大韓本草學會誌 제34권 제1호(2019년 1월)
Kor. J. Herbol. 2019 ; 34(1) : 23-31

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2019.34.1.23.

HaCaT 세포와 RBL2H3 세포에서 패모 추출물의 알레르기 염증 완화 효과

김은영[1,#], 이비나[1], 김재현[1], 홍수연[1], 김민선[1], 박재호[2], 김좌진[3], 손영주[1], 정혁상[1,*]

1 : 경희대학교 한의과 대학 해부학 교실, 2 : 중원대학교 생약자원개발학과, 3 : 충남대학교 의과대학

Effect of Fritillariae Thunbergii Bulbus for Allergic Inflammation on HaCaT and RBL2H3 Cells

Eun-Young Kim[1,#], Bina Lee[1], Jae-Hyun Kim[1], SooYeon Hong[1], Minsun Kim[1], Jae Ho Park[2], Jwa-Jin Kim[3], Youngjoo Sohn[1], Hyuk-Sang Jung[1,*]

1 : Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul, 02447, Korea
2 : Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, 85 Munmu-ro, Goesan-eup, Goesan-gun, Chungbuk, Korea
3 : Department of Medical Science, Brain Research Institute, School of Medicine, Chungnam National University, 266, Munhwa-ro, Jung-gu, Daejeon, 35015, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study was to investigate the effect for allergic-inflammation of Fritillariae Thunbergii Bulbus (FTB) on HaCaT cells and RBL2H3 cells.

Methods : To investigate the effects of FTB for anti-inflammation in HaCaT cells, the cells were pretreated with FTB for 1h and then stimulated with TNF-α/IFN-γ for 24h. Then thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and Macrophage-derived chemokine (MDC) levels were analyzed with ELISA kit.

Also to investigate the effect of skin barrier protein, the cells were treated with FTB of various concentrations, and then cells were harvested, expressions of skin barrier protein were measured with RT-PCR. To investigate the effects of FTB for anti-allergy in RBL2H3 cells, the cells were pre-treated with FTB for 1h, and then stimulated with A23187 for 30 min. β-hexosaminidase, IL-4 and TNF-α were measured using cultured media. The cells were harvested to analyze the mechanism of the effect for FTB via Western blot.

Results : FTB did not show cytotoxicity in HaCaT and RBL2H3. In HaCaT cells, FTB significantly suppressed the expression of TARC, MDC at a dose-dependent manner and markedly increased formation of the skin barrier proteins. In RBL2H3 cells, FTB decreased release of the β-hexosaminidase, IL-4 and TNF-α in RBL2H3 through inhibition of the phosphorylation of JNK and p38, which are include in the signaling mechanism of MAPK

Conclusion : These results indicate that FTB has an anti-inflammatory effect on the allergic response through blocking MAPK pathway. This suggest that FTB could be a therapeutic agent for allergic response.

Key words : Fritillariae Thunbergii Bulbus, Allergy, HaCaT, RBL2H3

*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 · E-mail address : jhs@khu.ac.kr
#First author : Eun-Young Kim, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedae-ro, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.
· Tel: (82) 2-961-0327 · E-mail address : turns@hanmail.net
· Received : 30 November 2018 · Revised : 21 December 2018 · Accepted : 25 January 2019

Ⅰ. 서 론

피부는 외부환경의 유해한 물리적, 화학적 및 생물학적 자극으로부터 신체를 보호하는 기관으로, 크게 표피, 진피, 피하조직으로 구성되어 있다[1]. 이중 각질형성세포인 keratinocyte는 표피층에 존재하는 주요 구성 세포로, 세포 분화를 통해 피부 장벽을 만드는 역할을 한다[2]. 이러한 피부 장벽의 파괴로 인해 알레르기 유발 물질이 체내에 유입하게 되면, 표피에서는 Thymus and activation-regulated chemokine (TARC)와 Macrophage-derived chemokine (MDC)같은 케모카인을 생성하여, 염증세포를 염증 부위로 시킨다[3]. TARC와 MDC는 아토피 피부 환자의 혈청에서 유의한 농도로 검출되어, 아토피 피부염 진단에 유효한 생체지표가 된다[4].

알레르기 반응에서 중요한 역할을 하는 비만세포는 세포질 내에 과립을 풍부하게 가지고 있는 세포로, 외부 자극으로 인해 탈과립이 발생하면, 염증성 사이토카인인 IL-4와 TNF-α, 그리고 가려움증 매개체인 histamine과 같은 물질을 방출하여 알레르기 반응을 유도한다[5, 6]. RBL2H3는 쥐의 호염기성 백혈병 비만세포주로, 비만세포의 탈과립 연구 모델로 많이 사용되고 있다[7].

패모(Fritillariae Thunbergii Bulbus)는 백합과(Liliaceae)에 속하는 여러해살이풀로, 한의학에서 청열화담(靑火熱痰, 열을 내리고 가래를 없앰), 산결소옹(散結消癰_뭉친 것을 풀어주고 부스럼을 없앰)의 효능이 있어 기침, 가래, 임파선 결핵, 감염성 염증, 유선염, 화농성 폐렴 등의 증상에 사용하며[8], 염증을 제거하기 위한 외용 처방제로도 사용되어 왔다[9]. 선행연구로는 패모가 HMC-1에서 염증성 사이토카인의 발현을 억제한다는 보고[10]와 패모류 한약재의 주요 성분인 peimine과 peiminine이[11, 12] 아토피 피부염 동물 모델과 RAW 264.7 세포에서의 염증 반응을 완화 시킨다는 보고가 있다[13, 14]. 그러나 아직 각질형성세포와 비만세포에서 패모의 효능에 대한 연구는 보고되지 않았다. 이에 본 연구자는 HaCaT 세포와 RBL2H3 세포를 이용하여 패모 추출물이 아토피에 미치는 영향을 조사하여, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시약

