

# 喘四君子湯과 水蛭(麻黃炒)가 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-16, GM-CSF 발현에 미치는 영향

한동하, 정희재, 정승기, 이형구  
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

## The Inhibitory Effects of Cheonsagunja-tang and Leech on the IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA Level by Human Epithelial Cells

Dong-Ha Han, Hee-Jae Jung, Sung-Ki Jung, Hyung-Koo Rhee

Division of Respiratory System, Department of Internal Medicine,  
College of Oriental Medicine, Kyunghee University, Seoul, Korea

**Objectives** : We aimed to identify the dose-dependent inhibitory effects of Cheonsagunja-tang(喘四君子湯), leech(*Hirudo medicinalis*/水蛭) roasted with Ephedrae Herba(麻黃) on the mRNA expression of IL-6, IL-16, GM-CSF involved in the asthma model.

**Methods** : In the study BEAS-2B cell lines, human epithelial cells were used. These cells were stimulated with tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  for artificial inflammatory expression.  $\beta$ -actin messenger RNA(mRNA) was used by internal standard. After 24 hours of the Cheonsagunja-tang, leech-treatment, total cellular RNAs were collected treating RNAzol directly on the living cells. Then the transcriptional activities of IL-6, 16 and GM-CSF were measured by RT-PCR with electrophoresis.

**Results** : In the Cheonsagunja-tang study, the mRNA expression of IL-6 showed 30% transcriptional inhibitory effect compared to the control group in the 100  $\mu$ l/ml category( $p < 0.005$ ). In the IL-16, there was 26%, 31% and 31% transcriptional inhibitory effect compared to the control groups in the 4  $\mu$ l/ml, 20  $\mu$ l/ml and 100  $\mu$ l/ml categories, respectively( $p < 0.05$ ). In the GM-CSF, the experimental group had 56% transcriptional inhibitory effect compared to the control group in the 100  $\mu$ l/ml category( $p < 0.001$ ). In other concentrations, there was no inhibitory effect.

In the leech study, the mRNA expression of IL-6 showed 37% transcriptional inhibitory effect compared to the control group in the 100  $\mu$ l/ml category( $p < 0.001$ ). In the IL-16, there was 63% and 67% transcriptional inhibitory effect compared to the control groups in the 20  $\mu$ l/ml and 100  $\mu$ l/ml categories, respectively( $p < 0.001$ ). In the GM-CSF, there was 64% and 68% transcriptional inhibitory effect compared to the control groups in the 20  $\mu$ l/ml and 100  $\mu$ l/ml categories, respectively( $p < 0.001$ ). In other concentrations, there was no inhibitory effect.

**Conclusions** : This study shows that Cheonsagunja-tang and leech roasted with Ephedrae Herba have dose-dependent inhibitory effects on the mRNA expression of IL-6, IL-16 and GM-CSF in BEAS-2B cell lines, human epithelial cells.

**Key Word** : Cheonsagunja-tang(Chunsijunzitang), leech, asthma, cytokine

## I. 緒 論

기관지 천식(이하 천식)은 다양한 자극원에 의해 기도의 급만성 염증과 증가된 과민성으로 특징지어지는 기도질환으로 갑작스러운 기침, 호흡곤란, 천명의 증상을 보이면서 이러한 임상증상

이 자연히 혹은 치료에 의해 가역적으로 호전되는 질환을 말한다.<sup>1</sup>

한의학에서는 천식을 呼吸急促하며 喉中有響響한 증상을 나타내는 哮喘證, 哮喘證의 범주에 속하는 질환으로 인식하고,<sup>2</sup> 임상적으로 동일한 병증을 대상으로 치료해 오면서 많은 처방들이 유

의성 있는 효과를 보여 왔다.<sup>3</sup> 최근에는 천식에 임상적 효과가 인정되는 한약물을 이용하여 천식에 있어 기도의 염증 반응에 관여하는 cytokines의 전사효과를 관찰한 분자생물학적인 연구가 활발하다.

喘四君子湯의 처방내용은 明代 龔延賢의 《萬病回春》의 喘急篇에 四君子湯이란 이름으로 처음 기재되어 氣短하여 호흡이 短促하면서 痰聲이 없는 증상을

접수 : 2001년 10월 9일 채택 : 2001년 11월 22일

교신저자 : 한동하 (서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 부속한방병원 5내과의사실 경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실.  
전화 : 031-390-2012, 팩스 : 031-390-2190, E-mail : zamchoo@unitel.co.kr)

치료하는 처방으로 임상에서 천식을 치료하는 방제로 응용되고 있으나, 아직까지 喘四君子湯에 대한 연구보고는 없었다.

水蛭에 대한 연구로 水蛭을 이용한 혈전용해에 관한 연구가 진행되어 왔고,<sup>5,6</sup> 천식과 관련된 연구보고는 없으나 항염증 효과에 관련된 연구보고가 있었으며,<sup>7</sup> 김 등<sup>8</sup>은 水蛭이 임신중에 간기능과 신장기능에 미치는 영향을 연구보고하였다. 麻黃은 천식을 포함한 호흡기질환에 다용되는데, 단미만을 이용한 연구로 김<sup>9</sup>은 O<sub>3</sub> 중독에 대한 폐손상에 미치는 영향에 대해 연구보고 한 바 있으며, 윤<sup>10</sup>은 약침용 麻黃抽出液의 면역, 발열 및 용혈독성시험에 관한 실험적 연구 결과를 보고하였으며, 麻黃을 포함한 처방의 효능에 대한 연구로 김 등<sup>11</sup>은 小青龍湯이 진통, 항경련 및 흰쥐의 폐손상에 미치는 영향에 관한 연구를 보고하였고, 고<sup>12</sup>는 麻黃附子細辛湯이 혈전증에 유의성이 있다는 보고를 하였고, 이 등<sup>13</sup>은 麻黃杏仁甘草石膏湯 및 麻黃杏仁甘草石膏湯加味方이 SO<sub>2</sub>에 의한 흰쥐의 호흡기 손상에 미치는 영향에 대한 연구를 보고하였다.

최근 Chopin 등<sup>7</sup>은 水蛭의 항염증효과를 연구보고하여 水蛭이 인체에서 염증반응을 억제할 수 있다는 가능성을 보였고, 동시에 한의학적인 해석으로도 천식의 병리에 있어 기도의 염증과 울혈 상태를 어혈로 착안하여 活血祛瘀 작용이 뛰어난 水蛭을 선택하였고, 麻黃의 기관지 이완효과의 긍정적인 효과를 기대하여 麻黃과 함께 炒를 한 후 麻黃은 버리고 水蛭만을 택하여 水蛭(麻黃炒)를 실험에 이용하였다.

따라서 임상에서 천식치료에 대응하는 喘四君子湯과 새로운 치료약물의 개발을 목적으로 水蛭(麻黃炒)을 분자생물학적인 방법을 통하여 기도의 염증과

정에 필수적으로 관여하는 cytokines의 활성화에 어떤 작용을 하는지 규명해 볼 필요가 있다.

이에 저자는 천식의 발생에 중요한 역할을 하는 Interleukin-6(IL-6)과 IL-16 그리고 granulocyte macrophage colony stimulating factor(GM-CSF) 등의 cytokines을 대상으로 이들의 전사의 변화를 관찰하고자, 喘四君子湯과 水蛭(麻黃炒)를 이용하여 BEAS-2B 인간 기관지상피 세포주에서 염증유발 cytokine인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )에 의해 유도된 IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 조사하여 이들 cytokines의 발현을 용량의존적으로 억제하는 효과를 관찰하였기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재료

#### 1) 세포주

본 실험에서 사용된 세포는 미국 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.)사에서 구입한 BEAS-2B cell line으로 adenovirus 12-SV40로 전이된 인간 기관지상피 세포주이다.

