大韓本草學會誌 제29권 제6호(2014년 11월)
Kor. J. Herbology 2014 ; 29(6) : 117-123

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2014.29.6.117.

인간 비만세포에서 PMA와 A23187에 의해 유도된 전염증 매개체에 대한 신효월도산 추출물의 항염증 효과

위경[#], 양다운[#], 강옥화, 김성배, 문수현, 서윤수, 강다혜, 임재수, 김마룡, 곽남원, 공룡, 권동렬[*]

원광대학교 약학대학 한약학과, 원광 한약연구소, 원광대학교 한의학전문대학원 BK21 plus 사업팀

Anti-inflammatory effect of *Sinhyowoldo-san* Extract with regard to Pro-inflammatory Mediators in PMA plus A23187-induced Human Mast Cells

Gyeong Wi[#], Da-Wun YANG[#], Ok-Hwa KANG, Sung-Bae KIM, Su-Hyun MUN, Yun-Soo SEO, Da-Hye KANG, Jae-Soo LIM, Ma-Ryong KIM, Nam-Won KWAK, Ryong KONG, Dong-Yeul Kwon[*]

Dept. of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, and BK21 Plus Team, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, 570-749, Korea.

ABSTRACT

Objectives : *Sinhyowoldo-san* (SHWDS) is said to be a traditional medicine used for shigellosis, abdominal pain, diarrhea. But mechanism of SHWDS mediated-modulation of immune function is not sufficiently understood. To ascertain the molecular mechanisms of SHWDS 70% EtOH extract on pharmacological and biochemical actions in inflammation, we researched the effect of pro-inflammatory mediators in phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)+ A23187-activated human mast cell line (HMC-1).

Methods : In the present research, cell viability was measured by MTS assay. pro-inflammatory cytokine production was measured by performing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and western blot analysis to analyze the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB). The investigation focused on whether SHWDS inhibited the expressions of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), MAPKs and NF-κB in PMA+A23187-activated HMC-1 cells.

Results : SHWDS has no cytotoxicity at measured concentration (50, 100, and 250 μg/ml). SHWDS (250 μg/ml) inhibits pro-inflammatory cytokine expression in PMA+ A23187-activated HMC-1 cells. Moreover, SHWDS inhibited cyclooxygenase (COX)-2 expression. In activated HMC-1 cells, SHWDS suppressed phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) and c-jun N-terminal Kinase (JNK 1/2). Then, SHWDS suppressed activation of nuclear factor NF-κB in nuclear, degradation of IkB α in cytoplasm.

Conclusions : We propose that SHWDS has an anti-inflammatory therapeutic potential, which may result from inhibition of ERK 1/2, JNK 1/2 phosphorylation and NF-κB activation, thereby decreasing the expression of pro-inflammatory genes.

Key words : *Sinhyowoldo-san*, Anti-inflammatory activity, Human mast cell, Mitogen-activated protein kinases (MAPKs), Nuclear factor NF-κB, Cytokines

서 론

신효월도산 (神效越桃散)은 명 (明)의 의학강목 (醫學綱目)에서 처음 수록된 처방 (處方)으로, 치자인과 고량강으로 구성되며, 복만통 (腹滿痛), 하리 (下痢)를 치료한다고 기록되어 있다[1]. 신효월도산에 쓰이는 약재들을 살펴보면, 치자인은

*Corresponding author : Dong-Yeul Kwon. Dept. of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy Wonkwang University
· Tel : +82-63-850-6802 · FAX : +82-63-852-6802 · E-mail : sssimi@wku.ac.kr
#First author : Gyeong Wi. Dept. of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy Wonkwang University

Gardeniae Semen로 사화 (瀉火), 양혈 (凉血), 이뇨 (利尿), 제번 (除煩), 청열 (淸熱), 해독 (解毒) 등의 효능이 있다고 알려졌으며, 소갈 (消渴), 뇨혈 (尿血), 임병 (淋病), 황달 (黃疸), 육혈 (衄血), 목적 (目赤), 인통 (咽痛), 열병허번불면 (熱病虛煩不眠), 혈리 (血痢), 토혈 (吐血) 등의 치료에 사용되었다[2]. 치자인에 대한 연구로는, 항산화효과, 항염증효과, 항우울효과 등이 보고되어 있다[3-5]. 고량강은 Alpiniae Officinarum Rhizoma로 거풍 (祛風), 온중산한 (溫中散寒), 행기지통 (行氣止痛) 등의 효능이 있다고 알려졌으며, 반위 (反胃), 신위중한 (脾胃中寒), 완복냉만 (脘腹冷痛), 구토설사 (嘔吐泄瀉), 식체 (食滯), 냉벽 (冷癖), 열격 (噎膈), 장학 (瘴瘧) 등의 치료에 사용되었다[6]. 고량강에 대한 연구로는, 항염증효과, 혈압강하 효과, 항미생물 효과, 항암효과 등이 보고되어 있다[7-11].

