

蒼朮 에탄올 추출물이 비만세포 매개 염증반응에 미치는 영향

김선민 · 김경준

경원대학교 한의과대학 안이비인후피부과학 교실

The Effects of Ethanol Extract from *Atractylodes Chinensis* Rhizome on the Mast Cell-Mediated Inflammatory Responses

Sun-Min Kim · Kyung-Jun Kim

Objective : *Atractylodes Chinensis* Rhizome (ACR) is widely used in oriental medicine as a remedy for an inflammation and an allergic disease. However, as yet there is no clear explanation of how ACR affects the production of inflammatory cytokine. This study was to determine the effects of ACR on the mast cell-mediated inflammatory responses.

Method : 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 ACR was measured. The TNF- α protein levels were analysed by Western blots. 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.

NF- κ B, phospho-I κ B and MAPKs were examined by Western blot analysis. The NF- κ B promoter activity was examined by a luciferase assay.

- Results :**
1. The expressions of TNF- α and TNF- α mRNA were decreased dose-dependently at 0.05-0.2mg/ml of ACR and significantly decreased at 0.2mg/ml.
 2. The expressions of IL-6 and IL-6 mRNA were decreased dose-dependently at 0.05-0.2mg/ml of ACR and significantly decreased at 0.2mg/ml.
 3. The expressions of IL-8 and IL-8 mRNA were decreased dose-dependently at 0.05-0.2mg/ml of ACR and significantly decreased at 0.2mg/ml specially.
 4. The expressions of Phosphorylated-JNK were decreased, not p38, ERK
 5. The expressions of NF- κ B were decreased dose-dependently at 0.1-0.2mg/ml of ACR. The expressions of Phosphorylated I κ B were significantly decreased at 0.2mg/ml. In addition, ACR suppressed PMA plus A23187-induced NF- κ B promoting activity.

Conclusion : It is suggested that ACR should suppress through inhibition of NF- κ B activity and cytokine production.

Key words : *Atractylodes Chinensis* Rhizome(ACR), The human mast cell line (HMC-1), MAPKs, NF- κ B.

I. 서 론

염증반응은 조직의 손상부위와 감염된 부위로만 조직의 피해를 국한시키기 위한 초기 보호작용이다. 이는 대식세포에서 분비하는 사이토카인과 염증매개물질들의 국소혈관에 대한 효과로 야기된다¹⁾. 알려진 염증반응은 항원, anti-IgE, lectin과 같은 면역자극제나 calcium ionophore A23187, compound 48/80 및 anaphylatoxins(C3a, C5a)과 같은 약리학적 복합물질에 의한 비만세포의 활성화와 histamine, TNF- α , IL-6, IL-8과 같은 염증매개물질들의 분비 및 IgE의 생성을 특징으로 한다²⁻⁶⁾.

NF- κ B 및 p38, JNK, ERK와 같은 MAP kinases 들의 활성화에 의한 염증성 cytokine의 분비는 알려진 염증을 유발하고 지속시키는데 관련이 된다⁷⁻¹¹⁾.

蒼朮(Atractylodes Chinensis Rhizome)은 苦溫하고 性燥, 辛香하여 주로 發散작용을 하는데 外로는 風濕의 邪氣를 제거하고 內로는 脾胃의 濕邪로 인하여 病이 된 모든 證에 上下表裏를 막론하고 응용할 수 있다¹²⁾.

蒼朮이 主藥으로 구성되어 있는 方劑는 濕, 內傷, 傷風寒, 脾胃에 관련된 病理에 주로 사용되고 있으며¹³⁾, 임¹⁴⁾은 蒼朮이 君藥인 不換金正氣散은 IgE 반응을 감소시키고, TNF- α 의 생성을 억제시키며, Th1 반응을 유도하면서 Th2 반응을 감소시켜 불균형한 Th세포들의 반응을 교정하면서 항알레르기 작용을 가진다고 하였다. 한¹⁵⁾은 소염작용 및 진통, 해열작용과 면역증강 작용이 있어 관절염을 비롯한 각종 염증성 질환에 응용되고 있다고

하였으며, 이¹⁶⁾는 蒼朮이 IL-4, IL-5의 생성을 억제시킨다고 하였고, 허¹⁷⁾는 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제시켜 NO의 형성을 억제함으로써 염증성 질환에 효과적으로 작용할 것을 시사했다.

이에 저자는 창출에 대한 기존 연구의 항염 및 항알레르기 작용에 대해 검토된 결과를 토대로 즉시형 알레르기 반응 모델에서 창출의 효과를 연구하고자 하였고, 염증성 질환에 대한 창출의 효과를 확인하기 위하여 비만세포를 창출 에탄올 추출물로 전처리한 후, PMA와 A23187로 유도한 TNF- α , IL-6, IL-8의 염증매개물질의 생성에 어떠한 영향을 미치는가 알아보았으며, MAP kinases와 NF- κ B의 활성을 억제함으로써 염증성 매개물질에 대한 억제 효과를 기대할 수 있는지 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재추출

실험에 사용된 蒼朮 에탄올 추출물(Atractylodes Chinensis Rhizome, 이하 ACR)은 옴니허브(Korea)에서 창출(Atractylodes chinensis Rhizome)의 근경을 구입하여 100 g을 정량 후 80% 에탄올을 가하여 30분 동안 2회에 걸쳐 초음파진동을 이용하여 추출액을 획득하였다. 지름 185mm 종이여과지(Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 여과 하였다. 그 후 감압농축기(Eyela, Japan)를 사용하여 농축한 다음, 동결건조기(Freezedryer, Matsushita, Japan)로 동결건조하여 분말을 얻어 DMSO에 녹여 사용하였다.

교신저자 : 김경준, 인천광역시 남동구 구월동 1200-1번지 경원대학교 부속길한방병원 한방안이비인후피부과 (Tel. 070-7120-5008, E-mail : kkjo215@hanmail.net)

* 이 논문은 2011년도 경원대학교 교내연구비 지원에 의하여 수행되었음.

• 접수 2011/03/08 • 수정 2011/03/29 • 채택 2011/04/05

2) 시약

Reagent	Company	Country
Iscove's Modified Dulbecco's Medium	GIBCO BRL	USA
Compound 48/80 anti-DNP IgE DNP-human serum albumin (HSA) phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) A23187 evans blue	Sigma aldrich	USA
MTS	promega	USA
histamine kit	Oxford Bio-medical Research	USA
Anti-human TNF- α antibody biotinylated anti-human TNF- α antibody recombinant human TNF- α	R&D Systems	USA
Anti-human IL-6/IL-8 antibody biotinylated anti-human IL-6/IL-8 antibody recombinant human IL-6/IL-8 protein	BD Biosciences	USA
NF- κ B p-I κ B lamine B antibody	Santacruz Biotechnology	USA
α -tubulin antibody	Sigma aldrich	USA
luciferase assay system	promega	USA

3) 실험동물

실험동물로는 Sprague-Dawley계 흰쥐(rat)를 오리엔트 바이오(경기도, 성남)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

4) 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 24well 배양용기에서 배양한 후 각 농도의 ACR을 1시간 전

처리한 후 PMA와 A23187을 처리하여 세포를 얻어 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 국소성 즉시형 알레르기 반응(Passive cutaneous anaphylaxis reaction, 이하 PCA)

털을 깎은 SD-rat의 등 세 곳에 anti-DNP IgE 10 μ g을 피내 주사하였다. 48시간 후 PBS에 녹인 5mg의 DNP-HSA와 4% evans blue (1:4) 혼합액 50 μ l를 정맥에 주사하였다. ACR은 DNP-HSA를 주사하기 1 시간 전에 200 mg/kg으로 경구투여하였다. DNP-HSA를 주사한지 30 분 후에 색소 부위를 측정하기 위해 rat의 등쪽 피부를 취하였다.

