

원 저

黃芪가 C57BL/6J 생쥐의 Bleomycin유발 肺纖維化에 미치는 影響

이경희, 정희재, 정승기, 윤유식, 이형구

경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

The Effects of *Astragalus Radix* on Bleomycin-induced Lung Fibrosis

Kyoung-Hee Lee, Hee-Jae Jung, Sung-Ki Jung, Yoo-Sik Yoon, Hyung-Goo Rhee

Division of Respiratory System, Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine,
Kyung Hee University, Seoul, Korea

Backgrounds & Objectives : Many acute and chronic lung disorders with variable degrees of pulmonary inflammation and fibrosis are collectively referred to as interstitial lung diseases. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is one of several idiopathic interstitial pneumonias with the pathogenesis unclear. *Astragalus Radix* is known to inhibit the Th2 immune response. The effects of *Astragalus Radix* on bleomycin-induced lung fibrosis were evaluated.

Materials and Methods : *Astragalus Radix* extract was daily given to the normal rats, control (bleomycin) and treated (bleomycin and *Astragalus Radix* extract, 24.0 mg/10g body weight) rats for 14 days. After 14 days, we observed the change of total leukocyte count and percentage, IFN-gamma and IL-4 in BALF (Bronchoalveolar lavage fluid), and of semiquantitative histological index (SHI).

Results : Compared to the control group, *Astragalus Radix* decreased total leukocyte count ($p<0.05$), lymphocyte ($p<0.05$), neutrophil (no significance) percentage, SHI ($p<0.05$), IFN-gamma and IL-4 ($p<0.05$). Otherwise, macrophage percentage was increased ($p<0.01$).

Conclusion : This study showed that *Astragalus Radix* reduced the incidence of inflammatory cells and cytokines and prevented the fibrosis of tissue in bleomycin-induced lung fibrosis rats.

Key Words: IPF (idiopathic pulmonary fibrosis), *Astragalus Radix*, bleomycin

서 론

肺纖維化란 原因不明의 慢性 纖維化性 間質性 肺

炎에 起因하며, 組織損傷 後 炎症과 治愈過程을 거치면서 組織이 纖維화를 끝게 되는 것이다. 또한 組織學의으로 肺實質의 炎症과 纖維화가 特徵의인 通常性 間質性 肺炎을 보이는 痘患이다¹.

폐섬유화증에 대한 대표적인 실험모델로서 bleomycin에 의한 肺損傷 및 肺纖維화는 特發性 肺纖維症 研究의 土臺가 되어왔다². 肺纖維화에 대한 韓醫學의인 研究는 國內에서 드문 실정이고, 中國文獻 중에서, 張³은 短氣, 喘證, 咳嗽, 肺痿, 肺脹 등의 症疇로 보았으며, 病機가 複雜하고, 痘瘍가 內生하여

· 접수 : 2004년 2월 13일 · 논문심사 : 2004년 2월 28일
· 채택 : 2004년 3월 8일
· 교신저자 : 이형구, 서울특별시 동대문구 회기동 1 경희의료
원 부속한방병원 한방 5내과 의국
(Tel. 02) 958-9147, Fax : 02) 958-9148, E-mail:
orientdoc@freechal.com

오래되면 热로 化하니 이러한 것은 邪實하게 되면서 그것이 오래되어 正虛하게 되어 發生하는 것이라고 하였으며, 張偉⁴는 辨證施治로서 痰熱壅肺肅降失常證, 肺氣虛弱衛表不固證, 肺陰虧虛失于濡養證, 氣陰兩虛氣滯血瘀證, 脾腎兩虛痰瘀互結證, 陰陽兩虧血脈瘀阻證의 6가지를 제시하였으며, 기타 鍼刺療法, 貼付療法, 按摩, 食療, 氣功療法 등을 소개하고 있다. 또한 陳은 肺氣虛證, 氣陰兩虛證, 脾腎兩虛氣血凝滯證, 陰陽俱虛血脈瘀阻證 등의 4가지로 나누어 分類하였다. 하지만 肺纖維化에 미치는 黃芪의 영향에 관한 研究는 아직 미비한 실정이다.

黃芪는 콩과에 속하는 다년생 초본인 黃芪 Astragalus membranaceus BUNGE의 뿌리를 乾燥한 것으로 性味는 甘溫하여 益衛固表, 利水消腫, 托毒, 生肌하여 自汗, 盜汗, 血痺, 浮腫, 瘰疽不潰, 潰久不斂 등을 治療하며, 炙用時에는 補中益氣하여 內傷勞倦, 脾虛泄瀉, 脫肛, 氣虛血脫, 崩帶, 一切氣衰血虛之證에 사용한다⁵. 또한 利尿作用, 降壓作用, 抗菌作用 등이 있으며⁶, 細胞性 免疫反應 및 體液性 免疫反應을 增加시키는 作用이 있으며⁸, 黃芪 藥針液은 IL-4의 發顯을 有意性있게 抑制하였고⁹, 癌細胞에 있어서 Th2 cytokines를 抑制하고 Th1 cytokines를 增加시킨다¹⁰.

이와 같이 黃芪는 韓方의 代表的인 補氣藥으로서 損傷된 細胞의 機能回復 및 免疫反應시 Th2 cytokines 抑制 機能을 가지고 있어 黃芪가 bleomycin에 의한 肺纖維化에 미치는 影響을 백혈구 총수, 백혈구 비율, 조직학적 폐손상지표, IFN-gamma 및 IL-4를 대상으로 實驗的으로 研究觀察하여 의미 있는 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물 및 약재

1) 동물 - 본 실험에 사용한 동물은 12주령, 체중 30g 전후의 C57BL/6J계 숫컷 생쥐를 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에 1주간 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약재 - 본 실험에 사용된 약재는 黃芪 (Astragali

Radix)로 경희의료원 한방병원 약재과에서 엄선된 약재를 사용하였다.

