

케어스웰을 이용한 사이토카인 억제 효과에 대한 연구

하효철^{1#}, 오사랑², 이지혜², 정지욱^{2*}

1 : 대구한의대학교 식품약리학과, 2 : 대구한의대학교 한약재약리학과

The Study of Cytokine Inhibitory Effect using Careswell

Hyocheol Ha^{1#}, Sarang Oh², Jihye Lee², Ji wook Jung^{2*}

1 : Department of Herbal Food Science, Daegu Haany University,
2 : Department of herbal medicine pharmacology, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : In this study, we attempted to evaluate the effects of Careswell on human mast cell-mediated allergy inflammation in vitro and pruritogen-induced scratching behavior in vivo.

Method : The Careswell was extract by distilled water. The anti-itching effects of Careswell were investigated on the compound 48/80 (50 µg/kg) or histamine (100 µg/kg) induced scratching behavior male ICR mice for 30 min by an observer blind. Terfenadine (10 mg/kg) was used as a positive control drug. The cell toxicity of Careswell was determined by 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. The regulatory effect of Careswell on interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF) -α levels was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in phorbol 12-myristate 13-acetate plus calcium ionophore A23187 (PMACI) stimulated human mast cells (HMC-1). Also, we evaluated the effect of Careswell on PMACI induced the activation of Nuclear factor-κB (NF-κB) into nucleus by Western blot analysis.

Result : The results revealed that the oral administration of Careswell (200 mg/kg, p.o.) attenuated the compound 48/80 or histamine-induced scratching behavior in mice. We showed that Careswell significantly reduced the PMACI-induced the production of IL-6 (0.5-1 mg/ml) and TNF-α (0.1-1 mg/ml). Additionally, Careswell significantly inhibited the activation of NF-κB in PMACI-stimulated HMC-1.

Conclusion : Collectively, the findings of this study provide us with a novel insight into the pharmacological actions of Careswell as a potential molecule for use in the treatment of allergic inflammation diseases.

Key words : Careswell, Inflammation, Human mast cells, Cytokine, NF-κB

서론

최근 서구화된 생활환경, 식생활 변화 및 산업화에 따른 환경오염으로 인해 아토피, 천식 등 알레르기성 염증성 질환이 빠르게 증가하고 있다¹⁾. 염증성 질환이란 크게는 염증을 주 병변으로 하는 질병을 말하고 작게는 외부에서 침입한 물질에 대하여 면역체계가 지나치게 반응을 보이는 면역반응으로 오는 질병을 말한다²⁾. 염증은 물리·화학 등의 자극에 대한 생체조직의 방어반응이며, 면역반응에는 여러 염증매개인들이 관여하는데 이들로 인하여 조직 방어로서 염증성 산출

물로 인해 피부가 붓는 부종, 발열, 홍반 등의 증상이 일어나며 장기적인 염증반응은 아토피, 관절염 및 암 등의 발생과 연관이 있다.

비만세포 (mast cell)는 결합조직과 점막표면에서 신체 전반에 존재하면서 다양한 면역반응에 관여 한다³⁾. 비만세포는 두드러기, 비염, 천식 및 아토피 피부염 등 과민반응을 기초로 하는 알레르기 염증반응에서 결정적인 효과기 세포로서 간주된다. 다양한 자극에 의해 비만세포 과립 내 여러 매개물질들이 분비되면서 급성 염증 반응을 일으키는데 그 중 히스타

*교신저자 : 정지욱, 경상북도 경산시 어봉지길 285-10
· Tel : 053-819-1337 · FAX : 053-819-1339 · E-mail : jwjung@dhu.ac.kr
#제1저자 : 하효철, 경상북도 경산시 어봉지길 285-10
· Tel : 053-819-1498 · E-mail : hcha@dhu.ac.kr
· 접수 : 2014년 4월 25일 · 수정 : 2014년 5월 11일 · 채택 : 2014년 5월 14일

민은 혈관에 작용하는 즉각형 과민 반응과 관련된 중요한 인자이다⁴⁾. 또한 다양한 자극으로 활성화된 비만세포는 종양괴사인자-알파 (TNF- α), 인터루킨(IL)-6, IL-8, 및 IL-13 같은 세포의 신호 전달을 매개하는 단백질인 사이토카인을 과량으로 분비함으로써 알레르기성 염증반응을 유도하게 된다^{5,6)}. 따라서 활성화된 비만세포에서 분비되는 염증성 매개인자들의 역제가 알레르기 질환치료의 주요핵심이 된다⁷⁾.

