

## 桑枝 목초액이 호흡기 객담 과다분비에 미치는 영향

김 호, 정혜미, 김솔리, 서운교  
동국대학교 한의과대학 내과학교실

### Effect of Wood Vinegar Produced from *Morus alba* on Hypersecretion of Airway Mucus

Ho Kim, Hye-mi Jung, Sol-li Kim, Un-kyo Seo

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Guk University

#### ABSTRACT

**Objectives :** In this study, the author tried to investigate whether wood vinegar produced from *Morus alba* (MA) significantly affects the increase in airway epithelial mucosubstances and hyperplasia of tracheal goblet cells of rats, and *in vitro* airway mucin secretion and PMA- or EGF- or TNF-alpha-induced MUC5AC mucin production / gene expression from human airway epithelial cells.

**Materials and Methods :** For the *in vivo* experiment, the author induced hypersecretion of airway mucus and goblet cell hyperplasia by exposure of rats to SO<sub>2</sub> over 3 weeks. Effect of orally-administered MA over 2 weeks on increase in airway epithelial mucosubstances from tracheal goblet cells of rats and hyperplasia of goblet cells were assessed using histopathological analysis after staining the epithelial tissue with alcian blue. For the *in vitro* experiment, confluent RTSE cells were chased for 30 min in the presence of MA to assess the effect of MA on mucin secretion by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Also, effects of MA on PMA- or EGF- or TNF-alpha-induced MUC5AC mucin production and gene expression from human airway epithelial cells (NCI-H292) were investigated. Confluent NCI-H292 cells were pretreated for 30 min in the presence of MA and treated with PMA (10 ng/ml), EGF (25 ng/ml) or TNF-alpha (0.2 nm) for 24 hrs, to assess both effects of MA on PMA- or EGF- or TNF-alpha-induced MUC5AC mucin production by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Possible cytotoxicities of MA *in vitro* were assessed by examining LDH release from RTSE cells and the rate of survival and proliferation of NCI-H292 cells. *In vivo* liver and kidney toxicities of MA were evaluated by measuring serum GOT/GPT activities and serum BUN/creatinine concentrations of rats after administering MA orally.

#### Results :

1. MA decreased the amount of intraepithelial mucosubstances of rats exposed to sulfur dioxide inhalationally.
2. MA decreased *in vitro* mucin secretion from cultured RTSE cells.
3. MA significantly inhibited PMA-, EGF-, and TNF-alpha-induced MUC5AC mucin productions and the expression levels of MUC5AC mRNA from NCI-H292 cells.
4. MA did not show either *in vitro* or *in vivo* hepatic or renal toxicities.

**Conclusion :** The results from this study suggests that MA can regulate the secretion, production and gene expression of airway mucin observed in diverse respiratory diseases accompanied by mucus hypersecretion and does not show *in vivo* toxicity to liver and kidney functions after oral administration. Effects of MA should be further studied using animal experimental models that simulate the diverse pathophysiology of respiratory diseases via future research.

**Key words :** respiratory system, mucus, mucin, secretion, wood vinegar produced from *Morus alba*(MA)

## 1. 서론

· 교신저자: 서운교 경기도 성남시 분당구 수내3동 87-2  
동국대학교 분당한방병원 2내과  
TEL: 031-710-3751 FAX: 031-710-3780  
E-mail : high418@hanmail.net

호흡기 내강에 존재하는 점액(mucus)은 표면  
상피세포층의 배상세포 및 점막하의 점액선으로부터

터 생성되며 섬모세포의 작용에 의해 인후두부의 방향으로 이송되는 과정을 통하여 인체에 유해한 입자 및 기체상 물질을 체외로의 제거에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>1</sup>. 객담의 인체 방어 기능은 주로 점액의 구성요소인 뮤신의 물리화학적 성상에 기인하는데, 이러한 뮤신의 양과 질의 이상은, 호흡기 생리작용의 이상 뿐 아니라 인체의 방어 작용에 영향을 주어 다양한 병리 현상의 원인으로 작용할 수 있다. 즉, 천식, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, 낭포성 섬유증 등의 호흡기 질환에서 관찰되는 객담(점액)의 과다분비는 이러한 질환들의 예후를 악화시키는 주요인으로 보고되어 있다<sup>2,3,4</sup>. 임상에서 객담(점액) 과다분비를 조절하기 위해 여러 약물이 사용되고 있으나, 그 약효나 부작용 면에서 문제가 있어서 효율적인 약물요법을 시행하기가 쉽지 않은 것으로 알려져 있다<sup>5,6</sup>. 현재, 기존의 서양의학적 약물 외에 많은 신약후보 물질이 연구되어 학계에 보고<sup>7,8</sup>되고 있으나, 아직까지 실용화되어 임상에서 응용되는 약물은 드문 실정이다.

뽕나무는 잎, 가지, 뿌리, 열매와 기생충까지도 모두 한약재로 이용되어, 각각 桑葉, 桑枝, 桑白皮, 桑椹子, 桑寄生이라 칭하고, 우리나라의 산지에 광범위하게 분포하여 그 활용 범위가 넓다. 그 중 桑枝(*Mori Ramulus*)는 桑科에 속한 낙엽교목인 뽕나무 및 동속(뽕나무과: Moraceae) 근연식물의 가지로, 祛風濕, 利關節하는 效能으로 風濕痺痛, 筋疾患, 四肢拘攣, 關節酸痛麻木, 水腫 등에 多用된다<sup>9</sup>.

桑枝에 대한 연구는 혈압 및 당뇨에 미치는 영향<sup>10</sup>, 항산화효과<sup>11</sup>, 혈당조절에 미치는 효과<sup>12</sup>, 항균 활성물질에 미치는 효과<sup>13</sup>, 지질농도에 미치는 효과<sup>14</sup> 등이 보고되고 있으나 桑枝 목초액에 대한 연구는 찾아볼 수 없다. 따라서, 본 연구에서는 항염증 및 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 桑枝로 목초액을 만들어 호흡기 객담의 과다분비에 어떠한 영향을 줄 수 있는지를 관찰하고, 객담 중의 주요 생화학적 구성요소인 기도 뮤신의 생성, 분비 및

뮤신 유전자 발현에 대한 영향을 관찰하여 유의한 결과를 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 재 료

#### 1) 실험동물

5-6주령 정도의 웅성의 흰쥐를 대한바이오링크(주) (Kyung-gi-do, Korea)에서 구입하고, 1주일 동안 실험실 환경에서 순화시킨 후 실험에 사용하였고 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하였다.

#### 2) 배양세포

NCI-H292 세포는 American Type Culture Collection 사 (Manassas, VA, U.S.A.)에서 구입하였다.

#### 3) 시 약

Type I collagen은 R&D systems (Minneapolis, MN, U.S.A.)에서, Amicon은 Millipore사 (Billerica, MA, U.S.A.)에서, protease inhibitor cocktail은 Roche 사 (Indianapolis, IN, U.S.A.)에서, mouse anti-human total mucin clone 17Q2는 Covance사 (Berkley, CA, U.S.A.)에서, LDH assay kit (Cytotox-96)는 Promega사 (Madison, WI, U.S.A.)에서, mouse anti-MUC5AC clone 45M1 및 HRP-Goat Anti-Mouse IgG Conjugate은 NeoMarkers사 (Freemont, CA, U.S.A.)에서, Easy-Blue RNA extraction kit는 INTRON biotechnology사 (Kyung-gi-do, Korea)에서, Accuprep RT premix kit와 Accuprep PCR premix kit는 Bioneer사 (Daejeon, Korea)에서, trichloroacetic acid (TCA), sulforhodamine B (SRB), ethidium bromide, trypsin-EDTA, pronase (Type XIV), insulin, transferrin, epidermal growth factor (EGF), formaldehyde, alcian blue, periodic acid-schiff (PAS), tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), hydrocortisone, sodium selenite, Tween 20, bovine serum albumin (BSA), retinoic acid, gentamicin, HEPES, dimethyl sulfoxide (DMSO), diethylpyrocarbonate (DEPC), 3, 3', 5, 5'- tetramethyl- benzidine peroxide solution (TMB),

Trizma base, NP-40, EDTA, EGTA, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), HEPES 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), RPMI 1640 등은 GIBCO-BRL사 (Grand Island, New York, U.S.A.)에서, 기타 제반 시약들은 일급시약 등급 이상의 것들을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 탈이온 2차 증류수이었다.

