

柴梗半夏湯이 LPS로 유발된 급성 폐손상에 대한 영향

김기태 · 고 흥*

세명대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of Shigyungbanha-Tang on the Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice

Ki Tae Kim, Heung Ko*

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Semyung University

This study was performed to investigate the effects of Shigyungbanha-tang(SGT) on the lipopolysaccharide(LPS) induced acute lung injury(ALI) in mice. 1 and 24 h before LPS intratracheal instillation, control group was taken distilled water orally. Treated groups was taken each concentrate SGT(2.5 g/kg, 6.7 g/kg) by orally as same times. Normal group was not instilled with LPS and was taken distilled water. 24 h after LPS intratracheal instillation, lung histology was performed in inflated-fixed lungs in 3 mice of each groups. The other mice of each groups, bronchoalveolar laverage fluids(BALF) was obtained to measure proinflammatory cytokines(TNF- α , IL-1 β , IL-6) and blood sample was obtained to measure white blood cell(WBC). In vitro, the effect of SGT(100 ug/ml, 500 ug/ml, 1000 ug/ml) on the release of RANTES, TARC induced by TNF- α and IL-4 in human aveolar epithelial cell(A549) was examined. Histopathologically, SGT prevented LPS-induced lung injury. SGT decreased protein, TNF- α , IL-1 β and IL-6 according to concentrations. In vitro, 500 ug/ml, 1000 ug/ml concentrate SGT suppressed the expression of RANTES and TARC on A549 cells. On the basis of these results, SGT had a markedly anti-inflammatory effect in a clinically relevant model of ALI. Nevertheless, further investigations are required to determine the potential clinical usefulness of SGT in the adjunctive therapy of ALI.

Key words : Shigyungbanha-tang, lipopolysaccharide, TNF- α , IL-1 β , IL-6, RANTES, TARC, ALI

서론

급성호흡부전증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS)은 급성적인 폐의 염증으로 폐포와 모세혈관이 손상되면서 투과성이 증가되어 폐부종이 유발되고 기계적인 환기가 방해되면서 심각한 가스교환 장애가 발생하는 임상 증후군이다. 폐렴, 위 내용물의 흡인, 독성물질의 흡입손상, 패혈증, 심한 외상, 약물 과량투여, 췌장염 등 다양한 내과 및 외과질환으로 인한 미만성 폐손상으로 유발될 수 있고, 이 중 패혈증 증후군과 세균성 폐렴은 급성호흡부전증후군의 중요한 원인이다^{1,2)}. 과거 1980년대 급성호흡곤란증후군에 의한 사망률은 53-68%에 이르렀으나 최근의 보고는 32-45%로 정도로 감소하는 추세이다. 그렇지만 아직 급성호흡곤란증후군에 특이적이고 효과적인 치료법에 대한

개발은 쉽게 이루어지고 있지 않은 실정이며, 최근 사망률이 감소한 이유는 감염관리, 영양요법 등 보존적 치료법이 발전했기 때문인 것으로 보고 있다^{3,4)}.

급성호흡부전증후군의 실험적 병태모델로는 그람 음성균의 세포벽 구성성분인 lipopolysaccharide(LPS)를 기관지내에 투여하는 방식이 주로 이용된다^{5,6)}. LPS는 LPS결합단백질에 결합하여 대식세포를 자극하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, 백혈구 화학주성인자, 성장인자, 유착분자 등을 분비하게 하고, 호중구가 혈류를 통하여 혈관 내피세포로부터 폐포 상피세포를 지나 폐포강 내로 이동하게 한다. 이때 발생하는 호중구의 침윤현상은 급성폐손상을 나타내는 중요한 특징이다^{7,8)}.

柴梗半夏湯은 寒熱往來, 發熱痰盛, 咳嗽, 胸脇脹痛, 肺熱, 胸膈痞悶 등의 病症에 적용되고, 이에 근거하여 임상적으로 발열, 객담, 기침, 흉협통, 호흡곤란 등을 나타내는 급성기관지염, 폐렴, 흉막삼출증 등에 사용되어진다⁹⁾. 실험적 연구로, 폐부종 병태모델에서 柴梗半夏湯이 폐부종을 감소시키고 환기장애편을 개

* 교신저자 : 고 흥, 충북 제천시 신월동 세명대학교 한의과대학 내과학교실

· E-mail : yurie99@hanmail.net, · Tel : 043-649-1813

· 접수 : 2009/11/02 · 수정 : 2009/11/23 · 채택 : 2009/11/30

선하는 효과가 있는 것으로 보고되었고¹⁰⁾, 최근에는 생쥐의 복강에서 채취한 대식세포에 대하여 柴梗半夏湯이 NF-κB 활성을 억제하고 염증관련 cytokine과 NO의 생성억제를 유도한다는 보고가 있었다¹¹⁾.

본 연구에서는 柴梗半夏湯이 급성폐손상에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 내독소로 그람 음성균의 LPS를 이용하여 급성폐손상을 유발시킨 생쥐에서, 기관지폐포세척액을 검출하여 단백질 누출정도를 관찰하고 염증관련인자인 TNF-α, IL-1β, IL-6를 측정하여 급성 염증변화에 대한 억제효과를 관찰하였다. 또한 In vitro 실험으로 폐포상피세포주(A549)를 이용하여 TNF-α 및 IL-4를 투여하여 RANTES, TARC의 분비를 유도하고, 이러한 chemokine 분비에 미치는 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물 및 재료

1) 동물

본 실험에 사용된 실험용 생쥐는 체중 28-33 g의 BALB/c 생쥐(샘타코, 한국) 6주령 된 수컷을 사용하였으며, 실험 당일까지 고형사료(제일제당, 한국)를 자유식이 하면서 물을 충분히 공급하였다. 실온 22 ± 2℃, 상대습도 50 ± 10%, 조명시간 12시간(07:00-19:00)으로 설정하고 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약재

柴梗半夏湯의 구성은 《東醫肺系內科學》⁹⁾을 근거로 하였고, 세명대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Tabel 1).

Table 1. The Composition of Shigyungbanha-Tang

Scientific name	Herbs	Dose amount(g)
Bupleurum falcatum L.	Bupleuri Radix(柴胡)	8
Trichosanthes kirilowii MAXIM.	Trichosanthis Semen(瓜蒌仁)	4
Pinellia ternata(THUNB.)BREIT.	Pinelliae Rhizoma(半夏)	4
Scutellaria baicalensis GEORGI	Scutellariae Radix(黃芩)	4
Citrus aurantium L.	Aurantii Fructus(枳殼)	4
Platycodon grandiflorum (JACQ.)A. DC.	Platycodi Radix(桔梗)	4
Citrus unshiu MARKOVICH.	Citri Reticulatae Viride Pericarpium(青皮)	3
Prunus armeniaca L. var. ansu MAXIM..	Armeniaca Semen(杏仁)	3
Glycyrrhiza uralensis FISCH.	Glycyrrhizae Radix(甘草)	2
Zingiber officinale ROSC.	Zingiberis Rhizoma Recens(生薑)	4
Total amount		40

2. 방법

1) In vivo 실험

(1) 약물 제조

柴梗半夏湯 2첩 80 g을 1.5 ℓ 증류수에 넣고 3시간 열탕하

여 추출한 후 원심분리 하였다. 이를 감압 농축기로 농축한 후, 성인 60 kg을 기준으로 생쥐 무게로 환산하여, 저농도는 성인 복용량의 2배 분량(2.5 g/kg)을, 고농도는 성인복용량의 5배 분량(6.7 g/kg)을 1회 복용량으로 1 ml를 실험에 사용하였다.

