

# 加味六君子湯이 호흡기 뮤신분비 및 뮤신 유전자 발현에 미치는 영향

박양춘\*

대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실

## Effect of Gamiyukgunja-tang on Secretion and Gene Expression of Airway Mucin

Yang Chun Park\*

*Division of Respiratory System, Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University*

In the present study, the author intended to investigate whether Gamiyukgunja-tang (Jiaweiliujunzi-tang, GYGT) significantly affect both mucin release from and MUC5AC gene expression in cultured hamster tracheal surface epithelial (HTSE) cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with 3H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of GYGT to assess the effect on 3H-mucin release. Possible cytotoxicity of the agent was assessed by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release. Total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed and effect of GYGT on MUC5AC gene expression in cultured HTSE cells were investigated. GYGT did not affect mucin release from cultured HTSE cells. GYGT did not show significant cytotoxicity. GYGT also did not affect the secretion of the other releasable glycoproteins with less molecular weight than mucin. GYGT increased the expression level of MUC5AC gene. We suggest that the effect of GYGT with their components should be further investigated through ongoing research.

Key words : airway, mucus, mucin, Gamiyukgunja-tang (加味六君子湯; Jiaweiliujunzi-tang, GYGT)

### 서 론

인체 호흡기에 존재하는 점액(mucus)은 점액섬모청소(mucociliary clearance)라고 불리는 섬모세포와의 협동작용을 통해, 인체에 불필요하거나 혹은 유해한 물질의 제거에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>1)</sup>. 호흡기 점액의 인체 방어 기능은 주로 점액의 구성요소인 뮤신(mucin)의 점성 및 탄성에 기인하는데, 이러한 뮤신의 양과 질의 이상으로 말미암은 점액섬모청소가 정상적으로 작동하지 못하면 오히려 세균의 성장 및 집락을 촉진시키는 발판 역할을 하게 된다<sup>2)</sup>. 즉 천식, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증 등의 호흡기 질환에서 관찰되는 객담 혹은 점액의 과다분비는 이러한 질환군의 예후를 악화시키는 주된 요인으로 알려져 있다<sup>3)</sup>. 현재 서양의학 체계에서는 이러한 과다분비된 점

액의 점도 및 분비를 조절하기 위해 점액용해제, 점액활성제, 점액조절제등을 사용하고 있으나, 그 효능 및 응용 범주에 제한이 있어 적절한 약물치료를 시행하기가 용이하지 않은 실정이다<sup>4)</sup>.

加味六君子湯은 六君子湯에 化痰止咳平喘하는 蘇子, 白芥子, 紫菀, 款冬花, 桑白皮와 健脾燥濕하는 厚朴, 蒼朮, 薏苡仁과 消食健胃하는 砂仁, 山楂肉, 神麩, 麥芽, 鷄內金を 가한 처방으로 대전대학교부속한방병원 폐계내과에서 기관지천식 등의 완해기에 다용하는 처방이다.

최근 한약처방이 호흡기 객담분비에 미치는 영향에 대한 연구<sup>5-9)</sup>가 이루어지고 있으나 氣虛痰盛을 치료하는 六君子湯을 기본으로 구성된 방제에 대한 연구는 없었다. 이에 저자는 加味六君子湯의 객담 생성 및 과다분비 조절 작용을 규명하고자 일차 배양 햄스터 기관표면 상피(hamster tracheal surface epithelial, 이하 HTSE)세포를 이용하여 뮤신 분비 및 생성에 미치는 영향과 그 영향이 특이적인지를 측정하고, 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase, 이하 LDH) 활성에 미치는 영향을 측정할 결과,

\* 교신저자 : 박양춘, 대전시 동구 용운동 대전대학교 한의과대학

· E-mail : omdstar@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8630

· 접수 : 2006/10/31 · 수정 : 2007/01/16 · 채택 : 2007/02/09

유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

알차배양 기관표면 상피세포(hamster tracheal surface epithelial cells)를 얻기 위하여 8-10 주령의 웅성 Golden Syrian 햄스터를 실험동물 전문 사육업체에서 공급받은 후 사용하였다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대전대학교부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며 加味六君子湯 처방 내용과 1첩의 용량은 각각 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Gamiyukgunja-tang (GYGT)