#### 4) 점액의 제조

桑枝 목초액(MA)은 양잠용 뽕나무(桑枝: *Mori Ramulus*)를 세척, 건조, 절단 한 후 뽕기름 추출기(등록특허 10-0882743)를 사용하여 제조하였다. 최종 약물 용액을 클린 벤치 내에서 0.22  $\mu$ m filter를 이용, 가압 여과하고 멸균용기에 저장하여, 4°C 조건에서 보관하였다.

## 2. 방법

### 1) 흰쥐를 대상으로 한 관찰

#### (1) 흰 쥐 객담 과다분비 모델 유도

가로 200 cm, 세로 60 cm, 높이 30 cm의 직육면체 상자를, 두께 2 cm의 아크릴 수지판을 재료로 하여 제작하였다. 가로면의 일부에 실험동물이 출입할 수 있도록 출입문을 만들고, 가로 평면과 수직으로 접하고 있는 좌우 양면의 중앙부에 구멍을 만든 후 그에 맞는 nipple과 polyethylene duct를 장착하였다. 한쪽 duct는 이산화황(SO<sub>2</sub>)이 발생하는 초음파 가습기의 분무 입구에 연결시키고, 반대쪽 duct는 배기 장치에 연결하였다. 이산화황 노출방법은 Pon 등<sup>15</sup>이 보고한 방법을 개량하여 사용하였다. 15% (V/V) Sodium metabisulfite (MBS) 수용액을 초음파 가습기에 주입하고, 가습기를 작동시켰다. 작동 후 3분 이내에 MBS의 증기가 충분하게 하였고, 작동 종료 시까지 실험장치 내부의 이산화황 농도는 150ppm으로 유지하였다. 동물을 정상군, 대조군(이산화황 3주 처리), 실험군(이산화황 1주

처리 후 최종 2주간 이산화황 처리 및 약물 동시투여)으로 무작위 배정하고, 각 군당 동물 수는 5마리 이상으로 하였다. 노출 기간은 1일 3시간, 1주일에 5일, 3주간이었다. 정상군은 실험장치가 설치된 동일한 실내에 전 실험기간 동안, 1일 3시간의 이산화황 노출 및 약물 처리 조작성 제외하고 노출군과 동일한 조건 하에 사육하였다<sup>16</sup>.

#### (2) 동물군 및 검액 투여

이산화황 1주 처리 후 최종 2주간 이산화황 처리 및 약물 동시투여 군에 배당된 실험동물을 대상으로, 체중 70 kg 성인을 기준으로 환산된 체중 350 g 내외의 흰쥐에의 투여용량인 약물 1%로 희석한 용액 2 ml를 경구투여용 needle를 이용하여 투여하였다. 즉, 총 3주간의 이산화황 노출 기간 중 마지막 2주간 (주5회, 총10회) 매일 반복적으로 약물을 투여하였는데 약물 투여는 오전 10시에서 11시 사이에, 이산화황 노출은 오후 1시에서 4시까지, 각각 실시하였다.

#### (3) 기도 상피세포 내 점액함유량 측정

약물이 흰쥐의 기도 배상세포 내 점액 함유량에 미치는 영향을 측정하기 위하여 기관내강 상피세포층에 대한 병리조직학적 검사를 실시하였다. 3주간의 이산화황 노출 기간이 종료된 후 각 군에 소속된 해당 실험동물을 이산화탄소로 질식사시킨 후 기관을 절개하고 분리한 후 냉각된 10% formalin in PBS (pH 7.2)에 넣어 24 시간동안 고정하였다. 고정된 조직을 파라핀으로 포매(embedding)하였다. Microtome을 이용하여 5  $\mu$ m 두께로 잘라 조직 절편을 제작하였다. 탈파라핀 과정을 거치고 Alcian Blue 염색을 실시한 후 광학 현미경 하에서 관찰하고 200배 배율에서 사진 촬영하였다. 대조군, 이산화황 처리군, 약물 처리군의 기관내강 배상세포(goblet cell)의 증식 여부 및 배상세포내 점액 함유량(정도)을 비교함으로써 약물이 배상세포 내 점액함유 상태에 미치는 영향을 측정하였다<sup>17,18</sup>.

#### (4) 기관상피세포의 분리 및 배양

흰쥐의 기관표면 상피세포(Tracheal Surface Epithelial

Cells : TSEC) 분리와 배양에 적용된 실험방법은 다수의 연구자들이 보고한 방법<sup>17,19-21</sup>을 적절히 변형하여 사용하였다. 5 - 6주령의 웅성의 흰쥐를 이산화탄소로 흡입 질식사시켜, 기관을 무균 상태에서 노출시킨 후 멸균된 폴리에틸렌 튜브를 삽입하였다. 이 튜브를 통하여  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ - free Minimum Essential Medium (S-MEM)에 용해시킨 0.1% pronase를 기관강 내에 주입하고, 4°C에서 16시간 동안 방치하였다. 16시간 후, 기관강 내용물을 세척 및 수거하고, 10% fetal bovine serum을 함유하는 S-MEM 내에서 200×g로 원심분리 함으로써 수거한 세포를 2회 세척하였다. 세척된 cell pellets는 insulin (5  $\mu$ g/ml), transferrin (5  $\mu$ g/ml), epidermal growth factor (12.5 ng/ml), hydrocortisone (0.1  $\mu$ m), sodium selenite (0.01  $\mu$ m), fetal bovine serum (5%, V/V) (FBS), retinoic acid (0.1 $\mu$ m), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml), gentamicin (50 $\mu$ g/ml) 등이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME)과 M199의 1 : 1 혼합 배양액에 재현탁 시켰다. Type I collagen을 이용하여 준비된 두꺼운 collagen gel (0.15 ml/cm<sup>2</sup>)이 도포된 24 well plate에 세포를 104 cells/cm<sup>2</sup>의 밀도로 분포시켰다. 세포는 습도 55%, 95% 공기, 5% CO<sub>2</sub>를 함유하는, 37°C 조건에서 배양하였다. 배양액 교체는 배양 개시후 제 1, 3, 5, 7 일에 각각 시행하였다.

#### (5) 기관상피세포의 약물 처리

성숙한 TSEC에 well 당 200  $\mu$ l의 배양액을 가하고 24시간 동안 배양한 후 배양액(pretreatment sample, PT)을 수거해 두었다. 배양세포에 well당 0.5 ml의 PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복 함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 약물 1 : 100 로 희석시킨 용액 2 - 10  $\mu$ l를 함유하는 PBS 200  $\mu$ l를 well마다 가하고 37°C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하여, treatment sample (T)로 정의하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 원심분리의 원리를 이용하여 T sample 중의

한약 성분을 제거하는 조작(Centrifuge microfilter, Amicon)을 거친 후, mucin 함량을 측정할 때까지 - 70°C에서 냉동 저장했다.

#### (6) 분리된 뮤신 정량

냉동된 각 PT 및 T sample을 해동한 후 sample을 PBS로 1 / 10배 희석하고, 희석된 각 sample을 ELISA 전용 96-well plate에 각각 100  $\mu$ l씩 나누어 넣고, 2시간 동안 상온에서 배양하였다. 2시간 후 PBS - Tween 20 (PBS-T, 0.05%) 용액 200  $\mu$ l/well을 이용, 각 well 당 3회씩 세척하였다. 세척 후 2% BSA in PBS-T 용액 200  $\mu$ l를 각 well당 가하고, 다시 1시간 동안 배양하였다. 1시간 후, PBS-T 200  $\mu$ l로 3회 세척하고, 호흡기 total mucin에 대한 monoclonal antibody인 mouse anti-human total mucin clone 17Q2를 2% BSA에 1 : 1,000의 비율로 희석한 후에, 각 well당 100  $\mu$ l씩 첨가하고, 1시간 동안 배양하였다. 1시간 후 PBS-T로 3회 세척하고, 2차 항체인 HRP-Goat Anti - Mouse IgG Conjugate를 2% BSA에 1 : 3,000의 비율로 희석한 후, 각 well당 100  $\mu$ l씩 첨가하여 1시간 동안 배양하였다. PBS-T로 다시 3회 세척 후 3, 3', 5, 5' - tetramethyl - benzidine peroxide solution (TMB) 100  $\mu$ l를 각 well에 첨가하고, 5분 후 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 50  $\mu$ l를 첨가, 반응을 정지시켰다. 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정함으로써 대조군과 약물 처리군 간의 뮤신을 정량, 비교하였다<sup>22,23</sup>.

