

조절 T세포에 미치는 梔子の 효과

서 산, 정희재, 정승기
경희대학교 한의과대학 폐계내과학 교실

Research on the Effect of *Gardeniae Fructus* on Regulatory T Cell Stimulation

San Seo, Hee-jae Jung, Sung-ki Jung

Division of Allergy, Immune & Respiratory System,
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Objectives : Regulatory T cells can reduce inflammation and allergic reactions through their inhibitory functions. *Gardeniae Fructus*(GF) is a Heat-clearing herb used in traditional Korean medicine, and a wide range of studies on its anti-inflammatory effects are being carried out. The authors investigated the effect that *Gardeniae Fructus* has on regulatory T cells.

Methods : The authors screened 14 herbs for their effects on regulatory T cells. 100mg of each herb were separately dissolved in 1ml of sterile saline and the supernatant was harvested after 10 minutes of centrifuge at 15,000 rpm. The supernatant was filtered through a 0.2 µm syringe filter, and the resulting stock was refrigerated at 4°C. The stock was diluted before testing and used at a final concentration of 0.01µg/ml.

CD4+CD25+ T cells from healthy BALB/c spleens were used as natural regulatory T cells (nTreg), and CD4+CD25- T cells were used as reactive T cells.

CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells were activated with anti-CD3e (10µg/ml)/anti-CD28 (1µg/ml) and cultured. IL-10 from supernatant of the culture medium was measured by IL-10 cytokine ELISA. The percentages, cell numbers, phenotype and function of CD4+CD25+ Treg cells were determined by flow cytometry.

Results : *Gardeniae Fructus* was shown to be the most potent herb among the 14 herbs tested for suppressing CD4+CD25- reactive T cell proliferation by stimulating CD4+CD25+ natural regulatory T cells. *Gardeniae Fructus* induces IL-10 secretion increase by stimulating CD4+CD25+ natural regulatory T cells, and indirectly suppresses CD4+CD25- reactive T cell proliferation through increasing CD25 (IL-2 receptor α) expression and thus promoting bonding with IL-2. *Gardeniae Fructus* did not directly affect CD4+CD25- reactive T cell proliferation.

Conclusions : *Gardeniae Fructus* suppressed reactive T cell proliferation through inducing increases in IL-10 secretion and CD25 (IL-2 receptor α) expression.

Key words : *Gardeniae Fructus*, Regulatory T cells

1. 서론

알레르겐에 의해 반응이 일어나면, CD4+T세포,

CD8+T세포, NK T세포 등 다양한 T세포가 관여하게 되며¹, CD4+T세포 중 Th2 세포가 Th1 세포보다 우세하여 Th1 사이토카인인 IFN-γ 생산이 억제되고 Th2 사이토카인인 IL-4의 생산이 증가되는 것이 IgE의 생산을 조절 하는 중요한 역할을 한다². 이러한 Th1 세포나 Th2 세포와 다르게 IgE 생성에 대한 억제능력을 가진 소수의 T세포 아형

· 교신저자: 정희재 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 부속한방병원 한방5내과 의사실
TEL: 02-958-9147 FAX: 02-958-9148
E-mail: hanfish@khmc.or.kr

의 발견이 1970년대부터 있었고³, 최근 수 년 전부터 조절 T세포라 명명되어, 그 역할에 대한 연구가 진행되고 있다¹.

조절 T세포는 자가 항체에 대해 면역학적으로 반응하지 않도록 하고 과도한 면역반응을 억제하는 데 중요한 역할을 한다. 조절 T세포가 결핍되면, 마우스의 경우 자가 면역질환, 염증성 장 질환, 종양 거부 반응을 나타내게 된다⁴. 또한 조절 T세포가 과잉 시에는 알레르기 반응이 억제되며, 장기 이식에 관용을 보이며, 골수이식 후 거부반응을 예방하고, 태아-모체 면역관용을 증진시킨다⁵.

본 연구는 한의학에서 淸熱解毒, 淸熱燥濕, 發散風寒, 活血祛瘀 등의 효능이 있는 약재들이 항염증 또는 항알레르기 효과를 내는 과정에서 CD4+CD25+조절 T세포에 작용할 수 있을 것이라는 가설아래 약물 스크리닝을 진행한 결과, 14종의 약물(Table 1)중 梔子가 CD4+CD25+조절 T세포를 통한 CD4+CD25- 반응 T세포의 증식억제 효과가 가장 우수하였다.

梔子(Gardeniae Fructus)의 性味는 苦, 寒 하고 心, 肝, 肺, 胃, 腎, 膀胱經으로 들어가며, 淸熱瀉火 除煩, 瀉熱利濕, 養血止血, 消腫止痛 등의 효능을 나타내며 황달이나 淋病, 消渴, 目赤, 咽痛, 吐血, 衄血, 血痢, 熱毒瘡瘍 등에 사용된다⁶.

梔子에 대한 연구로는 항균 효과에 관한 연구⁷, 기억력 개선 효과에 대한 연구⁸, 결핵균 외의 기타 Mycobacteria에 대한 항균 작용⁹, 藥物性 肝障害에 대한 보호 효과¹⁰, 항염 및 진통 완화 효과¹¹, 피부 투과 및 항염 효과¹², 항산화 활성성분에 관한 연구¹³, monoamine oxidase 저해활성¹⁴, 간암에서의 apoptosis 작용¹⁵ 등이 있었다. 최근 들어 梔子가 배양된 human umbilical vein endothelial cells(HUVECs)에서 NO를 통하여 endothelial exocytosis를 억제함으로써 항염 효과를 나타낸다는 연구가 있었고¹⁶, 梔子の 에탄올 추출물은 carrageenan-induced rat paw edema에서 항염 작용을 나타낸다는 연구도 있었다¹⁷. 이러한 梔子에 대한 다양한 연구 중에서, 조절 T세포

와 관련된 연구는 없었으므로, 이에 저자는 梔子の CD4+CD25+조절 T세포에 미치는 영향을 세포 분화 및 IL-10 분비량 등의 실험을 통하여 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 이용한 약물들은 Sunten 제약(Taipei, Taiwan)으로부터 구입하였다. 100mg의 약물분말을 1ml의 멸균 증류수에 녹인 후 15,000rpm에서 10분 동안 원심 분리해 상층액을 취하였다. 이를 0.2µm의 syringe filter로 여과하여 stock을 만들어 4°C 냉장고에 보관 후 실험하기 전에 희석하여 최종농도 0.01µg/ml로 사용하였다.

