

## 貝母가 Bleomycin에 의한 肺纖維化에 미치는 影響

이규신, 이형구, 정승기, 정희재  
경희대학교 한의과대학 폐계내과교실

### The Effects of Fritillariae Rhizoma on bleomycin- induced lung fibrosis

Kyu-Sun Lee, Hyung-Koo Rhee, Sung-Ki Jung, Hee-Jae Jung

Division of Respiratory System, Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University Seoul, Korea

**Background & Objective** : Idiopathic Lung Fibrosis(IPF) is chronic fibrotic interstitial pneumonia. The pathogenesis is unclear. Fritillariae Rhizoma is the most commonly used antitussive and expectorant Oriental medicinal herb. The effects of Fritillariae Rhizoma on bleomycin-induced lung fibrosis is here evaluated.

**Material and Methods** : Fritillariae Rhizoma extract was daily given to the normal rats, control(bleomycin) rats and treated(bleomycin and Fritillariae Rhizoma) rats at 9.0 mg per body weight 10g for 14 days. 14 days later, the change in Leukocyte count and percentages were observed, as well as IFN-gamma and IL-4 in BALF, and the change in Semiquantitative histological index(SHI).

**Results** : Compared to control rats, Fritillariae Rhizoma treated rats showed a lower leukocyte count( $P<0.05$ ) lymphocyte, neutrophil percentage, SHI( $p<0.05$ ), IFN-gamma and IL-4( $p<0.05$ ) in treated rats. Conversely, macrophage percentages went higher( $p<0.05$ ) in treated rats.

**Conclusion** : This study supports a role for Fritillariae Rhizoma in reducing the maintaining inflammatory cells and cytokines in rats with bleomycin-induced lung fibrosis and in the reduction of fibrosis tissues. Further research is needed in order to develop an effective treatment for lung fibrosis.

**Key Words**: bleomycin-induced lung fibrosis, Fritillariae Rhizoma, bleomycin.

### 1. 緒 論

폐섬유화증은 만성 섬유화성 간질성 폐렴의 하나로 폐생검 상 통상성 간질성 폐렴(Usual Interstitial Pneumonia)의 조직학적 소견을 보이는 질환이며, 염증과 섬유화 등의 병리학적 양상은 잘 인식되고 있으나, 그 원인과 병리기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다<sup>1</sup>.

폐섬유화증은 폐포나 폐포중격에 세포의 침윤, 부종, 삼출 등의 염증성 변화와 collagen, proteoglycan, fibronectin, glycoprotein과 같은 extracellular matrix(ECM)의 침윤, 섬유화 등에 의하여 폐실질의 파괴가 일어나고 이런 조직학적 변화에 의해 acinus에서 가스 교환의 장애와 제한성 환기 장애를 초래하게 된다<sup>2</sup>.

폐섬유화증은 서서히 진행되는 호흡곤란이 가장 현저한 증상이며 그 외에 객담을 수반하지 않는 기침이 흔하며, 또한 흡기말 수포음이 들리고, 말단 곤봉지가 관찰되기도 한다<sup>1,3</sup>. 이러한 폐섬유화증의 발병 및 발전과정에서 나타나는 증후는 16종 咳嗽

· 접수 : 2005. 2. 6 · 채택 : 2005. 2. 23  
· 교신저자 : 이규신

(Tel. 031-746-5547 Fax.  
E-mail : lee9696@hanmail.net)

중 鬱嗽, 乾嗽와 喘證, 肺痿, 肺癆<sup>4</sup> 등의 병증에서 증상의 유사성을 찾아 볼 수 있다.

貝母는 心肺氣分으로 引經하여 清熱潤肺, 化痰止咳하므로 肺熱燥咳, 乾咳少痰, 陰虛勞嗽, 咯痰帶血을 치료한다. 특히 痰熱로 인한 咳嗽를 치료하면서도 滋潤性이 강하여 潤肺化痰시키는 효능이 있어, 肺熱燥咳와 肺虛勞嗽의 證을 치료하는 대표적인 鎮咳祛痰劑이다.<sup>5,6</sup>

기존의 연구에서도 貝母를 單味劑 또는 주요 藥材로 사용한 處方을 이용하여 거담작용<sup>7,8</sup>, 기관지 평활근의 수축을 억제하는 咳嗽 및 喘證에 대한 효과<sup>9</sup> 등이 증명되었다.

지금까지 폐섬유화증에 대한 한약물의 효과를 연구한 논문에는 金銀花<sup>10</sup>, 熟地黃<sup>11</sup>, 黃芪<sup>12</sup>, 麥門冬<sup>13</sup> 등이 있으며, 貝母와 관련된 연구는 미비한 실정이다.

이에 저자는 貝母가 폐섬유화증에 미치는 영향을 알아보고자 bleomycin으로 유발한 폐섬유화 모델을 이용하여 폐섬유화증의 기전에 관여하는 macrophage, lymphocyte, neutrophil 등 염증세포의 연동분석과 폐손상에 대한 조직학적 관찰, 그리고 IL-4, INF- $\gamma$  등의 cytokine 연동분석을 통해 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 동물 및 약재

#### 1) 동물

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

#### 2) 약재

본 실험에 사용된 약재는 貝母 (Fritillariae Rhizoma)로 경희의료원 한방병원 약재과에서 얻어진 약재를 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 약물의 조제 및 투여

貝母 200g을 증류수 2,000ml와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 1차 여과한 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후 완전 동결건조시켜 貝母 물추출 엑기스(Fritillariae Rhizoma Water Extract : FRE) 27g을 얻었다. 실험동물은 각 군당 6마리씩으로 정상군(Normal), bleomycin으로 폐섬유화를 유발시킨 군(Control) 및 bleomycin으로 폐섬유화 유발과 함께 FRE 투여군(sample)으로 나누고, FRE는 생쥐 체중 10g당 9.0mg을 14일간 1일 1회 경구투여하였다.

