

## 목단피의 NF- $\kappa$ B와 MAPKs 억제를 통한 Pro-inflammatory Cytokines 활성화에 미치는 효과

박주호 · 김경준

경원대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

### The Effect of Moutan Cortex on Pro-inflammatory Cytokines through NF- $\kappa$ B & MAPKs pathway in HMC-1

*Joo-Ho Park · Kyung-Jun Kim*

**Objective** : Moutan Cortex (the root bark of *Paeonia suffruticosa* Andr.) is widely used in oriental medicine as a remedy for inflammation. However, as yet there is no clear explanation of how MC(Moutan Cortex) affects the production of inflammatory cytokine. This study was to determine the effects of Essence extracted MC on the mast cell-mediated inflammatory responses.

**Method** : We observed the effect of MC on compound 48/80-induced histamine release of rat peritoneal mast cells and the effect of administering MC on PCA in rat. 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 MC. The TNF- $\alpha$  protein levels were analysed by Western blot. The TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 secreted protein levels were measured by the ELISA assay. The TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 mRNA levels were measured by the RT-PCR analysis. NF- $\kappa$ B, phospho-I $\kappa$ B and MAPKs were examined by Western blot analysis. The NF- $\kappa$ B promoter activity was examined by luciferase assay.

- Result** : 1. Enzyme immunoassay indicated that MC suppressed histamine secretion of rat peritoneal mast cells.  
2. In PCA dependent on IgE, MC had anti-allergic effect of the internal surface of rat skin.  
3. Western blot indicated that MC decreased TNF- $\alpha$  protein levels.  
4. ELISA indicated that MC decreased TNF- $\alpha$ , IL-6 but MC had no significant effect on IL-8 in HMC-1 cells.  
5. RT-PCR indicated that MC decreased TNF- $\alpha$ , IL-8 but MC had no significant effect on IL-6 in HMC-1 cells.  
6. Western blot indicated that MC suppressed the induction of MAPKs, NF- $\kappa$ B & phospho-I $\kappa$ B activity in HMC-1 cells.  
7. Luciferase assay indicated that MC suppressed the PMA plus A23187-induced NF- $\kappa$ B promoting activity in HMC-1 cells.

**Conclusion :** In this study, we have found that MC is an inhibitor of NF- $\kappa$ B, MAPKs & cytokines on the mast cell-mediated inflammatory responses.

**Key words :** Moutan Cortex, HMC-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, NF- $\kappa$ B, MAPKs.

## 서 론

염증이란 손상에 대한 살아 있는 조직의 반응으로 생체 조직이 어떠한 원인에 의하여 손상을 받았을 때 이 손상을 최소화 시키고 손상된 부위를 정상상태로 되돌리려는 생체의 고도로 발달된 방어기전이다<sup>1)</sup>. 손상된 조직에 있는 세포나 단백질은 cytokine을 분비하고 다른 세포들과 작용하여 내재면역반응이 시작되고 이 결과 감염된 조직에서 염증 상태가 유도된다<sup>2)</sup>.

제1형 과민반응(Type I hypersensitivity reaction)은 외부로부터 항원이 침입하여 인체가 IgE를 생성하고 비만세포의 Fc $\epsilon$ RI와 결합하면 비만세포는 활성화되어 histamine, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8과 같은 염증매개물을 방출하는 것으로 시작된다<sup>2)</sup>.

MAPKs(Mitogen activated protein kinases)는 세포막 수용체로부터 정보전달에 의해 활성화되어 세포질 또는 핵 안에 있는 전사인자를 인산화 시켜 그 기능을 조절한다<sup>3)</sup>. NF- $\kappa$ B는 정상적 상태에서는 세포질에 I- $\kappa$ B와 결합하여 존재하다가 외부 자극에 의해 I- $\kappa$ B가 인산화 및 분해되면서 NF- $\kappa$ B는 핵 안으로 이동하여<sup>4,5)</sup> TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8와 같은 목적 유전자의 프로모터 부위에 결합하여 발현을 조절할 수 있다<sup>6,7)</sup>.

이와 같이 제1형 과민반응에서 histamine, TNF-

$\alpha$ , IL-6, IL-8의 분비와 MAPKs와 NF- $\kappa$ B의 활성화는 염증을 개시하고 유지시키는 중요한 요소이며 이들의 분비량과 활성화에 대한 조절은 항염 효과를 파악하는 기준이 된다.

목단피(Moutan Cortex)는 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속한 모란 *Paeonia suffruticosa* Andr.의 뿌리 껍질을 건조한 것으로 성질은 약간 차며 맛은 쓰고 매우며 독은 없다<sup>8,9)</sup>. 효능은 淸熱涼血, 活血祛瘀하고 약리작용으로는 진통·진정·해열·항경련작용과 항염증작용, 혈전 형성 억제작용, 항균작용 등이 있다<sup>10-12)</sup>. 목단피에 대한 기존의 연구를 살펴보면 노<sup>35)</sup>는 목단피의 항염효과를, 오<sup>36)</sup>는 항염증 작용 및 TNF- $\alpha$ , iNOS에 생성억제효과를 보고한 바 있다.

이 실험에서는 제1형 과민반응에서 알레르기 염증 질환에 대한 목단피의 효과를 확인하기 위해 비만세포를 목단피 추출물(MC)로 전처리한 후, PMA와 A23187로 유도한 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8의 염증매개물질의 생성에 어떠한 영향을 미치는가 알아보았으며, 또한 MC가 NF- $\kappa$ B와 MAPKs의 활성을 억제함으로써 염증매개물질에 대한 억제 효과를 기대할 수 있는지 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재추출

실험에 사용된 목단피 추출물(MC)은 움니허브사(영천, 한국)에서 목단피를 구입하여 100g을 정량

교신저자 : 김경준, 인천광역시 중구 용동 117번지 경원대학교 부속 길한방병원 안이비인후피부과  
(Tel :032-770-1215, E-mail : kkjo215@hanmail.net)

• 접수 2009/06/29 • 수정 2009/07/30 • 채택 2009/08/03

\* 이 논문은 2009년도 경원대학교 교내연구비 지원에 의하여 수행되었음.

후 80% 에탄올을 가하여 30분 동안 2회에 걸쳐 초음파진동을 이용하여 추출액을 획득하였다. 지름 185mm 종이여과지를 이용하여 감압여과 하였다. 그 후 감압농축기를 사용하여 농축한 다음, 동결건조하여 분말을 얻어 demethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 사용하였다.

## 2) 기기 및 시약

### ① 기기

| Equipment                                   | Company                           | Country |
|---|-----------------------------------|---------|
| 종이여과지<br>ECL                                | Whatman<br>Amersham<br>Bioscience | England |
| Freezedryer<br>감압농축기                        | Matsushita<br>Eyela               | Japan   |
| Luciferase assay<br>system<br>GeneQuant Pro | Promega<br>Amersham<br>Bioscience | USA     |
| ELISA reader                                | Tecan                             | Canada  |

### ② 시약

| Reagent   | Company                    | Country |
|---|----------------------------|---------|
| Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM)   | GIBCO BRL                  | USA     |
| Compound 48/80<br>anti-DNP IgE<br>DNP-human serum albumin (HSA)<br>phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)<br>A23187<br>evans blue<br>Anti- $\alpha$ -tubulin | Sigma aldrich              | USA     |
| MTS<br>Lysis buffer   | Promega                    | USA     |
| Histamine kit   | Oxford Biomedical Research | USA     |
| Anti-human IL-6/IL-8<br>biotinylated anti-human IL-6/IL-8<br>재조합 human IL-6/IL-8 protein  | BD Biosciences             | USA     |
| Anti-human TNF- $\alpha$<br>biotinylated anti-human TNF- $\alpha$<br>재조합 human TNF- $\alpha$  | R&D Systems                | USA     |

## 3) 실험동물

실험동물로는 Sprague-Dawley계 흰쥐(Rat)를 오리엔트 바이오사 (성남, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 동물은 4마리당 한 cage에 사육하였으며, 온도  $22\pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55\pm 5\%$ 의 환경을 유지하였다.

