

Sarijang Enhances Maturation of Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells

Cheng-Yun Jin^{1,2}, Min Ho Han^{1,2}, Cheol Park^{2,4}, Hye Jin Hwang^{3,4}, Eun-A Choi⁵ and Yung Hyun Choi^{1,2,4*}¹Department of Biomaterial Control (BK21 Program), Graduate School, ²Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, ³Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, and ⁴Blue-Bio Industry RIC, Dongeui University, Busan 614-714, Korea⁵InSan BamBoo Salt Inc., Hanyang, Keongnam 676-805, Korea

Received November 10, 2011 / Revised December 2, 2011 / Accepted December 6, 2011

Dendritic cells (DCs) are professional antigen-presenting cells playing key roles in immune sentinels as initiators of T-cell responses against microbial pathogens and tumors. Sarijang, a folk sauce containing extracts of *Rhynchosia nulubilis*, *Ulmus davidiana* roots, *Allium sativum*, and *Rhus Verniaiflora* bark, has been used as a nonspecific immunostimulant for cancer patients. However, little is known about its immunomodulating effects or their mechanisms. In this study, we investigated whether sarijang induces phenotypic and functional maturation of DCs. For this study, murine bone marrow-derived myeloid DCs were cultured in the presence of interleukin-4 (IL-4) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), and the generated immature DCs were stimulated with sarijang or lipopolysaccharide (LPS). Our data indicated that sarijang significantly enhanced the expression of co-stimulatory molecules (CD80 and CD86) as well as major histocompatibility complex (MHC) II, as did LPS. The results provide new insight into the immunopharmacology of sarijang and suggest a novel approach to the manipulation of DC for therapeutic application.

Key words : Sarijang, dendritic cells, maturation

서 론

수지상세포(dendritic cells, DCs)는 림프기관, 피부와 소화기, 호흡기 등의 상피조직과 대부분의 실질기관의 간질에 존재한다. 모든 DC는 골수 내 전구세포에서 유래하였을 것으로 생각되며, 대부분 골수성 수지상세포(myeloid DCs)로 불리는 단핵 포식세포계와 관련 있다. DC는 항원을 섭취하여 말초조직에서 lymphoid 기관으로 이동하는 특화된 전문적인 항원제시세포(antigen-presenting cells, APCs)이다. DC는 미성숙 T 세포를 자극하는 능력이 있어서 일차적 면역반응을 개시하는 중심적인 역할을 하며, 미성숙 상태에서 자가관용(self-tolerance)에 관여하므로 면역질환 치료의 수단과 목적으로 여겨지고 있어[3,4], 장기 이식, 알레르기, 자가면역질환, 감염과 종양에 대한 저항, 면역결핍, 백신 등에 대한 연구에 널리 이용되고 있다[2]. 특히 류마티스 관절염 같은 자가면역질환의 경우 활성화된 수지상세포의 숫자가 증가하고, DC에 의한 자가항원(self antigen)의 제시는 자가면역질환에 결정적인 역할을 한다[14,16]. 따라서 DC의 성숙에 대한 조절은 면역학적 치료에 있어 중요한 부분이다. 사리장은 예로부터 약용으로 잘 알려졌으며 최근 강력한 항암 효과가 있음이 확인한 서목태(*Rhynchosia nulubilis*, 鼠目太, 일명 쥐눈이콩)을 백국균(*Aspergillus kawachii*)으로 발효시킨 후, 유향오리, 유근피, 마

늘 및 옷을 달인 액에 죽염을 혼합하여 숙성시킨 간장으로 해독성과 항암 및 소염성이 우수할 것으로 추정된다. 사리장은 민간에서 암, 당뇨 등을 포함한 각종 난치병 치료에 효과가 있는 것으로 알려졌으나, 이에 대한 학술적인 근거는 매우 미약한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 사리장에 의한 DC의 성숙 유도 가능성을 증명하기 위하여 골수 유래 수지상세포 [bone marrow (BM)-derived myeloid DCs, BMDCs]에서 세포표면 수용체들의 발현 증가 여부를 lipopolysaccharide 처리군과 비교하여 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 fetal bovine serum (FBS), RPMI-1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 항체인 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-major histocompatibility complex (MHC) class I 및 II, anti-CD11c-APC, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD80 및 anti-CD86은 PharMingen (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* 026:B6) 및 complete medium 제조를 위한 시약들은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. 사리장은 인산죽염촌(주)에서 제공 받아서 0.4 µl의 siringe filter로 여과 멸균하

