

건칠이 비만세포 매개 염증반응에 미치는 영향

김석산·김경준

경원대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

The Effects of *Lacca Sinica Exsiccata* (LSE) on the Mast Cell-mediated Inflammatory Responses

Sok-San Kim · Kyung-Jun Kim

Objective : *Lacca Sinica Exsiccata* (LSE) extracted from *Rhus verniciflua Stokes* (RVS) has been used traditionally as a remedy for inflammation in Korea, China, and Japan. However, as yet there is no clear explanation of how LSE affects the production of inflammatory cytokines. This study was to determine the effects of LSE on the mast cell-mediated inflammatory responses.

Method : We measured the amount of inflammatory cytokine production induced by the phorbol myristate acetate (PMA) plus calcium ionophore(A23187) in the human mast cell line (HMC-1) incubated with various concentrations of *Lacca Sinica Exsiccata* (LSE). The TNF- α , IL-6 and IL-8 secreted protein levels were measured by the ELISA assay. The TNF- α , IL-6 and IL-8 mRNA levels were measured by the RT-PCR analysis.

Nuclear and cytoplasmic proteins were examined by Western blot analysis. The NF- κ B promoter activity was examined by a luciferase assay.

Result : LSE inhibited the PMA + A23187-induced TNF- α , IL-6, and IL-8 expression and suppressed NF- κ B activation in the stimulated-HMC-1. In addition, LSE inhibited induction of NF- κ B promoter-mediated luciferase activity.

Conclusion : In this study, we have found that LSE is an inhibitor of NF- κ B and cytokines on the mast cell-mediated inflammatory responses.

Key words : *Lacca Sinica Exsiccata* (LSE)

서론

교신저자 : 김경준, 서울시 송파구 송파동 20-8
경원대학교 부속서울한방병원 안이비인후피부과
(Tel :02-425-3456, E-mail : kkjo215@hanmail.net)
• 접수 2009/02/16 • 수정 2009/03/28 • 채택 2009/04/03

乾漆 *Lacca Sinica Exsiccata*(LSE)은 옻나무 *Rhus verniciflua Stokes*(RVS)의 수지를 건조한 약재로, 癩

혈을 제거하고 凝結을 푸는 효능이 있어서¹⁾ 주로 어혈로 인한 복부의 積聚를 치료하는데 사용한다. 일반적으로 어혈로 인한 적취는 염증반응을 수반하는 경우가 많다. 그런데, 건칠의 기원식물인 옷나무는 알레르기성 접촉피부염을 유발하기도 한다. 접촉피부염을 일으키는 항원은 옷나무에 있는 urushiol로서, 직접 피부에 접촉하여 알레르기성 접촉피부염을 유발하기도 하지만, 경구복용에 의해서 전신에 걸쳐 소양감과 피부발진을 동반하는 전신성 접촉피부염을 일으키기도 한다²⁾. 이러한 양면적 특징에 주목하여, 건칠이 알레르기성 염증에도 효과가 있을 것으로 기대되어 이를 분자생물학적으로 확인해 보고자 하였다.

건칠 및 옷나무 추출물에 대한 연구는, 항암효과^{3,4)}, 위암에 미치는 영향^{5,6)}, 당뇨에 미치는 영향⁷⁾, 혈관신생관련 단백질발현에 미치는 영향⁸⁾, 그리고 인간기관지상피세포 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향⁹⁾ 등이 있다.

면역체계의 이상으로 발생하는 알레르기성 천식, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 부비동염 등의 질병은 외부 이물질 등이 항원으로 작용하여 발생한다. 항원(allergen)이 될 수 있는 물질에 여러 번 접하거나 유전성 소인(inherited predisposition)을 가진 사람은 IgE(immunoglobulin E)라 불리는 특이성 type의 항체를 만들기 시작한다. 생성된 IgE항체는 비만세포(mast cells)와 결합하게 되는데, 이 비만세포는 세포표면에 그 항체를 받아들이는 Fc ϵ RI 수용체를 가지고 있다^{10,11)}. 그 결과 비만세포가 염증매개 물질을 분비하게 되고, 이런 화학적 물질들이 알레르기 증상을 유발한다.

비만세포는 항원, anti-IgE, lectin 등과 같은 면역자극제이나, calcium ionophore A23187, compound 48/80 및 anaphylatoxins(C3a, C5a) 등과 같은 약리학적 복합물 등에 의하여 활성화된다. 이렇게 활성이 유도된 비만세포 내로 칼슘이 유입되면, 세포내 Ca⁺⁺이 증가하여, 비만세포는 이

미 만들어진 히스타민, 세로토닌, 가수분해 효소, 헤파린, 프로스타글란딘(prostaglandin) TNF- α , IL-6, IL-8 등등의 염증매개물질들을 세포 밖으로 분비하게 된다¹²⁾.

본 연구에서는 건칠추출물로 처리한 비만세포를 PMA와 A23187로 활성화하여, TNF- α , IL-6, IL-8 등의 염증매개물질의 생성에 건칠이 어떠한 영향을 미치는지 알아보았으며, 또한 NF- κ B 활성을 막음으로써 염증성 매개물질의 억제 효과를 기대할 수 있는지 알아보았다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 乾漆 추출물은 음니허브(Korea)에서 구입한 乾漆 100g을 정량한 후 80% 에탄올을 가하여 30분 동안 2회에 걸쳐 초음파진동을 이용하여 추출액을 획득한 것이다. 지름 185mm 종이 여과지(Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압 여과하였다. 그 후 감압 농축기(Eyela, Japan)를 사용하여 농축한 다음, 동결 건조기(Freezedryer, Matsushita, Japan)로 동결 건조하여 분말을 얻어 DMSO에 녹여 사용하였다.

