

# 十六味流氣飲이 FRTL-5 갑상선 세포의 DNA와 cAMP의 합성 및 MHC-class II의 발현에 미치는 영향

이재은, 김병우

상지대학교 부속한방병원 내과학교실

## Effects of *Sipyukmiyukieum* on DNA Synthesis, cAMP Synthesis and MHC-class II Expression of FRTL-5 Thyroid Cells

Jae-eun Yi, Byoung-woo Kim

Department of Internal Medicine, Oriental Hospital of Sangji University, Wonju, Korea

**Objective:** Graves' disease encompasses hyperthyroidism and diffused goiter associated with auto-antibodies to the thyroid stimulating hormone(TSH) receptors. In clinical environment, treatments of Graves' disease have many side effects such as recurrence and hypothyroidism. We've studied the effects of *Sipyukmiyukieum* on DNA synthesis, cAMP synthesis, and MHC-class II expression of FRTL-5 thyroid cells were studied.

**Methods:** DNA synthesis was investigated by using BrdU staining and cAMP synthesis by ELISA kit, and expression of interferon- $\gamma$  activated MHC class II by Flow cytometer.

**Results:** After introduction of *Sipyukmiyukieum*, significant inhibition of DNA synthesis, cAMP synthesis, and expression of interferon- $\gamma$  activated MHC class II of FRTL-5 thyroid cells was observed.

**Conclusions:** Judging from these results, *Sipyukmiyukieum* has potential as a potent herbal treatment for inhibiting the enlargement of goiter, synthesis of abnormal thyroidal hormones, and autoimmune responses of Graves' disease.

**Key Words:** *Sipyukmiyukieum*(*Shiliumeiliuqiyan*), FRTL-5 Thyroid Cells, DNA Synthesis, cAMP Synthesis, MHC class II Expression.t

### 1. 緒 論

체내에서 갑상선호르몬은 성장과 산소소모율 및 열생산 증가, 소화관으로부터 glucose 흡수율의 증가, 세포내에서의 glucose 이용도 증가 및 단백질, 지질 대사를 조절하는 중요한 역할을 한다<sup>1</sup>.

갑상선 기능항진증(hyperthyroidism)은 내분비질환 중 당뇨병 다음으로 유병율이 높은 질환으로서,

갑상선에서 갑상선호르몬이 과잉 생산, 분비되어 나타나는 갑상선중독증을 말하는데<sup>2,5</sup>, 이러한 갑상선중독증을 일으키는 원인 중 그레이브스병(Graves' disease)이 가장 흔하고, 그 빈도는 지역에 따라 60~90%로 다양하다<sup>4,6</sup>.

그레이브스병은 한의학에서는 癭癧, 鷄眼癩睛, 消渴, 怔忡, 煩燥 등의 범주에서 '本虛標實'을 바탕으로 肝氣鬱滯, 肝腎虧損, 心腎不交, 濕痰鬱結 등으로 나눠 辨證施治하는 것으로 알려져 있으나, 이 질환은 임상적으로 비특이적 증상이 대부분이고, 한방병원에 내원하는 환자의 경우 대부분 항갑상선제를 복용하여 갑상선종대, 안구돌출, 심계정축, 피로감,

· 접수 : 2005. 4. 20. · 채택 : 2005. 5. 19.  
· 교신저자 : 이재은, 강원도 원주시 우산동 283번지  
상지대학교 부속한방병원 5층 512호 내과외국  
(Tel. 033-741-9381  
E-mail : mind728@freechal.com)

식욕항진, 체중감소, 월경부조 등의 임상증상과는 다른 비전형적인 증상을 나타내 한의학적 치료 및 접근이 용이하지 않은 실정이다<sup>7,8</sup>.

이러한 임상적 어려움을 가진 갑상선기능항진증에 대하여朴<sup>9</sup>, 金<sup>10</sup>, 鄭<sup>11</sup>, 李<sup>12</sup>, 崔<sup>13</sup> 등이 임상 및 실험실 연구를 통하여 부분적인 효능을 보고한 바 있으나, 갑상선 세포의 DNA와 cAMP 합성 및 MHC-class II의 발현에 미치는 영향에 대해서는 아직까지 연구가 이루어지지 않았다.

이에 저자는 임상적으로 갑상선기능항진증, 갑상선종에 효과가 있다고 알려진 十六味流氣飲이 FRTL-5 갑상선 세포의 DNA와 cAMP의 합성 및 MHC-class II의 발현에 미치는 영향을 methimazole과의 대조실험을 통하여 비교 분석한 결과 유의한 결론을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 검액의 제조

본 실험에 사용한 十六味流氣飲의 구성 약재와

용량은 Table 1과 같다. 十六味流氣飲 한첩 분량(41.2g)을 100ml의 증류수로 탕전한 후 -70℃에서 동결 건조하여 3.4g의 extract를 얻어 실험에 사용하였다(Table 1.).

### 2. Fisher rat thyroid cells(FRTL-5 갑상선 세포)의 배양

본 실험에서 사용한 FRTL-5 갑상선 세포(International Thyroid Research Foundation, Baltimore, MD, U.S.A)는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 제공받았다. FRTL-5 갑상선 세포의 배양은 5H medium과 6H medium을 사용하였다. 5H medium은 Coon's modified Ham's F-12 medium(K. C. Biological, St. Louis, MO, U.S.A.) 1 l 에 5% FBS(Gibco; Invitrogen Corp., CA, U.S.A.), 10 μg/μl insulin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), 5 μg/μl transferrin(Sigma), 10 ng/μl Gly-His-Lys acetate(Sigma), 10ng/μl somatostatin(Sigma), 10 μM cortisol(Sigma)을 혼합하여 사용하였고, 6H medium은 5H medium에 1mU/ml TSH(Sigma)를 첨가하여 사용하였다.

