

魚腥草가 비만세포 매개 염증반응에 미치는 영향

이희조 · 김경준

경원대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

The Effects of Houttuyniae Herba on the Mast Cell-mediated Inflammatory Responses

Hee-Joe Lee · Kyung-Jun Kim

Objective : Houttuyniae Herba is widely used in oriental medicine as a remedy for inflammation. However, as yet there is no clear explanation of how Houttuyniae Herba affects the production of inflammatory cytokine. This study was to determine the effects of Essence extracted from *Houttuynia cordata* Thunb(HCT) 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 HCT. 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 : HCT inhibited the PMA + A23187-induced TNF- α , IL-6 expression and reduced mRNA of TNF- α , IL-6 and IL-8. we observed that HCT suppressed the induction of NF-B activity. In addition, HCT suppressed PMA plus A23187-induced NF- κ B promoting activity.

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

Key words : Houttuyniae Herba, inflammatory cytokine, the mast cell-mediated inflammatory responses, TNF- α , IL-6, IL-8, mRNA

교신저자 : 김경준, 인천광역시 중구 용동 117번지
경원대학교 부속길한방병원 안이비인후피부과
(Tel :032-770-1215, E-mail : kko215@hanmail.net)

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

* 이 논문은 2009년도 경원대학교 교내연구비 지원에 의하여 수행
되었음.

서 론

魚腥草Houttuyniae Herba는 삼백초과 Saururaceae
에 속한 다년생 초목인 약모밀 *Houttuynia*

cordata Thunb의 전초로 味는辛하고 性은寒하며 주로 폐경으로 들어간다. 효능은 淸熱解毒, 消癰排膿, 利尿通淋하고 약리작용으로는 항균작용, 항바이러스작용, 이노작용, 진정지혈작용 등이 있다^{1,2)}.

전초에는 정유가 들어있는데, 그 성분으로는 decanoyl acetaldehyde, methyl-n-nonylketone, myrcene, lauric aldehyde, capric aldehyde, capric acid, linalool, camphene, d-limonen, myrcene, a-pinene 등이 함유되어 있다²⁻⁴⁾.

원래 魚腥草는 일본지역에서 광범위하게 활용되어 왔는데 독을 다스린다하여 도쿠다미라고 불리워졌는데 민간요법으로 그 생즙을 이용하여 자궁염, 방광염, 요도염, 폐렴, 중이염 등 염증성 질환, 협심증, 자궁근종, 당뇨병병증, 지방간, 갑상선질환 등 다양한 부분에 까지 치료 영역을 확대해 가고 있다¹⁸⁻²⁰⁾.

魚腥草에 관한 연구로는 항고혈압 작용⁵⁾, 항산화 작용⁶⁾, 인체의 T, B세포에 미치는 영향⁷⁾, 항균활성 작용⁸⁾, 항암효과⁹⁻¹¹⁾ 및 면역기능에 미치는 영향¹²⁾, 고지혈증¹³⁾, 폐렴¹⁴⁾, 관절염¹⁵⁾ 등에 관한 실험적 연구가 보고되었다. 또한 최근에는 魚腥草의 항알레르기 기전에 관한 연구들이 보고되고 있다^{16, 17)}.

본 연구는 魚腥草의 항염증 작용을 알아보고자 비만세포를 활성화할 때 방출되는 histamine, TNF- α , IL-6, IL-8와 같은 염증 매개물질에 대한 억제효과를 분자 생물학적으로 규명하고자 진행하였다.

비만세포의 활성화는 항원, anti-IgE, lectin과 같은 면역자극들이나 calcium ionophore A23187, compound 48/80 및 anaphylatoxins(C3a, C5a)과 같은 약리학적 복합물질에 의하여 유도된다. 이렇게 유도된 비만세포 내로의 칼슘유입은 세포내 Ca⁺을 증가시킴으로써, 비만세포 내에 이미 만들어진 히스타민, 세로토닌 및 가수분해 효소, 헤파린, 프로스타글란딘과 같은 염증매개물질들을 비만세포 밖으로 분비한다.

비만세포가 활성화 된후, 세포 밖으로 TNF- α ,

IL-6, IL-8과 같은 염증매개물질들을 방출한다. TNF- α 는 많은 cytokine과 관련한 염증반응에서 중요한 매개체로 인식되고 있다. 이 TNF- α 는 IgE반응 메카니즘에서 비만세포, 대식세포(macrophages), T세포의 알레르기 메카니즘으로 분비되며^{21,22)}, 혈관내피세포에 유착인자의 발현을 야기하며 백혈구를 축적시켜 염증반응을 나타낸다. IL-6는 T세포의 활성을 증가시켜, IgE의 생산을 유도함으로써 만성염증반응을 초래한다²³⁾. 비만세포로부터 방출된 IL-8은 호중구, 호산구, T-림프구와 같은 세포에 작용하여 염증반응을 활성화 한다²⁴⁾.

염증성 cytokine(TNF- α , IL-6, IL-8 등)의 발현은 전사인자인 nuclear factor인 NF- κ B에 의해 조절받는데, 이것은 TNF- α , IL-6과 같은 목적 유전자의 프로모터 부위에 NF- κ B의 결합부위가 존재함으로써 발현을 조절할 수 있다^{25,26)}. 더욱이 NF- κ B는 정상적 상태에서는 세포질에 I- κ B와 결합하여 존재하다가 외부자극에 의해 I- κ B가 인산화 및 분해되면서 NF- κ B를 핵안으로 이동시킨다^{27,28)}.