Table 1. Herbs used for screening

| | Herbals | Concentration |
|------|---------------------------------|---------------|
| 薑 黃 | Curcumaе Rhizoma(CR) | 0.01µg/ml |
| 決明子 | Cassiae Semen(CS) | 0.01µg/ml |
| 桃 仁 | Persicae Semen(PS) | 0.01µg/ml |
| 蔓荊子 | Viticis Fructus(VF) | 0.01µg/ml |
| 牡丹皮 | Moutan Radicis Cortex (MRC) | 0.01µg/ml |
| 射 干 | Belamcanda Chinensis (BC) | 0.01µg/ml |
| 桑 葉 | Mori Folium(MF) | 0.01µg/ml |
| 辛 夷 | Magnoliae Liliflorae Flos (MLF) | 0.01µg/ml |
| 連 翹 | Forsythiae Fructus(FF) | 0.01µg/ml |
| 五倍子 | Galla Rhois(GR) | 0.01µg/ml |
| 龍膽草 | Gentianae Scabrae Radix (GSR) | 0.01µg/ml |
| 益母草 | Leonuri Herba(LH) | 0.01µg/ml |
| 紫花地丁 | Violae Herba(VH) | 0.01µg/ml |
| 梔 子 | Gardeniae Fructus(GF) | 0.01µg/ml |

2) 실험동물

본 실험에 사용한 흰쥐는 생후 6~8주령 (몸무게 20~25g)으로 수컷 BALB/c 를 Charles River Korea (Sungnam, Korea)로부터 구입하였다. 일부 실험에는 FoxP3-EGFP부착 BALB/c(The Jackson laboratory, USA) 마우스를 사용하였다. 동물이 사육되고 있는 동물 실험실 내 면역무균실은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10 %의 환경을 유지하는 청결한 조건으로 08:00부터 20:00까지 12시간 간격으로 명암조절 하였다. 또한 동물에게 멸균고형사료와 음용수는 무제한 공급하였다. 본 연구는 경희대학교 동물실험위원회에서 승인한 동물실험계획서 (KHUASP(SE)-09-024)에 준하여 시행되었다.

2. 실험 방법

1) 림프구 분리

건강한 BALB/c 비장을 적출하여 멸균된 주사기로 파쇄한 후 cell strainer(BD Biosciences, USA)로 걸러 내었다. Lysing buffer(BD Biosciences, USA)를 이용하여 적혈구를 제거한 후 CD4+CD25+ T 세포와 CD4+CD25- T 세포를 분리하기 위하여 CD4+CD25+ regulatory T cell isolation kit(Milteny iBiotec GmbH, Germany)를 이용하여 자기장세포분리법을 통하여 분리하였다. 양성 선택법으로 CD4+T세포를 획득한 후, CD25에 PE-labeled anti-CD25mAb (Milteny iBiotec GmbH, Germany)와 anti-PE microbeads(Milteny iBiotec GmbH, Germany)를 각각 부착하여 음성 선택법으로 CD4+CD25+ T 세포와 CD4+CD25- T 세포를 각각 분리하였다. 분리된 CD4+CD25+ T 세포는 자연유발 조절 T 세포(nTreg)으로, CD4+CD25- T 세포는 반응 T 세포로 사용하였다.

2) 세포 배양배지와 항체

본 실험에 사용된 배양배지는 10% 우태아혈청 포함(fetal bovine serum, FBS), 1% penicilin/streptomycin, anti-CD28(clone:37.51, BD Biosciences, USA) 1µg/ml, 유전자 재조합 인형 IL-2(rIL-2, BD Biosciences, USA) 1000U/ml를 포함한 RPMI1640를

사용하였다. 배양은 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 실험에 사용된 cluster는 96well cell culture round bottom plate(Corning, NY, USA)에 anti-CD3e(clone:145-2C11, BD Biosciences, USA) 10µg/ml를 4°C 밤새 코팅하여 사용하였다.

3) 자연유발 조절 T 세포 (nTreg) 의 조절기능 강화 약물 탐색

5×10⁴개의 CD4+CD25+자연유발 조절 T 세포(nTreg)을 anti-CD3e (10µg/ml)/anti-CD28 (1µg/ml)과 여러 가지 약물로 1주일간 처리 한 후 동일수의 CD4+CD25- 반응 T 세포를 첨가하여 5일간 Co-Culture하였다. 자연유발 조절 T 세포의 증식 억제 기능은 CD4+ 세포의 분화된 정도로 측정되었다. 모든 샘플은 duplicate 하였다.

4) CFSE 염색

CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit(Invitrogen, USA)를 이용하여 CD4+CD25- T 세포를 염색하였다. PBS를 미리 37°C 로 예열한 후 5×10⁴/ml 의 CD4+CD25- T 세포를 10µM CFSE에서 15분간 37°C에서 배양하였다. 신선한 PBS로 행군 후 다시 미리 37°C 로 예열한 배양액에서 30분간 추가로 배양하고 다시 PBS로 행구었다.

5) 유세포 분석

FoxP3-EGFP부착 BALB/c 마우스에서 분리한 5×10⁴개의 CD4+CD25+자연유발 조절 T 세포(nTreg)를 PE-anti-CD25 항체로 세포표면염색 하였다. 염색한 세포를 anti-CD3e/anti-CD28로 자극하며 梘子 (0.01µg/ml) 가 있거나 또는 없는 환경에서 1주일간 배양하여 GFP와 CD25 발현량을 유세포 분석을 통하여 측정하였다. 염색된 세포는 CellQuest 프로그램이 설치된 FACS Calibur (BD Biosciences, USA)로 분석하였다.

