366.95(이상 ng/ml)로서 定常群에 비해 對照群의 IgE level이 유의하게 상승하였으며(P=0.024), 對照群에 비해 Naloxone群은 차이가 없었으나 電鍼群은 유의한 감소(P=0.029)를 보였다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Total IgE Production from Serum in DNP-KLH Mice

Group	IgE production(ng/ml)
Normal	3724.8±123.11
IM	6323.2±292.96#
IM-NA	6061.8±742.89
IM-EA	3091.5±2366.95*

The amounts of total IgE in serum was measured by ELISA. Data shown as mean±S.E.M.(n=5). Statistical analysis was by one-way ANOVA followed by a post hoc test(Dunnett's multiple comparison test); \*, P=0.029 for IM-EA group vs IM group; #, P=0.024 for IM group vs Normal group  
 Normal : Non-immunized group  
 IM : Immunized only group  
 IM-NA : Immunization with naloxone i.p. injection before electro-acupuncture group  
 IM-EA : Immunization with electro-acupuncture group

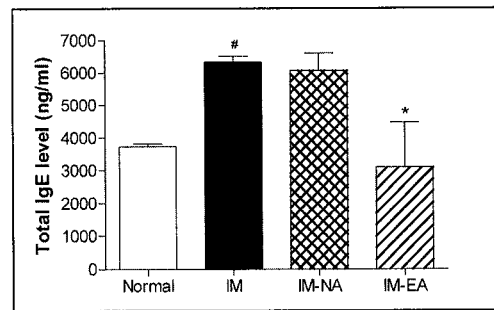


Fig. 2. Total IgE production from serum in DNP-KLH mice.

The amounts of total IgE in serum was measured by ELISA. Data shown as mean ±S.E.M.(n=5). Statistical analysis was by one-way ANOVA followed by a post hoc test(Dunnett's multiple comparison test); \*, P=0.029 for IM-EA group vs IM group; #, P=0.024 for IM group vs Normal group  
 Normal : Non-immunized group  
 IM : Immunized only group  
 IM-NA : Immunization with naloxone i.p. injection before electro-acupuncture group  
 IM-EA : Immunization with electro-acupuncture group

#### 2. Antigen-specific IgE assay 결과

Antigen-specific IgE level을 측정된 결과, 定常群은 393.5±2.85, 對照群은 596.0 ±59.51, Naloxone群은 607.0±75.94, 電鍼群은 282.2± 248.71(이상

Table 3. Antigen-specific IgE Production from Serum in DNP-KLH Mice

Group	Antigen-specific IgE production (ng/ml)
Normal	393.5±2.85
IM	596.0±59.51
IM-NA	607.0±75.94
IM-EA	282.2±248.71*

The amount of antigen-specific IgE in serum was measured by ELISA. Data shown as mean ±S.E.M.(n=5); \*, P=0.045 for IM-EA group vs IM group  
 Normal : Non-immunized group  
 IM : Immunized only group  
 IM-NA : Immunization with naloxone i.p. injection before electro-acupuncture group  
 IM-EA : Immunization with electro-acupuncture group

ng/ml)로서 定常群에 비해 對照群의 antigen-specific IgE level이 상승하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었으며, 對照群에 비해 Naloxone群은 차이가 없었으나 電鍼群에서는 유의하게 감소하였다(P=0.045)(Table 3, Fig. 3).

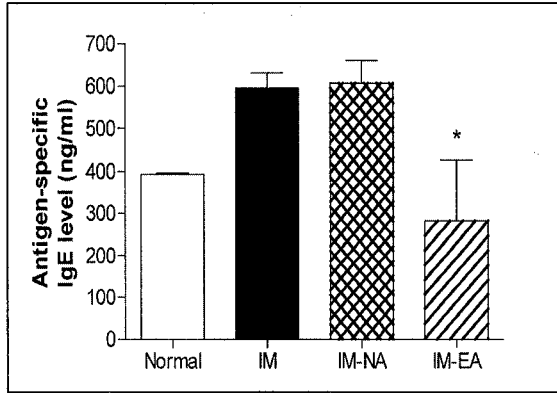


Fig. 3. Antigen-specific IgE production from serum in DNP-KLH mice.

