생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
40(3) : 233 ~ 237 (2009)

생강나무 추출물의 알레르기성 염증반응 억제 효과

김상현[1] · 손준호[2] · 이승호*
[1]경북대학교 의과대학, [2]대구경북한방산업진흥원, 영남대학교 약학대학

Inhibitory Effects of Water Extract of *Lindera obtusiloba* on the Mast Cell-Mediated Allergic Inflammation

Sang-Hyun Kim[1], Jun-Ho Son[2] and Seung-Ho Lee*
[1]*Department of Pharmacology, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 700-422, Korea*
[2]*Daegu.Gyeongbuk Institute for Oriental medicine Industry, Kyongsan, Korea*
College of Pharmacy, Yeungnam University,Kyongsan 712-749, korea

Abstract – *Lindera obtusiloba* has been used for centuries as a traditional medicine in Korea and recently known to have an anti-fibrotic effect. In this report, we investigated the effect of hot water extract from *L. obtusiloba* (WELB) on the mast cell-mediated allergic inflammation and studied its possible mechanisms of action. WELB inhibited phorbol-12-myristate 13-acetate and calcium ionophore A23187 (PMACI)-induced histamine release in HMC-1 human mast cells. WELB reduced PMACI-induced gene expression and secretion of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-α, interleukin (IL)-1β, IL-6, and IL-8. The inhibitory effect of WELB on the expression of proinflammatory cytokines was c-jun N-terminal kinase and nuclear factor-κB dependent. These results indicate that WELB may be beneficial in the treatment of mast cell-mediated allergic inflammation.

Key words – *Lindera obtusiloba*, histamine, proinflammatory cytokine, mast cells, allergic inflammation.

비만세포는 피부, 호흡기, 림프관 주위, 혈관 주위, 위장관의 점막, 뇌 등 전신의 장기에 분포하고 있으며, 천식이나 알레르기성 비염과 같은 알레르기 반응을 매개하는 중요한 세포이다.[1)] 비만세포로부터 히스타민의 유리는 알레르기 반응의 병리적 진행과정에서 필수적인 단계인데, 비만세포 표면에 존재하는 면역글로블린 E (IgE)의 수용체인 FcεRI에 항원이 결합하여 유발되는 비만세포 활성화에 의해 히스타민이 유리된다. 비만세포가 활성화되면 비만세포는 탈과립 되고 또한 아라키돈산 대사물질과 염증반응을 유발하는 다양한 사이토카인이 분비된다.[2, 3)] 비만세포에서 분비되는 다양한 염증 유발물질 중 히스타민은 즉시형 과민성 반응을 유발하는 가장 강력한 생리 활성물질로 알려져 있다.[4)]

비만세포의 탈과립 반응은 IgE 수용체를 통한 자극 이외에도 칼슘 ionophore, codeine, 합성 부신피질 자극호르몬, compound 48/80과 같은 약리학적 복합물에 의한 자극 등이 있다. Compound 48/80은 비만세포 내의 칼슘 수준을 증가시켜 아나필락시 반응을 일으키는데 가장 많이 사용되고 있으며, 이러한 비만세포의 탈과립을 유도하는 자극에 의해 세포내 과립에 저장되어 있는 히스타민 등의 화학적 매개물질이 유리되고, 그 결과 말초혈관에 대한 투과성 항진과 확장작용, 점막표면에 대한 선세포의 분비 항진작용, 기관지 평활근에 대한 수축작용 등을 일으켜 알레르기 반응이 발현된다.[5)] 비만세포의 활성화 후 유발되는 탈과립 과정의 신호전달 경로에 대해서는 지금까지 많은 연구가 진행되었는데 특히 tyrosine kinase의 인산화와 칼슘의 세포내 유입이 중요하다.[6,7)] 또한 비만세포에서의 히스타민의 유리에는 cAMP가 중요한 역할 한다고 알려져 있다.[8)]

