

원 저

冷哮丸이 호흡기 뮤신 분비와 기관지 평활근에 미치는 영향

윤종만¹, 박양춘¹, 이용구²

¹대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실, ²대전대학교 혜화병원 내과

Effect of *Naenghyo-hwan* on Secretion of Airway Mucin and Contractility of Tracheal Smooth Muscle

Jong-man Yoon¹, Yang-chun Park¹, Yong-koo Lee²

¹Division of Respiratory System, Dept. of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

²Dept. of Internal Medicine, Hyehwa Hospital, Daejeon University

Objectives : In the present study, the author investigated whether *Naenghyo-hwan*(NHH) significantly affect mucin secretion from airway epithelial cells.

Methods : Confluent hamster tracheal surface epithelial (HTSE) cells were metabolically radiolabeled with 3H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of NHH to assess the effect of the agent on 3H-mucin secretion. Total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed. Effect of NHH on contractility of isolated tracheal smooth muscle was investigated. Also, effect of the agent on MUC5AC gene expression in cultured NCI-H292 cells was investigated. Possible cytotoxicities of the agent were assessed by measuring both lactate dehydrogenase (LDH) release from HTSE cells and examining the rate of survival and proliferation of NCI-H292 cells.

Results : NHH significantly increased mucin secretion from cultured HTSE cells, with significant cytotoxicity. NHH chiefly affected the 'mucin' secretion. NHH inhibited ACh-induced contraction of isolated tracheal smooth muscle. NHH disturbed both the extraction of total RNA from NCI-H292 cells and polymerase chain reaction, nonspecifically. Therefore, in this experiment, the effect of NHH on the expression levels of MUC 5AC gene in cultured NCI-H292 cells could not be elucidated.

Conclusions : The author suggests that the effect of NHH 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, *Naenghyo-hwan* (NHH), MUC5AC mRNA, tracheal smooth muscle

서 론

호흡기 방어작용의 하나인 점액섬모청소(mucociliary clearance)는 점액과 섬모세포의 협동작용을 통해 인체에 불필요하거나 유해한 물질을 제거하는데 중요한 역할을 한다¹⁾. 점액의 정상적 역할은 점액의 구성요소인 뮤신(mucin)의 점성과 탄성에 기인하게 되는데 이러한 뮤신의 양과 질의 이상으로 점

· 접수 : 2007년 4월 10일 · 논문심사 : 2007년 4월 12일
· 채택 : 2007년 4월 28일
· 교신저자 : 박양춘, 충북 청주시 상당구 용담동 173-9
대전대학교 청주한방병원 1내과
(Tel : 043-229-3704, Fax : 043-253-8757,
E-mail : omdpyc@dju.ac.kr)

액섬모청소가 정상적으로 작용하지 못하면 오히려 점액은 세균의 성장 및 집락을 촉진시키는 발판 역할을 하게 된다²⁾. 즉 천식, 만성기관지염, 폐기종, 기관지확장증과 같은 만성호흡기질환에서 관찰되는 객담 혹은 점액의 과다분비는 이러한 질환군의 예후를 악화시키는 주된 원인으로 작용할 수 있다³⁾. 현재 서양의학에서는 이러한 질환에서 점액의 점도 및 분비를 조절하기 위해 점액용해제, 점액활성제, 점액조절제 등을 사용하고 있으나, 그 효능 및 응용 범주에 제한이 있어 적절한 약물치료를 시행하기가 어려운 것으로 알려져 있다⁴⁾.

冷哮丸은 《張氏醫通》⁵⁾에 처음 기재된 처방으로 “天冷易發 呼吸急促 喘鳴有聲 咳痰清稀色白 泡沫狀 胸膈滿悶 面色晦而帶青 形寒怕冷 口不渴 或渴喜熱飲 舌苔白滑 脈弦緊 或 弦滑”한 증상을 보이는 實證 哮喘의 寒痰型에 溫肺散寒 定喘化痰의 목적으로 사용한다⁶⁾.

최근 한약처방이 호흡기 객담분비에 미치는 영향에 대한 연구들⁷⁻¹¹⁾이 이루어지고 있으나 冷哮丸을 대상으로 한 연구는 없었다. 이에 저자는 冷哮丸이 寒

痰型의 實證 哮喘에 사용되는데 착안하여 점액분비 조절과 관련된 효능을 규명하고자 일차배양 햄스터 기관 표면 상피(hamster tracheal surface epithelial, 이하 HTSE)세포를 이용하여 뮤신 분비 및 생성, 호흡기 뮤신의 유전자인 MUC5AC mRNA의 발현, 적출된 토끼 기관 평활근의 수축도 및 세포독성 등을 측정한 결과, 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료와 방법

1. 재료

1) 동물

일차배양 기관표면 상피세포(hamster tracheal surface epithelial cells)를 얻기 위하여⁸⁻¹⁰⁾ 주령의 웅성 Golden Syrian 햄스터와 기관 평활근을 얻기 위하여 백색 가토(albino rabbit)를 실험동물 전문 사육업체에서 공급받은 후 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대전대학교 부속 한방병