Nuclear factor- κ B (NF- κ B)는 염증 매개물질의 생성을 조절하는 전사인자이다. NF- κ B는 p50과 RelA/p65의 형태로 구성되어 있으며 보통 내생성 억제분자인 I κ B- α 단백질과 결합한 상태로 세포질에 존재한다. 그러나 다양한 원인에 의해 자극되면 I κ B- α 가 인산화 및 분해되고 NF- κ B는 핵내로 들어가 다양한 매개물질들의 생성을 유도한다. 따라서 NF- κ B의 활성억제는 많은 염증치료제의 중요한 전략이 되고 있다^{8,9)}.

현대의학의 발전으로 알레르기 염증 질환의 발병기전과 치료제 개발에 많은 진보가 있었음에도 불구하고, 아직까지 이러한 질환을 효과적으로 치료할 수 있는 약물의 개발이 이루어져 있지 않다. 현재까지, 알레르기 염증 질환에는 면역요법과 약물요법의 치료가 시행되고 있으나 특별한 치료제가 없어, 증상이 심한 경우 스테로이드제제를 사용하고 있다. 이런 약물은 단기간의 임상 증상 완화에만 효과가 있고, 장기간 복용 시 심각한 부작용이 초래되어 진다. 따라서 이러한 문제점을 극복할 수 있는 치료제 개발이 시급한 실정이다.

본 연구는 생선콜라겐 추출 분말, 흑효모 배양 추출 분말, 서양톱풀 추출 분말, 당귀수산 추출 분말, 알로에베라 추출 분말로 구성된 복합처방인 케어스웰의 염증질환의 개선효과와 약리기전을 규명하기 위하여 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

Compound 48/80, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), avidin peroxidase (AP)와 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 에서 구매하였다. 또한 Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) 은 Gibco BRL (Grand Island, NY) 에서 Fetal bovine serum (FBS) 은 JR Scientific, Inc. (Woodland, CA, USA) 에서 구입하였고, anti-mouse IgE, recombinant IgE와 biotinylated IgE은 Pharmingen (San Diego, CA, USA)에서 anti-human TNF- α , biotinylated anti-human TNF- α 와 recombinant human TNF- α 는 R&D Systems에서 구입하여 사용하였다.

2) 케어스웰 추출

본 연구에 사용된 약재는 생선콜라겐 추출분말 1710 mg, 흑효모배양추출분말 870 mg, 서양톱풀추출분말 570 mg, 당귀수산추출분말 5.9 mg, 알로에베라추출분말 1200 mg로 구성되어 있으며, 무게의 8배의 증류수를 가하여 6시간 1회 열수 추출을 시행하였다. 추출이 완료된 다음 농축기 (Eyela,

N-1110, Japan) 를 이용하여 진행하였고, 동결건조기 (Ilsinbiobase, Eyela, FD8508, Korea)에서 건조한 뒤 얻어진 분말을 실험에 사용하였다. 수득율은 6.7%였다.

3) 실험동물

본 실험에서는 7주령의 웅성 ICR mice를 대한바이오링크 (충청도, 한국) 에서 공급받아 대구한의대학교 한방산업대학의 clean cage에 약 7일간 적응시켜 사용하였으며, 명암주기는 12 시간씩 자동적으로 조절되는 환경에서 사육하였다. 사육실의 온도는 23 ± 2 °C로 유지되었고, 습도는 $55 \pm 10\%$ 로 하였으며, 조명은 12시간 주기(인공조명, 오전 8시~오후 8시)로 사용하였다. 사료는 실험동물용 분말사료, 물은 상수도로 실험기간 동안에 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 방법

1) Compound 48/80 및 histamine에 의한 국소 소양증 유도

Compound 48/80 및 histamine은 급성 염증 반응에 관여하는 매개인자로서 국소적 부위에 소양증을 유발하는 약물이다. 실험 시작 1시간 전에 실험동물을 행동 관찰실로 옮기고 약물을 투여한 후 안정시켰다. 케어스웰 (200 mg/kg)는 PBS에 녹인 후 경구투여 하였고 양성대조군에는 terfenadine을 10 mg/kg의 농도로 경구투여 하였으며¹⁰⁾ 대조군에는 PBS를 경구투여 하였다. 경구투여 30분 후 실험 조건과 동일한 환경의 cage로 옮겨 30분간 적응시켜주었다. 이로부터 30분 뒤 compound 48/80 (50 μ g/kg) 및 histamine (100 μ g/kg)을 진양 효과를 알아보기 위한 음성 대조군으로 피하 주사하였고, 주사한 직후로부터 동일한 환경의 새로운 cage에서 10분 단위로 30분간 scratching frequency를 카운터기를 이용해 체크하였다.

