

천연물제제 마루플랜트-AMP-365TM의 항염증 및 면역활성에 미치는 영향

신은명 · 김동현¹ · 권영복² · 김영식*

서울대학교 약학대학 천연물과학연구소, ¹경희대학교 약학대학, ²쥬아토마루

Anti-inflammatory and Immunomodulatory Effects of the Botanical Product AMP-365TM

Eun Myoung Shin, Dong Hyun Kim¹, Young Bok Kwon², and Yeong Shik Kim*

Natural Products Research Institute, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

¹College of Pharmacy Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

²Atomaru Co., Gapyeong-gun, Kyeonggi-do, Korea

Abstract – The effect of aqueous extracts of medicinal plants AMP-365TM was tested for immune system regulating activity based on anti-inflammatory activity, anti-oxidant, macrophage proliferation and T-lymphocyte proliferation activity. AMP-365TM dose-dependently increased proliferation of RAW264.7 macrophage cells and its nitric oxide production as well as DPPH radical scavenging activity. On the other hand, T-lymphocyte proliferation activity was decreased on dose-dependent manner. Passive cutaneous anaphylaxis reaction was alleviated by 49% by administering 250 mg/kg of AMP-365TM. These results suggest that AMP-365TM can be beneficial in the treatment of immediate allergic reactions as an adjuvant supplement material.

Key words – atopic dermatitis, anti-inflammatory effect, antioxidant, herbal extract

염증은 조직의 상해나 파괴에 의해서 일어나는 과정에서 상해를 보호하는 증상으로서 최근에 들어 선천성 면역, 압과 매우 긴밀한 관계를 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 염증은 모든 질환이 진행되는 과정의 필수과정으로 여겨지고 있다. 그러나, 이러한 염증이 과하게 나타났을 때 만성 염증으로 발전되어, 관절염, 알레르기성 질환, 천식 등으로 발전할 수 있다. 활성화산소 (reactive oxygen species, ROS)는 미토콘드리아내의 전자전달계 및 백혈구 세포의 활성화 등 정상적인 세포기능을 유지하는데 중요한 역할을 담당하는 세포 내 신호전달 물질로 작용한다. 반면에 ROS의 조절기능에 이상이 초래되어 과도한 양의 ROS가 생성이 되면 세포내 단백질, 지방, DNA/RNA 등을 공격하여 손상을 초래하게 되어 세포사멸을 유도하거나 세포증식을 일으킨다. 따라서 과도한 ROS의 생성에 의한 세포의 스트레스는 궁극적으로 노화, 암, 뇌졸중, 당뇨병, 관절염, 면역결핍증, 동맥경화 등 여러 성인병의 직접적인 원인으로 알려져 있다.¹⁾ 세포내에서 ROS 생성을 조절하는 인자로서 세포 안에 존재하는 항산화 효소인 superoxide dismutase, catalase,

glutathione peroxidase 등에 의해서 조절되거나, vitamin C, glutathione 등 항산화 물질의 역할이 잘 알려져 있다. 특히 매일 섭취하는 음식물 또는 녹차 같은 기호식품에 함유된 항산화(antioxidant) 작용을 나타내는 천연물질은 체내 생명 현상으로 발생하는 ROS의 농도를 낮추는 역할을 하는 기능을 담당하고 있으며, 최근의 연구결과 한약재에 함유된 다양한 성분이 강력한 항산화작용을 나타내며 활성화 산소에 기인한 여러 질환모델에 대하여 약리활성을 보이고 있다.²⁻⁴⁾

천식이나 아토피성 피부염과 같은 알레르기성 질환이 지난 수십 년간 번창하였다. 이러한 증상은 아이러니컬하게 현대사회에서 어린이에게 바이러스나 박테리아의 노출이 더욱 적어지면서 제 1형 T세포(Th1)는 약해지면서 제 2형 T세포(Th2)가 활성화 되어 사이토카인류인 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13이 분비되며 이들 중 IL-4는 IgE의 증가에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{5,6)} IL-5는 IL-3와 GM-CSF와 함께 호산구(eosinophil)의 분화를 촉진하고 활성화와 생존유지에 관여한다. 결과적으로 활성화된 호산구에서 생성, 배출되는 염기성 단백질등에 의하여 조직의 손상이 일어나고, 이것이 만성적인 알레르기성 염증을 유발한다.^{7,8)} 치료