염증반응은 어떤 자극에 대한 생체 조직의 비 특이적 면역반응으로써, 조직의 변성, 순환장애와 삼출, 조직 증식의 세 가지를 유발하는 복잡한 병변을 말한다. 한편, 염증반응에는 다양한 세포들이 관여되어 있는데, 그 중, 과립구 세포에서는 중성구, 호산구, 호염구, 비만세포 등이 알려져 있다. 비만세포는 골수계 전구세포에서 분화하여, 주로 피부, 여러 기관의 결합조직이나 호흡기관, 비뇨생식기관 및 소화기관의 점막 상피조직과 같이 다양한 조직에서 발견 된다[12,13]. 비만세포에서 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)는 PKC를 자극하고, 염증성 cytokines 생성을 증가 시킨다[14]. Calcium Ionophore A23187은 Ca^{2+}을 배출하여, 세포 내의 Ca^{2+}을 증가시켜, 미토콘드리아의 ATPase 활성을 저해하는 작용한다고 알려져 있다[15]. PMA, A23187는 비만세포에서 immunoglibulin (Ig) E의 교차결합에 관여하여 Fcε RI의 응집을 일으키고 Tyrosine의 급격한 인산화를 유발하여 비만세포의 활성화와 탈 과립을 일으킨다. 이 과정에서 PKC가 활성화되고, 세포 내 Ca^{2+} 증가, 초기 염증 반응이 일어나게 된다. 이로 인해, histamine, vasocative amines, specific proteolytic enzymes, cytokines, chemokines, ararchidonic acid metabolites 등 다양한 세포외 분비물을 생성 한다[16,17].

또한, COX (cyclooxygenase)는 arachidonic acid로부터 prostaglandin을 합성하는데 관여하고, COX-1,COX-2 두 아형으로 존재한다. COX-1은 대부분의 정상 조직에서 발현되어 있으며, 위점막의 보호, 혈액응고, 신장 기능조절 등의 관리역할과 항상 일정한 발현을 유지하지만, COX-2는 COX-2 유전자로부터 유도, 합성되며, 염증성 cytokines, 발암물질, 발암 유전자 성장인자 증식에 관여한다고 알려져 있다[18].

이에, 우리는 신효월도산의 주재료인 고량강과 치자인의 항염증효과를 참고하여 신효월도산 70% EtOH 추출물이 PMA와 A23187로 활성화된 사람 비만세포에서 염증성 매개체와 관련 기전에 어떠한 효과가 있는지 연구하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 신효월도산은 동의보감 처방을 기준으로 하였으며, 사용된 치자인과 고량강은 대학한약국 (익산, 한국)에서 구입하고 감정하여 사용하였다.

2) 시약

세포배양에서 필요한 Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) 배지는 Welgene (Daegu, Korea) 제품을 사용하였으며, Fetal bovine serum (FBS)는 Hyclone (New zealand) 제품을 구입해 사용하였다.

본 실험에 사용한 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Calcium Ionophore A23187, Penicillin-Streptomycin, Bovine Serum Albumin (BSA)는 Sigma (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. 세포 독성 측정에서 필요한 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)는 Promega (Madison, Wisconsin, USA)에서 구입하였다. 또한, Human IL-6, IL-8 ELISA Set는 BD Biosciences (San Diego, USA)에서 구입하여 사용하였다. Western blot 실험에서 필요한 Protein Extraction Solution은 iNtRON Biotechnology (Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였고, Ponceau S solution은 Sigma (St. Louis, Mo, USA), EzReprobe은 ATTO (Tokyo, Japan)에서 구입하였다.

항체인 ERK 1/2, JNK 1/2, p38, COX-2, β-actin, NF-κB, IκBα, p-IκBα, anti-rabbit은 Santa Cruz Biotechnology (Santacruz, CA, US) 에서 구입하였다. anti-mouse IgG은 life-Technonlogies 와 anti-goat IgG은 kirkegaard &Perry Laboratories Inc.에서 구입하였다. PCR실험에서 사용된 Easy Blue total RNA Extraction kit는 iNtRON Biotechnology (Gyeonggi-do, Korea), Reverse Transcription kit 는 Giagen (Valencia, CA, USA), Sensi 2 × PCR premix 은 Lugen, Gel red, 6 × loading buffer는 Dynebio (Gyeonggi-do, Korea), Primer는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 구입해 사용하였다. 핵과 세포질 추출에서 Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents는 Thermo Scientifeic (MA, USA)에서 구입해 사용하였다.

