

## 가미청폐탕, 가감정기탕, 가미사물탕, 가미이중탕이 호흡기 뮤신의 분비 및 뮤신 유전자의 발현에 미치는 영향

이현숙 · 민상연 · 김장현

동국대학교 한의과대학 소아과학교실

### Abstract

## Effects of Four Oriental Medicines on Secretion and Gene Expression of Mucin in Airway Epithelial Cells

Lee Hyun Sook · Min Sang Yeon · Kim Jang Hyun

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongguk University

### Objectives

In this study, the author intended to investigate whether *Gami-cheongpetang* (GCP), *Gagam-jeongkitang* (GJG), *Gami-samooltang* (GSM) and *Gami-ijoongtang* (GIJ) significantly affect in vivo (animal model) and in vitro (cultured cells) mucin secretion and MUC5AC gene expression in airway epithelial cells.

### Methods

For in vivo experiment, the author induced hypersecretion of airway mucin in rats by introducing SO<sub>2</sub> for 3 weeks. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to assess the effects of orally-administered GCP, GJG, GSM and GIJ in vivo mucin secretion from tracheal goblet cells of rats after 1 week. Also, the effects of the agents on TNF- $\alpha$  or EGF-induced MUC5AC gene expression in human airway epithelial cells (NCI-H292) were investigated. Possible cytotoxicities of the agents were assessed by examining the rate of survival and proliferation of NCI-H292 cells.

### Results

(1) GCP and GJG significantly inhibited hypersecretion of in vivo mucin, although GSM and GIJ did not affect hypersecretion of in vivo mucin; (2) GCP and GJG significantly increased in vitro mucin secretion from cultured HTSE cells. However, GSM and GIJ did not affect in vitro mucin secretion from HTSE cells; (3) GCP and GJG significantly inhibited the expression levels of EGF-induced MUC5AC gene in NCI-H292 cells. However, GSM and GIJ increased the expression levels of EGF-induced MUC 5AC gene in NCI-H292 cells; (4) GCP, GJG, GSM and GIJ did not significantly inhibit the survival and proliferation of NCI-H292 cells.

### Conclusions

These results suggest that GCP, GJG, GSM and GIJ can not only affect the secretion of mucin but also affect the expression of mucin gene. The author suggests that the effects of GCP, GJG, GSM and GIJ with their components should be further investigated by using animal experimental models that simulate the diverse pathophysiology of pulmonary diseases.

**Key words:** Airway, Mucin, Gene, *Gami-cheongpetang* (GCP), *Gagam-jeongkitang* (GJG), *Gami-samooltang* (GSM), *Gami-ijoongtang* (GIJ)

## I. Introduction

小兒는 生理的으로 臟腑嬌嫩 形氣未充하여 《小兒藥證直訣》<sup>1)</sup>에서는 “五臟六腑 成而未全 … 全而未壯”이라 하였으며, 臟腑嬌嫩에는 五臟六腑가 모두 포함되지만 특히 肺, 脾, 腎이 중요하다. 《溫病條辨·解兒難》<sup>2)</sup>에서는 “臟腑薄 藩籬疏 易于傳變 肌膚嫩 神氣怯 易于感觸”이라 하여 臟腑機能과 衛外機能의 취약한 生理的 특징으로 인해 疾病의 罹患과 轉變이 쉽다고 설명하고 있다. 따라서 小兒는 外因으로 六淫의 侵襲과 內因으로 음식에 傷하는 것이 쉬워 脾肺의 病證이 가장 많으며 특히 肺常不足으로 衛外機能의 未固로 六淫의 邪氣를 받기 쉬워 急性 呼吸器 感染으로 인한 咯痰을 主症으로 하는 感冒, 咳嗽, 哮喘, 肺炎 등이 많다<sup>3)</sup>.

咯痰은 唾液, 血清, 단백질 삼출물, 박리된 상피세포들과 呼吸器 粘液의 혼합물로 구성되어 있는 病理的 物質이며, 氣道 病理 狀態의 한 指標가 될 수 있다<sup>4)</sup>. 咯痰의 주요 성분인 粘液은 기도 표피 섬모세포와의 협동적 작용을 통해, 人體에 불필요하거나 혹은 유해한 물질의 제거에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>5)</sup>. 呼吸器 粘液의 인체 방어기능은 주로 粘液의 구성요소인 뮤신의 점탄성에 기인하는데, 이러한 뮤신의 양과 질의 이상은 氣道 生理의 이상뿐만 아니라 인체의 防禦作用에 영향을 주어 病理現象을 유발할 수 있다. 즉 喘息, 慢性 氣管支炎, 肺氣腫, 氣管支 擴張症, 囊胞性 纖維症 등의 呼吸器 疾患에서 관찰되는 咯痰 혹은 粘液의 過多分泌는 이러한 질환군의 豫後를 惡化시키는 주된 요인으로 알려져 있다<sup>6)</sup>.

서양의학계에서도 氣道粘液(咯痰) 過多分泌를 조절하기 위해 여러 약물을 사용하고 있으나, 그 약효나 부작용 면에서 문제가 있어서 효율적인 약물요법을 시행하기가 쉽지 않은 것으로 알려져 있다<sup>7-8)</sup>. 현재 기존의 서양의학적 약물 외에 많은 신약후보물질이 연구되어 학계에 보고되고 있으나, 아직까지 실용화되어 臨床에서 응용되는 약물은 없어 치료제 개발이 절실한 상황이다<sup>9-10)</sup>.

咯痰은 痰飲의 범주로, 韓醫學에서 痰飲은 體內的 過多한 水分이 어느 한 부분에 停聚된 것으로 疾病의 原因이 될 뿐 아니라 疾病의 結果로 발생하는 病的 狀態를 말한다<sup>11)</sup>. 본 실험에 사용된 加味淸肺湯, 加減正氣湯, 加味四物湯, 加味理中湯은 臨床에서 咯痰을 포함하는 呼吸器 疾患에 다양하게 응용되는 方劑이나,

그 작용기전에 대하여는 알려진 바가 없었다.

이에 저자는 이상의 方劑들이 呼吸器 뮤신의 분비 및 뮤신 유전자의 발현에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여 2007년 1월 2일 ~ 2007년 2월 28일의 기간 동안 氣道粘液 過多分泌 동물 (Rat) 모델과 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포 (HTSE) 및 NCI-H292 세포를 대상으로 加味淸肺湯, 加減正氣湯, 加味四物湯, 加味理中湯의 약리학적 작용을 연구하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. Materials and methods

### 1. 재료

#### 1) 동물

8~10주령의 음성 Golden Syrian 햄스터 및 6주령의 Sprague-Dawley rat을 각각 대한바이오링크(주) (Kyung-gi, Korea)에서 구입하고, 2주 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 약제

加味淸肺湯 (GCP), 加減正氣湯 (GJG), 加味四物湯 (GSM), 加味理中湯 (GIJ) 등 각 方劑의 구성 약물은 동국대학교 부속 한방병원 약제실에서 공급받았으며, 각 처방의 구성은 다음과 같다.

