

원저

半夏 藥鍼液이 사람 기관지 상피세포의 TARC 분비에 미치는 효과

홍재화 · 서정철 · 임성철 · 정태영 · 한상원

대구한의대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

Effect of Pinelliae Rhizoma Herbal Acupuncture on the Release of Thymus and Activation-Regulated Chemokine (TARC) in Human Bronchial Epithelial Cell

Hong Jae-hwa, Seo Jung-chul, Lim Seong-chul, Jung Tae-young and Han Sang-won

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine,
Daegu Haany University

Objective : Chemokines are important for the recruitment of leukocytes, which is essential in host defense to the sites of infection. The thymus and activation-regulated chemokine (TARC) is a CC chemokine which potentially plays a role via a paracrine mechanism in the development of allergic respiratory diseases.

Methods : The objective of this study is to investigate the effect of Pinelliae Rhizoma Herbal Acupuncture Solution (PHS) on the secretion of TARC of human bronchial epithelial cell

Methods : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect the secretion of TARC. The cytotoxicity was measured by MTT assay.

Results : PHS significantly inhibited the secretion of TARC with a dose-dependant manner. The effective dosage did not have the cytotoxicity on human bronchial epithelial cell by MTT assay.

Conclusion : Results of our study imply that PHS would play an important role in modulation of TARC in Human bronchial epithelial cells.

Key words : Pinelliae Rhizoma Herbal Acupuncture Solution (PHS), thymus and activation-regulated chemokine (TARC), Human bronchial epithelial cells, A549

- 접수 : 2005년 1월 18일 · 수정 : 2005년 1월 27일 · 채택 : 2005년 1월 27일
· 교신저자 : 한상원, 대구광역시 수성구 상동 165 대구한의대학교 부속대구한방병원 침구과
Tel. 053-770-2236 E-mail : chinguhan@hanmail.net

I. 緒 論

半夏 (Pinelliae Rhizoma)는 天南星科 (Araceae)에 속한 多年生 本草인 半夏 (Pinelliae ternata(THUNB) BREIT)의 塊莖을 건조한 것으로 性味는 辛, 溫, 有毒하고 脾·胃·肺經으로 歸經하며 燥濕化痰, 降逆止嘔, 消痞散結의 효능으로 痰多喘咳, 痰飲眩暈, 風痰眩暈, 痰厥頭痛, 嘔吐反胃, 胸院痞悶 등의 증상을 치료한다¹⁾.半夏의 효능에 관한 실험적 연구로는 張 등²⁾의 肥滿에 관한 연구, 金 등³⁾의 妊娠惡阻에 관한 연구 등이 있으며,半夏가 사용된 處方들에 관해서도 많은 연구가 보고 되었으나⁴⁻⁹⁾,半夏 藥鍼의 효과에 관한 실험적 연구는 아직 접하지 못하였다.

藥鍼療法은 新鍼療法의 하나로, 경락학설의 원리에 의거하여 약물을 선택해서, 유관한 穴位, 壓通點 혹은 체표의 축진으로 얻어진 陽性反應點에 주입하여, 刺鍼과 藥物作用을 통하여 생체의 기능을 조정하고 병리상태를 개선시켜, 질병을 치료한다¹⁰⁾.

천식은 발작성의 호흡곤란, 천명, 기침, 나음 (rales)을 특징으로 하는 증후군으로, 알레르기가 대부분의 원인이 되며, 그 외에도 상기도 감염, 정서적 스트레스, 기후변화, 약물, 운동 등으로 유발될 수 있다¹¹⁻¹⁴⁾.

韓醫學에서 천식은 哮喘證에 該當되는데, 喉中 有聲響한 것을 哮라 하고 呼吸急促한 것을 喘이라 하여 구분하기도 하나, 清代 이후로는 哮와 喘이 兼한다고 하여 哮喘證을 하나의 證候로 보고 있다¹¹⁾.

Chemokine은 화학주성을 유발하는 세포 분비물로서 종류는 CXC, CC, C 및 CX3C subfamily로 구분한다¹⁵⁾. 케모카인은 감염된 곳에 위치한 백혈구의 반응반응을 위해 중요하며, 숙주의 방어에 필수적이다. 이 중 TARC는 알러지성 호흡기 질환의 발생에서 paracrine 메카니즘의 잠재적 역할을 하는 CC 케모카인의 일종이다¹⁶⁾. TARC는 기관지 천식환자들의 폐 기관지 상피세포에 강하게 발현되어 T-helper 2 cell에 의한 병리적인 병변을 유발한다고 알려져 있다. 따라

서 기관지 상피세포에서 TARC 분비를 억제하는 것이 치료 및 예방을 위해 매우 중요하다고 할 수 있다¹⁶⁾.

