

원저

款冬花藥鍼의 喘息抑制 및 免疫調節效果에 對한 實驗的 研究

최가원 · 이현 · 홍권의

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Experimental Study on the Suppressive Effect of Asthma and Immune Response Improvement of Farfarae Flos Herbal-acupuncture

Choi Ka-won, Lee Hyun and Hong Kwon-eui

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

Objectives : The purpose of this study is to observe the suppressive effect of Asthma and Immune response improvement of FF(Farfarae Flos) Herbal-acupuncture into Joksamni(ST36) on ovalbumin-induced asthma in mice.

Methods : C57BL/6 mice were sensitized and challenged with OVA(ovalbumin) for 12 weeks. Experimental group was treated with concentrations(1%) of FF-HA at Joksamni(ST36) for the later 8 weeks(3times/week).

Results : 1. The weight and total cells in the mice lung treated with FF-HA decreased significantly compared with that of control group.
2. Total leukocytes and eosinophils in BALF of the mice group treated with FF-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 FF-HA decreased significantly compared with those of Control group.
4. The concentrations of IgE, IL-4, IL-5 in BALF, and IL-4, IL-5, IL-13 in serum of the mice group treated with FF-HA decreased significantly compared with those of control group.

5. The number of Gr-1+/CD11b+, CD11+ cells, CCR3+ cells, CD4+ cells, and CD3e+/CD69+ in the lungs of the mice group treated with FF-HA decreased significantly compared with those of control group.
6. The mRNA expression of TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 in the mice group treated with FF-HA with RT-PCR decreased remarkably compared with those of control group.

Conclusion : These result suggests that Farfarae Flos 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, FF(Farfarae Flos) Herbal acupuncture, Joksamni(ST36)

I. 緒 論

기관지천식은 임상적으로는 가역적인 기도폐쇄, 병리학적으로는 광범위한 기도염증, 생리학적으로는 기관지과민성으로 특징되는 대표적인 만성 호흡기질환으로 병인은 일차적으로 기도의 아급성염증질환으로 간주하며 병태생리는 염증세포와 각종 화학매개체, cytokine들이 관여하는 복합적 기도염증으로 이해되고 있어¹⁻³⁾, 최근 분자생물학적인 방법으로 cytokine, chemokine을 대상으로 천식의 작용기전을 연구하고 있다⁴⁻⁵⁾.

韓醫學에서 喘息은 呼吸急促, 喘鳴有聲을 特徵的인 症候群으로 하는 哮喘證과 類似하며⁶⁾, 원인으로 주로 寒冷, 심리적요인, 유전적소질, 痰, 과민반응, 그리고 脾, 肺, 腎 등의 호흡장부의 기능장애로 보고 있으며⁷⁻⁸⁾, 최근에는 한의학 연구에 있어서도 처방이나 개별 한약재의 효능에 대한 분자생물학적인 연구⁹⁻²⁴⁾가 시도되고 있다.

款冬花는 潤肺下氣, 止咳化痰의 효능을 가지고 있어 咳嗽, 喘咳痰多, 咳血 등의 증상을 치료하여 기관지천식 및 급만성기관지염, 폐렴 등의 질환에 다용되고 있으며²⁵⁾, 款冬花에 대한 기존의 연구로 韓²⁶⁾等, 韓²⁷⁾ 등이 보고하였으나 足三里(ST36) 款冬花藥鍼(FF-HA)이 천식억제 및 면역계의 조절에 미치는 영향에 대해 보고한 바는 아직 접하지 못하였다.

이에 著者는 潤肺下氣, 止咳化痰의 효능²⁵⁾이 있는 款冬花로 藥鍼液을 제조한 후, 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시키고, 款冬花藥鍼液을 調中氣, 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元, 祛邪防病 등의 效能²⁸⁻³²⁾

이 있는 足三里(ST36)에 刺入한 후 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/6생쥐를 대한 실험센터에서 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℃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 款冬花(Farfarae Flos ; 以下 FF)이라 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

款冬花 55g을 粉碎機를 利用해서 粉末로 하여 원형 삼각 flask에 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 가하고, 室溫에서 攪拌한 후 방치하여, 沈澱物이 生成되게 한 후 濾過하였다. 이 濾過液을 rotary evaporator로 減壓濃縮한 후, 濃縮液을 다시 濾過하였다. 이 濾過液에 85% ethyl alcohol 30

ml를 加하고 잠시 攪拌한 후 방치하여, 沈澱物이 생성되게 한 후 濾過하였다. 濾過液에 75% ethyl alcohol 30ml를 加하고 攪拌한 후 방치하였다가 濾過하는 조작을 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 조절하고, 저온에서 12시간 방치한 후 滅菌하였다. 滅菌된 濃縮液에 PBS를 가하여 1%로 희석하여 藥鍼液으로 사용하였다.

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 약침액을 가하여 48시간 동안 배양 시킨 후 표식항체를 반응시켜 FACS 분석하였다.

2) In vivo

(1) Asthma mouse model과 실험군

실험 1주째 200 μ l의 OVA/alum(500 μ g/ml), 2-3주째에는 100 μ l OVA/alum(500 μ g/ml)을 생쥐에 복강투여(i.p)하였다. 4주째는 마취 후 100 μ l의 OVA/alum(500 μ g/ml)을 기도투여(i.t)하였다. 5-8주째는 2.5mg/ml의 OVA/PBS 40 μ l을, 9-12주째는 5mg/ml의 OVA/PBS 40 μ l을 air compressor를 이용하여 30분간 주 3회 노출시켰다. 5주째부터 12주째까지 8주간 주 3회 우측 족삼리(ST36)에 1%의 款冬花 藥鍼液(100 μ l)을 주입하였다.

(2) Control군의 분류

Control군은 7마리를 1群으로 하여 정상군(Normal), OVA-Control군, OVA-Needle prick(NP)군 등 3群으로 나누었다.

① 정상군(Normal)

정상군(Normal)은 아무런 처치도 하지 않았다.

② OVA-control군

OVA-Control군은 喘息 誘發 후 아무런 처치도 하지 않았다.

