

## 비만세포에서 백질려 추출물의 항염증효과에 대한 연구

노효선<sup>1#</sup>, 박용기<sup>1,2\*</sup>, 배효상<sup>3\*</sup>

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 동국대학교 한방신약개발센터,  
3 : 동국대학교 한의과대학 사상체질과

### Effects of Tribuli Fructus extract on inflammatory responses in IgE-stimulated RBL-2H3 mast cells

Rho Hyo Sun<sup>1#</sup>, Yong-Ki Park<sup>1,2\*</sup>, Hyo Sang Bae<sup>3\*</sup>

1 : Department of Herbolgy, college of Korean Medicine, Dongguk University,  
2 : Korean Medicine R&D Center, Dongguk University,  
3 : Department of Sasang Constitutional Medicine, college of Korean Medicine, Dongguk University

#### ABSTRACT

**Objectives :** *Tribulus terrestris* Linné (Tribuli Fructus; TF) has been used to treat hypochondrium, agalactia, nebula, itching and vitiligo in traditional Korean medicine. In this study, we investigated the effects of TF 30% ethanol extract on inflammatory responses in IgE-stimulated RBL-2H3 mast cells.

**Methods :** TF extract was prepared by 30% ethanol. RBL-2H3 cells, a rat mast cell line, were treated with TF extract at different concentrations for 1 hr and then stimulated with DNP-IgE/HSA for indicated times. Cell viability was measured by WST-1 assay. The expression of inflammatory cytokines (IL-4, IL-13 and IFN- $\gamma$ ) mRNA was determined by reverse transcriptase-PCR, and the phosphorylation of ERK1/2, p38 and JNK MAP kinases (MAPKs) was determined by Western blot. The nuclear expression of NF- $\kappa$ B p65 in the cells was detected by Western blot and immunocytochemistry, respectively.

**Results :** The treatment of TF extract at 0.1 and 0.2 mg/ml significantly decreased the expression of IL-4 and IL-13 mRNA in IgE-stimulated RBL-2H3 mast cells, while significantly increased the expression of IFN- $\gamma$  mRNA. TF extract treatment was also inhibited the phosphorylation of ERK1/2, p38 and JNK MAPKs in IgE-stimulated RBL-2H3 mast cells in a dose-dependent manner. In addition, TF extract significantly blocked the translocation of NF- $\kappa$ B p65 into the nuclear of cells after IgE stimulation.

**Conclusions :** These results indicate that TF extract inhibits inflammatory response in IgE-stimulated mast cells through blocking MAPKs/NF- $\kappa$ B pathway. This suggests that TF extract has an anti-inflammatory activity in mast cell activation.

**Key words :** *Tribulus terrestris* Linné, Tribuli Fructus, RBL-2H3 cells, inflammatory responses, MAPKs/NF- $\kappa$ B pathway

## I. 서 론

아토피 피부염(Atopic dermatitis: AD)은 아토피의 첫 증

상으로 대부분 5세 이전 유아의 90% 정도가 발병한다고 알려져 있으며 피부 홍반, 삼출, 가피, 인설(鱗屑) 등이 만성적으로 되풀이 되는 증상을 보이며 특히 소양증이 심한 습진이 나타

\*Corresponding author : Hyo Sang Bae, Department of Sasang Constitutional Medicine, college of Korean Medicine, Dongguk University.  
· Tel : +82-31-961-9031 · E-mail : bjypapa@gmail.com

Yong-Ki Park, Department of Herbolgy, college of Korean Medicine, Dongguk University.  
· Tel : +82-54-770-2661 · Fax : +82-54-770-2647 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr

#First author : Rho Hyo Sun, Department of Herbolgy, college of Korean Medicine, Dongguk University.  
· Tel : +82-54-770-2647 · Fax : +82-54-770-2647 · E-mail : nhs140@naver.com

· Received : 14 February 2017 · Revised : 3 March 2017 · Accepted : 15 March 2017

나는 것을 특징으로 하는 만성 피부염증질환이다<sup>1-4)</sup>. 아토피 피부염은 아토피 질환의 과거력이나 가족력이 있는 경우 흔히 나타나며<sup>5)</sup>, 전 세계적으로 1% 정도였던 과거 발병률이 최근 들어 10~20% 정도로 증가하고 있다<sup>6)</sup>. 현재까지 아토피 피부염의 발병 원인은 구체적으로 밝혀진 바는 없으며 복합적 요인에 의해 발병하는 다인자성 질환으로 인식되고 있고, 유전적 요인 또는 알레르겐(allergen)이나 자극물질, 감염, 기후, 스트레스 등의 환경적 요인, 2형 보조 T세포(Th2) 면역반응 이상, 피부보호막 이상 등 다양한 원인으로 아토피 피부염 증상이 발현되는 것으로 알려져 있다<sup>7,8)</sup>. 아토피 피부염의 발병 기전으로는 비만세포 활성화와 이에 따른 탈과립으로 인한 혈중 히스타민의 유리, 1,2형 보조 T세포(helper T cell)로부터 분비되는 사이토카인(Th1, Th2) 간의 불균형 및 과도한 IgE 생산 등이 핵심기전으로 알려져 있다<sup>9,10)</sup>. 아토피 피부염의 치료는 피부보습용 외용제, 경구용 항히스타민제, H2 길항제 및 항우울제, 국소용 스테로이드 연고, 항염증제 등과 타이모펜틴과 같은 면역조절제 또는 광선 치료 등이 다양하게 사용되고 있으며<sup>11)</sup>, 이중 국소 스테로이드제가 가장 보편적인 약제로 활용되고 있다<sup>12)</sup>. 그러나 이들 약제가 피부 위축, 모세혈관확장증, 스테로이드성 여드름, 자색반, 팽창선, 다모증, 자반, 녹내장, steroid addiction syndrome 등 다양한 부작용을 유발함이 알려지면서<sup>13)</sup> 아토피 피부염의 새로운 치료요법이나 약제 개발의 필요성이 높아지고 있으며, 대체의학이나 민간요법 등에 대한 관심도 증가하고 있는 실정이다.