3) 세포배양

실험에 사용한 사람 비만세포주 HMC-1은 ATCC (Manassas, USA)에서 구입하였으며, 항생제 (100 U/mL Penicillin, 100 U/mL Streptomycin)와 10% FBS가 첨가된 IMDM 배지에서 37 ℃, 5% CO_2 incubator에 적응시켜 배양하였다. 계대 배양은 이틀에 한 번씩 하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제방법

신효월도산 70% EtOH 추출물은 치자인 12g, 고량강 12g과 70% EtOH 500mL로 2시간씩 2회에 달여 추출하였으며,

· Tel : +82-63-850-6802 · FAX : +82-63-852-6802 · E-mail : bjherb@hanmail.net
Da-Wun YANG. Dept. of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy Wonkwang University
· Tel : +82-63-850-6802 · FAX : +82-63-852-6802 · E-mail : dawun1202@nate.com
· Received : 13 October 2014 · Revised : 10 November 2014 · Accepted : 11 November 2014

감압 농축한 다음 동결 건조한 후, 1.8g이 얻어져 4℃에서 보관하였다. 시약은 멸균한 PBS (phosphate buffered saline)에 녹여 실험에 사용하였다(Table 1).

Table 1. The composition of *Sinhyowoldo-san*

Pharmacognostic name (Herb name)	Weight (g)
Gardeniae Semen (梔子仁)	12
Alpiniae Officinarum Rhizoma (高良薑)	12

2) MTS assay

세포독성은 MTS assay를 이용하여 확인하였다. HMC-1을 96 well plate에 5×10^4 cells/well 로 분주한 후, 30분 뒤 신효월도산을 각각 50, 100, 250, 500 μg/mL 농도별로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후, MTS solution을 20 μL씩 첨가한 후, 37 ℃, 5% CO_2 incubator에서 2시간 배양하였다. Microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) ELISA assay

HMC-1를 48 well plate에 5×10^5 cells/well 로 분주하였고, 30분 뒤 시료를 각 각 50, 100 250 μg/mL 처리한 후, 1시간 뒤 PMA (50nM), A23187 (1μM)를 처리 하고 8시간 뒤, 세포를 가라앉게 한 후, 배양 상층액을 수거하였다. 4℃에 하룻밤 동안 있던 1차 항체 coating plate를 다음날, 30분 실온 상태로 둔 뒤, 3번 wash buffer로 세척 후, Assay buffer를 200μL 분주하였다. 1시간 뒤 3번 세척하였다. sample과 standard를 100μL 분주 후, 2시간 실온 상태로 두었다. 5번 세척하고, working Detector (2차 항체 + SA-HRP) 100μL 분주 후, 1시간 실온 상태로 두었다. 7번 세척 후, Substrate Solution을 100μL 분주하고, 암실에서 최대 30분 기다렸다. 마지막으로, Stop Solution (1M H_3PO_4)을 50μL 분주한 후, Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) RNA 분리 및 RT-PCR

HMC-1를 6 well plate에 3×10^6 cells/well 로 분주하였고, 30분 뒤 시료를 각 각 50, 100 250 μg/mL 처리한 후, 1시간 뒤 PMA (50nM), A23187 (1μM)로 자극하고 6시간 뒤, 세포를 수집하였다. PBS로 세척하여 Easy Blue 1mL을 넣고 용해시킨 뒤, Chloroform을 400μL 첨가하고 vortexing 후, 원심 분리 (13,000 rpm, 10분)하였다. 상층액 400μL을 새로운 tube에 옮기고, isopropanol을 동량 넣어주었다. tube을 2회 inverting 하고 실온에 10분간 두었다. 원심분리 (13,000 rpm, 5분)하였다. 상층액을 버리고, 70 % EtOH 1mL을 넣고 2회 세척한 후, 건조시켜 DEPC가 처리된 증류수에 용해시킨 후, Nano Drop 기계로 A260/A280 nm의 비율이 1.6~2.0 범위 내의 값을 갖는 RNA 시료를 실험에 사용하였다.

cDNA 합성은 Reverse Transcription kit를 사용하였다. cDNA에 IL-6, IL-8, GAPDH, COX-2 Primer를 넣고 유전자 증폭기를 이용하여 증폭시켰다. 2% Agarose Gel에 Gel red를 1:10,000 희석시켜 전기영동 한 후, UV 검출기로 발현 정도를 확인하였다. RT-PCR을 위해 여러 개의 primer를 사용하였다. Primer의 구성은 다음과 같다(Table 2).

