

RBL-2H3 세포에 있어서 꾸지뽕 당단백질에 의한 히스타민 방출 및 COX-2 활성 억제 효과

오필선¹ · 이혜진² · 임계택^{3*}

¹전남대학교 생물공학연구소 분자생화학 교실 및 동물유해인자 제어를 위한 전문인력 양성 사업팀(BK21)

²전남대학교 동물자원학부, ³전남대학교 생물공학연구소 분자생화학교실

Inhibitory Effect of Glycoprotein Isolated from *Cudrania tricuspidata* Bureau on Histamine Release and COX-2 Activity in RBL-2H3 Cells

Phil-Sun Oh¹, Hye-Jin Lee², and Kye-Taek Lim^{3*}

¹Molecular Biochemistry Laboratory, Biotechnology Research Institute & Center for the Control of Animal Hazards Using Biotechnology (BK21), Chonnam National University

²Department of Animal Science, Chonnam National University

³Molecular Biochemistry Laboratory, Biotechnology Research Institute, Chonnam National University

Abstract The purpose of this study was to determine the inhibitory effect of a glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* Bureau (CTB glycoprotein, 75 kDa) on immunoglobulin E (IgE)-induced allergic inflammation in RBL-2H3 cells. This experiment evaluated the production of intracellular reactive oxygen species (ROS), the activities of mitogen-activated protein kinase (MAPK), transcription factor (c-jun), and cyclooxygenase (COX)-2, and histamine release in cells. The results showed that the CTB glycoprotein inhibited histamine release and COX-2 expression induced by IgE in the cells. The CTB glycoprotein also had suppressive effects on the expressions of ERK1/2, p38 MAPK, c-jun, and the production of intracellular ROS in IgE-treated RBL-2H3 cells. The activities of c-jun and COX-2 were collectively blocked by ERK1/2 inhibitor (PD98059) and p38 MAPK inhibitor (SKF86002), respectively. Hence, we speculate that CTB glycoprotein might be a component with potential use in the preparation of health supplements for the prevention of allergic diseases.

Key words: *Cudrania tricuspidata* Bureau glycoprotein, RBL-2H3 cells, histamine, cyclooxygenase-2

서 론

알레르기성 질환은 현대사회의 산업화에 따른 환경오염, 식생활의 변화, 그리고 유전적 영향 등의 복합적인 원인으로 그 발병율은 남녀노소를 불문하고 급격히 증가하고 있다(1). 일상생활에서 흔히 볼 수 있는 애원동물과의 피부 접촉, 음식물이나 약물의 복용, 자동차 배기가스나 매연 등의 호흡물질로 인해 우리 몸의 면역체계가 민감하게 반응(hypersensitive reaction) 함으로써 면역글로블린인 IgE가 과도하게 생성되고, 이에 따라 활성화된 비만세포(mast cell)로부터 여러 가지 매개 물질들의 유리 및 염증세포의 침윤을 복합적인 원인으로 추측하고 있다(2).

비만세포는 피부, 림프관 주위, 호흡기, 혈관 주위, 위장 관의 점막, 뇌 등 전신의 장기에 분포하고 있으며 천식이나 알레르기성 비염과 같은 알레르기 반응을 매개하는 중요한 세포이다(3).

이 세포는 표면의 immunoglobulin E(IgE) 수용체(FcεRI)에 IgE 항체와 multivalent antigen이 결합할 때 특이적으로 antigen과 FcεRI의 cross-linking으로 활성화되면 비만세포의 과립내의 화학매개체(histamine, proteoglycan, serine proteases, carboxypeptidase A, sulfatases, exoglycosidases)등과 특이적인 사이토카인을 분비하면서 알레르기 염증의 초기 반응과 후기 반응을 일으킨다. 게다가 이러한 화학 매개체들이 세포로부터 지속적으로 생성되고 방출되면 만성적으로 염증반응을 일으킨다(3,4). 이러한 비만세포로부터 탈과립을 유도하는 방법에는 IgE/FcεRI와 antigen의 결합에 의한 면역학적 자극 외에 compound 48/80, substance P, anaphylatoxin C5a 등에 의한 비면역학적 자극이 있다. 또한 calcium inophore A23187, morphine sulfate, basic polypeptides(polylysine, polyarginine) 등도 비만세포를 직접 활성화 할 수 있다.

Histamine은 비만세포의 과립으로부터 가장 빠르게 유리되는 화학 매개체로서 말초혈관에 대한 투과성 항진과 확장작용, 기관지 평활근에 대한 수축작용, 점막표면에 대한 선상세포의 분비항진 작용 등을 나타내어 과민반응 및 만성 염증반응을 일으킨다(3,5,6). 또한 cyclooxygenase(COX)는 염증과 알레르기 증상 유발 물질인 arachidonic acid로부터 eicosanoids의 일종인 prostaglandine(PG)과 leukotrienes의 생합성을 매개하는 효소로서 염증 반응에 주도적 역할을 한다. COX-1은 대표적인 생리작용인 위장세포 보호 및 신장의 정상기능유지, 그리고 혈소판 응집과 같은 생리

*Corresponding author: Kye-Taek Lim, Molecular Biochemistry Laboratory, Biotechnology Research Institute, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Tel: 82-62-530-2115

Fax: 82-62-530-0285

E-mail: ktlim@chonnam.ac.kr

Received March 30, 2009; revised April 20, 2009;

accepted April 28, 2009

기능 유지와 관련 있는 효소임에 반해(7), COX-2는 여러 종류의 자극에 의해 유도되는 효소이며 염증과 통증을 야기하는 prostaglandin을 생산함으로써 염증성 질환 및 종양의 생성에도 관여하는 것으로 알려져 있다(8). 따라서 histamine과 COX-2만을 선택적으로 억제한다면 정상적인 생리기능은 그대로 유지가 가능함으로써 부작용이 없거나 감소된 상태로 염증치료가 가능하다는 가설에 도달하게 된다. 현재까지는 대부분 증상을 완화시키는 약물들로 스테로이드(steroid), 항히스타민(anti-histamine), 항류코트리엔(anti-leukotriene), 아드레날린(adrenalin), 인탈(intal) 등 많은 약물들이 개발되어 왔으나(9,10) 진정작용이나 식욕증가, 중추신경장애, 그리고 심혈관계의 부작용을 초래하는 것으로 알려져 있다. 증가되는 발병률에도 불구하고 아직도 알레르기 질환의 병태생리가 명확하게 구명되지 않았고 더욱이 뚜렷한 원인치료 약물이 없는 실정이다. 따라서 최근에는, 이러한 부작용을 줄이면서도 질환의 진행과정을 방해하고 억제하며, 또한 영양물질 및 식이요소로 이용될 수 있는 천연물을 이용한 항 알레르기제의 개발에 많은 연구가 시행되고 있다(11-13).

