

북강활 에틸아세테이트분획의 비만세포에서의 염증반응 억제효과

서운교¹, 이주일¹, 박준홍², 박용기^{3*}

1: 동국대학교 분당한방병원 내과 2: 봉화고랭지약초시험장
3: 동국대학교 한의과대학 한방신약개발센터·한의학연구소

The Ethylacetate Extract of North Kangwhal (*Ostericum koreanum*) Attenuates the Inflammatory Responses in PMA/A23187-stimulated Mast Cells

Un-Kyo Seo¹, Ju IL Lee¹, Jun Hong Park², Yong-Ki Park^{3*}

1: Department of Internal Medicine, Dongguk University Oriental Hospital
2: Bongwha Alpine Medicinal Plant Experiment Station
3: Oriental Medicine Drug R&D Center and Oriental Medicine Research Institute,
College of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : In this study, the pharmacological effects of the ethylacetate extract of *Ostericum koreanum*(North Kangwhal; NK) on allergic inflammation were investigated in activated human mast cells.

Methods : North Kangwhal was extracted with 80% methanol for 24 h, and then fractionated with ethylacetate(NK-EtOAc extract). HMC-1 cells, an human mast line, were pre-incubated with different concentrations of NK-EtOAc extract for 30 min, and then stimulated with PMA(50 nM/ml) and A23187(1 μM/ml) at indicated times. The cell toxicity was determined by MTT assay. The concentrations of prostaglandin E2(PGE2) and cytokines(TNF-α, IL-8) were measured by enzyme-linked immunosorbant assay.

Results : NK-EtOAc extract(10~50 μg/ml) significantly inhibited the productions of PGE₂, TNF-α and IL-8 in PMA/A23187-stimulated HMC-1 cells without cell toxicity(0~50 μg/ml). NK-EtOAc extract also inhibited PMA/A23187-induced phosphorylation of ERK1/2 MAPK and the NF-κB p65 subunit translocation into the nuclear of HMC-1 cells.

Conclusions : This study suggests that NK-EtOAc extract may have an anti-inflammatory property through suppressing the production of inflammatory mediators in activated mast cells and its molecular mechanism underlies the blocking of NF-κB pathway.

Key words : *Ostericum koreanum*, inflammation, mast cells, prostaglandin E2, cytokines, NF-κB

* 교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한방신약개발센터, 한의학연구소
· Tel : 054-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr
· 접수 : 2008년 11월 8일 · 수정 : 2008년 12월 19일 · 채택 : 2008년 12월 22일

서론

비만세포(mast cell)는 결합조직과 점막에 존재하는 세포질 내 과립을 풍부하게 가진 면역세포로서 알레르기 염증반응에 관여한다^{1,2)}. 비만세포는 IgE가 매개하는 면역반응과 관계되어 있으며, TH2 type에 의존적인 면역과민성반응과 알레르기성 질환 및 특정 선천성 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있다³⁾. 특히 외부자극으로부터 활성화된 비만세포는 다양한 프로테아제나 히스타민과 같은 혈관확장 물질들을 분비하며, 염증유발물질인 지질매개물과 다양한 사이토카인의 분비를 자극한다. 비만세포로부터 분비되는 TNF- α , IL-6, IL-8, vascular permeability factor, vascular endothelial cell growth factor, GM-CSF, stem cell factor, basic fibroblast growth factor, monocyte inhibitory protein-1 α 등의 사이토카인들은 알레르기 염증의 초기반응과 후기반응을 유발하고 만성적으로 염증반응을 지속시키는 데 중요한 역할을 한다¹⁻³⁾. 특히 활성화된 비만세포로부터 후천적으로 생성되는 leukoreiene, platelet activating factor prostaglandin(PG) 등은 점액분비를 증가시키고, 기도 내 염증세포의 침윤을 유도하며, 혈관 투과성을 증가시키고, 부종 등을 유발함으로써 실제 알레르기 천식과 직접 연관되는 것으로 알려져 있다⁴⁻⁷⁾. 따라서 활성화된 비만세포로부터 유발되는 염증반응을 조절하고 염증매개물질들을 조절하는 것은 알레르기 천식을 막아줄 수 있는 유효한 방법이 될 수 있다⁸⁻¹¹⁾.

강활(羌活, 本經, *Osterici Radix*, *Ostericum koreanum* Maximowicz)은 미나리과(繖形科; Umbelliferae)에 속한 多年生 本草로서 根을 基源으로 한다¹²⁾. 강활의 根莖에는 주로 cnidilin, notofterol, imperatorin, nodakenetin 등의 coumarin 계열 화합물과 *p*-hydroxylphenethyl anisate, ferulic acid 등의 페놀류, β -sitosterol glucoside, β -sitosterol 등의 스테롤 화합물이 함유되어 있다¹²⁾. 강활은 《神農本草經》上品의 獨活項目에 一名羌活이라 하여 獨活의 異名으로 風寒所擊 金瘡 止痛 奔豚 癰瘡 女子疝瘕를 치료한다고 처음으로 기재되어 강활과 독활의 구분은 없으나^{13,14)}, 唐代의 《藥性本草》에서 처음으로 강활과 독활을 구별하였고, 우리나라의 《東醫寶鑑》에서 독활은 땀두릅의 뿌리, 강활은 강호리라 하여 구분하고 있다¹⁵⁾. 현재 국내에서 사용되는 강활은 국내에서 재배되는 *Ostericum koreanum* Maximowicz의 뿌리와 중국 강활인 *Notopterygium incisum* Ting, 寬葉羌活인 *N. forbesii* Boissier의 뿌리가 있다¹⁶⁻²⁰⁾. 강활은 性味