2) 시약

세포배양액인 Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM)은 GIBCO BRL(Grand Island, NY, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)와 A23187은 Sigma aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, MTS는 promega(Madison, WI, USA)에서 구입하였고 histamine assay kit는 Oxford Biomedical Research(Oxford, MI, USA)에서 구입하였다. Biotinylated anti-human TNF- α 항체,

Anti-human TNF- α 항체, 그리고 재조합 human TNF- α 는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. Anti-human IL-6/IL-8 항체, biotinylated anti-human IL-6/IL-8 항체, 재조합 human IL-6/IL-8 단백질은 BD biosciences (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Western blot 분석에 사용된 NF- κ B, p-I κ B, lamine B 항체는 Santacruz Biotechnology(CA, USA)에서 구입하였으며, α -tubulin 항체는 Sigma aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 luciferase assay를 위해 사용된 luciferase assay system은 promega(Madison, WI, USA)에서 구입하였다.

3) 세포주

① HMC-1(Human Mast Cells)

사람 비만세포인 HMC-1 cell은 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM)에 100U/ml Penicillin과 100 μ g/ml Streptomycin (P-S)을 첨가한 배지에서 2-3일 마다 배양액을 교환해 주었으며, 배양 환경은 37 $^{\circ}$ C 포화 습도로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. HMC-1 세포는 24 well 배양용기에서 배양한 후 각 농도의 乾漆抽出物에 1시간 전 처리한 후 PMA와 A23187을 처리하여 세포를 얻어 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) MTS assay

HMC-1 세포에 乾漆(LSE) 추출물을 농도별로 처리했을 때의 생존율을 MTS (Promega, Madison, USA) assay로 조사하였다. 세포를 24-well culture plate에 각각 1 \times 10⁶ 개가 되도록 심어준 후 乾漆 추출물의 농도를 0.01mg/ml, 0.02mg/ml, 0.04mg/ml로 달리하여 1시간 전 처리하였다. 이를

다시 25 nM PMA와 1 μ M A23187로 24 시간 처리한 후 MTS를 최종농도 0.25mg/ml로 넣어 2시간 반응하게 하였다. 490 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였고, 乾漆 추출물의 세포증식효과에 대한 영향을 조사하였다.

2) Histamine 측정

먼저 乾漆抽出物의 농도를 0.01mg/ml, 0.02mg/ml, 0.04mg/ml, 0.08mg/ml로 다르게 하여 각각 다른 농도의 乾漆抽出物에 HMC-1세포 1 \times 10⁶ cell/ml를 1시간 동안 처리하였다. 乾漆抽出物로 처리한 비만세포를 활성화하기 위하여, 히스타민 분비 실험에서는 PMA와 A23187로 6시간 동안 처리하였고, 세포증식실험에서는 24시간 처리하였다. 그 다음 배양된 배지를 얻어 enzyme immuno assay kit (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, USA)를 사용하여 히스타민을 측정 하였다.

3) ELISA(TNF- α , IL-6, IL-8 측정)

ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)방법으로, 배양된 HMC-1세포의 배지 내에서 TNF- α , IL-6, 그리고 IL-8을 측정하였다. Anti-human TNF- α , IL-6, IL-8 capture 단클론 항체를 96 well plate에 각각 2 μ g/ml로 코팅하고 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 반응시켰다. 코팅 후 비특이성 반응을 막기 위해서 10% fetal bovine serum(FBS)을 함유한 phosphate-buffered saline(PBS)으로 구성된 blocking solution을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 0.05% tween 20을 함유한 PBS인 washing buffer로 4회씩 세척한 후 표준이 되는 재조합 단백질 TNF- α , IL-6, IL-8을 적절한 농도로 계대 희석하여 준비하고, 각 한약재의 배양상등액을 희석하여 각 well에 100 μ l씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 washing buffer로 4회씩 세척한 후 biotinylated anti-human TNF- α , IL-6, IL-8을 blocking solution을 이용하여

300ng/ml의 농도로 희석한 후, 각 well에 100 μ l씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이어서 washing buffer로 4회 세척한 후 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate enzyme을 2.5 μ g/ml 농도로 각 well에 처리한 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응하게 한 후 4회 세척하였다. 기질액을 각 well에 50 μ g씩 가하여 20분간 발색을 유도한 다음, 2N 황산을 이용하여 반응을 멈추게 한 후 ELISA reader를 이용하여 450nm에서 TNF- α , IL-6, IL-8의 단백질 양을 측정하였다.

4) Reverse transcription-PCR

얻어진 세포를 PBS로 세척한 후 4 $^{\circ}$ C에서 원심 분리하여 모으고 Easy Blue (Intron, Korea) 1 ml 을 가하고 상온에서 5분간 반응시킨 다음, 0.2 ml 의 클로로포름을 첨가하여 15초간 완전히 섞은 뒤, 4 $^{\circ}$ C 12,000 xg에서 10분간 원심분리하였다. 원심 분리한 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 0.4 ml의 binding buffer를 섞었다. 상온에서 1분간 반응시키고 column에 옮긴 후, 12,000 xg에서 1 분간 원심분리하였다. RNA 침전물을 75% 에탄올로 세척하고, 상온에서 건조시킨 다음 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리한 증류수에 녹였다. 정제된 RNA 를 GeneQuant Pro (Amersham Biosciences)로 정량하고, ethidium bromide를 넣은 한천 겔에 전기영동하여 RNA의 integrity와 정확한 quantification 을 재확인하였다.

분리된 총 RNA 2 μ g에, random hexamer 2.5 μ g(Amersham Biosciences, USA)과 DEPC를 처리한 물을 가하고 65 $^{\circ}$ C에서 10 분간 반응시킨 뒤 얼음에서 2 분간 식혔다. 5x first strand buffer와 0.1M DTT, 10mM dNTP, 200unit M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, USA) 그리고 DEPC로 처리한 증류수를 가하여 총 30 μ l가 되게 하고 42 $^{\circ}$ C에서 1 시간동안 반응시켰다. 다시 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 뒤 cDNA를 만들었다.

