경락경혈학회지 Vol.26, No.3, pp.55~68, 2009
Journal of Meridian & Acupoint

黃芩 藥鍼이 급성염증 백서의 면역조절능에 미치는 영향

양승희[1], 이향숙[1], 이은[2], 이준무[1*]

[1]상지대학교 한의과대학 경락경혈학교실, [2]상지대학교 보건과학대학 제약공학과

Immunomodulatory activity of *Scutellaria baicalensis* Georgi Pharmacopuncture on Acute Inflammatory Rat Model

Seung Hee Yang[1], Hyang Sook Lee[1], Eun Lee[2], Joon Moo Lee[1]
[1]*Dept. of Meridian & Acupoint, College of Korean Medicine, Sangji University*
[2]*Dept. of Pharmaceutical Engineering, College of health Science, Sangji University*

Abstract

Objectives : To investigate the anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi pharmacopuncture in lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory rat model.

Methods : Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups; LPS control (n=6), LPS+*Scutellaria baicalensis* Georgi pharmacopuncture at BL23 (n=6, BL23), LPS+*Scutellaria baicalensis* Georgi pharmacopuncture at CV12 (n=6, CV12), and LPS+*Scutellaria baicalensis* Georgi pharmacopuncture at GV4 (n=6, GV4). Pharmacopuncture was given every two days for 4 weeks followed by inflammation induction by intraperitoneal LPS injection (5mg/kg). Blood, liver tissue, and peritoneal lavage fluid were taken and proinflammatory cytokines and other related factors were analysed.

Results : For proinflammatory cytokines, CV12 pharmacopuncture group was significantly different compared with the control group in plasma IL-1β, IL-6, TNF-α, and IL-10 5 h after LPS injection ($P<0.05$). For plasma IL-1β and IL-6, CV12 pharmacopuncture group also showed significant difference at 2 h compared with the control ($P<0.05$). GV4 pharmacopuncture group was significantly different compared with the control at 5 h in plasma IL-1β, IL-6, and TNF-α and at 2 h in IL-10 ($P<0.05$). Liver cytokines were analyzed at 5 h after LPS injection; only CV12 pharmacopuncture group showed significant difference in IL-1β ($P<0.05$) and others including IL-6, TNF-α, and IL-10 had no difference compared with the control group. CD4/CD8 ratio and the phagocytic activities of polymorphonuclear neutrophils were not different from those of control group in all pharmacopuncture groups ($P>0.05$). Plasma NO3-/NO2- and intracellular adhesion molecule-1 of CV12 pharmacopuncture group were significantly lower than that of the control group ($P<0.05$). In the plasma concentration of prostaglandin E2, all 3 pharmacopuncture groups had significantly lower values than that of the control group ($P<0.05$), but there was no difference among pharmacopucnture groups. Monocyte chemoattractant protein-1 and cytokine-induced neutorphil chemoattractant-1 in peritoneal lavage fluid was significantly decreased in CV12 pharmacopuncture group compared with the control group ($P<0.05$).

Conclusions : These results indicate that *Scutellaria baicalensis* Georgi pharmacopuncture at CV12 may have a potent anti-inflammatory effect in an LPS-induced inflammatory rat model.

Key words : pharmacopuncture; *Scutellaria baicalensis* Georgi; anti-inflammation; CV12

· 교신저자 : 이준무, 강원도 원주시 우산동 660번지 상지대학교 한의과대학 경락경혈학교실, Tel. 033-730-0662, E-mail : jmlee@sangji.ac.kr
· 투고 : 2009/08/31 심사 : 2009/09/11 채택 : 2009/09/20

Ⅰ. 서 론

생체 내에서 항원침입이나 조직손상과 같은 응급상황이 발생하였을 때에 림프구를 포함한 면역세포들에 의해 항원제거 등의 일련의 생체보호반응들이 나타나는데 이러한 반응들을 염증반응이라 한다. 염증반응은 급성염증반응 (acute inflammatory response)과 만성염증반응 (chronic inflammatory response)으로 구분되며, 급성염증반응은 감염이나 조직손상을 처리하기 위하여 국소적인 반응과 전신적인 반응을 수반한다. 국소적인 급성염증반응은 부종 (swell), 발진 (redness), 발열 (heat), 통증 (pain) 및 기능상실 (loss of function) 등의 증상을 나타내며, 전신적인 반응으로 급성단계반응 (acute phase response)을 수반한다. 또한 만성염증반응은 항원이 오랜 기간 동안 지속적으로 존재하기 때문에 나타나는 반응으로 심각한 조직손상을 유발한다. 따라서 염증반응은 급성 및 만성에 관계없이 과도하게 나타나거나 지속적으로 나타나게 되면 주변조직의 손상과 더불어 생체기능에 이상을 가져와 질병의 상태를 악화시키거나 새로운 질병을 유도한다[1]. 따라서 염증제어는 질병 치료에서 가장 기본적으로 수행되는 임상적 대응 중의 하나가 된다.

한방에서는 생체 내 염증반응을 諸痛瘡瘍, 皆屬於火라 하여 모든 瘡瘍은 火를 겸하며, 瘡瘍으로 인한 炎症反應은 火를 동반하여 나타나는 현상으로 瘀血, 痰飮, 氣鬱 등의 생체위해조건이 지속되면 化火하여 內火로서 작용하여 이것이 생체 스트레스 및 각종 질환의 병인으로 작용할 수 있고, 결과적으로 炎症은 瘡瘍으로 인해 발생하는 生體反應이며, 火를 동반한다고 했다[2,3]. 치료원칙으로는 淸熱, 解毒, 行氣, 活血[4] 등의 방법을 사용하는 것이 보편적이다.