Table 1. The Composition and Dosage of GCP (Gami-cheongpetang)

Herbal name	Pharmaceutical name	Amount (g)
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	6
半夏 (薑製)	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	6
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	6
天花粉	<i>Trichosanthes Radix</i>	6
赤茯苓	<i>Hoelen</i>	6
杏仁	<i>Armeniaca Amarum Semen</i>	6
桑百皮	<i>Mori Cortex</i>	6
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	3
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	3
枳殼	<i>Ponciri Fructus</i>	3
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2
大棗	<i>Jujubae Fructus</i>	6
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	8
Total amount		67

Table 2. The Composition and Dosage of GJG  
(Gagam-jeongkitang)

Herbal name	Pharmaceutical name	Amount (g)
蒼朮	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	4
陳皮	<i>Aurantii Nobilis Pericarpium</i>	4
烏藥	<i>Linderae Radix</i>	4
蘇葉	<i>Perillae Folium</i>	4
半夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	4
赤茯苓	<i>Hoelen</i>	4
枳殼	<i>Ponciri Fructus</i>	4
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	4
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	3
白芷	<i>Angelicae Daburicae Radix</i>	3
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	12
香附子	<i>Cyperii Rhizoma</i>	8
Total amount		58

Table 3. The Composition and Dosage of GSM  
(Gami-samooltang)

Herbal name	Pharmaceutical name	Amount (g)
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	4
熟地黃	<i>Rebmanniae Radix Alba</i>	4
玄參	<i>Scrophulariae Radix</i>	4
樺皮	<i>Cortex Betula Platyphyllae</i>	4
防風	<i>Iedebouriellae Radix</i>	4
蒼耳子	<i>Xanthii Fructus</i>	4
白蒺藜	<i>Tribulus Terrestris</i>	12
牛蒡子	<i>Arctii Fructus</i>	16
Total amount		60

Table 4. The Composition and Dosage of GIJ  
(Gami-ijoongtang)

Herbal name	Pharmaceutical name	Amount (g)
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4
乾薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	4
附子	<i>Aconiti Tuber</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Cortex</i>	2
肉桂	<i>Ciniamomi Cortex</i>	2
白茯苓	<i>Hoelen</i>	6
蛇床子	<i>Torilis Fructus</i>	6
玄參	<i>Scrophulariae Radix</i>	8
金銀花	<i>Lonicerae Flos</i>	8
Total amount		44

### 3) 시료제조

각 처방 한 첩 분량에 1,000 ml의 탈이온 2차 증류수를 가하고 100 °C로 가온된 상태에서 3시간 동안 전탕하여, 최종 각각 80 ml의 탱액을 수거하였다. 각 탱액을 실온 정도로 放冷한 후, 멸균 청정 후드 내에서 0.22 µm filter를 이용, 가압 여과하고 멸균용기에 저장하여, 4 °C 냉장고에 보관하였다.

### 4) 시약

Ethidium bromide, Trypsin-EDTA, Pronase (Type XIV), insulin, transferrin, Epidermal growth factor (EGF), Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), hydrocortisone, sodium selenite, Tween 20, Bovine serum albumin (BSA), testicular hyaluronidase (Type VI-S), retinoic acid, gentamicin, sodium dodecyl sulfate, Sepharose CL-4B, 3',3',5',5'- tetramethyl-benzidine (TMB), Sulforhodamine B (SRB), Trizma base, Trichloroacetic acid (TCA) 등은 Sigma사 (St. Louis, Mo., U.S.A.)에서, penicillin-G, streptomycin, Joklik-modified Minimal Essential Medium (S-MEM), Dulbecco's modified eagle's medium (DME), Fetal bovine serum (FBS), Medium 199 (M199), L-glutamine, RPMI 1640은 GIBCO-BRL사 (Grand Island, New York, U.S.A.)에서, [6-3H] glucosamine (39.2 Ci/mmol)은 Amersham사 (U.S.A.)에서, mouse anti-MUC5AC clone 45M1 및 HRP-goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate은 NeoMarkers사 (Freemont, CA, U.S.A.)에서, mouse anti-human total mucin clone 17Q2는 Covance사 (Berkley, CA, U.S.A.)에서, type I collagen은 Regenmed (Seoul, Korea)에서, Easy-blue RNA extraction kit는 Intron biotechnology사 (Kyung-gi, Korea)에서, Accuprep RT premix kit와 Accuprep PCR premix kit는 Bioneer사 (Daejeon, Korea)에서, sodium acetate 등과 기타 일반시약들은 reagent grade 이상의 것들을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 탈이온 2차 증류수였다<sup>12-4)</sup>.

## 2. 방법

### 1) In vivo

(1) 이산화황으로 유발된 기도점액 과다분비 동물모델가로 200 cm, 세로 60 cm, 높이 30 cm의 직육면체 상자를 두께 2 cm의 아크릴 수지판을 재료로 하여 제작하였다. 가로면의 일부에 rat이 출입할 수 있도록 출입문을 만들고, 가로 면과 수직으로 접하고 있는 좌우

양면의 중앙부에 구멍을 만든 후 그에 맞는 nipple과 polyethylene duct를 장착하였다. 한쪽 duct는 이산화황이 발생하는 초음파 가슴기의 분무구에 연결시키고, 반대쪽 duct는 모터로 구동되는 환풍기의 흡기구에 연결시켜 실험 종료 후 잔류하는 이산화황 기체를 완전히 제거할 수 있도록 조치하였다. 이산화황 노출방법은 Pon 등<sup>15)</sup>이 보고한 방법을 개량하여 사용하였다. 15% (V/V) Sodium metabisulfite (MBS) 수용액을 초음파 가슴기에 주입하고, 가슴기를 작동시켰다. 작동 후 3분 이내에 MBS의 증기가 충전했고 작동 종료 시까지 실험장치 내부의 이산화황 농도는 150 ppm으로 유지되었다. 이산화황 농도 측정은 20~3,600 ppm 범위의 대기 중 이산화황을 감지할 수 있는 Gastec detector kit (Tokyo, Japan)을 이용하였다. 동물을 대조군, 이산화황 3주 처리군, 이산화황 2주 처리 후 최종 1주간 이산화황 및 약물 동시 처리군으로 무작위 배정하고, 각 군당 동물 수는 5마리 이상으로 하였다. 노출 기간은 1일 3시간, 1주일에 5일, 3주간이었다. 대조군은 실험 장치가 설치된 동일한 실내에 전 실험기간 동안, 1일 3시간의 이산화황 노출 및 약물 투여 조작만 제외하고 노출군과 동일한 조건 하에 사육되었다.

## (2) 약물의 경구 투여

이산화황 2주 처리 후 최종 1주간 方劑 투여군에 배당된 실험동물을 대상으로 체중 70 kg 성인에게 투여되는 약물의 투여 용량을 기준으로 환산된 체중 350 g 정도의 흰쥐에의 투여 용량을 方劑 추출물 2 ml를 경구 투여하였다. 즉, 총 3주간의 이산화황 노출 기간 중 마지막 1주간 (총 5일), 매일 반복적으로 약물을 투여하였는데, 약물 투여는 오전 10시에서 11시 사이에, 이산화황 노출은 오후 1시에서 4시까지 각각 실시하였다.

## (3) 뮤신 분비량의 측정

이산화황 노출 및 약물 투여가 종료된 각 실험동물을 이산화탄소로 질식사시킨 후, 청정한 환경에서 기도를 노출시키고 기관지 폐포액 세척술 (bronchoalveolar lavage, BAL)을 통하여 생체 내 (in vivo) 뮤신을 함유한 세척액을 각 동물당 5 ml씩 수거하였다. 각 세척액 sample을 PBS로 1/10배 희석하고, 희석된 각 sample을 ELISA 전용의 96-well plate에 각각 100  $\mu$ l씩 나누어 넣고, 2시간 동안 상온에서 incubation하였다. 2시간 후 PBS-Tween 20 (PBS-T, 0.05%) 용액 200  $\mu$ l/well을

이용, 각 well 당 3회씩 washing하였다. washing 후 2% BSA in PBS-T 용액 200  $\mu$ l를 각 well 당 가하고, 다시 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후, PBS-T 200  $\mu$ l로 3회 washing하고, 대표적 호흡기 뮤신인 MUC5AC에 대한 monoclonal antibody인 mouse anti-MUC5AC clone 45M1을, 2% BSA에 1:1,000의 비율로 희석한 후에, 각 well 당 100  $\mu$ l씩 첨가하고 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후 PBS-T로 3회 washing하고, 2차 항체인 HRP-goat anti-mouse IgG conjugate를 2% BSA에 1:5,000의 비율로 희석한 후, 각 well 당 100  $\mu$ l씩 첨가하여 1시간 동안 incubation하였다. PBS-T로 다시 3회 washing 후, 과산화수소와 3',3',5',5'-tetramethylbenzidine (TMB)의 혼합조제 용액 100  $\mu$ l를 각 well에 첨가하고, 5분 후 1N 황산 용액 50  $\mu$ l를 첨가, 반응을 정지시켰다. 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정함으로써, 대조군과 약물 처리군 간의 뮤신의 양을 정량, 비교하였다<sup>16-7)</sup>.