Polymerase chain reaction(PCR)은 2.5 μ l cDNA 주형, TNF-alpha (5' TGA GCA CTG AAA GCA TGA TCC 3' 5'ATC ACT CCA AAG TGC AGC AG 3'), IL-6 (5' AAC CTT TCC AAA GAT GGC TGA A 3' 5'CAG GAA CTG GAT CAG GAC TTT 3'), IL-8 (5' TCA GTG CAT AAA GAC ATA CTC C 3' 5'TGG CAT CTT CAC TGA TTC TTG 3'), 그리고 GAPDH(5' CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA 3' 5' CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT 3')와 같은 특이적인 primer 25 μ M, 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂ 그리고 2.5 unit Taq. DNA polymerase (TaKaRa Korea, Seoul, Korea)를 혼합하여 시행하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분으로 하였다. 반응액 중 cycle 별로 각각 5 μ l를 취해서 2.0% 한천 겔에 전기영동하고 ethidium bromide 로 염색하여 PCR 산물을 확인하였다.

5) 핵 및 세포질 단백질 분리

얻어진 세포를 차가운 PBS로 세척한 후, 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5mM DTT, 그리고 0.2mM PMSF로 조성된 버퍼 100 μ l와 섞었다. 이어서 얼음에서 5분간 반응시킨 후 5,000 rpm에서 4분간 원심분리하여 pellet만을 얻었다. 다시 10mM HEPES, pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1% NP-40, 0.5 mM DTT, 그리고 0.2 mM PMSF가 포함된 버퍼 60 μ l를 넣고 15분간 반응시킨 후, 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 그리고 남겨진 pellet에 20mM HEPES, pH 7.9, 420mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 25% glycerol, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 그리고 0.2mM PMSF가 포함된 버퍼 40 μ l를 넣고 30분간 반응시킨 후 5,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 분리하여 얻은 세포질과 핵단백질은

Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) 방법을 이용하여 정량하여 사용하였다.

6) Western blot 분석

배양된 세포를 차가운 PBS로 두 번 세척한 후, 40mM Tris-HCl, pH7.4, 10mM EDTA, 120mM NaCl, 1mM dithiothreitol, 0.1% nonidet P-40, 1mM PMSF, 1mM NaF, 1mM Na₃VO₄ and P1 cocktail이 포함된 lysis buffer를 사용하여 vortexing하여 섞어 준 후 ice에서 30 분간 반응시켰다. 그리고 난 후 4℃, 13,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하여 총 단백질을 얻었다. 얻은 총 단백질을 Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) 방법을 이용하여 정량한 다음 40 μ g의 단백질을 15% acrylamide gel에 전기영동하였다. 이것을 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Germany)에 transfer하여 PBST에 1% skim milk와 1% BSA가 든 blocking 용액에서 1 시간 동안 blocking한 후 PBST로 5 분간 2회 세척하였다. Anti- α -tubulin (Sigma Aldrich, Louis, MO), anti-NF- κ B, anti-p-I κ B, anti-lamine B antibodies(Santa Cruz, California)를 이용하여 4℃에서 16 시간동안 1차 항체반응을 하게 한 다음, 상온에서 1 시간 동안 PBST로 2차 항체반응을 시켰다. PBST로 10분, 15분, 30분 간 세척한 후 ECL(Amersham Biosciences, UK)로 발광하여 X-ray film에 노출시켜 단백질 발현 분석을 실시하였다.

7) Luciferase assay

세포에 유전자 도입을 위해 transfection을 수행하였다. 우선 HMC-1세포를 1 \times 10⁶으로 12 well에 접종한 후 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 pNF- κ B luciferase(LUC)(Stratagene, La Jolla, CA, USA)

를 혈청이 없는 배지 상태에서 일시적으로 transfection하였다. 6시간 후 혈청이 있는 배지로 갈아주고, 24시간 동안 배양하였다. 그 후 약제를 1시간 전 처리한 후 25nM PMA와 1 μ M A23187을 24시간 동안 반응하게 하였다. 세포를 차가운 PBS로 세척 한 후 lysis buffer (Luciferase Reporter Assay System; Promega)를 이용하여 세포를 용해시켰다. Vortexing하여 세포를 섞은 다음, 4℃에서 12,000rpm으로 3분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻은 상층액은 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다. Luciferase assay를 위해, 상온에서 세포가 용해된 상층액 100 μ l와 Luciferase substrate 20 μ l를 96 well plate에 넣어 luminometer (1420 luminescence counter, Perkin Elmer)로 측정하였다. Luciferase activity는 측정값을 총 단백질량으로 나누어 수치를 구한 뒤 (relative light units per milligram of protein), transfection된 정상세포를 기준으로 fold 값을 구하였다.

8) 통계분석

본 실험에서 결과는 측정값의 평균 \pm 표준편차 값을 기준으로 통계분석하였다. 실험 결과의 통계적 분석을 위해 independent *t*-tests 을 사용하여 각 실험군 간의 유의성을 분석하였고, 그 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. HMC-1세포에서 건칠(LSE)추출물이 Histamine 분비 및 세포증식에 미치는 영향

건칠추출물이 비만세포(HMC-1)의 histamine분비 및 세포증식에 미치는 효과에 대한 실험에서, 건칠추출물을 농도 별로 처리하였을 때 히스타민의 분비에는 별다른 영향을 주지 않았다(Figure

1A). 또한 세포증식 결과에서도, 건칠추출물 각각의 농도에서 정상세포와 별다른 차이가 없었다.(Figure 1B).

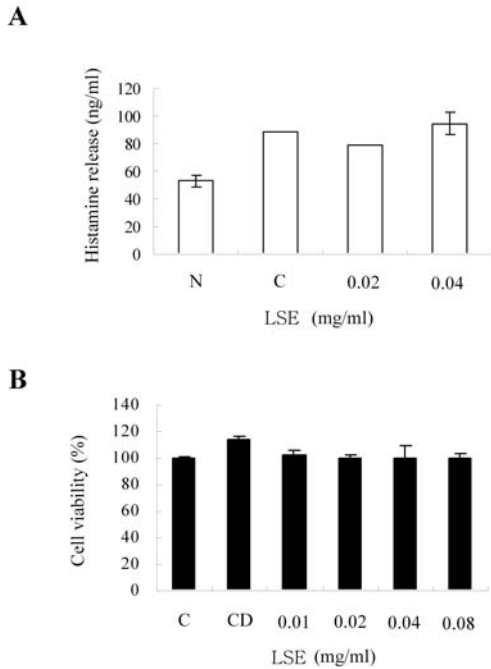


Fig. 1. Effect of *Lacca Sinica Exsiccata* (LSE) on cell viability and histamine release of activated mast cells. The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) were treated with indicated concentration (0.01 mg/ml to 0.08 mg/ml) of LSE for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 6 h (A) or 24 h (B). The percentage from each treatment were relative to the control (PMA plus A23187, 100%) (B).

