

## Mucin 분비에 미치는 大靑龍湯 및 <石室秘錄> 急治法方에 대한 연구

박완열, 서운교

동국대학교 한의과대학 폐계내과학교실

### The Effects of *Daecheongryong-tang* and prescription A on airway mucin secretion

Wan-yeol Park, Woon-gyo Suh

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

**Objectives :** This study was done with intend to investigate whether two oriental medical prescriptions, daecheongryong-tang (DCRT) and prescription A (P-A) significantly affect mucin release from cultured hamster tracheal surface epithelial (HTSE) cells.

**Methods :** Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with  $^3\text{H}$ -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of DCRT or P-A to assess the effect of each agent on  $^3\text{H}$ -mucin release. Possible cytotoxicities of each agent were assessed by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release. Also, the effects of DCRT and P-A on contractility of isolated tracheal smooth muscle were investigated.

**Results were as follows :**

1. DCRT significantly inhibited mucin release from cultured HTSE cells, with significant cytotoxicity.
2. P-A significantly increased mucin release from cultured HTSE cells, with significant cytotoxicity.
3. DCRT inhibited Ach-induced contraction of isolated tracheal smooth muscle.
4. P-A also inhibited Ach-induced contraction of isolated tracheal smooth muscle.

**Conclusion :** Results suggest that DCRT and P-A have regulating effects on mucin secretion from goblet cells. Further investigation is needed, because of the value in finding novel agents to this purpose, and these oriental medical prescriptions have potential for this role.

**Key Words:** airway, mucus, mucin, daecheongryong-tang (DCRT) and prescription A (P-A)

### 1. 緒 論

호흡기에 존재하는 mucus(粘液)은 섬모세포와의 협동적 작용을 통해, 인체에 불필요하거나 혹은 유해한 물질의 제거에 있어서 중요한 역할을 하는 것

으로 알려져 있다<sup>1</sup>. 호흡기 점액의 인체 방어 기능은 주로 점액의 구성요소인 mucin(粘液素)의 점성 및 탄성에 기인하는데, 이러한 mucin의 양과 질의 이상은 기도 생리의 이상 뿐 아니라 인체의 방어 작용에 영향을 주어 병리 현상을 유발할 수 있다. 이로 인해 야기되는 객담 혹은 점액의 과다분비는 일련의 호흡기 질환의 예후를 악화시키는 주된 요인으로 알려져 있다<sup>2</sup>.

현재, 서양의학 체계에서는 이러한 과다 분비된

· 접수 : 2006. 2. 13. · 채택 : 2006. 2. 25.  
· 교신저자 : 서운교, 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2번지  
동국대학교 분당한방병원 2내과  
(Tel. 031-710-3751, Fax. 031-710-3780  
E-mail : high418@hanmail.net)

점액의 점도 및 분비를 조절하기 위해 여러 치료법이 사용되고 있으나, 그 효능 및 응용 범주에 제한이 있어 적절한 약물치료를 시행하기가 쉽지 않은 실정이다<sup>3</sup>.

한의학에서는 「素問·通評虛實論」<sup>4</sup>에서 ‘幼者中風熱 喘鳴肩息’이라 하여 風熱邪氣에 의하여 喘息이 유발할 수 있음을 제시하였고, 「丹溪心法」<sup>5</sup>에서는 喘息의 유발원인 및 병리과정에 ‘專主於痰’이라 하여 喘息과 痰의 상관관계를 명확히 하였다.

따라서, 본 연구에서는 호흡기 mucin의 약리 연구에 보편적으로 사용되는 일차배양 햄스터 기관 표면상피(HTSE)세포를 이용하여<sup>6</sup>, 호흡기 질환 발병 시에 사용되는 大靑龍湯 및 「石室秘錄」急治法에 기재되어 있는 外感喘脹을 치료하는 처방의 효능을 실험적으로 규명하기 위하여 이들 처방의 효능 중 객담의 생성 및 과다분비 조절, mucin 분비에 미치는 영향, 평활근의 수축도에 미치는 영향을 검증함으로써, 두 방제의 한의학적 효능을 현대 과학적으로 규명하고, 동시에 새로운 호흡기 점액 조절약물로서의 응용 가능성을 모색하고자 하였다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 재료

#### 1) 실험동물

일차배양 기관표면 상피세포를 얻기 위해, 8-10 주령의 웅성 Golden Syrian 햄스터 및 적출 기관 평활근에 대한 약물의 영향을 알아보기 위해 체중 1.5Kg의 건강한 백색 가토(Albino rabbit)을 실험동물 전문 사육업체에서 공급받은 후 사용하였다.

#### 2) 약재

大靑龍湯(DCRT)의 구성약물(麻黃, 桂枝, 甘草, 杏仁, 石膏, 生薑, 大棗) 및 「石室秘錄」急治法方(P-A)의 구성 약물(麥門冬, 白茯苓, 柴胡, 當歸, 黃芩, 射干, 桔梗, 甘草, 半夏)은 동국대학교 분당한방병원 약제실에서 공급받아, 원내 처방집에 기재된 처방대로 조제하였다.

