

B 淋巴球와 肥滿細胞에서 牡丹皮 抽出物の 抗알리지 作用에 關한 研究

장성익, 진속창, 이한배, 김성균, 이승희, 서영배, 이용구, 이영철

해당한방병원, 동서한방병원, 대전대학교

The effects of the abstracts from Moutan Cortex on an anti-allergic action on B cells and mast cells of the BALB/C mouse

Jang Sung-Ik, Jeon Sok-Chang, Kim Sung-Kyun, Lee Han-Bae, Lee Seung-Hee,
Seo Young-Bae, Lee Yong-Gu, Lee Young-Chul

Hae Dang Hospital of Oriental Medicine, Dong Seo Hospital of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine,
Taejon University, Taejon, Korea

Objective : This study was carried out for the purpose of proving the effect of anti-allergic efficacy on B cells and the mast cells of the BALB/C mouse by the abstraction from a Moutan cortex.

Methods & Results : In order to know what the effect of an abstraction from Moutan cortex and about the expression of CD23 and IgE, IC-2 cell (mouse mast precursor cells that was dependent on IL-3), it was necessary to be activated. We then analyzed it from the flow of cytometry on the increase and the divorce of the B cells activated by anti-CD40. In order to know what the effect of it was on the organization of cytokine gene expression from the increase and divorce of the B cells and allergic acting by Moutan cortex, we found it necessary to examine the IC-2 cells and B cells. At the same time, as we examined the histamine release of IC-2 cells by ELISA method, we also examined the effect of Moutan cortex on the increase and divorce of the B cells by 3H-thymidine uptake method. We then analyzed the release of IL-4, IgE and histamine.

Conclusions : As a results, Moutan Cortex promoted blood supply by extending the blood vessel of nasal mucous, which was contracted by the hypertrophied nasal mucous.

Key Words: Moutan cortex, B cells, the mast cells, Anti-allergic action

1. 緒 論

牡丹皮는 毛茛科(미나리아재비과; ranunculaceae)에 속한 落葉小灌木인 모란 *Paeonia suffruticosa* ANDR. 의 根皮를 乾燥한 것으로, 心 肝 腎經으로 入하고 味가 苦辛하고 性이 寒하여 血分에 들어가 涼

· 접수 : 2002년 9월 26일 · 채택 : 2002년 12월 24일
· 교신저자 : 장성익, 서울특별시 마포구 합정동 363-14
(Tel: 011-9779-4182 Fax: 332-9928, E-mail:
97794182@hanmail.net)

血散瘀하는 效能이 있어 瘀血을 留하지 않게 하며 活血하여도 妄行하지 않게 하는 特點을 가지고 있고 氣가 清芳하여 陰分의 伏熱을 清透케 하므로 熱邪가 들어가 나타나는 吐衄, 斑疹, 또는 夜熱早涼 및 血熱로 인한 瘀血停滯 등 證에 多用한다.

주성분은 뿌리에는 paeonol, paeonolide(paeonoside + arabinose), paeoniflorin이 함유되어 있고, 이외에 精油 0.15-0.4%, 및 phytosterin이 함유되어 있다. 藥理作用은 소염, 항혈전죽상동맥경화, 항심근허혈, 항부정맥, 혈압강하, 진통, 해열, 체온강하, 항균, 이노, 그리고 유산작용으로 피부소양증, 원발성 혈소판감소성 자반, 고혈압, 과민성 비염 등에 사용된다.

면역계통에 미치는 영향을 살펴보면 牡丹皮메틸알콜提取物이나 paeonol은 mouse의 網狀內皮系統에 탐식능력증강 및 명확한 항알러지 작용이 있고, 동시에 특이성 抗體의 생성을 억제하지는 않으면서 血清補體活性抑制와 有關하며 히스타민 방출 억제작용이 있다^{3,6}.

이외의 연구 결과를 보면 牡丹皮에는 抗癌變作用이 있고⁷, 진품과 위품을 구별하는 중요한 요인이 paeonol 성분의 유무이며⁸, 口腔患部に 바르거나 또는 患部에 직접 바르는 것도 粘膜에 흡수되어 항염, 진통효과를 발휘한다고 하였다. 비슷한 연구로 粘敷療法 즉 透皮療法은 胃腸의 방해나 肝臟의 통과작용 없이 부작용을 감소시키고 藥物作用時間을 延長하면서 사용도 편리하다고 하였다⁹.

또한 抗菌性物質함유 및 抗脂質過酸化作用, slow release作用, 血小板凝集 抑制作用이 보고되어 있지만¹⁰⁻¹³, 牡丹皮가 면역계 특히 항알러지작용에 미치는 효과는 아직 많은 연구가 이루어지지 않은 실정이다.

알러지 반응 중 즉시형 과민반응이 일어나는 과정을 보면 항원과 처음 접하게 될 때 B cells로부터 특이 IgE가 합성되고 분비된 IgE는 고친화성 Fcε 수용체(FcεRI)를 통해 비만세포와 결합한다. 이후 항원에 재차 노출되면 IgE분자들이 교차결합되어 즉시형 과민반응이 유발된다.

본 연구에서 T cells, B cells, alveolar macrophages, platelets, mononuclear cells, fibroblasts 그리고 neu-

trophils 등에서 만들어지는 rHRF14는 neutrophils 및 mast cells와의 상호작용으로 IgE에 의해 매개되는 histamine 방출을 향상시키는 물질로 보고되었으며¹⁵, IgE와 독립적으로도 CD23의 경로와는 다른 pathway로도 이의 활성이 나타나는 것으로 알려져 있기에 anti-CD40등과 함께 자극인자로 선택하였다.

