

滋陰降火湯이 호흡기 점액의 생성 및 분비에 미치는 영향

천진홍¹ · 민상연² · 김장현²

¹부산대학교 한의학전문대학원

²동국대학교 한의과대학 한방소아과학교실

Abstract

Effect of Jaeumganghwa-tang on Production and Secretion of Respiratory Mucus

Cheon Jin Hong¹ · Min Sang Yoen² · Kim Jang Hyun²

¹Department of Korean Pediatrics, School of Korean Medicine, Pusan National University

²Department of Pediatrics, College of Korean Medicine, Dongguk University

Objectives

In this study, the effects of Ja-eum-gang-hwa-tang (JGT) on the increase in airway epithelial mucosubstances of rats and ATP- or PMA- or EGF- or TNF- α -induced MUC5AC mucin production and gene expression from human airway epithelial cells were investigated.

Materials and Methods

Hypersecretion of airway mucus was produced by exposure of SO₂ to rats for 3 weeks. The effect of orally-administered JGT for 2 weeks on increased epithelial mucosubstances from tracheal goblet cells of rats was assessed by using histopathological analysis after staining the epithelial tissue with Hematoxylin-eosin and PAS-alcian blue. Possible cytotoxicity of JGT was assessed by investigating the potential damage on kidneys and liver functions by measuring serum GOT/GPT activities and serum BUN concentration of rats and the body weight gain during experiment. Also, the effect of JGT on ATP- or PMA- or EGF- or TNF- α -induced MUC5AC mucin production and gene expression from human airway epithelial cells (NCI-H292) were investigated.

Confluent NCI-H292 cells were pretreated for 30 min in the presence of JGT and treated with ATP (200 μ M) or PMA (10 ng/ml) or EGF (25 ng/ml) or TNF- α (0.2 nM) for 24 hrs to assess the effect of JGT both on ATP- or PMA- or EGF- or TNF- α -induced MUC5AC mucin production by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and on gene expression by the same inducers using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results

- (1) JGT decreased the amount of intraepithelial mucosubstances of trachea of rats.
- (2) JGT did not show any renal and hepatic toxicities, and did not affect body weights either.
- (3) JGT significantly inhibited ATP-, PMA-, EGF-, and TNF- α -induced MUC5AC mucin productions from NCI-H292 cells.
- (4) JGT inhibited EGF-, and PMA-induced expression levels of MUC5AC gene in NCI-H292 cells. However, ATP- and TNF- α -induced MUC5AC gene expression levels were not affected in NCI-H292 cells.

Conclusions

The result from the present study suggests that JGT might control the production and gene expression of airway mucin observed in various respiratory diseases which accompanied by mucus hypersecretion. Also, JGT did not show liver toxicity or impact on kidney functions. The effect of JGT should be further studied by using animal experimental models which can show proper pathophysiology of airway diseases.

Key words : Jaeumganghwa-tang (JGT), Mucus secretion, Mucin, MUC5AC, NCI-H292 cells

Received: April 22, 2016 • Revised: May 13, 2016 • Accepted: May 16, 2016

Corresponding Author: Kim Jang Hyun

Dongguk university Bundang Oriental Medicine Hospital 1F Oriental Pediatrics,
268 Buljeong-ro Bundang-gu, Sungnam-si, Gyeonggi-do 463-865, Republic of Korea

Tel: +82-31-710-3724, Fax: +82-31-710-3780

E-mail: kjh@dongguk.ac.kr

© The Association of Pediatrics of Korean Medicine. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I. Introduction

기도는 호흡기를 통해 유입되는 병원성 미생물, 유해성 기체 및 입자 등에 대한 방어에 있어서 다양한 방식으로 기능을 발휘한다. 한편, 소아의 호흡기는 기도 내경이 작아서 폐쇄성 질환을 일으키기 쉽고, 면역력이 완전히 성숙되지 않아 감염이 자주 발생하며, 기도 점액선의 밀도가 높아 염증이 생겼을 때 쉽게 많은 분비물이 분비된다¹⁾. 특히, 소아는 생리적으로 臟腑嬌嫩하고 形氣未充한 특징을 보이는데, 그 중에서도 肺常不足으로 인한 衛外기능의 未固로 六淫의 邪氣를 받기 쉬워서 급성 호흡기 감염으로 인한 感冒, 咳嗽, 哮喘, 肺炎 등이 자주 발생하며²⁾, 肺의 宣降기능의 장애로 인한 氣機不利로 津液이 쌓여 痰이 쉽게 형성되고 이 有形的 痰이 기도를 막아 기침이 쉽게 심해지게 된다³⁻⁴⁾.

기도 점액은 수분, 지질, 당단백질, 단백질, 염류, 효소, 항효소 물질, 산화성 물질, 항산화성 물질, 외인성 세균, 내인성 항균물질, DNA 등 세포 잔해, 히스타민 등 세포 및 혈장유래 염증매개 물질의 혼합물이다⁵⁾. 특히, 뮤신 (mucin)은 점액성 당단백질 (mucous glycoprotein)로 전체 점액 중량의 2% 정도 만을 차지하는 물질이나 이러한 점액 (mucus)에 물리화학적 성질인 점탄성 (viscoelasticity)을 부여하는 주요한 생화학적 구성요소이다. 정상적인 생리 상태에서 뮤신은 생체 방어적으로 작용하지만, 다양한 만성 기도 질환에서 관찰되는 점성이 비정상적으로 높은 점액의 과다 생성 혹은 과다 분비 즉, 뮤신의 양과 질의 이상은 병리적으로 작용하여 질환의 악화를 유발할 수 있으며, 호흡기 질환의 예후를 악화시키는 주된 요인이 된다⁶⁻⁷⁾.

서양의학계에서도 이러한 기도 점액의 점도나 과다 분비를 조절하기 위해 점액용해제, 점액활성제, 점액 조절제 등의 여러 약물을 사용하고 있지만, 각 약물의 약효나 부작용 측면에서 다양한 문제가 발생하여 효율적인 약물요법의 시행이 쉽지 않은 것으로 알려져 있으며⁸⁻⁹⁾, 새로운 작용기전을 가진 효과적인 약물을 개발하기 위해 지속적인 노력을 하고 있으나 실용화되어 임상에서 효과적으로 적용 중인 약물은 아직 없는 것으로 알려져 있다^{6,10-11)}.

滋陰降火湯은 龔¹²⁾의 《萬病回春·虛勞門》에 수록된 처방으로, 陰虛火動, 發熱咳嗽, 吐痰喘急, 盜汗口乾, 咯唾血, 將成勞瘵 등에 사용한다고 하였으며, 근래

임상에서는 급만성 기관지염, 상기도염, 폐결핵, 기타 기관지천식 등에 유용하게 활용되고 있다¹³⁾. 滋陰降火湯에 관한 실험적 연구로는, 趙 등¹⁴⁾과 鄭 등¹⁵⁾의 실험적으로 손상된 肺에 대한 효능 연구, 김 등¹⁶⁾의 알레르기성 염증반응억제 효과에 대한 연구 및 정 등¹⁷⁾의 면역 활성화에 대한 비교 연구 등이 있었으나, 기도 점액 과다 분비 상태의 치료 효과에 대하여 객관적으로 규명한 연구는 아직 이루어지지 않았다.

이에 저자는 기도 점액의 과다 분비 및 이와 연관된 기도 뮤신의 생성 및 유전자 발현에 어떠한 작용을 발현할 수 있는지를 알아보기 위하여, 기도 점액 과다 분비 흰쥐 모델에서 상피 배상 세포 (goblet cell) 내의 점액 함유량에 대한 滋陰降火湯의 영향을 관찰하였으며, 세포 수준에서의 滋陰降火湯의 약리작용 및 그 기전을 탐색하기 위하여 인간의 기도 상피 세포인 NCI-H292 세포에서 기도 뮤신인 MUC5AC 뮤신의 생성에 대한 약물의 영향과 기도 뮤신 유전자인 MUC5AC mRNA의 발현을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. Materials and methods

1. 재료

1) 동물 - 5주령의 체중 200 g 내외인 Sprague-Dawley (SD)계 雄性 흰쥐 (대한바이오링크(주), Kyung-gi, Korea)를 구입하고, 2~3일간 실험실 환경에서 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 본 동물실험은 부산대학교 동물실험윤리위원회 (PNU-IACUC)에 의해 동물실험의 윤리성과 과학성에 대한 검토를 받아 적합한 것으로 승인 (승인번호: PNU-2016-1162)을 획득하여 수행되었다.

2) 배양세포 - NCI-H292 세포는 American Type Culture Collection사 (Manassas, VA, U.S.A.)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

3) 약재 - 滋陰降火湯 (이하 JGT)의 구성 약물은 《方藥合編》¹⁸⁾에 준하여, 동국대학교 부속 한방병원 약제실에서 공급받아, 정선하여 사용하였다. 한 첩당 처방의 내용과 용량은 다음과 같다 (Table 1).

