凉血除濕湯의 비만세포 활성화 억제작용

김상헌 · 구영선[1] · 진미림 · 김동희*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1:대전대학교 한의과대학 청주혜화의원

Anti-inflammatory Activity of YHJST in Activated Mast Cells

Sang Hun Kim, Young Sun Koo[1], Mi Rim Jin, Dong Hee Kim*

Department of Pathology, 1:Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Activated mast cells play pivotal roles in allergic and non-allergic inflammatory responses through the release of inflammatory mediators such as histamin, cysteinyl leukotriens, pro-inflammatory cytokines as well as chemokine. We tested whether YHJST, which is clinically prescribed for the treatment of various inflammatory disease including allergic disease, modulate inflammatory reactions in activated mast cells. YHJST decreased the release of histamine and b-hexosamidase in pholbol-12-myristate 13-acetate and/or calcium ionophore A23187 stimulated HMC-1 and RBL-2H3 cells, respectively. Further, the gene expressions of tumor necrosis factor-a, IL-6 and IL-8 were significantly reduced by YHJST. YHJST suppressed powerful induction of NF-kB promoter-mediated luciferase activity. Taken together, these data suggested that YHJST showed it's anti-inflammatory effects through the down-regulation of mast cell activation.

Key words : YHJST, Mast cell, Inflammatory mediators, NF-kB

서 론

비만세포는 정상 조직에 널리 분포하며 감염에 대한 저항성 및 항상성 유지를 위한 역할을 수행하지만 알레르기성 및 비알레르기성 반응을 포함하는 다양한 염증성 질환에서 활성화되어 병리적 인자로 작용한다[1]. 급성 혹은 만성적으로 활성화된 비만 세포는 히스타민, 에이코사노이드, 프로티에즈과 같은 염증성 매개 물질을 분비하고, 염증성 사이토카인 및 키모카인을 합성하고 분비함으로서 알레르기성 염증 반응을 확대한다[2,3]. 비만세포에서 TNF-a, IL-6, IL-8와 같은 염증성 사이토카인의 발현은 전사인자인 NF-kB의 조절을 받는데[4,5], RelA (p65)와 NFKB1 (p50) 또는 NFkB2 (p52)의 이합체 (dimer)로 구성되어 세포질에 존재하다가 다양한 자극에 의해 활성화되어 핵 내로 이동하고 타rpt 유전자의 프로모터에 존재하는 특이적 DNA 염기서열에 결합함으로서 타겟 유전자의 발현을 활성화 한다[6].

비만세포에서 분비되는 히스타민이나 염증성 사이토카인이 조직 손상과 염증 반응의 확대를 일으키므로 이들의 활성을 효과적으로 조절하는 약물이 염증성 질환의 치료제로서 사용될 수 있다. 그러나 현재 사용되는 약물들은 효능이 미약하거나 부작용을 나타낸다. 일례로 Disodium cromoglycate는 in vitro에서 IgE-의존성 비만세포 활성에 의한 염증성 물질의 분비를 억제하는 작용을 나타내기는 하지만, 높은 농도를 사용하여도 최대 히스타민 분비량의 10-20% 정도의 감소만을 나타낸다. 더욱이 만성적 사용으로 인하여 속성내성 (tachyphylaxis)를 일으킨다고 보고됨으로써[7], 비만세포의 활성을 효과적으로 조절할 수 있는 안전한 약물의 개발이 요구되고 있다. 凉血除濕湯은 抗炎症 作用에 대한 數種의 韓方 處方 檢索에서 有意性있는 結果가 導出된 臨床 處方으로 주로 淸熱, 利濕, 祛風作用이 강한 藥物로 構成되었다. 構成 藥物 중 知母[8], 黃芩[9], 生地黃[10], 牧丹皮[11], 苦蔘[12], 車前草[13]는 이미 抗炎症 및 抗酸化 作用이 實驗的으로 糾明된 바가 있어, 이들로 構成된 凉血除濕湯 역시 有意性있는 結果가 期待된다.

