

원저

蘇子藥鍼의 喘息抑制 및 免疫調節效果에 對한 實驗的 研究

고승경 · 홍권의

대전대학교 부속한방병원 침구과

An Experimental Study on the effect of Perillae Fractus Herbal-acupuncture at ST36 ; the Suppressive Effect against OVA-induced Asthma and the Regulatory Effect on Immune Response

Seung-kyoung Ko · Kwon-eui Hong

Department of Acupuncture & Moxibustion, Oriental Medical Hospital, Daejeon University

Abstract

Objectives : The purpose of this study was to confirm the suppressive effect against asthma and immune regulatory effect of Perillae Fractus Herbal-acupuncture at Chok-samni (ST36) on ovalbumin-induced asthma in mice.

Methods : C57BL/6 mice were sensitized and challenged with OVA(ovalbumin) for 12 weeks. The mice in the PF-HA group were treated with PF-HA at ST36 for the later 8 weeks (3 times a week). The mice in the OVA-Needle-Prick (NP) group were treated with single prick with an injection needle at ST36 for the later 8 weeks (3 times a weeks).

- Results :**
1. The lung weight of the mice treated with PF-HA at St36 were decreased significantly compared with that of the control group.
 2. The total leukocytes and eosinophils in BALF of the group treated with PF-HA were decreased significantly compared with those of the control group.
 3. Eosinophils in BALF and the collagen accumulation in lung of the mice treated with PF-HA were decreased significantly compared with those of the control group.
 4. The concentrations of IgE, IL-4 and IL-5 in BALF, and IL-4, IL-5 and IL-13 in serum of the PF-HA group were decreased significantly compared with those of the control group.
 5. The numbers of CD3-/CCR3+, Gr-1+/CD11b+, CD4+, and CD3e+/CD69+cells in lung of the mice group treated with PF-HA at St36 were decreased significantly compared with those of the control group.
 6. The mRNA expressions of TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 in lung of the mice group treated with PF-HA at St36 were decreased significantly compared with those of the control group.

Key words : OVA-induced asthma, PF-HA(Perillae Fractus 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

천식은 다양한 刺戟에 대한 기관지 반응의 증가를 특징으로 하며 평활근 수축, 혈관울혈, 기관지 벽의 부종, 끈끈한 분비물에 의한 기도 직경의 감소로 기도저항의 증가, 호기량 및 유량의 감소, 폐의 흉곽 과팽창 등이 유발되어 발작적 호흡곤란, 기침, 천명이 나타나는 기도 질환으로¹⁾, 선진국을 비롯하여 우리나라에서도 점차 증가하고 있으며 이환율과 비용면에서 주된 대중 건강 문제를 나타내고 있다²⁾.

천식은 Th1과 Th2 cell간의 imbalance로 인하여 유발되는 알레르기성 질환으로³⁾, 특히 Th2 cell에 의한 Interlukin(IL)-4, IL-5 및 IL-13의 과도한 생성이 천식의 발생에서 중요한 역할을 한다⁴⁾.

임상 증상으로는 발작성 호흡곤란, 천명, 기침, 라임(rale)을 특징으로 하며⁵⁾ 원인의 대부분을 차지하는 알레르기 외에도 상기도 감염, 정서적 스트레스, 기후 변화, 약물, 운동 등이 천식을 유발할 수 있다⁶⁾. 의학 수준의 발달로 치료법에서도 많은 발전이 있었으나 아직 천식의 이환율, 사망률은 감소하지 않는 실정이며 서양의학에서는 치료의 개념에서 관리의 개념으로 변화되었다^{7,8)}.

한의학에서 천식은 呼吸急促하며 喉中有聲響한 증상을 나타내는 哮喘症과 哮喘症에 속하는 질환으로《黃帝內經·素問》⁹⁾에서 呼吸困難, 痰鳴音 같은 哮喘의 特徵을 기술한 이래로《丹溪心法》¹⁰⁾에서 최초로 “哮喘”이라는 독립된 病名을 사용하였고 그 후 많은 의서에서 언급되었다. 寒冷, 心因, 痰因, 素因, 感染, 過敏反應, 肺腎의 呼吸機能 障礙 등에 의해 발병하며 潤肺, 祛痰, 定喘, 補陰시키는 약물과 침구치료를 위주로 치료하고 있다¹¹⁾.

氣管支 喘息에 대한 韓醫學的 연구로, 차¹²⁾ 등의 복합제 전탕액 경구투여가 천식억제에 미치는 영향에 대한 보고가 있었고, 單味劑에 대한 연구로는 김¹³⁾ 등의 연구가 있으며, 藥鍼의 응용에 관하여 金¹⁴⁾ 등이 Ovalbumin 유발된 알레르기 천식 및 면역조절효과에 대해 연구 보고한 바 있으나 蘇子에 대한 연구는 접하지 못했다.

이에 저자는 降氣潤肺, 消痰定喘하는 蘇子로 藥鍼液을 제조하여 알레르기 喘息이 유발된 mouse의 足三里(ST36)^{14,15)}에 藥鍼施術하여 喘息抑制 및 免疫調節效果에 대해 유의한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 動物

動物은 雄性인 4~5週齡의 C57BL/6 생쥐를 대한실험센터에서 공급받아 實驗 當日까지 固型飼料(抗生劑 無添加, 삼양사료)와 물을 充分히 供給하고, 室溫 22±2°C를 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 蘇子(Perillae Fructus; 以下 PF이라 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

蘇子 55g을 粉碎機를 利用하여 粉碎하여 粉末로 만들어, 원형삼각플라스크에 넣고, 蒸溜水 500ml을 加하여 3時間 동안 shaking water bath에서 流出하고 濾過하였다. 이 濾過液을 濾過紙로 3回 濾過한 후, rotary evaporator로 減壓濃縮 하였다. 이 濃縮液에 95% ethyl alcohol 30ml을 加하고 室溫에서 攪拌한 후 放置하여, 沈澱物이 生成되게 하였다. 沈澱物이 生成되면 濾過하여 沈澱物을 除去하고, 濾過液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮한 후, 이 濃縮液에 85% ethyl alcohol 30ml를 加하고 잠시 攪拌한 후 放置하여, 濾過하였다. 다시 濃縮 후 75% ethyl alcohol 30ml를 加하고 攪拌한 후 放置하였다가 濾過하는 造作을 2回 反復하였다. 濾過液 中の ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 減壓除去하고, 남은 濃縮液이 20ml가 되게 하였다. 1N NaOH를 이용하여 濃縮液을 pH6.8이 되도록 조절하고, 低溫에서 12時間 放置한 후 滅菌하였다. 滅菌된 濃縮液에 PBS를 加하여 1%로 稀釋하여 藥鍼液으로 使用하였다(Scheme 1).

2. 方法

1) In vitro

천식이 유발된 생쥐에서 분리한 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 약 침액을 가하여 48시간 동안 배양 시킨 후 표식항체를 반응시켜 FACS 분석하였다.

