

紫菀治哮喘과 瓜蒌枳實湯이 일차배양된 齧齒類 氣道 杯狀細胞에서의 뮤신 분비에 미치는 영향

박정준 · 김윤식 · 설인찬*

대전대학교 한의과대학 심계내과학교실

Effect of Jawan-Chihyosan and Gwaru-Jisiltang on Secretion of Mucin by the First Cultivated Goblet Cells of Rodent's Airway

Jung Joon Park, Yoon Sik Kim, In Chan Seol*

Department of Cardiovascular & Neurologic Disease, College of Oriental Medicine, Daejeon University

In the present study, the author tried to investigate whether four oriental medical prescriptions named , jawan-chihyosan (CHS), gwaru-jisiltang (GJT), and several single compounds, kaempferol, coumarin, betaine and ursolic acid significantly affect mucin release from cultured hamster tracheal surface epithelial (HTSE) cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with 3H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of CHS, GJT, kaempferol, coumarin, betaine and ursolic acid, respectively, to assess the effect of each agent on 3H-mucin release. Possible cytotoxicities of each agent were assessed by measuring lactate dehydrogenase(LDH) release. Additionally, total elution profiles of control spent media and treatment sample (CHS and GJT) through Sepharose CL-4B column were analysed and effect of CHS and GJT on MUC5AC mRNA expression in cultured HTSE cells were investigated. The results were as follows : (1) CHS and GJT significantly stimulated mucin release from cultured HTSE cells, with significant cytotoxicity ; (2) CHS and GJT chiefly stimulated the 'mucin' release and did not affect significantly the release of the other releasable glycoproteins with less molecular weight than mucin. This result suggests that the three herbal prescriptions specifically stimulate the release of mucin ; (3) CHS and GJT significantly increased the expression levels of MUC 5AC mRNA. This result suggests that the three herbal prescriptions can affect the synthesis of mucin at gene level in cultured HTSE cells ; (4) Kaempferol and coumarin did not affect mucin release, however, betaine and ursolic acid stimulated mucin release. All the agents did not show significant cytotoxicity. We suggest that the effects of CHS and GJT, betaine and ursolic acid should be further investigated and it is of great value to find, from oriental medical prescriptions, novel agents which have the effective expectorant or mucoregulative effect on mucin secretion from airway goblet cells.

Key words : airway goblet cell, mucin, jawan-chihyosan (CHS), gwaru-jisiltang (GJT)

서 론

객담은 기관 또는 기관지의 분비물로, 정상인에서의 기도 분비물은 1일 100ml 이상이 분비된다. 그러나 생리적인 기도분비물은 배출되는 일이 거의 없으므로 객담의 배출은 호흡기의 이상을 의미하며, 초기의 만성 기관지염과 같이 객담이 유일한 증

상인 경우도 많다¹⁾. 천식, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, 낭포성 섬유증 등의 호흡기 질환에서 관찰되는 객담 혹은 점액의 과다분비는 이러한 질환군의 예후를 악화시키는 주 요인으로 익히 알려져 있다^{2,3)}. 현대에 와서 서양의학의 체계에서는 이러한 과다분비된 점액의 점도 및 분비를 조절하기 위해 bromhexine, ambroxole, S-carboxymethylcysteine 등의 약물이 사용되고 있으나, 그 효능 및 응용 범주에 제한이 있어 적절한 약물치료를 시행하기가 용이하지 않은 실정이다⁴⁾.

한의학적으로 이러한 점액은 痰飲의 범주로, 痰은 水濕에 의

* 교신저자 : 설인찬, 대전시 중구 대흥동 22-5 대전대학교 부속한방병원

· E-mail : seolinch@dju.ac.kr, · Tel : 042-229-6805

· 접수 : 2005/09/16 · 수정 : 2006/01/09 · 채택 : 2006/02/03

해서 이뤄지고⁹⁾, 肺, 脾, 腎, 膀胱에 의해 生成되며 특히 肺는 “貯痰之器”라고 하여 外邪를 感受하여 肺失肅降하면 氣의 上下 및 升降에 障礙가 초래되어 痰飲이 발생된다고 하였다^{6,7)}.

紫苑治哮喘과 瓜蒌枳實湯 등의 방제들은 喘息, 咳嗽 및 咯痰 등의 증상이 발생한 곳에 널리 응용하는 처방으로 알려져 있다.

이에 본 연구에서는 한의학 임상에서 호흡기 질환 발병 시에 치료제로 多用되고 있는 紫苑治哮喘과 瓜蒌枳實湯의 止咳平喘祛痰의 효능을 究明하고자 호흡기 뮤신의 약리 연구에 보편적으로 사용되는 일차배양 햄스터 기관표면 상피(HTSE)세포를 이용하여, 호흡기 질환에서 호발되는 객담의 생성 및 과다분비 조절 효능이 뮤신 분비에 미치는 영향을 검증하고, 동시에 이 방제들의 뮤신 분비에 대한 작용이 특이적인지, 그리고 뮤신의 분비뿐 아니라 생성에도 영향을 줄 가능성이 있는 지 등을 검증함으로써 이러한 방제들의 한의학적 효능을 현대과학적으로 규명하고, 동시에 새로운 호흡기 점액 분비 조절약물로서의 응용 가능성을 타진해 보고자 한 바, 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

일차배양 기관표면 상피세포를 얻기 위해, 8-10 주령의 웅성 Golden Syrian 햄스터를 실험동물 전문 사육업체에서 공급받은 후 사용하였다.