2. HMC-1세포에서 건칠추출물이 TNF- α 의 발현에 미치는 영향

건칠추출물로 전 처리한 HMC-1을 PMA와 A23187로 활성화를 유도하여, 건칠이 TNF- α 발현량에 미치는 효과를 알아보기 위해서 ELISA 및

RT-PCR 방법을 이용하였다. 건칠추출물을 0.01, 0.02, 0.04 mg/ml의 농도로 HMC-1세포에 1시간 전 처리한 후 PMA(25 ng/ml)와 A23187($1 \mu\text{M}$)로 4시간 동안 처리하여 결과를 얻었다. 실험 결과 건칠추출물로 처리한 실험군에서 TNF- α 의 생성율이 현저히 감소되어 있었다. 특히 건칠추출물 0.04 mg/ml의 농도에서 TNF- α 생성율이 0.376 ± 0.032 ng/ml을 나타내었고, PMA(25ng/ml)와 A23187($1 \mu\text{M}$)로만 유도된 TNF- α 의 생성을 1.562 ± 0.056 ng/ml에 비하면 현저히 낮은 생성율을 보였다(Figure 2A). mRNA의 발현도 마찬가지로 PMA(25ng/ml)와 A23187($1 \mu\text{M}$)로만 유도된 TNF- α 의 발현량 보다 높은 억제효과를 보여주었다(Figure 2B, 2C).

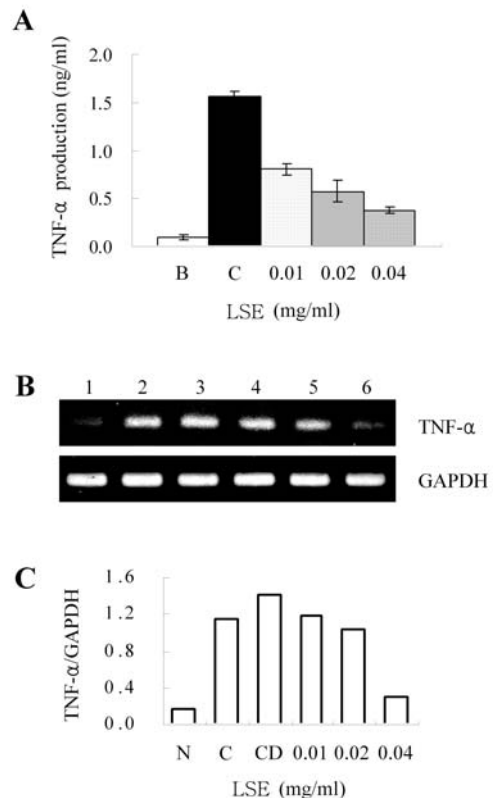


Fig. 2. Effect of LSE on PMA plus A23187-

stimulated TNF- α expression levels. The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) incubated with various concentrations (0.01 mg/ml to 0.04 mg/ml) of LSE for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h (A, B). The TNF- α secreted protein levels in the supernatant were measured by the ELISA assay. B, Normal cells; C, control cells (A). The IL-6 mRNA levels were measured by the RT-PCR analysis (B). The TNF- α mRNA levels were measured by densitometry. 1, Normal cells; 2, control cells; 3, DMSO control cells; 4, LSE (0.01 mg/ml)+PMA plus A23187; 5, LSE (0.02 mg/ml)+PMA plus A23187; 6, LSE (0.04 mg/ml)+PMA plus A23187).

HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) incubated with various concentrations (0.01 mg/ml to 0.04 mg/ml) of LSE for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h (A, B). The IL-6 secreted protein levels in the supernatant were measured by the ELISA assay. B, Normal cells; C, control cells (A). The IL-6 mRNA levels were measured by the RT-PCR analysis (B). The IL-6 mRNA levels were measured by densitometry. 1, Normal cells; 2, control cells; 3, DMSO control cells; 4, LSE (0.01 mg/ml)+PMA plus A23187; 5, LSE (0.02 mg/ml)+PMA plus A23187; 6, LSE (0.04 mg/ml)+PMA plus A23187).

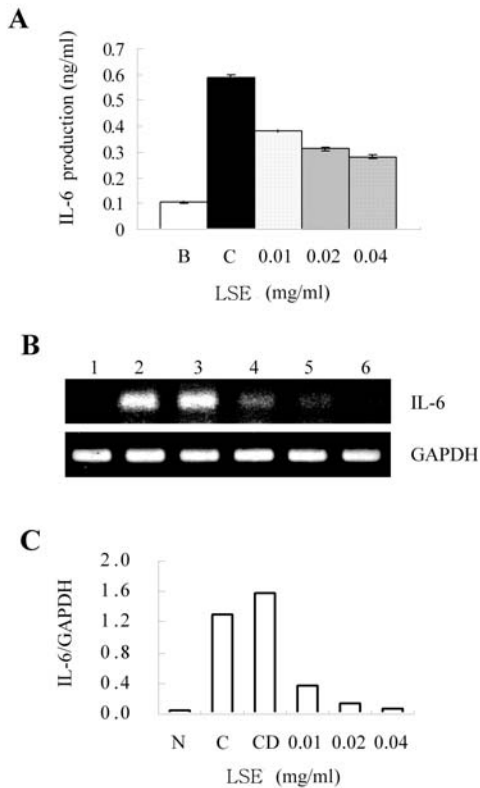


Fig. 3. Effect of LSE on PMA plus A23187-stimulated IL-6 expression levels. The

3. HMC-1세포에서 건칠추출물이 IL-6의 발현에 미치는 영향

비만세포인 HMC-1에서 건칠추출물이 IL-6의 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 ELISA 및 RT-PCR 방법을 이용하여 IL-6의 단백질 및 mRNA의 발현량을 확인하였다. 그 결과 건칠추출물 0.01, 0.02, 0.04 mg/ml 등 모든 농도에서, PMA plus A23187로 유도된 IL-6의 생성량이 50% 정도 감소하여 발현됨을 알 수 있었다(Figure 3A). IL-6의 mRNA 발현율에서도 0.01 mg/ml에서 0.04 mg/ml까지 모든 농도에서 억제현상이 나타났으며, 0.04 mg/ml에서 가장 억제효과가 컸다(Figure 3B, 3C).