4) JGT 추출물 분리 - JGT 한 첩 분량에 800~1,000

Table 1. The Contents of Ja-eum-gang-hwa-tang (JGT)

Herbs	Scientific Name	Dose (g)
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	6.0
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	5.0
熟地黃	<i>Rebmanniae Radix Preparata</i>	4.0
麥門冬	<i>Liriodopsis Tuber</i>	4.0
白朮	<i>Atractylis Rhizoma</i>	4.0
生地黃	<i>Rbenamniae Radix</i>	4.0
黃柏	<i>Pbellodendri Cortex</i>	3.0
知母	<i>Anemarrhenae Rhizoma</i>	3.0
陳皮	<i>Aurantii nobilis Pericarpium</i>	3.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2.0
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	6.0
大棗	<i>Zizyphi inermis Fructus</i>	6.0
Total amount		50.0

mℓ의 탈이온 2차 증류수를 가하고 100 ℃로 가열된 상태에서 3시간 동안 전탕하여, 최종 80 mℓ의 탱액을 수거하였다. 탱액을 실온 정도로 식게 한 후, 클린 벤치 안에서 0.22 μm filter를 이용하여 가압 여과하고 멸균용기에 저장하여 4 ℃ 조건에서 보관하였다.

5) 시약 - Easy-Blue RNA extraction kit는 INTRON biotechnology사 (Kyung-gi, Korea)에서, Accuprep RT premix kit와 Accuprep PCR premix kit는 Bioneer사 (Daejeon, Korea)에서, Protease inhibitor cocktail은 Roche사 (Indianapolis, IN, U.S.A.)에서, Mouse anti-MUC5AC clone 45M1 및 HRP-Goat Anti-Mouse IgG Conjugate은 NeoMarkers사 (Freemont, CA, U.S.A.)에서, ethidium bromide, trypsin-EDTA, epidermal growth factor (EGF), formaldehyde, alcian blue, periodic acid-schiff (PAS), tumor necrosis factor-α (TNF-α), Tween 20, bovine serum albumin (BSA), HEPES, dimethyl sulfoxide (DMSO), diethylpyrocarbonate (DEPC), 3,3',5,5'- tetramethyl- benzidine peroxide solution (TMB), Trizma base, NP-40, EDTA, EGTA, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) 등은 Sigma사 (St. Louis, Mo., U.S.A.)에서, penicillin-G, streptomycin, fetal bovine serum (FBS), RPMI 1640은 GIBCO-BRL사 (Grand Island, New York, U.S.A.)에서 구입하였으며, 기타 제반 시약들은 일급시약 등급 이상의 제품을 구입하여 사용하였고, 물은 탈이온 2차 증류수를 사용하였다.

2. 방법

1) In vivo

(1) 기도 점액 과다 분비 흰쥐 모델의 조성

아크릴수지 판을 이용하여 직육면체 상자 (200 cm × 60 cm × 30 cm, 두께 2 cm)를 제작하여 상자의 가로면에 실험동물이 출입할 수 있도록 출입문을 만들고, 좌우 양 세로면의 중심부에 구멍을 만든 후 폴리에틸렌 소재의 duct를 부착시켰다. 한쪽 duct는 이산화황 (sulfur dioxide, SO₂)이 발생하는 초음파 가슴기의 분무구에, 반대쪽 duct는 배기 장치에 각각 연결하였다. SO₂ 노출방법은 Pon 등¹⁹⁾이 보고한 방법을 개량·변형하여 사용하였다. 15% (V/V) Sodium metabisulfite (MBS) 수용액을 초음파 가슴기에 주입하고 가슴기를 작동시켰고, 작동 후 3분 이내에 MBS의 증기가 충만했으며 작동 종료 시까지 실험장치 내부의 SO₂ 농도는 130~150 ppm으로 유지시켰다. 흰쥐를 대조군 (무처리군), SO₂ 3주 처리군, SO₂ 1주 처리 후 최종 2주간 SO₂ 처리 및 JGT 동시 투여군으로 무작위 배정하였는데, 각 군당 흰쥐 수는 5마리 이상으로 하였다. 노출 기간은 1일 3시간, 1주일에 5일, 3 주간이었다. 대조군은 실험장치가 설치된 동일한 실내에서, 전 실험기간 동안 1일 3시간의 SO₂ 노출 및 JGT 처리 과정만 제외하고 노출군과 동일한 조건으로 사육하였다²⁰⁾.

(2) 기도 점액 과다 분비 흰쥐 모델에 JGT의 경구투여

체중 350 g의 흰쥐에게 투여할 용량을, 체중 70 kg 성인이 복용하는 JGT의 용량을 기준으로 환산하여, 투

여 용량은 JGT 추출물 2 ml로 하였다. SO₂ 1주 처리 후 최종 2주간 SO₂ 처리 및 JGT 동시 투여군에 배당된 흰쥐 모델을 대상으로, 경구투여용 주사바늘을 이용하여 JGT 추출물 2 ml를 투여하였다. 즉, 총 3주간의 SO₂ 노출 기간 중 마지막 2주간 (총 10일), 매일 반복적으로 JGT를 투여하였는데, JGT의 투여는 오전 10시에서 11시 사이에, SO₂ 노출은 오후 1시에서 4시까지 각각 실시하였다.

(3) 흰쥐의 기도 배상 세포내 점액 함유량에 미치는 영향 측정

JGT가 흰쥐 기도 배상 세포내 점액 함유량에 미치는 영향을 측정하기 위하여 기관내강 상피 세포층에 대한 병리조직학적 검사를 실시하였다. 3주간의 SO₂ 노출 기간이 종료된 후 각 군에 소속된 해당 흰쥐 모델을 이산화탄소로 질식사시킨 후, 기관을 절개·분리하여 냉각된 10% formalin in PBS (pH 7.2)에 넣어 24시간동만 고정하였다. 고정한 조직은 파라핀으로 포매(embedding)한 후, Microtome을 이용하여 5 μm 두께로 잘라 조직절편을 제작하였다. 탈파라핀 과정을 거치고 Hematoxylin-eosin 염색과 Periodic Acid Schiff (PAS) - Alcian Blue (pH 2.5) 염색을 실시한 후, 광학 현미경으로 관찰하고 200배 배율에서 사진 촬영하였다. 대조군, SO₂ 처리군, JGT 처리군의 기도 배상 세포내 점액 함유량을 비교함으로써 JGT이 배상 세포내 점액 함유 상태에 미치는 영향을 측정하였다²¹⁻²⁾.

(4) 흰쥐의 체중 증가에 미치는 영향 측정

투여된 JGT의 생체 안전성을 검증하기 위한 하나의 지표로서 JGT 투여 기간을 포함하여 전 실험 기간 중 각 흰쥐 모델의 체중 증가 정도, 즉 실험 시작 시점의 각 흰쥐 모델의 체중과 실험 종료 시점의 체중의 차이를 측정하여 대조군과 JGT를 투여한 군 간에 비교함으로써, JGT 투여가 각 흰쥐 모델의 영양 및 대사 상태에 미치는 영향을 검증하고자 하였다.

(5) 흰쥐의 간 기능에 미치는 영향 측정

투여된 JGT에 의한 간독성 발생 여부를 검증하기 위하여, 간세포 파괴시 혈청으로 유출되는 효소인 GOT (AST), GPT (ALT)의 혈청 중 활성을 생화학 자동 분석기인 OLYMPUS AU400 (Olympus, Japan)을 이용하여 측정하였다. 먼저, 혈청 중의 GOT (Glutamate Oxaloacetate

Transaminase)는 L-aspartate와 α-ketoglutarate를 oxaloacetate와 L-glutamate로 전환시키며 이때 생성된 oxaloacetate는 Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH)의 존재 하에 Malate Dehydrogenase (MDH)의 작용으로 L-malate로 전환된다. GOT의 활성값은 340 nm에서 NADH의 감소 속도를 측정함으로써 계산하였다. 혈청 중 GPT (Glutamate Pyruvate Transaminase)는 L-alanine과 α-ketoglutarate를 pyruvate와 L-glutamate로 변환시키며, 이때 생성된 pyruvate는 NADH의 존재 하에 Lactate Dehydrogenase (LDH)의 작용으로 lactate로 전환된다. GPT의 활성값은 340 nm에서 NADH의 감소 속도를 측정하여 계산하였다.

