

加味鎮咳湯과 小青龍湯加石膏가 PMA로 유발된 기도뮤신의 생성 및 MUC5AC gene 발현에 미치는 영향

변준섭, 박양춘, 양수영, 안정조, 박소애
대전대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of *Gamijinhae-tang* and *Socheongryong-tang-ga-seokgo* on PMA-induced Production of Airway Mucin and Expression of Airway MUC5AC Gene

Jun-seop Byun, Yang-chun Park, Su-young Yang, Joung-jo An, So-ae Park
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University.

ABSTRACT

Objectives : In this study, the author tried to examine whether *Gamijinhae-tang* and *Socheongryong-tang-ga-seokgo* significantly affect both PMA-induced mucin production and MUC5AC gene expression from airway epithelial cells.

Materials and Methods : Confluent NCI-H292 cells were pretreated for 30 min in the presence of JHT and STS and treated with PMA (10ng/ml), to assess the effects of the agents on PMA-induced mucin production by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Also, the effects of the agents on PMA-induced MUC5AC gene expression from the same cells were investigated. Possible cytotoxicities of the agent were assessed by examining the rate of survival and proliferation of NCI-H292 cells after treatment of agents during 48 hrs.

Results : (1) JHT and STS did not show significant cytotoxicity to NCI-H292 cells. (2) JHT significantly decreased PMA-induced mucin production from NCI-H292 cells. However, STS did not affect mucin production. (3) JHT significantly inhibit the expression levels of PMA-induced MUC5AC gene in NCI-H292 cells. STS slightly decreased the expression levels of PMA-induced MUC5AC gene.

Conclusion : These results suggest that JHT can not only affect the production of mucin but also affect the expression of the mucin gene, and this explains the traditional use of JHT in oriental medicine. The effects of JHT and STS with their components should be further investigated using animal experimental models that simulate pathophysiology of airway diseases through future studies.

Key words : airway mucin, MUC5AC gene *Gamijinhae-tang*, *Socheongryong-tang-ga-seokgo*

1. 서론

인체의 기도상피세포들은 외부로부터 들어오는

매연, 먼지, 세균, 항원들의 공격으로부터 인체를

보호하기 위해 진화되어 왔다. 이렇게 외부로부터 들어오는 자극들로부터 기도상피세포를 보호하기 위한 첫 번째 방어막이 바로 기도의 점액(mucus)이다¹. 담배를 피우지 않는 정상인에서도 하루에 생성되는 기도분비물은 100 ml 정도이고, 이는 원활한 점막운동으로 배출이 적절하게 이루어져 무의식적으로 삼키기 때문에 객담으로 인식하여 배출하는 경우가 드물다. 기도분비물의 95%는 수분이

· 교신저자: 박양춘 충북 청주시 용담동 173-9
대전대 부속 청주한방병원 내과
TEL: 043-229-3704 FAX: 043-253-8757
E-Mail: omdpyc@dju.kr

고 glycoproteins, 기타 여러 가지 물질들이 섞여있다.² 기도의 점액은 적절한 점탄성을 가진 겔 형태로 기도의 표면을 얇은 막 형태로 덮고 있는데 이러한 점액의 점탄성은 점액 중 존재하는 거대분자량의 당단백질인 뮤신(mucin)에 의하여 갖게 되는 특징이다.³ 이러한 점액의 분비는 외부로부터 들어온 이물질에 의한 기도의 손상을 막아주는 인체의 중요한 기전 중 하나이다.¹

그러나 기도 점액이 오히려 기도 생리의 이상뿐 아니라 인체의 방어 작용에 영향을 주어 병리 현상을 유발할 수 있다. 즉, 천식, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, 낭포성 섬유증 등의 호흡기 질환에서 관찰되는 객담 혹은 점액의 과다 분비는 이러한 질환군의 예후를 악화시키는 주된 요인으로 알려져 있다.^{4,6}

최근 한약처방이 호흡기 객담분비에 미치는 영향에 대한 연구들은 주로 햄스터의 기도상피세포(hamster tracheal surface epithelial: HTSE)를 사용한 실험이 많이 있었다. 이러한 실험에서 HTSE에서의 뮤신 분비와 MUC5AC mRNA의 발현을 감소시키는 처방⁷⁻¹³도 있었으며 증가시키는 처방⁹⁻²¹도 있었다. 加味鎮咳湯(JHT) 및 小青龍湯加石膏(STS)는 임상적으로 호흡기 질환의 치료를 위하여 사용되고 있다. 加味鎮咳湯은 張介賓의 《景岳全書·新方八陣》²²에 수록된 金水六君煎의 가미방으로²³ 咳嗽兼喘 胸悶氣短 咳清稀痰 動即心悸 食少腹脹 惡寒支冷 夜尿增多 午後足微浮腫 舌尖胖有齒痕 苔白滑 脈細數 한 증상을 보이는 內傷咳嗽, 哮喘, 久感冒를 치료하는데 사용되는 처방이며 補陰潤肺 鎮咳祛痰의 작용을 하고 咳嗽, 哮喘, 慢性氣管支炎, 肺氣腫 등에 사용한다²⁴. 小青龍湯加石膏는 《金匱要略·肺痿肺癰咳嗽上氣病脈證并治》²⁵에 처음 기재된 처방으로 “肺脹 咳而上氣 煩躁而喘 脈浮者 心下有水 小青龍湯加石膏主之”라하여 外邪와 內飲을 治함에 熱邪가 兼한 것을 치료하며, 肺炎, 氣管支炎, 喘息, 百日咳 등 광범위한 호흡기 질환에 사용된다²⁶⁻²⁷. 加味鎮咳湯에 대한 연구는 유

²⁸등의 연구에서 O₃로 손상을 유발한 폐에서 Thiobarbituric acid(TBA), 혈청전해질 등에 加味鎮咳湯이 미치는 영향을 연구한 바가 있으나 아직까지 호흡기 뮤신의 분비, 유전자 발현 등에 관한 연구는 이루어지지 않았다. 小青龍湯加石膏에 대한 연구로는 김²⁰등의 연구에서 小青龍湯加石膏가 HTSE에서 뮤신의 분비에 유의성 있는 영향을 주지 못한다고 보고 되어있다. 따라서 저자는 加味鎮咳湯 및 小青龍湯加石膏의 방제가 인간 기도 상피세포에서 포볼 에스터의 일종인 Phorbol Myristate Acetate(PMA)에 의해 촉발된 뮤신의 생성 및 뮤신 유전자 발현에 미치는 영향을 검증한 결과 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 세 포

인간 기도 상피세포주인 NCI-H292 세포는 American Type Culture Collection 사(Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2) 약 재

본 실험에 사용한 약재는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며 加味鎮咳湯(Gamijinhae-tang: JHT), 小青龍湯加石膏(Socheongryong-tang-ga-seokgo: STS)의 처방 내용과 1貼의 용량은 각각 다음과 같다.