③ OVA-Needle prick(NP)군

NP群은 喘息을 誘發하고 우측 足三里(ST36)에 주사기를 刺入한 후 즉시 제거하였다. NP자극은 5주째부터 12주째까지 8주간 주 3회 시행하였다.

(3) Bronchoalveolar-lavage fluid isolation

생쥐를 麻酔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.

(4) Photomicrograph

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.

(5) Histological analysis

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

(6) Fluorescence activated cell sorter(FACS) analysis

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

(7) Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) analysis

ELISA Kit를 사용하여, 생쥐에서 分離한 BALF와 serum에서 各 cytokine량을 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.

(8) mRNA RT-PCR analysis

① Total RNA의 抽出

各 실험군의 생쥐에서 떼어낸 폐 組織을 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 精량하고, RNA를 확인하기 爲하여 RNA 4 μ g을 EtBr이 들어있는 formaldehyde buffer와 섞어 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 denaturation 시키고, formaldehyde를 넣은 1.5% agarose gel에 loading dye와 함께 loading 하여 그 量을 確認하였다. 確認한 RNA는 RT-PCR에 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 $^{\circ}$ C에서 10分 동안 denaturation 시키고, 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 後 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 後 遠心分離하여 37 $^{\circ}$ C 恒溫 水槽에서 60分 동안 反應시켜 first-strand cDNA를 合成한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 10分 동안 放置하여 M-MLV RT를 不活性化시키고 즉시 얼음으로 옮겼다. 이렇게 合成이 완료된 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 利用하여 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, 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 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 멸균증류수를 加하고 predenaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5분, denaturation; 74 $^{\circ}$ C, 5분, annealing; 55 $^{\circ}$ C, 1분, elongation; 72 $^{\circ}$ C, 1분을 25cycle한 後 postelongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 條件으로 PCR을 수행하였

다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 50V 條件에서 30분간 전기영동을 통하여 分析하였다.

(9) 統計處理

통계는 Student's t-test로 하였다.

III. 結 果

1. In vitro screening

1) FACS analysis

(1) Granulocytes/lymphocytes population

肺 細胞 中 granulocyte의 비율이 normal에서는 8.2%였으나 control에서는 26.8%이었고 FF-HAS에서는 13.6%로 감소하였다(Fig. 1-1).

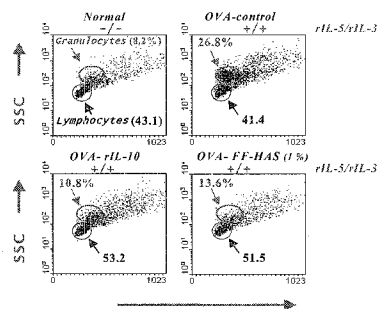


Fig. 1-1. Effect of FF-HAS on granulocytes/lymphocytes population(%) in mouse OVA-induced asthma lung cells

(2) CD3e-/CCR3+

肺 細胞 中 CD3e-/CCR3+ 細胞의 비율이 normal에서는 77.1%였으나 control에서는 92.2%이었고 FF-HAS에서는 75.6%로 감소하였다(Fig. 1-2).

(3) CD69+/CD3e+

肺 細胞 中 CD69+/CD3e+의 비율이 normal에서는 10.4%였으나 control에서는 46.8%이었고 FF-HAS에서는 37.4%로 감소되었다(Fig. 1-3).

(4) CD4+ 및 CD8+

肺 細胞 中 CD4+ 細胞의 비율이 normal에서는 35.1%였으나 control에서는 41.6%이었고, FF-HAS

에서는 40.4%로 감소했고, CD8+의 비율은 normal에서는 31.9%였으나 control에서는 20.1%이었고, FF-HAS에서는 26.9%로 증가했다.(Fig. 1-4).

(5) CD23+/B220+

肺細胞 中 CD23+/B220+의 비율이 normal에서는 0.37%였으나 control에서는 1.59%이었고 FF-HAS에서는 1.23%로 감소되었다(Fig. 1-5).

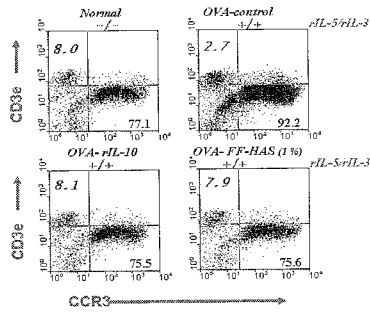


Fig. 1-2. Effect of FF-HAS on the percentage of CD3e-CCR3+ population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells

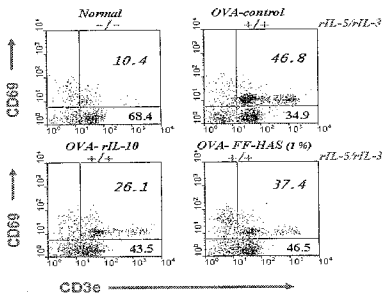


Fig. 1-3. Effect of FF-HAS on the percentage of CD69+/CD3e+ population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells

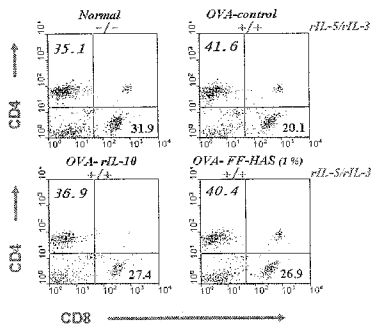


Fig. 1-4. Effect of FF-HAS on the percentage of CD4+ and CD8+ population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells

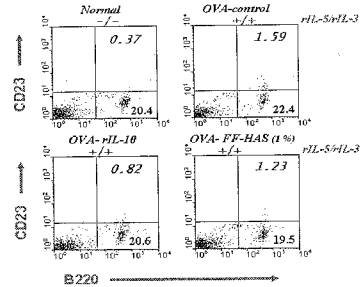


Fig. 1-5. Effect of FF-HAS on the percentage of CD23+/B220+ population (%) in mouse OVA-induced asthma lung cells

2. In vivo

1) Lung weight

폐의 무게를 측정 한 결과 control군에서는 normal에 비해 증가하였고 FF-HA군에서는 control군보다 유의성 있게 감소하였다(p<0.05)(Fig. 2-1).