따라서 본 실험에서는 牡丹皮의 清熱 涼血 作用에 消炎 鎮痛作用이 있는 것으로 보고 알러지 또한 일종의 염증반응으로 볼 때, 항알러지 작용에 효과가 있으리라 여겨, 알러지 과정 중 牡丹皮추출물이 B cells 증식반응에 미치는 영향, CD23에 미치는 영향, IgE 발현에 대한 영향, 생쥐 B cells에 있어서 IL-4 발현량에 미치는 영향, B cells에서 IgE 방출량에 미치는 영향, Histamine 발현에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

實驗動物은 雄性 4주령의 BALB/c 생쥐를 韓國化學研究所에서 供給받아 實驗當日까지 固形飼料(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 供給하고 室溫 22±2℃를 계속 維持하면서 2 週間 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

2) 藥材

본 實驗에 使用한 牡丹皮 (Moutan Cortex ; MC)는 혜화약업사(大田)에서 구입하여 大田大學校 韓醫科大學 本草學 教室에서 확인한 뒤 精選하여 使用하였다.

3) 試料製造

牡丹皮 200 g에 각각 蒸溜水 1,500 ml을 加하여 熱湯 抽出器에서 3 시간 抽出하여 얻은 抽出液 (Moutan Cortex extract ; MCE)을 吸入 濾過하여, 이를 減壓 蒸溜裝置 (Rotary evaporator, Buchi B-480, Switzerland)로 濃縮하고, 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 얻은 완전 건조된 분말 (30g)을 冷凍 (-84℃) 保管하면서 적당한 濃度로 희석하여 使用하였다.

4) 試藥 및 器機

Diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), magnesium chloride (MgCl₂)은 Sigma社(U.S.A.)제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa社(Japan) 제품을, 역전사효소 (moleoy Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega社(Madison, U.S.A.) 제품을, RNAzolB는 Tel-Test社(U.S.A.) 제품을, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS.)은 Hyclone社(Logan, U.S.A.) 제품, 그리고 agarose (FMC, U.S.A.)등을 사용하였고, 유세포형광분석에 사용된 phycoerythrin (PE)-anti-rat conjugate Ig, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD23, anti-IgE, anti-CD40, anti-B220-FITC는 Pharmingen社(Torreyana, U.S.A.)의 제품을, 3H-thymidine, Sephadex G-10은 Amersham Pharmacia社(Buckinghamshire, UK)에서 구입하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

本 研究에 使用된 機器는 bright microscope (Nikon, Japan), inverted micr-oscope (Nikon, Japan), flow cytometry (Becton Dickinson, U.S.A.) spectrophotometer (Shimazue, Japan), CO₂ incubator (Napco, Germany), imager II photo-system (Bioneer, Korea), 遠心分離器 (Centrikon, Sigma) bio-freezer (Sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision科學) 및

homogenizer (OMNI, USA) 등의 것을 使用하였다.

2. 方法

1) 細胞 培養

(1) IC-2 cells 배양

IC-2 cells (RCB0102, Koyasu, Shigeo, Japan)는 IL-3 의존성(dependent) 생쥐 비만세포 (mast cells)로 100 U/ml의 rIL-3 (R&D system)를 RPMI-1640-10% FBS 배양액에 처리하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 세포배양을 하였다. IC-2 cells (2.0 x 10⁶개)를 24 well plate에 분주하고 牡丹皮 추출물을 처리한 후 배양기에서 (37℃, 5% CO₂)에서 6 시간 배양하였다.

(2) 생쥐 B cells 분리 및 배양

BALB/c 생쥐에서 비장을 분리하여 비장세포 (spleen cells)를 채취하여 2,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포를 회수하였다. 이에 적혈구용혈액 (Sigma, U.S.A.) 2 ml을 넣고 37℃ 항온수조에 5분간 방치하였다. 그리고 나서 즉시 10 ml의 D-PBS를 첨가하여 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 사용하였다. 분리한 비장세포에 JIJ, GK153, M1/70 배양상층액 (1 ml/108세포)을 처리한 후 얼음에서 30분간 반응시켰다 (Table 1). 반응 후 2회 D-PBS로 수세한 후 rabbit complement lyophilised (Serotec, UK) 0.5 ml을 처리한 후 37℃ 항온수조에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 5회 complete medium으로 수세하고 Sephadex G-10 column (Amersham Pharmacia, U.S.A.)에 통과시켜 B cells를 분리하였다. B cells 함량을 측정하기 위하여 α-B220-FITC를 이용해 유세포형광분

Table 1. Inhibition effect of MCE on B cells proliferation by [³H] thymidine uptake

Drugs	Dose	Thymidine uptake (cpm)
		mouse B cells
Normal(B cells)		4343.0±151.4
rHRF+anti-CD40(con.)		4421.0±198.5
MCE+rHRF+anti-CD40	MCE(100 μg/ml)	4250.8±438.8
MCE+rHRF+anti-CD40	MCE(10 μg/ml)	1960.5±319.9***
MCE+rHRF+anti-CD40	MCE(1 μg/ml)	1675.7±515.4**

Mouse B cells were stimulated with anti-CD40(100 ng/ml) and rHRF(10 μg/ml) for 72hrs. Normal : Only B cells (5×10⁶ cells/well) ; Samples : It was treated with rHRF(10 μg/ml), MCE and anti-CD40 incubated for 72 hours by above dosages. The results are expressed the mean± S.E (N=4). Statistically significant value compared with control group data by T test (**p<0.005, ***p<0.001)

석기 (flow cytometry)로 분석하였다 (Fig. 1).

