

필용방감길탕이 기도 뮤신의 분비, 생성, 유전자 발현 및 점액 과다 분비에 미치는 영향

김윤영* · 민상연 · 김장현

*하늘한방소아과한방재활의학과한의원 / 동국대학교 한의과대학 소아과교실

Abstract

Effect of Piryongbanggamgil-tang on Airway Mucin Secretion, Production, Gene Expression and Hypersecretion of Mucus

Kim Yoon Young* · Min Sang Yeon · Kim Jang Hyun

*Hanul Korean Pediatrics & Rehabilitation Clinic

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives

In this study, the author tried to investigate whether piryongbang-gamgil-tang (PGGT) significantly affect in vitro airway mucin secretion, PMA- or EGF- or TNF- α -induced MUC5AC mucin production / gene expression from human airway epithelial cells and increase in airway epithelial mucosubstances and hyperplasia of tracheal goblet cells of rats.

Materials and Methods

For in vitro experiment, confluent RTSE cells were chased for 30 min in the presence of PGGT to assess the effect of PGGT on mucin secretion by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Also, effect of PGGT on PMA- or EGF- or TNF- α -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 PGGT and treated with PMA (10 ng/ml) or EGF (25 ng/ml) or TNF- α (0.2 nM) for 24 hrs, to assess both effect of PGGT on PMA- or EGF- or TNF- α -induced MUC5AC mucin production by ELISA and gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

For in vivo experiment, the author induced hypersecretion of airway mucus and goblet cell hyperplasia by exposure of rats to SO₂ during 3 weeks. Effect of orally-administered PGGT during 2 weeks on increase in airway epithelial mucosubstances from tracheal goblet cells of rats and hyperplasia of goblet cells were assessed by using histopathological analysis after staining the epithelial tissue with alcian blue.

Possible cytotoxicities of PGGT 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 PGGT were evaluated by measuring serum GOT/GPT activities and serum BUN/creatinine concentrations of rats after administering PGGT orally.

Results

(1) PGGT did not affect in vitro mucin secretion from cultured RTSE cells. (2) PGGT significantly inhibited PMA-, EGF-, and TNF- α -induced MUC5AC mucin productions and the expression levels of MUC5AC mRNA from NCI-H292 cells. (3) PGGT decreased the amount of intraepithelial mucosubstances and showed the tendency of expectorating airway mucus already produced. (4) PGGT increased LDH release from RTSE cells. However, PGGT did not show in vivo liver and kidney toxicities and cytotoxicity to NCI-H292 cells.

Conclusion

The result from this study suggests that PGGT can regulate the production and gene expression of airway mucin observed in diverse respiratory diseases accompanied by mucus hypersecretion and do not show in vivo toxicity to liver and kidney functions after oral administration. Effect of PGGT with their components should be further studied using animal experimental models that reflect the diverse pathophysiology of respiratory diseases through future investigations.

Key words : Airway, Mucin, Gene, Piryongbanggamgil-tang (PGGT)

Received: May 3, 2014 • Revised: May 19, 2014 • Accepted: May 20, 2014

Corresponding Author: Kim Jang Hyun

Department of Korean Pediatrics, Dongguk University Bundang Korean Hospital, 268, Buljeong-ro, Bun-dang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 463-865, Republic of Korea.

Tel: +82-31-710-3724, Fax: +82-31-710-3780

E-mail: kjh@dongguk.ac.kr

© The Association of Pediatrics of Korean Medicine. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I. Introduction

소아는 생리적으로 臟腑嬌嫩하고 形氣未充한 특징을 보이며, 특히 肺常不足으로 衛外기능이 未固하여 六淫의 邪氣를 받기 쉬우므로 급성 호흡기 감염으로 인한 感冒, 咳嗽, 哮喘 등이 빈번하게 발생하고¹⁾, 肺의 宣降기능이 失調되어 氣機不利로 인한 津液의 輸布, 排泄에 장애가 유발되어 痰이 쉽게 형성된다²⁾.

객담은 有形의 痰, 狹義의 痰에 해당되고³⁾, 타액, 혈청 단백질 삼출물, 박리된 상피세포들과 기도 점액의 혼합물로 구성되어 있는 병리적 물질로 기도 병리상태의 지표가 될 수 있다⁴⁾. 정상적으로 분비되는 기도 점액은 섬모 운동과 호흡, 혈관 및 림프관에 의해 제거 또는 흡수되면서 인체에 유해한 물질을 제거하는 방어 작용을 하나⁵⁾, 점액의 구성요소인 뮤신의 점탄성 변화로 객담 혹은 점액이 과다분비 되면 호흡기 생리 및 방어 작용에 영향을 주어 병리 현상을 유발할 수 있으며, 호흡기 질환의 예후를 악화시키는 주된 요인이 된다⁶⁻⁸⁾.

서양의학에서 기도 점액의 과다분비를 조절하기 위해 다양한 기전의 약물을 사용하고 있으나 약효 및 부작용 면에서 효율적으로 약물 요법을 시행하기가 쉽지 않은 것으로 알려져 있으며^{9,10)}, 기존의 약물 외에 많은 신약 후보 물질이 연구되어 학계에 보고되고 있으나 실용화되어 임상에서 응용되고 있는 약물은 아직까지 없는 상황이다^{11,12)}.

必用方甘桔湯은 《東醫寶鑑》¹³⁾, 《方藥合編》¹⁴⁾에 수록되어 있는 처방으로, 痰熱, 肺熱로 인한 咳嗽, 咯痰, 咽痛, 嘎聲, 扁桃腺炎, 咽喉炎 등에 사용되는 甘桔湯에²⁾ 荊芥, 防風, 薄荷, 黃芩, 玄參을 加하여 風熱로 인한 咽喉腫痛과 喉痺 등에 활용되어왔다^{13,14)}. 必用方甘桔湯에 관한 실험적 연구로는 박 등¹⁵⁾의 진통, 항염증 효과에 대한 연구와 甘桔湯 및 甘桔湯加味方을 이용한 거담, 항염증, 해열, 진통, 항산화 작용 등에 관련된 보고가 있었으나¹⁶⁻¹⁹⁾, 기도 점액 과다분비 상태의 치료 효과에 대한 必用方甘桔湯의 효능을 객관적으로

규명한 연구는 아직까지 없었다.

이에 저자는 必用方甘桔湯이 기도 점액의 과다분비와 기도 뮤신의 생성, 분비 및 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 일차배양된 흰쥐 기관 표면 상피세포(RTSE)에서의 기도 뮤신분비 및 NCI-H292 세포에서 기도 뮤신인 MUC5AC의 생성과 기도 뮤신 유전자인 MUC5AC mRNA의 발현을 관찰하고, 기도 점액 과다분비 흰쥐모델에서 상피 배상세포 내의 점액 함유량을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. Materials and methods

1. 재료

1) 동물

5~6주령의 웅성 Sprague-Dawley (SD) 흰쥐 (대한바이오링크(주), Kyung-gi, Korea)를 2~3일간 실험실 환경에서 순화시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 배양세포

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

3) 약제

必用方甘桔湯(PGGT)의 구성 약물은 《方藥合編》에 준하여, 동국대학교 부속 한방병원에서 공급받아 조제하였다. 한 첩당 처방의 구성은 다음과 같다(Table 1).

4) 약물 제조

必用方甘桔湯 한 첩 분량에 800 ml의 탈이온 2차 증류수를 가하고, 100 °C로 가열된 상태에서 3시간 동안 전탕하여 최종 80 ml의 탱액을 수거하였다. 탱액을 실온 정도로 식힌 후, 클린 벤치 내에서 0.22 μm filter를

Table 1. Prescription of Piryongbanggamgil-tang (PGGT)

Herbal name	Pharmaceutical name	Amount (g)
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	8.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0
荊芥	<i>Schizonepetae Herba</i>	4.0
防風	<i>Ledebouriiellae Radix</i>	4.0
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	4.0
薄荷	<i>Menthae Herba</i>	4.0
玄參	<i>Scrophulariae Radix</i>	4.0
Total amount		32.0

이용하여 가압 여과하고, 멸균용기에 저장하여 4 °C 조건에서 보관하였다.