## 4) 세포주

HMC-1(Human Mast Cells-line)은 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 IMDM에 100U/ml Penicillin과 100 ug/ml Streptomycin(P-S)을 첨가한 배지에서 2-3일마다 배양액을 교환해 주었으며, 배양 환경은  $37^\circ\text{C}$  포화 습도로 유지되는 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였다. HMC-1 세포는 24 well 배양용기에서 배양한 후 각 농도의 목단피를 1시간 전 처리한 후 PMA와 A23187을 처리하여 세포를 얻어 실험에 사용하였다.

| Reagent   | Company                       | Country |
|---|-------------------------------|---------|
| Anti-NF- $\kappa$ B, Anti-p-I- $\kappa$ B, Anti-lamine B<br>Anti-phospho-ERK1/2, Anti-phospho-p38<br>Anti-phospho-JNK, Anti-ERK2<br>Anti-p38, Anti-JNK1, Anti-TNF- $\alpha$ | Santacruz Biotechnology       | USA     |
| random hexamer  | Amersham Bioscience           | USA     |
| Reverse transcriptase<br>Lipofectamine2000  | Invitrogen                    | USA     |
| DNA polymerase<br>Easy Blue   | TaKaRa<br>Intron              | Korea   |
| Nitrocellulose membrane   | Schleicher&Schuell Bioscience | Germany |
| p-NF- $\kappa$ B luciferase   | Stratagene                    | USA     |

## 2. 실험방법

### 1) 수동적 피부 즉시형 과민반응

(Passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 측정

털을 깎은 SD-rat의 등 세 곳에 anti-DNP IgE 10 ug을 피내 주사하였다. 48 시간 후 PBS에 녹인 5 mg의 DNP-HSA와 4%의 evans blue (1:4) 혼합액 50  $\mu$ l를 정맥에 주사하였다. MC는 DNP-HSA를 주사하기 1시간 전에 200 mg/kg으로 경구 투여하였다. DNP-HSA를 주사한지 30 분 후에 색소 부위를 측정하기 위해 rat의 등쪽 피부를 취하였다. 얻어진 피부를 5 ml의 formamide를 넣고 55 $^{\circ}$ C 오븐에서 24시간동안 색소를 용출시켰다. 그리고 상등액을 취해 spectrophotometer 620 nm에서 측정하였다.

### 2) 흰쥐의 복강내 비만세포 분리

흰쥐의 복강내 비만세포를 분리하기 위해 복강내에 tyrode buffer A (10 mM HEPES, 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.75 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> & 0.1% bovine serum)를 10 ml 주입하고, 약 90 초간 복막을 부드럽게 맛사지한 후

복막을 열어 파스테르 파이펫으로 세포를 모았다. 모든 복강내 세포들은 150 $\times$ g에서 10 분간 원심분리한 후 모아진 세포를 tyrode buffer 로 풀어주고 Hachiskuka et. al.<sup>13)</sup>의 방법을 이용하여 비만세포를 분리하였다. 비만세포는 toluidine blue 염색을 통해 확인하였다.

### 3) Histamine 측정

분리된 비만세포를 tyrode buffer를 이용하여 2 $\times$ 10<sup>5</sup> cells로 풀어준 뒤, MC를 0.05~0.2 mg/ml의 농도로 10분전 처리하고 난 다음 compound 48/80 (5 ug/ml)를 처리하여 20분간 반응시켰다. 세포에서 분비된 histamine 측정을 위해 400 $\times$ g에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 얻은 후, histamine kit를 이용하여 효소면역검사(enzyme immuno assay)방법으로 450 nm에서 측정하였다. Histamine 분비 억제율은 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{Histamine 분비 억제율(\%)} = (A-B) \times 100 / A$$

이때 A는 전처리 없이 compound 48/80으로 유도된 세포의 histamine 분비량이며, B는 MC로 처리한 후 세포의 histamine 분비량을 나타낸다.

#### 4) MTS assay

HMC-1에 MC를 농도별로 처리한 후 MTS로 생존율을 조사하였다. 세포를 24-well culture plate에 각각  $1 \times 10^6$  개가 되도록 심어준 후 MC를 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml로 1시간 전 처리 후 25 nm PMA와 1  $\mu$ M A23187을 24시간동안 처리한 후 MTS를 최종농도 0.25 mg/ml로 넣어 2시간 반응하였다. 490 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 MC의 세포독성 효과를 조사하였다.

#### 5) Cytokine 측정방법

배양된 HMC-1세포에서 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용하여 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8을 측정하였다. 즉 anti-human TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 capture 단클론 항체를 96 well plate에 각각 2  $\mu$ g/ml 로 코팅하고 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 반응시켰다. 코팅 후 비특이성 반응을 막기 위해서 10% FBS를 함유한 PBS(phosphate buffered saline)로 구성된 blocking solution을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응하였다. 다시 0.05% tween 20을 함유한 PBS인 washing buffer로 4회씩 세척한 후 표준이 되는 재조합 단백질 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8을 적절한 농도로 계대 희석하여 준비하고, 배양 상등액을 희석하여 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시켰다. 다시 washing buffer로 4회씩 세척한 후 biotinylated anti-human TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8을 blocking solution을 이용하여 300 ng/ml의 농도로 희석한 후 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 washing buffer로 4회 세척한 후 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate enzyme를 2.5  $\mu$ g/ml 농도로 각 well에 처리한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응한 후 4회 세척하였다. 기질액을 각 well에 50  $\mu$ l씩 가하여 20분간 발색을 유도한 다음 2N 황산을 이용하여 반응을 멈추

고 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8의 단백질 양을 측정하였다.

#### 6) Reverse transcription-PCR 검사

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

분리된 총 RNA 2  $\mu$ g에 random hexamer 2.5  $\mu$ g과 DEPC를 처리한 물을 가하고 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 뒤 얼음에서 2분간 식혔다. 5 $\times$ first strand buffer와 0.1 M DTT, 10 mM dNTP, 200 unit M-*ml*V reverse transcriptase 그리고 DEPC 처리한 증류수를 가하여 총 30  $\mu$ l가 되게 하고 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 뒤 cDNA를 만들었다. PCR은 2.5  $\mu$ 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  $\mu$ M, 1  $\times$  PCR

buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> 그리고 2.5 unit *Taq* DNA polymerase를 혼합하여 시행하였다. PCR 조건은 95°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 하였다. 반응액 중 cycle 별로 각각 5 μl를 취해서 2.0% 한천 겔에 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 PCR산물을 확인하였다.

#### 7) 핵 및 세포질 단백질 분리

얻어진 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 그리고 0.2 mM PMSF로 조성된 buffer를 100 μl 넣고 섞어준다. 얼음에서 5분간 반응시킨 후 5,000 rpm에서 4분간 원심분리하여 덩어리만 얻는다. 그 후 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP-40, 0.5 mM DTT, 그리고 0.2 mM PMSF가 포함된 버퍼 60 μl를 넣고 15분간 반응시킨 후 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 얻는다. 다음으로 남겨진 pellet에 20 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 그리고 0.2 mM PMSF가 포함된 버퍼 40 μl를 넣고 30분간 반응시킨 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻는다. 분리하여 얻은 세포질과 핵 단백질은 Bradford assay(Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) 방법을 이용하여 정량하여 사용하였다.

#### 8) Western blot 분석

얻어진 세포를 차가운 PBS로 두 번 세척한 후 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA, 120 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.1% nonidet P-40, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and P1 혼합물이 포함된 lysis buffer를 사용하여 흔들어 섞어 준 후 ice에서 30분간 반응시켰다. 그리고 난 후 4°C, 13,000 rpm에서 20분

간 원심분리하여 상층액을 취하여 총 단백질을 얻었다. 얻은 총 단백질을 Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) 방법을 이용하여 정량한 다음 40 μg의 단백질을 15% acrylamide gel에 전기영동하였다. 이것을 nitrocellulose membrane에 옮겨 PBST에 1% skim milk와 1% BSA가 들어간 blocking 용액에서 1시간 동안 blocking한 후 PBST로 5분 간 2회 세척하였다. Anti-α-tubulin, anti-NF-κB, anti-p-I-κB, anti-lamineB anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-phospho-JNK, anti-ERK2, anti-p38, anti-JNK1, anti-TNF-α 항체를 이용하여 1차 항체반응을 4°C에서 16시간 반응시킨 다음 PBST로 2차 항체반응을 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 10분, 15분, 30분간 세척한 후 ECL로 발광하여 X-ray film에 노출시켜 단백질 발현 분석을 실시하였다.

