

Effect of Jak-Yak Tang water extract on expression of cytokin and chemokine

You-Chang Oh, Ok-Hwa Kang and Dong-Yeul Kwon*

Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, 570-749, South Korea.

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of extract from Jak-Yak Tang (JYT) on the THP-1 cell and HMC-1 cell.

Method : To evaluate of anti-inflammatory of JYT, we examined cytokines production in lipopolysacchride (LPS)-induced THP-1 cell and A23187, PMA-induced HMC-1 cell.

Result : Extract of JYT inhibit LPS-induced interleukin (IL)-8 production in human monocyte THP-1 cells.

Extract of JYT inhibit A23187, PMA-induced IL-8, tumor necrosis factor- α (TNF- α) production in HMC-1 cells.

Conclusion : JYT down-regulated LPS-induced IL-8 production and A23187, PMA-induced IL-8, TNF- α production, which may be provide a clinical basis for anti-inflammatory properities of JYT.

Key words : Jak-Yak Tang (JYT), anti-inflammation, interleukin (IL)-8, tumor necrosis factor- α (TNF- α).

서론

Interleukin (IL)-8은 다양한 염증성 질환에서 염증 반응의 개시와 유지에 중추적인 역할을 한다¹⁾. IL-8은 염증조직 안으로 호중구를 보충해주는 역할을 하는 중요한 염증성 매개자이며, 자극원의 자극에 의해서 강력하게 활성화된다^{2,3,4)}. 인간 단핵세포인 THP-1 세포에서 IL-8은 LPS의 자극에 의해 강력하게 발현되고, 인간 비만세포주인 HMC-1 세포에서는 A23187

과 PMA의 자극에 의해서 발현된다. 또 다른 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 간에서 염증에 대한 급성반응을 유도하여 체온을 상승시키고, 근육과 지방 세포에 작용해 에너지 대사를 변화시켜 체온을 높이게 된다. 특히, TNF- α 는 혈관내피세포를 활성화시키고 혈관투과성을 높여 이미 형성된 IgG, 보체의 염증세포로의 유입을 용이하게 한다⁵⁾. Lipopolysaccharaide (LPS)는 다당류, 인지질, 소량의 단백질로 구성되어 있으며⁶⁾, 염증반응을 일으키는 인자로, 세포를 활성화시키고, 여러 사이토카인이 분비되도록 한다^{7,8)}.

* Correspondence: Dong-Yeul Kwon, Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, 570-749, South Korea. Tel: +82-63-850-6802; E-mail: sssimi@wonkwang.ac.kr

작약탕은 금원사대가의 한 사람인 류완소(劉完素)의 저서 소문병기의보명집(素問病氣宜保命集)에 나오는 처방으로, 기혈을 조화시키고(調和氣血), 청열해독(淸熱解毒) 하는 작용이 있어, 예로부터 습열이질(濕熱痢疾), 복통변농혈(腹痛便膿血), 이급후중(裏急後重), 항문작열(肛門灼熱), 소변단적(小便短赤) 등의 병증을 치료하는데 널리 사용되었다. 현대에 와서는 작약탕이 세균성이질과 아메바성이질, 과민성결장염, 궤양성 대장염, 급성장염등의 치료에 사용되고 있다.

이에 저자는 작약탕의 추출물이 자극원으로 유도한 세포내의 염증반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 *in vitro*에서 염증성 매개물질 즉 IL-8, TNF- α 의 생성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

Bovine serum albumin(BSA), LPS, PMA, 칼슘 이온 운반자 A23187은 Sigma(St, Louis, Mo)에서 구입하였다. Anti-human TNF- α , IL-8 항체, biotinylated Anti-human TNF- α , IL-8 항체, 그리고 재조합된 인간(rh) Anti-human TNF- α , IL-8 는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

약재

작약탕에 들어가는 약재 작약, 당귀, 황금, 황련, 대황, 감초, 관계, 빈랑, 목향은 대한한약국(익산, 한국)에서 구입하였다. 작약탕 추출물은 증류수 (100g/L)로 2시간 동안 달여서 준비되었다. 그 추출물은 0.45 μ m 필터로 걸러졌고, 감압하에 동결 건조(lyophilized)하였으며, 4°C에서 보관되었다. 동결건조된 추출물은 실험하기 위하여 인산완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS)에 용해되었다.

