

## 해표이진탕이 기도 뮤신의 분비, 생성 및 유전자 발현에 미치는 영향

석연희 · 민상연 · 김장현

동국대학교 한의과대학 소아과교실

### Abstract

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

Suk Yun Hee · Min Sang Yeon · Kim Jang Hyun

*Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongguk University*

### Objectives

In this study, effects of haepyoijintang (HIJ) on the increase in airway epithelial mucosubstances of rats and ATP-, PMA-, EGF- or TNF- $\alpha$ -induced MUC5AC mucin production and gene expression from human airway epithelial cells were investigated.

### Methods

Hypersecretion of airway mucus was induced by exposure of rats to SO<sub>2</sub> during 3 weeks. Effect of orally-administered HIJ during 2 weeks on increase in airway epithelial mucosubstances from tracheal goblet cells of rats was evaluated using histopathological analysis after staining the epithelial tissue with PAS-alcian blue. Possible cytotoxicity of HIJ was evaluated by examining the potential damage of kidney and liver functions by measuring serum GOT/GPT activities and serum BUN and creatinine concentrations of rats and the body weight gain during experiment, after administering HIJ orally. At the same time, the effect of HIJ on ATP-, PMA-, 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 HIJ and treated with ATP (200  $\mu$ M), PMA (10 ng/ml), EGF (25 ng/ml) or TNF- $\alpha$  (0.2 nM) for 24 hrs, to evaluate the effect of HIJ both on ATP-, PMA-, EGF- or TNF- $\alpha$ -induced MUC5AC mucin production using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and on gene expression by the same inducers using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

### Results

(1) HIJ decreased the amount of intraepithelial mucosubstances of trachea of rats. (2) HIJ did not show renal and hepatic toxicities and did not affect body weight gain of rats during experiment. (3) HIJ significantly inhibited ATP-, PMA-, EGF-, and TNF- $\alpha$ -induced MUC5AC mucin productions from NCI-H292 cells. (4) HIJ significantly inhibited ATP-, PMA-, EGF-, and TNF- $\alpha$ -induced MUC5AC mucin gene expression from NCI-H292 cells.

### Conclusions

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

**Key words** : Haepyoijin-tang (HIJ), Airway, Mucin, Gene

## I. Introduction

근래 대기오염과 급격한 기후변화 등으로 호흡기 질환의 임상적 중요도가 점차 커지고 있다. 소이는 성인에 비해 臟腑嬌嫩하고 形氣未充한 특성으로 衛外機能이 완전히 못하여 六淫의 邪氣를 받기 쉽다. 특히 肺常不足하므로 肺의 肅降機能이 장애를 받아 氣機가 불리하고 津液이 쌓이면 곧 痰을 형성하게 되며<sup>1)</sup>, 기도 내경이 좁아 폐쇄성 질환을 자주 일으키고 면역기능이 미숙한 특성으로 인해 기도질환이 발생하는 경우가 흔하다<sup>2)</sup>.

호흡기는 인체에서 외부환경과 접촉하는 중요 기관으로 온도 및 습도 변화를 비롯하여 자극 물질에 노출되어 있으므로 다양한 방어기전이 요구된다. 그 중 기도 배상세포와 기도 상피 및 점막하선의 분비물로 이루어진 호흡기 점액은 기도 벽을 덮고 섬모세포의 섬모운동과 더불어 방어 작용을 수행한다<sup>3)</sup>. 뮤신은 호흡기 점액 전체 중량의 2% 정도를 차지하는 점액성의 당단백질로 점액에 있어 중요한 물리화학적 성질인 점탄성을 부여하는 주요 생화학적 구성요소이다. 따라서 뮤신의 양과 질의 변화는 기도생리의 이상을 유발할 뿐 아니라 인체의 방어 작용에 영향을 미쳐 더 심한 병리현상을 유발한다<sup>4)</sup>.

따라서 급 만성 기관 및 기관지염, 폐렴, 천식, 기관지 확장증, 폐기종 등에서 관찰되는 호흡기 조직에서의 염증에 기인한 점액의 과생성 및 과분비는 이러한 질환군의 효율적인 치료 및 양호한 예후를 위하여 반드시 조절해 주어야 할 병리현상이다.

현재까지 다양한 기전의 약물을 사용하여 기도 점액의 분비를 조절하기 위해 노력해 왔으나 거담제나 점액 용해제 등이 과다하게 분비된 점액을 환자의 기도에서 제거하는데 효과를 나타내는데도 불구하고<sup>5)</sup> 그 부작용이나 기타 약리작용으로 인해 호흡기 질환의 치료에 적절히 응용되기에는 많은 제약이 따른다. 근래 새로운 작용기전을 가진 신약 후보 물질이 연구되고 보고되어 있으나 임상에서 널리 응용되고 있는 약물은 아직 없는 것으로 알려져 있다<sup>6-10)</sup>.

解表二陳湯은 明代에 龔廷賢의 『古今醫鑑』에 처음으로 기재되어<sup>11)</sup> 임상에서 風寒과 痰飲을 겸한 哮喘證의 치료<sup>12)</sup> 목적으로 사용되고 있는 처방으로 기존의 실험적 연구로 폐손상 모델에 대한 영향<sup>3)</sup>, Guinea Pig의 기관지 평활근에 미치는 영향<sup>4)</sup>, 또 가미방을 이용한 천식모델 cytokine에 대한 영향<sup>5)</sup>, 알레르기 천식 모

델의 호흡양상과 기관 조직에 미치는 영향에 대한 보고<sup>16)</sup>가 있었으며 뮤신의 분비나 유전자 발현 수준의 연구는 보고된 바 없었다.

따라서 본 연구에서는 解表二陳湯이 만성 기관지염, 폐렴, 천식, 폐기종, 기관지 확장증 등에서 관찰되는 호흡기 점액의 과분비 및 이와 연관된 호흡기 뮤신의 생성 및 유전자 발현에 어떠한 작용을 발현할 수 있는지를 검증해 보고자 이산화황 흡입투여로 유발된 호흡기 점액 과분비 동물모델을 대상으로 약물을 경구 투여한 후 상피 배상세포 내의 점액 함유량에 대한 解表二陳湯의 영향을 측정하였다. 이때 독성검증을 위해 흰쥐의 체중 변화, 간 기능 및 신 기능에 미치는 영향을 측정함으로써 각각 검증하였다.

또한, 인간의 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포에서 호흡기 뮤신인 MUC5AC 뮤신의 생성과 MUC5AC mRNA의 발현에 대한 解表二陳湯의 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

## II. Materials and methods

### 1. 재료

#### 1) 동물

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

#### 2) 배양세포

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

#### 3) 약재

解表二陳湯 (이하 HIJ)의 구성 약물은 『東醫寶鑑』<sup>17)</sup>에 기록된 바에 준하여, 동국대학교 부속 한방병원 약제실에서 조제, 공급받아 사용하였다. 처방 처방의 구성은 다음과 같다 (Table 1).

#### 4) 약물 제조

HIJ 한 첩 분량에 800 ml의 탈이온 2차 증류수를 가해 100 °C로 가온된 상태로 3시간 전탕하여, 최종 80 ml의 탱액을 수거하였다. 탱액을 실온 정도로 식혀 클

린 벤치에서 0.22 μm filter를 이용해 가압 여과하고 멸균용기에 저장해 4 °C 조건에서 보관하였다.

5) 시약

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, U.S.A.)에서, Mouse anti-MUC5AC clone 45M1 및 HRP-Goat Anti-Mouse IgG Conjugate은 NeoMarkers사 (Freemont, CA, U.S.A.)에서, ethidium bromide, trypsin-EDTA, epidermal growth factor (EGF), formaldehyde, alcian blue, periodic acid-schiff (PAS), tumor necrosis factor-α (TNF-α), Tween 20, bovine serum albumin (BSA), 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) 등은 Sigma사 (St. Louis, Mo., U.S.A.)에서, penicillin-G, streptomycin, fetal bovine serum (FBS), RPMI 1640은 GIBCO-BRL사 (Grand Island, New York, U.S.A.)에서 구입하였으며 기타 모든 시약은 일급시약 이상의 제품을 구입 사용하였다.