얻어진 피부를 5ml의 formamide를 넣고 55℃ 오븐에서 overnight하여 색소를 용출시켰다. 그리고 나서 상등액을 취해 spectrophotometer 620nm에서 측정하였다.

2) 쥐의 복막 내 비만세포 준비

흰쥐의 복강 내 비만세포를 분리하기 위해 복강 내 Tyrode buffer A(10mM HEPES, 136mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 2.75mM NaH₂PO₄, 그리고 0.1% bovine serum)를 10ml 주입하고, 약 90초간 복막을 부드럽게 마사지 해 준 후 복막을 열어 파스테르 파이펫으로 세포를 모았다. 모든 복강 내 세포들은 150×g에서 10분간 원심분리하고 난 후 모아진 세포를 Tyrode buffer 로 풀어주고 Hachiskuka et. al.(1998)¹⁸⁾의 방법을 이용하여 비만세포를 분리하였다. 비만세포는 toluidine blue 염색을 통해 확인하였다.

3) 히스타민 측정

분리된 쥐 복막 내 비만세포를 tyrode buffer를 이용하여 2×10⁵cells로 풀어준 뒤,蒼朮 에탄올 추출물을 0.05-0.2mg/ml의 농도로 10분 전 처리하고 난 다음 compound 48/80(5 μg/ml)를 처리하여 20분간 반응시켰다. 세포에서 분비된 히스타민 측정을 위해 400×g에서 10분동안 원심분리하여 상청액(上清液, supernatant)을 얻었다. 얻어진 상청액으로 히스타민 분비 억제율을 구하기 위해 히스타민 키트를 이용하여 enzyme immunoassay 방법으로 450nm에서 측정하였다. 히스타민 분비 억제율은 다음과 같은 식으로 계산하여 구하였다. 이때 A는 ACR 처리 없이 compound 48/80으로 유도된 세포의 히스타민 분비량이며, B는 ACR 처리 후 compound 48/80으로 유도된 세포의 히스타민 분비량을 나타낸다.

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

4) MTS assay

HMC-1 세포에 ACR을 농도별로 처리했을 때 생존율을 MTS(Promega, Madison, USA) assay로 조사하였다. 세포를 24-well culture plate에 각각 1×10⁶ 개가 되도록 심어준 후 ACR을 0.05, 0.1, 0.2 및 0.4mg/ml로 1시간 전 처리 후 25nm PMA와 1μm A23187을 24시간 처리한 후 MTS를 최종농도 0.25mg/ml로 넣어 2시간 반응하였다. 490nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였고, ACR의 세포증식효과에 대한 영향을 조사하였다.

5) 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 96well plate에 각각 2μg/ml 로 코팅하고 4℃에서 12시간 동안 반응시켰다.

코팅 후 비특이성 반응을 막기 위해서 10% FBS를 함유한 phosphate-buffered saline(PBS)로 구성된 blocking solution을 첨가하여 37℃에서 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 한약제의 배양 상등액을 희석하여 각 well에 100μl씩 넣어 37℃에서 2시간 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 100μl씩 넣어 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 washing buffer로 4회 세척한 후 streptavidin-horseradish peroxidase conjugenzyme을 2.5μg/ml 농도로 각 well에 처리한 다음 37℃에서 30분간 반응한 후 4회 세척하였다. 기질액을 각 well에

50 μ l씩 가하여 20분간 발색을 유도한 다음 2N 황산을 이용하여 반응을 멈추고 ELISA reader를 이용하여 450nm에서 TNF- α , IL-6, IL-8의 단백질 양을 측정하였다.

6) Reverse transcription-PCR

Harvest한 세포를 PBS로 세척한 후 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하여 모으고 Easy Blue(Intron, Korea) 1ml을 가하고 상온에서 5분간 반응시킨 다음 0.2ml의 클로로포름을 첨가하여 15초간 완전히 섞은 뒤, 4 $^{\circ}$ C 12,000 \times g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 0.4ml의 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 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 뒤 얼음에서 2분간 식혔다. 5 \times first strand buffer와 0.1 M DTT, 10mM dNTP, 200 unit M-*ml*V reverse transcriptase(Invitrogen, USA) 그리고 DEPC 처리한 증류수를 가하여 총 30 μ l가 되게 하고 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 뒤 cDNA를 만들었다. Polymerase chain reaction(PCR)은 2.5 μ l 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, 1x PCR buffer, 2.5mM 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 bromide로 염색하여 PCR 산물을 확인하였다.

7) 핵 및 세포질 단백질 분리

얻어진 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 10mM Hepes, pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5mM DTT, 그리고 0.2mM PMSF로 조성된 버퍼를 100 μ l 넣고 섞어준다. 얼음에서 5분간 반응시킨 후 5,000 rpm에서 4분간 원심분리하여 pellet 만을 얻는다. 그 후 10mM Hepes, pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1% NP-40, 0.5mM DTT, 그리고 0.2mM PMSF가 포함된 버퍼 60 μ l를 넣고 15분간 반응시킨 후 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 얻는다. 다음으로 남겨진 pellet에 20mM Hepes, pH 7.9, 420mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 25% glycerol, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 그리고 0.2mM 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.

8) Western blot 분석

얻어진 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 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 µg의 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, anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-phospho-JNK, anti-ERK2, anti-p38, anti-JNK1, anti-TNF- α antibodies (Santa Cruz, California)를 이용하여 1차 항체반응을 4°C에서 16 시간 반응 시킨 다음 PBST로 2차 항체반응을 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 10분, 15분, 30분간 세척한 후 ECL (Amersham Biosciences, UK) 로 발광하여 X-ray film에 노출시켜 단백질 발현 분석을 실시하였다.

9) Luciferase assay

세포에 유전자 도입을 위해 transfection을 수행하였다. 우선 HMC-1세포를 1×10⁶으로 12well에 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 25nm PMA와 1µM 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 100µl를 상온에서 Luciferase substrate 20µl씩 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.

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.

III. 결 과

1. 쥐의 복강 내 비만세포에서 ACR 에탄올 추출물의 Histamine 분비에 미치는 영향

0.05mg/ml의 농도부터 0.2mg/ml의 농도까지 히스타민 분비량에 대한 ACR의 억제현상은 관찰할 수 없었다(Fig. 1).

2. 생체 내 국소성 즉시형 알레르기 반응에 미치는 영향

생리식염수를 경구투여한 후 DNP-HSA를 정맥 주사한 control과 비교해 보았을 때 사진뿐만 아니라 파란색 색소의 용출량에서도 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2, 3).

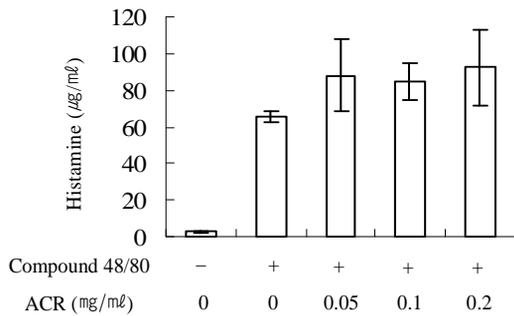


Fig. 1. Effect of ACR on compound 48/80-induced histamine release of rat peritoneal mast cells

The mast cells (1×10^5 cell/ml) were treated with indicated concentration (0.05 mg/ml to 0.2 mg/ml) of ACR for 10 min and then treated with compound 48/80 for 20 min.

