

## 加味通竅湯이 호흡기 뮤신 분비 및 기관 평활근 긴장도에 미치는 영향

이남열 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

### Abstract

## Effect of Gamitonggyu-tang on Secretion of Airway Mucin and Contractility of Tracheal Smooth Muscle

Lee Nam Yeol, 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 Gamitonggyu-tang (GTT) significantly affects (since the subject is GTT, you need an 's') in vivo and in vitro mucin secretion from airway epithelial cells.

### Methods

In vivo experiment, mice's mucin which is on a hypersecretion of an airway, mice's tracheal goblet cells in hyperplasia and mice's intraepithelial mucosubstances were exposed with SO<sub>2</sub> for 3 weeks. Effects of orally-administered GTT for 1 week on in vivo mucin secretion and hyperplasia of tracheal goblet cells were assessed by using 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 <sup>3</sup>H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of GTT to figure out the effectiveness of <sup>3</sup>H-mucin secretion. Total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analyzed. Possible cytotoxicities of each agent were assessed by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release. Also, the effect of GTT on contractility of isolated tracheal smooth muscle was investigated.

### Results

- (1) GTT inhibited hypersecretion of in vivo mucin. However, it did not affect the increase the number of goblet cells
- (2) GTT significantly increased mucin release from cultured HTSE cells, without significant cytotoxicity
- (3) GTT chiefly affected the 'mucin' secretion and did not affect the secretion of the other releasable glycoproteins with less molecular weight than mucin
- (4) GTT did not affect Ach-induced contraction of isolated tracheal smooth muscle.

Conclusions

This result suggests that GTT can increase mucin secretion during short-term treatment (in vitro) whereas it can inhibit hypersecretion of mucin during long-term treatment (in vivo). The author suggests that the effect GTT with their components should be further investigated and it is valuable to find from oriental medical prescriptions, novel agents which might regulate mucin secretion from airway epithelial cells.

Key words : Airway, Mucin, Goblet Cell, Tracheal Smooth Muscle, Gamitonggyu-tang(GTT)

I. 緒 論

호흡기는 우리 신체가 외부 환경과 가장 많이 접하는 기관이기 때문에 호흡기 질환은 신생아부터 성인이 되기까지 가장 흔한 건강상의 문제이다. 소아에서 나타나는 호흡기 증상 중 눈여겨보아야 할 것은 기침, 객담, 호흡음 및 호흡곤란의 심한 정도, 성격 및 특징 등이다<sup>1)</sup>. 그 중 객담이란 기도의 염증반응 등으로 분비물 생성이 증가되거나 분비물의 물리적 성상이 바뀔 때 또는 점막운동의 장애로 인하여 배출이 지장을 받을 때 분비물이 인두로 운반되어 연하되거나 배출됨으로써 나타나는 증상이다<sup>2-4)</sup>.

소아는 생리적으로 臟腑가嬌嫩하고 鼻竅개구부가 크며 外邪를 제어할 능력이 약하여 호흡기 질환의 발병율이 비교적 높으며 성인에 비해 그 비중이 크다<sup>5)</sup>. 특히 肺常不足하여 肺의 宣降기능이 장애를 받아 氣機가 불리하여 津液이 쌓여 痰을 형성하고 이 痰이 기도를 막아 기침이 심해지고 感冒夾痰 등을 이루게 된다<sup>1)</sup>.

현재 서양의학에서는 과다 분비된 점액의 점도 및 분비를 조절하기 위해 bromhexine, ambroxole, s-carboxymethylcysteine 등의 약물이 사용되고 있으나 그 효능 및 응용 범주에 제한이 있어 적절한 약물치료를 시행하기가 어려운 실정이다<sup>6)</sup>.

通竅湯<sup>7)</sup>은 龔의 《萬病回春》<sup>8)</sup>에 처음 기

록된 처방으로 辛溫發散하고 清熱除濕하며 消炎生肌하는 약물로 구성되어 外感風寒, 鼻塞聲重, 流涕, 不聞香臭 등의 증상에 응용되어 왔으며<sup>8-10)</sup>, 加味通竅湯은 通竅湯에 桔梗, 連翹, 金銀花, 黃芪, 薄荷, 蒼耳子, 辛夷, 貝母, 天花粉, 梔子를 가하여 消炎, 抗菌作用을 더욱 강화하여 특히 소아의 기도 및 호흡기 질환의 치료에 주로 활용할 수 있는 처방이다.

최근 清金降火湯, 杏蘇湯, 加味腎氣湯, 加味清肺湯 등이 호흡기 기도 점액 분비에 미치는 영향<sup>11-16)</sup>에 대한 실험적 보고와 通竅湯의 효과<sup>17-21)</sup>에 대한 다수의 실험적 보고가 있으나 아직까지 加味通竅湯이 호흡기 뮤신 분비에 미치는 영향에 대한 실험적 보고는 접하지 못하였다.

이에 저자는 加味通竅湯이 *in vivo*에서 이산화황의 흡입으로 유발된 호흡기 점액 과다분비 동물모델을 이용하여 기도점액 분비에 대한 영향을 측정하고 기도 배상세포 내 점액함유 정도 증가 및 배상세포 수에 미치는 영향을 검증하였으며 *in vitro*에서 일차배양된 햄스터 기관 표면 상피세포 (HTSE cell)<sup>22)</sup>로부터의 뮤신 생성, 젖산 탈수소효소 활성(LDH activity)에 미치는 효과 및 적출된 토끼 기관 평활근의 수축도에 미치는 영향을 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

구입한 것을 정선하여 사용하였으며, 1첩의 처방내용과 용량은 각각 다음과 같다(Table 1).

### 1. 동물 및 재료

#### 1) 동물

웅성 Golden Syrian 햄스터(8~10주령), 흰쥐 (Sprague-Dawley, 이하 SD rat), 백색가토(Albino rabbit) 등은 대한바이오링크(주)에서 공급받은 후 사용하였다.

#### 2) 약재

실험에 사용한 加味通竅湯(*Gamitonggyu-tang*, 이하 GTT)<sup>7)</sup>은 대전대학교 천안한방병원에서

#### 3) 시료제조

加味通竅湯 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 방냉한 후 멸균 청정 후드 내에서 0.22 μm filter를 이용 가압 여과하고 멸균용기에 저장하여 4 °C 냉장고에 보관하였다.