The amount of antigen-specific IgE in serum was measured by ELISA. Data shown as mean  $\pm$  S.E.M.(n=5); \*, P=0.045 for IM-EA group vs IM group

- Normal : Non-immunized group
- IM : Immunized only group
- IM-NA : Immunization with naloxone i.p. injection before electro-acupuncture group
- IM-EA : Immunization with electro-acupuncture group

### 3. Real-time RT-PCR 결과

두 번째 DNP-KLH를 주입한 후 4일째 되는 날 과민반응의 감퇴에 전침자극이 미치는 영향을 확인하기 위해 각 군의 실험동물의 비장에서 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 real-time PCR함으로써 유전자의 발현량의 평가한 결과는 다음과 같다.

#### 1) GAPDH

각각의 유전자의 발현량을 normalization하기 위하여 internal control로써 사용된 GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct(Cycle number)값을 기준

으로 standard curve를 작성하였다. Data의 선형 회귀분석결과 R<sup>2</sup>는 0.9966으로 나타나 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다(Fig. 4).

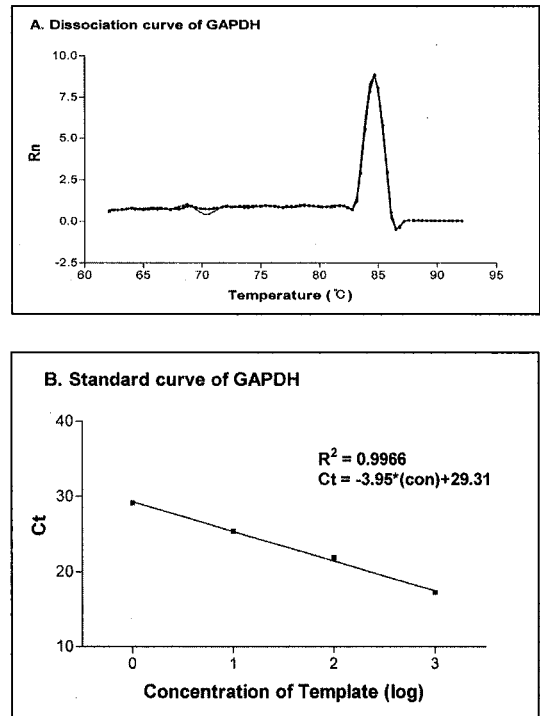


Fig. 4. Dissociation and standard curve of GAPDH as internal control

- A: After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 60 to 93°C was detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer; Rn, Replica numbers
- B: Serially diluted cDNA(1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers(Ct) of each concentration were used to make standard curve.

#### 2) IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$  유전자에 대한 real-time PCR 결과, dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며, 농도별 Ct값의 선형회귀분석결과 R<sup>2</sup>는 0.9928로 나타나 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다(Fig. 5-1).

Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample별 IFN- $\gamma$  유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다. 각 群 간의 차이는 통계학적으로 유의하지 않았다(Table 4, Fig. 5-2).

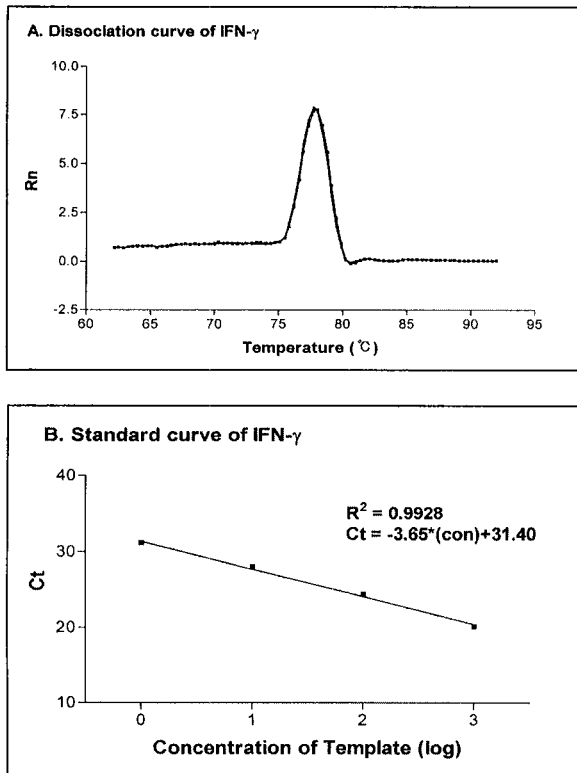


Fig. 5-1. Dissociation and standard curve of IFN-γ

A: After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 60 to 93°C was detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer.

