

## 熟地黃이 Bleomycin에 의한 肺纖維化에 미치는 影響

류한천, 이형구, 정승기, 정희재\*

경희대학교 한의과대학 폐계내과교실

### The Effect of Rehmanniae Radix on Bleomycin-induced Lung Fibrosis

Han-Chon Ryu, Hyung-Gu Rhee, Sung-Ki Jung, Hee-Jae Jung

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

**Objective :** The main purpose of this study was to determine if Rehmanniae Radix has significant effects on lung fibrosis.

**Materials and Methods :** C57BL/6J mice were divided into three groups. These were the normal group, which were not treated, the control group, given Intratracheal instillation(IT) of Bleomycin, the sample group, given IT of bleomycin and water-extracted Rehmanniae Radix. Animals were sacrificed 14 days after IT treatment. Lung fibrosis was evaluated by analysis of bronchoalveolar lavage(BAL) total WBC, percentage of macrophage, lymphocyte and neutrophil. This was done histologically by semiquantitative histological index(SHI) of lung tissue.

**Results :** The sample group in coparison with control group showed a decrease in the BAL, total WBC, lower percentage of lymphocyte and neutrophil( $p < 0.05$ ) and correspondingly a lower percentage of macrophage( $p < 0.01$ ).

The Sample group showed a significant decrease of collagen accumulation with respect to the control group in SHI of lung tissue( $p < 0.01$ ).

INF- $\gamma$  and IL-4 levels in BALF of mice significantly decreased in the control group( $p < 0.05$ ).

**Conclusions :** Results suggest that Rehmanniae Radix has an anti-inflammatory effect and anti-fibrotic effect on the lungs through decrease of IL-4 and total WBC count for not only macrophage, but also lymphocyte and neutrophil. The degradation of INF- $\gamma$  calls for research beyond the scope of this study.

**Key Words:** Rehmanniae Radix, lung fibrosis, IL-4, INF- $\gamma$ , macrophage

### 1. 緒 論

폐섬유화증은 원인 불명의 만성 섬유화성 간질성 폐렴으로, 조직학적으로 폐 실질의 염증과 섬유화가 특징적인 통상성 간질성 폐렴을 보이는 질환이다<sup>1</sup>. 이러한 폐섬유화증은 폐에 손상을 주는 많은 질병의 일반적인 결과이고 정상적인 조직체계의 손실과 비

세포결합조직의 증가가 특징이다<sup>2</sup>.

섬유화 과정은 collagen, fibronectin 등의 세포외 기질이 조직에 축적되어 정상 구조를 파괴하여 기능의 장애를 가져옴으로서 야기되는데 폐에서 대표적으로 섬유화를 일으키는 질병이 바로 특발성 폐섬유화증이며, 이러한 폐섬유화증은 하부기도의 만성염증과 함께 폐포 대식세포, 호중구 또는 임파구, 섬유아세포 등이 폐포내 또는 폐포벽에 증가되어 있는 특징을 나타낸다<sup>3</sup>.

폐섬유화증의 원인으로는 폐에 손상을 주는 질병들이 선행되는 것으로 알려져 있고, 이 중 특발성 폐

· 접수 : 2004년 5월 11일    채택 : 2004년 5월 18일

· 교신저자 : 류한천, 서울시 서대문구 연희동 194-37번지 동서한방병원 한방내과  
(Tel : 02)320-7807~8, Fax : 02)334-6746, E-mail : ryu11000@hanmail.net

섬유화증은 원인이 특별히 밝혀진 것이 없다. 증상은 특별한 원인이 없이 서서히 진행되는 호흡곤란이 가장 현저한 증상이고 그 외에 객담을 수반하지 않는 기침이 흔하다<sup>56</sup>.

이렇듯 폐섬유화증은 서서히 진행되어 만성적 경과를 밟는다는 사실과 객담을 수반하지 않는 기침이 주된 증상이라는 점을 근거로 살펴볼 때 한의학적으로 肺虛咳嗽, 鬱嗽, 勞嗽, 乾嗽, 久喘, 陰虛喘 등의 병증에서 증상의 유사성을 찾아 볼 수 있고 이들의 治方은 血虛나 陰虛를 개선하는 四物湯, 六味地黃湯, 金水六君煎, 瓊玉膏 등이 응용<sup>79</sup>되고 있다.

