

麥門冬이 C57BL/6J 생쥐의 Bleomycin 유발 肺纖維化에 미치는 影響

이병삼, 이형구, 정승기, 정희재*
경희대학교 한의과대학 폐계내과교실

The Inhibitory Effects of Liriopsis Tuber on the Bleomycin-induced lung fibrosis in C57BL/6J mice

Byeong-Sam Lee, Hyung-Koo Rhee, Sung-Ki Jung, Hee-Jae Jung

Division of Respiratory System, Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University, Seoul, Korea

Objectives : The aim was to identify the inhibitory effects of Liriopsis Tuber on bleomycin-induced lung fibrosis by analysing the changes of inflammatory cell cytokines and SHI(Semiquantitative Histological Index).

Materials and Methods : In this study fibrosis prone C57BL/6J mice were used. Control group was treated with blomycin(0.06mg/0.1ml) by IT(intratracheal) instillation which is a popular method of inducing lung fibrosis and sample group took Liriopsis Tuber water extract(38.0mg/10g body weight) orally for 14 days after IT instillation of blomycin. We measured the total and differential count of WBC, IFN- γ & IL-4 in mice BALF and SHI(Semiquantitative Histological Index) from lung tissues of mice. BALF and lung tissues of mice were taken 14 days after IT instillation of blomycin.

Results : In sample group total WBC count, proportion of neutrophil, SHI and IL-4 significantly($p<0.05$) decreased, proportion of macrophage significantly($p<0.05$) increased and proportion of lymphocyte, IFN- γ did not decrease significantly.

Conclusions : This study suggests that Liriopsis Tuber has an inhibitory effects of pulmonary fibrosis by attenuation of inflammation and Th2 immune response. To determine whether this herbal medicine contribute to cure and prophylaxis of pulmonary fibrosis, further studies on the role of IFN- γ relating to fibrosis are required.

Key Words: Liriopsis Tuber, lung fibrosis, WBC, neutrophil, IL-4

1. 緒 論

폐섬유화는 간질성 폐질환(ILD)으로 알려진 200여종의 폐질환에서 나타나며, 가장 흔하고 관리하기 어려운 간질성 폐질환이 특발성 폐섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)이다¹. 최근의 정의에 의하면 "IPF는 만성 섬유화성 간질성 폐렴의 하나로서 폐에만 국한되어 발생하는 원인불명의 질환으로서 폐생김상 통상성 간질성 폐렴(usual interstitial pneumonia, UIP)의 조직학적 소견을 보이는 경우"를 의미한다^{1,2}. 기본적인 병태생리학적 소견은 폐포나 폐포중격에 세포의 침윤, 부종, 삼출 등의 염증성 변화와 콜라겐, proteoglycan, fibronectin, glycoprotein과 같은 extracellular matrix(ECM) 침윤, 섬유화 등에 의하여 폐실질의 파괴가 일어나고 가스교환의 장애와 제한성 환기장애를 초래하게 된다³. 그 원인에 대하여서는 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않으며, 단지 위험요소로서 흡연, 항우울제, 위 식도 역류, 먼지가 많은 환경에의 직업적인 노출, 바

환으로서 폐생김상 통상성 간질성 폐렴(usual interstitial pneumonia, UIP)의 조직학적 소견을 보이는 경우"를 의미한다^{1,2}. 기본적인 병태생리학적 소견은 폐포나 폐포중격에 세포의 침윤, 부종, 삼출 등의 염증성 변화와 콜라겐, proteoglycan, fibronectin, glycoprotein과 같은 extracellular matrix(ECM) 침윤, 섬유화 등에 의하여 폐실질의 파괴가 일어나고 가스교환의 장애와 제한성 환기장애를 초래하게 된다³. 그 원인에 대하여서는 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않으며, 단지 위험요소로서 흡연, 항우울제, 위 식도 역류, 먼지가 많은 환경에의 직업적인 노출, 바

· 접수 : 2004. 9. 22 · 채택 : 2004. 10. 15
· 교신저자 : 이병삼, 서울시 강서구 내발산 2동 669-1
서울경희한의원
(Tel. 02-3662-2075 Fax. 02-3663-2076
E-mail : mediport@hotmail.com)

이러스 감염, 유전적 경향성 등이 제시되고 있다. 폐섬유화의 확진은 서양의학적인 검사가 필수적이므로, 이 질환에 대한 한의학적 접근은 환자가 호소하는 증상이 근거가 된다.

폐섬유화는 임상증상인 노력성(勞力性) 호흡곤란, 발작적인 마른 기침, 점진적인 체중의 감소와 피로 등⁴을 고려할 때 韓醫學의 16중 해수 중 鬱嗽, 勞嗽, 乾嗽와 비슷하며, 喘八證 중 氣喘, 火喘, 陰虛喘과 虛勞, 肺痿, 燥證의 범주에 해당한다고 할 수 있다.

麥門冬은 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津하는 작용으로 肺燥乾咳, 肺痿, 肺癰, 虛勞煩熱을 치료한다⁵. 또한 清涼滋養 生津劑로서 心肺에 引經하며 清心肺火 止渴하는 효능이 있다⁶. 기존의 麥門冬에 대한 韓醫學的 研究는 單味 또는 麥門冬을 포함한 처방으로써 천식 등 호흡기 질환에 미치는 영향을 실험동물을 이용하여 염증반응이나 면역기능을 통하여 관찰하거나, cytokine들의 변화양상을 분자생물학적인 기법으로 확인하려는 연구들이었다.