#### 2) 배지 및 시약

LHC-9 계통의 medium과 세포배양에 필요한 growth factor들은 미국회사(BioWhittaker, Inc. Walkersville, MD)에서 kit로 구입하였다(Bronchial/Tracheal Epithelial Cell Growth Medium Bullet Kit). RNA의 정제를 위하여 RNAzolTM B를 TEL-TEST, Inc(Texas, USA)로부터 구입하였으며, reverse transcriptase, Taq DNA poly-

merase, dNTP등 RT-PCR 관련 시약은 Promega사에서 구입하여 사용하였다. TNF- $\alpha$ 은 Beringer Mennheim, Inc.사에서 구입하였으며, PCR에 사용된 primer는 바이오니아(주)(청원, 대한민국)에서 주문 제작하였다. 기타 시약은 Sigma, Co.(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다.

### 3) 약재

경희의료원 한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였으며, 水蛭은 의학용인 *Hirudo medicinalis*로 한스바이오테드사(한국)에서 구입하였다. 실험에 이용된 喘四君子湯 1첩의 구성은 白朮 6g, 人蔘 炙甘草 當歸 각 4g, 茯苓 陳皮 厚朴 砂仁 蘇子 桑白皮 生薑 大棗 각 3g, 沈香 木香 각 2g이며, 水蛭(麻黃炒)는 水蛭 11g, 麻黃 11g을 사용하였다. 실험에 이용된 喘四君子湯 1貼 및 水蛭(麻黃炒)의 내용과 용량은 Table I과 같다.

### 2. 방법

#### 1) 검액의 조제

喘四君子湯 200g을 사용하여 1 l의 수냉식 용축기가 장착된 전탕기에서 1 l의 3차 증류수와 함께 2시간 동안 전탕한 후 상온에 3시간 동안 방치하여 식혔다. 상온의 탕액을 Whatman paper로 여과한 후 여과액을 회전식 증발기를 이용하여 45℃에서 감압하에서 약 200ml로 농축하였다. 이를 동결건조기로 건조하여고형분을 구하여 -80℃에 보관하였다.

水蛭(麻黃炒)의 경우 건조하지 않은 生水蛭 11g을 동량의 麻黃과 함께 약한 불에 볶아(炒) 麻黃이 갈색을 띠기 시작할 때 水蛭만 취하여 상기와 동일한 방법으로 고형분을 구하였다.

**Table 1.** Composition of Cheonsagunja-tang-derivatives(喘四君子湯) and Hirudo medicinalis(roasted with Ephedrae Herba)[水蛭(麻黃炒)]

Herbs	Scientific Name	Dose(g)
人蔘	Ginseng Radix(Panax ginseng C.A. MEY.)	4.0
炙甘草	Glycyrrhizae Radix(broiled Glycyrrhiza uralensis FISCH.)	4.0
當歸	Angelicae Gigantis Radix(Angelica gigas NAKAI)	4.0
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma(Atractylodes japonica KOIDZ.)	6.0
茯苓	Poria(Poria cocos(SCHW.) WOLF)	3.0
陳皮	Citri Pericarpium(Citrus unshiu MARKOVICH)	3.0
厚朴	Magnoliae Cortex(Magnolia officinalis REHD. et WILS.)	3.0
砂仁	Amomi Fructus(Amomum villosum LOUR.)	3.0
蘇子	Perillae Fructus(Perilla frutescens var. acuta KUDO)	3.0
桑白皮	Mori Cortex(Morus alba L.)	3.0
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens(Zingiber officinale ROSC.)	3.0
大棗	Jujubae Fructus(Zizyphus jujuba MILL. var. inermis REHDER)	3.0
沈香	Aquilariae Resinatum Lignum(Aquilaria sinensis(LOUR.) GILG)	2.0
木香	Aucklandiae Radix(Aucklandia lappa DECNE.)	2.0
Total amount		46.0
Herbs	Scientific Name	Dose(g)
水蛭	Hirudo(Hirudo medicinalis)	11.0
麻黃	Ephedrae Herba(Ephedra sinica STAPF)	11.0
Total amount		22.0

**Table 2.** Sequences for Polymerase Chain Reaction and Conditions

	Sequences and the Expected Size	PCR Conditions
β-actin	5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'	94℃, 1min.
	5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'	72℃, 1min.
IL-6	600bp	72℃, 2min. 25 cycles
	5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC-3'	94℃, 1min.
IL-6	5'-GAAGACCCCTCAGGCTGGACTG-3'	65℃, 1min.
	628bp	72℃, 2min. 25 cycles
IL-16	5'-ATGCCCGACCTCAACTCC-3'	94℃, 1min.
	5'-CTAGGAGTCTCCAGCAGC-3'	65℃, 1min.
GM-CSF	389bp	72℃, 2min. 25 cycles
	5'-GAGCATGTGAATGCCATCCAGGAG-3'	94℃, 1min.
GM-CSF	5'-CTCCTGGACTGGCTCCCAGCAGTCAAA-3'	60℃, 1min.
	390bp	72℃, 2min. 25 cycles

喘四君子湯과 水蛭(麻黃炒)의 회수 고형량은 각각 53.6g과 0.45g이었으며 회수율은 각각 42.4%와 3.90%였다. 세포배양액에 투입시 정량을 3차 증류수에 녹인 후 고압에서 멸균하고 사용하였다.

2) 세포배양

BEAS-2B세포는 37℃에서 5%의 이산화탄소의 존재 하에서 LHC-9 medium에서 배양하였으며 2일에 한번

씩 1/2로 나누어 배양하였다. 최종단계에서 세포를 fibronectin과 collagen-(Type II)으로 사전처리된 6 well plate로 옮겨 36시간동안 80~90% 정도 성장시켰다. 약제를 TNF-α(10ng/ml)와 함께 처리하여 24시간 후, 배양액을 제거하고 살아있는 세포에 RNAzol을 직접 처리하여 RNA 정제에 사용하였다.

3) mRNA의 준비와 RT-PCR analysis  
TNF-α(최종농도 10ng/ml)와 함께

정량의 고형분을 세포에 처리하고 24시간 후에 6-well plate에서 각 well로부터 RNA를 분리하고 random primer로 cDNA를 구하였다. 이를 2~5배 정도 희석하여 PCR에 이용하였으며, IL-6, IL-16, GM-CSF의 mRNA의 정량화를 위하여 발현된 β-actin의 mRNA 발현을 internal standard로 하였다. RT-PCR 실험에 사용된 조건은 시약 제공 회사에서 제시된 과정을 따랐으며 cDNA의量は 상기의 희석액을 1/10로 사용하였다. 모든 실험은 별개의 실험을 세 번 이상 반복하여 그 결과를 평균하였다. PCR에 사용된 primer의 서열과 조건은 Table II 과 같다.

4) 전기영동과 영상분석

PCR산물은 ethidium bromide가 함유된(1μg/ml) 1.5% agarose gel(TAE 완충용액)로 100V하에서 7분간 전기영동하였다. 분리된 띠를 UV의 조사하에서의 밝기를 영상획득 장치로 디지털화 한 후(Image Master TotalLab, Amersham Pharmacia Biotech, Inc) 정량화하였다.

5) 통계처리 방법

실험결과는 3회 이상의 독립적인 실험에서 얻어진 결과를 통계처리하여 평균과 표준편차를 구하였고, 비교는 student T test에 근거하여 행하여졌다.

III. 成績

1. 喘四君子湯이 IL-6, IL-16 및 GM-CSF mRNA 발현에 미치는 효과

10ng/ml TNF-α에 유발된 IL-6, IL-16 및 GM-CSF의 mRNA 발현에 미

치는 喘四君子湯의 효과를 RT-PCR로 관찰한 결과 각각 4 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml의 喘四君子湯을 처리한 후 24시간 후의 RT-PCR 결과는 喘四君子湯의 농도가 증가함에 따라  $\beta$ -actin에 비해 cytokine의 발현이 감소되었다 (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3).

상기의 실험을 3회 반복하여 internal standard와 비교한 상대치를 densitometer로 정량화하여 그 평균과 표준편차를 Table에 나타내었다. Table은 IL-6 mRNA의 발현이 喘四君子湯 100 $\mu$ g/ml에 의해 억제되었으며, IL-16 mRNA은 모든 농도에서 감소된 것으로 나타났으나, GM-CSF mRNA의 발현의 경우는 喘四君子湯 100 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 억제되었다(Table III).