일반적으로 천연물로부터 분리된 당단백질은 동물, 식물 그리고 미생물에서 체내 대사나 신호전달, 면역기능 및 항상성 유지를 위한 유용한 물질로서 작용한다(14). 본 실험실에서 천연물로부터 당단백질을 추출하여 그에 대한 생물학적인 이용성을 연구하였던 결과, 느릅나무, 옷나무, 까미중 열매, 그리고 마로부터 추출된 식물성 당단백질들이 생체 방어적 조절자로서 탁월하고 강력한 항산화 효과, 항암효과, 그리고 면역기능 조절 효과를 가진다는 것을 알았다(15-19). 특히 마로부터 추출된 마 당단백질은 여러 세포에서 거의 독성을 나타내지 않았으며, 특이하게도 선택적으로 전사인자를 조절함으로써 면역세포의 cytokine 발현 양을 조절하였고, 산화적 스트레스에 의해 유도된 흉선 세포자살 과정을 억제하는 효과를 가지고 있었다(18,19). 이와 같은 결과는 식물성 당단백질들이 항산화 효과를 지니며 신호전달 경로에 매우 특이적이고 선택적이면서 세포내의 항상성을 유지시키기 때문에, 알레르기 반응을 억제하는데 탁월하다는 것을 암시해 준다.

본 연구에서 사용된 꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata* Bureau, CTB)은 뽕나무과에 속하는 낙엽교목으로 10여종이 알려져 있으나 우리나라에는 1종만이 충청남도, 전라도, 경상도 등의 남부 지방에서 자생하고 있으며, 중국과 일본 등 동아시아에 주로 분포하고 있다(20). 예로부터, 꾸지뽕 나무는 한방에서 습진, 유행성 이하선염, 폐 결핵, 타박상, 급성관절염 등의 치료에 사용되어 왔으며(21), 동의보감에서도 또한 꾸지뽕 열매가 항암 효과가 뛰어나고 강장, 자양, 숙취해소, 간과 신장보호 등의 효과가 있다고 소개되고 있다. 그러나 현재까지 꾸지뽕 나무에 대한 연구는 성분분석 연구가 대부분이며, 최근까지 연구로는 꾸지뽕 나무의 잎, 줄기, 뿌리 등을 이용한 항염증 작용 및 항균작용, 고지혈증 억제 작용(22,23) 등이 보고가 되었을 뿐 꾸지뽕 당단백질에 대한 항 알레르기 연구는 거의 없는 상태이다. 최근 본 실험실에서는 꾸지뽕의 열매로부터 당단백질을 추출하여 대략적 크기가 75 kDa이고, 당이 72.5%, 단백질이 27.5%로 구성되어있고 다양한 생리활성능력을 발견하였다. 이전의 보고에서, 꾸지뽕 당단백질은 oxygen 라디칼에 대한 강한 항산화 효과를 지니고 있었고, 대식세포에서 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 유도된 염증 반응을 전사인자인 nuclear factor(NF)- κ B의 억제를 통한 항 염증작용을 보여주었다(24). 이러한 꾸지뽕 당단백질은 염증 매개 인자들의 조절을 통해 알레르기성 질환의 발병 억제 및 면역능력을 개선하여 알레르기의 치료제로써 가능성이 있다고 생각된다.

따라서, 본 연구에서는 꾸지뽕 당단백질(CTB glycoprotein)의

항알레르기 효과를 알아보기 위하여 활성화된 비만세포에서 ROS 생성, histamine 유리 및 COX-2 활성 및 관련된 신호 전달기전을 조절할수 있는지를 밝히고자 한다.

재료 및 방법

시약

본 실험에 사용된 시약 중 anti-dinitrophenyl(DNP) IgE, human serum albumin(HSA), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein(H_2 DCF-DA), o-phthalaldehyde, glycine, tris(hydroxymethyl) amino-methane, glycine, trypsin, sodium dodecyl sulfate(SDS) 등은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), antibiotics는 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, 그 외 사용된 시약은 순도가 높은(순도 99% 이상) 등급을 구입하여 사용하였다.

꾸지뽕 당단백질 분리 및 정제

꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata* Bureau) 열매로부터 분리된 꾸지뽕 당단백질(CTB glycoprotein)은 이전의 방법으로 추출하였다(24). 즉, 꾸지뽕 열매를 전라남도 나주 재래시장에서 구입하여 그 열매를 잘게 부순 후, 증류수에 3개월간 침지하여 Whatman filter paper(No. 2)를 이용하여 불순물을 제거하고 회전 농축하였다. 농축이 끝난 액상 꾸지뽕 추출물을 동결 건조하여 수확물을 얻었다. 얻어진 수확물을 증류수로 다시 용해시켜 concanavalin A-sepharose 4B affinity chromatography(24-45 mm, Sigma, C9017)를 통과시킨 후 0.5 M NaCl을 포함한 0.5 M methyl α -D-glucopyranoside을 이용하여 정제하였다. 정제된 용액은 동결 건조시켜 crude extract를 얻었다. 꾸지뽕 당단백질을 확인하기 위해 분리 및 정제된 꾸지뽕 당단백질을 0.1% SDS가 함유된 15% polyacrylamide gel에 100 V, 30 mA에서 2.5시간 전기영동 후 gel은 Schiff reagent(25)를 이용하여 염색 하고, 그 분자량을 marker와 비교하여 확인하였다.

세포 배양 및 cytotoxicity

비만세포주 RBL-2H3을 본 연구에서 사용하였다. RBL-2H3세포는 한국 세포주 은행(Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 구입하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 그리고 100 μ g/mL streptomycin이 포함된 DMEM에서 배양하였다. RBL-2H3세포를 anti-dinitrophenyl(DNP) IgE(0.1 μ g/mL)로 22시간 동안 반응시키고 HSA(1 μ g/mL)로 반응시키기 15분 전에 37°C에서 꾸지뽕 당단백질을 처리하였다. 또한, 꾸지뽕 당단백질의 세포독성 능력을 관찰하기 위해, Mosmann의 방법에 따라 3-(4,5 dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay(26)로 확인하였다. 간략하게 말하면, RBL-2H3세포에 꾸지뽕 당단백질(25 μ g/mL-200 μ g/mL)을 24시간 동안 반응시킨 후 MTT stock solution(5 mg/mL)을 더해 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 96 well multi plates에 acidic isopropanol을 더해 SpectraCount™(Packard Instrument Co. Downers, Ill., Meriden, CT, USA)을 사용하여 560 nm에서 읽었다.