본 실험은 폐섬유화의 병리현상에 대한 한의학적인 약물치료 방법을 찾고자, 麥門冬을 이용하여 폐섬유화의 병태생리에 관여된 표지자의 변화를 통하여 그 효능을 연구하였다. 이번 연구를 통하여 麥門冬 투여시 폐섬유화의 중요한 병리기전으로 인식되고 있는 염증반응의 호전여부를 백혈구와 대식세포, 림프구, 호중구의 수치 변화를 통하여 분석하고, 조직학적 지표(SHI)를 통하여 폐조직 손상의 억제여부를 판단하고, 폐섬유화에 영향을 미친다고 알려진 cytokine인 IFN- γ , IL-4의 변동을 실험적으로 관찰하여 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 동물 및 약재

1) 동물

본 실험에 사용한 실험동물은 12주령, 체중 30g 전후의 C57BL/6J계 숫컷 생쥐를 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에 1주간 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 약재는 麥門冬 (Liriopsis Tuber) 으로 경희의료원 한방병원 약재과에서 엄선된 약재를 사용하였다.

2. 방법

1) 약물의 조제 및 투여

麥門冬 200g을 증류수 2,000ml와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음 1차 여과한 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후 완전 동결건조시켜 麥門冬 물추출 엑기스(Liriopsis Tuber water extract : LTE) 114g을 얻었다. 실험동물은 각 군당 6마리씩으로 정상군(Normal), bleomycin으로 폐섬유화를 유발시킨 군(Control) 및 bleomycin으로 폐섬유화 유발과 함께 LTE 투여군(Sample)으로 나누고, LTE는 생쥐 체중 10g당 38.0mg을 14일간 1일 1회 경구투여하였다.

2) 폐섬유화 유발

폐섬유화는 Kremer 등, Laxer 등, Lossos 등 및 Berkman 등의 intratracheal (IT) instillation 방법에 따라 Bleomycin (Nippon Kayaku, Japan) 용액을 기관(trachea)을 통하여 직접 폐 속에 주입하는 방법을 사용하였다.

3) 폐세척액 및 폐조직 채취

Bleomycin을 IT방법으로 주입한 14일 후, C57BL/6J 생쥐를 pentobarbital 용액 복강주사로 마취시킨 다음 복부동맥을 절단하여 탈혈시켜 희생시켰다. 전경부와 흉부를 절개하여 기관과 폐를 노출시키고 기관을 절개한 다음 앞을 등글게 만든 19 gauge 주사바늘을 장착한 1ml용 주사기를 기관에 장착하였다. 생리식염수를 사용하여 0.5ml씩 8번에 걸쳐 총 4.0ml의 폐세척액(bronchoalveolar lavage fluid; BALF)를 채취하여 IL-4와 IFN- γ 의 측정과 백혈구 총수 및 백혈구의 감별 측정에 사용하였다. 폐세척액을 채취한 직후 폐조직을 분리하여 右肺는 -50℃의 dry ice-isopentane 용액으로 급속히 동결시켜 IL-4 및 IFN- γ 측정용으로 -80℃ 냉동고에 보관

하고, 左肺는 10% buffered neutral formalin 용액으로 고정하여 조직염색용으로 사용하였다.

4) 폐세척액 내 백혈구 총수 및 감별 측정

폐세척액 내 총백혈구 수는 COULTER STKS의 자동혈구계산기로 측정하였으며, 백혈구 감별 측정(leukocyte differential count)은 자동혈구계산기의 측정치와 함께 폐세척액을 슬라이드에 도말한 다음 Wright 용액으로 염색하고, 현미경하에서 무작위로 100개의 백혈구 중 macrophage, lymphocyte 및 neutrophil의 비율을 측정하여 자료로 사용하였다.

5) 폐조직의 Masson's trichrome 및 H-E 염색

고정된 폐조직을 paraffin 절편하여 폐조직의 조직학적 변화를 관찰하기 위해서는 일반적인 hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 실시하였으며, 폐조직의 섬유화에 의한 collagen의 침착 정도를 관찰하기 위해서는 Masson's trichrome 염색을 실시하였다. 즉, 조직으로부터 paraffin을 제거하고 56°C의 Bouin's solution에서 1시간 재고정 후 세척하고, Weigert's iron hematoxylin solution에 10분, Biebrich scarlet-acid fuchsin solution에 2분간 반응시켰다. 다시 세척한 후 5% aqueous phosphotungstic acid solution에 15분, light green solution에 1분, glacial acetic solution에 3분간 반응시켜 collagen이 초록색을 띠도록 염색하였다.

6) 조직학적 폐손상지표 (Semiquantitative Histological Index; SHI)의 측정

폐조직의 섬유화 정도 및 조직학적 변화는 Kremer 등, Laxer 등, Lossos 등 및 Berkman 등의 방법을 이용하여, 실험동물 당 Masson's trichrome 염색과 H-E 염색된 10개의 폐조직을 관찰하여 다음과 같이 5단계로 SHI를 정량화 하였다.

0 : 정상 폐조직

1 : 10개의 조직 중 1~3개의 조직에서, 중성백혈구 침착이 군데군데 국소적으로 관찰되는 미약한 염증반응을 보이고, 또한 국소적으로 미약하게 상피세포가 비대 (epithelial hyperplasia) 되거나 collagen이 침착된 섬유화 (fibrosis)가 관찰된 경우

2 : 10개의 조직 중 4~7개의 조직에서, 중성백혈구 침착이 군데군데 국소적으로 관찰되는 미약한 염증반응을 보이고, 또한 국소적으로 미약하게 상피세포가 비대되거나 collagen이 침착된 섬유화가 관찰된 경우

3 : 10개의 조직 중 4~7개의 조직에서, 중성백혈구 침착이 조직 전체에서 관찰되는 중등도의 염증반응을 보이고, 또한 전반적으로 상피세포의 비대와 collagen 침착에 의한 섬유화가 관찰된 경우

4 : 10개의 조직 중 4~7개의 조직에서, 심한 염증반응으로 중성백혈구, 임파구 및 적혈구 침착이 조직 전체에서 관찰되고, 이러한 심한 염증반응과 상피세포의 비대가 동반되어 국소적인 폐조직의 폐쇄가 관찰되며, 전반적인 심한 collagen 침착 섬유화가 관찰된 경우

5 : 10개의 모든 조직에서 심한 염증반응으로 중성백혈구, 임파구 및 적혈구 침착이 조직 전체에서 관찰되고, 이러한 심한 염증반응과 상피세포의 비대가 동반되어 국소적인 폐조직의 폐쇄가 관찰되며, 전반적인 심한 collagen 침착 섬유화가 관찰된 경우

