

생약복합조성물(HemoHIM)의 사람 비만세포주 활성 억제 효과

김종진 · 조성기¹ · 정우희¹ · 박혜란¹ · 이성태*

순천대학교 생명산업과학대학 생물학과, ¹한국원자력연구원 정읍 방사선과학연구소 방사선생명공학연구부

Received October 14, 2009 / Accepted October 26, 2009

Inhibitory Effects of a Herbal Composition (HemoHIM) on the Activation of Human Mast Cell Line (HMC-1). Jong-Jin Kim, Sung-Kee Jo¹, Uhee Jung¹, Hae-Ran Park¹ and Sung-Tae Yee*. Dept. of Biology, College of Life Science and Natural Resources, Sunchon National University, 413 Jungangno, Suncheon, 540-742, Korea, ¹Radiation Research Division for Bio-Technology, Advanced Radiation Technology Institute, Jeongeup campus of Korea Atomic Energy Research Institute, 1266 Sinjeong-dong, Jeongeup, 580-185, Korea - In our previous study, a new herbal preparation (HemoHIM) was developed as a functional food for the radioprotection and immunomodulatory agents. In order elucidate the mechanism involved, we examined the effect of HemoHIM on the compound 48/80-induced histamine release, and on the phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/calcium ionophore (A23187)-induced inflammatory cytokine secretion in HMC-1. The cell culture supernatants were harvested, and the cytokines (IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF) in the supernatants were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The total RNA of the cells was extracted, and the cytokines or c-kit/tryptase/Fc ϵ RI's messenger RNA expressions were examined using reverse transcriptase polymerase chain reaction. Under low concentrations, HemoHIM inhibited histamine release in HMC-1 stimulated compound 48/80. Furthermore HemoHIM inhibited PMA/A23187-induced inflammatory cytokines' secretion or mRNA expression in a dose-dependent manner. But IL-8 secretion was not inhibited by low concentration of HemoHIM, respectively. The mRNA expression of c-kit and Fc ϵ RI were also inhibited in a dose-dependent manner. Tryptase mRNA expression was only inhibited by low concentration of HemoHIM. These results indicated that HemoHIM might be an useful agent for protection against allergy as well as immune modulation, especially since it is a relatively nontoxic natural product.

Key words : HMC-1, HemoHIM, histamine, inflammatory cytokine, allergy

서 론

알레르기는 과민반응(hypersensitivity reactions)이라고 하는 면역반응 중의 하나이다[30]. 이때, 면역반응이란 조직손상을 유발하며 심각한 질병을 일으킬 수 있는 유해한 면역반응을 말한다. 알레르기 반응은 무해한 항원, 즉 알레르겐(allergen)에 반응하여 생성된 IgE 항체를 가진 사람이 동일한 알레르겐에 계속적으로 노출되었을 때 일어난다. 알레르겐은 이미 노출된 조직에 있는 IgE 결합 비만세포를 활성화시켜, 알레르기(allergy)의 특징적인 반응이 연속적으로 일어나게 한다[25]. 특히, IgE는 기생충에 대한 방어면역에 관여하는데 저개발국가에서 흔한 현상이다. 그러나 선진국에서는 무해한 항원에 대한 IgE 반응이 우세하며 알레르기는 가장 흔한 질병들 중의 하나이다. 비만세포는 IgE에 의해 일어나는 type I 알레르기 반응에서 중요한 역할을 하고 있으며, 비만세포 표면에 존재하는 IgE 수용체에 결합한 IgE에 알레르겐이 결합하면, histamine 분비뿐만 아니라, 염증성 cytokine의 생성 증가하여 염증반응을 유도한다[2]. 또한 비만세포의 분화 증식 인

자인 c-Kit와, 단백분해효소인 tryptase의 발현이 증가하며 [22,29], 염증성 cytokine은 다른 염증매개물질을 통하여 염증반응을 유발 할 수 있다. 이러한 알레르기 질환은 산업화에 따른 환경 알레르기원의 지속적인 자극과 더불어 식생활의 변화가 주요인으로 생각되고 있다.

본 연구팀에서는 동양의학에서 사용되고 있는 다양한 생약재 및 한약처방제의 방사선에 대한 보호 효과를 보고한 바 있으며[7,12-16,19,24], 최근에 식품 원료로 사용 가능한 생약재 3종 당귀, 천궁, 백작약을 이용하여 새로운 생약복합물(HIM-I)을 개발하여 면역세포 활성화 효과, 면역·조혈계 회복촉진 효과, 재생조직 및 면역조혈계의 방어 효과, 항산화 효과에 대해 보고하였다[27]. 그리고 HIM-I에서 면역 및 조혈기능 활성화 효과가 강화된 새로운 생약복합조성물을 개발하고자 HIM-I에 그 조다당 분획이 첨가된 HemoHIM을 제조하였다. 생약복합조성물(HemoHIM)은 방사선에 의해 유발된 위장관 및 면역계 조직의 손상을 감소시켜 생존을 증가시키는 면역조혈세포 방호 및 회복촉진 효과가 높은 것으로 관찰되었다[8]. 그리고 암세포 치료를 위해 투여하는 화학치료제와 HemoHIM을 함께 투여하였을 때, 화학치료제의 독성을 줄이면서 항암 효과를 증가시키는 효과도 확인하였다[26].

