

백령의 알레르기 염증반응에 대한 억제효과

김장현¹, 천진홍¹, 김성윤², 박용기^{2,3*}

1: 동국대학교 한의과대학 한방소아과 2: 동국대학교 한의과대학 본초학교실
3: 동국대학교 한방신약개발센터 · 한의학연구소

The Effects of Ampelopsis Radix on Allergic Inflammation in PMA-stimulated Human Mast Cells

Jang Hyun Kim¹, Jin Hong Chun¹, Sung Yun Kim², Yong-Ki Park^{2,3*}

1 : Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongguk University
2 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University
3 : Oriental Medicine Drug R&D Center · Medicine Research Institute, College of Oriental Medicine,
Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : In this study, we investigated the inhibitory effects of Ampelopsis Radix methanol (AR-M) extract on allergic inflammation in activated human mast cells and its potential therapeutic or toxic effects.

Methods : Ampelopsis Radix(AR) was extracted with 80% methanol. HMC-1 cells, a human mast cell line, were treated with different concentrations of AR-M extract, and then stimulated with PMA plus A23187. The cell toxicity of AR-M extract was determined by MTT assay. The concentrations of PGE₂ and cytokines were measured by ELISA. The gene expression of COX-2 and its protein levels were determined by RT-PCR and Western blot. The phosphorylation of ERK MAPK and the NF- κ B activation were determined by Western blot.

Results : AR-M extract was significantly inhibited the production of PGE₂ and inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-8) in PMA/A23187-stimulated HMC-1 cells. AR-M extract also attenuated the mRNA expression of COX-2 and its protein induction. Furthermore, AR-M extract attenuated PMA/A23187-induced phosphorylation of ERK1/2 MAPK and the NF- κ B p65 subunit translocation into nuclear of HMC-1 cells. AR-M extract significantly decreased PMA/ A23187-induced release of histamine in a dose-dependent manner.

Conclusions : These results indicate that Ampelopsis Radix shows the property of anti-allergic inflammation *in vitro* through suppressing the production of inflammatory mediators released from mast cells, suggesting have a potential for the treatment of allergic diseases.

Key words : Ampelopsis Radix, allergic inflammation, mast cells, NF- κ B pathway

* 교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실 및 한방신약개발센터
· Tel : 054-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr
· 접수 : 2008년 11월 8일 · 수정 : 2008년 12월 18일 · 채택 : 2008년 12월 22일

서 론

비만세포(mast cell)는 세포질 내 과립을 풍부하게 가진 면역세포로 주로 결합조직과 점막에 존재하면서 알레르기 염증반응에 관여한다^{1,2)}. 외부자극으로부터 활성화된 비만세포는 다양한 프로테아제(proteases), 히스타민(histamine)과 같은 혈관확장물질들을 분비하며, 염증유발물질인 지질매개물질과 다양한 사이토카인 등의 분비를 자극한다. 비만세포로부터 생성되는 매개물질들은 이미 자극을 받기 전에 생성되어 과립 내 저장되어 있는 물질들과 자극을 받은 후 새롭게 생성되어 유리되는 물질이 있는데, 특히 후자의 경우로부터 생성되는 물질들인 platelet activating factor, leukoreiene, prostaglandins 등은 알레르기 염증반응과 직접 연관되며, 기관지 수축효과는 실제 히스타민보다 강력한 것으로 보고되고 있다^{4,5)}. 즉 비만세포는 알레르기 항원인 IgE-FcεRI 자극과 알레르겐의 결합을 통해 활성화되면 염증반응을 유발하는 다양한 화학매개체들과 사이토카인들을 분비하게되며⁶⁻⁸⁾, 결국 IgE 생산 증가를 통해 만성알레르기 발병에 기여하게 된다^{9,10)}. 따라서 비만세포로부터 유발되는 염증반응을 어떻게 조절되는가를 이해하고, 활성화된 비만세포로부터 다량 분비되는 염증매개물질들을 억제시켜주는 것은 IgE의 과도한 생성에 의해 발생하는 알레르기 천식을 막아줄 수 있는 유효한 치료 접근방법이 될 수 있다. 최근에는 한약물을 이용하여 비만세포에서의 염증반응을 조절하는 것에 대한 연구가 진행되고 있다¹¹⁻¹⁴⁾.

백림(Ampelopsis Radix)은 葡萄科(포도과; Vitaceae)에 속한 多年生 攀援藤本(낙엽활엽 덩굴나무)인 가회톱 *Ampelopsis japonica* (THUNB.) MAKINO의 塊根을 乾燥한 것으로 性은 微寒無毒하고 味는 苦하며, 心, 胃, 肝經에 入하여, 清熱解毒, 斂瘡生肌하는 效能이 있어 瘡癰腫毒, 癰疽發背, 癩癧, 水火燙傷 등을 치료하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 백림에 대한 실험 연구로 항산화 활성에 의한 adriamycin의 독성 발현 경감 효과 연구¹⁶⁾, 중앙면역조절 작용¹⁷⁾에 관한 연구 등이 보고되어 있으나 백림의 항염증이나 항알레르기 효과에 대한 연구는 아직 이루어지지 않고 있다.

이에 저자는 백림의 메탄올추출물을 제조하고 사람의 비만세포주(human mast cell line)인 HMC-1 세포를 이용하여 백림의 알레르기 염증반응에 대한 효과를 검증하여 유의한 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 백림은 (주)광명당제약(울산, 한국)으로부터 구입하였으며 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 검정하고 정선한 것을 사용하였다.

2) 시약

실험에는 methanol(Merck Co, Germany), lipopolysaccharide (LPS; E. coli B0111:B4; Sigma, St. Louis, MO), Acrylamide solution (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA), 3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-tetrazolium bromide(MTT, Sigma), N-trityl-1,3-propane diamine acetate(Sigma), Sulfanilamide (Sigma), anti-iNOS monoclonal antibody(Santa Cruz Co., Ltd, Santa Cruz, CA), anti-COX-2 mAb(SantaCruz), anti-ERK mAb(Cell Signaling Technology Inc., Denver, CA), anti-p-ERK mAb(Cell Signaling), anti-NF-κB p65 mAb(Cell Signaling), anti-I-κBα mAb(Cell Signaling), ELISA Development System (R&D System, Inc., Minneapolis, MN) 등의 시약을 사용하였다.

