

瀉白散과 瀉白散加沙蔘이 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF 발현에 미치는 영향

정광진, 정희재, 정승기, 이형구
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

The Inhibitory Effects of Sabaek-san and Sabaeksan plus Sasam on the IL-6, IL-8 and GM-CSF mRNA Levels in Human Epithelial Cells

Kwang-Jin Chung, Hee-Jae Jung, Sung-Ki Jung, Hyung-Koo Rhee

Division of Respiratory System, Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University, Seoul, Korea

Objective : We aimed to identify the dose-dependent inhibitory effects of Sabaek-san(瀉白散) and Sabaeksan plus Sasam(Adenophorae Radix 瀉白散加沙蔘) on the mRNA expressions of Interleukin(IL)-6, IL-8 and granulocyte macrophage colony stimulating factor(GM-CSF) involved in the asthma model.

Materials and Methods : Through this study, BEAS-2B cell lines, human epithelial cells were used. These cells were stimulated by tumor necrosis factor(TNF)- α , IL-1 β and histamine for artificial inflammatory expression. β -action messenger RNA(mRNA) was used for standards. After each 24hours of Sabaeksan and Sabaeksan plus Sasam treatment, total cellular RNAs were collected by treating RNA zoi directly on living cells. Then the transcriptional activities of IL-6, 8 and GM-CSF were measured by RT-PCR with electrophoresis.

Results : The mRNA expressions of IL-6 are significantly inhibited compared to those of controlled group at 40 and 100ug/ml of Sabaeksan extract and 100 μ g/ml of Sabaeksan plus Sasam extract ($p<0.05$).The mRNA expressions of IL-8 are significantly inhibited compared to that of controlled group at 2,40 and 100 ug/ml of Sabaeksan extract and 40,100 μ g/ml of Sabaeksan plus Sasam extract($p<0.05$) The mRNA expressions of GM-CSF are significantly inhibited compared to those of the controlled group at 100 μ g/ml of Sabaeksan extract adn 40,100 μ g/ml of Sabaeksan plus Sasam extract.($p<0.05$)

Conclusions : This study shows that Sabaeksan and Sabaeksan plus Sasam have dose-dependent inhibitory effects on the mRNA expressions of IL-6, IL-8 and GM-CSF in human epithelial cells. Therefore, these types of herb medicine may inhibit the inflammatory process of asthma. Advanced studies are required to investigate the mechanisms of inhibition by herb medicine in the asthma model.

Key Words : Sabaeksan, Root of *Adenophora triphylla var.japonica* HARA asthma, cytokine.

1. 緒 論

기관지천식은 기도의 만성적인 염증 질환으로서 기관지천식의 특징인 기도 과민성과 기도의 폐쇄 그리고 천식의 증상 발현에는 세포성 염증 반응에 의한 기도의 구조적 변화가 중요한 역할

을 한다.

기도의 만성적인 염증과 기도의 구조적 변화에는 호산구, 비만세포, 림프구 등 여러 가지 다양한 염증세포와 이 세포들에서 분비되는 염증매개물질이 관여한다. 특히 기관지 상피세포는 platelet activating factor, prosta-

glandin, Interleukin(이하 IL)-1, IL-6, IL-8, granulocyte macrophage colony stimulating factor(이하 GM-CSF), Tumor necrosis factor- α (이하 TNF- α), 그리고 macrophage chemo-tactic protein-1 등 많은 proin-flammatory cytokine을 분비하며, 이들 cytokine은 기도점막에 작용하여 기도점막의 염증을 더욱 심하게 하는 것으로 보고되고 있다.² 따라서 천식의 치료에 있어 투여한 약제의 효과를 판단

하기 위해서는 상피세포에서 분비되는 이들 cytokine들이 어떻게 조절되는지를 확인하는 것이 중요하다.

천식을 한의학에서는 呼吸急促하며 喉中有聲響한 증상을 나타내는 哮喘證, 哮喘證의 범주에 속하는 질환으로 인식하고,³ 임상적으로 哮喘證에 준하여 치료하면서 많은 처방들이 유의성 있는 효과를 보여 왔다.^{4,5} 최근 한의학에서는 哮喘證에 임상적 효과가 인정된 처방과 개별 한약재를 이용하여 천식에서 나타나는 기도 염증반응에 관여하는 cytokine의 전사효과를 관찰한 분자생물학적인 연구가 활발하게 진행되고 있다.⁶⁻¹⁰

瀉白散은 宋代 錢乙의 「小兒藥證直訣」¹¹에 처음으로 수록되었고, 瀉肺火·清虛熱·止咳平喘하는 효능으로 肺實證·肺熱咳嗽氣喘 등을 치료하는 처방이다.¹²

기도점막의 염증을 유발하여 천식의 병리기전을 진행시키는데 있어서 중요한 역할을 하는 cytokine인 IL-6, IL-8 및 GM-CSF는 기관지 상피세포에 TNF- α , IL-1 β 와 histamine을 처리하면 발현시킬 수 있다.^{13,14} 본 연구에서는, 인간 기관지 상피세포에 임상적으로 기관지 천식에 치료효과가 있는 瀉白散과 瀉白散加沙蔘을 각각 처리한 후, proinflammatory cytokine(TNF- α , IL-1 β , histamine)을 처리하여, 이들 처방들이 기관지 상피세포에서 발현하는 cytokine인 IL-6, IL-8, GM-CSF에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 재료

1) 세포주

세포는 미국 ATCC(American Type

Culture Collection, Rochville, MD, U.S.A.)사에서 구입한 BEAS-2B cell line으로 adenovirus 12-SV40으로 전이(transformation)된 인간 기관지상피세포주이다.