가 辛苦, 溫하고, 歸經은 肺, 膀胱, 腎經이며, 효능은 散寒, 祛風, 除濕, 止痛으로 外感風寒과 風濕에 인한 頭身疼痛과 風寒濕邪로 인한 關節疼痛을 치료하므로 感冒나 關節질환에 상용되고 있는 한약재이다¹²⁾. 실제 임상에서는 感冒로 인한 解熱뿐 아니라 鼻塞, 咳嗽, 頭痛, 全身疼痛에 사용되고 있으며, 關節疾患으로 각종 痺證에 사용되고 皮膚瘙癢症에도 응용되고 있다²⁰⁾. 강활에 대한 實驗研究로는 살모넬라균에 대한 항균효과²¹⁾와 중국 강활의 cyclooxygenase(COX)와 5-Lipoxygenase 억제효과에 대한 보고가 있을 뿐, 현재까지 국내에서 재배되는 강활의 약리적인 연구는 거의 없는 실정이다²²⁾.

따라서 본 연구에서는 국내에서 재배되는 강활의 메탄올추출물로부터 에틸아세테이트분획을 분리하여 사람의 비만세포로부터 유발되는 알레르기성 염증반응에 대한 효과를 조사하였으며, 유의한 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 북강활의 뿌리는 경상북도 농업기술원 봉화고랭지약초시험장에서 재배된 1년생 강활로서 2007년 10월 하순에 뿌리를 수확하여 물로 세척하고 열풍건조기로 40℃에서 건조한 시료를 사용하였다.

2. 방법

1) 약물 제조

건조된 북강활(560 g)을 분쇄한 후 메탄올 2L를 가하여 상온에서 24시간 추출하였으며, 여과지(Whatman No. 1)로 여과한 후 회전식 증발기로 감압·농축하였다. 위의 추출조작은 3회 반복하였으며, 최종 74g의 북강활 메탄올추출물을 얻었다. 북강활 메탄올추출물 70 g을 물 1L에 현탁하여 3L 분액여두에 넣고 에틸아세테이트용매 1L를 분액여두에 넣은 후 24시간 상온에서 방치함으로써 에틸아세테이트층을 회수하였으며, 40℃에서 감압 농축하였다. 이와 같은 방법으로 2회 반복하여 최종 10g의 북강활 에틸아세테이트 분획물(NK-EtOAc extract)을 얻었다.

2) 세포배양

사람의 비만세포주(human mast cell line)인 HMC-1

세포는 10% inactivated fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin/streptomycin이 포함된 Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMEM)을 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3) 세포독성조사

HMC-1 세포(5×10⁴ cells/well)를 96-well culture plate에 100 μl의 IMEM 배지와 함께 하룻밤 배양한 다음, 여러 농도의 복강활 에틸아세테이트 분획물을 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 50 μl씩 넣은 후 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도하였으며, 100 μl의 DMSO 용액을 첨가하여 보라색의 formazan 결정을 완전히 용해하였다. 발색정도를 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성 (cell toxicity)은 세포만 배양한 무처리군의 생존도 100%를 기준으로 약물처리군의 상대적인 세포생존도를 계산하였다.

4) Prostaglandin E₂ 측정

활성화된 비만세포로부터 분비되는 염증물질인 PGE₂의 양을 세포배양액으로부터 효소면역분석법을 이용하여 측정하였다. 즉 HMC-1 세포에 다양한 농도의 복강활 에틸아세테이트 분획물을 처리하여 30분간 배양한 다음 PMA(50 nM/ml)와 A23187(1 μM/ml)를 처리하여 8 시간 배양하였다. 세포배양액을 수거하여 배양액 내에 존재하는 PGE₂의 양을 PGE₂ Enzyme ImmunoAssay kit를 이용하여 측정하였으며, PGE₂의 농도(pg/ml)는 PGE₂ 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

5) 사이토카인 측정

활성화된 HMC-1 세포로부터 분비되는 염증사이토카인인 TNF-α와 IL-8의 양을 ELISA 방법으로 측정하였다. 먼저 HMC-1 세포에 여러 농도의 복강활 에틸아세테이트 분획물을 30분간 전처리한 후 PMA(50 nM/ml)와 A23187 (1 μM)를 8시간 처리하여 세포배양액을 수집하였다. ELISA를 위해 먼저 capture monoclonal antibody (mAb)를 100 μl씩 96-well coating plate의 각 well에 넣은 후 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 이를 0.05% Tween-20이 포함된 1x PBS(PBS-T)로 3번 세척한 다음, 1% bovine serum albumin가 포함된 blocking 용액을 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. Blocking 용액을 제거한 다음, 수거한 세포배양액과 각 사이토카인의 표준단백