2. 방법

1) 약물제조

건조된 백림(200g)을 마쇄기로 갈은 후 80% methanol 1L를 가하여 추출기에서 3시간 동안 전탕하였다. 이를 2겹 거여즈와 와트만 여과지(Wathman No. 1)로 여과하여 회전식 증발기로 감압농축한 후 동결·건조하였다. 백림 메탄올추출물(Ampelopsis Radix methanol; AR-M extract)의 총 회수량은 총 50g이었으며 수득률은 25%였다. 백림 메탄올추출물은 실험 직전 DMSO에 녹여 사용하였다.

2) 세포배양

사람의 비만세포인 HMC-1 세포는 10% fetal bovine serum과 1% streptomycin/ penicillin이 함유된 IMEM 배지를 배양액으로 하여 37 °C와 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

3) 세포독성조사

백림추출물의 HMC-1 세포에 대한 독성(cytotoxicity)을

MTT assay 방법으로 조사하였다. 먼저 세포(5×10^4 cells/well)를 96-well culture plate에 $100 \mu\text{l}$ IMEM 배지와 함께 하룻밤 37°C , 5% CO_2 조건으로 배양한 다음, 여러 농도($10\text{--}500 \mu\text{g/ml}$)의 백림추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 $50 \mu\text{l}$ 씩 넣고 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도한 다음, $10 \mu\text{l}$ 의 DMSO 용액 첨가하여 formazan 결정을 완전히 용해하였다. 발색정도를 microplate reader를 이용하여 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 약물을 처리하지 않고 세포만 배양한 대조군의 생존도인 100% 를 기준으로 상대적인 세포생존도를 계산하였다.

4) Enzyme-linked immunosorbent assay

HMC-1 세포로부터 분비되는 염증사이토카인인 TNF- α , IL-6, IL-8의 양을 ELISA Development System을 이용한 ELISA 방법으로 측정하였다. 먼저 HMC-1 세포를 24-well plate에 하룻밤 배양한 후 여러 농도의 백림추출물($5\text{--}50 \mu\text{g/ml}$)을 30분간 전처리하고, PMA(50 nM/ml)와 A23187($1 \mu\text{M}$)를 처리하여 6시간 배양하고 각 세포의 배양액을 수거하였다. ELISA를 위해서는 먼저 $1 \times$ phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)에 capture antibody를 희석하여 $100 \mu\text{l}$ 씩 96-well plate(Nunc coating plate)의 각 well에 넣은 후 실온에서 하룻밤 반응시켰다. 이를 0.05% Tween -20이 포함된 $1 \times$ PBS(PBS-T)로 3번 세척한 다음 1% bovine serum albumin이 포함된 blocking 용액으로 실온에서 1시간 반응시켰다. Blocking 용액을 제거한 다음, 세포 배양액과 여러 농도의 각 cytokine에 대한 표준단백질을 $100 \mu\text{l}$ 씩 넣은 후 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이를 $1 \times$ PBS-T로 5번 세척하고 detection antibody $100 \mu\text{l}$ 를 넣어 1시간 실온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 plate는 $1 \times$ PBS-T로 다시 3회 세척한 후 streptavidin-HRP mAb를 넣고 30분간 실온에서 암반응 시켰다. 이를 다시 $1 \times$ PBS-T 용액으로 3회 세척하고 TMB(tetramethylbenzidine) 기질용액을 넣어 15분 교반기 위에서 암반응 시켰다. 반응을 종료시키기 위해 1 M phosphoric acid 용액을 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하고 microplate reader를 이용하여 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 각 사이토카인의 농도는 표준단백질의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

5) Prostaglandin E_2 측정

HMC-1 세포로부터 생성되는 PGE $_2$ 의 양을 측정

하기 위해 HMC-1 세포를 24-well plate에 하룻밤 배양한 후 서로 다른 농도($5\text{--}50 \mu\text{g/ml}$)의 백림추출물을 30분간 전처리한 다음 PMA (50 nM/ml)와 A23187($1 \mu\text{M}$)를 처리하여 8시간 배양하였다. 세포 배양액으로부터 PGE $_2$ 의 농도를 PGE $_2$ enzyme immunoassay kit를 이용하여 측정하였다. 세포배양액 내 존재하는 PGE $_2$ 의 농도는 표준액의 농도를 기준으로 환산하여 계산하였다.

6) Reverse Transcriptase(RT)-PCR

HMC-1 세포로부터 분비되는 염증사이토카인들(TNF- α , IL-6, IL-8)의 유전자 발현에 대한 백림추출물의 조절효과를 조사하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 즉, HMC-1 세포를 하룻밤 배양하고 다양한 농도($10\text{--}50 \mu\text{g/ml}$)의 백림추출물을 처리하여 30분간 배양하였다. 여기에 PMA와 A23187을 처리하여 5시간 동안 배양함으로써 세포를 활성화시켰다. 각 세포를 수거하기 위해 $5,000 \text{ rpm}$ 에서 5분간 원심분리한 후 TRIzol 시약을 이용하여 세포로부터 total RNA를 분리하였다. 분리된 mRNA와 oligo-(dT) primer와 Improm-IITM reverse transcriptase (Promega)를 이용하여 25°C 에서 10분, 42°C 에서 60분, 70°C 에서 15분 조건으로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 대한 PCR을 수행하기 위해 cDNA $1 \mu\text{g}$ 에 iNOS primers[sense; $5'\text{-GAC CAGT ATA AGG CAA GCA C-3'}$, antisense; $5'\text{-CTT GTC TTT GAC CCA GTA GC-3'}$], TNF- α primers[sense; $5'\text{-TTC TGT CTA CTG AAC TTC GGG GTG AT C GGT CC-3'}$, antisense; $5'\text{-GTA TGA GAT AGC AAA TCG GCT GAC GGT GTG GG-3'}$], IL-8 primers [sense; $5'\text{-ATG GCA ACT GTT CCT GAA CTC AAC T-3'}$, antisense; $5'\text{-CAG GAC AGG TAT AGA TTC TTT CCT TT-3'}$], IL-6 primers [sense; $5'\text{-AAC ACA GCT ACG AAA ACC-3'}$, antisense; $5'\text{-CAC AGT ATG ATG TAA CAG TCC-3'}$] 및 $10 \times$ buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), $250 \mu\text{M}$ dNTP, 1 U Tag polymerase를 잘 혼합한 후 denaturation을 위해 94°C 에서 30초, annealing을 위해 $55\text{--}60^\circ\text{C}$ 에서 30초 및 extension을 위해 70°C 에서 60초 조건에서 20-25 cycles을 수행하였다. PCR 반응의 표준 대조구로 GAPDHs[Fw; $5'\text{-CTC GTG GAG TCT ACT GGT GT-3'}$, Rv, $5'\text{-GTC ATC ATA CTT GGC AGG TT-3'}$]를 사용하였다.

