



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학박사학위논문

생강 성분인 12-Dehydrogingerdione의
항천식 효과

Anti-asthmatic Effects of
12-Dehydrogingerdione,
a Constituent of *Zingiber officinale* Roscoe

2013년 2월

서울대학교 대학원
식품영양학과
한 영 아

생활과학박사학위논문

생강 성분인 12-Dehydrogingerdione의
항천식 효과

Anti-asthmatic Effects of
12-Dehydrogingerdione,
a Constituent of *Zingiber officinale* Roscoe

2013년 2월

서울대학교 대학원
식품영양학과
한 영 아

생강 성분인 12-Dehydrogingerdione의 항천식 효과

Anti-asthmatic Effects of 12-Dehydrogingerdione,
a Constituent of *Zingiber officinale* Roscoe

지도교수 권 훈 정

이 논문을 생활과학박사학위논문으로 제출함
2012년 12월

서울대학교 대학원

식품영양학과

한 영 아

한영아의 박사학위논문을 인준함

2013년 1월

위 원 장

지근익



부 위 원 장

황근택



위 원

권영혜



위 원

송창우



위 원

권훈정



국문 초록

생강 성분인 12-dehydrogingerdione의 항천식 효과

서울대학교 대학원 식품영양학과

한 영 아

천식은 알러지성 만성 염증 질환 중의 하나이며, 최근 알러지 반응 및 초기 염증 수준을 억제할 수 있는 물질에 대한 연구가 진행되고 있다. 또한 기존에 천식 치료제로 사용하고 있는 비스테로이드성 항염증제 혹은 흡입제의 단점이 부각되면서 천연물질에서 유래되는 식이 성분을 이용한 알러지 반응 및 초기염증 억제제로 사용할 수 있는 가능성이 증명되고 있다. 본 연구에서 사용한 생강성분인 12-dehydrogingerdione(12-DHGD)은 탁월한 대식세포의 탐식능 및 산화질소 억제능이 입증되었고, 그로인해 본 물질의 항염 및 항알러지 효과가 기대되어지고 있다. 본 연구에서는 활성화된 대식세포 및 비만세포로부터 생성되는 다양한 염증매개물질에 대한 12-DHGD의 억제효과와 난백단백질로 유도한 천식동물에게 경구 투여된 12-DHGD의 천식진행 억제 및 증상완화에 대한 효과를 확인하고자 하였다.

12-DHGD은 세포독성을 나타내지 않는 수준에서 LPS에 의해 증가되어지는 염증성 사이토카인인 Interleukin(IL)-6(50, 100,

150, 200 ng/ml)의 생성을 농도의존적으로 억제하였다. 또한 LPS 자극으로부터 생성되는 염증유도물질인 Prostaglandin(PG)E₂ (200 ng/ml)와 Nitric oxide(NO) (150, 200 ng/ml) 발생을 효과적으로 억제하였으며, 이는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase(COX)-2의 mRNA 발현 결과와도 일치함을 보여주었다. 또한 12-DHGD은 비만세포에 대하여 세포독성을 나타내지 않았고, 측정된 모든 사이토카인 granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF) (10 µg/ml), IL-6 (1, 10 µg/ml), IL-8 (1, 10 µg/ml) 및 tumor necrosis factor(TNF)-α (0.1, 1, 10 µg/ml)의 생성 저해제로서 작용을 하는 것으로 나타났다. 난백단백질인 ovalbumin(OVA)으로 유도한 천식동물에서 12-DHGD의 경구투여는 천식유도에 따른 폐 세척액내의 호산구 및 호중구의 유입을 현저히 감소시켰다. 또한 알러지 질환 특이적으로 발현되는 혈중 IgE 수준에 대하여 유의성있는 억제 효과를 나타냈다. 폐 조직 내에 존재하는 사이토카인(IL-1β, TNF-α, (interferon)IFN-γ, IL-12, IL-4, IL-13)의 발현 및 염증세포 침윤정도에 있어서도 천식 증상 완화 효과가 확인되었다.

위와 같은 결과를 토대로 12-DHGD은 천식과 같은 염증 및 알러지 반응에 의한 질환을 위한 예방 또는 치료제로서 사용되어질 수 있는 가능성을 제시하였다.

주요어: 생강, 12-dehydrogingerdione, 알러지, 천식, Raw 264.7 세포, HMC-1세포.

학 번: 2006-21863

목 차

국문초록	i
목차	iii
표목차	vii
그림목차	viii
약어일람	xii
서론	1
1장. 문헌고찰	5
1.1. 천식	6
1.2. 염증세포 및 염증매개체에 의한 천식의 기전	9
1.3. 천식 동물 모델	13
1.4. 12-dehydrogingerdione	17
2장. LPS로 자극한 Raw 264.7 세포에서 생강 성분인 12-dehydrogingerdione의 항염증 효과	21
2.1. 서론	22
2.2. 실험재료 및 방법	25
2.2.1. 시약	25
2.2.2. 세포주 및 세포배양	26
2.2.3. 세포독성 측정	26
2.2.4. NO (nitric oxide) 측정	27

2.2.5. PGE ₂ 및 cytokines 생성량 측정	28
2.2.6. RNA 정량 및 cDNA 합성	28
2.2.7. Real-time PCR 수행	29
2.2.7. 통계처리	30
2.3. 결과	32
2.3.1. 12-DHGD의 Raw 264.7 세포에 대한 독성	32
2.3.2. LPS로 유도한 NO 생성에 있어서 12-DHGD의 억제효과	34
2.3.3. LPS로 유도한 초기염증성 사이토카인 (IL-1 β , IL-6 TNF- α) 생성에 있어서 12-DHGD의 억제효과	36
2.3.4. LPS로 유도한 PGE ₂ 생성에 있어서 12-DHGD의 억제효과	41
2.3.5. LPS로 유도한 COX-2 및 iNOS 유전자 발현에 있어서 12-DHGD의 억제효과	43
2.4. 고찰	47
3장. PMACI로 자극한 HMC-1 세포에서 분비되는 사이토카인에 대한 생강성분인 12-dehydrogingerdione의 효과	52
3.1. 서론	53
3.2. 실험 재료 및 방법	56
3.2.1. 시약	56
3.2.2. 세포주 및 세포배양	56
3.2.3. 세포독성 측정	57
3.2.4. Cytokine 생성량 측정	57

3.2.5. 통계처리	58
3.3. 결과	59
3.3.1. 12-DHGD의 HMC-1 세포에 대한 독성	59
3.3.2. PMACI로 유도한 IL-6, IL-8, TNF- α 및 GM-CSF 생성에 있어서 12-DHGD의 억제 효과	61
3.4. 고찰	68

4장. 난백단백질을 이용한 천식동물에서 생강 성분인 12-dehydrogingerdione의 경구투여로 인한 항천식 효과 ----- 71

4.1. 서론	72
4.2. 실험 재료 및 방법	75
4.2.1. 시약	75
4.2.2. 동물	75
4.2.3. 천식유발	76
4.2.4. 12-dehydrogingerdione의 투여	78
4.2.5. 폐 세척액 수집, 총 세포수 및 감별 세포수 측정	78
4.2.6. Serum IgE 측정	79
4.2.7. 폐 조직 내 면역세포 관련 cytokines 측정	79
4.2.8. 폐 조직 내 면역세포 염색	80
4.2.9. 통계분석	81
4.3. 결과	82
4.3.1. 체중변화	82
4.3.2. 폐 세척액 내의 총 세포수 및 감별 세포수에 대한 12-DHGD의 효과	84
4.3.3. Serum IgE 생산에 대한 12-DHGD의 효과	86

4.3.4. 폐 조직 내 cytokines 발현에 대한 12-DHGD의 효과-----	88
4.3.4.1. Pro-inflammatory cytokines 발현에 대한 12-DHGD의 효과-----	88
4.3.4.2. Th1 세포 분비 cytokines 발현에 대한 12-DHGD의 효과-----	92
4.3.4.3. Th2 세포 분비 cytokines 발현에 대한 12-DHGD의 효과-----	96
4.3.5. 폐 조직 내의 염증세포 및 점액분비세포 침윤에 대한 12-DHGD의 효과-----	100
4.3.6. 고찰-----	104
5장. 결론-----	109
참고문헌-----	114
Abstract-----	133

표 목차

Table 1-1. Cytokines that may have a role in the pathogenesis of asthma.....	10
Table 1-2. Advantages and disadvantages of individual animal model of asthma.....	14
Table 1-3. The botanical classification of <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	19
Table 2-1. Sequences of the primers used for RT-PCR...	31
Table 4-1. Experimental groups of asthma animal model...	77

그림 목차

Figure 1-1. Anatomy of an asthma attack -----	7
Figure 1-2. Host factors and Environmental exposures -----	8
Figure 1-3. Immunological pathways that result in the inflammatory changes that occur in the airway of individuals with asthma -----	12
Figure 1-4. The structure of 12-dehydrogingerdione -----	20
Figure 2-1. Cell viability of murine macrophage Raw 264.7 cells -----	33
Figure 2-2. Effect of 12-DHGD on NO production by LPS-stimulated Raw 264.7 cells -----	35
Figure 2-3. Effect of 12-DHGD on IL-1 β production by LPS-stimulated Raw 264.7 cells -----	38
Figure 2-4. Effect of 12-DHGD on IL-6 production by LPS-stimulated Raw 264.7 cells -----	39

Figure 2-5. Effect of 12-DHGD on TNF- α production by LPS-stimulated Raw 264.7 cells	40
Figure 2-6. Effect of 12-DHGD on PGE ₂ production by LPS-stimulated Raw 264.7 cells	42
Figure 2-7. Effect of 12-DHGD on COX-2 and iNOS expression in LPS-stimulated Raw 264.7 cells	45
Figure 3-1. Cell viability of human mast cell line (HMC-1 cells)	60
Figure 3-2. Effect of 12-DHGD on IL-6 production by PMACI-induce HMC-1 cells	64
Figure 3-3. Effect of 12-DHGD on IL-8 production by PMACI-induce HMC-1 cells	65
Figure 3-4. Effect of 12-DHGD on TNF- α production by PMACI-induce HMC-1 cells	66
Figure 3-5. Effect of 12-DHGD on GM-CSF production by PMACI-induce HMC-1 cells	67
Figure 4-1. Experimental scheme of animal model of asthma	

.....	77
Figure 4-2. Body weight changes of animals	83
Figure 4-3. The effect of 12-DHGD on total and differential cellular components in the BALF of OVA-sensitized and -challenged mice	85
Figure 4-4. Effect of 12-DHGD on the level of serum IgE	87
Figure 4-5. Effect of 12-DHGD on the levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α in the lung tissue	90
Figure 4-6. Effect of 12-DHGD on the levels of Th1-related cytokines IFN- γ and IL-12 in the lung tissue	94
Figure 4-7. Effect of 12-DHGD on the levels of Th2-related cytokines IL-4 and IL-13 in the lung tissue	98
Figure 4-8. Histopathological changes in the lung tissue of OVA-sensitized and -challenged mice after 12-DHGD treatment	102

Figure 5-1. Possible anti-asthmatic mechanisms of
12-DHGD on asthma disease----- 113

약어일람

12-DHGD	12-dehydrogingerdione
BALF	Brochoalveolar Lavage Fluid
CI	Calcium Ionophore
COX-2	Cyclooxygenase-2
EOS	Eosinophil
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
IFN- γ	Interferon- γ
IgE	Immunoglobulin E
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
LYM	Lymphocyte
MTT	3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5- diphenyl tetrazolium bromide
MAC	Macrophage
NO	Nitric Oxide
NEU	Neutrophil
OVA	Ovalbumin
PMA	Phorbol Myristic Acetate
PGE ₂	Prostaglandin E2
ROS	Reactive Oxygen Species
Th	T helper
TNF	Tumor Necrosis Factor
WST	Water Soluble Tetrazolium Salt

서론

천식은 기도가 수축하고 염증이 생기는 흔한 만성 호흡기 질환으로 세계 인구 중 약 3억 명 정도가 천식으로 고통 받고 있으며 환자뿐만 아니라 가족, 건강의료시스템과 정부에까지 큰 부담이 되고 있다(Masoli M. *et al.*, 2004). 우리나라 역시 소아에서 1983년 5.7 %, 1990년 10.1 %, 2000년 초등학생 13.0 %, 중학생 12.8 %의 천식 비율을 보이며 천식의 발병률이 증가되고 있다(한국 성인 천식의 진료지침, 보건복지부). 전 세계적으로 연간 250,000명 정도가 천식으로 사망하며, 우리나라에서도 하기도 질환으로 인한 사망자는 연간 인구 10만 명당 22.6명으로 추정되며 이중 연간 3,000 ~ 4,000명이 천식으로 사망한다고 보고되며 이는 당뇨병으로 인한 사망률을 바로 뒤따르고 있다(Yoon *et al.*, 1998, Cho *et al.*, 2006).

천식의 발병은 주로 아메리카나 호주, 영국 등 산업화된 나라를 중심으로 높게 나타나고 있고, 천식으로 인한 사망률은 산업화가 진행된 나라에서는 낮은 수치를 보이나 천식의 발병률이 높지 않은 러시아와 중국과 같은 나라에서 그로인한 사망률이 높게 나타나고 있다. 이는 천식의 발병률보다는 발병 후 관리 및 치료의 중요성을 시사하고 있다. 천식의 발병을 제대로 치료 관리하지 않으면 사망에 까지 이를 수 있기 때문에 미리 예방하고 조기 치료하여 그 피해를 줄이도록 하여야 할 것이다. 선진국은 전체 의료비의 1~2% 정도를 천식조절에 소요한다고 합니다. 한국 역시 천식으로 인하여 발생하는 사회적 비용은 점점 증가하고 있다. 2004년 측정된 사회적 비용

은 연간 4조원 이상이 되는 것으로 측정이 되고 있으며 이는 악성 종양 (5.5조), 심혈관계 질환(4.3조)의 절반수준에 달하고 있다. 천식은 소아에서 노인까지 전 생애를 거쳐 지속되고, 잦은 재발과 증상악화로 삶의 질을 심각하게 훼손시키는 질환이므로 조기 발견 및 지속적인 관리가 절실하다. 제대로 조절되지 못한 천식은 치료에 고비용이 소요되므로 예방적인 약물치료에 대한 투자는 급성악화에 의한 응급치료 시 비용절감 효과를 가져올 수 있다(한국 성인 천식의 진료지침, 보건복지부, Cho *et al.*, 2006).

현재 천식의 증상완화 및 치료를 위해 사용되어지는 약제로는 흡입 스테로이드, 류코트리엔 조절제 및 지속성 흡입 베타 2 항진제 등이 대표적이다. 흡입 스테로이드제는 기도 염증을 조절하고 기도 과민성을 호전시키며 폐 기능을 개선하지만 중단 시 수 주에서 수 개월 내에 다시 천식 증상이 악화될 수 있다. 또한 국소 부작용으로 구인두 캔디다증, 목소리 변성, 간헐적 기침 등이 나타날 수 있으며 일부 폐에서 흡수되어 전신 부작용이 나타나기도 한다. 류코트리엔 조절제는 흡입스테로이드와 추가 사용 시 스테로이드 용량을 줄일 수 있고, 스테로이드만으로 조절이 되지 않을 때 추가할 경우 증상 조절에 도움이 되지만 지속성 흡입 베타 2 항진제보다는 그 효과가 적다고 알려져 있다. 지속성 흡입 베타 2 항진제는 기도 염증을 억제하는 효과가 없어서 단독으로만 사용할 수는 없지만 흡입 스테로이드와 함께 사용할 경우 가장 효과적이며 천식 증상 완화 및 진행 억제 뿐 아니라 흡입 스테로이드의 필요용량을 줄일 수 있다. 하지만, 이 약제 역시 심혈과 자극, 골격근 진전 및 저칼륨혈증 등의 부작용이 있다(한국 성인 천식의 진료지침, 2011., GINA, 2011, Colice 2000).

이와 같이 현재 사용되는 천식 치료제는 효과적인 약물임에도 불구하고 다양한 부작용 나타나고 있다. 최근 이러한 문제점을 해결하고자 식물 추출물 및 식품유래성분을 이용한 천식 증상 완화제 혹은 치료제에 관한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다(Dai *et al.*, 2002, Harish *et al.*, 2001, Dhawan *et al.*, 2003, Yi *et al.*, 2002). 특히 천식과 같은 만성적인 염증 질환의 경우 지속적인 예방법 혹은 치료법이 적용되어야 하기 때문에 천연 성분에 의한 천식 조절 연구가 필요한 실정이다.

생강(*Zingiber officinale* Roscoe)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하며 세계적으로 향신료로 사용되고 있고, 한방에서는 폐, 비장, 위장에 작용하고 진토제 및 건위제로 사용하였으며 감기, 멀미, 피임약 등으로도 사용되어 왔다. 또한 다양한 연구를 통하여 생강의 항암(Lee *et al.*, 2007, Brown *et al.*, 2009), 항염(Ippoushi *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2005, Jolad *et al.*, 2005), 항당뇨(Akhani *et al.*, 2004, Kato *et al.*, 2006) 등의 효과가 입증되고 있다. 또한 생강 성분 중 1-dehydro-[10]-gingerdione과 [10]-gingerdione의 대식세포 탐식능과 NO 소거능이 확인(Koh *et al.*, 2009)되었고, 이를 바탕으로 gingerdione 유도체들의 생리활성능에 대한 관심이 높아지고 특히 구조가 유사한 12-dehydrogingerdione(12-DHGD) 역시 항염 혹은 항알러지 효과가 기대되고 있다.

따라서 12-DHGD이 알러지 반응에 따른 만성 염증성 기도 질환인 천식의 진행과 증상발현에 대한 효과를 확인하기 첫째, 마우스 대식세포주인 Raw 264.7 세포를 LPS로 자극함으로써 생성되어지는 다양한 사이토카인 및 염증매개물질의 12-DHGD에 의한 억제

능을 확인하여 항염효과를 평가하고 둘째, 알러지 반응을 유도하는 데 가장 중요한 역할을 하는 비만세포주인 HMC-1 세포를 PMACI로 활성화시킴으로써 생성되어지는 다양한 사이토카인에 대한 12-DHGD의 억제효과를 확인하며 셋째, ovalbumin으로 천식동물을 유도하는 동안 12-DHGD을 경구투여시킴으로써 천식의 유도 및 증상완화효과를 알아보려고 하였다.

1장. 문헌고찰

1.1. 천식

천식은 기도가 수축하고 염증이 생기는 흔한 만성 호흡기 질환이다(Mackay *et al.*, 2000, Pearce *et al.*, 2007). 천식은 평소에도 기관지에 염증이 존재하므로 정상인들에게는 아무렇지도 않은 가벼운 자극에도 쉽게 기도가 좁아지게 되어 천명(숨쉴 때 쉼쉼거리는 소리), 기침, 가슴 답답함, 호흡곤란, 객담 등의 증상이 나타나게 된다. 천식은 기도 내에 만성염증이 진행된 상태이므로, 기도 과민성으로 인해 다양한 자극에 대한 반응으로 기도가 더욱 좁아지게 된다(Figure 1-1). 기도염증의 특징적 양상은 호산구, 비만세포, 대식세포, T 림프구의 증가가 나타난다(Mackay *et al.*, 2000, Hamid and Tulic 2009, Devereux 2006). 만성염증과 함께 기관지 상피의 손상과 회복과정에서 기도의 구조적, 기능적 변화가 발생하게 되는데, 이를 기도개형이라하며 상피세포의 손상, 점액분비의 증가, 기도 평활근의 수축, 혈관의 증식 등이 특징적으로 발생된다(Barnes 2008, Hamid and Tulic 2009, Devereux 2006). 천식의 위험인자들로는 천식의 발생을 용이하게 하거나 억제하는 숙주인자들과, 소인이 있는 개인들에서 천식발생의 감수성에 영향을 미치거나 천식 악화를 유발하기도 하며 증상을 지속하도록 야기하는 환경인자들로 분류할 수 있다(NIH, Guide for the diagnosis and management of asthma, 2007). 숙주인자들은 천식이나 알레르기 감작의 발생과 관련된 유전적 소인(아토피피부염, 비정상적인 IgE 생성), 기도 과민성, 성별 및 인종 등을 포함하고, 환경인자들은 소인이 있는 개인들에서 천식이 발병하는 가능성을 변화시키는 즉, 알

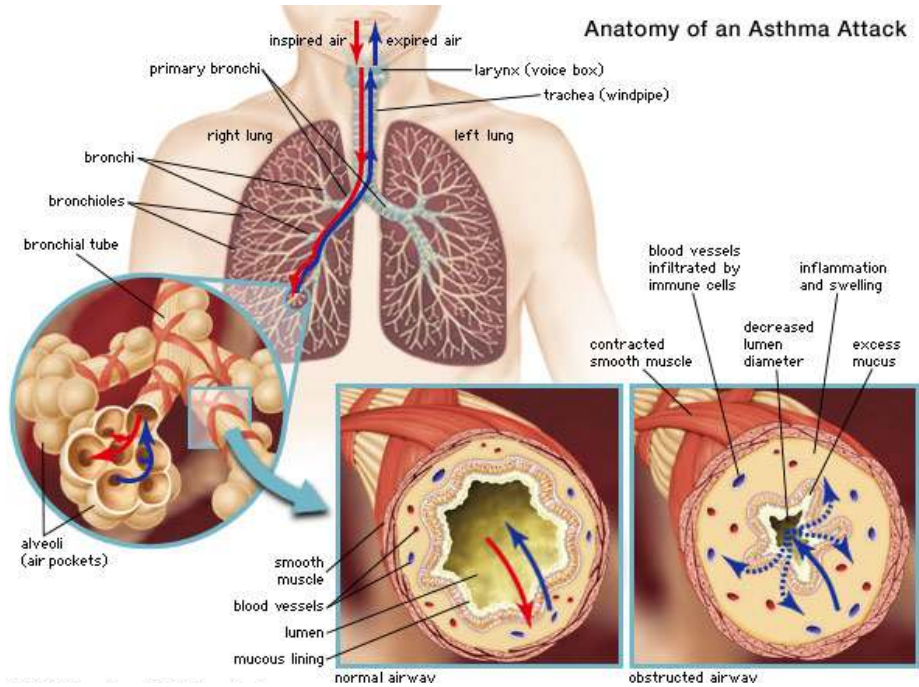


Figure 1-1. Anatomy of an asthma attack (Encyclopedia Britannica, Inc, 2001).

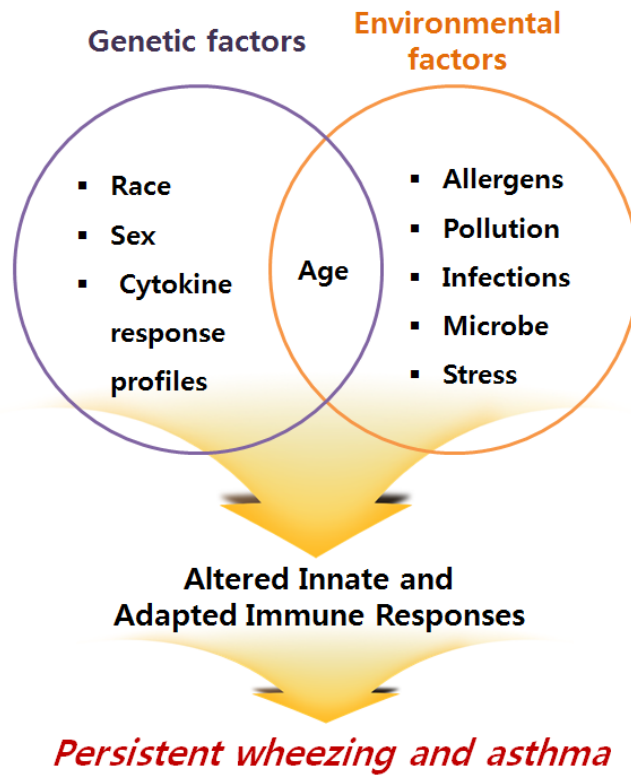


Figure 1–2. Host factors and Environmental exposures (Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma, Full Report 2007, National Asthma Education and Prevention Program).

레르겐, 직업적감작제, 흡연, 대기오염, 호흡기감염, 식이 등이 포함된다(Figure 1-2).

1.2. 염증세포 및 염증매개체에 의한 천식의 기전

천식은 알러젠에 대한 기도 과민증, 기도 폐쇄 및 기도 내 점액 분비 증가 등의 특징을 가지는 만성 염증성 폐질환이다. Naive 한 T helper(Th) 세포는 외부의 감염에 의하여 interleukin(IL)-12를 분비하여 Th1 세포를 활성화시키고, 외부 알러젠에 의한 자극에 대하여 IL-4를 분비하며 Th2 세포를 활성화시킨다. 천식의 경우, 외부 알러젠에 의하여 자극받은 Th2 세포는 염증성 사이토카인인 IL-4, IL-5, 및 IL-13등을 분비하여 호산구(eosinophils)을 자극 부위로의 유입을 유도한다. 또한 알러지 염증의 가장 큰 특징 중의 하나인 B 세포로부터의 immunoglobulin(Ig)E 항체 생성을 유도하며 비만세포를 활성화시킨다(Table 1-1). 지속적으로 allergen에 노출이 되면 이러한 일련의 반응은 더욱 빠르게 진행된다. 알러젠은 APC(antigen presenting cells:항원지시세포) 세포 뿐 아니라 비만세포를 직접 자극하여 과립내에 존재하는 histamine이나 prostaglandins의 분비를 가속화시키고 염증부위에 사이토카인, IgE, 호산구, 호중구(neutrophils)의 유입을 증가시켜 기도 상피세포에 존재하는 점액분비세포를 활성화시키며 기도평활근을 수축하게 한다. 그에 따라 기도는 점점 좁아지고 탄력이 없어지며 점액으로 가득차 호흡이 곤란하게 된다(Figure 1-3). 알러젠에 반응하여 면역 및 염증에 기여하는 세포로 크게 T 세포, 호산구, 호중구 및

Table 1–1. Cytokines that may have a role in the pathogenesis of asthma(modified with Mackay *et al*, 2000).