이에 本 實驗에서는 現在 臨床에서 皮膚 瘙痒症에 活用되고 있는 凉血除濕湯을 試料로 PMA와 A23187에 의하여 활성화된 비만세포의 염증성 매개 물질의 분비를 억제 작용과 염증성 사이토카인 억제 작용 및 NF-kB 활성에 관한 효과를 조사하였다.

실험방법

1. 재료

* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학

· E-mail : dhkim@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2623

· 접수 : 2006/09/26 · 수정 : 2006/10/30 · 채택 : 2006/11/27

1) 약물

본 실험에 사용한 양혈제습탕 (YHJST)의 구성 약재들은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 그 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. The compositions of Yanghyuljesubtang (YHJST)

韓藥名	生藥名	用量(g)
知母	*Anemarrhenae Rhizoma*	5
黃芩	*Scutellariae Radix*	8
石膏	*Gypsum*	15
生地黃	*Rhemaniae Radix*	8
牧丹皮	*Moutan Cortex Radix*	10
百部根	*Stemonae Radix*	15
苦參	*Sophorae Flavescentis Radix*	6
白鮮皮	*Dictamni Radix*	15
車前草	*Plantaginis Herba*	8
		90

2) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 Diethyl pyrocarbonate (DEPC), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, trypsin-0.2% EDTA, 3-4, 5-dimethylthiazol-2, 5- carboxymetho xyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolim (MTS), 5-(and-6)- choromethyl- 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate,acetylester (CM- H2DCFDA), 2,7-dichloro-dihydrofluorescindiacettate (DCFH-DA), 2,2-diphenyl -1-picrylhydrazyl, chloroform, RPMI-1640 배양액, trichloroacetic acid, isopropanol, ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), EtOH, LPS, magnesium chloride (MYHYBTI2), A23187, PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), p-nitrophenyl-N-acetyl- b-glucosamide, o-phtaldialdehyde 등은 Sigma 사 (U.S.A) 제품을, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa 사 (Japan) 제품을, 역전사효소 (Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 CsA (cyclosporin A)는 중외제약, Dexamethasone은 sigma제품을, RNase inhibitor는 Promega 사 (Madison, U.S.A) 제품을, 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, U.S.A) 제품을, DMED과 RPMI는 Gibco 사 (Gaithersburg, MD, U.S.A) 제품을, RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, U.S.A) 제품을, 인간 재조합 MCP-1, IL-6, IL-8, TNF-α, histamine kit는 R & D system사 (U.S.A.) 제품을, LipofectamineTM2000 Reagent는 Invitrogen 사(Carlsbad, U.S.A) 제품을, Luciferase assay kit는 Promega 사(Madison, U.S.A) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

3) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), microwave oven (LG, Korea), rotary vacuum evaporator, vaccum pump (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Co., Japan), CO_2 incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Co., Japan), micro-pipet (Gilson, Co., France), water bath (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line, Co., U.S.A), vortex mixer, heating block (Vision scientific. Co., Korea), spectrophotometer (Shimazue, Co., Japan), centrifuge (한일. Korea), deep-freezer (Sanyo, Co., Japan), plate shaker (Lab-Line, U.S.A), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), ELISA reader (Molecular Devices, Co., U.S.A.), 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Co., U.S.A.), flow cytometer (Becton Dickinson, U.S.A) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

양혈제습탕 (YHJST)의 2첩 분량에 각각 증류수 2,000 ㎖을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하였다. 이를 다시 흡입 여과하여 감압 증류장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축한 후 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조하였다. 건조된 24 g을 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

2) 세포 배양

(1) Human fibroblast cell (hFCs) 배양

피부 조직을 Cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15 ㎖)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 이 tube에 DMEM {containing collagenase A (5 ㎎/㎖, BM, Indianapoilis, IN, USA)와 DNase type I (0.15 ㎎/㎖, Sigma Co., U.S.A), antibiotics (penicillinm 104 U/㎖, streptomycin 10 ㎎/㎖, amphotericin B 25 ㎍/㎖)}를 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 hFCs를 2 시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하여 30 분간 배양하고, 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양하였다. 이를 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 분리하여 연속으로 1주일씩 3회 반복하여 살아있는 부착세포를 DMEM-5% FBS에서 배양하였다.

