

補中益氣湯 加味方과 仙方敗毒湯이 기도 점액의 분비와 뮤신 유전자발현에 미치는 영향

정창호 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

Effects of Bojung-ikgitang-gamibang and Seonbang-paedoktang on Secretion of Airway Mucus and Expression of Mucin Gene

Jung Chang ho, Han Jae Kyung, Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Objectives

In the present study, the author intended to investigate whether bojung-ikgitang-gamibang(BJGB) and seonbang-paedoktang(SBPT) significantly affect in vivo and in vitro mucin secretion from airway epithelial cells.

Methods

In vivo experiment, mice's mucin which is on a hypersecretion of airway mucin, mice's tracheal goblet cells in hyperplasia and mice's intraepithelial mucosubstances were exposed with SO₂ for 3 weeks. Effects of orally-administered BJGB and SBPT during 1 week on vivo mucin secretion and hyperplasia of tracheal goblet cells were assessed by using both enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and staining goblet cells with alcian blue. In vitro experiment, confluent hamster tracheal surface epithelial(HTSE) cells were metabolically radiolabeled with ³H-glucosamine for 24hrs and chased for 30 min in the presence of each agent to figure out the effectiveness of ³H-mucin secretion. Total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analyzed. The effects of each agent on contractility of isolated tracheal smooth muscle and effects of each agent on MUC5AC gene expression in cultured HTSE cells were investigated. Also, possible cytotoxicities of each agent were assessed by measuring lactate dehydrogenase(LDH) release. Additionally, effects of BJGB and SBPT on both MUC5AC gene expression in cultured HTSE cells and TNF- α or EGF-induced MUC5AC gene expression in human airway epithelial cells (NCI-H292) were investigated.

Results

(1) BJGB and SBPT inhibited hypersecretion of in vivo mucin. SBPT also inhibited the increase the number of goblet cells. However, BJGB did not affect the increase of number of goblet cells; (2) BJGB significantly increased mucin secretion from cultured HTSE cells, without significant cytotoxicity, and chiefly affected the 'mucin' secretion; (3) SBPT did not affect mucin secretion from cultured HTSE cells without significant cytotoxicity, and also did not affect the secretion of the other releasable glycoproteins; (4) BJGB and SBPT did not affect Ach-induced contraction of isolated tracheal smooth muscle; (5) SBPT significantly inhibit the expression levels of MUC5AC gene and BJGB significantly increased the expression levels of MUC5AC gene in both HTSE cells and NCI-H292 cells.

Conclusions

BJGB and SBPT can not only affect the secretion of mucin but also affect the expression of mucin gene. The author suggests that the effects BJGB and SBPT with their components should be further investigated and it is highly desirable to find from oriental medical prescriptions, novel agents which might regulate hypersecretion of mucin from airway epithelial cells.

Key words : airway, mucin, gene, bojung-ikgitang-gamibang(BJGB), seonbang-paedoktang (SBPT)

I. 緒 論

호흡기 질환은 소아에게서 가장 빈번한 질환으로 주요 병변 부위는 肺部肌表에 있으며 六淫의 邪氣가 口鼻와 皮毛를 침입하여 肺衛에 손상을 준다. 소아는 肺常不足하여 肺의 宣發, 肅降 機能이 장애를 받으면 氣機가 不利하여 津液이 쌓여 痰을 형성하고, 痰이 氣道를 막아 기침이 심해지고 感冒夾痰을 이루게 된다¹⁾.

호흡기는 끊임없이 외계로부터 흡인되는 병인요소에 대하여 방어기전을 갖고, 그 중 기관지상피의 점액선과 점액하선에서 분비되는 기관지 점액(mucus)은 섬모세포와의 협동작용을 통해 흡인된 공기 속의 이물이나 병원체 등을 외부로 제거해 주는 역할을 한다²⁾. 기관지 점액의 인체 방어 기능은 주로 점액의 구성요소인 뮤신(mucin, 粘液素)의 점성 및 탄성(viscoelasticity)에 기인하는데, 이러한 뮤신의 양과 질의 이상은 기도 생리의 이상 뿐 아니라 인체의 방어 기능에 영향을 주어 더 심한 병리 현상을 유발할 수 있다. 즉, 천식, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, 낭포성 섬유증 등의 호흡기 질환에서 관찰되는 객담 혹은 점액의 과다분비는 이러한 질환군의 예후를 악화시키는 주된 요인으로 알려져 있다^{3,4)}.

호흡기 질환의 한의학적 치법은 원인에 따라 扶正法과 祛邪法이 응용되고 있는데 扶正法으로 補中益氣 養血補腎하는 방법 등이 있으며, 祛邪法으로는 辛散解表 清金降火하는 방법 등이 있다⁵⁾. 최근 객담을 제거하는 효능이 있는 처방에 대한 실험적 연구⁶⁻¹³⁾가 활발히 이루어지고 있으나 주로 기도점액 분비 및 평활근 긴장에 미치는 영향을 살펴봄으로

써 이미 생성된 뮤신의 분비 조절에 초점이 맞추어져 있었던 반면, 본 연구에서는 扶正法과 祛邪法에 해당할 수 있는 補中益氣湯 加味方과 仙方敗毒湯을 선택하여 두 처방이 기도에서의 뮤신분비 및 뮤신 유전자발현에 미치는 영향을 살펴봄으로써 생성된 뮤신 뿐 아니라 뮤신의 생성단계 자체에 영향을 미치는 지를 검증해보고자 하였다. *In vivo* 실험에서는 이산화황의 흡입으로 유발된 호흡기 점액 과다분비 모델 동물을 이용하여 뮤신의 분비량 및 기도 배상세포 증식에 미치는 영향을 검증하였다. *In vitro* 실험에서는 일차배양 햄스터 기관 표면 상피(HTSE)세포¹⁴⁾를 이용하여 상피세포에 대사적 방사능 표지를 실시하여 방사성 뮤신이 생성되도록 한 후 세포에 두 방제를 투여하고 그에 의한 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비 정도를 방사성 뮤신 함량 측정법을 통하여 측정하였으며 뮤신분비에 대한 약리작용에서의 특이성을 규명하기 위하여 겔 여과 크로마토그래피를 이용한 전체 용출양상 분석을 실시하였다. 또한 토끼 적출 기관 평활근의 수축 및 이완에 미치는 영향을 측정하였으며, 세포독성이 유발될 수 있는지 여부를 젯산 탈수소 효소 활성 측정을 통하여 검증하였다. 마지막으로 뮤신의 분비뿐만 아니라 생성 자체에도 영향을 줄 가능성을 검증하기 위하여 햄스터 기관표면 상피세포 및 인간의 호흡기 상피세포인 NCI-H292세포에서 호흡기 뮤신의 유전자인 MUC5AC의 발현 정도에 미치는 영향을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 동물 및 재료

1) 동물

실험동물인 Male Golden Syrian Hamster(8 ~ 10주령), 흰쥐(Sprague-Dawley, 이하 SD rat), 백색가토(Albino rabbit, 이하 토끼)등은 대한 바이오링크(주)에서 공급받은 후 사용하였다.

2) 약재

실험에 사용한 처방은 補中益氣湯 加味方(이하 BJGB로 약칭), 仙方敗毒湯(이하 SBPT로 약칭)으로 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며, 1첩의 처방 내용과 용량은 각각 다음과 같다(Table 1, 2).

3) 약물 제조

각 방제 한 첩 분량에 800~1,000 ml의 탈이온 2차 증류수를 가하고 100 °C로 가온된 상태에서 3시간 동안 전탕하여, 80 ml의 탱액을 수거하였다. 각 탱액을 실온 정도로 방냉

한 후, 멸균 청정 후드 내에서 0.22 µm filter를 이용, 가압 여과하고 멸균용기에 저장하여, 4 °C 냉장고에 보관하였다.

4) 시약

Pronase (Type XIV), insulin, transferrin, epidermal growth factor(EGF), tumor necrosis factor-alpha(TNF-α), hydrocortisone, sodium selenite, bovine serum albumin(BSA), testicular hyaluronidase (Type VI-S), retinoic acid, gentamicin, sodium dodecyl sulfate, sepharose CL-4B, acetylcholine, 3',3',5',5'-tetramethyl-benzidine(TMB), alcian blue, ethidium bromide, collagenase type IV, Trypsin-EDTA 등은 Sigma사 (St. Louis, Mo., U.S.A.)에서, penicillin-G, streptomycin, Joklik-modified Minimal Essential Medium(S-MEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DME), fetal bovine serum(FBS), Medium 199(M 199) 등은 GIBCO-BRL사 (Grand Island, New York, U.S.A.)에서, [6-³H] glucosamine (39.2 Ci/mmol)은 Amersham사 (U.S.A.)에서, mouse anti-MUC5AC clone 45M1 및 HRP-Goat Anti-Mouse IgG(H+L)

Table 1. Prescription of Bojungikgitang gamibang (BJGB)

Herb Name	Scientific Name	Amount(g)
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	8
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	6
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	6
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	6
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
陳皮	<i>Pericarpium Citri</i>	2
升麻	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	2
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	2
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4
防風	<i>Ledebouriellae Radix</i>	4
荊芥	<i>Schizonepetae Herba</i>	4
蘇葉	<i>Perillae Folium</i>	4
薄荷	<i>Menthae Herba</i>	4
Total amount		56

Table 2. Prescription of Seonbang-paedoktang (SBPT)

Herb Name	Scientific Name	Amount(g)
金銀花	<i>Lonicerae Flos</i>	10
連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	10
貝母	<i>Fritillariae Cirrhosae Bulbus</i>	4
皂角刺	<i>Gleditsiae Spina</i>	4
白芷	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	4
天花粉	<i>Trichosanthis Radix</i>	4
玄參	<i>Scrophulariae Radix</i>	4
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	4
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	4
前胡	<i>Peucedani Radix</i>	4
桑白皮	<i>Mori Cortex</i>	4
羌活	<i>Notopterygii Rhizoma</i>	4
枳殼	<i>Ponciri Fructus</i>	4
獨活	<i>Angelicae Pubescentis Radix</i>	4
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
赤茯苓	<i>Poria</i>	4
薄荷	<i>Menthae Herba</i>	2
荊芥	<i>Schizonepetae Herba</i>	4
防風	<i>Ledebouriellae Radix</i>	4
射干	<i>Belamcandae Rhizoma</i>	4
山豆根	<i>Sophorae Tonkinensis Radix</i>	4
牛蒡子	<i>Arctii Fructus</i>	4
Total amount		102

Conjugate는 NeoMarkers사 (Freemont, CA, U.S.A.)에서, type I collagen은 Regenmed (Seoul, Korea)에서, LDH assay kit (LDH-LQ)은 아산제약 (Kyunggi-do, Korea)에서, Easy-Blue RNA extraction kit는 INTRON biotechnology사 (Kyunggi-do, Korea)에서, Accuprep RT premix kit와 Accuprep PCR premix kit는 Bioneer사 (Daejeon, Korea)에서, sodium acetate 등과 기타 일반시약들은 reagent grade 이상의 것들을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 탈이온 2차 증류수였다¹⁵⁻¹⁷⁾.