(2) 실험군 분류 및 처치

실험군은 정상군, 대조군 그리고 柴梗半夏湯 저농도 투여군, 고농도 투여군으로 나누고 일반 사료와 식수를 충분히 공급하였다. LPS 처치 24시간 전과 1시간 전에 저농도군(2.5 g/kg)과 고농도군(6.7 g/kg)은 각각 柴梗半夏湯 농축액 1 ml를 경구 투여하였고, 정상군과 대조군은 1차 증류수 1 ml를 경구 투여하였다. 대조군과 柴梗半夏湯 투여군은 phentobarbital(20 mg/kg)을 복강주사하여 마취하였으며, 이어 경부에서 기관이 보이도록 박리한 후, 30 G needle을 구부려서 LPS(Escherichia coli, 0055:B5, Sigma chemical, USA) 100 μg를 생리식염수 100 μl에 녹여 기관내에 주입하였다. 경부에 절개한 부위는 auto clip으로 봉합하였고, 정상군은 LPS 기관내 주입을 하지 않았다. 실험군은 모두 9마리씩 배정하여 혈액 채취 및 기관지폐포세척액은 각 군당 6마리로 시행하였고, 폐조직 관찰은 각 군당 3마리에서 폐를 적출하여 평가하였다.

(3) 혈액 내 백혈구수 측정

LPS 처치로 급성폐손상을 유발시키고 24시간이 경과한 후에, 생쥐들을 다시 마취시키고 좌심실과 우심실에서 총 2 ml의 혈액을 EDTA관(EDTA-3k, 새원메디칼, 한국)에 채취하였다. 채혈에 의하여 얻어진 혈액을 혈구측정기(KX-21, Sysmax, Japan)를 이용하여 백혈구수를 측정하였다.

(4) 기관지폐포세척액 내 단백질 측정

기관지와 폐를 노출시킨 후, 노출된 폐에 1 ml의 PBS를 기관내로 주입하고 흡입하기를 2회 시행하여 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluids, BALF)을 채취하였다. BALF는 원심분리를 하였고, 상층액으로 추가 분석을 시행하였다. BALF 속의 단백질 양은 Bradford 분석을 이용하였다. 채취한 BALF를 희석하지 않고 10 μl씩 96 well plate에 넣은 후 단백질 측정 시약(comassie brilliant blue G-250)을 200 μl 넣고 5분 동안 반응시킨 후 595 nm로 흡광도를 측정하여 BSA(Bovine Serum Albumin)을 기준으로 환산하였다.

(5) 기관지폐포세척액 내 TNF-α, IL-1β, IL-6 측정

BALF의 TNF-α 함량은 ELISA kit(Endogen, USA)로 측정하였다. 표준액 및 검액을 각 well에 50 μl씩 넣고, biotinylated antibody reagent를 50 μl씩 추가하였다. 접착성 plate cover를 덮고 실온에서 2시간 동안 반응시키고 5회 세척한 후, streptavidin-HRP concentrate를 100 μl씩 각 well에 넣고 30분간 반응시켰다. 재차 5회 세척하고 100 μl TMB substrate solution을 30분간 반응시켜 발색시킨 후 각 well에 100 μl의 stop solution으로 반응을 정지시키고 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. BALF의 IL-1β, IL-6 함량은 ELISA kit(Endogen, USA)로 측정하였다. biotinylated antibody reagent를 각 well에 50 μl씩 넣고, 표준액 또는 검액을 50 μl씩 추가하였다. 접착성의 plate cover를 덮고 실온에서 2시간 반응시켰다.

이후 3회 세척을 한 후 streptavidin-HRP solution을 100 μ l씩 넣고 다시 plate cover를 덮고 30분간 반응시켰다. 3회 세척하고 TMB substrate solution을 각 well에 100 μ l씩 넣고 30분간 반응시킨 후, stop solution을 각 well에 100 μ l씩 넣어 반응을 정지시키고 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(6) 폐 조직 관찰

LPS로 인한 폐의 조직학적 변화는 각 군당 3마리로 평가하였다. LPS 처치를 하고 24시간이 경과한 후에, 생쥐들을 다시 마취하고 폐 내부로의 출혈을 감소시키기 위해 하대정맥을 절단하여 출혈로 희생시킨 후, 좌측 폐를 적출하여 10% 중성 포르마린액에 2일간 고정하였다. 고정된 조직을 일반적인 조직처리과정을 거쳐서 파라핀 포매하고 5 μ m의 박절편을 제작하였다. 제작된 박절편을 Hematoxylin-Eosin 염색하여 광학현미경으로 병리조직학적 소견을 관찰하였다.

(7) 통계 처리

모든 측정값은 평균 \pm 표준편차로 표시하였고, Mann-Whitney U test를 이용하여 통계학적 분석을 시행하였다. 통계 프로그램은 SPSS version 12.0.1을 이용하였고, 대조군과의 차이를 비교하여 $p < 0.05$ 를 통계학적 의의가 있는 것으로 간주하였다.

2) In vitro 실험

(1) 시료 제조

柴梗半夏湯 2첩 분량인 80 g을 1.5 l의 3차 증류수로 2시간 30분 전탕한 후, 3000 rpm에서 15분간 원심분리 시키고 상층액을 거르로 여과한 다음, -70 $^{\circ}$ C(deep freezer)에서 12시간 이상 동결시키고, freezing dryer로 동결 건조시켜서, 완전 건조한 시료 25 g을 냉동(-84 $^{\circ}$ C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

(2) 세포배양 및 실험조건

폐포상피세포주(A549)를 세명대학교 본초학교실에서 분양받아 사용하였다. 10% fetal bovine serum(FBS)와 항생제가 들어있는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)으로 2-3일마다 배지를 교환하였다. 이를 24 well plate에 분주한 후 12시간 후에 柴梗半夏湯 실험군은 농도별로 전처리하였다. 이어서 IL-4(10 ng/ml)와 TNF- α (10 ng/ml)를 병행투여 하고, 48시간 후에 RANTES와 TARC를 측정하였다.

(3) 세포 독성 측정

柴梗半夏湯의 세포독성 유무를 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay법을 사용하였다. MTT를 각 세포배양액에 0.1 mg/ml의 농도로 처리한 후 4시간동안 37 $^{\circ}$ C CO₂ incubator에서 배양하였다. 이후에 DMSO를 첨가하여 690 nm를 대조과장으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 환산하였다.

(4) Chemokines 측정

Chemokine의 양은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법으로 측정하였다. 측정에는 capture 항체와 detection 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN)를 별도로 구입하여 ELISA plate를 준비하였다. Nunc-ELISA plate를 각각의 cytokine capture 항체로 coating하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 처리하였다. Plate 바닥에 고정되지 않은 여분의 capture 항체를 자동화된

plate 세척기로 3회 씻어낸 다음 각 plate를 2% BSA-PBS로 blocking 하였다. Blocking이 끝난 다음 plate를 PBS-Tween 0(0.05%; v/v)으로 씻어내고 검체를 100 μ l씩 가하였다. 3시간 후 각 plate들을 세척기로 3회 세척한 다음 biotin을 결합시킨 polyclonal rabbit anti-cytokine 항체를 가하였다. 2시간 후 세척하였으며 streptavidin-peroxidase를 가한 다음 30분간 더 처리하였다. 다시 3회 세척한 다음 발색 기질 tetra methyl benzidine TMB)를 sodium citrate에 녹인 후 H₂O₂를 약간 첨가한 용액 100 μ l씩 첨가하여 발색시켰다. 이후 2 M H₂SO₄을 50 μ l 첨가하여 발색 반응을 정지시키고 450 nm 파장에서 ELISA reader로 측정하였다. 제조합 RANTES와 TARC를 125 pg/ml부터 순차적으로 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 모든 기준치는 duplicate로 측정하였고 결과는 3회에 걸친 독립적인 실험치의 평균값 \pm 표준편차로 나타내었다.

