대한한의학 방제학회지 제25권 제2호
Herbal Formula Science
2017;25(2):167~177
pISSN 1229-1218, eISSN 2288-5641 https://doi.org/10.14374/HFS.2017.25.2.167
Official Journal of The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study
Available at http://www.formulastudy.com HFS

Original Article / 원저

고삼, 형개, 자초 혼합물(GHJ)의 인간비만세포에서의 항염증 효과

황만기[1], 최영진[2], 김민주[3], 이비나[4], 정혁상[4*], 손영주[4*]

[1]서초아이누리한의원, [2]경희다복한의원, [3]약수아이누리한의원,
[4]경희대학교 한의과대학

The Inhibitory Effects of GHJ on Allergic Inflammatory Response in Human Mast Cells (HMC-1)

Man Ki Hwang[1], Young Jin Choi[2], Min Ju Kim[3], Bina Lee[4], Hyuk Sang Jung[4*], Youngjoo Sohn[4*]

[1]Seocho Inuri Korean Medicine Clinic,
[2]Kyung Hee Dabok Korean Medicine Clinic,
[3]Yaksu Inuri Korean Medicine Clinic,
[4]Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : This study aimed to evaluate inhibitory effects of GHJ on allergic inflammatory response in human mast cells (HMC-1).

Methods : To investigate the inhibitory effect of GHJ (62.5, 125, 250, 500, 1000 μg/mL), HMC-1 cells were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate plus calcium ionophore A23187 (PMACI). Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), RT-PCR and Western blot analysis were investigated using GHJ extract.

Results : GHJ inhibited levels of TNF-α and IL-6 of 1000 μg/mL concentration in ELISA and mRNA expression. GHJ had inhibitory effects in level of MAPKs, p-IκB-α and p-NF-kB also. GHJ attenuated Compound 48/80-stimulated histamine release. In addition, GHJ inhibited PCA reaction *in vivo*.

Conclusion : This study indicated that GHJ extract can inhibit allergic responses in HMC-1 cell.

Key words : *Sophora flavescens*, *Schizonepeta tenuifolia Briquet*, *Lithospermum erythrorhizom* Sieb, GHJ, Allergy, HMC-1, MAPKs, NF-kB

ⓒ 2017 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study
This paper is available at http://www.formulastudy.com which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Ⅰ. 서론

GHJ의 구성약재인 苦蔘(Sophora flavescens)은 콩과에 속하는 다년생 초본식물으로써 주요성분으로는 마트린이 포함되어 있고 항균, 항바이러스 및 피부질병에 이용된다[1,2]. 荊芥는 꿀풀과에 속하는 荊芥의 꽃의 이삭과 잎을 건조한 것으로 학명은 Schizonepeta tenuifolia Briquet이고 熱惡寒, 頭痛, 腎通 등의 증상에 전통적으로 빈번하게 사용되어 왔다[3,4]. 紫草는 지치과의 다년생 풀 지치(Lithospermum erythrorhizon Sieb. et Zucc)이 뿌리를 가리키는데 전통적으로 解毒作用이 뛰어나다고 알려져 있으며 항암, 항균 효과가 있다는 보고도 있다[3,4].

알레르기성 염증은 천식, 아토피 피부염과 같이 빠르게 증가하고 있는 추세이며 그 원인으로는 식새활의 서구화 등이 꼽히고 있다[5]. 알레르기 염증은 생체가 감염상황일 때나 손상을 입었을 때 스스로를 방어하기 위해서 일어나는 반응이지만 과한 방어 반응은 면역계의 불균형을 초래하게 하고 조직 괴사나 급성 쇼크 등의 반응을 일으킨다[6]. IgE를 매개로 일어나는 알레르기 급성 반응을 제 I 형 알레르기 반응이라 하는데, 이는 항원의 자극에 의해 생성된 IgE가 비만세포의 표면에 존재하는 수용체인 FcεRI에 결합하여 비만세포의 탈과립을 유도하고 비만세포로부터 방출된 히스타민, 프로스타글란딘, 류코트리엔과 사이토카인등의 화학 물질 등을 분비함으로써 나타나는 반응이다[7-9].

알레르기 염증 반응을 매개한다고 알려져 있는 비만세포에 항원이 결합되면 탈과립 발생과 함께 과립 속에 있던 히스타민, 세로토닌, 사이토카인이 방출된다. 특히 비만세포로부터 방출되는 interleukin (IL)-6, IL-8, tumor necrosis factor alpha (TNF-α)와 같은 사이토카인들은 알레르기 반응에서 주요한 역할을 한다[10]. Compound 48/80은 탈과립을 통해 히스타민을 방출시키는데, 분비된 히스타민은 염증성 사이토카인을 분비시키는 작용을 한다[11]. 알레르기 염증에 있어서 비만세포의 탈과립과 혈중 히스타민의 유리와 1, 2형 helper T 세포에서 분비되는 면역조절 사이토카인간의 불균형 및 과도한 IgE 생산은 염증 질환의 핵심기전으로 이해되고 있다[12].

따라서 본 실험에서는 비만세포에서의 GHJ의 항알레르기 효과를 규명하고자 HMC-1 세포에서 PMACI에 의한 사이토카인 수준과 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 염증 신호전달경로인 extracellular signal regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38의 발현과 nuclear factor kappa B (NF-kB)의 신호전달에서의 효과를 관찰하였다. 또한 흰쥐에서 GHJ가 PCA에 미치는 영향, Compound 48/80에 의해 흰쥐 복강 비만세포(Rat peritoneal mast cell)의 탈과립 및 히스타민 방출 억제 효과를 증명하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

Compound 48/80, anti-DNP IgE, DNP human serum albumin (HSA), PMA, A23187과 Evans blue는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였다. Recombinant TNF-α, IL-6와 IL-8, biotinylated IL-6와 IL-8, 그리고 anti-human TNF-α, IL-6와 IL-8는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazol 3-(bromide (MTT)는 Promega (Madison, WI), Iscove's Modified Dulbecco's Media-(IMDM), 그리고 fetal bovine serum (FBS)는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다.