構成藥物	生藥名	用量(g)
人參	<i>Ginseng Radix</i>	6.0
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	6.0
白茯苓	<i>Poria</i>	6.0
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	6.0
半夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	6.0
山藥	<i>Discoreae Rhizoma</i>	6.0
薏苡仁	<i>Coicis Semen</i>	8.0
蘇子	<i>Perillae Fructus</i>	4.0
白芥子	<i>Sinapis Semen</i>	4.0
紫苑	<i>Asteris Radix</i>	4.0
款冬花	<i>Farfarae Flos</i>	4.0
桑白皮	<i>Mori Cortex</i>	4.0
厚朴	<i>Magnoliae Cortex</i>	4.0
蒼朮	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	4.0
砂仁	<i>Amomi Fructus</i>	4.0
鷄內金	<i>Galli Stomachichum Corium</i>	4.0
山楂肉	<i>Crataegii Fructus</i>	4.0
神曲	<i>Massa Medicata Fermentata</i>	4.0
麥芽	<i>Hordei Fructus Germinatus</i>	4.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	3.0
Total Amount		99.0

#### 3) 시료제조

加味六君子湯(GYGT)의 한 첩 분량에 800ml의 이차 증류수를 가하고 100℃로 가온된 상태에서 3시간 동안 전탕하여, 80ml의 탕액을 수거하였다. 각 탕액을 실온 정도로 방냉한 후, 멸균 청정 후드 내에서 0.22µm filter를 이용, 여과하여 멸균용기에 저장하여 4℃ 냉장고에 보관하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 기관표면 상피세포의 분리 및 배양

햄스터의 기관표면 상피세포 분리와 배양에 적용된 실험방법은 Kim 등, Wu 등, Lee 등의 방법<sup>10,13)</sup>을 사용하였다. 세포들이 1-3일간 배양된 후에는 37℃ incubator에서 32℃ incubator로 옮겨서 배양했다. 배양액 교체는, 배양 개시 후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다.

#### 2) 뮤신의 대사적 방사선 표지(radiolabeling)

Kim 등, Lee 등의 방법<sup>10,11)</sup>을 이용하였는데, 배양세포 중의 뮤신은, 성숙한 배양세포(24 well plate, 5×10<sup>5</sup>cells/well)에, 10µCi/ml의 [6-3H] glucosamine(39.2 Ci/mmol, New England nuclear)을 함유하는 완전배양액[insulin(5µg/ml), transferrin(5µg/ml), epidermal growth factor(12.5ng/ml), hydrocortisone(0.1µM), sodium selenite(0.01µM), fetal bovine serum(5%, V/V, 이하 FBS), retinoic acid(0.1µM), penicillin G(100U/ml), streptomycin(100µg/ml), gentamicin(50µg/ml)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DME)과 Medium 199(M199)의 1:1 혼합 배양액]을 well당 200µl씩 가하고 32℃에서 24시간 동안 배양함으로써 방사선 표지(metabolic radiolabeling)되었다.

#### 3) 약물 처리

24시간 동안의 대사적 방사선 표지가 완결된 후 배양액 (pretreatment sample, 이하 PT로 약칭)을 수거하여 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 각 방제의 최종 추출물 20-80µl 함유하는 PBS 200µl를 각각 well마다 가하고 32℃에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하여 treatment sample(이하 T sample)로 정의하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포와 기타 잔사를 제거하고, 50µl의 상징액은 젖산탈수소효소 활성측정(LDH activity assay)을 위해 따로 덜어두고 나머지는 방사성 뮤신 함량을 측정할 때까지 -70℃에서 냉동저장 하였다<sup>10,11)</sup>.

#### 4) 뮤신 함량 측정

Hyaluronidase에 의해 분해되지 않으며, sepharose CL-4B column으로부터 exclude되는 고분자량의 glycoconjugate를 뮤신으로 정의하였고, Lee 등의 방법<sup>10,11)</sup>에 따라 방사성 뮤신의 함량을 측정하였다.