2. 방법

(1) 약물의 조제 및 투여

黃芪 (Astragalus Radix) 200g을 증류수 2,000ml와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 1차 여과한 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후 완전 동결건조시켜 黃芪 물추출 엑기스 72g을 얻었다. 실험동물은 각 군 당 6마리씩으로 정상군 (Normal), bleomycin으로 폐섬유화를 유발시킨 군 (control) 및 bleomycin으로 폐섬유화 유발과 함께 黃芪 물추출 엑기스 투여군 (sample)으로 나누고, 黃芪 물추출 엑기스는 생쥐 체중 10g당 24.0mg을 14일간 1일 1회 경구투여하였다.

(2) 폐섬유화 유발

폐섬유화는 Kremer¹¹ 등, Laxer¹² 등 및 Berkman¹³ 등의 intratracheal instillation (IT) 방법에 따라 bleomycin (Nippon Kayaku, Japan) 용액을 기관 (trachea)을 통하여 직접 폐 속에 주입하는 방법을 사용하였다. 즉, C57BL/6J 생쥐를 70% N2O와 30% O2 gas 및 1.5% isoflurane으로 흡입마취한 상태에서 전경부의 피부를 절개하고 근육을 정리하여 기관을 노출시킨 다음 안과용 수술가위로 기관을 조금 절개하였다. 앞을 둥글게 만든 19 gauge 주사바늘을 장착한 1ml용 주사기를 사용하여 bleomycin 0.06mg을 녹인 증류수용액 0.1ml을 절개된 기관을 통하여 직접 폐 속으로 단번에 주입하였다. 주입 직후 곧바로 절개한 전경부의 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나게 한 다음 일반사육 케이지에 담아 14일간 사육하였다.

(3) 폐세척액 및 폐조직 채취

Bleomycin을 IT방법으로 주입한 14일 후, C57BL/6J 생쥐를 pentobarbital 용액 복강주사로 마취시킨 다음 복부동맥을 절단하여 탈혈시켜 희생시켰다. 전경부와 흉부를 절개하여 기관과 폐를 노출시키고 기관을 절개한 다음 앞을 둥글게 만든 19 gauge 주사바늘을 장착한 1ml용 주사기를 기관에 장착하였다. 생리식염수를 사용하여 0.5ml씩 8번에 걸쳐 총

4.0ml의 폐세척액 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF)를 채취하여 IL-4와 IFN-gamma의 측정과 백혈구 총수 및 백혈구의 감별 측정에 사용하였다. 폐세척액을 채취한 직후 폐조직을 분리하여 右肺는 -50°C의 dry ice-isopentane 용액으로 급속히 동결시켜 IL-4 및 IFN-gamma 측정용으로 -80°C 냉동고에 보관하고, 左肺는 10% buffered neutral formalin 용액으로 고정하여 조직염색용으로 사용하였다.

(4) 폐세척액 내 백혈구 총수 및 감별 측정

폐세척액 내 총백혈구 수는 COULTER STKS의 자동혈구계산기로 측정하였으며, 백혈구 감별 측정 (leukocyte differential count)은 자동혈구계산기의 측정치와 함께 폐세척액을 슬라이드에 도말한 다음 Wright 용액으로 염색후, 현미경하에서 무작위로 100개의 백혈구중 macrophage, lymphocyte 및 neutrophil의 비율을 측정, 자료로 사용하였다.

(5) 폐조직의 Masson's trichrome 및 H-E 염색

고정된 폐조직을 paraffin 절편하여 폐조직의 조직학적 변화를 관찰하기 위해서는 일반적인 hematoxiline-eosin (H-E) 염색을 실시하였으며, 폐조직의 섬유화에 의한 collagen의 침착정도를 관찰하기 위해서는 Masson's trichrome 염색을 실시하였다. 즉, 조직으로부터 paraffin을 제거하고 56°C의 Bouin's solution에서 1시간 재고정 후 세척하고, Weigert's iron hematoxylin solution에 10분, Biebrich scarlet-acid fuchsin solution에 2분간 반응시켰다. 다시 세척한 후 5% aqueous phosphotungstic acid solution에 15분, light green solution에 1분, glacial acetic solution에 3분간 반응시켜 collagen이 초록색을 띠도록 염색하였다.

(6) 조직학적 폐손상지표 (Semiquantitative Histological Index; SHI)의 측정

폐조직의 섬유화 정도 및 조직학적 변화는 Kremer¹¹등, Laxer¹²등, Lossos¹³등 및 Berkman¹⁴등의 방법에 따라, 실험동물 당 Masson's trichrome 염색과 H-E 염색된 10개의 폐조직을 관찰하여 다음과 같이 5단계로 SHI를 정량화 하였다.