NE-PER Nuclear과 Cytoplasmic Extraction Reagent는 Pierc(Rockford,IL,USA)에서 구입하였다. Phosphorylation-ERK (P-ERK), ERK, P-P38, P38, P-c-Jun-NH2-terminal kinase (JNK), JNK, phosphorylation-NF-kB (p-NF-kB) and p-IkB-α 항체들은 Cell Signaling (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)에서, β-actin는 Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)에

* Corresponding author : Youngjoo Sohn. Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedae-ro, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.
Tel : +82-2-961-9202, Fax : +82-2-961-0327, e-mail : youngjoos@khu.ac.kr
* Corresponding author : Hyuk-Sang Jung. Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedae-ro, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.
Tel : +82-2-961-9449, Fax : +82-2-961-0327, e-mail : jhs@khu.ac.kr
• Received : April 12, 2017 / Revised : May 27, 2017 / Accepted : May 29, 2017

서, peroxidase IgG는 Jackson ImmunoResearch (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)에서 구입하였다. PCR primers는 Genotech (Daejeon, Korea)에서 구입하였다.

2) 검액의 추출

GHJ에 들어가는 한약재는 옴니허브에서 구입하였으며 약재의 동정은 경희대 한의과대학 본초학교실의 부영민 교수가 확인하였다. 고삼, 형개, 자초의 시료번호는 각각 A050, A056, A048이며 경희대 한의과대학 해부학교실에서 표본으로 보유하고 있다. 세가지 약물을 1:1:1 비율의 구성약물 240g을 3L의 둥근 플라스크에 2.4L의 증류수를 넣고 환류냉각장치 설치하에 2시간 전탕 후 2시간 냉각하였다. 냉각 후 거름종이를 이용하여 여과하였으며, 감압농축기 (vacuum rotary evaporator)를 이용하여 농축 한 후, 동결 건조하여 냉장 보관하였다. 수율은 20.5%이며 혼합물 또한 시료번호 A070으로 표본을 보유하고 있다.

3) 실험 동물

실험동물은 나라바이오텍에서 구입한 6주령의 수컷 SD-rat (나라바이오텍)를 사용하였다. 마우스는 물과 고형사료는 제한 없이 충분히 공급하였으며, 온도 23 ± 3℃, 습도 40-60%, 조명 12시간 명/암을 유지하면서 일주일 동안 실험실 환경에 적응 시킨 후 실험에 사용하였다.

4) 세포

인간비만세포주 (human mast cell, HMC-1)는 IMDM media (Gibco)에 10% fetal bovine serum과 100U/mL penicillin, 100ug/mL streptomycin을 첨가하여 배양하였으며 배양환경은 30℃, 5% CO2를 유지하였다. HMC-1세포는 25nm PMA와 1uM A23187로 자극하여 활성화 하였다.

2. 방법

1) 세포 생존능력 측정을 위한 MTS assay

HMC-1 세포 ($1x10^5$ cells/well)에 다양한 농도의 GHJ (62.5, 125, 250, 500, 1000㎍/mL)를 하루 동안 반응 시킨 후 세포 생존율은 MTS assay 이용하여 ELIS로 흡광도 490n에서 측정하였다. 아무런 처치를 하지 않은 대조군 세포에서는 100% 생존율로 계산하여 생존율을 계산하였다.

2) 비만세포에서 염증성 사이토카인의 정량 분석

세포를 GHJ 에서 1시간 동안 전처리하고 난 뒤 PMACI로 자극하여, 7시간 동안 배양하였다. 각 세포의 상층액은 2시간 동안 상온에서 96 well ELISA plates (Nunc, Roskilde, Denmark)에 반응시켰다. 그리고 mouse anti-human TNF-α, IL-6와 IL-8 monoclonal antibodies를 100㎕을 넣어 96 well ELISA plates에 1시간 반응시켰다. 세척한 후, avidin-peroxidase 포함된 biotinylated anti-human TNF-α, IL-6와 IL-8을 첨가하여 37℃ 에서 1시간 동안 세포 배양기에서 반응시켰다. 반응 후 Well을 다시 세척하고 TMB substrate (Sigma-Aldrich)를 처리하였다. 발색현상은 405nm에서 ELISA를 이용하여 측정하였다. 표준곡선 분석은 recombinant human TNF-a, IL-6와 IL-8을 이용하였다.

3) 단백질 수준에서의 MAPK와 NF-kB western blotting 분석

HMC-1 세포($2x10^5$ cells/well)에 GHJ (62.5, 125, 250, 500, 1000㎍/mL)를 1시간 전처리한 뒤 PMACI로 각각 30분 (MAPKs), 2시간 (NF-kB)동안 반응시켰다. 세포 수집 후 ice-cold PBS로 2회 세척하였다. MAPKS expression의 경우, 세척된 세포는 용해한 뒤 13,000rpm, 4℃, 20분간 원심 분리하였다. NF-kB와 IkB-a expression는 세포를 NE-PER Nuclear과 Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce, Rockford, IL, USA)로 각각 Manufacturer's instruction에 따라 용해한 후 원심분리 하여 단백질을 얻었다. 단백질 농도는 BCA Protein Assay Kit의 Manufacturer's instruction에 따라 정량 하였다. 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel로 전기영동 한 후 nirtrocellulose membrane (Whatman, Maidstone, Kent, UK)에 1시간 transfer하였다. Membrane 5% skimmed milk를 첨가한 TBST에서 1시간 동안 blocking 하였다. PBST로 membrane을 세척한 후, anti-MAPK antibodies (P-ERK, ERK, P-JNK, JNK, P-P38, P38)와 NF-kB antibodies는 1:1000으로 희석되었다. Ab들은 4℃에서 24시간 동안 반응시키고 PBST로 세척하였다. MAPKs는 2차 항체인 Anti-mouse IgG (1:10,000)를, NF-kB는 horseradish peroxidase-conjugated secondary Ab

를 각각 상온에서 1시간 동안 반응시켰고, enhanced chemiluminescence (ECL) 시약 (Amersham Pharmacia, NJ, USA)을 이용하여 단백질을 형광 감광 발현시켰다.