2. 방법

1) 기도 점액 과분비 흰쥐 모델의 조성

2 cm 두께의 아크릴 수지판으로 가로 200 cm, 세로 60 cm, 높이 30 cm 크기의 직육면체 상자를 만들어 가

로면에 실험동물이 출입할 수 있도록 출입문을 만들고 가로면에 수직으로 접한 좌우 양면의 중심부에 구멍을 만들어 폴리에틸렌 소재의 관을 부착하였다. 한쪽 관은 이산화황 (SO<sub>2</sub>)이 발생하는 초음파 가습기의 분무구에 연결한 후 반대쪽 관은 배기 장치에 연결하였다.

이산화황 노출방법은 Pon 등<sup>18)</sup>이 보고한 방법을 개량해 사용하였다. 15% (V/V)의 Sodium metabisulfite (MBS) 수용액을 초음파 가습기에 주입하여 가습기를 작동시켰다. 작동 후 3분 이내에 장치 내부에 MBS의 증기가 가득 찼고 작동 종료할 때까지 내부 이산화황 농도는 150 ppm으로 유지하였다.

흰쥐를 대조군, 이산화황 단독 3주 흡입군, 이산화황 1주 흡입 후 최종 2주간 이산화황 흡입 및 HIJ 동시 투여군으로 하여 각 군당 동물 수는 5마리로 무작위 배정하였다. 노출 기간 동안 1일당 3시간, 1주일에 5일 노출하였다. 대조군은 동일한 실험장치가 설치된 실내 환경에서 전체 실험기간 동안 1일 3시간의 이산화황 노출 및 HIJ 처리 과정만을 제외하고 이산화황 노출군과 동일한 조건으로 사육하였다<sup>19)</sup>.

2) 점액 과분비 흰쥐 모델에 약물의 경구투여

이산화황 1주 흡입 후 최종 2주간 이산화황 흡입 및 약물 동시투여 군에 체중 70 kg 성인이 복용하는 약물의 용량을 기준으로 체중 350 g의 흰쥐의 투여용량을 환산해 약물 추출물 2 ml를 경구투여용 바늘을 이용하여 투여하였다. 총 3주 동안의 이산화황 노출 기간 중 마지막 2주 (1주당 5일로 총 10일)동안 매일 반복적으로 약물을 투여하였으며 약물 투여는 오전 10시에서

Table 1. Prescription of Haepyojin-tang (HIJ)

Herbal name	Pharmaceutical name	Amount (g)
半夏	<i>Pinellia Rhizoma</i>	8.0
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	4.0
赤茯苓	<i>Poria</i>	4.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2.0
蘇葉	<i>Perilla Herba</i>	2.0
麻黃	<i>Ephedra Herba</i>	2.0
杏仁	<i>Armeniacae Amarum Semen</i>	2.0
桑白皮	<i>Morus Cortex</i>	2.0
紫菀	<i>Asteris Radix</i>	2.0
貝母	<i>Fritillaria Thunbergii Bulbus</i>	2.0
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	2.0
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>	3.0
Total amount		35.0

11시 사이, 이산화황 흡입은 오후 1시에서 4시까지 각각 실시하였다.

### 3) HIJ가 흰쥐 호흡기 배상세포 내의 점액 함유량에 미치는 영향 측정

HIJ가 흰쥐의 호흡기 배상세포 내의 점액 함유량에 미치는 영향 측정을 위해 기관내강 상피세포층에 대해 병리조직학적 검사를 실시하였다. 3주간의 이산화황 흡입 기간이 종료된 후 각 군의 실험동물을 이산화탄소로 질식사시킨 후 기관을 절개, 분리하여 냉각된 10% formalin in PBS (pH 7.2)에 넣고 24시간 동안 고정하였다.

고정한 조직을 파라핀으로 포매 후 microtome을 이용하여 5  $\mu$ m 두께의 조직절편을 제작하였다. 탈 파라핀 과정을 거쳐 hematoxylin-eosin과 Periodic Acid Schiff (PAS)-alcian blue (pH 2.5)로 염색한 후 광학 현미경으로 관찰하고 200배 배율에서 촬영하였다. 대조군, 이산화황 처리군, 약물 처리군의 배상세포 내 점액 함유량을 비교하여 HIJ의 배상세포 내 점액 함유 정도에 미치는 영향을 판단하였다<sup>20,21)</sup>.

### 4) HIJ의 경구투여 시 흰쥐의 체중 증가도에 미치는 영향 측정

투여한 약물의 생체 안전성을 검증하기 위하여 별도로 2주간 약물만 투여한 약물 투여군을 설정하여 약물 투여 기간을 포함한 전 실험 기간 중 실험 시작 시점과 종료 시점 각 동물의 체중의 차이를 측정, 체중 증가 정도를 대조군과 비교함으로써 약물 투여가 실험동물의 영양 및 대사 상태에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

### 5) HIJ의 경구투여 시 흰쥐의 간 기능에 미치는 영향 측정

투여한 약물에 의한 간독성 발생 여부 검증을 위해 약물 투여군의 간세포 파괴 시 혈청에 유출되는 효소인 GOT (AST), GPT (ALT)의 혈청 중 활성을 생화학 자동분석기 OLYMPUS AU400 (Olympus, Japan)으로 측정하여 대조군과 비교하였다.

먼저 혈청 중 GOT (Glutamate Oxaloacetate Transaminase)는 L-Asparatate와  $\alpha$ -ketoglutarate를 oxaloacetate와 L-Glutamate로 전환시키는데 이 때 생성된 oxaloacetate는 reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) 존재 하에 malate dehydrogenase (MDH)의 작용으로 L-Malate로 전환되므로, GOT의 활성값을 340 nm에서 NADH 감소 속도 측정으로써 계산하였다.

혈청 중 GPT (Glutamate Pyruvate Transaminase)는 L-alanine과  $\alpha$ -ketoglutarate를 각각 pyruvate와 L-glutamate로 변환시키며, 생성된 pyruvate는 NADH 존재 하에 Lactate Dehydrogenase (LDH)의 작용으로 lactate로 전환되므로 GPT의 활성값은 340 nm에서 NADH의 감소 속도 측정을 통하여 계산하였다.

### 6) HIJ의 경구투여 시 흰쥐의 신 기능에 미치는 영향 측정

투여된 약물에 의한 신 독성 발생 여부 검증을 위해 약물 투여군의 혈청 중 BUN (Blood Urea Nitrogen)과 creatinine 값을 생화학 자동분석기인 OLYMPUS AU400 (Olympus, Japan)을 이용하여 측정하여 대조군과 비교하였다.

혈청 중 요소는 urease에 의해 특이적으로 분해되어 암모니아와 이산화탄소를 생성하는데, 생성된 암모니아는 2-oxoglutarate와 반응하고 glutamate dehydrogenase (GLDH) 존재 하에 NADH와 반응해 glutamate와 NAD를 생성하므로 이 반응에서 감소하는 NADH의 감소 속도를 측정하여 혈청 중 BUN의 농도를 측정하였다. 혈청 중 creatinine은 pH가 알칼리성인 조건에서 picric acid와 반응해 적색의 화합물을 생성하여, 이 적색 화합물의 증가 속도 측정으로써 creatinine의 농도를 측정하였다.

### 7) NCI-H292 세포 배양 및 약물 처리

24시간의 약물 처리 기간 동안 약물이 인간 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포 내 MUC5AC 유전의 생성 및 유전자 (mRNA) 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 NCI-H292 세포를 다음과 같이 배양하였다.

세포는 습도가 충분히 유지되고 95%의 공기와 5%의 CO<sub>2</sub>를 함유하는 37 °C 조건에서 HEPES (25 mM), penicillin-G (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml), FBS (10% V/V)등이 첨가된 RPMI 1640 배양액 (이하 배양액)에서 배양되며 주 2회의 빈도로 subculture하였다.