***Corresponding author**

Tel : +82-51-850-7413 , Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

여 4°C 보관하며 사용하였다. DC 분리를 위한 C57BL/6 mouse 6주령 수컷은 오리엔트 바이오(경기도 성남)에서 구입하여 사용하였다.

BMDCs의 분리 및 배양

BM 세포로부터 DC의 분리는 Inaba *et al.* [8]의 방법에 준하여 C57BL/6 mouse의 경골과 대퇴골 부위에서 골수를 채취하고 원심분리 한 후에 상층액을 제거한 다음 0.165 M NH₄Cl을 넣고 적혈구를 제거하였다. 다시 원심분리한 후에 상층액을 버리고 complete medium [RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 5×10⁵ M 2-mercaptoethanol, 10 mM HEPES (pH 7.4), 20 ng/ml recombinant mouse (rm) granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and 20 ng/ml of rm interleukin-4 (IL-4)]을 이용하여 6-well plate (3 ml/well)에 3×10⁶개의 세포를 넣어 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 3시간 후 plate 바닥에 붙어있는 대식세포를 제거하고 상층액을 취하기 위하여 원심분리하였다. 그 후에 상층액을 버리고, complete medium을 이틀 간격으로 교환하면서 6일 동안 배양하여 immature DC (iDCs) 또는 DC precursor를 준비하여[12], 적정 농도의 사리장 및 LPS가 함유

된 complete medium을 이용하여 배양하였다.

Flow cytometry analysis

BMDC의 분리 및 배양 7일째, 이들 세포를 PBS로 수세 후, FACS washing buffer (2% FBS and 0.1% sodium azide in PBS)를 넣은 후 스크래퍼로 긁어서 세포를 모아 normal rat serum, Fc gamma receptor blocker, anti-CD80-PE, anti-CD86-PE, anti-CD11c-APC, anti-I-Ab-FITC-MHC class I 및 II로 4°C에서 20분간 염색하였다. 염색된 세포들의 세포표면 수용체들의 발현 증가 여부는 FACS Calibur flowcytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 분석하였다[5].

MTT assay 및 통계처리

사리장 및 LPS가 처리된 조건에서 배양된 DC의 세포표면 수용체들의 발현 변화가 사리장 및 LPS에 의한 세포독성과 연관성이 있는지를 확인하기 위하여 동일 조건에서 배양된 DC를 대상으로 MTT assay를 실시하였다. 또한 모든 실험 결과는 평균±표준편차로 표시하였고 SigmaPlot을 이용하여 Student *t*-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

