

원저

桔梗藥鍼의 喘息抑制 및 免疫調節效果에 對한 實驗的 研究

박치영 · 홍권의

대전대학교 한의과대학 침구학교실

The Experimental Study on the suppression effect of Asthma and Immune response improvement of Platycodi Radix Herbal-acupuncture

Chi-Young Park · Kwon-Eui Hong

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

Abstract

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

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

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

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

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

4. The concentrations of IL-4, IL-5, IgE in BALF, and IL-4, IL-5, IL-13 in serum of the mice group treated with PR-HA decreased significantly compared with those of control group.

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

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

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

Conclusions : These result suggests that Platycodi Radix Herbal-acupuncture at Joksamni(St36) in C57BL/6mice may be an effective part to OVA-induced asthma in C57BL/6 mice.

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

* 교신저자 : 홍권의, 대전광역시 중구 대흥동 22-5
대전대학교 부속한방병원 침구과,
(Tel : 042-229-6816 E-mail: hkeacu@hanmail.net)

I. 緒 論

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

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

桔梗은 도라지과(Campanulaceae)에 屬하는 多年生 草本인 도라지Platycodon grandiflorum(JACQ.) A. DC.의 根을 乾燥한 것으로^{7,8)} 藥性은 微溫, 有小毒하며, 味는 苦辛甘하고 歸經은 肺, 心, 腎, 胃로 記錄되어 있다^{9,12)}.

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

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

II. 實 驗

1. 材料

1) 動物

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

2) 藥材

實驗에 使用된 桔梗(Platycodi Radix ; 以下 PR이라 表

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

3) 藥鍼液의 製造

桔梗 55g을 粉末로 만들고 蒸溜水 500ml을 加하여 3시간 동안 shaking water bath에서 流出한 後 濾過하였다. 이 濾過液을 濾過紙로 3回 濾過하고 rotary evaporator로 減壓濃縮한 後 95% ethyl alcohol 30ml을 加하였다. 室溫에서 攪拌하고 방치하여, 沈澱物이 生成되게 한 後 濾過하였다. 이 濾過液을 rotary evaporator로 減壓濃縮한 後 다시 濾過하고 85% ethyl alcohol 30ml을 加하고 잠시 攪拌한 後 방치하여, 沈澱物이 生成되게 한 後 濾過하였다. 濾過液에 75% ethyl alcohol 30ml를 加하고 攪拌한 後 방치하였다가 濾過하는 操作을 2회 반복하였다. 濾過液중의 ethyl alcohol 成分을 rotary evaporator로 減壓 제거하고, 남은 濃縮液이 20ml가 되게 하였다. 1N NaOH를 이용하여 濃縮液을 pH6.8이 되도록 調整하고, 저온에서 12시간 방치한 後 滅菌하였다. 滅菌된 濃縮液에 PBS를 加하여 1%로 희석하여 藥鍼液으로 使用하였다.

2. 方法

1) In vitro

천식이 유발된 생쥐의 폐 조직을 잘게 절단한 후 collagenase를 가하여 shaking incubation을 통해 세포를 분리하였다. 분리해 낸 세포에 rIL-3/rIL-5를 가하여 incubation하여 활성화 시켰다. 활성화된 세포에 약침액을 가하여 48시간 동안 배양 시킨 후 표식항체를 반응시켜 FACS 분석하였다.

2) In vivo

(1) Asthma mouse model

실험 1주째 200µl의 OVA/alum(500µg/ml)을, 2,3주째에는 100µl OVA/alum (500µg/ml)을 생쥐의 복강에 투여(i.p)하였다. 4주째에는 마취 후에 100µl의 OVA/alum (500µg/ml)을 기도투여(i.t)하였다. 5-8주째까지는 2.5mg/ml의 OVA/PBS 40µl을, 9-12주째까지는 5mg/ml의 OVA/PBS 40µl을 air compressor를 이용하여 30분간 주3

회 노출시켰다.

(2) Classification of experimental animal groups

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

(3) Bronchoalveolar lavage fluid(BALF) isolation

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

(4) Photomicrographs

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

(5) Fluorescence activated cell sorter(FACS)

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

(6) Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

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

(7) RT-PCR

① Total RNA의 抽出

各 실험군의 생쥐에서 떼어낸 폐 組織을 homogenizer를 이용하여 분쇄한 後 RNazolB(Tel-Test, USA)를 이용하여 total RNA를 抽出하였다. 抽出한 RNA는 DEPC(Diethyl Pyrocarbonate)를 處理한 20 μ l의 蒸溜水에 溶解시켜 정량하고, RNA를 확인하기 위하여 RNA 4 μ g을 EtBr이 들어있는 formaldehyde buffer와 섞어 70°C에서 10分間 denaturation 시킨 後, formaldehyde를 넣은 1.5% agarose gel에 loading dye와 함께 loading 하여 그 量을 確認하였다. 確認한 RNA는 RT-PCR(Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction)에 使用하였다.

② cDNA 合成

逆轉寫 反應은 準備된 total RNA 3 μ g에 該當하는 量을 75°C에서 10分 동안 denaturation시키고, 이 denaturated total RNA 3 μ g에 2.5 μ l의 10mM dNTPs, 1 μ l의 random sequence hexanucleotides (25pmole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l의 RNasin(20U/ μ l), 1 μ l의 100mM DTT 및 4 μ l의 5 \times RT buffer(250mM Tris-Cl, pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 混合한 後, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 添加한 뒤 DEPC 處理된 蒸溜水를 더하여 最終 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 反應 混合液을 잘 섞은 뒤 遠心分離하여 37°C 恒溫 水槽에서 60分 동안 反應시켜 first-strand cDNA를 合成한 다음, 95°C에서 10分 동안 放置하여 M-MLV RT를 不活性化시키고 즉시 얼음으로 옮겼다. 이렇게 合成이 完了된 first-strand cDNA는 PCR(Polymerase Chain Reaction)에 使用하였다.

