

金水六君煎이 이산화황으로 유발된 흰쥐의 호흡기 점액 및 뮤신생성에 미치는 영향

김은진 · 민상연 · 김장현

동국대학교 한의과대학 소아과교실

Abstract

Effect of Geumsuyukgunjeon on Airway Mucus Secretion and Mucin Production

Kim Eun Jin · Min Sang Yeon · Kim Jang Hyun

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives

In this study, effect of Geumsuyukgunjeon (GYJ) on the increase in airway epithelial mucosubstances of rats with acute bronchitis and EGF-induced MUC5AC mucin production from human airway epithelial cells were investigated.

Materials and Methods

Hypersecretion of airway mucus was induced by exposure of rats to SO₂ during 3 weeks. Effect of orally-administered GYJ during 2 weeks on increase in airway epithelial mucosubstances from tracheal goblet cells of rats was assessed using histopathological analysis after staining the epithelial tissue with PAS-alcian blue. Possible cytotoxicity of GYJ was assessed by examining the potential damage of kidney and liver functions by measuring serum GOT/GPT activities and serum BUN and creatinine concentrations of rats and the body weight gain during experiment, after administering GYJ orally. Effect of GYJ on EGF-induced MUC5AC mucin production from human airway epithelial cells (A549) was investigated. Confluent A549 cells were pretreated for 30 min in the presence of GYJ and treated with EGF (25 ng/ml) for 24 hrs, to assess the effect of GYJ on EGF-induced MUC5AC mucin production using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results

(1) GYJ decreased the amount of intraepithelial mucosubstances of trachea of rats. (2) GYJ did not show kidney and liver toxicities and did not affect body weight gain of rats during experiment. (3) GYJ significantly inhibited EGF-induced MUC5AC mucin production from A549 cells.

Conclusions

The result from the present study suggests that GYJ might control both the mucus hypersecretion in vivo and do not show in vivo toxicity to liver and kidney functions after oral administration and the production of pulmonary mucin.

Key words : Geumsuyukgunjeon (GYJ), Pulmonary mucus, MUC5AC

I. Introduction

소아는 形氣未充하고, 肌膚가 유약하며, 衛外기능이 비교적 좋지 못하고 면역계의 발달이 불완전하여 외부와 접촉이 증가함에 따라 호흡기 감염성 질환에 이환되기 쉽다. 또한 기도의 내경이 작아 말초기도의 저항이 증가되어 있으며 기도 내의 점액선의 밀도가 높아 호흡기 염증성 질환 발생 시 쉽게 많은 분비물이 생긴다¹⁾.

호흡기는 공기의 통로인 기도와, 기체 교환이 일어나는 폐로 구성되어 있다. 호흡기도의 점액은 다양한 항염증, 항균, 및 항단백 분해효소 물질을 함유하고 있어 기도 상피를 보호하며 수분을 유지하고²⁾ 점액섬모 제거기능 (mucociliary clearance)을 통해 호흡기로 유입된 다양한 병원체 및 독성물질들을 호흡기계 외로 제거하는 역할을 한다³⁾. 하지만 급·만성 기관지염이나 천식, 기관지 확장증, 폐기종, 낭포성 섬유증 등의 호흡기 질환에서는 점액이 과다 분비되어 점액전 (mucus plug)을 형성하여 기도분비물의 배출을 방해하고 기관지 폐쇄, 배농장애 등을 유발할 가능성이 있다⁴⁾.

현재까지 기도의 점액과다를 조절하는 방법으로 bromhexine, ambroxole, acetylcysteine 등의 점액용해제나 NH₄Cl, KI, 휘발성 정유 등의 거담제를 사용하고 있으나 응용범주 및 부작용 등에 의한 제한이 있어 적극적인 약물 치료를 시행하기가 어렵다⁵⁾. 또한 많은 신약 후보물질들이 연구되어 학계에 보고되고 있으나 아직까지 임상에서 응용되는 약물은 없는 실정이다⁶⁾.

金水六君煎은 張介賓의 『景岳全書』 新方八陳⁷⁾에서 肺腎이 虛寒하여 水가 넘쳐 痰이 되었거나 또는 나이가 들어 陰虛하고 氣血이 부족한데 風寒을 外感하여 咳嗽, 嘔惡, 多痰, 喘急하는 등의 증상을 치료하는데 효과가 있다고 하였으며, 小兒則 外感發熱治法⁸⁾에서는 中氣가 不足하면서 熱과 咳嗽를 동반하는데 적

합하다고 하였다. 임상에서는 積痰이 肺脘에 久留하여 發하는 久嗽에 多用되고 있다⁹⁾. 현재까지 진행된 金水六君煎의 실험적인 연구로는 SO₂에 의한 흰쥐의 呼吸器組織損傷에 미치는 영향¹⁰⁾, 吸煙한 白鼠의 肺損傷에 미치는 영향¹¹⁾, ovalbumin으로 유발된 白鼠의 천식에 미치는 영향¹²⁾, 알러지반응과 肺損傷에 미치는 영향¹³⁾ 등이 있으나, 이산화황으로 유발된 기도점액 과다분비 모델 흰쥐의 기관지 점액분비 및 뮤신생성에 대한 金水六君煎의 영향을 객관적으로 규명한 연구는 아직까지 찾아볼 수 없었다.

이에 저자는 in vivo 수준에서는 이산화황 흡입투여로 유발된 기도점액과다분비 흰쥐 모델을 대상으로 金水六君煎이 호흡기 배상세포 (goblet cell) 내의 점액량에 미치는 영향을 관찰하였고, 또한 金水六君煎의 투여에 의해 유발될 수 있는 독성 여부를 신기능 및 간기능, 흰쥐의 체중증가에 미치는 영향을 측정함으로써 검증하였다. in vitro 수준에서는 인간의 폐암 세포주인 A549 세포에서 기도 뮤신인 MUC5AC 뮤신의 생성에 대한 金水六君煎의 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

II. Materials and methods

1. 재료

1) 동물

5주령의 SD 雄性 흰쥐를 대한바이오링크(주) (Kyung-gi, Korea)에서 구입하고, 2-3일간 실험실의 환경에서 순화시킨 뒤 실험에 사용하였다.