Reactive oxygen species(ROS) 정량

RBL-2H3 세포 내에서 생성되는 ROS를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorodihydrofluorescein(H_2 DCF-DA)를 이용하였다. H_2 DCF-DA는 세포내로 들어가면 intracellular esterase에 의해 deacetylation되면

서 DCFH로 전환되고 산소 라디칼에 의해 산화되어 DCF라는 형광을 내는 물질로 전환된다. RBL-2H3 세포를 22시간 동안 anti-DNP IgE로 감작시킨 후 배양액을 제거하고, DCF-DA를 100 μ L를 가하고 30분 동안 빛을 차단한 곳에서 배양하였다. 30분 후 DCF-DA를 제거하고, HSA를 시간별로 처리하고 꾸지뽕 당단백질을 농도별로 처리한 후 형광($\lambda_{ex}=385$ nm, $\lambda_{em}=550$ nm)을 측정하였다(27).

Whole protein의 추출

6 well plate에 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, anti-DNP IgE가 포함된 DMEM을 2 mL씩 각각 분주하여 22시간 동안 배양하였다. HSA를 처리하기 15분 전에 일정한 농도와 시간 동안 꾸지뽕 당단백질을 처리 한 후 상층액을 걷어내고 ice-cold PBS로 씻은 후, protease inhibitor cocktail이 포함된 whole cell lysis buffer(20 mM HEPES; pH 7.9, 0.42 M NaCl, 0.5% NP-40, 25% glycerol, 0.2 mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1 mM DTT)로 재 현탁한 후, 에펜도르프 튜브에 넣고 30분 동안 혼합하였다. 4°C에서 30분간 14,000 rpm에서 원심분리 한 후, 상층액을 -70°C에서 보관하였다.

Nuclear protein의 추출

6 well plate에 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, anti-DNP IgE가 포함된 DMEM을 2 mL씩 각각 분주하여 22시간 동안 배양하였다. HSA를 처리하기 15분 전에 일정한 농도와 시간 동안 꾸지뽕 당단백질을 처리 한 후 상층액을 걷어내고 ice-cold PBS로 씻은 후, hypotonic buffer(10 mM HEPES; pH7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% NP-40)로 재 현탁한 후 4°C에서 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 핵 단백질은 postase inhibitor cocktail이 포함된 NE buffer(20 mM HEPES; pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 25% glycerol, 1 mM PMSF, 1.5 mM MgCl, 0.5% NP-40)를 가하여 30분 동안 혼합하고 4°C에서 15분간 12,000 rpm으로 원심 분리한 후, 상층액을 회수하여 -70°C에 보관하였다.

Western blot 분석

Western blot 실험을 수행하기 위하여 RBL-2H3 세포를 HSA로 자극하기 15분 전에 일정한 농도와 시간 동안 꾸지뽕 당단백질을 처리한 후, 전체 세포 단백질과 핵단백질을 추출하였다. 이렇게 얻어진 전체 세포 단백질과 핵단백질은 Lowry등(28)의 방법으로 단백질 농도를 측정하고, 10% polyacrylamide gel에 100 V, 30 mA에서 2.5시간 동안 전기 영동 한 후, nitrocellulose membrane에 transfer 시켰다. Transfer된 nitrocellulose membrane을 5% 탈지분유가 함유된 TBS-Tween 용액(25 mM tris-Cl, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 0.05% tween-20)으로 25°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 3,000배 희석된 primary antibody 와 10,000배 희석된 secondary antibody를 적당한 시간 동안 처리하고, 발색시약(ECL)을 넣어 ERK 1/2, AP-1(c-jun과 c-fos)과 COX-2의 활성을 확인하였다.

Histamine 정량

세포배양 상층액 및 혈청 중에 있는 히스타민의 정량은 Shore 등(29)의 방법으로 하였다. 간단히 설명하면, 배양된 RBL-2H3세포를 4°C에서 5분 동안 400 rpm으로 원심 분리하여 그 상층액이 시료로 사용되었다. 에펜도르프 튜브에 시료 25 μ L를 넣고 0.1 N-

HCl 22.5 μ L, 60% HClO₄ 2.5 μ L를 넣고 혼합 후 원심분리(1,500 rpm, 20 min)하여 그 상층액 40 μ L를 5 N-NaOH용액 25 μ L, 증류수 150 μ L, *n*-butanol 500 μ L 및 NaCl 0.06 g을 혼합한 튜브에 넣고 진탕 후 원심분리(2,000 rpm, 10 min)하였다. Butanol층 400 μ L를 에펜도르프 튜브에 넣고 0.1 N-HCl 용액 150 μ L, *n*-heptane 0.5 mL를 가하여 진탕 후 원심분리(2,000 rpm, 10 min)하였다. 여기에서 얻어진 수층 100 μ L에 1 N-NaOH 용액 200 μ L와 1% o-phthaldialdehyde용액 5 μ L를 넣고 혼합 후 37°C에서 3분 동안 반응시킨 후 3 N-HCl용액 10 μ L를 넣고 혼합하여 2분 동안 방치한 후 spectrofluometer($\lambda_{ex}=360$ nm, $\lambda_{em}=440$ nm)로 형광도를 측정하였다.

통계학적 분석

모든 실험은 3회 반복 실시 하였으며, 실험결과는 SPSS program (ver 12.0)의 one-way analysis of variance(ANOVA)을 이용하여 분산 분석한 후 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 시료간의 유의적인 차이를 검정하였으며, 대조군과 비교하여 *p*값이 5% 미만일 때를 통계학적 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

꾸지뽕 당단백질의 세포 독성에 대한 효과

일반적으로 식물성 생리활성물질은 합성물질에 비해 부작용이 적고 그 특이구조에 따라 생리적 기능의 증진은 물론 면역능 증강에도 관여한다고 알려져 왔다. 산업화에 따른 질병의 예방과 치료를 위하여 많은 자연과학자들은 천연물로부터 여러 생리활성물질을 탐색하여 동양의학과 접목하여 면역력을 증강시켜 간접적으로 여러 질병을 예방하고 치료하려고 노력하고 있다. 본 연구에서 사용했던 꾸지뽕 당단백질(75 kDa)은 일반 식물성 유래 당단백질과 같이 생리활성효과를 역시 나타내준다. 예를 들면, 까마중 열매 당단백질(150 kDa)은 암세포 성장을 억제하는 효과를 가지고있고, 마 당단백질(30 kDa)은 세포에 독성이 없고 또한 강한 항산화 효과를 지니고 있었다. 꾸지뽕 당단백질은 분자량의 크기에 있어서 까마중 열매 당단백질과 마 당단백질의 중간 크기의 분자량을 가지고 있었고 또한 라디칼을 소거하는 항산화력을 가지고 있었고 또한 항염증효과를 가지고 있었다. 흥미롭게도 본 연구에서 얻은 결과는 꾸지뽕 당단백질이 항알레르기 실험 모델로써 RBL-2H3 cells에 HAS에 의해 유도된 알레르기 반응의 제어에 특이적으로 억제하는 효과를 나타내는 결과로 보아 꾸지뽕 당단백질이 알레르기를 억제할 수 있다고 사료된다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이, 꾸지뽕 나무의 효과를 알아보기 위해 RBL-2H3 세포에 꾸지뽕 당단백질을 처리한 후 MTT assay를 이용하여 세포 독성을 측정하였다. MTT assay는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 측정하는 방법으로 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의해 MTT tetrazolium이 MTT formazan(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원되고 540 nm의 파장에서 흡광도가 최대가 되어 살아있는 세포 수를 반영한다. Fig. 1A에서 볼 수 있듯이 꾸지뽕 당단백질을 25 μ g/mL 에서 200 μ g/mL 을 처리 후 세포독성을 관찰한 결과, 꾸지뽕 당단백질의 가장 높은 농도인 200 μ g/mL를 처리 하였을 때 세포독성이 관찰되지 않았다. 또한 Fig. 1B에서와 같이 HSA와 꾸지뽕 당단백질을 함께 처리 한 실험에서도 유의성 있는 세포 독성은 관찰되지 않았다.