(5) 통계 처리

모든 측정값은 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 통계적 차이는 one-way ANOVA로 분석하였고, 사후검정으로 Tukey 검정법을 사용하여 각 군간의 차이를 비교하였다. 통계 프로그램은 SPSS version 12.0.1을 이용하였고, 대조군 혹은 정상군과의 차이를 비교하여 $p < 0.05$ 를 통계학적 의의가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. In vivo 실험

1) 혈중 백혈구 수

LPS 기관내 주입에 의한 급성폐손상 유발 생쥐의 혈중 백혈구 수치를 측정된 결과, 대조군은 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다. 柴梗半夏湯 저농도군과 고농도군은 대조군에 비해 증가가 억제되었으나 유의성은 없었다(Fig. 1).

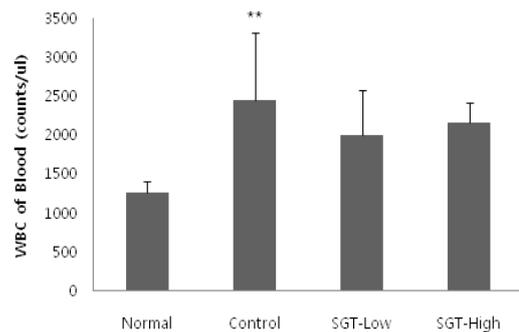


Fig. 1. Effect of Shigyungbanha-Tang(SGT) on the white blood cell level of blood in LPS-induced acute lung injury mouse. WBC counts of control group significantly increased compared with normal group($p < 0.01$). Low and high concentrate SGT(2.5 g/kg, 6.7g/kg) treated groups(SGT-Low, SGT-High) were not significantly decreased compared with control group.

2) 기관지폐포세척액 내 단백질

기관지폐포세척액을 채취하여 폐포에 축적된 단백질의 양을 측정해본 결과, 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게 상승되었다. 柴梗半夏湯 저농도군과 고농도군은 농도에 따라 대조군에 비

해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

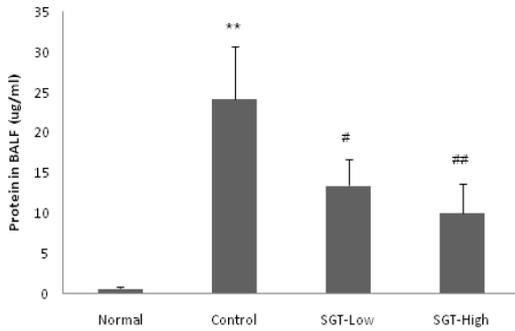


Fig. 2. Effect of Shigyungbanha-Tang(SGT) on the protein level of bronchoalveolar lavage fluids(BALF) in LPS-induced acute lung injury mouse. Protein contents in BALF of control group was significantly increased compared with normal group(** $p<0.01$). Protein contents in BALF of low and high concentrate SGT(2.5 g/kg, 6.7g/kg) treated groups(SGT-Low, SGT-High) were significantly decreased compared with control group(# $p<0.05$, ## $p<0.01$).

3) 기관지폐포세척액 내 TNF- α

기관지폐포세척액 내의 TNF- α 를 측정해본 결과, 정상군에 비해 유의성 있게 대조군에서 상승되었다. 柴梗半夏湯 저농도군은 대조군에 비해 낮게 나타났으나 유의성은 없었고, 柴梗半夏湯 고농도군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3).

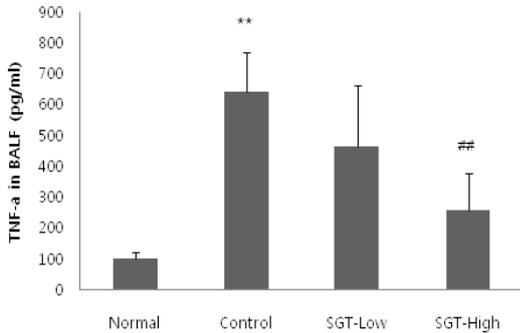


Fig. 3. Effect of Shigyungbanha-Tang(SGT) on the TNF- α level of bronchoalveolar lavage fluids(BALF) in LPS-induced acute lung injury mouse. TNF- α contents in BALF of control group was significantly increased compared with normal group(** $p<0.01$). TNF- α contents in BALF of high concentrate SGT(6.7 g/kg) treated group(SGT-High) was significantly decreased compared with control group## $p<0.01$).

4) 기관지폐포세척액 내 IL-1 β

기관지폐포세척액 내의 IL-1 β 를 측정해본 결과, 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 높게 나타났다. 柴梗半夏湯 저농도군과 고농도군은 대조군에 비해 농도에 따라 모두 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

5) 기관지폐포세척액 내 IL-6

기관지폐포세척액 내의 IL-6를 측정해본 결과, 대조군은 정상군에 비해 유의한 차이로 높게 나타났다. 柴梗半夏湯 저농도군과 고농도군은 대조군에 비해 농도에 따라 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

6) 조직학적 소견

정상군에서는 기관지, 세기관지, 폐포 및 폐포벽 등에서 병리조직학적 이상 소견은 관찰되지 않았다(Fig. 6). LPS를 기관내 투여한 대조군에서는 급성 간질성 폐렴(acute interstitial pneumonia) 및 급성 화농성 폐포염(suppurative alveolitis)이 주된 소견으로 관찰되었다. 폐포벽(alveolar wall)은 모세혈관 확장, 호중구 침윤 및 폐포 대식세포 증식으로 현저히 두터워져 있었고, 폐포 내에는 호중구 및 단백성 삼출액이 가득 차 있었다(Fig. 7). 柴梗半夏湯 저농도군에서는 급성 간질성 폐렴이 주된 소견으로 관찰되었으나 급성 화농성 폐포염은 관찰되지 않았다. 폐포벽의 모세혈관 확장은 대조군에서와 유사한 정도 였으나 호중구 침윤 및 폐포대식세포 증식은 미약하게 관찰되었다. 또한 폐포내 호중구 및 단백성 삼출액은 없거나 아주 미약하게 관찰되었다(Fig. 8). 柴梗半夏湯 고농도군에서도 급성 간질성 폐렴 소견은 관찰되었으나 급성 화농성 폐포염은 관찰되지 않았다. 폐포벽의 폐포 대식세포 증식 및 호중구 침윤은 대조군에서와 유사한 정도 였으나 폐포 모세혈관의 확장은 현저히 줄어들었다. 또한 폐포내 호중구 및 단백성 삼출액은 없거나 아주 미약하게 관찰되었다(Fig. 9).

