

구절초 에탄올 추출물의 FcεRI α chain 발현 저해효과

심선엽 · 변대석^{1*}

부경대학교 해양생명과학연구소, ¹부경대학교 식품영양학과

Inhibitory Effects of *Chrysanthemum zawadsaki* Ethanolic Extract on FcεRI α Chain Expression

Sun-Yup Shim and Dae-Seok Byun^{1*}

Institute of Marine Life Science, Pukyong National University

¹Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University

Abstract Human basophilic KU812F cells express a high affinity for IgE receptor, FcεRI, which plays an important role in immunoglobulin E (IgE)-mediated allergic reactions. Using the human basophilic KU812F cells, we assessed the inhibitory effects of the ethanolic extract from *Chrysanthemum zawadsaki*(CZ) on FcεRI α chain expression. Flow cytometric analysis showed that cell surface FcεRI α chain expression was suppressed when the cells were cultured with CZ extract. RT-PCR analysis showed that the mRNAs for FcεRI α chain decreased by the treatment of CZ extract. Moreover, CZ extract was also observed to result in a reduction in the release of histamine from anti-FcεRI antibody (CRA-1)-stimulated cells. These results suggest that CZ extract may exert anti-allergic activity through down-regulation of FcεRI α chain expression and a subsequent decrease in histamine release.

Keywords: *Chrysanthemum zawadsakii* var. *latilobum*, FcεRI, histamine

서 론

구절초(*Chrysanthemum zawadsakii* var. *latilobum*)는 국화과(*Compositae*)에 속하는 다년생 초본으로, 전국 각처의 산지와 고원지에서 자생하고 세계적으로는 중국, 러시아, 몽골, 일본 등에서 자라며 민간에서는 전초와 꽃 이삭을 폐렴, 기관지염, 기침, 감기, 인두염, 방광질환, 부인병, 냉증, 위장병 및 고혈압 등에 사용하여 왔다(1,2). 구절초의 함유성분으로는 항암, 항염증, 간보호 작용을 갖는 플라보노이드계의 *linarin*과 *acacetin*이 보고되고 있다(3-7). 그러나 구절초 추출물에 의한 FcεRI 발현 조절에 관한 연구는 지금까지 보고된 바가 없다.

고친화성 IgE 수용체, FcεRI은 비만세포와 호염기구의 세포표면에서 발견되고, IgE를 매개로 한 알러지 반응에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(8). FcεRI이 IgE 및 특이적 알레르겐과 결합함으로써, 활성화된 비만세포와 호염기구로부터 히스타민, 프로스타글란딘, 류코트라이엔과 같은 염증매개인자 분비를 야기함으로써 천식, 아토피성 피부염, 알러지성 비염과 같은 알러지 반응을 유발한다(9-11). 비만세포와 호염기구의 FcεRI 분자는 각각 한개씩의 α와 β, 두개의 γ chain로 이루어져 있다. 이 중 α chain이 대부분의 세포표면으로 뻗어 있어 IgE 항체의

Fc부분과 직접 결합한다(12). 따라서 FcεRI α chain 발현 억제는 IgE를 매개로 한 알러지 반응을 감소시킬 수 있을 것이다. 최근, 녹차 카테킨의 (-)-epigallocatechin-3-O-gallate(EGCG), 연수의 kaempferol, 곰피의 dioxinodihydroeckol, phlorofucofuroeckol A 과 같은 성분이 FcεRI 발현을 억제함으로써 항알러지 활성을 갖는다고 보고되고 있지만(13-16), 구절초 추출물에 대한 연구는 아직 이루어지지 않고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 인간 호염기구형 세포, KU812F 세포의 FcεRI α chain 발현에 있어 구절초 에탄올 추출물에 의한 저해 효과에 대해 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

시료 및 재료

구절초는 2010년산(제천한방약초, Jecheon, Korea), RPMI-1640 배지, fetal bovine serum(FBS) 및 penicillin-streptomycin solution 은 HyClone사(Logan, UT, USA), histamine, o-phthalaldehyde (OPA) 및 dimethylsulfoxide(DMSO)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA), Celltiter 96[®]AQ_{UCOUS} One Solution Cell Proliferation Assay, MMLV-reverse transcriptase, Taq DNA polymerase는 Promega사(Madison, WI, USA), anti-human FcεRI 항체(CRA-1)는 Kyokuto 사(Tokyo, Japan), FITC-conjugated F(ab')₂ goat anti-mouse IgG 는 Jackson ImmunoResearch Lab.(West Grove, PA, USA), TRI_{ZOL} reagent는 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

