

오과다가 쥐의 폐섬유화 모델의 치료에 미치는 영향

이해자

원광대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

The Effects of Okwada on the Lung Fibrosis Mouse Model

Lee Hai Ja

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objectives

To evaluate that Okwada affected which factors for treatment of lung fibrosis.

Methods

Bleomycin induced lung fibrosis model made in mice. After Okwada lyophilized, power sample obtained and melt in distilled water. Okwada solution administered mice through oral route on 21 days after bleomycin instillation and this procedure performed once a day for 7 days. We divided by three groups; normal (control), bleomycin induced lung fibrosis without treatment (experimental), bleomycin induced lung fibrosis with treatment (treatment). On six weeks after bleomycin instillation, mice sacrificed and removed lung. We performed Western blot analysis for TGF-beta, phosphodiesterase 5A, interleukin (4,5,13) and compared therapeutic effects of Okwada.

Results

On western blot analysis, all normal and experimental mice detected TGF-beta, phosphodiesterase 5A, interleukin 4,5,13. The amount of band of TGF-beta, phosphodiesterase 5A, interleukin 5 in experimental and treatment group was similar. However, interleukin 4,13 of treatment group decreased compared with experimental group.

Conclusions

Okwada would be effected the lung fibrosis through suppression of interleukin 4,13.

Key words : Okwada, fibrosis

I. 緒 論

五果茶는 호두, 은행, 대조, 생밤(껍질포함), 생강으로 구성되어 老人氣虛 外感咳嗽를 치료 하는데 사용되어온 처방이다¹⁾. 최근 알레르기 환자들이 늘어나고 소아 천식 및 기침 환자가 많아지면서 면역을 강화시키는 효능 및 기관지를 보호해주는 효과가 있다하여 천식 환자에게 민간요법에서 건강차로 많이 활용되고 있다²⁾.

특발성 폐섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis)의 원인은 정확히 알 수 없으며 서서히 폐 섬유화가 진행되고, 환자의 폐 기능을 감소시켜 사망에 이르게 하는 예후가 매우 불량한 질환으로 알려져 있다³⁾. 병인이 밝혀져 있지 않고 유병률도 낮고, 환자의 생존 기간은 매우 짧아서 병태생리를 연구하거나 치료법을 개발하는 것이 매우 어렵다^{3,4)}. 또한 아직까지도 효과적인 치료제가 확립되지 않아 새로운 치료 방법의 개발이 절실히 요구되는 상황이다. 질환을 연구하기 위해서는 그 병태 생리적 특징을 잘 나타내는 동물 모델이 필요하다. 림프종에 대한 치료제로 사용되는 블레오마이신의 부작용 중 하나는 폐 조직의 섬유화로⁵⁾ 이를 이용하여 모델을 만든다. 그 이유는 약제를 구하기 쉽고 비교적 어렵지 않게 모델을 만들 수 있으며, 재현성도 높은 편이어서 좋은 동물 모델로서의 조건을 가지고 있기 때문이다⁴⁾. 오과다는 호두, 은행, 대추, 밤, 생강 등 일상생활에서 음식으로도 활용되고 있고 흔히 구할 수 있는 재료로 만성 기침에 효과가 있는 것으로 알려져 있지만 호흡기의 만성 질환인 폐 섬유화에 대한 효과는 알려져 있지 않다^{1,2)}. 폐 섬유화를 일으키는 데 관여하는 것으로 알려져 있는 인자로는 방사선, 블레오마이신, 티지에프-베타(TGF-beta)나 인터루킨(Interleukin) 등이 알려져

있다^{3,4,6)}. 이런 인자는 폐 실질이 손상되었을 때 염증과정, 응고과정, 단백질 분해 과정, 중간매개체로서 역할을 함으로써 폐 섬유화를 일으키는 것으로 알려져 있다.