6) 梘子가 CD4+CD25- 반응 T 세포의 분화에 미치는 영향 측정

CD4+CD25- 반응 T 세포를 CFSE로 염색한 후 5일간 anti-CD3e/ anti-CD28로 자극하며 梘子 0.01 µg/ml가 있거나 또는 없는 환경에서 1주일간 배양

하여 梔子が CD4+CD25- 반응 T 세포의 분화에 미치는 영향을 유세포 분석을 통하여 측정하였다. 염색된 세포는 CellQuest 프로그램이 설치된 FACSCalibur (BD Biosciences, USA)로 분석하였다.

7) Cell proliferation 측정

CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega, USA) kit를 사용하였다. CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent를 37°C 수조에서 10분간 완전히 녹여 준비 하였다. 96well plate에 샘플 100 μ l을 넣고 준비한 CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent 20 μ l를 첨가하였다. 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 흡광도를 Tecan Genios Plus plate reader(Tecan, Switzerland)를 이용하여 490nm에서 측정하였다.

8) IL-10분비량 측정

세포배양액의 상층액에서 IL-10 cytokine ELISA를 위해 IL-10 ELISA(BD Biosciences, USA) kit를 사용하였다. 제조사의 protocol을 이용하되 capture antibody를 coating buffer(0.2M sodium phosphate)로 희석하여 96-well plate에 100 μ l씩 분주한 후 4°C에 over night 코팅하였다. 코팅한 plate를 wash buffer(PBS/Tween20, 0.05%)로 3번 세척한 후 Assay Diluent를 200 μ l/well 씩 분주한 후 실온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 다시 wash buffer로 3번 세척하고 Standard와 시료를 100 μ l 씩 분주한 후 실온에서 2시간 반응 시켰다. Wash buffer로 5번 세척하고 Working Detector(Detection antibody + SAv-HRP) 100 μ l씩 각 well에 첨가한 후 실온에서 1시간 반응 뒤 wash buffer로 7번 세척한 후 Substrate Solution(TMB Substrate Reagent; BD Biosciences, USA) set을 각 well 마다 100 μ l씩 첨가하였다. 그 뒤 실온의 어두운 곳에서 30분 동안 반응한 후 50ml의 2N 황산을 첨가 한 후 30분 안에 흡광도를 450nm에서 Tecan Genios Plus plate reader (Tecan, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

9) 통계처리 방법

각 집단 간의 통계학적 분석은 PRISM 4.0

(GraphicPad Software Inc., USA) 프로그램을 이용하였다. 각 집단 간 측정치의 비교는 Student's t-test를 시행하였고, 전체 실험의 통계적인 유의성은 신뢰구간 p<0.05에서 인정하였다.

III. 결 과

1. 자연유발 조절 T세포(nTreg)의 조절 기능 강화 약물 탐색 결과

CD4+CD25+자연유발 조절 T세포(nTreg) 기능 강화 약물 탐색 실험에서 총 14종류의 약물 중 梔子(GF)가 CD4+CD25+자연유발 조절 T세포에 작용하여 CD4+ CD25- 반응 T세포의 증식을 가장 강하게 억제하는 것으로 나타났다.

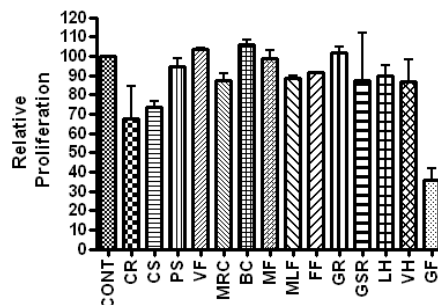


Fig. 1. Anti-proliferative effect of herbals to CD4+CD25- cells through CD4+CD25+ cell stimulation.

CD4+CD25+ cells were cultured in the presence or in the absence of each herbal medicine (0.01 μ g/ml) for 1 week. After 1 week culture, CD4+CD25- cells(5×10^4 /well) were added to prepared CD4+CD25+ cells. Two kinds of cells were co-cultured for 5 days. Cells were activated by anti-CD3e(10 μ g/ml)/anti-CD28(1 μ g/ml). Proliferation of cells were determined by MTS.

2. 梔子が 자연유발 조절 T 세포의 증식에 미치는 효과

CD4+CD25+자연유발 조절 T세포를 梔子和 함께 또는 없이 1주일간 anti-CD3e(10 μ g/ml)/anti-CD28

(1 μ g/ml)로 자극배양 하였다. 배양한 CD4+ CD25+ 자연유발 조절 T세포에 비장에서 분리한 신선한 CD4+CD25- 반응 T세포에 넣어 5일간 Co-culture 하였다. 梔子 (0.01 μ g/ml)가 있는 환경에서 배양한 CD4+CD25+자연유발 조절 T세포가 梔子 없이 배양한 CD4+CD25+자연유발 조절 T세포보다 유의성 있게 CD4+CD25- 반응 T세포의 증식을 억제 하였다(p < 0.01).

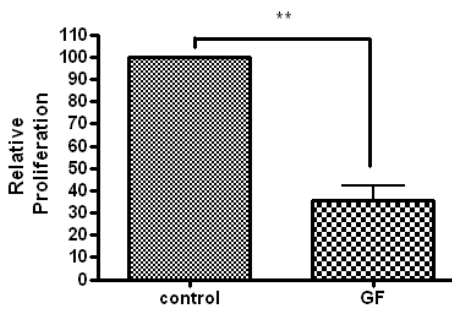


Fig. 2. The effect of GF on activating CD4+CD25+ T cells to down-regulate proliferation of CD4+CD25- T cells.

CD4+CD25+ cells were cultured in the presence or in the absence of GF for 1 week. After 1 week culture, CD4+CD25- cells(5 \times 10⁴/well) were added to prepared CD4+CD25+ cells. Two kinds of cells were co-cultured for 5 days. control; Cells were incubated in medium without GF extract as control. GF; Cells were incubated in medium containing GF (0.01 μ g/ml) extract. Proliferation of cells were determined by MTS. Asterisks indicate statistical significance. (** : p < 0.01)
GF : Gardeniae Fructus

3. 梔子가 조절 T세포 (nTreg)의 CD25 (IL-2Ra) 발현량에 미치는 효과

마우스에서 분리한 CD4+CD25+자연유발 조절 T세포를 梔子和 함께 또는 없이 5일간 culture 후 CD25의 발현량을 유세포 분석을 통해 측정하였다. 측정결과 梔子和 함께 배양된 자연유발 조절 T세포(nTreg)에서 梔子 없이 배양한 군에 비하여 CD25(IL-2Ra)의 발현량이 증가하는 것으로 나타났다.

