

Original Article

## Elastase로 유도된 폐손상에 대한 小青龍湯의 보호효과

이주관<sup>1</sup>, 양수영<sup>1</sup>, 김민희<sup>2,3</sup>, 남궁옥<sup>2,3</sup>, 박양춘<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실

<sup>2</sup>대전대학교 한의과대학 신경생리학교실

<sup>3</sup>대전대학교 동서생명과학연구원

### Protective Effects of Socheongryong-tang on Elastase-Induced Lung Injury

Ju-Guan Lee<sup>1</sup>, Su-Young Yang<sup>1</sup>, Min-Hee Kim<sup>2,3</sup>, Uk Nangung<sup>2,3</sup>, Yang-Chun Park<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Division of Respiratory System, Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

<sup>2</sup>Dept. of Neurophysiology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

<sup>3</sup>Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University

**Objective:** This study aimed to evaluate the protective effects of Socheongryong-tang (SCRT) on elastase-induced lung injury.

**Materials and Methods:** The extract of SCRT was treated to A549 cells and elastase-induced COPD mice model. Then, various parameters such as cell-based cytoprotective activity and histopathological findings were analyzed.

**Results:** SCRT showed a protective effect on elastase-induced cytotoxicity in A549 cells. This effect was correlated with analysis for caspase 3 levels, collagen and elastin contents, and gene expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in A549 cells. SCRT treatment also revealed the protective effect on elastase-induced COPD mice model. This effect was evidenced via histopathological findings including immunofluorescence stains against elastin, collagen, and caspase 3, and protein level of Cdc2, cyclin B1, and phospho-Erk1/2 in lung tissue.

**Conclusion:** These data suggest that SCRT has pharmaceutical properties on COPD. This study provides scientific evidence for the efficacy of SCRT for clinical application to patients with COPD.

**Key Words :** Socheongryong-tang, chronic obstructive pulmonary disease, A549 cell, elastase

### 서론

만성폐쇄성폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD)은 유해입자 또는 가스에 의한 비정상적 염증반응과 연관되어 비가역적인 기류제한이 나타나고 점차 진행되는 특징을 지닌 만성질환이다<sup>1)</sup>. 우리나라 성인 유병률이 7.8%에 이르며<sup>2,3)</sup>, 전 세계

적으로 사망 원인 4위에 해당하는 주요 질병으로 예방과 치료에 대한 중요성이 점점 높아지고 있다<sup>4)</sup>. 현재 COPD에 대한 약물치료는 증상을 완화하고, 급성 악화의 빈도를 감소시키며, 삶의 질과 운동 능력을 향상시키는 것을 목적으로 한다<sup>5)</sup>. 따라서 아직까지는 폐기능이 장기간에 걸쳐 지속적으로 감소되는 것을 직접적으로 막아주는 약제는 개발되지 못한

• Received : 19 May 2011

• Revised : 8 July 2011

• Accepted : 8 July 2011

• Correspondence to : 박양춘(Yang-Chun Park)

대전광역시 중구 대흥동 22-5 대전대학교대전한방병원 호흡기내과

Tel : +82-42-229-6919, Fax : +82-42-254-3403, E-mail : omdpyc@dju.kr

것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 따라서 COPD 환자의 질병 경과를 향상시킬 수 있는 좀 더 효과적이고 안전한 제제의 개발이 필요한 실정이다.

COPD에 대한 한약의 효과를 평가한 연구는 많지 않은 실정으로 金銀花가 lipopolysaccharide(LPS)로 유도된 COPD 동물모형에서 중성구와 염증 사이토카인의 발현 및 폐조직의 손상을 억제한다는 보고<sup>7)</sup>가 있었으며, 柴梗半夏湯이 LPS로 유발된 생쥐의 급성폐손상에서 cytokine 분비를 감소시켜 염증성 진행을 억제하는 효과가 있다고 보고되었고<sup>8)</sup>, 加味八味丸의 elastase로 유발된 A549 세포의 사멸양상과 염증반응에 대한 효과를 평가한 연구<sup>9)</sup>와 elastase 매개성 폐조직 손상에 대한 宣肺定喘湯의 보호효과를 평가한 연구<sup>10)</sup>가 있었다.

小青龍湯은 張<sup>11)</sup>의 《傷寒論》에 처음 수록된 처방으로 傷寒太陽病에 表邪가 不解한데 心下有水氣하고, 乾嘔發熱而咳하며 或渴 或痢 或吃 或小便不利 小腹痛 或喘者에 사용하였다. 또 解表散寒하고 溫肺化飲하는 효능이 있어 哮喘證의 치료와 만성기관지염, 기관지천식, 폐기종 등의 급성발작의 증상에 활용되고 있다<sup>12,13)</sup>.

小青龍湯에 대한 연구로는 천식동물모델을 이용한 연관 cytokines에 대한 실험 연구들<sup>14-18)</sup>과 환자 대상 임상연구들<sup>19-22)</sup>이 이루어졌으며, 상기도감염에 대한 연구<sup>23)</sup> 및 호흡기 배양세포에서의 뮤신분비에 대한 영향을 평가한 연구<sup>24)</sup>가 있었으나 COPD의 병리와 관련된 연구는 찾을 수 없었다.

이에 본 연구에서는 손상 폐조직에 대한小青龍湯의 보호효과를 조사하기 위하여 사람 폐포의 기저상피세포에서 유래된 A549 세포주와 elastase의 기도흡입 동물모델에서 세포의 생존 혹은 사멸에 관련된 단백질 인자들의 생성수준에 대하여 western blot 분석과 면역형광염색 분석을 통하여 조사하였고, 염증관련 cytokines에 대한 영향을 역전사 중합효소연쇄반응을 이용하여 평가하였다. 본 연구결과小青龍湯은 다양한 수준에서 손상자극에 노출된 폐조직 세포에 대한 보호효과를 나타냄을 확인하였기에 보고하는 바이다.

## 실험

### 1. 재료

#### 1) A549 세포

사람의 폐포 기저 상피세포에서 유래된 aneuploid cell line인 A549 세포(Korean Cell Line Bank, Korea)를 사용하였다.

#### 2) 동물

Albino ICR 계열의 7주령 수컷 생쥐로서 고품 사양과 물을 제약 없이 섭취하도록 하였으며, 온도는 22-24°C, 습도는 50±10%가 유지되도록 하고, 조명은 밤낮 주기(12시간 주/야)가 조절되는 실험실 환경에서 사육하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리위원회의 규정에 따라 시행되었다(승인번호: DJUAR2010-008).

#### 3)小青龍湯의 구성

小青龍湯(Socheongryong-tang; SCRT)의 구성 약물은 (주) 휴먼허브(Gyeongbuk, Korea)에서 지원받아 사용하였으며, 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

#### 4) 시료의 추출

小青龍湯 4첩 분량(160 g)에 증류수 1,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 동안 가열하여 얻은 액을 여과하였다. 이를 감압 증류장치(Buchi B-480, Switzerland)로 농축하고, 다시 동결 건조기(Eyela FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 추출물을 냉동(-84°C) 보관하면서 생리식염수에 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.小青龍湯의 초기 약재 160 g 으로부터 26 g의 추출물을 얻어 16 %의 수율을 나타내었다.

#### 5) 시약

Elastase(Sigma, USA), anti-elastin rabbit polyclonal antibody(Calbiochem, USA), monoclonal anti-collagen(Sigma, USA), cleaved caspase 3(Cell Signaling

**Table 1.** The Composition of *Socheongryong-tang* (SCRT)

Herbal name	Pharmacognostic name	Lot No.	Country of origin	Amount (g)
麻黃	Stem of <i>Ephedra sinica</i>	M011005	China	6.0
白芍藥	Root of <i>Paeonia lactiflora</i>	J031008	Gyeongbuk, Korea	6.0
五味子	Fruit of <i>Schizandra chinensis</i>	A151008	Gyeongbuk, Korea	6.0
半夏	Tuber of <i>Pinellia ternata</i>	B031003	China	6.0
細辛	Root of <i>Asiasarum heterotropoides</i> var. <i>mandshuricum</i>	S381004	China	4.0
乾薑	Scaled rhizoma of <i>Zingiber officinale</i>	K021008	Chungnam, Korea	4.0
桂枝	Bark of <i>Cinnamomum cassia</i>	K031006	Vietnam	4.0
甘草	Root of <i>Glycyrrhiza uralensis</i>	K370910	China	4.0
Total amount				40.0

Technology, USA), fluorescein goat anti-mouse IgG (Invitrogen, USA), rhodamine red-X goat anti-rabbit IgG(Invitrogen, USA), Hoechst 33258(Invitrogen, USA), anti-cyclin B1 developed in rabbit IgG fraction of antiserum(Sigma, USA), polyclonal anti-cdc2 (1:1,500, Santa Cruz Biotechnology, USA), phospho-p44/42 Erk1/2 kinase antibody(1:4,000, Cell Signaling Technology, USA), p44/42 Erk1/2 kinase antibody (1:4,000, Cell Signaling Technology, USA), actin (MP Biomedicals, USA), goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, USA) 등을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) *In vitro* 실험

#### (1) 세포 배양

A549 cell은 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS)과 penicillin(100 units/ml)/streptomycin (100 µg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 media(Lonza, USA)로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. Cell은 75 cm<sup>2</sup> flask(SPL, Korea)에서 충분히 증식시킨 후, 3일 간격으로 계대 배양하였다.