5) 시약

Mouse anti-human total mucin clone 17Q2는 Covance사 (Berkley, CA, U.S.A.)에서, LDH assay kit (Cytotox-96)은 Promega사 (Madison, WI, U.S.A.)에서, type I collagen은 R&D systems (Minneapolis, MN, U.S.A.)에서, Amicon은 Millipore사 (Billerica, MA, U.S.A.)에서, protease inhibitor cocktail은 Roche사 (Indianapolis, IN, U.S.A.)에서, mouse anti-MUC5AC clone 45M1 및 horse radish peroxidase (HRP)-goat anti-mouse IgG conjugate는 NeoMarkers사 (Freemont, CA, U.S.A.)에서, Easy-Blue RNA extraction kit는 INTRON biotechnology사 (Kyung-gi, 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- α), 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 1640은 GIBCO-BRL사 (Grand Island, New York, U.S.A.)에서 구입하였고, 기타 제반 시약들은 일급시약 등급 이상의 것들을 구입하여 사용하였으며, 물은 탈이온 2차 증류수를 사용하였다.

2. 방법

1) 흰쥐 기관 표면 상피세포 (Rat Tracheal Surface Epithelial cells : RTSE)의 분리 및 배양

RTSE 세포의 분리와 배양에 적용된 실험방법은 다수 연구자들이 보고한 방법²⁰⁻²⁶⁾을 적절히 변형하여 사용하였다.

5~6주령의 웅성 SD 흰쥐를 이산화탄소로 질식사시키고, 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 내의 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 μ g/ml), transferrin (5 μ g/ml), EGF (12.5 ng/ml), hydrocortisone (0.1 μ M), sodium selenite (0.01 μ M), FBS (5%, V/V), retinoic acid (0.1 μ M), penicillin-G (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), gentamicin (50 μ g/ml) 등이 함유된 DME와 M199의 1:1 혼합 배양액에 재현탁시켰다.

Type I collagen을 이용하여 두꺼운 collagen gel (0.15 ml/cm²)이 도포된 24 well plate를 준비하고, 여기에 세포를 10⁴ cells/cm²의 밀도로 분포시켰다. 세포는 습도가 충분히 유지되며 95%의 공기, 5%의 CO₂를 함유하는 37 °C 조건에서 배양되었고, 배양액 교체는 배양 개시 후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다.

2) 배양된 RTSE 세포에 약물 처리

성숙한 RTSE 세포에 well당 200 ml의 배양액을 가하고, 24시간 동안 배양한 후 배양액 (pretreatment sample, PT)을 수거해 두었다. 배양세포에 well당 0.5 ml의 PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 약물 추출물 5, 10, 20

μl 를 함유하는 PBS 200 μl 를 각 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, 상품명 Amicon)을 거친 후 뮤신 함량을 측정할 때까지 -70 °C에서 냉동 저장하였다.

3) 분비된 뮤신의 정량 (효소연계 면역흡착정량법 : ELISA)

냉동된 각 PT 및 T sample을 해동한 후 sample을 PBS로 1/10배 희석하고, 희석된 각 sample을 ELISA 전용의 96-well plate에 각각 100 μl 씩 나누어 넣고 2시간 동안 상온에서 incubation하였다. 2시간 후 PBS-Tween 20 (PBS-T, 0.05%) 용액 200 μl /well을 이용하여 각 well당 3회씩 washing하고, 2% BSA in PBS-T 용액을 각 well당 200 μl 씩 가하고 다시 1시간 동안 incubation하였다.

1시간 후 PBS-T 200 μl 로 3회 washing하고, 호흡기 total mucin에 대한 monoclonal antibody인 mouse anti-human total mucin clone 17Q2를 2% BSA에 1 : 1,000의 비율로 희석한 후 각 well당 100 μl 씩 첨가하고, 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후 PBS-T로 3회 washing하고, 2차 항체인 HRP-goat anti-mouse IgG conjugate를 2% BSA에 1 : 3,000의 비율로 희석한 후 각 well당 100 μl 씩 첨가하여 1시간 동안 incubation하였다. PBS-T로 다시 3회 washing하고, TMB 100 μl 를 각 well에 첨가하고 5분 후 1N H₂SO₄ 용액 50 μl 를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정함으로써 대조군과 약물 처리군 간의 뮤신을 정량, 비교하였다^{27,28)}.

4) NCI-H292 세포 배양 및 약물 처리

24시간의 약물 처리 기간 동안 약물이 인간 기도 상피세포인 NCI-H292 세포 내에 존재하는 MUC5AC 뮤신의 생성 및 유전자 (mRNA) 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 NCI-H292 세포를 다음과 같은 방법으로 배양하였다. 세포는 습도가 충분히 유지되며 95%의 공기, 5%의 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 배양액

(이하 배양액)에서 배양되었으며, 1주에 2회의 빈도로 subculture하였다.

뮤신 생성량 검증을 위해서 24 well culture plate를 기준으로 well당 2.0×10⁴ cells/well의 밀도로 세포를 도포하고, 뮤신 유전자 발현 정도의 검증을 위해서 6 well culture plate를 기준으로 well당 5.0×10⁴ cells/well의 밀도로 세포를 도포하고 배양하였다.

세포가 다 자라면 FBS의 농도를 0.2%로 감소시킨 배양액을 주고 24시간 동안 배양한 후 serum을 첨가하지 않은 배양액 (serum-free medium)으로 세포를 세척하였다. 이렇게 준비된 세포에 약물 추출물 각각 5, 10, 20 μl 씩을 함유하는 배양액 200 μl 를 24 well plate를 기준으로 well마다 가하고, 30분이 지난 시점에 PMA 10 ng/ml 또는 EGF 25 ng/ml 또는 TNF- α 0.2 nM을 각 well마다 투여한 후 37 °C에서 24시간 동안 배양하였다.

5) NCI-H292 세포에서 MUC5AC 뮤신 생성량 측정 (ELISA)

24시간의 배양이 종료된 시점에 세포 용해용 완충액 (20 mM 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 μl 씩 분포시킨 후 42 °C에서 완전히 건조될 때까지 incubation하였다. 그 후 PBS-T (0.05%) 용액 200 μl /well을 이용하여 각 well당 3회씩 세척하였다. 세척 후 PBS-T에 용해된 2% BSA 용액 200 μl 를 각 well에 첨가하고 다시 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후 PBS-T 200 μl 로 3회 세척하고, MUC5AC에 대한 monoclonal antibody인 mouse anti-MUC5AC clone 45M1을 2% BSA에 1 : 200의 비율로 희석한 후에 각 well에 100 μl 씩 첨가하고 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후 PBS-T로 3회 세척하고, 2차 항체인 HRP-goat anti-mouse IgG conjugate를 2% BSA에 1 : 3,000의 비율로 희석한 후 각 well에 100 μl 씩 첨가하고 1시간 동안 incubation하였다. PBS-T로 다시 3회 세척 후 TMB 용액 100 μl 를 각 well에 첨가하고, 5분 후 1N H₂SO₄ 50 μl 를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정함으로써 대조군과 약물 처리군 간의 MUC5AC를 정량, 비

교하였다^{27,28)}.

6) NCI-H292 세포 내에 존재하는 total RNA의 분리
24시간 동안 약물 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 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 chloroform을 첨가하여 15초간 vortexing하고, 상온에 2~3분간 방치한 후 4 °C, 13,000 rpm (Hanil centrifuge, MICRO 17 R)에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액 400 μl를 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 DEPC가 함유된 75% ethanol을 가하고 4 °C, 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리함으로써 세척하였다.

수거된 RNA 침전물을 5분간 대기 중에서 건조시킨 후 20 μl의 RNase-free water로 부유시키고, spectrophotometer (Beckman, DU-650)를 사용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도를 측정 후 실험에 사용하였다²⁹⁾ (1.0A₂₆₀=single strand RNA 40 μg/ml).

7) 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction : PCR)을 위한 primer 제조

PCR에 사용된 primer는 전문 제조회사인 Genotec (주) (Daejeon, Korea)에 주문하여 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 크

기는 500 bp였다.