질을 100 μl씩 넣어 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이를 5번 1x PBS-T로 세척하고 detection mAb를 넣어 1시간 실온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 plate를 1x PBS-T로 3회 세척하고 streptavidin-HRP mAb를 넣어 30분간 실온에서 암반응시켰다. 이를 다시 1x PBS-T 용액으로 3회 세척하고 TMB 기질용액을 넣어 15분 교반기 위에서 암반응시켰다. 반응을 종료시키기 위해 1M phosphoric acid 용액 50μl 첨가하고 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 사이토카인의 농도는 표준단백질의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

6) Western blot 분석

HMC-1 세포로부터 COX-2의 단백질 발현과 염증신호전달분자들(MAPKs, I-κBα 및 NF-κB)의 발현에 대한 복강활 에틸아세테이트 분획물의 효과를 조사하기 위해 Western blot을 수행하였다. 즉 HMC-1 세포에 다양한 농도의 강활 에틸아세테이트 분획물을 처리하여 30분간 배양한 다음 여기에 PMA(50 nM/ml)와 A23187(1 μM)를 처리하여 30분간(pERK/ERK, NF-κB/I-κB) 또는 12시간(COX-2) 배양하였다. 각 세포를 수거하여 HBSS 용액으로 2회 세척한 다음 RIPA 용액(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin)으로 lysis 한 후 얼음에 30분간 유지시켰다. 20 μg의 단백질을 2× sample buffer(100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM dithithreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)와 섞어 100°C에서 3분 끓인 다음 10-12% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였다. 전기영동 후 gel상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4°C, 30V로 16시간 동안 transfer시켰다. Membrane은 10% skim milk로 실온에서 1시간 동안 blocking 한 다음 각 단백질에 대한 일차항체와 상온에서 2시간 반응시켰다. Membrane을 TBS-T로 3회 세척한 후 anti-rabbit IgG conjugated HRP 이차항체와 상온에서 1시간 반응시키고 ECL solution을 이용하여 x-ray film에 감광시켰다.

7) 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균±표준편차(mean ±SD)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 SPSS program의 Student t-test 로 검정하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포독성 검정

HMC-1 세포에 대한 북강활 에틸아세테이트 분획물(NK-EtOAc fraction)의 독성 정도를 조사하기 위하여 MTT assay를 수행하였다(Fig. 1).

세포 독성은 HMC-1 세포만 배양하였을 때의 세포생존율인 100%를 기준으로 북강활 에틸아세테이트 분획물의 처리농도 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 103.2 \pm 6.15%, 99.66 \pm 2.48%, 101.8 \pm 5.91%, 95.46 \pm 6.47%, 66.73 \pm 4.15% 및 49.16 \pm 2.66%로 측정되었으며 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 세포독성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 세포독성에 의한 영향을 배제하기 위하여 이후 실험은 50 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 북강활 에틸아세테이트 분획물의 농도에서 수행하였다.

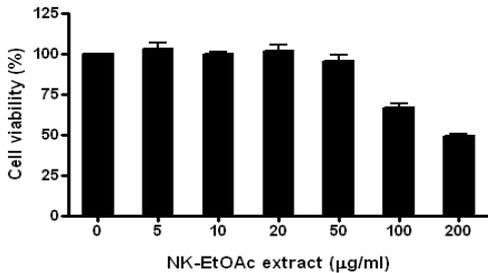


Fig. 1. Effects of the ethylacetate fraction of North Kangwhal on the viability of HMC-1 cells

Cells(5×10^4 cells/well) were treated with different concentrations of NK-EtOAc extract for 24 h, and cell viability was assessed by MTT assay as described in the Materials and Methods. Results shown as percentage cell viability compared with the viability of untreated control cells, and presented as mean \pm SD of three independent experiments.

2. PGE₂ 생성에 대한 효과

활성화된 비만세포로부터 분비되는 염증매개물질인 PGE₂에 대한 북강활 에틸아세테이트 분획물(NK-EtOAc extract)의 억제효과를 조사하기 위하여, 효소면역반응법을 수행하였다(Fig. 2).

HMC-1 세포에서 PGE₂의 분비는 세포만 배양하였을 경우, 58.43 \pm 1.35 pg/ml로 매우 낮게 검출된 반면, PMA와 A23187를 처리하였을 때 719.8 \pm 15.13 pg/ml로 증가하였다. 한편 북강활 에틸아세테이트 분획물을 2 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때는 각각 751.9 \pm 16.21 pg/ml, 570.2 \pm 28.82 pg/ml, 465.2 \pm 2.17 pg/ml, 177.3 \pm 1.207

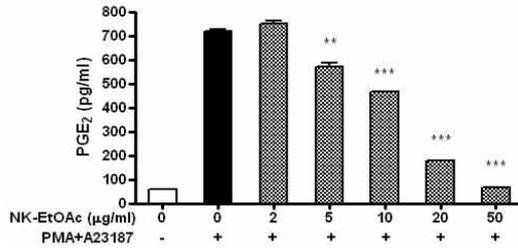


Fig. 2. Effects of the ethylacetate fraction of North Kangwhal on PGE₂ production in PMA/ A23187-stimulated HMC-1 cells

