

OMC-2010 추출물이 마우스의 비장세포 cytokine 생성에 미치는 영향

배기상¹, 박경철², 최선복², 조일주², 서상완³, 김종진³, 신용국³, 김민선⁴, 박규환⁴, 김현식⁴,
송호준², 박성주^{1,2,*}

1 : 원광대학교 한방체액조절연구센터, 2 : 원광대학교 한의과대학 본초학교실,
3 : 충북테크노파크 전통의약산업센터, 4 : 한국기초과학지원연구원 질량분석연구부

Effects of OMC-2010 extracts on cytokine productions in mouse spleen cells

Gi-Sang Bae¹, Kyoung-Chel Park², Sun-Bok Choi², Il-Joo Jo², Sang-Wan Seo³,
Jong-Jin Kim³, Yong-Kook Shin³, Min Sun Kim⁴, Kyu Hwan Park⁴, Hyun Sik Kim⁴,
Ho-Joon Song², Sung-Joo Park^{1,2,*}

1 : Hanbang Body-fluid Research Center, Wonkwang University,
2 : Dept. of Herbology, College of oriental Medicine, Wonkwang University,
3 : ChungBuk Oriental Medicine Center, ChungBuk Techno Park,
4 : Division of Mass Spectrometry Research, Korea Basic Science Institute

ABSTRACT

Objective : This study was performed to estimate the effects of OMC-2010 extract on cytokine production in mouse spleen cells.

Methods : Mouse spleen cells were pre-treated with ethanol and water extract of OMC-2010 for 1 h, then stimulated with lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/ml) for 48 h. Then the cells were harvested for real-time reverse transcription polymerase chain reaction to detect cytokines.

Results : OMC-2010 ethanol extract significantly inhibited the LPS-induced interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α and IL-5 mRNA expressions, but not shown such changes in IL-6, IL-4, IL-13. OMC-2010 water extract significantly inhibited the LPS-induced TNF- α , and IL-5 mRNA expressions, but not shown such changes in IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-13.

Conclusions : These results could suggest that both ethanol and water OMC-2010 extract could inhibit the TNF- α and IL-5 mRNA expression.

Key words : OMC-2010, lipopolysaccharide (LPS), splenocyte, inflammation

서론

최근 천연물에 의한 신약 개발 및 건강식품에 관한 관심이 많아지면서, 음식이나 식품으로부터 면역증강에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 천연물질로부터 항암, 항산화, 면역활성 등의 효과에 대한 연구는 추후, 적은 부작용, 적은 치료비용을 의미할 수 있다. 면역 조절 작용은 생명 유지에 있어 가장 근본이 되는 과정으로, 암, 염증 등의 발생과 예방에 필

수적이다¹⁾.

비장에서는 면역조절에 관여하는 세포가 다수 존재하는데, 면역조절에 관여하는 대부분의 T 세포는 interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α 를 분비하는 Th1 type과 interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13 등을 분비하는 Th2 type이 있다. T 세포에서 분비되는 이런 사이토카인은 세포성 면역반응의 실행단계에서 작용을 나타내며, 면역 세포와 염증세포간의 신호 전달 과정에서도 중요한 역할을 한다^{2,3)}.

*교신저자 : 박성주, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 063-850-6450 · E-mail : parksj08@wku.ac.kr
#제1저자 : 배기상, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한방체액연구조절센터
· Tel : 063-850-6837
· 접수 : 2012년 08월 20일 · 채택 : 2012년 08월 31일

金水六君煎은 肺腎虛寒의 虛症에 주로 사용하는 처방으로 1642년경 《景岳全書》에 최초로 수록된 처방으로서 일명 歸地二陳湯 혹은 熟地二陳湯이라고도 한다. 金水六君煎은 경구 투여가 알레르기성 천식 모델 마우스의 기관의 조직 및 미세 구조에 미치는 영향이 보고하는 등 면역세포에 영향이 있음을 보고하고 있다⁴⁾. 본 연구에서는 金水六君煎이 면역세포에 미치는 효과를 증대시키기 위해서, 처방 구성 및 용량을 변경한 OMC-2010을 이용하여 면역세포 조절 능력을 관찰해 보았다. OMC-2010은 “金水六君煎”의 기원처방인 熟地黃 (*Rehmanniae Radix*), 半夏 (*Pinellia Tuber*), 陳皮 (*Citri Pericarpium*), 甘草 (*Glycyrrhizae Radix*)를 주성분으로 포함하고, 桔梗 (*Platycodi Radix*) 및 五味子 (*Schizandrae Fructus*)가 가미한 처방이다. 金水六君煎에도 補陰, 去痰 작용이 훌륭하지만, 여기에서 去痰 작용이 좋은 桔梗, 補陰 작용이 탁월한 五味子を 추가하여 약효를 증대를 시도하였다.