Table 1. Prescription of Naenghyo-hwan 《NHH》

한약명	생약명	중량(g)
麻 黃	<i>Ephedrae Herba</i>	4.0
川 烏	<i>Aconiti Radix</i>	4.0
細 辛	<i>Asari Herba Cum Radice</i>	4.0
蜀 椒	<i>Zanthoxyli Fructus</i>	4.0
白 礬	<i>Alumen</i>	4.0
皂 莢	<i>Gleditsiae Fructus</i>	4.0
半 夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	4.0
南 星	<i>Arisaematis Rhizoma</i>	4.0
杏 仁	<i>Armeniacae Semen</i>	4.0
生甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0
紫 菀	<i>Astris Radix</i>	8.0
款冬花	<i>Farfarae Flos</i>	8.0
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	8.0
Total Amount		64.0

원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며 冷哮丸 처방 내용과 1貼의 용량은 각각 다음과 같다(Table 1).

3) 시료제조

冷哮丸(NHH)의 구성약물은 대전대학교 부속한방병원 약제실에서 공급받아, 《張氏醫通》⁵⁾에 기재된 처방의 1/10로 조제하였다. 한 貼 분량에 800 ml의 이차 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, 여과하여 4°C 냉장고에서 멸균용기에 보관하여 사용하였다.

4) 시약

Pronase (Type XIV), insulin, transferrin, epidermal growth factor, hydrocortisone, sodium selenite, testicular hyaluronidase (Type VI-S), retinoic acid, gentamicin, sodium dodecyl sulfate, Sepharose CL-4B, ethidium bromide, trichloroacetic acid (TCA), Sulforhodamine B (SRB), Trizma base 등은 Sigma사 (USA)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)는 GIBCO-BRL사 (USA)에서, Easy-Blue RNA extraction kit는 INTRON biotechnology사 (Korea)에서, Accuprep RT premix kit와 Accuprep PCR premix kit는 Bioneer사 (Korea)에서, [6-3H] glucosamine (39.2 Ci/mmol)은 Amersham사 (USA)에서, type I collagen은 Regenmed사 (Korea)에서, LDH assay kit (LDH-LQ)는 Asan Pharmaceutical사 (Korea)에서, sodium acetate 등과 기타 일반시약들은 reagent grade 이상의 것들을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 탈이온 2차 증류수를 사용하였다.

2. 방법

1) 뮤신 분비에 미치는 영향 측정

(1) 기관표면 상피세포의 분리 및 배양

햄스터의 기관표면 상피세포 분리와 배양에 적용된 실험은 Kim 등¹²⁻¹⁶⁾의 방법을 사용하였다. 세포들은 37°C incubator에서 1-3일간 배양한 후에 32°C incubator로 옮겨서 배양했다. 배양액 교체는, 배양 개시 후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다.

(2) 뮤신의 대사적 방사선 표지(radiolabeling)

Kim 등¹²⁻¹⁵⁾방법을 이용하였는데, 배양세포 중의 뮤신은, 성숙한 배양세포(24 well plate, 5×10⁵ cells/well)에, 10 µCi/ml의 [6-3H] glucosamine (39.2 Ci/mmol, New England nuclear)을 함유하는 완전배양액 [insulin(5 µg/ml), transferrin(5 µg/ml), epidermal growth factor(12.5 ng/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 µg/ml), gentamicin(50 µg/ml)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DME)과 Medium 199(M199)의 1:1 혼합 배양액]을 well당 200 µl씩 가하고 32°C에서 24시간 동안 배양해서 방사선 표지(metabolic radiolabeling)하였다.

(3) 약물 처리

24시간 동안의 대사적 방사선 표지가 완결된 후 배양액(pretreatment sample; 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, 冷哮丸 추출물 10, 20, 40, 80 µl를 함유하는 PBS 200 µl를 각각 well마다 가하고 32°C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하여 treatment sample(T sample)로 정의하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포와 기타 잔사를 제거하고, 50 µl의 상등액은 젖산탈수소효소 활성측정(LDH activity assay)을 위해 따로 덜어두고 나머지는 방사성 뮤신 함량을 측정할 때까지 -70°C에서 냉동 저장하였다¹²⁻¹⁴⁾.

(4) 뮤신 함량 측정

Hyaluronidase에 의해 분해되지 않으며, sepharose CL-4B column으로부터 exclude되는 고분자량의 glycoconjugate를 뮤신으로 정의하였고, Lee 등¹²⁻¹⁴⁾의 방법에 따라 방사성 뮤신의 함량을 측정하였다.