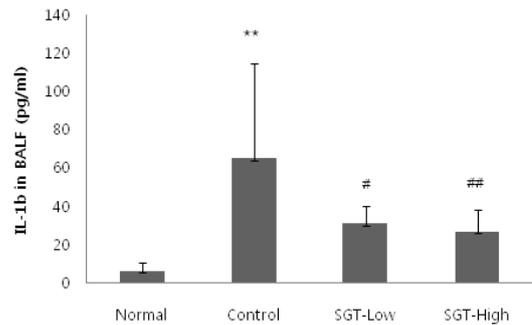


Fig. 4. Effect of Shigyungbanha-Tang(SGT) on the IL-1 β level of bronchoalveolar lavage fluids(BALF) in LPS-induced acute lung injury mouse. IL-1 β contents in BALF of control group was significantly increased compared with normal group(** $p<0.01$). IL-1 β contents in BALF of low and high concentrate SGT(2.5 g/kg, 6.7g/kg) treated groups(SGT-Low, SGT-High) were significantly decreased compared with control group(# $p<0.05$, ## $p<0.01$).

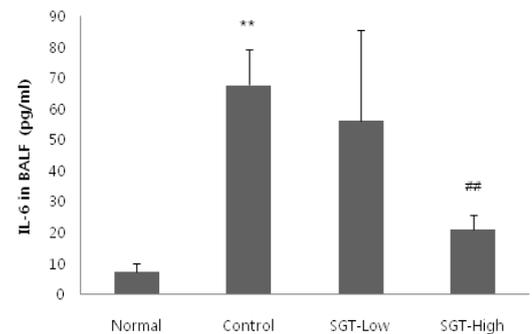


Fig. 5. Effect of Shigyungbanha-Tang(SGT) on the IL-6 level of bronchoalveolar lavage fluids(BALF) in LPS-induced acute lung injury mouse. LPS was intratracheally injected and 24h later, BALF was harvested and the concentration of IL-6 was measured using ELISA. IL-6 contents in BALF of control group was significantly increased compared with normal group(** $p<0.01$). IL-6 contents in BALF of high concentrate SGT(6.7g/kg) treated group(SGT-High) was significantly decreased compared with control group## $p<0.01$).

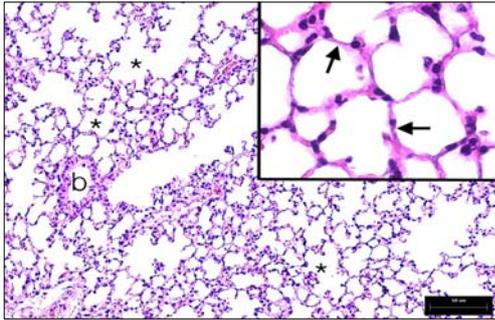


Fig. 6. Histological structure of no challenged lung tissue. The histological structures of bronchiole(b), alveoli(asterisks), and alveolar walls were intact. Insert : higher magnification showing thin alveolar walls(arrows). H&E stain. bar=50 μ m

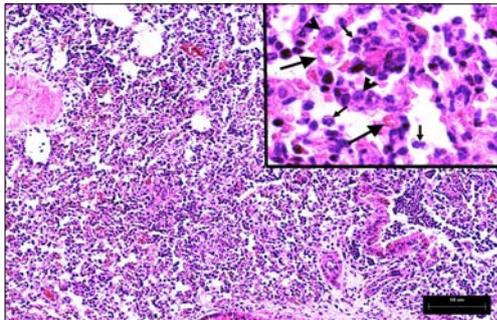


Fig. 7. Histological structure of intratracheal LPS instilled lung tissue. Acute interstitial pneumonia and suppurative alveolitis were occurred. Most of alveoli were filled with exudation. Insert : higher magnification showing thickened alveolar walls. The walls were thickened by dilation of alveolar capillaries(long arrows), infiltration of neutrophils and proliferation of alveolar macrophages(arrow heads). And numerous neutrophils(small arrows) and protein-rich fluids exudated into alveoli H&E stain. bar=50 μ m

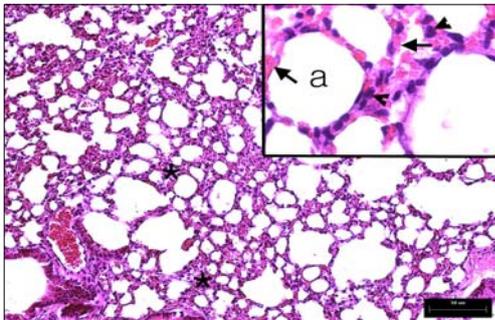


Fig. 8. Histological structure of intratracheal LPS instilled and low concentrate Shigyungbanha-Tang(2.5 g/kg) treated lung tissue. Acute interstitial pneumonia was occurred(asterisks). Insert : higher magnification showing thickened alveolar walls. The walls were thickened by dilation of alveolar capillaries (arrows), infiltration and proliferation of some inflammatory cells(arrow heads). But the severities of infiltration and proliferation were alleviated, and exudations into alveoli(a) were not shown. Compare with Fig. 2. H&E stain. bar=50 μ m

2. In vitro 실험

1) 세포 독성

柴梗半夏湯이 농도에 따라 세포내 독성을 유발시키는지 확인하기 위해 MTT assay를 시행하였다. 정상군의 생존율을 100으로 가정하고, 柴梗半夏湯을 농도를 달리하여 처치한 후에 생존율을 계산하였다. 모든 농도의 柴梗半夏湯 처치군에서 세포독성은 관찰되지 않았다(Fig. 10).

2) RANTES

TNF- α 와 IL-4를 병용투여한 대조군에서 RANTES 발현이 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었다. 柴梗半夏湯에 의한 RANTES 분비 억제효과를 관찰한 결과, 柴梗半夏湯 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml 처치군에서 농도에 따라 유의하게 RANTES의 분비가 감소하였다(Fig. 11).

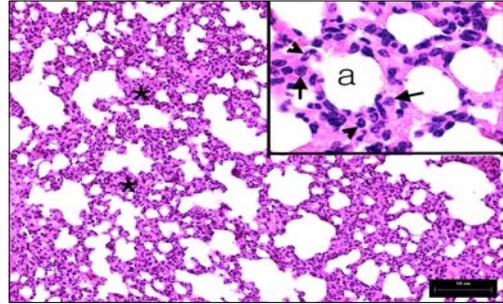


Fig. 9. Histological structure of intratracheal LPS instilled and high concentrate Shigyungbanha-Tang(6.7 g/kg) treated lung tissue. Acute interstitial pneumonia was occurred(asterisks). Insert : higher magnification showing thickened alveolar walls. The walls were thickened by infiltration of neutrophils (arrow heads) and proliferation of alveolar macrophages(arrows). But the severity of infiltration of neutrophils and dilation of capillaries were alleviated, and exudations into alveoli(a) were not shown. Compare with Fig. 2. & Fig. 3. H&E stain. bar=50 μ m

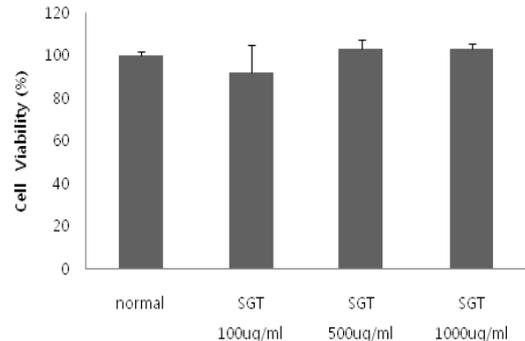


Fig. 10. Effect of Shigyungbanha-Tang(SGT) on the viability of A549 cells. The cell viability was determined using the MTT assay. 100 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml concentrate SGT treated groups did not have the cytotoxicity on A549 cells.