7) 폐세척액 내 IFN- γ 및 IL-4의 측정

폐세척액 내 IFN- γ 및 IL-4의 측정은 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 사용하였다. 즉, 바닥이 평편한 96-well microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark)를 well 당 50 μ l의 polyclonal antibody (1 ng/ μ l in 0.6 M NaCl, 0.26 M H₃BO₄, and 0.08 N NaOH, pH 9.6)를 4°C에서 24시간 동안 코팅하고, PBS와 0.05% Tween-20으로 세척하였다. 비특성반응을 차단하기 위해서 2% bovine serum albumin을 사용하였으며, well 당 50 μ l의 측정 sample을 가한 다음 37°C에서 1시간동안 incubation 시켰다. 다시 well 당 50 μ l의 biotinylated polyclonal antibody (3.5 ng/ μ l in wash buffer, 2% FCS)를 가한 다음 37°C에서 45분동안 incubation 하고, plate를 3회 세척한 다음 streptavidin-peroxidase conjugate (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)를 가하여 37°C에서 30분동안 incubation 하였다. 그 다

음 chromogen substrate (Dako, Carpinteria, CA)를 가하여 실온에서 incubation 하고, 490 nm에서 automated microplate reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT)로 측정하였다.

III. 成績

1. 폐세척액 내 백혈구 총수의 변화

Normal 군의 폐세척액 내 백혈구 총수는 $0.06 \pm 0.01 \times 10^6/\text{ml}$ 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군은 $0.53 \pm 0.07 \times 10^6/\text{ml}$ 로 확연한 증가를 나타내었다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 LTE를 투여한 Sample 군은 $0.34 \pm 0.04 \times 10^6/\text{ml}$ 으로 Control 군에 비하여 35.8%의 유의성 ($P < 0.05$) 있는 백혈구 총수의 감소를 나타내었다(Table 1).

2. 폐세척액 내 백혈구 비율의 변화

Normal 군의 폐세척액 내 백혈구 중 macrophage의 비율은 $90.9 \pm 1.0 \%$ 이었으며, lymphocyte의 비율은 $5.6 \pm 0.8 \%$, neutrophil의 비율은 $3.6 \pm 0.2 \%$ 이었다. Bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨

Control 군은 백혈구 중 macrophage의 비율이 $34.4 \pm 4.5 \%$ 로 확연하게 감소하였으며, lymphocyte의 비율은 $39.8 \pm 6.7 \%$ 로, neutrophil의 비율은 $25.8 \pm 2.6 \%$ 로 확연하게 증가하였다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 LTE를 투여한 Sample 군은 백혈구 중 macrophage 비율이 $53.2 \pm 2.8 \%$ 로 Control 군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있게 증가하였으며, lymphocyte의 비율은 $30.6 \pm 3.6 \%$ 로 Control 군에 비하여 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었고, neutrophil의 비율은 $16.2 \pm 2.1 \%$ 로 Control 군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다(Table 2).

3. 조직학적 폐손상 지표의 변화

폐조직의 Masson's trichrome 염색과 H-E 염색 소견에 따른 조직학적 폐손상 지표(SHI)는 Normal 군에서는 0.3 ± 0.2 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군은 4.5 ± 0.2 로 거의 모든 조직에서 확연한 염증반응과 상피세포의 비대 및 섬유화가 관찰되었다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 LTE를 투여한 Sample 군의 SHI는 3.0 ± 0.6 으로 Control 군에 비하여 33.3%의 유

Table 1. Total WBC Count in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Mice Treated by Intratracheal Instillation of Bleomycin ($\times 10^6/\text{ml}$)

Group	total WBC	Decrease %	P-value
Normal	0.06 ± 0.01	-	
Control	0.53 ± 0.07	-	
Sample	0.34 ± 0.04	35.8	<0.05

P-value means statistical significance with respect to control data.

Table 2. Differential WBC Count in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Mice Treated by Intratracheal Instillation of Bleomycin (%)

Group	Macrophage	Lymphocyte	Neutrophil
Normal	90.9 ± 1.0	5.6 ± 0.8	3.6 ± 0.2
Control	34.4 ± 4.5	39.8 ± 6.7	25.8 ± 2.6
Sample	$53.2 \pm 2.8^*$	30.6 ± 3.6	$16.2 \pm 2.1^*$

* means statistical significance with respect to control data (*; $P < 0.05$).

Table 3. Semiquantitative Histological Index of Lung Tissue in Mice Treated by Intratracheal Instillation of Bleomycin

Group	SHI	Decrease %	P-value
Normal	0.3±0.2	-	
Control	4.5±0.2	-	
Sample	3.0±0.6	33.3	<0.05

P-value means statistical significance with respect to control data.

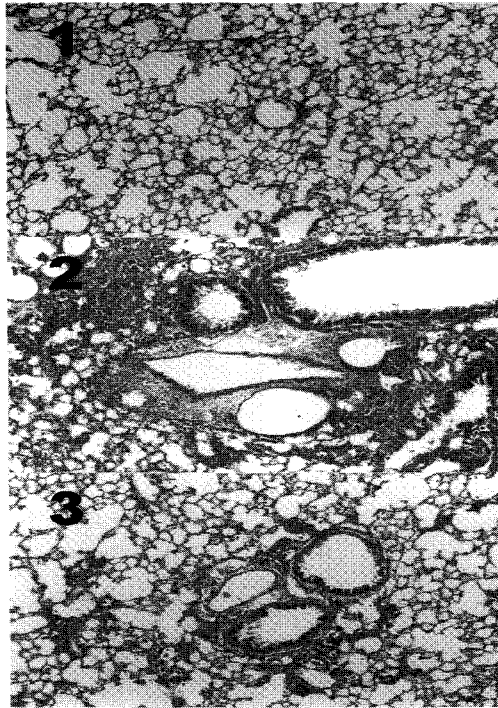


Fig. 1. Sections stained with Masson's trichrome method of lung tissue in mice treated by intratracheal instillation of bleomycin (section 1, Normal group; section 2, Control group; section 3, Sample group). Sample group shows significant decrease of collagen accumulation (green color) with respect to Control group.