1) 喘四君子湯이 IL-6 mRNA 발현에 미치는 효과

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 IL-6의 발현을 85.8 $\pm$ 9.9 %로 보여주었다. 4 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml의 喘四君子湯 추출액에서는 각각 91.0 $\pm$ 10.5 %, 96.4 $\pm$ 7.8 %로 나타나 이 농도에서는 喘四君子湯은 IL-6의 발현에 영향을 주지 않았으며, 100 $\mu$ g/ml의 농도에서는 IL-6

mRNA 발현이 60.3 $\pm$ 9.0 %로 감소하여 대조군에 비하여 29.8%의 IL-6 발현을 억제 효과를 나타냈다 (p<0.005)(Table III, Fig. 1).

2) 喘四君子湯이 IL-16 mRNA 발현에 미치는 효과

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 IL-16의 발현을 75.5 $\pm$ 6.3 %로 보여주었다. 4 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml 그리고 100 $\mu$ g/ml의 喘四君子湯 추출액에서는 IL-16의 발현이 각각 55.8 $\pm$ 6.3 %, 52.5 $\pm$ 5.2 %, 52.4 $\pm$ 11.1 %로 감소되어 대조군에 비하여 각각 26.1 %, 30.5 %, 30.6 %의 IL-16 발현을 억제 효과를 나타냈다 (p<0.05)(Table III, Fig. 2).

3) 喘四君子湯이 GM-CSF mRNA 발현에 미치는 효과

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 GM-CSF의 발현을 314 $\pm$ 17 %로 보여주었다. 4 $\mu$ g/ml과 20 $\mu$ g/ml의 喘四君子湯 추출액의 존재하에서 각각 302 $\pm$ 25 %와 260 $\pm$ 18 %로 나타나 이 농도에서는 喘四君子湯은 영향을 주지 않았으며, 100 $\mu$ g/ml의 농도에서는 GM-CSF

mRNA의 발현이 140 $\pm$ 11 %로 감소하여 喘四君子湯으로 처리되지 않은 대조군에 비하여 55.4 %의 GM-CSF 발현을 억제효과를 나타냈다(p<0.001)(Table III, Fig. 3).

2. 水蛭(麻黃炒)가 IL-6, IL-16 및 GM-CSF mRNA 발현에 미치는 효과

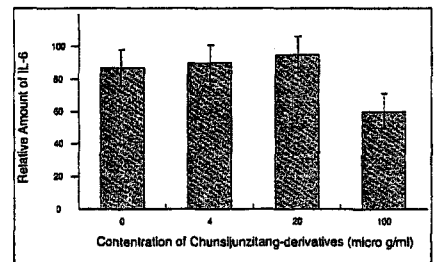


Fig. 1. Dose-dependent inhibitory effects of Cheonsagunja-tang-derivatives on the mRNA expression levels of interleukin-6.

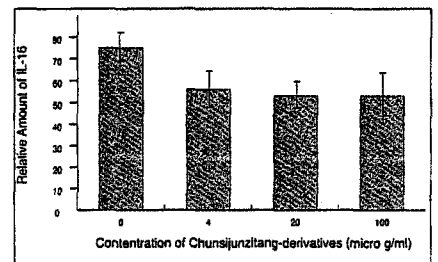


Fig. 2. Dose-dependent inhibitory effects of Cheonsagunja-tang-derivatives on the mRNA expression levels of interleukin-16.

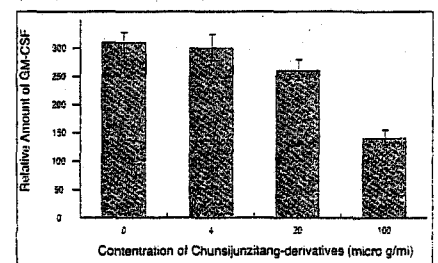


Fig. 3. Dose-dependent inhibitory effects of Cheonsagunja-tang-derivatives on the mRNA expression levels of granulocyte macrophage colony-stimulating-factor.

Table 3. Dose-Dependent Effects of Cheonsagunja-tang-derivatives on the mRNA Expression Levels of Interleukin-6, Interleukin-16 and Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

	Concentration of Cheonsagunja-tang-derivatives paeum ( $\mu$ g/ml)			
	0	4	20	100
mRNA Level (%) of IL-6	85.8 $\pm$ 9.9	91.0 $\pm$ 10.5	96.4 $\pm$ 7.8	60.3 $\pm$ 9.0*
Inhibitory Effect**(%)	-	-6.1	-12.45	29.8
mRNA Level (%) of IL-16	75.5 $\pm$ 6.3	55.8 $\pm$ 6.3*	52.5 $\pm$ 5.2*	52.4 $\pm$ 11.1*
Inhibitory Effect**(%)	-	26.1	30.5	30.6
mRNA Level (%) of GM-CSF	314 $\pm$ 17	302 $\pm$ 25	260 $\pm$ 18	140 $\pm$ 11*
Inhibitory Effect**(%)	-	3.8	17.2	55.4

\* At least, p<0.05 when compared to the value for each cytokine without treating by Cheonsagunja-tang-derivatives.

\*\* The value of inhibitory effect is comparative one with internal standard.

10ng/ml TNF- $\alpha$ 에 유발된 IL-6, IL-16 및 GM-CSF의 mRNA 발현에 미치는 水蛭의 효과를 관찰하기 위해 각각 4 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml의 水蛭를 처리한 후 24시간 후의 RT-PCR 결과는 水蛭의 농도가 증가함에 따라  $\beta$ -actin에 비해 cytokines의 발현이 감소되었다(Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6).

상기의 실험을 3회 반복하여 internal

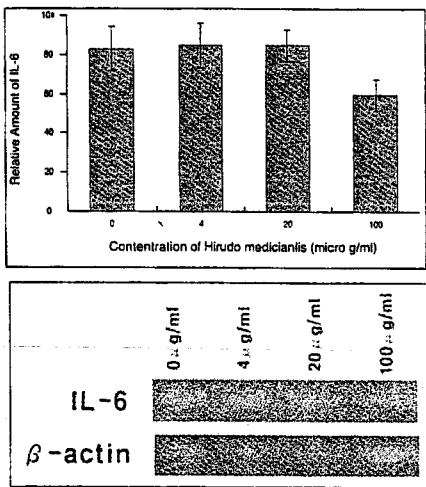


Fig. 4. Dose-dependent inhibitory effects of Hirudo Medicinalis(roasted with Ephedrae Herba) on the mRNA expression levels of interleukin-6.

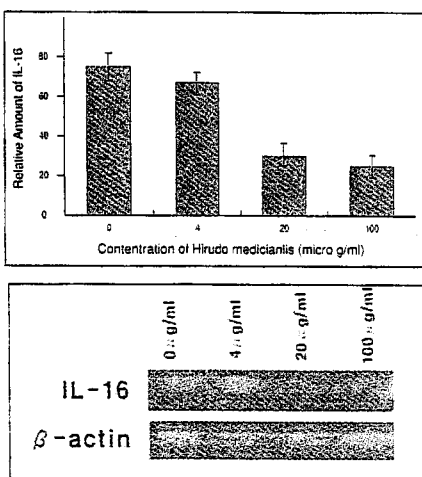


Fig. 5. Dose-dependent inhibitory effects of Hirudo Medicinalis(roasted with Ephedrae Herba) on the mRNA expression levels of interleukin-16.

standard와 비교한 상대치를 densitometer로 정량화하여 그 평균과 표준편차를 Table에 나타내었다. Table은 IL-6 mRNA의 발현이 水蛭 100 $\mu$ g/ml에 의해 억제되었으며, IL-16 mRNA와 GM-CSF mRNA의 발현은 水蛭 20 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 억제되었다(Table IV).