0: 정상 폐조직

1 : 10개의 조직 중 1~3개의 조직에서, 중성백혈구

침착이 군데군데 국소적으로 관찰되는 미약한 염증반응을 보이고, 또한 국소적으로 미약하게 상피세포가 비대 (epithelial hyperplasia) 되거나 collagen이 침착된 섬유화 (fibrosis)가 관찰된 경우

2 : 10개의 조직 중 4~7개의 조직에서, 중성백혈구 침착이 군데군데 국소적으로 관찰되는 미약한 염증반응을 보이고, 또한 국소적으로 미약하게 상피세포가 비대되거나 collagen이 침착된 섬유화가 관찰된 경우

3 : 10개의 조직 중 4~7개의 조직에서, 중성백혈구 침착이 조직 전체에서 관찰되는 중등도의 염증반응을 보이고, 또한 전반적으로 상피세포의 비대와 collagen 침착에 의한 섬유화가 관찰된 경우

4 : 10개의 조직 중 4~7개의 조직에서, 심한 염증반응으로 중성백혈구, 임파구 및 적혈구 침착이 조직 전체에서 관찰되고, 이러한 심한 염증반응과 상피세포의 비대가 동반되어 국소적인 폐조직의 폐쇄가 관찰되며, 전반적인 심한 collagen 침착 섬유화가 관찰된 경우

5 : 10개의 모든 조직에서 심한 염증반응으로 중성백혈구, 임파구 및 적혈구 침착이 조직 전체에서 관찰되고, 이러한 심한 염증반응과 상피세포의 비대가 동반되어 국소적인 폐조직의 폐쇄가 관찰되며, 전반적인 심한 collagen 침착 섬유화가 관찰된 경우

(7) 폐세척액 내 IFN-gamma 및 IL-4의 측정

폐세척액 내 IFN-gamma 및 IL-4의 측정은 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 사용하였다. 즉, 바닥이 평평한 96-well microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark)를 well 당 50 µl의 polyclonal antibody (1 ng/µl in 0.6 M NaCl, 0.26 M H3BO4, and 0.08 N NaOH, pH 9.6)를 4°C에서 24시간 동안 코팅하고, PBS와 0.05% Tween-20으로 세척하였다. 비특성반응을 차단하기 위해서 2% bovine serum albumin을 사용하였으며, well 당 50 µl의 측정 sample을 가한 다음 37°C에서 1시간동안 incubation 시켰다. 다시 well 당 50 µl의 biotinylated polyclonal antibody (3.5 ng/µl in wash buffer, 2% FCS)를 가한 다음 37°C에서 45분동안 incubation 하고, plate를 3회

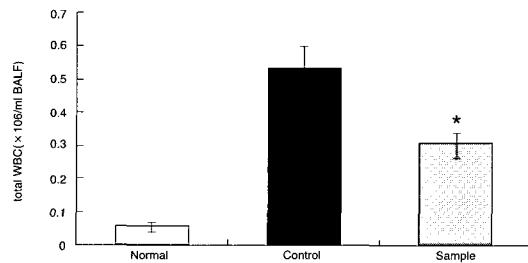


Fig. 1. Effect of *Astragali Radix* on total WBC count in bronchoalveolar lavage fluid of mice treated by intratracheal instillation of bleomycin.

Normal; animal group treated neither bleomycin nor *Astragali Radix*.

Control; animal group treated with bleomycin (0.06mg/0.1ml) intratracheal instillation.

Sample; animal group treated with bleomycin (0.06mg/0.1ml) intratracheal instillation and *Astragali Radix* water extract (24.0mg/10g body weight) for 14 days.

Decrease % calculated from sample data and control data.

* ; significantly different from control group($p<0.05$)

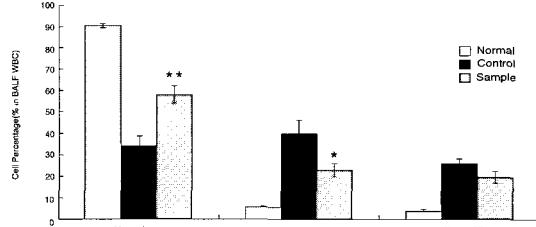


Fig. 2. Effect of *Astragali Radix* on differential WBC count in bronchoalveolar lavage fluid of mice treated by intratracheal instillation of bleomycin.

Normal; animal group treated neither bleomycin nor *Astragali Radix*.

Control; animal group treated with bleomycin(0.06mg/0.1ml) intratracheal instillation

Sample; animal group treated with bleomycin (0.06mg/0.1ml) intratracheal instillation and *Astragali Radix* water extract (24.0mg/10g body weight) for 14 days.

* ; significantly different from control group (*; $p<0.05$, **; $p<0.01$)

세척한 다음 streptavidin-peroxidase conjugate (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)를 가하여 37℃에서 30분동안 incubation 하였다. 그다음 chromogen substrate (Dako, Carpinteria, CA)를 가하여 실온에서 incubation 하고, 490 nm에서 automated microplate reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT)로 측정하였다.

결과

1. 폐세척액 내 백혈구 총수의 변화

Normal군의 폐세척액 내 백혈구 총수는 $0.06 \pm 0.01 \times 10^6/\text{ml}$ 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 control 군은 $0.53 \pm 0.07 \times 10^6/\text{ml}$ 로 심한 증가를 나타내었다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 黃芪 물추출 액기스를 투여한 sample 군은 $0.31 \pm 0.03 \times 10^6/\text{ml}$ 으로 control 군에 비하여 41.5%의 유의성($p<0.05$) 있는 백혈구 총수의 감소를 나타내었다(Fig. 1).