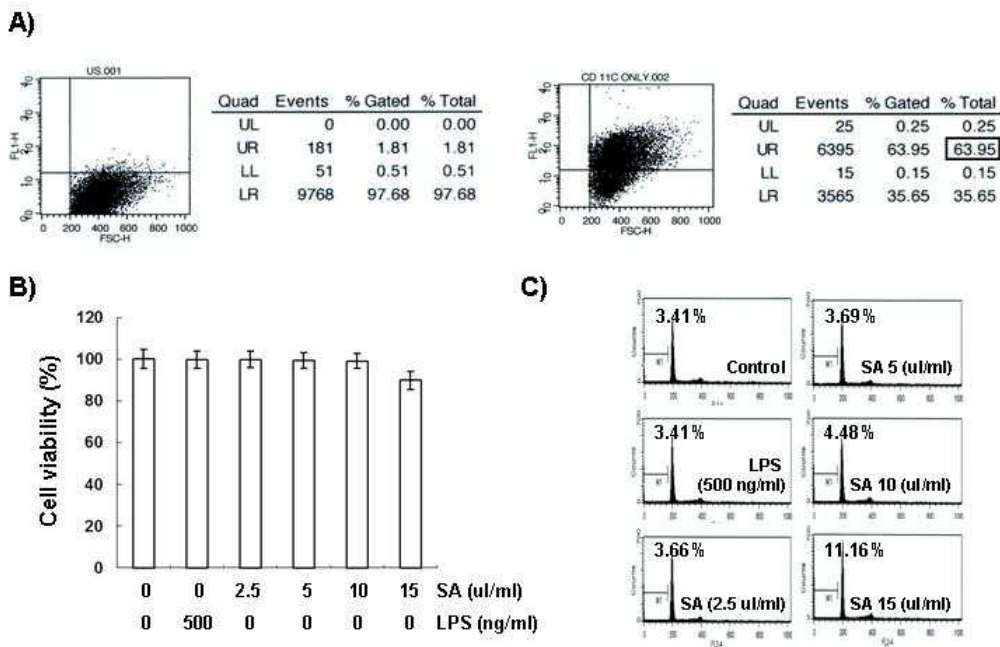


Fig. 1. Expression of CD11c in bone marrow (BM)-derived myeloid DCs, and effects of sarijang and LPS on the growth of BMDCs. (A) On day 7, BMDCs were harvested, washed with PBS, and resuspended in a FACS washing buffer. The cells were blocked with 10% (v/v) normal goat serum for 15 min at 4°C, and stained with FITC-conjugated anti-CD11c+ antibody for 30 min at 4°C. The stained cells were analyzed using a flow cytometer. (B) On day 6, BMDCs were treated with the indicated concentrations of sarijang (SA) or LPS (500 ng/ml), and incubated for 24 hr. On day 7, the growth inhibition was measured by the metabolic-bye-based MTT assay. The data shown are means±SD of three independent experiments. (C) Cells grown under the same conditions as B were collected and stained with PI for flow cytometry analysis. The profile represents the increase of sub-G1 population and each point represents the mean of two independent experiments.

결과 및 고찰

DC의 분화 유도 확인

DC는 거의 모든 조직에서 관찰되지만 대부분 미성숙 상태로 관찰된다. 따라서 사리장이 DC의 성숙에 미치는 영향을 조사하기 위한 DC의 분화 여부를 확인하기 위하여 CD11c+의 발현 정도를 분석한 결과, 약 64% 이상의 세포에서 CD11c+가 발현되어 DC로의 분화가 적절히 유도되었음을 확인하였다 (Fig. 1A). 이러한 조건에서 사리장 및 LPS의 처리가 이들 세포 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 분화 유도 6일째, 적정 농도의 사리장 및 LPS (500 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 이들 세포를 대상으로 MTT assay 및 flow cytometry를 실시한 결과, LPS 처리군 및 사리장 농도 10 µl/ml 이하의 조건에서는 유의적인 세포 증식의 억제 및 세포사멸의 증가 현상은 관찰되지 않았으나, 15 µl/ml 처리군에서는 약간의 세

포독성이 관찰되었다(Fig. 1B 및 C).

사리장이 DC의 수용체 CD80 및 CD86의 발현에 미치는 영향

DC가 미성숙 단계인 경우, 비교적 적은 형태의 돌기를 가지고 있고 T 세포나 다른 면역세포의 활성을 유도할 수 있는 능력이 약하지만 항원을 인지하고 uptake하게 되면 성숙단계로 발전하게 된다[1]. 성숙된 DC는 lymph node로 이동하게 되며 강력한 돌기 모양을 형성하고 표면 단백질 표시 인자(CD marker)의 극단적인 증가를 보이고 여러 가지 cytokine을 분비한다[13]. 그 후 T 세포나 B 세포와의 상호작용을 통하여 이들 세포를 자극하여 활성을 유도한다[6,15]. 따라서 본 연구에서는 사리장이 DC의 성숙에 미치는 정도를 조사하기 위하여 DC의 성숙 정도를 판단할 수 있는 수용체의 발현에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 조사하였다. 이를 위하여 준비된