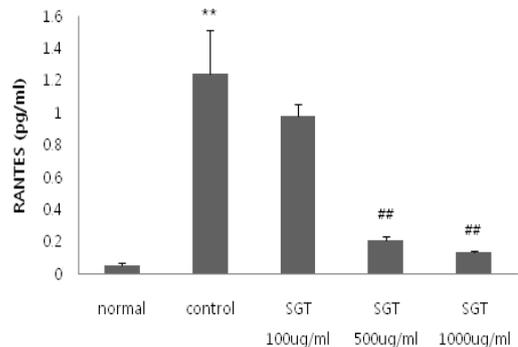


Fig. 11. Effect of Shigyungbanha-Tang(SGT) on the secretion of RANTES in A549 cells at 48h after cytokine treatment. The concentration of RANTES was measured using ELISA. RANTES contents of control group was significantly increased compared with normal group(**p<0.01). 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml concentrate SGT treated groups suppressed the expression of RANTES on A549 cells(##p<0.01).

3) TARC

TNF-α와 IL-4를 병용투여한 대조군에서 TARC의 발현이 정상군에서 유의하게 증가하였다. 柴梗半夏湯에 의한 TARC의 분비 억제 효과를 관찰한 결과, 柴梗半夏湯 500 μg/ml, 1000 μg/ml 처치군에서 대조군에 비해 유의하게 분비가 감소되었다(Fig. 12).

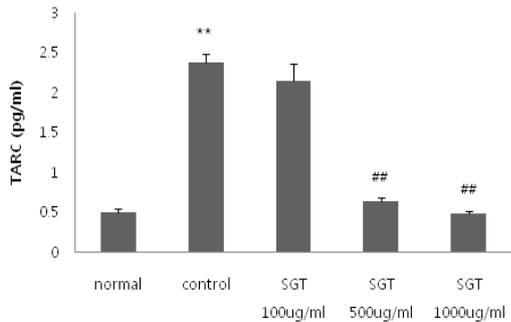


Fig. 12. Effects of Shigyungbanha-Tang(SGT) on the secretion of TARC in A549 cells at 48h after cytokine treatment. The concentration of TARC was measured using ELISA. TARC contents of control group was significantly increased compared with normal group(**p<0.01). 500 ug/ml, 1000 ug/ml concentrate SGT treated groups suppressed the expression of TARC on A549 cells(##p<0.01).

고찰

급성폐손상(acute lung injury, ALI)과 급성폐손상의 가장 심각한 형태인 급성호흡부전증후군(ARDS)은 중증 질환을 앓고 있는 환자에게서 사망률과 치명률을 높이는 중요한 질환이다. 폐혈증은 급성호흡부전증후군의 가장 중요한 선형 질환인데 이중 그람 음성균에 감염된 환자의 18-42%가 급성호흡곤란증후군으로 발전하며 그중 50%가 사망한다^{3,4)}.

급성호흡부전증후군은 급성적으로 양측 폐에 전반적인 심각한 손상이 발생한 것으로, 심한 저산소증, 고투과성 폐부종, 호중구 침윤, 폐탄성 감소, 폐혈관의 저항 증가 등 특징을 나타낸다. 급성호흡곤란증후군에 현재 선택할 수 있는 약물적 치료로는 항생제, 부신피질호르몬, 외부계면활성제, 항산화제, 흡입성 폐혈관 확장제 등이 있다^{1,2)}.

외부 계면활성제는 몇몇 소규모 연구와 동물연구에서는 효과가 있다고 보고되었으나^{12,13)}, 폐혈증에 의한 급성호흡곤란증후군을 대상으로 한 대규모 임상실험 결과에서는 효과가 없었다^{1,2)}. 항산화제는 자유산소기(free radicals)가 급성호흡곤란 증후군의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 인식되면서 주목받고 있고, 급성호흡곤란증후군에서 사용되고 있는 고농도의 산소요법에 의해 유리산소의 독성 작용이 증가할 수 있다는 점에서 선택되어지고 있다.

항산화제는 동물실험에서는 유효한 결과를 얻었으나 임상실험에서는 아직 확실한 효과가 입증되지 않았고, 급성호흡곤란증후군에서 질환의 경감 정도와 사망률에 대해서는 뚜렷한 효과가 없었다¹⁴⁻¹⁶⁾.

급성호흡곤란증후군의 폐손상이 염증성 변화와 밀접한 관련이 있으므로 부신피질호르몬 등 항염증제를 사용하지만, 급성기

에는 스테로이드 사용이 사망률을 감소시키지 않고, 일부 연구에서는 오히려 병원 감염률과 사망률이 높았다는 부정적인 결과를 보여 통상적인 스테로이드 사용은 권장되지 않고 있다¹⁻³⁾. 이와 같이 급성호흡곤란증후군에 대한 뚜렷한 치료법은 아직 개발되지 않았고, 집중치료실(ICU)에서 기계적 환기장치와 산소투여로 이루어지는 지지요법과 감염 관리, 영양 요법 등 보존적 치료에 의해 사망률은 다소 낮아지고 있는 실정이다^{2,4)}.

급성폐손상과 급성호흡곤란증후군의 가장 중요한 병태생리학적 특징은 폐포 상피세포와 모세혈관 내피세포로 구성된 폐포-모세혈관 장벽(alveolar-capillary barrier)의 손상이다. 급성기에 내피세포의 손상과 혈관 투과성의 증가로 폐포-모세혈관 장벽의 투과성이 증가되어 단백질이 풍부한 삼투액이 폐포 안으로 들어 오게 되면 삼투압 경사가 사라져 폐부종을 가속화 하는데, 이 때문에 폐포 상피세포의 손상 정도는 환자의 예후에 영향을 준다. 폐포 상피세포의 손상은 제2형 폐포세포에서 생산되는 계면활성제의 이상을 초래하여 폐포허탈은 더욱 악화된다^{3,17,18)}.

LPS로 유도된 급성호흡곤란증후군에서 여러 인자들 중 호중구는 내독소를 주입한지 6시간이 지나면 폐포강 내에서 현저히 증가되며, 폐장 내에서 호중구가 활성화되면서 단백질분해소와 많은 양의 자유산소기를 생성하여 폐부종을 일으키는 주요 원인으로 작용한다. 급성기의 폐 조직에 다량의 침윤된 호중구가 확인되며, 임상에서도 기관지폐포세척액 내 호중구 함량은 예후를 결정하는 지표가 된다^{1,19)}.

또한 각종 염증성 cytokine들이 급성폐손상 및 급성호흡곤란증후군에서 염증 반응을 시작, 증폭시키고 지속시키는데 관여한다는 연구결과들이 발표되었다⁶⁾. 내독소 LPS는 대식세포의 표면에 있는 LPS 수용체 CD14에 결합되거나, 대식세포와 결합하는 가용성 단백질에 의해 혈장에서 추출된 LPS는 대식세포 표면의 CD14에 전달된다. 이때 대식세포의 Toll양 수용체(Toll-like receptor, TLR)가 관여하는데, 특히 TLR-4는 CD14와 LPS의 복합체와 연관되어 TLR-4의 세포질 내 신호 도메인(signaling domain)을 통한 세포 내 신호를 발생시켜서 다양한 cytokine 유전자들의 전사를 개시한다^{3,7)}.

