대한한방내과학회지 제22권 3호(2001년 9월)
Korean J.Orient.Int. Med. 2001;22(3):415-422

六味地黃湯合瀉白散과 桑白皮가 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-8, GM-CSF mRNA level에 미치는 영향

주창엽, 황우석, 허태석, 정희재, 정승기, 이형구

경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

The Inhibitory Effects of Yukmijihwang-tang-Hap-Sabaek-san and Root Cortex of Morus alba L. on the IL-6, IL-8 and GM-CSF mRNA Levels in Human Epithelial Cells

Chang-Yeop Ju, Woo-Suck Hwang, Tae-Seok Heo, Hee-Jae Jung, Sung-Ki Jung, Hyung-Koo Rhee

Division of Respiratory System, Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University, Seoul, Korea

Objectives : We aimed to identify the dose-dependent inhibitory effects of Yukmijihwang-tang-Hap-Sabaek-san(YMHSB) and Root cortex of Morus alba L.(RCM) on the mRNA expression of Interleukin(IL)-6, IL-8, granulocyte macrophage colony stimulating factor(GM-CSF) involved in the asthma model.

Methods : In this study BEAS-2B cell lines, human epithelial cells, were used. These cells were stimulated by tumor necrosis factor(TNF)-α, IL-1β and histamine for artificial inflammatory expression. β-actin messenger RNA(mRNA) was used for the internal standard. After each 24 hours of the YMHSB and RCM treatment, total cellular RNAs were collected by treating RNA zol directly on the living cells. Then the transcriptional activities of IL-6, 8 and GM-CSF were measured by RT-PCR with electrophoresis.

Results : In the YMHSB study, the mRNA expression of GM-CSF and IL-8 is significantly inhibited compared to that of control group. But the mRNA expression of IL-6 is not significantly inhibited.

In the RCM study, the mRNA expression of GM-CSF and IL-8 is significantly inhibited compared to that of control group. But the mRNA expression of IL-6 is not significantly inhibited.

Conclusions : This study shows that YMHSB and RCM have dose-dependent inhibitory effects on the mRNA expression of IL-8 and GM-CSF in human epithelial cells. So these herbal medicines may inhibit the inflammatory process of asthma. Advanced studies are required to investigate the mechanisms of inhibition by herbal medicine in the asthma model.

Key Word : Yukmijihwang-tang(Liuweidihuangtang), Sabaek-san(Xiebaisan), Root cortex of Morus alba L., Asthma, Cytokine

I. 緖 論

알레르기성 천식은 기관지천식(이하 천식)환자의 약 50%를 차지하며, 최근의 연구에 의하면 알레르기성 질환의 발병에 환경인자의 중요성이 대두되고 있는데, 고도의 산업화에 따른 새로운 항원(allergen)의 출현 및 환경공해, 대기오염, 흡연인구의 증가 등으로 인해 천식의 유병률이 증가하고 있으며, 천식으로 인한 사망률도 증가하고 있는 추세이다.[1,2]

한의학에서는 천식을 呼吸急促하며 喉中有聲響한 증상을 나타내는 哮喘證, 哮吼證의 범주에 속하는 질환으로 인식하고, 임상적으로 처방들이 哮喘證 치료에 유의성 있는 효과를 보여 왔다.[3,4] 최근 한의학에서는 哮喘證에 임상적 효과가 인정된 처방과 개별 한약재를 이용하여 천식에서 나타나는 기도 염증반응에 관여하는 cytokine의 전사효과를 관찰한 분자생물학적인 연구가 활발하게 진행되고 있다.[5,6,7]

천식의 병리기전 중 필수적인 과정인 기도점막의 염증은 상피세포 자체에 의해 만성화된다. 즉 상피세포는 platelet activating factor, prostaglandin, Interleukin(이하 IL)-1, IL-6, IL-8, granulocyte macrophage colony stimulating factor(이하 GM-CSF), Tumor necrosis factor-α(이하 TNF-α), 그리고 macrophage chemotatic protein-1 등 proinflammatory cyto-

접수 : 2001년 9월 14일 채택 : 2001년 10월 21일
교신저자 : 주창엽 (서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 부속한방병원 5내과의사실, 전화 :02-958-9147, 팩스 :02-958-9148, 핸드폰 : 018-543-1518, E-mail :carpalis@netian.com)

kine을 분비하는데, 이들 cytokine은 기도점막에 작용하여 기도점막의 염증을 더욱 심하게 하는 것으로 보고되고 있다.[8] 따라서 천식의 치료에 있어 투여한 약제의 효과를 판단하기 위해서는 상피세포에서 분비되는 이들 cytokine이 처방 및 개별 한약재에 의해 어떻게 조절되는지를 확인하는 것이 중요하다.

六味地黃湯은, 宋代(A.D.1119년) 錢乙이 저술한 『小兒藥證直訣』에 최초로 수록된 처방으로 滋陰補腎하여 腎水를 專補케 하고 脾胃를 理하는 효능으로 腎陰虛로 인한 腰膝疲軟, 頭暈目眩, 耳鳴耳聾, 盜汗, 遺精, 消渴, 骨蒸潮熱, 手足心熱, 勞嗽 등의 증상을 치료하는데 사용되어 왔다.[9,10,11]

瀉白散은 宋代 錢乙의 『小兒藥證直訣』에 처음으로 수록되었고, 瀉肺火·清虛熱·止咳平喘하는 효능으로 肺實證·肺熱咳嗽氣喘 등을 치료하는 처방이다.[9,12]

桑白皮는 性이 寒無毒하고 味는 甘하며 肺經에 入하여 瀉肺平喘, 利水消腫의 효능이 있어 肺熱咳喘, 水腫脹滿尿少, 面目肌膚浮腫 등의 치료에 사용되고 있다.[13]

기도점막의 염증을 유발하여 천식의 병리기전을 진행시키는데 있어서 중요한 역할을 하는 cytokine인 IL-6, GM-CSF와 IL-8은 기관지 상피세포에 TNF-α, IL-1β와 histamine을 처리하면 발현시킬 수 있다.[14] 본 연구에서는, 인간 기관지 상피세포에 proinflamatory cytokine(TNF-α, IL-1β, histamine)과 동시에 六味地黃湯合瀉白散 및 桑白皮를 처리하여, 이들 처방과 개별 한약재가 IL-6, GM-CSF와 IL-8의 발현에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 세포주

세포는 미국 ATCC(American Type Culture Collection, Rochville, MD, U.S.A.)사에서 구입한 BEAS-2B cell line으로 adenovirus 12-SV40으로 전이(transformation)된 인간 기관지상피세포주이다.