## 2) In vitro

### (1) 햄스터 기관표면 상피세포의 분리 및 배양

햄스터 기관표면 상피세포의 분리와 배양에 적용된 실험방법은 Kim 등<sup>18-22)</sup>의 방법을 사용하였다. 동물을 이산화탄소로 질식사시킨 후, 소독된 수술대 위에 고정시키고, 70% 에탄올로 세척한 후, 소독된 면도날로 피부를 절개한다. 수술용 가위로 기관 (trachea) 부위를 노출시키고, 기관을 덮고 있는 근육을 주의 깊게 자르고, 기관을 노출시킨 후 후두 바로 밑 부분의 기도에 기관 둘레의 1/2에 해당하는 부분만 절개하고, 멸균된 polyethylene tube (PE관)를 절개된 기관 부위에 밀어 넣고, 수술사로 묶어준다. 기관을 완전히 분리한 후, Minimum Essential Medium (이하 S-MEM)에 용해된 0.1% pronase를 기관 내부에 충분히 주입한 뒤, 기관의 노출된 끝부분과 PE관 쪽을 단단히 묶은 후, 4 °C에서 16시간 동안 방치해 둔다. 동시에, 24 well culture plate를 기준으로, well 당 400  $\mu$ l의 콜라겐 혼합물을 도포하고 37 °C incubator 내에서 2시간 정도 gel을 고형화한 뒤, insulin (5  $\mu$ g/ml), transferrin (5  $\mu$ g/ml), epidermal growth factor (12.5 ng/ml), hydrocortisone (0.1  $\mu$ M), sodium selenite (0.01  $\mu$ M), fetal bovine serum (5%, V/V) (이하 FBS), retinoic acid (0.1  $\mu$ M), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml), gentamicin (50  $\mu$ g/ml) 이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium (DME)과

Medium 199 (M199)의 1:1 혼합 배양액 (이하 완전 배양액)을 각 well마다 400  $\mu$ l씩 첨가하여 37 °C incubator 내에서 24시간 동안 평형화시킨다. Pronase 처리 시작 16시간 후, 분리된 상피세포 및 효소함유 배양액이 함유된 시험관을 원심 분리함으로써 상피세포만을 얻고, 침전된 세포 pellet을 완전배양액에 분리 및 재현탁시킨다. 배양액에 재현탁된 세포를 16 mm, 24 well plate를 기준으로, 1 well 당 50  $\mu$ l씩 도포한다. 도포된 세포들은 37 °C, 95% 공기, 5% CO<sub>2</sub>, 습도가 적절한 incubator 내에서 만 24시간 동안 배양된 후, 배양액을 교체한다. 세포들이 1~3일간 배양된 후에는 37 °C incubator에서 32 °C incubator로 옮겨서 배양하고 배양액 교체는 위와 같은 방식으로 배양 개시 후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다.

#### (2) HTSE 세포에의 약물 투여 및 분비된 뮤신의 ELISA 방법을 이용한 측정

다 자란 HTSE 세포에 well 당 200  $\mu$ l의 배양액을 가하고 24시간 동안 배양한 후 배양액 (pretreatment sample, 이하 PT)을 수거해 두었다. 배양세포에 well 당 0.5 ml의 PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 각 方劑 추출물 10~80  $\mu$ l를 함유하는 PBS 200  $\mu$ l를 well마다 가하고 32 °C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하여, treatment sample (이하 T sample)로 정의하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 원심분리의 원리로 Centrifuge microfilter (상품명 Centricon T sample)를 사용하여 T sample 중 한약 성분을 제거한 후, mucin 함량을 측정할 때까지 -70 °C에서 냉동 저장했다. 냉동된 각 PT 및 T sample을 해동한 후 sample을 PBS로 1/10배 희석하고, 희석된 각 sample을 ELISA 전용의 96-well plate에 각각 100  $\mu$ l씩 나누어 넣고, 2시간 동안 상온에서 incubation하였다. 2시간 후 PBS-Tween 20 (PBS-T, 0.05%) 용액 200  $\mu$ l/well을 이용, 각 well 당 3회씩 washing하였다. washing 후 2% BSA in PBS-T 용액 200  $\mu$ l를 각 well 당 가하고, 다시 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후, PBS-T 200  $\mu$ l로 3회 washing하고, 호흡기 total mucin에 대한 monoclonal antibody인 mouse anti-human total mucin clone 17Q2 (Covance, Berkley, CA, U.S.A)를, 2% BSA에 1:1,000의 비율로 희석한 후에, 각 well 당 100  $\mu$ l씩 첨가하고, 1시간 동안 incubation하

였다. 1시간 후 PBS-T로 3회 washing하고, 2차 항체인 HRP-goat anti-mouse IgG conjugate를 2% BSA에 1:5,000의 비율로 희석한 후, 각 well 당 100  $\mu$ l씩 첨가하여 1시간 동안 incubation하였다. PBS-T로 다시 3회 washing 후, 과산화수소와 3',3',5',5'- tetramethyl-benzidine (TMB)의 혼합조제 용액 100  $\mu$ l를 각 well에 첨가하고, 5분 후 1N 황산용액 50  $\mu$ l를 첨가, 반응을 정지시켰다. 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정함으로써 No Centricon group, After Centricon group에 배당된 각각의 대조군과 약물 처리군 간의 뮤신의 양을 정량, 비교하였다<sup>16-7)</sup>.

#### (3) NCI-H292 세포 내에 존재하는 total RNA의 분리

30분의 투여기간 동안 뮤신의 분비에 영향을 주는 각 方劑가, 24시간의 투여기간 동안 인간 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포 내에 존재하는 뮤신 유전자인 MUC 5AC의 발현 정도에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, NCI-H292 세포를 다음과 같은 방법으로 배양하였다. L-glutamine (2 mM), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml), FBS (10%, V/V) 등이 첨가된 RPMI 1640 배양액 (이하 배양액)에서 배양하였다. 세포는 습도가 충분히 유지되며 95% 공기, 5% CO<sub>2</sub>를 함유하는 37 °C 조건에서 배양되며, 1주에 2회의 빈도로 subculture하였다. 方劑의 작용을 검증하기 위하여, 24 well culture plate를 기준으로, well 당 2.5 x 10<sup>5</sup> cells/well의 밀도로 세포를 도포하고 배양하였다. 세포가 다 자라면, FBS의 농도를 0.5%로 감소시킨 배양액을 주고 24시간 동안 배양하고, 이후 serum을 첨가하지 않은 배양액으로 세포를 세척하였다. 이렇게 준비된 세포에 tumor necrosis factor-alpha (이하 TNF-alpha) 0.1 nM (500 U/ml) 또는 EGF 25 ng/ml을 투여한 후 30분이 지난 시점에 각 方劑를 최종 추출물 기준으로 각각 20  $\mu$ l씩 함유하는 완전배양액 200  $\mu$ l를 well (24 well plate 기준)마다 가하고, 37 °C에서 24시간 동안 배양시킨 다음, 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 분리하고자 Intron biotechnology사의 Easy-blue RNA extraction kit (total RNA isolation reagent)를 이용해 (0.5 ml/4x10<sup>5</sup> cells) 세포를 lysis시키고,

핵단백질을 완전히 분리해내기 위해 상온에서 5분간 방치하였다. 5분 후 즉시, microtube에 chloroform를 첨가, 15초간 vortexing하고 상온에 2~3분간 방치한 후 4 °C, 13,000 rpm (Hanil centrifuge, MICRO 17 R)에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액 400  $\mu$ l를 새 microtube에 옮겼다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 4 °C, 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 이 침전물에 diethylpyrocarbonate (DEPC)가 함유된 75% ethanol을 가하고 4 °C, 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리함으로써 세척하였다. 수거된 RNA 침전물을 5분간 대기 중에서 건조시킨 후, 20  $\mu$ l의 RNase-free water로 부유시키고, spectrophotometer (Beckman, DU-650)를 사용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도를 알아내어 실험에 사용하였다 (1.0A260=single strand RNA 40  $\mu$ g/ml)<sup>23</sup>.

#### (4) PCR (Polymerase Chain Reaction)을 위한 primer 제조

PCR에 사용된 primer는 전문 제조회사인 제노텍 (주)에 주문, 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 500 bp 였다.  $\beta$ -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 bp 였다.

