

金銀花가 Bleomycin에 의한 肺纖維化에 미치는 影響

이재성, 정희재, 정승기, 이형구
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

The Effects of Lonicerae Flos on bleomycin-induced lung fibrosis

Jae-Sung Lee, Hee-Jae Jung, Sung-Ki Jung, Hyung-goo Rhee

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Objective : Idiopathic Lung Fibrosis(IPF) is chronic fibrotic interstitial pneumonia. The pathogenesis is unclear. Lonicerae Flos is known to prevent the inflammation and reinforce the immune system. The effects of Lonicerae Flos on bleomycin-induced lung fibrosis is evaluated.

Material and Methods : Lonicerae Flos extract was given to the Normal rats, control(bleomycin) rats everyday and treated(bleomycin and Lonicerae flos) rats 21.0 mg per body weight 10g for 14 days. 14 days after, we observed the change of leukocyte count and percentage of IFN-gamma and IL-4 in BALF. and that of Semiquantative histological index(SHI).

Results : Compared to control rats, Lonicerae Flos decreased leukocyte count($P<0.01$) lymphocyte, neutrophil percentage($P<0.05$), SHI($P<0.01$), IFN-gamma and IL-4($P<0.05$) in Treated rats. Otherwise, macrophage percentage was increased($P<0.01$) in Treated rats.

Conclusion : This study showed that Lonicerae Flos reduced the change of inflammatory cells and cytokines in bleomycin-induced lung fibrosis and reduced the fibrosis of tissue. And, we needed many other distinct researches on lung fibrosis.

Key Words: IPF(Idiopathic Pulmonary fibrosis), Lonicerae Flos, bleomycin

1. 緒 論

Bleomycin에 의한 肺損傷 및 肺纖維化 實驗모델은 特發性 肺纖維症 研究에 많이 이용되어왔다. 이러한 bleomycin은 DNA를 분해시키는데, 대부분의 조직들은 bleomycin hydrolase의 활성도가 높지만, 폐와 피부는 이 효소의 활성도가 낮아서 bleomycin 투여 후 독성이 잘 나타난다¹.

肺纖維化에 대한 韓醫學의 研究는 國內에서 드문 실정이고, 中國의 몇몇 文獻들에서 볼 수 있으며,

肺纖維化에 미치는 金銀花의 영향에 관한 研究는 아직 미비한 실정이다. 韓醫學의으로는 肺纖維化를 先天不足으로 正氣虛衰한 狀態에서 外邪에 感하여 肺中の 津液이 損傷되고 肺葉이 枯痿하게 되거나, 慢性的인 喘息이 反復的으로 發作하여 五臟機能失調가 되어 發生한다고 보았다^{2,4}.

肺纖維化는 慢性 纖維化性 間質性 肺炎에 의해 발생하며 組織學的으로 肺實質의 炎症과 纖維化가 特徵적인 疾患이며, 現在까지 그 原因은 정확히 밝혀지지 않고 있다^{5,6}. 肺纖維化는 肺를 侵犯하여 正常組織構造의 缺損 및 collagen으로 이루어진 結合組織이 漫然해지는 疾患으로 볼 수 있다. 이러한 過程은 炎症性 細胞의 肺浸潤, 그리고 TGF- β , Th1 cytokine과 Th2 cytokine의 放出로 結局에는 纖維牙

· 접수 : 2004년 1월 13일 · 채택 : 2004년 3월 10일
· 교신저자 : 이재성, 서울특별시 동대문구 회기동 1
경희의료원 부속한방병원 한방 5내과 의국
(Tel. 02-958-9147 Fax. 02-958-9148 E-mail :
jsje70@hotmail.com)

細胞가 증가되어 結合組織의 合成이 이루어지게 되는 疾患이다⁷.

金銀花는 忍冬科에 속하는 慢性藤本人인 人동당굴 *Lonicerae japonica* Thunb의 花冠으로 性은 寒 無毒하고 味는 甘하며, 肺, 胃, 心經에 들어가서 肺經의 邪熱을 宣散하므로 風熱表證을 治療하는 良品이 된다⁸. 또한 炎症細胞의 減少效果와, 抗菌效果가 있으며⁹, 過敏反應을 抑制하면서도 細胞毒性이 없는 것으로 알려져 있다¹⁰.

이에 西洋醫學의으로 抗炎症作用이 있으며 韓醫學의으로도 熱毒瘡癰을 治療하는 效능을 지닌 金銀花가 bleomycin에 의한 肺纖維化에서 나타나는 백혈구 총수, 백혈구 비율, 조직학적 폐손상 지표, IFN-gamma 및 IL-4를 대상으로 研究觀察하여 의미 있는 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 동물 및 약제

1) 동물 - 본 실험에 사용한 동물은 12주령, 체중 30g 전후의 C57BL/6J계 수컷 생쥐를 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 실험실환경에 1주간 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약제 - 본 실험에 사용된 약제는 金銀花 (*Lonicerae Flos*)로 경희의료원 한방병원 약재과에서 엄선된 약재를 사용하였다.

2. 방법

1) 약물의 조제 및 투여

金銀花(*Lonicerae Flos*) 200g을 증류수 2,000ml와 함께 round flask에 담고 2시간동안 전탕한 다음 1차 여과한 여과액을 감압농축한 후 완전 동결건조시켜 金銀花 물추출 엑기스 63g을 얻었다. 실험동물은 각 군당 6마리씩으로 정상군(normal), bleomycin으로 폐섬유화를 유발시킨 유발군(control) 및 bleomycin으로 폐섬유화 유발과 함께

金銀花 물추출 엑기스 투여군 (sample)으로 나누고, 金銀花 물추출 엑기스는 생쥐 체중 10g당 21.0mg을 14일간 1일 1회 경구투여하였다.