이러한 사실을 바탕으로 이 실험에서는 염증성 질환에 대한 魚腥草의 효과를 확인하기 위하여 비만세포를 魚腥草 抽出物로 전처리한 후, PMA와 A23187로 유도한 TNF- α , IL-6, IL-8의 염증매개물질의 생성에 어떠한 영향을 미치는가 알아보았으며, 또한 魚腥草 抽出物로 전처리된 비만세포가 NF- κ B의 활성을 억제하므로써 염증성 매개물질에 대한 억제 효과를 기대할 수 있는지 알아보았다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재추출

실험에 사용된 魚腥草 抽出物(HCT)은 옴니허브

(Korea)에서 魚腥草를 구입하여 100g을 정량 후 80% 에탄올을 가하여 30분 동안 2회에 걸쳐 초음파진동을 이용하여 추출액을 획득하였다. 지름 185mm 종이여과지(Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압여과 하였다. 그 후 감압농축기(Eyela, Japan)를 사용하여 농축한 다음, 동결건조기(Freeze-dryer, Matsushita, Japan)로 동결건조하여 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), A23187은 Sigma aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, MTS는 promega(Madison, UI, USA)에서 구입하였다.

Anti-human TNF- α 항체, biotinylated 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, UI, USA)에서 구입하였다.

3) 세포주

사람 비만세포인 HMC-1(Human Mast Cells)은

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 2-3일마다 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 HCT를 1시간 전 처리한 후 PMA와 A23187을 처리하여 세포를 얻어 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) MTS assay

HMC-1 세포에 HCT를 농도별로 처리했을 때 생존율을 MTS (Promega, Madison, USA) assay로 조사하였다. 세포를 24-well culture plate에 각각 1 \times 10⁶ 개가 되도록 심어준 후 HCT를 0.01, 0.02, 0.04 mg/ml로 1시간 전 처리 후 25 nm PMA와 1 μ M A23187을 24시간 처리한 후 MTS를 최종농도 0.25 mg/ml로 넣어 2시간 반응하였다. 490 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였고, HCT의 세포증식효과에 대한 영향을 조사하였다.

2) ELISA (TNF- α , IL-6, IL-8 측정)

배양된 HMC-1세포의 배지내에서 TNF- α , IL-6, 그리고 IL-8을 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)방법을 이용하여 실험하였다. 즉 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% FBS를 함유한 phosphate-buffered saline(PBS)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- α , IL-6, IL-8을 적절한 농도로 계대 희석하여 준비하고, 각 한약재의 배양 상등액을 희석하여 각 well에 100 μ 씩 넣어 37°C에서 2시간 반응시켰다. 다시 washing buffer로 4회씩 세척한 후 biotinylated anti-human TNF- α , IL-6, IL-8을 blocking solution을 이용하여 300 ng/ml의 농도로 희석한 후 각 well에 100 μ 씩 넣어 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 washing buffer로 4회 세척한 후 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate enzyme을 2.5 μ g/ml 농도로 각 well에 처리한 다음 37°C에서 30분간 반응한 후 4회 세척하였다. 기질액을 각 well에 50 μ 씩 가하여 20분간 발색을 유도한 다음 2N 황산을 이용하여 반응을 멈추고 ELISA reader를 이용하여 450nm에서 TNF- α , IL-6, IL-8의 단백질 양을 측정하였다.

3) Reverse transcription-PCR

Harvest한 세포를 PBS로 세척한 후 4°C에서 원심분리하여 모으고 Easy Blue(Intron, Korea) 1 ml을 가하고 상온에서 5분간 반응시킨 다음 0.2 ml의 클로로포름을 첨가하여 15초간 완전히 섞은 뒤, 4°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 diethylpyrocarbonate(DEPC)로 처리한 증류수에 녹였다. 정제된 RNA를 GeneQuant Pro(Amersham Biosciences)로 정량하고, ethidium bromide를 넣은 한천 겔에 전기영동하여 RNA의 integrity와 정확한 quantification을 재확인하였다.

분리된 총 RNA 2 μ g에 random hexamer 2.5 μ g(Amersham Biosciences, USA)과 DEPC를 처리한 물을 가하고 65°C에서 10분간 반응시킨 뒤

얼음에서 2분간 식혔다. 5 \times first strand buffer와 0.1 M DTT, 10 mM dNTP, 200 unit M-mlV reverse transcriptase(Invitrogen, USA) 그리고 DEPC 처리한 증류수를 가하여 총 30 μ 가 되게 하고 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 95°C에서 5분간 가열한 뒤 cDNA를 만들었다. Polymerase chain reaction(PCR)은 2.5 μ cDNA 주형, TNF- α (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, 1 \times PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂ 그리고 2.5 unit Taq, DNA polymerase(TaKaRa Korea, Seoul, Korea)를 혼합하여 시행하였다. PCR 조건은 95°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 하였다. 반응액 중 cycle 별로 각각 5 μ 를 취해서 2.0% 한천 겔에 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 PCR 산물을 확인하였다.

4) 핵 및 세포질 단백질 분리

얻어진 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 10 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 그리고 0.2 mM PMSF로 조성된 버퍼를 100 μ 넣고 섞어준다. 얼음에서 5분간 반응시킨 후 5,000 rpm에서 4분간 원심분리하여 pellet만을 얻는다. 그 후 10 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% NP-40, 0.5 mM DTT, 그리고 0.2 mM PMSF가 포함된 버퍼 60 μ 를 넣고 15분간 반응시킨 후 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 얻

는다. 다음으로 남겨진 pellet에 20 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 25% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 그리고 0.2 mM PMSF가 포함된 버퍼 40 μ l를 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.