2) 세포배양

인간 비만 세포주 (Human mast cell)인 HMC-1 세포는 100 U/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신, 그리고 10% FBS가 추가된 IMDM 배지를 이용하여 37°C의 5% CO₂ 세균배양기에서 배양하였다.

3) 세포생존율

세포의 생존율을 측정하기위하여 MTT colorimetric assay를 실시하였다. 간략히 기술하면, 먼저 세포 (2×10^5)를 24well plate에 균일하게 배양한 후 다양한 농도의 케어스웰을 24시간 처리하였다. 20 μ l의 MTT solution (5 mg/ml)을 처리하고 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ 상태에서 배양하였다. 그 후 250 μ l의 dimethyl sulfoxide를 MTT formazan에 첨가하고 automatic microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 사이토카인 측정

세포 (5×10^5)에 다양한 농도의 케어스웰을 전처리하고 PMA와 A23187으로 12시간 자극하였다. 배양 상층액으로 TNF- α 와 IL-6의 level을 측정하였다. 사이토카인 농도는

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 측정하였다. 96 well plate에 각 사이토카인에 대한 단클론 항체를 PBS (pH 7.4) 로 희석하여 96 well plate에 100 μ l 씩 각각 코팅한 다음, 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 방치한다. 이 plate를 0.05% tween이 함유된 PBS로 세정 후 1% BSA, 5% sucrose, 0.05% NaN₃를 함유한 PBS로 1시간동안 blocking한다. 여러 번 세정한 다음 샘플을 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 방치 후, 각 well을 다시 세정하고 biotin이 결합된 2차 항체를 첨가하여 다시 2시간 동안 방치한다. Well을 씻어낸 다음 AP를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 30 분 동안 방치하여 well을 다시 세정한 다음에 기질인 ABTS 용액을 첨가하고, 발색반응은 ELISA reader를 사용하여 405 nm에서 측정한다.

5) 핵단백질 분리

전사 인자인 NF- κ Bp65 검출을 위해 핵단백질을 분리하였다. 1×10^7 개의 세포를 harvest하여 PBS로 세포를 씻은 다음, 400 μ l buffer A (10 mM HEPES/KOH, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH7.9)를 넣어 vortex한 다음 15,000 x g로 원심분리 했다. 상층액(cytosol extract)은 제거 후, 침전된 핵은 300 μ l buffer B (50 mM HEPES/KOH, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10% glycerol, pH7.9)로 resuspension한 다음 vortex하고 원심 분리하여 상층액 (nuclear extract)을 분리하여 단백질 정량 후 실험을 수행하였다.

6) Western blot 분석

정량한 단백질은 SDS-PAGE로 전기영동하고 PVDF membrane (Milipore, MA, USA)에 옮겼다. Membrane은 일차 항체 NF- κ B (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 와 반응시키고 TBS-T로 15분간 2회 세척 후 membrane을 2차 항체로 2 시간 반응시켰다. 항체들에 대한 발현 분석은 horseradish peroxidase-linked (HRP) 이차항체에 의해 발현되는 enhanced chemiluminescence (ECL) Western Blot Analysis (Amersham, NJ, USA) 시스템을 이용하였으며 Image Qant LAS 4000 mini (FUJIFILM Lifescience U.S.A.)를 이용하여 비교 분석 하였다.

7) 통계처리

실험 결과는 평균 \pm 표준편차 (standard deviation; SD) 으로 나타내었고, 유의성 검정은 one way analysis of variance (ANOVA)로 수행하였으며, 통계적 검정은 Student-Newman-Keuls test를 사용하였으며, *P* 값이 0.05 이하를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 초기 염증 반응과 유사한 compound 48/80에 의해 유도된 국소 소양증 동물모델에서 케어스웰의 scratching behavior에 대한 효과