4. HMC-1세포에서 건칠추출물이 IL-8의 발현에 미치는 영향

비만세포인 HMC-1에서 건칠추출물이, PMA와 A23187로 유도된 IL-8의 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 ELISA 및 RT-PCR 방법을 이용하였다. 그 결과 농도의존적으로 IL-8의 분비량이 감소되는 것을 알 수 있었다. 특히 PMA와 A23187

로만 처리한 세포의 IL-8 생성량 $31,979 \pm 1,171$ ng/ml과 비교하여 0.04 mg/ml의 건칠추출물로 처리한 후에 활성화시킨 세포의 IL-8의 생성량은 $19,219 \pm 0,198$ ng/ml로 약 40% 억제율을 보였다 (figure 4A). 다음으로는 IL-8의 mRNA 수준을 조사하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 결과 건칠추출물 0.02 mg/ml 농도에서는 약간 감소하였으며, 0.04 mg/ml의 농도에서는 IL-8의 mRNA 발현이 아무 처리도 하지 않은 정상세포 수준과 거의 비슷할 정도로 감소되었다.(Figure 4B, 4C).

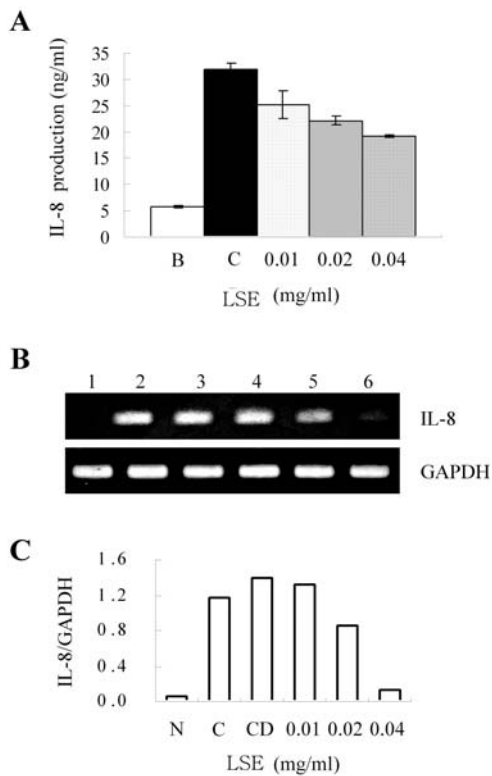


Fig. 4. Effect of LSE on PMA plus A23187-stimulated IL-8 expression levels. The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) incubated with various concentrations (0.01 mg/ml to 0.04 mg/ml) of LSE for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h (A, B). The IL-8 secreted protein levels in the supernatant

were measured by the ELISA assay. B, Normal cells; C, control cells (A). The IL-8 mRNA levels were measured by the RT-PCR analysis (B). The IL-8 mRNA levels were measured by densitometry. 1, Normal cells; 2, control cells; 3, DMSO control cells; 4, LSE (0.01 mg/ml)+PMA plus A23187; 5, LSE (0.02 mg/ml)+PMA plus A23187; 6, LSE (0.04 mg/ml)+PMA plus A23187).

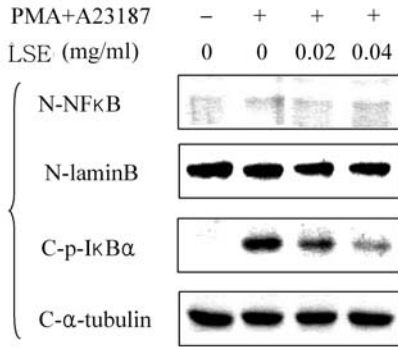
5. HMC-1세포에서 건칠추출물이 NF- κ B의 발현에 미치는 영향

TNF- α , IL-6등의 pro-inflammatory 사이토카인은 NF- κ B에 의해 그 발현이 조절된다. 그래서 본 실험에서는 NF- κ B 및 NF- κ B 억제자인 I κ B의 단백질 발현정도를 관찰하였다. 핵 안에 존재하는 NF- κ B는 PMA와 A23187로 유도하였을 때, loading control인 핵막의 구성성분 laminB와 비교하여 현저히 증가한 반면, 건칠추출물로 처리하였을 때 0.02 mg/ml과 0.04 mg/ml의 농도에서 NF- κ B 단백질이 뚜렷하게 감소되어 있음을 확인하였다. 더욱이 인산화된 I κ B(p-I κ B)의 발현 또한 乾漆 추출물 0.04 mg/ml의 농도에서 감소되어 나타났다(Figure 5A).

다음으로는 NF- κ B의 프로모터 활성에 대해 알아보기 위해 luciferase assay를 수행하였다. 그 결과 transfection만 된 세포에 비해, PMA와 A23187로 유도된 transfection세포에서는 NF- κ B의 프로모터 활성이 8배 이상 증가한 반면, 乾漆 추출물 0.02 mg/ml의 농도로 처리한 transfection된 세포에서는 현저히 감소되어 나타났다(Figure 5B).