2) In vivo

① Asthma mouse model 作成

실험 1,2주째 200 μ l의 OVA/alum(500 μ g/ml)을, 3주째에는 100 μ l OVA/alum (500 μ g/ml)을 생쥐의 복강에 투여(i.p)하였다. 4주째에는 마취 후에 100 μ l의 OVA/alum (500 μ g/ml)을 기도투여(i.t)하였다. 5-8주째까지는 2.5mg/ml의 OVA/PBS 40 μ l을, 9-12주째까지는 5mg/ml의 OVA/PBS 40 μ l을 air compressor를 이용하여 20분간 주3회 노출시켰다. 5주째부터 12주째까지 8주간 주 3회, Needle-prick 群은 족삼리에 주사기를 刺入 後 즉시 제거하였고, 蘇子藥鍼群은 足三里에 1%의 蘇子 藥鍼液(100 μ l)을 注入하였다(Fig. 1).

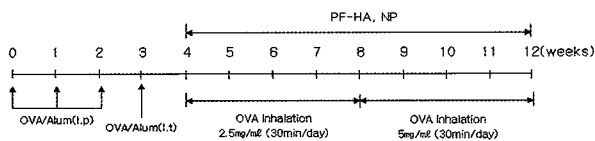


Fig. 1 OVA-induced asthmatic mouse model

② BALF 分離

생쥐를 痲醉한 후 表皮를 열고 氣道에 10% FBS/DMEM medium을 넣은 注射器를 삽입하고 끈으로 묶어 固定한 후 10% FBS/DMEM medium 3회 循環시켜 分離하였다.

③ Photomicrographs

분리된 BALF를 세척해서 Cytospin centrifuge에 1,000rpm으로 5분간 원심 분리하여 고정시킨 후 blood smears staining set (Merck Germany)를 사용하여 염색하였다. 공기 중에서 건조시킨 후 bright microscope (Nikon.

Japan; \times 400)로 測定하였다.

④ Histological Analysis

조직은 Masson's Trichrome 염색을 하였다. 폐조직의 일부 Cryotome을 이용하여 절편을 한 후, 시판의 Masson's Trichrome stain system (Dako, Japan)을 사용하여 염색하였다

⑤ FACS Analysis

생쥐에서 分離해낸 폐 조직을 잘게 절단한 후 collagenase를 가하여 incubation 통해 分離해 낸 細胞에 標式抗體를 反應시켜 Flow cytometer로 分析하였다.

⑥ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Analysis

ELISA Kit를 使用하여, 생쥐에서 分離한 BALF와 serum에서 各 cytokine 량을 測定하였다. 抗cytokine 抗體가 코팅된 96well plate에 BALF 또는 serum을 加하여 反應 시킨 후 4번 洗滌하였다. 그 후 biotin이 標式된 抗cytokine 抗體를 加하여 反應 시킨 후 4번 洗滌하고 여기에 straptavidin-HRP를 加하여 Elisa-reader를 利用하여 測定하였다.

⑦ mRNA 遺傳子 分析

a. Total RNA의 抽出

각 실험군의 생쥐에서 떼어낸 폐조직을 homogenizer를 이용하여 분쇄한 後 RNazolB(Tel-Test, USA)를 利用하여 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 loading하여 그 量을 確認하였다. 確認한 RNA는 RT-PCR(Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction)에 使用하였다.

b. 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 혼합한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 추가한 뒤 DEPC 처리된 증류수를 더하여 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합물을 잘 섞은 뒤 원심분리하여 37 $^{\circ}$ C恒温水槽에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 10분 동안放置하여 M-MLV RT를 불활성화시키고 즉시 얼음으로 옮겼다. 이렇게 합성이 완료된 first-strand cDNA는 PCR(Polymerase Chain Reaction)에 사용하였다.

c. cDNA의 PCR 증폭

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in Germany)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 1 μ l의 first-strand cDNA를 주형으로 사용하였다. 주형에 대한 β -actin, IL-4, IL-5, IL-13, IL-1 β , TNF- α 에 대한 sense primer (20pmole/ μ l)와 antisense primer (20pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 추가하고, 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 추가한 다음 최종 부피가 30 μ l 되도록 멸균 증류수를 추가하고 predenaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5분, denaturation; 74 $^{\circ}$ C, 5분, annealing; 55 $^{\circ}$ C, 1분, elongation; 72 $^{\circ}$ C, 1분을 25cycle한 뒤 postelongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 50V 조건에서 30분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

3) 統計處理

통계는 ANOVA-test로 하였다.

III. 成績

1. in vitro screening

천식이 유발된 생쥐의 폐에서 분리한 폐세포에 소자 약침액을 처리한 후 FACS 분석한 결과, 肺細胞中 CD3e/CCR3⁺細胞의 비율이 control이 normal에 비하여 현저하게 증가하였으며, PF-HA에서는 control에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig.2).

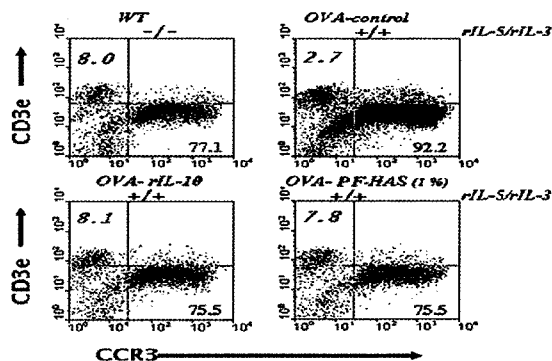


Fig. 2 Effect of PF-HAS on CD3e-/CCR3+ population (%) in OVA-induced asthmatic mouse lung.

2. in vivo

1) Lung weight

폐 무게를測定한 결과, control군 및 NP군에서는 normal군에 비하여 유의하게 증가하였으며(*p<0.05, **p<0.01) PF-HA군은 control군에 비하여 유의하게 (**p<0.01) 감소하였다(Fig.3.)

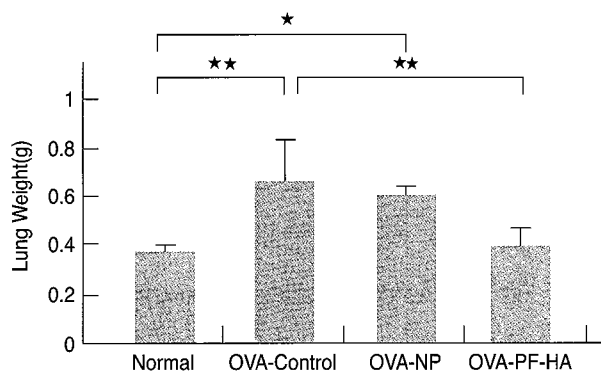


Fig. 3 Effect of PF-HA at ST36 on OVA-induced asthmatic mouse lung weight.

2) Cell count in BALF

① Total Leukocyte in BALF

BALF에서 적혈구를 제거한 후 細胞數를 측정한 결과, control군 및 NP군은 normal군에 비하여 leukocyte수가 유의하게(*p<0.05, **p<0.01) 증가하였으며, PF-HA군

에서는 control군에 비하여 leukocyte수가 유의하게 (* $p < 0.05$) 減少하였다(Fig.4).

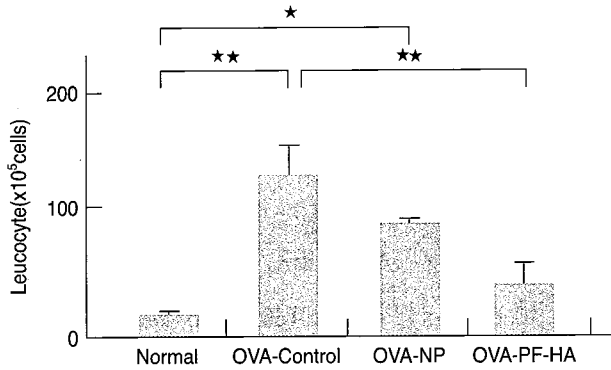


Fig. 4 Effect of PF-HA at ST36 on total leucocytes number in BALF.