다양한 자극에 의한 비만세포의 활성화는 히스타민, 세로토닌, 류코트리엔과 같은 생리 활성 물질이외에도 tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β, IL-6, IL-8과 같은 사이토카인을 분비하고, 이러한 염증유발성 물질에 의해 알레르기성 염증 질환이 유발된다.[9,10)] 전사인자인 mitogen-activated protein kinase (MAPK)와 NF-κB는 세포활성, 염

*교신저자(E-mail) : seungho@yu.ac.kr
(Tel) : 053-810-4654

증과 같은 다양한 세포내 반응을 조절하는 인자로서 특히 TNF-α, IL-1β, IL-6 및 IL-8와 같은 염증유발 사이토카인의 발현을 조절하고 세포외부로부터의 자극을 세포내부로 전달하는 역할을 주로 담당한다고 알려져 있다.[10-12)]

생강나무는 녹나무과의 다년생 관목으로 약명은 黃梅木이라 하며 속명으로는 猴楸木, 猴楸樟, 山薑, 香麗木, 檀香梅, 산동백나무 등으로 불린다. 우리나라 전역에 분포하는 낙엽관목으로 꽃은 황색이며 잎보다 먼저 핀다. 관상용, 공업용, 약용으로 쓰이고, 관상수 및 열매로 기름을 짜며 향료로 사용된다. 민간에서는 열매, 잎, 가지 등을 해열, 강심제, 학질, 건위제 등으로 사용한다. 성분으로는 가지에 sitosterol, stigmasterol, campesterol 등이, 가지와 잎에는 방향유가 0.4-0.6% 함유되어 있고 주성분은 l-borneol이다. 잎은 탄소수 16-33개의 파라핀이 함유되어 있고 종자유 중에는 carpric acid, lauric acid, myristic acid, linderic acid 등이 함유되어 있다.[13)]

본 연구에서는 천연물에서 비만세포에 의해 유발되는 알레르기성 염증 반응에 효과가 있는 생강나무를 시료로 하여 히스타민 유리와 염증유발성 사이토카인 억제에 대한 효과 및 작용기전을 실험하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 세포 배양 – Phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA), calcium ionophore A23187 (PMACI)은 Sigma사에서 구입하였다. 항 TNF-α와 IL-6 항체는 R&D사 제품을 사용하였다. 인체비만세포주인 HMC-1 세포는 10% FBS가 첨가된 Life Technologies사의 Iscove's media에서 배양하였다.

시료의 제조 – 실험에 사용된 생강나무는 2009년 4월 대구지역에서 채집한 것으로 충남대학교 배기환 교수에게 감정 받아 사용하였으며 (SH09018), 표본은 영남대학교 약학대학에 보관하고 있다. 생강나무 줄기 1 kg을 잘게 썰어 2 L의 증류수를 가하고 100°C에서 4시간 추출 후 용매를 유거하고 동결 건조하여 115 g의 추출물을 얻었다.

히스타민 정량 – 세포배양액에 있는 히스타민은 형광분석법으로 정량하였다.[12)] 즉 에펜돌프 튜브에 시료 500 μl를 취하여 0.1 M HCl 450 μl와 60% 과염소산 용액 50 μl를 혼합한 후 원심분리(400 g, 20분)하였다. 그 상등액 800 μl를 취해 5 M NaOH 용액 500 μl, 증류수 3 ml, *n*-butanol 10 ml, NaCl 1.2 g을 혼합한 시험관에 넣고 진탕 후 원심분리(500 g, 10분)하였다. *n*-butanol층 8 ml를 취해 0.1 M HCl 3 ml, *n*-heptane 10 ml를 가하여 진탕 후 원심분리(500 g, 10분)하였다. 여기서 얻어진 수층 2 ml에 1 M NaOH 400 μl, 1% *o*-phthaldialdehyde 용액 100 μl를 가하여 혼합하고 2분 동안 방치한 다음 emission 438 nm, excitation 353 nm에서 형광강도를 측정하였다.

