

定喘化痰湯 등 수종 방제의 호흡기 객담분비 조절 효능에 관한 실험적 연구

김준명, 이충재¹, 박양춘

대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실, 충남대학교 의과대학 약리학교실

Studies on the Effects of Selected Oriental Herbal Medicines on Inhibitory Activity of Airway Mucus Secretion

Joon-myoung Kim, Chung-jae Lee¹, Yang-chun Park

Division of Respiratory System, Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea
Dept. of Pharmacology, College of Medicine, Chungnam University, Daejeon, Korea

In the present study, the author intended to investigate whether three oriental medical prescriptions named *Jeongcheonhwadam-tang*(JHT), *Haengso-tang*(HST), *Socheongryong-tang*(SCRT) significantly affect mucin release from cultured hamster tracheal surface epithelial (HTSE) cells. The results were as follows : (1) JHT significantly inhibited mucin release from cultured HTSE cells, without significant cytotoxicity : (2) HST significantly inhibited mucin release from cultured HTSE cells, without significant cytotoxicity : (3) SCRT significantly inhibited mucin release from cultured HTSE cells, without significant cytotoxicity : (4) JHT, HST chiefly inhibited the 'mucin' release and did not significantly affect the release of the other releasable glycoproteins with less molecular weight than mucin. These results suggest that the three herbal prescriptions specifically inhibit the release of mucin : (5) JHT significantly inhibited the expression levels of MUC 5AC mRNA. This result suggests that JHT affects the synthesis of mucin at gene level in cultured HTSE cells. All agents showed no significant cytotoxicity. In view of these results, further investigation of the effects of JHT and HST are likely to be instrumental in yielding novel agents from oriental medical prescriptions which have inhibitory effects or expectorative effects on airway mucus secretion.

Key Words: airway, mucus, *Jeongcheonhwadam-tang*(JHT), *Haengso-tang*(HST), *Socheongryong-tang*(SCRT)

1. 緒 論

定喘化痰湯은 『東醫寶鑑·咳嗽·痰喘』¹에서 “治咳嗽痰喘”한다고 기재된 처방으로 대부분 肺經에 귀속되는 약물로 구성되어 咳嗽, 喘息, 痰喘, 기관지염 등의 치료에 활용되고 있다^{2,4}. 杏蘇湯은 『世醫得效方』⁵

에 처음 기재된 처방으로 『東醫寶鑑·咳嗽·寒嗽』¹에서 “治傷風寒咳嗽痰盛”한다고 하였으며, 止咳平喘, 解表散寒의 효과가 있어 惡寒發熱, 咳嗽, 객담 등의 치료에 활용되고 있다^{6,7}. 小青龍湯은 「傷寒論」⁸에 처음 기재된 처방으로 解表散寒, 溫肺化痰, 止咳平喘하는 효과가 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, 喘息 등의 증상을 나타내는 급·만성 기관지염, 기관지천식, 알레르기성 비염, 폐렴 등의 질환에 폭 넓게 응용되고 있다^{7,8}.

· 접수 : 2006. 2. 10. · 채택 : 2006. 2. 27.
· 교신저자 : 박양춘, 충북 청주시 상당구 용담동 173-9
대전대학교 청주한방병원 내과
(Tel. 043-229-3704, Fax. 043-253-8757
E-mail : omdpyc@dju.ac.kr)

외계로부터 지속적으로 흡인되는 병인요소에 대한 호흡기의 방어기전 중의 하나로서 기관지상피의 점액선과 점막하선에서 분비되는 기관지 점액(mucus)은 섬모세포와의 협동작용을 통해 흡인된 공기 속의 이물이나 병원체 등을 외부로 제거하는 작용을 한다⁹⁻¹¹. 호흡기 점액의 인체 방어기능은 주로 점액의 구성요소인 뮤신의 점성 및 탄성과 밀접한 관련이 있는데 이러한 뮤신의 양과 질의 이상은 인체의 방어기능에 영향을 주어 호흡기계에 심각한 병리 현상을 유발할 수 있다. 즉, 천식, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지확장증, 낭포성 섬유증 등의 호흡기 질환에서 객담 혹은 점액의 과다분비가 관찰되는데 이러한 변화는 그 질환군의 예후를 악화시키는 중요한 요인이다^{12,13}.

현재까지 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯의 효능에 대하여 다양한 실험연구와 임상연구가 보고되었고¹⁴⁻⁹, 특히 객담분비 조절과 관련하여 나 등²⁰은 小青龍湯이 뮤신 분비를 감소시킨다고 하였고, 임 등²¹은 杏蘇湯이 뮤신 분비를 감소시킨다고 하였으나 定喘化痰湯에 대한 보고는 없었다.

이에 저자는 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯의 객담 생성 및 과다분비 조절 작용을 규명하고자 일차배양 햄스터 기관표면 상피(hamster tracheal surface epithelial, 이하 HTSE)세포를 이용하여 뮤신 분비 및 생성에 미치는 영향과 그 영향이 특이적인지를 측정하고, 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase, 이하 LDH)활성에 미치는 영향을 측정한 결과, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 동물

일차배양 기관표면 상피세포(hamster tracheal surface epithelial cells)를 얻기 위하여 8~10 주령의 웅성 Golden Syrian 햄스터를 실험동물 전문 사육 업체에서 공급받은 후 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯 처방 내용과 1貼의 용량은 각각 다음과 같다.