*교신저자(E-mail) : kims@plaza.snu.ac.kr
(FAX) : 02-765-4768

법으로 스테로이드 호르몬을 사용하고 있지만 장기간 사용하는 경우 많은 부작용으로 피부 위축, 혈관 확장, 색소 탈실 및 팽창 선조의 발생 등 다양한 피부 부작용을 야기시킨다. 그러므로 이러한 부작용을 나타내지 않으면서, 항염증 효능을 보유하는 아토피 치료용 의약품 개발을 위한 다양한 연구가 활발히 진행되고 있다. 아토피 피부염은 다양한 염증반응과 동시에 면역이상을 수반함으로써 면역계를 조절하면서 항염증 효과가 있는 천연물질이 치료효과를 나타낼 수 있을 것으로 여겨지고 있다. 따라서 본 연구의 목적은 아토피성 피부염 증상 완화제로서의 가능성을 확인하기 위하여 세포수준에서의 항염증 효과 탐색을 통해, 민간에서 사용하고 있는 식물성제제 마루플랜트 AMP-365TM의 아토피성 피부염 증상 완화제로서의 가능성을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - ㈜아토피마루에서 제공한 마루플랜트 AMP-365TM제제(쑥, 황기, 감초, 갈근, 포공영, 삼백초)의 물 추출물을 농축하여 동결 건조한 후 본 실험에 사용하였으며, 시료를 증류수에 녹여서 처리 농도에 따라 PBS에 희석하여 사용하였다.

시약, 동물 및 분석기기 - Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), RPMI 1640, penicillin-streptomycin 혼합용액, sulfanilamide, dinitrophenol(DNP), bovine serum albumin (BSA), naphthylethylenediamine dihydrochloride, lipopolysaccharide(LPS), 등은 Sigma(St Louis, MO)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS, South Pacific, New Zealand)에서 구입하여 사용하였다. 그리고 관련된 배양 dish 등은 Greiner (Germany) 및 Orange(USA)사의 동물세포 배양 적정제품을 구입하여 사용하였다. 기타 시약들도 ACS급 시약을 사용하였다. 기타, UV spectrophotometer (Jasco), Microplate reader (Molecular Device), Microfluorometer(Molecular Device) 등의 기기를 실험을 위해 사용하였다. 실험에 사용한 mouse 는 샘타코 (Osan, Korea)에서 구입하였다.

세포독성 조사(cell viability) - 시료의 세포독성을 확인하고자 Raw264.7, Jurkat T lymphocyte, Caki 세포주를 이용한 독성검사를 실시하였다. 실험에 사용한 세포주는 한국 세포주은행으로부터 분양을 받아 실험에 사용하였다. 각 세포를 $0.5\sim 1.0 \times 10^4$ 개씩 96 well plate에 각각 분주한 후, 24시간 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 배지를 교환하고, 시료를 농도별로(10, 50, 100, 200, 500 µg/ml)로 처리하여, 48시간동안 배양한다. 세포독성은 무처리 대조군에 대한 생존세포의 비율로 결정하였으며, CCK-8(Dojindo, Japan) Kit을 사용하여 확인하였다.

NO(nitric oxide)측정을 통한 마우스의 대식세포와 Jurkat T세포 활성화에 미치는 영향 조사 - 활성화된 대식세포가 분비하는 것으로 알려진 nitric oxide (NO)의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 마우스의 monocyte 기원의 RAW 264.7 cell line을 이용하여 nitric oxide의 생성량 변화를 측정하였다.⁹⁾ 세포 배양용 flask에 배양한 RAW 264.7 cell을 scraper로 떼어낸 후, 10% FBS 및 penicillin(100 µg/ml), streptomycin(100 U/ml)이 포함된 DMEM 배지 및 RPMI배지에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 대식세포 RAW 264.7 cell line은 2.0×10^5 개/ml 농도로 24 well plate에 각각 분주한 후, 24시간 후 시료용액을 여러 농도(100, 200, 500, 1000 µg/ml)로 넣어 주었으며 동시에 대조군으로서 LPS(0.1 µg/ml)를 처리하였다. Jurkat T lymphocyte의 경우는 4.0×10^5 개/ml 농도로 24 well plate에 각각 분주한 후, 시료용액을 여러 농도(50, 100, 200, 400 µg/ml)로 넣어 주었다. Griess Reagent는 5%의 질산용액에 1% sulfanilamide를 넣고 0.1% naphthylethylene-diamine dihydrochloride을 섞어 만들었다. 위에서 언급했던 실험조건을 반복한 후에 마지막 24시간 배양한 후에 배지를 100 µl씩 취하고 Griess Reagent(100 µl)와 섞은 후에 ELISA Plate Reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 sodium nitrite의 검량선으로부터 nitric oxide의 대사체인 nitrite의 농도를 계산하였다. 대조군으로 사용된 doxorubicin 및 Phytohemagglutinin은 각 10 µg/ml의 농도로 처리하였다.