본 연구에서는, OMC-2010의 면역조절효과를 조사하기 위해, 비장세포를 분리하여 사이토카인의 분비를 조사하였다. OMC-2010을 에탄올과 물을 통해 추출한 다음, 비장세포에 처리하여, 전염증성 사이토카인인 IL-1beta, IL-6, TNF-alpha등을 조사하고, Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13의 발현을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

모든 실험은 원광대학교에서 정해놓은 동물 관리 규정에 따라 수행되었다. 본 실험에 사용한 C57BL/6 Mouse (체중 15-20g, female)는 오리엔트 바이오 (성남, 경기도, 대한민국)에서 구입하였다. 실험동물은 원광대학교 한의과대학 동물 사육실에서 일정한 조건(온도:21±2℃, 습도:50~60%, 명암: 12시간 주기하에서 일반 고형사료(오리엔트 바이오, 성남)와 물을 충분히 공급하면서 환경 적응을 위해 일주일 동안 적응 시킨 후 실험하였다.

2) 약재

실험 약재인 熟地黃, 半夏, 陳皮, 甘草, 桔梗, 五味子是 Omniherb(영천, 대한민국)에서 구입한 후 정선한 후 실험약재로 사용하였다. 충북테크노파크 전통의약산업센터에서 확인한 후 약재를 사용하였으며, 일부는 보관하였다.

2. 방법

1) 약물 추출

(1) 에탄올 추출

熟地黃, 半夏, 陳皮, 甘草, 桔梗, 五味子を 2:1:1:0.5:1:1로 섞은 처방을 50배의 70% 에탄올 용액을 가하여 37℃ 항온수조에서 24시간 동안 추출하였다. 추출 후 에탄올층(상등액)을 회전감압농축기(EYELA, RikakikiCo., Tokyo, Japan)로 농축한 후, 생리식염수 녹여 stock solution을 제조하였다. 제조된 stock solution은 -20℃에 보관하면서 분석방법에 적합하도록 희석하여 사용하였다

(2) 물 추출

熟地黃, 半夏, 陳皮, 甘草, 桔梗, 五味子を 2:1:1:0.5:1:1로 섞은 처방을 50배의 물에 약탕기(대웅, 한국)로 3시간 가열 추출한 다음 여과한 후, 동결 건조하여 각각 건조분말을 얻었으며, 실험을 위하여 4℃에 보관했다. 생리식염수 녹여 stock solution을 제조하였다. 제조된 stock solution은 -20℃에 보관하면서 분석방법에 적합하도록 희석하여 사용하였다

2) Mouse splenocytes 준비

C57BL/6 마우스로부터 spleen을 분리하여 micro slide glass로 잘개 으갠 뒤, 0.4 μm nylon cell strainer로 여과하였다. 1200rpm에서 10분간 원심분리 한 후 증류수를 이용하여 적혈구를 파괴하였다. Splenocyte를 세척하여 RPMI-1640으로 부유한 후 cell수를 측정하였다.

3) 세포 독성 분석

Spleen cell의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT분석법으로 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서 동일한 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 OMC-2010을 처리하였다. 48시간 동안 배양한 뒤 5 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 용해액을 96-well plate에 loading한 후, 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다.

4) mRNA 발현 측정

세포에 TriZol 1ml를 넣은 후 Chloroform 200μl를 넣고 vortexing한 후 12,000 rpm, 4℃에서 15분 동안 원심분리 한 후 상층액을 분리하여, -20℃에 보관된 isopropanol 500 μl를 넣은 뒤 상온에서 30분 동안 놓아두었다. 이를 12,000 rpm, 4℃에서 10분 동안 원심 분리하여 용액을 버리고 80% ethanol 1ml를 넣은 후 7,500 rpm, 4℃에서 5분 동안 원심 분리하였다. ethanol을 버리고, DEPC treated water에 녹인 후 fluorometer를 이용하여 정량하였다. 동량의 mRNA를 cDNA로 합성 하였다. cDNA를 가지고 Taqman 방식으로 염증성 활성 물질을 측정 하였다. 각 primer와 probe는 Applied Bio systems (CA, USA)에서 구입하였다.

