

원 저

## 小青龍湯과小青龍湯加沙蔘이 BEAS-2B 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF mRNA level에 미치는 영향

정진용, 정희재, 정승기, 이형구  
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

### The Inhibitory Effects of *Socheongryong-tang* and *Socheongryong-tang plus Sasam (Adenophorae Radix)* on the IL-6, IL-8 and GM-CSF mRNA Levels in Human Epithelial Cells

Jin-Yong Jung, Hee-Jae Jung, Sung-Ki Jung, Hyung-Koo Rhee

Division of Respiratory System, Dept. of Internal Medicine,  
College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

**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 *Socheongryong-tang* and *Socheongryong-tang plus Sasam (Adenophorae Radix)* on the mRNA expressions of Interleukin (IL)-6, IL-8 and granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) involved in the asthma model.

**Materials and Methods** : In this study, BEAS-2B cell lines, human epithelial cells, were used. These cells were stimulated by tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and histamine for artificial inflammatory expression.  $\beta$ -actin messenger RNA (mRNA) was used for the internal standard. After each 24 hours of the *Socheongryong-tang* (小青龍湯) and *Socheongryong-tang plus Sasam* (小青龍湯加沙蔘) treatment, total cellular RNAs were collected by applying RNazol directly to the living cells. Then the transcriptional activities of IL-6, IL-8 and GM-CSF were measured by RT-PCR with electrophoresis.

**Results** :

In the *Socheongryong-tang* (小青龍湯) study, the mRNA expressions of IL-6, IL-8 and GM-CSF were significantly inhibited compared to that of the control group ( $p < 0.05$ ).

In the *Socheongryong-tang plus Sasam* (小青龍湯加沙蔘) study, the mRNA expressions of IL-6, IL-8 and GM-CSF were significantly inhibited compared to that of the control group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions** : This study shows that *Socheongryong-tang* (小青龍湯) and *Socheongryong-tang plus Sasam* (小青龍湯加沙蔘) have dose-dependent inhibitory effects on the mRNA expressions of IL-6, 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. (*J Korean Oriental Med* 2003;24(1):74-83)

**Key Words**: *Socheongryong-tang* (Xiaoqinglong-tang), *Adenophorae Radix* (沙蔘), asthma, cytokine.

## 서론

기관지천식(이하 천식)은 천명(wheezing), 해수(cough), 호흡곤란(dyspnea)이 주증상을 이루는 증후군으로<sup>1,3)</sup>, 원인이 되는 다양한 자극원에 의해 기도의 급만성 염증과 증가된 과민성으로 인하여 기도의 폐색을 초래하여 갑작스런 발작적 기침, 호흡곤란, 천명의 증상을 보이면서 임상증상이 자연히 혹은 치료에 의해 가역적으로 호전되는 기도질환이며<sup>4)</sup>, 개인에 있어서 유전적 성향이 강하고 유전적인 인자에 노출됨으로써 발병하는 다인자 질환이다.

알레르기성 천식은 천식환자의 약 50%를 차지하며<sup>5)</sup>, 고도의 산업화에 따른 새로운 항원(allergen)의 출현 및 환경공해, 대기오염, 흡연인구의 증가 등으로 인해 천식의 유병율이 증가하고 있으며, 천식으로 인한 사망률도 증가하고 있는 추세다.

천식은 한의학에서 呼吸急促하며 喉中有聲響한 증상을 나타내는 哮喘證, 哮喘證의 범주에 속하는 疾患으로 인식하고<sup>2)</sup>, 임상적으로 哮喘證에 준하여 치료하면서 많은 처방들이 유의성 있는 효과를 보여 왔다<sup>6)</sup>. 최근 한의학에서는 哮喘證에 임상적 효과가 인정된 처방과 개별 한약재를 이용하여 천식에서 나타나는 기도 염증반응에 관여하는 cytokine의 전사 효과를 관찰한 분자생물학적인 연구가 활발하게 진행되고 있다<sup>6,7)</sup>.

小青龍湯은 漢代 張의 《傷寒論》<sup>8)</sup>에 처음 기재된 처방으로 解表散寒, 溫肺化痰, 止咳平喘하는 效能이 있어 風寒客表하고 內有水飲停滯하여 나타나는 惡寒發熱, 無汗, 頭面四肢浮腫, 身體疼痛, 胸痞, 乾嘔, 咳嗽 천식 등에 쓰이며 慢性氣管支炎, 氣管支천식, allergy性 鼻炎, 老人性 肺氣腫 및 氣管支炎 急性發作에서 外感風寒하거나 水飲停滯로 發作하는 경우에 응용할 수 있다<sup>9,10)</sup>.

알레르기 천식의 병인 및 병태생리에는 인체 면역 시스템 중 T-helper type 2 cell(이하 Th2 cell)이 중추적인 역할을 하며, 이와 관련된 cytokine에 대한 연구가 의학계에서 활발하게 진행되고 있다<sup>11,12)</sup>.

천식의 병리기전중 중요 과정인 기도점막의 염증

은 상피세포 자체에 의해 만성화된다<sup>13)</sup>. 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- $\alpha$ (이하 TNF- $\alpha$ ), 그리고 macrophage chemotactic protein-1 등 proinflammatory cytokine을 분비하는데, 이들 cytokine은 기도점막에 작용하여 기도점막의 염증을 더욱 심하게 하는 것으로 보고되고 있다<sup>13)</sup>.