2) 유세포 형광분석기를 이용한 IgE와 CD23 발현 분석

B cells를 24 well plate에 5×10^5 cells/well로 분주하고 Anti-CD40(100ng/ml)과 rHRF(10 μ g/ml), rIL-4(10 ng/ml), 그리고 牡丹皮 抽出物 (100 μ g/ml, 1 μ g/ml)등을 가하여 48시간 배양하였다. 배양 후 B cells를 인산완충생리식염수 (3%우태아혈청, 0.1% NaN₃)로 2회 수세하였다. 4℃에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였고, 각각에 goat'-phycoerythrin (PE)-anti-rat conjugate Ig, anti-mouse IgE, 그리고 fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-mouse CD23 등을 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기 (flow cytometer, Becton Dickinson, USA)로 B cells에서 IgE와 CD23 (Fce)의 발현을 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램으로 IgE+과 CD23+ (positive cells)의 비율 (gated, %)을 산출하였다.

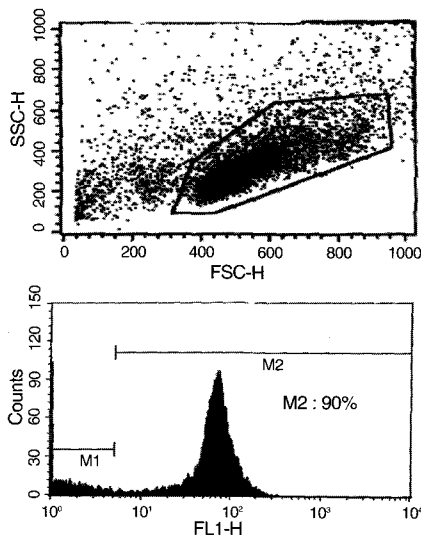


Fig. 1. Purity of B cells isolated in BALB/c spleen cells. The spleen cells acquired in BALB/c mice were soluted with RBC lysis solution, and added α -Thy1.2(J1J, GK 1.5.3, M1/70), complement and then B cells were obtained by sephadex G-10 column.

3) B cells에서 싸이토카인 유전자발현

(1) 牡丹皮 抽出物처리

B cells에 牡丹皮를 각각 100, 50, 10, 1 μ g/ml씩 처리하였고, 목단피가 처리되지 않은 B cells에 rIL-4 (10ng/ml)+Anti-CD40 (100 ng/ml), IL-10(104U/ml)를 처리한 후 5 시간 동안 동시 배양한 후에 배양 상등액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

① RNA 추출

배양종료 후 상층액을 제거한 후 RNAzolB를 이용하여 IC-2 cells와 B cells의 세포막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. RNAzolB를 1/10 양으로 CHCl₃ (chloroform) (40 μ l/400 μ l RNAsolB)을 넣은 후 15 초간 Vortex로 혼합하고 얼음 (ice)에서 15 분간 방치하였다. 고속원심분리기 (4℃)로 15,000rpm에서 15 분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 동량의 iso-propanol과 혼합하고 천천히 흔들어 주었다. 그리고 고속원심분리기로 4℃, 15,000rpm에서 15 분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고, 1 ml의 80% EtOH/DEPC D.W를 넣고 살짝 vortex후 15,000 rpm에서 15 분간 원심분리하고 상층액을 다시 제거한 speed-vac으로 건조시켰다. DEPC/D.W (0.05%)추출한 total RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

② 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 75℃에서 5분 동안 변성 (denaturation) 시키고, 이어서 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-mlV RT (200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 초간 원심침강하여 37℃ 항온 수조에서 60 분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5 분 동안 방치하여 M-mlV RT를 불활

성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

③ cDNA PCR

유전자 증폭을 위한 thermocycler (Perkin Elmer, Branchburg, NJ)를 이용하여 역전사-중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-10 (IL-10), GM-CSF, tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/ μ l)와 antisense primer (20 pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5 mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 μ l Taq polymerase (5 U/ μ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μ l 되도록 멸균증류수를 가하고 predenaturation : 95 $^{\circ}$ C, 5 분, denaturation : 95 $^{\circ}$ C, annealing : 55 $^{\circ}$ C, 1 분, elongation : 72 $^{\circ}$ C, 1 분을 25cycles한 뒤 postelongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3 분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20 분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

PCR product의 양은 Windows 1D main program (AAB, USA)을 이용하여 최고값 (height, Ht)으로 측정하였다.

4) 싸이토카인 측정

B cells를 분리하여 anti-B220으로 확인한 후 24 well plate에 2 \times 10⁶ cells를 각 well에 분주하였다. 牡丹皮 抽出物 (100, 1 μ g/ml), anti-CD40을 48시간 동안 CO₂ 조직배양기에서 동시배양 하였다. 배양 종료후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수하여 ELISA와 histamine release에 사용하였다. ELISA는 IL-4 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Endogen, U.S.A.)와 IgE ELISA kit (Pharmingen, U.S.A.)으로 분비량을 측정하였다. 각 항체(antibody)를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 B

cells 배양상층액 (culturesupernatant)을 100 μ l씩 분주하였다. 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2 회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Histamine release량 측정

IC-2 cells에 100 U/ml의 rIL-3 (R&D system)를 RPMI1640 FBS (10%) 배양액에 처리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 세포를 배양하였다. IC-2 cells (2.0 \times 10⁶개)를 24 well plate에 분주하고 牡丹皮 抽出物과 rHRF, anti-CD40 및 IL-10으로 처리한 B cells 배양액을 각 well에 분주한 후 72 시간 동안 동시배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5 분간 원심분리 하여 상등액을 회수하여 histamine release kit (ImmunoTech., France)으로 histamine 유출량을 측정하였다.