#### (5) RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

수거된 total RNA를 이용, 역전사 반응 (reverse transcription; RT)으로 cDNA를 만들고, 이를 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)으로 증폭시켰다. 즉 각각의 조건에서 얻어진 total RNA 1  $\mu$ g을 75 °C에서 5분간 가열함으로써 denaturation시키고, 이를 열음에 담가 급냉시킨 후 RT premix kit의 사용자 설명서에 따라 역전사 반응을 진행시켰다. MUC 5AC 유전자에 대한 중합효소 연쇄반응 (PCR)은, 각각의 역전사 반응에서 얻은 cDNA 산물 2  $\mu$ l를 PCR premix kit의 사용자 설명서에 따라 진행시켰다. 증폭반응을 위하여,

PCR (PCR thermal cycler; Takara MP-300, Japan)을 40 회 실시하였으며, denaturation은 94 °C에서 30초, annealing은 60 °C에서 30초, extension은 72 °C에서 30초 간 각각 시행하였다.

#### (6) 전기영동에 의한 중합효소 연쇄반응 산물의 확인

RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응으로 증폭된 cDNA 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC5AC 유전자 발현 정도의 변동을 관찰하였다. 즉, 증폭된 PCR 산물 10  $\mu$ l를 10 $\times$  gel loading buffer (0.2 5% 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  $\mu$ g/ml의 ethidium bromide가 포함된 1.0% agarose gel에서 전기영동 하였다. Gel 상에서 이동된 각각의 DNA band는 자외선 투사기 (ultraviolet transilluminator)를 이용하여 관찰하고, 사진을 촬영하였다.

#### (7) NCI-H292 세포의 생존 및 증식에 미치는 약물의 영향 측정 (세포독성 시험, Sulforhodamine B (SRB) method)

96 well plate의 각 well에 104개의 NCI-H292 cell을 함유하는 배양액 180  $\mu$ l를 가하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 존재 하에서 24시간 배양하였다<sup>24,5</sup>. 24시간 배양 후 각 方劑 추출물을 0.2  $\mu$ l/PBS 200  $\mu$ l의 농도로 배양세포의 well마다 가하고 48시간 동안 추가로 배양하였다. 배양이 완료된 후, 냉각된 50% trichloroacetic acid (TCA) 50  $\mu$ l를 각 well에 서서히 가해주었다. 10분 후에 4 °C 조건의 냉장고에 옮겨 1시간 동안 충분히 세포들을 고정 (fixation)시키고, 고정이 완료된 후 각 well에 존재하는 액체 성분들을 전량 흡인배출 (suction)한 후에 well 당 250  $\mu$ l의 증류수를 이용, 5회 이상 세척하였다. 이렇게 준비된 세포에, acetic acid에 용해된 0.4% SRB 용액 100  $\mu$ l/well을 가하고 실온에서 45분 동안 염색하였고, 재차 suction 후 100  $\mu$ l의 1% acetic acid를 이용, 5회 이상 세척한 후 세포들을 건조시켰다. 각 well 당 150  $\mu$ l의 10 mM unbuffered Tris용액으로 SRB를 잘 녹여낸 후, 흡광분석 측정 장치 (microplate reader)로 540 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다<sup>25</sup>.

#### 3) 통계처리

모든 측정 결과는 Mean  $\pm$  S.E.M.으로 환산된 후, 약물 처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타냈다.

통계처리는 unpaired Student's t-test로 하였으며,  $p < 0.05$  인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

### III. Results

#### 1. In vivo

##### 1) 이산화황으로 유발된 기도점액 과다분비 상태에 미치는 영향

(1) 加味淸肺湯은 체중 350 g의 흰쥐를 대상으로 총 5일간 최종 추출물 2 ml를 투여했을 때, 이산화황으로 유발된 과다분비 점액의 양을 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있게 감소시켰다 (Fig. 1).

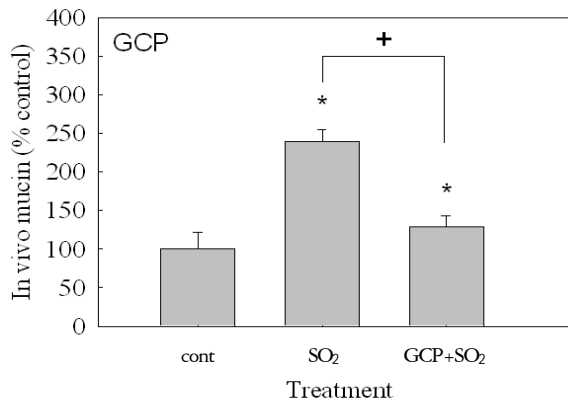


Fig. 1. Effect of GCP on secretion of in vivo mucin

Rats were exposed to sulfur dioxide and effect of orally-administered GCP extract on quantity of secreted airway mucin from rats, as described in Materials and methods (SO<sub>2</sub>: sulfur dioxide).

\*: significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

+: significantly different from SO<sub>2</sub>-only ( $p < 0.05$ ).

(2) 加減正氣湯 역시 이산화황으로 유발된 과다분비 점액의 양을 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있게 감소시켰다 (Fig. 2).

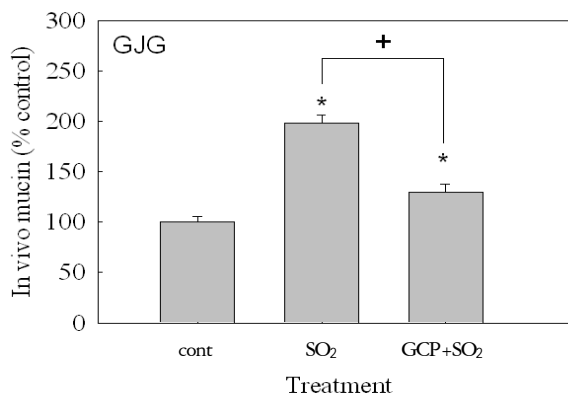


Fig. 2. Effect of GJG on secretion of in vivo mucin

Rats were exposed to sulfur dioxide and effect of orally-administered GJG extract on quantity of secreted airway mucin from rats, as described in Materials and methods (SO<sub>2</sub>: sulfur dioxide).

\*: significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

+: significantly different from SO<sub>2</sub>-only ( $p < 0.05$ ).

(3) 加味四物湯은 350 g 체중 흰쥐를 대상으로 총 5일간 최종 추출물 2 ml를 투여했을 때, 이산화황으로 유발된 과다분비 점액의 양에 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있는 영향을 나타내지 못하였다 (Fig. 3).

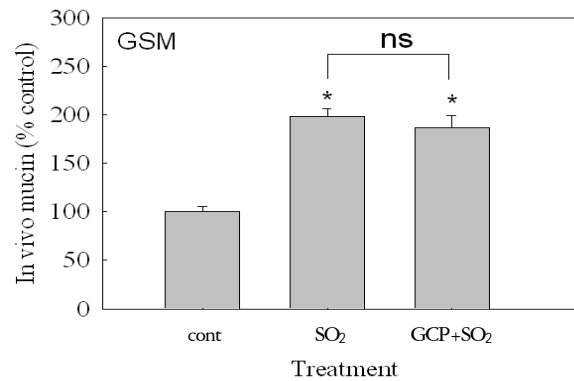


Fig. 3. Effect of GSM on secretion of in vivo mucin

Rats were exposed to sulfur dioxide and effect of orally-administered GSM extract on quantity of secreted airway mucin from rats, as described in Materials and methods (SO<sub>2</sub>: sulfur dioxide).

\*: significantly different from control ( $p < 0.05$ ) (ns: not significant).

(4) 加味理中湯은 350 g 체중 흰쥐를 대상으로 총 5일간 최종 추출물 2 ml를 투여했을 때, 이산화황으로 유발된 과다분비 점액의 양에 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있는 영향을 나타내지 못하였다 (Fig. 4).