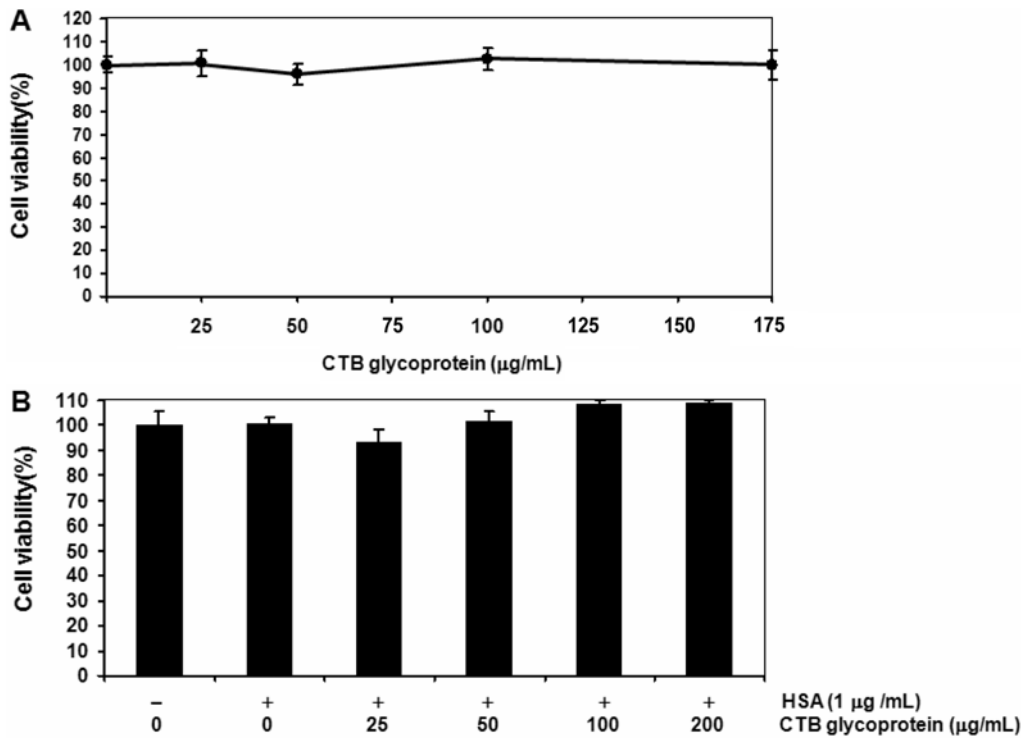


Fig. 1. Effect of CTB glycoprotein on cell viability in RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were treated with the CTB glycoprotein (25-200 µg/mL), or cotreated with HSA (1 µg/mL) and the CTB glycoprotein for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are the means±SD from triplicate experiments.

HSA가 처리된 RBL-2H3 세포에서 꾸지뽕 당단백질의 ROS의 생성 억제 효과

비만세포는 항원에 의해 자극되었을 때 ROS를 생성하고(30), ROS가 알레르기성 염증반응에서 intracellular second messenger로써 작용하여 염증 매개 인자들의 생성과 신호전달을 촉진시키기 때문에(30,31), 꾸지뽕 당단백질이 염증 억제 능력을 나타내는지 알아보기 위해 RBL-2H3 세포에 꾸지뽕 당단백질을 HSA와 함께 처리하여 세포 내에서 발생하는 ROS의 생성량을 측정하였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이, 세포내의 ROS 생성량은 DCF fluorescence의 intensity에 비례함에 따라 RBL-2H3세포에 HSA를 1 µg/mL의 농도로 30분 동안 처리했을 때, 세포내 ROS 생성량은 유의적으로 증가하였으며 30분 이후는 ROS의 생성량이 감소되었다. 즉, RBL-2H3 세포에 HSA를 시간에 의존적으로 처리했을 때 세포내 ROS 생성량은 30분에서 대조군에 비해 1.3배 증가하였다. 이는 비만 세포 내에서 생성된 ROS가 염증반응에 있어서 second messenger로서 짧은 시간내에 활성을 띠어 염증 반응을 매개한다는 것을 의미 한다. 그러나 꾸지뽕 당단백질을 HSA와 함께 처리했을 때 HSA로 인해 증가한 세포내 ROS의 생성량을 농도에 의존적으로 감소시켰다. Fig. 2B에서 볼 수 있듯이, 꾸지뽕 당단백질(100 µg/mL)의 처리는 HSA로 인해 증가된 ROS의 생성량을 HSA 처리구와 비교하였을 때 0.2배만큼 감소시켰다. 이러한 결과는 강력한 항산화제인 꾸지뽕 당단백질이 RBL-2H3 세포에서 HSA에 의해 촉진된 ROS의 발생을 막음으로써 염증 반응을 억제하였다는 것을 의미한다.

HSA가 처리된 RBL-2H3 세포에서 꾸지뽕 당단백질의 ERK1/2의 인산화 억제 효과

비만세포를 활성화 시키는 신호전달 체계 중 mitogen-activated

protein kinase(MAPK)는 대표적인 신호전달 매개 단백질로써 세포 외 신호를 핵 안으로 전달한다. 반응하는 기질에 따라 3가지 그룹으로 분류되며, extracellular signal-related kinase(ERK), c-jun NH2-terminal kinase(JNK), 그리고 p38 MAPK 이다(32). 비만세포의 자극 인자에 의해 MAPK이 활성화 되면 전사인자 AP-1을 포함한 세포 내 기질을 인산화하여 케모카인이나 사이토카인 유전자와 COX-2와 같은 염증 유전자를 작동시킨다(33). 꾸지뽕 당단백질의 비만 세포내 신호전달경로의 변화를 관찰하기 위해 MAPK의 주요 biomarker로써 ERK1/2의 인산화 형태의 단백질을 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이, HSA를 처리한 결과 ERK1/2의 인산화 형태인 phospho-ERK1/2는 시간에 의존적으로 발현이 증가하여 활성화되었으며 특히 30분에서부터 유의적으로 발현 양이 증가하였다($p < 0.05$). 그러나 꾸지뽕 당단백질을 처리하였을 때 HSA에 의해 증가된 phospho-ERK1/2를 농도에 의존적으로 감소시켰다. 즉, RBL-2H3 세포에 꾸지뽕 당단백질의 처리 없이 HSA(1 µg/mL)을 30분 동안 처리하였을 때, 대조군에 비해 phospho-ERK1/2의 활성은 10.1배 증가한 반면, 50과 100 µg/mL 꾸지뽕 당단백질의 처리는 HSA에 의해 증가된 phospho-ERK1/2를 각각 0.14 그리고 0.31배 감소 시켰다.