#### 2) 폐섬유화 유발

폐섬유화는 Berkman 등, Kremer 등 및 Laxer 등의 intratracheal instillation (IT) 방법에 따라 Bleomycin 용액을 기관을 통하여 직접 폐 속에 주입하는 방법을 사용하였다.

#### 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 등글게 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℃의 dry ice-isopentane 용액으로 급속히 동결시켜 IL-4 및 IFN-gamma 측정용으로 -80℃ 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 염색하고, 현미경하에서 무작위로 100개의 백혈구 중 Macrophage, Lymphocyte 및 Neutrophil의 비율을 측정하여 자료로 사용하였다.

5) 폐조직의 Masson's trichrome 및 H-E 염색

폐조직의 조직학적 변화를 관찰하기 위해서 hematoxiline-eosin(H-E)염색을 실시하였으며, 폐조직의 섬유화에 의한 collagen의 침착정도를 관찰하기 위해서는 Masson's trichrome 염색을 실시하였다.

6) 조직학적 폐손상지표 (Semiquantitative

Histological Index; SHI)의 측정

폐조직의 섬유화 정도 및 조직학적 변화는 Berkman 등, Kremer 등, Laxer 등 및 Lossos 등의 방법에 따라, 실험동물 당 Masson's trichrome 염색과 H-E 염색된 10개의 폐조직을 관찰하여 다음과 같이 5단계로 SHI를 정량화 하였다.

0 : 정상 폐조직

1 : 1~3개의 조직에서, 미약한 (weak) 염증반응 (inflammation), 상피세포의 비대 (epithelial hyperplasia) 및 collagen 침착 섬유화 (fibrosis) 관찰

2 : 4~7개의 조직에서 미약한 염증반응, 상피세포의 비대 및 collagen 침착된 섬유화 관찰

3 : 4~7개의 조직에서 중등도 (moderate)의 염증반응을 보이고, 또한 전반적으로 상피세포의 비대와 collagen 침착에 의한 섬유화가 관찰된 경우

4 : 4~7개의 조직에서 심한 (strong) 염증반응 및 collagen 침착 섬유화 관찰

5 : 10개의 모든 조직에서 심한 염증반응 및

collagen 침착 섬유화 관찰

7) 폐세척액 내 IFN- $\gamma$  및 IL-4의 측정

폐세척액 내 IFN- $\gamma$  및 IL-4의 측정은 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 사용하였다.

### III. 成 績

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 FRE를 투여한 sample 군은  $0.32 \pm 0.04 \times 10^6/\text{ml}$ 으로 Control 군에 비하여 39.6%의 유의성( $p < 0.05$ ) 있는 백혈구 총수의 감소를 나타내었다(Table 1, Fig. 1).

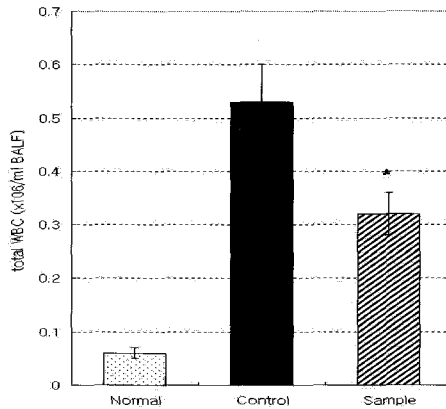
2. 폐세척액 내 백혈구 비율의 변화

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 현저하게 감소하였으며, lymphocyte의 비율은  $39.8 \pm 6.7 \%$ 로, neutrophil의 비율은  $25.8 \pm 2.6 \%$ 로 현저하게 증가하였다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 FRE를 투여한 sample 군은 백혈구 중 macrophage 비율이  $59.2 \pm 5.0 \%$ 로 Control 군에 비하여 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게

Table 1. Total WBC Count in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Mice Treated by Intratracheal Instillation of Bleomycin ( $\times 10^6/\text{ml}$ )

Group	total WBC	Decrease %	P-value
Normal	$0.06 \pm 0.01$	-	
Control	$0.53 \pm 0.07$	-	
Sample	$0.32 \pm 0.04$	39.6	<0.05

P-value means statistical significancy with respect to Control data.



**Fig. 1.** Effect of Fritillariae Rhizoma on total WBC count in lavage fluid of mice treated by intratracheal of bleomycin. Normal; animal group treated neither bleomycin nor Fritillariae Rhizoma. 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 Fritillariae Rhizoma water extract (9.0mg/0.3ml body weight) for 14 days.

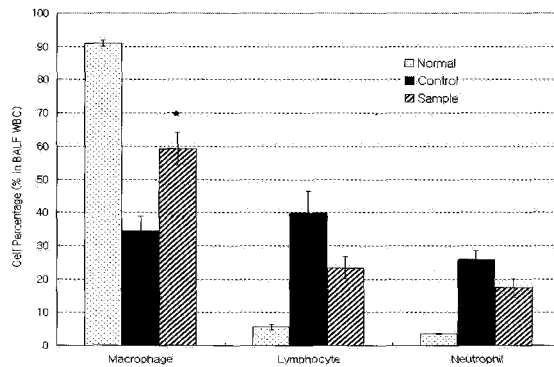
Decrease % calculated from sample data and control data.

\* means statistical significancy with respect to control data (\* p<0.05).

**Table 2.** Differential WBC Count in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Mice Treated by Intratracheal Instillation of Bleomycin (%)

Group	Macrophage	Lymphocyte	Neutrophil
Normal	90.9±1.0	5.6±0.8	3.6±0.2
Control	34.4±4.5	39.8±6.7	25.8±2.6
Sample	59.2±5.0*	23.4±3.1	17.4±2.8

\* means statistical significancy with respect to control data (\* p<0.05).