#### 5) 배양세포의 세포질로부터 유리된 젖산 탈수소효소 활성 측정(LDH activity assay)

배양세포 중의 뮤신은, 다 자란 배양세포(24 well plate, 5×10<sup>5</sup>cells/well)에, 10µCi/ml의 [6-3H] glucosamine(39.2 Ci/mmol, Amersham)을 함유하는 완전배양액을 well당 200µl씩 가하고 32℃에서 24시간 동안 배양함으로써 방사선 표지하였고, 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 각 방제의 최종 추출물 20-80µl를 함유하는 PBS 200µl, 를 각각 well마다 가하고 32℃에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액(T sample)을 수거하여 부유세포와 기타 잔사를 제거하고, 50µl의 상징액을 젖산탈수소효소 활성측정(LDH activity assay)에 사용했다. LDH 활성측정은 commercial kit(Sigma, LD-L 10)을 이용하였다<sup>10,11)</sup>.

#### 6) Sepharose CL-4B column을 통한 전체 용출양상 분석

뮤신의 방사선 표지 후 각 방제의 최종 추출물을 가하고 배양하여 얻어진 T sample을 1.0×50cm 규격의 sepharose CL-4B column에 적용하였다. 한 분획의 용량은 0.35ml로 하였고 뮤신이 용출되는 void volume뿐만 아니라 included volume과 total bed volume이 용출될 때까지 분획을 수거하였다. 각 분획에 scintillation cocktail을 첨가한 뒤 LSC를 이용, 방사선량을 측정하였다. 대조 sample과 각 약물의 처리가 뮤신 및 그보다 분자량이 작은, 표지된 여타의 당단백질들의 전체 용출양상에 미치는

영향을 비교하였다<sup>10,11</sup>).

7) RT-PCR

(1) RNA의 분리

각 방제가, HTSE 세포 내에 존재하는 유신 유전자인 MUC 5AC mRNA의 발현정도(수준)에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 먼저 total RNA를 분리하고자 GIBCO BRL사의 TRIZOL reagent(total RNA isolation reagent)를 이용하였다. 즉, 배양된 HTSE 세포에 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯을 최종 추출물 기준으로 각각 40 $\mu$ l, 40 $\mu$ l, 80 $\mu$ l를 함유하는 완전배양액 200 $\mu$ l를 well 마다 가하고, 32 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 배양시킨 다음, 냉각된 PBS로 2회 세척하였다. Matrix인 collagen을 분해하기 위하여 완전배양액에 녹인 0.2% collagenase type IV 각 well당 400 $\mu$ l씩 가하고, 37 $^{\circ}$ C 배양기에 2시간 동안 반응시킨 후 세포들만 원심 분리하였다. 이어서, total RNA isolation reagent를 이용해 세포를 lysis시키고, 핵단백질을 완전히 분리해 내기 위해 상온에서 5분간 방치하였다. 5분 후 즉시, microtube에 chloroform을 첨가, 15초간 vortexing하고 상온에 2-3분간 방치한 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm (Hanil centrifuge, MICRO 17 R)에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 새 microtube에 옮겼다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 이 침전물에 diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 함유된 80% ethanol을 가하고 4 $^{\circ}$ C, 7,500 rpm에서 5분간 원심분리함으로써 세척하였다. 수거된 RNA 침전물을 대기 중에서 건조시킨 후, RNase-free water로 부유시키고, spectrophotometer (Beckman, DU-650)를 사용하여 260nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도를 알아내어, 실험에 사용하였다 (1.0A260=single strand RNA 40 $\mu$ g/ml)<sup>14</sup>).

(2) Primer 제조

MUC 5AC의 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5'-CACCGGCCTCACCCGACGCCACC-3', antisense primer의 염기서열은 5'-GATGGGGCCGCCTCCCGAGAGC-3'이며, 이 primer에 의해 합성된 PCR 산물의 크기는 440bp였다.  $\beta$ -actin 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5'-TGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCTG-3' 이고, antisense primer는 5'-GTGCCACCAGACAGCACTGTGTTG-3' 이며 이 primer가 표적으로 하는 DNA 크기는 290bp였다.