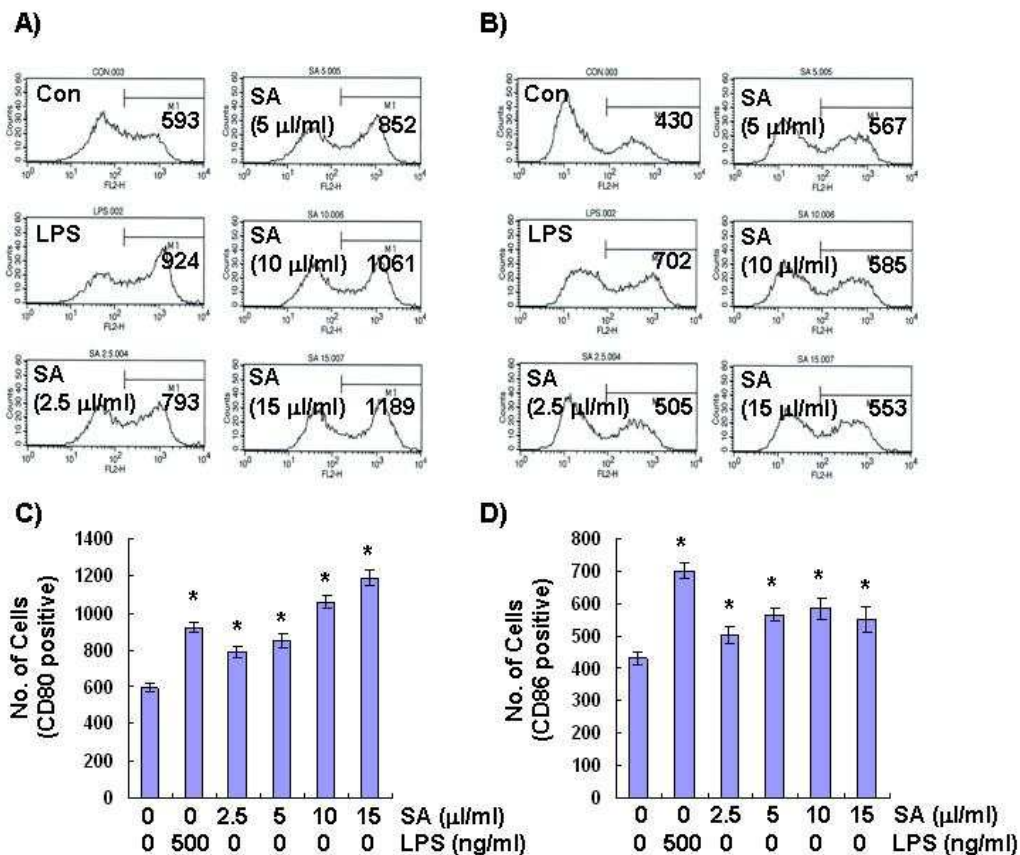


Fig. 2. Sarijang up-regulates the expression of CD80 and CD86 on DCs. DCs were generated from murine BM cells cultured with IL-4 and GM-CSF. Immature DCs (iDCs) were left untreated (control), stimulated with the indicated concentrations of sarijang (SA) or induced to mature with 500 ng/ml LPS. To investigate differential effects on the phenotypic maturation of CD80 (A) or CD86 (B), the cells were gated on CD11c+. The DCs were stimulated for 24 hr with the indicated concentrations of sarijang (SA) or LPS (500 ng/ml) on day 6. After 24 hr incubation, DCs were harvested and analyzed using anti-CD80 and anti-CD86 antibodies by a flow cytometry. The numbers indicate CD11c+ cells expressing CD80 and CD86. (C and D) Each value indicates the mean±S.D. and is representative of results obtained from three independent experiments. **p*<0.05 indicates a significant difference from untreated control cells.