4) 비만세포에서 염증성 사이토카인의 mRNA 발현 정도 분석

HMC-1 세포를 GHJ에 전처리 한 뒤 PMACI로 6시간 반응시켰다. 반응이 완료되면 cell에서 RNA를 분리하였다. 추출한 RNA를 reverse transcriptase를 사용하여 cDNA로 합성한 뒤 합성된 cDNA로 중합효소연쇄반응을 진행하였다. 사용된 primer는 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-8, TNF-a, IL-1b을 확인했고 GAPDH을 사용하여 발현량을 표준화 하였다. primer의 염기서열은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Primer sets for RT-PCR

Name	Forward primer	Reverse primer
IL-6	5' GAT GGC TGA AAA AGA TGG ATG C 3'	5' GTT TTG GGT CAG GGG TGG TT 3'
IL-8	5' CGA TGT CAG TGC ATA AAG ACA 3'	5' TGA ATT CTC AGC CCT CTT CAA AAA 3'
TNF-a	5' CCT ACC AGA CCA AGG TCA AC 3'	5' AGG GGG TAA TAA AGG GAT TG 3'
IL-1b	5' CCG GAT CCA TGG CAC CTG TAC GAT CA 3'	5' GGG GTA CCT TAG GGA GAC ACA AAT TG 3'
GAPDH	5' CGT CTA GAA AAA CCT GCC AA 3'	5' TGA AGT CAA AGG AGA CCA CC 3'

RT-PCR은 C1000 Touch Thermal Cycler (BIO-RAD, CA, USA)를 사용하여 진행되었고 1.2% agarose농도의 gel을 만든 뒤 전기 연동하였다. 전기영동을 진행한 agarose gel은 NaBI (Neoscience, Suwon, Korea) gel doc system에서 image를 얻은 후, Image J를 사용하여 band의 면적을 구했다.

5) 히스타민 발현 분석

마취된 흰쥐의 복강에서 10mM HEPES, 136mM Nacl, 5mM KCl, 2mM CaCl2, 2.75mM MgCl2, 5.6mM glucose, 11mM NaHCO3, 0.6mM NaH2PO4 그리고 1% bovine serum albumin (BSA), pH 7.4가 함유된 20mL HEPES Tyrode's buffer로 복부를 3분간 마사지 해 주었다. 이후 peritoneal exudate cells (PECs)를 세척 추출하고 비만세포는 Percoll (Sigma-Aldrich) density gradient centrifugation (800g 10 min 4℃)에 의해 정제 추출되었다. 비만세포는 toluidine blue 염색으로 순도를 확인하였으며 Trypan blue 염색으로 세포의 97% 이상의 생존률을 확인하였다. 세포를 HEPES-Tyrode buffer에 분리한 다음 200㎕를 25㎕ GHJ (final concentration: 62.5, 125, 250, 500, 1000㎍/mL)와 함께 37℃에서 10동안 배양하였다. 히스타민 분비는 compound 48/80 (5㎍/mL) 25㎕를 첨가하고 37℃에서 20분간 배양하였고, 반응은 tube를 냉각시켜 반응을 정지시켰다. 세포를 4℃에서 15분 동안 3,000rpm으로 원심 분리시켰다. 상층액 내 히스타민 함량은 히스타민 kit을 이용하여 450nm로 측정하였다.

6) PCA 반응 분석

우선 대조군 (Control 군, n=8)과 실험군 (GHJ군, n=8)은 anti-DNP IgE에 의한 PCA반응을 유발하기 위하여 수컷 흰쥐의 진피내로 anti-DNP IgE 0.5㎍ (50㎕)을 주입하였다. 정상군 (Normal 군, n=8)은 PBS를 주입하였다. 주입 48시간 후에 DNP-human serum albumin (DNP-HSP) 100㎍ (100㎕)을 포함하는 4% Evans blue (1:4) 를 음경등쪽정맥 내로 주입하였다. DNP-HSA 주입 1시간 전에 GHJ를 희석하여 경구투여 (High: 274mg/kg, Low: 27.4mg/kg) 하였다. 정상군과 대조군은 같은 양의 D.W를 경구투여 하였다. 양성반응 판정을 위해 4% Evans blue 용액을 주입하고 30분이 경과한 뒤 anti-DNP IgE를 주사한 등쪽 피부 부위를 절개하여 주사한 부위의 진피에서 파란색 반점이 얼마나 나타나는 지를 관찰하였다. Formmide 용액으로 Evans blue 용액을 72시간동안 추출하였으며 추출한 Evans blue density를 spectrophtometer (backman instruments Inc, DU530, U.S.A.)로 620nm에서 측정한 후 색소의 양은 Evans blue의 calibration curve로 계산되었다.

7) 통계처리

측정값은 평균 ± 표준오차 (mean ± S.E.M.)를 이용해 표기하였고 통계분석은 Graph Pad PRISM Software (Graphpad Software Inc, CA, USA) 프로그램을 사용하였다. One-way ANOVA를 이용하였으며 Dunnett's Multiple Comparison Test를 이용하여 분석하였다. 유의수준은 P value < 0.05인 경우 유의성이 있다고 판단하였다.

Ⅲ. 결과

1. GHJ의 세포독성 및 염증성 사이토카인에 미치는 영향

GHJ의 세포독성을 알아보기 위하여 HMC-1 cell에 24시간 동안 다양한 농도의 GHJ (62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000㎍/mL)를 처리했다. 그 결과 GHJ는 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig 1A). HMC-1 cell은 PMA와 A23187로 자극한 후 7시간 배양되었다. HMC-1 cell에서 TNF-α, IL-6와 IL-8 분비를 관찰한 결과 1시간 전처리한 GHJ (62.5, 125, 250, 500, 1000㎍/mL)에 의해 TNF-α, IL-6의 분비가 억제됨을 관찰하였다. TNF-α의 분비는 PMA와 A23187로 처리된 대조군은 정상군에 비해 현저하게 증가하였다 (Fig 1B). GHJ 투여군은 TNF-α의 분비를 1000㎍/mL 농도에서 유의하게 감소시켰다 (Fig 1B). IL-6의 분비는 PMA와 A23187로 처리된 대조군은 정상군에 비해 현저하게 증가하였다. GHJ 투여군의 IL-6 분비는 1000㎍/mL에서 유의성 있는 결과를 나타내었다 (Fig 1C). IL-8의 분비는 PMA와 A23187로 처리된 대조군은 정상군에 비해 현저하게 증가하였다. GHJ 투여군은 IL-8에서 통계적 유의성을 보이지 않았다 (Fig 1D).

