두충과 느릅 혼합추출물에 의한 염증 억제 효과

권희정 · 신영민 · 정성린 · 박종석 · 노영창 · 임윤묵*

한국원자력연구원 첨단방사선연구소 공업환경연구부

In Vitro Anti-inflammatory Activities of Herbal Extracts with *Eucommia ulimoides* and *Ulmus davidiana*

Hui-Jeong Gwon, Young Min Shin, Sung-In Jung, Jong-Seok Park, Young-Chang Nho and Youn-Mook Lim*

Research Division for Industry & Environment, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

Abstract - This study confirmed the cytotoxicity and anti-inflammatory activities of natural herbal extracts (HE) including *Eucommia ulimoides* and *Ulmus davidiana* against human mast cell (HMC-1). HE was extracted with distilled water (at 75°C) and then freeze-dried for 5 days. Finally, the HE was sterilized by gamma radiation with ^{60}Co γ source at room temperature. Cytotoxicity of the HE against HMC-1 cell was measured using cell counting kit-8 (CCK-8) assay. In addition, inflammatory cytokines such as TNF-α, IL-6 and IL-8 were evaluated by ELISA kit on the HMC-1 cells with calcimycin A23187 and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). The results showed that HE had no toxicity and reduced TNF-α, IL-6, IL-8 response on HMC-1 cells.

Key words : *Ulmus davidiana*, *Eucommia ulimoides*, Cytotoxicity, Cytokine

서 론

아토피성 피부염은 가장 흔하게 발생하는 소아기 만성 피부질환으로 생후 몇 년 내에 발병한다. 최근 여러 역학연구 결과에 따르면, 지난 30년간에 걸쳐서 산업화된 국가에서 아토피성 피부염 발병률이 증가함을 보이고 있고 난치성 질환이라 짧은 기간 내에 완치하기 어려운 질병으로 알려져 있다 (Shultz and Hanifin 2002). 아토피성 피부염의 발병원인은 면역학적 이상과 생리적 생화학적 피부장벽구조의 결함에 의하여 발병하여, 유전적 및 환경적 이상 등이 복잡하게 연관되어 작용한다. 이 질환은 피부 건조, 소양, 찰상 및 태선, 홍반 등의 소견을 보이며 증상이 심할수록 혈청 내 IgE가 정상인에 비해 증가된다 (Leung and Bieber 2003). 또한 알레르기 증상의 대부분이 비만세포나 호산구가 분비하는 히스타민 등의 염증반응 매개 물질에 의해서 임상적 증상이 나타나며, 아토피성 피부염 환자의 피부조직에서 과도한 각질화와 염증세포의 침윤 등이 관찰된다. 따라서 피부장벽이 제 기능을 하지 못하게 되고 피부 수분함량이 줄어들어 경피의 수분손실이 증가하게 된다 (Kim *et al.* 2006).

아토피성 피부염에 대한 현재까지 알려진 치료방법은 스테로이드제 항히스타민제 도포나 복용 및 최근 개발되고 있는 면역억제제가 사용되고 있으나 장기간 사용의 부작용이 문제점으로 대두되고 있다 (Furukawa *et al.*

* Corresponding author: Youn-Mook Lim, Tel. +82-63-570-3065, Fax. +82-63-570-3079, E-mail. ymlim71@kaeri.re.kr

2004). 일부 동양권에서는 천연 약용식물에서 추출한 몇 몇 성분들을 이용하여 아토피성 피부염을 치료하는데 사용하여 왔다.

두충 (*Eucommia ulimoides*)은 두충나무과에 속하는 1과 1속 1종의 낙엽교목으로서 높이 15 m, 지름 40 cm까지 자란다. 원산지는 중국의 호북, 사천성 등지로 알려져 있으며 우리 나라 중부이남 지역 어디에서나 잘 서식하며 특히 계곡이나 산녹지대 또는 토질이 좋고 수분이 적절한 곳에서 잘 자라며 약용가치가 높아 전국적으로 많이 재배되고 있다. 두충 및 두충차의 약리활성에 관한 연구로는 활성산소종의 소거작용 (Hsieh *et al.* 2000) 및 항산화효과 (Yen *et al.* 2000)가 보고되고 있으며 콜라겐 합성을 촉진시키는 효과 (Li *et al.* 1998), 알파글루코시다아제를 억제하는 기전에 의거한 항당뇨효과 (Watanabe *et al.* 1997), 암발생저해효과 (Nakamura *et al.* 1997), 항보체효과 (Oshima *et al.* 1998) 등이 보고되고 있다.