3) 점액의 조제

加味鎮咳湯 및 小青龍湯加石膏는 대전대학교 부속 한방병원 약제실에서 제공받아, 각각 《대전대학교병원처방집》²³, 《金匱要略》²⁵에 기재된 처방대로 조제하였다. 각 방제 한 첩 분량에 800-1,000 ml의 탈이온 2차 증류수를 가하고 100℃로 가온된 상태에서 3시간 동안 전탕하여, 최종 80 ml의 탱액을 수거하였다. 각 탱액을 실온 정도로 방냉한 후, 멸균청정 후드 내에서 0.22 μm filter를 이용, 가압 여과하고 멸균용기에 저장하여, 4℃ 냉장고에 보관하였다.

Table 1. Prescription of *Gamijinhae-tang* 《JHT》

Herb Name	Scientific Name	Amount(g)
熟地黄	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	12.0
萊菔子	<i>Raphani Semen</i>	12.0
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	4.0
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	4.0
半夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	4.0
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	4.0
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4.0
白茯苓	<i>Poria cocos</i>	4.0
麥門冬	<i>Liriopis Tuber</i>	4.0
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	4.0
前胡	<i>Peucedani Radix</i>	4.0
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	4.0
桑白皮	<i>Mori Cotex Radicis</i>	4.0
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	4.0
白芥子	<i>Sinapis Semen</i>	3.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3.0
Total Amount		78.0

Table 2. Prescription of *Socheongryong-tang-ga-seokgo* 《STS》

Herb Name	Scientific Name	Amount(g)
麻黃	<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
石膏	<i>Gypsum Fibrosum</i>	4.0
Total Amount		44.0

4) 시약

PMA(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), trypsin-EDTA, ethidium bromide, HEPES, dimethyl sulfoxide(DMSO), diethylpyrocarbonate (DEPC), tween 20, bovine serum albumin(BSA), sodium dodecyl sulfate, 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine peroxide solution(TMB), Sulforhodamine B(SRB),

trizma base, trichloroacetic acid(TCA), NP-40, EDTA, EGTA 등은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서, penicillin-G, streptomycin, fetal bovine serum(FBS), RPMI 1640은 GIBCO-BRL사(Grand Island, NY, USA)에서, mouse anti-MUC5AC clone 45M1 및 HRP-Goat anti-Mouse IgG conjugate는 NeoMarkers사(Fremont, CA, USA)에

서, easy-Blue RNA extraction kit는 INTRON biotechnology사(Kyung-gi, Korea)에서, Accuprep RT premix kit와 accuprep PCR premix kit는 Bioneer사(Daejeon, Korea)에서, protease inhibitor cocktail은 Roche사(Indianapolis, IN, USA)에서, sodium acetate 등과 기타 일반시약들은 reagent grade 이상의 것들을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 탈이온 2차 증류수 이었다²⁹⁻³⁰.

2. 방법

1) NCI-H292 세포 배양

세포는 습도가 충분히 유지되고 95% 공기, 5% CO₂를 함유하는 37°C 조건에서 HEPES(25 mM), penicillin G(100 U/ml), streptomycin(100 µg/ml), FBS(10%, V/V) 등이 첨가된 RPMI 1640 배양액에서 배양되었으며 1주에 2회의 빈도로 subculture 하였다. 뮤신 생성 및 유전자 발현에 대한 두 방제의 작용을 검증하기 위하여, 24 wells culture plate를 기준으로, well 당 2.5×10^5 cells/well의 밀도로 세포를 도포하고 배양하였다. 세포가 다 자라면 FBS의 농도를 0.5%로 감소시킨 배양액을 주고 24시간 동안 배양하고, 이후 serum을 첨가하지 않은 배양액(serum-free medium)으로 세포를 세척하였다. 이렇게 준비된 세포에 두 방제 추출물 각각 4-20 µl씩(단 저농도에서 유의성 있는 결과가 나온 경우 고농도의 실험은 생략하였다)을 함유하는 배양액 200 µl를 well(24 well plate 기준)마다 가하고, 30분이 지난 시점에 PMA 10 ng/ml을 각 well마다 투여한 후 37°C에서 24시간동안 배양하였다.

2) 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향《Sulforhodamine B(SRB) test》

96 wells plate의 각 well에 10⁴개의 NCI-H292 cell을 함유하는 배양액 180 µl를 가하여 37°C, 5% CO₂ 존재 하에서 24시간 배양하였다³¹⁻³². 24시간 배양 후 각 방제 추출물을 0.2 µl/PBS 200 µl의 농도로 배양세포의 well마다 가하고 48시간 동안 추가로 배양하였다. 배양이 완료된 후, 냉각된 50%

trichloroacetic acid(TCA) 50 µl를 각 well에 서서히 가해 주었다. 10분 후에 4°C 조건의 냉장고에 옮겨 1시간 동안 충분히 세포들을 고정(fixation)시키고, 고정이 완료된 후 각 well에 존재하는 액체 성분들을 전량 흡인배출한 후에 well 당 250 µl의 증류수를 이용, 5회 이상 세척하였다. 이렇게 준비된 세포에, acetic acid에 용해된 0.4% SRB 용액 100 µl/well을 가하고 실온에서 45분 동안 염색하였고, 재차 suction 후 100 µl의 1% acetic acid를 이용, 5회 이상 세척한 후 세포들을 건조시켰다. 각 well 당 150 µl의 10 mM unbuffered Tris용액으로 SRB를 잘 녹여낸 후, 흡광분석 측정장치(microplate reader)로 540 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다³².