Cytokine	Primary Sources	Primary Targets	Effects or Function
GSF	Monocytes, fibroblasts, epithelial cells	Neutrophil precursors	· Maturation and differentiation of target cells
GM-CSF	Activated macrophages and T cells	E o s i n o p h i l s , neutrophils, macrophages	· Proliferation, differentiation, activation, and prolonged survival of target cells; enhanced cytokine production; degranulation of eosinophils
IFN-γ	CD4+ Th1 cells, lymphocytes, natural killer cells, some CD8+ T cells	Macrophages CD4+ T cells CD8+ T cells Natural killer cells	· Differentiation of macrophages; activation of macrophages, leading to the expression of nitric oxide synthase, IL-1, TNF · Shift in cytokine profile from Th2 tyoe to Th1 type · Increased cytotoxicity of CD8+ T cells · Activation of natural killer cells
IL-1	Monocytes, macrophages	CD4+ Th2 cells CD8+ T cells B cells	· Production of cytokines · Cellular cytotoxicity; production of cytokines · Differentiation of B cells; proliferation of B cells production of immunoglobulin
IL-2	CD4+ T cells	T cells	· Differentiation and expression of cytokines; maturation of CD8+ T cells
IL-4	CD4+ Th2 cells	B cells Th1 cells	· Growth and activation of B cells; production of IL-6, TNF; class switching to IgE · Inhibition of differentiation of Th1 cells and production of IFN- γ

		Th2 cells	· Differentiation of Th2 cells
		CD8+ T cells	· Differentiation of CD8+ T cells; production of IL-5
IL-5	CD4+ T cells, CD8+ T cells	Eosinophils	· Proliferation, chemoattraction, adhesion, activation, enhanced survival, and degranulation of eosinophils
IL-9	CD4+ T cells (especially Th2)	B cells	· Enhancement of response to IL-4
IL-10	CD4+ Th0 cells, Th1 cells, Th2 cells, CD8+ T cells	Monocytes Macrophages	· Differentiation to macrophage · Inhibition of TNF production, inhibition of IL-4 and IFN- γ by Th2 cells
IL-12	Monocytes, macrophages	Natural killer cells Th0 cells Th1 cells Th2 cells	· Activation of natural killer cells · Production and proliferation IL-2 · Production of IFN- γ and TNF- α · Inhibition of production of IL-4, 5, and 10
IL-13	CD4+ Th2 cells	B cells Monocytes	· Similar to those of IL-4 · Inhibition of production of IL-1 and TNF
IL-14	Activated T cells	Activated B cells	· Expansion of B-cells and suppression of immunoglobulin secretion
M-CSF	Monocytes, fibroblasts, epithelial cells	Multipotential hematopoietic precursors	· Differentiation of monocytes
Platelet-derived growth factor	Alpha granules of platelets, monocytes, macrophages	Fibroblasts and smooth muscle cells	· Proliferation of target cells; chemoattractant for fibroblasts; active in wound healing, atherogenesis, and airway remodeling
Stem-cell factor	Bone marrow stroma, fibroblast	Mast cells	· Chemoattractant; stimulation of growth; induction of histamine release

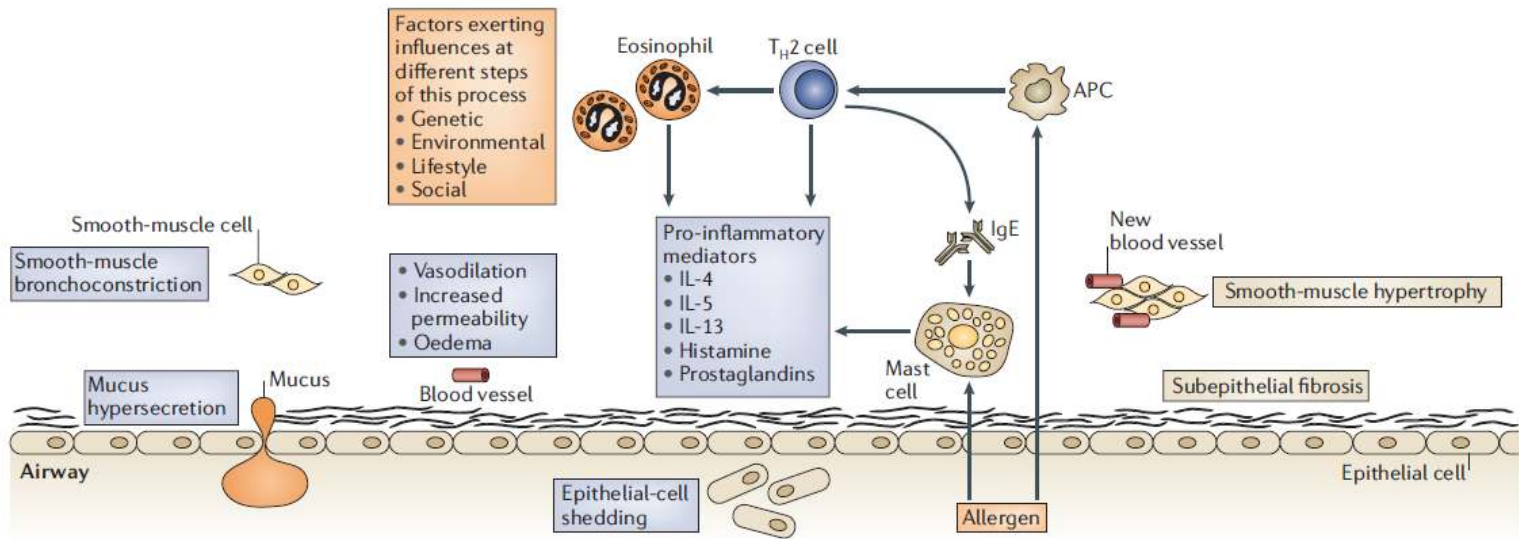


Figure 1–3. Immunological pathways that result in the inflammatory changes that occur in the airways of individuals with asthma.

비만세포를 들 수 있다. T 세포의 활성화는 기도 폐쇄, 기도 과민성, 기도 내로 호산구의 유입 및 작용 촉진을 유도한다. 호산구는 T 세포의 자극으로부터 염증부위로 모여와 T 세포와 함께 초기염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor(TNF)- α , granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF) 등을 분비하며 천식 증상을 악화시키는 역할을 한다. 실제적으로 천식환자의 폐 세척액 내에서 정상대조군에 비하여 호산구의 유의적인 증가를 확인할 수 있다. 호중구는 reactive oxygen species(ROS), lipid mediators, elastase, cathepsin G와 같은 염증 매개체 및 효소들을 분비하면서 기도 질환의 병변을 일으키는데 중요한 역할을 한다. 비만세포는 세포질 내 과립을 가진 세포중의 하나로서 미성숙한 상태로 혈액에 존재하다가 주위 환경에 영향을 받아 성숙한 형태로 발달하게 된다. 세포 표면에 Fc ϵ RI가 존재하여 자극 받은 B세포에서 형성된 IgE와 결합하여 과립내의 화학매개체와 cytokines을 분비하면서 알레르기 및 염증반응을 일으킨다.

1.3. 천식 동물 모델

전 세계적으로 천식의 발병률, 증상악화 및 사망률이 증가되고 있지만 적절한 치료법은 미흡한 실정이다. 알러지성 염증 질환을 치료하거나 증상완화에 도움이 되는 효과적인 새로운 약물의 필요성이 대두되고 있다 (Szelenyi, 2000). 최근 다양한 연구를 통하여 인체에서 나타나는 기관지천식을 모방하는 동물모델이 제안되고 있다(Szelenyi, 2000). 특정물질의 천식 증상 완화 효과 확인 및 신약 개발에 뒷받침하기 위해서는 적절한 동물의 선택이 필요하기 때문이다. Table 1-2에서와 같이 현재 천식동물로서 마우스, 랫드, 기니피그 등이 사용되고 있다. 각 동물들에 있

Table 1–2. Advantages and disadvantages of individual animal model of asthma(Shin *et al.* 2009 and David *et al.*, 2000)).

Animal	Advantages	Disadvantages
Mouse	<ul style="list-style-type: none"> · IgE is the primary anaphylactic antibody · Numerous immunological reagents · Numerous inbred strains · Easy Breeding · Short gestational period · Small and relatively inexpensive 	<ul style="list-style-type: none"> · Do not exhibit spontaneous airway hyperresponsiveness · Limited airway musculature · Lung anatomical differences · Do not respond to histamine · Absence of a chronic model
Rat	<ul style="list-style-type: none"> · IgE is the primary anaphylactic antibody · Produce long–lasting airway response · Show immediate and late phase airway responses 	<ul style="list-style-type: none"> · Requires injection of the allergen for sensitization · Requires adjuvants for sensitization · Species–specific immunological reagents are not abundant
Guinea pig	<ul style="list-style-type: none"> · Lung is the primary target of anaphylaxis · Response to cholinergic agonists · Show immediate and late phase airway responses 	<ul style="list-style-type: none"> · IgG1 is the major anaphylactic antibody · Shortage of inbred strains · Few species–specific reagents

	<ul style="list-style-type: none"> · Pulmonary inflammation composed of eosinophils and neutrophils 	
Cat	<ul style="list-style-type: none"> · The histopathology of the lung is similar to humans (accumulation of mucus and persistent hyperresponsiveness to methacholine) 	<ul style="list-style-type: none"> · Little is known about the immune system · Markers to measure IgE or cytokines are not readily available
Dog	<ul style="list-style-type: none"> · High IgE levels · Increased levels of mucus and numbers of eosinophils in the lung 	<ul style="list-style-type: none"> · Expensive · Alum is required as an adjuvant for immunization
Rabbit	<ul style="list-style-type: none"> · Show immediate and late phase airway responses · Lung is the primary target of anaphylaxis · IgE is the primary anaphylactic antibody 	<ul style="list-style-type: none"> · Neonatal immunization required for late phase airway response
Large animals	<ul style="list-style-type: none"> · Horses naturally develop respiratory disorders when exposed to barn dust · Monkeys develop natural sensitivity to <i>Ascaris</i> 	<ul style="list-style-type: none"> · Hard to handle · Expensive

어서 장·단점이 존재하지만 마우스가 천식의 특징을 잘 나타내며 다루기도 쉽고 경제적이므로 가장 많이 사용되고 있다(Shin *et al.* 2009). Gueders 등에 의하면 가장 많이 사용하고 있는 마우스 종인 C57BL/6와 Balb/c 중에서 Balb/c 동물에서 기도과민성, 폐 조직 내 비만세포 양 증가 및 Th2 관련 cytokines (IL-4, IL-5, IL-13) 수치가 C57BL/6 보다 유의적으로 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다(Gueders *et al.*, 2009). Blacquiere 등은 같은 Balb/c 마우스 중에서도 암컷에서 혈중 IgE의 수준 및 기도과민성, 기도 내 호산구의 수 증가 등이 수컷에서보다 높게 측정됨을 보고하였다(Blacquiere *et al.*, 2010). Di Valentin 등은 Balb/c 마우스를 이용하여 천식 유도기간에 따른 바이오마커 발현정도를 측정하였는데, short term (28일) 기간에서 기도과민성, 폐 조직 내 염증세포 침윤 및 호산구 수치가 대조군에 비하여 유의적인 증가를 보였다(Di Valentin *et al.*, 2009). 56일 및 90일 동안 천식 유도하는 동물에서는 대조군과의 차이가 28일 보다 낮아지거나 차이를 보이지 않는 경우가 존재하였다. 인위적으로 질병 모델을 만들 경우, 기간이 증가되면서 동물이 회복하려는 경향에 따라 대조군과의 차이가 좁아지거나 차이가 나타나지 않게 되는 기존 문헌들과 일치하는 부분이기도 하다. 기존 문헌들에 따라 천식유발동물은 천식질환의 특징을 가장 잘 나타내며 많은 이점을 가지고 있는 Balb/c female 마우스를 이용하고, short term으로 적용하는 것이 새로운 천식 치료효과 후보물질을 적용하기에 가장 적합할 것으로 사료된다.

1.4. 12-dehydrogingerdione

건강(*Zingiber officinale* Roscoe)은 생강의 뿌리줄기를 건조한 것으로서 <동의보감>에 의하면 ‘건강은 외풍을 몰아내는 온성의 소화제로서 심기를 통하고 양을 돋우며 오장육부의 냉을 제거하는데 쓴다’고 기록되어있다. 또한 예로부터 건강은 소화기계의 복통이나 소화불량에 사용되며 진통제로 사용되기도 했다(Table 1-3). 건강의 주성분으로는 2-gingerol, 6-gingerol, 6-shogaol, 8-gingerol 및 10-gingerol 등이 있고 이 성분들의 anticancer, anti-inflammatory effect, antimicrobial, anti-diabetic effects 등이 연구되어왔다. Koh 등은 *Zingiber officinale*로부터 분리한 14개의 화합물을 이용하여 대식세포의 탐식능과 LPS 자극으로부터 생성되어지는 염증성 NO 억제능을 연구하였다. 총 14가지 물질 중 1-dehydro-[10]-gingerdione과 [10]-gingerdione 성분에서 대식세포의 탐식능은 높게 유지하면서 LPS 자극에 의한 NO 생성은 유의적으로 억제하는 것이 확인되었다. 이러한 작용이 gingerdione의 구조로부터 유도되는 기능이라 추측되어 gingerdione과 구조적으로 유사한 유도체 11가지를 합성한 후 대식세포의 탐식능이 재확인되었다. 그 중 12-DHGD이라는 성분은 생강의 0.01 % 정도를 차지하는 소수성분이나, 대식세포의 탐식능을 높게 유지하며, 합성도 용이하여 추후 활용이 기대되어 졌다. 일반적으로 대식세포는 외부에서 유입된 pathogen을 세포내로 잡아들여 소화하여 제거하는 작용을 하며 이 과정에서 hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion (O_2^-) 및 nitric oxide (NO)와 같은 물질이 생성되어 염증

이 진행되고 만성질환을 일으키게 된다. 하지만, 위의 두 물질처럼 대식세포의 탐식능을 증가시켜 외부 pathogen 제거에는 탁월하며, 외부 자극에 의해 생성되는 염증매개 물질을 억제하는 작용은 체내로부터 외부 자극물질에 대한 보호작용을 할 수 있는 가능성이 보였다. Tjendraputra 등은 생강 구성분과 합성 유도체 17가지를 이용하여 COX-2 저해능에 관한 연구를 진행하였고, 구조분석을 통하여 COX-2를 저해하기 위해 필요되는 3가지 구조특징을 규명하였다. 첫째, 방향족을 구성하며 둘째, 친유기의 알킬 곁사슬 (alkyl side chain)을 가지며 셋째, 곁사슬에 대한 기능기 치환 패턴 (functional group substitution pattern)을 포함하는 것이다 (Tjendraputra *et al.*, 2001). 본 연구에서 사용한 12-DHGD의 구조는 Figure 1-4와 같다. 본 물질의 화학구조에서 알 수 있듯이, 12-DHGD은 Tjendraputra 등이 규명한 COX-2 저해하기 위해 필요한 방향족을 구성하고, 친유기의 알킬곁사슬을 가지며 또한 기능기 치환 패턴을 유지하고 있다. 이러한 기존 연구결과를 토대로 12-DHGD은 COX-2의 저해능이 기대되어지고 또한 항염 및 항알러지 효과 및 알러지성 만성 염증 질환에 적용하여도 그 효용성이 있을 것으로 사료된다.

Table 1–3. The botanical classification of *Zingiber officinale* Roscoe (Butt M.S. and Sultan M.T. 2011).

Kingdom:	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta–Vascular plants
Super–division	Spermatophyta–Seed plants
Class	Monocotyledons
Subclass	Zingiberidae
Family	Zingiberaceae (Ginger Family)
Genus	Zingiber
Species	Officinale
Major pungent ingredients	Gingerols, Shogaols, Paradols, Gingerdiones, Dehydrogingerdiones



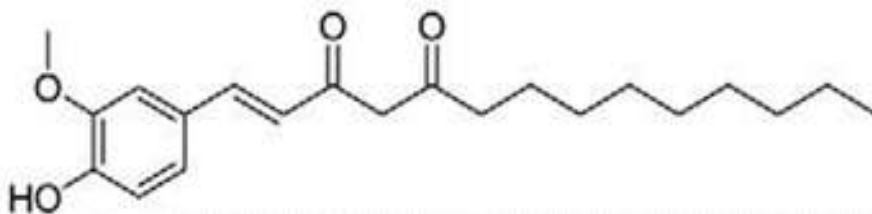


Figure 1-4. The structure of 12-dehydrogingerdione.

2장. LPS로 자극한 Raw 264.7
세포에서 생강 성분인
12-dehydrogingerdione의 항염증
효과

2.1. 서 론

염증 반응은 체내에 병원체의 침입이나 손상된 조직에 대하여 생리적으로 체내를 보호하기 위한 다양한 활동으로 인해 진행된다 (Li and Wang 2011, Su *et al.*, 2011). 만성적으로 진행된 또는 치료되지 않은 염증은 심혈관계질환, 류머티즘, 암, 알츠하이머병 및 파킨슨병으로 진행될 수 있다 (Jara *et al.*, 2006, Karin *et al.*, 2006). 염증 진행 과정에서 대식세포는 병원체에 반응하여 interleukin (IL)- 1β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α 와 같은 초기염증성 cytokines의 생성과 nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2 및 prostaglandin E (PGE) $_2$ 와 같은 염증 촉진 매개체를 지속적으로 분비하게 된다 (Tao *et al.*, 2008, 이 외., 2010). LPS는 gram 음성 박테리아의 외막 구성분으로써 인체에 강력한 내독소이며 세포 표면의 CD14/TLR4/MD에 결합하여 대식세포의 활성화를 유도한다. 기존의 다양한 문헌에서 마우스 대식세포인 Raw 264.7 세포에 LPS 자극을 줌으로써 LPS 자극에 의해 생성되어지는 염증성 cytokines의 생성 및 염증 촉진 매개체의 변화를 측정하여 식물추출물 또는 단일물질의 완화효과를 살펴보고 있다 (Yoon *et al.*, 2009, Yang *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2009).

Nitric oxide (NO)는 세포내에서의 형태와 그 농도에 따라 그 작용이 달라지며, 세포에서 L-arginin이 NADPH에 의해 L-citrullin으로 산화되는 과정에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의하여 합성된다. NOS는 구성형과 유도형으로 존재한다. 구성형 NOS는

calcium과 calmodulin 결합에 의한 효소활성 수준에 따라 조절되고 neuronal NOS(nNOS)로서 신경계에 존재한다. 구성형 NOS는 낮은 수준으로 NO를 생성하며 수용성의 guanylate cyclase를 활성화하여 second messenger cyclic GMP를 생산한다. 이러한 작용은 체내에서 혈압조절, 혈소판 응집, 골격근 대사 및 세포사이의 여러 가지 생리 대사적인 변화를 조절하는 역할을 한다(Wilson, K. T *et al.*, 1996). 유도형 nitric oxide synthase(NOS)는 미생물, 사이토카인, 다양한 세포들이 분비하는 자극물질 등에 의하여 대식세포가 활성화되면서 생체를 방어하기 위하여 고농도로 장시간 생산되어진다. 과도한 NO의 생성은 조직손상, 신경손상등을 유발하고 혈관 투과성을 증가시킴으로 다른 면역세포의 유입을 유도하여 염증 반응을 촉진시킨다(이 외, 2010, Wink and Mitchell, 1998).

Cyclooxygenase(COX)는 염증의 중요한 매개체인 prostaglandins(PGs)의 생성을 조절하는 핵심 효소이다. COX-2의 발현은 초기염증성 사이토카인 및 성장촉진 요인과 같은 세포외부로부터의 신호에 의하여 유도되어진다. Arachidonic acid는 세포막 내에 저장되어진 다가불포화 지방산이다. Arachidonic acid는 PGs, prostacyclin, thromboxane등으로 전환되어진다. COX-1과 COX-2 효소는 PGs의 형성에 대하여 비율제한적으로 촉진한다. COX-1은 생리적인 기능을 유지하기 위하여 낮은 수준에서 PGs을 합성하는 대부분의 조직에서 구성적으로 발현된다. 반면에 COX-2는 초기염증성 자극, 사이토카인의 발현 등에 의하여 활성화된 대식세포에 의하여 급격히 생성되어지며 결국 PGs의 과도한 생성의 결과를 가져온다. 특히 PGE₂는 염증, 통증, 발열 유발인자로 알려져 있으며 최근 혈관신생을 통한 암 발생에도 기여한다는 보고

가 있다(Park *et al.*, 2006, Hussain *et al.*, 2003). 또한 COX-2의 활성이 직접적으로 NO에 의하여 조절되고 있음이 보고되고 있다. iNOS가 직접적으로 COX-2와 결합하여 iNOS의 활성을 증가시키면서 NO의 발생을 증가시킨다는 보고도 전해지고 있다(Kim *et al.*, 2005). 따라서 염증 반응에서 생성되는 위와 같은 다양한 cytokines의 발현과 NO, PGE₂의 생성을 억제함으로써 항염증 효과를 확인할 수 있다.

이번 장에서는 생강성분 중 하나인 12-DHGD의 염증성 질환을 위한 치료후보 물질로서 활용 가능성을 확인하기 위하여 LPS로 활성화시킨 대식세포로부터 생성되어지는 초기 염증성사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α), 염증반응을 촉진하는 다양한 매개체(NO, PGE₂) 및 조절인자(iNOS, COX-2)의 발현에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

2.2. 실험재료 및 방법

2.2.1. 시약

Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)은 LONZA(Lonza Walkersville, Inc., USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), penicillin streptomycin (P/S)은 GibcoBRL (Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. E. coli lipopolysaccharide(LPS)와 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazilyl blue(MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), Griess reagent system 은 Promega (Madison, WI, USA), IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂ ELISA kit는 모두 R&D system, Inc. (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. RNA 추출을 위하여 RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하였고, 중합효소반응 키트는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 시험물질인 12-DHGD은 바닐린, 아세톤 및 수산화나트륨으로부터 합성되어진 것으로서 한국화학연구원(Korean Research Institute of Chemical Technology, Daejeon, Korea)으로부터 NMR에 의하여 구조 확인한 후 지원받아 사용하였으며, 실험 시 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 희석하여 사용하였다.

2.2.2. 세포주 및 세포배양

Raw 264.7 세포 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea, KCLB No: 40071)는 마우스(mouse) 대식세포로서 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin(P/S)를 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 세대 배양을 수행하였다.

2.2.3. 세포독성 측정

12-DHGD에 의한 세포 독성을 측정하기 위하여 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay 방법을 사용하였다. 이 방법은 대사적으로 왕성한 세포의 미토콘드리아 내 전자 전달계에 존재하는 탈수소 효소가 tetrazolium salts를 분해하여 formazan이라는 발색물질을 생성하는 원리를 이용한다. 이 formazan에 의한 발색 강도 증감은 살아있는 세포 수와 직선적인 상관관계가 있다는 것을 의미한다. Raw 264.7 세포를 5×10^4 /well 농도로 96 well plate에 각각 분주하고, 24시간 후에 배지를 제거하고 DMSO에 녹인 12-DHGD을 50, 100, 150, 200 ng/ml의 농도별로 처리하여 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 MTT 시약 (5 mg/ml)을 well 당 100 μ l 씩 넣은 후 빛을 차단하여 37 °C incubator에서 4시간 동안 배양하였다. MTT 시약을 제거하고 DMSO를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 MTT 환원에 의해 생성된 formazan을 ELISA microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도

를 측정하였다.

세포생존율은 다음과 같은 공식에 의하여 계산되었다.

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{absorbance of treated cells}}{\text{absorbance of untreated cells}} \times 100$$

2.2.4. NO(nitric oxide) 측정

활성화된 대식세포에 의해 생성된 NO는 쉽게 nitrate와 nitrite로 분해되어지며, nitrate NADH 또는 NADPH 의존적인 nitrate reductase에 의하여 nitrite로 전환된다. 총 NO의 생성량을 측정하기 위하여 nitrite와 화학반응하여 보라색의 아조염을 형성하는 griess reagent를 사용하였다. Raw 264.7 세포를 2×10^5 /well 농도로 24 well plate에 각각 분주하고, 24 시간 후에 배지를 제거하고 12-DHGD을 농도별(50, 100, 150, 200 ng/ml) 1 시간 동안 전 처리하였다. 1 μ g/ml 농도의 LPS를 첨가하여 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 배양 상등액 50 μ l를 취하여 96 well plate에 loading하였다. Sulfanilamide 50 μ l를 첨가하여 빛을 차단한 후 10분 동안 반응시켰다. 그 후 N-1-napthylethylenediamine dihydrochloride(NED) solution 50 μ l를 첨가하고 빛을 차단한 후 10 분 동안 반응시켜 생성된 보라색 아조염을 ELISA microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서

흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 NO 표준곡선으로부터 계산하였다.

2.2.5. PGE₂ 및 cytokine 생성량 측정

Raw 264.7 세포를 5×10^6 /well 농도로 6 well plate에 각각 분주하고, 24 시간 후에 배지를 제거하고 12-DHGD을 농도별(50, 100, 150, 200 ng/ml) 1 시간 동안 전 처리하였다. 1 μ g/ml 농도의 LPS를 첨가하여 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 배양 상등액을 수집하여 -80°C 에 보관하였다. 세포 상등액에 존재하는 세포활성 물질량은 ELISA 법을 이용하여 정량하였다. 96 well plate에 IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 PGE₂의 1차 항체를 코팅하여 overnight 하였다. 코팅된 plate는 0.05 % tween 20이 포함된 PBS를 이용하여 washing 하였다. BSA가 포함된 PBS를 이용하여 코팅된 1차 항체를 blocking 하였다. Washing 한 후 준비한 각 물질의 standard 및 세포 배양 상등액을 96 well plate에 넣어 1차 항체와 반응시켰다. 2시간 동안 상온에서 반응 시킨 후 2차 항체를 붙여주었다. Washing 한 후 streptavidin-HRP를 첨가하고 빛을 차단한 상태로 20분간 상온에서 발색시키고, 2N H₂SO₄를 이용하여 반응을 멈추고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.6. RNA 정량 및 cDNA 합성

Total RNA는 Qiagen의 RNeasy mini kit를 사용하여 추출하였

다. Raw 264.7 세포는 12-DHGD 각 농도별(50, 100, 150, 200 ng/ml)로 전처리 한 뒤, 1 μ g/ml의 LPS를 첨가하여 24시간 동안 배양한 세포 pellet으로부터 준비하였다. Pellet은 β -mercaptanol이 첨가된 RLT buffer 600 μ l를 넣어 용해시켜 원심분리 후 상등액은 동량의 70 % ethanol과 혼합되었다. Spin column으로 옮긴 후 원심 분리하여 column을 빠져나간 용액은 모두 버리고 RW1 buffer를 이용하여 column을 washing하였다. RPE buffer를 이용하여 RNA에 부착되어있는 salts와 잔여물질을 washing하고 순수한 RNA만을 추출하였다. 추출한 RNA는 분광 광도법(NanoDrop 2000c; Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)을 이용하여 정량하였다. 추출한 RNA는 Improm II Reverse Transcription System을 사용하여 cDNA로 합성하였다. RNA 5 μ l는 nuclease-free water에 용해된 1 μ g oligo-dT와 혼합하여 70 $^{\circ}$ C에서 5 분간 반응시켰다. 역전사 반응을 위하여 변성시킨 RNA, oligo-dT solution, MgCl₂, dNTP, reverse transcriptase 및 nuclease free water를 혼합하여 42 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 합성된 cDNA 역시 분광 광도법을 이용하여 정량하였다.