Table 2. Sequences of oligonucleotide primers designed for RT-PCR

cDNA		Primer sequences
IL-6	Forward	5'-GATGGATGCTTCCAATCTGGAT-3'
	Reverse	5'-AGTTCTCCATAGAGAACAACATA-3'
IL-8	Forward	5'-TGTGCTCTCCAAATTTTTTTTTACTG-3'
	Reverse	5'-CTCTCTTTCCTCTTTAATGTCCAGC-3'
COX-2	Forward	5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3'
	Reverse	5'-AGATCATCTCTCTCCTGAGTATCTT-3'
GAPDH	Forward	5'-CCATGTTCGTCATGGGTGTGAACCA-3'
	Reverse	5'-GCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTC-3'

5) 핵과 세포질 추출 및 Western blot analysis

핵과 세포질 추출은 Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents를 사용하였다. cell volume이 20μL 일 때, CER Ⅰ을 200μL 넣고 pellet을 15초 동안 최고로 세게 vortexing 하였다. 그리고 얼음에 10분 두고, CER Ⅱ를 11μL 넣고 5초 동안 최고로 vortexing 하였다. 얼음에 1분간 둔 뒤, 5초 동안 최고로 vortexing 한 후, 원심분리 (13,000 rpm, 5분)하였다.즉시, 상층액 (세포질 추출)을 새로운 tube에 옮겨 담았다. 남아있는 pellet에 NER을 100μL 넣고, 15초 동안 최고로 vortexing 하였다. 얼음에 sample을 40분간에 두는데, 10분마다 15초 동안 vortexing 하였다. 40분 뒤, 원심분리 (13,000 rpm, 10분)하였다. 즉시 상층액(핵 추출)을 새로운 tube에 옮겨 담았다.

HMC-1를 6 well plate에 5×10^6 cells/well 로 분주하고, 30분 뒤 시료를 50, 100, 250 μg/mL 처리한 후, 1시간 뒤 PMA (50nM), A23187 (1μM)로 자극하고 1시간 뒤, 세포를 수집하였다. PBS로 세척 한 뒤, lysis buffer를 200 μL 넣고, 20분 동안 lysis 한 후, 원심 분리 (13,000 rpm, 5분)하였다. 단백질 정량은 BSA와 Bio-Rad protein Assay Kit를 사용하였고, microplate reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하고 정량하였다.

만들어진 단백질을 12% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane에 15V에서 1시간 동안 Transfer하였다. 그리고 Ponceau S solution으로 염색 한 후, Transfer가 잘 되었는지 확인하였다.

염색을 TBS-T (TBS + 0.05% Tween 20)용액으로 세척한 후, membrane을 5% skim milk가 첨가된 TBS-T 용액에 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 1차 항체 반응은 1차 항체를 5% skim milk에 희석하여 4℃에서 하룻밤 동안 수행하였다. TBS-T로 3회 15분씩 세척하였다. 2차 항체 반응은 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 뒤, TBS-T로 3회 15분씩 세척하여 ECL Substrate에 반응 후, ImageQuant™ LAS 4000 mini을 이용하여 단백질 발현량을 분석하였다.

6) 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치±표준편차 (SEM)를 구하여 그 유의성

은 Student's *t*-test(SPSS. ver.19) 분석법을 이용하여 신뢰수준 95% ($p < 0.05$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

결 과

1. 신효월도산 추출물이 세포생존율에 미치는 영향

SHWDS이 세포 생존에 미치는 영향을 측정하기 위해, MTS assay를 통해 확인하였다.

SHWDS은 50, 100, 250 μg/mL에서 세포독성이 나타나지 않았다. 그러나 500 μg/mL 농도에서 71.5% 세포 생존율이 측정되어, 50, 100, 250 μg/mL 농도에서 실험을 진행하였다(Fig. 1).

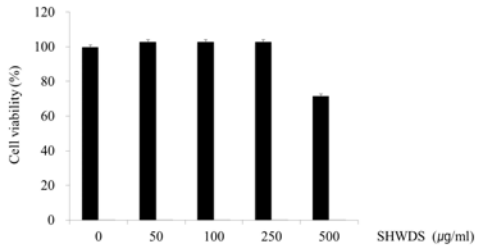

Fig.1. Cell viability of HMC-1 cells.
Cell viability was measured by MTS assay. Cell viability of HMC-1 cells after incubation in presence of various concentrations (50, 100 and 250 μg/mL) of SHWDS for 24 hours. Date represent the mean±SD values of triplicate determinations from three separate experiment. *P<0.05.