3) 뮤신 생성량 측정

24시간의 배양이 종료된 시점에 세포 용해용 완충액(20mM Tris, 0.5% NP-40, 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, protease inhibitor cocktail)을 가하여 세포 내에 존재하는 MUC5AC 뮤신을 추출한 후 이후의 실험에 사용하였다. 즉, 수거된 세포 용해 추출액(cell lysate)을 PBS로 1/10배 희석하고 희석된 각 sample을 ELISA 전용의 96 wells plate에 각각 100 µl씩 분포시킨 후, 4°C에서 완전히 건조될 때까지 incubation하였다. 그 후 PBS-Tween 20(0.05%, PBS-T) 용액 200 µl/well을 이용, 각 well 당 3회씩 세척하였다. 세척 후 PBS-T에 용해된 2% BSA 용액 200 µl를 각 well당 가하고, 다시 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후, PBS-T 200 µl로 3회 세척하고, MUC5AC에 대한 monoclonal antibody인 mouse anti-MUC5AC clone 45M1을, 2% BSA에 1: 200의 비율로 희석한 후에, 각 well당 100 µl씩 첨가하고, 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후 PBS-T로 3회 세척하고, 2차 항체인 Horse radish peroxidase (HRP)-goat Anti-Mouse IgG Conjugate를 2% BSA에 1:3,000의 비율로 희석한 후, 각 well당 100 µl씩 첨가하고 1시간 동안 incubation하였다.

PBS-T로 다시 3회 세척 후, 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine peroxide(TMB)용액 100 μ l를 각 well에 첨가하고, 5분 후 1N H₂SO₄ 50 μ l를 첨가, 반응을 정지시켰다. 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정함으로써 대조군과 약물 처리군 간의 MUC5AC를 정량, 비교하였다³³⁻³⁴.

4) Total RNA의 분리

24 시간의 배양이 종료된 세포를 냉각된 PBS로 2회 세척하였다. 세포에 trypsin-EDTA 용액을 처리하여 배양 용기 바닥으로부터 분리하고, 세포들의 혼합물을 1.5 ml용량의 microtube에 옮겨 원심 분리함으로써 세포들만 수거하였다. 이어서, total RNA를 분리하고자 INTRON biotechnology사의 Easy-Blue RNA extraction kit(total RNA isolation reagent)를 이용해(0.5 ml/4×10⁵ cells) 세포를 lysis시키고, 상온에서 5분간 방치하였다. 5분 후 즉시, microtube에 chloroform를 첨가, 15초간 vortexing하고 상온에 2-3분간 방치한 후 4°C, 13,000 rpm(Hanil centrifuge, MICRO 17 R)에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액 400 μ l를 새 microtube에 옮겼다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 4°C, 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 RNA 침전물을 얻었다.

이 침전물에 diethylpyrocarbonate(DEPC)가 함유된 75% ethanol을 가하고 4°C, 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리함으로써 세척하였다. 수거된 RNA 침전물을 5분간 대기 중에서 건조시킨 후, 20 μ l의 RNase-free water로 부유시키고, spectrophotometer(Beckman, DU-650)를 사용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도를 알아내어 실험에 사용하였다(1.0A₂₆₀=single strand RNA 40 μ g/ml)³⁵.

5) Polymerase Chain Reaction(PCR)을 위한 primer 제조

PCR에 사용된 primer는 전문 제조회사인 제노텍(주)(Daejeon, Korea)에 주문, 합성하였다. NCI-H292

세포에서의 human MUC5AC 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5'-TGA TCA TCC AGC AGC AGG GCT-3', antisense primer의 염기서열은 5'-CCG AGC TCA GAG GAC ATA TGG G-3'이며, 이 primer에 의해 합성된 PCR 산물의 크기는 약 500 bp였다. β -actin 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5'-TAC AAC GAG CTG CGT GTG GCC-3' 이고, antisense primer는 5'-CAA CGG AAC CGC CTC GTT GC-3'이며 이 primer가 표적으로 하는 DNA 크기는 500 bp였다.

6) RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

수거된 total RNA를 이용, 역전사 반응(RT)으로 cDNA를 만들고, 이를 중합효소 연쇄반응(PCR)으로 증폭시켰다. 즉, 얻어진 total RNA 1 μ g을 75°C에서 5분간 가열함으로써 denaturation시키고, 이를 얼음에 담가 급냉시킨 후 RT premix kit의 사용자 설명서에 따라 역전사 반응을 진행시켰다. MUC5AC 유전자에 대한 PCR은, 각각의 역전사 반응에서 얻은 cDNA 산물 2 μ l를 PCR premix kit의 사용자 설명서에 따라 진행시켰다. 증폭반응을 위하여, PCR을 40회 실시(PCR thermal cycler: Takara MP-300, Japan)하였으며, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 60°C에서 30초, extension은 72°C에서 30초간 각각 시행하였다.

7) 전기영동에 의한 중합효소 연쇄반응 산물의 확인

RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응으로 증폭된 cDNA 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC5AC 유전자 발현변동여부를 관찰하였다. 즉, 증폭된 PCR 산물 10 μ l를 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, 1 mM EDTA)용액 및 1 μ g/ml의 ethidium bromide가 포함된 1.0% agarose gel에서 전기 영동하였다.

Gel 상에서 이동된 각각의 DNA band는 자외선 투사기(ultraviolet transilluminator)를 이용하여 관찰하고, 사진 촬영하였다.

8) 통계처리

모든 측정 결과는 Mean±SEM으로 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. 성 적

1. 加味鎮咳湯과 小青龍湯加石膏가 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향

1) 加味鎮咳湯의 영향

加味鎮咳湯을 NCI-H292 세포에 0.2 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도로 48시간 동안 투여했을 때, 세포의 생존 및 증식에 유의성 있는 영향을 나타내지 않았다(Fig. 1).