한의학에서 현대 질병인 아토피 피부염과 부합하는 병명은 없지만, 증상에 따라 胎熱, 胎癩, 浸淫瘡, 斂瘡, 奶癩, 濕疹 범주에 속하며<sup>14)</sup>, 발병 원인을 風熱, 血熱, 血虛, 脾胃運化機能失調에 의한 胎火濕熱, 風濕熱의 侵入 등으로 볼 수 있다<sup>15)</sup>. 따라서 이에 대한 치료는 기본적으로 清熱解毒이 주가 되며 濕型和 乾型으로 나누어, 濕型の 경우 燥濕, 清熱, 止痒의 治法으로 하고 乾型の 경우 清熱, 止痒, 利濕의 治法으로 한다<sup>16)</sup>.

白蒺藜(*Tribulus terrestris* Linné; Tribuli Fructus)는 남가새과(Zygophyllaceae)에 속한 1년생 또는 다년생 초본인 남가새(蒺藜)의 성숙한 열매를 건조한 것으로 性味が 辛苦平하고 平肝潛陽, 疏肝解鬱, 祛風明目, 止痒의 효능이 있어 頭痛眩暈, 胸脇脹痛, 乳閉乳癰, 目赤翳障, 風疹瘙癢 등에 사용한다<sup>17)</sup>. 한방에서는 혈압 강하와 심혈관계 조절, 항노화, 강장 작용 등 다양한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며, 주요 성분으로 kaempferol, kaempferol-3-glycosides, kaempferol-3-rutinoside, tribuloside, furostanol bisglycoside 등이 있다. 백질려에 대한 실험연구로는 혈압 강하<sup>18,19)</sup>, 국소뇌혈류량 증가<sup>20)</sup>, 항치아우식<sup>21)</sup> 및 항알레르기 효과<sup>22)</sup>와 관련한 연구가 이루어졌으며, 최근 백질려로부터 추출한 steroid saponins 성분의 피부 소양감, 부종, 기관염 및 염증 억제 효과<sup>23)</sup>와 급성염증 억제효과<sup>24)</sup>가 보고되었다.

본 연구에서는 아토피 피부염에 대한 백질려의 효능을 평가하기 위해 아토피 피부염 발병의 핵심 면역세포인 비만세포에서 염증반응 유발에 대한 억제 효과 및 약리기전을 확인하

였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 추출물 제조

본 실험에 사용된 백질려(Tribuli Fructus; TF)는 옴니허브(경북, 한국)로부터 표준약재를 구입하여 추출물 제조에 사용하였다. 백질려 추출물 제조를 위해 백질려 100g을 30% 에탄올을 이용하여 95℃에서 3시간 추출하였으며, 추출액을 3겹 거어즈 및 왓만 거름종이(Whatman No. 1)로 거른 후 회전식 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 이를 냉동시킨 후 동결건조기로 건조하였으며 이때 수율은 8.8% 였다. 건조된 추출물은 가루 상태로 마쇄한 후 일정 용기에 담아 냉동 보관하였으며, 1x PBS에 10 mg/ml 농도로 용해시켜 시험약물(TF extract)로 사용하였다.

### 2. 세포배양

흰쥐(rat)의 비만세포주(basophilic leukemia cell line)인 RBL-2H3 세포를 ATCC사(CRL-2256; Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 15% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin이 함유된 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)을 배양액으로 하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 3. 세포독성평가

RBL-2H3 세포에서 백질려 추출물의 독성 농도를 평가하기 위해 WST-1 assay를 수행하였다. 즉, RBL-2H3 세포(2×10<sup>4</sup> cells/well)를 96-well culture plate에 분주하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 하루 동안 배양한 후 백질려 추출물을 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/ml 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 여기에 각 well당 WST-1 용액을 10 μl 씩 넣어 2시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도하였다. 이후 발색정도를 microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 독성정도는 세포만 배양한 대조군에서의 100% 생존도를 기준으로 상대적인 세포생존도(cell viability)를 계산하였다.

### 4. Reverse Transcriptase (RT)-PCR

RBL-2H3 비만세포에서 발현되는 사이토카인들(IL-4, IL-13, IFN-γ)의 유전자에 대한 백질려추출물의 조절 효과를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 즉, RBL-2H3 세포(8×10<sup>4</sup> cells/ml)를 60 mm culture dish에서 하룻밤 배양한 다음 anti-IgE antibody(0.2 μg/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 여기에 서로 다른 농도(0.1, 0.2 mg/ml)의 백질려 추출물과 대조약물로서 비만세포안정화제인 DSCG(30 μm) 및 스테로이드제인 hydrocortisone(10 μm)을 각각 처리하여 1시

간 동안 배양한 후 IgE 자극원으로써 DNP-HSA 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하여 24시간 동안 재배양하였다. 각 세포를 수거하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 TRIzol용액을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA의 농도를 Nanodrop을 이용하여 정량한 후 total RNA(5  $\mu\text{g}$ )에 5 $\times$  RT buffer, oligo-(dT) primer, dNTP mixture, Promega<sup>TM</sup> M-MLV reverse transcriptase를 넣고 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분, 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분, 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분의 조건으로 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

PCR 수행을 위해 합성된 cDNA 1  $\mu\text{l}$ 에 각 타겟 유전자에

대한 primers(표 1) 및 10x PCR buffer(10 mM Tris-HCl, pH8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 2 mM dNTP, 1U Taq polymerase를 혼합한 후 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분 조건에서 1 cycle, 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 55~63 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60초 조건에서 30 cycles; 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 조건에서 1 cycle을 수행하였다. 최종 PCR 반응물은 EtBr을 포함하는 1% agarose gel을 이용하여 100V, 30분간 전기 영동한 후 이미지장비(Bio-Rad ChemiDoc)를 이용하여 확인하였다.