5) Western blot 분석

얻어진 세포를 차가운 PBS로 두 번 세척한 후 40 mM Tris-HCl, pH7.4, 10 mM EDTA, 120 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.1% noniodet P-40, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ and P1 cocktail이 포함된 lysis buffer를 사용하여 vortexing하여 섞어 준 후 ice에서 30분간 반응시켰다. 그리고 난 후 4°C, 13,000 rpm에서 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 1시간 동안 blocking한 후 PBST로 5분 간 2회 세척하였다. Anti- α -tubulin (Sigma Aldrich, Louis, MO), anti-NF- κ B, anti-p-I- κ B, anti-lamineB antibodies(Santa Cruz, California)를 이용하여 1차 항체반응을 4°C에서 16 시간 반응 시킨 다음 PBST로 2차 항체 반응을 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 10분, 15분, 30분간 세척한 후 ECL(Amersham Biosciences, UK) 로 발광하여 X-ray film에 노출시켜 단백질 발현 분석을 실시하였다.

6) Luciferase assay

세포에 유전자 도입을 위해 transfection을 수행하였다. 우선 HMC-1세포를 1 \times 10⁶으로 12 well에 접종시킨 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, 24시간을 배양하였다. 그 후 약제를 1시간 전 처리한 후 25 mM PMA와 1 μ M A23187을 24시간 동안 반응시켰다. 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 lysis buffer (Luciferase Reporter Assay System; Promega)를 이용하여 세포를 용해시켰다. Vortexing하여 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 μ l를 상온에서 Luciferase substrate 20 μ l씩 불투명한 96well에 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 fold값을 구하였다.

7) 통계분석

본 실험에서 결과는 측정값의 평균 \pm 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. HMC-1세포에서 魚腥草 抽出物(HCT)의 세포증식 효과

HCT가 비만세포(HMC-1)에서 histamine분비 및 세포증식에 미치는 효과에 대해 실험하였다. 그 결과 HCT는 histamine분비 및 세포증식면에서 농도별로 별다른 영향을 주지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 1).

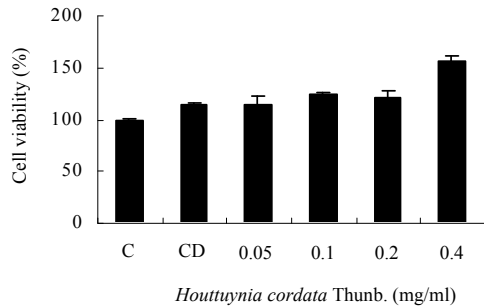


Fig. 1. Effect of HCT on cell viability of activated mast cells.

The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) were treated with indicated concentration (0.05 mg/ml to 0.4 mg/ml) of HCT for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for or 24 h.

The percentage from each treatment were relative to the control (PMA plus A23187, 100%).

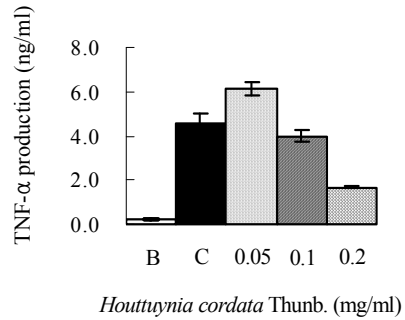
C, control (PMA plus A23187) cells;

CD, DMSO control cells (DMSO+PMA plus A23187).

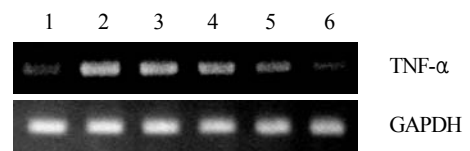
2. HMC-1세포에서 魚腥草 抽出物(HCT)에 의해 PMA와 A23187로 유도된 TNF- α 억제 효과

비만세포인 HMC-1에서 HCT에 의한 PMA와 A23187로 유도된 TNF- α 의 억제효과를 알아보기 위해 ELISA 및 RT-PCR 방법을 이용하였다. HCT를 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml의 농도로 HMC-1세

A



B



C

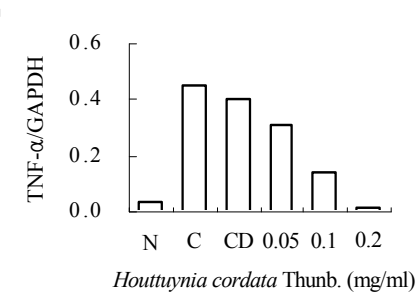


Fig. 2. Effect of HCT on PMA plus A23187-stimulated TNF- α expression levels.

(A, B): The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) incubated with various concentrations (0.05 mg/ml to 0.2 mg/ml) of HCT for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h.

(A): The TNF- α secreted protein levels in the supernatant were measured with the ELISA assay.

B, normal cells;

C, control cells.

(B): The TNF- α mRNA levels were measured with the RT-PCR analysis.

(C): The TNF- α mRNA levels were measured by densitometry.

N; normal cells;

C; control cells;

CD; DMSO control cells;

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

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

0.2; HCT (0.2 mg/ml)+PMA plus A23187.