따라서 폐섬유화증과 관련된 병증으로 생각되는 肺虛咳嗽, 鬱嗽, 勞嗽, 乾嗽, 久喘, 陰虛喘 등의 治方에 있어서는 血虛나 陰虛를 개선하는 약물인 熟地黃이 폐섬유화증에 응용될 경우 임상적으로 유의성있는 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각되며, 이에 저자는 熟地黃이 폐섬유화증에 미치는 영향을 알아보고자 bleomycin으로 유발한 폐섬유화 모델을 이용하여 폐섬유화의 기전에 관여하는 macrophage, lymphocyte, neutrophil 등의 염증세포와 폐손상에 대한 조직학적 관찰, 그리고 IL-4, INF- $\gamma$  등의 cytokine 발현에 관하여 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 동물 및 약재

#### 1) 동물

본 실험에 사용한 실험동물은 12주령, 체중 30g 전후의 C57BL/6J계 숫컷 생쥐를 사용하였다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용된 약재는 熟地黃(Rehmanniae Radix)으로 경희의료원 한방병원 약재과에서 엄선된 약재를 사용하였다.

### 2. 방법

#### (1) 약물의 조제 및 투여

熟地黃 200g을 증류수 2,000ml와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간동안 전

탕한 다음 1차 여과한 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후 완전 동결 건조시켜 熟地黃 물추출액기스(Rehmanniae Radix Water Extract : RRE) 108g을 얻었다. 실험동물은 각 군당 6마리씩으로 정상군(Normal), bleomycin으로 폐섬유화를 유발시킨 군(Control) 및 bleomycin으로 폐섬유화 유발과 함께 RRE 투여군(Sample)으로 나누고, RRE는 생쥐 체중 10g당 36.0mg을 14일간 1일 1회 경구투여하였다.

#### (2) 폐섬유화 유발

폐섬유화는 Kremer 등, Laxer 등, Lossos 등 및 Berkman 등의 intratracheal instillation (IT) 방법에 따라 Bleomycin용액을 기관을 통하여 직접 폐 속에 주입하는 방법을 사용하였다.

#### (3) 폐세척액 및 폐조직 채취

Bleomycin을 IT방법으로 주입한 14일 후, C57BL/6J 생쥐의 전경부와 흉부를 절개하여 기관과 폐를 노출시키고 기관을 절개한 다음 19 gauge 주사바늘을 장착한 1ml용 주사기를 기관에 장착하고 생리식염수를 사용하여 0.5ml씩 8번에 걸쳐 총 4.0ml의 폐세척액(bronchoalveolar lavage fluid; BALF)를 채취하여 IL-4와 IFN-gamma 등 cytokine 측정과 백혈구 총수 및 백혈구의 감별 측정에 사용하였다. 폐세척액을 채취한 직후 폐조직을 분리하여 우폐는 IL-4 및 IFN-gamma 측정용으로, 좌폐는 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

폐조직의 조직학적 변화를 관찰하기 위해서 hematoxiline-eosin (H-E) 염색을 실시하였으며, 폐조직의 섬유화에 의한 collagen의 침착정도를 관찰하기 위해서 Masson's trichrome 염색을 실시하였다.

#### (6) 조직학적 폐손상지표 (Semiquantitative

Histological Index; SHI)의 측정

폐조직의 섬유화 정도 및 조직학적 변화는 Kremer 등, Laxer 등, Lossos 등 및 Berkman 등의 방법에 따라, 실험동물 당 Masson's trichrome 염색과 H-E 염색된 10개의 폐조직을 관찰하여 다음과 같이 5단계로 SMI를 정량화 하였다.

0: 정상 폐조직

- 1: 1~3개의 조직에서 미약한 (weak) 염증반응 (inflammation), 상피세포의 비대 (epithelial hyperplasia) 및 collagen 침착 섬유화 (fibrosis) 관찰
- 2: 4~7개의 조직에서 미약한 염증반응, 상피세포의 비대 및 collagen 침착 섬유화 관찰
- 3: 4~7개의 조직에서 중등도 (moderate)의 염증반응, 상피세포의 비대 및 collagen 침착 섬유화 관찰
- 4: 4~7개의 조직에서 심한 (strong) 염증반응 및 collagen 침착 섬유화 관찰
- 5: 10개의 모든 조직에서 심한 염증반응 및 collagen 침착 섬유화 관찰
- 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

Normal 군의 폐세척액 내 백혈구 총수는  $0.06 \pm 0.01 \times 10^6/ml$  이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군은  $0.53 \pm 0.07 \times 10^6/ml$ 로 심한 증가를 나타내었다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 RRE를 투여한 Sample 군은  $0.33 \pm 0.04 \times 10^6/ml$ 으로 Control 군에 비하여 37.7%의 유의성( $P < 0.05$ ) 있는 백혈구 총수의 감소를 나타내었다. (Table 1)

2. 폐세척액 내 백혈구 비율의 변화

Normal 군의 폐세척액 내 백혈구 중 macrophage의 비율은  $90.9 \pm 1.0 \%$  이었으며, lymphocyte의 비율은  $5.6 \pm 0.8 \%$ , neutrophil의 비율은  $3.6 \pm 0.2 \%$  이었다.