2) 배지 및 시약

LHC-9 계통의 medium과 세포배양에 필요한 growth factor들은 미국의 BioWhittaker, Inc. Walkersville, MD.에서 kit로 구입하였다(Bronchial/Tracheal Epithelial Cell Growth Medium Bullet Kit). Total RNA의 정제를 위하여 RNA zol™ B를 TEL-TEST, Inc.(Texas, USA)로부터 구입하였으며, reverse transcriptase, Taq DNA polymerase, dNTP 등 RT-PCR 관련 시약은 Promega사에서 구입하여 사용하였다. TNF-α와 IL-1β는 Beringer Mennheim, Inc.에서 구입하였으며, PCR에 사용된 primer는 바이오니아㈜(청원, 대한민국)에서 주문 제작하였다. 기타 시약은 Sigma, Co.(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다.

3) 약재

한약재는 경희의료원 약제과에서 구입 정선한 후 사용하였으며 실험에 사용된 六味地黃湯合瀉白散 1첩의 구성은 熟地黃 16g, 山藥 山茱萸 각 8g, 白茯苓, 牡丹皮, 澤瀉 각 6g, 桑白皮 地骨皮 각 8g, 甘草 4g 이었다.

2. 방법

1) 검액의 조제

건조된 六味地黃湯合瀉白散 200g 및 桑白皮 200g을 각각 수냉식 응축기가 장착된 전탕기에서 2L의 3차 증류수와 함께 2시간동안 전탕한 후 상온에 3시간 동안 방치하여 식혔다. 상온의 탕액을 천으로 일차적으로 여과한 후 Whatman paper로 다시 여과하여 침전물을 제거하였다. 여과액을 회전식 증발기를 이용하여 45℃에서 감압 하에서 약 200ml로 농축하였다. 이를 동결건조기로 건조하여 -80℃에 보관하여 실험에 이용하였다. 六味地黃湯合瀉白散 및 桑白皮의 회수량은 각기 41.2g, 18.3g 이었으며 회수율은 각각 20.6%, 9.15%였다. 세포배양액에 투입시 정량을 3차 증류수에 녹인 후 고압에서 멸균하고 사용하였다.

2) 세포배양과 검액의 처리

BEAS-2B세포는 37℃에서 5%의 이산화탄소의 존재 하에서 LHC-9 medium에서 배양하였으며 2일에 한번씩 1/2로 나누어 배양하였다. 최종 단계에서 세포를 fibronectin과 collagen(Type II)으로 사전 처리된 6-well plate로 옮겨 36시간 동안 성장시켰다(80~90%로 성장). 세포에 아무런 처리도 하지 않은 군을 음성대조군(negative control group), 세포에 TNF-α, IL-1β, histamine을 처리한 군을 양성대조군(positive control group), 세포에 TNF-α, IL-1β, histamine과 검액을 동시에 처리한 군을 검액처리군(sample group)으로 정하였다. 조제된 검액과 TNF-α (50ng/ml), IL-1β (5ng/ml), histamine(111ng/ml=1μM)을 함께 세포에 처리하여 24시간 후, 배양액을 제거하고 세포에 RNA zol을 직접 처리하여 total RNA의 분리에 사용하였다. 검액

Table 1. Effects of TNF-α, IL-1β and Histamine on the mRNA Expression Levels of IL-6, GM-CSF and IL-8 in BEAS-2B Cells

Conditions	The Ratio of mRNA Expression Level to the Internal Standard(β-actin)		
	IL-6	GM-CSF	IL-8
Negative control	1.51 ± 0.45	0.92 ± 0.38	2.06 ± 0.54[a)]
Positive control	4.72 ± 1.59***	5.66 ± 0.93***	6.17 ± 1.84***

Negative control : untreated group.
Positive control : group treated with TNF-α, IL-1β and histamine.
a) : Mean ± standard deviation.
*** Indicates that p values are lower than 0.005 compared to negative control group.

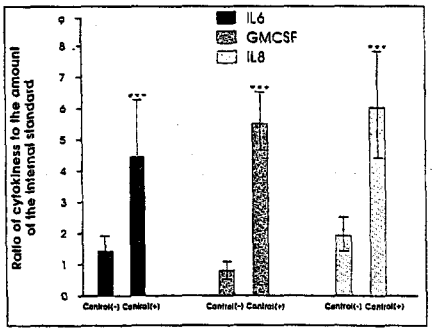

Fig. 1. Effects of TNF-α, IL-1β and histamine on the mRNA expression level of IL-6, GM-CSF and IL-8 in BEAS-2B cells.
Negative control : untreated group.
Positive control : group treated with TNF-α, IL-1β and histamine.
*** Indicates that p values are lower than 0.005 compared to negative control group.

의 농도는 최종농도가 각각 4, 20, 100μg/ml로 되도록 처리하였으며 각 실험조건에 관하여 3번을 반복하였다.