본 실험에서 사용한 패모는 중국산 절패모(Fritillariae Thunbergii Bulbs, FTB)로 옴니허브에서 구입하였다. HaCaT 세포와 RBL2H3는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)은 Welgene (Daejeon, Korea)에서 구입하였으며, antibiotics penicillin/streptomycin (PS)은 Gibco (New York, USA)에서, fetal bovine serum (FBS)는 Atlas Biologicals (Fort Collins, CO, USA)에서 구입하였다. Cell Titer 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit는 Promega (Wisconsin, USA)에서 구입하였다. A23187과 4-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide (p-NAG)은 시그마-알드리치(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. TNF-α, IFN-γ, TARC ELISA kit는 R&D system에서 구매하였다. MDC kit는 Boster Bio (Wuhan, China)에서 구입하였다. Total-extracellular signal regulated kinase (T-ERK)-1,2, phosphorylated ERK-1,2 (p-ERK), total-c-Jun N-terminal kinase (T-JNK), phosphorylated JNK (p-JNK), total-p38 mitogen-activated protein kinase (T-p38) and phosphorylated p38 (p-p38)의 항체는 Cell Signaling Tech (Beverly, MA)에서 구입하였다. RNAiso Plus는 Takara Bio (Dalian, China). SuperScript II Reverse transcription kit and SYBR green은 Invitrogen (California, USA)에서 구입하였다. Taq polymerase는 Kapa Biosystems (Massachusetts, USA)에서, PCR primers는 Genotech (Daejeon, Korea)에서 제작하였다.

2. 약물의 제조

둥근 플라스크에 패모 1kg과 80% 주정 10 L를 넣고 멸균기를 이용해 1기압, 121℃에서 15분간 추출하였다. 추출액은 실온에서 충분히 식힌 후, 동결 건조하였으며, 수득률은 11%였다.

3. High performance liquid chromatography (HPLC) 분석

본 연구에 사용된 패모 추출물의 peimine과 peiminine을 분석하기 위해 HPLC-UV system(Waters 2695/2487)을 이용하였다. 칼럼은 Xbridge C18 (250 mm × 6 mm, 5 um, Waters)를 사용하였으며, 이동상은 물(pH 10)과 Acetonitrile을 45 : 55 비율로 40분간 분석하였다. 유속은 분당 1㎖이며, 검출기는 UV 210 nm에서 분석하였다. Peimine과 peiminine의 각 표준품을 2, 10, 50, 100 ㎍/㎖ 농도로 조제하여 동일한 조건하에 분석하여 정량선을 작성한 다음 패모 추출물 중의 각 함량을 정량하였다.

4. HaCaT 세포를 이용한 항염증 효능 검증

1) 세포 배양 및 세포 생존율 측정

HaCaT 세포와 RBL2H3 세포는 10% FBS와 1% PS가 포함된 DMEM 배지를 사용하여 5% CO_2, 37℃ 조건에서 배양하였다. 세포는 3일 간격으로 세포의 밀집도가 80~90%에 도달했을 때 trypsin을 이용하여 계대 배양하였다. 세포 생존율은 Cell Titer 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 각 세포를 1.5×10^3/well을 분주하여 24시간 동안 안정화한 후 패모 추출물을 100, 200, 400 ㎍/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 후 MTS를 20 ml 처리한 후 2시간 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아무것도 처리하지 않은 세포의 생존율을 100%로 가정하여 계산하였다.

2) 세포 면역측정법 (ELISA)에 의한 TARC와 MDC의 측정

HaCaT 세포에서 패모 추출물의 효과를 분석하기 위해 6-well plate에 1×10^6/well을 분주한 후 24시간 동안 부착시킨 후, 패모를 농도별로 처리하였다. 1시간 후 TNF-α/IFN-γ를 10 ng/ml를 처리한 후 24시간 동안 자극하였다. 24시간 후 배지를 4,000 rpm, 4℃에서 원심분리하여, 세포 배양액에 존재하는 TARC와 MDC의 농도를 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 실험 방법은 제조사의 매뉴얼에 따라 진행하였다.

3) 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain reaction, RT-PCR)

패모 추출물이 피부 장벽 보호 단백질에 미치는 영향을 분석하기 위해서, HaCaT 세포를 6-well plate에 1×10^6cells/well을 분주하고 24시간 후 패모 추출물을 농도별로 처리하였다. 24시간 후 cell을 RNA iso plus를 사용하여 RNA를 추출하고, SuperScript II Reverse transcription kit를 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 Kapa Taq PCR kit를 이용하여 제조사 매뉴얼에 따라 수행하였다. PCR은 95℃에서 10분 동안 초기 변성 후, 95℃ 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Primers, Sequences and PCR Conditions

Primer name	Primer Sequence	Annealing Tm (℃)	cycle
FLG	5'- TTTCGTGTTTGTCTGCTTGC- 3' 5'- CTGGACACTCAGGTTCCCAT-3'	60℃	40
INV	5′-TGCCTGAGCAAGAATGTGAG 5′-AGCTGCTGATCCCTTTGTGT	60℃	40
AQP	5'-GGTTGATGGTGAGGAAACCA-3' 5'-GGGACCCTCATCCTGGTG-3'	60℃	35
GAPDH	5'-ACTTTGTCAAGCTCATTTCC-3′ 5'-TGCAGCGAACTTTATTGATG-3′	57.5℃	35

Abbreviations: FLG, filaggrin; INV, involucrin; AQP, aquaporin-3; GAPDH, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

5. RBL2H3 세포를 이용한 항염증 효능 검증

1) 세포 배양 및 세포 생존율 측정

RBL2H3 세포는 10% FBS와 1% PS가 포함된 DMEM 배지를 사용하여 5% CO_2, 37℃ 조건에서 배양하였다. 세포는 3일 간격으로 세포의 밀집도가 80~90%에 도달했을 때 Trypsin을 이용하여 계대 배양하였다. 세포 생존율은 Cell Titer 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 각 세포를 4×10^4/well을 분주하여 24시간 동안 안정화한 후 패모 추출물을 100, 200, 400 μg/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 후 MTS를 20 ml 처리한 후 2시간 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아무것도 처리하지 않은 세포의 생존율을 100%로 가정하여 계산하였다.