2. 신효월도산 추출물이 IL-6와 IL-8에 미치는 영향

염증성 cytokine 분비를 확인하기 위해 ELISA 실험을 통하여 확인하였다. 실험 결과, PMA와 A23187을 처리한 HMC-1에서 IL-6와 IL-8이 생성 되었으며, SHWDS이 전 처리된 HMC-1 세포에서 IL-6의 생성이 농도 의존적으로 억제되었으며, IL-8의 생성은 250 μg/mL에서 현저히 감소하였다(Fig. 2).

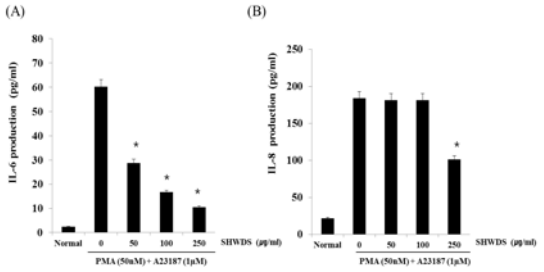

Fig.2. Effects of SHWDS on IL-6 production and IL-8 production in PMA (50nM) +A23187 (1μM)-stimulated HMC-1 cells.
Production of IL-6 was measured by ELISA assay. HMC-1 cells were treated with IMDM or various concentrations (50, 100 and 250 μg/mL) of SHWDS in the presence of PMA+A23187 for 8 hours. Date are mean±SD values of triplicate determinations from three separate experiment. *P<0.05.
(A) IL-6 production (B) IL-8 production

3. 신효월도산 추출물이 IL-6와 IL-8 mRNA 발현에 미치는 영향

IL-6와 IL-8 mRNA 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 통해 확인하였다. 실험 결과, PMA와 A23187을 처리한 HMC-1에서 IL-6와 IL-8의 mRNA가 발현되었으며, SHWDS이 전 처리된 HMC-1 세포에서 IL-6와 IL-8 발현이 억제되었으며, 특히, 250 μg/mL에서 현저히 감소하였다(Fig. 3).

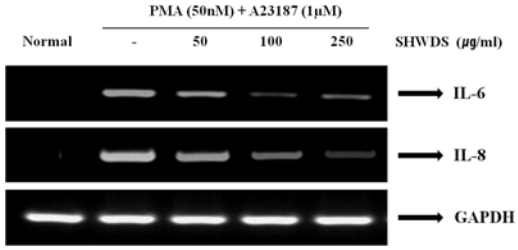

Fig.3. Effect of SHWDS on IL-6 mRNA and IL-8 mRNA in PMA (50nM) +A23187 (1μM)-stimulated HMC-1 cells.
Expression of mRNA were analyzed by RT-RCR. HMC-1 cells were treated with IMDM or various concentrations (50, 100 and 250 μg/mL) of SHWDS in the presence of PMA+A23187 for 6 hours. The experiment was repeated three times, and similar results were ascertained.

4. 신효월도산 추출물이 COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향

COX-2 mRNA 발현을 확인하기 위해 COX-2 mRNA의 전사를 RT-PCR을 통해 확인하였다. 실험 결과, PMA와 A23187을 처리한 HMC-1 세포에서 COX-2의 mRNA가 발현되었으며, SHWDS 전 처리된 세포에서 COX-2 발현을 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 4).

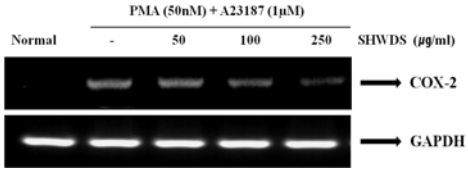

Fig. 4. Effect of SHWDS on COX-2 mRNA in PMA (50nM) +A23187 (1μM)-stimulated HMC-1 cells.
Expression of mRNA were analyzed by RT-RCR. HMC-1 cells were treated with IMDM or various concentrations (50, 100 and 250 μg/mL) of SHWDS in the presence of PMA+A23187 for 6 hours. The experiment was repeated three times, and similar results were ascertained.

5. 신효월도산 추출물이 MAPKs 인산화에 미치는 영향

세포내의 신호전달 경로를 확인하기 위해 MAPKs (ERK 1/2, JNK 1/2, p38)의 인산화를 Western blot을 통해 확인하였다. 실험 결과, PMA와 A23187을 처리한 HMC-1 세포에서 ERK 1/2, JNK 1/2, p38 인산화가 증가하였으며, SHWDS이 전 처리된 HMC-1 세포에서 ERK 인산화, JNK 인산화를 억제하였음을 확인 할 수 있었다(Fig. 5).