② Eosinophils in BALF

BALF內 好酸球 數를 측정 한 결과, control 및 NP군이 normal군에 비하여 호산구수가 유의하게(** $p < 0.01$) 증가 하였으며, PF-HA군은 control군에 비하여 好酸球가 유의하게(* $p < 0.05$) 減少하였다(Fig.5).

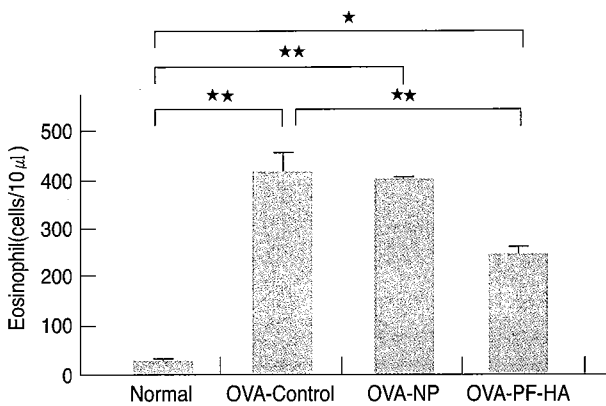


Fig. 5 Effect of PF-HA at ST36 on Eosinophil population in BALF.

3) Photomicrographs of Eosinophil in BALF

Blood smears staining set을 이용하여 BALF를 염색하여 관찰한 결과, control군에서는 好酸球가 다량으로 관찰 되었으며, PF-HA군의 BALF에서는 control군에 비하여 好酸球가 현저하게 減少하였다(Fig.6).

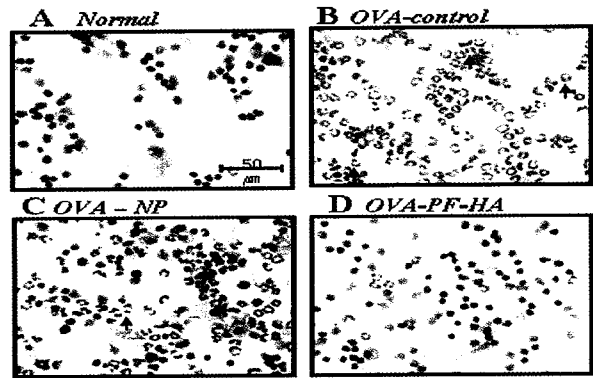


Fig. 6 Photomicrographs of BALF cytopins from mice.

4) Histological analysis of lung sections

Masson's Trichrome stain system(Dako, Japan)을 이용하여 Lung 조직을 염색하여 관찰한 결과, control군에서는 collagen이 조직에 다량으로 부착되어 있는 것이 관찰 되었으며 PF-HA군에서는 control군에 비하여 collagen의 부착이 현저하게 감소하였다(Fig.7).

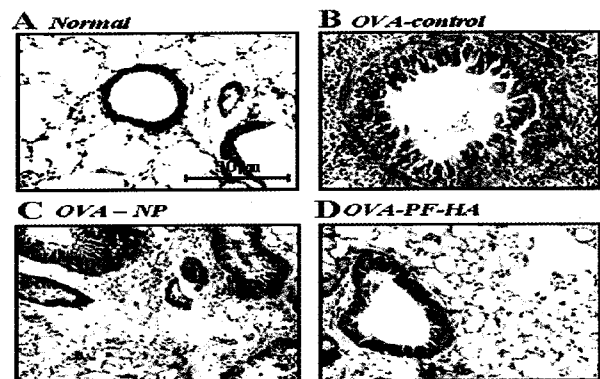


Fig. 7 Histological analysis of lung sections from mice.

5) ELISA

① IgE in BALF

생쥐의 폐에서 분리한 BALF를 IgE ELISA kit (TECAN, Canada)를 이용하여 分析한 結果, control군 및 NP군에서는 normal군에 비하여 BALF內 IgE가 유의하게(** $p < 0.01$) 증가하였으며, PF-HA군에서는 control군 및 NP군에 비하여 IgE의 分泌가 유의하게(** $p < 0.01$) 감소 되었다(Fig.8).

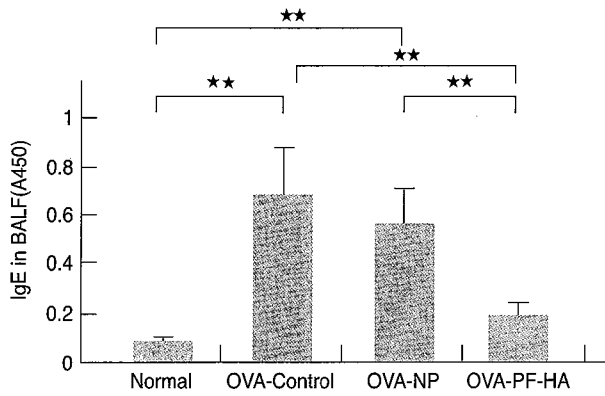


Fig. 8 Effect of PF-HA at ST36 on IgE level in BALF.

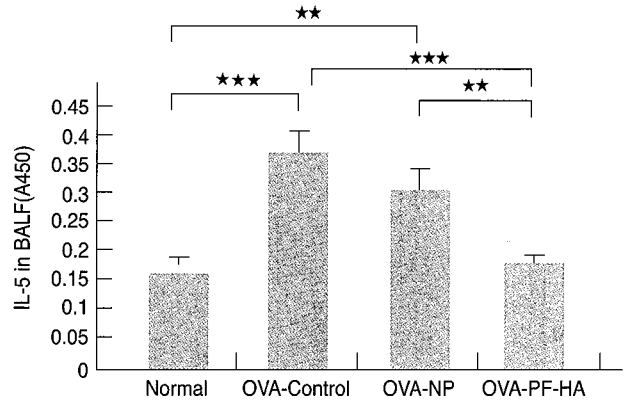


Fig. 10 Effect of PF-HA at ST36 on IL-5 level in BALF.

② IL-4 in BALF

생쥐의 폐에서 분리한 BALF를 IL-4 ELISA kit(TECAN, Canada)를 이용하여 분석한 결과, control군이 normal군에 비하여 BALF내 IL-4가 유의하게 (*p<0.05) 증가하였으며, PF-HA군에서는 control군에 비하여 IL-4의 분비가 현저하게 감소되었다(Fig.9).

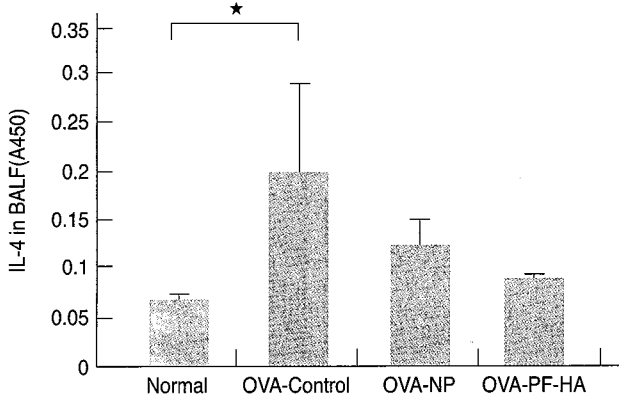


Fig. 9 Effect of PF-HA at ST36 on IL-4 level in BALF.