B: Serially diluted cDNA(1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers(Ct) of each concentration were used to make standard curve.

Table 4. Expression Level of IFN-γ

Group	IFN-γ/GAPDH (%)
Normal	100.0±96.70
IM	127.0±14.85
IM-NA	144.5±126.14
IM-EA	354.6±172.67

Each amount of mRNA was normalized with respective amount of GAPDH. Data shown as mean±S.E.M.(n=5). There is no significant difference between each group.

Normal : Non-immunized group

IM : Immunized only group

IM-NA : Immunization with naloxone i.p. injection before electro-acupuncture group

IM-EA : Immunization with electro-acupuncture group

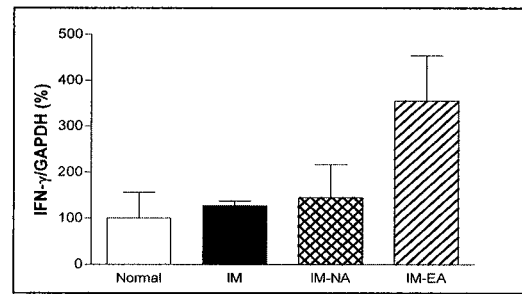


Fig. 5-2. Expression level of IFN-γ

Each amount of mRNA was normalized with respective amount of GAPDH. Data shown as mean±S.E.M.(n=5). There is no significant difference between each group.

Normal : Non-immunized group

IM : Immunized only group

IM-NA : Immunization with naloxone i.p. injection before electro-acupuncture group

IM-EA : Immunization with electro-acupuncture group

### 3) IL-4

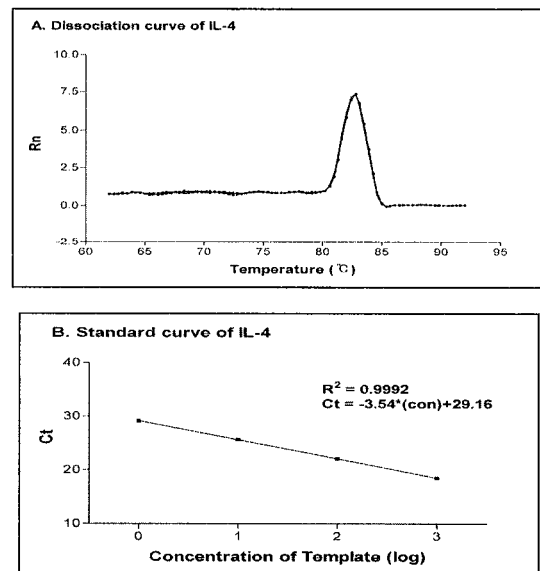


Fig. 6-1. Dissociation and standard curve of IL-4

A: After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 60 to 93°C was detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer.

B: Serially diluted cDNA (1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers(Ct) of each concentration were used to make standard curve.



IL-4 유전자에 대한 real-time PCR 결과, dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct값의 선형회귀분석결과 R<sup>2</sup>는 0.9992로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다(Fig. 6-1).

Table 5. Expression Level of IL-4

Group	IL-4/GAPDH (%)
Normal	100.0±70.15
IM	402.8±42.96###
IM-NA	167.2±47.01**
IM-EA	82.9±73.14***

Each amount of mRNA was normalized with respective amount of GAPDH. Data shown as mean±S.E.M.(n=5). \*\*, P=0.003; \*\*\*, P=0.000 vs IM group; ###, P=0.000 vs Normal group.