Table 1. Total WBC Count in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Mice( $\times 10^6/ml$ )

Group	total WBC	Decrease %	P-value
Normal	$0.06 \pm 0.01$	-	
Control	$0.53 \pm 0.07$	-	
Sample	$0.33 \pm 0.04$	37.7	<0.05

P-value means statistical significance with respect to Control data.

Table 2. Differential WBC Count in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Mice Treated by Intratracheal Instillation of Bleomycin(%)

Group	Macrophage	Lymphocyte	Neutrophil
Normal	$90.9 \pm 1.0$	$5.6 \pm 0.8$	$3.6 \pm 0.2$
Control	$34.4 \pm 4.5$	$39.8 \pm 6.7$	$25.8 \pm 2.6$
Sample	$62.5 \pm 5.9^{**}$	$21.2 \pm 3.3^*$	$16.3 \pm 3.0^*$

\* means statistical significance with respect to Control data (\*;  $P < 0.05$ , \*\*;  $P < 0.01$ ).

Bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군은 백혈구 중 macrophage의 비율이  $34.4 \pm 4.5 \%$ 로 현저하게 감소하였으며, lymphocyte의 비율은  $39.8 \pm 6.7 \%$ 로, neutrophil의 비율은  $25.8 \pm 2.6 \%$ 로 현저히 증가하였다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 RRE를 투여한 Sample 군은 백혈구 중 macrophage 비율이  $62.52 \pm 5.9 \%$ 로 Control 군에 비하여 유의성 ( $P < 0.01$ ) 있게 증가하였으며, lymphocyte의 비율은  $21.2 \pm 3.3 \%$ 로, neutrophil의 비율은  $16.3 \pm 3.0 \%$ 로 모두 Control 군에 비하여 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있는 감소를 나타내었다. (Table 2)

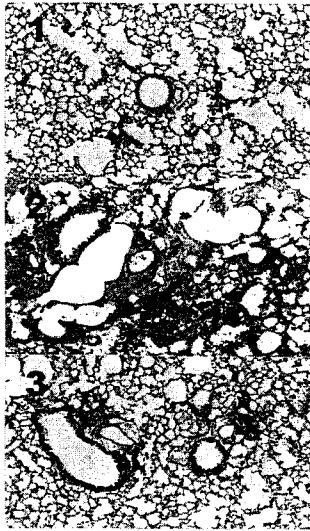
3. 조직학적 폐손상 지표의 변화

폐조직의 Masson's trichrome 염색과 H-E 염색 소견에 따른 조직학적 폐손상 지표 SHI는 Normal 군에서는  $0.3 \pm 0.2$  이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군은  $4.5 \pm 0.2$ 로 거의 모든 조직에서 심한 염증반응과 상피세포의 비대 및 섬유화가 관찰되었다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 RRE를 투여한 Sample 군의 SHI는  $2.8 \pm 0.4$ 로 Control 군에 비하여 37.8%의 유의성( $P < 0.01$ )있는 염증반응의 감소, 상피세포 비대의 감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소가 관찰되었다. (Table 3, Fig. 4)

**Table 3.** Semiquantitative Histological Index of Lung Tissue in Mice Treated by Intratracheal Instillation of Bleomycin

Group	SHI	Decrease %	P-value
Normal	0.3±0.2	-	
Control	4.5±0.2	-	
Sample	2.8±0.4	37.8	<0.01

P-value means statistical significance with respect to 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).

#### 4. 폐세척액 내 IFN-gamma 및 IL-4의 변화

Normal 군의 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 RRE를 투여한 Sample 군은 98.3±13.2 pg/ml로 Control 군에 비하여 유의성 (P<0.05) 있는 Th1-type immune response의 감소를 나타내었다. Normal 군의 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,

**Table 4.** IFN-gamma and IL-4 Levels in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Mice Treated by Intratracheal Instillation of Bleomycin (pg/ml)

Group	IFN-gamma	IL-4
Normal	17.5±3.1	6.0±0.7
Control	138.3±11.4	42.0±3.1
Sample	98.3±13.2*	30.5±3.1*

\* means statistical significance with respect to Control data (\*; P<0.05).

bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 RRE를 투여한 Sample 군은 30.5±3.1 pg/ml로 Control 군에 비하여 유의성(P<0.05) 있는 Th2-type immune response의 감소를 나타내었다. (Table 4)

### IV. 考 察

폐섬유화증은 원인 불명의 만성 섬유화성 간질성 폐렴으로, 조직학적으로 폐 실질의 염증과 섬유화가 특징적인 통상성 간질성 폐렴 (usual interstitial pneumonia, UIP)을 보이는 질환이다. 이 과정은 염증 세포의 폐침윤과 섬유모세포와 결합조직 합성의 증강조절시키는 cytokine이나 eicosanoid같은 광범위한 매개체에 의하여 매개된다.