2) 배양세포

인간 폐암 세포주인 A549 세포 (Human lung adenocarcinoma epithelial cell line)는 American Type

Table 1. Prescription of Geumsuyukgunjeon (GYJ)

Herbal name	Pharmaceutical name	Amount (g)
熟地黄	Rehmaniae Radix Preparata	12.0
陳皮	Citri Unshii Pericarpium	6.0
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4.0
半夏	Pinelliae Rhizoma	4.0
白茯苓	Poria sclerotium	4.0
甘草	Glycyrrhizae Radix	4.0
生薑	Zingiberis Rhizoma	4.0
Total amount		38.0

Culture Collection 社 (Manassas, VA, U.S.A.)에서 구입하였다.

3) 金水六君煎 (GYJ)의 약물 구성

金水六君煎 (이하 GYJ)의 구성 약물은 『方藥合編』¹⁴⁾에 근거하여, 동국대학교 부속 한방병원 약제실에서 공급받아, 精選하여 실험에 사용하였다. 한 첩 당 처방 내용 및 용량은 다음과 같다 (Table 1).

4) GYJ 추출물 분리

GYJ 한 첩 분량에 800 ml의 탈이온 2차 증류수를 가하고 100 °C에서 3시간 동안 전탕하여, 최종 80 ml의 탱액을 수거하였다. 탱액을 실온 정도로 식힌 후, clean bench 안에서 0.22 µm filter를 이용하여 가압 및 여과 후 멸균용기에 저장하여 4 °C에서 보관하였다.

5) 시약

Protease inhibitor cocktail은 Roche 社 (Indianapolis, IN, U.S.A.)에서, HRP-Goat Anti-Mouse IgG Conjugate 및 Mouse anti-MUC5AC clone 45 M1은 NeoMarkers 社 (Freemont, CA, U.S.A.)에서, trypsin-EDTA, epidermal growth factor (EGF), formaldehyde, alcian blue, bovine serum albumin (BSA), periodic acid-schiff (PAS), Tween 20, HEPES, dimethyl sulfoxide (DMSO), 3,3',5,5'- tetramethyl- benzidine peroxide solution (TMB), EDTA, EGTA, Trizma base, NP-40 등은 Sigma 社 (St. Louis, Mo., U.S.A.)에서, fetal bovine serum (FBS), penicillin-G, streptomycin, RPMI 1640은 GIBCO-BRL 社 (Grand Island, New York, U.S.A.)에서, 기타 다른 모든 시약은 일급시약급 이상의 제품을 구입 사용하였다.

2. 방법

1) In vivo

(1) 기도 점액 과다 분비 흰쥐 모델 작성

가로 2 m, 세로 0.6 m, 높이 0.3 m의 크기를 가진 아크릴 수지 재질의 직육면체 상자의 가로 면에 출입 문을 만들고 좌우 양 세로 면의 중심부에 구멍을 만들어 폴리에틸렌 소재의 관(管)을 부착시켰다. 이산화황 (SO₂, sulfur dioxide)이 발생하는 초음파 가슴기의 분무구에 한쪽 관을 연결하고 반대쪽 관은 배기 장치와 연결하였다.

이산화황 노출방법은 Pon 등¹⁵⁾이 보고한 방법을 개

량 및 변형하여 사용하였다. 초음파 가슴기에 15% (V/V) Sodium Metabisulfite (MBS) 수용액을 주입하고 가슴기를 작동시켰다. 작동이 시작된 후 3분 이내에 MBS의 증기가 가득하기 시작하였으며, 가슴기의 작동을 종료 할 때까지 실험장치 내부는 이산화황 130 - 150 ppm의 농도로 유지하였다.

흰쥐를 각 군당 3마리 이상으로 하여 대조군, 이산화황 1주 처리 후 최종 2주 동안 이산화황 처리 및 GYJ 동시 투여군, 이산화황 3주 처리군으로 무작위 배정하였다. 이산화황 노출 시간은 오후 1시에서 4시까지로 하였으며, 노출된 기간은 1일 3시간, 1주일에 5일, 총 3주간이었다. 대조군은 동일한 조건으로 사육하였으며, 실험기간 동안 이산화황 노출 및 GYJ 투여만 제외하였다¹⁶⁾.

(2) 기도 점액 과다 분비 흰쥐 모델에 GYJ의 경구투여

이산화황 1주 처리 후 최종 2주 동안 이산화황 처리 및 GYJ 동시 투여군에 배정된 실험동물을 대상으로 총 3주간의 이산화황 노출 기간 중 마지막 2주간 (총 10일) 동안 매일 오전 10시에서 11시 사이에 GYJ 추출물 2 ml를 경구투여용 주사바늘을 사용하여 투여하였다. 체중 350 g인 흰쥐의 GYJ 투여량은 체중 70 kg 성인이 복용하는 GYJ의 용량을 기준으로 환산하여 GYJ 추출물 2 ml로 하였다.

(3) GYJ가 호흡기 배상세포 내 점액 함유량에 미치는 영향 측정

GYJ가 흰쥐 호흡기 배상세포 내의 점액 함유량에 미치는 영향을 측정하기 위해 기관 내강 상피세포층에 대한 조직병리학적 검사를 실시하였다.

총 3주간의 이산화황 노출이 종료된 후 각 군에 소속된 실험동물을 이산화탄소를 이용하여 질식사시킨 후 기관을 절개 및 분리하여 pH 7.2의 냉각된 10%의 formalin in PBS에 넣어 24시간동안 고정하였다.

고정한 조직을 파라핀으로 포매 (embedding)하고 5 µm 두께로 잘라 (Microtome을 이용) 조직절편을 제작하였다. 탈파라핀 후에 Periodic Acid Schiff (PAS) - Alcian Blue (pH 2.5) 염색과 Hematoxylin-eosin 염색 후 광학 현미경으로 관찰하고 200배 배율에서 사진 촬영을 하였다. 대조군, 이산화황 처리군, 이산화황 처리 및 GYJ 동시 투여군의 배상세포 내 점액 함유량을 비교함으로써 GYJ가 배상세포 내의 점액 함유 상태에 미치는 영향을 측정하였다¹⁷⁾.

(4) GYJ의 경구투여가 흰쥐의 신장 기능에 미치는 영향 측정

흰쥐에게 투여된 GYJ에 의한 신장독성 여부를 검증하기 위하여, GYJ 투여 후 혈청 중의 BUN (Blood Urea Nitrogen) 및 creatinine의 값을 측정하였다.