느릅나무 (*Ulmus davidiana* var. *japonica*)는 이른 봄이나 가을에 뿌리 껍질을 벗겨서 약으로 사용되어 왔다. 분포지역으로는 우리 나라를 비롯하여 일본, 사할린, 쿠릴열도, 중국 북부 및 동시베리아 등이다. 한방에서는 껍질을 유피라는 약재로 사용하며, 치습, 이뇨 소종독의 처방에 사용하고 있다. 유피의 기원식물에는 크게 개느릅나무인 비술나무를 포함한 느릅나무와 시무나무가 있으며 약용부위로 근피와 수피가 함께 사용되고 있다. 유피의 기원식물 중 느릅나무의 효능에 관한 연구로는 항암 및 면역 활성 (Yang and Kim 2001), 항균효과 (Kim *et al.* 2003), 항산화효과 (Lee and Han 2000), 소염진통작용 (Cho *et al.* 1996), 약효 (Hong *et al.* 1990), 위염 및 위궤양 관련 연구 (Lim and Cui 2002)와 성분 연구 (Bae and Kim 2000)가 보고되었으며 시무나무에 있어서는 성분과 항산화활성 (Chang *et al.* 2004)이 보고 되었다.

이처럼 천연 약용식물의 효능이 입증되고 있으나 각 약용식물의 혼합물에 대한 세포독성평가 및 아토피 피부염 완화 및 치료에 관한 자세한 보고는 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 몇 가지 천연 약용식물들을 선별하고 각각을 열수 추출한 뒤, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay를 통해 추출액의 세포독성을 비교 측정하고 ELISA kit를 이용하여 항염증 반응을 확인하여, 향후 아토피성 피부염 완화 및 치료에 활용해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

Cell counting kit-8 (CCK-8)은 Dojindo사 (Kumamoto, Japan) 제품을 이용하였다. Cell culture 100-dish, 96-well plate, 24-well plate는 NUNC사 (Naperville, IL, USA) 제품을 이용하였고, Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Dulbecco's phosphate Bufferd saline (DPBS), Penicillin Streptomycin, Fetal Bovine Serum (FBS), Pen Strep-Penicillin Streptomycin은 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA) 제품을 이용하였다. Calcimycin A23187, PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)은 Sigma-Aldrich co. (St. Louis, Mo, USA) 제품을 이용하였다. Human TNF-α, IL-6, IL-8 ELISA kit는 R&D system (Minneapolis, MN USA) 제품을 이용하였다. 두충과 느릅은 ShinHeung science (Daejeon, Korea)를 통해서 구입하여 사용하였다.

2. 추출물 제조방법

추출용매로는 3차 증류수를 이용하였다. 두충, 느릅을 각각 10 : 0, 8 : 2, 5 : 5, 2 : 8, 0 : 10의 조성비율로 3차 증류수 1 L를 가하여 75°C에서 24시간 동안 열수 추출하였다 (Table 1). 여기서 얻은 추출물을 냉동건조 (−55°C, 5일)시켜 분말로 만든 후 25 kGy (10 kGy hr^{-1})로 방사선 멸균하였다.

3. 세포배양

비만세포 (HMC-1)는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)으로부터 구입하였고, 세포 배양액은 HMC-1 cell을 IMDM에 10% FBS, 100 unit ml^{-1}의 penicillin과 100 unit ml^{-1}의 streptomycin을 첨가한 것을 사용하였다. 배양은 배양기를 이용하여 37°C, 5% CO_2 상태를 유지하였다.

4. 세포독성 실험

추출물의 세포 독성여부 확인은 CCK-8 assay를 이용하여 측정하였다. HMC-1 cell을 96-well plate에 1×10^5 cells $well^{-1}$이 되도록 분주하고 37°C, 5% CO_2 상태로 24시간 배양하였다. 배양 후 96-well plate에 분주된 HMC-1 cell은 추출물을 0 mg ml^{-1}, 0.6 mg ml^{-1}, 1.2 mg ml^{-1}, 1.8 mg ml^{-1}, 2.1 mg ml^{-1}, 2.4 mg ml^{-1}, 2.7 mg ml^{-1}, 또는 3 mg ml^{-1}의 농도로 처리하여 37°C, 5% CO_2 상태로 24시간

Table 1. Composition of herbal extracts mixtures

Group	*Eucommia ulmoides*	*Ulmus davidiana*
I	10	0
II	8	2
III	5	5
IV	2	8
V	0	10

동안 배양한 후 세포독성을 측정하였다.