(6) 흰쥐의 신장 기능에 미치는 영향 측정

투여된 JGT에 의한 신장독성 발생 여부를 검증하기 위하여, JGT 투여 후 혈청 중의 Blood Urea Nitrogen (BUN) 값을 생화학 자동분석기인 OLYMPUS AU400 (Olympus, Japan)을 이용하여 측정하였다. 혈청 중의 요소(urea)는 urease에 의해 특이적으로 분해되어 암모니아와 이산화탄소를 생성하며, 생성된 암모니아는 2-oxoglutarate와 먼저 반응하고 GLDH의 존재 하에 NADH와 반응하여 glutamate와 NAD를 생성하고, 이 반응에서 감소하는 NADH의 감소 속도를 측정하여 BUN의 농도를 계측하였다.

2) In vitro

(1) NCI-H292 세포 배양 및 JGT의 처리

24시간의 JGT 처리 기간 동안, JGT이 인간 기도 상피세포인 NCI-H292 세포 내에 존재하는 MUC5AC 뮤신의 생성 및 유전자 (mRNA)의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 NCI-H292 세포를 다음과 같은 방법으로 배양하였다. 세포는 습도가 충분히 유지되며 95% 공기, 5% CO₂를 함유하는 37 °C의 조건 하에서 HEPES (25 mM), penicillin-G (100 U/ml), streptomycin (100 μg/ml), FBS (10%, V/V) 등이 첨가된 RPMI 1640 배양액 (이하 배양액)에서 배양하였으며, 1주에 2회의 빈도로 subculture하였다. 뮤신 생성량 검증을 위해서, 24 well culture plate를 기준으로 각 well당 2.0 × 10⁴ cells/well의 밀도로, 뮤신 유전자 발현 정도의 검증을 위해서 6 well culture plate를 기준으로 well 당 5.0 × 10⁴ cells/well의 밀도로 각각 세포를 도포하고 배양하였다. 세포가 다 자란 후, FBS의 농도를 0.2%로 감소시킨

배양액을 주고 24시간 동안 배양하였으며, 이후 serum 을 첨가하지 않은 배양액 (serum-free medium)으로 세포를 세척하였다. 이렇게 준비된 세포에 JGT 추출물을 각각 2~10 μl 씩을 함유하는 배양액 200 μl 를 24 well plate에 각 well마다 가하고, 30분이 지난 후에 ATP 200 μM , PMA 10 ng/ml, EGF 25 ng/ml, 그리고 TNF- α 0.2 nM을 각 well마다 투여한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간동안 배양하였다.

(2) NCI-H292 세포에서의 MUC5AC 뮤신 생성량 측정

24시간의 배양이 종료된 후, 세포 용해용 완충액 (20 mM Tris, 0.5% NP-40, 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, protease inhibitor cocktail)을 가하여 세포 내에 존재하는 MUC5AC 뮤신을 추출한 후 실험에 사용하였다. 수거된 세포 용해 추출액 (cell lysate)은 PBS로 1/10배 희석하고 희석된 각 sample을 ELISA 전용의 96-well plate에 각각 100 μl 씩 분포시킨 후 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 완전히 건조될 때까지 incubation하였다. 그 다음, PBS-Tween 20 (0.05%, PBS-T) 용액 200 μl /well을 이용하여 각 well 당 3회씩 세척하였다. 세척 후, PBS-T에 용해된 2% BSA 용액 200 μl 를 각 well당 가하고 다시 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후 PBS-T 200 μl 로 3회 세척하고 MUC5AC에 대한 monoclonal antibody 인 mouse anti-MUC5AC clone 45M1을 2% BSA에 1 : 200의 비율로 희석한 후에 각 well당 100 μl 씩 첨가하고 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후 PBS-T로 3회 세척하고, 2차 항체인 Horse radish peroxidase (HRP)-Goat Anti-Mouse IgG Conjugate를 2% BSA에 1 : 3,000의 비율로 희석한 후 각 well당 100 μl 씩 첨가하고 1시간 동안 incubation하였다. PBS-T로 다시 3회 세척 후, 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine peroxide (TMB) 용액 100 μl 를 각 well에 첨가하고, 5분 후 1N H₂SO₄ 50 μl 를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정함으로써 대조군과 JGT 처리군 간의 MUC5AC 함량을 측정하여 비교하였다²³⁻⁴⁾.

(3) NCI-H292 세포 내에 존재하는 total RNA의 분리

24시간 동안 JGT을 처리한 세포를 냉각된 PBS로 2회 세척하였다. 세포에 trypsin-EDTA 용액을 처리하여 배양 용기 바닥으로부터 분리하고, 세포들의 혼합물을

1.5 ml 용량의 microtube에 옮겨 원심 분리함으로써 세포들만 수거하였다. total RNA를 분리하기 위해서 INTRON biotechnology사의 Easy-Blue RNA extraction kit (total RNA isolation reagent) (0.5 ml/4 x 10⁵ cells)를 이용해 세포를 lysis시키고, 상온에서 5분간 방치하였다. 5분 후 즉시 microtube에 chloroform을 첨가하여 15초간 vortexing하고 상온에 2~3분간 방치한 후 4 $^{\circ}\text{C}$, 13,000 rpm (Hanil centrifuge, MICRO 17 R)에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액 400 μl 를 새 microtube에 옮겼다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 상온에서 10분 동안 방치하고 다시 4 $^{\circ}\text{C}$, 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 이 침전물에 diethylpyrocarbonate (DEPC)가 함유된 75% ethanol을 가하고 4 $^{\circ}\text{C}$, 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리함으로써 세척하였다. 수거된 RNA 침전물을 5분 동안 대기 중에서 건조시킨 후, 20 μl 의 RNase-free water로 부유시키고, UV-spectrophotometer를 사용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도를 측정 후 실험에 사용하였다 (1.0A260 =single strand RNA 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)²⁵⁾.

(4) 중합효소 연쇄반응을 위한 primer 제조

중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction: PCR)에 사용된 primer는 전문 제조회사인 Genotec(주) (Daejeon, Korea)에 주문하여 합성하였다. NCI-H292 세포에서의 human MUC5AC 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5'-TGA TCA TCC AGC AGC AGG GCT-3', antisense primer의 염기서열은 5'-CCG AGC TCA GAG GAC ATA TGG G-3'이며, 이 primer에 의해 합성된 PCR 산물의 크기는 약 461 bp였다. β -actin 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5'-TAC AAC GAG CTG CGT GTG GCC-3'이고, antisense primer는 5'-CAA CGG AAC CGC CTC GTT GC-3'이며, 이 primer가 표적으로 하는 DNA 크기는 500 bp였다.

(5) RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응

수거된 total RNA를 이용하여 역전사 반응 (Reverse Transcription: RT)으로 cDNA를 만들고, 이를 중합효소 연쇄반응 (PCR)으로 증폭시켰다. 즉, 얻어진 total RNA 1 μg 을 75 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 가열함으로써 denaturation시키고, 이를 얼음에 담아 급냉시킨 후 RT premix kit의

사용자 설명서에 따라 역전사 반응을 진행시켰다. MUC5AC 유전자에 대한 PCR은, 각각의 역전사 반응에서 얻은 cDNA 산물 2 μ l를 PCR premix kit의 사용자 설명서에 따라 진행시켰다. 증폭 반응을 위하여, PCR을 40회 실시 (PCR thermal cycler, Takara MP-300, Japan)하였으며, denaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 30초, annealing은 60 $^{\circ}$ C에서 30초, extension은 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 각각 시행하였다.

(6) 전기영동에 의한 중합효소 연쇄반응 산물의 확인
RNA의 RT-PCR 및 PCR로 증폭된 cDNA 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC5AC 유전자 발현의 변동 여부를 관찰하였다. 즉, 증폭된 PCR 산물 10 μ l를 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 1.0% agarose gel에서 전기 영동하였다. Gel 상에서 이동된 각각의 DNA band는 자외선 투사기 (ultraviolet trans-illuminator)를 이용하여 관찰하고, 사진 촬영하였다.