ACR : Atractylodes Chinensis Rhizome

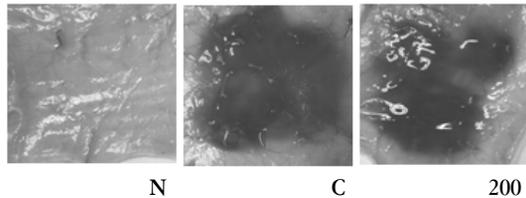


Fig. 2. Passive cutaneous anaphylaxis is on one internal surface of rat skin

N: Normal ; fed with saline only

C: Control(DNP-HAS) ; fed with saline and injected with antigen, DNP-HAS intravenously

200: ACR(200mg/kg) ; experimental group fed with 200 mg/kg of ACR and injected with antigen, DNP-HAS intravenously

3. HMC-1세포에서 蒼朮 에탄올 추출물의 세포 활성에 미치는 영향

ACR의 HMC-1 세포의 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과, ACR 0.05 mg/ml부터 0.2 mg/ml의 농도까지 별다른 영향을 주지 않는 것으로 나타났지만, ACR 0.4 mg/ml의 농도에서는 세포독성을 관찰하였다(Fig. 4). 이러한 이유로 사이토카인에 대한 연구에서는 ACR 0.05 mg/ml에서 0.2 mg/ml의 농도만을 시험에 사용하였다.

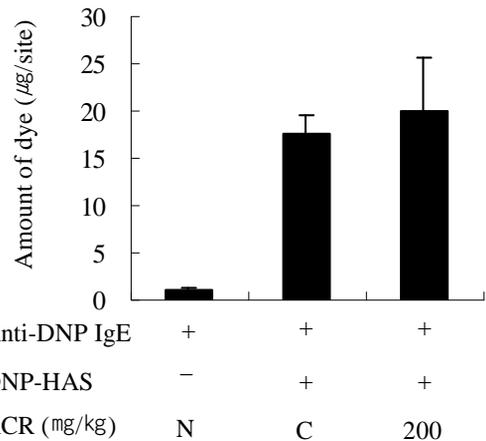


Fig. 3. Effect of ACR on PCA in rat

Each amount of dye is presented as the mean \pm S.E.M.

N: Normal

C: Control (DNP-HAS)

200: ACR (200mg/kg)

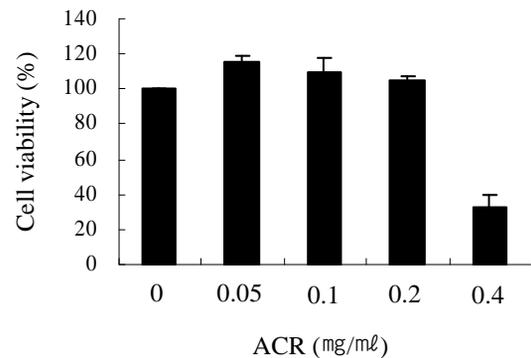


Fig. 4. Effect of ACR on cell viability of activated mast cells

The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) were treated with indicated concentration (0.05 mg/ml to 0.4 mg/ml) of ACR 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%).

ACR : Atractylodes Chinensis Rhizome

4. HMC-1세포에서 蒼朮 에탄올 추출물에 의해 PMA와 A23187로 유도된 TNF- α 억제에 미치는 효과

TNF- α 의 단백질 발현을 조사하기 위해 Western

blot 분석을 한 결과 蒼朮 에탄올 추출물의 농도 0.2 mg/ml에서 TNF- α 의 단백질 발현이 현저히 감소되어 있었다(Fig. 5A, 5B). ACR의 PMA와 A23187로 유발된 TNF- α 억제 효과를 살펴본 결과, 0.05, 0.1 및 0.2mg/ml ACR 처리군의 TNF- α 분비량은 각각 $4.21 \pm 0.08 \text{ ng/ml}$, $3.59 \pm 0.05 \text{ ng/ml}$ 및 $2.46 \pm 0.06 \text{ ng/ml}$ 로 나타나 25ng/ml의 PMA와 1 μm A23187로만 유도된 대조군의 $6.07 \pm 0.14 \text{ ng/ml}$ 에 비하여 농도 의존적으로 유의한($p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 6). mRNA의 발현도 마찬가지로 25ng/ml의 PMA와 1 μm A23187로만 유도된 대조군의 TNF- α 의 발현량보다 농도 의존적으로 높은 억제효과를 보여주었다(Fig. 7A, 7B).

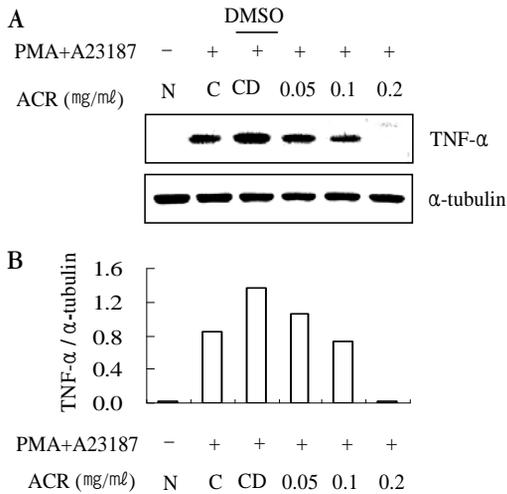


Fig. 5. Effect of ACR on PMA plus A23187-stimulated TNF- α protein levels

The HMC-1 cells(1×10^6 cells/ml) incubated with various concentrations(0.05mg/ml to 0.2mg/ml) of ACR for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h. The TNF- α protein levels were measured with the Western blot analysis(A). The TNF- α protein levels were measured by densitometry(B).

N: normal

C: control(PMA plus A23187)

CD: DMSO control

0.05: ACR (0.05mg/ml)+PMA plus A23187

0.1: ACR (0.1mg/ml)+PMA plus A23187

0.2: ACR (0.2mg/ml)+PMA plus A23187.

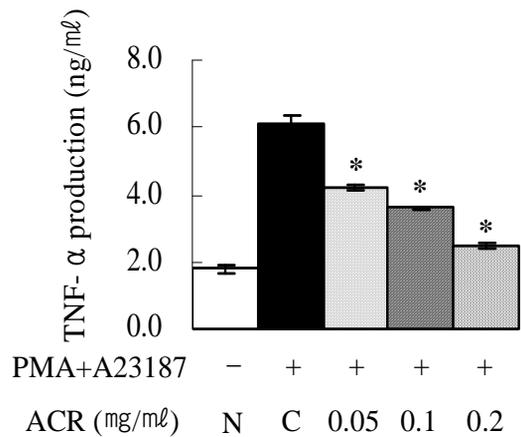


Fig. 6. Effect of ACR on PMA plus A23187-stimulated secretion of TNF- α

The HMC-1 cells(1×10^6 cells/ml) incubated with various concentrations(0.05mg/ml to 0.2mg/ml) of ACR for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h. The TNF- α secretion levels were measured with the ELISA method.

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

N: normal

C: control(PMA plus A23187).

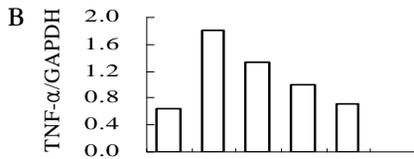
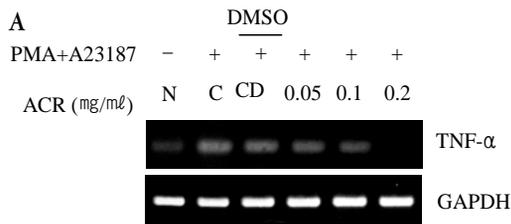
0.05: ACR (0.05mg/ml)+PMA plus A23187

0.1: ACR (0.1mg/ml)+PMA plus A23187

0.2: ACR(0.2mg/ml)+PMA plus A23187

5. HMC-1세포에서 蒼朮 추출물의 PMA와 A23187로 유도된 IL-6 억제에 미치는 효과

ACR의 0.05mg/ml, 0.1mg/ml 및 0.2mg/ml의 농도에서 각각 $0.16 \pm 0.01 \text{ ng/ml}$, $0.11 \pm 0.01 \text{ ng/ml}$ 과 $0.06 \pm 0.04 \text{ ng/ml}$ 의 농도를 나타내며 PMA plus A23187로 유도된 대조군의 IL-6의 생성량인 $0.48 \pm 0.01 \text{ ng/ml}$ 보다 현저히 감소하여 분비됨을 알 수 있었다(Fig. 8). 또한 IL-6의 mRNA 발현을에서도 0.05mg/ml에서 0.2mg/ml의 ACR 농도 의존적으로 억제현상이 나타남을 알 수 있었다. 특히 0.2mg/ml 농도의 ACR에서 그 분비량이 현저하게 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 9A, 9B).



