

麥門冬 에탄올 추출물이 알레르기 염증 반응에 미치는 영향

김호석 · 박지혜 · 김현갑 · 김재현 · 이비나 · 민주희 · 김은영 · 정혁상 · 이향숙 · 손영주*

경희대학교 한의과대학 해부학교실

Effects of Ethanol Extract of *Liriope platyphylla* on Allergic Inflammation

Ho Seok Kim, Ji hye Park, Hyun Kab Kim, Jae Hyun Kim, Bina Lee, Ju Hee Min, Eun Young Kim, Hyuk Sang Jung, Hyang Sook Lee, Young Joo Sohn*

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

This study investigated the effect of *Liriope platyphylla* (LP) on allergic reactions and its mechanism of action. We investigated the effect of LP on Evans Blue (EB) extravasation induced by anti-dinitrophenyl (DNP)-IgE in rats. We tested whether the ethanol extract of LP reduced ear skin thickness and histological changes induced by topical application of 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) to ears of mice. We evaluated compound 48/80-induced release of histamine in rats peritoneal mast cell (RPMCs). We also investigated the regulatory effect of LP on the level of inflammatory mediators in PMACI-induced human mast cell (HMC-1): cytokine IL-6, IL-8, TNF- α in HMC-1, MAPKs (ERK, JNK and p38) in HMC-1. The ethanol extract of LP (81.3 mg/100 g body weight) significantly inhibited the PCA reaction compared with the control ($P < 0.05$). However, LP did not prevent topical applications of DNFB-induced ear skin thickening and histological changes. In RPMCs, histamine release induced by compound 48/80 was significantly attenuated by LP at 100 μ g/ml ($P < 0.05$). LP extract (100 μ g/ml) significantly reduced the PMACI-induced IL-6, IL-8, and TNF- α secretion via inhibition of ERK phosphorylation in HMC-1. In conclusion, the ethanol extract of LP inhibited mast cell-derived, immediate-type allergic reactions, and the result suggest the potential of LP for preventing allergic inflammatory disorders.

keywords : *Liriope platyphylla*, IgE, PCA, Human Mast Cell, RPMC, IL-6, IL-8, TNF- α , MAPKs

서 론

알레르기라는 개념은 1906년 Clemens Freiherr von Pirquet (C.V. Pirquet)가 처음으로 제창하였다. Pirquet의 시대 까지도 이미 면역현상의 개념이 확고했지만 그의 시대가 되어 과민증의 지식이 구체화되었다. 알레르기란 그리스어의 변한다는 의미의 allos (change)와 작용의 ergo (action)가 합쳐진 말로, 즉 생체의 변화된 반응이라는 뜻의 합성어에서 유래되었다¹⁾.

알레르기는 보통 사람에게는 아무런 반응을 나타내지 않는 외부 자극에 대해 인체의 면역 기전이 보통 보다도 과민한 반응이 유발되는 것으로, I형 anaphylaxis형, II형 세포용해형, III형 면역복합체형, IV형 세포중개형, V형 자극성 과민반응형의 5가지 유형이 있는데 그 중 대부분은 제 I형 알러지 반응에 속한다^{2,3)}.

알레르기 반응은 항원 (allergen)에 대해 감작 (sensitization)

이 되어 IgE에 의해 매개되는 즉시성 과민반응 (immediate hypersensitivity) 또는 아나필락틱 (anaphylactic) 과민반응이다⁴⁾. 즉시성 과민반응 (type I hypersensitivity)은 주로 비만세포의 Fc수용체에 결합된 IgE에 특이적인 항원이 결합하여 발생한다. 이 상호작용은 비만세포의 탈과립 (degranulation)과 이에 따른 염증매개물질의 방출을 초래한다⁵⁾.

비만세포 (mast cell)가 활성화되면 과립 속에 있던 histamine, serotonin, 호산구 유주인자와 cytokine이 방출되어 과민반응이 나타나게 되며, 특히 비만세포에서 분비되는 interleukin (IL)-6, IL-8, tumor necrosis factor alpha (TNF- α)와 같은 cytokine들은 알레르기 반응에서 주요한 역할을 한다^{6,7)}.

비만세포는 급성염증과 만성염증에 모두 관련되어 있는데 비만세포의 염증작용에 의하여 많은 질환이 발생하게 된다⁸⁾. 그러므로 비만세포의 생성과 분비의 억제는 염증성 질환들의 치료

* Corresponding author

Young Joo Sohn, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 130-701, Korea

E-mail : youngjoos@khu.ac.kr · Tel : +82-2-961-9202

Received : 2014/06/09 · Revised : 2014/08/29 · Accepted : 2014/09/03

© The Korean Society of Korean Pathology, The Korean Society of Korean Physiology

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529

Available online at www.hantopic.com

에 매우 중요한 인자가 될 것이다⁹⁾.

麥門冬 (Liriope Tuber)은 백합과에 속한 多年生 本草인 맥문동 (*Liriope platyphylla* Wang et Tang) 또는 소엽맥문동 (*Ophiopogon japonicus*)의 塊根이다. 性은 微寒하고, 味는 辛味苦하다. 肺 心 胃 三經에 들어가 肺胃의 陰不足을 清養하여 生津潤燥하고, 아울러 清心除煩하므로 虛勞咳血, 乾咳稠痰, 心煩口渴 및 腸燥便秘등의 證을 치료하는데 常用된다¹⁰⁾. 麥門冬은 胃家의 陰精을 끌어서 心肺를 運轉하게 하여 脈道를 통하게 하고 逆氣를 내려가게 하며 煩熱을 없앤다¹¹⁾. 그 외에 麥門冬의 효능으로는 산소결핍, 부정맥과 심허열 개선, 출혈성 shock에 대한 작용, 혈당조절 작용, 항균작용 등을 하여 관상동맥질환, 피부건조증 등에 사용된다¹²⁾. 張元素는 “麥門冬은 肺中伏火를 치료하고, 心氣不足을 補한다.”¹³⁾고 하였는데, 이를 두고 長山雷는 “燥熱이 血을 傷한 것으로 麥門冬이 血의 妄行을 主한다.”¹⁴⁾고 했는데 이는 火熱이 오르는 것을 麥門冬의 微寒 苦味の 힘으로 치료한다고 본 것이다.