Table 1. The Amount and Synthesis of *Sipyukmiyukieum* Extract

韓藥名	生藥名	重量(g)
蘇葉	Perillae Folium	6
人蔘	Ginseng Radix	4
黃芪	Astragali Radix	4
當歸	Angelicae gigantis Radix	4
川芎	Cnidii Rhizoma	2
肉桂	Cassiae Cortex	2
厚朴	Machili Cortex	2
白芷	Angelicae Radix	2
防風	Sileris Radix	2
烏藥	Linderae Radix	2
檳榔	Arecae Semen	2
芍藥	Paeoniae Radix	2
枳殼	Ponciri Fructus	2
木香	Helenii Radix	2
甘草	Glycyrrhizae Radix	2
桔梗	Platycodi Radix	1.2
	總量	41.2

### 3. FRTL-5의 세포독성 측정

十六味流氣飲의 세포독성은 Crystal Violet을 이용하여 측정하였다. 세포를 96well 세포배양용기에  $1 \times 10^4$  cells/well 로 분주한 후 12시간 이상 배양하여 부착하였고, serum-free media에서 24시간 배양하였다. 세포배양액을 제거하고 5H 혹은 6H medium 하에서 여러 농도의 十六味流氣飲을 투여한 후 2일간 배양하였다. 배양액을 제거 후 Crystal Violet 투여 후 약 5~10분간 상온에 방치하였다. 세포는 1ml의 1% SDS를 첨가하여 분해한 후, spectrophotometer (Dynatech, Inc., Alexandria, VA, U.S.A.)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. FRTL-5의 DNA 합성억제 측정

FRTL-5 갑상선 세포의 DNA 합성억제 정도는 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II (Roche, Germany)를 이용하여 측정하였다. 실험 방법은 제조회사의 protocol에 의하였다. 24-well culture plate에 각 well 당  $2 \times 10^5$  cells를 넣어 배양한 후 十六味流氣飲과 methimazole을 농도별로 처리하여 24시간 더 배양하였다. 24시간이 지난 후 세포배양액을 제거하고 BrdU를 10 $\mu$ mol/L로 넣고 약 20분간 다시 배양하였다. 배지를 제거 한 뒤 1 $\times$ PBS로 세 번 세척하고 에탄올 고정액(50mM glycin, 70% Ethanol)을 넣어 -20 $^{\circ}$ C에서 20분간 방치하였다. 다시 1 $\times$  PBS(phosphate buffered saline)로 세 번 세척하고 anti-BrdU 용액을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치하였다. 1 $\times$  PBS로 세 번 세척하고 anti-mouse-Ig-AP 용액을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치하였다. 1 $\times$  PBS로 세 번 세척하고 기질(NBT와 phosphate 용액)을 넣어 세포가 반응하여 색깔이 나오면 반응을 멈추고 현미경하에서 세포수를 측정하였다.

### 5. FRTL-5의 cAMP level 측정

十六味流氣飲의 효과를 cAMP ELISA kit(Sigma, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다. 6H 배지 하에서 1~2일간 배양한 FRTL-5 갑상선 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 부착 시킨 후 5H 배지 하에서

72시간 배양하였다. 그런 다음 이를 十六味流氣飲과 methimazole을 포함한 6H 배지로 전환시켜 4시간 동안 배양하였다. 이 배지를 수거하여 cAMP ELISA kit(Sigma, U.S.A.) 방법에 따라 cAMP 양을 측정하였다.

### 6. FRTL-5의 MHC-class II의 발현 측정

FRTL-5 갑상선 세포의 MHC-class II의 발현은 Rat thyroid cell recombinant rat Interferone- $\gamma$ (Gibco, U.S.A.)로 유도하였다. 6H medium 하에서 1~2일간 배양한 FRTL-5 갑상선 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 부착시킨 후 5H medium 하에서 72시간 배양하였다. 그 후 十六味流氣飲 및 methimazole을 포함한 6H medium으로 전환시켜 4시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 100U/ml Interferone- $\gamma$ 를 첨가하여 4일 동안 배양시켜 MHC-class II의 발현을 유도한 후 갑상선 세포를 0.05% Trypsin-0.53mM EDTA 용액을 처리하여 날개의 세포로 수확하였다. 이들 세포에 1 $\mu$ g murine monoclonal antibody clone 53~502(Gibco, U.S.A.)를 처리하여 4 $^{\circ}$ C ice water에서 30분간 반응시켰다. 음성대조군은 Isotype이 같은 Mouse IgG를 처리하였다.

30분후 Bovine serum albumin이 0.5% 되게 첨가된 cold phosphate buffered saline 용액으로 2회 세척한 후 fluorescein isothiocyanate(FITC)가 부착된 Goat anti-mouse antibody 시약을 각각의 세포에 처리하여 4 $^{\circ}$ C ice water에서 1시간 동안 반응시켰다. 이들 세포를 재차 2회 세척한 다음 0.4ml의 1% Paraformaldehyde 용액에 부유시킨 다음 Flow cytometer에서 세포의 형광도를 측정하였다.

### 7. 통계분석을 통한 유의성 검증

본 연구의 통계학적 분석은 SigmaStat(ver 2.1)를 이용하여 ANOVA test로 검증하였고, 각각의 수치는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며, 유의성은  $p$ 값이 <0.05 수준일 때를 기준으로 하였다.

### III. 結果

#### 1. FRTL-5의 세포독성에 미치는 영향

十六味流氣飲의 세포독성을 알아보기 위해 다양한 농도의 十六味流氣飲을 FRTL-5 갑상선 세포에 처리한 후 Crystal Violet를 이용하여 cell survival을 측정하였다.

十六味流氣飲을 0에서 800 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리하였더니 cell survival이 농도별로 점차 감소하여 800 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 대조군에 비해 약 73.8%의 cell survival을 나타내었다( $p < 0.05$ )(Fig. 1.). 따라서 본 연구에서는 800 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 50 $\mu\text{g/ml}$ , 100 $\mu\text{g/ml}$ , 200 $\mu\text{g/ml}$ , 400 $\mu\text{g/ml}$ , 600 $\mu\text{g/ml}$ , 800 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 본 실험을 진행하였다(Fig. 1.).