#### (2) 세포 독성 및 생존율

MTT[3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltet

razolium bromide] 환원법을 이용하여 측정하였다. 먼저 96 well plate에 1 × 10<sup>5</sup> 개의 A549 cell을 분주하고, 세포 독성 평가에서는 (i) 정상군(생리식염수)과 (ii) 실험군(小青龍湯 추출물 각각 0.1, 0.3, 0.5, 1mg/ml 처리)으로 나누었고, 세포 생존율 평가에서는 각 군을 (i) 정상군(생리식염수), (ii) 대조군(elastase 1 unit 처리), (iii) 실험군(elastase 1 unit와小青龍湯 추출물 0.3 또는 0.5 mg/ml 처리)으로 나누어, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간동안 배양하였다. 각 well에 MTT solution을 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포의 생존율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = \frac{\text{대조군 또는 실험군의 흡광도}}{\text{정상군의 흡광도}} \times 100$$

#### (3) 면역형광염색

이중 면역형광 염색법(double immunofluorescence staining)을 수행하기 위하여, 유리 coverslip을 poly-L-ornithine 0.1 mg/ml(Sigma, USA)과 laminin 0.02 mg/ml(Collaborate Research, USA) 용액에 넣어 실온에서 pre-coating 하였다. 1 × 10<sup>5</sup> 개의 A549 cell을 pre-coating된 coverslip에 분주하고, (i) 정상군(생리식염수), (ii) 대조군(elastase 1 unit 처리), (iii) 실험군(elastase 1 unit와小青龍湯 추출물 0.5 mg/ml 처

리)으로 나누어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. Coverslip 표면에서 자란 세포를 4% paraformaldehyde/4% sucrose가 혼합된 인산완충용액(phosphate buffer saline; PBS)으로 상온에서 40분 동안 고정하였다. 비특이적 결합을 막기 위해 blocking buffer에 담근 후 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 1차 항체는 2.5% bovine serum albumin(BSA) 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 정해진 비율로 혼합하여 처리한 후, 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 PBST(PBS plus 0.1% triton X-100)로 조직을 씻어내고, 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 Fluorescein-goat anti-mouse antibody(green)와 Rhodamine-goat anti-rabbit antibody(red)를 1:400으로 혼합하여 암실에서 1시간 30분 동안 2차 항체를 처리하였다. 2차 항체 처리 후 3회에 걸쳐 PBST로 세척하였다. Hoechst 핵염색을 수행하는 경우 2회 세척 후 0.25% Hoechst 33258 형광염료를 함유한 PBST 용액으로 처리 후 다시 PBST 용액으로 세척하였다. 2차 항체는 빛에 민감하기 때문에 반응시간 동안 암실에서 수행하였다. 염색된 세포들은 형광현미경(Zeiss fluorescent microscope)을 통해 관찰하였고, 디지털 카메라로 찍은 모든 images는 Adobe Photoshop(version 5.5)을 이용하여 green과 red의 밝기와 강도를 같은 비율로 조절하여 관찰하였다. 그리고 Photoshop program의 Layer blending mode options를 이용하여 images를 중복시켜 관찰함으로써 각 단백질의 발현 위치를 관찰하였다. 본 실험에 사용한 1차 항체는 anti-elastin rabbit polyclonal antibody(1:500, Calbiochem, Germany), monoclonal anti-collagen(1:400, Sigma, USA), 그리고 cleaved caspase-3 antibody(1:500, Cell Signaling Technology, USA) 등 이었다.

#### (4) Western blot 분석

A549 세포를 60 mm culture dish에  $2 \times 10^5$  cells/ml 로 분주한 후 (i) 정상군(생리식염수), (ii) 대조군(elastase 1 unit 처리), (iii) 실험군(elastase 1

unit와 小青龍湯 추출물 0.3 또는 0.5 mg/ml 처리)으로 나누어 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양한 A549 cell은 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.4)가 함유된 PBS로 씻은 후 50 - 200  $\mu$ l의 triton lysis buffer(20 mM Tris, pH 7.4, 137 mM NaCl, 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, pH 7.14, 2 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 2  $\mu$ M benzamidin, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF)에 담가 초음파 분해하였다. 그 다음 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 그 중 10  $\mu$ g 단백질을 western blot 분석에 사용하였다. 정량한 단백질은 12% SDS-polyacrylamide gel(1.5M Trisma base, 10% sodium dodecyl sulfate, 30% acrylamide, 10% ammonium sulfate, TEMED) 상에서 전기영동시킨 후 PVDF membrane(Pall Corporation, USA)에 전기이동 시켰다. Antibody와의 비특이적 결합을 막기 위해 3% BSA, 0.1% Tween 20을 함유하고 있는 TBS buffer에서 membrane을 1시간 동안 상온 반응시키고 4°C에서 16시간 동안 blocking buffer 상에서 반응을 진행하였다. 반응을 끝낸 membrane을 washing한 후 1차 항체를 blocking buffer(1  $\times$  TBS buffer, 3% BSA, 0.1% Tween 20)에 정해진 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 그 다음 membrane을 씻어내고 goat anti-rabbit IgG(Santa Cruz Biotechnology, USA) 또는 anti-mouse IgG(Santa Cruz Biotechnology, USA)가 결합되어 있는 horseradish peroxidase를 1:2000의 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 처리하고 다시 한 번 씻어냈다. 마지막으로 membrane에 부착된 단백질을 western blotting detection system을 이용하여 측정하였으며 Kodak Scientific Imaging Film(Eastman Kodak Co., USA)에 감광 하였다. 본 실험에 사용한 1차 항체는 anti-elastin rabbit polyclonal antibody(1:1,000, Calbiochem, Germany), monoclonal anti-collagen(1:400, Sigma, USA), anti-cyclin B1(1:1,500, Sigma, USA), polyclonal anti-cdc2(1:1,500, Santa Cruz,

biotechnology, USA), cleaved caspase-3 antibody (1:1,500, Cell Signaling Technology, USA), phospho-p44/42 Erk1/2 kinase antibody(1:4,000, Cell signaling Technology, USA), p44/42 Erk1/2 kinase antibody (1:4,000, Cell signaling Technology, USA), actin (1:15,000, MP Biomedicals, USA) 등 이었다.

(5) RNA 추출 및 RT-PCR 실험

A549 Cell을 60 mm culture dish에  $2 \times 10^5$  cells/ml 로 분주한 후 (i) 정상군(생리식염수), (ii) 대조군 (elastase 1 unit 처리), (iii) 실험군(elastase 1 unit와 小青龍湯 추출물 0.3 또는 0.5 mg/ml 처리)으로 나누어 24시간 동안 배양하였다. RNA는 약제 처리 후 24시간 뒤에 easy-BLUE 시약(Intron Biotechnology, Korea)을 사용하여 분리하였다. 배양된 세포에 1 ml의 easy-BLUE 시약을 넣고, 상온에서 10초간 세포를 용해시킨 후, 여기에 200  $\mu$ l의 chloroform을 추가하여 잘 혼합한 후 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리 하였다. 분리된 상층액 400  $\mu$ l에 동일한 양의 2-propanol을 첨가하고 상온에 10분간 방치시킨 후, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 분리된 RNA는 1 ml의 75% ethanol을 첨가하여, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 75% ethanol을 제거한 뒤, diethylpyrocarbonate(DEPC) 첨가된 증류수에 용해시킨 후 260 nm에서 흡광도를 측정하고, 농도를 정량하여 실험에 사용하였다. cDNA 합성은 1  $\mu$ g oligo-dT와 역전사효소(MMLV-RT, Promega, USA)를 사용하여 합성하였다. PCR은 Taq polymerase (Promega, USA)와 각각의 특이 primer를 이용하여 실험하였으며, PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C-5min, 94 $^{\circ}$ C-30sec,

55 $^{\circ}$ C-30sec, 72 $^{\circ}$ C-30sec, 72 $^{\circ}$ C-7min으로 30 cycle로 진행하였다. 실험에 사용된 primer는 IL-1 $\beta$ (Bioneer, Korea)와 TNF- $\alpha$ (Bioneer, Korea) cDNA에 대응하는 서열로 합성하였다(Table 2).