현재까지 진행된 麥門冬에 대한 연구로는 non-obese diabetic 당뇨 생쥐에서 췌장의 β -세포를 선택적으로 파괴하는 염증면역세포의 침윤을 억제하여 인슐린염으로 진행을 차단하는 항염증 효과¹⁵⁾, 麥門冬이 세포손상으로 인한 Bax 단백질양의 증가를 억제시키고 Bcl-2 단백질양의 감소를 회복시키는 작용¹⁶⁾, lipopolysaccharide 처리를 통해 만성 폐쇄성 폐질환과 유사한 병리변화를 유발시킨 폐손상 모델에서 麥門冬이 세포의 생존력을 개선시키고 염증성 진행을 억제함으로써 폐손상을 보호하는 효과¹⁷⁾, 천식모델에서 기도염증과 기관지의 과민반응의 억제 효과¹⁸⁾, 麥門冬 추출물에서의 면역조절 효과¹⁹⁾, 구속 스트레스로 유발된 기억 손상에 대한 麥門冬의 신경보호 효과²⁰⁾ 등의 연구가 있었다.

麥門冬이 肺中伏火와 血의 燥熱을 치료하는 효능이 염증효과와 밀접하게 연관되어 있다고 볼 수 있다. 기존의 연구에서도 이러한 麥門冬의 효과가 당뇨와 폐손상 모델에서 염증에 대한 조절로 발현되었다. 따라서 皮毛를 主하는 肺에 귀경하여, 潤肺陰과 清肺熱하는 麥門冬이 알레르기 염증반응의 치료에 관련이 있을 것으로 생각된다. 그러나 현재까지 연구된 결과를 살펴볼 때 알레르기와 관련된 연구가 미비하기에 이에 저자는 알레르기 질환에 있어서 麥門冬의 효능과 기전에 대해 알아보고자 본 연구를 설계하였다.

본 연구에서는 알레르기 질환에 있어서 麥門冬의 효능을 밝히기 위해 麥門冬이 흰쥐의 passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 반응에 미치는 영향, 염증세포 유입에 의한 생쥐의 귀조직의 부종에 대한 효과, 복강 비만세포 (rat peritoneal mast cells, RPMCs)에서 compound 48/80에 의해 유도된 histamine의 유리, 그리고 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 A23187에 의해 유도된 IL-6, IL-8, TNF- α 등과 같은 cytokine들의 분비 억제효과를 관찰하였다. 또한, human mast cell line (HMC-1)에서 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 대표적인 염증신호경로인 extracellular signal-regulated kinase (ERK), Jun N-terminal kinase

(JNK), p38의 발현을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

Compound 48/80, anti-DNP IgE, DNP human serum albumin (HSA), PMA, A23187과 Evans blue (EB)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Recombinant IL-6와 IL-8, biotinylated IL-6와 IL-8, 그리고 anti-human IL-6와 IL-8 등은 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Recombinant TNF- α , biotinylated TNF- α 와 anti-human TNF- α 는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), 그리고 fetal bovine serum (FBS)는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Histamine kit 는 Oxford Biomedical Research (Oxford, MI, USA)에서 구입하였다. ERK, p-38, JNK의 antibodies는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

2) 시료의 제조

본 실험에 사용된 麥門冬은 (주)옵니허브(대구)에서 구입하였다. 麥門冬 100 g을 1 L 삼각 플라스크에 넣고 80% 에탄올 1,000 mL를 가하여 2주간 밀폐된 곳에서 냉침 추출하였다. 추출액은 Whatman filter paper (No 3, Maidstone, England)를 사용하여 여과시킨 후 60°C에서 농축시키고, 동결 건조시켜 麥門冬 에탄올 추출물 (*Liriope platyphylla* ethanol extract, 이하 LP)을 얻었다.

2. 방법

1) 동물

Sprague-Dawley (SD) rats (8 주, 수컷)과 BALB/c mice 는 Samtako (오산, 경기도, 대한민국)로부터 구입하였다. 사육실의 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 하고, 습도는 일정하게 유지하였으며, 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 (lights on from 07:00 to 19:00) 하였고, 물과 사료는 자유롭게 먹도록 하였다. SD rat에서 PCA 반응을 위한 실험군의 분류는 다음과 같다. 정상군 (Normal 군, n=6)은 PCA 반응을 유도하지 않고 생리식염수를 경구 투여 하였으며, 대조군 (Control 군, n=6)은 PCA 반응을 유도하고 생리식염수를 경구 투여 하였으며, 실험군 (LP 군, n=6)은 EB를 주사하기 1시간 전에 LP를 희석하여 경구 투여 (81.3 mg/100 g body weight) 하였다. BALB/c mice에서 접촉성 알레르기 염증반응을 위한 실험군은 다음과 같다. 정상군 (Normal 군, n=6)은 민감한 반응을 유도하지 않고 생리식염수를 경구 투여 하였으며, 대조군 (Control 군, n=6)은 민감한 반응을 유도하고 생리식염수를 경구 투여 하였으며, 실험군 (LP 군, n=6)은 민감화를 유도후 LP를 경구투여 하였다. 동물관리와

모든 실험과정은 경희대학교 동물실험 윤리위원회의 가이드라인 (KHUASP (SE)-09-001)에 따라서 수행되었다.