2) 폐섬유화 유발

폐섬유화는 Kremer¹¹ 등, Laxer¹² 등 및 Berkman¹³ 등의 intratracheal instillation (IT) 방법에 따라 bleomycin (Nippon Kayaku, Japan) 용액을 기관 (trachea)을 통하여 직접 폐 속에 주입하는 방법을 사용하였다.

3) 폐세척액 및 폐조직 채취

Bleomycin을 IT방법으로 주입한 14일 후, C57BL/6J 생쥐를 pentobarbital 용액 복강주사로 마취시킨 다음 희생시켰다. 전경부와 흉부를 절개하여 기관과 폐를 노출시키고 기관을 절개한 다음 1ml용 주사기를 기관에 장착하였다. 생리식염수를 사용하여 폐세척액 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF)을 채취하여 IL-4와 IFN-gamma의 측정과 백혈구 총수 및 백혈구의 감별 측정에 사용하였다. 폐세척액을 채취한 직후 폐조직을 분리하여 右肺는 급속히 동결시켜 IL-4 및 IFN-gamma 측정용으로 -80℃ 냉동고에 보관하고, 左肺는 10% buffered neutral formalin 용액으로 고정하여 조직염색용으로 사용하였다.

4) 폐세척액 내 백혈구 총수 및 감별 측정

폐세척액 내 총백혈구 수는 COULTER STKS의 자동혈구계산기로 측정하였으며, 백혈구 감별 측정 (leukocyte differential count)은 자동혈구계산기의 측정치와 함께 폐세척액을 슬라이드에 도말한 다음 Wright 용액으로 염색하고, 현미경하에서 무작위로 100개의 백혈구 중 macrophage, lymphocyte 및 neutrophil의 비율을 측정하여 자료로 사용하였다.

5) 폐조직의 Masson's trichrome 및 H-E 염색

고정된 폐조직을 paraffin 절편하여 폐조직의 조직학적 변화를 관찰하기 위해서는 일반적인 hematoxiline-eosin(H-E)염색을 실시하였으며, 폐조직의 섬유화에 의한 collagen의 침착정도를 관찰하기 위해서는 Masson's trichrome 염색을 실시하였다.

6) 조직학적 폐손상지표(Semiquantitative Histological Index; SHI)의 측정

폐조직의 섬유화 정도 및 조직학적 변화는 Kremer¹¹ 등, Laxer¹² 등, Berkman¹³ 등 및 Lossos¹⁴ 등의 방법을 이용하여, 실험동물 당 Masson's trichrome 염색과 H-E 염색된 10개의 폐조직을 관찰하여 다음과 같이 5단계로 SHI를 정량화 하였다.

0 : 정상 폐조직

1 : 10개의 조직 중 1~3개의 조직에서, 중성백혈구 침착이 군데군데 국소적으로 관찰되는 미약한 염증반응을 보이고, 또한 국소적으로 미약하게 상피세포가 비대 (epithelial hyperplasia) 되거나 collagen이 침착된 섬유화 (fibrosis)가 관찰된 경우

2 : 10개의 조직 중 4~7개의 조직에서, 중성백혈구 침착이 군데군데 국소적으로 관찰되는 미약한 염증반응을 보이고, 또한 국소적으로 미약하게 상피세포가 비대되거나 collagen이 침착된 섬유화가 관찰된 경우

3 : 10개의 조직 중 4~7개의 조직에서, 중성백혈구 침착이 조직 전체에서 관찰되는 중등도의 염증반응을 보이고, 또한 전반적으로 상피세포의 비대와 collagen 침착에 의한 섬유화가 관찰된 경우

4 : 10개의 조직 중 4~7개의 조직에서, 심한 염증반응으로 중성백혈구, 임파구 및 적혈구 침착이 조직 전체에서 관찰되고, 이러한 심한 염증반응과 상피세포의 비대가 동반되어 국소적인 폐조직의 폐쇄가 관찰되며, 전반적인 심한 collagen 침착 섬유화가 관찰된 경우

5 : 10개의 모든 조직에서 심한 염증반응으로 중성백혈구, 임파구 및 적혈구 침착이 조직 전체에서 관찰되고, 이러한 심한 염증반응과 상피세포의 비대가 동반되어 국소적인 폐조직의 폐쇄가 관찰되며, 전반적인 심한 collagen 침착 섬유화가 관찰된 경우

7) 폐세척액 내 IFN-gamma 및 IL-4의 측정

폐세척액 내 IFN-gamma 및 IL-4의 측정은

enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 사용하였다.

III. 成績

1. 폐세척액 내 백혈구 총수의 변화

Normal군의 폐세척액 내 백혈구 총수는 $0.06 \pm 0.01 \times 10^6/\text{ml}$ 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 control 군은 $0.53 \pm 0.07 \times 10^6/\text{ml}$ 로 심한 증가를 나타내었다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 金銀花 물추출액기스를 투여한 sample 군은 $0.26 \pm 0.02 \times 10^6/\text{ml}$ 로 control 군에 비하여 50.9%의 유의성($P < 0.01$) 있는 백혈구 총수의 감소를 나타내었다(Fig. 1).