		DMSO				
PMA+A23187	-	+	+	+	+	+
ACR (mg/ml)	N	C	CD	0.05	0.1	0.2

Fig. 7. Effect of ACR on PMA plus A23187-stimulated TNF- α mRNA levels

The HMC-1 cells(1×10^6 cell/ml) incubated with various concentrations(0.05 mg/ml to 0.2 mg/ml) of ACR for 1 h and then treated with PMA plus A23187 for 4 h. The TNF- α mRNA levels were measured with the RT-PCR analysis(A). The TNF- α mRNA levels were measured by densitometry(B).

N: normal

C: control(PMA plus A23187)

CD: DMSO control

0.05: ACR(0.05 mg/ml)+PMA plus A23187

0.1: ACR(0.1 mg/ml)+PMA plus A23187

0.2: ACR(0.2 mg/ml)+PMA plus A23187

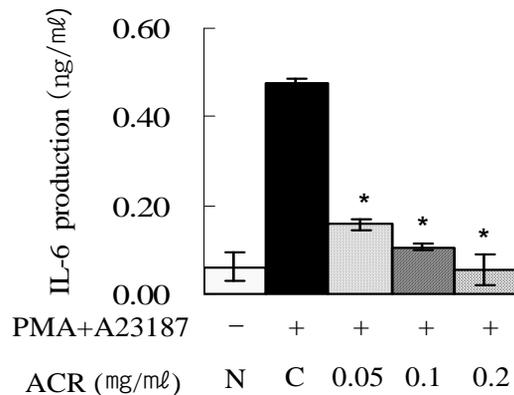


Fig. 8. Effect of ACR on PMA plus A23187-stimulated IL-6 secretion

The HMC-1 cells(1×10^6 cell/ml) incubated with various

concentrations(0.05 mg/ml to 0.2 mg/ml) of ACR 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 from the PMA plus A23187 value at $p < 0.05$.

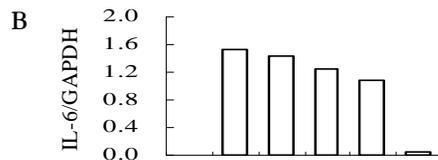
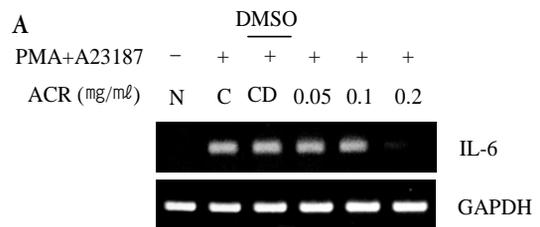
N: normal

C: control(PMA plus A23187)

0.05: ACR(0.05 mg/ml)+PMA plus A23187

0.1: ACR(0.1 mg/ml)+PMA plus A23187

0.2: ACR(0.2 mg/ml)+PMA plus A23187



		DMSO				
PMA+A23187	-	+	+	+	+	+
ACR (mg/ml)	N	C	CD	0.05	0.1	0.2

Fig. 9. Effect of ACR on PMA plus A23187-stimulated IL-6 mRNA levels

The HMC-1 cells(1×10^6 cell/ml) incubated with various concentrations(0.05 mg/ml to 0.2 mg/ml) of ACR 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

C: control(PMA plus A23187).

CD: DMSO control

0.05: ACR(0.05 mg/ml)+PMA plus A23187

0.1: ACR(0.1 mg/ml)+PMA plus A23187

0.2: ACR (0.2 mg/ml)+PMA plus A23187

6. HMC-1세포에서 蒼朮 에탄올 추출물의 PMA와 A23187로 유도된 IL-8 억제에 미치는 효과

ACR의 0.05mg/ml, 0.1mg/ml 및 0.2mg/ml의 농도에서 각각 12.08±1.96ng/ml, 10.95±0.74ng/ml 과 0.56±0.11 ng/ml의 농도를 나타내며 PMA plus A23187로 유도된 IL-8의 생성량인 26.39±1.96 ng/ml보다 현저히 감소하여 분비됨을 알 수 있었다(Fig. 10). 특히 0.2mg/ml 농도의 ACR에서 그 분비량이 Normal 세포의 분비량보다 현저하게 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 10) 또한 IL-8의 mRNA 발현율에서도 0.05mg/ml에서 0.2mg/ml의 ACR 농도 의존적으로 억제현상이 나타남을 알 수 있었다(Fig. 11A, 11B).

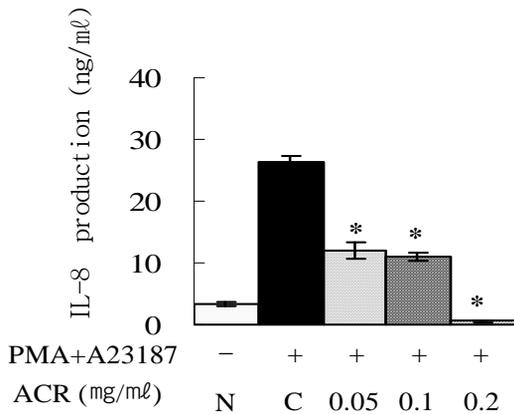


Fig. 10. Effect of ACR on PMA plus A23187-stimulated IL-8 secretion

The HMC-1 cells(1×10⁶cell/ml) incubated with various concentrations(0.05mg/ml to 0.2mg/ml) of ACR 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 from the PMA plus A23187 value at p < 0.05.

N: normal

C: control(PMA plus A23187)

0.05: ACR(0.05mg/ml)+PMA plus A23187

0.1: ACR(0.1mg/ml)+PMA plus A23187

0.2: ACR(0.2mg/ml)+PMA plus A23187

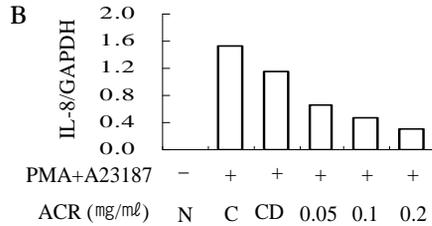
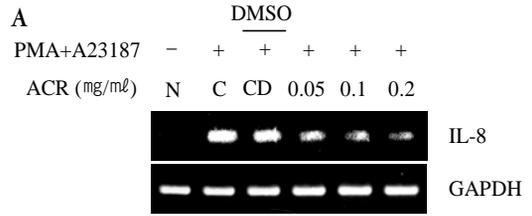


Fig. 11. Effect of ACR on PMA plus A23187-stimulated IL-8 mRNA levels

The HMC-1 cells(1×10⁶cell/ml) incubated with various concentrations(0.05mg/ml to 0.2mg/ml) of ACR 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

C: control(PMA plus A23187)

CD: DMSO control

0.05: ACR(0.05mg/ml)+PMA plus A23187

0.1: ACR(0.1mg/ml)+PMA plus A23187

0.2: ACR(0.2mg/ml)+PMA plus A23187

7. PMA와 A23187로 유도된 MAPKs에서 蒼朮 에탄올 추출물이 미치는 효과

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). 이 결과를 바탕으로 ACR의 MAPKs의 활성을 측정하기 위해 ACR 0.2mg/ml의 농도로 PMA와 A23187로 유도하기 1 시간 전에 처리한 후 PMA와 A23187로 30 분 동안 반응시켰다. ACR 0.2mg/ml의 농도에서 인산화된 JNK의 감소를 확인할 수 있었다. 반면, p38에서는 별 변화 없었고, ERK에서는 유의성 있는 정도는 아

나나 약간의 증가 경향을 보여주었다(Fig. 13A, 13B).