의성 ($P < 0.05$) 있는 염증반응의 감소, 상피세포 비대의 감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소가 관찰되었다(Table 3, Fig. 1).

4. 폐세척액 내 IFN- γ 및 IL-4의 변화

Normal 군의 폐세척액 내 IFN- γ 는 17.5 ± 3.1 pg/ml 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군은 138.3 ± 11.4 pg/ml로 확연한 Th1-type immune response의 증가를 나타내었으며,

bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 LTE를 투여한 Sample 군은 115.2 ± 18.9 pg/ml로 Control 군에 비하여 감소하였지만 통계학적 유의성은 없었다. Normal 군의 폐세척액 내 IL-4는 6.0 ± 0.7 pg/ml 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군은 42.0 ± 3.1 pg/ml로 확연한 Th2-type immune response의 증가를 나타내었으며, bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 LTE를 투여한 Sample 군은 30.8 ± 3.8 pg/ml로

Table 4. IFN- γ and IL-4 Levels in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Mice Treated by Intratracheal Instillation of Bleomycin (pg/ml)

Group	IFN- γ	IL-4
Normal	17.5 \pm 3.1	6.0 \pm 0.7
Control	138.3 \pm 11.4	42.0 \pm 3.1
Sample	115.2 \pm 18.9	30.8 \pm 3.8*

* means statistical significancy with respect to control data (*; P<0.05).

Control 군에 비하여 유의성 (P<0.05) 있는 Th2-type immune response의 감소를 나타내었다(Table 4).

IV. 考 察

폐섬유화증에서 가장 흔한 IPF는 원인 불명의 만성 섬유화성 간질성 폐렴으로, 조직학적으로 폐실질의 염증(inflammation)과 섬유화가 특징적인 통상성 간질성 폐렴(usual interstitial pneumonia, UIP)을 보이는 질환이다¹.

기본적인 병태생리학적 조건은 폐포나 폐포중격에 세포의 침윤, 부종, 삼출 등의 염증성변화와 콜라겐, proteoglycan, fibronectin, glycoprotein과 같은 extracellular matrix(ECM)침윤, 섬유화 등에 의하여 폐실질의 파괴가 일어나고 가스교환의 장애와 제한성 환기장애를 초래하게 된다³. 환자들은 일반적으로 50대로 호흡곤란 및 비객담성 기침을 주소로 잠행성으로 발병한다. 서서히 진행되는 호흡곤란이 가장 현저한 증상이며 그 외에 객담을 수반하지 않는 기침이 흔하다. 보통 50세 이상에서 발병하며 남자에서 약간 더 호발한다. 폐기능검사에서는 제한성 양상과 확산능의 감소, 운동후 심해지는 저산소혈증 등이 관찰된다. 임상경과는 서서히 진행되어 악화하는데 가끔은 갑자기 악화되어 호흡부전으로 사망하는 경우도 있다⁷.

한의학적으로 폐섬유화는 그 임상증상에 있어 韓醫學의 16종 해수 중 鬱嗽, 勞嗽, 乾嗽와 비슷하며, 喘八證 중 氣喘, 火喘, 陰虛喘과 虛勞, 肺痿, 燥證의 범주에 해당한다고 할 수 있다. 鬱嗽는 腎水焦枯로 邪火濁上炎肺하여 발병하고 乾咳無痰, 有聲痰少, 面

赤, 喘息不眠 등 火嗽의 심한 증상이 나타난다^{8,9}. 勞嗽는 虛勞의 咳嗽로서 陰虛火動, 酒色過度, 虛勞血少, 津液內耗, 心火自炎에 의하여 盜汗出兼痰多, 寒熱, 吐血, 咯唾膿血, 上氣涎潮, 咳嗽連續不休의 증상이 있다^{8,9}. 乾嗽는 火鬱로 肺中火邪가 津液枯竭시켜 無痰有聲하며 咽喉癢痒感이 있으며, 微한 즉 連咳十數聲而痰出하고 甚하면 雖咳數十聲而無痰出한다^{8,9}. 氣喘은 七情에 傷하여 發하며 氣虛 短氣 上氣 등에 기인하며 氣息하고 無聲響하며 驚憂하면 氣鬱하고 惕惕悶悶하며 引息할 때 鼻脹하고 呼吸急促하면서 無痰聲하다^{8,9}. 火喘은 衝脈의 火가 胸中에 運行하여 發作하며 平居即 氣和平하고 行動即 氣促하며 喘息한다^{8,9}. 陰虛喘은 陰虛, 血虛로 인하며 氣가 臍下로부터 氣道를 따라 上衝하며 喘息不休한다^{8,9}. 虛勞는 元氣가 虧損되고 臟腑가 受傷한 所致로 虛損이 累積되어 점차 衰弱하여지는 慢性疾患을 총칭하며, 常證으로는 飲食減少 精神昏短 遺精夢泄 腰背胸脇筋骨引痛 潮熱自汗 痰盛咳嗽 등을 들 수 있다^{8,9}. 肺痿는 咳하며, 口中에서 濁唾涎沫이 多出하고 혹 唾中에 紅線이나 膿血이 섞이며 寸口脈이 數한 증상으로 慢性衰弱病證을 총칭한다^{8,9}. 燥病은 血液衰少하여 百骸에 營養을 供給하지 못한 데서 起因하는 것으로서 火熱에 의하여 金衰하면 風生하게 되는데, 風能勝濕하여 熱能耗液함으로써 燥에 이르고, 燥於上하면 咽喉焦乾한다^{8,9}.