본 연구는 小青龍湯과 小青龍湯加沙蔘을 proinflammatory cytokine(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , histamine)과 동시에 인간 기관지 상피세포에 처리한 후 IL-6, IL-8 및 GM-CSF의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다.

## 실험

### 1. 재료

#### 1) 세포주

ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)사를 통하여 흰 쥐의 adenovirus 12-SV40로 전이된 human airway epithelial 세포주인 BEAS-2B cell line을 사용하였다.

#### 2) 배지 및 시약

LHC-9 계통의 medium과 세포배양에 필요한 growth factor들은 미국회사(BioWhittaker, Inc. Walkersville, MD)에서 구입하였으며 kit로 구입하였다(Bronchial/Tracheal Epithelial Cell Growth Medium BulletKit).

Total RNA의 정제를 위하여 RNAzol™ B를 TEL-TEST, Inc(Texas, USA)로부터 구입하였으며, reverse transcriptase, Taq DNA polymerase, dNTP 등 RT-PCR 관련 시약은 Promega사에서 구입하였다. TNF- $\alpha$ 과 IL-1 $\beta$ 는 Beringer Mannheim, Inc.사에서 구입하였으며, PCR에 사용된 primer는 바이오니아(주)(청원, 대한민국)에서 주문 제작하였다. 언급되지 않은 다른 시약은 Sigma, Co.에서 구입하여 사용하였다.

#### 3) 약제

경희의료원 한방병원 약제과에서 약제를 구입 및

정선하여 사용하였으며, 小青龍湯 1貼의 內容 및 용량은 경희의료원 한방병원에서 발행한 慶熙韓方處方集<sup>14)</sup>을 기준으로 하였다(Table 1, 2).

## 2. 방법

### 1) 검액의 준비

건조된 小青龍湯 200g(5척분량) 및 小青龍湯加沙蔘 230g(5척분량)을 각각 수냉식 응축기가 장착된 전탕기에서 2L의 3차 증류수와 함께 1시간 30분 동안 전탕한 후 상온에 1시간 동안 방치하여 식혔다. 상온의 탱액을 천으로 일차적으로 여과한 후 Whatman paper로 여과하여 침전물을 제거하였다. 여과액을 회전식 증발기를 이용하여 55℃에서 감압 하에서 약 200ml로 농축하였다. 이를 동결건조기로 건조하여 -80℃에 보관하여 실험에 이용하였다.

小青龍湯의 회수량은 8.8g으로 회수율은 4.4%였으며, 小青龍湯加沙蔘의 회수량은 7.1g으로 회수율은 2.7%였다. 세포배양액에 투입시 정량은 medium에 녹인 후 filtering하여 사용하였다.

### 2) 세포배양과 검액의 처리

BEAS-2B세포는 37℃에서 5%의 이산화탄소의 존재 하에서 DMEM/F12 medium에서 배양하였으며 2일에 한번씩 1/2로 나누어 배양하였다. 최종단계에서 세포를 fibronectin과 collagen(Type II)으로 사전 처리된 6 well plate로 옮겨 36시간동안 성장시켰다(80~90%로 성장).

검액 처리 24시간 후, TNF- $\alpha$ (100ng/ml), IL-1 $\beta$

(10ng/ml) 및 histamine(10-6M)을 함께 처리하여 48시간 후 배양액을 제거하고 세포에 RNAzol을 직접 처리하여 total RNA의 분리에 사용하였다. 검액의 농도는 최종농도가 각기 2 $\mu$ g/ml, 40 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml로 되게 처리하였으며 각 실험조건에 관하여 3번을 반복하였다.

세포에 아무런 처리도 하지 않은 군을 정상군(Normal group), 세포에 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 histamine을 처리한 군을 대조군(Control group), 세포에 검액과 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 histamine을 처리한 군을 실험군(Sample group)으로 정하였다.

### 3) mRNA의 준비와 RT-PCR analysis

TNF- $\alpha$ (100ng/ml), IL-1 $\beta$ (10ng/ml) 및 histamine(10-6M)을 세포에 처리하고 48시간 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 및 GM-CSF의 mRNA 발현의 정량화를 위하여  $\beta$ -actin의 mRNA 발현을 internal standard로 하였다. RT-PCR 실험에 사용된 조건은 시약제공회사에서 제시된 과정을 따랐다. PCR에 사용된 primer의 서열과 실험조건은 Table 3와 같다(Table 3).

### 4) 전기영동과 영상분석

PCR산물은 ethidium bromide가 함유된(1 $\mu$ g/ml) 2% 아가젤(TAE 완충용액)로 100V 하에서 15분간 전기영동하여 분리된 띠를 ultraviolet(UV)의 조사하에서 영상화하였으며, 영상획득 장치로 디지털화하여

**Table 1.** Composition & Dosage of Socheongryong-tang(小青龍湯)

Herbs	Scientific name	Dose(g)
麻 黃	<i>Ephedrae Herba</i>	6.0
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	6.0
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	6.0
半 夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	6.0
細 辛	<i>Asari Herba cum Radice</i>	4.0
乾 薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	4.0
桂 枝	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	4.0
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0
Total amount		40.0

**Table 2.** Composition & Dosage of Socheongryong-tang-plus-Sasam(小青龍湯加沙蔘)

Herbs	Scientific name	Dose(g)
麻 黃	<i>Ephedrae Herba</i>	6.0
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	6.0
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	6.0
半 夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	6.0
細 辛	<i>Asari Herba cum Radice</i>	4.0
乾 薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	4.0
桂 枝	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	4.0
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0
沙 蔘	<i>Adenophorae Radix</i>	6.0
Total amount		46.0