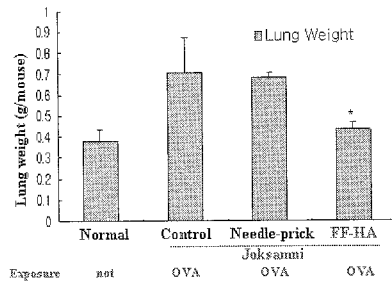


Fig. 2-1. Effect of FF-HAS on lung weight in mice with OVA-induced asthmatic mouse lung weight

2) Cell count

(1) Total cells in lung

총 폐 세포수가 control군에서는 normal에 비해 증가하였고 FF-HA군에서는 control군보다 현저하게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 2-2).

(2) Total Leukocyte in BALF

BALF내 leukocyte가 control군에서는 normal에 비해 증가하였고 FF-HA군에서는 control군보다 현저하게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 2-3).

(3) Eosinophils in BALF

BALF내 eosinophil은 control군에서는 normal에 비해 증가하였고 FF-HA군에서는 control군보다 현

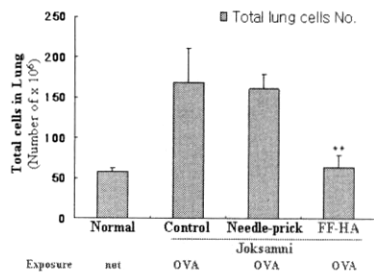


Fig. 2-2. The number of total cells in OVA-induced asthmatic mouse lung tissue.

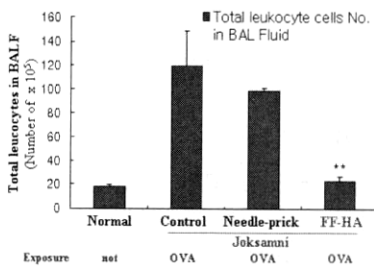


Fig. 2-3. The number of Total leukocytes in bronchoalveolar lavage fluid.

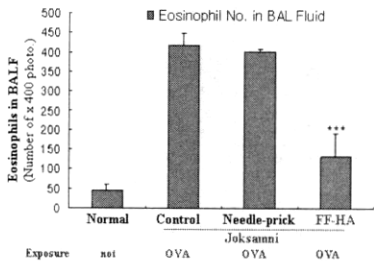


Fig. 2-4. The number of Eosinophil in bronchoalveolar lavage fluid.

저하게 감소하였다($p < 0.001$)(Fig. 2-4).

3) Photomicrographs of Eosinophil in BALF

Control군의 BALF에서는 eosinophil이 다량으로 관찰 되었으며 FF-HA군의 BALF에서는 eosinophil이 현저하게 減少하였다(Fig. 2-5).

4) Histological analysis of lung sections

FF-HA군에서는 control군에 비해 collagen의 침착이 현저하게 감소하였다(Fig. 2-6).

5) ELISA analysis

(1) IgE in BALF

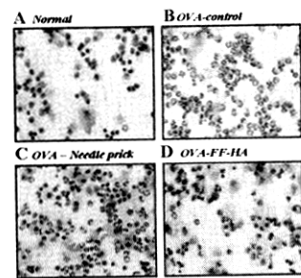


Fig. 2-5. Photomicrographs(original magnification, $\times 400$) of BALF cytopins from mice

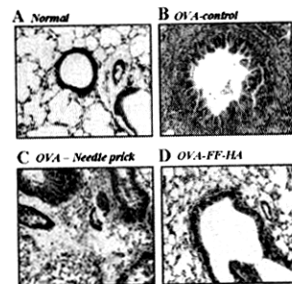


Fig. 2-6. Histological analysis of lung sections from mice

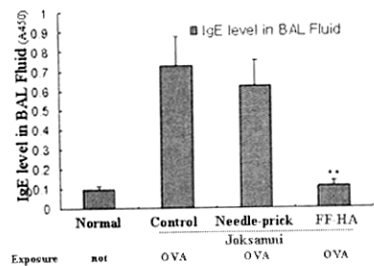


Fig. 2-7. The level of IgE in bronchoalveolar lavage fluid

BALF내 IgE의 양은 control군에 비해 FF-HA군에서 현저하게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 2-7).

(2) IL-4 in BALF

BALF내 IL-4의 양은 control군에 비해 FF-HA군에서 유의하게 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 2-8).

(3) IL-5 in BALF

BALF내 IL-5의 양은 control군에 비해 FF-HA군에서 현저하게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 2-9).

(4) IL-4 in Serum

Serum내 IL-4의 양은 control군에 비해 FF-HA군에서 현저하게 감소하였다($p < 0.001$)(Fig. 2-10).

(5) IL-5 in Serum

Serum내 IL-5의 양은 control군에 비해 FF-HA 군에서 현저하게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 2-11).

(6) IL-13 in Serum

Serum내 IL-13의 양은 control군에 비해 FF-HA 군에서 현저하게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 2-12).

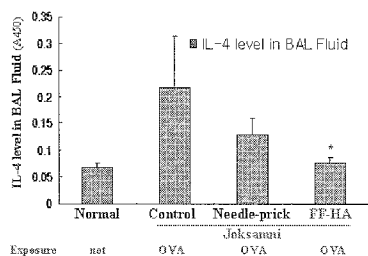


Fig. 2-8. The level of IL-4 in bronchoalveolar lavage fluid

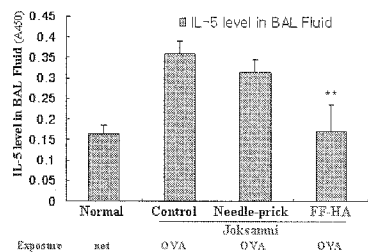


Fig. 2-9. The level of IL-5 in bronchoalveolar lavage fluid

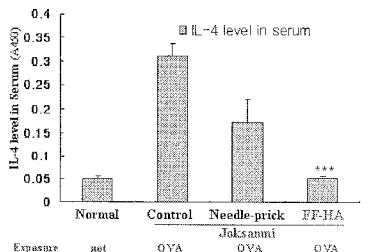


Fig. 2-10. The level of IL-4 in C57BL/6 mouse Serum

6) FACS analysis FACS분석에 의해 각 細胞 수를 測定하였다.