2) β-hexosaminidase의 분비 측정

RBL2H3 세포를 24-well plate에 2×10^5cells/well에 분주한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거한 뒤 piperazine-N,N′-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES) buffer로 수세한 뒤 PIPES buffer로 수세한 후 패모 추출물을 농도별로 전처리하였다. 1시간 후 A23187 10 μM로 자극한 후 30분 동안 반응시켰다. 배지를 걷어내어 2,000 rpm에 5분간 원심분리한 후 상층액을 96-well plate에 옮긴 후 1 mM p-NAG 50 ml를 추가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 후 carbonate stop buffer를 이용하여 반응을 종료시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 세포 면역측정법 (ELISA)에 의한 IL-4와 TNF-α의 측정

RBL2H3 세포에서 염증성 사이토카인에 대한 패모 추출물의 효과를 분석하기 위해 6-well plate에 1×10^6 cells/well을 분주한 후 24시간 동안 부착시킨 후, 패모 추출물을 농도별로 처리하였다. 1시간 후 A23187 10 μM로 자극한 후 30분 후 배지를 4,000 rpm, 4℃에서 원심분리하여, 세포 배양액에 존재하는 IL-4와 TNF-α의 농도를 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 실험 방법은 제조사의 매뉴얼에 따라 진행하였다.

4) Protein extract and Western blot

알레르기성 항염증 효능에 대한 기전을 분석하기 위해, 6-well plate에 1×10^6cells/well을 분주하고 24시간 후 패모 추출물을 농도별로 처리하였다. 1시간 후 A23187 10 μM을 처리한 후 30분 후 cell을 cold PBS로 3회 세척한 후 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer를 넣고 세포를 용해하였다. 이후 4℃에서 30분간 반응시킨 후 13,000 rpm, 4℃에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 사용하였다. 단백질은 BCA assay로 정량하였으며, 30 μg의 단백질은 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였으며, 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane으로 transfer 하였다. 항체의 비특이적 결합을 막기 위해 membrane을 TBST로 용해한 5% skim milk로 blocking 한 후, T-ERK, p-ERK, T-JNK, p-JNK, T-p38, p-p38의 항체를 1:1,000으로 희석하여 4℃에서 overnight 반응시킨 후 TBST로 3회 세척하였다. 그 후 HRP-conjugated secondary Ab를 1:10,000으로 희석하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. TBST로 3회 세척 후 ECL kit를 이용하여 발색시켰다.

6. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 평균치 ± 표준오차(Mean ±

SEM) 나타내었으며, analysis of variance (ANOVA)로 분석하고 Dunnett's multiple comparison test를 실시하여 검정하였다. $P<0.05$인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였으며, 모든 실험은 3회 이상 반복하여 얻어진 결과로 검정하였다.

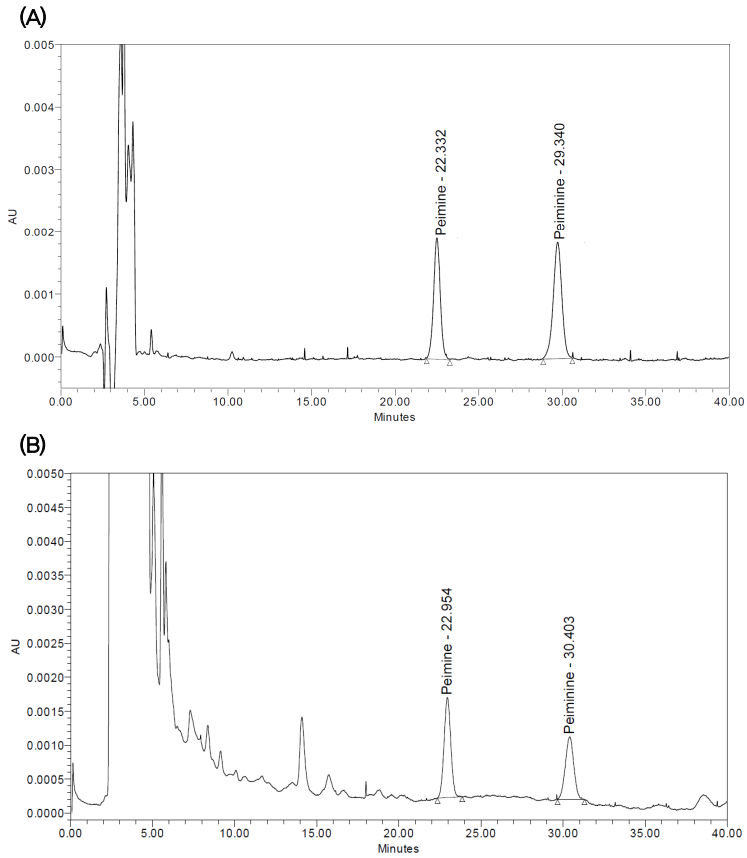
Ⅲ. 결 과

1. HaCaT cell과 RBL2H3 세포에서 패모 추출물에 대한 세포독성

본 연구에 사용된 추출물로부터 패모의 주요 약리성분인 peimine[11]과 peiminine[12]을 확인하기 위해 HPLC-UV방법을 이용하여 각 성분을 분석하였다. 추출물로부터 peimine과 peiminine은 모두 확인 되었으며(Figure 1), 표준품을 이용한 정량분석 결과, 추출물 중 peimine과 peiminine의 함량은 각 15.158 ㎎/g과 9.558 ㎎/g로 확인되었다.