이에 저자는, 사람 기관지 상피세포에 알러지 환경을 유발하고자 사이토카인을 처리하여 TARC의 분비를 유도하고, 이 케모카인 분비에半夏 藥鍼液(Pinelliae Rhizoma Herbal Acupuncture Solution. PHS)이 미치는 효과에 대하여 유의성이 있었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

본 實驗에서 사용된半夏는 大邱韓醫大學校 附屬 大邱韓方病院 藥劑科에서 구입하여 嚴選한 것을 사용하였으며, 試料의 生藥名과 學名은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Botanical Name of BAN-XIA(半夏)

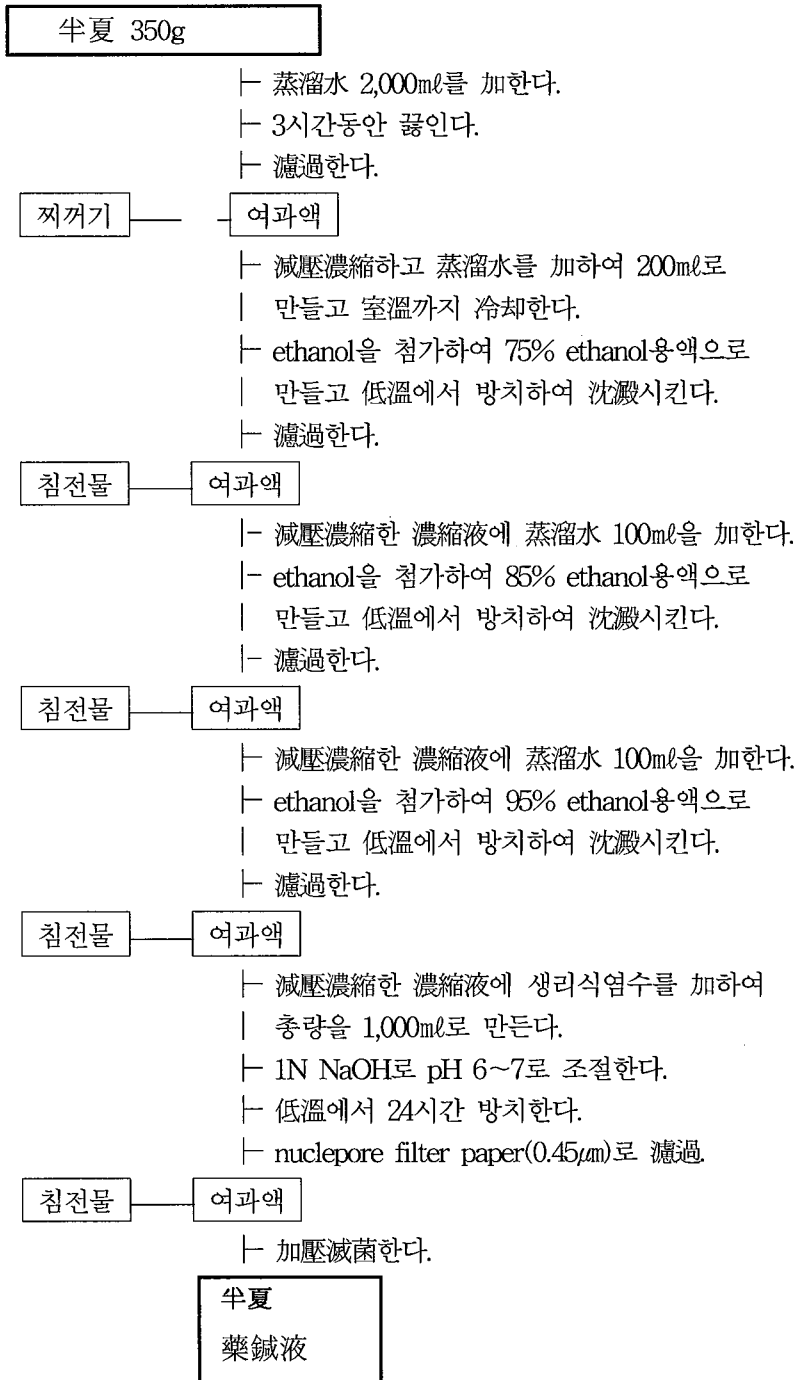
Oriental Crude Drug	Crude Drug	Scientific Name
半夏	Pinelliae Rhizoma	Pinelliae ternata(THUNB) BREIT

2. 方法

1)半夏 藥鍼液의 製造

實驗에 사용한半夏 藥鍼液은半夏 350g을 取해 粗末하여 圓底 flask에 넣고, 蒸溜水 2,000 ml를 加한 後, 3時間 煎湯하여 抽出하고 濾過하였다. 濾液은 rotary evaporator로 減壓濃縮하고 濃縮液에 蒸溜水를 加하여 全量을 200ml이 되도록 한 다음, 室溫까지 冷却하고 ethanol을 加하여 75% ethanol 溶液으로 되게 한 다음, 攪拌하고 低溫에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮한 濃縮液에 蒸溜水 100ml를 加하고 溶解시킨

Table 2. Preparation of Pinelliae Rhizoma Herbal-Acupuncture Solution.