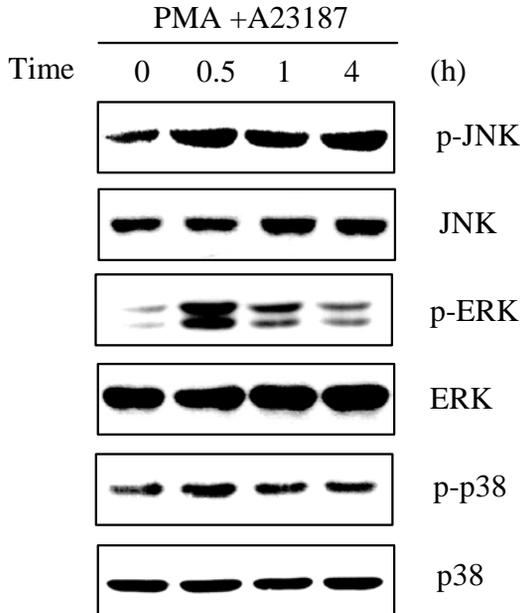


Fig. 12. Time course of MAPKs in PMA plus A23187-induced HMC-1 cells

Cells were treated with PMA plus A23187 for 0, 0.5, 1, and 4 h. Phosphorylated MAPKs and total MAPKs were measured with the Western blot analysis.

8. HMC-1세포에서 蒼朮 에탄올 추출물의 PMA와 A23187로 유도된 NF-κ B에 미치는 효과

핵 안에 존재하는 NF-κ B는 PMA와 A23187로 유도하였을 때 loading control인 핵막을 구성하는 성분인 laminB와 비교하여 현저히 증가한 반면, ACR 0.1mg/ml과 0.2mg/ml의 농도로 처리하였을 때 농도 의존적으로 핵 내 NF-κ B 단백질이 뚜렷하게 감소되어 있음을 확인하였다. 더욱이 p-Iκ B의 발현 또한 ACR 0.2mg/ml의 농도에서 현저하게 감소되어 나타났다(Fig. 14).

NF-κ B의 프로모터가 있는 유전자를 비만세포에 일시적으로 transfection한 후 ACR 0.2mg/ml의 농

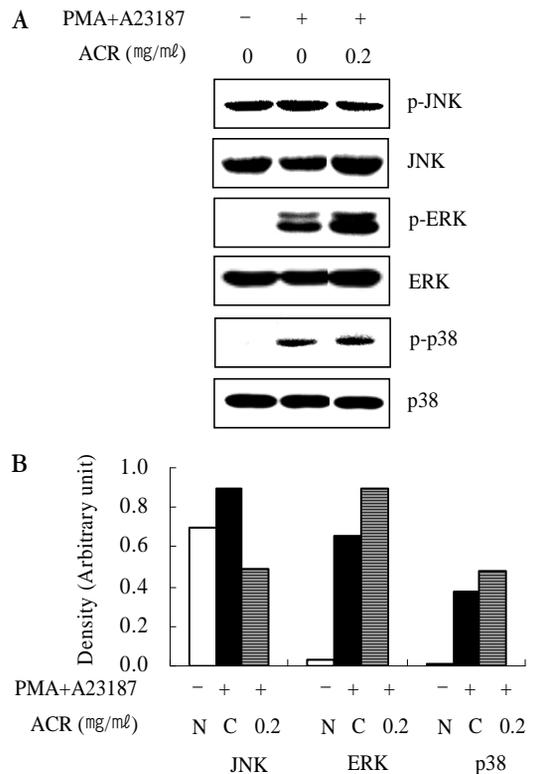


Fig. 13. Effect of ACR on PMA and A23187-activated MAPKs in HMC-1 cells

Cells were treated with PMA plus A23187 or pretreated with ACR, for 1 h. Phosphorylated MAPKs were measured with the Western blot analysis(A). Phosphorylated MAPKs levels were measured by densitometry(B).

N: normal

C: control(PMA plus A23187)

0.2: ACR(0.2 mg/ml)+PMA plus A23187

도로 1 시간 전 처리하고 PMA와 A23187로 24 시간동안 처리하여 NF-κ B프로모터 활성을 유도하였다. 그 결과 NF-κ B만을 transfection한 세포에 비해 PMA와 A23187을 처리한 세포에서는 NF-κ B promoter활성이 15배 정도 증가하여 나타났다, ACR을 처리한 세포에서는 PMA와 A23187을 처리한 세포의 NF-κ B promoter활성보다 유의성 있게(p < 0.05) 감소되었다(Fig. 15).

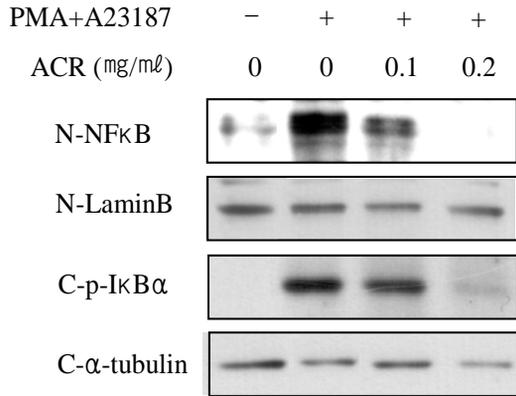


Fig. 14. Effect of ACR on PMA plus A23187-stimulated NF- κ B activation and I κ B α phosphorylation
The HMC-1 cells(1×10^6 cell/ml) were incubated with ACR(0.1mg/ml, 0.2mg/ml) for 1 h and then stimulated with PMA plus A23187 for 2 h. Nuclear and cytoplasmic proteins were isolated by lysis buffer and examined for NF- κ B, p-I 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

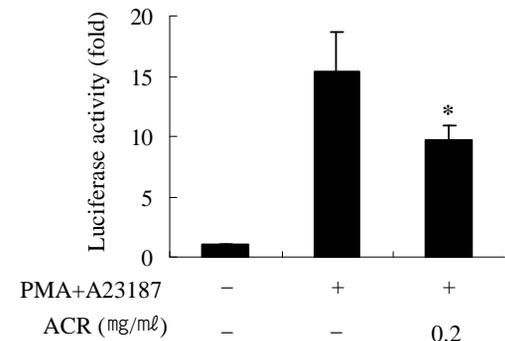


Fig. 15. Effect of ACR on activation of NF- κ B promoter region

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

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

IV. 고 찰

염증반응은 감염이나 조직의 손상에 의하여 비 특이적인 연쇄반응을 유발하며 감염 장소의 통증, 발적, 열, 종창에 의하여 특징지어지고, 부가적인 효과 분자들을 감염 장소로 이동시키며, 미세혈관을 응고 시켜 대식세포 반응에 의해 손상된 조직의 복구가 주된 목표인 인체내 면역반응이다¹⁾.

염증반응에는 여러 순환 혈구와 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 있다¹⁹⁾.

면역 반응은 일련의 효과분자들을 움직이며 다양한 방법으로 항원을 제거한다. 일반적으로 이들 효과분자들은 국소적인 염증반응을 유도하여 몸체 조직의 큰 손상 없이 항원을 제거한다. 그러나 어떤 경우에는 이들 염증반응이 해로운 작용을 하여 조직손상이나 심지어는 죽음을 일으키기도 한다. 이러한 부적절한 면역반응을 과민반응 또는 알러지라고 하고, IgE에 의한 제 1형, 항체에 의한 제 2형, 면역복합체에 의한 제3형, 세포성 면역 반응에 의한 지연형 과민반응 (DTH)인 제4형으로 구별한다²⁾.

IgE 항체 분자에 항원이 결합하면 세포에서 다양한 종류의 매개 물질이 빠르게 분비됨으로써 총체적으로 혈관투과성이 증가하며, 혈관의 확장기관지 및 내장 평활근의 수축, 그리고 국부 염증 등과 같은 반응이 일어난다. 이 반응은 항원의 공격이 있는 후, 수분 내에 급속하게 시작되기 때문에 이를 즉시형 과민반응이라 부른다²⁰⁾.