Table. 1. 작약탕 약재 구성표

약재명	학명 (scientific name)	용량 (g)
작약(芍藥)	<i>Paeonia lactiflora</i>	15g
당귀(當歸)	<i>Angelica gigas Nakai</i>	9g
황금(黃芩)	<i>Scutellaria baicalensis</i>	9g
황련(黃蓮)	<i>Coptis chinensis</i>	5g
대황(大黃)	<i>Rheum palmatum L.</i>	9g
감초(甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis Fischer</i>	5g
관계(官桂)	<i>Cinnamomum cassia Blume</i>	5g
빈랑(檳榔)	<i>Areca catechu</i>	5g
목향(木香)	<i>Inula helenium</i>	5g

세포 배양

인간 단핵세포 THP-1 cell은 한국 세포주은행(Korean Cell Line Bank)에서 분양 받았으며, 10%의 열 불활성화된 우태혈청 (FBS), 2 mM 글루타민, 100 IU/mL 페니실린, 50 μ g/mL streptomycin과 1.2 mM α -티오글리세롤이 추가된 RPMI-1640에서 공기 중 이산화탄소 5% 이하 37°C 상태에서 배양되었다. 인간 대식세포 HMC-1 cell(Dr. Y, Kitamura; Osaka University Medical School, Osaka, Japan)에서 제공해주신)은 10%의 열 불활성화된 우태혈청 (FBS), 2 mM 글루타민, 100 IU/mL 페니실린, 50 μ g/mL streptomycin과 1.2 mM α -티오글리세롤이 추가된 Iscove's modified Dulbecco's medium(IMDM)에서 공기 중 이산화탄소 5% 이하 37°C 상태에서 배양되었다.

효소 면역 측정법(enzyme-linked immunosorbent assay. ELISA)

THP-1 세포는 24 well tissue culture plates 안에 well당 1×10^6 개의 세포들을 배양해 LPS (2 μ g/ml)로 자극하기 전에 30분간 두 가지 농도(10, 1000 μ g/ml)

의 작약탕 추출물로 전 처리되었다. HMC-1 세포는 24 well tissue culture plates 안에 well당 1×10^6 개의 세포들을 배양해 A23187($1 \mu\text{M}$)이 첨가된 PMA(50 nM)로 자극하기 전에 30분간 두 가지 농도($10, 1000 \mu\text{g/mL}$)의 작약탕 추출물로 전 처리되었다. ELISA plate(Falcon, Becton Dickinson Labware, USA)는 coating buffer(0.1 M carbonate, $\text{pH } 9.5$)에서 희석되어진 인간에 대한 IL-8, TNF- α 항체로 4°C 에서 밤새도록 덧입혀졌다. 다음에 0.05% tween 20(PBS-T)을 함유한 PBS로 4번을 세척했다. 단백질이 결합할 수 있는 장소는 적어도 1시간 동안 assay diluent(FBS10% 농도의 PBS $\text{pH } 7.0$)로 차단되어졌고 각 샘플의 $100 \mu\text{L}$ 혹은 assay diluent로 표준 희석되어진 IL-8, TNF- α 는 well에 적용되어졌다. 2시간 동안 배양한 후에, $100 \mu\text{L}$ 의 발효 작용 검출기(바이오티닐레이트된 인간에 대한 IL-8, TNF- α 모노클로날 항체와 avidin-HRP가 첨가되어 1시간 동안 배양되어졌다. 그 후, $100 \mu\text{L}$ 의 기질용해제 (tetramethylbenzidine (TMB))가 각 well에 첨가되어졌고 $50 \mu\text{L}$ 의 stop solution($2 \text{ N H}_2\text{SO}_4$)에 의해 그 반응이 멈춰지기 전 30분간 암실에서 배양되어졌고, 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 모든 이후의 절차들은 실온에서 이루어졌고, 모든 표준 규격품 및 샘플들은 세 번씩 측정되어졌다.

