

감국의 수지상세포의 성숙 억제 효과

박성주^{1,#}, 최병민², 송호준^{1*}

1; 원광대학교 한의과대학 본초학교실, 2; 원광대학교 의과대학 생화학교실

Inhibitory effect of FLOS CHRYSANTHEMI on the maturation of dendritic cells

Sung-Joo Park^{1,#}, Byung-Min Choi², Ho-Joon Song^{1*}

1: Dept. of Herbology, College of Oriental medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea

2: Dept. of Biochemistry, School of medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea

ABSTRACT

Objectives : FLOS CHRYSANTHEMI (FC) has been reported to possess a variety of pharmacological activities. However, the effect of FC on the dendritic cells has not been determined.

Methods : To examine the effect of FC on the immune response, we used several methods such as flow cytometric analyses, enzyme-linked immunosorbent assay.

Results : 1. FC inhibited lipopolysacchride (LPS)-induced maturation of bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) such as down-regulation of MHC class II and CD40.
2. FC also inhibited uptake of FITC-Dextran in BMDC stimulated with LPS.
3. Furthermore, FC inhibited several kinds of cytokine production such as TNF- α , IL-6 and IL-12 in BMDC.

Conclusions : These results suggest that FC plays pivotal role in the development of inflammatory diseases.

Key words : FLOS CHRYSANTHEMI, bone marrow-derived dendritic cells, maturation, inflammation.

*교신저자 : 송호준, 원광대학교, 한의과대학 본초학교실
· Tel : 063-850-6844, · E-mail : songhj@wku.ac.kr

#제1저자 : 박성주, 원광대학교, 한의과대학 본초학교실
· Tel : 063-850-6450, · E-mail : parksj08@wku.ac.kr

· 접수 : 2007년 7월 31일 · 수정 : 2007년 9월 19일 · 채택 : 2007년 9월 21일

서 론

감국 (FLOS CHRYSANTHEMI)은 국화과에 속하는 다년생 초본으로¹⁾ 6-10월에 걸쳐 개화하며 크기가 1.5cm 내외인 꽃봉우리가 줄기의 끝부분에 밀집되어 있다. 감국은 해열, 소염, 혈압저하작용, 두통해소 그리고 결핵균 및 각종 바이러스에 대한 억제 효과 등이 알려져 있다²⁾. 특히 감국은 예로부터 약용, 향료, 국화주, 국화차 및 떡류 등 음식물 첨가제로 널리 사용되고 있다³⁾. 감국의 주요성분은 apigenin, luteolin, acacetin, lactone, essential oil, sesquiterpene 그리고 일일배당체성분 등으로 구성되어 있다⁴⁻⁹⁾.

DC는 성숙 정도에 따라 크게 두 가지로 분류한다. immature DC (iDC)와 mature DC (mDC)로 분류한다. 이 두 가지 DC는 그 기능과 역할이 현저히 다르다. 먼저 외부 이물질이 우리 몸에 침입하면 iDC는 외부 이물질을 인식하고, 그 이물질을 uptake한다. 이물질을 섭취한 iDC는 인접한 림프노드로 이동한다. 또한 mDC는 이물질을 peptide로 조각을 내서 MHC-peptide complex를 이루어 T 세포에 있는 TCR (T cell receptor)과 결합하여 T cell을 활성화 시킨다¹⁰⁻¹⁵⁾. 이 과정에서 DC에 존재하는 costimulatory molecule과 동시에 결합하여 T 세포의 활성화에 영향을 미친다. mDC는 대식세포보다 T cell을 활성화 시키는 능력이 100배에서 1,000배 정도 탁월하다. 또한 mDC는 naive T cell을 활성화 시킬 수 있는 유일한 항원표시세포 (antigen presenting cell: APC)이다. 최근에는 DC를 조절하여 면역계를 조절하고자 한다. iDC와 mDC의 가장 큰 특징은 표면에 존재하는 receptor의 발현량에 크게 차이가 난다. 이 receptor는 T 세포를 활성화 시키는데 절대적으로 중요한 역할을 한다. 특히, MHC II는 mDC에서 iDC에 비해 월등하게 많이 표면에 존재한다. 특히 costimulatory molecule인 CD80/CD86의 발현도 차이가 심하게 난다. 이런 이유 때문에 DC의 성숙을 조절하는 것은 곧 T 세포의 활성을 조절하는 것과 어는 정도 일맥상통한다.