1형 즉시형 과민반응이 감퇴하면서 그동안 방출

되었던 매개물질들이 후기반응이라 불리는 국소적인 염증을 유발한다. 제 1형 반응이 발생하고 4-6 시간이 지난 뒤 후기반응이 시작되고 1-2일 계속된다. 이러한 지역적인 후기반응은 비만세포에서 방출된 싸이토카인에 의해서도 진행된다²⁾.

유전성 소인을 가진 사람이거나, 반복적으로 항원에 노출되면 인체는 IgE라 불리는 특이성 type의 항체를 만들기 시작하고, IgE항체는 세포 표면에 그 항체를 받아들이는 FcεRI 수용체를 가진 비만세포, 호염구와 결합하게 된다^{21,22)}. 이렇게 감각된 비만 세포에 다시 같은 항원이 노출되면 비만세포의 세포막에 붙어 있던 IgE의 교차결합이 발생되고 이로 인해 세포막내의 인지질들의 메틸화가 촉진되고 막의 유동성이 증가된다. 이렇게 되면 세포내로의 Ca²⁺의 증가는 세포내의 탈과립을 유발하게 된다. 그 결과 histamine, TNF-α, IL-6, IL-8, NF-κB 등과 같은 많은 염증매개체들이 방출하게 되고 이러한 화학적 물질들의 작용인 혈관 확장, 점액분비 증가, 평활근 수축 등의 작용에 의하여 신체 부위에 국소적 또는 전신적 영향을 미쳐 천식, 알러지 비염, 아토피성 피부염 등의 알러지 질환이 발생하게 된다²⁾.

TNF-α는 국소적으로 혈관내피세포를 활성화하고 혈관투과성을 증가하여 세포와 조직에서 IgG보체의 침투를 높이는데 기여하고 림프절로의 fluid drainage를 증가 시키며 전신적으로는 발열과 대사산물충격을 기동한다. IL-6는 국소적으로 림프구 활성화와 항원생산을 증가시키며 전신적으로는 발열과 급성기 단백질생산을 유발하고, IL-8은 화학조성인자로서 국소적으로 호중구, 호염구, T세포를 감염된 부위로 모으는 작용을 한다¹⁾.

MAP kinase(MAPKs) 신호전달체계는 세포가 외부의 환경변화에 따른 자극들을 인지하여 그 정보를 세포질 및 세포핵 내부로 전달하는 과정에 관여하는 대표적인 신호전달체계이다. 활성화된 MAPKs는 핵내로 유입되어 활성인자를 직접 활성화

화하고 매개자(mediator)로 표적 유전자를 활성화하거나, 전사인자(transcription factor)인 NF-κB에 영향을 미쳐 NF-κB가 IκB의 조절에서 벗어나 핵내로 이동하여 활성화하여 기전을 나타내기도 한다. 특히 세포의 성장, 발생, 분화 사멸 등의 조절기전에 관여한다. 척추동물세포에 존재하는 MAP kinase군에는 extracellular signal-related kinase(ERK), stress-activated protein kinase(SAPK/JNK), p38 MAP kinase등이 있다²³⁻²⁵⁾.

이들은 세 가지의 구별적인 신호전달을 통해 조절되어지는 것으로 알려져 있다. ERK의 활성화는 다양한 성장 인자, cytokines, 그리고 phorbol esters에 의해 이루어지며, 많은 세포에서 세포 증식과 분화를 유도하는 그 기능을 나타낸다²³⁾. 반면 JNK와 p38은 성장인자와 염증유도 cytokine, 자외선 노출, 방사선 조사, 열 충격, 그리고 삼투효과 등의 스트레스에 의해 활성이 증가되는 것으로 알려져 있고²⁴⁻²⁶⁾, 특히 인산화된 JNK는 pro-inflammatory cytokines의 발현에 필수적이다²⁷⁾.

전사인자인 NF-κB는 B세포에서 κ light chain의 발현을 조절하는 것으로 처음 알려진 후, 면역반응이나 염증반응에 관여하는 TNF, IL-1, IL-6, IL-8, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF), inducible nitric oxide synthase(iNOS), intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1), E-selectin, MHC class I 과 II 분자 등의 전사를 증가시키는데 관여하는 것으로 밝혀졌다. NF-κB는 분자량 50 κD과 65 κD의 p50/p65의 heterodimer로 구성되어 있다. 자극을 받지 않은 세포에서는 NF-κB가 IκB라는 저해 단백질과 결합하여 세포질에 위치한다. 세포가 병원균이나 염증 cytokine, 과산화물, 자외선 등의 stress 신호를 받으면 IκB의 특정 serine 잔기가 인산화되며 ubiquitin경로를 통해 분해된다. IκB로부터 자유로워진 NF-κB는 핵내로 이동하여 관련유전자의 promoter부위에 결합하여 전사를

촉진한다²⁸⁻³²⁾.

이렇게 하여 NF- κ B가 활성화 되고 세포내 분비량이 증가되면, activator protein-1(AP-1: T세포 활성화 전사인자) 등과 함께 각종 염증매개물을 합성하도록 유도하는 전사인자로서의 기능을 가지게 된다³³⁾. 이는 NF- κ B가 다양한 종류의 유전자 발현을 조절하고 발현 유전자중 많은 수가 면역 혹은 염증 반응에 관계되어 있다는 것을 의미한다. 물론 이들 유전자들은 NF- κ B에 의해서만 조절되는 것은 아니나 TNF- α , IL-6, IL-8과 같은 단백질의 발현에 있어 NF- κ B가 이들을 조절하는 중요한 역할을 담당한다는 뜻이다²⁾.

그런데 이처럼 중요한 NF- κ B의 발현량은 I κ B의 분비량에 반비례하게 나타나게 된다. 따라서 항염증제의 역할은 염증 발생시 세포내로 분비되는 염증매개물질과 I κ B의 양을 증가 시키고 NF- κ B의 발현량을 감소시키는데 중요성이 있다고 할 수 있다.

蒼朮은 방향성의 정유성분을 함유하면서 濕邪가 주로 中焦에 정체됨에 따라 나타나는 泄瀉, 消化不良, 食慾不振 등의 각종 소화기 질환³⁴⁾ 및 vitamin A가 함유되어 있어 안과의 內外障, 青盲, 夜盲症을 치료하며 살균작용 및 소독작용을 가지고 있다³⁵⁾.

성분은 茅蒼朮의 근경 정유 중에는 atracylodin, hinesol, β -edudesmol, elemol, atractylone, acractylodinol 등이 함유되어 있고, 北蒼朮의 근경 정유 중에는 atracylodin, atractylone, hinesol, β -selinene, L- α -bisabolol 등이 함유되어 있다. 性은 溫하고 味는 辛苦하고 歸經은 脾胃肝經이며 效能主治는 燥濕健脾 祛風散寒 明目, 治腕腹脹滿 泄瀉 水腫 腳氣痿躄 風濕痺痛 風寒感冒 夜盲 등이다¹²⁾. 또한 蒼朮은 脾經藥으로 脾胃肺大小腸經에 영향을 미치는 燥濕止瀉하며 陰虛液燥便秘에는 禁忌하여야 한다고 하였고³⁶⁾, 主作用은 燥濕健脾, 祛風濕作用이며, 健胃, 利尿, 鎮靜, 血糖降下 및 強壯의 약리작용을 가지고 있으며, 蒼朮의 性質은 辛燥

하므로 陰虛咯血, 鼻出血시에 사용하지 않도록 하였다³⁷⁾.

약리학적 작용을 살펴보면 위액의 산도를 높이며 정유 성분은 위장의 운동, 분비, 흡수기능을 높이는 작용이 있다³⁸⁾. 이노작용은 현저하지는 않지만 뇨 중 Na와 K를 배설시키며 혈당 강하 작용 및 혈중의 콜레스테롤 수치를 감소시킨다^{39,40)}.

