

加味腎氣湯 등 數種 方劑가 일차배양 호흡기 상피세포에서의 점액 분비에 미치는 영향

김정숙, 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학 교실

Studies on the Effects of Several Oriental Herbal Medicines on mucin secretion from Primary Cultured Respiratory Epithelial cells

Kim Jeong Sook, Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Object : In the present study, the author tried to investigate whether six oriental medical prescriptions named *gamisingitang* (SGT), *gamijungtang* (IJT), *gamicheongpyetang* (CPT), *galhwongchihyosan* (CHS), *chwiyeontang* (CYT), *sigyoungcheongpyetang* (SCPT) significantly affect mucin release from cultured hamster tracheal surface epithelial (HTSE) cells.

Method : Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of drugs aforementioned, respectively, to assess the effect of each drug on ^3H -mucin release. Possible cytotoxicities of effective drugs were assessed by measuring lactate dehydrogenase(LDH) release. Additionally, total elution profiles of control spent media and treatment sample (CPT, CHS, SCPT and CYT) through Sepharose CL-4B column were analysed and effect of CPT, CHS and CYT on MUC5AC mRNA expression in cultured HTSE cells were investigated.

Results : (1) SGT and IJT did not affect mucin release without cytotoxicity; (2) CPT, SCPT and CHS significantly stimulated mucin release from cultured HTSE cells, with significant cytotoxicity ; (3) However, CYT slightly inhibited mucin release from cultured HTSE cells, with significant cytotoxicity ; (4) CPT, CHS, SCPT and CYT chiefly affected the 'mucin' release and did not affect significantly the release of the other releasable glycoproteins with less molecular weight than mucin. This result suggests that the four herbal prescriptions specifically affect the release of mucin ; (5) CPT and CHS did not significantly affect the expression levels of MUC 5AC mRNA, however, CYT significantly inhibit the expression levels of MUC 5AC mRNA.

Conclusion : CYT can decrease the synthesis of mucin at gene level in cultured HTSE cells.

Key words : airway goblet cell, mucin, *gamicheongpyetang* (CPT), *galhwangchihyosan* (CHS), *chwiyeontang* (CYT), *sigyoungcheongpyetang* (SCPT)

접 수 : 2006년 3월 31일, 채택일자: 2006년 4월 22일
교신저자 : 김정숙, 대전광역시 서구 탄방동 1027 금정한의원
(Tel.: 042-483-5500, E-mail: dcm26@freechal.com)

I. 서 론

小兒는 生理的으로 臟腑가 嬌嫩하고 形氣가 充實하지 못하고, 脾常不足 肺常不足, 腎常虛하여 外因으로 六淫의 侵襲으로 인한 폐 호흡기 질환과 內因으로 飲食傷이 많은 편이다^{1,2)}.

痰飲은 人體의 體內 津液代謝 過程에서 肺의 通調水道作用, 脾의 運輸水穀精微作用, 腎의 蒸化水液, 分清泌濁作用이 消失되어 津液이 정상적으로 化生, 輸布, 排泄되지 못하거나 熱에 의해 煎熬되어 水濕이 어느 한 부분에 停滯되어 형성되는데, 狹意의 痰飲은 咯痰 즉 호흡기 痰液으로 인식되기도 한다³⁾.

서양의학에서의 咯痰은 호흡기질환에서 나타나는 대표적인 증상 중의 하나로서 타액, 혈청, 단백질 삼출물, 박리된 상피세포들과 호흡기 점액의 혼합물로 구성되어 있는 병리적 물질이며, 기도 병리 상태의 한 지표가 될 수 있다⁴⁾.

粘液은 咯痰의 주요 성분으로 섬모세포와의 협동작용을 통해, 인체에 불필요하거나 혹은 유해한 물질을 제거하는데 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 호흡기 점액의 인체 방어 기능은 주로 점액의 구성요소인 뮤신(mucin, 粘液素)의 점성 및 탄성

(viscoelasticity)에 기인하고, 이러한 뮤신의 양과 질의 이상은, 기도 생리의 이상 뿐 아니라 인체의 방어 작용에 영향을 주어 더욱 심한 병리 현상을 유발할 수 있다⁵⁻⁷⁾.

보통 건강인은 하루 10~20ml의 점액분비가 일어나며, 100ml 이상의 점액분비가 일어날 때는 병리현상이 나타나는데⁸⁾ 비염, 부비동염, 중이염, 알레르기비염, 만성 기관지염 등의 호흡기 질환에서 점액의 과분비가 흔히 나타나며, 코막힘과 호흡곤란을 일으키고, 호흡한 공기 중의 해로운 물질이 호흡기점막에 부착됨으로써 기침이 유발된다. 결국 이와 같은 咯痰의 증가는 호흡기 질환의 병적 상태를 증가시키는데, 감염의 위험을 높이고 기도폐쇄를 가져오며, 咯痰의 만성적 증가는 사망 위험을 증가시킨다⁹⁻¹¹⁾.

현재, 서양의학 체계에서는 이러한 과다 분비된 점액의 점도 및 분비를 조절하기 위해 bromhexine, ambroxole, S-carboxymethylcysteine 등의 약물이 사용되고 있으나, 그 효능 및 응용 범주에 제한이 있어 적절한 약물치료를 시행하기가 용이하지 않은 실정이다^{12,13)}.

이에 저자는 호흡기 뮤신의 약리 연구에 보편적으로 사용되는 일차배양 햄스터 기관 표면상피(HTSE)세포를 이용하여, 한의학 임상에서 호흡기 질환 치료제로 응용되는 加味腎氣湯, 加味理中湯, 加味淸肺湯, 葛黃治哮散, 柴梗淸肺湯, 取淵湯 등의 다양한 효능 중 호흡기

질환에서 호발되는 咯痰의 생성 및 과다분비 조절 효능을 究明하기위하여, 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향과 동시에 이 방제들의 뮤신 분비에 대한 작용이 특이적인지, 뮤신의 분비뿐 아니라 생성에도 영향을 줄 가능성이 있는지, 그리고 각 방제를 구성하고 있는 약제 중의 특정한 단일성분들이 뮤신 분비에 어떠한 영향을 미치는 지 등을 연구한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

8-10 주령의 웅성 Golden Syrian 햄스터를 실험동물 전문 사육업체에서 공급받은 후 사용하였다.

2) 약제

실험에 사용한 處方은 加味腎氣湯(GS GT)¹⁴, 加味理中湯(IJT), 加味清肺湯(GC PT)¹⁵, 葛黃治哮喘散(CHS)¹⁴, 柴梗清肺湯(SCPT)¹⁵ 및 取淵湯(CYT)¹⁶으로 실험에 사용한 구성 약제들은 대전대학교 부속 한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며 1첩의 처방내용과 용량은 각각 다음과 같다(Table 1, 2, 3, 4, 5, 6).

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

일차배양 기관표면 상피세포를 얻기 위해,

3) 시료 제조

각 방제 한 첩 분량에 600~800ml의 달이온 2차 증류수를 가하고 100℃로 가온된 상태에서 3시간 동안 전탕하여, 80ml의 탕액을 수거하였다. 각 탕액을 실온 정도로 방냉한 후, 멸균 청정 hood 내에서 0.22µm filter를 이용, 가

Table 1. Prescription of Gamisingitang(GSGT)

構成藥物	生藥名	用量(g)
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	8.0
山藥	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	6.0
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	6.0
白茯苓	<i>Hoelen</i>	4.0
牡丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	4.0
麥門冬	<i>Liriopsis Tuber</i>	4.0
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	2.0
貝母	<i>Fritillariae Cirrhosae Bulbus</i>	2.0
杏仁	<i>Armeniaca Arrarum</i>	2.0
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	2.0
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	2.0
胡桃肉	<i>Juglandis Semen</i>	2.0
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	12.0
大棗	<i>Jujubae Fructus</i>	8.0
總量		64.0

Table 2. Prescription of Gamijungtang(IJT)

構成藥物	生藥名	用量(g)
金銀花	<i>Lonicerae Flos</i>	8.0
玄 蔘	<i>Scrophulariae Radix</i>	8.0
白茯苓	<i>Hoelen</i>	6.0
蛇床子	<i>Torilis Fructus</i>	6.0
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4.0
附 子	<i>Aconiti Tuber</i>	4.0
乾 薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	4.0
肉 桂	<i>Cinamomi Cortex</i>	2.0
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2.0
總 量		44.0

압 여과하여 멸균용기에 저장한 후, 4℃ 냉장
고에 보관하였다.

Table 3. Prescription of Gamicheongpye-tang(GPT)

構成藥物	生藥名	用量(g)
柴 胡	<i>Bupleuri Radix</i>	6.0
半 夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	2.8
黃 芩	<i>Scutellariae Radix</i>	2.8
天花粉	<i>Trichosanthis Radix</i>	2.8
青 皮	<i>Citri Reticulatae Viride Pericarpium</i>	2.8
赤茯苓	<i>Hoelen</i>	2.8
杏 仁	<i>Armeniacaе Arrarum</i>	2.8
桑白皮	<i>Mori Cortex</i>	2.8
川 芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	2.8
枳 殼	<i>Aurantii Fructus</i>	2.0
桔 梗	<i>Platycodi Radix</i>	2.0
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2.0
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	12.0
大 棗	<i>Jujubae Fructus</i>	8.0
總 量		54.4

Table 4. Prescription of Chihyosangamibang(CHG)

構成藥物	生藥名	用量(g)
葛 根	<i>Puerariae Radix</i>	8.0
黃 芩	<i>Scutellariae Radix</i>	6.0
半 夏	<i>Corni Fructus</i>	6.0
陳 皮	<i>Citri Pericarpium</i>	4.0
赤茯苓	<i>Hoelen</i>	4.0
麻 黃	<i>Ephedrae Herba</i>	4.0
蘇 葉	<i>Perillae Fructus</i>	4.0
杏 仁	<i>Armenicae Amrum Semen</i>	4.0
桑白皮	<i>Mori Cortex</i>	4.0
前 胡	<i>Peucedani Radix</i>	4.0
貝 母	<i>Fritillariae Cirrhosae Bulbus</i>	4.0
桔 梗	<i>Platycodi Radix</i>	4.0
枳 殼	<i>Auranti Fructus</i>	4.0
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	4.0
總 量		68.0

