

回生散 에탄올 추출물이 비만세포 매개성 염증반응에 미치는 영향

박지혜 · 권동렬¹ · 이수경^{2*}

원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과, 1: 약학대학 한약학과, 2: 한의과대학 한방재활의학과학교실

Effects of Hoesaeng-san Ethanol Extract on the Human Mast cell-mediated Inflammatory Responses

Jee Hea Park, Dong Yeol Kwon¹, Su Kyung Lee^{2*}

Department of Third Medicine, Professional Graduate School of Korean Medicine, 1: Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, 2: Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University

Hoesaeng-san is known to be effective for treating diarrhea and vomiting. However the therapeutic mechanism of Hoesaeng-san is still not well understood. The aim of the present study was to demonstrate the effects of Hoesaeng-san ethanol extract (HSSEE) on the expression of pro-inflammatory cytokines, as well as to elucidate its mechanism of action in the human mast cell line (HMC-1). Mast Cell were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) plus A23187 in the presence or absence of HSSEE. To study the possible effects of HSSEE, ELISA, RT-PCR, Western blot analysis were used in this study. HSSEE significantly inhibited the PMA plus A23187-induction of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6 and IL-8. In activated HMC-1 cells, phosphorylation of extra-signal response kinase (ERK) 1/2 and c-jun n-terminal kinase (JNK)1/2 decreased after treatment with HSSEE. Moreover HSSEE inhibited PMA plus A23187-induced nuclear factor (NF)- κ B activation and I κ B degradation. HSSEE suppressed the expression of TNF- α , IL-6, IL-8 through a decrease in the ERK 1/2 and JNK 1/2, as well as activation of NF- κ B. These results indicated that HSSEE exerted a regulatory effect on inflammatory reactions mediated by mast cells.

Key words : Hoesaeng-san, mast cell, inflammatory reactions

서 론

回生散은 藿香과 陳皮로 구성된 처방으로 明代 李梴의 《醫學入門》에 “陳皮藿香各五錢水煎溫服治癍亂吐瀉但一點胃氣存者服之回生”이라고 처음 수록된 이후에 《東醫寶鑑》과 《方藥合編》에도 토하고 설사하는 것을 치료하는 처방으로 소개되어 있는 것으로 보아 처음 만들어진 이후 吐瀉癍亂에 있어 중요한 처방으로 사용되어 왔음을 알 수 있다¹⁻⁴⁾.

癍亂은 濕癍亂과 乾癍亂으로 나누어 볼 수 있는데 濕癍亂은 위로는 토하고 아래로는 설사하는 것으로 癍亂의 일반적인 경우이고 乾癍亂은 토하지도 않고 설사도 하지 않는 것이 일반적이

* 교신저자 : 이수경, 전북 익산시 익산대로 460 원광대학교 한의과대학

· E-mail : skolive@hanmail.net, · Tel : 063-850-6836

· 접수 : 2013/11/25 · 수정 : 2014/01/07 · 채택 : 2014/02/05

다¹⁾. 濕癍亂에서 나타나는 구토와 설사의 증상으로 보아 급성 위장염이나 전염성 질환인 콜레라라고 볼 수 있다.

回生散의 구성 약물인 藿香은 芳香化濁, 開胃止嘔, 發表解暑 등의 효과가 있고 항염증 작용이 있는 것으로 밝혀져 서양에서도 치료 약물로서 藿香이 많이 이용되고 있다^{5,6)}. 또한 陳皮는 理氣健脾, 燥濕化痰 작용이 있고 진피추출물이 관절염 개선효과 및 염증 억제효과가 있다는 보고가 있다^{7,8)}.

염증반응은 상해에 대한 생체조직 방어반응의 하나로써 생체 조직에 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다. 따라서 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암을 유발하기도 한다⁹⁾.

비만세포는 염증성 질환에 작용하여 각종 사이토카인을 분

비하는데, 결체조직과 점막에 존재하는 세포질 내 과립을 풍부하게 가진 면역세포로서 알레르기 염증반응에 관여한다^{10,11}). 비만세포는 IgE가 매개하는 면역반응과 관계되어 있으며, TH2 type에 의존적인 면역 과민성 반응과 알레르기성 질환 및 특정 선천성 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있다¹²). 특히 외부 자극으로부터 활성화된 비만세포는 다양한 protease나 histamine과 같은 혈관 확장 물질들을 분비하며, 염증 유발물질인 지질 매개물과 다양한 사이토카인의 분비를 자극한다. 비만세포로부터 분비되는 TNF- α , IL-6, IL-8, vascular permeability factor, vascular endothelial cell growth factor, GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), stem cell factor, basic fibroblast growth factor, monocyte inhibitory protein-1 α 등의 사이토카인들은 알레르기성 염증의 초기반응을 유발하고, 만성적으로 염증반응을 지속시키는데 중요한 역할을 한다^{9,11}). 특히 비만세포는 helicobacter pylori에 의해 유발된 위염이나 급성장염 또는 cholera toxin에 의해 발생한 염증과 밀접한 관련이 있다는 연구결과가 있다¹³⁻¹⁵).

한편 陳皮와 藿香으로 구성된 回生散에 대한 생리활성 연구가 아직 보고된 바 없다. 이에 본 저자는 회생산 에탄올 추출물을 이용하여 PMA와 A23187로 활성화된 인간의 비만세포로부터 유발되는 염증반응에 대한 효과를 조사하기 위해 염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 알아보고 그 기전을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시료의 조제

회생산 에탄올 추출물(HSSEE)은 70% 에탄올로 2시간 환류 추출하였다. 그 추출물은 0.45 μ m 필터로 걸러, 감압 하에 농축하여 건조(lyophilized)하였으며, 4°C에서 보관하였다. 추출된 추출물을 실험에 이용하기 위하여 인산완충 식염수(phosphate-buffered saline. PBS)에 용해하였다. 회생산 에탄올 추출물은 陳皮 18.75 g, 藿香 18.75 g, 조성으로 되어 있으며, 대한약국(익산, 한국)에서 구입하였다(Table 1).