**Table 3.** Primer Sequences for Polymerase Chain Reaction and Conditions

	Sequences and the Expected Size	PCR Conditions
$\beta$ -actin :	5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'	94℃, 1min.
	5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'	70℃, 1min.
IL-6 :	600bp	72℃, 2min. 25 cycles
	5'-ATGAACCTCTTCTCCACAAGCGC-3'	94℃, 1min.
	5'-GAAGACCCCTCAGGCTGGACTG-3'	60℃, 1min.
IL-8 :	628bp	72℃, 2min. 30 cycles
	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT	94℃, 1min.
	5'-ATGCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA-3'	60℃, 1min.
GM-CSF :	289bp	72℃, 2min. 30 cycles
	5'-GAGCATGTGAATGCCATCCAGGAG-3'	94℃, 1min.
	5'-CTCCTGGACTGGCTCCCAGCAGTCAAA-3'	55℃, 1min.
	390bp	72℃, 2min. 35 cycles

**Table 4.** Effects of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and Histamine on the mRNA Expression of IL-6, IL-8 and GM-CSF of BEAS-2B compared to the Expression of the Internal Standard

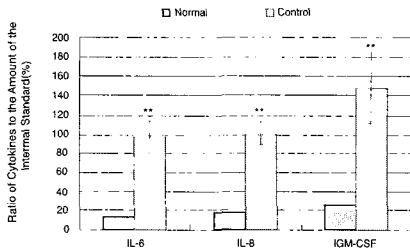
Conditions	The Ratio of mRNA Expression Level(%)		
	IL-6	IL-8	GM-CSF
Normal group	14.10 $\pm$ 6.88 <sup>a)</sup>	18.43 $\pm$ 3.77	26.09 $\pm$ 4.25
Control group	96.25 $\pm$ 17.07 <sup>**</sup>	99.74 $\pm$ 12.15 <sup>**</sup>	147.94 $\pm$ 37.76 <sup>**</sup>

Normal group : untreated group.

Control group : treated with TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and histamine.

a) : Mean  $\pm$  standard deviation.

\*\* Indicates that p values are lower than 0.05 when compared to normal group.



**Fig. 1.** Effects of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and Histamine on the mRNA expression of IL-6, IL-8 and GM-CSF of BEAS-2B cell line.

Normal : untreated group.

Control : treated with TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and histamine.

\*\* Indicates that p values are lower than 0.05 when compared to normal group.

(ImageMaster TotalLab, Amersham Pharmacia Biotech, Inc) 정량화하였다.

#### 5) 통계처리 방법

3회 이상의 독립적인 실험에서 얻어진 결과를 통계 처리하여 평균과 표준편차를 구하였고, 유의성 평가를 위한 대조군과의 비교는 student T test를 이용하였다.

## 결 과

IL-6, IL-8 및 GM-CSF는 BEAS-2B 세포에 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 histamine을 처리하여 발현을 유발시켰다.

### 1. BEAS-2B 세포에 미치는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 및 histamine의 영향

BEAS-2B 세포에 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 histamine을 투여하였을 때 IL-6, IL-8 및 GM-CSF의 발현량은 정상군에 비하여 각각 96.25 $\pm$ 17.07(%)로 6.82배, 99.74 $\pm$ 12.15(%)로 5.41배, 147.94 $\pm$ 37.76(%)로 5.67배 모두 유의한(p<0.05) 증가를 나타내었다(Table 4, Fig. 1).

### 2. 小青龍湯의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF의 발현에 미치는 효과

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 histamine의 최종농도가 100ng/ml, 10ng/ml, 10-6M인 상태에서 BEAS-2B 세포에서 RT-PCR로 유발된 cytokine의 mRNA 발현을 연구하였다. 小青龍湯投與群에서 IL-6은 농도 의존적으로 cytokine의 발현이 억제되지 않았으나, IL-8과 GM-CSF

는 농도 의존적으로 cytokine의 발현이 억제되었다.

IL-6 mRNA의 발현에 있어서 小青龍湯을 2μg/ml 투여한 경우에는 78.50±7.67로 18%, 40μg/ml 투여한 경우에는 45.92±28.08로 52% 억제되었으나 유의성은 없었다. 반면에 100μg/ml 투여한 경우 대조군에 비해 49.99±22.25로 48%(p<0.05)의 유의성있는 증가억제효과를 보였다(Table 5).

IL-8 mRNA의 발현에 있어 小青龍湯을 2μg/ml 투여한 경우에는 73.20±13.04로 27%, 40μg/ml 투여한 경우에는 70.32±16.66으로 29% 억제되었으나 유의성은 없었다. 반면에 100μg/ml 투여한 경우 대조군에 비해 53.13±22.42로 47%(p<0.05)의 유의성있는 증가억제효과를 보였다(Table 5).

GM-CSF mRNA의 발현에 있어 小青龍湯을 2μg/ml 투여한 경우에는 112.23±43.02로 24% 억제되었고, 40μg/ml 투여한 경우에는 101.52±37.78로 31% 억제되었으나 유의성은 없었다. 반면에 100μg/ml 투여한 경우 대조군에 비해 65.73±31.47로 56%(p<0.05)의 유의성있는 증가억제효과를 보였다(Table 5).