(2) Human mast cell line (HMC-1) 배양

HMC-1 (Human mast cell line; J. H. Butterfield, Mato Clinic, Rochester, MN) 2.0 x 10^6/㎖ 세포를 DMEM {containing collagenase A (5 ㎎/㎖, BM, Indianapoilis, IN, U.S.A)와 DNase type I (0.15 ㎎/㎖, Sigma), antibiotics (penicillinm 104 U/㎖, streptomycin 10 ㎎/㎖, amphotericin B 25 ㎍/㎖)}과 4M 2-mercaptoethanol을 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 3일간 배양하였다.

(3) RBL-2H3 cell 배양

RBL-2H3 (Rat mast cell line; Korea cell line bank) 5.0 x 10^5/㎖ 세포를 DMEM, antibiotics (penicillinm 104 U/㎖, streptomycin 10 ㎎/㎖, amphotericin B 25 ㎍/㎖)과 10% FBS를 넣고, 37℃ CO_2 배양기에서 3일간 배양하였다.

(4) SRB assay

세포독성 측정은 SRB assay법을 약간 변형하여 사용하였다. hFCs 세포는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 자란 것을 trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어낸 후, 2.0 x 10^4개 세포로 96 well plate에 분주한 후 배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 2시간 배

양하였다. 배양 후 SFR (최종 농도 1000 ㎍/㎖, 500 ㎍/㎖, 250 ㎍/㎖, 125 ㎍/㎖, 62.5 ㎍/㎖, 31.2 ㎍/㎖ 15.6 ㎍/㎖, 7.8 ㎍/㎖)을 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액 (PBS)로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 ㎕를 가하여 1 시간 동안 4℃에 방치하였다. 이 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 ㎕/well로 가하고, 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM tris base로 100 ㎕/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, U.S.A)에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA reader (Molecular devices, U.S.A) 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

3) Histamine 측정

HMC-1 세포를 24 well plate에 5 x 10^4 세포로 각 well에 분주하고, 여기에 추출물 (200, 100, 10 ㎍/㎖)과, 양성대조군으로 CsA (10 ㎍/㎖)를 처리하고 1시간 후 PMA (50 ng/㎖)와 A23187 (0.5 μM)를 각각의 well에 첨가하여 CO_2 배양기에 24시간에 배양한 후, 각 항체 anti-IgE 를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4℃에서 30분 방치한 후, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) b-hexosaminidase 측정

48well plate에 RBL-2H3 cell을 5 x 10^5 cell/㎖로 18시간 배양한 뒤 tyroid buffer로 세포의 배양액을 세척하고, tyroid buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.4 mM NaH_2PO_4, 5.6 mM glucose)로 배양액을 바꿔주었다. 시료를 농도별로 1시간 전처리하고 양성대조군으로 10 μM의 A23187을 처리한 15분 뒤 상층을 얻었다. 얻은 상층액 50 ㎕와 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 녹인 1 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-glucosamide 50 ㎕를 30분 동안 인큐베이터에서 반응시켰다. 반응을 정지시키기 위해 1N HCl을 넣은 후 405 nm에서 β-hexosaminidase의 방출량을 측정하였다.

5) Real Time Quantitative RT-PCR

(1) RNA 추출

HMC-1 세포를 24 well plate에 5 x 10^4 세포로 각 well에 분주하고, 여기에 추출물 (200, 100, 10 ㎍/㎖)과, 양성대조군으로 CsA (10 ㎍/㎖)를 처리하고 1시간 후 PMA (50 ng/㎖)와 A23187 (0.5μM)를 각각의 well에 첨가하여 CO_2 배양기에 24시간에 배양한 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzolB 500 ㎕를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform ($CHCl_3$) 50 ㎕를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 ㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 ㎕와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 ㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 ㎍을 DNase I (10 U/㎕) 2U/tube를 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 ㎕ 10 mM dNTPs mix, 1 ㎕ random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 ㎕), RNA inhibitor로서 1 ㎕ RNase inhibitor (20 U/㎕), 1 ㎕ 100 mM DTT, 4.5 ㎕ 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MHCl_2$)를 가한 후, 1 ㎕의 M-MLV RT (200 U/㎕)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 ㎕가 되도록 하였다.