1) 水蛭(麻黃炒)가 IL-6 mRNA 발현에 미치는 효과

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하

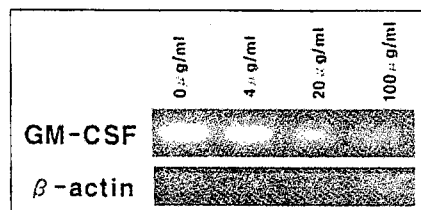
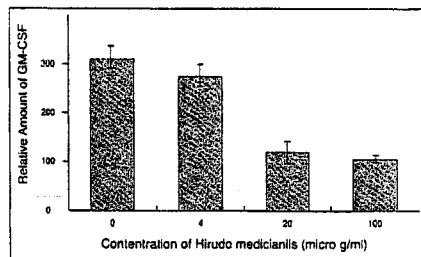


Fig. 6. Dose-dependent inhibitory effects of Hirudo Medicinalis(roasted with Ephedrae Herba) on the mRNA expression levels of granulocyte macrophage colony stimulating factor.

Table 4. Dose-Dependent Effects of Hirudo Medicinalis(roasted with Ephedrae Herba) on the mRNA Expression Levels of Interleukin-6, Interleukin-16 and Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

	Concentration of Cheonsagunja-tang-derivatives paeum ( $\mu$ g/ml)			
	0	4	20	100
mRNA Level (%) of IL-6	85.8 ± 9.9	87.8 ± 8.8	87.5 ± 4.4	54.4 ± 8.7*
Inhibitory Effect**(%)	-	-2.3	-2.0	36.68
mRNA Level (%) of IL-16	75.5 ± 6.3	65.8 ± 4.5	27.9 ± 4.4*	25.2 ± 4.6*
Inhibitory Effect**(%)	-	12.9	63.2	66.6
mRNA Level (%) of GM-CSF	314 ± 17	287 ± 17	113 ± 20*	102 ± 3*
Inhibitory Effect**(%)	-	8.6	64.0	67.5

\* At least, p<0.001 when compared to the value for each cytokine without treating by Hirudo medicinalis.

\*\* The value of inhibitory effect is comparative one with internal standard.

에서 internal standard에 비하여 IL-6 mRNA의 발현을 85.8 ± 9.9 %로 보여 주었다. 4 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml의 水蛭(麻黃炒) 추출액에서는 각각 87.8 ± 8.8 %, 87.5 ± 4.4 %로 나타나 이들 농도에서 水蛭는 IL-6 mRNA의 발현에 영향을 주지 않았으며, 100 $\mu$ g/ml의 농도에서는 IL-6의 발현이 54.4 ± 8.7 %로 감소되어 대조군에 비하여 36.3%의 IL-6 발현을 억제효과를 나타냈다(p<0.001)(Table IV, Fig. 4).

2) 水蛭(麻黃炒)가 IL-16 mRNA 발현에 미치는 효과

BEAS-2B 세포가 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 75.5 ± 6.3 %의 발현을 보여주었다. 4 $\mu$ g/ml의 水蛭 추출액에서는 65.8 ± 4.5 %로 나타나 水蛭는 IL-16 mRNA의 발현에 영향을 주지 않았으며, 20 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml의 농도에서는 IL-16 mRNA 발현이 27.9 ± 4.4 %, 25.2 ± 4.6 %로 감소하여 대조군에 비하여 각각 63.0 %, 66.6 %의 IL-16 발현을 억제효과를 나타냈다(p<0.001)(Table IV, Fig. 5).

3) 水蛭(麻黃炒)가 GM-CSF mRNA 발현에 미치는 효과

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하

에서 internal standard에 비하여 GM-CSF mRNA의 발현을  $314 \pm 17$  %로 보여주었다.  $4 \mu\text{g/ml}$ 의 水蛭 추출액에서는  $287 \pm 17$  %로 나타나 영향을 주지 않았으며,  $20 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 GM-CSF mRNA의 발현이  $113 \pm 20$  %과  $102 \pm 3$  %로 감소하여 대조군에 비하여 64.0 %와 67.5 %의 GM-CSF 발현을 억제효과를 나타냈다 ( $p < 0.001$ ) (Table IV, Fig. 6).

#### IV. 考 察

최근 알레르기 질환은 지속적으로 증가하고 있으나 그 원인을 유전적인 측면만으로는 설명하기 어려워 환경의 중요성이 대두되고 있다.<sup>14</sup> 특히 기관지 천식(이하 천식)은 유전적인 성향이 강한 개인에 있어 환경적인 인자에 노출됨으로서 발병하는 다인자 질환으로, 다양한 자극원에 의해 기도의 급만성 염증과 증가된 과민성으로 인하여 기도의 폐색을 초래하여 갑작스러운 기침, 호흡곤란, 천명의 증상을 보이면서 임상증상이 자연히 혹은 치료에 의해 가역적으로 호전되는 기도질환을 말한다.<sup>1</sup>

한의학에서는 질병관의 차이로 알레르기 질환에 대한 직접적인 언급은 없으나 그 질환과 유사하거나 면역적인 측면에서 접근되는 질환들에 대한 설명은 《內經》 이후 역대 많은 문헌들에 나타나고 있는데, 천식을 呼吸急促하며 喉中有聲響한 증상을 나타내는 哮喘證, 哮喘吼證의 범주에 속하는 질환으로 인식하고 있으며,<sup>2</sup> 특히 哮喘은 隋時代의 《巢氏諸病源候論》<sup>15</sup>에서 처음으로 '呬嗽'라고 기재되면서, 그 후 많은 의서들에 언급되면서 임상적으로는 동일한 병증으로 간주하여 치료해 왔고 많은 처방들이 유의성 있는 효과를 보였다.<sup>3</sup>

이와 관련된 연구로 정 등<sup>16</sup>은 哮喘의 원인과 치법, 길촌 등<sup>17</sup>은 알레르기성 천식의 동서의학적 비교 고찰, 정<sup>18</sup>은 알레르기 질환의 한방요법에 관하여 연구보고 하였으며, 실험적 연구로는 김 등<sup>19</sup>은 蘇子降氣湯 및 蘇子導痰降氣湯, 이<sup>20</sup>는 五拗湯, 정<sup>21</sup>은 定喘湯의 천식 및 항알레르기 효과에 대하여, 유 등<sup>22</sup>, 왕 등<sup>23</sup>, 김 등<sup>24</sup>은 각각 麥門冬湯, 定喘湯, 解表二陳湯이 알레르기 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향을 연구보고 하였으며, 임상 연구로는 조 등<sup>3</sup> 호천증의 임상 연구, 정 등<sup>25</sup>은 加味清上補下湯의 임상적 효과에 대하여 보고한 바 있다.

최근의 연구에 의하면 기도의 염증(inflammation)이 천식의 병리적 과정에서 필수적이며 기도의 과민성과 기류폐쇄를 가속화시키는 촉진제 역할을 한다고 보고되고 있다. 그리고 기도의 염증은 천식의 공통적인 임상양상이며 경중에 관계없이 천식의 모든 시기에 기도의 벽에 활성화된 호산구(eosinophile)와 비만세포(mast cell)의 확인이 가능하며, 이런 염증세포(inflammatory cell)의 존재는 천식환자의 기도내에서 증가된 cytokines의 존재로 알 수 있다.<sup>26</sup>

따라서 천식의 발생기전과 그 치료과정에 대한 연구로 분자생물학적 실험기법을 도입하였고, 이러한 연구방법은 염증반응이나 면역에 관여하는 여러 cytokines과 chemokines의 증감을 관찰함으로써 세포 단계에서의 조직손상 및 치유과정을 설명하고 있다.<sup>27</sup> 이러한 분자생물학적인 연구방법을 도입하여 몇몇의 연구가 진행되었는데, 특히 解表二陳湯, 小青龍湯, 瀉白散, 甘草, 麥門冬, 五味子, 杏仁, 桔梗 등의 cytokines 발현 억제에 관한 분자생물학적인 연구들은 한약물이 천식의 염증 발현을 억제시킴

으로써 천식의 치료효과를 나타낸다는 것을 보여주고 있다.