3) 통계처리

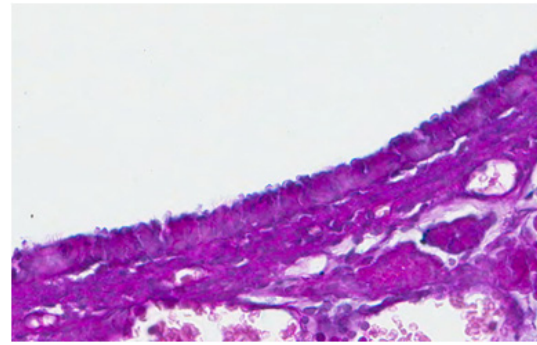
모든 측정 결과는 Mean \pm S.E.M.으로 환산한 후, JGT 처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타냈다. 통계 처리는 unpaired Student's t-test로 하였으며, $p < 0.05$ 인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. Results

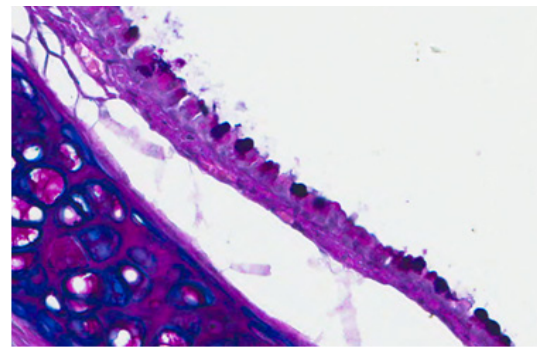
1. In vivo

1) 흰쥐의 기도 배상 세포내 점액 함유량 증가에 미치는 영향

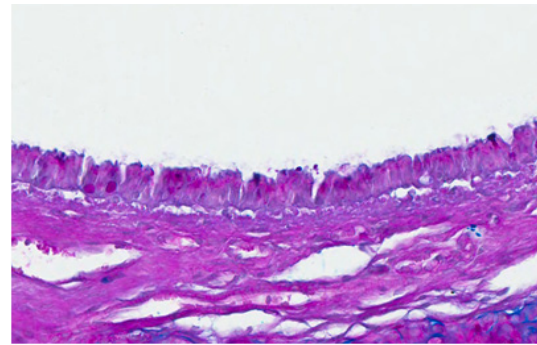
기도상피세포층에 Hematoxylin-eosin 염색과 Periodic Acid Schiff (PAS)-Alcian Blue 염색을 실시한 후 광학 현미경 하에서 관찰한 결과, SO₂에 3주간 노출된 흰쥐의 배상 세포 내에 검은 보라색으로 염색된 뮤신의 양은 증가된 반면에, SO₂ 1주 노출 후 2주간 JGT 동시 투여군에서는 배상 세포 내에 검은 보라색으로 염색된 뮤신의 양이 감소하였다 (Fig. 1. A, B, C).



A. Control



B. Sulfur Dioxide Only Exposure



C. JGT + Sulfur Dioxide Exposure

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

2) 흰쥐의 체중 증가에 미치는 영향

2주간의 JGT 경구 투여 기간을 포함한 전체 3주간의 실험 기간 동안 각 흰쥐의 체중 변화를 측정한 결과, 대조군은 140 \pm 10 g (100 \pm 7% control)로, JGT를 투여한 군은 136 \pm 4 g (97 \pm 3% control)로 측정되어 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2).

3) 흰쥐의 간 기능에 미치는 영향

2주간의 JGT 경구투여 후 GOT, GPT의 혈청 중 활성을 측정한 결과, 대조군에서 GOT, GPT 흡광도는 각각 0.460 \pm 0.044 (100 \pm 10% control), 0.320 \pm 0.01 (100 \pm 3% control)로, JGT를 투여한 군의 GOT, GPT

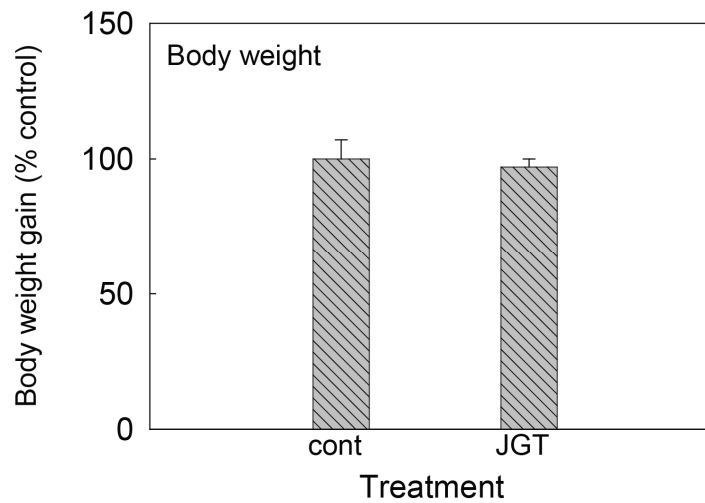


Fig. 2. Effect of JGT on body weight gain of rat after oral administration

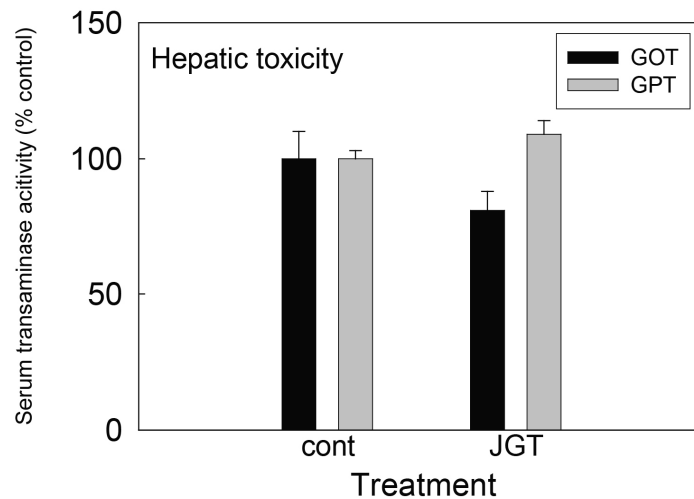


Fig. 3. Effect of JGT on serum GOT and GPT activities of rat

흡광도는 각각 0.373 ± 0.033 ($81 \pm 7\%$ control), 0.350 ± 0.015 ($109 \pm 5\%$ control)로 측정되어 유의한 차이는 없었다 (Fig. 3).

4) 흰쥐의 신장 기능에 미치는 영향

신장독성의 지표로는 Blood Urea Nitrogen (BUN)의 혈청 중 농도를 선정하였으며, 2주간의 JGT 경구 투여 후 BUN의 혈청 중 농도를 측정된 결과, 대조군의 BUN은 8.300 ± 0.500 mg/dl ($100 \pm 6\%$ control)로, JGT를 투여한 군의 BUN은 7.573 ± 1.512 mg/dl ($91 \pm 16\%$ control)로 측정되어 유의한 차이를 관찰할 수 없었다 (Fig. 4).

2. In vitro

1) NCI-H292 세포에서 ATP로 자극된 MUC5AC 뮤신 생성에 미치는 영향

JGT는 최종 추출물 2, 5, 10 μ l/200 μ l 배양액의 투여 농도에서 ATP로 자극된 뮤신의 생성 증가를 유의성 있게 ($p < 0.05$) 역전 (감소)시켰다 (Fig. 5).

2) NCI-H292 세포에서 EGF로 자극된 MUC5AC 뮤신 생성에 미치는 영향

JGT는 최종 추출물 2, 5, 10 μ l/200 μ l 배양액의 투여 농도에서 EGF로 자극된 뮤신 생성 증가를 유의성 있게 ($p < 0.05$) 역전 (감소)시켰다 (Fig. 6).

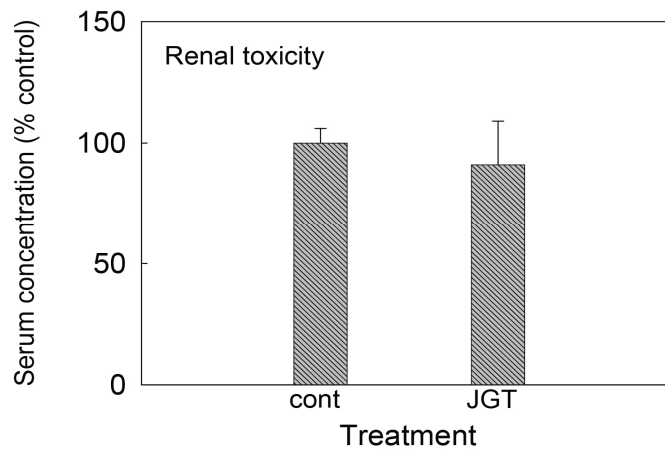


Fig. 4. Effect of JGT on serum BUN concentration of rat

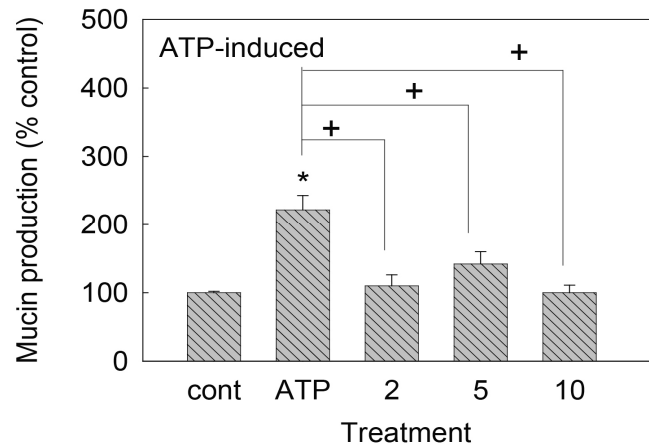


Fig. 5. Effect of JGT on ATP-induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells

* significantly different from control ($p < 0.05$).
 + significantly different from ATP only ($p < 0.05$).