Table 5. Prescription of Siqyoungcheongpyetang(SCPT)

構成藥物	生藥名	用量(g)
柴 胡	<i>Bupleuri Radix</i>	6.0
半 夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	4.0
黃 芩	<i>Scutellariae Radix</i>	4.0
青 皮	<i>Citri Reticulatae Viride Pericarpium</i>	4.0
赤茯苓	<i>Hoelen</i>	4.0
杏 仁	<i>Armenicae Arrarum</i>	4.0
枳 殼	<i>Aurantii Fructus</i>	4.0
桔 梗	<i>Platycodi Radix</i>	4.0
桑白皮	<i>Mori Cortex</i>	4.0
白芥子	<i>Sinapis Semen</i>	2.0
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2.0
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	12.0
大 棗	<i>Jujubae Fructus</i>	8.0
總 量		62.0

Table 6. Prescription of Chwiyeontang(CYT)

構成藥物	生藥名	用量(g)
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	100.0
玄參	<i>Scrophulariae Radix</i>	40.0
梔子炒	<i>Gadeniae Fructus</i>	12.0
辛夷	<i>Magnoliae Flos</i>	8.0
貝母	<i>Fritillariae Cirrhosae Bulbus</i>	4.0
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	4.0
總量		168.0

4) 시약

Pronase(Type XIV), insulin, transferrin, epidermal growth factor, hydrocortisone, baicalein, coumarin, berberine, uridine, sodium selenite, testicular hyaluronidase (Type VI-S), LDH assay kit(LD-L 10), retinoic acid, gentamicin, sodium dodecyl sulfate, sepharose CL-4B, ethidium bromide, collagenase type IV 등은 Sigma사(St. Louis, Mo., U.S.A.)에서, penicillin-G, streptomycin, Joklik-modified Minimal Essential Medium (S-MEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DME), fetal bovine serum(FBS), Medium 199(M199), Klenow fragment of DNA polymerase, TRizol reagent는 GIBCO-BRL사(Grand Island, New York, U.S.A.)에서, RNazol B는 BIOTECK사에서, PCR mini construction kit는 Clontech사에서, acrylamide, bis-acrylamide는 Bio-Rad에서, oligo-dT, dNTP, Taq. Polymerase, molony murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT)등은 Promega사에서, $[6-^3\text{H}]$ glucosamine(39.2 Ci/mmol)은 New England Nuclear사(U.S.A.)에서, type I collagen은

Regenmed(Seoul, Korea)에서, sodium acetate 등과 기타 일반시약들은 reagent grade 이상의 것들을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 탈이온 2차 증류수를 사용하였다^{17,18)}.

2. 방법

1) 햄스터 기관표면 상피세포의 분리 및 배양

햄스터의 기관표면 상피세포 분리와 배양에 적용된 실험방법은 Kim 등, Wu 등, Lee 등의 방법^{4,17-23)}을 사용하였다. 세포들이 1~3일간 배양된 후에는 37°C incubator에서 32°C incubator로 옮겨서 배양했다. 배양액 교체는, 배양 개시 후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다.

2) 뮤신의 대사적 방사능 표지 (radiolabeling)

Kim 등, Lee 등의 방법^{4,17,18,20)}을 변형, 이용하였는데, 배양세포 중의 μg 뮤신은, 성숙한 배양세포(24 well plate, 5×10^5 cells/well)에, 10 $\mu\text{Ci/ml}$ 의 $[6-^3\text{H}]$ glucosamine (39.2Ci/ mmol, New England nuclear)을 함유하는 완전배양

액(insulin (5 μ g/ml), transferrin (5 μ g/ml), epidermal growth factor (12.5ng/ml), hydrocortisone (0.1 μ M), sodium selenite (0.01 μ M), fetal bovine serum (5%, V/V)(이하 FBS), retinoic acid (0.1 μ M), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), gentamicin (50 μ g/ml)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME)과 Medium 199(M199)의 1:1 혼합 배양액)을 well당 200 ml씩 가하고 32 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양함으로써 방사능 표지 (metabolic radiolabeling)되었다.

3) 약물 처리

24시간 동안의 대사적 방사능 표지가 완결된 후 배양액 (pretreatment sample, 이하 PT로 약칭)을 수거해 두었다. 배양세포에 well당 0.5ml의 Dulbecco's Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free PBS (Phosphate-Buffered Saline)를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 각 방제의 최종 추출물 5~150ml를 함유하는 PBS 200ml, 혹은 다양한 농도의 baicalein, berberine, coumarin, uridine을 함유하는 PBS 200ml를 각각 well마다 가하고 32 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하여, treatment sample (이하 T sample)로 정의하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 50ml의 상등액은 젯산 탈수소효소 활성측정(LDH activity assay)을 위해 따로 덜어두고 나머지는 방사성 뮤신 함량을 측정할 때까지 -70 $^{\circ}$ C에서 냉동 저장하였다.^{4,17,18)}

4) 뮤신 함량 측정법

Hyaluronidase에 의해 분해되지 않으며,

Sepharose CL-4B column으로부터 exclude되는 고분자량의 glycoconjugate를 뮤신으로 정의하였고, Lee 등의 방법^{4,17,18)}에 따라 방사성 뮤신의 함량을 측정하였다.

5) 배양세포의 세포질로부터 유리된 젯산 탈수소 효소 활성 측정(LDH activity assay)

배양세포 중의 뮤신은, 다 자란 배양세포(24 well plate, 5 \times 10⁵ cells/well)에, 10 μ Ci/ml의 [6-³H] glucosamine (39.2 Ci/mmol, New England nuclear)을 함유하는 완전배양액을 well당 200ml씩 가하고 32 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양함으로써 방사능 표지하였고, 방사능 표지가 완결된 후 spent medium은 수거해 두었다. 배양세포에 well당 0.5ml의 PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 각 방제의 최종 추출물 5~120ml를 함유하는 PBS 200ml, 혹은 다양한 농도의 baicalein, berberine, coumarin, uridine을 함유하는 PBS 200ml를 각각 well마다 가하고 32 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 T sample을 수거하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 50ml의 상등액을 젯산 탈수소효소 활성측정(LDH activity assay)에 사용했다. LDH 활성 측정은 commercial kit (Sigma, LD-L 10)을 이용하였다.^{4,17,18)}

6) 각 방제 투여 배양 상등액(drug-treated sample)의 sepharose CL-4B column을 통한 전체 용출양상 분석

배양세포 중의 뮤신은, 성숙한 배양세포(24 well plate, 5 \times 10⁵ cells/well)에, 10 μ Ci/ml의 [6-³H] glucosamine (39.2 Ci/mmol, New

England Nuclear)을 함유하는 완전배양액을 well당 200ml씩 가하고 32°C에서 24시간 동안 배양함으로써 방사능 표지하였고, 방사능 표지가 완결된 후 spent medium은 수거해 따로 보관해 두었다. 배양세포에 well당 0.5ml의 PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤 각 방제의 최종 추출물 5~120ml를 함유하는 PBS 200ml를 well마다 가하고 32°C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 T sample을 수거하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 얻어진 T sample을 1.0×50cm 규격의 Sepharose CL-4B column에 적용하였다. 한 분획의 용량은 0.35ml로 하였고 뮤신이 용출되는 void volume뿐만 아니라 included volume과 total bed volume이 용출될 때까지 분획을 수거하였다. 각 분획에 scintillation cocktail을 첨가한 뒤 LSC를 이용, 방사선량을 측정하였다. 대조 sample과 각 약물의 처리가 뮤신 및 그보다 분자량이 작은, 표지된 여타의 당단백질들의 전체 용출양상에 미치는 영향을 비교하였다^{4,17,18)}.

7) HTSE 세포 내에 존재하는 total RNA의 분리

30분의 투여 기간 동안 뮤신의 분비에 영향을 주는 각 방제가, 24시간 투여 기간 동안, HTSE 세포 내에 존재하는 뮤신 유전자인 MUC 5AC mRNA의 발현 정도(수준)에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 먼저 total RNA를 분리하고자 GIBCO BRL사의 TRIzol reagent (total RNA isolation reagent)를 이용하였다. 즉, 배양된 HTSE 세포에 加味清肺湯, 葛黃治哮散, 取淵湯을 최종 추출물 기준으로 각각 20ml, 20ml, 120ml를 함유하는 완전배양

액 200ml를 well마다 가하고, 32°C에서 24시간 동안 배양시킨 다음, 냉각된 PBS로 2회 세척하였다. Matrix인 collagen을 분해하기 위하여 완전배양액에 녹인 0.2% collagenase type IV를 각 well당 400ml씩 가하고, 37°C 배양기에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 생성된 콜라겐 용해물 및 세포들의 혼합물을 1.5ml 용량의 microtube에 옮겨 원심분리함으로써 세포들만 분리하였다. 이어서, total RNA isolation reagent를 이용해 세포를 lysis시키고, 핵단백질을 완전히 분리해 내기 위해 상온에서 5분간 방치하였다. 5분 후 즉시, microtube에 chloroform를 첨가, 15초간 vortexing하고 상온에 2~3분간 방치한 후 4°C, 12,000rpm (Hanil centrifuge, MICRO 17 R)에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 새 microtube에 옮겼다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 4°C, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 이 침전물에 diethylpyrocarbonate(DE PC)가 함유된 80% ethanol을 가하고 4°C, 7,500 rpm에서 5분간 원심분리함으로써 세척하였다. 수거된 RNA 침전물을 대기 중에서 건조시킨 후, RNase-free water로 부유시키고, spectrophotometer (Beckman, DU-650)를 사용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도를 알아내어 실험에 사용하였다 ($1.0A_{260}$ =single strand RNA 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)²⁵⁾.