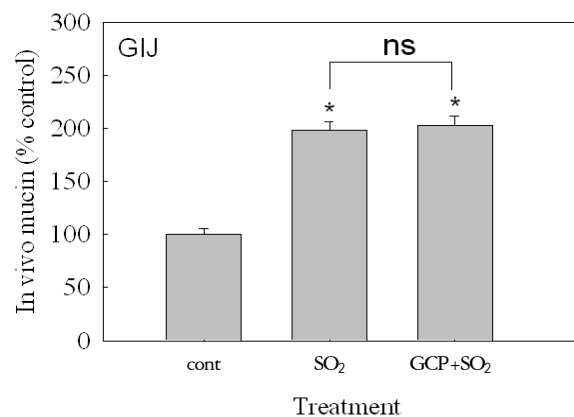


Fig. 4. Effect of GIJ on secretion of in vivo mucin

Rats were exposed to sulfur dioxide and effect of orally-administered GIJ extract on quantity of secreted airway mucin from rats, as described in Materials and methods (SO<sub>2</sub>: sulfur dioxide).

\*: significantly different from control ( $p < 0.05$ ) (ns: not significant).

2. In vitro

1) 일차배양 HTSE 세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향

(1) 加味清肺湯은 최종 추출물 10~40  $\mu$ l/200  $\mu$ l PBS의 투여 농도 범위에서 뮤신 분비를 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있게 증가시켰다 (Fig. 5).

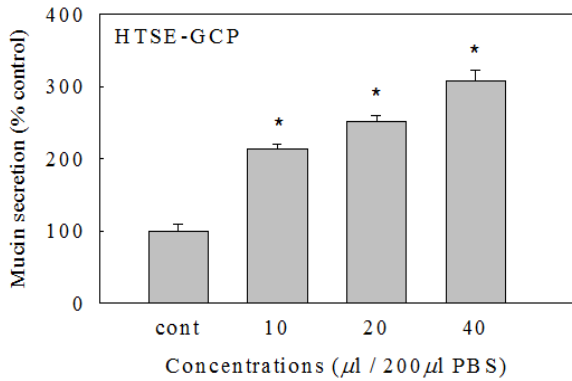


Fig. 5. Effect of GCP on mucin secretion from cultured HTSE cells (ELISA)

Confluent HTSE cells were chased for 30 min in the presence of varying concentrations of GCP extract. The amount of mucin in the spent media was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described in Materials and methods. Each bar represents a Mean  $\pm$  S.E.M. from 4 culture wells.

\*: significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

(2) 加減正氣湯도 역시 최종 추출물 10~40  $\mu$ l/200  $\mu$ l PBS의 투여 농도 범위에서 뮤신 분비를 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있게 증가시켰다 (Fig. 6).

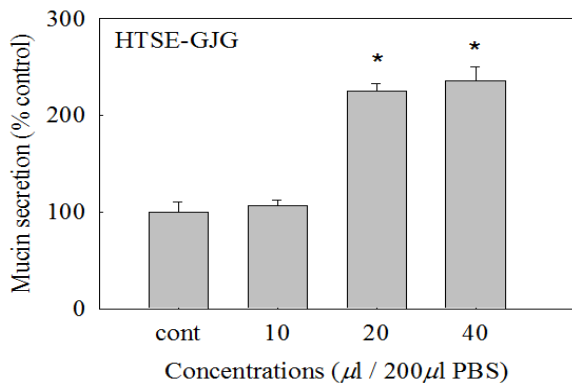


Fig. 6. Effect of GJG on mucin secretion from cultured HTSE cells (ELISA)

Confluent HTSE cells were chased for 30 min in the presence of varying concentrations of GJG extract. The amount of mucin in the spent media was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described in Materials and methods. Each bar represents a Mean  $\pm$  S.E.M. from 4 culture wells.

\*: significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

(3) 加味四物湯은 최종 추출물 20~80  $\mu$ l/200  $\mu$ l PBS의 투여 농도 범위에서 뮤신 분비에 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있는 영향을 주지 못하였다 (Fig. 7).

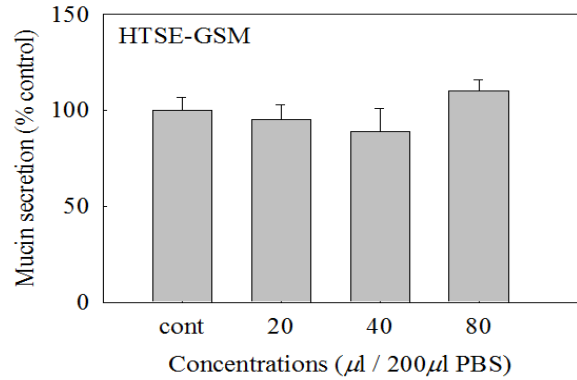


Fig. 7. Effect of GSM on mucin secretion from cultured HTSE cells (ELISA)

Confluent HTSE cells were chased for 30 min in the presence of varying concentrations of GSM extract. The amount of mucin in the spent media was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described in Materials and methods. Each bar represents a Mean  $\pm$  S.E.M. from 4 culture wells.

(4) 加味理中湯은 최종 추출물 20~80  $\mu$ l/200  $\mu$ l PBS의 투여 농도 범위에서 뮤신 분비에 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있는 영향을 주지 못하였다 (Fig. 8).

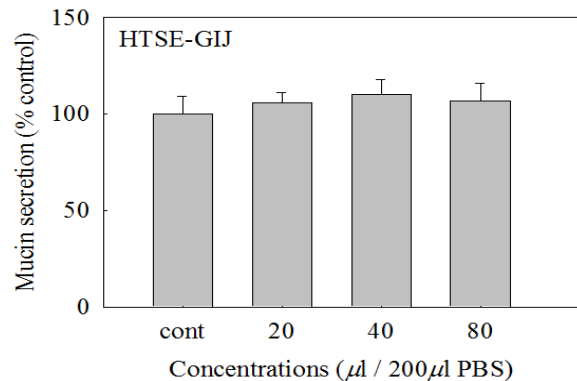


Fig. 8. Effect of GIJ on mucin secretion from cultured HTSE cells (ELISA)

Confluent HTSE cells were chased for 30 min in the presence of varying concentrations of GIJ extract. The amount of mucin in the spent media was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described in Materials and methods. Each bar represents a Mean  $\pm$  S.E.M. from 4 culture wells.

2) NCI-H292 세포에서 EGF로 유도된 MUC5AC 유전자 발현 증가에 미치는 영향

(1) 加味清肺湯, 加減正氣湯은 24시간의 투여기간 동안 EGF로 유도된 MUC5AC의 발현 수준을 감소시켰다 (Fig. 9).



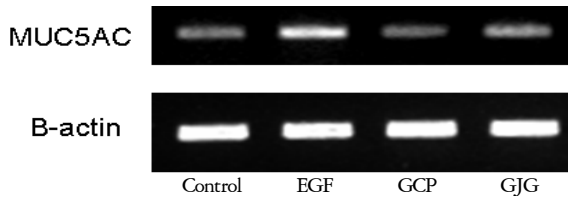


Fig. 9. Effects of GCP and GJG on EGF-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were incubated with the indicated concentration of each agent for 24 hrs. Total RNA was isolated and MUC5AC mRNA levels were analyzed by RT-PCR. The PCR products were separated on 1.0% agarose gel and stained with ethidium bromide, as described in Materials and methods.

(2) 加味四物湯, 加味理中湯은 24시간의 투여기간 동안 EGF로 유도된 MUC5AC의 발현 수준을 약간 더 증가시키는 결과를 보여 주었다 (Fig. 10).

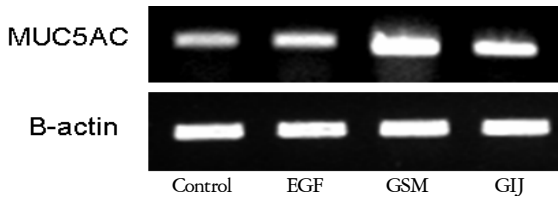


Fig. 10. Effects of GSM and GJ on EGF-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were incubated with the indicated concentration of each agent for 24 hrs. Total RNA was isolated and MUC5AC mRNA levels were analyzed by RT-PCR. The PCR products were separated on 1.0% agarose gel and stained with ethidium bromide, as described in Materials and methods.

3) NCI-H292 세포에서 TNF-alpha로 유도된 MUC5AC 유전자 발현 증가에 미치는 각 方劑의 영향

(1) 加味清肺湯, 加減正氣湯은 24시간의 투여기간 동안 TNF-alpha로 유도된 MUC5AC의 발현에 영향을 주지 못하였다 (Fig. 11).