Normal : Non-immunized group

IM : Immunized only group

IM-NA : Immunization with naloxone i.p. injection before electro-acupuncture group

IM-EA : Immunization with electro-acupuncture group

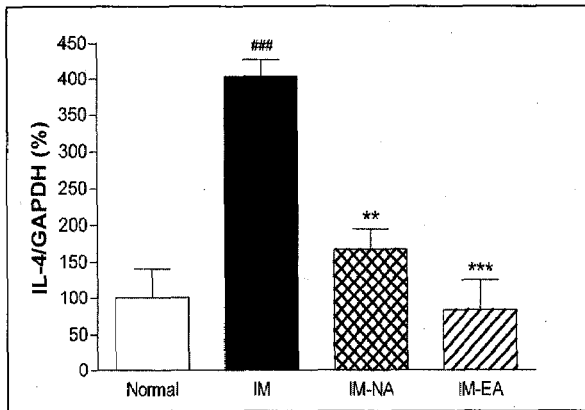


Fig. 6-2. Expression level of IL-4

Each amount of mRNA was normalized with respective amount of GAPDH. Data shown as mean±S.E.M.(n=5). \*\*, P=0.003; \*\*\*, P=0.000 vs IM group; ###, P=0.000 vs Normal group.

Normal : Non-immunized group

IM : Immunized only group

IM-NA : Immunization with naloxone i.p. injection before electro-acupuncture group

IM-EA : Immunization with electro-acupuncture group

Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample별 IL-4 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다. IL-4 유전자의 발현량은 正常群에 비해 對照群에서 유의하게 상승하였으며(P=0.000), 對照群에 비해 電鍼群(P=0.000)과 Naloxone群(P=0.003)에서 유의하게 감소하였다(Table 5, Fig. 6-2).

#### IV. 考 察

刺鍼의 작용 원리에 대해 『黃帝內經』의 《靈樞·刺節眞邪篇》<sup>3)</sup>에 “用鍼之類 在於調氣”, 《素問·寶命全形論》<sup>2)</sup>에 “凡刺之眞, 必先治神”이라 하여 臟腑에 絡屬된 經絡 위의 經穴을 자극함으로써 氣를 다스려 經絡과 臟腑의 氣血陰陽을 조절하여 불균형을 해소하는데 있다고 하였다. 즉 침의 調氣작용에 의해 특정부위인 經穴에 대한 침자극이 국소 부위에 한정되지 않고 全身적이고 계통적인 작용과 치료효과를 가져오게 되어 통증의 원인이 되는 氣血의 불균형을 해소하므로 국소의 통증뿐만 아니라 많은 내상 질환에도 응용된다. 刺鍼의 효과에 영향을 미치는 주요 요소인 氣至 또한 氣를 조절하는 것이 얼마나 중요한가를 보여주고 있다.

면역 반응의 과정에서 naive CD4<sup>+</sup> T cell은 cytokine의 발현양상에 따라 크게 TH1과 TH2 cell로 분화되는데, 이 TH1/TH2 세포반응의 불균형이 알리지성 면역반응을 일으키는 주요 원인으로 지적되고 있다. TH1 세포는 세포매개성 면역반응과 관련이 있으며 주로 IL-2, IFN-γ, TNF-β 등을 생산하고, TH2 세포는 체액성 면역반응과 관련이 있고 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 및 IL-10 등의 cytokine을 분비한다. 이 중 IL-4는 TH2 specific cytokine으로서 항체생산을 자극하는데 특히 IgE의 생산과 연관이 있다고 보고<sup>15)</sup>되고 있어 TH2 cytokine의 발현량의 증가는 알리지성 반응을 초래하는 것으로 보인다. 따라서 알리지성 질환에 대한 침의 효과 연구는 주로 이러한 cytokine을 위주로 이루어져 IFN-γ와

IL-2 분비의 증가 그리고  $\beta$ -endorphin의 분비 증가에 의한 natural killer(NK) cell 활성의 증강 등<sup>6,7)</sup>이 보고되었다. 특히 박 등<sup>8)</sup>은 DNP-KLH로 알러지 반응을 유발시킨 생쥐모델에서 전침자극 후 IL-4와 IL-13 등 TH2-specific cytokine의 분비가 줄어들며 이것이 total IgE와 항원특이 IgE의 생산을 억제하는 역할을 한다고 보고하였다. 이러한 침의 TH1/TH2 세포반응의 불균형에 대한 조절 작용은 질병을 陰陽의 平衡調節의 불균형으로 파악하고 근본적인 질병으로부터의 예방·치료적인 방법으로서 體内の 氣血津液 및 陰陽의 평형조절을 중시하는 한의학적인 관점과도 일치한다<sup>16)</sup>.