喘四君子湯은 明代 龔延賢의 《萬病回春》의 喘急篇에 처음 기재된 처방으로 氣短하여 喘하는데, 호흡이 短促하면서 痰聲이 없는 증상을 치료하는 효능으로 몇몇의 한의서에서 지속적으로 인용하여 임상에서 다용되고 있는 처방으로 健脾益氣의 효능을 가진 人蔘, 白朮, 茯苓, 甘草로 이루어진 四君子湯을 기본방으로 여기에 補血潤燥하는 當歸를 가하고, 降氣平喘의 蘇子, 桑白皮를 가해진해거담, 소염, 진정을 꾀하도록 하였으며, 陳皮, 厚朴, 縮砂仁, 沈香, 木香을 가하여 利氣作用을 증가시킨 처방이다.<sup>28</sup>

최근 Chopin 등<sup>29</sup>이 水蛭의 항염증 효과의 연구보고에 따라 水蛭이 인체에서 염증반응을 억제할 수 있다는 가능성을 보이고 있다.

水蛭의 기원을 살펴보면 水蛭科(Hirudinidae)에 속한 환형동물인 寬體金線蛭(Whitmania pigra)과 日本醫蛭(Hirudo nipponica Whitman) 및 柳葉螞蟥/茶色蛭(Whitmania acranulata)의 건조체<sup>30</sup>로 서양의학에서는 기원전 5세기 이전부터 혈액응고를 막기 위해 水蛭을 사용해 왔으며, 현재 유럽에서 의학용으로 Hirudo medicinalis을 이용한다.<sup>30</sup> 따라서 본 연구에서도 Hirudo medicinalis를 사용하였다.

水蛭의 성분은 주로 단백질로 신선한 水蛭의 타액중에는 hirudin이라는 단백질을 함유하여 fibrinogen에 대한 thrombin의 작용을 억제함으로써 혈액의 응고를 저해한다.<sup>29</sup> 그 밖에 heparin이라는 단백질은 fibrinogen 분해효소를 함유하고 있어 혈관벽에 형성된 혈전을 용해시키는 작용을 하고, antistatin이라는 단백질은 항암효과가 있는데, 다른 항암제와는 달리 부작용이

적고 면역체계를 보강시키는 것으로 알려져 있다.<sup>30</sup>

水蛭(麻黃炒)의 각각의 약물의 효능을 살펴보면, 水蛭은 환형동물이라는 큰 분류군에 속하며<sup>30</sup>, 性은 平有小毒하고 味는 辛鹹苦하며 肝經으로 入한다. 그리고 通利水道, 生津澤, 破血逐瘀, 通經의 작용이 있어 癥瘕痞塊, 血瘀閉經, 腫毒惡瘡折傷, 跌打損傷을 治한다. 석회와 식염을 꺼리고 허약체질과 無瘀血者와 孕婦는 금한다. 약재로 사용하는 경우는 炒하여 사용하고, 크기가 작은 것이 좋고 생용하지 않는다고 하였다.<sup>29</sup>

麻黃은 性이 溫無毒하고 味는 辛微苦하며, 肺經과 膀胱經으로 入한다. 그리고 發汗散寒, 宣肺平喘, 利水消腫하는 효능이 있어 傷寒表實, 頭痛鼻塞, 咳嗽氣喘등을 치료한다. 外感의 경우 太陽經病의 發汗重劑이면서 肺經의 鬱火之邪를 풀어준다. 風寒邪가 肺를 鬱하게 하여 咳逆上氣하고 痰哮喘喘한 것을 治한다. 發汗을 시키기 위해서는 莖를 사용하고 止汗을 시키기 위해서는 根絶을 사용하는데, 일반적으로 發汗解表에 사용할 경우에는 生用하고 平喘止咳에는 灸用한다. 허약하여 汗出하면서 喘하는 증상에는 금하고 여름철에 다용하는 것도 주의한다.<sup>31</sup>

麻黃의 성분은 1~2%정도의 alkaloid를 함유하고 그 중 주요 성분은 ephedrine과 d-pseudoephedrine으로, ephedrine은 기관지 평활근을 이완시키며, d-pseudo ephedrine는 소염작용을 나타내 모세혈관 투과성을 억제시키는데, 장기간 사용에 따른 중독증상과 교감신경 및 중추신경 흥분 등의 부작용이 있을 수 있다.<sup>31</sup>

麻黃은 일반적으로 哮喘에 다용하는 약물로 알려져 있고 특히 平喘止咳에는 灸用한다고 했고<sup>31</sup>, 水蛭의 鹹味는 軟堅

하는 작용이 있어 이완작용을 나타낼 수 있고, 活血去瘀의 효능이 있으며, 생용하지 않고 검게 볶거나(熬黑), 暴乾한 후 炒黃해서 사용했다는 기록이 있다. 따라서 麻黃의 주성분중의 하나인 ephedrine의 부작용을 우려하면서 平喘止咳작용을 보존하기 위하여 生水蛭과 함께 동량을 炒하여 麻黃이 갈색으로 변할 즈음에 麻黃을 버리고 水蛭만을 실험에 이용하였는데, 麻黃의 약성과 효능이 水蛭에 영향을 미칠 수 있을 것으로 기대했다.

지금까지 水蛭과 麻黃에 대한 연구로 水蛭을 이용한 혈전용해에 관한 연구가 진행되어 왔고<sup>36</sup>, 천식과 관련된 연구보고는 없으나 항염증 효과에 관련된 연구보고가 있었으며<sup>37</sup>, 김 등<sup>38</sup>이 쥐를 이용한 실험에서 水蛭이 임신부의 간기능과 신기능의 손상을 초래할 수 있다는 것을 연구보고 하였다.

麻黃은 천식을 포함한 호흡기질환에 다용되는데, 김<sup>39</sup>은 麻黃과 桑白皮가 O<sub>3</sub> 중독에 대한 폐손상에 대한 유의성 있는 영향에 대하여 연구 보고한 바 있으며, 윤<sup>40</sup>은 약침용 麻黃抽出液의 면역, 발열 및 용혈 독성시험에 관한 실험적 연구 결과를 보고하였고, 麻黃이 포함된 처방의 효능에 대한 연구로 김 등<sup>41</sup>은 小青龍湯이 진통, 항경련 및 흰쥐의 폐손상에 미치는 영향에 관한 연구를 보고하였고, 고<sup>42</sup>는 麻黃附子細辛湯이 혈전증에 유의성이 있다는 연구를 보고하였으며, 이 등<sup>43</sup>은 麻黃杏仁甘草石膏湯 및 麻黃杏仁甘草石膏湯加味方이 SO<sub>2</sub>에 의한 흰쥐의 호흡기 손상에 미치는 영향에 대한 연구 등을 보고하였다.

최근에는 천식의 발병기전과 병태생리에 대한 연구로 분자생물학적인 연구를 통하여 그 기전을 밝히려고 시도하고 있으며, Carlos 등<sup>44</sup>은 세포의 염증반

응 및 면역반응에 cytokines의 역할과 치료약제를 투여하여 어떤 변화가 있는지를 관찰하고 있다.

이러한 cytokines은 천식의 병리를 설명하는데 필수적으로 IL-4와 IL-13 등은 천식에서 IgE 유도 cytokines으로 분류되고, IL-3, IL-5, GM-CSF 등은 호산구 활성화 cytokines으로, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  등은 증가된 histamine의 분비와 기도내의 염증을 유발하는 cytokines이다.<sup>32</sup> 그리고 최근의 연구로 IL-16은 상피세포의 염증반응에 중요한 역할을 한다고 제시되었는데<sup>33</sup>, CD4<sup>+</sup> T cell, 호산구(eosinophil), 단핵구(monocyte)의 강력한 화학주성(chemoattractant)을 유인하는 cytokine임이 밝혀졌다.<sup>34</sup> 또한 IL-6은 천식의 일반적인 특징인 기도 점막의 과증식과 이상분비물 증가에 기여하는 것으로 밝혀졌다.<sup>35</sup> GM-CSF는 IL-3, IL-5와 함께 호산구의 생존을 연장하는데<sup>32</sup>, 특히 GM-CSF가 염증이 유발된 천식의 기도안에서 호산구 생존을 증강시키는 작용을 하는 것과 더욱 관련이 깊고, 거기에는 CD4<sup>+</sup> T cell의 활성화가 그러한 작용을 증강시키는 것으로 알려져 있다.<sup>35</sup>