Prescription of Jeongcheonhwadam-tang 『JHT』

구성약물	생약명	용량(g)
陳 皮	<i>Citri Pericarpium</i>	8.0
半 夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	6.0
南 星	<i>Arisaematis Rhizoma</i>	6.0
杏 仁	<i>Ansu Semen</i>	8.0
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	3.2
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3.2
款冬花	<i>Fareariae Flos</i>	2.8
人 蔘	<i>Ginsengs Radix</i>	2.8
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	5.0
Total Amount		45.0

Prescription of Haengso-tang 『HST』

구성약물	생약명	용량(g)
杏 仁	<i>Ansu Semen</i>	4.0
紫蘇葉	<i>Perillae Folium</i>	4.0
桑白皮	<i>Mori Cortex</i>	4.0
陳 皮	<i>Citri Pericarpium</i>	4.0
半 夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	4.0
貝 母	<i>Fritikkariae Royeli Bulbus</i>	4.0
白 朮	<i>Atractylis Rhizoma</i>	4.0
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	4.0
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2.0
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	5.0
Total Amount		39.0

Prescription of *Socheungryong-tang* 『SCRT』

구성약물	생약명	용량(g)
麻 黄	<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

3) 시료제조

定喘化痰湯(JHT), 杏蘇湯(HST), 小青龍湯(SCRT)의 구성약물은 대전대학교 부속한방병원 약제실에서 공급받아, 『方藥合編』²²에 기재된 처방대로 조제하였다. 각 방제 한貼 분량에 800~1,000ml의 이차 증류수를 가하고 100℃로 가온된 상태에서 3시간 동안 전탕하여, 80ml의 탕액을 수거하였다. 각 탕액을 실온 정도로 방냉한 후, 멸균 청정 후드 내에서 0.22µm filter를 이용, 여과하여 멸균용기에 저장하여 4℃ 냉장고에 보관하여 사용하였다.

2. 방법

1) 기관표면 상피세포의 분리 및 배양

햄스터의 기관표면 상피세포 분리와 배양에 적용된 실험방법은 Kim 등, Wu 등, Lee 등의 방법²³⁻⁷을 사용하였다. 세포들이 1~3일간 배양된 후에는 37℃ incubator에서 32℃ incubator로 옮겨서 배양했다. 배양액 교체는, 배양 개시 후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다.

2) 뮤신의 대사적 방사선 표지(radiolabeling)

Kim 등, Lee 등의²³⁻⁵ 방법을 이용하였는데, 배양 세포 중의 뮤신은, 성숙한 배양세포(24 well plate, 5×10⁵cells/well)에, 10µCi/ml의 [6-³H] glucosamine (39.2 Ci/mmol, New England nuclear)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(100U/ml), streptomycin(100µg/ml), gentamicin(50 µg/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 방사선 표지(metabolic radiolabeling) 되었다.

3) 약물 처리

24시간 동안의 대사적 방사선 표지가 완결된 후 배양액(pretreatment sample, 이하 PT로 약칭)을 수거하여 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 각 방제의 최종 추출물 20~80µl 함유하는 PBS 200µl를 각각 well마다 가하고 32℃에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하여 treatment sample(이하 T sample)로 정의하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포와 기타 잔사를 제거하고, 50µl의 상징액은 젖산탈수소효소 활성측정(LDH activity assay)을 위해 따로 덜어두고 나머지는 방사성 뮤신 함량을 측정할 때까지 -70℃에서 냉동저장 하였다²³⁻⁵.

4) 뮤신 함량 측정

Hyaluronidase에 의해 분해되지 않으며, sepharose CL-4B column으로부터 exclude되는 고분자량의 glycoconjugate를 뮤신으로 정의하였고, Lee 등의 방법²³⁻⁵에 따라 방사성 뮤신의 함량을 측정하였다.

5) 배양세포의 세포질로부터 유리된 젖산 탈수소 효소 활성 측정(LDH activity assay)

배양세포 중의 뮤신은, 다 자란 배양세포(24 well plate, 5×10⁵cells/well)에, 10µCi/ml의 [6-³H] glucosamine(39.2 Ci/mmol, Amersham)을 함유하는 완전배양액을 well당 200µl씩 가하고 32℃에서 24시간 동안 배양함으로써 방사선 표지하였고, 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 각 방제의 최종 추출물 20~80µl를 함유하는 PBS 200µl를 각각 well마다 가하고 32℃에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액(T sample)을 수거하여 부유세포와 기타 잔사를 제거하고, 50µl의 상징액을 젖산탈수소효소 활성

측정(LDH activity assay)에 사용했다. LDH 활성측정은 commercial kit(Sigma, LD-L 10)을 이용하였다^{23,5}.

6) Sepharose CL-4B column을 통한 전체 용출양상 분석

뮤신의 방사선 표지 후 각 방제의 최종 추출물을 가하고 배양하여 얻어진 T sample을 1.0×50cm 규격의 sepharose CL-4B column에 적용하였다. 한 분획의 용량은 0.35ml로 하였고 뮤신이 용출되는 void volume 뿐만 아니라 included volume과 total bed volume이 용출될 때까지 분획을 수거하였다. 각 분획에 scintillation cocktail을 첨가한 뒤 LSC를 이용, 방사선량을 측정하였다. 대조 sample과 각 약물의 처리가 뮤신 및 그보다 분자량이 작은, 표지된 여타의 당단백질들의 전체 용출양상에 미치는 영향을 비교하였다^{23,5}.

7) RT-PCR

① RNA의 분리

각 방제가, HTSE 세포 내에 존재하는 뮤신 유전자인 MUC 5AC mRNA의 발현정도(수준)에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 먼저 total RNA를 분리하고자 GIBCO BRL사의 TRIZOL reagent(total RNA isolation reagent)를 이용하였다. 즉, 배양된 HTSE 세포에 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯을 최종 추출물 기준으로 각각 40 μ l, 40 μ l, 80 μ l를 함유하는 완전배양액 200 μ l를 well마다 가하고, 32 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 배양시킨 다음, 냉각된 PBS로 2회 세척하였다. Matrix인 collagen을 분해하기 위하여 완전배양액에 녹인 0.2% collagenase type IV 각 well당 400 μ l씩 가하고, 37 $^{\circ}$ C 배양기에 2시간 동안 반응시킨 후 세포들만 원심 분리하였다. 이어서, total RNA isolation reagent를 이용해 세포를 lysis시키고, 핵단백질을 완전히 분리해 내기 위해 상온에서 5분간 방치하였다. 5분 후 즉시, microtube에 chloroform을 첨가, 15초간 vortexing하고 상온에 2~3분간 방치한 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm (Hanil centrifuge, MICRO 17R)에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 새 microtube에 옮겼다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하여 RNA 침전물을 얻었다.