8) RNA 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

수거된 total RNA를 이용하여 역전사 반응 (Reverse Transcription : RT)으로 cDNA를 만들고 이를 PCR로 증폭시켰다. 즉, 얻어진 total RNA 1 μg을 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 μl를 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.

9) 전기영동에 의한 중합효소 연쇄반응 산물의 확인

RNA의 RT-PCR로 증폭된 cDNA 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC5AC 유전자 발현의 변동 여부를 관찰하였다. 즉, 증폭된 PCR 산물 10 μl를 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 μg/ml의 ethidium bromide가 포함된 1.0% agarose gel에서 전기영동하였다. Gel 상에서 이동된 각각의 DNA band는 자외선 투사기 (ultraviolet transilluminator)를 이용하여 관찰하고 사진 촬영하였다.

10) 기도 점액 과다분비 흰쥐 모델의 제작 (in vivo SO₂ 유발 모델)

두께 2 cm의 아크릴 수지판을 재료로 하여 가로 200 cm, 세로 60 cm, 높이 30 cm의 직육면체 상자를 제작하였다. 가로면의 일부에 실험동물이 출입할 수 있도록 출입문을 만들고, 가로면과 수직으로 접하고 있는 좌우 양면의 중앙부에 구멍을 만든 후 그에 맞는 nipple과 polyethylene duct를 장착하였다. 한쪽 duct는 이산화황이 발생하는 초음파 가습기의 분무구에 연결시키고, 반대쪽 duct는 배기 장치에 연결하였다.

이산화황 노출방법은 Pon 등³⁰⁾이 보고한 방법을 개량하여 사용하였다. 15% (V/V) Sodium metabisulfite (MBS) 수용액을 초음파 가습기에 주입하고 가습기를

작동시켰다. 작동 후 3분 이내에 MBS의 증기가 충분하였고, 작동 종료 시까지 실험장치 내부의 이산화황 농도는 150 ppm으로 유지되었다.

동물을 대조군, 이산화황 3주 흡입군, 이산화황 1주 처리 후 최종 2주간 이산화황 처리 및 약물 동시 투여군으로 무작위 배정하고, 각 군당 동물 수는 5마리 이상으로 하였다. 노출 기간은 1일 3시간, 1주일에 5일, 3주간이었다. 대조군은 실험장치가 설치된 동일한 실내에 전 실험기간 동안 1일 3시간의 이산화황 노출 및 약물 처리 조작만을 제외하고 이산화황 노출군과 동일한 조건하에 사육되었다²⁶⁾.

11) 기도 점액 과다분비 흰쥐 모델에 약물의 경구투여 (*in vivo*)

체중 70 kg인 성인에게 복용시키는 약물의 용량을 기준으로 체중 350 g인 흰쥐에게 투여할 용량을 환산하여, 이산화황 1주 처리 후 최종 2주간 이산화황 처리 및 약물 동시 투여군에 배당된 실험동물을 대상으로 약물 추출물 2 ml를 경구투여용 needle을 이용하여 투여하였다. 즉, 총 3주간의 이산화황 노출 기간 중 마지막 2주간(총 10일) 매일 반복적으로 약물을 투여하였는데 약물 투여는 오전 10시에서 11시 사이에, 이산화황 노출은 오후 1시에서 4시까지 각각 실시하였다.

12) 약물이 흰쥐의 기도 배상세포 내 점액 함유량에 미치는 영향 측정 (*in vivo*)

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 절개하여 분리하고, 냉각된 10% formalin in PBS(pH 7.2)에 넣어 24시간동안 고정하였다.

고정한 조직을 파라핀으로 포매하고, microtome을 이용하여 5 µm 두께로 잘라 조직절편을 제작하였다. 탈파라핀 과정을 거치고 alcian blue 염색을 실시한 후 광학 현미경 하에서 관찰하고 200배 배율에서 사진 촬영하였다. 대조군, 이산화황 처리군, 약물 처리군의 기관내강 배상세포의 증식 여부 및 배상세포 내 점액 함유량을 비교함으로써 약물이 배상세포 내 점액함유 상태에 미치는 영향을 판별하였다^{31,32)}.

13) 일차배양 RTSE 세포의 세포질로부터 유리된 젖산 탈수소 효소 (LDH) 활성 측정

뮤신 분비량 측정 과정에서 수거된 T sample을 원심 분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 50 µl의 상등액을 LDH 활성 측정에 사용하였다. LDH 활성 측정은 commercial kit (Cytotox-96, Promega사, Madison, WI, U.S.A.)를 사용하였으며 제조사의 설명에 따라 측정을 진행하였다.

14) 약물이 NCI-H292 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향 측정

96 well plate의 각 well에 2×10⁴개의 NCI-H292 cell을 함유하는 배양액 100 µl를 가하여 37 °C, 5% CO₂ 존재 하에서 24시간 배양하였다^{33,34)}. 24시간 배양 후 약물 추출물을 각 0.2, 2 µl/200 µl 배양액의 농도로 100 µl씩 배양세포의 well마다 가하고, 72시간 동안 추가로 배양하였다. 배양이 완료된 후 냉각된 50% TCA 50 µl를 각 well에 서서히 가해 주었다. 10분 후 4 °C 조건의 냉장고에 옮겨 1시간 동안 충분히 세포들을 고정시키고, 고정이 완료된 후 각 well에 존재하는 액체 성분들을 전량 흡인 배출한 후에 well당 250 µl의 증류수를 이용하여 5회 이상 세척하였다.

이렇게 준비된 세포에 acetic acid에 용해된 0.4% SRB 용액 50 µl/well을 가하고 실온에서 30분 동안 염색하였고, 다시 흡인 배출 후 100 µl의 1% acetic acid를 이용하여 5회 이상 세척한 후 세포들을 건조시켰다. 각 well당 100 µl의 10 mM unbuffered Tris 용액으로 SRB를 잘 녹여낸 후 흡광분석 측정장치 (microplate reader)로 540 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다³⁴⁾.

15) 약물의 경구투여가 흰쥐의 간기능에 미치는 영향 측정 (*in vivo* 간독성 측정)

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

먼저 혈청 중의 GOT (Glutamate Oxaloacetate Transaminase)는 L-asparatate와 α-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 340 nm에서 NADH의 감소 속도를 측정함으로써 계산하였다.

혈청 중 GPT (Glutamate Pyruvate Transaminase)는 L-alanine과 α-ketoglutarate를 pyruvate와 L-glutamate로 변환시키며, 이때 생성된 pyruvate는 NADH의 존재 하에 LDH의 작용으로 lactate로 전환된다. GPT의 활성값은 340 nm에서 NADH의 감소 속도를 측정하여 계산하였다.

16) 약물의 경구투여가 흰쥐의 신장기능에 미치는 영향 측정 (*in vivo* 신장독성 측정)

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

혈청 중의 요소는 urease에 의해 특이적으로 분해되어 암모니아와 이산화탄소를 생성하며, 생성된 암모니아는 2-oxoglutarate와 먼저 반응하고 GLDH의 존재하에 NADH와 반응하여 glutamate와 NAD를 생성하고, 이 반응에서 감소하는 NADH의 감소 속도를 측정함으로써 혈청 중의 BUN 농도를 측정하였다.

혈청 중의 creatinine은 pH가 알칼리성인 조건에서 picric acid와 반응하여 적색의 화합물을 생성하며, 이때 생성되는 적색 화합물의 증가 속도를 측정하여 creatinine의 농도를 측정하였다.

3. 통계처리

모든 측정 결과는 Mean ± S.E.M.으로 환산된 후 약

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

III. Results

1. 일차배양 RTSE 세포로부터의 뮤신분비에 미치는 영향

必用方甘桔湯은 최종 추출물 5, 10, 20 μl / 200 μl PBS의 농도에서 뮤신분비에 유의한 영향을 나타내지 못하였다 (Fig. 1).

2. NCI-H292 세포에서 PMA로 유발된 MUC5AC 뮤신 생성 증가현상에 미치는 영향

必用方甘桔湯은 최종 추출물 10, 20 μl / 200 μl 배양액의 농도에서 PMA로 유발된 뮤신생성 증가를 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 2).