염증반응은 시간이 지나면서 섬유아세포가 더욱 증가하는 상태로 변화하며, 섬유아세포에서 합성하여 분비하는 교원질(collagen)에 의해 폐포벽이 두꺼워지는 섬유화현상이 나타나서 결국은 폐포가 gas교환기능을 상실하게 되어 치명적인 상태로 발전하게 된다.

폐섬유화증의 치료에 대하여 여러 가지 약제들에 대한 동물실험 및 소규모 임상연구가 시도되고 있고, 그 중 몇 가지 희망적인 약제(gamma-interferon과 pirfenidone)들에 대해서는 대규모 연구가 진행되고 있으나<sup>12</sup> 서양의학적으로 현 시점에서는 폐이식 이외에는 폐섬유화증에 효과가 있다고 인정된 치료법으로 현재까지 뚜렷하게 제시되고 있지 못하는 실정이다.<sup>13</sup>

이러한 폐섬유화증이 일어나는 기전에 대해서 아직 확실하게 밝혀진 것은 없지만 크게 폐포의 염증과 Type 2 cytokine인 IL-4와 Type 1 cytokine인 INF-γ의

부조화가 공통적으로 관여되고 있음이 많은 연구를 통해서 밝혀져 왔다<sup>24</sup>.

폐섬유화증은 초기에는 폐포 대식세포, 호중구 또는 임파구 등의 염증세포 침윤이 폐포에 증가되는 소위 "alveolitis" stage를 거치고 시간이 지나면서 폐포 간질조직에 섬유아세포의 증가와 더불어 교원질(collagen)등의 침착으로 "fibrotic" stage로 이행하는 현상이다<sup>14</sup>.

최근의 염증과 폐 섬유화에 관한 연구 결과에 의하면 폐섬유화증과 염증과의 상관성에 대한 의견은 분분하지만, 폐의 염증과 폐섬유화와의 무관성을 주장하는 논문에서도 폐섬유화에 앞서 폐의 염증이 선행된다는 사실을 인정하고 있다. 15, 16 이러한 염증반응 단계에서 초기에 증가된 염증세포 중에서, 특히 정상적으로 폐포에 제일 많이 존재하는 폐포 대식세포가 간질 섬유화를 유발하는데 직접 또는 간접적으로 관여할 것으로 생각되고 있다<sup>17</sup>.

폐포의 대식세포는 산화체와 protease를 분비하여 폐포의 손상을 야기하고, IL-8인 강력한 호중구 화학주성 인자(NFC, IL-8)를 방출하여 호중구를 폐내로 유도하여 더욱 손상을 가중시키며, 간엽세포의 성장인자를 분비함으로써 폐섬유화증에서 간엽세포의 확산을 활성화하는 기전을 통해서 폐섬유화에 관여하게 된다<sup>18,19</sup>. 호중구는 폐섬유화증의 병리적 과정의 발현과 발전에 모두 관여하며, 폐섬유화증의 폐포염을 일으키는 중요 구성요소로서 폐의 실질을 손상시킬 수 있는 매개물질을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 섬유화증에 있어서 호중구는 주로 섬유성 변화와 주로 관련이 있고, 림프구는 주로 침습성 형태의 병인에 중요한 역할을 하고 있다<sup>20</sup>.

살펴본 바와 같이 매크로파지, 호중구, 림프구는 폐섬유화와 관련된 병리적인 변화에 중요한 역할을 한다고 생각되어지므로 폐섬유화증은 매크로파지와 다형핵 호중구, 림프구에 의한 미만성 간염, 폐포간염증으로 특징지어지는 만성 섬유성 장애로 볼 수 있다.

폐섬유화증에 관계하는 기전 중에 염증의 기전 이외에도 IL-4와 INF- $\gamma$ 는 폐섬유화에 관여하는 중요한

cytokine으로 주목을 받고 있다. 이 중 Th2 cytokine인 IL-4는 섬유아세포의 증식, collagen gene expression 및 합성 증가를 유도하여 콜라겐성과 비콜라겐성 기질 단백질의 생산과 증식을 촉진함으로써 섬유화를 유지·발전시키는 작용을 하며<sup>21</sup>, Th1 cytokine인 INF- $\gamma$ 는 섬유화 억제제의 대표적인 cytokine으로 섬유아세포 증식의 억제와 collagen 침착의 억제, 섬유아세포의 apoptosis 유도, TGF- $\beta$ 의 생성 억제 등의 기전을 통해서 섬유화를 억제시키는 역할을 하고 있다<sup>22</sup>. 그러나 IL-4가 섬유화를 촉진한다는 데는 별다른 이견이 없으나, INF- $\gamma$ 가 직접적으로 섬유화를 조절한다는 사실에는 의견이 분분하다. INF- $\gamma$ 는 적어도 C57BL/6J같은 Bleomycin에 민감한 쥐들의 경우 또는 특발성 폐섬유화증환자의 기관지폐포액 등 어떤 경우에는 INF- $\gamma$ 가 폐섬유화를 촉진하는 작용을 한다는 주장도 많이 보고 되고 있다<sup>23,24</sup>.