RT-PCR을 이용한 유전자 발현 분석 – RNA 분리 kit를 사용해 세포로부터 total RNA를 분리하고, 분리된 total RNA의 흡광도를 측정하여 정량한 후 1 μg의 RNA로 cDNA를 합성한 후 이 cDNA를 주형으로 다양한 primer (Table I)를 사용해 PCR로 증폭하였다. 이때 대조군으로 β-actin에 대한 PCR을 함께 실시하며 얻어진 DNA 생성물은 2% agarose gel에서 전기영동 후 Ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 관찰하였다.

세포활성물질 분비 측정(Enzyme-linked immnosorbent assay, ELISA) – 각 세포활성물질에 대한 단클론 항체를 PBS (pH 7.4)로 희석하여 96 well plate에 100 μl씩 각각 코팅하고, 0.05% tween이 함유된 PBS로 씻어낸 다음 1% BSA, 5 % sucrose, 0.05% NaN_3를 함유한 PBS로 1시간동안 blocking 하였다. 여러 번 씻어 낸 다음 원심분리 하여 얻은 혈청과 표준 세포활성물질을 첨가한 후 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. Biotin이 결합된 2차 항체 첨가 후, avidin peroxidase를 첨가하고 기질인 ABTS 용액을 첨가하고, 발색반응은 ELISA reader를 사용하여 405 nm에서 측정하였다.

Table I. Primers and PCR conditions for gene expression

Gene	Primers	Annealing temperature (°C)	Amplified size(bp)
TNF-α	s 5'-cct acc aga cca agg tca ac-3' as 5'-agg ggg taa taa agg gat tg-3'	57	279
IL-1β	s 5'-aaa cag atg aag tgc tcc tt-3' as 5'-tgg aga aca cca ctt gtt gc-3'	57	391
IL-6	s 5'-aaa gag gca ctg gca gaa aa-3' as 5'-atc tga ggt gcc cat gct ac-3'	59	412
IL-8	s 5'-aca gca gag cac aca agc tt-3' as 5'ctg gca acc cta caa cag ac-3'	59	247
β-actin	s 5'-gga ctt cga gca aga gat gg-3' as 5'-agc act gtg ttg gcg tac ag-3'	54	234

Western blot 분석 – 세포를 2 mM PMSF와 10 μg/ml leupeptin를 함유한 추출완충액(1% triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS를 함유한 PBS용액)으로 용해시킨 후 syndication해서 DNA를 조각낸다. 단백량은 BSA를 표준으로 이용해서 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 측정하였다. 세포 총단백 10-50 μg을 0.1% SDS를 함유한 8-12% (w/v) polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 gel에 존재하는 단백을 electroblotting 방법으로 nitrocellulose (NC) filter에 옮기고 난 후, 비특이적인 결합을 차단하기 위하여 NC filter를 5% 탈지분유를 함유한 tris-buffered saline-tween (TBS-tween) 용액에 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Filter를 타겟 단백질에 대한 항체를 함유한 TBS-tween 용액에 넣고 실온에서 1시간 동안 방치한 후 HRP로 표지된 2차 항체로 표지하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL)을 이용하여 band들을 가시화 하였다.

통계학적 분석 – 실험결과는 mean±SEM으로 표시하였고 ANOVA와 Duncan's multiple range tests에 의해 유의성을 검정하여 $P<0.05$인 결과를 얻었을 때 유의성이 있는 것으로 하였다.