2. 방법

1) In vivo

(1) 이산화황으로 유발된 기도점액 과다분

비 모델

가로 200 cm, 세로 60 cm, 높이 30 cm의 직육면체 상자를 두께 2 cm의 아크릴 수지판을 재료로 하여 제작하였다. 가로면의 일부에 실험동물(체중 200 g 정도의 웅성 SD rat)이 출입할 수 있도록 출입문을 만들고, 가로면과 수직으로 접하고 있는 좌우 양면의 중앙부에 구멍을 만든 후 그에 맞는 nipple과 polyethylene duct를 장착하였다. 한쪽 duct는 이산화황이 발생하는 초음파 가슴기의 분무구에 연결시키고, 반대쪽 duct는 모터로 구동되는 환풍기의 흡기구에 연결시켜 실험 종료 후 잔류하는 이산화황 기체를 완전히 제거할 수 있도록 조치하였다. 이산화황 노출방법은 Pond¹⁸⁾이 보고한 방법을 변형하여 사용하였다.

15% (V/V) Sodium metabisulfite (MBS) 수용액을 초음파 가습기에 주입하고 가습기를 작동시켰다. 작동 후 3분 이내에 MBS의 증기가 증만했고 작동 종료 시까지 실험장치 내부의 이산화황 농도는 150 ppm으로 유지되었다. 이산화황 농도 측정은 20~3,600 ppm 범위의 대기 중 이산화황을 감지할 수 있는 Gastec detector kit을 이용하였다. 동물을 대조군, 이산화황 3주 처리군, 이산화황 2주 처리 후 최종 1주간 이산화황 및 약물 동시 처리군으로 무작위 배정하고 각 군당 동물 수는 5마리 이상으로 하였다. 노출 기간은 1일 3시간, 1주일에 5일, 3주간이었다. 대조군은 실험장치가 설치된 동일한 실내에 전 실험기간 동안 1일 3시간의 이산화황 노출 및 약물 투여 조작만 제외하고 노출군과 동일한 조건 하에 사육되었다.

(2) 약물의 경구 투여

이산화황 2주 처리 후 최종 1주간 약물 투여군에 배당된 실험동물을 대상으로 체중 70 kg 성인에게 투여되는 약물의 투여용량을 기준으로 환산된 체중 350 g 정도의 흰쥐에의 투여용량인 약물 추출물 2 ml를 경구 투여하였다. 즉, 총 3주간의 이산화황 노출 기간 중 마지막 1주간(총 5일) 매일 반복적으로 약물을 투여하였는데 약물 투여는 오전 10시에서 11시 사이에, 이산화황 노출은 오후 1시에서 4시까지 각각 실시하였다.

(3) 약물이 뮤신분비에 미치는 영향

이산화황 노출 및 약물 투여가 종료된 각 실험동물을 이산화탄소로 질식사시킨 후 청정한 환경에서 기도를 노출시키고 기관지 폐포액 세척술(bronchoalveolar lavage)을 통하여 뮤신 (in vivo)을 함유한 세척액을 각 동물당 5

ml씩 수거하였다. 각 세척액 sample을 PBS로 1/10배 희석하고 희석된 각 sample을 ELISA 전용의 96-well plate에 각각 100 μ l씩 나누어 넣고 2시간 동안 상온에서 incubation하였다. 2시간 후 PBS-Tween 20(0.05%, 이하 PBS-T) 용액 200 μ l/well을 이용하여 각 well 당 3회씩 washing하였다. Washing 후 2% BSA in PBS-T 용액 200 μ l를 각 well당 가하고 다시 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후 PBS-T 200 μ l로 3회 washing하고 대표적 호흡기 뮤신인 MUC5AC에 대한 monoclonal antibody인 mouse anti-MUC5AC clone 45M1 (NeoMarkers, Fremont, CA)을 2% BSA에 1:1000의 비율로 희석한 후에 각 well당 100 μ l씩 첨가하고 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후 PBS-T로 3회 washing하고 2차 항체인 HRP-Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Conjugate를 2% BSA에 1: 5000의 비율로 희석한 후 각 well당 100 μ l씩 첨가하여 1시간 동안 incubation하였다. PBS-T로 다시 3회 washing 후 과산화수소와 3',3',5',5'- tetramethylbenzidine (TMB)의 혼합조제 용액 100 μ l를 각 well에 첨가하고 5분 후 1N 황산 용액 50 μ l를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정함으로써 대조군과 약물 처리군 간의 뮤신 (in vivo)의 양을 정량 비교하였다^{19,20}.

(4) 약물이 배상세포 내 점액함유 정도에 미치는 영향

약물이 기관내강 상피세포에의 조직학적 변화에 미치는 영향을 판별하기 위하여, 3주간의 이산화황 노출 기간이 종료된 후 각 군에 소속된 해당 실험동물을 이산화탄소로 질식사시킨 후 기관을 절개하여 분리한 후 냉각된 10% formalin in PBS (pH 7.2)에 넣어 24 시간동안 고정하였다. 고정한 조직을 파라핀

으로 포매(embedding)하였다. Microtome을 이용하여 5 μm 두께로 잘라 조직절편을 제작하였다. 탈 파라핀 과정을 거치고 Alcian Blue 염색을 실시한 후 광학 현미경 하에서 관찰하고 사진 촬영하였다. 대조군, 이산화황 처리군, 약물 투여군의 기관내강 배상세포(goblet cell)의 증식 여부 및 배상세포내 점액함유 정도를 비교함으로써 약물이 배상세포 내 점액함유 정도에 미치는 영향을 판별하였다^{20,21)}.

2) In vitro

(1) 햄스터 기관표면 상피세포의 분리 및 배양

햄스터의 기관표면 상피세포 분리와 배양에 적용된 실험방법은 Kim 등²²⁻²⁴⁾, Wu 등^{25,26)}의 방법을 사용하였다. 세포들이 1-3일간 배양된 후에는 37 $^{\circ}\text{C}$ incubator에서 32 $^{\circ}\text{C}$ incubator로 옮겨서 배양했다. 배양액 교체는 배양 개시 후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다.

(2) 뮤신의 대사적 방사능 표지

Kim 등과 여러 연구자들^{15-17,24)}의 방법을 이용하였는데, 배양세포 중의 뮤신은 성숙한 배양세포 (24 well plate, 5×10^5 cells/well)에, 10 $\mu\text{Ci/ml}$ 의 [^3H] glucosamine (39.2 Ci/mmol, Amersham)을 함유하는 완전배양액 {(insulin (5 $\mu\text{g/ml}$), transferrin (5 $\mu\text{g/ml}$), epidermal growth factor (12.5 $\mu\text{g/ml}$), hydrocortisone (0.1 μM), sodium selenite (0.01 μM), fetal bovine serum (5%, V/V) (이하 FBS), retinoic acid (0.1 μM), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$), gentamicin (50 $\mu\text{g/ml}$)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME)과 Medium 199(M199)의 1:1 혼합 배양액}을 well당 200 μl 씩 가하고 32 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 배양함으로써 방사능 표지 (metabolic radiolabeling)되었다.

(3) 배양세포에 대한 약물 처리

24시간 동안의 대사적 방사능 표지가 완결된 후 배양액 (pretreatment sample, 이하 PT로 약칭)을 수거해 두었다. 배양세포에 well당 0.5 ml의 Dulbecco's Ca^{++} , Mg^{++} free PBS (Phosphate-Buffered Saline)를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤 각 약물 추출물 10~80 μl 를 함유하는 PBS 200 μl 를 well마다 가하고 32 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하여 treatment sample(이하 T sample)로 정의하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 50 μl 의 상등액은 젓산탈수소효소 활성측정 (LDH activity assay)을 위해 따로 덜어두고 나머지는 방사성 뮤신함량을 측정할 때까지 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 저장했다^{15-17,23)}.

(4) 뮤신 함량 측정

Hyaluronidase에 의해 분해되지 않으며 Sepharose CL-4B column으로부터 exclude되는 고분자량의 glycoconjugate를 뮤신으로 정의하였고, Kim 등^{15,17,23,27)}의 방법에 따라 방사성 뮤신의 함량을 측정하였다.