포에 1시간 전 처리한 후 PMA(25 ng/ml)와 A23187(1 uM)로 4시간 동안 처리하여 결과를 얻었다. 그 결과 HCT의 농도 의존적으로 TNF- α 의 생성율이 현저히 감소되어 있었다. 특히 HCT 0.2 mg/ml의 농도에서 TNF- α 생성율이 $1,679 \pm 0.040$ ng/ml을 나타내며, PMA(25 ng/ml)와 A23187(1 uM)으로만 유도된 TNF- α 의 생성을 $4,560 \pm 0.478$ ng/ml 보다 현저히 낮은 생성율을 보였다(Fig. 2A). mRNA의 발현도 마찬가지로 PMA(25 ng/ml)와 A23187(1 uM)만 유도된 TNF- α 의 발현량 보다 농도 의존적으로 높은 억제효과를 보여주었다(Fig. 2B, 2C).

3. HMC-1세포에서 魚腥草 抽出物(HCT)의 PMA와 A23187로 유도된 IL-6 억제효과

비만세포인 HMC-1에서 HCT에 의해 PMA와 A23187로 유도된 IL-6의 억제효과를 알아보기 위해 ELISA 및 RT-PCR 방법을 이용하여 IL-6의 단백질 및 mRNA의 발현량을 확인하였다. 그 결과 HCT의 0.1 mg/ml와 0.2 mg/ml의 농도에서 각각 0.349 ± 0.012 ng/ml과 0.214 ± 0.029 ng/ml의 농도를 나타내며 PMA plus A23187로 유도된 IL-6의 생성량인 0.475 ± 0.006 ng/ml보다 27%, 55% 정도 감소하여 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 3A). IL-6의 mRNA 발현율에서도 0.05 mg/ml에서 0.2 mg/ml의 HCT 농도 의존적으로 억제현상이 나타남을 알 수 있었다(Fig. 3B, 3C).

4. HMC-1세포에서 魚腥草 抽出物(HCT)의 PMA와 A23187로 유도된 IL-8 억제효과

비만세포인 HMC-1에서 HCT의 PMA와 A23187로 유도된 IL-8의 억제효과를 알아보기 위해 ELISA 및 RT-PCR 방법을 이용하였다. 그 결과 IL-8의 분비량에는 크게 영향이 없는 것을 알 수

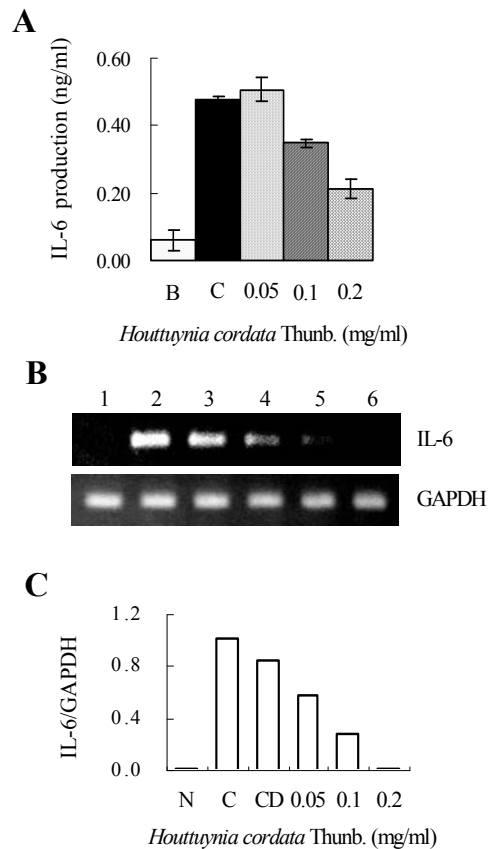


Fig. 3. Effect of HCT on PMA plus A23187-stimulated IL-6 expression levels.

(A, B): The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) incubated with various concentrations (0.05 mg/ml to 0.2 mg/ml) of HCT for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h.

(A): The IL-6 secreted protein levels in the supernatant were measured with the ELISA assay. B, normal cells; C, control cells.

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

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

N; normal cells;

C; control cells;

CD; DMSO control cells;

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

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

0.2; HCT (0.2 mg/ml)+PMA plus A23187.

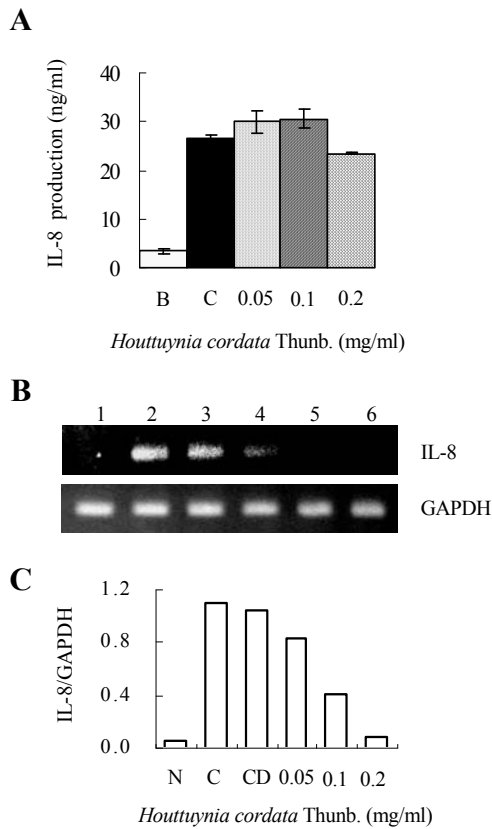


Fig. 4. Effect of HCT on PMA plus A23187-stimulated IL-8 expression levels.