시료의 추출

건조된 구절초에 10배의 80% 에탄올을 첨가하여 4시간 동안

*Corresponding author: Dae-Seok Byun, Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Tel: 82-51-629-5844

Fax: 82-51-629-5842

E-mail: dsbyun@pknu.ac.kr

Received January 10, 2011; revised February 18, 2011;

accepted February 22, 2011

3회 반복 추출한 후, 원심분리 한 후 여과하였다. 여과액을 회전식 진공농축기로 감압 농축한 후, 동결 건조하여 -20°C에서 보관하면서, DMSO에 용해하여 본 실험에 사용하였다.

세포배양, 시료처리

본 실험에 사용한 호염기성 세포주 KU812F는 ATCC로부터 분양 받아, 10% FBS, 및 100 units/mL penicillin, 및 100 µg/mL streptomycin이 첨가된 RPMI-1640 배지에, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였으며, 2-3일 간격으로 계대 배양하면서 사용하였다. KU812F 세포는 DMSO에 희석된 여러 가지 농도의 시료와 함께 24시간 배양한 후, 10 µg/mL CRA-1/Tyrode buffer(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.4 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 1.8 mM CaCl₂)로 37°C에서 30분간 자극하였다.

세포독성 측정

구절초 추출물에 의한 세포독성은 Celltiter 96[®]AQ_{aqueous} One Solution을 사용하여 측정하였다. KU812F 세포를 2.5×10⁴ cells/plate의 농도로 분주하여, DMSO로 희석한 각 농도별 추출물과 함께 무혈청 조건하에서 24시간 동안 배양하였다. 세포독성을 측정하기 위해, Celltiter 96[®]AQ_{aqueous} One Solution을 첨가하여, 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader(Molecular Devices, VersaMax, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 측정하였다. 세포 생존율은 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 나타내었다.

세포표면 FcεRI α chain 발현량 측정

세포표면의 FcεRI α chain 발현량은 flow cytometry에 의해 측정되었다. KU812F cells(1×10⁶ cells)를 10 µg/mL CRA-1/1% BSA와 60분간 반응시킨 후, PBS로 washing하였다. 10 µg/mL FITC-conjugated F(ab')₂ goat anti-mouse IgG와 반응시킨 후, PBS로 washing하여, flow cytometry로 측정하였다(Beckman Coulter, EPICS[®]XL, Fullerton, CA, USA). Negative control로 CRA-1대신 mouse IgG 항체를 사용하였다.

FcεRI α chain mRNA 발현량 측정

FcεRI α chain mRNA 발현량은 RT-PCR에 의해 확인되었다. RNA를 TRIzol을 이용하여 추출한 후, oligo(dT)₁₅ primer와 MMLV reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA를 specific sense 와 antisense primers를 이용하여 PCR증폭하였으며, human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)를 internal control로 이용하였으며, 프라이머 배열은 Table 1에 나타내었다. FcεRI α chain과 G3PDH 유전자는 94°C, 30-min denaturing; 55°C, 30 min annealing; and 72°C, 1 min extension, 18 cycles 실시하였다. 증폭된 PCR산물은 1% agarose로 전기영동하고, ethidium bromide로 염색한 후 분석하였다.

히스타민 측정

히스타민 함량은 형광 분석법에 의해 측정하였다(17). 추출물이 처리된 세포를 회수하여 PBS로 washing한 후, 10 µg/mL CRA-1/Tyrode buffer의 농도로 자극하였다. 상층액에 1 N NaOH 및 0.2% OPA를 첨가하여 얼음 위에서 40분간 반응시켜 3 N HCl의 첨가에 의해 반응을 정지시킨 후, 형광강도를 microplate fluorescence reader(BioTek, FLx800, Winooskin, VT, USA)를 이용하여 Ex파장 360 nm 및 Em 파장 460 nm에서 측정하였다. 세포내 히스타민 농도는 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도