2) *In vivo* 실험

(1) Elastase 폐손상 모델

7주령 albino ICR계 수컷 생쥐에 대해 elastase를 기도에 0.4 unit의 농도로 100  $\mu$ l 흡입시킨 후 2일 동안 경과를 지켜본 후 폐조직 손상을 유도하였다. Elastase는 마취를 약간만 시킨 후 움직임이 없을 때 생쥐의 앞니를 고정시킨 상태에서 코에 elastase를 흡입시켰다. 각 군은 (i) 정상군(멸균 증류수 100  $\mu$ l 경구투여), (ii) 대조군(elastase 0.4 unit, 100  $\mu$ l 흡인 및 멸균 증류수 100  $\mu$ l 경구투여), (iii) 실험군 (elastase 0.4 unit, 100  $\mu$ l 흡인 및 小青龍湯 추출물 400 mg/kg, 100  $\mu$ l 경구투여)으로 나누었다. 실험이 끝난 후 각 군 생쥐의 폐조직을 분리하였다.

(2) Hemotoxylin & Eosin 염색

폐조직은 -20 $^{\circ}$ C에서 냉동시킨 후 cryostat를 이용하여 20  $\mu$ m의 두께로 잘라 슬라이드에 붙였다. H & E staining을 실시하기 위하여 슬라이드를 hematoxylin에 1분 동안 담가 둔 후 흐르는 증류수에 여러 번 세척 후 eosin에 30초간 담그고 흐르는 증류수로 여러 번 세척하였다. 그 다음 50%, 70%, 95% ethanol에 순서대로 여러 번 씻으며 염색을 적당히 제거한 후 xylene에 1분간 담가두었다. 마지막으로 gelatin mount medium을 이용하여 cover-slide를 영구 부착하였으며, 이러한 샘플들은 광학현미경(Nikon, Japan)

Table 2. Primer Sequences

Target Gene		Primer Sequence	Product Size (bp)
IL-1 $\beta$	Forward	GCT GAT GGC CCT AAA CAG	672
	Reverse	GAA GAC GGG CAT GTT TTC	
TNF- $\alpha$	Forward	AGC CCA TGT TGT AGC AAA CC	516
	Reverse	GGT TGA GGG TGT CTG AAG GA	

을 통해 관찰하였다.

(3) 면역형광염색

생쥐 폐조직은 -20°C에서 냉동시킨 후 cryostat를 이용하여 20 μm의 두께로 잘라 슬라이드에 부착시켰다. 이중 면역형광 염색법(double immunofluorescence staining)을 수행하기 위해, 4% paraformaldehyde, 4% sucrose가 혼합된 인산완충용액(phosphate buffered saline; PBS)에 45분 동안 슬라이드를 넣어 조직을 고정하였다. 이후의 실험 과정은 *in vitro* 실험과정과 동일하였다.

(4) Western blot 분석

폐조직을 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.4)가 함유된 PBS로 씻은 후 50-200 μl의 triton lysis buffer(20 mM Tris, pH 7.4, 137 mM NaCl, 25 mM β-glycerophosphate, pH 7.14, 2 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 5 μg/ml leupeptin, 5 μg/ml aprotinin, 3 μM benzamidine, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF) 용액 하에서 분해하였다. 그 다음 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 15 μg의 단백질을 western blot 분석에 사용하였다. 이후의 실험 과정은 *in vitro* 실험과정과 동일하였다.

(5) 조직 sample의 현미경 분석

면역형광조직 및 H & E 염색조직은 Nikon 형광 현미경을 이용하여 분석한 후 현미경에 부착된 디지털 카메라로 이미지를 포착하여 ACT-1 software를 이용하여 분석하였다. 중첩이미지는 Photoshop 프로그램 상의 image blend 모드를 이용하여 분석하였다.

3) 통계분석

본 실험에서 얻은 결과를 one-way ANOVA(SPSS Ver 12.0)로 분석하였으며 Duncan의 방법으로 사후검정을 하였다. 대조군을 정상군과, 실험군을 대조군과 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. *In vitro* 성적

1) 세포 독성

A549 세포에 小青龍湯을 0.1 mg/ml에서 1.0 mg/ml 농도범위로 처리한 결과, 세포생존율은 아무것도 처리하지 않은 정상군에 비해 90-100%의 생존을 범위를 유지하여 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1A). Elastase 처리로 감소시킨 A549 세포의 세포 생존율에 대한 영향을 평가한 결과, elastase(1 unit)을 처리한 대조군의 세포생존율은 정상군에 비해 77% 정도

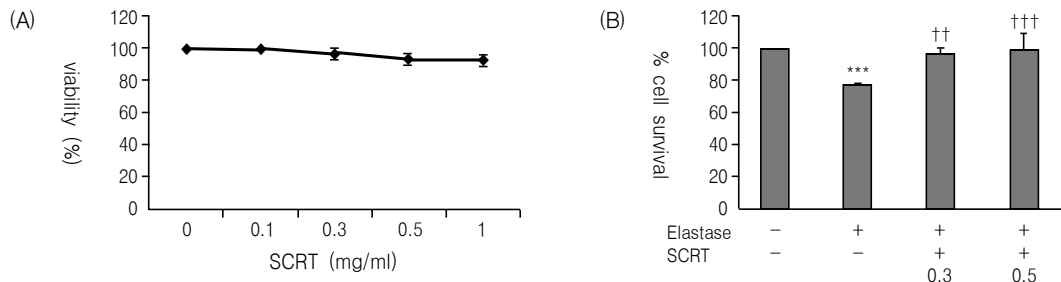


Fig. 1. Cytotoxicity of SCRT on proliferation of A549 cell. (A) A549 cells were treated with various concentrations of SCRT for 24 hr and harvested for MTT assay. Effects of SCRT on survival of A549 cell. (A) A549 cells were treated with elastase (1 unit) alone or elastase (1 unit) plus SCRT (0.3 mg/ml or 0.5 mg/ml).

\*\*\*: p<0.001 compared with normal by ANOVA test

† † † : p<0.001 † † † : p<0.001 compared with control by ANOVA test.

로 감소하였으나, elastase(1 unit)와 小青龍湯을 각각 0.3 mg/ml와 0.5 mg/ml 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 95% 이상으로 유의성 있게 회복되었다 (Fig. 1B).

2) Caspase 3 생성에 미치는 영향

Caspase 3 단백질의 생성여부의 관찰에서 먼저 A549 세포에 elastase(1 unit)를 처리한 후 caspase 3 단백질 생성에 양성반응을 나타내는 세포를 Hoechst 핵 염색 이미지와 비교한 결과, caspase 3 양성반응을 나타내는 세포들은 Hoechst 핵 염색시 수축되거나 조각난 형태를 나타내었다(Fig. 2A). 또한 정상군에서는 caspase 3에 양성반응을 나타내는 세포가 관찰되지 않았으나, elastase(1 unit)를 처리한 대조군에서는 양성반응을 나타내는 세포가 다수 관찰되었고, 小青龍湯(0.5 mg/ml)을 동시에 처리한 실험군에서는 caspase 3 양성반응 세포의 증가가 억제되었다 (Fig. 2B).