③ cDNA의 PCR 增幅

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in Germany)을 이용하여 수행하였다. 反應은 이미 合成된 1 μ l의 first-strand cDNA를 主型으로 使用하였다. 主型에 대한 β -actin, TNF- α , IL-1b, IL-5, IL-4, IL-13에 대한 sense primer (20pmole/ μ l)와 antisense primer (20pmole/ μ l)를 混合하여 1 μ l를 加하고, 다시 3 μ l 2.5mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂) 및 0.18 μ l Taq polymerase (5U/ μ l)를 添加한 다음 최종 부피가 30 μ l 되도록 堊균 증류수를 加하고 predenaturation; 95°C, 5分, denaturation;

74°C, 5분, annealing; 55°C, 1분, elongation; 72°C, 1분을 25cycle한 뒤 postelongation을 72°C에서 3분 동안의條件으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 µl 씩 1.2% agarose gel에 loading하여 50V條件에서 30분간 전기영동을 통하여 分析하였다

Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다(Table 1).

3. 統計處理

통계는 student's t-test로 하였다.

III. 結果

1. In vitro

1) FACS analysis

① Granulocytes/lymphocytes

肺細胞中 Granulocytes의 比率이 Normal에서는 8.2%이었으나 Control에서는 26.8%로 증가하였고 PR-HAS에서는 13.6%로 減少하였다(Fig.1-1).

Table 1. Sequencing of Oligonucleotide

β-actin	sense oligonucleotide	5'-TGGAATCCTGATCCATGAAC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAGTCCG-3'
IL-4	sense oligonucleotide	5'-AGCCATATCCACGGATGCGAC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GCATGGTGGCTCAGTACTACG-3'
IL-5	sense oligonucleotide	5'-GCTCCTCAGGAATCTGTTC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GGCTCATGTACTTTCATGAG-3'
IL-13	sense oligonucleotide	5'-GCCGGGATGGGCATTCCACGTGTG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GGACGCCAAGGTCAAGAACAGTTG-3'
IL-1β	sense oligonucleotide	5'-CCTCTTCTGAGCTTGCAAC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-AGCCCATGAGTTCATTAC-3'
TNF-α	sense oligonucleotide	5'-AGCGGCTGACTGTCAGATTGTTAG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'

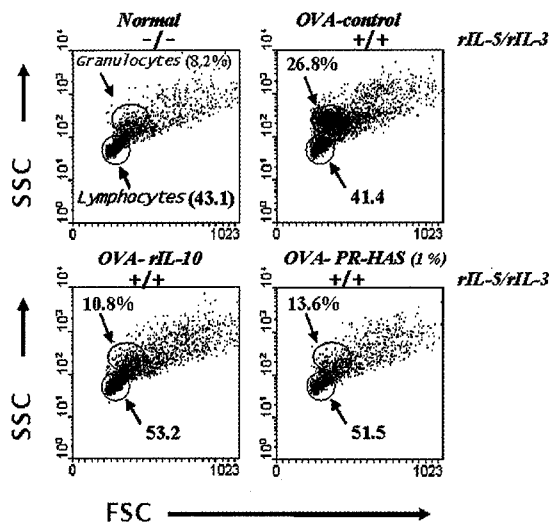


Fig. 1-1 Effect of PR-HAS on granulocytes/lymphocytes population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells.

② CD3e/CCR3⁺

肺細胞中 CD3e/CCR3⁺細胞의 比率이 Normal에서는 77.1%이었으나 Control에서는 92.2%로 증가하였고 PR-HAS에서는 77.6%로 減少하였다(Fig.1-2).

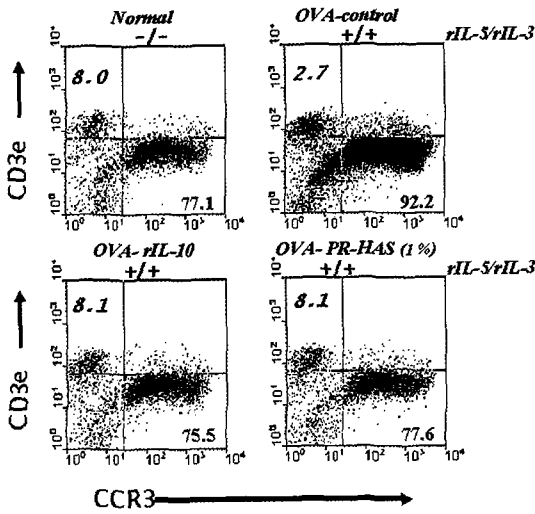


Fig. 1-2 Effect of PR-HAS on the percentage of CD3e⁺/CCR3⁺ population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells.

③ CD69⁺/CD3e⁺

肺細胞中 CD69⁺/CD3e⁺의 比率이 Normal에서는 10.4%이었으나 Control에서는 46.8%이었고 PR-HAS에서는 30.5%로 抑制되었다. CD69⁺/CD3e⁺의 비율은 Normal에서는 68.4%이었으나 Control에서는 34.9%이었고 PR-HAS에서는 48.5%로 增加했다(Fig.1-3).

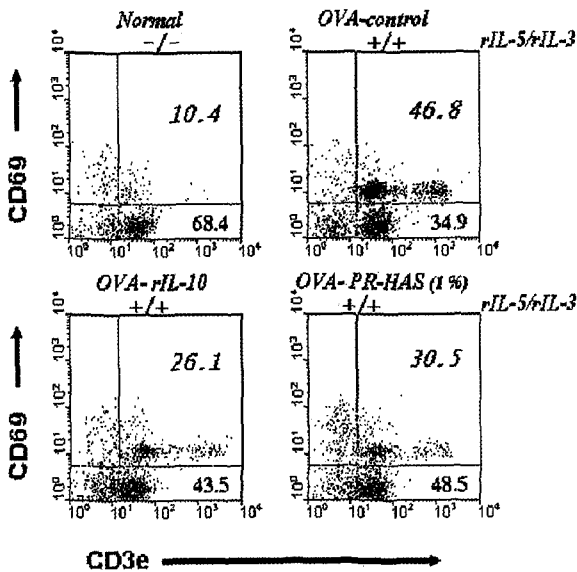


Fig. 1-3 Effect of PR-HAS on the percentage of CD69⁺/CD3e⁺ population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells.