麥門冬은 性은 寒하며 味는 甘 微苦하여 養陰潤肺 清心除煩 益胃生津의 효능이 있어 肺燥乾咳 吐血 咯血 肺痿 肺癰虛勞煩熱 消渴 熱病津傷 咽乾口燥 便秘를 治한다¹⁰. 기존의 麥門冬에 대한 한의학적 연구는 麥門冬 單味나 麥門冬을 포함한 복합 처방

의 형태로 알려지 천식모델이나 폐, 호흡기 손상에 미치는 영향을 실험동물을 이용한 염증반응이나 면역기능을 통하여 관찰하거나, cytokine들의 변화양상을 분자생물학적인 기법으로 확인하는 형태로 이루어져왔다. 폐섬유화의 억제에 미치는 영향에 대하여서는 최근 숙지황, 금은화, 황기 등의 한약재에서 좋은 결과가 도출된 바 있다. 이에 저자는 폐섬유화의 임상적 증상을 근거로 그 치료에 대하여 여러 한의학적 서적과 연구를 통해 검증된 麥門冬을 투여하여, 폐섬유화의 중요한 병리기전으로 인식되고 있는 염증반응의 호전여부를 백혈구와 대식세포, 림프구, 호중구의 수치 변화를 통하여 분석하고, 조직학적 지표(SHI)를 통한 폐조직 손상의 억제여부와 폐섬유화에 영향을 미친다고 알려진 cytokine인 IFN- γ , IL-4의 변화를 실험적으로 관찰하여 분석해 보고자 하였다.

폐의 염증과 섬유화의 상관관계에 대한 논란¹¹에 대하여는 지속적인 연구가 필요하나, 폐섬유화에 있어 염증의 소견은 분명히 존재한다. 어떠한 이유이든 염증 세포가 폐 간질에 축적되고, 이들 염증 세포와 활성화된 폐포 상피세포 등에서 다양한 fibrogenic cytokine 및 polypeptide 매개물질의 분비가 증가하게 된다. 이들이 섬유아세포 증식을 자극하여 ECM 분비를 증가시켜 폐 섬유화를 일으킨다는 것이 지금까지의 일반적인 가설이다. UIP를 보이는 폐 조직의 26%에서 NSIP(nonspecific interstitial pneumonia)를 동반하고 있으며, 한군데 이상의 폐 조직을 얻었던 환자의 73%에서 NSIP와 UIP가 같이 있었다. 이는 치료되지 않은 NSIP가 UIP로 전환될 수 있는 가능성을 시사하며, NSIP 환자의 연령이 UIP 환자의 연령보다 낮은 점도 UIP와 NSIP는 한 스펙트럼상이라는 것이다. 이것은 폐 섬유화(UIP)와 염증성 폐 침윤(NSIP)이 같이 있음을 의미하며, 한 환자의 폐에서 병의 진행상 초기(염증성 폐 침윤, NSIP)에서부터 말기(섬유화, UIP)까지 다양하게 있음을 의미하므로 만성 염증이 UIP의 병인에 매우 중요하다는 것을 시사하는 소견이다. UIP 환자의 폐 조직에 대한 조사에서 염증은 주로 collagen이

침착되는 부위 혹은 honeycomb 부위에 있었으며, 정상적인 폐포 벽에는 염증의 소견이 없었으므로 염증과 섬유화의 관계를 알 수 있다¹². UIP 환자의 급성 악화는 원인없이 나타나며, 폐의 조직학적 소견은 UIP 소견이외에도 폐포의 호염기 세포의 팽창과 염증세포의 침착, 비정형 재생성 상피세포의 증식 등 주로 폐 염증이 주요한 소견이다. 이의 치료로 스테로이드가 사용되는 데 급성 악화가 없는 UIP와는 달리 급성악화가 있는 경우는 47%이상의 환자에서 호전을 보인다고 보고하므로, UIP의 급성악화시는 염증이 중요한 역할을 할 것으로 판단된다¹³.

간질성 폐질환은 하부기도의 만성염증과 함께 폐포 대식세포, 호중구 또는 림프구, 섬유아세포 등이 폐포내 또는 폐포벽에 증가되어 있는 특징을 나타낸다¹⁴. 이러한 염증반응은 시간이 지나면서 섬유아세포가 더욱 증가하는 상태로 변화하며, 섬유아세포에서 합성하여 분비하는 교원질(collagen)에 의해 폐포벽이 두꺼워지는 섬유화현상이 나타나서 결국은 폐포가 gas교환기능을 상실하게 되어 치명적인 상태로 발전하게 된다¹². IPF에서도 폐포의 대식세포, 호중구, 림프구, 다른 염증 세포들과 관련된 폐포의 염증이 폐의 실질과 간질의 섬유화에 선행한다¹⁵. 초기에는 폐포 대식세포, 호중구 또는 림프구 등의 염증세포 침윤이 폐포에 증가되는 소위 "alveolitis" stage를 거치고 시간이 지나면서 폐포 간질조직에 섬유아세포의 증가와 더불어 교원질(collagen)등의 침착으로 "fibrotic" stage로 이행하는 현상이다. 간질성 폐질환 환자의 82%에서는 폐포 대식세포에서 섬유아세포의 성장을 촉진시키는 물질을 분비하지만 정상인의 폐포 대식세포에서는 그러한 물질을 분비하지 않는다. 면역자극에 의해 폐포 대식세포가 활성화되고 활성화된 이들 세포에서 분비하는 여러 매개물질들이 초기의 폐포염 단계 또는 말기의 섬유화 단계에 관여한다. 폐포 대식세포에서 분비하는 산화물이 호중구에서 분비하는 latent collagenase를 활성화시켜 collagen의 파괴 및 재합성에도 관여함으로써 폐의 섬유화에 중요한 역할을 한다. 호중구

는 IPF의 폐포염을 일으키는 중요한 구성요소로서 폐의 실질을 손상시킬수 있는 매개물질을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 탐식작용, 화학주성, 무작위 이동, 산화물 대사 등에 관여한다. IPF환자에 있어서는 탐식작용은 줄어들고, 호중구성 화학주성과 산화물대사는 증가하는데 이는 독성 산화물질과 연관이 있었다¹⁶.