#### (7) 일차배양 RTSE세포의 세포질로부터 유리된 젓산 탈수소 효소 활성 측정(LDH activity assay)

특정물질에 의해 세포막이 손상되면 세포질 내부에 존재하는 젓산 탈수소효소(LDH)가 세포질 외부로 유출되는 현상을 이용한 이 독성 측정법은, 보편적으로 사용되는 방법으로 보고되어있다<sup>15,24</sup>. 뮤신 분비량 측정 과정에서 수거된 T sample을 원심 분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고 50  $\mu$ l의 상등액을 젓산 탈수소효소 활성측정(LDH activity assay)에 사용했다. LDH 활성 측정은 commercial kit (Cytotox-96, Promega 사, Madison, WI, U.S.A.)

을 사용하였으며 제조사의 설명에 따라 측정을 진행하였다.

#### (8) 간 기능에 미치는 영향 측정

투여된 약물에 의한 간독성 발생 여부를 검증하기 위하여, 간세포 파괴 시 혈청으로 유출되는 효소인 GOT(AST), GPT(ALT)의 혈청 중 활성을 생화학 자동분석기인 OLYMPUS AU400(Olympus, Japan)을 이용하여 측정하였다.

#### (9) 신 기능에 미치는 영향 측정

투여된 약물에 의한 신장독성 발생 여부를 검증하기 위하여, 약물 투여 후 혈청 중의 BUN(Blood Urea Nitrogen) 값과 creatinine 값을 생화학 자동분석기인 OLYMPUS AU400 (Olympus, Japan)을 이용하여 측정하였다.

### 2) 인간 기도상피세포를 대상으로 한 관찰

#### (1) 배양 및 약물 처리

24시간의 약물 처리 기간 동안, 약물이 인간 기도 상피세포인 NCI-H292 세포 내에 존재하는 MUC5AC 뮤신의 생성 및 유전자(mRNA)의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, NCI-H292 세포를 다음과 같은 방법으로 배양하였다. 세포는 습도가 55%, 95% 공기, 5% CO<sub>2</sub>를 함유하는 37°C 조건에서 HEPES (25 mM), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), FBS (10%, V/V) 등이 첨가된 RPMI 1640 배양액 (이하 배양액)에서 배양되며, 1주에 2회의 빈도로 subculture하였다. 뮤신 생성 및 그 유전자 발현에 대한 약물의 작용을 검증하기 위하여, 뮤신 생성량 검증을 위해서는 24 well culture plate를 기준으로, well 당 2.0 x 10<sup>4</sup> cells/well의 밀도로, 뮤신 유전자 발현 정도의 검증을 위해서는 6 well culture plate를 기준으로, well 당 5.0 x 10<sup>4</sup> cells/well의 밀도로 각각 세포를 도포하고 배양하였다. 세포가 다 자라면, FBS의 농도를 0.2%로 감소시킨 배양액을 주고 24 시간 동안 배양하고, 이후, serum을 첨가하지 않은 배양액 (serum-free medium)으로 세포를 세척하였다. 이렇게 준비된 세포에 약물 1:100 희석액 각각 5-20 µl씩을

함유하는 배양액 200 µl를 well(24 well plate 기준)마다 가하고, 30분이 지난 시점에 PMA 10 ng/ml, 또는 EGF 25 ng/ml, 또는 TNF-alpha 0.2 nm을 각 well마다 처리한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다.

#### (2) MUC5AC 뮤신 생성량 측정

24 시간의 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-well 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'-tetramethyl-benzidine peroxide (TMB)용액 100 µl를 각 well에 첨가하고, 5분 후 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 µl를 첨가, 반응을 정지시켰다. 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정함으로써 대조군과 약물 처리군 간의 MUC5AC를 정량, 비교하였다<sup>22,23</sup>.

#### (3) Total RNA 분리

24 시간 동안 약물을 처리한 세포를 냉각된 PBS로 2회 세척하였다. 세포에 trypsin-EDTA 용액을

처리하여 배양 용기 바닥으로부터 분리하고, 세포들의 혼합물을 1.5 ml 용량의 microtube에 옮겨 원심 분리함으로써 세포들만 수거하였다. 이어서, total RNA를 분리하고자 INTRON biotechnology(kyung-gi-do, Korea)사의 Easy-Blue RNA extraction kit (total RNA isolation reagent)를 이용해(0.5 ml/4x10<sup>5</sup> cells) 세포를 lysis하고, 상온에서 5분간 방치하였다. 5분 후, microtube에 chloroform을 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  $\mu$ 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  $\mu$ l의 RNase-free water로 부유시키고, spectrophotometer(Beckman, DU-650)를 사용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도를 측정 후 실험에 사용하였다(1.0A260 = single strand RNA 40  $\mu$ g/ml)<sup>25</sup>.

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

PCR에 사용된 primer는 Genotec(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.  $\beta$ -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 크

기는 500 bp였다.

(5) RNA의 역전사 반응 및 증합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

수거된 total RNA를 이용, 역전사 반응(Reverse Transcription)으로 cDNA를 만들고, 이를 증합효소 연쇄반응(PCR)으로 증폭시켰다. 즉, 얻어진 total RNA 1  $\mu$ g을 75°C에서 5분간 가열함으로써 denaturation 시키고, 이를 얼음에 담가 급격히 냉각시킨 후 RT premix kit의 사용자 설명서에 따라 역전사 반응을 진행시켰다. MUC5AC 유전자에 대한 PCR은, 각각의 역전사 반응에서 얻은 cDNA 산물 2  $\mu$ 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.

(6) 전기영동에 의한 증합효소 연쇄반응 산물의 확인

RNA의 역전사 반응 및 증합효소 연쇄반응으로 증폭된 cDNA 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC5AC 유전자 발현 변동여부를 관찰하였다. 즉, 증폭된 PCR 산물 10  $\mu$ 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  $\mu$ 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.

(7) NCI-H292 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향

96 well plate의 각 well에 2 X 10<sup>4</sup>개의 NCI-H292 cell을 함유하는 배양액 100  $\mu$ l를 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 존재 하에서 24시간 배양하였다<sup>26,27</sup>. 24시간 배양 후 약물 1 : 100 로 희석시킨 용액을 0.2-2  $\mu$ l/200  $\mu$ l(배양액)의 농도로 100  $\mu$ l씩 배양

세포의 well마다 가하고 72시간 동안 추가로 배양하였다. 배양이 완료된 후, 냉각된 50% trichloroacetic acid(TCA) 50  $\mu$ l를 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  $\mu$ l의 증류수를 이용, 5회 이상 세척하였다. 이렇게 준비된 세포에, acetic acid에 용해된 0.4% SRB 용액 50  $\mu$ l/well을 가하고 실온에서 30분 동안 염색하였고, 다시 흡인배출 후 100  $\mu$ l의 1% acetic acid를 이용, 5회 이상 세척한 후 세포들을 건조시켰다. 각 well 당 100  $\mu$ l의 10 mM unbuffered Tris용액으로 SRB를 잘 녹여낸 후, 흡광분석 측정장치(microplate reader)로 540 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다<sup>27</sup>.

### 3. 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 < 0.05인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## III. 결 과

### 1. 흰쥐를 대상으로 한 관찰 결과

1) 기도상피 배상세포 증식 및 점액 함유량 증가에 미치는 효과

이산화황 흡입으로 유발된 호흡기 객담 과다분비 흰쥐 모델을 대상으로 약물을 2주간 경구투여한 후 상피 배상세포(goblet cell) 내의 점액 함유량에 대한 약물의 영향을 200배 확대하여 관찰하였다.

桑枝 목초액은 흰쥐에서 이산화황으로 유발된 기도상피 배상세포 내의 점액 함유량 증가 및 배상세포 과다증식을 억제시켰다.