(3) RT-PCR

수거된 total RNA를 이용, 역전사 반응(reverse transcription; RT)으로 cDNA를 만들고, 이를 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)으로 증폭시켰다. 즉 각각의 조건에서 얻어진 total RNA 5  $\mu$ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열함으로써 denaturation시키고, 이를 얼음에 담가 급냉시킨 후 4 $\mu$ l의 5 $\times$ RT buffer (250 mM Tris-HCl/pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM Dithiothreitol), 2.5  $\mu$ l의 10 mM dNTP, 1 $\mu$ l의 oligo-dT15 (25 pmol), 1 $\mu$ l의 역전사 효소 용액 (M-MLV RT; 200 U/ $\mu$ l)을 첨가하고 총 반응액이 20 $\mu$ l가 되도록 탈이온 2차 증류수를 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 얻었다. 얻어진 cDNA 산물은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하여 역전사 효소를 불활성화시킨 다음

얼음에 담가 급냉하였다. MUC 5AC 유전자에 대한 중합효소 연쇄반응(PCR)은, 각각의 역전사 반응에서 얻은 cDNA 산물 5 $\mu$ l에, 4 $\mu$ l의 10 $\times$ PCR buffer (100 mM Tris/pH 8.0, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mg/ml BSA), 4 $\mu$ l의 2.5 mM dNTP, 1 $\mu$ l씩의 MUC 5AC에 대한 sense, antisense primer (10 pmol/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l의 Taq DNA polymerase (0.2 U/ $\mu$ l)를 첨가하여 총 반응액이 40 $\mu$ l 되도록 탈이온 2차 증류수를 가한 후 시행되었다. 증폭반응을 위하여, PCR (PCR thermal cycler; Takara MP-300, Japan)을 30회 실시하였으며, denaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing은 60 $^{\circ}$ C에서 1분, extension은 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 각각 시행하였다.

(4) 전기영동

RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응으로 증폭된 cDNA 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC 5AC mRNA 발현 정도(수준)의 변동을 관찰하였다. 즉, 증폭된 PCR 산물 (20  $\mu$ l)을 10 $\times$ gel loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 50% glycerol)와 잘 혼합한 다음, Tris-acetate-EDTA buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)용액 및 1 $\mu$ g/ml의 ethidium bromide가 포함된 1.0% agarose gel에서 전기영동하였다. Gel 상에서 이동된 각각의 DNA band는 자외선 투사기 (ultraviolet transilluminator)를 이용하여 관찰하고, 사진 촬영하였다.

8) 통계처리

모든 측정 결과는 mean $\pm$ S.E.M.으로 환산된 후, 약물 처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타냈다. 통계처리는 unpaired Student's t-test로 하였으며, p<0.05인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 유신 분비에 미치는 영향

加味六君子湯(GYGT)은 최종 추출물 20-80 $\mu$ l/PBS 200 $\mu$ l의 투여 농도에서 유신 분비에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다(Fig. 1).

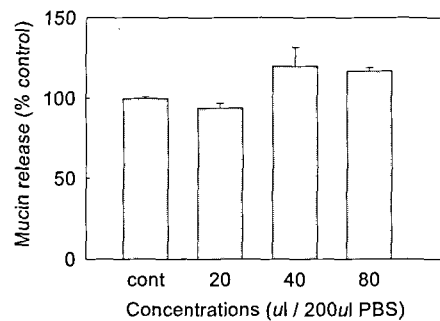


Fig. 1. Effect of GYGT on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with 3H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of GYGT and the amount of 3H-mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean $\pm$ S.E.M. from 4 culture wells.

2. LDH 분비에 미치는 영향

加味六君子湯(GYGT)은 20-80 $\mu$ l/PBS 200 $\mu$ l 투여 농도 범위

에서 세포독성의 한 지표인 LDH 분비에 유의성 있는 영향을 미치지 않았다(Fig. 2).

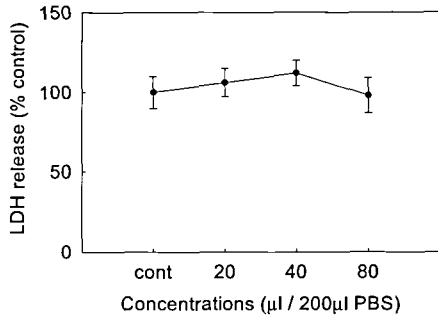


Fig. 2. Effect of GYGT on LDH release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of GYGT for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean±S.E.M. from 4 culture wells.