6) B cells의 細胞增殖에 대한 영향 측정

B cells는 rHRF와 anti-CD40 (SIGMA)등과 동시에 牡丹皮를 처리한 IC-2 cells의 증식억제정도를 측정하기 위하여 96 well plate의 각 well에 2 \times 10⁵ cells씩 첨가하고, 牡丹皮 抽出物을 농도별로 처리한 후 세포를 사용하였고, 세포를 37 $^{\circ}$ C에서 48 시간 배양 후 50 μ Ci/ml의 [methyl-3H] Thymidine (Amersham, U.S.A.)을 첨가한 후 다시 8 시간 배양하였다. 세포내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 세포만을 세포수집기 (Cell Harvester, Cambridge Tech., U.S.A.)를 사용하여 유리섬유여지(Glass microfiber filter, Whatman, U.S.A.)위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기 (Liquid Scintillation Counter, Beckman Co., U.S.A.)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

7) 統計處理

多様な 實驗으로부터 얻은 結果는 mean \pm standard error로 記錄하였고, 有意性 檢證은 Student's T-test 分析方法을 利用하여 決定하였다.

III. 實驗 成績

1. 牡丹皮 抽出物(MCE)이 B cells 增殖反應에 미치는 影響

正常 BALB/c 생쥐의 B cells에 MCE (100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$)과 anti-CD40 (100 ng/ml), rHRF(10 $\mu\text{g/ml}$)를 各各 處理하고, 72 時間 後에 [^3H] thymidine uptake assay를 實施한 結果, MCE 투여군 (MCE 10, 1 $\mu\text{g/ml}$)에서 陽性對照群에 比하여 큰 폭의 減少를 보여 有意性있는 B cells의 增殖 抑制가 나타났다(Table 1).

2. CD23의 발현에 대한 牡丹皮 抽出物 (MCE)의 影響

IgE 항체에 특이적으로 반응하는 CD23 (Fc ϵ) 수용체는 알러지 반응을 유도하는 중요한 역할을 한다. CD23은 IgE 항체로 인해 유발되는 즉시형 과민반응 (immediate hypersensitivity)의 발생 부위에 많이 존재한다. Mouse의 B cells에서 MCE 처리로 인한 CD23 발현 조절을 관찰하였다. 그 결과 CD23 (Fc ϵ)의 발현이 對照群 (anti-CD40+rIL-4)에 比하여, MCE를 병용 처리한 實驗群에서 소폭의 감소를 보였다(Fig. 2).

3. IgE 發顯에 대한 牡丹皮 抽出物 (MCE)의 影響
BALB/c mouse의 B cells에 MCE를 처리하여 IgE 발현조절을 관찰한 결과, Fig. 3 에서처럼 anti-IgE 발현에 대한 양성세포 (positive cells) 수는 대조군이 59.40%로 나타났는데, MCE를 處理한 結果 IgE 生成은 모든 濃度 (100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$)에서 各各 37.50, 42.50, 40.40%로 나타나 대조군에 比하여 소폭의 감소를 보였다(Fig. 3).

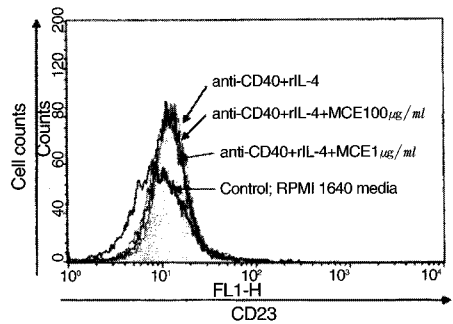


Fig. 2. Effects of *Moutan Cortex* extract (MCE) on the expression of CD23 in B cells (*in vitro*).

The mice B cells were cultured with MCE(100 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$), anti-CD40 (100 ng/ml), and rIL-4(10 ng/ml) for 48 hours. The cells were washed twice and analyzed by flow cytometer.

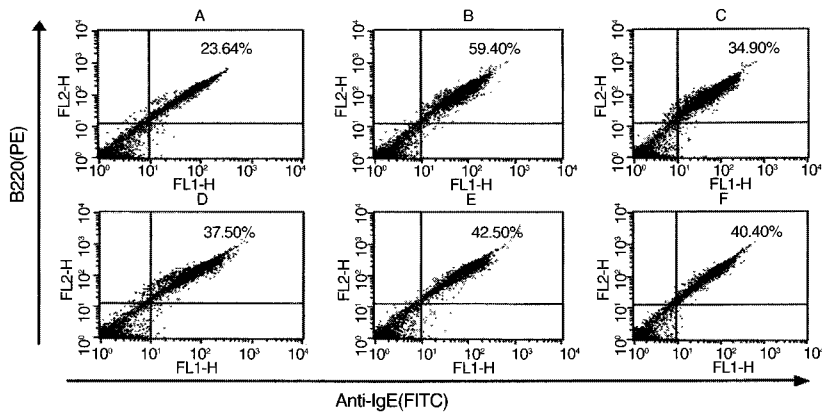


Fig. 3. Effects of *Moutan Cortex* extract (MCE) on the expression of anti-IgE $^+$ in B cells (*in vitro*).