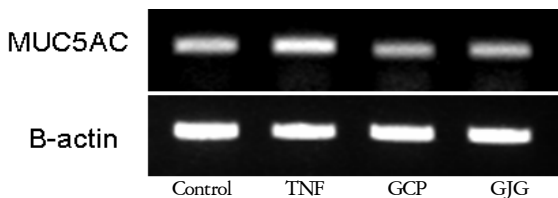


Fig. 11. Effects of GCP and GJG on TNF-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were incubated with the indicated concentration of each agent for 24 hrs. Total RNA was isolated and MUC5AC mRNA levels were analyzed by RT-PCR. The PCR products were separated on 1.0% agarose gel and stained with ethidium bromide, as described in Materials and methods.

(2) 加味四物湯은 24시간의 투여기간 동안 TNF-alpha로 유도된 MUC5AC의 발현 수준을 약간 감소시켰으며, 加味理中湯은 TNF-alpha로 유도된 MUC5AC의 발현에 영향을 주지 못하였다 (Fig. 12).

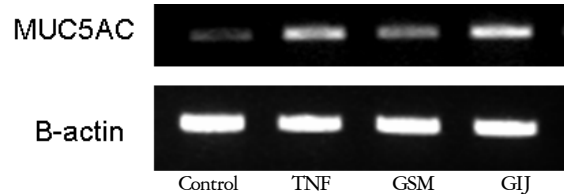


Fig. 12. Effects of GSM and GJ on TNF-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were incubated with the indicated concentration of each agent for 24 hrs. Total RNA was isolated and MUC5AC mRNA levels were analyzed by RT-PCR. The PCR products were separated on 1.0% agarose gel and stained with ethidium bromide, as described in Materials and methods.

4) NCI-H292 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향

(1) 加味清肺湯과 加減正氣湯을 NCI-H292 세포에 각각 0.2 μl/200 μl PBS의 투여 농도로 48시간 동안 투여했을 때, 세포의 생존 및 증식에 유의성 (P<0.05) 있는 영향을 주지 못하였다 (Fig. 13).

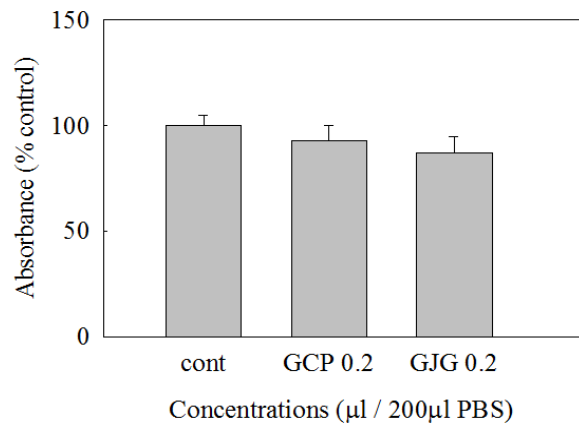


Fig.13. Effects of GCP and GJG on survival and proliferation of NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were treated with 0.2 μl GCP extract/200 μl PBS or 0.2 μl GJG extract/200 μl PBS for 48 hrs. The number of cells survived was counted, as described in Materials and methods.

(2) 加味四物湯과 加味理中湯을 NCI-H292 세포에 각각 0.2 μl/200 μl PBS의 투여 농도로 48시간 동안 투여했을 때, 세포의 생존 및 증식에 유의성 (P<0.05) 있는 영향을 주지 못하였다 (Fig. 14).

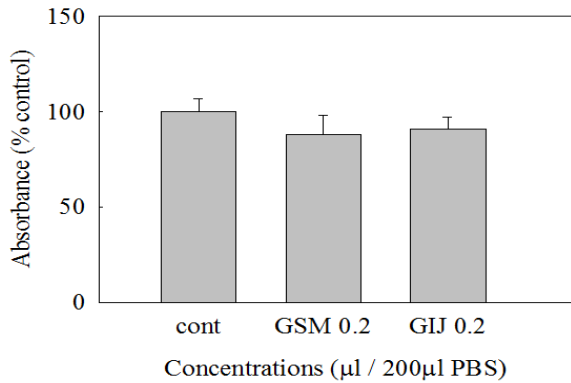


Fig. 14. Effects of GSM and GIJ on survival and proliferation of NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were treated with 0.2 μl GSM extract/200 μl PBS or 0.2 μl GIJ extract/200 μl PBS for 48 hrs. The number of cells survived was counted, as described in Materials and methods.

#### IV. Discussion

韓醫學에서 痰飲은 津液의 病理的 現象으로 《類證治裁·痰飲》<sup>26)</sup>에 “在肺則咳, 在胃則嘔, 在心則悸, 在頭則眩, 在背則冷, 在胸則痞, 在脇則脹, 在腸則瀉, 在經絡則腫, 在四肢則麻, 變幻百端”이라 하였다. 依義의 痰은 咯出한 痰液, 즉 咯痰을 가리키는데<sup>27)</sup>, 咯痰이란 炎症반응 등으로 分泌物 生成이 증가되거나 또는 分泌物의 物理的 性狀이 바뀔 때, 纖毛運動의 障礙로 인하여 排出이 지장을 받을 때 分泌物이 咽喉로 운반되어 嚥下되거나 배출됨으로써 나타나는 증상이다<sup>28)</sup>.

咯痰을 구성하는 주요 구성성분인 粘液은 纖毛細胞와의 협동적 작용을 통해, 인체에 불필요하거나 혹은 유해한 물질의 제거에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>9)</sup>. 呼吸器 粘液의 人體 防禦 機能은 주로 粘液의 구성요소인 뮤신의 점성 및 탄성에 기인하는데, 이러한 뮤신의 양과 질의 이상은 氣道 生理의 이상뿐 아니라 人體의 防禦作用에 영향을 주어 呼吸器系에 심한 病理 現상을 유발할 수 있다<sup>6)</sup>.

보통 건강인은 하루 10-20 ml의 粘液分泌가 일어나는 것이 정상이지만 100 ml 이상의 粘液分泌가 일어날 때에는 病理現象이 나타나게 된다<sup>29)</sup>. 즉 鼻炎, 副鼻腔炎, 中耳炎, 알레르기 鼻炎, 慢性 氣管支炎 등의 呼吸器 疾患에서 粘液의 過分泌가 흔히 나타나서 코 막힘과 呼吸困難을 惹起하고 호흡한 공기 중의 해로운 물질이 코점막에 부착되면 기침을 일으키기도 한다<sup>29-30)</sup>.

이에 대해 粘液을 減少시키기 위한 治療방침으로는

粘液의 分泌 자체를 줄이는 것, 상피세포의 粘液輸送 能을 증대시키는 것, 粘液의 流動학적 特性을 변화시켜 기침에 의해 보다 효과적으로 제거할 수 있는 방법의 세 가지가 있으나, 粘液의 分泌 자체를 줄이는 방법이 가장 효과적이고 臨床에서 널리 쓰이는 방법이라고 알려져 있다<sup>9)</sup>.

현재 서양의학에서 이러한 過多分泌된 粘液의 粘度 및 分泌를 조절하기 위해 사용되는 粘液溶解劑 (bromhexine, ambroxole, s-car-boxymethylcysteine 등)는 반사기전에 의한 극심한 粘液 分泌를 초래하거나 지나친 粘度 減少로 粘液의 원위기관 유입을 초래하기도 하며<sup>31)</sup>, 去痰劑 (ammonium chloride, amino benzoic acid 등)는 氣道를 직접 자극하여 粘液 分泌를 증가시키기도 하는 등 그 효능 및 응용 범주에 제한이 있어 적절한 약물치료를 시행하기가 용이하지 않다<sup>7)</sup>.

