

Effects of *Platycodon Grandiflorum* Including Platycodin D in IgE/Ag-Induced Type I HypersensitivitySae-Jin Park¹, Jong Woo Kim², Sang Jin Park² and Tack-Joong Kim^{1*}¹Division of Biological Science and Technology, College of Science and Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea²B&C Biopharm, Suwon 443-270, Korea

Received January 27, 2012 / Revised April 18, 2012 / Accepted May 8, 2012

Allergic response is associated with mast cells, through the release of arachidonic acid, proinflammatory cytokines, and histamine. We investigated the effect of *Platycodon grandiflorum* including platycodin D (PG-Platycodin D) on allergic responses in an animal model and on mast cell degranulation. PG-Platycodin D suppressed the release of β -hexosaminidase, a type of marker associated with degranulation. PG-Platycodin D efficiently inhibited the passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction in ICR mice. In addition, molecular analysis demonstrated that PG-Platycodin D inhibited mRNA expression of both IL-3. These results suggest that PG-Platycodin D can inhibit mast cell degranulation through the inhibition of IL-3 mRNA expression, and that PG-Platycodin D may potentially serve as an anti-allergic agent.

Key words : Mast cells, Allergic response, Platycodin D, Passive cutaneous anaphylaxis

서 론

알러지성 비염이나 알러지성 아토피, 알러지성 천식 및 아나필락틱 쇼크(anaphylactic shock) 등을 포함하는 알러지로 인한 질병은 전 세계적으로 급증하고 있으며 이러한 알러지성 질환을 치료하거나 증상을 완화하는 방향에 대한 연구가 진행되고 있다[6].

비만세포는 즉각적인 과민반응을 유발하는 주요 효과세포이며, 면역반응에 있어서 다양한 기능을 담당한다. 게다가 비만세포는 알러지 반응을 증가시키는 주요한 세포이다. 쥐의 호염기성 백혈구 조직으로부터 유래된 비만세포인 RBL-2H3세포는 활성화 되었을 경우 알러지 반응에 의한 탈과립현상을 통해 히스타민이나 β -hexosaminidase, 대사산물, 그리고 염증성 사이토카인 등을 방출한다[2,4]. 비만세포는 각각 단일의 α chain과 β chain, 그리고 두 개의 γ chain을 갖는 Fc epsilon Receptor 1 (Fc ϵ RI)을 세포표면에 높은 수준으로 발현하고 있다[7]. 제 1형 알러지의 경우, 비만세포(mast cell)와 호염기구의 표면에 존재하는 수용체인 Fc ϵ RI이 알러지를 유발하는 항체인 immunoglobulin E (IgE)와 결합하여 항원을 접하게 되면 알러지 반응이 활성화 되는 방식으로 진행된다[3].

호염기구나 활성화된 비만세포에서 알러지 반응에 의해 방출되는 사이토카인의 일종인 IL-3는 면역 반응에 있어서 T 세포의 성장과 분화를 촉진시키는 것이 보고되었다[9].

항 알러지 약물로서 대표적으로 흔히 사용되는 제제는 항히스타민제나 특정 알러젠의 수용체에 대한 길항제들을 예로 들 수 있으나, 이러한 약물은 환자에게 투여 후 단기간 내에 내성을 보이므로 일정기간이 지난 후, 혹은 반복 투여 시 환자들의 증상을 효과적으로 호전시키지 못하는 경우가 많다. 따라서, 부작용이 없는 알러지 치료제 개발이 요구되고 있다.

도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 우리나라의 전통 한방에서 진해제, 거담 및 소염제로 주로 사용되었으나 이외에도 뇌신경보호 등 다양한 약리작용으로 인하여 최근 주목을 받고 있는 식물로서, 도라지에서 약효를 나타내는 주 성분은 사포닌계로서 platycodin A, C, D와 polygalacin D, spinasterol, spinasterol glucoside, inulin 등의 성분이 알려져 있다. 특히, platycodin D는 도라지 뿌리에 존재하는 트리테펜 사포닌계(triterpenoid saponin) 화합물 중 하나로 항염증효과, 항비만효과, 콜레스테롤 저하효과, 통각 억제효과가 있는 것으로 보고되었다[5,10].

본 연구에서는 platycodin D를 포함하는 도라지 추출물(PG-Platycodin D)로부터 항 알러지 효과의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

Mouse monoclonal anti-DNP IgE antibody와 dinitrophenyl-conjugated human serum albumin (DNP-HSA), Evans blue는 WelGENE. (Daegu, Korea)에서 구입하였다. P-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (p-NAG)는 MP

*Corresponding author

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

E-mail : ktj@yonsei.ac.kr

Biomedicals. (Solon, OH, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 1%, 3% 그리고 5%의 platycodin D를 포함하는 도라지 추출물 (PG-Platycodin D)은 표준화되어 (주)비엔씨바이오팜으로부터 제공받았다.