2.2.7 Real-time PCR 수행

유전자의 발현 정도를 분석하기 위하여 Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다. 반응을 위하여 cDNA 5 μ l에 2X SYBR 10 μ l, 10 pmole primer 각 0.5 μ l와

nuclase-free water 4 μl 를 합하여 총 20 μl 에 맞춘 다음 StepOne™ Software V2.1(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 이용하여 수행하였다. 증폭조건은 95 °C로 10분 동안 holding stage를 거치고 95 °C, 15초 후 60 °C, 1분의 cycling stage 및 95 °C로 15초 후 60 °C로 1분의 melt curve stage의 반응을 40회 반복하여 증폭하였다. 모든 cycle이 완료된 후 95 °C에서 15초 동안 반응시켜 primer의 melting curve 분석을 수행하였다. 모든 PCR 산물은 항존 유전자인 β -actin에 대하여 상대정량하여 계산되었다. Real-time PCR에 사용된 primer의 염기서열은 Table 2-1과 같다.

2.2.8. 통계처리

모든 실험 결과는 3 회 이상 실시하여 이루어 졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 mean \pm SD로 나타내었으며, 통계처리는 students' *t*-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

Table 2-1. Sequences of the primers used for RT-PCR.

Target Gene		Oligonucleotide sequence
iNOS	Forward	5'-GGATCTTCCCAGGCAACCA-3'
	Reverse	5'-CAATCCACAACCTCGCTCCAA-3'
COX-2	Forward	5'-GCCGGGTAAGCATTGTTTCCT-3'
	Reverse	5'-CCTATCTCTATGACAAAAATCCTAAAGCT-3'
β -actin	Forward	5'-AATCGTGCGTGACATCAAAG-3'
	Reverse	5'-GCCATCTCCTGCTCGAAGTC-3'

2.3. 결과

2.3.1. 12-DHGD의 Raw 264.7 세포에 대한 독성

특정 화합물 혹은 식물 추출물을 이용하여 세포 수준에서 효능을 조사하기 위해서는 기본적으로 세포 대사에 영향을 주지 않는 농도를 선택하여야 한다. 12-DHGD이 세포 생존율에 영향을 주는 지 확인하기 위하여 Raw 264.7 세포와 12-DHGD을 24시간 동안 배양한 후 MTT 방법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 무처리군에 대한 12-DHGD의 각 농도 50, 100, 150, 200 ng/ml에 대한 세포 생존율은 110.7 %, 105.2 %, 97.1 % 및 97.3 %로 측정되었다. 12-DHGD은 세포 독성을 나타내지 않았으며, 50과 100 ng/ml의 농도에서는 12-DHGD을 처리하지 않은 대조군보다 세포 생존율이 증가되었다(Figure 2-1). 이로써 본 시험에 사용되어진 12-DHGD 모든 농도 값은 Raw 264.7 세포에 대하여 독성이 없는 것으로 나타났으며, 이에 따라 추후 시험은 이 농도 범위에서 이루어졌다.

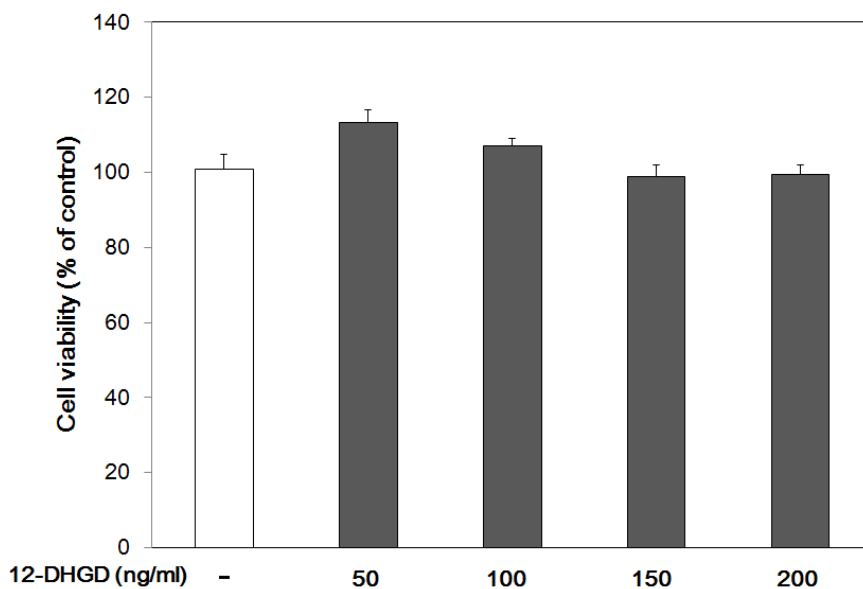


Figure 2-1. Cell viability of murine macrophage Raw 264.7 cells.

Cell viability of Raw 264.7 cells after incubation in the presence of various concentrations (50, 100, 150 and 200 ng/ml) of 12-DHGD for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay.

2.3.2. LPS로 유도한 NO 생성에 있어서 12-DHGD의 억제 효과

대식세포는 LPS 또는 TNF- α 와 같은 자극제에 의하여 NO를 생산한다. 염증과정중에 생성되는 과도한 NO는 혈관 투과성을 증가 시킴으로서 조직손상, 신경과괴 및 부종 등을 야기한다(이 외, 2010, Wink and Mitchell, 1998). LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서 12-DHGD의 NO 생성 저해능을 확인하였다. 12-DHGD을 Raw 264.7 세포에 다양한 농도로 처리한 후 각 농도별로 생성되는 NO의 양을 측정하였다. Raw 264.7 세포만을 배양한 무처리 control 군에서는 NO가 거의 생성되지 않아 Nitrite 표준곡선 대비 $0.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$ 값이 측정되었다. 하지만, LPS로 자극한 Raw 264.7 세포에서는 NO의 생성량이 증가하여 $48.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$ 이 측정되었다. LPS로 인하여 활성화 된 Raw 264.7 세포로부터 생성되어진 NO는 12-DHGD 농도별 50, 100, 150 and 200 μM 에 대하여 각각 $47.4 \pm 0.5 \mu\text{M}$, $46.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$, $46.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 및 $45.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$ 이 측정되었다(Figure 2-2). 모든 농도의 12-DHGD이 LPS에 의해 자극받은 Raw 264.7 세포가 분비하는 NO의 생성을 크게 억제하지는 않았지만, 100 ng/ml, 150 ng/ml과 200 ng/ml 농도의 12-DHGD은 LPS 자극에 의하여 생성되어지는 NO에 대하여 통계적으로 유의성있게 감소시키는 것으로 나타났다.

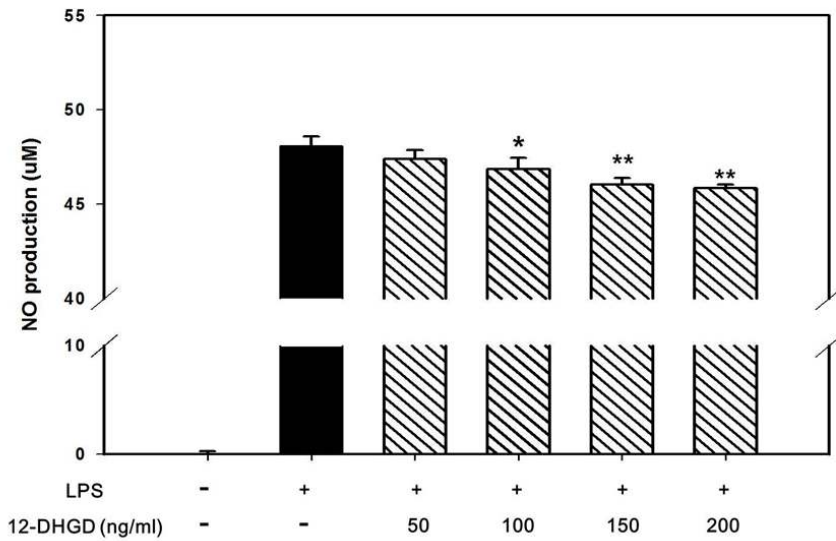


Figure 2-2. Effect of 12-DHGD on NO production by LPS-stimulated Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were treated with only DMEM or 50-200 ng/ml 12-DHGD in the presence of LPS (1 µg/ml) for 24 h. Nitrite levels in the culture medium were measured with Griess reagent. * $p < 0.05$ for cells treated with LPS versus LPS+12-DHGD. ** $p < 0.01$ for cells treated with LPS versus LPS+12-DHGD.

2.3.3. LPS로 유도한 초기염증성 사이토카인 (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성에 있어서 12-DHGD의 억제 효과

생강 성분인 12-DHGD이 LPS 자극으로부터 활성화된 Raw 264.7 세포로부터 분비되어지는 염증성 cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 억제하는지 확인하기 위하여, 12-DHGD을 농도별(50, 100, 150, 200 ng/ml)로 1시간 동안 전 처리한 후 LPS를 첨가하여 24시간 추가 배양함으로써 생성되어지는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 양을 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다.

Raw 264.7 세포만을 배양한 무처리 control 군에서는 IL-1 β 가 거의 생성되지 않아 IL-1 β 재조합 표준곡선 대비 35.9 ± 2.2 pg/ml 값이 측정되었다. 하지만 LPS로 활성화되어진 Raw 264.7 세포에서는 IL-1 β 가 과량 분비되어 830.3 ± 8.4 pg/ml이 측정되었다. LPS로 인하여 활성화 된 Raw 264.7 세포로부터 생성되어진 IL-1 β 는 12-DHGD 농도별 50, 100, 150, 200 ng/ml에 대하여 각각 864.7 ± 3.9 pg/ml, 916.3 ± 29.2 pg/ml, 890.9 ± 16.4 pg/ml 및 836.6 ± 37.6 pg/ml이 측정되었다(Figure 2-3). 12-DHGD 모든 처리농도에서 LPS 자극에 의하여 과량 생성된 IL-1 β 보다 더 높은 수준의 IL-1 β 생성을 나타냈으나, 이 값은 통계적인 유의성을 갖지는 않았다.

Raw 264.7 세포만을 배양한 무처리 control 군에서는 IL-6가 거의 생성되지 않아 IL-6 재조합 표준곡선 대비 40.2 ± 1.0 pg/ml 값이 측정되었다. 하지만 LPS로 활성화되어진 Raw 264.7 세포에서는 IL-6가 과량 분비되어 1011.7 ± 9.7 pg/ml이 측정되었다.

LPS로 인하여 활성화 된 Raw 264.7 세포로부터 생성되어진 IL-6 는 12-DHGD 농도별 50, 100, 150, 200 ng/ml에 대하여 각각 908.3 ± 8.3 pg/ml, 886.1 ± 7.2 pg/ml, 899.5 ± 17.9 pg/ml 및 833.2 ± 10.3 pg/ml이 측정되었다(Figure 2-4). 12-DHGD 모든 처리농도에서 LPS 자극에 의하여 Raw 264.7 세포로부터 생성된 IL-6를 통계적으로 유의성있게, 농도 의존적으로 감소시키는 것이 확인되었다.

Raw 264.7 세포만을 배양한 무처리 control군에서는 TNF- α 가 거의 생성되지 않아 TNF- α 재조합 표준곡선 대비 64.1 ± 2.7 pg/ml 값이 측정되었다. 하지만 LPS로 활성화되어진 Raw 264.7 세포에서는 TNF- α 가 과량 분비되어 1704.8 ± 19.4 pg/ml이 측정되었다. LPS로 인하여 활성화 된 Raw 264.7 세포로부터 생성되어진 TNF- α 는 12-DHGD 농도별 50, 100, 150, 200 ng/ml에 대하여 각각 1647.9 ± 16.8 pg/ml, 1669.1 ± 6.2 pg/ml, 1643.5 ± 26.5 pg/ml 및 1629.8 ± 35.4 pg/ml이 측정되었다(Figure 2-5). 12-DHGD 모든 처리농도에서 LPS 자극에 의하여 과량 생성된 TNF- α 생성량 대비 약간 감소하는 경향을 나타냈지만, 통계적으로 유의성이 나타나지 않았다.

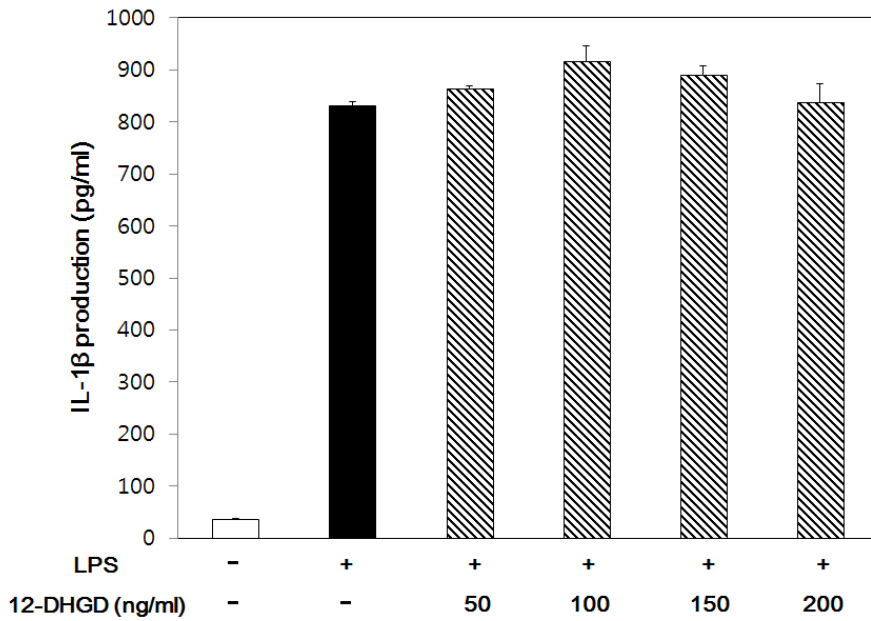


Figure 2–3. Effects of 12–DHGD on IL–1 β production by LPS–stimulated Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were treated with only DMEM or 50–200 ng/ml 12–DHGD in the presence of LPS (1 μ g/ml) for 24 h. Production of IL–1 β was measured in the culture medium by ELISA assay.

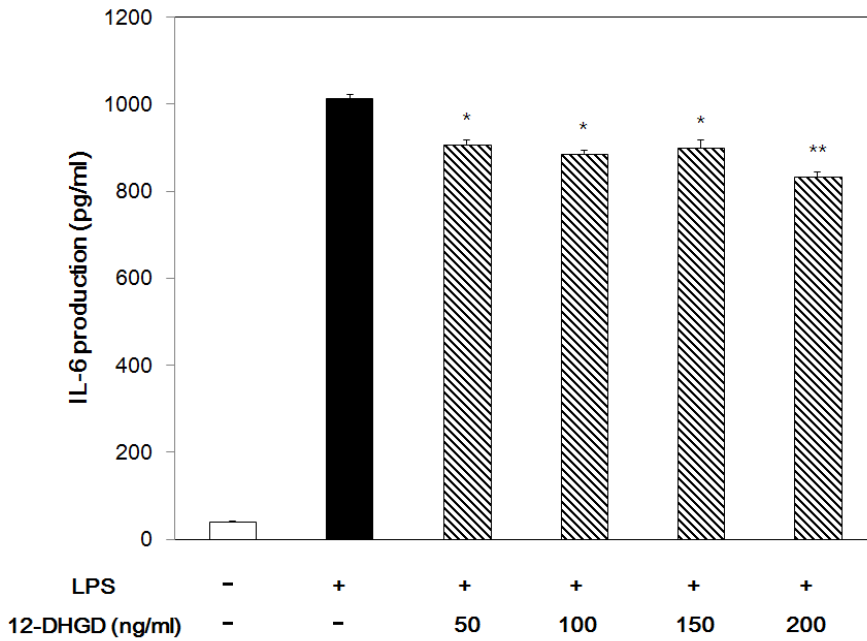


Figure 2-4. Effects of 12-DHGD on IL-6 production by LPS-stimulated Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were treated with only DMEM or 50-200 ng/ml 12-DHGD in the presence of LPS (1 μ g/ml) for 24 h. Production of IL-6 was measured in the culture medium by ELISA assay. * $p < 0.05$ for cells treated with LPS versus LPS+12-DHGD.

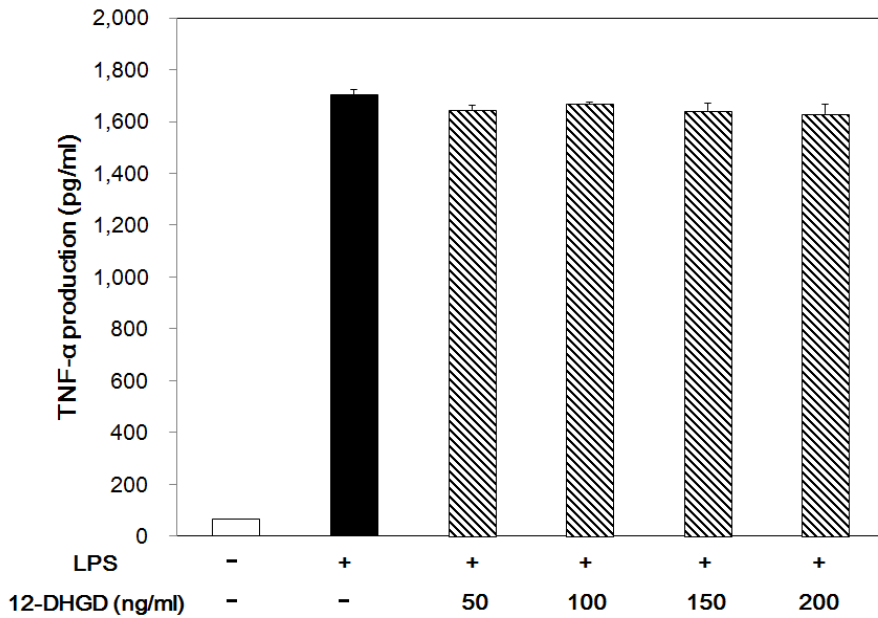


Figure 2-5. Effects of 12-DHGD on TNF- α production by LPS-stimulated Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were treated with only DMEM or 50-200 ng/ml 12-DHGD in the presence of LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. Production of TNF- α was measured in the culture medium by ELISA assay.

2.3.4. LPS로 유도한 PGE₂ 생성에 있어서 12-DHGD의 억제 효과

PGE₂는 다양한 염증 반응 시 COX-2 효소에 의하여 생성되며 염증부위에 혈관 투과성을 증가시켜 면역세포를 유입하는데 중요한 역할을 한다. 따라서 PGE₂의 생산은 중요한 염증반응 지표로 사용할 수 있다. 본 실험에서 생강 성분인 12-DHGD이 LPS 자극으로부터 활성화된 Raw 264.7 세포로부터 분비되어지는 염증성 cytokine인 PGE₂을 억제하는지 확인하기 위하여, 12-DHGD을 농도별(50, 100, 150, 200 ng/ml)로 1시간 동안 전 처리한 후 LPS를 첨가하여 24시간 추가 배양함으로써 생성되어지는 PGE₂의 양을 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다.

Raw 264.7 세포만을 배양한 무처리 control 군에서는 PGE₂가 거의 생성되지 않아 PGE₂ 재조합 표준곡선 대비 724.8 ± 24.7 pg/ml 값이 측정되었다. 하지만 LPS로 활성화되어진 Raw 264.7 세포에서는 PGE₂가 과량 분비되어 2374.8 ± 91.9 pg/ml이 측정되었다. LPS로 인하여 활성화된 Raw 264.7 세포로부터 생성되어진 PGE₂는 12-DHGD 농도별 50, 100, 150, 200 ng/ml에 대하여 각각 2158.5 ± 171.5 pg/ml, 2017.3 ± 134.4 pg/ml, 1904.8 ± 215.7 pg/ml 및 1634.8 ± 134.4 pg/ml이 측정되었다(Figure 2-6). 12-DHGD 모든 처리농도에서 LPS 자극에 의하여 Raw 264.7 세포로부터 생성된 PGE₂를 감소시키는 경향이 확인되었으며, 특히 200 ng/ml의 농도에서는 통계적으로 유의성있게 감소시키는 것으로 나타났다.

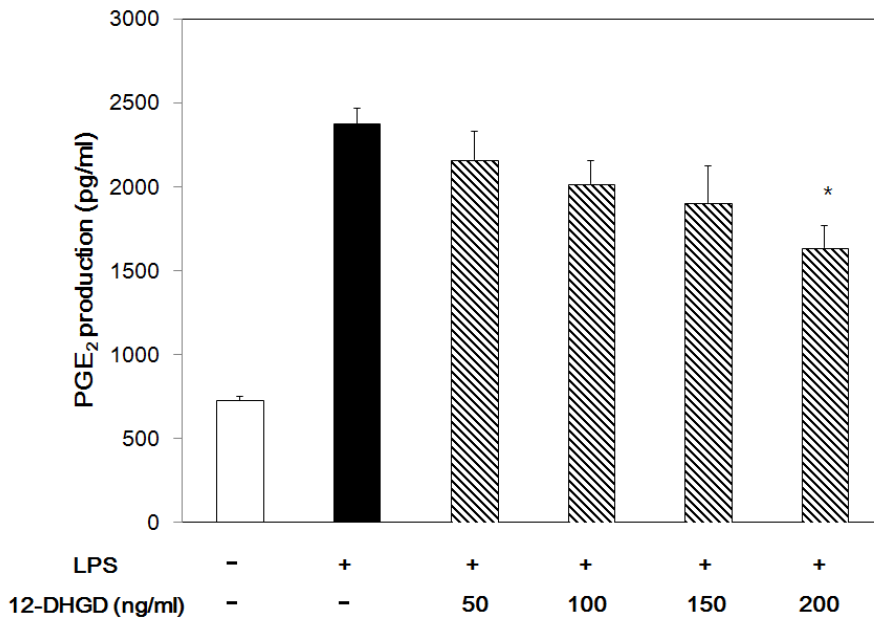


Figure 2-6. Effect of 12-DHGD on PGE₂ production by LPS-stimulated Raw264.7 cells.

Raw 264.7 cells were treated with only DMEM or 50-200 ng/ml 12-DHGD in the presence of LPS (1 μ g/ml) for 24 h. PGE₂ levels in the culture medium were measured by ELISA assay. *p< 0.05 for cells treated with LPS versus LPS+12-DHGD.

2.3.5. LPS로 유도한 COX-2 및 iNOS 유전자 발현에 있어서 12-DHGD의 억제 효과

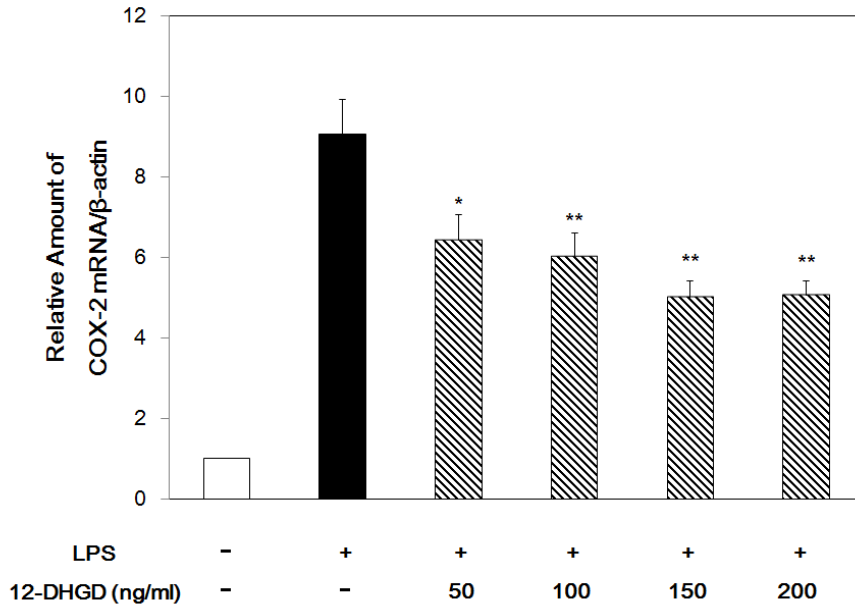
COX-2는 PGE₂ 생성에 관여하는 효소이고, iNOS는 LPS, IFN- γ 및 IL-1 β 등에 의해 활성화된 대식세포에서 다량의 NO를 생성하는데 기여하는 것으로 알려져 있다(이 외, 2010, Hussain *et al.*, 2003). COX-2와 iNOS의 생성억제는 PGE₂ 및 NO 생성을 차단하여 염증 진행을 방해하는 중요한 요소가 될 수 있다. 본 실험에서는 mRNA 수준에서 COX-2와 iNOS의 측정하였다. Raw 264.7 세포에 12-DHGD (50, 100, 150, 200 ng/ml)을 1시간 전처리하고 1 μ g/ml의 LPS를 24시간 동안 처리하였다. COX2와 iNOS의 mRNA 발현은 LPS로 유도하였다.

Raw 264.7 세포만을 배양한 무처리 control 군에서 발현된 COX-2 mRNA 발현양의 값을 1을 기준으로 LPS로 활성화되어진 Raw 264.7 세포에서 발현된 COX-2 mRNA 발현양의 값은 9.1 ± 0.9 로 증가되었다. LPS로 인하여 활성화 된 Raw 264.7 세포로부터 증가되어진 COX-2 mRNA 발현양은 12-DHGD 농도별 50, 100, 150, 200 ng/ml에 대하여 각각 6.4 ± 0.6 , 6.0 ± 0.6 , 5.0 ± 0.4 및 5.1 ± 0.4 로 측정되었다(Figure 2-7, A). 12-DHGD 모든 처리농도에서 LPS 자극에 의하여 Raw 264,7 세포로부터 생성된 COX-2 mRNA 발현에 대하여 농도의존적이며, 통계적으로 유의성 있는 수준으로 억제하는 것으로 나타났다.