7) Western blot 분석

HMC-1 세포로부터 염증관련 단백질들에 대한 백림추출물의 효과를 조사하기 위해 Western blot를 수행하였다. 즉 HMC-1 세포를 6-well plate에 하룻밤 배양하고 백림추출물을 다양한 농도(10-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 30분간 전배양하였다. 여기에 PMA와 A23187을 처리하여 30분(pERK/ERK, NF- κB /I- κB) 또는 12시간(COX-2) 배양함으로써 세포를 활성화시켰다. HMC-1 세포를 수거하여 HBSS 용액으로 2회 세척한 다음 얻어진 세포를 RIPA 용액(50 mM HEPES, pH 7.4, 15 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin)으로 lysis 시킨 후 얼음에 30분간 유지시켰다. 20 μg 의 단백질을 2 \times sample buffer(100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200mM dithithreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)와 섞어 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분 끓인 다음 10-12% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였다. 전기영동 후 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4 $^{\circ}\text{C}$, 30V로 16시간 동안 transfer 시켰다. Membrane은 10% skim milk로 실온에서 1시간 동안 blocking 한 다음, COX-2, pERK/ERK, NF- κB /I- κB 및 β -actin에 대한 단클론 항체를 0.05% Tween이 함유된 TBS-T로 희석하여 상온에서 2시간 반응시켰다. Membrane을 TBS-T로 3회 세척한 후 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated HRP 항체와 상온에서 1시간 반응시키고 ECL solution을 이용하여 x-ray film에 감광시켰다.

8) 히스타민 분비 측정

백림추출물의 히스타민 분비에 대한 억제효과를 histamine assay kit를 이용하여 측정하였다. 즉 HMC-1 세포를 하룻밤 배양한 다음 백림추출물을 다양한 농도로 처리하여 30분간 전배양하였다. 여기에 PMA와 A23187를 처리하여 1, 2, 4, 6시간에 세포배양액을 수거한 후 히스타민의 농도를 측정하였다. 측정결과는 히스타민 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

9) 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균 \pm 표준편차 (standard deviation: SD)로 나타내었으며 통계학적 분석은 SPSS program의 student *t*-test를 이용하여 *p*값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포독성 검정

백림추출물(AR-M extract)의 HMC-1 세포에 대한 독성정도를 조사하기 위해서 MTT assay를 수행하였다(Fig. 1).

HMC-1 세포에서의 백림추출물에 의한 세포생존율(cell viability; %)은 세포만 배양한 대조군의 세포생존율 100%를 기준으로, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 100.4 \pm 0.75%, 103.4 \pm 4.13%, 103.7 \pm 5.62%, 86.28 \pm 7.87%, 56.78 \pm 4.49% 및 48.91 \pm 9.26%로 측정되었다(Fig. 1). 따라서 백림추출물은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 처리농도까지 세포독성이 없는 것으로 나타났다(IC₅₀=200 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

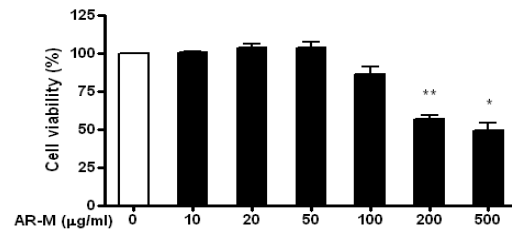


Fig. 1. Cell cytotoxicity of Ampelopsis Radix methanol extract in HMC-1 cells

After the cells(5 \times 10⁴ cells/well) were cultured with different concentrations(10-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of Ampelopsis Radix methanol(AR-M) extract at the presence of PMA(50 nM/ml)/A23187 (1 μM) or absence for 24 h, cell viability was measured by MTT assay. The results show mean value of three independent experiments (SD = bars). * *p* < 0.05 and ** *p* < 0.01 vs. non-treated group.

2. TNF- α 생성에 대한 억제효과

백림추출물이 활성화된 HMC-1 세포로부터 분비되는 염증사이토카인인 TNF- α 의 생성을 억제시켜줄 수 있는지 ELISA 방법으로 조사하였다(Fig. 2).

먼저, 세포만 배양한 경우 TNF- α 의 생성은 매우 낮게 검출되었으며(18.63 \pm 0.81 pg/ml), PMA/A23187을 처리한 후 현저히 증가되는(421 \pm 3.52 pg/ml) 것을 확인하였다(Fig. 2A). 또한 백림추출물의 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리농도에서 각각 419.1 \pm 9.24 pg/ml, 407.3 \pm 4.98 pg/ml, 188.5 \pm 9.55 pg/ml 및 107.4 \pm 4.51 pg/ml로 측정되어, 유의적이고 농도 의존적으로 TNF- α 의 생성이 감소하였다(Fig. 2A).

한편 TNF- α 의 유전자 발현(Fig. 2B)을 RT-PCR 방법으로 조사한 결과, 세포만 배양한 경우와 백림추

출물만 단독(50 $\mu\text{g/ml}$)으로 처리한 경우에는 거의 발현되지 않았으며, PMA/ A23187 처리에 의해 증가되었다. 또한 백림추출물(50 $\mu\text{g/ml}$) 처리에 의해 TNF- α 유전자의 발현이 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 2C).