활성화된 대식세포에 의한 cytokine으로 TNF-α, IL-1, IL-6, CXCL8, IL-12 등이 있는데, 이들은 초기 염증반응을 유발시키는 cytokine으로 감염된 조직에 국한되거나 신체 전부에서 나타나는 강력한 면역반응을 유도한다^{7,12)}. 또한 TNF-α, IL-1, IL-6는 간장에서 급성기 반응을 유발하는데 핵심적인 역할을 하며, 이는 다양한 방법으로 숙주의 방어를 효과적으로 일으키도록 한다. 급성호흡부전증후군 환자나 급성호흡부전증후군이 발생할 위험성이 높은 환자의 기관지폐포세척액 내에서 cytokine을 비롯한 염증성 매개물질의 농도가 증가하므로, TNF-α, IL-6 등의 농도를 측정하여 급성호흡부전증후군의 진단 및 예후의 판정에 이용하려는 시도가 있었는데, 기관지폐포세척액 내의 농도가 증가된 경우에는 예후가 불량하였으나 혈장내의 농도측정은 예후의 지표가 되지 못했다^{3,8)}.

Chemokine은 주로 화학주성인자로 작용하여 염증반응에 관련된 세포들을 불러 모으는 역할을 한다⁷⁾. RANTES는 초기 반

유전자에 의해서 표현되고, T세포와 내 등에서 TNF- α 와 IL-1 β 에 의해 합성이 유도되며, T세포, 호산구와 호염구에 대한 화학주성인자로 작용하여 염증부위에 백혈구를 불러들인다. TARC은 특히 T세포에 붙어서 화학주성을 유발시키는데, TNF- α 와 IL-4에 의해서 농도가 높아지고, IFN- γ 에 의해 농도가 낮아지며, T세포와 대식세포를 염증 부위로 불러모으는 작용을 한다^{20,22}.

과거 한의학 문헌에 기재되어 있는 손상, 産後, 溫病, 瘧疾, 癰疽 등의 원인으로 인해 喘證이 유발되었다는 내용이 있는데, 이는 폐에 원인 질환이 없고 다른 기저질환이 있던 중 호흡기 증상이 발생하였다는 것으로, 급성호흡부전증후군과 임상 표현 양상이 유사하다. 급성호흡부전증후군은 한의학적으로 哮喘證, 肺脹證, 肺絕候 등 위중한 증후의 범주에 속한다. 이 질환의 발생이유가 원발 질병에 대한 치료가 성공적이지 못했거나 혹은 병정이 악화되는 경우인데, 이는 正氣가 이미 虛한 상태에서 邪氣는 여전히 實한 것으로 病邪가 肺를 犯하여 肺氣가 虛損되어 宣發 및 肅降작용을 하지 못하게 되어 氣短, 氣喘, 呼吸不利가 나타나는 것으로 해석할 수 있다. 급성호흡부전증후군의 초기에는 標實과 本虛 중에 標實을 치료하는 것이 우선이므로, 熱毒, 痰濁, 瘀血이 肺氣를 壅滯하는 것을 清熱解毒, 祛痰活血하는 治法으로 邪氣를 빨리 내몰아야 한다^{9,23}.

柴梗半夏湯은 《醫學入門》²⁴에 처음 수록된 이후 여러 醫書에 기재된 處方으로 柴胡, 瓜蒌仁, 半夏, 黃芩, 枳殼, 桔梗, 靑皮, 杏仁, 甘草, 生薑으로 구성되어 있다. 柴胡, 半夏, 黃芩은 小柴胡湯에 포함되는 약물들로, 小柴胡湯은 다양한 염증성 질환에 실험적으로 효과가 입증된 처방이고, 瓜蒌仁, 枳殼, 半夏, 桔梗은 胸痞痛徹背, 喘急, 妨悶 할때 활용하는 瓜蒌實丸의 주된 구성 약제이다^{25,26}. 그러므로 柴梗半夏湯은 小柴胡湯과 瓜蒌實丸을 합방하고 靑皮, 杏仁을 가미한 처방으로 흉부 증상을 주로 호소하는 염증성 질환에 적용 가능하고, 임상에서는 急性氣管支炎, 肺炎, 肋膜炎 등을 치료하는데 응용되고 있다^{9,27,28}.

柴梗半夏湯에 대한 실험적 연구로는, Xylene으로 유발된 폐부종에서 저산소증에 대하여 의미있는 교정효과가 확인되었고¹⁰, LPS로 유도한 복강대식세포에서 NF- κ B의 활성을 억제하여 염증관련 cytokine들과 NO의 생성을 억제하는 것으로 보고되어서¹¹, 삼출성 변화를 동반한 염증성 폐질환에 활용할 수 있는 가능성이 제시되었다.

본 실험에서 병태모델 작성을 위해 기관지 내로 주입된 LPS는 그람 음성균에서 분비되는 내독소로, 폐내로 주입하면 급성폐손상이 유발되어 급성호흡곤란증후군 및 급성폐손상 병태모델에 주로 이용된다^{5,19}. 임상에서 급성호흡곤란증후군의 증상은 약 50%의 환자에서 유발요인 발생 후 24시간 이내에 급격히 나타나는 것이 보통인데, 동물실험 모델에서도 LPS를 기관지로 주입하면 시간의 경과에 따라 급성 폐손상 변화가 관찰되며, 24시간 이후에 정점에 이르고 72시간 이후에는 기저치 수준으로 감소된다^{17,19}. 이에 근거하여 본 연구에서는 급성호흡곤란증후군을 유발시키기 전에 2회 柴梗半夏湯을 경구 복용시킨 후, LPS로 급성호흡곤란 증후군을 유발시키고 폐손상이 가장 심하게 유발되는 24시간 후에 각종 지표들을 측정하여, 예방적으로 투여한 柴梗半夏

湯이 염증성 변화에 대해 억제 효과가 있는지를 확인하고자 하였다.

급성호흡곤란증후군에서 폐포-모세혈관 장벽이 손상 받으면 단백질이 함유된 삼출물이 폐포강 내로 유입되므로, 검사 상 기관지폐포세척액 내의 단백질 양은 폐포-모세혈관 투과성을 반영할 수 있다^{29,30}. 본 실험에서 대조군에서 정상군에 비해 유의하게 많은 단백질이 검출되었고, 柴梗半夏湯 투여군에서는 대조군에 비해 농도에 따라 단백질이 적게 검출되어 柴梗半夏湯이 폐포상피세포의 손상을 억제시킨 것으로 보인다. 현미경으로 관찰한 폐조직에서도 대조군은 정상군에 비해 폐포 모세혈관벽이 두꺼워지고, 폐포내 출혈소견이 보이며, 폐포강으로 중성구들의 침윤이 보이는 등 명확한 염증성 변화와 폐포 내피세포의 손상을 나타내었고, 柴梗半夏湯 투여군에서는 급성 간질성 폐렴 소견을 보였으나, 대조군에 비해서는 폐포내 호중구 및 단백질 삼출액은 없거나 미약하게 나타났다. 기관지폐포세척액 내의 단백질량의 증가를 억제하고, 조직학적으로 염증성 변화와 삼출성 변화가 미약하게 나타난 것은 柴梗半夏湯이 폐포 상피세포와 혈관 내피세포의 손상과 염증성 변화를 억제시켜서 폐포-모세혈관 투과성을 건전하게 유지시키는 효과가 있는 것으로 생각된다.