Table 1. Primer sequences used in this study

Name	Sequences	
FcεRI α-chain	Sense	5'-CTTAGGATGTGGGTTCAAGAAGT-3'
	Antisense	5'-ACAGTGGAGAATACAAATGTCA-3'
G3PDH	Sense	5'-GCTCAGACACCATGGGGAAGGT-3'
	Antisense	5'-GTGGTGCAGGAGGCATTGCTGA-3'

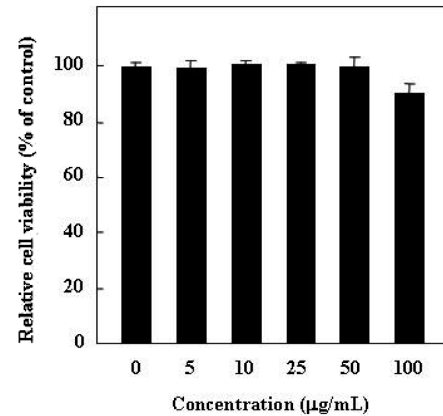


Fig. 1. Effects of CZ extract on cell viability. KU812F cells were cultured in the presence of different concentrations of CZ extract for 24 h, and the cell viabilities were determined using Celltiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Each determination was made in triplicate and data shown are means±SD.

를 백분율로 환산하여 나타내었다.

통계학적 분석

대조군과 구절초 추출물 처리군의 실험결과에 대한 통계처리는 Student's *t*-test로 비교하였다. 통계처리 후 *p*값이 0.05 미만일 경우(*p*<0.05) 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

KU812F 세포에 대한 구절초 추출물의 세포독성효과

KU812F 세포의 구절초 추출물에 대한 세포독성을 측정하였다. 여러 가지 농도의 구절초 추출물을 24시간 처리한 후, 세포 생존율을 측정한 결과를 대조군에 대한 실험군의 세포생존율을 백분율로 나타내었다. Fig. 1과 같이 각각의 구절초 추출물은 0-50 µg/mL의 농도에서 어떠한 독성도 나타내지 않았으며, 100 µg/mL의 농도에서는 독성이 나타났으므로, 본 실험에서는 독성이 나타나지 않는 범위의 추출물을 사용하였다.

세포표면 FcεRI α chain 발현 억제 효과

고친화성 IgE 수용체, FcεRI은 비만세포와 호염기구 세포표면에 발현하고 있으며, IgE를 매개로 한 알러지 반응에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(18-20). FcεRI α chain 세포 표면 발현에 있어 구절초 추출물에 의한 저해효과를 평가하기 위해 여러 가지 농도의 구절초 추출물을 무혈청 조건하에서 24시간 배양한 후, CRA-1 항체를 이용하여 세포 표면에서의 FcεRI α chain 발현량을 flow cytometry로 분석하였다. FcεRI α chain 발현량은 구절초 추출물 0, 10, 25, 50 µg/mL의 농도에서 각각 29.9, 27.8, 25.4 및 19.9%였으며, 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

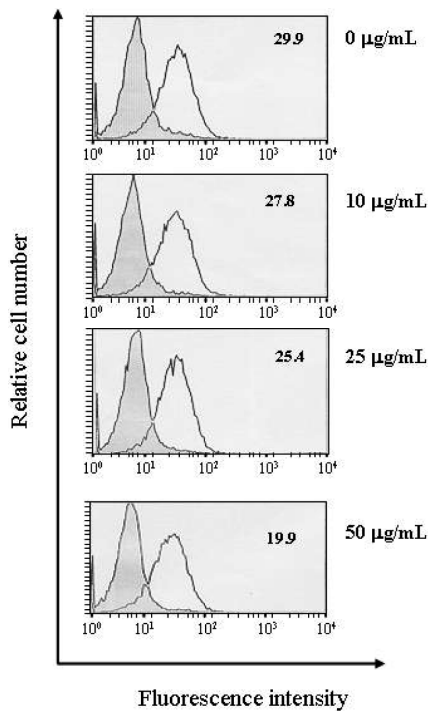


Fig. 2. Effects of CZ extract on the cell surface expression of FcεRI. KU812F cells were cultured in the presence of different concentrations of CZ extract. The cells were then incubated with CRA-1 followed by staining with the FITC-conjugated F(ab)²₂ goat anti-mouse immunoglobulins. Stained cells were then analyzed by flow cytometry. The percentage of FcεRI-positive cells was calculated with the arbitrary 2% cutoff position as determined by the negative control. The percentage of cell expressing the cell surface FcεRI is shown in each figure, and the value in the figure is the mean fluorescence intensity of CRA-1.