5) 통계 처리

실험 결과는 Mean ± SE로 표시하였고, 대조군과 실험군의 차이를 검정할 때에는 one way ANOVA로 검정하여 P값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. OMC-2010이 세포 독성에 미치는 영향

OMC-2010이 마우스 비장 세포의 대사 및 독성에 영향을 미쳐서 사이토카인 조절에 관여할 수 있음을 배제하기 위하

여, 비장 세포에서 OMC-2010를 48시간 동안 처리하여 세포 생존률을 관찰하였다. 그 결과, 아래 Fig. 1과 같이 OMC-2010은 마우스 비장세포에서 유의성 있는 세포 독성을 보이지 않았다.

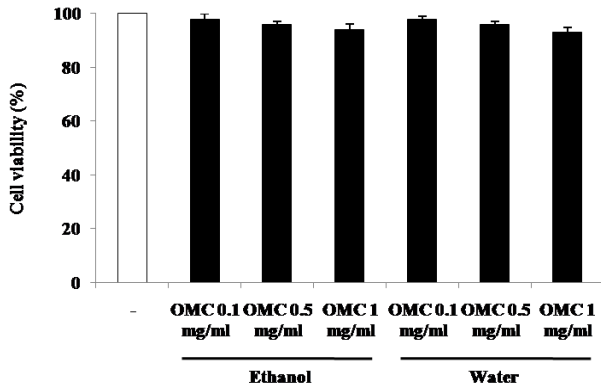


Fig. 1. The cytotoxicity of OMC-2010. The spleen cells were incubated with OMC-2010 as indicated doses for 48 h. The cell viability was measured by MTT assay. The results were similar in 3 additional experiments.

2. OMC-2010이 전염증성 사이토카인 분비에 미치는 영향

OMC-2010이 마우스 비장세포에서 LPS로 유도한 전염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해, OMC-2010을 마우스 비장세포에 1시간 동안 전처리한 후, LPS (1 μg/ml)를 48시간 동안 처리하여 비장 세포의 활성화 및 사이토카인 분비를 촉진시켰다. 그 결과, OMC-2010 에탄올 추출물은 IL-1beta와 TNF-alpha의 발현을 유의성 있게 억제하였으나, IL-6의 발현을 억제하지 못하였다. 또한 OMC-2010 물 추출물은 TNF-alpha의 발현을 유의성 있게 억제하였고, IL-1beta와 IL-6의 발현은 억제하지 못하였다 (Fig. 2).

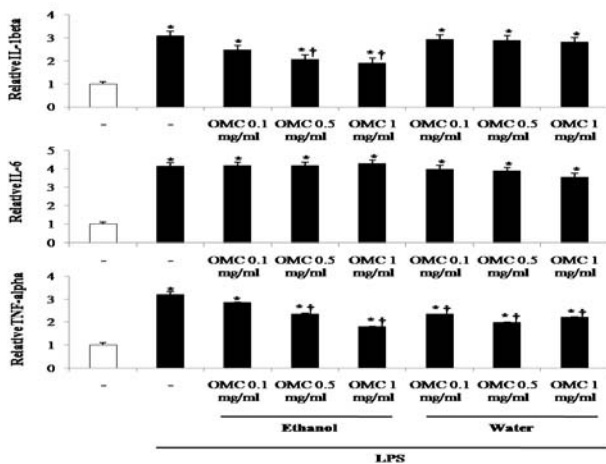


Fig. 2. Effect of OMC-2010 on the mRNA expression of IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha. The cells were pre-treated OMC-2010 extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without 1 μg/ml LPS for 48 h. Detail methods were described Materials and Methods. *P < 0.05 : significant as compared to saline, †P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

3. OMC-2010이 Th2 사이토카인 분비에 미치는 영향

OMC-2010이 마우스 비장세포에서 LPS로 유도한 Th2 사이토카인 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해, OMC-2010을 마우스 비장세포에 1시간 동안 전처리한 후, LPS (1 μg/ml)를 48시간 동안 처리하여 비장 세포의 사이토카인 분비를 촉진시켰다. 그 결과, OMC-2010 에탄올 추출물과 물 추출물은 IL-5의 발현을 유의성 있게 억제하였으나, IL-4, IL-13의 발현을 억제하지 못하였다 (Fig. 3).