본 실험은 생약복합조성물인 HemoHIM의 알레르기 억제

*Corresponding author

Tel : +82-61-750-3618, Fax : +82-61-750-3208

E-mail : sungtae@sunchon.ac.kr

효과를 체계적으로 평가하기 위한 목적으로, 사람 비만세포주 HMC-1의 histamine 및 염증성 cytokine인 IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF의 분비 억제에 미치는 효과와, 비만세포 분화 증식 유전자인 c-Kit와 단백분해효소 tryptase의 발현 억제 정도를 측정하여 HemoHIM의 항알레르기 효과를 검증하는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

사용 시약

세포 배양에 필요한 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)과 항생제는 Gibco (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였으며, fetal bovine serum (FBS)는 Hyclone (Logan, UT, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 2-mercaptoethanol(2ME)과 sodium bicarbonate (NaHCO_3), compound 48/80, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), A23187 (calcium ionophore)는 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 또한 cytokine 측정에 필요한 항체는 PharMingen (San Diego, CA, USA)에서 구입하였으며, RT-PCR에 필요한 시약 reverse transcriptase, dNTP Mixure, oligo (dT) 15 primer, *Taq*. DNA polymerase 등은 Promega (Madison, WI, USA) 제품을 사용하였다.

세포주 배양

사람 비만세포주 HMC-1은 IMDM 배지에 NaHCO_3 (3.024 g/l, 항생제(100 units/ml penicillin G sodium, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin sulfate, 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin B), 2-ME (50 μM)가 첨가된 10% FBS 배지를 이용하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다.

생약복합조성물(HemoHIM) 및 분획의 제조

생약복합조성물(HemoHIM)은 아래와 같은 방법으로 제조한 시료를 (주)선바이오텍에서 제공받아 사용하였다. 서울 경동 한약재 시장에서 구입한 생약재 3종, 즉 당귀(Danggui, *Angelica gigas* Nakai)의 뿌리, 천궁(Chuanxiong, *Cnidium officinale* Makino)의 근경, 백작약(Baishaoyao, *Paeonia japonica* Miyabe)의 뿌리를 동일한 무게비율로 혼합한 후, 혼합 생약재 100 g당 중류수 1,000 ml을 가하고 4시간 열탕 추출하였다. 추출물의 고형분을 제거하고 감압농축하여 생약복합물 HIM-I를 얻었다. HIM-I의 일부를 취하여 4배 부피의 100% 에탄올 주정을 첨가하고(최종 에탄올 농도 약 80%), 25°C 이하에서 16시간 정치한 후, 원심분리하여 침전된 조다당 분획(HIM-I-P)과 상층의 에탄올 분획(HIM-I-E)을 수거하였다. 수거한 조다당 분획의 일부를 이에 해당하는 HIM-I에 첨가하여 생약복합조성물 HemoHIM을 제조하였다. 제조한 HemoHIM은 동결건조하여 냉동 저장하였으며, 실험 직전에 중류수에 녹여 사용하였다.

히스타민 분비량 측정

사람 비만세포주 HMC-1 (3×10^6 개)에 시료를 농도별로 처리하여 37°C에서 30분 동안 배양한 다음, compound 48/80 (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하여 20분 동안 반응시켰다. Compound 48/80을 처리한 세포는 가볍게 원심 분리하여 상층액을 수거하였고, 상층액에 포함된 히스타민은 OPT와 반응시킨 후 측정하였다. 즉 상층액 속에 포함된 histamine의 양을 측정하기 위해 상층액 500 μl 에 0.5N HClO_4 2ml를 넣고 혼합한 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리였다. 원심분리한 상층액 2 ml에 6N NaOH 0.2ml, butanol-chloroform (3:2) 3.3 ml과 NaCl 을 넣고 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리한다. 원심 분리한 상층액의 윗층 3 ml에 *n*-heptane 3 ml과 0.1N HCl 1.2 ml을 넣고 혼합한 후 100°C에서 10분간 끓인 다음, 3,000 rpm에서 5분 원심 분리하여 아래층을 파스퇴르 피펫으로 수거하였다. 수거한 용액에 0.1N HCl 1 ml과 1N NaOH 0.3 ml, 0.2% OPT 0.2 ml 넣고 냉암소에서 45분 간 반응시킨 다음, 0.5N H_2SO_4 0.28 ml을 넣어 반응을 종결 시킨 뒤 형광광도 측정기(Spectrofluorophotometer, Shimadzu, Japan)로 excitation 350 nm, emission 440 nm에서 석영 큐벳을 사용하여 측정하였다.