BUN은 생화학 자동분석기인 OLYMPUS AU400 (Olympus, Japan)을 이용하여 측정하였다. 혈청 중 urease에 의해 특이적으로 분해된 요소(urea)는 이산화탄소와 암모니아를 생성하는데 이때 생성된 암모니아는 먼저 2-oxoglutarate와 반응하고, glutamate dehydrogenase의 존재 하에 NADH (Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide)와 반응하여 Glutamate와 NAD를 생성한다. 이 반응에서 NADH의 감소 속도를 측정함으로써 혈청 중의 BUN의 농도 (양)을 측정하였다.

혈청 중 creatinine은 picric acid와 pH가 알칼리성인 조건에서 반응하여 적색의 화합물을 생성하는데 그 화합물의 증가 속도를 측정함으로써 creatinine의 농도 (양)을 측정하였다.

(5) GYJ의 경구투여가 흰쥐의 간 기능에 미치는 영향 측정

흰쥐에게 투여된 GYJ에 의한 간 독성 여부를 검증하기 위하여, GYJ 투여 후 GOT (AST), GPT (ALT)의 혈청 중 활성을 OLYMPUS AU400 (Olympus, Japan)을 이용하여 측정하였다. GOT (AST), GPT (ALT)는 간세포의 파괴 시 혈청으로 유출되는 효소이다.

먼저, 혈청 중의 GOT (Glutamate Oxaloacetate Transaminase)는 L-Asparatate와 α -ketoglutarate를 각각 oxaloacetate와 L-Glutamate로 전환시키며 이때 생성된 oxaloacetate는 NADH의 존재 하에 MDH (Malate Dehydrogenase)의 작용으로 L-Malate로 전환된다. GOT의 활성 값은 340 nm에서 NADH의 감소 속도를 측정함으로써 계산하였다.

혈청 중 GPT (Glutamate Pyruvate Transaminase)는 α -ketoglutarate과 L-alanine를 pyruvate와 L-glutamate로 변환시키며, 이때 생성된 pyruvate는 NADH의 존재 하에 LDH (Lactate Dehydrogenase)의 작용으로 lactate로 전환된다. GPT의 활성 값은 340 nm에서 NADH의 감소 속도를 측정함으로써 계산하였다.

(6) GYJ의 경구투여가 흰쥐의 체중 증가에 미치는 영향 측정

흰쥐에게 투여된 GYJ의 생체 안정성을 검증하기 위해 전 실험 기간 중 각 동물의 체중 변화를 관찰하였다. 즉 실험 시작과 종료 시점의 각 동물의 체중의 차이를 측정하고, 대조군과 GYJ 투여군 간에 비교하여 GYJ 투여가 각 동물의 대사상태 및 영양상태에 미치는 영향을 검증하고자 하였다.

2) In vitro

(1) A549 세포 배양 및 GYJ의 처리

24시간의 GYJ 처리 기간 동안, GYJ가 인간 폐암 세포주인 A549 세포 내에 존재하는 MUC5AC 뮤신의 생성 (production)에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 A549 세포를 다음과 같은 방법으로 배양하였다.

세포는 95% 공기, 5% 이산화탄소를 함유하며 습도가 충분히 유지되는 37 °C의 조건에서 HEPES (25 mM), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), FBS (10%, V/V)등이 첨가된 RPMI 1640 배양액(이하 배양액)에서 배양되며 1주에 2회 subculture하였다.

뮤신 생성에 대한 GYJ의 작용을 검증하기 위하여 well 당 2.0×10^4 cells/well의 밀도로 (24 well culture plate를 기준) 세포를 도포하고 배양하였다.

세포가 다 자라면 FBS의 농도를 10%에서 0.2%로 감소시킨 배양액을 주고 24시간 동안 배양한 뒤, serum을 첨가하지 않은 serum-free medium 배양액으로 세포를 세척하였다. 이렇게 준비된 세포의 각 well (24 well culture plate 기준)마다 방제 추출물 2 - 10 μ l 씩을 함유하는 배양액 200 μ l를 가하고 30분이 지나서 EGF 25 ng/ml을 투여한 후 24시간동안 37 °C에서 배양하였다.

(2) A549 세포에서의 MUC5AC 뮤신 생성량 측정

24시간 동안의 배양이 종료된 후 세포 용해용 완충액 (20mM Tris, 0.5% NP-40, 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, protease inhibitor cocktail)을 가하여 세포 내 존재하는 MUC5AC 뮤신을 추출하였다.

수거된 세포 용해 추출액 (cell lysate)을 PBS로 1/10 배 희석하고 각 sample을 ELISA 전용 96-well plate에 각각 100 μ l씩 분포시킨 후 완전히 건조될 때까지 42 °C에서 incubation하였다. 그 후 PBS-Tween 20 (0.05%, PBS-T) 용액 200 μ l/well으로 3회씩 각 well을 세척하였다. 그 후 PBS-T에 용해된 2% BSA 용액 200

μl를 각 well당 가하고 다시 1시간 동안 incubation 하였다. 1시간 후 PBS-T 200 μl로 3회 세척하고 mouse anti-MUC5AC clone 45M1 (MUC5AC에 대한 monoclonal antibody)을 2% BSA에 1:200의 비율로 희석한 후 각 well당 100 μl씩 가하고 1시간 동안 incubation 하였다. 1시간 후 PBS-T로 3회 세척하고, 2차 항체인 Horse radish peroxidase (HRP)-Goat Anti-Mouse IgG Conjugate를 2% BSA에 1:3,000의 비율로 희석하여 각 well당 100 μl씩 첨가하고 1시간 동안 incubation 하였다. 1시간 후 PBS-T로 다시 3회 세척 하고 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine peroxide (TMB) 용액 100 μl를 각 well에 첨가한 후 5분 정도 지났을 때 1N H2SO4 50 μl를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 마지막으로 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하여 대조군과 GYJ 처리군 간의 MUC5AC 함량을 비교하였다^{18,9)}.

3. 통계처리

모든 측정 결과는 Mean ± S.E.M.으로 환산하여, GYJ 처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타냈다. 신독성·간독성·체중 증가 여부의 통계처리는 T-test, MUC5AC 뮤신생성의 통계처리는 One-way ANOVA로 하였으며 post-hoc test (사후 검정)로는 Holm-Sidak test를 실시하고, P<0.05인 경우에 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

III. Results

1. In vivo

1) 호흡기 상피 배상세포 내의 점액 함유량 증가에 미치는 영향

호흡기 상피세포층에 Periodic Acid Schiff (PAS) - Alcian Blue 염색과 Hematoxylin-eosin 염색을 실시한 후 광학 현미경으로 관찰해 보면 이산화황에 3주간 노출된 군의 흰쥐 배상세포 내에 검은 보라색으로 염색된 점액 (뮤신)의 양이 증가되어 있음에 비해 (Fig. 1. B), 이산화황 1주 노출 후 2주간 GYJ 동시 투여군의 흰쥐 배상세포 내에 검은 보라색으로 염색된 점액 (뮤신)의 양이 감소되는 경향을 보임을 알 수 있다 (Fig. 1. C).

