

원저

# 金銀花와 白芍藥이 BEAS-2B 인간 기관지상피세포의 Cytokines mRNA level에 미치는 影響

정희재, 박성규<sup>1)</sup>, 정승기, 이형구

경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실, 경희대학교 한의과대학 방제학 교실<sup>1)</sup>

## The Inhibitory Effects of *Lonicerae Flos* and *Paeoniae Radix* on the IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level by BEAS-2B, Human Epithelial Cells

Hee-Jae Jung, Sung-Kyu Park<sup>1)</sup>, Sung-Ki Jung, Hyung-Koo Rhee

Division of Respiratory System, Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Department of Description, Graduate School of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul Korea<sup>1)</sup>

**Background** : Production of cytokines by bronchial epithelial cells may contribute to the local accumulation of inflammatory cells in patients with bronchial asthma. In many recent studies, molecular biological methods have been used to investigate the role of cytokines in pathogenesis and new therapeutic targets of asthma.

**Objective** : We aimed to identify the dose-dependent inhibitory effects of *Lonicerae Flos* (金銀花) and *Paeoniae Radix* (白芍藥) on the mRNA expression of IL-6, IL-16, and GM-CSF involved in the asthma model.

**Materials and 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 for internal standard. After 24 hours of *Lonicerae Flos* (金銀花), *Paeoniae Radix* (白芍藥), total cellular RNAs were collected treating RNAzol directly on the living cells. Then the transcriptional activities of IL-6, 16, GM-CSF were measured by RT-PCR with electrophoresis.

**Results** : In the *Lonicerae Flos* (金銀花) study, the mRNA expression of IL-6, IL-16 and GM-CSF was showed no inhibitory effect compared to the control group in all concentrations.

In the *Paeoniae Radix* (白芍藥) study, the mRNA expression of IL-6, IL-16 and GM-CSF was showed no inhibitory effect compared to the control group in all concentrations.

**Conclusion** : This study shows that *Lonicerae Flos* (金銀花) and *Paeoniae Radix* (白芍藥) 桔梗 have no inhibitory effects on the mRNA expression of IL-6, IL-16 and GM-CSF in BEAS-2B cell lines, human epithelial cells. Advanced studies are required to investigate the other mechanisms of inhibitory effect by *Lonicerae Flos* (金銀花) and *Paeoniae Radix* (白芍藥) in the asthma model. (J Korean Oriental Med 2003;24(3):145-154)

**Key Words**: *Lonicerae Flos* (金銀花), *Paeoniae Radix* (白芍藥), cytokine, asthma, IL-6, IL-16, GM-CSF

· 접수 : 2003년 5월 23일 · 논문심사 : 2003년 6월 12일 · 채택 : 2003년 7월 12일  
· 교신저자 : 정희재, 서울시 동대문구 회기동 1 경희의료원 부속한방병원 한방 5내과 의국  
(Tel: 958-9147, Fax: 958-9148 E-mail: hanfish@khmc.or.kr)  
· 본 연구는 2002년 경희대학교 연구비 지원에 의한 것임.

## 서론

기관지 천식은 呼吸急促하며 喉中有聲響한 症狀을 나타내는 韓醫學의 哮喘證, 哮喘證의 범주에 속하고<sup>1)</sup>, 臨床에서는 哮喘證에 사용되는 처방으로 治療하여 유의성 있는 결과를 얻은 바 있다<sup>2)</sup>.

가역적인 기도폐쇄와 기관지 과민성, 기도의 부종, 호산구성-림파구성 염증을 특징으로 하는 복합적 임상적 증후군인 기관지 천식은 지난 10년간 수많은 중요한 연구를 통하여 초기 기도평활근 수축의 질환으로 정의되었던 개념이 염증 매개체(inflammatory mediator), 신경계(nervous system) 그리고 각종 효과세포(effector cells)의 복합적 상호작용에 의한 병리현상으로 변화되어 왔고 특히 기도 염증에 대한 병리작용이 중요하게 인식되었다<sup>3)</sup>.

최근 기관지 천식에 대하여 韓醫學에서는 단미 및 복합 처방을 이용하여 염증반응이나 면역기능에 관한 동물실험<sup>4)5)</sup>이 있었고, 분자생물학적 실험기법을 도입하여 cytokines과 chemokines에 대한 한약의 효능에 대한 실험연구<sup>6)14)</sup>가 계속되어 왔다.

金銀花에 대해서는 그람 양성 및 그람음성균에 대한 항균작용에 관한 연구<sup>15)</sup>, 세포분열 및 세포성장대 대한 촉진작용과 抗突然變異原성에 대한 연구<sup>16)</sup>, 약침액의 항종양작용<sup>17)</sup>과 암세포 성장저해 효과에 관한 연구<sup>18)</sup>, 그리고 金銀花의 림프구 활성화에 관한 연구<sup>19)</sup>, 항염증 작용<sup>20)</sup> 및 Mouse 망내계의 탐식활성화 작용과 모세혈관투과 억제 작용에 대한 연구<sup>21)</sup> 등이 있었다.