2) PCA reaction

흰쥐의 등 쪽 피부 세 부위를 면도하고 각 0.5 μg (50 μl) anti-DNP IgE 를 피내주사 하였다. 48시간 후에 각각의 쥐의 음경등정맥 (dorsal vein of penis)에 4% EB가 포함된 100 μg (100 μl)의 DNP-HSA를 주사하였는데, 주사하기 1시간 전에 LP 를 희석하여 경구 투여하였다. EB extravasation 측정을 위하여 EB를 주입하고 30분이 지나서 쥐의 등 쪽 피부를 절개하여 색소의 영역을 관찰하고 image analyzer (Scion Image, version 4.0.3; Scion Corporation, MD, USA)를 이용하여 면적을 측정하였다. 절개피부를 formamide 용액으로 EB용액을 추출하였으며 추출된 EB용액의 농도를 spectrophotometer (Beckman, IL, USA)로 620 nm에서 측정하였고, 색소의 양은 EB의 calibration curve를 사용하여 계산하였다.

3) Sensitization and elicitation procedure

2,4-dinitro-fluoro-benzene (DNFB)을 국부에 반복적으로 도포하여 접촉성 과민반응을 만들었다. Acetone과 olive oil을 3:1의 비율로 섞은 시료에 DNFB (0.15%, 25 μl)를 BALB/c 생쥐의 오른쪽 귀 안쪽과 바깥쪽에 7일 간격으로 6회, 국소적으로 도포하였다. 민감화 반응 과정 중 섞은 DNFB를 도포하고 난 후 5일째 되는 날 LP를 경구투여 (81.3 mg/100 g body weight)하였다. 귀의 피부 두께는 24, 48, 72 시간 후에 thickness dial gauge로 측정하였다.

4) 조직학적 검사

귀의 가운데 조각을 3.5%의 paraformaldehyde에 고정시키고 파라핀 안에서 포매시켰다. 각 색선은 광범위한 측정을 위해서는 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였고, 비만세포는 toluidine blue로 염색하였다. 비만세포는 12 high-power fields (0.07 mm)에서의 평균 숫자로 측정하였다. 각 색선은 세 명의 관찰자에 의해 다른 색선의 측정 결과를 모른 채 독립적으로 측정되었으며, 평균값으로 분석하였다.

5) Histamine assay

RPMCs은 앞서 보고된 방법을 사용하여 얻었다²¹⁾. 세포들은 1×10^6 cells/ml의 세포수로 HEPES-Tyrode buffer에 분리한 다음 200 μl 를 25 μl LP (final concentration: 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 함께 37°C에서 10분간 배양하였다. Histamine 분비는 compound 48/80 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 25 μl 를 첨가하고 37°C에서 20분간 배양하였고, 그 반응은 tube를 냉각시켜 정지시켰다. 이후 4°C에서 15분 동안 3,000 rpm으로 원심 분리하였다. 세포로부터 분리된 부유물인 histamine은 o-phthalaldehyde spectrofluorometric procedure를 이용하여 측정하였다. Fluorescence intensity는 spectro- fluorometer를 이용하여 440 nm (excitation wavelength, 360 nm)에서 측정하였다.

6) HMC-1 세포배양과 표본 처리

HMC-1은 습도 95%, CO₂ 5%, 온도 37°C에서 10%의 FBS가 첨가된 IMDM에서 배양하였다. HMC-1 세포 (3×10^5 cell)에 다양한 농도의 LP (1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 1시간 동안 전처리

하고 난 뒤 25 nM PMA plus 1 μM A23187 (PMACI)을 처리하여 자극시켰다.

7) 세포 생존능력 측정을 위한 MTT assay

세포 생존율은 MTT assay를 이용하여 ELISA로 흡광도 570 nm에서 측정하였다. HMC-1세포 (3×10^5 cell)을 다양한 농도의 LP (1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)들과 같이 24-well plate에서 배양시킨다. MTT 용액 (5 mg/ml)을 각각의 well에 첨가하고 24시간 배양한 뒤, 반응하지 않은 MTT 용액을 버리고 생존세포에 의한 MTT 반응의 결과로 생성된 formazan 을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 용해하여 세포 생존율을 간접적으로 계산하였다. 아무런 처치를 하지 않은 대조군 세포에서는 100% 생존율로 산정하여 각 군별 생존율을 계산하였다.

8) Cytokine assay

HMC-1 세포는 습도 95%, CO₂ 5%, 온도 37°C에서 10%의 FBS가 첨가된 IMDM에서 배양하였고, 다양한 농도의 LP (1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 1시간 동안 전처리하고 난 뒤 PMACI를 처리하여, 7시간 동안 배양한 후에 각각의 상층액은 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)로 정량하였다. PBS (pH 7.4, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 mouse anti-human TNF- α , IL-6와 IL-8 monoclonal antibodies를 100 μl 을 넣어 96 well ELISA plates (Nunc, Roskilde, Denmark)에 배양시켰다. 그리고 1% BSA, 5% sucrose와 0.05% NaN₃를 함유하는 PBS로 blocking 하였으며, 각각의 상층액이나 recombinant TNF- α , IL-6와 IL-8을 세포 배양기에서 반응시켰다. 세척한 후에는 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 biotinylated anti-human TNF- α , IL-6와 IL-8을 첨가하여 37°C 에서 2시간 동안 세포 배양기에서 반응시켰다. 세척을 한 번 더 하고 avidin-peroxidase를 처리하여 30분 동안 37°C 세포 배양기에서 반응시켰다. Well을 다시 세척하고 ABTS substrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 처리하였다. 발색은 405 nm에서 ELISA를 이용하여 측정하였다. 표준곡선은 recombinant human TNF- α , IL-6와 IL-8을 이용하여 분석하였다.