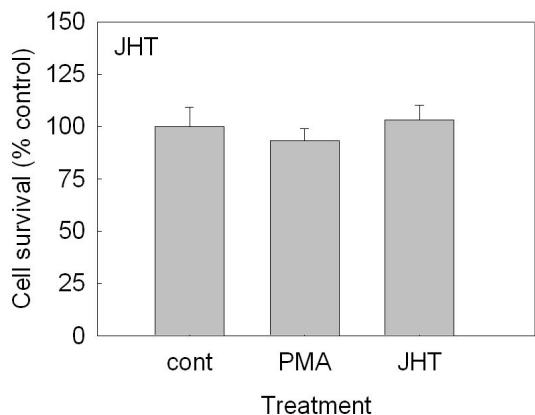


Fig. 1. Effect of JHT on survival and proliferation of NCI-H292 cells.

NCI-H292 cells were treated with 0.2 μ l JHT extract/200 μ l PBS for 48 hrs. The number of cells survived was counted as described in Materials and Methods.

2) 小青龍湯加石膏의 영향

小青龍湯加石膏를 NCI-H292 세포에 0.2 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도로 48시간 동안 투여했을 때, 세포의 생존 및 증식에 유의성 있는 영향을 나타내지 않았다(Fig. 2).

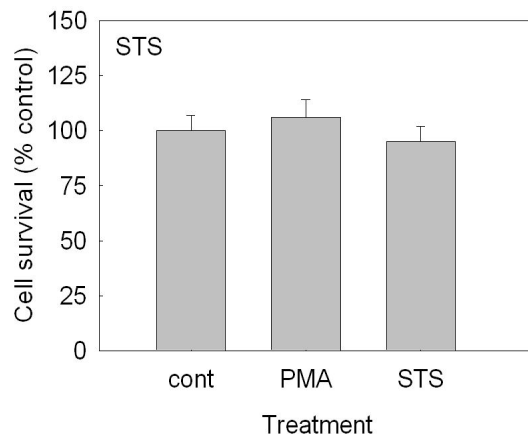


Fig. 2. Effect of STS on survival and proliferation of NCI-H292 cells.

NCI-H292 cells were treated with 0.2 μ l STS extract/200 μ l PBS for 48 hrs. The number of cells survived was counted as described in Materials and Methods.

2. 加味鎮咳湯과 小青龍湯加石膏가 MUC5AC mucin 생성 증가현상에 미치는 영향

1) 加味鎮咳湯의 영향

加味鎮咳湯은 최종 추출물 4-10 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도에서 PMA로 유발된 MUC5AC mucin 생성 증가현상을 감소시켰다(Fig. 3).

2) 小青龍湯加石膏의 영향

小青龍湯加石膏는 최종 추출물 4-20 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도 범위에서 PMA로 유발된 MUC5AC mucin 생성 증가현상을 감소시키지 못하였다(Fig. 4).

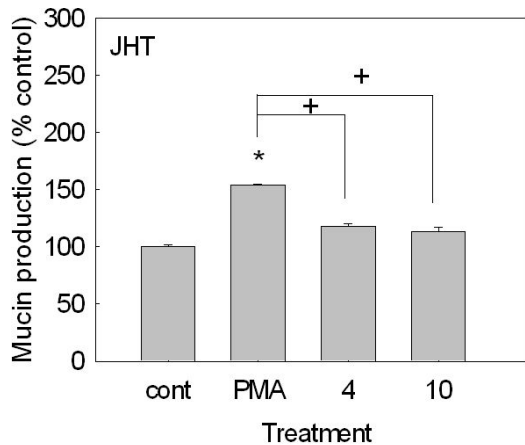


Fig. 3. Effect of JHT on PMA-induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells.

NCI-H292 cells were pretreated with JHT extract 4-10 μ l/200 μ l PBS for 30 min and then stimulated with PMA(10 ng/ml) for following 24hrs. Cell lysates were collected for quantitation of MUC5AC mucin production by ELISA as described in Materials and Methods. Each bar represents a mean \pm SEM of 4 culture wells.

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

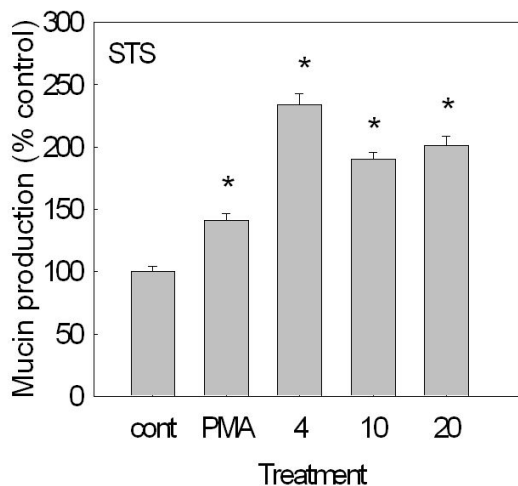


Fig. 4. Effect of STS on PMA-induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells.

NCI-H292 cells were pretreated with STS extract 4-20 μ l/200 μ l PBS for 30 min and then stimulated with PMA(10 ng/ml) for following 24hrs. Cell lysates were collected for quantitation of MUC5AC mucin production by ELISA as described in Materials and Methods. Each bar represents a mean \pm SEM. of 4 culture wells.

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

3. 加味鎮咳湯과 小青龍湯加石膏가 MUC5AC gene 발현 증가현상에 미치는 영향

1) 加味鎮咳湯의 영향

加味鎮咳湯은 최종 추출물 20 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도에서 PMA로 유발된 MUC5AC gene 발현 증가현상을 감소시켰다(Fig. 5).