Raw 264.7 세포만을 배양한 무처리 control 군에서 발현된 iNOS mRNA 발현양의 값을 1을 기준으로 LPS로 활성화되어진

Raw 264.7 세포에서 발현된 iNOS mRNA 발현양의 값은 66.4 ± 12.5 로 증가되었다. LPS로 인하여 활성화 된 Raw 264.7 세포로부터 증가되어진 iNOS mRNA 발현양은 12-DHGD 농도별 50, 100, 150, 200 ng/ml에 대하여 각각 59.7 ± 11.0 , 54.3 ± 7.2 , 56.3 ± 6.9 및 35.3 ± 3.3 으로 측정되었다.(Figure 2-7, B). 12-DHGD 모든 처리농도에서 LPS 자극에 의하여 Raw 264.7 세포로부터 생성된 iNOS mRNA 발현을 감소시키는 경향이 확인되었으며, 특히 200 ng/ml의 농도에서는 통계적으로 유의성있게 감소되는 것이 확인되었다.

A.



B.

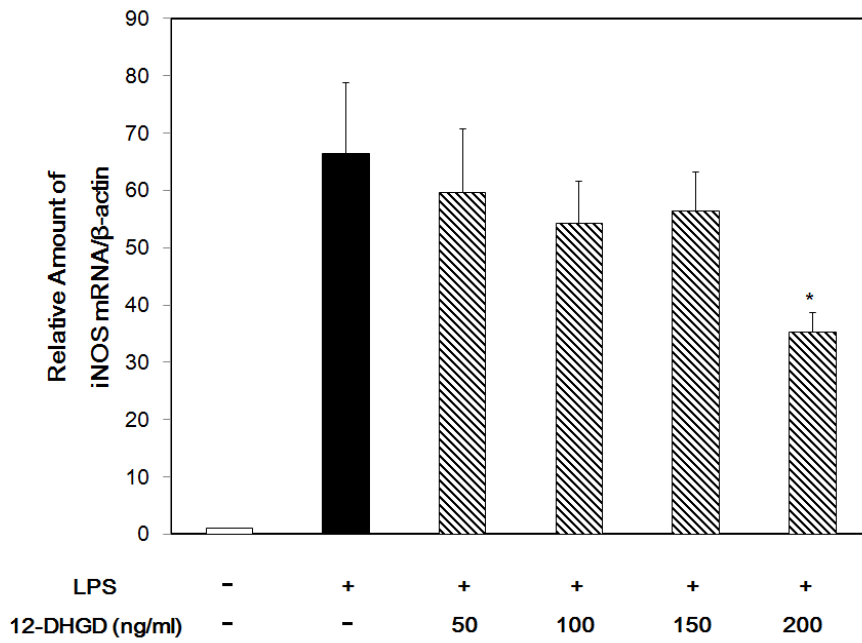


Figure 2-7. Effect of 12-DHGD on COX-2 and iNOS mRNA expression in LPS-stimulated Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were treated with only DMEM or 50-200 ng/ml 12-DHGD in the presence of LPS (1 μ g/ml) for 24 h. Cell lysates were prepared and analyzed for mRNA expression of (A) COX-2 and (B) iNOS by real-time PCR(RT-PCR). The values were normalized in each individual sample by the level of β -actin expression. * p < 0.05 for cells treated with LPS versus LPS+12-DHGD. ** p < 0.01 for cells treated with LPS versus LPS+12-DHGD.

2.4. 고찰

염증과 관련된 질환을 위하여 스테로이드와 비스테로이드성 항염증제제를 주로 치료제로 사용되어지고 있다. 이러한 약물들은 항염 효과에 있어서는 탁월한 효과를 보이고 있지만, 장기간 사용 시 다양한 부작용을 나타낼 수 있기 때문에 만성염증성 질환을 앓고 있는 환자에게 지속적으로 공급하기가 힘들다. 이러한 단점을 개선하기 위하여 최근 다양한 천연물로부터 유래한 유효성분을 이용하여 항염, 항산화 및 항암효과에 대한 연구가 입증되고 있다(Masaki *et al.*, 1998, Lazer *et al.*, 1998).

본 연구에 사용된 12-DHGD는 생강성분 중 하나이며 이미 생강 추출물 및 다양한 성분에 대한 항염증, 항산화 및 항암 작용에 대한 연구가 진행되었다(Lee *et al.*, 2007, Brown *et al.*, 2009, Ippoushi *et al.*, 2003). Kato 등은 생강 열수추출물을 이용하여 aldose reductase inhibitor의 활성을 가지며, 백내장 동물에게 투여함으로써 수정체에 galactitol 축적을 억제함으로써 생강추출물을 당뇨 보조제로 이용할 수 있는 가능성을 보고하였다(Kato *et al.*, 2006). 또한 이, Brown 등은 생강의 구성분 중 [6]-, [8]-, [10]-gingerol, [6]-shogaol 등을 이용하여 지방암세포 및 대장암 세포주를 이용하여 암세포의 증식 및 혈관생성 억제를 통하여 항암효과를 가진다고 보고하기도 하였다(Brown *et al.*, 2008).

본 연구에서는 생강성분 중 하나인 12-DHGD의 항염증효과를 평가하기 위하여, LPS로 자극한 Raw 264.7 대식세포주에서 12-DHGD 전처리가 염증진행을 유도하는 다양한 사이토카인 및

매개물질에 미치는 영향을 평가하고자 수행하였다.

Nitric oxide(NO)는 nitric oxide synthase (NOS)에 의하여 L-arginin으로부터 생성되어 다양한 자극에 의해 여러 종류의 세포에서 합성되어지며 세포간의 신호전달을 통하여 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 물질로 알려져 있다(Wang *et al.*, 2007). 정상 상태에서는 NO는 혈관확장, 신경전달체계, 항균물질, 면역조절 등의 생체 보호기능을 수행한다(Weisz *et al.*, 1996). 하지만, 세균 및 병원체 등에 의하여 과도하게 생성된 NO는 숙주세포의 파괴, 쇼크에 의한 혈관확장, 조직손상 및 염증반응을 유발한다(Wink and Mitchell, 1998, Hseu *et al.*, 2005). Inducible nitric oxide synthase(iNOS)는 LPS와 같은 내독소나 IFN- γ , IL-1 β , TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인의 자극에 의하여 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포, 심근세포 등에서 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다(Sarkar *et al.*, 2008). 본 연구에서는 세포독성을 나타내지 않는 농도의 12-DHGD를 선택하여 Raw 264.7 세포에서 NO 생성 및 iNOS의 발현정도를 비교하였다. 그 결과, LPS를 처리한 군에서는 LPS 미처리 대조군과 비교하여 NO 생성이 유의적으로 증가하였으며, 12-DHGD (150 ng/ml, 200 ng/ml) 처리한 군에서 통계적으로 유의성있게 NO 생성을 저해하였다(Figure II-2). NO 생성 억제와 iNOS 단백질 발현의 연관성을 확인하기 위하여 real-time PCR을 이용하여 세포내에 존재하는 iNOS mRNA 발현양을 확인하였다. Raw 264.7 세포에 LPS만을 처리한 경우 iNOS mRNA 발현양이 현저히 증가되었으나, 12-DHGD 처리 농도가 증가함에 따라 iNOS mRNA 발현양이 감소하는 결과가 나타났다(Figure 2-7, B). 12-DHGD에 의한 NO

생성억제 효과는 iNOS 단백질 발현이 저해됨으로서 나타나는 기전임을 확인할 수 있었다.

LPS는 그람 음성균의 세포 외벽에 존재하며 bacteria에 의하여 분비되며 많은 선천성 면역반응을 활성화시킨다. LPS에 의하여 대식세포주의 세포막에 존재하는 toll-like receptor(TLR)-4 자극을 주게 되면 MyD88(myeloid differentiation primary-response protein 88)을 활성화시켜 전사인자(transcription factor)인 nuclear factor- κ B(NF- κ B)를 활성화 시키게 된다. 활성화된 NF- κ B에 의하여 cytokines (TNF, IL-1 β , IL-6), chemokines (CCL2, CXCK8), endothelial adhesion molecules (E-selectin) 및 costimulatory molecules (CD80, CD86) 등의 다양한 염증유도 매개물질들이 분비된다(Abbas and Lichtman, 7th edition). 따라서 LPS의 활성화에 따른 염증 반응 과정 중 생성되는 물질들의 억제를 통한 항염증 효과를 확인할 수 있다. 본 연구에서는 염증반응에 관여하는 초기 염증성 사이토카인인 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 생성에 대한 12-DHGD의 효과를 살펴보았다. LPS만을 처리했을 때, 염증성 사이토카인의 수치는 LPS 미처리 대조군과 비교하여 유의적으로 증가되었다. 12-DHGD 처리는 IL-6의 경우 모든 농도 (50, 100, 150, 200 ng/ml)에서 유의적인 저해 효과를 보였고, 또한 농도 의존적으로 감소효과가 큰 것으로 나타났다. 하지만, 12-DHGD의 처리가 LPS에 의해 생성이 증가된 IL-1 β 와 TNF- α 에 대하여 억제하는 효과를 관찰할 수 없었다(Figure 2-3, 2-5). 12-DHGD이 LPS에 의한 TLR4 기전을 통한 염증 진행을 억제를 통하여 IL-6의 생성억제를 보였는지 확인하기 위해서는 NF- κ B와 같은 전사인자에 대한 실험이 추가적으로 필요할

것으로 생각된다.

Prostaglandin E₂(PGE₂)는 cyclooxygenase(COX)-2의 활성화에 의하여 생성이 증가하며 주로 비만세포(mast cell)와 대식세포(macrophage cell)에 의해 분비되는 것으로 알려져 있다. 이는 히스타민(histamine), NO와 같은 염증매개 물질과 함께 염증부위에 부종, 통증, 혈관투과성을 증가시켜 염증 진행을 촉진하게 된다. COX-2는 정상 상태에서는 발현되지 않지만 TNF- α 와 같은 암 발생 촉진물질, 성장인자, 사이토카인과 같은 자극에 의하여 빠르게 발현되어 염증반응 부위에서 염증을 매개하는 PGE₂의 합성에 관여한다(Kim *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2004). 본 연구에서는 Raw 264.7 세포에서 LPS에 의해 생성되는 PGE₂의 생성에 대한 12-DHGD의 처리효과에 대하여 확인하였다. LPS 처리는 PGE₂의 유의적인 증가를 나타냈으며, 12-DHGD의 처리는 농도 의존적으로 PGE₂의 생성을 억제하였고 특히 200 ng/ml의 농도에서 통계적으로 유의 있게 감소하였다(Figure 2-6). 12-DHGD의 PGE₂ 생성 억제가 COX-2 기전 차단으로 인한 것인지를 확인하기 위하여 real-time PCR을 통하여 세포내에 존재하는 COX-2 mRNA 발현량을 측정하였다. 12-DHGD의 처리는 COX-2의 mRNA 발현량을 감소시키는 경향이 확인되었고, 이는 PGE₂의 생성저하와 일치되는 결과라 할 수 있다. 그러므로 PGE₂의 생성 저해 효과에 있어서 COX-2 기전을 통한 작용으로 진행된 과정임을 확인할 수 있었다. 인진쑥의 flavonoid 성분인 capillarisin과 갈조류로부터 분리한 fucozanthin이 LPS로 자극한 Raw 264.7 세포에서 PGE₂의 생성을 각각 30%와 68% 억제가 보고되고 있고(Han *et al.*, 2013, Heo *et al.*, 2010), 구기자 열수 추출물의 처리는 LPS로 자극한

Raw 264.7 세포에서 COX-2와 iNOS의 mRNA 발현을 각각 40% 및 20%의 억제가 보고되고 있다(Oh *et al.*, 2012). 또한 Hinson 등이 COX-2 기전을 통한 PGE₂의 생성이 IL-6의 생성을 유도하는 데 중요한 작용을 한다고 보고하였고(Hinson *et al.*, 1995), 12-DHGD이 염증 기전에 중요한 역할을 하는 위의 세 물질의 생성 단계의 차단을 통한 효과로서 생각된다.

위와 같은 결과를 토대로 생강성분 중 하나인 12-DHGD이 LPS로 활성화 시킨 대식세포 염증모델에서 NO, IL-6, PGE₂의 생성 및 iNOS, COX-2 mRNA 발현 억제를 통하여 항염증 효과의 가능성을 제시하였다. 그러나 초기염증성 사이토카인의 발현에 있어서 IL-1 β 와 TNF- α 의 생성에 대하여 유의적인 억제 효과를 보이지 않아 추가적인 기전 연구가 필요할 것으로 생각된다.

3장. PMACI로 자극한 HMC-1
세포에서 분비되는 사이토카인에
대한 생강 성분인
12-dehydrogingerdione의 효과

3.1. 서 론

알러지는 외부에서 침입한 항원에 대하여 체내의 다양한 면역세포들의 면역반응으로 인해 발생하는 과민반응이라고 할 수 있다. 알러젠으로 작용하는 항원에 대한 반복적인 접촉으로 기억세포에 의한 과도한 면역 반응이 이루어지게 됨으로써 알러지 질환으로 진행된다. 이러한 알러지 질환을 유발할 수 있는 요인으로는 서구식 주거환경에서 발생하는 물질에 대한 노출 및 거주시간이 증가됨에 따른 house dust mite의 노출증가, 위생과 청결한 환경 및 항생제 남용으로 인한 미생물에 대한 노출변화, 육체활동 감소로 인한 비만인구의 증가, 서구식이로의 변화에 따른 항산화물질 섭취기회의 감소 등으로 알려지고 있다(NIH, Guide for the diagnosis and management of asthma, 2007).

알러지 질환으로 널리 알려진 아토피 피부염, 천식, 알러지성 비염과 같은 경우 비만세포가 주요 원인으로 보고되고 있다(Bergmann *et al.*, 1997, Campbell *et al.*, 1998, Holgate *et al.*, 2005). 비만세포는 세포질 내에 과립을 풍부하고 가지고 있으며 과립 내에는 생리활성이 높은 알러지 매개성분이 포함되어있다. 비만세포는 혈관이나 림프관 근처의 결합조직에 많이 분포하며, 특히 피부 및 점막조직에 많이 존재한다. 또한 세포 표면에 $Fc\epsilon RI$ 라는 수용체가 결합되어있어 외부에서 항원이 체내에 들어오게 되면 B 세포에서 생성된 IgE가 비만세포의 $Fc\epsilon RI$ 에 결합하게 되면서 비만세포가 활성화되고 내부에 존재하던 leukotriens, prostaglandin D2, histamine이 급격히 방출되면서 초기 알러지 반응이 일어나게

되어 점막부종, 점액분비 증가 및 기관지 평활근 수축과 같은 증상을 유도하며, IL-6, IL-8, TNF- α 및 GM-CSF와 같은 사이토카인을 방출을 증가시킨다(Brown *et al.*, 2008, Norrby. 1997, Nagai. 2008, Geha *et al.*, 2003). 특정 항원에 의하여 생성된 IgE가 비만세포 표면에 존재하는 Fc ϵ RI에 결합하면서 세포질 내에 존재하는 Fyn과 Lyn 과 같은 tyrosine-protein kinase들의 활성화가 일어나게 되면 이는 MAP kinase의 연속적인 활성화를 유도하게 된다. 이는 비만세포의 핵 내에서 사이토카인 유전자 발현을 유도하며 알러지 반응을 유도하는 다양한 사이토카인의 분비를 촉진하게 된다. 또한 tyrosine-protein kinase의 활성화는 phosphatidylinositol-specific phospholipase C(PI-PLC γ)를 활성화하여 세포막에 존재하는 PIP₂로부터 IP₃과 diacylglycerol(DAG)의 방출을 촉진한다. 방출된 IP₃은 endoplasmic reticulum(ER)로부터 세포질 내 Ca²⁺ 수준을 증가시키고, Ca²⁺와 DAG는 PKC를 활성화시킴으로써 myosin light chain 단백질을 인산화하여 비만세포 내에 존재하는 히스타민과 같은 과립의 분해를 유도하고 방출하도록 한다. MAP kinase와 Ca²⁺은 또한 phosphatidyl A₂(PLA₂)를 활성화하여 arachidonic acid로부터 지질매개물질인 prostaglandin D₂(PGD₂), leukotrien C₄(LTC₄) 등을 합성 및 분비하도록 한다 (Abbas and Richman, 2012). 분비된 사이토카인 중 IL-6는 주로 Th2 세포의 자극을 통하여 IgE 생성을 촉진하며 알러지 진행을 유도하는 것으로 보고되고 있으며(Toru *et al.*, 1998), IL-8은 강력한 주화성을 갖고 있어 감염부위로 호중구, T 세포, B 세포와 같은 림프구의 유입을 증가시킨다(Vocanson *et al.*, 2009). TNF- α 는 외부에서 침입한 항원이나 조직 손상에 대하여 1차적으로 반응하며

IL-1, IL-5, IL-6 및 GM-CSF와 같은 다양한 염증성 사이토카인의 분비를 촉진시킨다(Vocanson *et al.*, 2009, 안, 2004). GM-CSF는 호산구의 apoptosis를 지연시켜 생존을 연장하며 호산구로부터 세포독성이 나타나는 eosinophilic peroxidase(EPO)의 생성을 유도한다(Levi-schaffer *et al.*, 1998, Hoenstein *et al.*, 2001). 비만세포는 세포막에 존재하는 Fc ϵ RI에 IgE가 결합할 때 세포내부에 Ca²⁺가 증가하게 되는데, 세포수준에서 비만세포 내부의 Ca²⁺를 증가시키기 위한 활성물질로는 calcium ionophore, compound 48/80, morphine sulfate 등이 알려져 있다(이 외, 2002).

이번 장에서는 생강성분 중 하나인 12-DHGD의 알러지성 질환을 위한 치료 후보물질로서 활용 가능성을 확인하기 위하여 PMACI로 활성화시킨 비만세포로부터 생성되어지는 IL-6, IL-8, TNF- α 및 GM-CSF와 같은 다양한 사이토카인 발현에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

3.2. 실험 재료 및 방법

3.2.1. 시약

Iscove's Modified Dulbecco's medium(IMDM), fetal bovine serum(FBS), phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), calcium ionophor(CI) A23187 및 fetal bovin serum(FBS)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, penicillin streptomycin(P/S)은 GibcoBRL (Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. 세포 생존도를 측정하기 위하여 pre-mix water-soluble tetrazolium salt(WST) 시약은 Takara (Shiga, Japan)에서 구입하여 사용하였다. IL-6, IL-8, TNF- α 및 GM-CSF ELISA kit는 모두 R&D system, Inc. (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 시험물질인 12-DHGD 은 한국화학연구원(Korean Research Institute of Cehmical Technology, Daejeon, Korea)으로부터 지원받아 사용하였으며 실험 시 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 희석하여 사용하였다.

3.2.2. 세포주 및 세포배양

Human mast cell line(HMC-1)은 경희대학교 한의과대학으로부터 분양받아 사용하였다. HMC-1 세포는 10 % FBS와 1 % P/S를 첨가한 IMDM 배지를 사용하여 37 °C, 5 % CO₂ incubator

에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대 배양을 수행하였다.

3.2.3. 세포독성 측정

12-DHGD에 의한 세포 독성을 측정하기 위하여 WST assay 방법을 사용하였다. 이 방법은 위에서 사용한 MTT 방법과 원리는 동일하지만, DMSO를 이용하여 세포를 용해시킬 필요가 없어 HMC-1 세포와 같이 부유세포를 이용한 생존도 측정 시 반복적인 배지흡입에 따른 오차를 줄일 수 있는 방법이므로 적용하였다. HMC-1 세포를 5×10^4 /well 농도로 96 well plate에 각각 분주하고, 24시간 후에 배지를 제거하고 DMSO에 녹인 12-DHGD을 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 처리하여 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 WST 시약을 well 당 100 μl 씩 넣은 후 빛을 차단하여 37 °C incubator에서 2시간 동안 배양하였다. 발색정도는 ELISA microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포생존율은 다음과 같은 공식에 의하여 계산되었다.

% Cell viability =

(absorbance of treated cells/absorbance of untreated cells) x
100

3.2.4. Cytokine 생성량 측정

HMC-1 세포를 1×10^6 /well 농도로 6 well plate에 각각 분주하고, 24 시간 후에 배지를 제거하고 12-DHGD을 농도별(50, 100, 150, 200 ng/ml) 2 시간 동안 전처리하였다. PMA ($50 \mu\text{M}$)과 CI ($1 \mu\text{M}$)을 첨가하여 8시간 동안 배양한 뒤, 세포 배양 상등액을 수집하여 -80°C 에 보관하였다. 세포 상등액에 존재하는 세포활성물질양은 ELISA 법을 이용하여 정량하였다. 96 well plate에 IL-6, IL-8, TNF- α 및 GM-CSF의 1차 항체를 코팅하여 overnight 하였다. 코팅된 plate는 0.05 % tween 20이 포함된 PBS를 이용하여 washing 하였다. 1 % bovine serum albumin(BSA)가 포함된 PBS를 이용하여 코팅된 1차 항체를 blocking 하였다. Washing 한 후 준비한 각 물질의 standard 및 세포 배양 상등액을 96 well plate에 넣어 1차 항체와 반응시켰다. 2시간 동안 상온에서 반응 시킨 후 2차 항체를 붙여주었다. Washing 한 후 streptavidin-HRP를 첨가하고 빛을 차단한 상태로 20분간 상온에서 발색시키고, 2N H_2SO_4 를 이용하여 반응을 멈추고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3.2.5. 통계처리

모든 실험 결과는 3 회 이상 실시하여 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 mean \pm SD로 나타내었으며, 통계처리는 students' *t*-test에 준하였고 *p*-value가 0.05 미만일 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

3.3. 결 과

3.3.1. 12-DHGD의 HMC-1 세포에 대한 독성

12-DHGD의 HMC-1 세포에 대한 세포독성을 평가하기 위하여 다양한 농도의 (0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 12-DHGD를 처리하여 24 시간 동안 배양 후 WST를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 무처리군에 대한 12-DHGD의 각 농도 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 대한 세포 생존율은 102.2 %, 103.1 % 및 101.8 %로 측정되었다 (Figure 3-1). 이로써 본 시험에 사용되어진 12-DHGD 모든 농도 값은 HMC-1 세포에 대하여 독성이 없는 것으로 나타났으며, 이에 따라 추후 시험은 이 농도 범위에서 이루어졌다.

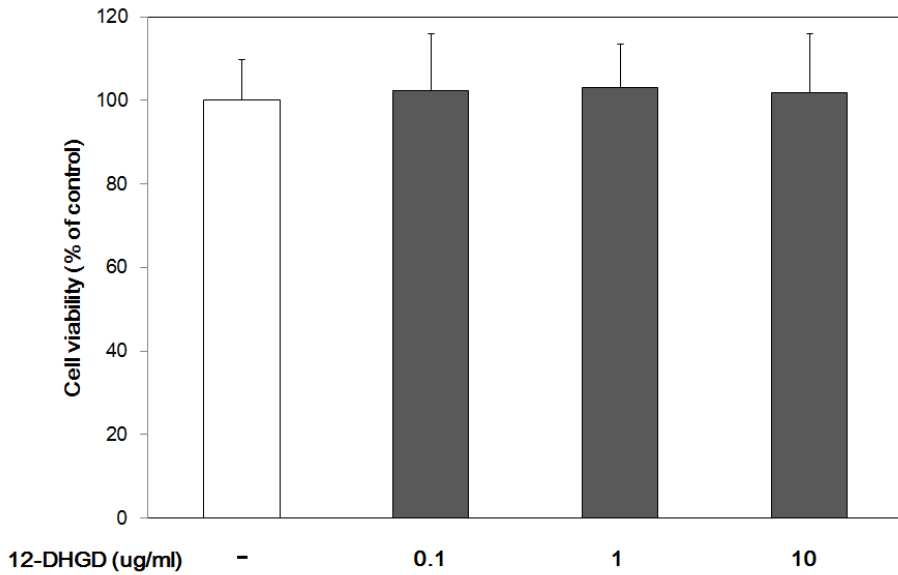


Figure 3-1. Cell viability of human mast cell line (HMC-1 cells).

Cell viability of HMC-1 cells after incubation in the presence of various concentrations (0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of 12-DHGD for 24 h. Cell viability was measured by WST assay.

3.3.2. PMACI로 유도한 IL-6, IL-8 TNF- α 및 GM-CSF 생성에 있어서 12-DHGD의 억제 효과

생강 성분인 12-DHGD이 PMACI로부터 활성화된 HMC-1 세포로부터 분비되어지는 염증성 cytokine인 IL-6, IL-8, TNF- α 및 GM-CSF을 억제하는지 확인하기 위하여, 12-DHGD을 농도별 (0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 2시간 동안 전 처리한 후 PMACI 첨가하여 8시간 추가 배양함으로써 생성되어지는 IL-6, IL-8, TNF- α 및 GM-CSF의 양을 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다.

HMC-1 세포만을 배양한 무처리 control 군에서는 IL-6가 거의 생성되지 않아 IL-6 재조합 표준곡선 대비 0.1 pg/ml 값이 측정되었다. 하지만 PMACI로 활성화되어진 HMC-1 세포에서는 IL-6가 과량 분비되어 $100.4 \pm 2.6 \text{ pg}/\text{ml}$ 이 측정되었다(Figure 3-2). PMACI로 인하여 활성화 된 HMC-1 세포로부터 생성되어진 IL-6는 12-DHGD 농도별 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 대하여 각각 $106.2 \pm 2.1 \text{ pg}/\text{ml}$, $84.3 \pm 1.8 \text{ pg}/\text{ml}$, $7.4 \pm 0.1 \text{ pg}/\text{ml}$ 이 측정되었다. 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 12-DHGD은 PMACI의 자극에 의해 생성된 IL-6를 통계적으로 유의성있게, 농도 의존적으로 감소시키는 것이 확인되었다. 특히 최고 농도인 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 12-DHGD은 PMACI 자극에 의해 생성된 IL-6를 90 % 이상 억제하는 것을 나타냈다.