### 3. 小青龍湯加沙蔘의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF의 발현에 미치는 효과

TNF-α, IL-1β 및 histamine의 최종농도가 100ng/ml, 10ng/ml, 10-6M인 상태에서 BEAS-2B 세포에서 RT-PCR로 유발된 cytokine의 mRNA 발현을 연구하였다.

小青龍湯加沙蔘投與群에서 IL-6, IL-8 및 GM-CSF

는 농도 의존적으로 cytokine의 발현이 억제되었다.

IL-6 mRNA의 발현에 있어 小青龍湯加沙蔘을 2μg/ml 투여한 경우에는 86.01±12.16으로 11%, 40μg/ml 투여한 경우에는 86.01±12.16으로 30% 억제되었으나 유의성은 없었다. 반면에 100μg/ml 투여한 경우에는 39.49±10.20으로 59%(p<0.01)의 유의성 있는 증가억제효과를 나타내었다(Table 6).

IL-8 mRNA의 발현에 있어 小青龍湯加沙蔘을 2μg/ml 투여한 경우에는 80.49±9.63으로 19% 억제되었으나 유의성은 없었다. 반면에 40μg/ml 투여한 경우에는 61.43±7.80으로 38%(p<0.01), 100μg/ml에서는 56.55±10.83으로 43%(p<0.01)의 유의성 있는 증가억제효과를 나타내었다(Table 6).

GM-CSF mRNA의 발현에 있어 小青龍湯加沙蔘을 2μg/ml 투여한 경우에는 96.55±12.07로 35% 억제되었으나 유의성은 없었다. 반면에 40μg/ml 투여한 경우에는 77.48±12.02로 48%(p<0.05), 100μg/ml 투여한 경우에는 57.09±15.19로 61%(p<0.05)의 유의성 있는 증가억제효과를 나타내었다(Table 6).

## 고찰

천식은 천명(wheezing), 해수(cough), 호흡곤란(dyspnea)등 기관지와 관련된 이상증상들이 주증상을 이루는 증후군으로<sup>1-3)</sup>, 원인이 되는 다양한 자극원에 의해 기도의 급만성 염증과 증가된 과민성으로

**Table 5.** Dose-Dependent Effects of *Socheongryong-tang*(小青龍湯) on the mRNA Expression Levels of Interleukin-6(IL-6), Interleukin-8(IL-8) and Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor(GM-CSF) in BEAS-2B Cells

Concentrations of <i>Socheongryong-tang</i> (μg/ml))		The Ratio of mRNA Expression Level(%)		
		IL-6	L-8	GM-CSF
Control group		96.25±17.07 <sup>a)</sup>	99.74±12.15	147.94±37.76
Sample	2	78.50 ± 7.67	73.20 ± 13.04	112.23 ± 43.02
group	40	45.92 ± 28.08	70.32 ± 16.66	101.52 ± 37.78
	100	49.99 ± 22.25*	53.13 ± 22.42*	65.73 ± 31.47*

Control group : treated with TNF-α, IL-1β and histamine.

2 : treated with *Socheongryong-tang* 2μg/ml, TNF-α, IL-1β and histamine.

40 : treated with *Socheongryong-tang* 40μg/ml, TNF-α, IL-1β and histamine.

100 : treated with *Socheongryong-tang* 100μg/ml, TNF-α, IL-1β and histamine..

<sup>a)</sup> : Mean ± standard deviation.

\* Indicates that p values are lower than 0.05 when compared to control group.

**Table 6.** Dose-Dependent Effects of *Socheongryong-tang-plus-Sasam*(小青龍湯加沙蔘) on the mRNA Expression Levels of Interleukin-6(IL-6), Interleukin-8(IL-8) and Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor(GM-CSF) in BEAS-2B Cells

Concentrations of <i>Socheongryong-tang-plus-Sasam</i> (μg/ml)	Control group	The Ratio of mRNA Expression Level(%)		
		IL-6	L-8	GM-CSF
Sample group	2	96.25 ± 17.07 <sup>a</sup>	99.74 ± 12.15	147.94 ± 37.76
	40	86.01 ± 12.16	80.49 ± 9.63	96.55 ± 12.07
	100	66.95 ± 31.04	61.43 ± 7.80**	77.48 ± 12.02*
		39.49 ± 10.20**	56.55 ± 10.83**	57.09 ± 15.19*

Control group : treated with TNF-α, IL-1β and histamine.

2 : treated with *Socheongryong-tang-plus-Sasam* 2μg/ml, TNF-α, IL-1β and histamine.

40 : treated with *Socheongryong-tang-plus-Sasam* 40μg/ml, TNF-α, IL-1β and histamine.

100 : treated with *Socheongryong-tang-plus-Sasam* 100μg/ml, TNF-α, IL-1β and histamine.

<sup>a</sup> : Mean ± standard deviation.

\* Indicates that p values are lower than 0.05 when compared to control group.

\*\* Indicates that p values are lower than 0.01 when compared to control group.

인하여 기도의 폐색을 초래하여 갑작스런 발작적 기침, 호흡곤란, 천명의 증상을 보이면서 임상증상이 자연히 혹은 치료에 의해 가역적으로 호전되는 기도질환이며, 개인에 있어서 유전적 성향이 강하고 환경적인 인자에 노출됨으로써 발병하는 다인자 질환이다<sup>4)</sup>.