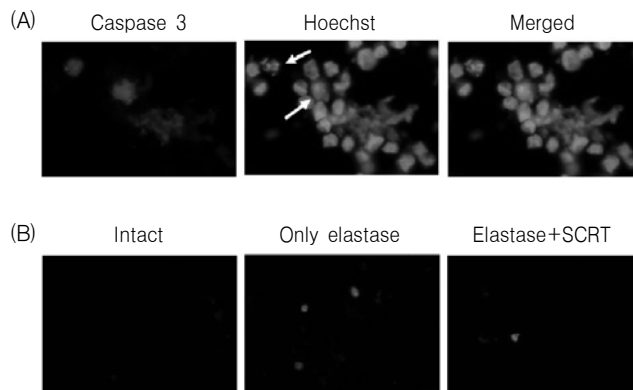
3) Elastin 생성에 미치는 영향

Elastin 분해에 대한 小青龍湯의 보호효과를 면역형광염색을 이용하여 관찰한 결과, 정상군의 경우 elastin 단백질은 세포질 부분에서 잘 관찰되었고,

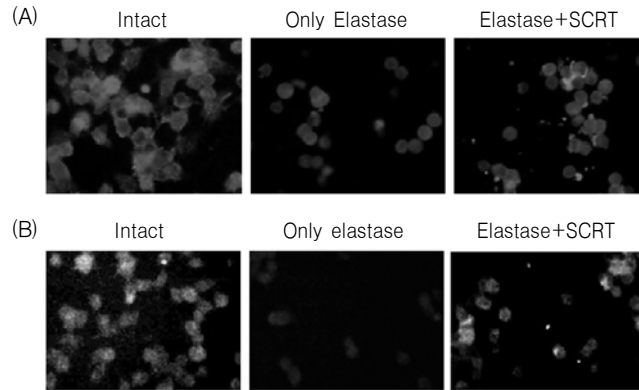
elastase(1 unit)를 처리한 대조군의 경우 염색된 정도가 감소되었으며, 小青龍湯(0.5 mg/ml)을 동시에 처리한 실험군에서는 elastin 발현의 감소가 억제되었다(Fig. 3A). Collagen 단백질의 분해에 대한 小青龍湯의 보호효과를 면역형광염색을 이용하여 관찰한 결과, elastase(1 unit)를 처리한 대조군의 경우 정상군에 비하여 collagen 단백질의 발현이 현저히 감소하였고, 小青龍湯(0.5 mg/ml)을 동시에 처리한 실험군에서는 collagen 단백질 발현의 감소가 억제되었다(Fig. 3B).

4) Cdc2 생성에 미치는 영향

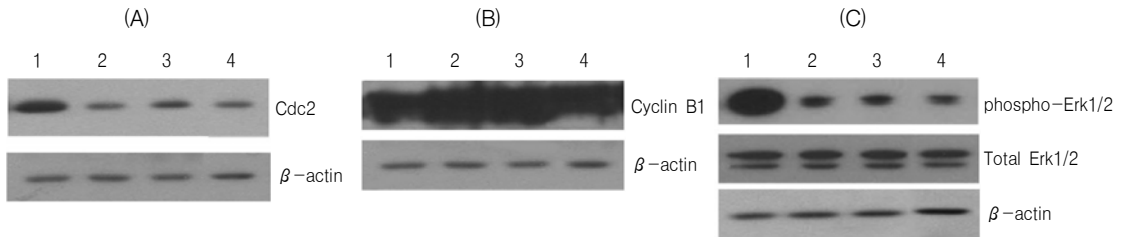
Cdc2 단백질 발현수준을 A549 세포에서 western blot 방법으로 관찰한 결과, elastase(1 unit)를 처리한 대조군에서는 정상군에 비하여 Cdc2 단백질의 발현이 현저하게 감소하였고, 小青龍湯(0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml)을 동시에 처리한 실험군에서는 대조군과 유사한 정도의 Cdc2 단백질의 발현이 나타났다(Fig. 4A). Cyclin B1 단백질 발현수준을 A549 세포에서 western blot 방법으로 관찰한 결과, 정상군, 대조군 및 실험군 모두에서 일정한 양으로 cyclin B1 단백질 발현이 나타나는 것으로 관찰되었다(Fig. 4B). Phospho-Erk1/2 단백질 발현수준을 A549 세포에서



**Fig. 2.** Effect of SCRT on elastase-induced apoptosis via immunofluorescence staining of caspase 3. (A) Nuclear identification of caspase 3-positive cells. A549 cells were treated with elastase for 24 hr and used for caspase 3 immunostaining (red) and Hoechst nuclear staining (blue). The nuclei positive to caspase 3 were marked by arrows in Hoechst-stained image. (B) A549 cells were treated with elastase (1 unit) or elastase (1 unit) plus SCRT (0.5 mg/ml) for 24 hr and used for caspase 3 immunostaining. Caspase 3-positive cells were identified in red color.



**Fig. 3.** Effect of SCRT on intra-cellular elastin (A) and collagen (B) level in elastase-treated A549 cells. A549 cells were treated with elastase (1 unit) or elastase (1 unit) plus SCRT (0.5 mg/ml) for 24 hr and used for elastin immunostaining.



**Fig. 4.** Effects of SCRT on Cdc2 (A), cyclin B1 (B) and phospho-Erk1/2 (C) protein level in elastase-treated A549 cells. A549 cells were cultured and treated with elastase or elastase plus SCRT for 24 hr. Cell lysate was used for western blot analysis for Cdc2, cyclin B1, phospho-Erk1/2 and total Erk1/2. Western blot analysis for actin protein was performed as an internal control. Lanes 1: intact control, 2: elastase (1 unit), 3: elastase (1 unit) plus SCRT (0.3 mg/ml), 4: elastase (1 unit) plus SCRT (0.5 mg/ml).

western blot 방법으로 관찰한 결과, elastase(1 unit)를 처리한 대조군에서는 정상군에 비하여 phospho-Erk1/2 단백질의 발현이 현저하게 감소하였고, 小青龍湯(0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml)을 동시에 처리한 실험군에서는 대조군과 유사한 정도의 phospho-Erk1/2 단백질의 발현이 나타났다(Fig. 4C).

5) 염증성 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향  
IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 발현 수준을 RT-PCR 방법으로 관찰한 결과, elastase(1 unit)를 처리한 대조군에서는 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 발현이 증가하였고, 小青龍湯(0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml)을 동시에 처리한 실험군에서는 IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$  발현의 증가를 억제시켰다(Fig.

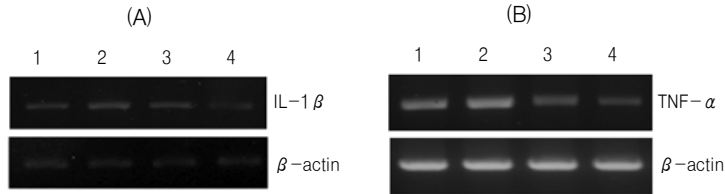
5A, 5B).

## 2. *In vivo* 성적

### 1) 조직학적 변화

정상 폐조직과 elastase, 그리고 elastase와 小青龍湯을 처리한 폐조직을 H&E 염색을 통해 비교하였다. 정상 폐조직에서는 작은 크기의 폐포가 균일하게 관찰된 반면, elastase(0.4 unit)를 처리한 대조군에서는 폐포가 크게 확장된 형태가 관찰되었다. Elastase(0.4 unit) 처리 후 小青龍湯(400 mg/kg, *p.o.*)을 7일간 투여한 실험군에서는 폐포 부분의 면적은 정상 폐조직에 비해 약간 확장된 형태이나 elastase 만 처리한 대조군보다는 확장된 크기가 작은 것으로





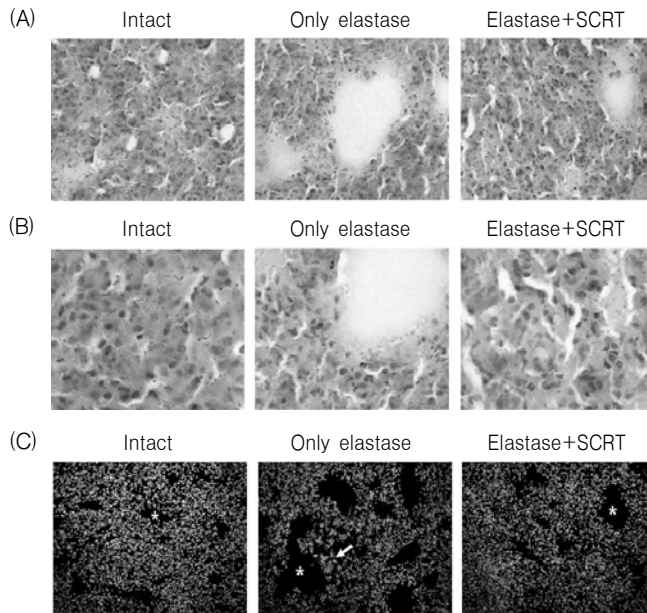
**Fig. 5.** Effects of SCRT on IL-1 $\beta$  (A) and TNF- $\alpha$  (B) mRNA expression in elastase-treated A549 cells. A549 cells were cultured and treated with elastase or elastase plus SCRT for 24 hr. RT-PCR analysis of IL-1 $\beta$  (A) and TNF- $\alpha$  (B) mRNA expression was performed with  $\beta$ -actin as an internal control. Lanes 1: intact control, 2: elastase (1 unit), 3: elastase (1 unit) plus SCRT (0.3 mg/ml), 4: elastase (1 unit) plus SCRT (0.5 mg/ml).