9) Western blotting analysis

HMC-1 세포는 다양한 농도의 LP (1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 1시간 동안 전처리하고 난 뒤 PMACI를 처리하여 30분 (MAPKs) 반응시켰다. 세포들을 분리한 후 ice-cold PBS로 2번 세척하였다. MAPKs expression의 경우, 세척된 세포는 용해제로 용해한 뒤 13,000 \times g, 4°C, 20분간 원심 분리하여 단백질을 얻었다. 단백질 농도는 Manufacturer's instruction에 따라 단백질 정량법을 이용하여 정량하였다. 각 샘플들은 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)- polyacrylamide gel에 의해 전기영동한 후 nitrostruulose membrane으로 transfer 하였다. Membrane을 5% skimmed milk이 첨가된 PBST로 실온에서 2시간 동안 blocking 하였다. PBST로 membrane을 세척한 후, anti-MAPK antibodies (p-ERK, t-ERK, p-JNK, t-JNK, p-p38, t-p38 ; 1% BSA 가 첨가된 PBSTe m으로 1:1000 희석)는 4°C에서 24시간 동안 배양하고 PBST로 3번 세척하였다. MAPKs는 2차 항체인 Anti-mouse IgG (1:2000)를 상온에서 1

시간 동안 반응시켰고, 단백질 발현은 enhance chemiluminescence (ECL) 시약 (Amersham Pharmacia, NJ, USA)을 이용하여 형광 감광하였다.

10) 통계분석

측정값은 평균 ± 표준오차 (mean ± S.E.M.)로 표기하였다. 통계분석은 Graph Pad PRISM Software (Graphpad Software Inc, CA, USA) 프로그램을 이용하였다. One-way ANOVA를 이용하였으며 Dunnett's Multiple Comparison Test를 post hoc test 로 하였으며, 유의수준 P value < 0.05 인 경우 유의성이 있다고 판단하였다.

결 과

1. LP의 PCA에 대한 효과

정상군은 쥐의 등 쪽 피부에서 선명하게 EB용액이 지나간 혈관은 보이지만 EB용액의 분출(extravasation)이나 피부의 염색자국은 관찰되지 않았다(Fig. 1A). 반면에 anti-DNP를 주입한 대조군에서는 정상군에 비하여 명백한 EB용액의 분출이나 피부의 염색 부위가 관찰되었다(Fig. 1B). LP군은 대조군에 비하여 EB용액의 분출을 유의하게(P < 0.05) 억제하여 약 54%의 감소를 나타내었다(Fig. 1C, D), 피부의 염색 면적은 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1C, E).

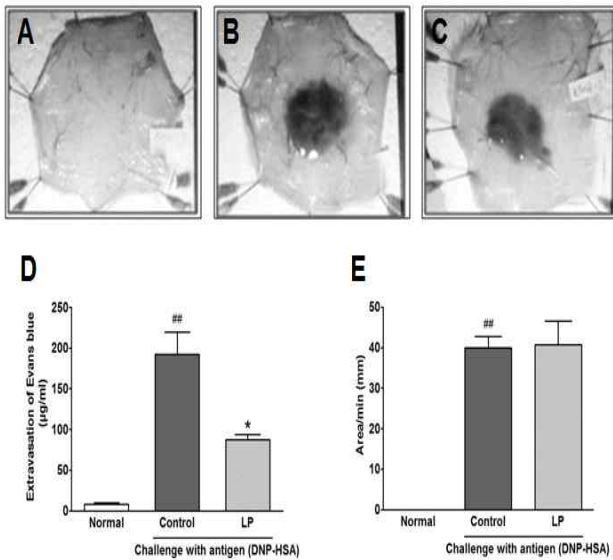


Fig. 1. Inhibitory effects of LP on PCA reaction in rat. Internal surfaces of the rat skins in A (Normal), B (Control), C (LP), D, EB extravasation ; E, EB-stained area. The stained blue areas indicate EB extravasation. Normal group was not treated with anti-DNP IgE and LP. Distilled water was administered in the control-treated group. Value represents the mean ± S.E.M. of 6 animals each. ^{##}P < 0.01 compared with the normal group. ^{*}P < 0.05 compared with the control group.

2. 귀부종의 조직학적인 측정

귀 두께의 조직학적인 특징을 알아내기 위하여, 35일간 DNFB 도포 후 0, 24, 48, 72시간에 귀의 생검 표본을 검사하였다. 조직학적인 분석 결과, 대조군에서 귀의 피부에 부종이 관찰

되었다. 또한 LP를 투여한 군에서도 DNFB에 의해 유발된 염증 반응이 억제되지 않아 대조군에서의 부종이 그대로 관찰되었다. 비만세포의 숫자도 실험 시작 35일 후에 측정하였다. 대조군은 정상군에 비하여 비만세포의 숫자가 많이 증가되었다. 마찬가지로, LP를 투여한 군에서도 비만세포의 증가를 억제하지 못하였다(Fig. 2).

