

## 水蛭의 製法에 따른 BEAS-2B 人間 氣管支上皮細胞의 炎症誘發性 Cytokines 發顯에 미치는 影響

한동하, 정희재, 정승기, 이형구  
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

### A Study the Effects of Three Preparations of Hirudo on the Expression of Pro-inflammatory Cytokines in Human Bronchial Epithelial Cells Line BEAS-2B

Dong-Ha Han, Hee-Jae Jung, Sung-Ki Jung, Hyung-Koo Rhee

Division of Respiratory System, Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

**Backgrounds** : In recent years, asthma has become recognized as a chronic inflammatory disease associated pathologically with airway epithelial inflammation and airway remodeling.

**Objectives** : To evaluate the different effects of Hirudo depending upon pharmaceutical manufactures on the expression and the activities of IL-6 and GM-CSF in airway epithelial cells, samples of Hirudo(水蛭), Hirudo toasted with Talcum(水蛭滑石炒) and Hirudo toasted with Ephedrae Herba(水蛭麻黃炒) were tested.

**Methods** : After inducing enhanced messenger RNA(mRNA) expression and secretion of each cytokine by tumor necrosis factor-alpha(10 ng/ml) treatment, cultured human bronchial epithelial cell line BEAS-2B was added to each sample(1, 10, 100 & 1000  $\mu$ g/ml). Subsequently, DNA activities were analyzed. Specifically mRNA expression and culture supernatants(protein levels) of IL-6 and GM-CSF from BEAS-2B cells, were analyzed using luciferase reporter gene assay, reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) analysis and enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results** : Hirudo toasted with Ephedrae Herba(水蛭麻黃炒) and Hirudo(水蛭) inhibited IL-6 activities in BEAS-2B cells remarkably, and inhibited mRNA expression levels and protein levels in supernatant of IL-6 and GM-CSF at various concentrations, significantly(P<0.05). However, Hirudo toasted with Talcum(水蛭滑石炒) had no effect on mRNA expression levels and showed a slight inhibitory effect on GM-CSF protein levels in supernatant of culture medium.

**Conclusions** : These results strongly suggest that Hirudo toasted with Ephedrae Herba(水蛭麻黃炒) and Hirudo(水蛭) would be serve as effective medicaments in the treatment of airway inflammation and remodeling of asthmatic patients.

**Key Words**: asthma, Hirudo(*Whitmania pigra* Whitman), cytokine, IL-6, GM-CSF

### 1. 緒 論

기관지천식(이하 천식)은 기도의 만성적인 염증, 기도 과민성 및 remodeling을 특징으로 하는 질환으로 최근 지속적인 증가추세에 있고 전통적으로 천식을 가역적인 질환이라고 정의하고 있지만, 많은

연구결과들은 기도의 remodeling과 관련하여 비가역적으로 변화함을 시사하고 있다<sup>1</sup>.

천식의 원인에 있어 최근의 관심은 Th2 림프구 외에도 기도자체의 문제와 더불어 기도의 염증과 remodeling에 초점이 맞춰지고 있고<sup>2</sup>, 일련의 연구 결과에서 여기에 thrombin<sup>3</sup>, 혈소판 및 혈소판-활성인자<sup>4</sup> 등도 관여하고, heparin이 기도의 염증을 억제한다는 이론들<sup>5</sup>이 보고되고 있는데, 이는 한의학적 인 瘀血 및 活血祛瘀法과 관련하여 접근할 수 있을 것으로 보인다.

· 접수 : 2004. 10. 11 · 채택 : 2004. 11. 3  
· 교신저자 : 한동하, 경기도 군포시 산본동 1100-1  
남천한방병원 한방내과  
(Tel. 031-390-2012 Fax. 031-390-2190  
E-mail : gamchoo@hanmail.net)

한의학에서는 천식을 哮喘證과 유사하게 보고 있으며<sup>6</sup>, 瘀血이 哮喘을 유발한다는 문헌적 고찰은 찾아 볼 수 없었다.

水蛭은 《神農本草經》<sup>7</sup>에 처음 기록된 活血祛瘀의 대표적인 약물로서 많은 種이 약용으로 활용되고 있으며<sup>8</sup>, 근래에 들어 심혈관질환, 뇌혈관질환 등 다양한 질환<sup>9</sup> 및 천식<sup>10</sup>, 알레르기 질환<sup>11</sup> 등에도 응용되어지고 있다.

水蛭과 관련된 국내외 연구를 살펴보면, 국내 연구로 혈전증 및 임신에 미치는 영향<sup>12</sup>, 문헌적인 고찰<sup>13</sup>, 유효성분 분리가 연구<sup>14</sup> 보고되었고, 국외에서는 대부분의 경우가 심혈관계 질환과 관련하여 연구보고<sup>13</sup> 하였고, 만성폐색성 폐질환 등의 호흡기 질환 및 천식의 임상연구<sup>15</sup>, 制法에 관한 실험적 연구<sup>16</sup> 등이 보고되었고, 그 외 水蛭로부터 hirudin을 포함한 많은 활성물질이 분리되어 활용중이고, 특히 항염증효과가 있는 tessulin이라는 단백질은 면역세포 활성도를 감소시키는 효과<sup>17</sup>가 있어 水蛭의 항염증효과에 근거를 제시하고 있다.

水蛭에 관한 연구 중 韓 등<sup>18</sup>은 水蛭麻黃炒를 이용하여 인간 기관지 상피세포로부터 발현되는 Interleukin-6(IL-6), IL-16 및 granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF) mRNA의 발현억제 효과를 보고하여 水蛭의 천식에 대한 활용의 가능성을 실험적으로 증명하였으나, 임상활용에 있어 生用과 炒用 등 수처방법에 따른 효능 차이<sup>11,16</sup>에 대한 연구는 미진한 편이다.

이에 저자는 水蛭의 制法에 따른 천식에 미치는 효과의 차이를 알아보고자 acetylcholine으로 유발시킨 기관지수축에 미치는 영향 및 BEAS-2B 인간 기관지상피 세포주에 TNF- $\alpha$ 를 처리하여 염증을 유발시킨 후, luciferase reporter gene assay을 통해 IL-6의 활성도를 확인하고, IL-6 및 GM-CSF mRNA 및 protein levels를 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) analysis과 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하여 살펴본 결과 이들 cytokines의 발현 억제효과에 유의성이 인정되어 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재료 및 사용기기

#### 1) 약재

실험에 사용된 水蛭은 寬體金線蛭(*Whitmania pigra* Whitman)로 5-6월경 중국의 광둥성, 광서성, 절강성에서 채취된 것으로 경동약업사(화성, 한국)를 통하여 구입하여 감별한 후 다시 陽乾하여 사용하였다. 그리고 수치 및 실험샘플로 사용된 麻黃은 6-7월경 내몽고 자치지구에서 채취된 것으로 경동약업사(화성, 한국)를 통하여 구입 후 이용하였고, 수치에 사용된 滑石은 일본산(Nippon Talc co. Ltd.)으로 대홍약품(서울, 한국)을 통하여 구입 후 이용하였다.

#### (1) 水蛭

제법은 문헌<sup>8</sup>을 근거로 흐르는 물에 10여 차례 세척하여 감별한 후 陽乾을 통하여 단순 건조시킨 것이다.