유전 생성량 검증을 위해 24 well culture plate를 기준으로 각각의 well 당 2.0 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well의 밀도로, 유전 유전자의 발현 정도 검증을 위해 6 well culture plate를 기준으로 각 well 당 5.0 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well의 밀도로 세포를 도포하여 배양하였다. 세포가 다 자라면 FBS의 농도를 0.2%로 감소시킨 배양액을 주어 24시간 동안 배양한 후 serum을 첨가하지 않은 배양액 (serum-free

medium)으로 배양된 세포를 세척하였다. 세척한 세포에 HIJ 추출물 각각 5, 10, 20  $\mu\text{l}$ 씩을 함유하는 배양액 200  $\mu\text{l}$ 를 24 well plate를 기준으로 각 well마다 가하고, 30분 후 ATP 200  $\mu\text{M}$  또는 PMA 10 ng/ml 또는 EGF 25 ng/ml 또는 TNF- $\alpha$  0.2 nM을 각 well마다 투여한 후에 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 배양하였다.

#### 8) NCI-H292 세포에서 MUC5AC 뮤신 생성량 측정

24시간의 배양이 종료된 후에 세포 용해용 완충액 (20 mM Tris, 0.5% NP-40, 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, protease inhibitor cocktail)을 가해 세포 내에 존재하는 MUC5AC 뮤신을 추출해 사용하였다. 즉, 세포 용해 추출액 (cell lysate)을 PBS로 1/10배 희석하여 희석된 각 sample을 ELISA 전용 96 well plate에 각각 100  $\mu\text{l}$ 씩 분포시키고 42  $^{\circ}\text{C}$ 에서 완전히 건조될 때까지 incubation하였다. 다음으로 PBS-Tween 20 (0.05%, PBS-T) 용액 200  $\mu\text{l}$ /well을 이용해 well 당 각각 3회씩 세척한 후 PBS-T에 용해된 2% BSA 용액 200  $\mu\text{l}$ 를 각 well에 가하여 다시 1시간 동안 incubation하였다. 그 후 PBS-T 200  $\mu\text{l}$ 로 3회씩 세척하고 2% BSA에 MUC5AC의 monoclonal antibody인 mouse anti-MUC5AC clone 45M1을 1: 200의 비율로 희석하여 각 well당 100  $\mu\text{l}$ 씩 가하여 1시간 동안 incubation하였다. 그 후 PBS-T로 3회 세척한 다음 2차 항체인 Horse radish peroxidase (HRP)-goat anti-mouse IgG conjugate를 2% BSA에 1: 3,000의 비율로 희석하여 각 well당 100  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하고 1시간 동안 incubation하였다. PBS-T로 다시 3회 세척한 후, TMB 용액 100  $\mu\text{l}$ 를 각 well에 가하여 5분 후  $\text{NH}_2\text{SO}_4$  50  $\mu\text{l}$ 를 첨가해 반응을 정지시켰다. 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하여 대조군과 약물 처리군 간의 MUC5AC를 정량하여 비교하였다<sup>22,23)</sup>.

#### 9) NCI-H292 세포 내에 존재하는 total RNA의 분리

24시간 동안 약물을 처리한 세포를 냉각된 PBS로 2회 세척한 후 trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 배양 용기 바닥으로부터 분리한 후 혼합물을 1.5 ml 용량의 microtube에 옮겨 원심 분리하여 세포들만 수거하였다.

Total RNA를 분리하기 위해 Easy-Blue RNA extraction kit (total RNA isolation reagent. INTRON biotechnology사)을 이용해 (0.5 ml/4 $\times$ 10<sup>5</sup> cells) 세포를 lysis시키고, 상온에 5분간 방치하였다. 바로 microtube에 chloroform을 첨가해 15초간 vortexing하고 상온에 2-3분

간 방치 후 4  $^{\circ}\text{C}$ , 13,000 rpm (Hanil centrifuge, MICRO 17 R)에서 10분간 원심 분리해서 얻은 상층액 400  $\mu\text{l}$ 를 새로운 microtube에 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 상온에서 10분 동안 방치하고 다시 4  $^{\circ}\text{C}$ , 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리해 RNA 침전물을 얻었다. 이 침전물에 diethylpyrocarbonate (DEPC)가 함유된 75% ethanol을 가하여 4  $^{\circ}\text{C}$ , 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리, 세척하였다.

수거한 RNA 침전물을 5분 동안 공기 중에서 건조한 후, 20  $\mu\text{l}$ 의 RNase-free water로 부유시키고 UV-spectrophotometer (Beckman, DU-650)를 사용, 260 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 RNA의 농도를 측정한 후 (1.0 A<sub>260</sub>=single strand RNA 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 이를 실험에 사용하였다<sup>24)</sup>.

#### 10) Polymerase Chain Reaction (PCR)을 위한 primer 제조

PCR에 사용한 primer는 전문 제조회사인 Genotec (주) (Daejeon, Korea)에 주문해 합성하였다. NCI-H292 세포에서 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 500 bp였다.

정량적 대조 유전자로 사용된 Rig/S15 유전자 primer의 염기서열은 sense primer가 5'-TTC CGC AAG TTC ACC TAC C-3' 및 antisense primer가 5'-CGG GCC GGC CAT GCT TTA CG-3'이며 이 primer의 표적 DNA 크기는 361 bp였다.

#### 11) RNA의 역전사 및 증합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

수거한 total RNA를 이용해 역전사 반응 (Reverse Transcription, RT)으로 cDNA를 만들어 이를 PCR로 증폭시켰다. 얻은 total RNA 1  $\mu\text{g}$ 을 5분간 75  $^{\circ}\text{C}$ 에서 가열하여 denaturation시키고 얼음에 담가 급랭시켜 RT premix kit의 설명서에 따라 역전사 반응을 진행시켰다. 각각의 역전사 반응에서 얻은 cDNA 산물 2  $\mu\text{l}$ 를 이용, PCR premix kit의 설명서에 따라 MUC5AC 유전자에 대한 PCR을 진행시켰다. PCR은 증폭반응을 위해 40회 실시하였으며 (PCR thermal cycler, Takara MP-300, Japan), denaturation은 94  $^{\circ}\text{C}$ 에서, annealing은 60  $^{\circ}\text{C}$ 에서, extension은 72  $^{\circ}\text{C}$ 에서 각각 30초간 시행하였다.

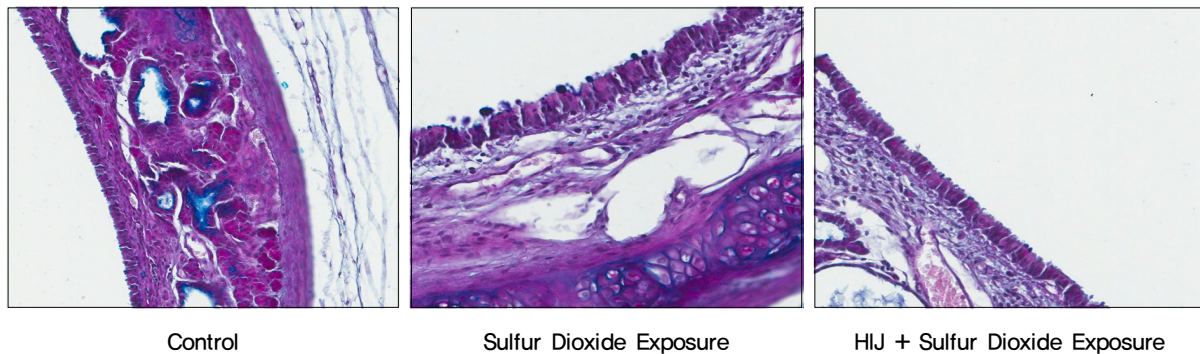


Fig. 1. Effect of HIJ on intraepithelial mucosubstances in trachea of rats exposed to sulfur dioxide

Rats were exposed to sulfur dioxide and effect of orally-administered HIJ extract on intraepithelial mucosubstances was investigated as described in Materials and Methods (zoom ; 200 X)

(Hematoxylin-eosin and Periodic Acid Schiff (PAS)-Alcian Blue staining, Dark purple - black ; Mucin)

### 12) 전기영동에 의한 중합효소 연쇄반응 산물의 확인

전기영동으로 RNA의 RT-PCR로 증폭된 cDNA 산물을 분리하여 MUC5AC 유전자 발현 변동을 관찰하였다. 즉, 증폭된 PCR 산물 10  $\mu$ l를 10  $\times$  gel loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 50% glycerol)와 잘 혼합한 다음, Tris-acetate-EDTA buffer (40mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)용액 및 1  $\mu$ g/ml의 ethidium bromide가 포함된 1.0% agarose gel에서 전기 영동하였다. Gel 상에서 이동되어 형성된 각각의 DNA band는 자외선 투사기 (ultraviolet transilluminator)를 이용해 관찰, 촬영하였다.