#### 2. FRTL-5의 DNA 합성 억제에 미치는 영향

十六味流氣飲의 DNA 합성억제효과를 알아보기 위하여 FRTL-5 갑상선 세포에 BrdU와 BrdU를 인식하는 항체를 처리하여 세포의 핵을 염색한 후 염색된 세포를 측정하여 DNA의 합성 정도를 관찰하였다(Fig. 2.).

十六味流氣飲의 DNA 합성 억제효과를 알아보기 위하여 methimazole과 같이 세포에 처리하여 관찰한 결과 합성 정도가 각 농도에 따라 감소하였으며, methimazole 또한 감소하였으나 methimazole 보다 十六味流氣飲의 DNA 합성억제 효과가 더 높은 것으로 나타났다. 즉, 十六味流氣飲은 50 $\mu\text{g/ml}$ , 100 $\mu\text{g/ml}$ , 200 $\mu\text{g/ml}$ , 400 $\mu\text{g/ml}$ , 600 $\mu\text{g/ml}$ , 800 $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 대조군에 비해 유의한 DNA 합성 억제

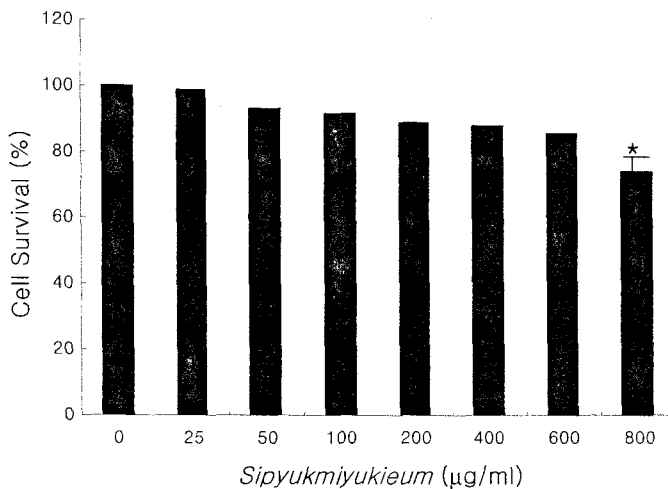


Fig. 1. Cell Survival of *Sipyukmiyukieum* on FRTL-5 Thyroid Cells

\*  $p < 0.05$  vs Control

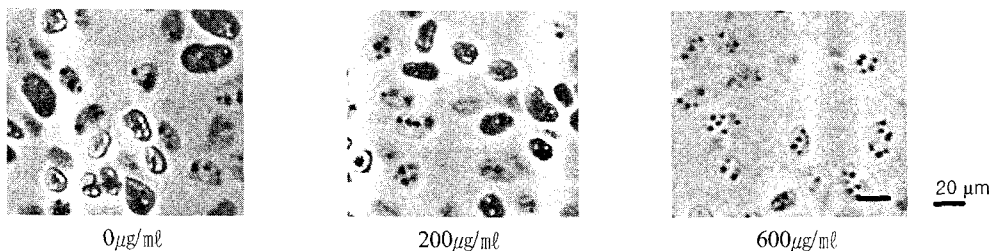


Fig. 2. Inhibitory Effects of *Sipyukmiyukieum* on FRTL-5 Thyroid Cells DNA Synthesis (By BrdU Staining)

효과를 보였으며, 특히 600 $\mu\text{g/ml}$ , 800  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 양성대조군인 100mM의 methimazole에 비해서도 유의한 억제효과를 나타내었다(Fig. 3.).

3. FRTL-5의 cAMP 합성에 미치는 영향

十六味流氣飲이 FRTL-5 갑상선 세포의 cAMP 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 cAMP ELISA

kit(Sigma, U.S.A.) 방법에 따라 cAMP 양을 측정한 결과, 十六味流氣飲은 200 $\mu\text{g/ml}$ , 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 유의한 발현억제 효과를 보였으며, 50 $\mu\text{g/ml}$ , 100 $\mu\text{g/ml}$ , 200 $\mu\text{g/ml}$ , 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 양성대조군인 100mM의 methimazole에 비해 유의한 발현억제 효과를 나타내었다(Fig. 4.).

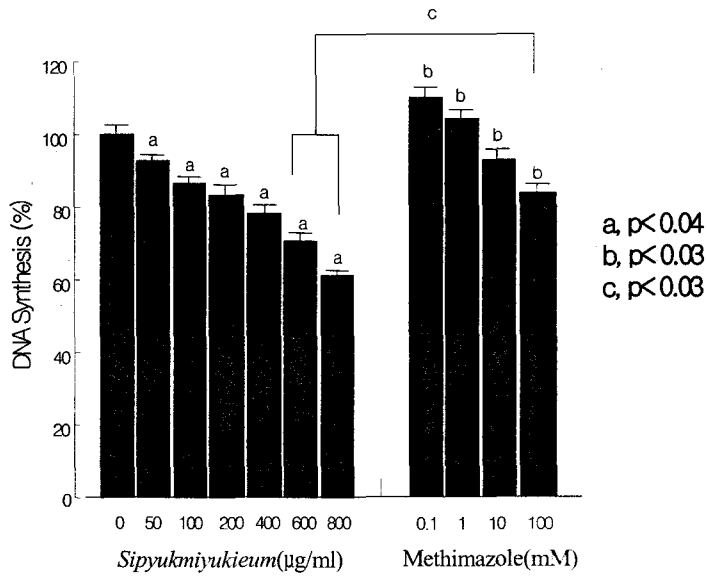


Fig. 3. Inhibitory Effects of *Sipyukmiyukieum* on FRTL-5 Thyroid Cells DNA Synthesis