한편, 白芍藥에 대해서는 항혈전작용에 대한 연구<sup>22)</sup>와 白芍藥藥鍼의 위궤양에 미치는 면역조직학적 연구<sup>23)</sup>, 白芍藥 조다당분획의 면역증진 특성에 대한 연구<sup>24)</sup> 등이 있었다.

氣管支 上皮細胞는 platelet activating factor, prostaglandin, Interleukin(이하 IL)-1, IL-6, IL-8, granulocyte macrophage colony stimulating factor(이하 GM-CSF), Tumor necrosis factor- $\alpha$ (이하 TNF- $\alpha$ ), 그리고 macrophage chemotactic protein-1 등 많은 proinflammatory cytokine을 분비하며, 분비된

cytokine은 다시 氣道粘膜에 작용하여 氣道粘膜의 炎症을 더욱 심하게 하는 것으로 보고되고 있다<sup>25)</sup>. 따라서 喘息의 治療의 한 방법으로 上皮細胞에서 분비되는 이들 cytokine들이 투여된 약제에 의해 어떻게 조절되는지를 확인하는 것도 중요하다.

이에 喘息의 발생에 중요한 역할을 하는 cytokines을 대상으로 이들의 轉寫의 變化를 관찰하고자, 金銀花와 白芍藥을 이용하여 BEAS-2B 人間 氣管支 上皮細胞柱에서 炎症誘發 cytokine인 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )에 의해 유도된 IL-6, IL-16, GM-CSF의 發顯에 미치는 영향을 RT-PCR로 觀察하였다.

## 실험

### 1. 재료 및 동물

#### 1) 세포주

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

#### 2) 배지 및 시약

세포배양에 필요한 medium인 Bronchial Epithelial Cell Basal Medium(BEBM)과 growth factor인 Bronchial/Tracheal Epithelial Cell Groth Medium(BEGM) Bulletkit은 미국회사(BioWhittaker, Inc. Walkersville, MD, U.S.A.)에서 구입하였다. RNA의 정제를 위하여 TRIzol(Invitrogen, U.S.A.), phenol:chloroform premixed isoamyl alcohol(Ameresco, Ohio, U.S.A.), DEPC water(Amvion, U.S.A.), TAE buffer(BIO-RAD, U.S.A.)를 사용하였다. TNF- $\alpha$ 는 Roche(Germany)에서 구입하였으며, PCR에 사용된 primer는 바이오니아(주)(청원, 대한민국)에서 주문 제작하였다. One step RNA PCR kit(Takara, Japan)를 사용하여 RT-PCR을 하였다.

#### 3) 약제

본 연구에 사용된 약제는 경희의료원 한방병원에서 구입한 후 경희대학교 방제학교실에서 외부형태를 확인 후 정선하여 실험에 사용하였다.

(1) 金銀花(*Lonicerae Flos*) 50g

(2) 白芍藥(*Paeoniae Radix*) 50g

2. 방법

1) 검액의 조제

金銀花와 白芍藥 각 50g을 각각 정확하게 중량을 측정 후 환류추출기에 1차 증류수 1,000mL와 함께 넣은 뒤 100℃ 가까이 온도가 상승하여 탕액이 끓는 시점으로부터 2시간동안 가열하여 추출한 다음, filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 각각의 동결건조 추출물은 金銀花 9.7g과 白芍藥 11.2g을 얻었으며, 수율은 金銀花 19.4%와 白芍藥 22.4% 이었다. 동결 건조한 추출물들을 세포배양액에 투입시 정량을 3차 증류수에 녹인 후 Syringe Filter 하여 사용하였다.

2) 세포배양

BEAS-2B 세포는 37℃, 5%의 이산화탄소의 존재 하에 BEBM medium에서 배양하였으며 2~3일에 한 번씩 1/2로 나누어 배양하였다. 최종단계에서 세포를 collagen (Type I)으로 사전 처리된 75T flask로 옮겨 36시간 동안 성장시켰다(80~90% 성장). 약제를 TNF-α(10ng/mL)와 함께 처리하여 24시간 후, 배양액을 제거하고 살아있는 세포에 TRIzol을 직접 처리하여

RNA정제에 사용하였다.

3) mRNA의 준비와 RT-PCR analysis

TNF-α(최종농도 10ng/mL)와 함께 정량의 검액을 세포에 처리하고 24시간 후에 각 75T flask에서 RNA를 분리하고 one step RNA PCR kit을 사용하여 PCR을 하였다. IL-6, IL-16, GM-CSF의 mRNA의 정량화를 위하여 발현된 β-actin의 m-RNA 발현을 internal standard로 하였다. RT-PCR 실험에 사용된 조건은 시약 제공회사에서 제시된 과정을 따랐다. 모든 실험은 별개의 실험을 세 번 이상 반복하여 그 결과를 평균하였다. PCR에 사용된 primer의 서열과 조건은 다음의 Table 1과 같다.

4) 전기영동과 영상분석

PCR산물은 ethidium bromide (0.5µg/mL)가 함유된 2% Aga gel(TAE 완충용액)로 100V하에서 35분간 전기영동 하였다. 분리된 띠를 UV의 조사하에서 밝기를 영상획득 장치로 디지털화 한 후(Gel Doc 2000, BIO-RAD, U.S.A.) 정량화 하였다.