2) Sepharose CL-4B column을 통한 전체 용출 양상 분석

배양세포 중의 뮤신은, 성숙한 배양세포(24 well plate, 5×10^5 cells/well)에, $10 \mu\text{Ci/ml}$ 의 [6-3H] glucosamine을 함유하는 완전배양액을 well당 $200 \mu\text{l}$ 씩 가하고 32°C 에서 24시간 동안 배양함으로써 방사선 표지하였고, 방사선 표지가 완결된 후 spent medium은 수거해 따로 보관해 두었다. 배양세포에 well당 0.5 ml 의 PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사들을 제거한 뒤 최종 추출물 10, 20, 30, 40, 50, $60 \mu\text{l}$ 를 함유하는 PBS $200 \mu\text{l}$ 를 well마다 가하고 32°C 에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액(T sample)을 수거하였다. 수거된 모든 T sample들은 원심분리하여 부유세포, 기타 잔사를 제거하고, 얻어진 T sample을 $1.0 \times 50 \text{ cm}$ 규격의 sepharose CL-4B column에 적용하였다. 한 분획의 용량은 0.35 ml 로 하였고 뮤신이 용출되는 void volume뿐만 아니라 included volume과 total bed volume이 용출될 때까지 분획을 수거하였다. 각 분획에 scintillation cocktail을 첨가한 뒤 액체 섬광 계수기를 이용, 방사선량을 측정하였다. 대조 sample과 T sample을 대상으로, 뮤신 및 그보다 분자량이 작은, 표지된 여타의 당단백질들의 전체 용출양상에 미치는 영향을 비교하였다¹²⁻¹⁴⁾.

3) 적출 기관 평활근 수축도 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. 기

관을 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 5g 의 resting tension을 가하고, 37°C , 산소 공급 하에서 약 1시간 동안 15분 간격으로 세척하면서 안정화시켰다. 이 표본에 방금 조제된 acetylcholine 용액 $1 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$ 를 투여하여 최고 수축도를 측정한 다음, 세척하고, 15분간 안정화시켰다. 약물에 의한 기관 수축 억제 효과(기관 평활근 이완 효과) 측정은, Magnus 장치에 담긴 Tyrode solution 50 ml 당 각 방제 추출액 $50-500 \mu\text{l}$ 를 투여하고, 5분간 방치한 다음 acetylcholine 용액 $1 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$ 을 투여하여, 각 약물을 투여하기 전 acetylcholine 단독투여에 의한 수축도와 비교함으로써 시행하였다.

4) RT-PCR

(1) RNA의 분리

인간의 폐암 세포주인 NCI-H292 배양세포에서 total RNA를 분리하고자 INTRON biotechnology사의 Easy-Blue RNA extraction kit (total RNA isolation reagent)를 이용하였다. 즉, 배양된 NCI-H292 세포에 약물 추출액 $10 \mu\text{l}$ 를 함유하는 완전 배양액 $200 \mu\text{l}$ 를 well마다 가하고, 32°C 에서 24시간 동안 배양시킨 다음, 냉각된 PBS로 3회 세척하였다. 이어서, total RNA isolation reagent를 이용해 세포를 lysis시키고, 핵단백질을 완전히 분리해 내기 위해 상온에서 5분간 방치하였다. 5분 후 즉시, microtube에 chloroform를 첨가, 15초간 vortexing하고 상온에 2-3분간 방치한 후 4°C , $12,000 \text{ rpm}$ 에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 새 microtube에 옮겼다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 4°C , $12,000 \text{ rpm}$ 에서 15분간 원심분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 이 침전

물에 diethylpyrocarbonate (DEPC)가 함유된 80% ethanol 을 가하고 4℃, 7,500 rpm에서 5분간 원심분리함으로써 세척하였다. 수거된 RNA 침전물을 대기 중에서 건조시킨 후, RNase-free water로 부유시키고, spectrophotometer (DU-650)를 사용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도를 알아내어 실험에 사용하였다 (1.0A260 =single strand RNA 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)¹⁷⁾.

(2) Primer 제조

PCR에 사용된 primer는 전문 제조회사인 제노텍(주)에 주문, 합성하였다. MUC 5AC의 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5'-TCC GGC CTC ATC TTC TCC-3', antisense primer의 염기서열은 5'-GTC CGG CCT CTC CAA TCG-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.

(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 얻어진 total RNA 1 μg 을 94℃에서 5분간 가열함으로써 denaturation시키고, 이를 얼음에 담가 급냉시킨 후 RT premix kit의 사용자 설명서에 따라 역전사 반응을 진행시켰다. MUC 5AC 유전자에 대한 중합효소 연쇄반응(PCR)은, 역전사 반응에서 얻은 cDNA 산물 2 μl 를 PCR premix kit의 사용자 설명서에 따라 진행시켰다. 증폭반응을 위하여, PCR을 30회 실시하였으며, denaturation은 94℃에서 30초, annealing은 55℃에서 30초, extension은 72℃에서 30초간 각각 시행하였다.

(4) 전기영동

RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응으로 증폭된 cDNA 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC 5AC 유전자의 발현 정도의 변동을 관찰하였다. 즉, 증폭된 PCR 산물 10 μl 를 10×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 전기영동하였다. Gel 상에서 이동된 각각의 DNA band는 자외선 투사기 (ultraviolet transilluminator)를 이용하여 관찰하고, 사진 촬영하였다.