천식 중 알레르기성 천식은 전체 천식환자의 50% 정도를 차지하며<sup>3)</sup>, 최근 알레르기疾患은 지속적으로 증가하고 있으나 그 원인을 유전적인 측면만으로는 설명하기 어려워 환경의 중요성이 대두되고 있다<sup>15,16)</sup>. 일반적으로 생활환경이 향상되면서 알레르기 질환의 빈도가 증가하고 있다<sup>17)</sup>.

한의학에서 천식은哮喘證,哮吼證의 범주에 속하는 질환<sup>2)</sup>으로,鄭<sup>18,19)</sup>은哮喘의 원인에 대해서內傷과外感 및 內在的인 素因에 대해서 언급하였으며, 또한 장부적으로는 호흡과 관련있는肺腎이 원인이 됨을 설명하고 있다.

小青龍湯은 漢代 張의《傷寒論》<sup>8)</sup>에 처음 기재된 處方으로 解表散寒, 溫肺化痰, 止咳平喘하는 效能이 있어 風寒客表하고 內有水飲停滯하여 나타나는 惡寒發熱, 無汗, 頭面四肢浮腫, 身體疼痛, 胸痞, 乾嘔, 咳嗽 천식 등에 쓰이며 慢性氣管支炎, 氣管支천식, allergy性 鼻炎, 老人性 肺氣腫 및 氣管支炎 急性發作에서 外感風寒하거나 水飲停滯로 發作하는 경우에 응용할 수 있다<sup>9,10)</sup>. 즉 太陽(經)은 命門火에 根據를 둔 三焦의 氣化作用과 心火가 水와 交和과 그 上升力이 氣化作

用으로 化하는데 힘입어 寒水의 氣를 全身의 肌表로 運行하여 陽을 敷布하는 것이므로 이 表가 不利하면 또한 全身의 氣化作用도 不利하게 되어 水毒이 停滯하게 되는 것이니 이 小青龍湯은 水毒이 心下에 停滯하여 여러 가지 病變을 일으키는 것을 治療하는 處方인 것이다<sup>20)</sup>.

小青龍湯의 構成藥物 중 麻黃과 桂枝의 辛溫은 太陽을 從하여 侵入한 外束의 寒邪를 表에서 發散시킴인 것이요, 細辛은 寒氣에 退하여 少陰으로 入한 裏의 水인 濁飲을 下降하면서 그 辛溫의 通陽作用은 「辛以潤之」의 性を 發揮하여 水中의 陽이 肝木을 生하는 뜻으로써 一陽을 進하게 하는 것이며, 乾薑은 寒水에 沈滯된 中土를 溫和하게 하여 元陽을 促進함과 아울러 그 中土의 힘을 발휘케 하므로 亂動의 水를 定하여 歸處로 流하도록 함인 것이요, 半夏는 中宮의 寒水를 제거함과 아울러 寒滯된 竅를 通하고 逆을 降하게 함이며, 五味子の 酸과 芍藥의 酸苦는 經에서 말한 酸苦湧泄의 뜻으로써 麻黃, 桂枝, 細辛, 半夏, 乾薑에 의해 發揮되는 宣揚作用이 다시 下降作用으로 化하게 함을 도와 순조로운 上升과 순조로운 下降으로 津液을 지나치게 消耗하지 않게 하면서도 老廢된 濁飲은 그 歸處를 향하여 신속하게 내려가도록 함인 것이며, 甘草의 甘溫한 中和의 德은 諸藥의 急暴을 緩하고 調하여 病邪와 水飲이 互結된 곳을 골고루 解하게 하면서도 元氣의 損傷을 방지하며 半

夏, 乾薑과 合流하여 中宮의 元陽을 補助하니, 中宮의 轉運과 上下와 半表半裏의 轉樞와 末梢의 開達이 그 全身으로 調和되는 權衡을 得하게 되어 無形의 邪氣는 肌表를 從하여 解散하고 有形의 水飲은 水道를 따라서 潤下하는 것이다<sup>20)</sup>.

이상을 요약하여 보면 小青龍湯 처방중의 麻黃과 桂枝는 發汗解表하고 宣肺平喘하며, 白芍藥은 桂枝와 배합하여 營衛를 調和하고, 乾薑과 細辛은 溫肺化飲하고 辛散風寒하며, 五味子は 溫斂肺氣하고 止咳하여 肺氣의 耗散을 방지하며, 半夏는 燥濕化痰하고, 甘草는 諸藥을 調和하여<sup>40,42)</sup> 傷寒兼裏水飲證에 散寒解表하고 化飲平喘하는 方劑가 되므로 천식의 급성기에 응용하기가 좋으며 哮喘證 치료에 가장 적합한 처방의 하나라 할 수 있다<sup>21)</sup>.

沙蔘은 桔梗科에 속하는 다년생 초목인 잔대(Adenophora triphylla var. japonica HARA)의 뿌리를 가을에 채취하여 건조한 것으로 性は 微寒無毒하고 味는 甘하며, 肺經와 胃經으로 들어가 養陰清肺 祛痰止咳하여 肺熱燥咳 虛勞久咳 乾咳稠痰 傷陰咽乾喉痛하는 작용이 있다<sup>21)</sup>. 本品은 肺胃傷陰으로 인하여 熱이 있는 者에게 마땅하므로 虛寒에 속한 證에는 복용해서는 안된다고 하였는데 이것으로 보아 염증을 치료하는 작용이 있음을 알 수 있다<sup>21)</sup>.