세포표면 FcεRI α chain mRNA 발현 억제 효과

구절초에 의한 FcεRI α chain 유전자 발현 조절 효과를 검토하기 위해, FcεRI α chain mRNA 수준이 구절초 추출물이 처리된 KU812F 세포로부터 추출한 총 RNA를 이용하여 RT-PCR에 의해 측정되었다. 무처리 KU812F 세포에서는 FcεRI α chain mRNA가 명확히 확인된 반면, 구절초 추출물이 처리된 세포에서는 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 구절초 추출물에 의한 세포표면 FcεRI α chain 발현 억제효과는 FcεRI α chain 유전자 발현 감소에 의한 것으로 생각되어진다.

FcεRI α chain 유전자 발현은 GATA-1 및 Elf-1와 같은 전사인자에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다(21,22). 구절초에 의한 FcεRI α chain 발현 저해 기전에 있어, 이 유전자를 암호화하는 전사인자 조절에 관한 구체적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

히스타민 유리 억제효과

CRA-1를 포함한 다양한 자극은 비만세포 및 호염기구 세포 내 히스타민을 유리시킨다(8). 호염기구 세포 탈과립에 있어, 구절초에 의한 억제효과를 검토하기 위해, KU812F 세포를 여러가지 농도의 구절초 추출물을 처리하여, CRA-1로 자극한 후, 유리되는 히스타민을 측정하였다. 5, 10, 25, 50 μg/mL의 구절초 추출물이 처리된 세포에서 각각 97, 92, 84, 77%의 히스타민이 유리되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 구절초 추출물이 FcεRI α chain 발현을 억제함으로써 호염기구를 불활성화에 관여하는 것으로서, 알러지

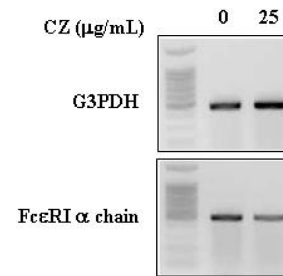


Fig. 3. Effects of CZ extract on FcεRI α chain mRNA expression. KU812F cells were cultured in 25 μg/mL of CZ extract for 24 h under serum-free conditions, total cellular RNA was isolated from the cells, and FcεRI α chain and G3PDH mRNA levels were analyzed by RT-PCR.

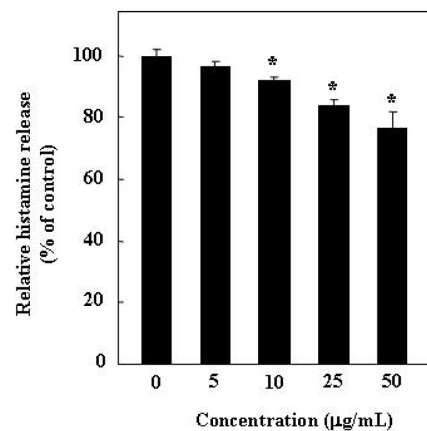


Fig. 4. Effects of CZ extract on FcεRI-mediated histamine release. KU812F cells were cultured in the presence of different concentrations of CZ extract (0, 5, 10, 25 and 50 μg/mL) for 24 h. The cells were stimulated with CRA-1 antibody for 30 min. Histamine content was determined by a spectrofluorometric method. Each value represents the mean±SD of three different experiments. *Values are significantly different from control ($p < 0.05$).

반응을 감소시키는 것으로 생각된다.

구절초 추출물의 FcεRI α chain 유전자 발현 감소에 의한 세포표면 발현량이 감소되고, 이로 인해, 히스타민 유리 감소 효과는 감태, 어성초 및 지리 오갈피 추출물과 유사한 활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다(23-25).