The mice B cells were cultured with MCE, anti-CD40 (100 ng/ml) and rIL-4(10 ng/ml) for 48 hours. The cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. The panel (A) was control group(treated with RPMI media). The B cells of panel (B) were treated with anti-CD40 (100 ng/ml) and rIL-4(10 ng/ml). The B cells of panel (C) were treated with anti-CD40, rIL-4 and IL-10(104 U/ml) and the B cells of panel (D)-(F) were treated with anti-CD40, rIL-4 and MCE;(D) MCE(100 $\mu\text{g/ml}$), MCE(10 $\mu\text{g/ml}$), MCE(1 $\mu\text{g/ml}$).

4. 생쥐 B cells에 있어서 IL-4 발현량의 측정

Table 2는 생쥐 B cells를 분리하여 MCE (100, 10 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하고 anti-CD40, rHRF로 자극한 후 분비되는 IL-4 생산량을 분석한 결과이다. 그 결과 정상군과 대조군 (control)에 비하여 MCE가投與된 경우 IL-4의 발현량이 소폭 감소되었다(Table 2).

5. B cells에서 IgE 放出량의 측정

항원과 처음 접한 B cells는 IgE를 합성하고, 이 IgE 항체는 고친화성 Fc 수용체에 결합하며 이후 항원에 재차 노출되면 즉시형 과민반응이 유발된다.

Table 3은 생쥐 B cells를 분리하여 MCE (100, 1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하고 anti-CD40, rHRF로 자극한 후 분비되는 IgE 생산량을 분석한 결과이다. 그 결과 정상군과 對照群 (control)에 비하여 MCE가 投與된 경우 IgE의 발현량이 큰 폭으로 감소되었다(Table 3).

6. Histamine 發顯에 미치는 영향

히스타민은 표적세포의 수용체에 결합함으로써 효과를 미치는데, 내피세포가 혈관 평활근세포 이완제

인 프로스타사이클린 (prostacyclin, PGI₂)을 합성하게 하여 이들이 혈관확장을 일으킨다. 히스타민의 이러한 작용에 의해 즉시형 과민반응의 구진과 발적확장이 일어나게 된다.

정상 BALB/C 생쥐의 B cells (5×10⁵ cells/ml)에 MCE (100, 10 $\mu\text{g/ml}$), anti-CD40 100 ng/ml, rHRF 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 각각 處理하고, 48 時間 後에 배양상층액을 획득하고, 이를 다시 IC-2 cells (2×10⁶ cells/well)에 100 $\mu\text{l/ml}$ 를 넣고 48 時間 後에 ELISA kit을 사용하여 450 nm의 吸光度로 측정된 결과 對照群에 비하여 MCE를 처리한 경우 histamine 量의 생성량이 큰 폭의 감소를 보였다(Table 4).

7. 牡丹皮 抽出物(MCE)의 B cells의 遺傳子 發顯에 미치는 影響

IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , IFN- γ 들의 遺傳子 發顯에 미치는 影響을 보면 Table 5에서 각각의 표준 지표 유전자 (Internal control)는 β -actin이 사용되었고, 각 遺傳子 發顯에서 lane(1-7) 들의 Ht값을 정리하였다. 결과에서 IL-5 PCR product의 감소를 제외한

Table 2. Inhibitory effect of MCE on IL-4 release of B cells

Drugs	Dose	IL-4 (pg/ml)
		mouse B cells
Normal	0	45.74
rHRF+Anti-CD40(con.)		186.25
rHRF+Anti-CD40+IL-10		74.97
Anti-CD40+IL-4		706.83
MCE+rHRF+Anti-CD40	MCE 100 $\mu\text{g/ml}$	63.63
MCE+rHRF+Anti-CD40	MCE 10 $\mu\text{g/ml}$	172.28

Mouse B cells were stimulated with anti-CD40(100 ng/ml), rHRF(10 $\mu\text{g/ml}$), IL-10(10⁶ U/ml), rIL-4(10 ng/ml) and MCE by above dosages for 72 hrs. Normal : Only B cells (5×10⁵ cells/well)

Table 3. Inhibitory effect of MCE on IgE release of B cells

Group	Dosage	IgE(ng/ml)
Normal		1.28
rHRF+Anti-CD40(con.)		8.25
rHRF+Anti-CD40+IL-10		0.01
Anti-CD40+IL-4		5.42
MCE+rHRF+Anti-CD40	MCE 100 $\mu\text{g/ml}$	2.55
MCE+rHRF+Anti-CD40	MCE 1 $\mu\text{g/ml}$	1.98

Mouse B cells were stimulated with anti-CD40(100 ng/ml), rHRF(10 $\mu\text{g/ml}$), IL-10(10⁶ U/ml), rIL-4(10 ng/ml) and MCE by above dosages for 72hrs. Normal : Only B cells (5×10⁵ cells/well)

Table 4. Inhibitory effects of MCE on the histamine release of IC-2 cells

Drugs	Dose	histamine release
nM		
Normal		0.054
rHRF+Anti-CD40(con.)		1.410
rHRF+Anti-CD40+IL-10		0.060
Anti-CD40+IL-4		0.583
MCE+rHRF+Anti-CD40	MCE 100 $\mu\text{g/ml}$	0.058
MCE+rHRF+Anti-CD40	MCE 1 $\mu\text{g/ml}$	0.068