Table 1. Specific primers for PCR

Name (rat primer sets)		Acession, No. (Bionics)	Tm ( $^{\circ}\text{C}$ )	Sequences
IL-4	Forward	80737	59	5'-ACC TTG CTG TCA CCC TGT TC-3'
	Reverse	80738	57	5'-TTG TGA GCG TGG ACT CAT TC-3'
IL-13	Forward	80739	65	5'-GCT CTC GCT TGC CTT GGT GGT C-3'
	Reverse	80740	61	5'-CAT CCG AGG CCT TTT GGT TAG AG-3'
IFN- $\gamma$	Forward	80741	61	5'-GCT GAT GGC CTG GTT GTC TTT C-3'
	Reverse	80742	59	5'-CGC CGC GTC TTG GTT TTG-3'
GAPDH	Forward	80743	59	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'
	Reverse	80744	59	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

### 5. Western Blot

RBL-2H3 비만세포에서 염증신호전달경로에 대한 백질러 추출물의 차단효과를 조사하기 위해 MAPKs와 NF- $\kappa\text{B}$  단백질 발현에 대한 Western blot을 수행하였다. 즉, RBL-2H3 세포( $7.5 \times 10^5$  cells/ml)를 60 mm culture dish에서 하룻밤 배양한 다음 anti-IgE antibody (0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리하여 24시간 배양하였다. 여기에 백질러추출물과 DSCG, hydrocortisone을 각각 처리하여 1시간 동안 배양한 후 DNP-HSA를 처리하고 MAPKs 발현을 위해 15분, NF- $\kappa\text{B}$  발현을 위해 2시간 동안 재배양하였다. 각 세포를 수거하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 1x PBS로 2회 세척하고, phosphatase inhibitor cocktail을 첨가한 lysis 용액(50 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin)을 첨가하여 단백질을 분리하였다. 한편 핵에서의 NF- $\kappa\text{B}$  발현 확인을 위해서는 NE-PER Nuclear and Cytosol Isolation kit를 이용하여 핵과 세포질을 각각 분리하였다. 이후 세포로부터 분리된 단백질의 농도를 Bradford protein assay 방법으로 정량한 후 30  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 5x sample buffer(100 mM Tris-HCl, pH6.8, 200 mM dithithreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)와 섞어 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분 동안 8% acrylamide/bisacrylamide gel을 SDS-PAGE를 실시하였다. 겔에 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4 $^{\circ}\text{C}$ , 90V 조건에서 3시간 동안 transfer하였으며, membrane은 5% skim milk에 담가 실온에서 1시간 동안 blocking한 다음, 각 단백질(ERK1/2, JNK, p38, NF- $\kappa\text{B}$ )에 대한 1차 항체(Cell Signaling)와 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 반응시켰다. 이를 TBST 완충액으로 3회 세척한 후 2차 항체인 HRP-

conjugated secondary antibody 용액과 실온에서 2시간 반응시키고 ECL 용액으로 기질 반응시킨 후 이미지장비(Bio-Rad ChemiDoc)를 이용하여 밴드를 확인하였다. 각 밴드는 Image J program을 이용하여 density를 측정하고 반복실험에 대한 결과는 Histogram으로 나타내었다.

### 6. 면역세포화학염색

#### (Immunocytochemistry, ICC)

RBL-2H3 비만세포에서 염증신호 전사인자인 NF- $\kappa\text{B}$ 의 핵 내로의 이동과 백질러추출물의 억제효과를 확인하기 위해 면역세포화학염색(ICC)을 수행하였다. 즉, RBL-2H3 세포( $1 \times 10^5$  cells/ml)를 4 well slide chamber에 분주하여 하룻밤 배양한 다음 anti-IgE antibody를 처리하여 24시간 배양하였다. 여기에 백질러추출물 및 DSCG, hydrocortisone을 각각 처리하여 1시간 배양한 후 DNP-HSA를 처리하여 2시간 동안 재배양하였다. 각 세포를 1 $\times$  PBS로 세척한 후, 4% paraformaldehyde 용액을 넣어 30분 고정시켰다. 고정된 세포에 0.5% Triton X-100이 포함된 1 $\times$  PBS(PBS-T)를 이용하여 5분간 반응시키고 5% BSA 용액에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 1 $\times$  PBS로 3회 세척한 후 NF- $\kappa\text{B}$  p65 antibody (Cell Signaling)와 함께 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 반응시켰다. 반응이 끝난 세포는 1 $\times$  PBS로 3회 세척한 후 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG와 함께 2시간 실온에서 반응시키고 DAPI 용액이 포함된 mounting 용액을 이용하여 봉입한 후 형광현미경(Leica DM2500)으로 관찰하였다.

### 7. 통계학적 검정

모든 실험 결과는 3회 반복 실험에 대한 평균과 표준편차 (mean±SD)로 나타내었으며, 통계학적 유의성 검증은 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램(ver. 5.01, GraphPad Software Inc.)을 이용하여 정상군과 IgE 대조군 혹은 IgE 대조군과 약물 처리군 간 일원변량분석(One way ANOVA)을 실시하였으며, 모든 결과는 p값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 세포독성 평가

RBL-2H3 비만세포에서 백질려추출물의 독성정도를 평가 하기 위해 WST-1 assay를 수행하였다.

그 결과, 세포만 배양한 경우의 세포생존율(cell viability)을 100%로 하였을 때 백질려 추출물 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/ml 처리 농도에서 각각 102.1±2.11%, 93.5±3.42%, 67.51±3.05% 및 53.90±3.03%로 측정되었다. 따라서 이후 실험에서는 독 성이 없는 농도 범위(0.1, 0.2 mg/ml)에서 수행하였다(그림 1).

#### 2. 염증사이토카인 발현에 대한 효과

RBL-2H3 비만세포에서 백질려추출물의 염증성 사이토카인 발현에 대한 억제 효과를 평가하기 위해 DNP/IgE-HSA로 자극한 RBL-2H3 세포에서 IL-4, IL-13, IFN-γ 유전자의 발현 변화를 RT-PCR 방법으로 측정하였다.