5) 통계처리

실험성적은 3회 이상의 독립적인 실험에서 얻어진 결과를 통계처리하여 평균치±표준편차(Mean±SD)로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이를 검정할 때에는 Student's t-test로 검정하여 p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

Table 1. Sequences for Polymerase Chain Reaction and Conditions

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

### 실험 결과

1. 金銀花의 IL-6, IL-16 및 GM-CSF의 발현에 미치는 효과

1) 金銀花가 IL-6 mRNA 발현에 미치는 효과

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 IL-6의 발현을  $91.9 \pm 37.4\%$ 로 보여주었다. 0.1mg/mL, 0.5mg/mL, 1.0mg/mL의 金銀花群에서는  $110.8 \pm 46.6\%$ ,  $95.8 \pm 32.5\%$ ,  $94.4 \pm 32.5\%$ 로 각각 나타나 유의한 효과가 나타나지 않았다(Table 2, Fig. 1).

2) 金銀花가 IL-16의 mRNA 발현에 미치는 효과

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여  $99.8 \pm 12.9\%$ 의 발현을 보여주었다. 0.1mg/mL, 0.5mg/mL, 1.0mg/mL 농도의 金銀花群에서는  $126.2 \pm 10.4\%$ ,  $99.6 \pm 26.6\%$ ,  $105.2 \pm 22.6\%$ 로 나

타나 유의한 효과가 나타나지 않았다(Table 3, Fig. 2).

3) 金銀花가 GM-CSF의 mRNA 발현에 미치는 효과

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 GM-CSF의 발현을  $65.5 \pm 10.2\%$ 로 보여주었다. 0.1mg/mL, 0.5mg/mL, 1.0mg/mL 농도의 金銀花群에서는  $76.2 \pm 18.8\%$ ,  $69.4 \pm 13.6\%$ ,  $74.7 \pm 11.5\%$ 로 각각 나타나 유의한 효과가 나타나지 않았다(Table 4, Fig. 3).

2. 白芍藥의 IL-6, IL-16, GM-CSF의 mRNA 발현에 미치는 효과

1) 白芍藥이 IL-6의 mRNA 발현에 미치는 효과

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 IL-6의 발현을  $91.9 \pm 37.4\%$ 로 보여주었다. 0.1mg/mL, 0.5mg/mL, 1.0mg/mL 농도의 白芍藥群에서는  $92.3 \pm 37.4\%$ ,  $101.5 \pm 25.3\%$ ,  $105.8 \pm$

**Table 2.** Dose-Dependent Effects of *Lonicerae Flos* on the mRNA Expression Levels of IL-6

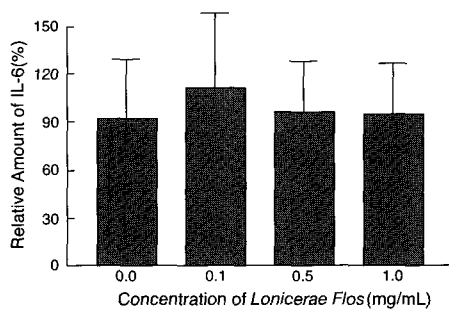
	Concentration of <i>Lonicerae Flos</i> (mg/mL)			
	0	0.1	0.5	1
mRNA Level(%) of IL-6	$91.9 \pm 37.4$	$110.8 \pm 46.6$	$95.8 \pm 32.5$	$94.4 \pm 32.5$
Inhibitory Effect(%)*	-	-20.4	-4.2	-2.6

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

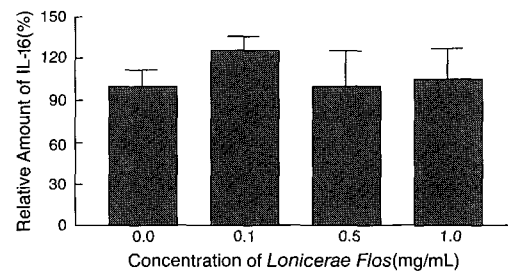
**Table 3.** Dose-Dependent Effects of *Lonicerae Flos* on the mRNA Expression Levels of Interleukin-16

	Concentration of <i>Lonicerae Flos</i> (mg/mL)			
	0	0.1	0.5	1
mRNA Level(%) of IL-16	$99.8 \pm 12.9$	$126.2 \pm 10.4$	$99.6 \pm 26.6$	$105.2 \pm 22.6$
Inhibitory Effect(%)*	-	-26.4	0.3	-5.3

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



**Fig. 1.** Dose-dependent effects of *Lonicerae Flos* on the mRNA expression levels of IL-6.



**Fig. 2.** Dose-dependent effects of *Lonicerae Flos* on the mRNA expression levels of interleukin-16.

**Table 4.** Dose-Dependent Effects of *Lonicerae Flos* on the mRNA Expression Levels of GM-CSF

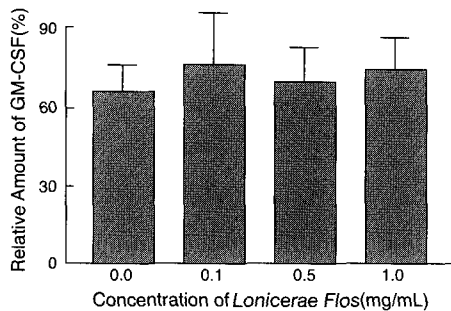
	Concentration of <i>Lonicerae Flos</i> (mg/mL)			
	0	0.1	0.5	1
mRNA Level(%) of GM-CSF	65.5±10.1	76.2±18.8	69.4±13.6	74.7±11.5
Inhibitory Effect(%)*	-	-16.4	-6.1	-14.1