④ IL-4 in Serum

생쥐로부터 분리한 serum을 IL-4 ELISA kit(TECAN, Canada)를 이용, 분석한 결과 control군 및 NP군이 normal군에 비하여 serum IL-4가 유의하게(***p<0.001, **p<0.01) 증가하였으며, PF-HA는 control 및 NP군에 비하여 IL-4의 분비가 유의하게(***p<0.001, **p<0.01) 억제되었다. NP군 역시 control군에 비하여 혈청 IL-4의 유의한(**p<0.01) 감소를 보였다(Fig.11).

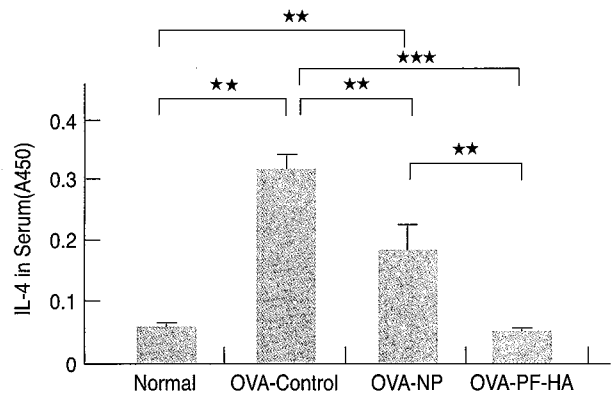


Fig. 11 Effect of PF-HA at ST36 on IL-4 level in serum.

③ IL-5 in BALF

생쥐의 폐에서 분리한 BALF를 IL-5 ELISA kit(TECAN, Canada)를 이용하여 분석한 결과, control군 및 NP군에서는 normal군에 비하여 BALF내 IL-5가 유의하게(***p<0.001, **p<0.01) 증가하였으며, PF-HA군에서는 control 및 NP군에 비하여 IL-5의 분비가 유의하게(***p<0.001, **p<0.01) 감소되었다(Fig.10).

⑤ IL-5 in Serum

생쥐로부터 분리한 serum을 IL-5 ELISA kit(TECAN, Canada)를 이용하여 분석한 결과, control군 및 NP군에서는 normal군에 비하여 serum IL-5가 유의하게 (*p<0.05) 증가하였으며, PF-HA군에서는 control군 및 NP군에 비하여 IL-5의 분비가 감소되었으나 통계적 유의성은 없었다(Fig.12).

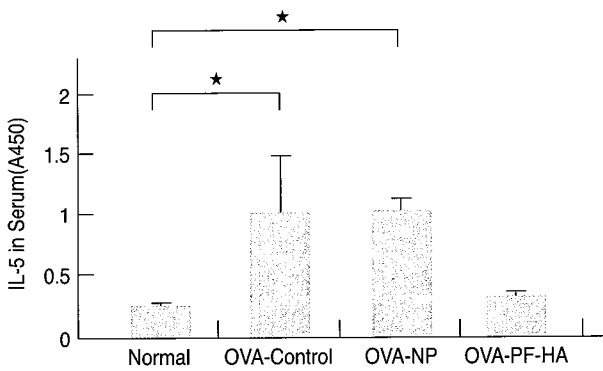


Fig. 12 Effect of PF-HA at ST36 on IL-5 level in serum.

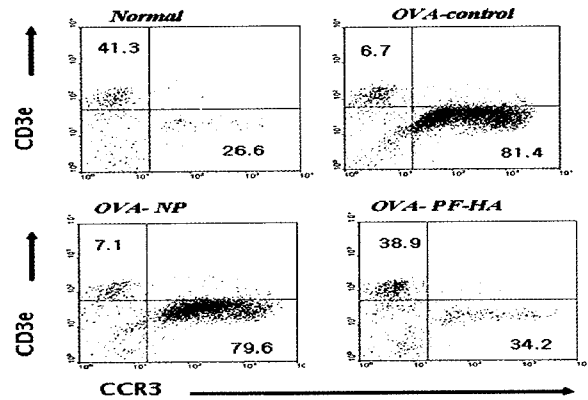


Fig. 14 Effect of PF-HA at ST36 on CCR3+ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

⑥ IL-13 in Serum

생쥐로부터 분리한 serum을 IL-13 ELISA kit(TECAN, Canada)를 이용하여 分析한 結果, NP군에서는 normal군에 비하여 serum IL-13이 유의하게(**p<0.01) 증가하였으며, PF-HA군에서는 NP군에 비하여 IL-13의 分泌가 유의하게(**p<0.01) 감소되었다(Fig.13).

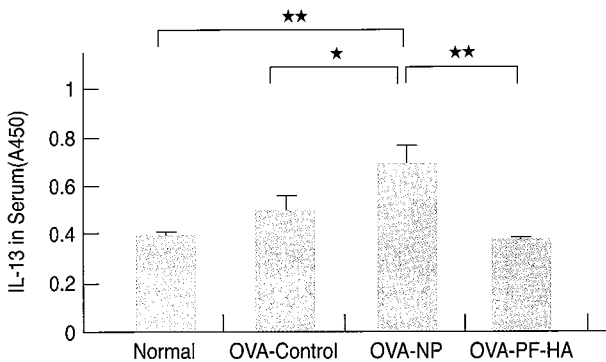


Fig. 13 Effect of PF-HA at ST36 on IL-13 level in serum.

6) FACS analysis

① CD3/CCR3+

FACS를 이용하여 폐내 CD3/CCR3+ 세포수를 측정 한 결과, control군에서 81.4%로 normal군 26.6%에 비하여 CD3/CCR3+ 세포수가 현저하게 증가하였으며, PF-HA군에서는 34.2%로 control군에 비하여 현저하게 減少하였다(Fig.14).

② Gr-1+/CD11b+ cell population in lung

폐내 Gr-1과 CD11b의 이중 양성 세포수를 측정 한 결과, control군에서 normal군에 비하여 Gr-1+/CD11b+細胞가 현저하게 증가하였으며, PF-HA군에서는 control군에 비하여 현저하게 減少하였다(Fig.15).

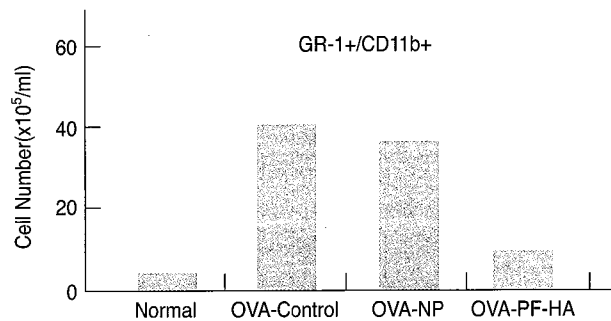


Fig. 15 Effect of PF-HA at ST36 on Gr-1+/CD11b+ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

③ CD4+ cell population in lung

폐내 CD4 양성 세포수를 측정 한 결과, CD4+細胞수는 control군이 normal군에 비하여 현저히 증가하였으며, PF-HA군은 control군에 비해 현저히 減少하였다(Fig.16).