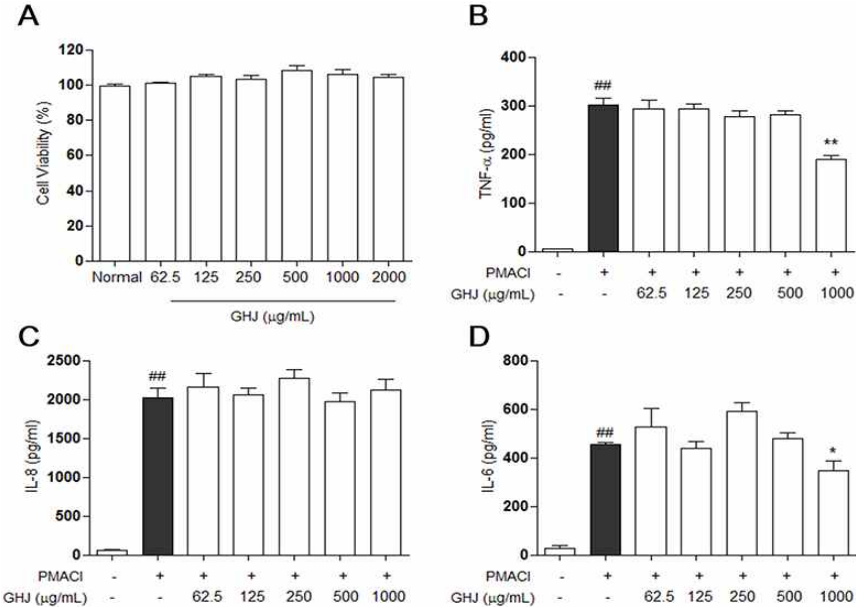

Fig. 1. (A) Cell viability of GHJ in HMC-1 cells. The optical density of the culture plates at 490 nm was measured with a Spectrophotometer. The effect of GHJ on the production (B) TNF-α, (C) IL-8, and (D) IL-6 cytokine levels in PMACI-stimulated HMC-1 cells. The value represents the mean ± S.E.M of three independent experiments. *##P<0.01*, significantly different from the Normal group; **P<0.05* and ***P<0.01* compared with the PMACI only group.

2. MAPK에서 GHJ의 억제 효과

PMA와 A23187에 의해 2시간 30분 동안 자극받은 HMC-1 세포는 용해된 다음 Western blot 을 통하여 분석하였다. GHJ는 HMC-1 세포가 PMA와 A23187로 자극 받기 1시간 전에 전 처리 하였다. ERK (T-ERK), JNK (T-JNK), p38 (T-p38)는 추가 대조군으로 사용된다. PMA와 A23187로 처리된 대조군은 정상군에 비해 ERK (P-ERK)발현이 증가하였다. GHJ로 처치된 군은 ERK (P-ERK) 발현을 억제하는 경향을 나타내었으며 특히 1000㎍/mL에서는 유의성 있는 결과를 나타내었다 (Fig 2B). PMA와 A23187로 처리된 대조군은 정상군에 비해 JNK (P-JNK)발현이 현저하게 증가하였다. GHJ로 처치된 군은 JNK (T-JNK)발현을 억제하는 경향을 나타내었으며 특히 1000㎍/mL에서는 유의성 있는 결과를 나타내었다 (Fig 2C). PMA와 A23187로 처리된 대조군은 정상군에 비해 p38 (P-p38)발현이 유의성있게 증가하였다. GHJ로 처치된 군은 p38 (T-p38) 발현을 1000 ㎍/mL에서 유의성 있게 억제하였다 (Fig 2D).

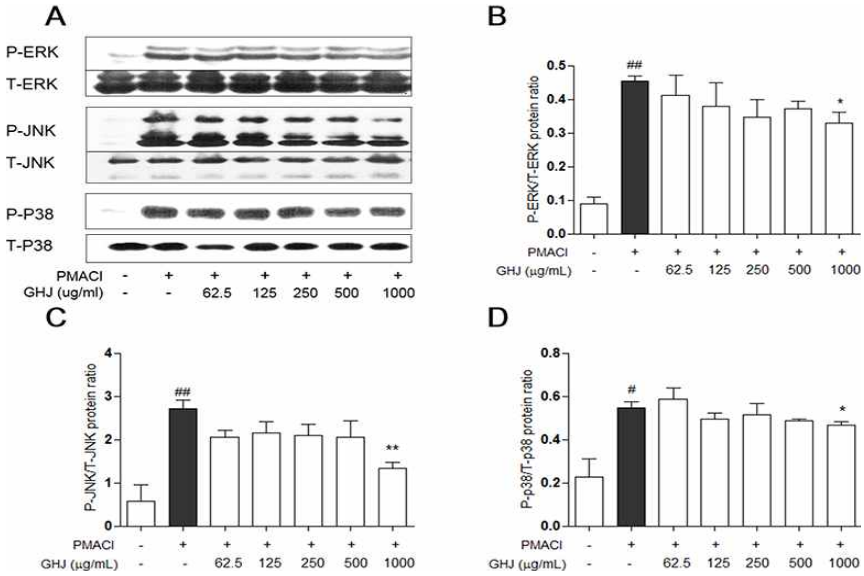

Fig. 2. The effects of GHJ on PMACI-induced the MAPKs expressions in HMC-1 cells. (A) Panel is a typical band image; (B-D) panel is a relative level of MAPK expression band by Image J. The value represents the mean ± S.E.M of three independent experiments. *##P<0.01*, significantly different from the Normal group; **P<0.05* and ***P<0.01* compared with the PMACI only group.