2) 배지 및 시약

DMEM/F12 계통의 medium과 세포배양에 필요한 growth factor들은 미국의 BioWhittaker, Inc. Walkersville, MD.에서 kit로 구입하였다(Bronchial/Tracheal Epithelial Cell Growth Medium Bullet Kit). Total RNA의 정제를 위하여 RNAzol™ B를 TELTEST, Inc.(Texas, USA)로부터 구입하였으며, reverse transcriptase, Taq DNA polymerase, dNTP 등 RT-PCR 관련 시약은 Promega사에서 구입하여 사용하였다. TNF- α 와 IL-1 β 는 Beringer Mannheim, Inc.에서 구입하였으며, PCR에 사용된 primer는 바이오니아(주)(청원, 대한민국)에서 주문 제작하였다. 기타 시약은 Sigma, Co.(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다.

3) 한약재

경희의료원 한방병원 약제과에서 한약재를 구입 정선한 후 사용하였으며,

실험에 사용된 瀉白散과 瀉白散加沙蔘 1첩의 구성은 Table 1과 같다.

2. 방법

1) 검액의 조제

건조된 瀉白散 100g과 瀉白散加沙蔘 130g을 수냉식 응축기가 장착된 전탕기에서 2l의 3차 증류수와 함께 1시간 30분 동안 전탕한 후 상온에 1시간 동안 방치하여 식혔다. 상온의 탱액을 천으로 일차적으로 여과한 후 Whatman paper로 다시 여과하여 침전물을 제거하였다. 여과액을 회진식 증발기를 이용하여 55℃에서 감압 하에서 약 200ml로 농축하였다. 이를 동결건조기로 건조하여 -80℃에 보관하여 실험에 이용하였다. 瀉白散과 瀉白散加沙蔘 회수량은 각각 7.1g, 11.3g이었으며 회수율은 각각 7.1%, 8.7%였다. 세포배양액에 투입시 정량을 medium에 녹인 후 filtering하여 사용하였다.

2) 세포배양과 검액의 처리

BEAS-2B세포는 37℃에서 5%의 이산화탄소의 존재 하에서 DMEM/F12 medium에서 배양하였으며 2일에 한번씩 1/2로 나누어 배양하였다. 최종 단계에서 세포를 fibronectin과 colla-

Table 1. Composition of Sabaek-san(瀉白散) and Sabaeksan Plus Sasam(瀉白散加沙蔘)

1) Sabaek-san(瀉白散)		
Herbs	Scientific Name	Dose(g)
桑白皮	Mori Cortex(Root cortex of <i>Morus alba</i> L.)	8.0
地骨皮	Lycii Radicus Cortex(Root cortex of <i>Lycium chinense</i> Mill.)	8.0
甘草	Glycyrrhizae Radix(Root of <i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH.)	4.0
Total amount		20.0
2) Sabaeksan Plus Sasam(瀉白散加沙蔘)		
Herbs	Scientific Name	Dose(g)
桑白皮	Mori Cortex(Root cortex of <i>Morus alba</i> L.)	8.0
地骨皮	Lycii Radicus Cortex(Root cortex of <i>Lycium chinense</i> Mill.)	8.0
甘草	Glycyrrhizae Radix(Root of <i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH.)	4.0
沙蔘	Adenophorae Radix(Root of <i>Adenophora triphylla</i> var. <i>japonica</i> HARA)	6.0
Total amount		26.0

gen(Type II)으로 사전 처리된 6-well plate로 옮겨 36시간동안 성장시켰다 (80~90%로 성장). 조제된 검액을 처리하고 24시간 후 TNF- α (100ng/ml), IL-1 β (10ng/ml), histamine(111ng/ml=1 μ M)을 함께 세포에 처리하여 48시간 후, 배양액을 제거하고 세포에 RNAzol을 직접 처리하여 total RNA의 분리에 사용하였다. 검액의 농도는 최종농도가 각각 2, 40, 100 μ g/ml로 되도록 처리하였으며 각 실험조건에 관하여 3번을 반복하였다. 세포에 아무런 처리도 하지 않은 군을 정상군(normal group), 세포에 TNF- α , IL-1 β 및 histamine을 처리한 군을 대조군(control group), 세포에 검액과 TNF- α , IL-1 β 및 histamine을 처리한 군을 실험군(sample group)으로 정하였다.

3) mRNA의 준비와 RT-PCR analysis

TNF- α (100ng/ml), IL-1 β (10ng/ml), histamine(111ng/ml=1 μ M)을 세포에 처리하고 48시간 후에 6-well plate의 각 well로부터 total RNA를 분리하고 oligo dT primer와 reverse transcriptase로 cDNA를 구하였다. 이를 polymerase chain reaction(PCR)에 이용하였으며, IL-6, IL-8, GM-CSF의 mRNA 발현의 정량화를 위하여 β -actin의 mRNA 발현을 internal standard로 하였다. RT-PCR 실험에 사용된 조건은 시약제공회사에서 제시된 과정을 따랐다.

4) 전기영동과 영상분석

PCR산물은 ethidium bromide(1 μ g/ml)가 함유된 2% 아가젤(TAE 완충용액)로 100V하에서 15분간 전기영동하여 분리된 띠를 UV의 조사하에서 영

상화하였으며, 영상획득 장치(Image Master Total Lab, Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)로 디지털화하여 정량화하였다.

5) 통계처리 방법

3회 이상의 독립적인 실험에서 얻어진 결과를 통계처리하여 평균과 표준편차를 구하였고, 유의성 평가는 student T test를 이용하였다.

III. 結果

IL-6, IL-8 및 GM-CSF는 천식의 발

병기전에 있어 중요한 cytokine으로서 BEAS-2B 세포에 TNF- α , IL-1 β 및 histamine을 처리하여 실험적으로 발현을 유발시켰다. 본 연구는 이러한 실험 조건에서 瀉白散 및 瀉白散加沙參이 천식관련 cytokine의 발현에 미치는 영향을 조사하였고 유의한 결과를 얻었다.