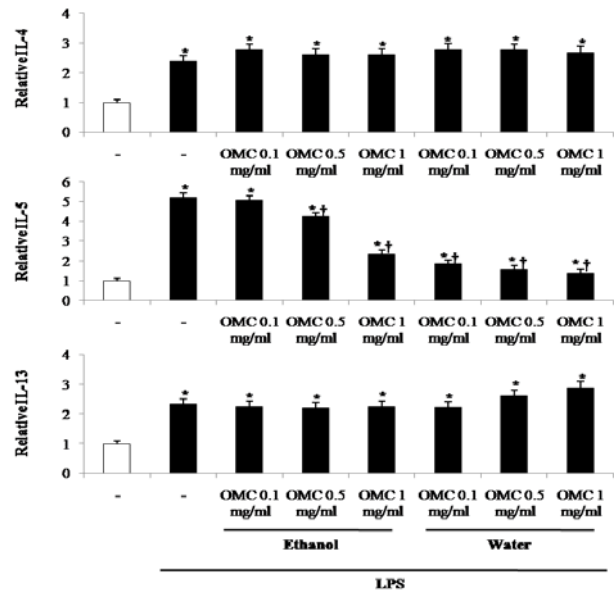


Fig. 3. Effect of OMC-2010 on the mRNA expression of IL-4, 5, and 13. The cells were pre-treated OMC-2010 extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without 1 μg/ml LPS for 48 h. Detail methods were described Materials and Methods. *P < 0.05 : significant as compared to saline, †P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

고찰

본 연구에서는 면역 조절에 관여하는 전염증성 사이토카인인 IL-1beta, IL-6, TNF-alpha의 mRNA 발현 및, 천식에 관여하는 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13의 mRNA 발현을 조사하였다. OMC-2010 에탄올 추출물과 물 추출물 동시에 TNF-alpha와 IL-5의 발현을 유의성 있게 억제함으로써 면역 조절 및 천식에 있어서 가능성을 보여주었다. OMC-2010 에탄올 추출물은 물 추출물과 다르게 IL-1beta의 발현을 억제함으로써, 에탄올 추출물에는 물 추출물과 서로 다른 유효성분이 있음을 직간접적으로 보여주었다.

TNF-alpha는 전신성 염증과, 급성 반응을 조절하는 사이토카인이다. 주로 활성화된 대식세포에서 생성되며, 또한 CD4+ T cell이나 NK cell에서도 생성된다⁵⁾. TNF-alpha의 주요한 역할은 면역세포의 조절이다^{5,6)}. TNF-alpha는 세포의 apoptosis를 유도하며, 추가적인 IL-1beta, IL-6의 분비를 촉진시킨다⁷⁾. 실제로 TNF-alpha의 분비를 억제하였을 때, 대장염, 천식 등을 억제했다는 보고가 다수 있다^{8,9)}. 그렇기 때문에 TNF-alpha의 억제는 큰 의미를 가질 수 있다. OMC-2010의 에탄올 및 물 추출물은 LPS로 활성화된 비장

세포에서 나오는 TNF-alpha의 발현을 크게 억제하였고, 이는 추후 면역 조절에 크게 기여할 수 있음을 보여준다.

IL-5는 Th2 사이토카인으로, 주로 IL-5 수용체와 결합하여 B세포의 성장에 관여하고, immunoglobulin의 생성에 기여한다^{10,11}. 또한 eosinophil의 활성화에 아주 중요한 매개체로서, 천식 반응에 관련하여 아주 중요한 사이토카인이다¹². 임상적으로도 IL-5는 알러지성 천식의 발견 지표로 사용되어 왔고, eosinophil의 활성화와 큰 유사성을 가지는 것으로 보여 많이 사용되고 있다¹³. 이 연구에서 OMC-2010 에탄올 및 물 추출물은 IL-5의 발현을 유의성 있게 억제하였고, 이는 OMC-2010이 면역 조절 뿐만 아니라 Th2반응과 관련된 천식에서도 유효한 효과가 있을 것으로 추측할 수 있다.