그 결과, IL-4와 IL-13의 유전자 발현은 모두 DNP-

IgE/HSA 자극에 의해 증가되었으며, 백질려추출물을 0.1, 0.2 mg/ml 농도로 처리하였을 때 감소하였다. IFN-γ의 유전 자 발현은 DNP-IgE/HSA 자극에 의해 유의적으로 감소되었 으며, 백질려 추출물 0.2 mg/ml 처리에 의해 유의적으로 증가 되었다. 한편, 대조약물인 DSCG 처리군에서는 이들 사이토 카인의 발현에 영향을 주지 않았으며, hydrocortisol(HC) 처 리군에서는 백질려추출물 0.2 mg/ml 처리에서와 유사하게 대 조군에 비해 유의적으로 IFN-γ 발현을 증가시키는 것으로 나타났다(그림 2).

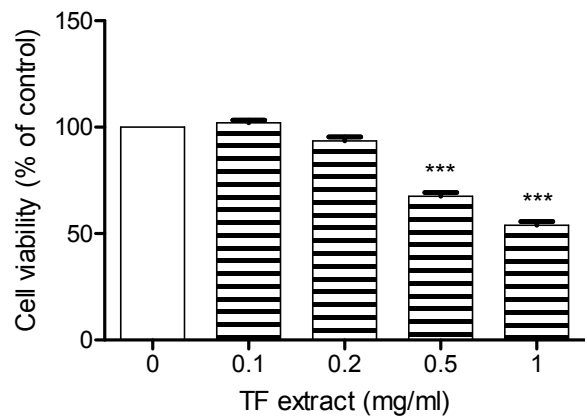


Fig. 1. Effect of TF extract on cell viability in RBL-2H3 cells. Cells were treated with TF extract at 0.1, 0.2, 0.5, and 1 mg/ml for 24 hr. Cell viability was measured by WST-1 assay. Data represents mean±SD of three independent experiments. \*\*\*P<0.001 vs. normal cells

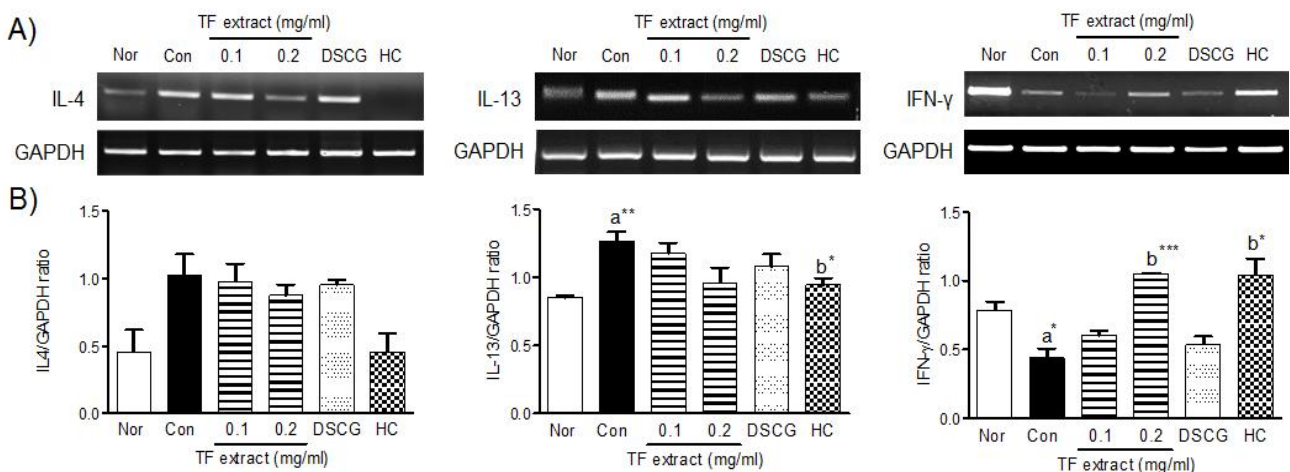


Fig. 2. Effect of TF extract on the expression of IL-4, IL-13 and IFN-γ mRNA in DNP/IgE-HSA-stimulated RBL-2H3 cells. Cells were incubated with anti-DNP-IgE (0.2 μg/ml) for 24 h, treated with TF extract (0.1 and 0.2 mg/ml), DSCG (30 μM) or hydrocortisone (HC: 10 μM) for 1 h, and then stimulated with DNP-HSA (1 μg) for 24 h. (A) The expression of IL-4, IL-13 and IFN-γ mRNA was determined by RT-PCR. (B) Histograms showed the expression ratio of each cytokine compare to GAPDH with mean±SD of three independent experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 vs normal (a) or DNP-IgE/HSA-stimulated cells (b).

#### 3. MAPKs 분자 인산화에 대한 효과

RBL-2H3 비만세포에서 백질려추출물의 염증신호분자 발 현에 대한 억제 효과를 평가하기 위해 DNP/IgE-HSA로 자

극한 RBL-2H3 세포에서 MAPKs 단백질의 인산화 정도를 Western blot 방법으로 측정하였다. 그 결과, ERK1/2, p38, JNK MAPK 분자들은 모두 DNP-IgE/HSA 자극에 의해 인

산화가 증가되었으며, 이는 백질러추출물 0.1, 0.2 mg/ml 처리에 의해 감소하였다. 특히 백질러추출물 0.2 mg/ml 처리 농도에서 ERK와 JNK의 유의적인 인산화 억제 효과가 나타났고,

대조약물인 DSCG와 hydrocortisone(HC) 처리군에서도 ERK, JNK, p38 인산화 억제효과가 관찰되었다(그림 3).