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

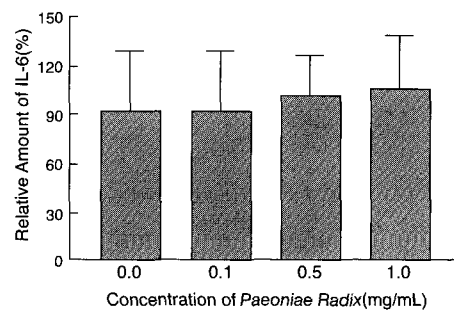
**Table 5.** Dose-Dependent Effects of *Paeoniae Radix* on the mRNA Expression Levels of IL-6

	Concentration of <i>Paeoniae Radix</i> (mg/mL)			
	0	0.1	0.5	1
mRNA Level(%) of IL-6	91.9±37.4	92.3±37.4	101.5±25.3	105.8±33.4
Inhibitory Effect(%)*	-	-0.3	-10.3	-15.0

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



**Fig. 3.** Dose-dependent effects of *Lonicerae Flos* on the mRNA expression levels of GM-CSF.



**Fig. 4.** Dose-dependent effects of *Paeoniae Radix* on the mRNA expression levels of IL-6.

33.4%로 각각 나타나 유의한 효과가 나타나지 않았다(Table 5, Fig. 4).

2) 白芍藥이 IL-16의 mRNA 발현에 미치는 효과

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 IL-16의 발현을 97.7±17.5%로 보여주었다. 0.1mg/mL, 0.5mg/mL, 1.0mg/mL 농도의 白芍藥群에서 103.2±17.1%, 110.9±18.6%, 123.3±3.9%로 나타나 유의한 효과가 나타나지 않았다(Table 6, Fig. 5).

3) 白芍藥이 GM-CSF의 mRNA 발현에 미치는 효과

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 GM-CSF의 발현을 65.5±10.2%로 보여주었다. 0.1mg/mL, 0.5mg/mL, 1.0mg/mL의 白芍藥群에서는 77.1±22.0%, 79.9±11.8%, 81.2±23.0%로 나타나 유의한 효과가 나타나지 않았다(Table 7, Fig. 6).

## 고 찰

기관지 천식은 韓醫學의 呼吸急促하고 喘鳴有聲한 哮喘證의 범주에 속하고<sup>1)</sup>, 哮喘證의 치료법은 風寒을 피하고 厚味를 절제하면서 虛實을 판별하여 扶正 혹은 散邪하되, 發作 前에는 腎에 중점을, 發作 中에는 肺에, 發作 後에는 補中을 위주로 한다. 치료 중에는 涼藥과 熱藥의 사용을 禁하고 初期 外感으로 哮喘證이 發作할 때는 表散시키는 약을 같이 사용하여야 한다<sup>2)</sup>.

기관지 천식은 다양한 刺戟原에 의해 氣道의 急慢性 炎症과 증가된 過敏性을 나타내는 氣道疾患으로 갑작스러운 기침, 呼吸困難, 喘鳴의 증상을 보이면서, 자연히 혹은 치료에 의해 可逆的으로 호전되는 질환이다.

천식에 對한 研究중 分子生物學的의 實驗方法이 도입

**Table 6.** Dose-Dependent Effects of *Paeoniae Radix* on the mRNA Expression Levels of IL-16

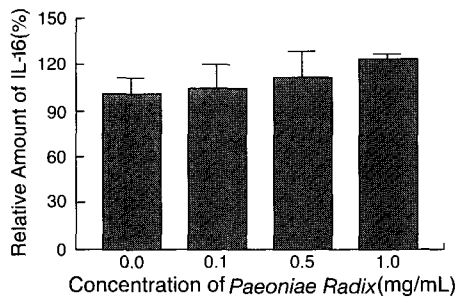
	Concentration of <i>Paeoniae Radix</i> (mg/mL)			
	0	0.1	0.5	1
mRNA Level(%) of IL-16	99.8±12.9	103.2±17.1	110.9±18.6	123.3±3.9
Inhibitory Effect(%)*	-	3.7	-13.3	-23.9

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

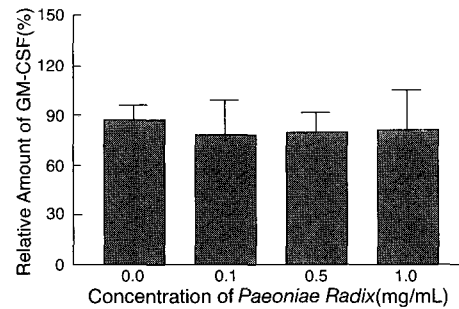
**Table 7.** Dose-Dependent Effects of *Lonicerae Flos* on the mRNA Expression Levels of GM-CSF

	Concentration of <i>Paeoniae Radix</i> (mg/mL)			
	0	0.1	0.5	1
mRNA Level(%) of GM-CSF	65.5±10.2	77.1±22.0	79.9±11.8	81.2±22.9
Inhibitory Effect(%)*	-	-17.7	-22.0	-23.9

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



**Fig. 5.** Dose-dependent effects of *Paeoniae Radix* on the mRNA expression levels of IL-16.



**Fig. 6.** Dose-dependent effects of *Paeoniae Radix* on the mRNA expression levels of GM-CSF.

되면서 炎症反應이나 免疫에 關여하는 여러 cytokines 과 chemokines의 增減을 관찰하여 細胞 단계에서의 조직손상 및 치유과정을 설명하게 되었다<sup>25)</sup>.

