

苦參 에탄올 추출물이 NFκB 및 JNK, p38 조절을 통한 알레르기성 염증에 미치는 영향

이지영 · 박성식

동국대학교 한의과대학 사상체질과

Abstract

The Effect of Allergic Inflammation by *Sophora Flavescens* Aiton Extract Ion Through Inhibition of the NFκB, JNK and p38 Pathway

Lee Ji-Young, Park Seong-Sik

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk Univ.

1. Objectives

The roots of *Sophora flavescens* Aiton (SFA) are widely used as a herbal remedy for allergic inflammation. In this study, we investigated the effect of SFA on passive cutaneous anaphylaxis reaction and histamin release and we demonstrated that SFA suppressed the production of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-8 (IL-8), through inhibition of the NFκB, JNK and p38 pathway in the human mast cell line, HMC-1.

2. Methods

To accomplish this, we investigated passive cutaneous anaphylaxis reaction and histamin release at an animal experiment. In addition, we investigated the effect of SFA on the production of inflammation-related cytokines in HMC-1 cells that were co-treated with PMA and A23187, which can induce production of pro-inflammatory cytokines.

3. Results and Conclusions

SFA induced passive cutaneous anaphylaxis reaction and histamin release and suppressed the expression of TNF-α, IL-6, and IL-8. In addition, the protein levels of TNF-α were also decreased by SFA treatment. Furthermore, SFA inhibited the nuclear translocation of nuclear factor NFκB through inhibition of the phosphorylation and degradation of IκB-α, which is an inhibitor of NFκB. Moreover, SFA also inhibited induction of MAPKs (JNK, p38) and NFκB promoter-mediated luciferase activity. Taken together, these results suggest that SFA could be used as a treatment for mast cell-derived allergic inflammatory diseases.

Key Words : *Sophora flavescens* Aiton (SFA), Allergic Inflammation, TNF-α, IL-6, IL-8, MAPKs (JNK, p38), NFκBm.

1. 서론

첨단 과학의 발전에 따른 질병 발생에 관한 병태 생리의 이해와 새로운 치료약제의 도입에도 불구하고 알레르기 질환은 최근 전 세계적으로 증가하고 있는 추세이다.¹ 알레르기 질환의 발생에는 항원에의 노출 과 감작, 알레르기성 염증 반응이라는 일련의 과정이 필요하며,² 염증이란 생체의 세포나 조직이 어떠한 원인에 의하여 손상이나 자극을 받게 되면 즉각적으로 이에 대한 반응을 일으켜 손상을 극소화하고 더 나아가서 손상된 부위를 원상으로 회복시키려는 일련의 반응을 말한다.³ 최근에는 이러한 알레르기 반응에 있어서 염증반응을 가장 핵심으로 이해하려는 반응이 지배적이다.

치료가 있어, 양방의 치료는 즉각적인 증상 완화는 있으나, 지속적인 치료효과는 기대하기 어렵다. 최근에는 扶正祛邪라는 한의학적 치료방법이 알레르기 성 질환에 시도되는 빈도가 높아지고 있으며, 체질과의 연관성을 중요하게 생각하는 경향이 높아지고 있다. 한방에서는 단미 약재나 처방을 중심으로 알레르기 성 질환에 대한 치료를 하고 있다.

그 중 苦蔘은 性寒味苦無毒하며, 瀉火, 燥濕, 補陰, 去風殺蟲 利尿하는 효능이 있어 熱毒風 皮膚生瘡 赤癩眉脫 除大熱嗜睡 明目止淚 養肝膽氣 除伏熱腸澀 小便黃赤 療齒痛及惡瘡 下部蟲 등의 염증성 질환에 多用되어 왔다.^{4,6}

苦蔘은 四象醫學에서는 梔子, 金銀花, 生地黃, 黃連, 石膏, 黃芩, 連翹 등과 함께 少陽人 약물로 분류된다.⁷ 少陽人은 기본적으로 火熱病證으로 규정했기 때문에 少陽人의 기본적인 약리는 保命之主인 陰清之氣를 확보하는 것인데, 草本卷⁸에서는 이를 清腸이라고 하였다. 이들 약재들은 清熱燥濕, 清熱涼血, 清熱解毒하는 성질이 있어 發熱, 浮腫, 疼痛 등의 염증 치료에 적합하다고 사료된다.

苦蔘의 염증에 관계된 실험 연구로는 항균효과^{9,12}와 세포독성에 관한 연구¹³⁻¹⁵, 알레르기성 질환에 관한 연구^{16,17} 등이 있다. 그러나, 대부분의 실험이 세포주가 아니면 동물 실험 위주였던 것과, 메탄올, 에틸 아세테이트 등을 용매로 하거나 전탕액이었으므로, 보다 효과적인 임상적 유용성을 위해 동물 생체 실험에

비만세포주 실험을 추가하였으며, 에탄올을 용매로 사용하였다. 또한, 기존의 염증연구에서는 보통 기본적인 cytokine에 대한 변화만을 보는데 비해, 여기에서는 NF- κ B의 변화와 전사인자인 NF- κ B를 상부에서 조절하는 MAPKs 기전을 밝히고자 하였다.

이에 저자는 苦蔘의 에탄올 추출물이 생체 내 국소성 즉시형 알레르기반응에 미치는 영향, 히스타민 분비에 미치는 영향, 사람 비만 세포에서 세포종식 효과, 염증매개 사이토카인인 TNF- α , IL-6, IL-8 억제효과와 MAPKs 활성화에 미치는 영향, NF- κ B 전사활성에 미치는 영향을 통해 항염증 효과를 살펴보고자한다.

2. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재추출

苦蔘(*Sophora flavescens* Aiton, 옴니허브, 경북, Korea) 100g을 정량 후 80% 에탄올 2 l를 가하여 30분 동안 2회에 걸쳐 초음파진동을 이용하여 추출액을 획득하였다. 감압 여과한 후 감압 농축기를 사용하여 농축한 다음, 동결 건조기로 동결 건조하였다. 얻어진 분말 14.88g을 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여 사용하였다.

2) 시약

세포배양액인 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)은 GIBCO BRL(Grand Island, NY, USA)의 제품을 사용하였다.

Compound 48/80, anti-DNP IgE, DNP-human serum albumin (HAS), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), A23187, evans blue는 Sigma aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, MTS는 promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다.

히스타민 측정을 위해 histamine kit을 Oxford Biomedical Research (Oxford, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Anti-human TNF- α 항체, biotinylated anti-human TNF- α 항체, 재조합 human TNF- α 는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

Anti-human IL-6/IL-8 항체, biotinylated anti-human

IL-6/IL-8 항체, 재조합 human IL-6/IL-8 단백질은 BD Biosciences(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

Western blot 분석에 사용된 NF κ B, p-I κ B, lamine B 항체는 Santacruz Biotechnology(CA, USA)에서 구입하였으며, α -tubulin 항체는 Sigma aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 luciferase assay를 위해 사용된 luciferase assay system은 promega(Madison, WI, USA)에서 구입하였다.

3) 실험동물

실험동물로는 흰쥐를 오리엔트 바이오(경기도, 성남)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 동물은 4마리 당 한 cage에 사육하였으며, 온도 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 55 \pm 5 $^{\circ}$ C의 환경을 유지하였다.

4) 세포주

사람 비만세포인 HMC-1(Human Mast Cells)은 배지에서 2-3일마다 배양액을 교환해 주었다. 배양 환경은 37 $^{\circ}$ C 포화 습도로 유지되는 5% CO $_2$ 배양기에서 배양하였다. HMC-1 세포는 24 well 배양용기에서 배양한 후 각 농도의 苦蓼 추출물을 1 시간 전 처리한 후 PMA와 A23187 를 처리하여 세포를 얻어 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction

생체 내 국소성 즉시형 알레르기 반응을 보기 위해 Braga & Mota¹⁸의 방법을 이용하여 실험동물모델로 사용하였다.

2) 쥐의 복강 내 비만세포 준비

흰쥐의 복강 내 비만세포를 분리하기 위해 복강 내 Tyrode buffer A (10 mM HEPES, 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl $_2$, 2.75 mM NaH $_2$ PO $_4$, 그리고 0.1% bovine serum)를 10 ml 주입하고, 약 90 초간 복막을 부드럽게 맞사지 해 준 후 복막을 열어 파스테르 파이펫으로 세포를 모았다. 모든 복강 내 세포들은 150 \times g에서 10 분간 원심분리하고 난 후 모아진 세포를 Tyrode buffer로 풀어주고 Hachisuka et. al.¹⁹의 방법

을 이용하여 비만세포를 분리하였다.

3) 히스타민 측정

세포에서 분리된 히스타민 측정을 위해 400 \times g에서 10 분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액으로 히스타민 분비 억제율을 구하기 위해 히스타민 키트를 이용하여 enzyme immunoassay 방법으로 450 nm에서 측정하였다. 히스타민 분비 억제율은 히스타민 분비 억제율 (%)=(A-B) \times 100/A 같은 식으로 계산하여 구하였다. 이때 A는 苦蓼 처리 없이 compound 48/80으로 유도된 세포의 히스타민 분비량이며, B는 苦蓼 처리 후 compound 48/80으로 유도된 세포의 히스타민 분비량을 나타낸다.

4) 농도별 HMC-1 세포 생존율 측정

HMC-1 세포에 苦蓼(SFA) 추출물을 농도별로 처리했을 때 생존율을 MTS (Promega, Madison, USA) assay로 조사하였다.

5) 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. 사이토카인 측정을 위해 Kim and Lee²⁰의 ELISA방법을 변형하여 사용하였다.

6) Reverse transcription-PCR

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

분리하여 얻은 세포질과 핵 단백질은 Brad-ford assay방법²¹을 이용하여 정량하여 사용하였다.

8) 단백질 발현 분석

얻은 총 단백질을 Brad-ford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California)방법을 이용하여 정량한 다음 40 μ g의 단백질을 15%acrylamide gel에 전기영동하였다. 이것을 nitrocellulose membrane(Schleicher&Schuell Bios-

ciences, Dassel, Germany)에 transfer하여 PBST에 1% skim milk 와 1% BSA가 든 blocking 용액에서 1시간 동안 blocking한 후 PBST로 5분간 2회 세척하였다. Anti-NF κ B, anti-p-I κ B, anti-I κ B antibodies(Santa Cruz, California)를 이용하여 1차 항체반응을 4°C에서 16 시간 반응 시킨 다음 PBST로 2차 항체반응을 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST 로 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. 6시간 후 혈청이 있는 배지로 같이주고, 24 시간을 배양하였다. 그 후 약제를 1시간 전 처리한 후 25nM PMA와 1 μ M A23187을 24 시간동안 반응시켰다. 세포를 차가운 PBS로 세척 한 후 lysis buffer (Luciferase Reporter Assay System; Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 세포를 용해시켰다. Vortexing하여 세포를 섞은 다음, 12,000 rpm, 4°C, 3분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻은 상층액은 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다. Luciferase assay를 위해 보관 중인 세포용해된 상층액 100 μ l 를 상온에서 Luciferase substrate 20 μ l씩 불투명한 96well 에 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 \pm 표준편차값을 기준으로 통계분석하였다. 실험 결과값의 통계적 분석을 위해 independent *t*-tests 을 사용하여 각 실험군 간의 유의성을 분석하였고, 그 유의수준은 p <0.05로 하였다.

