Journal of Radiation Industry 5 (3) : 273~277 (2011)

TNF-α, IL-6, IL-8 저해를 통한 천연약용식물 추출물의 항염증 특성

김용수 · 권희정 · 박종석 · 임윤묵 · 노영창*

한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소 방사선공업환경연구부

Anti-inflammatory Activity of Herbal Extracts through Inhibition of TNF-α, IL-6 and IL-8

Yong-Soo Kim, Hui-Jeong Gwon, Jong-Seok Park, Youn-Mook Lim and Young-Chang Nho*

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

Abstract - This study evaluated the cytotoxicity and anti-inflammatory activities of natural herbal extracts including *Houttuynia cordata* and *Eucommia ulmoides* against human mast cell (HMC-1). *Houttuynia cordata* (HC) and *Eucommia ulmoides* (EU) were extracted with distilled water (at 75°C) and then freeze-dried for 5 days. Finally, the mixture of HC and EU were sterilized by γ-rays irradiation. Cytotoxicity of the mixture against HMC-1 cell was measured using cell counting kit-8 (CCK-8) assay. In addition, inflammatory mediator 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 mixture of HC and EU had no cytoxicity and reduced TNF-α, IL-6, IL-8 response on HMC-1 cells.

Key words : *Houttuynia cordata, Eucommia ulimoides*, Cytotoxicity, Cytokine

서 론

아토피성 피부염은 다인성인 만성 피부질환으로 생후 몇 년 내에 가장 흔하게 발생하는 소아기 질환이다. 최근 여러 역학연구 결과에 따르면, 지난 30년간에 걸쳐서 산업화된 국가에서 아토피성 피부염 발병율이 증가됨을 보이고 있다. 아토피성 피부염과 다른 알레르기 질환의 관련성도 광범위하게 보고되었는데, 아토피성 피부염의 조기발생은 천식의 발생위험 증가와 관련이 되었으며 많은 연구자들이 아토피성 피부염을 소위 '아토피 행진'의 첫 번째 임상발현으로 제시하였다 (Shultz and Hanifin 2002). 한편 아토피성 피부염의 진행이나 발생에 영향을 미치는 요인에 대해서는 완전히 밝혀져 있지 않다. 아토피성 피부염의 원인은 아마도 유전적 변이와 환경적 자극에 의한 피부 과민성을 주원인으로 보고 있다. 습진성 병변, 소양증, 경피수분손실 및 피부건조증의 증가를 특징으로 한다. 최근의 연구에서 피부장벽의 기능이상과 아토피성 피부염의 중증도와의 관계가 아토피성 피부염의 치료에 중요성이 있음을 보여주고 있다. 손상된 피부장벽은 피부를 약하게 하여 항원의 침투가 용이하게 하며, 항원세포와 항원의 상호작용을 증가시킨다. 이러한 현상이 아

* Corresponding author: Young-Chang Nho, Tel. +82-63-570-3060, Fax. +82-63-570-3069, E-mail. ycnho@kaeri.re.kr

토피성 피부염을 유발한다고 보고되어 있다(Elias *et al.* 1999). 아토피성 피부염에 대한 현재까지 알려진 치료방법은 면역억제제, 스테로이드제, 항히스타민제가 사용되고 있으나, 이들의 장기간 사용시 부작용이 문제점으로 대두되고 있다(Furukawa *et al.* 2004).

예로부터 일부 동양권 나라에서는 어성초, 두충 등 천연 약용식물 추출물을 이용하여 아토피성 피부염을 치료하는 데 사용되어 왔다. 어성초(*Houttuynia cordata* Thunb.)는 삼백초과의 다년생 초본으로 약모밀(*Houttuynia cordata* Thunberg)로 불려지며, 그늘지고 물기가 많은 곳에서 잘 자라고 주로 한국과 중국, 일본, 히말라야, 북미 그리고 자바에 분포되어 있다. 어성초라는 명칭은 잎에서 특유의 비린내가 나기 때문에 붙여진 것으로 다양한 생리활성물질들은 함유하고 있어 해독 및 이뇨에 효과가 있으며, 백일해, 기관지염, 간염, 폐렴 등의 증상 완화에 효과가 있다고 알려져 있다. 특히 어성초는 아토피, 항알레르기 등 피부질환의 개선 목적으로 많이 사용되어 왔으며, 최근에는 건강 보조식품으로써 그 사용이 증가하고 있다(Shin *et al.* 2006). 예로부터 민간에서는 발효엑기스를 암치료 등에 이용하여 왔으며, Seo 등이 어성초 핵산 추출물이 암세포주에 미치는 항암효과에 대해 보고하였다(Seo *et al.* 2003). 그 외에도 항돌연변이 효과(Choi *et al.* 1994), 항균 효과(Song *et al.* 2003) 및 어성초 즙과 분말이 고지방, 고콜레스테롤혈증 쥐의 혈청지질 및 지질성분에 미치는 영향(Sung *et al.* 1998) 등에 대한 보고가 다수 발표되었다.