2) 흰쥐의 신장 기능에 미치는 영향

신장 독성의 지표로는 Blood Urea Nitrogen (BUN) 및 creatinine의 혈청 중 농도를 선정하였으며, 2주간의 GYJ 경구투여 후 Blood Urea Nitrogen (BUN) 및 creatinine의 혈청 중 농도를 측정하였다.

대조군의 BUN 및 creatinine은 각각 3.500 ± 0.600 mg/dl (100 ± 17% control), 0.2264 ± 0.0066 mg/dl (100 ± 3% control)로, GYJ를 투여한 군의 BUN 및 creatinine은 각각 3.000 ± 0.600 mg/dl (86 ± 17% control), 0.2080 ± 0.0300 mg/dl (92 ± 13% control)으로 측정되어 유의한 차이를 보이지 않아 GYJ가 실험동물에서 신장 독성을 유발하지 않음을 확인하였다 (Fig. 2).

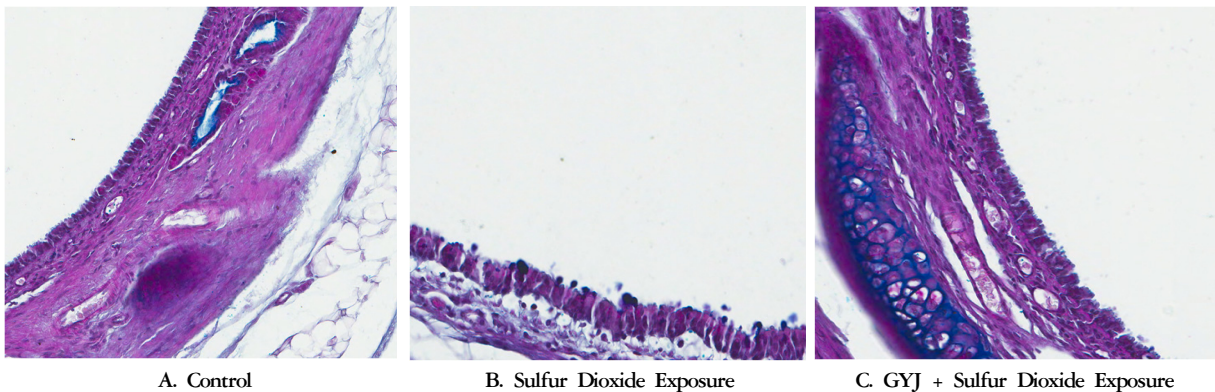


Fig. 1. Effect of GYJ on intraepithelial mucosubstances in trachea of rats exposed to sulfur dioxide

Rats were exposed to sulfur dioxide and effect of orally-administered GYJ extract on intraepithelial mucosubstances was investigated as described in Materials and Methods (zoom ; 200 X). (Hematoxylin-eosin and Periodic Acid Schiff (PAS)-Alcian Blue staining, Dark purple - black ; Mucin)

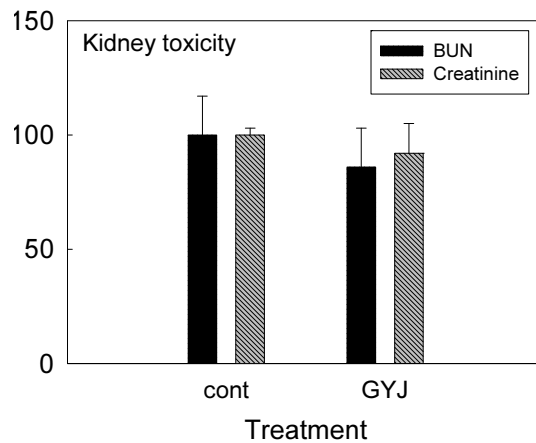


Fig. 2. Effect of GYJ on serum BUN and creatinine concentrations of rat

GYJ extract (2 ml/day/rat) was administered to rats during 2 weeks and serum BUN concentration and creatinine concentration of each rat were measured, as described in Materials and Methods. Each bar represents a mean \pm S.E.M. from 3 rats.

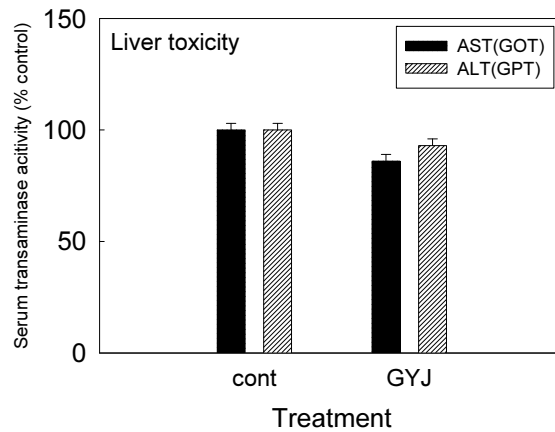


Fig. 3. Effect of GYJ on serum GOT and GPT activities of rat

GYJ extract (2 ml/day/rat) was administered to rats during 2 weeks and serum GOT and GPT activities of each rat was measured, as described in Materials and Methods. Each bar represents a mean \pm S.E.M. from 3 rats.

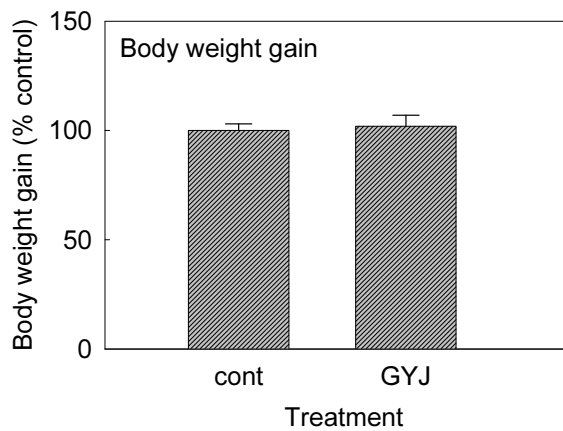


Fig. 4. Effect of GYJ on body weight gain of rat after oral administration

GYJ was administered to rats during 2 weeks and body weight of each rat in control group and GYJ administration group was measured, as described in Materials and Methods. Each bar represents a mean \pm S.E.M. from 3 rats.