Table 1. The composition and dosage of Daecheongryong-tang

Constituent herbs	Scientific name	Dose(g)
麻黃	Ephedrae Herba	18.75
桂枝	Cinnamomi Ramulus	7.50
甘草	Glycyrrhizae Radix	7.50
杏仁	Armeniaca Amarum Semen	7.50
石膏	Gypsum Fibrosum	24.00
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens	11.20
大棗	Jujubae Fructus	7.50

Table 2. The composition and dosage of P-A

Constituent herbs	Scientific name	Dose(g)
麥門冬	Liriopis Tuber	12.00
白茯苓	Poria	8.00
柴胡	Bupleuri Radix	4.00
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4.00
黃芩	Scutellariae Radix	4.00
射干	Belamcandae Rhizoma	4.00
桔梗	Platycodi Radix	8.00
甘草	Glycyrrhizae Radix	4.00
半夏	Pinelliae Rhizoma	4.00

### 3) 시약

Pronase (Type XIV), insulin, transferrin, epidermal growth factor, hydrocortisone, sodium selenite, testicular hyaluronidase (Type VI-S), retinoic acid, gentamicin, sodium dodecyl sulfate, Sepharose CL-4B, acetylcholine 등은 Sigma사(St. Louis, Mo., U.S.A.)에서, penicillin-G, streptomycin, Joklik-modified Minimal Essential Medium (S-MEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME), fetal bovine serum (FBS), Medium 199 (M199)등은 GIBCO-BRL사 (Grand Island, New York, U.S.A.)에서, [6-3H] glucosamine (39.2 Ci/mmol)은 Amersham사 (U.S.A.)에서, type I collagen은 Regenmed (Seoul, Korea)에서, LDH assay kit (LDH-LQ)은 Asan Pharmaceuticals

(Seoul, Korea)에서, sodium acetate 등과 기타 일반 시약들은 reagent grade 이상의 것들을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 탈이온 2차 증류수이었다.

## 2. 방법

### 1) 검액의 조제

각 방제 한 첩 분량에 800ml의 탈이온 2차 증류수를 가하고 100℃로 가온된 상태에서 3시간 동안 전탕하여, 80ml의 탱액을 수거하였다. 각 탱액을 실온 정도로 식힌 후, 멸균 청정 후드 내에서 0.22µl filter를 이용, 가압 여과하고 멸균용기에 저장하여, 4℃ 냉장고에 보관하였다.

### 2) 햄스터 기관표면 상피세포의 분리 및 배양

햄스터 기관표면 상피세포 분리와 배양에 적용된 실험방법은 Kim<sup>7-9</sup> 등과 Wu<sup>10,11</sup> 등의 방법을 적절히 변형, 사용하였다. 세포들이 1~3일간 배양된 후에는, 37℃로 조절된 세포배양기에서 32℃로 조절된 세포배양기로 옮겨서 배양했다. 배양액 교체는, 배양 개시 후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다.

### 3) Mucin의 대사적 방사능 표지

Kim<sup>7</sup> 등과 여타 연구자들의 방법<sup>12-4</sup>을 이용하였는데, 배양세포 중의 mucin은, 성숙한 배양세포(24 well plate, 5x10<sup>5</sup> cells/well)에, 10µCi/ml의 [6-<sup>3</sup>H] glucosamine (39.2 Ci/mmol, Amersham)을 함유하는 완전배양액(insulin (5µg/ml), transferrin (5µg/ml), epidermal growth factor (12.5ng/ml), hydrocortisone (0.1 µM), sodium selenite (0.01µM), fetal bovine serum (5%, V/V)(이하 FBS), retinoic acid (0.1µM), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100µg/ml), gentamicin (50µg/ml)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME)과 Medium 199(M199)의 1:1 혼합 배양액)을 well당 200µl씩 가하고 32℃에서 24시간 동안 배양함으로써 방사능 표지 (metabolic radiolabeling)되었다.

### 4) 세포에의 방제 추출물 투여

24시간 동안의 대사적 방사능 표지가 완결된 후 배양액 (pretreatment sample, 이하 PT로 약칭)을 수

거해 두었다. 배양세포에 well당 0.5ml의 Dulbecco's Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>-free PBS(Phosphate-Buffered Saline)를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 각 방제 추출물 20~80µl를 함유하는 PBS 200µl를 well마다 가하고 32℃에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하여, treatment sample (이하 T sample)로 정의하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 50µl의 상등액은 LDH activity assay를 위해 따로 덜어두고 나머지는 방사성 mucin함량을 측정할 때까지 -70℃에서 냉동 저장했다<sup>9,12-4</sup>.

### 5) Mucin 함량 측정법

Hyaluronidase에 의해 분해되지 않으며, Sepharose CL-4B column으로부터 exclude되는 고분자량의 glycoconjugate를 mucin으로 정의하였고, Kim 등의 방법<sup>9,12-5</sup>에 따라 방사성 mucin의 함량을 측정하였다.