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.

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 이들 각각을 열수 추출한 뒤, cell counting kit-8 (CCK-8) assay를 통해 추출액의 세포독성 및 사이토카인을 비교 측정하여, 향후 아토피성 피부염 완화 및 치료에 활용해 보고자 하였다. 추출물들의 세포독성 및 사이토카인을 측정하기 위해 비만세포(HMC-1)를 사용하였다.

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. 어성초와 두충은 ShinHeung science (Daejeon, Korea)를 통해서 구입하여 사용하였다.

2. 추출물 제조방법

추출용매로는 3차 증류수를 이용하였다. 어성초, 두충을 각각 10 : 0, 8 : 2, 5 : 5, 2 : 8, 0 : 10의 조성비율로 3차 증류수 1 l를 가하여 75˚C에서 24시간 동안 열수추출하였다(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.

Table 1. Composition of herbal extracts mixtures

Group	*Houttuynia cordata*	*Eucommia ulmoides*
I	10	0
II	8	2
III	5	5
IV	2	8
V	0	10

4. 세포독성 실험

추출물의 세포독성 여부 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}, 0.3 mg ml^{-1}, 0.6 mg ml^{-1}, 1.2 mg ml^{-1}, 1.8 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 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 활성화된다고 보고되어 있다(Metcalfe *et al.* 1981). 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 leukoreiene, 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 79.5% 이상으로 독성이 없음을 나타내었다(Fig. 1). 5.6 mg ml^{-1} 이상의 농도에서는 79% 이하의 세포독성을 나타났다. 따라서 그룹 I, II, III, IV, V은 3.0 mg ml^{-1}의 농도에서 항염증반응 실험을 진행해야 할 것으로 판단되었다.

2. 추출혼합물의 항염증반응

본 연구에서 열수추출한 천연약용식물에 의해 염증매개물질인 사이토카인의 생성이 억제되는 것을 확인하였다. TNF-α의 경우 그룹 I, II, III, IV, V의 사이토카인 저감율은 각각 7.7%, 19.1%, 28.8%, 50.0%, 62.6%로 두층의 함량비율이 높아질수록 사이토카인의 생성이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 2). 하지만 IL-8의 경우, 그룹 I, II,

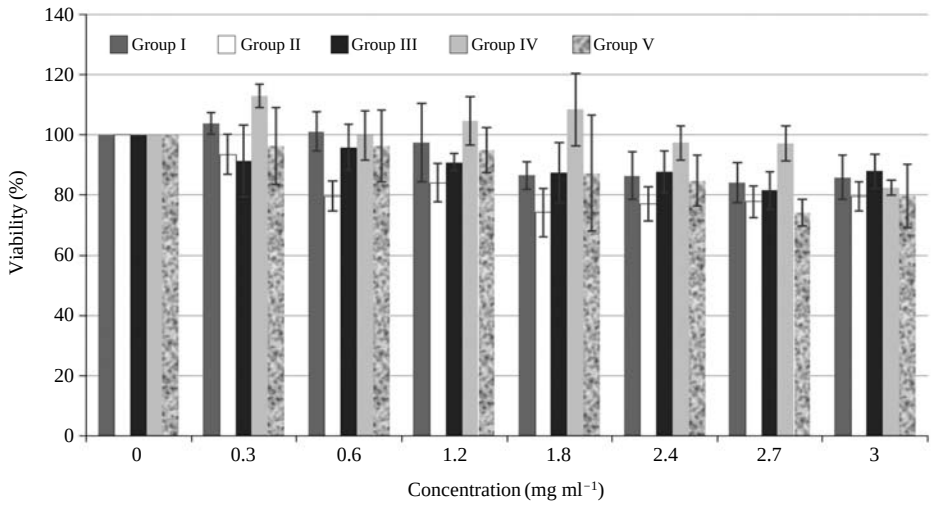

Fig. 1. Cytotoxicity test of herbal extracts mixtures on HMC-1 cell line.