#### 9) Luciferase assay 방법

세포에 유전자 도입을 위해 transfection을 수행하였다. 우선 HMC-1세포를 1×10<sup>6</sup>으로 12 well에 접종시킨 후 Lipofectamine 2000을 이용하여 p-NF-κB luciferase를 혈청이 없는 배지 상태에서 일시적으로 transfection하였다. 6시간 후 혈청이 있는 배지로 갈아주고, 24시간을 배양하였다. 그 후 MC를 1시간 전 처리한 후 25 mM PMA와 1 μM A23187을 24시간 동안 반응시켰다. 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 lysis buffer를 이용하여 세포를 용해시켰다. 흔들어 세포를 섞은 다음, 12,000 rpm, 4°C, 3분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻은 상층액은 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다. Luciferase assay를 위해 보관 중인 세포용해된 상층액 100 μl를 상온에서 Luciferase substrate 20 μl씩 불투명한 96well에 넣어 luminometer (1420 luminescence counter, Perkin Elmer)로 측정하였다. Luciferase activity

는 측정값을 총 단백질량으로 나누어 수치를 구한 뒤 (relative light units per milligram of protein), transfection된 정상세포를 기준으로 fold 값을 구하였다.

10) 통계분석

본 실험에서 결과는 측정값의 평균±표준편차값을 기준으로 통계분석하였다. 실험 결과값의 통계적 분석을 위해 independent *t*-tests를 사용하여 각 실험군간의 유의성을 분석하였고, 그 유의수준은  $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 비만세포에서 MC의 histamine 분비 억제 효과

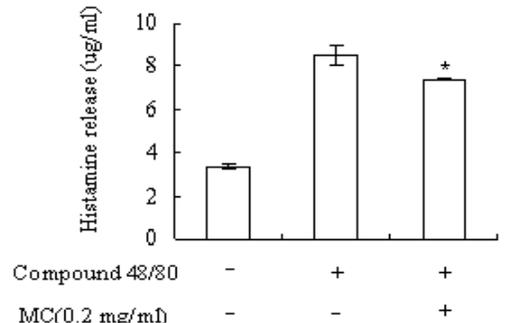


Fig. 1. The inhibitory effect of MC on compound 48/80-induced histamine release of rat peritoneal mast cells.

MC is the essence extracted Moutan Cortex. The mast cells ( $4 \times 10^5$  cell/ml) were treated with 0.2 mg/ml of MC for 10 min and then treated with compound 48/80 for 20 min.

\* Statistically significant difference from the compound 48/80 value at  $p < 0.05$ .

흰쥐의 복강내 비만세포로부터 compound 48/80으로 유도된 histamine 분비량과 MC를 10분전 처리 후

histamine 분비량을 측정한 결과, compound 48/80을 단독 처리한 세포는  $8.47 \pm 0.48$  ug/ml로, MC를 0.2 mg/ml 농도로 처리한 군은  $7.43 \pm 0.04$  ug/ml로 억제되어 나타났다(Fig. 1). ( $p < 0.05$ ).

2. 수동적 피부 즉시형 과민반응 (PCA) 측정 결과

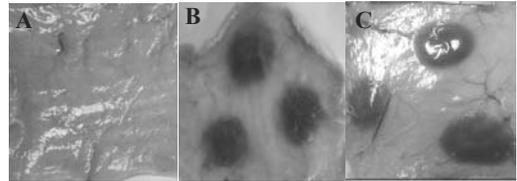


Fig. 2. Challenge with the antigen (DNP-HSA) after a photogram of the internal surface of rat skin.

- A. Normal; none treated
- B. Control (DNP-HSA); taked saline solution by mouse
- C. taked 200 mg/kg MC p.o. by mouse

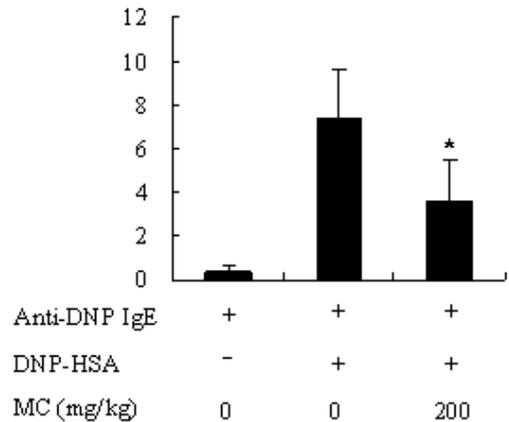


Fig. 3. Effect of administering MC (200 mg/kg) on PCA in rat.

MC is the essence extracted Moutan Cortex. The amount of dye is presented as the mean±S.E.M.

\* Statistically significant difference from control cells value at  $p < 0.05$ .

200 mg/kg의 MC를 경구 투여한 후 용출된 색소량을 정량한 결과 생리식염수를 경구투여한 대조군과 비교해 보았을 때 피부의 색소의 양이 감소되어 나타났으며, 파란색 색소의 용출량에서도 50%이상의 억제율을 나타내어 의미있게 감소되었다(Fig. 2, 3). ( $p < 0.05$ ).

### 3. HMC-1세포에서 MC의 세포독성 효과

MC가 비만세포의 세포독성에 미치는 효과에 대해 실험하였다. MC를 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml의 농도로 처리한 후 세포독성을 MTS분석을 이용해 측정하였다. 그 결과 대조군 세포를 100%로 보았을 때, MC 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml 각각의 농도에서 별다른 세포독성을 나타나지 않았다(Fig. 4). 따라서 본 연구는 MC 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml의 농도를 사용하였다.

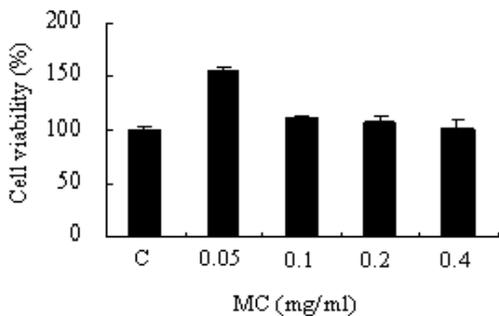


Fig. 4. Effect of MC on cell viability of activated mast cells.

MC is the essence extracted Moutan Cortex. The HMC-1 cells ( $1 \times 10^6$  cell/ml) were treated with indicated concentration (0.05 mg/ml to 0.4 mg/ml) of MC for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 24 h. The percentage from each treatment were relative to the control (PMA plus A23187, 100%). C, control ; the HMC-1 cells were treated with PMA plus A23187.

### 4. HMC-1세포에서 MC의 TNF- $\alpha$ 억제 효과

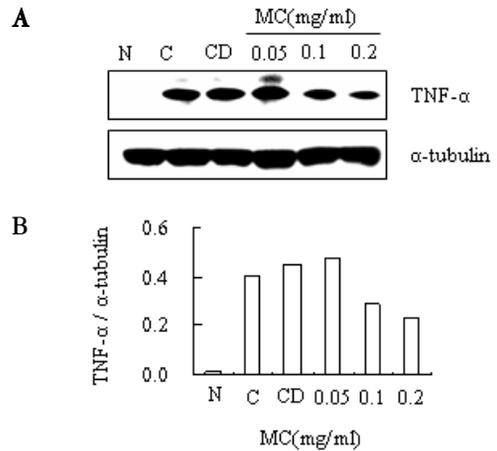


Fig. 5. The inhibitory effect of MC on PMA plus A23187-stimulated TNF- $\alpha$  protein levels.