1. BEAS-2B 세포에 미치는 TNF- α , IL-1 β 및 histamine의 영향

정상군 BEAS-2B 세포에 TNF- α (50ng/ml), IL-1 β (5ng/ml), histamine(111ng/ml=1 μ M)을 투여하였을

Table 2. Effects of TNF- α , IL-1 β and Histamine on the mRNA Expression Levels of IL-6, IL-8 and GM-CSF of BEAS-2B Cells Compared to the Expression of the Internal Standard(β -actin)

Conditions	The Ratio of mRNA Expression Level(%)		
	IL-6	IL-8	GM-CSF
Normal group	14.10 \pm 6.87 ^a	18.43 \pm 3.77	26.09 \pm 4.25
Control group	96.25 \pm 17.07	99.74 \pm 12.15 [*]	147.94 \pm 37.76

Normal group : untreated group.

Ccontrol group : group treated with TNF- α , IL-1 β and histamine.

a) : Mean \pm standard deviation.

* Indicates that p values are lower than 0.05 when compared to normal group.

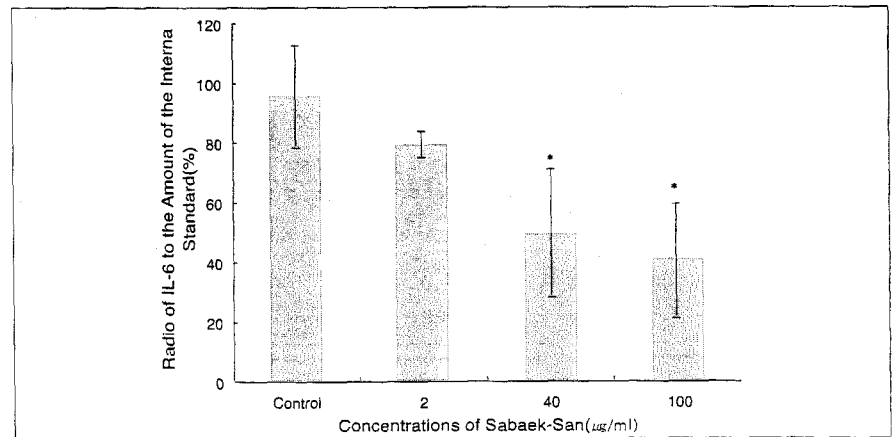


Fig. 1. Dose-dependent effects Sabaek-san(瀉白散) on the mRNA expression levels of IL-6 in BEAS-2B cells.

Control : group treated with TNF- α , IL-1 β and histamine.

2 ; group treated with Sabaek-san 2 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.

40 ; group treated with Sabaek-san 40 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.

100 ; group treated with Sabaek-san 100 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.

* Indicates that p values are lower than 0.05 when compared to control group

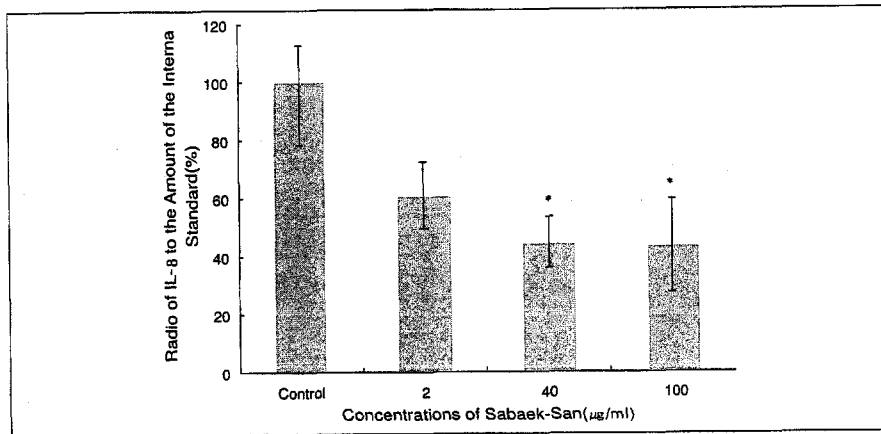


Fig. 2. Dose-dependent effects of Sabaek-san(瀉白散) on the mRNA expression levels of IL-8 in BEAS-2B cells.

Control ; group treated with TNF- α , IL-1 β and histamine.
 2 ; group treated with Sabaek-san 2 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 40 ; group treated with Sabaek-san 40 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 100 ; group treated with Sabaek-san 100 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 * Indicates that p values are lower than 0.05 when compared to control group.

Table 3. Dose-Dependent Effects of Sabaek-san(瀉白散) on the mRNA Expression Levels of IL-6, IL-8 and GM-CSF in BEAS-2B Cells

Concentrations of Sabaek-san(μ g/ml)		The Ratio of mRNA Expression Level(%)		
		IL-6	IL-8	GM-CSF
Control		96.25 \pm 17.07 ^{a)}	99.74 \pm 12.15	147.94 \pm 37.76
Sample	2	79.54 \pm 4.29	60.13 \pm 12.46 [*]	96.58 \pm 11.76
	40	49.36 \pm 21.41 [*]	44.34 \pm 9.05 [*]	74.76 \pm 34.28
	100	40.61 \pm 18.98 [*]	43.03 \pm 16.10 [*]	62.26 \pm 15.42 [*]

Control : group treated with TNF- α , IL-1 β and histamine.
 Sample : group treated with Sabaek-san 2, 4, 100 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 a) : Mean \pm standard deviation.
 * Indicates that p values are lower than 0.05 when compared to control group.