(A, B): The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) incubated with various concentrations (0.05 mg/ml to 0.2 mg/ml) of HCT for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h.

(A): The IL-8 secreted protein levels in the supernatant were measured with the ELISA assay.

B; normal cells;

C; control cells.

(B): The IL-8 mRNA levels were measured with the RT-PCR analysis.

(C): The IL-8 mRNA levels were measured by densitometry.

N; normal cells;

C; control cells;

CD; DMSO control cells;

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

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

0.2; HCT (0.2 mg/ml)+PMA plus A23187).

있었다. HCT 0.2 mg/ml의 농도에서만 약간의 억제율을 보였다(Fig. 4A). 이에 반해 IL-8의 mRNA 수준을 조사한 결과 HCT 0.05에서 0.2 mg/ml의 모든농도에서 농도의존적으로 IL-8의 mRNA 발현이 감소되어 나타나는 것을 알 수 있었다. 특히, 0.2 mg/ml의 농도에서는 아무것도 처리하지 않은 정상세포 수준과 비슷하게 감소되어 나타났다(Fig. 4B, 4C).

5. HMC-1세포에서 魚腥草 抽出物(HCT)의 PMA와 A23187로 유도된 NF- κ B 효과

TNF- α , IL-6등의 pro-inflammatory cytokine 은 NF- κ B에 의해 그 발현이 조절된다. 그래서 본 실험에서는 NF- κ B 및 NF- κ B 억제자인 I- κ B의 단백질 발현정도를 관찰하였다. 그 결과 핵 안에 존재하는 NF- κ B는 PMA와 A23187로 유도하였을 때 loading control인 핵막을 구성하는 성분인 laminB와 비교하여 현저히 증가한 반면, HCT를 0.05 mg/ml부터 0.2 mg/ml의 농도로 처리하였을 때 농도의존적으로 핵 내 NF- κ B 단백질이 뚜렷하게 감소되어 있음을 확인하였다. 더욱이 인산화된 I- κ B(p-I- κ B)의 발현 또한 HCT 0.2 mg/ml의 농도에서 현저하게 감소되어 나타났다(Fig. 5A).

다음으로는 NF- κ B의 프로모터 활성에 대해 알아보기 위해 luciferase assay를 수행하였다. 하지만 0.1 mg/ml과 0.2 mg/ml의 두 농도에서 PMA와 A23187로 유도된 transfection세포만큼의 NF- κ B의 프로모터 활성이 나타났다(Fig. 5B).

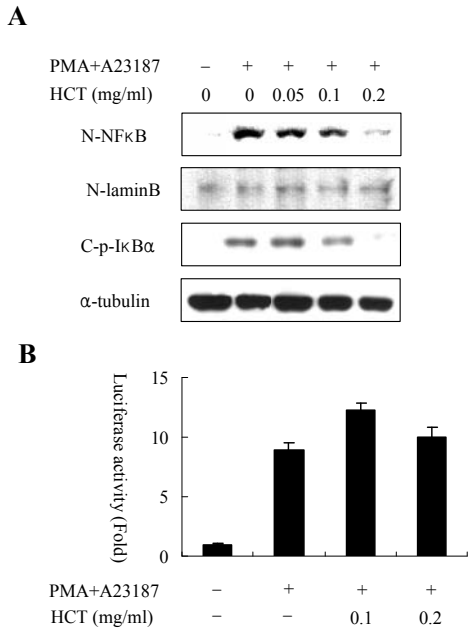


Fig. 5. Effect of HCT on PMA plus A23187-stimulated NF-κ B activation and I-κ B α phosphorylation.

(A) : The HMC-1 cells(1×10^6 cell/ml) were incubated with HCT(0.05- 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, lamineB and α-tubulin protein with Western blot analysis. α-tubulin and laminB are loading controls for cytosolic and nuclear extracts, respectively.

N, nuclear extract;
C, cytosol extract .

(B) : The HMC-1 cells(1×10^6 cell/ml) were treated with HCT (0.1- 0.2 mg/ml) for 1 h and then stimulated with PMA plus A23187 for 24 h. The NF-κ B activity was examined with a luciferase assay .

고 찰

면역학적인 과민반응(hypersensitivity)은 외부물질에 대한 비정상적인 과대면역반응으로 인하여 숙주에게 세포나 조직의 손상 또는 염증 등의 질

환을 일으키는 것을 말한다. 이들은 일반적으로 제 I형 아나필락시형 과민반응, 제II형 세포독성 과민반응, 제III형 면역복합체 과민반응, 제IV형 세포매개성 과민반응 등 4 가지형으로 나누고 있으며 일부에서는 II형을 둘로 나누어 5가지로 나누기도 한다²⁹⁾.

과민증(hypersensitivity)는 type I 즉시형(immediate) 과민증과 typeIV 지연형(delayed) 과민증으로 나타난다³⁰⁾. 결과적으로 IgE에 의한 비만세포의 활성화는 여러 가지 즉시형 과민증 반응에 주요한 메카니즘을 보이며, 반면 다양한 T 세포 소집단에서는 지연형 과민증 반응에 주요한 효과를 나타낸다³¹⁾.

본 연구에서는 비만세포주인 HMC-1 세포에 PMA와 calcium ionophore A23187 로 자극하여 분비하는 염증성 물질에 대한 魚腥草 抽出物の 억제효과를 보여줌으로서, 魚腥草 抽出物이 type I 인 즉시형 과민증에 나타나는 염증반응을 조절하는 효과가 있음을 규명하려 하였다.