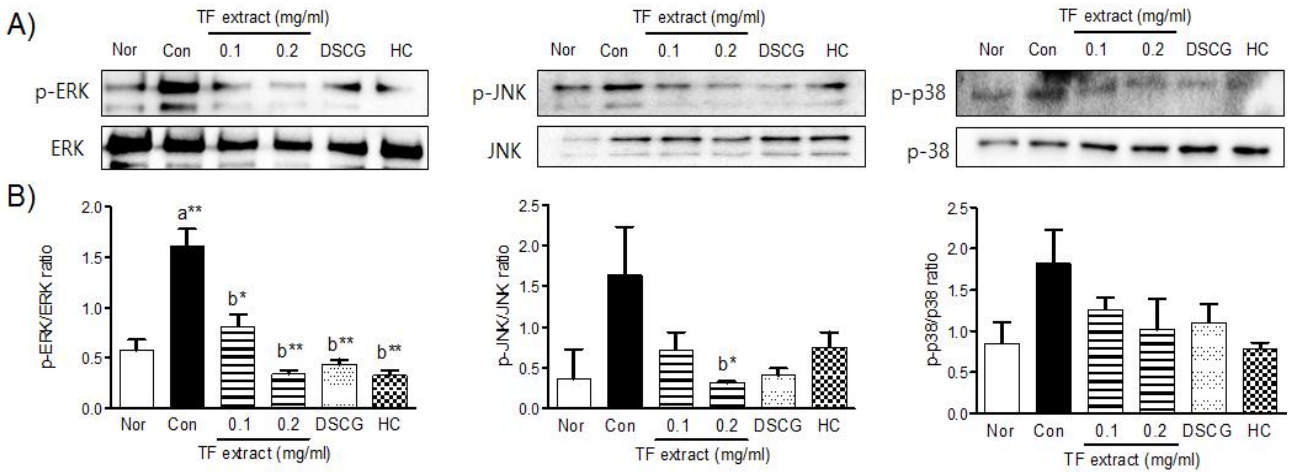


Fig. 3. Effect of TF extract on the phosphorylation of ERK1/2, p38 and JNK in DNP/IgE-HSA-stimulated RBL-2H3 cells. Cells were incubated with anti-DNP-IgE (0.2  $\mu$ g/ml) for 24 h, treated with TF extract (0.1 and 0.2 mg/ml), DSCG (30  $\mu$ m) or hydrocortisone (HC: 10  $\mu$ m) for 1 h, and then stimulated with DNP-HSA (1  $\mu$ g/ml) for 5 min (for ERK1/2) or 15 min (for p38 and JNK). The phosphorylation of ERK1/2, p38 and JNK MAPK was determined by Western blot. Histograms was showed the expression ratio of each phospho-form compare to total form with mean $\pm$ SD of three independent experiments. \*P<0.05, and \*\*P<0.01 vs normal (a) or DNP-IgE/HSA-stimulated cells (b).

#### 4. NF- $\kappa$ B 발현에 대한 억제 효과

RBL-2H3 비만세포에서 백질러추출물의 염증신호기전에 대한 억제 효과를 평가하기 위해 DNP/IgE-HSA로 자극한 RBL-2H3 세포의 핵에서의 NF- $\kappa$ B 발현을 Western blot 및 세포염색 방법을 통해 조사하였다.

먼저 핵에서의 NF- $\kappa$ B 발현은 DNP-IgE/HSA 자극 후 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 백질러추출물 처리에 의해 감소하는 것으로 나타났다. 특히 백질러추출물 0.2 mg/ml 처

리군에서는 DNP-IgE/HSA 대조군에 비해 유의적인 NF- $\kappa$ B 발현 감소가 관찰되었다. 한편, 대조약물인 DSCG와 hydrocortisone(HC)의 처리는 NF- $\kappa$ B의 핵 내 발현 증가에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(그림 4).

또한 면역세포화학염색에서도 Western blot 결과에서와 마찬가지로 DNP-IgE/HSA 자극 후 핵 내 NF- $\kappa$ B의 발현 증가가 관찰되었고, 이는 백질러추출물 처리에 의해 억제되는 것을 확인하였다(그림 5).

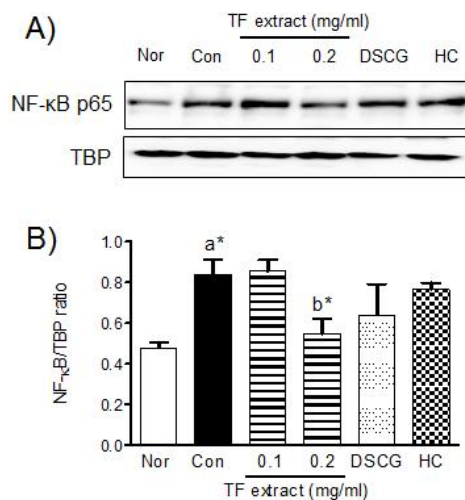


Fig. 4. Effect of TF extract on the nuclear expression of NF- $\kappa$ B in DNP/IgE-HSA-stimulated RBL-2H3 cells. Cells were incubated with anti-DNP-IgE (0.2  $\mu$ g/ml) for 24 h, treated with TF extract at (0.1 and 0.2 mg/ml), DSCG (30  $\mu$ m) or hydrocortisone (HC: 10  $\mu$ m) for 1 hr, and then stimulated with DNP-HSA (1  $\mu$ g/ml) for 2 hr. The expression of NF- $\kappa$ B was determined in nuclear fraction of the cells by Western blot. Histograms was showed the expression ratio of each phospho-form compare to total form with mean $\pm$ SD of three independent experiments. \*P<0.05 vs normal (a) or DNP-IgE/HSA-stimulated cells (b).