염증성 사이토카인 측정

사람 비만세포주 HMC-1 (5×10^5 개)에 시료를 농도별로 처리한 후, 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 시료를 처리한 세포는 다시 PMA (25 ng/ml)와 A23187 (1 μM)을 첨가하여 24시간 동안 반응시킨 후 배양 상층액을 수거하였다. 상층액에 포함된 TNF- α , GM-CSF, IL-6, IL-8의 양은 효소항체법(enzyme-linked immunosorbent assay)을 이용하여 측정하였다. 즉, 일차항체 anti-TNF- α , GM-CSF, IL-6, IL-8 mAb를 coating buffer (0.1M NaHCO_3)에 희석하여 plate에 적정량을 넣고 4°C에서 하룻밤 둔 다음, washing buffer (0.05% Tween 20/PBS)로 세척한 다음, 10% FCS를 첨가한 PBS로 2시간 동안 blacking하였다. 다시 세척 후 배양 상층액을 적절하게 희석하여 넣어 반응시키고, 4시간 후에 washing 용액으로 세척하고 이차 항체 biotin-conjugated anti-TNF- α , GM-CSF, IL-6, IL-8 mAb를 첨가하였다. 다시 1시간 후에 washing용액으로 세척한 다음, avidin-peroxidase를 첨가하고, 기질(2, 2'-azino-bis, 0.1M citric acid, H_2O_2)를 넣어 발색시켜서 Microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 이용하여 환산하였다. 이때 각 사이토카인의 측정 한계치는 10 pg/ml이었다.

mRNA 발현량 측정

사람 비만세포주 HMC-1 (3×10^6 개)에 시료를 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양한 후, PMA (25 ng/ml)와 A23187 (1 μM)로 2시간 동안 자극하였다. 자극한 세포를 모아 원심분리하여 상층액을 제거하고, RNA

zol을 이용하여 RNA를 추출하였다. Total RNA 1 µg을 75°C에서 5분간 변성시킨 후, dNTP (1 mM), oligo (dT)15 (0.5 µg), AMV reverse transcriptase (20 U), RNase inhibitor (0.5 U), RT buffer, MgCl₂ (5 mM)와 DEPC로 처리된 중류수로 최종 부피가 20 µl가 되도록 하여, 42°C에서 30분간 반응시켜 cDNA를 합성하여 효소중합연쇄반응에 사용하였다. 효소중합연쇄반응은 합성된 cDNA 2 µl을 주형으로 FcεRIα, tryptase, c-kit 와 GAPDH의 sense primer와 antisense primer (15 pmol), Taq polymerase (0.5 U), polymerase buffer를 DEPC로 처리된 중류수로 최종 부피가 20 µl되도록 하여 predenaturation; 95°C 5분, denaturation; 94°C 1분, annealing; 55°C 30초, elongation; 72°C 1분을 40 cycle한 다음, postelongation을 72°C에서 5분하는 조건으로 수행하였다. 효소중합연쇄반응의 product는 20 µl 씩 2% agarose gel에 loading하여 100 V에서 40분간 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하여 UV 하에서 관찰하였다. 전기영동 밴드의 밀도는 Densitometer (Bio-Rad Laboratories, Inc. Gel Doc™ XR)를 이용하여 측정하고 대조군에 대한 상대적 밀도를 측정하였다.

각 primer의 염기서열은 아래와 같다.

FcεRI: sense CTT AGG ATG TGG GTT CAG AAG T
antisense GAC AGT GGA GAA TAC AAA TGT CA
Tryptase : sense GGA GCT GGA GGA GCC CGT GA
antisense ACC TGG GTA AGG AAG CAG TGG TG
c-kit : sense CGT TGA CTA TCA GTT CAG CGA G
antisense CTA GGA ATG TGT AAG TGC CTC C
GAPDH: sense GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG
antisense GCT GTA GCC AAA TTC GTT GTC

결과 및 고찰

히스타민 측정

비만세포는 항원 자극이나 calcium ionophore A23187, compound 48/80 등과 같은 다양한 약제들, 또는 보체 활성화 과정에서 생기는 분해산물인 C3a, C5a와 같은 anaphylatoxin에 의해 활성화된다[30]. 활성화된 비만세포 내로 칼슘유입이 증가하면, 비만세포 내 히스타민, 세로토닌, 가수분해효소 등의 염증성 매개물질이 세포 밖으로 분비된다[4]. 또한 활성화된 비만세포의 phospholipase A2에 의해 세포막의 phosphatidyl choline○ arachidonic acid로 전환되고, arachidonic acid는 cyclooxygenase와 5-lipoxygenase pathway를 통해 prostaglandin D2, leukotriene C4, leukotriene D4, leukotriene E4 등의 매개물질들을 분비하여 알레르기를 유발한다[30]. 비만세포를 활성화시키는 compound 48/80은 phenethylamine의 혼합 당체로서 세포 외 칼슘이 세포 내로 유입되는 것을 유발한다 [34,35]. 세포 내 칼슘이온의 농도가 증가하면 다양한 2차 신호 전달물질에 세포 내부로 신호가 전달되어 비만세포의 탈관