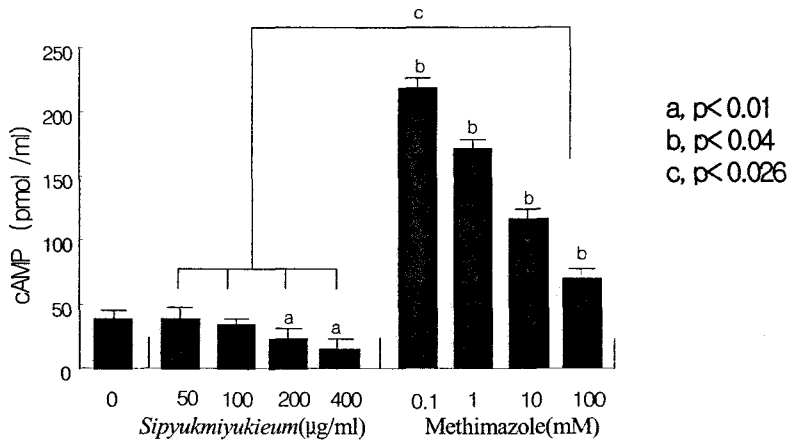


Fig. 4. Inhibitory Effects of *Sipyukmiyukieum* on FRTL-5 Thyroid Cells cAMP Synthesis

4. FRTL-5의 MHC-class II 발현에 미치는 영향

十六味流氣飲이 FRTL-5 갑상선 세포의 MHC-class II의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 Interferone- $\gamma$ 를 이용하여 MHC-class II의 발현을 유발하였다. MHC-class II 발현 FRTL-5 갑상선 세포에 十六味流氣飲 및 methimazole을 첨가하여 반응시킨 후 Flow cytometer에서 세포의 형광도를 측정

하였다(Fig. 5).

Interferone- $\gamma$ 를 첨가하지 않은 음성대조군의 cell number(%)가 12.24인데 비해, Interferone- $\gamma$ 를 첨가한 대조군에서는 78.31로 MHC-class II 발현이 충분히 유발되었다.

十六味流氣飲은 50 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml, 400 $\mu$ g/ml의 농도 모두에서 대조군에 비해 유의한 MHC-

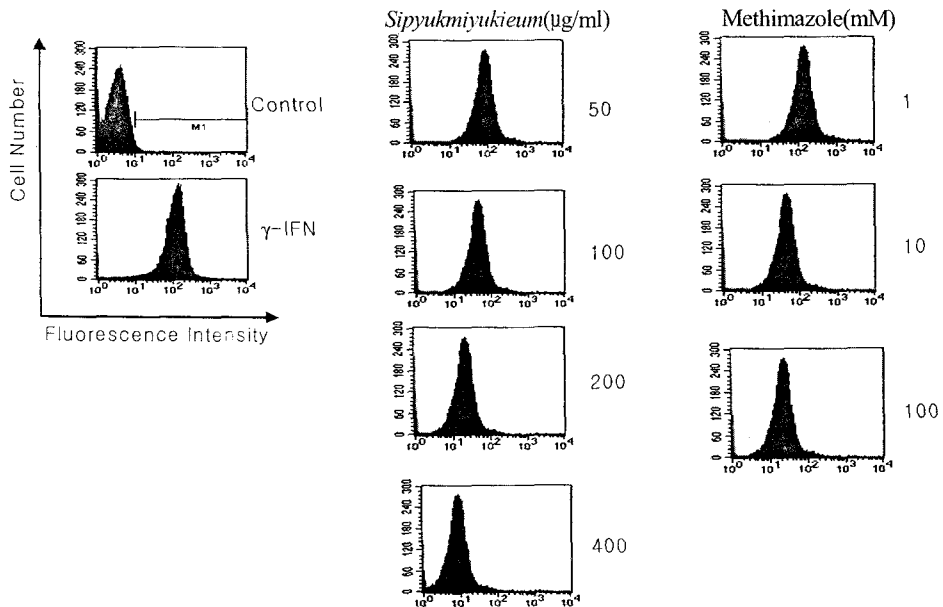


Fig. 5. Inhibitory Effects of *Sipyukmiyukieum* on FRTL-5 Thyroid Cells MHC-class II Expression

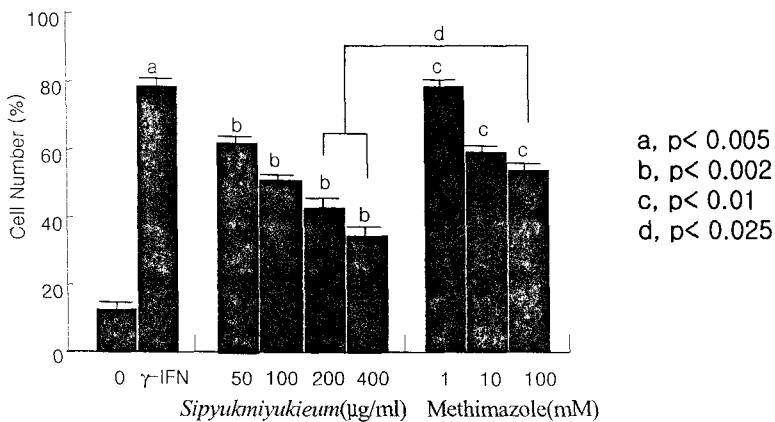


Fig. 6. Inhibitory Effects of *Sipyukmiyukieum* on FRTL-5 Thyroid Cells MHC-class II Expression

class II 발현 억제 효과를 보였으며, 200 $\mu$ g/ml, 400  $\mu$ g/ml의 농도에서는 100mM methimazole에 비해서도 유의한 발현 억제 효과를 나타내었다(Fig. 6).