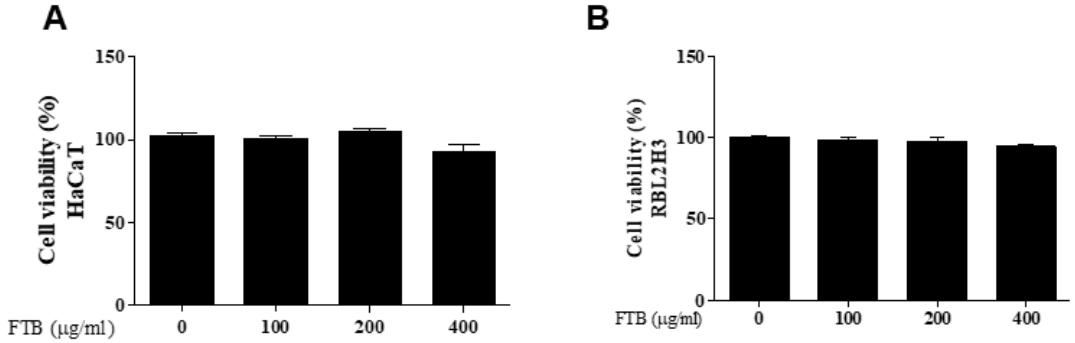
2. HaCaT cell과 RBL2H3 세포에서 패모 추출물에 대한 세포독성

패모 추출물의 독성을 알아보기 위해 HaCaT cell과 RBL2H3에서 MTS assay를 수행하였다. HaCaT cell에 패모 추출물을 100, 200, 400 ㎍/ml로 처리한 후 세포 생존율을 분석한



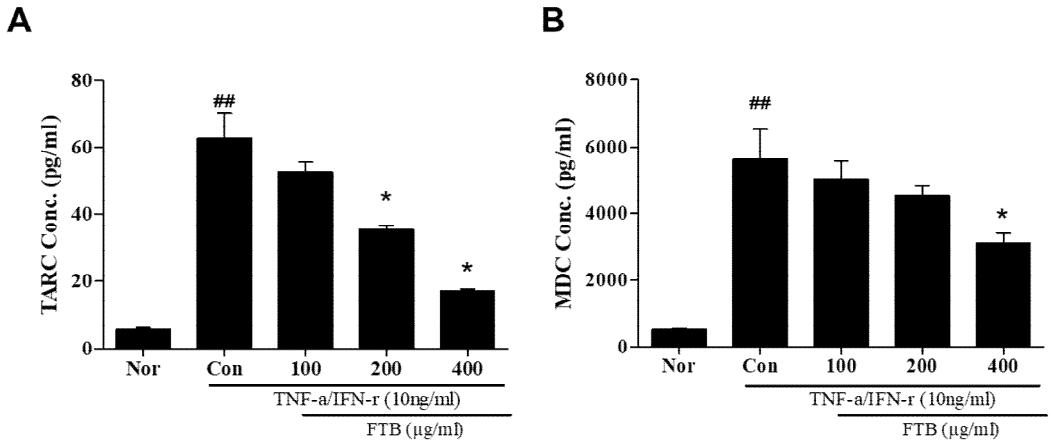
A: Standard peimine and peiminine, B: FTB

Figure 1. Identification of Peimine and Peiminine from FTB by HPLC-UV.



Cell viability was measured by MTS assay. Values are mean ± SEM of three independent experiments

Figure 2. Effect of FTB on the cell viability in HaCaT and RBL2H3 cells.



HaCaT cells were pretreated FTB for 1h, and stimulated with TNF−α/IFN−γ (10 ng/ml) for 24h. Cultured media was harvested and ELISA kits were used to assay production of TARC and MDC. Values are mean ± SEM of three independent experiments. ##p<0.01 vs. Nor; *p<0.05 vs. Con

Figure 3. Effect of FTB on TARC and MDC expression in HaCaT cells

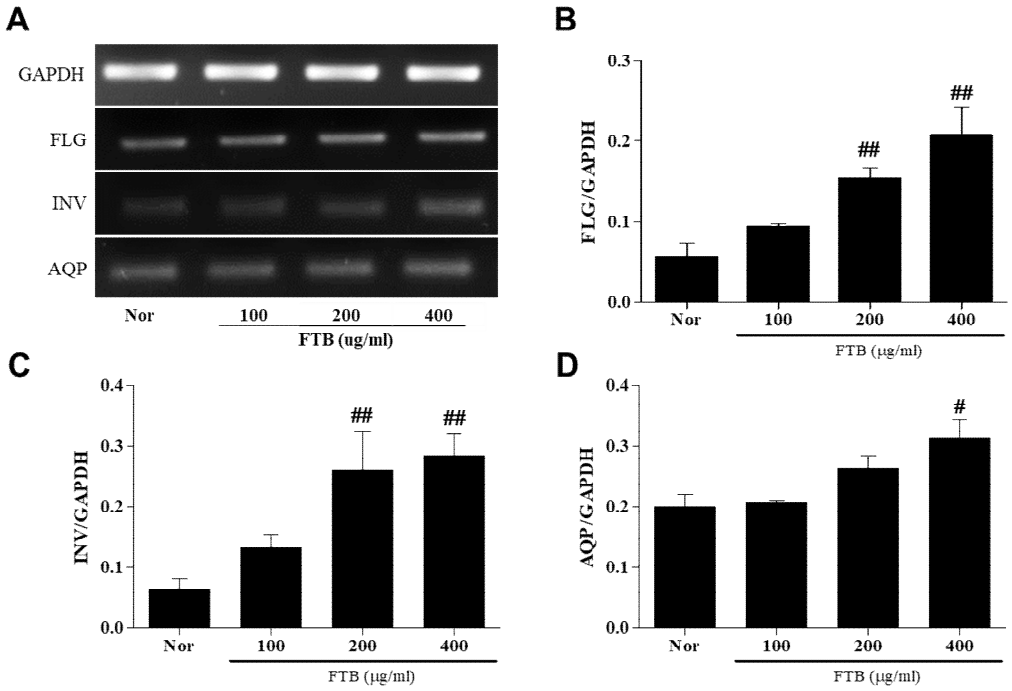
결과, 패모 추출물은 400 μg/ml까지 독성이 관찰되지 않았다(Figure 2A). 또한 RBL2H3 세포에서 패모 추출물을 100, 200, 400 μg/ml로 처리한 후 세포 생존율을 분석한 결과, 패모 추출물은 400 μg/ml까지 독성이 관찰되지 않았다(Figure 2B).