後, ethanol을 가하여 85% ethanol 溶液으로 되게 한 다음攪拌하고 低溫에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮한 濃縮液에 蒸溜水 100ml를 가하고 溶解시킨 後, ethanol을 가하여 95% ethanol 溶液으로 되게 한 다음攪拌하고 低溫에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮하여 生成된 濃縮液에 生理食鹽水를 가하고 3% NaOH로 pH 6~7로 調節하여 全量이 1,000ml가 되게 한 다음, 低溫에서 24時間 放置한 後 nuclepore filter (0.45 μ m, 직경 25mm, Millipore Corp, Pleasanton, California, U.S.A.)로 濾過하고 加壓 滅菌하여 試料의 원액으로 使用하였다. 이상의 과정을 도식화하면 Table 2와 같다.

2) 세포주

사람 기관지 상피세포 A549 (a human type II bronchial epithelial cell line)를 경희대학교 의과대학 미생물학교실에서 분양받아 사용하였다.

3) 세포배양 및 실험조건

FBS (10% fetal bovine serum)와 항생제가 들어있는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)으로 2-3일마다 배지를 교환하였다. 이를 24 well plate에 분주한 후 각각 Interleukin-4 (10ng/ml), TNF(Tumor Necrosis Factor)- α (10ng/ml), INF- γ (10ng/ml) 및 Interleukin-1 β (1ng/ml)를 단독 처리하고, IL-4 (10ng/ml)와 TNF- α (10ng/ml)를, TNF- α (10ng/ml)와 INF- γ (10ng/ml)를, INF- γ (10ng/ml)와 IL-1 β (1ng/ml)를 병용 처리하여 24시간 처리한 후 TARC의 양을 측정하여 TARC 분비량이 최고인 조건을 확립하였다. 2차 실험에는 半夏 藥鍼液을 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 및 200 μ g/ml의 농도로 전처리한 후 12시간 후에 IL-4 (10ng/ml)와 TNF- α (10ng/ml)를 처리하고 48시간동안 배양하면서 12, 24 및 48시간 경과시 TARC의 양을 측정하였다.

4) TARC 측정

TARC의 양은 ELISA (enzyme-linked

immunosorbent assay)법으로 측정하였다. 측정에는 capture 항체와 detection 항체 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 별도로 구입하여 ELISA plate를 준비하였다. Nunc-ELISA plate를 각각의 cytokine capture 항체로 coating하여 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 처리하였다. Plate 바닥에 고정되지 않은 여분의 capture 항체를 씻어낸 다음 각 plate를 2% BSA-PBS (Bovine Serum Albumin- Phosphate Buffered saline)로 blocking 하였다. Blocking이 끝난 다음 plate를 PBS-Tween20 (0.05%; v/v)으로 씻어내고 검체를 100 μ l씩 가하였다. 2시간 후 각 plate들을 철저히 세척한 다음 biotin을 결합시킨 polyclonal rabbit 항-사이토카인 항체를 가하였다. 30분 후 세척하였으며 streptavidin-peroxidase를 가한 다음 30분간 더 처리하였다. 다시 충분히 세척한 다음 발색 기질 TMB (tetra methyl benzidine)를 sodium citrate에 녹인 후 H₂O₂를 약간 첨가한 용액 100 μ l씩 첨가하여 발색시켰다. 그후 발색을 2M H₂SO₄을 50 μ l 첨가하여 반응을 정지시키고 450nm 파장에서 ELISA reader(Rockford, IL, USA)로 측정하였다. 재조합 TARC를 125pg/ml부터 순차적으로 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 모든 기준치는 duplicate로 측정하였고 결과는 3회에 걸친 독립적인 실험치의 평균값 \pm 표준오차로 나타내었다.

5) MTT assay

半夏 藥鍼液의 세포독성 유무를 확인하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay법을 사용하였다. MTT를 각 세포배양액에 0.1mg/ml의 농도로 처리한 후 4시간 동안 37 $^{\circ}$ C CO₂ incubator에서 배양하였다. 이후에 DMSO (Dimethylsulfoxide)를 첨가하여 690nm를 대조파장으로 하고, 595nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 환산하였다.

