Journal of Radiation Industry 3 (4) : 293~297 (2009)

방사선 조사된 천연약용식물 추출혼합물의 NF-κB 활성 평가

김용수 · 임윤묵 · 권희정 · 최보람 · 노영창*

한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소

Effect of Gamma-Ray Irradiated Natural Herbal Extracts on NF-κB Activation in HMC-1 Cells

Yong-Soo Kim, Youn-Mook Lim, Hui-Jeong Gwon, Bo-Ram Choi and Young-Chang Nho*

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

Abstract - Recently, studies have documented various health benefits of some natural herbal extracts (NHE) such as *Houttuynia cordata* (H), *Centella asiatica* (C), *Plantago asiatica* (P), *Morus alba* L. (M), and *Ulmus davidiana* (U). The aim of the present study was to demonstrate the radiation effect on NF-κB activation of the NHE in the human mast cell line (HMC-1). The HMC-1 cells were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) plus A23187. Both non- and irradiated NHE also significantly inhibited the PMA plus A23187-induced nuclear factor NF-κB activation and also suppressed the expression of activation of NF-κB. These results indicated that the NHE exerted a regulatory effect on inflammatory reactions mediated by mast cells.

Key words : Natural herbal extracts, NF-κB activation, Radiation, Inflammatory reactions, HMC-1

서 론

생활패턴의 서구화와 더불어 접촉성 피부염, 아토피피부염 등과 같은 알러지성 피부질환의 발생빈도가 지난 30년간에 걸쳐서 산업화된 국가에서 점차 증가하는 추세를 보이고 있다. 이러한 아토피피부염은 가장 흔하게 발생하는 소아기 만성 피부질환으로 생후 몇 년 내에 발병한다. 한편 아토피피부염의 진행이나 발생에 영향을 미치는 요인에 대해서는 완전히 밝혀져 있지 않다. 아토피피부염의 원인은 아마도 다인자성으로 유전적 요인과 환경적 요인의 상호작용이 관여하는 것으로 여겨지고 있다. 장기간에 걸친 아토피피부염의 경과는 많은 연구에서 보고되었으나 진단적 평가의 차이로 위험인자의 상대적 중요성을 평가하는 것은 쉽지 않다 (Vickers *et al*. 1989). 이들 피부질환의 치료 방법으로는 피부의 수분 유지, 면역계 염증반응 조절을 위한 스테로이드 등이 흔히 사용되어 왔으나, 이러한 치료 방법은 일시적으로 증상을 완화시키는 효과는 있으나, 과량 사용 시 심각한 부작용을 초래하는 문제점을 가지고 있다. 현재 의약품 수준으로 사용되고 있는 약물로는 cyclosporin A, methotrexate, azathioprine 등이 있으며, 비스테로이드성 면역억제제로 FK506 (tacrolimus), SDZ-ASM 981 (Elidel) 등의 약물이 임상적으로 사용되고 있다. 일본 후지사와 제약 회사에서 개발된 tacrolimus는 장기 이식 거부반응을 억제하기 위해 개발되었으나 주요 난치성 피부질환 치료에 이용되

* Corresponding authors: Young-Chang Nho, Tel. +82-63-570-3060, Fax. +82-63-570-3079, E-mail. ycnho@kaeri.re.kr

고 있으며, 또한 노바티스에서 개발된 Elidel은 tacrolimus와 화학적으로 유사한 제제이나 역시 같은 용도로 현재 이용되고 있다. 이러한 약물은 효과면에서 우수한 장점을 지니고 있으나, 전문의약품으로 분류되어 처방전이 있어야만 사용할 수 있으며 또한 매우 고가로 시판되어 사용 시 경제적인 측면을 고려해야 하는 등의 문제점을 지니고 있다. 따라서 사용이 간편하면서 경제적으로도 부담이 되지 않는 새로운 면역조절 관련 제품 개발이 요구되고 있으며, 이러한 관점에서 자가면역성 피부염에 효과가 있는 천연물 소재를 이용한 피부질환 치료제 개발이 절실하다고 판단된다. 일부 동양권에서 어성초, 느릅나무, 금전초, 차전초, 상엽 등 천연약용식물에서 추출한 몇몇 성분들을 이용하여 아토피성 피부염을 치료하는데 사용되어 왔다.