예로부터 구절초는 폐렴, 기관지염, 기침, 감기, 인두염, 방광질환, 부인병, 냉증, 위장병 및 고혈압 등에 사용하여 왔다(1,2). 구절초의 함유성분으로는 항암, 항염증, 간보호 작용을 갖는 플라보노이드계의 linarin과 acacetin이 보고되고 있다(3-7). 항알러지 활성을 갖는 물질 탐색의 일환으로 구절초를 에탄올로 추출하여, 알러지 반응 조절 연구에 많이 이용되는 호염기구형 세포, KU812F 세포에 있어, 구절초 추출물이 KU812F 세포의 탈과립을 저해한다는 것을 알 수 있었다.

알러지 반응은 비만세포 및 호염기구 표면에 발현하고 있는 고친화성 IgE 수용체인 FcεRI과 알레르겐 및 특이적 항체와의 결합에 의해 일어나며, 항원응집은 다양한 세포 내 신호전달을 일으켜, 히스타민과 같은 염증매개인자를 분비하게 된다(8,26-30). 따라서, 구절초에 의한 보다 구체적인 연구를 위해, 항알러지 활성을 갖는 단일 성분을 분리하여, 이에 대한 세포 내 신호전달체 기전에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

KU812F 세포는 세포표면에 FcεRI를 발현하고 있어, IgE를 매개로 한 알러지 반응에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다. KU812F 세포를 이용하여, FcεRI α chain 발현에 있어 구절초 에탄올 추출물의 저해효과를 조사하였다. 본 연구 결과, FcεRI α chain의 세포표면 발현량 및 mRNA수준을 구절초 추출물이 감소시키는 것을 flow cytometry 및 RT-PCR로 각각 확인하였다. 또한, 구절초 추출물은 CRA-1 자극에 의한 히스타민 유리를 농도 의존적으로 억제시켰다. 이러한 결과는 구절초 추출물이 FcεRI α chain 발현을 감소시킴으로써, 히스타민 유리가 억제되고, 이를 통해 항알러지 활성화에 기여하는 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단 기초연구사업(No. 2010-0012943) 지원으로 수행되었으며, 지원에 감사 드립니다.