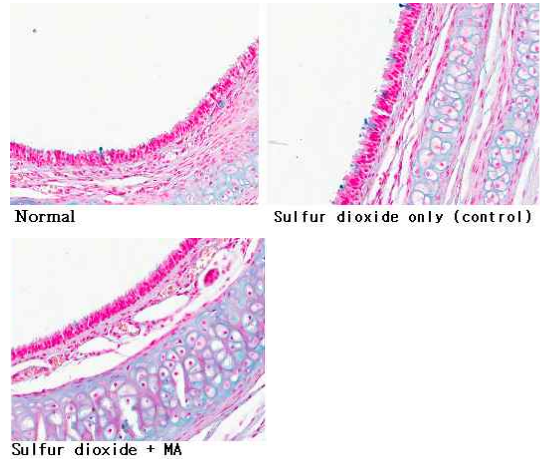


Fig. 1. Rats were exposed to sulfur dioxide and effect of orally-administered MA on intraepithelial mucosubstances and hyperplasia of goblet cells was investigated as described in Materials and Methods (zoom ; 200 X )

(Hematoxylin-eosin staining and Alcian Blue (pH 2.5) staining.)

(Blue : Mucin Pinkish red : Nuclei Pale pink : Cytoplasm)

2) 일차배양 RTSE세포로부터 기도뮤신 분비에 미치는 효과

세포 수준에서의 약물의 작용기전을 규명하기 위하여 1차 배양된 흰쥐의 정상적인 기관표면 상피세포(RTSE)에 약물을 처리하고 약물에 의한 세포로부터의 뮤신분비 정도를 효소연계 면역흡착정량법(ELISA)으로 측정하였다.

桑枝 목초액은 1 : 100 희석시킨 용액 2  $\mu$ l /200  $\mu$ l, 5  $\mu$ l/200  $\mu$ l, 10  $\mu$ l/200  $\mu$ l PBS의 처리농도 범위에서 뮤신 분비를 유의하게 감소시켰다.

3) 일차배양 RTSE세포로부터 LDH분비에 미치는 효과

정상적인 RTSE 세포에서 약물의 처리에 의해 유발될 수 있는 독성을 젓산 탈수소 효소 활성 측정법(LDH assay)을 이용하여 검증하였다.

桑枝 목초액은 1 : 100 희석액 4  $\mu$ l/200  $\mu$ l, 10  $\mu$ l/200  $\mu$ l PBS의 처리 농도에서 LDH 분비에 유

의한 영향을 주지 않음으로써 배양세포에 대해 단기간 처리 시에 독성을 나타내지 않을 가능성을 보여 주었다.

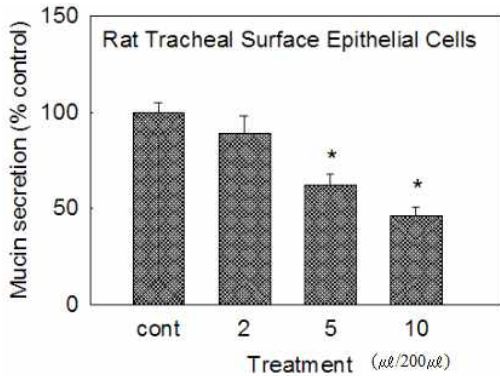


Fig. 2. Confluent RTSE cells were chased for 30 min in the presence of varying concentrations of MA.

The amount of mucin in the spent media was measured by enzyme-linked immunosorbent assay as described in Materials and Methods. Each bar represents a mean ± S.E.M. from 4 culture wells. \* : significantly different from control (p < 0.05).

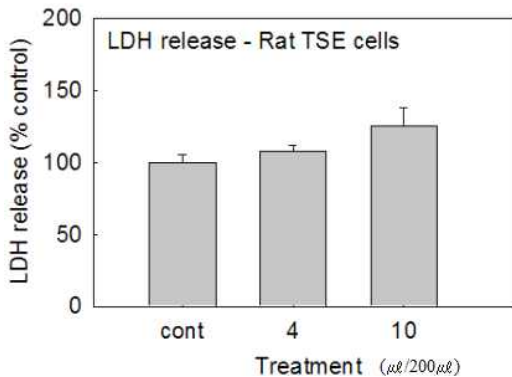


Fig. 3. Confluent RTSE cells were treated with varying concentrations of MA for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment.

Each bar represents a mean±S.E.M. from 4 culture wells.

4) 간 기능에 미치는 영향

객담 과다분비 흰쥐모델에서 약물의 투여에 의해 유발될 수 있는 독성을 흰쥐의 간기능 측정법을 이용하여 검증하였다.

간독성의 지표로는 transaminase인 GOT, GPT의 혈청 중 활성을 선정하였으며, 2주간의 약물 경구투여 후 GOT, GPT의 혈청 중 활성을 측정할 결과, 대조군과 약물 투여군 간에 유의한 차이를 보이지 않음으로써 桑枝 목초액이 실험동물에서 간독성을 유발하지 않음을 보여주었다.

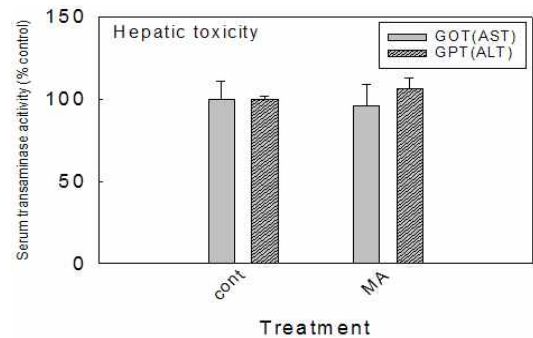


Fig. 4. MA (2 ml/day/rat) was administered to rats during 2 weeks and serum GOT and GPT activities of each rat was measured, as described in Materials and Methods.

Each bar represents a mean±S.E.M. from 5 rats.

5) 신 기능에 미치는 영향

객담 과다분비 흰쥐모델에서 약물의 투여에 의해 유발될 수 있는 독성을 흰쥐의 신기능 측정법을 이용하여 검증하였다.

신장독성의 지표로는 Blood Urea Nitrogen (BUN) 및 Creatinine의 혈청 중 농도를 선정하였으며, 2주간의 약물 경구투여 후 Blood Urea Nitrogen (BUN) 및 Creatinine의 혈청 중 농도를 측정할 결과, 대조군과 약물 투여군 간에 유의한 차이를 보이지 않음으로써 桑枝 목초액이 실험동물에서 신장독성도 유발하지 않음을 보여주었다.



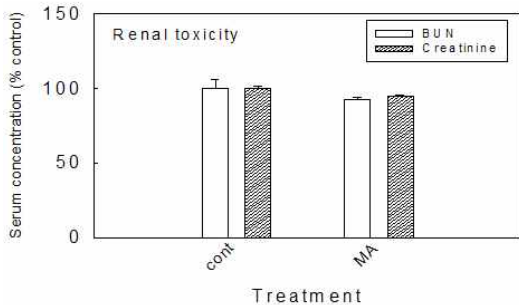


Fig. 5. MA (2ml/day/rat) was administered to rats during 2 weeks and serum BUN and creatinine concentrations of each rat was measured, as described in Materials and Methods.

Each bar represents a mean±S.E.M. from 5 rats.

2. NCI-H292를 대상으로 한 관찰 결과

1) NCI-H292세포에서 PMA로 자극된 MUC5AC 뮤신생성에 미치는 효과

인간의 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포에 phorbol ester(PMA)로 기도 뮤신의 생성(production)을 자극한 상태에서 24 시간의 약물 투여 기간 동안 기도 뮤신인 MUC5AC 뮤신의 생성에 대한 약물의 영향을 효소연계 면역흡착정량법(ELISA)을 이용하여 측정하였다.

桑枝 목초액은 1 : 100 로 희석시킨 용액 5  $\mu$ l /200  $\mu$ l, 10  $\mu$ l /200  $\mu$ l, 20  $\mu$ l /200  $\mu$ l 배양액의 투여 농도에서 PMA로 자극된 뮤신생성 증가를 역전(감소)시켰다.