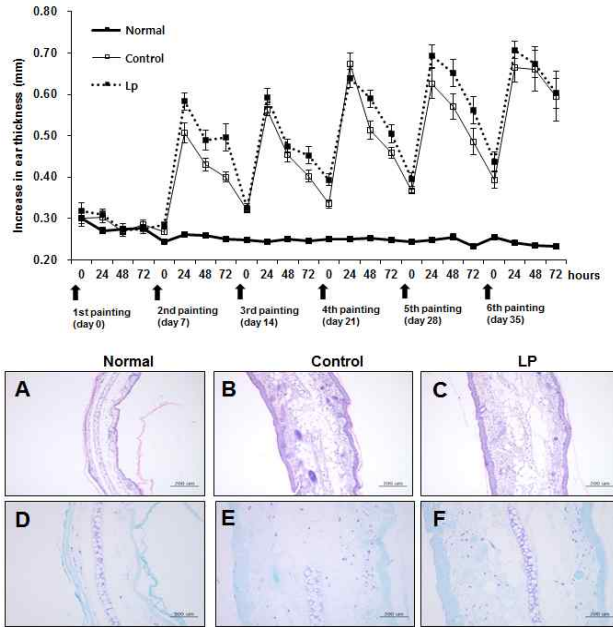


Fig. 2. Histological pictures of mouse ear after repeated application of DNFB. Mice ears were excised 72 h after the last application of DNFB and fixed in 10% neutral burrferd formalin, embedded in paraffin by standard methods, cut into 5 µm section and stained with hematoxyline & eosin (A, B, and C, magnification 100x) and toluidine blue (magnification 200x) then assessed under light microscopy. Nor: D.W was orally administrated daily for 5 weeks of first experiment application. Con: D.W was orally administrated daily for 5 weeks from the day of first DNFB application. LP: LP was orally administrated daily for 5 weeks from the day of first DNFB application.

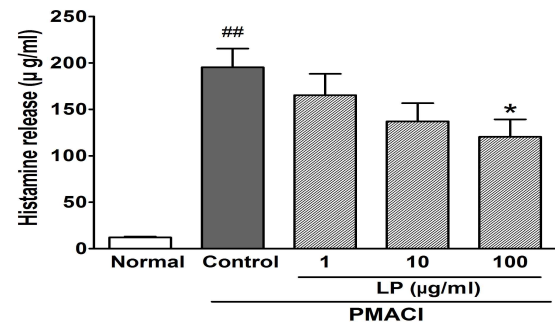


Fig. 3. Effect of LP on compound 48/80-induced histamine release from rat peritoneal mast cells (RPMCs). The value represents the mean ± S.E.M. from three independent experiments. ^{##}P < 0.01 compared with the normal group. ^{*}P < 0.05 compared with the control group.

3. LP의 RPMCs에서의 histamine 분비에 대한 억제 효과
복강 비만세포에 compound 48/80을 처리한 후 비만세포로부터 유리된 histamine 양을 측정하였다. 정상군은 histamine의

분비가 약간 증가된 반면, 대조군은 정상군에 비해 histamine 분비의 확연한 차이를 보였다. 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 LP를 전처리하고 compound 48/80을 처리한 후 비만세포로부터 유리된 histamine 양을 측정된 결과, LP로 전처리한 군은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 histamine의 분비를 유의하게 ($P < 0.05$) 억제하여 약 38%의 감소를 나타내었다(Fig. 3).

4. HMC-1에서의 LP의 세포독성

HMC-1에 미치는 LP의 세포독성을 알아보기 위하여 24시간 동안 다양한 농도의 LP (1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 실험한 결과 세포독성을 보이지 않았다(Fig. 4A).

5. IL-6, IL-8과 TNF- α 의 분비에 대한 LP의 효과

IL-6의 분비는 PMACI로 처리된 대조군에서 정상군에 비해 현저하게 ($P < 0.01$) 증가한 반면, LP 처리군은 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 IL-6의 분비를 유의하게 (모두 $P < 0.01$) 억제하여 약 29, 29, 35%의 감소를 나타내었다(Fig. 4B). IL-8의 분비는 PMACI로 처리된 대조군에서 정상군에 비해 현저하게 ($P < 0.01$) 증가한 반면, LP 처리군은 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 IL-8의 분비를 유의하게 (각각 $P < 0.05$, $P < 0.01$) 억제하여 약 19, 36%의 감소를 나타내었다(Fig. 4C). TNF- α 의 분비는 PMACI로 처리된 대조군에서 정상군에 비해 현저하게 ($P < 0.01$) 증가한 반면, LP 처리군은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 TNF- α 의 분비를 유의하게 ($P < 0.05$) 억제하여 약 20%의 감소를 나타내었다(Fig. 4D).

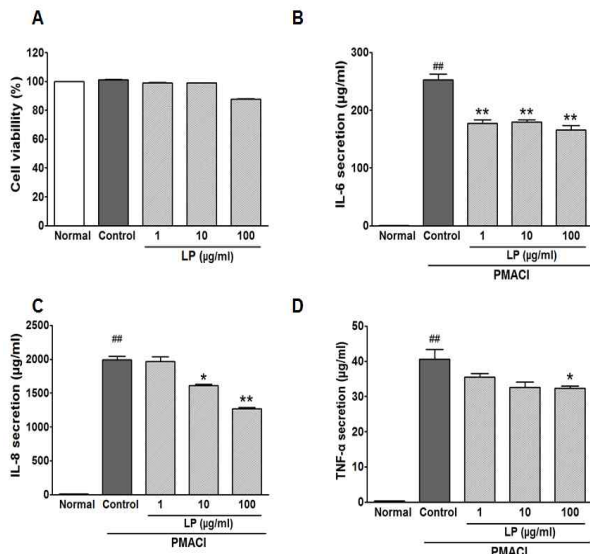


Fig. 4. Effects of LP on cytotoxicity and inhibitory effect of LP on pro-inflammatory cytokines in HMC-1. (A) Effects of LP on cytotoxicity in HMC-1, (B) effects of LP on IL-6 secretion, (C) IL-8 secretion, (D) TNF- α secretion. HMC-1 viability (3×10^5 cell) was evaluated by MTT colorimetric assay for 24 h after pretreatment with various concentrations (1, 10, and 100 $\mu\text{g/ml}$) of LP. Data were compared with the untreated control (% control data). Data are represented as mean \pm S.E.M. ### $P < 0.01$ compared with the normal group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with the control group.