#### (2) 水蛭滑石炒

제법은 문헌<sup>8</sup>을 근거로 하여 滑石을 볶을 수 있는 용기에 넣고 180-200℃ 정도의 열로 달군 다음 여기에 水蛭 단순건조물을 滑石과 7:10의 비율로 넣어 3.5-4분 정도 볶는다. 일정한 시간이 지나면 水蛭이 하얗게 색을 띠면서, 부풀어 오르는데 이 때 滑石은 버리고 水蛭만을 취한 것이다.

#### (3) 水蛭麻黃炒

제법은 韓 등<sup>18</sup>의 연구를 근거로 하여 水蛭 단순건조물을 연한 연두색을 띠는 동량의 麻黃과 함께 炒하여 麻黃이 갈색을 띠기 시작할 때, 麻黃은 버리고 水蛭만을 취한 것이다.

실험에 이용된 약물의 종류는 Table 1과 같다.

Table 1. List of Herbs

Herbs	Pharmaceutical Name
水 蛭	Hirudo
水蛭滑石炒	Hirudo toasted with Talcum
水蛭麻黃炒	Hirudo toasted with Ephedrae Herba
麻 黃	Ephedrae Herba

## 2) 검액의 조제

水蛭, 水蛭滑石炒 및 水蛭麻黃炒 각 100 g을 정확하게 중량을 측정된 뒤, 환류 추출기에 1차 증류수 2,000 ml와 함께 넣은 후, 100°C 가까이 온도가 상승하여 탱액이 끓는 시점으로부터 2시간동안 가열하여 추출한 다음, filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 이와 달리 麻黃은 20 g을 정확히 중량을 측정하여 증류수 400 ml를 넣고 상기와 동일한 방법을 거쳐 시료를 얻었다. 각각의 동결건조 추출물은 水蛭 7 g, 水蛭滑石炒 9.1 g, 水蛭麻黃炒 2.3 g 및 麻黃 2.4 g을 얻었으며, 수율은 水蛭 7%, 水蛭滑石炒 9.1%, 水蛭麻黃炒 2.3% 그리고 麻黃 12% 이었다. 동결 건조한 추출물들은 정량을 medium에 녹인 후 0.45  $\mu$ m syringe filter를 사용하여 filtering 하였다.

## 3) 실험동물

실험동물은 250~300 g 내외의 Sprague-Dawley계 수컷 흰 쥐(샌타코 실험동물, 한국)를 고품사료(샌타코 실험동물, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 2주 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

## 4) 시약 및 사용기기

실험에 사용한 시약은 NaCl, KCl,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , glucose, Acetylcholine (Ach)은 Sigma(Sigma Chemical Co., USA) 제품을 사용하였다. 기기는 환류추출기(Duksan, Korea), rotary evaporator(Eyela, Japan), freeze drier(Eyela, Japan), force-displacement transducer가 장착된 polygraph(Grass instrument Co., USA)를 사용하였다.

## 5) 세포주

본 실험에서 사용된 세포는 미국 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)사에서 구입한 BEAS-2B cell line으로 adenovirus 12-SV40로 전이된 human airway epithelial 세포주이다.

## 6) 배지 및 시약

세포배양에 필요한 medium인 Bronchial Epithelial

Cell Basal Medium(BEBM)과 growth factor인 Bronchial/Tracheal Epithelial Cell Growth Medium (BEGM) Bulletkit은 BioWhittaker Inc.(Walkersville, USA)에서 구입하였다. RNA의 정제를 위하여 TRIzol(Invitrogen, USA), chloroform(Sigma, USA), DEPC water(Amvion, USA), TAE buffer(BIO-RAD, USA)를 사용하였다. TNF- $\alpha$ 는 Roche(Roche, Germany)에서 구입하였으며, PCR에 사용된 primer는 바이오니아(주)(Bioneer, Korea)에서 주문 제작하였다. Reverse Transcriptase는 바이오닉스(주)(Bionics, Korea), PCR용 Taq polymerase는 Takara(Takara, Japan)에서 구입하여 사용하여 RT-PCR을 하였다. ELISA용 kit는 R&D system Inc. (Minneapolis, USA)에서 Quantikine human IL-6 및 GM-CSF immunoassay를 구입하였다. Luciferase reporter gene assay kits(Promega, USA)와 lipofectamin reagent(Invitrogen, USA)는 transfection assay에 사용되었다.

## 7) Vector Construct

DNA transfection 기술을 이용하여 주입하고자 하는 DNA vector를 제작하는 과정으로, TRAS-IL-6 RE 8X는 TRAS-enhancer에 Bgl II와 Bam HI restriction enzyme을 사용하여 linearization한 후 여기에 IL-6 RE consensus sequence(CCTTCTGGGAA TTCT) 8 repeats를 삽입하여 제조한 것(Medxbio Inc., Korea)을 구입하여 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 기관지수축에 미치는 영향

#### (1) 생리영양액 제조

생리영양액의 조성(mM)은 NaCl 130, KCl 4.7,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.18,  $\text{MgSO}_4$  1.17,  $\text{CaCl}_2$  1.6,  $\text{NaHCO}_3$  14.9 그리고 glucose 5.5이고, pH는 7.38로 유지하였다.

#### (2) 기관지조직절편 제작

기관지절편은 백서의 경동맥으로서 백서를 출혈사시킨 다음 복부중양선을 따라 개복하고 기관지를 적출하여 4°C의 산소가 포화된 생리영양액(Physiological salt solution, PSS)에 담았다. 산소를

계속 공급하면서 주위 지방조직과 결체조직을 깨끗이 제거한 후 약 1.5~2 mm의 길이가 되도록 횡으로 절단하여 고리절편을 만들었다.

### (3) 등장성수축 측정

95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>로 포화된 37°C의 PSS (5 ml)가 담긴 근실 (organ chamber)의 바닥에 장치된 고리에 적출 기관지의 한쪽 부분을 걸고 다른쪽 부분은 force-displacement transducer에 매달아 등장력을 측정하여 그 결과를 polygraph에 기록하였다. 약물 실험하기 전에 기관지는 2 g의 기저 긴장도를 부하하고 매 20분마다 신선한 PSS를 바꿔주면서 90분간 평형을 유지시켰다. 일정한 기저선이 유지되면 KCl 100 mM이 함유된 PSS를 투여하여 수축의 크기를 확인하였다. 실험을 마치고 60분이 지난 후에 각종 agonist의 효과를 용량-축적 방법으로 관찰하였다. 수축도가 일정시간 유지되지 못하거나 조직이 손상을 입은 경우는 절편을 제거하고, 재 실험을 실시하였다. 기관지수축 약물로는 acetylcholine으로 수축력을 유도한 후 유도된 기관지조직절편에 대하여 水蛭, 水蛭滑石炒, 水蛭麻黄炒 및 麻黄 추출물의 0.1 mg/ml, 1 mg/ml, 3 mg/ml, 10 mg/ml, 30 mg/ml 및 100 mg/ml의 농도에 대한 효과를 용량-축적 방법으로 비교 관찰하였다.