(5) 약물 투여 배양 상등액의 겔 여과 크로마토그래피를 이용한 전체 용출양상 분석

배양세포 중의 뮤신은 성숙한 배양세포에 10 $\mu\text{Ci/ml}$ 의 ^3H -glucosamine을 함유하는 완전배양액을 well당 200 μl 씩 가하고 32 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 배양함으로써 방사능 표지하였고, 방사능 표지가 완결된 후 spent medium은 수거해 따로 보관해 두었다. 배양세포에 well당 0.5 ml의 PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤 약물의 최종 추출물 40, 80 μl 를 함유하는

PBS 200 μl 를 well마다 가하고 32 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액(T sample)을 수거하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고 얻어진 T sample을 1.0 \times 50 cm 규격의 Sepharose CL-4B column에 적용하였다. 한 분획의 용량은 0.35 ml로 하였고 뮤신이 용출되는 void volume뿐만 아니라 included volume과 total bed volume이 용출될 때까지 분획을 수거하였다. 각 분획에 scintillation cocktail을 첨가한 뒤 방사선량 측정기(액체섬광 계수기)를 이용하여 방사선량을 측정하였다. 대조 Sample과 약물 처리 sample을 대상으로 뮤신 및 그 보다 분자량이 작은 표지된 여타의 당단백질들의 전체 용출양상에 미치는 영향을 비교하였다^{15,16}.

(6) 적출 기관 평활근에 대한 약물의 영향

체중 1.5 kg 정도의 건강한 토끼를 이산화탄소를 이용하여 질식사시킨 후 즉시 기관 전체를 적출하여 Tyrode 용액으로 세척하고 주위 조직을 조심스럽게 제거하였다. 기관을 가로 방향으로 절취하여 기관 연골 3-5개를 포함하는 기관근 절편 표본을 제작하였다. 이렇게 얻어진 표본을 Tyrode 영양액이 들어있는 chamber (Magnus 장치)의 하단에 고정하고 상단은 isometric transducer에 연결하고 physiograph를 이용하여 수축 정도를 측정하였다. 기관 표본에 5 g의 resting tension을 가하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 산소 공급 하에서 약 1시간 동안 15분 간격으로 세척하면서 안정화시켰다. 이 표본에 방금 조제된 acetylcholine 용액 1×10^{-4} g/ml를 투여하여 최고 수축고를 측정한 다음 세척하고 15분간 안정화시켰다. 약물에 의한 기관 수축 억제효과(기관 평활근 이완 효과) 측정은 Magnus 장치에 담긴 Tyrode solution 50 ml

당 각 약물 추출액 50, 500 μl 를 투여하고 5분간 방치한 다음 acetylcholine 용액 1×10^{-4} g/ml를 투여하여 각 약물을 투여하기 전 acetylcholine 단독 투여에 의한 수축고와 비교함으로써 시행하였다.

(7) 젓산 탈수소효소 활성 측정(LDH activity assay)

배양세포에 well당 0.5 ml의 PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 각 약물 추출물 10~80 μl 를 함유하는 PBS 200 μl 를 well마다 가하고 32 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 배양한 뒤 T sample을 수거하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고 50 μl 의 상등액을 젓산 탈수소효소 활성측정에 사용했다. LDH 활성 측정은 commercial kit를 이용하였다^{15,16}.

(8) HTSE 세포 내에 존재하는 total RNA의 분리

30분의 투여 기간 동안 뮤신의 분비에 영향을 주는 각 약물이 24시간의 투여 기간 동안 HTSE 세포 내에 존재하는 뮤신 유전자인 MUC5AC의 발현 정도에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 먼저 total RNA를 분리하고자 INTRON biotechnology사의 Easy-Blue RNA extraction kit(total RNA isolation reagent)를 이용하였다. 즉, 배양된 HTSE 세포에 각 약물을 최종 추출물 기준으로 각각 10~80 μl 씩 함유하는 완전배양액 200 μl 를 well마다 가하고 32 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간동안 배양시킨 다음 냉각된 PBS로 2회 세척하였다. Matrix인 collagen을 분해하기 위하여 완전배양액에 녹인 0.2% collagenase type IV를 각 well당 400 μl 씩 가하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 배양기에서 2시간 동안 반응시켰다. 반

응 후 생성된 콜라겐 용해물 및 세포들의 혼합물을 1.5 ml 용량의 microtube에 옮겨 원심 분리함으로써 세포들만 분리하여 total RNA isolation reagent를 이용해 세포를 lysis시키고 핵단백질을 완전히 분리해 내기 위해 상온에서 5분간 방치하였다. 5분 후 즉시 microtube에 chloroform를 첨가하여 15초간 vortexing하고 상온에 2~3분간 방치한 후 4 °C, 12,000 rpm (Hanil centrifuge, MICRO 17 R)에서 20분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 새 microtube에 옮겼다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 4 °C, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 이 침전물에 diethylpyrocarbonate(DEPC)가 함유된 80% ethanol을 가하고 4 °C, 7,500 rpm에서 5분간 원심 분리하고 세척하였다. 수거된 RNA 침전물을 대기 중에서 건조시킨 후 RNase-free water로 부유시키고 spectrophotometer (Beckman, DU-650)를 사용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도를 알아내어 실험에 사용하였다.²⁸⁾(1.0A260=single strand RNA 40 µg/ml).

(9) NCI-H292 세포 내에 존재하는 total RNA의 분리

30분의 투여 기간 동안 무신의 분비에 영향을 주는 각 약물이 24시간의 투여 기간 동안 인간 호흡기 상피세포인 NCI-H292세포 내에 존재하는 무신 유전자인 MUC5AC의 발현 정도에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 NCI-H292세포를 다음과 같은 방법으로 배양하였다. L-glutamine (2 mM), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), FBS (10%, V/V) 등이 첨가된 RPMI 1640 배양액(이하 배양액)에서 배양하였다. 세포는 습도가 충분히 유지되며 95% 공기, 5% CO₂를 함유하는 37°C 조건에

서 배양하였으며 1주에 2회의 빈도로 sub-culture하였다. 약물의 작용을 검증하기 위하여 24 well culture plate를 기준으로 well 당 2.5 × 10⁵ cells/well의 밀도로 세포를 도포하고 배양하였다. 세포가 다 자란 후 FBS의 농도를 0.5%로 감소시킨 배양액을 주고 24 시간 동안 배양하고, 이후 serum을 첨가하지 않은 배양액으로 세포를 세척하였다. 이렇게 준비된 세포에 tumor necrosis factor-α(이하 TNF-α) 0.1 nM (500 U/ml) 또는 EGF 25 ng/ml을 투여한 후 30분이 지난 시점에 각 약물을 최종 추출물 기준으로 각각 20 µl씩 함유하는 완전배양액 200 µl를 well(24 well plate 기준)마다 가하고, 37 °C에서 24시간동안 배양시킨 다음 냉각된 PBS로 2회 세척하였다. 세포에 Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 배양 용기 바닥으로부터 분리하고, 세포들의 혼합물을 1.5 ml 용량의 microtube에 옮겨 원심 분리함으로써 세포들만 수거하였다. 또한 total RNA를 분리하고자 Easy-Blue RNA extraction kit를 이용해 세포(0.5 ml⁴ × 10⁵ cells)를 lysis시키고, 핵단백질을 완전히 분리해 내기 위해 상온에서 5분간 방치한 후 즉시 microtube에 chloroform를 첨가하여 15초간 vortexing하고 상온에 2~3분간 방치한 후 4 °C, 13,000 rpm (Hanil centrifuge, MICRO 17 R)에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액 400 µl를 새 microtube에 옮겼다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 4 °C, 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 이 침전물에 DEPC가 함유된 75% ethanol을 가하고 4 °C, 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리함으로써 세척하였다. 수거된 RNA 침전물을 5분간 대기 중에서 건조시킨 후, 20 µl의 RNase-free water로 부유시키고 spectrophotometer (Beckman, DU-650)를

사용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도를 알아내어 실험에 사용하였다²⁸⁾(1.0A260=single strand RNA 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

(10) PCR을 위한 primer 제조

PCR(Polymerase Chain Reaction)에 사용된 primer는 전문 제조회사인 제노텍(주)에 주문하여 합성하였다. HTSE 세포에서의 MUC5AC의 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5' -ACC AAC GAC CAG AAG GAT GAG T-3', antisense primer의 염기서열은 5' -CAG AAG CAG CCT TCT GTG AAG-3'이며, 이 primer에 의해 합성된 PCR 산물의 크기는 500 bp였다. β -actin 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5' -TAC AAC GAG CTG CGT GTG GCC-3' 이고, antisense primer는 5' -CAA CGG AAC CGC CTC GTT GC-3'이며 이 primer가 표적으로 하는 DNA 크기는 500 bp였다. NCI-H292세포에서의 MUC 5AC의 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5' -TGA TCA TCC AGC AGC AGG GCT-3', antisense primer의 염기서열은 5' -CCG AGC TCA GAG GAC ATA TGG G-3'이며, 이 primer에 의해 합성된 PCR 산물의 크기는 약 500 bp였다. β -actin 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5' -TAC AAC GAG CTG CGT GTG GCC-3' 이고, antisense primer는 5' -CAA CGG AAC CGC CTC GTT GC-3'이며 이 primer가 표적으로 하는 DNA 크기는 500 bp였다.

(11) RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

수거된 total RNA를 이용 역전사 반응(reverse transcription; RT)으로 cDNA를 만들고, 이를 중합효소 연쇄반응(polymerase chain re-

action; PCR)으로 증폭시켰다. 각각의 조건에서 얻어진 total RNA 1 μg 을 75 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 가열함으로써 denaturation시키고, 이를 얼음에 담겨 급냉시킨 후 RT premix kit의 사용자 설명서에 따라 역전사 반응을 진행시켰다. MUC5AC유전자에 대한 PCR은 각각의 역전사 반응에서 얻은 cDNA 산물 2 μl 를 PCR premix kit의 사용자 설명서에 따라 진행시켰다. 증폭반응을 위하여 HTSE 세포의 경우 PCR (PCR thermal cycler; Takara MP-300, Japan)을 30회 실시하였으며, denaturation은 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, annealing은 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, extension은 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 각각 시행하였다. NCI-H292 세포의 경우에는, PCR (PCR thermal cycler; Takara MP-300, Japan)을 40회 실시하였으며, denaturation은 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, annealing은 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, extension은 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 각각 시행하였다.