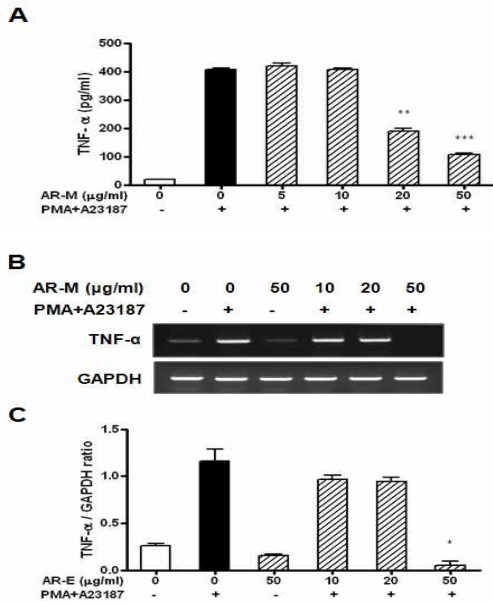


Fig. 2. Inhibitory effect of Ampelopsis Radix methanol extract on PMA/A23187-induced TNF- α production from HMC-1 cells

HMC-1 cells were incubated with various concentrations (5~50 $\mu\text{g/ml}$) of Ampelopsis Radix methanol (AR-M) extract in the presence of PMA/A23187 or absence for 6 h. (A) TNF- α production from cells was determined in culture supernatant by ELISA. Three independent experiments were performed, and the data shown indicate the mean \pm SD. (B) Total RNAs were isolated, and mRNA levels of TNF- α were measured by RT-PCR. The figures show representative results of three independent experiments. The quantification of relative band intensities from three independent experimental results was determined by densitometry. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. PMA/A23187- treated group.

3. IL-6 생성에 대한 효과

백림추출물이 HMC-1 세포로부터 염증사이토카인인 IL-6의 생성을 억제시켜줄 수 있는지 ELISA 방법으로 조사하였다(Fig. 3).

HMC-1 세포만 배양한 대조군의 경우 IL-6의 생성은 매우 낮게 검출되었으며(19.48 \pm 0.12 pg/ml), PMA/A23187을 처리한 경우 현저히 증가(1022 \pm 31.2 pg/ml) 하였다(Fig. 3A). 또한 백림추출물을 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 으로 처리하였을 때 각각 999.1 \pm 7.30 pg/ml, 966.4 \pm 4.65 pg/ml, 691.9 \pm 5.43 pg/ml 및 456.8 \pm 1.48 pg/ml로 측정되어, 유의적이고

농도 의존적으로 백림추출물이 IL-6의 생성이 억제하는 것으로 나타났다.

한편 IL-6의 유전자 발현에 대한 효과를 RT-PCR 방법으로 조사한 결과(Fig. 3B), 세포만 배양한 경우와 백림추출물을 단독(50 $\mu\text{g/ml}$)으로 처리한 경우에는 IL-6의 유전자발현이 관찰되지 않은 반면, PMA/A23187 처리에 의해 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 또한 백림추출물(20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$) 처리에 의해 유의적으로 억제되었다(Fig. 3C). 특히 백림추출물을 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때 가장 효과적으로 IL-6의 유전자발현이 억제되었다.

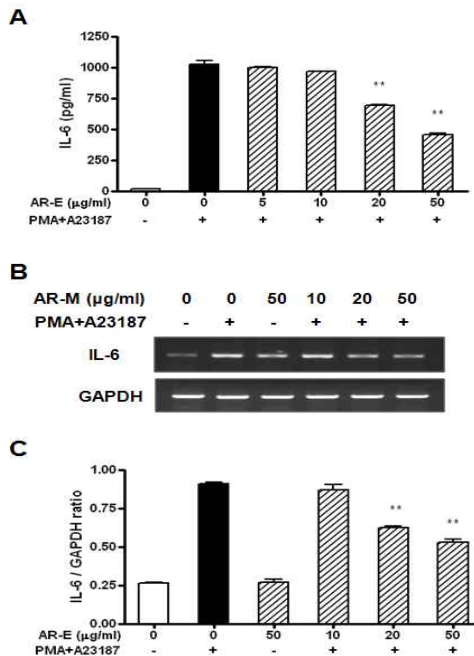


Fig. 3. Inhibitory effect of Ampelopsis Radix methanol extract on PMA/A23187-induced IL-6 production from HMC-1 cells

HMC-1 cells were incubated with various concentrations(5~50 $\mu\text{g/ml}$) of Ampelopsis Radix methanol(AR-M) extract in the presence of PMA/A23187 or absence for 6h. (A) IL-6 production from cells was determined in culture supernatant by ELISA. Three independent experiments were performed, and the data shown indicate the mean \pm SD. (B) Total RNAs were isolated, and mRNA levels of IL-6 were measured by RT-PCR. The figures show representative results of three independent experiments. The quantification of relative band intensities from three independent experimental results was determined by densitometry. ** $p < 0.01$ vs. PMA/A23187-treated group.

4. IL-8 생성에 대한 효과

백림추출물이 활성화된 HMC-1 세포로부터 분비되는 염증사이토카인인 IL-8의 생성을 억제시켜줄 수 있는지 ELISA 방법으로 조사하였다(Fig. 4).

세포만 배양한 경우, IL-8의 생성은 매우 낮게 검출되었으며(15.95±2.27 pg/ml), PMA /A23187을 처리한 후 증가(269.9± 13.78 pg/ml) 하였다(Fig. 4A). 이는 백림추출물을 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml 및 50 µg/ml 농도로 처리하였을 때, 각각 222.2±1.27 pg/ml, 133.6±4.76 pg/ml, 66.78±3.52 pg/ml 및 18.03±1.71 pg/ml로 측정되어, 유의적이고 농도 의존적으로 IL-8의 생성이 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 4A).

한편 IL-8의 유전자 발현을 RT-PCR 방법으로 조사한 결과(Fig. 4B), 세포만 배양한 경우와 백림추출물을 단독(50 µg/ml)으로 처리한 경우에는 매우 낮게 발현된 반면, PMA/A23187 처리후 현저히 증가되었고, 백림추출물의 처리 농도에 의존적으로 억제되었다(Fig. 4C). 특히 50µg/ml의 백림추출물 처리농도에서 가장 효과적으로 억제되었다.