2. 폐세척액 내 백혈구 비율의 변화

Normal군의 폐세척액 내 백혈구 중 macrophage

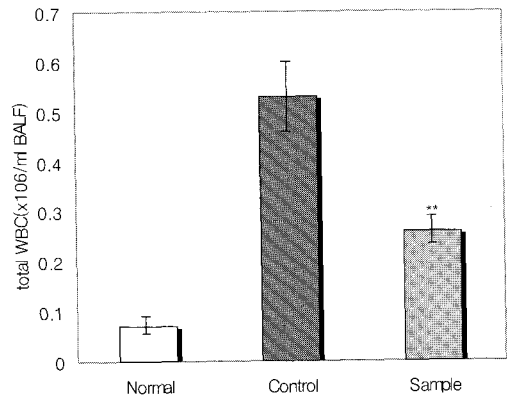


Fig. 1. Effect of Lonicerae Flos on total WBC count in bronchoalveolar lavage fluid of mice treated by intratracheal instillation of bleomycin.

Normal; animal group treated neither bleomycin nor Lonicerae Flos.

Control; animal group treated with bleomycin(0.06mg/0.1ml) intratracheal instillation.

Sample; animal group treated with bleomycin (0.06mg/0.1ml) intratracheal instillation and Lonicerae Flos water extract (21.0mg/10g body weight) for 14 days.

Decrease % calculated from sample data and control data. * means statistical significance with respect to control data (*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$).

All the following figures have the same explanation of normal, control and sample group and *.

의 비율은 $90.9 \pm 1.0\%$ 이었으며, lymphocyte의 비율은 $5.6 \pm 0.8\%$, neutrophil의 비율은 $3.6 \pm 0.2\%$ 이었다. Bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 control 군은 백혈구 중 macrophage의 비율이 $34.4 \pm 4.5\%$ 로 심하게 감소하였으며, lymphocyte의 비율은 $39.8 \pm 6.7\%$ 로, neutrophil의 비율은 $25.8 \pm 2.6\%$ 로 심하게 증가하였다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 金銀花 물추출 액기스를 투여한 sample 군은 백혈구 중 macrophage 비율이 $64.5 \pm 4.9\%$ 로 control 군에 비하여 유의성 ($P < 0.01$) 있게 증가하였으며, lymphocyte의 비율은 $19.8 \pm 3.3\%$ 로, neutrophil의 비율은 $15.7 \pm 3.0\%$ 로 control 군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 2).

3. 조직학적 폐손상 지표의 변화

폐조직의 Masson's trichrome 염색과 H-E 염색 소견에 따른 조직학적 폐손상 지표 SHI는 정상적인 C57BL/6J 생쥐에서는 0.3 ± 0.2 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 control 군은 4.5 ± 0.2 로 거의 모든 조직에서 심한 염증반응과 상피세포의 비대 및 섬유화가 관찰되었다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 金銀花 물추출 액기스를 투여한 sample 군의 SHI는 2.7 ± 0.5 로

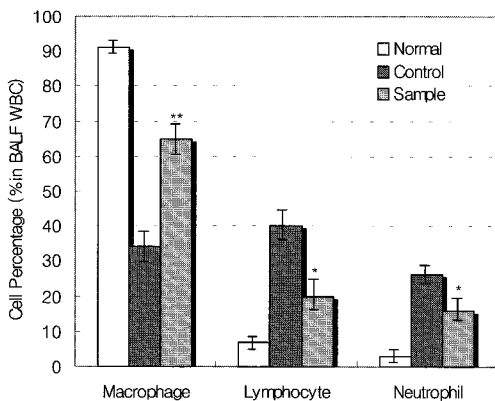


Fig. 2. Effect of Lonicerae Flos on differential WBC count in bronchoalveolar lavage fluid of mice treated by intratracheal instillation of bleomycin.

control 군에 비하여 40.0 %의 유의성 ($P < 0.01$) 있는 염증반응의 감소, 상피세포 비대의 감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소가 관찰되었다(Fig. 3, 4).

4. 폐세척액 내 IFN-gamma 및 IL-4의 변화

Normal군의 폐세척액 내 IFN-gamma는 17.5 ± 3.1 pg/ml 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 control 군은 138.3 ± 11.4 pg/ml로 심한 Th1-type immune response의 증가를 나타내었으며, bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 金銀花 물추출 액기스를 투여한 sample 군은 101.5 ± 11.2 pg/ml로 control 군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 Th1-type immune response의 감소를 나타내었다. Normal군의 폐세척액 내 IL-4는 6.0 ± 0.7 pg/ml 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 control 군은 42.0 ± 3.1 pg/ml로 심한 Th2-type immune response의 증가를 나타내었으며, bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 金銀花 물추출 액기스를 투여한 sample 군은 32.5 ± 2.7 pg/ml로 control 군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 Th2-type immune response의 감소를 나타내었다(Fig. 5).

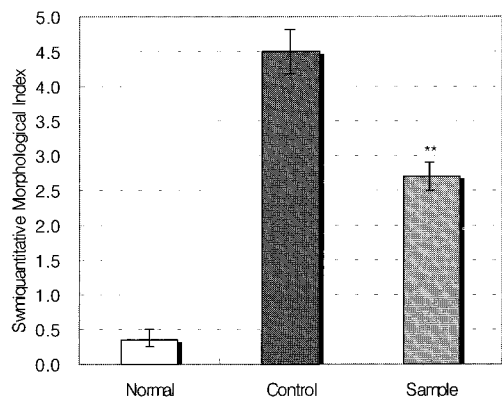


Fig. 3. Effect of Lonicerae Flos on semiquantitative histological index of lung tissue in mice treated by intratracheal instillation of bleomycin.

Decrease % calculated from sample data and control data.