이 20 ㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37℃ heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 이를 다시 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(3) Real Time Quantitative RT-PCR

HMC-1으로부터의 총 RNA는 TRI 시약으로 분리하고, DNase I (Life Technologies, Grand Island, NY)로 염색체의 DNA을 제거하기 위해 digested 하였다. 75℃에서 20분 동안 DNase과 5 ug을 넣어 total RAN은 First Strand cDNA Synthesis kit (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)로 cDNA으로 transcrition하였다.

기술된 것에 따라 Real-Time PCR은 Applied (Applied Biosystems, U.S.A)을 사용하면서 수행되었다. probes는 6-carboxy-fluorescein으로 라벨을 붙이고, beta-actin cDNA는 모든 cDNA과 같은 양을 포함한 각 cDAN 표본을 AmpliTaq Gold DNA Polymerase을 포함시켜 TaqMan Universal PCR로 증폭시켰다. PCR 조건은 40 cycles를 위한 50℃에서 2분, 95℃과 10 분, 60℃에서 15초 수행하였다. 사용된 probe 는 아래와 같다.

human interleukin-6	AGCCCTGAGAAAGAGACATGTAACAAGAGTAACA
human interleukin-8	AGAGCTCTGTCTGGACCCCAAGGAAAAC
human glyceraldehyde -3-phosphatede hydrogenase (G3PDH)	CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC
human TNF-alpha	TGGCCCCAGGCAGTCAGATCATC

y = x(1+e)n, x = starting quantity, y = yield, n = number of cycles, e = efficiency로 계산하여 RQ (relative quantitative)을 측정하였다.

6) NF-κB promoter activity 측정

48well plate에 RBL-2H3 cell을 5 x 10^5 cell/㎖로 18시간 배양한 뒤 FBS와 antibiotics를 제거한 배양액으로 바꿔준 후, NF-κB 부위가 3 copy로 되어있는 NF-κB-Luc vector와 b-galactosidase assay를 통해 형질전환의 비율을 측정할 수 있도록 pCMV-β-Luc vector를 4시간 형질전환 시켰다. 세포에 FBS와 antibiotics가 함유된 배양액으로 바꿔준 후 시료와 양성대조군인 PMA를 18시간 처리하고 lysis buffer를 이용하여 세포를 lysis 시켰다. 3차례의 급속 냉동-해동을 거쳐 세포를 파괴하고, 12,000 xg, 5분간 원심분리하여 세포 추출물을 얻어 luciferase substrate와 반응시켜 NF-κB promoter 활성을 측정하였다.

7) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석법을 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

1. 세포독성에 미치는 영향

YHJST의 세포독성을 측정한 결과, 1000, 500, 250 , 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 ㎍/㎖ 농도에서 생존율이 각각 100 ±, 5.2, 70.4 ± 0.4, 85.9 ± 0.4, 99.4 ± 0.2, 100.0 ± 0.3, 102.7 ± 0.6, 105.5 ± 0.4, 95.7 ± 0.0 %로 나타나, 250 ㎍/㎖ 이하 농도에서는 유의성 있는 감소는 나타나지 않았다 (Fig. 1). 그러므로 본 연구에서는 200 ㎍/㎖이하의 농도를 사용하여 실험을 진행하였다.

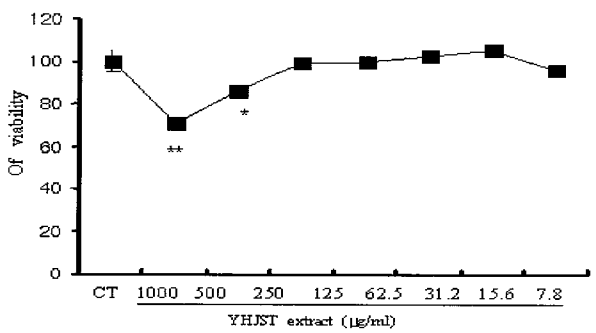

Fig. 1. Effects of YHJST on the viability of mouse lung fibroblast Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) were cultured with various concentration of YHJST extract for 48 hr and the cell viability was measured by SRB method. The results were presented by the mean ± S.E (N=6).