혈중 백혈구 수치는 대조군과 柴梗半夏湯 투여군에서 모두 정상군에 비해 상승하여 전신적인 염증성 변화 양태를 나타내었고, 대조군에 비해 柴梗半夏湯 투여군에서 낮은 백혈구 수치를 나타내었으나 유의한 차이는 보이지 않았다.

그람 음성균의 세포벽 구성성분인 LPS는 인체의 선천성 면역반응에 관여하는 단백질, 대식세포 등의 면역세포를 자극하여 IL-1, IL-6, TNF- α 등 염증성 cytokine들을 분비시켜 염증반응을 일으킨다. 급성폐손상이 발생하면, TNF- α 와 IL-1 β 는 내피세포 응집인자의 합성을 유발하고 IL-6의 합성을 일으켜 폐의 염증 반응을 시작하는 중요한 역할을 한다⁷. 또한 IL-1 β 는 급성호흡곤란증후군의 증식기와 섬유화기에서 tissue growth factor(TGF)- β 의 합성을 유발하여 점차적으로 폐의 섬유화를 일으키는 작용을 하고 표면활성제 단백질의 합성을 감소시켜 표면활성제의 양과 조성을 변화시키는 작용을 하여 급성호흡곤란증후군의 전반적 과정에 관여한다⁸. 동물실험에서 급성폐손상 시 기관지폐포세척액과 폐 조직에서 전염증 cytokine과 호중구가 증가된다고 보고되었으며, 이러한 cytokine들이 폐내에서 상승하게 되면 활성화된 호중구들이 다량 유입된다는 연구 결과도 있었다. 또한 TNF- α 와 IL-1 β 를 인체에 주사하면 패혈증과 유사한 상태가 되고, 기도로 주입하면 기관지폐포세척액에 호중구가 증가된 소견을 보이므로, 급성호흡곤란증후군에서 조기반응 cytokine들은 염증성 변화와 호중구의 유입에 중요한 역할을 한다^{31,32}.

본 실험에서는 발병 후 24시간 후의 초기 염증반응을 관찰하기 위하여, 조기반응 cytokine인 TNF- α 와 IL-1 β 의 발현을 측정하였다. 대조군의 TNF- α 는 정상군에 비해 유의성 있게 상승되었고, 柴梗半夏湯 저농도군은 대조군에 비해 낮게 나타났으나 유의성은 없었으며, 柴梗半夏湯 고농도군은 유의하게 감소하였다. 기관지폐포세척액 내의 IL-1 β 는 대조군에 비해 柴梗半夏湯 저농도군과 고농도군에서 모두 유의성 있게 감소하였다. 이는 柴梗半夏

湯의 전처치가 LPS로 인한 급성호흡곤란증후군으로의 이행에 있어 초기 염증반응을 억제하는 효과가 있는 것으로 생각할 수 있다. 기존 연구에서 柴梗半夏湯이 복강 대식세포에 대하여 NF- κ B의 활성을 억제한다고 하였는데, 본 연구 결과도 같은 기전에 의해서 cytokine 억제 효과가 나타난 것으로 보인다¹¹⁾.

IL-6는 초기와 후기 염증 반응에 모두 관여하는 cytokine으로 간장에서 급성 반응 물질의 생산을 유도하며 B세포와 T세포의 활성화를 돕는 등 여러 가지 역할을 한다¹²⁾. 최근에는 IL-6의 내피세포 보호효과와 항염증효과 등에 대한 연구가 이루어지고 있으나, 급성호흡곤란 증후군에서 IL-1 β 와 IL-6치가 중증도 및 사망률과 밀접한 관련이 있어 예후를 예측하는 지표로 사용되기도 하므로, 초기 반응에서 IL-6 수치는 질병의 중증도와 연관하다^{12,33)}. 본 실험에서 기관지폐포세척액 내의 IL-6는 대조군에 비해 柴梗半夏湯 저농도군과 고농도군에서 농도에 따른 감소를 나타내었는데, 이는 IL-6가 TNF- α 와 IL-1 β 의 자극에 의해 내피세포, 상피세포 및 섬유모세포 등에서 분비되고, IL-6가 염증반응 중에 생물학적으로 활성성인 TNF- α 와 IL-1 β 의 활성도를 나타내는 인자이므로^{8,34)}, TNF- α 와 IL-1 β 의 분비 억제 효과에 따른 결과라고 생각되어 진다.

In vivo 실험에서 초기 cytokine인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 발현에 柴梗半夏湯이 억제효과 있었으므로, 추가적으로 In vitro 실험에서 이러한 cytokine에 의해 분비되어 염증관련 세포들에 대한 화학주성인자로 작용하는 chemokine에 대한 효과를 확인하였다.

柴梗半夏湯이 농도에 따라 세포 독성을 일으키는지 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여 측정된 결과, 모든 처치군에서 세포독성은 관찰되지 않았다. 보고에 의하면 TNF- α 와 IL-4는 CC chemokine 계열의 RANTES와 TARC의 분비를 유도하므로, 柴梗半夏湯을 농도별로 TNF- α , IL-4와 함께 처리 한 후 RANTES와 TARC에 대한 분비억제를 관찰한 결과, 柴梗半夏湯을 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml의 농도로 처리했을 때 유의하게 RANTES와 TARC의 발현이 저하되었다.

본 연구에서 실시한 In vivo 실험 결과, 柴梗半夏湯은 폐포 상피세포의 손상을 억제하여 단백질의 누출을 억제하였고, 초기 cytokine의 발현을 감소시켰으며, In vitro 실험에서는 염증 관련 세포들에 대한 주성인자로 작용하는 chemokine의 발현을 억제하였으므로, 柴梗半夏湯이 급성호흡곤란증후군에서 초기 폐포 상피세포 손상을 억제하고, 초기 염증반응에 대하여 억제 효과가 있는 것으로 생각되어진다.

최근 ARDS network가 형성되어 이를 통한 대규모 임상시험들로 향후 급성호흡곤란증후군으로 인한 사망률을 감소시킬 수 있는 새로운 치료법의 등장이 기대되는 상황에서³⁾, 柴梗半夏湯은 폐렴과 패혈증이 선행된 급성호흡곤란증후군의 초기 급성 삼출기에 다른 치료법들과 함께 병용투여가 가능할 것으로 사료되며 이에 대한 추가적인 실험과 임상시험이 진행되어야 할 것이다.

결 론

급성호흡곤란증후군을 유발시키기 전에 2회 柴梗半夏湯을

경구 복용시킨 후, LPS로 급성호흡곤란 증후군을 유발시키고 폐손상이 가장 심하게 유발되는 24시간 후에 각종 지표들을 측정하여, 예방적으로 투여한 柴梗半夏湯이 염증성 변화에 대해 억제 효과가 있는지를 확인하였다. In vitro 실험으로 폐포상피세포주를 이용하여 TNF- α , IL-4 전처치로 염증상태를 유발한 후에 chemokine 변화를 측정하였다.