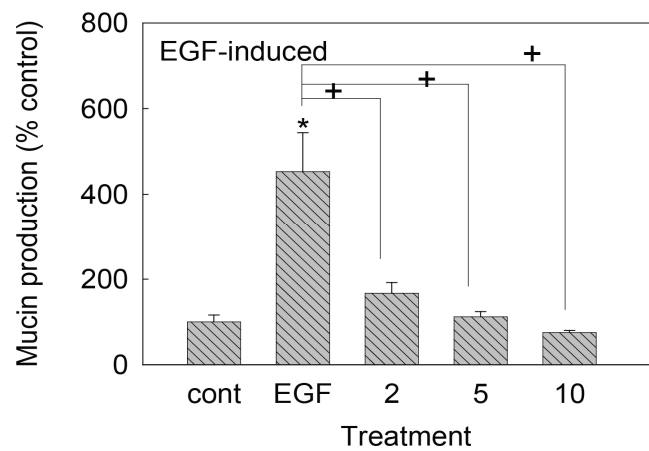


Fig. 6. Effect of JGT on EGF-induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells

* significantly different from control ($p < 0.05$).
 + significantly different from EGF only ($p < 0.05$).

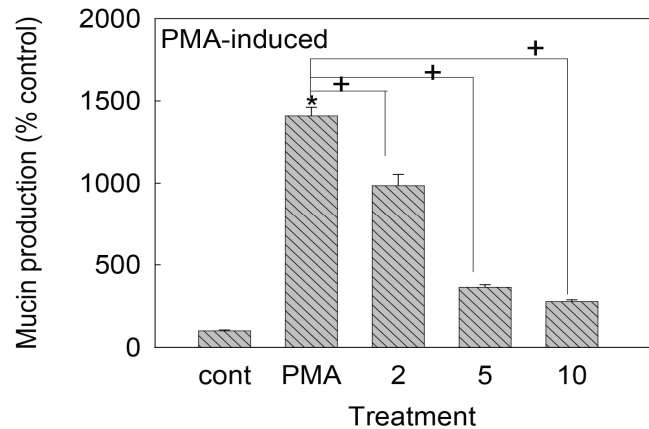


Fig. 7. Effect of JGT on PMA-induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells

* significantly different from control ($p < 0.05$).
 + significantly different from PMA only ($p < 0.05$).

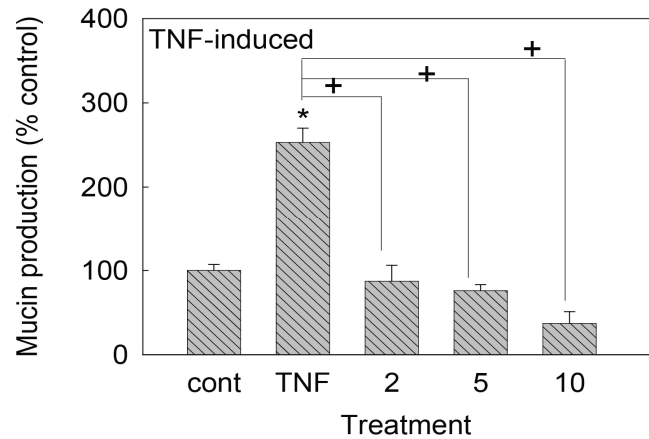


Fig. 8. Effect of JGT on TNF- α -induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells

* significantly different from control ($p < 0.05$).
 + significantly different from TNF only ($p < 0.05$).

3) NCI-H292 세포에서 PMA로 자극된 MUC5AC
 뮤신 생성에 미치는 영향

JGT는 최종 추출물 2, 5, 10 $\mu\text{l}/200 \mu\text{l}$ 배양액의 투여 농도에서 PMA로 자극된 뮤신 생성 증가를 유의성 있게 ($p < 0.05$) 역전 (감소)시켰다 (Fig. 7).

4) NCI-H292 세포에서 TNF- α 로 자극된 MUC5AC
 뮤신 생성에 미치는 영향

JGT는 최종 추출물 2, 5, 10 $\mu\text{l}/200 \mu\text{l}$ 배양액의 투여 농도에서 TNF- α 로 자극된 뮤신 생성 증가를 유의성 있게 ($p < 0.05$) 역전 (감소)시켰다 (Fig. 8).

5) NCI-H292 세포에서 ATP로 유도된 MUC5AC 유전자
 발현에 미치는 영향

JGT는 최종 추출물 전 투여 농도범위에서 24시간의 처리 기간 동안 ATP로 유도된 MUC5AC mRNA의 발현 수준에 뚜렷한 감소 경향을 나타내지 못했다 (Fig. 9).

6) NCI-H292 세포에서 EGF로 유도된 MUC5AC
 유전자 발현에 미치는 영향

JGT는 최종 추출물 2, 5, 10 $\mu\text{l}/200 \mu\text{l}$ 배양액의 투여 농도에서 24시간의 처리 기간 동안 EGF로 유도된 MUC5AC mRNA의 발현 수준을 농동 의존적으로 감

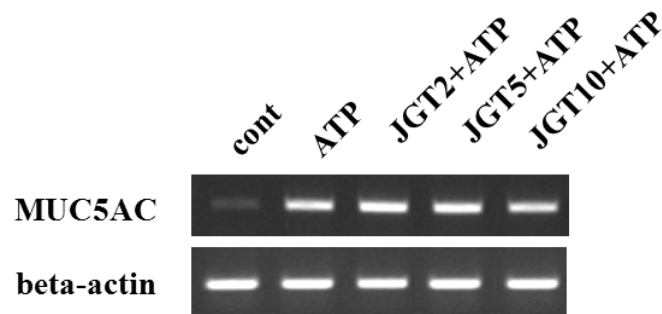


Fig. 9. Effect of JGT on ATP-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

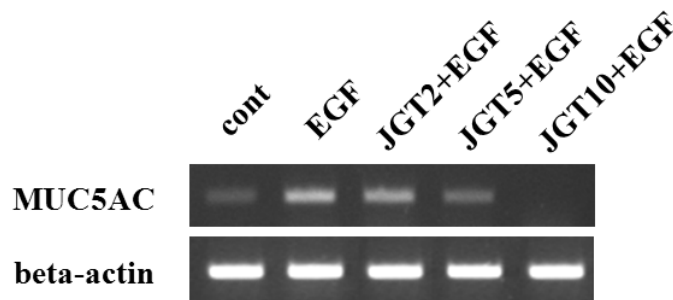


Fig. 10. Effect of JGT on EGF-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

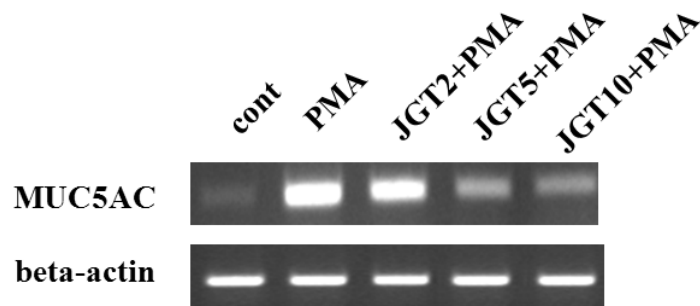


Fig. 11. Effect of JGT on PMA-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

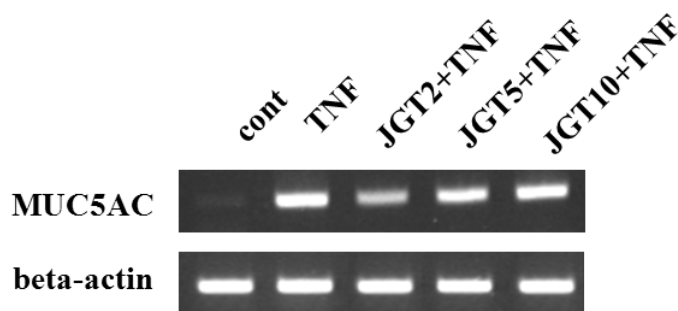


Fig. 12. Effect of JGT on TNF- α -induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

소시키는 경향을 나타냈다 (Fig. 10).

7) NCI-H292 세포에서 PMA로 유도된 MUC5AC 유전자 발현에 미치는 영향

JGT는 최종 추출물 2, 5, 10 μl /200 μl 배양액의 투여 농도에서 24시간의 처리 기간 동안 PMA로 유도된 MUC5AC mRNA의 발현 수준도 농도 의존적으로 감소시키는 경향을 보여주었다 (Fig. 11).

8) NCI-H292 세포에서 TNF- α 로 유도된 MUC5AC 유전자 발현에 미치는 영향

JGT는 최종 추출물 전 투여 농도범위에서 24시간의 처리 기간 동안 TNF- α 로 유도된 MUC5AC mRNA의 발현 수준에 뚜렷한 감소 경향을 보여주지 못했다 (Fig. 12).