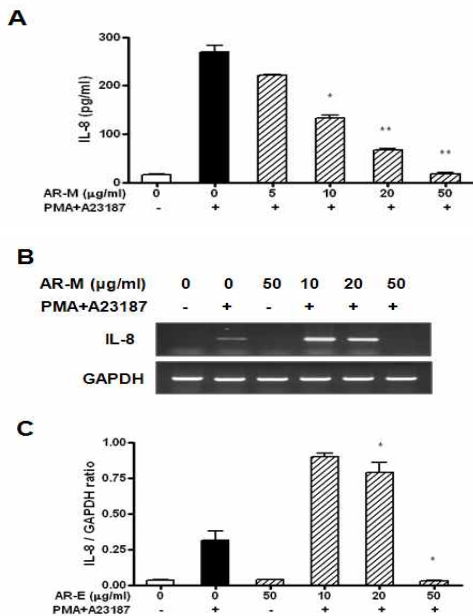


Fig. 4. Inhibitory effect of Ampelopsis Radix methanol extract on PMA/A23187-induced IL-8 production from HMC-1 cells

HMC-1 cells were incubated with various concentrations(5~50 µg/ml) of Ampelopsis Radix methanol(AR-M) extract in the presence of PMA/A23187 or absence for 6 h. (A) IL-8 production from cells was determined in culture supernatant by ELISA. Three independent experiments were performed, and the data shown indicate the mean±SD. (B) Total RNAs were isolated, and mRNA levels of IL-8 were measured by RT-PCR. The figures show representative results of three independent experiments. The quantification of relative band intensities from three independent experimental results was determined by densitometry. * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. PMA/A23187 -treated group.

5. PGE₂ 생성에 대한 효과

백림추출물이 활성화된 HMC-1 세포로부터 분비

되는 이차 염증물질인 PGE₂의 양을 줄여줄 수 있는지 효소면역방법(EIA)으로 조사하였다.

먼저 세포만 배양한 경우와 백림추출물을 단독으로 처리한 경우에는 PGE₂의 생성이 매우 낮게 검출되었으며(26.88±2.31 pg/ml, 62.33±6.09 pg/ml), PMA/A23187을 처리한 후 증가하였다(421±16.24 pg/ml; Fig. 5A). 또한 백림추출물을 10 µg/ml, 20 µg/ml 및 50 µg/ml 농도로 처리하였을 때 각각 440.5±25.62 pg/ml, 289.7±40.81 pg/ml 및 104.5±9.89 pg/ml로 측정되어, 유의적이고 농도 의존적으로 PGE₂의 생성이 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 5A).

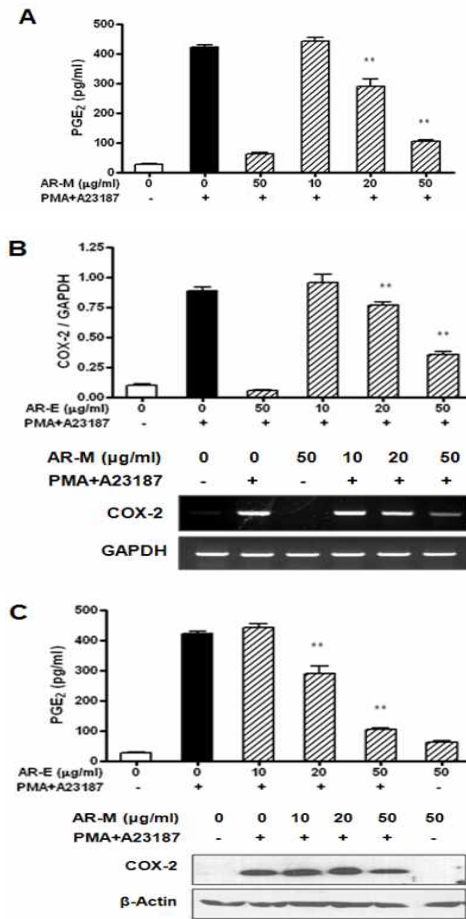


Fig. 5. Inhibitory effect of Ampelopsis Radix methanol extract on PMA/A23187-induced PGE₂ production from HMC-1 cells

The cells were incubated with different concentrations(5~50 µg/ml) of Ampelopsis Radix methanol(AR-M) extract in the presence of PMA/A23187 or absence for 8 h. PGE₂ production from cells was determined in culture supernatants by enzyme-immunoassay. The quantification of relative band intensities from three independent experimental results was determined by densitometry. ** p < 0.01 vs. PMA/A23187 -treated group.

한편 PGE2의 합성효소인 COX-2의 유전자 발현(Fig. 5B)과 단백질 발현(Fig. 5C)을 RT-PCR과 Western blot 방법으로 조사한 결과, COX-2의 발현은 세포만 배양한 경우와 백령추출물 단독으로 처리한 경우에는 관찰되지 않았으며, PMA/A23187를 처리하였을 때 증가되었고, 백령추출물 처리에 의해 억제되었다.

6. ERK MAPK 활성화에 대한 억제효과

Mitogen activated protein kinases(MAPK)는 세포의 증식과 분화를 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절하며, 특히 외부 감염에 의해 활성화됨으로써 염증매개물질들의 생성을 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 따라서 본 연구에서는 활성화된 비만세포에서 ERK1/2 MAPK 분자의 인산화에 대한 백령추출물의 억제효과를 조사하였다(Fig. 6).