#### IV. 考 察

갑상선 기능항진증(hyperthyroidism)은 내분비질환 중 당뇨병 다음으로 유병율이 높은 질환으로서, 갑상선에서 갑상선호르몬이 과잉 생산, 분비되어 나타나는 갑상선증독증을 말하는데<sup>2,5</sup>, 이러한 갑상선증독증을 일으키는 원인 중 그레이브스병이 가장 흔하고, 그 빈도는 지역에 따라 60~90%로 다양하다<sup>4,6</sup>. 그레이브스병은 TSH 수용체에 대한 자가항체가 갑상선을 자극하여 갑상선기능항진증을 일으키는 기관-특이성 자가면역질환이다<sup>4,14</sup>.

자가면역성 갑상선질환은 갑상선 자가항원에 대한 자가면역 현상이 일어나서 자가항체가 생성되고, 염증성 변화가 일어나는 경우를 말한다. 그 결과 갑상선 세포가 파괴되어 갑상선기능저하증이 초래되거나 혹은 자가항체가 갑상선을 자극하여 갑상선기능항진증이 유발된다. 그 구체적 과정으로 대식세포나 수상세포(dendrite cell)와 같은 항원제시세포의 세포막에 항원결정기가 구조적합성복합체 II(MHC-class II) 항원과 결합하여 표출되면 자가반응성 T 세포가 이를 인지한다. 이때 유착분자(ICAM-1, LFA-1)와 보조자극신호분자(B7, CD28/CTLA-4)들이 서로 결합하여야 T 세포가 활성화되어 면역 현상이 일어나게 된다. 자가면역성 갑상선질환 환자의 갑상선 세포는 MHC-class II 항원을 표출하며, 유착분자들을 표출하고 있음이 밝혀졌다<sup>4</sup>. 갑상선자극항체는 TSH 수용체의 세포 밖 부분에 결합한 후 아데닐레이트 싸이클라아제-cAMP 신호전달체계를 자극하여 요오드(I)의 세포 섭취, 갑상선호르몬 생성 및 분비와 갑상선 세포의 성장을 촉진시키며, 그레이브스병에서 갑상선기능항진증의 원인이 된다. MHC class II 항원 표출은 그 자체가 갑상선 자가면역의 일차적 병인이라기 보다는 어떤 원인에 의해 시작된 자가면역 현상의 이차적 결과(림프구에서 분비된

감마 인터페론에 의해 유도된)이며, 자가항원을 계속적으로 주위 T 세포에 제시함으로써 자가면역 현상을 지속시키는 증폭제 역할을 한다고 생각된다<sup>2,4,6,14</sup>.

그레이브스병은 임상적으로 열불내인성, 체중감소, 쇠약감, 심계항진 등의 갑상선증독증의 증상과 미만성 갑상선종, 안구돌출증, 피부병증과 경골전 점액수종의 증상을 동반하며, 갑상선 기능검사상 혈청 TSH의 감소와 T<sub>3</sub>(Triiodothyronine), T<sub>4</sub>(Thyroxine)의 증가 및 갑상선 자극 호르몬 수용체 항체(TSH receptor antibody: TSH-R-Ab)를 특징으로 한다<sup>2,6,14</sup>.

또한, 이 질환은 TSH 수용체 항체에 의한 자가면역질환이므로 근본적 치료로는 자가항체의 생성을 억제해야 하지만 현재로서는 아직 방법이 없는 실정이므로 갑상선호르몬의 생산량을 조절하여 정상 갑상선기능을 유지시키는 것이 유일한 방법이다. 이러한 목적으로 첫째, 갑상선호르몬의 생산, 분비 및 대사에 영향을 미치는 약제를 투여하여 갑상선기능을 정상으로 유지시키는 방법과 둘째, 방사성요오드 사용 또는 수술로써 갑상선조직을 파괴 혹은 제거시키는 방법이 사용되고 있다. 그러나, 약물요법의 경우 치료 중단 후의 잦은 재발이, 방사성요오드요법과 갑상선절제술은 시술 후의 갑상선기능저하증의 부작용이 문제가 되어 임상적으로 그레이브스병의 완전한 관해를 기대하기가 어렵다고 할 수 있다<sup>2,4,6,15</sup>.

그레이브스병은 한의학적으로 癭, 癭瘤, 鷄眼凝睛, 癩眼, 消渴, 怔忡, 驚悸, 煩燥 등의 範疇에 屬하며, 세부적으로는 갑상선이 종대된 것은 “癭病”, 多食하고 少瘦한 것은 “消渴”, 心動過速한 것은 “怔忡”·“驚悸”, 眼球突出은 “兔眼”, 熱不耐性은 “煩燥” 등의 範疇에 각각 포함시켜 설명하고 있다<sup>7,16</sup>. 原因으로는 肝氣鬱滯, 肝陽上亢, 肝腎虧損, 心陰不足, 心腎不交, 腎水不足, 氣血鬱滯, 濕痰鬱結 등을 들 수 있고, 陰虛火旺, 虛火內動(本虛標實)의 病理變化에 의해 발생한다고 할 수 있으며, 通治方으로는 六味地黃丸, 當歸龍薈丸, 丹梔逍遙散, 十六味流氣飲, 龍膽瀉肝湯 등이 쓰이고 있다<sup>7</sup>. 그러나, 그레이브스병은 임상적으로 비특이적 증상이 대부분이고, 한방병원에

내원하는 환자의 경우 대부분 항갑상선제를 복용하여 갑상선종대, 안구돌출, 심계정층, 피로감, 식욕항진, 체중감소, 월경부조 등의 임상증상과는 다른 비전형적인 증상을 나타내 동양의학적 치료 및 접근이 용이하지 않은 실정이다<sup>8</sup>.