Table 1. The composition of Hoesaeng-san

Herbal name	Latin name	Dosage (g)
陳皮	Citri Unshii Pericarpium	18.75 g
藿香	Agastachis Herba	18.75 g

2) 시약

PMA, A23187 (Calcymin; C29H37N3O6), PD98059와 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 그리고 다른 시약들은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. IMDM, 우태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS) 및 항생제는 Hyclone (Logan, UT, USA)로부터 구입하였고, 조직배양 플레이트와 직경 100 mm 페트리접시는 Nunc Inc (Rochester, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Anti-human TNF- α /IL-6/IL-8 antibodies, biotinylated

anti-human TNF- α /IL-6/IL-8 antibodies, and recombinant human TNF- α /IL-6/IL-8는 BD PharMingen (San Diego, CA, USA); Anti-NF- κ B/I κ B/MAPKs (ERK, JNK, p38) antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santacruz, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

3) 세포

인간 비만 세포주 HMC-1 cells는 IMDM medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)에 10% fetal bovine serum과 100 U/mL penicillin/streptomycin sulfate를 첨가하여 배양하였다. 그리고 배양 환경은 5% CO₂와 37°C를 유지하였다. PMA, A23187은 HMC-1 세포의 자극제로 사용하였다.

4) Primer 준비

RT-PCR을 위해 여러 개의 Primer를 사용하였다. Primer의 구성은 다음과 같다.

Table 2. Primer sequences for RT-PCR

	cDNA	Primer sequence
IL-6	forward	5'-GAT GGA TGC TTC CAA TCT GGA T-3'
	reverse	5'-AGT TCT CCA TAG AGA ACA ACA TA -3'
TNF- α	forward	5'-CAC CAG CTG GTT ATC TCT CAG CTC-3'
	reverse	5'-CGG GAC GTG GAG CTG GCC GAG GAG-3'
IL-8	forward	5'-CGA TGT CAG TGC ATA AAG ACA-3'
	reverse	5'-TGA ATT CTC AGC CCT CTT CAA AAA-3'
β -actin	forward	5'-CAA AAG GGT CAT CAT CTC TG-3'
	reverse	5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG -3'

2. 방법

1) MTT 분석

세포 생존력은 MTT assay를 이용하였다. 회생산 에탄올 추출물이 처리된 HMC-1세포에 10 μ L의 MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] 5 mg/mL 용해액을 첨가한 후 37°C에서 4시간 보존하였다. 세포 배양 상층액을 제거하고 100 μ L의 DMSO를 첨가하여 MTT를 용해시킨 후 microplate reader기를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) ELISA 측정

HMC-1 세포를 IMDM 배지를 이용하여 1 \times 10⁶ cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 회생산 에탄올 추출물을 각각 100, 250, 500 μ g/mL 농도로 1시간 동안 처리한 후, PMA와 A23187로 HMC-1 세포를 자극한 후 8시간 후에 세포 부유액을 원심 분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하였다. 상층액 내 TNF- α , IL-6, IL-8 생성량을 ELISA kit (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법으로 정량해 분석하였다.

3) RNA 분리 및 RT-PCR

회생산 에탄올 추출물에 의한 염증성 사이토카인의 mRNA 발현 여부를 알아보기 위하여 RT-PCR로 mRNA 발현을 조사하였다. 세포를 세포배양 접시에 3 \times 10⁶ 세포로 분주한 다음 회생산 에탄올 추출물을 처리한 후, PMA와 A23187로 처리하고 6시간 후에 세포를 모아 PBS로 세척하여 이지 블루(easy blue, 인트론

사) 1 mL를 가하여 실온에서 교반하였다. 클로로포름 200 μ L를 넣고 다시 교반하여 13,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리한 다음, 상층액 400 μ L에 이소프로판올을 가하여 다시 원심 분리하여 RNA 펠렛을 얻었다. 여기서 얻어진 RNA에 MuLV 역전사효소(reverse transcriptase), 1 mM dNTP 0.5 μ g을 넣어 cDNA를 만들었다. 여기에 TNF- α , IL-6, IL-8, β -actin 프라이머를 넣고 유전자 증폭기(thermal cycler)를 이용하여 증폭시켰다. 이때 TNF- α , IL-8, β -actin은 95°C에서 1분, 60°C에서 45초, 72°C에서 1분 동안 반응시켰으며, IL-6은 94°C에서 1분, 56°C에서 45초, 72°C에서 1분 동안 반응시켰다. 만들어진 RNA를 2% 아가로스 겔에 전기영동시켜 UV 검출기로 확인하였다.