2. 폐세척액 내 백혈구 비율의 변화

Normal군의 폐세척액 내 백혈구 중 macrophage의 비율은 $90.9 \pm 1.0\%$ 이었으며, lymphocyte의 비율은 $5.6 \pm 0.8\%$, neutrophil의 비율은 $3.6 \pm 0.2\%$ 이었다. Bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 control 군은 백혈구 중 macrophage의 비율이 $34.4 \pm 4.5\%$ 로 심하게 감소하였으며, lymphocyte의 비율은 $39.8 \pm 6.7\%$ 로, neutrophil의 비율은 $25.8 \pm 2.6\%$ 로 심하게 증가하였다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 黃芪 물추출 액기스를 투여한 Sample 군은 백혈구 중 macrophage 비율이 $57.8 \pm 4.7\%$ 로 control 군에 비하여 유의성($p<0.01$) 있게 증가하였으며, lymphocyte의 비율은 $23.1 \pm 2.8\%$ 로 control 군에 비하여 유의성($p<0.05$) 있는 감소를 나타내었고, neutrophil의 비율은 $19.1 \pm 3.4\%$ 로 control 군에 비하여 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다(Fig. 2).

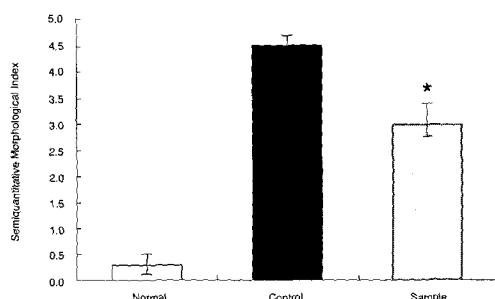


Fig. 3. Effect of *Astragalus Radix* on semiquantitative histological index of lung tissue in mice treated by intratracheal instillation of bleomycin.

Normal; animal group treated neither bleomycin nor *Astragalus Radix*.

Control; animal group treated with bleomycin(0.06mg/0.1ml) intratracheal instillation.

Sample; animal group treated with bleomycin(0.06mg/0.1ml) intratracheal instillation and *Astragalus Radix* water extract(24.0mg/10g body weight) for 14 days.

Decrease % calculated from sample data and control data.

* ; significantly different from control group (*; p<0.05).

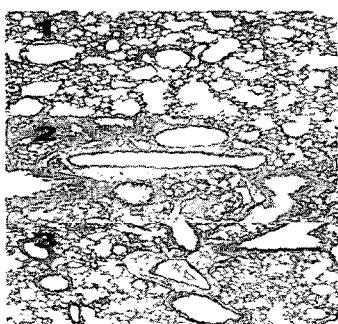


Fig. 4. Sections stained with Masson's trichrome method of lung tissue in mice treated by intratracheal instillation of bleomycin (section 1, Normal group; section 2, Control group; section 3, sample group). sample group shows significant decrease of collagen accumulation (green color) with respect to control group.

3. 조직학적 폐손상 지표의 변화

폐조직의 Masson's trichrome 염색과 H-E 염색 소

견에 따른 조직학적 폐손상 지표 SHI는 정상적인 C57BL/6J 생쥐에서는 0.3 ± 0.2 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 control 군은 4.5 ± 0.2 로 거의 모든 조직에서 심한 염증반응과 상피세포의 비대 및 섬유화가 관찰되었다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 黃芪 물추출 액기스를 투여한 sample 군의 SHI는 3.0 ± 0.4 으로 control 군에 비하여 33.3%의 유의성($p<0.05$) 있는 염증반응의 감소, 상피세포 비대의 감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소가 관찰되었다(Fig. 3, 4).

4. 폐세척액 내 IFN-gamma 및 IL-4의 변화

Normal군의 폐세척액 내 IFN-gamma는 17.5 ± 3.1 pg/ml 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 control 군은 138.3 ± 11.4 pg/ml로 심한 Th1-type immune response의 증가를 나타내었으며, bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 黃芪 물추출 액기스를 투여한 sample 군은 106.5 ± 7.8 pg/ml로 control 군에 비하여 유의성($p<0.05$) 있는 Th1-type immune response의 감소를 나타내었다. Normal군의 폐세척액 내 IL-4는 6.0 ± 0.7 pg/ml 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 control 군은 42.0 ± 3.1 pg/ml로 심한 Th2-type immune response의 증가를 나타내었으며, bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 黃芪 물추출 액기스를 투여한 sample 군은 30.2 ± 4.3 pg/ml로 control 군에 비하여 유의성($p<0.05$) 있는 Th2-type immune response의 감소를 나타내었다(Fig. 5).

고찰

黃芪는 代表의in 補氣藥으로서 콩과에 속하는 다년생 초본인 *Astragalus membranaceus* bunge의 뿌리를 乾燥한 것으로 性은 溫 無毒하고 味는 甘하다. 生用時에는 益衛固表, 利水消腫, 托毒, 生肌하여 自汗, 盗汗, 血腫, 浮腫, 瘰疽不潰, 潰久不斂 등을 治療하며, 炙用時에는 補中益氣하여 內傷勞倦, 脾虛泄瀉, 脫肛, 氣虛血脫, 崩帶, 一切氣衰血虛之證에 使用한다⁶.

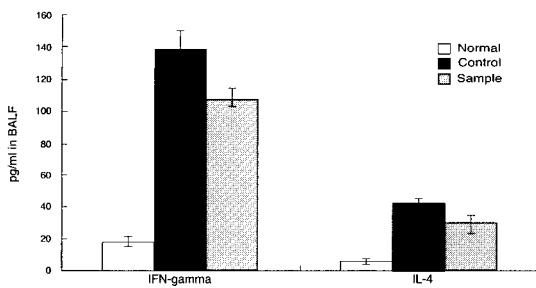


Fig. 5. Effect of Astragalus Radix on IFN-gamma and IL-4 levels in bronchoalveolar lavage fluid of mice treated by intratracheal instillation of bleomycin.