Table 1. Prescription of *Gamitonggyu-tang*(GTT)

Herb Name	Scientific Name	Amount(g)
防 風	<i>Radix Ledebouriellae</i>	4
羌 活	<i>Radix Osteric Koreani</i>	4
藁 本	<i>Radix Ligustici Temuissimae</i>	4
升 麻	<i>Rhizoma Cimicifugae</i>	4
葛 根	<i>Radix Puerariae</i>	4
蒼 朮	<i>Rhizoma Atractylodis</i>	6
川 芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	3
梔 子	<i>Gardeniae Fructus</i>	2
白 芷	<i>Radix Angelicae Daburicae</i>	8
桔 梗	<i>Platycodi Radix</i>	6
連 翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	4
金銀花	<i>Lonicerae Flos</i>	4
麻 黃	<i>Herba Ephedrae</i>	2
川 椒	<i>Pericarpium Zanthoxyli</i>	2
荊 芥	<i>Schizonepetae Herba</i>	4
細 辛	<i>Radix Asari</i>	2
黃 芪	<i>Astragali Radix</i>	8
薄 荷	<i>Menthae Herba</i>	2
蒼耳子	<i>Xanthii Fructus</i>	4
辛 夷	<i>Magnoliae Flos</i>	6
貝 母	<i>Fritillariae Cirrhosae Bulbus</i>	6
天花粉	<i>Trichosanthis Radix</i>	6
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	8
大 棗	<i>Jujubae Fructus</i>	6
柳根皮	<i>Ulmus Davidiana Planch</i>	16
貢砂仁	<i>Anomi Fructus</i>	4
山查肉	<i>Crataegii Fructus</i>	4
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
Total Amount		137

4) 시약

Pronase(Type XIV), insulin, transferrin, epidermal growth factor, hydrocortisone, sodium selenite, bovine serum albumin(BSA), testicular hyaluronidase(Type VI-S), retinoic acid, gentamicin, sodium dodecyl sulfate, Sepharose CL-4B, acetylchoilne, 3',3',5',5'- tetramethyl- bezidine(TMB), alcian blue 등은 Sigma사(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 (M199) 등은 GIBCO-BRL사(U.S.A.)에서, [6-<sup>3</sup>H] glucosamine (39.2 Ci/mmol)은 Amersham사(U.S.A.)에서, mouse anti-MUC5AC clone 45M1 및 HRP-Goat Anti-Mouse IgG(H+L) Conjugate은 Neo-Markers사(U.S.A.)에서, type I collagen은 Regenmed(Seoul, Korea)에서, LDH assay kit(LDH-LQ)은 아산제약(Korea)에서, sodium acetate 등과 기타 일반시약들은 reagent grade 이상의 것들을 구입하여 사용하였으며 실험에 사용된 물은 탈이온 2차 증류수였다.

2. 방법

1) *In vivo*

(1) 이산화황으로 유발된 기도점액 과다분비 동물모델

가로 200 cm, 세로 60 cm, 높이 30 cm의 직육면체 상자를 두께 2 cm의 아크릴 수지판을 재료로 하여 제작하였다. 가로면의 일부에 실험동물 SD rat이 출입할 수 있도록 출입문을 만들고 가로면과 수직으로 접하고 있는 좌우 양면의 중앙부에 구멍을 만든 후 그에 맞는 nipple과 polyethylene duct를 장착하였다. 한쪽 duct는 이산화황이 발생되는 초음파 가습기의 분무구에 연결시키고 반대쪽 duct는 모터로 구동되는 환풍기의 흡기구에 연결시켜 실험 종료 후 잔류하는

이산화황 기체를 완전히 제거할 수 있도록 조치하였다. 이산화황 노출방법은 Pon 등<sup>23)</sup>이 보고한 방법을 변형하여 사용하였다. 15% (V/V) Sodium metabisulfite (MBS) 수용액을 초음파 가습기에 주입하고 가습기를 작동시켰다. 작동 후 3분 이내에 MBS의 증기가 충분했고 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, 1주일 5일, 3주간이었다. 대조군은 실험장치가 설치된 동일한 실내에 전 실험기간 동안 1일 3시간의 이산화황 노출 및 약물투여 조작만 제외하고 노출군과 동일한 조건 하에 사육되었다.

(2) 약물의 경구투여

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 매일 반복적으로 약물을 투여하였는데 약물 투여는 오전 10시에서 11시 사이에 이산화황 노출은 오후 1시에서 4시까지 각각 실시하였다.

(3) 약물이 뮤신분비에 미치는 영향 판정

이산화황 노출 및 약물 투여가 종료된 각 실험동물을 이산화탄소로 질식사시킨 후, 청정한 환경에서 기도를 노출시키고 기관지 폐포액 세척술(bronchoalveolar lavage)을 통하여 뮤신을

함유한 세척액을 각 동물 당 5 ml씩 수거하였다. 각 세척액 sample을 PBS로 1/10배 희석하고 희석된 각 sample을 ELISA 전용의 96-well plate에 각각 100  $\mu$ l씩 나누어 넣고 2시간 동안 상온에서 incubation하였다. 2시간 후 PBS-Tween 20 (0.05%) 용액 200  $\mu$ l/well을 이용 각 well 당 3회씩 washing하였다. Washing 후 2% BSA in PBS-T 용액 200  $\mu$ l를 각 well당 가하고 다시 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후 PBS-T 200  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l씩 첨가하여 1시간 동안 incubation하였다. PBS-T로 다시 3회 washing 후, 과산화수소와 3',3',5',5'- tetramethylbezidine (TMB)의 혼합조제 용액 100  $\mu$ l를 각 well에 첨가하고 5분 후 1N 황산 용액 50  $\mu$ l를 첨가 반응을 정지시켰다. 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정함으로써 대조군과 약물 처리군 간의 뮤신의 양을 정량 비교하였다<sup>24,25</sup>.

(4) 약물이 배양세포 내 점액함유 정도에 미치는 영향 판별

기관내강 상피세포에의 조직학적 변화에 미치는 약물의 영향을 판별하기 위하여 조직학적 검사를 실시하였다. 즉 3주간의 이산화황 노출 기간이 종료된 후 각 군에 소속된 해당 실험동물을 이산화탄소로 질식사시킨 후 기관을 절개 분리한 후 냉각된 10% formalin in PBS (PH 7.2)에 넣어 24 시간 동안 고정하였다. 고정한 조직을 파라핀으로 포매 (embedding)하였다. Micro-

tome을 이용 5  $\mu$ m 두께로 잘라 조직절편을 제작하였다. 탈파라핀 과정을 거치고 Alcian Blue 염색을 실시한 후 광학 현미경 하에서 관찰하고 사진 촬영하였다. 대조군, 이산화황 처리군, 약물 투여군의 기관내강 배양세포 (goblet cell)의 증식 여부 및 배양 세포내 점액함유 정도를 비교함으로써 약물이 배양세포 내 점액함유 정도에 미치는 영향을 판별하였다<sup>24,25</sup>.