3. NCI-H292 세포에서 EGF로 유발된 MUC5AC 뮤신생성 증가현상에 미치는 영향

必用方甘桔湯은 최종 추출물 10, 20 μl / 200 μl 배양액의 농도에서 EGF로 유발된 뮤신생성 증가를 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 3).

4. NCI-H292 세포에서 TNF- α 로 유발된 MUC5AC 뮤신생성 증가현상에 미치는 영향

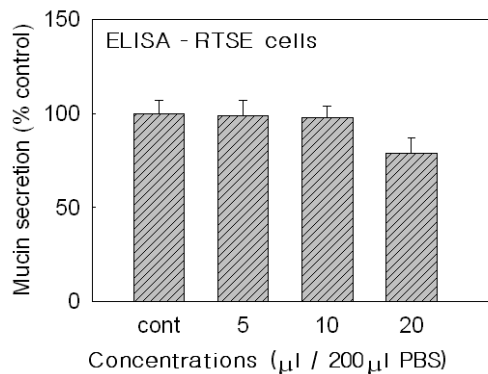


Fig. 1. Effect of PGGT on mucin secretion from cultured RTSE cells

Confluent RTSE cells were chased for 30 min in the presence of varying concentrations of PGGT extract. The amount of mucin in the spent media was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described in Materials and Methods. Each bar represents a mean ± S.E.M. from 4 culture wells.

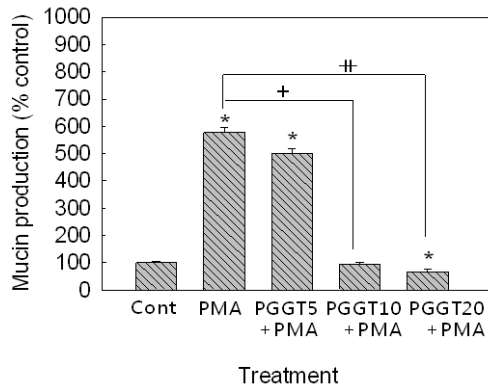


Fig. 2. Effect of PGGT on PMA-induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were pretreated with PGGT extract 5, 10, 20 $\mu\text{l}/200\ \mu\text{l}$ media for 30 min and then stimulated with PMA (10 ng/ml) for following 24 hrs. 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).

†† ; significantly different from PMA only (p<0.01).

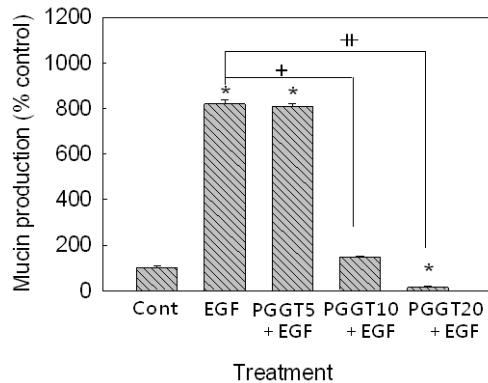


Fig. 3. Effect of PGGT on EGF-induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were pretreated with PGGT extract 5, 10, 20 $\mu\text{l}/200\ \mu\text{l}$ media for 30 min and then stimulated with EGF (25 ng/ml) for following 24 hrs. 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).

†† ; significantly different from EGF only (p<0.01).

必用方柑桔湯은 최종 추출물 10, 20 $\mu\text{l}/200\ \mu\text{l}$ 배양액의 농도에서 TNF- α 로 유발된 뮤신생성 증가를 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 4).

액의 농도에서 24시간의 처리 기간 동안 PMA로 유발된 MUC5AC mRNA의 발현 증가를 억제시키는 경향을 나타냈다 (Fig. 5).

5. NCI-H292 세포에서 PMA로 유발된 MUC5AC 유전자 발현 증가에 미치는 영향

RT-PCR로 증폭된 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC5AC 유전자 발현의 변동 여부를 관찰한 결과, 必用方柑桔湯은 최종 추출물 20 $\mu\text{l}/200\ \mu\text{l}$ 배양

6. NCI-H292 세포에서 EGF로 유발된 MUC5AC 유전자 발현 증가에 미치는 영향

RT-PCR로 증폭된 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC5AC 유전자 발현의 변동 여부를 관찰한 결과, 必用方柑桔湯은 최종 추출물 20 $\mu\text{l}/200\ \mu\text{l}$ 배양

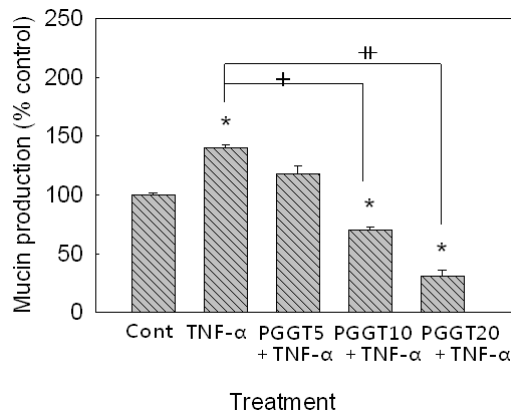


Fig. 4. Effect of PGGT on TNF- α -induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were pretreated with PGGT extract 5, 10, 20 μ l/200 μ l media for 30 min and then stimulated with TNF- α (0.2 nM) for following 24 hrs. 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- α only (p<0.05).
 † ; significantly different from TNF- α only (p<0.01).

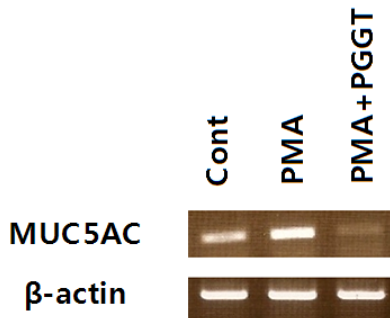


Fig. 5. Effect of PGGT on PMA-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were incubated with the indicated concentration of PGGT 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.

액의 농도에서 24시간의 처리 기간 동안 EGF로 유발된 MUC5AC mRNA의 발현 증가를 억제시키는 경향을 나타냈다 (Fig. 6).

7. NCI-H292 세포에서 TNF- α 로 유발된 MUC5AC 유전자 발현 증가에 미치는 영향

RT-PCR로 증폭된 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC5AC 유전자 발현의 변동 여부를 관찰한 결과, 必用方甘桔湯은 최종 추출물 20 μ l / 200 μ l 배양액의 농도에서 24시간의 처리 기간 동안 TNF- α 로 유

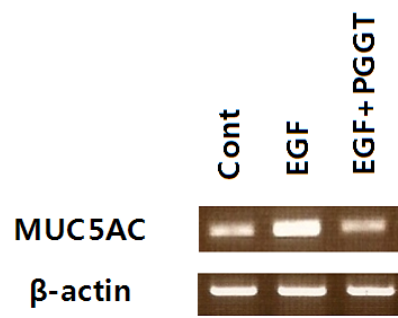


Fig. 6. Effect of PGGT on EGF-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were incubated with the indicated concentration of PGGT 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.

발된 MUC5AC mRNA의 발현 증가를 억제시키는 경향을 나타냈다 (Fig. 7).

8. 이산화황으로 유발된 기도상피 배상세포 내의 점액 함량 증가에 미치는 영향 (in vivo)

기관내강 상피세포층에 alcian blue 염색을 실시한 후 광학 현미경 하에서 관찰한 결과, 이산화황에 1주간 노출된 후 2주간 이산화황 흡입과 약물이 동시에 투여된 군은 뮤신이 배상세포 내에 존재하지 않고 상피세포 표면에만 존재하는 것으로 관찰되었으며, 따라서

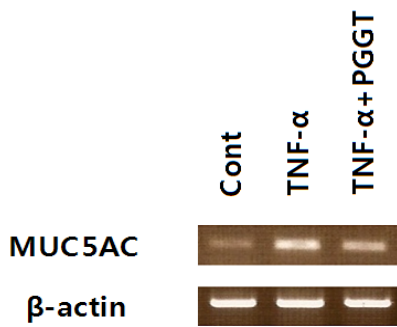


Fig. 7. Effect of PGGT on TNF- α -induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were incubated with the indicated concentration of PGGT 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.