Normal : IC-2 cells (2×10^6 cells/well) added B cells culture sup. Positive control : It was treated with rHRF(10 $\mu\text{g/ml}$), anti-CD40(100 ng/ml) and IL-10(10^6 U/ml). Each samples : It was treated with rHRF(10 $\mu\text{g/ml}$), anti-CD40, IL-10 and MCE(100, 1 $\mu\text{g/ml}$) incubated for 48 hours by above dosages

Table 5. The effects of MCE on gene expression in B cells of BALB/c mice lane

lane	lane1	lane2	lane3	lane4	lane5	lane6	lane7
遺傳子	(정상군)	ani-CD40 +IL-4	IL-10	MCE100 $\mu\text{g/ml}$	MCE50 $\mu\text{g/ml}$	MCE10 $\mu\text{g/ml}$	MCE1 $\mu\text{g/ml}$
IL-1 β	67	73	72	77	85	65	73
IL-4	23	58	66	56	62	48	51
IL-5	35	61	65	26	28	22	17
IL-10	37	88	68	41	48	38	42
TNF- α	22	32	78	71	76	74	83
IFN- γ	21	52	88	74	71	104	85

The mice B cells were cultured with MCE. Reverse transcription reactions were carried out 20 μl reaction volume containing with 3 μg total RNA. and 3 μl of resulting products were analyzed by PCR analysis. Lane M; 100bp DNA ladder marker; lane1, RPMI 1640 media control; lane2, anti-CD40(100 ng/ml) +IL-4 (10 ng/ml); lane3, IL-10(10 $\mu\text{U/ml}$); lane4, MCE 100 $\mu\text{g/ml}$; lane5, MCE 50 $\mu\text{g/ml}$; lane6, MCE 10 $\mu\text{g/ml}$; lane7, MCE 1 $\mu\text{g/ml}$ and internal control(β -action)

IL-1 β , IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ PCR product는 lane1 과 비교하여 소폭으로 증가되었다(Table 5).

IV. 考 察

본 연구에서는 蒸溜抽出法에 의해 얻어진 牡丹皮 抽出物이 생쥐 B cells와 mast cells에서 염증 알러지 반응에 대한 治療效果를 緋明하고자 하였다. 생쥐 B cells에는 anti-CD40 및 rHRF로 자극하여 활성화 시켜 B cells의 증식과 분화를 촉진하여 IgE합성을 유도한 후, 牡丹皮 抽出物에 의한 억제 효과를 알아보고자 CD23 (Fc ϵ) 발현과 IgE 발현을 유세포형광분석기로 관찰하였고, B cells의 분화와 알러지반응에 대한 기전이 싸이토카인 유전자 발현 조절에 미치는 영향을 알아보고자 활성화된 IC-2 cells와 생쥐 B cells에서 IgE합성과 염증반응의 조절에 대한 牡丹皮 抽出物의 효과를 관찰하였다. 그리고 IC-2 cells에서 histamine 유출량을 ELISA법으로 관찰하였고, B cells 증식과 분화에 抽出物의 영향을 3H-thymidine uptake

법을 이용하여 관찰하였고, B cells에서 IL-4, IgE의 발현량을 분석하였다.

이러한 연구로 B cells와 mast cells에서 抽出物의 淸熱 涼血 散瘀作用에 의한 항알러지 효과를 觀察하여 有意한 결과를 얻었기에 報告하는 바이다.

우선 牡丹皮 抽出物(MCE)이 B cells 增殖反應에 미치는 影響을 실험한 결과 MCE 투여군 (MCE 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$)에서 陽性對照群에 비하여 큰 폭의 減少를 보여 B cells의 增殖 抑制가 나타났다.

IC-2 cells는 생쥐의 비장에서 유래한 IL-3 의존성 mast cells의 전구체로 IL-3, IL-4, GM-CSF의 성장인자에 주로 반응을 하기 때문에 實驗에 이용하였다.

CD23 (Fc ϵ R II, the low affinity)은 IgE의 Fc수용체이지만 낮은 친화력을 가지고 있고 IgE의 생성과 조절에 관여한다[16-18]. CD23과 IgE의 결합으로 과민반응을 하게 되므로 이러한 결합을 방해하는 방법이 알러지를 치료하는 한 방법으로 인정이 될 수가 있다. 따라서 anti-CD23이나 anti-IgE의 발현은 IgE와 CD23이 결합하는 것을 막게끔 하는 것이다.

IL-4는 보조 T림프구에서 유래되며 항Ig 항체로 항원과 상동원이 존재할 때 생쥐의 B림프구의 증식을 자극하며 class II MHC분자의 발현을 증가시키는 약 20KD의 cytokine이다¹⁶. B cells이 IgE를 생산하는데 있어서 IL-4의 역할 및 작용기전은 명확하지는 않지만 B 세포막의 저친화성 IgE 수용체 표현을 증가시키거나 FcεR II의 수용성 절편을 생성하므로 B cells에서 IgE의 생산을 유도한다고 알려져 있다^{16, 19, 23}.

CD40은 IgE가 rearrangement할 때 관여하는 물질로 B cells의 표면에 존재하는 antigen이며, anti-CD40은 CD40 ligand와 같은 역할을 한다^{16, 24}. CD40 Ligand는 T cells 표면에 존재하는 antigen이며 anti-CD40 ligand에 대한 항체이다. CD40과 CD40L에 의해서 B cells이 활성화가 되어 IgE 생성이 증가하지만, anti-CD40 ligand에 의해서는 IgE의 생성이 차단된다. 또한 CD40은 CD23에 비해서 친화도가 높은 편이다²⁴.