이 일어나 히스타민이 분비된다[20]. 따라서 사람 비만세포주 HMC-1에 HemoHIM을 농도별로 처리한 후에 compound 48/80으로 히스타민 분비를 유도하여 HemoHIM의 히스타민 분비 억제 효과를 관찰하였다. 그 결과, 대조군 7.42±0.91 ng/ml에 비해 compound 48/80을 처리한 실험군은 26.49±0.55 ng/ml로 히스타민 분비량이 증가하였다(Table 1). 여기에 HemoHIM 0.1, 1, 10 µg/ml을 처리한 실험군에서는 약 25%, 38%, 12% 정도 히스타민 분비가 억제되는 것을 관찰하였으며, 특히 HemoHIM 1 µg/ml에서 가장 억제 효과가 큰 것으로 나타났다. 그러나 고농도인 100 µg/ml을 처리하였을 때는 히스타민 분비량이 약간 증가하는 것으로 나타났다. 이는 HemoHIM이 다양한 종류의 생리활성 성분을 포함한 복합조성물이기 때문에 농도에 따라 히스타민 분비를 억제하는 성분과 촉진하는 성분의 균형이 달라지기 때문에 생각되며, 복합조성물에서 억제성분만을 분리 정제할 필요성이 있다고 판단된다. 천연 식물인 복분자[21], 상백과[20], 조각자나무[33], 연명초[17] 등의 추출물도 동일하게 비만세포의 히스타민 분비를 억제한다는 보고도 있다. 또한 항산화물질이 비만세포의 히스타민 분비를 억제한다는 보고[31]가 있으며, HemoHIM의 항산화 효과[27]도 증명되었기 때문에, 이러한 비만세포의 히스타민 분비 억제 효과는 HemoHIM에 함유된 항산화물질에 의한 것일 가능성도 있다고 생각된다. 알레르기 억제제는 비만세포 내로 칼슘 유입을 억제하거나 비만세포 내 칼슘저장소에서 세포질 내로의 칼슘 유출을 억제하여, 세포 내 칼슘의 양을 감소시켜 히스타민 분비를 억제하는 것으로 알려져 있다[9]. 따라서 HemoHIM의 세포 외 칼슘 유입 또는 세포질 내 칼슘 유출 억제 효과에 대한 연구도 필요하다고 생각된다.

사이토카인 분비량 측정

알레르기 반응에는 비만세포를 포함하는 다양한 면역세포가 관여하는데, 이를 세포는 IL-6, TNF-α, GM-CSF 등과 같은 염증성 사이토카인을 분비한다[2]. TNF-α는 비만세포가 활성

Table 1. Effects of HemoHIM on histamine release in HMC-1

	Concentrations (µg/ml)	Compound 48/80	Histamine
			(ng/ml)
	0	(-)	7.42±0.91
HemoHIM	0.1	(+)	26.49±0.55
		(+)	21.71±1.55
	1	(+)	19.20±0.78
	10	(+)	24.10±0.16
	100		31.30±0.11

HMC-1 cells (3×10^6 cells) were cultured with or without HemoHIM for 30 min, and then stimulated with compound 48/80 (300 µg/ml) for 20 min at 37°C. After stimulation, the histamine contents were quantified using an automated fluorometric method.

Table 2. Effects of HemoHIM on the inflammatory cytokines secretion in HMC-1 cell

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PMA/ A23187	Cytokines			
		IL-6 (pg/ml)	IL-8 (ng/ml)	TNF- α (pg/ml)	GM-CSF (ng/ml)
HemoHIM	0 (-) (+)	<10	<10	<10	<10
		1,830.0 \pm 106.1	8.9 \pm 0.2	789.4 \pm 31.4	3.0 \pm 0.4
	0.1 1 10	1,080.0 \pm 53.0	9.3 \pm 0.1	375.6 \pm 27.5	2.0 \pm 0.1
		1,230.0 \pm 0.0	9.0 \pm 0.1	447.8 \pm 3.9	2.2 \pm 0.0
		1,061.3 \pm 26.5	8.6 \pm 0.0	347.8 \pm 19.6	1.7 \pm 0.0
	100	1,155.0 \pm 53.0	7.3 \pm 0.0	378.3 \pm 23.6	1.6 \pm 0.1

Cells (5×10^5 cells) were pretreated with or without HemoHIM for 24 hr prior to PMA (25 ng/ml) and A23187 (1 μM) stimulation and incubated additional 24 hr. Cytokines level in supernatants were measured using ELISA.