韓醫學에서도 分子生物學的인 연구방법을 통한 연구가 進行되었는데, 특히 解表二陳湯<sup>10)</sup>, 小青龍湯<sup>9)</sup>, 瀉白散<sup>12)</sup>, 甘草<sup>8)</sup>, 麥門冬<sup>6,14)</sup>, 五味子<sup>6)</sup>, 杏仁<sup>7)</sup>, 桔梗<sup>10)</sup> 등의 cytokines 發顯抑制에 關한 연구들은 韓藥이 喘息의 炎症 發顯과 關連된 cytokines에 影響을 미쳐 喘息의 治療효과가 있다는 것을 보여주고 있다

천식에 關한 병인으로 기도점막의 염증이 중요시 되고 있으며, 특히 eosinophil의 증가와 eosinophil의 점막침해가 重要할 것으로 생각되고 있다<sup>28)</sup>.

천식환자의 bronchoalveolar lavage fluid(BALF)와 기도점막에서 나타나는 CD4+ T세포의 축적과정은 Interleukin-3(IL-3), IL-4, IL-5 그리고 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)등에

의해 進行된다고 알려져 있으며, 이 물질들은 eosinophil의 증식, 생존연장, 활성화와 이동 등에 關계되는 인자들이다<sup>29,31)</sup>. 따라서 천식은 여러 chemokine에 의한 eosinophil과 CD4+ T세포의 기도축적에 의해 나타난다고 볼 수 있다.

최근 연구에서 기도염증은 상피세포자체에 의해 만성화된다고 보고되었고, 상피세포의 염증은 platelet activating factor<sup>32)</sup>와 prostaglandin<sup>33)</sup> 그리고 IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , macrophage chemotactic protein (MCP)-1 등 proinflammatory cytokine의 분비에 의한 것으로 보고되고 있다<sup>32,33)</sup>. 또한 IL-16은 강력한 CD4+ T세포, 호산구, 단핵구의 화학주성(chemoattractant) 유인 사이토카인이 밝혀져 상피세포의 염증반응에 重要한 역할을 한다고 보고되었다<sup>34)</sup>.

IL-6과 TNF- $\alpha$ 는 喘息의 氣道壁 염증유발 cytokines 으로 알려져 있는데, 특히 IL-6은 氣道 점막의 과증

식과 이상분비물 증가에 관여한다<sup>35</sup>. IL-6 유전자 發顯은 TNF- $\alpha$ 를 이용한 자극 후에 다양한 세포군에서 유도되고, 반면에 스테로이드제제 처리로 감소된다. IL-6을 분비하는 기관지 평활근의 다양한 세포들은 氣道의 염증을 증가시키거나 억제하는데 깊숙이 관여되어 있으나, IL-6의 정확한 역할은 밝혀지지 않았다<sup>35</sup>.

IL-16은 CD4+에 대한 강력한 화학주성(chemoattractant) cytokine으로 분류되며<sup>36</sup>, 호산구와 비만세포 그리고 氣道の 상피세포에서 생산된 후 CD4+ T cell을 모이게 하고 활성화시킨다<sup>37</sup>. IL-16은 histamine, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  등의 자극을 통하여 기관지의 상피세포에서 발현되고<sup>36</sup>, 氣道內 염증유발 세포의 축적에 중요한 역할을 담당한다<sup>37</sup>.

호산구 활성화 cytokine인 GM-CSF는 喘息의 염증과정을 총괄하고, IL-3, IL-5과 더불어 Th2에 의해서 생산되어 氣道の 염증부위에 호산구를 모이게 하고, 이 활성화된 호산구는 조직과 상피세포에 손상을 일으키게 된다<sup>38</sup>. 반대로 호산구는 IL-5와 GM-CSF를 생산하는데<sup>39</sup>, GM-CSF는 과립형성과 호흡기의 섬유화를 유도하여<sup>36</sup>, 심각한 喘息의 비가역적 氣道상태에 대한 원인이 된다<sup>38</sup>. IL-5는 폐에 있어 제한적인 생물학적 기능만을 나타내는 반면 GM-CSF는 다방면에 기능하는 cytokine이기 때문에 GM-CSF의 집중적인 연구도 중요시 된다.

金銀花는 清熱解毒藥으로 항균, 항바이러스, 이노 등의 약리 작용을 가지고 있고, 임상에서는 화농성피부질환, 설사, 감기, 열성질환에 응용한다<sup>40</sup>.