CD4<sup>+</sup> T cell은 천식에 있어서 항원의 감작기에 B cell이 IgE 합성을 유도하면서 동시에 Th2 cytokines의 분비를 통한 염증유발의 정보전달(cascade)자로서 필수적인 역할을 하는데, IgE 합성과 염증이 유발된 기도에서 호산구의 축적에 중추적 역할을 한다.<sup>36</sup>

IL-6과 TNF- $\alpha$ 는 IL-1과 더불어 천식에 있어서 기도벽의 염증유발 cytokines으로 알려져 있다.<sup>32</sup> 특히 IL-6은 천식의 일반적인 특징인 기도 점막의 과증식과 이상분비물 증가에 기여한다.<sup>35</sup> IL-6 유전자 발현은 TNF- $\alpha$ 를 이

용한 자극 후에 다양한 세포군에서 유도되고, 반면에 스테로이드제제 치료로 감소된다. 반면에 TNF- $\alpha$ 는 폐에서 NF- $\kappa$ B와 AP-1을 유도하고 이어서 AP-1 등은 IL-6의 발현과 분비를 조절한다. 천식이나 다른 호흡기 질환에서의 기관지 평활근으로부터 분비되는 IL-6의 정확한 역할은 밝혀지지 않았지만, IL-6을 분비하는 기관지 평활근의 다양한 세포들은 기도의 염증을 증가시키거나 억제하는데 깊숙이 관여되어 있다.<sup>37</sup>

IL-16은 강력한 CD4<sup>+</sup>에 대한 화학주성(chemoattractant) cytokine으로 분류되어<sup>33,35,36</sup>, 이의 발현은 정상군에 비하여 천식환자에 있어 더욱 의미있는 증가를 보이며<sup>33,36</sup>, 호산구와 비만세포 그리고 기도의 상피세포에 의해 생산된 후 CD4<sup>+</sup> T cell을 모이게 하고 활성화시킨다.<sup>34</sup> IL-16은 histamine, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  등으로부터 자극을 받은 후 기관지의 상피세포로부터 생산되어<sup>33</sup>, 기도내 염증유발 세포의 축적에 중요한 역할을 담당한다.<sup>36</sup>

GM-CSF는 호산구 활성화 cytokine으로 천식의 염증과정을 총괄하는데, IL-3, IL-5과 더불어 Th2에 의해서 생산되어 기도의 염증부위에 호산구를 모이게 하고 이 활성화된 호산구에 의해 조직과 상피세포의 손상을 일으키게 된다.<sup>32</sup> 반대로 호산구는 IL-5와 GM-CSF를 생산하는데<sup>35</sup>, GM-CSF는 과립형성을 유도하고 호흡기의 섬유화를 작용을 유도하여, 심각한 천식에 있어 비가역적인 기도상태의 원인이 된다.<sup>33</sup> 따라서 지금까지는 천식에 있어 IL-5의 역할에 많은 연구를 해 왔는데, IL-5는 폐에 있어 제한적인 생물학적 기능만을 나타내는 반면 GM-CSF는 다방면에 기능하는 cytokine이기 때문에 GM-CSF의 집중적인 연구도 중요시 된다.

이처럼 천식에 있어서 기도의 염증을 유발하는 cytokines는 천식의 병태생리, 악화인자, 지속적인 염증유발과 관련되어 치료에 있어 천식의 염증과정을 완화시키는데 중요하게 연구되어지고 있고<sup>32</sup>, cytokines의 발현을 억제할 수 있는 치료방법은 천식에 있어 기도의 염증양상 및 염증성 매개인자의 발생과 발현을 변화시킬 수 있을 것이다.<sup>38</sup> 더불어 천식의 서양의학적 치료에 있어 스테로이드제제는 강력한 효과를 보임에도 불구하고 사용에 따른 많은 부작용을 보여 심각한 천식환자들에 사용 가능한 대체약물의 개발이 시급한 실정이고, 임상에서 천식에 많이 사용하는 麻黃은 심계, 정충, 발한과다등의 부작용이 있어, 새로운 천식 치료약물의 개발 및 제형의 변화가 요구된다.

이에 저자는 본 실험에서 천식을 치료하는데 임상에서 다용하는 喘四君子湯과 새로운 치료약물의 개발을 목적으로 水蛭(麻黃炒)를 이용하여 분자생물학적인 방법을 통한 기도내 염증에 필수적으로 관여하는 cytokines의 활성을 억제하는 효능을 규명하고자 하였다. 따라서 천식에 있어 기도내 염증반응에 관여하는 cytokines의 전사의 변화를 관찰하기 위해 세포주를 이용하여 염증유발 cytokines의 존재하에서 喘四君子湯과 水蛭(麻黃炒)를 처리하여 염증유발 cytokines인 IL-6, IL-16, GM-CSF의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험에 사용한 세포주는 BEAS-2B cell line으로 adenovirus 12-SV40로 전이된 human airway epithelial 세포주를 인체 기도내 세포의 모델로 이용하였다. IL-6, IL-16, GM-CSF는 천식의 발생에 있어 기도내 염증을 유발시키는데 주된 작용을 하는 cytokines으로 BEAS-2B cell에 TNF- $\alpha$ 를 처리하

여 염증발현을 유발시켰다. IL-6, IL-16, GM-CSF의 mRNA의 정량화를 위하여 세포 내에서 항시 비슷한 정도로 발현되어 있다고 알려진  $\beta$ -actin의 mRNA 발현을 internal standard로 하였다. 모든 실험은 독립된 3회 이상의 실험을 반복하여 얻어진 결과를 통계처리하여 평균과 표준편차를 구하였고 비교는 student T test에 근거하여 행하여졌다.

喘四君子湯의 IL-6, IL-16 그리고 GM-CSF의 발현에 미치는 효과를 살펴보면, 10ng/ml TNF- $\alpha$ 에 유발된 cytokine의 mRNA 발현에 미치는 喘四君子湯의 효과를 RT-PCR로 연구한 전형적인 결과 4 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml로 喘四君子湯의 농도가 증가함에 따라  $\beta$ -actin에 비해 cytokine의 발현이 감소되었다(Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3).

喘四君子湯이 IL-6의 발현에 미치는 효과는 실험 결과 BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 IL-6의 발현을 85.8 $\pm$ 9.9%로 보여주었다. 이 수치는 4 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml의 喘四君子湯 추출액의 존재하에서 91.0 $\pm$ 10.5%, 96.4 $\pm$ 7.8%로 각각 나타나 이 농도에서는 喘四君子湯은 IL-6의 발현에 영향을 주지 않은 것으로 나타났다. 100 $\mu$ g/ml의 농도에서는 IL-6의 발현이 60.3 $\pm$ 9.0%로 감소하여 喘四君子湯이 없는 대조군에 비하여 29.8% 감소된 것으로 나타났다(p<0.005)(Table III, Fig. 1). 이는 喘四君子湯이 염증반응에 중요한 역할을 하는 cytokine인 IL-6에 의한 histamine 분비억제와 기도내 염증을 억제하고, 기도점막의 과증식 및 이상분비물의 증가를 억제하는 작용이 있다고 생각된다.

喘四君子湯이 IL-16의 발현에 미치는 효과는 실험 결과 BEAS-2B 세포는



TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 IL-16의 발현을  $75.5 \pm 6.3\%$ 로 보여주었다. 이 수치는  $4\mu\text{g/ml}$ ,  $20\mu\text{g/ml}$  및  $100\mu\text{g/ml}$ 의 喘四君子湯 추출액의 존재하에서 각각  $55.8 \pm 6.3\%$ ,  $52.5 \pm 5.2\%$  및  $52.4 \pm 11.1\%$ 로 나타나 이 농도에서 喘四君子湯은 대조군에 비하여 각각  $26.1\%$ ,  $30.5\%$ ,  $30.6\%$ 의 IL-16의 발현을 감소시켰다 ( $p < 0.05$ ) (Table III, Fig. 2). 통계적인 유의성에도 불구하고 이러한 차이는 RT-PCR상의 결과로 매우 작은 차이로 여겨지나 실험결과는 喘四君子湯이 염증반응에 관여하는 IL-16의 발현 억제 효과가 있다는 것을 시사한다. 따라서 IL-16은  $\text{CD4}^+$  T cell에 대한 화학주성 cytokine이기 때문에 喘四君子湯은  $\text{CD4}^+$  T cell이 B cell에 의한 IgE를 생산하는 것을 방해하고 기도내 염증유발 세포들의 축적을 방해하는 작용이 있는 것으로 생각된다.