그 결과 세포만 배양한 대조군에서는 ERK1/2의 인산화가 관찰되지 않았으며, PMA/ A23187 처리에 의해 유도되는 것을 확인하였다(Fig. 6A). 또한 백령추출물을 처리하였을 때, 모든 처리농도에서 ERK1/2의 인산화가 억제되는 것을 알 수 있었다(Fig. 6B). 한편 백령추출물은 HMC-1 세포에서 발현되는 ERK의 비인산화 형태(un-phosphorylated forms)에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

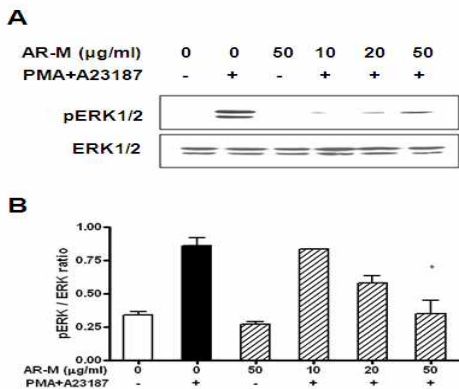


Fig. 6. Effects of Ampelopsis Radix methanol extract on PMA/A23187-induced ERK1/2 phosphorylation in HMC-1 cells

The cells were incubated with different concentrations(5~50 µg/ml) of Ampelopsis Radix methanol(AR-M) extract in the presence of PMA/A23187 or absence for 15 min. The cellular proteins from the cells were used for the detection of phosphorylated or total forms of ERK1/2 MAPK. The figures show representative results of three independent experiments. The quantification of relative band intensities from three independent experimental results was determined by densitometry. * p < 0.05 compared with PMA/A23187 alone.

7. NF-κB 활성화에 대한 효과

NF-κB는 MAPKs와 마찬가지로 세포의 증식과 분화를 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절하며, 외부 자극으로 활성화되어 염증물질들의 생성을 유도하는데 중요한 역할을 한다. 따라서 본 연구에서는 활성화된 비만세포에서 NF-κB p65 subunit의 핵으로의 이동과 NF-κB의 negative regulator로 알려져 있는 I-κBa의 발현에 대한 백령추출물의 억제효과를 핵과 세포질 분획으로 나누어 조사하였다.

먼저 세포질 내 존재하는 I-κBa의 경우(Fig. 7A), 세포만 배양하였을 때와 백령추출물만 처리하였을 경우에는 분리가 일어나지 않아 I-κBa가 그대로 검출되는 반면, PMA/A23187을 처리하였을 때 NF-κI-κBa의 분리가 증가되어 세포만 배양한 경우에 비해 약하게 관찰되었다. 반면 PMA/A23187에 의해 유도된 I-κBa의 분리는 백령추출물을 20 µg/ml과 50 µg/ml 처리하였을 때 억제되어 세포만 배양했을 때와 유사한 수준으로 관찰되었다.

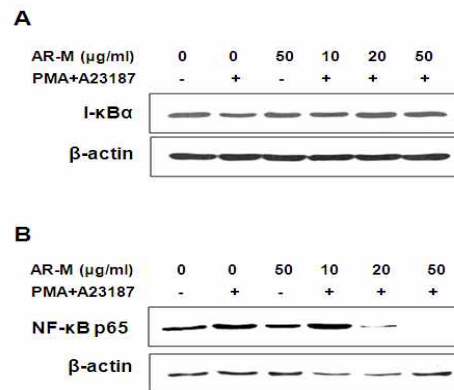


Fig. 7. Effects of Ampelopsis Radix methanol extract on IκB phosphorylation and the DNA-binding activity of the NF-κB p65 subunit in PMA/ A23187-stimulated HMC-1 cells

The cells were incubated with various concentrations(5~50 µg/ml) of Ampelopsis Radix methanol(AR-M) extract in the presence of PMA/A23187 or absence for 30 min. (A) The cellular proteins from the cells were used for the detection of I-κBa, and (B) total nuclear proteins were used for the detection of the NF-κB p65 subunit by Western blotting. The figures show representative results of three independent experiments. The quantification of relative band intensities from three independent experimental results was determined by densitometry. *p<0.05 compared with PMA/A23187 alone.

한편 NF-κB는 세포만 배양하였을 때와 AR-M extract만 처리하였을 때, 세포질에서 핵으로 이동이 적게 일어나 핵에서의 NF-κB p65 subunit의 발현이 약하게 관찰되는 반면, PMA/A23187의 처리에 의해

발현양이 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 7B). 반면 PMA/A23187에 의한 NF-κB의 핵으로의 이동은 백립 추출물 처리농도에 의존하여 감소되었다.

따라서 백립추출물은 HMC-1 비만세포에서 PMA/A23187 처리에 의해 유도되는 NF-κB의 활성화를 차단하므로 염증효소들의 전사를 억제시키고 이를 통해 염증 물질들의 분비를 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

8. 히스타민 생성에 대한 효과

비만세포 안에는 염증유발분자인 히스타민 과립이 채워져 있으며, 무해한 물질에 대해서도 탈과립 반응을 하여 알레르기반응을 일으키며 극단적으로 아나필락시스반응을 일으키기도 한다. 따라서 본 연구에서는 백립추출물이 활성화된 비만세포로부터 히스타민의 분비를 조절할 수 있는지 조사하였다.

HMC-1 세포로부터 히스타민의 분비는 PMA/A23187의 처리시간에 의존하여 증가되는 것으로 나타났으며(Fig. 8A), 백립추출물을 2 μg/ml, 5 μg/ml, 10 μg/ml, 20 μg/ml, 50 μg/ml로 처리하였을 때 각각 66.0±1.64 nM/ml, 59.8±1.67 nM/ml, 51.2±0.73 nM/ml, 39.8±1.96 nM/ml 및 36.3±2.06 nM/ml로 측정되어 농도 의존적이고 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 8B).

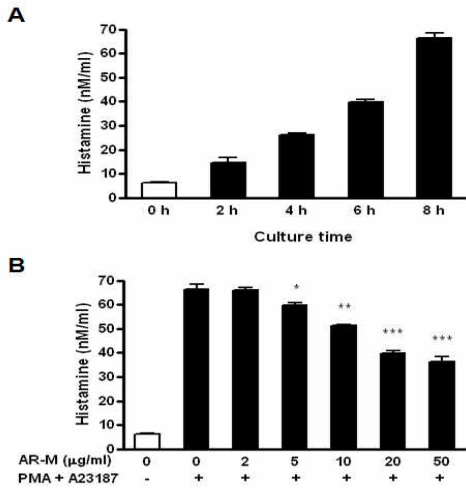


Fig. 8. Effect of Ampelopsis Radix methanol extract on the degranulation of HMC-1 cells

(A) The cells were incubated with different concentrations(5--50 μg/ml) of Ampelopsis Radix methanol(AR-M) extract in the presence of PMA/A23187 or absence for 2h, 4h, 6h, and (B) 8h. The histamine release was determined with the aid of histamine assay kit. The results represent three independent experiments conducted in duplicate. Each datum represents the mean±SD of three independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 compared with PMA/A23187 alone.

