

## Anti-Allergic Effects of Nodakenin in IgE/Ag-Induced Type I Hypersensitivity

Yong-Jae Kim, Sae-Jin Park and Tack-Joong Kim\*

Division of Biological Science and Technology, College of Science and Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

Received September 29, 2011 / Revised December 2, 2011 / Accepted December 6, 2011

Mast cells are major effector cells associated with allergic responses. They are activated through the release of histamine, arachidonic acid, and proinflammatory cytokines. We investigated the effect of nodakenin, derived from the roots of *Angelica gigas Nakai*, on mast cell degranulation and on an allergic response in an animal model. We also investigated the effect of nodakenin on expression of multiple cytokines. Nodakenin suppressed the release of  $\beta$ -hexosaminidase, a marker of degranulation, as well as the expression of interleukin IL-4 and TNF- $\alpha$  mRNA. Nodakenin inhibited the passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction in ICR mice in a dose-dependent manner. These results suggest that nodakenin can inhibit mast cell degranulation through the inhibition of IL-4 and TNF- $\alpha$  mRNA expression, and that nodakenin may potentially serve as an anti-allergic agent.

**Key words** : Mast cells, allergic response, nodakenin, passive cutaneous anaphylaxis

## 서 론

비만세포(mast cell)는 여러 가지 알러지 질환 즉, 알러지성 비염, 알러지성 아토피성 피부염, 알러지성 결막염, 알러지성 천식, 음식 알러지 및 아나필락틱 쇼크(anaphylactic shock) 등을 유발하는 체내 세포로 알려져 있다. 이들 세포는 세포표면에 알러지를 유발하는 항체인 immunoglobulin E (IgE)에 대한 수용체 Fc epsilon Receptor 1 (Fc $\epsilon$ RI)를 가지고 있고, 제 1형 알러지 반응을 매개하는 주요한 효과세포로서 이 수용체와 결합한 항체에 항원이 접하게 되면 알러지 반응이 활성화된다[5,13-15]. 알러지를 치료하는 다양한 방법들이 존재하나, 현재 대부분의 알러지 치료는 그 원인을 없애기보다는 증상을 완화하는 방향으로 연구가 진행되고 있다.

대표적으로 알러지에 의해 비만세포 등에서 분비된 히스타민이나 류코트리엔 등의 수용체에 대한 길항약들이 주를 이루고 이러한 약물들이 거대한 시장을 이루고 있다. 그러나, 이러한 약물은 환자에게 투여 후 단기간 내에 내성을 보이기 때문에 일정기간 지난 후 혹은 반복 투여 시 환자들의 증상을 호전시키지 못하는 경우가 많다. 따라서, 항히스타민제 등의 부작용이 없는 알러지 치료제 개발을 요구하고 있는 실정이다.

RBL-2H3세포는 쥐의 호염기성 백혈구 조직으로부터 유래된 비만세포이고, 활성화된 이들 세포는 탈 과립현상을 통해 히스타민이나  $\beta$ -hexosaminidase, 대사산물, 그리고 염증성 사이토카인 등을 방출한다[1,7].

IL-4는 활성화된 비만세포에서 알러지 반응에 의해 방출되는 사이토카인 중의 하나이다. TNF- $\alpha$  역시 활성화된 비만세포

에서 알러지 반응에 의해 방출되는 사이토카인 중의 하나로서 방출되는 양을 통해서 알러지 반응의 정도를 예상할 수 있다 [3,4,10].

Nodakenin은 참당귀(*Angelica gigas Nakai*)로 부터 추출한 물질로서 진정, 진통 등에 유효하여 산후요약으로 아시아 지역에서 전통 민간 치료제들로서 사용되어 왔으나 이러한 작용에 대한 구체적인 분자 기작이 명확하게 밝혀지지 않았다[2]. 본 연구에서는 항원-항체 반응에 의해 매개되는 알러지 반응에서 nodakenin의 효과와 분자 기작을 분석하고자 했다.

## 재료 및 방법

## 실험재료

Nodakenin은 서울대학교 약학대학 성상현교수로부터 제공받았다(Fig. 1). Mouse monoclonal anti-DNP IgE antibody와 dinitrophenol-conjugated human serum albumin (DNP-HSA), Evans blue, 그리고 세포 배양을 위한 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. P-Nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide는 MP Biomedicals, LLC (Solon, OH, USA)로 부터 구입하여 사용하였다.