金銀花에 대한 연구를 살펴보면 金銀花의 methanol 추출액은 독성이 거의 없고, 수종의 그람 양성 및 그람 음성균에 항균작용이 있고<sup>15</sup>, 金銀花의 ethyl acetate 분획이 세포분열 및 세포성장에 관여하여 그 작용을 촉진시키고 동시에 抗突然變異原성을 일으키고<sup>16</sup>, 약침액의 항종양작용<sup>17</sup>과 암세포 성장저해 효과에 관한 연구<sup>18</sup> 등이 있다. 그리고 金銀花의 림프구 활성화에 관한 연구<sup>19</sup>, 항염증 작용<sup>20</sup> 및 Mouse 망내계의 탐식활성화 작용과 모세혈관투과 억제 작용에 대한 연구<sup>21</sup> 등이 있었다.

白芍藥은 補血藥으로 補血 緩急止痛작용이 있

며, 실험에 의한 鎮痙, 鎮痛, 鎮靜, 抗菌작용을 확인하였고, 임상적 관찰에서는 止汗, 利尿 등의 작용 등을 볼 수 있다. 臨床에서는 肝脾不和에 의한 腹痛, 血虛에 의한 四肢의 筋肉痙攣, 하복부의 不快感과 疼痛에 사용한다<sup>40</sup>.

白芍藥에 대하여 항혈전작용에 대한 연구<sup>22</sup>와 白芍藥약침의 위궤양에 미치는 면역조직학적 연구<sup>23</sup>, 白芍藥 조다당분획의 면역증진 특성에 대한 연구<sup>24</sup> 등이 있었다.

이 연구는 臨床에서 喘息治療 處方に 加해지는 金銀花와 白芍藥을 分子生物學的인 방법을 통하여 기도의 炎症過程에 필수적으로 관여하는 cytokines의 활성화에 어떤 作用을 하는지 규명하여 새로운 치료약물의 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

이에 喘息의 발생에 중요한 역할을 하는 cytokines을 대상으로 이들의 轉寫의 變化를 관찰하고자, 金銀花와 白芍藥을 이용하여 BEAS-2B 人間 氣管支上皮細胞柱에서 炎症誘發 cytokine인 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )에 의해 유도된 interleukin mRNA의 發顯에 미치는 영향을 RT-PCR로 조사하여 이들 cytokines의 發顯을 살펴보고자 한다.

金銀花가 BEAS-2B 人間 氣管支上皮細胞柱에서 IL-6, IL-16 및 GM-CSF mRNA의 발현에 미치는 효과를 살펴보면, 金銀花 농도 0.1mg/mL, 0.5mg/mL, 1.0 mg/mL에서 IL-6 mRNA 발현, IL-16의 mRNA 발현, GM-CSF의 mRNA 발현에 모두 유의한 효과가 없는 것으로 나타났다(Table 2-4, Fig. 1-3).

金銀花와 관련된 염증과 면역에 관련된 연구를 살펴보면 이<sup>19</sup>가 金銀花는 림프구 세포의 증식을 억제하여 접촉성 피부염을 억제함을 확인하였고, 이들 T 세포의 작용을 억제함으로써 접촉성 과민반응을 억제하는 것으로 보고하였다. 우<sup>21</sup>는 金銀花의 수침액 기스가 mouse 망내계의 탐식작용을 증가하는 작용이 있으며, histamine에 의하여 유발된 모세혈관 투과성을 유의성있게 억제함을 보고 하였고, 한<sup>20</sup>은 金銀花 수침액기스의 혈관투과성억제작용, 육아조직 그리고 낭내 삼출액 형성 억제작용 등 항염증작용을 보고하였다.

이상의 연구결과로 金銀花의 혈과투과성 억제를 통한 항염증작용, 림프구 증식억제 작용 등은 천식치료와 관련하여 유의한 결과가 있을 것으로 생각되었으나, 이번의 BEAS-2B 人間 氣管支上皮 細胞柱에서 IL-6, IL-16 및 GM-CSF mRNA 발현에 대한 실험에서는 유의한 결과를 볼 수가 없었다. 이 연구결과는 金銀花가 천식치료제로 사용하기 부적당하기보다는 氣道 점막의 과증식과 이상분비물 증가에 관여하는 IL-6, CD4+에 대한 강력한 화학주성(chemoattractant) cytokine 인 IL-16, 氣道の 염증부위에 호산구를 모이게 하는 GM-CSF와는 관련없이 다른 작용기전을 통하여 천식과 관련된 항염증 작용이 있는 것으로 생각되며, mast cell, IgE, ICAM-1, VACM-1 등 여러 가지 기전과 관련하여 다양한 방법을 통하여 연구가 진행된다면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

白芍藥이 IL-6, IL-16 및 GM-CSF mRNA의 발현에 미치는 효과를 살펴보면, 白芍藥 농도 0.1mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0mg/mL에서 IL-6 mRNA 발현, IL-16의 mRNA 발현, GM-CSF의 mRNA 발현에 모두 유의한 효과가 없는 것으로 나타났다(Table 5-7, Fig. 4-6).