최근 폐섬유화에 대한 前胡를 이용한 연구 등⁷⁾ 단미를 통한 연구는 진행되고 있지만 처방 및 복합제에 대한 연구는 없어 노인 氣虛 外感咳嗽에 사용되는 오과다에 배를 첨가하여 폐 섬유화 과정 중 발현되는 인자 중 TGF-beta, 포스포디에스테라아제(phosphodiesterase 5A), interleukin을 대상으로 어떤 기전을 통해 치료에 영향을 줄 수 있는 지에 대해서 알아보고자 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 쥐 모델의 준비와 처치

병원체 감염이 되지 않은 20~25 g의 수컷 C57BL/6 쥐(Daejeon, Korea)를 이용하여 전북대학교 동물실험윤리위원회에 승인을 받아 연구를 시행하였다. 쥐는 티오펜탈소듐(thiopental sodium, 0.08 mL/kg of body weight)을 복강 내에 주입하여 마취한 후 기관 삽관을 시행하였다. 대조군의 경우에는 생리식염수 30 μ L를 기도 내로 주입하였고, 실험군에는 10 mg/kg의 bleomycin hydrochloride (Nippon Kayaku Co., Tokyo, Japan)을 30 μ L의 생리식염수에 섞어 기도 내로 주입하였다. 블레오마이신을 투여한 후 6주 후에 쥐를 희생시켜 웨스턴 블롯을 시행하였다⁸⁾ (Fig. 1)

2. 오과다 정제 방법과 투여 방법

오과다는 원광대학교 익산 한방 병원(Iksan, Chonbuk, Korea)에서 구입하였다 (Table 1). 2405g에 3차 증류수 1.8L을 환저플라스크에 넣고,

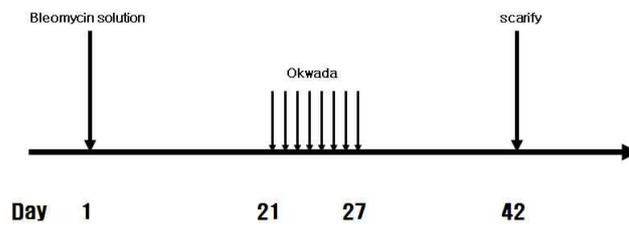


Fig 1. Schematic diagram of the experimental protocol. On days 1, mice were sensitized by intratracheal injection of bleomycin solution. Okwada was given 7 times at 24 hr intervals on days 21–23.

Table1. Dosage of Okwada Radix

Herb Name	Scientific Name	Capacity(g)
호두	SEMEN JUGLANDIS	50
견을	CASTANEA CRENATA	40
대조	FRUCTUS ZIZIPHI JUJUBAE	25
생강	RHIZOMA ZINGIBERIS RECENS	25
백과	SEMEN GINKGO	15
배	PYRES PYRIFOLIA	2250
Total		2405

냉각기를 부착하여 2시간 전열기로 증탕한 후 3,000rpm에서 20분간 분리하고 진공압축기로 감압 농축한 후 동결건조기에서 24시간동안 동결 건조하여 20g의 분말시료를 얻었다. 오과다 분말을 (200 mg/kg body weight/day) 증류수에 녹인 후 처음 블레오마이신을 투여한 날부터 21일째 처음 경구 투여 하였다. 21일째부터 1일 간격으로 7 차례에 걸쳐 경구 투여하였다.

3. 웨스턴 블롯 분석

떼어 낸 쥐의 폐는 폐 용량에 8배 정도의 완충액(1.3 M sucrose, 1.0 mM MgCl₂, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.2)에 넣어서 균질 하게 되도록 했다. 균질화 된 폐는 네 겹의 거즈를 이용해서 여과시킨 후 1000 × g로 15분 동안 원심 분리 하였다. 원심 분리를 한 후 생긴 침전물은 2.4 M sucrose (1.0 mM MgCl₂, 10 mM potassium phosphate buffer, pH

7.2)를 이용하여 다시 뜨게 한 후 100,000 × g로 한 시간 동안 원심 분리 하여 최종적으로 2.2 M 수크로우스 농축액을 만들었다. 이렇게 생성된 핵 침전액을 0.25 M sucrose (0.5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 7.2)로 한 번 씻어 낸 후 1000 × g로 10분 동안 원심 분리하였다. 원심 분리 후 생긴 침전물을 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.3 M sucrose, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20% glycerol, 2% Triton X-100, 2 mM PMSF, protein inhibitor cocktails이 포함되어 있는 용액으로 용해시켰다. 이렇게 해서 만들어진 혼합물을 2시간 동안 얼린 후 다시 12,000 × g로 30분 동안 원심 분리 하였다. 웨스턴 블롯 분석을 위해서 생성된 현탁액 (30mg of protein per lane)- TGF-beta, phosphodiesterase 5A, interleukin 4,5,13 (Santa Cruz Biotechnology)를 검출하기 위해서 핵단백질을 용해하는 데 사용- 10% SDS-PAGE 젤에 놓았다.