어성초(*Houttuynia cordata* Thunb.)는 그늘지고 물기가 많은 곳에서 잘 자라며 주로 한국과 중국, 일본, 히말라야, 북미 그리고 자바에 분포되어 있다. 어성초는 잎에서 특유의 비린내가 나기 때문에 붙여진 이름으로 다양한 생리활성물질들은 함유하고 있어 해독 및 이뇨에 효과가 있으며, 특히 아토피, 항 알레르기 등 피부질환의 개선 목적으로 많이 사용되어 왔다(Shin *et al*. 2006). Seo *et al*. (2003)은 어성초 핵산 추출물이 암세포주에 미치는 항암효과에 대해 보고하였다. 그외에도 어성초 즙과 분말이 고지방, 고 콜레스테롤혈증 쥐의 혈청지질 및 지질성분에 미치는 영향(Sung *et al*. 1998) 등에 대한 보고가 다수 발표되었다. 느릅나무(*Ulmus davidiana* var. japonica)는 뿌리 껍질을 벗겨서 약으로 사용되어 왔는데, 한방에서는 느릅나무 껍질을 유피라고 하여 약재로 사용되고 있는데, 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 보고 되었다. 금전초(*Centella asiatica*)(C)는 '병풀' 이라는 이름으로 미나리과에 속하는 다년생 식물로 인도, 스리랑카, 벵갈, 히말라야산까지 널리 분포하면서 중국이나 인도 등에서 상처 치유 등의 약용으로 많이 사용하였다. 주요성분은 asiatic acid, asiaticoside, madecassic acid으로 항산화효과가 우수하고 피부트러블과 노화예방에 효과적이며 피부의 손상을 복구해주는 피부의 재생에 효능이 있는 것으로 보고되고 있다(Chatterjee *et al*. 1992). 차전초(*Plantago asiatica* var.)는 질경이과에 속하는 다년생 초본으로 우리나라를 비롯하여 중국과 일본에서 매우 흔하게 볼 수 있다. 질경이의 잎인 차전초는 소염 및 이뇨 등의 작용으로 오랫동안 약제로 사용되고 있다(Kim *et al*. 1998). 또한 위액분비와 위장관 운동조절작용, 항염작용, 항종양작용 등이 입증되었고, 혈당저하작용과 간 손상 회복에 유의한 효능이 있음이 보고되었다. 상엽(*Morus alba* L.)은 뽕나무과에 속한 뽕나무(*Morus alba* L.) 및 동속 근연식물의 잎을 건조한 것으로 본초강목 등의 동양의학서에 상백피, 누에고치 등과 함께 소갈증에 효과가 있음이 기록되어 있다. 당뇨병, 동맥경화증, 고지혈증 예방치료에 효과가 있다고 보고 되어 있다(Myo *et al*. 1989). 이밖에도 상엽은 마우스 유래의 전이성 대장암 세포주에서의 항암효과와 면역조절 기능에도 효과가 있는 것으로 보고되었다(Ahn *et al*. 2001).

본 연구에서는 상기의 천연약용식물 추출물을 이용하여 방사선 조사 전후 천연추출물의 항알러지 효과를 세포수준에서 비교 평가하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

천연약용식물인 어성초, 느릅나무, 금전초, 차전초, 상엽은 신흥과학상사를 통해서 구입하였다. Cell counting kit-8(CCK-8)은 Dojindo사(Kumamoto, Japan)에서 구입하였다. Cell culture 100dish, 96well plate, 24well plate Modified는 NUNC사(Naperville, IL, USA)에서 구입하였고, Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose(DMEM), Iscove's Dulbecco's Medium(IMDM), Dulbecco's phosphate Bufferd saline(DPBS), Penicillin Streptomycin, Fetal Bovine Serum(FBS), Pen Strep-Penicillin Streptomycin, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid(HEPES), NaCl, Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), Phenylmethylsulphonyl fluoride(PMSF), Aprotinin은 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. TransAM™ NF-κB p65 Transcription Factor Assay Kit는 Active Motif(CA, USA)에서 구입하였다.

2. 추출물 제조방법

3차 증류수를 이용하여 어성초(H), 느릅나무(U), 금전초(C), 차전초(P), 상엽(M)을 1:1:1:1:1의 조성비율로 3차 증류수 1l를 가하여 75°C에서 24시간 동안 열수 추출하였다. 여기서 얻은 추출물을 냉동건조(−55°C, 5일)시켜 파우더로 만든 후 25 kGy로 방사선 조사하였다.