이에 본 연구에서는 감국의 효과를 골수유래수지상세포를 이용하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 감국은 옴니허브에서 구입하여 물 1L에 100g을 넣고 2시간 동안 전탕한 액을 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여서 필터한 후에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

Fetal bovine serum(FBS), RPMI-1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서 배양조는 Corning(Rochester, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 항체인 FITC-conjugated anti-MHC class II Ab (25-3-17), PE-conjugated anti-CD40 Ab, APC-conjugated anti-CD11c Ab 와 FITC-dextran은 BD Pharmingen에서 구입하였다. anti-mouse IL-6, TNF- α , IL-12 antibodies, 재조합 IL-6, TNF- α , IL-12, GM-CSF는 R & D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입했다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다

3) 실험동물

C57BL/6 6주령 암컷을 오리엔트에 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 제조

감국 물 추출물은 100g을 3차 증류수로 2시간 30분 전탕한 후 동결 건조 시켜서 용매를 제거하고 그 얻어진 분말을 농도별로 녹여서 실린지 필터로 여과해서 사용했다.

2) Bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) 배양

C57BL/6 마우스의 tibia, femur에서 골수를 채취한다. 채취한 골수를 single 세포로 만들 후 Nylon mesh로 거른다. 이 세포를 원심분리한 후에 상층액을 버리고 0.165 M NH₄Cl를 넣고 적혈구를 제거한다. 다시 원심분리한 후에 상층액을 버리고 여기에 RPMI1640 complete (01% FBS, 항생제)을

넣는다. 이 세포를 petri dish에 넣고 37 oC 5% CO2 배양기에 3시간 정도 배양한다. 3시간 후에 가볍게 pipetting을 한다. 이 과정에서 dish 바닥에 붙어 있는 세포는 거의 대부분이 대식세포이다. 상층액을 채취한 후 원심분리한다. 상층액을 버리고, GM-CSF 넣고 배양한다. 이를마다 배지를 버리고 6일째 되는 날 실험한다. 이 6일째 되는 세포는 거의 대부분이 iDC 이거나 DC precursor이다.

3) MTT 분석

골수유래수지상세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT분석법으로 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서 1 x 10⁶/ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 AETD로 처리하였다. 4시간 동안 배양한 뒤 1 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해 완충액(50% n,n-dimethylformamide을 포함하는 20% SDS 용액, pH4.7)을 첨가함으로써 용해했다. 그리고 계속해서 20~24시간 동안 배양하였다. formazan의 양은 570nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다

4) Cytokine(TNF- α , IL-6, IL-12) 측정

LPS (500 ng/ml)로 수지상세포를 자극하기 전 감국 추출물을 1시간동안 전 처리 하였다. Pro-inflammatory cytokine의 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해서 LPS (500 ng/ml)로 자극한 후 18시간 뒤 이들 염증매개물을 세포 상층액에서 ELISA법으로 정량하였다

5) Flow cytometry 분석법 및 세포 내 cytokine 분석

세포를 모은 후 cold PBS로 2번 씻는다(1,500 rpm, 5분). Ab로 FACS buffer (PBS + 2% FBS + 0.1% sodium azide)혼합하여 세포를 염색한다(4 oC, 30분). FACS로 분석한다.

6) Endocytosis assay

수지상세포의 항원 섭취 능력을 조사하기위하여, FITC-dextran (1mg/ml)을 37 oC에서 1시간 동안 처리한후, 3번 세척하여 FACS를 이용하여 분석하였다.

3. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 students' t-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 감국 추출물이 골수유래수지상세포의 세포표면 수용체에 미치는 영향

감국의 세포독성에 관해 알아보기 위하여 대식세포에 감국을 농도 의존적으로 처리하여 24 시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. 감국은 골수유래수지상세포에서 독성을 나타내지 않았다 (data not shown).

immature BMDC (iBMDC)에 LPS (500 ng/ml)을 24시간 동안 처리 후에 성숙 표지자를 조사하였다. figure 1에서 나타난 바와 같이 MHC class II와 CD40의 발현이 iBMDC보다 증가하게 나타나고 있다. 다음은 감국의 효과를 조사하기위하여 감국을 30분간 전처리하고 LPS를 처리하였다. 24시간 후에 BMDC의 MHC class II와 CD40의 발현을 조사한 결과, 감국이 농도 의존적으로 MHC class II와 CD40의 발현을 억제하였다.

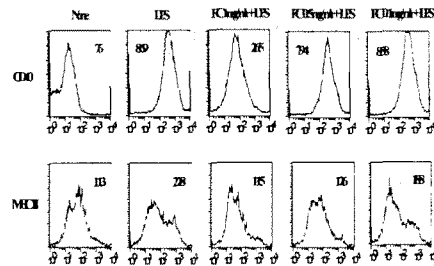


Figure 1. FC down-regulates the expression of CD40 and MHC II on BMDC. BMDC were generated from murine bone marrow cells in the presence with GM-CSF. Immature BMDC were stimulated with LPS (500 ng/ml) in the absence/presence with FC. After 24 hours incubation, BMDC were harvested and analyzed by flow cytometry. Cells were gated on CD11c+. The numbers indicate the mean fluorescence intensity. The results are representative of three independent experiments.

2. 감국 추출물이 골수유래수지상세포의 항원 섭취에 미치는 영향

세포 표면 수용체 즉, MHC class II와 CD40은 수지상세포의 성숙 정도를 나타내는 지표중에 하나로 사용된다. 즉 iBMDC는 위의 수용체가 적게 발현하나, mBMDC는 MHC와 CD40의 발현이 증가되어 있다. 이 결과 mBMDC는 T 세포를 자극하는 능력이 증가되어 있다. 하지만 iBMDC는 항원을 섭취하는 능력은 탁월하나, T 세포를 자극하는 능력은 감소되어 있다. 따라서 감국이 BMDC의 수용체에 발현하는 MHC와 CD40의 발현을 억제했기에 다음은 항원의 섭취 능력을 조사하였다. Figure 2에서 보는 바와 같이, LPS 처리시에는 FITC-dextran의 섭취가 억제되었다. 세포배지만으로 배양한 집단에서는 61% 정도의 FITC-dextran의 섭취 능력을 보이는 데, LPS를 처리한 집단에서는 31%의 FITC-dextran의 섭취 능력을 보이고 있다. 이 결과는 figure 1의 결과와 동일하게 성숙한 DC는 항원을 섭취하는 능력이 감소됨을 보이는 결과이다.

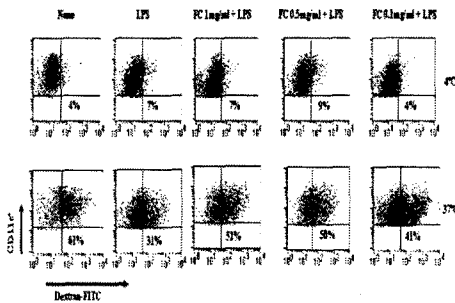


Figure 2. FC recovered endocytic capacity in BMDC stimulated with LPS. BMDC were generated as described in Materials and methods and harvested on day 6. Receptor-mediated endocytosis (FITC-dextran) on CD11c-positive BMDC was analyzed by flow cytometry. The numbers indicate the percentage of CD11c+ cells that were positive for FITC-dextran. The results are representative of two separate experiments that yielded similar results.