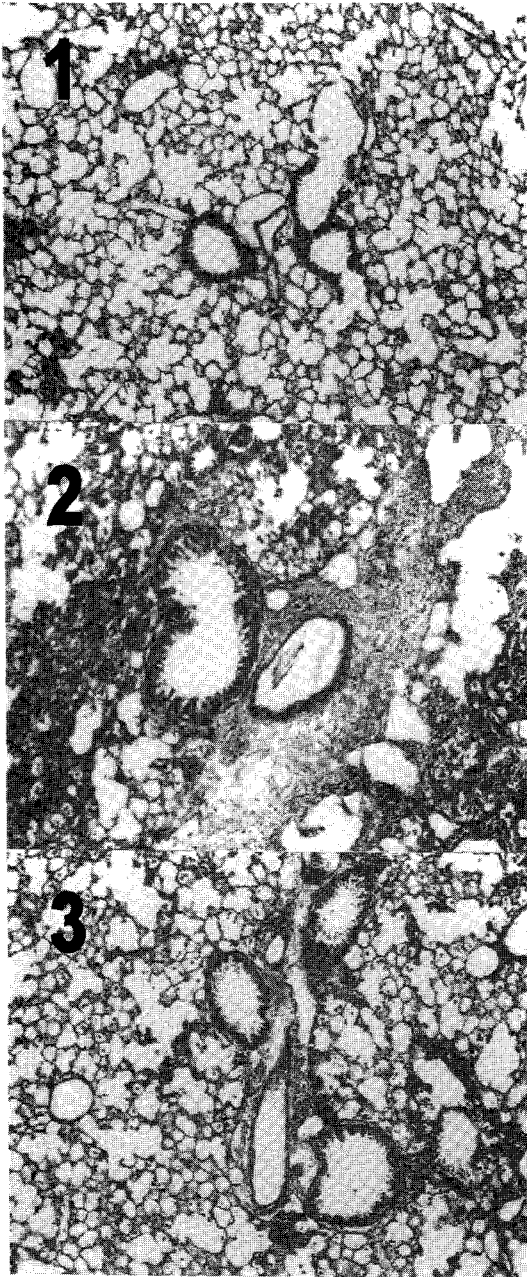


Fig. 4. Sections stained with Masson's trichrome method of lung tissue in mice treated by intratracheal instillation of bleomycin (section 1, Normal group; section 2, control group; section 3, sample group). Sample group shows significant decrease of collagen accumulation (green color) with respect to control group.

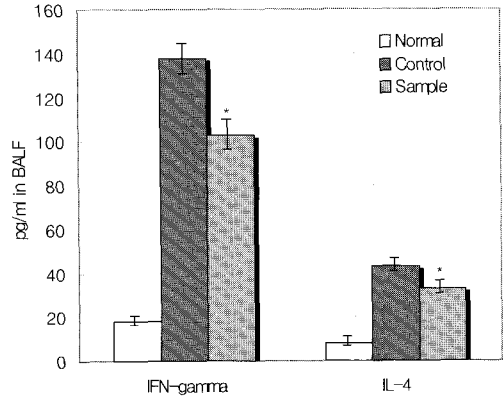


Fig. 5. Effect of Lonicerae Flos on IFN-gamma and IL-4 levels in bronchoalveolar lavage fluid of mice treated by intratracheal instillation of bleomycin.

IV. 考 察

金銀花는 忍冬科에 속한 多年生 半常綠木質藤本인 忍冬 *Lonicera japonica* THUB., 紅腺忍冬 *L. hypoglauc* MIQ., 山銀花 *L. cofusa* DC. 및 毛花柱忍冬 *L. dasystyla* REHD. 등의 花蕾를 여름철 꽃이 피기 전에 採取하여 乾燥하여 使用한다. 產地에 대해서는 우리나라 各地에 分布하고, 中國에서는 廣東, 廣西, 雲南, 浙江, 江西, 福建, 湖南, 四川省 등 地域에 分布한다. 成分은 꽃에는 luteolin, inositol 약 1%가 함유되어 있으며, 이 외에 saponin, tannin을 함유한다. 性은 寒無毒하고, 味는 甘하다. 歸經은 肺 胃 心經에 속하고, 效能主治로서는 清熱解毒, 涼散風熱하여 癰腫疔瘡, 喉痺, 丹毒, 熱毒血痢, 風熱感冒, 溫病發熱 등을 治療하는 것으로 알려져 있다. 그 性이 寒涼하여 清熱시키고 解毒시키는 效能이 있어 熱毒瘡癰을 治療하는 要藥이 된다. 또한 金銀花는 體가 輕揚하여 肺經에 들어가 肺經의 邪熱을 宣散하므로 風熱을 宣散하여 風熱表證을 治療하는 良品이 되기도 한다.^{15,16} 炒炭하면 血分에 들어가 熱毒血痢를 治療하는데, 이는 清熱解毒시키고 止血시키는 效能이 있기 때문이다. 또한 사용하는데 있어

서 熱毒癰腫에는 用量을 重하게 하는 것이 마땅하고, 溫病發熱에는 用量을 輕하게 하고 아울러 반드시 生用하며, 血痢血便에는 炒炭하여 應用한다. 단, 虛寒作瀉者는 服用을 忌하고, 外瘍氣虛膿清者는 服用을 禁한다.^{8,17}. 또한 金銀花는 炎症細胞를 감소시키며, 抗菌效果가 있으며⁹, 過敏反應을 抑制하면서도 細胞毒性이 없다¹⁰.