3. NF-κB 전사억제에서 GHJ의 효과

PMA와 A23187에 의해 1시간 동안 자극받은 HMC-1 세포는 용해된 다음Western blot 을 통하여 분석하였다. GHJ는 HMC-1 세포가 PMA와 A23187로 자극받기 2시간 전에 전 처리 하였다. GHJ로 처치된 군은 P-IκB-α은 250, 500, 1000 μg/mL 농도에서, P-NF-κB는 500, 1000 μg/mL농도에서 유의하게 염증 반응을 억제하는 것으로 나타났다 (Fig 3).

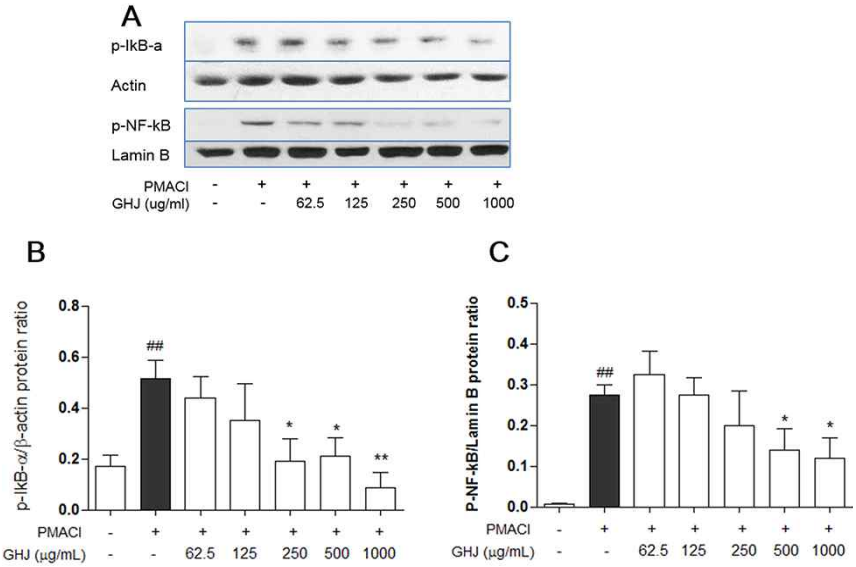

Fig. 3. The effect of GHJ on the degradation of p-IκB-α in the cytosol and p-NF-κB activation in the nuclei of PMACI-induced HMC-1 cells. The relative expression levels of p-IκB-α and p-NF-κB were measured using an Image J (B-C). The value represents the mean ± S.E.M of three independent experiments. *##P<0.01*, significantly different from the Normal group; **p<0.05* and ***p<0.01* significantly different from the PMACI only group.

4. GHJ가 염증성 사이토카인 mRNA 발현에 미치는 영향

HMC-1 세포는 GHJ로 1시간 동안 전처리 후 PMA와 A23187로 6시간을 자극하였으며 이 후 cell에서 RNA를 분리하고 cDNA를 합성한 후 KAPA PCA kit를 사용하여 중합효소연쇄반응을 진행 하였다. IL-6의 분비는 PMA와 A23187로 처리된 대조군은 정상군에 비해 현저하게 증가하였다. GHJ 투여군의 IL-6 분비는 500, 1000㎍/mL 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다 (Fig 4B). TNF-α의 분비는 PMA와 A23187로 처리된 대조군은 정상군에 비해 현저하게 증가하였다. GHJ 투여군의 TNF-α의 분비는 감소하는 경향을 나타내었고 특히 1000㎍/mL에서는 유의성 있게 감소하였다 (Fig 4C). IL-8의 분비는 PMA와 A23187로 처리된 대조군은 정상군에 비해 현저하게 증가하였다. GHJ 투여군의 IL-8의 분비는 감소하지 않았다 (Fig 4D). IL-1β의 분비는 PMA와 A23187로 처리된 대조군은 정상군에 비해 현저하게 증가하였다. GHJ 투여군의 IL-1β의 분비는 1000㎍/mL 농도에서 유의성 있게 감소하였다 (Fig 4E).