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

Normal; animal group treated neither bleomycin nor Fritillariae Rhizoma.

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 Fritillariae Rhizoma water extract (9.0mg/0.3ml) for 14 days.

\* means statistical significancy with respect to control data (\* p<0.05).

증가하였으며, lymphocyte의 비율은 23.4±3.1 %로 Control 군에 비하여 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었고, neutrophil의 비율은 17.4±2.8 %로 역시 control 군에 비하여 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다(Table 2, Fig. 2).

3. 조직학적 폐손상 지표의 변화

폐조직의 Masson's trichrome 염색과 H-E 염색 소견에 따른 조직학적 폐손상 지표 SHI는 Normal

군에서는 0.3±0.2 이었으며, bleomycin에 의하여 폐 섬유화를 유발시킨 Control 군은 4.5±0.2로 거의 모든 조직에서 심한 염증반응과 상피세포의 비대 및 섬유화가 관찰되었다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 FRE를 투여한 Sample 군의 SHI는 3.3±0.4로 Control 군에 비하여 26.7 %의 유의성 (p<0.05) 있는 염증반응의 감소, 상피세포 비대의 감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소가 관찰되었다 (Table 3, Fig. 3, 4).

Table 3. Semiquantitative Histological Index of Lung Tissue in Mice Treated by Intratracheal Instillation of Bleomycin

Group	SHI	Decrease %	P-value
Normal	0.3±0.2	-	
Control	4.5±0.2	-	
Sample	3.3±0.4	26.7	<0.05

Data presented mean ± standard error.

Normal; animal group treated neither bleomycin nor Fritillariae Rhizoma.

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 Fritillariae Rhizoma water extract (9.0mg/0.3ml) for 14 days.

Decrease % calculated from sample data and control data.

P-value means statistical significance with respect to control data.

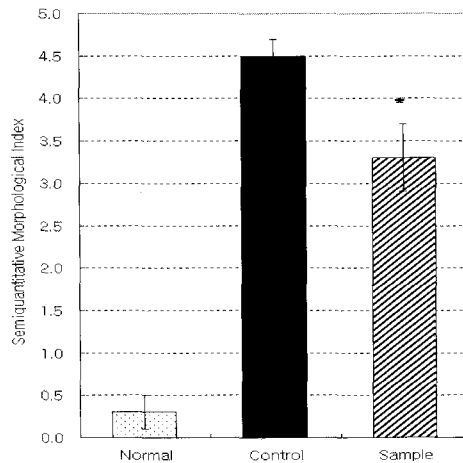


Fig. 3. Effect of Fritillariae Rhizoma on semiquantitative histological index of lung tissue in mice treated by intratracheal instillation of bleomycin.

Normal; animal group treated neither bleomycin nor Fritillariae Rhizoma.

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

Sample; animal group treated with bleomycin (0.06mg/0.1ml) intra-tracheal instillation and Fritillariae Rhizoma. water extract (21.0mg/10g body weight) for 14 days.

Decrease % calculated from sample data and control data.

\* means statistical significance with respect to control data (\*; p<0.05).

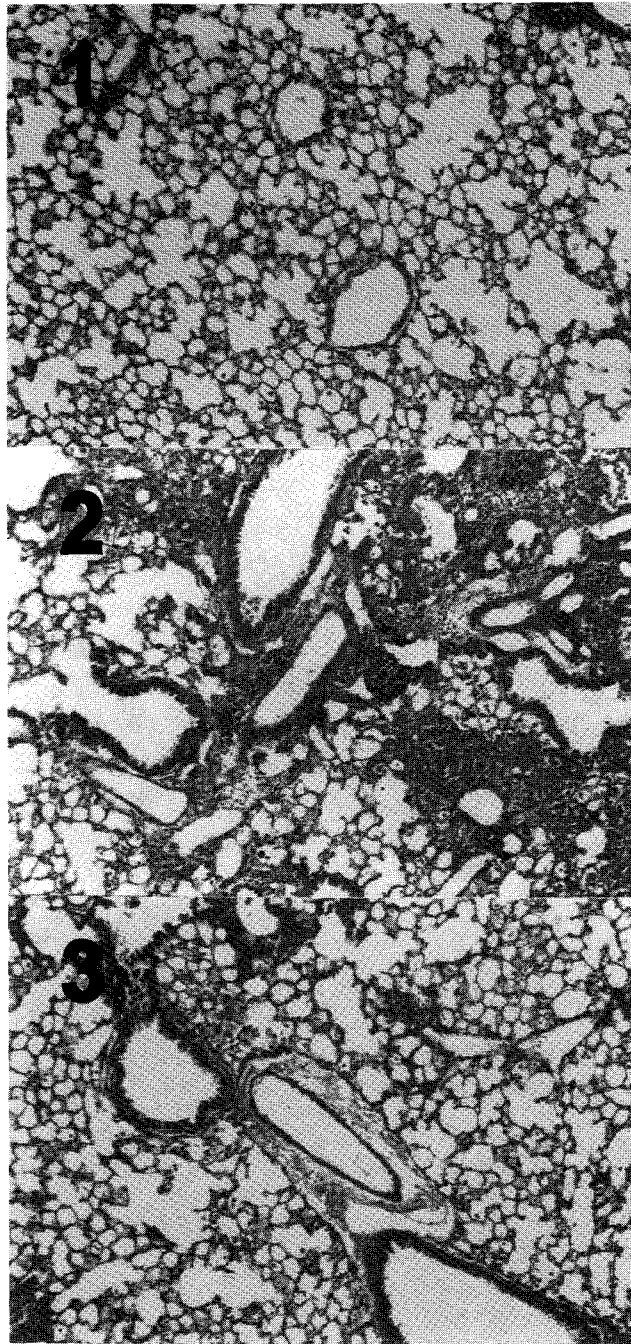


Fig. 4. Sections stained with Masson's trichrome method of lung tissue in mice treated by intratracheal instillation of bleomycin (section 1, Normal group; section 2, control group; section 3, sample group). sample group shows significant decrease of collagen accumulation (green color) with respect to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