(1) Gr-1+/CD11b+

Gr-1+/CD11b+細胞와 CD11b+細胞는 control군에 비해 FF-HA군에서 현저히 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 2-13).

(2) CD3-/CCR3+

CCR3+細胞는 control군에 비해 FF-HA군에서 현저히 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 2-14).

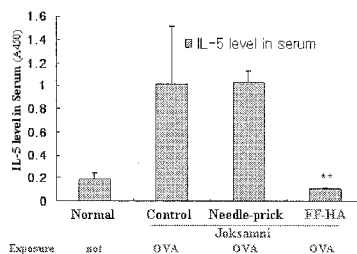


Fig. 2-11. The level of IL-5 in C57BL/6 mouse Serum

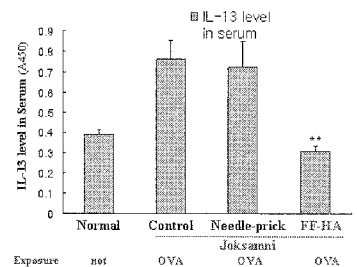


Fig. 2-12. The level of IL-13 in C57BL/6 mouse Serum

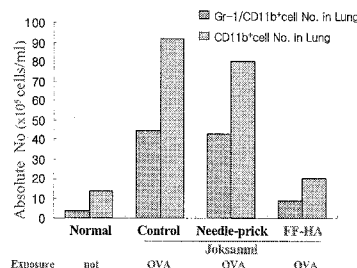


Fig. 2-13. Effect of FF-HA on Gr-1+/CD11b+ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung

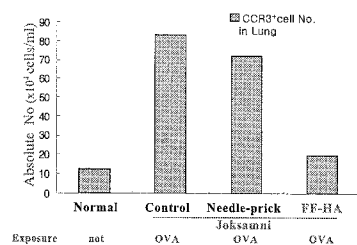


Fig. 2-14. Effect of FF-HA on CCR3+ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung

IV. 考 察

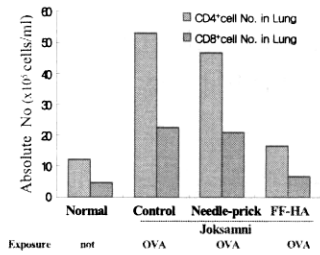


Fig. 2-15. Effect of FF-HA on CD4 and CD8 cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung

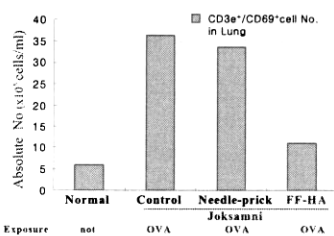


Fig. 2-16. Effect of FF-HA on CD3e+/CD69+ cell number in OVA-induced asthmatic mouse lung

(3) CD4+ 및 CD8+

CD4+ 및 CD8+細胞는 control군에 비해 FF-HA군에서 현저하게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 2-15).

(4) CD3e+/CD69+

CD3e+/CD69+細胞는 control군에 비해 FF-HA군에서 현저하게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 2-16).

7) RT-PCR analysis

RT-PCR을 이용하여 喘息 유발과 관련된 여러 cytokine 들의 mRNA 發顯을 관찰한 結果, TNF- α , IL-5, IL-4, IL-13등의 mRNA 發顯이 control군에 비해 FF-HA군에서 현저하게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 2-17).

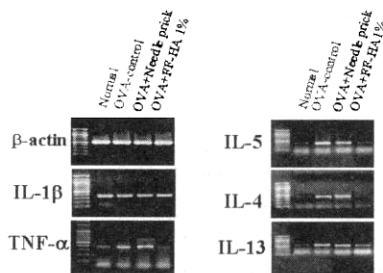


Fig. 2-17. mRNA expression of β -actin, TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-5, and IL-13 in the lung

氣管支喘息의 病因에 關與하는 細胞는 Tcell, Bcell, macrophage, eosinophil, mast cell, 氣道上皮細胞 등 여러 가지가 있지만 이중 Th 림프구는 cytokine을 분비하여 기도의 염증반응을 조절하는 중요한 역할을 하고 있다³³⁾.

T lymphocyte는 CD3를 表面分子로 가지며, CD4+Tcell, CD8+Tcell, cytotoxic Tcell, inducer Tcell 등이 있는데, 이 중 CD4+Tcell과 CD8+Tcell은 免疫機轉에서 重要な 役割을 擔當한다³⁴⁾.

CD4+Tcell은 活性化되었을 때 分泌하는 cytokine에 따라 Th1細胞와 Th2細胞로 分類된다. Th1세포는 CCR5 수용체를 가지고, IL-2, IL-12, IFN(interferon)- γ 를 생산하며, 遲延型 過敏反應, 結核菌이나 바이러스에 對한 防禦作用, 腫瘍에 對한 宿主反應에 關與한다. Th2細胞는 CCR3, CCR4, CCR8 受容體를 가지고, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 등을 生産하여 即時型 過敏反應, 氣管支喘息과 같은 알레르기성 疾患, 寄生蟲 感染에 對한 防禦作用 등에 關與한다³⁵⁾. Th1과 Th2細胞는 相互拮抗作用을 통해 免疫均衡을 維持하며³⁶⁾, 알레르기성 氣管支喘息患者의 BALF에서는 Th2細胞의 機能이 活性化됨이 觀察되고 있다¹⁸⁾.

CD8+Tcell은 class I MHC(抗原提示細胞)와 結合하여 virus나 特定 細菌에 의한 感染이나 惡性腫瘍에 대하여 신체 보호 역할을 한다³⁷⁾.