결 과

작약탕 추출물이 THP-1 세포에서 IL-8 발현에 대한 영향

전염증성 인자들에 대한 영향을 조사하기 위하여 THP-1 세포들 안에서 LPS로 유도된 IL-8의 생성에 관해 작약탕 추출물의 억제효과를 실험하였다. 상청액은 ELISA 방법에 의해 측정되어졌다. 작약탕이 LPS로 유도된 IL-8의 생성을 농도의존적으로 억제한다는 것을 보여준다. 작약탕 추출물은 고농도($1000 \mu\text{g/mL}$)에서 IL-8 생성을 84% 억제하고 저농도($10 \mu\text{g/mL}$)에서 IL-8 생성을 36% 억제하는 것을 보여주었다.

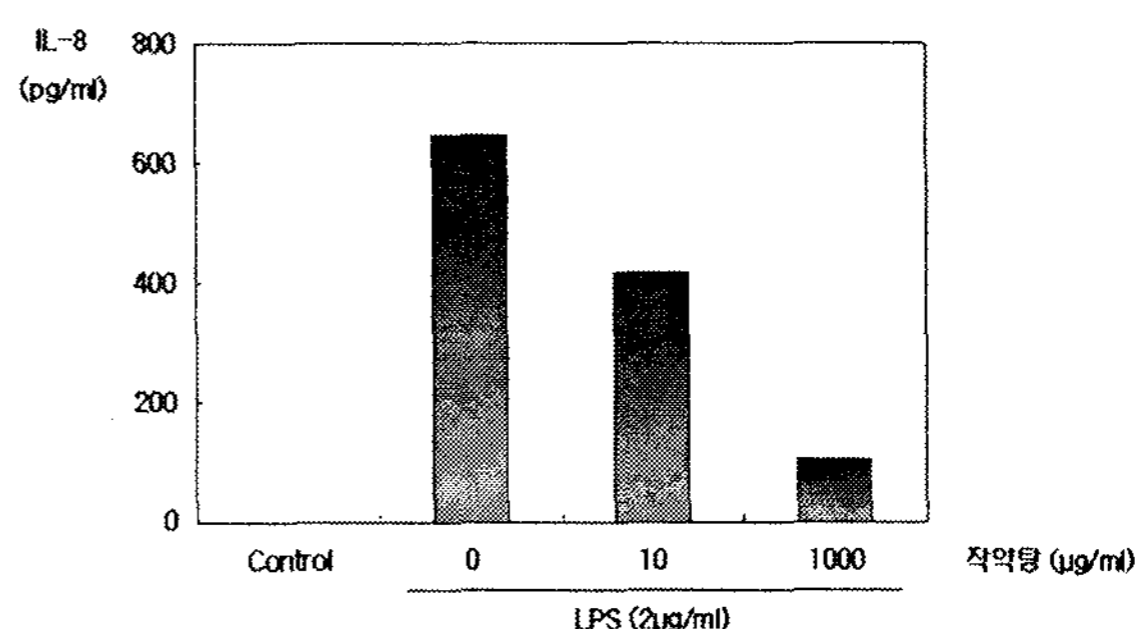


Fig. 1. THP-1 세포에서 LPS로 유도된 IL-8 생성에 대한 작약탕 추출물의 효과

세포들은 LPS($2 \mu\text{g/mL}$)로 자극되어지기 전에 두 가지 농도 ($10, 1000 \mu\text{g/mL}$)의 작약탕 추출물로 전처리되었다. IL-8 생성은 ELISA로 측정되어졌다. 결과들은 $\text{mean} \pm \text{S.E}$ 이다.