실험동물

수컷 ICR mice (7주)는 Orient Bio (Gangneung, Korea)로부터 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 platycodin D의 1%, 3% 그리고 5%를 포함하는 도라지 추출물(PG-Platycodin D) 100 mg/kg의 농도로 경구투여 하여, 1시간 후에 3% Evans blue와 혼합된 DNP-HSA (200 µg)을 정맥주사 하였다. DNP-HSA 처리 2시간 후에 ICR mice를 안락사 시키고 귀의 IgE/Ag 반응에 의한 Evans blue 염색약의 양을 육안으로 관찰하였다. 또한, 500 µl formamide에 해당 귀를 절개 하여 넣고, 63°C에서 하루 동안 반응시켜 microplate reader를 이용하여 620 nm의 흡광도로 염색약의 양을 측정하였다.

세포배양

쥐의 비만세포인 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, Daegu, Korea) 배지에서 2-3일마다 배양액을 교환해 주었으며, 배양 환경은 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

β-hexosaminidase 방출량 측정

탈과립 현상의 표지 물질인 β-hexosaminidase의 방출량을 측정함으로써 알러지 반응 억제 정도를 세포 수준에서 알아보았다. 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 배양하였다. 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 CaCl₂, and 0.1% BSA)로 두 번 세척하였고, 37°C에서 30분 동안 PIPES buffer에 녹인 PG-Platycodin D를 처리하였다. 세포는 37°C에서 15분간 DNP-HSA (25 ng/ml)와 반응시켰으며 안정화를 위해 5분간 얼음 위에 두었다. β-hexosaminidase 방출량을 측정하기 위해

서, IgE/Ag 반응이 일어난 세포가 존재하는 well의 PIPES buffer 상층액과 β-hexosaminidase의 기질인 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 녹인 p-NAG를 96-well plate에서 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰고, 0.1 M carbonate buffer (pH 10.5)를 처리하여 반응을 종결시킨 뒤, microplate reader를 이용하여 405 nm의 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, PG-Platycodin D를 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 흡광도계를 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-3의 경우, 94°C 1분, 60°C 45초, 72°C 45초로 24 cycles을 수행하였다. PCR 산물은 2% agarose gel로 전기영동을 한 후, ethidium bromide을 첨가하여 밴드를 가시화 하였다. 사용된 primer는 다음과 같다. IL-3 sense 5'-GTATGCTGCTCCCGCTCCTGATG-3'; IL-3 antisense 5'-CATTCCACGGTCATAGGGCGAAAG-3'; β-actin sense 5'-ATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGC-3'; and β-actin antisense 5'-AGCATTGCGGTGCACGATGGAGGG-3'.

통계처리

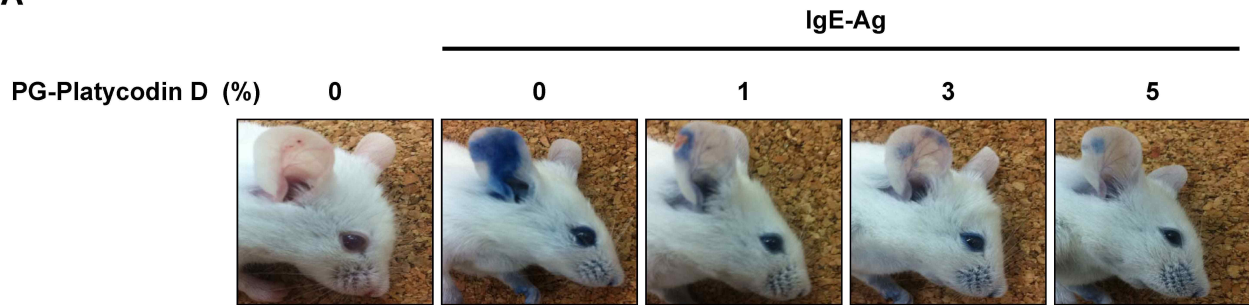
모든 실험 결과는 평균±표준편차(means±SD)로 나타내었다. 통계처리는 Dunnett's test로 검정하였고 정상 대조군과 비교하여 <0.05 이하의 경우 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

IgE/Ag에 의해 매개된 아나필락틱 쇼크에 대한 PG-Platycodin D의 억제 효과

아나필락틱 쇼크 평가를 위한 수동피부과민반응 동물 모델은 알러지 반응의 생체 수준 평가에 광범위하게 사용되기 때문에 수동피부과민반응의 억제 효과에 대해 PG-Platycodin D를 이용하여 확인하였다. Anti-DNP-specific IgE를 ICR mice의 귀에 피하주사 하고, Platycodin D의 함량이 1%, 3%, 5%인 PG-Platycodin D 100 mg/kg으로 경구투여 한 후, Evans blue와 DNP-HSA를 정맥주사하여, 귀의 항원-항체 반응에 의한 Evans blue 염색약의 양을 육안으로 확인한 결과, IgE/Ag에 의해 매개된 수동피부과민반응이 대부분 억제됨을 알 수 있었다. 생화학적인 분석을 위하여, formamide에 해당 귀를 절개