8) PCR (Polymerase Chain Reaction)을 위한 primer 제조

PCR에 사용된 primer는 제노텍(주)에 주문, 합성하였다. MUC 5AC의 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5'-CACCGGCTCACCCGACGCCACC-3',

antisense primer의 염기서열은 5'-GATGG GGCCGGCCTCCCGGAGAGC-3'이며, 이 primer에 의해 합성된 PCR 산물의 크기는 440 bp였다. β -actin 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5'-TGG AGAAGAGCTATGAGCTGCCTG-3' 이고, antisense primer는 5'-GTGCCACCAGA CAGCACTGTGTTG-3'이며 이 primer가 표적으로 하는 DNA 크기는 290bp였다.

9) RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄 반응 (RT-PCR)

수거된 total RNA를 이용, 역전사 반응(reverse transcription; RT)으로 cDNA를 만들고, 이를 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)으로 증폭시켰다. 즉 각각의 조건에서 얻어진 total RNA 5 μ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열함으로써 denaturation시키고, 이를 얼음에 담가 급냉시킨 후 4 μ l의 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl/pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50mM Dithiothreitol), 2.5 μ l의 10 mM dNTP, 1 μ l의 oligo-dT₁₅ (25 pmol), 1 μ l의 역전사 효소 용액 (M-MLV RT; 200 U/ μ l)을 첨가하고 총 반응액이 20 μ l가 되도록 탈이온 2차 증류수를 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 얻었다. 얻어진 cDNA 산물은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하여 역전사 효소를 불활성화시킨 다음 얼음에 담가 급냉하였다. MUC 5AC 유전자에 대한 중합효소 연쇄반응(PCR)은, 각각의 역전사 반응에서 얻은 cDNA 산물 5 μ l에, 4 μ l의 10 \times PCR buffer (100 mM Tris/pH 8.0, 30 mM MgCl₂, 2.5mg/ml BSA), 4 μ l의 2.5 mM dNTP, 1 μ l씩의 MUC 5AC에 대한 sense, antisense primer (10 pmol/ μ l), 1 μ l의 Taq DNA polymerase (0.2 U/ μ l)를 첨가하여 총 반응액이

40 μ l가 되도록 탈이온 2차 증류수를 가한 후 시행되었다. 증폭반응을 위하여, PCR (PCR thermal cycler; Takara MP-300, Japan)을 30회 실시하였으며, denaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing은 60 $^{\circ}$ C에서 1분, extension은 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 각각 시행하였다.

10) 전기영동에 의한 중합효소 연쇄반응 산물의 확인

RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응으로 증폭된 cDNA 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC 5AC mRNA 발현 정도(수준)의 변동을 관찰하였다. 즉, 증폭된 PCR 산물(20 μ l)을 10 \times gel loading buffer(0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 50% glycerol)와 잘 혼합한 다음, Tris-acetate-EDTA buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)용액 및 1 μ g/ml의 ethidium bromide가 포함된 1.2% agarose gel에서 전기영동하였다. Gel 상에서 이동된 각각의 DNA band는 자외선 투사기 (ultraviolet transilluminator)를 이용하여 관찰하고, 사진 촬영하였다.

11) 통계처리

모든 측정 결과는 Mean \pm S.E.M.으로 환산된 후, 약물 처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타냈다. 통계처리는 unpaired Student's *t*-test로 하였으며, $p < 0.05$ 인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 실험 성적

1. 일차배양 HTSE 세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향

1) 加味腎氣湯

加味腎氣湯(GSGT)은 최종 추출물 20 μ l ~ 150 μ l/200 μ l PBS 사이의 투여 농도에서 뮤신 분비에 유의성이 나타나지 않았다(Fig.1).

2) 加味理中湯

加味理中湯(IJT)도 최종 추출물 20 μ l ~ 150 μ l/200 μ l PBS 사이의 투여 농도에서 뮤신 분비에 유의성이 나타나지 않았다(Fig.2).

3) 加味清肺湯

加味清肺湯(CPT)은 뮤신분비를 증가시키는 것으로 나타났는데, 최종 추출물 10 μ l ~ 40 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도에서 용량의존적으로 뮤신분비를 600-900% 가량(over the control) 증가시켰다(Fig.3).

4) 葛黃治哮散

葛黃治哮散(CHS)은 뮤신분비를 증가시키는 것으로 나타났는데, 최종 추출물 5 μ l ~ 20 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도에서 용량의존적으로 뮤신분비를 120~600% 가량(over the control) 증가시켰다(Fig.4).

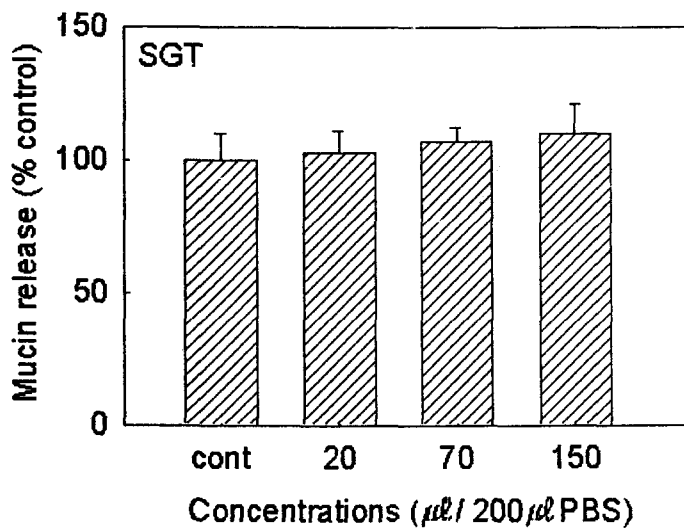


Fig. 1. Effect of GSGT on mucin release from cultured HTSE cells.

Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with 3 H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of SGT extract and the amount of 3 H-mucins in the spent media was measured. Each bar represents a Mean \pm S.E.M. from 4 culture wells.

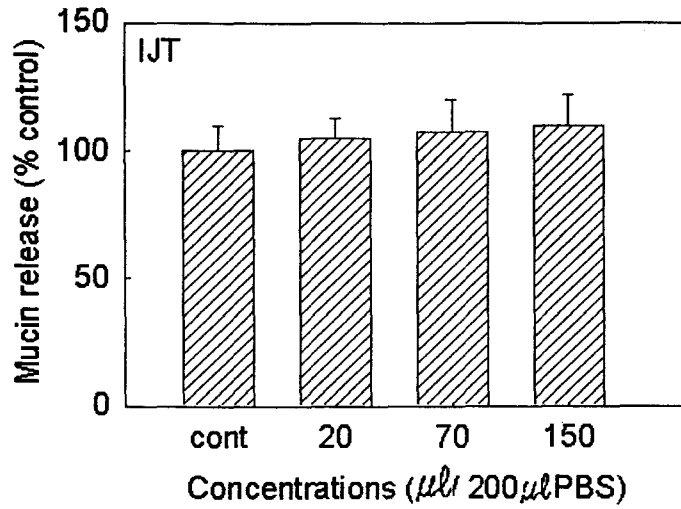


Fig. 2. Effect of IJT on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of IJT extract and the amount of ^3H -mucins in the spent media was measured. Each bar represents a Mean \pm S.E.M. from 4 culture wells.

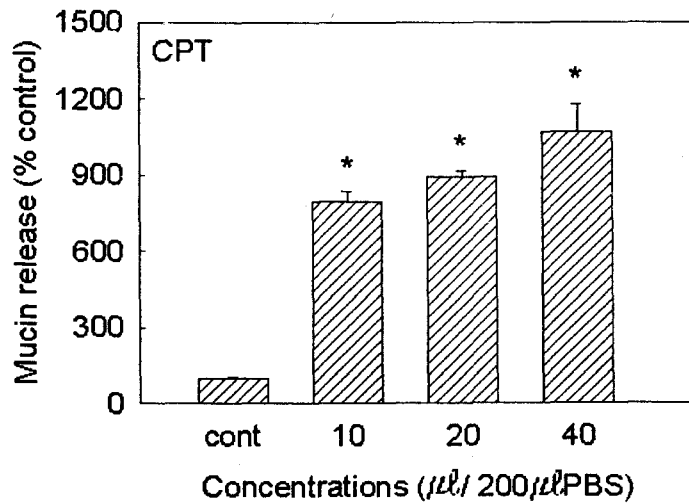


Fig. 3. Effect of CPT on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of CHS extract and the amount of ^3H -mucins in the spent media was measured. Each bar represents a Mean \pm S.E.M. from 4 culture wells.
*: significantly different from control($p < 0.05$).

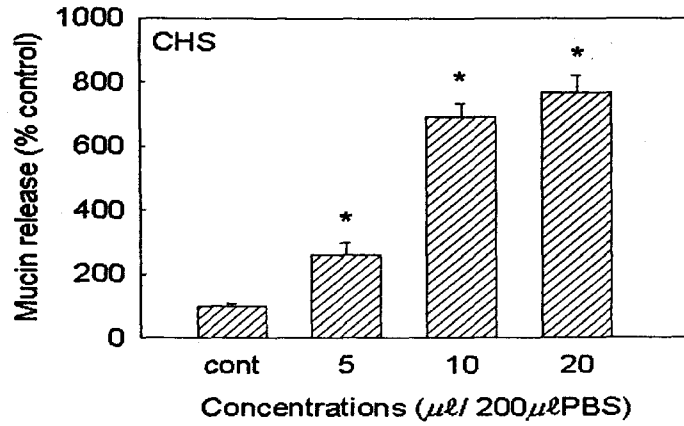


Fig. 4. Effect of CHS on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of CHS extract and the amount of ^3H -mucins in the spent media was measured. Each bar represents a Mean \pm S.E.M. from 4 culture wells.
*: significantly different from control($p<0.05$).

5) 柴梗清肺湯 $\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ PBS의 투여 농도에서 용량의존적으로
 柴梗清肺湯(SCPT)도 뮤신분비를 증가시키 로 뮤신분비를 250~300% 가량(over the
 는 것으로 나타났는데, 최종 추출물 10 μl ~40 control) 증가시켰다(Fig.5).