분해된 단백질을 90분 동안 120V로 전기영동을 한 후 wet transfer 방법에 의해 polyvinylidene difluoride membranes (Amersham Pharmacia Biotech)로 이동하였다. 비 특이적인 위치가 TBST buffer (25 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)내에서 5% non-fat dry milk와 같이 1시간 동안 차단되었다. 그리고 나서 점들을 TGF-beta, phosphodiesterase 5A, interleukin(4,5,13)의 항체와 약 4°C에서 하루 동안 배양하였다. Anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated IgG를 항체와 결합 유무를 알기 위해서 사용하였다.

특이 항체와의 결합은 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용하였으며 Albumin standard(BSA)는 one albumin standard(BSA) ampule을 희석하여 사용하였다. 5ul 씩 3번 시행할 수 있는 양을 만들기 위해서 샘플을 1/10으로 희석한 후 96well testplate에 5ul 씩 놓고, PIERCE 23200, Coomassie(Bradford) protein assay kit에 250ul을 넣은 후 30초 동안 흔들고 실내에 10분 동안 놓아두었다. 컴퓨터를 작동시킨 후 softmax program에서 595nm으로 읽었다. 베타-액틴을 기준으로 각 그룹에서 나타나는 띠의 모양을 비교해 봄으로써 오판다가 폐 섬유화에 미치는 영향을 평가하였다.

III. 結 果

웨스턴 브롯 분석상 정상 쥐 그룹에서는 TGF-beta, phosphodiesterase 5A, interleukin 4,5, 13이 검출되었다. 또한, 블레오마이신을 투여한 뒤 6주 후에 희생을 시킨 쥐 그룹에서는 모두 검출되었다.

TGF-beta의 경우 정상 쥐 그룹과 블레오마이신을 투여한 후 6주 쥐를 비교할 때 정상보다 블레오마이신을 투여한 경우에 더 많은 양이 검출되어 폐 섬유화가 유발됨을 알 수 있었다. 그러나 오판다를 투여한 쥐와 정상, 오판다를 투여하지 않은 쥐를 비교했을 때 검출된 TGF-beta의 양이 정상보다 증가되고, 오판다를 투여하지 않은 경우와 비슷한 정도로 검출되었다. 즉 폐 섬유화를 치료하는 데 오판다와 TGF-beta는 연관이 없음을 예측 할 수 있다 (Fig 2).

phosphodiesterase 5A의 경우도 정상 쥐 그룹과 블레오마이신을 투여한 후 6주 쥐를 비교할 때 정상보다 블레오마이신을 투여한 경우에 약간 많은 양이 검출되어 폐 섬유화가 유발됨을 알 수 있었다. 그러나 오판다를 투여한 쥐와 정상, 오판다를 투여하지 않은 쥐를 비교했을 때 검출된 phosphodiesterase 5A의 양이 정상보다 약간 증가되고, 오판다를 투여하지 않은 경우와 같은 양이 검출되었다. 즉 폐 섬유

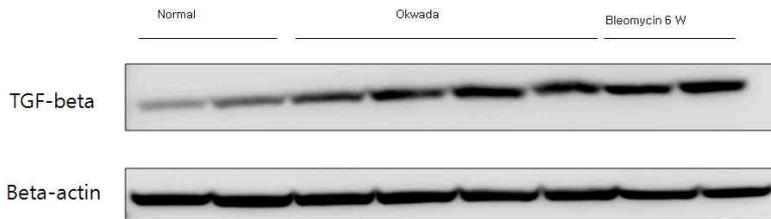


Fig 2. Western blot analysis. Effect of Okwada on TGF-beta protein expression in lung tissues of normal, treatment of Okwada, six weeks after bleomycin instillation.

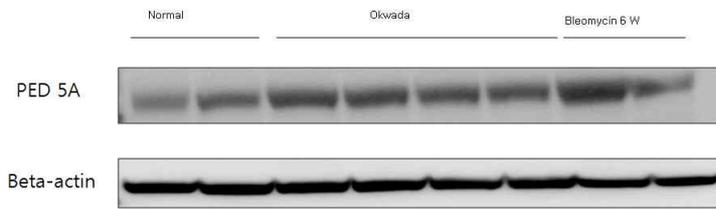


Fig 3. Western blot analysis. Effect of Okwada on phosphodiesterase 5A protein expression in lung tissues of normal, treatment of Okwada, six weeks after bleomycin instillation.