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<sup>22)</sup>, 이런 염증세포(inflammatory cell)의 존재는 천식환자의 기도내에서 증가된 cytokines의 존재로 알 수 있다<sup>23)</sup>.

많은 연구에서 이러한 세포단계의 반응에 어떤 cytokines나 chemokines이 관여하고 있는지를 계속적으로 보고하고 있으며, 각종 치료 제제를 투여함으로써 그러한 기전에 변화를 초래하는 기전들을 구체적으로 제시하고 있다.

Griffiths-Johnson 등<sup>24)</sup>은 천식의 동물실험 모델을

보다 구체화시키는 방법의 일환으로 분자생물학적 기법을 도입하여 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8 및 IFN- $\gamma$ , MCP-1(monocyte chemotactic protein-1), MIP-1 $\alpha$ (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ), GM-CSF(granulocyte macrophage colony stimulating factor), TNF- $\alpha$  등의 chemokines들을 측정함으로써 새로운 영역을 구축하였음을 종합적으로 보고하였다.

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 세포단계에서의 조직손상 및 치유과정을 설명하고 있다<sup>24,25)</sup>.

천식을 비롯한 allergy 질환에서의 염증반응은 immunoglobulin E(IgE)의 과도한 생성과 백혈구, 특히 호산구(eosinophil)의 대량 유입으로 특징 지워진다<sup>26,27)</sup>. IgE의 합성은 유전, 항원 노출 및 T 림프구 cytokine에 의해 조절되며 특히 Th2 림프구는 IL-4와 IL-5의 분비를 통하여 IgE 생산과 호산구의 풍부한 염증반응을 촉진한다<sup>26,27)</sup>. 호산구는 IL-4에 의하여 염증반응 시에 나타나는 특별한 과립구로 IL-5에 의하여 활성화된다. Allergy 반응에서 호산구는 IgE에 의한 항체 의존성 세포매개 세포독성에 의하여 조직상해를 일으킨다<sup>28)</sup>.

기관지천식에서는 자극(challenge) 후 15-30분 사이에 기도 수축이 오는 조기반응과 약 40%의 환자에서 4-24시간 사이에 나타나는 후기반응을 관찰할 수 있다<sup>29)</sup>. 조기 반응시에 비만세포(mast cell) 표면의 IgE에 항원이 결합하면 세포내 2차 신호전달물질을 활성화시킨다. 활성화된 비만세포와 호염기구(basophil)는 histamine, 지질매개물질인 Prostaglandin D2, Leukotriene C4, Leukotriene D4, Leukotriene E4, 및 TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 등의 cytokine과 같은 매개물질을 생산한다. Histamine과 지질매개물질은 혈관누출, 혈관확장 및 기관지 수축과 같은 즉시형 과민반응의 초기 과정을 담당하며 cytokine은 후기 단계 반응을 매개한다<sup>28)</sup>. 후기반응이 있는 환자의 6시간 후 BALF

와 조직에서 호산구가 주로 관찰됨을 알 수 있다. 천식 환자의 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)에서 Major basic protein(MBP), Eosinophil cationic protein(ECP), Eosinophil peroxidase(EPO), Eosinophil-derived neurotoxin(EDN) 등 호산구 과립성 매개물질이 증가됨을 알 수 있다<sup>29)</sup>.

T helper(Th) 림프구는 cytokine의 분비 양상에 따라 Th1, Th2 림프구로 나뉘어진다. Th1 림프구는 주로 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ 를 생산하며 지연형 과민반응, 결핵균이나 바이러스에 대한 방어작용, 종양에 대한 숙주반응에 관여한다. Th2 림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며 즉시형 과민반응, 기관지천식과 같은 allergy성 질환, 기생충 감염에 대한 방어작용 등에 관여한다. Th1 림프구와 Th2 림프구는 서로 길항작용을 나타내어 Th1 림프구의 기능이 항진되면 Th2 림프구의 기능이 억제되는 현상이 관찰되며 allergy성 기관지천식 환자의 BALF에서는 Th2 림프구의 기능이 활성화됨이 관찰되고 있다<sup>26,29,30)</sup>.

기관지천식에서 cytokine 분비에 의한 면역 반응은 병태 생리에 가장 중요한 기전이다. 즉 T 림프구에서 분비되는 cytokine 중 IL-4, IL-13은 IgE 형성을 촉진시키고 IL-5, GM-CSF, IL-3는 호산구 침윤 및 활성화에 중요하며 IL-3, IL-9는 비만세포 증식에 관여한다. 이외에도 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 등은 여러 가지 염증 세포의 이동, 염증매개물질 분비, 유착물질 발현 등을 억제한다<sup>31)</sup>.

이들 염증관련 cytokine 중 이번 실험에서 변화를 관찰하고자 하는 cytokine은 기관지 상피세포에서 발현되는 IL-6, IL-8, GM-CSF이다.

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 이상 분비물 증가에 관여한다. IL-6 유전자 발현은 TNF- $\alpha$ 를 이용한 자극 후에 다양한 세포군에서 유도되고, 반면에 스테로이드제제 치료로 감소된다. 천식이나 다른 호흡기 질환에서 기관지 평활근으로부터 분비되는 IL-6의 정확한 역할은 밝혀지지 않았지만, IL-6

을 분비하는 기관지 평활근의 다양한 세포들은 기도의 염증을 증가시키거나 억제하는데 깊숙이 관여되어 있다<sup>32)</sup>.