HMC-1 세포만을 배양한 무처리 control 군에서는 IL-8가 생성되지 않아 IL-8 재조합 표준곡선 대비 0값 보다 낮게 측정되어 0으로 표현하였다. PMACI로 활성화되어진 HMC-1 세포에서는

IL-8가 과량 분비되어 1298.4 ± 83.8 pg/ml이 측정되었다. PMACI로 인하여 활성화 된 HMC-1 세포로부터 생성되어진 IL-8는 12-DHGD 농도별 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에 대하여 각각 1166.3 ± 103.9 pg/ml, 1091.6 ± 85.4 pg/ml, 287.9 ± 12.7 pg/ml이 측정되었다 (Figure 3-3). 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 12-DHGD은 PMACI의 자극에 의해 생성된 IL-8를 통계적으로 유의성있게, 농도 의존적으로 감소시키는 것이 확인되었다.

HMC-1 세포만을 배양한 무처리 control 군에서는 TNF- α 가 생성되지 않아 TNF- α 재조합 표준곡선 대비 0값 보다 낮게 측정되어 0으로 표현하였다. PMACI로 활성화되어진 HMC-1 세포에서는 TNF- α 가 과량 분비되어 401.1 ± 11.3 pg/ml이 측정되었다. PMACI로 인하여 활성화 된 HMC-1 세포로부터 생성되어진 TNF- α 는 12-DHGD 농도별 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에 대하여 각각 336.9 ± 17.3 pg/ml, 347.1 ± 17.8 pg/ml, 322.3 ± 26.5 pg/ml이 측정되었다(Figure 3-4). 처리한 12-DHGD 모든 농도에서 PMACI의 자극에 의해 생성된 TNF- α 를 통계적으로 유의성있게 감소시키는 것으로 나타났으며, 이는 PMACI에 의하여 생성된 TNF- α 대비 13.5 % ~ 19.7 %까지 억제하는 것으로 나타났다.

HMC-1 세포만을 배양한 무처리 control 군에서는 GM-CSF가 거의 생성되지 않아 GM-CSF 재조합 표준곡선 대비 16.0 ± 0.2 pg/ml 값이 측정되었다. PMACI로 활성화되어진 HMC-1 세포에서는 GM-CSF가 과량 분비되어 807.2 ± 8.6 pg/ml이 측정되었다. PMACI로 인하여 활성화 된 HMC-1 세포로부터 생성되어진 GM-CSF는 12-DHGD 농도별 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에 대하여 각각 801.9 ± 8.6 pg/ml, 766.0 ± 21.8 pg/ml, 186.5 ± 3.1 pg/ml이 측정

되었다(Figure 3-5). 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 12-DHGD은 PMACI의 자극에 의해 생성된 GM-CSF를 통계적으로 유의성있게 감소시키는 것으로 나타났으며, 이는 PMACI에 의하여 생성된 GM-CSF 대비 76.9 %까지 억제하는 것으로 나타났다.

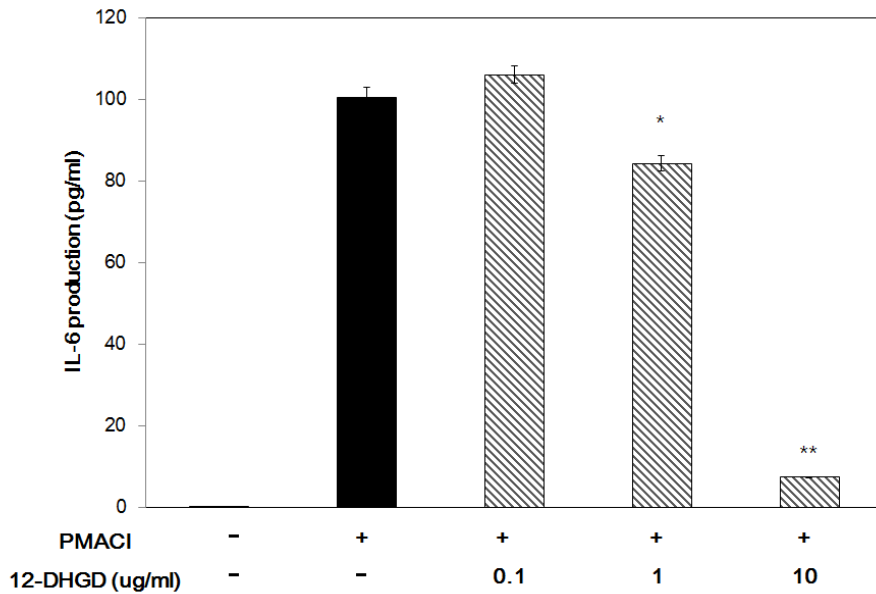


Figure 3-2. Effects of 12-DHGD on IL-6 production induced by PMACI in HMC-1 cells.

HMC-1 cells were treated with only IMDM or various concentration (0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$) of 12-DHGD in the presence of PMACI for 8 hours. Production of IL-6 was measured in the culture medium by ELISA assay. ** $p < 0.01$ for cells treated with PMACI versus PMACI+12-DHGD.

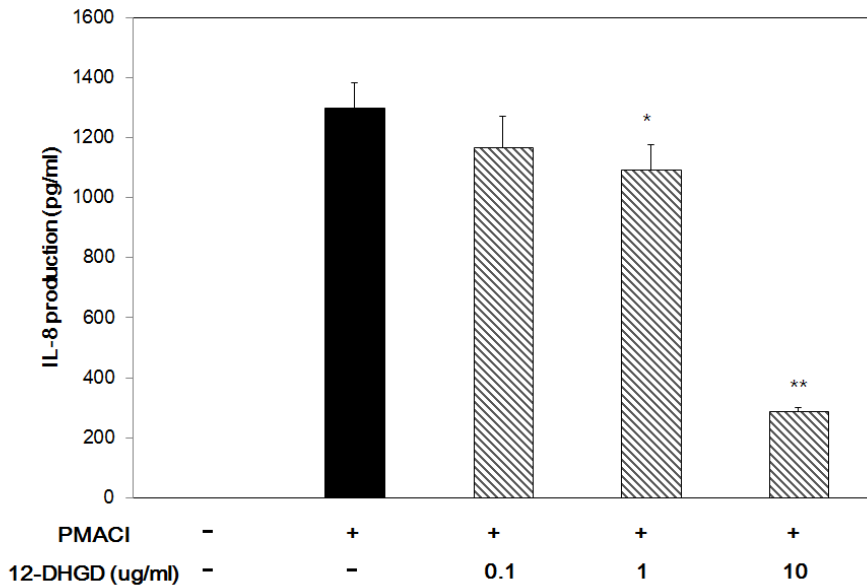


Figure 3-3. Effects of 12-DHGD on IL-8 production induced by PMACI in HMC-1 cells.

HMC-1 cells were treated with only IMDM or various concentration (0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$) of 12-DHGD in the presence of PMACI for 8 hours. Production of IL-8 was measured in the culture medium by ELISA assay. * $p < 0.05$ for cells treated with PMACI versus PMACI+12-DHGD.

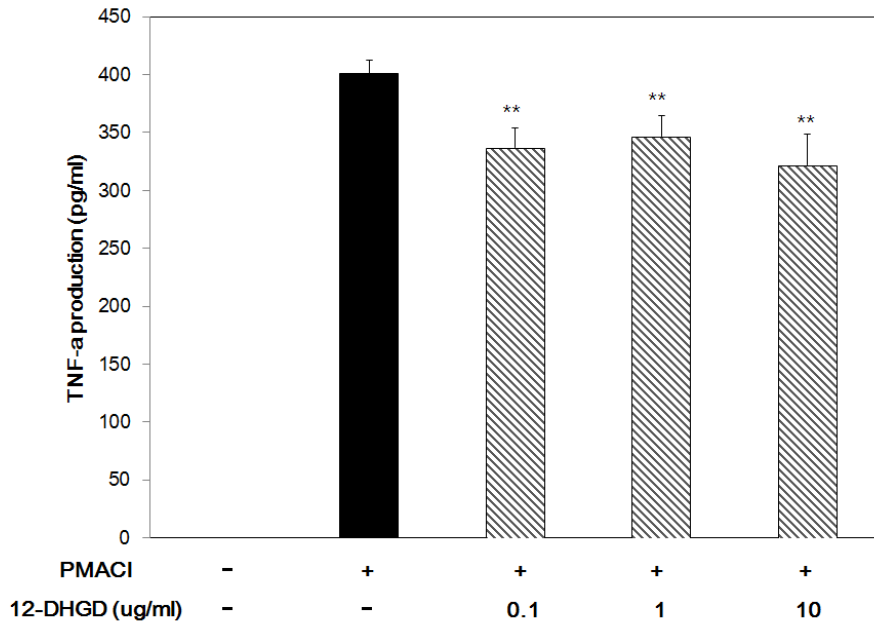


Figure 3–4. Effects of 12–DHGD on TNF– α production induced by PMACI in HMC–1 cells.

HMC–1 cells were treated with only IMDM or various concentration (0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$) of 12–DHGD in the presence of PMACI for 8 hours. Production of TNF– α was measured in the culture medium by ELISA assay. ** $p < 0.01$ for cells treated with PMACI versus PMACI+12–DHGD.

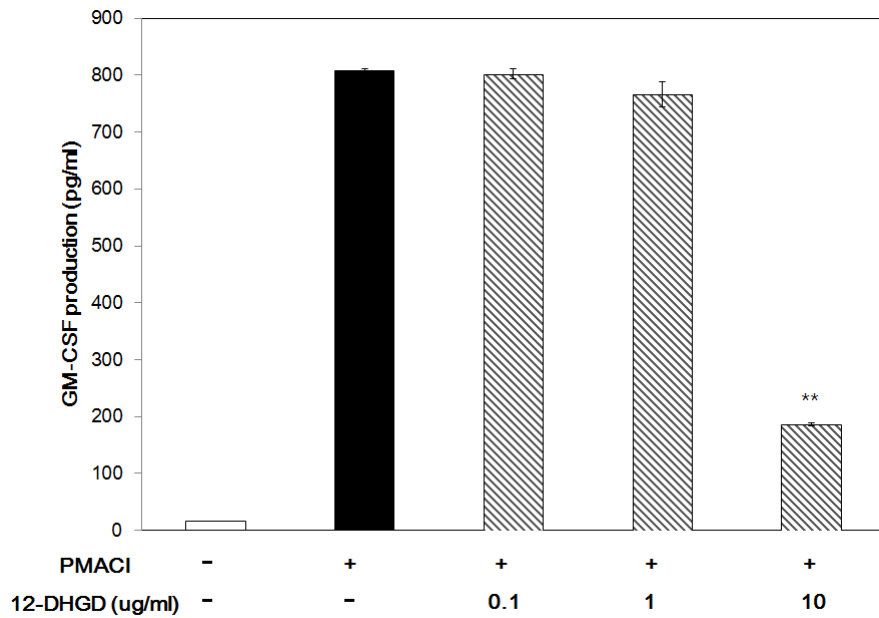


Figure 3-5. Effects of 12-DHGD on GM-CSF production induced by PMACI in HMC-1 cells.

HMC-1 cells were treated with only IMDM or various concentration (0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$) of 12-DHGD in the presence of PMACI for 8 hours. Production of GM-CSF was measured in the culture medium by ELISA assay. **p < 0.01 for cells treated with PMACI versus PMACI+12-DHGD.

3.4. 고 찰

아토피 피부염, 기관지 천식, 알레르기성 비염 및 류마티스 관절염 등 다양한 알레르기 질환에서 비만세포는 매우 중요한 역할을 수행한다(Baruah *et al.*, 1998). 비만세포 표면에 존재하는 $Fc\epsilon RI$ (high-affinity receptor for IgE)에 면역글로불린 E가 결합되어 세포의 활성화가 진행되면, 세포내에 존재하고 있던 과립이 세포 밖으로 분비되어지며 과립내의 히스타민 (histamine), 프로스타글란딘 (prostaglandin) 등의 매개물질이 점막 부종, 평활근 수축 및 점액분비 증가 등의 알러지 반응을 증가시키고 염증을 지속한다 (Costello *et al.*, 1996). 또한 활성화 된 비만세포에서 생성되는 IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF 등은 Th2 세포를 자극하고 IgE의 생성을 증가시키면서 만성 알레르기 질환을 가속화 한다 (Theoharidies and Kalogeromitros, 2006, Galli, 1993).

Mackay 등은 IL-6는 비만세포에서 생성되어 염증유발 물질의 분비를 유도하며, 배양된 airway smooth muscle cell의 비대, 이상증식을 유도 및 점액 분비를 증가시킨다고 보고하였다(Mckay *et al.*, 2000).

TNF- α 는 혈관내피세포의 점착분자를 발현시키고 손상부위의 호산구 (eosinophils) 및 림프구 (lymphocyte)의 유입을 촉진시키며 다른 염증성 사이토카인의 분비 역시 증가시키는 역할을 한다. 특히 IL-6의 분비를 증가시키며 이는 스테로이드 제제를 이용하여 감소되는 경향을 보인다(Mckay *et al.*, 2000, Sada *et al.*, 2001).

GM-CSF는 Th2 세포에 의해서 생산되며 호산구의 주화성을 도우며, 호산구의 생존기간을 연장시키며 그로인한 조직과 상피세포의 손상을 일으킨다. 또한 GM-CSF는 호흡기의 섬유화 작용에 기여하며 만성 천식에서 나타나는 비가역성 기도개형의 원인으로 작용한다(Ferreira and Carlos, 1998, Xing *et al.*, 1996).

IL-8은 중성구(neutrophils)와 호산구의 화학주성인자이며 기도 내로의 유입 및 축적을 유도한다. 또한 천식환자에서 IgE의 증가는 IL-8의 발현과 비례적인 증가를 보임으로써 IL-8이 천식 진행 및 알러지 반응에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어진다(Erger and Casale, 1998).

이와 같이, 알러지 반응에 있어서 IL-6, TNF- α , GM-CSF 및 IL-8이 비만세포의 활성화에 따라 분비되어 염증을 일으키므로 이러한 사이토카인의 발현을 억제 시킬 수 있다면, 알러지 매개 질병 유도 및 증상악화에 있어서 예방 및 증상 완화효과를 기대할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 생강성분인 12-DHGD를 이용하여 PMACI로 활성화 시킨 HMC-1 비만세포로부터 이러한 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 평가하고자 시험을 수행하였다.

PMACI를 처리한 군에서는 PMACI 미처리 대조군과 비교하여 비만세포 유래 염증성 사이토카인의 수치는 유의적으로 증가되었다. 12-DHGD 처리는 IL-6와 IL-8의 경우 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 통계적으로 유의성 있는 감소효과를 보였으며 이는 PMACI 군 대비 80 % 이상의 억제율을 나타내고 있었다. TNF- α 의 경우 12-DHGD 모든 처리군 (0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$)에서 통계 유의적인 저해 작용을 나타냈다. GM-CSF의 경우 12-DHGD의 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리 농도에서만 통계적으로 유의성 있는 감소 효과를 보였으며 이

는 PMACI 군 대비 80 % 이상의 저해효과를 확인할 수 있었다.

위와 같은 결과를 토대로 생강성분인 12-DHGD이 PMACI로 활성화시킨 비만세포 염증모델에서 IL-6, IL-8, TNF- α 및 GM-CSF의 생성억제를 통하여 항염증 효과의 가능성을 제시하였다. 하지만, 비만세포 특이적인 histamine의 발현에 대한 효과와 다양한 사이토카인의 분비를 조절하는 전사인자에 대한 충분한 근거가 부족하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각되어진다. 앞으로 대식세포 및 비만세포에 대한 염증억제 효과를 토대로 실제적인 알러지성 염증 동물모델을 이용하여 질환 억제 및 증상완화 효과를 갖는 후보물질로서의 가능성을 위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

4장. 난백단백질을 이용한
천식동물에서 생강 성분인
12-dehydrogingerdione의
경구투여로 인한 항천식 효과

4.1. 서 론

천식은 기도가 수축하고 염증이 생기는 흔한 만성 알러지성 호흡기 질환으로 세계적인 보건 건강 문제로 대두되고 있다. 전 세계적으로 천식의 발병율은 아메리카, 호주, 잉글랜드와 같은 산업화된 나라에서 발병율이 증가되고 있으며, 중국 및 러시아에서는 천식의 발병율이 높지는 않지만 그로 인한 사망률이 증가되고 있다(Pearce *et al.*, 2007). 이는 천식의 발병을 제대로 치료, 관리하지 않으면 사망에까지 이를 수 있음을 시사하고 예방 및 조기치료에 대한 중요성을 나타낸다. 선진국은 전체 의료비의 1~2% 정도를 천식조절에 소요한다고 한다. 한국 역시 천식으로 인하여 발생하는 사회적 비용은 점점 증가하고 있으며, 2004년 측정된 사회적 비용은 연간 4조원 이상으로 측정이 되고 있으며 이는 악성종양 (5.5조), 심혈관계질환(4.3조)의 절반수준에 달하고 있다. 천식은 소아에서 노인까지 전 생애를 거쳐 지속되고, 잦은 재발과 증상악화로 삶의 질을 심각하게 훼손시키는 질환이므로 조기 발견 및 지속적인 관리가 필요하다. 제대로 조절되지 못한 천식은 치료에 고비용이 들므로 예방적인 약물치료에 대한 투자는 급성악화에 의한 응급치료 시 비용 절감 효과를 가져올 수 있다.

천식은 알레르기 질환으로서 비만세포가 활성화되며 그에 따른 기도 주위에 호산구의 수가 증가하며 Th2 세포가 활성화되어 다양한 사이토카인 및 염증 매개체들이 분비되어 기도 협착 및 기도과민증을 유발한다. 항원이 기도내로 들어오게 되면 항원지시세포인 dendritic cell에서 Th2 세포로 신호를 전달하여 IL-4와 IL-13과

같은 사이토카인을 분비하여 B 세포로부터 면역 글로불린인 IgE의 생성을 유도한다(Mackay *et al.*, 2001, Barnes, 2008, Devereux, 2006). 또한 항원은 기도 내 상피세포로부터 stem cell factor를 분비하여 비만세포를 자극하여 히스타민(histamine), 류코트리엔(leukotrienes) 및 프로스타글란딘(prostaglandin D₂)와 같은 다양한 염증 매개물질을 분비하여 기도 평활근 수축 및 점액분비세포의 증식을 유도한다(Devereux, 2006). 비만세포에서 분비되는 TNF- α 와 Th2 세포에서 분비되는 IL-5와 같은 사이토카인은 각각 호중구(neutrophils)와 호산구(eosinophils)을 기도내로 유입하고 침착시켜 기도의 염증과 과민증을 악화시키는데 중요한 역할을 한다.

현재 천식의 증상완화 및 치료를 위해 사용되어지는 약제로는 흡입 스테로이드, 류코트리엔 조절제 및 지속성 흡입 베타 2 항진제 등이 대표적이다. 위와 같은 약물이 천식 증상의 즉각적인 증상 완화에는 탁월한 효과를 보이지만, 만성적으로 사용할 경우 구인두 칸디다증, 심혈관자극 및 저칼륨혈증 등을 유발하는 다양한 부작용을 유발한다(GINA, 2001, Colice, 2000). 천식과 같은 만성적인 염증 질환의 경우 지속적인 예방법 혹은 치료법이 적용되어야 하기 때문에 식물 추출물 및 식품유래성분을 이용한 알러지성 염증 질환을 위한 치료제 개발이 진행되고 있다.

지난 10여년 동안 인체에서 나타나는 기관지천식에 대한 기전을 규명하고 치료제를 개발하기 위하여 다양한 천식 동물모델이 제안되고 있다(Szelenyi, 2000). 그 중 마우스가 천식의 특징을 잘 나타내며 다루기도 쉽고 경제적이므로 가장 많이 사용되고 있다(Shin *et al.* 2009). 특히, 난백단백질인 ovalbumin(OVA)을 암컷 Balb/c 마우스에 복강투여를 통하여 감작시킨 후 OVA mist를 반복흡입노

출 시킴으로써 천식질환을 유도하는 경우, 혈중 IgE의 분비증가, 폐 내의 호산구를 비롯한 염증세포의 유입 증가, Th2 관련 사이토카인의 분비 증가 및 기도과민성 증가와 같은 인체 천식증상과 유사한 반응이 두드러지게 나타남이 보고되고 있다(Gueders *et al.*, 2009, Blacquiere *et al.*, 2010, Di Valentin *et al.*, 2009)

생강(*Zingiber officinale* Roscoe)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하며 기존 연구를 통하여 생강 추출물 또는 성분들이 항암, 항염, 항당뇨 등의 효능을 가지고 있다고 보고되고 있다(Butt and Sultan, 2011). 본 저자 역시 앞선 두 연구를 통하여 생강성분 중 하나인 12-DHGD의 염증 및 알러지 질환에 있어서 활용할 수 있는 가능성을 확인하였다. 본 연구에서는 12-DHGD이 천식에 미치는 효과를 확인하고자, Balb/c mouse에 난백 단백질인 OVA을 이용하여 감작 및 천식을 유발하고, 12-DHGD의 경구투여가 BALF (Bronchoalveolar lavage fluid: 폐 세척액)에 존재하는 면역세포 비율, 폐 조직에 존재하는 다양한 사이토카인의 변화, 혈중 IgE의 변화 및 조직염색을 통한 염증세포 및 점액분비세포 침윤 정도에 기여하는 바를 확인하고자 한다.

4.2. 실험 재료 및 방법

4.2.1. 시약

시험물질인 12-DHGD은 한국화학연구원(Korean Research Institute of Chemical Technology, Daejeon, Korea)으로부터 지원받아 사용하였으며 실험 시 corn oil에 부유하여 사용하였다.

4.2.2. 동물

천식동물을 유발하기 위하여 특정 병원균에 오염되지 않은 7주령 암컷 Balb/c 마우스를 오리엔트 바이오(Orient Bio Inc., Gyeonggi-Do, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 마우스는 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$ 로 유지되고 12시간 주기 밤, 낮 사이클을 유지하였고 물과 사료는 자유 섭취 시켰다. 모든 동물은 입수 후, 일주일 간 순화기간을 거쳤으며 그 중 건강한 동물만을 선별하여 본 실험에 사용하였다. 모든 실험은 식약청(Korea Food and Drug Administration Good Laboratory Practice for Non-Clinical Studies, notification No. 2005-79) 비임상시험관리규정에 따라 수행하였으며, 국제실험동물평가인증협회(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International)로의 규정에 따라 수행하였다.

동물들은 Table 4-1과 같이 4그룹으로 나누었다.

Table 4-1. Experimental groups of asthma animal model.

Group	Intraperitoneal injection	Nose-only inhalation exposure	12-dehydrogingerdione
Normal control	PBS	Clean Air	Corn oil
OVA	OVA + alum	OVA mist	Corn oil
OVA + 500 mg/b.w.	OVA + alum	OVA mist	12-DHGD 500 mg in corn oil
OVA + 1000 mg/b.w.	OVA + alum	OVA mist	12-DHGD 1000 mg in corn oil

4.2.3. 천식유발

천식을 유발하기 위하여 day 1과 day 8에 OVA 25 μ g과 alum hydroxide 2 mg을 PBS 500 μ l에 녹여 복강투여 하여 감작하였다. 동물들은 두 번째 감작 일주일 후인 day 15일부터 연속되는 5일 동안 비부노출 챔버에 장착되어 OVA 미스트에 노출되었다(Figure 4-1). OVA 미스트는 OVA 30 mg/ml의 solution을 이용하여 mist generator를 이용하여 분사되었으며 각 동물들은 30 분 동안 약 40 ~ 50 μ g 노출되었다. 노출동안 미스트 공기는 비부노출 챔버 2개 포트를 통해 미니펌프를 이용하여 teflon filter에 흡착시켰다. 노출 후 filter에 흡착된 OVA는 PBS에 용해시킨 후 Bradford 법을 이용하여 표준 OVA 대비 상대적인 단백질 정량을 측정하였다. 마지막 노출 다음날, 동물들은 isoflurane 가스에 의한 흡입마취하에 희생되었다.

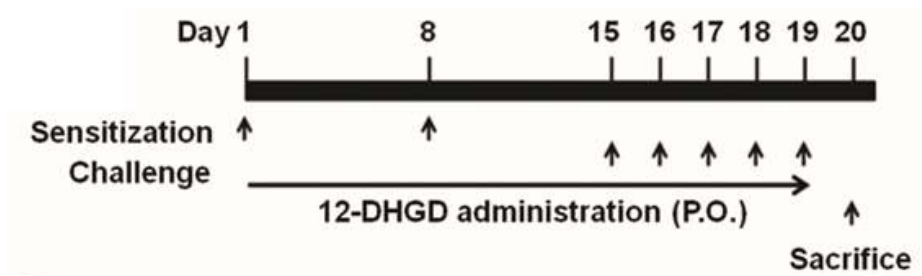


Figure 4-1. Experimental scheme of animal model of asthma.

4.2.4. 12-DHGD의 투여

Day 1부터 day 19까지 정상 대조군 동물들은 체중 kg 당 10 ml의 corn oil이 경구투여 되었고, 실험동물들은 체중 kg 당, 각각 corn oil에 부유시킨 500 mg와 1000 mg의 12-DHGD이 매일 경구 투여되었다.

4.2.5. 폐 세척액 수집, 총 세포수 및 감별세포수 측정

폐 세척액은 동물을 희생 후 바로 수집되었다. 동물의 기도를 조심스럽게 자르고 카테터를 이용하여 폐의 분지 바로 윗부분까지 넣은 후 상부기도를 수술용 실로 매듭을 지었다. 800 μ l의 생리식염수를 이용하여 폐 내로 주입과 회수를 3회 반복하여 얻었다. 얻어진 폐 세척액은 모아서 ice에서 보관하였다가 3000 rpm으로 3분 동안 원심 분리하였다. 상등액은 버리고, 세포 펠렛 부분만을 이용하여 1 ml의 생리식염수를 이용하여 재 부유시켰고, 이 중 500 μ l의 용액을 이용하여 총세포수 측정(Vi-cell, Beckman Coulter)에 사용하였다. 또한, 남은 세포 부유액 중 200 μ l의 용액을 이용하여 슬라이드를 만들어 감별세포수 측정(Cytospin 4, Thermo)에 사용하였다. 슬라이드는 wright giemsa's stain solution(Muto pure chemical Co.)을 이용하여 염색한 후 수세하여 건조한 뒤 광학현미경하에서 각 슬라이드의 세포 중 호중구, 호산구, 림프구, 대식세포의 비율을 객관화하여 분석을 구분하였다.