6) 통계

통계처리는 SPSS 10.0 for Windows program

을 이용하였고, 半夏 藥鍼液의 효과를 판정하기 위해 각 One-way ANOVA test를 수행하였고, 사후검정으로 Dunnetts multiple comparison test를 사용하여 대조군과 비교하였다. 유의수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

III. 成 績

1. 표준곡선 및 선형회귀분석

재조합 TARC를 이용하여 케모카인 정량을 위해 흡광도에 따른 TARC 표준곡선을 작성하였다. 그 결과 TARC 농도가 각각 1.0, 2.0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 및 125.0pg/ml일 경우에 흡광도는 각각 0.183, 0.212, 0.236, 0.293, 0.391, 0.587, 0.947, 및 1.483이었다. 이를 선형회귀분석을 수행하여 수식을 산출하였고, 이를 흡광도로부터 TARC를 정량하였다 (Figure. 1).

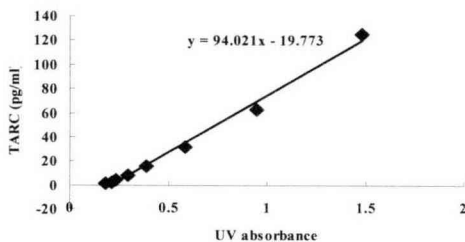


Fig. 1. Standard curve between ultra-violet (UV) absorbance at 450 nm and the concentration of thymus and activation-regulated chemokine (TARC). A simple linear regression analysis of TARC concentration on the UV absorbance was calculated and graphed. The equation of the estimated regression line is: $y = 94.021x - 19.773$. We used this formula for TARC quantification in further experiments.

2. A549 세포의 사이토카인에 의한 TARC 분비 측정

사람의 기관지 상피 세포에 각각 IL-4, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 를 각각 처리하는 경우와 IL-4

와 TNF- α , TNF- α 와 IFN- γ , IFN- γ 와 IL-1 β 를 병용 처리할 경우의 TARC 분비량을 측정하였다. 그 결과 IL-4와 TNF- α 를 병용 처리하는 경우 (1481.1 ± 73.3 pg/ml, $p < 0.05$)와 TNF- α 와 IFN- γ 를 병용 처리하였을 경우 (247.7 ± 0.4 pg/ml, $p < 0.05$)에만 TARC 분비가 유의하게 증가하였다 (Figure. 2). 그 외의 경우에는 아무것도 처리하지 않은 군에서 1.0 ± 0.0 pg/ml의 분비를 보였고, IL-4, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 단독처리시와, IFN- γ 와 IL-1 β 를 병용 처리시에는 각각 1.5 ± 0.0 , 49.7 ± 0.1 , 1.4 ± 0.0 , 25.1 ± 0.0 , 및 9.5 ± 0.1 pg/ml의 분비량을 보여 큰 차이를 관찰할 수 없었다. 따라서 A549 세포는 여러 사이토카인 중 IL-4와 TNF- α 또는 TNF- α 와 IFN- γ 가 함께 존재할 경우에만 세포내 신호전달체계가 흥분하여 TARC를 분비하는 것을 알 수 있었다. 이 중 가장 높은 TARC 분비를 보인 IL-4와 TNF- α 병용 처리를 이후 TARC 유도를 위한 조건으로 사용하였다.

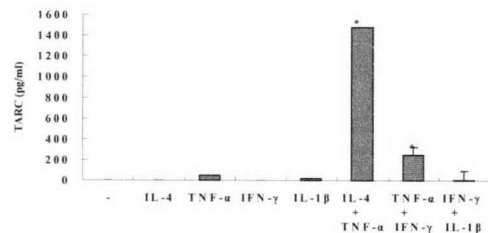


Fig. 2. TARC released into the culture media of human bronchial epithelial cell exposed to IL-4, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , both IL-4 and TNF- α , both TNF- α and IFN- γ , or both IFN- γ and IL-1 β . (* represents $P < 0.05$ compared to the control).

3. 시간대별 TARC 분비 양상 측정

시간대별로 TARC의 분비 양상을 측정한 결과 대조군은 0, 6, 12, 24 및 48시간에서 각각 0.0 ± 0.0 , 5054.9 ± 1188.5 , 89808.9 ± 21138.8 , 313898.7 ± 5881.9 및 410482.9 ± 20629.3 pg/ml의 TARC분비를 나타내었고, 半夏 藥鍼液 $50 \mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서는 시간별로 각각 0.0 ± 0.0 , 3654.0 ± 259.0 , 88959.7 ± 721.6 , 99734.6 ± 259.0 , 및 110774.9 ± 736.6 pg/ml의 TARC

분비를 나타내었고, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 시간별로 각각 0.0 \pm 0.0, 1389.5 \pm 6.3, 3736.0 \pm 44.2, 4119.2 \pm 1406.3 및 36489.6 \pm 53932.6pg/ml의 TARC 분비를 나타내었으며, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 시간별로 각각 0.0 \pm 0.0, 906.5 \pm 8.1, 1701.8 \pm 137.5, 2319.2 \pm 132.1 및 27282.7 \pm 42714.3pg/ml의 TARC 분비를 나타내었다.