작약탕 추출물이 HMC-1 세포에서 IL-8 발현에 대한 영향

전염증성 인자들에 대한 영향을 조사하기 위하여 HMC-1 세포들 안에서 A23187과 PMA로 유도된 IL-8의 생성에 관해 작약탕 추출물의 억제효과를 실험하였다. 상청액은 ELISA 방법에 의해 측정되어졌다. 작약탕이 A23187과 PMA로 유도된 IL-8의 생성을 농도의존적으로 억제한다는 것을 보여준다. 작약탕 추출물은 고농도($1000 \mu\text{g/mL}$)에서 IL-8 생성을 52% 억제하고 저농도($10 \mu\text{g/mL}$)에서 IL-8 생성을 20% 억제하는 것을 보여주었다.

세포들은 A23187($1 \mu\text{M}$)과 PMA(50 nM)로 자극되

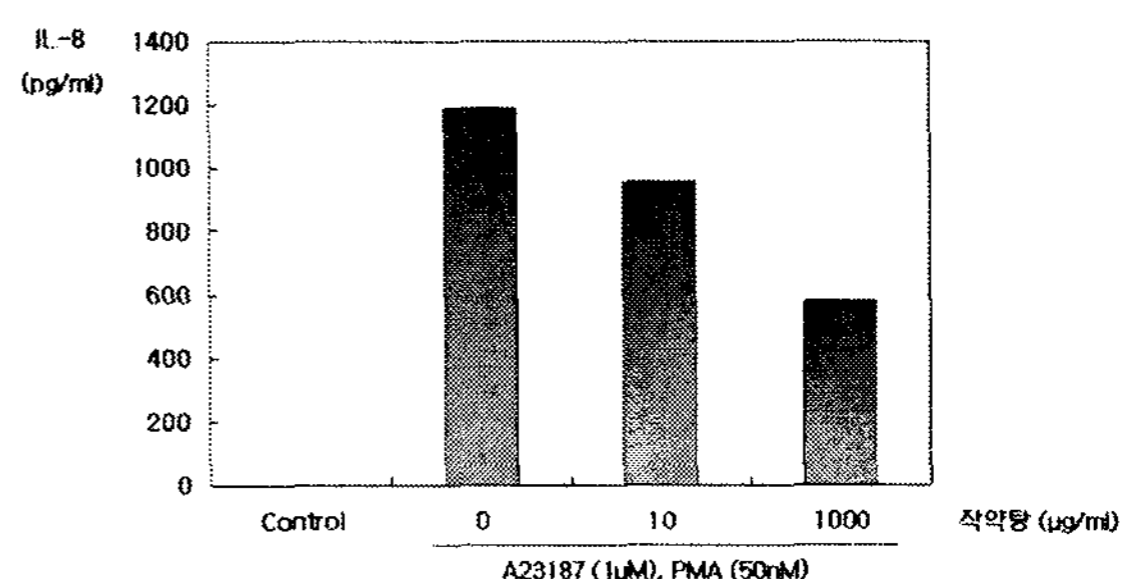


Fig. 2. HMC-1 세포에서 A23187과 PMA로 유도된 IL-8 생성에 대한 작약탕 추출물의 효과

어지기 전에 두 가지 농도 (10, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 작약탕 추출물로 전처리 되었다. IL-8 생성은 ELISA로 측정되어졌다. 결과들은 $\text{mean}\pm\text{S.E}$ 이다.

작약탕 추출물이 HMC-1 세포에서 TNF- α 발현에 대한 영향

전염증성 인자들에 대한 영향을 조사하기 위하여 HMC-1 세포들 안에서 A23187과 PMA로 유도된 TNF- α 의 생성에 관해 작약탕 추출물의 억제효과를 실험하였다. 상청액은 ELISA 방법에 의해 측정되어졌다. 작약탕이 A23187과 PMA로 유도된 TNF- α 의 생성을 농도의존적으로 억제한다는 것을 보여준다. 작약탕 추출물은 고농도(1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 TNF- α 생성을 74% 억제하고 저농도(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 TNF- α 생성을 12% 억제하는 것을 보여주었다.