이번 실험결과에서 bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 LTE를 투여한 Sample 군은 Control 군에 비하여 기관지폐세척액(bronchoalveolar lavage fluid ; BALF)내 백혈구 총수에 있어서 35.8%의 유의성 ($P<0.05$) 있는 감소를 나타내었다 (Table 1). 이것은 麥門冬에 의한 염증반응의 현저한 호전으로 해석할 수 있겠다. 또한 백혈구 비율의 변화를 살펴보면 Normal 군의 폐세척액 내 백혈구 중 macrophage의 비율은 $90.9\pm 1.0\%$ 이었으며, lymphocyte의 비율은 $5.6\pm 0.8\%$, neutrophil의 비율은 $3.6\pm 0.2\%$ 이었다. Bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군은 백혈구 중 macrophage의 비율이 $34.4\pm 4.5\%$ 로 확연하게 감소하였으며, lymphocyte의 비율은 $39.8\pm 6.7\%$ 로, neutrophil의 비율은 $25.8\pm 2.6\%$ 로 확연하게 증가하였다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 LTE를 투여한 Sample 군은 백혈구 중 macrophage 비율이 $53.2\pm 2.8\%$ 로 Control 군에 비하여 유의성 ($P<0.05$) 있게 증가하였으며, lymphocyte의 비율은 $30.6\pm 3.6\%$ 로 Control 군에 비하여 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었고, neutrophil의 비율은 $16.2\pm 2.1\%$ 로 Control 군에 비하여 유의성 ($P<0.05$) 있는 감소를 나타내었다 (Table 2).

즉, Bleomycin에 의하여 유발된 폐섬유화군에서는 대식세포의 비율은 줄어드는 대신에 호중구와 림프구의 비율은 확연하게 증가하여 염증반응이 폭발적으로 진행된 것을 알 수 있다. LTE를 투여한 Sample 군에서 대식세포의 비율은 유의성있게 증가하였고, 림프구는 감소하였으나 유의성은 없었고, 호중구의 비율은 유의성있게 감소하였다. Control 군에 비하여 림프구와 호중구의 비율이 감소한 점

은 염증반응의 감소를 시사한다고 할 수 있다. 대식세포의 비율은 증가하여 Normal 군에 근접한 것을 알 수 있다. Normal 군에서 대식세포의 비율이 높은 점과 Sample 군에서 대식세포의 비율이 유의성 있게 증가한 점으로 보아 대식세포는 오히려 염증반응이나 폐섬유화를 억제하는 기능을 한다고 생각해 볼 수 있다. 대식세포가 처음에는 섬유아세포를 모아서 증식하도록 자극하지만 결과적으로는 프로스타글란딘을 생산하여 대식세포, 호중구, 림프구의 반응을 억제하여 조직손상과 섬유화의 진행을 약화시킨다는 기존의 연구를 뒷받침한다고 볼 수 있다. 즉, 麥門冬은 대식세포의 비율 증가와 림프구와 호중구의 비율 감소에 의한 염증반응의 호전을 통해 폐섬유화를 억제하는데 상당한 효과가 있다고 할 수 있다.

폐조직의 Masson's trichrome 염색과 H-E 염색 소견에 따른 조직학적 폐손상 지표(SHI)는 Normal 군에서는 0.3 ± 0.2 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군은 4.5 ± 0.2 로 거의 모든 조직에서 확인한 염증반응과 상피세포의 비대 및 섬유화가 관찰되었다. Bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 LTE를 투여한 Sample 군의 SHI는 3.0 ± 0.6 으로 Control 군에 비하여 33.3%의 유의성 ($P<0.05$) 있는 염증반응의 감소, 상피세포 비대의 감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소가 관찰되었다(Table 3, Fig. 1). 따라서 폐섬유화에 있어서 麥門冬이 유의한 수준으로의 폐손상 억제능력이 있는 것으로 확인되어, 앞으로 麥門冬의 투여를 통한 폐섬유화의 치료에 있어서 임상 증상의 호전은 물론 조직학적인 폐손상의 억제 가능성을 확인할 수 있었다.

섬유화의 주요한 기전으로 제시되고 있는 또 다른 이론으로 T helper type 1 (Th1)과 T helper type 2 (Th2) cytokine response의 부조화를 들 수 있다.

Th1 cytokine response는 세포 매개성 면역에 관계하는 것으로 알려져 있으며, 조직 회복에 관련한 손상 부위를 정상적으로 회복시켜준다. 이에 반하여 Th2 cytokine response는 주로 섬유아세포의 활성화

와 증식을 통해서 ECM의 침착 및 섬유화를 유발한다. 섬유화에 관계된 대표적인 cytokine은 IFN- γ 와 IL-4로서 Th2 cytokine인 IL-4는 섬유아세포의 증식, collagen gene expression 및 합성 증가를 유도하며, Th1 cytokine인 IFN- γ 는 섬유화 억제에 대표적인 cytokine으로서 섬유아세포 증식의 억제, collagen 침착의 억제, 섬유아세포의 apoptosis 유도, 염증과 섬유화의 진행에 불가결한 TGF- β 의 생성 억제를 통해서 섬유화를 억제시킨다¹⁷. UIP 환자의 조직에서 단핵구 세포의 50%이상에서 IL-4, IL-5가 양성으로 염색되고, 이에 반해 IFN- γ 는 7%에서만 염색되는 점¹⁸, BALF내에서의 IL-4, IL-5, MCP-1이 증가되어 있는 점¹⁹으로 보아, UIP에서는 Th1 response의 감소와 Th2 response의 증가를 알 수 있다. 또한 최근 UIP 환자의 치료에 있어서 스테로이드 단독 사용보다 스테로이드와 IFN- γ 를 6개월 사용한 후 폐 조직에서 TGF- β 와 procollagen의 m-RNA를 감소시킴을 보였고, 임상적으로는 폐용적을 증가시키고 산소포화도를 개선시키는 효과를 보임으로써²⁰ 폐 섬유화의 기전에 Th1과 Th2 cytokine response의 불균형이 관계함을 알 수 있다. 현재까지의 연구에 의하면 IL-4는 콜라겐성과 비콜라겐성 기질 단백질의 생산과 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있고, INF- γ 는 섬유모세포의 증식과 콜라겐의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다²¹. 또한 IL-4와 IFN- γ 는 잠정적으로 각각 섬유화를 유발하고 섬유화를 방지하는 사이토카인으로 특징 지워지고, 복구중인 폐의 조직에서 관찰된다²². IFN- γ 는 점막의 면역반응과 관련된 것으로 알려진 BALT(bronchus-associated lymphoid tissues)의 발전(development)을 억제하는 효과도 있다²³. 그러나, 이들 cytokine중 INF- γ 가 in vitro 연구에서 직접적으로 섬유화를 조절한다는 사실에는 의견이 분분하다. 또한, 폐섬유화증에 관계하는 기전에 대해서도 아직까지 명확하게 밝혀진 것은 없다. 한편 IL-4가 섬유화를 촉진한다는 주장은 여러 논문에서 보고되고 있다. IL-4와 IL-13-binding cells은 bleomycin에 의해 유발된 폐섬유화의 유지에 필요하고²⁴, 폐섬유화 모델에서 IL-4는 초기 T 림프구의