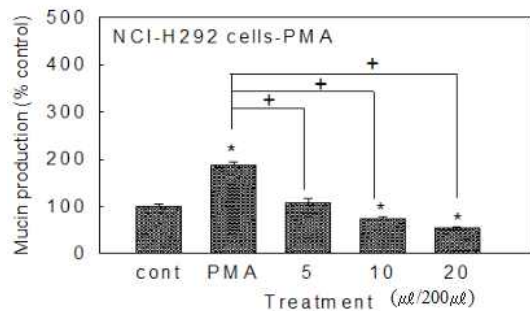


Fig. 6. NCI-H292 cells were pretreated with MA 5-20  $\mu$ l/200  $\mu$ l media for 30 min and then

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  $\pm$  S.E.M. of 4 culture wells.

\* : significantly different from control (p < 0.05).  
+ : significantly different from PMA only (p < 0.05).

2) NCI-H292세포에서 EGF로 자극된 MUC5AC 뮤신생성에 미치는 효과

인간의 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포에 상피세포 성장인자(EGF)로 기도 뮤신의 생성을 자극한 상태에서 24 시간의 약물 투여 기간 동안 기도 뮤신인 MUC5AC 뮤신의 생성에 대한 약물의 영향을 효소연계 면역흡착정량법(ELISA)을 이용하여 측정하였다.

桑枝 목초액은 1 : 100 로 희석시킨 용액 5  $\mu$ l /200  $\mu$ l, 10  $\mu$ l /200  $\mu$ l, 20  $\mu$ l /200  $\mu$ l 배양액의 투여 농도에서 EGF로 자극된 뮤신생성 증가를 역전(감소)시켰다.

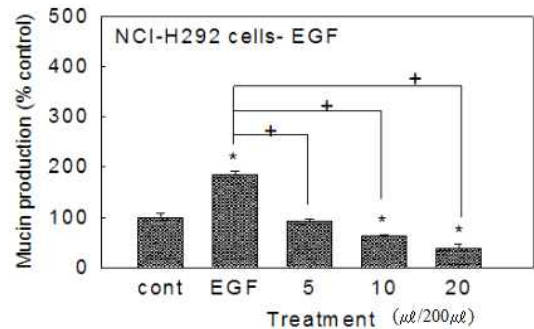


Fig. 7. NCI-H292 cells were pretreated with MA 5-20  $\mu$ l/200  $\mu$ l media for 30 min and then stimulated with EGF (25ng/ml) for following 24hrs.

Cell lysates were collected for quantitation of MUC5AC mucin production by ELISA as described in Materials and Methods. Each bar represents a mean  $\pm$  S.E.M. of 4 culture wells.

\* : significantly different from control (p<0.05).  
+ : significantly different from EGF only (p<0.05).

3) NCI-H292세포에서 TNF-alpha로 자극된 MUC5AC 뮤신생성에 미치는 효과

인간의 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포에 증양피사인자(TNF-alpha)로 기도 뮤신의 생성을 자극한 상태에서 24 시간의 약물 투여 기간 동안 기도 뮤신인 MUC5AC 뮤신의 생성에 대한 약물의 영향을 효소연계 면역흡착정량법(ELISA)을 이용하여 측정하였다.

桑枝 목초액은 1 : 100 로 희석시킨 용액 5  $\mu$ l /200  $\mu$ l, 10  $\mu$ l/200  $\mu$ l, 20  $\mu$ l/200  $\mu$ l 배양액의 투여 농도에서 TNF-alpha로 자극된 뮤신생성 증가를 역전(감소)시켰다.

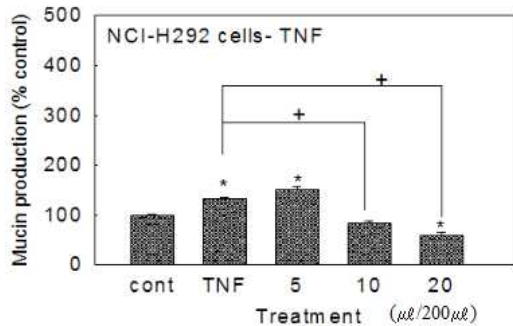


Fig. 8. NCI-H292 cells were pretreated with MA 5-20  $\mu$ l/200  $\mu$ l media for 30 min and then stimulated with TNF-alpha (0.2nm) for following 24hrs.

Cell lysates were collected for quantitation of MUC5AC mucin production by ELISA as described in Materials and Methods. Each bar represents a mean  $\pm$  S.E.M. of 4 culture wells.

\* : significantly different from control (p<0.05).  
+ : significantly different from TNF only (p<0.05).

4) NCI-H292세포에서 PMA로 자극된 MUC5AC 유전자 발현 증가에 미치는 효과

인간의 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포에 phorbol ester(PMA)로 기도 뮤신의 생성을 자극한 상태에서 24 시간의 약물 처리 기간 동안 MUC5AC mRNA의 발현에 대한 약물의 영향을 역전사-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)법을 이용하여 관찰하였다.

桑枝 목초액은 1 : 100 로 희석시킨 용액 20  $\mu$ l /200  $\mu$ l 배양액의 투여 농도에서 24 시간의 처리기간 동안 PMA로 유도된 MUC5AC mRNA의 발현 수준을 감소시키는 경향을 나타내었다.

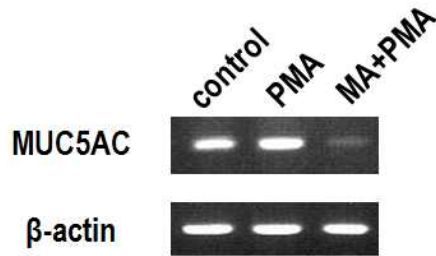


Fig. 9. NCI-H292 cells were incubated with the indicated concentration of MA for 24 hrs.

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.

5) NCI-H292세포에서 EGF로 유도된 MUC5AC 유전자 발현 증가에 미치는 효과

인간의 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포에 상피세포 성장인자(EGF)로 기도 뮤신의 생성을 자극한 상태에서 24 시간의 약물 처리 기간 동안 MUC5AC mRNA의 발현에 대한 약물의 영향을 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)법을 이용하여 관찰하였다.

桑枝 목초액은 1 : 100 로 희석시킨 용액 20  $\mu$ l /200  $\mu$ l 배양액의 투여 농도에서 24 시간의 처리기간 동안 EGF로 유도된 MUC5AC mRNA의 발현 수준을 감소시키는 경향을 나타내었다.

6) NCI-H292 세포에서 TNF-alpha로 유도된 MUC5AC 유전자 발현 증가에 미치는 효과

인간의 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포에 증양피사인자(TNF-alpha)로 기도 뮤신의 생성을 자극한 상태에서 24 시간의 약물 처리 기간 동안 MUC5AC mRNA의 발현에 대한 약물의 영향을 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)법을 이용하여

여 관찰하였다.

桑枝 목초액은 1:100 로 희석시킨 용액 20  $\mu$ l /200  $\mu$ l 배양액의 투여 농도에서 24 시간의 처리기간 동안 TNF-alpha로 유도된 MUC5AC mRNA의 발현 수준을 감소시키는 경향을 나타내었다.

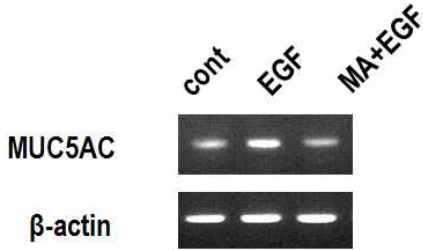


Fig. 10. NCI-H292 cells were incubated with the indicated concentration of MA for 24 hrs.

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.

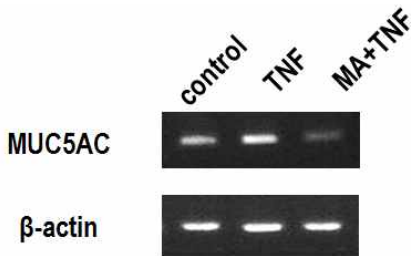


Fig. 11. NCI-H292 cells were incubated with the indicated concentration of each agent for 24 hrs.

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.

7) NCI-H292 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향  
NCI-H292 세포에서 약물의 처리에 의해 유발될 수 있는 독성을 세포 증식 검증법을 이용하여 관찰하였다.