항산화 작용 측정 - 시료의 항산화 작용을 측정하기 위하여 1,1-dimethyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) 소거 활성을 측정하였다.¹⁰⁾ DPPH용액은 1.5×10^{-4} M의 농도로 methanol에 녹여 사용하였으며 대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였다. 다양한 농도의 시료에 DPPH용액을 처리한 후 20분간 실온에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 활성산소 소거율로 나타내었다.

T-lymphocytes proliferation 조사 - BALB/c 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여, Lysis buffer를 이용하여, 적혈구를 제거하여 순수하게 모은 비장세포에, T-lymphocyte의 mitogen으로 알려진 Concanavalin A를 5 µg/ml 농도로 처리하여 T-lymphocyte를 선택적으로 활성화시킨 후, 1×10^5 개의 세포를 96 well plate에 분주한 후 각 시료를 농도 별로 처리하여 72시간 동안 37°C에서 배양한 후 CCK-8 kit을 이용하여 세포활성을 측정하였다. 이때, 비교군으로 사용한 Concanavalin A(5 µg/ml) 처리군의 세포 활성을 100으로 보고, 시료 처리한 각 군의 활성도를 상대값으로 계산하였다.¹¹⁾

실험동물에서 passive cutaneous anaphylaxis 반응 저해효과 - 이나가키(Inagaki)등의 방법^{12,13)}에 따라 실시하였으며, 간략히 Dinitrophenol-bovine serum albumin에 대한 IgE 혈청을 생리식염수로 희석한 10 µg을 에테르로 마취시

킨 생쥐의 등에 주사하고 수동감작 시키고 48시간 후 DNP-BSA 0.2 mg과 Evans blue 1.6 mg을 포함한 생리식염수 0.2 ml를 꼬리정맥에 주사하고 30분 후 경부 탈골로 치사시켜 등에 누출된 evans blue 색소량을 측정하였다. 생쥐의 등의 일정부위를 잘라 시험관에 넣고 1N-KOH 0.7 ml를 넣고 37°C에서 하루 밤 동안 배양하였다. 이 시험관에 0.6 N 인산, 아세톤 혼합액(5:13) 4 ml를 가한 다음 진탕하고 여과하여 추출된 색소를 620 nm에서 비색정량 하였다. 검체를 생리식염수에 용해 또는 현탁하여 경구로 항원 투여 한 시간 전에 투여하였다.

통계처리 - 모든 실험은 최소한 3번 이상 반복하여 수행하였으며 Student's t-test로 통계처리하여 대조군과 유의성차를 유의수준 5% 이상 (*) $p < 0.05$ 에서 검정하였다.

결과 및 고찰

세포독성 조사(cell viability) - AMP-365TM의 세포독성을 확인하고자 다양한 세포주를 이용한 독성검사를 실시한 결과, Raw264.7, Jurkat T세포주, CaCo-2 및 Caki 세포주에 대한 세포독성이 없으며, 농도 의존적으로 Raw264.7의 cell viability를 소폭 증가시키는 것으로 확인되었다(data not shown).

Nitric Oxide 활성 - 대식세포의 활성화와 관련하여 제공 받은 시료에 대한 nitric oxide의 생성정도는 100, 200, 500 µg/ml 농도 사이에서 농도 의존적으로 nitric oxide의 생성을 증가시키는 것을 확인하였고, Human Jurkat T lymphocyte의 경우 50, 100, 200 µg/ml 농도로 처리한 결과 50~200 µg/ml 농도처리에서 소량의 nitric oxide의 생성을 확인하였다(data not shown). 이러한 소폭의 nitric oxide의 증가는 대식세포 및 T lymphocyte를 활성화 시키는 것으로 이해할 수 있다(Fig. 1). 따라서, AMP-365TM는 포괄적으로 탐식세포(phagocytic cell)에서 cytokine등의 자극에 의해 생성되는 반응성 질소종(reactive nitrogen intermediates)을 1차적으로 활성화 시킬 수가 있다고 보인다.