이러한 임상적 어려움을 가진 갑상선기능항진증에 대하여 많은 연구들이 행해져 왔고, 특히 한의학적인 측면에서 접근한 여러 연구 실적들이 보고되고 있는데, 현재까지 安全白虎湯<sup>8</sup>, 海藻玉壺湯<sup>9</sup>, 八味逍遙散加味方<sup>12</sup>, 逍遙散加味方<sup>17</sup>, 十六味流氣飲<sup>18</sup>, 炙甘草湯<sup>19</sup> 등의 처방 및 夏枯草<sup>10</sup> 등과 갑상선기능의 연관성에 대한 연구가 이루어져 있는 상태이고, 최근 葛根·黃芩이 FRTL-5 갑상선 세포의 증식과 cAMP 합성 및 MHC-class II의 발현에 미치는 영향<sup>13</sup>에 대해서도 실험적 연구가 이루어 졌다. 그러나, 임상적으로 갑상선기능항진증, 갑상선종에 유의한 효과가 있다고 알려진 十六味流氣飲이 갑상선 세포의 DNA와 cAMP 합성 및 MHC-class II의 발현에 미치는 영향에 대해서는 아직까지 연구가 이루어지지 않은 상태이다. 이에 저자는 본 연구에서 임상적으로 갑상선기능항진증, 갑상선종에 효과가 있다고 알려진 十六味流氣飲이 FRTL-5 갑상선 세포의 DNA와 cAMP의 합성 및 MHC-class II의 발현에 미치는 영향을 methimazole과의 대조실험을 통하여 증명하고자 했다.

十六味流氣飲은 宋代의 『瘡瘍全書』에 처음으로 수록된 方劑로 婦人乳癌을 치료하는 데 사용되었다<sup>18</sup>. 『醫學正傳』<sup>20</sup>에는 紫蘇葉 6g 人蔘 黃芪 當歸 各 4g 川芎 肉桂 厚朴 白芷 防風 烏藥 檳榔 白芍藥 枳殼 木香 甘草 各 2g 桔梗 1.2g과 같이 처방이 구성된다고 되어 있다. 처방구성약물 중 蘇葉, 防風, 白芷는 發散風寒藥으로 邪氣를 發散시켜 癰疽瘡瘍을 치료하며, 人蔘, 黃芪, 甘草는 補氣하며, 除大熱, 瀉陰火, 補元氣하여 瘡瘍의 聖藥으로, 治腫癰, 癭瘤, 癰疽한다. 當歸, 白芍藥, 川芎은 補血活血하여 혈액순환을 촉진시켜 癰疽瘡瘍, 癩癧, 癭瘤를 치료한다. 肉桂는 溫裏祛寒, 通行血脈하며, 治陰疽한다 하였으며, 枳殼, 木香, 烏藥, 桔梗, 厚朴, 檳榔은 理氣藥으로, 枳殼은

散留結, 木香은 療腫毒, 消惡氣, 烏藥은 治癰疽, 桔梗은 祛痰排膿, 破滯氣及積聚, 治癰瘤, 厚朴은 化濕, 溫中益氣, 消痰下氣, 檳榔은 殺蟲, 治瘡瘍하며, 枳殼, 白芍藥, 桔梗은 排膿散으로 瘡瘍을 치료한다. 그러므로, 補氣補血, 理氣活血, 發散하여 表裏를 불문하고 氣血의 凝滯를 疏散시키므로 이로 인한 腫塊를 치료하는 효능을 갖는다<sup>18</sup>.

본 연구에서 사용한 FRTL-5 갑상선 세포는, 쥐의 정상 갑상선 세포로서 갑상선 기능항진증, 특히 그레이브스병의 생리 병리 기전 연구 및 치료 약물의 효능연구에 가장 널리 응용되는 모델로, TSH의 자극에 의해 활성화되어 갑상선 세포증식과 DNA 합성 그리고 갑상선 호르몬의 합성을 일으키게 되며<sup>21,22</sup>, 특히 MHC class I, II와 같은 면역반응 조절단백의 호르몬에 의한 발현 조절을 연구하는데 있어 비면역계 세포 중에서 가장 좋은 시스템이다<sup>23</sup>.

임상적으로 TSH에 의해 자극받은 갑상선 세포의 증식은 갑상선종을 유발하는데, 현재까지 그레이브스병의 치료에 응용되는 methimazole은 TSH 자극에 의한 갑상선 세포의 증식을 직접적으로 억제하는 효능은 적은 것으로 알려져 있다<sup>24</sup>.

十六味流氣飲이 FRTL-5 갑상선 세포의 DNA 합성 억제에 미치는 효과를 알아보기 위하여 methimazole과 같이 세포에 처리하여 알아 본 결과 농도 의존적으로 감소하였으며, methimazole 또한 감소하였으나 十六味流氣飲의 DNA 합성 억제 효과가 보다 더 높은 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 나타난 결과로 미루어 볼 때 methimazole에 비해 十六味流氣飲이 임상적으로 갑상선종의 유발을 보다 더 직접적으로 억제시키는 효능이 있을 것으로 추정되었다(Fig. 3).

TSH는 갑상선 세포막의 TSH 수용체와 결합하여 아데닐레이트 사이클라아제와 phospholipase(PLC) 신호전달 경로를 활성화시켜 그 작용을 나타낸다. 아데닐레이트 사이클라아제는 ATP로부터 cAMP를 만들고 cAMP는 protein kinase A(PKA)를 활성화시켜 세포내 단백을 인산화시킨다<sup>25-8</sup>. 즉 갑상선 세포 내에서 cAMP의 합성은 TSH의 자극 정도와 TSH에



의한 갑상선 세포의 증식 및 갑상선 호르몬의 합성에 중요한 에너지원으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 특히 FRTL-5 갑상선 세포에서 세포내로의 3H-thymidine의 결합은 cAMP와 연관된 TSH의 활성화에 의하는 경로와 cAMP와는 무관한 IGF-I에 의한다는 두가지 경로가 있는 것으로 알려져 있으며, methimazole은 cAMP-TSH 경로보다는 IGF-I 경로와 보다 상관성이 있는 것으로 보고되고 있고<sup>29</sup>, 이것은 본 연구에서도 나타난 methimazole이 cAMP의 발현을 억제하지 못하는 결과와도 일치한다. 그러나, 본 연구에서 확인할 수 있었던 十六味流氣飲에 의한 FRTL-5 갑상선 세포의 DNA 합성 억제 효과와 cAMP 합성 억제 효과로 미루어 볼 때 十六味流氣飲의 갑상선 세포 증식 및 DNA 합성 억제 효과는 기존의 항갑상선제제인 methimazole과는 다르게 cAMP-TSH의 경로를 차단하여 발생하는 것으로 여겨진다(Fig. 3, 4).