④ CD3e+/CD69+ cell population in lung

폐내 CD3e와 CD69 이중 양성 세포수를 측정 한 결과, control군에서 normal군에 비하여 CD3e+/CD69+細胞수가 현저히 증가하였으며, PF-HA군에서는 control군에 비하여 현저히 減少하였다(Fig.17).

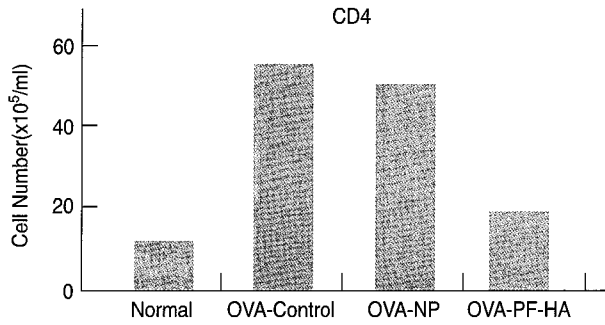


Fig. 16 Effect of PF-HA at ST36 on CD4+ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

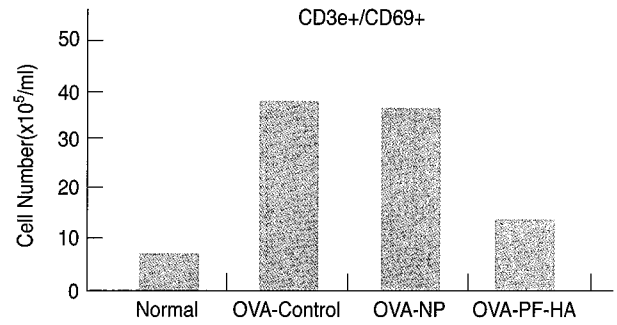


Fig. 17 Effect of PF-HA at ST36 on CD3e+/CD69+ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung.

7) RT-PCR

RT-PCR을 이용하여 喘息 유발과 관련된 여러 cytokine 들의 mRNA 發顯을 관찰한 結果, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 등의 mRNA 發顯이 control군에 비하여 PF-HA군에서 현저히 減少하였다(Fig.18).

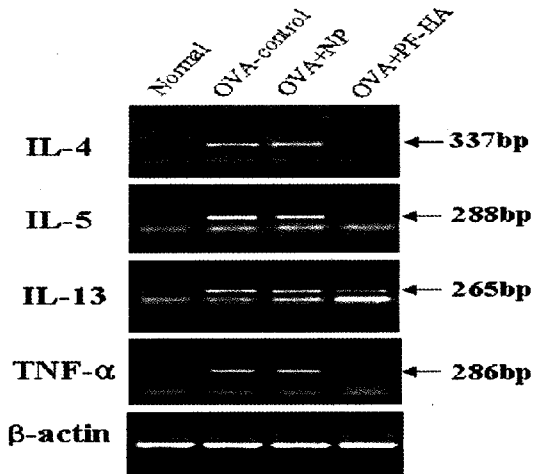


Fig. 18 mRNA expression of TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6 and IL-13 in the lung.

IV. 考 察

1960년대에는 喘息을 ‘氣道 공기의 흐름에 짧은 기간 동안 변화가 초래되는 병¹⁶⁾’으로 정의하였으며 治療에 있어서도 氣道收縮 緩和를 위한 베타 자극제와 같은 氣道擴張劑가 주로 사용되었으나 喘息으로 인한 사망은 오히려 증가하였다¹⁷⁾. 1980년대에 이르러 好酸球

등의 炎症細胞의 침윤을 동반한 기도의 慢性 炎症을 특징으로 하는 疾患이란 사실을 연구를 통해 알게 되었으며¹⁸⁾, 이러한 研究結果를 바탕으로 최근에는 喘息을 ‘호산구, 비만세포, 림프구 등의 염증세포 침윤을 특징으로 하는 氣道の 慢性 炎症疾患’으로 정의하게 되었다¹⁹⁾.

喘息의 원인은 다양하며 유전적 요인과 환경적 영향의 상호작용에 의하지만 흔히 기초가 되는 기전은 환경적인 알레르겐에 대해 조절되지 않는 알레르기 염증 반응, 즉 제1형 과민반응에 의한 급성 알레르기 반응과 만성 알레르기성 염증 반응이다^{4,20)}.

喘息은 부분적으로 可逆的인 氣道閉鎖, 氣道 過敏性, 慢性 炎症을 특징으로 하는데, 喘息의 病態生理와 臨床 症狀에 관여하는 주된 기전은 광범위한 氣道閉鎖이다. 氣道炎症은 천식의 가장 특징적 소견으로 공기흐름 차단, 기관지과민성, 기도개형 등과 같은 다양한 임상양상을 나타내며 염증반응의 정도는 천식의 중증도 및 병의 시간적 경과와 연관되어 있다. 기도 상피세포 박피(denudation), 기관지내 점액막개 형성, 기저막하 아교질(collagen) 침착, 호중구과 호산구 등의 염증세포 침윤, 기관지 평활근 비대 및 증식 등이 특징적인 염증 소견으로²¹⁾, 이와 같은 염증 반응을 유발하는 주요 세포는 활성화된 비만세포와 IL-4, IL-5, IL-13을 분비하는 Th2 림프구이다²²⁾. 이들 세포에서 분비된 사이토카인에 의해 호산구, 각종 림프구, 상피세포가 활성화되어 chemokine 이 분비되면서 염증반응이 가속화된다. 또한 염증반응에서 빼 놓을 수 없는 것이 유착분자로서(ICAM-1, VSAM-1) 염증세포에 있는 수용체와 결합하여 혈관 내에서 부착시켜 기도내로의 이동을 돕는다. Cytokine의 불균형은 천식 염증발생 기전에서 특징적인데 Th1

cytokine(IFN- γ)보다는 Th2 cytokine(IL-4, IL-5, IL-13)이 우세하다. 이외에 상기 염증반응에 의해 유발된 염증세포에 의해서 氣道 平滑筋 收縮, 氣道 粘膜浮腫, 점액 과다분비가 되어 이로 인해 기도폐쇄가 발생한다²⁰⁾.

위와 같은 병리 변화로 인해 기관지 천식에서 반복적인 천명, 호흡곤란(dyspnea), 기침, 흉부압박, 객담, 發熱 등의 임상증상이 나타나며 심한 경우 青色症, 意識障礙, 失禁 등의 증상도 나타날 수 있다²¹⁾. 喘息의 惡化要因으로는 집먼지 진드기 등과 같은 항원외의 노출, 바이러스 등과 같은 감염, 운동, 위식도 역류, 스트레스 등이 있으며 항원노출로 인한 발병에 있어서는 IgE항체가 관여하게 된다²²⁾.