고찰

비만세포는 알레르기의 주요 원인이 되는 면역세포로서 비만세포 표면에는 IgE 형태의 항체가 붙을 수 있는 표면 인자인 IgE-FcεRI가 있다^{1,2)}. 기질에 붙은 후 비교적 바로 떨어지는 다른 항체와 달리 IgE는 비만 세포에 붙으면 거의 떨어지지 않으며, 알레르겐과 같이 IgE에 붙는 물질이 인체 내에 들어와 IgE에 결합을 하게 되면, IgE와 결합하고 있는 비만 세포가 활성화가 되게 된다^{3,4)}. 이렇게 활성화된 비만 세포는 신경 전달 물질인 히스타민을 외부로 분비하여 알레르기 반응을 유발시킨다. 즉 알레르기는 특정한 항원에 대하여 나타나는 반응으로 그 항원에 대해 특이적인 IgE급 항체가 비만세포에 결합되어 유도되는 반응이다.

비만세포로부터 분비되는 히스타민은 기관지수축, 점액분비 증가, 혈관확장, 혈관투과성 증가 등을 통해 알레르기 천식에 관여하게 된다. 한편 비만세포가 외부 자극을 받은 후 새롭게 생성되어 분비되는 가장 중요한 물질로 arachidonic acid 경로를 통해 생성되는 대사산물인데 여기에 중요한 대사 과정으로는 cyclooxygenase (COX) 경로와 lipoxygenase 경로가 있다⁶⁾. COX 경로에 의한 대사산물로 prostaglandin이 있으며, lipoxygenases 경로에 의한 대사산물은 leukotriene C4 (LTC4), LTD4, LTE4 등이 있다⁶⁻⁸⁾. 이들 역시 점액 분비 증가, 기도 내 염증세포 침윤 유도, 혈관 투과성 증대, 부종 유발 등을 통해 실제 알레르기 천식과 연관되며, 기관지 수축효과는 실제 히스타민보다 강력해서 천식 환자의 경우 정상인에 비해 훨씬 민감한 것으로 알려져 있다^{4,5)}.

사람의 비만세포는 알레르기 항원인 IgE-FcεRI 자극을 통해 다양한 사이토카인들을 분비하는데, 이들은 점막부종, 기관지 평활근 수축, 점액분비 증가 등을 일으키면서 초기 알레르기 반응에 관여한다^{7,18)}. 특히 비만세포로부터 분비되는 TNF-α는 혈관내피세포의 유착분자의 발현을 증가시켜, T 세포, 호산구 등의 표적기관으로의 유입을 촉진하고, tryptase, IL-5, GM-CSF 등을 분비하여 호산구의 화학주성과 증식을 돕고, IL-4, IL-6, IL-8 등은 Th2 세포의 면역반응을 증가시켜 결국 IgE의 생산을 증가시킴으로써 만성알레르기 발병에 기여하게 된다^{9,10,19)}. 즉 사람의 비만세포는 IgE-FcεRI-알레르겐으로 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. 따라서 본 연구에서는 비만세포로부터 유발되는

염증반응을 백림추출물이 어떻게 억제시켜 줄 수 있는가를 이해하기 위해 알레르기 염증반응에 대한 효과를 조사하였다.

TNF- α 는 다양한 생물학적 기능을 갖는 대표적인 염증사이토카인이며, 비만세포로부터 분비되는 TNF- α 는 알레르기 천식에서 초기에서부터 만성 염증반응 발달에 기여하고, 히스타민 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다^{20,21}. IL-6는 T 세포, monocyte, macrophage, synovial fibroblast 등의 면역세포에서 분비되는 염증사이토카인으로서 세포 활성화를 유도하며²², 비만세포로부터 분비되어 알레르기 염증 반응을 통해 사람의 천식과 동물의 수동피부 아나필락시스(passive cutaneous anaphylaxis)를 유발하는데 기여한다²³. IL-8은 비만세포를 포함하여 T 세포, B 세포, neutrophils, eosinophils 등의 면역 세포로부터 분비되는 cytokine 으로서 비만세포로부터 분비되는 IL-8은 neutrophil의 migration에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁴. 본 연구에서 백림추출물은 자극원인 PMA/A23187 처리에 의해 활성화 된 HMC-1 세포로부터 분비되는 IL-6, IL-8, TNF- α 를 농도의존적이고 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다. 이런 결과는 백림추출물이 비만세포로부터 분비되는 염증사이토카인들의 분비를 감소시킴으로써 항염증 효과가 있음을 의미한다.

한편 비만세포는 prostaglandins과 같은 염증매개물질을 분비하게 되는데, 본 연구에서 백림 추출물은 PMA/A23187 처리에 의해 활성화된 HMC-1 세포로부터 생성되는 PGE₂와 염증효소인 COX-2의 발현을 유의적으로 억제시킴으로써 염증 유전자 발현의 조절을 통해 항염증 효과가 있음을 알 수 있었다.