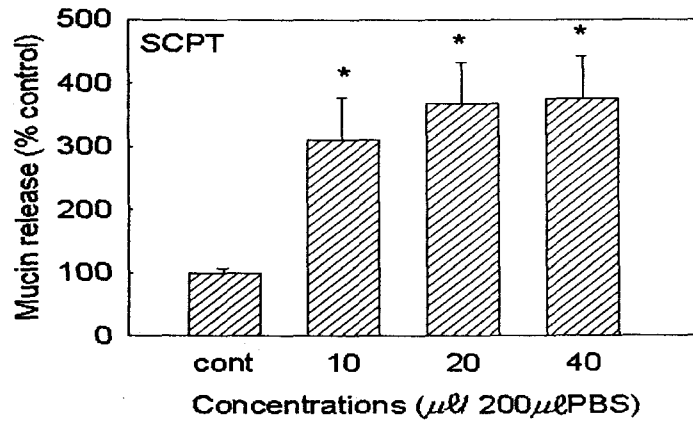


Fig. 5. Effect of SCPT on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of SCPT extract and the amount of ^3H -mucins in the spent media was measured. Each bar represents a Mean \pm S.E.M. from 4 culture wells.
*: significantly different from control($p<0.05$).

6) 取淵湯

取淵湯(CYT)은 뮤신분비를 미약하게 억제하는 것으로 나타났는데, 최종 추출물 120 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도에서, 뮤신분비를 20% 가량 (under the control) 억제시켰다 (Fig.6).

2) 葛黃治哮喘散

葛黃治哮喘散은 최종 추출물 20 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도에서, 세포독성의 한 지표인 LDH 분비를 150% 가량(over the control) 증가시켰다(Fig.8).

2. 일차배양 HTSE 세포로부터의 LDH 분비에 미치는 영향

3) 柴梗淸肺湯

柴梗淸肺湯은 최종 추출물 10 μ l~40 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도에서, 세포독성의 한 지표인 LDH 분비를 100~150% 가량(over the control) 증가시켰다(Fig.9).

1) 加味淸肺湯

加味淸肺湯은 최종 추출물 20~40 μ l/200 μ l PBS의 투여농도에서, 세포독성의 한 지표인 LDH 분비를 60-80% 가량(over the control) 증가시켰다.(Fig.7)

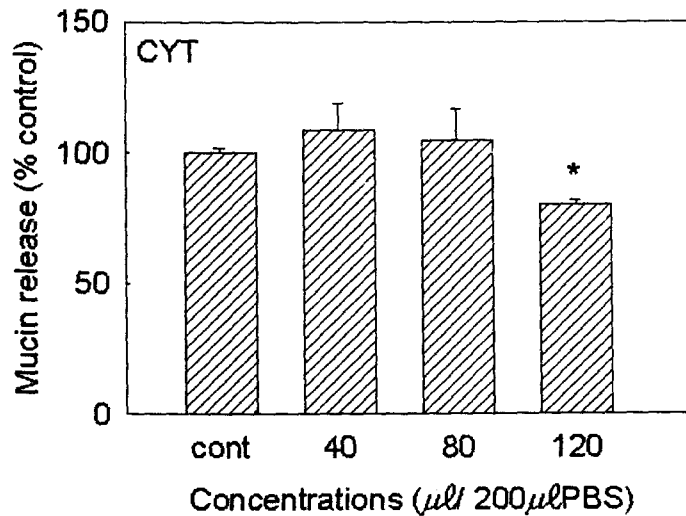


Fig. 6. Effect of CYT on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with 3 H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of CYT extract and the amount of 3 H-mucins in the spent media was measured. Each bar represents a Mean \pm S.E.M. from 4 culture wells.
* : significantly different from control(p<0.05).

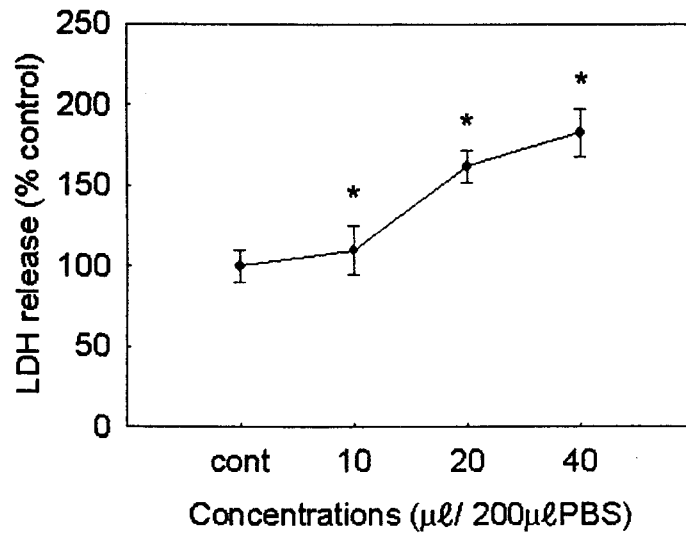


Fig. 7. Effect of CPT on LDH release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of CPT extract for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a Mean \pm S.E.M. from 4 culture wells. *: significantly different from control($p<0.05$).

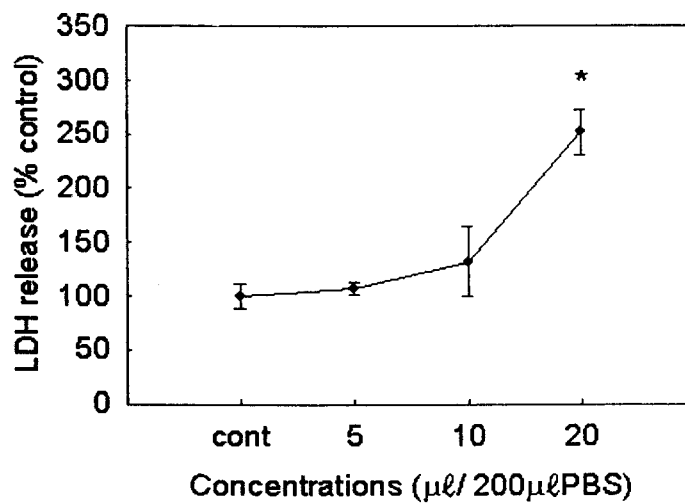


Fig. 8. Effect of CHS on LDH release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of CHS extract for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a Mean \pm S.E.M. from 4 culture wells. *: significantly different from control($p<0.05$).

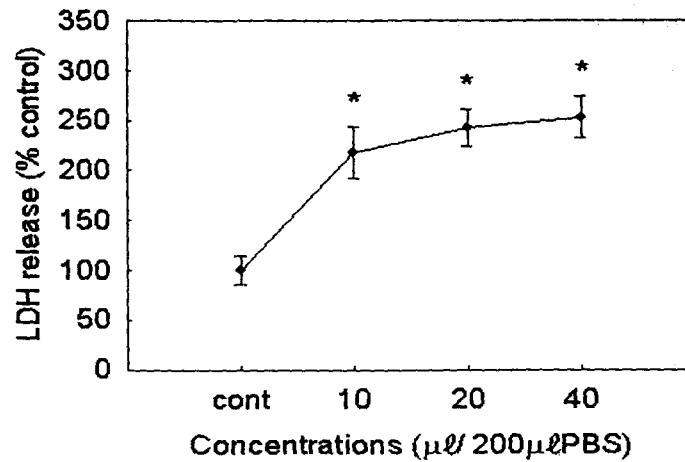


Fig. 9. Effect of SCPT on LDH release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of SCPT extract for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a Mean \pm S.E.M. from 4 culture wells. *: significantly different from control ($p < 0.05$).

4) 取淵湯 LDH 분비를 170~220% 가량(over the control) 증가시켰다(Fig.10).
 取淵湯은 최종 추출물 80 μl ~120 $\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ PBS의 투여 농도에서, 세포독성의 한 지표인

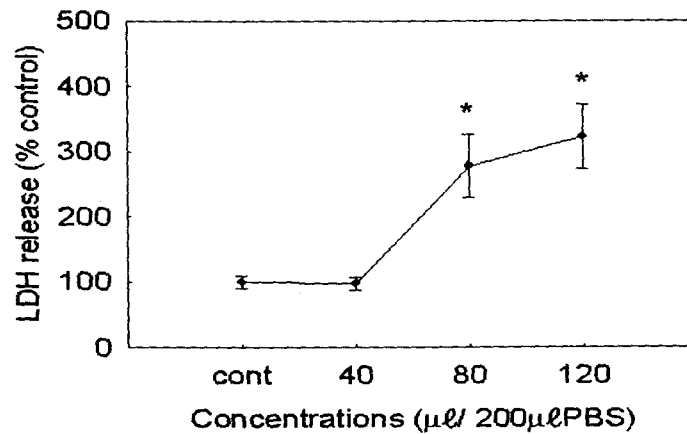


Fig.10. Effect of CYT on LDH release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of CYT extract for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a Mean \pm S.E.M. from 4 culture wells. *: significantly different from control ($p < 0.05$).

3. sepharose CL-4B column을 통한 전체 용출 양상 분석

1) 加味清肺湯

加味清肺湯(CPT) 20 μ l/200 μ l PBS 처리 시, CPT는 주로 뮤신의 분비를 증가시키며, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에는 유의성 있는 영향을 발현하지 않는 것으로 나타났다 (Fig.11).

2) 葛黃治哮喘散

葛黃治哮喘散(CHS) 10 μ l/200 μ l PBS 처리 시, CHS는 주로 뮤신의 분비를 증가시키며, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에는 유의성 있는 영향을 발현하지 않는 것으로 나타났다(Fig.12).

3) 柴梗清肺湯

柴梗清肺湯(SCPT) 20 μ l/200 μ l PBS 처리 시, SCPT 역시 주로 뮤신의 분비에만 영향을 주며, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에는 유의성 있는 영향을 발현하지 않는 것으로 나타났다 (Fig.13).