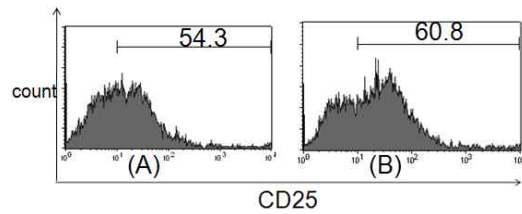


Fig. 3. The effect of GF on up-regulating CD25 expansion of CD4+CD25+ T cells.

CD4+CD25+ cells(5 \times 10⁴/well) were cultured in the presence or in the absence of GF for 1 week. Cells were activated by anti-CD3e(10 μ g/ml)/anti-CD28(1 μ g/ml). Cell numbers and phenotype of CD4+CD25+ T cells were determined by flow cytometry. (A) CD4+CD25+ T cells in the absence of GF. (B) CD4+CD25+ T cells in the presence of GF (0.01 μ g/ml).
GF : Gardeniae Fructus

4. 梔子가 자연유발 조절 T세포 (nTreg)의 Foxp3 발현량에 미치는 효과

FoxP3-EGFP부착 BALB/c 마우스에서 분리한 CD4+CD25+자연유발 조절 T세포를 梔子和 함께 혹은 없이 5일간 culture 후 FoxP3의 발현량을 유세포 분석을 통해 측정하였다.

측정결과 梔子是 CD4+CD25+자연유발 조절 T세포의 FoxP3 발현에 영향을 미치지 않았다.

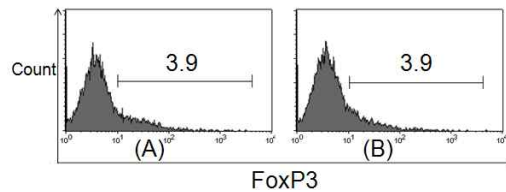


Fig. 4. The effect of GF on Foxp3 expansion in CD4+CD25+ T cells.

CD4+CD25+ cells(5 \times 10⁴/well) were cultured in the presence or in the absence of GF for 1 week. Cells were activated by anti-CD3e(10 μ g/ml)/anti-CD28(1 μ g/ml). Cell numbers and phenotype of CD4+CD25+ T cells were determined by flow cytometry. (A) CD4+CD25+ T cells in the absence of GF. (B) CD4+CD25+ T cells in the presence of GF (0.01 μ g/ml).
GF : Gardeniae Fructus

5. 梔子が CD4+CD25⁻세포의 분화에 미치는 효과
 梔子が CD4+CD25⁻ 세포의 분화에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 CD4+CD25⁻ T세포를 CFSE로 염색한 후 梔子和 함께 혹은 없이 anti-CD3e/anti-CD28로 자극하며 5일간 배양한 후 유세포 측정기를 이용하여 세포 분열을 분석하였다. 실험결과 梔子は CD4+CD25⁻ T세포 증식을 직접적으로 억제하지 않았다.

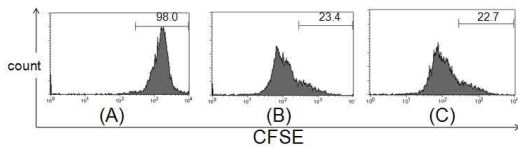


Fig. 5. The effect of GF on proliferation in CD4+CD25⁻ T cells.

Cells were activated by anti-CD3e(10µg/ml)/anti-CD28(1µg/ml). Cell numbers and phenotype of CD4+CD25⁻ T cells were determined by flow cytometry. (A) CFSE-labeled CD4+CD25⁻ cells (day0). (B) CFSE-labeled CD4+CD25⁻ cells in the absence of GF (day5). (C) CFSE-labeled CD4+CD25⁻ cells in the presence GF(0.01µg/ml) (day5).

GF : Gardeniae Fructus

6. ELISA를 이용한 梔子が IL-10분비량에 미치는 효과

CD4+CD25⁺자연유발 조절 T세포를 梔子和 함께 또는 없이 1주일간 anti-CD3e(10µg/ml)/anti-CD28(1µg/ml)로 자극배양 하였다. 배양한 CD4+CD25⁺자연유발 조절 T세포에 비장에서 분리한 신선한 CD4+CD25⁻ 반응 T세포에 넣어 5일간 Co-culture 하였다. 세포배양 후 배양배지의 상층액을 수집해 효소면역측정법으로 IL-10 분비량을 측정하였다.

梔子(0.01µg/ml) 함께 배양한 CD4+CD25⁺자연유발 조절 T세포에서 대조군에 비해 IL-10분비가 3.2배 증가하였다.

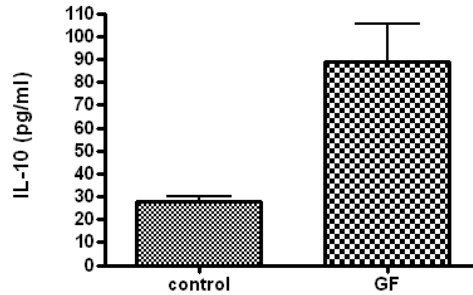


Fig. 6. The effect of GF on IL-10 secretion.

Supernatant from same experiment with Fig 2, medium of CD4+CD25⁺ cells & CD4+CD25⁻ cells. were used for IL-10 ELISA. control; Cells were incubated in medium without GF extract as control. GF; Cells were incubated in medium containing GF (0.01µg/ml) extract.
 GF : Gardeniae Fructus

IV. 고찰

T세포는 thymus-derived lymphocyte, thymus-dependent lymphocyte 또는 thymus-processed lymphocyte에서 유래된 말이다. T세포는 면역학적으로 세포성 면역(cell-mediated immunity)을 담당하며, 지연성 과민반응에 관여한다. 또한 B세포와의 협동작용을 하여 면역기능을 활성화 시키고, 면역학적 기억력을 갖기도 하고, 직접 항원에 작용하기도 한다¹⁸.