이상에서 살펴본 바와 같이 폐섬유화에 대한 기전을 살펴보았을 때 macrophage, lymphocyte, neutrophil 등에 의한 폐포의 염증반응과 Type 2 cytokine인 IL-4와 Type 1 cytokine인 INF- $\gamma$ 의 부조화라는 두가지 단계가 폐섬유화증을 유발하는 주요한 원인으로 보인다.

폐섬유화증의 韓醫學的 範疇에 대한 文獻的 考察에 대해서는 아직까지 연구된 바가 없다. 그러나 폐섬유화증은 증상이 서서히 진행되어 만성적 경과를 밟는다는 사실과 객담을 수반하지 않는 기침이 주된 증상이라는 점을 근거로 살펴보면 한의학적으로 肺虛咳嗽, 鬱嗽, 勞嗽, 乾嗽, 久喘, 陰虛喘 등의 범주에서 그 내용을 찾아 볼 수 있다.

肺虛咳嗽'는 咳嗽의 外感內傷분류중 內傷咳嗽에 속하는 것이고, 鬱嗽, 勞嗽, 乾嗽는 東醫寶鑑'의 咳嗽門에서 찾아볼 수 있으며 久喘, 陰虛喘은 醫學入門'의 八喘證에서 찾아볼 수 있다.

肺虛咳嗽'는 병정이 비교적 緩慢하며 증상은 乾咳少痰, 痰血, 形體消瘦, 神疲乏力, 飲食不振, 咽乾口燥, 午後潮熱, 面顴紅赤, 手足心熱, 失眠盜汗, 舌質紅, 脈細數이며 月華丸 등으로 養陰清肺이나 化痰止咳의 치법을 사용하여 치료한다.

鬱嗽'의 原因은 腎水焦枯 邪火濁炎於肺이며 症狀

은 乾咳無痰, 有聲痰少, 面赤, 喘息不眠이며 治方으로 瀉白散, 清化丸, 清金降火湯, 利膈湯이 제시되어 있다.

勞嗽는 原因이 陰虛火動, 酒色過度, 虛勞少血, 津液內耗, 心火自炎이며 症狀은 盜汗出兼痰多, 寒熱, 或吐血, 咯唾膿血, 上氣涎潮, 咳嗽連續不休이고 治方으로 陰虛火動而嗽인 경우 四物湯 合 二陳湯 加 黃栢 · 知母, 陰虛喘嗽 或 吐血인 경우 四物湯 加 黃栢 · 知母 · 五味子 · 麥門冬 · 桑白皮 · 地骨皮 등을 제시하고 있다.

乾嗽는 原因이 氣澁혹은 肺中에 津液이 枯竭되거나 火鬱로 痰鬱火邪在肺中한 경우 등이며 症狀은 無痰有聲, 澁微者 連咳十數聲 方有痰出, 澁甚者 雖咳十數聲 亦無痰出이며 治方으로 瓊玉膏, 潤肺散, 加味二母丸 등을 제시하고 있다.

久喘은 原因이 久病으로 氣短하여 발생하는데 症狀은 短氣, 氣息不能接續, 似喘非喘이며 單人蔘湯, 調中益氣湯, 人蔘紫菀湯, 定喘湯 등을 제시하고 있다.

陰虛喘은 陰虛, 血虛 등의 原因으로 血虛則陽無所依附上奔爲喘하는 것으로 陰虛者는 氣從臍下直衝清道而上하여 喘息不休한 症狀이 나타나며 降氣滋陰하는 寧肺湯, 潤肺豁痰寧嗽湯, 人蔘五味子散을 治方으로 제시하고 있다.

이상의 제 증들은 만성적 경과를 밟는 다는 점과 가래가 동반되지 않는 기침 및 점진적인 호흡곤란 등에서 폐섬유화증과 대비시킬 수 있다.

熟地黃(REHMANNIAE RADIX PREPARAT)은 補血藥으로 玄蔘科(Scrophulariaceae)에 속한 다년생 초본인 地黃 *Rehmannia glutinosa*(GAERTNER) LIBOSCH. 또는 地黃 *R. glutinosa* LIBOSCH. 및 懷慶地黃 *R. glutinosa* LIBOSCH. *hueichingensis*(CHAO et SCHIH) HSIA. 의 根莖을 가공증건한 것이다<sup>8</sup>.

원래 地黃은 《神農本草經》<sup>25</sup>에서 최초로 나오는 것으로 《神農本草經》에서는 단지 生地黃과 乾地黃으로만 구분하였을 뿐 熟地黃에 대한 설명은 없었으며, 《本草圖經》<sup>26</sup>에서 “二月, 八月, 採根, 蒸三二日, 令爛暴乾, 謂之熟地黃, 陰乾者, 謂之生地黃.” 이라고 하여 최초로 熟地黃에 대하여 언급함으로써 비로소 生地黃, 乾地黃 및 熟地黃으로 분류하게 되었다.