## 4. 폐세척액 내 IFN-gamma 및 IL-4의 변화

Normal군의 폐세척액 내 IFN-gamma는  $17.5 \pm 3.1$  pg/ml 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군은  $138.3 \pm 11.4$  pg/ml로 심한 Th1-type immune response의 증가를 나타내었으며, bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 FRE를 투여한 sample 군은  $121.0 \pm 15.7$  pg/ml로 control 군에 비하여 감소하였지만 통계학적 유의성은 없었다. Normal군의 폐세척액 내 IL-4는  $6.0 \pm 0.7$  pg/ml 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군은  $42.0 \pm 3.1$  pg/ml로 심한 Th2-type immune response의 증가를 나타내었으며, bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간

FRE를 투여한 sample 군은  $28.0 \pm 6.1$  pg/ml로 Control 군에 비하여 유의성( $p < 0.05$ ) 있는 Th2-type immune response의 감소를 나타내었다(Table 4, Fig. 5).

## IV. 考 察

폐섬유화증(Idiopathic Pulmonary Fibrosis)은 만성 섬유화성 간질성 폐렴의 하나로써 폐에만 국한되어 발생하는 원인불명의 질환으로서 폐생검 상 통상성 간질성 폐렴(Usual Interstitial Pneumonia)의 조직학적 소견을 보이는 질환이다<sup>1</sup>.

폐섬유화증은 폐포나 폐포중격에 세포의 침윤,

Table 4. IFN-gamma and IL-4 Levels in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Mice Treated by Intratracheal Instillation of Bleomycin (pg/ml)

Group	IFN-gamma	IL-4
Normal	$17.5 \pm 3.1$	$6.0 \pm 0.7$
Control	$138.3 \pm 11.4$	$42.0 \pm 3.1$
Sample	$121.0 \pm 15.7$	$28.0 \pm 6.1^*$

\* means statistical significance with respect to control data (\*  $p < 0.05$ ).

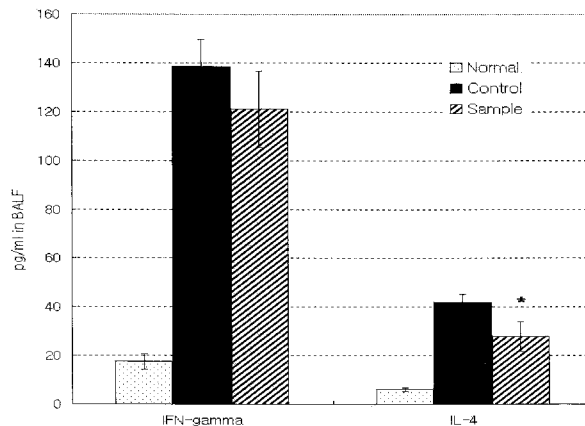


Fig. 5. Effect of Fritillariae Rhizoma on IFN-gamma and IL-4 levels in bronchoalveolar lavage fluid of mice treated by intratracheal instillation of bleomycin.

Normal; animal group treated neither bleomycin nor Fritillariae Rhizoma.

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 Fritillariae Rhizoma water extract (9.0mg/0.1ml) for 14 days.

\* means statistical significance with respect to control data (\*  $p < 0.05$ ).

부종, 삼출 등의 염증성 변화와 collagen, proteoglycan, fibronectin, glycoprotein과 같은 extracellular matrix(ECM)의 침윤, 섬유화 등에 의하여 폐실질의 파괴가 일어나고 이런 조직학적 변화에 의해 acinus에서 가스 교환의 장애와 제한성 환기 장애를 초래하게 된다<sup>2</sup>.

섬유화의 과정에서 호흡곤란이 서서히 진행되어 나타나며, 그 외에 객담을 수반하지 않는 기침이 흔하다. 또한 흡기말 수포음이 들리고, 말단 곤봉지가 관찰되기도 한다. 발생빈도는 10만명 당 3~5명 정도이며, 50대 이후에 호발하고 남자에서 여자보다 2배가량 발생율이 높다. 또한 폐기능 검사에서 제한성 양상과 확산능의 감소, 운동 후 심해지는 저산소혈증 등이 관찰된다<sup>1,2</sup>.

현재 폐섬유화증의 가장 확실한 치료법인 폐 이식 이외에는 효과가 있다고 인정된 치료법은 없다. 약물 치료로는 steroid, 면역억제제 및 항 섬유화 제제들이 사용되어 왔으며, 이 중 steroid는 가장 많이 사용되었던 약제이지만, 효과를 입증할 수 없고, 심각한 부작용이 많은 것으로 보고되었다. 면역억제제는 Cyclophosphamide, Azathioprine 등이 주로 steroid에 반응하지 않거나, steroid 치료에 위험성이 높은 환자들에서 사용되었다. 이들 제제는 IPF환자의 생존에 대한 제한적인 효과를 갖고 있다<sup>14,15</sup>.

이러한 폐섬유화증의 발생기전은 아직도 확실히 규명되지는 못하였으나, 지금까지는 원인에 상관없이 공통된 병태생리학적 일련의 과정이 모든 섬유화성 폐 질환의 바탕이 된다고 인식되어 왔다. 이 염증성 섬유화 기전에서는 만성적인 염증이 폐를 손상시키고 섬유화를 조절하여 결국 말기 섬유화증을 초래한다<sup>16</sup>. 폐포의 macrophage, neutrophil, lymphocyte, 다른 염증 세포들과 관련된 폐포의 염증이 폐의 실질과 간질의 섬유화에 선행되는데<sup>17</sup>, bleomycin에 유도된 폐 손상의 과정에서 부종, 출혈과 주로 macrophage와 neutrophil 위주인 세포의 침윤으로 시작한다<sup>18,19</sup>.