④ CD4⁺ 및 CD8⁺

肺細胞中 CD4⁺細胞의 比率이 Normal에서는 35.1%이었으나 Control에서는 41.6%이었고 PR-HAS에서는 40.9%로 감소했다. CD8⁺의 비율은 Normal에서는 31.9%이었으나 Control에서는 20.1%이었고 PR-HAS에서는 34.5%로 增加했다(Fig.1-4).

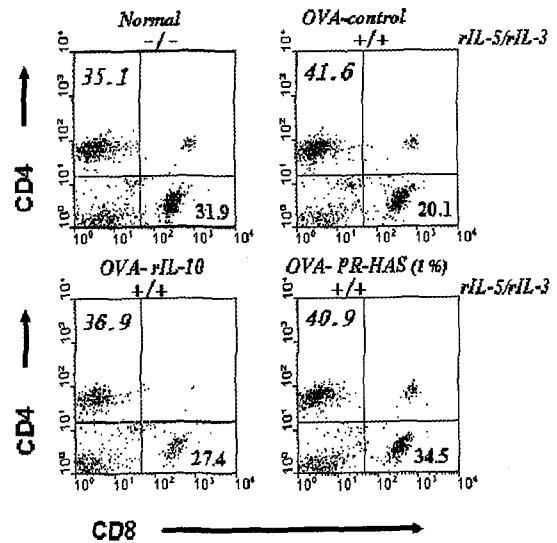


Fig. 1-4 Effect of PR-HAS on the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells.

⑤ CD23⁺/B220⁺

肺細胞中 CD23⁺/B220⁺의 比率이 Normal에서는 0.37%이었으나 Control에서는 1.59%이었고 PR-HAS에서는 1.54%로 抑制되었다(Fig.1-5).

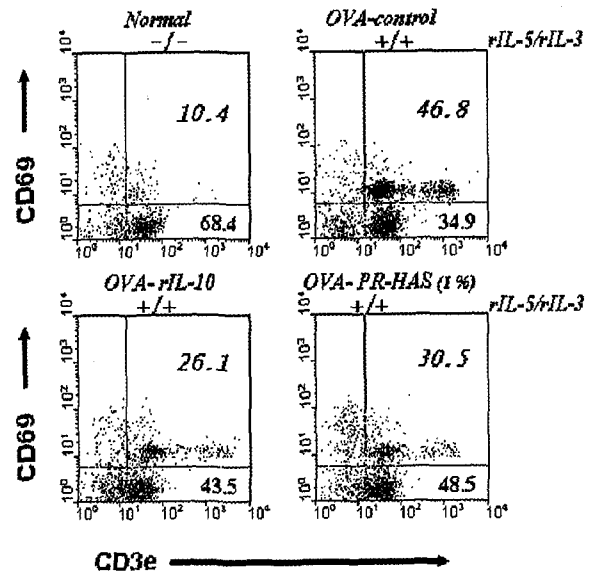


Fig. 1-5 Effect of PR-HAS on the percentage of CD23⁺/B220⁺ population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells.

2. In vivo

1) Lung weight

폐의 무게를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 무게가 유의성 있게 減少하였다($p < 0.05$)(Fig.2-1).

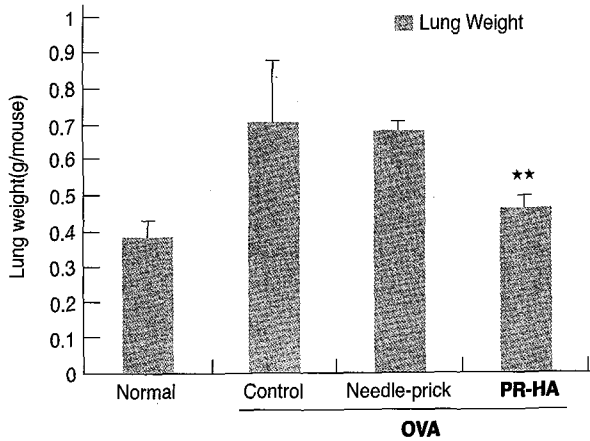


Fig. 2-1 Effect of PR-HA on lung weight in mice with OVA-induced asthmatic mouse lung weight.

2) Cell count

① Total cells in Lung

총 폐 세포수를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성 있게 減少하였다($p < 0.01$)(Fig.2-2).

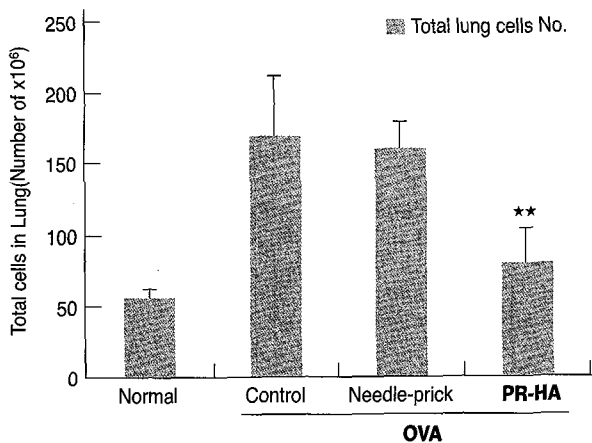


Fig. 2-2 The number of total cells in OVA-induced asthmatic mouse lung tissue.