강¹⁸ 등은 金銀花의 methanol 추출액은 毒性이 거의 없고 수종의 그람 양성 및 그람 음성균에 抗菌作用이 있고, 손상된 肝에 治愈效果가 있으며, 抗炎作用이 있다고 보고하였다. 李¹⁰ 등은 접촉성 피부염에 관한 研究에서 細胞毒性이 黃連, 黃連解毒湯보다는 낮으면서, lymphocyte의 增殖反應을 誘導하는 DNBS(2,4-Dinitrobenzene-sulfonic acid dihydrate)에 의해 발생한 접촉성 피부염에 대해서 特異的인 저해효과를 가진다고 하였다.

그 외에 金銀花의 대부분 항종양 작용에 대해서 이루어져 왔다. 정¹⁹은 金銀花가 암종세포에 직접적인 독성은 없지만 간접적 항암작용이 있다고 보고하였고, 한²⁰은 金銀花 Ethyl Acetate 가용성 분획중에 소분획 B에 항암활성물질이 많이 함유되어 있다고 하였고, 최²¹와 김^{22,23}는 金銀花약침액을 처리한 암세포의 현미경관찰에서 세포수의 감소와 형태의 변화를 관찰하였으며, 항암효과가 있음을 보고하였다.

肺纖維化의 韓醫學的 原因에 대해서 張偉²는 첫째, 先天不足으로 稟賦薄弱하고, 正氣虛衰한데 復感外邪하여 肺中津液이 損傷되고, 肺葉이 枯癯하거나 들쭉, 長期的으로 慢性咳嗽으로 氣逆하여 反復적으로 發作하여 五臟機能失調가 되어 肺가 主氣하지 못하고, 腎이 納氣하지 못하며, 脾가 運化하지 못하게 되어 津液이 停滯되어 痰濁이 內部에 發生하고 氣機를 阻塞하거나, 셋째, 肝이 疏泄하지 못하여 氣機가 不利하게 되어 胸中脹滿하고 咳嗽氣逆하게 되는 것을 들고 있다. 그리하여 辨證施治로서 痰熱壅肺肅降失常證, 肺氣虛弱衛表不固證, 肺陰虧虛失于濡養證, 氣陰兩虛氣滯血瘀證, 脾腎兩虛痰瘀互結證, 陰陽兩虧血脈瘀阻證의 6가지로 나누어 記述하고 있으며, 기타 鍼刺療法, 貼付療法, 按摩, 食療, 氣功療

法 등을 소개하고 있다. 또한 陳⁴은 常見呼吸系疾病 中西醫結合診斷與治療에서 肺氣虛證, 氣陰兩虛證, 脾腎兩虛氣血凝滯證, 陰陽俱虛血脈瘀阻證 등의 4가지로 나누어 分類하였으며, 張³은 폐섬유화 환자 12명에 대해서 補氣通肺湯으로 治療하여 좋은 結果를 보였으며, 그는 폐섬유화를 韓醫學에서의 短氣, 喘證, 咳嗽, 肺痿, 肺脹 등의 範疇로 보았으며, 病機가 複雜하고, 初起에는 病邪가 肺內部에 侵入하여 留滯되어 있다가 肺臟을 損傷시키고, 이것이 오래되면 腎臟을 損傷시킨다고 하였으며, 病位에 대해서는 初起에는 氣分에 있다가 오래되면 血分을 損傷하게 된다고 하였다. 痰瘀가 内生하여 오래되면 熱로 化하니 이러한 것은 邪實하게 되면서 그것이 오래되어 正虛하게 되어 發生하는 것이라고 하였다.

특발성 폐섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)은 원인불명의 만성 섬유화성 간질성 폐렴으로, 조직학적으로 폐실질의 염증과 섬유화가 특징적인 통상성 간질성 폐렴(usual interstitial pneumonia, UIP)을 보이는 질환이다²⁴.

그 임상증상은 특징적으로 60세 전후의 연령분포를 보이며 점진적 호흡곤란, 마른 기침, 피로감 등이고, 가장 흔한 단순 흉부 X-선 촬영의 소견은 양측성 폐 기저부의 불규칙적인 선상 음영, 간유리음영, 봉와상 낭포성 변화 및 동반된 폐용적의 감소이다. 불규칙 선상 음영은 모든 예에서 관찰되는 것으로 보고되며 폐허부 주변부에 가장 흔하다. HRCT 소견은 Reticular, honeycombing, traction bronchiectasis, focal ground glass 등의 소견을 보이는 것이다. 대개 진단후 3년 내에 반수가 사망한다고 알려진 치명적인 질환이나 효과적인 치료법을 아직 찾지 못하고 있다²⁵.

폐섬유화증의 치료법으로는 서양의학에서 steroid, 면역억제제, 항섬유화제, 항산화제, ACE inhibitor, Cytokine 길항제(TGF-β), Relaxin, Lovastatin, Leulitriene B4 등이 사용되고 있다²⁶.

현재까지 이 질병의 병인은 최근 발달된 많은 실험적 기술과 과학자들의 노력에도 불구하고, 밝혀지지 않고 있다. 어떠한 이유이든 염증세포가 폐간질

에 축적되고, 이들 염증세포와 활성화된 폐포상피세포 등에서 다양한 fibrogenic cytokine 및 polypeptide 매개물질의 분비가 증가하게 된다²⁷. 이들이 섬유아세포증식을 자극하여 ECM분비를 증가시켜 폐섬유화를 일으킨다는 것이 일반적인 가설이 되어왔으며, 최근 폐의 염증이 폐섬유화의 중요한 요소가 아니라는 지적이 제기되었고, 이에 대한 논란이 계속되고 있다. 폐염증과 섬유화의 상관관계에 대해서는 계속적인 연구가 필요하지만, 기본적으로 폐의 손상이나 염증이 기본적으로 먼저 발생하고 이어 치유되는 과정에서 섬유화가 진행되는지 혹은 섬유용해가 진행되는지에 따라 폐섬유화 발생여부가 결정될 것이다²⁸.