모집(recruitment)을 제한하여 호염증 매개체(pro-inflammatory mediators)인 TNF-alpha, IFN- γ , NO 등을 과잉 생산하고, 만성적으로는 섬유화를 자극한다²⁵. Bleomycin을 투여한 후 3일에서 14일 사이에 폐의 IL-4 mRNA의 양은 매우 증가한 것으로 보아 IL-4는 염증반응을 자극하고 강화하여 섬유아세포의 콜라겐 합성을 자극하고 따라서 섬유화와 말기 폐질환으로의 진전을 촉진한다²⁶. 또한 IL-4는 in vitro에서 섬유아세포의 콜라겐 합성을 자극함으로써 특발성 폐섬유화증에서 간질성 섬유화의 진전에 관련되어 있다²⁷. 폐섬유화에 민감한 쥐(C57BL/6)에서 저항성이 있는 Control 군(BALB/c mice)에 비하여 IL-4 receptor mRNA이 발현이 큰 것을 보아 IL-4 receptor의 조절을 통하여 폐의 섬유화 진행을 막을 수 있을 것이다²⁸는 보고도 있다.

본 실험 결과에서 Normal 군의 폐세척액 내 IFN- γ 는 17.5 ± 3.1 pg/ml 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군은 138.3 ± 11.4 pg/ml로 확인한 Th1-type immune response의 증가를 나타내었으며, bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 LTE를 투여한 Sample 군은 115.2 ± 18.9 pg/ml로 Control 군에 비하여 감소하였지만 통계학적 유의성은 없었다. Normal 군의 폐세척액 내 IL-4는 6.0 ± 0.7 pg/ml 이었으며, bleomycin에 의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군은 42.0 ± 3.1 pg/ml로 확인한 Th2-type immune response의 증가를 나타내었으며, bleomycin에 의한 폐섬유화 유발과 함께 14일간 LTE를 투여한 Sample 군은 30.8 ± 3.8 pg/ml로 Control 군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 Th2-type immune response의 감소를 나타내었다(Table 4). 지금까지 제기된 이론에 의하면 폐섬유화에 있어서는 Th1-type immune response의 감소와 Th2-type immune response의 증가가 나타나야 하는데 실험 결과는 그렇지 않았다. LTE를 투여한 Sample 군에서 Th2-type immune response의 유의성있는 감소는 기존의 이론과 상부하여 麥門冬이 IL-4의 억제를 통한 폐섬유화를 감소시킨다는 충분한 근거로 제시될 수 있다. 하지만 bleomycin에

의하여 폐섬유화를 유발시킨 Control 군에서 Th1-type immune response의 증가는 급성염증으로 인한 조직손상의 회복을 위하여 급격하게 INF- γ 가 증가되었다는 해석과는 별도로, INF- γ 가 오히려 섬유화를 촉진한다는 기존 논문의 가능성을 뒷받침한다. 공교롭게도 실험에서 사용된 폐섬유화 유발물질이 bleomycin에 의한 것으로서, INF- γ 는 적어도 bleomycin에 의해 유발된 경우에 있어서는 폐의 염증과 섬유화를 매개한다²⁹는 주장이다. INF- γ 가 폐섬유화를 억제한다는 여러 근거가 있지만, 폐섬유화를 유발하는 물질에 따라서 그 역할이 상반될 수도 있는 가능성에 대하여는 좀 더 다양한 실험모델을 가지고 검증해 보아야 할 것이다.

이상의 결과를 종합하면 麥門冬은 대식세포 비율의 증가와 림프구, 호중구의 비율감소에 의한 염증반응의 호전을 통해 폐섬유화를 억제하는데 상당한 효과가 있으며, 폐섬유화의 조직학적 관찰에서도 유의한 수준으로의 폐손상 억제능력이 있고, IL-4의 억제를 통한 Th2-type immune response를 유의성있게 감소시켜 폐섬유화를 호전시킨다는 근거를 제시하였다고 볼 수 있다. 따라서 폐섬유화의 치료에 있어서 현재 투여되고 있는 항염증제, 면역억제제, 스테로이드와 병행하여 麥門冬의 투여로 그 임상증상의 개선은 물론 폐조직의 조직학적인 손상의 억제에도 효과가 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

Bleomycin에 의한 폐섬유화에 대해서 LTE 투여 후 측정된 폐세척액 내 백혈구 총수의 변화, 폐세척액 내 백혈구 비율의 변화, 조직학적 폐손상 지표의 변화, 폐 세척액 내 INF- γ 및 IL-4의 변화를 비교 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BALF 內 백혈구의 총수는 Sample 군에서 Control 군에 비하여 35.8%의 유의성 ($P<0.05$) 있는 감소를 보였다.
2. BALF 內 백혈구 중 macrophage의 비율은 Sample

군에서 $53.2\pm 2.8\%$ 로 Control 군에 비하여 유의성 ($P<0.05$) 있는 증가를 보였다.