Compound 48/80은 초기 염증 반응과 관련 있는 비만세포를 자극하는 강력한 물질로서 본 실험에서는 compound 48/80으로 유도된 소양증 동물모델에서 케어스웰의 항소양 효과에 대하여 실험을 수행 하였다. 실험 결과, compound 48/80 단독 처리군은 대조군 (3.4 ± 0.67)과 비교 시 몸을 긁는 횟수(scratching frequency)가 유의적으로 증가하였다 (182.4 ± 14.91 , $P < 0.05$). 그러나 케어스웰 (100 mg/kg) 투여군 에서는 이러한 증상이 현저히 감소하였고 (79.4 ± 11.21 , $P < 0.05$), 본 실험에서는 항히스타민제인 terfenadine (10 mg/kg)을 양성 대조군으로 사용하였다 (69.8 ± 2.54 , $P < 0.05$). 케어스웰의 억제율은 약 56.6% 을 나타내었다(Fig. 1).

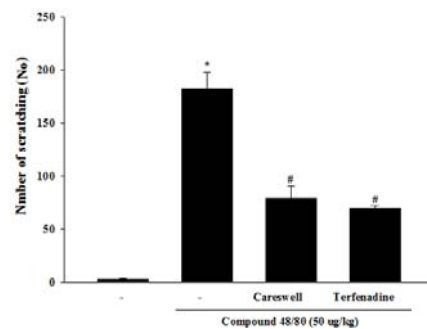


Figure 1. The effect of Careswell on scratching behavior in mice. Careswell (100 mg/kg) was orally administered 1 h before compound 48/80 (50 μ g/kg) intradermal injection. Scratching behavior was counted as one incident of scratching for 30 min. Each datum represents the means \pm S.D. of three independent experiments ($^*P < 0.05$ vs. control group, $^{\#}P < 0.05$ vs. compound 48/80-treated group).

2. 초기 염증 반응과 유사한 histamine에 의해 유도된 국소 소양증 동물모델에서 케어스웰의 scratching behavior에 대한 효과

Histamine은 초기 염증 반응에서 자극받은 비만세포로부터 방출되는 물질로서 국소적 부위에 소양증을 유발하는 약물 이다. 본 연구에서 히스타민으로 유도된 소양증 동물모델에서 케어스웰의 항소양 효과를 측정 한 결과, 히스타민 단독 처리군은 대조군 (12.4 ± 0.81)과 비교 시 몸을 긁는 횟수 (scratching frequency)가 유의적으로 증가하였다 (152.8 ± 7.08 , $P < 0.05$). 그러나 케어스웰 (100 mg/kg) 투여군 에서는 이러한 증상이 현저히 감소하였고 (72.8 ± 4.37 , $P < 0.05$), 억제율은 약 52.6%임을 확인 하였다(Fig. 2).

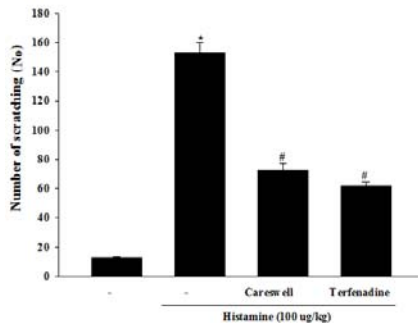


Figure 2. The effect of Careswell on scratching behavior in mice. Careswell (100 mg/kg) was orally administered 1 h before histamine (100 µg/kg) intradermal injection. Scratching behavior was counted as one incident of scratching for 30 min. Each datum represents the means \pm S.D. of three independent experiments ($^*P < 0.05$ vs. control group, $^{\#}P < 0.05$ vs. histamine-treated group).

3. HMC-1 세포에서 케어스웰의 세포독성 효과

케어스웰의 세포독성 효과를 확인하기 위하여 MTT assay 를 수행하였다. 다양한 농도 (0.1-1 mg/ml)의 케어스웰을 처리하고 세포 생존율을 측정된 결과 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 3).

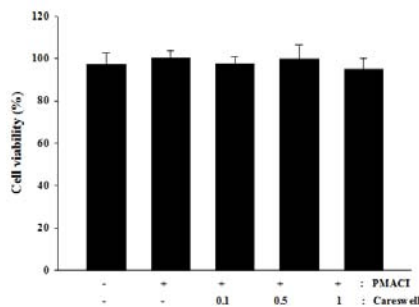


Figure 3. The effect of Careswell on cytotoxicity in HMC-1 cells. Cells were incubated with different concentrations of modified Careswell (0.1-1 mg/ml) for 24 h and then cell viability was measured by MTT assay. Each datum represents the means \pm S.D. of three independent experiments.