4.2.6. Serum IgE 측정

혈청 내의 IgE의 생성정도를 평가하기 위하여 부검 시 복대정맥을 이용하여 채혈하였다. 주사기에 모인 혈액을 serum separation tube(SST)에 담아 90 분 동안 방치 후 1,500 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상등액에 존재하는 serum 만을 취하여 -80°C 에 보관한 후 ELISA 법을 이용하여 분석하였다. 96 well plate에 mouse IgE의 1차 항체를 코팅하여 overnight 하였다. 코팅된 plate는 0.05 % tween 20이 포함된 PBS를 이용하여 washing 하였다. 1 % bovine serum albumin(BSA)이 포함된 PBS를 이용하여 코팅된 1차 항체를 blocking 하였다. Washing 한 후 준비한 IgE standard 및 serum을 96 well plate에 넣어 1차 항체와 반응시켰다. 2시간 동안 상온에서 반응 시킨 후 2차 항체를 붙여주었다. Washing 한 후 streptavidin-HRP를 첨가하고 빛을 차단한 상태로 20분간 상온에서 발색시키고, 2N H_2SO_4 를 이용하여 반응을 멈추고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4.2.7. 폐 조직 내 염증성 cytokines 측정

폐 조직은 부검 시 -80°C 에 보관한 후 사용하였다. 300 μl 의 PBS를 첨가하여 homogenizer를 이용하여 세포를 부유시키고 원심 분리하여 상등액만을 사용하였다. 천식 질환과 관련되어지는 초기염증성 cytokine(IL- 1β , TNF- α)과 Th-1(INF- γ , IL-12) 및 Th-2(IL-4, IL-13) 세포 특징적으로 발현되어지는 cytokines의

양은 ELISA 법을 이용하여 정량하였다. 96 well plate에 IL-1 β , TNF- α , INF- γ , IL-12, IL-4 및 IL-13의 1차 항체를 코팅하여 overnight 하였다. 코팅된 plate는 0.05 % tween 20이 포함된 PBS를 이용하여 washing 하였다. 1 % bovine serum albumin(BSA)이 포함된 PBS를 이용하여 코팅된 1차 항체를 blocking 하였다. Washing 한 후 준비한 각 물질의 standard 및 세포 배양 상등액을 96 well plate에 넣어 1차 항체와 반응시켰다. 2시간 동안 상온에서 반응 시킨 후 2차 항체를 붙여주었다. Washing 한 후 streptavidin-HRP를 첨가하고 빛을 차단한 상태로 20분간 상온에서 발색시키고, 2N H₂SO₄를 이용하여 반응을 멈추고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 bovine albumin serum(BSA)을 표준품으로 이용하여 Bradford 법으로 단백질 정량하여 조직 단백질 무게 mg 당 사이토카인의 생성량으로 나타냈다.

4.2.8. 폐 조직 내 면역세포 염색 (H&E, PAS)

부검 시 폐 조직은 기관지와 함께 흉강으로부터 박리시켰으며, 채취한 뒤 10 % 중성 완충 포르말린 용액을 이용하여 고정하였다. 검체는 Tissue Processor(Thermo Scientific, Encelsior ES, U.S.A)를 사용하여 탈수과정을 거쳤고 embedding workstation(Thermo Scientific, Histostat, U.S.A)를 사용하여 파라핀 블록을 제작하였다. Microtome(Thermo Scientific, Microm HM355S, U.S.A)을 사용하여 3 μ m 두께로 슬라이스 과정

거친 후 hematoxylin and eosin(H&E)과 periodic-acid-Schiff (PAS) 염색을 수행하였다. 염증세포의 침윤 정도와 점액분비세포의 침윤 정도는 기관지 주변부와 혈관주변부의 침윤 정도를 0-3으로 객관적 점수화하였다. 즉, 염증 및 점액분비 세포가 관찰되지 않은 경우는 0, 간헐적으로 염증 및 점액분비 세포의 집락이 관찰되는 경우를 1, 대부분의 기관지 또는 혈관주변부에 얇은 염증 및 점액분비 세포의 띠를 형성하는 경우를 2, 대부분의 기관지 또는 혈관주변부에 두꺼운 염증 및 점액분비세포의 띠를 형성하는 경우를 3으로 점수화하였으며, 그 평균값을 나타내었다.

4.2.9. 통계분석

모든 실험 결과는 3 회 이상 실시하여 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 mean \pm SD로 나타내었으며, 통계처리는 students' *t*-test에 준하였고 *p*-value가 0.05 미만일 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

4.3. 결 과

4.3.1. 체중변화

OVA 노출에 따른 질병진행으로 인한 혹은 12-DHGD 투여를 통한 질병완화로 인한 체중변화를 확인하기 위하여 OVA 감작 첫날부터 동물의 체중을 측정하였다. OVA 첫 감작 날부터 정상대조군에 비하여 OVA 감작 동물들의 체중이 감소되기 시작하였다. OVA 미스트 노출이 시작되면서 동물 group 간의 체중변화 차이는 더 벌어지기 시작했고, 노출된 모든 group에서 감소가 나타났다. 1000 mg/kg body weight(b.w.) 농도의 12-DHGD이 투여된 group의 동물에서 천식 대조군 및 500 mg/kg b.w. 농도의 12-DHGD이 투여된 동물에 비하여 정상동물과 비슷한 수준으로 회복되는 경향을 나타냈다(Figure 4-2). 하지만, 정상동물에 비하여 다른 group들의 체중에 있어서 통계적으로 유의적인 차이는 없었다.

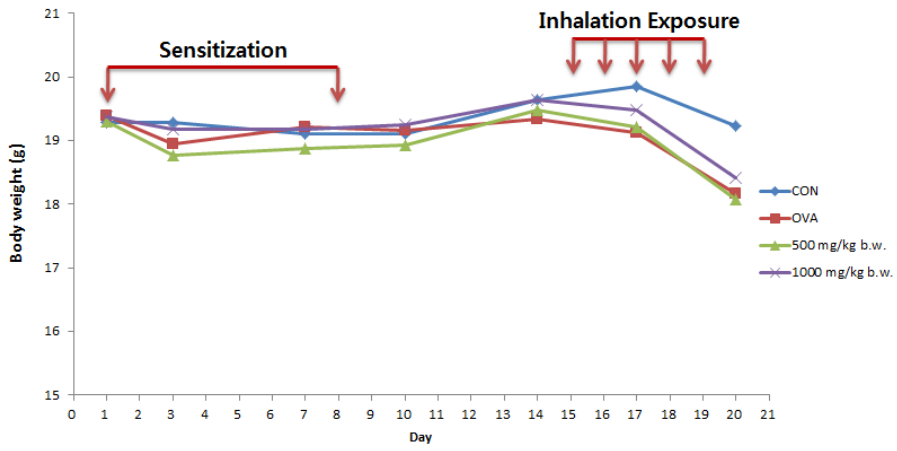


Figure 4–2. Body weight changes of animals.

4.3.2. 폐 세척액 내의 총 세포수 및 감별세포수에 대한 12-DHGD의 효과

천식유발동물에 있어서 12-DHGD이 폐 세척액에 존재하는 총 세포수, 호산구(eosinophils), 호중성구(neutrophils), 림프구(lymphocytes) 및 대식세포(macrophage cells)의 변화에 어떠한 효과를 나타내는지 관찰하였다. 임의로 선택한 300 개의 세포중에 각 세포들이 어떠한 비율로 존재하는지 확인하기 위하여 세포를 감별하였다. OVA의 감작 및 노출은 폐 세척액내에 염증관련 세포들인 호산구, 호중성구 및 림프구의 유입을 촉진한다(그림 A). 특히, 정상 대조군과 비교하여 OVA 천식 동물의 폐 세척액내에서 호산구와 호중성구의 비율이 급격히 증가가 나타났다. 12-DHGD의 투여는 폐 세척액내의 호산구와 호중성구의 비율을 농도 의존적으로 감소시켰다. 천식 질환의 가장 큰 특징 중의 하나인 호산구의 경우, 정상대조군에서는 하나도 검출되지 않았지만, OVA 천식동물에서는 34.8 ± 29.0 개가 검출되었다. OVA 감작 및 노출에 의하여 증가된 폐 세척액 300개의 세포 중 호산구의 수는 12-DHGD의 500 mg/kg b.w., 1000 mg/kg b.w. 투여 농도별 각각 9.5 ± 13.4 개 및 2.8 ± 3.6 개로 검출되었다(Figure 4-3).

A.

B.

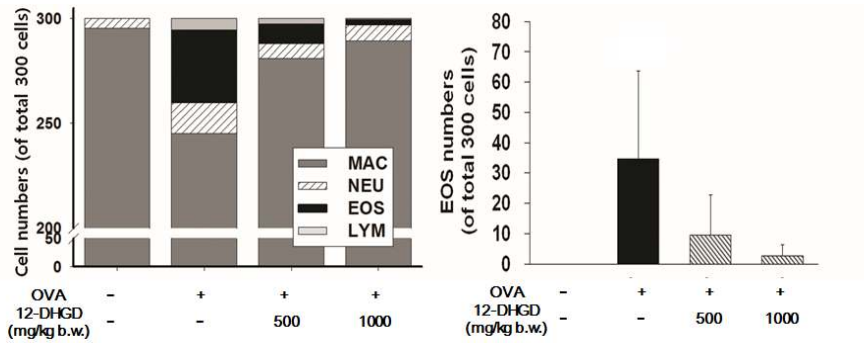


Figure 4-3. The effect of 12-DHGD on total and differential cellular components in the BALF of OVA-sensitized and -challenged mice.

(A) BALF cells were separated using cytopsin and stained with Wright-Giemsa stain solution. LYM, lymphocytes; EOS, eosinophils; NEU, neutrophils; MAC, macrophages. (B) The numbers of eosinophils are expressed as a fraction of a total 300 cells.

4.3.3. Serum IgE 생산에 대한 12-DHGD의 효과

알러젠이 체내에 들어오게 되면 항원지시세포가 인식하고 즉시 B 세포를 자극하여 항체를 생산하기 위한 IgE를 생성하게 된다. IgE는 알러지 질환은 유도하고 증상을 악화시키는데 가장 중요한 역할을 하는 물질 중 하나이다. 천식유발동물에 있어서 12-DHGD 이 혈중 IgE 수준에 대하여 어떠한 효과를 나타내는지 관찰하기 위하여, 동물 희생 시 보관한 serum을 이용하여 분석을 수행하였다. 정상대조군 동물의 혈중 IgE의 수준은 1114.4 ± 619.7 ng/ml로 측정되었고, OVA 천식동물에서는 4581.2 ± 627.9 ng/ml로 OVA로 천식을 유도한 경우 혈중 IgE 수준이 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4-4). OVA 감작 및 노출에 의하여 증가된 혈중 IgE는 12-DHGD의 500 mg/kg b.w., 1000 mg/kg b.w. 투여 농도별 각각 2639.0 ± 855.8 ng/ml 및 2623.0 ± 426.4 ng/ml로 검출되었다(Figure 4-4). 500, 1000 mg/kg b.w. 농도의 12-DHGD의 경구 투여는 OVA 감작 및 자극에 의해 생성된 혈중 IgE의 농도를 통계적으로 유의성있게, 농도 의존적으로 감소시키는 것이 확인되었다.

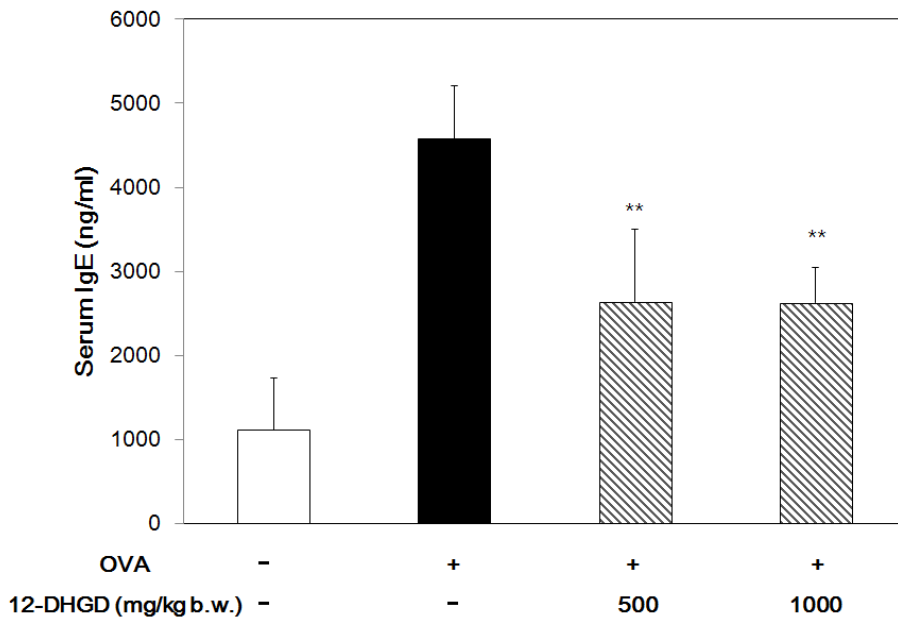


Figure 4-4. Effect of 12-DHGD on the levels of serum IgE. Blood was obtained from cephalic vein and total serum was separated. Serum IgE level was evaluated by ELISA. ** $p < 0.01$ for OVA-sensitized and -challenged mice versus 12-DHGD 500 mg/kg b.w. or 1000 mg/kg b.w. administration.

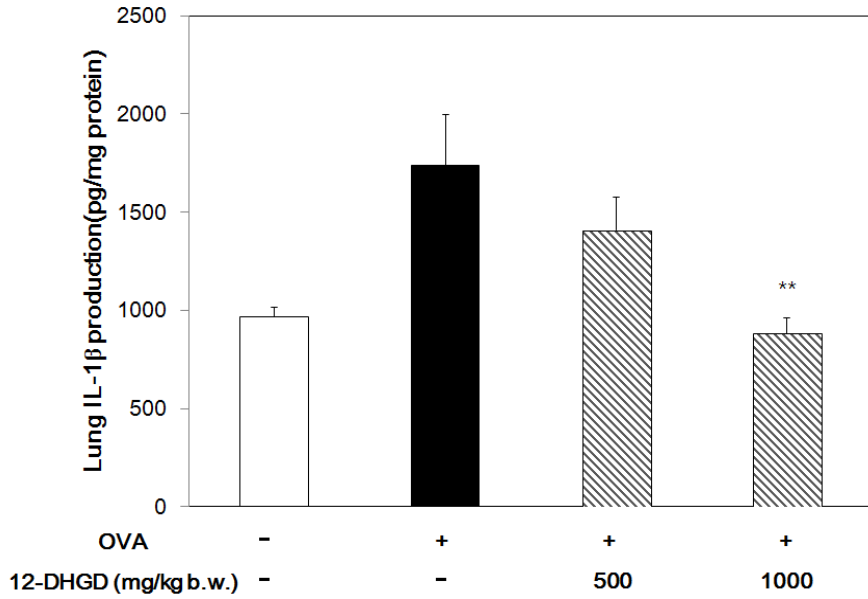
4.3.4. 폐 조직 내 cytokines 발현에 대한 12-DHGD의 효과

4.3.4.1 Pro-inflammatory cytokines 발현에 대한 12-DHGD의 효과

천식은 알러지유도 만성염증성 질환이다. 지속적인 염증관련 사이토카인의 분비는 천식 진행을 유도하고 증상을 악화시키는 중요한 요인이다. 천식유발동물에 있어서 12-DHGD이 폐 조직에 존재하는 초기염증성 사이토카인인 IL-1 β 와 TNF- α 의 생성에 대한 효과를 관찰하기 위하여, 폐 조직 균질액을 이용하여 ELISA 법을 통해 각 cytokine을 측정하였다. 정상대조군 동물의 폐 조직 내에 존재하는 IL-1 β 는 965.4 \pm 48.9 pg/ml로 측정되었고, OVA 천식 동물에서는 1735.6 \pm 171.2 pg/ml로 OVA로 천식을 유도한 경우 폐 조직 내에 존재하는 IL-1 β 수준이 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4-5, A). OVA 감작 및 노출에 의하여 증가된 폐 조직 내 IL-1 β 는 12-DHGD의 500 mg/kg b.w., 1000 mg/kg b.w. 투여 농도별 각각 1407.5 \pm 171.2 pg/ml 및 882.9 \pm 79.0 pg/ml로 측정되었다(Figure 4-5, A). 500, 1000 mg/kg b.w. 농도의 12-DHGD의 경구투여는 OVA 감작 및 자극에 의해 생성된 폐 조직 내 IL-1 β 의 수준을 농도 의존적으로 감소시키는 경향이 확인되었으며, 특히 1000 mg/kg b.w. 투여 동물에서는 OVA 천식동물과 비교하여 통계적으로 유의성있게 감소시킨 것이 확인되었다. 정상대조군 동물의 폐 조직 내에 존재하는 TNF- α 는

61.3±3.7 pg/ml로 측정되었고, OVA 천식동물에서는 128.5±8.0 pg/ml로 OVA로 천식을 유도한 경우 폐 조직 내에 존재하는 TNF- α 수준이 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4-5, B). OVA 감작 및 노출에 의하여 증가된 폐 조직 내 TNF- α 는 12-DHGD의 500 mg/kg b.w., 1000 mg/kg b.w. 투여 농도별 각각 73.6±3.8 pg/ml 및 58.8±79.0 pg/ml로 측정되었다(Figure 4-5, B). 500, 1000 mg/kg b.w. 농도의 12-DHGD의 경구투여는 OVA 감작 및 자극에 의해 생성된 폐 조직 내 TNF- α 의 수준을 통계적으로 유의성있게, 농도 의존적으로 감소시켰으며 이는 정상동물과 비슷한 수준으로 나타났다.

A.



B.

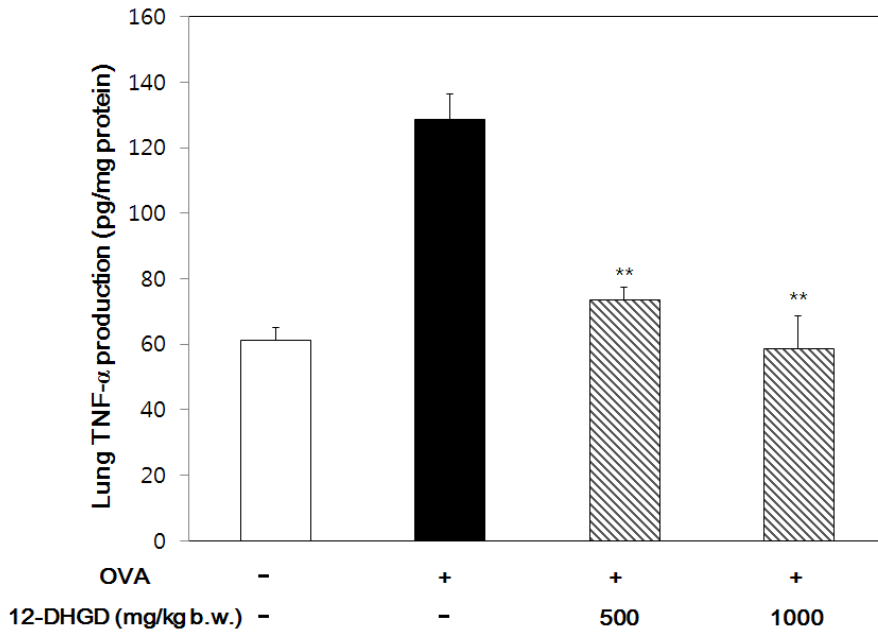


Figure 4-5. Effect of 12-DHGD on the levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α in the lung tissue.

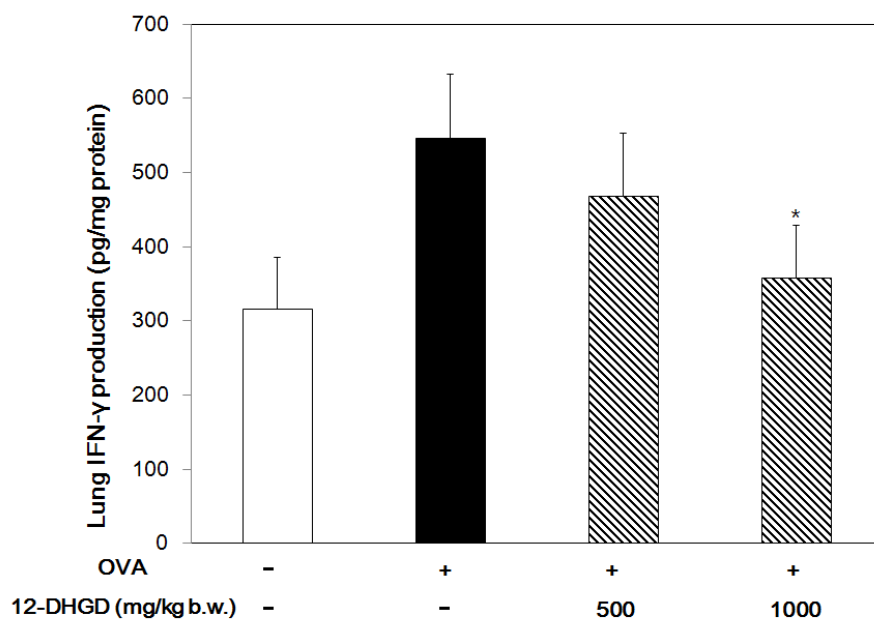
The production of (A) IL-1 β , and (B) TNF- α was evaluated with ELISA for the lung homogenates. ** p < 0.01 for OVA-sensitized and -challenged mice versus 12-DHGD 500 mg/kg b.w. or 1000 mg/kg b.w. administration.

4.3.4.2 Th-1 세포 분비 cytokines 발현에 대한 12-DHGD의 효과

최근 만성 천식에서 Th1 세포 주도적인 사이토카인 발현의 증가가 나타난다는 보고가 있다. 천식유발동물에 있어서 12-DHGD 이 폐 조직에 존재하는 Th1 관련 사이토카인인 $\text{INF-}\gamma$ 와 IL-12의 생성에 대하여 어떠한 효과를 나타내는지 관찰하기 위하여, 폐 조직 균질액을 이용하여 ELISA 법을 통해 각 cytokine을 측정하였다. 정상대조군 동물의 폐 조직 내에 존재하는 $\text{INF-}\gamma$ 는 315.8 ± 69.6 pg/ml로 측정되었고, OVA 천식동물에서는 546.6 ± 85.7 pg/ml로 OVA로 천식을 유도한 경우 폐 조직 내에 존재하는 $\text{INF-}\gamma$ 수준이 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4-6, A). OVA 감작 및 노출에 의하여 증가된 폐 조직 내 $\text{INF-}\gamma$ 는 12-DHGD의 500 mg/kg b.w., 1000 mg/kg b.w. 투여 농도별 각각 467.4 ± 86.1 pg/ml 및 357.4 ± 70.9 pg/ml로 측정되었다(Figure 4-6, A). 12-DHGD의 경구투여는 OVA 감작 및 자극에 의해 생성된 폐 조직 내 $\text{INF-}\gamma$ 수준을 농도 의존적으로 감소시키는 경향이 확인되었으며, 특히 1000 mg/kg b.w. 투여 동물에서는 OVA 천식동물과 비교하여 통계적으로 유의성있게 감소시킨 것이 확인되었다. 정상대조군 동물의 폐 조직 내에 존재하는 IL-12는 83.9 ± 2.7 pg/ml로 측정되었고, OVA 천식동물에서는 164.2 ± 10.2 pg/ml로 OVA로 천식을 유도한 경우 폐 조직 내에 존재하는 IL-12 수준이 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4-6, B). OVA 감작 및 노출에 의하여 증가된 폐 조직 내

IL-12는 12-DHGD의 500 mg/kg b.w., 1000 mg/kg b.w. 투여 농도별 각각 87.2 ± 0.7 pg/ml 및 91.0 ± 5.3 pg/ml로 측정되었다 (Figure 4-6, B). 500, 1000 mg/kg b.w. 농도의 12-DHGD의 경구투여는 OVA 감작 및 자극에 의해 생성된 폐 조직 내 IL-12의 수준을 통계적으로 유의성있게, 농도 의존적으로 감소시켰으며 이는 정상동물과 비슷한 수준으로 나타났다.

A.



B.

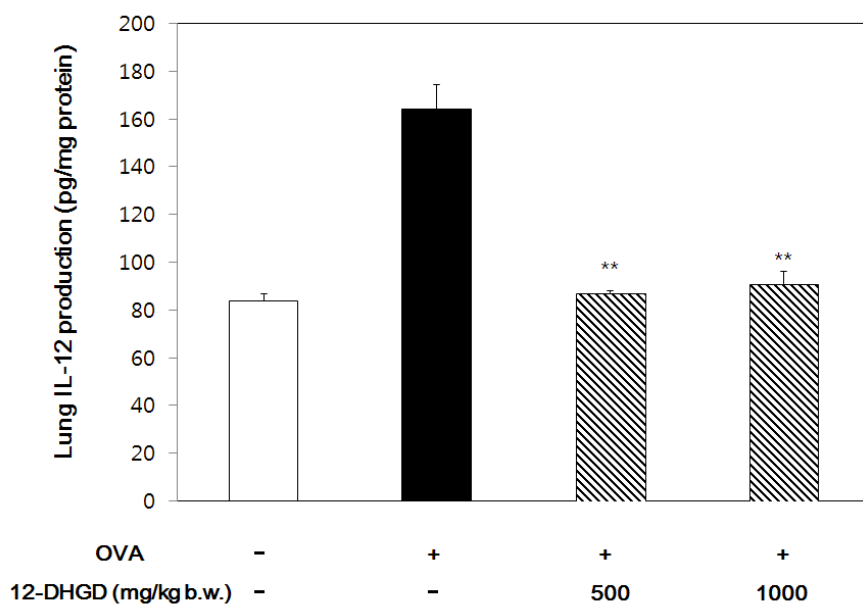


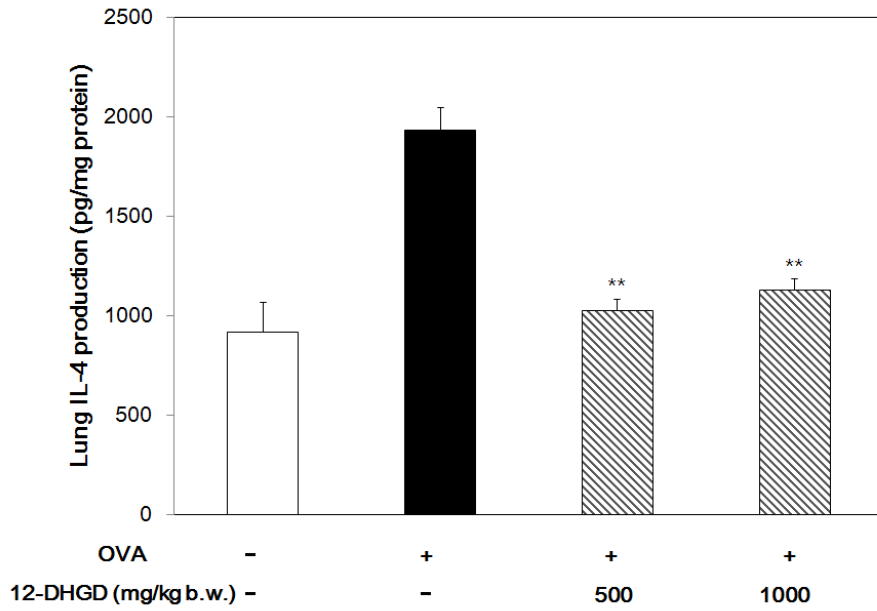
Figure 4-6. Effect of 12-DHGD on the levels of Th1-related cytokines IFN- γ and IL-12 in the lung tissue. The production of (A) IFN- γ , and (B) IL-12 was evaluated with ELISA for the lung homogenates. * $p < 0.05$ for OVA-sensitized and -challenged mice versus 12-DHGD 500 mg/kg b.w. or 1000 mg/kg b.w. administration. ** $p < 0.01$ for OVA-sensitized and -challenged mice versus 12-DHGD 500 mg/kg b.w. or 1000 mg/kg b.w. administration.