MC is the essence extracted Moutan Cortex. The HMC-1 cells ( $1 \times 10^6$  cells/ml) incubated with various concentrations (0.05, 0.1, 0.2 mg/ml) of MC for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h.

The TNF- $\alpha$  protein levels were measured with the Western blot analysis (A).

The TNF- $\alpha$  protein levels were measured by densitometry (B).

N; normal cells; none treated cells.

C; control cells; the cells were treated with PMA plus A23187.

CD; control cells: DMSO

0.05; MC (0.05 mg/ml)+PMA plus A23187

0.1; MC (0.1 mg/ml)+PMA plus A23187

0.2; MC (0.2 mg/ml)+PMA plus A23187

TNF- $\alpha$ 의 단백질 발현량을 조사한 결과, MC의 각각 0.1 mg/ml과 0.2 mg/ml농도에서 TNF- $\alpha$ 의 단백질 발현이 현저히 감소되었다(Fig. 5A, 5B). HMC-1에서 TNF- $\alpha$ 의 분비량을 ELISA방법을 통해 측정된 결과 MC 0.05 mg/ml의 농도에서 TNF- $\alpha$  생성량이  $5.194 \pm 0.228$  ng/ml, MC 0.1 mg/ml의 농도에서는  $4.655 \pm 0.153$  ng/ml, MC 0.2 mg/ml의 농도에서는  $3.109 \pm 0.068$  ng/ml로 농도 의존적으로 감소되어 PMA(25 ng/ml)와 A23187(1  $\mu$ M)으로만

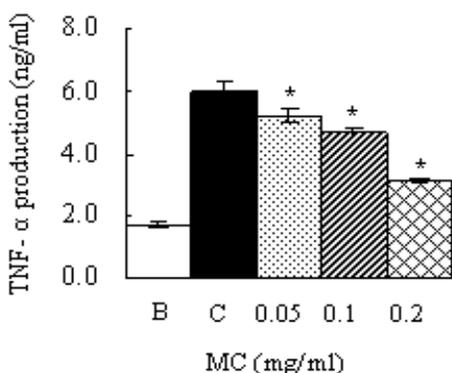


Fig. 6. The inhibitory effect of MC on PMA plus A23187-stimulated secretion of TNF- $\alpha$ .

MC is the essence extracted Moutan Cortex. The HMC-1 cells ( $1 \times 10^6$  cells/ml) incubated with various concentrations (0.05, 0.1, 0.2 mg/ml) of MC for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h. The TNF- $\alpha$  secretion levels were measured with the ELISA method.

\* Statistically significant difference from control cells value at  $p < 0.05$ .

B; normal cells; none treated

C; control cells; PMA plus A23187

0.05; MC (0.05 mg/ml)+PMA plus A23187

0.1; MC (0.1 mg/ml)+PMA plus A23187

0.2; MC (0.2 mg/ml)+PMA plus A23187

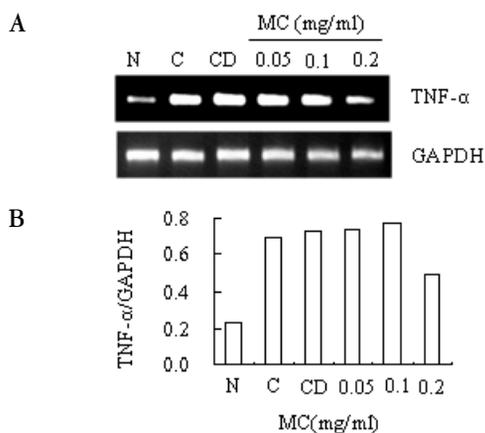


Fig. 7. Effect of MC on PMA plus A23187-stimulated TNF- $\alpha$  mRNA levels.

MC is the essence extracted Moutan Cortex. The HMC-1 cells ( $1 \times 10^6$  cell/ml) incubated with various concentrations (0.05, 0.1, 0.2 mg/ml) of MC for

1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h. The TNF- $\alpha$  mRNA levels were measured with the RT-PCR analysis (A).

The TNF- $\alpha$  mRNA levels were measured by densitometry (B).

N; normal cells; none treated

C; control cells; PMA plus A23187

CD; DMSO control cells

0.05; MC (0.05 mg/ml)+PMA plus A23187

0.1; MC (0.1 mg/ml)+PMA plus A23187

0.2; MC (0.2 mg/ml)+PMA plus A23187

유도된 TNF- $\alpha$ 의 생성량  $5.984 \pm 0.315$  ng/ml 보다 낮은 분비량을 보였다( $p < 0.05$ , Fig. 6). 하지만, RT-PCR을 통한 mRNA의 발현에서는 MC 0.2 mg/ml 농도에서만 억제현상을 나타내었다(Fig. 7A, 7B).

## 5. HMC-1세포에서 MC의 IL-6 억제 효과

HMC-1에서 IL-6의 분비량을 ELISA방법을 통해 측정한 결과, MC 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml의 농도에서 각각  $0.401 \pm 0.013$  ng/ml,  $0.356 \pm 0.015$  ng/ml,  $0.249 \pm 0.007$  ng/ml의 농도를 나타내어, 대조군의  $0.497 \pm 0.006$  ng/ml에 비해 농도의존적인 분비 감소를 보였다( $p < 0.05$ , Fig. 8). 또한 RT-PCR 방법으로 mRNA 발현량을 확인한 결과, IL-6의 mRNA 발현을 억제하는 관찰할 수 없었다(Fig. 9A, 9B).

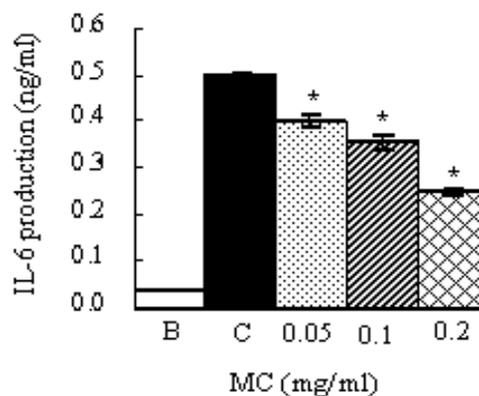


Fig. 8. The inhibitory effect of MC on PMA plus A23187-stimulated IL-6 secretion.

MC is the essence extracted Moutan Cortex.

The HMC-1 cells ( $1 \times 10^6$  cell/ml) incubated with various concentrations (0.05, 0.1, 0.2 mg/ml) of MC for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h.

The IL-6 secreted protein levels in the supernatant were measured with the ELISA assay.

\* Statistically significant difference from control cells value at  $p < 0.05$ .

B, normal cells; none treated

C, control cells; PMA plus A23187

0.05; MC (0.05 mg/ml)+PMA plus A23187

0.1; MC (0.1 mg/ml)+PMA plus A23187

0.2; MC (0.2 mg/ml)+PMA plus A23187

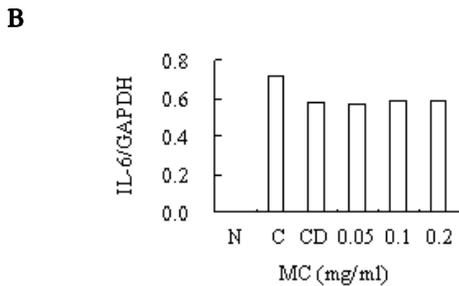
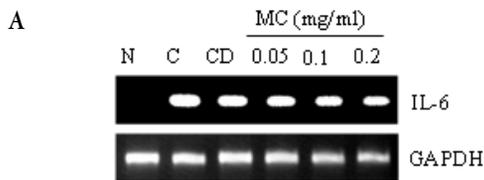


Fig. 9. The inhibitory effect of MC on PMA plus A23187-stimulated IL-6 mRNA levels.

MC is the essence extracted Moutan Cortex.

The HMC-1 cells ( $1 \times 10^6$  cell/ml) incubated with various concentrations (0.05, 0.1, 0.2 mg/ml) of MC for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h.