이상의 결과에서 半夏 藥鍼液 처리군의 24시간 및 48시간에서 통계적으로 유의한 감소를 관찰할 수 있었다(p<0.001, Figure. 3). 24시간 처리군의 경우를 자세히 나타내면 다음과 같다 (Figure. 4).

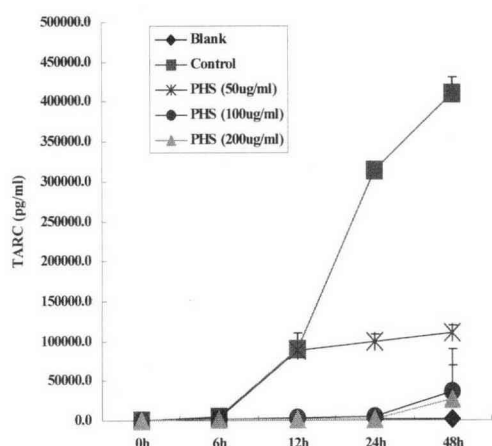


Fig. 3. Time course response of TARC secretion in human bronchial epithelial cell at 48h after cytokine and PHS (Pinelliae Rhizoma Herbal Acupuncture Solution- 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treatment. Each value is the mean \pm SEM. (n=3).

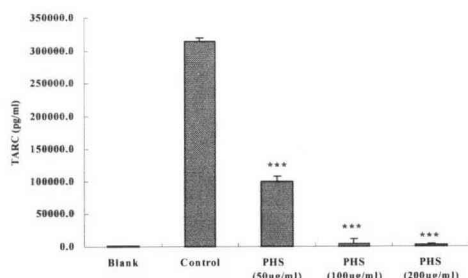


Fig. 4. Effects of PHS (Pinelliae Rhizoma Herbal Acupuncture Solution- 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on a secretion of TARC in human

bronchial epithelial cell at 24h after cytokine treatment. Each value is the mean \pm SEM. (n=3). (***) represents P < 0.001 compared to the control).

4. MTT assay 결과

대조군의 생존률을 100.0 \pm 10.7%로 계산하였을 때 半夏 藥鍼液을 처리한 후의 세포생존률은 50, 100, 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 각각 99.0 \pm 14.4, 99.7 \pm 13.4, 및 97.2 \pm 16.5%로 유의한 세포독성은 관찰되지 않았다 (Figure. 5).

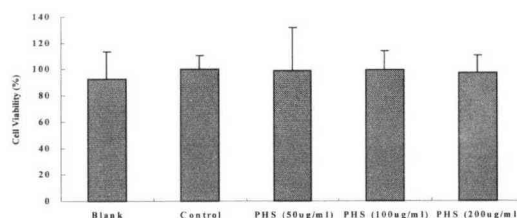


Fig. 5. Influence of PHS on the viability of A549. The cell viability was determined using the MTT assay. There was no significant change in the number of living cells between control and PHS groups. Each value is the mean \pm SEM. (n=3).

IV. 考 察

기관지 천식은 기관지의 반응성의 증가를 특징으로 하며 여러 가지 자극에 의해 기도의 점막에 염증반응을 일으키고 기관지 평활근을 수축시켜 기도폐색을 일으키게 된다. 특징적인 증상으로 발작성의 호기성 호흡곤란, 천명, 과호흡, 기침, 나음(rales)을 들 수 있다. 천식을 일으키는 원인으로는 알러젠(allergen)의 흡입, 호흡기감염, 스트레스, 공기오염, 기후, 약물, 운동 등이 있으며, 이 중 알러지성 반응이 대부분으로 받아들여지고 있다¹¹⁻¹⁴⁾. 천식은 어린이와 청소년에게 호발하는 질환중 하나이고 이환률이 증가하고 있다. 서양에서도 최근 20년동안 천식 이환률이 2배로 증가하여 최근 유병률이 10-20% 사이인

것으로 알려져 있다¹⁷⁾.