Table 1. Prescription of Jawanchihyo-san(CHS)

韓藥	生藥名	用量(g)
紫苑	<i>Asters Radix</i>	10.0
百部根	<i>Stemona Radix</i>	6.0
半夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	6.0
白茯苓	<i>Poria Cocos</i>	6.0
杏仁	<i>Armenicae Amarum Semen</i>	6.0
桑白皮	<i>Mori Cortex</i>	4.0
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	4.0
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	4.0
前胡	<i>Peucedani Radix</i>	4.0
蘇葉	<i>Perillae Folium</i>	4.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2.0
Total amount		56.0

Table 2. Prescription of Gwarujisil-tang(GJT)

韓藥	生藥名	用量(g)
瓜蒌仁	<i>Tricosanthis Fructus</i>	8.0
枳實	<i>Aurantii Immaturus Fructus</i>	8.0
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	8.0
赤茯苓	<i>Poria Cocos</i>	8.0
貝母	<i>Fritillariae Cirrhosae Bulbus</i>	8.0
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	8.0
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	8.0
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	8.0
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	5.0
縮砂仁	<i>Amomi Fructus</i>	4.0
木香	<i>Aucklandiae Radix</i>	4.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2.0
Total amount		79.0

2) 약물

본 실험에 사용한 CHS, GJT의 구성 약물은 대전대학교 부속 한방병원에서 공급받아 사용하였고, 각각 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1, Table 2).

2. 방법

1) 시료제조

각 방제 한 첩 분량에 600~800ml의 탈이온 2차 증류수를 가하고 100℃로 가온된 상태에서 3시간 동안 전탕하여, 80ml의 탱액을 수거하였다. 각 탱액을 실온 정도로 방냉한 후, 멸균 청정 후드 내에서 0.22 μ m filter를 이용, 가압 여과하여 멸균용기에 저장, 4℃ 냉장고에 보관하였다.

2) 햄스터 기관표면 상피세포의 분리 및 배양

햄스터의 기관표면 상피세포 분리와 배양에 적용된 실험방법은 Kim 등^{8,9)}, Wu 등^{10,11)}방법을 사용하였다. 세포들이 1~3일간 배양된 후에는 37℃ incubator에서 32℃ incubator로 옮겨서 배양했다. 배양액 교체는, 배양 개시 후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다.

3) 뮤신의 대사적 방사선 표지(radiolabeling)

Kim 등⁸⁾, Lee 등¹²⁻¹⁴⁾의 방법을 변형, 이용하였는데, 배양세포 중의 뮤신은, 성숙한 배양세포(24 well plate, 5×10⁵ cells/well)에, 10 μ Ci/ml의 [6-3H] glucosamine (39.2 Ci/mmol, New England nuclear)을 함유하는 완전배양액 {insulin(5 μ g/ml), transferrin(5 μ g/ml), epidermal growth factor(12.5ng/ml), hydrocortisone(0.1 μ m), sodium selenite (0.01 μ m), fetal bovine serum(5%, V/V)(이하 FBS), retinoic acid(0.1 μ m), penicillin G(100 U/ml), streptomycin(100 μ g/ml), gentamicin(50 μ g/ml)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME)과 Medium 199(M199)의 1 : 1 혼합 배양액}을 well당 200 μ l씩 가하고 32℃에서 24시간 동안 배양함으로써 방사선 표지(metabolic radiolabeling)가 되었다.

4) 약물 처리

24시간 동안의 대사적 방사능 표지가 완결된 후 배양액 (pretreatment sample, 이하 PT로 약칭)을 수거해 두었다. 배양세포에 well당 0.5ml의 Dulbecco's Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free Phosphate-Buffered Saline(PBS)를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 각 방제의 최종 추출물 2~80 μ l를 함유하는 PBS 200 μ l, 혹은 다양한 농도의 kaempferol, coumarin, betaine, ursolic acid를 함유하는 PBS 200 μ l를 각각 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, 50 μ l의 상등액은 젖산 탈수소효소 활성측정(LDH activity assay)을 위해 따로 덜어두고 나머지는 방사성 뮤신함량을 측정할 때까지 -70℃에서 냉동저장하였다²⁻⁴⁾.

5) 뮤신 함량 측정법

Hyaluronidase에 의해 분해되지 않으며, Sepharose CL-4B column으로부터 exclude되는 고분자량의 glycoconjugate를 뮤신으로 정의하였고, Lee 등¹²⁻¹⁴⁾의 방법에 따라 방사성 뮤신의 함량을 측정하였다.