이 침전물에 diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 함유된 80% ethanol을 가하고 4 $^{\circ}$ C, 7,500 rpm에서 5분간 원심분리함으로써 세척하였다. 수거된 RNA 침전물을 대기 중에서 건조시킨 후, RNase-free water로 부유시키고, spectrophotometer (Beckman, DU-650)를 사용하여 260nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도를 알아내어, 실험에 사용하였다(1.0A₂₆₀ = single strand RNA 40 μ g/ml)²⁸.

② Primer 제조

MUC 5AC의 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5'-CACCGCCTCACCCGAC GCCCACC-3', antisense primer의 염기서열은 5'-GAT GGGGCCGGCCTCCCGGAGAGC-3'이며, 이 primer에 의해 합성된 PCR 산물의 크기는 440bp였다. β -actin 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5'-TGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCTG-3'이고, antisense primer는 5'-GTGCCACCAGACAG CACTGTGTTG-3'이며 이 primer가 표적으로 하는 DNA 크기는 290bp였다.

③ RT-PCR

수거된 total RNA를 이용, 역전사 반응(reverse transcription; RT)으로 cDNA를 만들고, 이를 증합 효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)으로 증폭시켰다. 즉 각각의 조건에서 얻어진 total RNA 5 μ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열함으로써 denaturation시키고, 이를 얼음에 담가 급냉시킨 후 4 μ l의 5 \times RT buffer (250mM Tris-HCl/pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, 50mM Dithiothreitol), 2.5 μ l의 10mM dNTP, 1 μ l의 oligo-dT15 (25pmol), 1 μ l의 역전사 효소 용액 (M-MLV RT; 200 U/ μ l)을 첨가하고 총 반응액이 20 μ l가 되도록 탈이온 2차 증류수를 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 얻었다. 얻어진 cDNA 산물은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하여 역전사 효소를 불활성화시킨 다음 얼음에 담가 급냉하였다. MUC 5AC 유전자에 대한 증합효소 연쇄반응(PCR)은, 각각의 역전사 반응에서 얻은 cDNA 산물 5 μ l에, 4 μ l의 10 \times PCR buffer (100mM Tris/pH 8.0, 30mM MgCl₂, 2.5mg/ml BSA), 4 μ l의 2.5mM dNTP, 1 μ l씩의 MUC 5AC

에 대한 sense, antisense primer (10pmol/μl), 1μl의 Taq DNA polymerase (0.2U/μl)를 첨가하여 총 반응액이 40μl 되도록 탈이온 2차 증류수를 가한 후 시행되었다. 증폭반응을 위하여, PCR (PCR thermal cycler; Takara MP-300, Japan)을 30회 실시하였으며, denaturation은 94℃에서 1분, annealing은 60℃에서 1분, extension은 72℃에서 2분간 각각 시행하였다.

④ 전기영동

RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응으로 증폭된 cDNA 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC 5AC mRNA 발현 정도(수준)의 변동을 관찰하였다. 즉, 증폭된 PCR 산물 (20μl)을 10×gel loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 50% glycerol)와 잘 혼합한 다음, Tris-acetate-EDTA buffer (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA)용액 및 1μg/ml의 ethidium bromide가 포함된 1.2% agarose gel에서 전기영동하였다. Gel 상에서 이동된 각각의DNA band는 자외선 투사기 (ultraviolet transilluminator)를 이용하여 관찰하고, 사진 촬영하였다.

8) 통계처리

모든 측정 결과는 mean±S.E.M.으로 환산된 후, 약물 처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타냈다. 통계처리는 unpaired Student's t-test로 하였으며, p<0.05인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 成 績

1. 뮤신 분비에 미치는 영향

1) 定喘化痰湯

定喘化痰湯(JHT)은 최종 추출물 40μl/PBS 200μl의 투여 농도에서 뮤신 분비를 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 1).

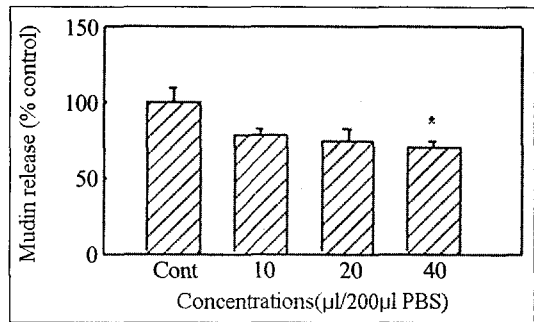


Fig. 1. Effect of JHT on mucin release from cultured HTSE cells.

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

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

2) 杏蘇湯

杏蘇湯(HST)은 최종 추출물 40μl/PBS 200μl의 투여 농도에서 뮤신 분비를 유의성 있게 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 2).

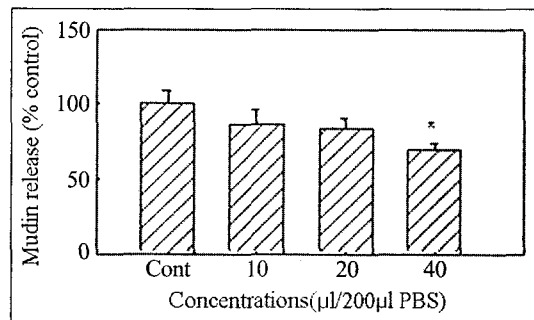


Fig. 2. Effect of HST on mucin release from cultured HTSE cells.