Macrophage는 폐섬유화증과 관련된 병리변화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 폐섬유화

증 환자의 폐내 상피세포에는 Monocyte 및 macrophage에 대한 화학주성인자인 MCP-1의 mRNA와 그 단백질생산물인 MCP-1의 mRNA와 그 단백질생산물이 증가되어 폐섬유화증 환자의 폐내 상피세포에서 강하게 나타났는데<sup>20</sup>, 이는 monocyte 및 macrophage의 폐 간질로의 동원 및 침윤과정을 이해하는 기초가 된다. Alveolar macrophage가 면역 복합체의 IgG Fc receptor 등으로 자극되면<sup>21</sup>, IL-8과 같은 neutrophil에 대한 강력한 화학 주성 인자를 분비하여<sup>22</sup> neutrophil을 기도로 동원한다.

병소에 침윤된 neutrophil은 폐섬유화증에 관여하는 가장 중요한 염증세포로 인식되고 있다<sup>23</sup>. Neutrophil은 alveolar macrophage에서 분비된 산화물에 의해 활성화된 type I collagenase를 분비하여 폐포벽의 교원조직의 변성을 초래하며<sup>24,25</sup>, 변성된 교원조직은 T 림파구를 자극하여 세포매개성 면역 반응에 의해 폐손상이 가중된다. 또한 neutrophil은 myeloperoxidase, oxidant radical도 분비하여 폐손상을 가속시키고<sup>26</sup>, neutrophil 자체가 폐실질세포에 손상을 유발하기도 한다.

이러한 염증반응은 시간이 지나면서 fibronectin, PDGF, IGF, TGF- $\beta$  등의 성장촉진인자들이 분비되어 섬유아세포의 증식이 일어나고, 섬유아세포에서 합성하여 분비하는 collagen에 의해 폐포벽이 두꺼워지는 섬유화현상이 나타나서 결국은 폐포가 gas 교환기능을 상실하게 되어 치명적인 상태로 발전하게 된다<sup>27</sup>.

그러므로 폐섬유화증은 만성적인 염증이 폐를 손상시키는 일련의 염증성 경과를 거치는 질환이며, 그 과정에는 macrophage와 neutrophil 및 lymphocyte가 밀접하게 연관되어 있다.

이외에 섬유화를 조절하는 데 있어 잘 알려진 또 다른 주요한 기전 중의 하나는 T helper type 1 (Th1)과 T helper type 2 (Th2) cytokine response의 부조화에 의한 것이다. 염증반응에서 조직의 섬유화로의 이행과정은 섬유화를 촉진하는 cytokine과 섬유화를 억제하는 cytokine과의 균형에 변화가 발생하였을 때 촉진되거나, 억제되어진다는 것이다<sup>28</sup>.



Th2 cytokine인 IL-4는 섬유아세포의 증식, collagen gene expression 및 합성 증가를 유도하여 섬유화를 유지하고 발전시킨다<sup>29</sup>. Th1 cytokine인 IFN- $\gamma$ 는 섬유화 억제에 대표적인 cytokine으로 섬유아세포 증식의 억제, collagen 침착의 억제, 섬유아세포의 apoptosis 유도, TGF- $\beta$ 의 생성 억제를 통해서 섬유화를 억제시킨다<sup>30</sup>. 폐섬유화증 환자의 폐조직에서 간질 염증세포의 침윤에서의 cytokine 표현형을 분석해 보았을 때, IL-4, IL-5로 대표되는 Th2 cytokine이 우세하게 나타났으며<sup>31</sup>, 동물 실험에서 bleomycin을 이용한 폐 섬유화 모델에서 IFN- $\gamma$ 를 투여하면 TGF- $\beta$ 와 procollagen의 m-RNA를 감소시켜 폐 섬유화를 막을 수 있다고 보고<sup>32</sup>로 보아, 폐섬유화증에서는 Th1 response이 감소되어 있고 Th2 response가 증가되어 있음을 알 수 있다.

이상에서 살펴본 바와 같이 폐섬유화 발생기전에서 폐의 손상이나 염증이 기본적으로 먼저 발생하고 이어 치유되는 과정에서 섬유화가 진행되는 지 혹은 섬유 용해가 진행되는 지에 따라 폐 섬유화 발생 여부가 결정된다고 할 수 있다. 그 과정에서 T helper type 1 (Th1)과 T helper type 2 (Th2) cytokine response의 부조화 및 TGF- $\beta$ 와 같은 인자들이 중요한 역할을 담당하게 되는 것이다.

한의학적 폐섬유화증의 발병 및 발전과정에서 나타나는 증후를 한의학적으로 고찰해 보면 東醫寶鑑의 16종 咳嗽 증 鬱嗽, 乾嗽와 喘證, 肺痿, 肺癆<sup>4</sup>의 籠疇에 속하는 것으로 볼 수 있다.

鬱嗽는 腎水焦枯하고 邪火가 홀로 肺에 上炎하여 發한다. 火嗽의 심한 증상으로 乾咳하며 無痰 혹은 有聲痰少 面赤 喘息不眠한다.

乾嗽는 肺中에 津液이 枯渴하거나 火鬱로 인하여 肺中에 火邪가 있는 경우에 發한다. 乾咳嗽者는 無痰有聲한 症으로 澁咳者는 連咳十數聲하여야 痰出하고 澁甚者는 비록 咳嗽數聲하여도 無痰出한다.

肺痿는 臨床上 咳, 濁唾涎沫을 主症으로 하는 慢性衰弱病症을 總稱한 것으로 咳, 口中에서 濁唾涎沫이 多出하고 或은 唾中에 紅線이나 膿血이 섞이기도 하며 寸口脈이 數한 것을 말한다. 症狀의 轉變過

程에 따라 虛熱型和 虛寒型의 두 種類로 나누어지며 病症이 相異하므로 그 治法도 다르다.