## 2) Cytokines 활성 및 발현에 미치는 영향

### (1) DNA Transfection과 Reporter Assay

BEAS-2B Cells을 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 와 10% fetal bovine serum (FBS)이 들어있는 BEBM media에서 자라게 한 후 약  $1 \times 10^4$  의 세포를 96-well plate에 옮긴다. 이후 세포가 전체 면적의 60~80%까지 자라게 한 후 0.04~0.08 mg의 IL-6 DNA를 0.1~1  $\mu$ l의 lipofectamin reagent와 혼합하여 상온에서 15~45분간 배양한다. 이후 적정량의 media를 넣어 부드럽게 섞어준 다음 각 well에 transfection 한다. 37°C 세포배양기에서 2~24시간 배양한 후 serum이 들어있는 적정량의 배지를 가한 후 배양한다. 실험군을 설정하여 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml) 처리후 dexamethasone(1  $\mu$ g/ml) 처리, 그리고 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml) 처리후 각 샘플을 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml 및 1000  $\mu$ g/ml의 농도별

로 처리하고 transfection을 시작 한 후 24~72시간 경과시 IL-6 DNA 발현 측정을 위해 luciferase reporter gene assay에 사용하였다. luciferase reporter gene assay는 firefly luciferase activity를 측정하는 것으로 luciferase reporter gene assay kits를 사용하여 제조사의 권장 protocol에 따라 진행하였으며 ascent software V.2.4.2 (ThermoLabsystems)를 통한 luminescent 값을 측정하였다.

### (2) 세포배양

BEAS-2B 세포는 37°C, 5%의 이산화탄소의 존재 하에 T 75 flask에서 BEBM medium에 배양하였으며 2~3일에 한번씩 1/2로 나누어 배양하였다. 최종 단계에서 약  $2 \times 10^5$ 개의 세포를 collagen으로 사전 처리된 6 well plates로 옮겨 36시간 동안 80~90% 정도로 성장시켰다. TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)을 처리하여 24시간 후 약제를 dose dependent 하게 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml 및 1000  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 후, 배양액을 제거하고 살아있는 세포에 TRIzol을 직접 처리하여 RNA정제에 사용하였다.

### (3) mRNA의 준비와 RT-PCR analysis

TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)와 함께 정량의 검액을 세포에 처리하고 24시간 후에 각 6 well plate에서 RNA를 분리하고 RT-PCR을 하였다. IL-6 및 GM-CSF의 mRNA의 정량화를 위하여 발현된  $\beta$ -actin의 mRNA 발현을 internal standard로 하였다. RT-PCR 실험에 사용된 조건은 시약 제공회사에서 제시된 과정을 따랐다. 모든 실험은 별개의 실험을 세 번 이상 반복하여 그 결과를 평균하였다. PCR에 사용된 primer의 서열과 조건은 다음의 Table 2와 같다.

### (4) 전기영동과 영상분석

PCR 산물은 ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml)가 함유된 2% Agarose gel (TAE 완충용액)로 100 V하에서 30분간 전기영동 하였다. 분리된 띠를 UV의 조사 하에서 밝기를 영상획득 장치로 디지털화 한 후 (Gel Doc 2000, BIO-RAD, USA) 정량화하였다.

### (5) protein levels의 ELISA assay

BEAS-2B Cells을 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 10% FBS이 들어있는 BEBM media에서 자라게 한 후 약

Table 2. Sequence of Primers for PCR and Conditions

	Sequences and the Expected DNA Size	PCR Conditions
β-actin	5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'	94°C, 1min
	5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'	72°C, 1min
	600 bp	72°C, 2min. 30 cycles
IL-6	5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC-3'	94°C, 1min
	5'-GAAGACCCCTCAGGCTGGACTG-3'	65°C, 1min
	628 bp	72°C, 2min. 30 cycles
GM-CSF	5'-GAGCATGTGAATGCCATCCAGGAG-3'	94°C, 1min
	5'-CTCCTGGACTGGCTCCCAGCAGTCAAA-3'	60°C, 1min
	390 bp	72°C, 2min. 30 cycles

3×10<sup>5</sup>의 세포를 6 well plate에 옮긴다. 4시간 후에 TNF-α(10 ng/ml)를 처리하고, 24 시간 후에 각 샘플을 처리하였다. 다시 24시간 배양 후에 FBS가 있는 media를 버리고 FBS가 없는 media로 갈아준 후 48 시간 동안 37°C에서 배양 하였다. BEAS-2B 세포 상층액을 모아서 ELISA assay에 사용하였다. ELISA assay는 R&D system에서 권장해준 방법에 의해 실험하였다.

(6) 통계처리

실험성적은 3회 이상의 독립적인 실험에서 얻어진 결과를 통계처리하여 평균치±표준편차(Mean ± S.D.)로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이를 검정할 때에는 SPSS 10.0을 이용하여 Mann-Whitney U test로 검정하였다.

III. 結 果

1. 기관지수축에 미치는 영향

1) Acetylcholine 유도성 기관지수축

기관지는 acetylcholine에 대해 용량 의존적인 수축을 보였다. 10<sup>-3</sup>M acetylcholine에 대한 최대 수축 반응은 KCl에 대한 최대 수축반응의 157.8±9.4%이었다.

2) 水蛭, 水蛭滑石炒 및 水蛭麻黃炒가 acetylcholine 유도성 기관지수축에 미치는 영향

기관지는 acetylcholine에 대해 용량 의존적인 수

축을 보였다. Acetylcholine으로 유도된 최대 수축력에 대하여 100 mg/ml 농도에서 水蛭(WP I), 水蛭滑石炒(WP II) 및 水蛭麻黃炒(WP III)는 각각 12.9±9.85%, 1.2±6.6%, 4.5±4.5%의 이완도를 보였고, 麻黃(MH)은 92.8±4.1%의 이완효과로 麻黃을 제외하고 水蛭, 水蛭滑石炒 및 水蛭麻黃炒의 기관지 이완효과는 관찰되지 않았다.

2. Cytokines 활성 및 발현에 미치는 영향

1) 水蛭, 水蛭滑石炒 및 水蛭麻黃炒가 IL-6의 활성에 미치는 영향

TNF-α에 유발된 IL-6의 활성도의 억제에 미치는 효과를 관찰하기 위해 transfection을 시작한 후 24 시간이 경과하였을 때, 양성 대조군에는 TNF-α(10 ng/ml)를 처리한 후 dexamethasone(1 μg/ml)을 처리했고, 실험군에는 TNF-α(10 ng/ml)를 처리한 후 각 샘플을 1 μg/ml, 10 μg/ml, 100 μg/ml 및 1000 μg/ml 으로 농도별로 처리하였다. 이후 유전자 발현 측정을 위해 luciferase reporter gene assay를 한 결과, 모든 실험군에서 IL-6의 활성도는 저농도에서 고농도까지 현저하게 억제되었다. 상기의 실험을 각 샘플별로 3회 반복하여 그 평균과 표준편차를 구하였다.

(1) 水蛭이 IL-6의 활성에 미치는 영향

TNF-α로 유발된 IL-6의 활성도의 억제에 미치는 효과를 살펴보면 水蛭(WP I)은 1 μg/ml, 10 μg/ml, 100 μg/ml 및 1000 μg/ml의 농도에서 각각 1.087±

0.078,  $1.131 \pm 0.076$ ,  $1.056 \pm 0.021$  및  $1.086 \pm 0.129$ 의 활성도를 나타내었다. 따라서 수질을 처리하지 않고 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)만 처리한 군에 비하여 각각 39.9%, 42.0%, 44.3% 및 37.6%의 억제효과를 나타내었다.