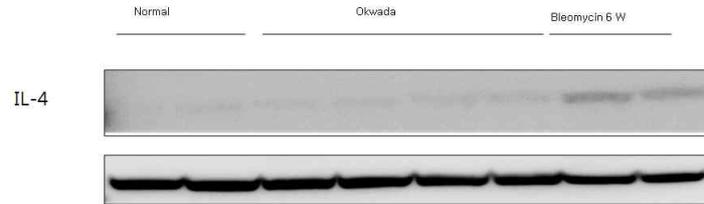


Fig 4. Western blot analysis. Effect of Okwada on interleukin 4 protein expression in lung tissues of normal, treatment of Okwada, six weeks after bleomycin instillation.

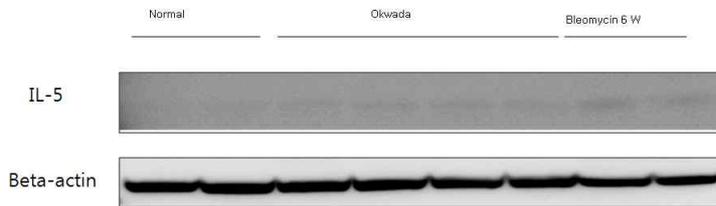


Fig 5. Western blot analysis. Effect of Okwada on interleukin 5 protein expression in lung tissues of normal, treatment of Okwada, six weeks after bleomycin instillation.

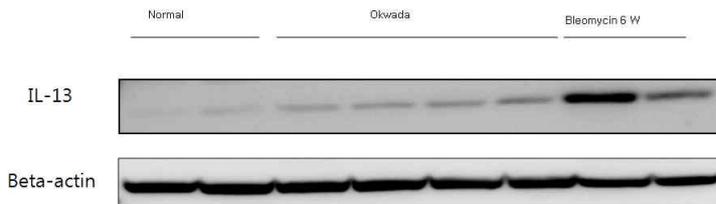


Fig 6. Western blot analysis. Effect of Okwada on interleukin 13 protein expression in lung tissues of normal, treatment of Okwada, six weeks after bleomycin instillation.

화를 치료하는 데 오과다와 phosphodiesterase 5A는 연관이 없음을 예측 할 수 있다 (Fig 3). interleukin 4의 경우에는 정상 쥐 그룹과 블레오마이신을 투여한 후 6주 쥐를 비교할 때

정상보다 블레오마이신을 투여한 경우에 많은 양이 검출되어 폐 섬유화가 유발됨을 알 수 있었다. 또한 오과다를 투여한 쥐와 정상, 오과다를 투여하지 않은 쥐를 비교했을 때 검출된

interleukin 4의 양이 정상과 비슷하고, 오파다를 투여하지 않은 경우와 비교했을 때 interleukin 4의 양이 현저하게 감소되었다. 따라서 오파다가 interleukin 4의 양을 감소시킴으로써 폐 섬유화를 치료할 수 있음을 예측 할 수 있다 (Fig 4).

interleukin 5의 경우 정상 쥐 그룹과 블레오마이신을 투여한 후 6주 쥐를 비교할 때 정상보다 블레오마이신을 투여한 경우에 약간 많은 양이 검출되어 폐 섬유화가 유발됨을 알 수 있었다. 그러나 오파다를 투여한 쥐와 정상, 오파다를 투여하지 않은 쥐를 비교했을 때 검출된 interleukin 5의 양이 정상과 비슷하고, 오파다를 투여하지 않은 경우와 같은 양이 검출되어서 오파다가 역시 interleukin 5의 양을 감소시키지 않음을 알 수 있다. 즉 폐 섬유화 치료하는 데 오파다와 interleukin 5는 연관이 없음을 예측 할 수 있다 (Fig 5).

interleukin 13의 경우에 정상 쥐 그룹과 블레오마이신을 투여한 후 6주 쥐를 비교할 때 정상보다 블레오마이신을 투여한 경우에 많은 양이 검출되어 폐 섬유화가 유발됨을 알 수 있었다. 또한 오파다를 투여한 쥐와 정상, 오파다를 투여하지 않은 쥐를 비교했을 때 검출된 interleukin 13의 양이 정상보다는 증가되었지만 오파다를 투여하지 않은 경우와 비교했을 때 interleukin 13의 양이 현저하게 감소되었다. 따라서 오파다가 interleukin 13의 양을 감소시킴으로써 폐 섬유화 치료에 효과가 있음을 예측 할 수 있다 (Fig 6).