桑枝 목초액 1 : 100 로 희석시킨 용액을 NCI-H292 세포에 각각 0.2  $\mu$ l/200  $\mu$ l, 2  $\mu$ l/200  $\mu$ l PBS의 농도로 72시간 동안 처리했을 때에도, 세포의 생존 및 증식에 유의한 저해효과를 나타내지 않으므로써 독성을 나타내지 않을 가능성을 보여주었다.

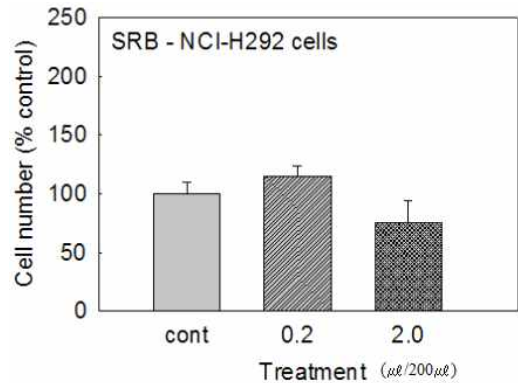


Fig. 12. NCI-H292 cells were treated with 0.2-2  $\mu$ l MA /200  $\mu$ l media for 72 hrs.

The number of cells survived was counted as described in Materials and Methods.

#### IV. 고 찰

본 연구의 최종 목표는 항염증 및 항산화 활성을 발현함으로써 임상에서 다양한 염증성 질환 치료에 응용될 수 있는 桑枝 목초액(MA)이 천식, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증 등에서 관찰되는 호흡기 객담의 과다분비에 어떠한 영향을 줄 수 있는지를 검증하고, 그 작용기전과 관련하여 객담 중의 주요 생화학적 구성요소인 기도 뮤신의 생성, 분비 및 뮤신 유전자 발현에 대한 영향을 탐색하고자 함이었다.

喀痰을 韓醫學적으로 살펴보면 痰飲의 범주에 속하고 넓은 의미에서 보면 痰飲은 인체의 水液代謝의 장애로 인하여 生成되는데, 주로 脾의 水濕運化作用의 失調로 인하여 生痰하게 되고, 肺에서 저장하게 된다. 특히 肺에서 通調水道作用의 失調로

津液이 停滯되면 痰飲이 생기고 이를 喀痰으로 지칭한다<sup>28</sup>. 한편, 목초액은 민간요법으로 주로 사용되었으며 임상에서 활용된지가 400년이 넘었을 것으로 추정된다. 우리나라에서도 지리산계곡에서 자생하는 고로쇠 수액을 채취해서 마셨고, 캐나다나 일본에서도 나무의 수액을 건강음료나 질병치료의 목적으로 활용한 기록이 있다<sup>29</sup>. 竹瀝은 대나무 목초액으로 성질이 차고 熱痰이나 煩渴을 치료하는 藥材로 사용했다는 기록이 남아있고, 이전부터 韓藥材로 식물의 수액이 이용되어 왔다<sup>29</sup>. 목초액은 나무를 탄화하는 과정에서 발생하는 연기와 수증기를 냉각시켜 얻어지는 응축물을 일정기간 정치하여 얻어지는 수용액을 말하는데, 대부분 담갈색의 산성 액상 천연물질로서 대부분이 수분이고 나머지는 유기산류, 페놀류, 카르보닐화합물류, 알코올류 등 200여종의 유기화합물과 다수의 미네랄 성분이 함유되어 있는 복합추출물이다<sup>30</sup>. 현재 목초액은 향균, 살균, 보존성 향상, 가공식품에 식품용 첨가제로 사용하고 있으며<sup>31-33</sup>, 농업 및 환경분야에서 토양살균, 축산분뇨의 탈취, 작물의 병해충방지, 퇴비발육촉진, 식물성장 촉진효과 등 토양환경개선에 광범위하게 이용되고 있다<sup>34,35</sup>. 또한 목초액이 생체에 미치는 효과에 대한 연구는 주로 참나무 목초액에 대한 연구가 비교적 활성화 되어 있는데, 참나무 목초액의 항균 및 항산화 활성과 일산화질소 합성저해연구<sup>36</sup>, 혈청의 지질대사에 미치는 영향<sup>37</sup>, 흰쥐 간조직의 활성산소 및 제거효소에 미치는 영향<sup>38</sup> 등이 보고되어 있다.

桑枝는 잎, 가지, 뿌리, 열매와 기생충까지도 모두 한약재로 이용되어, 각각 桑葉, 桑枝, 桑白皮, 桑椹子, 桑寄生이라 칭하고, 우리나라의 산지에 광범위하게 분포하여 그 활용 범위가 넓다. 그 중 桑枝(Mori Ramulus)는 桑科에 속한 낙엽교목인 뽕나무 및 동속(뽕나무과: Moraceae) 근연식물의 가지로, 祛風濕, 利關節하는 效能으로 風濕痺痛, 筋疾患, 四肢拘攣, 關節酸痛麻木, 水腫 등에 多用된다<sup>9</sup>. 또한 味는 苦하고 性은 平, 無毒하며 歸經은 肺, 腎

2經이라 記載되어 있기도 하고<sup>9</sup>, 대부분의 本草書는 肝經이라 하였다. 현재 桑枝에 대한 연구는 혈압 및 당뇨에 미치는 영향<sup>10</sup>, 항산화효과<sup>11</sup>, 항당뇨 효과<sup>12</sup>, 항균활성물질<sup>13</sup>, 지질농도에 미치는 영향<sup>14</sup> 등이 보고되어 있으나, 桑枝 목초액에 대한 연구는 아직 활발히 이루어지지 않고 있는 상태이고, 이에 桑枝 목초액이 호흡기객담에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

객담 과다분비 동물 모델을 만들기 위하여, 호흡기에 화학적 손상을 유발함으로써 만성 기관-기관지염을 유발할 수 있는 이산화황 기체를 흰쥐에 일정 기간 흡입시킴으로써 염증성 객담 과다분비 상태를 유발한 모델을 대상으로 약물을 2주간 경구투여한 후, 상피 배상세포(goblet cell) 내의 점액 함유량에 대한 약물의 효능을 측정하였다. 객담 과다분비 흰쥐 모델에 약물을 2주간 경구투여한 후 상피 배상세포(goblet cell) 내의 점액 함유량에 대한 약물의 영향을 병리조직학적인 방법으로 확인한 결과, 대조군, 이산화황 3주 흡입군과 비교시 이산화황 1주 흡입 후 2주간 이산화황 흡입 및 桑枝 목초액 동시 투여군에서는 기도 배상세포 내 점액(청색으로 염색됨) 함유량이 감소되는 경향을 보여주었다(Fig. 1). 이러한 연구 결과는 桑枝 목초액이 기도내 점액분비에 관여하는 배상세포의 점액 증가를 억제 함으로서 객담의 과다분비를 억제하는 역할을 하는 것으로 생각된다. 이는 뮤신분비에 미치는 영향과 관련하여 임상에서 빈용되는 처방 위주로 연구하였던 기존논문<sup>39,40</sup>들과 비교할 때의 의미가 있는 것으로 생각된다.

이어서, 호흡기 세포 수준에서는 약물이 어떠한 작용을 나타내는지를 관찰함으로써 약물의 작용기전을 탐색하고자, 효소연계 면역흡착정량법(ELISA)을 이용하였는데, 이 방법은 미량성분 혹은 생리활성을 가지는 물질의 분석에 현재 널리 이용되는 방법이다<sup>41</sup>. 일차배양된 흰쥐의 기관표면 상피세포(RTSE)에 약물을 처리하고 30분간의 약물 처리 기간 동안 약물에 의한 세포로부터의 뮤신분비 정

도를 효소연계 면역흡착정량법 (ELISA)으로 측정 한 결과, 2  $\mu$ l/200  $\mu$ l, 5  $\mu$ l/200  $\mu$ l, 10  $\mu$ l/200  $\mu$ l에서 점차 뮤신분비를 감소시키는 경향을 나타내었다(Fig. 2). 이는 가미진해탕을 투여한후 ELISA법을 이용하여 뮤신분비의 감소효과를 보인 실험<sup>42</sup>과 비교해도 유의한 결과라 볼 수 있다.