喘四君子湯이 GM-CSF의 발현에 미치는 효과는 실험 결과 BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 GM-CSF의 발현을  $314 \pm 17\%$ 로 보여주었다. 이 수치는  $4\mu\text{g/ml}$ 과  $20\mu\text{g/ml}$ 의 喘四君子湯 추출액의 존재하에서  $302 \pm 25\%$ 와  $260 \pm 18\%$ 로 각각 나타나 이 농도에서는 喘四君子湯은 영향을 주지 않은 것으로 나타났으나  $100\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 GM-CSF의 발현이  $140 \pm 11\%$ 로 감소하여 喘四君子湯이 없는 대조군에 비하여  $55.4\%$ 로 감소된 것으로 나타났다 ( $p < 0.001$ ) (Table III, Fig. 3). 이 결과는 喘四君子湯이 GM-CSF에 의한 호산구 활성을 방해하여 염증부위에 호산구 침착이 일어나지 않기 때문에 호산구에 의한 조직과 상피세포의 손상을 막을 수 있다는 것을 의미한다. 또한

GM-CSF에 의한 기도의 섬유화 작용을 막아 심각한 천식환자들에게서 발생하는 기도의 비가역적인 상태를 막을 수 있다는 가능성이 있다고 생각된다.

水蛭(麻黃炒)가 IL-6, IL-16 그리고 GM-CSF의 발현에 미치는 효과를 보면,  $10\text{ng/ml}$  TNF- $\alpha$ 에 유발된 cytokine의 mRNA 발현에 미치는 水蛭(麻黃炒)의 효과를 RT-PCR로 연구한 전형적인 결과는  $4\mu\text{g/ml}$ ,  $20\mu\text{g/ml}$ ,  $100\mu\text{g/ml}$ 로 水蛭(麻黃炒)의 농도가 증가함에 따라  $\beta$ -actin에 비해 cytokines의 발현이 감소되었다 (Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6).

水蛭(麻黃炒)가 IL-6에 미치는 영향은 실험결과 BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 IL-6의 발현을  $85.8 \pm 9.9\%$ 로 보여주었다. 이 수치는  $4\mu\text{g/ml}$ ,  $20\mu\text{g/ml}$ 의 水蛭(麻黃炒) 추출액의 존재하에서  $87.8 \pm 8.8\%$ ,  $87.5 \pm 4.4\%$ 로 각각 나타나 이 농도에서는 水蛭(麻黃炒)는 IL-6의 발현에 영향을 주지 않은 것으로 나타났으나,  $100\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 IL-6의 발현이  $54.4 \pm 8.7\%$ 로 감소하여 水蛭(麻黃炒)가 없는 대조군에 비하여 IL-6 발현율이  $36.6\%$  감소된 것으로 나타났다 ( $p < 0.001$ ) (Table IV, Fig. 4). 이는 水蛭(麻黃炒)가 천식에 있어 염증반응에 중요한 영향을 미치는 IL-6의 발현 조절에 관여하여 IL-6에 의한 histamine 분비억제와 기도내 염증을 억제하고, 기도점막의 과증식 및 이상분비물의 증가 억제작용을 한다는 것을 의미한다.

水蛭(麻黃炒)가 IL-16에 미치는 효과로 실험결과 BEAS-2B 세포가 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여  $75.5 \pm 6.3\%$ 의 발현을 보여주었다. 이 수치는  $4\mu\text{g/ml}$ 의 水蛭(麻黃炒) 추출액의 존재하에서  $65.8 \pm 4.5\%$ 로

나타나 水蛭(麻黃炒)는 IL-16의 발현에 영향을 주지 않은 것으로 나타났고,  $20\mu\text{g/ml}$ ,  $100\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는  $27.9 \pm 4.4\%$ ,  $25.2 \pm 4.6\%$ 로 각각 감소하여 水蛭(麻黃炒)가 없는 대조군에 비하여 각기  $63.0\%$ 과  $66.6\%$  감소하였다 ( $p < 0.001$ ) (Table IV, Fig. 5). 이 실험 결과는 IL-6의 발현에 미치는 영향과 같이 水蛭(麻黃炒)가 천식환자의 기도내 상피세포의 염증과정을 억제하고 IgE 합성과 염증이 유발된 기도내 호산구 축적을 막고, 기도내 염증유발세포들의 축적을 방해한다는 것을 의미한다.

水蛭(麻黃炒)가 GM-CSF의 발현에 미치는 영향으로 실험 결과 BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 GM-CSF의 발현을  $314 \pm 17\%$ 로 보여주었다. 이 수치는  $4\mu\text{g/ml}$ 의 水蛭(麻黃炒) 추출액의 존재하에서  $287 \pm 17\%$ 로 각각 나타나 이 농도에서는 水蛭(麻黃炒)는 영향을 주지 않은 것으로 나타났다. 하지만  $20\mu\text{g/ml}$ ,  $100\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 GM-CSF의 발현이  $113 \pm 20\%$ 과  $102 \pm 3\%$ 로 감소하여 水蛭(麻黃炒)가 없는 실험군에 비하여  $64.0\%$ 와  $67.5\%$ 로 감소되었다 ( $p < 0.001$ ) (Table IV, Fig. 6). 이는 위의 결과와 마찬가지로 水蛭(麻黃炒)가 천식에서 기도내 염증을 억제할 수 있음이 밝혀졌고, 특히 호산구의 활성화를 막아 기도내의 과민반응을 억제하고, 조직과 상피세포의 손상을 막을 수 있다는 것을 의미한다. 또한 GM-CSF에 의한 기도의 섬유화 작용을 막아 심각한 천식환자들에게서 발생하는 기도의 비가역적인 상태를 막을 수 있다는 가능성을 제시한다고 하겠다.

본 실험에서 이용한 水蛭(麻黃炒)는 건조하지 않은 水蛭과 麻黃을 함께 약한 불에炒한 후 麻黃을去한 것으로 麻

黃의 알칼로이드 성분인 ephedrine, nor-ephedrine, l-ephedrine, (+)-pseudoephedrine 등<sup>1)</sup>이 水蛭에 영향을 미칠 수 있었을 것으로 보이며, 水蛭(麻黃炒)의 추출물 준비단계의 시료가 감압하의 회전식 증발기를 사용하고 동결 건조시에 0.01 mbar에서 24시간 이상 처리했기 때문에 휘발성이 강한 flavonoids의 영향은 없었을 것으로 생각된다.

실험 결과는 喘四君子湯과 水蛭(麻黃炒)가 천식의 진행에 중요한 cytokines 인 IL-6, IL-16 그리고 GM-CSF의 발현을 농도 의존적으로 억제하는 효과가 있음을 보이고 있으며, 이는 喘四君子湯이 천식에 임상적 효과가 있음을 분자 생물학적으로 입증하고 있고, 또한 水蛭(麻黃炒)을 이용한 천식을 치료하는 새로운 약물의 개발 가능성을 제시하고 있다. 추후 喘四君子湯의 구성약물의 개별적 연구와 麻黃과 水蛭의 수처된 성상별로 구체적이고 심도있는 연구가 지속되어야 할 것으로 생각되며, 水蛭의 약물 독성검사가 요할 것으로 생각된다.

## V. 結 論

喘四君子湯과 水蛭(麻黃炒)가 천식의 세포배양모델에 미치는 효과를 조사하기 위해 인간의 상피세포에서 기원한 BEAS-2B세포를 TNF- $\alpha$ 로 처리하고, 천식의 염증반응에 중요하다고 알려진 대표적인 cytokines인 IL-6, IL-16 그리고 GM-CSF의 mRNA 발현에 미치는 영향을 살펴 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 喘四君子湯은 IL-6 mRNA의 발현에 4 $\mu$ g/ml와 20 $\mu$ g/ml에서는 억제효과가 없었고, 100 $\mu$ g/ml 검액에서 대조

군에 비해 30%의 억제효과를 나타냈다(p<0.005).