### 6) 배양세포의 세포질로부터 유리된 LDH activity assay

배양세포 중의 mucin은, 다 자란 배양세포(24 well plate, 5x10<sup>5</sup> cells/well)에, 10µCi/ml의 [6-<sup>3</sup>H] glucosamine (39.2 Ci/mmol, Amersham)을 함유하는 완전 배양액을 well당 200µl씩 가하고 32℃에서 24시간 동안 배양함으로써 방사능 표지하였고, 방사능 표지가 완결된 후 spent medium은 수거해 두었다. 배양세포에 well당 0.5ml의 PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 각 방제 추출물 20~80µl를 함유하는 PBS 200µl를 well마다 가하고 32℃에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액(T sample)을 수거하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 50µl의 상등액을 LDH activity assay에 사용했다. LDH 활성 측정은 commercial kit (Asan Pharmaceuticals, LDH-LQ)을 이용하였다<sup>12,13</sup>.

### 7) 적출 기관 평활근에 대한 약물의 영향

체중 1.5kg 정도의 건강한 백색 가토(Albino rabbit)를 이산화탄소를 이용하여 질식사시킨 후, 즉시 기관

전체를 적출하여 Tyrode 용액으로 세척하고, 주위 조직을 조심스럽게 제거하였다. 기관을 가로 방향으로 절취하여 기관 연골 3~5개를 포함하는 기관근 절편 표본을 제작하였다. 이렇게 얻어진 표본을 Tyrode 영양액이 들어있는 chamber(Magnus 장치)의 하단에 고정하고 상단은 isometric transducer에 연결, physiograph를 이용, 수축 정도를 측정하였다. 기관 표본에 5g의 정지 장력(resting tension)을 가하고, 37°C, 산소 공급 하에서 약 1시간 동안 15분 간격으로 세척하면서 안정화시켰다. 이 적출 표본에, 방금 조제된 acetylcholine 용액  $2 \times 10^{-4}$ g/ml를 투여하여 최고 수축고를 측정한 다음, 세척하고, 15분간 안정화시켰다. 약물에 의한 기관 수축 억제효과(기관 평활근 이완 효과) 측정은, Magnus 장치에 담긴 Tyrode solution 50ml 당 각 방제 추출액 50~500 $\mu$ l를 투여(전처치)하고, 5분간 방치한 다음 acetylcholine 용액  $2 \times 10^{-4}$ g/ml를 투여하여, 각 약물을 투여하기 전 acetylcholine 단독투여에 의한 수축고와 비교함으로써 시행하였다.

8) 통계처리

모든 측정 결과는 Mean $\pm$ S.E.M.으로 환산된 후,

약물 처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타냈다. 통계처리는 unpaired Student's *t*-test로 하였으며,  $p < 0.05$ 인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 實驗結果

1. DCRT가 일차배양 HTSE 세포로부터의 mucin분비에 미치는 영향.

대조군( $\mu$ l/200 $\mu$ l PBS) 투여농도에서 mucin분비는 100 $\pm$ 4%이었다. 최종 추출물 20 $\mu$ l/200 $\mu$ l PBS의 투여 농도에서 mucin분비는 75 $\pm$ 4%, 40 $\mu$ l/200 $\mu$ l PBS의 투여 농도에서 mucin분비는 72 $\pm$ 6%, 80 $\mu$ l/200 $\mu$ l PBS의 투여 농도에서 mucin분비는 65 $\pm$ 8%을 나타냈다. 따라서, 최종 추출물 80 $\mu$ l/200 $\mu$ l PBS의 투여 농도에서 mucin분비를 30% 가량 감소시켰다.

2. P-A가 일차배양 HTSE 세포로부터의 mucin분비에 미치는 영향.

대조군( $\mu$ l/200 $\mu$ l PBS) 투여농도에서 mucin분비는 100 $\pm$ 8%이었으며, 최종 추출물 20 $\mu$ l/200 $\mu$ l PBS의 투여 농도에서 mucin분비는 36 $\pm$ 5%, 40 $\mu$ l/200 $\mu$ l

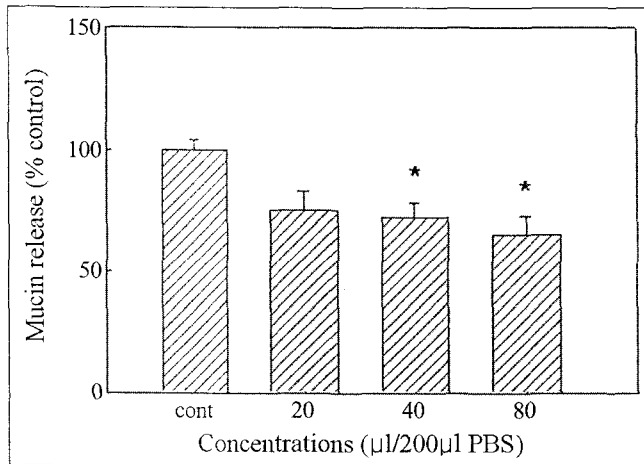


Fig. 1. Effects of DCRT on mucin release from airway goblet cells

Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with  $^3$ H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of DCRT extracts and the amount of  $^3$ H-mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean $\pm$ S.E.M. from 4 culture wells.

\*: significantly different from control( $p < 0.05$ ).