3. 세포배양 및 세포 독성 측정

비만세포(HMC-1)는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으

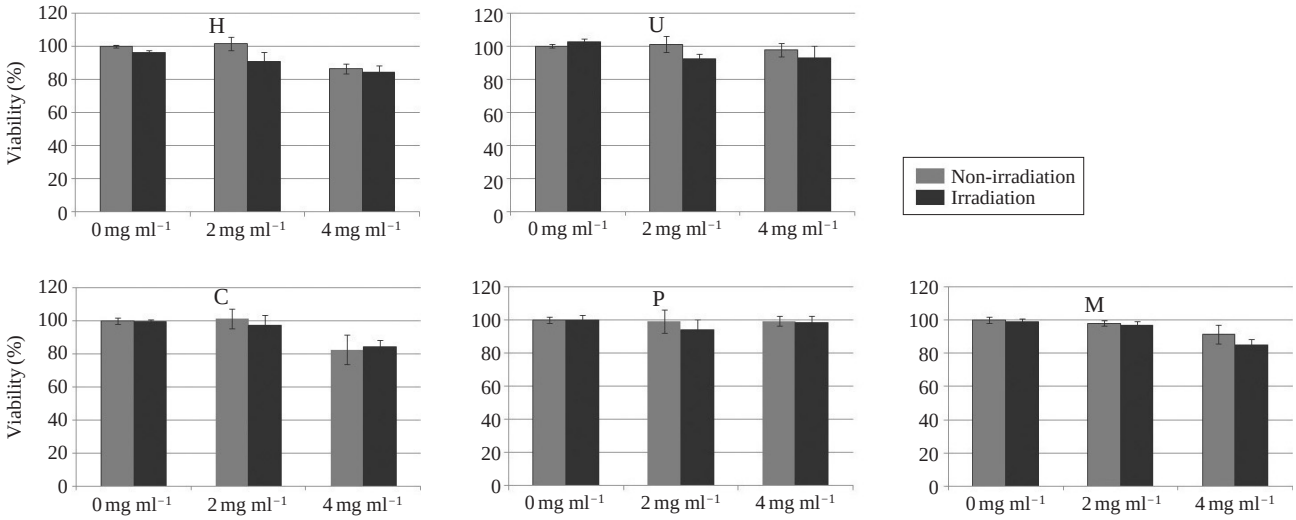

Fig. 1. Cytotoxicity of non-irradiated and irradiated herbal extracts in HMC-1 cells.

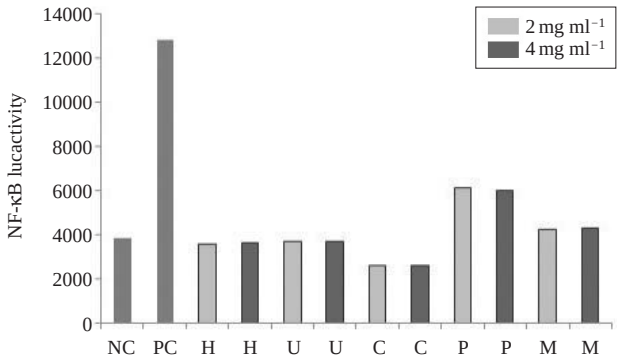

Fig. 2. NF-κB Luc activity test of herbal extracts mixtures (H, U, C, P and M) in HMC-1 cells.

로부터 구입하였고, 세포 배양액은 IMDM에 10% FBS, 1X Penicillin Streptomycin 1%를 첨가한 것을 사용하였다. 배양은 배양기를 이용하여 37°C, 5% CO_2 상태를 유지하였다. 방사선에 의한 천연추출물의 HMC-1 cell에 대한 세포 독성여부 확인은 CCK-8 assay를 이용하여 측정하였다. HMC-1 cell을 96 well plate에 1×10^5 well^{-1}이 되도록 분주하고 24시간 배양하였다.

4. HMC-1 세포에서 NF-κB 활성 측정

HMC-1 세포에 천연추출물을 24시간 처리하고 수거하여, PBS로 2회 세척한 후 세포용해 완충용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin)을 첨가하여, 4°C에서 30분간 반응시키고 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포 용해액을 얻었다. 이 세포 용해액을 TransAM™ NF-κB p65 Transcription Factor Assay Kit를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

5. 통계처리

본 실험에서 측정된 결과는 mean±S.D.로 나타내었고, 군 간의 차이는 Student's *t*-test를 이용하였으며, $p < 0.05$인 경우를 유의한 차이로 인정하였다.