4) Western blot analysis

배양이 끝난 세포를 수집하여 2-3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척 한 후 1 mL의 lysis buffer를 첨가하여 30분간 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 핵 추출을 위해서는 비만세포를 100 mm의 세포배양용 접시에 5×10^6 cells/mL의 농도로 분주하였다. 다양한 농도(100, 250, 500 μ g/mL)의 시료용액으로 처리한 세포를 PMA와 A23187로 1시간 동안 활성화시킨 후, 한 차례 PBS로 씻어내고 1 mL의 차가운 PBS에 모은 다음 원심 분리하였다. 세포질을 녹이기 위해 용해 완충액(lysis buffer, 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L CaCl₂, 1% Triton X-100, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, and 10 μ g/mL aprotinin)에 풀어준 후 4°C에서 12,000 X g로 1분간 원심 분리하였다. 또한 핵 분리를 위해 모은 세포를 저장 완충액(hypotonic buffer, 10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM KCl, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM dithiothritol (DTT), 10 μ g/mL aprotinin)에 풀어준 후, 얼음 위에서 15분간 방치하였다. 0.1% N(Nonidet)P-40을 가하고 10초간 강하게 교반하여 세포를 용해하였다. 4°C에서 12,000 X g로 1분간 원심 분리하여 핵과 세포질을 분리하였으며, 이를 다시 고농도 식염수(high salt buffer, 20 mM HEPE, pH 7.9, 25% 글리세롤, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM NaF, 1 mM sodium vanadate)에 풀어주었다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 protein assay Kit (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)를 사용하여 정량하였다. 20-30 μ g의 lysate를 8-12% mini gel SDS-OAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TBS-T (TBS+0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 1시간 동안 실시하였다. ERK, NF- κ B 및 I- κ B 1차 항체의 발현 양을 검토하기 위해 항체로는 1차 항체 (1 : 1000)를 TBS-T 용액에서 희석하여 4°C에서 하루 동안 배양시킨 후 다음날 TBS-T로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG를 1 : 2000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBS-T로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1-3분간 반응 후 LAS 4000 (GE,

Healthcare, USA)을 이용하여 확인하였다.

5) 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치 \pm 표준편차(SEM)를 구하여 그 유의성은 Student's t-test를 이용하여 신뢰수준 99% ($p < 0.01$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

결 과

1. 회생산 에탄올 추출물이 세포 생존에 미치는 영향

회생산 에탄올 추출물이 세포 독성에 영향을 주는지 알아보기 위해 MTT 분석법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 회생산 에탄올 추출물을 100, 250, 500 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때 모두에서 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

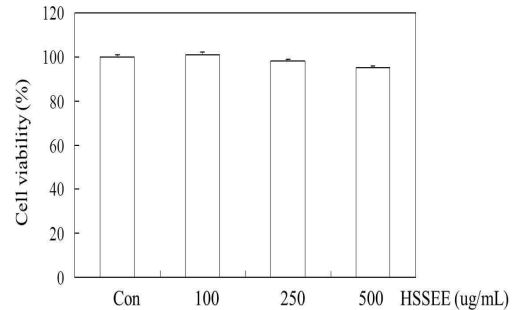


Fig. 1. Effect of Hoesaeng-san ethanol extract (HSSEE) on cell viability in HMC-1 cells. Cell viability was evaluated with the MTT assay. Data represent the mean \pm S.E.M. of duplicate determinations from three separate experiments.

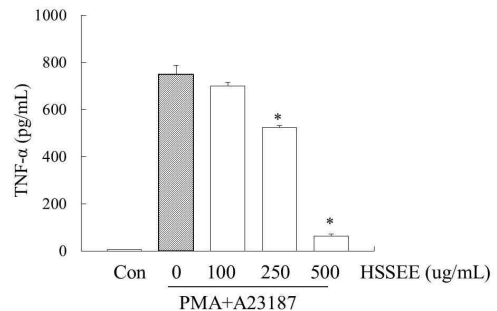


Fig. 2. Effect of Hoesaeng-san ethanol extract (HSSEE) on production of TNF- α in PMA plus A23187-induced HMC-1 cells. HMC-1 cells were pretreated with HSSEE (100, 250, 500 μ g/mL) for 1 h prior to PMA+A23187 stimulation for 8 h. The production level of TNF- α was determined by ELISA. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. * $p < 0.01$, compared with PMA+A23187-stimulated values.

2. TNF- α 생성에 대한 회생산 에탄올 추출물의 영향

TNF- α 와 같은 pro-inflammatory cytokine은 염증단계에서 중추적 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서 비만세포주인 HMC-1 세포로부터 염증성 사이토카인 TNF- α 의 생성을 ELISA를 이용하여 실험하였다. 먼저, HMC-1세포에 회생산 에탄올 추출물을 100, 250, 500 μ g/mL의 농도로 전 처리한 후 PMA (50 nM) 와 A23187 (1 μ M)로 자극하고 8시간 후에 그 상층액을 가

지고 실험하였다. 그 결과 PMA와 A23187을 처리하였을 때 TNF- α 생성이 현저히 증가하였다. 회생산 에탄올 추출물을 100, 250, 500 ug/mL 농도로 처리하였을 때 TNF- α 생성이 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 특히 250, 500 ug/mL 농도에서 TNF- α 생성이 유의하게 억제되었다.

3. IL-6 생성에 대한 회생산 에탄올 추출물의 영향

Pro-inflammatory cytokine인 IL-6의 생성을 ELISA를 이용하여 실험하였다. PMA와 A23187로 활성화된 HMC-1 세포에서 IL-6의 생성량이 현저히 증가하였고, 회생산 에탄올 추출물을 100, 250, 500 ug/mL 농도로 처리하였을 때 IL-6 생성 역시 통계적으로 유의하게 억제하는 양상을 보였다(Fig. 3).