되면 분비하는 다기능 사이토카인으로 면역반응과 염증반응에 관여하며, IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF와 같은 다른 염증성 사이토카인의 분비를 촉진한다[1,3]. IL-6 역시 강력한 염증반응을 매개하는 강력한 사이토카인이며[5], GM-CSF는 골수계 세포의 분화와 증식을 촉진하는 작용을 한다[23]. 그리고 IL-8은 호중구, 림프구, 호산구의 동원을 촉진하는 화학주성인자로서, 호중구를 활성화시켜 리소좀 효소를 방출하고 활성산소생산을 유발하며, 관절염이나 패혈증 등과 같은 염증성질환에 관여한다[6]. 따라서 히스타민 분비를 억제하는 효과가 있는 HemoHIM이 염증성 사이토카인의 분비도 효과적으로 억제하는지 확인하였다. HemoHIM을 농도별로 HMC-1에 처리한 후에 PMA와 A23187로 사이토카인의 분비를 유도하였다. 그 결과 GM-CSF의 분비량은 HemoHIM을 처리하였을 때, 대조군 2.95 \pm 0.41 ng/ml에 비하여 약 27-45% 정도 분비량이 농도의존적으로 억제되었다(Table 2). 하지만 염증성 케모카인 IL-8의 분비량은 저농도에서는 억제효과가 나타나지 않았지만, HemoHIM 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서만 약 18% 정도 억제되었다. TNF- α 의 경우에 대조군 789.4 \pm 31.4 pg/ml에 비해 HemoHIM을 농도별로 처리하였을 때, 약 43-55% 정도 분비량이 억제되었고, IL-6의 경우에도 대조군 1,830.0 \pm 106.1 pg/ml과 비교하였을 때, HemoHIM의 각 농도에서 약 32-42% 정도 분비량이 억제되는 것을 확인하였다. IL-6와 TNF- α 의 분비량은 실험한 모든 농도에서 비슷한 억제효과를 나타내었는데, 이는 HemoHIM이 두 종류의 사이토카인 생산에 더 민감한 작용을 나타내는 것으로 GM-CSF 분비량과는 다른 신호전달 과정에 관여할 가능성이 있는 것으로 생각된다. 이와는 달리 북강활에틸아세테이트 분획이 TNF- α 와 IL-8의 분비량을 동시에 억제한다는 보고[32]와 오미자 물추출물이 HMC-1의 IL-6, TNF- α , GM-CSF의 분비량을 억제한다는 보고[10]도 있었다. 따라서 이를 추출물과 HemoHIM의 활성성분이 다를 가능성성이 있다고 판단된다.

사이토카인 mRNA 발현량 분석

HemoHIM에 의한 염증성 사이토카인의 분비 억제 효과가

각 사이토카인의 유전자 전사과정을 억제한 결과인지 알아보기 위하여 사이토카인의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR법을 이용하여 비교하였다. IL-6와 GM-CSF의 mRNA 발현량은 사이토카인의 분비량과 같이 HemoHIM 처리에 의해 그 정도가 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 1). 그러나 저농도의 HemoHIM 처리로 분비량이 억제되었던 TNF- α 의 경우에는 저농도에서 mRNA 발현량이 거의 억제되지 않았다. 이러한 결과는 HemoHIM이 비만세포 내에 이미 합성되어 축적된 TNF- α 의 분비를 억제하지만, 활성화된 비만세포가 TNF- α 를 새로 합성하는 것은 억제하지 못할 가능성을 시사하는 것으로 생각된다[1,3]. 그리고 저농도의 HemoHIM에 의해 분비량이 억제되지 않았던 IL-8의 mRNA 발현량이 많이 억제되었다. 즉 분비는 억제하지 못하였지만 IL-8 mRNA 합성은 억제하는 것으로 생각된다. 알레르기성 염증반응의 중요한 전자인자인 NF- κ B가 IL-6, TNF- α , GM-CSF 유전자의 전사를 조절

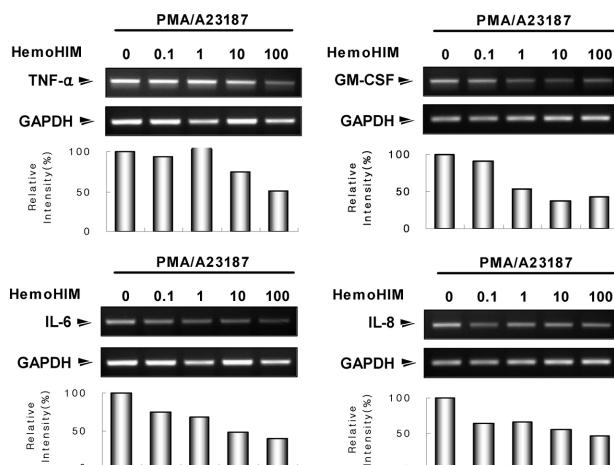


Fig. 1. Effects of HemoHIM on the inflammatory cytokine's mRNA expression in HMC-1. Cells (3×10^6 cells) were pretreated with or without HemoHIM for 24 hr and were then stimulated with PMA (25 ng/ml) and A23187 (1 μM). After an additional 2 hr of incubation, total RNA from cells were carried out RT-PCR.