2. 히스타민 분비량에 미치는 영향

히스타민은 아나필락시스와 염증반응, 신경 전달 작용 등 다양한 생물학적 반응을 나타내는 화학적 매개물질[15]로서 PMA와 A23187에 의해서 비만세포에서 분비된다. HMC-1에서 분비되는 히스타민 양을 측정한 결과, 정상군은 5.2 ± 0.8 (nmol)로 나타난 반면, 대조군 79.7 ± 4.9 (nmol)로 나타나 큰 폭으로 증가하였다. 반면 비교대조군인 CsA 투여군은 23.6 ± 2.1 (nmol)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었고, YHJST 100, 50, 10㎍/㎖ 농도 투여군에서는 각각 36.9±1.5, 42.0±9.4, 78.3±0.4 (nmol)로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 50 ㎍/㎖ 이상의 농도에서 유의성 있게 (***p<0.001) 감소되었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 YHJST가 활성화된 비만세포의 히스타민 분비 억제능이 있음을 보여주고 있다.

3. β-Hexosaminidase 분비량에 미치는 영향

YHJST에 의한 β-Hexosaminidase 분비량을 측정한 결과, 대조군인 A23187에 의해 방출되는 β-Hexosaminidase 분비량의 YHJST에 의한 Inhibition 비율이 YHJST 10 ㎍/㎖ 농도에서는 13.2%, 100 ㎍/㎖ 농도에서는 24.9%, 200 ㎍/㎖ 농도에서는 44.6%로 유의성 있게 증가하였다. YHJST에 의한 β-Hexosaminidase IC_{50} 값은 224.22 ㎍/㎖으로 나타났다 (Table 1).

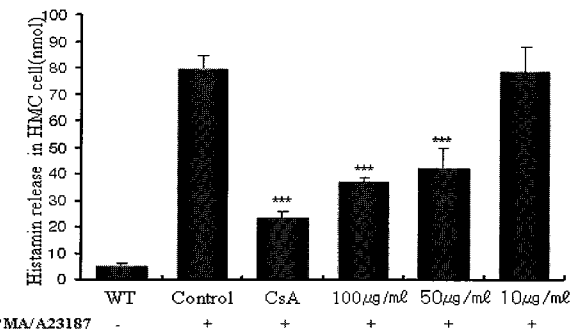

Fig. 2. Effect of YHJST on histamine release in HMC-1. Human mast cells were stimulated with PMA (50 ng/ml) and A23187 (0.5μM), and cultured in the presence of YHJST (100, 50, 10 ㎍/ml) or cyclosporin A (10 ㎍/ml) for 6 h. The levels of histamine in the supernatant were determined by ELISA assay. The results are expressed the mean ± S.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (***p(0.001).

Table 1. Inhibitory effects of YHJST on A23187-induced release of β-hexosaminidase.

Compound	Inhibition (%)				IC50 (㎍/ml)
	0 ㎍/ml	10 ㎍/ml	100 ㎍/ml	200 ㎍/ml	
YHJST	0± 0.5	13.2± 1.3*	24.9± 2.1*	44.6± 4.5*	224.22± 15

Each value represents the mean ± S.D. *p(0.05 significantly different from the control

4. 염증성 사이토카인 및 키모카인 발현에 미치는 영향

1) TNF-α mRNA 발현에 미치는 영향

TNF-a 는 알레르기성 및 비알레르기성 염증 질환의 병리인자로 질환의 발병과 밀접한 관련이 있으며 조직 손상과 염증 반응의 개시, 조직의 섬유화 등을 유도하는 것으로 알려져 있다[14]. PMA와 A23187로 활성화된 HMC-1에서 TNF-α mRNA 유전자 발현을 real-time PCR 방법에 의하여 정량적으로 비교하였다. 대조군의 RQ값이 1 일때, CsA는 0.153, YHJST 200, 100, 50 ㎍/㎖ 농도 투여군에서는 각각 0.201, 0.149, 0.188로 나타났다 (Fig. 3). 이러한 결과는 YHJST가 TNF-a의 발현 억제를 통하여 비만세포의 염증성 반응을 억제함을 보여주고 있다.