### 13) 통계처리

모든 측정 결과는 Mean  $\pm$  S.E.M.으로 환산하였고 약물 처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타났다. 통계처리는 두 그룹의 경우 Student's t-test로, 여러 그룹의 경우 One-way ANOVA로 하였으며, post-hoc test로는 Holm-Sidak test를 실시하였고,  $p < 0.05$ 인 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## III. Results

### 1. 이산화황으로 유발된 호흡기 상피 배상세포 내 점액 함유량 증가에 미치는 영향

호흡기 상피세포층에 hematoxylin-eosin 염색과 PAS-alcian blue 염색을 실시한 후 광학 현미경으로 관찰한

결과 이산화황에 3주 동안 노출된 흰쥐의 경우 배상세포 내에 검보라색으로 염색된 뮤신의 양이 증가되어 있는데 비해, 이산화황에 1주 노출 후 2주간 약물을 동시에 투여한 군에서는 배상세포 안에 존재하는 뮤신의 양이 감소하는 경향을 보여주었다. 따라서 HIJ는 흰쥐에서 이산화황으로 유발된 호흡기 상피 배상세포 내의 점액 함유량 증가를 억제하는 경향을 나타내었다 (Fig. 1).

### 2. HIJ의 경구투여가 흰쥐의 체중 증가도에 미치는 영향

3주간의 전체 실험 기간 동안 대조군과 약물 투여군의 실험동물의 체중 변화를 측정한 결과 유의한 차이가 나타나지 않아 HIJ가 실험동물의 대사 상태와 영양 섭취에 유의한 독성을 유발하지 않음을 확인하였다 (Fig. 2).

### 3. HIJ의 경구투여가 흰쥐의 간 기능에 미치는 영향

2주 간 약물 경구투여 후 대조군과 약물 투여군의 GOT, GPT의 혈청 중 활성을 측정한 결과 유의한 차이를 보이지 않아 HIJ가 실험동물에서 간독성도 유발하지 않음을 확인하였다 (Fig. 3).

### 4. HIJ의 경구투여가 흰쥐의 신 기능에 미치는 영향

2주간의 약물 경구투여 후 BUN 및 creatinine의 혈청 중 농도를 측정한 결과, 약물 투여군과 대조군 간에 유의한 차이가 보이지 않아 HIJ가 실험동물에서 신 독성을 유발하지 않음을 보여주었다 (Fig. 4).

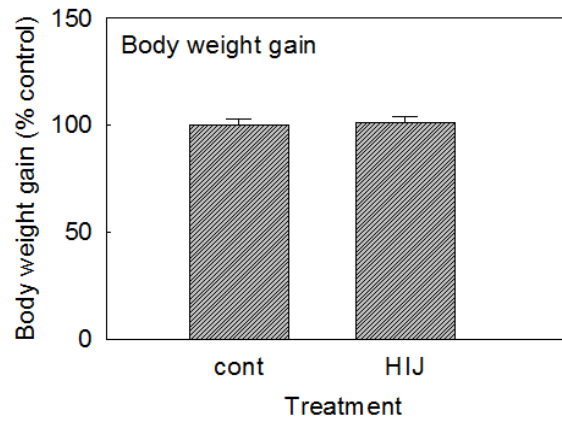


Fig 2. Effect of HIJ on body weight gain of rat after oral administration

HIJ was administered to rats during 2 weeks and body weight of each rat in control group and HIJ administration group was measured, as described in Materials and Methods. Each bar represents a mean  $\pm$  S.E.M. from 5 rats.

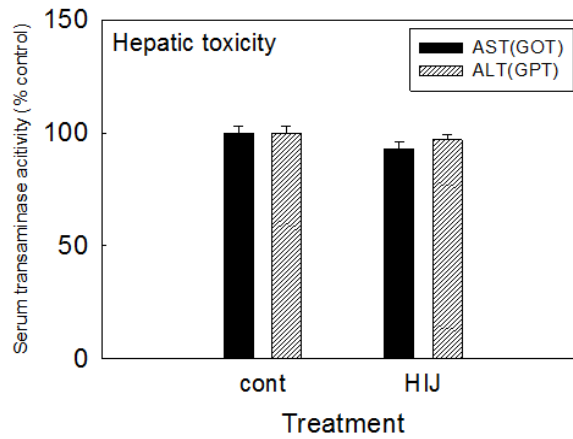


Fig 3. Effect of HIJ on serum GOT and GPT activities of rat

HIJ 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  $\pm$  S.E.M. from 5 rats.

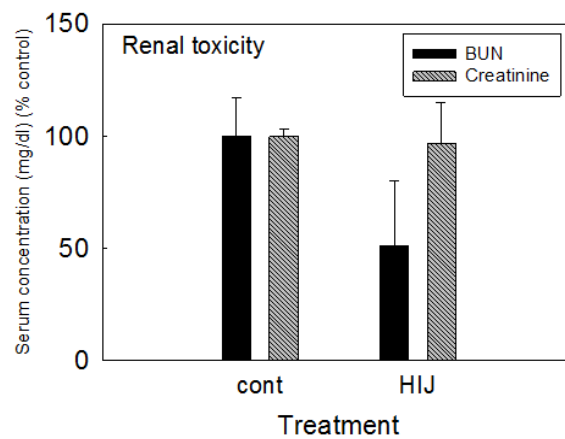


Fig 4. Effect of HIJ on serum BUN and creatinine concentrations of rat

HIJ extract (2 ml/day/rat) was administered to rats during 2 weeks and serum BUN concentration and creatinine concentration of each rat was measured, as described in Materials and Methods. Each bar represents a mean  $\pm$  S.E.M. from 5 rats.

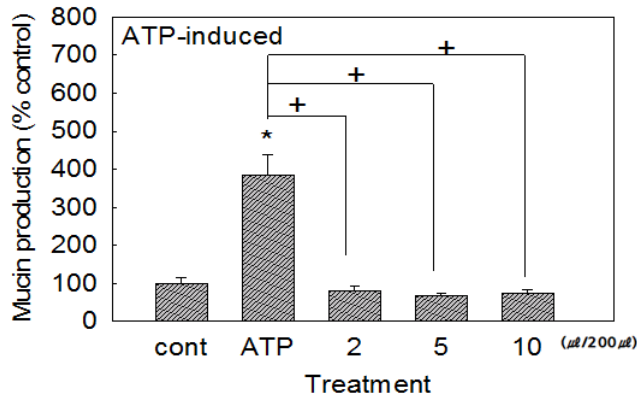


Fig. 5. Effect of HIJ on ATP-induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were pretreated with HIJ extract 2, 5, 10 μl/200 μl media for 30 min and then stimulated with ATP (200 μM) 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 ± S.E.M. of 3 culture wells.

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

+ ; significantly different from ATP only (p<0.05).