必用方柑桔湯은 이산화황으로 유발된 기도상피 배상 세포 내의 점액 함유량 증가 및 배상세포 과다증식을 억제시켰으며, 이미 생성된 점액에 대해서는 분비 촉진 작용을 나타내는 경향을 보여주었다 (Fig. 8).

9. 일차배양 RTSE 세포로부터의 LDH 분비에 미치는 영향

必用方柑桔湯은 최종 추출물 10, 20 μl / 200 μl PBS의 농도에서 LDH 분비를 유의하게 증가시켰으므로 배양세포에 대해 독성을 나타낼 가능성을 보여주었다 (Fig. 9).

10. NCI-H292 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향

必用方柑桔湯은 최종 추출물 0.2, 2.0 μl / 200 μl PBS의 농도에서 72시간 동안 처리된 NCI-H292 세포의 생존 및 증식에 유의한 영향을 나타내지 않았다 (Fig. 10).

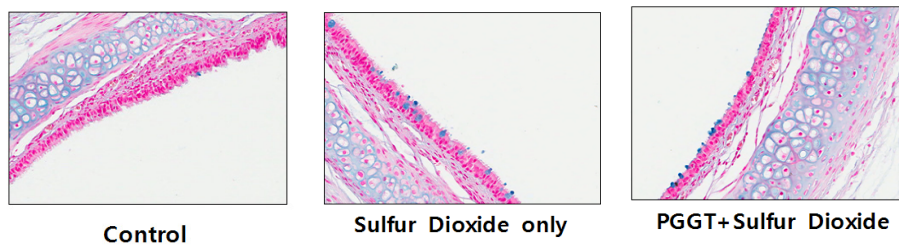


Fig. 8. Effect of PGGT on intraepithelial mucosubstances and hyperplasia of goblet cells in trachea of rats exposed to sulfur dioxide

Rats were exposed to sulfur dioxide and effect of orally-administered PGGT extract on intraepithelial mucosubstances and hyperplasia of goblet cells were investigated as described in Materials and Methods (zoom ; 200 \times) (Hematoxylin-eosin staining and Alcian Blue (pH 2.5) staining.) (Blue ; Mucin, Pinkish red ; Nuclei, Pale pink ; Cytoplasm)

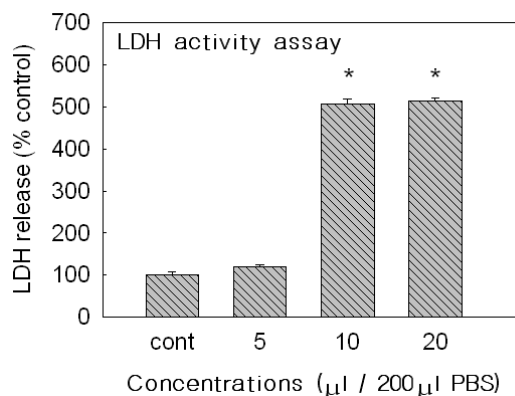


Fig. 9. Effect of PGGT on LDH release from cultured RTSE cells

Confluent RTSE cells were treated with varying concentrations of PGGT 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.

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

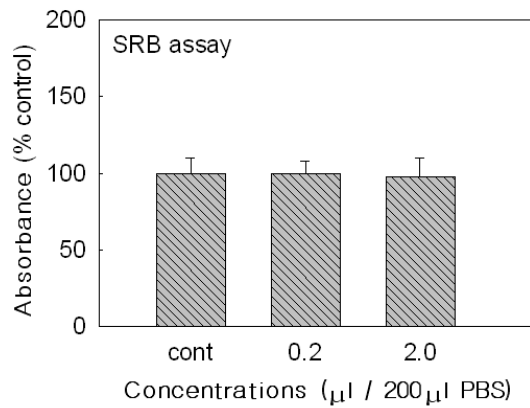


Fig. 10. Effect of PGGT on survival and proliferation of NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were treated with 0.2, 2.0 µl PGGT extract /200 µl media for 72 hrs. The number of cells survived was counted as described in Materials and Methods.

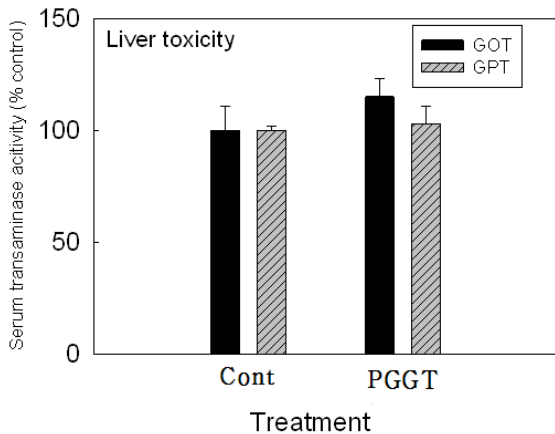


Fig. 11. Effect of PGGT on serum GOT and GPT activities of rat

PGGT extract (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.

11. 경구투여가 흰쥐의 간기능에 미치는 영향 (*in vivo* 간독성)

매일 2 ml의 必用方甘桔湯을 2주간 경구투여 한 후 혈청 중 GOT, GPT의 활성을 측정된 결과, 대조군과 약물 투여군 간의 유의한 차이는 보이지 않았다. 이로써 必用方甘桔湯이 실험동물에서 간독성을 유발하지 않음을 보여주었다 (Fig. 11).

12. 경구투여가 흰쥐의 신장기능에 미치는 영향 (*in vivo* 신장 독성)

매일 2 ml의 必用方甘桔湯을 2주간 경구투여 한 후 혈청 중 BUN, creatinine의 농도를 측정된 결과, 대조군

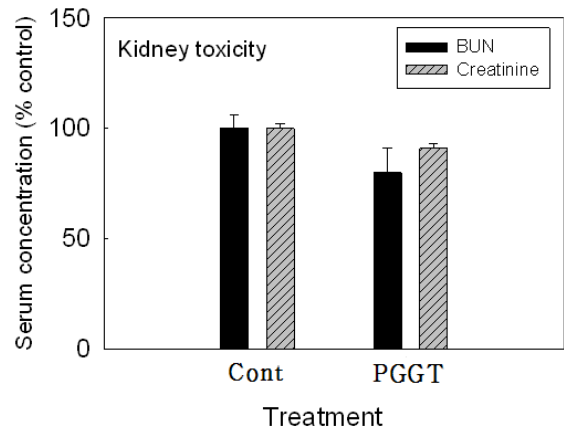


Fig. 12. Effect of PGGT on serum BUN and creatinine concentrations of rat

PGGT extract (2 ml/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.

과 약물 투여군 간의 유의한 차이는 보이지 않았다. 이로써 必用方甘桔湯이 실험동물에서 신장독성도 유발하지 않음을 보여주었다 (Fig. 12).

IV. Discussion

소아는 각 기관의 발육이 不全하고 脆弱하며 형체와 기능이 완전하지 못하고 臟腑機能과 衛外機能의 취약한 특징으로 인해 병리적으로 질병의 이환과 전변이 쉽다³⁵⁾. 특히 호흡기 질환은 소아에서 흔히 발생하

는 질환으로 6개월 이후부터 6세 사이의 소아에게 빈번하게 발생하며 2~3세의 유아에서 가장 많이 볼 수 있고 주로 겨울과 봄의 기후 변화가 심할 때 반복적으로 감염되어 잘 낫지 않거나 증상이 악화되는 경향을 보인다³⁶⁾.

소아의 호흡기는 아직 성장하고 있는 미숙한 기관으로 면역력이 완전히 성숙되지 않은 상태이기 때문에 쉽게 감염이 되며, 기도 내경이 좁아 기관지 감염과 이물, 객담만으로도 기도 폐쇄가 자주 발생하고 심한 호흡곤란이 유발되기도 한다¹⁾. 호흡기의 방어 체계는 면역계와 점막으로 구성되는데, 소아는 면역계의 발달이 미숙하므로 1차 방어선의 역할을 담당하는 점막의 기능이 중요하며, 성인에 비해 기도 점액선이 높은 밀도로 분포되어 있어 감염이 발생하면 다량의 점액이 분비된다³⁷⁾.