Table 4. Dose-Dependent Effects of Sabaeksan Plus Sasam(瀉白散加沙蔘) on the mRNA Expression Levels of IL-6, IL-8 and GM-CSF in BEAS-2B Cells

Concentrations of Sabaeksan Plus Sasam(μ g/ml)		The Ratio of mRNA Expression Level(%)		
		IL-6	IL-8	GM-CSF
Control		96.25 \pm 17.07 ^{a)}	99.74 \pm 12.15	147.94 \pm 37.76
Sample	2	81.49 \pm 15.20	81.83 \pm 14.60	99.12 \pm 11.64
	40	63.22 \pm 23.97	72.09 \pm 4.63 [*]	76.65 \pm 20.77
	100	51.17 \pm 15.46 [*]	46.68 \pm 15.17 [*]	59.65 \pm 25.61 [*]

Control : group treated with TNF- α , IL-1 β and histamine.
 Sample : group treated with Sabaeksan Plus Sasam(瀉白散加沙蔘) 2, 4, 100 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 a) : Mean \pm standard deviation.
 * Indicates that p values are lower than 0.05 when compared to control group.

때 IL-6, IL-8과 GM-CSF는 각각 6.83, 5.41, 3.92배 증가하였다 (p<0.05)(Table 2).

2. 瀉白散이 IL-6, IL-8 및 GM-CSF의 발현에 미치는 효과

TNF- α , IL-1 β , histamine의 최종농도가 각각 100ng/ml, 10ng/ml, 1 μ M(=111ng/ml)인 상태에서 BEAS-2B 세포에서 유발된 cytokine의 mRNA 발현을 RT-PCR로 연구하였다. 瀉白散에 의해 IL-6, IL-8, GM-CSF mRNA의 발현이 용량의존적으로 유의하게 억제되었다(Table 3, Fig. 1~3).

3. 瀉白散加沙蔘이 IL-6, IL-8 및 GM-CSF의 발현에 미치는 효과

TNF- α , IL-1 β , histamine의 최종농도가 각각 100ng/ml, 10ng/ml, 111ng/ml(=1 μ M)인 상태에서 BEAS-2B 세포에서 유발된 cytokine의 mRNA 발현을 RT-PCR로 연구하였다. 瀉白散加沙蔘에 의해 IL-6, IL-8, GM-CSF mRNA의 발현이 용량의존적으로 유의하게 억제되었다(Table 4, Fig. 4~6).

IV. 考 察

천식은 기도의 염증이 병리 과정에서 필수적이며, 염증반응은 기도의 과민성과 기류폐쇄를 가속화시키는 촉진제 역할을 한다고 보고되고 있다.¹⁵ 그리고 기도의 염증은 천식의 공통적인 임상양상이며 경중에 관계없이 천식의 모든 시기에 기도의 벽에 활성화된 호산구(eosinophil)와 비만세포(mast cell)의 확인이 가능하며,¹⁶ 이런 염증세포(inflammatory cell)의 존재는 천식환자의 기도 내에서 증가된 cytokine의

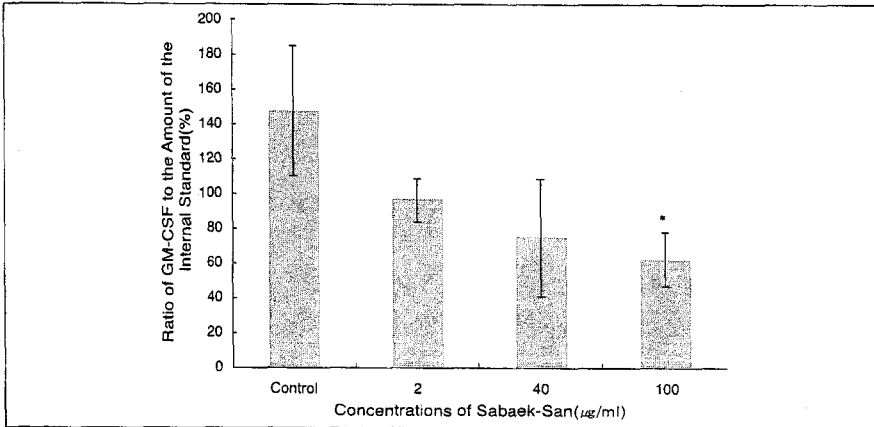


Fig. 3. Dose-dependent effects of Sabaek-san(瀉白散) on the mRNA expression levels of GM-CSF in BEAS-2B cells.

Control ; group treated with TNF- α , IL-1 β and histamine.
 2 ; group treated with Sabaek-san 2 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 40 ; group treated with Sabaek-san 40 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 100 ; group treated with Sabaek-san 100 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 * Indicates that p values are lower than 0.05 when compared to control group.

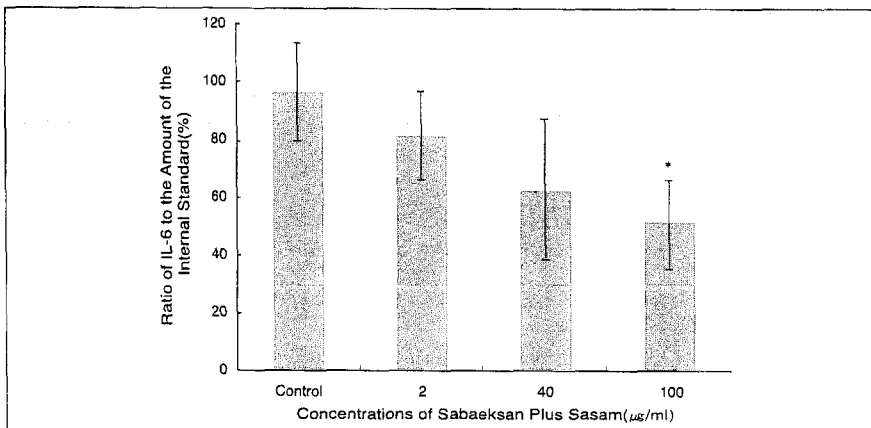


Fig. 4. Dose-dependent effects of Sabaeksan Plus Sasam(瀉白散加沙蔘) on the mRNA expression levels of IL-6 in BEAS-2B cells.