(2) 水蛭滑石炒가 IL-6의 활성에 미치는 영향

TNF- $\alpha$ 로 유발된 IL-6의 활성도의 억제에 미치는 효과로 水蛭滑石炒(WP II)는 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  및 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각  $0.812 \pm 0.013$ ,  $0.800 \pm 0.0849$ ,  $0.842 \pm 0.188$  및  $0.829 \pm 0.0556$ 의 활성도를 나타내어 수질을 처리하지 않은 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)만 처리한 군에 비하여 각각 32.6%, 41.1%, 40.7% 및 35.9%의 억제효과를 나타내었다.

(3) 水蛭麻黄炒가 IL-6의 활성에 미치는 영향

TNF- $\alpha$ 로 유발된 IL-6의 활성도의 억제에 미치는 효과로 水蛭麻黄炒(WP III)는 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  및 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각  $0.757 \pm 0.017$ ,  $0.782 \pm 0.074$ ,  $0.872 \pm 0.139$  및  $0.845 \pm 0.175$ 의 활성도를 나타내어 수질을 처리하지 않은 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)만 처리한 군에 비하여 각각 53.0%, 52.7%, 48.7% 및 51.6%의 억제효과를 나타내었다.

2) 水蛭, 水蛭滑石炒 및 水蛭麻黄炒가 IL-6 및 GM-CSF mRNA 발현에 미치는 영향

TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)와 함께 水蛭(WP I), 水蛭滑石炒(WP II) 및 水蛭麻黄炒(WP III)를 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  및 1000  $\mu\text{g/ml}$ 으로 농도별로 처리하고 24시간 후에 IL-6 및 GM-CSF mRNA를 RT-PCR한 결과, 각 실험군은 일정한 농도에서 각 cytokines mRNA의 발현을 억제하였으나 용량 의존적이지는 않았다.

정량화를 위하여 발현된  $\beta$ -actin의 mRNA 발현을 internal standard로 하여 모든 실험은 별개의 실험을 세 번 이상 반복하여 그 평균과 표준편차를 구하였고, 각 PCR 그림은 BEAS-2B 세포를 왼쪽부터 각각 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  및 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 24시간 후의 결과로 각 cytokines mRNA의 발현 억제율을 internal standard과 비교하여 그림으로 처리하였다.

(1) 水蛭이 IL-6 mRNA 발현억제에 미치는 영향  
BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)의 존재하에서 internal standard에 비하여 IL-6 mRNA의 발현을  $320.83 \pm 20.0\%$ 로 나타내었다. 水蛭(WP I)은 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 IL-6 mRNA 발현을 억제하는 경향을 보였으나 유의성이 없었고, 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  및 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 IL-6 mRNA의 발현이  $265.27 \pm 13.2\%$ ,  $266.60 \pm 29.0\%$  및  $229.23 \pm 13.9\%$ 로 감소하여 대조군에 비하여 각각 17.3%, 16.9% 및 28.6%의 IL-6 mRNA 발현을 억제효과를 나타내었다( $p < 0.05$ )(Fig. 1).

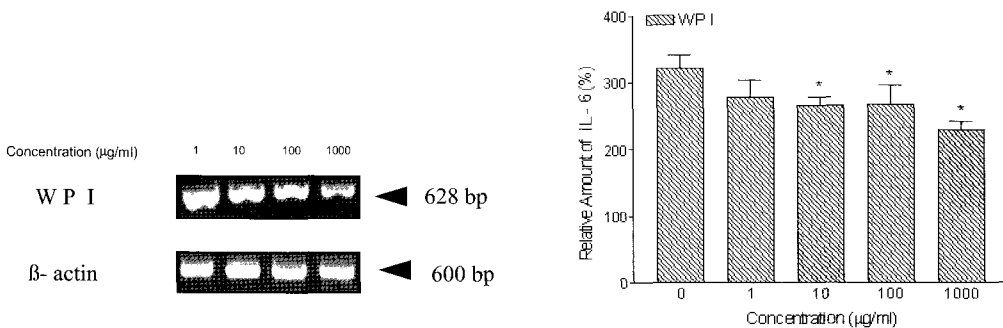


Fig. 1. Effects of Hirudo on the mRNA expression levels of IL-6. Photographs of representative RNA-polymerase chain reaction products electrophoresed on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. WP I : Hirudo treatment group. \* : At least,  $P < 0.05$  when compared to the value for one without treating by Hirudo.

(2) 水蛭滑石炒가 IL-6 mRNA 발현억제에 미치는 영향

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)의 존재하에서 internal standard에 비하여 IL-6 mRNA의 발현을  $174.57 \pm 0.7\%$ 로 나타내었다. 水蛭滑石炒(WP II)은 1  $\mu\text{g/ml}$ 와 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 영향을 주지 않았으며, 10  $\mu\text{g/ml}$ 와 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 IL-6 mRNA의 발현이  $106.10 \pm 3.4\%$ 와  $124.53 \pm 5.2\%$ 로 감소하여 대조군에 비하여 39.2%와 28.7%의 IL-6 mRNA 발현을 억제효과를 나타내었다( $P < 0.05$ )(Fig. 2).

(3) 水蛭麻黃炒의 IL-6 mRNA 발현억제에 미치는 영향

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ 의 존재하에서 internal standard에 비하여 IL-6 mRNA의 발현을  $276.67 \pm 12.1\%$ 로 나타내었다. 水蛭麻黃炒(WP III)은 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 미약한 변화가 있었고, 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  및 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 IL-6 mRNA의 발현이  $235.93 \pm 4.8\%$ ,  $242.17 \pm 10.8\%$  및  $180.50.1 \pm 2.5\%$ 로 감소하여 대조군에 비하여 14.7%, 12.5% 및 34.8%의 IL-6 mRNA 발현을 억제효과를 나타내었

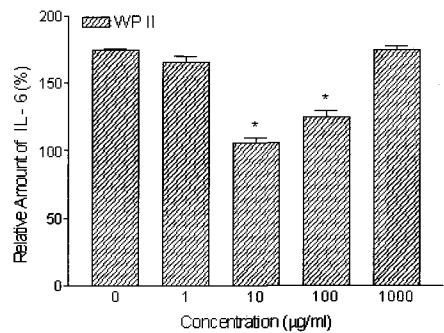
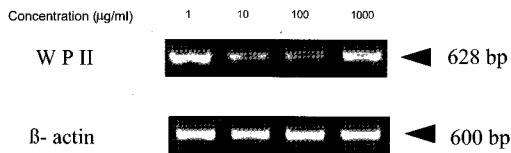


Fig. 2. Effects of Hirudo toasted with Talcum on the mRNA expression levels of IL-6.

Photographs of representative RNA-polymerase chain reaction products electrophoresed on 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

WP II : Hirudo toasted with Talcum treatment group after TNF- $\alpha$  treatment.

\* : At least,  $P < 0.05$  when compared to the value for one without treating by Hirudo toasted with Talcum.