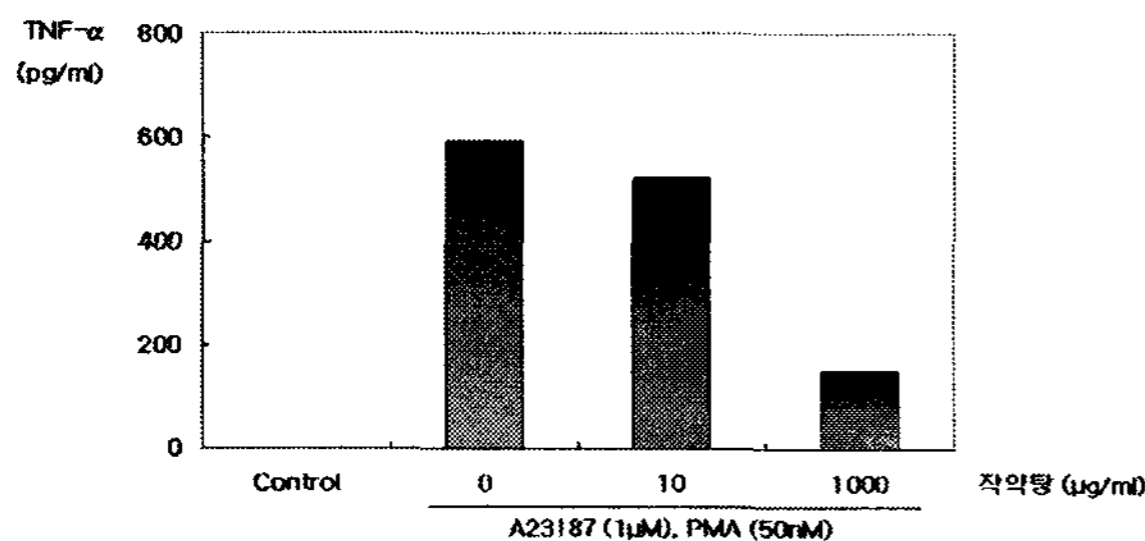


Fig. 3. HMC-1 세포에서 A23187과 PMA로 유도된 TNF- α 생성에 대한 작약탕 추출물의 효과

세포들은 A23187(1 μM)과 PMA(50nM)로 자극되어지기 전에 두 가지 농도 (10, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 작약탕 추출물로 전처리 되었다. TNF- α 생성은 ELISA로 측정되어졌다. 결과들은 $\text{mean}\pm\text{S.E}$ 이다.

고 찰

염증반응은 면역세포의 활성화에 의해서 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균이나 바이러스 등의 미생물 및 생체내의 이물질 등을 인식하면, 면역

세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응의 원인이 되는 많은 인자를 분비하여 염증반응을 유발시킨다⁹⁾.

여러 가지 자극원중 LPS는 그람 음성균의 세포벽에 있는 지질다당류의 성분을 가진 물질로 세포내에서 전염증성 인자들을 효과적으로 유도할 수 있는 물질이다¹⁰⁾. 이들 전염증성 분자들은 면역세포를 활성화 시켜서 세균이나 이물질의 침입을 효과적으로 방어하도록 도와준다^{11,12)}. 그러나 LPS등의 자극원에 의해서 발현된 전염증성 인자들은 정상적인 세포의 기능을 파괴 하고, multiple-organ dysfunction syndromes 이나 lethal septic shock을 유발할 수 있다^{13,14,15,16)}. 그러므로 LPS 등의 자극원에 의해서 생긴 세포의 면역작용을 억제할 수 있는 약물의 발견은 치료에 매우 유용한 일이다.