## 세포배양

RBL-2H3세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 구매하였으며, 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 첨가된 Eagle's minimal essential medium (WelGENE, Inc., Daegu, Korea) 배지에서 2-3일마다 배양액을 교환해 주었으며, 배양 환경은 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

## \*Corresponding author

Tel : +82-33-760-2242, Fax : +82-33-760-2183

E-mail : ktj@yonsei.ac.kr

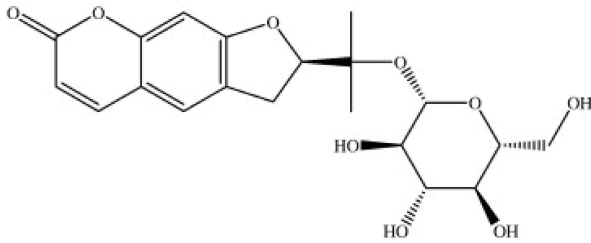


Fig. 1. Chemical structure of nodakenin.

**동물**

수컷 ICR mice (aged 7 weeks)는 Orient Bio (Gangneung, Korea)로 부터 구매하여 온도 20-22°C와 습도 40-50%의 환경에서 사육하였다. 모든 동물들은 표준화 된 사료와 물을 제공하였으며, 연세대학교의 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) (Wonju, Korea)가 본 연구의 동물실험을 승인하였다.

**수동피부과민반응 측정**

Anti-DNP-specific IgE (0.5 µg)는 각각의 ICR mice의 귀에 피하주사로 주입하였으며, 24시간 후에, nodakenin을 25에서 50 mg/kg의 농도로 경구투여 하여, 1시간 후에 3% Evans blue와 혼합된 DNP-HSA (200 µg)을 정맥주사 하였다. 항원 처리 2시간 후에 ICR mice를 안락사 시키고 귀의 항원-항체 반응에 의한 Evans blue 염색약의 양을 육안으로 관찰하였다. 또한, 500 µl formamide에 해당 귀를 절개 후, 63°C에서 하루 동안 반응시켜 620 nm의 흡광도로 염색약의 양을 측정하였다.

**β-hexosaminidase 방출량 측정**

탈과립 현상의 표지 물질인 β-hexosaminidase의 방출량을 측정함으로써 알러지 반응 억제 정도를 세포 수준에서 알아 보았다. RBL-2H3 세포는 24-well plates에 각 well당 200,000 세포가 되도록 분주한 후, 12시간을 배양하였다. Anti-DNP-specific IgE를 200 ng/ml 농도로 각 well에 감작시켜 12시간 배양 하였다. IgE에 감작된 세포는 PIPES buffer (25 mM PIPES, pH 7.2, 110 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.4 mM MgCl, 40 mM HCl, 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.1% BSA)로 두 번 세척하였고, 37°C에서 30분 동안 PIPES buffer에 녹인 nodakenin을 농도별로 처리하였다. 세포는 37°C에서 15분간 DNP-HSA (25 ng/ml)와 반응시켰으며 안정화를 위해 5분간 얼음 위에 두었다. β-hexosaminidase 방출량을 측정하기 위해서, 항원-항체 반응이 일어난 세포가 존재하는 well의 PIPES buffer 상층액과 β-hexosaminidase의 기질인 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 녹인 P-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide를 96-well plate에서 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰고, 0.1 M carbonate buffer (pH 10.5)를 처리하여 반응을 종결 시킨 뒤, microplate reader를 이용하여 405 nm의 파장으로

흡광도를 측정하였다.

**세포 생존율 측정**

세포 생존율은 Ez-Cytox Enhanced Cell Viability Kit (Daeil Labservice, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. RBL-2H3 세포는 96-well plate에 분주하였고 12시간 후에 200 ng/ml anti-DNP-specific IgE를 감작시켰다. 12시간 후에, nodakenin 과 25 ng/ml DNP-HSA 를 23시간 동안 처리하였다. Ez-Cytox Kit reagent는 세포가 있는 배양액에 투여하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다.