HSA가 처리된 RBL-2H3 세포에서 꾸지뽕 당단백질의 AP-1의 활성 억제 효과

꾸지뽕 당단백질이 염증성 신호전달인자들의 활성을 조절할 수 있는지를 알아보기 위하여, RBL-2H3 세포에 꾸지뽕 당단백질을 HSA와 함께 처리한 후 핵단백질을 분리하여 전사인자인 AP-1의 대표적 subunit인 c-jun과 c-fos의 활성 변화를 western blot 방법을 통하여 알아보았다(Fig. 4). AP-1은 세포내의 ROS에 의해 유도되며 c-jun과 c-fos의 heterodimer로서 비만세포에서 염증반응과

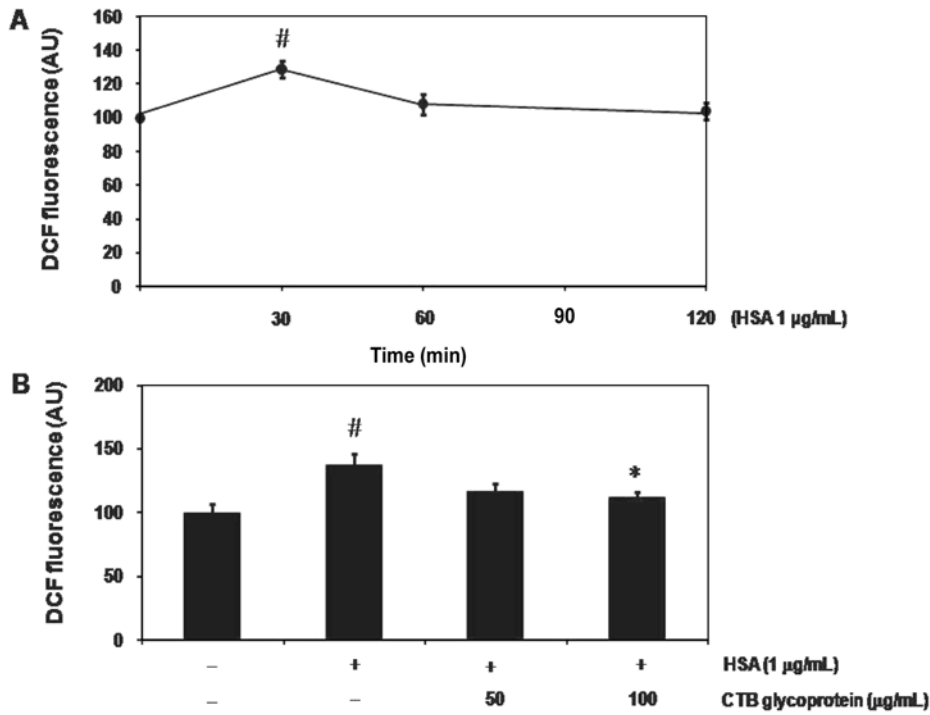


Fig. 2. Inhibitory effects of CTB glycoprotein on ROS Production in RBL-2H3 Cells. RBL-2H3 cells were treated with HSA (1 µg/mL) for indicated time, or cotreated with HSA (1 µg/mL) and the CTB glycoprotein (50-100 µg/mL) for 30 min. Fluorescence intensity is presented as relative intensity based on monitoring dichlorodihydrofluorescein (DCF) fluorescence using a fluorescence microplate reader (Dual Scanning SPECTRAMax, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Data are the means±SD from triplicate experiments. [#], a significant difference between treatments and control, $p < 0.05$. ^{*}, a significant difference between HSA treatment and the CTB glycoprotein treatment in the presence of HSA, $p < 0.05$.

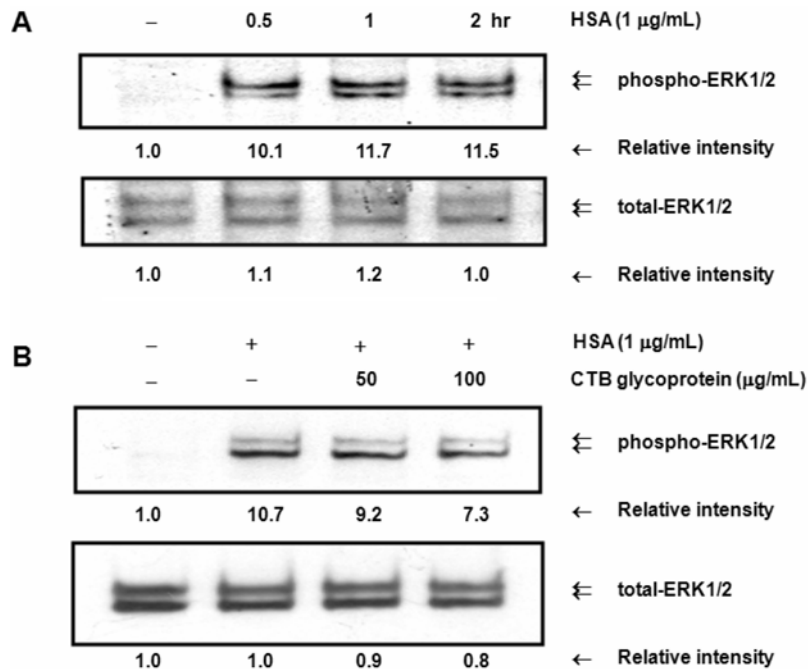


Fig. 3. Inhibitory effect of CTB glycoprotein in the presence of HSA on phosphorylation of ERK1/2 in HSA-treated RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were treated with HSA (1 µg/mL) for indicated time, or cotreated with HSA (1 µg/mL) and the CTB glycoprotein (50-100 µg/mL) for 30 min. The relative intensities of bands were calculated using Scion Imaging Software (Scion Image Beta 4.02, Maryland, USA). The data represent triplicate experiments. Lane 1, control; lane 2, HSA alone; lane 3, 50 µg/mL CTB glycoprotein in the presence of HSA; lane 4, 100 µg/mL CTB glycoprotein in the presence of HSA.