알레르겐에 대한 반응에는 CD4+T세포, CD8+T세포, NK(natural killer) T세포 등 여러 다른 종류의 T세포가 관여한다. 이들 중에서 CD4+T세포가 작동세포로서 가장 주된 역할을 한다¹. CD4+T세포 중에서 Th2 세포는 항원 제시 세포에 의해 제시되는 펩티드 항원을 인식함으로써, 알레르기 염증 반응을 시작하게 하는 결정적인 역할을 하며 Th1 세포도 알레르기 질환에서 염증의 단계에 따라서 작동세포로 작용한다¹⁹.

1970년대, Gershon에 의해 전형적인 T세포의 effector function을 제어할 수 있는 T세포의 존재 가능성이 suppressive T cell이라는 개념을 도입하

여, 처음으로 제시 되었다²⁰. 그 후 활발한 연구가 없었다가 1995년 Sakaguchi에 의해 CD25가 naturally occurring CD4⁺ regulatory T세포의 중요한 phenotypic marker로서 작용할 수 있음이 제시된 이래²¹, 면역 억제능력을 가지고, Th1 세포나 Th2 세포와는 다른 사이토카인을 생성하는 T세포에 대한 연구가 진행되면서, 조절 T세포(regulatory T cell)라고 명명되었고, 그 역할이 강조되고 있다¹. 그리고 지난 수년간의 조절 T세포 biology에 대한 연구를 통해 thymus에서 유래된 natural CD4⁺CD25⁺ 조절 T세포(Treg cell)의 발생 및 기능에 있어서 Forkheadbox P3(FOXP3 or Scurfin)라는 전사체(transcriptional factor)의 중요성이 밝혀졌다²²⁻²⁴. 그리고 CD4⁺CD25⁺ T세포 이외에도 Tr1 세포와 같이 phenotype 및 기능에 있어 다른 종류의 조절 T세포의 존재가 확인되었다²⁵.

조절 T세포의 종류는 생성되는 곳에 따라 크게 natural 조절 T세포와 adaptive (or inducible) 조절 T세포로 구분할 수 있다. Natural 조절 T세포의 경우 흉선에서 생성되며, 높은 수준의 CD25와 cytotoxic T lymphocyte antigen 4(CTLA 4)나 glucocorticoid-induced TNF receptor family related protein(GITR)과 같은 co-signaling molecules 및 Foxp3를 발현하고 있다. Natural 조절 T세포는 흉선에 존재하는 self antigen에 대해 specificity를 가지고 있으며 peripheral tolerance의 유지에 중요한 역할을 담당한다. 반면 induced 조절 T세포란 말초 조직에서 생성되거나 실험적으로 생성되는 조절 T세포를 말한다²⁵. Induced 조절 T세포의 종류에는 Tr1 세포(T regulatory 1 cell)와 Th3 세포(T helper 3 cell)가 있다. Tr1 세포는 주로 IL-10을 생성하고 TGF- β 를 생성하기도 하며, 항원 특이적이며(antigen-specific), 실험적으로 IL-10의 존재 하에 naive T세포에 항원자극을 주었을 때 생성된다²⁶. 이 외에도 다양한 형태의 조절 T세포들이 존재하는데, 아직까지 특정 subset을 정의할 수 있는 선택적 세포 표면 표식자가 발견되지 않았기 때문에 조절 T세

포를 구분하기 위해서 CD62L, CD3e8, CD103, GITR 및 CD45RB(low expression) 등의 선택적 세포 표면 표식자들이 제시되었으며²⁵, natural CD4⁺ 조절 T세포의 분화 및 유도에 있어서 전사 인자인 Foxp3가 결정적이라는 사실들이 밝혀짐에 따라²²⁻²⁴ Foxp3가 natural 조절 T세포에 대한 가장 효과적인 intracellular marker로 생각되고 있다. 그리고 natural T세포에 반해 induced T세포는 Foxp3를 표현하지 않는다고 알려져 왔으나, 최근에 마우스 작동 T세포로부터 Foxp3를 표현하는 T세포가 유도되었고, Th3 세포는 Foxp3를 표현하기도 하는 것이 밝혀졌다. Natural 조절 T세포의 비율은 전체 CD4⁺T세포의 5-10% 정도를 차지하고 있다⁴.

조절 T세포의 suppressive mechanism에 대해서는 in vitro 및 다양한 종류의 in vivo mouse model을 통해 규명되었는데, 크게 cell to cell contact에 의한 것과 immunosuppressive cytokine의 secretion을 통해 이루어지는 immune suppression으로 나눌 수 있다²⁵. Natural T세포는 주로 contact-dependent manner로 작용하며, induced T세포는 세포접촉에 의하기도 하지만²⁹, 주로 IL-10이나 TGF- β 를 통해 억제능력을 나타낸다²⁷.

CD4⁺CD25⁺ Treg 세포를 중심으로 한 일련의 연구들을 통해, self antigen에 대한 tolerance의 유도 및 autoimmunity의 방지에 있어서 natural 조절 T세포가 갖는 중요성이 잘 알려졌다²⁵.

CD25⁺cell depleted T세포 또는 CD25⁻ T세포를 T cell deficient nude mice에 adoptive transfer한 mice에서 다양한 종류의 자가 면역질환을 유발할 수 있다는 실험적 사실을 통해 natural 조절 T세포로 알려진 CD4⁺CD25⁺ T세포가 tolerance 및 자가 면역질환의 방지에 있어 중요하다는 사실이 밝혀진 것이다²⁸. 이를 이용하여, organ transplantation 및 autoimmunity의 방지 및 치료를 위한 여러 시도들이 수행되고 있다²⁵.