**RNA 추출과 역전사 중합효소 연쇄 반응 측정(RT-PCR)**

RBL-2H3 세포는 6-well plate에 분주한 뒤, 200 ng/ml anti-DNP-specific IgE를 감작시켜 하루 동안 배양하였다. PIPES buffer로 두 번 세척 한 후, nodakenin을 농도 별로 처리하고, 1시간 동안 DNP-HSA (25 ng/ml)를 처리하였다. 반응 후에, 세포를 PBS로 세척하고, TRI reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. Total RNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량하여 1 µg의 RNA를 이용하였고, cDNA 합성 및 PCR은 Accupower RT/PCR premix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR조건은 IL-4의 경우, 94°C 1분, 50°C 45초, 72°C 45초로 35 cycle을 수행하였으며, TNF-α의 경우, 94°C 1분, 49°C 45초, 72°C 45초로 35 cycle을 수행하였다. PCR 산물은 2% agarose gel로 전기영동을 한 후, ethidium bromide를 첨가하여 밴드를 가시화 하였다. 사용된 primer는 다음과 같다. rat IL-4 sense 5'- acctgtgctcacctgttc-3'; rat IL-4 antisense 5'-ttgtgagcghthactc-3'; rat TNF-α sense 5'-caaggaggagaagtcccaa-3'; TNF-α antisense 5'-cggactccgtgatgtctaag-3'; β-actin sense 5'-atgccatcctcgctggacctggc-3'; and β-actin antisense 5'-agcatttgcggtgcacgatggaggg-3'.

**통계처리**

모든 실험 결과는 평균±표준편차(means±SEM)로 나타내었다. 통계처리는 Dunnett's test로 검정하였고 정상 대조군과 비교하여 <0.05 이하의 경우 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

**결과 및 고찰**

IgE/Ag에 의해 매개된 아나필락틱 쇼크에 대한 nodakenin의 효과

아나필락틱 쇼크 평가를 위한 수동피부과민반응 동물 모델은 알러지 반응의 생체 수준 평가에 광범위하게 사용된다 [6,9,11]. 그러므로, 수동피부과민반응에서 nodakenin의 효과

를 탐색하였다. Anti-DNP-specific IgE를 ICR mice의 귀에 피하주사 하고, nodakenin을 25와 50 mg/ml로 경구투여 하였다. 이후 Evans blue와 DNP-HSA를 정맥주사하여, 귀의 항원-항체 반응에 의한 Evans blue 염색약의 양을 육안으로 확인하였다. 그리고 비교 대조군으로서 사용한 50 mg/kg의 diphenylhydramine (DPH)와 비교되었다. Nodakenin는 25 mg/ml와 50 mg/ml에서 IgE/Ag에 의해 매개된 수동피부과민반응을 농도 의존적으로 억제함을 확인 할 수 있었다(Fig. 2A). 또한, 생화학적인 분석을 위하여, formamide에 해당 귀를 절개하여, 63°C에서 하루 동안 반응시켜 염색약의 양을 측정 한 결과, nodakenin은 Evans blue의 양을 농도 의존적으로 억제함을 확인하였고, 50 mg/kg의 nodakenin을 경구투여 하였을 때, 수동피부과민반응의 정도가 가장 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 따라서, nodakenin이 *in vivo* 상에서 항원-항체 반응에 의한 알러지 반응을 효과적으로 억제할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

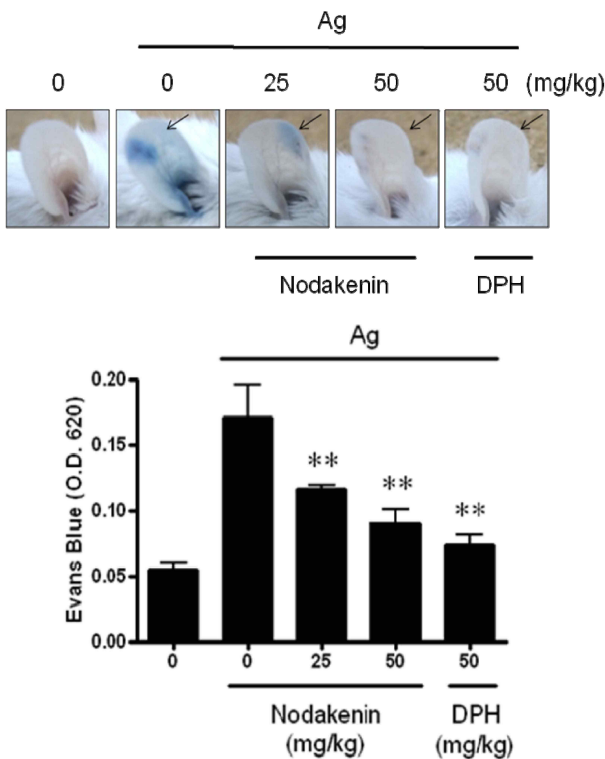


Fig. 2. Effect of nodakenin on IgE/Ag-induced passive cutaneous anaphylaxis (PCA). Seven-week-old ICR mice were intravenously injected with 200 µg antigen containing 3% Evans blue 24 hr after intradermal injection of DNP-IgE (0.5 µg) into the ear. Nodakenin was orally administered 1 h before the antigen. (A) Representative pictures of the ears are shown. (B) The dye was extracted overnight in 500 µl of formamide at 63°C, and the light absorbance was measured at 620 nm. Data are expressed as mean±SD (n=4). \*\*  $p < 0.01$ .