3) mRNA의 준비와 RT-PCR analysis

정량의 검액을 세포에 처리하고 24시간 후에 6-well plate의 각 well로부터 total RNA를 분리하고 oligo dT primer와 reverse transcriptase로 cDNA를 구하였다. 이를 polymerase chain reaction(PCR)에 이용하였으며, IL-6, IL-8, GM-CSF의 mRNA 발현의 정량화를 위하여 β-actin의 mRNA 발현을 internal standard로 하였다. RT-PCR 실험에 사용된 조건은 시약제공회사에서 제시된 과정을 따랐다.

4) 전기영동과 영상분석

PCR산물은 ethidium bromide(1μg/ml)가 함유된 1.5% 아가겔(TAE 완충용액)로 100V하에서 15분간 전기영동하여 다른 불순물을 제거한 다음, 분리된 띠를 UV의 조사하에서 영상화하였으며, 영상획득 장치(Image Master Total Lab, Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)로 디지털화하여 정량화하였다.

5) 통계처리 방법

3회 이상의 독립적인 실험에서 얻어진 결과를 통계처리하여 평균과 표준편차를 구하였고, 유의성 평가는 student T test를 이용하였다.

III. 結 果

IL-6, IL-8, 그리고 GM-CSF는 천식의 진행기전에 있어 중요한 cytokine으로서 BEAS-2B 세포에 TNF-α, IL-1β, histamine을 처리하여 발현을 실험적으로 유발시켰다. 본 연구는 이러한 실험조건에서 六味地黃湯合瀉白散 및 桑白皮가 천식관련 cytokine의 발현에 미치는 영향을 조사하였고 유의한 결과를 얻었다.

1. BEAS-2B 세포에 미치는 TNF-α, IL-1β, histamine의 영향

BEAS-2B 세포에 TNF-α, IL-1β, histamine을 투여하였을 때 IL-6, GM-CSF와 IL-8은 각각 3.13, 6.14, 3.00배 증가하였다(Table Ⅰ, Fig. 1).

2. 六味地黃湯合瀉白散이 IL-6, GM-CSF와 IL-8의 발현에 미치는 효과

TNF-α, IL-1β, histamine의 최종농도가 50ng/ml, 5ng/ml, 111ng/ml인 상태에서 BEAS-2B 세포에서 유발된 cytokine의 mRNA 발현을 RT-PCR로 연구하였다. 六味地黃湯合瀉白散에 의해 농도의존적으로 IL-8, GM-CSF mRNA의 발현이 억제되었다(Table Ⅱ, Fig. 2, 3, 4). IL-6 mRNA의 발현은 六味地黃湯合瀉白散 100μg/ml에 의해 양성대조군에 비해 53%가 억제되었으나, 억제효과에 대한 통계적인 유의성은 없었다. 六味地黃湯合瀉白散 100μg/ml에서 GM-CSF mRNA와 IL-8 mRNA는 양성대조군에 비하여 각각 70%($p<0.001$), 80%($p<0.001$)가 억제되었고, 20μg/ml의 농도에서도 각각 53%($p<0.01$), 60%($p<0.05$)가 억제되어, 유의한 억제효과를 보였다.

3. 桑白皮가 IL-6, GM-CSF와 IL-8의 발현에 미치는 효과

TNF-α, IL-1β, histamine의 최종농도가 각각 50ng/ml, 5ng/ml, 111ng/ml인 상태에서 BEAS-2B 세포에서 유발된 cytokine의 mRNA 발현을 RT-PCR로

Table 2. Dose-Dependent Effects of Yukmijihwang-tang-Hap-Sabaek-san(YMHSB) on the mRNA Expression Levels of IL-6, GM-CSF and IL-8 in BEAS-2B Cells

Concentration of YMHSB (μg/ml)		The Ratio of mRNA Expression Level to the Internal Standard(β-actin)		
		IL-6	GM-CSF	IL-8
Positive control		4.72 ± 1.59	5.66 ± 0.93	6.17 ± 1.84[a)]
Sample	4	5.44 ± 0.45	3.97 ± 0.66	3.34 ± 0.72
	20	4.54 ± 1.38	2.68 ± 0.84**	2.44 ± 0.43*
	100	2.23 ± 0.84	1.69 ± 0.23***	1.25 ± 0.40**

Positive control : group treated with TNF-α, IL-1β and histamine.
Sample : group treated with TNF-α, IL-1β, histamine and YMHSB.
a) : Mean ± standard deviation.
*, ** and *** indicate that the p values are less than 0.05, 0.01 and 0.005, respectively, when compared to positive control group.

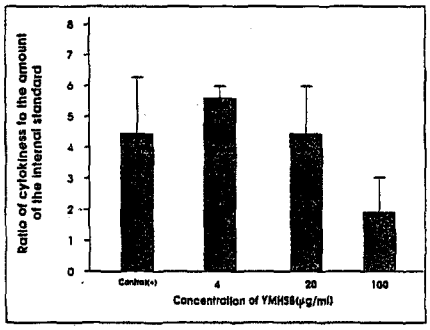

Fig. 2. Dose-dependent effects of Yukmijihwang-tang-Hap-Sabaek-san(YMHSB) on the mRNA expression levels of IL-6 in BEAS-2B cells.
Positive control : group treated with TNF-α, IL-1β and histamine.

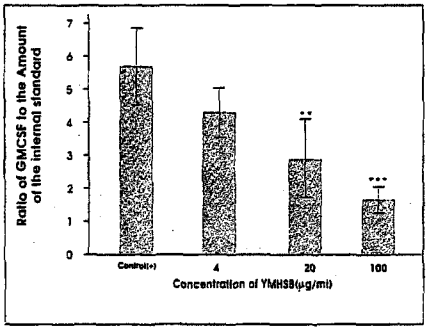

Fig. 3. Dose-dependent effects of YMHSB on the mRNA expression levels of GM-CSF in BEAS-2B cells.
Positive control : group treated with TNF-α, IL-1β and histamine.
** and *** indicate that the p values are less than 0.01 and 0.005, respectively, when compared to positive control group.