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

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

3) 小青龍湯

小青龍湯(SCRT)은 용량 의존적으로 뮤신 분비를 감소시키는 것으로 나타났는데, 최종 추출물 40μl ~

80 μ l/PBS 200 μ l의 투여 농도 범위에서 뮤신 분비를 대조군에 비하여 30% 가량 감소시켰다(Fig. 3).

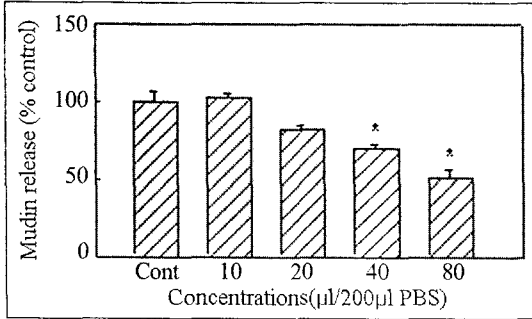


Fig. 3. Effect of SCRT on mucin release from cultured HTSE cells.

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

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

2. LDH 분비에 미치는 影響

1) 定喘化痰湯

定喘化痰湯(JHT)은 전 투여 농도 범위에서 細胞毒性的 한 지표인 LDH 분비에 유의성 있는 영향을 미치지 못하였다(Fig. 4).

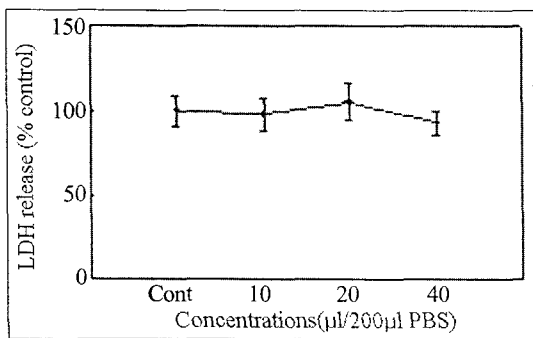


Fig. 4. Effect of JHT on LDH release from cultured HTSE cells.

Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of JHT extract 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.

2) 杏蘇湯

杏蘇湯(HST)은 전 투여 농도 범위에서 細胞毒性的 한 지표인 LDH 분비에 유의성 있는 영향을 미치지 못하였다(Fig. 5).

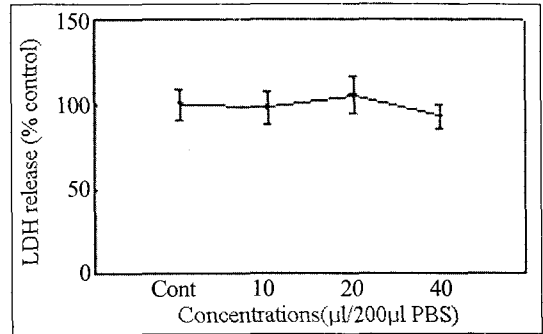


Fig. 5. Effect of HST on LDH release from cultured HTSE cells.

Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of HST extract 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.

3) 小青龍湯

小青龍湯(SCRT)은 전 투여 농도 범위에서 細胞毒性的 한 지표인 LDH 분비에 유의성 있는 영향을 미치지 못하였다(Fig. 6).

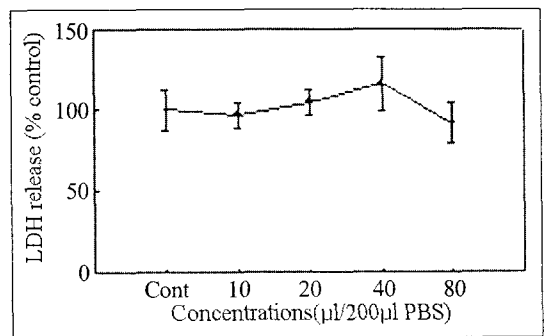


Fig. 6. Effect of SCRT on LDH release from cultured HTSE cells.

Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of SCRT extract 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.

3. Sepharose CL-4B column을 통한 전체 용출 양상 분석

1) 定喘化痰湯

定喘化痰湯(JHT) 40 μ l/PBS 200 μ l 처리 시, JHT는 주로 뮤신의 분비를 감소시키며, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에는 영향을 발현하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 7).

2) 杏蘇湯

杏蘇湯(HST) 40 μ l/PBS 200 μ l 처리 시, HST는

주로 뮤신의 분비를 감소시키며, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에는 영향을 발현하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 8).

3) 小青龍湯

小青龍湯(SCRT) 80 μ l/PBS 200 μ l 처리 시, SCRT은 주로 뮤신의 분비에만 영향을 주며, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에는 영향을 발현하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 9).

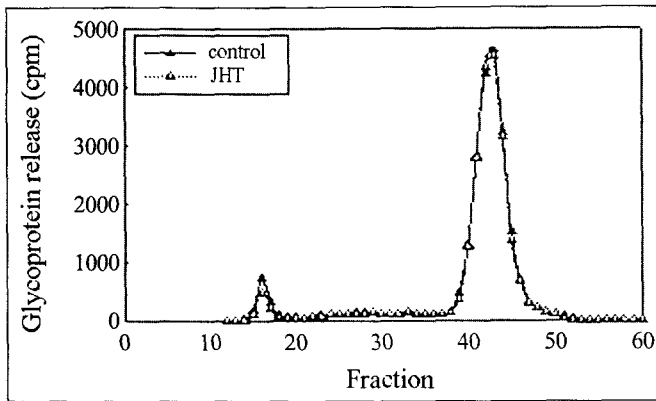


Fig. 7. Effect of JHT on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column.

Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of JHT 40 μ l/PBS 200 μ l and total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed, as described in *Materials and Methods*.