뇌하수체는 침의 효과를 나타내는데 있어 중추로 작용하는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 침자극이 중추신경계, 특히 hypothalamus에서의 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 연구<sup>17)</sup>가 활발히 이루어지고 있으나, 이러한 연구의 어려움은 특정 병태 모델이 유발된 상태에서 침자극에 의한 치료 효과와 유전자 발현을 확인하는 연구가 동시에 이루어져야 한다는 데 있다. 기능성 자기공명영상을 이용한 몇 가지 연구<sup>18-20)</sup>에 따르면 경혈에 침 자극을 가했을 때 hypothalamus의 조영이 증강되거나 비경혈점을 자극하였을 때는 이러한 반응이 나타나지 않았다고 한다. 시상하부 병변이 있을 경우 침에 의한 진통이 일어나지 않는다<sup>21)</sup>는 사실 또한 침의 작용 기전에 있어 시상하부가 중추로서의 역할을 함을 강력하게 시사한다. 따라서 침의 진통작용의 기전으로 시상하부-뇌하수체-부신축(HPA axis)이론<sup>22)</sup>이 대두되게 되었다. 이는 국소부위의 침자극이 중추신경계와 부신피질의 HPA axis를 통해 내인성 아편양 물질을 분비시킴으로써 신체 homeostasis에 중요한 역할을 한다는 것으로, 특정 經穴의 刺鍼으로 體内の 氣血循環을 조절함으로써 질병을 치료한다는 한의학 이론과 상당히 유사하다.

침의 진통작용은 면역 조절 작용과도 관련된 것으로 보고<sup>11)</sup>되어 침의 면역조절 작용도 이와 같은 기전을 이용할 것으로 추측된다. 또한 최근 Buske-Kirschbaum 등<sup>23)</sup>은 hypothalamus-pituitary-adrenal(HPA) axis가 스트레스 상황

하에서 알러지성 질환의 심화 및 비정상적인 면역 반응을 유도할 수 있다는 사실을 보고하였고, norepinephrin과 dexamethaxone 등의 HPA 치료와 관계있는 주요 호르몬이 TH2로의 분화를 선택적으로 유도한다<sup>24)</sup>는 연구결과도 있어 면역조절 작용 또한 이와 관련이 있을 것으로 추측할 수 있다. 그러나 현재까지 알러지성 질환에 있어서 침의 효과기전과 HPA axis의 관련성에 대한 연구는 없었으며, 다만 capsaicin 유발 부종에 대한 항염증작용에 대한 실험적 연구에서 전침의 항염증 작용이 naloxone에 의해 반전됨을 보고<sup>12)</sup>하여 전침의 면역 억제작용 중 일부는 HPA axis 및 opioid system과 관련이 있을 것으로 사료된다.

이에 본 연구에서는 이미 보고된 침의 알러지 질환에 대한 면역조절작용<sup>8)</sup>을 토대로 그 작용기전이 뇌하수체의 아편양 물질의 분비와 관련되어 있는지 확인하기 위해 동일한 protocol을 사용하여 電鍼刺戟을 가하고, 면역의 중추인 비장에 naloxone을 투여하여 그 작용이 반전되는지를 확인하였다.

본 연구에서 이용한 足三里는 足陽明胃經의 合穴로 調氣血, 補虛弱, 鎮痙止痛, 調理脾胃, 調中氣, 疏風化濕, 通調經絡氣血, 扶正培元, 祛邪防病하는 효능을 지녔으며<sup>25)</sup> 진통 및 면역과 관련된 기존 실험연구에서 사용된 바 있어 본 연구에서도 활용되었다.