肺癆는 短氣하고 面腫하며 鼻不聞香臭하며 咳嗽唾痰하며 兩脇脹痛하고 喘息不定하며 氣乏하고 心腹冷痛하며 甚하면 毛髮焦枯하며, 津液枯渴되어 咳嗽發熱한다.

喘證은 呼吸急促 或은 氣息이 喘急한 病症을 總稱하며, 그 形狀은 促促氣急하며 喝喝痰聲하고 입을 벌리고 어깨를 들먹이며, 身體와 肚腹을 動搖하는 것이다.

貝母는 性은 寒하고 味는 苦하여 心肺氣分에 속하여 清心肺熱痰하는 主治를 가지고 있다<sup>5</sup>. 또한 清熱潤肺, 化痰止咳하므로, 痰熱로 인한 咳嗽을 치료하는 대표적 藥材이며, 滋潤性이 강하여 潤肺化痰시키는 효능이 있어 肺熱燥咳, 乾咳少痰, 陰虛勞嗽, 咯痰帶血의 증에 다용한다<sup>6</sup>.

貝母에 관한 기존의 연구는 貝母 單味劑보다는 複合劑에 대하여 이루어졌다. 호흡기 손상으로 인한 담의 분비증가를 억제시키는 효과와 담의 점도를 감소시켰고<sup>7,8</sup>, 교감신경 수용체에 작용하여 기관지 수축을 억제하였다<sup>9</sup>.

상술한 바와 같이 폐섬유화증은 한의학적 관점에서 고찰해 보았을 때 元氣가 虛損되고 臟腑가 受傷한 所致로 虛損이 누적되어 점차 衰弱하여지는 慢性疾患으로 볼 수 있다. 그 임상양상은 주로 肺陰虛의 양상과 虛火로 인한 痰熱의 양상으로 나타난다. 따라서 咳嗽 및 기관지 질환에 다용하며 滋潤性이 있는 貝母가 폐섬유화증에 미치는 영향을 실험적으로 평가하기 위하여 bleomycin으로 유발한 폐섬유화 모델을 만들었다. 폐섬유화증의 기전에 관여하는 macrophage, lymphocyte, neutrophil 등의 염증세포와 IL-4, INF- $\gamma$  등의 cytokine을 관찰하여 貝母의 항염증반응과 항섬유화작용을 관찰하여 분석해 보고자 하였다.

본 실험에서 bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 貝母 물추출 액기스를 투여한 sample 군은 control 군에 비하여 폐세척액 내 백혈구 총수에 있어서 39.6%의 유의성(P<0.05) 있는 백혈구 총

수의 감소를 나타내었다(Table 2, Fig. 1). 이러한 변화는 bleomycin의 주입으로 증가된 염증세포들이 베타의 투여로 인해 감소되며, 베타가 폐섬유화증에서 섬유화 과정에 선행되는 염증반응을 억제한다는 것을 의미한다.

백혈구 비율의 변화를 살펴보면 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 베타 물추출 액기스를 투여한 sample 군은 백혈구 중 macrophage 비율이  $59.2 \pm 5.0$  %로 control 군에 비하여 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게 증가하였으며, lymphocyte의 비율은  $23.4 \pm 3.1$  %로 control 군에 비하여 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었고, neutrophil의 비율은  $17.4 \pm 2.8$  %로 역시 control 군에 비하여 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다(Table 3, Fig. 2). control 군에서 총 백혈구 중 macrophage의 비율이 normal 군에 비해 떨어졌으나, 총 백혈구 수치가 증가했음을 감안할 때 BALF 내의 macrophage의 총 수는 엄연히 증가했다. G. Izbicki<sup>33</sup> 등의 실험에서도 3, 6일에 급격하던 neutrophil의 증가세가 누그러진 14, 21일에 macrophage는 오히려 명확히 증가하였다. 게다가 Struhar D<sup>34</sup> 등의 실험에서도 MHC class II를 표현하는 alveolar macrophage의 비율은 IPF환자에서 보듯이 명확하게 상승되었는데, 이는 폐섬유화 과정에서 macrophage에 관한 항원이 존재하며, 그로인해 macrophage가 활성화 된다는 것을 말해준다. 이에 반해 베타를 투여한 sample 군에서는 bleomycin 투여로 감소하였던 macrophage의 비율이 다시 증가하였고, neutrophil과 lymphocyte의 비율은 감소하였다. Macrophage가 처음에는 섬유아세포를 모아서 증식하도록 자극하지만, 결국에는 prostaglandin을

생산하여 macrophage, neutrophil, lymphocyte의 염증 반응을 억제함으로써 섬유화를 억제한다는 보고<sup>35</sup>와 총 백혈구 수치가 감소한 결과를 참조할 때 본 실험에서는 백혈구의 비율을 normal 군의 염증 세포의 비율로 되돌렸으며, 이는 베타가 염증성 변화를 억제하였다고 추정할 수 있다.