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

배양세포 중의 뮤신은, 다 자란 배양세포(24 well plate, 5×10^5 cells/well)에, $10 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ 의 $[6\text{-}^3\text{H}]$ glucosamine ($39.2 \text{ Ci}/\text{mmol}$, New England nuclear)을 함유하는 완전배양액을 각 well당 $200 \mu\text{l}$ 씩 가하고 32°C 에서 24시간 동안 배양함으로써 방사능 표지하였고, 방사능 표지가 완결된 후 spent medium은 수거해 두었다. 배양세포에 각 well당 0.5 ml 의 PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 각 방제의 최종 추출물 $2\text{--}80 \mu\text{l}$ 를 함유하는 PBS $200 \mu\text{l}$, 혹은 다양한 농도의 kaempferol, coumarin, betaine, ursolic acid를 함유하는 PBS $200 \mu\text{l}$ 를 각각 well마다 가하고 32°C 에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액(T sample)을 수거하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, $50 \mu\text{l}$ 의 상등액을 젖산 탈수소효소 활성측정(LDH activity assay)에 사용했다. LDH 활성 측정은 commercial kit(Sigma, LD-L 10)를 이용하였다¹²⁻¹⁴.

7) 통계처리

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

결 과

1. CHS가 일차배양 HTSE 세포로부터의 뮤신분비에 미치는 영향
CHS는 용량의존적으로 뮤신분비를 유의성 있게 증가시켰으며, 최종 추출물 $2\text{--}20(\mu\text{l}/\text{PBS } 200 \mu\text{l})$ 의 투여 농도에서, 뮤신분비를 $100\text{--}840\%$ 가량 증가시켰다(Fig. 1).

2. CHS가 일차배양 HTSE 세포로부터의 LDH 분비에 미치는 영향
CHS는 $10\text{--}20(\mu\text{l}/\text{PBS } 200 \mu\text{l})$ 의 투여 농도에서 세포독성의 한 지표인 LDH 분비에 유의성 있는 영향이 나타났으며, $20 \mu\text{l}/\text{PBS } 200 \mu\text{l}$ 에서는 대조군에 비해 LDH분비를 2배가량 증가시켰다(Fig. 2).

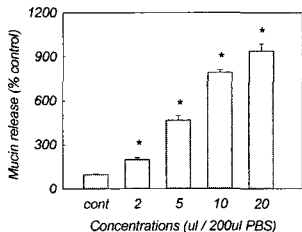


Fig. 1. Effect of CHS on mucin release from cultured HTSE cells. *: significantly different from control($p < 0.05$).

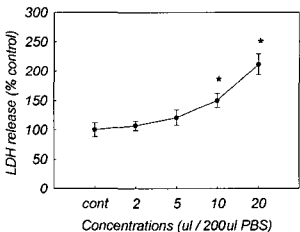


Fig. 2. Effect of CHS on LDH release from cultured HTSE cells. *: significantly different from control($p < 0.05$).

3. GJT가 일차배양 HTSE 세포로부터의 뮤신분비에 미치는 영향
GJT는 용량의존적으로 뮤신분비를 유의성있게 증가시키는

것으로 나타났는데, GJT 추출물 $20 \mu\text{l}\text{--}80 \mu\text{l}/\text{PBS } 200 \mu\text{l}$ 의 투여 농도 범위에서, 뮤신분비를 $50\text{--}250\%$ 가량 증가시켰다(Fig. 3).

4. GJT가 일차배양 HTSE 세포로부터의 LDH 분비에 미치는 영향
GJT 추출물 $80 \mu\text{l}/\text{PBS } 200 \mu\text{l}$ 의 투여 농도에서, LDH분비에 유의성있는 영향을 나타냈으며, 대조군에 비해 5배가량 증가시켰다(Fig. 4).

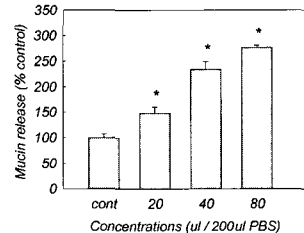


Fig. 3. Effect of GJT on mucin release from cultured HTSE cells. *: significantly different from control($p < 0.05$).

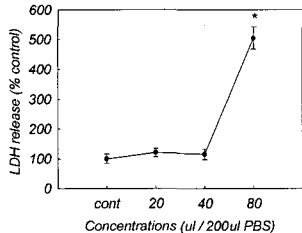


Fig. 4. Effect of GJT on LDH release from cultured HTSE cells. *: significantly different from control($p < 0.05$).

5. CHS-treated sample의 sepharose CL-4B column을 통한 전체 용출 양상 분석

CHS $5 \mu\text{l}/\text{PBS } 200 \mu\text{l}$ 처리 시, CHS는 뮤신의 분비를 증가시켰으나, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에는 유의성있는 영향을 나타내지 않았다(Fig. 5).