2) *In vitro*

(1) 햄스터 기관표면 상피세포의 분리 및 배양  
 햄스터의 기관표면 상피세포(Hamster Tracheal Surface Epithelial cell, 이하 HTSE cell) 분리와 배양에 적용된 실험은 Kim 등<sup>26-28</sup>과 Wu 등<sup>29,30</sup>의 방법을 사용하였다. 세포들은 37 °C incubator에서 1~3일간 배양된 후 32 °C incubator로 옮겨서 배양했다. 배양액 교체는 배양 개시 후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다.

(2) 뮤신의 대사적 방사능 표지 (radiolabeling)  
 Kim 등과 여러 연구자들<sup>27,31-33</sup>의 방법을 이용하였는데 배양세포 중의 뮤신은 성숙한 배양세포 (24 well plate,  $5 \times 10^5$  cells/well)에 10  $\mu$ Ci/ml의 [ $^3\text{H}$ ] glucosamine을 함유하는 완전배양액 (insulin (5  $\mu$ g/ml), transferrin (5  $\mu$ g/ml), epidermal growth factor (12.5 ng/ml), hydrocortisone (0.1  $\mu$ m), sodium (0.01  $\mu$ m), fetal bovine serum (5%, V/V)(이하 FBS), retinoic acid (0.1  $\mu$ m), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml), gentamicin (50  $\mu$ g/ml)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME)과 Medium 199 (M199)의 1:1 혼합 배양액을 well당 200  $\mu$ l씩 가하고 32 °C에서 24시간 동안 배양해서 방사능 표지 (metabolic radiolabeling)를 하였다.

(3) 배양 세포에 대한 약물 처리

24시간 동안의 대사적 방사능 표지가 완결된

후 배양액 (pretreatment sample, 이하 PT sample)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 加味通竅湯 추출물 10~40  $\mu$ l를 함유하는 PBS 200  $\mu$ l를 well마다 가하고 32  $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하여 treatment sample (이하 T sample)로 정의하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고 50  $\mu$ l의 상등액은 젯산탈수소효소 활성측정 (LDH activity assay)을 위해 따로 덜어두고 나머지는 방사성 뮤신 함량을 측정할 때까지 -70  $^{\circ}$ C에서 냉동 저장하였다<sup>27,31-33</sup>.

#### (4) 뮤신 함량 측정

Hyaluronidase에 의해 분해되지 않으며, Sepharose CL-4B column으로부터 exclude되는 고분자량의 glycoconjugate를 뮤신으로 정의하였고 Kim 등 및 여러 연구자들의 방법<sup>27,31-33</sup>에 따라 방사성 뮤신의 함량을 측정하였다.

#### (5) 젯산 탈수소효소 활성 측정 (LDH activity assay)

배양세포 중의 뮤신은 다 자란 배양세포 (24 well plate,  $5 \times 10^5$  cells/well)에, 10  $\mu$ Ci/ml의 [ $^3$ H] glucosamine을 함유하는 완전배양액을 well당 200  $\mu$ l씩 가하고 32  $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양함으로써 방사능 표지하였고, 방사능 표지가 완결된 후 spent medium은 수거해 두었다. 배양세포에 well당 0.5 ml의 PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤 加味通竅湯 추출물 10~40  $\mu$ l를 함유하는 PBS 200  $\mu$ l를 well마다 가하고 32  $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 T

sample을 수거하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고 50  $\mu$ l의 상등액을 LDH activity assay에 사용했다. LDH 활성 측정은 commercial kit을 이용하였다<sup>32,33</sup>.

#### (6) 약물 투여 배양 상등액의 겔 여과 크로마

토그래피를 이용한 전체 용출양상 분석 배양세포 중의 뮤신은 성숙한 배양세포에 10  $\mu$ Ci/ml의  $^3$ H- glucosamine을 함유하는 완전배양액을 well당 200  $\mu$ l씩 가하고 32  $^{\circ}$ C에서 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 加味通竅湯 최종 추출물 40  $\mu$ l를 함유하는 PBS 200  $\mu$ l를 well마다 가하고 32  $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 T sample을 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 이용 방사선량을 측정하였다. 대조 sample과 약물 처리 sample을 대상으로 뮤신 및 그보다 분자량이 작은 표지된 여타의 당단백질들의 전체 용출양상에 미치는 영향을 비교하였다<sup>32,33</sup>.

#### (7) 적출 기관 평활근에 대한 약물의 영향 측정

체중 1.5 kg 정도의 건강한 백색 가토 (Albino rabbit)를 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 연결 physiograph를 이용 수축 정도를 측정하였다. 기관 표본에 5 g의 resting tension을 가하고 37 °C, 산소 공급 하에서 약 1시간 동안 15분 간격으로 세척하면서 안정화시켰다. 이 표본에 방금 조제된 acetylcholine 용액  $1 \times 10^{-4}$  g/ml를 투여하여 최고 수축도를 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  $\mu$ l를 투여하고 5분간 방치한 다음 acetylcholine 용액  $1 \times 10^{-4}$  g/ml를 투여하여 각 약물을 투여하기 전 acetylcholine 단독투여에 의한 수축도와 비교함으로써 시행하였다.

3) 통계처리

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

III. 成 績

1. *In vivo*

1) 이산화황으로 유발된 기도점액 과다분비 상태에 미치는 영향

加味通竅湯은 이산화황으로 유발된 과다분비된 점액의 양을 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 감소시켰다(Fig. 1).