고 찰

A



B

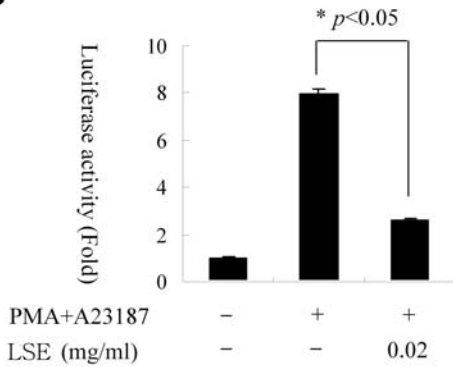


Fig. 5. Effect of LSE on PMA plus A23187-stimulated NF- κ B activation and I κ B α phosphorylation. The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) were incubated with LSE (0.02 mg/ml to 0.04 mg/ml) for 1 h and then stimulated with PMA plus A23187 for 2 h. Nuclear and cytoplasmic proteins were isolated by lysis buffer and examined for NF- κ B, pI κ B α , lamine B and α -tubulin protein by Western blot analysis. α -tubulin and lamin B are loading controls for cytosolic and nuclear extracts, respectively. N, nuclear extract; C, cytosol extract (A). The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) were treated with LSE (0.02 mg/ml) for 1 h and then stimulated with PMA plus A23187 for 24 h. The NF- κ B activity was examined by a luciferase assay (B). * $p < 0.05$; significantly different from the control value.

염증(inflammation)은 생체의 한 국소에 가해진 자극에 대한 혈관성 조직(vascular tissue)의 반응으로 정의한다. 염증 병소에서 나타나는 발적(redness) 종창(swelling) 발열(heat) 동통(pain) 그리고 염증부위의 기능상실(loss of function) 등이 염증의 5대 징후이다. 염증은 개체를 해로운 자극으로부터 보호하는 유익한 작용을 하지만, 과민반응과 같은 자가면역성 질환에서는 개체에 해로운 영향을 주기도 한다.

염증반응에는 여러 순환혈구와 비만세포를 포함한 결합조직세포 및 비세포성 구성성분들이 관여하게 된다. 순환혈구는 호중구 호산구 호염기구 단구 림프구 및 혈소판 등이 있으며, 결합조직세포들은 비만세포(Mast cell) 섬유모세포, 그리고 이따금 그 곳에 거주하는 대식세포와 림프구 등이 있다. 염증반응에 관여하는 세포의 성분으로는 기저막, 교원섬유, 탄력섬유 그리고 기타 단백질, 화학물질 등이 있다¹³⁾.

과민반응(hypersensitivity)은 외부물질에 대한 비정상적인 과대면역반응으로 인하여 숙주에게 세포나 조직의 손상 또는 염증 등의 질환을 일으키는 것을 말한다. 이들은 일반적으로 제I형(type I) 아나필락시형 과민반응, 제II형(type II) 세포독성 과민반응, 제III형(type III) 면역복합체 과민반응, 제IV형(type IV) 세포매개성 과민반응 등 4 가지형으로 나누고 있으며 일부에서는 II형을 둘로 나누어 5가지로 나누기도 한다¹⁴⁾.

과민반응 중 type I 은 즉시형 과민증(immediate hypersensitivity)으로 나타나고, type IV는 지연형 과민증(delayed hypersensitivity)으로 나타난다¹⁵⁾. IgE에 의한 비만세포의 활성화는 여러 가지 즉시형 과민증 반응에서 주요한 메카니즘을 보이며, 반면 다양한 T 세포 소집단에서는 지연형 과민증 반응에 주요한 효과를 나타낸다¹⁶⁾.

비만세포는 피부표면, 기도, 위장관의 점막, 림프관 주위, 혈관주위, 장막 등 외부의 자극물질과 접촉하는 부위에 분포하며, 혈액 중에 존재하는 호염기구와 함께 세포표면에 고친화성 Fcε 수용체(Fcε RI)를 4만~10만개 지니고 있으면서 IgE의 Fc부에 대한 강한 친화력을 가지고 있다. 이 Fcε RI는 α쇄, β쇄, 그리고 2분의 γ쇄(S-S결합)등이 있다. 반면, 저친화성 Fcε 수용체(Fcε RII)는 B세포 및 활성화된 대식세포나 T세포상에 존재하며 CD23항원을 지니고 있다.

제I형 아나필락시형 과민반응에서 T세포와 B세포는 중요한 역할을 하는데, T세포에서 분비되는 여러 종류의 lymphokine에 의해 B세포가 자극을 받아 IgE 등의 항체를 생성하게 된다. IgE 항체는 Fcε RI 수용체를 표현한 비만세포의 세포막에 결합하고, 외부의 항원이 이미 비만세포와 결합한 IgE 항체와 교차결합하면 비만세포는 여러 가지 종류의 화학물질을 유리하여 혈관확장, 기관지수축, 단백질 유출 등 과민반응을 유발한다. 이들 화학물질들 중에서 비만세포내 과립 중에 이미 보유하고 있다가 자극을 받아 방출하는 물질은 히스타민(histamine), 세로토닌(serotonin), 헤파린(heparin), 칼리크레인, 호산구주화인자(ECFA), 호중구주화인자, 아닐살피타제 등이며, 자극에 의해 새롭게 합성해 방출하는 물질은 류코트리엔(leukotrienes), 프로스타글란딘, HETE, 트롬복산A₂, 혈소판활성화인자(PAF) 등이다¹⁷⁾.

TNF-α는 cytokine과 관련한 여러 염증반응에서 중요한 매개체로 인식되고 있다. 이 TNF-α는 IgE 반응 메카니즘에서 비만세포, 대식세포(macrophages), T세포의 알레르기 메카니즘으로 분비되며^{18,19)}, 혈관내피세포에 유착인자의 발현을 야기하며 백혈구를 축적시켜 염증반응을 나타낸다. IL-6는 T세포의 활성을 증가시켜, IgE의 생산을 유도함으로써 만성염증반응을 초래한다²⁰⁾. 비만세포로부터 방출된 IL-8은 호중구, 호산구, T-림프구

와 같은 세포에 작용하여, 염증반응을 활성화한다²¹⁾.