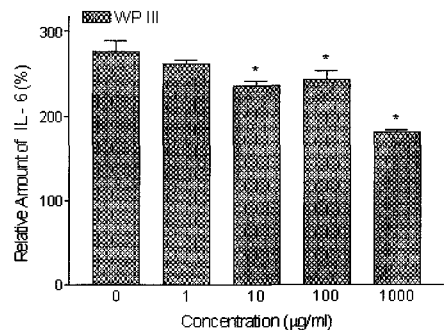
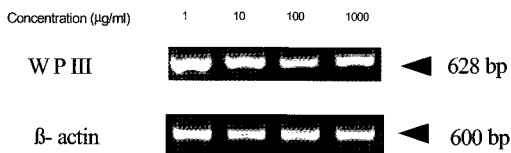


Fig. 3. Effects of *Whitmania pigra* Whitman toasted with Ephedrae Herba on the mRNA expression levels of IL-6. Photographs of representative RNA-polymerase chain reaction products electrophoresed on 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

WP III: *Whitmania pigra* Whitman toasted with Ephedrae Herba treatment group after TNF- $\alpha$  treatment.

\* At least,  $p < 0.05$  when compared to the value for one without treating by *Whitmania pigra* Whitman toasted with Ephedrae Herba.

다( $P < 0.05$ )(Fig. 3).

(4) 水蛭이 GM-CSF mRNA 발현억제에 미치는 영향

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)의 존재하에서 internal standard에 비하여 GM-CSF mRNA의 발현을  $351.17 \pm 8.1\%$ 로 나타내었다. 水蛭(WP I)은 1  $\mu\text{g/ml}$ 과 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 영향을 주지 않았으며, 10  $\mu\text{g/ml}$ 과 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 GM-CSF mRNA의 발현이 각각  $186.97 \pm 7.7\%$ 와  $225.2 \pm 2.0\%$ 로 감소하여 대조군에 비하여 각각 46.8%와 35.9%

의 GM-CSF mRNA 발현을 억제효과를 나타내었다 ( $P < 0.05$ )(Fig. 4).

(5) 水蛭滑石炒가 GM-CSF mRNA 발현억제에 미치는 영향

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)의 존재하에서 internal standard에 비하여 GM-CSF mRNA의 발현을  $142.80 \pm 6.7\%$ 로 나타내었으나, 水蛭滑石炒(WP II)는 모든 농도에서 유의성 있는 억제효과를 나타내지 않았다(Fig. 5).

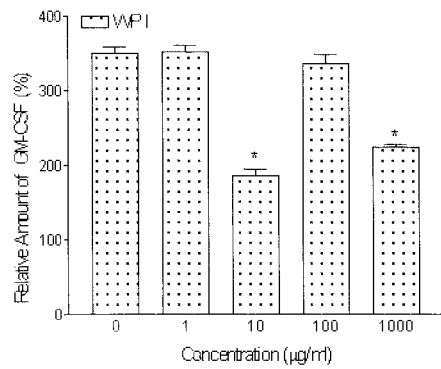
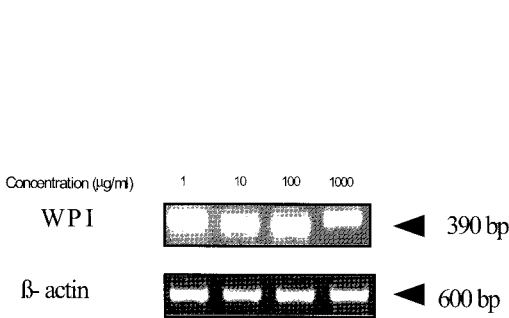


Fig. 4. Effects of Hirudo on the mRNA expression levels of GM-CSF.

Photographs of representative RNA-polymerase chain reaction products electrophoresed on 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

WP I : Hirudo treatment group.

\* : At least,  $P < 0.05$  when compared to the value for one without treating by Hirudo.

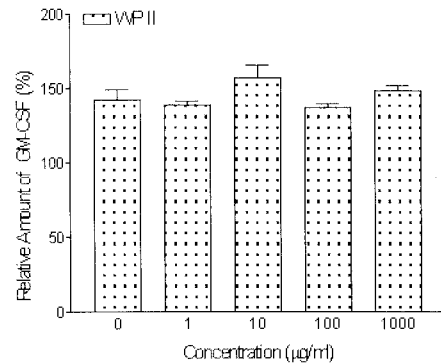
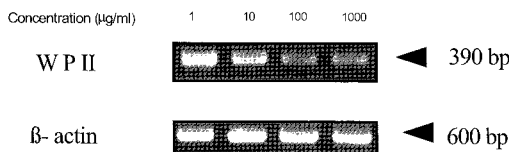


Fig. 5. Effects of Hirudo toasted with Talcum on the mRNA expression levels of GM-CSF.

Photographs of representative RNA-polymerase chain reaction products electrophoresed on 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

WP II : Hirudo toasted with Talcum treatment group after TNF- $\alpha$  treatment.



(6) 水蛭麻黃炒가 GM-CSF mRNA 발현억제에 미치는 영향

BEAS-2B 세포는 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)의 존재하에서 internal standard에 비하여 GM-CSF mRNA의 발현을 145.30 $\pm$ 5.7%로 나타내었다. 水蛭麻黃炒(WP III)은 1  $\mu$ g/ml과 1000  $\mu$ g/ml의 농도에서는 영향을 주지 않았으며, 10  $\mu$ g/ml과 100  $\mu$ g/ml의 농도에서는 GM-CSF mRNA의 발현이 각각 110.13 $\pm$ 4.85와 33.73 $\pm$ 9.05로 감소하여 대조군에 비하여 각각 24.2%와 76.8%의 GM-CSF mRNA 발현을 억제효과를 나타내었다(P<0.05)(Fig. 6).

3) 水蛭, 水蛭滑石炒 및 水蛭麻黃炒가 IL-6 및 GM-CSF protein levels에 미치는 영향

BEAS-2B 세포를 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)와 함께 水蛭(WP I), 水蛭滑石炒(WP II) 및 水蛭麻黃炒(WP III)를 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml 및 1000  $\mu$ g/ml로 농도별로 처리하고 48시간 후의 BEAS-2B 세포 상층액에서 IL-6 및 GM-CSF protein levels의 ELISA assay 결과, 각 실험군은 일정한 농도에서 각 cytokines proteins levels의 합성을 유의성 있게 억제하였다.

TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)만을 처리한 군을 대조군으로 하여 모든 실험은 별개의 실험을 세 번 이상 반복하여 그 평균과 표준편차를 구하였고, BEAS-2B 세포를

각각 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml 및 1000  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 후 48시간 후의 결과로 각 cytokine의 proteins 합성 억제율을 대조군과 비교하였다.

(1) 水蛭이 IL-6 protein level에 미치는 영향

BEAS-2B 세포 상층액은 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)만 처리한 대조군에서 IL-6 protein level을 109.40 $\pm$ 1.49로 나타내었다. 水蛭(WP I)은 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml 및 1000  $\mu$ g/ml의 모든 농도에서 IL-6 protein level이 각각 105.79 $\pm$ 0.91, 91.62 $\pm$ 0.40, 85.51 $\pm$ 0.56 및 80.18 $\pm$ 1.05로 감소하여 대조군에 비하여 각각 3.3%, 16.3%, 21.8% 및 26.8%로 농도 의존적인 IL-6 protein 합성 억제효과를 나타내었다(P<0.05).