Cells were treated with different concentrations of the EtOAc extract with PMA(50 nM/ml) plus A23187(1 $\mu\text{M/ml}$) or without for 8 h, and PGE₂ concentration in medium was determined using enzyme immunoassay. Results shown as percentage cell viability compared with the viability of untreated control cells, and presented as mean \pm SD of three independent experiments. **p<0.01 and ***p<0.001 vs. PMA/A23187-treated group.

pg/ml 및 65.19 \pm 2.17 pg/ml로 측정되어, PMA와 A23187자극에 의해 HMC-1 세포로부터 분비되는 PGE₂가 처리농도에 의존적이고 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다.

3. 염증사이토카인 생성에 대한 효과

활성화된 비만세포로부터 분비되는 염증사이토카인인 TNF- α 와 IL-8에 대한 북강활 에틸아세테이트 분획물(NK-EtOAc extract)의 효과를 조사하기 위하여, ELISA를 수행하였다(Fig. 3).

먼저 HMC-1 세포에서 TNF- α 의 생성은 세포만 배양하였을 경우에는 93.61 \pm 7.98 pg/ml로 낮게 측정되었고, PMA와 A23187를 처리하였을 때 1310 \pm 50.71 pg/ml로 높게 측정되었다(Fig. 3A). 또한 북강활 에틸아세테이트 분획물을 2 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때는 각각 970.6 \pm 14.79 pg/ml, 572.2 \pm 12.01 pg/ml, 441.2 \pm 50.71 pg/ml, 363.5 \pm 15.49 pg/ml 및 259.5 \pm 4.93 pg/ml로 농도 의존적이고 유의적으로 TNF- α 의 생성이 억제되는 것으로 나타났다.

한편 IL-8은 세포만 배양하였을 경우에 50.49 \pm 4.76 pg/ml로 낮게 측정되었으며, PMA와 A23187의 처리 후 955.2 \pm 38.03 pg/ml로 증가되었다(Fig. 3B). 반면 NK-EtOAc 분획물을 2 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때, 각각 791.3 \pm 19.06 pg/ml, 469.4 \pm 12.13 pg/ml, 333.6 \pm 38.34 pg/ml, 248.5 \pm 15.45 pg/ml 및 244.7 \pm 7.45 pg/ml로 측정되어 TNF- α 에서와 마찬가지로 IL-8의

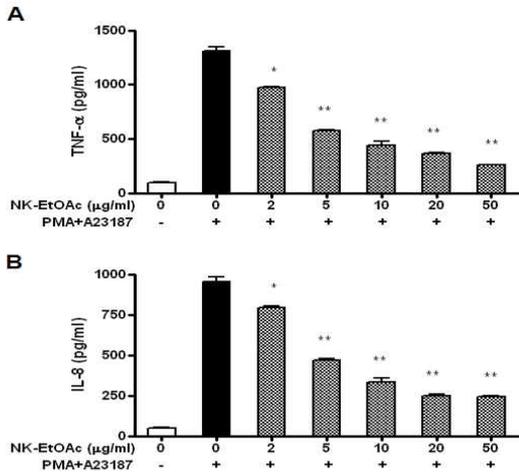


Fig. 3. Effects of the ethylacetate fraction of North Kangwhal on cytokine production in PMA/ A23187-stimulated HMC-1 cells

Cells were treated with different concentrations of the EtOAc extract with PMA(50 nM/ml) plus A23187(1 μM/ml) or without for 8 h, and the concentration of TNF-α and IL-8 in medium was determined using ELISA. Results shown as mean±SD of three independent experiments. *p<0.05 and **p<0.01 vs. PMA/A23187-treated group.

생성이 농도 의존적이고 유의적으로 억제되는 것으로 나타났다.

따라서, PMA와 A23187에 의해 활성화되는 HMC-1 세포로부터 생성되는 염증사이토카인인 TNF-α와 IL-8은 북강활 에틸아세테이트 분획물에 의해 효과적으로 억제됨을 알 수 있었다.

4. MAPK 활성화에 대한 효과

북강활 에틸아세테이트 분획물(NK-EtOAc extract)이 HMC-1 세포에서 PMA/A23187에 의해 유도되는 ERK1/2 MAPK 분자의 활성화에 어떤 영향을 주는지 조사하기 위하여 Western blot을 수행하였다(Fig. 4).

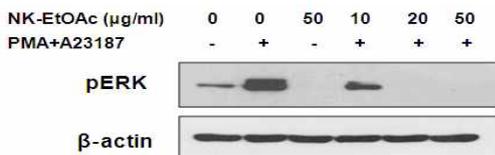


Fig. 4. Effect of the ethylacetate extract of North Kangwhal on the phosphorylation of ERK1/2 MAPK molecules in PMA/ A23187-stimulated HMC-1 cells

Cells were treated with different concentrations of the EtOAc extract with PMA(50 nM/ml) plus A23187(1 μM/ml) or without for 15 min, and the ERK levels in cell lysates were determined using Western blot as described in the Materials and Methods. Results are representative of three independent experiments.