갑상선 호르몬은 TSH 수용체의 자극 인자인 TSH, cAMP, TSH 수용체 자가항체 등에 의해 활성화되는데, 그레이브스병에서는 TSH 수용체 자가항체에 의한 cAMP의 합성 및 활성화 증가로 인해 비정상적인 갑상선 호르몬의 합성 및 방출이 이루어지게 된다<sup>2,4,5,6</sup>. 따라서 본 연구에서 관찰된 十六味流氣飲의 cAMP 합성 억제작용을 고려할 때, TSH 자극에 의해 활성화되는 cAMP의 작용을 억제하여 요오드의 갑상선 세포내에서의 갑상선 호르몬으로의 전환을 억제할 것으로 여겨진다(Fig. 4).

또한, 갑상선 세포에서 관찰되는 비정상적인 MHC-class II는 자가면역성 갑상선질환과 관련되는 것으로 여겨지는데, 이는 이차적으로 갑상선으로의 임파구 침윤을 매개하는 Interferon- $\gamma$ 와 같은 사이토카인에 의해 생산되고, 그 결과 과생산된 MHC-class II는 갑상선 세포를 항원제공세포(antigen-presenting cells)로 인식되게 해서 갑상선 호르몬 분비에 대한 자가면역 반응을 촉진시키게 된다. 따라서 그레이브스병에 대한 원인 및 질병 예후에 있어 MHC-class II의 중요성이 대두되고 있다<sup>2,4,6,14</sup>. 현재까지 methimazole이 그레이브스병에서 MHC-class II의

발현을 억제하는지에 대한 연구에서 in vitro에서는 methimazole이 갑상선 세포의 MHC-class II의 발현을 직접적으로 억제하지 못하는 반면, in vivo 및 임상연구에서는 갑상선 호르몬의 합성과 갑상선 항원형성에 대한 억제 작용을 통한 이차적인 면역 조절 기능이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>30,35</sup>. 본 연구 결과, 十六味流氣飲은 FRTL-5 갑상선 세포의 MHC-class II 발현 억제에 유의한 효과가 있음이 입증되었다. 따라서 十六味流氣飲은 그레이브스병에 있어 자가면역성 반응을 억제시키는 데에도 직접적으로 관여할 것으로 생각된다(Fig. 5, 6).

본 연구의 결과로 미루어볼 때 十六味流氣飲은 그레이브스병에서 나타나는 갑상선종과 갑상선 호르몬 합성 및 자가면역성 반응의 억제에 광범위하게 응용할 수 있는 처방으로 사료되며, 아울러 향후 in vivo 및 임상 연구를 통한 검증이 필요하리라 사료된다.

## V. 結 論

十六味流氣飲이 FRTL-5 갑상선 세포의 DNA와 cAMP의 합성 및 MHC-class II의 발현에 미치는 영향을 알아보고자 실험을 진행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 十六味流氣飲은 모든 농도에서 대조군에 비해 농도의존적으로 유의한 DNA 합성 억제효과를 보였으며, 특히 600 $\mu$ g/ml, 800 $\mu$ g/ml 농도에서는 양성대조군인 100mM의 methimazole에 비해서도 유의한 억제효과를 나타내었다.
2. 十六味流氣飲은 200 $\mu$ g/ml, 400 $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 유의한 cAMP 합성 억제효과를 보였으며, 모든 농도에서 양성대조군인 100 mM의 methimazole에 비해 유의한 합성 억제효과를 나타내었다.
3. 十六味流氣飲은 모든 농도에서 대조군에 비해 유의한 MHC-class II 발현 억제효과를 보였으며, 200 $\mu$ g/ml, 400 $\mu$ g/ml의 농도에서는 100mM methi-

mazole에 비해서도 유의한 발현 억제효과를 나타내었다.

이상의 결과로 十六味流氣飲은 FRTL-5 갑상선 세포의 DNA와 cAMP의 합성 억제 및 MHC-class II의 발현 억제에 모두 유의한 효과를 보임이 입증되었다. 그러므로, 그레이브스병에서 나타나는 갑상선종과 갑상선 호르몬 합성 및 자가면역성 반응의 억제에 광범위하게 응용할 수 있는 처방으로 사료되며, 아울러 향후 in vivo 및 임상 연구를 통한 검증이 필요하리라 사료된다.