黃芩(*Scutellariae radix*)은 꿀풀과(*labitate*)에 속하는 다년생 초본식물인 黃芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 주피를 벗긴 뿌리이다. 성미는 苦寒하고 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 止血, 安胎의 효능이 있으며 주요 성분은 flavonoid계 화합물들이며, 약 30여종의 성분들이 밝혀졌다[5]. 현재까지 밝혀진 黃芩의 주요 생리활성기능으로는 항histamin효과[6], 항균작용[7], 항염증효과[8] 등이다.

본 연구는 소염효과를 개선하고, 부작용이 없는 새로운 염증제어요법을 개발하기 위한 기초연구로 생체 내의 면역기능 조절과 관련이 깊은 혈위 가운데 腎兪(BL23), 中脘(CV12) 및 命門(GV4)에 상응하는 부위에 黃芩약침을 처리한 흰쥐에게 LPS를 이용하여 급성기 염증반응을 유발시켜, 黃芩약침이 혈액 및 간장의 전염증성(proinflammatory) 싸이토카인들과 기타 면역 조절능에 미치는 영향을 검토했다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험군

평균체중이 182.59±4.03g의 Sprague-Dawley계 수컷 24두를 1주일간 실험식이에 적응시킨 후, 평균체중이 유사하게 하여 6두를 한군으로 하여 배치하였다. LPS로 염증을 유발하고 아무 처리 하지 않은 대조군(LPS)과 腎兪(BL23), 中脘(CV12),

命門(GV4)에 각각 黃芩약침 처리 후 LPS로 염증을 유발한 약침군으로 나누어, 실험을 진행하였다.

2. 식이 및 물

식이(Table 1) 및 물은 시험기간 4주 동안 자유 급여하였다.

Table 1. Composition of experimental diet.

Ingredients	Composition (%)
Casein	20.0
α-Corn starch	35.0
Sucrose	11.0
Lard	4.0
Corn oil	1.0
Mineral mix[1)]	3.5
Vitamin mix[2)]	1.0
Cellurose powder	23.5
DL-methione	0.3

[1)]Mineral mix (g/kg diet): CaCO3, 29.29; CaHPO$_4$·2H2O, 0.43; KH2PO, 34.30; NaCl, 25.06; MgSO4·7H2O, 9.98; Ferric citrate hexahydrate, 0.623; CUSO4·5H2O, 0.516; MnSO4·H2O, 0.121; ZnCl, 0.02; KI, 0.005; (NH4)6 MO7O24·4H2O, 0.0025.

[2)]Vitamin mix (mg/kg diet): thiamine-HCl, 12; riboflavin, 40; pyrodoxin-HCl, 8; vitamin-B12, 0.005; ascorbic acid, 300; D-biotin, 0.2; menadione, 52; folic acid, 2; D-calcium pantothenate, 50; P-aminobenzoic acid, 50; nicotinic acid, 60; Cholin choloride, 2000 (IU/kg diet); Rethinyl acetate, 5000 (IU/kg diet); Cholecalciferol, 50 (IU/kg diet).

3. 黃芩약침액의 조제

약재는 원주 시내의 약업사에서 정선된 약재를 구입하여 사용하였다. 약침액은 100g의 黃芩을 둥근 flask에 2ℓ의 증류수와 함께 넣어 수증기 증류법으로 1600ml의 증류액을 만든 후, 냉각, 여과하고, 이 여액을 100ml되게 감압, 농축하여, pH 7로 조정, 냉장 보관했다.

4. 약침처리 및 취혈

대조군을 제외한 腎俞(BL23), 中脘(CV12), 命門(GV4)의 3개 약침처리군들은 4주 동안, 격일로 오후 6시에 각 처리군 별로 약침 처리를 하였다. 위의 방법으로 조제한 약침액 원액을 1cc 주사기(26G, 1/2 inch, (주)한국백신, 한국)로 0.2cc씩 경혈에 주입하였다. 약침처리시의 스트레스를 줄이기 위해 1.5m의 합판에 10개의 보정축을 설치한 보정틀을 제작, 이용했다. 취혈은 인체의 腎俞(BL23), 中脘(CV12) 및 命門(GV4)에 상응하는 부위를 WHO의 표준경혈정위법[9)]의 방법에 준해 취혈하였다.

5. Lipopolysaccharide (LPS) 처리

LPS 처리는 4주간의 사양 및 약침처리 기간이 종료된 후, 그리고 마지막 약침처리 후 약 15시간 후에 5mg/kg의 수준으로 각 처리군 모두 동일하게 복강 주사하였다.

6. 혈액, 간장 및 peritoneal lavage fluid (PLF)의 채취

혈액채취는 시험 최종일에 LPS 처리 직전, LPS 처리 후 2h 및 5h째에 각 처리군 별로 심장천자법에 의해 채혈했다. 간장채취는 LPS 처리 후 5시간째에 혈액채취가 끝난 후 적출했다. 또한 peritoneal cells을 분리하기위하여 10ml의 phosphate buffered saline (PBS)을 복강으로 주입한 후, PLF를

채취했다.

7. 혈장 및 간장의 싸이토카인 정량

혈장 싸이토카인 정량용 시료는 채혈 직후, 혈장을 분리하여 -80℃에 냉동 보관하였다. 간장 싸이토카인 정량용 시료는 1g의 간장을 채취하여 5ml의 cold PBS (pH 7.4, containing a protease inhibitors cocktail)과 함께 혼합하여 얼음 위에서 분쇄(homogenized)하였다. 분쇄혼합물을 4℃, 15,000 rpm, 15분간 원심분리한 후, 상층부를 0.45㎛ 필터로 여과하고, 다시 원심분리해서 상층부를 -80℃에 냉동 보관했다. 싸이토카인 (IL-1β, TNF-α, IL-6 및 IL-10)정량은 시판 kit (Biosource International, USA)를 이용했다. TNF-α의 최저 측정농도는 0.7pg/ml이며, 다른 싸이토카인들은 3-8pg/ml이다. 간장 싸이토카인 정량은 5ml의 PBS에 생 간장 1g을 혼합한 조정액으로 측정하였으며, pg/mg 단위로 나타내었다.