白芍藥과 관련된 면역에 관한 실험을 살펴보면 白芍藥 조다당분획은 B세포의 증식작용이 있었으나 이 작용은 T 세포 및 대식세포의 도움이 필수적인 것으로 관찰되었고, 白芍藥 조다당분획은 먼저 대식세포를 자극하여 GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 가 생산되고, 이 사이토카인은 다시 T 세포와 대식세포를 활성화시켜 T 세포가 INF- $\gamma$ 와 IL-2를 주로 생산하게 했으며, INF- $\gamma$ 는 다시 B세포와 대식세포를 활성화시키는 것으로 관찰되었다<sup>24)</sup>.

이러한 실험결과는 白芍藥이 T세포중 Th1와 Th2의 구성비에 영향을 미쳐 천식의 치료에 도움이 될 것으로 생각 되었으나 이번의 BEAS-2B 人間 氣管支 上皮 細胞柱에서 IL-6, IL-16 및 GM-CSF mRNA 발현에 대한 실험에서는 유의한 결과를 볼 수가 없었다. 이 연구결과는 白芍藥이 천식치료제로 사용하기 부적당하기보다는 氣道 점막의 과증식과 이상분비물 증가에 관여하는 IL-6, CD4+에 대한 강력한 화학주

성(chemoattractant) cytokine 인 IL-16, 氣道の 염증부위에 호산구를 모이게 하는 GM-CSF와는 관련없이 다른 작용기전을 통하여 천식과 관련된 항염증 작용이 있는 것으로 생각되며, mast cell과 IgE와 관련된 연구, 그리고 기관지 평활근과 관련된 연구가 진행된다면 白芍藥의 천식치료 효과에 새로운 연구 결과가 있을 것으로 생각된다.

### 결론

金銀花와 白芍藥이 천식 세포배양모델에 미치는 효과를 연구하기 위하여 인간의 기관지상피세포에서 기원한 BEAS-2B세포를 TNF- $\alpha$ 로 처리하고, 천식의 염증반응에 중요하다고 알려진 대표적인 cytokine인 IL-6, IL-16 및 GM-CSF의 mRNA 발현에 미치는 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. IL-6 mRNA의 발현은 金銀花, 白芍藥의 농도별 투여에서 유의한 억제효과가 없었다.
2. IL-16 mRNA의 발현은 金銀花, 白芍藥의 농도별 투여에서 유의한 억제효과가 없었다.
3. GM-CSF의 mRNA 발현은 金銀花, 白芍藥의 농도별 투여에서 유의한 억제효과가 없었다.

### 참고문헌

1. 전국한의학대학교 폐계내과학교실편. 東醫肺系內科學. 서울: 한문회사. 2002:178-99.
2. 吉永星, 崔錫鳳, 鄭昇紀, 李珩九. 哮喘證에 關한 臨床的 研究. 大韓韓醫學會誌. 1987;8(2):32.
3. Busse WW, Horwitz RJ, Reed CE. Asthma In: Middleton E, Jr, Ellis EF, Yunginger JW, Reed CE, Adkinson NF, Jr, Busse WW. Allergy principles & practice. 5th ed. St. Louis: Mosby. 1998:838-58.
4. 이준우, 정희재, 정승기, 이형구. 소청룡탕이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포에 미치는 영향. 경희의학. 2001;17(2):242-53.
5. 김진주, 정희재, 정승기, 이형구. 맥문동탕과 정천화담강기탕이 알레르기 천식모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 한의학회지. 2002;23(1):37-49.