4) 取淵湯

取淵湯(CYT) 120 μ l/200 μ l PBS 처리 시, CYT은 주로 뮤신의 분비를 억제시키며, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에는 유의성 있는 영향을 발현하지 않는 것으로 나타났다(Fig.14).

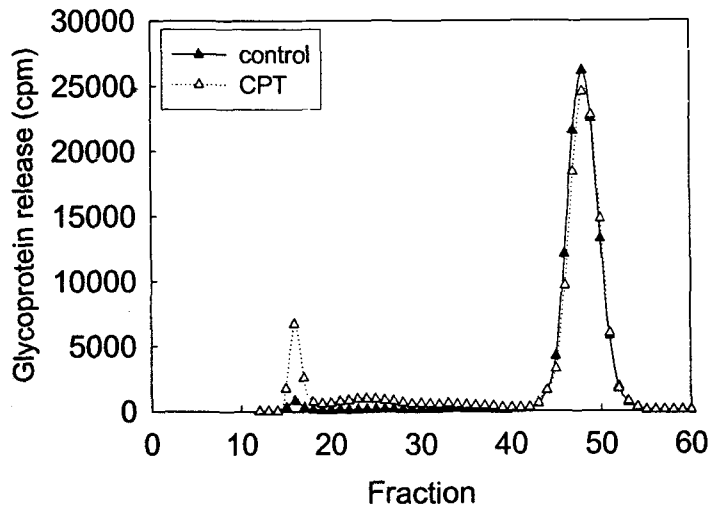


Fig. 11. Effect of CPT on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with 3 H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of CPT 20 μ l/200 μ l PBS and total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed, as described in Materials and Methods.

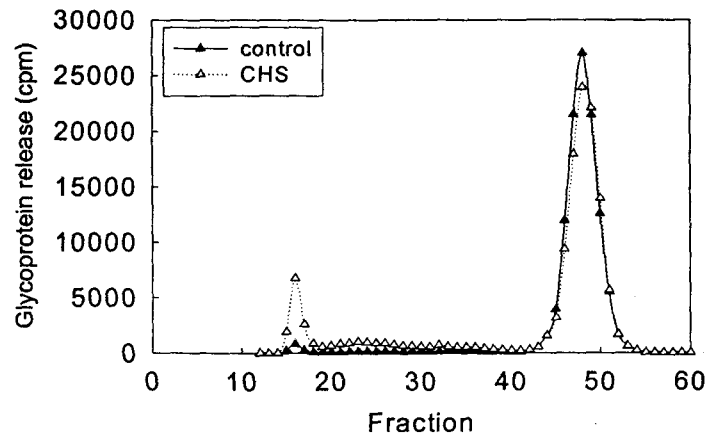


Fig. 12. Effect of CHS on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of CHS $10\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ PBS and total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed, as described in Materials and Methods.

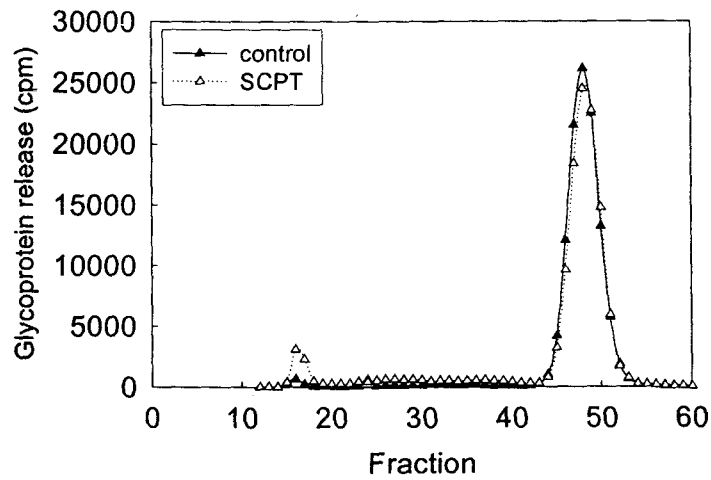


Fig. 13. Effect of SCPT on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of SCPT $20\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ PBS and total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed, as described in Materials and Methods.

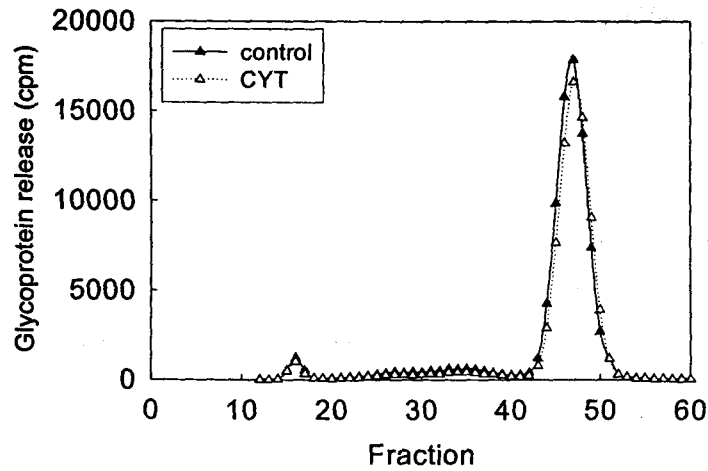


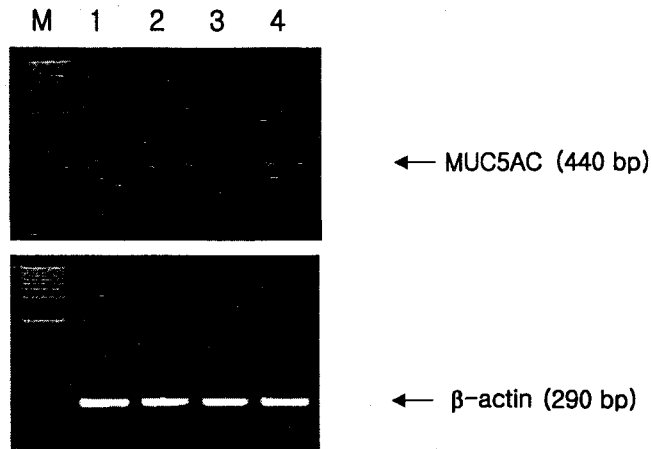
Fig. 14. Effect of CYT on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column.

Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of CYT $120\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ PBS and total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed, as described in Materials and Methods.

4. MUC 5AC mRNA 발현에 미치는 CPT, CHS, CYT의 영향

RT-PCR 실험 결과, 30분간 투여 시 뮤신 분비를 증가시키는 것으로 나타난 加味清肺湯 및 葛黃治哮喘 투여군에서는 24시간 동안의 MUC5AC mRNA 발현 수준은 대조군에 비하여 유의성 있는 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 30분간 투여 시 뮤신 분비를 미약하게나마 억제시키는 것으로 나타난 取淵湯 투여군에서는 24시간 동안의 MUC5AC mRNA 발현 수준이 대조군에 비하여 뚜렷하게 감소하는 것으로 나타났다. 즉, 加味清肺湯 및 葛黃治哮喘에 의한 뮤신 분비 증가작용은 분비 현상 자체에 대한 방제의 작용일 가능성이 높으며, 取淵湯에 의한 뮤신 분비의 억제는, 단기적으

로는 분비 현상 자체에 대한 영향과 아울러 반복(장기) 투여 시 뮤신의 생성, 즉 뮤신 유전자 수준에서의 발현 감소에 기인할 가능성을 시사하는 결과라 할 수 있을 것이다.



M: 1kb marker, 1: Control, 2: 가미청폐탕, 3: 취연탕, 4: 갈황치효산

Fig. 15. Effects of CPT, CYT and CHS on MUC5AC mRNA expression in cultured HTSE cells.

HTSE cells were incubated with the indicated concentration of each agent for 24 hrs. Total RNA was isolated and MUC 5AC mRNA levels were analyzed by RT-PCR. The PCR products were separated on 1.2% agarose gel and stained with ethidium bromide, as described in Materials and Methods.

IV. 고찰

살아있는 생체는 조직세포의 신진대사작용을 위하여 산소 공급을 끊임없이 필요로 하고 있으며, 대사의 최종산물인 이산화탄소를 배출시키기 위하여 필요한 가스교환을 담당하는 기관을 호흡기계라 한다. 호흡기계는 가스 교환이 이루어지는 폐와 체외에서 폐까지 외기가 들어오는 통로인 호흡기도로 나누어지는데, 호흡기도는 비강, 인두, 후두, 기관, 기관지 등이 속하게 된다^{1,25)}.

호흡기의 주기능은 호흡운동과 호흡운동을 원활하게 유지하기 위한 방어작용으로 나누게 되는데, 방어작용은 하루에 흡입하는 20,000L의 공기에 포함되어있는 각종 유해물질인 세균

이나 바이러스, 먼지, 깃털들과 화학성 가스, 연기 등으로부터 인체를 보호하는 것으로, 호흡기에 유입되는 기체를 가운, 가습하고 수용성 기체는 흡착 제거하며, 입자물질들은 여과하고, 이미 기도까지 들어오고 난 이후에는 기도반사를 통해 기침이나 기관지를 축소하여 제거하고 점액섬모를 통하여 배출하도록 한다. 또한 폐포거식세포, 중성구, 림프구, 호산구, 호염기구와 같은 세포나 면역글로블린, interferon, lysozyme, alpha 1-antitrypsin, 보체 등을 이용하여 원활한 호흡작용을 위해 호흡기를 보호하는 작용을 한다⁶⁾.

소아는 각 기관의 발육이 부전하고 형체와 기능이 완전하지 못하므로 외부의 변화에 취약하여 外因으로 六淫의 侵襲으로 인한 폐호흡기 질환과 內因으로 飮食傷이 많은 편이다^{1,2)}.

그 중 호흡기 질환은 생후 6개월까지는 모유의 자연면역으로 발병이 다소 적은 편이나 6개월 이후 6세까지의 소아에게 가장 빈번하게 발생하며, 특히 2~3세의 유아에서는 겨울과 봄에 기후변화가 심할 때 반복적으로 발생하고 잘 낫지 않는 편이다^{2,26)}.