3. 감국 추출물이 골수유래수지상세포의 세포활성물질에 미치는 영향

수지상세포는 성숙하면서 다양한 세포활성물질을 유리한다. 즉, TNF-a, IL-6, IL-12 등의 세포활성물질을 유리한다. 수지상세포는 naive T 세포를

MHC-peptide complex와 soluble factor인 세포활성물질에 의해서 T 세포의 분화에 관여한다. 즉, 성숙한 수지상세포는 TNF-a, IL-6, IL-12를 다량 분비하나, 미성숙 수지상 세포는 위의 세포활성물질의 생산이 적다. 따라서, 감국이 세포활성의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. figure 3에서 나타난 바와 같이 LPS는 다량의 TNF-a, IL-6, IL-12를 생산하고 있다. 하지만 감국은 LPS에 의해 생산된 TNF-a, IL-6, IL-12의 생산을 농도 의존적으로 억제하고 있다.

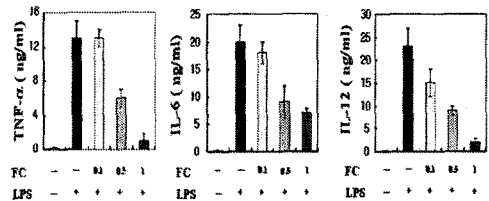


Figure 3. FC inhibits LPS-induced cytokine production in BMDC. After the development of iBMDC (on day 6), 2 x 10⁵ cells/ml were cultured with LPS in the presence/absence with FC for 24 hours. The production of TNF-a, IL-6 and IL-12 was determined by ELISA.

고찰

본 논문에서는 감국이 수지상세포에 미치는 영향을 조사하였다. 감국은 한의학적으로 甘 苦 微寒 無毒하고 肺, 肝 二經에 작용하며 효능 및 주치는 疏散 風熱, 清肝明目, 平肝陽, 清熱解毒 등의 효능이 있어 感冒風熱, 目赤疼痛, 頭暈, 疔瘡腫毒 등의病症을 치료한다¹⁶⁾. 감국의 주요성분은 apigenin, luteolin, acacetin, lactone, essential oil, sesquiterpene 그리고 알킬배당체성분 등으로 구성되어 있다⁴⁻⁹⁾. 특히 luteolin은 항염증효과를 보이는 성분으로 잘 알려져 있다.

감국의 독성효과를 알아보기 위하여 MTT assay를 한 결과 BMDC에 1mg/ml에서도 독성을 보이지 않고 있다 (data not shown). 한의학적으로도 감국이 無毒하다는 것을 본 실험에서도 입증하였다.

iDC는 항원 섭취능력이 뛰어나나, T세포를 활성화 시키는 능력은 mDC에 비해 떨어진다. iDC는 T 세포 활성화를 억제하며 이러한 기능은 조직이식에 중요한 역할을 한다. 하지만 mDC는 항원 섭취능력은 떨어지나 T세포를 활성화 시키는 능력은 iDC에

비해 월등하다. 또한 mDC는 naive T세포를 자극하여 T세포의 분화를 유도한다. iDC는 MHC class II와 CD40의 발현이 적으나 mDC는 MHC class II와 CD40의 발현이 많다. 이와 같이 증가된 MHC와 보조적 수용체인 CD40는 T세포를 자극하는데 중요한 역할을 한다. 감국은 LPS에 의한 MHC와 CD40의 발현을 억제하였다. 즉 감국은 T세포의 활성화를 DC의 성숙도를 조절하여 면역계를 조절할 수 있다는 것을 의미한다. 또한 항원의 섭취능력을 조사한 결과 감국이 LPS에 의해 저하된 항원섭취능력을 회복시켰다. 결론적으로 감국은 T세포를 활성화 시키는 표면수용체의 발현을 감소시켰으며, 항원섭취능력을 회복시켰다. 즉 감국이 LPS에 의한 BMDC의 성숙을 억제하였다는 의미이다.