② Total Leukocyte in BALF

Leukocyte를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성 있게 減少하였다($p < 0.01$)(Fig.2-3)

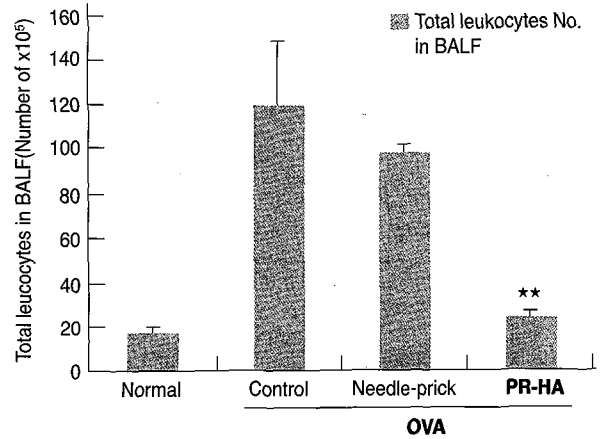


Fig. 2-3 The number of Total leukocytes in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

③ Eosinophils in BALF

好酸球수를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성 있게 減少하였다($p < 0.001$) (Fig.2-4).

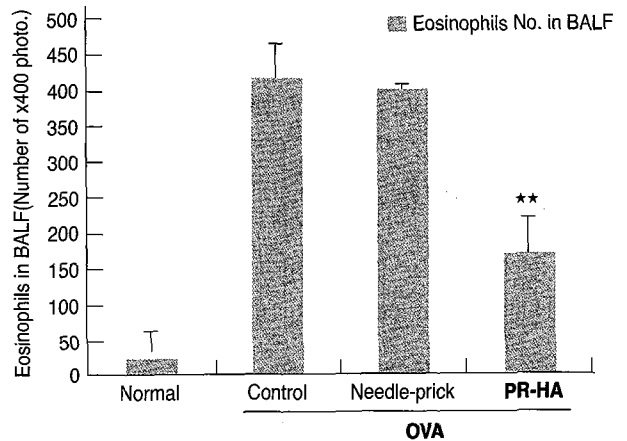


Fig. 2-4 The number of Eosinophil in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

3) Photomicrographs of Eosinophil in BALF

Control群에서는 好酸球가 다량으로 관찰 되었으며 PR-HA군에서는 好酸球가 현저하게 減少하였다(Fig.2-5).

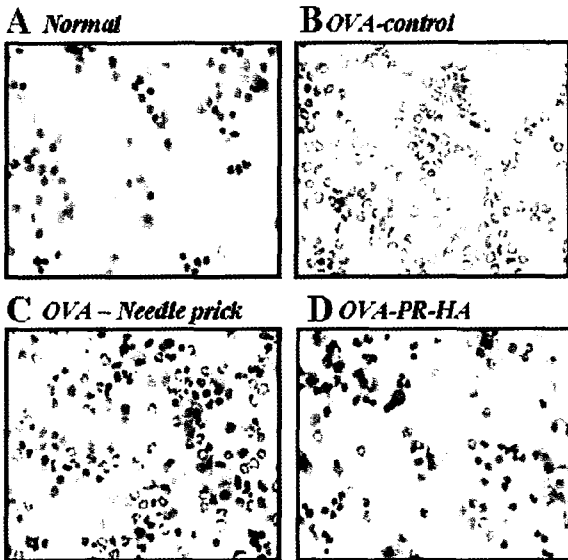


Fig. 2-5 Photomicrographs (original magnification, $\times 400$) of BALF cytopins from mice.

4) Histological analysis of lung sections

PR-HA群에서는 Control群에 비해 collagen의 부착이 현저하게 감소하였다(Fig.2-6).

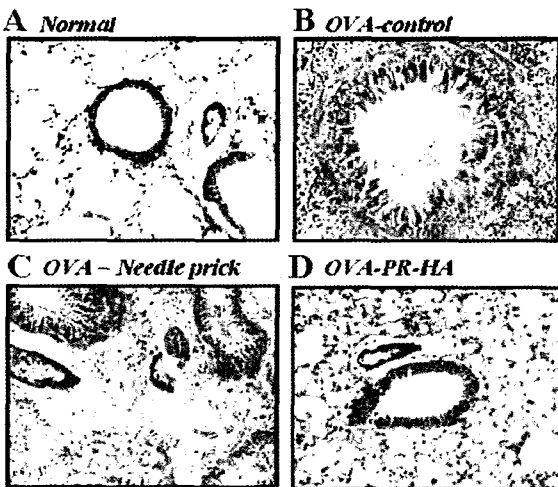


Fig. 2-6 Histological analysis of lung sections from mice

5) ELISA

① IgE in BALF

IgE의 양을 측정 한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성 있게 減少하였다($p < 0.001$)(Fig.2-7).

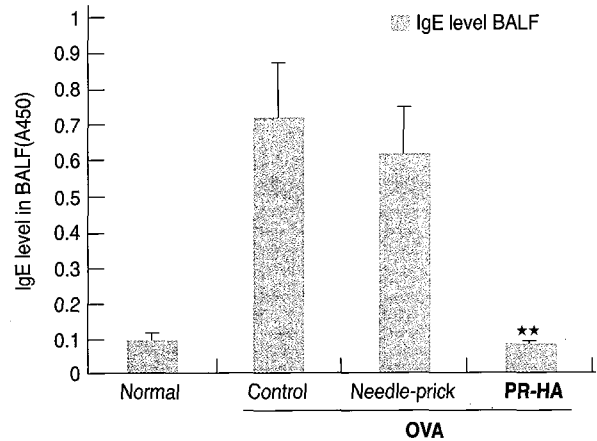


Fig. 2-7 The level of IgE in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

② IL-4 in BALF

IL-4의 양을 측정 한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성 있게 減少하였다($p < 0.05$)(Fig.2-8).