소아에게 호발하는 호흡기 질환은 상기도 질환으로는 급성비인두염, 급·만성인두염, 급·만성비염, 중이염, 부비동염, 경부인두염 등이 있고, 하기도 이하 질환으로는 후두염, 기관염, 기관지염, 폐렴, 기관지천식, 급성세기관지염 등을 임상에서 흔히 접할수 있다^{13,25,26)}.

기도의 병변을 유발하는 인자로는 알레르기, 약물성, 심인성, 감염성, 공기오염 등의 자극이 있으며, 주요 호흡기 질환의 증상은 기침, 객담, 호흡곤란, 흉통, 천명, 객혈 등으로 나타나는데^{13,26)}, 호흡기 질환에서 나타나는 대표적인 증상 중의 하나인 咯痰은 타액, 혈청, 단백질 삼출물, 박리된 상피세포들과 호흡기 점액의 혼합물로 구성되어 있는 병리적 물질이며, 기도 병리 상태의 한 지표가 될 수 있다⁴⁾. 점액은 咯痰의 주요 성분으로 기도표피 섬모와의 협동 작용을 통해, 인체에 불필요하거나 혹은 유해한 물질을 제거하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{5,6)}. 보통 건강인은 하루 10-20ml의 점액분비가 일어나는데, 100ml 이상의 점액분비가 일어날 때는 병리현상이 나타난다⁸⁾. 즉, 비염, 부비동염, 중이염, 알레르기비염, 만성 기관지염 등의 호흡기 질환에서 점액의 과분비가 흔히 나타나서 코막힘과 호흡곤란을 야기하고, 호흡한 공기 중의 해로운 물질이 코점막에 부착되면 기침을 일으키기도 한다^{18,25)}. 호흡기 점액의 인체 방어 기능은 주로 점액의 구성요소인 뮤신(mucin, 粘液素)의 점성 및 탄성(viscoelasticity)에 기인하는데, 이러한 뮤신의 양과 질의 이상은, 기도 생리의

이상 뿐 아니라 인체의 방어 작용에 영향을 주어 천식, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, 낭포성 섬유증 등의 호흡기 질환군의 예후를 악화시키는 주 요인임이 알려져 있다^{7,29)}.

현재, 서양의학 체계에서는 이러한 과다 분비된 점액의 점도 및 분비를 조절하기 위해 bromhexine, ambroxole, S-carboxymethyl-cysteine 등의 약물이 사용되고 있으나, 그 효능 및 응용 범주에 제한이 있어 적절한 약물치료를 시행하기가 용이하지 않은 실정이다^{11,13)}.

韓醫學의으로 咯痰은 體内の 水液代謝가 失調되어 體内の 어느 한 부분에 과다한 水分이 停滯되어 형성된 痰飲의 일부로 痰飲은 疾病의 原因이 될 뿐만 아니라 疾病의 結果로도 발생된다^{3,28)}. 人體의 體內 津液代謝過程에서 肺의 通調水道作用, 脾의 運輸水穀精微作用, 腎의 蒸化水液, 分清泌濁作用이 失調되면 津液이 정상적으로 化生, 輸布, 排泄되지 못하거나 熱에 의해 煎熬 즉 졸아붙어 痰이 生成된다^{3,28)}. 痰이 肺에 留滯하면 咳喘과 痰多를 발생하고, 胃에 留滯하면 惡心과 嘔吐를 일으키며, 胸脇間에 留滯하면 胸滿而喘하고 咳嗽하면 胸脇作痛이 발생한다. 그 외 經絡 臟腑 四肢 各處에 留滯되어 각기 다른 證候로 표현되기도 한다³⁾.

《東醫寶鑑》²⁹⁾에서는 痰病有十이라 하여 “有風痰 寒痰 濕痰 熱痰 燥痰 鬱痰 氣痰 食痰 酒痰 驚痰 痰之原不一, 有因熱而生者, 有因氣而生者 ...” 痰의 原因을 10가지로 분류하고 있는데, 그 中에 呼吸器 咯痰과 비교적 밀접하게 관련된 痰의 종류는 風痰, 寒痰, 濕痰, 熱痰, 燥痰, 鬱痰, 氣痰 등이 있다. 일 반적인 痰飲의 治療法은 實脾土燥脾濕이나 呼吸器 痰飲은 風, 寒, 熱, 濕痰이 많으므로 각각 祛風痰, 溫肺化痰, 清熱化痰, 除濕化痰을 위주로 한다^{3,29)}.

咯痰을 볼 수 있는 대표적인 호흡기 질환은 급성비인두염, 급성인두염, 중이염, 부비동염, 기관지염, 폐렴, 기관지천식, 급성세기관지염, 경부인파선염 등이 있고 韓醫學的으로는 感冒, 鼻淵, 咳嗽, 哮喘 등을 들 수 있다^{13,25,26)}.

感冒는 가장 흔한 호흡기 질환으로 發熱, 惡寒, 頭痛, 콧물과 코막힘, 재채기, 기침 등을 주요증상으로 한다^{1,2,25)}.

《東醫寶鑑》²⁹⁾에 의하면 咳嗽는 “咳謂有聲而無痰, 肺氣傷而不清也, 嗽謂無聲而有痰, 脾濕動而有痰也. 咳嗽者有痰而有聲 因肺氣受傷 動乎脾濕而然也”라 하여 기침과 함께 咯痰을 볼 수 있다.

鼻淵은 서양의학의 부비동염에 해당되는 질환으로 鼻腔에서 濁涕가 흐르며 鼻塞, 後鼻漏, 頭痛, 咳嗽 등의 증상이 수반되며 부비동의 점액증가와 배설장애로 유발된다^{1,24)}.

哮喘은 기관지천식에 해당되는 질환으로, 哮는 喉中에서 소리가 나는 것을 말하며, 喘은 숨이 促迫하여 呼吸이 困難한 것을 말한다. 《丹溪心法》³⁰⁾에서 哮喘이라는 병명이 최초로 언급되었고 病因을 “專主於痰”이라고 하였다.

加味腎氣湯은 六味地黃湯 半量에 理氣調中 燥濕化痰하는 陳皮, 清熱潤肺, 化痰止咳하는 貝母, 降氣止咳平喘, 潤腸通便하는 杏仁을 加하고, 養陰潤肺, 清心除煩하는 麥門冬과 斂肺滋腎, 生津收汗하는 五味子を 더해 補肺腎하여 久嗽痰膠를 치료하는 처방³¹⁾이다.

加味理中湯은 理中湯 本方에서 補脾益胃, 燥濕和中하는 白朮을 빼고 回陽補火, 散寒除濕하는 附子, 補元陽, 暖脾胃, 除積冷, 通血脈하는 肉桂, 溫腎助陽, 祛風燥濕하는 蛇床子를 加하여 理中湯의 溫裏기능을 더하고 脾臟을 補하며 利水滲濕, 健脾寧心하는 茯

苓을 加하여 痰의 根源인 脾濕을 제거하며 清熱解毒, 涼散風熱하는 金銀花와 滋陰清熱, 解毒滑腸하는 玄蔘을 加하여 清熱을 겸하게 한 처방이다.

加味清肺湯¹⁵⁾은 肺熱痰이 盛하여 寒熱 胸痞 脇痛을 發하는데 사용하는 처방으로 《晴崗醫鑑》¹⁵⁾의 柴梗半夏湯에 和解退熱, 疎肝解鬱하는 柴胡를 5分 減하고, 活血行氣, 祛風止痛하는 川芎을 加하고 溫肺祛痰, 理氣散結하는 白芥子を 빼서 좀 더 완만하게 肺熱 咳嗽을 치료하는 처방이라 할 수 있다.

治哮散은 解表二陳湯에서 理氣行痰, 破氣消積하는 枳殼을 加한 處方이고, 葛黃治哮散은 治哮散에 發散風熱하는 葛根과 清熱燥濕하는 黃芩을 加한 處方으로 肺熱哮喘을 치료하였다.

柴梗清肺湯은 肺熱咳嗽하여 肺炎, 肋膜炎 初期에 사용하는 柴梗半夏湯에 清化熱痰하는 瓜蒌仁을 去하여 肺熱 咳嗽 痰喘 脇痛을 치료하는 처방이다.

取淵湯은 膽移熱於腦로 인해 黃濁한 콧물이 계속되는 것을 치료하는데, 處方을 구성하고 있는 藥物들의 個別效能^{32,33)}을 살펴보면 辛夷는 祛風寒, 通鼻竅하여 治鼻淵, 鼻塞不通, 鼻流濁涕의 효능이 있고, 當歸는 潤燥滑腸, 補血和血하며, 柴胡는 和解退熱, 疎肝解鬱하고, 梔子炒는 清熱, 瀉火, 涼血하며, 玄蔘은 滋陰清熱, 解毒滑腸 清熱하는데 柴胡가 諸藥들을 膽經으로 引經하여 膽熱을 내리고, 貝母는 清熱潤肺, 化痰止咳한다.

이에 저자는 加味腎氣湯, 加味理中湯, 加味清肺湯, 葛黃治哮散, 柴梗清肺湯, 取淵湯 등이 호흡기 질환에서 호발되는 咯痰의 생성 및 과다분비 조절에 대한 효능을 究明하기 위하여, 일차배양 햄스터 기관지표면 상피세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향을 살펴보고, 동

시에 이 방제들의 뮤신 분비에 대한 작용이 특이적인지, 그리고 뮤신의 분비뿐 아니라 생성에도 영향을 줄 가능성이 있는 지 등을 알아보고자 하였다.

서양 의학적으로 호흡기 뮤신의 분비를 증가시키는 것으로 알려진 물질로는 ATP, TNF- α 등의 인체의 염증 진행과정에서 확인되는 내인성 물질³¹ 및 phorbol ester, NH₄Cl, KI, bromhexine, ambroxole 등의 약물이 있으나, 뚜렷한 거담효과를 나타내면서도 임상에서 적절히 활용하기에는 다양한 제한점이 있는 것으로 알려져 있다¹²⁾.