2) 이산화황으로 유발된 기도 배상세포내 점액 함유정도 증가 및 배상세포 수 증가에 미치는 영향

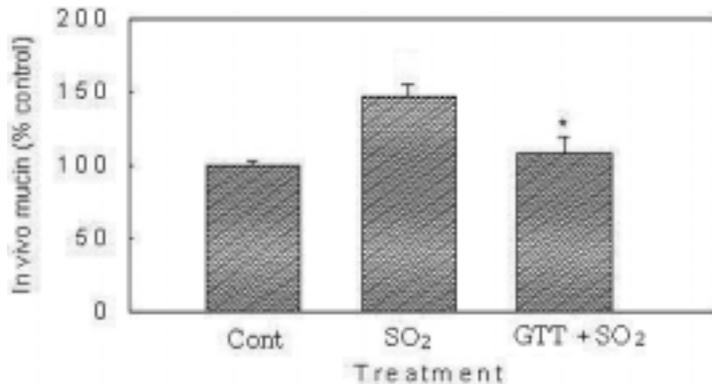


Fig. 1. Effect of GTT on hypersecretion of mucin from trachea of rats exposed to sulfur dioxide. Rats were exposed to sulfur dioxide and effect of orally-administered GTT extract on quantity of secreted airway mucin from rats, as described in *materials and methods*.  
\* : Significantly different from SO<sub>2</sub> group ( $p < 0.05$ ).

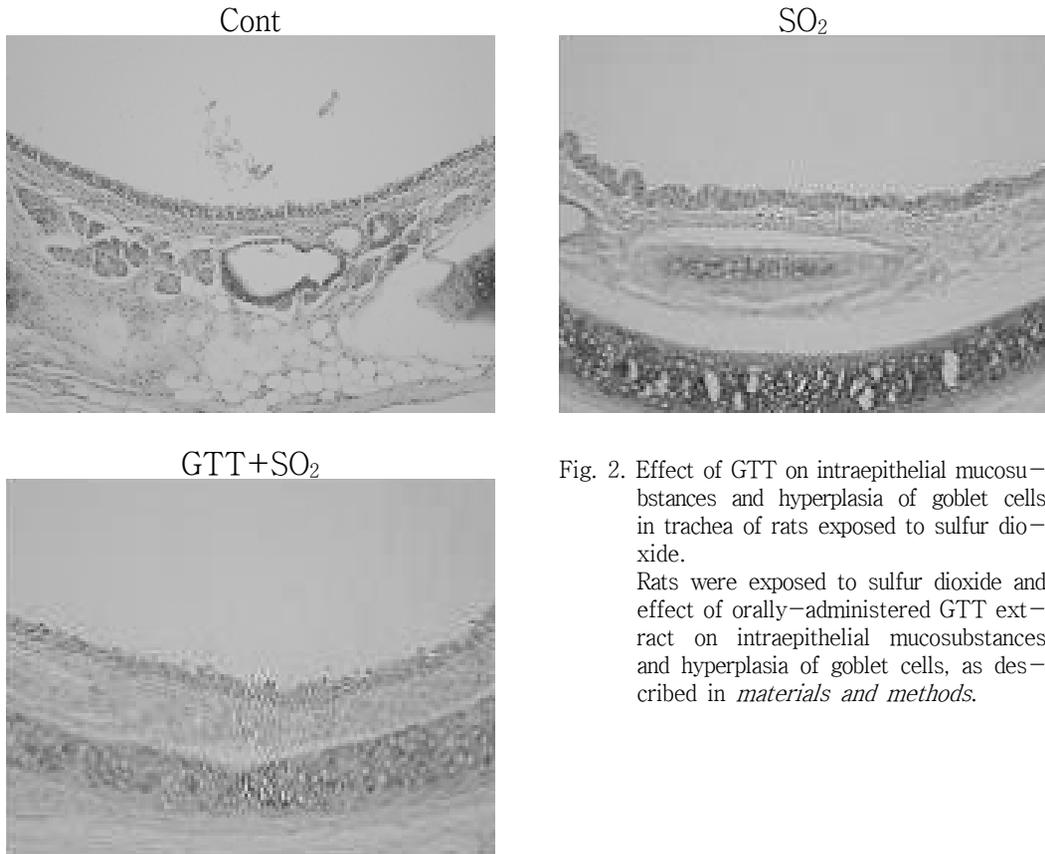


Fig. 2. Effect of GTT on intraepithelial mucosubstances and hyperplasia of goblet cells in trachea of rats exposed to sulfur dioxide. Rats were exposed to sulfur dioxide and effect of orally-administered GTT extract on intraepithelial mucosubstances and hyperplasia of goblet cells, as described in *materials and methods*.

加味通竅湯은 이산화황으로 유발된 기도 배상세포 내 점액 함유정도 증가 및 배상세포 수 증가에 영향을 미치지 못하였다(Fig. 2).

## 2. In vitro

1) 일차배양 HTSE 세포로부터의 뮤신분비에 미치는 영향

加味通竅湯은 최종 추출물 20, 40  $\mu\text{l}/200 \mu\text{l}$  PBS 투여 농도에서 뮤신분비를 유의성 있게 ( $p < 0.05$ ) 증가시켰다(Fig. 3).

2) 加味通竅湯 처리 배양 상등액의 겔 여과 크로마토그래피를 이용한 전체 용출 양상 분석

GTT 40  $\mu\text{l}/200 \mu\text{l}$  PBS 처리 시 GTT은 주로 뮤신의 분비를 증가시키며 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에는 유의성 있는 영향을 발현하지 않았다(Fig. 4).

3) 일차배양 HTSE 세포로부터의 LDH 분비에 미치는 영향

加味通竅湯은 최종 추출물 10~40  $\mu\text{l}/200 \mu\text{l}$  PBS의 투여 농도 범위에서 세포독성의 한 지표인 LDH 분비에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다(Fig. 5).

4) 토끼 기관 평활근의 긴장도에 미치는 영향  
加味通竅湯은 최종 추출물 50, 500  $\mu\text{l}$

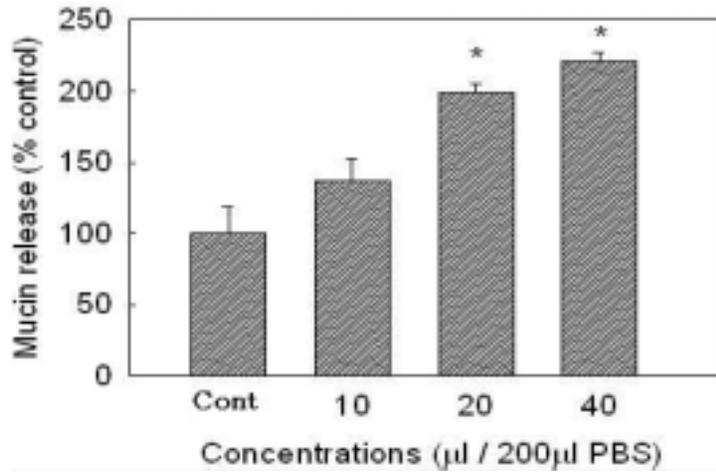


Fig. 3. Effect of GTT on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with  $^3\text{H}$ -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of GTT extract and the amount of  $^3\text{H}$ -mucins in the spent media was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