본 실험에 사용된 처방을 살펴보면, 加味淸肺湯은 《晴崗醫鑑》<sup>32)</sup>에 수록된 處方으로 感冒未解, 寒熱往來, 肺熱咳嗽에 효과가 있는 柴梗淸肺湯에서 靑皮를 去하고 川芎, 枳殼을 加하여 開鬱散結, 行氣의 效果를 增強시킨 處方이다. 加減正氣湯도 《晴崗醫鑑》<sup>32)</sup>에 수록된 處方으로 感冒未解, 胸膈不快, 梅核氣에 응용하며 解表化濕, 理氣和中하는 효능이 있어 外感風寒, 內傷食滯로 인한 疾患에 응용되는 藿香正氣散에 藿香, 大腹皮, 厚朴, 白朮을 빼고, 疏肝理氣하는 香附子, 燥濕健脾하고 去風濕하는 蒼朮, 行氣散寒하는 烏藥, 行氣寬中하는 枳殼, 行氣去風하는 川芎을 加味하여 理氣行氣하는 효능을 더욱 強化시킨 處方이다<sup>33)</sup>. 또한 加味四物湯은 《和劑局方》<sup>34)</sup>에 기재되어 있는 처방으로 補血, 涼血, 滋潤의 작용이 있는 四物湯을 근거로 한 處方으로서, 諸病에 津液이 生하지 않는 者는 四物湯에 加減한다고 하였다. 四物湯에 玄蔘, 牛蒡子로 降火滋陰, 利咽喉하여 消炎去痰시키고 白蒺藜, 蒼耳子로 燥濕解鬱하며 防風, 樺皮로 解表驅風하여 血虛者의 外感咽痛, 咳嗽에 응용하였다. 마지막으로 加味理中湯은 《傷寒論》에 기재된 脾土를 調理하는 理中湯<sup>35)</sup>에 去白朮, 加附子하여 勝寒散滿하고, 肉桂로 健胃, 回陽散寒하고, 茯苓, 蛇床子로 燥濕滲泄, 散寒去風하며, 玄蔘으로 降火滋陰, 利咽喉하고, 金銀花로 散熱解毒消炎하여 消化器 虛寒者의 感冒, 咽痛, 咳嗽에 사용되는 處方이다.

본 연구는 韓醫學에서 臨床에 呼吸器 疾患 治療에 사용되고 있는 加味淸肺湯, 加減正氣湯, 加味四物湯, 加味理中湯의 方劑가 呼吸器 뮤신의 분비 및 뮤신 유

전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 질환모델 동물 및 배양세포를 대상으로 검증하고자 하였다.

각 方劑가 이산화황 흡입으로 유발된 呼吸器 粘液 過多分泌 동물모델에서 氣道粘液의 過多分泌 상태에 어떠한 영향을 주는지를 알아보기 위하여, Pon 등<sup>15)</sup>이 보고한 동물모델을 개량한 질환모델 동물을 이용하여, 생체 내 뮤신 (in vivo)의 分泌에 대한 각 方劑의 영향을 측정된 결과 (Fig. 1, 2), 흰쥐를 이산화황 기체에 3주간 노출시켰을 때 in vivo 氣道粘液의 分泌量이 대조군보다 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있게 증가하였으나, 加味淸肺湯 및 加減正氣湯 투여군에서는 氣道粘液의 分泌量을 다시 減少시킴으로써 두 方劑가 炎症性 呼吸器 疾患에서의 氣道粘液 過多分泌를 조절, 다양한 呼吸器 疾患에서 치료 작용을 발현할 가능성을 실험적으로 보여주었다. 그러나 加味四物湯과 加味理中湯 투여군의 경우에는 이산화황으로 유발된 氣道粘液 過多分泌 동물모델에서 in vivo 뮤신의 분비에 영향을 주지 못하였다 (Fig. 3, 4).

배양된 呼吸器 上皮細胞에서 단기간 (30분)의 藥物 投與에 관한 반응에 의하면 加味淸肺湯과 加減正氣湯은 30분간의 약물처리 기간 동안 용량 의존적으로 뮤신 분비를 증가시켰다 (Fig. 5, 6). 그러나 加味四物湯과 加味理中湯은 질환모델 동물에서의 결과와 유사하게 배양세포에서의 뮤신 분비에 대해서도 유의성 있는 영향을 나타내지 못하였다 (Fig. 7, 8).

이상의 결과, 加味淸肺湯과 加減正氣湯은 배양된 齧齒類의 호흡기 상피세포에 대해서는 단기적으로 뮤신의 분비를 증가시키는 경향이 있으나, 氣道粘液 過多分泌 모델 동물 (질환모델 동물)을 대상으로 한 장기, 반복 투여 시에는 뮤신의 과다분비를 감소시킴으로써, 이 두 方劑가 呼吸器 炎症性 疾患의 임상에서 呼吸器 粘液 (咯痰) 過多分泌 상태를 好轉시킬 수 있음이 나타났다. 그러나 加味四物湯과 加味理中湯의 경우에는 배양된 呼吸器 上皮細胞, 氣道粘液 過多分泌 모델 동물에서 뮤신분비에 대해 영향을 나타내지 못하였다.

또한, 본 연구에서는 상기 연구과정에서 알아본 바와 같이 각 方劑가 이미 생성된 뮤신의 분비에만 영향을 미치는지, 혹은 생성 단계 자체에서 뮤신 유전자의 발현에도 영향을 미치는지 알아보려고 인간의 呼吸器 상피세포주인 NCI-H292 세포를 대상으로 뮤신 유전자 발현 관련 연구를 진행하였다. NCI-H292 세포에 호흡기 뮤신 유전자인 MUC5AC의 발현을 유도 (자극)하는 물질인 EGF (상피세포성장인자) 혹은 TNF-alpha (중양괴사인자)를 미리 (30분 전) 투여한 후, 24시간 동

안 方劑를 투여하고 MUC5AC의 발현 수준에 대한 영향을 검증해 본 결과, 먼저 EGF로 유도된 뮤신 유전자 발현에 대해서 加味淸肺湯과 加減正氣湯은 MUC5AC의 발현 수준을 減少시키는 경향을 보였으며 (Fig. 9), 加味四物湯과 加味理中湯의 경우에는 EGF로 유도된 MUC5AC의 발현수준을 오히려 增加시키는 경향을 보여주었다 (Fig. 10). 다음으로 TNF로 유도된 뮤신 유전자 발현에 대하여는 加味淸肺湯과 加減正氣湯은 MUC5AC의 발현수준에 의미 있는 영향을 나타내지 못하였으나 (Fig. 11), 加味四物湯은 TNF로 유도된 MUC5AC의 발현수준을 微弱하게 減少시켰으며, 加味理中湯의 경우에는 MUC5AC의 발현 수준에 의미 있는 영향을 나타내지 못하였다 (Fig. 12).

이는 EGF나 TNF의 두 유전자 발현 유도물질 중 EGF에 의해 조성된 실험조건이 선형 실험결과들과 더 부합함을 제시하고 있는 것으로서, 加味淸肺湯과 加減正氣湯은 장기 (24시간 이상) 투여 시 뮤신의 분비만 억제하는 것이 아니라 뮤신 유전자의 발현도 억제함으로써 두 方劑가 뮤신의 생성 및 분비단계에서 공히 억제적으로 작용할 가능성을 보여주었다. 淸熱解毒 혹은 止咳化痰平喘 효능을 가진 本草를 함유하는 두 方劑가 단기적으로는 배양세포에 대하여 뮤신 분비를 증가시키는 영향을 줄 수 있으나, 질환모델 동물에 장기 투여 시에는 뮤신 분비의 감소에만 영향을 미칠 뿐 아니라, 뮤신 생성을 저해함으로써 염증성 호흡기 질환 시의 객담 과다분비를 조절해 줄 가능성을 제시하고 있는 것이다. 반면, 加味四物湯과 加味理中湯의 경우에는 단기 및 장기 투여 시에도 뮤신의 분비에는 영향을 나타내지 못하나, 호흡기 뮤신 유전자의 발현은 오히려 증가시키는 결과를 보여줌으로써, 두 方劑가 함유하고 있는 人蔘, 當歸, 熟地黃, 芍藥, 甘草, 附子 등 補益陰陽 작용을 나타내는 本草들에 의해 유전자의 발현이 증가하는 현상을 초래했을 가능성을 보여주었다. 이 두 方劑는 뮤신의 분비 보다는 생성 단계에 주로 작용하여 陰虛로 인한 少量의 粘稠한 咯痰이 존재하는 병리적 상황에서 뮤신의 생성을 증가시킴으로써 결과적으로 기침을 통한 咯痰 배출을 도울 수 있음을 보여주고 있으며, 향후 다양한 呼吸器 疾患 모델 동물을 이용하여 그 가능성을 계속 검증 시도해 나가야 할 것이라 생각된다.