2. 喘四君子湯은 IL-16 mRNA의 발현에 4 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml 그리고 100 $\mu$ g/ml 검액에서 대조군에 비해 각각 26%, 31%, 31%의 억제효과를 나타냈다(p<0.05).

3. 喘四君子湯은 GM-CSF의 mRNA 발현에 4 $\mu$ g/ml와 20 $\mu$ g/ml에서는 억제효과가 없었고, 100 $\mu$ g/ml 검액에서 대조군에 비해 55%의 억제효과를 나타냈다(p<0.001).

4. 水蛭(麻黃炒)는 IL-6 mRNA의 발현에 4 $\mu$ g/ml와 20 $\mu$ g/ml에서는 억제효과가 없었고, 100 $\mu$ g/ml 검액에서 대조군에 비해 37%의 억제효과를 나타냈다(p<0.001).

5. 水蛭(麻黃炒)는 IL-16 mRNA의 발현에 4 $\mu$ g/ml에서는 억제효과가 없었고, 20 $\mu$ g/ml과 100 $\mu$ g/ml 검액에서 대조군에 비해 각각 63%, 67%의 억제효과를 나타냈다(p<0.001).

6. 水蛭(麻黃炒)는 GM-CSF의 mRNA 발현에 4 $\mu$ g/ml에서는 억제효과가 없었고, 20 $\mu$ g/ml와 100 $\mu$ g/ml 검액에서 대조군에 비해 각각 64%, 68%의 억제효과를 나타냈다(p<0.001).

## 參考文獻

1. 한용철. 임상호흡기학. 서울: 일조각; 1997, p.208.
2. 이형구, 정승기. 동의폐계내과학. 서울: 아트동방; 1999, p.162-202.
3. 조영민, 이경기, 조일현, 차은수, 정희재, 정승기 외. 호천증에 관한 임상적 연구. 제19회 전국한의학 학술대회 발표논문집 1997:141-51.
4. 龔廷賢. 萬病回春. 서울: 행림서원; 1972, p.127.
5. Baskova I, Zavalova L, Berezhnoy S, Avdonin P, Afanasjeva G, Popov E et al. Inhibition of induced and spon-

taneous platelet aggregation by destabilase from medicinal leech. Platelets 2000;11(2):83-6.

6. Weinfeld AB, Yuksel E, Boutros S, Gura DH, Akyurek M, Friedman JD. Clinical and scientific considerations in leech therapy for the management of acute venous congestion. Ann Plast Surg 2000;45(2):207-12.
7. Chopin V, Stefano GB, Salzet M. Amino-acid-sequence determination and biological activity of tessulin, a naturally occurring trypsinchymotrypsin inhibitor isolated from the leech Theromyzon tessulatum. Eur J Biochem 1998;258(2):662-8.
8. 김은기, 이경섭, 송병기. 수질, 맹충, 반묘가 임신에 미치는 영향. 경희한의대논문집 1996;19(2):13-22.
9. 김경철, 홍무창, 김완희. 백서의 O<sub>3</sub> 중독 폐손상에 관한 麻黃, 桑白皮의 영향. 동의생리학회지 1987;3(1):59-68.
10. 윤계숙, 남상수, 이재동, 최도영, 안병철, 박동식 외. 약침용 마황추출액의 면역, 발열 및 용혈독성시험에 관한 실험적 연구. 대한침구학회지 1997;14(1):361-82.
11. 김기창, 이형구. 소청룡탕의 진통, 항경련 및 흰쥐의 폐손상에 미치는 영향. 경희한의대논문집 1985;8:129-37.
12. 고광식. 麻黃附子細辛湯 및 처방구성 약재가 Endotoxin으로 유발된 혈전증에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1990.
13. 이주희, 정승기, 이형구. 麻黃杏仁甘草石膏湯 및 麻黃杏仁甘草石膏湯加味方이 SO<sub>2</sub>에 의한 흰쥐의 호흡기 손상에 미치는 영향. 경희한의대논문집 1993;16:85-105.
14. Davies RJ, Rusznak C, Devalia JL. Why is allergy increasing?-environmental factors. Clin Exp Allergy 1998;28 Suppl 6:8-14.
15. 巢元方. 諸病源候論. 北京: 人民衛生出版社; 1982, p.82.
16. 정승기, 이형구. 哮喘의 원인 및 치료에 관한 연구. 대한한의학회지 1986;7(1):60-7.
17. 길촌영성, 황의옥, 정승기, 이형구. 알레르기성 천식에 관한 문헌적고찰(동서의학적 비교고찰). 대한한의학회지 1990;11(1):39-70.
18. 정승기. 알레르기 질환의 한방요법(천식을 중심으로). 대한한의학회지 1990;11(2):11-5.

19. 김영태, 정승기, 이형구. 소자강기탕 및 소자도담강기탕이 I형 및 IV형 알레르기 반응과 폐혈전색전에 미치는 영향에 관한 비교 연구. *경희의학* 1988;4(4):432-40.
20. 이형구. 오요탕이 해수천식에 미치는 영향. *경희한의대논문집* 1982;5:175-90.
21. 정승기, 이형구. 효천의 원인 및 치료에 관한 연구. *대한한의학회지* 1986;7(1):60-7.
22. 류옥상, 정희재, 정승기, 이형구. 麥門冬湯이 알레르기 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향. 제5회 한중학술대회 발표논문집 1999:1-13.
23. 왕중권, 정희재, 정승기, 이형구. The effects of Jungchun-tang on respiratory pattern and tracheal tissues in allergic asthma, The 10th ICOM abstract 1999: 102.
24. 김승수, 정희재, 정승기, 이형구. 解表二陳湯이 알레르기 천식의 호흡양상과 기관 조직에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 1999;19(2)(별책부록):59-73.
25. 정승기, 이형구. 효천에 응용되는 加味清上補下湯에 대한 임상적 관찰. *경희의학* 1986;2(4):97-102.
26. O'Byrne PM. Airway inflammation and asthma. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10 Suppl 2:18-24.
27. Carlos AG, Carlos ML, Conceisao SM, Alcinda M. Cytokines and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1997;7(5):270-3.
28. 신재용. 방약합편해설. 서울: 전통의학연구소; 1993, p.442.
29. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 역. *완역 중약대사전(6권)*. 서울: 도서출판정담; 1998, p.3324-8.
30. 강제원. 잊혀져 가는 생물(잘못 알고 있는 거머리). 서울: 도서출판 아카데미; 1995, p.19, 41.
31. 전국한의과대학 본초학교실 공편저. *본초학*. 서울: 영림사; 1992, p.121-3.
32. Ferreira MB, Palma Carlos AG. Cytokines and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1998;8(3):141-8
33. Arima M, Plitt J, Stellato C, Bickel C, Motojima S, Makino S et al. Expression of interleukin-16 by Human Epithelial cells: inhibition by Dexamethasone. *Am J respir Cell Mol Biol* 1999;21:684-92.
34. Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA, Ryan T, Schwabegger A, Cruikshank WW et al. A Role for IL-16 in the Cross-Talk Between Dendritic Cells and T Cell. *J Immunol* 1999;163:3232-8.
35. 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.
36. Lagerge S, Pinsonneault S, Varga EM, Till SJ, Kayhan NA, Jacobson M et al. Increased expression of IL-16 immunoreactivity in bronchial mucosa after segmental allergen challenge in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:293-301.
37. McKay S, Hirst SJ, Has MB, Jongste JC, Hoogsteden HC, Saxena PR et al. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Enhances mRNA Expression and Secretion of Interleukin-6 in Cultured Human Airway Smooth Muscle Cells. *Am J Resspir Cell Mol Biol* 2000;23:103-11.
38. Busse WW. Inflammation in asthma: the cornerstone of the disease and target of therapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102(4 Pt 2):S17-22.