5. 항염증반응 실험

비만세포는 24-well plate에 1×10^6 cells $well^{-1}$이 되도록 분주하고 PMA 50 nM ml^{-1}와 A23187 1 μM ml^{-1}을 처리한 후 7시간 동안 배양 후, 세포 배양액을 취하여 사이토카인을 측정하였다. 수거된 배지는 측정 전까지 4°C에서 보관하고, TNF-α, IL-6, IL-8 함량은 R&D Systems ELISA kit를 사용하여 측정하였으며, 각 사이토카인의 함량은 표준물질의 반응으로부터 얻어진 표준곡선을 이용하여 환산하였다.

결과 및 논의

1. 추출 혼합물의 세포독성평가

비만세포는 알레르기 반응의 유발에 필수적인 세포로 알려져 있다. 비만세포는 세포질 내 과립을 풍부하게 가진 면역세포로서 결체조직과 점막에 존재하며 알레르기 염증반응에 관여한다. 비만세포는 IgE가 매개하는 면역반응과 관계되어 있으며, 탈과립을 유도하는 물질인 PMA와 A23187에 의해 비만세포가 활성화된다. 특히 외부자극으로부터 활성화된 비만세포는 다양한 히스타민과 프로테아제를 분비하여 혈관을 확장하고, 염증유발물질인 다양한 사이토카인의 분비를 자극한다. 비만세포로부터 분비되는 사이토카인들은 알레르기 염증의 초기와 후기반응을 유발하고 만성염증반응을 지속시키는 데 중요한 역할을 한다(Galli *et al.* 2008). 특히 활성화된 비만세포로부터 후천적으로 생성되는 leukotriene, platelet activating factor prostaglandin (PG) 등은 혈관 투과성과 점액분비물을 증가시키고, 부종을 유발하고, 기도 내 염증세포의 침윤 등을 유발함으로써 실제 알레르기 천식과 직접 연관되는 것으로 알려져 있다(Brown *et al.* 2008).

각 추출 혼합물이 비만세포에 미치는 세포독성을 알아보기 위하여 실시한 실험결과 모든 그룹에서 3.0 mg ml^{-1}의 농도에서 75.0% 이상으로 독성이 없음을 나타내었다(Fig. 1). 따라서 그룹 I, II, III, IV, V은 3.0 mg ml^{-1}의 농도에서 항염증반응 실험을 진행해야 할 것으로 판단되었다.

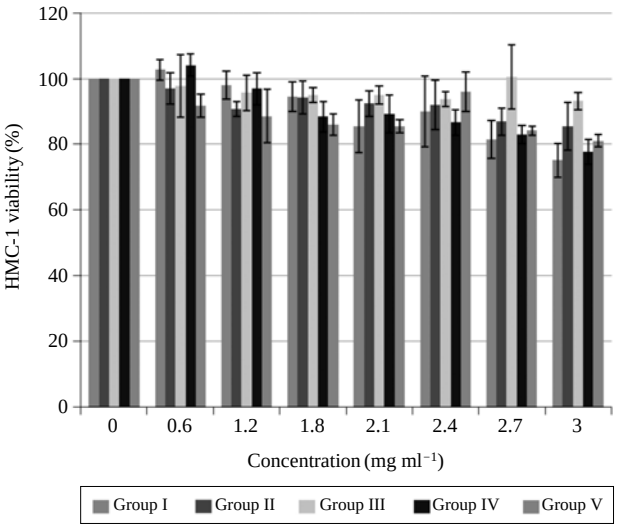

Fig. 1. Cytotoxicity test of herbal extracts mixtures on HMC-1 cell line.