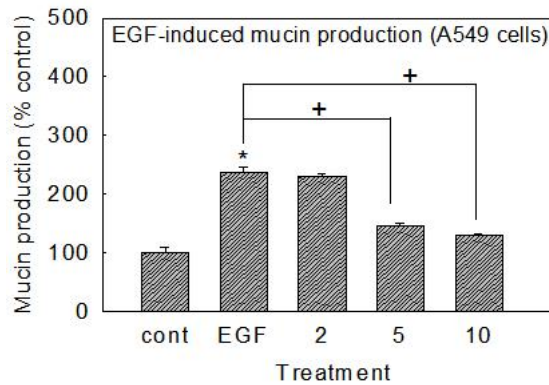


Fig. 5. Effect of GYJ on EGF-induced MUC5AC mucin production from A549 cells

A549 cells were pretreated with GYJ extract 2, 5, 10 μ l/200 μ l media for 30 min and then stimulated with EGF (25 ng/ml) for following 24hrs. Cell lysates were collected for quantitation of MUC5AC mucin production by ELISA as described in Materials and Methods. Each bar represents a mean \pm S.E.M. of 3 culture wells.

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

+ ; significantly different from EGF only ($P < 0.05$).

3) 흰쥐의 간 기능에 미치는 영향

간 독성의 지표로는 GOT (AST), GPT (ALT)의 혈청 중 활성을 선정하였으며, 2주간의 GYJ 경구투여 후 GOT (AST), GPT (ALT)의 혈청 중 활성을 측정하였다.

대조군에서 GOT 흡광도, GPT 흡광도는 각각 0.452 ± 0.014 ($100 \pm 3\%$ control), 0.328 ± 0.01 ($100 \pm 3\%$ control)로, GYJ을 투여한 군의 GOT, GPT 흡광도는 각각 0.389 ± 0.015 ($86 \pm 3\%$ control), 0.304 ± 0.011 ($93 \pm 3\%$ control)로 측정되어 유의한 차이를 보이지 않아 GYJ가 실험동물에서 간독성을 유발하지 않음을 확인하였다 (Fig. 3).

4) 흰쥐의 체중 증가에 미치는 영향

2주간의 GYJ 경구투여 기간을 포함한 총 3주간의 실험 기간 동안 각 군의 실험동물의 체중 변화를 측정하였다. 대조군은 142 ± 4 g ($100 \pm 3\%$ control)로, GYJ를 투여한 군은 145 ± 7 g ($102 \pm 5\%$ control)로 측정되어 체중 변화에 있어서 유의성 있는 차이를 보이지 않음을 확인하였다 (Fig. 4).

2. In vitro

1) A549 세포에서 EGF로 자극된 MUC5AC 뮤신생성 증가에 미치는 영향

GYJ 은 최종 추출물 5 및 10 μ l/200 μ l 배양액의 투여 농도에서 EGF (25 ng/ml)로 자극된 뮤신생성을 유

의성 있게 ($P < 0.05$) 감소시켰다 (Fig. 5).

IV. Discussion

호흡기는 온도 및 습도의 변화, 자극물질, 공해물질, 알레르겐에 항상 노출되어 있으므로 효과적이고 다양한 방어기전이 요구된다. 보통 호흡기방어는 점막 및 혈관층을 포함한 물리적 장벽, 기침과 같은 생리적 반사작용, 점액 섬모운동 등에 의해 유지되고 있다²⁰.

소아는 形氣未充 臟腑嬌嫩하여 衛外기능이 비교적 좋지 못하고 “脾常不足, 肺常不足, 腎常虛”하기에 外邪感受로 인한 咳嗽, 感冒, 肺炎 등의 호흡기계 질환이 발생하기 쉽다. 또한 호흡구조 사이의 간격이 성인보다 짧아서 병원체가 빠르게 이동하며¹, 기도의 내경이 좁고 점액섬의 밀도가 높아 호흡기 질환 발생 시 성인에 비해 분비물의 증가가 많다²¹.

2013년도 보건복지부 환자조사에 의하면 1세-19세 소아청소년기 외래환자 수진율 1위가 호흡계통의 질환이었다²². 또한 급성 기관지염 (J20)으로 한방치료를 받는 환자 중 0세-19세의 소아청소년기 환자가 차지하는 비율은 2011년 45.4%, 2012년 48.9%, 2013년 45.3%이며, 만성기관지염 (J42)로 한방치료를 받는 환자 중 0세-19세의 소아청소년기 환자가 차지하는 비율은 2011년 24.2%, 2012년 21.4%, 2013년 19.1%²³으로 상당한 비중을 차지하고 있다. 이를 볼 때 급·만성 기

관지염을 비롯한 소아 호흡기 감염성 질환에 대한 지속적인 한의학적 연구가 필요한 것으로 보인다.

기도 점액은 상기도 점막상피 위쪽 5-10 μm 에 점액층을 형성하고 있으며 정상인의 경우 하루 10-20 ml의 점액 분비가 일어난다. 점액 (mucus)의 분비는 오존, endotoxin, SO₂, 바이러스 혹은 염증 매체에 의해 영향을 받으며²⁴, 점액의 양은 주로 점액이 생성되는 속도와 섬모운동에 의해 제거 및 흡수 되는 속도의 균형에 의해 조절된다. 그러나 비염 (rhinitis), 부비동염 (sinusitis), 알레르기 비염 (nasal allergy), 만성 기관지염 (chronic bronchitis), 천식 (asthma)등의 염증성 호흡기 질환의 경우 점액분비세포의 과증식 (hyperplasia)과 섬모상피의 편평세포화생 (squamous metaplasia)으로 점액이 과다분비 (mucus hypersecretion)되어 질병의 예후를 악화시키게 된다²⁵⁻⁶.

기도의 점액은 상피 및 점막하선 조직의 분비물과 투과액 등이 혼합되어 있으며, 기도분비물 중 수분이 약 95%를 차지하고 나머지 5% 중 약 2-3%를 뮤신이 차지하고 있다²⁷. 뮤신의 양과 질의 이상으로 인한 뮤신의 점탄성 (viscoelasticity)의 변화는 기도의 인체 방어 작용에 영향을 주어 병리적인 증상을 유발할 수 있다²⁸.