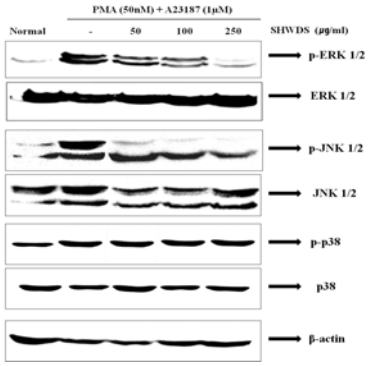

Fig. 5. Effect of SHWDS on the phosphorylation of MAPKs in PMA (50nM) +A23187 (1 μM)-stimulated HMC-1 cells.
Phosphorylation of MAPKs were analyzed by western blot analysis. HMC-1 cells were treated with IMDM or various concentrations (50, 100 and 250 μg/mL) of SHWDS in the presence of PMA+A23187 for 1 hours.
The experiment was repeated three times, and similar results were ascertained.

6. 신효월도산 추출물이 NF-κB 신호전달경로에 미치는 영향

SHWDS이 전사인자에 미치는 영향을 알아보기 위해 NF-κB의 핵 내로의 이동을 Western blot을 통해 확인하였다. 실험 결과, SHWDS이 전 처리된 HMC-1 세포에서 세포질 내의 IkB α의 phosphorylation과 IkB α의 degradation이 억제 하였다. 따라서 SHDWS이 핵 내의 NF-κB의 신호전달 경로를 차단함을 확인하였다(Fig. 6).

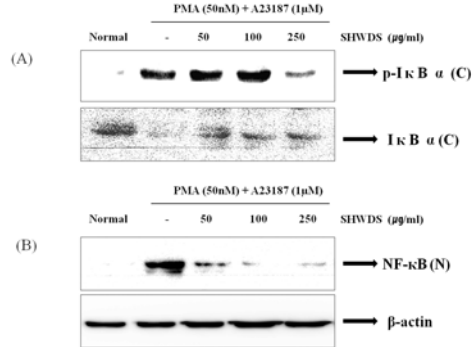

Fig. 6. Effect of SHWDS on activation of NF-κB in PMA (50nM) +A23187 (1 μM)-stimulated HMC-1 cells.
Activation of NF-κB were analyzed by western blot analysis. HMC-1 cells were treated with IMDM or various concentrations (50, 100 and 250 μg/mL) of SHWDS in the presence of PMA+A23187 for 1 hours (cytoplasm) or 2 hours (nuclear).
The experiment was repeated three times, and similar results were ascertained.
(A) In cytoplasm (B) In nuclear

고 찰

신효월도산(神效越桃散)은 명(明)의 의학강목(醫學綱目)에서 처음 수록된 처방(處方)으로 치자인과 고량강으로 구성되어 있으며, 복만통(腹滿痛), 하리(下痢)을 치료하였다[1]. 신효월도산에 대한 연구로는, methicillin-resistant staphylococcus aureus 에 대한 항균 효과가 보고되어 있으며[19], 따라서, 본 연구에서는 PMA와 A23187로 활성화된 인간 비만세포(HMC-1 cells)에서 신효월도산 70% EtOH 추출물을 이용한 항염증 기전에 관하여 연구하였다.

PMA와 A23187로 활성화된 인간 비만세포는 *in vitro* 실험 모델에서, 염증반응 매개인자를 연구하는데 잘 알려져 있다[20]. PMA와 A23187는 세포질 내의 Ca^{2+} 농도 상승에 의해 각종 Ca^{2+} 감수성 조절인자에 작용하여 일련의 비만세포 활성화 반응에 관여한다. 염증반응에서 관여하는 세포들 간의 복합적 상호작용은 cytokines 이라고 불리는 단백군에 의해 매개된다[21,22]. 특히, IL-6은 비만세포에서 생성되어, 조혈작용과 염증을 조절하는데 관여하는 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있다[23]. IL-8은 호산구 화학주성인자이며, 염증 반응에 있어서 중요한 역할을 하는 chemokines이다[24]. 본 연구에서, PMA와 A23187로 활성화된 HMC-1에서 SHWDS을 처리하였을 때, IL-6의 생성이 농도 의존적으로 억제되었으며, IL-8은 250μg/mL에서 현저하게 억제되었음을 확인하였다. 또한, IL-6와 IL-8의 mRNA 발현정도를 본 결과, SHWDS을 처리하였을 때, IL-6, IL-8의 발현이 농도 의존적으로 억제되었으며, 특히, 250μg/mL에서 현저하게 억제되었음을 확인하였다. 한편, COX-2는 염증과정 및 종양 발생에서 중요한 역할을 하며, COX-2의 발현은 염증반응에서 중요한 지표로 알려져 있다. 본 연구에서는, PMA와 A23187로 활성화된 HMC-1에서 SHWDS을 처리하였을 때, COX-2 mRNA 발현정도의 발현이 농도 의존적으로 억제되었음을 확인하였다. 그리고 염증반응은 주로 MAPKs (mitogen-activated protein kinases) 분자들의 활성화로 인한 NF-κB 같은 전사조절인자들의 가동으로 시작된다. MAPKs의 subfamily에는 대표적으로 ERK, JNK, p38가 있으며, 이들의 신호전달과정은 염증물질의 합성을 유도하는 점에서 염증반응과정에서 중요한 역할을 한다[25,26]. 실험 결과, PMA와 A23187을 처리한 HMC-1 세포에서 ERK, JNK, p38 경로를 경유하며, SHDWS을 함께 처리한 HMC-1에서는 ERK 인산화와 JNK 인산화를 억제시켰음을 확인하였다.