항산화활성 - 항산화활성의 측정결과 시료의 처리농도에 비례하게 항산화활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 식물 추출물의 경우 50 µg/ml, 100 µg/ml 농도에서 각각 46% 및 69%의 유해산소를 소거하는 것으로 항산화활성을 확인하였다(Fig. 2). 항산화활성은 시료중의 식물유래의 페놀성 화합물의 양에 의해 증가된 것으로 판단된다. 따라서, 접촉성 피부염에 대하여 AMP-365TM의 작용은 아토피를 유발시킬 수 있는 활성산소를 감소시킬 수 있다고 보이며 이러한 현상은 항산화 효과에 의한 것으로 사료되고 있다.

T-lymphocytes proliferation 조사 - BALB/c 마우스의 비장세포에 Concanavalin A를 5 µg/ml 농도로 처리하여 T-lymphocyte를 선택적으로 활성화시킨 후, 1×10^5 개의 세포

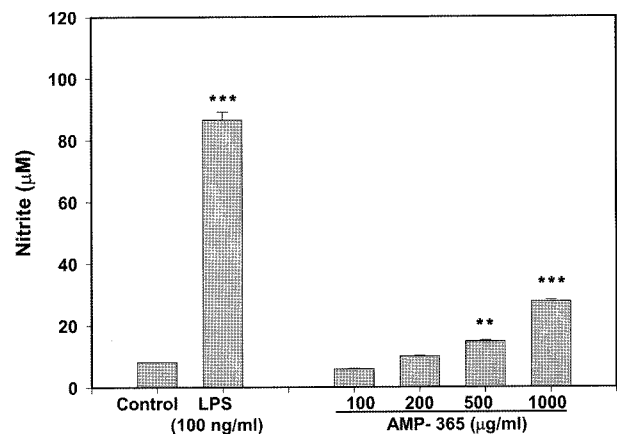


Fig. 1. Measurement of nitric oxide production by AMP-365TM. AMP-365TM was treated for 24 hours. Data were obtained from three independent experiments and were expressed as means \pm S.D. (**) $p < 0.01$ and (***) $p < 0.001$ indicate significant differences from the control.

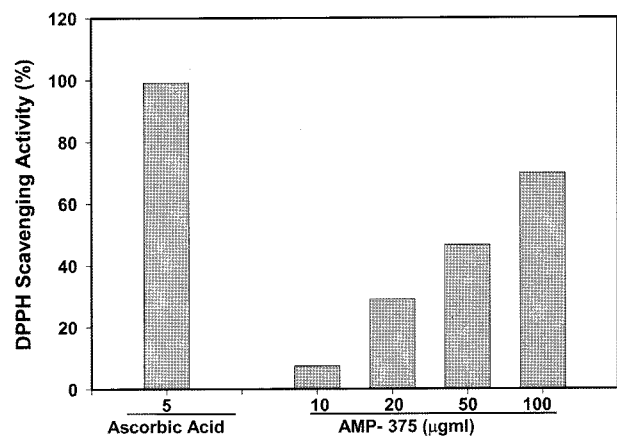


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity by AMP-365TM. The scavenging activity of each concentration of AMP-365TM against DPPH radical was measured as described in Materials and Methods. Each 0.3 mL of extract solution (dissolved in methanol or distilled water) was added to 0.1 mL of 1 M Tris-HCl buffer (pH 7.9) and then mixed with 0.6 mL of 100 mM DPPH in methanol for 20 min under light protection at room temperature. The absorbance at 517 nm was measured. Deionized water or methanol was used as a blank. The scavenging activity of DPPH radicals (%) was calculated following the equation: $[(A_{517, \text{blank}} - A_{517, \text{sample}}) \div A_{517, \text{blank}}] \times 100$ and showed in percentage (%).