8. Lymphocyte subpopulation 분포

Lymphocyte subpopulation의 검사는 LPS 처리 후 5h의 혈액을 사용했다. 혈액 내의 CD4 와 CD8의 분포는 flow cytometry로 분석했다. Th cells과 cytotoxic T cells의 동정을 위해 fluorescein-conjugated mouse anti-rat CD8 와 phycoerythrin-conjugated mouse anti-rat CD4 (Serotec, Oxford, United Kingdom)가 각각 사용되었다. Fluorescence data는 5x104 viable cells 농도로 flow cytometry (Coulter, Miami, FL, USA)에 의해 분석했다.

9. 혈액 polymorphonuclear neutrophils (PMNs)의 phagocytosis assay

혈액 PMNs의 phagocytic activity는 flow cytometric phagocytosis test는 Böhmer 등의 방법에 의해 실시했다[10]. Ice-water bath에서 혈액에 opsonized fluorescein iso-thiocyanate-labeled Escherichia coli (Molecular probes, Eugene, OR, USA)를 첨가하고, 10분간 37℃에서 incubate한 후, trypan blue (Sigma, St. Louis, MO, USA) solution (0.25mg/ml in citrate salt buffer, pH 4.4) 100μL가 첨가되었다. 그 후, Hank's buffered saline solution 으로 2회 세척, FACS lysing solution (Becton Dickinson)을 첨가하여 erythrocytes를 용해했다. 그 후, Hank's buffered saline solution 으로 세척, 100μL의 propidium iodide solution (1μg/ml in Hank's buffered saline solution)이 nuclear DNA를 stain하기 위하여 flow cytometric analysis 10분전에 첨가되었다. Flow cytometry 는 488-nm argon laser가 장착된 FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson)를 사용했다.

10. Plasma intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) 및 prostaglandin E2 (PGE2) 농도

혈장 ICAM-1 및 CINC-1 농도는 시판

enzyme-linked immunosorbent assay microtiter plates, antibodies specific for rat ICAM-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 와 CINC-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, United Kingdom)이 코팅된 microtiter strips에 의해서 측정했다. Detection limits는 ICAM-1 과 CINC-1 이 각각 <17 pg/ml 및 1.3pg/ml이었다. PGE2 농도 측정은 enzyme-linked immunosorbent assay로 했다. PGE2 농도의 측정 한계는 <8.3 pg/ml이었다.

11. Stable nitrite (NO2-) 와 nitrate (NO3-)의 정량

혈장 및 PLF 내의 NO2-/NO3-의 측정은 kit (Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA)로 측정했다.

12. PLF monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 및 CINC-1 농도

MCP-1 및 CINC-1 농도 측정은 quantitative sandwich enzyme immunoassay kit (Biosource)로 실시했다. Detection limit는 <8 pg/ml이었다.

13. 통계처리

실험결과는 SPSS package를 이용하여 one-way ANOVA검정을 수행하였으며, 각 처리군 간의 유의성 검정은 Duncan's multiple range test 에 의해 P<0.05 수준에서 실시했다.

III. 결 과

1. Plasma IL-1β 농도

LPS 처리 후 2시간째(2h)에 전 처리군 모두가 급격히 상승하여 5시간째(5h)까지도 상승상태를 유지했다. 각 처리군 별 상승 수준은 LPS처리 후 2h째에는 中脘(CV12) 약침군이 가장 낮은 값을 나타내어 대조군과 유의성 있게 차이가 있었으며(P<0.05), 5h째에는 中脘(CV12) 및 命門(GV4) 약침군이 대조군보다 유의성 있게 낮은 값을 나타내었다 (P<0.05, Table 2).

Table 2. Effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi pharmacopuncture on plasma IL-1β concentration in lipopolysaccharide-exposed rats.

Treatment	IL-1β (pg/ml), time (h)*		
	0h	2h	5h
Control	18.38±2.57^{NS}	94.21±10.14^{b}	355.81±33.75^{c}
BL23	13.88±2.39^{NS}	108.72±10.53^{b}	322.45±28.51^{bc}
CV12	18.68±3.15^{NS}	77.35± 7.22^{a}	269.15±18.39^{a}
GV4	14.57±3.11^{NS}	95.83± 8.41^{b}	288.43±30.18^{ab}

*, 0h, 2h and 5h after LPS injection; Control, intraperitoneal injection of LPS (5 mg/kg); BL23, BL23 pharmacopuncture + LPS; CV12, CV12 pharmacopuncture + LPS; GV4, GV4 pharmacopuncture + LPS; ^{a,b,c}, means in the same column with different superscripts are significantly different (P<0.05); ^{NS}, not significantly different (P>0.05).

2. Plasma IL-6 농도

LPS 처리 후 2시간째(2h)에 전 처리군 모두가 급격히 상승하여 5시간째(5h)까지도 상승상태를 유지했다. 각 처리군 별 상승 수

준은 LPS처리 후 2h째에는 中脘(CV12) 약침군이 통계적으로 유의하게 낮은 값을 나타내었으며($P<0.05$), 5h째에는 中脘(CV12) 및 命門(GV4) 약침군이 대조군보다 유의하게 낮은 값을 나타내었다 ($P<0.05$, Table 3).

Table 3. Effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi pharmacopuncture on plasma IL-6 concentration in lipopolysaccharide-exposed rats.

Treatment	IL-6 (pg/ml), time(h)*		
	0h	2h	5h
Control	16.37±3.11^{NS}	92.47±11.35^{b}	628.41±37.55^{b}
BL23	18.02±3.75^{NS}	102.32±13.71^{b}	603.18±30.29^{b}
CV12	15.88±2.94^{NS}	71.14± 7.55^{a}	514.57±20.34^{a}
GV4	15.31±3.62^{NS}	115.35±15.43^{b}	527.26±27.84^{a}

*, 0h, 2h and 5h after LPS injection; Control, intraperitoneal injection of LPS (5 mg/kg); BL23, BL23 pharmacopuncture + LPS; CV12, CV12 pharmacopuncture + LPS; GV4, GV4 pharmacopuncture + LPS; ^{a,b}, means in the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$); ^{NS}, not significantly different ($P>0.05$).