관찰되었다(Fig. 6A, 6B). 약물처리에 따른 세포수의 변화를 관찰하기 위하여 Hoechst 33258을 이용한 세포핵의 청색형광염색을 통해 분석하였다. 정상 조직의 경우 폐포 부분을 제외한 조직부위의 핵들은 일정한 분포를 나타내었으나, elastase(0.4 unit)를 처리한 대조군에서는 폐포 주변부위에서 부분적으로 높은 밀도를 나타내었다. Elastase(0.4 unit) 처리 후 小青龍湯(400 mg/kg, p.o.)을 7일간 투여한 실험군에

서는 염색된 핵의 밀도는 정상군과 유사한 수준으로 회복되었다(Fig. 6C).

## 2) Caspase 3 생성에 미치는 영향

폐조직의 단백질 추출물에 대하여 western blot 분석에서 단백질이 탐지되지 않았으나, 면역형광염색에 의하여 caspase 3 단백질을 관찰할 수 있었다. 아무것도 처리하지 않은 정상군에서는 단백질



**Fig. 6.** Histopathological analysis of lung tissues. Mice were inhaled with elastase (0.4 unit) once, and then treated with SCRT (400 mg/kg, p.o) or distilled water for 7 days. Lung tissues were examined under microscope after H & E staining (A: 200  $\times$  magnification, B: 400  $\times$  magnification) and Hoechst nuclear staining (C: 200  $\times$  magnification). Alveolar ducts are marked by asterisks, and the arrows indicate the densely stained area of nuclei.

신호가 관찰되지 않았으나, elastase(0.4 unit)를 처리한 대조군에서는 폐포 주변을 중심으로 뚜렷한 caspase 3 단백질 신호가 탐지되었으며, elastase(0.4 unit) 처리 후 小青龍湯(400 mg/kg, p.o.)을 7일간 투여한 실험군에서는 caspase 3 발현이 다소 약해지는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

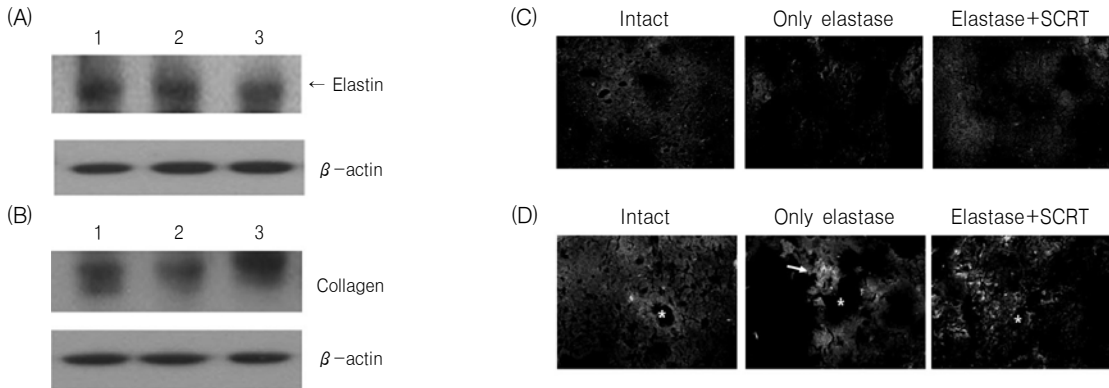
### 3) Elastin 및 collagen 생성에 미치는 영향

Western blot 분석에 의해 elastin 및 collagen 생성수준을 분석한 결과, elastin 단백질의 경우 폐손상을 유발하지 않은 정상군, elastase(0.4 unit)를 처리한 대조군, elastase(0.4 unit) 처리 후 小青龍湯

(400 mg/kg, p.o.)을 7일간 투여한 실험군 모두에서 elastin 단백질의 생성수준이 유사하게 나타나는 것으로 관찰되었으나, collagen 단백질의 경우 대조군에서는 정상군에 비하여 collagen 단백질 생성수준이 감소하였고, 실험군에서는 collagen 단백질의 생성수준이 증가되는 것이 관찰되었다(Fig. 8A, 8B). Elastin 및 collagen 단백질의 생성 및 분포를 면역형광염색방법에 의해 관찰한 결과, 정상군에서는 전체적으로 폐포 주변에 일정한 수준으로 elastin 및 collagen 단백질이 관찰되었으나, elastase(0.4 unit)를 처리한 대조군에서는 elastin 및 collagen 단백질 신호가 폐포 주변부와 같은 조직의 일부분에서만 강



**Fig. 7.** Immunofluorescence analysis for caspase 3 in lung tissue. Mice were inhaled with elastase (0.4 unit, 100  $\mu$ l) once, and then treated with SCRT (400 mg/kg, 100  $\mu$ l, p.o.) or distilled water (100  $\mu$ l, p.o.) for 7 days. The tissue was examined under microscope after immunofluorescence staining against caspase 3. Alveolar ducts are marked by asterisk, and the arrows indicate the densely stained area of caspase 3.



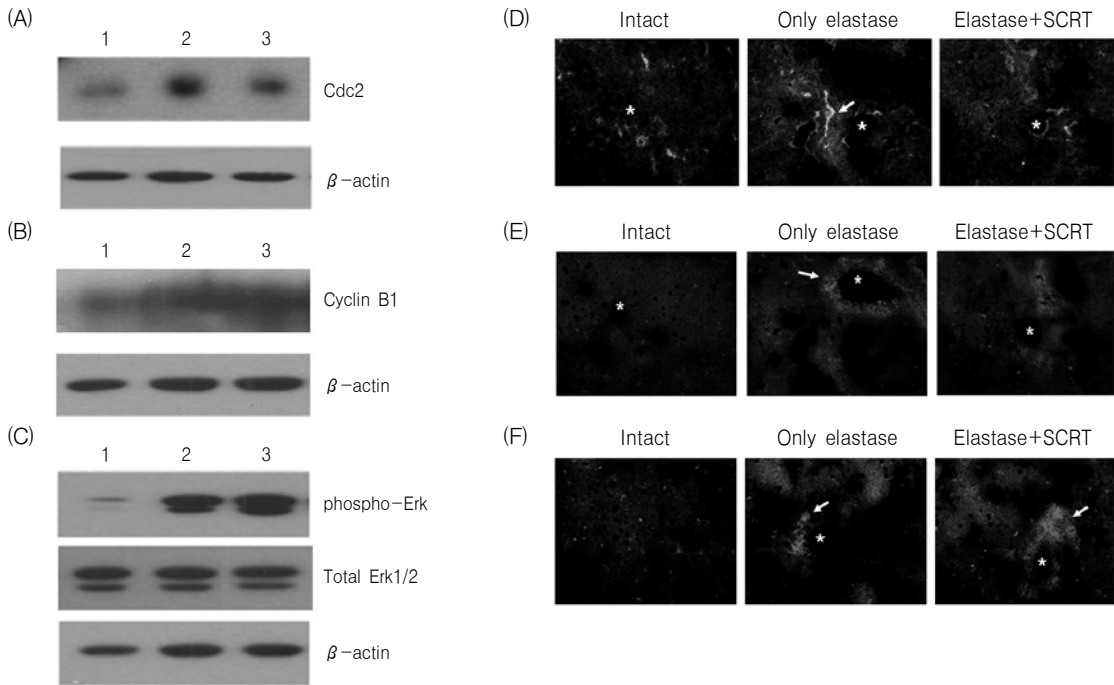
**Fig. 8.** Protein analysis for elastin and collagen in lung tissue. Mice were inhaled with elastase once, and then treated with SCRT or distilled water for 7 days. Elastin (A) and collagen (B) protein was analyzed as comparing to  $\beta$ -actin by western blotting. Lanes 1: distilled water (100  $\mu$ l, p.o.), 2: elastase (0.4 unit, 100  $\mu$ l, inhaled) plus distilled water (100  $\mu$ l, p.o.), 3: elastase (0.4 unit) plus SCRT (400 mg/kg, 100  $\mu$ l, p.o.). Immunofluorescence analysis for elastin in lung tissue. Mice were inhaled with elastase (0.4 unit, 100  $\mu$ l) once, and then treated with SCRT (400 mg/kg, 100  $\mu$ l, p.o.) or distilled water (100  $\mu$ l, p.o.) for 7 days. The tissue was examined under microscope after immunofluorescence staining against elastin (C) and collagen (D).