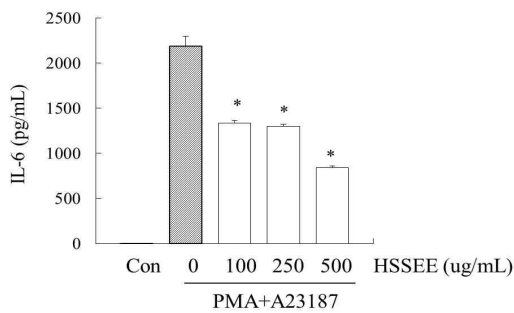


Fig. 3. Effect of Hoesaeng-san ethanol extract (HSSEE) on production of IL-6 in PMA plus A23187-induced HMC-1 cells. HMC-1 cells were pretreated with HSSEE (100, 250, 500 ug/mL) for 1 h prior to PMA+A23187 stimulation for 8 h. The production level of IL-6 was determined by ELISA. Each bar represents the mean±S.E.M. of three independent experiments. *p<0.01 compared with PMA+A23187-stimulated values.

4. IL-8 생성에 대한 회생산 에탄올 추출물의 영향

Chemokine으로 알려진 IL-8의 생성에 대한 회생산 에탄올 추출물의 효과를 알아보기 위해, HMC-1 세포에 회생산 에탄올 추출물을 100, 250, 500 ug/mL의 농도로 전 처리한 후 PMA (50 nM) 와 A23187 (1 uM)로 자극하고 8시간 후에 그 상층액을 가지고 실험하였다. 그 결과 회생산 에탄올 추출물에 의해 IL-8의 생성량이 농도 의존적인 억제 양상을 나타냈다(Fig. 4).

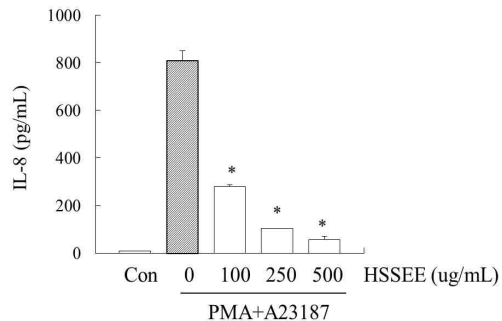


Fig. 4. Effect of Hoesaeng-san ethanol extract (HSSEE) on production of IL-8 in PMA plus A23187-induced HMC-1 cells. HMC-1 cells were pretreated with HSSEE (100, 250, 500 ug/mL) for 1 h prior to PMA+A23187 stimulation for 8 h. The production level of IL-8 was determined by ELISA. Each bar represents the mean±S.E.M. of three independent experiments. *p<0.01 compared with PMA+A23187-stimulated values.

5. TNF- α mRNA 발현에 대한 회생산 에탄올 추출물의 효과

염증성 사이토카인의 유전자 발현을 RT-PCR을 사용해 실험하였다. 먼저, PMA와 A23187에 의해 증가된 TNF- α mRNA의 발현이 회생산 에탄올 추출물을 100, 250, 500 ug/mL로 처리하였을 때 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 5).

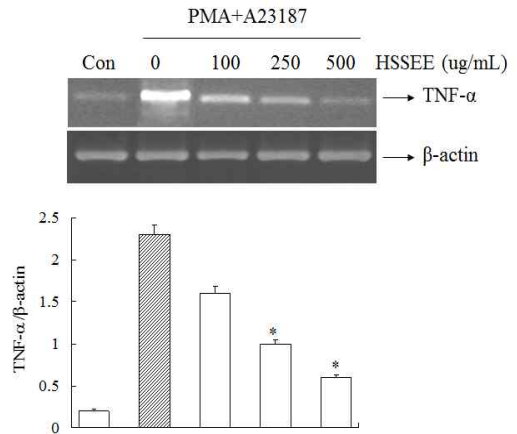


Fig. 5. Effect of Hoesaeng-san ethanol extract (HSSEE) on gene expression of TNF- α in PMA plus A23187-induced HMC-1 cells. HMC-1 cells were pretreated with HSSEE (100, 250, 500 ug/mL) for 1 h prior to PMA+A23187 stimulation for 6 h. The mRNA expression level of TNF- α was determined by RT-PCR. Each bar represents the mean±S.E.M. of three independent experiments. *p<0.01 compared with PMA+A23187-stimulated values, as analyzed by an image analyzer.

6. IL-6 mRNA 발현에 대한 회생산 에탄올 추출물의 효과

비만세포주인 HMC-1 세포로부터 염증성 사이토카인 IL-6 mRNA의 발현을 RT-PCR을 이용하여 실험하였다. 그 결과, PMA와 A23187을 처리하였을 때 IL-6 mRNA 발현이 현저히 증가하였고, 회생산 에탄올 추출물을 처리하였을 때 IL-6 mRNA 발현 억제효과가 나타났다. 특히, 회생산 에탄올 추출물의 250, 500 ug/mL에서 유의하게 억제양상을 보였다(Fig. 6).

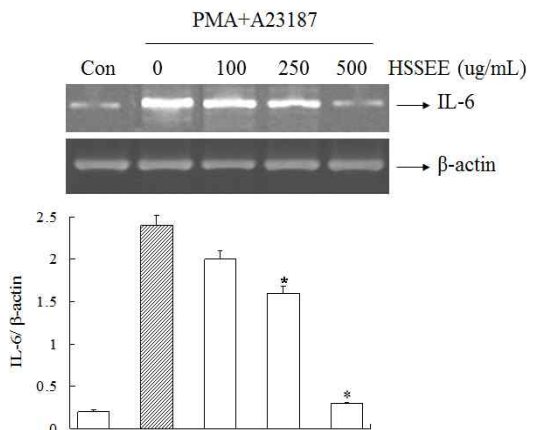


Fig. 6. Effect of Hoesaeng-san ethanol extract (HSSEE) on gene expression of IL-6 in PMA plus A23187-induced HMC-1 cells. HMC-1 cells were pretreated with HSSEE (100, 250, 500 ug/mL) for 1 h prior to PMA+A23187 stimulation for 6 h. The mRNA level of IL-6 was determined by RT-PCR. Each bar represents the mean±S.E.M. of three independent experiments. *p<0.01, compared with PMA+A23187-stimulated values, as analyzed by an image analyzer.