먼저 HMC-1 세포만 배양하였을 경우와 북강활 에틸아세테이트 분획물(50 μg/ml)만 처리하였을 경우에는 ERK1/2의 인산화 형태인 p-ERK1/2의 발현이 관찰되지 않은 반면, PMA/A23187 처리에 의해 인산화 형태가 발현되는 것을 확인하였다. 또한 PMA/A23187에 의한 ERK1/2의 인산화가 북강활 에틸아세테이트 분획물 20 μg/ml과 50 μg/ml 농도의 처리에 의해 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 북강활 에틸아세테이트 분획물은 비만세포의 활성화를 통해 나타나는 ERK1/2 MAPK의 활성을 억제함으로써 항염증 효과를 나타내는 것으로 나타났다.

5. NF-κB 활성화에 대한 효과

북강활 에틸아세테이트 분획물(NK-EtOAc extract)이 HMC-1 세포에서 PMA/A23187에 의해 유도되는 I-κBa의 degradation과 NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 HMC-1 세포의 세포질과 핵 내 존재하는 I-κBa와 NF-κB p65 subunit의 발현을 Western blot으로 조사하였다(Fig. 5).

먼저 세포질 내 I-κBa의 경우, 세포만 배양한 경우와 북강활 에틸아세테이트 분획물(50 μg/ml)만 처리한 경우에는 I-κBa의 degradation이 일어나지 않아 I-κBa가 그대로 발현되는 반면, PMA/A23187의 처리에 의해 degradation이 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 5A). 또한 PMA/A23187에 의한 I-κBa의 degradation은 북강활 에틸아세테이트 분획물의 20 μg/ml과 50 μg/ml 처리농도에서 억제되어 세포만 배양했을 때와 유사하게 나타났다.

한편 세포 핵 내의 NF-κB 이동은 세포만 배양한 경우와 북강활 에틸아세테이트 분획물만 처리하였

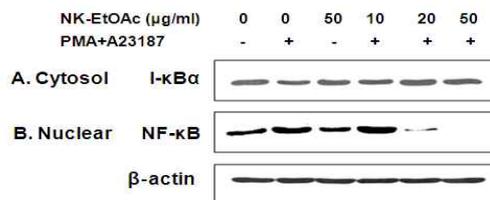


Fig. 5. Effect of the ethylacetate extract of North Kangwhal on the I-κBa degradation and the NF-κB activation in PMA/A23187-stimulated HMC-1 cells

Cells were treated with different concentrations of the EtOAc extract with PMA(50 nM/ml) plus A23187(1 μM/ml) or without for 30 min, and the expression of I-κBa and NF-κB p65 subunit in nuclear extracts of the cells were determined using Western blot as described in the Materials and Methods. Results are representative of three independent experiments.

을 경우에는 세포질로부터 핵 내로 이동이 적게 일어나서 발현이 약하게 관찰되었으며, PMA/A23187의 처리에 의해 NF- κ B의 핵 내로 이동하였으므로 발현이 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 5B). 또한 PMA/A23187에 의한 NF- κ B의 핵 내로의 이동은 북강활 에틸아세테이트 분획물을 20 μ g/ml과 50 μ g/ml 농도로 처리하였을 때, 억제되는 것으로 나타났다.

따라서 PMA/A23187에 의해 활성화된 비만세포로부터 분비되는 다양한 염증매개물질들을 북강활 에틸아세테이트 분획물이 억제하는 것이 주요 염증신호전달경로인 NF- κ B pathway의 차단과 연관됨을 알 수 있었다.

고 찰

비만세포는 알레르기의 주요 원인이 되는 면역세포로서 비만세포 표면에는 IgE 형태의 항체가 붙을 수 있는 표면인자인 IgE-Fc ϵ RI가 있으며, 알레르기 항원인 IgE-Fc ϵ RI 자극을 통해 다양한 사이토카인들을 분비함으로써 점막부종, 기관지 평활근 수축, 점액 분비 증가 등을 일으키게 되면서 초기 알레르기 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다^{7,8)}. 특히 비만세포로부터 분비되는 TNF- α 는 혈관내피세포의 유착분자의 발현을 증가시켜 T 세포, B 세포 및 호산구 등의 면역세포를 표적기관으로 유입하게 되고, tryptase, IL-5, GM-CSF 등을 분비하여 호산구의 화학주성과 증식을 돕고, IL-4, IL-6, IL-8 등을 분비하여 Th2 세포의 면역반응을 증가시킴으로써 결국 IgE의 생산을 증가시켜 만성알레르기 발병에 기여하게 된다⁵⁻⁸⁾. 즉 사람의 비만세포는 IgE-Fc ϵ RI-알레르긴으로부터 시작하여 알레르기 초기 염증반응을 일으키고 지속시키는 데 중요한 역할을 하기 때문에 비만세포로부터 분비되는 다양한 염증물질들을 조절하는 것은 알레르기 천식의 발병을 막아줄 수 있는 매우 유효한 치료 접근방법이 될 수 있다. 최근에는 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가되는 각종 염증물질들을 효과적으로 감소시킬 수 있는 항염증제 및 치료보조제 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며, 특히 한약재로부터 유래되는 생리활성성분이나 화합물이 치료를 위한 표적물질들이 되고 있다⁸⁻¹¹⁾.