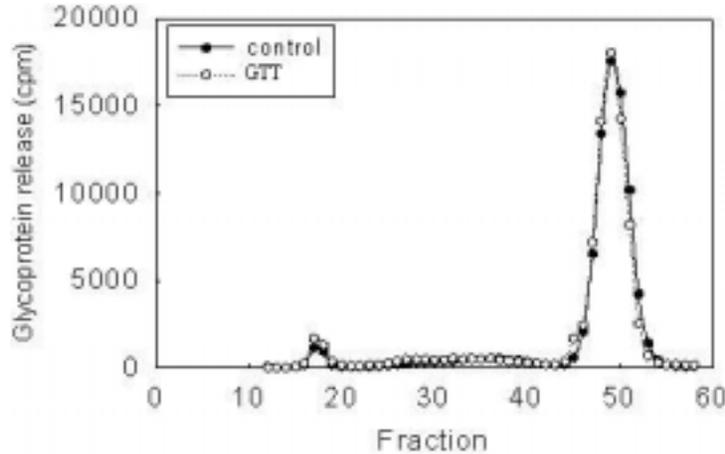


Fig. 4. Effect of GTT on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with  $^3\text{H}$ -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of GTT 40  $\mu\text{l}/200 \mu\text{l}$  PBS and total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed, as described in *materials and methods*.

Tyrod solution 50 ml의 투여 농도에서 토끼 적출 기관에서  $1 \times 10^{-4}$  g/ml 농도의 acetylcholine으로

유발된 수축 현상에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다(Fig. 6).

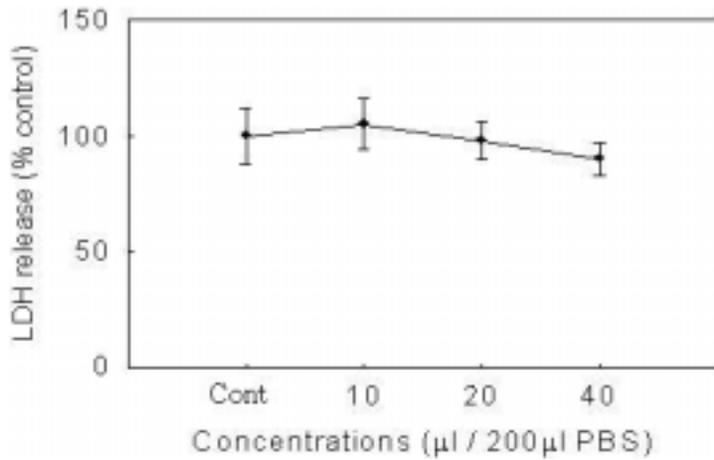


Fig. 5. Effect of GTT on LDH release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of GTT extract for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean $\pm$ S.E.M. from 4 culture wells.

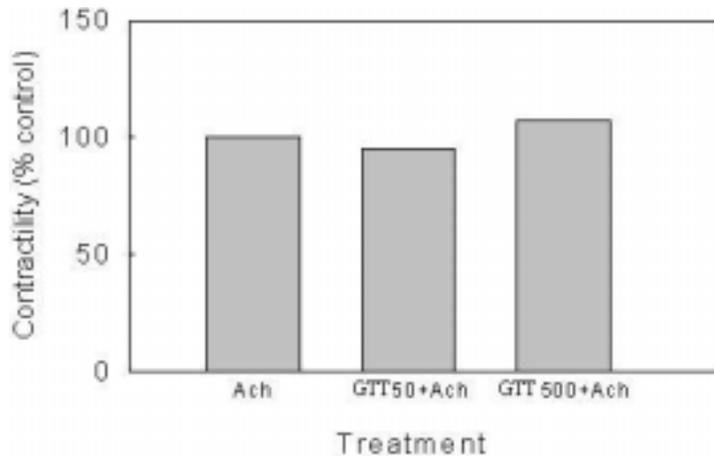


Fig. 6. Effect of GTT on contractility of isolated tracheal smooth muscle. Isolated tracheal smooth muscle of rabbit was prepared and effect of GTT extract on acetylcholine-induced contraction was measured as described in *materials and methods*. (Ach ; acetylcholine)

#### IV. 考 察

호흡기는 위장관과 함께 외부 환경과 우리 신체가 접촉하는 가장 중요한 기관이다. 따라서 외부 환경으로부터 들어온 유익한 물질은

받아들이고, 유해한 물질은 받아들이지 말아야 하는 매우 중요한 기능을 가지고 있다. 특히, 유해한 물질을 받아들이지 않는 기능을 방어 기능이라고 하는데 점막은 방어 체계의 1차 방어선의 역할을 담당하고, 면역계(immune system)는

식세포(phagocyte)와 림프구로 구성되고, 이들은 각각 2차, 3차 방어선의 역할을 담당하고 있다. 2차, 3차 방어선 역할을 하는 면역계의 발달이 미숙한 신생아와 영·유아에게는 1차 방어선인 점막의 역할이 더욱더 중요하다. 점막의 기본적인 구조는 성인과 같지만, 두께가 얇고 안정성이 성인에 비해 떨어져 쉽게 상처를 입게 되고 이를 통해 2차적인 세균 감염이 잘 일어난다<sup>34)</sup>. 이러한 방어 체계의 특수성 때문에 성인에 비해 기도 점액 분비선이 많고 말초기도 내경이 작아 소아의 호흡기 질환은 기도 수축보다는 점막의 부종과 점액분비가 주요인이며 무기폐가 자주 관찰되는 특징이 있다.

서양 의학에서 설명하는 객담의 주요 구성 성분인 점액의 양은 주로 생성되는 속도와 흡수, 증발, 섬모운동에 의해 제거되는 속도의 균형에 의해 조절되는데 많은 임상 질환들이 이러한 점액의 생성과 제거의 균형이 깨져 발생한다. 점액은 코막힘과 호흡곤란을 야기하며 호흡한 공기 중의 해로운 물질을 코점막에 부착시킴으로써 기침을 일으킨다. 하지만 점액은 병원균이 호흡점막에 부착되는 것을 방해하고 여러 독성물질을 불활성화시킴으로써 많은 해로운 물질로부터 기도를 보호하는 역할을 하기도 한다<sup>35)</sup>.