III. 結果

1. 생체 내 국소성 즉시형 알레르기 반응 (passive cutaneous anaphylaxis, PCA)

본 실험에서는 苦蔘의 즉시형 알레르기 반응의 억제 효과를 보기 위해 동일한 조건의 실험동물인 흰쥐에 생리식염수를 사용하여 대조군으로 사용하였다. 정량한 결과 생리식염수를 경구투여한 후 DNP-HSA를 정맥 주사한 대조군과 비교해 보았을 때 그 부위의 색깔이 감소되어 나타났으며 파란색 색소의 용출량에서도 30%이상의 억제율을 나타내며 의미있게 감소되었다 (Fig.1, p<0.05).

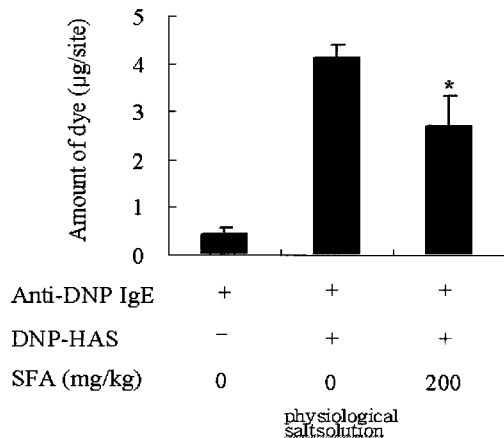


Fig. 1. Effect of administering SFA (200 mg/kg) on PCA in rat. Each amount of dye is presented as the mean \pm S.E.M. *Statistically significant from the DNP-HAS value at p<0.05.

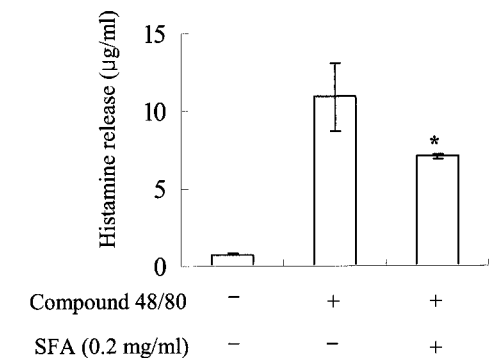


Fig. 2. Effect of SFA on compound 48/80-induced histamine release of rat peritoneal mast cells. The mast cells (1 \times 10⁵ cell/ml) were treated with 0.2 mg/ml of SFA for 10 min and then treated with compound 48/80 for 20 min. *Statistically significant from the compound 48/80 value at p<0.05.

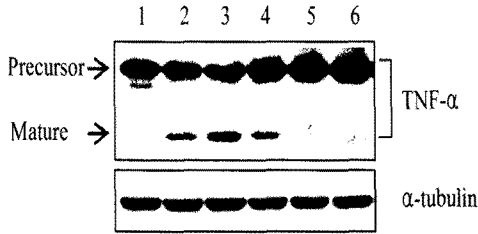


Fig. 3. A. Effect of SFA on PMA plus A23187-stimulated TNF- α expression levels. The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) incubated with various concentrations (0.05mg/ml to 0.2 mg/ml) of SFA for 1h and then treated with PMA plus A23187 for 4h
1, Normal cells;
2, Control cells;
3, DMSO control cells;
4, SFA (0.05mg/ml)+PMA plus A23187;
5, SFA (0.1mg/ml)+PMA plus A23187;
6, SFA (0.2mg/ml)+PMA plus A23187).

2. 쥐의 복강 내 비만세포에서 히스타민 분비에 미치는 영향

compound 48/80 단독으로 처리한 세포에서의 히스타민 분비량 10.92 ± 2.147 ug/ml에 비해 苦蓼 0.2 mg/ml의 농도에서 분비된 히스타민량이 7.089 ± 0.151 ug/ml로 억제되어 나타났다(Fig 2, $p < 0.05$).

3. HMC-1세포에서 세포증식 효과

세포증식 결과에서도 정상세포와 비교하였을 때 苦蓼 추출물을 농도별로 처리하면, 0.4 mg/ml의 농도까지 유의한 변화를 나타내지 않았다.

4. HMC-1세포에서 TNF- α 억제 효과

苦蓼추출물을 0.05, 0.1, 0.2mg/ml의 농도로 HMC-1 세포에 1시간 전 처리한 후 PMA(25 ng/ml)와 A23187 (1 μ M)로 4시간 동안 처리하여 결과를 얻었다. 그 결과 苦蓼 추출물에 농도 의존적으로 TNF- α 의 단백질 발현량과 분비량이 현저히 감소되어 있었다. 특히 苦蓼 0.2mg/ml의 농도에서는 PMA(25ng/ml)와 A23187(1 μ M)로만 유도된 TNF- α 의 생성율과 비교하였을 때 50% 이상의 억제효를 보였으며(Fig. 3, Fig 4: $p < 0.05$),

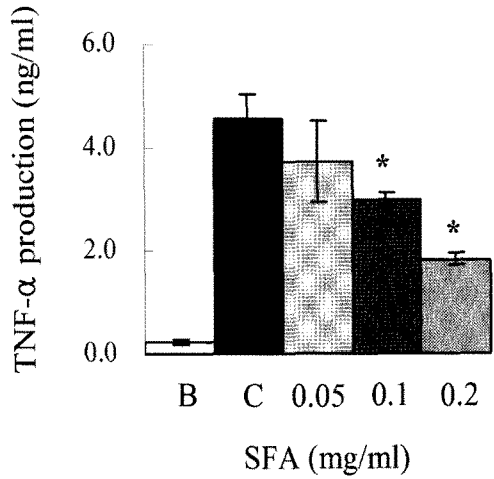


Fig. 4. The TNF- α protein levels in the cells or supernatant were measured with the Immunoblotting analysis or ELISA assay.
B, Normal cells;
C, Control cells
*Statistically significant value at $p < 0.05$.