PBS의 투여 농도에서 mucin분비는  $420 \pm 10\%$ ,  $80 \mu\text{l}$ / $200 \mu\text{l}$  PBS의 투여 농도에서 mucin분비는  $427 \pm 14\%$ 을 나타냈다. 따라서, 최종 추출물  $80 \mu\text{l}/200 \mu\text{l}$  PBS의 투여 농도에서 mucin분비를 300% 가량 증가시켰다.

3. DCRT가 일차배양 HTSE 세포로부터의 LDH 분비에 미치는 영향.

대조군( $\mu\text{l}/200 \mu\text{l}$  PBS) 투여농도에서 LDH분비는  $100 \pm 11\%$ 이었다. 최종 추출물  $20 \mu\text{l}/200 \mu\text{l}$  PBS의 투여 농도에서 LDH분비는  $107 \pm 10\%$ ,  $40 \mu\text{l}/200 \mu\text{l}$

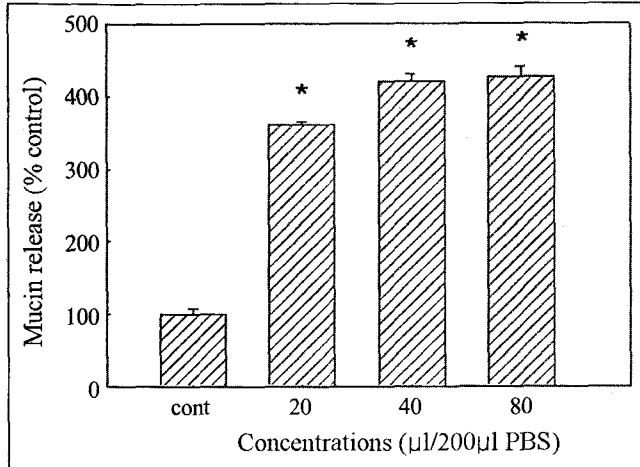


Fig. 2. Effects of P-A on mucin release from airway goblet cells

Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with  $^3\text{H}$ -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of P-A extracts and the amount of  $^3\text{H}$ -mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean  $\pm$  S.E.M. from 4 culture wells.

\*: significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

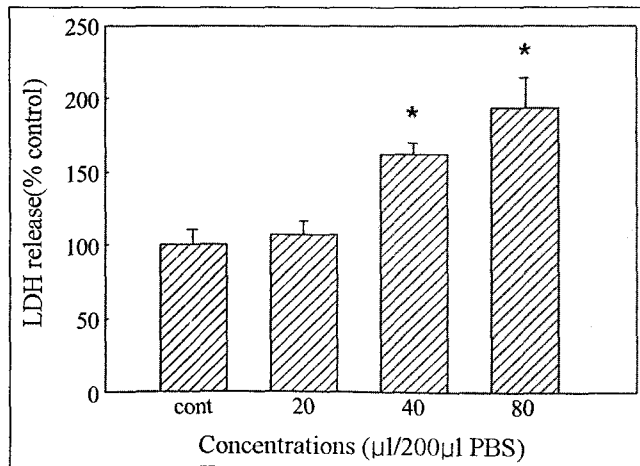


Fig. 3. Effects of DCRT on LDH release from airway goblet cells

Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of DCRT extracts for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean  $\pm$  S.E.M. from 4 culture wells.

\*: significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

PBS의 투여 농도에서 LDH분비는  $162 \pm 8\%$ ,  $80 \mu\text{l}/200 \mu\text{l}$  PBS의 투여 농도에서 LDH분비는  $194 \pm 21\%$ 을 나타냈다. 따라서, 최종추출물  $20 \sim 80 \mu\text{l}/200 \mu\text{l}$  PBS의 투여 농도 범위에서 세포독성의 한 지표인 LDH 분비를 대조군의 2배 가량 증가시켰으므로, 유의성있는 세포독성을 발현할 가능성을 보였다.

4. P-A가 일차배양 HTSE 세포로부터의 LDH 분비에 미치는 영향.

대조군( $\mu\text{l}/200 \mu\text{l}$  PBS) 투여농도에서 LDH분비는  $100 \pm 31\%$ 이었으며, 최종 추출물  $20 \mu\text{l}/200 \mu\text{l}$  PBS의 투여 농도에서 LDH분비는  $232 \pm 25\%$ ,  $40 \mu\text{l}/200 \mu\text{l}$  PBS의 투여 농도에서 LDH분비는  $580 \pm 28\%$ ,  $80 \mu\text{l}/200 \mu\text{l}$  PBS의 투여 농도에서 LDH분비는  $950 \pm 27\%$

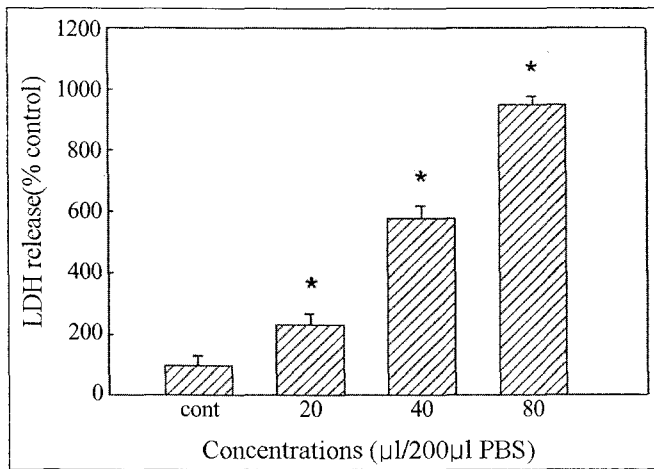


Fig. 4. Effects of P-A on LDH release from cultured HTSE cells

Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of P-A extracts for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean  $\pm$  S.E.M. from 4 culture wells.