폐조직의 Masson's trichrome 염색과 H-E 염색 소견에 따른 조직학적 폐손상 지표 SHI는 normal 군에서는  $0.3 \pm 0.2$  이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 control 군은  $4.5 \pm 0.2$ 로 거의 모든 조직에서 심한 염증반응과 상피세포의 비대 및 섬유화가 관찰되었다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 베타 물추출 액기스를 투여한 sample 군의 SHI는  $3.3 \pm 0.4$ 로 control 군에 비하여 26.7%의 유의성( $p < 0.05$ ) 염증반응의 감소, 상피세포 비대의 감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소가 관찰되었다(Table 4, Fig. 3, 4). 따라서 폐섬유화증에 있어서 베타가 유의한 수준으로 조직학적 폐손상을 억제한다고 확인되었으며, 이는 베타가 실제로 폐섬유화증에서 나타나는 증상을 호전시킬 수 있을 것으로 사료된다.

normal군의 폐세척액 내 IFN- $\gamma$ 는  $17.5 \pm 3.1$  pg/ml 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 control 군은  $138.3 \pm 11.4$  pg/ml로 확연한 Th1-type immune response의 증가를 나타내었으며, bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 베타 물추출 액기스를 투여한 sample 군은  $121.0 \pm 15.7$  pg/ml로 control 군에 비하여 감소하였지만 통계학적 유의성은 없었다. normal군의 폐세척액 내 IL-4는  $6.0 \pm 0.7$  pg/ml 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 control 군은  $42.0 \pm 3.1$  pg/ml로 심한 Th2-type immune response의 증가를 나타내었으며, bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 베타 물추출 액기스를 투여한 sample 군은  $28.0 \pm 6.1$  pg/ml로 control 군에 비하여 유의성 ( $p < 0.05$ )있는 Th2-type immune response의 감소를 나타내었다.(Table 5, Fig. 5)

본 실험에서 IL-4의 작용으로 대표되는 Th2

immune response가 폐섬유화를 촉진하며, 貝母가 이러한 Th2 반응을 감소시키는 확실하다. 백서를 이용한 다른 실험에서도 bleomycin을 투여한 후 3일에서 14일 사이에 폐의 IL-4 mRNA의 양은 매우 증가하였으며, 섬유화가 일어나는 국소부위에서의 monocyte와 macrophage는 늘어나는 양상을 보였다<sup>36</sup>.

따라서, IL-4가 염증반응을 자극하고 강화하여 섬유아세포의 collagen 합성을 자극하고 따라서 섬유화와 말기 폐질환으로의 진전을 촉진한다는 것을 알 수 있다. 그러므로 貝母가 Th2 response를 억제함으로써 폐섬유화를 억제하는 효능이 있음을 인정할 수 있다.

그런데, 섬유화를 억제하는 Th1 response의 대표적인 cytokine으로 인식되는 IFN- $\gamma$ 가 폐섬유화가 일어난 control 군에서 증가한 것에 대해서는 여러 각도로 생각해 보아야 한다. 金銀花<sup>10</sup>, 熟地黄<sup>11</sup>, 黃芪<sup>12</sup>, 麥門冬<sup>13</sup> 등 다른 약물을 이용한 기존의 실험에서도 폐섬유화가 일어난 control 군에서 IL-4와 IFN- $\gamma$ 가 모두 증가하였다. 또한 bleomycin에 의해 유발된 폐손상에 있어서 IFN- $\gamma$ 와 IL-4가 모두 높게 나타났다는<sup>37</sup> 보고와, IFN- $\gamma$ 는 적어도 bleomycin에 의해 유발된 경우에 있어서는 폐의 염증과 섬유화를 매개한다는<sup>38</sup> 주장을 참고하였을 때, 추가적인 실험에서는 IL-4와 INF- $\gamma$ 의 변화에 대한 연구가 필요하다.

이상의 결과를 종합하면 貝母는 총 백혈구 수치를 감소시키고, 백혈구 내 비율에 있어서 macrophage의 비율을 증가시키고, neutrophil과 lymphocyte의 비율을 감소시켜서 정상 비율로 복귀시켜 염증반응을 호전시킨다. 또한 Th2 response의 대표적 cytokine인 IL-4의 수치를 감소시킴으로써 반응을 억제한다. 貝母는 이를 통해 조직학적으로 조직 내의 염증반응을 감소시키고, 상피세포의 비대와 collagen 침착을 감소시키는 등 섬유화 감소 효과를 발휘하였다. 그러므로 貝母는 폐섬유화증의 병리기전과 발현된 증상에 있어 좋은 효과를 발휘할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

貝母가 Bleomycin에 의한 폐섬유화에 미치는 영향을 실험적으로 평가하기 위하여 FRE 투여 후 측정된 폐세척액 내 백혈구 총수의 변화, 폐세척액 내 백혈구 비율의 변화, 조직학적 폐손상 지표의 변화, 폐세척액 내 IFN- $\gamma$  및 IL-4의 변화를 Normal 군 및 Control 군과 비교 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백혈구 총수에 있어서 貝母 투여군은 Control 군에 비하여 39.6 %의 유의성( $p < 0.05$ ) 있는 백혈구 총수의 감소를 나타내었다.
2. 폐세척액 내 백혈구 비율의 변화에 있어서 貝母 투여군은 백혈구 중 macrophage 비율이 Control 군에 비하여  $59.2 \pm 5.5\%$ 로 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가하였으며, lymphocyte와 neutrophil의 비율은 모두 Control 군에 비하여  $23.4 \pm 3.1\%$ ,  $17.4 \pm 2.8\%$ 로 둘 다 감소는 하였으나, 통계학적 유의성은 없었다.
3. 조직학적 폐손상 지표(SHI)에 있어서 貝母 투여군은 Control 군에 비하여 26.7 %의 유의성( $p < 0.05$ ) 있는 염증반응의 감소, 상피세포 비대의 감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소가 관찰되었다.
4. IFN- $\gamma$ 에 있어서 貝母 투여군은  $121.0 \pm 15.7$  pg/ml로 Control 군에 비하여 감소하였지만 통계학적 유의성은 없었으며, IL-4는  $28.0 \pm 6.1$  pg/ml로 Control 군에 비하여 유의성( $p < 0.05$ ) 있는 감소를 나타내었다.