Th2 cytokine인 IL-4, IL-13은 B細胞를 刺戟하여 IgE 形成을 促進시키고⁵⁾, IL-5는 IL-4의 作用을 도울 뿐만 아니라 骨髓에서 好酸球 分化를 促進하고, 氣道內로 移動하여 氣道內 好酸球를 活性化시키는 役割을 하여 氣管支 喘息 病態生理에 매우 重要な 役割을 한다³⁸⁾.

IL-4는 B 細胞活性化와 isotype교환, 특히, IgE 抗體의 發生에 있어서 重要な 役割을 한다. 機能性 IL-4 遺傳子가 缺乏된 생쥐는 IgE를 生産할 수 없다. 免疫反應 初期段階에서 IL-4의 出現은 反應의 性質에 重要な 影響을 준다. IL-4는 T 세포에 의한 IL-4의 보다 많은 生産을 도와주며, 抗體 形成을 增進시키고, 遲延型 過敏性 反應을 抑制하는 IFN- γ 의 生産을 抑制한다³⁹⁾.

IL-5는 호산구증가증을 초래하는 주요한 cytokine

이다. IL-5는 또한 성숙한 eosinophil를 활성화시키고, 그들의 수명을 연장하며, 염증부위에서의 축적에 기여한다⁴⁰⁾. IL-5가 결핍된 생쥐에서는 알레르기 질환에 대한 반응에서 어떠한 폐호산구증가증(pulmonary eosinophilia)이 나타나지 않았다⁴¹⁾.

IL-13은 Th2細胞에서 주로 生産하며, IL-4와 機能的으로 類似하여, IgE의 生産을 促進한다. 이에 對한 受容體는 大食細胞, 好酸球, 好鹽氣球, 肥滿細胞, 內皮細胞等に 發顯되며, T細胞에는 發顯되지 않는다³⁹⁾.

알레르기 炎症反應에서 好酸球의 役割을 살펴보면, 吸入된 抗原은 氣道內 肥滿細胞와 Th2細胞를 活性化시켜서, 炎症을 일으키는 chemokine mediator와, IL-4, IL-5같은 cytokine의 生産을 惹起한다. 好酸球가 여러 cytokine들과 chemokine들의 影響을 통해 氣道組織으로 들어가면, 그들의 生存은 IL-3, IL-5, GM-CSF등에 의해 延長된다. 活性化狀態에서 好酸球는 leukotrien이나 granule protein같은 炎症媒介物을 放出하여 氣道組織에 病變을 일으킨다. 아울러 好酸球는 GM-CSF를 生産하여 그들의 生命을 延長시키고 持續的인 氣道炎症反應에 影響을 준다³⁸⁾.

款冬花藥鍼液의 喘息抑制 및 免疫調節效果를 알기 위하여, In vitro에서 FACS분석을 통하여 granulocytes/lymphocytes population(%)에 미치는 영향을 살펴보면, 폐세포 중 granulocyte의 비율이 normal에서는 8.2%였으나 control에서는 26.8%이었고 FF-HAS에서는 13.6%로 감소하였다(Fig. 1-1).

Granulocytes는 eosinophil과 neutrophil, basophil로 나눌 수 있다. 그중 eosinophil은 寄生蟲의 感染이나 알레르기성 疾患일 경우에 增加한다⁴²⁻⁴³⁾. 따라서 FF-HAS폐에서 폐 세포내의 과립구의 감소는 폐내 염증이나 알레르기 반응의 감소를 나타낸다.

폐 세포 중 CD3e-/CCR3+ 세포의 비율은 normal에서는 77.1%였으나 control에서는 92.2%이었고 FF-HAS에서는 75.6%로 감소하였다(Fig. 1-2).

CD3는 T세포의 決定標識因子로, T lymphocyte의 항원 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포안으로 전달하는 역할을 하고, CCR3는 eosinophil의 활성화와 탈과립화에 관여하는 것으로 보인다⁴⁴⁻⁴⁵⁾. 따라서 FF-HAS에서 CD3e-/CCR3+ 세포의 비율이 감소된 것은 염증과 알레르기 반응을 일으키는 eosinophil의 감소를 나타낸다.

폐 세포 중 CD69+/CD3e+ 세포의 비율은 normal에서는 10.4%였으나 control에서는 46.8%이었고 FF-HAS에서는 37.4%로 감소되었다(Fig. 1-3).

CD69는 활성화된 B세포, T세포, macrophage에 분포하는 것으로, lymphocyte의 신호전달에 관여하고, CD3는 T세포 결정표식인자로, FF-HAS에서의 CD69+/CD3e+의 비율의 감소는 염증과 알레르기 반응 중의 T세포의 감소를 나타낸다⁴⁴⁻⁴⁵⁾.

폐 세포 중 CD4+세포의 비율이 normal에서는 35.1%였으나 control에서는 41.6%이었고 FF-HAS에서는 40.4%로 감소했다(Fig. 1-4). CD4는 만성염증반응에 대한 알레르겐을 통제하는 Th 세포 밀도의 표지자이다⁴⁴⁻⁴⁵⁾. 따라서 FF-HAS에서의 CD4+ 세포 비율의 감소는 염증과 알레르기 반응 중의 T세포의 감소를 나타낸다.

폐 세포 중 CD23+/B220+ 세포의 비율이 normal에서는 0.37%였으나 control에서는 1.59%이었고 FF-HAS에서는 1.23%로 감소되었다(Fig. 1-5). CD23은 B세포일부, 단구, 수상돌기세포, eosinophil, 혈소판에 발현하는 세포로, macrophage와 eosinophil에 의한 세포독성을 매개한다. B220은 쥐의 B세포 표면에 있는 표식자로, B세포의 면역증가를 의미한다⁴⁴⁻⁴⁵⁾. 따라서 FF-HAS에서의 CD23+/B220+ 세포 비율의 감소는 염증과 알레르기 반응 중의 B세포의 감소를 나타낸다.

이상의 In vitro 실험결과, 과립구, CD3e-/CCR3+, CD69+/CD3e+, CD4+, CD23+/B220+의 비율이 FF-HAS에서 control에 비해 감소한 것으로 보아, 款冬花藥鍼液이 喘息抑制 및 免疫調節作用이 있는 것으로 사료된다.