어린이와 청소년 천식환자 중 항원에 대한 IgE 합성이 증가하는 특징을 가지는 아토피성 피부염과 밀접한 관련이 있는 것은 잘 알려져 있다¹⁸⁾. 결과적으로 이들 환자들에 특정한 공기 중에 포함된 항원에 대한 노출은 과민반응으로 이어져 결국 기도 내 염증유발로 이어진다. 기도 내 염증유발은 조직내 백혈구 침윤 반응이 특징적인 현상인데, 이로써 기도 상피세포의 손상 및 기도 폐색을 일으킨다¹⁸⁾. 이 백혈구를 혈액에서 조직내로 끌어오는 것이 케모카인 (chemokine) 이다.

케모카인은 염증 반응에서 백혈구의 선택적인 접점반응을 조절하는 중요한 역할을 하는 물질로 interleukin 생산, angiogenesis, 및 collagen 생산에도 영향을 끼친다고 알려져 있다¹⁹⁻²⁰⁾. 케모카인은 다양한 종류의 세포에서 형성되며, 특히 T 세포, 대식세포, 섬유아세포, 상피세포가 CC 케모카인을 분비한다고 알려져 있다²¹⁾. 최근 많은 종류의 케모카인 및 그 수용체들이 계속해서 밝혀짐에 따라 이들이 수행하는 기능들의 영역도 확대되어 화학주성 이외에 조혈 기능의 조절²²⁾, 혈관 신생의 조절²³⁾, 창상 치유²⁴⁾ 등이 입증되었으며 특히 사람 면역 바이러스의 병인에도 관여하고 있음이 밝혀졌다²⁵⁻²⁶⁾.

이 중 TARC는 흉선과 림프절에서 백혈구가 활성화되면서 분비되는 CC 케모카인이다. TARC는 CCR4 (CC Chemokine Receptor 4)에 선택적으로 발현하는 활성화된 T세포와 선택적인 면역반응을 하게 된다. 항원제공세포 (Antigen-Presenting Cell, APC)들이 TARC를 분비함으로써 Th2 면역 반응에 중요한 역할을 수행한다. TARC의 Th2 T cell subset에서의 화학면역효과 때문에 Th2의 반응이 필요한 면역관련 질병 모델 예방법으로 활용될 것으로 생각되고 있다²⁷⁾.

韓醫學的으로 천식은 哮喘證에 해당되는데, 喉中有聲響한 것을 哮라 하고 呼吸急促한 것을 喘이라 하여 구분하기도 하나, 近來에는 哮와 喘이 兼한다고 하여 哮喘證을 하나의 證候로 보고 있다¹¹⁾.

哮喘證의 原因으로는 虛實로 나누어, 實證은

主로 風寒, 痰濁· 등의 病邪로 因하며, 虛證은 主로 肺虛, 腎虧 등으로 因한다고 보고 있다¹¹⁾.

半夏는 《神農本草經》²⁸⁾ 下品에 “味辛平, 主傷寒, 寒熱, 心下堅, 下氣, 咽喉腫痛, 頭眩風瘡, 咳逆腸鳴, 止汗”이라고 처음 기재된 후, 韓醫學에서 가장 頻用되고 효용성이 높은 약물 중의 하나이다.半夏의 效能²⁹⁾으로는 降逆止嘔, 燥濕化痰, 消痞散結 등이 있고, 臨床的으로 강력한 止咳化痰의 效能이 있어 呼吸器系 疾患에 常用藥이다.半夏는 氣管支의 分泌液을 증가시키고 痰液을 배제하는 작용이 있어 急慢性咳嗽, 痰多, 胸悶氣急, 咳喘 등의 症에 適用된다.

半夏의 효능에 관한 실험적 연구로는 張 등²⁾이 肥滿誘導 白鼠의 體重, 副睪丸 脂肪組織, 血液 및 遺傳子 變化에 유의한 결과를 보고하였으며, 金 등³⁾이 T3로 誘發한 妊娠惡阻 白鼠에서 薑半夏와 淸半夏의 血清중 gastrin의 유의한 감소와 K⁺의 유의한 증가를 보고한 바 있다.

藥鍼療法은 經絡학설의 원리에 의거하여 약물을 선택해서, 有關한 穴位, 壓通點 혹은 체표의 축진으로 얻어진 陽性反應點에 주입하여, 刺鍼과 藥物作用을 통하여 생체의 기능을 조정하고 병리상태를 개선시켜, 질병을 치료하는 신침요법의 일종으로¹⁰⁾ 현재 임상에서 다양하게 사용되고 있으며 많은 실험적 및 임상적 연구가 보고되고 있다.

이에 哮喘 治療의 주요 處方에 任用되는半夏가 藥鍼으로서도 효능이 있는지 규명하고자,半夏 藥鍼液이 사람 기관지 상피세포에 알러지 환경을 유발하는 사이토카인을 처리하여 TARC 분비에 미치는 효과를 알아본 결과를 고찰해보면 다음과 같다.