결과 및 고찰

비만세포로부터 히스타민의 유리에 미치는 WELB의 효과 – 비만세포에 PMACI를 투여하면 비만세포가 활성화 되면서 세포내의 주함유물질이며 알레르기 유발물질인 히스타민이 유리된다. 인체 비만세포주인 HMC-1 세포에 미치는 WELB의 효과를 검토하기 위하여 PMACI를 투여하기 10분전에 WELB를 처리하였다. Fig. 1에서와 같이 WELB는 비만세포에서 PMACI에 의한 히스타민의 유리를 농도의존적으로 억제하였다. WELB의 비만세포에 대한 독성여부를 확인하기 위해 MTT 실험을 한 결과 WELB 농도 1 mg/ml까지 세포독성이 나타나지 않았다. (data not shown)

염증유발 사이토카인 유전자의 발현 및 분비에 미치는 WELB의 효과 – TNF-α, IL-1β, IL-6 및 IL-8은 잘 알려진 염증유발물질로서 PMACI의 자극에 의해 비만세포에서 발현된다. 비만세포 유래의 염증유발에 대한 WELB의 효과를 검토하기 위하여 HMC-1 세포를 PMACI로 자극하기 1시간 전에 WELB를 처리하였다. Fig. 2에서와 같이 WELB는 비만세포에서 PMACI에 의한 TNF-α, IL-1β, IL-6 및 IL-8의 발현을 농도 의존적으로 억제하였다. 또한 Fig. 3에서와 같이 WELB는 PMACI로 자극된 비만세포에서 TNF-α와 IL-6의 분비를 농도 의존적으로 억제하였다.

WELB의 염증유발 사이토카인 발현 억제 기전 – 전사인자인 mitogen-activated protein kinase (MAPK)와 NF-κB는 세포활성, 염증과 같은 다양한 세포내 반응을 조절하는 인자로서 특히 TNF-α, IL-1β, IL-6 및 IL-8와 같은 염증유발

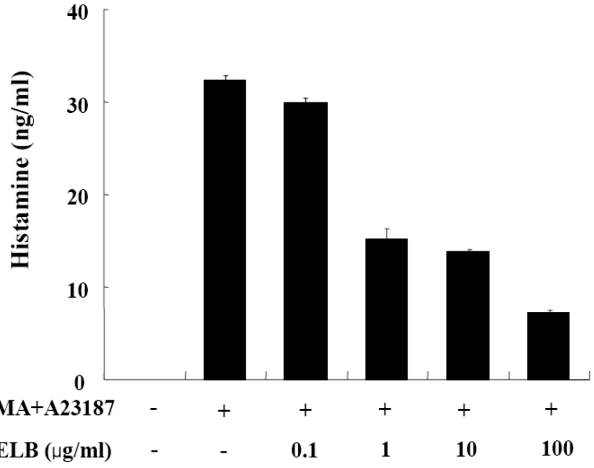

Fig. 1. Effect of the water extract of *L. obtusiloba* (WELB) on PMACI-induced histamine release from HMC-1 cells. The cells (2×10^6 cells/ml) were preincubated with WELB at 37°C for 10 min prior to incubation with PMA (20 nM) and A23187 (1 μM). Each data represents the mean±SEM of three independent experiments. *Statistically significant at $P<0.05$.

사이토카인의 발현을 조절한다고 알려져 있다. MAPK는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK), 및 p38 MAPK로 구성되어 있으며, 이들은 세포외부로부터의 자극을 세포내부로 전달하는 역할을 주로 담당한다. 염증유발 사이토카인 발현에 대한 WELB의 억제효과에 대한 작용기전을 검토하기 위하여 HMC-1 세포를 PMACI로 자극하기 1시간 전에 WELB를 처리하고 MAPK와 NF-κB의 활성에 대한 WELB의 효과를 측정하였다. Fig. 4에서와 같이 WELB는 비만세포에서 PMACI에 의한 NF-κB의 활성을 억제하였다. 또한 WELB는 ERK 및 p38 MAPK에 대한 영향 없이 JNK의 인산화를 특이적으로 억제하였다.

활성화된 비만세포는 히스타민과 같은 생리 활성 물질 및 염증유발성 사이토카인 분비를 통해 알레르기성 염증 질환을 유발한다. 또한 염증유발성 사이토카인은 MAPK와 NF-κB와 같은 전사인자를 통해 분비된다. 따라서 비만세포에 의해 분비되는 히스타민 및 염증 유발성 사이토카인 분비를 억제 하는 물질을 발굴하고 작용기전을 밝히는 일은 알레르기성 염증 질환치료에서 중요한 분야이다. 본 연구에서는 WELB가 히스타민 유리를 억제하고, NF-κB와 JNK의 활성을 억제하여 염증유발 사이토카인의 발현을 억제함을 시사하고 있다.