뮤신 중량의 약 80%를 당단백질이 차지하고 있는데 이를 합성하는데 관여하는 유전자로 기도상피세포내의 점액유전자인 MUC유전자가 있음이 알려져 있다²⁹. 현재까지 사람과 설치류에서 21개의 MUC유전자가 발견되었는데³⁰, 정상적인 기도점막에서는 MUC5B가 기도점액의 주성분인 반면 기도의 염증성 질환에서는 기도점막에서 MUC5AC, MUC5B의 발현이 급격히 증가한다³¹. 최근의 연구에 의하면 기도의 염증으로 인한 점액분비과다 질환에서 상피세포 성장인자 (epidermal growth factor; EGF) 및 수용체 (EGF receptor; EGFR)가 활성화되어 배상세포의 증식이 일어나고, 이 과정에서 MAPK (mitogen-activated protein kinase)와 MEK 1,2가 세포내 신호전달에 관여하는 것으로 보고되었다³².

현재까지 점액의 과다분비를 조절하기 위해 점액용해제 (mucolytics)나 거담제 (expectorants)를 사용하여 점액의 배출을 돕는 방법, 점액 수송 능력을 향상시키는 방법, 점액 생성 양을 줄이는 방법 등을 사용하고 있다²⁵. 그러나 각 약물들의 응용범주와 약리작용 및 부작용 등에 의한 제한이 있어 임상에서 응용되기에 제한이 있다⁵.

한의학에서 호흡기 점액분비의 이상을 조래하는 질환은痰喘,哮喘등의 범주에서 찾아볼 수 있다. 그 원인이 되는痰飲은肺의宣降機能,脾의運化機能,腎의氣化機能 障碍,三焦水道の通調障碍등으로 인하여 발생한다.廣義의痰飲은어떤병변이된기관조직내에괴인점액물질을모두포괄하여지칭하고,狹義의痰飲은咯痰으로呼吸道에서咳出된일종의粘稠汚濁한分泌物을말하는데痰飲은그원인에따라風痰,寒痰,熱痰,濕痰,燥痰,鬱痰,氣痰등으로분류할수있다³³.痰飲의치료는淸熱化痰,除濕化痰,溫肺化痰하는治法을원칙으로二陳湯을기본處方으로활용하고있다.또한咯痰이수반되는호흡기질환환자에게주로柴梗半夏湯,瓜蒌枳實湯,蘇子導痰降氣湯,金水六君煎,淸上補下湯등을多用하고있다⁹.

본 연구에 사용된 金水六君煎은肺腎虛寒水泛爲痰咳嗽喘急한 증상을 치료하는데¹⁴ 그 구성 약물을 살펴보면 熟地黃은補血滋陰,滋胃,益眞陰하고 陳皮는理氣健脾,燥濕化痰하며 當歸는補血和血,活血止痛하고 半夏는降逆止嘔,燥濕化痰,消痞散結하며 白茯苓은滲濕利水,益脾和胃,寧心安身하고 甘草는補裨益氣,淸熱解毒,潤肺祛痰하며 生薑은發汗解表,溫中止嘔,溫肺止咳한다. 이를 종합하면 金水六君煎은半夏,陳皮,白茯苓,甘草의二陳湯으로燥濕化痰하여 이미 생성된痰을 제거하고 熟地黃,當歸의眞元飲으로補血,補腎水하는 처방이다^{34,5}. 현재까지 임상에서는肺腎陰虛가 오래 지속되어濕痰이內盛하여 발생하는多痰·咳嗽·喘逆·嘔惡·久嗽 및 만성 기관지염·기관지 천급·기관지 확장증 등의 증상에³⁶ 많이 응용되어 왔다. 그러나 金水六君煎의 점액분비 및 뮤신생성에 대한 영향을 객관적으로 규명한 연구는 아직까지 찾아볼 수 없었다.

이에 저자는 임상 한의학에서 객담을 수반한 호흡기 질환의 치료를 위해 사용되고 있는 金水六君煎이 기도 점액 과다 분비 흰쥐 모델의 기도조직 병태 및 호흡기 세포에서의 점액 생성에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하여 기도 점액 과다 분비의 조절 약물로서 급·만성 호흡기 염증성 질환의 치료제제로의 활용 가능성을 제시하고자 하였다. 본 실험에서는通行經絡,溫肺祛痰,利氣散結하여膜과皮사이나胸膈에생긴痰飲을 제거하는 효능이 있는‘白芥子’는氣弱不用하기에 제외하고 사용하였다³⁴.

먼저 in vivo 실험을 위해 흰쥐에 이산화황을 3주간 흡입시켜 기도점액 과다분비 모델을 제작하였다. 보통

흰쥐에 1-3주의 이산화황을 노출시키면 인간의 기관지염과 유사한 병리학적 변화를 일으켜 점막 하 점액선의 크기와 배상세포 (goblet cell)수의 증가 및 뮤신 (점액)의 양을 증가시키며, 말초기도 뮤신의 산성화 등의 조직학적 변화를 일으킨다⁴⁾. 저자는 대조군, 3주간 이산화황 처리군, 1주간 이산화황 처리 후 2주간 이산화황 처리 및 GYJ 동시 투여군의 호흡기 상피 배상세포 내 점액 함유량 측정을 위해 호흡기 상피세포층에 Periodic Acid Schiff (PAS) - Alcian Blue 염색과 Hematoxylin-eosin 염색 후 광학 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 이산화황에 3주간 노출된 흰쥐군의 경우 배상세포 내 검은 보라색으로 염색된 점액 (뮤신)의 양이 대조군 (Fig. 1 A)에 비하여 증가되는 경향을 보였으나 (Fig. 1 B), 이산화황 1주 노출 후 2주간 이산화황 노출 및 GYJ 동시 투여군에서는 배상세포 내 검은 보라색으로 염색된 점액 (뮤신)의 양이 감소되는 경향을 나타내었다 (Fig. 1 C). 이는 金水六君煎 호흡기 점액 과생성 및 과분비 현상의 조절 혹은 치료약물로서 응용될 가능성을 일부나마 제시하는 기초과학적 증거라고 판단할 수 있다.