\*: significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

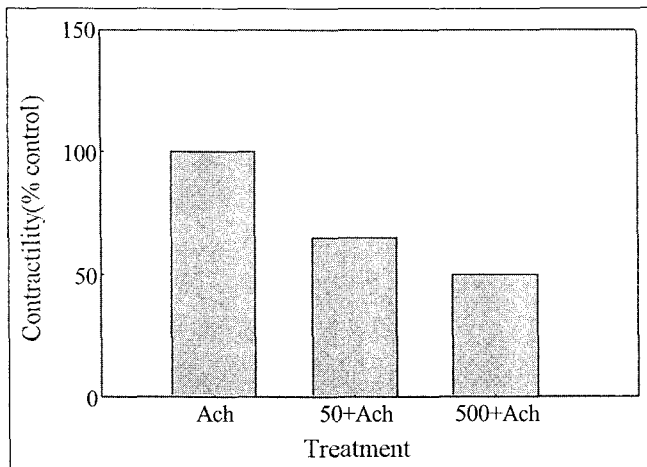


Fig. 5. Effects of DCRT on contractility of isolated tracheal smooth muscle

Isolated tracheal smooth muscle of rabbit was prepared and effect of DCRT extracts on acetylcholine-induced contraction was measured as described in Materials and Methods. (Ach ; acetylcholine)

을 나타냈다. 따라서, 최종추출물 40 $\mu$ l/200 $\mu$ l PBS의 투여 농도에서 세포독성의 한 지표인 LDH 분비를 대조군의 5배 가량 증가시켰다.

5. DCRT가 적출된 토끼 기관 평활근의 긴장도에 미치는 영향.

최종 추출물 50 $\mu$ l/Tyrode solution 50ml의 투여 농도에서, 토끼 적출 기관에서 2 $\times$ 10<sup>-4</sup>g/ml 농도의 acetylcholine으로 유발된 수축 현상을 35% 가량 억제하였으며, 최종 추출물 500 $\mu$ l/Tyrode solution 50ml의 투여 농도에서는 수축 현상을 50% 가량 억제하였다.

6. P-A가 적출된 토끼 기관 평활근의 긴장도에 미치는 영향.

최종 추출물 50 $\mu$ l/Tyrode solution 50ml의 투여 농도에서, 토끼 적출 기관에서 2 $\times$ 10<sup>-4</sup>g/ml 농도의 acetylcholine으로 유발된 수축 현상을 20% 가량 억제하였으며, 최종 추출물 500 $\mu$ l/Tyrode solution 50ml의 투여 농도에서는 수축 현상을 42% 가량 억제하였다. 따라서, 최종 추출물 500 $\mu$ l/Tyrode solution 50ml의 투여 농도에서, 토끼 적출 기관에서 2 $\times$ 10<sup>-4</sup>g/ml 농도의 acetylcholine으로 유발된 수축 현상을 유의성 있게 억제하였다.

IV. 考 察

본 연구의 목표는 한의학적으로 호흡기 질환의 치료에 사용해 왔던 방제인 大靑龍湯(DCRT) 및 「石室秘錄」急治法方(P-A)의 호흡기 점액 분비에 대한 객관적 영향을 규명하고자 하는 것이었다. 서양의학적으로 호흡기 mucin의 분비를 증가시키는 것으로 알려진 물질로는 삼인산화 아데노신(adenosine triphosphate), 종양괴사 인자(tumor necrosis factor) 등 인체의 염증 진행과정에서 확인되는 내인성 물질 및 phorbol ester, 염화 암모늄, 요오드화 칼륨, bromhexine, ambroxol 등의 약물이 있으나, 뚜렷한 祛痰효과를 나타내면서도 임상에서 적절히 활용하기에는 여러 가지 문제점이 있는 것으로 알려져 있다<sup>3,16</sup>.

한의학에서는 朱丹溪<sup>5</sup>가 ‘專主於痰’이라고 하여 喘息과 발병인자 및 병리과정에서 痰의 관련성을 주장하였으며, 이후 諸家の 喘息치료에 병리적 기초가 되었다. 한편 「醫宗必讀」<sup>17</sup>에서는 ‘痰火鬱于內, 風寒速于外’라 하여 喘息의 병리를 風熱 및 外感風寒 등으로 규명하여 解表利氣, 化痰定喘함으로써 후세 의가들이 喘息치료에 있어서 통치방법으로 삼고 있다.