결과 및 논의

1. 방사선 조사된 천연추출물의 HMC-1에 대한 세포 독성 평가

비만세포 (HMC-1)는 결체조직과 점막에 존재하는 세포질 내 과립을 풍부하게 가진 면역세포로서 알레르기 염증반응에 관여하고, 특히 IgE가 매개하는 면역반응과 관계되어 있는 것으로 알려져 있다 (Ahn 2004). 비만세포는 외부 자극에 의해 알레르기 염증반응을 일으키는 매개체를 생산, 분비하게 된다. 이러한 매개체에는 자극을 받기전에 이미 생성되어 과립내에 저장되어 있는 물질과 자극을 받은 후에 새롭게 생성, 유리되는 물질이 있다 (Schwartz *et al*. 1998). 비만세포의 과립내에는 히스타민, proteoglycan, serine proteases, carboxypeptidase A, sulfatases, exoglycosidases 등이 이미 생성되어 존재하고 있다. 과립내에는 heparin과 chondroitin sulfate proteoglycan이 혼합되어 있는데 히스타민, serine proteases 등은 이러한 proteoglycan과 이온결합을 함으로써 안정된 상태로 유지되고 있다. 일단 자극을 받으면 이러한 이온결합은

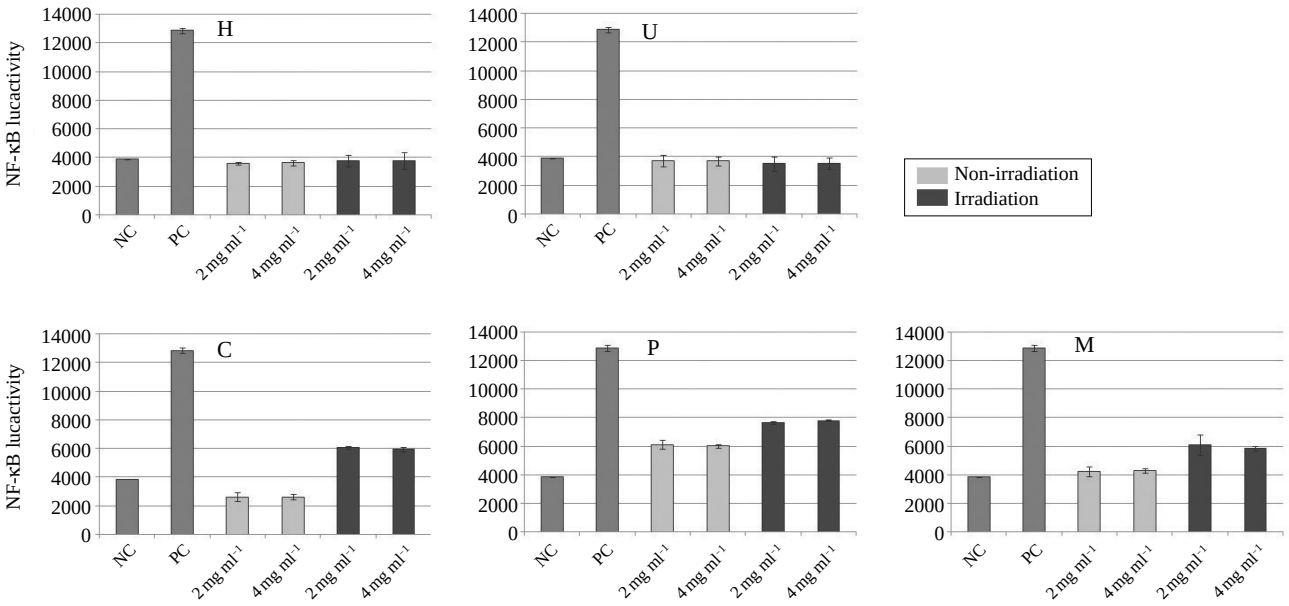

Fig. 3. NF-κB Luc activity test of non-irradiated and γ-irradiated herbal extracts mixtures (H, U, C, P and M) in HMC-1 cells.

깨지게 되고 화학매개체들은 세포 외부로 유리된다. 이렇게 외부자극에 의해 활성화된 비만세포는 히스타민과 같은 혈관확장 물질들을 분비하여 염증유발물질인 다양한 사이토카인 분비를 자극한다. 비만세포로부터 분비되는 이러한 사이토카인들은 알레르기 염증의 초기반응과 후기반응을 유발하고 만성적으로 염증반응을 지속시키는데 중요한 역할을 한다(Galli *et al*. 2008). 따라서, 본 연구에서는 비만세포에서의 어성초(H), 느릅나무(U), 금전초(C), 차전초(P), 상엽(M) 각각 추출물들의 세포독성을 측정하고, 방사선 조사에 의해 각 추출물의 활성성분과 항알러지 potential에 변화가 있는지 살펴보고자 하였다. HMC-1 세포에 대한 세포 독성을 평가해본 결과, 방사선 조사에 따른 세포 생존율이 약간의 감소는 있었으나 유의할 만한 큰 변화는 없었다(Fig. 1).