조절 T세포가 결핍되면, 마우스의 경우 자가면역질환, 염증성 장질환, 종양 거부 반응을 나타내

게 된다⁴. 또한 조절 T세포가 과잉 시에는 알레르기 반응이 억제되며, 장기이식에 관용을 보이며, 골수이식 후 거부반응을 예방하고, 태아-모체 면역 관용을 증진 시킨다⁵. Type I 당뇨, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 건선 등의 자가면역질환에 있어서도 Treg 세포의 결핍이나 억제 기능의 상실이 관여함이 밝혀졌다²⁹. Foxp3의 돌연변이 사람에게서 복수의 내분비기관들에서 자가면역질환 (type I 당뇨, 갑상선염 등)을 유발하는 IPEX(X-linked immunodeficiency syndrome)을 유발한다는 점이 알려졌는데^{30,31}, 이러한 것은 tolerance 및 자가 면역질환의 방지에 있어 CD4+CD25+Foxp3+ 조절 T세포의 중요함을 말해주고 있다.

조절 T세포는 병원성 감염에서도 작용을 하는데 pathogen derived antigen specific CD4+CD25+ Treg 세포의 존재는 Leishmania major(L. major)의 감염 시 감염 부위 내에 Treg 세포의 집중으로 기생충의 제거에 필요한 사이토카인을 분비하거나, effector T세포의 cytolytic function을 억제한다는 사실에서 처음 확인되었다^{32,33}.

Treg 세포는 항원특이 T세포의 priming뿐 아니라 T세포의 작동기능을 억제할 수 있음이 tumor model을 이용한 실험을 통해 증명되었다²⁵. CD4+CD25+ T세포의 제거를 위해 처리하는 anti-CD25 항체를 tumor inoculation 전 후에 처리하였을 때 tumor의 성장을 억제할 수 있으며, tumor associated antigen specific Treg 세포를 effector T 세포와 함께 adoptive transfer할 때 effector T세포의 adoptive transfer가 가지는 치료 효과가 떨어진다는 점³⁴은 T세포의 priming 및 effector function 단계에 있어 Treg 세포의 억제효과가 영향을 미친다는 점을 말해준다²⁵.

알레르기 질환에서 조절 T세포의 역할은 5가지 기전으로 생각되는데, 항원제시 세포의 억제, Th1 세포와 Th2 세포의 억제, 알레르겐 특이 IgE의 억제와 IgG4, IgA의 생성유도, 비만세포, 호염기구, 호산구의 억제, 그리고 remodeling에 관여하는 것²⁷

으로 모두 면역반응이나 염증반응을 억제하는 것이다. 조절 T세포는 기관지 천식에서 알레르겐 유도 염증 반응을 하향 조절하는 것으로 여겨지고 있으며, 최근에는 마우스 실험에서 기관지 과민성 등의 폐의 알레르기 반응성을 조절하는 데 있어 폐의 CD4+CD25+ 조절 T세포가 작용하며 이 작용은 IL-10과 TGF- β 의존성 반응이라는 보고가 있다³⁵. 그리고 우유 알레르기의 자연적인 면역 관용이 CD4+CD25+ 조절 T세포와 연관된다고 하며, 제대 혈내의 조절 T세포를 연구하여, 생후 1년 내에 계란 알레르기를 나타낸 환아와 계란 알레르기가 나타나지 않은 환아의 조절 T세포의 기능이 다르다고 보고된 바 있고³⁶, 고식적인 면역치료 후와 벌에 여러 번 노출된 후 벌 독에 대한 면역관용을 가지게 된 환자들에서 CD4+CD25+IL-10+ 조절 T세포가 유도되었다는 보고도 있다^{37,38}.

본 연구에서는 한의학에서 항염증 작용을 하거나 알레르기 질환에 많이 사용되는 淸熱解毒, 淸熱燥濕, 發散風寒, 活血祛瘀의 약성이 있는 약재들이 항염증 또는 항알레르기 효과를 내는 과정에서 CD4+CD25+ 조절 T세포에 작용하는 약재가 있을 것이라는 가설아래 CD4+CD25+ 조절 T세포에 영향을 주는 약물을 찾고자 먼저 약물의 T세포의 증식 억제 효과 스크리닝을 진행하였다. 14종의 약물 스크리닝(Table 1) 결과 梔子の CD4+CD25+조절 T세포를 통한 CD4+CD25- 반응 T세포의 증식억제가 가장 우수하였다.

梔子(Gardeniae Fructus)는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 梔子나무(*Gardenia jasminoides* Ellis)열매를 건조한 것이다. 9~11월에 과실이 성숙하여 紅黃色을 띠 때 채집하여 건조한다³⁹. 梔子の 性味는 苦, 寒 하고 心, 肝, 肺, 胃, 腎, 膀胱經으로 들어가며, 淸熱瀉火除煩, 瀉熱利濕, 養血止血, 消腫止痛 등의 효능을 나타내며 瘧疾이나 淋病, 消渴, 目赤, 咽痛, 吐血, 衄血, 血痢, 熱毒瘡瘍 등에 사용된다⁶. 우리나라에서는 南部地方에 栽植하고 있으며, 中國에서는 浙江, 江西, 湖南, 福建省이 主産地이다³⁹.

梔子の 주성분으로는 flavonoid, gardenin, pectin, tannin, crocin, *d*-mannitol, nonacosane, β -sitosterol 이외에 여러 종류의 iridoide 골격의 배당체 즉 gardenoside, geniposide(genipin-1-glucoside), genipin- β -*d*-gentiobioside 및 소량의 shanzhiside를 함유하고 또 gardoside, scandoside, methyl ester, choline 및 ursolic acid가 들어있다³⁹.