4.3.4.3 Th2 세포 분비 cytokines 발현에 대한 12-DHGD의 효과

지속적이고 반복적인 알러젠의 유입은 dendritic cell로부터 다양한 chemokines을 방출시켜 Th2 세포를 자극한다. 활성화된 Th2 세포는 IL-4, 5, 9 및 13과 같은 세포 특이적인 cytokines을 분비하면서 비만세포, B 세포, 호산구 등을 활성화하여 천식 질환 진행에 주도적인 역할을 한다. 천식유발동물에 있어서 12-DHGD이 폐 조직에 존재하는 Th2 관련 사이토카인인 IL-4와 IL-13의 생성에 대하여 어떠한 효과를 나타내는지 관찰하기 위하여, 폐 조직 균질액을 이용하여 ELISA 법을 통해 각 cytokine을 측정하였다. 정상대조군 동물의 폐 조직 내에 존재하는 IL-4는 916.3 ± 151.6 pg/ml로 측정되었고, OVA 천식동물에서는 1933.0 ± 111.8 pg/ml로 OVA로 천식을 유도한 경우 폐 조직 내에 존재하는 IL-4 수준이 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4-7, A). OVA 감작 및 노출에 의하여 증가된 폐 조직 내 IL-4는 12-DHGD의 500 mg/kg b.w., 1000 mg/kg b.w. 투여 농도별 각각 $1,025.0 \pm 55.9$ pg/ml 및 $1,126.8 \pm 56.0$ pg/ml로 측정되었다(Figure 4-7, A). 12-DHGD의 경구투여는 OVA 감작 및 자극에 의해 생성된 폐 조직 내 IL-4의 수준을 통계적으로 유의성있게 감소시켰으며 이는 정상동물과 비슷한 수준으로 나타났다. 정상대조군 동물의 폐 조직 내에 존재하는 IL-13은 $10,007.3 \pm 1412.7$ pg/ml로 측정되었고, OVA 천식동물에서는 15573.0 ± 464.6 pg/ml로 OVA로 천식을 유도한 경우 폐 조직 내에 존재하는 IL-13 수준이

유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 4-7, B). OVA 감작 및 노출에 의하여 증가된 폐 조직 내 IL-13은 12-DHGD의 500 mg/kg b.w., 1000 mg/kg b.w. 투여 농도별 각각 $13,273.9 \pm 1,166.3$ pg/ml 및 $11,232.3 \pm 629.0$ pg/ml로 측정되었다(Figure 4-7, B). 500, 1000 mg/kg b.w. 농도의 12-DHGD의 경구투여는 OVA 감작 및 자극에 의해 생성된 폐 조직 내 IL-13의 수준을 농도 의존적으로 감소시키는 경향이 확인되었으며, 특히 1000 mg/kg b.w. 투여 동물에서는 OVA 천식동물과 비교하여 통계적으로 유의성있게 감소시킨 것이 확인되었다.

A.



B.

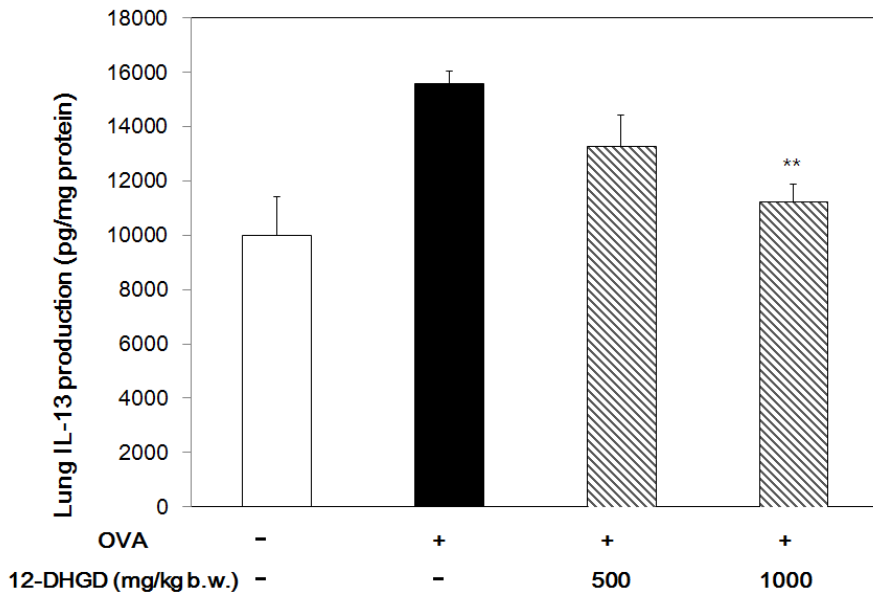


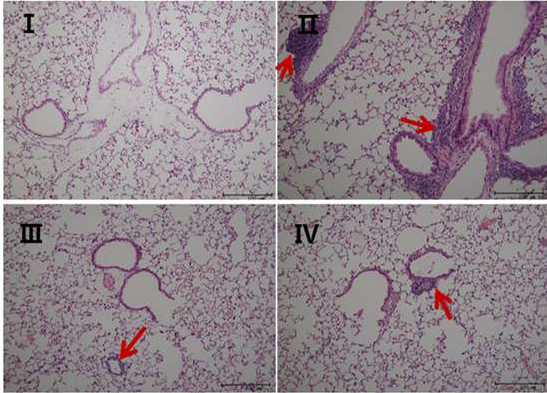
Figure 4-7. Effect of 12-DHGD on the levels of Th2-related cytokines IL-4 and IL-13 in the lung tissue. The production of (A) IL-4, and (B) IL-13 was evaluated with ELISA for the lung homogenates. ** $p < 0.01$ for OVA-sensitized and -challenged mice versus 12-DHGD 500 mg/kg b.w. or 1000 mg/kg b.w. administration.

4.3.5. 폐 조직 내의 염증세포 침윤 및 점액분비세포 침윤에 대한 12-DHGD의 효과

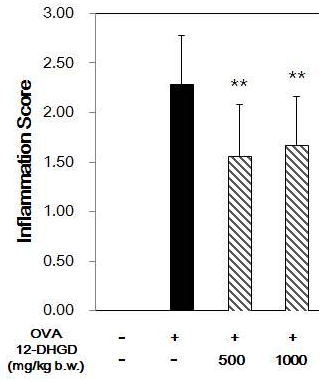
염증세포의 축적 및 점액분비세포의 증가는 천식의 가장 큰 특징인 기도 과민성을 증가시키며 기도폐쇄를 초래하게 된다. 조직 내에 염증세포와 점액분비세포의 침윤정도를 확인하기 위하여 부검 시 동물의 폐 조직을 고정하였다. 염증세포 침윤정도는 H&E 염색을, 점액분비세포의 침윤정도는 PAS 염색을 통하여 수행하였다. 침윤정도를 0~5까지 점수화하여 정상 대조군 동물과 OVA 천식동물, OVA 천식동물과 12-DHGD 경구투여 동물간의 차이를 조사하였다. 먼저 H&E 염색결과, 정상 대조군 동물의 폐 조직 내 염증세포 침윤정도인 inflammation index는 0.0 ± 0.0 으로 폐포 내강 및 기관지가 뚜렷이 잘 보이고 염증세포 침윤도 관찰되지 않았다. 하지만, OVA 천식 동물에서 inflammation index는 2.3 ± 0.5 로 증가되었고 폐포의 이상 형태 및 협착이 관찰되었으며 염증세포 침윤 정도가 정상 대조군 동물과 비교하여 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4-8, A, B). OVA 감작 및 노출에 의하여 증가된 폐 조직 내 염증세포 침윤정도는 12-DHGD의 500 mg/kg b.w., 1000 mg/kg b.w. 투여 농도별 각각 1.6 ± 0.5 및 1.7 ± 0.5 로 측정되었다. 12-DHGD의 경구투여는 OVA 감작 및 자극에 의해 생성된 폐 조직 내 염증세포 침윤정도인 inflammation index 값을 통계적으로 유의성있게 감소시켰으며, 폐포 이상 형태 및 협착에 대하여 완화된 것을 확인할 수 있었다. PAS 염색결과, 정상 대조군 동물의 폐 조직 내 점액분비세포 침윤정도인 mucus hyperplasia index

0.0±0.0으로 점액분비세포가 관찰되지 않았다. 하지만, OVA 천식 동물에서 mucus hyperplasia index는 2.9±0.4로 증가되었다 (Figure 4-8, C, D). 이는 천식이 진행됨에 따라 동물의 기도 상피세포 내에 점액을 분비하는 술잔세포와 점액선이 증가한 것으로 생각된다. OVA 감작 및 노출에 의하여 증가된 폐 조직 내 점액분비세포 침윤정도는 12-DHGD의 500 mg/kg b.w., 1000 mg/kg b.w. 투여 농도별 각각 1.7±0.5 및 2.2±0.4로 측정되었다. 12-DHGD의 경구투여는 OVA 감작 및 자극에 의해 생성된 폐 조직 내 점액분비세포 침윤정도인 mucus hyperplasia index 값을 통계적으로 유의성있게 감소시켰으며, 술잔세포 증식 및 점액선 비대에 대하여 완화된 것을 확인할 수 있었다.

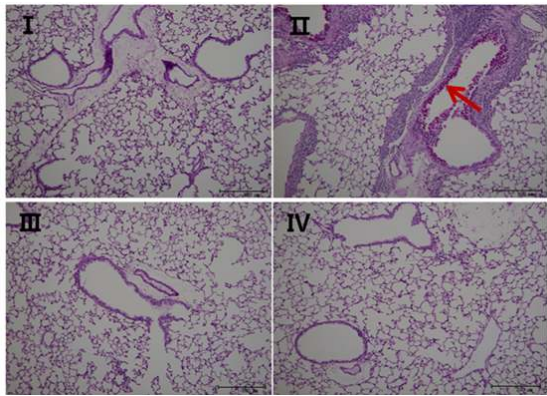
A.



B.



C.



D.

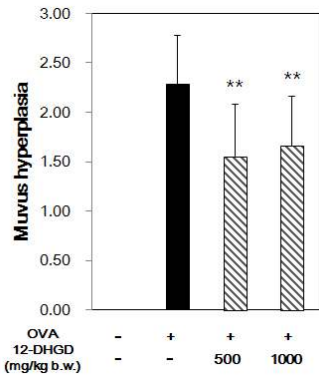


Figure 4–8. Histopathological changes in the lung tissue of OVA–sensitized and challenged mice after 12–DHGD treatment.

(A) Lung tissues of 3 μm thickness were fixed and sectioned and consecutively stained with H&E solution (magnification $\times 100$). (B) The extent of inflammation was scored and shown in graph. (C) Lung tissues of 3 μm thickness were fixed and sectioned and were consecutively stained with PAS solution (magnification $\times 100$). (D) The extent of mucus hyperplasia was scored and shown in graph. Inflammatory and goblet cell infiltration is indicated by red arrows. For histopathological data, I, normal control mice; II, OVA–sensitized/challenged mice; III, 12–DHGD 500 mg/kg b.w. + OVA–sensitized/challenged mice; IV and 1000 mg/kg b.w., 12–DHGD 1000 mg/kg b.w. + OVA–sensitized/challenged mice. For bar graph, ** $p < 0.01$ for OVA–sensitized and –challenged mice versus 12–DHGD 500 mg/kg b.w. or 1000 mg/kg b.w. administration.

4.3.6. 고 찰

기관지 천식은 기관지 민감성, 기도 폐색 및 기도 염증을 특징으로 갖고 있는 만성 알러지성 염증질환이다. 최근 세계적으로 서구화가 진행됨에 따라 그 유병율은 급속도로 증가하고 있는 추세이며, 예방 및 치료의 수준에 따라 천식으로 인한 사망률은 가역적으로 조절될 수 있음이 보고되고 있다(Cho *et al.*, 2006).

천식은 알러지 반응에 의하여 진행되는 염증질환으로서 비만세포, 단핵세포, 임파구 및 호산구 등의 작용이 두드러지며 이들로부터 유리되는 매개물질들 및 사이토카인에 의하여 질환이 유도되고 증상악화에 기여한다. 이 중 호산구는 천식 질환에 있어 가장 특징적인 유발세포로 알려져 있으며, 특히 기도 상피세포 손상에 관여한다고 알려져 있다(Filipovic and Cekic, 2001, Pearlman, 1999, Ricci *et al.*, 1997). 항원에 의한 기도내의 호산구 비정상적인 과축적과 호산구에서 분비되는 염증 유도 매개체는 천식을 비롯한 다른 알레르기 질환의 발병에도 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Busse, 1998). 특히, 호산구가 분비하는 과립은 비만세포와 호염구의 탈과립을 통한 기도의 과민성을 증가시켜주고, 지질 매개물질 효소는 기도 내 점액분비를 증가시키며 혈관 확장을 유도한다(Desreumaux and Capron, 1996). 또한 사이토카인 및 케모카인(chemokines)은 호산구의 생존을 연장시키고 점착물질의 발현을 증가시키며 기도 개형을 유발한다(Fish and Peters, 1999). BALF 내에 존재하는 면역세포수의 측정을 통하여 천식질환에 따른 다양한 면역세포들의 유입 정도를 확인 할 수 있다. 일반적으로 정상

상태에서 폐 세척액내에는 대식세포만이 존재한다. 천식과 같은 기도 질환이 있을 경우, 기관지 주위로 호산구 및 호중구와 같은 면역세포의 유입이 증가되며 이는 환자 및 동물의 폐 세척액에서도 일치하는 결과를 보였다. 본 실험에서 BALF 내에 존재하는 호산구, 호중구 및 림프구의 수는 정상 대조군에 비하여 OVA 유도 천식군에서 유의적으로 증가하였다. 12-DHGD 경구투여로 인하여 각 면역세포의 감소경향을 확인할 수 있었으며, 특히 호산구 유입에 미치는 영향은 농도 의존적으로 현저히 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 12-DHGD의 투여가 OVA으로 천식을 유도하는 과정에서 호산구, 호중구, 림프구 등의 염증 유발 세포들이 기도에 침착되는 것을 억제하고 이들에 의한 염증반응이 억제될 수 있을 것으로 생각된다.

면역학적인 관점에서, 천식은 Th2 면역반응의 과도한 항진 또는 Th1 면역반응의 감소에 의한다고 알려져 있다. T helper 세포는 IL-2, INF- γ , IL-12 등을 분비하는 Th1 세포와 IL-4, IL-5 및 IL-13을 분비하는 Th2 세포로 나뉜다. 주로 Th1 세포는 바이러스 감염 시 활성화되어 미생물 살해능을 증가시키며 IgG급의 항체 생산을 촉진한다. Th2 세포는 기생충에 대한 면역반응을 촉진시키며 IL-4를 분비하여 B 림프구로부터 IgE 항체의 생산을 촉진하고 IL-5를 분비하여 호산구의 활성화를 유도한다. 기존의 연구에서는 Th1 세포에서 분비되는 IFN- γ 혹은 IL-12가 호산구의 침윤을 억제하고 Th2 세포에서 분비되는 사이토카인의 작용을 억제하여 Th1 세포의 활성화가 천식의 진행 및 증상을 완화시켜줄 수 있다고 여겨졌다(Garlisi *et al.*, 1995, Robinsin *et al.*, 1992). 하지만, 최근 연구를 통하여 만성적으로 진행된 천식에서 Th1 세포의

활성화가 보고되었고(Leckie *et al.*, 2000), 그로인한 급성 및 만성 천식환자 및 동물의 폐 조직에서 IFN- γ 의 유의적인 증가를 확인하였고, 또한 이는 천식의 중증도, 기도 과민성 및 혈액 내 호산구 증가 비례함을 보고하였다(Cembrzynska-Nowak *et al.*, 1993, Krug *et al.*, 1996, Magnan *et al.*, 2000). 이러한 패러다임은 천식을 단순히 Th1/Th2 세포 반응으로 극단적으로 나누어 설명하기에는 무리가 있음을 보여준다. 실제적으로 생강 추출물을 이용한 기도 질환 억제효과를 살펴본 연구로는 Ahui 등이 염증 쥐에게 생강 열수 추출물을 복강 투여한 후 천식을 유도하여 천식진행 과정에서 유도되어지는 Th2 세포 특이적인 감소 효과를 확인하였고(Ahui *et al.*, 2008), Ghayur 등은 생강 70 % 메탄올 추출물이 아세틸콜린(acetylcholine)으로 자극한 쥐의 기도 평활근 수축에 대한 억제 효과가 있음을 보고하였으며(Ghayur *et al.*, 2008), Yao 등은 생강의 약침을 통하여 OVA로 유도한 천식 동물에서 증상 완화효과가 있음을 보고하였다(Yao *et al.*, 2007). 본 연구에서는 동물의 폐조직을 이용하여 조직 내 존재하는 초기염증성, Th1 세포관련 및 Th2 세포관련 사이토카인의 발현정도에 미치는 12-DHGD 경구투여의 효과를 살펴보았다. OVA를 이용하여 천식을 유도한 동물의 폐 조직 내에서는 초기염증성, Th1, Th2 세포관련 사이토카인의 생성이 유의성있게 증가되었다. 12-DHGD의 경구투여를 통하여 이들의 생성을 대부분 정상수준으로 감소시키는 것이 확인되었다. 이는 12-DHGD의 투여가 BALF 내에 존재하는 염증세포의 침착을 감소시켜 그들로 인한 다양한 사이토카인의 분비가 억제된 것과 일치하는 것으로 사료된다. 본 실험을 통하여 천식동물에서 Th1 세포 특이적인 사이토카인인 IFN- γ 와 IL-12의 증가가 나타났다. 또한

12-DHGD의 투여는 증가된 두 사이토카인의 생성량을 유의적으로 억제하였다. 앞서 말했듯이, 최근 연구에서 보고되고 있는 급성 혹은 만성 천식에서 나타날 수 있는 Th1 세포성 사이토카인의 증식이 후기천식 증상 특히 호산구의 유입을 유도한다는 결과와 일치하며 12-DHGD은 Th1세포성 사이토카인의 증가로 발생할 수 있는 증상악화 또한 억제한 것으로 생각된다. IL-12는 IFN- γ 의 발현을 유도하는 사이토카인으로서 IFN- γ 증가에 대한 뒷받침을 하고 있다. 하지만, 천식치료제로 사용되어지고 있는 약물에 대한 비교 값이 없어 12-DHGD의 천식증상완화 정도를 비교하기에는 미흡하다.

IgE는 mast cell 표면에 존재하는 Fc ϵ RI에 강하게 결합하여 비만세포에 의한 알러지반응을 촉진하는데 중추적인 역할을 한다. 기도내로 들어온 알러젠은 Th2 세포에서 분비하는 IL-4와 IL-13을 통하여 B 세포로부터 IgE 항체를 생성하도록 유도한다. 지속적인 알러젠 유입으로 인하여 IgE 항체는 과량 분비되고 비만세포 표면에 존재하는 Fc ϵ RI에 결합하여 비만세포 내의 과립을 세포 밖으로 방출시킨다. 과립내에 존재하는 histamines, leukotriens 및 사이토카인들을 통하여 조직이 파괴되고 기도과민반응이 촉진된다 (Campbell *et al.*, 1998, Theoharidies and Kalogeromitros, 2006). 본 실험에서 OVA로 유도한 천식동물에서 혈청 IgE 수준은 정상 대조군 동물에 비하여 유의성 있게 증가되었으며, 12-DHGD 투여군에서는 천식동물의 혈청 IgE 생성에 비하여 현저한 감소를 나타냈다.

본 연구에서는 동물의 폐 조직염색을 통하여 폐 조직내에 침윤되어있는 염증성 세포 및 점액분비세포를 관찰하였다. OVA로 유도

한 천식 동물에서 염증수치와 점액분비세포인 술잔세포의 과다증식이 확인되었다. 12-DHGD의 투여는 이러한 염증수치 및 술잔세포의 증식을 유의적으로 억제하였으며 이는 폐 조직에 전반적인 염증 반응의 감소와 기도개형을 완화시키는 것으로 생각된다. 이 결과 BALF 내의 염증세포 유입억제 및 폐 조직 내 사이토카인 발현 억제 효과와 일치하는 결과라 할 수 있다.

이와 같이, 12-DHGD의 투여가 천식 모델에 있어서 BALF 내에 총 세포수감소 및 염증세포 유입 억제, 혈청 IgE 수준 감소, 폐 조직내에 초기염증성 사이토카인 및 T 세포 관련 사이토카인을 감소시키고 결국 폐 조직내에 염증과 점액분비를 억제함으로써 결국 천식의 질환 진행 및 증상을 완화하는 것으로 생각된다. 본 연구를 배경으로 12-DHGD에 대한 염증 및 알러지 관련 질환 억제 효과에 대한 깊이 있는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Chapter 5. 결 론

본 연구는 생강성분인 12-DHGD이 활성화 된 대식세포와 비만 세포를 이용하여 각 세포들이 분비하는 염증 유도 사이토카인 및 매개물질을 관찰하고, Balb/c mouse에 ovalbumin을 이용한 기관지 천식 모델에서 천식 유도 및 질병진행에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

생강은 염증치료제, 소화기계의 복통이나 소화불량에 사용되며 진통제로 사용되기도 했다(Butt M.S. and Sultan M.T. 2011). 생강의 주성분으로는 gingerol, shogaol 및 paradol 등이 있고, 다양한 연구를 통하여 생강추출물 단일성분을 이용하여 항염증작용, 암 세포의 사멸유도 및 전이억제, 또는 신생혈관생성억제, 지방생성억제, 항당뇨작용, 간과 신장에 대한 독성으로부터의 보호효과 등의 연구결과가 보고되어있다. 생강 추출물 및 주요 성분에 대한 질환 예방 효과 및 증상 개선효과에 대한 연구는 보고되고 있지만, 12-DHGD에 대한 연구는 전무한 실정이다. 생강성분인 12-DHGD의 합성용이성 및 대식세포의 탐식능 증가 등이 보고되고 있기 때문에, 본 연구에서는 천식질환의 진행 및 증상완화에 대한 효과를 확인하기 위하여 대식세포와 비만세포를 이용하여 자극 받은 각 세포들이 분비하는 염증 유도 사이토카인 및 매개물질을 관찰하고, Balb/c mouse에 ovalbumin을 이용한 기관지 천식 모델에서 폐 세척액 내 면역세포 비율, 혈청 IgE, 폐 조직 내 존재하는 cytokine 발현 및 조직 염색을 통한 염증 및 점액분비 세포 침윤 정도에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

12-DHGD은 LPS로 활성화시킨 대식세포에서 NO(100, 150,

200 ng/ml) 및 PGE₂(200 ng/ml)의 생성을 유의적으로 감소시켰으며, 이는 각 물질의 촉진 효소인 iNOS(200 ng/ml)와 COX-2(50, 100, 150, 200 ng/ml) mRNA 발현에 대한 결과와 일치한다. 12-DHGD은 LPS로 활성화시킨 대식세포에서 염증성 사이토카인인 IL-6(50, 100, 150, 200 ng/ml)의 생성을 유의성 있게 감소시켰다. 그러나, IL-1 β 와 TNF- α 의 생성에 대한 유의한 변화는 나타나지 못하였다. 12-DHGD은 PMACI로 자극한 비만세포에서 염증성 사이토카인인 IL-6(1, 10 μ g/ml), IL-8(1, 10 μ g/ml), TNF- α (0.1, 1, 10 μ g/ml) 및 GM-CSF(10 μ g/ml)의 생성을 유의성 있게 감소시켰다. 12-DHGD은 OVA를 이용하여 천식유발시, BALF 내의 면역세포 수를 감소시켰으며 특히 호중구의 유입을 억제하였다. 12-DHGD은 OVA로 유발된 천식동물의 폐 조직내에서 증가되어진 IL-1 β 와 TNF- α 와 같은 초기 염증성 사이토카인의 생성을 유의성 있게 감소시켰다. 12-DHGD은 OVA로 유발된 천식동물의 폐 조직내에서 증가되어진 T 세포 관련 사이토카인(Th1:IFN- γ , IL-12, Th2; IL-4, IL-5)의 생성을 유의성있게 감소시켰다. 12-DHGD은 OVA로 유발된 천식동물의 폐 조직으로 염증세포와 점액분비세포의 침윤을 유의적으로 억제하였다.