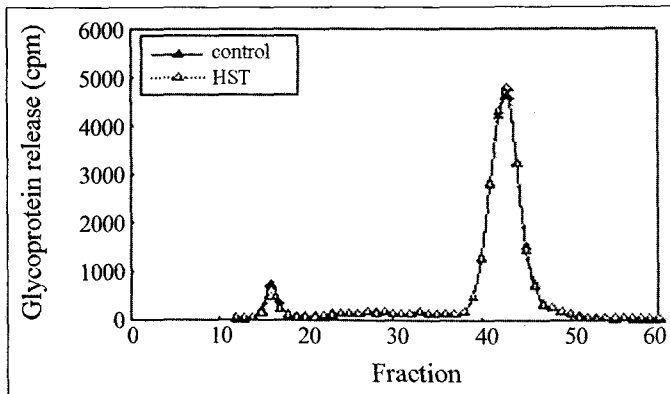


Fig. 8. Effect of HST on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column.

Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of HST 40 μ l/PBS 200 μ l and total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed, as described in *Materials and Methods*.

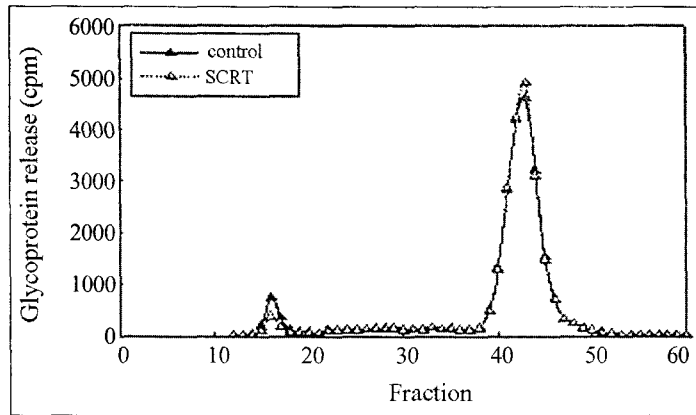


Fig. 9. Effect of SCRT on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column.

Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of SCRT $80\mu\text{l}$ /PBS $200\mu\text{l}$ and total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed, as described in *Materials and Methods*.

4. MUC 5AC mRNA 발현 수준에 미치는 영향

RT-PCR 實驗 結果, 30분간 투여 시 뮤신 분비를 감소시키는 것으로 나타난 定喘化痰湯($40\mu\text{l}$ /PBS $200\mu\text{l}$), 杏蘇湯($40\mu\text{l}$ /PBS $200\mu\text{l}$) 및 小青龍湯($80\mu\text{l}$ /PBS $200\mu\text{l}$) 투여군 중 定喘化痰湯 투여군에서 24 시간 동안의 MUC 5AC mRNA 발현 수준이 대조

군에 비하여 감소되는 것으로 나타났다. 즉 이들 방제 중 定喘化痰湯에 의한 뮤신 분비의 감소는 분비 현상 자체에 대한 영향과 아울러 반복(장기) 투여 시 뮤신의 生成, 즉 뮤신 유전자 수준에서의 발현 감소에도 일부 기인할 가능성을 시사하는 결과라 할 수 있다.

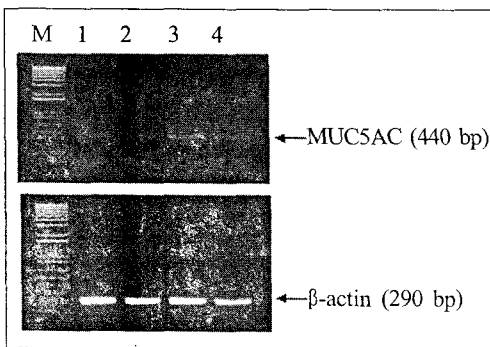


Fig. 10. Effect of JHT, HST and SCRT on MUC5AC mRNA expression in cultured HTSE cells.

M : 1kb marker 1: Control 2: JHT 3: HST 4: SCRT
HTSE cells were incubated with the indicated concentration (JHT, $40\mu\text{l}$ /PBS $200\mu\text{l}$, HST $40\mu\text{l}$ /PBS $200\mu\text{l}$, SCRT $80\mu\text{l}$ /PBS $200\mu\text{l}$) of each agent for 24 hrs. Total RNA was isolated and MUC 5AC mRNA levels were analyzed by RT-PCR. The PCR products were separated on 1.2% agarose gel and stained with ethidium bromide, as described in *Materials and Methods*.

IV. 考 察

객담은 호흡도에서 분비되는 점액성의 병리적 산물로 체내의 모든 비생리적 체액을 지칭하는 痰飲의 개념 중에서 협의의 痰飲에 속하는데 기관, 기관지에서 분비된 분비물이 침입한 이물이나 병원체를 흡착하여 섬모운동을 통하여 인후두부로 옮겨지고 반사기능에 의해 외계로 배출되거나 연하되는 것을 말한다⁷. 한의학에서의 객담의 종류에는 風痰, 寒痰, 濕痰, 熱痰, 燥痰, 鬱痰, 氣痰 등이 있으며 서양의학에서는 객담을 점액성, 장액성, 화농성, 혈성으로 분류한다^{7,29}.

객담의 주요 성분인 점액(mucus)은 섬모세포와의 협동작용을 통해 흡인된 공기 속의 이물이나 병원체 등을 외부로 제거하는 역할을 하는데^{6,8} 점액의 구성요소인 뮤신(mucin, 점액소)의 양과 질의 이상은

오히려 인체의 방어 작용에 영향을 주어 호흡기에 심한 병리 현상을 유발할 수 있다. 객담의 증가는 호흡기 질환의 병적 상태를 증가시키는데, 감염의 위험을 높이고, 기류폐쇄를 가져오며 객담의 만성적 증가는 사망 위험을 증가 시킨다^{9,10,30}.

定喘化痰湯은 『東醫寶鑑·咳嗽·痰喘』¹에 “治咳嗽痰喘”한다고 기재된 처방으로 대부분 肺經에 귀속되는 약물로 구성되어 咳嗽, 喘息, 痰喘, 기관지염 등의 치료에 활용되고 있는데^{2,4}, 그 구성을 살펴보면 燥濕化痰하는 陳皮, 半夏, 南星炮, 宣肺氣하며 止咳하는 杏仁, 款冬花, 肺氣를 수렴하는 五味子, 肺氣를 補하는 人蔘, 開痰하는 生薑, 諸藥을 調和하는 甘草로 이루어져 있다^{14,31}.