3. 패모 추출물이 TARC 및 MDC생성에 미치는 영향

아토피 염증 반응 시 발현되는 TARC와 MDC의 분비량을 ELISA를 이용해 분석해 본 결과, TNF−α/IFN−γ를 처리한 세포의 경우 세포 배양액 내 TARC와 MDC의 생성이 유의하게 증가하였으며, 패모 추출물은 TARC의 생성을 200 μg/ml과 400 μg/ml에서 농도 의존적으로 유의하게 감소시켰다(Figure 3A). 또한, 패모 추출물은 400 μg/ml에서 MDC의 생성을 유의하게 억제하였다(Figure 3B).

4. 패모 추출물이 피부 장벽 조절 인자에 미치는 영향

패모 추출물이 피부 장벽 조절 인자에 미치는 영향을 알



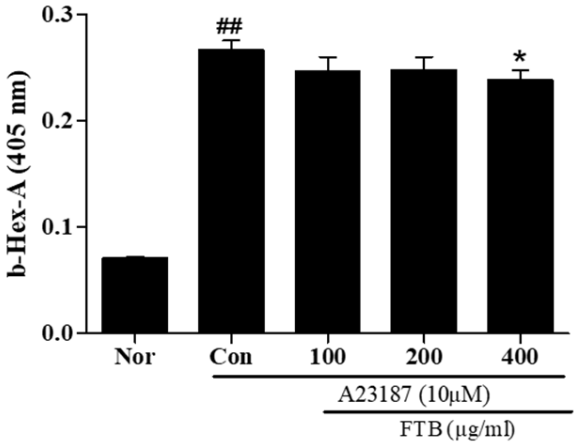
HaCaT cells were pretreated FTB for 1h, and stimulated with TNF−α/IFN−γ (10 ng/ml) for 24h. Cells were harvested and mRNA levels were measured by RT−PCR (A). Filaggrin (B), involucrin (C), aquaporin (D) mRNA expressions were normalized to GAPDH. Values are mean ± SEM of three independent experiments. #p<0.05, ##p<0.01 vs. Nor.

Figure 4. Effect of FTB on filaggrin, involucrin and AQP mRNA expressions in HaCaT cells

아보기 위해, 피부 장벽 단백질의 mRNA 발현을 확인하였다. Figure 4.에서 보여지는 바와 같이, 패모 추출물 200 μg/ml, 400 μg/ml은 filaggrin의 발현을 농도 의존적으로 유의하게 증가시키며, 패모 추출물 200 μg/ml, 400 μg/ml은 involucrin의 발현 또한 유의하게 증가시켰다. 그리고 패모 추출물 400 μg/ml은 aquaporin의 발현도 유의하게 증가시켰다. 이는 패모 추출물이 피부의 물리적 장벽을 보호할 수 있다는 것을 의미한다.

5. 패모 추출물이 β-hexosaminidase의 분비에 미치는 영향

비만세포의 탈과립 정도를 측정하기 위해 RBL2H3 세포를 이용하여 β-hexosaminidase의 발현량을 분석해보았다. 그 결과 β-hexosaminidase는 A23187에 유의하게 증가하였으며, 패모 추출물 400 μg/ml은 β-hexosaminidase의 분비를 유의하게 감소시켰다(Figure 5).



RBL2H3 cells were pretreated FTB for 1h, and stimulated with A23187 for 30m. Cultured media were harvested and β-hexosaminidase release were measured by Dastych method. Values are mean ± SEM of three independent experiments. ##p<0.01 vs. Nor. *p<0.05 vs. Con.

Figure 5. Effect of FTB on β-hexosaminidase in RBL2H3 cells

6. 패모 추출물이 IL-4와 TNF-α의 분비에 미치는 영향

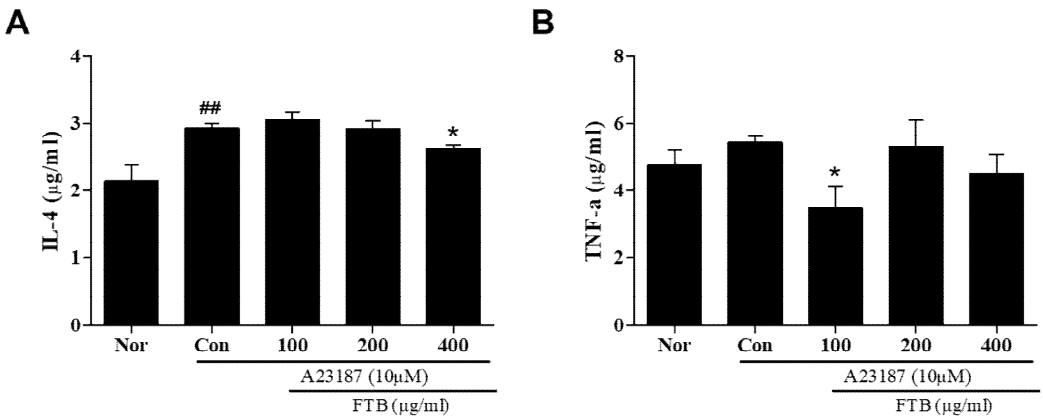
RBL2H3 세포에서 염증성 사이토카인 IL-4와 TNF-α의 발현량을 분석해 본 결과, A23187을 처리한 세포의 경우 세포 배양액 내의 IL-4의 생성이 유의하게 증가하였고, TNF-α의 생성은 비록 유의하지는 않았으나 증가하는 경향을 보였다. 그러나 패모 추출물 400 μg/ml 은 IL-4의 생성을 유의하게 감소시켰으며(Figure 6A), 패모 추출물 100 μg/ml은 TNF-α의 생성을 유의하게 감소시켰으며, 이는 아무것도 처리하지 않은 정상군의 TNF-α 보다 더 낮은 발현량을 보여주었다(Figure 6B).