6. GJT-treated sample의 sepharose CL-4B column을 통한 전체 용출 양상 분석

GJT $40 \mu\text{l}/\text{PBS } 200 \mu\text{l}$ 처리 시, GJT는 뮤신의 분비를 증가시켰으나, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에는 유의성 있는 영향을 나타내지 않았다(Fig. 6).

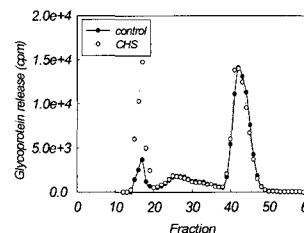


Fig. 5. Effect of CHS on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column.

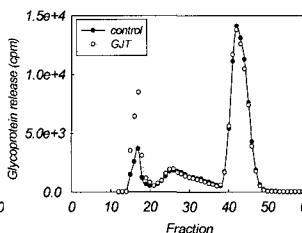


Fig. 6. Effect of GJT on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column.

7. MUC 5AC mRNA 발현 수준에 미치는 CHS, GJT의 영향
RT-PCR 실험 결과, 30분간 투여 시 뮤신 분비를 증가시키는 것으로 나타난 CHS, GJT, 투여군에서는 24시간 동안의 MUC5AC mRNA 발현 수준도 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되는 것으로 나타났다.

8. 각 방제를 구성하는 단미약물 중의 특정 단일성분들이 일차배양 HTSE 세포로부터의 뮤신분비에 미치는 영향

고찰

Kaempferol 및 coumarin은 10 μ m ~ 1,000 μ m 투여 농도 범위에서 뮤신 분비에 유의성있는 영향을 나타내지 않았다(Fig. 7, Fig. 9). 그러나 Betaine 및 ursolic acid는 동일한 투여 농도 범위에서 용량의존적으로 뮤신분비를 유의성있게 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 11, Fig. 13).

9. 각 방제를 구성하는 단미약물 중의 특정 단일성분들이 일차배양 HTSE 세포로부터의 LDH 분비에 미치는 영향

Kaempferol, coumarin, betaine 및 ursolic acid는 공히 전 투여 농도 범위에서 세포독성의 한 지표인 LDH 분비에 유의성있는 영향을 나타내지 않았다(Fig. 8, Fig. 10, Fig. 12, Fig. 14).

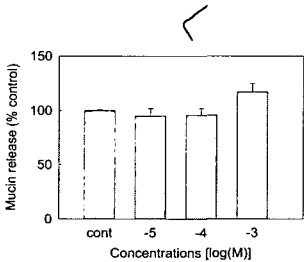


Fig. 7. Effect of kaempferol on mucin release from cultured HTSE cells.

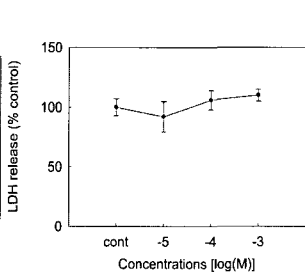


Fig. 8. Effect of kaempferol on LDH release from cultured HTSE cells.

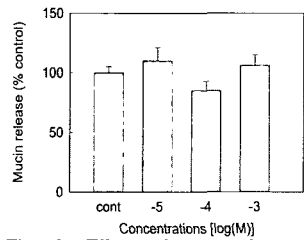


Fig. 9. Effect of coumarin on mucin release from cultured HTSE cells.

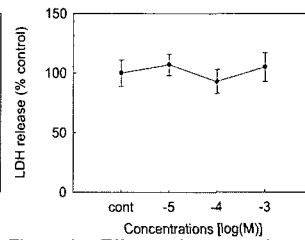


Fig. 10. Effect of coumarin on LDH release from cultured HTSE cells.

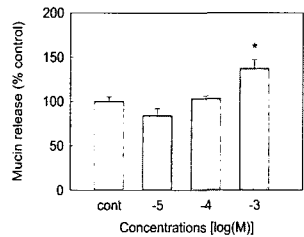


Fig. 11. Effect of betaine on mucin release from cultured HTSE cells. *: significantly different from control($\alpha < 0.05$).

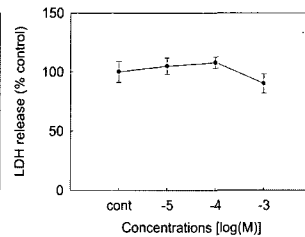


Fig. 12. Effect of betaine on LDH release from cultured HTSE cells.

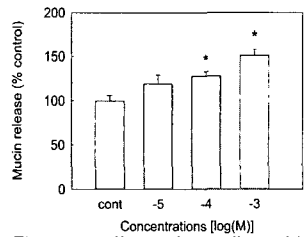


Fig. 13. Effect of ursolic acid on mucin release from cultured HTSE cells. *: significantly different from control($\alpha < 0.05$).

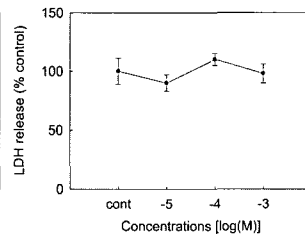


Fig. 14. Effect of ursolic acid on LDH release from cultured HTSE cells.