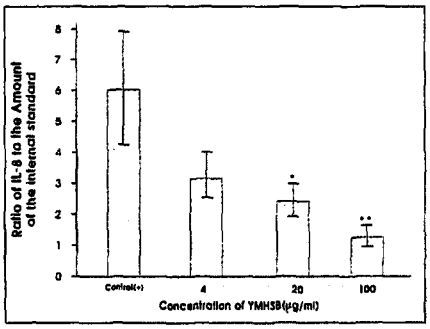

Fig. 4. Dose-dependent effects of YMHSB on the mRNA expression levels of IL-8 in BEAS-2B cells.
Positive control : group treated with TNF-α, IL-1β and histamine.
* and ** indicate that the p values are less than 0.05 and 0.01, respectively, when compared to positive control group.

연구하였다. IL-6 mRNA의 발현은 桑白皮 100μg/ml에 의해, 양성대조군에 비해 50%가 억제되었으나, 억제효과에 대한 통계적인 유의성은 없었다. 桑白皮 100μg/ml에서 GM-CSF mRNA와 IL-8 mRNA는 양성대조군에 비하여 각각 49%(p<0.01), 53%(p<0.05)가 억제되었고, 20μg/ml의 농도에서도 각각 61%(p<0.001), 65%(p<0.05)가 억제되어, 유의한 억제효과를 보였다 (Table Ⅲ, Fig. 5, 6, 7)

Ⅳ. 考 察

한의학에서 천식은 哮喘證, 哮吼證의 범주에 속하는 질환으로[3], 정은 哮喘의 원인에 대해서, 첫째 冷한 음료나 혹은 鹹, 酸, 甘味를 지나치게 嗜食하게 되면 積痰溫熱하여 발생하게 되며, 둘째 外感病邪를 초기에 表散시키지 못하여 餘邪가 肺絡에 잠복해 있다가 다시 外邪가 침범하면 발병하게 되며, 셋째 내재된 소인을 가지고 있는 사람이 寒冷, 疲勞 등 어떤 유인을 만나서 발생하게 되며, 넷째 모종의 음식에 대한 과민반응으로도 발생되며, 다섯째 장기적인 원인으로 肺, 腎의 호흡기능 저하로 발생하게 된다고 하였다.[15] 哮喘의 병인병리를 살펴보면 원래 체질이 脾腎不足하고 陽虛不運하여 痰濕內盛한데 外邪가 肺를 傷하면 痰濁이 動하여 肺氣를 沮遏함으로 哮喘이 발생하고, 혹은 疲勞過度하여 거듭 脾陽을 傷하여 痰濕이 더욱 盛함으로 哮喘이 발생한다 하였다.[16]

哮喘症의 치료는 첫째 風寒을 피하고 厚味를 절제하면서 體實者는 吐法, 體虛者는 祛痰을 위주로 하되 병증의 虛實을 감별하여 虛證에는 正氣扶養, 實證에는 散邪해야 하며, 둘째 병증의 발작시기와 시간에 따라서 발작 전에는 腎에 중점을 두고, 발작 중에는 肺에 중점을 두고, 발작 후에는 補中하는데 힘써야 하며, 셋째 약물의 사용에 있어서는 凉藥과 熱藥의 사용을 금하고, 表散하는 약물이 함께 사용되어야 한다.[15]

천식은 유전적인 성향이 강한 개인에 있어 환경적인 인자에 노출됨으로써 발병하는 다인자 질환으로, 다양한 자극원에 의해 기도의 급만성 염증과 증가된 과민성으로 인하여 기도의 폐색을 초래하여 갑작스러운 기침, 호흡곤란, 천명의 증상을 보이면서 임상증상이 자연히

Table 3. Dose-Dependent Effects of Root cortex of Morus alba L.(RCM) on the mRNA Expression Levels of IL-6, GM-CSF and IL-8 in BEAS-2B Cells

Concentration of RCM (μg/ml)		The Ratio of mRNA Expression Level to the Internal Standard(β-actin)		
		IL-6	GM-CSF	IL-8
Positive control		4.72 ± 1.59	5.66 ± 0.93	6.17 ± 1.84[a]
Sample	4	4.45 ± 0.08	4.60 ± 1.69	4.37 ± 1.88
	20	3.70 ± 0.45	2.15 ± 0.38*	2.16 ± 0.88*
	100	2.36 ± 0.76	2.86 ± 0.63**	2.90 ± 0.56**

Positive control : group treated with TNF-α, IL-1β and histamine.
Sample : group treated with TNF-α, IL-1β, histamine and RCM.
a) : Mean ± standard deviation.
*, ** and *** indicate that the p values are less than 0.05, 0.01 and 0.005, respectively, when compared to positive control group.

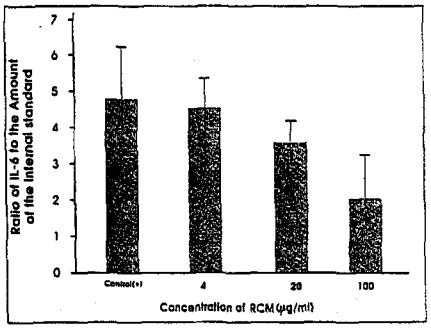

Fig. 5. Dose-dependent effects of Root cortex of Morus alba L.(RCM) on the mRNA expression levels of IL-6 in BEAS-2B cells.
Positive control : group treated with TNF-α, IL-1β and histamine.