기도 점액은 점막하 점액선으로부터 분비되는 뮤신, 액체성분, 폐포의 표면 및 주위로부터 유래된 용질과 상피 배상세포의 분비물로 구성되어 있는 물질로, 점액의 방어 기능은 점액성 당단백질인 뮤신의 점탄성에 기인하여 이루어진다. 정상 생리 상태에서 뮤신은 적절한 점도가 유지되어 섬모세포의 운반작용에 의한 기도 및 폐내 이물질 제거, 폐의 순환작용 등의 기능을 담당하며⁴⁾, 건강인의 경우 보통 하루 10~20 ml의 점액 분비가 정상적으로 일어나게 된다³⁸⁾.

뮤신의 양 혹은 질의 이상으로 기도 점액의 점도 변화 및 과다분비가 유발되어 100 ml 이상의 점액 분비가 일어나면 점액전을 형성하게 되고, 이는 오히려 기도 분비물의 배출을 방해하여 인체 방어 작용에 영향을 주며, 병리 현상을 유발하게 된다³⁹⁾. 따라서 기도 점액의 과다분비 혹은 점도의 변화로 고통을 겪게 되는 만성 기관지염, 기관지 천식, 기관지 확장증, 낭포성 섬유증과 같은 호흡기 질환 환자에서 기도 점액 분비의 조절은 질환으로 인한 고통의 경감 및 질환의 치료 측면에서 중요하다⁴⁾.

현재까지 호흡기 질환에서 점액 분비 및 조절 이상의 치료는 점액성 분비물의 점도를 낮추는 점액용해제나 분비물의 배출을 더욱 자극하는 거담제를 사용해왔으나 점액의 점도 감소가 지나칠 경우 오히려 점액이 원위 기관지로 들어가 기관지 폐쇄가 악화될 위험이 있으며¹⁰⁾, 거담제의 경우 성분에 따라 장기 사용시 중독을 일으키거나 유아에게 사용시 후두경련 및 중추성 흥분 등의 부작용을 유발할 수 있다⁴⁾. 최근 점액 생성 및 유리 자체를 억제하는 약물에 대한 연구가 진행되

면서 glucocorticoid나 poly-L-lysine, poly-L-arginine 등의 폴리양이온성 펩티드가 기도 뮤신 분비를 억제하는 물질로서 보고되었으나 이러한 약물들은 다양한 약리 작용과 이에 수반되는 광범위한 부작용이 치료 약물로서의 효용성을 제한하고 있는 실정이다^{26,39)}.

한의학에서 객담은 痰飲의 범주에 속하며, 체내의 과다한 수분이 어느 한 부분에 정취되어 형성된 병리 산물로 질병의 원인이 될 뿐만 아니라 질병의 결과로도 발생된다. 痰飲은 체내 진액대사 과정에서 肺의 通調水道作用, 脾의 運輸水穀精微作用, 腎의 蒸化水液 및 分清泌濁作用의 失調로 津液의 정상적인 分布와 排泄에 이상이 유발되어 생성되며⁴⁰⁾, 《東醫寶鑑》에서는 “有風痰, 寒痰, 濕痰, 熱痰, 鬱痰, 氣痰, 食痰, 酒痰, 驚痰. 痰之源不一”이라 하여 痰을 원인에 따라 분류하였고, 이 중 호흡기 객담은 寒痰, 濕痰, 熱痰, 燥痰, 鬱痰, 氣痰 등과 비교적 밀접한 관련이 있다¹³⁾. 痰飲의 치료는 “實脾土, 燥脾濕, 是治其本”, “治痰順氣爲先, 分導次之”라 하여¹³⁾ 實脾土 燥脾濕을 기본으로 清熱化痰, 除濕化痰, 溫肺化痰하는 治法이 사용되었으며 半夏, 桔梗, 生薑, 茯苓 등의 약제가 주로 활용되었다⁴¹⁾.

必用方 甘桔湯은 甘桔湯에 祛風시키는 荊芥, 防風, 清熱시키는 薄荷, 黃芩, 玄參을 加하여 清熱化痰, 解毒消炎, 發散風熱 등의 효능을 증가시킨 처방으로⁴²⁾, 《東醫寶鑑》¹³⁾에 “治風熱咽喉腫痛, 或喉痺神效”, 《方藥合編》¹⁴⁾에 “治風熱咽喉腫痛”이라 기록되어 風熱로 인한 咽喉腫痛, 咽下장애, 喉痺症 등을 치료하는데 사용되어 왔다¹⁵⁾.

必用方 甘桔湯의 구성약물을 살펴보면, 桔梗은 肺氣를 開泄하고 祛痰시키는 효능이 있어 肺中の 痰濁膿血을 체외로 배출시키며, 甘草는 潤肺止咳하고 기도 점막을 자극하지 않으면서 祛痰하는 효능이 있다. 荊芥는 發散風寒, 疏散風熱하여 風寒이나 風熱을 막론하고 모두 응용할 수 있고 성질이 輕揚疏散하므로 血分の 風熱이 상부에 鬱遏하여 발생하는 병증에 사용하며, 防風은 祛風을 善行하고 風邪를 祛하므로 治風에 통용하고, 薄荷는 上焦의 風熱을 疏散시키며 清利咽喉하고 肺氣를 소통시키는 효능이 있다. 黃芩은 清熱燥濕하고 肺經의 熱을 瀉하는데 효과가 우수하여 邪熱이 肺를 犯하여 나타나는 증상에 사용하고, 玄參은 滋陰清熱, 瀉火解毒의 효능이 있고 혈관을 확장하여 국소의 혈액순환을 촉진시켜 염증을 제거하는 작용이 있다^{43,44)}.

이상의 약효를 종합해보면 必用方 甘桔湯은 祛痰排

膿, 解毒消炎, 滋陰清熱, 潤肺止咳, 發散風寒, 發散風熱 하는 약물들이 배합되어 소아의 咳嗽痰多, 胸滿, 呼吸困難, 咽喉腫痛 등의 증상을 유발하는 기관지염, 폐렴, 천식, 인후염, 편도선염 등의 호흡기 질환에 응용할 수 있음을 알 수 있다⁴⁴⁾.

이에 저자는 必用方甘桔湯이 객담을 동반하는 호흡기 질환에서 뮤신 분비에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, RTSE 세포에서의 뮤신분비, NCI-H292 세포에서의 MUC5AC 생성과 MUC5AC mRNA 발현 및 기도 점액 과다분비 흰쥐 모델에서의 상피 배상세포 내 점액 함유량에 대한 必用方甘桔湯의 약리학적 작용을 연구하였다.

必用方甘桔湯이 기도 뮤신분비에 미치는 영향을 알아보기 위하여 일차배양된 RTSE 세포에 약물을 처리하고, 30분간의 약물 처리 기간 동안 세포로부터 분비되는 뮤신의 양을 효소연계 면역흡착정량법 (ELISA)을 사용하여 측정하였다.

실험결과는 必用方甘桔湯의 농도 증가에 따라 뮤신 분비가 감소되는 경향을 보였으나 통계적으로 유의성 있는 차이를 나타내지는 못하였는데 (Fig. 1), 이는 단기간 (30분)의 투여가 배양된 RTSE 세포에서의 뮤신 분비에 큰 영향을 미치지 못하였음을 의미하는 것이라 생각된다.

必用方甘桔湯이 기도 뮤신의 분비, 생성뿐만 아니라 뮤신 유전자의 발현에도 영향을 미치는지 알아보기 위해, 인체 기도 뮤신의 거동과 관련된 연구모델로 자주 사용되는 인간 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포를 이용하여⁴⁵⁾ 연구를 진행하였다. NCI-H292 세포에 PMA, EGF, TNF- α 로 각각 기도 뮤신의 생성을 자극한 상태에서 24시간의 약물 처리 기간 동안 MUC5AC 뮤신의 생성 정도를 측정하였고, 동일한 조건으로 뮤신 유전자 발현을 자극한 상태에서 24시간의 약물 처리 기간 동안 MUC5AC mRNA의 발현 정도를 관찰하였다.