3. Sepharose CL-4B column을 통한 전체 용출 양상 분석

加味六君子湯(GYGT) 80μl/PBS 200μl 처리 시, GYGT는 뮤신의 분비뿐만 아니라, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에도 유의성있는 작용을 보이지 않았다(Fig. 3).

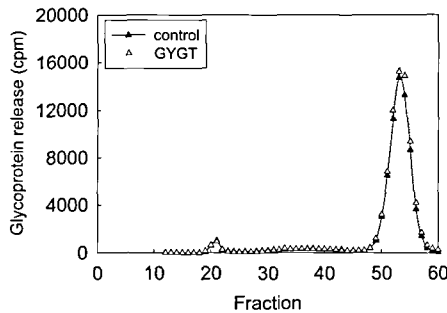


Fig. 3. Effect of GYGT on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with 3H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of GYGT 80μl/PBS 200μl and total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed, as described in Materials and Methods.

4. MUC 5AC mRNA 발현 수준에 미치는 영향

RT-PCR 실험 결과, 加味六君子湯(GYGT)은 24시간의 투여 기간 동안 뮤신의 유전자인 MUC 5AC mRNA의 발현 수준을 강하게 증가시켰다(Fig. 4).

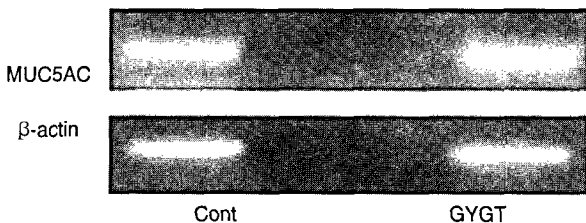


Fig. 4. Effect of GYGT on MUC5AC mRNA expression in cultured HTSE cells. HTSE cells were incubated with the indicated concentration GYGT for 24 hrs. Total RNA was isolated and MUC5AC mRNA levels were analyzed by RT-PCR. The PCR products were separated on 1.0% agarose gel and stained with ethidium bromide, as described in Materials and Methods.

고찰

객담은 체내의 모든 비생리적 체액을 지칭하는 痰飲의 개념 중에서 협의의 痰飲에 해당하는데 정상상태에서는 기관, 기관지에서 분비된 분비물이 침입한 이물이나 병원체를 흡착하여 섬모 운동을 통하여 인후두부로 옮겨지고 반사기능에 의해 외계로 배출되거나 연하되지만 이러한 기관지 점액 분비가 비정상적으로 증가하게 되면 가래의 형태로 배출하게 된다<sup>15,16</sup>. 한의학에서의 객담의 종류에는 風痰, 寒痰, 濕痰, 熱痰, 燥痰, 鬱痰, 氣痰 등이 있으며 서양의학에서는 객담을 점액성, 장액성, 화농성, 혈성으로 분류 한다<sup>15,17</sup>.

객담의 주요 성분인 점액(mucus)은 섬모세포와의 협동작용을 통해 흡입된 공기 속의 이물이나 병원체 등을 외부로 제거하는 역할을 하는데 점액의 구성요소인 뮤신(mucin, 점액소)의 양과 질의 이상은 오히려 인체의 방어 작용에 영향을 주어 호흡기계에 심한 병리 현상을 유발할 수 있다<sup>12</sup>. 객담의 증가는 호흡기 질환의 병적 상태를 증가시키는데, 감염의 위험을 높이고, 기류폐쇄를 가져오며 객담의 만성적 증가는 사망 위험을 증가시킨다<sup>3</sup>.

加味六君子湯은 六君子湯에 潤肺化痰하여 止咳作用을 강화할 목적으로 蘇子, 白芥子, 紫菀, 款冬花, 桑白皮 등을 가한 처방으로 대전대학교부속한방병원 폐계내과에서 기관지천식 등에 사용하는 처방이다. 그 구성약물에서 半夏, 蘇子, 白芥子, 紫菀, 款冬花, 桑白皮는化痰止咳平喘하고, 人蔘, 白朮, 山藥, 厚朴, 蒼朮, 薏苡仁은健脾燥濕하고, 砂仁, 鷄內金, 山查肉, 神曲, 麥芽는消食健胃하고, 陳皮는理氣化痰하고, 茯苓은利水滲濕하고 炙甘草는調和諸藥하며 潤肺한다<sup>18</sup>.