地黃의 主治效能에 대하여서 《神農本草經》<sup>25</sup>에서는 “主折跌, 折筋, 傷中, 逐血痺, 填骨髓, 長肌肉, 作湯, 除寒熱, 積聚, 除痺”라고 하였고, 그 후 《名醫別錄》<sup>27</sup>에서 乾地黃은 “主治男子五勞, 七傷, 女子傷中, 胞漏, 下血, 破瘀血, 尿血, 利大小腸, 去胃中宿食, 飽力斷絕, 補五臟內傷不足, 通血脈, 益氣力, 利耳目.”이라 하였고, 生地黃은 “主治婦人崩中血不止, 及產後血上薄心, 悶絕, 傷身, 胎中, 下血, 胎不落, 墮胎, 腕折, 瘀血, 留血, 衄鼻, 吐血, 皆搗飲之.”라고 하였고, 그 후 《湯液本草》<sup>28</sup>에서 “氣寒 味苦 陰中之陽 甘微苦 味厚氣薄 陰中陽也 無毒”, “象云 酒洒 蒸如烏金 加酒力則微溫 大補血衰者須用之 先黑髮 髮”이라고 하였는데 이 때부터 生地黃은 涼血의 작용에 치우쳐 사용하고 熟地黃은 補腎, 補血의 작용에 치우쳐서 사용하기 시작한 것으로 보인다. 東垣은 “若脈虛則宜熟地黃 地黃假火力蒸九數 故能補腎中元氣 仲景製八味丸 以熟地黃爲諸藥之首 天一所生之原也, 湯液四物 以治藏血之臟 亦以乾熟地黃爲君者 癸乙同歸一治也.”라고 하여 熟地黃의 補血作用을 설명하고 있고, 方藥合編에서는 熟地黃은 性は 微溫하고, 滋腎水, 補血烏髮, 益精髓하는 效能을 지닌 本草로서 묘사하고 있으며, 주된 기능은 腎陰 혹은 腎精을 補하는 것으로 설명하고 있다. 이상의 文獻을 살펴 볼 때 熟地黃은 결국 血虛나 陰虛의 證候를 개선하는데 사용되고 있음을 알 수 있다.

폐섬유화증은 그 증상에서 肺虛咳嗽, 鬱嗽, 勞嗽, 乾嗽, 久喘, 陰虛喘과 유사한 점을 발견할 수가 있으며 治方은 血虛나 陰虛를 개선하는 四物湯, 六味地黃湯, 金水六君煎, 瓊玉膏 등이 많이 사용되는데 이들 처방의 君藥이 熟地黃이라는 점과, 咳嗽 喘息의 병리기전 중 肺腎虛證은 久咳傷肺하여 腎虧 攝納無力하여 肺主氣하고 腎主納氣하는 기능이 실조되어 少氣而喘함으로서 발생된다'는 점을 살펴볼 때 熟地黃이 폐섬유화증에 응용될 경우 임상적으로 유의성있는 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 이에 저자는 熟地黃이 폐섬유화증에 미치는 영향을 알아보고자 bleomycin으로 유발한 폐섬유화 모델을 만들고 熟地黃이 Bleomycin에 의한 폐섬유화에 미치는 영향을 실

험적으로 평가하기 위하여 폐섬유화의 기전에 관여하는 macrophage, lymphocyte, neutrophil 등의 염증세포와 IL-4, INF- $\gamma$  등의 cytokine 발현에 관하여 bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군과 Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 RRE를 투여한 Sample 군으로 나누어 熟地黃의 항염증반응, 조직학적 변화 및 항섬유화작용을 관찰하였다.

본 실험에서 폐기관지 세척액내 백혈구 총수의 증가가 RRE의 투여된 Sample 군이 Control 군에 비하여 유의성( $P < 0.05$ ) 있는 백혈구 총수의 감소를 나타낸 것으로 보아 RRE는 총 백혈구수의 감소를 통해 bleomycin으로 감작된 기관지내 염증 억제효과 및 섬유화 발현 억제효과가 있음을 알 수 있다.

폐세척액 내 백혈구 비율의 변화에 있어서 Bleomycin유발 폐섬유화모델에서는 Macrophage보다는 Lymphocyte와 Neutrophil의 현저한 증가를 특징으로하는 병적인 염증상태를 보인다고 볼 수 있으며, RRE의 투여는 이러한 병적인 상태를 개선하여 정상적인 세포의 백혈구 비율로 회복시킨다고 볼 수 있다. 즉, RRE의 투여는 폐섬유화증을 유발하는 주요 백혈구 중 macrophage보다는 lymphocyte와 neutrophil의 증가 억제를 통해서 bleomycin으로 감작된 기관지내 염증을 억제효과 및 섬유화 발현억제 효과가 있음을 강력히 시사하는 것이다.