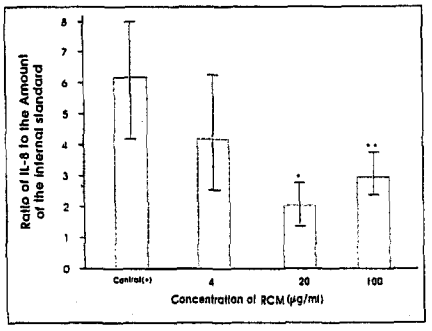

Fig. 7. Dose-dependent effects of RCM on the mRNA expression levels of IL-8 in BEAS-2B cells.
Positive control : group treated with TNF-α, IL-1β and histamine.
* indicate that the p values are less than 0.05, when compared to positive control group.

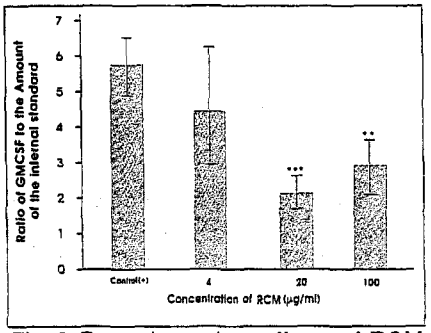

Fig. 6. Dose-dependent effects of RCM on the mRNA expression levels of GM-CSF in BEAS-2B cells.
Positive control : group treated with TNF-α, IL-1β and histamine.
** and *** indicate that the p values are less than 0.01 and 0.005, respectively, when compared to positive control group.

혹은 치료에 의해 가역적으로 호전되는 기도질환을 말한다.[17,18]

천식의 정의에서 보듯이 기도의 염증이 천식의 병리 과정에서 필수적이며, 염증반응은 기도의 과민성과 기류폐쇄를 가속화시키는 촉진제 역할을 한다고 보고되고 있다.[19] 그리고 기도의 염증은 천식의 공통적인 임상양상이며 경중에 관계없이 천식의 모든 시기에 기도의 벽에 활성화된 호산구(eosinophil)와 비만세포(mast cell)의 확인이 가능하며, 이런 염증세포(inflammatory cell)의 존재는 천식환자의 기도 내에서 증가된 cytokine의 존재로 확인할 수 있다.[20,21]

천식 중 알레르기성 천식은 전체 천식환자의 50% 정도를 차지하며, 최근 알레르기 질환은 지속적으로 증가하고 있으나 그 원인을 유전적인 측면만으로는 설명하기 어려워 환경의 중요성이 대두되고 있다.[1,22] 일반적으로 생활환경이 향상되면 알레르기 질환의 빈도가 증가하며, 제왕절개 분만의 증가, 위생적인 생활환경, 모유 수유의 감소 및 예방백신 접종도 알레르기 질환을 증가시키는 원인이 된다.[23,24,25,26]

천식에는 여러 종류의 세포와 매개물질이 관련된다. IgE와 비만세포는 초기 반응에, 호산구와 호산구 과립 단백은 후기 반응에 관계되며, Th2 cell도 IL-4, IL-5, IL-6, IL-9와 IL-13 등 cytokine을 생산하여, 이들 초기와 후기 반응을 조절함으로써 천식에 관련된다. 최근의 연구에서는 기관지 상피세포도, 조직에 염증을 유발하고 지속시키는 chemokine들을 생산하여 Th2 cell에서 유래한 cytokine들과 함께 기도의 염증에 관계하는 것으로 보고되고 있다. 즉 알레르기성 천식에서 Th2 cell은 항원을 인지하고 염증을 유발시키며 지속시키는데 중추적인 역할을 하고, 호산구는 proinflammatory cytokine을 분비하여 상피세포를 손상시키고, 비만세포, 상피세포, 호염구, 섬유아세포, 평활근세포와 대식세포는 조직 염증을 유발하며, Th2 cell및 호산구 작용에 영향을 미치는 cytokine을 분비하여 천식의 발병에 관여한다.[27]

따라서 천식의 발생기전과 그 치료과정을 연구하기 위해서는 이들 cytokine들의 변화를 확인해야 하며, 이에 대한 연구로 분자생물학적 실험기법을 도입하였고, 이러한 연구방법은 염증반응이나 면역에 관여하는 여러 cytokine들과 chemokine들의 증감을 관찰함으로써

세포 단계에서의 조직손상 및 치유과정을 설명하고 있다.[28] 이러한 분자생물학적인 연구방법을 도입하여 몇몇의 연구가 진행되었는데, RBL-2H3 세포주를 이용하여 解表二陳湯, 小靑龍湯의 IL-1, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF-α에 대한 조절 효과를 보고한 연구와, 같은 세포주를 이용하여 瀉白散, 甘草, 麥門冬, 五味子, 杏仁, 桔梗 등의 IL-4, IL-5, IL-6에 대한 조절효과를 보고한 연구들이 있었다. 이러한 cytokine 발현 조절에 관한 분자생물학적인 연구들은 처방과 개별 한약재가 천식의 기관지 염증 반응을 억제시킴으로써 천식의 치료효과를 나타낸다는 것을 보여주고 있다.[5,6,7]

이들 염증 관련 cytokine 중 이번 실험에서 변화를 관찰하고자 하는 cytokine은 기관지 상피세포에서 발현되는 IL-6, GM-CSF, IL-8이다.