杏蘇湯은 『世醫得效方』⁵에 처음 기재된 처방으로 『東醫寶鑑·咳嗽·寒嗽』¹에서 “治傷風寒咳嗽痰盛”한다고 하였으며, 宣肺潤氣藥인 杏仁, 發散藥인 紫蘇葉과 生薑, 清熱藥인 桑白皮, 化痰藥인 陳皮, 半夏, 貝母, 補氣助陽藥인 白朮과 甘草, 收斂藥인 五味子로 구성되어 止咳平喘, 解表散寒의 효과가 있어 惡寒發熱, 咳嗽, 객담 등의 치료에 활용되고 있다^{6,7,15,31}.

小青龍湯은 『傷寒論』⁸에 처음 기재된 처방으로 구성 약물 중 麻黃, 桂枝는 發汗解表하며 宣肺平喘하고, 芍藥은 桂枝와 배합되어 榮衛를 調和하고, 乾薑, 細辛은 溫肺化痰하는 외에도 辛散風寒하고, 五味子是 斂肺氣하는 약물로서 止咳하면서 아울러 肺氣의 耗散을 방지하고, 半夏는 燥濕化痰하며 甘草는 諸藥을 調和하며 芍藥과 배합되어 麻黃 桂枝의 지나친 辛散作用을 완화 시킨다^{8,31}. 이런 약물들의 작용으로小青龍湯은 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, 喘息 등의 증상을 나타내는 급·만성 기관지염, 기관지천식, 알레르기성 비염, 폐렴 등의 질환에 폭 넓게 응용되고 있다^{7,8}.

서양의학적으로 호흡기 뮤신의 분비를 감소시키는 물질로는 서양의학 체계에서 다양한 염증성 질환의 치료제로 응용되는 glucocorticoid가 대표적이며³² 최근 poly-L-lysine (PLL) 등의 양이온성 폴리펩티드가 호흡기 뮤신 분비를 억제하는 물질로서 보고되었다²³.

그러나 이러한 약물들은 그 다양한 약리작용 및 부작용 등으로 인해 호흡기 질환의 임상에서 적절히 응용되기에는 많은 제한이 따르고 있다. 또한, 한의학적 처방약물 중에서도 호흡기 객담의 주 구성요소인 뮤신의 분비를 억제할 수 있는 처방 혹은 단미약물에 대한 연구는 본격적으로 시도된 바가 없었다.

이에 저자는 선행 연구^{20,21}에서 효능이 일정하게 알려진 小青龍湯, 杏蘇湯과 痰喘의 治方이며 喘嗽의 통치약으로 제시⁷되고 있는 定喘化痰湯의 여러 효능 중 객담의 생성 및 과다분비에 대한 조절 효능에 대해 알아보기 위해, 호흡기 객담의 생화학적 주 구성 성분인 뮤신(mucin)의 약리 연구에 보편적으로 사용되는 일차배양 햄스터 기관표면 상피(HTSE)세포를 이용하여, 각 방제들이 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향을 규명하고, 동시에 이 방제들의 뮤신 분비에 대한 작용의 특이성과 뮤신의 분비뿐 아니라 생성에도 영향을 줄 가능성이 있는지를 검증해 보았다.

실험의 결과에서 볼 수 있듯이 定喘化痰湯은 최고 투여용량에서 뮤신 분비를 약 30% 가량 감소시켰고 (Fig. 1), 杏蘇湯의 경우에도 최고 투여용량에서 뮤신 분비를 약 30% 가량 감소시켰으며 (Fig. 2), 小青龍湯 역시 최종 추출물 80 μ l/PBS 200 μ l의 투여 농도에서 뮤신 분비를 약 50% 가량 감소시켰다 (Fig. 3). 이러한 실험결과는 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, 낭포성 섬유증, 천식 등의 호흡기 질환 발생 시 관찰되는 객담의 과다생성 및 분비를 조절하는 수단으로서의 각 방제의 약물학적 역할을 시사하는 결과라 할 수 있다. 定喘化痰湯과 杏蘇湯에는 陳皮, 半夏, 南星, 白朮, 五味子 등 燥濕化痰, 燥濕利水, 斂肺滋腎하는 약물들이 공통적으로 配劑되어 있으며, 小青龍湯에도 五味子和 半夏가 配劑되어 있다는 점을 고려할 때, ‘燥濕化痰’의 개념을 ‘지나친 객담의 분비를 감소시킨다’는 의미로 해석할 수 있으며, 이러한 해석이 상기한 방제들에 의해 발현되는 ‘뮤신 분비 및 생성의 감소 가능성’을 설명할 수 있는 하나의 단서가 될 것으로 판단되며, 향후 이 방제들을 구성하고 있는 각 단미 약물을 대상으로 한 효능

연구 역시 추가적으로 시행되어야 할 것으로 사료된다.

한편, 상기한 방제들은 뮤신 분비에 대한 작용과는 무관하게 세포막 손상에 기인한 독성을 유발할 가능성이 있다. 따라서 본 연구에서는 세포막 손상의 한 지표인 LDH 활성 측정을 통하여 각 방제들의 잠재적 독성발현 가능성을 검증해 보았다. 세포막이 손상되면 세포는 그 완전성과 정상기능을 상실하게 되므로 세포막 손상 시 분비되는 LDH의 활성 측정을 세포독성 유발여부 측정의 한 방법으로 채택하였다^{33,34}. 실험결과에 나타났듯이(Fig. 4~6) 모든 방제의 경우 공히 세포독성은 발현하지 않는 것으로 나타났다. 이러한 실험결과는 이 방제들의 의약품으로서의 안전성을 기초적으로나마 입증해주는 실험결과라 할 수 있다.