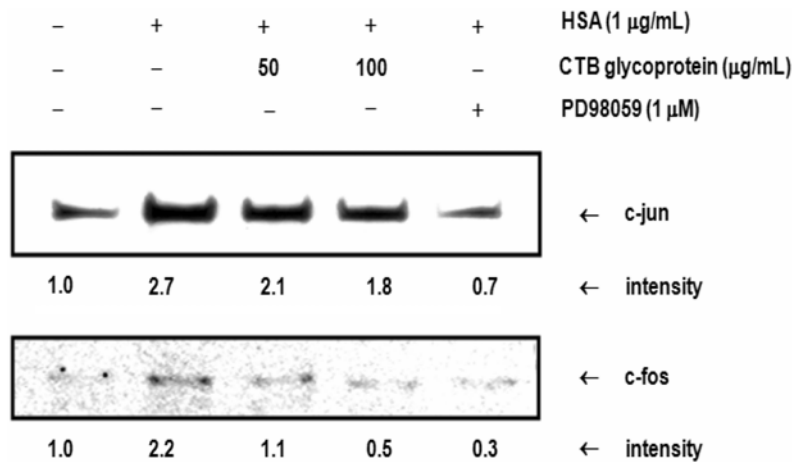


Fig. 4. Inhibitory effect of CTB glycoprotein on activities of AP-1 (c-jun and c-fos) in HSA-treated RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were treated with HSA (1 µg/mL) or cotreated with the CTB glycoprotein (50-100 µg/mL) and PD98059 (1 µM) for 2 h. The relative intensities of bands were calculated using Scion Imaging Software (Scion Image Beta 4.02, Maryland, USA). The data represent triplicate experiments. Lane 1, control; lane 2, HSA alone; lane 3, 50 µg/mL CTB glycoprotein in the presence of HSA; lane 4, 100 µg/mL CTB glycoprotein in the presence of HSA; lane 5, PD98059 in the presence of HSA.

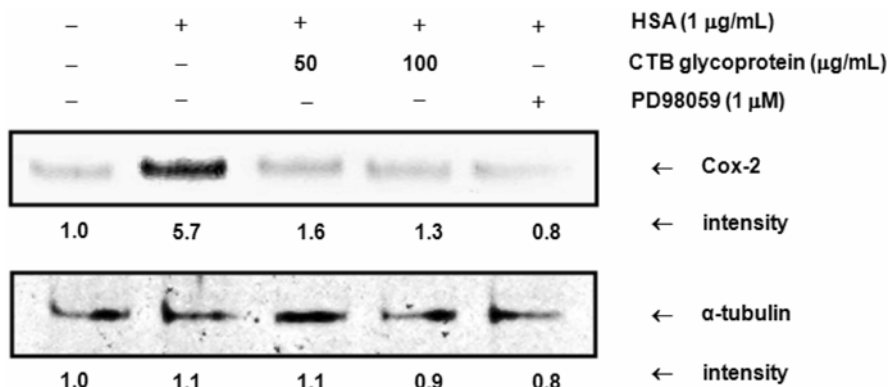


Fig. 5. Inhibitory effect of CTB glycoprotein on COX-2 expression in HSA-treated RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were treated with HSA (1 µg/mL) or cotreated with the CTB glycoprotein (50-100 µg/mL) and PD98059 (1 µM) for 2 h. The relative intensities of bands were calculated using Scion Imaging Software (Scion Image Beta 4.02, Maryland, USA). The data represent triplicate experiments. Lane 1, control; lane 2, HSA alone; lane 3, 50 µg/mL CTB glycoprotein in the presence of HSA; lane 4, 100 µg/mL CTB glycoprotein in the presence of HSA; lane 5, PD98059 in the presence of HSA.

관련한 인자들의 AP-1 결합부위에 결합하여 전사(transcription)를 유발하는 전사인자이다. 비만 세포내에서 ROS나 MAPK와 같은 protein kinase를 통해 염증성 신호매개자들인 COX-2 등의 유전자를 포함하여 다양한 cytokine, cell adhesion molecule, growth factor 등의 발현에 관여하는 유전자의 promoter나 enhancer의 c-jun이나 c-fos site에 결합함으로써 전사를 유도하는 것으로 알려져 있다(34,35). Fig. 4에서 보는 바와 같이, RBL-2H3 세포에 꾸지뽕 당단백질의 처리 없이 HSA(1 µg/mL)를 처리하고 4시간 경과 했을 때, 세포 핵 내에서의 c-jun과 c-fos의 활성화는 대조군에 비해 현저히 증가 했다(Fig. 4, lane 2). 이에 반해, RBL-2H3 세포에 50과 100 µg/mL의 꾸지뽕 당단백질을 HSA(1 µg/mL)와 함께 4시간 동안 처리한 후, 핵 내의 AP-1(c-jun과 c-fos)의 활성화는 처리된 꾸지뽕 당단백질의 농도에 비례하여 감소했다(Fig. 4, lanes 3 and 4). 한편, AP-1의 활성화는 MAPK의 인산화를 통해서 조절이 된 것인지 알기 위해, ERK1/2의 inhibitor인 PD98059(1 µM)을 HSA로 자극하기 30분 전에 처리하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이, RBL-2H3 세포에 HSA로 자극하기 30분전에 PD98059(1 µM)을 처리한 결과, c-jun과 c-fos의 핵 내의 활성화는 대조군에

비해 현저히 감소하였다(Fig. 4, lane 5). 이런 결과를 통해 꾸지뽕 당단백질은 MAPK의 인산화와 전사인자인 AP-1의 활성을 억제 시킴으로써 염증인자들의 발현을 조절하여 알레르기 염증 반응을 효과적으로 막는 역할을 한다는 것을 의미한다.

HSA가 처리된 RBL-2H3 세포에서 꾸지뽕 당단백질의 COX-2의 활성 억제 효과

꾸지뽕 당단백질이 COX-2 단백질의 활성을 조절할 수 있는지를 알아보기 위해, RBL-2H3 세포에 꾸지뽕 당단백질을 HSA(1 µg/mL)와 함께 처리한 후 전체 단백질을 분리하여 COX-2의 활성 변화를 western blot 방법을 통하여 알아보았다(Fig. 5). Fig. 5에서 보는 바와 같이, RBL-2H3 세포에 꾸지뽕 당단백질의 처리 없이 HSA(1 µg/mL)를 처리하고 4시간이 경과 했을 때, 세포 내에서의 COX-2의 활성화는 대조군에 비해 현저히 증가 했다(Fig. 5, lane 2). 이에 반해, RBL-2H3 세포에 50과 100 µg/mL의 꾸지뽕 당단백질을 HSA(1 µg/mL)와 함께 4시간 동안 처리한 후, 세포내의 COX-2의 활성화는 처리된 꾸지뽕 당단백질의 농도에 비례하여 감소했다(Fig. 5, lanes 3 and 4). 한편, COX-2의 활성화는 MAPK