IV. Discussion

호흡기는 외부 환경과 우리 신체가 접촉하는 중요한 기관으로, 공기의 통로로 작용하는 기도와, 산소 및 이산화탄소의 교환이 일어나는 폐 등으로 구성되어 있다. 기도는 기도를 통해 유입되는 병원성 미생물, 유해성 기체 및 입자 등에 대한 방어에 있어서 다양한 방식으로 기능을 발휘하는데, 기도 점막은 1차 방어선의 역할을 담당하고 식세포 (phagocyte)와 림프구로 구성된 면역계 (immune system)는 2차, 3차 방어선의 역할을 담당한다⁹⁻¹⁰. 즉, 인체 호흡기에 존재하는 점액은 점액 섬모 청소 (mucociliary clearance)라고 불리는 섬모세포와의 협동작용을 통해, 인체에 불필요하거나 혹은 유해한 물질의 제거에 있어서 중요한 역할을 한다²⁹.

소아는 《溫病條辨·解兒難》²⁶에서 “臟腑薄, 藩籬疏, 易于轉變, 肌膚嫩, 神氣怯, 易于感觸”이라고 하였듯이, 衛外機能이 취약한 특징으로 인해 병리적으로 질병의 이환과 전변이 쉽다. 또한 소아의 호흡기는 나이가 어릴수록 더욱 미숙하여 가벼운 병적 상태에서도 증상이 심하게 나타날 수 있고, 영유아는 성인에 비해 기도가 좁아 환기장애가 일어나기 쉬우며, 폐포 면적이 작기 때문에 가스의 확산 장애가 일어나기 쉽다¹. 이 때문에, 호흡기 질환은 소아에서 흔히 발생하는데, 생후 6개월부터 6세 사이의 소아에게 빈번하게 발생하며 환절기처럼 기후변화가 심할 때 쉽게 반복적으로 감염이 발생하고 잘 낫지 않거나 증상이 악화되는 경

향을 보인다. 또한 호흡기 감염에 이환되었을 때 초기에 회복되지 못하거나 재차 감수되면 만성 재발성 호흡기 증상을 호소하게 된다²⁷⁻⁸. 호흡기의 방어 체계는 면역계와 점막으로 구성되는데, 소아는 면역계의 발달이 미숙하므로 1차 방어선의 역할을 담당하는 점막의 기능이 중요하며, 성인에 비해 기도 점액선이 높은 밀도로 분포되어 있어 감염이 발생하면 다량의 점액이 분비된다¹.

기도 점액 (객담)은 점막하 점액선으로부터 분비되는 뮤신, 액체성분, 폐포의 표면 및 주위로부터 유래된 용질과 상피 배상세포의 분비물로 구성되어 있는 물질로, 점액의 방어 기능은 점액성 당단백질인 뮤신의 점탄성에 기인하여 이루어진다. 정상 생리 상태에서 뮤신은 적절한 점도가 유지되어 섬모세포의 운반작용에 의한 기도 및 폐내 이물질 제거, 폐의 유희작용 등의 기능을 담당한다²⁹.

건강인의 경우 보통 하루 10~20 ml의 점액 분비가 정상적으로 일어나게 된다. 객담의 주요 성분인 뮤신의 양 혹은 질의 이상으로 기도 점액의 점도 변화 및 과다 분비가 유발되어 100 ml 이상의 점액 분비가 일어나면 점액전을 형성하게 되고, 이는 오히려 기도 분비물의 배출을 방해하여 인체 방어 작용에 영향을 주며, 병리 현상을 유발하게 된다³⁰. 객담의 증가는 호흡기 질환의 병적 상태를 증가시키는데, 감염의 위험을 높이고 기류폐쇄를 가져오며, 객담이 만성적으로 증가할 경우 사망 위험을 증가시킨다³¹. 따라서 기도 점액의 과다 분비 혹은 점도의 변화로 고통을 겪게 되는 만성 기관지염, 기관지 천식, 기관지 확장증, 낭포성 섬유증과 같은 호흡기 질환 환자에서 기도 점액 분비의 조절은 질환으로 인한 고통의 경감 및 질환의 치료 측면에서 중요하다²⁹.

서양의학에서는 기도 점액 생성 및 유리 자체를 억제하는 약물에 대한 연구가 진행되면서 glucocorticoid나 poly-L-lysine (PLL), poly-L-arginine 등의 양이온성 polypeptide가 호흡기 뮤신 분비를 억제하는 물질로서 보고되었다. 그러나 이러한 약물들은 그 다양한 약리 작용 및 부작용 등으로 인해 호흡기 질환의 임상에서 적절히 응용되기에는 많은 제한이 따르고 있는 실정이다^{8,20,32}.

韓醫學에서 咯痰은 주로 체내 진액대사 과정에서 肺의 通調水道作用, 脾의 運輸水穀精微作用, 腎의 蒸化水液 및 分清泌濁作用의 失調로 津液의 정상적인 分布와 排泄에 이상이 유발되어 생성되는데³³, 체내의

모든 비생리적 체액을 지칭하는 痰飲의 개념 중에서 狹義의 痰飲에 해당한다⁴⁾. 정상상태에서는 기관, 기관지에서 분비된 분비물이 침입한 이물이나 병원체를 흡착하여 섬모운동을 통하여 인후두부로 옮겨지고 반사기능에 의해 외계로 배출되거나 연하되지만 이러한 기관지 점액 분비가 비정상적으로 증가하게 되면 가래의 형태로 배출하게 된다^{4,34)}. 咯痰의 종류는 그 원인에 따라 風痰, 寒痰, 濕痰, 熱痰, 鬱痰, 氣痰, 食痰, 酒痰, 驚痰 등으로 분류되고, 이 중 호흡기 咯痰은 寒痰, 濕痰, 熱痰, 燥痰, 鬱痰, 氣痰 등과 비교적 밀접한 관련이 있다. 痰飲의 치료는 “實脾土, 燥脾濕, 是治其本”, “治痰順氣爲先, 分導次之”라 하여 實脾土 燥脾濕을 기본으로 淸熱化痰, 除濕化痰, 溫肺化痰하는 治法이 사용되었다³⁵⁻⁶⁾.

滋陰降火湯은 龔¹²⁾의 《萬病回春·虛勞門》에 수록된 처방으로, 腎水가 虛乏하면 肝火와 命門火가 妄動하여 脾肺를 蒸灼하게 되는데, 이로 인한 發熱咳嗽, 吐痰喘急, 盜汗口乾, 咯唾血, 將成勞瘵 등을 消炎滋潤하여 치료한다고 하였고, 《東醫寶鑑》³⁵⁾에서는 ‘咳嗽門’의 夜嗽, 痰喘에서 滋陰降火湯을 언급하였다.

본 연구에 사용된 滋陰降火湯은, 血虛火動와 陰虛火動을 治하는 知柏四物湯에 川芎은 去하고, 滋陰淸肺하는 麥門冬, 生地黃과, 滋陰之劑의 厚중한 滋味를 잘 흡수할 수 있도록 理氣健脾하는 白朮, 陳皮, 甘草를 加하여 消炎, 燥濕, 滋潤 등의 효능을 증가시킨 처방인데^{12,18)}, 그 구성약물을 살펴보면, 白芍藥은 養血平肝補血하여 斂陰하는 특징이 있어 陰虛發熱, 胸脇腹痛, 自汗盜汗 등을 치료하고, 當歸는 溫陽補血하는 효능이 있어 血虛로 인한 여러 증상에 활용되며, 熟地黃은 補血滋潤하여 腎陰不足과 心肝血虛로 인한 骨蒸潮熱, 盜汗, 血虛萎黃 등의 여러 증상을 치료한다. 麥門冬은 肺胃의 陰不足을 淸養, 生津, 潤燥하여 肺燥乾咳, 陰虛勞嗽, 咯血, 肺痿, 肺癰, 虛勞煩熱, 熱病傷津, 咽乾口燥 등을 치료하는 효능이 있으며, 生地黃은 滋腎陰, 淸營涼血하여 邪熱을 泄熱하는데 溫熱病의 熱이 營血에 들어가거나 熱이 陰液을 손상하여 나타나는 각종 病證에 응용된다. 黃柏과 知母는 相須하여 養陰藥과 配合되면 肺腎陰虛와 陰虛火旺으로 인한 潮熱, 盜汗 등을 치료한다. 白朮은 健脾益氣, 燥濕利水, 祛痰하며, 陳皮는 理氣健脾, 燥濕化痰하여 咳嗽痰多를 치료하고, 甘草는 潤肺하여 肺痿咳嗽을 치료하는데 동시에 諸藥을 調和하는 효능이 있다^{18,37-8)}.