폐섬유화를 일으키는 주요 기전 및 매개물질에는 TGF- β , Type1/Type 2 cytokine response, 상피세포와 섬유아세포의 연결 등이 있다. 본 논문에 제기되고 있는 IL-4와 IFN-gamma는 Th1과 Th2 cytokine response의 부조화에 관련된 것이다. Th1 cytokine response는 세포매개성 면역에 관계하는 것으로 알려져 있으며, 조직 회복에 관한 한 손상부위를 정상적으로 회복시켜준다. 이에 반해 Th2 cytokine response는 주로, 섬유아세포의 활성화와 증식을 통해서 ECM의 침착 및 섬유화를 유발한다. Th1 cytokine은 IL-2, IL-12, IL-18, IFN-gamma, lymphotoxin이 있고, Th2 cytokine에는 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13과 MCP-1이 있다²⁹.

현재까지의 기전을 요약하면 어떤 원인이든 폐조직에 손상이나 염증이 생긴 후 치유되는 과정에서 비정상적인 상처 치유과정을 밟는 것으로 생각된다. 추후 필요한 연구는 상피세포의 손상이 섬유화를 직접적으로 유발할 수 있는지, 폐섬유화를 유발하는 유전자가 있는지, 섬유화의 최종단계를 조절할 수 있는 인자가 있는 지에 대한 연구가 필요할 것이다⁵.

Bleomycin은 copper-chelating glycopeptides의 혼합물로서 산소와 철 또는 구리 이온들이 상호작용하여 DNA를 분해시킨다. 대부분의 조직들은 bleomycin hydrolase의 활성도가 높지만, 폐와 피부는 이 효소의 활성도가 낮아서 bleomycin 투여 후

독성이 잘 나타난다. 이렇게 bleomycin 투여로 인한 폐손상은 특발성 폐섬유증과 비슷하고 동물실험시 단기간내 폐섬유화를 유발하여 폐손상 및 폐섬유화의 기전을 이해하고자 하는 실험에 많이 이용되고 있다³⁰.

즉, 이제까지 bleomycin 투여 실험을 통해 알려진 폐손상 및 섬유화의 기전은 산소유리기 생성으로 인한 직접독성과 염증세포들 및 섬유모세포와 세포의 기질 등에 의한 간접독성에 의해 유발된다³¹. 특발성 폐섬유증의 발생기전도 이와 비슷하게 설명되고 있으며, 특히 간접독성이 더 중요한데 면역복합체에 의해 활성화된 대식세포가 중성구에 대한 화학주성인자를 유리하여 중성구를 증가시키면 대식세포 자체와 증가된 중성구가 산소유리기를 생성하여 조직에 손상을 주고, 대식세포에서 유리된 fibronectin이나 성장인자들이 작용하여 섬유화를 초래한다는 것이다³².

이에 毒性이 거의 없고 수종의 그림 양성 및 그림 음성균에 抗菌作用이 있고, 손상된 肝에 治愈效果가 있으며, 抗癌, 抗炎作用이 있다고 보고된 金銀花가 bleomycin으로 유발된 폐섬유화에 대한 영향을 알아보기 위하여 흰쥐에 투여하여 14일간 경과를 고찰하였다.

여기서 실험기간을 14일로 정한 것은 bleomycin-induced lung fibrosis를 QIA(Quantative Image Analysis) 방법으로 경과를 분석한 결과 폐의 fibrotic change는 14일에 최고에 달하며 14일부터 21일 사이에는 더이상 진행되지 않는 것으로 밝혀졌기에 14일로 정하였다³³.

Bleomycin에 의한 폐섬유화에 대해서 金銀花 역가스 투여 후 측정된 폐세척액 내 백혈구 총수의 변화, 폐세척액 내 백혈구 비율의 변화, 조직학적 폐손상 지표의 변화, 폐세척액 내 IFN-gamma 및 IL-4의 변화를 정상군, 대조군과 비교 관찰하였다.

Sample 군은 $0.26 \pm 0.02 \times 10^6/\text{ml}$ 으로 Control 군에 비하여 50.9%의 유의성($P < 0.01$) 있는 백혈구 총수의 감소를 나타내었다(Fig. 1). 백혈구 총수는 폐섬유화 과정에서 증가하는데³³ 金銀花가 백혈구 총수의 증가를 억제함을 볼 수 있다.

Sample 군은 백혈구 중 macrophage 비율이 64.5 ± 4.9 %로 Control 군에 비하여 유의성 ($P < 0.01$) 있게 증가하였으며, lymphocyte의 비율은 19.8 ± 3.3 %로, neutrophil의 비율은 15.7 ± 3.0 %로 Control 군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 2).

폐섬유화 과정에서 macrophage 비율은 감소하고 lymphocyte 비율은 증가하고, neutrophil 비율은 증가하는데³³, 金銀花는 macrophage 비율의 감소를 억제하고 lymphocyte 비율의 증가를 억제하며, neutrophil 비율의 증가를 억제함을 볼 수 있다.

폐섬유화 과정에서 macrophage 비율이 감소하는 것은 macrophage의 총수가 감소함을 의미하는 것은 아니다. 실제로 bleomycin-induced lung fibrosis에서 14일 후의 macrophage 총수는 증가하였다³³. 결과적으로 金銀花는 백혈구비율을 정상치에 가깝도록 회복시킨다는 것을 알 수 있다.