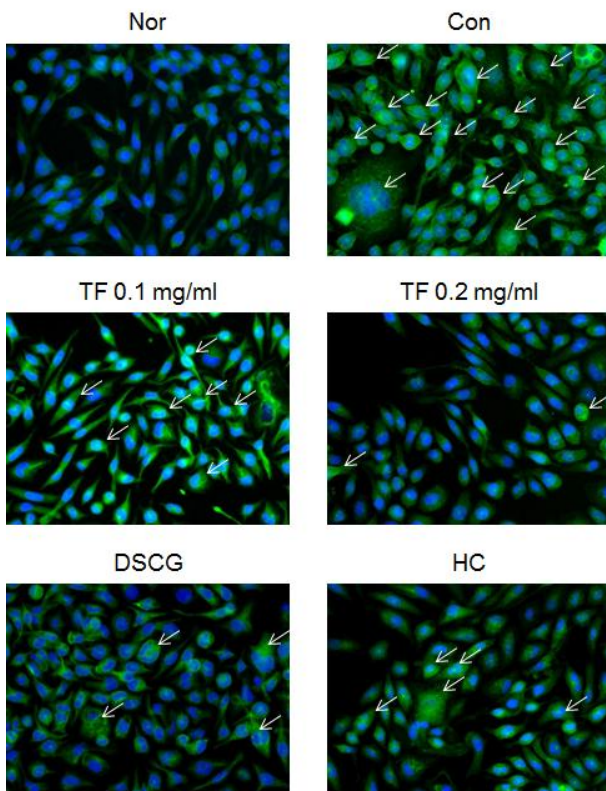


Fig. 5. Effect of TF extract on the nuclear expression of NF- $\kappa$ B in DNP/IgE-HSA-stimulated RBL-2H3 cells. Cells were incubated with anti-DNP-IgE (0.2  $\mu$ g/ml) for 24 h, treated with TF extract (0.1 and 0.2 mg/ml), DSCG (30  $\mu$ M) or hydrocortisone (HC: 10  $\mu$ M) and then stimulated with DNP-HSA (1  $\mu$ g/ml) for 2 hr. Cells were stained with anti-NF- $\kappa$ B p65 antibody (green) and DAPI (blue). The expression of NF- $\kappa$ B was observed by fluorescence microscope ( $\times$ 400). Arrows indicate nuclear expression of NF- $\kappa$ B in the cells.

#### IV. 고 찰

백질러는 임상에서 소양증, 피부질환, 두통, 안구충혈, 고혈압, 유선염 등의 치료에 광범위하게 사용하는 본초로 平肝解鬱, 祛風活血, 明目, 止痒 등의 효능이 있다고 알려져 있다. 최근 백질러의 현대약리 효능에 대한 연구가 이루어지고 있으며<sup>17,25)</sup> 항염증 효능과 관련한 연구로 피부 소양감, 부종, 기관지염 및 염증 치료 효과<sup>23)</sup>와 급성 염증 완화에 대한 효능<sup>24)</sup>이 보고된 바 있다.

아토피 피부염은 심한 소양감을 동반하는 만성 재발성 피부염증 질환이기 때문에 염증을 제어하기 위해 직접적인 항염증 인자 및 간접적인 병리적 인자들에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있으며<sup>26-28)</sup>, 치료에 있어 염증제어는 중요한 치료 목표 중 하나로 가장 보편적으로 처방되고 있는 스테로이드제의 문제점을 해결하면서 보다 효과적으로 피부염을 개선시킬 수 있는 새로운 약제 개발에 대한 관심이 높아지고 있다. 이런 점에서 최근 스테로이드제와 비슷한 효능을 나타내지만 부작용이 없는 한약소재 및 천연성분을 활용한 제제 개발 연구가 이루어지고 있다. 본 연구에서도 아토피 피부염 제제개발 한약소재 발굴을 위해 알레르기성 염증반응 유발의 핵심 면역세

포인 비만세포에서의 백질러추출물의 항염증 효과를 조사하였다.

비만세포는 아토피 피부염뿐만 아니라, 알레르기성 비염이나 기관지 천식 등 제1형 알레르기 반응인 즉시형 과민반응을 매개하는 핵심 면역세포이며, 세포질 내 풍부한 과립(granules)을 가지고 있고<sup>29)</sup>, 세포 표면에는 Fc $\epsilon$  RI가 있어 항원제시세포(APC) 및 T 세포로부터 외부 항원의 자극을 전달 받아 B세포로부터 합성, 분비되는 IgE와 특이적으로 교차 결합함으로써 IgE-Fc $\epsilon$  RI 복합체 형성, 알레르기성 염증 반응을 주도적으로 일으키게 된다<sup>30,31)</sup>. 따라서 알레르기성 질환 치료제는 비만세포의 활성을 조절하거나 이로부터 방출되는 다양한 알레르기 반응 매개물질을 차단하는 방법을 활용하고 있다. 본 연구에서 사용한 RBL-2H3 세포는 흰쥐의 중성구에서 유래한 비만세포이며 세포 표면에 IgE 수용체가 있어 IgE 자극에 의한 사이토카인의 발현, 히스타민의 방출, 염증물질 분비 등 사람의 비만세포와 유사한 특징을 나타내기 때문에 알레르기 질환에서의 항염증, 항알러지 소재 개발연구에 많이 사용하고 있다<sup>32)</sup>. 본 연구에서는 DNP-IgE/HSA complex 자극을 통해 활성화된 비만세포에서 합성, 분비되는 염증성 사이토카인(IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$ )과 염증신호전달 분자인 MAPKs 단백질의 인산화 및 염증신호전달 전사인자인 NF- $\kappa$ B 경로에 대한 백질러추출물의 조절 작용을 검증함으로써 백질러추출물의 알레르기성 염증반응 조절을 통한 아토피 피부염 치료소재로서의 가능성을 평가하였다.