Naloxone은 opioid receptor antagonist로 중추신경계에서 opioid receptor에 대해 경쟁적 길항제로서 작용하며, 특히  $\mu$  opioid receptor에 높은 친화성을 가지고 있고 이외  $\kappa$  및  $\delta$  opioid receptor에도 친화력이 높은 것으로 알려져 있다<sup>26)</sup>. 또한 naloxone과 면역능과의 관계에 관한 일부 연구보고에서 naloxone이 스트레스에 의해 저하된 NK cell 및 lymphocyte의 증식능을 역전시키거나<sup>27-28)</sup> TH2 편향상태에서 TH1 cytokine 생산을 증가시키고 TH2 cytokine 생산을 감소시킨다고<sup>29)</sup>하여 opioid system이 면역기능과 관련하여서도 중요한 역할을 하고 있다는 것을 알 수 있다. 그러나 알러지 반응으로 인한 과도한 IgE의 생산 및 TH2 편향 상태 모두에 대한 전침자극의 면역조절 효과와 opioid system과의 연관관계에 관하여는 아직

까지 학계에 보고된 바가 없어 본 실험에 이용하였다.

먼저 total IgE level을 측정한 결과, 正常群에 비해 對照群의 IgE level이 상승하였으며, 電鍼群은 對照群에 비해 유의한 감소( $P < 0.05$ )를 보였으며 antigen-specific IgE level에서도 동일한 결과를 확인할 수 있었다. IgE는 알러지 반응의 주요 매개인자이므로 이러한 결과는 전침자극이 DNP-KLH 주입으로 인한 알러지 반응의 유발에 대한 유의한 억제능을 가지고 있다는 사실을 증명한 결과라 하겠다. 또한 naloxone투여 후 전침자극을 시행한 Naloxone群의 IgE level은 알러지만을 유발한 對照群과 유의한 차이를 보이지 않음으로서 opioid receptor가 전침자극으로 유발된 알러지 반응 억제능과 밀접한 연관을 가지며, 특히 전침의 면역학적인 효과가 opioid system을 통하여 이루어질 가능성을 시사한다.

TH1/TH2 평형조절에 대한 전침자극과 opioid system과의 관계를 확인하기 위해 IFN- $\gamma$  및 IL-4 mRNA 발현량을 측정한 결과, TH1 specific cytokine인 IFN- $\gamma$  mRNA의 발현량에서는 電鍼群 및 Naloxone群 모두 증가하는 경향성만을 확인할 수 있었을 뿐 유의한 차이는 없었으나, TH2 specific cytokine인 IL-4 mRNA 발현량에서는 두 群 모두에서 유의한 감소( $P < 0.05$ )가 확인되었다. 이는 박 등<sup>8)</sup>의 연구결과와 일치하는 것으로 전침자극이 TH2 cytokine 편향상태에 대하여 강력한 면역조절능을 가지는 것을 유전자 수준에서도 확인할 수 있었다.

電鍼群 뿐 아니라 Naloxone群에서도 IL-4 mRNA의 발현량이 유의하게 감소한 것에 대해서는 여러 가지 추측이 가능하다. 침의 진통효과가 나타나는 기전에 대한 연구에서 일부에서는 naloxone에 의해 침의 효과가 반전되었으나<sup>30-32)</sup> 그렇지 않은 경우도 많이 보고되고 있어<sup>33-34)</sup> 전침자극에 의한 효과 중 일부는 opioid 비의존성 경로를 통해서 일어나는 것으로 생각된다. 특히 면역과 관련하여 침의 함염증 작용의 일부도 이러한 opioid 비의존성 경로를 통해 일어난다는 보고<sup>13)</sup>도 있다. 그러나 전침자극 뿐 아니라 naloxone도 TH1/TH2 평형에 관여한다는 사실이 보고<sup>29)</sup>됨에 따라 이러한 반응이 naloxone 자

체의 약리작용에 의한 것인지 혹은 전침자극의 TH1/TH2 평형조절능이 opioid 비의존성 경로를 통하기 때문인지는 확신할 수 없으며 추후 더 심도있는 연구가 필요할 것이다.

종합하여 보면, 전침자극은 알러지 반응으로 유발된 과도한 IgE 생산에 관하여 opioid system, 즉  $\beta$ -endorphin 계열의 opioid peptide 등을 활성화하는 과정을 통하여 강력한 억제능을 발휘하며, 이러한 작용은 이미 알려진 침자극에 의한 진통효과의 기전과 동일하게 hypothalamus의 직접적인 영향을 통한 HPA 반응의 조절을 통하여 이루어지는 것으로 추정된다. 그러나 전침이 미치는 T helper cell 분화에 대한 효과는 opioid system에 의존하지 않는 것으로 보인다. 추후 전침자극이 면역세포 표면 혹은 내부의 opioid receptor 발현에 미치는 영향 등 세부기전에 관한 보다 심도있는 연구를 통하여 침자극의 면역조절 기전의 규명이 가능하리라 사료된다.