하게 관찰되었으며, elastase(0.4 unit) 처리 후 小青龍湯(400 mg/kg, *p.o.*)을 7일간 투여한 실험군에서는 정상군과 비슷한 형태로 조직 전체에 걸쳐 고르게 관찰되었으며 이때 collagen 단백질의 경우 발현정도는 조금 더 강하게 나타났다(Fig. 8C, 8D).

4) Cdc2, cyclin B1 및 phospho-Erk1/2 protein 생성에 미치는 영향

Western blot 분석으로 Cdc2, cyclin B1 및 phospho-Erk1/2 단백질 생성수준을 관찰한 결과, elastase(0.4 unit)를 처리한 대조군에서는 정상군에 비하여 Cdc2, cyclin B1 및 phospho-Erk1/2 단백질 생성수준이 증가하였고, elastase(0.4 unit) 처리 후

小青龍湯(400 mg/kg, *p.o.*)을 7일간 투여한 실험군에서는 Cdc2 단백질의 생성수준이 약간 감소한 반면 cyclin B1 및 phospho-Erk/2 단백질 생성수준은 대조군보다 더욱 증가하였다(Fig. 9A-C). Cdc2, cyclin B1 및 phospho-Erk1/2 단백질의 생성 및 분포를 면역형광염색방법에 의해 관찰한 결과, elastase(0.4 unit)를 처리한 대조군에서는 정상군에 비하여 Cdc2, cyclin B1 및 phospho-Erk1/2 단백질 신호가 폐포 주변부에서 강하게 관찰되었으며, elastase(0.4 unit) 처리 후 小青龍湯(400 mg/kg, *p.o.*)을 7일간 투여한 실험군에서는 Cdc2, cyclin B1 및 phospho-Erk1/2 단백질의 생성수준이 정상군과 비슷한 형태로 조직 전체에 걸쳐 고르게 관찰되었으며 발현정도는 조금



**Fig. 9.** Protein analysis for Cdc2, cyclin B1 and Erk1/2 in lung tissue. Mice were inhaled with elastase once, and then treated with SCRT or distilled water for 7 days. Cdc2 (A), cyclin B1 (B) protein and both protein of Erk1/2 and Phospho-Erk1/2 (C) were analyzed as comparing to  $\beta$ -actin by western blotting. Lanes 1: distilled water (100  $\mu$ l, *p.o.*), 2: elastase (0.4 unit, 100  $\mu$ l, inhaled) plus distilled water (100  $\mu$ l, *p.o.*), 3: elastase (0.4 unit) plus SCRT (400 mg/kg, 100  $\mu$ l, *p.o.*). Immunofluorescence analysis for Cdc2, cyclin B1 and phospho-Erk1/2 in lung tissue. Mice were inhaled with elastase (0.4 unit, 100  $\mu$ l) once, and then treated with SCRT (400 mg/kg, 100  $\mu$ l, *p.o.*) or distilled water (100  $\mu$ l, *p.o.*) for 7 days. The tissue was examined under microscope after immunofluorescence staining against Cdc2 (D), cyclin B1 (E), phospho-Erk1/2 (F). Alveolar ducts are marked by asterisk, and the arrows indicate the densely stained area of Cdc2, cyclin B1, phospho-Erk1/2.

더 강하게 나타났다(Fig. 9D-F).

### 고 찰

말초기도의 폐쇄, 폐의 탄성 소실과 과도한 팽창, 환기 장애, 가스교환장애, 혈류장애의 특징을 갖는 COPD는 한의학의 咳而上氣하고 煩燥하는 肺脹證과 呼吸促急한 喘證 및 喉中有聲響하는 哮喘證의 범주에 속한다<sup>13)</sup>. 이와 관련된 小青龍湯의 효능에 대한 연구로는 실험동물을 이용한 연구들<sup>14-18,24)</sup>과 임상연구<sup>19-22)</sup>에서 그 유효성을 보고하고 있다. 따라서 小青龍湯이 COPD의 병리학적 변화에도 의미 있는 효과가 있을 것으로 기대되었다.

COPD는 유해한 기체나 입자들의 흡입에 대한 폐의 염증반응에 의해 유발되며, 기도저항의 증가와 폐실질의 파괴로 인해 폐 탄성이 소실되어 비가역적인 기도폐쇄를 보이는 질환으로써, 그 진행이 서서히 진행되는 특징을 가지고 있다<sup>28)</sup>. 만성폐쇄성폐질환의 병리학적 변화는 근위부 중심성 기도, 소기도, 폐실질, 폐혈관 등에 걸쳐 분포하며, 만성적인 염증과 손상에 따른 폐실질의 파괴를 특징으로 한다<sup>29)</sup>. 이러한 병리학적 변화에서 단백질분해효소와 항단백분해효소의 불균형이 대표적인 기전으로 제시되고 있다<sup>30)</sup>. 이 기전의 핵심은 단백질분해효소와 항단백분해효소의 불균형으로 인해 발생하는 결합조직, 특히 elastin의 손상이다. Elastin은 폐조직에서 탄성을 유지하는 기본 요소이므로 elastin이 분해되면 폐조직의 탄성이 감소된다<sup>31)</sup>. 만성폐쇄성폐질환의 병리변화에서 중요한 역할을 하는 대식세포와 호중구는 elastin을 분해하는 elastase를 다량으로 분비한다. 또한 흡연으로 인한 산화 스트레스는 elastin을 포함한 폐포의 조직성분을 손상시킬 뿐만 아니라 이들의 합성과 복구를 저해함으로써 산화 스트레스가 COPD를 유발시키는 주요 요인이라 알려져 있다<sup>32,33)</sup>. 따라서 많은 연구에서 elastase의 활성도가 높을수록 폐조직의 구조적 변화를 일으켜 COPD를 유발한다고 생각되고 있다<sup>34-36)</sup>. 이에 따라 COPD에 대한 실험 연구에서도 elastase를 기도에 흡입시키거나 담배

연기를 흡입시키는 동물모델이 널리 이용되고 있다<sup>37)</sup>.

본 연구에서는 elastase의 직접적인 처리에 의한 세포손상을 유도하고, 小青龍湯을 처리할 경우 세포의 생존력이 어떻게 변하는지 알아보기 위해 *in vitro*에서는 배양세포를 이용하여, *in vivo*에서는 폐조직을 이용하여 생화학적 및 조직학적 분석을 실시하였다. *In vitro* 실험에 이용한 A549 세포는 human type II lung cell line으로서 폐조직의 유해자극에 대한 반응성의 연구에 가장 보편적으로 사용되는 세포주 중의 하나이다<sup>26)</sup>. 본 연구에 사용한 A549 세포는 세포증식이 대단히 활발하고 다양한 외부자극에 반응을 잘 나타내기 때문에 손상 후 小青龍湯 처리에 의한 반응성의 변화 등을 *in vitro* 상태에서 분석하기 유리하므로 사용하였다. 반면에 A549 세포의 외부자극에 대한 반응성이 *in vivo* 폐조직의 반응성과 다소 차이가 있을 수도 있으므로 elastase의 기도 흡입으로 COPD 양상의 폐손상을 유발시키는 동물 모델을 사용하였다.

먼저 A549 세포에 elastase 처리 후 MTT assay를 통해 세포생존율을 관찰한 결과, 생존율이 78% 이하로 감소하는 것을 확인하였고, 반면 세포사멸에 있어 apoptosis 과정과 밀접한 관련이 있는 caspase 3 단백질의 생성은 20%에 미치지 못하여 elastase로 인한 세포사멸에 있어 apoptosis 이외에 necrosis도 관여하고 있다고 사료된다. 동물모델에서는 elastase 흡입시킨 후 폐조직의 변화를 관찰한 결과, 폐포공간이 뚜렷하게 확장된 것을 확인할 수 있어 본 연구에서 실시한 elastase 흡입 동물모델이 COPD의 조직학적 특성을 잘 나타내는 것으로 평가되었다. 또한 폐포주변부에서 강한 hematoxylin 반응과 Hoechst 핵 염색반응을 나타내었는데 이는 침윤된 중성구 세포와 같은 염증매개성 침윤반응이 진행되고 있음을 알 수 있었다. 이러한 조직학적 변화와 함께 caspase 3 단백질의 양성반응은 elastase를 처리한 폐조직의 폐포 주변부에서 뚜렷하게 관찰되었다. 따라서 A549 세포나 폐조직에서 모두 elastase에 의해 COPD와 유사한 기전의 손상반응이 나타나는 것을 알 수 있었다. 이러한 손상 반응에 대해 小青龍湯을 처리한

실험군에서 A549 세포의 세포생존율이 정상군과 유사한 수준으로 회복되었고, caspase 3 양성반응을 나타내는 수준이 감소하였으며, elastase를 처리한 생쥐의 폐조직에서도 caspase 3 양성반응의 수준과 폐포의 크기도 정상군과 유사한 수준으로 관찰되었다. 따라서 小青龍湯이 elastase로 일으킨 폐조직세포의 병리학적 손상에 대해 보호작용을 한다고 사료되며, 특히 본 실험 병태 모델은 COPD중에서도 폐기종과 관련이 있으므로 폐기종 우세형 COPD에 더욱 유리할 것으로 판단된다. 또한 이러한 결과는 加味八味丸을 대상으로 A549 세포를 이용한 *in vitro* 연구 결과와도 일치하였다<sup>9)</sup>.