실험결과 加味腎氣湯 및 加味理中湯은 호흡기 배상세포(goblet cell)에서의 뮤신 분비에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다(Fig. 1, Fig. 2). 이러한 결과는, 두 방제가 in vitro에서는 호흡기 상피세포에 대해 유의성 있는 직접적 작용을 나타내지 않음을 시사하는 결과인 것이다. 두 방제의 약물 구성으로 보아, 두 방제가 호흡기 상피세포 중 뮤신 분비세포인 배상세포에 대한 직접적인 작용을 나타낼 가능성보다는, 인체의 타 기관계, 즉 내분비계나 순환기계에 대한 작용을 통한 간접적인 호흡기계 작용 발현, 혹은 항염증 및 항산화 작용 등을 통한 호흡기계 염증 호전 등의 간접 기전을 경유할 가능성을 추정해 볼 수 있을 것이다. 그러나 잠정적인 결론은 알레르기 동물 모델 혹은 천식동물 모델 등을 이용한 동물실험을 통한 구체적 연구결과를 바탕으로 도출될 가능성이 높을 것으로 판단된다.

한의학 임상에서 호흡기 질환에 자주 사용되는 淸肺湯의 加味方인, 加味淸肺湯(CPT) 및 柴梗淸肺湯(SCPT)은 용량 의존적으로 뮤신 분비를 증가시켰다(Fig. 3, Fig. 5). 이러한 실험결과는 천식, 만성 기관지염, 기관지 확장증, 폐기종 등의 호흡기 질환 시 관찰되는 咯

痰 과다생성 및 분비 시, 과다 咯痰의 배출을 돕는 수단으로서의 淸肺湯 加味方의 한의학 적 응용 범주 및 임상적 증거들을 해석해 주는 결과라 할 수 있다. 이 방제는 鎮咳, 祛痰, 消腫, 排膿 효능을 발현할 가능성이 있는 다수의 약물들을 함유하고 있어서, 뮤신분비 증가 현상이 발현된 것으로 사료된다. 그러나 자세한 기전의 구명을 위해서는 방제 자체 혹은 방제를 구성하는 本草를 대상으로 한 추가 연구가 이루어져야 할 것으로 판단되며, 서양의학적인 시각에서 볼 때 淸肺湯의 加味方들은 효과적인 祛痰劑(expectorant)로 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

한편, 이 방제들에 의한 뮤신 분비 증가는 세포막 손상에 의한 세포 내용물의 외부 유출 결과일 가능성이 있다. 따라서 본 연구에서는 세포막 손상의 한 지표인 LDH 활성 측정을 통하여 연구에 사용된 물질들의 독성발현 가능성을 검증하고자 하였다. 세포막이 손상되면 세포는 그 완전성과 정상기능이 상실된다^{34,35)}. 그러므로 세포막 손상 시 분비되는 LDH의 활성 측정을 세포독성 유발여부 측정의 한 방법으로 채택할 수 있다. 加味淸肺湯은 최종 추출물 20~40 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도에서, LDH 분비를 50~80% 가량 증가시켰다(Fig.7). 柴梗淸肺湯의 경우에도, 최종 추출물 10~40 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도에서, LDH 분비를 100~150% 가량 증가시켰다(Fig. 9). 이러한 결과는, 淸肺湯의 加味方들이 배양된 호흡기 배상세포에 대해 세포막 손상을 일으킬 가능성을 시사하는 결과이다. 그러나 加味淸肺湯의 경우, 동일한 농도 범위에서 뮤신 분비의 증가정도는 800~900% 이상에 해당하는 것으로 보아, 뮤신 분비의 증가가 단순히 약물에 의한 비특이적인 세포막 손상의 결과로 인한 누출(leakage)에 기인한 것으로 단정하기는

어려울 것이라 판단된다. 따라서 세포독성 측정을 위해 사용되는 다양한 방법론을 적용, 추가적인 독성 연구를 시행함으로써 호흡기 질환 치료 효능을 극대화하면서도 방제의 안전성을 입증할 수 있는 과정이 가능해질 것으로 사료된다.

본 연구에 사용된 또 다른 처방인 葛黃治哮喘散(CHS)은, 호흡기 질환에 자주 사용되는 治哮喘散에 葛根 및 黃芩을 加味한 방제로서, 역시 뮤신 분비를 증가시키는 것으로 나타났다. 이 방제는 최종 추출물 20 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도에서, 뮤신 분비를 600% 가량 증가시켰다(Fig. 4). 이러한 실험결과는, 治哮喘散이 흉부 압박감 및 호흡곤란 등의 병리적 상황에서 사용되는 처방이라는 한의학적 지견 및 임상적 증거들을 지지하는 결과라 할 수 있다. 이 처방은, 葛根, 黃芩, 桔梗, 枳殼, 貝母, 杏仁 등 排膿消腫 및 鎮咳祛痰 효능을 발현할 가능성이 있는 本草를 함유하고 있어서, 유의성 있는 뮤신 분비 증가현상이 발현된 것으로 추정된다. 서양의학적인 시각에서 보면 葛黃治哮喘散은 완화된 祛痰劑(mild expectorant)로 응용될 수 있을 것으로 판단된다. 한편, 葛黃治哮喘散은 최종 추출물 20 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도에서, 세포독성의 한 지표인 LDH 분비를 100% 가량 증가시켰다(Fig.8). 이러한 결과는 葛黃治哮喘散이 배양된 호흡기 배상세포에 대해 세포막 손상을 일으킬 가능성을 시사하는 결과로 볼 수 있을 것이다. 그러나 동일한 농도에서 뮤신 분비의 증가 정도는 600% 이상에 해당하는 것으로 보아, 뮤신 분비의 증가가 전적으로 약물에 의한 비특이적인 세포막 손상의 결과로 인한 누출(leakage)에 기인한 것은 아닐 것으로 추정되며, 이 경우 역시 淸肺湯 加味方의 경우와 마찬가지로, 다양한 세포독성 측정 방법론을 적용하여 추가적인 독성 연구가

필요할 것으로 사료된다.

取淵湯은 방제의 구성 상, 한 첩당 當歸가 120g, 玄蔘이 40g씩 들어간 독특한 처방으로 임상에서 알레르기성 비염과 축농증 등의 치료를 위해 사용되는 처방이다. 실험 결과 取淵湯은 최종 추출물 120 μ l/200 μ l PBS의 투여농도에서, 뮤신 분비를 20% 가량 감소시켰다(Fig.6). 이러한 결과는 取淵湯이 *in vitro*에서 호흡기 상피세포에서의 뮤신의 분비를 미약하게나마 감소시킴으로서, 임상 적용 시 과도한 비강 분비물의 생성 혹은 분비를 감소시킬 가능성을 시사한다. 또한, 取淵湯은 투여농도 80~20 μ l/200 μ l PBS에서 세포독성의 한 지표인 LDH 분비를 100~200% 가량 증가시킴으로서 유의성 있는 세포독성을 발현하는 것으로 나타났다(Fig. 10). 그러나 取淵湯의 약물 구성으로 보아, 이 방제가 전적으로 호흡기 배상세포에 대한 직접적인 작용을 경유할 가능성보다는, 인체의 대사체계 혹은 타 기관계통에 대한 작용을 통하여 우회적으로 호흡기계 작용을 발현하거나, 항염증 작용을 통한 호흡기계 염증 호전 등의 기전을 경유할 가능성을 추정해 볼 수 있을 것이다. 따라서 *in vivo* 실험을 통한 구체적 연구결과를 바탕으로 생물학적 활성 및 독성에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 판단된다.

다음으로 뮤신분비를 증가시키는 것으로 나타난 세 방제인 加味淸肺湯, 葛黃治哮喘散 및 柴梗淸肺湯과 뮤신분비를 미약하게 억제하는 것으로 나타난 取淵湯이 거대 당단백질인 뮤신의 분비에만 특이적으로 영향을 미치는지, 혹은 뮤신보다 분자량이 작고 구조도 다른 여타의 방사능 표지 당단백질들의 분비에도 영향을 미치는지 여부를 검증하고, 각 방제의 뮤신 분비 증가 혹은 억제 작용에서의 특이성을 구명하고자 하였다.

Gel filtration chromatography에서는 resin에 loading되는 혼합물 중의 구성 성분들을 그 분자의 size 별로 분리한다. 따라서 특정 혼합물을 loading한 후 void volume으로부터 total volume까지, 즉 그 혼합물 중 가장 큰 크기의 물질부터, 가장 작은 크기의 물질까지 용출시켜, 그 각각의 분획들을 수거하여 물질을 정량할 수 있다. 일차배양된 HTSE세포에 ^3H -glucosamine을 이용, 배양세포가 생산하는 뮤신 및 glucosamine을 함유하는 여타의 당단백질에 방사능 표지한 후, 일정 기간 동안 세포를 배양하면, ^3H -표지 당단백질들이 배양액 중으로 유리된다²⁰⁾. 이때, 이 배양액을 sepharose CL-4B column에 loading 하면, ^3H -표지 당단백질 중 분자량 수백만 dalton에 해당하는 거대분자인 뮤신으로부터, 가장 크기가 작은 ^3H -glucosamine까지 용출되는 특정한 용출양상(elution profile)이 나타날 것이다. 만약, 대조 배양액의 전체 용출양상을 기준으로, 각 방제를 처리했을 때 전체 용출양상(total elution profile)의 특정부분에 변화가 생겼다면, 그 변화는 특정 크기의 ^3H -당단백질 분비량의 변화를 의미하는 것이다⁴⁷⁾. 실험결과(Fig. 11, 12, 13, 14)에서 볼 수 있듯이, 네 방제는 모두 뮤신과 같은 거대분자가 용출되는 fraction인 void volume fraction에서만 영향을 나타내고, 여타의 included volume 및 total volume에 해당하는 fraction에서는 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않았음을 알 수 있다. 이러한 실험 결과는, 네 방제가 뮤신과 같은 거대 당단백질의 분비에 주로 영향을 주며, 그보다 크기가 작고 구조도 다른 당단백질들의 분비에는 유의성 있는 영향을 미칠 가능성이 낮다는 점, 뮤신 분비에 대한 작용에서 특이성을 나타냄을 시사한다.