조직학적 폐손상 지표(SHI)에 있어서 Sample 군은 Control 군에 비하여 37.8%의 유의성( $P < 0.01$ ) 있는 감소가 관찰되었다. SHI가 Control 군보다 RRE를 함께 투여한 Sample 군에서 낮다는 것은 RRE를 투여는 bleomycin으로 감작된 기관지내 염증 억제효과 및 섬유화 발현 억제효과가 있음을 의미하는 것이다.

IL-4에 있어서 Sample 군은 Control 군에 비하여 유의성( $P < 0.05$ ) 있는 Th2-type immune response의 감소를 나타내었다. IL-4는 섬유화를 촉진하는 cytokine으로서 Control 군에서 보다 Sample 군에서 IL-4가 감소했다는 것은 RRE의 투여가 IL-4의 감소를 통해 폐섬유화를 억제함을 의미한다.

INF- $\gamma$ 에 있어서 Sample 군은 Control 군에 비하여 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있는 Th1-type immune response의 감

소를 나타내었다. INF- $\gamma$ 는 섬유화 억제의 대표적인 cytokine으로 섬유아세포 증식의 억제와 collagen 침착의 억제, 섬유아세포의 apoptosis 유도, TGF- $\beta$ 의 생성 억제등의 기전을 통해서 섬유화를 억제시키는데 적어도 C57BL/6J같은 Bleomycin에 민감한 쥐들의 경우 블레오마이신에 의해 유발된 폐섬유화모델에서는 INF- $\gamma$ 가 폐의 염증과 섬유화를 매개한다<sup>23</sup>고 하였으므로 Control 군보다 Sample 군에서 INF- $\gamma$ 가 감소되었다는 사실은 RRE의 투여가 적어도 C57BL/6J같은 쥐에서는 폐의 염증과 섬유화를 매개하는 INF- $\gamma$ 를 억제하여 섬유화를 억제한다고 할 수 있다. 또 다른 각도에서 고찰해 보면 INF- $\gamma$ 는 세포 매개성 면역에 관계하는 cytokine으로 조직 회복에 관련한 손상 부위를 정상적으로 회복시켜주는 역할을 하는데, Bleomycin을 투여로 염증상태가 유발됨으로서 초기 염증치유를 위해 INF- $\gamma$ 가 증가하였다가 RRE투여로 IL-4가 감소되어 급성염증상태가 회복됨으로서 INF- $\gamma$ 의 요구환경이 변화되어 INF- $\gamma$ 가 감소되었을 것으로도 추측할 수 있다. 그러나 INF- $\gamma$ 와 관련된 이 부분에서는 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

이상에서 살펴본 바와 같이 熟地黃은 백혈구 세포 중 특히 Lymphocyte, Neutrophil에 대한 억제작용과 IL-4에 대한 억제작용을 통해 조직학적으로 조직내의 염증반응의 감소 및 상피세포의 비대감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소 효과를 발휘하여 bleomycin으로 유발된 폐섬유화증에서 기관지내 염증을 억제효과 및 섬유화 발현 억제효과를 나타내었으므로 폐섬유화증에 熟地黃을 응용할 경우 좋은 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 結 論

熟地黃이 Bleomycin에 의한 폐섬유화에 미치는 영향을 실험적으로 평가하기 위하여 폐섬유화의 기전에 관여하는 macrophage, lymphocyte, neutrophil 등의 염증세포, 조직학적 변화 및 IL-4, INF- $\gamma$  등의 cytokine 발현에 관하여 bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군과 Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발

과 함께 14일간 RRE를 투여한 Sample 군으로 나누어 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백혈구총수에 있어서 熟地黃 투여군은 Control 군에 비하여 37.7 %의 유의성( $P < 0.05$ ) 있는 백혈구 총수의 감소를 나타내었다.
2. 폐세척액 내 백혈구 비율의 변화에 있어서 熟地黃 투여군은 백혈구 중 macrophage 비율이 Control 군에 비하여  $62.52 \pm 5.9$  %로 유의성 ( $P < 0.01$ ) 있게 증가하였으며, lymphocyte와 neutrophil의 비율은 모두 Control 군에 비하여  $21.2 \pm 3.3$  %,  $16.3 \pm 3.0$  %로 유의성( $P < 0.05$ ) 있는 감소를 나타내었다.
3. 조직학적 폐손상 지표에 있어서 熟地黃 투여군은 Control 군에 비하여 37.8 %의 유의성( $P < 0.01$ ) 있는 염증반응의 감소, 상피세포 비대의 감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소가 관찰되었다.
4. INF- $\gamma$ 에 있어서 熟地黃 투여군은 Control 군에 비하여 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있는 감소를 나타내었다.
5. IL-4에 있어서 熟地黃 투여군은  $30.5 \pm 3.1$  pg/ml로 Control 군에 비하여 유의성( $P < 0.05$ ) 있는 감소를 나타내었다.