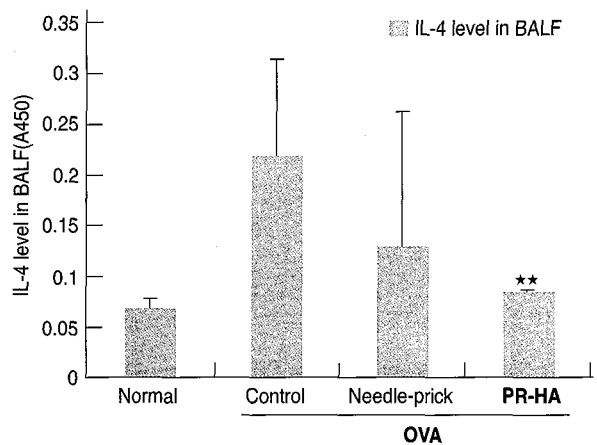


Fig. 2-8 The level of IL-4 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

③ IL-5 in BALF

IL-5의 양을 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성 있게 減少하였다($p < 0.01$)(Fig.2-9).

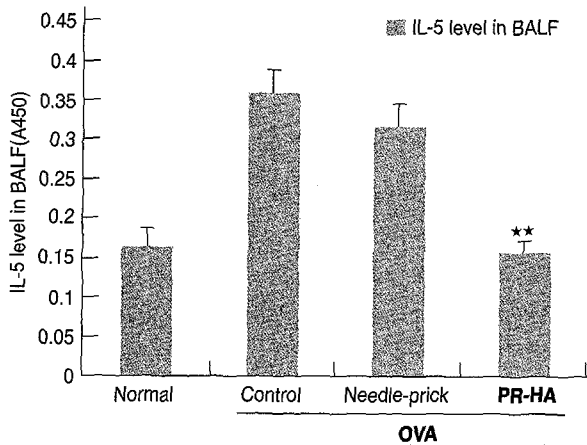


Fig. 2-9 The level of IL-5 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

⑤ IL-5 in Serum

IL-5를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성 있게 減少하였다($p < 0.05$) (Fig.2-11).

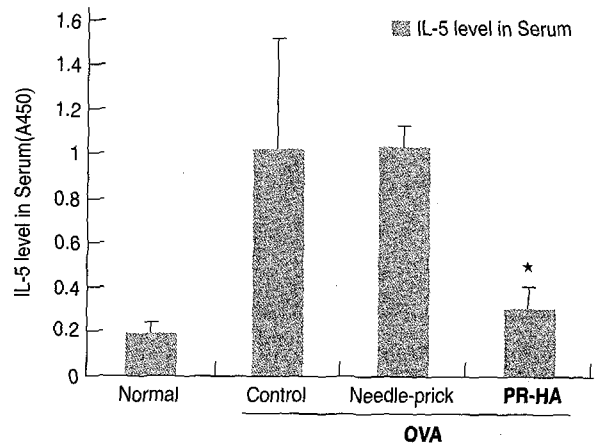


Fig. 2-11 The level of IL-5 in C57BL/6 mouse Serum.

④ IL-4 in Serum

IL-4를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성 있게 減少하였다($p < 0.001$) (Fig.2-10).

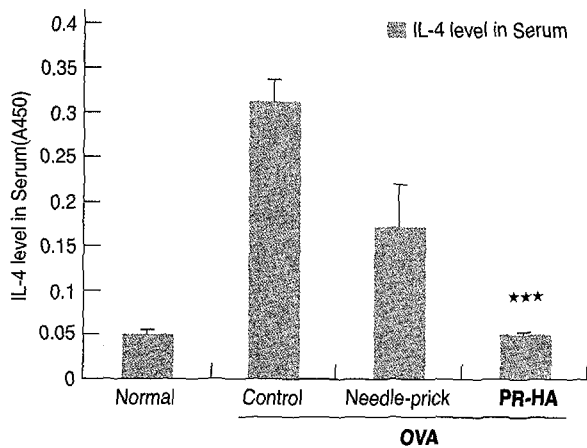


Fig. 2-10 The level of IL-4 in C57BL/6 mouse Serum.

⑥ IL-13 in Serum

IL-13을 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성 있게 減少하였다($p < 0.05$) (Fig.2-12).

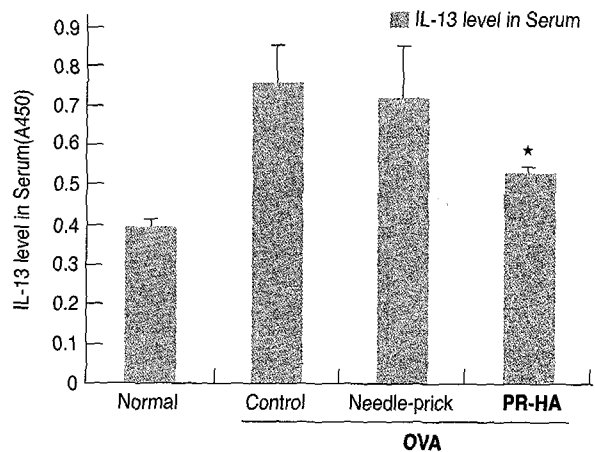


Fig. 2-12 The level of IL-13 in C57BL/6 mouse Serum.

5) FACS

FACS分析에 의해 각 細胞 수를 測定하였다.

① Gr-1+/CD11b+

Gr-1+/CD11b+ 세포 수를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성 있게 減少하였다(Fig.2-13).