서양의학적으로 호흡기 뮤신의 분비를 감소시키는 물질로는 서양의학 체계에서 다양한 염증성 질환의 치료제로 응용되는 glucocorticoid가 대표적이며<sup>19</sup> 최근 poly-L-lysine (PLL) 등의 양이온성 폴리펩티드가 호흡기 뮤신 분비를 억제하는 물질로서 보고되었다<sup>10</sup>. 그러나 이러한 약물들은 그 다양한 약리작용 및 부작용 등으로 인해 호흡기 질환의 임상에서 적절히 응용되기에는 많은 제한이 따르고 있다. 최근 한약처방이 호흡기 객담분비에 미치는 영향에 대한 연구로 小青龍湯과 加味治哮喘<sup>5</sup>, 清金降火湯과 瓜蒌枳實湯<sup>6</sup>, 杏蘇湯과 加味八味丸<sup>7</sup>, 定喘化痰湯<sup>8</sup>, 加味腎氣湯과 加味清肺湯<sup>9</sup> 등을 대상으로 하는 연구가 진행되었으나 氣虛痰盛을 치료하는 六君子湯을 기본으로 구성된 방제에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 加味六君子湯의 여러 효능 중 객담의 생성 및 과다분비에 대한 조절 효능에 대해 알아보기 위해, 호흡기 객담의 생화학적 주 구성성분인 뮤신(mucin)의 약리 연구에 보편적으로 사용되는 일차배양 햄스터 기관표면 상피(HTSE)세포를 이용하여, 각 방제들이 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향을 규명하고, 동시에 이 방제들의 뮤신 분비에 대한 작용의 특이성과 뮤신의 분비뿐 아니라 생성에도 영향을 줄 가능성이 있는지를 검증해 보았다.

加味六君子湯은 최종 추출물 20-80μl/200μl PBS의 투여농도 범위에서, 뮤신분비에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다(Fig.