氣管支 喘息의 치료원칙은 환경관리 및 회피요법, 약물요법, 면역요법이 있고²³⁾, 치료 목적은 최소한의 부작용으로 증상 경감, 정상 폐 기능 유지, 악화 예방에 있으며²⁴⁾, 최근에는 기관지 천식의 치료에 있어서 단순한 치료의 개념이 아닌 종합적 관리라는 개념이 도입되었다²⁵⁾. 이러한 천식의 병태생리의 이해에 근거하여 천식의 치료는 보다 조기의 그리고 광범위한 흡입 스테로이드제의 사용으로 전기를 마련하였다. 특히 최근의 치료에 도입된 스테로이드와 지속형 기관지 확장제의 복합 흡입제로 대부분의 환자에서 효과적인 천식 조절이 가능하게 되었으나 흡입스테로이드 사용 中斷 時 증상 재발 및 여러 염증표지의 증가와 장기간 고용량 스테로이드 사용에 따른 부작용, 그리고 스테로이드가 염증은 억제하나 내재된 병리기전을 변화시키지 못 한다는 한계점 등 많은 문제점을 내포하고 있어 특이적인 새로운 천식치료 약물의 연구 개발이 시급한 실정이다²⁶⁾.

韓醫學에서 기관지 천식은 哮喘, 痰喘, 風寒喘 등으로 나타나며 증상으로서 突然發作, 呼吸困難, 喉間有哮鳴聲하며 反復發作하는 것이 주요 특징 이다²⁷⁾. 또한 《醫學正傳》²⁸⁾에서는 “夫喘促喉間如水鷄聲者 謂之哮, 氣促而連屬不能以息者, 謂之喘”라 하여 喘과 哮가 같지 않음을 말하였으나 臨床상 哮는 반드시 喘을 兼하니 通稱하여 哮喘이라 한다고 하였다²⁹⁾. 病因은 內因으로 脾肺氣虛 및 肺實氣有餘 등의 臟腑機能失調, 飲食傷, 七情傷 등이 있으며 外因으로는 風寒暑濕이 있으며 不內外因으로는 勞倦, 墮恐 등이 있다²⁹⁾. 또한 《丹溪心法》³⁰⁾에서는 病因을 專主於痰이라고 하여 ‘未發以扶正氣爲主, 既發以攻邪氣爲急’의 치료 원칙을 제시하였으며, 《景岳全書》³¹⁾에서는 發病의 關鍵이 ‘夙根’이라고 하였고 “扶正氣須辨陰陽, 陰者補其陰, 陽虛者補其陽 攻邪其須分微甚, 或溫其寒, 或

清氣痰火, 發久者, …… , 或溫補中宜量加消散”이라 하여 丹溪의 未發扶正, 已發攻邪의 치료원칙을 상세하게 하였다. 哮喘의 치료는 우선 虛實을 가려야 하며 實症의 경우 病勢가 急迫하고, 呼吸은 深長하며 여유가 있고 呼出이 빠르고 息이 거칠고 크며 脈數有力한데 去風散寒, 燥濕化痰, 降氣, 清化熱痰, 宣肺溫肺하여 치료하고, 虛症인 경우 病勢가 緩慢하고 息이 차 呼吸이 계속되지 못하며 吸氣가 빠르고 움직이면 呼吸困難이 加重되고 語聲에 힘이 없으며 脈細弱 또는 無力한데 養肺定喘, 補益心腎, 納氣, 補益腎元하여 치료한다²⁷⁾.

蘇子(Perillae Fructus)는 紫蘇子라고도 하며 꿀풀과에 속한 1년생 초본인 소엽의 成熟한 果實을 乾燥한 것으로 下氣, 消痰, 止嗽, 潤心肺, 治風, 順氣의 效能이 있어 上氣咳逆, 冷氣, 喘急 등의 症狀에 사용한다²⁸⁾. 蘇子は 味辛性溫 無毒하여 肺經으로 들어가 降氣消痰시키는 效能이 있어 痰壅으로 인한 氣逆과 咳嗽氣喘을 治療하고 또한 降氣한다²⁹⁾. 또한 蘇子は 興奮性 鎮咳祛痰劑로서 辛溫이 散結하고 兼하여 潤肺하는 功이 있어서 外感·咳嗽·氣急·有痰한데 平氣化痰의 主藥으로 用하고, 氣管支炎·咯痰不利·咳嗽 또는 虛勞·咳嗽의 要藥이 되어 上下를 清利할 者에 마땅하다²⁹⁾.

足三里(ST36)는 足陽明胃經의 合土穴로 效能 및 主治範圍가 廣範圍하여 臨床에서 가장 많이 活用되는 穴位 중의 하나이다. 주로 消化器系統疾患이 代表的이고 循環, 呼吸, 泌尿生殖器系統病症 등에 良好한 效果를 나타내며 全身強壯의 要穴이다. 消風化濕, 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元, 祛邪防病 등의 效能이 있어¹⁴⁾ 免疫을 調整하고 全身을 強壯시킬 수 있는 穴位로 임상에서 많이 응용되고 있다³²⁾.

藥鍼療法(Herbal acupuncture)은 經絡療法과 藥物療法을 종합하여 經絡學說의 원리에 의거하여 藥物을 선택해서, 有關한 穴位, 壓通點 혹은 刺灸의 촉진으로 얻어진 陽性反應點에 주입하여 刺戟과 藥物作用을 통하여 生체의 기능을 조정하고 病理狀態를 개선시켜 질병을 치료하는 新鍼療法의 一種으로 體液系統, 免疫系統, 神經系統의 調節作用, 神經傳導, 協調陰陽, 疏通經絡, 調和榮衛氣血의 效能이 있다³³⁾. 또한 藥鍼은 藥物의 吸收가 빠르고 經口投與가 불가능한 경우에 處置할 수 있으며 患處에 直接 處置할 수 있는 등의 장점이 있다³³⁾.

최근 여러 가지 藥物을 응용한 藥鍼療法의 免疫調節機傳에 미치는 영향에 대한 實驗的, 臨床的 研究가 활발히 進行되고 있는 가운데 송³⁴⁾ 등은 약침이 알레르기

에 유의한 효과가 있었음을 보고하였고 정³⁹⁾ 등은 약침의 免疫增進의 효과가 있었음을 보고하였다. 또한, 氣管支喘息에 대한 약침 연구로는 신³⁹⁾ 등이 알레르기 喘息이 유발된 白鼠의 足三里에 藥鍼施術하여 유의한 喘息抑制 효과가 있었음을 보고한 바 있다.

알레르기 천식이 유발된 생쥐에서 분리한 폐세포에 소자약침액을 처리한 후 FACS 분석한 결과, 肺細胞中 CD3e-/CCR3+ 세포 비율이 control에서는 92.2%였으나 PF-HAS에서는 75.5%로 control에 비하여 현저히 감소하였다(Fig.2). CD3는 T세포의 결정표식인자로 T림프구의 항원 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달하고, CCR3는 호산구의 활성화와 탈과립화에 관여하는 것으로 CCR3가 活性化되면 好酸球, 好鹽基球, 肥滿細胞, Th2細胞의 활성화시켜 조직에 손상을 주고 이중 Th2細胞는 IL-5, IL-13을 분비, 好酸球를 활성화시키게 된다^{35,36)}. 따라서 蘇子약침액처리에 의한 CD3e-/CCR3+ 細胞數 減少는 염증 및 알레르기 반응을 일으키는 好酸球數의 감소를 의미하며, 소자약침이 喘息抑制에 효과가 있을 가능성을 시사한다.