작약탕은 전통적으로 청열해독(淸熱解毒)하는 작용이 있어, 예로부터 습열이질 (濕熱痢疾), 복통변농혈 (腹痛便膿血)등의 병증을 치료하는데 사용 되었고 현대에 와서는 세균성이질과 과민성 결장염, 급성장염등의 치료에 사용되고 있으므로 염증의 개선에 효과가 있을 것으로 생각되어 진다. 따라서 본 연구에서는 작약탕 추출물이 LPS로 유도된 THP-1 세포에서의 IL-8 발현과 A23187과 PMA로 유도된 HMC-1 세포에서의 IL-8과 TNF- α 발현을 억제하는 양상을 실험하였다. 작약탕 추출물로 전처리 후 LPS로 자극된 THP-1 세포에서는 IL-8의 발현이 현저하게 줄어들었으며, 용량 의존적으로 억제되는 양상을 보였다. 또한, 작약탕 추출물로 전처리 후 A23187과 PMA로 자극한 HMC-1 세포에서는 IL-8과 TNF- α 의 발현이 용량 의존적으로 현저하게 억제되는 양상을 보였다.

결론적으로, 작약탕 추출물은 세포내의 전염증성 인자들을 현저하게 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 작약탕이 항염증의 효과를 가진다는 것을 현대 과학적으로 증명하는 것이다. 또한, 나아가서는 류마티스성 관절염 및 만성 염증질환의 치료에도 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Kim JA, Kim DK, Kang OH, Choi YA, Park HJ, Choi SC, Kim TH, Yun KJ, Nah YH, Lee YM. Inhibitory effect of luteolin on TNF- α -induced IL-8 production in human colon epithelial cells. *Int Immunopharmacol*. 2005 Jan;5(1):209-17.
2. Mahida YR, Ceska M, Effenberger F, Kurlak L, Lindley I, Hawkey CJ. Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis. *Clin Sci (Lond)*. 1992 Mar;82(3):273-5.
3. Izzo RS, Witkon K, Chen AI, Hadjiyane C, Weinstein MI, Pellicchia C. Neutrophil-activating peptide (interleukin-8) in colonic mucosa from patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 1993 Apr;28(4):296-300.
4. Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, Saiki T, Ikeda H, Tsuruta O, Tanikawa K. IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol*. 1994 Jun;96(3):432-6.
5. Janeway, Charles A. *Immunobiology*. 5th ed., London, Churchill-Livingstone, 2001;3-80.
6. Morrison DC, Cuncan Jr. JL, Goodman SA. In vitro biological activities of endotoxin, In *Bacterial Endotoxin*. Alan R. Liss Inc. 1985;189;81-98.
7. Lindemann RA, Economou JS. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* activate human peripheral monocytes to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J Periodontol*. 1988 Nov;59(11):728-30.
8. Lindemann RA, Economou JS, Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J Dent Res*. 1988 Aug;67(8):1131-5.
9. Park SJ, Song HJ. Anti-inflammatory effect of extract of *Pulsatilla koreana* NAKAI in LPS-stimulated Murine peritoneal macrophage. *Kor. J. Herbology* 2007;22(1):111-117
10. Remick DG, Strieter RM, Eskandari MK, Nguyen DT, Genord MA, Raiford CL, Kunkel SL. Role of tumor necrosis factor- α in lipopolysaccharide-induced pathologic alterations. *Am J Pathol*. 1990 Jan;136(1):49-60.
11. Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B regulate *Helicobacter pylori*-mediated interleukin-8 release from macrophages. *Biochem J*. 2002 Nov 15;368(Pt 1):121-9.
12. Binétruy B, Smeal T, Karin M. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature*. 1991 May 9;351(6322):122-7.
13. Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Aug;283(2):G256-65.
14. Dos Santos CC, Slutsky AS. Invited review: mechanism of ventilator-induced lung injury: a perspective. *Journal of applied physiology*. 1985; 89:1645-1655.
15. Marshall JC. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7 Suppl): S99-106.
16. Shen FM, Guan YF, Xie HH, Su DF. Arterial baroreflex function determines the survival time in lipopolysaccharide-induced shock in rats. *Shock*. 2004 Jun;21(6):556-60.