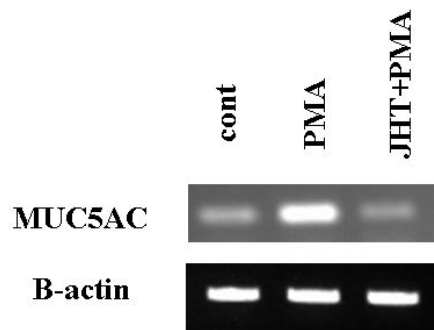


Fig. 5. Effect of JHT on PMA-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells.

NCI-H292 cells were pretreated with JHT extract 20 μ l/200 μ l PBS for 30 min and then stimulated with PMA(10 ng/ml) for following 24hrs. Total RNA was isolated and MUC5AC mRNA levels were analyzed by RT-PCR. The PCR products were separated on 1.0% agarose gel and stained with ethidium bromide as described in Materials and Methods.

2) 小青龍湯加石膏의 영향

小青龍湯加石膏는 최종 추출물 20 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도에서 PMA로 유발된 MUC5AC gene 발현 증가현상을 감소시켰다(Fig. 6).

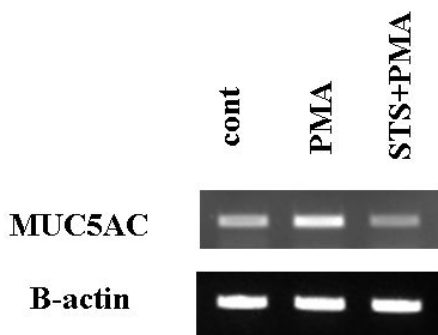


Fig. 6. Effect of STS on PMA-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells.

NCI-H292 cells were pretreated with STS extract 20 μ l/200 μ l PBS for 30 min and then stimulated with PMA(10 ng/ml) for following 24hrs. Total RNA was isolated and MUC5AC mRNA levels were analyzed by RT-PCR. The PCR products were separated on 1.0% agarose gel and stained with ethidium bromide as described in Materials and Methods.

IV. 고 찰

객담은 기도의 분비물로서 기도의 점막하점액선 및 goblet세포에서 생성되는 점액성 당단백으로 점액-섬모 escalator작용에 의해 구인두부로 운반된다³⁶. 점액의 과분비현상은 만성기관지염, 기관지천식 등의 호흡기 질환에서 주요한 소견중 하나이다³⁷. 기도분비물은 기도점막 세포 중 배상세포와 점막하층의 점막하 점액선에서 분비하는 것으로 알려져 있고 이들은 주로 기관과 기관지에 분포되어있다. 이들 중 점막하 점액선의 점액세포와 배상세포가 주세포가 되며 일부 ciliated epithelial cell에서도 분비가 되기도 한다. 기도분비물의 약 95%는 수분으로 구성되어있고 나머지 5%중 뮤신이 약 2-3%를 차지하고 있으며 뮤신은 고분자량의 단백질(20,000-30,000 kDa)로서 길이는 200-4,000 nm로 다양하며³⁸ 점액성분의 접착력, 탄력성과 점도를 결정한다³⁹.

호흡기 뮤신의 분비를 감소시키는 물질로는 서

양의학 체계에서 다양한 염증성 질환의 치료제로 사용되고 응용되고 있는 glucocorticoid가 대표적이며⁴ 최근 poly-L-lysine(PLL)등의 양이온성 폴리펩티드가 호흡기 뮤신 분비를 억제하는 물질로서 보고되었다²⁹.

한의학에서는 비 생리적인 체액을 痰飲⁴⁰이라 부르며 漢의 張中景은 《金匱要略·痰飲咳嗽病脈證并治第十一》²⁵에서 “夫飲有四 有痰飲 有懸飲 有溢飲 有支飲”이라 하여 담음의 종류를 나누어 놓았으며, “咳逆奇息 短氣不得臥 其形如腫”이라 하여 痰飲에 의한 호흡기 증상을 설명해 놓았다. 또한 朱丹溪는 《丹溪心法》⁴¹에서 “專主於痰”이라고 하여 호흡기 질환에서의 痰의 연관성에 대하여 언급하였고, 許浚의 《東醫寶鑑》⁴²에서는 痰飲의 원인, 증상, 치법이 다양하게 소개되어 있으며 다양한 담음의 종류를 風痰, 寒痰, 濕痰, 熱痰, 鬱痰, 氣痰, 食痰, 酒痰, 驚痰 등으로 분류하여 놓기도 하였다.

본 연구의 최종 목표는 임상에서 호흡기 질환 치료에 사용되고 있는 加味鎮咳湯과 小青龍湯加石膏의 방제가 기도 상피세포인 NCI-H292 세포에서 PMA에 의해 촉발된 뮤신의 생성 및 MUC5AC gene의 발현에 미치는 영향을 검증하고자 하는 것이었다.

인간 기관지 상피세포의 점액표피양암종인 NCI-H292 세포주는 뮤신 유전자 발현과 뮤신 단백질 분비 모델로 확립되었으며, 인간기도상피세포에서 분비 촉진제의 효과를 검증하는데 광범위하게 사용되고 있다⁴³.

뮤신분비와 관련된 점액소 유전자는 현재까지 MUC1-4, MUC5AC, MUC5B, MUC7-12 등이 있는 것으로 보고되었고^{44,45}, 기도의 점액 과다분비 질환에서는 MUC5AC가 주요한 것으로 알려져 있다⁴⁶⁻⁴⁷.

PMA는 calcium-dependent protein kinase(PKC)를 활성화시키는 물질로 강력한 nitric oxide(NO) promoter 활성, mouse 피부에서의 강력한 발암 촉진 활성, 배양된 간세포에서 iNOS의 발현 촉진 활

성 등^{48,49}이 보고되어 있는 물질로, 기도뮤신과 관련하여서는 일차배양 설치류 기도 상피세포에서 뮤신의 분비를 증가시키며 인간 기도 상피세포에서 뮤신 유전자의 발현 및 뮤신의 생성을 증가³³시키는 것으로 알려져 있는 물질이다.