梔子は 항균·항바이러스 작용을 하는데 황색포도상구균, 수막염균, 임균 등에 대하여 억제 작용이 있고, 梔子の 물침출물은 여러 피부진균에 대해 억제 작용이 있고, 렙토스피라와 혈흡충의 성충에 대해 살충작용이 있다⁶. 梔子 알코올추출물, 물추출물, 에틸아세테이트분획 및 geniposide는 모두 일정한 소염 작용이 있는데 연부조직 손상에 대해 소염, 지통효과가 있으며, 이 외에도 梔子は 利膽 작용, 췌장 분비 촉진 작용, 진정·해열작용, 혈압 강하 작용, 간기능 보호작용, 瀉下 작용, 심근 수축 억제 작용을 한다⁶. 梔子에 대한 연구로는 천 등⁷의 內疎黃連湯 및 구성약물들의 항균활성에 관한 연구 중 梔子の 항균효과에 관한 보고가 있었고, 김 등⁸은 梔子の 기억력 개선 효과를 보고하였고, 최 등⁹은 梔子수용성 추출액의 결핵균 외의 기타 Mycobacteria에 대한 항균작용에 대해 보고하였으며, 김 등¹⁰은 한국산 梔子 엑스 및 Geniposide의 藥物性 肝障害에 대한 보호효과를 보고하였다. 또한 김 등¹¹은 梔子엑스 항염 및 진통완화효과, 양 등¹²은 梔子엑스제 피부투과 및 항염효과, 한 등¹³은 梔子の 항산화 활성성분에 관한 연구, 황 등¹⁴은 梔子 추출물의 monoamine oxidase 저해활성 효과를 보고하였으며 간암에서의 apoptosis 작용¹⁵ 등도 보고되었다. 최근 들어 梔子が 배양된 human umbilical vein endothelial cells(HUVECs)에서 NO를 통하여 endothelial exocytosis를 억제함으로써 항염 효과를 나타낸다는 연구가 있었고¹⁶, 梔子の 에탄올 추출물은 carrageenan-induced rat paw edema에서 항염 작용을 나타낸다는 연구도 있었다¹⁷.

조절 T세포와 관련된 약물 스크리닝(Table 1)에

서 梔子の 조절 T세포에 대한 강화 효능이 가장 높았다. 이에 梔子が 어떤 기전을 통하여 증식억제 기전을 나타내는지, 또한 CD4+CD25+조절 T세포, CD4+CD25- 반응 T세포 각각에 미치는 영향을 관찰하였다.

Treg의 여러 가지 다양한 작용은 4가지의 기본 기전으로 정리해 볼 수 있는데, 첫 번째로 면역억제 사이토카인인 IL-10 또는 TGF- β 를 분비하여 억제기능을 나타내며, 최근에 발견된 IL-35라는 새로운 사이토카인도 조절 T 세포의 억제기능에 필요한 것으로 알려졌다. 두 번째로 granzyme A나 granzyme B, perforin 에 의존한 세포용해작용에 의하며, 세 번째, 고친화력 CD25-의존성 사이토카인 결핍, cyclic AMP 의존성 억제, CD3e9나 CD73 에 의한 아데노신 수용체 2a의 활성화를 통한 억제와 같은 대사성 파괴에 의하며, 네 번째로 수지상 세포의 성숙과 기능의 억제에 의한다³.

梔子로 자극한 CD4+CD25+ 자연유발 T세포와 함께 배양한 CD4+CD25- T세포군이 梔子를 처리하지 않은 CD4+CD25+ 자연유발 조절 T 세포와 함께 배양한 CD4+CD25- T세포군에 비해 증식이 유의성 있게 억제되었다. 또한 동일 실험에서 세포 배양액의 상층액을 효소면역측정법으로 IL-10 분비량을 측정한 결과 梔子로 자극한 CD4+CD25+ 자연유발 T세포와 함께 배양한 CD4+CD25- T세포군이 梔子 처리하지 않은 군에 비하여 IL-10 분비량이 많았다.

IL-10은 중요한 anti-inflammatory cytokine이며, 다른 많은 pro-inflammatory cytokine을 억제할 수 있다⁴⁰. 또한 조절 T세포의 면역 억제 기능에 관여한다. IL-10은 dendritic cell 또는 macrophage에 작용하여, IL-12 및 TNF와 같은 cytokine의 생성 및 MHC class II의 expression, costimulatory molecules의 발현을 억제 한다²⁵. 즉 IL-10의 기본적인 기능은 항원에 의해 과도하거나 위험한 염증 반응을 예방하여 면역반응을 유지하는 것이다. 알레르기와 천식 모델에서 선천적이거나 유도된 조

절 T 세포가 IL-10을 통하여 질환을 완화시켰다⁴¹.

梔子 자극이 CD4+CD25+ 자연유발 T세포에 어떤 변화를 가져와 조절 능력이 강화된 것인지 알아보는 실험에서는 CD25(IL-2Ra) 와 Foxp3 발현 변화량을 측정하였다. 그 결과 梔子は 조절 T세포의 CD25(IL-2Ra)의 발현량을 증가시켜 CD4+CD25- 반응 T세포의 증식에 필요한 IL-2에 대해 조절 T세포가 강한 친화력을 갖게 하여서 CD4+CD25- 반응 T세포의 증식을 억제 하도록 하였다. 그러나 梔子 자극이 Foxp3 발현량을 증가시키지는 않았다.

이상의 결과로 보면 梔子は CD4+CD25+ 자연유발 조절 T세포에 작용하여, IL-10분비량을 증가시키고, CD25(IL-2 receptor α)의 발현량을 증가시켜 IL-2와의 결합력을 증가시킴으로서 CD4+CD25- 반응 T세포가 증식하는 것을 억제한 것으로 생각된다. 반면에 梔子は 직접적으로 CD4+CD25- 반응 T 세포의 증식에는 영향을 미치지 않았다.

조절 T세포는 세포성 면역을 일으키는 Th1이나 체액성 면역을 일으키는 Th2를 모두 억제한다. 그리고 알레르기 반응을 일으키는 IgE도 억제 한다²⁷. 이런 조절 T세포의 면역 억제 능력이 실제로 각각의 질환에서 치료에 어떤 영향을 미치는 지는 연구가 부족한 실정이다. 향후 다양한 질환에 있어서 조절 T세포의 면역 억제 기능 강화와 관련된 연구가 더 이루어진다면 천식이나 아토피 같은 다양한 질환에 梔子を 더 적극적으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

조절 T세포의 분비에 대한 梔子の 효과 연구를 위하여 CD4+CD25+ 조절 T세포를 이용하여, CD4+CD25- 반응 T세포의 증식과 IL-10의 분비량, 그리고 CD25+의 발현량을 분석한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 14개 약물 중 梔子が CD4+CD25+ T세포의 면역 억제 기능을 가장 많이 증가시켰다.
2. 梔子は CD4+CD25+ T세포에 의한 CD4+CD25- T세포 증식을 유의성 있게 억제하였다.
3. 梔子は CD4+CD25+ T세포의 IL-10 분비를 증가 시켰다.
4. 梔子は 대조군에 비하여 자연 유발 조절 T세포 (nTreg)의 CD25 (IL-2Ra)발현량을 증가시켰다.
5. 梔子は 대조군에 비하여 조절 T세포의 Foxp3 발현량을 증가시키지 않았다.
6. 梔子は 직접적으로 CD4+CD25- 반응 T 세포의 증식을 억제하지 않았다.