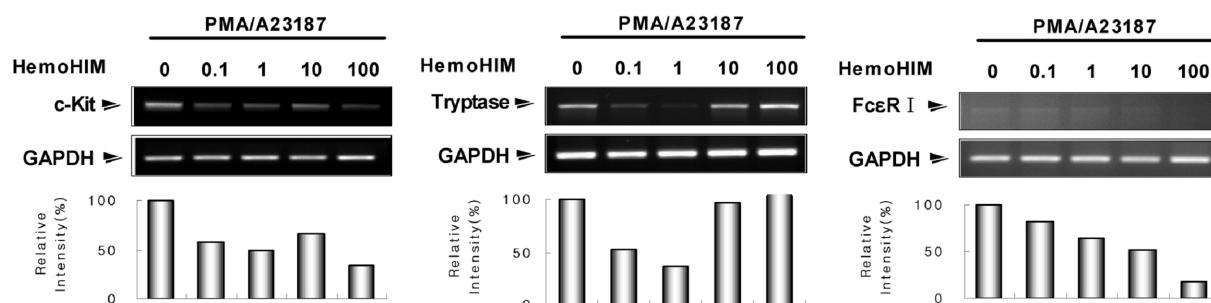


Fig. 2. Effects of HemoHIM on the mRNA expression of c-kit, tryptase and Fc ϵ RI in HMC-1. Cells (3×10^6 cells) were pretreated with or without HemoHIM for 24 hr and were then stimulated with PMA (25 ng/ml) and A23187 (1 μ M). After an additional 2 hr of incubation, total RNA from cells were carried out RT-PCR.

한다고 알려져 있다[28]. 오미자 물추출[10]과 복강활 에틸아세테이트 분획[32]이 세포질 내의 I κ B 분해를 억제하고, NF- κ B가 핵 내로 들어가는 것을 억제한다는 보고가 있기 때문에 NF- κ B에 대한 HemoHIM의 작용을 밝히는 것이 필요하다고 생각된다.

비만세포 특이 유전자의 mRNA 발현량 분석

알레르기 유발 항원의 침입에 대해 T세포가 IL-4를 분비하면 IL-4는 B세포가 IgE를 생성하도록 유도한다[11]. IgE는 비만세포의 Fc ϵ RI이라고 불리는 고친화성 IgE 수용체에 강하게 결합한다. 이때 항원이 비만세포의 Fc ϵ RI에 결합한 IgE에 결합하면, Fc ϵ RI의 교차결합에 의해 비만세포의 화학적 매개물질이 분비되어 알레르기 반응이 일어난다[25]. 단백분해효소 (tryptase)는 비만세포가 활성화되면 빠른 시간에 분비되는 화학적 매개물질로서[29] 최근에는 과민성 쇼크발생시 농도를 측정하여 전신 비만세포 활성화의 진단에 사용하고 있다[18]. 비만세포 막에 있는 Tyrosine kinase인 c-kit은 SCF (stem cell factor)와 결합하여 비만세포의 증식과 분화를 유도하는 수용체이다[22]. 따라서 HemoHIM이 비만세포의 활성화시 분비되는 단백분해효소, IgE에 대한 수용체인 Fc ϵ RI, 그리고 분화증식에 필요한 c-kit의 발현량을 억제하는 효과가 있는지 알아보기 위하여, 각 유전자의 mRNA 발현량을 RT-PCR법으로 확인하였다. 그 결과 c-kit의 mRNA 발현량은 모든 농도에서 약 33-65% 억제되었고, Fc ϵ RI의 mRNA 발현량은 HemoHIM 농도에 의존적으로 억제율이 증가하여 최대 약 82%까지 억제되었다(Fig. 2). 그러나 Tryptase mRNA 발현량은 HemoHIM 1 μ g/ml에서 최대 약 64%까지 억제되었으나, 10, 100 μ g/ml에서는 억제효과가 나타나지 않았다. 히스타민 분비 억제 실험에서도 HemoHIM 1 μ g/ml에서 최대 억제 효과가 나타나고 고농도에서는 억제 효과가 감소하는 현상이 나타났다. 이것은 다당체가 주성분인 HemoHIM이 고농도에서 서로 결합하여 오히려 억제 효과가 감소하여 나타나는 결과일 가능성이 있다고 생각된다.