The IL-6 mRNA levels were measured with the RT-PCR analysis (A).

The IL-6 mRNA levels were measured by densitometry (B).

N, normal cells; none treated

C, control cells; PMA plus A23187

CD, DMSO control cells

0.05; MC (0.05 mg/ml)+PMA plus A23187

0.1; MC (0.1 mg/ml)+PMA plus A23187

0.2; MC (0.2 mg/ml)+PMA plus A23187

## 6. HMC-1세포에서 MC의 IL-8 억제 효과

HMC-1에서 IL-8의 분비량을 측정한 결과 MC 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml의 모든 농도에서 IL-8의 억제 현상은 관찰할 수 없었다( $p < 0.05$ , Fig. 10). IL-8의 mRNA 발현량은 MC 0.2 mg/ml 농도에서 억제를 보였다(Fig. 11).

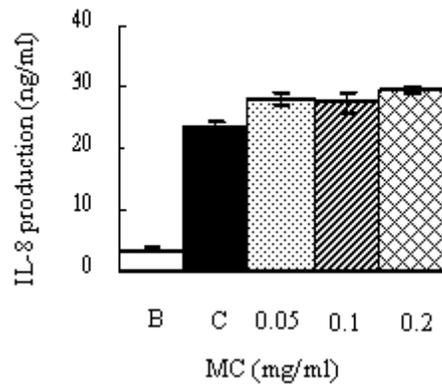


Fig. 10. The inhibitory effect of MC on PMA plus A23187-stimulated IL-8 secretion.

MC is the essence extracted Moutan Cortex.

The HMC-1 cells ( $1 \times 10^6$  cell/ml) incubated with various concentrations (0.05, 0.1, 0.2 mg/ml) of MC for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h. The IL-8 secreted protein levels in the supernatant were measured with the ELISA assay.

\* Statistically significant difference from the PMA plus A23187 value at  $p < 0.05$ .

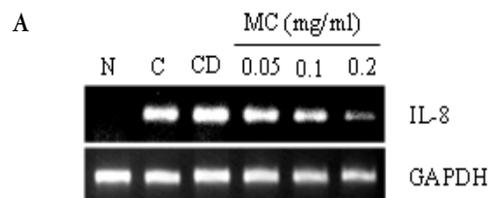
B; normal cells; none treated

C; control cells; PMA plus A23187

0.05; MC (0.05 mg/ml)+PMA plus A23187

0.1; MC (0.1 mg/ml)+PMA plus A23187

0.2; MC (0.2 mg/ml)+PMA plus A23187



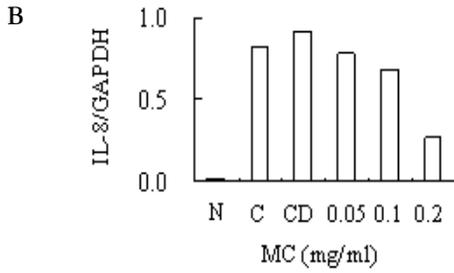


Fig. 11. The inhibitory effect of MC on PMA plus A23187-stimulated IL-8 mRNA levels.

MC is the essence extracted Moutan Cortex. The HMC-1 cells ( $1 \times 10^6$  cell/ml) incubated with various concentrations (0.05, 0.1, 0.2 mg/ml) of MC for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h. The IL-8 mRNA levels were measured with the RT-PCR analysis (A). The IL-8 mRNA levels were measured by densitometry (B).  
 N, normal cells; none treated  
 C, control cells; PMA plus A23187  
 CD, DMSO control cells  
 0.05; MC (0.05 mg/ml)+PMA plus A23187  
 0.1; MC (0.1 mg/ml)+PMA plus A23187  
 0.2; MC (0.2 mg/ml)+PMA plus A23187

### 7. HMC-1세포에서 MC의 MAPKs 억제효과

MC의 MAPKs의 활성을 시험하기 전 우선, 비만세포에서 PMA와 A23187로 유도되었을 때 MAPKs가 어느 시간에 활성화 되는지 알아보기 위해 시간별로 조사해 보았다. PMA와 A23187을 0 시간, 0.5 시간, 1 시간, 4 시간동안 처리하여 p38, ERK, JNK에 대해서 Western blot 분석을 한 결과 PMA와 A23187을 처리한지 0.5 시간에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 12). 이런 결과를 바탕으로 MC의 MAPKs 억제율을 측정하기 위해 MC 0.1 mg/ml과 0.2 mg/ml의 농도로 처리한 결과 MC 0.2 mg/ml의 농도에서 인산화된 ERK, p38, JNK의 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 13).

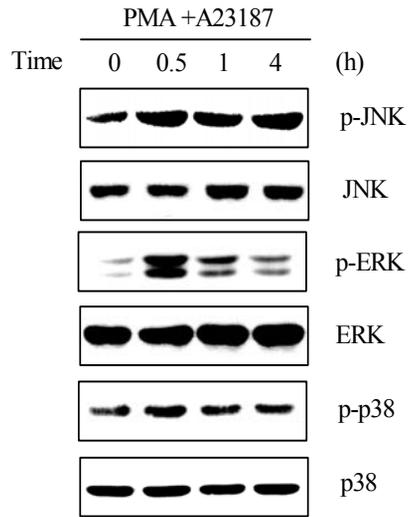


Fig. 12. Time course of MAPKs in PMA plus A23187-induced HMC-1 cells.

MC is the essence extracted Moutan Cortex. Cells were treated with PMA plus A23187 for 0, 0.5, 1, and 4 h. Phosphorylated-and total MAPKs were measured with the Western blot analysis.

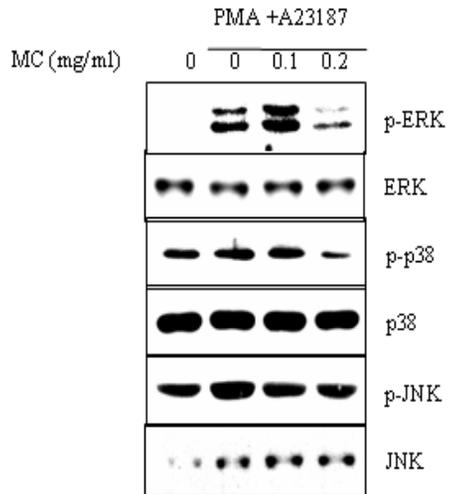


Fig. 13. The inhibitory effect of MC on PMA and A23187-activated MAPKs in HMC-1 cells.

MC is the essence extracted Moutan Cortex. Cells were treated with PMA plus A23187 or pretreated with MC, for 1 h. Phosphorylated MAPKs were measured with the Western blot analysis.

8. HMC-1세포에서 MC의 NF-κ B 억제효과

Western blot 분석을 통해 NF-κ B 및 인산화된 I-κ B의 단백질 발현정도를 관찰한 결과 핵 안에 존재하는 NF-κ B는 PMA와 A23187로 유도된 후 증가한 반면, MC 0.1, 0.2 mg/ml의 농도로 처리하였을 때 핵 내 NF-κ B 단백질이 뚜렷하게 감소되어 있음을 확인하였다. 더욱이 인산화된 I-κ B(p-I-κ B)의 발현 또한 MC 0.1 mg/ml과 0.2 mg/ml의 농도에서 농도 의존적으로 현저하게 감소되어 나타났다(Fig. 14).

다음으로는 NF-κ B의 프로모터 활성에 대해 알아보기 위해 luciferase assay를 수행하였다. NF-κ B의 프로모터가 있는 유전자를 비만세포에 일시적으로 transfection한 후 MC 0.2 mg/ml의 농도로 1 시간 전 처리하고 PMA와 A23187로 24 시간 동안 처리하여 NF-κ B 프로모터 활성을 유도한 결과, MC를 처리한 세포에서는 PMA와 A23187을 처리한 세포의 NF-κ B 프로모터 활성보다 유의성 있게 감소되었다(p < 0.05, Fig. 15).