6. MAPKs의 활성화에 대한 LP의 효과

ERK는 PMACI로 처리된 대조군에서는 현저하게 발현이 증가하였고 LP군은 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 발현을 유의하게 (각각 $P < 0.05$, $P < 0.01$) 억제하여 약 47, 60%의 감소를 나타내었다 (Fig. 5A, B). JNK의 경우 차이를 보이지 않았으며, p38의 경우는 LP군이 발현을 감소시키는 경향은 있었으나 유의성은 없었다 (Fig. 5A, C, D).

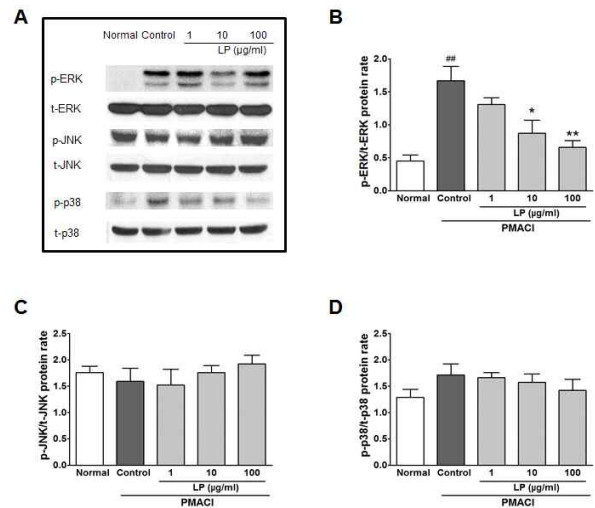


Fig. 5. Effect of LP on PMACI-induced phosphorylation of ERK, JNK, and p38 in HMC-1. The levels of MAP kinase were assayed via Western blot analysis (A). P-ERK/T-ERK (B), P-JNK/T-JNK (C), P-p38/T-p38 (D) protein rate. The value represents the mean \pm S.E.M. from three independent experiments. ## $P < 0.01$ compared with the normal group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the control group.

고찰

麥門冬은 복반구의 온대지방에 널리 분포하며 根莖과 種子를 통해 번식할 수 있는 다년생 식물이다²²⁾. 효능으로는 甘寒하고 質潤하여 養陰生津 潤燥하며, 苦寒한 性味는 清熱시키는 효과가 있으며 陰柔한 性을 가지고 있어 滋陰而不滋膩하고 清熱而不傷胃한다¹⁰⁾. 麥門冬의 이러한 養陰生津 潤燥와 清熱시키는 작용이 알레르기 염증반응에 효능이 있을 것으로 보고 본 연구를 시행하였다.

LP는 PCA 반응을 억제시키고 Compound 48/80으로 유도된 histamine 분비를 억제하며 비만 세포에서 TNF- α , IL-6와 IL-8의 분비를 억제함을 확인하였다. 또한 LP로 인해 PMA와 A23187에 의해 유도되는 MAPKs 경로 중 ERK의 인산화는 약화됨을 보였다.

PCA반응은 항알러지 약물을 평가하는데 있어 가장 많이 사용되는 모델 중 하나이다²³⁾. 특정한 항원에 의해 자극받으면 비만세포가 활성화되고 histamine과 같은 물질을 분비하는데 이러한 과정이 PCA 반응을 유도한다²⁴⁾. 본 연구에서 PCA에서 LP의 효과를 관찰하기 위해서 실험을 진행한 결과 LP를 경구 투여한 군에서는 대조군에 비하여 알레르기 피부반응을 유의하게 감소시켰다. 만성적인 염증 반응은 비만세포의 증가와 관련되는데,

이는 세포 부착분자에 의해 조절된다²⁵). 비만세포가 조직으로 분비되는 것은, 척수로부터 말초의 혈액으로 미성숙비만세포 전구체가 분비되면서 일어나는 것으로 보여진다. 본 연구에서 LP는 DNFB로 유도된 염증 조직부위에서 비만세포의 recruitment를 유의한 억제효과를 보이지 않아, 향후 麥門冬의 만성 접촉성 알러지 염증에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Compound 48/80은 혈액 내로 histamine 분비를 유도한다²⁶). 비만세포에 저장되어 있는 histamine은 알러지 반응에서 중요한 역할을 하며, 알러지로 나타나는 여러 가지 임상적인 증상과 관련된다²⁷). 본 연구에서 흰쥐의 복강 비만세포에서 compound 48/80으로 유도된 histamine 분비에 대한 麥門冬의 효과를 확인해 본 결과, 100 µg/ml 농도로 LP를 처리한 경우 비만세포로부터 유리된 histamine 양의 분비가 억제되었다. 따라서 본 결과는 麥門冬이 비만세포로부터 histamine의 유리를 억제하는 효과가 있다는 것으로 항알레르기 효과가 있음을 의미한다.

비만세포가 활성화되면 탈과립하여 histamine, heparin, serotonin, 가수분해 효소 등 많은 매개물질과 cytokine (TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13 등)을 분비하여 여러 면역반응과 염증 반응에 관여한다²⁸). TNF- α 는 cachetin이라고도 알려져 있는 물질로, 단핵구와 대식세포에 의해 생산되는 폴리펩티드 cytokine이다. 세포의 생존과 죽음에 신호를 보내는 역할도 한다²⁹). 또한, 면역 반응의 조정자 역할을 하며, 내인성 발열 원인으로의 역할까지 하기도 한다³⁰). IL-6는 여러 가지 기능을 하는 cytokine이다. 면역반응과 급성기 반응, 조혈작용을 조절하며, 인체의 방어기전에서 중심적인 역할을 한다³¹). 국소적으로 염증이 생긴 부위에서 생산되어, 급성기 단백질의 합성을 촉진하거나 억제한다³²). 양막내 전염이나 산과적 전염에서 중요한 지표 cytokine이기도 하다³³). 또한, 내피세포의 장애를 판단하는데 가장 중요한 지표 중에 하나이다³⁴). IL-8은 병리적인 혈관의 생성, 암의 성장 및 전이를 조절한다³⁵). IL-8과 그 수용기들은 내피세포에서 관찰되는데³⁶, 내피세포의 증식에 관여한다³⁵). 호중구의 화학 유인물질 중 하나이며, 호중구를 활성화시키는 역할도 한다³⁷).