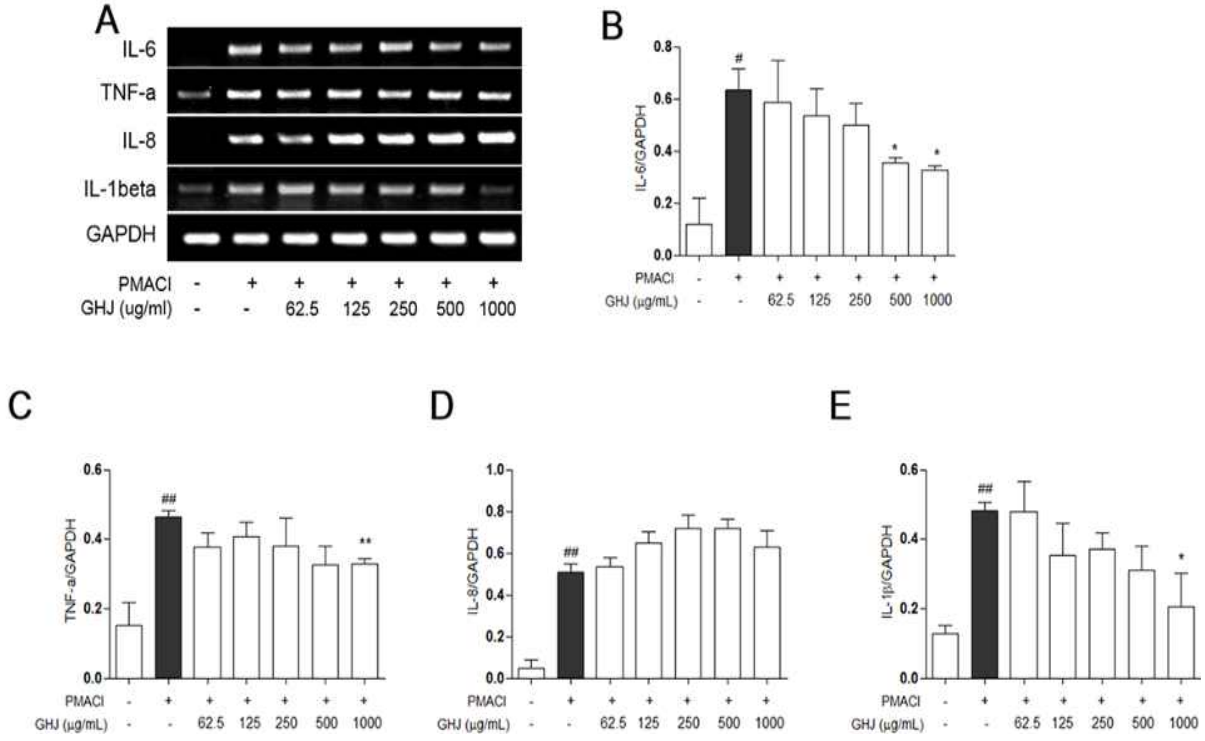

Fig. 4. The effect of GHJ on the production of (B) IL-6, (C) TNF-α, and (D) IL-8 and (E) IL-1β cytokine levels in PMACI-stimulated HMC-1 cells. The value represents the mean ± S.E.M of three independent experiments. *##P<0.01*, significantly different from the Normal group; **P<0.05* and ***P<0.01* compared with the PMACI only group.

5. GHJ의 히스타민에 대한 효과

복강 비만세포 부유액에 compound 48/80용액을 처리한 후 비만세포로부터 유리된 히스타민 양을 측정하였다. 대조군은 정상군에 비해 유의한 증가를 보였다. 반면에 상기 농도의 GHJ를 전처리 한 후 compound 48/80용액을 처리한 후 비만세포로부터 유리된 히스타민 양을 측정한 결과 125, 250, 500, 1000㎍/mL에서 유의한 ($P < 0.01$) 히스타민 분비 억제 효과를 나타내었다 (Fig 5).

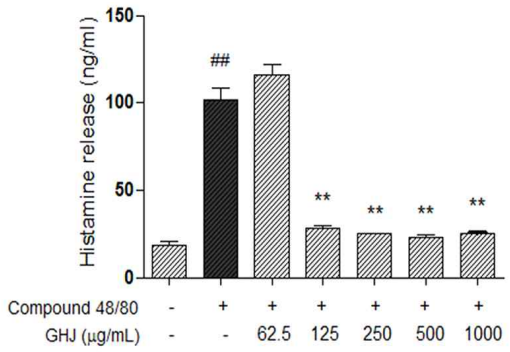

Fig. 5. Effect of GHJ on compound 48/80-induced histamine release from rat peritoneal mast cells (RPMCs). The value represents the mean ± S.E.M. from three independent experiments. *##P<0.01* compared with the normal group. ***P<0.01* compared with the PMACI alone group.

6. GHJ의 PCA에 대한 효과

수동 피부 아나필락시스 (passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 반응은 국소 알레르기 반응에서 민감성을 측정하는 매우 유용한 동물모델 중 하나이다[13,14]. GHJ의 효과를 밝히기 위하여 피부반응을 관찰하고 Evans blue 의 농도를 측정하였다. 고농도 투여군에서 Amound of dye 는 유의하게 줄어들었다. 고농도 투여군의 Evans blue patch area 또한 유의하게 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig 6).

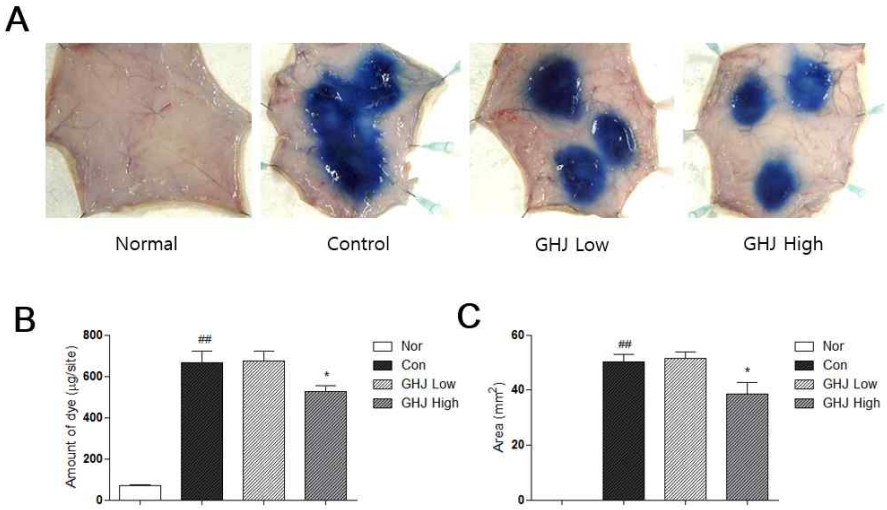

Fig. 6. The inhibitory effect of GHJ on 48 h passive cutaneous anaphylaxis. (A) Photograph image of internal surfaces of the rat skins, (B) Extravasation of Evans blue (μg/site) on internal surfaces of the rat, (C) area of Evans blue on internal surface of dorsal skin. The value represents the mean ± S.E.M *##P<0.01* compared with the vehicle group; **P<0.05* and ***P<0.01* compared with the control group.

Ⅳ. 고찰

본 연구결과는 GHJ가 PMACI로 유도된 사이토카인 (IL-6, IL-8, TNF-a, IL-1β)의 분비를 억제하고, 사이토카인의 발현에 주요한 역할을 하는 MAP kinase 경로의 활성화를 억제하며, 또한 compound 48/80으로 유도된 히스타민의 유리를억제하는 것을 보여준다. 또한 PCA의 동물모델에서 또한 알러지 억제 작용을 보여줌으로써 GHJ의 항염증 작용이 단순히 세포에만 그치는 것이 아니라 생체에서도 같은 작용을 한다는 것을 증명했다.