(12) 전기영동에 의한 중합효소 연쇄반응 산물의 확인

RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응으로 증폭된 cDNA 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC5AC 유전자 발현 정도의 변동을 관찰하였다. 즉, 증폭된 PCR 산물 10 μl 를 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ethidium bromide가 포함된 1.0% agarose gel에서 전기 영동하였다. Gel 상에서 이동된 각각의 DNA band는 자외선 투사기(ultraviolet transilluminator)를 이용하여 관찰하고 사진 촬영하였다.

3) 통계처리

모든 측정 결과는 Mean±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.

III. 成 績

1. In vivo

1) 補中益氣湯 加味方이 이산화황으로 유발된 기도점액 과다분비 상태에 미치는 영향

補中益氣湯 加味方은 이산화황으로 과다 분비된 점액의 양을 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 1).

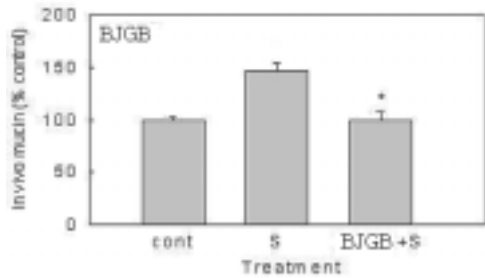


Fig. 1. Effect of BJGB on hypersecretion of mucin from trachea of rats exposed to sulfur dioxide.

Rats were exposed to sulfur dioxide and effect of orally-administered BJGB extract on quantity of secreted airway mucin from rats, as described in Materials and Methods (S : sulfur dioxide).

* : Significantly different from S group (p < 0.05)

2) 仙方敗毒湯이 이산화황으로 유발된 기도점액 과다분비 상태에 미치는 영향
仙方敗毒湯은 이산화황으로 과다 분비된 점액의 양을 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 2).

3) 補中益氣湯 加味方이 이산화황으로 유발된 기도 배상세포내 점액 함유정도 및 배상세포 수의 증가에 미치는 영향
補中益氣湯 加味方은 이산화황으로 유발된 기도 배상세포 내 점액 함유정도 및 배상세포 수의 증가에 유의성 있는 영향을 나타내지 못하였다(Fig. 3).

4) 仙方敗毒湯이 이산화황으로 유발된 기도 배상세포내 점액 함유정도 및 배상세포 수의 증가에 미치는 영향

仙方敗毒湯은 이산화황으로 유발된 기도 배상세포 내 점액 함유정도 및 배상세포 수의 증가를 감소시켰다(Fig. 4).

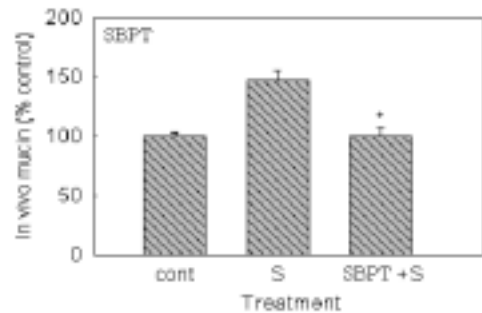


Fig. 2. Effect of SBPT on hypersecretion of mucin from trachea of rats exposed to sulfur dioxide.

Rats were exposed to sulfur dioxide and effect of orally-administered SBPT extract on quantity of secreted airway mucin from rats, as described in Materials and Methods (S : sulfur dioxide).

* : Significantly different from S group (p < 0.05)

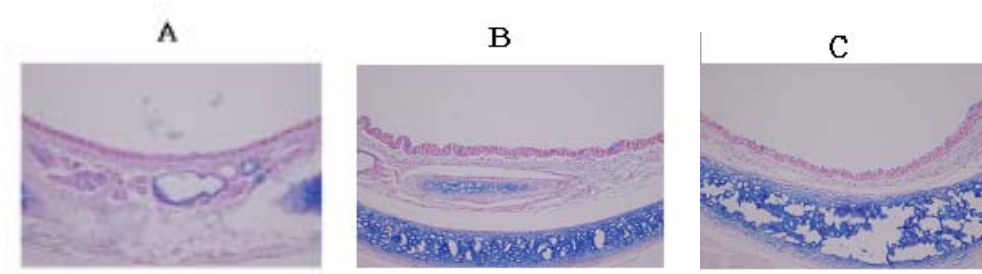


Fig. 3. Effect of BJGB on intraepithelial mucosubstances and hyperplasia of goblet cells in trachea of rats exposed to sulfur dioxide. (A : Cont., B : S, C : S+BJGB)
Rats were exposed to sulfur dioxide and effect of orally-administered BJGB extract on intraepithelial mucosubstances and hyperplasia of goblet cells, as described in Materials and Methods.

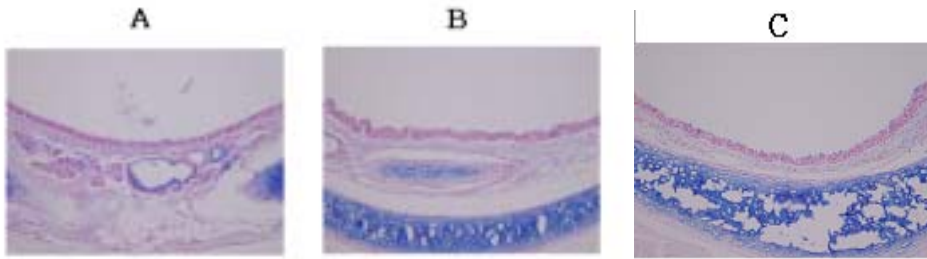


Fig. 4. Effect of SBPT on intraepithelial mucosubstances and hyperplasia of goblet cells in trachea of rats exposed to sulfur dioxide. (A : Cont., B : S, C : S+SBPT)
Rats were exposed to sulfur dioxide and effect of orally-administered SBPT extract on intraepithelial mucosubstances and hyperplasia of goblet cells, as described in Materials and Methods.

2. In vitro

- 1) 補中益氣湯 加味方이 일차배양 HTSE 세포로부터의 뮤신분비에 미치는 영향
補中益氣湯 加味方은 최종 추출물 10, 20, 40 $\mu\text{l}/200 \mu\text{l}$ PBS의 투여 농도에서 각각 뮤신 분비를 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 5).
- 2) 仙方敗毒湯이 일차배양 HTSE 세포로부터의 뮤신분비에 미치는 영향
仙方敗毒湯은 최종 추출물 10, 20, 40, 80 $\mu\text{l}/200 \mu\text{l}$ PBS의 투여 농도에서 뮤신분비에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다(Fig. 6).

- 3) 補中益氣湯 加味方 처리 배양 상등액의 겔 여과 크로마토그래피를 이용한 전체 용출 양상 분석
補中益氣湯 加味方 40 $\mu\text{l}/200 \mu\text{l}$ PBS 처리 시, 補中益氣湯 加味方은 주로 뮤신의 분비를 증가시키며, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에는 유의성 있는 영향을 나타내지 않았다(Fig. 7).
- 4) 仙方敗毒湯 처리 배양 상등액의 겔 여과 크로마토그래피를 이용한 전체 용출 양상 분석

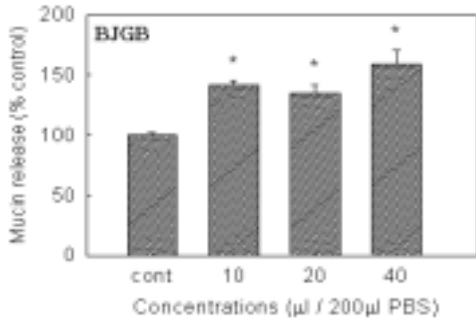


Fig. 5. Effect of BJGB on mucin secretion from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24hrs and chased for 30min in the presence of varying concentrations of BJGB extract and the amount of ^3H -mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean \pm S.E.M. from 4 culture wells.
* : Significantly different from S group ($p < 0.05$)

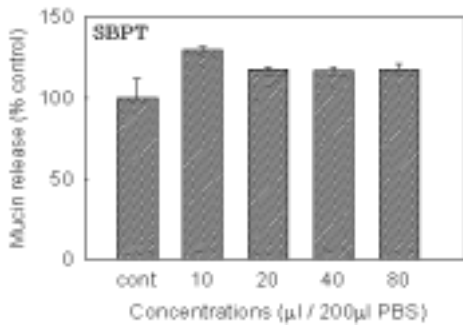


Fig. 6. Effect of SBPT on mucin secretion from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24hrs and chased for 30min in the presence of varying concentrations of SBPT extract and the amount of ^3H -mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean \pm S.E.M. from 4 culture wells.

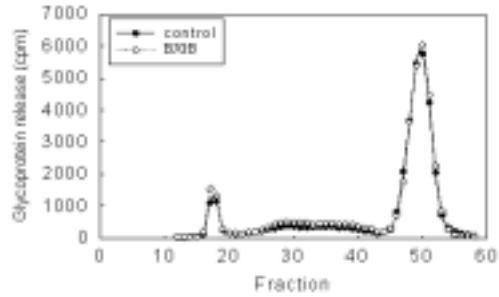


Fig. 7. Effect of BJB on total elution profile of treatment sample through sepharose CL-4B column. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24hrs and chased for 30min in the presence of BJB 40μl/200μl PBS and total elution profiles of control spent media and treatment sample through sepharose CL-4B column were analysed, as described in materials and methods.

仙方敗毒湯 80 μl/200 μl PBS 처리 시, 仙方敗毒湯은 주로 뮤신의 분비뿐만 아니라, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에도 유의성 있는 영향을 나타내지 않았다(Fig. 8).