3. Plasma TNF-α 농도

LPS 처리 후 2시간째(2h)에 전 처리군 모두가 급격히 상승하여 5시간째(5h)까지도 상승상태를 유지했다. 각 처리군 별 상승 수준은 LPS처리 후 2h째에는 전 처리군 모두가 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 5h째에는 中脘(CV12) 약침군이 대조군을 비롯한 여타 약침군들보다 유의하게 낮은 값을 나타내었다 ($P<0.05$, Table 4).

Table 4. Effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi pharmacopuncture on plasma TNF-α concentration in lipopolysaccharide-exposed rats.

Treatment	TNF-α (pg/ml), time (h)*		
	0h	2h	5h
Control	17.72±2.61^{NS}	654.52±47.85^{NS}	731.58±35.37^{c}
BL23	17.98±2.33^{NS}	711.46±59.32^{NS}	698.72±47.84^{bc}
CV12	15.85±2.47^{NS}	639.43±42.48^{NS}	538.52±30.64^{a}
GV4	16.11±2.75^{NS}	707.58±38.05^{NS}	652.94±43.71^{b}

*, 0h, 2h and 5h after LPS injection; Control, intraperitoneal injection of LPS (5 mg/kg); BL23, BL23 pharmacopuncture + LPS; CV12, CV12 pharmacopuncture + LPS; GV4, GV4 pharmacopuncture + LPS; TNF-α, tumor necrosis factor-α; ^{a,b,c}, means in the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$); ^{NS}, not significantly different ($P>0.05$).

4. Plasma IL-10 농도

LPS 처리 후 2시간째(2h)에 전 처리군 모두가 상승하여 5시간째(5h)까지도 상승상태를 유지했다. LPS 처리 후 5h째에는 中脘(CV12) 약침군이 대조군과 유의하게 차이가 났다 ($P<0.05$, Table 5).

Table 5. Effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi pharmacopuncture on plasma IL-10 concentration in lipopolysaccharide-exposed rats.

Treatment	IL-10 (pg/ml), time(h)*		
	0h	2h	5h
Control	18.24±2.57^{NS}	42.37±8.02^{ab}	70.17±8.51^{ab}
BL23	17.08±3.52^{NS}	44.12±9.14^{ab}	55.39±7.35^{a}
CV12	16.61±2.53^{NS}	58.47±7.85^{b}	97.66±11.94^{c}
GV4	17.73±3.15^{NS}	37.97±9.58^{a}	81.41±6.95^{bc}

*, 0h, 2h and 5h after LPS injection; Control, intraperitoneal injection of LPS (5 mg/kg); BL23, BL23 pharmacopuncture + LPS; CV12, CV12 pharmacopuncture + LPS; GV4, GV4 pharmacopuncture + LPS; ^{a,b,c}, means in the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$); ^{NS}, not significantly different ($P>0.05$).

5. 간장 싸이토카인 농도

LPS 처리 후 5h째에 측정한 각 처리군별 간장 내 각종 싸이토카인의 농도를 Table 6에 나타내었다. IL-1β의 농도에서 中脘(CV12) 약침군이 대조군과 비교하여 유의한 차이를 나타낸 것 ($P<0.05$) 이외에 IL-6, TNF-α 및 IL-10의 농도는 대조군과 약침 처리군들 사이에 유의한 차이가 없었다 ($P>0.05$, Table 6).

Table 6. Effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi pharmacopuncture on liver cytokines concentration in lipopolysaccharide-exposed rats.

Treatment	IL-1β (pg/mg)	IL-6 (pg/mg)	TNF-α (pg/mg)	IL-10 (pg/mg)
Control	27.53±4.91^{b}	6.35±0.75^{NS}	2.05±0.51^{NS}	1.21±0.44^{NS}
BL23	27.37±3.15^{b}	7.51±0.83^{NS}	1.77±0.73^{NS}	1.13±0.52^{NS}
CV12	19.86±3.05^{a}	6.11±0.94^{NS}	0.95±0.66^{NS}	1.38±0.61^{NS}
GV4	23.55±3.92^{ab}	6.92±1.08^{NS}	1.14±0.72^{NS}	1.62±0.58^{NS}

Control, intraperitoneal injection of LPS (5 mg/kg); BL23, BL23 pharmacopuncture + LPS; CV12, CV12 pharmacopuncture + LPS; GV4, GV4 pharmacopuncture + LPS; ^{a,b}, means in the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$); ^{NS}, not significantly different ($P>0.05$).

6. Lymphocyte subpopulation의 분포

LPS 처리 후 5h째에 각 처리군 별 lymphocyte subpopulations의 구성비를 보면 CD4 및 CD8 모두가 대조군과 약침 처리군들 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았다 ($P>0.05$). CD4/CD8의 비율은 中脘(CV12) 약침군이 높은 수치를 나타내었다 (Table 7).

Table 7. Effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi pharmacopuncture on lymphocyte subpopulation distributions in lipopolysaccharide-exposed rats.

Treatment	CD4(%)	CD8(%)	CD4/CD8(%)
Control	31.29±4.51^{NS}	25.27±4.88^{NS}	1.24
BL23	33.84±4.92^{NS}	23.55±3.35^{NS}	1.44
CV12	39.16±5.33^{NS}	21.47±4.32^{NS}	1.82
GV4	34.48±5.15^{NS}	22.39±3.71^{NS}	1.54

Control, intraperitoneal injection of LPS (5 mg/kg); BL23, BL23 pharmacopuncture + LPS; CV12, CV12 pharmacopuncture + LPS; GV4, GV4 pharmacopuncture + LPS; ^{NS}, not significantly different ($P>0.05$).