加味鎮咳湯은 張介賓의 《景岳全書·新方八陣》²²에 수록된 金水六君煎 가미방으로서²³ 熟地黃, 當歸, 萊菔子, 黃芪, 白朮, 半夏, 陳皮, 白茯苓, 白芥子, 黃芩, 麥門冬, 桔梗, 前胡, 桑白皮, 五味子, 甘草로 구성된 처방이다. 각각의 본초의 효능을 살펴보면 熟地黃, 當歸는 滋陰補血하며, 萊菔子は 下氣定喘 작용을 하고, 黃芪, 白朮은 補氣, 補脾, 燥濕하며 半夏, 陳皮, 白茯苓, 白芥子は 理氣, 燥濕, 利水, 祛痰한다. 黃芩, 麥門冬, 桔梗, 前胡, 桑白皮는 降氣, 宣肺, 潤肺, 平喘작용을, 五味子は 斂肺生津을, 甘草는 모든 약물을 和解시키는 작용을 한다⁵⁰. 補陰潤肺 鎮咳祛痰의 작용을 통하여 內傷咳嗽, 哮喘, 久感冒를 치료하는데 사용되는 처방으로 인체의 津液代謝의 標인 脾, 肺의 機能失調에 의해 발생된 痰飲을 二陳湯류의 약물로 다스리고 津液代謝의 本인 腎의 機能失調 또한 補陰補血지제로써 치료한다는 개념의 처방이다⁴². 이처방의 의의는 張中景의 《金匱要略·痰飲咳嗽病脈證并治第十一》²⁵에 “夫短氣有微飲 當從小便去之 苓桂朮甘湯主之 腎氣丸主之”라 하여 痰飲의 일종인 微飲의 치료에 利水祛痰燥濕 위주의 苓桂朮甘湯을 사용하며 동시에 補陰補血 위주의 腎氣丸을 사용하라는 방법에 나와 있다. 또한 張介賓은 《景岳全書·新方八陣》²²에서 “治因肺腎虛寒 水泛爲痰 或年滿陰虛 血氣不足 外受風寒 痰盛喘急等症”이라 하여 肺腎陰虛로 인해 水泛盛痰하여 발하는 咳嗽嘔惡, 喘逆多痰 등의 증상을 치료하는 처방으로 金水六君煎을 제시한 바가 있다.

小青龍湯加石膏는 漢代 張仲景의 《金匱要略·肺痿肺癰咳嗽上氣病脈證并治第七》²⁵에 처음 기재된 처방으로 “肺脹 咳而上氣 煩躁而喘 脈浮者 心下有水 小青龍湯加石膏主之”라 언급되어 있다. 처방의

구성은 麻黃, 桂枝, 白芍藥, 五味子, 半夏, 細辛, 乾薑, 甘草, 石膏로 되어있다. 각각의 본초의 효능을 살펴보면, 麻黃, 桂枝는 發散風寒하며, 白芍藥, 五味子は 氣운을 收斂하며, 半夏, 細辛, 乾薑은 燥濕, 溫散, 溫裏작용을 하고 石膏는 清熱작용을 하게 되며 甘草는 모든 약재를 和解시킨다⁵⁰. 이 처방은 《傷寒論·辨太陽病脈證并治》⁵¹에 기술되어있는 小青龍湯에 石膏가 가미된 처방으로 小青龍湯의 病症인 咳而上氣, 喘 心下有水氣 증상에 煩燥가 함께 있는 증상을 治하는 방제이다. 小青龍湯은 外邪와 內飲이 相搏한 證에 사용하는데 咳嗽 喘息함에 있어 痰涎이 清希하고, 惡寒發熱하며 無汗 등이 있을 때 사용하는 처방으로, 小青龍湯證에 더하여 裏에 熱邪를 挾하여서 煩燥까지 나타날 경우 石膏를 가하여 外邪, 內飲과 挾한 熱邪를 치료하는 방제가 되는 것이다.^{26,27,52}

두 방제가 NCI-H292 세포에 대해 독성을 발현하는지 여부를 알아내기 위해, 세포의 증식과 생존에 미치는 특정약물의 작용을 평가하는 독성시험 방법인 《sulforhodamine B(SRB) test》를 시행한 결과, 두 방제는 모두 현저한 세포독성을 발현하지 않을 가능성을 보여 주었다(Fig. 1, 2).

본 연구에서는, 인간의 기도 상피세포인 NCI-H292 세포에 두 방제를 전처리하고 30분이 지난 후 PMA를 처리하고 연속되는 24시간 동안 세포로부터 생성되는 뮤신의 양을 측정된 결과, 加味鎮咳湯은 4-10 μ l/200 μ l 농도에서 PMA로 유발된 뮤신의 생성을 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 3). 그러나 小青龍湯加石膏의 경우에는 4-20 μ l/200 μ l 농도에서 PMA로 유발된 뮤신의 생성을 감소시키지 못하였다(Fig. 4).

위의 실험결과와 연계하여, 두 방제가 PMA로 촉발된 MUC5AC 유전자 발현에 미치는 영향을 탐색한 결과 두 방제가 모두 MUC5AC 유전자의 발현을 감소시켰으나 小青龍湯加石膏보다는 加味鎮咳湯의 경우가 더 강한 감소경향을 보여주었다(Fig.5, 6). 小青龍湯加石膏와 처방구성이 유사한