Control ; group treated with TNF- α , IL-1 β and histamine.
 2 ; group treated with Sabaeksan plus Sasam 2 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 40 ; group treated with Sabaeksan plus Sasam 40 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 100 ; group treated with Sabaeksan plus Sasam 100 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 * Indicates that p values are lower than 0.05 when compared to control group.

존재로 확인할 수 있다.¹⁷

천식에는 여러 종류의 염증세포와 매개물질이 관련되는데 IgE와 비만세포는 천식의 초기 반응에, 호산구와 호산구 과립 단백질은 후기 반응에 관계되며, Th2 cell도 IL-4, IL-5, IL-6, IL-9와

IL-13 등 cytokine을 생산하여, 이들 초기와 후기 반응을 조절함으로써 천식에 관련된다. 최근의 연구에서는 기관지 상피세포도, 조직에 염증을 유발하고 지속시키는 chemokine들을 생산하여 Th2 cell에서 유래한 cytokine들과 함께 기

도의 염증에 관계하는 것으로 보고되고 있다. 즉 알레르기성 천식에서 Th2 cell은 항원을 인지하고 염증을 유발시키며 지속시키는데 중추적인 역할을 하고, 호산구는 proinflammatory cytokine을 분비하여 상피세포를 손상시키고, 비만세포, 상피세포, 호염구, 섬유아세포, 평활근 세포와 대식세포는 조직 염증을 유발하며, Th2 cell 및 호산구 작용에 영향을 미치는 cytokine을 분비하여 천식의 발병에 관여한다.¹⁸

따라서 천식의 발생기전과 그 치료과정을 연구하기 위해서는 이들 cytokine들의 변화를 확인해야 하며, 이를 위해 분자생물학적 실험기법을 도입하였고, 이러한 연구방법은 염증반응이나 면역에 관여하는 여러 cytokine들과 chemokine들의 증감을 관찰함으로써 세포 단계에서의 조직손상 및 치유과정을 설명하고 있다.^{19,20} 한의학에서도 이러한 분자생물학적인 연구방법을 도입하여 몇몇의 연구가 진행되었는데, RBL-2H3 세포주를 이용하여 解表二陳湯, 小青龍湯의 IL-1, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF- α 에 대한 조절 효과를 보고한 연구^{6,9}와, 같은 세포주를 이용하여 瀉白散, 甘草, 麥門冬, 五味子, 杏仁, 桔梗 등의 IL-4, IL-5, IL-6에 대한 조절효과를 보고한 연구^{7,8,10}들이 있다. 천식과 관련된 cytokine 발현 조절에 관한 분자생물학적인 연구에서 처방과 개별 한약재가 천식의 기관지 염증 반응을 억제시킴으로써 천식에 대한 치료효과를 가진 것으로 생각된다.

이들 염증 관련 cytokine 중 이번 실험에서 변화를 관찰하고자 하는 cytokine은 기관지 상피세포에서 발현되는 IL-6, IL-8, GM-CSF이다.

IL-6은 폐포 대식세포에서 주로 생성되며, 혈중 단핵구와 비만세포에서도 생

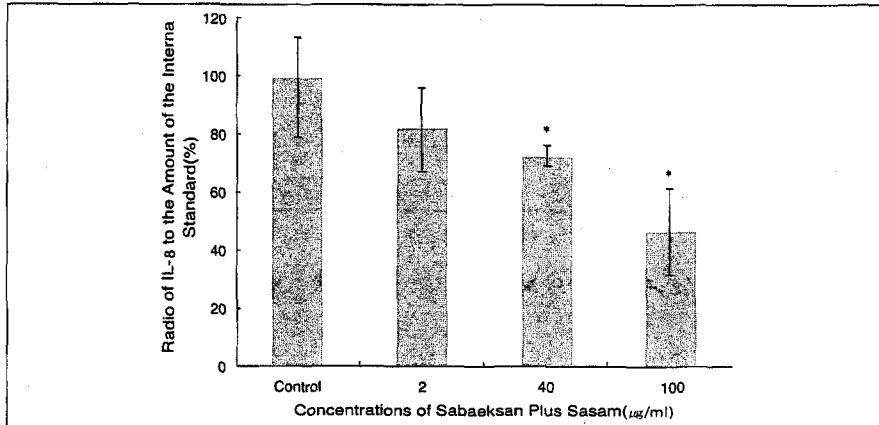


Fig. 5. Dose-dependent effects of Sabaeksan Plus Sasam(瀉白散加沙蔘) on the mRNA expression levels of IL-8 in BEAS-2B cells.

Control ; group treated with TNF- α , IL-1 β and histamine.
 2 ; group treated with Sabaeksan plus Sasam 2 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 40 ; group treated with Sabaeksan plus Sasam 40 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 100 ; group treated with Sabaeksan plus Sasam 100 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 * Indicates that p values are lower than 0.05 when compared to control group.

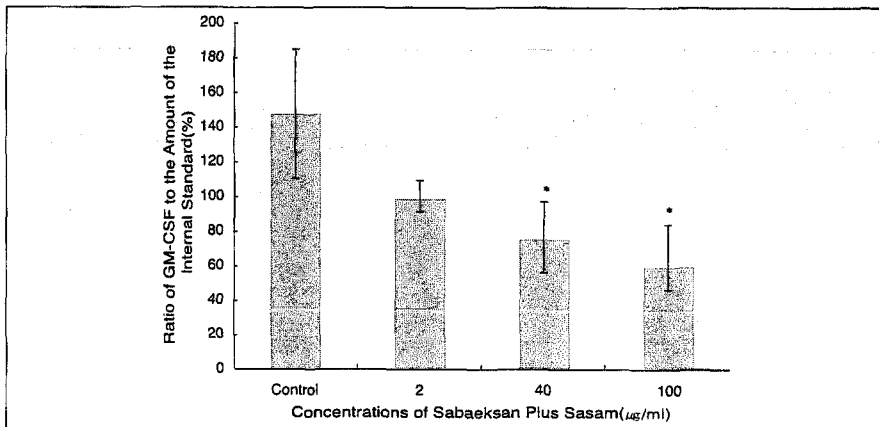


Fig. 6. Dose-dependent effects of Sabaeksan Plus Sasam(瀉白散加沙蔘) on the mRNA expression levels of GM-CSF in BEAS-2B cells.