Normal; animal group treated neither bleomycin nor Astragalus Radix.

Control; animal group treated with bleomycin (0.06mg/0.1ml) intratracheal instillation.

Sample; animal group treated with bleomycin (0.06mg/0.1ml) intra-tracheal instillation and Astragalus Radix water extract(24.0mg/10g body weight) for 14 days.

* ; significantly different from control group($p<0.05$).

또한 利尿作用, 降壓作用, 抗菌作用 등이 있으며⁷, 細胞性 免疫反應 및 體液性 免疫反應을 增加시키는 作用이 있으며^{8,9}, 黃芪 藥針液은 IL-4의 發顯을 有意性 있게 抑制하였고⁹, 癌細胞에 있어서 Th2 cytokines를 抑制하고 Th1 cytokines를 增加시키며¹⁰, 비활성상태의 T 림프구 生存을 維持하고 免疫反應시 CD4+ T cell의 活性反應을 強化한다¹⁵.

특발성 폐섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)은 원인 모르게 폐에 국한되어 생기는 만성 섬유성 간질성 폐렴으로서 조직학적으로는 UIP로 나타나는 질환으로 정의한다. 수술에 의한 폐생검에서 UIP 소견이 보이면 우선 약물이나 환경 또는 교원성 질환에 의한 폐섬유화증인지를 감별하고 흉부 X-선 및 HRCT에서 전형적인 IPF 소견을 보이는지, 폐기능검사에서 제한성 폐질환소견과 저산소혈증을 보이는지를 관찰한다. IPF의 결정적인 진단은 수술에 의한 생검을 요하지만 실제로는 연령이나 호흡곤란 등으로 인해 이러한 침습적인 검사가 불가능한 경우도 많은데 그러한 경우에는 Table 1.를 만족시키면 IPF

Table 1. Diagnostic Criteria of IPF in Absence of Surgical Lung Biopsy¹⁶

Major Criteria

- Exclusion of other known causes of ILD(Interstitial Lung Disease), such as drug, environmental exposures and connective tissue diseases
- Abnormal PFT(reduced VC, increased FEV1/FVC) and impaired gas exchange(Increased A-aDO₂ or decreased DLCO)
- Bibasilar reticular abnormalities with minimal ground-glass opacities on HRCT scans
- Transbronchial lung biopsy specimen or BAL fluid showing no features to support an alternative diagnosis Minor criteria
- Age>50 years
- Insidious onset of otherwise unexplained exertional dyspnea
- Durations of illness>3months
- Bibasilar, inspiratory crackles(dry or “velcro” type)

로 정의한다^{1,16}.

서서히 진행되는 호흡곤란이 가장 현저한 증상이며 그외에 객담을 수반하지 않는 기침이 흔하다. 보통 50세 이상에서 발병하며 남자에서 약간 더 호발한다. 청진에서 양측 폐야에서 흡기말 악설음이 들리고 폐기능검사에서 제한성 양상과 확산능의 감소, 운동 후 심해지는 저산소혈증 등이 관찰된다. 임상경과는 서서히 진행되어 악화하는데 가끔은 갑자기 악화되어 호흡부전으로 사망하는 경우도 있다. 대개 진단 후 3년 내에 반수가 사망한다고 알려져 있다^{16,17}.

현재까지 이 질병의 병인은 밝혀지지 않고 있으나, 어떠한 이유이든 염증세포가 폐간질에 축적되고, 이를 염증세포와 활성화된 폐포상피세포 등에서 다양한 fibrogenic cytokine 및 polypeptide 매개물질의 분비가 증가하게 된다. 이들이 섬유아세포증식을 자극하여 ECM(extracellular matrix)분비를 증가시켜 폐섬유화를 일으킨다는 것이 일반적인 가설이 되어왔으며, 최근 폐의 염증이 폐섬유화의 중요한 요소가 아니라는 지적이 제기되었고, 이에 대한 논란이 계속되고 있다. 폐염증과 섬유화의 상관관계에 대해서는 계속적인 연구가 필요하지만, 기본적으로 폐의 손상이나 염증이 기본적으로 먼저 발생하고 이어 치유되는

과정에서 섬유화가 진행되는지 혹은 섬유용해가 진행되는지에 따라 폐섬유화 발생여부가 결정될 것이다¹⁸.

폐섬유화를 일으키는 주요 기전 및 매개물질에는 TGF- β , Type1/Type 2 cytokine response, 상피세포와 섬유아세포의 연결 등이 있다. TGF- β 는 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3의 아형이 있으며 이중 TGF- β 1이 섬유화 기전에 가장 많이 연구되었다^{19,20}.

본 논문에 제기되고 있는 IL-4와 IFN-gamma는 Th1과 Th2 cytokine response의 부조화에 관련된 것이다. Th1 cytokine response는 세포매개성 면역에 관계하는 것으로 알려져 있으며, 조직 회복에 관한 한 손상부위를 정상적으로 회복시켜준다. 이에 반해 Th2 cytokine response는 주로, 섬유아세포의 활성화와 증식을 통해서 ECM의 침착 및 섬유화를 유발한다. IL-2, IL-12, IL-18, IFN-gamma, lymphotxin은 Th1 cytokine에 해당되고, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13과 MCP-1은 Th2 cytokine에 해당된다²²⁻²⁴. Th2 cytokine 인 IL-4는 섬유아세포의 증식, collagen gene expression 및 합성 증가를 유도하며, IL-13과 MCP-1 역시 type 1 procollagen 합성을 증가시키고, MCP-1은 TGF- β 와 IL-4 합성 증가를 유도한다²⁵⁻²⁷. Th1 cytokine 인 IFN-gamma는 섬유화억제의 대표적인 cytokine으로 섬유아세포 증식의 억제, collagen 침착의 억제, 섬유아세포의 apoptosis 유도, TGF- β 의 생성 억제를 통해서 섬유화를 억제시킨다^{19,31}.