다음으로 뮤신 분비를 감소시키는 것으로 나타난 세 방제, 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯이 거대 당단백질인 뮤신의 분비에만 특이적으로 영향을 미치는지, 혹은 뮤신보다 분자량이 작고 구조도 다른 여타의 방사능 표지 당단백질들의 분비에도 영향을 미치는지에 대한 여부를 검증하여 각 방제의 뮤신 분비에 대한 작용에서의 특이성을 규명하고자 하였다. Gel filtration chromatography에서는 resin에 loading 되는 혼합물 중의 구성 성분들을 그 분자의 크기 별로 분리하는데, 특정 혼합물을 loading한 후 void volume로부터 total volume까지, 즉 그 혼합물 중 가장 큰 크기의 물질부터, 가장 작은 크기의 물질까지 용출시켜, 그 각각의 분획들을 수거하여 물질을 정량할 수 있다^{24,35}. 일차배양된 HTSE 세포에 3H-glucosamine을 이용, 배양세포가 생산하는 뮤신 및 glucosamine을 함유하는 여타의 당단백질에, 방사능 표지를 한 후, 일정 기간 동안 세포를 배양하면, ³H-표지 당단백질들이 배양액 중으로 유리 된다^{24,25}. 이때, 이 배양액을 sepharose CL-4B column에 loading 하면, ³H-표지 당단백질 중 분자량 수백만 dalton에 해당하는 거대분자인 뮤신으로부터, 가장 크기가 작은 ³H-glucosamine까지 용출되는 특정한 용출양상(elution profile)이 나타난다. 만약, 대조 배양액의 전체 용출

양상을 기준으로, 각 방제를 처리했을 때 전체 용출양상(total elution profile)의 특정부분에 변화가 생겼다면, 그 변화는 특정 크기의 3H-당단백질 분비량의 변화를 의미하는 것이다. 실험 결과(Fig. 7~9)에서 볼 수 있듯이, 세 방제는 공히 뮤신과 같은 거대 분자가 용출되는 fraction인 void volume fraction에서만 유의성 있는 영향을 나타내고, 여타의 included volume 및 total volume에 해당하는 fraction에서는 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않았음을 알 수 있다. 이러한 실험 결과는, 세 방제가 주로 뮤신과 같은 거대 당단백질의 분비를 감소시키며, 그보다 크기가 작고 구조도 다른 당단백질들의 분비에는 유의성 있는 영향을 미칠 가능성이 낮다는 것을 나타낸다. 즉 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯 등의 방제가 뮤신 분비 감소작용에서 특이성을 나타낼 가능성을 시사하는 것이다.

한편, 배양된 HTSE 세포에 각 방제를 30분간 투여했을 때, 뮤신의 분비에 대한 영향은 검증되었으나, 각 방제가 단순히 이미 생성된 뮤신의 분비에만 영향을 주는지, 혹은 뮤신의 생성(production)에도 영향을 주는지의 여부를 규명하기 위하여 뮤신의 유전자 중 호흡기 뮤신의 대표적인 유전자인 MUC 5AC mRNA의 발현 정도에 각 방제가 미치는 영향을 검증하였다. 즉, 각 방제를 24시간 동안 투여했을 때 세포 내의 MUC 5AC mRNA의 수준에 어떤 영향이 있는지를 검색하였다. 실험 결과에서 볼 수 있듯이(Fig. 10), 세 방제를 24시간 동안 배양세포에 투여한 결과, 세 방제 중 定喘化痰湯이 뮤신의 유전자인 MUC 5AC mRNA의 발현 수준을 다소 감소시키는 것으로 나타났다. 이러한 실험 결과는 定喘化痰湯이 뮤신의 분비 현상에만 영향을 주는 것이 아니라 장기적으로는 뮤신의 생성, 즉 분자 수준에서의 뮤신 생성의 감소를 통해서도 작용할 가능성을 일부나마 시사하는 결과로 볼 수 있다. 杏蘇湯과 小青龍湯의 경우에는 오히려 mRNA의 발현 수준을 약간 증가시키는 듯한 결과를 보이고 있으나, 定喘化痰湯에 의한 결과를 포함하여, 본 연구에서 사용된 RT-PCR 기법의 특성상 현재의 실험 결과만으로는 확정적인

결론을 내리기는 어려울 것으로 판단되며, 방제 자체 혹은 각 방제를 구성하는 단미 약물들을 대상으로, real-time PCR 혹은 northern blot analysis 등을 통하여 유전자 발현 수준에서의 각 약물의 영향을 추가적으로 시험해 보는 과정이 필요할 것으로 사료된다.

종합하여 보면, 상기의 연구결과들은 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯의 특이적인 뮤신 분비 억제현상과 뮤신 유전자 수준에서의 작용 가능성 등을 이용하여, 새로운 작용기전을 가진 호흡기 점액분비 조절 약물의 개발 가능성을 제시하고 있으며, 실제 임상에서 객담의 분비조절(축진 혹은 감소)의 목적으로 사용되어 왔던 각 방제들이 세포 수준에서 뮤신의 분비 작용을 조절하고 있을 뿐만 아니라 유전자 수준에서의 뮤신 생성 조절에도 영향을 줄 가능성이 있음을 제시하고 있다.