참고문헌

1. 송태원. 조절 T 세포에 대한 최신 지견. 소아알레르기 호흡기. 2008;18(4):276-82.
2. Romagnani S. Induction of Th1 and Th2 response : a key role for the natural immune response. Immunol Today. 1992;13:379-81.
3. McGeady SJ, Buckley RH. Depression of cell-mediated immunity in atopic eczema. J Allergy Clin Immunol. 1975;56:393-406.
4. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. Cell. 2008;133:775-87.
5. Ochs HD, Ziegler SF, Torgerson TR. Foxp3 acts as a rheostat of the immune response. Immunol Rev. 2005;20:156-64.
6. 김호철. 한약약리학. 서울: 집문당; 2001, p. 125-7.
7. 천승철, 지선영, 이상근. 내소황련탕 및 구성약물의 항균활성에 관한 실험적 연구. 대한본초학회지. 2004;19(4):51-60.
8. 김동현, 이승주, 윤병훈, 류중훈. 梔子の 기억력 개선효과. 경희약대논문집. 2005;33(1):39-44.
9. 최철순, 신승식, 정상인, 양용태. 梔子の 수용성 추출액의 결핵균 외의 기타 Mycobacteria에 대

- 한 항균작용. 대한미생물학회지. 1986;21(1):53-62.
10. 김경완, 정명현. 한국산 梔子 엑스 및 Geniposide의 藥物性 肝障害에 대한 보호효과. 생약학회지. 1994;25(4):368-81.
 11. 김미정, 남용옥, 양재현. 케토톨락과 梔子엑스 가수분해물 제제의 랫트에 대한 항염 및 진통완화효과. 대한구강보건학회지. 2004;28(4):464-72.
 12. 양재현, 이남희. 梔子 엑스의 가수분해에 의한 피부투과 및 항염효과. 약제학회지. 2004;34(2):115-23.
 13. 한용남, 오희경, 황금희, 이미순. 梔子の 항산화 활성성분에 관한 연구. 생약학회지. 1994;25(3):226-32.
 14. 황금희, 박태규. 梔子추출물의 Monoamine Oxidase 저해활성. 생약학회지. 2007;38(2):108-12.
 15. Kim BC, Kim HG, Lee SA, Lim S, Park EH, Kim SJ, Lim CJ. Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. Biochemical pharmacology. 2005;70(9):1398-407.
 16. Wang GF, Wu SY, Rao JJ, Lü L, Xu W, Pang JX, Liu ZQ, Wu SG, Zhang JJ. Genipin inhibits endothelial exocytosis via nitric oxide in cultured human umbilical vein endothelial cells. Acta Pharmacol Sin. 2009 May;30(5):589-96.
 17. Koo HJ, Lim KH, Jung HJ, Park EH. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. J Ethnopharmacol. 2006 Feb 20;103(3):496-500.
 18. 하대유. T세포와 면역학적 결손증. 대한피부과학회지. 1974;12(2):65-8.
 19. Romagnani S. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. J Allergy Clin Immunol. 2004;113:395-400.
 20. Gershon, R. K., Kondo, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocyte. Immunology. 1970;18:723-37.
 21. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains(CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune disease. J Immunol. 1995;155:1151-64.
 22. Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. Control of Regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 2003;299:1057-61.
 23. Fontent, J. D., Gavin, M. A., Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol. 2003;4:330-6.
 24. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. Nat Immunol. 2003 Apr; 4(4):337-42.
 25. 김광순, 강창율. Regulatory T cell and immunotherapy. Biowave. 2006;8(19).
 26. Woodfolk JA. T-cell responses to allergens. J Allergy Clin Immunol 2007;119:280-94.
 27. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy : Novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. J Allergy Clin Immunol 2005;116:961-8.
 28. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu Rev Immunol. 2004;22:531-62.
 29. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Nochy D, Debré P, Piette JC, Gorochov G. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. J Immunol. 2005 Dec 15;175(12):8392-400.
 30. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow

- ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome(IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001 Jan; 27(1):20-1.
31. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):18-20.
32. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* 2005 Apr;6(4):353-60.
33. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature.* 2002 Dec 5;420 (6915):502-7.
34. Antony PA, Piccirillo CA, Akpinarli A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, Palmer DC, Chan CC, Klebanoff CA, Overwijk WW, Rosenberg SA, Restifo NP. CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol.* 2005 Mar 1;174(5):2591-601.
35. Joetham A, Takada K, Taube C, Miyahara N, Matsubara S, Koya T, et al. Naturally occurring lung CD4(+)/CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF- β . *J Immunol.* 2007;178: 1433-42.
36. Smith M, Tourigny MR, Noakes P, Thornton CA, Tulic MK, Prescott SL. Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4(+)/CD25(+)/CD127(lo/-) regulatory T cell function. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;212 :1460-6.
37. Francis JN, Tills SJ, Durham SR. Induction of IL-10+CD+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 ;111:1255-61.
38. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin-10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest.* 1998;102:98-106.
39. 전국한외과대학 본초학교수 共編著. 본초학. 서울: 도서출판 영림사; 2008, p. 167-8.
40. Jeong ES, Won YS, Kim HC, Cho MH, Choi YK. Role of IL-10 deficiency in pneumonia induced by *Corynebacterium kutscheri* in mice. *J Microbiol Biotechnol.* 2009 Apr;19(4):424-30.
41. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin. 10. secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology.* *Nat Rev Immunol.* 2005 Apr;5(4):271-83.