### 參 考 文 獻

1. 강두희. 생리학. 서울: 신광출판사; 1992. p. 15-23.
2. 민현기, 최영길, 고창순, 허갑범, 이태희, 이홍규. 내분비학. 1판. 서울: 고려의학; 1999. p.273-90.
3. 정재훈. Update in Pathophysiology of Graves' disease. 대한내분비학회 추계심포지움; 2002, p. 13-26.
4. 조보연. 임상갑상선학. 1판. 서울: 고려의학; 2001, p.109-36, 145-94.
5. Larsen, Kronenberg, Melmed, Polonsky. Williams Textbook of Endocrinology. 10th edition. Philadelphia: Saunders; 2002, p.378-403.
6. 민현기. 임상 내분비학. 2판. 서울: 고려의학; 1999, p. 215-39.
7. 두호경. 東醫腎系學. 서울: 동양의학연구원; 1993, p.1056-9.
8. 변상혁, 김순일, 권영구, 이병철, 안영민, 두호경, 안세영. 항갑상선제 저항성 그레이브스병(Graves' disease) 환자에 대한 安全白虎湯의 임상적 효능. 대한한방내과학회 추계학술대회지; 2003, p.59-65.
9. 박재현. 海藻玉壺湯이 白鼠의 甲狀腺機能亢進症에 미치는 影響. 동국대학교대학원 석사학위논문; 1989.
10. 김호진, 김선희. 薑朮 夏枯草가 甲狀腺機能亢進症 白鼠에 미치는 影響. 동서의학. 1993;18(1): 23-37.
11. 정찬길. 갑상선기능항진증의 한의치험 1례. 세명대학교 한의학연구소 논문집. 1999;2:71-8.
12. 이연성, 소경순, 정찬길. 八味逍遙散加味方이 sodium levothyroxine으로 유발된 흰쥐의 갑상선중독증에 미치는 영향. 동의병리학회지. 2001; 15(1):21-7.
13. 최정원. 葛根, 黃芩이 FRTL-5 thyroid cells의 증식과 cAMP 합성 및 MHC-class II의 발현에 미치는 영향. 경희대학교대학원 석사학위논문; 2004.
14. 조보연. 갑상선질환의 자가면역성 병인론. 대한의학협회지. 1993;36:31-9.
15. Marchant B, Lees JF, Alexander WD. Anti-thyroid drugs. Pharmacol Ther[B]. 1978;3:305-48.
16. 김철중. 갑상선기능항진증에 대한 문헌적 연구. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1998;7(1): 807-15.
17. 손숙영. 逍遙散加味方이 Sodium Levothyroxine 투여로 유발된 흰쥐의 갑상선기능항진증에 미치는 影響. 경희대학교대학원 석사학위논문; 1986.
18. 정연희, 채병윤. 十六味流氣飲 및 그 加味方이 甲狀腺機能에 미치는 影響. 한의학회지. 1988; 9(2):98-108.
19. 한승동. 炙甘草湯이 sodium levothyroxine으로 유발된 白鼠의 甲狀腺機能亢進症에 미치는 影響. 경산대학교대학원 석사학위논문; 1994.
20. 虞搏. 醫學正傳. 서울: 醫藥社; 1973, p.564.
21. Green LM, Murray DK, Tran DT, Nelson GA, Shah MM, Luben RA. A spontaneously arising mutation in connexin32 with repeated passage of FRTL-5 cells coincides with increased growth rate and reduced thyroxine release. J Mol Endocrinol. 2001;27:145-63.
22. Leer LM, Camunenga M, van der Vorm ER, de Vijlder JJ. Methimazole increases thyroid-specific

- mRNA concentration in human thyroid cells and FRTL-cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1991; 78:221-8.
23. 송민호, 신영태, 김영진, 노홍규. 갑상선 세포에서 ICAM-1(CD54) 유전자의 발현 조절(ICAM-1 유전자 프로모터의 클로닝과 조절부위 분석). *대한내분비학회지.* 1997;12(3):393-409.
  24. Taniguchi S, Yoshida A, Mashiba H. Direct effect of methimazole on rat thyroidal cell growth induced by thyrotropin and insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 1989;124:2046-51.
  25. Chazenbalk G, Magnusson RP, Rapoport B. Thyrotropin stimulation of cultured thyroid cells increases steady state levels of the messenger ribonucleic acid for thyroid peroxidase. *Mol Endocrinol.* 1987;1:913-7.
  26. Dumont JE, Jauniaux JC, Roger PP. The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends Biochem Sci.* 1989;14:67-71.
  27. Pisarev MA, Bocanera LV, Chester HA, Kleiman de Pisarev DL, Juvenal GJ, Pregliasco LB, Krawiec L. Effect of iodoarachidonates on thyroid FRTL-5 cells growth. *Horm Metab Res.* 1992; 24: 558-61.
  28. Van Heuverswyn B, Leriche A, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. Transcriptional control of thyroglobulin gene expression by cyclic AMP, *FEBS Lett.* 1985;188:192-6.
  29. Isozaki O, Tsushima T, Emoto N, Saji M, Tsuchiya Y, Demura H, Sato Y, Shizume K, Kimura S, Kohn LD. Methimazole regulation of thyroglobulin biosynthesis and gene transcription in rat FRTL-5 thyroid cells. *Endocrinology.* 1991;128:3113-21.
  30. Aguayo J, Iitaka M, Row VV, Volpe R. Studies of HLA-DR expression on cultured human thyrocytes: effect of antithyroid drugs and other agents on interferon-gamma-induced HLA-DR expression. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;66: 903-8.
  31. Atwa MA, Lukes YD, Salata K, Abo-Hashem EM, el-Kannishy MH, Burman KD. The influence of triiodothyronine, thyroxine, thyrotropin, and methimazole on thyroid cell MHC class II antigen expression. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995;76:209-13.
  32. Bottazzo GF, Pujol-Borrell R, Hanafusa T, Feldmann M. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet.* 1983;2(8359): 1115-9.
  33. Hanafusa T, Pujol-Borrell R, Chiovato L, Russell RC, Doniach D, Bottazzo GF. Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease: relevance for autoimmunity. *Lancet.* 1983;2(8359):1111-5.
  34. Kim H, Lee TH, Hwang YS, Bang MA, Kim KH, Suh JM, Chung HK, Yu DY, Lee KK, Kwon OY, Ro HK, Shong M. Methimazole as an antioxidant and immunomodulator in thyroid cells: mechanisms involving interferon-gamma signaling and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging. *Mol Pharmacol.* 2001; 60:972-80.
  35. Montani V, Shong M, Taniguchi SI, Suzuki K, Giuliani C, Napolitano G, Saito J, Saji M, Fiorentino B, Reimold AM, Singer DS, Kohn LD. Regulation of major histocompatibility class II gene expression in FRTL-5 thyrocytes: opposite effects of interferon and methimazole. *Endocrinology.* 1998;139:290-302.