4. HMC-1세포에서 케어스웰의 TNF- α 생성에 대한 효과

TNF- α 는 전염증성 인자로 알레르기 초기 반응에 관여하는 주요한 매개물로 잘 알려져 있다¹¹⁾. 본 실험에서는 케어스웰의 TNF- α 생성에 미치는 영향을 조사하였다. HMC-1 세포에 다양한 농도의 (0.1-1 mg/ml)의 케어스웰을 전처리 후 PMA와 A23187로 자극하였다. 세포에서 분비된 TNF- α 의 농도는 ELISA방법으로 측정하였다. 실험 결과, 대조군에 비해 PMA와 A23187에 의하여 TNF- α 의 생성은 유의적으로 증가하였으나, 케어스웰에 의하여 농도 의존적으로 감소하였다. 특히 고농도 (1 mg/ml)의 케어스웰은 약 25.4%의 억제 효과를 보였다(Fig. 4).

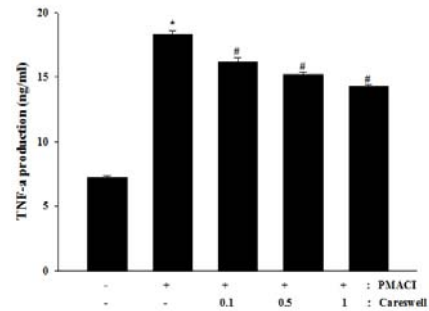


Figure 4. The effect of Careswell on the TNF- α production in PMACI-stimulated HMC-1 cells. HMC-1 cells were pre-treated with Careswell (0.1-1 mg/ml) for 1 h and then stimulated with PMACI for 12 h. The levels of TNF- α were measured from cell supernatant using ELISA. All data were represented in the means \pm S.D. of triplicate determinations from triplicate separate experiments ($^*P < 0.05$ vs. control, $^{\#}P < 0.05$ vs. PMACI alone).

5. HMC-1세포에서 케어스웰의 IL-6 생성에 대한 효과

활성화된 비만세포에서 분비되는 IL-6의 생성 조절에 케어스웰의 효과를 측정하였다. 세포에 다양한 농도의 케어스웰 (0.1-1 mg/ml)를 전처리 후 PMA와 A23187를 12시간 동안 자극하여 상층액을 ELISA방법으로 분석하였다. 실험 결과, 대조군에 비해 PMA와 A23187에 의하여 IL-6의 생성은 유의적으로 증가하였으나, 이러한 증가는 케어스웰에 의하여 농도 의존적으로 감소하였다. 특히 고농도 (1 mg/ml)의 케어스웰은 약 20.4%의 억제 효과를 보였다(Fig. 5).

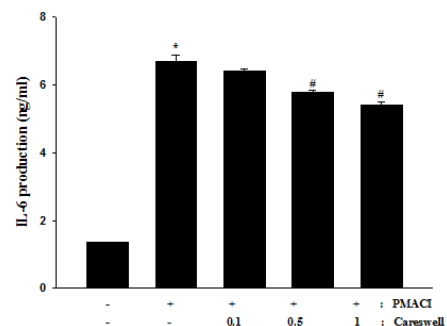


Figure 5. The effect of Careswell on the IL-6 production in PMACI-stimulated HMC-1 cells. HMC-1 cells were pre-treated with Careswell (0.1-1 mg/ml) for 1 h and then stimulated with PMACI for 12 h. The levels of IL-6 were measured from cell supernatant using ELISA. All data were represented in the means \pm S.D. of triplicate determinations from triplicate separate experiments ($^*P < 0.05$ vs. control, $^{\#}P < 0.05$ vs. PMACI alone).

6. HMC-1세포에서 케어스웰의 NF- κ B활성에 대한 효과

NF- κ B의 활성화는 염증성 사이토카인의 생성을 유도한다^{12,13)}. 본 연구에서는 케어스웰의 약리기전을 규명하기 위하여 케어스웰의 NF- κ B활성조절 효과를 측정하였다. 세포에 고농도의 케어스웰을 처리하고 PMA와 A23187를 2시간 동안 자극하였다. 핵단백질을 분리 후 western blot 분석을 수행하

었다. 실험결과 PMA와 A23187 자극 시 세포질에서는 NF- κ B의 활성이 감소한 반면 핵 내의 NF- κ B활성은 증가하였다. 즉 NF- κ B가 핵 내로 이동됨을 확인되었다. 그러나 1 mg/mg의 케어스웰에 의하여 핵내의 NF- κ B활성은 유의적으로 억제됨이 관찰되었다(Fig. 6).