魚腥草Houttuyniae Herba는 삼백초과 Saururaceae 에 속한 다년생 초목인 약모밀 *Houttuynia cordata* Thunb의 전초로, 蕺菜, 蕺菜, 臭草, 臭菜, 臭腥草, 魚鱗草, 肺形草, 十藥 등 다양한 異名이 있으며^{2,3,37)}, 문헌적으로 최초로 등장한 것은 [名醫別錄]으로 약명을 蕺으로 명하고, 蕺 微辛, 微溫. 主治 蠅蝮 癩瘡 多食 令人氣喘 이라 하였다³²⁾. 그후 李時珍의 [本草綱目]에 因有特異之腥臭 故又名魚腥草 라하여 오늘에 까지 그이름이 불리우고 있다³³⁾.

產地는 서북, 화북, 화중 및 장강 이남의 각곳에 분포하며, 음습한 습지에서 자란다^{2,34,35)}. 우리나라에서는 약모밀이라고 부르며 주로 울릉도의 야지, 제주도, 중부지방의 음습한 곳에서 자란다^{18,36)}.

채취시기는 전초를 사용하는 약재이다 보니 주로 여름에서 가을 사이에 식물이 무성한 시기에 채취한다^{2,18,38,39)}.

性味는 味는 주로 辛하다 함에 이견이 없으나, 性은 寒, 微寒, 凉, 微温 등으로 표현되고 있으며, 有毒, 有小毒, 無毒 등으로 표현되어, 대체적으로 味는 辛하고, 性은 寒하며 거의 독이 없는 것으로 사료된다^{2,4,34,40-44}.

주로 肺經^{2,34,38,46-48}으로 歸經하나 肝經^{2,46}, 腎經^{38,48}, 大腸經⁴⁷, 膀胱經^{38,47} 등도 관련성이 있으며, 그 效能으로는 清熱解毒^{2,39,40,42,49,50}, 利尿消腫^{2,36}, 化痰止咳^{2,49}, 利尿通淋³⁸, 消癰腫³⁸, 建碑利尿⁵⁰, 止血⁵⁰, 排膿⁴⁹ 등으로 발열, 발적, 종창으로 대표되어지는 염증에 대한 효과가 강한 것으로 사료된다. 主治症으로는 폐렴^{2,34}, 폐농양^{2,45}, 간염^{3,35, 46}, 중이염^{46,52}, 기관지염^{35,49}, 습진^{2,36}, 개선^{2,36}, 매독³⁹, 약창^{39,42}, 임병^{2,36,39} 등으로 폐관련질환 및 염증성 질환이 주된 목표가 된다.

성분은 decanoyl acetaldehyde, methyl-nonylketone, myrcene, lauric aldehyde, capric aldehyde, capric acid, linalool, camphene, d-limonen, myrcene, a-pinene, isoquercitrin, hyperin 등이 함유되어 있는 것으로 보고 되었으며, 성분에 관한 연구는 향후로도 지속되어야 할 것이다^{2,36,39,49,51}.

약리작용으로는 항균작용^{2,36,45,49,50}, 이노작용^{2,45,49,50}, 진정지혈작용^{2,4}, 진통작용^{2,4}, 장액분비억제작용^{2,4}, 지해작용^{3,49}, 조직재생촉진작용^{2,4}, 혈압강하작용^{45,50}, 항염작용^{45,49,50}, 항암작용⁹⁻¹¹ 등이 보고되어 있다.

임상응용질환에는 폐렴^{2,34}, 폐농양^{2,45}, 급만성기관지염^{2,3,52}, 백일해^{2,35,40,46}, 장염³⁴, 중이염^{46,52}, 만성신염^{4,49}, 폐결핵^{4,49}, 봉와직염⁵², 유선염⁵², 담낭염⁵³, 급만성비염⁵³, 담마진^{35,47}, 피부과질환^{2,3} 등 염증성 질환에 다용되고 있다. 최근 국내에서도 한약처방 뿐 아니라 민간요법으로도 그 생즙을 이용하여 자궁염, 방광염, 요도염, 폐렴, 중이염등 염증성 질환, 협심증, 자궁근종, 당뇨병병증, 지방간, 갑상선질환 등 다양한 부분에까지 치료영역을 확

대해 가고 있다.

魚腥草에 관한 연구로는 항고혈압 작용⁵, 항산화 작용⁶, 인체의 T, B세포에 미치는 영향⁷, 항균활성 작용⁸, 항암효과⁹⁻¹¹ 및 면역기능에 미치는 영향¹², 고지혈증¹³, 폐렴¹⁴, 관절염 및 항알레르기전에 관한 연구들이 보고되고 있다¹⁵⁻¹⁷.

본 연구는 魚腥草가 계반 만성질환 및 폐렴, 관절염, 알레르기 비염, 아토피피부염등 염증성질환에 광범위하고 다양하게 활용되고 있다는 것은 魚腥草의 항염증작용이 있을 것이라 보고 魚腥草 抽出物(HCT)의 항염증효과를 분자생물학적으로 확인해 보고자 하였다.

칼슘 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, A23187과 PMA를 모두 사용하였다.

먼저 HCT의 농도를 다르게 하여 HMC-1세포를 처리한 후 A23187과 PMA로 세포의 활성을 유도하여 히스타민 분비량을 측정된 실험과 세포 생존율을 비교한 실험에서, HCT는 히스타민 분비와 세포증식에 별다른 영향을 주지 않은 것으로 확인되었다.