Control ; group treated with TNF- α , IL-1 β and histamine.
 2 ; group treated with Sabaeksan plus Sasam 2 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 40 ; group treated with Sabaeksan plus Sasam 40 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 100 ; group treated with Sabaeksan plus Sasam 100 μ g/ml and TNF- α , IL-1 β , histamine.
 * Indicates that p values are lower than 0.05 when compared to control group.

성되어, IL-4, IL-9와 함께 비만세포로 하여금 염증유발물질을 분비하게 하여, 천식의 일반적인 특징인 기도 점막의 과증식과 이상분비물 증가에 관여한다. 특히 외인성 천식 환자의 혈장에서 유의하게 증가한다.²¹ IL-6 유전자 발현은 TNF- α 를 이용한 자극 후에 다양한 세

포균에서 유도되고, 반면에 스테로이드 제제 처리로 감소된다.¹³ 천식이나 다른 호흡기 질환에서 기관지 평활근으로부터 분비되는 IL-6의 정확한 역할은 밝혀지지 않았지만, IL-6을 분비하는 기관지 평활근의 다양한 세포들은 기도의 염증을 증가시키거나 억제하는데 깊숙

이 관여되어 있다.¹³

IL-8은 중성구(neutrophil)의 화학주성인자(chemo-attractant)로서 기도에 중성구를 축적시키고 진행성 폐손상을 일으킨다. 세균감염은 기도 상피세포 표면에 IL-8의 발현을 유도하여, 중성구를 기도로 모이게 한다.²² IL-8은 기도에 중성구 염증을 일으키고, 천식의 특징인 기도 과민성 유발에 중요한 역할을 한다.²³

GM-CSF는 호산구 활성화 cytokine의 일종으로, 천식의 염증과정을 총괄하는 Th2 cell에 의해서 생산되어, IL-3, IL-5와 더불어 기도의 염증부위에 호산구를 모이게 하고, 호산구의 생존을 연장시키며, 활성화된 호산구로부터 독성 과립단백(toxic granule protein)을 분비하게 하여 조직과 상피세포의 손상을 일으킨다.²⁴⁻²⁸ 호산구는 천식 염증 반응에서 중추적인 역할을 담당하는데, 후기 단계반응(late-phase response) 및 기관지 과민성과 연관이 있다.²⁶ GM-CSF는 이러한 호산구의 과립형성과 호흡기의 섬유화 작용을 유도하여, 심각한 천식에 있어 지속적인 기도 염증을 유발하는 원인이 된다.^{28,29}

이처럼 천식에 있어서 이들 IL-6, IL-8과 GM-CSF가 기도의 염증을 유발하므로, 이들 cytokine의 발현을 억제시킬 수 있다면, 천식의 악화 과정에서 중요한 역할을 하는 기도의 염증양상 및 염증성 매개인자의 발생과 발현을 억제시킬 수 있어 천식의 치료에 일정한 역할을 할 수 있을 것이다.¹⁶ 본 연구에서는 瀉白散과 瀉白散加沙蔘이 이러한 cytokine을 조절하는지 여부를 실험을 통해 분석하였다.

瀉白散은宋代錢乙의「小兒藥證直訣」에 처음으로 수록되었고, 淸肺瀉熱·止咳平喘하는 효능으로 肺熱로 해

수가 심하여 氣急하고 皮膚蒸熱하며 오 후에 발열이 더욱 심하고 舌紅苔黃하고 脈이 細數한 증상을 치료한다.³⁰ 구성약물의 공통된 性은 寒이고, 味는 甘, 辛, 苦며, 歸經은 肺, 脾, 肝, 腎經이다.¹² 瀉白散의 구성약물 중 桑白皮는 淸肺瀉熱하고 止咳平喘하는 효능이 있어 君藥으로 하였고, 地骨皮는 君藥의 肺中伏火를 瀉하는 작용을 협조함으로써 氣가 順降하게 되고 아울러 허열을 퇴하게 하므로 臣藥으로 하였으며, 炙甘草는 養胃和中하고 肺氣가 상하는 것을 방지하므로 佐·使藥으로 하였다. 이와 같은 처방구성으로 瀉白散은 瀉肺平喘하면서 正氣를 상하지 않게 한다.³⁰ 이 등³¹은 瀉白散과 瀉白散加訶黎勒이 acetylcholine이나 norepinephrine에 의해 수축된 기관지 평활근과 혈관 평활근을 현저하게 이완시키는 관찰하였고, 김 등³²은 瀉白散과 瀉白散의 각 구성약물이 쥐의 anaphylatic shock와 피하반응에 미치는 영향을 관찰한 결과 桑白皮가 항알레르기 효과가 있음을 밝혔고, 이 등¹²은 瀉白散이 즉시형 및 지연형 allergy, 면역반응, 폐색전 및 폐손상에 대하여 실험적으로 효과가 있음을 보였으며, 허 등¹⁰은 瀉白散이 천식 유발 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-6의 발현을 억제한다고 보고하였다.