## V. 結 論

본 연구에서는 전침자극이 면역계의 TH1/TH2 분화평형에 미치는 영향과 opioid system과의 관계를 알아보려고 DNP-KLH의 자극을 통해 IgE 매개 알러지 반응모델을 구축하고 足三里에 전침자극을 가한 후 TH1/TH2 분화평형 및 opioid receptor antagonist인 naloxone에 의한 반전여부를 확인하기 위해 total IgE, antigen-specific IgE, IFN- $\gamma$  및 IL-4 mRNA 발현량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 전침자극은 DNP-KLH로 인해 과도하게 생산된 혈청 total IgE 및 antigen-specific IgE를 감소시킴으로서 알러지 반응에 대한 유의한 억제능을 발휘하였으며, naloxone 투여로 전침의 효과가 상쇄된 것으로 미루어 opioid system이 전침에 의한 항알러지 효과에 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다.
2. 또한 전침자극은 DNP-KLH로 인한 TH2

cytokine의 편향상태에 대하여 TH1/TH2 평형조절능을 가진다는 것을 확인하였으며, naloxone으로 반전되지 않는 것으로 미루어 전침이 미치는 보조 T cell 분화에 대한 효과는 opioid system에 의존하지 않는 것으로 추정된다.

## VI. 參考文獻

- Robbins LS. Pathologic basis of disease. Philadelphia:W.B.Saunders co. 1984.
- 배병철. 금역황제내경소문. 서울:성보사. 1999; 49,769,341,285.
- 홍원식. 교감직역황제내경영추. 서울:전통문화연구회. 1994;431,488.
- 최민섭, 고흥균, 김창환. 침구요법이 면역기능에 미치는 영향에 대한 고찰. 대한침구학회지. 1993;7:61-74.
- Charlie CX, Robert E, Jerry J, Cliff DC, Chun GL. Effect of acupuncture in the treatment of seasonal allergic rhinitis: a randomized controlled clinical trial. Am J Chin Med. 2002;30(1):1-11.
- Yu Y, Kasahara T, Sato T, Asano K, Yu G, Fang J, Guo S, Sahara M, Hisamitsu T. Role of endogenous interferon-gamma on the enhancement of splenic NK cell activity by electroacupuncture stimulation in mice. J Neuroimmunol. 1998;90(2) :176-186.
- Yu Y, Kasahara T, Sato T, Guo SY, Liu Y, Asano K, Hisamitsu T. Enhancement of splenic interferon-gamma, interleukin-2, and NK cytotoxicity by ST36 acupoint acupuncture in F344 rats. Jpn J Physiol. 1997;47(2):173-178.
- Park MB, Ko EJ, Ahn CJ, Choi H, Rho SW, Shin MK, Hong MC, Min BI, Bae HS. Suppression of IgE production and modulation of TH1/TH2 cell response by electroacupuncture in DNP-KLH immunized mice. J Neuroimmunol. 2004;151: 40-44.
- Mansour A, Watson SJ, Akil H. Opioid receptors: past, present and future. Trends Neurosci. 1995;18(2):69-70.
- Takeshige C, Mera H, Hisamitsu T, Tanaka M, Hishida F. Inhibition of the analgesia inhibitory system by D-phenylalanine and proglumide. Brain Res Bull. 1991;26(3):385-391.
- Gollub RL, Hui KK, Stefano GB. Acupuncture: pain management coupled to immune stimulation. Zhongguo Yao Li Xue Bao. 1999;20(9):769-777.
- Ceccherelli F, Gagliardi G, Visentin R, Sandona F, Casal R, Giron G. The effects of parachlorophenylalanine and naloxone on acupuncture and electroacupuncture modulation of capsaicin-induced neurogenic edema in the rat hind paw; A controlled blind study. Clin Exp Rheumatol. 1999;17:655-662.
- Zhang SP, Zhang JS, Yung KL, Zhang HQ. Non-opioid-dependent anti-inflammatory effects of low frequency electroacupuncture. Brain Res Bull. 2004;62:327-334.
- 고형균, 인창식. 동의수의침구학. 서울:경희대학교 출판국. 2003:327.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murin helper T cell clone: I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted protein. J Immunol. 1986;136:2348-2357.
- 안덕균 역. 면역과 한방. 서울:열린책들. 1998:19-45.
- Zubieta J.K., Heitzeg M.M., Smith Y.R., Bueller J.A., Xu K., Xu Y. Koeppe R.A., Stohler C.S., Goleman D. COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor.