동시에, 치료약물은 유효하면서도 안전성이 담보되어야 하므로 金水六君煎 투여에 대한 안전성을 검증하기 위하여 신기능과 간기능 및 흰쥐의 체중 증가에 미치는 영향을 측정하였다. 신장독성 여부를 확인하기 위해 Blood Urea Nitrogen (mg/dl)과 Creatinine (mg/dl)의 혈청 중 농도를 측정 하였다. 그 결과 대조군의 BUN은 3.500 ± 0.600 mg/dl ($100 \pm 17\%$ control), GYJ를 투여한 군의 BUN은 3.000 ± 0.600 mg/dl ($86 \pm 17\%$ control)으로 측정되어 유의한 차이는 관찰할 수 없었으며, 대조군의 Creatinine은 0.2264 ± 0.0066 mg/dl ($100 \pm 3\%$ control), GYJ를 투여한 군의 Creatinine은 0.2080 ± 0.0300 mg/dl ($92 \pm 13\%$ control)으로 측정되어 역시 유의성 있는 차이를 관찰할 수 없었다 (Fig. 2). 또한 간독성 여부를 확인하기 위해 transaminase인 GOT (AST), GPT (ALT)의 혈청 중 활성을 측정하였다. 대조군에서 GOT 흡광도는 0.452 ± 0.014 ($100 \pm 3\%$ control), GYJ를 투여한 군의 GOT 흡광도는 0.389 ± 0.015 ($86 \pm 3\%$ control)으로 측정되어 유의성 있는 차이를 관찰할 수 없었으며, 대조군의 GPT 흡광도는 0.328 ± 0.01 ($100 \pm 3\%$ control)이며, GYJ를 투여한 군의 GPT 흡광도는 0.304 ± 0.011 ($93 \pm 3\%$ control)로 측정되어 유의성 있는 차이를 관찰할 수 없었다 (Fig. 3). 마지막으로 체중 변화에 미치는

영향을 알아보기 위해 2주간의 GYJ 경구 투여 기간을 포함한 총 3주간의 실험 기간 동안 각 흰쥐의 체중 변화를 측정하였는데, 대조군은 142 ± 4 g ($100 \pm 3\%$ control)로, GYJ를 투여한 군은 145 ± 7 g ($102 \pm 5\%$ control)로 측정되어 체중 변화에 있어서 유의성 있는 차이를 보이지 않았다 (Fig. 4). 이로써 金水六君煎이 동물의 전반적인 영양 및 대사기능에 독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다.

다음으로 金水六君煎이 실험동물에서 호흡기 점액의 과생성 및 과분비를 억제한다면, 세포 수준에서 뮤신의 생성 (production)에는 어떤 영향을 주는 지를 알아보고자 *in vitro* 실험을 진행 하였다. 호흡기 뮤신의 세포 및 분자생물학적 연구모델로 사용되는 인간 폐암 세포주인 A549 세포에 金水六君煎 추출물 각각 2 - 10 μ l 씩을 함유하는 배양액 200 μ l를 가지고 30분이 지난 시점에 EGF (25 ng/ml)를 투여하여 뮤신의 생성을 자극한 상태에서 효소연계 면역흡착정량법 (ELISA)을 이용하여 MUC5AC을 측정하여 뮤신의 생성에 대한 金水六君煎의 영향을 알아보았다. 실험 결과 金水六君煎 추출물 5 및 10 μ l/200 μ l 배양액을 투여한 세포에서 EGF로 자극된 뮤신생성을 감소시켰다 (Fig. 5). 이상의 연구결과에서 볼 수 있는 바 金水六君煎의 투여는 MUC5AC 기도 뮤신 당단백질의 생성을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과는 金水六君煎의 燥濕化痰, 潤肺祛痰하는 半夏, 陳皮, 茯苓 및 補血滋陰하는 熟地黃, 當歸의 本草들이 작용하여 기도 점액의 과다한 생성 및 분비를 감소시키고, MUC5AC 기도 뮤신 당단백질의 생성을 감소시키는 방향으로 작용하는 것으로 보인다. 따라서 金水六君煎이 급성 혹은 만성 호흡기 염증성 질환 병태에서 기도 점액의 과다한 생성 및 분비를 감소시키며 세포 수준에서도 점액의 생화학적 주성분인 뮤신의 생성을 감소시킴으로써 호흡기 염증성 질환의 조절 혹은 치료 수단으로서 작용할 가능성을 제시하고 있다.

소아는 성인에 비해 호흡계통 질환에 이환되기 쉬우며, 기도 내 점액 분비물이 증가하여 기관지염이 발생하기 쉽다. 현재까지 金水六君煎은 임상에서 年老하여 陰虛하고 氣血이 不足하거나, 中氣不足, 만성적 咳嗽 등에 많이 응용하였다. 소아의 경우 脾肺腎 三臟不足으로 인해 호흡기계 질환의 이환과 전변이 빠르므로 熟地黃, 當歸의 貞元飲으로 陰血을 補하면서 半夏, 陳皮, 茯苓, 甘草의 二陳湯로 咯痰을 제거하는 金水六君

煎은 소아의 호흡기 염증성 질환에 폭넓게 응용 가능할 것으로 보인다. 향후 다양한 원인에 따른 호흡기 감염 질환 모델을 이용하여 金水六君煎 및 각 본초의 자세한 작용 기전과 효과를 입증하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. Conclusion

金水六君煎이 기도점액 과다분비 흰쥐 모델의 기도 조직 병태 및 호흡기 세포에서의 점액 생성에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여, 이산화황 흡입투여로 유발된 기도점액 과다분비 흰쥐 모델을 대상으로 호흡기 배상세포내의 점액 함유량에 대한 金水六君煎의 영향과, 점액을 생성하는 인간의 폐암 세포주인 A549 세포에서 기도 뮤신인 MUC5AC 뮤신에 대한 金水六君煎의 영향을 관찰한 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 흰쥐 기도점액 과다분비 모델에 金水六君煎을 투여한 결과, 호흡기 배상세포 내 점액 함유량을 감소시켰다.
2. 金水六君煎은 실험동물에게 투여했을 때 신기능 및 간기능, 체중 증가도에 영향을 주지 않았다.
3. 金水六君煎은 인간 폐암 세포주 A549에서 점액 과다생성조건에서의 뮤신 생성을 억제하였다.

종합하면, 金水六君煎은 기도 점액 과다 분비를 동반한 호흡기 질환에서 기도 점액의 과다한 생성 및 분비를 감소시키며, 세포 수준에서 점액의 생화학적 주성분인 뮤신의 생성을 감소시킴으로써 호흡기 염증성 질환의 조절 혹은 치료 수단으로서 활용 가능성이 있다.