Sample 군의 조직학적 폐손상 지표 SHI는 2.7 ± 0.5 로 Control 군에 비하여 40.0 %의 유의성 ($P < 0.01$) 있는 염증반응의 감소, 상피세포 비대의 감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소가 관찰되었다 (Fig. 3, 4).

Semiquantative Histological Index(SHI)는 소세포 폐암이나 비소세포폐암의 조직평가를 위해 자주 적용되는 scale이다³⁴. 폐섬유화에서 조직의 변화를 평가하기 위해서도 적용되고 있다³³.

폐섬유화 과정에서 金銀花는 염증반응을 감소시키고, 상피세포 비대를 감소시키고, collagen 침착 섬유화를 감소시킴을 볼 수 있다.

폐세척액 내 IFN-gamma는 Sample 군에서 101.5 ± 11.2 pg/ml로 Control 군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 Th1-type immune response의 감소를 나타내었으며, 폐세척액 내 IL-4는 Sample 군에서 32.5 ± 2.7 pg/ml로 Control 군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 Th2-type immune response의 감소를 나타내었다(Fig. 5).

Th2 cytokine인 IL-4는 섬유아세포의 증식, collagen gene expression 및 합성 증가를 유도하며,

IL-13과 MCP-1 역시 type 1 procollagen 합성을 증가시키고, MCP-1은 TGF- β 와 IL-4 합성 증가를 유도한다³⁵. Th1 cytokine인 IFN-gamma는 섬유화억제의 대표적인 cytokine으로 섬유아세포 증식의 억제, collagen 침착의 억제, 섬유아세포의 apoptosis 유도, TGF- β 의 생성 억제를 통해서 섬유화를 억제시킨다³⁶.

Bleomycin-induced pulmonary fibrosis의 경과에 대한 상대적인 Th1과 Th2의 작용은 아직도 분명하게 정의되지 못하고 있다. 비록 IFN-gamma의 발현이 bleomycin 주입 후에 폐와 림프절에서 증가되었다고 하더라도 bleomycin-induced pulmonary fibrosis는 Th2 cytokines의 cytokine들과 연관이 깊다³⁷.

위 실험에서 IFN-gamma와 IL-4는 폐섬유화 과정 중에 증가하였는데 결국 金銀花가 이 두가지 cytokine의 증가를 억제한다는 것을 볼 수 있다.

V. 結 論

Bleomycin에 의한 폐섬유화에 대해서 金銀花 물 추출 엑기스($21.0\text{mg}/10\text{g body weight}$) 투여 후 측정된 폐세척액 내 백혈구 총수의 변화, 폐세척액 내 백혈구 비율의 변화, 조직학적 폐손상 지표의 변화, 폐세척액 내 IFN-gamma 및 IL-4의 변화를 정상군, 대조군과 비교 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 금은화 투여군은 $0.26 \pm 0.02 \times 10^6/\text{ml}$ 로 대조군에 비하여 50.9%의 유의성 ($P < 0.01$) 있는 백혈구 총수의 감소를 나타내었다.
2. 금은화 투여군은 백혈구 중 macrophage 비율이 64.5 ± 4.9 %로 대조군에 비하여 유의성 ($P < 0.01$) 있게 증가하였으며, lymphocyte의 비율은 19.8 ± 3.3 %로, neutrophil의 비율은 15.7 ± 3.0 %로 control 군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다.
3. 금은화 투여군의 조직학적 폐손상 지표 SHI는 2.7 ± 0.5 로 대조군에 비하여 40.0 %의 유의성

($P < 0.01$) 있는 염증반응의 감소, 상피세포 비대 감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소가 관찰되었다.

4. IFN-gamma는 금은화 투여군에서 101.5 ± 11.2 pg/ml로 대조군에 비하여 유의성($P < 0.05$) 있는 감소를 나타내었으며, IL-4는 금은화 투여군에서 32.5 ± 2.7 pg/ml로 대조군에 비하여 유의성($P < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다.

이와 같이 金銀花는 bleomycin 유발 폐섬유화에서 염증반응의 결과로서 나타나는 폐세척액 내 백혈구 총수의 변화, 폐세척액 내 백혈구성분 비율의 변화, 조직학적 폐손상 지표의 감소, 폐세척액 내 IFN-gamma 및 IL-4의 감소를 유도하여 폐섬유화 과정에서 나타나는 변화를 회복시킬 수 있다는 것을 알 수 있다. 추후에 더욱 연구되어야 할 과제는 금은화 및 다른 수종의 약제가 폐섬유화에 미치는 영향을 더욱 세밀히 바라보는 연구가 되어야 할 것이다. 또한 폐섬유화의 증상을 보이는 환자에게 투여할 수 있는 한약 처방에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