- Science. 2003;299:1240-1243.
18. Chiu JH, Cheng HC, Tai CH, Hsieh JC, Yeh TC, Cheng H, Lin JG, Ho LT. Electroacupuncture-induced neural activation detected by use of manganese-enhanced functional magnetic resonance imaging in rabbits. *Am J Vet Res.* 2001;62:178-182.
  19. Chiu JH, Chung MS, Cheng HC, Yeh TC, Hsieh JC, Chang CY, Kuo WY, Cheng H, Ho LT. Different central manifestations in response to electroacupuncture at analgesic and nonanalgesic acupoints in rats: a manganese-enhanced functional magnetic resonance imaging study. *Can J Vet Res.* 2003;67:94-101.
  20. Cho ZH, Chung SC, Jones JP, Park JB, Park HJ, Lee HJ, Wong EK, Min BI. New findings of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:2670-2673.
  21. Vidal C, Jacob J. The effect of medial hypothalamus lesions on pain control. *Brain Res.* 1980;199(1):89-100.
  22. 조장희, 황선출, 손영돈, 강창기, Edward K. Wong, 배선준, 이연정, 성장경, 박태석, 김영보, 민훈기, Terry Oleson. 침의 진통효과: 체성감각신경자극으로 유도된 진통작용에 대한 기능성자기공명영상장치를 이용한 연구. *대한침구과학회지.* 2004;21(2) :57-72.
  23. Buske-Kirschbaum A, Hellhammer DH. Endocrine and immune responses to stress in chronic inflammatory skin disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;992 :231-240.
  24. Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians.* 1996;108(5):374-381.
  25. 최용태 외. *침구학(상).* 서울:집문당. 1998. 382-384.
  26. Jefferys D, Copolov D, Funder JW. Naloxone inhibits both glucocorticoid and [D-Ala<sup>2</sup>,Met<sup>5</sup>]enkephalinamide reversal of behavioural effect of adrenalectomy. *Eur J Pharmacol.* 1984;103(3-4):205-210.
  27. Shavit Y, Terman GW, Martin FC, Lewis JW, Liebeskind JC, Gale RP. Stress, opioid peptides, the immune system, and cancer. *J Immunol.* 1985;135(2):834-837.
  28. 김현택, 양병환, 김정목, 김광일, 류재욱, 윤충환, 김시현. 스트레스로 유발된 흰쥐의 면역억제에 대한 날록손의 영향. *대한신경정신의학회지.* 1994;34(3):858-871.
  29. Sacerdote P, Manfredi B, Gaspani L, Panerai AE. The opioid antagonist naloxone induces a shift from type 2 to type 1 cytokine pattern in BALB/c mice. *Blood.* 2000;95(6):2031-2036.
  30. Mayer DJ, Price DD, Ruffin A. Antagonism of acupuncture analgesia in man by the narcotic antagonist naloxone. *Brain Res.* 1977;121:368-372.
  31. Pomeranz B, Chiu D. Naloxone blockade of acupuncture analgesia: endorphin implicated. *Life Sci.* 1976;19:1757-1762.
  32. Ulett GA, Han S, Han JS. Electroacupuncture: mechanisms and clinical application. *Biol Psychol.* 1998; 44:129-138.
  33. Eriksson SV, Lundeberg T, Lundberg S. Interaction of diazepam and naloxone on acupuncture induced pain relief. *Am J Chin Med.* 1991;19:1-7.
  34. Lundeberg T, Eriksson SV, Lundberg S, Thomas M. Effect of acupuncture and naloxone in patients with osteoarthritis pain: A sham acupuncture controlled study. *Pain Clinic.* 1991;4:155-161.