이에 著者는 潤肺下氣, 止咳化痰의 效능²⁵⁾을 지니고 있는 款冬花로 藥鍼液을 製造한 후, 調中氣, 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元, 祛邪防病 등의 效能²⁸⁻³²⁾이 있는 足三里(ST36)에 穴침시술하여, 足三里 款冬花藥鍼이 알레르기천식모델 생쥐에서 喘息억제 및 免疫조절에 미치는 영향을 알아보기 위하여, ovalbumin을 복강주입 및 흡입시켜 감작된 생쥐에 알레르기 천식 병태를 유발시키고, 款冬花藥鍼液을 足三里(ST36)에 刺入한 후 생쥐의 폐무게, 폐의 총세포수, 組織染色을 통한 collagen 沈着變化를 살펴보고, BALF內 leukocyte수, BALF內 eosinophil수, BALF內 IgE, IL-4, IL-5, serum內 IL-4, IL-5, IL-13의 분비량을 측정하고, 또한 Gr-1+/CD11b+ 세포수, CD3-/CCR3+ 세포수, CD4+ 및 CD8+ 세포수, CD3e+/CD69+, IgE+/B220+ 세포수의 변화를 측정하였다. 또한 RT-PCR을 이용하여 肺內 β-actin, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 및 TNF-α의 mRNA 발현

을 관찰하였다.

In vivo에서 실험동물의 폐의 무게를 측정된 결과, control군에서는 normal에 비해 증가하였고 FF-HA군에서는 control군보다 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 2-1). 폐의 질량증가는 폐와 기관지의 염증에 의한 collagen의 합성에 기인한 것으로, FF-HA군에서 폐의 질량 감소는 collagen의 합성 감소를 나타낸다. 따라서, FF-HA군가 폐와 기관지의 염증의 감소에 효과가 있는 것으로 사료된다.

폐의 총세포수는, control군에서는 normal에 비해 증가하였고 FF-HA군에서는 control군보다 현저하게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 2-2). 천식모델 생쥐의 폐내 총세포수 증가는 천식을 일으키는 면역세포들이 증식이나 활성화되어 기관지 및 폐에 침착, 침윤되어 있음을 의미하며, 폐내 세포수가 FF-HA군에서 감소된 것은 款冬花藥鍼이 면역세포의 침착 및 침윤과 염증에 있어서 유의한 효과가 있는 것으로 사료된다.

BALF내 leukocyte는 control군에서는 normal군에 비해 증가하였고 FF-HA군에서는 control군보다 현저히 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 2-3). FF-HA군에 leukocyte 수가 감소된 것은 款冬花藥鍼이 천식 및 면역조절에 효과가 있는 것으로 사료된다.

BALF내 eosinophil은 control군에서 normal군에 비해 증가하였고 FF-HA군에서 control군보다 현저히 감소하였다($p < 0.001$)(Fig. 2-4). BALF내 eosinophil 수의 감소는 폐의 염증이나 기관지 천식반응의 감소를 나타내므로, 款冬花藥鍼이 염증 및 알레르기 반응에 효과가 있음을 나타낸다.

Photomicrographs of eosinophil in BALF을 살펴보면, control군의 BALF에서 eosinophil이 다량으로 관찰 되었으며, FF-HA군의 BALF에서 eosinophil이 현저하게 감소하였다(Fig. 2-5). Photomicrographs에서 BALF내 eosinophil의 수가 control에 비해 FF-HA군에서 현저하게 감소하였다는 것은 폐와 기관지의 염증 반응의 감소를 나타내고, 款冬花藥鍼이 염증 및 알레르기 반응에 있어서 효과가 있음을 나타낸다.

肺 조직을 염색하여 관찰한 결과, FF-HA군에서는 control군에 비해 collagen의 침착이 현저하게 감소하였다(Fig. 2-6). 이는 款冬花藥鍼이 肺, 氣管支內 collagen 부착에 대한 抑制效果가 있다고 思料된다.

ELISA분석 결과, BALF내의 IgE, IL-4, IL-5의 양, 혈청내의 IL-4, IL-5, IL-13의 양이 FF-HA군에서 control에 비해 감소하였다(Fig. 2-7, 2-8, 2-9,

2-10, 2-11, 2-12).

IgE는 특정 항원 분자와 反應하는 항체 特性을 가진 혈청 글로불린으로, 항원이 기도내에 들어오면, 생성되어 mast cell이나 basophil 등의 수용체에 달라붙어서 알레르기 반응에 중요하게 관여하는 면역 글로불린이다⁴⁴⁻⁴⁵. IL-4, IL-13은 세포간의 정보를 전달하는 cytokine으로, 둘 다 Th림프구에서 생성하나, IL-4는 B림프구의 분화와 증식을 촉진하는 cytokine이며, IL-13은 macrophage를 표적으로 하여, 炎症誘發 cytokine을 활성화하고, 유리를 억제하는 기능을 지닌 cytokine이며⁴⁴⁻⁴⁵, IL-4, IL-13은 B 세포를 자극하여 IgE 형성을 촉진시키고, eosinophil의 응집을 야기하고, Th2세포의 생성을 돕는다³³. 한편, IL-5는 Th2세포 및 활성화된 mast cell에 의해 생산되며 eosinophil의 성장과 분화를 자극하고 성숙한 eosinophil을 활성화한다^{43,46}.

따라서 control에 비해 FF-HA군에서 IgE, IL-13, IL-4, IL-5 분비량이 감소한 것은 款冬花藥鍼이 氣管支喘息으로 인한 염증성 세포의 증식과 활성화를 억제시켜 천식 억제 및 면역조절에 유효한 것으로 생각된다.