沙蔘은 초롱꽃과 잔대(Adenophora triphylla var. japonica HARA)의 뿌리를 건조한 것으로, 微寒無毒하고, 味甘하며, 肺 胃經에 들어가 肺陰不足을 養陰하고 肺燥를 滋陰하므로 肺燥乾咳와 肺陰不足에 응용하며, 또한 胃陰不足을 養하여 津液을 生津케 하고, 虛熱을 淸熱시켜 熱病傷陰으로 인한 胃燥咽乾口渴의 증에 상용한다.³³ 沙蔘에 관한 연구로 신 등³⁴은 沙蔘이 T cell의 수는 감소시키고, B cell의 수는 증가시켜 세포성

면역과 체액성 면역에 있어서 서로 다른 작용으로 면역조절효과를 발현한다고 하였으며, 박 등³⁵은 加味沙蔘麥門冬湯의 항암활성과 방사선부작용 억제효과를 보고하였고, 김 등³⁶은 薺苳와 沙蔘의 淸肺, 淸熱, 解毒 효과를 비교하여 보고하였다. 沙蔘은 문헌상에 肺陰不足을 補하여 肺燥乾咳를 치료한다고 되어 있으나³³ 沙蔘이 호흡기 질환에 미치는 작용에 대한 연구는 없었다.

IL-6, IL-8, GM-CSF는 천식의 발생에 있어 기도내 염증을 유발시키는데 주된 작용을 하는 cytokine으로 기관지 상피세포에 TNF- α , IL-1 β 및 histamine을 처리하면 그 발현을 유발시킬 수 있다.¹³ 본 실험에서는 인간 기관지 상피세포에 瀉白散, 瀉白散加沙蔘을 처리한 후 proinflammatory cytokine(TNF- α , IL-1 β , histamine)을 처리하여 IL-6, IL-8, GM-CSF의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 분석하여 이들 처방과 개별 한약재의 천식 치료 기전을 조사하였다. IL-6, IL-8, GM-CSF의 mRNA의 정량화를 위하여 세포 내에서 항상 비슷한 정도로 발현되어 있다고 알려진 유전자 중의 하나인 β -actin의 mRNA 발현을 internal standard로 하였다. 모든 실험은 독립된 3회 이상의 실험을 반복하여 얻어진 결과를 통계처리하여 평균과 표준편차를 구하였고, 유의성 평가는 student T test에 근거하여 수행하였다.

瀉白散에 대한 연구에서, IL-6 mRNA의 발현은 瀉白散 추출물 2, 40, 100 μ g/ml에 의해 대조군에 비해 각각 약 17%, 49%($p < 0.05$), 58%($p < 0.05$)가 억제되었다. 이는 basophil을 이용하여 瀉白散의 IL-6에 대한 유의성있는 억제효과를 보고한 허¹⁰의 보고와 비슷한 결과를 나타내었다. IL-8 mRNA의

발현은 각각 약 40%, 56%, 57%가 억제되었으며($p < 0.05$), GM-CSF의 발현은 각각 약 35%, 49%, 58%($p < 0.05$)가 억제되었다(Table 3, Fig. 1~3).

瀉白散加沙蔘에 대한 연구에서, IL-6 mRNA의 발현은 瀉白散加沙蔘 추출물 2, 40, 100 μ g/ml에 의해 대조군에 비해 각각 약 15%, 34%, 47%($p < 0.05$)가 억제되었고, IL-8 mRNA의 발현은 각각 약 18%, 28%($p < 0.05$), 53%($p < 0.05$)가 억제되었으며, GM-CSF의 발현은 각각 약 33%, 48%($p < 0.05$), 60%($p < 0.05$)가 억제되었다(Table 4, Fig. 4~6). 瀉白散加沙蔘의 천식 유발 cytokine에 대한 억제효과가 瀉白散 단독의 효과보다 오히려 감소하는 것을 볼 수 있다. 이는 각 실험을 3회 반복하여 평균을 낸 수치를 비교한 것이므로 표준편차의 범위 내의 오차이기는 하지만, 沙蔘을 가미함으로써 瀉白散의 천식치료효과가 약화되는 경향을 보인 것은 분명하므로 瀉白散의 瀉肺하는 효능과 沙蔘의 養肺陰하는 효능 사이에 상호 길항하는 작용이 있다고 생각된다.

이상의 실험 결과는, 瀉白散과 瀉白散加沙蔘이 천식의 병태생리에서 중요한 역할을 하는 염증 유발 cytokine인 IL-6, IL-8과 GM-CSF의 발현을 억제함으로써 비만세포, 중성구, 호산구가 일으키는 기도의 염증을 완화시켜 천식 치료 효과를 가진다는 것을 입증하는 것이다.

V. 結 論

瀉白散 및 瀉白散加沙蔘의 천식에 대한 효과를 관찰하기 위해 인간의 기관지 상피세포에서 기원한 BEAS-2B cell에 이들 한약 전탕액의 추출물을 투여한 후 TNF- α , IL-1 β , histamine을 처

리하여 천식의 기도 염증반응에 관여한다고 알려진 대표적 cytokine인 IL-6, GM-CSF와 IL-8의 mRNA 발현에 미치는 영향을 살펴 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. IL-6 mRNA의 발현은 瀉白散 추출물 40 μ g/ml, 100 μ g/ml(각각 p<0.05) 농도에서, 瀉白散加沙蔘 추출물에서는 100 μ g/ml(p<0.05) 농도에서 대조군에 비해 유의한 억제 효과가 인정되었다.

2. IL-8 mRNA의 발현은 瀉白散 추출물 2, 40, 100 μ g/ml(각각 p<0.05) 농도에서, 瀉白散加沙蔘 추출물에서는 40 μ g/ml, 100 μ g/ml(각각 p<0.05) 농도에서 대조군에 비해 유의한 억제 효과가 인정되었다.