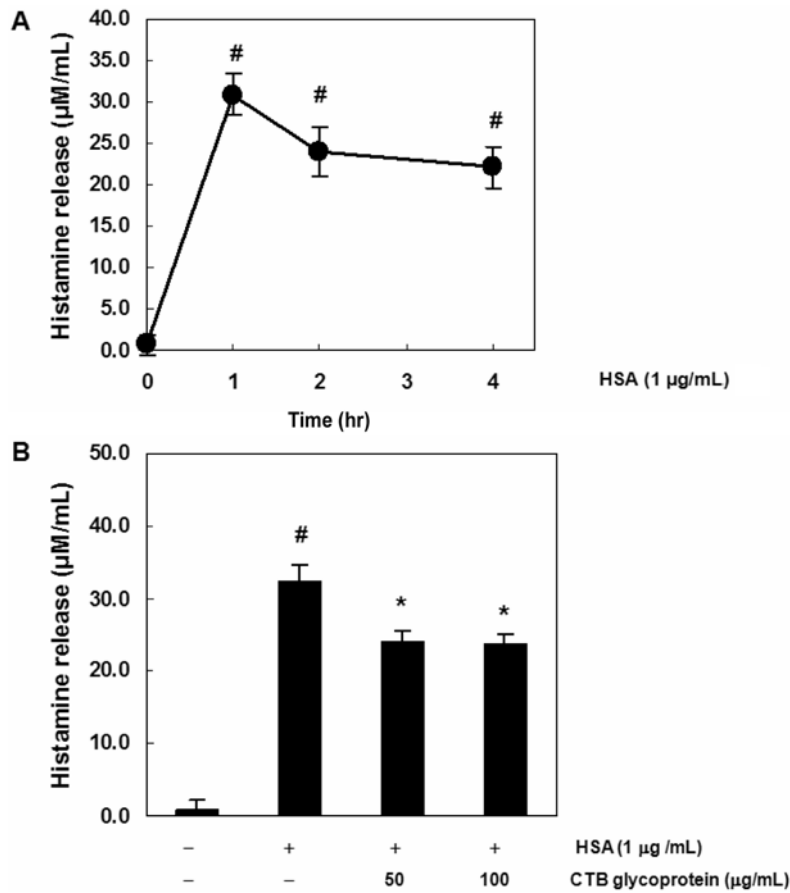


Fig. 6. Inhibitory effect of CTB glycoprotein on histamine release in HSA-treated RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were treated with HSA (1 µg/mL) or cotreated with the CTB glycoprotein (50-100 µg/mL). Data are the means±SD from triplicate experiments. #, a significant difference between treatments and control, $p < 0.05$. *, a significant difference between HSA treatment and the CTB glycoprotein treatment in the presence of HSA, $p < 0.05$.

의 인산화를 통해서 조절이 된 것인지 알기 위해, ERK1/2의 inhibitor인 PD98059(1 µM)을 HSA 로 자극하기 30분 전에 처리 하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, PD98059(1 µM)을 처리 후 COX-2의 활성은 대조군에 비해 현저히 감소하였다(Fig. 5, lane 5). 따라서 본 연구에서 얻어진 결과는 꾸지뽕 당단백질(100 µg/mL)이 세포내 신호전달 단백질인 MAPK의 인산화와 전사인자인 AP-1의 활성의 조절을 통한 염증 매개 인자인 COX-2 단백질 발현을 억제시킴으로써 항 알레르기 효과를 가지고 있음을 나타내고 있다.

HSA가 처리된 RBL-2H3 세포에서 꾸지뽕 당단백질의 histamine 억제 효과

비만세포의 활성화에 대한 탈 과립(degranulation)의 지표로서, histamine의 측정은 알레르기 억제물질의 생물활성 측정에 유용하게 사용되고 있다(5,6). 꾸지뽕 당단백질이 histamine 의 분비를 조절할 수 있는지를 알아보기 위해 RBL-2H3 세포에 꾸지뽕 당단백질을 HSA(1 µg/mL)와 함께 처리한 후 histamine의 분비량을 측정하였다. Fig. 6A에서 보는 바와 같이, RBL-2H3 세포에 꾸지뽕 당단백질의 처리 없이 HSA(1 µg/mL)를 시간별로 처리했을 때, histamine의 분비량은 대조군에 비해 1시간에서 30 µM 유의적으로 증가 했다(Fig. 6A). 이에 반해, RBL-2H3 세포에 50과 100 µg/mL의 꾸지뽕 당단백질을 HSA(1 µg/mL)와 함께 처리한 후 세포내의 histamine의 분비는 꾸지뽕 당단백질의 농도에 비례하

여 감소했다(Fig. 6B, lanes 3 and 4). 즉, RBL-2H3 세포에 50과 100 µg/mL의 꾸지뽕 당단백질을 HSA(1 µg/mL)와 함께 처리했을 때 histamine의 양은 각각 23.9 µM과 22.8 µM로 측정 되었다. 이러한 결과는 꾸지뽕 당단백질이 생체 내에 있는 비만세포의 막을 안정화시켜 histamine의 분비를 억제하는 것을 보여준다.

지금까지의 연구 결과를 종합해볼 때, 꾸지뽕 당단백질이 세포의 ROS 생성 및 ERK1/2의 인산화와 AP-1의 활성을 조절함으로써 프로스타글란딘류와 histamine 방출 제어를 통한 염증 신호 전달 기전을 억제할 수 있었다. 따라서 꾸지뽕 당단백질은 탁월한 천연 항산화제로써 비만세포의 활성화에 따른 염증 반응을 억제하고 체내의 면역기능 그리고 항상성 유지를 위한 유용한 물질로써 작용할 것으로 생각된다. 향후 꾸지뽕 당단백질의 항 알레르기 신호기전에 대한 분자생물학적인 연구로서 다른 염증성 매개 인자들인 tumor necrosis factor(TNF)-α, interleukin(IL)-1β, 그리고 IL-6 등의 발현 및 생성에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

요 약

본 연구는 꾸지뽕 나무 열매로부터 75 kDa의 당단백질(꾸지뽕 당단백질)을 추출한 후 꾸지뽕 당단백질의 첨가에 따른 알레르기성 염증 인자인 histamine 유리 억제능력 및 COX-2의 활성 억제 효과를 평가하였다. RBL-2H3세포를 22시간 동안 1gE로 감작시