요약

방사선에 대한 방호와 면역기능 조절을 목적으로 새로운 생약복합조성물인 HemoHIM을 개발하였다. 식품 원료로 사용 가능한 생약재 3종 당귀, 천궁, 백작약의 에탄올 분획을 열수추출물에 첨가하여 HemoHIM을 제조하였다. HemoHIM의 항알레르기 효과를 검증하기 위하여 사람 비만세포주 HMC-1을 사용해 compound 48/80으로 유도되는 히스타민 분비량과 PMA/A23187로 유도되는 염증성 사이토카인의 분비량을 측정하였다. 히스타민의 양은 형광분석법으로, 염증성 사이토카인 IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF의 양은 효소결합 면역측정법으로 측정하였다. 저농도의 HemoHIM에 의해 히스타민 분비량이 억제되었고, 모든 농도에서 IL-6, TNF- α , GM-CSF의 분비량은 억제되었지만 IL-8은 고농도에서만 억제되었다. 사이토카인의 mRNA 발현량은 HemoHIM의 농도 의존적으로 억제되었다. 그리고 c-kit와 Fc ϵ RI의 mRNA 발현량도 모든 농도에서 억제되었지만, tryptase의 mRNA 발현량은 저 농도에서만 억제되었다. 이상의 결과로 HemoHIM이 비만세포의 활성을 억제하는 효과가 있다는 것을 알 수 있었으며, 상대적으로 독성이 적은 항알레르기 제제로 개발할 가능성을 제시한 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력 연구개발 중장기 계획사업 (20090062186)의 지원을 받아 수행하였기에 이에 감사드립니다.

References

1. Arend, W. P. and J. M. Dayer. 1995. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38: 151-160.
2. Barnes, P. J. and I. Adcock. 1993. Anti-inflammatory actions