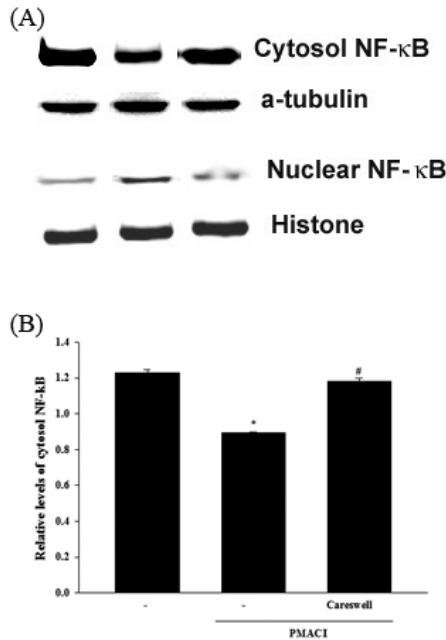


Figure 6. The effect of Careswell on the NF- κ B activation in PMACI-stimulated HMC-1 cells. HMC-1 cells were pre-treated with Careswell (1 mg/ml) for 1 h and then stimulated with PMACI for 2 h. (A) Nuclear and cytosol extracts were prepared as described in the Materials and methods section and evaluated for RelA/p65 via Western blot analysis. (B) The relative levels of NF- κ B were represented. All data were represented in the means \pm S.D. of triplicate determinations from triplicate separate experiments ($P < 0.05$ vs. control, $^{\#}P < 0.05$ vs. PMACI alone).

고찰

본 연구는 복합처방인 케어스웰의 염증반응에 대한 억제효과 및 기전을 규명하기 위하여 실험한 결과, 초기 염증반응 단계에서 유발되는 소양증 모델을 유발하기 위하여 compound 48/80과 histamine을 투여한 결과 케어스웰이 가려움증 개선에 효과가 있음을 확인하였다. 또한 초기 염증반응 단계에서 활성화되는 비만세포에서 증가되는 신호전달 물질 중 TNF- α , IL-6 생성 및 NF- κ B의 활성 억제효과도 확인하였다.

최근 식생활 변화와 산업화로 인한 환경오염의 증가로 천식, 아토피, 비염등 알레르기성 염증 질환자가 급격히 증가하는 추세이다¹⁴). 이 질환은 비정상적인 면역 반응으로 발생하는 과민반응이다. 다양한 항원으로 인해 비만세포가 활성화되면 세포내 과립에 존재하는 히스타민과 같은 화학 매개물질들이 방출되면서 급성 면역 반응을 유도하며 사람들은 가려움증을 느낀다. 또한 염증성 사이토카인 같은 다양한 염증매개인자의 합성과 분비가 유도되면서 만성 염증반응을 유도하기도 하며 조직 손상 및 상처를 유발한다. 따라서 활성화된 비만세포에서 분비되는 다양한 염증매개인자들을 억제하는 것은 염증성 질환의 치료하는데 중요한 전략이 될 수 있다^{15,16}). 이에 치료제로

써 비만세포의 히스타민 분비 억제, 탈과립 억제 등 항히스타민제, 항염증제 등을 사용하고 있으며, 이들은 일시적인 증상 개선은 가능하나 근본적인 치료가 되지 않고 있으며 부작용도 심각하다. 최근에는 한약을 이용하여 면역기능을 조절하는 치료제를 개발하려는 노력이 많이 이루어지고 있다. 따라서 본 연구에서도 복합처방인 케어스웰이 알레르기성 염증반응에 대한 조절 효과가 있는지에 대한 실험을 수행하였다. 우선, 소양증 동물모델을 이용하여 케어스웰의 항소양 효과를 측정하고자 하였다. 비만세포의 탈과립에서 분비되는 히스타민은 피부에서 가려움증을 유도하는 대표적인 인자이다^{17,18}). 실험결과, histamine 및 compound 48/80을 투여한 군에서 가려움증이 증가하였으며 케어스웰 (100 mg/kg)을 투여한 군에서는 가려움증이 유의적으로 감소됨을 확인하였다.