NCI-H292 세포에 phorbol ester(PMA), 상피세포 성장인자(EGF), 종양괴사인자(TNF)로 각각 기도 뮤신의 생성을 자극한 상태에서 24 시간의 약물 처리 기간 동안 MUC5AC 뮤신의 생성에 대한 약물의 효과를 측정하고, 동일한 조건으로 뮤신 유전자 발현을 자극한 상태에서 24 시간의 약물 처리 기간 동안 MUC5AC mRNA의 발현에 대한 약물의 효과를 측정하였다. PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate)는 PKC (Calcium-dependent protein kinase, 칼슘의존성 단백질 인산화 효소)를 활성화 하는 물질로 mouse의 피부암 발병 촉진 작용, 산화질소 생성 증강 작용, 유도형 산화질소 생성효소의 발현 촉진 작용<sup>43</sup>을 나타내며, 인간 기도 상피세포에서 뮤신 생성을 증가<sup>22,44</sup>시키는 것으로도 알려진 물질이다. EGF는 EGF-수용체(epidermal growth factor receptor)-MEK-ERK 신호전달 경로를 경유하고, TNF-alpha는 TNF-수용체 (tumor necrosis factor receptor)를 매개로 전사인자 결합부위 NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B)로 연결되는 세포 신호전달 경로를 경유하여, MUC5AC 뮤신의 생성을 촉진할 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>45,46</sup>. 본 연구결과에서 볼 수 있는 것처럼, 桑枝 목초액은 PMA, EGF, TNF-alpha로 각각 자극된 MUC5AC 기도 뮤신의 생성을 유의하게 감소시켰다(Fig. 6, 7, 8)과 동시에, 뮤신 유전자인 MUC5AC mRNA의 발현도 감소시키는 경향을 발현하였다(Fig. 9, 10, 11). 이러한 실험결과를, 桑枝 목초액이 발현하는 항염증 및 항산화 작용 등을 매개로 하여 MUC5AC 기도 뮤신의 mRNA 수준이나 최종 당단백질 합성과정에서 억제적 작용을 미친 결과로 생각된다.

한편 호흡기 객담 과다분비 흰쥐 모델을 대상으

로 하여 肝기능과 腎기능에 대한 독성시험을 실시 하였다. 먼저 肝기능의 측정은 간세포 파괴시 혈청으로 유출되는 효소인 GOT, GPT의 혈청 중 활성을 측정하였다. 혈청 중의 GOT(Glutamate Oxaloacetate Transaminase)는 L-asparatate와  $\alpha$ -ketoglutarate를 Oxaloacetate와 L-glutamate로 전환시키며 이때 생성된 Oxaloacetate는 Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH)의 존재 하에 Malate Dehydrogenase (MDH)의 작용으로 L-Malate로 전환된다. GOT의 활성값은 340nm에서 NADH의 감소 속도를 측정함으로써 계산하였다. 혈청 중 GPT(Glutamate Pyruvate Transaminase)는 L-alanine과  $\alpha$ -ketoglutarate를 Pyruvate와 L-glutamate로 변환시키며, 이때 생성된 Pyruvate는 NADH의 존재 하에 Lactate Dehydrogenase (LDH)의 작용으로 Lactate로 전환된다. GPT의 활성값은 340 nm에서 NADH의 감소 속도를 측정하여 계산하였다. 또 腎기능은 혈청 중의 BUN 값과 크레아티닌 값으로 측정하였다. 혈청 중의 요소(urea)는 urease에 의해 특이적으로 분해되어 암모니아와 이산화탄소를 생성하며, 생성된 암모니아는 2-oxoglutarate와 먼저 반응하고 GLDH의 존재 하에 NADH와 반응하여 Glutamate와 NAD를 생성하고, 이 반응에서 감소하는 NADH의 감소 속도를 측정하여 혈청 중의 BUN의 양(농도)을 측정하였다. 혈청 중의 크레아티닌은 pH가 알칼리성인 조건에서 picric acid와 반응하여 적색의 화합물을 생성하며, 이 때 생성되는 적색화합물의 증가 속도를 측정함으로써 크레아티닌의 양(농도)을 측정하였다. in vivo 독성시험을 실시한 결과 2주간 약물을 투여받은 흰쥐의 肝기능 및 腎기능에 유의한 독성이 관찰되지 않았으므로 본 연구에서 사용된 상지 목초액이 인체에 투여시에도 안전할 가능성을 제시하였다(Fig. 4, 5).

객담 과다분비 흰쥐 모델, RTSE 세포, NCI-H292 세포 수준에서 약물의 투여 혹은 처리에 의해 유발될 수 있는 독성을 각각 탐색한 결과, 배양된 RTSE 세포에서는 약물 처리에 의해 LDH 유리

정도에 유의한 영향을 주지 못함으로써 배양세포에 대해서 단기간 처리시 세포독성을 나타내지 않을 가능성을 보여주었다(Fig. 3). 인간 기도 상피세포주인 NCI-H292 세포에 72시간 동안 약물을 처리 후 세포의 생존 및 증식에 미치는 약물의 작용을 측정할 수 있는 SRB assay 방법<sup>27</sup>을 이용한 세포 독성시험에서도, 약물은 배양된 세포에 대해서 유의한 세포독성을 발현하지 않았다(Fig. 12).

이상의 연구결과를 종합하면, 桑枝목초액은 호흡기 염증으로 나타나는 객담의 과다분비 상태에 작용하여 뮤신의 생성 및 분비 감소 작용을 나타낼 가능성을 보여주고 있는 것이다. 또한 목초액은 韓醫學적으로 보았을 때 나무속에 있는 津液이 火로 인해 농축된 것으로 水中의 火의 특성을 지닌 水液으로 생각할수 있다. in vivo 상태에서의 2주간의 독성실험에서도 안정적인 것으로 나타났지만, 인체 투여를 위해서는 장기복용에 관한 연구와 그 외의 독성실험들이 더 필요할 것으로 보인다. 현재 뮤신의 분비를 줄이는 약으로 개발된 약물이 없는 실정에서 본 연구결과는 상지 목초액이 다양한 염증성 호흡기 질환에서 관찰되는 호흡기 객담 과다분비 상태에 작용하여 뮤신의 생성 및 분비 감소 작용을 나타낼 가능성을 보여주고 있으며 향후 천식, 만성기관지염, 폐기종, 기관지 확장증 등 다양한 호흡기 질환의 병태생리학적 특성을 적절히 반영할 수 있는 연구모델을 이용하여 약물의 작용 및 기전에 대한 후속 연구를 지속적으로 수행해야 할 필요가 있을 것이다.

## V. 결 론

본 연구는 桑枝 목초액이 이산화황으로 유발된 호흡기 점액의 과분비와 이와 연관된 호흡기 뮤신의 생성, 분비 및 관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보고자 흰쥐의 기도상피 배양세포에서 뮤신의 분비와 인간기도상피세포에서 MUC5AC 생성에 미치는 영향을 관찰하여 아래와 같은 결론

을 얻었다.

1. 호흡기 객담 과다분비 흰쥐 모델에서 桑枝 목초액은 기도 배양세포 내 점액 함유량을 감소시켰다.
2. 배양된 흰쥐 기도 상피세포에 대하여 단기간 처리하여 효소연계 면역흡착정량법(ELISA)을 이용하여 측정한 결과 桑枝 목초액은 뮤신의 분비를 감소시켰다.
3. 桑枝 목초액은 실험동물에게 2주간 투여했을 때 간 및 신장에서 독성을 발현하지 않았다.
4. 桑枝 목초액은 배양된 인간 기도 상피세포를 대상으로 PMA, EGF, TNF- $\alpha$ 로 기도 뮤신의 생성 혹은 유전자 발현을 자극(유도)시킬 수 있는 병리적 조건에서, 효소연계 면역흡착정량법(ELISA)을 이용하여 측정한 결과 뮤신의 생성과 그 유전자의 발현에 유의한 억제효과를 보여주었다.
5. 桑枝 목초액은 배양된 인간 기도 상피세포를 대상으로 PMA, EGF, TNF- $\alpha$ 로 기도 뮤신의 생성 혹은 유전자 발현을 자극(유도)시킬 수 있는 병리적 조건에서, 역전사-중합효소 연쇄 반응법(RT-PCR)을 이용하여 측정한 결과 뮤신의 생성과 그 유전자의 발현에 유의한 억제효과를 보여주었다.