8) 젓산 탈수소효소 활성 측정(LDH activity assay)

배양세포 중의 뮤신은, 다 자란 배양세포(24 well plate, 5×10^5 cells/well)에, 10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 의 [6-3H] glucosamine을 함유하는 완전배양액을 well당 200 μl 씩 가하고 32℃에서 24시간 동안 배양함으로써 방사선 표지하였고, 방사선 표지가 완결된 후 spent medium은 수거해 두었다. 배양세포에 well당 0.5 ml의 PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 각 방제의 최종 추출물 10-80 μl 를 함유하는 PBS 200 μl 를 각각 well마다 가하고 32℃에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액 (T sample)을 수거하였다. 수거된 모든 sample 들은 원심분리하여 부유세포와 기타 잔사를 제거하고, 50 μl 의 상등액을 젓산탈수소효소 활성측정 (LDH activity assay)에 사용했다. LDH 활성측정은 LDH assay kit를 이용하였다¹²⁻¹⁴⁾.

9) NCI-H292 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향 측정

96 well plate의 각 well에 104개의 NCI-H292 cell을 함유하는 배양액 180 μl 를 가하여 37℃, 5% CO2 존재 하에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 NHH 추출물을 각각 20 $\mu\text{l}/\text{PBS}$ 200 μl , 2 μl

/PBS 200 μ l, 0.2 μ l/PBS 200 μ l의 농도로 배양세포의 well마다 가하고 48시간 동안 추가로 배양하였다. 배양이 완료된 후, 냉각된 50% trichloroacetic acid (TCA) 50 μ l를 각 well에 서서히 가해 주었다. 10분 후에 4 $^{\circ}$ C 조건의 냉장고에 옮겨 1시간 동안 충분히 세포들을 고정시키고, 고정이 완료된 후 각 well에 존재하는 액체 성분들을 전량 흡인배출한 후에 well 당 250 μ l의 증류수를 이용, 5회 이상 세척하였다. 이렇게 준비된 세포에, acetic acid에 용해된 0.4% SRB 용액 100 μ l/well을 가하고 실온에서 45분 동안 염색하였고, 재차 suction 후 100 μ l의 1% acetic acid를 이용, 5회 이상 세척한 후 세포들을 건조시켰다. 각 well 당 150 μ l의 10 mM unbuffered Tris용액으로 SRB를 잘 녹여낸 후, 흡광분석 측정장치(microplate reader)로 540 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다¹⁸⁾.

10) 통계처리

측정 결과는 mean \pm SEM으로 계산한 후, 약물 처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타냈다. 통계처리는 unpaired Student's t-test로 하였으며, p<0.05인 경우에 통계적으로 유의성이 있

는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 뮤신 분비에 미치는 영향

冷哮丸(NHH)은 최종 추출물 10, 20, 40, 80 μ l /200 μ l PBS의 투여 농도 범위에서 뮤신 분비를 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 1).

2. Sepharose CL-4B column을 통한 전체 용출 양상

冷哮丸(NHH) 80 μ l/PBS200 μ l 처리 시, NHH는 주로 뮤신의 분비에 영향을 주며, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2).

3. 적출 토끼 기관평활근의 수축도에 미치는 영향

冷哮丸(NHH)은 최종 추출물 500 μ l/Tyrode solution 50 ml의 투여농도에서, 10-4 g/ml 농도의 acetylcholine으로 유발된 적출 토끼 기관평활근 수축을 43% 가량 억제하였다(Fig. 3).

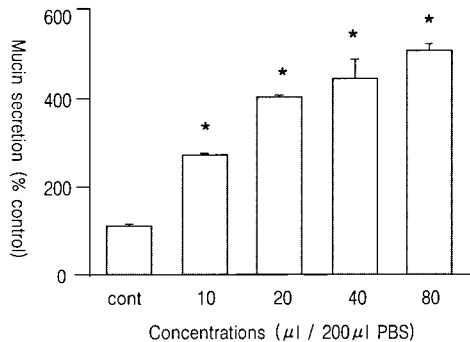


Fig. 1. Effect of NHH on mucin release from cultured HTSE cells.

Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with 3H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of NHH 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 control(p<0.05).

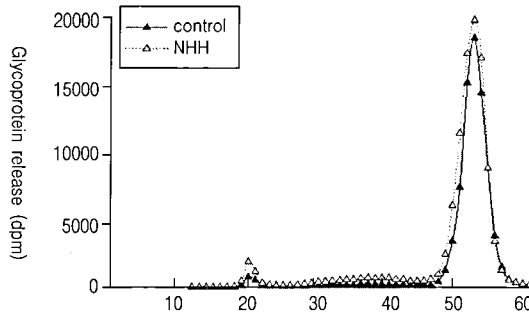


Fig. 2. Effect of NHH on total elution profile of treatment sample through sepharose CL-4B column. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of JHT $80 \mu\text{l}/\text{PBS}200\mu\text{l}$ and total elution profiles of 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

NCI-H292 세포에서 호흡기 뮤신의 대표적 유전자인 MUC5AC mRNA의 발현에 있어 冷哮丸은 total RNA의 추출 과정 및 PCR 반응 과정 등에 대한 원인 미상의 억제 효과로 인해 24 시간의 약물투여 기간 동안 MUC5AC mRNA의 발현 수준에 대한 영향 탐색이 불가능하였다(Fig. 4).