小青龍湯에 대한 이전의 실험들 중 나⁹등의 연구에서는 小青龍湯 추출액 20 μ l /PBS 200 μ l 투여농도에서 HTSE세포로부터의 뮤신분비를 대조군에 비하여 30%가량 감소시켰으며, 김⁸등의 연구에서는 용량 의존적으로 小青龍湯 추출액 40-80 μ l /PBS 200 μ l 투여농도에서 HTSE세포로부터의 뮤신분비를 대조군에 비하여 30%가량 감소시켰다. 그러나 김²⁰등의 연구에서는 小青龍湯加石膏 추출액 20-80 μ l /PBS 200 μ l 투여농도에서 HTSE세포로부터의 뮤신분비에 유의성 있는 영향을 주지 못한 것으로 보고되어 있다. 위의 연구결과로 미루어 볼 때 外邪와 內飲이 相搏한 證에 사용되는 小青龍湯에 大寒, 辛甘한 石膏⁵⁰가 가미되면서 처방의 기전이 변화를 일으킨 것으로 사료된다. 본 연구에서는 小青龍湯加石膏의 경우에는 PMA 처리와 같이 기도무신의 생성 혹은 유전자 발현을 촉발시킬 수 있는 조건에서 뮤신의 생성과 그 유전자의 발현에 뚜렷한 억제효과를 보여주지 못하였다. 선행 연구결과와 본 연구를 종합하여 볼 때 뮤신의 분비를 억제하는 작용을 갖고 있던 小青龍湯에 石膏가 가미되면서 小青龍湯加石膏는 뮤신의 생성단계보다는 이미 생성된 뮤신의 분비에 어떠한 영향을 미침으로써 호흡기 점액 과다분비에 임상적 효과를 발휘하며, 점액의 과다분비 조절 이외의 다른 방법으로 호흡기 질환에 임상적 효과를 나타낼 가능성을 시사하고 있다.

반면 加味鎮咳湯의 경우 인체의 水液代謝의 標인 脾, 肺의 기능을 조절하는 二陳湯, 桔梗, 前胡, 桑白皮 등 과 水液代謝의 本인 腎의 영역에까지 작용하는 熟地黃 등의 약재로 구성되어 있기 때문에 小青龍湯加石膏에 비하여 加味鎮咳湯은 인체의 痰飲, 喀痰의 조절을 통하여 호흡기 질환을 치료하는데 중점을 두고 있다고 할 수 있겠다. 실험결과에서, 加味鎮咳湯의 경우에는 동일한 조건에서 뮤신의 생성 및 유전자 발현을 모두 뚜렷하게 억제하였다. 이는 加味鎮咳湯이 인체의 호흡기 질환에서, 호흡기 점액 과다생성 및 분비 상태를 호전시

킬 가능성을 제시하고 있다.

종합하여 보면, 본 연구에서 얻어진 결과들은 방제 자체 및 방제 구성 본초를 대상으로 비염, 축농증, 천식, 급만성 기관지염 등 제반 호흡기 질환의 병태생리학적 특성을 적절히 반영할 수 있는 다양한 연구모형을 이용한 심층적 후속 연구의 필요성을 제시하고 있는 것이다.

V. 결 론

본 연구의 결과, 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 加味鎮咳湯과 小青龍湯加石膏는 모두 현저한 세포독성을 발현하지 않았다.
2. 加味鎮咳湯은 최고 농도에서 PMA로 유발된 뮤신의 생성을 유의성 있게 감소시켰으나, 小青龍湯加石膏의 경우에는 감소시키지 못하였다.
3. 加味鎮咳湯과 小青龍湯加石膏는 모두 PMA로 촉발된 MUC5AC 뮤신 유전자 발현을 감소시켰으나 小青龍湯加石膏보다는 加味鎮咳湯이 더 강한 감소경향을 보여주었다.

결론적으로 小青龍湯加石膏는 뮤신의 생성단계보다는 이미 생성된 뮤신의 분비에 어떠한 영향을 미침으로써 호흡기 점액 과다분비에 임상적 효과를 발휘하며, 점액의 과다분비 조절 이외의 다른 방법으로 호흡기 질환에 임상적 효과를 나타낼 가능성을 시사하고 있으며, 加味鎮咳湯은 인체의 호흡기 질환에서, 호흡기 점액 과다생성 및 분비 상태를 호전시킬 가능성을 제시하고 있다. 따라서 본 연구의 결과는 방제 자체 및 방제 구성 본초를 대상으로 다양한 호흡기 질환의 병태생리학적 특성을 적절히 반영할 수 있는 다양한 연구모형을 이용한 심층적 후속 연구의 필요성을 제시하고 있다.

참고문헌

1. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev.* 2006;86(1):245-78.
2. 김노경, 서울의대 내과학교실. 내과학. 서울: 고려의학; 1998. p. 401-3.
3. Sheehan JK, Thornton DJ, Somerville M, Carlstedt I. Mucin structure: the structure and heterogeneity of respiratory mucus glycoproteins. *AM Rev Respir Dis.* 1991;144:S4-S9.
4. 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.
5. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma Current understanding. *J Allergy Clin Immunol.* 1990;85:422-36.
6. Culpitt SV, Rogers DF, Traves SL, Barnes PJ, Donnelly LE. Sputum matrix metalloproteinases: comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Respir Med.* 2005;99(6):703-10.
7. 임도희, 이정은, 한영주, 황지호, 조철준, 배한호, 박양춘. 杏蘇湯 및 加味八味丸이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향. *대한한방내과학회지.* 2005;26(1):221-8.
8. 김준명, 이충재, 박양춘. 定喘化痰湯 등 數種 方劑의 호흡기 객담분비 조절 효능에 관한 실험적 연구. *대한한방내과학회지.* 2006;27(1):126-37.
9. 나도균, 이충재, 박양춘. 小青龍湯 및 加味治哮喘이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2004;18(3):734-9.
10. 金潤希, 韓在敬, 金允姬. 取淵湯 및 治哮喘加味方이 기도점액 분비 및 기관평활근 긴장도에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지.* 2005;19(1):11-23.
11. 김정숙, 김윤희. 加味腎氣湯 등 數種方劑가 일차 배양 호흡기 상피세포에서의 점액 분비에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지.* 2006;20(1):109-35.
12. 박완열, 서운교. Mucin 분비에 미치는 大靑龍湯 및 《石室秘錄》急治法方에 대한 연구. *대한한방내과학회지.* 2006;27(1):92-101.
13. 심성흠, 이주일, 정영재, 서운교. 射干麻黃湯 및 《石室秘錄》逆醫法方이 호흡기 점액의 분비에 미치는 영향. *대한한방내과학회지.* 2006;27(2):295-304.
14. 이정은, 박양춘. 淸金降火湯 및 瓜蒌枳實湯이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향. *대한한방내과학회지.* 2004;25(2):238-44.
15. 한달수, 김윤희, 강탁림. 加味腎氣湯 및 加味淸肺湯이 기도점액 분비 및 기관평활근 긴장도에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2006;20(1):156-62.
16. 윤종만, 박양춘, 이용구. 冷哮丸이 호흡기 뮤신 분비와 기관지평활근에 미치는 영향. *대한한의학회지.* 2007;28(2):54-65.
17. 윤재은, 한재경, 김윤희. 柴梗淸肺湯 및 通竅湯 加味方이 기도점액분비 및 기관평활근 긴장도에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지.* 2006;20(1):93-107.
18. 채호연, 한재경, 김윤희. 加減正氣湯, 加味通竅湯이 기도점액 분비에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지.* 2007;21(1):117-37.
19. 류인선, 김윤식, 설인찬. 加味治哮喘散 및 加味理中湯이 기도 객담 분비에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2004;18(6):1746-51.
20. 김호, 서운교. 小青龍湯加石膏 및 《石室秘錄》小治法方이 호흡기 점액의 분비에 미치는 영향. *대한한방내과학회지.* 2006;27(4):879-86.
21. 박정준, 김윤식, 설인찬. 紫菀治哮喘散과 瓜蒌枳實湯이 일차배양된 설치류 기도배상세포에서의 뮤신 분비에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2006;20(1):69-75.