IL-6은 폐포 대식세포에서 주로 생성되며, 혈중 단핵구와 비만세포에서도 생성되어, IL-4, IL-9와 함께 비만세포로 하여금 염증유발물질을 분비하게 하여, 천식의 일반적인 특징인 기도 점막의 과증식과 이상분비물 증가에 관여한다. IL-6 유전자 발현은 TNF-α를 이용한 자극 후에 다양한 세포군에서 유도되고, 반면에 스테로이드제제 처리로 감소된다. 천식이나 다른 호흡기 질환에서 기관지 평활근으로부터 분비되는 IL-6의 정확한 역할은 밝혀지지 않았지만, IL-6을 분비하는 기관지 평활근의 다양한 세포들은 기도의 염증을 증가시키거나 억제하는데 깊숙이 관여되어 있다.[14]

GM-CSF는 호산구 활성 cytokine의 일종으로, 천식의 염증과정을 총괄하는 Th2 cell에 의해서 생산되어, IL-3, IL-5와 더불어 기도의 염증부위에 호산구를 모이게 하고, 호산구의 생존을 연장시키며, 활성화된 호산구로부터 독성 과립단백(toxic granule protein)을 분비하게 하여 조직과 상피세포의 손상을 일으킨다.[29,30] 호산구는 천식 염증 반응에서 중추적인 역할을 담당하는데, 후기 단계반응(late-phase response) 및 기관지 과민성과 연관이 있다. GM-CSF는 이러한 호산구의 과립형성과 호흡기의 섬유화 작용을 유도하여, 심각한 천식에 있어 비가역적인 기도상태를 유발하는 원인이 된다.[31]

IL-8은 중성구(neutrophil)의 화학주성인자(chemo-attractant)로서 기도에 중성구를 축적시킨다. 세균감염은 기도 상피세포 표면에 IL-8의 발현을 유도하여, 중성구를 기도로 모이게 한다.[32] IL-8은 기도에 중성구 염증을 일으키고, 천식의 특징인 기도 과민성 유발에 중요한 역할을 한다.[33]

이처럼 천식에 있어서 이들 IL-6, GM-CSF와 IL-8이 기도의 염증을 유발하므로, 이들 cytokine의 발현을 억제시킬 수 있다면, 천식의 악화 과정에서 중요한 역할을 하는 기도의 염증양상 및 염증성 매개인자의 발생과 발현을 억제시킬 수 있어 천식의 치료에 일정한 역할을 할 수 있을 것이다.[20] 이에 본 연구에서는 六味地黃湯合瀉白散 및 桑白皮를 이용해 이러한 cytokine을 조절하는지 여부를 실험을 통해 분석하였다.

六味地黃湯의 主治 效能에 대하여 錢은 『小兒藥證直訣』에서 腎怯失音顴開不合 神不足 目中白睛多 面色眺白 등을 치료한다고 하였다.[9] 그러나 후세에 이르러 단지 소아뿐만 아니라 한방 각 과에서 광범위하게 腎陰을 滋補하는 기본적 처방으로 사용하게 되었다. 六味地黃湯의 효능에 대한 약리연구 분야로는 혈당조절 혈압강하 지질대사 부신피질호르몬 조절작용 등의 방면으로 진행되었고, 임상연구 분야에서는 각 과별로 신장질환 당뇨병 화학요법부작용 종양 피부질환 도한 골밀도 등의 방면으로 연구되고 있다.[11] 김 등은 六味地黃湯 투여가 혈중 cortisol의 양을 증가시킨다고 보고하였고, 한 등은 六味地黃湯이 복강대식세포의 활성을 증가시킨다고 보고하였는데, 이는 六味地黃湯이 천식의 기관지 염증반응을 억제할 가능성을 시사하는 것이다.[34,35]

瀉白散은 宋代 錢乙의 『小兒藥證直訣』에 처음으로 수록되었고, 瀉肺火 · 淸虛熱 · 止咳平喘하는 효능으로 肺實證 · 肺熱咳嗽氣喘 등을 치료하는 처방이다.[9] 구성약물의 공통된 性은 寒이고, 味는 甘, 辛, 苦며, 歸經은 肺, 脾, 肝, 腎經이다.[12] 이[36] 등은 瀉白散과 瀉白散加訶黎勒이 acetylcholine이나 norepinephrine에 의해 수축된 기관지 평활근과 혈관 평활근을 현저하게 이완시킴을 관찰하였고, 김[37] 등은 瀉白散과 瀉白散의 각 구성약물이 쥐의 anaphylatic shock와 피하반응에 미치는 영향을 관찰한 결과 桑白皮가 항알레르기 효과가 있음을 밝혔고, 이[12] 등은 瀉白散이 즉시형 및 지연형 Allergy, 면역반응, 폐색전 및 폐손상에 대하여 실험적으로 효과가 있음을 보였으며, 허[7] 등은 瀉白散이 천식유발 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-6을 억제한다고 보고하였다.

瀉白散의 구성약재인 桑白皮는 性이 寒無毒하고 味는 甘하며 肺經에 入한다. 그리고 瀉肺平喘, 利水消腫의 效能이 있어 肺熱咳喘, 水腫脹滿尿少, 面目肌膚浮腫을 治한다.[13] 최근 연구보고에 따르면 桑白皮 추출물은 혈압강하, 혈당강하, 항균, 항암 및 항아라키돈산 대사작용을 갖는다고 한다. 桑白皮의 약리작용에 관한 연구로 안 등은 염증관련 세포로부터 Nitric Oxide, TNF 및 IL-1등 염증매개인자의 분비를 억제하여 항염증 효

과를 나타낸다고 하였고, 권은 桑白皮 약침으로 나타나는 桑白皮의 항염증 및 항알레르기 효과를 보고하였다.[38,39]

IL-6, GM-CSF, IL-8은 천식의 발생에 있어 기도내 염증을 유발시키는데 주된 작용을 하는 cytokine으로 기관지 상피세포에 TNF-α, IL-1β, histamine을 처리하면 그 발현을 유발시킬 수 있다(Table Ⅰ, Fig. 1).[14] 본 실험에서는 인간 기관지 상피세포에 六味地黃湯合瀉白散, 桑白皮와 proinflamatory cytokine(TNF-α, IL-1β, histamine)을 동시에 처리하여 IL-6, GM-CSF, IL-8의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 분석하여 이들 처방과 개별 한약재의 천식 치료 기전을 조사하였다. IL-6, GM-CSF, IL-8의 mRNA의 정량화를 위하여 세포 내에서 항상 비슷한 정도로 발현되어 있다고 알려진 유전자 중의 하나인 β-actin의 mRNA발현을 internal standard로 하였다. 모든 실험은 독립된 3회 이상의 실험을 반복하여 얻어진 결과를 통계처리하여 평균과 표준편차를 구하였고, 유의성 평가는 student T test에 근거하여 수행하였다.