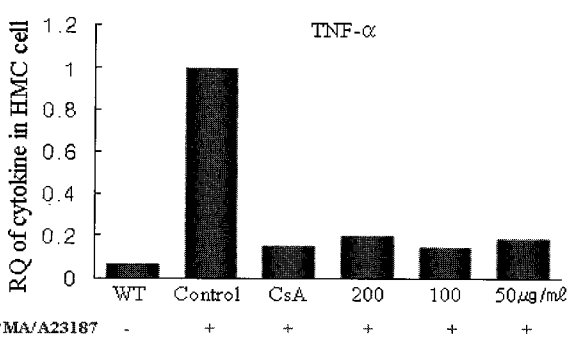

Fig. 3. Inhibitory effects of YHJST on TNF-α mRNA expression in PMA/A23187 -stimulated HMC-1. Human mast cell line were stimulated with PMA (50 ng/ml) and A23187 (0.5 μM), and cultured in the presence of YHJST (200, 100, 50 ㎍/ml) or cyclosporin A (10 ㎍/ml) for 6 h. The relative levels of TNF-a mRNA expression compared with control were determined by quantitative real-time PCR.

2) IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

IL-6는 PMA와 A23187과 같은 자극에 의해서 발현되며, IL-1과 같은 염증성 사이토카인의 자극에 의하여도 비만 세포에서 새로이 합성되어 분비됨으로서 염증 반응의 확장에 기여하는

것으로 알려져 있다[16]. HMC-1에서 IL-6 mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 1 일때, CsA는, 0.245, YHJST 200, 100, 50 ㎍/㎖ 농도 투여군은 각각 0.032, 0.474, 1.132로 나타났다 (Fig. 4).

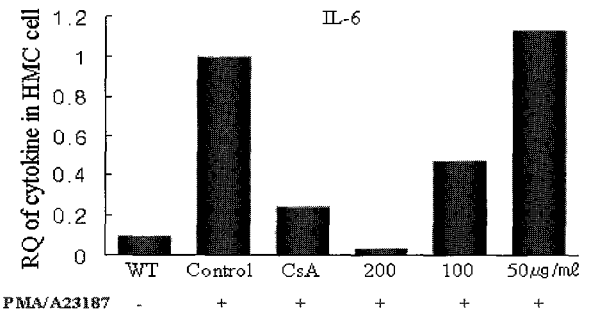

Fig. 4. Inhibitory effects of YHJST on TNF-α mRNA expression in PMA/A23187 -stimulated HMC-1. Human mast cell line were stimulated with PMA (50 ng/㎖) and A23187 (0.5 μM), and cultured in the presence of YHJST (200, 100, 50 ㎍/㎖) or cyclosporin A (10 ㎍/㎖) for 6 h. The relative levels of IL-6 mRNA expression compared with control were determined by quantitative real-time PCR.

3) IL-8 mRNA 발현에 미치는 영향

IL-8은 염증 부위로 중성구, 호산구 및 임파구의 유주 및 침윤을 유도하는 키모카인으로 비만 세포에서 분비된다[17]. PMA와 A23187로 활성화된 HMC-1에서 IL-8 mRNA 유전자 발현의 RQ 값을 1로 하였을 때, CsA는 0.609, YHJST 200, 100, 50 ㎍/㎖ 농도 투여군에서는 각각 0.357, 0.346, 0.285로 나타났다 (Fig. 5). 이러한 결과는 YHJST가 활성화된 비만세포에서 IL-8과 같은 키모카인의 발현을 억제 할 수 있다는 것을 나타내주고 있다.