7. IL-8 mRNA 발현에 대한 회생산 에탄올 추출물의 효과

다음으로 IL-8 mRNA 발현을 실험하였다. PMA와 A23187에 의해 증가된 IL-8 mRNA의 발현이 회생산 에탄올 추출물을 전 처리하였을 때 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 7).

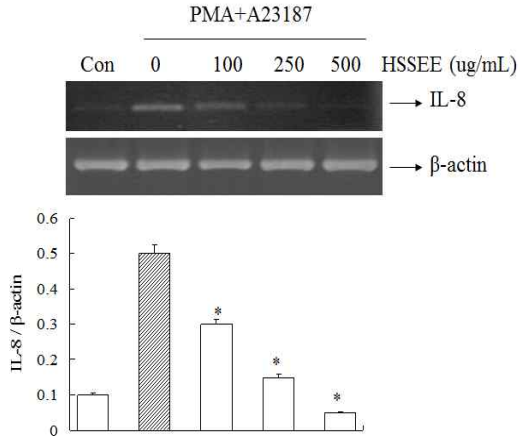


Fig. 7. Effect of Hoesaeng-san ethanol extract (HSSEE) on gene expression of IL-8 in PMA plus A23187-induced HMC-1 cells. HMC-1 cells were pretreated with HSSEE (100, 250, 500 ug/mL) for 1 h prior to PMA+A23187 stimulation for 6 h. The production level and mRNA expression level of IL-8 was determined by RT-PCR. Each bar represents the mean±S.E.M. of three independent experiments. *p<0.01, compared with PMA+A23187-stimulated values, as analyzed by an image analyzer.

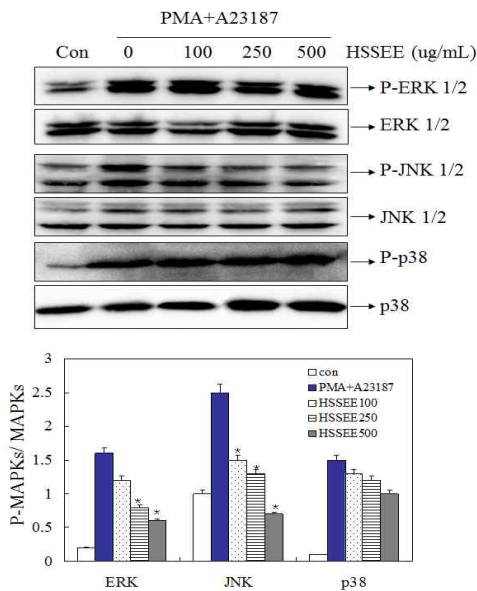


Fig. 8. Effect of Hoesaeng-san ethanol extract (HSSEE) on phosphorylation of MAPKs. After pretreatment of HSSEE for 1 h, HMC-1 cells were stimulated by PMA (50 nM) and A23187 (1 uM) 30 min for phosphorylation of MAPKs. Phosphorylation of MAPKs was analyzed by Western blot. Each bar represents the mean±S.E.M. of three independent experiments. *p<0.01, compared with PMA+A23187-stimulated values, as analyzed by an image analyzer.

8. MAPKs 인산화에 대한 회생산 에탄올 추출물의 효과

MAPKs는 세포의 성장과 분화 및 사이토카인과 스트레스 제어에 중요한 역할을 한다. 따라서 회생산 에탄올 추출물의 억

제 메커니즘이 MAPKs를 경유하는지 알아보기 위해 MAPKs의 인산화를 Western blot을 통해 확인하였다. 그 결과, PMA와 A23187에 의해 활성화된 HMC-1 세포에 회생산 에탄올 추출물을 처리한 경우 ERK 1/2와 JNK 1/2의 인산화를 유의하게 억제하는 것을 확인하였다. 그러나 p38의 인산화에는 유의한 결과를 나타내지 못했다(Fig. 8).

9. I-κB 분해와 핵 내의 NF-κB 활성화에 대한 회생산 에탄올 추출물의 억제효과

전사인자 NF-κB 활성과의 연관성을 확인하기 위해 I-κB 분해와 NF-κB 활성화 여부를 측정하였다. PMA와 A23187로 활성화된 HMC-1 세포에 회생산 에탄올 추출물을 처리한 경우 NF-κB 결합 활성저해를 핵의 추출물에서 보였고, 세포질에서 I-κB분해 역시 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 9). 따라서 MAPKs 인산화 저해는 I-κB분해 억제와 NF-κB 활성화저해에 의한 세포내 신호전달체계에 의한 것으로 확인되었다.

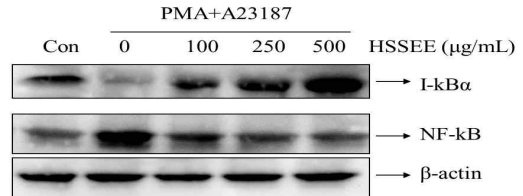


Fig. 9. Effect of Hoesaeng-san ethanol extract (HSSEE) on the activation of NF-κB in HMC-1 cells. Cells were pretreated with HSSEE for 1 h prior to PMA (50 nM) + A23187 (1 uM) stimulation. IκB degradation and NF-κB translocation were assayed by Western blot.