7. 패모 추출물이 MAPK 신호전달 기전에 미치는 영향

패모 추출물이 MAPK의 신호전달에 미치는 영향을 분석해 본 결과, A23187을 단독처리했을 때 p-ERK, p-JNK, p-p38의 발현을 증가시켰으며, 패모 추출물 400 μg/ml의 전처리는 p-JNK와 p-p38의 발현을 유의하게 억제하였다(Figure 7).

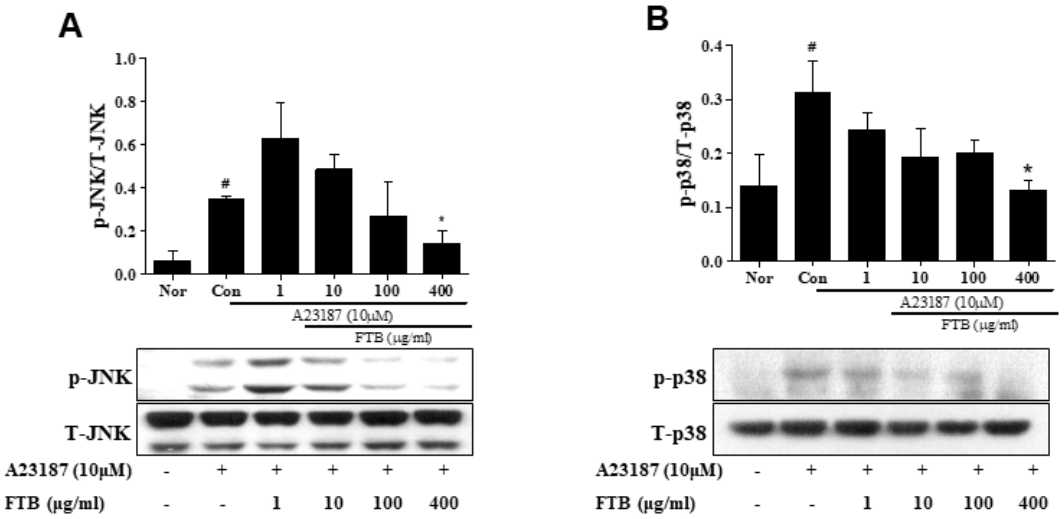
Ⅳ. 고 찰

절패모는 고한(苦寒)한 성미(性美)가 강한 본초로, 개설(開泄)시키는 작용이 크고, 청화산결(淸火散結) 시키는 효능이 강하여, 외감풍열(外感風熱)과 담화(淡火)의 울결(鬱結)로 인한 해수(咳嗽)와 나력옹종(瘰癧癰腫)등 증에 많이 응용하여 치료한다[15]. 이러한 패모의 효능을 바탕으로 패모의 효능에 대한 선행연구 결과, 패모와 패모의 주요 성분인 peimine이 HMC-1 세포에서 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 것을 확인하였고[13], 또한 패모의 다른 주요 성분인 peiminine이 아토피에 효능을 갖는 것을 확인하였다[14]. 이에 본 연구에서는 패모가 피부질환에 관여하는 각질형성세포인 HaCaT 세포와 쥐의 호염기성 백혈병 비만세포인 RBL2H3 세포에서 케



RBL2H3 cells were pretreated FTB for 1h, and stimulated with A23187 for 30m. Cultured media was harvested and ELISA kits were used to assay production of IL-4 and TNF-α. Values are mean ± SEM of three independent experiments. ##p<0.01 vs. Nor. *p<0.05 vs. Con.

Figure 6. Effect of FTB on IL-4 and TNF-α in RBL2H3 cells



RBL2H3 cells were pretreated FTB for 1h, and stimulated with A23187 for 30m. Cells were harvested and phosphorylation of JNK and p38 were investigated by Western blot using specific antibodies. Expressions of phosphorylated protein were normalized to total form. Values are mean ± SEM of three independent experiments. #p<0.05 vs. Nor. *p<0.05 vs. Con.

Figure 7. Effect of FTB on activation of JNK and p38 in RBL2H3 cells

모카인, 피부 보호 장벽, 그리고 염증성 사이토카인의 분비에 어떠한 영향을 미치는지 분석하였다.

알레르겐이 체내에 침투하면, 각질형성세포는 TSLP를 분비하여, 수지상 세포를 자극해 TARC와 MDC의 생성을 증가시킨다[16]. TARC와 MDC는 알레르기 염증과 아토피 피부염, 알레르기 천식, 알레르기성 비염에서 유의하게 증가하는 지표로 호산구, 비만세포, Th2 세포들을 염증 부위로 이동시키는데 중요한 역할을 한다[17]. 패모가 이런 TARC와 MDC의 발현에 미치는 영향을 분석해 본 결과, 패모는 TNF-α/IFN-γ에 의해 증가 된 TARC와 MDC의 분비를 유의하게 억제하였다. 이는 패모가 알레르기 염증에 관여하는 케모카인의 분비를 억제하여 염증성 세포를 염증 부위로의 이동을 억제시킴으로 염증 반응을 개선할 수 있다는 것을 의미한다.