마지막으로 뮤신 분비 및 뮤신 유전자 발현에 대한 효능이 있는 이러한 方劑들이 세포독성을 유발할 수 있는지 여부를 NCI-H292 세포에 각 方劑를 투여한 후

세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 측정하여 본 결과 세포의 생존율에는 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

이상의 연구 결과들은 韓醫學에서 加味淸肺湯, 加減正氣湯, 加味四物湯, 加味理中湯의 方劑가 喀痰 分泌 異狀을 보이는 呼吸器 疾患에 사용되어 왔던 과학적 배경을 실험적으로 제시하고 있으며, 앞으로 각각의 方劑 및 方劑構成 本草가 喘息, 急慢性 氣管支炎, 肺氣腫, 氣管支 擴張症, 鼻炎, 副鼻洞炎 등 여러 가지 呼吸器 疾患에 다양하게 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

## V. Conclusion

본 연구에서는 加味淸肺湯, 加減正氣湯, 加味四物湯, 加味理中湯 등의 方劑가 呼吸器 뮤신 및 뮤신 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보고자, 이산화황 흡입으로 유발된 氣道粘液 過多分泌 모델, 일차배양 헵스터 기관표면 상피세포, NCI-292세포를 이용한 뮤신 분비 및 생성, 각 方劑의 세포독성검사 실험을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味淸肺湯과 加減正氣湯은 배양된 齧齒類의 呼吸器 上皮細胞에서 短期的으로 뮤신의 분비를 증가시키는 경향이 있었으나, 氣道粘液 過多分泌 모델 동물 (질환모델 동물)을 대상으로 한 장기, 반복 투여 시에는 뮤신의 過多分泌를 減少시켰다.

加味四物湯과 加味理中湯의 경우에는 배양된 齧齒類의 呼吸氣 上皮細胞, 氣道粘液 過多分泌 모델 동물의 뮤신분비에 대해 영향을 나타내지 못하였다.

2. 加味淸肺湯과 加減正氣湯은 장기 (24시간 이상) 투여 시 上皮細胞 성장인자로 자극된 뮤신 (MUC5AC) 유전자의 발현을 抑制함으로써 이 두 方劑가 뮤신의 生成 및 分泌단계에서 모두 抑制的으로 작용하는 것으로 나타났다.

3. 加味四物湯과 加味理中湯은 상피세포 성장인자로 자극된 뮤신 유전자의 발현을 약간 더 증가시켰다.

4. 加味淸肺湯, 加減正氣湯, 加味四物湯, 加味理中湯에서 현저한 세포독성은 나타나지 않았다.

## References

1. Jeon E. Soayakjeungjikyool. Seoul: Yeogangchulpansa. 2002:35-6.
2. Oh GT. Onbyeongjobyeon. Seoul: Jipmoondang. 2001: 711.
3. Kim KB, Kim DG, Kim YH, Kim JH, Min SY, Park EJ, Beak JH, Yoo SE, Lee SY, Lee JY, Lee HJ, Jang GT, Chae JW, Han YJ, Han JK. Hanbangsoeacheongsoenyoneuihak (sang). Seoul: Euisungdang. 2015:32.
4. Joe MJ. Mechanism of mucin release from primary cultured hamster tracheal surface epithelial cells and characterization of a novel mucin-associated protein. Graduate school of Seoul National University. 2000.
5. Jeongukhanuigwadaehak byeongrihakgyosil. Donguipegyenaegwahak. Seoul: Hanmunhwasa. 2002:102-14.
6. Culpitt SV, Rogers DF, Traves SL, Barner PJ, Donnelly LE. Sputum matrix metalloproteases: comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Respir Med.* 2005;99(6):703-10.
7. Rogers DF. Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology?. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(3):241-50.
8. Korean academy of pediatric allergy & respiratory disease. *Pediatric allergic & respiratory disease.* Seoul: Gunjachulpansa. 2005:350-4.
9. Rogers DF, Barnes PJ. Treatment of airway mucus hypersecretion. *Ann Med.* 2006;38(2):116-25.
10. Rogers DF. Mucociliary dysfunction in COPD: effect of current pharmaco-therapeutic options. *Pulm Pharmacol Ther.* 2005;18(1):1-8.
11. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine. *Junguinaeguahak.* Hongkong: Commer Prss. 1982:24-5.
12. Lee CJ. Specificity in the inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *J Appl Pharmacol.* 2001;9(3):218-23.
13. Ko KH, Lee CJ, Shin CY, Jo MJ, Kim KC. Inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Am J Physiol.* 1999;(21):L811-5.
14. Lee CJ. Polycationic action mechanism for the inhibition of mucin release from trachea of rodents. Graduate school of Seoul National University. 1997.

15. Pon DJ, Van Staden CJ, Boulet L, Rodger IW. Hyperplastic effects of aerosolized sodium metabisulfite on rat airway mucus-secreting epithelial cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994;72:1025-30.
16. Harkema JR, Hotchkiss JA. In vivo effects of endotoxin on intraepithelial mucosubstances in rat pulmonary airways: quantitative histochemistry. *Am J Pathol.* 1992;141:307-31.
17. St George JA, Cranz DL, Zicker SC, Etchison JR, Dungworth DL, Plopper CG. An immunohistochemical characterization of rhesus monkey respiratory secretions using monoclonal antibodies. *Am Rev Respir Dis.* 1985;132:556-63.
18. Kim KC. Possible requirement of collagen gel substratum for production of mucin-like glycoproteins by primary rabbit tracheal epithelial cells in culture. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1985;1:617-21.
19. Kim KC, Rearick JI, Nettlesheim P, Jetten AM. Biochemical characterization of mucous glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial cells in primary culture. *J Biol Chem.* 1985;260:4021-7.
20. Kim KC, Brody JS. Gel contraction causes mucin release in primary hamster tracheal epithelial cells growing on a collagen gel. *J Cell Biol.* 1987;105:158a.
21. Wu R, Smith D. Continuous multiplication of rabbit tracheal epithelial cells in a defined, hormone-supplemented medium. *In Vitro.* 1982;18:800-12.
22. Wu R, Nolan E, Turner C. Expression of tracheal differentiated function in serum-free hormone-supplemented medium. *J Cell Physiol.* 1985;125:167-81.
23. Karlinsey J, Stamatoyannopoulos G, Enver T. Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells. *Anal Biochem.* 1989;180(2):303-6.
24. Kim YD, Kwon EJ, Park DW, Song SY, Yoon SK, Baek SH. Interleukin-1beta induces MUC2 and MUC5AC synthesis through cyclooxygenase-2 in NCI-H292 cells. *Mol Pharmacol.* 2002;62(5):1112-8.
25. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82:1107-12.
26. Lee BG, Kim TH, Park YB. *Hanbangjindanhak (II)*. Seoul: Seungbosa. 2000:57.
27. Kim WH. *Principle of Korean Medicine*. Seoul: Seungbosa. 2003:129-32, 165-8, 352-8.
28. *Lung system-Internal medicine of the national Korean oriental medical college*. Donguipegyeenaeguahak. Seoul: Hanmoonhwasa. 2002:52-5, 102-14, 144-99.
29. Kim YH, Han JG. Effects of Chwi-yeon-tang and Chihyosan-gamibang on airway mucus secretion and contractility of tracheal smooth muscle. *J Korean Orient Pediatr.* 2005;19(1):1-26.
30. *Pediatrics*. Seoul: Daehangyogwaseo. 2005: 655-74.
31. *The Korean academy of asthma, allergy and clinical immunology. Asthma and allergy*. Seoul: Gunjachulpansa. 2002:73-6.
32. Kim YH. *Cheongganguigam*. Seoul: Seungbosa. 1988: 84-5, 102.
33. Chae HY, Han JG, Kim YH. Effects of Gagam-jeonggi-tang, Gami-hwajeongjeon and Gami-tonggyutang on secretion of airway mucus in vitro and in vivo. *J Korean Orient Pediatr.* 2007;21(1):117-37.
34. Lee JH. *Doseolhanbanghaeseol*. Seoul: Seungbosa. 1996: 386-7.
35. Shin JY. *Bangyakhappyeunhaeseol*. Seoul: Seungbosa. 1991:23.