아토피 피부염 환자는 IL-4를 분비하는 Th2 세포의 증가와 INF- $\gamma$ 를 분비하는 Th1 세포의 상대적 저하를 특징적으로 나타내는데 이러한 Th1/Th2 간 불균형이 알레르기 질환으로의 진행을 유도하게 된다. IL-4는 B세포 성장인자로서 면역글로불린 생성 시 IgM에서 IgE로 분화를 유도하고 유착분자들을 활성화시킴으로써 피부조직으로의 염증세포 침윤과 Th0 세포에서 Th2 세포로의 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>11,33)</sup>. 또한 IL-13은 IL-4 수용체에 결합하는 사이토카인으로 IL-4와 함께 IgE 변환을 유도하는 중요한 인자이다<sup>34)</sup>. 본 연구에서 백질러추출물은 DNP/IgE-HSA 자극으로 활성화된 비만세포로부터 합성, 분비되는 IL-4와 IL-13을 억제하였으며, 이는 백질러추출물이 아토피 피부염에서 염증세포 침윤에 따른 피부염증 발생을 억제시키고 Th2 알레르기 반응에 따른 면역 불균형을 조절할 수 있음을 의미한다.

한편 MAPK는 serine/threonine protein kinase 단백질로 세포 외부로부터의 신호를 핵 내로 전달하여 세포의 성장과 분화 및 사멸을 조절하는 신호전달분자로서 비만세포 활성화 시 염증반응을 유도하는 대표적인 염증신호전달기전 조절자들이다<sup>35)</sup>. MAPKs는 반응하는 기질의 종류에 따라 ERK, JNK, p38로 분류할 수 있으며, 비만세포가 활성화되면 이들 분자들이 인산화 되면서 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 핵 내로의 이동을 촉진시켜 염증성 사이토카인들의 유전자를 작동시키게 된다<sup>36,37)</sup>. ERK는 비만세포에서 IL-13 생산에 필수적인 신호이고, JNK는 전사에 중요한 인자로 T 세포 활성화에 관여

한다<sup>38)</sup>. 또한 p38은 비만세포에서 IL-4 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>38,39)</sup>.

한편 아토피 피부염 발생에서 흔히 동반되는 피부장벽 기능의 손상은 피부염 악화의 중요한 요인이며<sup>28)</sup>, 본래 각질층 내 세라마이드는 분해되면서 스피고신(sphingosine)을 생성하여 PKC의 활성을 저해하는데 비해<sup>40)</sup> 아토피 피부염 유발 시에는 각질층 내 세라마이드 감소로 인해 PKC 활성이 유도되고 이로 인해 NF- $\kappa$ B가 자극되어 염증반응을 심화시키게 된다<sup>41)</sup>. NF- $\kappa$ B는 염증신호전달 전사인자로서 다양한 자극에 의해 핵으로 들어가 NF- $\kappa$ B binding site에 결합하여 염증관련유전자 등의 발현을 유도하는 역할을 한다<sup>42)</sup>. 본 연구에서 백질러추출물은 DNP/IgE-HSA 자극으로 활성화된 비만세포에서 ERK, JNK, p38 MAPKs의 인산화를 효과적으로 억제함으로써 염증신호전달 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 핵 내로의 이동을 차단시켜 염증성 사이토카인 등 염증물질의 합성과 분비를 제어할 수 있는 것으로 나타났다.

따라서 백질러추출물은 아토피 피부염에서 피부조직 내 IgE 자극을 통한 비만세포 활성화에 따른 알레르기성 염증물질의 생성을 MAPKs/NF- $\kappa$ B 염증신호전달경로의 근본적 제어를 통해 피부 염증을 개선시킬 수 있음을 의미한다.

## V. 결 론

본 연구에서는 IgE 자극으로 활성화된 RBL-2H3 비만세포에서의 백질러 30% 에탄올추출물의 알레르기성 염증반응 억제 효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백질러 추출물(0.1, 0.2 mg/ml)은 DNP/IgE-HSA 자극 RBL-2H3 세포에서 Th2 사이토카인인 IL-4와 IL-13의 유전자 발현을 억제하였으며, Th1 사이토카인인 IFN- $\gamma$  유전자의 발현을 증가시켰다.
2. 백질러 추출물(0.1, 0.2 mg/ml)은 DNP/IgE-HSA 자극 RBL-2H3 세포에서 ERK, p38, JNK MAPK의 인산화를 억제하였으며, 특히 0.2 mg/ml 처리 시 ERK의 유의적인 억제 효과를 나타내었다.
3. 백질러 추출물(0.1, 0.2 mg/ml)은 DNP/IgE-HSA 자극 RBL-2H3 세포에서 NF- $\kappa$ B의 핵으로의 이동과 발현 증가를 억제하였다.

따라서 백질러추출물은 비만세포에서 IgE 자극에 의한 MAPKs/NF- $\kappa$ B 염증신호전달 경로 활성화를 차단함으로써 염증성 사이토카인 합성 억제를 통해 항염증 효능을 나타내는 것으로 나타났으며, 이는 백질러추출물이 아토피 피부염 개선에 효과적일 수 있음을 의미한다.