피부 장벽의 손상은 알레르겐의 침투를 용이하게 하며, 아토피 피부염과 같은 피부질환을 유도한다고 알려져 있다. Filaggrin과 involucrin은 피부 장벽의 주요 구성 단백질로 피부 장벽의 손상 시 발현이 감소되며, filaggrin의 변이는 아토피 피부염, 천식, 알레르기 비염의 주 소인으로 보고되었다[18]. Aquaporin은 각질형성세포에서 생성되는 물과 글리세롤 운반 단백질로 각질형성세포의 이동과 분화에 관여하며, 피부 장벽 기능 회복에 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다[19, 20]. 본 실험에서는 패모가 피부 장벽 보호 단백질인 filaggrin과 involucrin 그리고 aquaporin-3의 발현에 미치는 효과를 연구해 본 결과, 패모 추출물은 피부 장벽 보호 단백질인 filaggrin과 involucrin의 발현을 증가시키고, 피부 장벽 기능 회복에 관여하는 aquaporin의 발현을 유의하게 증가시켰다. 따라서 본 결과는 패모가 각질형성세포의 분화를 촉진시켜 피부의 물리적 장벽의 형성을 증가시키고, 피부 장벽의 기능을 개선할 수 있음을 의미한다.

비만세포는 피부나 점막의 결합조직에 가장 많이 분포하고 있는 세포로, 염증 매개체로 알려진 β-hexosaminidase, histamine, IL-4, IL-5, TNF-α와 같은 화학물질들이 호염기과립 내에 함유되어 있으며, 이들은 비만세포가 활성화될 때 방출된다[1]. β-hexosaminidase는 비만세포가 활성화될 때 histamine과 함께 부수적으로 분비되는 효소로 비만세포 탈과립의 생물학적 지표이다[21]. IL-4 와 TNF-α는 비만세포 과립내에 저장되어있는 중요한 염증성 사이토카인으로, IL-4는 즉시형 과민반응을 유발 및 IgE 합성을 유발할 수 있으며, 알레르기 반응을 유지하는 데 중요한 역할을 한다[22]. 또한 비만세포에서 분비되는 TNF-α는 혈관 내피세포에 작용하여 ELAM-1의 발현 및 백혈구의 혈관 외 유주를 유도함으로, 알레르기 국소의 염증 반응에 중요한 역할을 한다[23]. 본 연구에서 패모가 비만세포의 탈과립 및 사이토카인 방출에 미치는 영향을 분석해 본 결과, 패모 추출물은 A23187에 의해 분비되는 β-hexosaminidas, IL-4 그리고 TNF-α의 세포 외 방출을 유의하게 억제하였다.

세포는 외부의 자극을 신호전달 체계를 통해 핵 내로 전달시키며, 이중 MAPK는 인산화 과정을 통해 전사조절인자들을 활성화한다[24]. MAPK는 ERK, JNK, P38의 복합체로 이루어져 있으며, ERK는 비만세포에서 IL-13의 생산에 중요한 역할을 하며, JNK는 T세포를 활성화시키는 역할을 하며, p38은 IL-4의 생성에 중요한 역할을 한다[25].

본 실험에서 패모가 세포 신호전달에 미치는 영향을 분석해 본 결과, 패모 추출물은 RBL2H3 세포에서 A23187에 의해 증가된 JNK와 p38의 인산화를 억제하였다. 이는 앞서 보고된 HMC-1 세포에서의 MAPK 인산화 억제를 통한 패모의 염증성 사이토카인의 분비 억제 연구 결과[10]와 패모의 주요 성분인 peimine의 알레르기성 항염증 효능[13]의 결과를 뒷받침하는 것으로 볼 수 있다.

이를 종합해 보면, 패모는 HaCaT 세포에서 TARC와 MDC의 발현을 억제하여, 염증 관련 세포의 염증 부위로의 이동을 억제하여, 염증 증상을 완화시킬 수 있으며, 피부 장벽 보호 단백질의 형성을 증가시켜 외부로부터의 알레르겐의 침입을 억제할 수 있다는 것을 의미한다. 또한 패모는 RBL2H3 세포

에서 비만세포의 탈과립을 억제할 뿐만 아니라, JNK와 p38의 인산화를 억제하여 염증성 사이토카인인 IL-4와 TNF-α의 발현을 억제하며 염증 반응을 완화시킬 수 있으며 또한 아토피 피부염 치료를 위한 후보물질로의 가능성을 확인하였다.

Ⅴ. 결 론

본 연구는 HaCaT 세포와 RBL2H3 세포에서 항염증 효과를 검증하기 위해, HaCaT 세포에서 TARC, MDC, 피부 보호 장벽 조절의 발현과 RBL2H3 세포에서 β -hexosaminidase의 방출 및 염증성 사이토카인인 IL-4와 TNF-α의 발현을 분석하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1. 패모가 Th2 세포의 염증 부위로 이동 및 침윤에 관여하는 대표적인 Th2 케모카인인 TARC와 MDC의 발현을 억제하는 것을 확인하였다.
2. 패모가 피부의 물리적 장벽을 이루는 단백질인 filaggrin, involucrin과 표피 세포의 수분을 유지하는 데 중요한 역할을 하는 aquaporin의 발현을 유의하게 증가시키는 것을 확인하였다.
3. 패모가 비만세포의 탈과립 지표인 β-hexosaminidase의 방출과 염증성 사이토카인인 IL-4와 TNF-α의 발현을 유의하게 억제하였다.
4. 패모는 MAPK의 신호전달 중 JNK와 p38의 인산화를 억제하였다.