V. 結 論

일차배양 햄스터 기관표면 상피(HTSE)세포를 이용하여, 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯의 뮤신 분비 및 생성에 미치는 영향과 그 영향이 특이적인지를 측정하고, 젖산 탈수소효소(LDH) 활성에 미치는 영향을 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 定喘化痰湯과 杏蘇湯은 최고투여 용량에서 뮤신 분비를 감소시켰고 小青龍湯은 용량 의존적으로 뮤신 분비를 감소시키는 경향을 보였다.
2. 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯은 공히 세포독성은 발현하지 않았다.
3. 뮤신의 분비를 유의성 있게 감소시키는 것으로 나타난 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯은 주로 뮤신과 같은 거대 당단백질의 분비를 감소시키며, 그보다 크기가 작고 구조도 다른 당단백질들의 분비에는 유의성 있는 영향을 미칠 가능성이 낮으므로, 뮤신 분비 감소작용에서 특이성을 나타냄을 알 수 있었다.
4. 定喘化痰湯은 뮤신의 분비 현상만 감소시키는 것

이 아니라 장기적으로는 뮤신의 생성, 즉 분자 수준에서의 뮤신 합성 감소를 통해서 작용할 가능성이 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과는 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯은 뮤신 분비를 억제함으로써 객담량의 증가를 주요 증상으로 하는 호흡기 질환에 응용할 수 있으며, 특히 定喘化痰湯은 뮤신의 생성을 억제할 가능성이 있다는 실험적 근거를 제시하는 것으로 사료된다. 또한 각 방제 구성 약물들의 개별적 약리작용에 대한 후속연구의 필요성을 제시하고 있다.

參考文獻

1. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 남산당; 1999, p.469, 475-6.
2. 康命吉. 濟衆新編. 서울: 杏林書院; 1975, p.176.
3. 尹吉榮. 東醫方劑學. 서울: 高文社; 1980, p.155.
4. 申載鏞. 方藥台編解說. 서울: 傳統醫學研究院; 2000, p.227.
5. 危亦林. 世醫得效方. 서울: 醫聖堂; 1990, p.158.
6. 宋炳基. 方證新編. 서울: 東園出版社; 1984, p.602.
7. 전국한외과대학폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울: 한문회사; 2002, p.52-5, 102-14, 144-9, 191, 542, 555.
8. 이상인, 김동걸, 이영종, 노승현, 주영승. 방제학. 서울: 영림사; 1990, p.50-2.
9. 차창룡. 호흡기의 숙주방어기전. 서울대학교의과대학 호흡기학. 서울: 서울대학교출판부; 1997, p.47-8.
10. 심영수. 호흡기의 해부학적 구조. 임상호흡기학. 서울: 일조각; 1990, p.6-8.
11. Rubin BK. Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care*. 2002;47(7):761-82.
12. 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.

13. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma. Current understanding. *J Allergy Clin Immuno.* 1990;85:422-36.
14. 朴東一, 鄭昇杞, 李珩九. 정천화담탕 및 정천화담 강기탕의 효능에 관한 실험적 연구. *경희의학.* 1989;5(2):177-88.
15. 尹錫雲, 鄭昇杞, 李珩九. 행소탕의 효능에 관한 실험적 연구. *경희한의대논문집.* 1988;11:183-92.
16. 황우석, 정희재, 주창엽, 이재성, 이경기, 이형구, 정승기. 소청룡탕치료 기관지천식환자의 혈액내 호산구수와 혈청IgE 및 T림프구아형의 변화. *대한한방내과학회지.* 2002;23(1):83-9.
17. 서영호, 배현수, 신민규, 홍무창. 소청룡탕이 Helper T cell의 활성화에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2002;16(4):693-700.
18. 정승기, 허태석, 황우석, 주창엽, 김영우, 정희재. 소청룡탕이 기관지천식환자의 혈청 IL-4, IL-5, IFN- γ 변화에 미치는 영향. *대한한의학회지.* 2002; 23(2):70-7.
19. 배한호, 이정은, 한영주, 박양춘. 생쥐의 B 세포에서 IgE의 분비와 cytokine 생산에 대한 소청룡탕의 효과. *대한한방내과학회지.* 2003;24(2):249-59.
20. 나도균, 이충재, 박양춘. 소청룡탕 및 가미치효산이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2004;18(3):734-9.
21. 임도희, 이정은, 한영주, 황지호, 조철준, 배한호, 박양춘. 행소탕 및 가미팔미환이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향. *대한한방내과학회지.* 2005;26(1):221-8.
22. 黃度淵. 方藥合編. 서울: 南山堂; 1992, p.15-5, 173.
23. Lee CJ. Specificity in the inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Appl. Pharmacol.* 2001;9(3):218-23.
24. 이충재. 설치류 기관 뮤신유리 억제에서의 폴리양이온성 작용기전. 서울: 서울대학교 대학원 박사학위 논문; 1997.
25. Kim KC, Rearick JI, Nettesheim P, Jetten AM. Biochemical characterization of mucous glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial cells in primary culture. *Biol. Chem.* 1985;260: 4021-7.
26. Kim KC, Brody JS. Use of primary cell culture to study regulation of airway surface epithelial mucus secretion. *Symp Soc Exp Biol.* 1989;43: 231-9.
27. Wu R, Smith D. Continuous multiplication of rabbit tracheal epithelial cells in a defined, hormone-supplemented medium. *In Vitro.* 1982;18: 800-12.
28. Karlinsky J, Stamatoyannopoulos G, Enver T. Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells. *Anal Biochem.* 1989;180(2): 303-6.
29. 정희재, 정승기, 이형구. 객담에 관한 동서의학적 문헌고찰. *대한한방성인병학회지.* 1995;1(1):51~62.
30. Rubin BK. Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care.* 2002;47(7):761-8.
31. 全國韓醫科大學本草學教授 공편. 本草學. 서울: 永林社; 2000, p.113-6, 121, 124-5, 165, 334, 347, 448, 450, 453, 458, 463, 478, 479, 481-4, 531, 536, 540, 542, 581, 622.
32. Mutschler E, Derendorf H. Drug actions. Boca Raton, Florida: CRC press; 1995, p.410-1.
33. Freshny. Measurement of viability and cytotoxicity. In: Culture of animal cells(3rd edn). Wiley-Liss; 1994, p.288.
34. 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(2):188-98.
35. Cheng PW, Sherman JM, Boat TE, Bruce M. Quantitation of radiolabeled mucous glycoproteins secreted by tracheal explants. *Anal. Biochem.* 1981;117:301-6.