## 감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원을 통해 보건복지부 “양·한방융합기반 기술개발사업”의 연구비 지원을 받아 수행된 연구입니다(HI15C0256).

## 참고문헌

1. Jane W. IMMUNOBIOLOGY-6/E : The Immune System In Health And Disease, Seoul : LifeScience, 2005 : 361, 551-94.
2. Eajakawa S. Skin diseases of children, Seoul : Korea Medical Book Publishig Company, 2005 : 20-30.
3. Rhim JW, Moon KS, Kong DY, Pyun BY, An Investigation into the Actual Condition of Outbreak and Treatment in Atopic Dermatitis, Allergy Asthma Respir Dis, 2005 ; 15(1) : 44-52.
4. Hong CY, Pediatrics, Seoul : Daehan Printing & Publishing Co, 2005 : 1207-11.
5. Rha YH, Choi SH, Editorial : Risk Factors Associated with Development of Atopic Dermatitis, Pediatr Allergy Respir Dis, 2009 ; 19(2) : 91-4.
6. Park YM, Advances In the Pathophysiology of Atopic Dermatitis, Pediatr Allergy Respir Dis, 2006 ; 16(3) : 189-96.
7. Boguniewicz M, Leung DYM, Atopic dermatitis, J Allergy Clin Immunol, 2006 ; 117(Suppl) : 475-80.
8. Buske-Kirschbaum A, Gierens A, Hollig H, Hellhammer DH, Stress-induced immunomodulation is altered in patients with atopic dermatitis, J Neuroimmunol, 2002 ; 129 : 161-7.
9. Cooper KD, Atopy dermatitis-Recent trends in pathogenesis and therapy, J Invest dermatol, 1994 ; 102 : 128-65.
10. Mosman TR, Cherwinski HM, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL, Two types of murine helper T cell clones, I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, J Immunol, 1986 ; 136 : 2348-57.
11. Lee HR, Atopic Dermatitis, Korean J Pediatr 2000; 43 :1161-1167.
12. Cambazard F, The use of topical corticosteroids in atopic dermatitis in children, Ann Dermatol Venerol, 2005 ; 132(1) : 64-7.
13. Hajar T, Leshem YA, Hanifin JM, Nedorost ST, Lio PA, Paller AS, Block J, Simpson EL, A systematic review of topical corticosteroid withdrawal (“steroid addiction”) in patients with atopic dermatitis and other dermatoses, J Am Acad Dermatol, 2014 ; 72(3) : 541-9.

14. Hong WS, Huangdi Neijing Suwen. Seoul : Research Institute of Oriental Medicine Publishing, 1985 : 72-80, 246-8.
15. Park SN. Effect of Sopungsan in BALB/c Mouse Model of Atopic Dermatitis. Doctoral Dissertation, Kyunghee University, 2004.
16. Cha KB, Kim YS, Seol IC. Literatual study on Atopic dermatitis. *J Oriental Med Daejeon Univ*, 2005 ; 14(2) : 113-26.
17. The National College of Oriental Medicine Herbology Classroom, Herbology. Seoul : Youngrimsa, 2016 : 557-8.
18. Yoo YJ, Lee HS. Effects of Fructus Tribuli on the Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Trad Korean Med*, 1999 ; 9(1) : 192-9.
19. Hong S. Effect of Fructus Tribuli extract on blood pressure and artery. *Kor J Orient Int Med*, 1997 ; 18(2) : 151-9.
20. Kang SY, Han JH, Kim KY. Effect of Fructus Tribuli extract on regional cerebral blood flow and pial arterial diameter. *Kor J Herbol*, 1998 ; 8(1) : 187-200.
21. Lee DH, Yu HH, Jung SY, Moon HD, Kim SM, Jeon BH, You YO. Anticariogenic Properties of the Ethanol Extract of Tribuli fructus against *Streptococcus mutans*. *Kor J Oriental Physiology & Pathology*, 2007 ; 21(5) : 1148-53.
22. Chou CY, Kim YB. The Effects of Tribulus terrestris on Model of Allergic Rhinitis. *Kor J Oriental Medical Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2011 ; 24(2) : 28-34.
23. Zhang JD, Cao YB, Zheng XU. In Vitro and in Vivo Antifungal Activities of the Eight Steroid Saponins from Tribulus terrestris L. with Potent Activity against Fluconazole-Resistant Fungal. *Biol Pharm Bull*, 2005 ; 28(12) : 2211-5.
24. Wei NI, Zhou G, HU LL, Tian DL, Jiang XX, OUYANG CH. Experimental study on the anti-inflammatory, anti-anoxia and anti-fatigue effects of extract from Tribulus terrestris L. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2007 ; 18(11) : 2778-9.
25. Xiao PG. Modern Chinese materia medica. Beijing : China Social Sciences Press, 2001.
26. Kim SA, Kang YH. Changes in Ceramide in Stratum Corneum and Anti-inflammatory Effects of Sopungdojeok-tang on Atopic Dermatitis. *Korean J Orient Int Med*, 2006 ; 27(1) : 72-83.
27. Yang HJ, Park KW, Kim HS, Cho SM, Park KM. Effect of Anti-atopic Allergic Reaction in Response to Oriental Herb Extracts. *Kor J Food Sci Technol*, 2010 ; 42(1) : 109-14.
28. Park YL, Park J. Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Kor J of Investigative Dermatology*, 2007 ; 14(3) : 67-72.
29. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev*, 1997 ; 77(4) : 1033-79.
30. Poole JA, Rosenwasser LJ. The role of immunoglobulin E and immune inflammation: implications in allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2005 ; 5(3) : 252-8.
31. Ahn KM. Role of Mast Cells in Allergic Inflammation and Innate Immunity. *Korean J Pediatr*, 2004 ; 47(11) : 1137-41.
32. Egle P, Neil F. The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell. *Inflamm Res*, 2009 ; 58(11) : 737-45.
33. Chrousos GP. Stress, chronic inflammation, and emotional and physical well-being : Concurrent effects and chronic sequelae. *J Allergy Clin Immunol*, 2000 ; 106(5) : 275-91.
34. Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, Mao I, Adra CN, Hopkin JM. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunol Today*, 2000 ; 21(2) : 60-4.
35. Kim NU. Inhibitory mechanism of curcumin on activation of mast cells for anti-allergic activity. Master Dissertation, Konkuk University, 2007.
36. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signaling pathways for mast cell activation. *Nat Rev Immunol*, 2006 ; 6 : 218-30.
37. Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem. Sci*, 2000 ; 25 : 7-9.
38. Theoharides TC, Kalogeromitros D. The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 2006 ; 1088 : 78-99.
39. Gary LJ, Razvan L. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science*, 2002 ; 298(5600) : 1911-2.
40. Andrea H, Thomas K, Josef P, Konrad S. Physiology and pathophysiology of phingolipid metabolism and signaling. *Biochem Biophys Acta*, 2000 ; 1485 : 63-99.
41. Kim SA, Kang YH. Changes in Ceramide in Stratum Corneum and Anti-inflammatory Effects of Sopungdojeok-tang on Atopic Dermatitis. *Kor J Orient Int Med*, 2006 ; 27(1) : 72-83.
42. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell*, 1996 ; 87 : 13-20.