5) 補中益氣湯 加味方이 적출된 토끼 기관 평활근의 긴장도에 미치는 영향

補中益氣湯 加味方은 최종 추출물 50, 500 μl/Tyrode solution 50 ml의 투여 농도에서 1×10^{-4} g/ml 농도의 acetylcholine으로 유발된 토끼 적출 기관의 평활근 수축 현상에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다(Fig. 9).

6) 仙方敗毒湯이 적출된 토끼 기관 평활근의 긴장도에 미치는 영향

仙方敗毒湯도 최종 추출물 50, 500 μl/Tyrode solution 50 ml의 투여 농도에서, 토끼

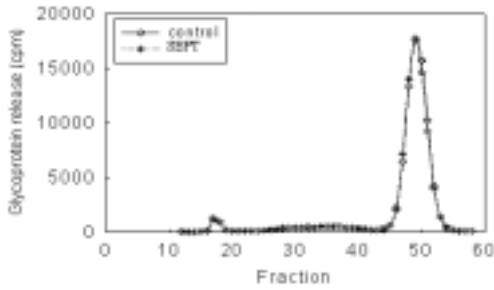


Fig. 8. Effect of SBPT on total elution profile of treatment sample through sepharose CL-4B column. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of SBPT $80\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ PBS and total elution profiles of control spent media and treatment sample through sepharose CL-4B column were analysed, as described in materials and methods.

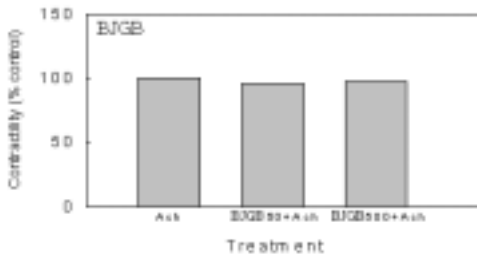


Fig. 9. Effect of BJGB on contractility of isolated tracheal smooth muscle. Isolated tracheal smooth muscle of rabbit was prepared and effect of BJGB extract on acetylcholine-induced contraction was measured as described in materials and methods. (Ach ; acetylcholine)

적출 기관에서 1×10^{-4} g/ml 농도의 acetylcholine 으로 유발된 토끼 적출 기관의 평활근 수축 현상에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다 (Fig. 10).

7) 補中益氣湯 加味方이 일차배양 HTSE 세

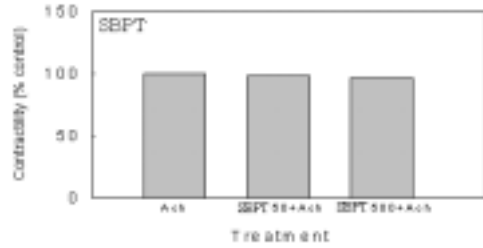


Fig. 10. Effect of SBPT on contractility of isolated tracheal smooth muscle. Isolated tracheal smooth muscle of rabbit was prepared and effect of SBPT extract on acetylcholine-induced contraction was measured as described in materials and methods. (Ach ; acetylcholine)

포로부터의 LDH 분비에 미치는 영향

補中益氣湯 加味方은 최종 추출물 10, 20, 40 $\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ PBS의 투여 농도 범위에서 세포독성의 한 지표인 LDH 분비에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다(Fig. 11).

8) 仙方敗毒湯이 일차배양 HTSE 세포로부터의 LDH 분비에 미치는 영향

仙方敗毒湯은 최종 추출물 10, 20, 40, 80 $\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ PBS의 투여 농도 범위에서 세포독성의 한 지표인 LDH 분비에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다(Fig. 12).

9) 補中益氣湯 加味方과 仙方敗毒湯이 HTSE 세포에서의 MUC5AC 유전자 발현 수준에 미치는 영향

RT-PCR 실험 결과 補中益氣湯 加味方은 MUC5AC의 발현 수준을 증가시키는 경향을 확인하였으며, 仙方敗毒湯의 경우에는 MUC5AC의 발현 수준을 감소시키는 경향을 확인하였다(Fig. 13).

10) 補中益氣湯 加味方과 仙方敗毒湯이 NCI-

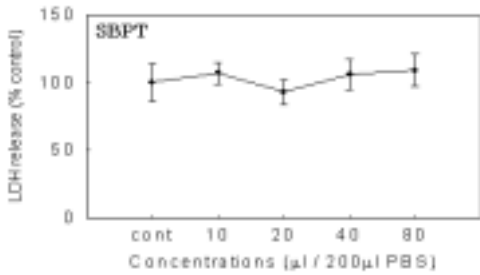


Fig. 11. Effect of BJGB on LDH release from cultured HTSE cells.
Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of BJGB extract for 30min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean±S.E.M. from 4 culture wells.

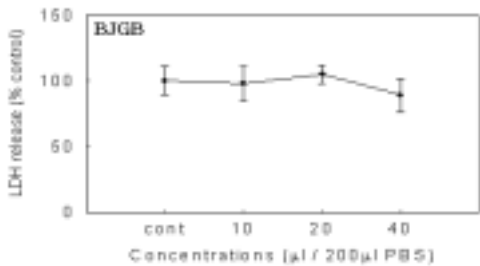


Fig. 12. Effect of SBPT on LDH release from cultured HTSE cells.
Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of SBPT extract for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean±S.E.M. from 4 culture wells.

H292 세포에서 TNF- α 로 유도된 MUC5AC 유전자 발현 증가 수준에 미치는 영향
RT-PCR 실험 결과 補中益氣湯 加味方は TNF- α 로 유도된 MUC5AC의 발현 수준을 증가시키는 경향을 확인하였으며, 仙方敗毒湯의 경우에는 MUC5AC의 발현 수준을 감소시키는 경향을 확인하였다(Fig. 14).



Fig. 13. Effects of BJGB and SBPT on MUC5AC gene expression in cultured HTSE cells.
HTSE cells were incubated with the indicated concentration of each agent for 24 hrs. Total RNA was isolated and MUC5AC mRNA levels were analyzed by RT-PCR. The PCR products were separated on 1.0% agarose gel and stained with ethidium bromide, as described in materials and methods.

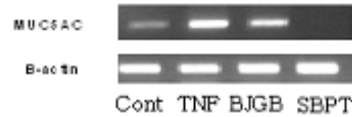


Fig. 14. Effects of BJGB and SBPT on TNF-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells.
NCI-H292 cells were incubated with the indicated concentration of each agent for 24hrs. Total RNA was isolated and MUC5AC mRNA levels were analyzed by RT-PCR. The PCR products were separated on 1.0% agarose gel and stained with ethidium bromide, as described in materials and methods.

11) 補中益氣湯 加味方과 仙方敗毒湯이 NCI-H292 세포에서 EGF로 유도된 MUC5AC 유전자 발현 증가 수준에 미치는 영향
補中益氣湯 加味方は EGF로 유도된 MUC5AC의 발현 수준을 증가시키는 경향을 확인하였으며, 仙方敗毒湯의 경우에는 MUC5AC의 발현 수준을 감소시키는 경향을 확인하였다(Fig. 15).

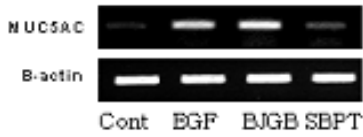


Fig. 15. Effects of BJGB and SBPT on EGF-induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells.

NCI-H292 cells were incubated with the indicated concentration of each agent for 24hrs. 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.

IV. 考 察

호흡기는 우리 신체가 외부 환경과 가장 많이 접하는 기관이기 때문에 호흡기 질환은 갓 태어난 신생아부터 성인이 되기까지 가장 흔한 건강상의 문제이다²⁹⁾. 소아는 1년 동안에 평균 3-8회 가량 감기에 걸리며³⁰⁾ 생후 6개월까지는 모유의 자연면역으로 발병이 다소 적은 편이나 6개월 이후 6세까지의 소아에게 가장 빈번하게 발생하며 특히 2-3세의 유아에서는 겨울과 봄에 기후변화가 심할 때 반복적으로 발생하고 잘 낫지 않는 편이다³¹⁾.

호흡기는 외부 환경으로부터 들어온 유익한 물질은 받아들이고, 유해한 물질은 받아들이지 말아야 하는 방어기능을 가지고 있다. 호흡기의 방어 체계는 호흡기를 싸고 있는 점막과 호흡기의 상피를 따라 발달된 면역계로 구성된다. 점막은 방어 체계의 1차 방어선의 역할을 담당하고, 면역계는 식세포와 림프

구로 구성되고 이들은 각각 2차, 3차 방어선의 역할을 담당하고 있다. 소아의 점막 구조는 성인에 비해 두께가 얇고 안정성이 떨어져 쉽게 상처를 입게 되고 이를 통해 2차적인 세균 감염이 잘 일어나고 또 알레르겐이 신체 내로 쉽게 유입된다²⁹⁾.

호흡기 점액(mucus)은 점막하 점액선(submucosal gland)과 상피 배상세포로부터의 분비물로 구성되어 있는데, 점막하 점액선으로부터 분비되는 분비물은 뮤신(mucin), 액체 성분, 폐포의 표면과 주위로부터 유래된 용질들을 함유하고 있다³¹⁾. 점액은 그 구성성분 중 95%가 수분, 나머지 5%정도는 당단백질(mucin), 지질 및 무기질 등으로 이루어져 있으며 당단백질의 구조가 선형중합체 이중구조로 되어있는 gel 형태라서 끈적이는 양상을 보인다³²⁾.