1). 이러한 결과는 加味六君子湯이 in vitro에서 30분간의 약물투여 기간 동안에 호흡기 상피세포에 대해 직접적인 작용을 나타내지 않음을 시사하는 결과이다. 또한 본 연구에서는 세포막 손상의 한 지표인 LDH 활성 측정을 통하여 加味六君子湯의 호흡기 배상세포에 대한 독성발현 가능성을 검증하고자 하였다. 세포막이 손상되면 세포는 그 완전성과 정상 기능을 상실한다<sup>20</sup>). 그러므로 세포막 손상 시 분비되는 LDH의 활성 측정을 세포독성 유발여부 측정의 한 방법으로 채택할 수 있다. 가미육군자탕은 LDH 분비에도 유의성 있는 영향을 미치지 않음으로써, 뚜렷한 세포독성 역시 발현하지 않음을 알 수 있었다(Fig. 2). 한편 加味六君子湯이 분자량이 큰 당단백질인 뮤신의 분비에 대해서는 영향이 없지만, 뮤신보다 분자량이 작고 구조도 다른 여타의 방사능 표지 당단백질들의 분비에는 여하한 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 겔 여과 크로마토그래피(gel filtration chromatography) 방법을 이용, 전체 용출 양상 분석을 실시하였다. 겔 여과 크로마토그래피에서는 resin에 loading되는 혼합물 중의 구성 성분들을 그 분자의 size 별로 분리하므로, 특정 혼합물을 loading한 후 그 혼합물 중 가장 큰 크기의 물질부터, 가장 작은 크기의 물질까지 용출시켜, 그 각각의 분획들을 수거하여 물질을 정량할 수 있다<sup>21</sup>). 일차배양된 HTSE세포에 3H-glucosamine을 이용, 배양세포가 생산하는 뮤신 및 glucosamine을 함유하는 여타의 당단백질에, 방사능 표지한 후, 일정 기간 동안 세포를 배양하면, 3H-표지 당단백질들이 배양액 중으로 유리된다<sup>11,22</sup>). 이때 이 배양액을 Sepharose CL-4B column에 loading하면, 3H-표지 당단백질 중 분자량 수백만 dalton에 해당하는 거대분자인 뮤신으로부터, 가장 크기가 작은 3H-glucosamine까지 용출되는 특정한 용출양상(elution profile)이 나타날 것이다. 만약, 대조 배양액의 전체 용출양상을 기준으로, 각 약물을 처리했을 때 전체 용출양상(total elution profile)의 특정부분에 변화가 생겼다면, 그 변화는 특정 크기의 3H-당단백질 분비량의 변화를 의미하는 것이다<sup>10</sup>). 그러나 加味六君子湯은 뮤신과 같은 거대분자가 용출되는 fraction인 void volume fraction 뿐 아니라 여타의 included volume 및 total volume에 해당하는 fraction에서도 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않음으로써, 뮤신보다 크기가 작고 구조도 다른 당단백질들의 분비에도 영향을 미치지 않음을 보여 주었다(Fig. 3). 한편 호흡기 배상세포에 加味六君子湯을 30분간 투여했을 때, 뮤신의 분비에 대한 영향은 측정되었으나, 이 방제가 단순히 이미 생성된 뮤신의 분비에만 영향을 주는지, 혹은 뮤신의 생성(production) 단계에서도 영향을 줄 수 있는 지 여부를 밝히기 위하여 뮤신의 유전자 중 호흡기 뮤신의 대표적 유전자인 MUC5AC의 발현 정도에 이 방제가 미치는 영향을 측정하고자 하였다. 즉 加味六君子湯을 24시간 동안 투여했을 때 세포 내의 MUC5AC mRNA의 수준에 어떤 영향이 있는지를 검색하였다. 실험결과 加味六君子湯이 MUC5AC의 발현 수준을 강하게 증가시키는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 이러한 실험 결과는, 加味六君子湯이 단기적으로는 뮤신의 분비에 영향을 주지 않으나, 장기 투여 시에는 분자 수준에서의 뮤신 합성단계에 작용, 뮤신 유전자의 발현을 강하게 증가시킴을 의미하는 것

이다. 加味六君子湯의 구성 약물 중 蘇子, 白芥子, 紫菀, 款冬花 등에 의해 뮤신 분비세포인 배상세포에 대한 직접적인 분비 증가 혹은 억제작용을 발현할 가능성보다는, 人蔘, 白朮, 白茯苓, 山藥, 炙甘草, 五味子 등에 의해 補陽, 補陰함으로써 津液을 보충하고, 氣血의 循環을 도움으로써, 기도 질환에서의 去痰을 도와 줄 가능성을 시사하는 것으로 볼 수 있다. 향후, in vivo 실험을 통한 구체적 연구결과를 바탕으로 잠정적인 결론을 도출할 수 있을 것이라 사료된다. 결론적으로 상기의 연구결과들은 방제 자체의 in vivo 상태에서의 약리작용에 대한 후속연구 및 각 처방의 구성 단일약물들과 뮤신 분비 간의 상관성에 관한 추가적 연구의 필요성을 제시하고 있다.

## 결론

일차배양 램스터 기관표면 상피(HTSE)세포를 이용하여, 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯의 뮤신 분비 및 생성에 미치는 영향과 그 영향이 특이적인지를 측정하고, 젖산 탈수소효소(LDH) 활성에 미치는 영향을 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

定喘化痰湯과 杏蘇湯은 최고투여 용량에서 뮤신 분비를 감소시켰고 小青龍湯은 용량 의존적으로 뮤신 분비를 감소시키는 경향을 보였다. 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯은 공히 세포독성은 발현하지 않았다. 뮤신의 분비를 유의성 있게 감소시키는 것으로 나타난 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯은 주로 뮤신과 같은 거대 당단백질의 분비를 감소시키며, 그보다 크기가 작고 구조도 다른 당단백질들의 분비에는 유의성 있는 영향을 미칠 가능성이 낮으므로, 뮤신 분비 감소작용에서 특이성을 나타냄을 알 수 있었다. 定喘化痰湯은 뮤신의 분비 현상만 감소시키는 것이 아니라 장기적으로는 뮤신의 생성, 즉 분자 수준에서의 뮤신 합성을 통해서 작용할 가능성이 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과는 定喘化痰湯, 杏蘇湯, 小青龍湯은 뮤신 분비를 억제함으로써 객담량의 증가를 주요 증상으로 하는 호흡기 질환에 응용할 수 있으며, 특히 定喘化痰湯은 뮤신의 생성을 억제할 가능성이 있다는 실험적 근거를 제시하는 것으로 사료된다. 또한 각 방제 구성 약물들의 개별적 약리작용에 대한 후속연구의 필요성을 제시하고 있다.