PMA는 calcium dependent protein kinase (PKC)를 활성화시켜 mouse 피부에서의 강력한 발암 촉진 활성, 배양된 간세포에서 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현 촉진 활성 등을 나타내는 것으로 알려져 있는 물질로^{46,47)}, 기도 뮤신과 관련하여서는 인간 기도 상피세포에서 뮤신 유전자의 발현 및 뮤신의 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있다^{33,48)}.

EGF와 TNF- α 는 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 기관지 확장증, 낭성 섬유화증, 미만성 범세기관지염 등의 기도 점액 과다분비 질환에서 증가되어 있는 것으로 알

려져 있으며⁴⁹⁾, EGF는 EGFR (epidermal growth factor receptor)-MEK-ERK pathway를 경유하고, TNF- α 는 TNFR (tumor necrosis factor receptor)을 매개로 하여, 신호 전달 체계를 거쳐서 전사인자인 NF- κ B (nuclear factor-kappa B)를 활성화시켜 MUC5AC mRNA의 발현을 촉진시키는 것으로 보고되어 있다^{27,28,50-52)}.

실험결과에서 必用方甘桔湯은 PMA, EGF, TNF- α 로 각각 자극된 NCI-H292 세포에서의 MUC5AC 뮤신 생성을 유의하게 감소시켰을 뿐만 아니라 (Fig. 2, 3, 4) MUC5AC mRNA의 발현도 억제시키는 경향을 나타냈다 (Fig. 5, 6, 7). 이러한 결과는 必用方甘桔湯의 항염증 및 祛痰 효능이 MUC5AC 뮤신의 유전자 수준이나 최종 당단백질의 합성과정에서부터 유전자 발현 및 뮤신의 생성을 억제하는 방향으로 작용하였기 때문인 것으로 생각된다.

실험동물을 대상으로 한 in vivo 실험에서 必用方甘桔湯이 기도 점액의 과다분비 상태에 미치는 영향을 알아보기 위해, 이산화황 흡입으로 유발된 기도 점액 과다분비 흰쥐 모델을 이용하여 연구를 시행하였다.

기도 점액 과다분비 흰쥐 모델의 상피 배상세포 내 점액 함유량을 조직병리화학적 방법으로 확인한 결과, 대조군과 이산화황에 3주간 노출된 군에 비하여 이산화황에 1주간 노출된 후 2주간 이산화황 흡입과 必用方甘桔湯이 동시에 투여된 군에서 기도 배상세포 내 점액 함유량이 감소되는 경향을 나타냈으나, 섬모 상피세포층 표면에는 점액이 다량 존재하는 것으로 나타났다 (Fig. 8). 이러한 결과는 必用方甘桔湯이 점액의 생성을 억제할 뿐만 아니라 이미 생성된 점액에 대해서는 분비를 촉진시키는 방향으로 작용한다는 것을 보여주는 것이며, 이는 길경 등에 의한 거담 작용의 발현으로⁴⁴⁾ 인한 것이라 생각된다.

必用方甘桔湯이 RTSE 세포, NCI-H292 세포 및 점액 과다분비 흰쥐 모델에 대해 독성을 나타낼 가능성은 없는지 검증하기 위하여 각각을 대상으로 연구를 시행하였다. 배양된 RTSE 세포에서는 특정물질에 의해 세포막이 손상되면 세포질 내부에 존재하는 LDH가 세포질 외부로 유출되는 현상을 이용한 독성 측정법을 사용하였는데^{53,54)}, 실험결과는 10, 20 μ l / 200 μ l PBS의 투여 농도에서 LDH 유리를 증가시키므로써 세포 독성을 발현할 수 있는 가능성을 보여주었다 (Fig. 9).

그러나 NCI-H292 세포에서는 세포의 생존 및 증식에 미치는 특정약물의 작용을 평가하는 독성 시험 방법인 SRB assay를 시행하여, NCI-H292 세포에 72시간

동안 약물을 처리한 후 독성을 관찰한 결과, 必用方甘桔湯은 세포의 생존 및 증식에 유의한 영향을 나타내지 않았으며 (Fig. 10), 기도 점액 과다분비 흰쥐 모델을 대상으로 2주간 약물을 투여 받은 흰쥐의 간기능 및 신기능을 검사한 *in vivo* 독성 시험에서도 必用方甘桔湯은 독성을 발현하지 않음을 알 수 있다 (Fig. 11, 12). 이는 한약을 대상으로 한 독성연구에서 특정 한약이 *in vitro*에서는 세포손상을 일으키지만 *in vivo*에서는 전혀 독성이 유발되지 않을 수도 있다는 점을 시사하는 연구결과라 생각된다.

이상의 결과들을 종합해보면, 必用方甘桔湯은 기도 뮤신의 생성을 감소시키고 이미 생성된 점액에 대해서는 분비를 촉진시키는 작용을 나타내며, 상기 결과는 必用方甘桔湯이 대표적으로 사용되어 왔던 風熱로 인한 咽喉腫痛, 喉痺症 등의 범주를 포함하여 기도 객담 과다분비 상태를 동반하는 호흡기 제질환을 대상으로도 활용될 수 있는 가능성을 제시하는 과학적인 기초자료라 생각된다. 향후 천식, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증 등 다양한 호흡기 질환의 병태생리학적 특성을 반영할 수 있는 연구 모델을 이용하여 必用方甘桔湯의 효능에 관한 추가적인 연구가 지속적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

V. Conclusion

必用方甘桔湯이 기도 점액의 과다분비 및 기도 뮤신의 생성, 분비, 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 일차배양된 RTSE 세포와 NCI-H292 세포에서의 뮤신분비, MUC5AC 생성 및 MUC5AC mRNA의 발현을 관찰하고, 기도 점액 과다분비 흰쥐 모델에서 상피 배상세포 내의 점액 함유량을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 배양된 RTSE 세포에 대한 약물의 단기간 처리에서, 必用方甘桔湯은 뮤신의 분비에 뚜렷한 영향을 나타내지 못하였다.
2. 배양된 NCI-H292 세포를 대상으로 기도 뮤신의 생성 혹은 유전자 발현을 유발시킬 수 있는 병리적 조건에서, 必用方甘桔湯은 10, 20 μl / 200 μl 배양액의 농도에서 뮤신 생성에 유의한 억제 효과를 나타냈으며, 20 μl / 200 μl 배양액의 농도에서 유전자 발현 증가에 억제 효과를 발휘하였다.

3. 이산화황으로 유발된 기도 점액 과다분비 흰쥐 모델에 약물을 투여한 결과, 必用方甘桔湯은 기도 배상세포 내 점액 함유량을 감소시켰으며, 이미 생성된 점액의 분비는 촉진함으로써 거담작용을 발현하였다.
4. 배양된 RTSE 세포, NCI-H292세포 및 점액 과다분비 흰쥐 모델에 대한 必用方甘桔湯의 독성 발현 가능성을 검증한 결과, 배양된 RTSE 세포에 독성을 발현하였으나 NCI-H292세포에는 독성을 발현하지 않았고, 점액 과다분비 흰쥐 모델의 간 및 신장에서도 독성을 발현하지 않았다.

이상의 연구결과들은 必用方甘桔湯이 기도 객담 과다분비를 동반하는 질환에서 기도 뮤신의 생성을 감소시키고 이미 생성된 점액의 분비는 촉진하여 거담작용을 발휘함으로써 증상을 개선시킬 가능성을 제시하고 있다.