DC에서 생산된 TNF- α , IL-6, IL-12는 T세포의 분화에 중요한 역할을 하는 세포활성물질이다. iDC는 TNF- α , IL-6, IL-12를 다량 생산한다. 따라서 감국이 이러한 세포활성물질의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 감국은 LPS에 의한 TNF- α , IL-6, IL-12의 생산을 억제하였다. 특히 IL-12는 T세포의 분화에 중요한 역할을 한다. 즉 IL-12에 의해서 T세포는 IFN- γ 를 생산하는 Th-1세포로 분화한다. 감국이 Th-1세포의 분화를 억제 할 수 있다는 의미이다. 특히 Th-1세포는 다양한 자가면역 질환의 관여하고 있다. IL-6는 Th-17 세포의 분화에 중요한 인자로 최근에 보고하고 있다. 감국이 BMDC의 IL-6생산을 억제 할 수 있다는 것은 Th-17세포의 분화에 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 의미한다.

본 논문에서 감국이 LPS에 의한 BMDC의 분화와 세포활성물질의 생산을 억제 하였다. 따라서 감국은 다양한 염증성 질환의 치료에 사용 할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

감국을 BMDC에 처리한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 감국은 LPS에 의해 유도된 MHC class II와 CD40의 발현을 억제하였다.
2. 감국은 LPS에 의해 억제된 항원섭취 능력을 회복시켰다.
3. 감국은 LPS에 의해 유도된 TNF- α , IL-6, IL-12의 생산을 억제하였다.

이상의 결과는 감국이 염증성 질환 치료에 사용할 수 있는 실험적 근거를 제시한다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 2007 교비지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Yuk CS. Original colors pictorial book of the korean medicinal use. Academy books, seoul. 1990;p537,
2. Shin GC, Shin YC. New our talk large a dictionary, Samsung Publishing company, Seoul, 1992;p68
3. Park CS. Chrysantemum raise and tubular. Chungwoon publishing company, Seoul. 1965;p21
4. Ryu SY, Choi SU, Lee CO, Lee SH, Ahn JW, Zee OP. Antitumor activity of some phenolic components in plants. Arch Pharm Res 1994; 17:42-44
5. Chatterjee A, Saekar S, Saha SK. Acacetin 7-O-gal-actopyranoside from Chrysanthemum indicum. Phytochem 1981;20:1761-1767
6. Chen Z, Peijuan X. Structural determination of yehu lactone, isolated from Chrysanthemum indicum L. Yaoxue Xuebao 1987;22:67-70,
7. Uchio Y, Tomosu K, Nakyama M, Yamamura A, Waki T. Constituents of the essential oils from three terpenoid species of Chrysanthemum Phytochem 1981;20: 2691-2693
8. Mladenova K, Tsankova E, Hung D. New sesquiterpenoids from Chrysanthemum indicum var, tuneful. Planta Med 1988;54:553-559
9. Jung KY, Oh SR, Kim CS, Kim JH, Lee HK. A new alkylalcohol glycoside from Chrysanthemum Flos. Kor J Pharmacogn 1996;27:15-19
10. Jaques Bancheureau and Ralph M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity, Nature. 1998;392:245-52
11. Philippe PierreI, Shannon J. Turley, Evelina Gatti, MichaelI Hull, Joseph Meltzer, Asra Mirza, Kayo Inaba, Ralph M. Steinman and

Ira Mellman, Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells, *Nature*. 1997;388:787-92

12. Pierre P, Mellman I, Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell*. 1998;93:1135-45

13. Shannon J. Turley, Kayo Inaba, Wendy S. Garrett, Melanie Ebersold, Julia Unternaehrer, Ralph M. Steinman, Ira Mellman, Transport of Peptide-MHC Class II Complexes in Developing Dendritic Cells. *Science*. 2000;288:522-7.

14. Garrett WS, Chen LM, Kroschewski R, Ebersold M, Turley S, Trombetta S, Galan JE, Mellman I. Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell*. 2000;102:325-34

15. Ira Mellman and Ralph M. Steinman, Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001;106:25-5-8.

16. 신민교, 임상본초학, 서울;영림사, 2002, p343-345