羌活은 性味が 辛苦, 濇하여 散寒, 祛風, 除濕, 止痛작용이 있으므로 感冒나 關節痛에 응용하는데 실제 임상에서 感冒나 關節痛 이외에도 鼻塞, 咳嗽, 頭痛 및 皮膚小양증에 사용되고 있다¹²⁾. 또한 上昇發

散하는 작용이 강하여 肌表의 游風과 寒濕의 邪氣를 發散시키고 關節을 通利하여 止痛시키는 효능이 있기 때문에 外感風寒과 風濕으로 인한 頭身疼痛과 風寒濕邪로 인한 關節痛을 치료하는데 사용하며 특히 上半身의 風寒濕痹에 뛰어난 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이 외 羌活은 水腫과 瘡瘍腫毒에 응용되는데 水腫은 羌活이 疏風透表하기 때문에 陽水로써 遍身水腫, 二便不利한 證을 치료하고, 瘡瘍腫毒은 羌活의 辛溫한 性味로 解表하기 때문이며 瘡瘍初期에 風寒表證이 있고 寒熱無汗한 경우에 사용하는 것으로 알려져 있다. 한편 羌活의 기원식물을 보면, 국내에서는 재배되는 羌活(*Ostericum koreanum* Maximowicz)의 뿌리와 중국에서 재배되는 羌活(*Notopterygium incisum* Ting; 寬葉羌活 *N. forbesii* Boissier)의 뿌리로 나누어지는데, 이들 중에서 국내 유통되는 羌活은 남강활과 북강활로써 유통되고 있지만, 그 효능에 대해서는 질환별 약리적 실험연구가 미비하여 정확하게 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 국내에서 재배되고 있는 북강활의 메탄올추출물로부터 에틸아세테이트 분획물을 분리하여 알레르기 염증반응에 대한 약리적 효과를 조사하기 위하여 사람의 비만세포에서 유발되는 염증반응에 대한 효과를 검증하였다.

PG는 대표적인 지용성 매개물질로서 폐포 내 대식세포와 비만세포에서 arachidonic acid로부터 COX의 작용에 의해 합성된다²⁵⁾. COX에는 두 가지 isoform인 COX-1과 COX-2가 있으며 COX-1은 대부분의 조직에서 꾸준히 만들어져 house-keeping 효소의 역할을 하는 반면, COX-2는 염증과 같은 병적인 상황에서 TNF- α , IL-1, growth factors, mitogens 등에 의해 유도되며 대식세포, 단핵구, 비만세포, 혈관내피세포, 연골세포, 조골세포, 활막세포 등 다양한 면역세포에서 생성된다. 일반적으로 PGE₂는 대표적인 염증매개물질로 알려져 있어 조직 내 PGE₂의 농도가 질병 정도와 유의적인 상관성이 있다는 보고가 있다²⁶⁾. PGE₂는 spleen precursor cells과 human umbilical cord로부터 비만세포의 발달을 촉진시키며, IgE-mediated murine mast cell degranulation, 히스타민, 사이토카인 및 vascular endothelial growth factor 등의 생성을 유도²³⁾함으로써 비만세포에서의 chemokinetic action을 나타낸다. 최근 비만세포로부터 생성되는 PGE₂가 호흡기 염증반응에서 호중구의 침윤을 통해 알레르기 천식의 병태생리에 기여하는 것으로 보고되었고²⁴⁾, monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)²⁷⁾과 vascular endothelial growth factor(VEGF)의 분비를 유도함으로써 inflammation-associated angiogenesis

를 유발하는 것으로 보고되었다²⁸⁾. 본 연구에서 복강활의 에틸아세테이트 분획물은 PMA/A23187 처리에 의해 활성화된 HMC-1 세포로부터 생성되는 PGE₂의 분비를 농도 의존적이고 유의적으로 억제시켰다. 최근 연구결과에 따르면 만성염증질환에 사용하는 비스테로이드성소염제에 의한 PGE₂의 억제는 단기적으로는 염증에 의한 증상을 조절하는데 도움이 되지만, 한편으로는 TH1 type 반응의 편향을 초래함으로써 병의 지속을 가져올 수 있다고 보고되고 있다. 따라서 PGE₂가 중요한 역할을 하는 염증질환에서 강활의 PGE₂ 작용에 대한 선택적 조절에 대한 연구가 추후 필요할 것으로 생각된다.