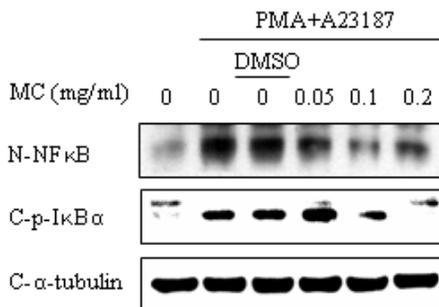


Fig. 14. The inhibitory effect of MC on PMA plus A23187-stimulated NF-κ B activation and I-κ B α phosphorylation.

MC is the essence extracted Moutan Cortex. The HMC-1 cells (1 × 10<sup>6</sup> cell/ml) were incubated with MC (0.05, 0.1, 0.2 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, and α

-tubulin protein with Western blot analysis. α-tubulin is loading controls for cytosolic extracts, respectively.

N, nuclear extract;  
C, cytosol extract  
CD, DMSO control.

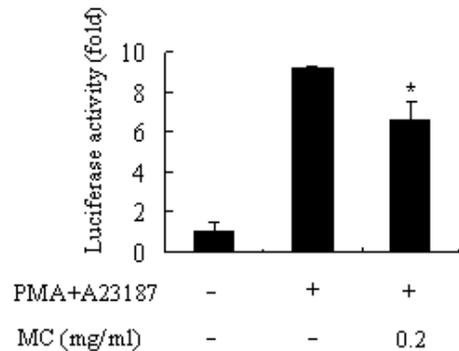


Fig. 15. The inhibitory effect of MC on activation of NF-κ B promoter region.

MC is the essence extracted Moutan Cortex. Cells were transiently transfected with the NF-κ B luciferase reporter gene. Then, the cells were incubated with PMA plus A23187 with or without MC (0.2 mg/ml). The NF-κ B promoter activity was examined with a luciferase assay.

\* Statistically significant difference from the PMA plus A23187 value at p < 0.05.

고 찰

목단피(Moutan Cortex)는 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속한 여러해살이풀 모란 *Paeonia Suffruticosa* Andr.의 뿌리껍질을 건조한 것으로 성질은 약간 차며 맛은 쓰고 매우며 독은 없다<sup>8,9)</sup>. 효능은 淸熱涼血, 活血祛瘀하여 溫病發斑, 癰腫瘡毒, 跌撲傷痛, 吐血衄血, 夜熱早涼, 無汗骨蒸, 經閉痛經을 치료한다<sup>10,11)</sup>. 약리작용으로는 진통·진정·해열·항경련작용과 항염증작용, 혈전 형성 억제작용, 항균작용 등이 있다. 임상에서는 과민성

비염, 습진, 피부소양증, 고혈압과 각종 동통 치료에 사용하였다<sup>12)</sup>.

목단피는 한의학적으로 각종 염증질환에 사용되어 왔고 최근 연구는 항염증 효능을 확인하는 보고들이 있다. 본 연구에서는 동물실험인 PCA 반응 시험과 쥐 비만세포의 histamine 분비 억제를 통해 목단피의 항알레르기 효과와 비만세포주인 HMC-1 세포에 PMA와 A23187로 자극하여 분비되는 염증매개물질 억제를 통해 항염효과를 보여 줌으로써, 목단피가 제1형 즉시형 과민증으로 나타나는 알레르기 및 염증반응을 조절하는 효과가 있음을 분자생물학적으로 확인해 보고자 하였다.

제1형 즉시형 과민반응은 다음의 3단계로 구분하여 설명할 수 있다<sup>14)</sup>. 제1단계는 IgE항체의 생성과 감각의 단계이다. 인체에 들어온 외인성 항원이나 생체에서 유래한 내인성 항원은 대식세포에 의해 처리되어 T림프구와 B림프구를 자극한다. 이때 B림프구는 helper T림프구의 보조를 받아 형질세포로 분화되어 IgE 항체를 생성, 분비하며 생성된 IgE항체는 비만세포나 호염구의 세포막 표면에 있는 고친화성 IgE수용체(Fc $\epsilon$ RI)에 결합하여 감각이 성립된다<sup>15)</sup>. 제2단계는 탈과립의 단계로 다시 침입한 동일한 항원이 비만세포나 호염구에 결합되어 있는 IgE항체 사이에서 교차결합(cross-linking)을 형성하면 세포막 내의 인지질들의 메틸화가 촉진되고 막의 유동성이 증가되어 세포내로 Ca<sup>2+</sup>의 유입이 증가하고 Ca<sup>2+</sup>의 증가는 비만세포의 활성화와 세포질을 채우고 있는 50~200개의 큰 과립 내에 histamine, heparin, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 그리고 다른 분해효소들과 염증매개물 등을 탈과립한다<sup>2)</sup>. 제3단계에서는 분해효소들과 염증매개물에 의해 모세혈관의 투과성 항진, 평활근 수축 및 점액 분비증가로 인해 알레르기 비염, 아토피 피부염, 천식, 두드러기, 알레르기성 결막염, 알레르기성 위장염 등의 질환이 발생하게 된다<sup>2)</sup>.

이 실험에 사용된 비만세포는 알레르기 반응의 주

된 세포로 알려져 있고 내재면역반응에 중요한 역할을 하는 cytokine을 생성하기도 한다. 비만세포의 모세포는 골수를 벗어나서 신체 내부의 표면에 있는 점막과 상피조직에 상주하고 있으며, 국소적인 외상과 감염에 대하여 면역계를 경계시키는 역할을 제공한다. 비만세포는 항체가 표면의 수용체와 결합하면 활성화되어 과립단백을 세포 밖으로 유출시키는데 이때 histamine, 신경분해효소, cytokine, acid hydrolases, proteoglycans 등 이미 생성된 화학매개체들이 유리된다. 비만세포 과립 내에는 다양한 cytokine(IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ )이 존재하며 알레르겐이나 cytokine으로 활성화된 비만세포는 cytokine의 생성과 분비를 증가시키게 된다. 비만세포의 활성화 경로는 다양하나 전형적인 경우는 비만세포나 호염기구 표면에만 존재하는 고친화성 IgE 수용체(Fc $\epsilon$ RI)에 결합한 IgE에 다가항원(multivalent allergen)이 교차결합하여 이루어진다. 항원이외에도 비만세포는 다른 물질들 즉 calcium ionophore A23187, basic polypeptide, chemokine, substance P, eosinophil granule protein, morphine sulfate, anaphylatoxins (C3a, C5a) 등과도 반응한다<sup>2,14)</sup>.

비만세포의 탈과립에 의해 분비되는 histamine은 혈관에 대한 투과성 항진과 확장작용, 점막표면에 대한 선세포의 분비항진작용, 기관지 평활근에 대한 수축작용을 일으켜 즉시형 과민반응을 주도한다<sup>16)</sup>. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 등의 사이토카인은 T세포에 의해 주로 분비되어 염증반응을 촉진하고 지속시켜 인체에 국소적, 전신적 효과를 미친다. TNF- $\alpha$ 는 IL-1b, IL-6, IL-8 그리고 Granulocyte macrophage colony-stimulating factor 등을 포함하는 다른 염증 사이토카인의 강력한 유도인자일 뿐만 아니라 하나의 자가 분비 매개체이다<sup>17,18)</sup>. IL-6는 T세포와 B세포의 성장과 분화에 관여하고 비만세포의 증식에 기여하며 일종의 염증 유도성 cytokine으로 염증 진행 과정의 강력한 매개자이다<sup>14,19,20)</sup>. IL-8은 손상된 조

직이나 감염의 장소로 백혈구를 유인하고 호중구와 T세포를 감염된 부위로 유인하고 활성화하는 작용을 한다<sup>2)</sup>.