뮤신은 정상 생리 상태에서는 적절한 점도(viscosity)가 유지되어 섬모세포의 운반작용에 의해 배출이 용이하게 되어 있어 기도 및 폐내 이물질 제거, 폐의 유험작용 등의 중요한 기능을 담당하고 있다. 또, 배상세포는 대기오염, 자극성 기체, 흡연 등의 자극들이나 만성 기관지염, 천식 등의 질환으로 세포수가 증가하고, 분비 점액을 증가시키며, 증가된 점액은 객담의 형태로 배출된다. 객담은 타액, 혈청 단백질 삼출물, 박리된 상피세포들과 기도점액의 혼합물로 구성되어 있는 병리적 물질이며, 기도 병리상태의 한 지표가 될 수 있다³³⁾. 또한, 기도의 협소는 호흡기 질환에 나타나는 병태생리적인 이상으로 이를 완화하기 위해서는 평활근 이완, 반응조절 및 기관지 확장이 필요하다⁷⁾.

보통 건강인은 하루 10~20 ml의 점액분비가 일어나는 것이 정상이지만 100 ml이상의 점액분비가 일어날 때에는 병리현상이 나타나게 된다³⁴⁾. 비염, 부비동염, 중이염, 알레르

기비염, 만성 기관지염 등의 호흡기 질환에서 점액의 과분비가 흔히 나타나며, 코막힘과 호흡곤란을 야기하고 호흡한 공기 중의 해로운 물질을 코점막에 부착시킴으로써 기침을 일으킨다.

점액의 분비를 조절하는 고식적인 방법은 점액자체의 생성량을 줄이는 방법과 점액수송능력을 향상시키는 방법, 점액의 성상을 변화시켜 기침에 의해 분비되는 점액을 잘 배출시키는 방법들인데 점액자체의 분비량을 줄이는 방법이 가장 효과적이고 임상에서 널리 쓰이는 방법이다⁶⁾.

현재 서양의학에서 이러한 과다 분비된 점액의 점도 및 분비를 조절하기 위해 사용되는 점액용해제(bromhexine, ambroxole, s-carboxymethylcysteine 등)는 반사기전에 의한 극심한 점액 분비를 초래하거나 지나친 점도 감소로 점액의 원위기관 유입을 초래하기도 하며³⁵⁾ 거담제(ammonium chloride, amino benzoic acid 등)는 기도를 직접 자극하여 점액 분비를 증가시키기도 하는 등 그 효능 및 응용 범주에 제한이 있어 적절한 약물치료를 시행하기가 용이하지 않은 실정이다³⁶⁾.

한의학에서의 痰飲은 痰飲의 범주에 속하는데 痰飲이란 체내의 과다한 수분이 어느 한 부분에 정체된 것으로 인체의 진액 대사 과정에서 肺의 通調水道作用, 脾의 運輸水穀精微作用, 腎의 蒸化水液, 分清泌濁作用이 소실되면 진액의 정상적 분포와 배설에 이상이 생겨 水濕이 모여 痰이 생성된다³⁷⁾. 일반적인 痰飲의 치료법은 實脾土燥脾濕이나 호흡기 痰飲은 風, 寒, 熱, 濕痰이 많으므로 각각 祛風痰, 溫肺化痰, 清熱化痰, 除濕化痰을 위주로 한다¹³⁾.

《素問·通評虛實論》³⁸⁾에서는 “邪氣盛則實 精氣奪則虛.”라 하여 精氣와 邪氣의 勢力

均衡을 통하여 허실이 분별됨을 말하였고, 《素問·三部九候論》³⁸⁾에서는 “調其氣之虛實 實即瀉之 虛即補之.”라하여 허실에 따른 補瀉의 치료원칙을 말하였다³⁹⁾. 병이 생기기 전에 예방하는 것과 병이 이미 생긴 후 치료하는 것 모두 扶正과 祛邪로 표현되는데, 扶正이란 면역체계를 튼튼히 하는 것으로 益胃氣, 補元氣, 養血氣, 益肺氣, 健脾氣, 補腎氣 등이고 祛邪란 이미 침범한 원인을 제거하는 것으로 祛散風邪, 清熱解毒, 活血化痰, 滌痰化濁 등으로 해석할 수 있다⁴⁰⁾.

이에 본 실험에서는 호흡기 점액 분비 및 점액의 주요 구성요소인 뮤신 유전자의 발현에 대한 객관적 영향을 규명하고자 호흡기 질환의 치료에 사용해 왔던 처방 중 扶正法의 의미로 처방되는 補中益氣湯 加味方과 祛邪法의 의미로 처방되는 仙方敗毒湯을 선택하였다.

補中益氣湯은 《東垣十種醫書》⁴¹⁾에 처음으로 수록된 처방으로 飲食失節이나 寒溫不適으로 脾胃가 傷한 경우와 喜怒憂恐과 勞役過度로 元氣가 손상되어 陰火가 上衝되어서 氣高而喘, 身熱而煩, 脈洪大, 頭痛, 或渴不止, 皮膚不任風寒而生熱 등의 症에 사용되었고, 그 후 많은 의서 등에 수록되어있다. 대개 飲食失節하고 損耗元氣하며 脾胃氣衰로 陽氣下陷한 證에 사용되는 처방으로 氣虛로 인한 諸 질환에 통용적으로 사용되고 있다⁴²⁾.

補中益氣湯 加味方은 《東醫寶鑑》⁴³⁾에서 內傷으로 인하여 正氣가 虛해진 틈을 타 邪氣인 外感에 感觸되어 질병이 나타날 경우 계절별로 가미하는 방법으로 春에 사용하는 川芎 防風 柴胡 荊芥 紫蘇葉 薄荷를 加味한 것이다.

補中益氣湯 加味方の 약물 구성을 보면, 黃芪는 補肺固表, 補氣하므로 君으로 하고,

人蔘, 白朮, 甘草는 甘溫하여 益氣, 補脾, 和中瀉火하여 使로 삼고, 當歸는 佐藥으로 和血養陰하며, 升麻는 陽明의 清氣를 升하고, 柴胡는 少陽의 清氣를 升하여 陰濁自降하고, 陳皮는 氣機를 調理하며, 川芎은 活血行氣, 祛風止痛하며, 防風은 發表祛風, 勝濕止痛하고, 荊芥는 發表祛風, 理血하며, 紫蘇葉은 解表散寒, 行氣寬中하며, 薄荷는 宣散風熱, 清頭目하는 효능이 있다⁴⁴⁾. 따라서 그 효능은 元氣를 補하고 脾胃를 養하고 下陷된 清氣를 升提하고 內傷을 治하며 人體의 면역기능을 증강시켜 질병에 대한 항병력을 강화시키는 것으로 볼 수 있다⁴⁵⁾.

仙方敗毒湯은 荊防敗毒散과 仙方活命飲의 加減方으로, 乳蛾와 같은 염증성 질환에 활용되는 처방이다⁴⁶⁾. 荊防敗毒散은 《醫學正傳》⁴⁷⁾에 최초로 수록되어 있으며 外感風寒濕邪를 主治하여 時氣發熱, 肢節痛, 瘡瘍을 치료하는 처방으로⁴⁸⁾ 傷寒 時氣로 頭痛項強, 壯熱惡寒, 身體煩疼한 증상에 사용한다⁴⁹⁾. 仙方活命飲은 《婦人良方大全》⁵⁰⁾에 처음 수록되었으며 消腫, 止痛, 解熱, 散瘀, 排膿, 補血, 活血하여 癰疽 및 각종 염증성 질환, 膿瘍, 腫瘍등의 치료에 사용되는 처방이다⁵¹⁾.

仙方敗毒湯의 약물구성을 살펴보면, 金銀花는 散熱解毒하는 聖藥으로서 君藥으로 定하였으며 連翹, 天花粉과 함께 그 火를 淸解하고, 防風과 白芷는 皮膚표면으로 약성이 도달케하고, 皂角刺는 경맥을 뚫게 하며, 血은 氣가 없으면 순행하지 못하므로 貝母로 氣를 散理하고, 羌活, 獨活, 柴胡, 前胡는 解熱, 散表寒邪하며, 荊芥로 發毒하고, 桔梗, 枳殼으로 祛痰, 散結痰滯하며, 黃芩, 玄蔘 牛蒡子로 咽喉痛을 消하고 無根之火를 瀉하며, 射干, 山豆根으로 淸熱解毒, 祛痰利咽하고, 薄荷로 行氣시키며, 茯苓, 桑白皮로 淸利濕熱, 瀉肺平喘

하고, 甘草로 緩和, 解毒한다⁴⁴⁾. 약물 구성의 전체적인 약성은 寒, 無毒하고 味는 苦하며 歸經은 肺經, 大腸經, 胃經, 肝經의 순서로 빈도가 높았으며 약리적으로 解熱, 鎮痛, 抗菌, 消炎, 鎮靜의 효과가 있다⁴⁴⁾.

따라서 仙方敗毒湯은 淸熱解毒, 消腫散結하여 氣血의 凝滯를 消散시키고, 降氣化痰, 潤肺祛痰, 利水滲濕, 淸肺提氣, 祛痰排膿, 通經絡하여 수분대사의 실조 혹은 혈관 투과성의 증대나 염증 등에 수반하여 체내에 저류된 痰飲, 水腫을 제거, 치료하는 데 활용되고 있다⁵²⁾.

이에 저자는 호흡기 질환의 치료에 활용하고 있는 처방인 補中益氣湯 加味方과 仙方敗毒湯의 호흡기 점액 분비에 대한 영향을 규명하고자 Pon 등¹⁸⁾이 보고한 동물모델을 개량한 모델을 이용하여 연구를 진행하였다.