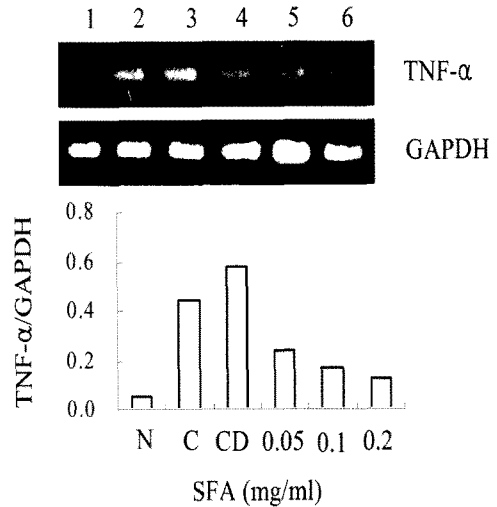


Fig. 5. The TNF- α mRNA levels were measured with the RT-PCR analysis. The TNF- α mRNA levels were measured by densitometry.
1, Normal cells
2, Control cells
3, DMSO control cells
4, SFA (0.05mg/ml)+PMA plus A23187
5, SFA (0.1mg/ml)+PMA plus A23187
6, SFA (0.2mg/ml)+PMA plus A23187

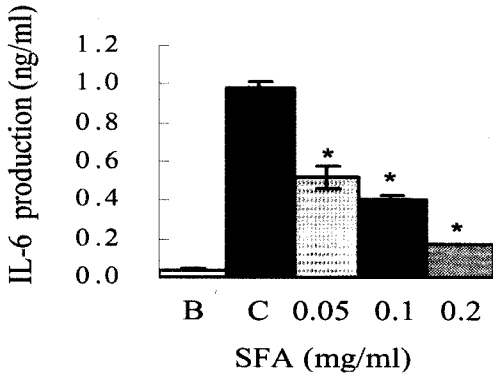


Fig. 6. Effect of SFA on PMA plus A23187-stimulated IL-6 expression levels.

The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) incubated with various concentrations (0.05 mg/ml to 0.2 mg/ml) of SFA for 1h and then treated with PMA plus A23187 for 4h. The IL-6 secreted protein levels in the supernatant were measured with the ELISA assay

B, Normal cells

C, Control cells

*Statistically significant value at $p < 0.05$.

mRNA의 발현도 PMA(25ng/ml)와 A23187(1 μ M)로만 유도된 TNF- α 의 발현량보다 높은 억제효과를 보여주었다(Fig. 5).

5. HMC-1세포에서 IL-6 억제효과

그 결과 苦參 추출물 0.2 mg/ml에서 PMA plus A23187로 유도된 IL-6의 생성량이 70% 정도 현저하게 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 6; $p < 0.05$). IL-6의 mRNA 발현율에서도 0.05 mg/ml에서 0.2 mg/ml까지의 모든 농도에서 농도 의존적으로 억제현상이 나타남을 알 수 있었다(Fig. 7).

6. HMC-1 세포에서 IL-8 억제효과

IL-8 또한 비만세포에서 분비되는 염증매개 사이토카인이다. 본 실험에서는 비만세포인 HMC-1에서 苦參 추출물의 PMA와 A23187로 유도된 IL-8의 억제효과를 알아보기 위해 ELISA 및 RT-PCR 방법을 이용하였다. 그 결과 농도 의존적으로 IL-8의 분비량이 감소되는 것을 알 수 있었다. 특히 0.2mg/ml의 苦參추출물

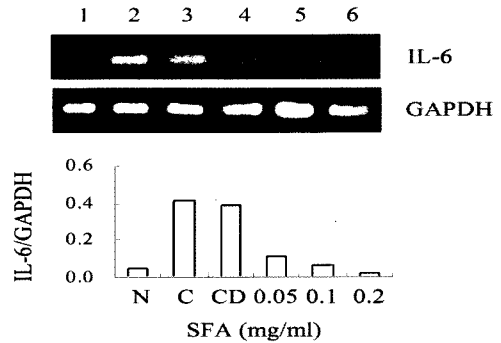


Fig. 7. Effect of SFA on PMA plus A23187-stimulated IL-6 expression levels.

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

1, Normal cells 2, Control cells

3, DMSO control cells

4, SFA (0.05 mg/ml)+PMA plus A23187

5, SFA (0.1 mg/ml)+PMA plus A23187

6, SFA (0.2 mg/ml)+PMA plus A23187

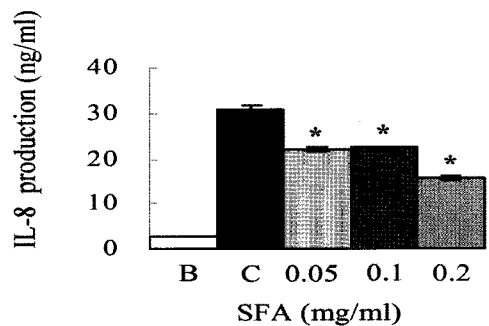


Fig. 8. Effect of SFA on PMA plus A23187-stimulated IL-8 expression levels.