DC를 대상으로 normal rat serum, Fc gamma receptor blocker, anti-CD11c+APC, anti-CD80-PE 및 anti-CD86-PE로 4°C에서 20분간 염색하여 flow cytometry 분석을 실시하였다. Fig. 2A의 결과에서 알 수 있듯이, 사리장의 처리농도 의존적으로 DC의 표면 수용체 CD80의 발현양이 유의적으로 증가하였다. 특히 10 µl/ml과 15 µl/ml 사리장 처리군에서는 대조군으로 사용된 LPS 처리(500 ng/ml) 군보다 CD80 발현양이 더욱 높게 증가하였다. 한편 DC의 또 다른 표면 수용체인 CD86의 발현양도 사리장의 처리 농도 의존적으로 증가하는 것을 알 수가 있었지만 대조군으로 사용된 LPS에 의한 CD80의 발현보다는 다소 낮게 나타났다(Fig. 2B).

사리장이 DC의 수용체 MHC I 및 MHC II의 발현에 미치는 영향

Immature DC (iDC)는 virus나 bacteria와 같은 병원 (pathogen)들을 찾기 위해 끊임없이 체내의 조직 곳곳을 순환한다. 이러한 과정은 pattern recognition receptors (PRRs)와

toll- like receptors (TLRs)에 의해 실행되어 지며, TLRs는 pathogens의 특정부분에 있는 화학적 신호를 이용하여 pathogen이라는 것을 인지한다[10]. iDC는 항원과 접촉하였을 때 활성을 가지게 되고 성숙하여 phagocytosis하였던 pathogen을 세포내에서 processing하여 major histocompatibility complex (MHC) molecule에 결합시켜 세포 표면으로 보낸다[7]. 또한 이와 동시에 CD80, CD86 등 세포표면에 있는 co-stimulated molecule의 발현이 증가되면서 이로 인해 비장(spleen)에서 혈액을 통해 lymph node로 이동할 수 있게 되므로[9] DC 성숙의 중요한 marker로 MHC의 발현양은 매우 중요하다. 예를 들어, 류마티스 관절염 같은 자가면역질환의 경우 활성화된 DC의 숫자가 증가되어 있고, DC에 의한 자가항원 (self antigen)의 제시는 자가면역 질환에 결정적인 역할[11]을 하기 때문에 DC의 성숙에 대한 조절은 면역학적 치료에 있어 중요한 부분이다. 이에 본 연구에서는 사리장에 의한 DC의 성숙에 대한 직접적인 증거를 제시하기 위하여 사리장을 처리한 후 유도된 DC를 대상으로 세포표면 수용체인 MHC I 및