(2) 水蛭滑石炒가 IL-6 protein level에 미치는 영향

BEAS-2B 세포 상층액은 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)만 처리한 control group에 비하여 IL-6 protein level을 125.30 $\pm$ 1.02로 나타내었다. 水蛭滑石炒(WP II)는 1  $\mu$ g/ml의 농도에서는 유의성 있는 감소가 없었으며, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml 및 1000  $\mu$ g/ml의 농도에서 IL-6 protein level이 각각 113.50 $\pm$ 1.07, 99.73 $\pm$ 0.99 및 107.27 $\pm$ 1.16으로 감소하여 대조군에 비하여 각각 9.4%, 20.4% 및 14.4%로 IL-6 protein 합성 억제효과를 나타내었다(P<0.05).

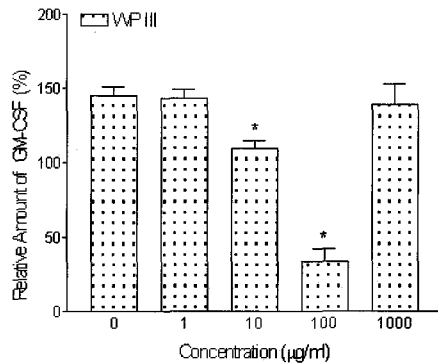
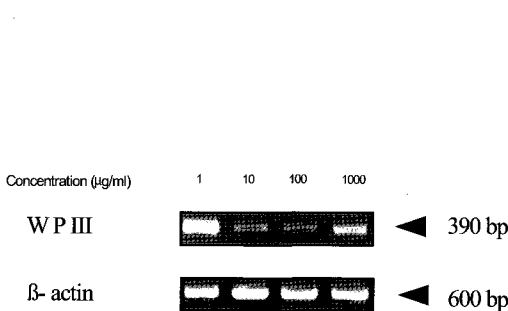


Fig. 6. Effects of Hirudo toasted with Ephedrae Herba on the mRNA expression levels of GM-CSF. Photographs of representative RNA-polymerase chain reaction products electrophoresed on 2% agarose gel stained with ethidium bromide.  
 WP III : Hirudo toasted with Ephedrae Herba treatment group after TNF- $\alpha$  treatment.  
 \* : At least, P<0.05 when compared to the value for one without treating by Hirudo toasted with Ephedrae Herba.

## (3) 水蛭麻黃炒가 IL-6 protein level에 미치는 영향

BEAS-2B 세포 상층액은 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)만 처리한 control group에 비하여 IL-6 protein level을 148.03 $\pm$ 0.75로 나타내었다. 水蛭麻黃炒(WP III)는 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml 및 1000  $\mu$ g/ml의 모든 농도에서 IL-6 protein level이 각각 145.73 $\pm$ 0.56, 122.76 $\pm$ 0.37, 126.57 $\pm$ 0.58 및 122.05 $\pm$ 0.73으로 감소하여 대조군에 비하여 각각 1.6%, 17.1%, 14.5% 및 17.6%로 IL-6 protein 합성 억제효과를 나타내었다 (P<0.05).

## (4) 水蛭이 GM-CSF protein level에 미치는 영향

BEAS-2B 세포 상층액은 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)만 처리한 control group에 비하여 GM-CSF protein level을 601.86 $\pm$ 1.97로 나타내었다. 水蛭(WP I)은 1  $\mu$ g/ml의 농도에서는 protein level이 오히려 증가하였고, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml 및 1000  $\mu$ g/ml의 농도에서 GM-CSF protein level이 각각 564.76 $\pm$ 0.33, 499.53 $\pm$ 0.34 및 416.05 $\pm$ 0.81로 감소하여 대조군에 비하여 각각 6.2%, 17.0% 및 30.9%로 농도 의존적인 GM-CSF protein 합성 억제효과를 나타내었다 (P<0.05).

## (5) 水蛭滑石炒가 GM-CSF protein level에 미치는 영향

BEAS-2B 세포 상층액은 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)만 처리한 control group에 비하여 GM-CSF protein level을 612.02 $\pm$ 2.05로 나타내었다. 水蛭滑石炒(WP II)는 10  $\mu$ g/ml과 1000  $\mu$ g/ml의 농도에서는 오히려 증가조건을 보였으며, 1  $\mu$ g/ml과 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 GM-CSF protein level이 각각 579.06 $\pm$ 0.37과 603.31 $\pm$ 0.35으로 감소하여 대조군에 비하여 각각 5.4%와 1.4%로 미약한 GM-CSF protein 합성 억제효과를 나타내었다(P<0.05).

## (6) 水蛭麻黃炒가 GM-CSF protein level에 미치는 영향

BEAS-2B 세포 상층액은 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)만 처리한 control group에 비하여 GM-CSF protein level

을 638.47 $\pm$ 2.69로 나타내었다. 水蛭麻黃炒(WP III)는 1  $\mu$ g/ml의 농도에서는 오히려 약간 상승조건을 보였으며, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml 및 1000  $\mu$ g/ml의 농도에서 GM-CSF protein level이 각각 518.49 $\pm$ 0.18, 451.80 $\pm$ 1.08 및 457.46 $\pm$ 0.60로 감소하여 대조군에 비하여 각각 18.8%, 29.2% 및 28.4%로 농도 의존적인 GM-CSF protein 합성 억제효과를 나타내었다 (P<0.05).

## IV. 考 察

천식에 관련된 최근 일련의 연구들은 기도의 염증이 기관지 상피세포 자체에 의해 지속될 수 있다는 것을 보고하고 있는데, 결과적으로 손상된 기도 상피세포는 IL-1, IL-6, IL-11, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$  등 다양한 염증유발성 인자들을 분비하고. 이러한 병리적 과정은 기도의 remodeling을 유발하고, 만성적인 지속성 천식환자에게 있어 기도의 기능을 떨어뜨릴 뿐만 아니라 기관지수축과 기도과민증에도 중요한 영향을 미친다<sup>1</sup>.

remodeling이 일어난 기도에서 가장 중요한 구조적인 변화는 기도 상피하 섬유증(subepithelial fibrosis)인데, GM-CSF는 호산구증다증과 섬유증을 동반해 기도의 염증을 유발하고, IL-6은 collagen 침착을 통하여 상피하 섬유증을 일으킨다<sup>19</sup>. 그리고 최근의 연구결과들로 혈소판, 혈소판-활성인자(platelet-activating factor, PAF)<sup>4</sup>, thrombin<sup>3</sup>이 천식에 있어 기도의 염증을 악화시키고, 기도 remodeling의 억제에 heparin이 잠재적인 효과를 보인다는 연구결과가 있다<sup>5</sup>.

천식은 한의학에서 哮喘證과 유사하게 볼 수 있는데, 아직까지 瘀血이 哮喘을 유발한다는 문헌적 고찰은 찾아 볼 수 없었다. 그러나 王<sup>20</sup>은 哮喘을 치료하는데 일반 辨證施治로 치료가 어려운 경우에 活血化痰法을 이용하면 우수한 효과가 있다고 한바, 천식에 있어 기도 remodeling의 특징인 기도벽의 구조적인 문제와 혈소판, 혈소판활성인자, thrombin 및 heparin의 연관성을 살펴보면 한의학적

인 活血祛瘀法이 이에 대한 치료원칙이 될 수 있다는 가능성을 뒷받침하고 있다.