결 론

비만세포에 의해 매개되는 알레르기성 염증반응에 대한 WELB의 효과 실험 결과 WELB는 인체비만세포주에서

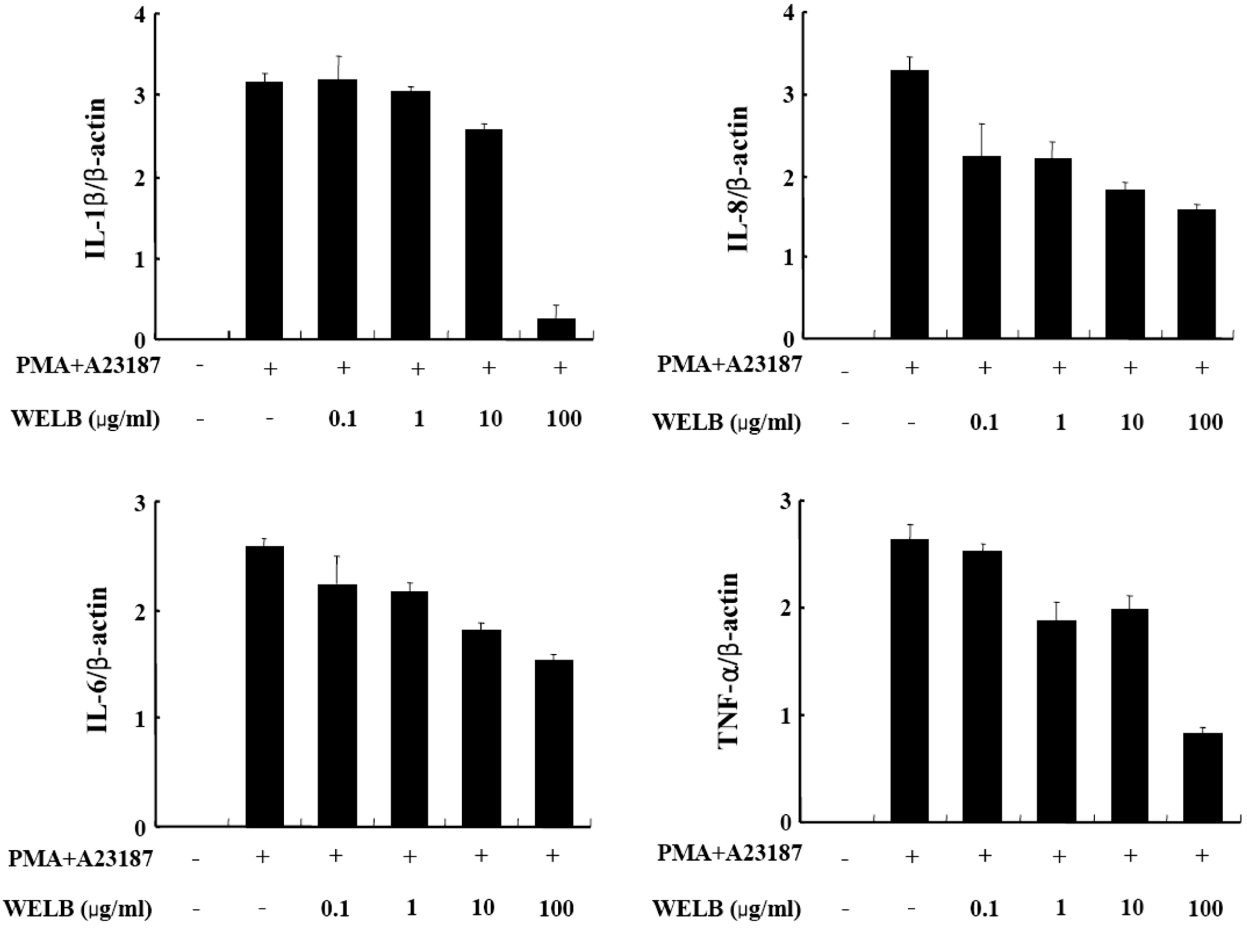

Fig. 2. Effect of the water extract of *L. obtusiloba* (WELB) on the gene expression of proinflammatory cytokines in HMC-1 cells. HMC-1 (2×10^6 cells/ml) was pretreated with WELB for 1 h and stimulated by PMA (20 nM) and A23187 (1 μM) for 4 h. Gene expression of TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-8 was quantified by RT-PCR. Products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel, visualized by staining with ethidium bromide and certificated using