우선 TARC 분비 유도를 위한 최선의 조건을 알아보기 위해 사람의 기관지 상피 세포에 각각 IL-4, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 를 처리하는 경우와 IL-4와 TNF- α , TNF- α 와 IFN- γ , IFN- γ 와 IL-1 β 를 병용 처리할 경우의 TARC 분비량을 측정하였다. 그 결과 IL-4와 TNF- α 를 병용 처리하는 경우와 TNF- α 와 IFN- γ 를 병용 처리하였을 경우에 TARC 분비가 유의하게 증가하였으며, 그 중 IL-4와 TNF- α 를 병용 처리하는 경우가 가장 많은 증가를 보였다. 따라서 A549 세

또는 여러 사이토카인 중 IL-4와 TNF- α , 또는 TNF- α 와 IFN- γ 가 함께 존재할 경우에 세포내 신호전달체계가 흥분하여 TARC를 분비하는 것을 알 수 있었다. 이 중 가장 높은 TARC 분비를 보인 IL-4와 TNF- α 병용 처리를 이후 TARC 유도를 위한 조건으로 사용하였다.

半夏 藥鍼液을 처리한 후 시간의 경과에 따른 TARC의 분비 양상을 측정한 결과半夏 藥鍼液 50 μ g/ml을 처리한 군에서는 0, 6, 12, 24 및 48시간별로 각각 0.0 \pm 0.0, 3654.0 \pm 259.0, 88959.7 \pm 721.6, 99734.6 \pm 259.0 및 110774.9 \pm 736.6pg/ml의 TARC 분비를 나타내었고, 100 μ g/ml을 처리한 군에서는 시간별로 각각 0.0 \pm 0.0, 1389.5 \pm 6.3, 3736.0 \pm 44.2, 4119.2 \pm 1406.3 및 36489.6 \pm 53932.6pg/ml의 TARC 분비를 나타내었으며, 200 μ g/ml을 처리한 군에서는 시간별로 각각 0.0 \pm 0.0, 906.5 \pm 8.1, 1701.8 \pm 137.5, 2319.2 \pm 1132.1, 및 27282.7 \pm 42714.3pg/ml의 TARC 분비를 나타내었다. 이상의 결과에서半夏 藥鍼液 처리 후 24시간 및 48시간에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 TARC 분비의 감소가 관찰되어半夏 藥鍼液 처리 후 시간이 경과함에 따라 지속적인 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 또한半夏 藥鍼液이 농도의존적으로 TARC 분비를 감소시키는 것을 알 수 있었다.

MTT assay를 이용하여半夏 藥鍼液의 농도가 세포내에서 독성을 일으키는지 확인하였다. 대조군의 생존률을 100.0 \pm 10.7%로 계산하였을 때半夏 藥鍼液을 처리한 후의 세포생존률은 50, 100, 및 200 μ g/ml 각각 99.0 \pm 14.4, 99.7 \pm 13.4, 및 97.2 \pm 16.5%로 유의한 세포독성은 관찰되지 않았다.

이상의 실험결과로 미루어 보아半夏 藥鍼液은 기관지 상피세포에서 발현하는 TARC의 분비를 억제하여 여러 원인으로 유발된 기관지 과민반응 혹은 염증반응 상태를 호전시킬 수 있을 것으로 사려된다. 본 결과는 기관지염 및 천식환자에 대한半夏 藥鍼液의 임상활용 및 농도 선택에 기초자료로 활용이 가능할 것으로 생각되며, 앞으로半夏 藥鍼液 이외의 다른 약침이나 처방의 효과에 대한 지속적인 연구가 요망된다.

V. 結 論

사람 기관지 상피세포에 알려진 환경을 유발하고자 사이토카인을 처리하여 TARC의 분비를 유도하고, 이 케모카인 분비에半夏 藥鍼液이 미치는 효과를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 사람의 기관지 상피 세포주에 각각 IL-4, TNF- α , IFN- γ 및 IL-1 β 를 처리하는 경우와 IL-4와 TNF- α , TNF- α 와 IFN- γ , IFN- γ 와 IL-1 β 를 병용 처리할 경우 TARC의 분비량을 측정한 결과 IL-4와 TNF- α 와 TNF- α 와 IFN- γ 를 병용 처리하였을 경우 TARC의 분비량이 유의하게 증가하였다.
- 2.半夏 藥鍼液 처리군의 24시간 및 48시간에서 통계적으로 유의한 감소를 관찰할 수 있었다.
- 3.半夏 藥鍼液에 의한 TARC 분비억제를 관찰한 결과 농도의존적인 분비 감소 효과를 관찰할 수 있었다.
4. MTT assay법을 이용한 세포 독성 측정에선 대조군과半夏 藥鍼液 처리군간에 유의성이 없었으므로 50, 100 및 200 μ g/ml의 농도에선 세포독성이 없었음을 관찰할 수 있었다.