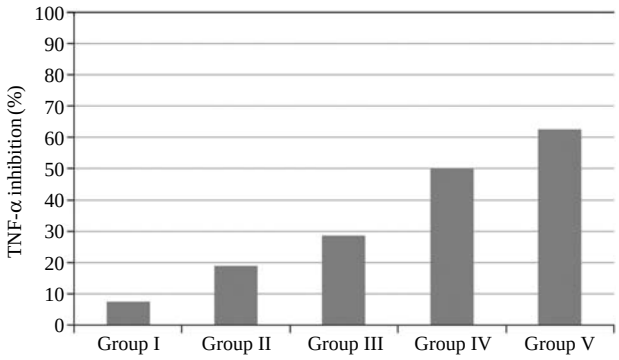

Fig. 2. Effects of extracts on the production of TNF-α in A23187 and PMA stimulated HMC-1 cells.

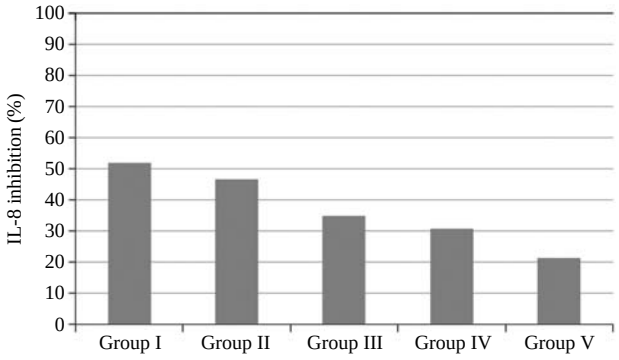

Fig. 3. Effects of extracts on the production of IL-8 in A23187 and PMA stimulated HMC-1 cells.

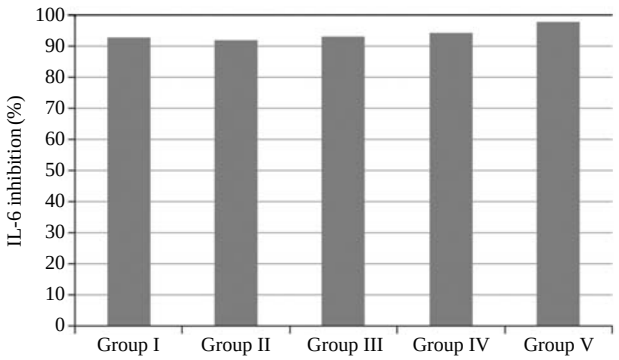

Fig. 4. Effects of extracts on the production of IL-6 in A23187 and PMA stimulated HMC-1 cells.

III, IV, V의 사이토카인 저감률은 각각 51.8%, 46.7%, 35.0%, 30.7%, 21.5%로 어성초의 함량비율이 높아질수록 사이토카인의 생성이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 황백피와 두충을 단독 처리하였을 때 황백피는 IL-8의 저감율이 높았으며 두충의 경우 TNF-α의 저감율이 높았다. 황백피와 두충의 조성의 변화에 따라 TNF-α와 IL-8의 저감율이 상반된 결과를 보이는데 이러한 추출물 간의 차이는 추출물에 유리된 성분의 차이에 의한 것으로 판단된다. 성분의 분석은 추후 실험이 더 필요할 것으로 보인다. IL-6의 경우에는 모든 그룹에서 90% 이상의 높은 억제를 보였다(Fig. 4).

결 론

본 연구에서는 열수추출한 어성초와 두충 천연약용식물 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.

참 고 문 헌

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

Choi YH, Kim EY, Park KY, Rhee SH and Lee WH. 1994. Antimutagenic effects of the juice and boiling water extract of *Houttuynia cordata* Thunb. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **23**:916-921.

Elias PM, Wood LC and Feingold KR. 1999. Epidermal pathogenesis of inflammatory dermatoses. *Am. J. Contact Dermatol.* **10**:119-126.

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.

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

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.

Metcalfe DD, Kaliner M and Donlon MA. 1981. The mast cell. *Critl. Rev. Immunol*. **3**:23-74.

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.

Seo DH and Han DS. 2003. Anticancer effects of hexane soluble extract of *Houttuynia cordata* against cancer cell lines. *J. Wonkwang Dental Res. Ins*. **12**:263-285.

Shin SE, Suh DS, Ding JL and Cha WS. 2006. Chemical characterization and antibacterial effect of volatile flavor concentrate from *Houttuynia cordata* Thunb. *Life Sci.* **16**:297-301.

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

Song JH, Kim MJ, Kwon HD and Park IH. 2003. Antimicrobial activity of fraction extracts from *Houttuynia cordata* root. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. **32**:1053-1058.

Sung NJ, Lee SJ, Shin JH, Chung MJ and Lim SS. 1998. Effects of *Houttuynia cordata* Thunb powder and juice on lipid composition of liver, brain and kidney in dietary Hypercholesterolemic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. **27**:1230-1235.

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.

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: September 7, 2011
Revised: September 9, 2011
Revision Accepted: September 16, 2011