현재까지의 기전을 요약하면 어떤 원인이든 폐조직에 손상이나 염증이 생긴 후 치유되는 과정에서 비정상적인 상처 치유과정을 밟는 것으로 생각된다. 상피세포손상의 섬유화유발여부, 폐섬유화유발 유전자 유무, 섬유화 최종단계 조절인자유무 대한 연구가 필요할 것이다¹⁹.

폐섬유화증의 치료법으로는 steroid, 면역억제제(cyclophosphamide)³⁴, 항섬유화제제(colicine, D-penicillamine, Pirfenidone, INF-gamma) 등이 있으며, 새로운 치료효과의 가능성성이 있는 제제들로는 항산화제제, ACE(Angiotensin-converting enzyme) inhibitor, Cytokine 길항제(TGF- β), Relaxin,

Lovastatin, Leulitriene B4 등이 있다¹⁷.

Bleomycin은 잘 알려진 폐섬유화실험모델로서, 폐와 피부는 bleomycin 투여 후 독성이 잘 나타난다. Bleomycin 투여로 인한 폐손상은 특발성 폐섬유증과 비슷하고 동물실험시 단기간내 폐섬유화를 유발하여 폐손상 및 폐섬유화의 기전을 이해하고자 하는 실험에 많이 이용되고 있다³³⁻³⁸.

韓醫學에서는 黃帝內經《素問 刺法論》에 正氣가 몸안에 존재하면 邪氣가 침범할 수 없고 眞氣가 따르면 정신이 몸을 지켜 병이 발생하지 않는다고 하였으니(正氣存內 邪不可干), 黃芪는 補氣作用을 통해 正氣를 強化시켜 邪氣의 侵犯을 抑制하는 作用과 損傷된 細胞의 機能을 回復시키며, 免疫反應시 Th2 cytokines을 抑制하는 機能을 통해 肺纖維화에서 발생하는 炎症細胞의 浸潤 및 纖維화를 抑制시킬 수도 있다고 推定할 수 있을 것이다.

이에 저자는 正氣나 胃氣虛로 인한 각종 虛證 疾患에 補氣益衛하는 작용을 가진 黃芪가 慢性 進行性인 肺纖維화症에 어떠한 影響을 미치는가를 조사하기 위하여 본 실험을 실시하였다.

Bleomycin에 의한 폐섬유화에 대해서 黃芪 물추출 액기스(24.0mg/10g body weight) 투여 후 측정한 폐세척액 내 백혈구 총수의 변화, 폐세척액 내 백혈구 비율의 변화, 조직학적 폐손상 지표의 변화, 폐세척액 내 IFN-gamma 및 IL-4의 변화를 정상군, 대조군과 비교 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 黃芪 물추출 액기스(24.0mg/10g body weight)를 투여 한 sample 군은 $0.31 \pm 0.03 \times 10^6/\text{ml}$ 으로 control 군에 비하여 41.5%의 유의성($p < 0.05$) 있는 백혈구 총수의 감소를 나타내었다(Fig. 1).

백혈구 총수는 肺纖維化 過程에서 增加하는데 위 실험에서 黃芪가 백혈구 총수를 減少시킴을 볼 수 있어, 炎症反應를 抑制하는 效能을 確認할 수 있었으며 韓醫學의 托毒, 生肌 作用과 관련이 있을 것으로 생각된다.

Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 黄芪 물추출 액기스(24.0mg/10g body weight)를 투여

한 sample 군은 백혈구 중 macrophage 비율이 $57.8 \pm 4.7\%$ 로 control 군에 비하여 유의성($p<0.01$) 있게 증가하였으며, lymphocyte의 비율은 $23.1 \pm 2.8\%$ 로 control 군에 비하여 유의성($p<0.05$) 있는 감소를 나타내었고, neutrophil의 비율은 $19.1 \pm 3.4\%$ 로 control 군에 비하여 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다(Fig. 2).

폐섬유화 과정에서 macrophage 비율은 감소하고 lymphocyte 비율은 증가하고, neutrophil 비율은 증가하는데, 黃芪는 macrophage 비율을 증가시키고 lymphocyte와 neutrophil 비율을 감소시킬 수 있다. 이중에 폐섬유화의 염증반응에 중요한 역할을 하는 lymphocyte의 비율을 감소시킨 것은 상당히 의미가 있다고 볼 수 있다.

Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 黃芪 물추출 액기스($24.0\text{mg}/10\text{g body weight}$)를 투여 한 sample 군의 SHI는 3.0 ± 0.4 으로 control 군에 비하여 33.3% 의 유의성($p<0.05$) 있는 감소를 나타내어 염증반응의 감소, 상피세포 비대의 감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소효과가 관찰되었다(Fig. 3, 4).

폐섬유화 과정에서 黃芪는 염증반응을 감소시키고, 상피세포 비대를 감소시키고, collagen 침착 섬유화를 감소시킬 수 있다.