결과적으로 패모는 항염증 효과를 갖고 있으며, 이는 MAPK의 신호전달 중 JNK와 p38의 인산화를 억제하여 염증성 사이토카인의 발현을 억제하며, 각질형성세포의 보습 기능을 활성화시켜 알레르기성 피부염의 유발을 억제하는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 경제협력권산업 육성사업으로 수행된 연구 결과입니다. (과제번호: R0006233)

References

1. Ross MH, Pawlina W. Histology : A Text and Atlas. bioscience. 2005 : 532-534.
2. Oh JS, Jang HH. Epidermal Differentiation and Skin Barrier. Asian Journal of Beauty and Cosmetology. 2015 ; 13 : 713-20.
3. Gandhi NA, Pirozzi G, Graham NMH. Commonality of the IL-4/IL-13 pathway in atopic diseases. Expert review of clinical immunology. 2017 ; 13 : 425-37.
4. Lee BK, Moon SJ, Kim H-S, Jung Y-S. Anti-Atopic Activities of Mixture Herbal Aqua Extracts. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2018 ; 47 : 1021-8.
5. Kim Hm, Um JY, Jung HJ, Hong, Sh. Immunity & Allergy. Shin IL books. 2018 : 159-173.
6. Jung MJ, Choi YW, Chung BY, Park CW, Kim HO. Pathophysiology and new treatment of itch. Journal of the Korean Medical Association. 2018 ; 61 : 670-7.
7. Smith J, Thompson N, Thompson J, Armstrong J, Hayes B, Crofts A, Squire J, Teahan C, Upton L, Solari R. Rat basophilic leukaemia (RBL) cells overexpressing Rab3a have a reversible block in antigen-stimulated exocytosis. The Biochemical journal. 1997 ; 323 (Pt 2) : 321-8.
8. Kim, YH. New herbology. Hanol publisher. 2014 : 588-9.
9. Seo J-Y, Kim J-S, Kim K-L. Anti-inflammatory Effects and Innate Immunity Suppression by *Fritillaria ussuriensis* Extracts. Asian Journal of Beauty and Cosmetology. 2018 ; 16 : 10-9.
10. Cho, IH, Lee, MJ, Kim, JH, Han, NY, Shin, KW, Sohn, Y, and Jung HS. *Fritillaria ussuriensis* Extract Inhibits the Production of Inflammatory Cytokine and MAPKs in Mast Cells. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 2011 ; 75(8) : 1440-5.
11. Wu X, Chan SW, Ma J, Li P, Shaw PC, Lin G. Investigation of association of chemical profiles with the tracheobronchial relaxant activity of Chinese medicinal herb Beimu derived from various Fritillaria species. Journal of ethnopharmacology. 2018 ; 210 : 39-46.
12. He J, He Y, Zhang AC. Determination and Visualization of Peimine and Peiminine Content in *Fritillaria thunbergii* Bulbi Treated by Sulfur Fumigation Using Hyperspectral Imaging with Chemometrics. Molecules. 2017 ; 22(9). pii:E1402.
13. Park JH, Lee B, Kim HK, Kim EY, Kim JH, Min JH, Kim S, Sohn Y, Jung HS. Peimine Inhibits the Production of Proinflammatory Cytokines Through Regulation of the Phosphorylation of NF-κB and MAPKs in HMC-1 Cells. Pharmacognosy Magazine. 2017 ; 13(2) : s359-64.
14. Lim JM, Lee B, Min JH, Kim EY, Kim JH, Hong S, Kim JJ, Sohn Y, Jung HS. Effect of peiminine on DNCB-induced atopic dermatitis by inhibiting inflammatory cytokine expression in vivo and in vitro. International immunopharmacology. 2018 ; 56 : 135-42.
15. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine schools. Herbology. Younglim publisher. 2004 :

503-4.
16. Lee A. Immunologic Barrier in Skin of Atopic Dermatitis. Atopic Dermatitis Symposium. 2010 : s143-48.
17. Sandoval-Lopez G, Teran LM. TARC: novel mediator of allergic inflammation. Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 2001 ; 31 : 1809-12.
18. Kim H, Shin JU, Lee KH. Atopic dermatitis and skin barrier dysfunction. Allergy, Asthma & Respiratory Disease. 2013 ; 1 : 20-8.
19. Sugiyama Y, Ota Y, Hara M, Inoue S. Osmotic stress up-regulates aquaporin-3 gene expression in cultured human keratinocytes. Biochimica et biophysica acta. 2001 ; 1522 : 82-8.
20. Roudier N, Bailly P, Gane P, Lucien N, Gobin R, Cartron JP, Ripoche P. Erythroid expression and oligomeric state of the AQP3 protein. The Journal of biological chemistry. 2002 ; 277 : 7664-9.
21. Fukuishi N, Murakami S, Ohno A, Yamanaka N, Matsui N, Fukutsuji K, Yamada S, Itoh K, Akagi M. Does beta-hexosaminidase function only as a degranulation indicator in mast cells? The primary role of beta-hexosaminidase in mast cell granules. Journal of immunology. 2014 ; 193 : 1886-94.
22. McLeod JJ, Baker B, Ryan JJ. Mast cell production and response to IL-4 and IL-13. Cytokine. 2015 ; 75 : 57-61.
23. Govan ADT. Pathology illustrated. Korea medical book. 1991 : 29.
24. Chang TW, Shiung Y-Y. Anti-IgE as a mast cell-stabilizing therapeutic agent. Current reviews of allergy and clinical immunology. 2006 ; 117 : 1203-12.
25. Gary LJ, Razvan L. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinase. Science. 2002 ; 298(5600) : 1911-2.