22. 張介賓. 景岳全書. 台北: 台聯國風出版社; 1972. p. 986.
23. 대전대학교 부속한방병원 편. 병원처방집. 대전: 대전대학교 부속한방병원; 2001, p. 228.
24. 전국한외과대학 폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울: 한문화사; 2002, p. 335, 587.
25. 張仲景. 金匱要略. 서울: 대성문화사; 1993, p. 21-2, 33-4.
26. 이정래. 東醫要諦眞詮. 대전: 동양학술원; 1996, p. 1328-9.
27. 김상찬. 방제학. 서울: 영림사; 1999. p.78-90.
28. 유상청, 정승기, 이형구. 金水六君煎 및 加味鎮咳湯의 효과에 관한 실험적 연구. 경희한의대 논문집. 1990;13:147-58.
29. Lee CJ. Specificity in the inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *J Appl Pharmacol.* 2001;9(3):218-23.
30. Ko KH, Lee CJ, Shin CY, Jo M, Kim KC. Inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Am J Physiol.* 1999;277(21):L811-5.
31. Kim YD, Kwon EJ, Park DW, Song SY, Yoon SK, Baek SH. Interleukin-1beta induces MUC2 and MUC5AC synthesis through cyclooxygenase-2 in NCI-H292 cells. *Mol Pharmacol.* 2002;62(5): 1112-8.
32. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990 1 4;82(13):1107-12.
33. Shao MXG, Ueki IF, Nadel JA. Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme mediates MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(20):11618-23.
34. Song KS, Lee WJ, Chung KC, Koo JS, E Yang EJ, Choi JY, Yoon JH. Interleukin-1 β and Tumor Necrosis factor-alpha Induce MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003 ;278(26):23243-50.
35. Karlinsey J, Stamatoyannopoulos G, Enver T. Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells. *Anal Biochem.* 1989;180(2):303-6.
36. 김영균. 기침과 객담:대한결핵 및 호흡기학회. 호흡기학. 서울: 군자출판사; 2004, p. 77-84.
37. Jens D Lundgren, James H Shelhamer. Pathogenesis of airway mucus hypersecretion. *J Allergy Clin Immunol.* 1990;85:399-417.
38. Sheehan JK, Oates K, Carlstedt I. Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucus glycoproteins. *Biochem J.* 1986;239:147-53.
39. 김도진, 김기엽, 남궁은경, 어택수, 김용훈, 신찬영, 고광호, 박춘식. 만성 기도질환에서 흰쥐 뮤신에 대한 단 세포군 항체 (RTO3)를 이용한 뮤신 측정에 관한 연구. *대한암학회지.* 1999; 47(6):786-96.
40. 최승훈, 안규양. 동의병리학. 서울:고문사; 1993, p. 70.
41. 朱丹溪. 丹溪心法. 서울: 행림서원; 1954, p. 108.
42. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 여강출판사; 2001. p. 260-98.
43. Christopher A Hewson, Mark R Edbrooke, Sebastian L Johnston. PMA induced the MUC5AC respiratory Mucin in human Bronchial Epithelial Cells, via PKC, EGF/TGF- α 1, Ras/Raf, MEK, ERK and Sp1-dependent Mechanism. *J Mol Biol.* 2004;344:683-95.
44. Rose MC. Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet

- cell hyperplasia. American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology. 2001 :25:533-7.
45. Rose MC. Mucus: structure, function, and role in pulmonary diseases. Am J Physiol. 1992 263:L413-29.
 46. Li J-D, Dohrman AF, Gallup M, Miyata S, Gum JR, Kim YS, et al. Transcriptional activation of mucin by Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. PNAS. 1997;94:967-72.
 47. Dohrman AF, Miyata S, Gallup M, Li J-D, Chapelin C, Coste A, et al. Mucin gene(MUC 2 and MUC 5AC) upregulation by Gram-positive and Gram-negative bacteria. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Molecular Basis of Disease. 1998;1406:251-9.
 48. Schmidt R, Hecker E. Autoxidation of phorbol esters under normal storage conditions. Cancer Res. 1975;35(5):1375-7.
 49. Saitoh T, Dobkins KR. Protein kinase C in human brain and its inhibition by calmodulin. Brain Res. 1986;379(1):196-9.
 50. 전국한의과대학본초학교수. 본초학. 서울: 영림사: 2000, p.178, 302-3, 347-8, 373-4, 448-9, 453-4, 458-61, 484-5, 534-7, 540-1, 578-82, 588-9, 622-3, 121-5, 135-6, 160-1, 334-5.
 51. 張仲景. 傷寒論. 서울: 대성문화사: 1993, p. 67-9.
 52. 이정래. 醫易間談 대전: 동양학술원: 1999, p. 505-6.