활성화된 비만세포에서 분비되는 염증성 사이토카인은 만성 알레르기 염증반응을 유도한다¹⁹). 비만세포로부터 생성되어 분비되는 TNF- α 는 혈관 내피세포의 유착분자의 발현을 증가시켜 호산구 및 T 세포의 표적기관으로의 유입을 촉진시키며, tryptase 및 IL-5등의 분비를 유도하여 호산구에 대한 화학 주성과 증식을 도와주게 된다²⁰). IL-6 또한 대표적인 염증성 사이토카인으로서 다양한 요인에 의해 합성되어 분비되면서 급성 혹은 만성 염증질환의 발생 및 진행 과정에서 중요한 역할을 한다^{21,22}). 따라서 TNF- α 와 IL-6의 합성 조절은 염증성 질환 치료의 중요한 전략이 된다. 본 연구에서 활성화된 HMC-1 세포에서 생성되는 염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-6의 생성에 대한 케어스웰의 효과를 측정하였다. ELISA 실험 결과, PMA와 A23187에 의하여 증가된 TNF- α 및 IL-6의 생성이 다양한 농도의 케어스웰에 의해 유의적으로 감소됨을 확인하였다. 본 실험 결과를 통해서 케어스웰의 알레르기 염증억제 효과는 염증성 사이토카인을 조절하면서 나타남이 사료되어진다.

NF- κ B는 다양한 염증매개인자들의 발현에 중요한 역할을 하는 전사인자로 알려져 있다^{23,24}). 전사인자 NF- κ B는 보통 상태에서는 세포질에서 억제유전자인 I κ B- α 와 결합하고 있다. 불활성화 된 상태로 세포질에 존재하나 바이러스, 세균 스트레스 감염 등 다양한 자극이 유도되면, I κ B- α 는 인산화되어 분해되고, 유리된 NF- κ B는 핵으로 들어가 표적 유전자의 결합부위에 결합하여 염증 관련 유전자의 발현을 촉진시켜 염증반응을 가속화함으로써 조직손상을 유도 한다. 따라서 NF- κ B 활성 억제는 항염증제 개발에 중요한 핵심이 된다^{25,26}). 본 연구에서는 NF- κ B의 활성에 대한 케어스웰의 조절 효과를 측정하였다. 실험결과, PMA와 A23187 자극에 의하여 세포질의 NF- κ B가 핵내로 이동됨을 확인하였고, 이러한 현상은 케어스웰에 의하여 감소됨을 관찰하였다. 이를 토대로, 케어스웰은 전사인자인 NF- κ B활성을 조절함으로써 알레르기 염증억제효과를 나타냄이 사료되어진다.

결론적으로 케어스웰은 동물모델에서 가려움증 개선 효과가 있음이 확인되었고, 활성화된 비만세포에서 TNF- α 및 IL-6생성을 농도 의존적으로 억제함을 관찰하였다. 또한 염증매개인자를 유도하는 전사인자인 NF- κ B의 활성을 유의적으로 억제하는 효과를 나타내었다. 이러한 실험 결과는 케어스웰이 염증반응에 나타나는 부종, 가려움증 개선 효과를 나타내어 아토피 및 천식 등의 염증성 알레르기 질환을 개선시킬 수 있음을 의미한다.

결론

케어스웰의 알레르기성 염증반응 억제 효과를 확인하기 위하여 소양증 동물모델을 이용하여 실험을 수행하였고, 인간 비만 세포주인 HMC-1세포에서 염증매개인자의 조절효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 케어스웰는 초기 염증 반응의 매개인자인 histamine 및 이의 방출을 자극하는 compound 48/80 투여로 유도된 소양증 모델에서 유의적으로 가려움 개선 효과를 나타내었다.
2. 케어스웰는 인간 비만세포인 HMC-1 세포에서 1mg/ml 농도까지 세포독성이 나타나지 않았다.
3. 케어스웰는 활성화된 비만세포에서 신호전달물질인 사이토카인 TNF- α 및 IL-6의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다.
4. 케어스웰는 활성화된 HMC-1세포에서 핵내의 NF- κ B의 활성을 유의적으로 억제시켰다.

따라서 케어스웰는 가려움 개선효과 및 활성화된 비만세포로부터 유도된 염증성 사이토카인 생성과 NF- κ B의 활성을 유의적으로 감소시킴으로써 염증반응을 조절할 수 있는 것으로 나타내어 염증성 질환의 치료 및 개선 물질로 유용하게 이용될 수 있을 것이라 생각된다.