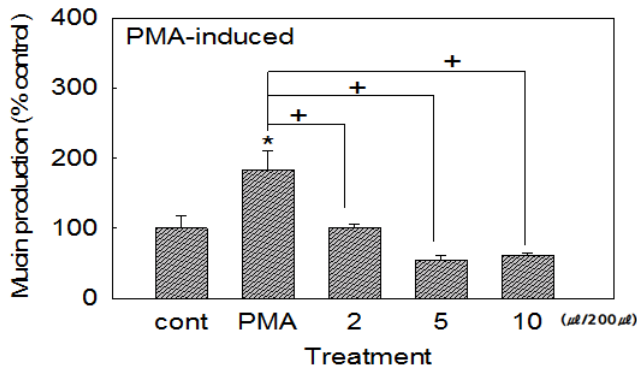


Fig. 6. Effect of HIJ on EGF-induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were pretreated with HIJ extract 2, 5, 10 μl/200 μl 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 ± S.E.M. of 3 culture wells.

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

+ ; significantly different from EGF only (p<0.05).

**5. NCI-H292세포에서 ATP로 유발된 MUC5AC 뮤신생성 증가에 미치는 영향**

HIJ는 최종 추출물 2 μl/200 μl, 5 μl/200 μl, 10 μl/200 μl 배양액의 농도에서 ATP로 유발된 뮤신생성을 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 5).

**6. NCI-H292세포에서 EGF로 유발된 MUC5AC 뮤신생성 증가에 미치는 영향**

HIJ는 최종 추출물 2 μl/200 μl, 5 μl/200 μl, 10 μl

/200 μl 배양액의 농도에서 EGF로 유발된 뮤신생성을 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 6).

**7. NCI-H292세포에서 PMA로 자극된 MUC5AC 뮤신생성 증가에 미치는 영향**

HIJ는 최종 추출물 2 μl/200 μl, 5 μl/200 μl, 10 μl/200 μl 배양액의 농도에서 PMA로 자극된 뮤신생성을 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 7).



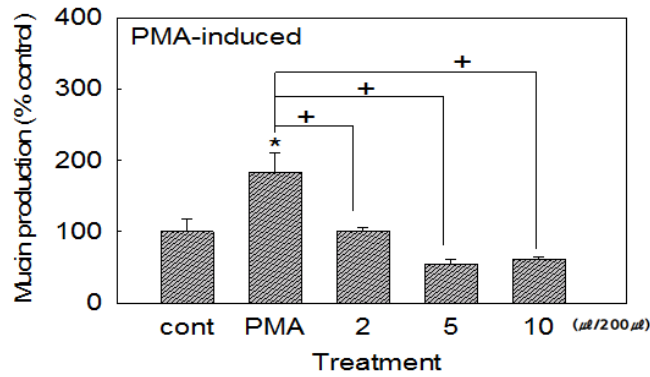


Fig. 7. Effect of HIJ on PMA-induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were pretreated with HIJ extract 2, 5, 10 µl/200 µl 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 ± S.E.M. of 3 culture wells.

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

+ ; significantly different from PMA only (p<0.05).

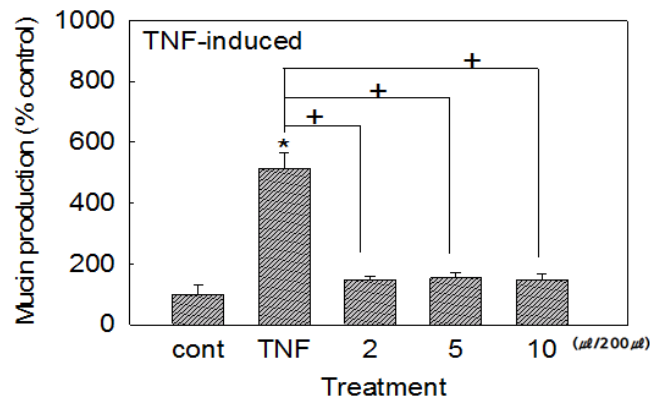


Fig. 8. Effect of HIJ on TNF-α induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells

NCI-H292 cells were pretreated with HIJ extract 2, 5, 10 µl/200 µl 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 ± S.E.M. of 3 culture wells.

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

+ ; significantly different from TNF only (p<0.05).

**8. NCI-H292세포에서 TNF-α 로 자극된 MUC5AC 뮤신 생성 증가에 미치는 영향**

HIJ는 최종 추출물 2 µl/200 µl, 5 µl/200 µl, 10 µl/200 µl 배양액의 농도에서 TNF-α로 자극된 뮤신생성을 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 8).

**9. NCI-H292 세포에서 ATP로 유도된 MUC5AC 유전자 발현 증가에 미치는 영향**

RT-PCR로 증폭된 산물을 전기영동을 통해 분리하여

MUC5AC 유전자 발현의 변동 여부를 관찰한 결과, HIJ는 최종 추출물 전 투여 농도범위에서 ATP로 유도된 MUC5AC mRNA의 발현 수준을 감소시켰다 (Fig. 9).

**10. NCI-H292 세포에서 EGF로 유도된 MUC5AC 유전자 발현 증가에 미치는 영향**

RT-PCR로 증폭된 산물을 전기영동을 통해 분리하여 MUC5AC 유전자 발현의 변동 여부를 관찰한 결과, HIJ는 최종 추출물 10 µl/200 µl 배양액의 투여 농도에

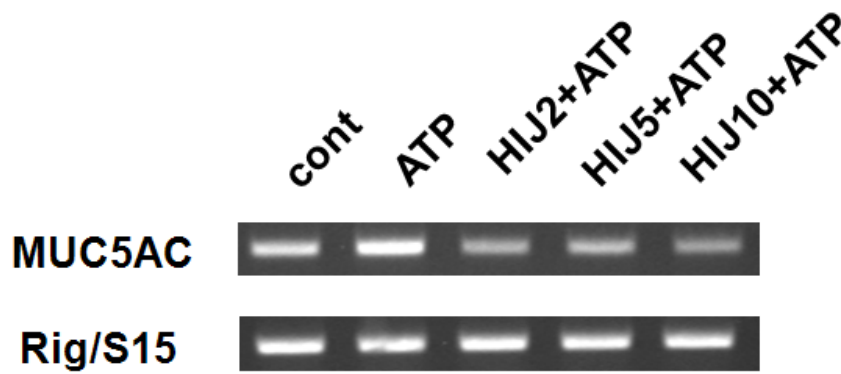


Fig. 9. Effect of HIJ on ATP-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

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

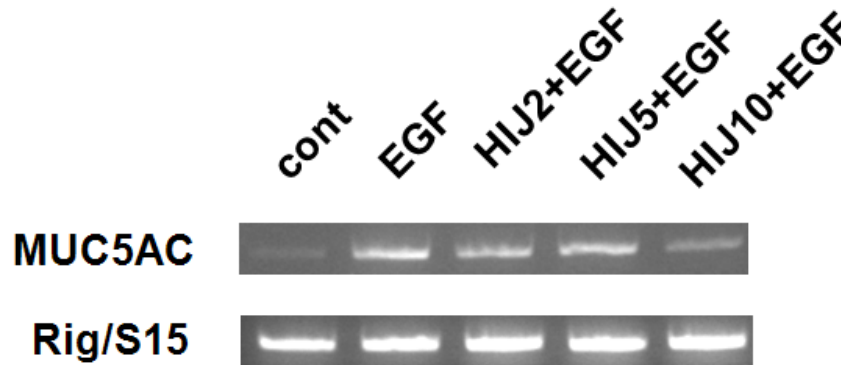


Fig. 10. Effect of HIJ on EGF-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

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

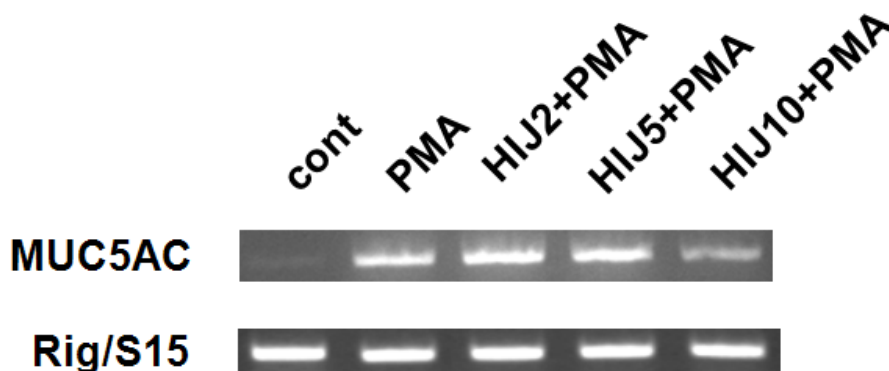


Fig. 11. Effect of HIJ on PMA-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