우선, A23187과 PMA로 자극된 HMC-1 세포에서 염증 반응 조절 효과를 관찰하기 위해 ELISA 방법으로 HCT의 1시간 전 처리한 비만세포의 배양액으로부터 TNF- α , IL-6, 그리고 IL-8을 분비량을 측정하였다.

그 결과 TNF- α 의 경우 HCT 0.2 mg/ml의 농도에서 현저히 감소하였으며(Fig. 2), IL-6의 경우에는 0.1 mg/ml과 0.2 mg/ml의 농도에서 농도의존적으로 그 분비량이 억제되는 것이 보였으며, A23187과 PMA 단독으로 유도된 HMC-1세포 배양액의 IL-6 생성량과 0.2 mg/ml의 농도에서의

HMC-1세포 배양액의 IL-6 생성량을 비교하였을 때 50%의 높은 저해율을 나타내었다(Fig. 3). 하지만 IL-8의 생성량의 경우에는 억제효과가 나타나지 않았다(Fig. 4).

자극된 비만세포에서 분비되는 TNF- α , IL-6, IL-8과 같은 염증성 물질들을 억제하는 효과는 mRNA 수준에서도 관찰되었다(Fig. 2, 3, 4).

이러한 실험결과로 미루어 보아 HCT가 염증매개물질인 TNF- α , IL-6의 생성을 억제함으로써 염증치료에 효능이 있을 것으로 사료된다.

TNF- α 는 IL-1b, IL-6, IL-8 그리고 Granulocyte macrophage colony-stimulating factor 등을 포함하는 다른 염증 cytokine의 강력한 유도인자일 뿐만 아니라 하나의 자가 분비 매개체이다^{54, 55}.

IL-6는 일종의 염증 유도성 cytokine(pro-inflammatory cytokine)이고, 염증진행과정의 강력한 매개자이다⁵⁶.

TNF- α , IL-6, IL-8과 같은 염증성 cytokine은 NF- κ B나 AP-1 등과 같은 전사인자에 의해 조절된다. NF- κ B의 전사활성은 전염증 매개물질(TNF- α , IL-6, IL-8 등)의 유전자 발현을 유도함으로써 염증을 불러일으키는 중요한 역할을 한다^{57,58}.

HCT는 I- κ B의 인산화를 억제함으로써 NF- κ B의 발현을 억제하는 것을 알 수 있었다. 하지만 NF- κ B의 프로모터 부위의 활성을 HCT가 억제하는 효과는 볼 수 없었다.

이러한 결과를 통해 HCT가 탈과립된 비만세포에서 I- κ B/NF- κ B 경로의 발현을 조절함으로써 이에 수반되는 염증매개물질인 TNF- α , IL-6, IL-8의 생성을 억제하는 효과가 있어, 여성초를 이용한 염증성 치료에 중요한 단서로 활용될 수 있으리라 생각된다.

결론

본 연구는 魚腥草의 항염증 효과를 알아보기 위하여 비만세포를 80% ethanol로 추출한 魚腥草抽出物(HCT)로 전처리한 후, PMA와 A23187로 유도한 TNF- α , IL-6, IL-8의 염증매개물질의 생성에 어떠한 영향을 미치는가 알아보았으며, 또한 HCT로 전처리된 비만세포가 NF- κ B의 활성을 억제하므로써 염증성 매개물질에 대한 억제 효과를 기대할 수 있는지에 대한 실험을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. HCT는 HMC-1세포에 대한 실험에서 히스타민 분비와 세포증식에 별다른 영향을 주지 않았다.
2. HMC-1세포에서 HCT의 TNF- α 에 대한 억제 효과에 대한 실험에서는 농도에 비례하여 그 효과가 컸으며, 특히, 0.2 mg/ml의 농도에서 60% 이상의 높은 저해율을 보였고 mRNA 발현에도 높은 억제효과가 있었다.
3. HMC-1세포에서 HCT의 IL-6 억제효과에 대한 실험에서도 농도에 비례하여 그 효과가 컸으며, 0.2 mg/ml의 농도에서 55% 정도의 저해율이 관찰되었다. mRNA 발현율에서도 농도의존적으로 억제현상을 나타내었다.
4. HMC-1세포에서 HCT의 IL-8 억제효과실험에서는 IL-8의 분비량에는 크게 영향이 없었으며, HCT 0.2 mg/ml의 농도에서만 약간의 억제율을 보였다. 이에 반해 IL-8의 mRNA는 농도의존적으로 IL-8의 mRNA 발현이 감소되어 나타나는 것을 알 수 있었다. 특히, 0.2 mg/ml의 농도에서는 아무것도 처리하지 않은 정상세포 수준과 비슷하게 감소되어 나타났다.
5. NF- κ B와 NF- κ B 억제자인 I- κ B의 단백질 발현 정도를 관찰하는 실험에서 HCT는 농도의존적으로 핵 내 NF- κ B 단백질이 뚜렷하게 감

소되어 있음을 확인하였다. 더욱이 인산화된 I-κB(p-I-κB)의 발현 또한 HCT 0.2 mg/ml의 농도에서 현저하게 감소되어 나타났다.

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

Acknowledgement

이 논문은 2009년도 경원대학교 교내연구비 지원에 의한 것입니다.