이상의 약효를 종합해보면, 滋陰降火湯은 滋陰補血

淸熱, 潤肺止咳, 理氣燥濕하는 약물들이 배합되어, 咳嗽痰多, 呼吸困難, 胸滿 등의 증상을 유발하는 급만성 기관지염, 상기도염, 폐결핵, 기타 기관지천식 등의 호흡기질환에 활용할 수 있음을 알 수 있다^{13,18)}.

이에 저자는, 陰虛火旺으로 인한 여러 咳嗽, 痰盛 등의 치료 목적으로 사용되고 있는 滋陰降火湯이 기도 점액의 과다 분비 및 그 기저 생리현상으로서의 기도 뮤신 생성 및 유전자 발현에는 어떤 약리작용을 발현하는지 관찰함으로써, 여러 급성·만성 호흡기 염증성 질환에서 관찰되는 기도 점액 과다 분비 현상의 조절 약물로서의 응용 가능성을 제시하고자 하였다.

먼저, 실험동물을 대상으로 한 *in vivo* 실험을 통해서 滋陰降火湯 (JGT)의 약리작용을 조사할 목적으로, SO₂ 흡입으로 유발된 기도 점액 과다 분비 흰쥐 모델을 이용하여 연구를 수행하였는데, 기도 점액 과다 분비 흰쥐 모델에 JGT를 2주간 경구 투여한 후 상피 배상 세포 (goblet cell) 내의 점액 함유량에 대한 약물의 영향을 조직병리학적 방법으로 확인하였다. 그 결과, 대조군이거나 SO₂ 3주 흡입군과 비교를 했을 때, SO₂ 1주 흡입 후 2주간 SO₂ 흡입 및 JGT 동시 투여군에서는, SO₂ 흡입으로 인해 증가되었던 기도 배상 세포내의 점액 함유량이 감소되는 경향을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 즉, 기도 상피 세포층에 Hematoxylin-eosin 염색과 Periodic Acid Schiff (PAS)-Alcian Blue 염색을 실시한 후 광학 현미경 하에서 관찰하였을 때, SO₂ 3주 흡입군에서는 배상 세포 내에 검은 보라색으로 염색된 뮤신의 양이 증가된 반면에 (Fig. 1 B), SO₂ 1주 흡입 후 2주간 SO₂ 흡입 및 JGT 동시 투여군에서는 염색된 뮤신의 양이 감소되는 경향을 보였다 (Fig. 1 C). 이러한 결과는, 滋陰降火湯이 다양한 기도 염증성 질환에서 관찰되는 기도 점액 과다 분비 현상의 조절약물로서 응용될 가능성을 일부나마 제시하는 기초과학적 증거라고 생각한다.

또한, 기도 점액의 과다 분비를 조절하는 효능을 발현하는 JGT가 실험동물에 대한 독성을 유발하지 않아야 하는데, 이는 유효하면서도 안전성이 담보되어야 하는 약물로서의 기본적인 요건이라고 할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 기도 점액 과다 분비 흰쥐 모델에서 JGT의 경구 투여에 대한 생체 안전성을 검증하기 위하여 흰쥐의 체중 증가도에 미치는 영향과 함께 간기능과 신기능에 미치는 영향을 각각 측정하였다. 체중 증가도에 미치는 영향을 알아보기 위해 2주간의 JGT 경구 투여 기간을 포함한 전체 3주간의 실험 기간 동안 각 흰쥐의 체중 변화를 측정하였는데, 대조군은

140 ± 10 g (100 ± 7% control)로, JGT를 투여한 군은 136 ± 4 g (97 ± 3% control)로 측정되어 체중 변화에는 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2). 간독성의 지표로는 transaminase인 GOT (AST), GPT (ALT)의 혈청 중 활성을, 신장독성의 지표로는 Blood Urea Nitrogen (BUN)의 혈청 중 농도를 각각 선정하여 2주간의 JGT 경구투여 후 GOT, GPT의 혈청 중 활성과 BUN의 혈청 중 농도를 측정하였다. 그 결과, 대조군에서 GOT, GPT 흡광도는 0.460 ± 0.044 (100 ± 10% control), 0.320 ± 0.01 (100 ± 3% control)로, JGT를 투여한 군의 GOT, GPT 흡광도는 0.373 ± 0.033 (81 ± 7% control), 0.350 ± 0.015 (109 ± 5% control)로 측정되었으며 (Fig. 3) 유의한 차이가 없었고, 대조군의 BUN은 8.300 ± 0.500 mg/dl (100 ± 6% control)로, JGT를 투여한 군의 BUN은 7.573 ± 1.512 mg/dl (91 ± 16% control)로 측정되어 (Fig. 4) 역시 유의한 차이는 관찰할 수 없었다. 이러한 *in vivo* 독성 시험의 결과를 종합해보면, 滋陰降火湯이 동물의 전반적인 영양 및 대사 상태에 독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있다.

다음으로, 滋陰降火湯이 기도 점액의 과다 분비를 억제한다면, 점액의 주된 생화학적 구성요소인 뮤신의 생성 및 그 유전자 발현 등 세포 및 분자 수준에서는 어떠한 작용을 발현하는지를 알아보고자 다음과 같은 후속 실험을 진행하였다. 인체 기도 뮤신의 거동과 관련된 연구모델로 자주 사용되는 인간 기도 상피세포인 NCI-H292 세포를 이용하여³⁹⁾ 아데노신 삼인산 (ATP), 상피세포 성장인자 (EGF), phorbol ester (PMA), 종양괴사인자 (TNF)로 각각 기도 뮤신의 생성 (production)을 자극한 상태에서 24시간의 JGT 처리 기간 동안 기도 뮤신인 MUC5AC 뮤신의 생성 정도를 측정하고, 동일한 조건으로 뮤신 유전자 발현을 자극한 상태에서 24시간의 JGT 처리 기간 동안 MUC5AC mRNA의 발현 정도를 관찰하였다. PMA는 calcium-dependent protein kinase (PKC, 칼슘의존성 단백질 인산화 효소)를 활성화하는 물질로, mouse 피부에서의 강력한 발암유발 작용, 강력한 산화질소 생성 촉진 활성, 유도형 산화질소 생성효소 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)의 발현 증강 작용⁴⁰⁻⁴¹⁾을 나타내는 것으로 널리 알려져 있으며, 인간 기도 상피세포에서 뮤신 생성을 증가^{23,42)}시키는 것으로도 보고된 물질이다. EGF는 EGF-수용체 (epidermal growth factor receptor)-MEK-ERK pathway를 경유하고, TNF-α는 TNF-수용체 (tumor necrosis factor receptor)를 매개로 전사인자 결합부위 NF-κB (nuclear

factor-kappa B)로 이어지는 신호전달 경로를 거쳐, MUC5AC 뮤신의 생성 촉진을 유도할 수 있는 것으로 알려져 있다^{23-4,43-44)}.

실험결과에서 JGT는, ATP, EGF, PMA, TNF-α로 각각 자극된 NCI-H292 세포에서의 MUC5AC 기도 뮤신 생성을 유의하게 감소시켰다 (Fig. 5-8). 그러나, 기도 뮤신의 유전자인 MUC5AC mRNA의 발현을 ATP, PMA, EGF, TNF-α로 각각 자극한 조건에서, JGT는 EGF 또는 PMA로 자극된 MUC5AC mRNA의 발현은 감소시키는 경향을 보였으나 (Fig. 10, 11), ATP와 TNF-α로 자극된 MUC5AC mRNA의 발현에는 뚜렷한 감소 경향을 보여주지 못했다 (Fig. 9, 12).

이러한 결과는, JGT를 구성하는 黃柏, 知母, 陳皮 등 '降火' 작용, 즉 강한 항염증 및 항산화 활성을 발현하는 本草들에 의해 나타나는 항염증-항산화 작용을 통하여 MUC5AC 기도 뮤신의 유전자 수준이나 최종 당단백질 합성과정에서의 억제적 효과도 실험모델을 통하여 나타났겠지만, 동시에 白芍藥, 當歸, 熟地黃, 生地黃, 麥門冬 등의 本草에 의한 滋陰, 補血 작용이 실험모델에 반영된 결과라고 추측되나, 본 연구에서 사용된 실험 모델로는 자세한 작용기전을 입증하기는 어려울 것으로 판단된다.

이상의 연구결과들을 종합해보면, 滋陰降火湯은 기도 뮤신의 생성을 감소시키고 유전자의 발현에 일정한 영향을 줌으로써, 결과적으로 기도 점액의 과다 생성 및 과다 분비를 조절할 가능성을 보여주고 있다. 이는, 滋陰降火湯 및 그 구성 本草 들이 기도 과다 분비 상태를 동반하는 여러 호흡기 질환에 활용될 수 있는 가능성을 제시하는 과학적인 기초자료라 생각되며, 향후 천식, 폐렴, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증 등 다양한 호흡기 질환의 병태생리학적 특성을 적절히 반영할 수 있는 연구모델을 이용하여 滋陰降火湯의 약효에 관한 추가적인 연구가 지속적으로 수행되어야 할 것으로 생각된다.