IgE/Ag에 의해 매개된 RBL-2H3 세포의 탈 과립현상에 대한 nodakenin의 효과

비만세포는 알러지 반응에 의한 탈 과립현상의 결과로서 히스타민이나 사이토카인, 또는 다른 중재자들을 방출한다. β-hexosaminidase의 방출량은 알러지 반응의 정도를 측정할 수 있는 좋은 표지로서 이용되기 때문에, *in vivo*에서 nodakenin의 항 알러지 효과를 확인한 결과를 바탕으로, nodakenin의 β-hexosaminidase 방출 억제 정도를 탐색하였다. β-hexosaminidase의 방출량은 nodakenin에 의해 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었고, 특히 100 µM의 농도에서는 50% 이상의 β-hexosaminidase 방출량 억제 효과를, 그리고 200 µM 농도에서는 70% 이상의 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3). 이를 통하여 우리는 nodakenin이 비만 세포의 탈 과립현상을 효과적으로 억제함으로써 항알러지 효과를 나타낸다는 사실을 알 수 있었다.

Nodakenin에 의한 RBL-2H3 세포의 독성 영향

생체상이나 혹은 세포상에 효과를 보이는 nodakenin의 독성 존재 여부를 판단하기 위하여 RBL-2H3 세포를 대상으로 Ez-Cytox kit를 이용한 세포생존율 측정 실험을 실시하였다. Nodakenin이 첨가된 RBL-2H3 세포에서 세포독성을 측정 한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Nodakenin을 첨가하지 않았을 경우, 세포 생존율을 100%로 볼 때 nodakenin을 첨가한 첨가군에서는 95% 이상의 생존율을 보였다. 따라서, 본 실험에 사용한 nodakenin은 RBL-2H3 세포에 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다. 본 결과를 통하여, nodakenin은 세포독성을 갖지 않고, IgE/Ag 관련 알러지 반응을 효과적으로 억제 한

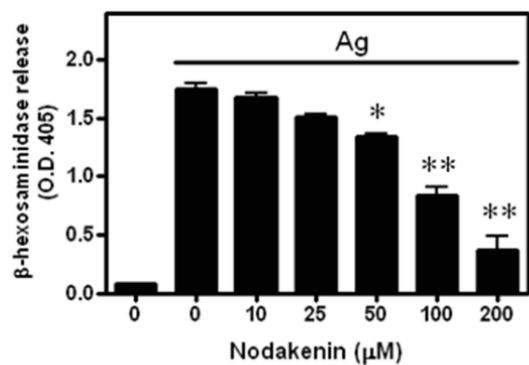


Fig. 3. Effect of nodakenin on IgE/Ag-stimulated mast cell degranulation. The cells were incubated overnight in 24-well plates with 200 ng/ml of DNP-specific IgE. The medium was replaced with PIPES buffer containing the indicated concentrations of nodakenin, and the cells were then challenged with 25 ng/ml DNP-HSA. After 15 min, β-hexosaminidase release was determined from the absorbance measured at 405 nm. Data are expressed as mean±SD (n=5). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

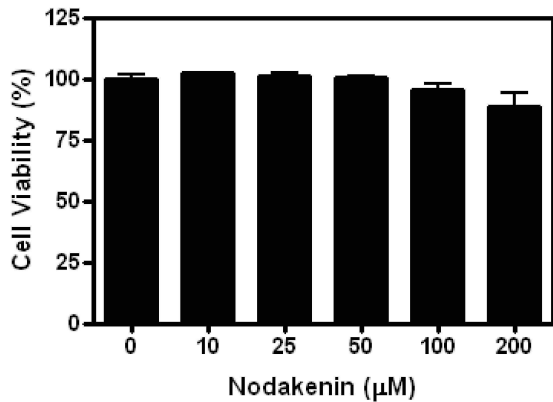


Fig. 4. Cytotoxic effects of nodakenin on mast cell. To assess cytotoxicity, RBL-2H3 cells were incubated overnight in medium containing 200 ng/ml of DNP-specific IgE, and then treated with nodakenin at various concentrations for 24 hr. Cell viability was determined with the Ez-Cytox kit from the absorbance at 450 nm.