IL-8은 중성구(neutrophil)의 화학주성인자(chemo-attractant)로서 기도에 중성구를 축적시킨다. 세균감염은 기도 상피세포 표면에 IL-8의 발현을 유도하여, 중성구를 기도로 모이게 한다<sup>33)</sup>. IL-8은 기도에 중성구 염증을 일으키고, 천식의 특징인 기도과민성 유발에 중요한 역할을 한다<sup>34)</sup>.

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<sup>35,36)</sup>. 호산구는 천식 염증 반응에서 중추적인 역할을 담당하는데, 후기단계반응(late-phase response) 및 기관지 과민성과 연관이 있다<sup>35)</sup>. GM-CSF는 이러한 호산구의 과립형성과 호흡기의 섬유화 작용을 유도하여, 심각한 천식에 있어 비가역적인 기도상태를 유발하는 원인이 된다<sup>35,37)</sup>.

천식에 있어서 IL-6, IL-8 및 GM-CSF가 기도의 염증을 유발하므로, 이들 cytokine의 발현을 억제시킬 수 있다면, 천식의 악화과정에서 중요한 역할을 하는 기도의 염증양상 및 염증성 매개인자의 발생과 발현을 억제시킬 수 있어 천식의 치료에 일정한 역할을 할 수 있을 것이다. 이에 본 연구에서는 小青龍湯 및 小青龍湯加沙蔘을 이용해 이러한 cytokine을 조절하는지 여부를 실험을 통해 분석하였다.

실험결과를 살펴보면, 小青龍湯投與群에서는 IL-6, IL-8 및 GM-CSF mRNA의 발현이 2 $\mu$ g/ml에서는 각각 약 18%, 27%, 24% 정도 억제되었고, 40 $\mu$ g/ml에서는 각각 약 52%, 29%, 31% 정도 억제되었으나 통계적 유의성은 없었다. 그러나 100 $\mu$ g/ml에서는 각각 약 48%(p<0.05), 47%(p<0.05), 56%(p<0.05) 정도로 억제되어 유의성 있는 증가억제효과를 나타내었다.

小青龍湯加沙蔘投與群에서는 IL-6, IL-8 및 GM-CSF mRNA의 발현이 2 $\mu$ g/ml에서는 각각 11%, 19%,



35% 억제되었으나 유의성은 없었으며, 40 $\mu$ g/ml에서는 IL-6은 유의성이 없었으나, IL-8과 GM-CSF mRNA의 발현에 대해서는 각각 약 38%( $p<0.01$ ), 48%( $p<0.05$ ) 정도로 유의성 있는 증가억제효과를 보였다. 100 $\mu$ g/ml에서는 각각 약 59%( $p<0.01$ ), 43%( $p<0.01$ ), 61%( $p<0.05$ )로 유의성 있는 증가억제효과를 보였다.

이상의 실험 결과는, 小青龍湯과 小青龍湯加沙蔘이 천식의 병태생리에서 중요한 역할을 하는 염증 유발인자 cytokine인 IL-6, IL-8 및 GM-CSF의 mRNA 발현에 있어서 유의성 있는 증가억제효과를 보이고 있으므로 小青龍湯과 小青龍湯加沙蔘이 기관지천식과 관련된 이상증상치료에 적용할 수 있는 처방으로 사려된다.

### 결론

小青龍湯 및 小青龍湯加沙蔘이 천식에 미치는 효과를 연구하기 위하여 인간 기관지상피세포에서 기원한 BEAS-2B cell에 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 histamine과 한약 전탕액의 추출물을 투여하여 IL-6, IL-8 및 GM-CSF의 mRNA 발현에 미치는 영향을 살펴 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. IL-6의 mRNA 발현이 小青龍湯投與群의 경우 농도의존적으로 증가억제되었으며, 100 $\mu$ g/ml 농도에서만 유의성( $p<0.05$ ) 있는 증가억제효과를 보였다. 小青龍湯加沙蔘投與群의 경우 농도의존적으로 증가억제되었으며, 100 $\mu$ g/ml 농도에서만 유의성( $p<0.05$ ) 있는 증가억제효과를 보였다.
2. IL-8의 mRNA 발현이 小青龍湯投與群의 경우 농도의존적으로 증가억제되었으며, 100 $\mu$ g/ml 농도에서만 유의성( $p<0.05$ ) 있는 증가억제효과를 보였다. 小青龍湯加沙蔘投與群의 경우 농도의존적으로 증가억제되었으며, 40 $\mu$ g/ml와 100 $\mu$ g/ml 농도에서만 유의성(각각  $p<0.01$ ,  $p<0.01$ ) 있는 증가억제효과를 보였다.
3. GM-CSF의 mRNA 發顯이 小青龍湯投與群의 경우 농도의존적으로 증가억제되었으며, 100 $\mu$ g/ml

농도에서만 유의성( $p<0.05$ ) 있는 증가억제효과를 보였다. 小青龍湯加沙蔘投與群의 경우 농도의존적으로 증가억제되었으며, 40 $\mu$ g/ml와 100 $\mu$ g/ml에서만 유의성(각각  $p<0.05$ ,  $p<0.05$ ) 있는 증가억제효과를 보였다.