폐세척액 내 IFN-gamma는 bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 黃芪 물추출 액기스($24.0\text{mg}/10\text{g body weight}$)를 투여한 sample 군에서 $106.5 \pm 7.8\text{ pg/ml}$ 로 control 군에 비하여 유의성($p<0.05$) 있는 Th1-type immune response의 감소를 나타내었으며, 폐세척액 내 IL-4는 bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 黄芪 물추출 액기스를 투여한 sample 군에서 $30.2 \pm 4.3\text{ pg/ml}$ 로 control 군에 비하여 유의성($p<0.05$) 있는 Th2-type immune response의 감소를 나타내었다(Fig. 5).

IFN-gamma는 type 1 CD4+ 및 CD8+ T cell과 natural killer cell에 의해서 생산되는 주된 effector cytokine이다. 폐섬유화 과정에서 C57BL/6 생쥐에서 bleomycin-induced lung fibrosis는 IFN-gamma의 mRNA의 증가를 보인다고 하였다^{56,57,58,59} 한편 다른

논문들에는 IFN-gamma가 감소한다는 논문도 제기되고 있다.

IL-4는 bleomycin-induced lung injury의 초기 염증 단계에서 lung T lymphocytes에 급성적으로 작용하며, active fibrosis의 최고단계에서 만성적으로 pulmonary fibroblasts에 작용하는 것으로 보고되었다.

Bleomycin-induced pulmoanry fibrosis의 경과에 대한 상대적인 Th1과 Th2의 작용은 아직도 분명하게 정의되지 못하고 있다. 비록 IFN-gamma의 발현이 bleomycin 주입 후에 폐와 림프절에서 증가되었다고 하더라도 bleomycin-induced pulmonary fibrosis는 Th2 cytokines의 cytokine들과 연관이 깊다고 한다.

이상의 실험에서 IFN-gamma와 IL-4는 폐섬유화 과정 중에 증가하였는데 黄芪가 이 두 가지 cytokine의 증가를 억제한다는 것을 볼 수 있다.

이 실험의 control군에서 IFN-gamma와 IL-4가 동시에 상승된 것은 IL-4의 증가에 대한 상대적인 억제 작용을 하는 IFN-gamma의 상대적인 상승으로 추측해 볼 수 있다면 sample군은 IFN-gamma와 IL-4가 동시에 감소된 것은 黄芪의 IL-4의 증가 억제작용으로 인한 상대적인 감소수치로 추측해 볼 수 있을 것이다.

이는 黄芪가 bleomycin 유발 폐섬유화에서 나타나는 폐세척액 내 백혈구 총수의 변화, 폐세척액 내 백혈구 비율의 변화, 조직학적 폐손상 지표의 변화, 폐세척액 내 IFN-gamma 및 IL-4의 변화를 감소시켜 폐섬유화 과정을 억제한다는 것을 알 수 있다.

결과

Bleomycin에 의한 폐섬유화에 대해서 黄芪 물추출 액기스($24.0\text{mg}/10\text{g body weight}$) 투여 후 측정한 폐세척액 내 백혈구 총수의 변화, 폐세척액 내 백혈구 비율의 변화, 조직학적 폐손상 지표의 변화, 폐세척액 내 IFN-gamma 및 IL-4의 변화를 정상군, 대조군과 비교 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 黄芪 투여군은 $0.31 \pm 0.03 \times 10^6/\text{ml}$ 으로서 대조 군에 비하여 41.5% 의 유의성($p<0.05$) 있는 백혈 구 총수의 감소를 나타내었다.

2. 黃芪 투여군은 백혈구 중 macrophage 비율이 대조군에 비하여 $57.8 \pm 4.7\%$ 의 유의성($p<0.01$) 있게 증가하였으며, lymphocyte의 비율은 대조군에 비하여 $23.1 \pm 2.8\%$ 로 유의성($p<0.05$) 있는 감소를 나타내었고, neutrophil의 비율은 대조군에 비하여 $19.1 \pm 3.4\%$ 의 감소를 나타내었으나 통계학적 유의성은 없었다.
3. 黃芪 투여군의 SHI는 3.0 ± 0.4 으로 대조군에 비하여 33.3% 의 유의성($p<0.05$) 있는 감소가 나타나, 염증반응의 감소, 상피세포 비대의 감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소효과가 관찰되었다.
4. IFN-gamma는 黃芪 투여군에서 106.5 ± 7.8 pg/ml로 대조군에 비하여 유의성($p<0.05$) 있는 감소를 나타내었으며, IL-4는 黃芪 투여군에서 30.2 ± 4.3 pg/ml로 대조군에 비하여 유의성($p<0.05$) 있는 감소를 나타내었다.