본 연구에서는 사이토카인 분석 뿐만 아니라, 추출 용매에 따른 OMC-2010의 효과를 비교하였다. 용매에 따라 약효가 크게 다를 것이라는 예상과 달리, OMC-2010은 에탄올 및 물 추출물에서 아주 비슷한 효과를 보였다. 다만 OMC-2010의 에탄올 추출물은 물 추출과 다르게 IL-1beta의 발현을 억제하는 효과를 보여주었는데, 이는 에탄올 추출물이 IL-1beta 기전에도 관여함을 의미하는 것으로, 추후 폐혈증과 같은 염증 모델에서 더 효과적임을 알 수 있었다. 하지만 TNF-alpha 및 IL-5의 발현 억제에서는 물 추출물이 에탄올 추출물에 비하여 월등하게 좋은 효과를 보였기 때문에, 천식에서는 물 추출물이 오히려 더 좋은 효과를 보일 수도 있을 것으로 사료된다. 추출 용매에 따른 성분 분석에 대하여 추가적인 실험이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결론

金水六君煎을 기원으로 한 OMC-2010 추출물의 면역 조절 능력을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. OMC-2010 에탄올 추출물 및 물 추출물은 비장 세포에서 세포 독성을 보이지 않았다.
2. OMC-2010 에탄올 추출물 및 물 추출물은 TNF-alpha의 생성을 유의성 있게 억제하였고, OMC-2010 에탄올 추출물은 IL-1beta의 발현 또한 억제하였다.
3. OMC-2010 에탄올 추출물 및 물 추출물은 Th2 사이토카인인 IL-5의 발현을 유의성 있게 억제하였다.

이상의 결과, OMC-2010은 비장세포에서 TNF-alpha와 IL-5의 생성을 유의성 있게 억제하였으며, 이는 OMC-2010 추출물은 추후 면역 질환 및 천식 등에 유효할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 충청북도 바이오국제공동연구사업[OMC-2010 기관지 천식치료제 개발]의 지원에 의하여 이루어졌습니다.

참고문헌

1. Germano G, Mantovani A, Allavena P. Targeting of the innate immunity/inflammation as complementary anti-tumor therapies. *Ann Med*. 2011 ; 43(8) : 581-93.
2. Khayyamian S, Hutloff A, Büchner K, Gräfe M, Henn V, Kroczeck RA, Mages HW. ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 ; 99(9) : 6198-203.
3. Marzo AL, Vezys V, Williams K, Tough DF, Lefrançois L. Tissue-level regulation of Th1 and Th2 primary and memory CD4 T cells in response to *Listeria* infection. *J Immunol*. 2002 ; 168(9) : 4504-10.
4. Jo JK, An CG, Kim KJ, Kim NK, Park MC. Effects of Kumsooyukkun-jeon extract on the Ovalbumin-Induced Allergic Asthma in Mice. *JKOOD*. 2007 ; 20(3) : 107-17.
5. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1975 ; 72 (9) : 3666-70.
6. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 1985 ; 316 (6028) : 552-4.
7. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003 ; 114 (2) : 181-90.
8. Mikocka-Walus AA, Turnbull DA, Moulding NT, Wilson IG, Andrews JM, Holtmann GJ. Controversies surrounding the comorbidity of depression and anxiety in inflammatory bowel disease patients: a literature review. *Inflammatory Bowel Diseases* 2007 ; 13 (2) : 225-234.
9. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987 ; 330 (6149) : 662-64.
10. Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, Klein O, Goldman M, Tavernier J, Capron A, Capron M. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med*. 1994 ; 179 (2) : 703-8.
11. Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992 ; 79 (12) : 3101-9.
12. Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth PH, Holgate ST. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic

- airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994 ; 10 (5) : 471-80.
13. Shen HH, Ochkur SI, McGarry MP, Crosby JR, Hines EM, Borchers MT, Wang H, Biechelle TL, O'Neill KR, Ansay TL, Colbert DC, Cormier SA, Justice JP, Lee NA, Lee JJ. A causative relationship exists between eosinophils and the development of allergic pulmonary pathologies in the mouse. *J Immunol.* 2003 ; 170 (6) : 3296-305.
- akchulpansa, 1996 : 170-1.