5. LDH 분비에 미치는 영향

冷哮丸은 20, 40, 80 $\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ PBS의 투여 농도에서, 세포독성의 한 지표인 LDH 분비를 유의

성있게 증가시켰다(Fig. 5).

6. NCI-H292 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향

冷哮丸은 0.2 $\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ PBS의 투여 농도로 48 시간 동안 투여했을 때, NCI-H292 세포의 생존 및 증식을 30% 가량 억제하였다(Fig. 6).

고 찰

체내의 모든 비생리적 체액을 지칭하는 痰飲의 개념 중에서 협의의 痰飲에 해당하는 객담은 호흡

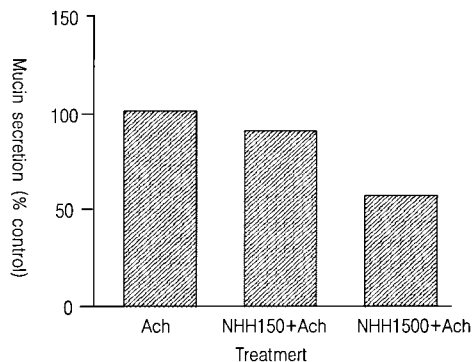


Fig. 3. Effect of NHH on contractility of isolated tracheal smooth muscle. Isolated tracheal smooth muscle of rabbit was prepared and effect of NHH extract on acetylcholine-induced contraction was measured as described in materials and methods. (Ach ; acetylcholine)

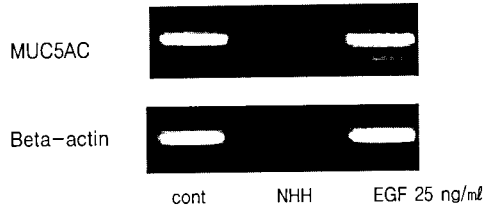


Fig. 4. Effect of NHH on MUC5AC gene expression in cultured NCI-H292 cells. NCI-H292 cells were incubated with the indicated concentration of NHH for 24 hrs. Total RNA was isolated and MUC5AC mRNA levels were analyzed by RT-PCR. The PCR products were separated on 1.0% agarose gel and stained with ethidium bromide, as described in Materials and Methods. (cont ; negative control, EGF ; positive control that enhance MUC5AC gene expression)

도에서 분비되는 점액이 주성분으로 정상상태에서는 침입한 이물이나 병원체를 흡착하여 섬모운동을 통해 인후두부로 옮겨져 반사기능에 의해 외계로 배출되거나 연하된다¹¹⁾. 한의학에서의 객담의 종류에는 風痰, 寒痰, 濕痰, 熱痰, 燥痰, 鬱痰, 氣痰 등이 있으며 서양의학에서는 점액성, 장액성, 화농성, 혈성으로 분류한다^{11,19)}. 객담의 구성요소인 뮤신의 양과 질의 이상으로 객담이 증가하면 호흡기질환의 병적 상태를 증가시키는데, 감염의 위험이 높아지고 기류폐쇄를 가져오며 객담의 만성적 증가는 사망 위험을 증가시킨다^{20,21)}. 서양

의학에서 호흡기 뮤신의 분비를 증가시키는 것으로 알려진 물질로는 ATP, TNF-alpha 등의 인체의 염증 진행과정에서 확인되는 내인성 물질²²⁾ 및 염화암모늄, 요오드화칼륨, bromhexine, ambroxole 등의 약물이 있으나, 뚜렷한 거담효과를 나타내면서도 임상에서 적절히 활용하기에는 여러 가지 문제점이 있는 것으로 알려져 있다²³⁾.

冷哮丸은 《張氏醫通》⁵⁾에 처음 기재된 처방으로 급성기 哮喘證의 寒痰에 溫肺散寒 定喘化痰의 목적으로 사용하는데¹¹⁾, 원방에서는 14兩을 분말하여 哮喘證의 급성기에 한번에 2錢을 生薑煎湯

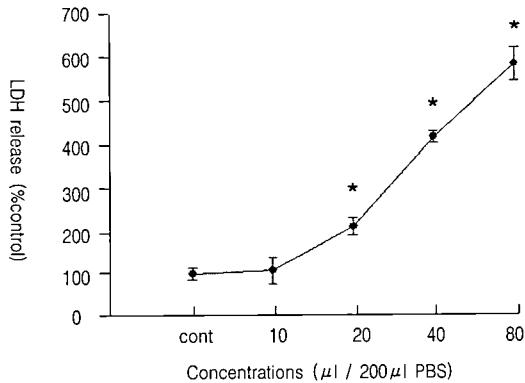


Fig. 5. Effect of NHH on LDH release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of NHH extract for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean±S.E.M. from 4 culture wells. *: significantly different from control(p<0.05).