References

1. Jung JK, Jung HM, Seo WG, Park YK. Anti-allergic effect of *Osterici Radix* water extract in human mast cells. *Kor J Herbology*. 2010 ; 25(3) : 35-41.
2. Korean Journal of Asthma, Allergy and Clinical Immunology. Asthma and Allergy disease. Seoul : koonja publisher. 2002 ; 66 : 431-3.
3. Seoul National University College of Medicine, Immunology. Seoul : Seoul National University publisher. 1987 : 188-97.
4. Harvima IT, Nilsson G. Mast cells as regulators of skin inflammation and immunity. *Acta Derm Venereol*. 2011 ; 91(6) : 644-50.
5. Ahn K. Role of mast cells in allergic inflammation and innate immunity. *Kor J Pediatrics*. 2004 ; 47(11) : 1137-41.
6. Church MK, Bradding P, Walls AF, Okayama Y. Human mast cells and basophils. In *Allergy and allergic diseases*. 1st ed. MA : Blackwell Science. 1997 : 149-70.
7. Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Asadullah K. Cytokine and anti-cytokine therapy in dermatology. *Expert opin Biol Ther*. 2003; 3 : 733-43.
8. Gilmore TD, Garbati MR. Inhibition of NF- κ B signaling as a strategy in disease therapy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011 ; 349 : 245-63.
9. Gadaleta RM, Oldenburg B, Willemsen EC, Spit M, Murzilli S, Salvatore L, Klomp LW, Siersema PD, van Erpecum KJ, van Mil SW. Activation of bile salt nuclear receptor FXR is repressed by pro-inflammatory cytokines activating NF- κ B signaling in the intestine. *Biochim Biophys Acta*. 2011 ; 1812(8) : 851-8.
10. Inami Y, Andoh T, Sasaki A, Kuraishi Y. Topical surfactant-induced pruritus: involvement of histamine released from epidermal keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013 ; 344(2) : 459-66.
11. Bunikowski R, Gerhold K, Bräutigam M, Hamelmann E, Renz H, Wahn U. Effect of low-dose cyclosporin a microemulsion on disease severity, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha production in severe pediatric atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunology*. 2001 ; 125(4) : 344-8.
12. Baldwin AS Jr. The NF- κ B and I κ B proteins : new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996 ; 14 : 649-83.
13. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers L M. New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem*. 1999 ; 45 : 7-17.
14. Kim HH. Allergic rhinitis, sinusitis and asthma : evidence for respiratory system integration. *Kor J Pediatrics*. 2007 ; 50(4) : 335-9.
15. Minardi T, Kapoor S, Bielory L. Complementary and alternative medicine : Herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 ; 123 : 283-94.
16. Xue CC, Li CG, Hügel HM, Story DF. Does acupuncture or Chinese herbal medicine have a role in the treatment of allergic rhinitis?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006 ; 6(3) : 175-9.
17. Brown JM, Wilson TM, Metcalfe DD. The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. *Clin Exp Allergy*. 2008 ; 38(1) : 4-18.
18. Cook EB, Stahl JL, Barney NP, Graziano FM. Mechanisms of antihistamines and mast cell stabilizers in ocular allergic inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002 ; 1(2) : 167-80.
19. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol*. 2005 ; 23 : 749-86.
20. Bradding P, Holgate ST. Immunopathology and human mast cell cytokines. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1999

- ; 31(2) : 119-33.
21. Nilsson G, Svensson V, Nilsson K. Constitutive and inducible cytokine mRNA expression in the human mast cell line HMC-1. *Scand J Immunol*. 1995 ; 42(1) : 76-81.
 22. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med*. 1998 ; 128(2) : 127-37.
 23. Barnes PJ, Adcock IM. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 1997 ; 18(2) : 46-50.
 24. Azzolina A, Bongiovanni A, Lampiasi N. Substance P induces TNF-alpha and IL-6 production through NF kappa B in peritoneal mast cells. *Biochim Biophys Acta*. 2003 ; 1643(1-3) : 75-83.
 25. Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM, Gaynor RB. Sulindac inhibits activation of the NF-kappa B pathway. *J Biol Chem*. 1999 ; 274(38) : 27307-14.
 26. Kim SH, Shin TY. Effect of Dracocephalum argunense on mast cell mediated hypersensitivity. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006 ; 139(2) : 87-95.