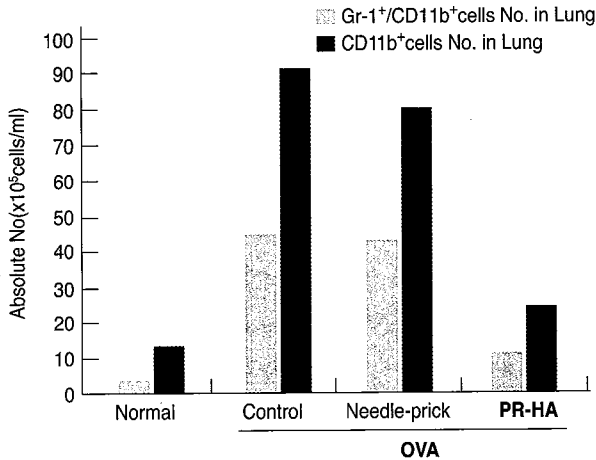


Fig. 2-13 Effect of PR-HA on Gr-1+/CD11b+ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

② CD3e+/CCR3+

CD3e+/CCR3+ 세포 수를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성 있게 減少하였다(Fig.2-14).

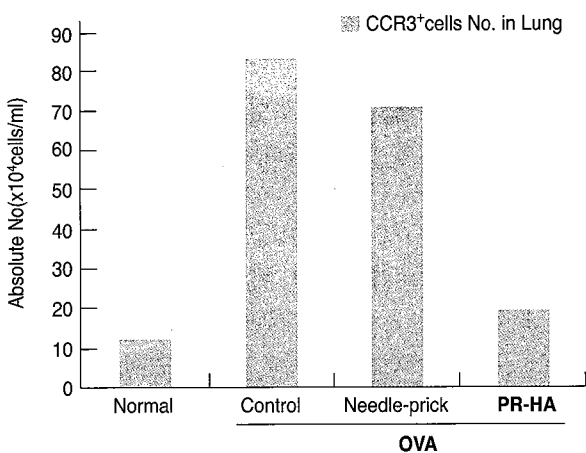


Fig. 2-14 Effect of PR-HA on CCR3+ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

③ CD4+ 및 CD8+

CD4+세포수와 CD8+ 세포 수를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성 있게 減少하였다(Fig.2-15).

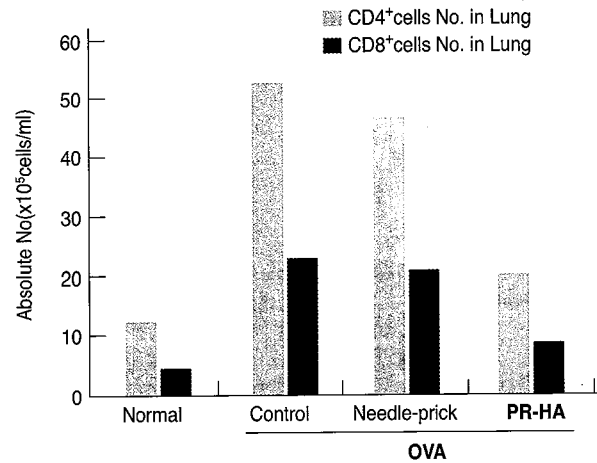


Fig. 2-15 Effect of PR-HA on CD4+ and CD8+ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

④ CD3e+/CD69+

CD3e+/CD69+ 세포 수를 측정한 결과, Control군에서는 Normal군에 비하여 증가하였고, PR-HA군에서는 Control군보다 유의성 있게 減少하였다(Fig.2-16).

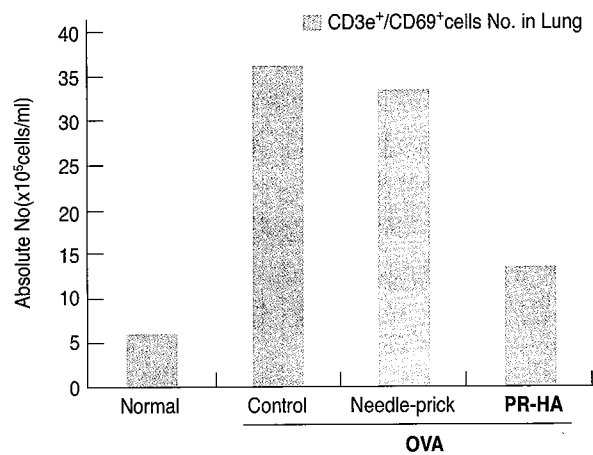


Fig. 2-16 Effect of PR-HA on CD3e+/CD69+ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

6) RT-PCR

RT-PCR을 이용하여 喘息 유발과 관련된 여러 cytokine 들의 mRNA 發顯을 관찰한 結果, β -actin, TNF- α , IL-5, IL-4, IL-13 등의 mRNA 發顯이 Control群에 비하여 PR-HA에서 현저히 減少하였다(Fig.2-17).

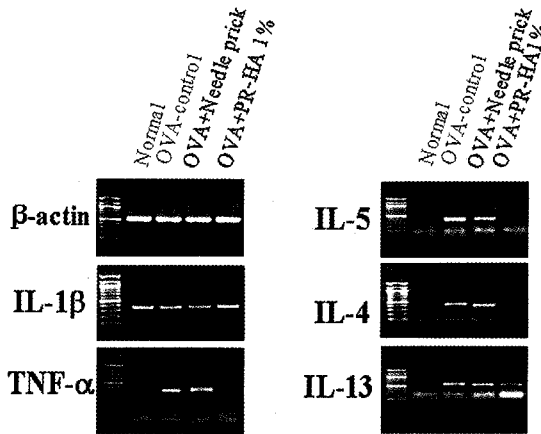


Fig. 2-17 mRNA expression of β -actin, TNF- α , IL-4, IL-5, and IL-13 in the lung.

IV. 考 察

알레르기성 질환 중 호흡기계 질환의 하나인 천식은 기도 내 염증반응에 의한 기도과민성과 가역적 기도폐쇄를 나타내는 질환이다³. 이러한 기도내의 염증반응은 천식반응 시 기도내로 유입되는 여러 가지 염증세포들의 활성화에 의해, 이들로부터 유리되는 여러 화학매개체들에 의해 이루어진다².

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

喘息(asthma)의 臨床病理學的 3가지 증상은 間歇的呼吸氣道 閉塞, 好酸球(eosinophil)에 의한 慢性 氣管支 炎症 및 氣管支 收縮物質에 의한 氣管支 平滑筋의 過反應이다⁴.