한편, 배양된 HTSE 세포에 각 방제를 30분

간 투여했을 때, 뮤신의 분비에 대한 영향은 검증되었으나, 각 방제가 단순히 이미 생성된 뮤신의 분비에만 영향을 주는지, 혹은 뮤신의 생성에도 영향을 주는지의 여부를 구명하기 위하여 뮤신의 유전자 중 호흡기 뮤신의 대표적인 유전자인 MUC5AC mRNA의 발현 정도에 각 방제가 미치는 영향을 검증하고자 하였다. 즉, 뮤신 분비를 증가시키는 방제 중 加味淸肺湯(淸肺湯類를 대표하여) 및 葛黃治哮喘散과, 뮤신 분비를 억제하는 取淵湯 등의 방제를 24시간 동안 투여했을 때 세포 내의 MUC5AC mRNA의 수준에 어떤 영향이 있는지를 검색하였다. 실험 결과에서 볼 수 있는바 (Fig.15), 세 방제를 24시간 동안 배양세포에 투여한 결과, 30분간 투여 시 뮤신 분비를 증가시키는 방제인 加味淸肺湯 및 葛黃治哮喘散은 24시간 투여 시 뮤신의 유전자인 MUC5AC mRNA의 발현 수준에 유의성 있는 영향을 나타내지 않았으나, 30분간 투여 시 뮤신 분비를 미약하게 억제하는 取淵湯은 24시간 투여 시 뮤신의 유전자인 MUC5AC mRNA의 발현 수준을 상당 수준에서 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 실험 결과는, 加味淸肺湯 및 葛黃治哮喘散은 주로 뮤신의 분비 현상에만 영향을 줄 가능성이 높으며, 取淵湯은 뮤신의 분비 현상에만 영향을 주는 것이 아니라 장기적으로 뮤신의 생성, 즉 분자 수준에서의 뮤신 합성단계에도 작용할 가능성을 시사하는 결과로 볼 수 있는 것이다.

종합하여 보면, 상기의 연구결과들은 加味淸肺湯, 葛黃治哮喘散, 柴梗淸肺湯 등의 특이적인 뮤신 분비 증가작용과 取淵湯에 의한 뮤신 분비 억제 및 뮤신 유전자 수준에서의 작용 가능성, 기타 berberine, uridine 등에 의한 뮤신 분비 증가작용을 이용하여, 새로운 호흡기 점액분비 조절약물의 개발 가능성을 제시하

고 있으며, 경험적으로 喀痰의 분비를 조절(촉진 혹은 감소)할 목적으로 사용되어 왔던 각 방제들이, 세포 수준에서 喀痰의 주요 구성 성분인 뮤신의 분비 및 유전자 수준에서의 뮤신 생성 조절에도 영향을 줄 가능성을 제시함으로써, 새로운 기전을 가진 호흡기 점액분비 조절 약물이거나 새로운 祛痰劑의 개발에 기여할 것으로 사료된다.

에도 영향을 미칠 가능성이 있다.

상기의 연구 결과들은, 각 방제 구성 약물들의 개별적 약리작용에 대한 후속연구의 필요성을 제시하고 있으며, 비록 제한적이기는 하나, 네 방제의 뮤신 분비 작용을 이용하여, 새로운 호흡기 점액분비 조절약물의 개발 가능성을 제시하고 있다.

V. 결 론

加味腎氣湯, 加味理中湯, 加味淸肺湯, 葛黃治哮喘散, 柴梗淸肺湯, 取淵湯 등이 호흡기 질환에서 호발되는 喀痰의 생성 및 과다분비 조절에 대한 효능을 구명하기 위하여, 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향을 살펴보고, 동시에 이 방제들의 뮤신 분비에 대한 작용이 특이적인지, 그리고 뮤신의 분비 뿐 아니라 생성에도 영향을 줄 가능성에 대하여 알아본 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味淸肺湯, 葛黃治哮喘散, 柴梗淸肺湯은 용량의존적으로 뮤신 분비를 증가시키나, 取淵湯은 뮤신 분비를 미약하게 억제하였다.
2. 加味淸肺湯, 葛黃治哮喘散, 柴梗淸肺湯, 取淵湯은 LDH의 분비를 증가시켰다.
3. 加味淸肺湯, 葛黃治哮喘散, 柴梗淸肺湯, 取淵湯은 호흡기 배상세포에서 분비될 수 있는 물질 중 주로 뮤신의 분비에 특이적으로 영향을 주었다.
4. 取淵湯은 뮤신의 분비뿐만 아니라 생성

참고 문헌

1. 김덕곤, 김윤희, 김장현, 박은정, 백정한, 이승연, 이진용, 장규태. 東醫小兒科學. 서울: 정담출판사. 2002:28-30,244-93.
2. 江育仁, 張奇文. 實用中醫兒科學. 上海: 上海科學技術出版社. 1995:455-61.
3. 김완희. 한의학원론. 서울:성보사부설한의학연구원. 2003:129-32,165-8,352-8.
4. 이충재. 설치류 기관 뮤신유리 억제에서의 폴리양이온성 작용기전. 서울:서울대학교대학원. 1997:4.
5. Newhouse, M.T. and Biennenstock, J.. Respiratory tract defense mechanism, In, textbook of pulmonary disease (Baum, G.L. and Wolinsky, E.(eds)), 3rd ed. Boston/Toronto: Little Brown and Company. 1983:3.
6. 서울대학교 의과대학편. 호흡기학. 서울: 서울대학교출판부. 1997:43-53.
7. Frigas, E., Loegering, D.A., Solley, G.O., Farrow, G.M. and Gleich, G.J.Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the

- sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin. Proc.* 1981;56(6): 345-53.
8. 김윤희. 取淵湯 및 治哮散加味方이 기도점액분비 및 기관평활근 긴장도에 미치는 영향. 대전:대전대학교대학원. 2005: 1-26.
 9. 차창룡. 호흡기의 숙주방어기전. 서울 : 서울대학교출판부. 1997:47-8.
 10. 심영수. 호흡기의 해부학적 구조. 서울 : 일조각. 1990:6-8.
 11. Rubin BK. Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care.* 2002; 47(7):761-8.
 12. Mutschler, E. and Derendorf, H. Drug actions. Florida : CRC press, Inc., Boca Raton. 1995:410-1.
 13. Merk Research Laboratories. 머크매뉴얼 제17판. 서울 : 도서출판한우리. 2001: 555-708.
 14. 朴炳昆. 漢方臨床 40年. 서울 : 大光文化社. 1993:586.
 15. 金永勳. 晴崗醫鑑. 서울 : 成輔社. 1995: 101-2,130-1,448.
 16. 陳士錄. 辨證奇聞. 서울 : 의성당. 1989: 220-2.
 17. Lee, C.J.. Specificity in the inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *J. Appl. Pharmacol.* 2001;9(3):218-23.
 18. Ko, K.H., Lee, C.J., Shin, C.Y. Jo, M.-J. and Kim, K.C.. Inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Am. J. Physiol.* 1999;277(21):811-815.
 19. Kim, K.C.. Possible requirement of collagen gel substratum for production of mucinlike glycoproteins by primary rabbit tracheal epithelial cells in culture. *In Vitro.* 1985;21 (11):617-21.
 20. Kim, K.C., Rearick, J.I., Nettesheim, P., and Jetten, A.M.. Biochemical characterization of mucous glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial cells in primary culture. *J. Biol. Chem.* 1985;260(7):4021-7.
 21. Kim, K.C., Brody, J.S.. Gel contraction causes mucin release in primary hamster tracheal epithelial cells growing on a collagen gel. *J. Cell. Biol.* 1987;105,158a.
 22. Wu, R. and Smith, D.. Continuous multiplication of rabbit tracheal epithelial cells in a defined, hormone-supplemented medium. *In Vitro* 1982; 18(9):800-81.
 23. Wu, R., Nolan, E. and Turner, C.. Expression of tracheal differentiated function in serum-free hormone-supplemented medium. *J. Cell Physiol.* 1985;125(2):167-81.
 24. Karlinsky, J., Stamatoyannopoulos, G., Enver, T. Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells. *Anal. Biochem.* 1989;180(2):303-6.
 25. 홍창의. 소아과학. 서울 : 대한교과서주식회사. 1997:480-517.
 26. 강미선, 김장현. 소아만성 재발성 호흡기 증상에 대한 고찰. 대한한방 소아과학회

- 지. 2002;16(2):84.
27. Gleich, G.J. The eosinophil and bronchial asthma. Current understanding. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1990;85(2): 422-36.
28. 上海中醫學院. 中醫內科學. 香港: 商務印書館. 1982:24-5.
29. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 法人文化社. 1999:277,280-1,1235-6.
30. 李珩九. 동의폐계내과학. 서울: 민서출판사. 1989:7-12,56-123.
31. 한달수. 加味腎氣湯 및 加味淸肺湯이 기도점액분비 및 기관평활근 긴장도에 미치는 영향. 대전: 대전대학교대학원. 2005:1-25.
32. 전국 한의과대학 본초학교수 공편. 본초학. 서울: 영림사. 1991:133-7,192,302-4, 334-5,347-9,351-2,448-9,458,460-1,463-4,478-85,540-1,581-2,622-3.
33. 李尙仁. 본초학. 서울: 학림사 1986:56, 61,63,121,172,197,281,303,338,348,350,352, 354,495,505,520,536.
34. Freshny. Measurement of viability and cytotoxicity. In, Culture of animal cells. 3rd. Wiley-Liss, Inc. 1994:298.
35. Yu, X.-Y., Schofield, B.H., Croxton, T., Takahashi, N., Gabrielson, E.W. and Spannhake, E.W. Physiologic modulation of bronchial epithelial cell barrier function by polycationic exposure. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994;11:188-98.