參考文獻

- 정순희, 용석중, 신계철, 안철민, 최인준, 조상호. 백서에서 Bleomycin 투여로 인한 폐손상 및 폐섬유화에 대한 Vitamin E의 영향. 결핵 및 호흡기질환 1995;42(2):184-205.
- 張偉, 周兆山, 童德臣. 中西醫結合呼吸病診療學. 중국: 南海出版公司; 1995, pp.211-224.
- 張天嵩. 補氣通肺湯治療特發性肺纖維化12例. 浙江中醫雜誌 1999;34(2):54-55.
- 陳永輝. 常見呼吸系疾病中西醫結合診斷與治療. 北京: 中國醫藥科技出版社; 1998, pp.243-251.
- 어수택. 순천향대학교 의과대학 내과학교실. 폐섬유화증의 병인 및 병태생리. 결핵 및 호흡기질환 2003 Feb;54(2):167-177.
- Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis : prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. Ann Intern Med 2001; 134:136-51.
- Berkman N, Goldstein RH, Breuer R. Bleomycin-induced lung injury is enhanced by interferon-alpha. Life Sci 1997;60(26):415-21.
- 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울: 永林社; 2000, pp.198-199.
- 劉接寶. 新中醫寶典. 中國: 立得出版社; 1971, pp.346-349.
- 이정현, 오양효, 김정만, 유기수, 임영진, 정민호. 집축성 피부염에서 황련, 황련해독탕, 금은화가 림프구 활성화에 미치는 영향. 동아대학교 의학과 박사학위논문. 2000.
- Kremer S, Breuer R, Lossos IS, Berkman N, Christensen TG, Connor MW, Goldstein RH, Or R. Effect of immunomodulators on bleomycin-induced lung injury. Respiration 1999;66(5):455-62.
- Laxer U, Lossos IS, Gillis S, Or R, Christensen TG, Goldstein RH, Breuer R. The effect of enoxaparin on bleomycin-induced lung injury in mice. Exp Lung Res. 1999 Sep;25(6): 531-41.
- Berkman N, Goldstein RH, Breuer R : Bleomycin-induced lung injury is enhanced by interferon-a. Life Sci, 1997;60:415-421.
- Lossos IS, Breuer R, Shriki M, Or R : Peribronchial lymphocyte activation in bleomycin-induced lung injury. Life Sci, 1998; 63:1183-1193.
- 李時珍. 本草綱目. 서울: 고문사; 1980, p.773.
- 李龍城. 經藥分類典. 서울: 정담출판사; 2002, p.22.
- 黃度淵. 對譯 證脈方藥合編. 서울: 南山堂; 1978, p.210.
- 강옥희. 金銀花의 약리작용에 관한 研究. 우석

- 대학교 석사학위논문. 1983, pp.8-18.
19. 정현우, 최정화, 진천식. 금은화 및 어성초가 인체 암세포주에 미치는 영향. 대한동의병리학회지. 1996;10(1):126-132.
 20. 한두석, 백경현, 김영옥, 최규은,곽정숙, 백승화. 한국산 생약으로부터 항암물질의 개발(제6보): 금은화 Ethyl Acetate 가용성 분획의 인체 구강유상피암종세포에 미치는 세포독성작용. 생약학회지 1998;29(1):22-27.
 21. 최혜경, 임종국, 손윤희, 배만중, 남경수. 금은화 약침액의 암세포성장 저해 효과. J. Life Resources & Industry 1998;3:65-73.
 22. 김중완, 최혜경, 손윤희, 임종국, 이향우, 남경수. 금은화 약침액의 암예방효과. 상약학회지 1999;30(3):261-268.
 23. 김중완. 임종국. 금은화 약침의 항종양 작용 및 생체 장기에 대한 영향. 대한침구학회지 1999 Feb;16(1):255-267.
 24. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis : diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society(ATS), and the European Respiratory Society(ERS). Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:646-64.
 25. 이경수. 특발성 간질성폐렴의 방사선학적 소견. 결핵 및 호흡기질환 2003 Feb;54(2):129-144.
 26. 김동순. 특발성폐섬유증(IPF)의 치료. 결핵및호흡기질환 2003 Mar;54(3):260-273.
 27. Furuie H, Yamasaki H, Suga M, Ando M. Altered accessory cell function of alveolar macrophages: a possible mechanism for induction of Th2 secretory profile in idiopathic pulmonary fibrosis. Eur Respir J. 1997 Apr; 10(4):787-94.
 28. Lossos IS, Breuer R, Shriki M, Or R. Peribronchial lymphocyte activation in bleomycin-induced lung injury. Life Sci. 1998;63(13):1183-93.
 29. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets; Th1, Th2 and more. Immunol Today 1996;17:138-47.
 30. Cooper JA Jr, White DA, Matthay RA. Drug-induced pulmonary disease. Part 1: Cytotoxic drugs. Am Rev Respir Dis. 1986 Feb;133(2):321-40.
 31. Copper JA Jr, Zitnik RJ, Matthay RA. Mechanisms of drug-induced pulmonary disease. Annu Rev Med. 1988;39:395-404.
 32. 이광길, 김정숙, 이유복, 김동식. Bleomycin에 의한 폐손상의 기전에 관한 형태학적 研究. 연세의대논문집 1979;12:127.
 33. Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW, Breuer R. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. Int J Exp Pathol. 2002 Jun;83(3):111-9.
 34. Jorgensen LG, Hirsch FR, Skov BG, Osterlind K, Cooper EH, Larsson LI. Occurrence of neuron specific enolase in tumour tissue and serum in small cell lung cancer. Br J Cancer. 1991 Jan;63(1):151-3.
 35. Strieter RM, Wiggins R, Phan SH, Wharram BL, Showell HJ, Remick DG, Chensue SW, Kunkel SL. Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1989;162:694-700.
 36. Jaffe HA, Gao Z, Mori Y, Li L, Varga J. Selective inhibition of collagen gene expression in fibroblasts by an interferon-gamma transgene. Exp Lung Res 1999;25:199-215.
 37. Maeyama T, Kuwano K, Kawasaki M, Kunitake R, Hagimoto N, Hara N. Attenuation of bleomycin-induced pneumopathy in mice by monoclonal antibody to interleukin-12. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001 Jun; 280(6):L1128-37.