V. Conclusion

滋陰降火湯이 기도 점액의 과다 분비 및 이와 연관된 기도 뮤신의 생성 및 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, SO₂ 흡입 투여로 유발된 기도 점액 과다 분비 흰쥐 모델에서 상피 배상 세포 내의 점액

함유량에 대한 滋陰降火湯의 영향을 관찰하고, 인간의 기도 상피세포인 NCI-H292 세포에서 기도 뮤신인 MUC5AC 뮤신의 생성에 대한 약물의 영향과 기도 뮤신 유전자인 MUC5AC mRNA의 발현을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 滋陰降火湯은, SO₂으로 유발된 기도 점액 과다 분비 흰쥐 모델에게 경구 투여한 결과, 기도 배상 세포 내의 점액 함유량을 감소시켰다.
2. 滋陰降火湯은 흰쥐 모델에게 경구 투여했을 때 체중 증가도와 간 및 신장 기능에 영향을 주지 않음으로써 생체 독성을 발현하지 않았다.
3. 滋陰降火湯은, 배양된 NCI-H292 세포를 대상으로 호흡기 염증성 질환 이환 상태를 반영한 점액 과다 생성 조건에서 뮤신 생성에 유의한 억제 효과를 발현하였다.
4. 滋陰降火湯은, 배양된 NCI-H292 세포를 대상으로 호흡기 염증성 질환 이환 상태를 반영한 점액 과다 생성 조건 중에서, EGF나 PMA로 자극된 경우에는 유전자 발현을 감소시켰으나, ATP 또는 TNF-α로 자극된 경우에는 유전자 발현을 뚜렷하게 감소시키지 못했다.

Acknowledgement

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업 (2년)에 의하여 연구되었음.

References

1. Ahn HS. Pediatrics 9th edition. Seoul: Daehangyogwaseo. 2007:585-98, 629-52.
2. Kim KB, Kim DG, Kim YH, Kim JH. Hanbangsoa-cheongsoneonuihak. Seoul: UiSungDang. 2010:37-9, 339-407.
3. Department of Pathology, college of Korean medicine. Pathology of Korean medicine. Seoul: Iljungsa. 2002: 69-81.
4. Department of Pulmonology, college of Korean medicine.

Pulmonology of Korean medicine (東醫肺系內科學). Seoul: Hanmunhwasa. 2002:52-5, 102-14.

5. Sim JJ. Signal transduction of MUC5AC expression in airway mucus hypersecretory disease. Tuberc Respir Dis. 2003;55(1):21-30.
6. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. Chest. 2009;135(2):505-12.
7. Culpitt SV, Rogers DF, Traves SL, Barnes PJ, Donnelly LE. Sputum matrix metalloproteases: comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. Respir Med. 2005;99(6):703-10.
8. Korean academy of pediatric allergic & respiratory disease. Pediatric allergic & respiratory disease. Seoul: Gunja publishing co. 2005:350-4.
9. Rogers DF. Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology?. Curr Opin Pharmacol. 2004;4(3): 241-50.
10. Rogers DF, Barnes PJ. Treatment of airway mucus hypersecretion. Ann Med. 2006;38(2):116-25.
11. Rogers DF. Mucociliary dysfunction in COPD: Effect of current pharmacotherapeutic options. Pulm Pharmacol Ther. 2005;18(1):1-8.
12. Kong JH. Manbyeonghoichun. Seoul: Haenglimseowon. 1975:204-5.
13. Jo GH. East-West medical analysis methodology of Korean medicine prescriptions. Seoul: Korea Medicine. 1999:430.
14. Cho YB, Lee HG. A study of effects of Jaumganghwatang on the antipyresis, analgesia, anticonvulsion and O₃ poisoned lung in rats and mice. Collection of Kyunghee University Korean medicine's dissertations. 1986;9:475-86.
15. Jeong HJ, Oh TH, Jeong SK, Lee HG. A study of effects of Jaemganghwa-tang and Jaemganghwa-tang-gamibang on the experimentallung damage and the hemostasis. Collection of Kyunghee University Korean medicine's dissertations. 1992;15:373-83.
16. Kim YK, Kim HJ, Kim WJ, Park HJ, Moon G, Kim DW. Inhibitory effect of Jaemganghwa-tang on allergic inflammatory reaction. Korean J Orient Int Med. 2004;25(2):174-82.
17. Jung DY, Ha HK, Lee HY, Lee JA, Lee JK, Huang DS. Stimulation of the immune response by Yin-tonifying formula. J Korean Med. 2010;31(5):112-23.

18. Hwangdoyeon. Bangyakhappyeon. Seoul: Youngrimsa. 2003:205.
19. 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.
20. 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.
21. Harkema JR, Hotchkiss JA. In vivo effect of endotoxin on intraepithelial mucosubstances in rat pulmonary airways: quantitative histochemistry. *Am J Pathol.* 1992;141:307-31.
22. George JA, Cranz DL, Zicker S, Etchison JR, Dungworth DL and Plopper. An immunohistochemical characterization of Rhesus monkey respiratory secretions using monoclonal antibodies. *Am Rev Resp Dis.* 1986;132:556-63.
23. 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.
24. 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.
25. Karlinsky J, Stamatoyanopoulos G, Enver T. Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells. *Anal Biochem.* 1989;180(2):303-6.
26. Oh KT. Wenbingtiaobian (溫病條辨). Beijing: People's medical publishing house co. 1994:190-1.
27. Kang MS, Jang GT, Kim JH. A study on chronic or recurrent respiratory symptoms. *J Pediatr Korean Med.* 2002;16(2):83-99.
28. Choi MH, Kim DK, Lee JY. A study of the chief complaint of pediatric outpatients in the Kyung hee oriental medicine hospital (2009 3월~2010년 2월). *J Pediatr Korean Med.* 2010;24(3):121-37.
29. Lee CJ, Ko KH. Pathophysiologic characteristic of airway mucus-hypersecretory disease and experimental models. *J Appl Pharmacol.* 1998;6(1):1-8.
30. Jeong CH, Han JK, Kim YH. Effects of Bojung-ikgi-tang-gamibang and Seonbang-paedoktang on secretion of airway mucus and expression of mucin gene. *J Pediatr Korean Med.* 2007;21(3):33-55.
31. Rubin BK. Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care.* 2002;47(7):761-82.
32. Lee CJ. Specificity in the inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Appl Pharmacol.* 2001;9(3):218-23.
33. Shanghai university of Chinese medicine. Chinese internal medicine. Hong Kong: Commercial Press. 1982:24-5.
34. The Korean academy of tuberculosis and respiratory diseases. Pulmonology. Seoul: Gunja publishing co. 2004;77-9.
35. Huh J. Donguibogam. Kyungnam: Donguibogam publishing co. 2005:198-225, 615-38.
36. Kim WH. Principles of Korean medicine. Seoul: Seongbosa. 2003:352-8.
37. Department of herbology, college of Korean medicine. Herbology. Seoul: Younglimsa. 2005:203-5, 233, 392-4, 581-3, 586-8, 632-8, 647-8.
38. Sin JY. Commentary of Bangyakhappeon (方藥合編). Seoul: Seongbosa. 1991:127-8.
39. Kai H, Yoshitake K, Hisatsune A, Kido T, Isohama Y, Takahama K, Miyata T. Dexamethasone suppresses mucus production and MUC2 and MUC5AC gene expression by NCI-H292 cells. *Am J Physiol.* 1996; 271(3):L484-8.
40. Schmidt R, Hecker E. Autoxidation of phorbol esters under normal storage conditions. *Cancer Res.* 1975;35: 1375-7.
41. Saitoh T, Dobkins KR. Protein kinase C in human brain and its inhibition by calmodulin. *Brain Res.* 1986;379:196-9.
42. Yuan-Chen WD, Wu R, Reddy SP, Lee YC, Chang MM. Distinctive epidermal growth factor receptor/extracellular regulated kinase-independent and -dependent signaling pathways in the induction of airway mucin 5B and mucin 5AC expression by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Am J Pathol.* 2007;170(1):20-32.
43. Li D, Gallup M, Fan N, Szymkowski DE, Basbaum CB. Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking re-

46 Effect of Jaeumganghwa-tang on Production and Secretion of Respiratory Mucus

- gion of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts. *J Biol Chem.* 1998;273:6812-20.
44. Kim SJ, Kang CM, You MB, Yoon HK, Kim YK, Kim KH, Moon HS, Park SH, Song JS. IP-10 decreases TNF- α induced MUC5AC expression in human airway epithelial cells: a possible relation with little sputum production in idiopathic pulmonary fibrosis. *Tuberc Respir Dis.* 2008;64:347-55.