다는 것을 알 수 있었다.

Nodakenin에 의한 RBL-2H3 세포의 사이토카인 발현 억제 효과

IL-4는 면역 B 세포의 IgE 생성에 영향을 미치며 naïve T 세포의 Th2 세포로의 전환을 촉진하는 역할을 한다[8]. TNF-α는 잠재적인 염증성 인자로서 비만 세포의 IgE와의 반응을 유도한다[6,12]. 본 연구에서 항원-항체 반응에 의해 활성화된 RBL-2H3 세포의 IL-4와 TNF-α의 발현에 있어서 nodakenin의 효과에 대하여 알아보았다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이, nodakenin은 항원-항체 반응에 의한 IL-4과 TNF-α mRNA의 발현을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이로부터, nodakenin이 IL-4 하위 조절자의 발현을 억제함으로써 IgE의 생성을 억제하고, TNF-α의 발현을 억제함으로써 결국 항원-항체 반응에 의한 탈 과립현상을 억제한다고 생각 된다.

본 연구를 통해 nodakenin이 비만 세포의 항원-항체 반응

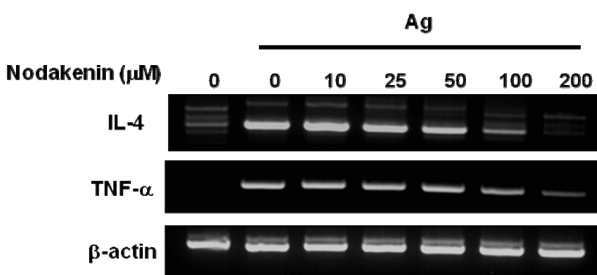


Fig. 5. Effect of nodakenin on the expression of TNF-α and IL-4 in IgE/Ag-stimulated mast cells. The IgE/Ag-sensitized RBL-2H3 cells were treated with various doses of nodakenin and then challenged with 25 ng/ml DNP-HSA for 1 hr. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR.

에 의해 매개되는 탈 과립현상을 효과적으로 억제한다는 것을 알 수 있었다. 그러나, 현재까지의 연구로는 알러지 반응 억제 관련 nodakenin의 정확한 분자 수준의 기전에 대해서는 많이 부족하며, 더 연구가 진행될 필요성이 있다. 결과적으로, nodakenin이 알러지 반응을 억제하거나 저해할 수 있는 효과를 입증하였고, nodakenin을 이용하여, 여러 가지 알러지 질환 즉, 알러지성 비염, 알러지성 아토피성 피부염, 알러지성 결막염, 알러지성 천식, 음식 알러지를 포함한 항 알러지 기능성 천연 소재로서의 사용 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구를 위해 노다케닌을 제공해 주신 서울대학교 성상현 교수께 감사의 말씀을 전합니다. 본 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ0080152011)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Bansal, G., Z. Xie, S. Rao, K. Nocka, and K. Druey. 2008. Suppression of immunoglobulin E-mediated allergic responses by regulator of G protein signaling 13. *Nat. Immunol.* **9**, 73-80.
- China Pharmacopoeia Committee. 1999. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (The first division of 2000 edition). pp. 167, China Chemical Industry Press, Beijing.
- Frossi, B., J. Rivera, E. Hirsch, and C. Pucillo. 2007. Selective activation of Fyn/PI3K and p38 MAPK regulates IL-4 production in BMMC under nontoxic stress condition. *J. Immunol.* **178**, 2549-2555.
- Granberg, M., C. Fowler, and S. Jacobsson. 2001. Effects of the cannabimimetic fatty acid derivatives 2-arachidonoylglycerol, anandamide, palmitoylethanolamide and methanandamide upon IgE-dependent antigen-induced beta-hexosaminidase, serotonin and TNF alpha release from rat RBL-2H3 basophilic leukaemic cells. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **364**, 66-73.
- Gregory, G. D. and M. Brown. 2006. Mast cells in allergy and autoimmunity: implications for adaptive immunity. *Methods Mol. Biol.* **315**, 35-50.
- Han, E. H., J. H. Park, J. Y. Kim, Y. C. Chung, and H. G. Jeong. 2009. Inhibitory mechanism of saponins derived from roots of Platycodon grandiflorum on anaphylactic reaction and IgE-mediated allergic response in mast cells. *Food Chem Toxicol.* **47**, 1069-1075.
- Itoh, T., K. Ohguchi, M. Iinuma, Y. Nozawa, and Y. Akao. 2008. Inhibitory effects of polymethoxy flavones isolated from Citrus reticulata on degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3: enhanced inhibition by their combination. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 7592-7598.
- Itoh, T., M. Oyama, N. Takimoto, C. Kato, Y. Nozawa, Y. Akao, and M. Iinuma. 2009. Inhibitory effects of sesqui-