The HMC-1 cells (1×10^6 cell/ml) incubated with various concentrations (0.0 mg/ml to 0.2 mg/ml) of SFA for 1h and then treated with PMA plus A23187 for 4h. The IL-8 secreted protein levels in the supernatant were measured with the ELISA assay.

B; Normal cells

C; Control cells

*Statistically significant value at $p < 0.05$.

에서는 PMA와 A23187 단독으로 처리한 세포의 IL-8 생성량에 비해 약 50% 억제율을 보였다(Fig. 8:

p<0.05). IL-8의 mRNA 수준을 조사하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 결과 苦蓼 추출물 0.1 mg/ml 농도에서 약간 감소하였으며, 0.2 mg/ml의 농도에서는 IL-8의 mRNA 발현이 아무것도 처리하지 않은 정상 세포 수준과 비슷하게 감소되어 나타났다.

7. HMC-1 세포에서 MAPKs 억제 효과

苦蓼의 MAPKs의 활성을 측정하기 위해 苦蓼 0.05 mg/ml부터 0.2 mg/ml의 농도로 PMA와 A23187로 유도하기 1 시간 전에 처리한 후 PMA와 A23187로 30 분 동안 반응시켰다. 苦蓼 0.2 mg/ml의 농도에서 인산화된 p38, JNK의 감소를 확인할 수 있었지만, 인산화된 ERK 에서는 감소현상을 관찰할 수 없었다.

8. HMC-1세포에서 NFκB 효과

NFκB는 정상상태에서는 세포질에 IκB 와 결합하여 존재하다가 외부의 자극에 의해 IκB가 인산화되면서 분해된다. IκB가 분해되면서 NFκB가 핵안으로 이동하여

사이토카인과 같은 타겟유전자의 프로모터 부위에 결합하여 타겟유전자의 발현을 활성화한다. Azzolin의 보고²²에 의하면 TNF-α, IL-6, IL-8은 NFκB에 조절 받는다고 한다. 그래서 본 실험에서는 비만세포에 苦蓼 추출물 처리 후 NFκB 및 NFκB 억제자인 IκB의 단백질 발현정도를 관찰한 결과 핵 안에 존재하는 NFκB는 PMA와 A23187로 유도하였을 때 현저히 증가한 반면, 苦蓼 추출물을 0.05mg/ml부터 0.2mg/ml까지의 농도로 처리하였을 때 0.1mg/ml과 0.2 mg/ml의 농도에서 NFκB 단백질이 뚜렷하게 감소되어 있음을 확인하였다. 또한 세포질 내에서 NFκB와 결합하여 존재하다가 외부자극을 받으면 IκB는 인산화되어 나타난다. 세포질내에서 PMA와 A23187로 유도하였을 때는 인산화된 IκB가 증가되어 나타나는 반면 苦蓼 추출물 0.2 mg/ml의 농도에서는 인산화된 IκB가 감소되어 나타났다(Fig 9).

NFκB의 프로모터 활성에 대해 알아보기 위해 luciferase assay를 수행한 결과, transfection만 된 세포에 비해 PMA와 A23187로 유도된 transfection세포에서는 NFκB의 프로모터 활성이 3배 이상 증가한 반면, 苦蓼 추출물 0.2 mg/ml의 농도로 처리한 transfection된 세포에서는 현저히 감소되어 나타났다(Fig. 10: p<0.05)

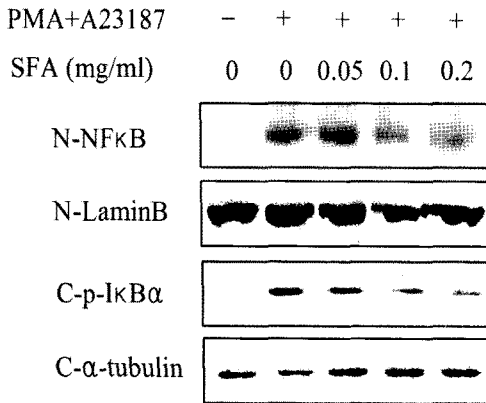


Fig. 9. Effect of SFA on PMA plus A23187-stimulated NFκB activation and IκBα phosphorylation and degradation. The HMC-1 cells (1×10⁶cell/ml) were incubated with SFA (0.05mg/ml to 0.2mg/ml) for 1h and then stimulated with PMA plus A23187 for 2h. Nuclear and cytoplasmic proteins were isolated by lysis buffer and examined for NFκB, pIκBα, and IκBα with Western blot analysis.
N; nuclear extract
C; cytosol extract

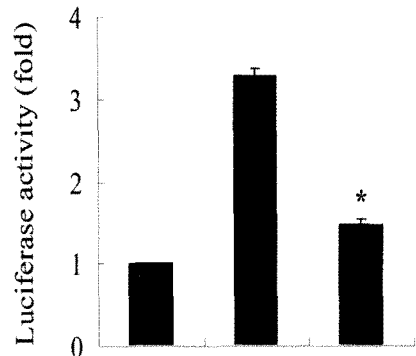


Fig. 10. The HMC-1 cells (1×10⁶cell/ml) were treated with SFA (0.2mg/ml) for 1h and then stimulated with PMA plus A23187 for 24h. The NFκB activity was examined with a luciferase assay.
*p<0.05; significantly different from the control value.