IV. 考 察

黃帝內經 靈樞 五味편에 오파란 棗, 李, 栗, 杏, 桃,의 다섯 가지 과일로 각각 甘, 酸, 鹹, 苦, 辛의五味를 가지고 있다 하여 과일 중에 다섯

가지를 오행의 성질에 배속시켜 설명하면서 五果가 기록되어 있다⁹⁾. 내경의 오파는 다르게 조선후기에 만들어진 방약합편 중통 52편에는 濟中新編을 출전으로 인용하면서 호두, 밤, 은행, 생강, 대조로 구성된 오파다를 기재하여 노인성 기침 및 감기로 인한 기침을 치료하는 한약제로 기록이 되면서 현재까지 널리 사용되고 있다¹⁻²⁾.

본 실험에서는 방약합편 오파다의 구성인 호두, 밤, 은행, 생강, 대조에 방약합편 중통 51편 風寒에 상하여 咳嗽 痰盛한 것을 치료하는 梨礮膏¹⁾ 주재료인 배를 더하여 사용하였다.

방약합편에서는 호두 10개, 은행 15개, 대추 7개, 밤 7개, 생강 1덩어리로 기술되어 정확한 양을 측정할 수 없어서 본 실험에서는 위 기술된 개수를 평균 무게로 환산하여 사용하고 배는 650g-700g 정도 크기의 배를 구입하여 후 아이들이 쉽게 음용하도록 하기 위해서 당도를 조절하여 3.5개를 사용하였고 재료는 모두 국산을 사용하였다(Table 1).

오파다의 주 재료로 사용되는 胡桃는 虛寒 喘嗽, 養血등에 사용되는데 潤腸을 목적으로 할 때는 內皮를 제거하고, 斂澀을 목적으로 할 때는 內皮째 사용하는데 본 처방에서는 斂肺 定喘을 목적으로 사용하여 內皮를 함께 사용하였다¹⁰⁾ 밤은 溫鹹하여, 補氣하고, 神氣를 補한다. 外氣 즉 感氣의 기운이 없으면 생밤 대신 마른 밤을 넣으라고 하여 본 처방에서는 마른 밤을 사용하였다¹¹⁾. 대조는 補脾和胃·養血安神·緩和藥性 등의 효능이 있어 脾虛少食, 脾弱便溏, 氣血津液不足, 血行不和, 營衛不和, 心悸怔忡, 婦人臟躁 등의 병증을 치료하므로 대부분의 방제에 포함된다. 發表劑 중에 사용할 때는 항상 生薑과 병용하는데, 이는 辛甘의 맛을 이용하여 外邪를 發散시키고 營衛를 조화시키기 위함이고, 본 처방에서도 생강과 함

게 사용되었다. 생강은 溫肺止咳 작용이 있으므로 風寒, 客肺, 咳嗽痰多의 병증을 다스리기도 하며 要熱에는 去皮하고 要冷에는 留皮하므로 오과다에서는 껍질째 사용하였다. 백과는 은행열매로 定痰喘, 收斂止帶의 효능이 있어 哮喘痰咳, 肺熱痰喘, 肺虛咳喘의 병증을 치료하는데 사용되나 유독하여 생식하거나 다량 복용하는 것은 중독의 우려가 있어 사용 시 주의가 요하는 약제다¹⁰. 배(梨)는 心肺의 客熱로 변열이 나거나 가슴이 답답하고 기침하며 숨찬 것을 없애고, 갈증을 멈춘다¹¹.

폐 섬유화증은 한의학에서 短氣, 咳嗽, 喘症, 肺痿등에 해당하는 것으로, 先天不足, 稟賦薄弱, 正氣虛衰한 상태에서 外邪가 코나 입 또는 기표로부터 폐를 침범하여 만성화되면 진액이 소모되어 유발되는 것으로 오래되면 益氣養陰, 清熱祛痰등의 치법으로 치료한다⁷. 이번 연구에서는 주변에서 음식으로 쉽게 접할 수 있고 만성기침 치료제 및 건강차로 소개되어 일상생활에서 널리 활용되는 오과다가 실제 만성 호흡기 질환을 치료하는 효과가 있다는 것을 실험을 통해 기전을 밝힌 것이 의미가 있다고 사료된다.