7. Plasma의 PMN phagocytosis, NO2-/NO3-, ICAM-1, CINC-1 및 PGE2 농도

Table 8은 LPS 처리 후 5h째에 각 처리군 별 plasma PMN phagocytosis와 plasma NO2-/NO3-, ICAM-1, CINC-1 및 prostaglandin E2 농도를 나타낸 것이다. Plasma PMN phagocytosis, CINC-1 농도는 대조군과 약침 처리군들 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다. NO2-/NO3- 농도는 中脘(CV12) 약침군과 命門(GV4) 약침군이 대조군보다 유의하게 낮은 값을 나타내었다 ($P<0.05$). ICAM-1 농도는 中脘(CV12) 약침군만이 대조군보다 유의하게 낮은 값을 나타내었다 ($P<0.05$). PGE2 농도는 약침군 모두가 대조군보다 낮은 값을 나타내었으며, 약침군 간에는 유의한 차이를 나타내지 않았다.

Table 8. Effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi pharmacopuncture on the phagocytosis of PMNs, plasma concentration of NO3-/NO2-, ICAM-1, CINC-1, and PGE2 in lipopolysaccharide-exposed rats.

Treatment	PMNs phagocytosis (%)	NO3-/NO2- (μM)	ICAM-1 (ng/ml)	CINC-1 (pg/ml)	PGE2 (pg/ml)
Control	50.18±15.44NS	51.95±4.73c	94.25± 9.36b	257.43±35.29NS	751.25±39.54b
BL23	47.61±14.86NS	48.32±4.11bc	90.73±15.88b	219.82±47.81NS	588.37±40.21a
CV12	55.62±11.38NS	35.69±4.07a	71.17± 9.58a	249.12±40.95NS	513.62±35.51a
GV4	57.39±16.72NS	38.17±6.74ab	82.94±12.55ab	230.63±42.51NS	522.71±51.38a

Control, intraperitoneal injection of LPS (5 mg/kg); BL23, BL23 pharmacopuncture + LPS; CV12, CV12 pharmacopuncture + LPS; GV4, GV4 pharmacopuncture + LPS; PMNs, polymorphonuclear neutrophils; ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1; CINC-1, cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1; PGE2, prostaglandin E2; $^{a\,b\,c}$, means in the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$); ^{NS}, not significantly different ($P>0.05$).

8. PLF의 MCP-1, PGE2 및 CINC-1 농도

Table 9는 LPS 처리 후 5h째에 각 처리군 별 PLF MCP-1, PGE2 및 CINC-1 농도를 나타낸 것이다. MCP-1 및 CINC-1 농도는 中脘(CV12) 약침군이 대조군보다 유의하게 낮은 값을 나타내었다 ($P<0.05$). PGE2 농도는 처리군 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다.

Table 9. Effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi pharmacopuncture on the PLF concentration of MCP-1, PGE2, and CINC-1 in lipopolysaccharide-exposed rats.

Treatment	PLF MCP-1 (pg/ml)	PLF PGE2 (pg/ml)	PLF CINC-1 (pg/ml)
Control	144.29±22.31^{b}	605.17±77.31^{NS}	402.33±51.54^{b}
BL23	121.88±25.75^{ab}	658.42±59.68^{NS}	378.94±72.38^{ab}
CV12	93.52±17.48^{a}	701.35±69.11^{NS}	297.55±56.17^{a}
GV4	101.27±20.91^{ab}	611.37±85.24^{NS}	340.72±61.44^{ab}

Control, intraperitoneal injection of LPS (5 mg/kg); BL23, BL23 pharmacopuncture + LPS; CV12, CV12 pharmacopuncture + LPS; GV4, GV4 pharmacopuncture + LPS; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; CINC-1, cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1; PGE2, prostaglandin E2; $^{a\,b}$, means in the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$); ^{NS}, not significantly different ($P>0.05$).

IV. 고 찰

생체에 위해인자가 침입하였을 때 나타나는 염증반응은 주변조직의 손상과 더불어 생체기능에 이상을 가져와 질병의 상태를 악화시키거나 새로운 질병을 유도하므로 소염제의 역할은 임상적으로 중요한 의미를 갖는다. 그러나 현재 임상현장에서 사용되는 항염증제들은 부작용으로 인해 제한적으로 사용되고 있으며, 이러한 결과가 환자의 치료효과를 하락시키는 요인으로 작용한다. 따라서 보다 더 개선된 새로운 염증제어요법이 필요하며 이에 한약재 및 천연물들이 응용되어 왔다.

黃芩(*Scutellariae radix*)은 꿀풀과(*labitate*)에 속하는 다년생 초본식물인 黃芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 주피를 벗긴 뿌리이다. 성미는 苦寒하고 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 止血, 安胎의 효능이 있으며 주요 성분은 flavonoid계 화합물들이며, 약 30여종의 성분들이 밝혀져 있다[5]. 현재까지 밝혀진 黃芩의 주요 생리활성기능으로는 항histamin효과[6], 항균작용[7], 항염증효과[8] 등

이다.

이러한 주요 기능들은 대부분이 黃芩에 내재하고 있는 flavonoid 성분들에 의한 것이며, 특히 baicalein은 dextran sulfate sodium (DSS)에 의해 유도된 대장염 모델 동물에서 기존의 염증치료제로 개발된 sulfasalazine보다 소량으로 거의 동일한 염증치료효과를 나타내었다고 보고되어 있다[11]. 또한 최근의 연구에서 DSS로 유도한 염증성 질환모델동물에서 黃芩 열수 추출물이 면역시스템을 강화하였다고 보고되었다[12]. 黃芩藥鍼液을 이용한 연구들에서는 type-1 hypersensitivity 염증 반응에 긍정적인 영향을 미친다고 보고되었으며[13], RAW 264.7 macrophage에서 LPS로 유발된 염증반응에 대한 소염효과도 보고되었다[8]. 기존의 연구들을 살펴볼 때 黃芩이 소염제로서의 작용이 탁월하며 아울러 생체 내에서 藥鍼으로 시술할 때의 연구가 필요하다고 생각되어 본 연구에서는 黃芩을 약침액으로 하여 흰쥐의 腎俞(BL23), 中脘(CV12) 및 命門(GV4)에 상응하는 부위에 4주간 약침을 처리한 후, LPS로 염증을 유발시켜 黃芩약침의 염증제어 효과를 검토하고자 하였다.