肺는 氣道를 통하여 外界와 接하여 1日 12,000 l의 공기를 흡입하므로 유해한 물질이나 세균 등의 침입을 막기 위하여 스스로 自淨作用을 갖추고 있다. 이 自淨作用의 기본적인 물질은 뮤신이라고 부르는 粘液性 당단백질로서, 1日 100ml씩 분비하고 있다. 이 뮤신과 세균, 먼지 등이 혼합되어 가래의 형태로 배출되는데, 질환을 의미하는 양상은 명확하게 정의되어 있으나, 무엇이 정상인지에 대해서는 아직 논의가 없는 상태이다¹⁶⁾. 이러한 뮤신의 분비를 증가시키는 것으로 알려진 물질로는 ATP, TNF-alpha 등의 인체의 염증 진행과정에서 확인되는 내인성 물질 및 염화암모늄, 요오드화칼륨, bromhexine, ambroxole 등의 약물이 있으나, 뚜렷한 祛痰效果를 나타내면서도 임상에서 적절히 활용하기에는 다양한 제한점이 있는 것으로 알려져 있다⁴⁾.

紫菀治哮喘은 《晴崗醫鑑》¹⁸⁾에 기재된 처방으로 喘息緩解劑에 가장 많이 응용된다는 治哮喘에 化痰止咳하고 潤肺下氣시키는 紫菀을 증량하고, 潤肺下氣止咳하는 百部根, 降氣祛痰하는 前胡를 加하고 枳殼을 減한 처방으로서 哮喘, 肺束寒熱, 寒暄咳 등에 사용한다. 瓜蒌枳實湯은 明代 龔의 《萬病回春》¹⁹⁾에 최초로記載된 처방으로 “治痰結咯吐不出 胸膈作痛 不能轉側 或痰結胸膈滿悶作寒熱氣急 并痰迷心竅不能言語者”한다고 하였다.

본 연구는 止咳平喘去痰 효능을 지닌 방제들의 호흡기 점액 분비에 대한 객관적 영향을 규명하고자 하는 것이었다. 따라서 본 연구에서는 호흡기 뮤신의 약리 연구에 보편적으로 사용되는 일차배양 햄스터 기관 표면 상피(HTSE)세포를 이용하여, 紫菀治哮喘, 瓜蒌枳實湯 등의 다양한 효능 중 호흡기 질환에서 好發되는 嗜痰의 생성 및 과다분비 조절 효능을, 일차배양 햄스터 기관 표면 상피세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향 검증을 통하여 규명하고, 동시에 이 방제들의 뮤신 분비에 대한 작용이 특이적인지, 그리고 뮤신의 분비뿐 아니라 생성에도 영향을 줄 가능성이 있는 지 등을 검증함으로써 이러한 방제들의 韓醫學의 효능을 규명하고, 동시에 새로운 호흡기 점액 분비 조절약물로서의 응용 가능성을 알아보하고자 하였다.

실험결과에서 볼 수 있는 것처럼, 紫菀治哮喘은 용량의존적으로 뮤신분비를 증가시켰으며 또한 세포독성을 발현할 가능성을 보였다(Fig. 1, Fig. 2). 紫菀治哮喘은 韓醫學의으로 흉부 압박감 및 호흡곤란 등의 병리적 상황에서 頻用되는 처방으로 紫菀, 桔梗, 枳殼, 貝母, 杏仁 등 排膿消腫 및 鎮咳去痰 효능을 발현할 가능성이 있는 약물을 함유하고 있어서, 호흡기 배상세포에 대해서도 직접 유의성 있는 뮤신분비 증가현상을 유발한 것으로 추정할 수 있다. 이러한 실험결과는, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, 낭포성 섬유증, 천식 등 호흡기 질환 발병 시 관찰되는 객담 과다생성 및 분비 시, 과다 객담의 배출을 돕는 수단으로서의 紫菀治哮喘의 약물학적 역할을 시사하는 결과라 할 수 있다. 향후 이 방제를 구성하는 각 단미약물을 대상으로 한 효능 연구가 추가적으로 시행되어야 할 것으로 사료되며, 서양의학적인 시각에서 보면 紫菀治哮喘 加味方은 효과적인 거담제(expectorant)로 응용될 가능성이 있을 것으로 사료된다. 또한,