혈중 백혈구 수는 대조군과 柴梗半夏湯 저농도군(2.5 g/kg), 고농도군(6.7 g/kg)에서 유의성 있는 차이가 없었다. 기관지폐포세척액 내 단백질량은 대조군에 비해 柴梗半夏湯 저농도군과 고농도군에서 모두 유의하게 증가가 억제되었다. 기관지폐포세척액 내 TNF- α 함량은 대조군에 비해 柴梗半夏湯 고농도군에서 유의하게 증가가 억제되었다. 기관지폐포세척액 내 IL-1 β 함량은 대조군에 비해 柴梗半夏湯 저농도군과 고농도군에서 모두 유의하게 감소하였다. 기관지폐포세척액 내 IL-6 함량은 대조군에 비해 柴梗半夏湯 고농도군에서 유의하게 증가가 억제되었다. 柴梗半夏湯 100 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml의 농도에서 폐포상피세포주에 대한 세포독성이 나타나지 않았다. 柴梗半夏湯 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml 농도에서 TNF- α 와 IL-4로 유도되는 RANTES와 TARC의 발현이 억제되었다.

이상의 성적을 토대로 할 때 柴梗半夏湯은 LPS로 유발된 생쥐의 급성폐손상에서 초기반응 cytokine의 분비를 감소시켜 급성폐손상의 염증성 진행을 억제하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 전국한의과대학 폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울, 나도, pp 72-74, 90, 192-199, 2007.
2. 대한내과학회 해리슨내과학 편집위원회. Harrison's Principles of Internal medicine 16th edition. 서울, MIP, pp 1737-1740, 2006.
3. 서울대학교의과대학 내과학교실. 임상 내과학(I). 서울, 고려의학, pp 1076-1089, 2004.
4. 이상민, 유철규. 급성호흡곤란증후군. 대한내과학회지 68(5): 476-486, 2005.
5. Kahdi, F., Udobi, E.D., Childs Karim Touijer. Acute Respiratory Distress Syndrome. AMERICAN FAMILY PHYSICIAN 67(20):315-322, 2003.
6. 김성은, 이영만, 박원학. 내독소로 유도된 급성폐손상에서 PLA2의 억제제인 Rutin의 효과. Korean J. Electron Microscopy 34(1):31-42, 2004.
7. Vadas, P., Browning, J., Edelson, J., Pruzanski, W. Extracellular phospholipase A2 expression and inflammation. Journal of Lipid Mediators 8: 1-8, 1993.
8. 김선영, 김창환, 김태규, 김희제, 서영훈, 성경석, 엄현석, 이기현 외. 면역학 제2판. 서울, 라이프사이언스, pp 223-273, 2006.
9. 윤호주. 급성 폐손상에서 cytokine의 역할. 대한내과학회지 54(4):544-549, 1999.

10. 권 현, 정승기, 이형구. 시경청폐탕과 시경반하탕이 Xylene으로 인한 흰쥐의 폐부종에 미치는 영향. 경희의학, 5(3):337-345, 1989.
11. 이승언, 신조영, 이시형. LPS로 유도한 복강대식세포에서 IkB- α 분해억제에 의한 柴梗半夏湯의 항염증효과. 대한한방내과학회지 28(3):442-452, 2007.
12. 김민희, 조승제, 송준섭, 노창수, 정현중. 내독소 투여로 유발된 폐손상에서 표면활성제 투여 방법이 IL-1 β 와 IL-6치에 미치는 효과. 대한주산의학회지 15(2):154-163, 2004.
13. Lewis, J.F., McCaig, L. Aerosolized versus instilled exogenous surfactant in nonuniform pattern of lung injury. Am Rev Respir Dis 148: 1187-1193, 1993.
14. Artigas, A., Bernard, G.R., Carlet, J., Dreyfuss, D., Gattinoni, L., Hudson, L., Lamy, M., Marinni, J.O., Matthay, M.A., Pinsky, M.R., Spracc, R., Suter, P.M. and the Consensus Committee. The American-European Consensus Conference on ARDS, Part 2. Am J Respir Crit Care Med 157: 1337-1347, 1998.
15. Katsumi Shimoda, Hiroaki Nakazawa, Maret, G., Traber, Daniel, L. Traber, Motohiro Nozaki. Plasma and tissue vitamin E depletion in sheep with burn and smoke inhalation injury. burns 34: 1137-1141, 2008.
16. Mandana, M., Mojtaba, M., Ali, M., Mohammad, S.S., Atabak, N., Mohammad, R.K., Molook, H., Mohammad, H.G. The role of glutathione-S-transferase polymorphisms on clinical outcome of ALI/ARDS patient treated with N-acetylcysteine. Respiratory Medicine 1: 1-8, 2008.
17. Chia Chou Yeh, Shang Jyh Kao, Chih Che Lin, Shulhn Der Wang, Ching Ju Liu, Shung Te Kao. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin In vivo and In vitro. Life Sciences 80(20):1821-1831, 2007.
18. M. Bachofen, E.R. Weibel. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. Clinics in Chest Medicine 31: 35-56, 1982.
19. Hyungug Cho. Germanium increases alveolar macrophage engulfment of apoptotic neutrophils in acute lung injury induced by endotoxin. Korean J. Electron Microscopy 35(4):1-7, 2005.
20. 김성호, 김희택. 황금이 A549 세포주에서 TNF- α 및 IL-4로 유도된 chemokines에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지 20(2):108-115, 2007.
21. Alam, R., et al. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. Journal of Immunology 150: 3442-3448, 1993.
22. Imai, T., et al. The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. Journal of Biological Chemistry 272(23):15036-15042, 1997.
23. 郭子光 外. 現代中醫治療學. 四川, 四川科學技術出版社, pp 92-94, 1995.
24. 李旻. 醫學入門. 서울, 大星文化社, p 208, 1984.
25. 윤용갑. 동의방제와 처방해설. 서울, 의성당, pp 639-692, 2002.
26. 신원용, 현민경, 정병무, 최은영, 윤철호, 정지천. 노인성 폐렴 환자 1례에 대한 증례보고. 대한한방내과학회지 26(1):229-235, 2005.
27. 이경진, 김재홍, 문상관, 조기호, 배형섭, 이경섭. 뇌졸중의 폐렴합병증에 대한 시경반하탕의 치험1예. 경희의학 15(1):107-112, 1999.
28. 전국한의학대학교 본초학교실. 본초학. 서울, 영림사, pp 136-541, 2000.
29. Chia Chou Yeh, Chih Che Lin, Shulhn Der Wang, Che Ming Hung, Ming Hsien Yeh, Ching Ju Liu, Shung Te Kao. Protective and immunomodulatory effect of Gingyo-san in a murine model of acute lung inflammation. Journal of Ethnopharmacology 111(2):418-426, 2007.
30. Behnia, R., Molteni, A., Waters, C.M., Panos, R.J., Ward, W.F., Schnaper, H.W. Early markers of ventilator-induced lung injury in rats. Ann Clin Lab Sci 26: 437-450, 1996.
31. Xiao Su, Yuanlin Song, Jinjun Jiang, Chunxue Bai. The role of aquaporin-1(AQP1) expression in a murine model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. Respiratory Physiology & Neurobiology 142(1):1-11, 2004.
32. 정진홍, 신경철. Interleukin-1으로 유도된 흰쥐 급성폐손상에서 Aerosolized Vitamin-E의 전처치 효과. 영남의대학술지 24(2):365-372, 2007.
33. Hierholzer, C., Kalf, J.C., Omert, L., Tsukada, K., Loeffert, J.E., Watkins, S.C., et al. Interleukin-6 production in hemorrhagic shock is accompanied by neutrophil recruitment and lung injury. Am J Physiol 275: 611-621, 1998.
34. Van der Poll, T., Keogh, C.V., Guirao, X., Buurman, W.A., Kopf, M., Lowry, S.F. Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. J Infect Dis 176(2):439-444, 1997.