흰쥐를 이산화황 기체에 3주간 노출시켰을 때 in vivo 기도점액의 분비량이 대조군보다 증가하였으나 補中益氣湯 加味方 및 仙方敗毒湯 투여군에서는 기도점액의 분비량을 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 1, 2). 이 결과는 補中益氣湯 加味方 및 仙方敗毒湯이 염증성 호흡기 질환에서의 기도 점액 과다분비를 조절하여 다양한 호흡기 질환에서 치료 작용을 나타낼 수 있음을 시사해 준다. 또한 이산화황 3주 처리로 기도 배상세포의 수가 증가하고 배상세포내 점액 함유정도가 증가하는 현상을 관찰할 수 있었으나 補中益氣湯 加味方 투여군의 경우에는 이산화황으로 유발된 기도점액 과다분비 동물모델에서 기도 점액의 분비는 감소시켰으나 기도 상피조직에서의 조직학적 변화에는 영향을 나타내지 못하였다(Fig. 3). 그러나 仙方敗毒湯을 경구 투여한 동물군에서는 배상세포내 점액 함유 정도나 기도 배상세포의 수가 감소하는 현상을 관찰

할 수 있었다(Fig. 4). 仙方敗毒湯의 경우 1주간 투여시 *in vivo*에서 기도점액의 분비에도 영향을 줄 뿐 아니라 과다증식된 기도 배상세포의 수에도 억제적 작용을 나타낼 가능성을 보여주는 것이며 補中益氣湯 加味方의 경우 1주간의 약물 투여로 기도 점액 분비의 영향은 보이나, 호흡기 배상세포 과다증식에 대한 억제효과가 나타나지 않아 약물 투여 기간과 용량에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

일차배양 HTSE 세포에서 뮤신분비에 미치는 영향을 살펴보기 위한 실험에서 補中益氣湯 加味方은 최종 추출물 10, 20, 40 $\mu\text{l}/200 \mu\text{l}$ PBS의 투여농도에서 30분간의 *in vitro* 약물처리 기간 동안 뮤신분비를 대조군보다 각각 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 5). 그러나 仙方敗毒湯은 최종 추출물 10, 20, 40, 80 $\mu\text{l}/200 \mu\text{l}$ PBS의 투여농도 범위에서 배양된 세포에서의 뮤신분비에 유의성 있는 작용을 나타내지 못하였다(Fig. 6). 이상의 결과는 補中益氣湯 加味方, 仙方敗毒湯이 단기적(*in vitro*)으로는 뮤신분비를 자극 혹은 특별한 영향을 주지 못할 수 있으나 장기적인(*in vivo*) 반복투여 시에는 뮤신의 과다분비를 감소시킬 가능성을 보임으로써, 두 처방이 임상적으로 기도객담의 과다분비 상태를 개선시킬 가능성을 보여주는 것이며 다양한 실험 모델을 이용한 추가적 연구의 필요성을 시사하고 있는 것이다.

뮤신분비에 영향을 주는 두 방제가 거대 당단백질인 뮤신뿐만 아니라 뮤신보다 분자량이 작고 구조도 다른 여타의 방사능 표지 당단백질들의 분비에도 영향을 미치는지 여부를 검증하고자 하였다. 일차 배양된 HTSE 세포에 ^3H -glucosamine을 이용하여 배양세포가 생산하는 뮤신 및 glucosamine을 함유하는 여타의 당단백질에 방사능 표지한 후 일정 기

간 동안 세포를 배양하면 ^3H -표지 당단백질들이 배양액 중으로 유리된다²⁰. 이 때 이 배양액을 겔 여과 크로마토그래피 컬럼인 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 나타난다. 만약, 대조 배양액의 전체 용출양상을 기준으로 각 약물을 처리했을 때 전체 용출양상(total elution profile)의 특정 부분에 변화가 생겼다면, 그 변화는 특정 크기의 ^3H -당단백질 분비량의 변화를 의미하는 것이다^{15,17}. 실험결과(Fig. 7)에서 補中益氣湯 加味方은 뮤신과 같은 거대분자가 용출되는 fraction인 void volume fraction에서만 영향을 나타내고, 여타의 included volume 및 total volume에 해당하는 fraction에서는 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 仙方敗毒湯의 경우에도 included volume 및 total volume에 해당하는 fraction에서 대조군과 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(Fig. 8). 이러한 실험 결과는 두 처방이 뮤신과 같은 거대 당단백질의 분비에 주로 영향을 주며 그보다 크기가 작고 구조도 다른 당단백질들의 분비에는 유의성 있는 영향을 미칠 가능성이 낮아 뮤신 분비에 대한 작용에서 특이성을 나타냄을 의미하는 것으로 생각된다.

약물이 적출된 토끼 기관 평활근의 수축도에 미치는 영향을 실험함으로써 천식 등 기관 평활근 수축으로 인한 여러 질환에 적용할 수 있는지를 검증하고자 하였는데, 補中益氣湯 加味方과 仙方敗毒湯은 최종 추출물 50, 500 $\mu\text{l}/\text{Tyrode solution } 50 \text{ ml}$ 의 투여 농도에서 토끼 적출 기관에서 $1 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$ 농도의 acetylcholine으로 유발된 토끼 적출 기관의 평활근 수축 현상에 유의성 있는 작용을 발현하

지 못하였다(Fig. 9, 10). 이는 두 처방이 기관 평활근의 긴장도에 영향을 주지 못하여 직접적인 기관 혹은 기관지 확장효과를 발현하지 못한다는 것을 의미한다.

뮤신 분비에 대한 효능을 발현하는 두 약물에 의한 세포독성 발현 가능성을 검증하기 위하여 세포막 손상의 한 지표인 LDH 활성 측정을 실시하였다. 세포막 손상 시 분비되는 LDH의 활성 측정 방법은 세포독성 확인법 가운데 보편적인 방법으로 알려져 있다^{53,54}. 補中益氣湯 加味方 및 仙方敗毒湯은 10, 20, 40, 80 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도에서 LDH 분비에 유의성 있는 영향을 주지 않음으로써 세포독성을 발현하지 않을 가능성을 보여주었다(Fig. 11, 12). 이러한 결과는 補中益氣湯 加味方과 仙方敗毒湯이 배양된 기도 상피세포에 대해 현저한 세포막 손상을 일으키지 않을 가능성을 제시하는 것으로 볼 수 있다. 그러나 본 연구에서의 독성실험 결과는 *in vitro* 실험이라는 제한이 있으며 세포독성 측정을 위해 사용하는 다양한 *in vivo* 방법론을 적용하여 추가적인 독성 연구를 시행해 볼 필요성이 있을 것이다.

마지막으로 본 연구에서는 두 약물이 설치류의 호흡기 상피세포 배양체인 HTSE세포 및 인간의 호흡기 상피세포주인 NCI-H292세포에서 이미 생성된 뮤신의 분비에만 영향을 미치는 지 혹은 생성 단계 자체에서 뮤신 유전자의 발현에도 영향을 미치는 지를 알아보고자 하였다. 먼저 HTSE세포를 대상으로 한 연구에서는 실험결과에 나타난 것처럼(Fig. 13) 두 약물을 24시간 동안 투여한 결과 補中益氣湯 加味方の 경우에는 MUC5AC의 발현 수준을 증가시키는 경향을 확인하였으며 仙方敗毒湯의 경우에는 MUC5AC의 발현 수준을 감소시키는 결과를 확인하였다. 인간의 호

흡기 상피세포주인 NCI-H292세포에 호흡기 뮤신 유전자인 MUC5AC의 발현을 유도하는 물질인 TNF- α (종양괴사인자) 혹은 EGF(상피세포 성장인자)를 미리 투여한 후 24시간 동안 방제를 투여하고 MUC5AC의 발현 수준에 대한 영향을 검증해 본 결과도 역시 유사한 양상을 나타내었다(Fig. 14, 15). 즉 補中益氣湯 加味方の 경우에는 MUC5AC의 발현 수준을 여전히 증가시키는 경향을 보여주고 있으며 仙方敗毒湯의 경우에는 MUC5AC의 발현 수준을 감소시키는 동일한 경향의 결과를 보여주었다. 이러한 결과는 仙方敗毒湯은 장기(24시간 이상)투여 시 뮤신의 분비만 억제하는 것이 아니라 뮤신 유전자의 발현도 억제함으로써 이 약물이 뮤신의 생성 및 분비단계에서 공히 억제적으로 작용할 가능성을 보여준다. 다시 말해 仙方敗毒湯은 단기적으로는 뮤신의 분비에 영향을 나타내지 못할 수 있으나 장기 투여 시(*in vivo*) 분비에만 영향을 주는 것이 아니라 분자 수준에서의 뮤신 합성단계에 작용하여 뮤신의 생성 자체를 줄여줌으로써 염증성 호흡기 질환의 객담 과다분비를 조절해 줄 가능성을 보여주고 있는 것이다. 그러나 補中益氣湯 加味方の 경우에는 단기적으로는 뮤신의 분비를 완만하게 증가시키고 장기 투여 시(*in vivo*)에는 뮤신의 과다분비를 억제하는 결과를 나타내나 호흡기 뮤신 유전자의 발현은 오히려 증가시키는 결과를 보여줌으로써 補中益氣湯 加味方이 補益 효과에 의한 유전자 발현 증가와 항염증 효과에 의하여 염증성 객담분비를 감소시키는 매우 복합적인 약리작용을 보유할 가능성을 보여주는 것이다.

이상의 연구결과, 두 처방이 객담 분비 이상을 보이는 호흡기 질환에 응용되어 왔던 배경을 실험적으로 제시하고 있으며, 또한 이

러한 처방 및 처방을 구성하는 본초를 대상으로 다양한 호흡기 질환의 병태 생리적 특성에 대한 추가적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 結 論

補中益氣湯 加味方, 仙方敗毒湯의 뮤신분비 조절 기능 및 기도 배상 세포 수에 미치는 영향, 기관 평활근의 수축도에 미치는 영향, MUC5AC 유전자 발현 수준에 미치는 영향 등을 연구한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 補中益氣湯 加味方과 仙方敗毒湯은 이산화황으로 유발된 기도점액 과다분비 동물모델에서, 뮤신의 분비를 유의성 있게 감소시켰다.
2. 仙方敗毒湯은 기도점액 과다분비 모델에서 기도 배상세포내 점액함유 정도 및 배상세포 수의 증가를 억제하였으나, 補中益氣湯 加味方은 기도 배상세포내 점액함유 정도 및 배상세포 수의 증가에 영향을 나타내지 못하였다.
3. 補中益氣湯 加味方은 배양된 세포를 대상으로 한 실험에서 뮤신분비를 유의성 있게 증가시켰으며, 仙方敗毒湯은 영향을 나타내지 못하였다. 그러나 뮤신 이외 여타 당단백질의 분비에는 두 처방 모두 영향을 나타내지 못하였다.
4. 補中益氣湯 加味方과 仙方敗毒湯은 토끼의 적출 기관 평활근의 수축현상에는 유의성 있는 영향을 나타내지 못하였다.