실제 임상에서 많이 사용되는 方藥合編에선 蒼朮이 主藥으로 配伍된 方劑는 濕, 內傷, 傷風寒, 脾胃에 관련된 병리에 사용되는 처방이었고, 蒼朮이 主藥으로 配伍된 方劑의 치료영역은 18개였으며, 그 중 寒門과 大便門의 처방사용 빈도는 가장 높았다고 한다¹³⁾.

蒼朮과 관련된 실험논문으로는 성⁴¹⁾은 蒼朮의 항병원미생물작용을 바탕으로 항위궤양 작용, 간조직의 재생 촉진 작용, 항종양 작용이 있다고 했으며, 유⁴²⁾는 소염, 진통작용과 면역기능 향진 작용으로 장관염증 및 관절염 등 각종 염증성 질환에 응용될 수 있다고 했다. 김⁴³⁾의 연구에서는 창출 추출액이 비만백서의 체중증가를 억제하는 효과가 있는 것으로 밝혀졌고, 조⁴⁴⁾는 창출의 알칼로이드 성분은 마우스의 일반행동, open-field에서의 행동 및 수중미로 학습과정 등의 실험을 통하여 유의한 진정효과를 나타내었으며, phenobarbital과 유사한 진정효과를 갖는 물질로 추측된다고 했다. 또한 임¹⁴⁾은 蒼朮이 君藥인 不換金正氣散이 IgE 반응과 TNF- α 생성을 감소시키고 Th1 반응을 유도하면서 Th2 반응을 감소시켜 불균형한 Th세포들의 반응을 교정하면서 항알레르기 작용을 가진다고 하였다. 한¹⁵⁾은 소염작용 및 진통, 해열작용과 면역증강 작용이 있어 관절염을 비롯한 각종 염증성 질환에 응용되고 있다고 했고, 이¹⁶⁾는 蒼朮이 IL-4, IL-5의 생성을 억제시킨다고 하였으며, 허¹⁷⁾는 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제시켜 NO의 형성을 억제함으로써 염증성 질환에 효과적으로 작용할 것을 시사했다.

위에서 살펴본 바와 같이 창출은 제반 염증성 질환 및 알레르기 질환에 효과가 있을 것을 보고하고 있으나, 창출 에탄올 추출물의 작용 기전을 분자생물학적으로 확인한 연구 결과는 없었다. 이에 본 연구에서는 창출의 즉시형 항알레르기 효과를 알아보고, 창출 에탄올 추출물(ACR)이 histamine, TNF- α , IL-6, IL-8, MAPKs, NF- κ B의 생성량과 활성을 감소시켜 항염증작용이 있는지를 분자생물학적으로 확인해 보고자 하였다.

본 연구에서는 동물실험인 PCA 반응 시험과 쥐 비만세포의 히스타민 분비를 통한 창출의 억제효과와 비만세포주인 HMC-1 세포에 PMA와 calcium ionophore A23187로 자극하여 분비하는 염증성 물질에 대한 창출 에탄올 추출물(ACR)의 억제효과를 보여줌으로서, 창출 에탄올 추출물이 type I 인 즉시형 과민증에 나타나는 알레르기 및 염증반응을 조절하는 효과가 있음을 규명하려 하였다.

창출의 항알레르기 효과 입증에 위해 수동적인 알레르기 반응을 시험한 결과, IgE의존적 PCA 반응에서 창출은 억제현상을 보이지 않았다(Fig. 1, 2, 3).

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 창출의 농도를 다르게 하여 HMC-1세포를 처리한 후 A23187과 PMA로 세포의 활성을 유도하여 세포 생존율을 비교한 실험에서, 창출은 0.2 mg/ml의 농도까지만 세포증식에 별다른 영향을 주지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 4).

우선, A23187과 PMA로 자극된 HMC-1 세포에서 염증 반응 조절 효과를 관찰하기 위해 ELISA

방법으로 창출의 1시간 전 처리한 비만세포의 배양액으로부터 TNF- α , IL-6, 그리고 IL-8을 분비량을 측정하였다.

그 결과 TNF- α 의 경우 단백질 발현은 창출 0.2mg/ml의 농도에서 현저히 감소하였으며, TNF- α 의 단백질 분비량이 농도 의존적으로 억제함을 보였다. IL-6의 경우에는 0.05mg/ml의 농도부터 0.2mg/ml의 농도까지 농도 의존적으로 그 분비량이 억제되는 것이 보였으며, A23187과 PMA 단독으로 유도된 HMC-1세포 배양액의 IL-6 생성량과 0.2mg/ml의 농도에서의 HMC-1세포 배양액의 IL-6 생성량을 비교하였을 때 높은 저해율을 나타내었다. 또한 IL-8의 생성량도 창출 0.05mg/ml에서 0.2 mg/ml의 농도에 의존적으로 감소되었다.

자극된 비만세포에서 분비되는 TNF- α , IL-6, IL-8과 같은 염증성 물질들을 억제하는 효과는 mRNA 수준에서도 관찰되었다.

이러한 실험결과로 미루어 보아 창출이 염증매개물질인 TNF- α , IL-6 및 IL-8의 생성을 억제함으로써 염증치료를 효능이 있을 것으로 사료된다.

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^{45,46}. NF- κ B 생성량에 대한 실험에서 창출의 0.1-0.2 mg/ml 농도에서 뚜렷하게 감소하였고, 더욱이 인산화된 I κ B(p-I κ B)의 발현은 창출 0.2 mg/ml의 농도에서 현저하게 감소되었다. 이는 창출이 I κ B의 인산화를 억제함으로써 NF- κ B의 발현을 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 14). 또한 NF- κ B의 프로모터 부위의 활성을 창출의 억제 효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 15).

MAPKs 경로는 세포내 반응에서 염증매개 분자들을 조절하는 역할을 한다^{7,8}. 전 연구에 의하면 PMA와 A23187은 p38, JNK, ERK와 같은 세 중

류의 MAPKs를 활성화시킨다고 보고된 바 있다⁹⁾. 본 실험에서 창출 에탄올 추출물이 0.2mg/ml에서 인산화된 JNK의 억제가 현저히 관찰되었으며, p38에서는 별 변화가 없었고, ERK에서는 유의성 있는 정도는 아니나 약간의 증가경향을 보여주었다(Fig. 13). 그러나 ERK의 경우 주로 성장인자의 자극에 의한 세포의 증식 및 사멸에 관련되는 것으로 알려져 있어, 본 연구와의 관련성을 설명하기는 어려우며, cytokine 관련 기전에 주로 영향을 미치는 p38과 JNK를 관찰할 필요가 있다.

이러한 결과는 탈라립된 비만세포에서 I κ B/NF- κ B 경로 및 JNK의 발현을 조절함으로써 이에 수반되는 염증성 물질인 TNF- α , IL-6, IL-8의 생성을 억제하는 효과가 있음을 의미한다.

이상의 연구결과로 볼 때 창출 에탄올 추출물이 즉시형 항알레르기 효과는 나타나지 않았지만, TNF- α , IL-6, IL-8, JNK, NF- κ B의 생성량 감소 및 활성을 억제시켜 창출의 항염증작용을 분자 생물학적인 차원에서도 확인할 수 있었다.

V. 결 론

본 연구는 창출의 항염증 효과를 알아보기 위하여 비만세포를 80% ethanol로 추출한 蒼朮 에탄올 추출물(ACR)로 전처리한 후, PMA와 A23187로 유도한 TNF- α , IL-6, IL-8의 염증매개물질의 생성에 어떠한 영향을 미치는가 알아보았으며, 또한 ACR로 전처리된 비만세포가 NF- κ B의 활성화 및 MAPKs의 활성을 억제하므로써 염증성 매개물질에 대한 억제 효과를 기대할 수 있는지에 대한 실험을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. ACR은 IgE 의존적인 PCA반응 동물실험에서 억제 현상을 나타내지 않았다. 하지만, TNF- α 분비는 ACR의 0.05-0.2mg/ml의 농도에서 농도

의존적으로 생성량이 감소했으며, 특히 0.2mg/ml의 농도에서 60% 이상의 높은 저해율을 보였다. mRNA 발현율에서도 농도의존적으로 억제 효과가 있었다.