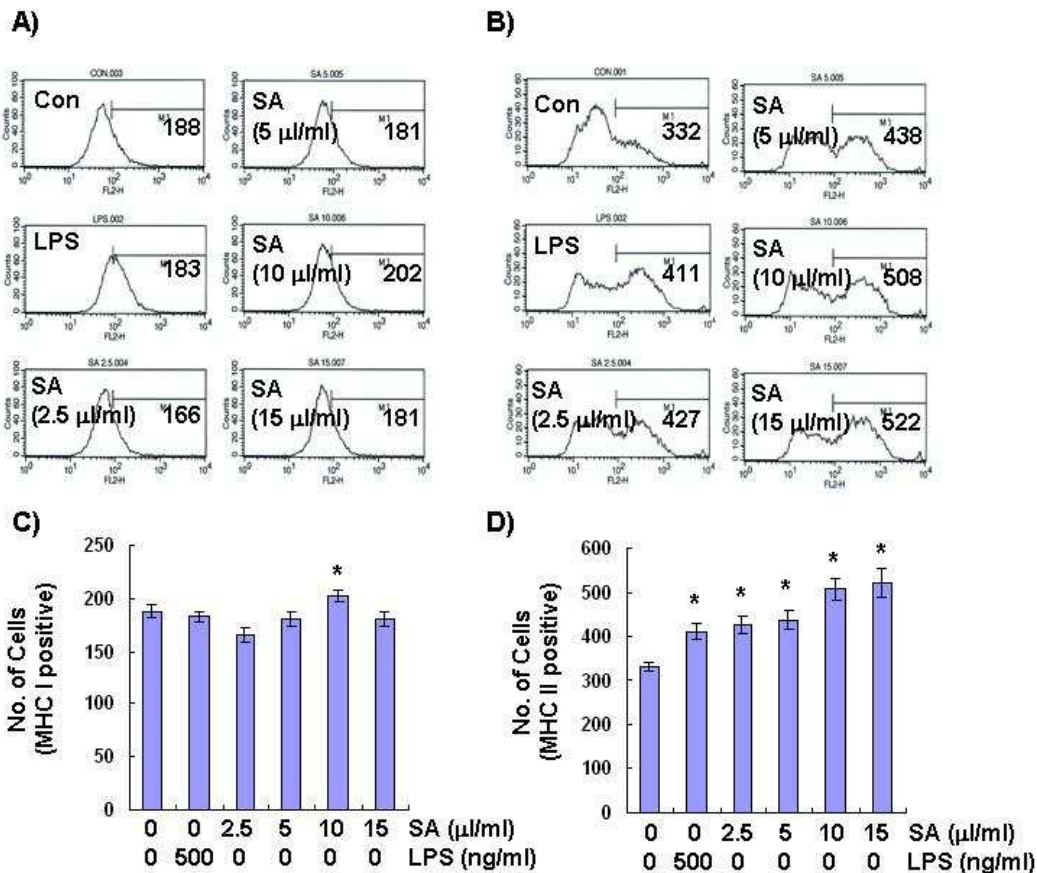


Fig. 3. Effects of sarijang on the expression of MHC I and II in DCs. To investigate differential effects on the phenotypic maturation of MHC I (A) and II (B), DCs generated under the same conditions as Fig. 2 were harvested and analyzed using anti-MHC I and anti-MHC II antibodies by flow cytometry. The numbers indicate the percentage of positive cells. (C and D) Each value indicates the mean±S.D. and is representative of results obtained from three independent experiments. *p<0.05 indicates a significant difference from untreated control cells.

MHC II의 발현 정도를 관찰하였다. Fig. 3A에서 알 수 있듯이 사리장이 처리된 DC에서 MHC I의 발현양은 변화가 없었으며 LPS 대조군에서도 이와 비슷한 결과를 얻었다. 그러나 DC의 또 다른 표면 수용체인 MHC II의 발현양은 사리장의 농도 의존적으로 현저하게 증가하는 것을 알 수가 있었으며, 사리장의 최저농도(2.5 μ l/ml)에서도 대조군으로 사용된 LPS 처리군 보다 MHC II의 발현이 훨씬 높게 나타났음을 확인할 수가 있었다(Fig. 3B). 이상의 결과에서 고농도의 사리장 처리군에서 약간의 세포독성이 관찰되었던 점을 고려하여도 대조군으로 사용된 LPS 처리군에서 보다 co-stimulatory molecules인 CD80 및 CD86 뿐만 아니라 MHC II의 발현 증가를 위한 사리장의 적용이 매우 유의적임을 알 수 있었다.

본 연구에서는 사리장이 DC의 성숙에 미치는 영향을 검토하기 위하여 GM-CSF와 IL-4를 이용하여 마우스의 BM 세포에서 유래된 iDC를 이용하여 DC의 성숙에 관여하는 주요 인자들의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. LPS 대조군과 비교한 결과 사리장은 처리농도 의존적으로 CD80, CD86 및 MHC II의 발현을 현저하게 증가시킴으로 인하여 DC의 성숙에 관여함을 알 수 있었으며, 이는 면역활성 증가를 위한 사리장의 적용 가능성이 매우 높음을 의미한다. 그러나 이를 보완하기 위한 생리활성 성분의 탐색과 그들의 특징 조사에 관한 선행연구가 동시에 이루어져야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림수산부 식품 기능성 평가 지원 사업(Food Functionality Evaluation program)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