IV. 考 察

알레르기 질환은 최근 전 세계적으로 증가하고 있는 추세이다.¹ 알레르기성 염증질환의 치료로는 항히스타민제와 스테로이드제가 가장 광범위하게 사용되고 있다. 그러나 항히스타민제는 H1, H2 수용체를 경쟁적으로 억제하여 염증완화작용은 뛰어나지만 중추신경계를 자극하는 부작용과 일시적인 진정효과만 있으며, 스테로이드제는 강력한 소염작용과 면역억제작용이 있으나 장기간 투여시 여드름, 월경불순, 성장장애, 고혈압, 당뇨, 소화성궤양, 골연화, 등의 부작용을 일으킨다.²³

한의학에서는 扶正祛邪라는 치료방법이 알레르기 질환에 시도되는 빈도가 높아지고 있으며, 체질과의 연관성을 중요하게 생각하는 경향이 높아지고 있다.

알레르기성 질환으로 볼 수 있는 한방 질환들은 喘, 咳嗽, 鼻鼾, 鼻炎, 噴嚏, 癢疹, 泄瀉, 便秘, 腹痛으로 분류되며,²⁴ 주로 清熱燥濕, 清熱涼血, 清熱解毒하는 黃芩, 黃連, 黃柏, 苦蔘, 生地黃, 金銀花, 連翹 등의 약물이 사용된다.

苦蔘은 豆科에 속한 다년생 초목인 *Sophora flavescens* Aiton의 根을 건조한 것으로 性은 無毒하고 味는 苦하다. 清熱燥濕 去毒殺蟲 利尿의 효능이 있고 瀉火 燥濕 補陰 補腎한다. 熱痢 便血 黃疸 尿閉 赤白帶下 陰腫癢疹 濕疹 濕瘡 皮膚癢疹 疥癬癩瘋을 치료하며, 外用하여 適蟲性陰道炎을 치료한다.²⁵

苦蔘은 四象醫學에서 少陽人 약물에 속하며, 八味苦蔘湯(草本卷)⁸이 吐血, 嘔吐, 腸病, 痞滿證을 치료하였고, 七味苦蔘湯 加 葛根(甲午本)²⁶로 吐血, 嘔吐, 腹痛, 痞滿을 치료하였고, 滑石苦蔘湯(辛丑本)^{27,28}으로 亡陰病 身寒腹痛泄瀉를 치료하였고, 熱地黃苦蔘湯^{27,29,30}으로 下消를 치료하였으며, 심혈관계, 항천식, 위궤양 치료, 항염증, 모발촉진 등의 약리 작용이 있다고 보고되었다.³¹

본 연구에서는 동물실험인 PCA 반응 시험과 쥐비만세포의 히스타민 분비를 통한 苦蔘추출물의 억제효과와 비만세포주인 HMC-1 세포에 PMA와 calcium ionophore A23187 로 자극하여 분비하는 염증성 물질에 대한 苦蔘 抽出物의 억제효과를 보여줌으로서, 苦蔘 抽出物이 type I 인 즉시형 과민증에 나타나는

알레르기성 염증반응을 조절하는 효과가 있음을 규명하려 하였고, 苦蔘(SEA) 抽出物의 알레르기성 염증에 미치는 효과를 분자생물학적으로 확인해 보고자 하였다.

苦蔘의 항알레르기 효과 입증에 위해 수동적인 알레르기 반응을 시험한 결과, IgE의존적 PCA반응에서 苦蔘이 현저한 억제현상을 보였다(Fig. 1, 2). 이러한 결과로 미루어 보아 苦蔘이 비만세포 매개 IgE 의존적인 알레르기 반응에 억제 효능이 있을 것으로 사료된다.

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 苦蔘의 농도를 다르게 하여 HMC-1세포를 처리한 후 A23187과 PMA로 세포의 활성을 유도하여 세포 생존율을 비교한 실험에서, 苦蔘은 0.4 mg/ml의 농도까지만 세포증식에 별다른 영향을 주지 않은 것으로 확인되었다.

비만세포에서 자극에 의한 히스타민, 사이토카인, 프로테아제의 분비는 알레르기성 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다.³². 또한 비만세포에서 분비된 사이토카인은 알레르기성 염증반응에서 중요한 생물학적 역할을 하고 있다. 본 실험에서는 A23187과 PMA로 자극된 HMC-1 세포에서 염증 반응 조절 효과를 관찰하기 위해 ELISA 방법으로 苦蔘의 1시간 전 처리한 비만세포의 배양액으로부터 TNF- α , IL-6, 그리고 IL-8을 분비량을 측정하였다. 그 결과 TNF- α 의 경우 苦蔘 추출물 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 특히, 0.2 mg/ml의 농도에서 50% 이상의 높은 저해율을 보였다(Fig. 3, 4). IL-6의 경우도 마찬가지로 농도 의존적으로 그 분비량이 억제되는 것이 보였으며, A23187과 PMA 단독으로 유도된 HMC-1세포 배양액의 IL-6 생성량과 0.2 mg/ml의 농도에서의 HMC-1세포 배양액의 IL-6 생성량을 비교하였을 때 70%의 높은 저해율을 나타내었다(Fig. 5). 또한 IL-8의 경우에도 0.2 mg/ml의 농도에서 50% 이상의 높은 저해율을 보였다(Fig. 6)

자극된 비만세포에서 분비되는 TNF- α , IL-6, IL-8과

같은 염증성 물질들을 억제하는 효과는 mRNA 수준에서도 관찰되었다(Fig. 5, 7, 8). 이러한 결과로 미루어 보아 苦蓼추출물이 염증매개물질인 TNF- α , IL-6, IL-8의 생성을 억제함으로써 염증치료에 효능이 있을 것으로 사료된다.