FACS 분석 결과, Gr-1+/CD11b+細胞와 CD11b+細胞는 control군에 비하여 FF-HA군에서 현저하게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 2-13). Gr-1은 Granulocyte에 많고, CD11b는 세포유착분자(Mac-1)로서 lymphocyte, macrophage의 표면에서 발현되며, eosinophil이 표적장기로 유입할 때 Rolling 후 두 번째 단계에서 內皮에 발현되어 있는 ICAM-1, 2(intercellular adhesion molecule¹⁻²) 등과 유착하여 endotheliocyte와 강하게 유착하여 이후 PAF, LTB₄, eotaxin(CCL11), RANTES 등의 化學走性因子등에 의해 경피내 이동이 일어나 결체조직으로 유입되게 된다. 따라서 Gr-1+/CD11b+세포수의 감소는 알레르기 반응을 나타내는 과립구의 감소를 의미하며 FF-HA가 eosinophil의 내피세포유착에 의한 경피내 이동을 감소시키는 것으로 사료된다.

CCR3+세포는 control군에 비하여 FF-HA군에서 현저하게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 2-14). CCR3는 eosinophil에서 가장 높게 나타나고, basophil, Th2세포, 천식환자의 기도상피세포에서 보이며, eosinophil의 활성화와 탈과립화에 관여하는 것으로 보인다⁴⁶. CCR3+세포수의 감소는 알레르기 반응을 나타내는 면역세포 중 eosinophil의 감소를 나타내므로 FF-HA가 eosinophil 수를 감소시키는 것으로 사료된다.

CD4+ 및 CD8+細胞는 control군에 비하여 FF-HA 군에서 현저하게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 2-15). CD4와 CD8는 모두 T세포의 活性 및 抑制를 나타내는 표지가 되는 세포로, CD4+와 CD8+세포수의 감소는 알레르기 반응을 일으키는 면역세포 중의 T세포의 감소를 나타낸다^{44,45)}. 따라서 FF-HA의 刺入에 의한 CD4+ 및 CD8+세포수의 감소를 통해 과민한 면역반응을 조절하는 효과가 있음을 알 수 있다.

CD3e+/CD69+細胞는 control군에 비하여 FF-HA 군에서 현저하게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 2-16). CD3는 T세포에 발현하여 TCR과 함께 CD3복합체를 이루고, T세포의 신호전달을 하는 기능을 나타내고, CD69는 활성화된 B세포, T세포, macrophage에 분포하는 것으로, 림프구의 신호전달에 관여한다⁴⁴⁻⁴⁵⁾. 따라서, CD3e+/CD69+세포수의 비율 감소는 알레르기 반응을 나타내는 면역세포 중의 T세포의 감소를 의미한다고 할 수 있으며 FF-HA가 T세포의 활성화를 감소시키는 것으로 사료된다.

RT-PCR을 이용하여 喘息 유발과 관련된 여러 cytokine들의 mRNA 發顯을 관찰한 結果, TNF- α , IL-5, IL-4, IL-13등의 mRNA 發顯이 control군에 비하여 FF-HA군에서 현저히 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 2-17).

TNF- α 는 前炎症性 cytokine으로 활성화된 macrophage, 활성화된 Lymphocyte, NK cell, mast cell 등에서 생성되어 염증면역반응을 매개한다⁴²⁾. IL-4는 IgE 抗體의 發生에 있어서 重要的 役割을 하며 抗體 形成을 增進시키고, 遲延型 過敏性 反應을 抑制하는 IFN- γ 의 生産을 抑制하며³⁹⁾, IL-5는 호산구증가증을 초래하는 주요한 cytokine으로 활성화된 B세포를 증식시키고 IgM과 IgA의 생산을 촉진, 성숙한 eosinophil을 활성화하고, 염증부위에서의 축적에 기여하며⁴⁰⁾, IL-13은 macrophage를 표적으로 하여, 炎症誘發 cytokine을 활성화하고, 유리를 抑制하는 機能을 지닌 cytokine이며 이들은 모두 염증과 알레르기 반응과 관계있는 cytokine으로, 이들의 mRNA 발현의 감소는 천식유발인자 감소를 나타낸다⁴⁴⁻⁴⁵⁾.

以上の 實驗結果를 綜合하여 보면 Gr-1+/CD11b+ 세포수, CD3-/CCR3+세포수, CD4+ 및 CD8+세포수, CD3e+/CD69+세포수, IgE+/B220+세포수 등의 지수가 감소한 것은 알레르기 및 염증의 감소를 말하며, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13등의 mRNA 발현이 control에 비하여 FF-HA에서 현저히 감소한 것은 款冬花藥鍼이 천식억제 및 면역 기능 조절에 유효한 것으로 판단되며 향후 지속적인 연구가 필요한 것으로

로 사료된다.

V. 結 論

OVA-asthma mouse model을 이용하여 款冬花藥鍼의 喘息 억제 및 免疫 조절 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 肺의 무게와 총세포수는 FF-HA에서 control에 비하여 유의하게 감소하였다.
2. BALF內의 총 lymphocyte수와 eosinophil수는 FF-HA에서 control에 비해 현저하게 감소하였다.
3. Collagen의 침착은 FF-HA에서 control에 비하여 현저하게 감소하였다.
4. BALF內 IgE, IL-4, IL-5양과 Serum內 IL-4, IL-5, IL-13의 양이 FF-HA에서 control에 비하여 유의하게 감소되었다.
5. BALF內의 Gr-1+/CD11b+와 CD11+ 세포수, CCR3+세포수, CD4+세포수, CD3e+/CD69+세포수는 FF-HA에서 control에 비해 유의하게 감소하였다.
6. TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 등의 mRNA 발현이 FF-HA에서 control에 비해 현저하게 감소하였다.

VI. 參考文獻

1. 고영률. 천식의 병태생리. 소아알레르기 및 호흡기. 2000 ; 10(4) : 255-262.
2. 해리슨 번역 편찬위원회. HARRISON'S 내과학. 서울 : 정담. 1997 : 1258-1264.
3. Lawrence M. 外. 오늘의 진단과 치료, 서울 :한우리. 2000 : 287-297.
4. Abehsira-Amar O, Gilbert M, Jolij M, Theze J, Jankovic D. IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells. J Immunol. 1992 ; 148 : 3820-3829.