참 고 문 헌

1. 본초학교수공편. 본초학. 서울: 영림사. 1998: 212-3.
2. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순외. 中藥大辭典. 서울: 도서출판 정담. 1997:2888-92.
3. 邱年永, 張光雄. 原色臺灣藥用植物圖鑑(1). 臺北: 南天書局. 1983:15.
4. 王浴生, 中藥藥理與應用. 北京: 人民衛生出版社. 1984:709-18.
5. 백진호. 어성초 부위별 추출물의 항고혈압 생리활성 분석 및 화학성분에 관한연구. 서울대학교 대학원 석사학위논문. 1998.
6. 김주형. 어성초의 항산화작용 및 활성성분. 숙명여자대학교 대학원 석사학위논문. 1998.
7. 전은영. 어성초 추출물이 사람의 B, T 세포에 미치는 영향 및 유효성분의 부분 분리. 서울대학교 대학원 석사학위논문. 1997.

8. 강정미. 어성초 휘발성 정유의 향기성분의 특성과 항균활성. 부경대학교 산업대학원 석사학위논문. 1997.
9. 임사비나. 어성초 수침의 항종양 효과에 관한 연구. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 1989.
10. 김은영. 어성초의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원 석사학위논문. 1994.
11. 심재연. 白鼠를 이용한 지실 어성초 천산갑 및 저령의 항암효과에 관한 연구. 경희대학교 대학원 박사학위논문. 1988.
12. 길춘영성. 어성초 및 상국음이 면역기능에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 박사학위논문. 1990.
13. 이정원. 어성초가 실험적 고지혈증의 예방에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 1995.
14. 송호준. 어성초 추출물이 폐렴유발 생쥐의 면역반응 및 조직변화에 미치는 영향. 원광대학교 대학원 박사학위논문. 1986.
15. 이종수. 실험적 관절염에 절식요법 및 어성초 투여가 미치는 영향에 관한 연구. 경희대학교 대학원 박사학위논문. 1988.
16. 이광소. 어성초와 복분자의 항알레르기 기전. 전북대학교 대학원 박사학위논문. 2003.
17. 노병규. 어성초 추출물의 항알레르기 효과에 관한 연구. 원광대학교 대학원 박사학위논문. 1998.
18. 김태정. 약이되는 야생초. 서울: 대원사. 2002: 104-5.
19. 이창복. 대한식물도감. 서울: 향문사. 1985:252
20. 김재우. 원색천연물사전(하권). 서울: 남산당. 1984:174.
21. Thomas PS. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. Immunol Cell Biol. 2001;79:132-40.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 송계용, 지제근, 함의근. 핵심병리학. 서울: 고려의학. 1998:193-202.
30. Comms RPA and Gell PGH. in *Clinival Aspects of Immunology*, ed. Gell, P. G. H. (Blackwell Scientific, Oxford). 1963: 317-37.
31. 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.:461-88.
32. 尙志鈞 輯校. 名醫別錄(輯校本). 北京: 人民衛生出版社. 1986:311-2.
33. 陳存人. 中國藥學大辭典(下冊). 臺北: 旋風出版社. 1981:1265-6.
34. 成都中醫學院. 中藥學. 上海: 上海科學技術出版社. 1982:83.
35. 鄭虎占等. 中藥現代研究與應用(第3卷). 北京: 學苑出版社. 1998: 983-3003.
36. 신민교, 정진섭. 도해향약대사전. 서울: 영림사. 1998:812-3.
37. 蔡永敏 編. 中藥藥名辭典. 北京: 中國中醫藥出版社. 1996:214.
38. 周鳳梧. 中藥學. 山東省: 山東科學技術出版社. 1981:191-2.
39. 載新民. 中國藥材學(下). 臺北: 啓業書局. 1981:1058-9.
40. 上海中醫學院. 中草藥學. 上海: 商務印書館. 1975:150-1.
41. 醫藥研究社 編. 古今中藥集成. 高雄: 大眾書局. 1979:476.
42. 李時珍. 本草綱目(下卷). 臺北: 文光圖書有限公司. 1982:14-5.

43. 유주열. 새로 쓴 사상의학. 고양시: 대성의학사. 2007:455.
44. 허준. 동의보감. 하동군: 동의보감출판사. 2006:2138.
45. 崔樹德 編. 中藥大全. 河北: 黑龍江科學技術出版社. 1989:301-2.
46. 吳盛義. 原色實用臺灣青草藥(第2冊). 臺北: 用山書店印行. 1982:223.
47. 載新民. 中國方藥學. 臺北: 啓業書局. 1985: 187-8.
48. 신민교. 임상본초학. 서울: 영림사. 1997: 574-5.
49. 안덕균. 원색 한국본초도감. 서울: 교학사. 1998:110.
50. 熊輔信. 臨床韓藥辭典. 서울: 의성당. 1994: 83-4.
51. 徐國鈞 等. 中國藥材學(下). 北京: 中國醫藥科技出版社. 1996:1346-8.
52. 全國中草藥匯編. 全國中草藥匯編(上冊). 北京: 人民衛生出版社. 1983:553-4.
53. 常敏毅 編. 抗癌中藥. 湖南: 湖南科學技術出版社. 1997:325-7.
54. 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.
55. Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF- α antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur Cytokine Netw.* 1996(4):225-30.
56. Erchler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med.* 2000;51:245-70.
57. Rao A. NF- κ B: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today.* 1994;15:274-81.
58. 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- κ B and NF-IL6) and IL-6 gene expression: role of α 3 β 1 and α 6 β 4 integrins. *Dev Immunol.* 2000;7:195-208.