2. 추출혼합물의 항염증반응

본 연구에서 열수 추출한 천연 약용식물에 의해 염증매개물질인 사이토카인의 생성이 억제되는 것을 확인하였다. TNF-α의 경우 그룹 I, II, III, IV, V의 사이토카인 저감률은 각각 61.1%, 70.1%, 79.2%, 94.8%, 97.4%로 느릅의 함량비율이 높아질수록 사이토카인의 생성이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 2). IL-8의 경우도 마찬가지

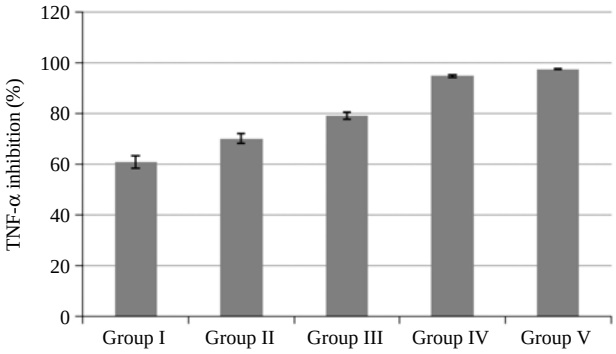

Fig. 2. Effects of extracts on the production of TNF-α in A23187 and PMA stimulated HMC-1 cells.

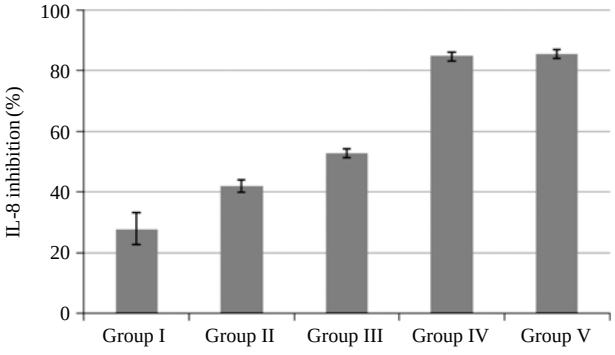

Fig. 3. Effects of extracts on the production of IL-8 in A23187 and PMA stimulated HMC-1 cells.

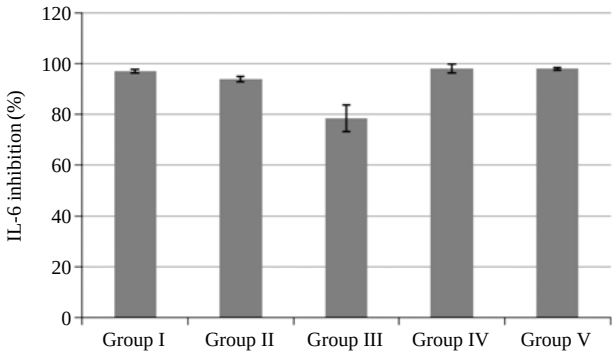

Fig. 4. Effects of extracts on the production of IL-6 in A23187 and PMA stimulated HMC-1 cells.

로, 그룹 I, II, III, IV, V의 사이토카인 저감률은 각각 27.9%, 41.9%, 52.8%, 84.7%, 85.4%로 느릅의 함량비율이 높아질수록 사이토카인의 생성이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 반면 IL-6의 경우에는 두충과 느릅의 혼합비율이 5:5일 때 가장 적은 저감률을 보였다(Fig. 4). 두충과 느릅의 조성의 변화에 따라 TNF-α, IL-8, IL-6의 저감률이 다양한 결과를 보이는데 이러한 추출물간의 차이는 추출물에 유리된 성분의 차이에 의한 것으로 판단된다. 성분의 분석은 추후 실험이 더 필요할 것으로 보인다.

결 론

본 연구에서는 열수 추출한 두충과 느릅의 천연 약용식물 성분을 방사선 멸균한 후 세포독성과 항염증작용을 측정하였다. 각각의 천연 약용식물의 추출물은 효능이 입증되었으나 각 약용식물의 혼합물에 대해서는 독성평가 및 아토피성 피부염에 미치는 영향에 관한 보고가 없기에 본 연구를 실시하였다. 그 결과, 비만세포에서는 3.0 mg ml^{-1} 이하의 농도에서 독성이 없는 것으로 나타났고, 항염증반응에서는 유의적인 값을 확인할 수가 있었다. 따라서 이번 실험에서 얻어진 결과를 바탕으로 독성이 없는 농도 범위 하에서 천연 약용식물의 혼합물을 이용하여 아토피 피부염을 억제할 수 있는 연구에 관한 새로운 발판을 마련할 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 교육과학기술부의 재원으로 시행하는 한국과학재단의 원자력기술개발사업으로 수해되었습니다.