에 복용토록 하였으나⁵⁾, 본 실험에서는 원방의 1/10분량에 생강 8g을 더하여 총 64g을 탕전하여 사용하였다. 처방의 내용과 구성약물의 효능을 보면 麻黃, 細辛, 生薑은 解表시키고 川烏, 蜀椒는 溫裏시키며, 半夏, 南星, 紫苑, 款冬花, 杏仁은 化痰止咳시키고, 白礬은 燥濕化痰시키고, 皂莢은 活血祛痰시키고, 甘草로 和解시킴²⁴⁾으로써 中外皆寒으로 인해 頑痰이 結聚되어 胸膈痞滿, 倚息不得臥하는 증상을 치료하여⁵⁾ 哮喘證, 喘證, 痰盛咳嗽 등의 급성호흡기질환에 응용할 수 있다⁶⁾.

최근 한약처방이 호흡기 객담분비에 미치는 영향에 대한 연구로 小青龍湯과 加味治哮喘⁷⁾, 清金降火湯과 瓜蒌枳實湯⁸⁾, 杏蘇湯과 加味八味丸⁹⁾, 定喘化痰湯¹⁰⁾, 加味腎氣湯과 加味清肺湯¹¹⁾ 등을 대상으로 하는 연구가 진행되었으나 寒痰型의 實證哮喘에 사용하는 冷哮丸을 대상으로 한 연구는 없었다.

이에 저자는 冷哮丸의 점액분비 조절과 관련된 효능을 규명하고자 일차배양 헵스터 기관표면 상피세포를 이용하여 뮤신 분비 및 생성에 미치는 영향, 호흡기 뮤신의 유전자인 MUC5AC mRNA의 발현에의 영향, 적출된 토끼 기관 평활근의 수축도에 미치는 영향 및 세포독성 등을 측정하였다.

뮤신분비에 대한 영향에서 冷哮丸은 10, 20, 40, 80 $\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ PBS의 투여농도에서 뮤신분비를 유의성있게 증가시켰다(Fig. 1). 이러한 결과는 冷哮丸이 기도객담의 배출을 자극함으로써 천식, 만성기관지염 등의 호흡기 질환에서의 증상을 개선시킬 가능성을 실험적 증거를 통하여 제시하고 있으며, 다양한 실험모델을 이용한 후속 연구의 필요성을 시사하고 있는 것이다.

다음으로 冷哮丸이 거대 당단백질인 뮤신의 분비에만 특이적으로 영향을 미치는지, 혹은 뮤신보다 분자량이 작고 구조도 다른 여타의 방사능 표지 당단백질들의 분비에도 영향을 미치는지 여부를 검증하고자 하였다. 방사성 뮤신을 함유한 HTSE 세포 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^{12,13)}.

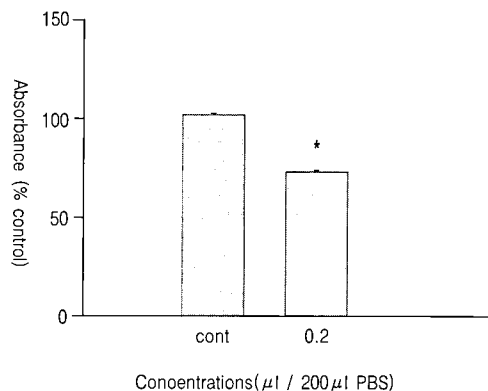


Fig. 6. Effect of NHH on survival and proliferation of NCI-H292 cells. NCI-H292 cells were treated with 0.2 μl NHH extract/200 μl PBS for 48 hrs. The number of cells survived was counted, as described in materials and methods.*: significantly different from control($p<0.05$).

실험결과 冷哮丸은 뮤신과 같은 거대분자가 용출되는 fraction에서만 영향을 나타내고, 여타의 fraction에서는 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않음을 알 수 있다(Fig. 2). 이러한 실험 결과는 冷哮丸이 뮤신과 같은 거대 당단백질의 분비에 주로 영향을 미칠 가능성이 높다는 것으로 다시 말해 뮤신 분비에 대한 작용에서 특이성을 나타냄을 의미하는 것이다.