본 실험에 사용된 水蛭은 寬體金線蛭로 문헌<sup>8</sup>을 근거로 감별하였는데, 흐르는 물에서 10여번 세척하였고, 물속에서 관찰을 해야 背面의 5개의 종선이 확실하게 드러나므로 물에 잠겨진 상태에서 상기 감별법을 근거로 감별한 후 다시 陽乾하여 실험에 이용하였다.

水蛭은 <神農本草經><sup>7</sup>에 처음 등장하는데, ‘味鹹 平 主逐惡血瘀血 月閉 破血癥積聚 無子 利水道’라는 효능으로 기재되어 있다. 水蛭의 호흡기질환과 관련된 연구로 만성해수 및 만성폐색성폐질환의 치료효과<sup>21,22</sup>에 관한 임상보고가 있었고, 문헌상에도 水蛭이 哮喘을 치료한다는 연구결과<sup>11</sup>가 있다. 水蛭로부터 분리된 성분 중 특히 주목할만한 것은 tessulin으로 이것은 1998년에 *Theromyzon tessulatum*이라는 種으로부터 항염증효과가 있는 것으로 분리되고 되었는데, therin, tessulin 등과 같은 antistatin-type 분자들은 lipopolysaccharide로 유도된 염증유발 실험에서 항염증성 활성을 나타내고, therin, tessulin 및 therostatin은 각각 면역세포 활성도를 감소시키면서 동시에 투여되는 경우 서로 상승효과를 나타내었다<sup>17</sup>.

水蛭의 制法에 관해서는 처음 기록된 <神農本草經>에는 炒를 해서 사용해야 한다는 언급이 없으나, 이후 대부분의 문헌들은 炒用해야 한다고 했고, 국가규범집에서도 滑石으로 炒해서 사용해야 한다고 기술하고 있다<sup>13</sup>. 그럼에도 불구하고 임상가들은 生用이 더욱 효과적이라고 하여<sup>16,22</sup>, 水蛭의 生用과 水蛭의 制法에 따른 효능차이의 검증이 필요한 실정이다.

이에 저자는 이미 기존의 연구를 통하여 살아 있는 水蛭(*Hirudo medicinalis*)을 麻黃과 함께 炒한 水蛭麻黃炒를 이용하여 실험적으로 IL-6, IL-16 및 GM-CSF mRNA 발현억제 작용을 확인한 바, 이를 바탕으로 水蛭의 制法에 따른 천식에 미치는 효과의 차이를 알아보고자, 水蛭, 水蛭滑石炒 및 水蛭麻黃炒를 이용하여 acetylcholine으로 유발시킨 기관지

수축에 미치는 영향을 살펴보고, BEAS-2B 인간 기관지상피 세포주에 TNF- $\alpha$ 를 처리하여 염증을 유발시킨 후, luciferase reporter gene assay를 통해 IL-6 DNA의 활성도를 측정하고, 더불어 IL-6 및 GM-CSF mRNA와 protein levels을 RT-PCR analysis와 ELISA assay를 이용하여 cytokines 발현에 대한 영향을 관찰해 보았다.

먼저 백서로부터 적출된 기관지수축에 미치는 영향에 관한 연구결과, 麻黃을 제외하고는 水蛭, 水蛭滑石炒 및 水蛭麻黃炒의 이완효과는 관찰되지 않았다. 이는 水蛭 단순건조품은 자체적으로 기관지수축에 대한 이완효과가 없는 것으로 생각되며, 水蛭麻黃炒 또한 이완효과를 나타내지 않은 것을 보면 水蛭을 麻黃과 함께 炒하는 과정에서도 麻黃의 유효성분이 水蛭에 전해지지 않은 것으로 판단된다.

더불어 본 연구에서는 특정 cytokine DNA의 활성에서부터 mRNA의 발현 그리고 protein을 합성하는 과정에 있어 水蛭이 그러한 전 과정에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하여 보았다. 먼저 천식의 유발 및 전개에 있어 중요한 역할을 할 것으로 여겨지는 IL-6의 기도상피세포내 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)로 BEAS-2B 인간 기관지상피세포에 염증을 유발시켜 발현된 IL-6 DNA 활성을 luciferase reporter gene assay를 하였다. 실험결과 水蛭, 水蛭滑石炒 및 水蛭麻黃炒 등 모든 실험군에서 IL-6의 활성도는 저농도에서 고농도까지 현저하게 억제되었다. 그 중 水蛭麻黃炒는 다른 실험군에 비하여 보다 나은 억제효과를 보였으며, 水蛭滑石炒는 전반적인 활성억제효과가 비교적 낮은 것으로 관찰되었다.

IL-6 및 GM-CSF mRNA 발현 억제와 protein 합성 억제에 미치는 효과를 RT-PCR과 ELISA assay한 결과, 용량 의존적이지는 않았으나 일정한 농도에서 각 cytokines mRNA의 발현을 억제하였고, 각 cytokines proteins levels의 합성 또한 유의하게 억제하였다.

구체적으로 水蛭이 IL-6 mRNA 발현 및 protein 합성 억제에 미치는 효과를 살펴보면, 水蛭은 1  $\mu$ g/

ml의 저농도를 제외하고 모든 농도에서 농도가 증가할수록 mRNA의 발현억제 및 이에 따른 protein 생성억제효과가 뚜렷하게 나타났다. 그리고 GM-CSF mRNA 발현억제에 효과와 달리 GM-CSF protein level에 미치는 억제효과로는 용량 의존적인 합성 억제효과를 나타내었다. 따라서 水蛭은 용량 의존적으로 IL-6 mRNA 및 protein 합성 억제효과를 보이고 있고, GM-CSF에서는 농도에 따른 일관성이 관찰되지 않았으나 비교적 고농도에서의 mRNA의 발현뿐만 아니라 및 protein 합성에서도 비교적 좋은 억제효과를 나타내었다.

水蛭滑石炒는 용량 의존적이지는 않지만 IL-6 mRNA 발현 및 protein 합성에 미치는 영향으로 일정한 농도에서 억제효과를 나타내고 있으나, GM-CSF mRNA 발현 억제 및 protein 합성에는 거의 효과가 없는 것으로 나타났다.

水蛭麻黄炒는 IL-6 mRNA의 발현억제와 비슷한 정도로 protein 합성 또한 억제하였고, GM-CSF에 있어서는 mRNA의 발현 억제정도와 protein의 합성 억제 정도에 일관성은 보이지 않았으나 전반적인 상승된 억제율을 보였고, 특히 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 80%에 가까운 mRNA의 발현 억제효과를 보였으나, protein level에서는 동일한 정도의 억제효과가 나타나지 않아 mRNA의 발현이 현저하게 억제 되었음에도 불구하고 이후의 protein 생성은 동일한 영향을 주지 않을 수도 있음을 알 수 있었다.