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

喘이라 한다^{3,17}.

In vitro에서 FACS분석을 통하여, granulocytes/lymphocytes population(%)을 살펴보면, 肺 細胞 中 granulocytes의 比率이 control에서는 26.8%였으나 PR-HAS群에서는 13.6%로 減少되었다(Fig.1-1). 이러한 結果로 PR-HAS群에서 肺內 炎症이나 알레르기 反應이 減少 된 것으로 생각된다.

肺細胞 中 CD3e-/CCR3+ 比率은 control에서는 92.2%이었으나 PR-HAS群에서는 77.6%로 낮아졌다(Fig.1-2). PR-HAS群에서 CD3e-/CCR3+ 비율이 감소된 것은 炎症과 알레르기 反應을 일으키는 호산구의 減少를 나타낸다.

肺細胞 中 CD69+/CD3e+ 비율은 control에서 46.8%이었으나 PR-HAS群에서는 30.5%로 억제되었고 CD69-/CD3e+비율은 control에서는 34.9%이었으나 PR-HAS群에서는 48.5%로 증가했다(Fig.1-3). PR-HAS群에서의 CD69+/CD3e+ 비율의 減少는 厭症과 알레르기 反應 中의 T세포의 減少를 나타낸다^{18,19}.

肺細胞 中 CD4+細胞의 比率이 control에서는 41.6%이었으나 PR-HAS群에서는 40.9%로 減少했고, CD8+細胞의 比率은 control이 20.1%이었으나 PR-HAS群에서는 34.5%로 增加했다(Fig.1-4). PR-HAS群에서의 CD4 세포 비율의 감소는 炎症과 알레르기 反應 中의 T세포의 減少를 나타낸다.

肺細胞 中 CD23+/B220+의 比率이 control에서는 1.59%이었으나 PR-HAS群에서는 1.54%로 抑制되었다(Fig.1-5). PR-HAS群에서의 CD23+/B220+ 比率의 減少는 炎症과 알레르기 反應 中의 B세포의 減少를 나타낸다.

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

이에 著者는 宣肺利咽, 祛痰排膿하는 效能⁸을 지니고 있는 桔梗으로 藥鍼液을 製造한 후, 疏風化濕, 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元, 祛邪防病 등의 效能^{20,21}이 있는 足三里에 藥鍼施術하여, 足三里-桔梗藥鍼이 알레르기 喘息모델 생쥐에서 喘息 抑制 및 免疫 調節에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생쥐의 폐 무게, 폐의 총세포수, BALF內 total leukocyte수, BALF內 eosinophil수, ELISA 分析에 의한 BALF內 IgE, IL-4, IL-5 및 serum內 IL-4, IL-5, IL-13을 測定하고, FACS 分析에 의해 Gr-

1+/CD11b+ 세포수, CD3-/CCR3+ 세포수, CD4+ 및 CD8+ 세포수, CD3e+/CD69+ 세포수의 變化를 測定하였다. 또한 RT-PCR을 利用하여 喘息 誘發과 關聯된 여러 cytokine 들의 mRNA 發顯을 觀察하였다.

In vivo 에서 實驗動物의 肺의 무게 측정 結果, PR-HA群에서 Control群에 比하여 肺의 무게가 減少하였다(Fig.2-1). 이러한 結果로 PR-HA가 肺와 氣管支의 炎症의 減少에 效果가 있는 것으로 思料된다.

肺의 총세포수는, control群에 比하여 PR-HA群에서 有意하게 減少하였다(Fig.2-2). 肺內 細胞數가 PR-HA에 의해 減少된 것은 桔梗藥鍼이 免疫細胞의 침착 및 침윤과 염증에 있어서 有意한 效果가 있는 것으로 思料된다.

BALF內의 leukocyte의 數는 control群에 比하여 PR-HA群에서 顯著하게 減少하였다(Fig.2-3). BALF內의 leukocyte의 數의 減少는 肺의 炎症이나 氣管支 喘息反應의 減少를 뜻하므로, 桔梗藥鍼으로 인해서 림프구수의 減少는 喘息 및 免疫調節에 效果가 있는 것으로 思料된다.

BALF內의 eosinophil의 數는 control群에 比하여 PR-HA群에서 有意하게 減少하였다(Fig.2-4). PR-HA에 의한 好酸球 數의 減少는 桔梗藥鍼이 염증 및 알레르기 反應에 效果가 있음을 나타낸다.

BALF를 染色하여 관찰한 結果, OVA-Control群에 비해 OVA-PR-HA群의 BALF에서 好酸球가 顯著하게 減少하였다(Fig.2-5). 이는 桔梗藥鍼이 알레르기 喘息의 病理과정에서 炎症性 細胞의 肺內 凝集 및 浸潤에 대한 抑制效果가 있음을 나타낸다.

肺 組織을 染色하여 관찰한 結果, OVA-Control群에서는 肺와 氣管支의 炎症으로 인하여 collagen이 組織에 多量으로 附着되고 주변의 好酸球도 多量으로 增加되었음이 觀察되었으며, 이에 比해 OVA-NR-HA群에서는 collagen의 沈着 및 好酸球가 減少되어, 桔梗藥鍼의 肺, 氣管支內 collagen 沈着 및 好酸球 移動에 대한 抑制效果가 있다고 思料된다(Fig.2-6).

ELISA 분석결과, BALF에서 IgE는 Control群은 정상군에 비해 有意하게 增加한 반면, PR-HA群은 Control群보다 有意하게 抑制되었다(Fig.2-7). BALF에서 IgE의 減少는 염증과 알레르기 反應의 減少를 나타낸다.