六味地黃湯合瀉白散에 대한 연구에서, IL-6 mRNA의 발현은 六味地黃湯合瀉白散 추출물 100μg/ml에 의해 양성대조군에 비해 53%가 억제되었으나, 통계적인 유의성은 없었다. GM-CSF mRNA와 IL-8 mRNA는 같은 조건에서 양성대조군에 비하여 각각 70%($p<0.001$), 80%($p<0.001$)가 억제되었고, 20μg/ml의 농도에서도 각각 53%($p<0.01$), 60%($p<0.05$)가 억제되어, 유의한 억제효과를 보였다. 六味地黃湯合瀉白散은 GM-CSF, IL-8 mRNA의 발현을 농도의존적으로 억제하였다(Table Ⅱ, Fig. 2, 3, 4). 이 실험에서 六味地黃湯合瀉白散이 IL-6의 억제에 통계적으로 유의한 효과가 없다는 것은, 瀉白散의 IL-6에 대한 유의성있는 억제효과를 보고한 허 등7의 논문과는 다소 차이가 있다. 이는 실험에 사용한 세포와 실험방법의 차이 때문인 것으로 생각되지만, 결과만으로 볼 때, 六味地黃湯合瀉白散의 효과와 瀉白散 단독의 효과는 차이가 있다는 것을 알 수 있었다.

桑白皮의 IL-6, IL-8, GM-CSF에 대한 억제효과를 살펴보면, IL-6 mRNA는 桑白皮 추출물 100μg/ml에 의해 양성대조군에 비해 50%가 억제되었으나, 억제효과에 대한 통계적인 유의성은 없었다. 같은 조건에서 GM-CSF mRNA와 IL-8 mRNA는 양성대조군에 비하여 각각 49%($p<0.01$), 53%($p<0.05$)가 억제되었고, 20μg/ml의 농도에서도 각각 61%($p<0.001$), 65%($p<0.05$)가 억제되어, 桑白皮가 IL-8, GM-CSF의 발현을 유의하게 억제함을 보였다(Table Ⅲ, Fig. 5, 6, 7).

桑白皮의 cytokine 억제효과를 상기한 六味地黃湯合瀉白散의 실험 결과와 비교할 때, 桑白皮 단미만으로도 六味地黃湯合瀉白散과 유사한 억제효과를 보여서 六味地黃湯合瀉白散의 구성 약물 중 하나인 상백피가 천식 관련 cytokine의 억제에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 하지만, 六味地黃湯合瀉白散의 억제효과가 桑白皮 단미에 비해서는 더 큰 것으로 나타났다.

천식의 서양의학적 치료에 있어 스테로이드제제(corticosteroid)는 강력한 항염증효과로 인해 그동안 천식의 치료에서 중요한 역할을 하였음에도 불구하고 장기 사용에 따른 많은 전신적 부작용을 보여, 부작용이 적은 대체약물의 개발이 시급한 실정이다.

이상의 실험 결과는, 六味地黃湯合瀉白散과 桑白皮가 IL-6에 대해서는 억제효과의 통계적 유의성은 없었지만, 천식의 병태생리에서 중요한 역할을 하는 염증 유발 cytokine인 IL-8와 GM-CSF를 억제하여 천식 치료 효과를 가진다는 것을 입증하는 것이다.

V. 結 論

六味地黃湯合瀉白散과 桑白皮가 천식의 세포배양모델에 미치는 효과를 조사하기 위해 인간의 기관지 상피세포에서 기원한 BEAS-2B cell에 TNF-α, IL-1β, histamine을 처리하여 염증유발 cytokine들이 발현되게 하면서, 동시에 이들 한약 전탕액의 추출물을 투여하여, 천식의 기도 염증반응에 중요하다고 알려진 대표적 cytokine인 IL-6, GM-CSF와 IL-8의 mRNA 발현에 미치는 영향을 살펴 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 六味地黃湯合瀉白散 추출물은 IL-6 mRNA의 발현에 통계적으로 유의한 억제효과가 없었다.

2. 六味地黃湯合瀉白散 추출물은 20μg/ml의 농도에서 양성대조군에 비하여 GM-CSF mRNA는 53%($p<0.01$), IL-8 mRNA는 60%($p<0.05$) 발현을 억제시켰고, 100μg/ml의 농도에서도 GM-CSF mRNA는 70%($p<0.001$), IL-8 mRNA는 80%($p<0.001$) 발현을 억제시켜 유의한 억제효과를 나타냈다.

3. 桑白皮 추출물은 IL-6 mRNA의 발현에는 통계적으로 유의한 억제효과가 없었다.

4.. 桑白皮 추출물은 20μg/ml의 농도

에서 양성대조군에 비하여 GM-CSF mRNA는 61%($p<0.001$), IL-8 mRNA는 65%($p<0.05$) 발현을 억제시켰고, 100㎍/ml의 농도에서도 GM-CSF mRNA는 49%($p<0.01$), IL-8 mRNA는 53%($p<0.05$) 발현을 억제시켜 유의한 억제효과를 나타냈다.