이에 著者는 蘇子藥鍼(PF-HA)의 喘息抑制 및 免疫調節效果를 알아보기 위하여 천식이 유발된 mouse의 足三里(ST36)에 蘇子藥鍼을 시술한 후 肺의 質量, BALF內 總白血球數, BALF內 好酸球數, BALF內 好酸球 현미경사진, 肺組織 사진, ELISA를 이용한 BALF내 IgE, IL-4, IL-5, 혈청내 IL-4, IL-5, IL-13 測定, FACS를 이용한 폐내 CD3-/CCR3+, Gr-1+/CD11b+, CD4+, CD3e+/CD69+의 세포수 측정, RT-PCR을 이용한 喘息誘發 cytokine 들의 mRNA 발현을 관찰하여 비교 분석하였다.

실험동물의 肺質량을 측정한 결과 control群 및 NP群에 비해 PF-HA群의 質量이 유의하게 감소한 것을 볼 수 있다(Fig.3). 肺質량의 증가는 肺의 炎症性 變化로 氣道 및 氣管支의 浮腫 및 細胞浸潤, 粘液分泌의 증가 등으로 인한 것으로, PF-HA群에서의 肺質量 減少는 蘇子藥鍼이 천식모델에서의 염증반응을 억제하는 효과가 있음을 나타내는 것으로 사료된다.

BALF내 總白血球數와 好酸球數가 control群 및 NP群에 비해 PF-HA群에서 유의하게 감소한 것을 볼 수 있으며(Fig.5-6) 현미경 사진상에서도 control群 및 NP군에서 다량으로 관찰된 好酸球가 PF-HA群서는 현저히 감소하였음을 볼 수 있다. 위 결과는 肺의 炎症이나 氣管支의 알레르기 반응이 감소한 것을 나타내므로 蘇子藥鍼이 천식 억제에 효과가 있음을 의미한다고 하겠다.

또한 肺組織을 염색 관찰한 결과 대조군에서 다량으로 부착되어 있는 collagen이 藥鍼群에서는 현저하게 감소되었는데, 이는 폐와 기관지의 염증에 의한 collagen 합성이 감소한 것으로, 소자약침에 의하여 폐와 기관지의 염증반응이 減少했다는 것을 의미한다.

ELISA 분석 결과 BALF내 IgE가 PF-HA群에서 control群 및 NP群 비해 유의하게 감소하였으며(Fig.8) 따라서 蘇子藥鍼이 IgE의 분비를 유의하게 억제시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. IgE는 제 1형 과민반응을 매개하는 항체 특성을 가진 혈청 글로블린으로, 항원이 기도내에 들어오면 생성되어 비만세포나 호염기구 등의 수용체에 달라붙어서 알레르기 반응에 중요하게 관여한다³⁹⁾. 蘇子藥鍼의 IgE 분비 억제는 제1형 알레르기 반응인 천식의 억제 및 면역조절효과가 있음을 의미한다고 할 수 있다. 또한, ELISA 분석을 통한 BALF 및 혈청내의 IL-4, IL-5와 혈청내 IL-13도 PF-HA군에서 control群에 비해 현저하거나 유의한 감소를 보였다(Fig.9-13). 여기서 IL-4는 활성화된 T세포, 비만세포, 호염기구 및 호산구 등에서 분비되어 알레르기 염증 발달에 중요한 역할을 하는 cytokine으로 Th0 림프구를 IL-4, IL-5, IL-9과 IL-13 등을 분비할 수 있는 Th2 림프구로 분화시킬 수 있으며 IgE 매개성 면역반응들을 촉진시키고 호산구 고사를 억제하고 eotaxin 발현을 증가시켜 호산구 화학 주성 및 활성화를 유도하여 호산구 성 염증을 촉진하는 작용을 한다. IL-5는 Th2 림프구에서 분비되는 cytokine으로서 골수에서 호산구 및 eotaxin-1과 같은 chemokine들을 이동시켜 기도내 호산구의 충원을 일으키며 이렇게 증가된 호산구는 매개체를 분비 기도상피세포의 손상을 일으키게 된다^{37,38)}. IL-13은 활성화된 Th2세포에서 분화된 단백질로 Th2 세포, NK T 세포, 비만세포와 호산구 등 조혈세포에서 생성되어 기도조직에 천식과 관련된 급만성 변화를 유도하며, CD8+ T세포에서도 생성되며 바이러스 감염 때 생성된 IL-13은 천식을 악화하는데 관여한다. 따라서 PF-HA群에서 IL-4, IL-5 및 IL-13의 유의한 감소는 蘇子藥鍼의 喘息抑制 및 免疫調節에 유효함을 의미한다고 思料된다.

FACS를 이용한 폐내 CD3-/CCR3+ 세포수 측정 결과 PF-HA群이 control群에 비해 현저하게 감소하였다(Fig.14). CCR3는 호산구에서 가장 높게 나타나고 호염기구, Th2세포, 천식환자의 기도상피에서 보이며, 호산구의 활성화와 탈과립화에 기여하며, CD3는 T세포에서

발현되는 표면분자³⁹⁾로, CD3-/CCR3+세포수의 감소는 알레르기 반응을 나타내는 호산구의 감소를 나타낸다.

폐내 Gr-1과 CD11b의 이중 양성 세포수 측정결과 control群 보다 PF-HA群에서 현저한 감소를 보였다 (Fig.15). Gr-1은 과립구에 많고, CD11b는 세포유착분자 (Mac-1)로서 림프구, 대식세포의 표면에서 발현되며, 호산구가 표적장기로 유입할 때 rolling 후 두 번째 단계에서 내피에 발현되어 있는 ICAM-1,2(intercellular adhesion molecule^{1,2)} 등과 유착하여 내피세포와 강하게 유착한다. 이후 PAF, LTB₄, eotaxin(CCL11), RANTES 등의 화학주성인자 등에 의해 경피내 이동이 일어나 결체조직으로 유입되게 된다⁴⁰⁾. 따라서 Gr-1+/CD11b+ 세포수의 감소는 알레르기 반응을 나타내는 면역세포 중 과립구의 감소를 의미한다고 사료된다.

CD4+세포수 및 CD3e+/CD69+세포수도 PF-HA群에서 현저히 감소하였다(Fig.16-17). CD4는 Th세포와 單球 일부, 피질흉선세포 일부에 발현하는 것으로 TCR과 함께 MHC class-II를 認知하는 기능을 하고 Th2세포를 인식하여 IL-4, IL-5, IL-13을 발현하고, CD8은 Tc세포, Ts세포, NK세포 일부, 피질흉선세포의 일부에 발현하는 세포로 TCR과 함께 MHC class-I을 인식하는 機能을 한다. 따라서 CD4세포의 감소는 염증과 알레르기 반응에 중요한 역할을 담당하는 T세포의 감소에 영향을 미쳐 과민 면역반응을 조절하는 효과가 있음을 나타낸다. CD3는 T세포 결정포지인자로 T림프구 항원 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달하고 CD69는 활성화된 B세포와 T세포, 대식세포, NK세포에 분포한다³⁶⁾. 따라서 CD3e+/CD69+세포수의 감소는 알레르기 반응을 나타내는 면역세포 중 활성화된 T세포의 감소를 의미한다고 할 수 있다.

RT-PCR을 이용하여 천식유발과 관련된 여러 cytokine들의 mRNA 발현을 관찰한 결과, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 등의 mRNA 발현이 control群에 비해서 PF-HA群에서 현저히 감소하였다(Fig.18). TNF- α 는 종양괴사인자로 대식세포의 활동을 증가시키고, 항바이러스 작용이 있어 염증 및 알레르기 반응과 연관이 있는 cytokine의 일종이다. 따라서 TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 등의 mRNA 발현 감소는 PF-HA群에서의 천식유발인자 감소를 의미한다³⁶⁾.