참 고 문 헌

Bae YS and Kim JK. 2000. Extractives of the bark of ash and elm as medicinal hardwood tree species. *MokchaeKonghak.* **28**:62-69.

Brown JM, Wilson TM and Metcalfe DD. 2008. The mast cell and implications for therapy. *Clin. Exp. Allergy* **38**:4-18.

Chang BS, Kwon YS and Kim CM. 2004. The chemical structures and their antioxidant activity of the components isolated from the heartwood of *Hemiptelea davidii. Korean J. Pharmacogn*. **35**:80-87.

Cho SK, Lee SG and Kim CJ. 1996. Anti-inflammatory and analgesic activities of water extract of root bark of *Ulmus parvifolia. Korean J. Pharmacogn.* **27**:274-281.

Furukawa H, Nakamure K, Zheng X, Tojo M, Oyama N, Akiba H, Nishibu A, Kaneko F, Tsunemi Y, Sseki H and Tamaki K. 2004. Enhanced TARC production by dust-mite allergens and its modulation by immunosuppressive drugs in PBMCs from patients with atopic dermatitis. *J. Dermatol Sci.* **35**:35-42.

Galli SJ, Tsai M and Piliponsky AM. 2008. The development of allergic inflammation. *Nature* **454**:445-454.

Hong ND, Rho YS, Kim NJ and Kim JS. 1990. A study on efficacy of *Ulmi cortex. Korean J. Pharmacogn.* **21**:217-222.

Hsieh CL and Yen GC. 2000. Antioxidant actions of duzhong (*Eucommia ulmiodes* oliv.) toward oxidative damage in biomolecules. *Life Sci.* **66**:1387-1400.

Kim CS, Lee JM, Choi CO, Park SB and Eom TJ. 2003. Chemical analysis and isolation of antibacterial compound from *Ulmus* specied (I): chemical analysis and antibacterial activity of extractives. *MokchacKonghak.* **30**:66-73.

Kim DW, Park JY, Na GY, Lee SJ and Lee WJ. 2006. Correlation of clinical features and skin barrier function in adolescent and adult patients with atopic dermatitis. *Int J. Dermatol.* **45**:698-701.

Lee YJ and Han JP. 2000. Antioxidative activities and nitric scavenging abilities of extracts from *Ulmus devidiana. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. **29**:893-899.

Leung DY and Bieber T. 2003. Atopic dermatitis. *Lancet*. **361**: 151-160.

Li Y, Sato T, Metori K, Koike K, Che QM and Takahashi S. 1998. The promoting effects of geniposidic acid and aucubin in *Eucommia ulmiodes* oliver leaves on collagen synthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **21**:1306-1310.

Lim JP and Cui X. 2002. Effect of water extract of *Ulmi pumilae* cortex on gastric ulcer in rats. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **10**:177-180.

Nakamura T, Nakazawa Y, Onizuka S, Satoh S, Chiba A, Sekihashi K, Miura A, Yasugahira N and Sasaki YF. 1997.

Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves): 1. The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice. *Mutat. Res.* **388**:7-20.

Oshima T, Takata S, Kikino H, Deyama T and Kinoshita G. 1998. Anticomplementary activity of the constituents of *Eucommia ulmoides* bark. *J. Ethnopharmacol.* **23**:159-164.

Shultz LF and Hanifin JM. 2002. Epidemiology of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am.* **22**:1-24.

Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H and Niki R. 1997. Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmiodes*). *Biosci Biotech. Bioch.* **61**: 177-178.

Yang YL and Kim YJ. 2001. Immunostimulating exopolysaccharide with anticancer activity from *Enterobacter* sp. SSYL (KCTC 0687BP) screened from *Ulmus parvifolia*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**:554-561.

Yen GC and Hsieh CL. 2000. Reactive oxygen species scavenging activity of Du-zhong (*Eucommia ulmiodes* oliv.) and its active compounds. *J. Agric. Food Chem.* **48**:3431-3436.

Manuscript Received: December 14, 2011
Revised: January 10, 2012
Revision Accepted: January 30, 2012