2. IL-6 분비는 ACR의 0.05-0.2mg/ml의 농도에서 농도의존적으로 생성량이 감소했으며, 특히 0.2 mg/ml의 농도에서 55% 정도의 저해율이 관찰되었다. mRNA 발현율에서도 농도의존적으로 억제현상을 나타내었다.
3. IL-8 분비는 ACR의 0.05-0.2mg/ml의 농도에서 농도의존적으로 생성량이 감소했으며, 특히 0.2 mg/ml의 농도에서는 아무것도 처리하지 않은 정상세포 수준과 비슷하게 감소되어 나타났다. mRNA 발현율에서도 농도의존적으로 억제현상을 나타내었다.
4. MAPKs에 대한 ACR의 효과를 시험한 결과, ACR 0.2mg/ml의 농도에서 오직 인산화된 JNK에서만 억제효과를 보였고, p38이나 ERK에서는 억제 현상을 관찰 할 수 없었다.
5. NF- κ B의 생성량은 ACR의 0.1-0.2mg/ml 농도에서 뚜렷하게 감소하였고 더욱이 p-I κ B의 발현은 ACR 0.2mg/ml의 농도에서 현저하게 감소되어 나타났다. 또한 NF- κ B promotor 활성이 현저히 감소하였다.

이상의 연구결과로 볼 때 蒼朮 에탄올 추출물이 즉시형 항알레르기 효과는 나타나지 않았지만, TNF- α , IL-6, IL-8, JNK, NF- κ B의 생성량 감소 및 활성을 억제시켜 ACR의 항염증작용을 분자 생물학적인 차원에서도 확인할 수 있었다.

앞으로 ACR을 알리지성 염증 및 제반 항염증 치료에 보다 폭넓게 활용할 수 있는 가능성을 보여주었다고 사료된다.

참고문헌

1. Janeway C. A. Jr., Travers P., Walport M & Shlomchik, M. 면역생물학(Immunobiology 6th edition). 서울:라이프사이언스. 2005;13, 46-7, 78-80, 564-6.
2. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B.A.,& Kuby, J. KUBY 면역학(Kuby immunology). 서울:월드사이언스. 2006;263, 419-20, 398-423, 417-8.
3. Thomas PS. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma, Immunol Cell Biol, 2001;79:132-40.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Arbabi S, Maier RV. Mitogen-activated protein kinases. Crit Care Med, 2002; 30:74-9.
8. Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P, Fiers W. The p38/RK mitogen activat-ed protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. EMBO J. 1996;15:1914-23.
9. Kim SH, Choi CH, Kim SY, Eun JS, Shin TY. Anti-allergic effects of Artemisia iwayomogi on mast cell-mediated allergy model. Exp Biol Med (Maywood). 2005; 230:82-8.
10. 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.
11. 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.
12. 韓醫科大學 本草學 編纂委員會. 本草學. 서울: 영림사. 2004;334-5.
13. 박종찬, 이장천, 국윤범, 염현식, 윤용갑. 方藥合編중 蒼朮이 配伍된 方劑의 活用に 대한 考察. 대한한의학 방제학회지. 2003;11(2):41-60.
14. 林剛民. 不換金正氣散이 마우스 Th1/Th2 분화 및 알레르기 염증 반응 조절에 미치는 효과. 동의생리병리학회지. 2006;20(6):1467-76.
15. 한영규, 加味蒼朮散 Carrageenan 유발 동물모델 관절염의 소염, 진통, 해열 및 면역에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2005;15(1): 127-41.
16. 이정우. 蒼朮이 천식 관련 Th1/Th2 세포분비 cytokine에 미치는 영향. 대한한방내과학회지.

- 2007;28(4):681-93.
17. 허인희. 蒼朮 추출물의 BV2 cell 소염작용에 관한 실험적 연구. 대한한방안이비인후과부과학회지. 2007;20(2):36-46.
 18. 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.
 19. 이중달. 기본병리학. 서울:고려의학. 1996; 79-130.
 20. 강병수. 韓方臨床 알레르기, 서울:성보사. 1988;57-8, 62-4, 83-110, 133-45.
 21. Williams, C. M., & Galli, S. J. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. J Exp Med. 2000; 192(3):455-62.
 22. Ptak, W., Geba, G. P., & Askenase, P. W. 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.
 23. manna S.K., Mukhopadhyay A., Aggrarwal B.B.: Leflunomide suppresses TNF-induced cellular responses:effects on NF-kappaB, activator protein-1,c-jun N-terminal protein kinase, and apoptosis. J Immunol. 2000; 165(10):5962-9.
 24. Bokemeyer D, Sorokin A, Dunn MJ. Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. Kidney Int 1996;49:1187-98.
 25. Simon C., Simon M., Vucelic G., Hicks M.J., Plinkert P.K., Zenner H.P.: The p38 SAPK pathway regulates the expression of themMP-9 collagenase via AP-1-dependent promotor activation. Exp Cell Res. Dec 10. 2001;271(2):344-55.
 26. Ip YT, Davis RJ.:Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase(JNK)-from inflammation to development. Curr Opin Cell Biol. 1988;10(2):205-19.
 27. Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, Mielke K, Kanzow M, Brecht S, et al. c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. Glia 2005;50(3):235-46.
 28. Regnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z., & Rothe, M. Identification and characterization of an Ikappa kinase. Cell. 1997;90:373-83.
 29. Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., & Karin, M. The IkappaB kinase complex(IKK) cntains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. Cell. 1997;91:243-52.
 30. 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.
 31. 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.
 32. Baldwin, A. S. Jr. The transcription factor NF- κ B human disease. J Clin Invest. 2000;107:3-6.
 33. Barnes, P. J., & Karin, M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. N Engl J

- Med. 1997;336:1066-71.
34. 김수영, 송용선. 창출에 대한 문헌적 고찰. 한방재활의학회지. 1997;7(1):583-9.
 35. 한국생약학교수협의회. 한방약리학. 서울:정담. 1998:132-5.
 36. 이용성. 經藥分類典. 서울:정담출판사. 2002:18.
 37. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영중, 이선희. 한약임상응용. 서울:전통의학연구소. 1986: 218-9.
 38. 강은미, 정창호, 심기환. 한국산 삼주의 기능성. 농산물저장유통학회지. 2001;8(1):86-91.
 39. Satoh K., Yasuda I., Ushiyama K., Akiyama K., Kano I. The effect of crude drugs using diuretic on horse kidney (Na⁺-K⁺)-adenosine triphosphatase. Yakugaku Zasshi. 1991;111(2):138-45.
 40. 김진기, 박경렬, 나익식. 삼주의 定量的 形質에 의한 변이분석. 한국자원식물학회지. 2002; 15(1):36-42.
 41. Hye-Young Sung, Young-Sun Choi, Sung-Hee Cho, Hyang-Rim Lee and Sang-Woo Choi. Effect of Methanol Extract of *Rubus Coreanus Miquel* and *Atractylodes Japonica* Rhizome on Hepatic Toxicity and Immunomodulating Activity in Mice. *Nutritional Sciences* 2006;9(2):68-73.
 42. 유광원, 신광순. 창출 성분의 장관 면역 자극을 통한 골수세포 증식활동. 한국식품과학회지. 2001;115:135-41.
 43. 김수용. 蒼朮 추출액이 肥滿白鼠와 3T3-L1의 지방세포분화에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1997.
 44. 조항영. 蒼朮 알칼로이드의 진정작용에 관한 연구. 생약학회지. 1974;5(3):159-66.
 45. 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.
 46. Erchler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med.* 2000;51:245-70.