## 參 考 文 獻

1. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:646-4.
2. J. R. Wyngarden, L. H. Smith Jr(Eds), WB Saunders, R. B. CRYSTAL. Interstitial lung disease. Philadelphia: The Cecil Textbook of Medicine; 1991, p.421-35.
3. 어수택. 폐 섬유화증의 병인 및 병태 생리. 결핵 및 호흡기 질환. 2003;54(2):167-77.
4. Bitterman PB, Adelberg S, Crystal RG. Mechanisms of pulmonary fibrosis: Spontaneous release of the alveolar macrophage-derived growth factor in the interstitial lung disorders. J Clin Invest. 1983;72:1801..
5. International consensus statement. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:646.
6. Raghu G. Evolving definition and approach to diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. in New approaches to managing idiopathic pulmonary fibrosis, American thoracic society. 2000.
7. 李珩九, 鄭升己. 東醫肺系內科學. 서울. 민서출판사. 1991;p.105-186.
8. 許俊. 東醫寶鑑.서울 :南山堂; 1992, p.705-37.
9. 李旻. 偏柱醫學入門. 서울. :대성문화사; 1994, p.252-5.
10. 張恒鴻. 結締組織疾病에 併發된 間質性肺疾患에 대한 活血化痰法의 治療效果 研究. 大田大學校 韓醫學研究所 論文集. 1997;5(2).
11. 全國韓醫科大學教授共編著. 本草學. 서울. :영림사; 1991, p.190-2, 580-1.
12. Raghu G.W, Johnson C, Lockhart D, Mageto Y. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with a new antifibrotic agent, pirfenidone. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1999;159:1061-9.
13. 김동순. 특발성폐섬유증(IPF)의 치료. 결핵 및 호흡기 질환. 2003;54(3):260-73.
14. 40. Bitterman PB, Adelberg S, Crystal RG. Mechanisms of pulmonary fibrosis: Spontaneous release of the alveolar macrophage-derived growth factor in the interstitial lung disorders. J Clin Invest. 1983;72:1801.
15. Borzone G, Moreno R, Urrea R, Meneses M, Oyarzun M, Lisboa C. Bleomycin- induced chronic lung damage does not resemble human idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2001;163:1648-53.
16. Kolb M, Bonniaud P, Galt T, Sime PJ, Kelly MM, Margetts PJ, Gauldie J. Differences in the fibrogenic response after transfer of active transforming growth factor-beta gene to lungs of "fibrosis-prone" and "fibrosis-resistant" mouse strains. Am J Respir Cell Mol Biol. 2002;27:141-50.
17. 41. Burkhardt A. Alveolitis and collapse in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. Am Rev Respir Dis. 1989;140:513.
18. Antoniadis HN, Neville-Golden J, Galanopoulos T, Kradin RL, Valente AJ, Graves DT. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89(12):5371-5.
19. Yoshimura K. Pathogenesis of idiopathic interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis: cellular and molecular biology of the disease. Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi. 1993;31:20-31.



20. Kolodkina LA, Ses' TP, Pokhodzei IV, Orlova GP. Role of neutrophilic leukocytes in pathogenesis of idiopathic fibrosing pulmonary alveolitis. *Probl Tuberk.* 1999;4:35-7.
21. Jakubzick C, Choi ES, Joshi BH, Keane MP, Kunkel SL, Puri RK, Hogaboam CM. Therapeutic attenuation of pulmonary fibrosis via targeting of IL-4- and IL-13-responsive cells. *J Immunol.* 2003;171(5):2684-93.
22. Desaki M, Sugawara I, Iwakura Y, Yamamoto K, Takizawa H. Role of interferon-gamma in the development of murine bronchus-associated lymphoid tissues induced by silica in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;185(1):1-7.
23. 서기현. 특발성간질성폐렴환자의 IL-4와 IFN-gamma의 활성화도. 순천향대학교 대학원. 2002.
24. Chen ES, Greenlee BM, Wills-Karp M, Moller DR. Attenuation of lung inflammation and fibrosis in interferon-gamma-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24(5):545-55.
25. 손성연 · 손병익집. 神農本草經. 대북: 오주출판사; 1985, p.42-3.
26. 蘇翼 · 상지균교. 本草圖經. 합비시: 안철과학기술출판사; 1994, p.80-1.
27. 陶弘景集 · 상지균교. 名醫別錄. 北京: 人民衛生出版社; 1986, p.23.
28. 王胡古. 湯液本草. 東醫十種醫書. 서울: 대성문화사; 1983, p.145-8.
29. 黃桃淵. 方藥合編. 서울: 남산당; 1983, p.129-31, 166-9, 175-7.