를 96 well plate에 분주한 후 각 시료를 10, 50, 100 및 200 µg/ml 농도별로 처리하여 72시간동안 37°C에서 배양한 후 CCK-8 kit을 이용하여 세포활성을 측정된 결과, Concanavalin A를 5 µg/ml 농도로 처리한 대조군에 비해 T-lymphocyte의 세포 활성이 AMP-365TM 시료에 의해 농도 의존적으로 저하되는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이러한 결과는

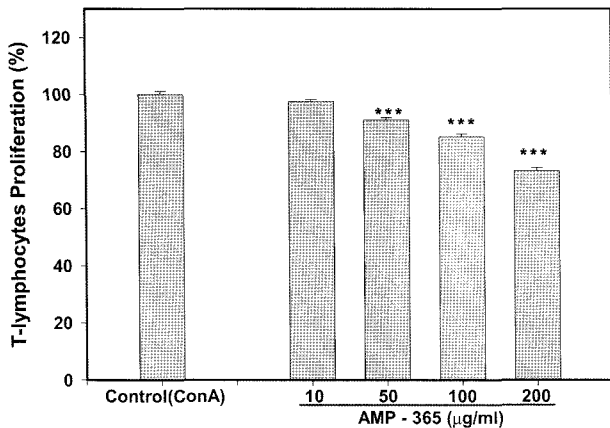


Fig. 3. T-lymphocyte proliferation by AMP-365TM. Spleen cells of BALB/c mouse were collected and T-lymphocytes were selectively activated by adding 5 μg/ml of Concanavalin A. AMP-365 was treated for 72 hours. Data were obtained from three independent experiments and were expressed as means±S.D. (***)p<0.001 indicate significant differences from the control.

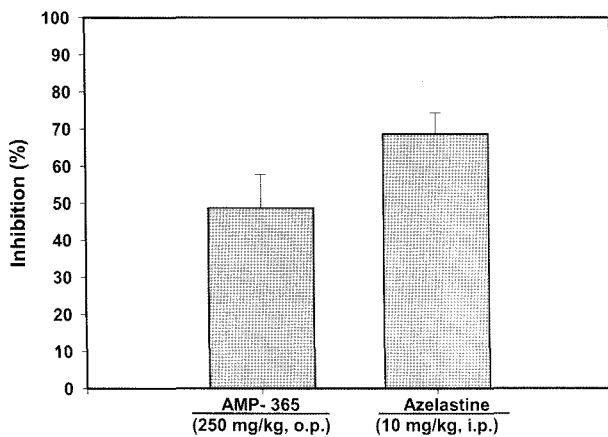


Fig. 4. Inhibitory effect of AMP-365TM on passive cutaneous anaphylaxis induced by IgE.

The sample was orally or intraperitoneally administered 1 h prior to antigen. Mice were sacrificed 60 min later by cervical dislocation and the excised skin specimen was dissolved in 1 ml of 1 M KOH solution by overnight incubation, and 4 ml of a mixture of 0.2 M phosphoric acid solution-acetone (5:13) was added. After vigorous shaking, the precipitate was filtered off and the amount of dye was measured colorimetrically at 620 nm.

AMP-365가 T-lymphocyte의 세포 활성을 억제하여 면역기능 조절 작용에 영향을 미치는 것임을 보여준다. 특히, 아토피성 피부염은 T세포의 대량 침윤에 의해서 일어나는 것으로 알려지기 때문에^{5,6,14} T세포의 팽창을 억제할 수 있는 점에서 아토피성 질환에 효능을 가져올 수 있다.

Passive cutaneous anaphylaxis reaction저해효과 - 제 1형 과민반응에 대한 저해효과는 있었다. 제 1형 반응은

즉시형으로 항원에 노출 후 20분 이내에 증상이 나타나며 제 1형의 항원과 반응하는 항체는 IgE로서 비만세포와 쉽게 결합한다. 이 상태에 항원이 침입하면 세포 표면에서 항원-항체 반응이 일어나 비만세포의 탈과립으로 과립 histamine과 같은 매개물질이 분비되어 anaphylaxis 과민반응이 일어난다.¹⁵ 이러한 점에서 AMP-35TM는 급성 기관지 천식, 알레르기성 비염, 아토피성 질환에 유효할 수 있을 것으로 판단된다.