고찰

回生散은 癩亂을 치료하는 처방으로 《醫學入門》에서는 癩亂에 대해 “癩亂者署濕乾三種, 病本中焦濕熱壅, 心腹卒痛或熱寒, 痰喘煩渴却可恐, 轉筋舌卷囊縮危, 分利升降消食冗”이라 설명하였고, 癩亂으로 몹시 토하고 설사할 때 胃氣가 조금이라도 남아 있는 경우 陳皮와 藿香을 같은 양으로 배합한 回生散을 처방한다고 하였다¹⁻³⁾.

回生散의 구성 약물인 陳皮는 산초과에 속하는 상록소교목인 귤나무의 성숙한 과실의 과피로 우리나라 제주도에서 많이 재배한다¹⁶⁾. 性味는 苦, 辛, 溫하며 脾, 胃에 歸經하고 效能은 理氣和中, 燥濕化痰한다^{6,17)}. 陳皮에는 carotenoid류, bio-flavonoid류, pectin 및 terpene류가 풍부하게 함유되어 있으며, 고혈압 예방, 혈중 LDL 콜레스테롤 함량 감소 작용 및 HDL 콜레스테롤을 높이며, 순환계 질환의 예방 및 개선 효과와 항괴양 작용 및 위액분비 촉진작용 소염 및 항알러지 효과, 항산화 효과, 면역조절 효과, 항관절염 효과 등 다양한 생리적 작용이 보고되고 있다^{7,17-21)}.

藿香은 꿀풀과(Labiatae)에 속한 일년생 혹은 다년생 초본인 배조향의 전초를 건조한 것으로 性味는 辛, 微溫하고 脾, 胃, 肺에 歸經한다. 效能은 發表解暑, 芳香化濕, 和胃止嘔한다⁶⁾. 주성분으로는 methylchavicol을 함유하고, 그 외에 anethole,

anialdehyde, limonene, hexadecanoic acid, linoleic acid, maslinic acid, oleanic acid, acacetin, tilianin 등을 함유한다²²⁻²⁴). 薑香의 정유 성분은 위장 점막으로부터 위증 분비를 촉진하고 소화를 도우며 급성 위장염에 효과가 있다. 물 추출물은 *Leptospira*를 사멸시키며, 薑香의 에테르, 에탄올 및 물 추출물은 곰팡이 및 세균의 성장을 억제한다^{6,9}). 특히, pogostol은 *staphylococcus*, *streptococcus*, *candida albicans* 등에 유효한 작용이 보고되어 있다²⁵⁻²⁷). 또한, 薑香은 항진균, 항바이러스작용, 죽종형성 억제작용, 염증성 세포 활성물질 억제 효과 등에 대한 연구 보고도 있다^{28,29}). 그러나 陳皮와 薑香으로 구성된 回生散에 대한 연구는 보고된 바 없었다. 따라서 본 연구에서는 陳皮와 薑香으로 구성된 회생산 에탄올 추출물이 비만세포를 매개로한 염증성 매개물질을 억제하는 것을 확인하였다. 이에 pro-inflammatory cytokine 억제기전과의 연관성을 밝히기 위해 회생산 에탄올 추출물을 이용하여 HMC-1 세포에서 PMA와 A23187로 유도된 TNF- α , IL-6, IL-8 생성과 발현에 대한 억제효과를 알아보고 그 작용기전에 대해 실험하였다. 그 결과, 회생산 에탄올 추출물을 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하였을 때 특히 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 TNF- α , IL-8의 생성 억제효과가 강하게 나타났고 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 IL-6의 생성 억제효과가 나타났으며(Fig. 2-4), TNF- α , IL-6, IL-8 mRNA 발현도 억제 되는 것으로 나타났다(Fig. 5-7).

비만세포는 주로 알레르기 반응 또는 각종 염증성 반응에 관여하는 세포로 잘 알려져 있다. 이 세포에서는 IL-8, IL-13, TNF- α , GM-CSF, IFN- γ , leukemia inhibitory factor 등이 분비되거나 각각의 mRNA의 발현이 증가된다³⁰). 이들 사이토카인들은 급성 반응 단백질 유전자를 자극하여 단백질을 생산하고 혈구성 인자들을 자극하여 염증세포들을 활성화 시킨다³¹).

그 중 TNF- α 는 조직의 손상을 통하여 신경 손실을 유도하며 염증반응의 주요한 인자로서 작용하며, IL-1b, IL-6, IL-8 그리고 GM-CSF 등을 포함하는 다른 염증 cytokine의 강력한 유도인자일 뿐만 아니라 하나의 자가분비 매개체이다^{32,33}). IL-6은 생체 내에서 과잉 생산되면 여러 질환들의 병인론에 관여하는 것으로 보이는데, 여러 종류의 악성종양, 중식성질환, 자가 면역성 질환 및 감염성 질환 등의 발병에 관여한다. 그래서 일종의 염증 유도성 cytokine (proinflammatory cytokine)이고, 염증진행과정의 강력한 매개자이다³⁴). TNF- α , IL-6, IL-8과 같은 염증성 cytokine은 NF- κB 나 AP-1 등과 같은 전사인자에 의해 조절된다. NF- κB 의 전사활성은 전염증 매개물질(TNF- α , IL-6, IL-8 등)의 유전자 발현을 유도함으로써 염증을 불러일으키는 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{35,36}).