현재 염증을 치료할 수 있는 약물은 항히스타민제와 스테로이드가 광범위하게 사용되는데 항히스타민의 경우 염증 완화작용은 뛰어나지만 일시적 진정효과가 있지만, 두통, 녹내장, 체중증가, 급성 중독 등

의 부작용이 있는 실정이고, 스테로이드제의 경우 강력한 소염작용과 면역억제 작용이 있으나 장기간 투여 시 골다공증, 고혈당, 쿠싱 증후군 등 심각하고 다양한 부작용이 일어나고 있다는 보고가 있다[15-17]. 면역요법은 정확한 작용기전이 없으며, 부작용으로 인한 사망사고가 빈번하여 치료에 한계가 있다. 이러한 한계점들로 인해 한방치료를 병행하는 것이 최근의 추세이다[16,18].

GHJ의 구성약재인 고삼은 항염증, 천식, 위궤양 등에 효과가 있다고 알려져 있다[4]. 또한 형개는 발열오한, 두통, 신통 등의 증상에 전통적으로 사용되어 왔다[4]. 마지막으로 자초는 해독작용이 뛰어나다고 알려져 있으며 항암, 항균 효과가 있다[4]는 보고도 있었지만 이 약재들을 배합한 약물으로 항염증 효과를 증명한 연구는 없었기 때문에 본 연구진은 고삼, 형개, 자초를 혼합한 열탕 추출물의 항염증 효과에 대해서 연구했다.

Th2세포들은 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, eotaxin, MCP, MIP등과 같은 사이토카인 인자들을 생성한다[19]. IL-6는 면역반응과 염증반응 진행되는 동안 세포분화, 성장, 생존과 이동을 유도하며 염증반응을 일으키는데 중요한 역할을 한다[20,21]. IL-8은 비만세포, 대식세포, 중성구와 같은 면역세포에서 생성되며 화학적 신호를 전달함으로써 염증부위에서 호중성 백혈구를 활성화시켜 지연형 알레르기 증상을 일으킨다[20]. TNF-α는 염증반응과 급성기반응의 구성원인 사이토카인이다[22-24]. TNF-α의 주요한 역할은 면역세포를 이용한 면역반응의 조절이다[22-24]. IL-1b는 IL-1 군에 속하며 사이토카인 네트워크의 활성화에 있어 중요한 역할을 수행한다[25,26]. IL-1에 의해 유도된 염증 활성은 IL-6 발현과 관련된다[25,26].

본 연구에서 GHJ의 염증성 사이토카인으 억제 작용을 확인했고, 그 결과 GHJ는 염증성 사이토카인의 발현을 대부분 억제시켰고 또한 사이토카인들의 mRNA 발현까지 억제한다는 것을 알 수 있었다. 하지만 IL-8의 발현은 억제시키지 못했다.

본 실험에서는 인간비만세포주인 HMC-1에 칼슘 ionphore인 A23187과 protein kinase C에 직접 작용하는 분열촉진제인 PMA가 결합된 PCACI를 처리하여 비만세포의 활성을 유도하여 염증을 유발했다. 또한 본 연구에서는 GHJ이 어떠한 효과를 나타내는지 확인하였다. 세포막에서 핵까지 신호를 전달하는 경로 MAPK pathway에 작용하는 요소인 MAPKs는 세포의 증식과 분화, 사멸, 사이토카인과 스트레스에 대한 세포 반응 조절 등 다양한 기능을 담당하며[27], 크게 ERK, JNK, P38로 분류된다[28-31].

본 연구 결과에서 GHJ는 이 MAPKs의 발현을 감소시켰고, 특히 고농도의 GHJ는 JNK의 발현을 현저하게 감소시켰다. 본 실험 결과는 사이토카인의 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있는 MAPKs의 활성화를 억제하는 것으로 알러지 염증 반응을 억제하는 것으로 보여진다.

NF-κB는 IκB와 결합하여 염증반응을 유도하는 유전자 발현을 촉진시키는 인자로써, 인산화된 이들 인자는 염증반응, 면역체계 조절, 세포고사, 세포증식, 상피세포의 분화 등에 관여한다[32-34].

본 실험에서 GHJ가 HMC-1 세포에서 PMA 와 A23187에 의해 유도되어 증가된 NF-κB의 활성화를 억제하는 효과를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 GHJ가 IκB의 인산화반응과 NF-κB가 핵 내 발현 과정을 비활성화시켜 IL-6, TNF-a 와 같은 proinflammatory 사이토카인의 발현을 억제할 수 있음을 시사한다.

여러 가지 염증 반응 중, 급성으로 심각한 결과를 초래할 수 있는 1형 과민반응은 IgE 에 의해 매개되는 반응으로 IgE의 결합에 의해 비만세포가 탈과립된다고 알려져 있고, 히스타민, 세로토닌, 혈소판활성인자, trypase, kininogenase, prostaglandin D2와 같은 화학전달물질이 유리한다[35]. 이 현상은 즉시형 과민반응 및 알레르기성 비염, 기관지의 천식, 아토피성 피부염 등을 일으키게 된다[36].

본 실험에서 GHJ가 HMC-1의 탈과립을 통한 히스타밍 방출을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 염증성 사이토카인의 억제로도 이어지는 것으로 해석될 수 있다.

PCA 반응은 비만세포를 매개체로 작용하는 즉시형 과민성 알레르기 반응에 대한 동물 모델이며, Anti-IgE는 PCA 반응을 유도시키는데 이용된다[13,37]. 본 실험에서 흰쥐에게 PCA 반응을 유도하여 등쪽 피부를 관찰하고 염색량을 비교한 결과, GHJ를 구강 투여한 그룹이 고농도군에서 Evans blue 농도와 면적이 감소하였다. 본 실험 결과 GHJ가 PCA 반응을 억제함으로써 GHJ가 생체에서의 알레르기 염증 반응에서도 효과가 있음을 알 수 있었다.