또한 본 연구에서는 冷哮丸이 적출된 토끼 기관 평활근의 수축도에 미치는 영향을 검증함으로써 기관지 평활근 수축의 병태생리를 갖고 있는 천식과 같은 질환에서 冷哮丸이 기관 평활근 이완 효능이 있는가를 검증하고자 하였다. 실험결과 冷哮丸은 최종 추출물 500 μ l/Tyrode solution 50 ml의 투여 농도에서, 1×10^{-4} g/ml 농도의 acetylcholine으로 유발된 토끼 기관 평활근 수축을 43% 가량 억제하였다(Fig. 3). 이러한 실험결과는 冷哮丸이 직접적인 기관 혹은 기관지 확장효과를 나타냄으로써 항천식 효능을 발현할 가능성을 시사하는 것으로 볼 수 있다. 冷哮丸이 생쥐의 비장 B세포에서 CD23+, CD69+, IgE 발현을 억제하고, 알레르기 관련 사이토카인의 분비를 조절하고, B세포의 증식을 억제하고, histamine의 방출량을 억제하는 효과가 있다는 연구²⁵⁾가 있어 冷哮丸의 기관 평활근 수축 확장효과는 알레르기 반응을 억제하는 효능에 의할 것으로 예상할 수 있다. 그러나 항천식 효과에 대한 확정적인 정보를 얻기 위해서는 冷哮丸이 동물성 항원으로 유발된 천식 모델 흰쥐의 기도염증 및 기도저항에 미치는 영향 등을 규명하는 과정, 즉 in vivo에서의 항천식 활성 검증이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

다음으로 본 연구에서는 冷哮丸이 호흡기 상피 세포에서 이미 생성된 뮤신의 분비에만 영향을 미치는지 혹은 생성 단계 자체에서 뮤신 유전자의 발현에도 영향을 미치는지를 알아보려고 하였다. 그러나 NCI-H292 세포에서 호흡기 뮤신의 대표적 유전자인 MUC5AC mRNA의 발현에 대한 冷

哮丸의 영향을 알기 위한 실험에서 冷哮丸은 total RNA의 추출 과정 및 PCR 반응 과정 등에 대한 원인 미상의 억제효과로 인해 24시간의 약물투여 기간 동안 MUC5AC mRNA의 발현 수준에 대한 영향 탐색을 불가능하게 하였다(Fig. 4). 冷哮丸과 MUC5AC gene을 발현시키는 작용이 있는 것으로 알려진(positive control), EGF (epidermal growth factor) 25 ng/ml를 24시간 동안 NCI-H292 세포에 투여한 결과, EGF는 MUC5AC의 발현 수준을 완만하게 증가시키나, 冷哮丸 처리세포의 경우에는 RNA 추출 단계에서부터 冷哮丸이 비특이적인 방해작용을 나타내었을 가능성을 암시하고 있다. 따라서 MUC5AC mRNA의 발현에 대한 冷哮丸의 영향을 알기 위해서는 본 연구에서 사용된 세포주나 RT-PCR 반응 관련 조건들을 변경하면서 동일한 실험을 반복해 볼 필요가 있다고 생각된다.

또한 뮤신분비에 영향을 주는 冷哮丸이 동일한 세포에 대해 독성을 나타낼 가능성은 없는지 알아보기 위하여, 세포막 손상의 한 지표인 LDH 활성 측정을 실시하였다. 세포막 손상 시 분비되는 LDH의 활성 측정 방법은 세포독성 확인법 가운데 보편적인 방법으로 알려져 있다^{26,27)}. 실험결과 冷哮丸은 20, 40, 80 μ l/200 μ l PBS의 투여 농도에서 LDH 분비를 유의성 있게 증가시킴으로써 세포독성을 발현할 가능성을 보였다(Fig. 5). 한편 冷哮丸을 인간의 호흡기 상피세포주인 NCI-H292 세포에 저농도로 장기 투여시(48시간)에도 세포의 생존 및 증식에 완만한 억제효과를 보임으로써 이 방제가 세포독성을 나타낼 가능성을 암시하였다(Fig. 6). 그러나 본 연구에서의 독성시험 결과는 어디까지나 in vitro에서의 연구결과이고, 유 등²⁵⁾의 연구에서는 생쥐의 폐섬유아세포 (lung fibroblast cell)을 대상으로 한 세포독성에 미치는 영향에서 생존도의 농도의존적 감소는 있었으나 유의성은 없었다. 따라서 冷哮丸이 실제로 인체에 투여되는 것과 유사한 상황, 즉 in vivo 실험에서도 유의성 있게 독성이 발현되는가를 검증하는 등의 추가적인

연구가 반드시 필요할 것으로 사료된다.

이상을 종합하면 이상의 연구결과들은 冷哮丸이 호흡기 뮤신의 분비를 특이적으로 증가시키고, 동시에 기관 및 기관지를 확장시킬 가능성을 보여 줌으로써, 이 처방의 임상적 응용 범주에 대한 실험적 증거를 부분적으로 제시하고 있다고 할 수 있다. 향후 冷哮丸 자체 및 처방을 구성하는 각 본초를 대상으로 천식을 포함하는 다양한 호흡기 질환의 병태생리를 반영하는 in vivo 모델들을 이용하여 그 효능을 검증하는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

일차배양 햄스터 기관표면 상피세포를 이용하여 冷哮丸의 뮤신 분비 및 생성, 호흡기 뮤신의 유전자인 MUC5AC mRNA의 발현, 적출된 토끼 기관 평활근의 수축도 및 세포독성 등을 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 冷哮丸은 뮤신 분비를 유의성있게 증가시켰다.
2. 冷哮丸은 주로 뮤신과 같은 거대 당단백질의 분비를 감소시키며 그보다 크기가 작고 구조도 다른 당단백질들의 분비에는 영향을 미치지 않았다.
3. 冷哮丸은 토끼의 적출 기관 평활근의 수축을 43% 가량 억제하였다.
4. 冷哮丸은 LDH 분비를 유의성있게 증가시키고, NCI-H292 세포의 생존 및 증식을 유의성있게 억제하였다.