NF- κB 는 염증 및 면역질환에 관여하는 cytokine의 합성에 중요한 역할을 한다는 것이 이미 보고되어 있다³⁷). NF κ B1 (p105/50), NF κ B2 (p100/52), RelA (p65), RelB 및 c-Rel이 NF- κB 족(family)에 속한다. 일반적으로 NF- κB 는 다이머(dimer)로 이루어져 있는데 이 다이머는 NF κ B1 (p50)과 RelA (p65) 또는 NF κ B1 (p50)과 NF κ B2 (p52)로 구성된다. NF- κB 는 내인성 억제인자 I κ B와 결합하여 세포질에 존재하다가 특정 신호에 의해 I κ B의

인산화와 분해가 이루어지면 핵 내로 이동하여 TNF- α 와 IL-6과 같은 유전자의 프로모터에 존재하는 특이한 DNA 서열이 결합함으로써 활성화 된다³⁸). 이러한 결과들을 종합하여 보면 NF- κB 와 관련 분자들이 염증과정의 조절에 중요한 역할을 하며, 또한 이들이 여러 가지 항염증제의 표적이 되는 것을 알 수 있다.

또한, 현재까지 비교적 잘 알려진 염증반응의 분자신호 전달 기전은 MAPK superfamily에 속하는 세 가지 효소들로 extracellular signal - regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal Kinase (JNK) /stress-activated protein kinase (SAPK), serine/threonine protein kinase인 p38 MAPK 등을 들 수 있다³⁹). 이들 MAPKs는 모두 다양한 세포의 자극에 반응해 upstream MAPK kinase (MEK)에 의해 tyrosine과 threonine에서 인산화가 일어남으로써 활성화된다. 위의 MAPKs의 인산화는 그 후에 다른 kinase나 전사 인자를 인산화, 활성화시키고, 결국 표적 유전자의 발현을 변화시킨다.

본 연구에서 사용한 칼슘 ionophore인 A23187는 세포내 칼슘의 농도를 증가시켜 비만세포의 활성화를 통해 탈과립을 유도하며, PMA는 protein kinase C에 직접 작용하는 분열 촉진제로서 비만세포를 활성화시켜 세포 활성물질을 분비하게 한다. 본 연구에서는 A23187과 PMA를 모두 사용하여 염증모델을 구축하고 회생산 에탄올 추출물이 염증성 사이토카인과 같은 염증매개체들을 어떠한 신호전달을 통해 억제하는지도 알아보았다. 그 결과, 회생산 에탄올 추출물이 핵 내의 NF- κB 의 활성을 억제하고 I- κB 분해를 억제하는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 MAPKs의 인산화는 ERK 1/2과 JNK 1/2의 인산화는 억제하는 반면 p38 MAPK 인산화에는 아무런 영향을 주지 못했다. 이는 PMA와 A23187로 유도된 비만세포의 염증반응은 ERK 1/2 와 JNK 1/2는 신호전달 경로를 경유하는 반면, p38 MAPK의 경로와는 다르다는 것을 보여준다.

이러한 연구결과로서 회생산 에탄올 추출물이 비만세포를 매개로 만성 염증 질환의 새로운 치료 후보 물질임을 알 수 있다.

결론

인간 비만세포주인 HMC-1 세포를 PMA와 A23187로 자극하였을 때 회생산 에탄올 추출물의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

회생산 에탄올 추출물은 PMA와 A23187로 유도된 비만세포에서 TNF- α , IL-6, IL-8 생성과 mRNA의 발현을 농도 의존적으로 억제하였다. 또한 회생산 에탄올 추출물 처리시 PMA와 A23187로 유도된 MAPKs 인산화와 NF- κB 의 활성을 저해하는지 알아보기 위해 western blot을 수행한 결과 ERK 1/2와 JNK 1/2의 인산화를 유의하게 억제하고 I κ Ba의 분해, NF- κB 의 활성이 저해되었다. 이와 같은 결과로 보아 회생산 에탄올 추출물은 비만세포에 작용하여 ERK와 JNK의 인산화 억제와 I κ Ba 분해, NF- κB 활성의 저해를 통해 TNF- α , IL-6, IL-8의 생성을 억제함으로써 비만세포 매개성 염증 질환 치료제로서의 가능성을 시사해 주고 있다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 원광대학교 교비지원에 의해서 수행되었습니다.