호흡기 점액의 인체 방어 기능은 주로 점액의 구성요소인 뮤신의 점성 및 탄성에 기인하는데, 이러한 뮤신의 양과 질의 이상은 기도 생리의 이상 뿐 아니라 인체의 방어 작용에 영향을 주어 더 심한 병리 현상을 유발할 수 있다<sup>6,36)</sup>. 즉 천식, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, 낭포성 섬유증 등의 호흡기 질환에서 관찰되는 객담 혹은 점액의 과다 분비는 이러한 질환군의 예후를 악화시키는 주된 요인으로 알려져 있다<sup>36)</sup>.

현재 서양의학에서 이러한 과다 분비된 점액

의 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 하며<sup>37)</sup>, 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 어려운 실정이다.

대표적 호흡기 질환인 천식의 경우 기본적인 병리는 기도 과민성과 기도 폐쇄, 혈액가스 교환의 이상으로 요약할 수 있다. 그 중 기도폐쇄는 기도 과민성의 표현형이라고 할 수 있는 천식의 대표적 병태생리 현상으로 부종, 점액의 과분비 및 평활근의 수축이 모두 관여한다. 기도 전반에서의 점액 과분비는 만성 점액전(Mucous plug)을 형성하며 그 분비물은 비정상적으로 진하고 끈적끈적하며 천식 발작 때에 더욱 심해진다. 또한 급성적인 기도 수축은 알레르기 현상에 관여하는 세포에서 분비하는 화학매체에 의해 기관지 평활근이 수축하여 나타나며 평활근 조직의 탄력성과 세포의 기질의 변화로 설명하고 있다<sup>34)</sup>.

한의학에서 略痰은 痰飲의 범주로 體內의 過多한 水分이 어느 한 부분에 停聚되어 疾病의 原因이 될 뿐만 아니라 질병의 結果로 發生되는 病的 상태를 말한다. 인체의 체내진액대사 과정에서 肺의 通調水液作用, 脾의 運輸水穀精微作用, 腎의 蒸化水液, 分清泌濁作用이 失調되면 津液의 정상적 분포와 排泄에 異常이 생겨 水濕이 모여 痰이 生成된다<sup>38)</sup>.

通竅湯은 《東醫寶鑑》<sup>9)</sup>에 風寒에 感觸되어 鼻塞聲重하고 流涕하며 不聞香臭 증상에 사용한다고 수록되어 있으며 龔 등<sup>39,40)</sup>이 風寒 및 肺氣虛寒으로 인한 鼻塞聲重, 流涕를 치료하는 처방으로 加味通竅湯은 通竅湯에 柳根

皮를 君藥으로 桔梗, 連翹, 金銀花, 黃芪, 薄荷, 蒼耳子, 辛夷, 貝母, 天花粉, 梔子 등을 가미하여 알레르기성·비후성·만성 비염 및 부비동염 등에 응용하는 처방이다.

加味通竅湯의 구성약물의 氣味는 대부분 辛溫하며 그 효능은 發散解表 祛風止痛하는 작용<sup>41,42</sup>이 있으며 약리학적으로는 抗菌, 抗炎, 解熱, 鎮痛, 抗알레르기 및 면역작용이 있는 것으로 알려져 있다. 특히 防風, 羌活, 麻黃, 細辛은 抗알레르기 및 면역작용이 있고 防風, 羌活, 蒼朮, 白芷, 麻黃, 細辛, 甘草 등은 抗消炎 작용이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>41,43,44</sup>.

加味通竅湯의 약물학적 구성을 보면 葛根, 升麻, 甘草, 生薑, 蔥白을 升麻葛根湯의 일부로 볼 수 있는데 升麻葛根湯은 陽明經(顔面部)의 感冒症이나 溫病에 사용해 온 약물이요 또한 羌活, 防風, 川芎, 白芷, 蒼朮, 細辛, 甘草는 九味羌活湯의 일부로 볼 수 있으며 九味羌活湯은 風寒邪에 감축된 諸疾患에 사용되어 온 약물이요. 개개의 약물 중에서는 君藥인 楡根皮가 消炎 및 止咳 작용을 하고, 川椒는 通竅 및 開竅작용을 하고, 麻黃은 發汗解表 止咳定喘하며 藁本은 鎮痛작용을 한다<sup>41,42</sup>.

따라서 이를 종합하면 加味通竅湯은 升麻葛根湯과 九味羌活湯이 합방된 처방에서 白芍藥, 生地黃, 黃芩을 去하고 楡根皮, 川椒, 麻黃, 藁本이 가미된 구성을 하고 있기 때문에 顔面部 陽明經에 風寒邪가 침입하여 생기는 여러 증상의 호흡기질환을 치료할 수 있는 약물로 생각할 수 있다.

서양 의학적으로 호흡기 뮤신의 분비를 증가시키는 것으로 알려진 물질로는 ATP, TNF- $\alpha$  등의 인체의 염증 진행과정에서 확인되는 내인성 물질<sup>45</sup> 및 염화 암모늄, 요오드화 칼륨,

bromhexine, ambroxole 등의 약물이 있으나 뚜렷한 거담효과를 나타내면서도 임상에서 적절히 활용하기에는 여러 가지 문제점이 있는 것으로 알려져 있다<sup>6</sup>.

이에 저자는 호흡기 질환 발병 시에 사용되는 加味通竅湯의 다양한 효능 중 호흡기 질환에서 호발되는 객담의 생성 및 과다분비 조절 효능을 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향, 적출된 토끼 기관 평활근의 수축도에 미치는 영향, 호흡기 점액 과다분비 모델동물에 대한 영향 등을 관찰하였다.

본 연구에서는 加味通竅湯이 살아 있는 동물 모델에서 기도점액의 과다분비 상태에 어떠한 영향을 주는지 검증하기 위하여 Pon 등<sup>23</sup>이 보고한 이산화황 유발 호흡기 점액 과다분비 동물모델을 사용하여 *in vivo* 연구를 진행하였다. 흰쥐를 이산화황 기체에 3주간 노출시켰을 때 기도점액의 분비량을 살펴본 결과 대조군보다 유의성 있게( $p < 0.05$ ) 증가하였으나 加味通竅湯 투여군에서는 기도점액의 분비량을 다시 감소시켰다(Fig. 1)으로써 加味通竅湯이 기도 염증 상태에서의 점액 과다분비를 조절하여 비염, 축농증 등의 호흡기 질환에서의 치료 작용을 발현함에 대한 기초과학적 배경을 제시하고 있다.