Anti-CD40을 이용한 CD40분자의 cross-linking의 자극에 의해서도 약간의 CD23의 발현이 유도되었는데 IL-4와 anti-CD40의 동시자극에는 CD23의 발현에 있어서 높은 상승효과가 관찰되었다^{25, 26}.

이와 같은 이론적 근거를 바탕으로 IL-4와 anti-CD40으로 처리한 대조군을 마련함으로써 anti-CD23의 발현의 原因에 대해 CD40 시스템과 IL-4 시스템의 작용 여부를 알아볼 수가 있었다.

IgE 항체에 특이적으로 반응하는 CD23 (Fcε) 수용체는 알러지 반응을 유도하는 중요한 역할을 한다. CD23은 IgE 항체로 인해 유발되는 즉시형 과민반응(immediate hypersensitivity)의 발생 부위에 많이 존재한다. CD23의 발현에 대한 牡丹皮 抽出物(MCE)의 영향을 알아보기 위해 Mouse의 B cells에서 MCE 처리로 인한 CD23 발현 조절을 관찰하였다. 그 결과 CD23 (Fcε)의 발현이 對照群(anti-CD40+rIL-4)에 비하여, MCE를 병용 처리한 實驗群에서 소폭의 감소를 보였다.

IgE 항체는 알러지 반응을惹起시키는데 중요한 항체이고 IL-4는 IgE 합성을 촉진시키는 중요한 cytokine일 뿐만 아니라, mast cells를 자극하는 능력도 가지고 있으며 단핵구의 주요조직적복합체(MHC)

클래스 II 항원 표현을 증가시키는 등 여러 가지 생물학적 활성을 가지고 있음이 보고되고 있다²⁷.

IgE 發顯에 대한 牡丹皮 抽出物(MCE)의 영향을 살펴보면 BALB/c mouse의 B cells에 MCE를 처리하여 IgE 발현조절을 관찰한 결과, anti-IgE 발현에 대한 양성세포(positive cells) 수는 대조군이 59.40%로 나타났는데, MCE를 處理한 결과 IgE 生成은 모든 濃度(100, 10, 1 μ g/ml)에서 각각 37.50, 42.50, 40.40%로 나타나 대조군에 비하여 소폭의 감소를 보였다.

B cells에 대한 anti-CD40과 IL-4의 작용에 대해서 이²⁴는 anti-CD40을 단독처리 한 결과 IL-4의 발현에 별다른 영향을 미치지 않았으나 anti-CD40과 IL-4의 동시자극은 괄목할 만하게 IL-4의 發顯을 상승적으로 유도한 것을 보고하였다. 이것은 anti-CD40의 자극이 IL-4의 發顯유도를 통해 B cells로 하여금 IL-4에 대한 反應性을 增加시키도록 한다는 것으로 보아 대조군을 anti-CD40으로 처리하였다.

IL-4는 helper T cells에서 유래되며, 항 Ig 항체가 존재할 때 생쥐의 B cells의 증식을 자극할 뿐 아니라 IgE 및 비만세포/호산구 매개성 면역반응의 조절자로 알려져 있다. IL-4는 IgE의 생산에 요구되며, IL-4의 생산 증가는 알러지(allergy)의 발생에 중추적인 것이다.

생쥐 B cells에 있어서 이러한 IL-4의 발현량을 測定한 결과 正常群과 대조군(control)에 비하여 MCE가 投與된 경우 IL-4의 발현량이 유의성 있게 감소되었다.

히스타민은 표적세포의 수용체에 결합함으로써 효과를 미치는데, 내피세포가 혈관 평활근세포 이완제인 프로스타사이클린(prostacyclin, PGI₂)을 합성하게 하여 이들이 혈관확장을 일으킨다. 히스타민의 이러한 작용에 의해 즉시형 과민반응의 구진과 발적확장이 일어나게 된다. Histamine 發顯에 미치는 영향을 살펴보면 본 실험에서 對照群에 비하여 MCE를 처리한 경우 histamine 量의 생성량이 큰 폭의 감소를 보였다.

마지막으로 牡丹皮 抽出物(MCE)의 B cells의 遺傳子 發顯에 미치는 影響을 보면 실험에서 IL-5 PCR

product는 MCA가 처리되지 않은 lane1과 비교하여 모든 농도에서 감소되었고, IL-1 β , IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ PCR product는 소폭으로 증가되었다.

따라서 알레르기 반응의 과정에 있어서 牡丹皮 抽出物은 B cells의 증식과 유전자발현, 그리고 CD23의 발현 및 IgE와 histamine방출에 있어서 실험 결과 억제 효과가 있는 것으로 사료되는 바이다. 하지만 본 실험은 B cells과 mast cell 외에 면역에 중요한 역할을 차지하는 T cells 및 B cells에 대한 T cells의 자극에 대한 연구가 부족한 실정이므로 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