3. GM-CSF mRNA의 발현은 瀉白散 추출물 100 μ g/ml(p<0.05) 농도에서, 瀉白散加沙蔘 추출물 40, 100 μ g/ml(각각 p<0.05) 농도에서 대조군에 비해 유의한 억제 효과가 인정되었다.

參考文獻

- Hallsworth MP, Moir LM, Lai D, Hirst SJ. Inhibitors of Mitogen-activated Protein Kinases Differentially Regulate Eosinophil-activating Cytokine Release from Human Airway Smooth Muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:688-97.
- Stellato C, Beck LA, Gorgone GA, Proud D, Schall TJ, Ono SJ et al. Expression of chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line: modulation by chemokines and glucocorticoids. *J. Immunol* 1995; 155(1):410-8.
- 이형구, 정승기. 동의계내과학. 10판. 서울:도서출판 아트동방; 1999, PP.162-202.
- 길촌영성, 최석봉, 정승기, 이형구. 효천증에 관한 임상적 연구. 대한한의학회지 1987;8(2):32.
- 조영민, 이경기, 조일현, 차은수, 정희재, 정승기 등. 효천증에 관한 임상적 연구, 제19회 전국한의학 학술대회 발표논문집 1997:141-51.
- 백동진, 정희재, 이형구, 정승기. 해표이진탕가감방이 Asthma model 내의 Cytokine에 미치는 영향. 대한한의학회지 2000;21(3):3-13.
- 이동생, 정희재, 정승기, 이형구. 맥문동과 오미자가 Asthma model 내의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 영향. 경희의학 2000;16(2):69-80.
- 정욱, 정희재, 정승기, 이형구. 행인과 길경이 Asthma model 내의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 영향, 대한한방내과학회지 2000;21(1):31-8.
- 차은수, 정희재, 정승기, 이형구. 소청룡탕이 Asthma model 내의 Cytokine에 미치는 영향. 경희한의대논문집 2000; 23(1):71-88.
- Heo TS, Jung HJ, Kim HY, Jung SK, Rhee HK. The Effects of Sabaek-san and Glycyrrhizae Radix on IL-4, IL-5 and IL-6 in asthma model. *Journal of Oriental Medicine* 2000;5(1):1-13.
- 전울. 소아약중적결. 서울: 의성당; 1994, P.47.
- 이순호, 한상환. 肺實證에 응용된 瀉白散의 문헌적 고찰. 대한한방내과학회지 1995;15(2):274-80.
- McKay S, Hirst SJ, Haas MB, de Jongste JC, Hoogsteden HC, Saxena PR et al. Tumor Necrosis Factor- α Enhances mRNA Expression and Secretion of Interleukin-6 in Cultured Human Airway Smooth Muscle Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23(1):103-111.
- Xue ML, Willcox MD, Lloyd A, Wakefield D, Thakur A. Regulatory role of IL-1beta in the expression of IL-6 and IL-8 in human corneal epithelial cells during Pseudomonas aeruginosa colonization. *Clin Experiment Ophthalmol* 2001;29(3):171-4.
- O'Byrne PM. Airway inflammation and asthma. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10 Suppl 2:18-24.
- Busse WW. Inflammation in asthma: the cornerstone of the disease and target of therapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102(4Pt2):S17-22.
- Denburg JA. The inflammatory response. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(6Pt2):S11-3.
- Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* 1999;104(8):1001-6.
- Carlos AG, Carlos ML, Conceisao SM, Alcinda M. Cytokines and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1997;7(5):270-3.
- Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Jose PT, Williams TJ. Animal models of asthma: role of chemokines. *Methods Enzymol* 1997;288:241-66.
- Wong CK, Ho CY, Ko FW, Chan CH, Ho AS, Hui DS et al. Proinflammatory cytokines(IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines(IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol* 2001;125(2):177-83.

22. Inoue H. Interleukin-8 and airway inflammation. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 1999;37(9):673-9.
23. Lu K, Qi H, Wang W. The relationship between interleukin-8 and airway hyperresponsiveness. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 1997;20(5):280-2.
24. Park CS, Choi YS, Ki SY, Moon SH, Jeong SW, Uh ST et al. GM-CSF is the main cytokine enhancing survival of eosinophils in asthmatic airway. *Eur Respir J* 1998;12:872-8.
25. Leung DY. Molecular basis of allergic diseases. *Mol Genet Metab* 1998; 63(3):157-67.
26. Ferreira MB, Palma Carlos AG. Cytokines and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1998;8(3):141-8.
27. Sato M, Takizawa H, Kohyama T, Ohtoshi T, Takafuji S, Kawasaki. Eosinophil Adhesion to Human Bronchial Epithelial Cells:regulation by cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:203-5.
28. Xing Z, Braciak T, Ohkawara Y, Sallenave JM, Foley R, Sime PJ et al. Gene transfer for cytokine functional studies in the lung: the multifunctional role of GM-CSF in pulmonary inflammation. *J Leukoc Biol* 1996; 59(4):481-8.
29. Turlej RK, Fievez L, Sandersen CF, Dogne S, Kirschvink N, Lekeux P et al. Enhanced survival of lung granulocytes in an animal model of asthma:evidence for a role of GM-CSF activated STAT5 signalling pathway. *Thorax* 2001;56:696-702.
30. 이상인, 김동걸, 노승현, 이영종, 주영승. 방제학. 서울: 영림사; 1992, PP.130-1.
31. 이순호, 한상환. 瀉白散과 瀉白散加訶黎勒이 호흡기계에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 1995;16(1):104-29.
32. 김민호, 한상환, 전병득. 瀉白散이 Compound 48/80에 의하여 유도된 Anaphylatic Shock와 피하반응에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 1990; 11(2):22-42.
33. 전국한의과대학 본초학교실 공편저. 본초학. 서울: 영림사; 1992, P.157.
34. 신동훈, 서영배. 沙蔘의 면역조절작용에 대한 실험적 연구. 대한본초학회지 2000;15(1):31-43.
35. 박양춘, 김병탁. 加味沙蔘麥門冬湯이 함암 활성화와 방사선부작용 억제효과에 미치는 영향. 대전대학교한의학연구소논문집 1999;8(1):403-24.
36. 김재학, 안덕균. 薺蔞와 沙蔘 중의 유리당 함량 및 효능에 관한 비교연구. 대한본초학회지 1992;7(1):3-13.