염증성 사이토카인(TNF-α, IL-6, IL-8등)의 발현은 전사인자인 nuclear factor인 NF-κB에 의해 조절을 받는데, 이것은 TNF-α, IL-6와 같은 목적 유전자의 프로모터 부위에 NF-κB의 결합부위가 존재함으로써 발현을 조절할 수 있기 때문이다^{22,23)}. 더욱이 NF-κB는 정상적 상태에서는 IκB와 결합되어 세포질 내에 존재하는데, 외부자극에 의해 IκB가 인산화 및 분해되면서 NF-κB가 핵 안으로 이동한다^{24,25)}.

건칠의 본초학적 효능은, 行血하고 殺蟲하며 堅結積滯와 오래도록 凝結된 瘀血을 없애며 筋骨折傷을 잇는 것 등이다. 즉, 건칠은 陳久한 어혈을 없애고 동시에 살충살균작용을 발휘하는 효능이 있다고 할 수 있다²⁶⁻²⁸⁾.

한약처방에서 건칠은 寒熱虛實 등의 변증에 의해서 사용하기 보다는 주로 그 기능적 효능을 취해서 사용하는 경향이 있다. 본 연구는 그 기능적 효능 중에서 항염증에 대한 효능을 분자생물학적 수준에서 살펴 본 것이다.

건칠추출물이 과민증 type I인 즉시형 과민증에서 나타나는 염증반응에서 어떠한 조절 효과가 있는지를 규명하기 위해, 비만세포주인 HMC-1 세포를 건칠추출물로 1시간 전처리한 후, PMA와 calcium ionophore A23187로 자극하여, 활성화된 비만세포가 분비하는 염증성 물질에 대해 억제효과가 있는지 실험하였다.

칼슘 ionophore인 A23187은 세포내 칼슘의 농도를 증가시켜 비만세포를 활성화하여 탈과립을 유도하며, PMA는 protein kinase C에 직접 작용하는 분열 촉진제로서 비만세포를 활성화시켜 세포활성물질을 분비하게 한다. 하지만, PMA 단독으로는 비만세포의 탈과립이 나타나지 않으므로, A23187과 PMA를 모두 사용하였다.

먼저 건칠추출물의 농도를 다르게 하여 HMC-1

세포를 처리한 후 A23187과 PMA로 세포의 활성을 유도하여 히스타민 분비량을 측정한 실험과 세포 생존율을 비교한 실험에서, 건칠추출물은 히스타민 분비와 세포증식에 별다른 영향을 주지 않은 것으로 확인되었다.

그 다음 건칠추출물의 염증 반응 조절 효과를 관찰하기 위해 건칠추출물로 1시간 전 처리한 비만세포를 A23187과 PMA로 활성화 한 후 세포의 배양액으로부터 TNF- α , IL-6, 그리고 IL-8의 분비량을 ELISA 방법으로 측정하였다.

그 결과 TNF- α 의 경우, 건칠추출물의 농도를 0.01mg/ml, 0.02mg/ml, 0.04mg/ml로 각각 달리하여 처리했을 때, 모든 경우에서 감소하는 것으로 나타났다. 위 세 가지 농도에서는 농도가 진해짐에 따라 저해율이 커졌고, 0.04mg/ml 농도에서는 70% 이상의 높은 저해율을 보였다. IL-6의 경우도 건칠추출물의 농도 0.01mg/ml, 0.02mg/ml, 0.04mg/ml 각각에서 그 분비량이 억제되는 것이 확인되었으며, 농도가 진할수록 그 효과가 컸다. A23187과 PMA로만 처리하여 활성화된 HMC-1세포 배양액의 IL-6 생성량과 0.04mg/ml 농도의 건칠추출물로 처리한 후 A23187과 PMA로 활성화한 HMC-1세포 배양액의 IL-6 생성량을 비교하였을 때, 50%의 높은 저해율을 나타내었다. 또한 IL-8의 경우에도 실험에 사용한 모든 농도에서 저해효과가 나타났으며, 농도가 진할수록 저해율이 컸다. 건칠추출물 0.04mg/ml의 농도에서는 40% 이상의 높은 저해율을 보였다.

자극된 비만세포에서 분비되는 TNF- α , IL-6, IL-8 등과 같은 염증성 물질에 대한 건칠추출물의 억제효과는 mRNA 수준에서도 관찰되었다.

TNF- α , IL-6, IL-8 등과 같은 염증성 사이토카인은 NF- κ B나 AP-1 등과 같은 전사인자에 의해 조절된다. NF- κ B의 전사활성은 전염증(pro-inflammatory) 매개물질(TNF- α , IL-6, IL-8 등)의 유전자 발현을 유도함으로써 염증을 불러일

으키는 중요한 역할을 한다^{29,30}. NF- κ B 발현억제 효과에 관한 실험한 결과, 건칠추출물은 I κ B의 인산화를 억제함으로써 NF- κ B의 발현을 억제하는 것을 알 수 있었다. 또한 NF- κ B의 프로모터 부위의 활성을 건칠추출물이 억제함으로써 NF- κ B의 생성을 억제함을 보였다.

이러한 실험결과로 미루어 보아 건칠추출물이 염증매개물질인 TNF- α , IL-6, IL-8 등을 억제함으로써 염증치료에 효능이 있을 것으로 사료된다. 또 탈과립된 비만세포에서 I κ B/NF- κ B 경로의 발현을 조절함으로써 이에 수반되는 염증성 물질인 TNF- α , IL-6, IL-8 등의 생성을 억제하는 효과가 있음을 보여주었다.

결 론

본 연구는 건칠의 항염증 효능을 확인하기 위해, 건칠추출물이 비만세포 매개 염증반응에 어떠한 영향을 미치는지를 실험해 보았으며, 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 건칠추출물은 HMC-1 세포에 대한 실험에서 히스타민 분비와 세포증식에 별다른 영향을 주지 않았다.
2. 건칠추출물은 활성이 유도된 HMC-1세포에서 TNF- α 의 발현을 저해하는 효과가 있었으며, 추출물의 농도에 비례하여 그 효과가 컸다. 특히, 0.04mg/ml의 농도에서 70% 이상의 높은 저해율을 보였고, mRNA 발현에도 높은 억제효과가 있었다.
3. 건칠추출물은 HMC-1세포에서 IL-6의 발현을 억제하는 효과가 있었으며, 실험에 사용한 모든 농도에서 50% 정도의 저해율이 관찰되었다. mRNA 발현율에서도 억제현상을 나타내었다.
4. HMC-1세포에서 건칠추출물은 IL-8의 발현을

억제하는 효과가 있었으며, 특히 0.04mg/ml의 농도에서는 40%의 높은 저해율이 관찰되었다. 또, mRNA발현의 경우, 0.04mg/ml 농도에서 정상세포와 비슷한 수준이었다.