이 방제에 의한 뮤신 분비 증가는, 방제에 의한 세포막 손상에 기인한 세포 내용물의 외부 유출 결과일 가능성도 있다. 따라서, 본 연구에서는 세포막 손상의 한 지표인 LDH 활성 측정을 통하여 각 방제들의 잠재적 독성발현 가능성을 검증하였다. 세포막이 손상되면 세포는 완전성과 정상기능을 상실한다. 그러므로 세포막 손상 시 분비되는 LDH의 활성 측정을 세포독성 유발여부 측정의 한 방법으로 채택할 수 있을 것이다^{21,22}. 실험결과에 나타나 있듯이 紫菀治哮喘은 최종 추출물 20 μ l/PBS 200 μ l의 투여 농도에서, 세포독성의 한 지표인 LDH 분비를 대조군의 2배가량 증가시켰다(Fig. 2). 이러한 결과는, 紫菀治哮喘이 배양된 호흡기 상피세포에 대해 세포막 손상을 일으킬 가능성을 시사하는 결과로 해석할 수도 있지만, 같은 농도에서 뮤신 분비의 증가정도는 840% 이상(over the control)에 해당하는 것으로 보아, 뮤신분비의 증가가 전적으로 방제에 의한 비특이적 세포막 손상 결과로 인한 누출이라 판단하는 것은 적절치 않을 것으로 판단된다. 따라서, 세포독성 측정을 위해 사용되는 다양한 방법론을 적용, 추가적인 독성 연구가 필요할 것으로 사료된다.

瓜蒌枳實湯도 용량의존적으로 뮤신분비를 증가시켰으며, 최고농도에서 세포독성을 유발하였다(Fig. 3, Fig. 4). 瓜蒌枳實湯은 治痰結喘吐不出 胸膈作痛 不能轉側 或痰結胸膈滿悶作寒熱氣急 并痰迷心竅不能言語者 등의 한의학적 臨床智見에 근거하여, 麻黃 配劑 湯液에 잘 반응하지 않는 喘息 환자가 咯痰을 배출하기 힘들어하는 병리적 상황에 응용되는 방제이다. 방제의 구성면에서 볼 때, 두 방제 공히, 桔梗, 枳殼 등 排膿消腫 효능이 있는 약물을 함유하고 있어서, 뮤신 분비 증가현상이 발현된 것으로 추측할 수 있으며, 서양의학적인 시각에서 보면 두 방제 역시 효과적인 祛痰劑(expectorant)로 응용될 가능성이 있는 것으로 판단된다. 瓜蒌枳實湯의 경우, 紫菀治哮喘의 경우와 마찬가지로 뮤신 분비 증가작용이 유효하게 발현되면서도, 세포독성을 유발하지 않는 농도 범위에서 효능에 대한 추가적 연구를 진행함으로써, 그 호흡기 관련 효능을 극대화하면서도 의약품으로서의 안전성을 입증하는 과정이 가능해질 것이라 사료된다.

다음으로, 뮤신분비를 증가시키는 것으로 나타난 紫菀治哮喘, 瓜蒌枳實湯은 거대 당단백질인 뮤신의 분비에만 특이적으로 영향을 미치는지, 혹은 뮤신보다 분자량이 작고 구조도 다른 여타의 방사능 표지 당단백질들의 분비에도 영향을 미치는지 여부를 검증, 각 방제의 뮤신 분비 증가작용에서의 특이성을 규명하고자 하였다. Gel filtration chromatography에서는 resin에 loading되는 혼합물 중의 구성 성분들을 그 분자의 크기별로 분리한다. 따라서, 특정 혼합물을 loading한 후 void volume으로부터 total volume 까지, 즉 그 혼합물 중 가장 큰 크기의 물질부터, 가장 작은 크기의 물질까지 용출시켜, 그 각각의 분획들을 수거하여 물질을 정량할 수 있다²³. 일차배양된 HTSE세포에 3H-glucosamine을 이용, 배양세포가 생산하는 뮤신 및 glucosamine을 함유하는 여타의 당단백질에, 방사능 표지한 후, 일정 기간 동안 세포를 배양하면, 3H-표지 당단백질들이 배양액 중으로 유리된다¹². 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 나타날 것이다. 만약, 대조 배양액의 전체 용출양상을 기준으로, 각 방제를 처리했을 때 전체 용출양상(total elution profile)의 특정부분에 변화가 생겼다면, 그 변화는 특정 크기의 3H-당단백질 분비량의 변화를 의미하는 것이다. 실험결과(Fig. 5, 6)에서 볼 수 있듯이, 두 방제는 공히 뮤신과 같은 거대분자가 용출되는 fraction인 void volume fraction에서만 유의성있는 영향을 나타내고, 여타의 included volume 및 total volume에 해당하는 fraction에서는 대조군과 유의성있는 차이를 나타내지 않았음을 알 수 있다. 이러한 실험 결과는, 두 방제가 주로 뮤신과 같은 거대 당단백질의 분비를 증가시키며, 그보다 크기가 작고 구조도 다른 당단백질들의 분비에는 유의성있는 영향을 미칠 가능성이 낮다는 점, 즉 紫菀治哮喘, 瓜蒌枳實湯 등의 방제가 뮤신 분비 증가작용에서 특이성을 나타냄을 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 MUC5AC mRNA의 발현 정도에 각 방제가 미치는 영향을 검증하고자 하였다. 즉, 각 방제를 24시간 동안 투여했을 때 세포내의 MUC 5AC mRNA의 수준에 어떤 영향이 있는지를 검색하였다. 실험 결과에서 볼 수 있는 대로 두 방제를 24시간 동안 배양세포에 처리한 결과, 뮤신의 유전자인 MUC 5AC mRNA의 발현 수준을 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 실험 결과는 두 방제가 뮤신의 분비 현상만 자극하는 것이 아니라 장기적으로는 뮤신의 생성, 즉 분자 수준에서의 뮤신 합성 증가를 통해서도 작용할 가능성을 시사하는 결과로 볼 수 있다.