또한, NF-κB는 염증성 cytokines 이나 면역세포 이동에 중요한 접합 분자들, chemokines 등의 유전자를 발현시키기 때문에 초기 염증반응 조절에 중요한 전사인자이다. NF-κB 전사인자들 중에, IKB α는 phosphorylation이 되면 ubiquitin-proteasome 체계에 의해 분해되어 IkB 농도가 감소하게 된다. 그 결과, IkB α의 phosphorylation으로 NF-κB가 활성화가 되어, 염증매개 인자들의 합성과 생성에 영향을 미치게 된다고 보고되어 있다[27,28]. 실험 결과, SHWDS은 PMA와 A23187로 활성화된 HMC-1의 세포질 내의 IkB α의 phosphorylation과 IkB α의 degradation이 억제 하였다. 따라서 SHDWS이 핵 내의 NF-κB의 신호전달 경로를 차단함을 확인하였다.

본 연구결과를 종합하면, 신효월도산 70% EtOH 추출물은 PMA와 A23187로 활성화된 인간비만세포에서 신호전달경로인 MAPKs에서의 ERK와 JNK의 phosphorylation과 NF-κB 경로를 저해함으로써, IL-6, IL-8, COX-2 발현에 영향을 미치는 것으로 관찰되었다.

이에 따라, 신효월도산이 비만세포를 매개한 염증반응에서 유효한 후보물질으로서의 가능성이 있음을 시사하는 바이다.

결 론

본 연구는 신효월도산의 HMC-1 세포에서 항염증 효과를 객관적으로 검증하기 위해, 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 신효월도산은 PMA+A23187로 활성화된 HMC-1 세포에서 IL-6와 IL-8 생성 및 mRNA 발현이 억제되었다.

2. 신효월도산은 PMA+A23187로 활성화된 HMC-1 세포에서 COX-2 mRNA 발현을 억제하였다.

3. 신효월도산은 PMA+A23187로 활성화된 HMC-1 세포에서 MAPKs (ERK, JNK)의 인산화를 억제하였다.

4. 신효월도산은 PMA+A23187로 활성화된 HMC-1 세포에서 IkB α의 phosphorylation, IkB α 의 degradation을 억제하고, NF-κB 활성을 억제하였다.

이상의 실험에서, 신효월도산은 항염증 효과가 유의한 결과가 도출되어, 항염증 효과가 있음을 실험적으로 입증되었다. 이러한 연구 결과를 통해, 신효월도산이 예로부터 腹滿痛, 下痢 등에 사용되어 온 것을 실험적으로 확인하였고, 비만세포를 매개한 염증성 질환에서 유효한 효과를 갖는 후보물질로서의 가능성이 있음을 시사하는 바이다.

감사의 글

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2013R1A1A2064673)

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (2008-0062484)