킨 후, HSA를 처리하여 histamine의 유리양을 측정된 결과 꾸지뽕 당단백질을 처리한 농도가 증가함에 따라 histamine의 유리양과 COX-2의 활성 억제율은 증가하였다. 또한 꾸지뽕 당단백질의 처리는 HSA에 의해 유도된 세포내 ROS 생성량을 농도에 의존적으로 억제하였다. 한편 꾸지뽕 당단백질을 농도별로 처리하여 세포내 단백질을 추출하여 western blot을 실시한 결과 100 µg/mL 농도의 꾸지뽕 당단백질을 처리한 그룹에서 ERK 1/2, AP-1과 COX-2의 활성 수준은 현저히 억제 되었다($p < 0.05$). 따라서 이러한 결과에 미루어볼 때, 꾸지뽕 당단백질은 세포내 해독효소의 활성을 증가시킴으로써 ROS 수준을 감소시켰으므로 꾸지뽕 당단백질의 역할이 다른 천연물 유래의 당단백질과 마찬가지로 특이적인 항산화 능력을 지니고 있음을 나타내며 histamine의 유리억제와 COX-2의 활성이 억제되었을 것으로 생각된다. 이는 꾸지뽕 당단백질이 항 알레르기 효능을 갖는 물질로써 알레르기성 비염, 아토피 등과 같은 알레르기 관련 질환의 예방 및 치료제로 사용될 수 있을 것 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

문헌

1. Metcalfe DD, Kaliner M, Donlon MA. The mast cell. *Crit. Rev. Immunol.* 3: 23-74 (1981)
2. Ahn K. Role of mast cells in allergic inflammation and innate immunity. *Korean J. Pediatr.* 47: 1137-1141 (2004)
3. Marshall JS. Mast cell responses to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 787-799 (2004)
4. Nadler MJ, Matthews SA, Turner H, Kinet JP. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor FcεRI: Coupling form to function. *Adv. Immunol.* 76: 325-355 (2000)
5. Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cells in innate immunity. *Immunol. Rev.* 173: 131-140 (2000)
6. Petersen LJ, Mosbech H, Skov PS. Allergen-induced histamine release in intact human skin *in vivo* assessed by skin microdialysis technique: Characterization of factors influencing histamine releasability. *J. Allergy Clin. Immun.* 97: 672-679 (1996)
7. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7563-7568 (1999)
8. Moon TC, Murakami M, Ashraf MD, Kudo I, Chang HW. Regulation of cyclooxygenase-2 and endogenous cytokine expression by bacterial lipopolysaccharide that acts in synergy with c-kit ligand and Fc epsilon receptor I crosslinking in cultured mast cells. *Cell. Immunol.* 185: 146-152 (1998)
9. Waldeck B. Beta-adrenoceptor agonists and asthma--100 years of development. *Eur. J. Pharmacol.* 445: 1-12 (2002)
10. Assanasen P, Naclerio RM. Antiallergic anti-inflammatory effects of H1-antihistamines in humans. *Cl. Aller. Im.* 17: 101-139 (2002)
11. Chen S, Gong J, Liu F, Mohammed U. Naturally occurring polyphenolic antioxidants modulate IgE-mediated mast cell activation. *Immunology* 100: 471-480 (2000)
12. Moreira MR, Kanashiro A, Kabeya LM, Polizello AC, Azzolini AE, Curti C, Oliveira CA, T-do Amaral A, Lucisano-Valim YM. Neutrophil effector functions triggered by Fc-gamma and/or complement receptors are dependent on B-ring hydroxylation pattern and physicochemical properties of flavonols. *Life Sci.* 81: 317-326 (2007)
13. Lee JY, Lee YD, Bahn JW, Park HS. A case of occupational asthma and rhinitis caused by Sanyak and Korean ginseng dusts. *Allergy* 61: 392-393 (2006)
14. Ooi VE, Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr. Med. Chem.* 7: 715-729 (2000)
15. Oh PS, Lim KT. HeLa cells treated with phytyglycoprotein (150 kDa) were killed by activation of caspase 3 via inhibitory activities of NF-kappaB and AP-1. *J. Biomed. Sci.* 14: 223-232 (2007)
16. Lee SJ, Lim KT. 150 kDa Glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* Linne stimulates caspase-3 activation and reduces inducible nitric oxide production in HCT-116 cells. *Toxicol. In Vitro* 20: 1088-1097 (2006)
17. Oh PS, Lee SJ, Lim KT. Glycoprotein (116 kD) isolated from *Ulmus davidiana* Nakai protects from injury of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)-treated BNL CL2 cells. *Pharmacol. Rep.* 58: 67-74 (2006)
18. Lee SJ, Lim KT. Inhibitory effect of 30-kDa phytyglycoprotein on expression of TNF-alpha and COX-2 via activation of PKCalpha and ERK 1/2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 317: 151-159 (2008)
19. Oh PS, Lim KT. Protective activity of 30 kDa phytyglycoprotein from glucose/glucose oxidase-induced cell death in primary cultured mouse thymocytes. *Environ. Toxicol. Phar.* 25: 114-120 (2008)
20. Lee CB. *Dehan Shikmul Dogam* (A pictorial book of the Korean flora). Hyang Moon Co., Seoul, Korea. p.285 (1985)
21. Jang IM. In *Treatise on Asian Herbal Medicines*. Natural Products Science National University Press, Seoul, Korea. P.7 (2003)
22. Chang CH, Lin CC, Hattori M, Namba T. Effects of anti-lipid peroxidation of *Cudrania cochinchinensis* var. gerontogea. *J. Ethnopharmacol.* 44: 179-185 (1994)
23. An RB, Sohn DH, Kim YC. Hepatoprotective compounds of the roots of *Cudrania tricuspidata* on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 838-840 (2006)
24. Joo HY, Lim KT. Glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* Bureau inhibits iNO and COX-2 expression through modulation of NF-kB in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Environ. Toxicol. Phar.* 27: 247-252 (2009)
25. Neville Jr DM, Glossmann H. Molecular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunits by discontinuous gel electrophoresis in dodecyl sulfate. *Method Enzymol.* 32: 92-102 (1974)
26. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63 (1983)
27. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Bio. Med.* 27: 612-616 (1999)
28. Lowry OH, Rosebrough NT, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
29. Shore PA, Burkhalter A, Cohn VH. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 127: 182-186 (1959)
30. Wolfreys K, Oliviera D. Alterations in intracellular reactive oxygen species generation and redox potential modulate mast cell function. *Eur. J. Immunol.* 27: 297-306 (1997)
31. Gushchin I, Petyaev I, Tsinkalovsky O. Kinetics of oxygen metabolism indices in the course of histamine secretion from rat mast cells. *Agents Actions* 30: 85-88 (1990)
32. Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem. Sci.* 25: 7-9 (2000)
33. Kim SJ, Jeong HJ, Moon PD, Myung NY, Kim MC, Kang TH, Lee KM, Park RK, So HS, Kim EC, An NH, Um JY, Kim HM, Hong SH. The COX-2 inhibitor SC-236 exerts anti-inflammatory effects by suppressing phosphorylation of ERK in a murine model. *Life Sci.* 81: 863-872 (2007)
34. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4: 131-136 (2002)
35. Lee YN, Tuckerman J, Nechushtan H, Schutz G, Razin E, Angel P. c-Fos as a regulator of degranulation and cytokine production in FcepsilonRI-activated mast cells. *J. Immunol.* 173: 2571-2577 (2004)