## 참고문헌

1. 심영수. 호흡기의 해부학적 구조: 한용철. 임상호흡기학. 서울, 일조각. pp 6-8, 1990.
2. 김영근. 숙주방어기전: 대한결핵 및 호흡기학회. 호흡기학. 서울:군자출판사. pp 55-56, 2004.
3. Rubin, B.K. Physiology of airway mucus clearance. Respir Care. 47(7):761-782, 2002.
4. 김세규, 장준. 호흡기 증상 완화제-진해제, 거담제, 항히스타민제-. 결핵 및 호흡기질환. 60(3):261-269, 2006.
5. 나도균, 이충재, 박양춘. 소청룡탕 및 가미육군자탕이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향. 동의생리병리

- 학회지 18(3):734-739, 2004.
6. 이정은, 박양춘. 청금강화탕 및 과루지실탕이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 25(2):238-244, 2004.
  7. 임도희, 이정은, 한영주, 황지호, 조철준, 배한호, 박양춘. 행소탕 및 가미팔미환이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 26(1):221-228, 2005.
  8. 김준명, 이충재, 박양춘. 정천화담탕 등 수증 방제의 호흡기 객담분비 조절 효능에 관한 실험적 연구. 대한한방내과학회지 27(1):126-137, 2006.
  9. 한달수, 김윤희, 강탁림. 가미신기탕 및 가미청폐탕이 기도점액 분비 및 기관평활근 긴장도에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 20(1):156-162, 2006.
  10. Lee, C.J. Specificity in the inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Appl. Pharmacol.* 9(3):218-223, 2001.
  11. Kim, K.C., Rearick, J.I., Nettesheim, P., Jetten, A.M. Biochemical characterization of mucous glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial cells in primary culture. *Biol. Chem.* 260:4021-4027, 1985.
  12. Kim, K.C., Brody, J.S. Use of primary cell culture to study regulation of airway surface epithelial mucus secretion. *Symp Soc Exp Biol.* 43:231-239, 1989.
  13. Wu, R., Smith, D. Continuous multiplication of rabbit tracheal epithelial cells in a defined, hormone-supplemented medium. *In Vitro.* 18:800-812, 1982.
  14. Karlinsey, J., Stamatoyannopoulos, G., Enver, T. Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells. *Anal Biochem.* 180(2):303-306, 1989.
  15. 전국한의과대학폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울, 한문회사. pp 52-55, 102-114, 2002.
  16. 박순규. 기침과 객담: 대한결핵 및 호흡기학회. 호흡기학. 서울, 군자출판사. pp 77-79, 2004.
  17. 정희재, 정승기, 이형구. 객담에 관한 동서의학적 문헌고찰. 대한한방성인병학회지 1(1):51-62, 1995.
  18. 전국한의과대학본초학교수. 본초학. 서울, 영림사. pp 289-540, 1991.
  19. Mutschler, E., Derendorf, H. Drug actions. Boca Raton: CRC press. pp 410-411, 1995.
  20. Freshny. Measurement of viability and cytotoxicity. In: Culture of animal cells(3rd edn). Willey-Liss; p 288, 1994.
  21. Cheng, P.W., Sherman, J.M., Boat, T.F., Bruce, M. Quantitation of radiolabeled mucous glycoproteins secreted by tracheal explants. *Anal Biochem.* 117(2):301-306, 1981.
  22. Lee, C.J., Paik, S.H., Ko, K.H., Kim, K.C. Effects of polycationic peptides on mucin release from airway goblet cells: relationship between polymer size and activity. *Inflamm Res.* 51(10):490-494, 2002.