TNF- α , IL-6, IL-8과 같은 염증성 cytokine은 NF κ B나 AP-1 등과 같은 전사인자 및 MAPKs에 의해 조절된다. 苦蓼이 I- κ B의 인산화를 억제함으로써 NF κ B의 발현을 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 9). 또한 NF κ B의 프로모터 부위의 활성을 苦蓼의 억제 효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 10).

이전 연구에 의하면 PMA와 A23187은 p38, JNK, ERK와 같은 세 종류의 MAPKs를 활성화시킨다고 보고된바 있다³³. 苦蓼의 약효에 대한 기전은 성장인자나 외부세포자극에 의해 활성화되는 신호전달경로(signal transduction pathway)를 통하여 세포표면에 위치한 수용체를 통해 신호분자를 활성화하여 세포내로 신호를 전달하고 유전자의 발현을 변화시키게 된다. 이러한 신호전달경로에서 대표적인 신호전달관련 단백질은 세포분열활성 단백질 인산화효소로 알려진 MAPK (mitogen-activated protein kinases)의 활성화가 일어나게 되고 활성화된 MAPK는 핵내로 유입되어 활성인자를 직접 활성화하고 매개자(mediator)로 표적 유전자를 활성화하거나, 본 실험에서처럼 전사인자(transcription factor)인 NF- κ B에 영향을 미쳐 NF- κ B가 I κ B의 조절에서 벗어나 핵내로 이동하여 활성화하여 기전을 나타내기도 한다.³⁴⁻³⁷ MAPK 신호전달경로는 모든 진핵세포의 신호전달에서 중심적인 역할을 하는 단백질 인산화효소로, MAPK Family는 세린/트레오닌 키나아제(serine/threonine kinase)로 적어도 3가지, 즉 extracellular signal-regulated kinase(ERK), JNK 및 p38로 분류된다. ERK의 활성화는 단백질 티로신 키나아제(tyrosin kinase)와 G단백질 연결 수용체(GPCR, G protein coupled Receptor)를 통해 작용하는 성장인자에 의해 유도되는 세포증식 신호전달에서 중심적인 역할을 하는 세포의 증식과 분화를 촉진시킨다. 반면 JNK와 p38은 성장인자 뿐 아니라 여러 사이토카인(cytokine)과 환경적 스트레스에 의해서도 유도되며 ERK와는 다르게 세포성장을 억제하고 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다.³⁸⁻⁴⁰

MAPK family는 일반적으로 인산화가 되면서 활성화되므로 MAPK의 활성화 정도를 알기 위해서는 인산화된 phospho MAPK의 발현에 대한 연구가 필요하다. 본 실험에서 苦蓼추출물이 0.1 mg/ml과 0.2 mg/ml에서 NF κ B 및 인산화된 MAPKs를 억제함을 관찰할 수 있었다(Fig. 9, 10).

이상의 연구 결과에서, 苦蓼의 알레르기성 염증 억제작용을 생체 실험과 분자생물학적 차원에서 확인할 수 있었으며, 이러한 결과를 통해 苦蓼이 탈과립된 비만세포에서 I- κ B/NF κ B 및 MAPKs 경로의 발현을 조절함으로써 이에 수반되는 염증매개물질인 TNF- α , IL-6, IL-8의 생성을 억제하는 효과가 있어, 苦蓼을 이용한 알레르기성 염증 치료에 중요한 단서로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

苦蓼의 알레르기성 염증 억제 효과를 알아보기 위해, 쥐의 생체 실험을 통하여 생체 내 국소성 즉시형 알레르기 반응, 쥐의 복강 내 비만세포에서 히스타민 분비에 미치는 영향을 알아보았으며, 80% ethanol로 추출한 苦蓼 抽出物(SFA)이 사람비만세포에서의 세포증식 효과, PMA와 A23187로 유도한 TNF- α , IL-6, IL-8 등 염증매개물질 생성 억제효과와 MAPKs 활성화에 미치는 영향, NF κ B 전사활성에 미치는 영향 등을 통해 항염증 효과를 살펴 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 생체 내 국소성 즉시형 알레르기 반응에서 30% 이상의 억제율을 보였다.
2. 쥐의 복강내 비만세포에서 고삼추출물은 히스타민 분비를 억제하였다.
3. HMC-1세포에서의 苦蓼(SFA)추출물에 의한 세포증식 효과는 유의성 있는 변화가 없었다.
4. HMC-1세포에서 苦蓼 추출물에 의해 농도 의존적으로 TNF- α 의 단백질 발현량과 분비량이 현저히 감소하였다.
5. HMC-1세포에서 苦蓼 추출물 0.2 mg/ml 농도에서 IL-6의 단백질생성량이 70% 정도 현저하게 감소됨을 알 수 있었다.
6. HMC-1세포에서 苦蓼 추출물에 의해 농도 의존

적으로 IL-8의 분비량이 감소되는 것을 알 수 있었다.

7. HMC-1세포에서 苦蓼 추출물 0.2 mg/ml의 농도에서 인산화된 p38, JNK의 감소를 확인할 수 있었지만, 인산화된 ERK에서 감소현상을 관찰할 수 없었다.

8. HMC-1세포에서 苦蓼 추출물에 의해 0.1mg/ml과 0.2 mg/ml의 농도에서 NF- κ B 단백질이 뚜렷하게 감소되었으며, 또한 세포질 내에서 苦蓼 추출물 0.2 mg/ml의 농도에서는 인산화된 I κ B가 감소되어 나타났다. 苦蓼 추출물 0.2 mg/ml의 농도로 처리한 transfection된 세포에서는 NF- κ B의 프로모터 활성이 현저히 감소되어 나타났다.