References

1. Kim KB, Kim DG, Kim YH, Kim JH, Min SY, Park EJ, Baek JH, Yu SA, Lee SY, Lee JY, Lee HJ, Chang GT, Chai JW, Han YJ, Han JK. Hanbangsoacheongsoneonuihak. Seoul: Ui Sung Dang Publishing Co. 2010:339-40, 357.
2. Ali M, Lillehoj EP, Park Y, Kyo Y, Kim KC. Analysis of the protome of human airway epithelial secretions.

- Proteome Sci. 2011;9:4.
3. Sim YS. Clinical respiratory system. Seoul: Iljogak. 1990:6-8.
4. Lee CJ, Ko KH. Pathophysiologic characteristics of airway mucus-hypersecretory diseases and experimental models. Biomol Ther. 1998;6(1):1-8.
5. Rogers DF. Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology. Curr Opin Pharmacol. 2004;4(3):241-50.
6. Rogers DF, Barnes PJ. Treatment of airway mucus hypersecretion. Annal Med. 2006;38(2):116-25.
7. Hong WS, Kim YN. Gukyeok kangeokzeonseo. Seoul: Iljungsa. 1992:34.
8. Yan YM. Kangeokzeonseo. Seoul: Hanmiuihak. 2006:1920.
9. Lee HG, Jung ki, Jung HJ, Kim JD. Donguiyegeneagwahak. Seoul: Gukjingihoek. 2004: 114, 168.
10. Lee SY, Park DI. Effects of Gyurnsuyukgunjun on the injured tracheal tissue induced SO₂ in rats. Korean J Orient Med. 1996;2(1):226-35.
11. Kam CW, Park DI. Experimental study of the effects of Gyumsuyukgunjun on the pulmonary injury caused by exposute of cigarette smoke in rat. Korea Institute of Sci Technol Inf. 1997;3(1):261-78.
12. Kim CS, Choi HY, Kim JD. Effects of Kumsooyukkun-jeon on asthma induced by ovalbumin in mice. J Korean Med. 2002;23(3):104-18.
13. Song JJ, Park YC, Kim BT, Kim SH. Effect of Kamkeumsooyukkunjeon on allergy and lung damage. Korean Soc Orient Med Pathol. 2002;14(2):70-9.
14. Hwang DY. Bangyakhappyeon. Seoul: Yonglimsa. 2002:148-9.
15. Pon DJ, Van Staden CJ, Boulet L, Roger IW. Hyperplastic effects of aerosolized sodium metasulfite on rat airway mucus-secretory epithelial cells. Can J Physiol Pharmacol. 1994;72(9):1025-30.
16. Lee, CJ. Effects of poly-L-arginine on the mucin release from airway goblet cells of hamster and on the mucosubstances of airway goblet cells of rat. J Appl Pharmacol. 2001;9(4):263-9.
17. St George JA, Cranz DL, Zicker S, Etchison JR, Dungworth DL, Plopper CG. An immunohistochemical

- characterization of Rhesus monkey respiratory secretions using monoclonal antibodies. *Am Rev Resp Dis.* 1985;132:556-63.
18. Shao MXG, Ueki IF, Nadel JA. Tumor necrosis factor alpha converting enzyme mediates MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:11618-23.
 19. Song KS, Lee WJ, Chung KC, Koo JS, Yang EJ, Choi JY, Yoon JH. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor-alpha Induce MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278:23243-50.
 20. The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease. *Pediatrics allergy immunology pulmonology.* Seoul: Goonjachulpana. 2005:267.
 21. Kang YI, Jang GM. *Silyongjongeigwahak.* Sanghaigwahakgisulchulpana. 1995:455-61.
 22. Korea institute for health and social affairs. Patients survey in 2013[Internet]. Available from: <http://stat.mw.go.kr/front/statData/publicationView.jsp?menuId=45&bbsSeq=11&nttSeq=21200&searchKey=&searchWord=&nPage=1>
 23. Health insurance review and assessment service. Survey of diseases and service: acute bronchitis(J20), chronic bronchitis(J242)[Internet]. Available from: <http://www.hira.or.kr/rd/dissdc/infoSickList.do?pgmid=HIRAA020044020100>
 24. Jany B, Gallup M, Tsuda T, Basbaum CB. Mucin gene expression in rat airways following infectin and irritation. *Biochem Biophys Res Comm.* 1991;181:2002:73-6.
 25. The Korean Academy of Asthma, Allergy and clinical immunology. *Asthma and allergy.* Seoul: Gunjachulpana. 2005;99(6):703-10.
 26. Culpiitt SV, Rogers DF, Traves SL, Barnes PJ, Donnelly LE. Sputum matrix metalloprotease: comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Respir Med.* 2005;99(6):703-10.
 27. Kim DJ, Kim KU, Namgung EK. Measurement of mucin amounts using RTO3 in patients with chronic airway disease. *Tuberc Respir Dis.* 1999;47(6):792-3.
 28. Zuhji Alimam M. Muc-5/5ac mucin messenger RNA and protein expression is a marker of goblet cell metaplasia in murine airways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;22:253-60.
 29. Hoorens PR, Rinaldi M, Li RW, Goddeeris B, Claerebout E, Wercruysse J. Genome wide analysis of the bovine mucin genes and their gastrointestinal transcription profile. *BMC Genomics.* 2011;12:140.
 30. Rousseau K, Kirkham S, McKane S, Newton R, Clegg P, Thornton DJ. Muc5b and muc5a are the major oligomeric mucins in equine airway mucus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292:1396-404.
 31. Shim JJ, Dabbagh K. Suplatast tosilate inhibits goblet-cell metaplasia of airway epithelium in sensitized mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105:739-45.
 32. Jung HJ, Jung SK, Lee HG. Review of literatures about sputum on west-oriental medicine. *J Orient Chronic Dis.* 1995;1(1):51-62.
 33. Lee SI, An DG, Sin MG. *Hanyakilmsangyeongyong.* Seoul: Sungbosa. 1986:355-6, 395.
 34. Sin MG. *Ilmsangyeongyongbonchuhak.* Seoul: Namsandang. 1988:176-7, 219, 221-2, 250-1, 254-5, 380-1, 556-7.
 35. Bea BC. *Ilmsangbangjahak.* Seoul: Sungbosa. 1995: 414.