본 실험에서 LP가 PMA와 A23187로 자극된 비만세포에서 IL-6, IL-8 및 TNF- α 의 발현을 억제하였다. 이러한 결과들은 LP의 항알레르기 효과가 비만세포로부터 분비되는 TNF- α , IL-6 및 IL-8의 양을 감소시켰다는 것을 의미한다.

LP의 histamine이나 cytokine 분비억제에 대한 효과들이 과연 이들 생성에 관여하는 전사인자인 MAPKs와 관련이 있는지 확인하였다.

세포 소멸과 염증에 관여되는 물질로 JNK, ERK 및 p38 kinase로 이루어져 있는 MAP kinase가 알려져 있는데³⁸, MAPK 경로는 cytokine 분비, 세포 증식과 괴사 등의 세포기능의 여러 가지 변화를 중재하는 기본경로이다. ERK, JNK, p38은 이러한 세포 반응에 중심적인 역할을 한다³⁹). MAPK 신호전달계는 세포가 외부의 환경변화에 따른 자극들을 인지하여 그 정보를 세포질 및 세포핵 내부로 전달하는 과정에 관여하는 대표적

인 신호전달계이다. 특히 세포의 성장, 발생, 분화, 사멸 등의 조절기전에 관여하다고 알려져 있다⁴⁰).

본 실험에서 LP는 PMACI로 유도되어 증가된 ERK의 활성화를 유의하게 억제하는 것을 보였지만, JNK와 p38의 활성화는 억제하지 못하였다. 이러한 결과들은 LP가 JNK와 p38의 인산화는 억제시키지 못했지만 ERK의 인산화를 억제시켜 염증 반응을 조절하는데 유의한 효과가 있음을 보여 주었다. ERK의 기능 억제와 관련한 기전에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

LP는 PCA 반응에서 항알레르기 효과가 확인되었으며, MAPK중 ERK의 인산화 억제에 따른 histamine과 TNF- α , IL-6, IL-8의 분비의 억제로 알레르기 염증반응을 조절하는 것으로 생각된다. 이러한 실험결과는 生津潤燥, 清心除煩의 효능을 가진 맥문동이 IgE 매개 즉시성 과민반응 관련 매개 인자들의 조절기전을 통하여 항알레르기 효과가 있음을 의미한다. 따라서 본 연구는 현재 임상에서 증가되고 있는 알레르기 염증성 질환에 맥문동의 치료효과와 기전을 밝혀 향후 치료제로서의 개발 가능성을 제시한 가치가 있다고 생각된다.

결론

麥門冬은 津液을 補하는 대표적인 약으로 肺陰손상으로 인한 咯血, 咳嗽에 쓰이며, 胃陰不足으로 인한 渴症, 消渴 및 便秘에도 사용한다. 이러한 효능을 가진 麥門冬이 알레르기 염증 반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PCA 실험동물 모델의 비만세포 활성화시 분비되는 histamine 유리, HMC-1 cell에서 cytokine (IL-6, IL-8, TNF- α) 분비, MAPKs DNFB로 유도된 염증반응에 미치는 영향을 관찰하였다. LP는 PCA 반응을 억제시키고 Compound 48/80으로 유도된 histamine 분비를 억제하며 비만 세포에서 TNF- α , IL-6와 IL-8의 분비를 억제함을 확인하였다. 또한 LP로 인해 PMA와 A23187에 의해 유도되는 MAPKs 경로 중 ERK의 인산화는 약화됨을 보였다.

References

1. Jeong K. Allergy and Oriental Medicine. Seoul, Jeil. p 15, 1993.
2. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. Immunology 6th eds. U.S.A., Mosby. pp 323-383, 2001.
3. Lee, K., Kim, K.. Recent Treatment of Allergy. Seoul, Hankookkeuihaksa. p 36, 2001.
4. Pyo, S., Son, E. Immunology. Seoul, Shinil Books. pp 253-254, 1992.
5. Parham, P. Immunology. Seoul, Life Science. pp 351-352, 2011.
6. Kim, Y. Basic Pathology. Seoul, Hyunmoonsa. pp 138-140, 438-439, 2005.
7. Hack, C.E., Aarden, L.A., Thus, L.G. Role of cytokines in sepsis. Advances in Immunology 66:

- 101-195, 1997.
8. Metz, M., Grimbaldston, M.A., Nakae, S., Piliponsky, A.M., Tsai, M., Galli, S.J. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunological Reviews* 217: 304-328, 2007.
 9. Kim, S.H., Park, H.H., Lee, S., Jun, C.D., Choi, B.J., Kim, S.Y., Kim, S.H., Kim, D.K., Park, J.S., Chae, B.S., Shin, T.Y. The anti-anaphylactic effect of the gall of *Rhus javanica* is mediated through inhibition of histamine release and inflammatory cytokine secretion. *International Immunopharmacology* 5(13-14):1820-1829, 2005.
 10. The Herbology Compilation Committee of College of Oriental Medicine. *Herbology*. Seoul, Youngrim. pp 645-646, 2004.
 11. Chu, J. *Bonkyoungsozeng 1st*. Daejeon, Joomin Publisher. p 167, 2012.
 12. Lim, J. *Herbal Pharmacognosy*. Seoul, Shinil Books. p 390, 2012.
 13. Jang, W. *EuihakKyewon*. Daejoen, Joomin Publisher. p 228, 2003.
 14. Jang, S. *Bonchojoengeui*. Seoul, Chunghong. 225, 2009.
 15. Roh, S., Choi, H., Kim, D, Seo, Y. Studies of Anti-immflamation of *Liriopis Tuber* to Autoimmunune Diabetes in NOD mice. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology* 22(4):766-770, 2008.
 16. Park, S., Kim, Y. Effects of *Liriopis Tuber* on 4-HNE-induced Apoptosis in PC-12 Cells. *Korean Journal of Herbology* 28(2):33-38, 2013.
 17. Lee, E., Yang, S., Kim, M., Nam, K., Park, Y. Effects of Root of *Liriope Spicata* on LPS-induced Lung Injury. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology* 25(4):641-649, 2011.
 18. Lee, Y.C., Lee, J.C., Seo, Y.B., Kook, Y.B. *Liriopis tuber* inhibit OVA-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in murine model of asthma. *Journal of Ethnopharmacology* 101(1-3):144-152, 2005.
 19. Kim, H.K., Lee, J.Y., Han, H.S., Kim, Y.J., Kim, H.J., Kim, Y.S., Kim, H.M., Ko, S.G., An, H.J., Lee, Y.J., Park, W. Immunomodulatory effects of *Liriope platyphylla* water extract on lipopolysaccharide-activated mouse macrophae. *Nutrients* 4(12):1887-1897, 2012.
 20. Kang, Y., Lee, T.. *Liriopis Tuber* improves stress-induced memorial impairments in rats. *Korean Journal of Herbology* 28(2):33-38, 2013.
 21. Kim, E.K., Kim, E.Y., Moon, P.D., Um, J.Y., Kim, H.M., Lee, H.S., Sohn, Y., Park, S.K., Jung, H.S., Sohn, N.W. *Lithospermi Radix* extract inhibits histamine release and production of inflammatory cytokine in mast cells. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 71(12):2886-2892, 2007.
 22. Huh, M.K., Huh, H.W., Choi, J.S., Lee, B.K. Genetic diversity and population structure of *Liriope platyphylla* (Liliaceae) in Korea. *Journal of Life Science* 17(3):328-333, 2007.
 23. Church, M.K., Miller, P. Time courses of the anti-anaphylactic and anti-inflammatory effects of dexamethasone in the rat and mouse. *British Journal of Pharmacology* 62(4):481-486, 1978.
 24. Inagaki, N., Nakamura, N., Nagao, M., Musoh, K., Kawasaki, H., Nagai, H. Participation of histamine H1 and H2 receptors in passive cutaneous anaphylaxis-induced scratching behavior in ICR mice. *European Journal of Pharmacology* 367(2-3):361-371, 1999.
 25. Henz, B.M., Maurer, M., Lipper, U., Worm, M. and Babina, M.. Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Experimental Dermatology* 10(1):1-10, 2001.
 26. Paton William, D.M.. Compound 48/80: a potent histamine liberator. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 6(3):499-508, 1951.
 27. Katz, G., Cohen, S. Experimental evidence for histamine release in allergy. *Journal of the American Medical Association* 117(21):1782-1783, 1941.
 28. Artuc, M., Hermes, B., Steckelings, U.M., Grutzkau, A., Henz, B.M. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing-active participants or innocent by standers? *Experimental Dermatology* 8(1):1-16, 1999.
 29. Chang, L., Kamata, H., Solinas, G., Luo, J.L., Maeda, S., Venuprasad, K., Liu, Y.C., Karin, M. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF alpha induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 124(3):601-613, 2006.
 30. Dinarello, C.A., Bernheim, H.A., Duff, G.W., Le, H.V., Nagabhushan, T.L., Hamilton N.C., Coceani F.. Mechanisms of fever induced by recombinant human interferon. *Journal of Clinical Investigation* 74(3):906-913, 1984.
 31. Sehgal, P.B., Greininger, G., Tosato, G. Regulation of the acute phase and immune responses: interleukin-6. *The New York Academy of Sciences* 557: 1-583, 1989.

32. Gabay, C., Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine* 340(6):448-454, 1999.
33. Santhanam, U., Avila, C., Romero, R., Viguet, H., Ida, N., Sakurai, S., Sehgal, P.B. Cytokines in normal and abnormal parturition: elevated amniotic fluid interleukin-6 levels in women with premature rupture of membranes associated with intrauterine infection. *Cytokine* 3(2):155-163, 1991.
34. Erzen, B., Sabovic, M., Sebestjen, M., Keber, I., Poredos, P. Interleukin-6 correlates with endothelial dysfunction in young post-myocardial infarction patients. *Cardiology* 107(2):111-116, 2006.
35. Koch, A.E., Poverini, P.J., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., Dipietro, L.A., Elnor, V.M., Elnor, S.G., Strieter, R.M. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258(5089):1798-1801, 1992.
36. Salcedo, R., Ponce, M.L., Young, H.A., Wasserman, K., Ward, J.M., Kleinman, H., Oppenheim, J.J., Murphy, W.J. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96(1):34-40, 2000.
37. Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A., Kuby, J. *Leukocyte migration and inflammation*. Immunology 5th ed. New York, WH Freeman and Company. pp 338-360, 2003.
38. Leppa, S., Saffrich, R., Ansorge, W., Bohmann, D. Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *The EMBO Journal* 17(15):4404-4413, 1998.
39. Puddicombe, S.M., Davies, D.E. The role of MAP kinases in intracellular signal transduction in bronchial epithelium. *Clinical and Experimental Allergy* 30(1):7-11, 2000.
40. Guise, S., Braguer, D., Carles, G., Delacourte, A., Briand, C. Hyperphosphorylation of tau is mediated by ERK activation during anticancer drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Journal of Neuroscience Research* 63(3):257-267, 2001.