이에半夏 藥鍼液은 TARC 케모카인 억제를 통해 천식에 대한 치료효과를 나타낼 수 있을 것으로 사려된다.

VI. 參考文獻

1. 全國韓醫科大學 本草學教授 共著. 本草學. 서울:永林社. 1995:448-9.
2. 張炳秀, 鄭錫熙, 李鍾秀, 金性洙, 申鉉大.半夏가 肥滿誘導 흰쥐의 體重, 脂肪組織, 血液 및 遺傳子 變化에 미치는 影響. 한방재활의학회지. 1999;9(1):103-28.

3. 金圭燮, 姜孝信. 生半夏 薑半夏 및 淸半夏가 T3로 유발된 白鼠의 妊娠惡阻에 미치는 影響. 제한동의학술원논문집. 1997;2(1):83-99.
4. 李英子, 申祖永. 杏仁半夏湯이 GUINEA PIG의 氣管支平滑筋에 미치는 影響. 대한한방내과학회지. 1992;13(1):124-34.
5. 조영민, 정희재, 정승기, 이형구. 小青龍湯이 알레르기 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향. 경희의학. 1999;5(1):78-89.
6. 주왕석, 박현준, 윤병국, 정성이, 박선동. 半夏瀉心湯이 CC14로 유도된 간중독 흰쥐에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1999;14(2):51-60.
7. 김영훈, 김병운. 半夏芩朮湯의 진통, 소염에 관한 실험적 연구. 경희의학. 1985;1(1):111-5.
8. 권현, 정승기, 이형구. 시경청폐탕과 시경반하탕이 Xylene으로 인한 흰쥐의 폐부종에 미치는 영향. 경희의학. 1989;5(3):337-46.
9. 황우석, 이재성, 최준용, 정희재, 이형구, 정승기. 小青龍湯으로 호전된 천식을 동반하는 만성부비동염 2례. 대한한의학회지. 2003;24(1):207-12.
10. 최용태. 鍼灸學(下). 서울:集文堂. 1993:1457.
11. 李珩九, 鄭昇杞. 東醫肺系內科學. 서울:民端出版社. 1999:187-202, 426, 460-1, 468.
12. 韓鏞徹. 臨床呼吸器學. 2. 서울:一潮閣. 1995:208-25.
13. 해리슨내과학편찬위원회. 해리슨 내과학(I). 1. 서울:정담. 1997:1258-64.
14. 전국의과대학교수역. 오늘의 진단 및 치료. 1. 서울:한우리. 1999:287-97.
15. Rollins BJ. Chemokines. Blood. 1997;90:909-28.
16. Sekiya T, Miyamasu M, Imanishi M, Yamada H, Nakajima T, Yamaguchi M, Fujisawa T, Pawankar R, Sano Y, Ohta K, Ishii A, Morita Y, Yamamoto K, Matsushima K, Yoshie O, Hirai K. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. J Immunol. 2000;165(4):2205-13.
17. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Lancet. 1998;351(9111):1225-32.
18. Teran LM, Carroll MP, Frew AJ, Redington AE, Davies DE, Lindley I, Howarth PH, Church MK, Holgate ST. Leukocyte recruitment after local endobronchial allergen challenge in asthma. Relationship to procedure and to airway interleukin-8 release. Am J Respir Crit Care Med. 1996;154(2 Pt 1):469-76.
19. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. Immunol Today. 1999;20:245-57.
20. Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD, Barrett TA. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. J Immunol. 1997;158:4129-36.
21. Schall TJ. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. Cytokine. 1991;3:165-83.
22. Goede V, Brogelli L, Ziche M, Augustin HG. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. Int J Cancer. 1999;82:765-70.
23. Tachibana K, Hirota S, Lizasa H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. Nature. 1998;393:591-4.
24. DiPietro LA, Burdick M, Low QE, Kunkel SL, Strieter RM. MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. J Clin Invest. 1998;101:1693-8.

25. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC CKR5:A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. 1996; 272:1955-8.
26. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*. 1996;85: 1135-48.
27. Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, Gray PW, Matsushima K, Yoshie O. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol*. 1999;11(1):81-8.
28. 神農本草經. 北京:科學技術文獻出版社. 1996: 92-3.
29. 金載益. 臨床本草學講座. 서울:대성의학사. 2001: 828-9.