NF- $\kappa$ B는 휴지기의 세포에서 p50과 p65가 결합한 heterodimer로 DNA결합에 필요한 N-말단부위에 inhibitor kappa B(I- $\kappa$ B)라고 불리는 저해제에 직접 결합하여 활성이 억제된 상태로 세포질에 존재한다. I- $\kappa$ B kinase(IKK)라는 protein kinase 복합체는 NF- $\kappa$ B를 활성화하는 세포 밖 신호를 변환시키는 역할을 한다. 자극이 주어진 후 수분 이내에 IKK가 활성화되고 I- $\kappa$ B의 N-말단에 있는 두 개의 serine부분을 phosphorylation시킨다. 그 다음에 E3 ubiquitin ligase가 이러한 phosphoserine부분에 결합하여 I- $\kappa$ B를 poly-ubiquitination시키고 proteosome에 의한 분해를 일으킨다. I- $\kappa$ B가 제거되면 NF- $\kappa$ B는 소단위에 있는 nuclear-location signal을 노출시키고 핵으로 이동 후 여러 목적 유전자의 전사를 시작한다<sup>21)</sup>. 이렇게 NF- $\kappa$ B가 활성화 되고 세포내 생성량이 증가되면 AP-1(activator protein-1:T세포 활성화 전사인자)등과 함께 각종 염증매개물을 합성하도록 유도하는 전사인자로서의 기능을 가지게 된다<sup>22)</sup>. NF- $\kappa$ B는 감염, 염증, ionizing radition과 같은 스트레스 자극과 염증 cytokine이라 불리는 TNF- $\alpha$ , IL-1에 의해서도 활성화되어, cytokine이나 chemokine을 포함하여 150개 이상의 유전자 전사를 자극하고 호중구를 혈액에서 조직으로 이동시키는데 관여하는 receptor의 발현을 촉진한다<sup>21)</sup>.

MAPKs 경로란 진핵세포의 신호전달에서 중심적인 역할을 하는 일련의 단백질 인산화효소가 연속되는 경로를 말한다<sup>23)</sup>. 세포질 내부의 신호를 세포내의 핵으로 전달하는데 관여하여 포유동물의 세포에서 다양한 생화학적 반응, 즉 세포의 성장, 분화, 사멸 등을 매개한다<sup>24)</sup>. 이 경로의 중심은 MAPKs(Mitogen-activated protein kinases)라는

serine/threonine protein kinases로 세포막에 여러 성장인자(growth factor)와 다른 신호전달 물질에 의해 활성화되어 세포핵으로 들어가 인산화 반응을 통해 전사인자의 활성을 조절하고 세포질 내에 다른 protein kinase를 인산화시킨다<sup>23)</sup>. 인산화로 활성화된 MAPKs가 핵의 전사인자(nuclear transcription factor)를 활성화시키면 DNA전사가 일어나게 된다. 사람에게에는 p38 kinase, ERK(extracellular signal regulated kinase, JNK(stress-activated c-Jun N-terminal kinase) 등의 MAPK 아형이 존재한다. ERK는 주로 표피 성장인자(epidermal growth factor, EGF)에 의해 활성화 되고, 세포내의 다른 신호전달 체계에 관여하기도 한다. JNK는 열충격(heat shock), cytokines, 삼투불균형(osmotic imbalance), 자외선 조사등의 세포 스트레스에 의해 활성화된다. p38 kinase는 지질다당질 분자나 삼투압과 관련된 세포 스트레스에 의해 활성화 된다<sup>3,24)</sup>. ERK1/2는 NF- $\kappa$ B를 활성화시키고<sup>25)</sup>, p38은 mRNA 수준에서 TNF- $\alpha$ 의 stability와 translation을 통제한다<sup>26)</sup>.

또한 JNK를 포함한 MAPKs를 활성화시키는 NF- $\kappa$ B 유발 kinases는 IKK를 인산화 시킨다<sup>27)</sup>. MAPKKK(the mitogen-activated protein kinase kinase kinase)가 변형된 TAK1(growth factor- $\beta$ -activated kinase-1)은 TAB(TAK1-binding protein)-1과 결합한다<sup>28,29)</sup>. TRAF6(tumor necrosis factor receptor-associated factor6)-IRAK(IL-1 receptor-associated kinase) 복합체는 TAK1과 결합하여 TAK1을 인산화하여 활성화시킨다<sup>30,31)</sup>. TAK1은 JNK를 활성화시키고 JNK는 다시 IKK를 활성화시켜 I- $\kappa$ B를 인산화하여 결국 NF- $\kappa$ B를 활성화시킨다<sup>29)</sup>.

이와 같이 알레르기 염증반응은 다양하고 연쇄적인 반응에 의해 발생하며 histamine, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, NF- $\kappa$ B, MAPKs 등의 염증매개물 생

성이 중요한 역할을 하고 이들의 생성량 조절이 항염증효과에 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. 이중 NF- $\kappa$ B와 MAPKs는 보다 중요한 의미를 가지는데 NF- $\kappa$ B는 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8과 같은 염증매개물의 합성을 유도하는 전사인자의 기능을 가지고 있고, MAPKs는 IKK의 활성화를 통해 NF- $\kappa$ B의 활성화를 조절하고 직접 핵으로 들어가 전사인자로서 작용하기 때문이다. 따라서 NF- $\kappa$ B와 MAPKs의 활성화 감소는 항염증효과를 유도한다는 것이다.

이에 본 실험에서는 MC의 항알레르기 및 항염증 효과를 알아보기 위해 비만세포를 사용해 histamine, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, NF- $\kappa$ B, MAPKs의 분비량과 활성화도를 조사하였다.

흰쥐의 복강내 비만세포는 MC 0.2 mg/ml에서 histamine이 감소되어 나타났고, 수동적 피부 즉시형 과민 반응에서 MC는 현저한 억제현상을 보였다. 이 결과로 목단피가 비만세포 매개 IgE 의존적인 알레르기 반응에 억제 효능이 있을 것으로 사료된다.

Calcium ionophore인 A23187는 세포내 칼슘의 농도를 증가시켜 비만세포의 활성화를 통해 탈과립을 유도하며, PMA는 protein kinase C에 직접 작용하는 분열 촉진제로서 비만세포를 활성화시켜 세포활성물질을 분비하게 한다. 하지만, PMA 단독으로는 비만세포의 탈과립이 나타나지 않으므로, 본 연구에서는 A23187과 PMA를 모두 사용하였다. A23187과 PMA로 자극된 HMC-1에서 MC의 세포독성을 살펴보기 위하여 MTS assay를 실행한 결과 MC는 0.05~0.4 mg/ml의 농도까지 HMC-1 세포에 별다른 영향을 주지 않은 것으로 확인되었다.

MC를 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml의 농도로 처리하여 ELISA 방법으로 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8을 분비량을 측정된 결과 TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 MC 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml의 농도에서 농도 의존적으로 분비량이

억제되는 것이 보였으나, IL-8의 분비량에서는 MC 0.05 mg/ml에서 0.2 mg/ml의 어떠한 농도에서도 억제현상을 관찰할 수 없었다. 그리고 mRNA의 발현율을 확인하기 위해 RT-PCR을 시행한 결과 TNF- $\alpha$ 와 IL-8의 mRNA 발현율은 0.2 mg/ml에서 감소되었으나, IL-6의 mRNA 발현율은 모든 농도에서 변화가 없었다. TNF- $\alpha$ 의 단백질 발현을 보기 위한 Western blot 검사에서 MC 0.1mg/ml와 0.2 mg/ml의 농도에서 현저히 감소하였다. 이 결과로 미루어 보아 MC는 TNF- $\alpha$ , IL-6 분비를 억제하여 염증에 효능이 있는 것으로 사료되고 IL-8의 분비량을 조절하기 위해서 보다 높은 농도에서의 실험이 필요할 것으로 보인다.

TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8과 같은 염증매개물은 NF- $\kappa$ B나 AP-1 등과 같은 전사인자 및 MAPKs에 의해 조절된다. 이전 연구에 의하면 PMA와 A23187은 p38, JNK, ERK와 같은 세 종류의 MAPKs를 활성화시킨다고 보고된바 있다<sup>32)</sup>. 본 실험에서는 MC 0.2 mg/ml에서 p38, JNK, ERK의 인산화 억제를 관찰할 수 있었다. NF- $\kappa$ B의 전사활성은 염증 유도성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 등의 유전자 발현을 유도함으로써 염증을 불러일으키는 중요한 역할을 한다<sup>33,34)</sup>. 이번 실험에서 HMC-1에서 일어나는 NF- $\kappa$ B에 대한 MC의 효과는 I- $\kappa$ B의 인산화를 억제하여 NF- $\kappa$ B의 발현을 억제하는 것을 알 수 있었다. 또한 MC는 NF- $\kappa$ B의 프로모터 부위의 활성을 억제함으로써 NF- $\kappa$ B의 생성을 억제함을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통해 MC가 탈과립된 비만세포에서 I- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 및 MAPKs 경로의 활성을 조절함으로써 이에 수반되는 염증매개물질인 TNF- $\alpha$ , IL-6의 생성을 억제하는 효과가 있음을 보여주는 것이다.

위의 결과로 목단피가 제1형 과민반응의 histamine, TNF- $\alpha$ , IL-6의 분비와 NF- $\kappa$ B, MAPKs의 활성을 조절함으로써 항알레르기 및 염증의 기전연구에 유의할 것으로 사료된다. 향후 MAPKs와 NF- $\kappa$ B

가 아닌 다른 신호전달경로에 목단피의 효과에 대한 연구가 필요할 것으로 보이며 목단피가 쓰이는 처방으로 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

## 결 론

본 연구는 목단피로 전처리된 비만세포가 NF- $\kappa$ B의 활성화 및 MAPKs의 활성을 억제함으로써 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8등의 분비 억제를 통한 항알레르기 및 항염증 효과를 실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. IgE 의존적인 PCA반응 동물실험에서 MC는 억제 현상을 나타냈으며, 복강내 비만세포의 histamine 분비량에서도 MC 0.2 mg/ml에서 감소되었다.
2. MC의 TNF- $\alpha$  분비 억제 효과는 농도 의존적으로 나타났고, 특히, 0.2 mg/ml의 농도에서 60% 이상의 높은 저해율을 보였으나 mRNA 발현은 0.2 mg/ml 농도에서 억제효과를 보였다.
3. MC의 IL-6 분비 억제 효과는 농도에 의존적으로 나타났으며, 0.2 mg/ml의 농도에서 55% 정도의 저해율이 관찰되었다. 하지만 mRNA 발현율에서는 IL-6의 억제현상을 관찰할 수 없었다.
4. MC의 IL-8 분비 억제 효과는 나타나지 않았지만, mRNA 발현율은 0.2 mg/ml에서 억제효과를 보였다.
5. MC의 MAPKs 인산화 억제 효과를 관찰한 결과, MC 0.2 mg/ml의 농도에서 인산화된 ERK, p38, JNK 모두에서 억제효과를 보였다.
6. MC의 NF- $\kappa$ B와 I- $\kappa$ B의 활성화 억제 효과를 관찰한 결과 핵 내 NF- $\kappa$ B 단백질과 p-I- $\kappa$ B이 현저하게 감소되어 나타났다. 또한 MC가

NF- $\kappa$ B의 프로모터 부위의 활성을 억제함으로써 NF- $\kappa$ B의 생성을 억제함을 알 수 있었다.

이상의 연구 결과에서, 그 동안 임상적으로 확인된 목단피의 항알레르기 및 항염증 작용을 분자생물학적 차원에서도 확인할 수 있었으며, 앞으로 목단피를 항염 치료에 보다 폭넓게 활용할 수 있는 가능성을 보여주었다고 사료된다.

## Acknowledgement

이 논문은 2009년도 경원대학교 교내연구비 지원에 의한 것입니다.

## 참 고 문 헌

1. 전국 한의과대학 피부외과학 교재편찬위원회. 韓醫皮膚外科學. 부산:선우. 2007:79-81.
2. Peter P. 면역학(*The Immune System 2nd edition*). 서울:라이프사이언스. 2006:7, 236-7, 307-37.
3. 西田榮介, 大野茂男. 정보전달. 서울:월드사이언스. 2004:93-117, 126.
4. 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.
5. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, and Maniatis T. The ubiquitinproteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B1 precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B. *Cell.* 1996;78(5): 773-85.

6. 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.
7. 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.
8. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울:永林社. 1992:193-95.
9. 식품의약품안전청. 대한약전의한약(생약)규격집. 한국의약품수출입협회. 2000:155-6.
10. 안덕균 저. 한국 본초도감. 서울:교학사. 1998: 366.
11. 李時珍. 本草綱目. 北京:人民衛生出版社. 1982: 852-4.
12. 國家中醫藥管理局《中華本草》編委會. 中華本草. 上海:上海科學技術出版社. 1999;3:528-35.
13. Hachisuka H, Kusuhara M, Higuchi M, Okubo K, Sasai Y. Purification of rat cutaneous mast cells with Percoll density centrifugation. *Arch Dermatol Res*. 1988;280:358-62.
14. 대한 소아알레르기 및 호흡기학회편. 소아 알레르기 호흡기학. 서울:군자출판사. 2005;11-46.
15. Ishizaka T, Soto CS, Ishizaka K. Mechanical of passive sensitization-III. Number of IgE molecules and their receptor sites on human basophil granulocytes. *J Immunol*. 1973;111:500-11.
16. Petersen LJ, Mosbech H, Skov P. Allergen induced histamine release in intact human skin in vivo assessed by skin microdialysis technique. Characterization of factors in fulencing histamine releasability. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97:672.
17. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capera JD. in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (Current Biology Publication, London). 1999;4th Ed.;461-88.
18. Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995;38(2):151-60.
19. Erchler WB, Keller ET. Age-associated increased interreukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med*. 2000;51:245-70.
20. Janeway C.A. Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 면역생물학(*Immunobiology 6th*). 서울:라이프사이언스. 2005;801.
21. Harvey L, Arnold B, Paul M, Chris AK, Monty K, Matthew PS, Lawrence Z, James D. 분자세포생물학(*Molecular Cell Biology 5th edition*). 서울:월드사이언스. 2006:601-2.
22. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1997;336:1066-71.
23. Geoffrey M,Cooper. 분자세포생물학(*The Cell*). 서울:한우리. 2002;491.
24. Parra V, Gadina M, Kovarova M, et al. Fyn kinase initiates complementry signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat. Immunol*. 2002;3:741-

- 48.
25. Cohen MP, Shea E, Chen S, Shearman CW. Glycated albumin increase oxidative stress, activates NF-kappa B and extracellular signal-regulated kinase(ERK), and stimulates ERK-dependent transforming growth factor-beta 1 production in macrophage RAW cells. *J Lab Clin Med*, 2003;141(4):242-9.
26. Dean JLE, Brook M, Clark AR, Saklatavala J. p38 mitogen activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem*, 1999;274:264-9.
27. Lin A, Minden A, Martinetto H, Claret FX, Lango-Carter C, Mercurio F, Johnson GI, Karin M. Identification of dual specificity kinase that activates the jun kinases and p38-mpk2. *Science* 1995; 268:286-90.
28. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001;412:346-51.
29. Song HY, Regnier CH., Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M. Tumor necrosis factor(TNF)-mediated kinases cascades: Bifurcation of Nuclear Factor- $\kappa$ B and c-Jun N terminal kinases(JNK/SARK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 9792-96.
30. Baud V, Liu ZG, Bennete B, Suzuki N, Xia Y, Karin M. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene activation via an amino-terminal effector domain Genes dev 1999;13:1297-308.
31. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathways : activation and function. *Cell signal*. 2000;12:1-13.
32. 송계용, 지제근, 함의근. 핵심병리학. 서울:고려의학. 1998:193-202.
33. Rao A. NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today*. 1994;15:274-81.
34. 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.
35. 노영득. 牡丹皮의 항염효과에 관한 연구. 익산. 원광대학교 대학원: 한의학과. 2004.
36. 오중환. 목단피와 Paeonol의 항염증작용 및 항염증 작용 및 TNF- $\alpha$ , iNOS에 생성억제효과. 경원대학교 대학원: 한의학과. 2005.