## 參考文獻

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. 김한겸 특발성 간질성 폐렴의 분류 및 병리학적 소견. 결핵 및 호흡기질환 2003;54(2):145-66.
  3. 한용철. 임상호흡기학. 서울: 일조각; 1997, p.240-51.
  4. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 남산당; 1998, p.470-81.
  5. 李龍城. 經藥分類典. 서울: 정담; 2002, p.12, 27.
  6. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울: 永林社; 2000, p.463, 464.
  7. 오태환, 정승기, 이형구. 貝甘散 및 貝甘散 加減 方의 祛痰作用에 對한 實驗的 研究. 경희대논문집 1990;13:133-45.
  8. 이정우, 정희재, 정승기, 이형구. 人蔘潤肺散 및 人蔘潤肺散 加味 方의 效能에 關한 實驗的 研究. 대한한의학회지 1996;17(2):203-13.
  9. 이춘재, 신조영. 이모산(二母散)이 GUINEA PIG의 기관지 평활근에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 1992;13(1):70-9.
  10. 이재성, 정희재, 정승기, 이형구. 金銀花가 Bleomycin에 의한 폐섬유화에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2004;25(1):71-80.
  11. 류한천, 이형구, 정승기, 정희재. 熟地黃이 Bleomycin에 의한 폐섬유화에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2004;25(2):298-306.
  12. 이경희. 이형구, 윤유식, 정승기, 정희재. 黃芪가 C57BL/6J 생쥐의 Bleomycin유발 폐섬유화에 미치는 영향. 서울: 경희대학교 대학원; 2004.
  13. 이병삼. 이형구, 정승기, 정희재. 麥門冬이 C57BL/6J 생쥐의 Bleomycin유발 폐섬유화에 미치는 영향. 서울: 경희대학교 대학원; 2004.
  14. Turner-Warwick M, Burrows B, Johnson A. Cryptogenic fibrosingalveolitis: response to corticosteroid treatment and its effect on survival. Thorax. 1980;35:593-99.
  15. Johnson MA, Kwan S, Snell NJ, Nunn AJ, Darbyshire JM, Turner-Warwick M. Randomised controlled trial comparing prednisolone alone with cyclophosphamide and low dose prednisolone in combination in cryptogenic fibrosing alveolitis. Thorax. 1989;44:280-8.
  16. Keogh BA, Crystal RG. Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders [Editorial]. Thorax. 1982;37:1-10.
  17. Yoshimura K. Pathogenesis of idiopathic interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis: cellular and molecular biology of the disease. Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi. 1993;31:20-31.
  18. Wallick SC, Figari IS, Morris RE, Levinson AD and Palladino MA. Immuno regulatory role of transforming growth factor  $\beta$ (TGF- $\beta$ ) in development of killer cells: Comparison of active and latent TGF- $\beta$ 1. J Exp Med. 1990; 172:1777-84.
  19. Giri SN, Schwartz LW, Hollinger MA, Freywald ME, Schiedt MJ and Zuckerman JE. Biochemical and structural alterations of hamster lungs in response to intratracheal administration of bleomycin. Exp Mol Pathol. 1980;33:1-14.
  20. Antoniadis HN, Neville-Golden J, Galanopoulos T, Kradin RL, Valente AJ, Graves DT. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89(12):5371-5.
  21. Hunninghake GW, Gadek JE, Lawley TJ, Crystal RG. Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. J Clin Invest. 1981;68(1):259-69.
  22. Carre PC, Mortenson RL, King TE Jr, Noble PW, Sable CL, Riches DW. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis.

- A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Invest.* 1991;88(6):1802-10.
23. O'Donnell K, Keogh B, Cantin A, Crystal RG. Pharmacologic suppression of the neutrophil component of the alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136(2):288-92.
  24. Campbell EJ, Senior RM, Welgus H: Extracellular matrix injury during lung inflammation. *Chest.* 1987;92:161.
  25. Gadek JE, Kelman JA, Fells G, Weinberger SE, Horwitz AL, Reynolds HY, Fulmer JD, Crystal RC. Collagenase in the lower respiratory tract of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 1979;301:737.
  26. Borzone G, Moreno R, Urrea R, Meneses M, Oyarzun M, Lisboa C. Bleomycin- induced chronic lung damage does not resemble human idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1648-53.
  27. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis : clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1301-15.
  28. R.K. Coker, GJ. Laurent. Pulmonary fibrosis : cytokines in the balance. *Eur Respir J.* 1998;11:1218-21.
  29. Strieter RM, Wiggings R, Phan SH, Wharram BL, Showell HJ, Remick DG, Chensue SW, Kunkel SL. Monocyte chemotatic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;162:694-700.
  30. Jaffe HA, Gao Z, Mori Y, Li L, Varge J. Selective inhibition of collagen gene expression in fibroblasts by an interferon-gamma transgene. *Exp Lung Res.* 1999;25:199-215.
  31. 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.
  32. Gurujeyalakshmi G, Giri SN : Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: downregulation of TGF-beta and procollagen I and III gene experssion. *Exp Lung Res.* 1995;21:791-808.
  33. G. Izbicki, M.J. Segel, T.G. Christensen, M.W. Conner and R. Breuer. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Path.* 2002;83:111-9.
  34. Struhar D, Grief J & Harbeck R.J. Class II antigen of the major histocompatibility complex are increased in lungs of bleomycin treated rats. *Immunol. Lett.* 1990;26: 197-202.
  35. Reiser KM, Last JA. Early cellular events in pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res.* 1986;10(4): 331-5
  36. Gharaee-Kermani M, Nozaki Y, Hatano K, Phan SH. Lung interleukin-4 gene expression in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Cytokine.* 2001;15(3):138-47.
  37. Hosoya T. Steroid resistance and lung-tissue cytokines in experimental bleomycin-induced lung fibrosis. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.* 1997;35(7):766-75.
  38. Chen ES, Greenlee BM, Wills-Karp M, Moller DR. Attenuation of lung inflammation and fibrosis in interferon-gamma-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24(5):545-55.