水蛭, 水蛭滑石炒 및 水蛭麻黄炒는 기도상피로부터 분비되어 기도염증에 관여하는 대표적인 cytokine인 IL-6 DNA의 활성화에서부터 DNA로부터의 mRNA의 발현 그리고 그에 따른 protein의 생성 과정에 뚜렷한 억제효과가 있음이 확인되었다. 이것을 보면 DNA 전사과정에 있어 水蛭 등의 약제가 cytokine DNA의 활성을 억제하는 효과는 DNA의 전사조절단계나 이후의 mRNA 발현 및 protein 합성 등을 조절하는 기전에 관여하는 것으로 추측되거나 각 cytokines DNA로부터 mRNA와 protein의 발현이 DNA의 활성화억제와 동일한 정도로 억제효과가 관찰이 되지 않는 것을 보면 기도염증의 유발에서

부터 cytokine이 발현되기까지는 단일 경로가 아닌 다양한 경로가 존재하여 많은 변수가 관여되는 것으로 여겨지고, mRNA의 발현의 억제와 protein level의 합성억제가 어느정도 비슷한 정도로 관찰됨은 mRNA 발현이후 과정에 있어서의 변수는 비교적 크지 않은 것으로 생각된다.

이상의 실험결과로 보아 水蛭은 기도상피에서 IL-6 및 GM-CSF 등의 cytokines 발현에 전반적인 억제효과를 가지고 있어, 이를 통하여 천식의 임상에서도 기도의 염증 및 remodeling을 개선시키는 효과가 있을 것으로 기대된다. 더불어 水蛭은 生用이 효과적인 것으로 보이며, 문헌에 제시된 수치방법인 滑石을 이용한 炒用은 재고되어야 하며, 동시에 천식에 활용할 경우 麻黄과 함께 炒하여 사용하는 제법은 生用과 유사하거나 보다 좋은 효과를 나타낼 것으로 생각된다. 더불어 용량 의존적인 억제효과가 아닌 저농도와 고농도 사이의 일정한 농도에서 억제효과가 보다 뚜렷하게 관찰됨에 따라 향후 동물실험 및 임상실험을 통하여 효과적인 투여량이 결정되어야 할 것이다. 그리고 기도의 염증과 조직의 구조적인 변성 자체를 瘀血로 이해할 수 있는지의 가능성에 관하여 구체적이고 추가적인 연구가 필요하며, 이에 水蛭 외의 다른 瘀血藥物을 이용하여 천식 치료약물의 개발가능성에 대해 더욱 면밀한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 結 論

水蛭의 制法에 따른 천식에 미치는 효과의 차이를 알아보고자 acetylcholine으로 유발시킨 기관지수축에 미치는 영향 및 BEAS-2B 인간 기관지상피 세포주에 TNF- $\alpha$ 를 처리하여 염증을 유발시킨 후, luciferase reporter gene assay을 통해 IL-6의 활성도를 확인하고, IL-6 및 GM-CSF mRNA 및 protein levels를 RT-PCR analysis과 ELISA assay를 이용하여 cytokines의 발현에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 水蛭, 水蛭滑石炒 및 水蛭麻黃炒 등의 모든 실험군은 기관지이완효과가 관찰되지 않았다.
2. 水蛭, 水蛭滑石炒 및 水蛭麻黃炒 등의 모든 실험군은 저농도에서 고농도까지 IL-6 활성을 억제하였고, 억제율은 水蛭麻黃炒, 水蛭, 水蛭滑石炒의 순으로 높게 나타났다.
3. 水蛭은 IL-6 mRNA 발현 및 protein 합성을 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 용량 의존적으로 유의하게 억제하였고( $P<0.05$ ), GM-CSF mRNA 발현은 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의하게 억제하였으며( $P<0.05$ ), GM-CSF protein 합성은 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 이상에서 용량 의존적으로 유의하게 억제하였다( $P<0.05$ ).
4. 水蛭滑石炒는 IL-6 mRNA 및 protein 합성을 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의하게 억제하였으나( $P<0.05$ ), 모든 농도에서 GM-CSF mRNA 발현 억제효과는 없었고, GM-CSF protein 합성을 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의하게 억제하였다( $P<0.05$ ).
5. 水蛭麻黃炒는 IL-6 mRNA 및 protein 합성을 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 용량 의존적으로 유의하게 억제하였고( $P<0.05$ ), GM-CSF mRNA 발현을 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의하게 억제하였고( $P<0.05$ ), GM-CSF protein 합성을 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 용량 의존적으로 유의하게 억제하였다( $P<0.05$ ).

### 參考文獻

1. Elliott MJ, Elliot FE, John WY, Charles ER, N. Franklin Adkinson, William WB. ALLERGY Principles & Practice(II) 5th edition. St. Louis: Mosby; 1998, pp.838-64.
2. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999;54(9):825-57.
3. Hauck RW, Schulz C, Schomig A, Hoffman RK, Panettieri RA Jr. Alpha-Thrombin stimulates contraction of human bronchial rings by activation of protease-activated receptors. *Am J Physiol* 1999;277:L22-9.
4. Moritani C, Ishioka S, Haruta Y, Kambe M, Yamakido M. Activation of platelets in bronchial asthma. *Chest* 1998;113(2):452-8.
5. Ahmed T, Ungo J, Zhou M, Campo C. Inhibition of allergic late airway responses by inhaled heparin-derived oligosaccharides. *J Appl Physiol* 2000;88(5):1721-9.
6. 全國韓醫科大學 肺系內科學教室 共著. 東醫肺系內科學. 서울:한출판사; 2002, pp.192-9.
7. 著者未詳. 神農本草經. 太原:山西科學技術出版社; 1991, p.118.
8. 廉先德. 中華藥海. 哈爾濱:哈爾濱出版社; 1993, pp.1174-6.
9. 上海中醫學院. 中草藥學. 香港:商務印書館; 1975, pp.394-5.
10. 董昆山. 現代臨床中藥學. 北京:中國醫藥科技出版社; 1998, pp.522-4.
11. 王浴生, 羅文龍, 薛春生. 中藥藥理與應用. 北京:人民衛生出版社; 2000, pp.229-39.
12. 安圭錫. 蚯蚓, 水蛭, 鱉蟾 및 蜈蚣이 血栓症에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌 1990;11(2): 92-101.
13. 韓동하, 정희재, 정승기, 이형구. 水蛭의 임상적 활용에 대한 문헌적 고찰. 대한한의학회지 2002;23(2):151-63.
14. 姜계원. 거머리-잇혀져 가는 생물. 서울:아카데미서적; 2000, pp.26-8, 88-9.
15. 林育貨. 河洪生教授治咳經驗. 新中醫 2000; 32(2):10-2.
16. 呂文海, 丁春紅, 王琦. 水蛭炮制的初步藥理研究. 中國中藥雜誌 1994;19(7):407-9.
17. Salzet M. Anticoagulants and inhibitors of platelet aggregation derived from leeches. *FEBS Lett* 2001;492(3):187-92.
18. 韓동하, 정희재, 정승기, 이형구. 喘四君子湯과 水蛭(麻黃炒)가 인간기관지상피세포의 IL-6,

- IL-16, GM-CSF mRNA 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2001;22(4):414-9.
19. Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* 1999;104(8):1001-6.
20. 王新喜. 活血化瘀法治療氣管支哮喘的運用經驗. 新中醫 1999;32(6):33.
21. 菅濟生. 水疾治療久咳. 中醫雜誌 1993;34(3):134.
22. 沈萬生. 水蛭生用功專力宏. 中醫雜誌 1993;34(2):69.