5. NF- κ B와 NF- κ B 억제자인 I κ B의 단백질 발현 정도를 관찰하는 실험에서 건칠추출물은 0.02mg/ml와 0.04mg/ml 농도에서 뚜렷한 억제효과가 있었으며, 인산화된 I κ B의 발현도 추출물 0.04mg/ml 농도에서 감소현상을 보였다. 또 이러한 TNF- α , IL-6, IL-8 등을 조절하는 NF- κ B의 프로모터 활성의 경우도 0.02mg/ml의 농도에서 억제현상이 나타났다.

이상의 연구 결과에서, 그 동안 임상적으로 확인된 건칠의 항염증 작용을 분자생물학적 차원에서도 확인할 수 있었으며, 앞으로 건칠을 항염증 치료에 보다 폭넓게 활용할 수 있는 가능성을 보여주었다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. 鄒澍지음, 임석진 옮김. 本經疏證. 서울:아티전. 1998:154-6.
2. 정소희, 조상현 이상진,김시용. 옷나무에 의한 알레르기성 접촉피부염과 경구복용에 의한 전신성 접촉피부염의 면역조직화학적 비교. 대한피부과학회지 1997;35(6):1052-8.
3. 최원철. 옷나무 추출물(Nexia)의 안정성 및 항암효과에 관한 연구. 경희대학교 동서의학대학원. 2006.
4. 오광인, 나천수, 정남철. 옷나무 철액성분 중 Urushiol의 암세포 증식억제 효과 - in vitro 세포독성효과 - 한국임학회지. 1998;87(2).
5. 김원찬. 건칠 EtOAc 분획물이 COX-2 발현억제를 통하여 위암 세포주에 미치는 영향. 경원대학교 대학원. 2007.
6. 안진영. 건칠이 위암세포의 활성, 세포사멸 및 세포주기 관련 유전자 발현에 미치는 영향. 세명대학교 대학원. 2006.
7. 오현주. 건칠추출물이 Streptozotocin으로 당뇨를 유도한 흰쥐에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2006.
8. 김성학, 김경준. 乾漆이 혈관신생관련 단백질 발현에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지 제19권 제3호(2006년 12월) The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 2006; 19(3):1-12.
9. 심대식. 건칠이 인간기관지상피세포 Cytokine 분비와 호산구 Chemotaxis에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2006.
10. Williams CM and Galli SJ. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. J Exp Med. 2000;192:455-62.
11. Ptak W, Geba GP and Askenase PW. Initiation of delayed-type hypersensitivity by low doses of monoclonal IgE antibody. Mediation by serotonin and inhibition by histamine. J. Immunol. 1991;170:3929-36.
12. 권명상, 권혁한, 김일택, 박기호, 이영종, 서설. 임상면역학. 서울:고려의학. 1998:219-27.
13. 이중달. 기본병리학. 서울:고려의학. 1996:79-130.
14. 송계용, 지제근, 함의근. 핵심병리학. 서울:고려의학. 1998:193-202.
15. Comms RPA and Gell PGH. in Clinival Aspects of Immunology, ed. Gell, P. G. H. (Blackwell Scientific, Oxford), 1963: 317-37.
16. Janeway CA, Travers P, Walport M and Capera JD. in Immunobiology: The

- Immune System in Health and Disease (Current Biology Publication, London), 1999, 4th Ed., pp. 461-88.
17. 서울대학교의과대학. 면역학. 서울:서울대학교출판부. 1997:17-35, 78-86, 99-108, 166-181, 229-41.
 18. Thomas PS. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunol Cell Biol.* 2001;79: 132-45
 19. Naka S, Suto H, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell-derived TNF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:6467-72.
 20. Bodreau RT, Hoskin DW, Lin TJ. Phosphatase inhibition potentiates IL-6 production by mast cells in response to Fcepsilon RI-mediated activation: involvement of p38 MAPK. *J Leukoc Biol.* 2004; 76:1075-81.
 21. Murayama T, Mukaida N, Sadanari H, Yamaguchi N, Khabar KS, Tanaka J, Matsushima K, Mori S, Eizuru Y. The immediate early gene 1 product of human cytomegalovirus is sufficient for up-regulation of interleukin-8 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279(1):298-304.
 22. Kuprsh DV, Udalova IA, Turetskaya RL, Rice NR, Nedospasov SAC. Conserved kappa B element located downstream of the tumor necrosis factor alpha gene: distinct NF-kappa B binding pattern and enhancer activity in LPS activated murine macrophages. *Oncogene.* 1995;11:97-106.
 23. Galien R, Evans HF, Garcia T. Involvement of CCAAT/enhancer-binding protein and nuclear factor-kappa B binding site in interleukin-6 promoter inhibition by estrogens. *Mol Endocrinol.* 1996;10:713-22.
 24. Beg AA, Baldwin AS Jr, The I kappa B protein: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factor. *Genes Dev.* 1993;7(11):2064-70.
 25. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, and Maniatis T. The ubiquitinproteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell.* 1996;78(5):773-85.
 26. 汪昂 著, 楊東喜 編著. 本草備要解析. 國興出版社. 中華民國74年:393-4.
 27. 黃宮綉. 本草求真. 人民衛生出版社. 1985:228-9.
 28. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울:永林社. 1991:439-40.
 29. Rao A. NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today.* 1994;15:274-81.
 30. Firrini E, Marchisio PC, Scupoli MT, 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.* 2000;7:195-208.