- of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 436-441.
3. Butler, D. M., R. N. Maini, M. Feldmann, and F. M. Brennan. 1995. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur. Cytokine Netw.* **6**, 225-230.
 4. Caufield, J. P., R. A. Lois, A. Hein, and K. F. Austen. 1980. Secretion in dissociated human pulmonary mast cells. Evidence for solubilization of granule contents before discharge. *J. Cell Biol.* **85**, 29-37.
 5. Erchler, W. B. and E. T. Keller. 2000. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu. Rev. Med.* **51**, 245-270.
 6. Harada, A., N. Mukaida, and K. Matsushima. 1996. Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory disease. *Mol. Med. Today* **2**, 482-489.
 7. Jo, S. K., Y. B. Yu, H. Oh, S. R. Kim, and S. H. Kim. 2000. The effects of Shi-Quan-Dai-Bu-Tang and its ingredients on the survival of jejunal crypt cells and hematopoietic cells in irradiated mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 93-98.
 8. Jo, S. K., H. R. Park, U. H. Jung, H. Oh, S. H. Kim, and S. E. Lee. 2005. Protective effect of a herbal preparation (HemoHIM) on the self-renewal tissues and immune system against γ -Irradiation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 805-813.
 9. Kang, K. J., B. D. Jun, O. H. Chai, and M. S. Lee. 1993. Inhibitory effects of Mori cortex on compound 48/80-induced histamine release and calcium uptake of rat peritoneal mast cells. *Korean J. Immunol.* **15**, 91-99.
 10. Kang, O. K., H. S. Chae, J. H. Choi, H. J. Choi, P. S. Park, S. H. Cho, G. H. Lee, H. Y. So, Y. K. Choo, O. H. Kweon, and D. Y. Kwon. 2006. Effect of the Schisandra fructus water extract on cytokine release from human mast cell line. *J. Med. Food* **9**, 480-486.
 11. Kay, A. B. 2006. The role of T lymphocyte in asthma. *Chem. Immunol. Allergy* **91**, 59-75.
 12. Kim, S. H., S. E. Lee, H. Oh, S. R. Kim, S. T. Yee, Y. B. Yu, M. W. Byun, and S. K. Jo. 2002. The radioprotective effects of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang: A prescription of traditional Chinese medicine. *Am. J. Chin. Med.* **30**, 127-137.
 13. Kim, S. H., S. E. Lee, H. Oh, J. A. Yang, C. Y. Chung, J. S. Jang, Y. B. Yu, and S. K. Jo. 1999. The radioprotective effect of Kuei-Pi-Tang as a prescription of traditional Chinese medicine in mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 698-704.
 14. Kim, S. H., M. R. An, S. Y. Nah, J. H. Lee, J. H. Kim, S. K. Jo, S. J. Jang, and D. H. Shin. 2001. The effects of herbs on the radiation-induced apoptosis in intestinal crypt cells. *J. Korean Assoc. Radiat. Prot.* **26**, 27-33.
 15. Kim, S. H., H. Oh, S. R. Kim, S. K. Jo, M. W. Byun, K. S. Kim, J. H. Lee, and D. H. Shin. 2001. The radioprotective effects of radices herbs. *Korea J. Vet. Res.* **41**, 105-111.
 16. Kim, S. H., H. Oh, E. S. Lee, S. K. Jo, and M. W. Byun. 1998. Effect of Si-Wu-Tang and Si-Jun-Zi-Tang on the survival of jejunal crypt cells and hematopoietic cells in irradiated mice. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 888-894.
 17. Kim, S. H., D. K. Kim, B. S. Chae, and T. Y. Shin. 2003. Inhibitory effect of Isodon japonicus Hara on mast cell-mediated immediate-type allergic reaction. *Kor. J. Pharmacogn.* **34**, 132-137.
 18. Lee, S. W., Y. M. Ye, J. H. Choi, S. H. Kim, C. H. Suh, and D. H. Nahm. et al. 2004. Measurement of serum tryptase in the diagnosis of systemic allergic reaction. *Korean J. Med.* **67**, 185-189.
 19. Lee, S. E., H. Oh, J. A. Yang, S. K. Jo, M. W. Byun, S. T. Yee, and S. H. Kim. 1999. Radioprotective effects of two traditional Chinese medicine prescriptions: Si-Wu-Tang and Si-Jun-Zi-Tang. *Am. J. Chin. Med.* **27**, 387-396.
 20. Lee, M. S., Y. G. Ryu, O. K. Chai, K. J. Kang and J. Y. Lee. 1999. Inhibitory effect of polysaccharide fraction from *Cortex mori* on compound 48/80-induced mast cell activation. *Korean J. Immunol.* **21**, 35-45.
 21. Li, G. Z., O. H. Chai, and C. H. Song. 2004. Inhibitory effect of Rubus coreanus on compound 48/80- or anti-DNP IgE-induced mast cell activation. *Immune. Network* **4**, 100-107.
 22. Makowska, J. S., M. Cieslak, and M. L. Kowalski. 2009. Stem cell factor and its soluble receptor (c-kit) in serum of asthmatic patients-correlation with disease severity. *BMC. Pulm. Med.* **9**, 27-33.
 23. Manning, A. M., F. P. Bell, C. L. Rosenbloom, J. G. Chosay, C. A. Simmons, J. L. Northrup, R. J. Shebuski, C. J. Dunn, and D. C. Anderson. 1995. NF-kappa B is activated during acute inflammation in vivo in association with elevated endothelial cell adhesion molecule gene expression and leukocyte recruitment. *J. Inflamm.* **45**, 283-296.
 24. Oh, H., H. R. Park, I. Y. Jeong, S. H. Kim, and S. K. Jo. 2002. Protective effects of *Paeonia japonica* against radiation-induced damage. *J. Korean Assoc. Radiat. Prot.* **27**, 181-188.
 25. Papageorgiou, P. S. 2002. Clinical aspects of food allergy. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 901-906.
 26. Park, H. R., E. J. Ju, S. K. Jo, U. Jung, S. H. Kim, and S. T. Yee. 2009. Enhanced antitumor efficacy of cisplatin in combination with HemoHIM in tumor-bearing mice. *BMC Cancer* **9**, 1-10.
 27. Park, H. R., S. H. Kim, S. T. Yee, M. W. Byun, and S. K. Jo. 2005. Effects of a herb mixture (HIM-I) on the protection of the hematopoietic-immune system and self-renewal tissues against radiation damage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 605-612.
 28. Pastore, S., E. Fanales-Belasio, C. Albanesi, LM. Chinni, A. Giannetti, and G. Girolomoni. 1997. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin. *J. Clin. Invest.* **99**, 3009-3017.
 29. Payne, V. and P. C. Kam. 2004. Mast cell tryptase. a review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia* **59**, 695-703.
 30. Platts-Mills, T. 2001. Hypersensitivity-Type I, pp. 323-343, In Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male (6th eds.), *Immunology*,

- Gower medical publishing.
31. Scheller, S., S. Dworniczak, T. Pogorzelska, M. Rajca, and J. Shani. 2000. Effect of quercetin, caffeic acid and caffeic acid phenylethyl ester, solubilized in non-ionic surfactants, on histamine release *in vivo* and *in vitro*. *Arzneimittelforschung*. **50**, 72-76.
 32. Seo, U. K., J. I. Lee, J. H. Park, and Y. K. Park. 2008. The ethylacetate extract of north kangwhal (*Ostericum korenum*) attenuates the inflammatory responses in PMA/A23187-stimulated mast cells. *Kor. J. Herbology* **23**, 81-89.
 33. Shin, T. Y. and D. K. Kim. 2000. Inhibitory effect of mast cell-dependent anaphylaxis by *Gleditsia sinesis*. *Arch. Pharm. Res.* **23**, 401-406.
 34. Tasaka, K., M. Mio, K. Izushi, and I. Aoki. 1991. Role of the cytoskeletons on Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} store of rat peritoneal mast cell Skin. *Pharmacol.* **4**, 43-52.
 35. Yoshii, N., M. Mio, M. Akagi, and K. Tassaka. 1991. Role of endoplasmic reticulum, an intracellular Ca^{2+} store in histamine release from rat peritoneal mast cell. *Immunopharmacol.* **21**, 13-24.