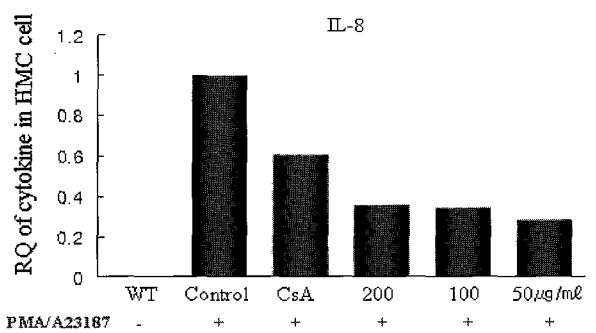

Fig. 5. Inhibitory effects of YHJST on IL-8 mRNA expression in PMA/A23187 -stimulated HMC-1. Human mast cell line were stimulated with PMA (50 ng/㎖) and A23187 (0.5 μM), and cultured in the presence of YHJST (200, 100, 50 ㎍/㎖) or cyclosporin A (10 ㎍/㎖) for 6 h. The relative levels of IL-8 mRNA expression compared with control were determined by quantitative real-time PCR.

5. NF-κB promoter 활성에 미치는 영향

TNF-a, IL-6 와 IL-8과 같은 염증성 사이토카인 및 키모카인의 발현은 NF-κB의 활성화에 의존한다[5,6]. YHJST의 사이토카인 발현 억제 작용이 NF-κB를 경유하는지를 알아보기 위하여 NF-κB promoter 활성에 관한 효과를 측정하였다. PMA를 처리한 결과 NF-κB promoter활성화에 의한 luciferase 활성이 PMA를 처리하지 않은 군에 비해 4배 증가하였으며, 이 때 YHJST(10, 100, 200 ㎍/㎖)를 동시에 처리한 결과 luciferase 활성이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. YHJST 100 ㎍/㎖ 농도에서 대조군에 비하여 약 50% 정도, 200 ㎍/㎖ 농도에서 약 70% 정도 유의성 있게 (*p<0.05) 감소되었다 (Fig. 6). 이러한 결과는 YHJST가 NF-κB 활성을 저해함으로서 사이토카인의 발현을 억제 할 가능성이 있음을 시사해주고 있으며, 앞서 기술된 사이토카인 결과와도 부합된다.

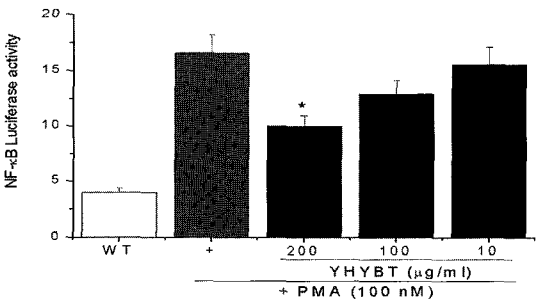

Fig. 6. Effects of YHJST on NF-κB dependent luciferase gene expression. Cells were transiently co-transfected with pGL-3-NF-κB, and pCMV-β-gal. After 18 h, cells were treated with vehicle, PMA, PMA plus YHJST. Values are expressed as means± S.D. of three independent experiments, performed in triplicate. *P < 0.05, significantly different from the PMA.

결 론

現在 臨床에서 皮膚 瘙痒症에 活用되고 있는 凉血除濕湯을 試料로 PMA와 A23187에 의하여 활성화된 비만세포의 염증성 매개물질의 분비 억제 작용과 염증성 사이토카인 억제 작용 및 NF-kB 활성에 관한 효과를 검색하였던바 다음과 같은 결론을 얻었다.