그러나 1주간의 加味通竅湯 투여가 기도 상피세포층의 조직학적 변화에는 영향을 주지 못하였다(Fig. 2). 실험결과를 보면 이산화황 3주 처리로 기도 배상세포의 수가 증가하고 배상세포내 점액 함유정도가 증가하는 현상을 관찰할 수 있었으나, 총 3주의 이산화황 노출 기간 중 최종 1주간 加味通竅湯을 경구 투여한 동물군에서는 배상세포내 점액함유 정도나 기도 배상세포의 수에 있어서 이산화황 3주 처리군과 차이를 발견하기 어려웠다. 이러한

결과는 加味通竅湯을 1주간 투여시 *in vivo*에서 기도점액의 분비에는 영향을 줄 수 있으나 과다분비 상태가 유발된 기도 상피세포의 조직학적 변화에는 영향을 주기 어렵다는 점을 시사하고 있다.

加味通竅湯이 일차배양 HTSE세포에서 뮤신분비에 미치는 영향을 살펴보기 위한 실험에서 加味通竅湯은 최종 추출물 40  $\mu$ l/200  $\mu$ l PBS의 투여농도에서 30분간의 *in vitro* 약물 처리 기간 동안 뮤신분비를 대조군보다 120% 가량 증가시켰다(Fig. 3).

이상의 세 결과는 加味通竅湯이 단기적으로는 뮤신분비를 완만하게 자극할 수 있으나 장기 반복투여 시에는 뮤신의 과다분비를 감소시킬 가능성을 보임으로써 加味通竅湯이 임상적으로 기도점액 과다분비 상태를 개선시킬 가능성을 실험적 증거를 통하여 제시하고 있으며, 다양한 실험모델을 이용한 후속 연구의 필요성을 시사하고 있다.

다음으로 뮤신분비에 영향을 주는 加味通竅湯이 거대 당단백질인 뮤신의 분비에만 특이적으로 영향을 미치는지 혹은 뮤신보다 분자량이 작고 구조도 다른 여타의 방사능 표지 당단백질들의 분비에도 영향을 미치는지의 여부를 검증하고자 하였다.

일차배양된 HTSE세포에  $^3\text{H}$ -glucosamine을 이용하여 배양세포가 생산하는 뮤신 및 glucosamine을 함유하는 여타의 당단백질에 방사능을 표지한 후 일정 기간 동안 세포를 배양하면  $^3\text{H}$ -표지 당단백질들이 배양액 중으로 유리되게 된다<sup>27,33</sup>. 이 시점에서 배양액을 Sepharose CL-4B column에 loading 하면  $^3\text{H}$ -표지 당단백질 중 분자량 수백만 dalton에 해당하는 거대분자인 뮤신으로부터 가장 크기가 작은  $^3\text{H}$ -glucosamine까지 용출되는 특정한 용출양상 (elution profile)이 나타난다. 만약 대조 배양액의 전체

용출양상을 기준으로 각 약물을 처리했을 때, 전체 용출양상 (total elution profile)의 특정부분에 변화가 생겼다면 그 변화는 특정 크기의  $^3\text{H}$ -당단백질 분비량의 변화를 의미하는 것이다<sup>31,33</sup>.

加味通竅湯은 뮤신과 같은 거대분자가 용출되는 fraction인 void volume fraction에서만 영향을 나타내고 여타의 included volume 및 total volume에 해당하는 fraction에서는 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않음을 알 수 있었다(Fig. 4). 이러한 실험 결과는 加味通竅湯이 뮤신과 같은 거대 당단백질의 분비에 주로 영향을 주며 그보다 크기가 작고 구조도 다른 당단백질들의 분비에는 유의성 있는 영향을 미칠 가능성이 낮다는 점으로 뮤신 분비에 대한 작용에서 특이성을 나타냄을 의미하는 것이다.

또한 본 연구에서는 세포막 손상의 한 지표인 LDH 활성 측정을 통하여 이 약물에 의한 세포독성 발현 가능성을 검증하고자 하였다. 세포막이 손상되면 세포는 그 완전성과 정상 기능을 상실한다<sup>46,47</sup>. 그러므로 세포막 손상시 분비되는 LDH의 활성 측정을 세포독성 유발 여부 측정의 한 방법으로 채택할 수 있다.

실험결과를 살펴보면 加味通竅湯은 최종 추출물 10~40  $\mu$ l/200  $\mu$ l PBS의 투여 농도에서 LDH 분비에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 加味通竅湯이 배양된 기도 상피세포에 대해 현저한 세포막 손상을 일으키지 않을 가능성을 나타내는 결과로 생각되며, 세포독성 측정을 위해 사용하는 다양한 방법론을 적용하여 추가적인 독성 연구를 시행해 볼 필요성이 있다고 할 수 있다.

이와 함께 본 연구에서는 加味通竅湯이 적출된 토끼 기관 평활근의 수축도에 미치는 영향을 검증함으로써 천식 등의 기관 평활근 수축 상태에서 加味通竅湯에 의한 기관 평활

근 이완 효능을 검증하고자 하였다. 실험결과에서 볼 수 있듯이 加味通竅湯은 최종 추출물 50~500  $\mu$ l/Tyrode solution 50 ml의 투여 농도에서 토끼 적출 기관에서  $1 \times 10^{-4}$  g/ml 농도의 acetylcholine으로 유발된 수축 현상에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다(Fig. 6).

이는 加味通竅湯이 기관지 평활근의 긴장도에는 영향을 주지 않는다는 것으로 다시 말해서 직접적인 기관 혹은 기관지 확장효과를 발현하지 못함으로써 항천식 효능은 나타내지 않는다는 것을 의미한다고 생각되나 확정적인 항천식 효과의 검증을 위해서는 향후 加味通竅湯이 동물성 항원으로 유발된 천식 모델 흰쥐의 기도저항에 미치는 영향 등을 규명하는 과정, 즉 *in vivo*에서의 각 약물의 항 천식 활성의 검증 과정이 수반되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 加味通竅湯이 단기적으로는 뮤신분비를 완만하게 자극하나, 장기 투여시에는 뮤신의 과다분비를 감소시킬 가능성을 보임으로써 임상적으로 기도점액 과다분비 상태를 개선시킬 가능성을 실험적 증거를 통하여 확인하였다.

#### IV. 結 論

加味通竅湯의 뮤신 분비 조절 기능 및 기도 배상 세포 수에 미치는 영향과 HTSE에서 뮤신 함량, 젖산 탈수소효소 활성 측정 및 기관 평활근 이완 효과를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味通竅湯은 이산화황으로 유발된 기도 점액 과다분비 동물모델에서, *in vivo* 실험상 뮤신의 분비를 유의성 있게 감소시켰

으나, 기도 상피조직에서의 조직학적 변화에는 영향을 주지 못하였다.