TNF- α 나 IL-8과 같은 Th2 type의 염증사이토카인들은 T 세포 등 다양한 면역 세포에서 분비되지만 활성화된 비만세포에서도 분비되어 과민성 반응을 유발함으로써 알레르기 질환의 병태생리에 직접 기여하게 된다^{29,30)}. TNF- α 는 다양한 생물학적 기능을 갖는 대표적인 염증사이토카인이며, 비만세포로부터 분비되는 TNF- α 는 알레르기 천식에서 초기에서부터 만성 염증반응 발달에 기여하고, 히스타민의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. IL-8은 비만세포를 포함하여 T 세포, B 세포, 중성구, 호중구 등의 면역 세포로부터 분비되는 사이토카인으로 비만세포로부터 분비되는 IL-8은 중성구의 침윤에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. IL-8은 천식환자의 기관지 폐포 세척액(Bronchoalveolar lavage fluid)에 많이 존재하는 것으로 알려져 있고 병의 진전에 관여하는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 본 연구에서 복강활의 에틸아세테이트 분획물은 PMA/A23187 처리에 의해 활성화된 HMC-1 세포로부터 분비되는 TNF- α 와 IL-8을 농도 의존적이고 유의적으로 억제하였다. 이런 결과는 복강활의 에틸아세테이트 분획물이 비만세포로부터 염증사이토카인 생성을 억제시킴으로써 알레르기성 염증반응에 대한 조절효과가 있음을 의미한다.

한편 외부자극을 통해 시작되는 염증반응은 주로 MAPK 분자들을 인산화시킴으로써 NF- κ B나 activator protein-1(AP-1)과 같은 전사조절인자들의 발현을 가동시키게 된다³¹⁾. MAPK의 subfamily에는 ERK1/2, c-Jun-N-terminal kinase /stress-activated protein kinase(JNK) 및 p38 MAPK가 있는데 이들의 신호 전달과정은 염증반응을 유도하는 염증매개물질들의 합성을 유도한다는 점에서 염증관련 질병의 발병기전에 중요한 역할을 하게 된다. 특히 비만세포에서의 ERK1/2의 인산화는 NF- κ B를 활성화시켜 TNF- α , IL-6, IL-8과 같은 염증사이토카인의 유전자발현을

증가시키는 것으로 알려져 있다³²⁾. 또한 NF- κ B는 면역 세포에서 염증기전에 관여하는 매우 중요한 전사인자 중 하나로써 면역조절, 급성기 반응, 세포주기 조절 등 다양한 세포 활동을 조절하게 된다³¹⁾. NF- κ B는 외부 자극에 의해 세포질에 존재하던 NF- κ B가 NF- κ B inhibitor인 I- κ B와의 degradation을 통해 핵안으로 이동되어 여러 유전자의 κ B element와 결합함으로써 그 유전자들의 전사를 가져오게 된다. 특히 NF- κ B는 염증에 관여하는 염증사이토카인이나 면역 세포 이동에 중요한 접합 분자들, 케모카인 등의 유전자를 발현시키기 때문에 초기 염증반응 조절에 매우 중요한 전사인자로 알려져 있다. 본 연구에서 복강활의 에틸아세테이트 분획물의 NF- κ B 염증신호전달 경로에 대한 효과를 조사한 결과, 복강활의 에틸아세테이트 분획물이 ERK1/2 MAPK의 인산화를 강력하게 억제하였고, cytosol에서 I- κ Ba 분해를 억제함으로써 NF- κ B의 핵으로의 이동을 효과적으로 차단하는 것으로 나타났다. 따라서 복강활의 에틸아세테이트 분획물은 PMA/A23187에 의해 활성화된 HMC-1 세포에서 NF- κ B 활성을 억제함으로써 염증매개물질들의 생성을 감소시키며, 이를 통해 알레르기성 염증반응에 대한 조절효과를 나타냄을 알 수 있었다.

결론적으로 복강활의 에틸아세테이트 분획물은 활성화된 비만세포로부터 분비되는 염증매개물질들을 유의적으로 억제시킴으로써 알레르기 염증반응에 대한 억제를 통해 알레르기성 천식과 같은 질환의 개선을 위한 약물소재로 활용되어질 수 있을 것으로 사료된다.

결론

복강활 에틸아세테이트 분획물의 알레르기성 염증반응에서 대한 약리효과를 조사하기 위하여 사람의 비만세포주인 HMC-1 세포에서 PMA/A23187의 자극을 통해 분비되는 염증매개물질(PGE₂)과 염증사이토카인(TNF- α , IL-8)에 억제효과 및 작용기전을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 복강활의 에틸아세테이트분획물의 HMC-1 세포에 대한 독성은 50 μ g/ml 농도까지 나타나지 않았다.
2. 복강활의 에틸아세테이트 분획물은 활성화된 HMC-1 세포로부터 PGE₂의 생성을 농도 의존적이고 유의적으로 감소시켰다.

3. 북강활의 에틸아세테이트 분획물은 활성화된 HMC-1 세포로부터 TNF- α 와 IL-8의 생성을 농도 의존적이고 유의적으로 감소시켰다.

4. 북강활의 에틸아세테이트 분획물은 활성화된 HMC-1 세포에서 유도되는 염증신호분자인 ERK1/2 MAPK의 인산화를 억제하였다.

5. 북강활의 에틸아세테이트 분획물은 활성화된 HMC-1 세포에서 I-kB의 degradation과 NF-kB의 핵으로 이동을 차단하였다.