YHJST는 생쥐 폐의 fibroblast에 대하여 250 ㎍/㎖ 이하의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. YHJST는 PMA와 A23187에 의하여 활성화된 비만세포 (HMC-1)의 히스타민 분비를 농도 의존적으로 억제하였다. YHJST는 A23187에 의하여 활성화된 비만세포 (RHL-2H3)의 b-hexosamindase의 분비를 농도 의존적으로 억제하였다. YHJST는 PMA와 A23187에 의하여 활성화된 비만 세포(HMC-1)의 염증성 사이토카인 (TNF-a와 IL-6) 및 키모카인 (IL-8)의 mRNA 발현을 유의적으로 억제하였다. YHJST는 PMA와 A23187에 의하여 활성화된 비만 세포에서 NF-kB 프로모터활성을 농도 의존적으로 억제하였으며, 200 ㎍/㎖ 농도에서는 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 한국산업기술평가원에서 지원하는 지역협력연구센터 과제인 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학 연구센터 (TBRC, RRC04700, 2005)의 지원에 의해 수행되었음을 밝히며 이에 감사합니다.

참고문헌

1. Bradding, P., Holgate, S.T. Immunopathology and human mast cell cytokines. Crit Rev Oncol Haematol 31:119-133, 1999.
2. Galli, S.J., Nakae, S., Tsai, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses Nat Immunol 6:135-142, 2005.
3. Marone, G., Galli, S.J., Kitamura, Y. Probing the roles of

mast cells and basophils in natural and aquaired immunity Trends Immunol 23:425-427, 2002.

4. Siebenlist, U., Franzoso, G., Brown, K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. Annu. Rev Cell Biol 10: 405-455, 1994.
5. Baeuerie, P.A., Henkel, T. Function and activation of NF-kB in the immune system. Annu Rev Immunol. 12:141-179, 1994.
6. Kuprush, D.V., Udalova, I.A., Turetskaya, R.L., Rice, N.R., Nedospasov, S.A.C. Conserved kappa B element located downstream of the tumor necrosis factor-a gene: distinct NF-kappa B binding pattern and enhancer activity in LPS acyivated murine macrophage. Oncogene 11:97-106, 1995.
7. Church, M.K., Hiroi, J. Inhibition of IgE-dependent histamine release from human dispersed lung mast cells by anti-allergic drugs and salbutamol Br J Pharmacol 90:421-429, 1987.
8. 정근기. 知母의 collagen 誘發 關節炎에 대한 消炎 效果 :DBA/1J mouse에서의 병태 관찰 및 RAW264.7에서의 cytokine 분비측정, 경희대학교 대학원, 2006.
9. 박수남 외. 활성산소의 유해작용에 대한 황금(黃芩)성분의 생체 보호작용에 관한 연구, 서울산업대학교논문집 445(1):189-199, 1997.
10. 권영달 외. 生地黃의 投與가 마우스의 先天免疫 및 適應免疫 反應에 미치는 影響, 韓方再活醫學科學會誌 8(1):233-254, 1998.
11. 이석원 외. 목단피 추출물 및 EA분획의 항알러지 작용에 대한 연구, 동의병리학회지 15(4):631-635, 2001.
12. 朴涌基. 葛花와 鬱金 및 고삼의 抗酸化作用에 關한 比較硏究, 大韓本草學會誌 16(1):41-53, 2001.
13. Yoon, Joung Yi. Anti-inflammatory and Analgesic Activity of Fractions of Plantago asiatica Herb, Chung-Ang journal of pharmacal sciences, 17:129-147, 2003.
14. Bradding, P., Roberts, J.A., Britten, K.M., Montefort, S., Djukanovic, R., Mueler, R. et al. Interleukin -4,-5, and -6 and tumor necrosis factor -a in normal and asthmatic airways:evidence for human mast cell as a source of these cytokines Am J Respir Cell Mol Biol 10:471-480, 1994.
15. Rangachari, P.K. Histamine; mercurial messenger in the gut Am J Physiol 262:G1-G13, 1993.
16. Kristiana, K.G., Duraisamy, K., Jing, Cao, Curtis, L.C., Theoharis, C.T. Regulation of IL-1-induced selective IL-6 release from human mast cells and inhibition by quercetin. Br J Pharmacol 148:208-215, 2006.
17. Salamon, D., Shoham, N.G., Gavrieli, R., Wolach, B., Mekori, Y.A. Human mast cells release IL-8 and induced neutrophil chemotaxis on contact with activated T cells Allergy 60: 1316-1319, 2005.