5. Ferrira MB, Palma Carlos AG. Cytokines and asthma. J of investigational allergology and clinical immunology. 1998 ; 8 : 141-148.
6. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂. 1989 : 145, 474-480.
7. 李珩九, 鄭昇杞. 東醫肺系內科學. 서울 : 아트동방. 1999 :162-202.
8. 白東鎮, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九. Allergy性呼吸器疾患에 對한 文獻的 考察. 大韓韓方內科學會誌. 1998 ; 19(1) : 338-339.
9. 차은수, 정희재, 정승기, 이형구.小青龍湯이 Asthma model 내의 Cytokine에 미치는 影響. 경희한의대논문집. 23(1) : 71-88, 2000.
10. 이동생, 정희재, 정승기, 이형구. 麥門冬과 五味子が Asthma model內의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響. 경희의학. 2000 ; 16(2) : 69-80.
11. 백동진, 정희재, 이형구, 정승기. 解表二陳湯加減方이 Asthma model內의 Cytokine에 미치는 影響. 대한한의학회지. 2000 ; 21(3) : 3-13.
12. 정옥, 정희재, 정승기, 이형구. 杏仁과 桔梗이 Asthma model 내의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響. 대한한방내과학회지. 2000 ; 21(1) : 31-38.
13. 허태석. 瀉白散과 甘草가 asthma모델내의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6,에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 2000.
14. 李成桓, 李潤浩, 申舜植. 五拗湯 藥鍼이 알레르기 喘息 흰쥐의 肺氣管支 洗滌液內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2001 ; 18(1) : 30-39.
15. 金珍珠. 麥門冬湯과 定喘化痰降氣湯이 알레르기 喘息 모델 흰쥐의 BALF內 免疫細胞 및血清 IgE에 미치는 影響. 경희대학교 대학원 박사학위논문. 2001.
16. 李俊雨. 小青龍湯이 알레르기喘息 모델 흰쥐의 BALF內 免疫細胞에 미치는 影響. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 2001.
17. 김재홍, 조명래, 유충열, 채우석. 冬蟲夏草藥鍼과 口腔投與가 ovalbumin으로 誘發된 asthma에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2002 ; 19(2) : 39- 50.
18. 김대검. 桑白皮가 제 I형 알레르기 喘息 모델 흰쥐의 BALF內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 影響. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 2002.
19. 황대룡, 강영성, 김성수, 김대한, 신민교, 송호준. 杏仁의 알레르기 천식 효과에 대한 연구. 대한본초학회지. 2003 ; 18(2) : 201-208.
20. 송민식. 沙蔘 藥鍼의 喘息抑制 및 免疫調節效果에 對한 實驗的 研究. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2004.
21. 신성찬. OVA-induced Asthma Model을 利用한 桑葉藥鍼의 喘息抑制效果에 對한 研究. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2004.
22. 박영수. OVA-induced Asthma Mouse Model을 이용한 羌活藥鍼의 喘息에 관한 影響. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2004.
23. 김보균. 升麻藥鍼의 喘息 및 免疫에 미치는 實驗的 研究. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2004.
24. 김일구. 細辛藥鍼의 喘息抑制 및 免疫調節效果에 對한 實驗的 研究. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2004.
25. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울 : 永林社. 1991 : 482-483.
26. 한대길, 한상환. 관동화산과 그 구성약물이 기관지평활근에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 1992 ; 13(1) : 1-20.
27. 한동현, 강성용, 유광석, 진상식, 하경화, 이경자. 관동화 전탕액이 기관지평활근에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 1996 ; 17(1) : 210-217.
28. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學(上,下). 서울 : 集文堂. 1991 : 214-234, 382-384, 699-701, 730-732, 1457-1467.
29. 李丁. 鍼灸經穴辭典. 서울 : 高麗醫學. 1989 : 138- 139, 397-398.
30. 安榮基. 經穴學叢書. 서울 : 成輔社. 196- 197, 678-679, 694-695. 1986.
31. 上海中醫學院. 鍼灸學. 香港 : 商務印書館香港分館. 1982 : 114, 189-190, 211-216.
32. 蔡禹錫. 經穴集成. 서울 : 大星文化社. 1995 : 83- 84, 404-405.
33. Corrigan CJ, Hamid Q, North J, Barkans J, Moqbel R, Durhams S, Gemou-Engesaeth V, Kay AB. Peripheral Blood CD4 but not CD8 T-lymphocytes in patients with exacerbation of asthma transcribe and translate

- messenger RNA encoding cytokines which prolong eosinophil survival in the context of a Th2- type pattern : Effect of glucocorticoid therapy. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol.* 1995 ; 12 : 567.
34. 황상의 역. 면역의 의미론. 서울 : 한울. 1998 : 143-155.
 35. Bacharier LB, Jabara H, Geha RS. Molecular mechanisms of IgE regulation. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998 ; 115 : 257-269.
 36. Kasakura S. A role for T-helper type 1 and 2 cytokines in the pathogenesis of various human diseases. *Rinsho Byori*, Sep 1998 ; 46(9) : 915-921.
 37. Roitt IM. *Roitt's Essential Immunology*. Blackwell Science. 1997 : 95, 201-221, 363-367.
 38. Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med.* 2001 ; 344(5) : 350-362.
 39. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999 ; 54 : 825-857.
 40. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SB, Kay B. Predominant TH2 like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med.* 1992 ; 326 : 298,
 41. Hogan SP, et al. Inhibition of aeroallergen-induced pulmonary eosinophilic infiltrate and lung damage in IL-5 deficient mice. *Austrian Society for Immunology.* 1994.
 42. 김세중. 면역학. 고려의학. 서울 : 1994 : 3, 8, 138, 25-32.
 43. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. 강재성 譯. 세포분자면역학. 서울 : 범문사. 2004 : 477-522.
 44. Ivan Roitt 외 2. *Immunology 6th*, Mosby. Newyork. 2002 : 125-127.
 45. Ivan Roitt. *Essential immunology 9th*, Blackwell science, U.S.A. 1994 : 179-200, 151-167.
 46. Nicholas W. Lukacs. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nature review : immunology.* 2001 : 108-116.