3. BALF 內 백혈구 중 lymphocyte의 비율은 Sample 군에서 $30.6\pm 3.6\%$ 로 Control 군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다.
4. BALF 內 백혈구 중 neutrophil의 비율은 Sample 군에서 $16.2\pm 2.1\%$ 로 Control 군에 비하여 유의성 ($P<0.05$) 있는 감소를 보였다.
5. 채취된 폐조직에 있어서 조직학적 폐손상 지표 (SHI)는 Sample 군에서 Control 군에 비하여 33.3%의 유의성 ($P<0.05$) 있는 염증반응의 감소, 상피세포 비대의 감소 및 collagen 침착 섬유화의 감소가 관찰되었다.
6. BALF 內 INF- γ 는 Sample 군에서 Control 군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다.
7. BALF 內 IL-4는 Sample 군에서 Control 군에 비하여 유의성 ($P<0.05$) 있는 감소를 보였다.

參考文獻

1. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:646-64.
2. King TE Jr, Costabel U, Cordier JF, doPico GA, du Bois RM, Lynch D, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:646-64.
3. 김한겸. 특발성 간질성 폐렴의 분류 및 병리학적 소견. 결핵 및 호흡기질환. 2003;54(2):145-66.
4. Alvarez-Sala R, Prados C, Garcia FR, Lazaro TC, Garcia-Satue JL, Pino JM, Villamor. Idiopathic pulmonary fibrosis: new diagnostic and therapeutic perspective. An Med Interna. 1993;10(7):355-60.
5. 전국한외과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:영림사; 1998, pp.588-9.

6. 이용성. 經藥分類典. 서울:정담; 2002, p.12, 27, pp.113-4, 124, 126.
7. International consensus statement. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:646-64.
8. 경희대학교 한의과대학 이형구, 정승기 편저. 동의폐계내과학. 서울:아트동방; 2000, pp.105-61, 166-75, 252-68.
9. 허준. 동의보감. 서울:남산당; 1998, pp.416-7, 443-56, 470-2, 474-9, 481-2.
10. 江蘇新醫學院. 중약대사전. 상해과학기술출판사; 1997, pp.1024-7.
11. 어수택. 폐 섬유화증의 병인 및 병태 생리. 결핵 및 호흡기질환. 2003;54(2):167-77.
12. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibroses : clinical relevance of pathologic classification. Am J Respir Crit Care Med. 1998; 157:1301-15.
13. Akira M., Hamada H., Sakatani M., Kobayashi C., Nishioka M., Yamamoto S. CT findings during phase of accelerated deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. AJR. 1997;168:79-83.
14. 송정섭, 김영균, 김관형, 한기돈, 문화식, 신완식, 박성학. 각종 간질성 폐질환에서 폐포 대식 세포의 Superoxide분비능과 식균 작용. 대한내과학회지. 1990;39(3):325-32.
15. Yoshimura K. Pathogenesis of idiopathic interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis: cellular and molecular biology of the disease. Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi. 1993;Suppl:20-31.
16. Kolodkina LA, Ses' TP, Pokhodzei IV, Orlova GP. Role of neutrophilic leukocytes in pathogenesis of idiopathic fibrosing pulmonary alveolitis. Probl Tuberk. 1999;(4):35-7.
17. Jaffe HA, Gao Z, Mori Y, Li L, Varge J. Selective inhibition of collagen gene expression in fibroblasts by an interferon- γ transgene. Exp Lung Res 1999;25:199-215.
18. Wallace WA, Ramage EA, Lamb D, Howie SE. A type 2 (Th2-like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA). Clin Exp Immunol. 1995;101:436-41.
19. Suga M, Iyonaga K, Ichiyasu H, Saita N, Yamasaki H, Ando M. Clinical significance of MCP-1 levels in BALF and serum in patients with interstitial lung diseases. Eur Respir J. 1999;14:376-82.
20. Ziesche R, Hofbauer E, Wittmann K, Petkov V, Block LH. A preliminary study of long-term treatment with interferon γ -1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med. 1999;341: 1264-9.
21. Lukacs NW, Hogaboam C, Chensue SW, Blease K, Kunkel SL. Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis. Chest. 2001;120(1 Suppl):5S-8S.
22. Sempowski GD, Derdak S, Phipps RP. Interleukin-4 and interferon- γ discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblast subsets. J Cell Physiol. 1996;167(2):290-6.
23. Desaki M, Sugawara I, Iwakura Y, Yamamoto K, Takizawa H. Role of interferon- γ in the development of murine bronchus-associated lymphoid tissues induced by silica in vivo. Toxicol Appl Pharmacol. 2002;185(1):1-7.
24. Jakubzick C, Choi ES, Joshi BH, Keane MP, Kunkel SL, Puri RK, Hogaboam CM. Therapeutic attenuation of pulmonary fibrosis via targeting of IL-4- and IL-13-responsive cells. J Immunol. 2003;171(5):2684-93.
25. Huaux F, Liu T, McGarry B, Ullenbruch M,

- Phan SH. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. *J Immunol.* 2003;170(4):2083-92.
26. Gharaee-Kermani M, Nozaki Y, Hatano K, Phan SH. Lung interleukin-4 gene expression in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Cytokine.* 2001;15(3):138-47.
27. Ando M, Miyazaki E, Fukami T, Kumamoto T, Tsuda T. Interleukin-4-producing cells in idiopathic pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Respirology.* 1999; 4(4):383-91.
28. Baecher-Allan CM, Barth RK. PCR analysis of cytokine induction profiles associated with mouse strain variation in susceptibility to pulmonary fibrosis. *Reg Immunol.* 1993;5(3-4): 207-17.
29. Chen ES, Greenlee BM, Wills-Karp M, Moller DR. Attenuation of lung inflammation and fibrosis in interferon- γ -deficient mice after intratracheal bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24(5):545-55.