외부자극을 통해 시작되는 염증반응은 주로 MAPK 분자들을 인산화시킴으로써 NF- κ B나 activator protein-1 (AP-1)과 같은 전사조절인자들의 발현을 가동시키게 된다²⁵. MAPK subfamily로는 ERK1/2, c-Jun-N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK) 및 p38 MAPK가 있는데 이들의 신호전달과정은 염증반응을 유도하는 염증매개물질들의 합성을 유도한다는 점에서 염증관련 질병의 발병기전에 중요한 역할을 하게 된다. 특히 비만세포에서의 ERK의 인산화는 NF- κ B를 활성화시켜 TNF- α , IL-6, IL-8 등의 염증사이토카인 및 COX-2의 발현을 증가시키게 된다^{5,6,25,27}. 한편 NF- κ B는 염증에 관여하는 TNF- α , IL-8, IL-6 등의 염증사이토카인이나 면역세포 이동에 중요한 접합 분자들, 케모카인 등의 유전자를 발현시키기 때문에 초기 염증반응 조절에 매우 중요한 전사인자로 알려져 있다. 또한 NF- κ B의 inhibitor인 I- κ B는 분리됨으로써, NF-

κ B가 핵 내로 이동하여 염증매개물질 유전자의 전사를 유도하게 한다. 본 연구에서 염증매개물질들의 발현을 조절하는 NF- κ B 염증신호전달 경로에 대한 백림 추출물의 효과를 조사한 결과, 백림 추출물은 ERK MAPK의 인산화를 효과적으로 억제하였으며, cytosol에서 I- κ Ba의 분리를 억제함으로써 NF- κ B의 핵 내로의 이동을 효과적으로 차단하는 것으로 나타났다. 이런 결과는 백림추출물이 활성화된 비만세포에서 NF- κ B pathway를 차단함으로써 TNF- α , IL-8, IL-6 등의 염증사이토카인 분비를 감소시켜 알레르기 염증 반응을 억제시킬 수 있음을 의미한다.

히스타민은 체내에서 히스티딘 탈탄산효소가 아미노산인 히스티딘에 작용해 생성되며 주로 비만세포 내에 커다란 과립형태로 저장된다^{1,2}. 본 연구에서 백림추출물은 활성화된 비만세포로부터 히스타민의 분비를 억제시킬 수 있는 것으로 나타났는데, 이는 백림추출물이 비만 세포로부터 히스타민의 분비를 억제함으로써 알레르기 증상을 완화시킬 수 있음을 시사한다.

결론적으로 백림추출물은 비만세포로부터 히스타민과 염증매개물질들의 분비를 유의적으로 억제시킴으로써 알레르기 염증반응을 개선시킬 수 있으며, 이는 백림이 알레르기 질환의 예방 및 치료를 위한 약물소재로 활용되어질 수 있음을 의미한다.

결론

본 연구에서는 알레르기 염증질환 치료를 위한 한방소재를 발굴하기 위해서 사람의 비만세포주인 HMC-1 세포에서 백림 메탄올 추출물의 효과와 작용기전을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백림추출물은 HMC-1 세포에서 50 μ g/ml 농도가 지 독성이 나타나지 않았다.
2. 백림추출물은 PMA/A23187에 의해 활성화된 HMC-1 세포로부터 TNF- α , IL-6, IL-8의 분비를 유의적으로 감소되었으며, 이들의 유전자 발현 역시 억제시켰다.
3. 백림추출물은 PMA/A23187에 의해 활성화된 HMC-1 세포로부터 PGE₂의 분비를 유의적으로 감소되었으며, COX-2의 유전자와 단백질 발현 역시 억제시켰다.
4. 백림추출물은 PMA/A23187에 의해 활성화된 HMC-1 세포로부터 ERK1/2 MAPK의 인산화를 억제하였으며, I- κ B의 분리를 통한 NF- κ B p65의 핵 내로

의 이동을 억제하였다.

5. 백림추출물은 PMA/A23187에 의해 활성화된 HMC-1 세포로부터 히스타민의 분비를 유의적으로 감소시켰다.

감사의 글

이 논문은 동국대학교 교내 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.
- Kraft S, Novak N, Katoh N, Bieber T, Rupec RA. Aggregation of the high-affinity IgE receptor Fc(epsilon)RI on human monocytes and dendritic cells induces NF- kappaB activation. *J Invest Dermatol*. 2002 ; 118 : 830-7.
- 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.
- Nagai H. Prostaglandin as a target molecule for pharmacotherapy of allergic inflammatory diseases. *Allergol Int*. 2008 ; 57 : 187-96.
- Norrby K. Mast cells and de novo angiogenesis: angiogenic capability of individual mast-cell mediators such as histamine, TNF, IL-8 and bFGF. *Inflamm Res*. 1997 ; 46 : S7-8.
- Abdel-Majid RM, Marshall JS. Prostaglandin E2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells. *J Immunol*. 2004 ; 172 : 1227-36.
- 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 Gamibojungikgitang 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.
- 康秉秀 外. 本草學. 서울 : 永林社. 1998 : 226-7.
- Park Seungman, Ahn Sangwoo, Cho Jong kwan. Effects of Ampelopsis japonica extracts on tumor immunity. *Korean Journal of Oriental Medicine*. 2005 ; 11 : 113-40.
- 김동석, 이성호, 정연봉. Adriamycin의 독성 발현에 미치는 백림(Ampelopsis radix)의 영향. *한국식품영양학회지*. 1994 ; 7 : 232-8.
- Temkin V, Kantor B, Weg V, Hartman ML, Levi-Schaffer F. Tryptase activates the mitogen-activated protein kinase/activator protein-1 pathway in human peripheral blood eosinophils, causing cytokine production and release. *J Immunol*. 2002 ; 169 : 2662-9.
- Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature*. 1996 ; 381 : 77-80.

20. 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- α 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.
21. Gordon JR, Burd PR, Galli SJ. Mast cells as a source multifunctional cytokines. *Immunol. Today.* 1990 ; 11 : 458-64.
22. Kim SJ, Lee EJ, Song YS, Jeong HJ, Lee KM, Kim HR, Chae HJ, Shin TY, Kim YK, Hong SH, Kim HM. Cheongyeol saseuptang inhibits production of TNF- α , IL-6 and IL-8 as well as NF- κ B activation in human mast cells. *J Ethnopharmacol.* 2005 ; 97 : 83-8.
23. Kim HM, Park YA, Lee EJ, Shin TY. Inhibition of immediate-type allergic reaction by *Rosa davurica* Pall. in a murine model. *J Ethnopharmacol.* 1999 ; 67 : 53-60.
24. 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.
25. 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.
26. Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002 ; 3 : 413-21.
27. Azzolina A, Guarneri P, Lampiasi N. Involvement of p38 and JNK MAPKs pathways in Substance P-induced production of TNF- α by peritoneal mast cells. *Cytokine* 2002 ; 18 : 72-80.