본 연구에서 선택한 혈위들을 살펴보면 우선 腎俞(BL23)는 足太陽膀胱經의 혈로 둘째허리뼈의 가시돌기 아래에서 가쪽으로 1.5寸으로 滋補腎陰, 振氣化, 祛水濕, 强要脊, 益水壯火, 益聽明目 등의 혈성이 있고, 中脘(CV12)은 任脈의 혈로 胃의 募穴이고 八會穴중 腑會에 속하고 回陽九針穴이며 手太陽小腸經, 手少陽三焦經, 足陽明胃經과 會穴로 배꼽과 칼몸통결합의 연결선의 중간점으로 배꼽 위 4寸에 있으며, 和胃氣, 化濕滯, 理中焦, 調升降의 혈성이 있고 命門(GV4)은 督脈의 혈로 生命所系初生之門으로 둘째허리뼈의 가시돌기 아래 오목한 곳에 있고 培元補腎, 固精, 舒筋活血, 疏經調氣, 强健腰脊의 혈성이 있다[14]. 따라서 인체 면역 반응을 精氣와 연관지어 볼 때 先天之精과 後天之精과 관련된 장부는 腎, 脾胃가 해당되므로 이들의 대표적인 경혈로 腎俞(BL23), 命門(GV4)과 中脘(CV12)을 선택하여 실험을 수행한 것이다. 아울러 기존의 실험적 연구들에서의 腎俞(BL23), 中脘(CV12)이 면역기능이나 염증억제에 효과가 있다는 보고들도 경혈 선택의 근거가 되었다[15,16].

본 연구에서 염증유발을 위해 사용한 LPS는 병원균의 내독소이며, 그람음성세균의 세포막 구성물질로서 다당류, 인지질 및 소량의 단백질로 구성되어 있으며, 여러 종류의 염증세포 및 조직세포들에 의한 싸이토카인 생산을 촉진한다는 것이 밝혀져 염증반응을 연구하는 실험모델로 많이 응용된다[17,18]. 염증반응의 상태를 파악하기 위하여 LPS를 주입한 후 혈중 싸이토카인들의 농도를 측정하였는데, 이러한 싸이토카인들은 질병전개과정에서 central mediator로서, necrosis, 염증, 세포사멸, 세포섬유화 등과 깊은 관련성을 가진다. 또한 질병상태일 경우에 간장 내에서 싸이토카인들은 대단히 중요한 역할을 하며, LPS shock의 경우에도 반응을 나타내므로[19] 간장 조직도 채취하여 전염증성 싸이토카인들을 측정하였으며 아울러 그 생산에 직접 및 간접적으로 작용하거나, 생체면역의 지표가 될 수 있는 생물학

적 수치들을 검토하여 黃芩약침의 면역조절 능을 검토했다.

LPS 처리 후 전염증성 싸이토카인들 각각의 경시적 변동경향은 약침군 별로 차이를 나타내었는데, 혈중 IL-1β, IL-6, TNF-α 농도는 LPS 처리 후 5시간째에는 中脘(CV12) 및 命門(GV4) 약침군이 대조군에 비해 유의하게 낮은 값을 나타내었으며, 中脘(CV12) 약침군에서는 IL-10이 또한 유의하게 증가함을 볼 수 있었다. LPS 처리 후 2시간째 혈중 IL-1β, IL-6 농도는 中脘(CV12) 약침군만 대조군에 비해 유의하게 낮은 값을 나타내었다.

IL-1β는 in vivo 나 in vitro에서 LPS 독성의 mediator로 알려진 전염증성 싸이토카인으로 생물학적 기능은 TNF-α와 유사하며 이들 두 싸이토카인들은 여러 형태의 실험에서 상호 상가효과를 나타내는 것이 밝혀졌다[20]. IL-6는 monocytes/macrophages와 주로 간장의 Kupffer cell에서 생산되는 중요한 전염증성 싸이토카인이며, TNF-α는 LPS를 비롯한 여러 가지의 자극에 반응하여 monocytes와 macrophage에 의해 방출되는 peptide mediator로[21], endotoxin의 제거효과를 가지는 가장 중요한 mediator로 가정되었다[22]. 그러나 TNF-α는 LPS의 shock에 의해 Kupffer cell로부터 방출되며, 간장에 상처를 주고 간세포의 사멸을 일으키며, TNF-α의 과잉 생산은 광범위의 pathogenic 상태를 유발하므로 생체 내에서 TNF-α의 생산을 하락시키는 방법을 연구하고 있다. 따라서 이러한 전염증성 싸이토카인들의 약침군에 따른 농도 차이는 염증상태의 수준이 다르다는 것을 나타내며, 결과적으로 대조군보다 약침 처리군 모두가 염증의 수준이 낮으며, 특히 中脘(CV12) 약침군이 가장 낮은 염증 수준임을 시사해 준다. 한편 IL-10은 lympocytes와 macrophages에 의해 생산되는 강력(potent)한 pleiotropic anti-inflammatory cytokine으로 이것은 T helper type 1 cells, mono/macrophages, polymorphonuclear cells에 의해서 IL-6와 TNF-α와 같은 전염증성 싸이토카인들의 합성을 억제하며, in vitro와 in vivo에서 T-cell 활성화를 감소시킨다[23]. 따라서 전술한 다른 싸이토카인들의 변동경향에 영향을 주었을 것으로 생각된다.