결론

본 연구에 사용된 시료는 6종류의 천연물이 혼합된 것으로 대식세포의 기능을 활성화시키고, T-lymphocyte의 세포 활성을 억제하는 것으로 확인되었으며, 제 1형 과민반응에 대한 억제기능을 가진 것으로 확인되었다. 또한 항산화활성을 보여 피부질환을 악화시킬 수 있는 활성산소를 감소시킬 수 있다고 보인다. 특히, 식물의 물추출로부터 유래하는 사포닌 및 후라보노이드 등의 식물성분이 면역질환 조절에 작용하는 것으로 보인다.⁹ 대표적인 성분으로는 감초의 glycyrrhizin, 속의 정유성분, 황기의 formonetin, 갈근의 isoflavone류, 삼백초의 polyphenolic 화합물 등 많은 성분에 의해서 효능을 기대할 수 있다. 앞으로도 많은 연구를 필요로 하고 있다. 특히, 제제가 민간에서 작은 규모지만 임상적으로 효능이 나타나기 때문에 규격화, 안전성 및 큰 규모의 임상 시험이 필요하리라고 보인다.

인용문헌

- Pharham, P. (2005), The Immune System. Garland Science, New York.
- Toyokuni, S., Tanaka, T., Kawaguchi, W., Fang, N.R., Ozeki, M., Akatsuka, S., Hiai H., Aruoma O.I., and Bahorun T. (2003) Effects of the phenolic contents of Mauritian endemic plant extracts on promoter activities of antioxidant enzymes. *Free Radic Res.* **37**: 1215-1224.
- Maldonado, P.D., Rivero-Cruz, I., Mata, R., and Pedraza-Chaverri, J. (2005) Antioxidant activity of A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum* (Geraniaceae). *J. Agric. Food Chem.* **53**: 1996-2001.
- Liu, C.T., Chuang, P.T., Wu, C.Y., Weng, Y.M., Chen, W., and Tseng, C.Y. (2006) Antioxidative and *In Vitro* hepatoprotective activity of *Bupleurum kaoi* leaf infusion. *Phytother Res.* (in press).
- Akdis, C.A., Akdis M., Trautmann, A., and Blaser K. (2000) Immune regulation in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol* **12**: 641-646.
- Rudikoff, D. and Lebwohl, M. (1998) Atopic dermatitis. *Lancet* **351**: 1715-1721.

7. Ackerman, S.J., Loegering, D.A., Venge, P., Olsson, I., Harley, J.B., Fauci, A.S., and Gleich, G.J. (1983) Distinctive cationic proteins of the human eosinophil granule: major basic protein, eosinophil cationic protein, and eosinophil-derived neurotoxin. *J. Immunol* **131**: 2977-2982.
8. Venge, P. (1993) Eosinophil and neutrophil granulocytes. *Allergy* **48(Suppl. 17)**: 39-47; discussion 48-49.
9. Ahn, K.S., Noh, E.J., Zhao, H.L., Jung, S.H., Kang, S.S., and Kim Y.S. (2005) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by Platycodon grandiflorum saponins via suppression of nuclear factor-kappaB activation in RAW 264.7 cells. *Life Sci.* **76**: 2315-2328.
10. Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.I., and Nishioka, I. (1998) Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem Pharmacol* **56**: 213-222.
11. Shim, J.Y., Lee, Y.S., Jung S.H., Choi, H.S., Shin, K.H., and Kim, Y.S. (2002) Pharmacological activities of a new glycosaminoglycan, acharan sulfate isolated from the giant African snail *Achatina fulica*. *Arch. Pharm. Res.* **25**: 889-894.
12. Inagaki, N., Nagao, M., Igeta, K., Kawasaki, H., Kim, J.F., and Nagai, H. (2001) Scratching behavior in various strains of mice. *Skin Pharmacol Appl. Skin Physiol* **14**: 87-96.
13. Kimata, M., Shichijo, M., Miura, T., Serizawa, I., Inagaki, N., and Nagai, H. (2000) Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clin Exp. Allergy* **30**: 501-508.
14. Tenda, Y., Yamashita, M., Kimura, M.Y., Hasegawa, A., Shimizu, C., Kitajima, M., Onodera, A., Suzuki, A., Seki, N., and Nakayama, T. (2006) Hyperresponsive Th2 cells with enhanced nuclear factor- κ B activation induce atopic dermatitis-like skin lesions in Nishiki-nezumi Cinnamon/Nagoya mice. *J. Allergy Clin Immunol* **118**: 725-723.
15. 고재숙, 하병조, 강승주, 고희정, 장경자 (2000) 피부과학, 수문사 pp. 107-118.

(2006년 7월 27일 접수)