## 참고문헌

1. Newhouse M.T. and Biennenstock J.. Respiratory tract defense mechanism: Baum, G.L. and Wolinsky, E. textbook of pulmonary disease, 3rd ed.: Little Brown and Company, 1983:2-47.
2. 蘇頌等, 新修本草. 대만: 국립중의약연구소; 1971, p. 362.
3. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: Current understanding. J. Allergy Clin. Immunol. 1990;85:422-36.

4. Culpitt SV, Rogers DF, Traves SL, Barnes PJ, Donnelly LE. Sputum matrix metalloproteases: comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Respir Med.* 2005;99(6):703-10.
5. Mutschler E. and Derendorf H.. Drug actions., Boca Raton, Florida:CRC press, Inc.. 1995:410-11.
6. Rogers DF. Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology? *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(3):241-50.
7. Rogers DF, Barnes PJ. Treatment of airway mucus hypersecretion. *Ann Med.* 2006;38(2):116-25.
8. Rogers DF. Mucociliary dysfunction in COPD: effect of current pharmacotherapeutic options. *Pulm Pharmacol Ther.* 2005;18(1):1-8.
9. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울: 永林社; 1991, p. 274-5, 484-5.
10. Ham IH, Jeong ES, Lee BH, Choi HY. The Study on Anti-hypertensive and Anti-diabetic Effect of Mori Ramulus. *Kor. J. Herbology.* 2008;23(2):203-12.
11. Cha YY. Comparative Study on Antioxidative Effects of mori Ramulus and Mori Cortex. *Kor. J. Oriental Physiology & Pathology.* 2007;21(4):934-9.
12. Park WY, RO JS, Lee KS. Hypoglycemic Effect of Cudrania tricuspidata Root Bark. *Kor. J. Pharmacogn.* 2001;32(3):248-52.
13. Kim YC, Hur Jin, Sohn DW, Kim HS. Antibacterial Compound of the Root Barks of Cudrania tricuspidata. *Kor. J. Pharmacogn.* 2008;39(3):246-8.
14. Cha JY, Cho YS. Effect of Stem Bark Extract From morus alba and Cudrania tricuspidata on the Concentrations of Lipid and Tissue Lipid Peroxidation in the Cholesterol-Fed Rat. *Kor. J Food Sci. Technol.* 2001;33(1):128-34.
15. Yu, X.-Y., Schofield, B.H., Croxton, T., Takahashi, N., Gabrielson, E.W. and Spannhake, E.W. Physiologic modulation of bronchial epithelial cell barrier function by polycationic exposure. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994;11:188-98.
16. Lee CJ. Effects of poly-L-arginine on the mucin release from airway goblet cells of hamster and on the mucosubstances of airway goblet cells of rat. *J. Appl. Pharmacol.* 2001;9(4):263-9.
17. Harkema JR, Hotchkiss JA. In vivo Effect of endotoxin on intraepithelial mucosubstances in rat pulmonary airways: quantitative histochemistry. *Am. J. Pathol.* 1992;141:307-31.
18. St. George JA, Cranz DL, Zicker S., Etchison, JR, Dungworth DL, Plopper. An immunohistochemical characterization of Rhesus monkey respiratory secretions using monoclonal antibodies. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1985;132:556-63.
19. Kim KC, Opaskar-Hincman H, Bhaskar KR. Secretions from primary rat tracheal surface epithelial cells in culture: Mucin-like glycoproteins, proteoglycans, and lipids. *Exp. Lung Res.* 1989;15:299-314.
20. 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.
21. Wu R, Nolan E, Turner C. Expression of tracheal differentiated function in serum-free hormone-supplemented medium. *J. Cell Physiol.* 1985;125:167-81.
22. 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* 100. 2003;116:18-23.
23. Song KS, Lee WJ, Chung KC, Koo JS, Yang

- EJ, Choi JY, Yoon JH. Interleukin-1 $\beta$  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;278:23243-50.
24. Freshny. Measurement of viability and cytotoxicity. In: *Culture of animal cells*. 3rd edn. :Wiley-Liss, Inc., 1994:288.
  25. 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.
  26. Kim YD, Kwon EJ, Park DW, Song SY, Yoon SK, Baek SH, Interleukin-1 $\beta$  induces MUC2 and MUC5AC synthesis through cyclooxygenase-2 in NCI-H292 cells. *Mol. Pharmacol.* 2002;62(5):1112-8.
  27. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J et. al., New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990;82:1107-12.
  28. 전국한의과대학 병리학교실, *동의병리학*. 서울: 일중사; 1999, p. 138-41.
  29. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals, ageing, and disease. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd eds: Clarendon Press (Oxford). 1989:444-5.
  30. Kim YH, Kim SK, Kim KS, Yun YH, Composition of constituents of commercial wood vinegar liquor in Korea. *Korean soc. agric. Chem. Biotechnol.* 2001;44:262-8.
  31. M.D. Guillen, M.J. Manzanos, Study on the components of an aqueous smoke flavoring by means of Fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography with mass spectrometry and flame ionization detectors. *Adv. Food Sci (CTML)*. 1996;18:121-7.
  32. Jeong CH, Shim KH, Nitrite-scavenging and antioxidant activities of wood vinegar. *Korean J. Food Preservation.* 2002;9:470-5.
  33. Pazczola DE, Tour highlights production and uses of smoke-based flavors. *Food Technol.* 1995:49:70-4.
  34. M.D. Guillen, M.L. Ibargolitia, New components with potential antioxidant and organoleptic properties, detected for the first time on liquid smoke flavoring preparations. *J. Agric. Food Chem.* 1998;46:1276-85.
  35. Lee JE, Hong JH, Chang KW, Hwang JY., Effect of pyroigneous acid liquor on the maturity of pig manure compost. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 2005;38:101-7.
  36. Jung IS, Kim YJ, Gal SY, Choi YJ. Antimicrobial and AntiOxidant Activities and Inhibition of Nirtic Oxide Synthesis of Oak Wood Vinegar. *Kor. J. Life Science.* 2007;17(1):105-9.
  37. Cho WK, Chio JH. Effect of Pyroigneous Liquor on Lipid Metabolism in Serum of CD Rats. *Kor. J Nutrition.* 2007;40(1):24-30.
  38. Cho WK, Choi JH, Effect of Pyroigneous Liquor on Oxygen Radicals and Their Seavenger Enzymes in Liver of CD Rats. *Kor. J. of Nutrition.* 2007;40(2):111-7.
  39. Sim SS, Seo WG, Effects of saganmahwang-tang and prescription C on airway mucin secretion. *Korean J. orient. int. med.* 2006;27(2):295-304.
  40. Kim Ho, Seo WG, Effects of Socheongryongtang -ga-seoggo and Prescription D on Airway Mucin Secretion. *Korean J. orient. int. med.* 2006;27(4):895-904.
  41. Izquierdo JM, Sotorrio P., Quiros A., Enzyme immunoassay of thyroxin with a centrifugal analyzer. *Clin. Chem.* 1982:28123-5.



42. Kim YH, Joo YJ, Jung HM, Seo UK, Effects of Gamijinhae-tang (Jiaweizhenke-tang) on Tracheal Smooth Muscle Contraction and Mucin Secretion from Airway Epithelial Cells. *Korean J. Oriental Med.* 2008;29(3):63-75.
43. Schmidt R, Hecker E, Autoxidation of phorbol esters under normal storage conditions. *Cancer Res.* 1975;35:1375-77.
44. Christopher A. Hewsona, Mark R, Edbrookeb, Sebastian L, Johnstona, PMA Induces the MUC5AC Respiratory Mucin in Human Bronchial Epithelial Cells, via PKC, EGF/TGF- $\alpha$ , Ras/Raf, MEK, ERK and Sp1-dependent Mechanisms. 2004;344(3):683-95.
45. Li D, Gallup M, Fan N, Szymkowski DE, Basbaum CB. Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts. *J Biol Chem.* 1998;273:6812-20.
46. Shim JJ, Signal Transduction of MUC5AC Expression in Airway Mucus Hypersecretory Disease, *The Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases.* 2003;55(1):21-30.