LPS 처리 후 5시간째에 측정한 각 약침군별 간장 싸이토카인들 농도를 살펴보면, IL-6, TNF-α 및 IL-10의 농도는 약침군과 대조군 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았으며 다만 中脘(CV12) 약침군에서 IL-1β가 유일하게 대조군에 비해 유의하게 낮은 값을 보였다. 간장은 IL-10의 주요 source로 macrophages, Kupffer cells, T 및 B lymphocytes와 hepatocytes에서 생산되며 특히 설치류에서 IL-10은 LPS shock시에 Kupffer cell에서 주요 전염증성 싸이토카인들인 TNF-α와 IL-6를 down-regulate하는 것으로 알려져 있다[19,23]. 그러나 본 연구의 결과에서 IL-1β 농도가 中脘(CV12) 약침군에서만 차이가 있었고, 다른 싸이토카인들은 약침군 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이러한 경향은 간장 내 싸이토카인 농도에 영향을 줄 수 있는 여러 요인들이 복합적으로 작용하여 나타난 현상이라 생각되며,

특히 간장에서는 싸이토카인들의 합성과 배출이 일어나므로 배출 후의 경과시간에 따라 싸이토카인 농도에 영향을 줄 수 있는 외부 요인들의 효과는 상당히 달라질 수 있을 수 있으며, 이러한 현상이 한 요인으로 작용하였을 것으로 생각된다.

LPS 처리 후 5시간째에 각 약침군별 lymphocyte subpopulations의 구성비를 살펴보았는데 CD4 및 CD8 모두가 처리군 간에 유의한 차이를 나타내지 않았으며, CD4/CD8의 비율은 中脘(CV12) 약침군이 높은 수치를 나타내어, 염증 유발시에 CD4 및 CD4/CD8의 비가 하락하였다는 다른 연구자들의 실험결과와 비교해 볼 때[24], 비록 CD4와 CD8의 수는 처리군 간에 유의한 차이를 나타내지 않았으나, 中脘(CV12) 약침군에서 CD4/CD8의 비가 증가하여, 中脘(CV12) 黃芩약침 처리가 항염증 효과를 나타내었음을 시사해 준다.

한편 염증유발과 관련하여 혈중 PMN phagocytosis 및 관련된 기능성 물질들인 PGE2, NO2-/NO3-, CINC-1, ICAM-1의 농도를 살펴보았다. PGE2는 전염증성 싸이토카인들과 다양한 chemoattractants들의 생산을 유도하며[25], superoxide (O2-)는 주변 조직에 손상을 주는 요인으로 작용하며[26], ICAM-1 및 CINC-1도 염증부위에서 염증상태를 악화시키는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[27]. 본 연구에서는 혈중 PMN phagocytosis와 CINC-1 농도는 대조군과 약침군들 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았다. NO2-/NO3- 및 ICAM-1 농도는 中脘(CV12) 약침군이 대조군보다 유의하게 낮은 값을 나타내었다. PGE2 농도는 약침군 모두가 대조군보다 유의하게 낮은 값을 나타내었으나, 약침군 사이에는 유의한 차이를 나타내지 않았다. PLF 내의 MCP-1 및 CINC-1 농도는 中脘(CV12) 약침군이 대조군보다 유의하게 낮은 값을 나타내었으나 PGE2 농도는 약침군 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이러한 생체 내 염증에 관여하는 기능성 물질들의 농도변화는 염증상태의 수준을 나타내주는 지표가 될 수 있으며, 본 시험의 결과를 검토해 보면 黃芩약침이 염증상태의 완화에 효과적임을 시사하고 있다. 이는 기존의 黃芩약침들을 이용한 消炎 또는 抗酸化 연구들의 결과들과 맥락을 같이 하는 것이지만[8,13,28] 경혈의 특이성에 관한 내용은 없었던 바, 본 연구의 결과를 바탕으로 향후 이에 대한 자세한 연구도 필요하다고 생각된다.

이상의 내용을 종합해 보면 黃芩약침이 염증반응에 관련된 인자들을 전반적으로 억제하는 효과가 있으며 특히 中脘(CV12)에 시술한 경우가 소염효과가 가장 우수한 것으로 보인다.

V. 결 론

새로운 염증제어요법을 개발하기 위한 기초연구로 黃芩을 약침으로 하여 흰쥐의 腎俞(BL23), 中脘(CV12) 및 命門(GV4)에 상응하는 부위에 4주간 처리한 후, LPS로 염증을 유발시켜 黃芩약침의 염증제어 효과를 검토한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

혈중 전염증성 싸이토카인들을 분석한 결

과, LPS 주입 후 5시간째에 中脘(CV12) 黃芩약침군이 대조군에 비해 IL-1β, IL-6, TNF-α 농도가 유의하게 감소하였고, IL-10은 유의하게 증가하였다 (P<0.05). LPS 주입 2시간째에도 中脘(CV12) 黃芩약침군에서 IL-1β, IL-6의 농도가 대조군에 비해 유의하게 낮았다 (P<0.05). 命門(GV4) 黃芩약침군은 IL-1β, IL-6, TNF-α 농도가 LPS 주입 5시간째에 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 (P<0.05).

LPS 주입 5시간째에 간장 싸이토카인들을 분석한 결과, IL-6, TNF-α, IL-10의 농도는 모두 대조군과 차이가 없었고 다만 中脘(CV12) 黃芩약침군에서 IL-1β의 농도가 유일하게 감소함을 보였다 (P<0.05).

CD4/CD8 비와 polymorphonuclear neutrophils의 phagocytic activity는 대조군에 비해 모든 약침군에서 차이가 없었다 (P>0.05). 혈중 NO3-/NO2-, intracellular adhesion molecule-1 농도는 中脘(CV12) 黃芩약침군에서 대조군에 비해 유의성 있게 낮았다 (P<0.05). 혈중 prostaglandin E2의 농도는 모든 약침군에서 대조군에 비해 유의성 있게 낮은 수치를 보였으나 (P<0.05), 약침군들 사이에는 차이가 없었다. Peritoneal lavage fluid의 monocyte chemoattractant protein-1, cytokine-induced neutorphil chemoattractant-1 농도는 中脘(CV12) 黃芩약침군에서 대조군에 비해 유의성 있게 낮았다 (P<0.05).