1. 민경업, 김상훈. 알레르기 질환 예방을 위한 7대 권장사항. 천식 및 알레르기. 1999;19(5):637.
2. 황수자. 알레르기 질환을 앓는 환아에서 유럽 집먼지 진드기에 대한 특이 IgG 및 IgG 아형 항체에 대한 연구. 이화여자대학교 대학원 석사학위 청구논문. 1995:31.
3. 대한병리학회. 병리학. 고문사, 서울, 1991: 71-113.
4. 허준. 對譯 東醫寶鑑. 법인문화사, 서울, 2002: 1932.
5. 林通國 編著. 實用臨証中藥指南. 사천과학기술출판사, 성도, 1990:61-64.
6. 朱震亨. 丹溪醫集. 서울대학교출판부, 서울, 2004: 87.
7. 元德必 編著. 國譯 韓醫學大系 13 東醫四象新編. 海東醫學社. 서울 1999;78-79.
8. 朴性植 譯解. 東醫壽世保元 四象草本卷. 集文堂, 서울, 2003:285.
9. 조훈 원성란 양은영 김중수 유일수 류도곤 이정호 강길웅 백승화. 苦蓼추출물의 항균효과. 약학회지. 1999;43(4):419-422.
10. 이현옥, 이경희, 박상규, 정승일, 백승화, 한동민. 苦蓼의 *Streptococcus mutans*에 대한 항세균효과. 한국식품영양학회지. 2000;13(6):539-546.
11. 강민희. 苦蓼 Tnf α 의 항위염 및 항 *H. pylori*균 효과. 생약학회지. 2006;37(4):266-271.
12. 이현옥 외. 苦蓼의 에틸아세테이트 추출물로부터

- 항균물질의 분리. 약학회지. 2001;45(6):588-590.
13. 유홍선. 苦蓼 에틸 아세테이트 추출물의 항균효과와 세포독성에 관한 연구. 원광대학교대학원박사학위논문. 1999.
14. 백승화 외. 苦蓼 메탄올 추출물의 세포독성과 항균효과. 경희대한의학연구소. 2000;1(2):45-51.
15. 류홍신 외. L1210 및 P388D1 세포에 대한 苦蓼 에틸 아세테이트 추출물의 세포독성에 관한 연구. 생약학회지. 2000;31(1):51-56.
16. 김찬중. Allergy성 접촉피부염에 대한 苦蓼, 황련의 Iontophoresis 치료 효과. 경희대학교대학원 박사학위논문. 2005.
17. 우무륜. 苦蓼이 알레르기성 염증반응에 미치는 영향. 대전대학교대학원 석사학위논문. 2007.
18. Braga F. and Mota I. Homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in mice and heterologous PCA induced in rats with mouse IgE. J Immunol. 1975;30: 655-669.
19. Hachisuka H, Kusuhara M, Higuchi M, Okubo K, Sasai Y. Purification of rat cutaneous mast cells with Percoll density centrifugation. Arch Dermatol Res. 1988;280:358-362.
20. Kim HM, Lee YM. Role of TGF-beta1 on the IgE-dependent anaphylaxis reaction. J Immunol. 1999;162: 4960-4965.
21. Brad ford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-254.
22. Azzolina, A., Bongiovanni, A., Lampiasi, N.. Substance P induces TNF-alpha and IL-6 production through NF kappa B in peritoneal mast cells. Biochimica et Biophysica Acta 2003;1643:75-83.
23. 대한피부과학회. 피부과학. 여문각, 서울, 1994; 21:55-64, 127-132, 555-560.
24. 정규만. 알레르기과 한방. 제일각, 서울, 1993:15-38.
25. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 영림사, 서울, 1991:185-186.
26. 이제마. 동의수세보원 갑오구본 복원본. 사상체질

- 학회. 2001:53.
27. 전국 한의과대학 사상의학교실. 四象醫學. 集文堂, 서울, 2005:685, 693.
 28. 박은경, 박성식. 急性泄瀉를 滑石苦參湯으로 治療한 證例. 사상체질의학회지. 1999;11(2): 385-389.
 29. 최병일, 송일병. 少陽人 凉膈散火湯과 忍冬藤 地骨皮湯 및 熟地黃苦參湯이 Alloxan투여 高 血糖 白鼠에 미치는 影響. 四象醫學회지. 1998; 10(2):513-532.
 30. 김선형, 유준상, 양상목, 김달래. 少陽人 陰虛午 熱證(下消證) 환자의 附子中毒症을 熟地黃 苦參湯으로 完화시킨 치험례. 사상체질학회지. 2001;13(3):145-150.
 31. 한방약리학 교재편찬위원회. 한방약리학. 신일상사, 서울, 1992:409-412.
 32. Mekori, Y.A., Metcalfe, D.D. Mast cells in innate immunity. *Immunological Reviews*, 2000;173:131-140.
 33. 송계용, 지제근, 함의근. 핵심병리학. 고려의학, 서울, 1998:193-202.
 34. Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 1999;19:2435-2444.
 35. Bokemeyer D, Sorokin A, Dunn MJ. Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. *Kidney Int*. 1996;49:1187-1198.
 36. Tian W, Zhang Z, Cohen DM. MAPK signaling and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;279: F593-604.
 37. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9:180-186.
 38. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 1995;270:1326-1331.
 39. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 1997;275:90-94.
 40. Bonventre JV, Force T. Mitogen-activated protein kinases and transcriptional responses in renal injury and repair. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1998;7:425-433.