- terpene lactones isolated from *Eupatorium chinense* L. on IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 3189-3197.
9. Lee, J. H., J. W. Kim, N. Y. Ko, S. H. Mun, E. Her, B. K. Kim, J. W. Han, H. Y. Lee, M. A. Beaven, Y. M. Kim, and W. S. Choi. 2008. Cucumin, a constituent of curry, suppresses IgE-mediated allergic response and mast cell activation at the level of Syk. *Clin. Immunol.* **121**, 1225-1231.
  10. Lee, J. H., J. W. Kim, N. Y. Ko, S. H. Mun, D. K. Kim, J. D. Kim, H. S. Won, H. S. Shin, H. S. Kim, E. Her, Y. M. Kim, and W. S. Choi. 2008. Mast cell-mediated allergic response is suppressed by *Sophorae flos*: inhibition of SRC-family kinase. *Exp. Biol. Med.* **233**, 1271-1279.
  11. Lee, J. H., J. W. Kim, N. Y. Ko, S. H. Mun, D. K. Kim, J. D. Kim, H. S. Won, H. S. Shin, H. S. Kim, Y. M. Kim, and W. S. Choi. 2008. Mast cell-mediated allergic response is suppressed by *Sophorae flos*: inhibition of SRC-family kinase. *Exp. Biol. Med.* **233**, 1271-1279.
  12. Lorentz, A., I. Klopp, T. Gebhardt, M. Manns, and S. Bischoff. 2003. Role of activator protein 1, nuclear factor-kappaB, and nuclear factor of activated T cells in IgE receptor-mediated cytokine expression in mature human mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, 1062-1068.
  13. Sakai, S., T. Sugawara, K. Matsubara, and T. Hirata. 2009. Inhibitory effect of carotenoids on the degranulation of mast cells via suppression of antigen-induced aggregation of high affinity IgE receptors. *J. Biol. Chem.* **284**, 28172-28179.
  14. Tiwari, N., C. Wang, C. Brochetta, G. Ke, F. Vita, Z. Qi, J. Rivera, M. Soranzo, G. Zabucchi, W. Hong, and U. Blank. 2008. VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood* **111**, 3665-3674.
  15. Wedemeyer, J., M. Tsai, and S. Galli. 2000. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 624-631.

#### 초록 : 노다케닌의 항 알러지 효과

김용재 · 박세진 · 김택중\*

(연세대학교 과학기술대학 생명과학기술학부)

현재 전 세계적으로 알러지 질환은 급격히 증가하고 있는 추세이다. 기존의 길항제나 항원 특이적 면역 치료법의 부작용으로 인하여 항 알러지 작용에 효과적인 천연 기능성 물질에 대한 연구가 알러지 질환 치료의 유망한 분야로 여겨지고 있다. 비만세포는 히스타민이나 아라키돈 산, 그리고 전 염증성 사이토카인 등을 방출하는 알러지 반응에 주요하게 작용하는 효과세포이다. 우리는 참당귀의 뿌리로부터 추출한 노다케닌의 알러지 반응 억제 효과에 대해서 연구하였다. 노다케닌을 이용하여 비만세포에서의 탈 과립현상 억제 효과를 측정한 결과, 비만세포에서 노다케닌이 탈과립의 표지인  $\beta$ -hexosaminidase의 방출량을 농도 의존적으로 억제하는 것을 관찰하였고, 이러한 탈과립 억제 현상이 다양한 사이토카인 중 IL-4과 TNF- $\alpha$ 의 양을 감소시킴으로써 매개된다는 사실을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 또한 쥐에서 수동피부과민반응을 유도하여 노다케닌을 경구투여 했을 때 알러지성 과민반응 증상을 효과적으로 억제하는 것을 관찰하였다. 결과적으로, 이러한 결과들은 노다케닌이 항 알러지 약물의 개발에 잠재적인 후보물질이 될 수 있음을 시사한다.