Serum과 BALF내 IL-4는 Control群에서 정상군에 비해 有意하게 增加한 반면, PR-HA群에서는 Control群에 比하여 有意하게 抑制되었다(Fig.2-8, 2-10). Serum과

BALF에서 IL-4의 減少는 炎症과 알레르기 反應의 減少를 나타낸다.

Serum과 BALF내 IL-5의 양은 有意하게 增加한 반면, PR-HA群에서는 Control群에 比하여 有意하게 抑制되었다(Fig.2-9, 2-11). Serum과 BALF에서 IL-5의 減少는 炎症과 알레르기 反應의 減少를 나타낸다.

Serum내 IL-13는 Control群에서는 정상군에 비해 有意하게 增加한 반면, PR-HA群은 Control群보다 有意하게 減少하였다(Fig.2-12). serum에서 IL-13의 減少는 염증과 알레르기 反應의 減少를 나타낸다(18,19).

위의 實驗을 통하여 ELISA 分析 結果 IL-4, IL-5, IL-13와 같은 cytokine과 IgE 등이 桔梗藥鍼實驗群에서는 대조군보다 有意하게 減少한 것은 PR-HA가 喘息으로 인한 염증성 세포의 增殖과 活性化를 抑制시켜 喘息抑制 및 免疫調節에 有效한 것으로 思料된다.

FACS 分析 結果, PR-HA群에서 Gr-1+/CD11b+세포수와 CD11b+세포수는 모두 control群에 比하여 정상군과 유사하게 減少하였다(Fig.2-13). Gr-1+/CD11b+세포수의 減少는 알레르기 反應을 나타내는 과립구의 減少를 意味한다.

CD3-/CCR3+세포수는 control에 比하여 PR-HA群에서 減少하였다(Fig.2-14). CD3-/CCR3+細胞數의 減少는 알레르기 反應을 나타내는 면역세포 중 호산구의 減少로 나타낸다.

CD4+세포수 및 CD8+세포수는 control에 比하여 CD4+세포수는 PR-HA群에서 減少하였고, CD8+세포수는 PR-HA群에서 Control群보다 有意하게 減少하였다(Fig.2-15). CD4+세포수 및 CD8+세포수의 減少는 알레르기 反應을 일으키는 免疫細胞 중의 T세포의 減少를 나타낸다(18,19).

CD3e+/CD69+세포 수는 control에 比하여 PR-HA群에서 減少하였다(Fig.2-16). CD3e+/CD69+세포수의 比率 減少도 또한 알레르기 反應을 나타내는 면역세포 중의 T세포의 減少를 意味한다고 할 수 있다.

RT-PCR을 이용하여 喘息 誘發과 關聯된 여러 cytokine들의 mRNA 發顯을 관찰한 結果, β -actin, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13등의 mRNA 發顯이 Control群에 比하여 PR-HA群에서 顯著히 減少하였다(Fig.2-17). 이들은 모두 염증과 알레르기 反應과 관계있는 cytokine으로, 이들의 mRNA 발현의 減少는 喘息誘發因子 減少를 나타낸다(18,19).

以上の 實驗結果 桔梗藥鍼에 의하여 Gr-1+/CD11b+세

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

V. 結 論

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

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

參考文獻

1. 대한 천식 및 알레르기학회 : 천식과 알레르기질 환, 서울, 군자출판사, pp.31-44, 59-67, 237-326, 2002.
2. 전국의과대학 임상교수편 : 임상진단학, 서울, 한미 의학, pp.392~393, 2002.
3. 李珩九, 鄭昇杞 : 東醫肺系內科學, 서울, 아트동방, pp.105-112, 162-202, 1999.
4. 巢元方 : 諸病源候論(卷13,14), 서울, 大星文化社, pp.106-117, 1992.
5. 李槿 : 編註醫學入門, 서울, 大星文化社, pp.397-398, 1992.
6. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 大星文化社, pp.283-285, p.261, 1992.
7. 李尙仁 : 韓藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp.470-473, 1982.
8. 李尙仁 : 本草學, 서울, 修書院, pp.329-330, 1981
9. 陳兆桓 : 神農本草經, 臺北, 文光圖書有限公司, pp.212, 1992.
10. 唐慎微 : 重修政和經史證類備用本草, 北京, 人民衛生出版社, p.249, 1982.
11. 金昌謙 : 本草從新, 서울, 杏林書院, p.10, 1982.
12. 申佶求 : 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp.456-461, 1973
13. 김성수 : 桔梗에 의한 알레르기 천식 효과에 대한 연구, 본초학회지, 19(2) : 61-70, 2004.
14. 정옥 : 행인과 길경이 Asthma model 내의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 영향, 내과학회지, 21(1) : 31-38, 2000.
15. 진철용, 변부형 : 길경이 고지방식으로 유발된 비만흰쥐의 체중 및 혈청중지질성분의 변화에 미치는 영향, 본초학회지, 17(2) : 19-28, 2002.
16. 해리슨 번역 편찬위원회 : HARRISON'S 내과학, 서울, 정담, pp.1258-1264, 1997.
17. 이양근 : 好酸球와 천식. 결핵 및 호흡기질환, 46(1) : 5-16, 1999.
18. Ivan Roitt의 2 : Immunology 6th, Mosby, Newyork, pp125-127, 2002.
19. Ivan Roitt : Essential immunology 9th, Blackwell science, U.S.A. pp.179-200, 151-167, 1994.
20. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室 : 鍼灸學(上,下), 서울, 集文堂, pp.382~384, 1991.
21. 李丁 : 鍼灸經穴辭典, 서울, 高麗醫學, pp.138-139,

- 397-398, 1989.
22. 安榮基 : 經穴學叢書, 서울, 成輔社, pp.196-197, 678-679, 694-695, 1986.
23. 上海中醫學院 : 鍼灸學, 홍콩, 商務印書館香港分館, p.114, pp.89-90, 211-216, 1982.
24. 蔡禹錫 : 經穴集成, 서울, 大星文化社, pp.83-84, 404-405, 1995.