a Kodak DC 290 digital camera. Each data represents the mean±SEM of three independent experiments. *Statistically significant at $P<0.05$.

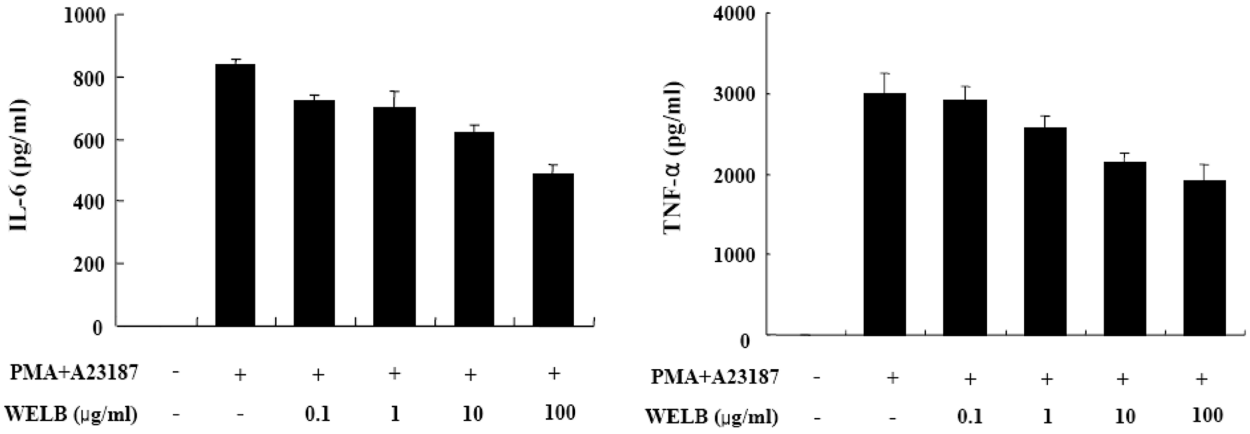

Fig. 3. Effect of the water extract of *L. obtusiloba* (WELB) on the secretion of proinflammatory cytokines in HMC-1 cells. HMC-1 (2×10^6 cells/ml) was pretreated with WELB for 1 h and stimulated by PMA (20 nM) and A23187 (1 μM) for 12 h. The secretion of TNF-α and IL-6 was measured by ELISA. Each data represents the mean±SEM of three independent experiments. *Statistically significant at $P<0.05$.