폐조직에서 탄성을 유지하는 elastin의 분해는 COPD 발생의 주요기전이며, elastin이 분해되면서 분리되는 desmosine이 COPD 환자의 소변에서 증가하는 연구결과<sup>38)</sup>도 이를 뒷받침하고 있다. 본 연구에서는 elastase 처리로 감소된 elastin의 발현이 小青龍湯의 투여로 일정하게 회복되는 양상을 보여 小青龍湯이 elastin의 분해를 억제하는 작용을 나타내는 것으로 생각된다. 또한 collagen 단백질은 조직 손상시 회복 과정에서 주로 섬유아세포에서 생성되거나 손상조직에 존재하는 collagen 섬유 분해반응도 일어난다고 알려져 있다<sup>39)</sup>. 본 연구에서는 대조군에서 collagen 생성수준이 정상군에 비해 감소되었고, 小青龍湯을 투여한 실험군에서는 collagen 생성수준이 증가하였다. 이러한 결과는 宣肺定喘湯이 elastin과 collagen의 감소를 억제하였던 결과와도 일치하는 것으로<sup>10)</sup> 小青龍湯이 collagen 합성과정 촉진 및 collagen 분해 억제를 통해 collagen의 생성을 증가시키는 작용을 나타내는 것으로 생각된다.

Elastase와 같은 외부자극에 대해 세포의 손상, 생존율, 그리고 사멸과 관련된 반응은 세포증식과정과 밀접하게 연관되어 있다. 일반적으로 폐조직을 포함한 외피세포들은 빠른 세포생성주기를 가지며, 외부의 유해한 자극에 대해 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다<sup>40)</sup>. 이러한 세포생성주기에서 Cdc2 kinase는 G2 phase-M기에 관여하여 세포의 증식을 촉진시킨다고 알려져 있다<sup>41,42)</sup>. 또한 Cdc2 kinase는 cyclin

B1 조절 단백질의 결합에 의하여 활성화되고 세포분열시 발생하는 주요변화에 관여하는 단백질들을 인산화시킴으로서 세포분열의 진행에 결정적 역할을 한다<sup>43-47)</sup>. 따라서 elastase로 유도되는 폐손상에서 발생하는 이러한 반응에 대한 小青龍湯의 영향을 알아보기 위해 세포증식과정에서 핵심적인 역할을 하는 Cdc2 kinase의 활성도를 Cdc2 및 cyclin B1 단백질의 생성 수준 관찰을 통하여 평가하였다.

A549 세포에 elastase를 처리하여 Cdc2 및 cyclin B1 단백질 생성수준을 관찰한 결과, Cdc2 단백질은 대조군에서는 정상군에 비해 약하게 발현되었고, 실험군에서는 대조군과 유사한 양상을 보였으며, cyclin B1의 생성은 세 군 모두 비슷한 수준으로 나타났다. 반면 폐조직에서는 조절이 다르게 진행되는 양상을 나타내고 있다. Cdc2 단백질은 대조군에서는 정상군에 비하여 증가하였고, 실험군에서는 감소하였으며, cyclin B1은 대조군에서는 정상군에 비하여 증가하였고, 실험군에서는 더욱 증가하는 양상을 나타내었다. 특히 면역형광염색에서 Cdc2와 cyclin B1 단백질이 정상군에서는 조직 전반에 걸쳐 나타나는데 비하여 대조군에서는 폐포 주변부에서 강하게 나타났고 실험군에서는 다시 조직 전반에 걸쳐 고르게 나타나는 양상을 보였다. 대조군의 경우 elastase에 의한 손상으로 증가된 염증반응 세포에서 Cdc2 및 cyclin B1 단백질의 발현을 증가시킨 것으로 보이며 이는 elastase 처리가 폐조직의 Hoechst 염색에서 폐포 주변부에 증가된 핵 염색을 보여 염증세포의 침윤을 나타낸 결과와도 부합되는 것으로 생각된다. 실험군의 경우 소청룡탕의 처리가 염증반응 세포의 감소와 전반적 조직에서의 Cdc2 및 cyclin B1 단백질 발현의 증가를 가져와 폐조직의 손상 억제와 재생 촉진을 유도하는 것으로 사료된다.

Elastase 및 小青龍湯 처리에 의한 세포생존력의 변화를 관찰하기 위해 생체 내에서 세포분화와 관련하여 Mitogen activated protein kinase(MAP kinase)의 하나인 Extracellular signal regulated kinase 1/2(Erk1/2) 단백질이 관련되어 있을 것으로 생각되어 폐조직내에서 Erk1/2 단백질의 활성도를 관찰하

였다. 일반적으로 MAP kinase는 세포증식, 세포주기 조절, 세포생존, 혈관신생, 세포의 이동 등에 관여하는 세포내 신호전달경로로서 Erk는 c-Jun N-terminal kinase(JNK)와 p38 kinase와 함께 MAP kinase 계열의 단백질 인산화 효소로서 세포외부에서 주어지는 성장인자 및 스트레스 등의 자극들에 대응하여 세포내부 기질 단백질들의 인산화를 통하여 활성도를 유도하는 단백질 집단이다<sup>48)</sup>. 이러한 단백질 인산화 효소들은 이들의 상위 단백질 인산화 효소에 의해 인산화된 후에 활성화되는데 상호 신호전달 경로를 공유하며 생리적 효과를 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>49,50)</sup>. 선행연구에 따르면 p38 kinase와 JNK 효소의 활성화는 외부 스트레스 자극에 대해 세포 자멸을 유도하는 반면, Erk1/2는 세포의 생존경로의 활성화와 관련되는 것으로 보고되었다<sup>51)</sup>. Erk1/2는 42 kDa과 44 kDa의 Erk1과 Erk2 효소를 총칭하고 있으며 이들 두 효소의 활성과 세포내 생화학적 효과가 거의 동일하여 함께 분석되고 있다. Erk1/2 단백질은 세포에서 항상 일정한 수준으로 발현이 되며 상위 MEK1/2 protein kinase에 의해 인산화된 후에 활성도를 나타낸다. 본 연구결과에서도 A549 세포와 생쥐의 폐조직 세포에서 Erk1/2 단백질은 모두 일정한 수준으로 생성되는 것을 확인하였다. A549 세포에서는 elastase를 처리한 대조군에서 phospho-Erk1/2 단백질의 생성수준이 정상군에 비하여 감소하였고, 실험군에서도 비슷한 생성수준을 보였다. 반면 *in vivo* 폐조직에서는 대조군에서 phospho-Erk1/2 단백질의 생성이 정상군에 비하여 증가하였고, 실험군에서는 더욱 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 변화는 침윤한 중성구 세포에 의해 활성도가 증가했을 것으로 사료되며 小青龍湯의 처리에 의해 폐조직 세포의 생존력이 증가하면서 phospho-Erk1/2 단백질의 수준이 더욱 증가한 것으로 사료된다.

Elastase 처리에 의해 염증반응 경로가 활성화된다고 제시하였으므로 그에 따라 대표적 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현을 관찰하였다. RT-PCR을 이용하여 유전자 발현을 관찰한 결

과, elastase 처리에 의해 두 염증 사이토카인 mRNA의 생성수준이 증가하였으며 小青龍湯 처리에 의해 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 小青龍湯은 elastase 처리에 의해 유도된 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 증가를 억제함으로써 폐손상에서 발생하는 염증반응을 감소시키는 것으로 생각된다.