문 헌

- Kwon HS, Ha TJ, Hwang SW, Jin YM, Nam SH, Park KH, Yang MS. Cytotoxic flavonoids from the whole plants of *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitamura. *J. Life Sci.* 16: 746-749 (2006)
- Kim YY, Lee SY, Yim DS. Biological activities of linarin from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*. *J. Pharm. Soc. Korea* 45: 604-610 (2001)
- Singh RP, Agrawal P, Yim DS, Agarwal C, Agarwal R. Acacetin inhibits cell growth and cell cycle progression, and induces apoptosis in human prostate cancer cells: Structure-activity relationship with linarin and linarin acetate. *Carcinogenesis* 26: 845-854 (2005)
- Hsu YL, Kuo PL, Lin CC. Acacetin inhibits the proliferation of HepG2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 67: 823-829 (2004)
- Seo JY, Lim SS, Park JA, Lim JS, Kim HJ, Kang HJ, Park JHY, Kim JS. Protection by *Chrysanthemum zawadskii* extract from liver damage of mice caused by carbon tetrachloride is maybe mediated by modulation of QR activity. *Nutr. Res. Pract.* 4: 93-98 (2010)
- Kim YY, Lee SY, Yim DS. Biological activities of linarin from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*. *Yakhak Hoeji* 45: 604-610 (2001)
- Han S, Sung KH, Yim D, Lee S, Lee CK, Ha NJ, Kim K. The effect of linarin on LPS-induced cytokine production and nitric oxide inhibition in murine macrophage cell line RAW264.7. *Arch. Pharm. Res.* 25: 170-177 (2002)
- Kinet JP, Blank U, Brini A, Jouvin MH, Kuster H, Mejan O, Ra C. The high affinity receptor for immunoglobulin E: A target for therapy of allergic diseases. *Int. Arch. Aller. A. Imm.* 94: 51-55 (1991)
- Blank U, Rivera J. The ins and outs of IgE-dependent mast cell exocytosis. *Trends Immunol.* 25: 266-273 (2004)
- Kinet JP, 1999. The high affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 931-972 (1999)
- Drombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, Koller BH, Kinet JP. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor ε chain gene. *Cell* 75: 969-976 (1993)
- Hakimi JC, Seals JA, Kondas L, Pettine W, Danko W, Kochan J. The α subunit of the human IgE receptor (FcεRI) is sufficient for high affinity IgE binding. *J. Biol. Chem.* 265: 22079-22081 (1990)
- Fujimura Y, Tachibana H, Yamada K. A tea catechin suppresses the expression of the high-affinity IgE receptor FcεRI in human basophilic KU812 cells. *J. Agr. Food Chem.* 49: 2527-2531 (2001)
- Fujimura Y, Tachibana H, Maeda-Yamamoto M, Miyase T, Sano M, Yamada K. Antiallergic tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate, suppresses FcεRI expression in human basophilic KU812 cells. *J. Agr. Food Chem.* 50: 5729-5734 (2002)
- Shim SY, Choi JS, Byun DS. Kaempferol isolated from *Nelumbo nucifera* stamens negatively regulates FcεRI expression in human basophilic KU812F cells. *J. Microbiol. Biotechn.* 19: 155-160 (2009)
- Shim SY, Choi JS, Byun DS. Inhibitory effects of phloroglucinol derivatives isolated from *Ecklonia stolonifera* on Fc(ε)RI expression. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 4734-4739 (2009)
- Shore PA, Burkhalter A, Cohn VH, Victor HC. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 127: 182-186 (1959)
- Blank U, Ra C, Miller L, White K, Metzger H, Kinet JP. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* 337: 187-189 (1989)
- Miller L, Blank U, Metzger H, Kinet JP. Expression of high affinity binding of human immunoglobulin E by trasfected cells. *Science* 244: 334-337 (1989)
- Ra C, Jouvin MH, Kinet JP. Complete structure of the mouse mast cell receptor for IgE (FcεRI) and surface expression of chimeric receptors (rat-mouse-human) on transfected cells. *J. Biol. Chem.* 264: 15323-15327 (1989)
- Nishiyama C. Molecular mechanism of allergy-related gene regulation and hematopoietic cell development by transcription factors. *Biosc. Biotech. Bioch.* 70: 1-9 (2006)
- Nishiyama C, Yokota T, Okumura K, Ra C. The transcription factors Elf-1 and GATA-1 to cell-specific enhancer elements of human high-affinity IgE receptor α-chain gene. *J. Immunol.* 163: 623-630 (1999)
- Shim SY, Quang-To L, Lee SH, Kim SK. *Ecklonia cava* extract suppresses the high affinity IgE receptor, FcεRI expression. *Food Chem. Toxicol.* 47: 555-560 (2009)
- ShimSY, Seo YK, Park JR. Down-regulation of FcεRI expression by *Houttuynia cordata* Thunb extract in human basophilic KU812F cells. *J. Med. Food* 12: 383-388 (2009)
- Shim SY, Sung CK, Lee SW, Choi YJ, Kim HR, Byun DS. Inhibitory effects of *Acanthopanax chiisanensis* ethanolic extracts on FcεRI α chain expression. *J. Life Sci.* 17: 1511-1516 (2007)
- Siraganian RP, Zhang J, Suzuki K, Sada K. Protein tyrosine kinase Syk in mast cell signaling. *Mol. Immunol.* 38: 1229-1233 (2002)
- Amoui M, Drrova L, Tolar P, Draber P. Direct interaction of Syk and Lyn protein tyrosine kinases in rat basophilic leukemia cells activated via type Fc εsiln receptors. *Eur. J. Immunol.* 27: 321-328 (1997)
- Eiseman E, Bolen JB. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature* 355: 78-80 (1992)
- Hata D, Kawakami Y, Inagaki N, Lantz CS, Kitamura T, Khan WN, Maeda-Yamamoto M, Miura T, Han W, Hartman SE. Involvement of Bruton's tyrosine kinase in FcεRI-dependent mast cell degranulation and cytokine production. *J. Exp. Med.* 187: 1235-1247 (1998)
- Nadler M, Matthews J, Turner SA, Kinet JP. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor FcεRI coupling form to function. *Adv. Immunol.* 76: 325-355 (2000)