참고문헌

- 이 천. 편주의학입문. 서울. 법인문화사, p 1779, 2009.
- 허 준. 동의보감. 서울. 여강출판사, p 1788, 2005.
- 황도연. 신증방약합편. 서울. 영림사, p 206, 2002.
- 교재편찬위원회편저. 한의학사전. 서울. 정보사, p 360, 2004.
- Fernandez Puntero, B., Iglesias Perinado, I., Villar del Fresno, A.M. An-tiflammatory and antiulcer activity of *Teucrium buxifolium*. *J Ethnopharmacol* 55(2):93-98, 1997.
- 한중현, 김기영, 공편역. 한방약리학. 서울. 도서출판 의성당, p 236, 2004.
- 정진기, 손건호, 김영식, 박용기. 陳皮 에탄올추출물의 콜라겐 유도 관절염 마우스에서의 항관절염 효과 연구. *대한본초학회지* 26(3):1-6, 2011.
- 박성혁. 진피의 염증 억제 효과. 원광대학교 대학원. 2004.
- Willoughby, D.A. Heberden Oration,. Human arthritis applied to animal models. *Ann Rheum Dis* 34: 471-478, 1974.
- Galli, S.J., Tsai, M., Piliponsky, A.M. The development of allergic inflammation. *Nature*, 454(7203):445-454, 2008.
- K. Ahn. Role of mast cell in allergic inflammation and innate immunity. *Korean J Pediatr*, 47(11):11-15, 2004.
- Wedemeyer, J., Tsai, M., Galli, S.J. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunology*, 12(6):624-631, 2000.
- Nakajima, S., Krishnan, B., Ota, H., Segura, A.M., Hattori, T., Graham, D.Y., Genta, R.M. Mast cell involvement in gastritis with or without *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 113(3):746-754, 1997.
- Feng, B.S., Zheng, P.Y., Chen, X., Liao, X.Q., Yang, P.C. Investigation of the role of cholera toxin in assisting the initiation of the Antigen-Specific Th2 Response. *Immunological Investigations*, 37(8):782, 2008.
- Hamilton, M.J., Sinnamon, M.J., Lyng, G.D., Glickman, J.N., Wang, X., Xing, W., Krilis, S.A., Blumberg, R.S., Adachi, R., Lee, D.M. Essential role for mast cell tryptase in acute experimental colitis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(1):290-295, 2011.
- 신민교. 임상본초학. 서울. 영림사, pp 469-470, 2006.
- 한방약리학교재출판위원회. 한방약리학. 서울. 신일서적. p 613, 2006.
- Monforte, M.T., Trovato, A., Kirjavaniien, S., Forestieri, A.M., Galati, E.M.I., Curto, R.B. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmaco* ; 50(9):595, 1995.
- Bok, H.S., Lee, H.S., Park, Y.B., Bae, K.H., Son, K.H., Jeong, T.S., Choi, M.S. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and acyl CoA cholesterol transferase are lower in rat fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J Nutr* 129(6):1182-1185, 1999.
- Jun, H.K., Jeong, Y.S., Park, C.D., Park, C.H., Hong, J.H. Effect of ethanol extract from citrus peels on oxidative damage in alloxan-induced HIT-T15 cell. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 39(8):1102-1106, 2010.
- 현재석, 강성명 마힌다, 고원준 양태석, 오명철, 오창경, 전유진, 김수현. 제주산 감귤류 진피와 과피의 항산화활성. *한국식품조리과학회지* 26(1):88-94, 2010.
- Yang, D., Wang, F., Su, J., Zeng, L. Chemical composition of essential oil in stems leaves and flowers of *Agastache rugosa*. *Zhong Yao Cai*, 23(3):149-151, 2000.
- Zou, Z.M., Cong, P.Z. Studies on the chemical constituents from roots of *Agastache rugosa*. *Yao Xue Xue Bao*, 26(12):906-910, 1991.
- Lee, C., Kim, H., Kho, Y. Agastinol and agastenol, novel lignans from *Agastache rugosa* and their evaluation in an apoptosis inhibition assay. *J Nat prod*, 65(3):414-416, 2002.
- Blaszczyk, T., Krzyzanowska, J. and Lamer-Zarawska, E. Screening for Antimycotic Properties of 56 Traditional. *Chinese Drugs Phytotherapy research*, 14(3):210-212, 2000.
- Shin, S. Essential oil compounds from *Agastache rugosa* as Antigungal Agents Against *Trichophyton* Species. *Arch Prm Res*, 27(3):295-299, 2004.
- Kim, H.K., Lee, H.K., Shin, C.G., Huh, H. HIV integrase inhibitory activity of *agastache rugosa*. *Arch Parm Res*, 22(5):520-523, 1999.
- Min, B.S., Hattori, M., Lee, H.K., Kim, Y.H. Inhibitory constituents against HIV-1 protease from *Agastache rugosa*. *Arch Parm Res*, 22(5):75-77, 1999.
- Min, Bs, Hattori, M., Lee, H.K., Park, J.H., Lee, K.Y., Kim, J.J., Jeong, T.S., Oh, G.T. Inhibition of cytokine - induced vascular cell adhesion molecule-1 expression; possible mevhanism for anti-atherogenic effect of *Agastache rugosa*. *FEBS Lett*, 495(3):142-147, 2001.
- Hu, Z.Q., Zhao, W.H., Shimamura, T. Regulation of mast cell development by inflammatory factors. *Curr Med Chem*, 14(28):3044-3050, 2007.
- Caughy, G.H. Mast cell proteases as protective and inflammatory mediators. *Adv Exp Med Biol*, 716: 212-234,

- 2011.
32. Arend, W.P., Dayer, J.M. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum*, 38(2):151-160, 1995.
 33. Butler, D.M., Maini, R.N., Feldmann, M., Brennan, F.M. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF- alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur Cytokine Netw* 6(4):225-230, 1995.
 34. Erchler, W.B., Keller, E.T. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med*, 51: 245-270, 2000.
 35. Rao, A. NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Trends in immunology*, 15(6):274, 1994.
 36. Firrini, E., Marchisio, P.C., Scupoli, M.T., Poffe, O., Tagliabue, E., Brentegani, M., Colombatti, M., Santini, F., Tridente, G., Ramarli, D. Adhesion of immature and mature T cells induces in human thymic epithelial cells(TEC) activation of IL-6 gene transcription factors (NF-kappaB and NF-IL6) and IL-6 gene expression: role of alpha3beta1 and alpha6beta4 integrins. *Dev Immunol*, 7(2-4):195-208, 2000.
 37. I. Hide, N. Toriu, T. Nuibe, A. Inoue, M. Hide, S. Yamamoto and Nakata. Suppression of TNF-alpha secretion by azelastine in a rat mast (RBL-2H3) cell line: evidence for differential regulation of TNF-alpha release, transcription, and degranulation. *J Immunology*, 159(6):2932-2940, 1997.
 38. Verhelst, K., Carpentier, I., Beyaert, R. Regulation of TNF-induced NF-κB activation by different cytoplasmic ubiquitination events. *Cytokine & Growth Factor Rev*, 22(5-6):277-286, 2011.
 39. de Dios, C.H., Román, E., Monge, R.A., Pla, J. The role of MAPK signal transduction pathways in the response to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida albicans*: implications in virulence. *Curr Protein Pept Sci*, 11(8):693-703. 2010.