참고문헌

1. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis : diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society(ATS), and the European Respiratory Society(ERS). Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:646-64.
2. Copper JA Jr, Zitnik RJ, Matthay RA. Mechanisms of drug-induced pulmonary disease. Annu Rev Med. 1988;39:395-404.
3. 張天嵩. 補氣通肺湯治療特發性肺纖維化12例. 浙江中醫雜誌. 1999;34(2):54-55.
4. 張偉. 周兆山,童德臣. 中西醫結合呼吸病診療學. 中國: 南海出版公司. 1995:211-24.
5. 陳永輝. 常見呼吸系疾病中西醫結合診斷與治療. 北京: 中國醫藥科技出版社. 1998:243-51.
6. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울: 永林社. 2000:534-536.
7. 劉接寶. 新中醫寶典. 中國 台北: 立得出版社. 1971:542-546.
8. 吳旻哲. 黃芪 및 當歸의 면역증강효과에 관한 연구. 경희한의대논문집. 1986;9:343-54.
9. 이경민, 서정철, 한상원. 황기약침액의 NO, DPPH消法 및 IL-4의 제 효과. 대한침구학회지. 2003;20(2):184-194.
10. Wei H, Sun R, Xiao W, Feng J, Zhen C, Xu X, Tian Z. Traditional Chinese medicine Astragalus reverses predominance of Th2 cytokines and their up-stream transcript factors in lung cancer patients. Oncol Rep. 2003;10(5):1507-12.
11. Kremer S, Breuer R, Lossos IS, Berkman N, Christensen TG, Connor MW, Goldstein RH, Or R. Effect of immunomodulators on bleomycin-induced lung injury. Respiration. 1999;66(5):455-62.
12. Laxer U, Lossos IS, Gillis S, Or R, Christensen TG, Goldstein RH, Breuer R. The effect of enoxaparin on bleomycin-induced lung injury in mice. Exp Lung Res. 1999;25(6):531-41.
13. Berkman N, Goldstein RH, Breuer R. Bleomycin-induced lung injury is enhanced by interferon- α . Life Sci. 1997;60:415-21.
14. Lossos IS, Breuer R, Shriki M, Or R. Peribronchial lymphocyte activation in bleomycin-induced lung injury. Life Sci. 1998;63:1183-93.
15. 강희, 배현수, 안규석. 황기에 의한 Helper T 세포의 생존 및 활성 증가. 동의생리병리학회지. 2001; 15(4):560-565.
16. 송정섭. 특발성 간질성폐렴의 진단적 접근방법. 결핵 및 호흡기질환. 2003;54(3):251-9.
17. 김동순. 특발성폐렴유증(IPF)의 치료. 결핵 및 호흡기질환. 2003;54(3):260-73.
18. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. Ann Intern Med. 2001;134:136-51.
19. 어수택. 폐섬유화증의 병인 및 병태생리. 결핵 및 호흡기질환. 2003 Feb;54(2):167-77.
20. Venkatesan N, Roughley PJ, Ludwig MS. Proteoglycan expression in bleomycin lung fibroblasts: role of transforming growth factor-beta(1) and interferon-gamma. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002 Oct;283(4):L806-14.
21. Huang M, Sharma S, Zhu LX, Keane MP, Luo J, Zhang L, Burdick MD, Lin YQ, Dohadwala M,

- Gardner B, Batra RK, Strieter RM, Dubinett SM. IL-7 inhibits fibroblast TGF-beta production and signaling in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 2002 Apr;109(7):931-7.
22. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets; Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 1996;17:138-47.
23. Keane MP, Belperio JA, Burdick MD, Strieter RM. IL-12 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(1):L92-7.
24. Blease K, Jakubzick C, Westwick J, Lukacs N, Kunkel SL, Hogaboam CM. Therapeutic effect of IL-13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma. *J Immunol.* 2001;166(8):5219-24.
25. Strieter RM, Wiggins R, Phan SH, Wharram BL, Showell HJ, Remick DG, Chensue SW, Kunkel SL. Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;162:694-700.
26. Majumdar S, Li D, Ansari T, Pantelidis P, Black CM, Gazycki M, du Bois RM, Jeffery PK. Different cytokine profiles in cryptogenic fibrosing alveolitis and fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis: a quantitative study of open lung biopsies. *Eur Respir J.* 14(2):251-7.
27. Wallace WA, Ramage EA, Lamb D, Howie SE. A type 2 (Th2-like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA). *Clin Exp Immunol.* 1995;101(3):436-41.
28. Walker C, Bauer W, Braun RK, Menz G, Braun P, Schwarz F, Hansel TT, Villiger B. Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Oct;150(4):1038-48.
29. Jaffe HA, Gao Z, Mori Y, Li L, Varga J. Selective inhibition of collagen gene expression in fibroblasts by an interferon-gamma transgene. *Exp Lung Res.* 1999;25:199-215.
30. Keane MP, Belperio JA, Arenberg DA, Burdick MD, Xu ZJ, Xue YY, Strieter RM. IFN-gamma-inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis. *J Immunol.* 1999 Nov 15;163(10):5686-92.
31. Sempowski GD, Derdak S, Phipps RP. Interleukin-4 and interferon-gamma discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblast subsets. *J Cell Physiol.* 1996;167(2):290-6.
32. Lossos IS, Or R, Ginzburg V, Christensen TG, Mashriki Y, Breuer R. Cyclosporin A upmodulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in BALB/c mice. *Respiration.* 2002;69(4):344-9.
33. 정순희, 용석중, 신계철, 안철민, 최인준, 조상호. 백서에서 Bleomycin 투여로 인한 폐손상 및 폐섬유화에 대한 Vitamin E의 영향. 결핵 및 호흡기 질환 1995;42(2):184-205.
34. Cooper JA Jr, White DA, Matthay RA. Drug-induced pulmonary disease. Part 1: Cytotoxic drugs. *Am Rev Respir Dis.* 1986;133(2):321-40.
35. Gutteridge JM, Xiao Chang F. Protection of iron-catalysed the radical damage to DNA and lipids by copper (II) bleomycin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981;99(4):1354-60.
36. 이광길, 김정숙, 이유복, 김동식. Bleomycin에 의한 폐손상의 기전에 관한 형태학적 연구. 연세의대논문집. 1979;12:127.
37. 이중달, 이유복. Bleomycin의 기관내 투여로 유발된 폐장의 간질성 섬유증식증의 실험적 연구. 연세의대논문집. 1979;12:158.
38. Bowden DH. Unraveling pulmonary fibrosis: the bleomycin model. *Lab Invest.* 1984;50(5):487-8.