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

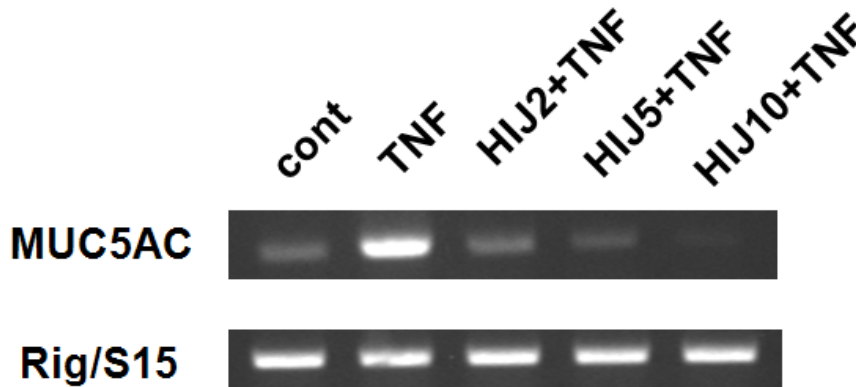


Fig. 12. Effect of HIJ on TNF- $\alpha$ -induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells

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.

서 EGF로 유도된 MUC5AC mRNA의 발현 수준을 감소시키는 경향을 보여주었다 (Fig. 10).

**11. NCI-H292 세포에서 PMA로 유도된 MUC5AC 유전자 발현 증가에 미치는 영향**

RT-PCR로 증폭된 산물을 전기영동을 통해 분리하여 MUC5AC 유전자 발현의 변동 여부를 관찰한 결과, HIJ는 최종 추출물 10  $\mu$ l/200  $\mu$ l 배양액의 투여 농도에서 PMA로 유도된 MUC5AC mRNA의 발현 수준을 감소시키는 경향을 보여주었다 (Fig. 11).

**12. NCI-H292 세포에서 TNF- $\alpha$  로 유도된 MUC5AC 유전자 발현 증가에 미치는 영향**

RT-PCR로 증폭된 산물을 전기영동을 통해 분리하여 MUC5AC 유전자 발현의 변동 여부를 관찰한 결과, HIJ는 최종 추출물 전 투여 농도범위에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 MUC5AC mRNA의 발현 수준을 감소시켰다 (Fig. 12).

**IV. Discussion**

소아는 臟腑機能과 衛外機能이 완전치 못하며 각 기관의 발육이 부전하여 질병에 이환되기 쉽다<sup>25)</sup>. 그 중 호흡기 질환은 6개월에서 6세 사이의 소아에게 빈

번하게 발생하며 주로 겨울이나 봄의 기후 변화가 심할 때 반복 감염되어 치유가 어렵고 악화되는 경향을 보인다. 한방병원 소아 외래환자의 주소증 중에서도 가장 높은 비율을 차지하며 한방치료에 대한 선호도 또한 높다<sup>26-8)</sup>.

호흡기는 외부와 직접 접촉하는 기관으로 소아의 경우 점막의 기본구조는 성인과 같으나 방어체계가 미숙하며 안정성이 떨어져 외부자극에 의한 손상, 감염, 알레르겐에 감작되기 쉽다, 또 기도 내경이 작고 점액선 밀도가 높아 감염 시 다량의 점액이 분비 되어 이에 의한 폐쇄가 흔하다<sup>2)</sup>.

기도 점액은 점막하 점액선에서 분비되는 뮤신, 액체성분과 폐포의 표면 및 주위로부터 유래된 용질, 그리고 인체 호흡기 배상세포의 분비물로 이루어진다<sup>29)</sup>. 세기관지를 제외한 호흡기의 표면 대부분을 2-5  $\mu$ m 정도의 두께로 덮으며, 흡입한 공기의 온습도를 조절하고 이물질들을 상기도 방향 섬모운동을 통해 제거하는 등 기도 방어기전에 중요한 역할을 담당한다<sup>2,3,10)</sup>.

이런 방어 기능에 중요한 기능을 하는 점액성 당단백인 뮤신은 정상 생리 상태에서 적절한 점도를 유지하여 섬모세포의 운반작용을 통한 기도 및 폐내 이물질의 제거, 폐의 순환작용 등 방어 기능을 담당하며 세균 및 바이러스 감염 시에는 염증반응을 조절하고 기도상피를 보호한다. 뮤신은 기도 내의 수분에 희석되며 이 때 기도 내 탄산의 양과 수분함량에 의해 점성 등 물리적 성상이 변화된다<sup>30)</sup>. 다양한 종류가 존재하여

뮤신의 펩티드 골격을 coding하는 유전자를 MUC로 약칭하는데 현재까지 MUC 1, 2, 3A, 3B, 4, 5AC, 5B, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20 등의 20여종의 MUC 유전자가 발견되었으며, 사람의 기도 분비세포 표면에 MUC1, MUC4, MUC16 등이, 기도 내 분비 점액에서 MUC5AC, MUC2, MUC5B, MUC6, MUC19 등이 발견되는데 MUC5AC와 MUC5B가 인간의 호흡기에서 발견되는 gel-forming mucin의 주를 이룬다. 정상 기도 점막에서는 MUC5B가 기도 점액의 주성분인 반면 기도 염증상태에는 MUC5AC의 발현이 증가한다<sup>31)</sup>.

이러한 뮤신의 양 또는 질의 이상은 인체의 방어 작용에 다시 영향을 주어 더욱 심한 병리 현상을 유발할 수 있다. 점도의 변화나 100 ml 이상의 분비 과다가 일어나면 점액전을 형성하여 기도 분비물의 배출을 막고 누적된 객담은 환기 저하나 바이러스 또는 알레르겐의 유입 증대, 세균감염과 미생물의 독성증강에 의한 2차적인 문제를 유발하므로 객담을 제거하는 것이 호흡기 질환 치료에 있어 기본적으로 중요한 부분을 차지한다<sup>32)</sup>.

호흡기 질환에서 기도 점액 분비 및 조절 이상의 치료는 점액성 분비물의 양을 늘리고 점도를 낮추는 점액용해제나 점액섬모 청소기능을 증가시켜 분비물의 배출을 더욱 자극하는 거담제 등을 사용해왔으나<sup>33)</sup> 점액의 점도를 지나치게 감소시켜 오히려 기관지 폐쇄가 악화되거나 기도를 직접 자극하여 점액 분비를 증가시키는 등 다양한 약리작용 및 부작용으로 호흡기 질환의 적절한 조절에 제한이 따르고 있다<sup>29)</sup>.

咯痰은 韓醫學에서 痰飲의 일종으로 원인에 따른 風痰, 寒痰, 濕痰, 熱痰, 鬱痰, 氣痰, 食痰, 酒痰, 驚痰의 분류 중 咯痰은 寒痰, 濕痰, 熱痰, 燥痰, 鬱痰, 氣痰과 관련이 있다<sup>17)</sup>. 痰飲은 병리산물인 동시에 病因으로도 작용하는데, 질병으로 인해 肺의 肅降기능과 脾胃의 運化기능이 저해되어 水濕이 氣化布散되지 못하여 발생된다. 그 원인은 다양하나 外感風寒과 寒濕, 宿食, 陽氣不足, 氣機鬱滯 등이 흔하다. 胸部나 肺系에 쌓여 氣機를 阻塞하게 되면 급만성 기관지, 심폐질환에서 잘 나타나는 胸部의 脹悶感和 胸痛, 痰喘 등이 생기며 惡心이 동반되는 경우가 많다<sup>33)</sup>.