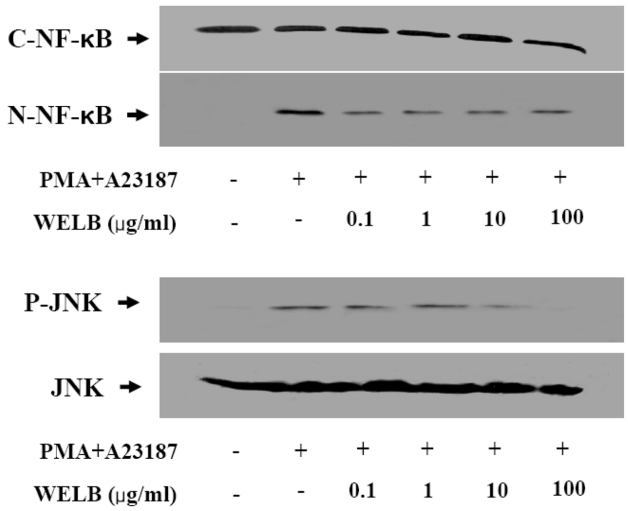

Fig. 4. Effect of the water extract of *L. obtusiloba* (WELB) on the activation of MAPKs and NF-κB in HMC-1 cells. HMC-1 (2×10^6 cells/ml) was pretreated with WELB for 1 h and stimulated by PMA (20 nM) and A23187 (1 μM) for 1 h. Phosphorylation of MAPK and activation of NF-κB were analyzed by Western blot. C-NF-κB, cytoplasmic NF-κB; N-NF-κB, nucleus NF-κB.

PMACI에 의해 유도된 히스타민의 유리를 억제하였다. 또한 WELB는 전사인자인 NF-κB와 JNK의 활성화를 억제하여 다양한 염증유발성 사이토카인의 발현과 분비를 억제하였다.

이러한 결과로 미루어 볼 때 생강나무 추출물인 WELB는 비만세포 매개 알레르기성 염증 질환의 예방과 치료에 사용될 수 있음을 시사하고 있다.

인용문헌

1. Metcalfe, D. D., Kaliner, M. and Donlon, M. A. (1981) The mast cell. *Crit. Rev. Immunol.* **3**: 23.
2. Miyajima, I., Dombrowicz, D., Martin, T. R., Ravetch, J. V., Kinet, J. P. and Galli, S. J. (1997) Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* **99**: 901.
3. Church, M. K. and Levi-Schaffer, F. (1997) The human mast cell. *J. Allergy Clin. Immunol.* **99**: 155.
4. Petersen, L. J., Mosbech, H. and Skov, P. S. (1996) Allergen-induced histamine release in intact human skin in vivo assessed by skin microdialysis technique: characterization of factors influencing histamine releasability. *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**: 672.
5. Ennis, M., Pearce, F. L. and Weston, P. M. (1980) Some studies on the release of histamine from mast cells stimulated with polylysine. *Br. J. Pharmacol.* **70**: 329.
6. Alfonso, A., Cabado, A. G, Vieytes, M. R. and Botana, L. M. (2000) Functional compartments in rat mast cells for cAMP and calcium on histamine release. *Cell Signal.* **12**: 343.
7. Beaven, M. A., Rogers, J., Moore, J. P., Hesketh, T. R., Smith, G. A. and Metcalfe, J. C. (1984) The mechanism of the calcium signal and correlation with histamine release in 2H3 cells. *J. Biol. Chem.* **259**: 7129.
8. Botana, L. M. and MacGlashan, D. W. (1994) Differential effects of cAMP-elevating drugs on stimulus-induced cytosolic calcium changes in human basophils. *J. Leukoc. Biol.* **55**: 798.
9. Galli, S. J., Gordon, J. R. and Wershil, B. K. (1991) Cytokine production by mast cells and basophils. *Curr. Opin. Immunol.* **3**: 865.
10. Galli, S. J., Kalesnikoff, J., Grimbaldeston, M. A., Piliponsky, A. M., Williams, C. M. and Tsai, M. (2005) Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* **23**: 749.
11. Azzolina, A., Bongiovanni, A. and Lampiasi, N. (2003) Substance P induces TNF-alpha and IL-6 production through NF kappa B in peritoneal mast cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1643**: 75.
12. Kim, S. H., Jun, C. D., Suk, K., Choi, B. J., Lim, H., Park, S., Lee, S. H., Shin, H. Y., Kim, D. K. and Shin, T. Y. (2006) Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol. Sci.* **91**: 123.
13. 중약대사전 상해과학기술출판사 1913.

(2009년 8월 20일 접수)