V. 결론

고농도의 GHJ은 염증성 사이토카인의 mRNA 수준의 발현과 MAP kinase와 NF-κB, p-IκB-α, 히스타민에서도 모두 억제 작용을 보였다. 게다가 생체에서 IgE 유발 과민반응에서 효과가 있었다. 본실험을 통해 GHJ 고농도가 가지는 항염증 효과는 증명되었지만 GHJ의 분획층이나 지표성분을 이용한 추가연구가 필요하다고 생각된다.

References

1. X He, J Fang, L Huang, J Wang, X Huang. Sophora flavescens Ait.: Traditional usage, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. Journal of ethnopharmacology. Aug 22 2015;172:10-29.
2. Y Liu, T Bi, W Dai, et al. Effects of Oxymatrine on the Proliferation and Apoptosis of Human Hepatoma Carcinoma Cells. Technology in cancer research &treatment. Jun 2016;15(3):487-497.
3. YH Kim. New Herbology. Hanol; 2014.
4. committee Korean Medical Pharmacology Text publication. Korean medical pharmacology. seoul: shinil books; 2010.
5. SH Cho. Allergic rhinitis mouse model. Korean society of othorhinolaryngology-head and neck surgery 2012;55:609-615.
6. DJ Stuehr, HJ Cho, NS Kwon, MF Weise, CF Nathan. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Sep 01 1991; 88(17):7773-7777.
7. Pthology The Korean Society of. Pathology. Vol 90. seoul, 2010.
8. Church MK, F Levi-Schaffer. The human mast cell. . J Allergy Clin Immunol 1997;99:155-160.
9. Kyung Bum Kim, Jeong Su Park, Jeong Jong Moon. Effects of Phyto-Extract Mixture (PEM381) in Type Ⅰ Allergic Reaction-Induced Mice. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2007;36:1377-1384.
10. TY Shin. Allergy and korean medicine. seoul, 2001.
11. The Korean Academy of Asthma Allergy and Clinical Immunology. Asthma and Allergic diseases. Koonja Publishing Inc; 1990.
12. KD Cooper. Atopy dermatitis-Recent trends in pathogenesis and therapy. J Invest Dermatol. 1994;102:128-137.
13. Koda A, Watanabe S, Yanagihara Y, Nagai H, K Sakamoto. A comparative study of the anti-allergic effects of disodium baicalein 6-phosphate (BPS) and disodium cromoglycate (DSCG). Jpn J Pharmacol. 1977;27:31-38.
14. Nagai H Takizawa T, Nakatomi I, Matsuura N, Koda A Anti-allergic action of glucocorticoids in rats. Jpn J Pharmacol. 1983;33:349-355.
15. Dermatology Korean Dermatology Association. Dermatology. Vol 208. Seoul: Ryo Moon Gak. P.Co; 1994.
16. Park JH, SW Hong. The Effects of Hyunggaeyungyo-tang of Suppression of iNOS Production on Mice with Allergic Rhinitis. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology &Otolaryngology &Dermatology 2012;25(1):12-21.
17. surgery The society of otorhinolaryngology-head and neck. Otorhinolaryngology-head and neck surgery. 2nd ed. Seoul: Ilchokak; 2009.
18. Malling HJ, B Weeke. Immunotheraphy. allergy. 1993;48:1-35.
19. Aversa G, J Punnonen, al. at. An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. J Exp Med 1993;178: 2213-2218.
20. Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M, M Babina. Mast cells as initiators of immunity and host defense. Exp Dermatol 2001;10:1-10.
21. Mican JA, Arora N, Burd PR, DD Metcalfe. Passive cutaneous anaphylaxis in mouse skin is

associated with local accumulation of interleukin-6 mRNA and immunoreactive interleukin-6 protein. J Allergy Clin Immunol 1992;90:815-824.
22. Bradding P, Mediwake R, Feather IH, Madden J, Church MK, al. et. TNF alpha is localized to nasal mucosal mast cells and is released in acute allergic rhinitis. Clin Exp Allergy 1995; 25:406-415.
23. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, al. et. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. Science. 1992;258:1798-1801.
24. Baggiolini M, Walz A, SL Kunkel. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. J Clin Invest. 1989;84:1045-1049.
25. Colomar A, Marty V, Medina C, Combe C, Parnet P, al. et. Maturation and release of interleukin-1beta by lipopolysaccharide-primed mouse Schwann cells require the stimulation of P2X7 receptors. The Journal of biological chemistry. 2003;278: 30732-30740.
26. Helle M, Brakenhoff JP, De Groot ER, LA Aarden. Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. Eur J Immunol 1988;18:957-959.
27. Johnson GL, R Lapadat. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science. 2002;298:1911-1912.
28. Jin-Deok Joo. The use of intra-cellular signaling pathways in anesthesiology and pain medicine field. Korean J anesthesiol 2009;57:277-283.
29. M Caivano. Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transporters and nitric oxide synthetase in RAW264 macrophages. FEBS Lett. 1998;429:249-253.
30. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, ME Greenberg. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science. 1995;270:1326-1331.
31. Ichijo H, Nishida E, Irie K, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. Science. 1997;275:90-94.
32. Chae Sung Won. Function and Activation of NF-κB in Immune System. Korean J Otolaryngol. 2005;48:284-288.
33. Mercurio F, DiDonato JA, Rosette C, M Karin. p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction. Genes Dev. 1993;7:705-718.
34. Denk A, Goebeler M, Schmid S, et al. Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells. The Journal of biological chemistry. 2001;276: 28451-28458.
35. Roitt Ivan , Brostoff Jonathan , David Male. Immunology 3th edition. Seoul: Komoonsa; 1994.
36. Cho Sang-Heon. Hyper sensitivity reaction. In Bio Wave. 2005;7(3).
37. Nagai H, Takizawa T, Nakatomi I, Matsuura N, A Koda. Anti-allergic action of glucocorticoids in rats. Jpn J Pharmacol 1983;33:349-355.