이 연구에서 블레오마이신에 의해 폐 섬유화가 된 경우 폐 섬유화에 관련이 있는 것으로 알려져 있는 TGF-beta, phosphodiesterase 5A, interleukin 4,5,13이 모두 발현되었지만, 이 중 오과다의 경우 interleukin 4와 13에만 영향을 줄 수 있었으며, 이런 경로를 통해서 폐 섬유화의 과정 중 염증 반응을 감소시킴으로써 폐 섬유화의 치료에 도움을 줄 것으로 예상할 수 있다. 이미 알려져 있는 것처럼 interleukin 4와 TGF-beta는 fibroblast를 자극해서 콜라겐의 합성을 증가시킴으로써 폐 섬유화를 일으키는 것으로 되어 있으며, interleukin 13은 대식세포나 단세포에서 생산되는 염증 사이토카인의

생산을 억제하는 것으로 알려져 있지만 폐 섬유화에서도 증가되는 것으로 알려져 있다. 오과다의 경우 interleukin 4의 생산을 억제함으로써 폐내에 콜라겐의 형성을 억제함으로써 폐 섬유화를 억제할 수 있으며, 또한 interleukin 13의 생산을 억제함으로써 폐 염증 과정을 억제하고 이로 인한 폐 섬유화의 발생도 억제할 것으로 생각된다^{12,13}.

이 실험의 제한점으로는 오과다를 투여한 후 기관지 세척을 통해서 다양한 세포의 변화를 측정하지 못했고, 또한 블레오마이신을 투여한 후 발생한 폐 섬유화 과정이나 오과다를 투여한 후 폐 섬유화가 얼마나 억제 또는 치료되었는지를 조직학적으로 밝히지 못했다는 것이며, 향후 이런 실험이 필요할 것으로 생각된다.

V. 結 論

오과다는 폐 섬유화의 염증을 일으키는 다양한 인자 중 interleukin 4,13을 억제함으로써 폐 섬유화를 억제할 수 있음을 알 수 있으며, 이런 기전을 이용해서 향후 오과다가 알레르기 질환에 발현되는 인자 중 어떤 인자를 억제할 수 있는지를 밝힌다면 소아 알레르기 환자에게 사용할 수 있는 근거를 마련할 수도 있을 것으로 생각된다.

※ 감사의 말씀

이 연구는 2007년 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었습니다.

參考文獻

1. 황도연.방약합편. 서울. 여강출판사. 1993; 197-8
2. 한동하. 알레르기 이별여행. 서울. 지성사. 2006;190-191
3. Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med 2001; 345:517-25.
4. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? Int J Biochem Cell Biol 2008;40:362-82.
5. Ritman EL. Micro-computed tomography-current status and developments. Annu Rev Biomed Eng 2004;6:185-208.
6. Chua F, Gauldie J, Laurent GJ. Pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 2005;33: 9-13.
7. 김현지, 이해자, 박은정. 전호가 Bleomycin 에 의한 폐섬유화에 미치는 영향. 대한한방 소아과학회지. 2008;22(2):37-49
8. 이재아, 진공용, 복세미 등. Bleomycin 유도 폐 섬유화 모델에서 미세 전산화 단층 촬영의 유용성. Tuberculosis and Respiratory Diseases 2009;5(67):00-00, In press
9. 양유걸. 내경영추역해. 서울. 대성문화사. 1990;403-4
10. 신민교. 임상본초학. 서울. 영림사. 2002; 176,233,770.
11. 조정준. 급유방. 서울. 여강출판사. 1993; 393-4.
12. Büttner C, Skupin A, Reimann T. Local Production of Interleukin-4 During Radiation-induced Pneumonitis and Pulmonary Fibrosis in Rats: Macrophages as a Prominent Source of Interleukin-4. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1997;17:315 - 325.
13. Hancock A, Armstrong L, Gama R. Production of Interleukin 13 by Alveolar Macrophages from Normal and Fibrotic Lung. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1998; 18:60 - 65.