大靑龍湯에서 靑龍은 東方과 春에 상응하여 肝을

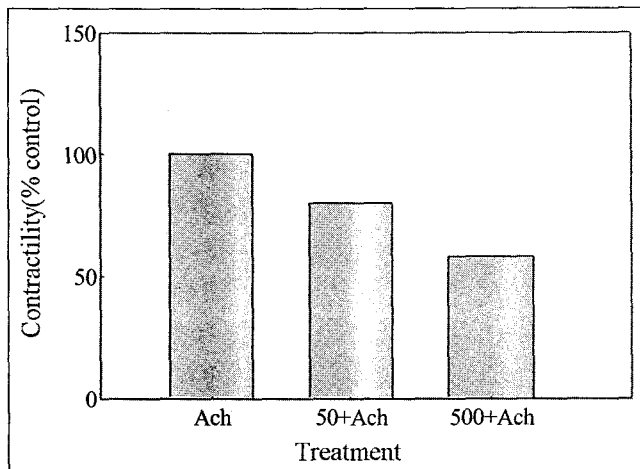


Fig. 6. Effects of P-A on contractility of isolated tracheal smooth muscle

Isolated tracheal smooth muscle of rat was prepared and effect of P-A extracts on acetylcholine-induced contraction was measured as described in Materials and Methods. (Ach ; acetylcholine)

주장하고 發散을 주관한다. 만물이 싹 틀 때는 두 가지 갈래로 나뉘지는데 肝도 兩葉이 있어 나무 앞에 해당한다. 靑龍이라고 말하는 것은 營衛를 모두 침범한 邪氣를 發散시키는데 이는 肝木의 體에 상당한 것이다.

이후 후대에 와서 吳謙<sup>18</sup>, 王普三<sup>19</sup> 등은 靑龍이 구름과 비를 일으키는 것으로 天地가 폭폭 찌면 비가 와야 조화롭게 되고 사람이 煩燥하면 맘을 내야 풀어지는 것처럼 신체의 鬱熱과 煩燥를 치료하는 것이 그 意味라고 하였다.

「傷寒論」<sup>20</sup>에는 ‘太陽中風, 脈浮緊, 發熱惡寒, 身疼痛, 不汗出而煩躁者, 大靑龍湯主之. 苦脈微弱, 汗出惡風者, 不可服. 服之則厥逆, 筋肉, 此爲逆也. 傷寒 脈浮緩, 身不疼但重, 乍有輕時, 無少陰證者, 大靑龍湯發之.’ 라고 하였고, 「醫宗金鑑」<sup>21</sup>에서는 ‘今無但欲寐, 身雖重乍有輕時, 則非少陰證, 乃榮衛兼病之太陽證也. 脈雖浮緩, 證則無汗, 屬實邪也, 故亦大靑龍湯發之.’ 라 하여 外感 中風風寒 時에 脈浮緊하며 發熱惡寒, 身疼痛, 無汗出하고 煩躁한 경우에 大靑龍湯을 처방한다고 되어 있다.

본 연구에서 大靑龍湯은 최종 추출물 80 $\mu$ l/200 $\mu$ l PBS의 투여농도에서 mucin분비를 대조군보다 30% 가량 감소시켰다. 임상적 혹은 기초과학적 연구결과 보고에 따르면 호흡기 mucin의 분비를 감소시키는 것으로 알려진 물질로는 서양의학 체계에서 다양한 염증성 질환의 치료제로 응용되는 부신피질 호르몬(당질 코르티코이드)이 대표적이며<sup>3</sup>, 최근 양이온을 다량 함유하는 염기성 아미노산의 폴리머 등이 호흡기 mucin분비를 억제하는 물질로서 보고되었다<sup>13</sup>. 그러나, 이러한 약물들은 그 다양한 약리작용 및 부작용 등으로 인해 호흡기 질환의 임상에서 적절히 응용되기에는 많은 제한이 따르고 있다. 또한, 방제 중에서 小靑龍湯이 mucin의 분비를 억제할 가능성이 있는 것으로 보고되어 있다<sup>22</sup>.

본 연구에서 검증한 大靑龍湯에서도 그와 유사한 약리작용이 나타났음을 알 수 있으며, 계속적인 연구를 통하여 大靑龍湯 자체 혹은 방제를 구성하는 각 본초를 대상으로 한 mucin분비 억제효능의 검증

을 통하여 새로운 작용기전을 가진 신약물의 개발에 한 단서를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

「石室秘錄」<sup>23</sup>의 急治法에 기재되어 있는 外感喘脹을 치료하는 처방은 風邪로서 喘이 있을 경우, 中陰寒하며 中心作痛이 있고 痰이 있으며, 氣喘으로서 外感이 아닌 경우, 腹痛으로서 內傷이 아닌 경우에 사용하는 처방이다. 喘脹에 관해서는 「石室秘錄」에서 호흡을 제대로 하지 못하는 類의 병이라 하여, 心의 中하여 갑자기 통증이 있고 손으로 만지기를 못하고 호흡할 때 답답하여 죽을 것만 같은 것이라 기술하고 있는데, 이 경우 柴胡, 射干, 桔梗을 사용해서 肺金의 氣를 풀어주며, 半夏를 사용해서 痰을 제거하고 黃芩을 사용해서 火를 제거함으로써 병세를 치료한다고 기술되어 있다.