6. 李同生, 鄭熙才, 李珩九, 鄭昇杞. 麥門冬과 五味子가 Asthma model 內的 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響. 慶熙醫學. 2000;16(2):69-80.
7. 鄭旭, 鄭熙才, 李珩九, 鄭昇杞. 杏仁과 桔梗이 Asthma model 內的 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響. 大韓韓方內科學會誌. 2000;21(1):31-8.
8. Heo Tae-Seok, Jung Hee-Jac, Rhee Hyung-Koo, Jung Sung-Ki. 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):20.
9. 車恩秀, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九. 小青龍湯이 Asthma model 內的 Cytokine에 미치는 影響. 경희한의대논문집. 2000;23(1):71-88.
10. 白東鎭, 鄭熙才, 李珩九, 鄭昇杞. 解表二陳湯加減方이 Asthma model 內的 Cytokine에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 2000;21(3):3-13.
11. 박상현, 정회재, 정승기, 이형구. 마행감석탕과 길경이 인간기관지 상피세포의 Cytokine에 미치는 영향. *경희의학*. 2001;17(2):230-41.
12. 조일현, 정회재, 이형구, 정승기. 사백산이 천식에 미치는 효능에 관한 분자생물학적 연구. *경희의학*. 2001;17(2):214-29.
13. 주창엽, 황우석, 허태석, 정회재, 정승기, 이형구. 육미지황탕합사백산과 상백피가 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-8, GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. *대한한방내과학회지*. 2001;22(3):415-22.
14. 정해준, 정회재, 정승기, 이형구. 麥門冬淸肺飲과 麥門冬이 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. *대한한의학회지*. 2002;23(1):11-23.
15. 강옥희. 금은화의 약리작용에 관한 연구. 우석대학교 석사학위논문. 1983.
16. 정규찬, 권동린, 백석환, 김성한, 장현욱. 금은화의 ethyl acetate 분획이 돌연변이원성에 미치는 영향. *대한약학회지*. 1988;325:328-33.
17. 김중완, 임종국. 금은화 약침의 항종양 작용 및 생체장기에 대한 영향. *대한침구학회지*. 1999;16(1):255-67.
18. 최혜경, 임종국, 손윤희, 배만중, 남경수. 금은화 약침액의 암세포 성장 저해 효과, 생명자원과 산업. 1998;3:65-73.
19. 이정현. 접촉성 피부염에서 황련, 황련해독탕, 금은화가 림프구 활성화에 미치는 영향. *동아대학교 대학원*. 1999.
20. 한화연. 금은화의 항염증작용에 관한 연구. *숙명여대 대학원*. 1990.
21. 우종오. 금은화 수침액기스의 Mouse網內系의 탐식활성화 작용 및 모세혈관투과억제 작용에 관한 연구. *중앙대 대학원*. 1987.
22. 백영규. 백작약의 항혈전작용에 대한 실험적 연구. *대전대 대학원*. 1998.
23. 박기현, 한상원, 박재현. 백작약약침이 백서의 위궤양에 미치는 면역조직화학적 연구. *대한침구학회지*. 1998;15(2):61-79.
24. 박혜란. 백작약 조다당분획의 면역증진 특성. *충남대 대학원*. 2001.
25. 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.
26. 정승기, 이형구. 哮喘의 原因 및 治法에 關한 研究. *대한한의학회지*. 1986;7(1):60-7.
27. Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Jose PT, Williams TJ. Animal models of asthma, role of chemokines. *Methods in enzymology*. 1997;288:241-66.
28. Sur, S., C. R. Adolphson, and G. J. Gleich. In *Allergy Principles and Practice*, 4th ed. E. Middleton, C. E. Reed, E. F. Ellis, J. N. F. Adkinson, J. W. Yunginger, and W. Busse, editor. Mosby, St. Louis. 1993:169-200.
29. Broide, D. H., G. S. Firestein. Emdobronchial allergen challenge in asthma. Demonstration of cellular source of granulocyte macrophage colony-stimulating factor by in situ hybridization. *J. Clin. Invest*. 1991;88:1048-53.
30. Ebisawa, M., M. C. Liu, T. Yamada, M. Kato, L. M. Lichtenstein, B. S. Bchner, and R. P. Schleimer. Eosinophil endothelial migrations induced by cytokine; II. The potentiation if eosinophil endothelial migration by eosinophil-active cytokines. *J. Immunol*. 1994; 152:4590-7.
31. Kato, M., M. C. Liu, B. A. Stealey, B. Friedman, L. M. Lichtenstein, S. Permutt, and R. P. Schleimer. Production of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in human airways during allergen-induced latephase reactions in atopic subjects. *Lymph. Cytokine Res*. 1992;11:287-92.
32. Holtzman, M. J., B. Ferdman, A. Bohrer, and J. Turk.

- Synthesis of the 1-0-hexadecyl molecular species of platelet-activating factor by airway epithelial and vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;177:357-64.
33. Churchill, L., Chiton, J. H. Risau, R. Bascom, W. C. Hubbard, and D. Proud. Cyclooxygenase metabolism of endogeneous archidonic acid by cultured human tracheal epithelial cells, *Am. res. Respir. Dis.* 1989;140:449-59.
34. Arther Kaser, Stefan Dunzendorfer, Felix A. Offner, Thomas Ryan, Anton Schwabegger, William W. Cruikshank, Christian J. Wiedermann, and Herbert Tilg. A Role for IL-16 in the Cross-Talk Between Dendritic Cells and T Cell. *The Journal of Immunology.* 1999;163:3232-8.
35. Sue McKay, Stuart J. Hirst, Marion Bertrand-de Has, Johan C. de Jongste, Henk C. Hoogsteden, Pramod R. Saxena etc. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Enhances mRNA Expression and Secretion of Interleukin-6 in Cultured Human Airway Smooth Nucle Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23:103-11.
36. M. Arima, J. Plitt, C. Stellato, C. Bickel, S. Motojima, S. Makino, T. Fukuda, and R. P. Schleimer. Expression of interleukin-16 by Human Epithelial cells - iInhibition by Dexamethasone. *Am J respir Cell Mol Biol.* 1999;21:684-92.
37. Martti Laan, Ingemar Qvarfordt, Gerdt C Riise, Bengt A Andersson, Sven Larsson, Anders Linden. Increased levels of interleukin-16 in the airways of tobacco smokers - relationship with peripheral blood T lymphocytes. *Thorax.* 1999;54:911-6.
38. Ferreira MB, Palma Carlos AG. Cytokines and asthma. *J. of investigational allergology and clinical immunology,* 1998;8(3):141-8.
39. C.S. Park, Y.S. Choi, S.y. Ki, S.H. Moon, S.W. Jeong, S.T. Uh, Y.H. Kim. GM-CSF is the main cytokine enhancing survival of eosinophils in asthmatic airway. *Eur Respir J.* 1998;12:872-8.
40. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영중, 이선희. 한약 임상응용. *전통의학연구소.* 1993:123-4, 360-2.