또한 본 연구에서는, 각 방제를 구성하고 있는 단미약물들 중의 특정한 단일성분들이 뮤신 분비에 어떠한 영향을 미치는지를 검증함으로써 호흡기 뮤신 분비에 특이적으로 영향을 줄 가능성이 있는 신약 후보물질을 검색하고자 하였다. Kaempferol은 flavonoid의 일종으로서, 杏仁, 款冬花, 白果, 桃仁 등을 위시한 다양한 본초에 함유되어 있는 물질로, 항염증 작용 등을 경유하여 뮤신 분비에 영향을 줄 가능성이 있는 물질이다²⁴. Coumarin은 當歸, 茵陳蒿, 菁蒿 등을 포함한 다양한 본초에서 광범위하게 발견되는 물질로, 다양한 생물학적 활성 검증을 거쳤으나, 역시 뮤신 분비에의 영향은 한번도 검증된 적이 없었던 물질이다²⁵. 그러나, 실험 결과에 나타났듯이, kaempferol과 coumarin의 경우, 뮤신 분비에 유의성있는 영향을 발현하지 않았으며, 뚜렷한 세포독성 역시 나타내지 않았음을 알 수 있다. 또 다른 단일성분인 betaine은 陳皮, 靑皮, 大棗, 枸杞子 등을 포함하는 다양한 본초에 함유된 성분으로 다양한 생물학적 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다²⁶. Ursolic acid는 山茱萸, 杜仲, 蓮翹, 夏枯草 등을 포함하는 다양한 본초에 함유되어 있는 성분으로 그 화학적 구조가 steroid와 유사하기에 항염증 작용 등이 기대되는 물질이다²⁷. 실험 결과에 나타나 있듯이, betaine 및 ursolic acid는 뮤신분비를 유의성있게 증가시키면서도 세포독성

은 나타내지 않음을 알게 되었다. Ursolic acid의 경우에는, 화학 구조에 근거한 추정 'steroid 유사구조에 근거한 항염증 작용 및 이를 기반으로 한 뮤신 분비 억제 가능성' 과는 상반된 효능을 보여주는 것으로 나타났다. 이러한 단일물질들의 호흡기에 관련된 다각적인 효능에 관해서는 후속연구가 요구되며, 뮤신 분비에 영향을 줄 가능성이 있는 것으로 판명된 물질들을 대상으로 자세한 분자생물학적 기전 규명이 필요할 것으로 사료된다.

종합하여 보면, 상기의 연구결과들은 紫苑治哮喘, 瓜蒌枳實湯의 특이적인 뮤신 분비 증가 현상, 뮤신 유전자 수준에서의 작용 가능성 및 betaine과 ursolic acid 등에 의한 뮤신 분비 증가 현상을 이용하여, 새로운 호흡기 점액분비 조절약물의 개발 가능성을 제시하고 있으며, 경험적으로 객담의 분비를 조절할 목적으로 사용되어 왔던 각 방제들이, 세포 수준에서 객담의 주요 구성 성분인 뮤신의 분비 및 유전자 수준에서의 뮤신 생성 조절에도 영향을 줄 가능성을 제시함으로써 한의학의 객담관에도 일부나마 기여한 것으로 思料된다.

결 론

CHS, GJT가 일차배양상피세포로부터 뮤신분비에 미치는 영향, 젯산 탈수소효소(LDH) 활성에 미치는 영향, sepharose CL-4B column을 통한 전체 용출 양상 분석, MUC 5AC mRNA 발현에 미치는 영향, 단미약물 중의 특정 단일성분인 Kaempferol, coumarin, betaine 및 ursolic acid의 뮤신 및 LDH 분비에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

CHS, GJT는 일차배양 HTSE 세포로부터 용량 의존적으로 뮤신분비를 증가시켰고 세포독성의 한 지표인 LDH 분비를 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다. CHS, GJT를 처리한 treated sample의 sepharose CL-4B column을 통한 전체 용출 양상 분석에서는 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에 유의성 있는 영향을 나타내지 않았다. CHS, GJT는 MUC 5AC mRNA 발현이 대조군에 비해 증가되었다. 각 방제를 구성하는 단미약물 중 특정성분인 Kaempferol 및 coumarin은 일차배양 HTSE 세포로부터의 뮤신분비에 유의성 있는 영향을 발현하지 못하였고, betaine 및 ursolic acid는 동일한 투여 농도 범위에서 용량 의존적으로 뮤신분비를 유의성 있게 증가시켰다. 각 방제를 구성하는 단미약물 중의 특정 단일성분인 Kaempferol, coumarin, betaine 및 ursolic acid는 전 투여 농도 범위에서 세포독성의 한 지표인 LDH 분비에 유의성있는 영향을 나타내지 않았다.