參考文獻

1. 한용철. 임상호흡기학. 서울:일조각;1998, 208쪽
2. Howarth PH. Is Allergy Increasing?:early life influences. Clin Exp Allergy 1998;28(suppl 6):2-7
3. 이형구, 정승기. 동의폐계내과학. 서울:아트등방;1999, 162-202쪽
4. 조영민, 이경기, 조일현, 차은수, 정희재, 정승기 등. 효천증에 관한 임상적 연구. 제19회 전국한의학 학술대회 발표논문집 1997:141-51
5. 백동진, 정희재, 이형구, 정승기. 해표이진탕가감방이 Asthma model 내의 Cytokine에 미치는 영향. 대한한의학회지 2000;21(3):3-13
6. 정욱, 정희재, 정승기, 이형구. 행인과 길경이 Asthma model 내의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2000;21(1):31-8
7. Heo TS, Jung HJ, Kim HY, Jung SK, Rhee HK. The Effects of Sabaek-San and Glycyrrhizae Radix on IL-4, IL-5 and IL-6 in asthma model. Journal of Oriental Medicine 2000;5(1):1-13
8. Stellato C, Beck LA, Gorgone GA, Proud D, Schall TJ, Ono SJ et al. Expression of chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line: modulation by chemokines and glucocorticoids. J Immunol 1995;155(1):410-8
9. 전을. 소아약증직결. 서울:의성당;1994, 47쪽
10. 이상인, 김동길, 노승현, 이영종, 주영승. 방제학. 서울:영림사;1992, 178-9쪽
11. 김시영, 이인선. 한방부인과영역에서 六味地黃湯과 附桂地黃丸의 효능에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지 1997;10(1):133-50
12. 이순호, 한상환. 肺實證에 응용된 瀉白散의 문헌적 고찰. 대한한방내과학회지 1995;15(2):274-80
13. 전국한의과대학 본초학교실 공편저. 본초학. 서울:영림사;1992, 484쪽
14. McKay S, Hirst SJ, Haas MB, de Jongste JC, Hoogsteden HC, Saxena PR et al. Tumor Necrosis Factor-α Enhances mRNA Expression and Secretion of Interleukin-6 in Cultured Human Airway Smooth Muscle Cells. Am J Respir Cell Mol Biol 2000;23(1):103-111
15. 정승기, 이형구. 哮喘의 원인 및 치법에 관한 연구. 대한한의학회지 1986;7(1):60-7
16. 상해중의학원편. 중의내과학. 상해:상무인서관;1983, 223-30쪽
17. Wiesch DG, Meyers DA, Bleecker ER. Genetics of asthma. J Allergy Clin Immunol 1999;104(5):895-901
18. Carey CF, Lee HH, Woeltje KF. The Washington Manual of Medical Therapeutics. New York:Lippincott-Raven;1998, P.217
19. O' Byrne PM. Airway inflammation and asthma. Aliment Pharmacol Ther 1996;10 Suppl2:18-24.
20. Busse WW. Inflammation in asthma: the cornerstone of the disease and target of therapy. J Allergy Clin Immunol 1998;102(4Pt2):S17-22
21. Denburg JA. The inflammatory response. Am J Respir Crit Care Med 1996;153(6Pt 2):S11-3
22. Davies RJ, Rusznak C, Devalia JL. Why is allergy increasing?-environmental factors. Clin Exp Allergy 1998;28(Suppl6):8-14
23. Heinrich J, Holscher B, Wjst M. Housing conditions and allergic sensitization in children. Zentralbl Hyg Umweltmed 1998;201(3):211-28
24. Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. J Immunol 1997;159(4):1739-45
25. Arita M, Mikawa H, Shirataka M, Takahashi K, Hayasawa H, Tomita M. Epidemiological research on incidence of atopic disease in infants and children in relation to their nutrition in infancy. Arerugi 1997;46(4):354-69
26. Barrios C, Brandt C, Berney M, Lambert PH, Siegrist CA. Partial correction of the TH2/TH1 imbalance in neonatal murine responses to vaccine antigens through selective adjuvant effects. Eur J Immunol 1996;26(11):2666-70
27. Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. Airway remodeling in asthma. J Clin Invest 1999;104(8):1001-6
28. Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Jose PT, Williams TJ. Animal models of asthma: role of chemokines. Methods Enzymol 1997;288:241-66
29. Park CS, Choi YS, Ki SY, Moon SH, Jeong SW, Uh ST et al. GM-CSF is the main cytokine enhancing survival of eosinophils in asthmatic airway. Eur Respir J 1998;12:872-8
30. Sato M, Takizawa H, Kohyama T, Ohtoshi T, Takafuji S, Kawasaki. Eosinophil Adhesion to Human Bronchial Epitherial Cells:regulation by cytokines. Int Arch Allergy Immunol 1997;113:203-5
31. Ferreira MB, Palma Carlos AG. Cytokines and asthma. J Investig Allergol Clin Immunol 1998;8(3):141-8
32. Inoue H. Interleukin-8 and airway inflammation. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi 1999;37(9):673-9
33. Lu K, Qi H, Wang W. The relationship between interleukin-8 and airway hyperresponsiveness. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi 1997;20(5):280-2
34. 김영권, 류봉하, 박동원, 류기원. 六味地黃湯이 생리활성지표와 임파구세포수에 미치는 영향. 대한한방종양학회지 1998;4(1):89-110
35. 한일수, 김철중. 六味地黃湯, 八味地黃湯 및 加味地黃湯이 생쥐의 복강대식세포 활성에 미치는 영향. 대전대학교 한의대논문집 1997;6(1):331-47
36. 이순호, 한상환. 瀉白散과 瀉白散加阿黎勒이 호흡기계에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 1995;16(1):104-29
37. 김민호, 한상환, 전병득. 瀉白散이 Compound 48/80에 의하여 유도된 Anaphylatic Shock와 피하반응에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 1990;11(2):22-42
38. 안재규, 안덕균, 조재천. 桑白皮가 대식세포의 NO, TNF-α 및 IL-1α 생산에 미치는 영향. 대한한의학회지 1998;19(2):485-501
39. 권대현. 桑白皮 약침의 항염증 및 항알레르기 활성. 대한침구학회지 1998;15(1):525-35