急治法方的 최종 추출물 80 $\mu$ l/200 $\mu$ l PBS의 투여농도에서 mucin분비를 300% 가량 증가시켰으므로, 大靑龍湯과는 반대되는 약리작용을 발현하였다. 이 방제는 뚜렷한 mucin분비 증가현상이 나타난 것으로 추측할 수 있으나, 자세한 기전의 규명을 위해서는 방제 자체 혹은 방제를 구성하는 본초를 대상으로 한 연구가 반드시 이루어져야 할 것으로 판단되며, 서양의학적 시각에서 보면 急治法方은 祛痰약물로 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

또한, 본 연구에서는 배양된 호흡기 상피세포에 투여된 방제들이 세포에 대한 직접적인 독성을 발현할 가능성을 검증하고자 하였다. 세포독성의 지표에는 여러 가지가 있겠으나, 본 연구에서는 세포막이 손상되었을 때 세포질 외부로 유출되는 LDH의 활성을 지표로 하여 세포독성을 검증하였다<sup>24,25</sup>. 大靑龍湯의 경우, 최종 추출물 40~80 $\mu$ l/200 $\mu$ l PBS의 투여 농도에서, LDH 분비를 대조군에 비해 50~70% 가량 증가시켰다. 이러한 결과는 大靑龍湯이 배양된 호흡기 상피세포에 대해 세포막 손상을 일으킬 가능성을 시사하는 결과이다. 그러나, 본 연구의 결과만으로 이 방제가 실제로 인체에 투여되었을 때에 세포독성을 유발할 가능성이 있을지 여부를 판정하기는 어려울 것으로 사료되며, 세포독성 측정을 위해 사용되는 다양한 방법론을 적용, 추가적인 독성 연구를



시행해야 할 필요성이 있을 것으로 판단된다. 急治法方의 경우에는 대조군보다 8배 이상의 LDH 분비를 증가시키는 결과를 보임으로써, 이 방제가 배양된 호흡기 상피세포에 대해 유의성있는 세포막 손상을 일으킬 가능성을 보여주고 있다. 그러나, 본 연구에서의 결과는 어디까지나 *in vitro*에서의 연구결과이고 이 방제가 실제로 인체에 투여되는 것과 유사한 상황, 즉 살아있는 실험동물을 이용한 *in vivo* 실험에서도 유의성 있는 독성이 발현되는가를 검증하는 등의 추가적인 독성 연구가 반드시 필요할 것이다. 동시에, 앞서 언급된 바와 같이 자세한 기전의 규명을 위해서는 방제를 구성하는 개별 본초를 대상으로 한 후속 연구가 반드시 이루어져야 할 것으로 판단된다.

한편, 본 연구에서는 大靑龍湯 및 急治法方이 적출된 토끼 기관 평활근의 수축도에 미치는 영향을 검증함으로써 喘息 등의 기관 평활근 수축 상태에서 두 방제에 의한 기관 평활근 이완 효능을 검증하고자 하였다. 실험결과에서 볼 수 있듯이 大靑龍湯은 최종 추출물 50~500 $\mu$ l/Tyrod solution 50ml의 투여 농도에서, 토끼 적출 기관에서 2 $\times$ 10<sup>-4</sup>g/ml 농도의 acetylcholine으로 유발된 수축을 30~50% 가량 억제하는 결과를 보여주었다. 또한, 急治法方도 최종 추출물 50~500 $\mu$ l/Tyrod solution 50ml의 투여 농도에서, 토끼 적출 기관에서 2 $\times$ 10<sup>-4</sup>g/ml 농도의 acetylcholine으로 유발된 수축 현상을 20~40% 가량 억제하는 결과를 보여주었다. 이러한 결과로 볼 때, 두 방제는 기관 평활근의 긴장도에 직접적인 영향, 즉 기관 혹은 기관지에 대한 직접적인 확장효과를 발현함으로써 抗喘息 효능을 나타낼 가능성이 있으며, 방제에 함유된 麻黃, 半夏 등에 의해 기관지 평활근 이완이 유발된 것으로 추측할 수 있다. 그러나, 확정적인 抗喘息 효과의 검증을 위해서는, 두 방제가 ovalbumin 또는 Ascaris 유래 항원으로 유발된 喘息 모델 흰쥐의 기도저항 및 점액의 생성에 미치는 영향 등을 규명하는 과정, 즉 *in vivo*에서의 각 방제의 抗喘息 활성의 검증 과정이 필요할 것으로 판단된다.

결론적으로, 이상의 연구결과들은 방제 자체의 *in*

*vivo* 상태에서의 약리작용에 대한 후속연구 및 각 방제 구성 본초와 mucin 분비 간의 상관성에 관한 부가 연구의 필요성을 제시하고 있으며, 大靑龍湯의 mucin분비 감소작용을 이용한 새로운 작용기전의 호흡기 점액분비 조절약물의 개발 가능성 및 急治法方의 mucin분비 증가현상을 이용한 새로운 祛痰 약물의 개발 가능성을 제시하고 있다.