이상의 결과는 冷哮丸이 뮤신 분비를 증가시켜 호흡기 점액분비 조절약물 또는 새로운 거담제의 개발 가능성을 제시하고 있으며 향후 천식을 포함한 다양한 호흡기 질환의 병태생리를 반영하는 in vivo 모델들을 이용한 추가적 연구의 필요성을 제시하고 있다.

참고문헌

1. 심영수. 호흡기의 해부학적 구조:한용철편. 임상호흡기학. 서울:일조각. 1990:6-8.
2. 김영균. 숙주방어기전:대한결핵 및 호흡기학회 편. 호흡기학. 서울:군자출판사. 2004:55-6.
3. Rubin BK. Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care*. 2002;47(7):761-82.
4. 김세규, 장준. 호흡기 증상 완화제-진해제, 거담제, 항히스타민제-. 결핵 및 호흡기질환. 2006; 60(3):261-9.
5. 張璠. 張氏醫通. 상해:상해과학기술출판사, 1995: 177-770.
6. 전국한외과대학 폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울:한문회사. 2002:192-331.
7. 나도균, 이충재, 박양춘. 소청룡탕 및 가미치효산이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향. *동의생리병리학회지*. 2004;18(3): 734-9.
8. 이정은, 박양춘. 청금강화탕 및 과루지실탕이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향. *대한한방내과학회지*. 2004;25(2):238-44.
9. 임도희, 이정은, 한영주, 황지호, 조철준, 배한호, 박양춘. 행소탕 및 가미팔미환이 호흡기 배상세포로부터의 뮤신 분비에 미치는 영향. *대한한방내과학회지*. 2005;26(1):221-8.
10. 김준명, 이충재, 박양춘. 정천화담탕 등 수종 방제의 호흡기 객담분비 조절 효능에 관한 실험적 연구. *대한한방내과학회지*. 2006;27(1):126-37.
11. 한달수, 김윤희, 강탁림. 가미신기탕 및 가미청폐탕이 기도점액 분비 및 기관평활근 긴장도에 미치는 영향. *동의생리병리학회지*. 2006;20(1): 156-62.
12. Lee CJ. Specificity in the inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Appl. Pharmacol*. 2001;9(3):218-23.
13. Kim KC, Rearick JI, Nettesheim P, Jetten AM. Biochemical characterization of mucous

- glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial cells in primary culture. *Biol. Chem.* 1985;260:4021-7.
14. Kim KC. 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.
 15. Kim KC, Brody JS. Use of primary cell culture to study regulation of airway surface epithelial mucus secretion. *Symp Soc Exp Biol.* 1989; 43:231-9.
 16. Wu R, Smith D. Continuous multiplication of rabbit tracheal epithelial cells in a defined, hormone-supplemented medium. *In Vitro.* 1982;18:800-12.
 17. 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.
 18. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H et. al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990;1 4;82(13):1107-12.
 19. 정희재, 정승기, 이형구. 객담에 관한 동서의학적 문헌고찰. *대한한방성인병학회지.* 1995; 1(1):51-62.
 20. 차창룡. 호흡기의 숙주방어기전. 서울대학교의과대학. 호흡기학. 서울:서울대학교출판부. 1997: 47-8.
 21. Rubin BK. Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care.* 2002;47(7):761-8.
 22. Kim KC, Zheng QX, Van-Seuningen I. Involvement of a signal transduction mechanism in ATP-induced mucin release from cultured airway goblet cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;8(2):121-5.
 23. Mutschler E, Derendorf, H. Drug actions. Boca Raton: CRC press. 1995:410-1.
 24. 전국한의과대학본초학교수. 본초학. 서울:영림사. 2000:121-484.
 25. 유선웅, 박양춘. 생쥐의 B세포에서 anti-CD40 과 rIL-4로 유도된 Cytokine 생산과 IgE, Histamine에 대한 냉효환의 효과. *대한한방내과학회지.* 2005;25(2):245-57.
 26. Freshny RI. Measurement of viability and cytotoxicity. In: *Culture of animal cells.* 3rd ed. New York: Willey-Liss. 1994:288.
 27. Yu XY, Schofield BH, Croxton T, Takahashi N, Gabrielson EW, Spannhake EW. Physiologic modulation of bronchial epithelial cell barrier function by polycationic exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;11(2):188-98.