References

1. Kim DG, Kim YH, Kim JH, Park EJ, Baek JH, Lee SY, Lee JY, Chang GT. Donguisoagwahak. Jeongdam. 2002:28-30,244-6.
2. Jeongukhanuigwadaehak byeongrihakgyosil. Hanbang-byeongrihak. seoul:Iljongs. 2002:69-81.
3. Jeongukhanuigwadaehak pegyenaegwahakgyosil. Dongui-pegyenaegwahak. seoul: Hanmunhwasa. 2002:102-14.
4. Lee CJ, Ko KH. Pathophysiologic characteristics of airway mucus-hypersecretory diseases and experimental models. J Appl Pharmacol. 1998;6 (1):1-8.
5. Newhouse MT, Biennenstock J. Respiratory tract defense mechanism. In: Baum GL, Wolinsky E ed.. Textbook of pulmonary disease. 4th ed.. Boston:Little, Brown and Company. 1994:2-47.
6. 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(6):345-53.
7. 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.
8. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: Current

- understanding. *J Allergy Clin Immunol.* 1990;85(2):422-36.
9. Rogers DF. Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(3):241-50.
 10. Mutschler E, Derendorf H. *Drug actions.* Boca Raton, Florida: CRC press. 1995:410-1.
 11. Rogers DF, Barnes PJ. Treatment of airway mucus hypersecretion. *Ann Med.* 2006;38(2):116-25.
 12. Rogers DF. Mucociliary dysfunction in COPD: effect of current pharmacotherapeutic options. *Pulm Pharmacol Ther.* 2005;18(1):1-8.
 13. Huhjoon. Donguibogam. Donguibogamchulpansa. 2005: 202-9, 624-5.
 14. Hwangdoyein. Bangyakhappyoen, Seoul: Namsandang. 2000:237-8.
 15. Park HK, Chae BY. Experimental studies on the anti-inflammatory, analgesic effect of Piryongbanggamgil-tang and Gamipiryongbanggamgil-tang on rats and mice. *KH Univ O Med J.* 1981;4:285-94.
 16. Min YT. Effect of gamgil-tang extract on the plasma cortisol concentration and plasma sodium concentration. *J Korean Med Soc Herb Formul Study.* 1990;1(1):173-82.
 17. Kim DH. The effect of Gamgil-tang on lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation in raw 264.7 cell and acute lung injury in rats. College of Oriental Medicine, Dongeui University. Master's thesis. 2001.
 18. Park MS, Son YJ, Lee YJ. The effect of Gamgil-tang and Gamigamgil-tang on antipyretics, anti-inflammation and discharge of phlegm. *Korean J Herbology.* 2002; 17(1):65-79.
 19. Jin HJ, Kim NJ, Choi HJ, Jung HJ, Jung SK. Anti-inflammatory effects, analgesic effects, antipyretic effects, anti-oxidative effects, and histamin permeation inhibition effects of modified Gamgil-tang per extraction method. *Korean J Orient Int Med.* 2008;29(3):554-66.
 20. Kim KC. Possible requirement of collagen gel substratum for production of mucin-like glycoproteins by primary rabbit tracheal epithelial cells in culture. *In Vitro.* 1985;21(11):617-21.
 21. Kim KC, Rearick JI, Nettesheim P, Jetten AM. Biochemical characterization of mucus glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial cells in primary culture. *J Biol Chem.* 1985;260(7):4021-7.
 22. Kim KC, Brody JS. Gel contraction causes mucin release in primary hamster tracheal epithelial cells growing on a collagen gel. *J Cell Biol.* 1987;105:158a.
 23. Wu R, Smith D. Continuous multiplication of rabbit tracheal epithelial cells in a defined, hormone-supplemented medium. *In Vitro.* 1982;18(9):800-12.
 24. Wu R, Nolan E, Turner C. Expression of tracheal differentiated function in serum-free hormone-supplemented medium. *J Cell Physiol.* 1985;125(2): 167-81.
 25. 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(4):L811-5.
 26. 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.
 27. 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.
 28. Song KS, Lee WJ, Chung KC, Koo JS, Yang EJ, Choi JY, Yoon JH. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α 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.
 29. 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.
 30. Pon DJ, Van Staden CJ, Boulet L, Roger IW. Hyperplastic effects of aerosolized sodium metabisulfite on rat airway mucus-secreting epithelial cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994;72(9):1025-30.
 31. Harkema JR, Hotchkiss JA. In vivo effect of endotoxin on intraepithelial mucosubstances in rat pulmonary airways: quantitative histochemistry. *Am J Pathol.* 1992;141(2):307-17.
 32. 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(3):556-63.
33. Kim YD, Kwon EJ, Park DW, Song SY, Yoon SK, Baek SH. Interleukin-1 β induces MUC2 and MUC5AC synthesis through cyclooxygenase-2 in NCI-H292 cells. *Mol Pharmacol.* 2002;62(5):1112-8.
34. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(13):1107-12.
35. Gang YI, Jang JM. *Silyongjonguisoagwahak.* Sanghae: Sanghaegwahakgisulchulpansa. 1996:455-61.
36. Kang MS, Jang GT, Kim JH. A study on chronic or recurrent respiratory symptoms. *J Pediatr Korean Med.* 2002;16(2):83-99.
37. Ahn HS. *Pediatrics.* Seoul: Daehangyogwaseo. 2005: 606-40.
38. Jung CH, Han JK, Kim YH. Effects of Bojungikgi-tang-gamibang and Seonbangpaedok-tang on secretion of airway mucus and expression of mucin gene. *J Pediatr Korean Med.* 2007;21(3):33-55.
39. Kim JM, Lee CJ, Park YC. Studies on the effects of selected oriental herbal medicines on inhibitory activity of airway mucus secretion. *Korean J Orient Int Med.* 2006;27(1):126-37.
40. Lee NY, Han JK, Kim YH. Effect of Gamitonggyu-tang on secretion of airway mucin and contractility of tracheal smooth muscle. *J Pediatr Korean Med.* 2007;21(3):109-24.
41. Kim HH. *Hanuihakwonron.* Seoul:Sungbosa. 2003: 352-8.
42. Yoon YG. *Donguibangjecheobanghaeseol.* Seoul: Uiseongdang. 2002:84.
43. Jeongukhanuigwadaehakbonchohakgyosu. *Bonchohak.* Seoul:younglimsa. 2000:127-8, 131-2, 142-3, 178-9, 192-3, 460-1, 540-1.
44. Lee SI, Ahn SI, Sin MH, Noh SH, Lee YJ, Kim SH. *Hanyakimsangeungyong.* Seoul:Jeontonguihakyoenguso. 1998:40-3, 52-3, 107-8, 114-6, 323-7, 472-3.
45. Kai H, Yoshitake K, Hisatsune A, Kido T, Isohama Y, Takahama K, Miyata T. Dexamethasone suppresses mucus production and MUC2 and MUC5AC gene expression by NCI-H292 cells. *Am J Physiol.* 1996; 271(3):L484-8.
46. Schmidt R, Hecker E. Autoxidation of phorbol esters under normal storage conditions. *Cancer Res.* 1975; 35(5):1375-7.
47. Saitoh T, Dobkins KR. Protein kinase C in human brain and its inhibition by calmodulin. *Brain Res.* 1986; 379(1):196-9.
48. Nam TH, Park YC. Effects of Seonbangpaedok-tang and Sigyeongcheongpye-tang on PMA-induced production of airway mucin and expression of MUC5AC. *J Korean Orient Med.* 2008;29(4):123-32.
49. Shim JJ. Signal transduction of MUC5AC expression in airway mucus hypersecretory disease. *Tuberc Respir Dis.* 2003;55(1):21-30.
50. 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(12):6812-20.
51. Kim YH, Yoon HK, Kim CH, Ahn JH, Kwon SS, Kim YK, Kim KH, Moon HS, Park SH, Song JS, Cho KS. MUC5AC gene expression induced by cigarette smoke is mediated via a pathway involving ERK1/2 and p38 MAPK. *Tuberc Respir Dis.* 2005;58(6):590-9.
52. Kim SJ, Kang CM, You MB, Yoon HK, Kim YK, Kim KH, Moon HS, Park SH, Song JS. IP-10 decreases TNF- α induced MUC5AC expression in human airway epithelial cells: a possible relation with little sputum production in idiopathic pulmonary fibrosis. *Tuberc Respir Dis.* 2008;64:347-55.
53. Yu XY, Schofield BH, Croxton T, Takahashi N, Gabrielson EW, Spannake EW. Physiologic modulation of bronchial epithelial cell barrier function by polycationic exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;11(2):188-98.
54. Freshny. Measurement of viability and cytotoxicity, In *Culture of animal cells*, 3rd ed. New York:Wiley-Liss. 1994:288.