牡丹皮 抽出物이 생쥐 B cells와 IC-cells에서 항알레르기 작용에 미치는 영향을 살펴본 바 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 牡丹皮 抽出物(MCE)이 B cells 增殖反應에 미치는 影響에 있어서 MCE투여군 (MCE 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$)에서 對照群에 비하여 큰 폭의 減少를 보여 有意性있는 B cells의 增殖 抑制가 나타났다.
2. Mouse의 B cells에서 MCE 처리로 인한 CD23 발현 조절을 관찰한 결과 CD23 (Fce)의 발현이 對照群(anti-CD40+rIL-4)에 비하여, MCE를 병용 처리한 實驗群에서 소폭의 감소를 보였다.
3. IgE 發顯에 있어서 MCE를 處理한 결과 IgE 生成은 모든 濃度 (100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$)에서 各各 37.50, 42.50, 40.40%로 나타나 대조군에 비하여 소폭의 감소를 보였다.
4. 생쥐 B cells에 있어서 IL-4 발현량이 감소되었고, IgE 放出量은 큰 폭으로 감소되었으며, histamine 生成량은 큰 폭의 감소를 보였다.
5. 牡丹皮 抽出物(MCE)의 B cells의 遺傳子 發顯에 미치는 影響에 있어서 IL-1 β , IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ 등은 소폭으로 증가되었고, IL-5는 모든 濃度에서 감소되었다.

이상의 결과로 보아 牡丹皮 抽出물이 알레르기 질환의 치료에 효과가 있을 것으로 사료되나 이에 대

하여 보다 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 全國韓醫科大學本草學教室編. 本草學. 서울: 永林社; 1991, p. 193-5.
2. 김호철. 한약약리학. 서울: 김문당; 2001, p. 147-50.
3. 久保道德, 等. 醫學雜誌(日). 1985;105(1):26.
4. 長尾考治, 等. 國外醫學·中醫中藥分冊. 1982;4(6):50.
5. 巫冠中, 等. 中國藥科大學學報. 1990;21(2):103.
6. 平井裕子, 等. 生藥學雜誌(日). 1983;37(4):374.
7. 李益福, 等. 丹皮木心藥效學的研究. 中國中藥雜誌. 1997;214-6.
8. 朱天明. 牡丹皮飲片及其偽品的鑑別. 中成藥. 1998;20(9):48.
9. 劉產明, 楊洪元 等. 丹皮酚口腔藥膜的研制. 中成藥. 1992; 14(8):8-9.
10. 권오근, 손진창, 김상철, 정신교, 박승우. 목단피 추출물의 항균 및 항산화 작용. KOREAN J. POSTHARVEST SCI. TECHNOL; 1998, p281-5.
11. 張衛國 等. 丹皮酚對大鼠心肌缺血再灌注損傷的線粒體膜脂的保護作用. 中草藥. 1994;25(4):193-4.
12. 姜洪芳, 汪國華. 丹皮酚復乳型凝膠的制備. 中成藥. 2001;23(3):173-4.
13. 李 薇 等. 丹皮酚和阿司匹林對大鼠血液流變性影響的比較. 中草藥. 2000;31(1):29-31
14. Kaplan, A. P., S. Reddigari, M. Baeza, and P. Kuna. Histamine releasing factors and cytokine-dependent activation of basophils and mast cells. Adv. Immunol. 1991;50:237.
15. Schroeder JT, Lichtenstein LM, MacDonald SM. Recombinant histamine-releasing factor enhances IgE-dependent IL-4 and IL-13 secretion by human basophils. J Immunol. 1997;159:447.
16. 지형준 외. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인덱스사; 1998, p. 397-8.
17. Bonnefoy, J. Y., S. Lecoanet-Henchoz, J.-P. Aubry, J.-F. Gauchet, and P. Graber. CD23 and B-cell activation. Curr. Opin. Immunol. 1995;7:355.
18. 박인철, 이하백. 알레르기성 천식환아 및 비알레르기성 환아에서 혈청 IgE, sCD23, IL-4와 INF- γ 치의 비교연구. 알레르기. 1994;14(2):199-208.
19. B 림프구 활성화와 자극에 따른 Interleukin-4 수용체

- 와 Type II IgE 수용체 발현조절양상의 상호관련성. Korea J. Immunol. 1995;17:185-92.
20. 박춘식. 알레르기 질환에서 IL-4의 역할. 알레르기. 1991;11(5):520-1.
21. 홍수종 외. 천식환아 말초혈액 단핵구의 싸이토카인 생산 양상. 알레르기. 1997;17(3):307-15.
22. 이현구 외. IL-4와 다른 여러 가지 cytokine이 사람 편도 단핵세포의 IgE 생산에 미치는 영향. Korea J. Immunol. 1995;17:193-201.
23. 문희범. 인터루킨-4와 IgE 조절. 대한알레르기학회 춘계학술대회 초록집. 1993; 146-7.
24. 이충은 외. 인체 B 림프구 활성화의 신호전달과정에서 IL-4 수용체와 CD40 분자간의 상호작용. Korea J. Immunol. 1995;17:175-83.
25. John D. Jeppson, Hiren R. Patel, Naoki Sakata, Joanne Domenico, Naohiro Terada, and Erwin W. Gelfand. Requirement for Dual Signals by Anti-CD40 and IL-4 for the Induction of Nuclear Factor-B, IL-6, and IgE in Human B Lymphocytes. The Journal of Immunology. 1998;161:1738-42.
26. Gauchat, J. F., G. Aversa, H. Gascon, and J. E. de Vries. Modulation of IL-4 induced germline epsilon RNA synthesis in human B cells by tumor necrosis factor-alpha, anti-CD40 monoclonal antibodies or transforming growth factor-beta correlates with levels of IgE production. Int. Immunol., 1992;4:397.