## 결론

만성폐쇄성폐질환에 대한 小青龍湯(*in vitro*: 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml, *in vivo*: 400 mg/kg)의 폐손상 보호 효과를 평가하기 위해 elastase로 유도된 A549 세포 손상(*in vitro*)과 동물모델(*in vivo*)에서 조직학적인 변화와 관련된 단백질 및 사이토카인의 변화를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

### *In vitro*에서

1. 小青龍湯은 세포독성을 감소시켰다.
2. Elastin과 collagen 단백질의 감소를 억제시켰다.
3. Caspase 3 단백질 발현의 증가를 억제시켰다.
4. Phospho-Erk1/2 단백질 발현의 감소를 억제시켰다.
5. IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  유전자 발현의 증가를 억제시켰다.

### *In vivo*에서

6. 폐의 조직학적 손상을 억제시켰다.
7. Elastin 및 collagen 단백질 감소를 억제시켰다.
8. Caspase 3 단백질 발현의 증가를 억제시켰다.
9. Cdc2, cyclin B1, phospho-Erk1/2 단백질 발현을 증가시켰다.

## 감사의 말씀

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(과제번호: 2010-0010960)

## 참고문헌

1. Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004;23(6):932-46.
2. Kim DS, Kim YS, Jung KS, Chang JH, Lim CM, Lee JH, et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in Korea: a population-based spirometry survey. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:842-7.
3. Korea National Statistical Office. Dajeon: Korea National Statistical Office; c1996-[cited 2009 Mar]. Available from: <http://www.nso.go.kr>
4. World Health Report. World Health Organization, Geneva. 2000. Available from URL: <http://www.who.int/whr/2000/en/statistics.htm>.
5. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(6):532-55.
6. Chang J. Pharmacologic treatment of COPD. *Tuberc Respir Dis*. 2005;59:231-42.
7. Lee DJ. The effects of *Lonicera japonica* on the murine model of Chronic obstructive pulmonary disease. Seoul: Kyung Hee Univ.; 2009.
8. Kim KT, Ko H. Effects of Shigyungbanha-tang on the lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Kor J Orient Physiol Pathol*. 2009; 26:1349-1357.
9. Oh JS, Park YC. Protective effects of Gamipalmihwan on elastase-induced apoptosis of A549 cells. *J Kor Orient Med*. 2010;31(2):137-48.
10. Yoon JM, Park YC. Protective effects of Seonpyejeongcheon-tang on elastase-induced lung injury in mice. *Kor J Orient Int Med*. 2010; 31(1):84-101.
11. 장기. 중경전서. 서울: 행림출판사. 1977:460-1.
12. 이상인. 방제학. 서울: 영림사. 1995:50.
13. 진국한의과대학 폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울: 한문회사. 2002:338-46.
14. Jung S, Cho SJ, Moon KI, Kim HW, Kim BY, Cho SI. Effects of Socheongryong-tang on immunoglobulin production in asthmatic mice. *Kor J Herbology*. 2008;23(1):23-8.
15. Kim KY, Lee JH, Kim YJ, Choi SY, Kim TH, Lyu YS, et al. Anti-allergic effects of Socheongyoung-tang on RBL-2H3 mast cell and mice-mediated allergy model. 2007;21(5):1260-70.
16. Kim HW. Effects of Socheongryong-tang on inflammatory cells in asthmatic mice. *Kor J Orient Prevent Med Soc*. 2006;10(2):121-9.
17. Jeong HJ, Hong MC, Shin MK, Bae HS. Sochungyong-tang, traditional Korean medicine, suppresses Th2 lineage development. *Kor J Orient Physiol Pathol*. 2005;19(2):380-8.
18. Jung JY, Jung HJ, Jung SK, Rhee HK. The inhibitory effects of Socheongryong-tang and Socheongryong-tang plus Sasam (*Adenophorae Radix*) on the IL-6, IL-8 and GM-CSF mRNA levels in human epithelial cells. *J Kor Orient Med*. 2003;24(1):74-83.
19. Hwang WS, Lee JS, Choi JY, Jung HJ, Rhee HK, Jung SK. Two cases of chronic sinusitis with asthma improved by Socheongryong-tang. *J Kor Orient Med*. 2003;24(1):207-12.
20. Jung SK, Heo TS, Hwang WS, Ju CY, Kim YW, Jung HJ. The effects of Socheongryong-tang on serum IL-4, IL-5, and IFN- $\gamma$  in asthmatic patients. *J Kor Orient Med*. 2002;23(2):70-7.
21. Hwang WS, Jung HJ, Ju CY, Lee JS, Lee KK, Rhee HK, et al. A study on changes in blood eosinophil, serum IgE and T lymphocyte subpopulation after Socheongryong-tang to asthmatic patients. *Kor J Orient Int Med*. 2002; 23(1):83-90.
22. Heo TS, Hwang WS, Ju CY, Jung HJ, Rhee HK, Jung SK. The effects of Socheongryong-tang on

- pulmonary function and quality-of-life in asthmatic patients. *J Kor Orient Med*. 2001;22(4):131-41.
23. Park YC. Effect of Socheongryong-tang on Pungghan and Pungyeol type common cold: a double blind, placebo controlled study. *Kor J Orient Physiol Pathol*. 2005;19(2):524-9
24. Na DG, Lee CJ, Park YC. Effects of Socheongryong-tang and Kamichihyo-san on mucine secretion from airway goblet cells. *Kor J Orient Physiol Pathol*. 2004;18(3):734-9.
25. Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. *Biol Pharm Bull*. 2008;31:1434-8.
26. Nakajoh M, Fukushima T, Suzuki T, Yamaya M, Nakayama K, Sekizawa K, et al. Retinoic acid inhibits elastase-induced injury in human lung epithelial cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28:296-304.
27. Lucey EC, Goldstein RH, Stone PJ, Snider GL. Remodeling of alveolar walls after elastase treatment of hamsters. Results of elastin and collagen mRNA in situ hybridization. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:555-64.
28. Molfino NA, Jeffery PK. Chronic obstructive pulmonary disease: Histopathology, inflammation and potential therapies. *Pulm Pharmacol Ther*. 2007;20(5):462-72.
29. Yoo CG. Pathogenesis and pathophysiology of COPD. *Kor J Int Med*. 2009;77:383-400.
30. Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008;12(4):361-7.
31. Harel S, Janoff A, Yu SY, Hurewitz A, Bergofsky EH. Desmosine radioimmunoassay for measuring elastin degradation in vivo. *Am Rev Respir Dis*. 1980;122:769-73.
32. Hogg JC, Timens W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:435-59.
33. Bowler RP, Barnes PJ, Crapo JD. The role of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*. 2004;1(2):255-77.
34. Cho HY, Kleeberger SR. Genetic mechanisms of susceptibility to oxidative lung injury in mice. *Free Radic Biol Med*. 2007;42:433-45.
35. Gardi C, Arezzini B, Martorana PA. Testing of compounds in models of pulmonary emphysema. *Curr Med Chem*. 2008;15:803-8.
36. Sethi JM, Rochester CL. Smoking and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2000;21:67-86.
37. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*. 1997;277:2002-4.
38. Gottlieb DJ, Stone PJ, Sparrow D, Gale ME, Weiss ST, Snider GL, et al. Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative Aging Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:1290-5.
39. Foronjy R, D'Armiento J. The role of collagenase in emphysema. *Respir Res*. 2001;2:348-52.
40. Uhal BD. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol*. 1997;272:L1031-L45.
41. Draetta G, Beach D. The mammalian cdc2 protein kinase: mechanisms of regulation during the cell cycle. *J Cell Sci Suppl*. 1989;12:21-7.
42. Draetta G. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. *Trends Biochem Sci*. 1990;15:378-83.
43. Moreno S, Nurse P. Substrates for p34cdc2: in vivo veritas? *Cell*. 1990;61:549-51.
44. Norbury CJ, Nurse P. Control of the higher eukaryote cell cycle by p34cdc2 homologues. *Biochim Biophys Acta*. 1989;989:85-95.
45. Nigg EA. The substrates of the cdc2 kinase. *Semin Cell Biol*. 1991;2:261-70.



46. Nigg EA, Krek W, Peter M. Vertebrate cdc2 kinase: its regulation by phosphorylation and its mitotic targets. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1991;56:539-47.
47. Enoch T, Nurse P. Coupling M phase and S phase: controls maintaining the dependence of mitosis on chromosome replication. *Cell.* 1991; 65:921-3.
48. Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:463-89.
49. Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12:14-21.
50. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med.* 1996;74:589-607.
51. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 1995;270:1326-31.