감사의 글

이 논문은 동국대학교 연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008 ; 454 : 445-54.
- KM Ahn. Role of mast cell in allergic inflammation and innate immunity. *Korean Journal of Pediatrics*. 2004 ; 47 : 11-5.
- Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol*. 2000 ; 12 : 624-31.
- Geha RS, Jabara HH & Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class- switch recombination. *Nature Rev. Immunol*. 2003 ; 3 : 721-32.
- Brown JM, Wilson TM & Metcalfe DD. The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. *Clin Exp Allergy*. 2008 ; 38 : 4-18.
- Hu ZQ, Zhao WH, Shimamura T. Regulation of mast cell development by inflammatory factors. *Curr Med Chem*. 2007 ; 14 : 3044-50.
- Brzezińska-Błaszczyk E, Pietrzak A, Misiak -Tłoczek AH. Tumor necrosis factor(TNF) is a potent rat mast cell chemoattractant. *J Interferon Cytokine Res*. 2007 ; 27 : 911-9.
- Kim EK, Kim EY, Moon PD, Um JY, Kim HM, Lee HS, Sohn Y, Park SK, Jung HS, Sohn NW. Lithospermi radix extract inhibits histamine release and production of inflammatory cytokine in mast cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007 ; 71 : 2886- 92.
- Moon PD, Na JJ, Jeong HJ, Hong SH, Kim SJ, Chae HJ, Kim HR, Choi JO, Lee SH, Shin JY, Kim HM. Inhibitory effect of Gamibojungkitang extract on mast cell- mediated allergic reaction in murine model. *J Pharm Pharm Sci*. 2005 ; 8 : 94-101.
- Xue CC, Hügel HM, Li CG, Story DF. Efficacy, chemistry and pharmacology of chinese herbal medicine for allergic rhinitis. *Curr Med Chem*. 2004 ; 11 : 1403-21.
- Shibata T, Kono T, Tanii T, Mizuno N, Hamada T. Effects of ryo-kan-kyomi-sin-ge-nin-to extract on degranulation of and histamine release from rat mast cells. *Am J Chin Med*. 1991 ; 19 : 243-9.
- 全國韓醫科大學 共同教材編輯委員會 編著. 本草學. 永林社. 2007 : 159-161.
- 馬繼興. 神農本草經輯注. 北京 : 人民衛生出版社. 1995 : 64-65
- 中國醫學科學院 藥物研究所. 中藥志(第2冊). 北京 : 人民衛生出版社. 1975 : 397-401.
- 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 大成出版社. 1986 : 721-722.
- 한국약학대학협의회 약전분과회. 대한약전 제8개정 해설서. 서울 : 신일상사. 2003 : 141.
- 全國中草藥匯編寫組. 全國中草藥匯編. 北京 : 人民衛生出版社, 1983 : 301.
- 中國醫學科學院 藥物研究所. 中藥志(第2冊). 北京 : 人民衛生出版社. 1975 : 397-401.
- 國家藥典委員會. 中華人民共和國藥典(一部). 北京 : 化學工業出版社. 2000 ; 144-145.
- 雷載權 張廷模. 中華臨床中藥學(上卷). 北京 : 人民衛生出版社. 1998 ; 204-209
- Shin S. *In vitro* effects of essential oils from *Ostericum koreanum* against anti biotic-resistant *Salmonella* spp. *Arch Pharm Res*. 2005 ; 28 : 765-9.
- Zschocke S, Lehner M, Bauer R. 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitory active constituents from Qianghuo (*Notopterygium incisum*). *Planta*

- Med. 1997 ; 63 : 203-6.
23. Rocca B, FitzGerald GA. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol.* 2002 ; 2 : 603-30.
 24. Oguma T, Asano K, Shiomi T, Fukunaga K, Suzuki Y, Nakamura M, Matsubara H, Sheldon HK, Haley KJ, Lilly CM, Drazen JM, Yamaguchi K. Cyclooxygenase-2 expression during allergic inflammation in guinea-pig lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 ; 165 : 382-6.
 25. Yousefi S, Hemmann S, Weber M, Hölzer C, Hartung K, Blaser K, Simon HU. IL-8 is expressed by human peripheral blood eosinophils. Evidence for increased secretion in asthma. *J Immunol.* 1995 ; 154 : 5481-90.
 26. Vancheri C, Mastruzzo C, Sortino MA, Crimi N. The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE₂. *Trends Immunol.* 2004 ; 25 : 40-6.
 27. Nakayama T, Mutsuga N, Yao L, Tosato G. Prostaglandin E₂ promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. *J Leukoc Biol.* 2006 ; 79 : 95-104.
 28. Abdel-Majid RM, Marshall JS. Prosta glandin E₂ induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells. *J Immunol.* 2004 ; 172 : 1227-36.
 29. Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth PH, Holgate ST. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994 ; 10 : 471-80.
 30. Gordon JR, Burd PR, Galli SJ. Mast cells as a source multifunctional cytokines. *Immunol. Today.* 1990 ; 11 : 458-64.
 31. Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002 ; 3 : 413-21.
 32. Azzolina A, Guameri P, Lampiasi N. Involvement of p38 and JNK MAPKs pathways in Substance P-induced production of TNF-alpha by peritoneal mast cells. *Cytokine.* 2002 ; 18 : 72-80.