이상의 연구결과들은 각 방제 구성 약물들의 개별적 약리작용에 대한 후속연구의 필요성을 제시하고 있으며, 제한적이기는 하나, 세 방제 및 betaine과 ursolic acid 등의 뮤신 분비 증가 현상을 이용하여 새로운 호흡기 점액분비 조절약물의 개발 가능성을 제시하고 있다.

참고문헌

1. 한림대학교의료원 호흡기. 임상호흡기 매뉴얼. 춘천. 한림대

학교 출판부. p 1, 2003.

2. Frigas, E., Loegering, D.A., Solley, G.O., Farrow, G.M., Gleich, G.J. Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin. Proc.* 56, 345-353, 1981.

3. Gleich, G.J. The eosinophil and bronchial asthma: Current understanding. *J. Allergy Clin. Immunol.* 85, 422-436, 1990.

4. Mutschler, E., Derendorf, H. *Drug actions.* CRC press, Inc., Boca Raton, Florida, pp 410-411, 1995.

5. 金聖勳, 金東熙, 全基石, 宋昊哲 編著. 東醫病理學. 대전, 周珉出版社, p 311, 411, 1999.

6. 강정수. 한의학개론. 대전, 대전대학교 한의과대학, p 85, 174, 1995.

7. 上海中醫學院. 中醫內科學. 香港, 商務印書館, pp 24-25, 1982.

8. Kim, K.C. Possible requirement of collagen gel substratum for production of mucinlike glycoproteins by primary rabbit tracheal epithelial cells in culture. *In Vitro.* 21, 617-621, 1985.

9. Kim, K.C., Brody, J.S. Gel contraction causes mucin release in primary hamster tracheal epithelial cells growing on a collagen gel. *J. Cell. Biol.* p 105, 158a, 1987.

10. Wu, R., Smith, D. Continuous multiplication of rabbit tracheal epithelial cells in a defined, hormone-supplemented medium. *In Vitro* 18, 800-812, 1982.

11. Wu, R., Nolan, E., Turner, C. Expression of tracheal differentiated function in serum-free hormone-supplemented medium. *J. Cell Physiol.* 125, 167-181, 1985.

12. Lee, C.J. Specificity in the inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *J. Appl. Pharmacol.* 9(3):218-223, 2001.

13. Ko, K.H., Lee, C.J., Shin, C.Y., Jo, M.-J., Kim, K.C. Inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Am. J. Physiol.* 277(21):L811-L815, 1999.

14. 이충재. 설치류 기관 뮤신유리 억제에서의 폴리양이온성 작용기전, 서울대학교 대학원 박사학위 논문, 서울, 1997.

15. Karlinsky, J., Stamatoyannopoulos, G., Enver, T. Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells. *Anal. Biochem.* 180(2):303-306, 1989.

16. 李珩九, 鄭昇紀. 東醫肺系內科學. 서울, 아트동방, p 82, 1996.

17. 黃度淵. 方藥合編. 南山堂, p 199, 2001.

18. 金永勳. 晴崗醫鑑. 서울, 成輔社, p 131, 2001.

19. 龔 信. 萬病回春. 서울, 醫聖堂, p 113, 1993.

20. Freshny. Measurement of viability and cytotoxicity. In, *Culture of animal cells* (3rd edn), Wiley-Liss, Inc., p 288, 1994.

21. Yu, X.-Y., Schofield, B.H., Croxton, T., Takahashi, N., Gabrielson, E.W., Spannhake, E.W. Physiologic modulation of bronchial epithelial cell barrier function by polycationic exposure. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11, 188-198, 1994.

22. Cheng, P.W., Sherman, J.M., Boat, T.E., Bruce, M. Quantitation

- of radiolabeled mucous glycoproteins 8. secreted by tracheal explants. *Anal. Biochem.* 117, 301-306, 1981.
23. 장일무 편저. (2003a) : 동양의약과학대전. 서울대학교 천연물 과학연구소 문헌정보학 연구실, 서울, pp 1975-1977, 2003.
24. 장일무 편저. (2003b). 동양의약과학대전. 서울대학교 천연물 과학연구소 문헌정보학 연구실, 서울, p 1180, 2003.
25. 장일무 편저. (2003c). 동양의약과학대전. 서울대학교 천연물 과학연구소 문헌정보학 연구실, 서울, p 3214, 2003.
26. 장일무 편저. (2003d). 동양의약과학대전. 서울대학교 천연물 과학연구소 문헌정보학 연구실, 서울, pp 5056-5058, 2003.
27. Kim, K.C., Rearick, J.I., Nettesheim, P., Jetten, A.M. Biochemical characterization of mucous glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial cells in primary culture. *J. Biol. Chem.* 260, 4021-4027, 1985.