5. 補中益氣湯 加味方과 仙方敗毒湯은 세포독성을 나타내지 않았다.
6. 仙方敗毒湯은 설치류 및 인간의 호흡기 상피세포에서 MUC5AC의 발현 수준을 감소시켰으며, 補中益氣湯 加味方은 MUC5AC의 발현 수준을 증가시켰다.

參考文獻

1. 김덕곤. 동의소아과학. 서울:정담출판사. 2002: 246-8.
2. 차창룡. 호흡기학. 서울:서울대학교출판부. 1987:47-8.
3. Frigas, E., Loegering, D.A., Solley, G.O., Farrow, G.M. and Gleich, G.J. Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. Mayo Clin. Proc. 1981;56:345-53.
4. Gleich, G.J. The eosinophil and bronchial asthma, Current understanding. J. Allergy Clin. Immunol. 1990;85:422-36.
5. 채병희. 한방안이비인후과학. 서울:집문당. 1991:219-23, 230-1, 245-9, 251-2
6. 김윤희, 한재경, 김윤희. 取淵湯 및 治哮散 加味方이 기도점액분비 및 기관 평활근 긴장도에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2005;19(1):1-26.
7. 윤재은, 한재경, 김윤희. 柴梗清肺湯 및 加味通竅湯加味方이 기도점액분비 및 기관 평활근 긴장도에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2006;20(1):93-107.
8. 한달수, 김윤희, 강탁림. 加味腎氣湯 및 加味清肺湯이 기도점액분비 및 기관 평활근

- 긴장도에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(1):156-62.
9. 나도균, 이충재, 박양춘. 소청룡탕 및 가미치효산이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2004;18(3):734-9.
 10. 이정은, 박양춘. 청금강화탕 및 과루지실탕이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;25(2):238-44.
 11. 임도희, 이정은, 한영주, 황지호, 조철준, 배한호, 박양춘. 행소탕 및 가미팔미환이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):221-8.
 12. 김준명, 이충재, 박양춘. 정천화담탕 등 수종 방제의 호흡기 객담분비 조절 효능에 관한 실험적 연구. 대한한방내과학회지. 2006;27(1):126-37.
 13. 김정숙, 김윤희. 加味腎氣湯 등 數種 方劑가 일차배양 호흡기 상피세포에서의 점액 분비에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2006;20(1):109-35.
 14. Kim, K.C., Opaskar-Hincman, H. and Bhaskar, K.R. Secretions from primary hamster tracheal surface epithelial cells in culture, Mucin-like glycoproteins, proteoglycans, and lipids. *Exp. Lung Res.* 1989;15:299-314.
 15. Lee, C.J. Specificity in the inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *J. Appl. Pharmacol.* 2001;9(3):218-23.
 16. Ko, K.H., Lee, C.J., Shin, C.Y., Jo, M.-J. and Kim, K.C. Inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Am. J. Physiol.* 1999;277(21):811-5.
 17. 이충재. 설치류 기관 뮤신유리 억제에서의 폴리양이온성 작용기전. 서울대학교 대학원 박사학위 논문. 1997.
 18. Pon, D.J., Van Staden, C.J., Boulet, L. and Rodger, I.W. Hyperplastic effects of aerosolized sodium metasilfite on rat airway mucous-secreting epithelial cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1994;72:1025-30.
 19. Harkema, J.R. and Hotchkiss, J.A. In vivo effects of endotoxin on intraepithelial mucosubstances in rat pulmonary airways, quantitative histochemistry. *Am. J. Pathol.* 1992;141:307-31.
 20. St. George, J.A., Cranz, D.L., Zicker, S., Etchison, J.R., Dungworth, D.L. and Plopper. An immunohistochemical characterization of Rhesus monkey respiratory secretions using monoclonal antibodies. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1985;132:556-63.
 21. Harkema, J.R. and Hotchkiss, J.A. In vivo effects of endotoxin on intraepithelial mucosubstances in rat pulmonary airways, quantitative histochemistry. *Am. J. Pathol.* 1992;141:307-31.
 22. Kim, K.C. Possible requirement of collagen gel substratum for production of mucinlike glycoproteins by primary rabbit tracheal epithelial cells in culture. *In Vitro.* 1985;21:617-21.
 23. Kim, K.C., Rearick, J.I., Nettlesheim, P., and Jetten, A.M. Biochemical characterization of mucous glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial cells in primary culture. *J. Biol. Chem.* 1985;260:4021-7.
 24. Kim, K.C., Brody, J.S. Gel contraction causes mucin release in primary hamster tracheal epi-

- thelial cells growing on a collagen gel. *J. Cell. Biol.* 1987;105:158a.
25. Wu, R. and Smith, D. Continuous multiplication of rabbit tracheal epithelial cells in a defined, hormone-supplemented medium. *In Vitro.* 1982;18:800-12.
 26. Wu, R., Nolan, E. and Turner, C. Expression of tracheal differentiated function in serum-free hormone-supplemented medium. *J. Cell Physiol.* 1985;125:167-81.
 27. Cheng, P.W., Sherman, J.M., Boat, T.E. and Bruce, M. Quantitation of radiolabeled mucous glycoproteins secreted by tracheal explants. *Anal. Biochem.* 1981;117:301-6.
 28. Karlinsey, J., Stamatoyannopoulos, G., Enver, T. Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells. *Anal. Biochem.* 1989;180(2):303-6.
 29. 안효섭. 홍창의 소아과학. 서울:대한교과서주식회사. 2005:606, 609.
 30. 홍창의. 소아과 진료. 서울:도서출판 고려의학. 2003:557.
 31. Newhouse, M.T. and Biennenstock, J. Respiratory tract defense mechanism, In, textbook of pulmonary disease (Baum, G.L. and Wolinsky, E.(eds)). 3rd ed. Little Brown and Company. 1983.
 32. 김세규, 장준. 호흡기 증상 완화제 - 진해제, 거담제, 항히스타민제 - 결핵 및 호흡기 질환. 2006;60(3):261-9.
 33. 이충재, 고광호. 기도점액 과다분비성 질환의 병태생리적 특성 및 연구모델. 응용약물학회지. 1998;6:2.
 34. 강임주. 진해 및 거담제. 파티마병원. 1991: 201-2.
 35. Mutschler, E. and Derendorf, H. Drug actions. Florida:CRC press, Inc. Boca Raton. 1995: 410-1.
 36. 채호연, 한재경, 김윤희. 가감정기탕 등 수종 처방이 기도점액 분비에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지 2007;21(1):117.
 37. 上海中醫學院. 中醫內科學. 香港:商務印書館. 1982:24-5.
 38. 이경우. 編注譯解 黃帝內經素問 2卷. 서울:여강출판사. 1985:171, 536.
 39. 박지수, 김윤희, 유동열. 補中益氣湯加味가 새끼 생쥐의 免疫能에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2001;15(2):25.
 40. 강재훈. 보중익기탕이 면역세포 배양에 미치는 영향. 경희대학교대학원 동서의학협동과정 석사학위논문. 1999:29.
 41. 李杲. 東垣十種醫書. 서울:대성문화사. 1983: 35-7, 86-7.
 42. 김종성, 심성용, 엄유식. 보중익기탕이 알레르기 비염 유발 백서의 과립구 및 조직학적 변화에 미치는 효과. 한방안이비인후피부과학회지. 2004;17(1):66-74.
 43. 허준. 東醫寶鑑. 서울:남산당. 1998:433.
 44. 전국한의과대학본초학교수. 본초학. 서울:영림사. 2000:127-32, 142-5, 165-6, 178-9, 192-3, 198-201, 214-6, 428-30, 440-1, 458-61, 463-4, 484-5, 149, 260, 302, 351, 540.
 45. 정순영, 서형식. 보중익기탕가미방을 투여한 비염환자 50예에 대한 분석. 한방안이비인후피부과학회지. 2006;19(2):239.
 46. 이종수, 김성주, 신현대, 정규만. 仙方敗毒湯의 鎮痛, 鎮靜, 消炎, 解熱 및 抗菌에 미치는 실험적 효과. 경희한의대논문집. 1988;11:213-26.
 47. 虞天民. 醫學正傳. 서울:의약사. 1973:117-26.
 48. 이종수, 정규만. 仙方敗毒湯의 본초학적 약리작용에 관한 고찰. 대한한의학회지.

- 1983;4(2):355-8.
49. 이재원, 정규만. 仙方敗毒湯이 항알레르기 작용에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1990;13:247-59.
50. 陳自明. 婦人良方大全. 臺北:文光圖書. 1981: 34-5.
51. 안봉전, 이진태, 이창언. 仙方活命飲의 항암 및 항산화효과 검증. 대한본초학회지. 2005;20(3):51-8.
52. 신동호, 김우연, 이진용, 김덕곤. 仙方敗毒湯이 아토피 피부염 환자 단핵세포의 Cytokine 분비능에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2002;16(1):21-37.
53. Freshny. Measurement of viability and cytotoxicity. In, Culture of animal cells (3rd edn). Willey-Liss, Inc. 1994:288.
54. Yu, X.-Y., Schofield, B.H., Croxton, T., Takahashi, N., Gabrielson, E.W. and Spannhake, E.W. Physiologic modulation of bronchial epithelial cell barrier function by polycationic exposure. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1994;11:188-98.