이상의 결과를 종합해 볼 때 LPS로 유발한 급성 염증 백서 모델에서 中脘(CV12) 黃芩약침이 여타 혈위보다 소염효과가 우수하여 추후 인체에서의 소염효과에 대한 연구도 필요하다고 생각된다.

참고문헌

1. Rabson A, Roitt IM, Delves PJ. Really Essential Medical Immunology. Oxford : Blackwell Publishing Ltd. 2005 : 1-14.
2. 김현제 외 편역. 한의학사전. 서울 : 성보사. 1988 : 194.
3. 문류모. Stress에 관한 문헌적 고찰 - 현대의학을 중심으로. 동의신경정신과학회지. 1991 ; 2(1) : 38-50.
4. 채병윤. 한방외과. 서울 : 고문사. 1978 : 53.
5. 김호철. 한약약리학. 서울 : 집문당. 2001 : 129-33.
6. Middleton E Jr, Drzewiecki G. Naturally occurring flavonoids and human basophil histamine release. Int Arch Allergy Appl Immun. 1985 ; 77(1-2) : 155-7.
7. Middleton E Jr, Harborne JB, Beretz A. Plant Flavonoids in Biology and Medicine II. Biochemical, Cellular and Medicinal Properties. New York : Alan R. Liss. 1988 : 61-5.
8. 최영광, 박성호, 서일복, 김호현, 김정선, 김이화. 黃芩藥鍼液이 LPS로 유발된 RAW 264.7 대식세포에서의 항염증효과. 대한약침학회지. 2003 ; 6(3) : 5-14.
9. WHO standard acupuncture point locations in the western pacific region.

WHO Library Cataloguing in Publication Data. 2008 : 111, 205, 225.
10. Böhmer RH, Trinkle LS, Staneck JL. Dose effects of LPS on neutrophils in a whole blood flow cytometric assay of phagocytosis and oxidative burst. Cytometry 1992 ; 13(5) : 525-31.
11. Hong T, Jin GB, Cho S, Cyong JC. Evaluation of the anti-inflammatory effect of baicalein on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. Planta Med. 2002 ; 68(3) : 268-71.
12. 이순희, 임병우, 조여원. DSS로 유도된 염증성 장 질환 동물 모델에서 황금 열수 추출물이 면역 조절 기능에 미치는 영향. 한국영양학회지. 2004 ; 37(6) : 431-9.
13. 김유승, 송춘호. 黃芩藥鍼이 type 1 hypersensitivity에 미치는 영향. 경락경혈학회지. 2006 ; 23(3) : 111-22.
14. 전국한의과대학, 한의학전문대학원 경락경혈학 교재편찬위원회. 대학경락경혈학각론(상, 하). 의방서원. 2009 : 591, 1172, 1234.
15. 唐照亮. 灸療抗炎免疫作用的實驗研究. 中國鍼灸. 1997 ; 17(4) : 233.
16. 김동윤, 김경호, 김갑성, 송춘호, 안창범. 胃俞穴과 中脘穴의 蒼朮水鍼이 胃炎回復效果에 미치는 影響. 대한침구학회지. 1993 ; 10(1) : 289-96.
17. Marriott JB, Westby M, Cookson S, Guckian M, Goodbourn S, Muller G et al. CC-3052: A water-soluble analog of thalidomide and potent inhibitor of activation-induced TNF-α production. J Immunol. 1998 ; 161(8) : 4236-43.
18. Alba-Loureiro TC, Martins EF, Landraf RG, Jancar S, Curi R, Sannomiya P. Role of insulin on PGE2 generation during LPS-induced lung inflammation in rats. Life Sci. 2006 ; 78(6) : 578-85.
19. Simpson KJ, Lukacs NW, Colletti L, Strieter RM, Kunkel SL. Cytokines and the liver. J Hepatol. 1997 ; 27(6) : 1120-32.
20. Mathiak G, Grass G, Herzmann T, Luebke T, Zetina CC, Boehm SA et al. Capase-1-inhibitor ac-YVAD-cmk reduces LPS-lethality in rats without affecting haematology or cytokine responses. Br J Pharmacol. 2000 ; 131(3) : 383-6.
21. Chamulitrat W, Blazka ME, Jordan SJ, Luster MI, Mason RP. Tumor necrosis factor-α and nitric oxide production in endotoxin-primed rats administered carbon tetrachloride. Life Sci. 1995 ; 57(24) : 2273-80.
22. Harbrecht BG, Di Silvio M, Demetris AJ, Simmons RL, Billiar TR. Tumor necrosis factor-α regulates in vivo nitric oxide synthesis and induces liver injury during endotoxemia. Hepatology. 1994 ; 20(4 Pt 1) : 1055-60.
23. Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJ et

al. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation in vitro. Hepatology. 1998 ; 28(6) : 1518-24.
24. Tsou SS, Chiu WC, Yeh CL, Hou YC, Yeh SL. Effects of omega-3 fatty acids on inflammatory mediators and splenocyte cytokine mRNA expressions in rats with polymicrobial sepsis. Nutrition. 2008 ; 24(5) : 484-91.
25. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol. 2002 ; 23(3) : 144-50.
26. Hogg N. Free radicals in disease. Semin Reprod Endocrinol. 1998 ; 16(4) : 241-8.
27. Bressan E, Cunha F de Q, Tonussi CR. Contribution of TNF-alpha, IL-1 beta and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis. Cytokine. 2006 ; 36(1-2) : 83-9.
28. 김성일, 도원석, 김갑성. 黃芩藥鍼液의 흰쥐 肝細胞內의 抗酸化 效能에 관한 硏究. 대한침구학회지. 1993 ; 16(1) : 497-509.