痰飲의 치료는 二陳湯, 茯苓半夏湯, 芎夏湯 등이 대표적 통치방으로 사용되며 補脾하는 人蔘과 甘草, 燥濕하는 白朮과 半夏, 理氣하는 陳皮와 青皮, 滲水하는 茯苓과 澤瀉를 활용하여 實脾土, 燥脾濕를 근본으로 하고<sup>34)</sup> “治痰順氣爲先, 分導次之”<sup>17)</sup>라 하였다.

小兒는 衛外機能이 未固하므로 쉽게 六淫의 邪氣를

받아 급성 호흡기 감염으로 인한 感冒, 咳嗽, 哮喘, 肺炎 등 증상이 발생한다. 특히 肺常不足으로 肺의 肅降機能 이 장애를 받으면 氣機가 不利하고 水液의 散布와 排出作用이 원활하지 못하고 停聚되어 痰飲이 발생된다<sup>34)</sup>.

解表二陳湯의 구성 약물을 살펴보면, 半夏는 溫燥하고 燥濕化痰의 主藥으로 咳嗽, 多痰, 백색의 점조한 痰, 胸脘痞悶 등 濕痰의 증상에 사용한다. 陳皮는 방항성을 지녀 점조한 白痰이 많이 나오고 가슴이 답답한 濕痰증상에 理氣化痰하며 半夏와 배합하면 祛痰, 止嘔작용이 강화된다. 赤茯苓은 痰飲內停증에 寒熱虛實을 막론하고 사용하며 健脾하여 標本을 모두 치료하는 효과가 있다. 甘草는 보조약으로 사용하면 약물의 峻烈한 작용과 자극성을 억제하며 補脾益氣하고 潤肺止咳하여 脾胃虛弱과 肺虛喘咳의 병증을 치료한다. 紫蘇葉은 行氣貫中하여 脾肺氣滯로 인한 咳嗽痰多 및 胸悶嘔惡 등에 적용한다. 杏仁은 宣肺化痰 止咳平喘의 효능이 있어 咳嗽證의 要藥으로 肺燥로 인한 乾咳, 燥痰을 潤解하며 祛痰降氣하여 치료한다. 紫菀은 潤肺하나 膩滯하지 않아 化痰止咳의 要藥으로 咳嗽의 寒熱外感內傷을 막론하고 咳嗽痰多에 배합하여 사용하며 기도의 분비를 증가시켜 객담을 희석하고 배출을 용이하게 한다. 桑白皮는 寫肺平喘하고 行水消腫하여 肺熱로 인한 咳嗽을 치료한다. 貝母는 潤燥化痰하여 杏仁 등 宣肺祛痰하는 약물과 배합해 風熱咳嗽痰多와 痰火鬱廢로 인한 咳嗽에 사용한다. 桔梗은 清肺提氣, 祛痰排膿하여 風寒이나 風熱로 인한 咳嗽. 痰이 많고 咽痛이 있는 경우에 적합하며 理氣祛痰약물의 보조약으로 쓴다<sup>35,36)</sup>.

위에서 보듯 解表二陳湯은 燥濕化痰 理氣和中하여 治痰하는 二陳湯을 기본으로 杏仁, 桑白皮, 紫菀, 貝母, 桔梗의 祛痰止咳劑와 麻黃, 蘇葉의 辛溫解表劑를 가미하여 밖으로 風寒表證을 다스리고 안으로 脾虛氣鬱하여 痰滯하여 이로서 氣逆하여 痰多氣急 咳嗽哮喘하는 것을 치료하므로 특히 痰이 많아 喘보다 哮가 심한 경우에 주로 사용되었다<sup>1,12)</sup>.

본 연구는 위와 같이 주로 痰多咳嗽, 喘息 등의 치료 목적으로 사용되고 있는 解表二陳湯이 천식, 폐렴, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증 등에서 관찰되는 호흡기 점액의 과분비 및 그 근처에 자리잡고 있는 세포 및 분자수준에서의 현상인 호흡기 뮤신 생성 및 유전자 발현에 어떠한 약리작용을 발현하는지 탐색함으로써, 解表二陳湯이 호흡기 점액 과분비의 조절약물로서 응용될 가능성을 타진하는 것을 목표로 하였다.

먼저 흰쥐를 대상으로 한 in vivo 실험에서 解表二陳

湯의 기도 점액의 과다분비에 대한 약리작용을 알아보기 위해 이산화황 흡입으로 유발된 기도 점액 과다분비 모델을 이용하여 연구를 진행하였다.

기도 점액 과다분비 흰쥐 모델에서의 상피 배상세포 내 점액 함유량을 조직병리학적으로 관찰하여 확인한 결과, 이산화황에 1주간 노출 후 2주간 이산화황 흡입과 동시에 解表二陳湯이 투여된 군에서 대조군과 이산화황에 3주간 노출된 군에 비해 기도 배상세포 내와 상피세포층 표면의 점액 함유량이 감소되는 경향을 나타내었다 (Fig. 1). 이러한 결과는 解表二陳湯이 기도 점액의 생성을 억제하는 방향으로 작용하는 것을 의미하며 祛痰 작용이 발현된 것으로 생각된다.

또한 치료약물로서 안전성을 확인하기 위해 解表二陳湯이 실험동물에 대한 독성을 유발할 가능성을 검증하였다. 2주간의 약물 경구투여 기간을 포함한 전체 기간 중 각 실험동물의 체중 증가 정도를 대조군과 약물투여군 간에 비교한 결과 약물 투여가 유의한 영향을 주지 않음이 확인되었다 (Fig. 2). 또 약물을 투여 받은 흰쥐의 간 기능 및 신 기능에 독성이 발현되지 않음을 증명하여 (Fig. 3, 4) 解表二陳湯이 실험동물의 대사 상태 및 영양 섭취에 대해 생체 내 독성을 유발하지 않음을 확인하였다.

解表二陳湯이 호흡기 점액의 과분비 억제효과를 세포 및 분자 수준에서 뮤신의 생성 및 그 유전자 발현 등을 통해 알아보고자 후속 실험을 수행하였다.

인체 호흡기 뮤신의 연구모델로 흔히 사용되는 인간 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포를 이용하여 아데노신삼인산 (ATP), 상피세포 성장인자 (EGF), phorbol ester (PMA), 종양괴사인자 (TNF)로 각각 호흡기 뮤신의 생성을 자극한 상태에서 24시간의 약물 처리 기간 동안 호흡기 뮤신인 MUC5AC 뮤신의 생성에 대한 약물의 영향을 측정하고, 동일한 조건으로 유전자의 발현을 자극한 상태에서 24시간의 약물 처리 기간 동안 MUC5AC mRNA의 발현에 대한 약물의 영향을 측정하였다. ATP는 뮤신분비수용체인 P2Y2 퓨린수용체 (P2Y2 purinergic receptor)를 활성화 하여 다량의 뮤신을 분비하게 하며<sup>30)</sup>, PMA는 칼슘의존성 단백질 인산화 효소 (calcium-dependent protein kinase, PKC)를 활성화하여 인간 기도 상피세포에서 뮤신 유전자의 발현과 뮤신 생성을 증가시키는<sup>37)</sup>것으로 알려진 물질이다. TNF- $\alpha$ 는 강력한 염증유발 시토카인으로 만성 폐쇄성 폐질환 환자의 객담에서 그 농도가 증가되는 것으로 알려져 있으며<sup>38)</sup> TNF-수용체를 거쳐 전사인자 결합부

위 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)로 이어지는 신호전달 경로를 거치고, EGF는 EGF-수용체-MEK-ERK 신호전달 경로를 경유하여 MUC5AC의 생성을 증가시킬 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>38,39)</sup>.