## V. 結 論

大靑龍湯(DCRT) 및 「石室秘錄」 急治法方(P-A)이 호흡기 점액의 분비에 미치는 영향에 관한 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DCRT는 호흡기 배상세포에서의 mucin분비를 감소시켰으며, 세포독성을 발현할 가능성을 보였다.
2. P-A는 호흡기 배상세포에서의 mucin분비를 증가시켰으며, 역시 세포독성을 발현할 가능성을 보였다.
3. DCRT 및 P-A 공히, 토끼 적출 기관 평활근 수축을 억제 함으로써 기관 평활근 이완효과를 보일 가능성을 시사하였다.

상기의 연구결과들은, 방제에 대한 *in vivo* 상태에서의 약리작용에 대한 후속연구 및 각 방제 구성 본초와 mucin 분비간의 상관성에 관한 부가 연구의 필요성을 제시하고 있으며, DCRT의 mucin분비 감소작용을 이용한 새로운 작용기전의 호흡기 점액분비 조절약물의 개발 가능성 및 P-A의 mucin분비 증가현상을 이용한 새로운 祛痰 약물의 개발 가능성을 제시하고 있다.

## 參考文獻

1. Newhouse MT, and Biennenstock J. Respiratory tract defense mechanism In textbook of pulmonary disease (Baum GL, and Wolinsky E(eds)). 3rd ed Little Brown and Company, p.2-47.

2. Frigas E, Loegering DA, Solley GO, Farrow GM, Gleich GJ. Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin Proc.* 1981;56:345-53.
3. Mutschler E, Derendorf H. *Drug actions.* Boca Raton, Florida: CRC press Inc; 1995, p.410-1.
4. 奎亨柱 解譯. 黃帝內經素問·上. 서울: 자유문고; 2004. p.291.
5. 宋丹溪. 丹溪心法. 서울:杏林書院; 1954. p.108.
6. Kim KC, Opaskar Hincman H, Bhaskar KR. Secretions from primary hamster tracheal surface epithelial cells in culture, Mucin-like glycoproteins, proteoglycans and lipids. *Exp Lung Res.* 1989;15:299-314.
7. Kim KC, Rearick JI, Nettesheim P, Jetten AM. Biochemical characterization of mucous glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial cells in primary culture. *J Biol Chem.* 1985;260:4021-7.
8. Kim KC, Brody JS. Gel contraction causes mucin release in primary hamster tracheal epithelial cells growing on a collagen gel. *J Cell Biol.* 1987;105, 158.
9. Kim KC. Possible requirement of collagen gel substratum for production of mucinlike glycoproteins by primary rabbit tracheal epithelial cells in culture. *In Vitro.* 1985;21:617-21.
10. Wu R, Smith D. Continuous multiplication of rabbit tracheal epithelial cells in a defined hormone-supplemented medium. *In Vitro.* 1982;18: 800-12.
11. Wu R, Nolan E, Turner C. Expression of tracheal differentiated function in serum-free hormone-supplemented medium. *J Cell Physiol.* 1985;125, 167-81.
12. Ko KH, Lee CJ, Shin CY, Jo MJ, Kim KC. Inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Am J Physiol.* 1999;277(21):811-5.
13. Lee CJ. Specificity in the inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *J Appl Pharmacol.* 2001;9(3):218-23.
14. 이충재. 설치류 기관 mucin유리 억제에서의 폴리 양이온성 작용기전. 서울대학교 대학원. 1997.
15. Cheng PW, Sherman JM, Boat TE, Bruce M. Quantitation of radiolabeled mucous glycoproteins secreted by tracheal explants. *Anal Biochem.* 1981;117, 301-6.
16. Kim KC, Zheng QX, Van Seuning I. Involvement of a signal transduction mechanism in ATP-induced mucin release from cultured airway goblet cells. *Am J Cell Mol Biol.* 1993;8:121-5.
17. 李中粹. 醫宗必讀. 北京: 人民衛生出版社; 1994. p.540.
18. 吳謙. 訂正傷寒論註. 서울: 大星出版社; 1991. p. 132.
19. 王普三. 縫雪園古方選注. 서울: 大星出版社; 1995. p.807.
20. 崔達永, 金俊錡. 傷寒論釋講. 서울: 大星文化社; 1995. p.78-9.
21. 吳謙. 醫宗金鑑(傷寒論注). 北京: 人民衛生出版社; 1990. p.101.
22. 배한호, 이정은, 한영주, 박양춘. 생쥐의 B 세포에서 IgE의 분비와 Cytokine 생산에 대한小青龍湯의 효과. *대한한방내과학회지.* 2003;24(2): 249-59.
23. 陳士鐸. 國譯 石室秘錄. 서울: 書苑堂; 2000. p. 120-1.
24. Freshny. Measurement of viability and cytotoxicity *In Culture of animal cells* (3rd edn). Wiley-Liss Inc; 1994, p.288.
25. Yu XY, Schofield BH, Croxton T, Takahashi N, Gabrielson EW, Spannhake EW. Physiologic modulation of bronchial epithelial cell barrier function by polycationic exposure. *Am J Respir. Cell Mol Biol.* 1994;11:188-98.