1. Azuma, M., D. Ito, H. Yagita, K. Okumura, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and C. Somoza. 1993. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* **366**, 76-79.
2. Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
3. Bayry, J., M. Thirion, S. Delignat, N. Misra, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, and S. V. Kaveri. 2004. Dendritic cells and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* **3**, 183-187.
4. Cools, N., P. Ponsaerts, V. F. Van Tendeloo, and Z. N. Berneman. 2007. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 1365-1374.
5. Crowley, M., K. Inaba, M. Witmer-Pack, and R. M. Steinman. 1989. The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell Immunol.* **118**, 108-125.
6. Glimcher, L. H., T. Hamano, R. Asofsky, E. Herber-Katz, S. Hedrick, R. H. Schwartz, and W. E. Paul. 1982. I region-restricted antigen presentation by B cell-B lymphoma hybridomas. *Nature* **298**, 283-284.
7. Groenewegen, G., W. A. Buurman, and C. J. Van der Linden. 1985. Lymphokine dependence of *in vivo* expression of MHC class II antigens by endothelium. *Nature* **316**, 361-363.
8. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **176**, 1693-1702.
9. Kyewski, B. A., C. G. Fathman, and R. V. Rouse. 1986. Intrathymic presentation of circulating non-MHC antigens by medullary dendritic cells. An antigen-dependent micro-environment for T cell differentiation. *J. Exp. Med.* **163**, 231-246.
10. Manni, M., R. D. Granstein, and G. Maestroni. 2011. β 2-Adrenergic agonists bias TLR-2 and NOD2 activated dendritic cells towards inducing an IL-17 immune response. *Cytokine* **55**, 380-386.
11. McGehee, A. M., K. Strijbis, E. Guillen, T. Eng, O. Kirak, and H. L. Ploegh. 2011. Ubiquitin-dependent control of class II MHC localization is dispensable for antigen presentation and antibody production. *PLoS One* **6**, e18817.
12. Menges, M., T. Baumeister, S. Rössner, P. Stoitzner, N. Romani, A. Gessner, and M. B. Lutz. 2004. IL-4 supports the generation of a dendritic cell subset from murine bone marrow with altered endocytosis capacity. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 535-543.
13. Mitra, R. S., T. A. Judge, F. O. Nestle, L. A. Turka, and B. J. Nickoloff. 1995. Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression. *J. Immunol.* **154**, 2668-2677.
14. Moretta, L., G. Ferlazzo, M. C. Mingari, G. Melioli, and A. Moretta. 2003. Human natural killer cell function and their interactions with dendritic cells. *Vaccine* **2**, S38-42.
15. Ramila, G. and P. Erb. 1983. Accessory cell-dependent selection of specific T-cell functions. *Nature* **304**, 442-445.
16. Thomas, R., K. P. MacDonald, A. R. Pettit, L. L. Cavanagh, J. Padmanabha, and S. Zehntner. 1999. Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 286-292.

초록 : 사리장 처리에 의한 수지상세포의 성숙 유도

김성운^{1,2} · 한민호^{1,2} · 박철^{2,4} · 황혜진^{3,4} · 최은아⁵ · 최영현^{1,2,4,*}

(동의대학교 ¹대학원 바이오물질제어학과(BK21 Program), ²한의과대학 생화학교실, ³생활과학대학 식품영양학과 및 ⁴블루바이오소재개발센터, ⁵(주)인산죽염촌)

수지상세포(DCs)는 항원을 섭취하여 말초조직에서 lymphoid 기관으로 이동하는 특화된 항원제시세포(APCs)로서 미성숙 T 세포를 자극함으로써 일차적 면역반응에 중심적인 역할을 하기 때문에 DC의 성숙에 대한 조절은 면역학적 치료 접근에 매우 중요한 부분이다. 본 연구에서는 서목태 발효 산물이 주 원료인 사리장에 의한 DC의 성숙 유도 가능성을 조사하기 위해 GM-CSF와 IL-4를 이용하여 골수 유래 수지상세포(BMDCs)를 대상으로 DC의 성숙에 관여하는 주요 인자들의 발현에 미치는 영향을 LPS 처리군과 비교하였다. 사리장은 처리농도 의존적으로 표면 수용체인 CD80 및 CD86의 발현을 증가시켰으나, CD80 발현 증가에 더 유의적이었다. 또한 사리장은 MHC I 보다 MHC II의 발현을 현저하게 증가시켰으며, 이러한 결과는 사리장이 DC의 성숙을 위한 적용에 매우 유익적으로 사용될 수 있을 가능성과 면역활성 효능을 가질 수 있음을 의미하는 것이다.