실험결과에서 解表二陳湯은 ATP, EGF, PMA, TNF- $\alpha$ 로 각각 자극된 MUC5AC 호흡기 뮤신의 생성을 감소시켰으며 (Fig. 5, 6, 7, 8) 그 유전자인 MUC5AC mRNA의 발현역시 억제시키는 경향을 나타냈다 (Fig. 9, 10, 11, 12). 이로써 뮤신, 나아가 *in vivo* 호흡기 점액의 과생성 및 과분비를 감소시키는 효능을 발현할 가능성을 보여주었다. 이러한 결과는 解表二陳湯의 祛痰 작용이 MUC5AC 뮤신의 유전자나 최종 당단백질 생성 과정에서 그 발현 및 생성을 억제하는 작용을 하였기 때문인 것으로 생각된다.

상기 연구결과를 종합하면, 解表二陳湯은 호흡기 뮤신의 생성 및 유전자의 발현에 영향을 줌으로써, 결과적으로 호흡기 점액의 과생성 및 과분비를 조절할 가능성을 보여주고 있다. 이러한 결과는 解表二陳湯이 전통적인 痰多氣急 咳嗽哮喘의 범주 뿐 아니라 호흡기 점액 과분비를 동반하는 호흡기 질환의 조절약물로서 응용될 가능성을 보이는 자료로 여겨지며 추후 다양한 호흡기 질환의 병태생리학적 특성을 적절히 반영할 수 있는 연구모델을 이용해 解表二陳湯의 효과에 대한 후속연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다.

## V. Conclusion

解表二陳湯이 기도 점액의 과다분비 및 기도 뮤신의 생성, 분비, 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 일차 배양된 NCI-H292 세포에서의 MUC5AC 생성 및 MUC5AC mRNA의 발현을 관찰하고, 기도 점액 과다분비 흰쥐 모델에서 상피 배상세포 내의 점액 함유량을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 이산화황으로 유발된 호흡기 점액 과분비 동물모델에 解表二陳湯을 투여한 결과, 호흡기 배상세포 내 점액 함유량을 감소시켰다.
2. 解表二陳湯은 실험동물에게 투여했을 때 체중 증가도, 간 및 신장 기능에 영향을 주지 않음으로써 생체 독성을 유발하지 않음을 보여 주었다.
3. 解表二陳湯은 배양된 인간 호흡기 상피세포에서

점액 과생성 조건에서의 뮤신 생성과 그 유전자 발현에 억제적 효과를 발현하였다.

종합하면, 解表二陳湯은 MUC5AC 생성 및 MUC5AC mRNA의 발현에 영향을 줌으로써, 결과적으로 호흡기 점액의 과생성 및 과분비를 조절할 가능성을 시사하고 있다.

## References

1. Kim KB, Kim DG, Kim YH, Kim JH, Min SY, Park EJ, Baek JH, Yu SA, Lee SY, Lee JY, Lee HJ, Chang GT, Chai JW, Han YJ, Han JK. Hanbangsoacheongsongyeonuihak. Seoul: Ui Sung Dang. 2010:37-40, 346-69, 744.
2. Hong CE. Textbook of pediatrics, 9th ed. Seoul: Korea Textbook Publishing Co. 2007:588-90, 594-5, 613.
3. The korean academy of pediatric allergy and respiratory disease. Pediatric allergy immunology pulmonology. Seoul: koonjachulpansa. 2005:267-8, 350, 354.
4. 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. Appl Pharmacol. 2001;9(4):263.
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. Lee CJ. Specificity in the inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. Appl Pharmacol. 2001;9(3):218-23.
7. Mutschler E, Derendorf H. Drug actions. Boca Raton, Florida: CRC press. 1995:410-1.
8. Rogers DF. Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology? Curr Opin Pharmacol. 2004;4(3):241-50.
9. 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.
10. The korean academy of tuberculosis and respiratory disease. pneumology. Seoul: koonjachulpansa. 2004:16, 83, 297.
11. Mae DD. Junggukuihaksaryak. Sanseo: Sanseoinmin-chulpansa. 1979:243.
12. Sin JY. Bangyakhappyeonhaeseol. Seoul: Jeontonguihak-yeonguso. 1988:133.
13. Park DI, Lee GT. The effects of Haepyojijintang on the pulmonary injury caused by SO<sub>2</sub> in rats. J Korean Orient Med. 1996;17(2):178-90.
14. Park CS, Han SH. Effects of Haepyojijintang and Haepyojijintang extract on the contraction of isolated guinea pig trachea smooth muscle. J Korean Orient Int Med. 1990;11(2):68-79.
15. Baek DJ, Jung HJ, Rhee HK, Jung SK. The effects of Haepyojij-tang on the cytokines in asthma model. J Korean Orient Med. 2000;21(3):57-67.
16. Kim MS, Park DI. The effects of Kamihapyojij-tang on the respiratory patterns and tracheal tissues in allergic asthma. Korean J Orient Physiol Pathol. 2002;16(3):557-62.
17. Heo J. Dongeui bogam. Seoul: Namsandang. 1998:100-4, 108-9, 732.
18. 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.
19. 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.
20. St. George JA, Cranz DL, Zicker S, Etchison JR, Dungworth DL and Plopper. An immunohistochemical characterization of Rhesus monkey respiratory secretions using monoclonal antibodies. Am Rev Resp Dis. 1985;132(3):556-63.
21. Harkema JR, Hotchkiss JA. In vivo effect of endotoxin on intraepithelial mucosubstances in rat pulmonary airways: quantitative histochemistry. Am J Pathol. 1992;141(2):307-31.
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. 2003;100(20):11618-23.
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 mecha-

- nism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278(26):23243-50.
24. 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.
  25. Gong YI, Jang GM. *Silyongjungeuiagwahak.* Shanghai:Sanghaegwahakgisulchulpansa. 1996:455-61.
  26. Kang MS, Jang GT, Kim JH. A study on chronic or recurrent respiratory symptoms. *J Pediatr Korean Med.* 2002;16(2):83-99.
  27. Han JK, Kim YH. Health care utilization of pediatrics outpatients in the oriental hospital. *J Pediatr Korean Med.* 2001;15(2):209-20.
  28. Choi MH, Kim DG, Lee JY. A study of the chief complaint of pediatric outpatients in the Kyung Hee oriental medicine hospital. *J Pediatr Korean Med.* 2010; 24(3):121-37.
  29. Lee CJ, Ko KH. Pathophysiologic characteristics of airway mucus-hypersecretory diseases and experimental models. *J Appl Pharmacol.* 1998;6(1):1-8.
  30. Lee JC. Formation of airway mucus; synthesis, exocytosis and dilution of Gel-forming mucins. *Korean Acad Asthma Allergy Clin Immunol.* 2012;32(2):73-80.
  31. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. *Chest.* 2009;135(2):505-12.
  32. 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.
  33. Hanbangbyeongrihak gyojaepyeonchanwiwonhoe. *Hanbangbyeongrihak.* Seoul: Hanuimunhwasa. 2007: 94-102.
  34. Jeongukhanuikwadaehak gyenaekwagyosil. *Dongui-pyegyenaekwahak.* Seoul: Hanmunhwasa. 2002:102-14.
  35. Jeongukhanuikwadaehak bonchohakgyosil. *bonchohak.* Seoul: Yeonglimsa. 2000:154-6, 158-9, 225-6, 348-50, 487, 499-500, 515-6, 518, 521-2, 586-8.
  36. Lee SI, An DG, Sin MG, No SH, Lee YD, Kim SH. *Hanyakimsangeungyong.* Seoul: Jeontonguihakyeonguso. 1998:36-7, 39-40, 151-3, 323-5, 393, 463-4, 472, 475-647, 748.
  37. Lee SY. The inhibitory effects of epidermal growth factor receptor inhibitor (erlotinib) in a mouse model of smoking. *Korean J Orient Int Med.* 2009;77(4):940.
  38. Shim JJ. Signal transduction of MUC5AC expression in airway mucus hypersecretory disease. *Tuberc Respir Dis.* 2003;55(1):26.
  39. Song KS, Lee WJ, Chung KC, Koo JS, Yang EJ, Choi JY, Yoon JH. Interleukin-1beta 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.