References

1. Her J. Naekyung-Pyun of Donguibogam. Yeogang. 2005 : 564.
2. Her J. Naekyung-Pyun of Donguibogam. Yeogang. 2005 : 3068.
3. Kim ST, Lee JC, Lee BK, Lee KS, Lyu JH, Lee YC. Comparison of geniposide quantification and antioxidant effect among the various parts of Gardeniae fructus. Kor J Herbology. 2013 ; 28(3) : 17-23.
4. Shon DH, Choi DW, Kim MH. Improvement of Anti-Inflammation Activity of Gardeniae fructus Extract by the Treatment of β-Glucosidase. Korea J Food Sci Technol. 2012 ; 44(3) : 331-6.
5. Hwang KH, Park TK. Inhibitory activity of the fruit extract of gardenia jasminoides on monoamine oxidase. Kor J Pharmacogn. 2007 ; 38(2) : 108-12.
6. Her J. Naekyung-Pyun of Donguibogam. Yeogang. 2005 : 3008.
7. Park HJ, Lee JH, Kim SY, Shim BS, Ku HJ, Kang JM, Choe IH, Lee JD, Kim NJ, Lee JS, Lim SB. Anti-inflammatory effect of alpiniae officinari rhizoma extract. Kor J Herbology. 2005 ; 20(2) : 43-53.
8. Lee SE, Lee JH, Kim JK, Kim GS, Kim YO, Soe JS, Choi JH, Lee ES, Noh HJ, Kim SY. Anti-inflammatory Activity of Medicinal Plant Extracts. Korean J Med Crop Sci. 2011 ; 19(4) : 217-26.
9. Kim HJ, Yoo MY, Kim HK, Lee BH, Oh KS, Seo HW, Yon GH, Gendaram O, Kwon DY, Kim YS, Ryu SY. Vasorelaxation effect of the flavonoids from the rhizome extract of alpinia officinarum on isolated rat thoracic aorta. Kor J Pharmacogn. 2006 ; 37(1) : 56-9.
10. Lee KH, Rhee KH. Anti-microbial Effects of Rhizome Extracts of Alpinia officinarum Hance against VRE (vancomycin-resistant enterococci) and Pathogenic Microorganisms. Nat Prod Sci. 2011 ; 17(2) : 160-4.
11. Lee HS, Cha MR, Choi CW, Choi SU, Kim YS, Kim YK, Kim YH, Yon GH, Ryu SY. Anti-proliferative effect of the rhizome extract of alpinia officinarum on cultured human tumor cell line. Kor J Pharmacogn. 2008 ; 39(4) : 347-51.
12. Lampinen M, Carlson M, Håkansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. Allergy. 2004 ; 58(8) : 793-805.
13. Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine date. Nat Rev Immunol. 2007 ; 7(2) : 93-104.
14. Weiss A, Wiskocil RL, Stobo JD. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. J Immunol. 1984 ; 133(1) : 123-8.
15. Wightman RM, Troyer KP, Mundorf ML, Catahan R. The association of vesicular contents and its effects on release. Ann N Y Acad Sci. 2002 ; 971 : 620-6.
16. Lee DH, Kim SH, Eun JS, Shin TY. Mosla dianthera inhibits mast cell-mediated allergic reactions through the inhibition of histamine release and inflammatory cytokine production. Toxicol Appl Pharmacol. 2006 ; 216(3) : 479-84.
17. Thomas J, Kindt, Richard A, Goldsby, Barabara A, Osborne. Kuby immunology. The Korean Society for Microbiology. 2008 : 389-409.

18. Goodwin JS, Ceuppens J. Regulation of the immune response by prostaglandins. J Clin Immunol. 1983 ; 3(4) : 295-315.
19. Shin IS, Kang OH, Joung DK, Kang HJ, Kim JE, Hwang HC, Kim IW, Kwon DY. Antibacterial Effect of Sinhyowoldosan Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureu. Kor J Herbology. 2013 ; 28(1) : 59-64.
20. Hosoda M, Yamaya M, Suzuki T, Yamada N, Kamanaka M, Sekizawa K, Butterfield JH, Watanabe T, Nishimura H, Sasaki H. Effects of rhinovirus infection on histamine and cytokine production by cell lines from human mast cells and basophils. J Immunol. 2002 ; 169(3) : 1482-91.
21. Grimbaldeston MA, Metz M, Yu M, Tsai M, Galli SJ. Effector and potential immunoregulatory roles of mast cells in IgE-associated ac quired immune responses. Curr Opin Immunol. 2006 ; 18(6) : 751-60.
22. White JR, Pluznik DH, Ishizaka K, Ishizaka T. Antigen-induced increase in protein kinase C activity in plasma membrane of mast cells. Proc Natl Acad. Sci USA. 1985 ; 82(23) : 8193-7.
23. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. Immunol Today. 1990 ; 11(12) : 443-9.
24. Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, Saiki T, Ikeda H, Tsuruta O, Tanikawa K. IL-8 as an important chmoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. Clin Exp Immunol. 1994 ; 96(3) : 432-6.
25. Shakoory B, Fitzgerald SM, Lee SA, Chi DS, Krishnaswamy G. The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. J Interferon Cytokine Res. 2004 ; 24(5) : 271-81.
26. Crossthwaite AJ, Hasan S, Williams RJ. Hydrogen peroxide-mediated phosphorylation of ERK1/2, Akt/PKB and JNK in cortical neurones: dependence on Ca(2+) and PI3-kinase. J Neurochem. 2002 ; 80(1) : 24-35.
27. Klemm S, Ruland J. Inflammatory signal transduction from the Fc epsilon RI to NF-kappa B. Immunobiology. 2006 ; 211(10) : 815-20.
28. Kriete A, Mayo KL. Atypical pathways of NF-KB activation and aging. Exp Gerontol. 2009 ; 44(4) : 250-5.