2. HMC-1 세포에서 NF-κB 활성 평가

비만세포가 IgE에 의해 자극을 받게 되면 세포내 신호전달계인 NF-κB가 활성화되어, 세포질에 존재하던 NF-κB는 핵으로 이동하게 되고 IL-4, 5 및 TNF-alpha 등과 같은 알러지성 염증을 매개하는 유전자의 프로모터에 binding하여 전사를 촉진함이 잘 알려져 있다. 천연물이 이러한 비만세포내 NF-κB signal에 영향을 미치는지 살펴보고자 비만세포 활성을 유도하여 luciferase activity를 측정한 결과, 모든 천연물이 NF-κB의 활성을 억제하였으며, 5가지 천연추출물 중 금전초가 가장 우수한 효과를 나타내었다(Fig. 2).

3. 방사선 조사에 의한 HMC-1 세포에서 NF-κB 활성 평가

방사선에 의한 NF-κB 활성에 미치는 영향을 평가해본 결과, 어성초(H), 느릅나무(U) 의 경우는 방사선 조사에 의해 NF-κB의 활성에 따른 억제능에 큰 변화가 없었으나, 금전초(C), 차전초(P), 상엽(M)의 경우 방사선 조사에 의해 NF-κB의 활성에 따른 억제능이 감소되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

결 론

선행 스크리닝 연구를 통해 항알러지 효과가 있는 5종의 천연물(어성초, 느릅나무, 차전초, 금전초, 상엽)을 선정하여, 각각의 천연추출물에 방사선을 조사한 후 항알러지효과가 영향을 받는지 살펴 보았다. 각 천연물로부터 열수추출된 천연약용식물 성분을 HMC-1 세포에 대한 세포 독성과 NF-κB 활성을 비교 측정해본 결과, 모든 천연추출물이 농도 의존적으로 NF-κB의 활성을 억제하였으며, 금전초, 차전초, 상엽의 경우 방사선 조사에 의해 NF-κB 활성 억제능이 감소됨을 확인할 수 있었다. 또한 상기의 천연물 중 금전초가 가장 우수한 억제 효과를 나타내었다. 세포 독성 측정결과에서는 모든 천연추출물에서 유의할 만한 세포 독성은 나타나지 않았으며, 특히 방사선 조사 후에도 세포 생존율에는 큰 영향을 미치지 않았다. 따라서 본 연구결과를 토대로 항염증효과를

나타낼 수 있는 유효한 농도범위의 천연추출물을 사용하여 아토피성 피부염을 보다 억제할 수 있는 새로운 발판을 마련할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부 지원 원자력연구개발사업에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Ahn K. 2004. Role of mast cells in allergic inflammation and innate immunity. *Korean J. Pediatr*. **47**(11):1137-1141.

Ahn MY, Ryu KS, Kim IS, Kim SY, Lee HS, Kim JW and Lee YK. 2001. Cytotoxicity of the ethanol of mulberry leaves, branches and silkworm feces. *Korean J Scric Sci*. **43**:26-28.

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

Chatterjee TK, Chakraborty A, Pathak M and Sengupta GC. 1992. Effects of plant extract *Centella asiatica* (Linn.) on cold restraint stress ulcer in rats. *Indian J. Exp. Biol.* **30**(10): 889-891.

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.

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.

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. *Mokchac Konghak*. **30**:66-73.

Kim SJ, Lee EJ, Song YS, Jeong HJ, Lee KM, Kim HR, Chae HJ, Shin TY, Kim YK, Hong SH and Kim HM. 2005. Cheongyeolsaseuptang inhibits production of TNF-α, IL-6 and IL-8 as well as NF-κB activation in human mast cells. *J. Ethnopharmacol.* **97**:83-88.

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.

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.

Myo CS. 1989 Coloured medicinal plant of korea. 1St. pp. 98-102. Academic Co, Seoul.

Schwartz LB and Huff TF. 1998. Biology of mast cells. pp. 261-276. *In*: Allergy: Principles and Practice (Middleton E *ed*.), Mosby, St. Louis.

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.

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.

Vickers CF. 1989. The management of the problem atopic child in 1988. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* **144**:23-25.

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.

Manuscript Received: December 10, 2009
Revision Accepted: December 21, 2009