2. 加味通竅湯은 *in vitro* 실험에서는 용량 의존적으로 뮤신분비를 증가시키는데, 호흡기 배상세포에서 분비될 수 있는 물질 중 주로 뮤신의 분비에 특이적으로 영향을 주었으며, LDH 분비에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다.
3. 加味通竅湯은 토끼의 적출 기관 평활근의 수축도에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다.

#### 參考文獻

1. 김덕곤 외. 동의소아과학. 서울:도서출판 정담. 2002:246.
2. 김노경 외. 내과학. 서울:고려의학. 1998:401.
3. 김세규. Pathophysiology로 이해하는 내과학. 서울:도서출판 정담. 2002:20.
4. 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九 咯痰에 관한 東西醫學的 文獻考察. 대한한방성인병학회지. 1995;1(1):51-61.
5. 오치엽 외. 만성부비동염의 병리조직 및 면역조직학적 검색. 대한이비인후과학회지. 1987; 6:30, 866-75.
6. Mutschler, E. and Derendorf, H. Drug actions. Florida:CRC press, Inc., Boca Raton. 1995:410-1.
7. 대전대학교 한방병원. 대전대학교 한방병원 처방집. 대전:한국출판사. 2001:414.
8. 龔廷賢. 萬病回春. 서울:醫文社. 1985:191.
9. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:法人文化史. 1999: 592-3.
10. 康命吉. 濟衆新編. 서울:杏林出版. 1974:203.
11. 金潤希, 韓在敬, 金允姬. 取淵湯 및 治哮

- 散加味方이 기도점액 분비 및 기관평활근 긴장도에 미치는 영향, 대한한방소아과학회지. 2005;19(1):11-23.
12. 김정숙, 김윤희. 加味腎氣湯 등 數種方劑가 일차배양 호흡기 상피세포에서의 粘液 분비에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2006;20(1):109-35.
  13. 윤재은, 한재경, 김윤희. 柴梗淸肺湯 및 通竅湯加味方이 기도점액분비 및 기관평활근 긴장도에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2006;20(1):93-107.
  14. 이정은, 박양춘. 淸金降火湯 및 瓜蒌枳實湯이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 分泌에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004; 25(2):238-44.
  15. 임도희, 이정은, 한영주, 황지호, 조철준, 배한호, 박양춘, 채은영. 杏蘇湯 및 加味八味丸이 호흡기배상세포로부터의 뮤신분비에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):221-8.
  16. 한달수. 加味腎氣湯 및 加味淸肺湯이 기도점액 분비 및 기관평활근 긴장도에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 2004.
  17. 김성배. 通竅湯의 抗 Allergy反應 및 抽出된 氣管支 平滑筋에 미치는 影響. 원광대학교 대학원. 1996.
  18. 정진영. 通竅湯이 알레르기 비염 모델 흰 쥐에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2005.
  19. 이규진. 알레르기성 비염의 동물 병태 모델에 대한 通竅湯이 Interferon- $\gamma$  Interleukin-4에 미치는 효과. 경희대학교 대학원. 2006.
  20. 김영복. 通竅湯의 卽刻型 알레르기 反應 抑制 效果에 關한 實驗的 研究. 원광대학교 대학원. 2001.
  21. 정동욱. 加味通竅湯이 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響. 경희대학교 대학원. 1987.
  22. 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.
  23. Pon, D.J., Van Staden, C.J., Boulet, L. and Rodger, I.W. Hyperplastic effects of aerosolized sodium metasulfite on rat airway mucus-secretory epithelial cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1994;72:1025-30.
  24. St. George, J.A., Cranz, D.L., Zicker, S., Etc-hison, 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.
  25. 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.
  26. 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(11): 617-21.
  27. Kim, K.C., Rearick, J.I., Nettesheim, 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(7): 4021-7.
  28. Kim, K.C., Brody, J.S. Gel contraction causes mucin release in primary hamster tracheal epithelial cells growing on a collagen gel. *J. Cell. Biol.* 1987;105, 158a.

29. Wu, R. and Smith, D. Continuous multiplication of rabbit tracheal epithelial cells in a defined, hormone-supplemented medium. *In Vitro*. 1982;18(9):800-12.
30. 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.
31. 이충재. 설치류 기관 뮤신유리 억제에서의 폴리양이온성 작용기전. 서울대학교 대학원. 1997.
32. 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.
33. 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.
34. 대한 천식 및 알레르기 학회. 천식과 알레르기 질환. 서울:군자출판사. 2002:73, 265.
35. Frigas E., Loegering D.A., Solley G.O., Farrow G.M., 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(6):345-53.
36. Gleich G.J. The eosinophil and bronchial asthma. Current understanding. *J Allergy Clin. Immunol*. 1980;85(2):422-36.
37. 안효섭, 홍창의. 소아과학. 서울:대한 교과서 주식회사. 2004:606-9, 1192-6.
38. 上海中醫學院. 中醫內科學. 香港:商務印書館. 1982:24-5.
39. 龔信. 古今醫鑑. 江西:江西科學技術出版社. 1990:239.
40. 龔廷賢. 增補萬病回春. 서울:一中社. 1990:4.
41. 이상인. 한약임상응용. 서울:정보사. 1982: 44-6, 50-8, 73-4, 76-7, 235-6, 245-6, 299-301, 361-4.
42. 辛民敎. 原色臨床本草學. 서울:남산당. 1986: 175-7, 249-50, 254-6, 271-2, 414-6, 504-8, 512-4, 516-7, 522-3, 525-6, 537-8, 540-1.
43. 苗明三. 中藥 藥리와 임상. 서안:세계도서출판공사. 1998:138-43, 337-9, 491-3, 629-31, 799-801, 1106-12.
44. 鄭虎占 外. 中藥현대연구와 응용. 북경:학원출판사. 1998:3005-11, 3546-56, 4206-17, 4302-21.
45. Kim, K.C., Zheng, Q.X. and Van-Seuningen, I. Involvement of a signal transduction mechanism in ATP-induced mucin release from cultured airway goblet cells. *Am. J. Cell Mol. Biol*. 1993;8:121-5.
46. 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.
47. Freshny. Measurement of viability and cytotoxicity. In *Culture of animal cells* (3rd edn). New-York:Wiley-Liss. Inc. 1994:288.