이상의 결과로 볼 때, 생강성분인 12-DHGD은 대식세포와 비만세포의 활성화에 따라 진행되는 염증 및 알러지 반응억제와 천식 모델 동물에서 호산구 유입 및 염증세포의 침윤 억제를 통한 매개물질의 차단으로 기도의 염증반응 및 과민반응을 억제되어 천식 증상이 완화된 것으로 생각되어진다(Figure 5-1). 또한 본 연구는 생강성분인 12-DHGD을 이용한 항염 및 항알러지 효과를 통한 천

식억제 가능성을 살펴 본 최초의 논문이며, 최근 보고되어지고 있는 급성 및 만성 천식환자에게서 증가되어지는 폐 조직 및 폐 세척액 내의 Th1 세포의 증가에 대한 억제 효과를 나타냄으로써 최신 연구에 대한 뒷받침되는 증거를 제시하고 있다. 하지만, 활성화된 비만세포로 특이적으로 분비되어지는 histamine에 대한 12-DHGD의 효과를 측정하지 못하였고, 천식동물에게 투여된 12-DHGD의 용량이 다소 높아 인체적용에 무리가 있을 수 있다. 그러므로 12-DHGD을 인체 적용 가능한 항염, 항알러지 및 항천식 치료제로서의 개발하기 위하여 추후 알러지 기전에 대한 연구 및 12-DHGD의 복강 및 정맥투여를 통한 효능 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 생각된다.

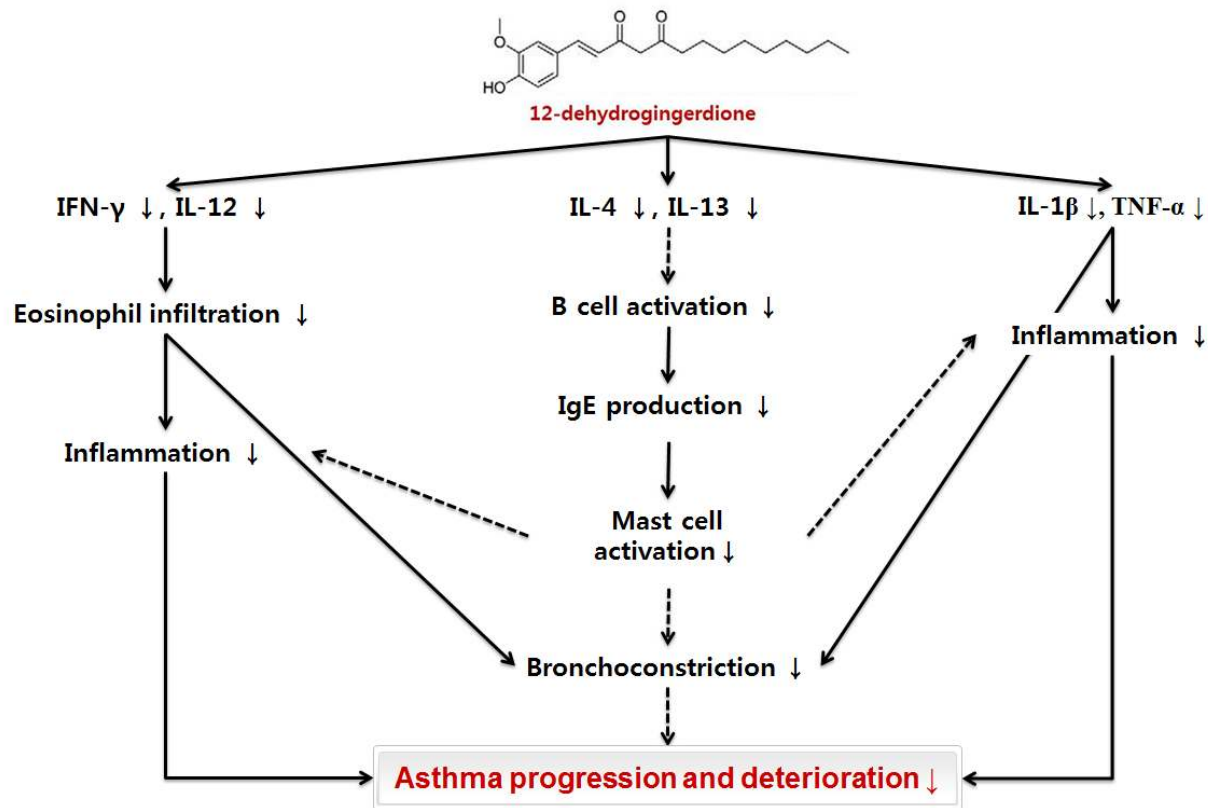


Figure 5–1. Proposed mechanisms of 12–DHGD on the modulation of asthma disease

참고문헌

류혜숙, 김현숙 (2004) 생강 추출물 투여가 마우스 면역세포 활성화에 미치는 영향. *한국본초학회지* 37;23-30

안강모 (2004) 비만세포의 알레르기 염증 반응과 Innate Immunity에서의 역할. *Korean Journal of Pediatrics* 47;1137-1141

이동훈, 손동섭, 조대운, 김범준, 임윤영, 김영희 (2010) LPS로 활성화된 Raw 264.7 Cells에서 고삼 뿌리 추출물의 항염증과 항산화 효과. *대한진균학회지* 15;39-50

이은희, 정현자 (2002) IgE에 의해 자극된 비만세포에서의 염증성 사이토카인 발현에 대한 BAPTA-AM의 효과. *한국노화학회지* 12;45-52

한국 성인 천식의 진료지침. (2011) *대한천식 알레르기 학회*

Abraham S.N. and St. Jhon A.L. (2010) Mast cell orchestrated immunity to pathogens. *Nature Reviews/Immunology* 10;440-452

Abbas A.K. and Lichtman A.H. (2012) Cellular and Molecular Immunology (7th edition) *Elsevier* 60-65

Ahui M.L, Champy P., Ramadan A., Pham V.L., Araujo L, Brou Andre K, Diem S., Damotte D., Kati-Coulibaly S., Offoumou M.A., Dy M., Thieblemont N., Herbelin A. (2008) Ginger prevents Th2-mediated immune responses in a mouse model of airway inflammation. *International Immunopharmacology* 8:1626-1632

Akhani S.P., Vishwakarma S.L., Goyal R.K. (2004) Anti-diabetic activity of *Zingiber officinale* in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Journal of pharmacy and pharmacology* 56:101-105

Appleby S.B., Ristimaki A., Neilson K., Narko K. and Hla T. (1994) Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochemical Journal* 302:723-727

Ajith T.A., Hema U., Aswathy M.S. (2007) *Zingiber officinale* Roscoe prevent acetaminophen-induced acute hepatotoxicity by enhancing hepatic antioxidant status. *Food and Chemical Toxicology* 45:2267-2272

Ajith T.A., Nivitha V., Usha S. (2007) *Zingiber officinale* Roscoe alone and in combination with α -tocopherol protect the kidney against cisplatin-induced acute renal failure. *Food and Chemical Toxicology* 45:921-927

Barnes P.J. (2008) Immunology of asthma and chronic

obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews/Immunology* 8;183–192

Baruah C.C., Gupta P.P., Nath A., Patnaik L.G., Dhawan B.N. (1998) Anti-allergic and anti-ana- phylactic activity of picroliv – A standardised iridoid glycoside fraction of *Picrorhiza kurroa*. *Pharmacological Research* 38;487–492

Bergmann R.L., Edenharter G., Bergmann K.E., Guggenmoos-Holzmann I., Forster J., Bauer C.P., Wahn V., Zepp F., Wahn U. (1997) Predictability of early atopy by cord blood IgE and parental history. *Clinical and Experimental Allergy* 27;752–760

Bhandari U., Kanojia R., Pillai K.K. (2005) Effect of ethanol extract of *Zingiber officinale* on dyslipidemia in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 97;227–230

Blacquiere M.J., Hylkema M.N., Postma D.S., Geerlings M., Timens W., Melgert B.N. (2010) Airway inflammation and remodeling in two mouse models of asthma: comparison of males and females. *International Archives of Allergy and Immunology* 153;173–181

Brown A.C., Shah C., Liu J., Pham J.T., Zhang J.G., Jadus M.R. (2009) Ginger's (*Zingiber officinale* Roscoe) Inhibition of rat colonic adenocarcinoma cells proliferation and

angiogenesis in vitro. *Phytotherapy Research* 23;640–645

Brown J.M., Wilson T.M., Metcalfe D.D. (2008) The mast cell and allergic disease: role in pathogenesis and implications for therapy. *Clinical and Experimental Allergy* 38;4–18

Butt M.S. and Sultan M.T. (2011) Ginger and its Health Claims: Molecular Aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51;383–393

Busse W.W. (1998) Leukotrienes and inflammation. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* 157;210–213

Campbell A.M., Vachier I., Chanez P., Vignola A.M., Lebel B., Kochan J., Godard P., Bousquet J. (1998) Expression of the high-affinity receptor for IgE on bronchial epithelial cells of asthmatics. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 19;92–97

Cembrzynska-Nowak M., Szklarz E., Inglot A.D., Teodorczyk-Injeyan J.A. (1993) Elevated release of tumor necrosis factor- α and interferon- γ by bronchoalveolar leukocyte from patients with bronchial asthma. *American Review of Respiratory Disease* 147;291–5

Cho S.H., Park H.W., Rosenberg D.M. (2006) The Current

Status of Asthma in Korea. *Journal of Korean Medical Science* 21;181–7

Colice G.L. (2000) Comparing Inhaled Corticosteroids. *Respiratory Care* 45;846–853

Costello P.S, Turner M., Walters A.E., Cunningham C.N., Bauer P.H., Downward J., Tybulewicz V.L. (1996) Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells. *Oncogene* 13;2595–2605

David E.B., Jeanclaire S., Francis H.Y.G. (2000) ANIMAL MODELS OF ASTHMA: Potential Usefulness for Studying Health Effects of Inhaled Particles. *Inhalation Toxicology* 12;829–862

Dai Y., Chan Y.P., Chu L.M., Bu P.P. (2002) Antiallergic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract from *Gleditsia sinensis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 5;1179–1182

Devereux G. (2006) The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nature Reviews/Immunology* 6;869–874

Dhawan K., Kumar S., Sharma A. (2003) Anti-asthmatic activity of the methanol extract of leaves of *Passiflora incarnata*. *Phytotherapy Research* 17;821–822

Delveds P.J. and Roitt I.M. (2000) The immune system. *The New England Journal of Medicine*. 343;108–117

Desreumaux P. and Capron M. (1996) Eosinophils in allergic reaction. *Current Opinion in Immunology* 8;790–795

Di Valentin E., Crahay C., Garbacki N., Hennuy B., Gueders M., Noel A., Foidart J.M., Grooten J., Colige A., Piette J., Cataldo D. (2009) New asthma biomarkers: lessons from murine models of acute and chronic asthma. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology* 296;185–197

Erger R.A. and Casale T.B. (1998) Interleukin-8 plays a significant role in IgE-mediated lung inflammation. *European Respiratory Journal* 11;299–305

Fish J.E. and Peters S.P. (1999) Airway remodeling and persistent airway obstruction in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104;509–516

Ferreira M.B. and Carlos A.G. (1998) Cytokines and asthma. *Journal of Investigation Allergology and Clinical Immunology*

8;141–148

Filipovic M. and Cekic S. (2001) The role of eosinophils in asthma. *Medicine and Biology* 8;6–10

Garlisi C.G., Falcone A., Kung T.T., Stelts D., Pennline K.J., Beavis A.J., Smith S.R., Egan R.W., Umland S.P. (1995) T cells are necessary for Th2 cytokine production and eosinophil accumulation in airways of antigen-challenged allergic mice. *Clinical Immunology and Immunopathology* 75;75–83

Galli S.J. (1993) New concepts about the mast cells. *The New England Journal of Medicine* 328;257–65

Geha R.S., Jabara H.H., Brodeur S.R. (2003) The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nature Review/ Immunology* 3;721–32

Ghayur M.N., Gilani A.H., Janssen L.J. (2008) Ginger attenuates acetylcholine-induced contraction and Ca²⁺ signalling in murine airway smooth muscle cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 86;264–271

Gueders M.M., Paulissen G., Crahay C., Quesada-Calvo F., Hacha J., Van Hove C., Tournoy K., Louis R., Foidart J.M., Noel A., Cataldo D.D. (2009) Mouse models of asthma: a

comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflammation Research* 58:845–854

Global initiative for asthma (2011) Global strategy for asthma management and prevention

Hamid Q. and Tulic M. (2009) Immunobiology of asthma. *Annual Review of Physiology* 71:489–507

Harish M.S., Nagur M., Badami S. (2001) Antihistaminic and mast cell stabilizing activity of *Striga orobanchioides*. *Journal of Ethnopharmacology* 76:197–200

Hinson R.M., Williams J.A., Shacter E. (1995) Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandinE2 in a murine model of inflammation: Possible role of cyclooxygenase-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:4885–4890

Holgate S.T., Djukanović R., Casale T., Bousquet J. (2005) Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic disease: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. *Clinical and Experimental Allergy* 35:408–416

Han S.B., Lee J.H., Kim C.W., Nam D.W., Chung W.S., Lee S.G., Ahn K.S., Cho S.K., Cho M.J., Ahn K.S. (2013) Capillarisin inhibits iNOS, COX2 expression, and

proinflammatory cytokines in LPS-induced Raw 264.7 macrophages via the suppression of ERK, JNK, and NF- κ B activation. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 35(1);34-42

Heo S.J., Yoon W.J., Kim K.N., Ahn G.N., Kang S.M., Kang D.H., Affan A., Oh C.H., Jung W.K., Jeon W.J. (2010) Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology* 48;2045-2051

Hoenstein R., Admon D., Solomon A., Norris A., Moqbel R., Levi-Schaffer F. (2001) Interleukin-2 activates human peripheral blood eosinophils. *Cellular Immunology* 210;116-124

Hoolgate S.T. and Polosa R. (2008) Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature reviews/Immunology* 8;218-230

Hseu Y.C., Wu F.Y., Wu J.J., Chen J.Y., Chang W.H., Lu F.J., Lai Y.C., Yang H.L. (2005) Anti-inflammatory potential of *Antrodia camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-kappaB pathway. *International Immunopharmacology* 5;1914-1925

Hussain T, Gupta S, Mukhtar H. (2003) Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis. *Cancer Letters* 191;125-135

Ippoushi K., Azuma K., Ito H., Horie H., Higashio H. (2003) [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774.1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions. *Life Sciences* 73;3427–3437

Jara L.J., Medina G., Vera-Lastra O., Amigo M.C. (2006) Accelerated atherosclerosis, immune response and autoimmune rheumatic disease. *Autoimmunity Reviews* 5;195–201

Jolad S.D., Lantz R.C., Chen G.J., Bates R.B., Timmermann B.N. (2005) Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): Composition and effects on LPS-stimulated PGE₂ production. *Phytochemistry* 66;1614–1635

Karin M., Lawrence T., Nizet V. (2006) Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 124;823–35

Kato A., Higuchi Y., Goto H., Kizu H., Okamoto T., Asano N., Hollinshead J., Nash R.J., Adachi I. (2006) Inhibitory effect of *Zingiber officinale* Roscoe derived components on aldose reductase activity in vitro and in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54;6640–6644

Kim H.W., Murakami A., Abe M., Ozawa Y., Morimitsu Y., Williams M.V., Ohigashi H. (2005) Suppressive effects of mioga ginger and ginger constituents on reactive oxygen and nitrogen species generation, and the expression of inducible pro-inflammatory genes in macrophages. *Antioxidants and Redox Signaling* 7;1621–1629

Kim E.H., Shim B., Kang S., Jeong G., Lee J.S., Yu Y.B., Chun M. (2009) Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* extract via suppression of immune modulators and MAP kinase signaling molecules. *Journal of Ethnopharmacology* 126;320–331

Kim N.K., Kim M.H., Yoon C.S., Choi S.W. (2006) Studies on the anti-inflammatory activity of *Paulownia coreana* uyeki leaf extract. *Journal of Society Cosmetic Scientists of Korea* 32;241–247

Kim J.Y., Jung K.S., Jeong H.G. (2004) Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Letters* 569;1–3

Kim S.F., Huri D.A., Snyder S.H., (2005) Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science* 310;1966–1970

Koh E.M., Kim H.J., Kim S., Choi W.H., Choi Y.H., Ryu S.Y.,

Kim Y.S., Koh W.S., Park S.Y. (2009) Modulation of macrophage functions by compounds isolated from *Zingiber officinale*. *Planta Medica* 75;148–151

Krug N., Madden J., Redington A.E., Lackie P., Djukanovic R., Schauer U., Holgate S.T., Frew A.J., Howarth P.H. (1996) T-cell cytokine profile elevated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 14;319–26

Lazer E.S., Sorcek R., Cywin C.L., Thome D., Possanza G.J., Graham A.G., Churchill L. (1998) Anti-inflammatory 2-benzyl-4-sulfonyl-4H-isoquinoline-1,3-diones: Novel inhibitors of COX-2. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 8;1181–1183

Leckie M.J., ten Brinke A., Khan J., Diamant Z., O'Connor B.J., Walls C.M., Mathur A.K., Cowley H.C., Chung K.F., Djukanovic R., Hansel T.T., Holgate S.T., Sterk P.J., Barnes P.J. (2000) Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *The Lancet* 356;2144–8

Levi-Schaffer F., Temkin V., Malamud V., Feld S., Zilberman Y. (1998) Mast cells enhance eosinophil survival in vitro: role of TNF- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Immunology*

160:5554–5562

Lee H.S., Seo E.Y., Kang N.E., Kim W.K. (2008) [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA–MB–231 human breast cancer cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19:313–319

Li C. and Wang M. H. (2011) Anti-inflammatory effect of the water fraction form hawthorn fruit on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Nutrition Research and Practice* 5:101–106

Magnan A.O., Mely L.G., Camilla C.A., Badier M.M., Montero-Julian F.A., Guillot C.M., Casano B.B., Prato S.J., Fert V., Bongrand P., Vervloet D.(2000) Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161:1790–6

Masoli M., Fabian D., Holt S., Beasley R. (2004) The global burden of asthmal executive of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy* 59:469–478

McKay S., Hirst S.J., Haas M.B., de Jongste J.C., Hoogsteden H.C., Saxena P.R., Sharma H.S. (2000) Tumor necrosis factor- α enhances mRNA expression and secretion of interleukin-6 in cultured human airway smooth muscle cells.

American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology
23:103–111

Mapp C.E. (2005) Genetic and the occupational environment.
Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology
5:113–118

Masaki M., Matsushita M., Wakitani K. (1998) Inhibitory effect of JTE-522, a novel prostaglandin H synthase-2 inhibitor, on adjuvant-induced arthritis and bone changes in rats. *Inflammation Research* 47:187–192

Nagai H. (2008) Prostaglandin as a target molecule for pharmacotherapy of allergic inflammatory disease. *Allergology International* 57:187–96

NIH, National asthma education and prevention program. Expert panel report 3: Guidelines for the diagnosis and management of asthma. Full Report 2007;20–23

Norrby K. (1997) Mast cells and de novo angiogenesis: angiogenic capability of individual mast-cell mediators such as histamine, RNF, IL-8 and bFGF. *Inflammation Research* 46 Suppl 1:7–8

Oh Y.C., Cho W.K., Im G.Y., Jeong Y.H., Hwang Y.H., Liang C., Ma J.Y. Anti-inflammatory effect of *Lycium* fruit water

extract in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 macrophage cells. *International Immunopharmacology* 13;181-189

Park J.Y., Pillinger M.H., Abramson S.B. (2006) Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. *Clinical Immunology* 119:229-240

Pearlman D.S. (1999) Pathophysiology of the inflammatory response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104:132-137

Pearce N., Aet-Khaled N., Beasley R., Mallol J., Keil U., Mitchell E., Robertson C. (2007) Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 62;758-766

Ricci M., Matucci A., Rossi O. (1997) Bronchial asthma: Pathogenetic mechanism and genetic aspects. *Recenti Progressi in Medicina* 88;530-540

Robinson D.S., Hamid Q., Ying S., Tsicopoulos A., Barkans J., Bentley A.M., Corrigan C., Durham S.R., Kay A.B. (1992) Predominant TH₂-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *The New England Journal of Medicine* 326;298-304

Sada K., Takano T., Yanagi S., Yamamura H. (2001) Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *The Journal of Biochemistry* 130;177-186

Sarkar D., Saha P., Gamre S., Bhattacharjee S., Hariharan C., Ganguly S., Sen R., Mandal G., Chattopadhyay S., Majumdar S., Chatterjee M. (2008) Anti-inflammatory effect of allylpyrocatechol in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2 via NF- κ B pathway. *International Immunopharmacology* 8;1264-1271

Shin Y.S. , Takeda K., Gelfand E.W. (2009) Understanding asthma using animal models. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* 1;10-18

Su Y.W., Chiou W.F., Chao S.H., Lee M.H., Chen C.C., Tsai Y.C. (2011) Ligustilide prevent LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 macrophages by preventing ROS production and down-regulating the MAPK, NF- κ B and AP-1 signaling pathway. *International Immunopharmacology* 11;1166-1172

Szelenyi I. (2000) Animal models of bronchial asthma. *Inflammation Research* 49;639-654

Tao J.Y., Zhao L., Huang Z.J., Zhang X.Y., Zhang S.L., Zhang

Q.G., Fei-Xiao, Zhang B.H., Feng Q.L., Zheng G.H. (2008) Anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Kummerowia striata* (Thunb.) Schindl on LPS-stimulated Raw 264.7 cell. *Inflammation* 31;154-166

Theoharidies T.C. and Kalogeromitros D. (2006) The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1088;78-92

Tjendraputra E., Tran V.H., Liu-Brennan D., Roufogalis B.D., Duke C.C. (2001) Effect of ginger constituents and synthetic analogues on cyclooxygenase-2 enzyme in intact cells. *Bioorganic Chemistry* 29;156-163

Toru H., Pawankar R., Ra C., Yata J., Nakahata T. (1998) Human mast cells produce IL-13 by high-affinity IgE receptor cross-linking: enhanced IL-13 production by IL-4-primed human mast cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102;491-502

Vocanson M., Hennino A., Rozières A., Poyet G., Nicolas J.F. (2009) Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 64;1699-1714

Wang MT, Honn KV, Nie D. (2007) Cyclooxygenase, prostanoids and tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews* 26;525-534

Weisz A., Cicatiello L., Esumi H. (1996) Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochemical Journal* 316;209-215

Wink H.Y. and Mitchell J.B. (1998) Chemical biology of Nitric oxide: Insight into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanism of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 25;434-456

Wilson, K. T., Vaandrager, A. B., De Vente, J., Musch, M. W., De Jonge H. R., and Chang E. B. (1996) Production and localization of cGMP and PGE2 in nitroprusside-stimulated rat colonic ion transport. *American Journal of Physiology* 270;832-840

Xing Z., Braciak T., Ohkawara Y., Sallenave J.M., Foley R., Sime P.J., Jordana M., Graham F.L., Gauldie J. (1996) Gene transfer for cytokine functional studies in the lung - the multifunctional role of GM-CSF in pulmonary inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 59;481-488

Yao H., Tong J., Wang Z., Zhang Z.Q., Chen J.X. (2007) Effect of acupoint application therapy on expression of IL-4 and IFN-gamma in lung tissue of asthma rats. *Acupuncture*

Research 32:174–8

Yang E.J., Moon J.Y., Kim M.J., Kim D.S., Lee W.J., Lee N.H., Hyun C.G. (2010) Anti-inflammatory Effect of *Petalonia binghamiae* in LPS-Induced Macrophages is Mediated by Suppression of iNOS and COX-2. *International Journal of Agriculture and Biology* 12:754–758

Yoon H.S., Cha J.K., Lee H.R. (1998) A survey of current trends in the management of childhood asthma in practical fields. *Pediatric Allergy and Respiratory Disease* 8:167–78

Yoon W.J., Ham Y.M., Kim K.N., Park S.Y., Lee N.H., Hyun C.G., Lee W.J. (2009) Anti-inflammatory activity of brown alga *Dictyota dichotoma* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:1–8

Yi J.M., Kim M.S., Seo S.W., Lee K.N., Yook C.S., Kim H.M. (2002) *Acanthopanax senticosus* root inhibits mast cell-dependent anaphylaxis. *Clinica Chimica Acta* 79:347–352

Abstract

Anti-asthmatic effects of 12-dehydrogingerdione, a constituent of *Zingiber officinale Roscoe*

Seoul National University Graduate School

Food and Nutrition

Han Young Ah

Asthma is one of an allergic chronic inflammatory disease. Recently, many studies have been proceeding about the materials that inhibit the allergy reaction and pro-inflammatory status. Following the NSAID or inhaler disadvantages which has been used in asthma treatment, the possibility to use food component from natural material as allergy reaction suppressant and pro-inflammation has been approved. 12-DHGD, which is used in this study, is one of constituent of ginger and its' phagocytic activity in macrophage cells was reported. Therefore, this material is expected to have an anti-inflammatory and anti-allergic

effect. So, this study is to investigate the inhibitory effects of diverse inflammatory mediators from stimulated macrophage and mast cells and the relieve effects of asthma progression and symptom deterioration form OVA-induced asthmatic mouse.

In the level of no cytotoxicity, 12-DHGD dose-dependently and significantly decreased the production of IL-6 (50, 100, 150, and 200 ng/ml) on LPS-induced Raw 264.7 cells. And 12-DHGD effectively down-regulated the inflammatory mediators such as PGE₂(200 ng/ml) and NO(150 and 200 ng/ml) produced by LPS stimulation from Raw 264.7 cells and then these results were matched up the mRNA expression of COX-2 and iNOS. 12-DHGD had no cytotoxic effect on HMC-1 cells and decreased all of the cytokine levels such as GM-CSF(10 µg/ml), IL-6(1, 10 µg/ml), IL-8(1, 10 µg/ml) and TNF-α (0.1, 1, 10 µg/ml) which was secreted by stimulated mast cells. In the OVA-induced asthmatic animal, 12-DHGD oral administration inhibited the entrance of eosinophils, neutrophils and lymphocytes to the lung tissue. It also significantly decreased the serum IgE level which especially increased in allergic disease. Both the production of asthma-related cytokines and, the infiltration of inflammatory cells and goblet cells to the lung tissue were suppressed by 12-DHGD.

In conclusion, I suggest that 12-DHGD might provide

possible therapeutic application in diverse disease induced by allergic and inflammatory reaction.

Key words: allergy, asthma, *Zingiber officinale* Roscoe,
12-dehydrogingerdione, Raw 264.7 cells,
HMC-1 cells

Student Number: 2006-21863