以上の 結果를 綜合 分析해 보면, 蘇子藥鍼이 喘息抑制 및 免疫機能調節에 有效한 影響을 미치는 것으로 나타났으며 향후 이에 대한 持續的인 연구와 臨床的

活用이 필요하다고 思料된다.

V. 結 論

알레르기 천식 모델 생쥐에서 蘇子藥鍼의 喘息抑制 및 免疫調節效果에 대해 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 폐의 質量은 PF-HA群에서 control群에 비해 유의하게 감소하였다.
2. BALF내 총 백혈구수와 호산구수는 PF-HA群에서 control群에 비하여 유의하게 감소하였다.
3. Photomicrographs에서 BALF내 호산구와 폐 조직 염색상 collagen 부착이 control群 보다 PF-HA群에서 현저하게 감소하였다.
4. BALF내 IgE, IL-4 및 IL-5와 Serum내 IL-4, IL-5 및 IL-13의 분비량이 PF-HA群에서 control群에 비해 모두 유의하게 감소하였다.
5. 폐내 CD3-/CCR3+ 세포수, Gr-1+/CD11b+ 세포수, CD4+ 세포수, CD3e+/CD69+ 세포수가 PF-HA群에서 control群에 비해 현저하게 감소하였다.
6. TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 등의 mRNA 발현이 PF-HA群에서 control群에 비해 현저히 감소하였다.

參考文獻

1. E. Braunwald 의 : HARRISON'S 내과학. 서울:정담. 2003. : 1500-4.
2. 양은석. 천식에서의 IL-4/IL-13 사이토카인 및 수용체. 소아알레르기 및 호흡기학회지. 2005 ; 15(1):1-11.
3. Chiang DJ, Ye YL, Chen WL, Lee YL, Hsu HY, Chiang BL : Ribavirin or CpG DNA sequence-modulated dendritic cells decrease the IgE level and airway inflammation. Am J Respir Crit care Med. 2003

- ;168(5) : 575-80.
4. 최준호, 박성우, 장안수, 이준혁, 김도진, 박중숙, 박춘식, 장희경, 안미현, 민지원. 호산구성 기관지염과 천식의 객담내 IL-5과 IL-13의 기도 과민성과의 연관성. 천식 및 알레르기학회지. 2005 ; 25(3) : 210-6.
 5. 李珩九, 鄭昇杞. 東醫肺系內科學. 서울: 民瑞出版社. 1999 : 187-202, 426, 460-1, 468.
 6. 전국의과대학교수 역. 오늘의 진단 및 치료. 서울: 한우리. 1999 : 287-97.
 7. 최병휘. 기관지 천식의 장기간의 치료원칙. 대한내과학회지. 2003 ; 64(4) : 374-87.
 8. 황영실. 중증 기관지 천식의 치료. 대한내과학회지. 2004 ; 67(2) : 440-7.
 9. 楊維傑編. 黃帝內經譯解. 서울: 一申社. 1991:67-73, 235-43.
 10. 朱震亨. 丹溪醫集:서울대학교 출판부. 서울. 2000 : 261-4.
 11. 박양춘. 蘇子降氣湯과 加味蘇子降氣湯이 I형 및 IV형 알레르기 반응과 肺損傷에 미치는 영향. 大田大學校大學院. 1994.
 12. 김상찬, 변성희. 백화사설초(白花蛇舌草)가 ovalbumin으로 유도된 천식동물모델에서 Eosinophil의 수, IgE 및 IL-4에 미치는 영향. 대한본초학회지(본초분과학회지). 2005 ; 20(2) : 35-42.
 13. 김재홍. 冬蟲夏草 藥鍼과 口腔投與가 ovalbumin으로 유발된 Asthma에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 ; 19(2) : 39-50.
 14. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學(上,下). 서울 : 集文堂. 1991 : 382-4.
 15. 李丁. 鍼灸經穴辭典. 서울 : 高麗醫學. 1989 : 138-9, 397-8.
 16. Teculescu D. Clear defunitions of chronic bronchopulmonary disease : a necessary for practice, teaching and research in pneumology. Rev Pneumol Clin. 1990 ; 46 : 194-199.
 17. Sly RM. Continuing decreases in asthma mortality in the United State. Ann Allergy Asthma Immunol. 2004 ; 92 : 313-318.
 18. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. am J Respir Crit Med. 2001 ; 164 : 28-38.
 19. Bukantz SC. Clemens von Pirquet and the concept of allergie. J Allergy Clin Immunol. 2002 ; 109 : 724-726.
 20. 김미경. 비염, 부비동염과 천식. 대한내과학회지. 2003 ; 65(2) : 546-548.
 21. 박용민. 기관지 천식의 최신지견. 소아알레르기 및 호흡기. 2004 ; 14(4) : 306-323.
 22. 丁奎萬. 알레르기과 韓方. 서울:도서출판 第一路. 1993 : 59-89.
 23. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. : National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health. 2002.
 24. 虞搏編. 醫學正傳. 서울:도서출판 성보사. 1986 : 101-4.
 25. 李中粹. 醫宗必讀. 서울:일증사. 1991 : 303-8.
 26. 張介賓. 景岳全書(上). 서울:일증사. 1984 : 344-9.
 27. 전국한의과대학 폐계내과학교실. 東醫肺系內科學. 서울:도서출판 한문화사. 200 : 192-9.
 28. 申佶求. 申氏本草學. 서울:수문사. 1988 : 484-5.
 29. 全國韓醫科大學 本草學教室編著. 本草學. 서울:永林社. 1999 : 483-4.
 30. 金定濟. 最新鍼灸學. 서울:성보사. 1979 : 405.
 31. 崔旼燮. 水針療法에 關한 考察. 대한한의학회지. 1990 ; 11(1) : 315-324.
 32. 송영호. 白屈菜分劃藥鍼이 抗癌 및 免疫反應에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 1997.
 33. 정영돈. 足三里에 시술한 芫花草藥鍼의 免疫增進과 抗癌작용에 關한 研究. 大田大學校大學院. 2003.
 34. 신성찬. 桑葉藥鍼이 喘息抑制效果에 對한 實驗的 研究. 大田大學校大學院. 2004.
 35. 하대유. 그림으로 본 면역학. 서울 : 고문사. 1994 : 279-330.
 36. Ivan Roitt. Immunology 6th. NewYork: Mosby. 2002 : 125-7.
 37. Stirling RG, Van Rensen EL, Barnes PJ, Chung KF. Interleukin-5 induces CD34+eosinophil progenitor mobilization and eosinophil CCR3 expression in asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2001 ; 164 : 1403-1409.
 38. Van Rensen EL, Stirling RG, Scheerens J, Staples K, Sterk PJ, Barnes PJ, et al. Evidence for systemic rather than pulmonary effects of interleukin-5 administration

- in asthma. Thorax. 2001 ; 56 : 935-940.
39. 김세중. 면역학. 서울:고려의학. 1994 : 3, 8, 25-6, 28, 31-2.
40. Nicholas W. Lukacs. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. Nature review. Immunology. 2000 ; 1 : 108-16