### 참고문헌

- 1.李文鎬, 全鍾暉, 許仁穆, 金應振. 內科學(下). 서울:學林社. 1986:2043-2044.
- 2.李珩九, 鄭昇杞. 東醫肺系內科學. 서울:아트동방. 1999:162-202.
- 3.韓鏞徹. 臨牀呼吸器學. 서울:一潮閣. 1998:208-225.
- 4.서울대학교 의과대학. 呼吸器學. 서울:서울대출판부. 1997:231.
- 5.吉村永星, 崔錫鳳, 鄭昇杞, 李珩九. 哮喘證에 관한 臨牀的研究. 大韓韓醫學會誌. 1987;8(2):32.
- 6.白東鎮, 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.
- 7.鄭旭, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九. 杏仁과 桔梗이 Asthma model 內的 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響. 大韓內科學會誌. 2000;21(1):31-38.
- 8.張仲景. 仲景全書. 서울:大星文化社. 1989:142-144.
- 9.湯本求真. 皇漢醫學 제1권. 서울:계축문화사. 1995:359-364.
- 10.李尙仁, 金東傑, 李暎鍾, 盧昇鉉, 朱榮丞. 方劑學. 서울:영림사. 1990:50-52.
- 11.Colavita AM, Reinach AJ, Peters SP. Contributing factors to the pathobiology of asthma. The Th1/Th2 paradigm. Clin Chest Med. 2000;21(2):263-277.
- 12.Yssel H, Groux H. Characterization of T cell subpopulations involved in the pathogenesis of asthma and allergic diseases. Int Arch Allergy Immunol. 2000;121(1):10-18.
- 13.Stellato, C., L. A. Beck, G. A. Gorgone, D. Proud, T. J. Schall, S. J. Ono, L. M. Lichtenstein, and R. P. Schleimer. Expression of chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line: modulation by chemokines and glucocorticoids. J. Immunol. 1995;155:410-418.
- 14.경희대부속한방병원. 경희한방처방전. 서울:트윈기획.

- 1997:125.
15. Denise G. Wiesch, PhD, Deborah A. Meyers, PhD, Eugene R. Bleecker, MD. Genetics of asthma. *Journal of allergy clinical immunology*. 1999;104(5):895-901.
  16. R. J. Davies, C. Rusznak, J. L. Devalia. Why is allergy increasing? Environmental factors. *Clinical and Experimental Allergy*. 1998;28(6):8-14.
  17. Heinrich J, Holscher B, Wjst M. Housing conditions and allergic sensitization in children. *Zentralbl Hyg Umweltmed*. 1998;201(3):211-228.
  18. 鄭昇杞. 알레르기 疾患의 韓方療法(천식을 中心으로). *大韓韓醫學會誌*. 1990;11(2):11-15.
  19. 鄭昇杞 李珩九. 哮喘의 原因 및 治法에 關한 研究. *大韓韓醫學會誌*. 1986;7(1):60-67.
  20. 李正來. 東醫要諦眞詮 권2. 대전:도서출판 동양학술원. 1996:707-711.
  21. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울:永林社. 1991:121-125,135-136,334-335,448-449, 540-541,587-588,581-582,622-623.
  22. William W. Busse. Inflammation in asthma-The cornerstone of the disease and target of therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102:17-22.
  23. Judah A. Denburg. The Inflammatory Response. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1996;153:11-13.
  24. Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Jose PT, Williams TJ. Animal models of asthma, role of chemokines. *Methods in enzymology*. 1997;288:241-266.
  25. Carlos AG, Carlos ML, Conceisao SM, Alcinda M. Cytokines and asthma. *J. of investigational allergology and clinical immunology*. 1997;7(5):270-273.
  26. Hogan SP, Foster PS. Cytokines as targets for the inhibition of eosinophilic inflammation. *Pharmacol. Ther*. 1997;74(3):259-283.
  27. Holgate ST. Asthma and allergy-disorders of civilization?, *Q. J. Med*. 1998;91:171-184.
  28. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Saunders. 1997:250-277.
  29. 이양근. 호산구와 천식. *결핵 및 호흡기질환*. 1999; 46(1): 5-16.
  30. Palma Carlos AG, Palma Carlos ML, Conceicao SM, Alcinda M. Cytokines and asthma. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol*. 1997;7(5):270-273.
  31. 이숙영, 윤형규, 신윤. 기관지천식에서 기관지폐포세척액내 IL-10과 기도염증정도의 연관성. *결핵 및 호흡기질환*. 1999;46(1):44-52.
  32. Sue McKay, Stuart J. Hirst, Marion Bertrand-de Has, Johan C. de Jongste, Henk C. Hoogsteden, Pramod R. Saxena. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Enhances mRNA Expression and Secretion of Interleukin-6 in Cultured Human Airway Smooth Muscle Cells. *Am J Resppir Cell Mol Biol*. 2000;23:103-111.
  33. Inoue H. Interleukin-8 and airway inflammation. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 1999;37(9):673-679.
  34. 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):280-282.
  35. Ferreira MB, Palma Carlos AG. Cytokines and asthma. *J. of investigational allergology and clinical immunology*. 1998;8(3):141-148.
  36. Makoto Sato, Hajime Takizawa, Tadashi Kohyama, Takayuki Ohtoshi, Shigeru Takafuji, Shin Kawasaki. Eosinophil Adhesion to Human Bronchial Epithelial Cells - Regulation by Cytokines. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;113:203-205.
  37. Zhou Xing, Todd Braciak, Yuichi Ohkawara, Jean Michel Sallenave, Ronan Foley, Patricia J. Sime. Gene transfer for cytokine functional studies in the lung - the multifunctional role of GM-CSF in pulmonary inflammation. *J Leukoc Biol*. 1996;59:481-488.