A



B

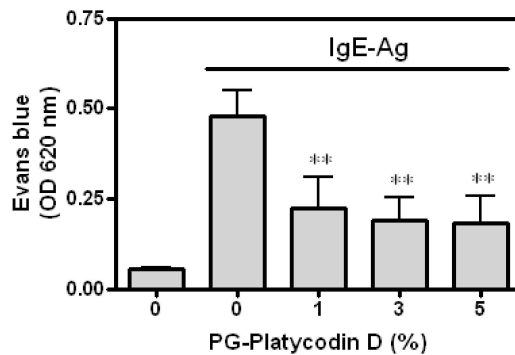


Fig. 1. Effect of PG-Platycodin D on IgE/Ag-induced passive cutaneous anaphylaxis (PCA). Seven-week-old ICR mice were intravenously injected with 200 μ g DNP-HSA containing 3% Evans blue 24 hrs after intradermal injection of DNP-IgE (0.5 μ g) into the ear. PG-Platycodin D was orally administered 1 hr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

하여, 63°C에서 하루 동안 반응시켜 염색약의 양을 측정할 결과, Evans blue의 양이 Platycodin D의 함량에 따라 농도 의존적으로 저하되는 것을 확인하였다(Fig. 1). 따라서, PG-Platycodin D가 *in vivo* 알러지 반응을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

IgE/Ag에 의해 매개된 비만세포의 탈 과립현상에 대한 PG-Platycodin D의 억제 효과

*In vivo*에서 PG-Platycodin D의 항 알러지 효과를 확인한 후, 비만세포에서의 항 알러지 효과를 추가적으로 연구하였다. 비만세포는 히스타민, 세로토닌, 헤파린, 그리고 다양한 전 염증성 사이토카인과 같은 매개 물질을 방출하는 알러지 반응의 주요 효과 세포로서 알려져 있다[1,7]. 탈 과립현상의 생체표지물질로서 β -hexosaminidase를 이용하여 비만세포 내에서 알러지 반응 결과 물질의 방출량을 측정할 결과, platycodin D의 함량에 의해 β -hexosaminidase의 방출량이 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 추가적으로 세포독성실험에서 100 μ g/ml 용량의 PG-Platycodin D에서 세포독성은 관찰되지 않았다(data not shown). 이 결과를 통해 platycodin D의 함량에 의해 비만세포의 탈 과립현상을

억제함으로써 항 알러지 효과가 나타남을 알 수 있었다.

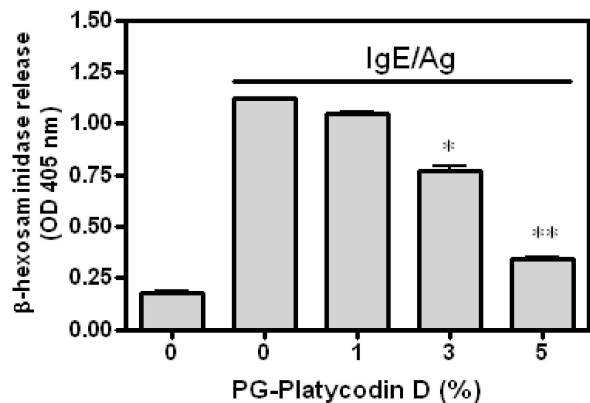


Fig. 2. Effect of PG-Platycodin D on IgE/Ag-stimulated mast cell degranulation. The cells were incubated overnight in 24-well plates with 200 ng/ml of DNP-specific IgE. The medium was replaced with PIPES buffer containing the indicated concentrations of PG-Platycodin D, and the cells were then challenged 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 \pm SD (n=5). * p <0.05, ** p <0.01.

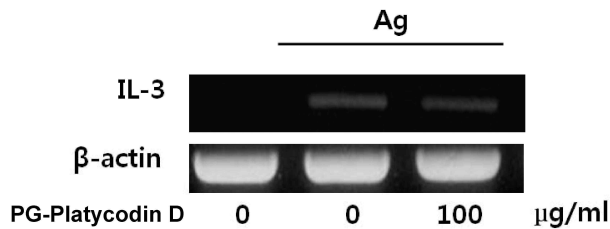


Fig. 3. Effect of PG-Platycodin D on the expression of IL-3 in IgE/Ag-stimulated mast cells. The IgE/Ag-sensitized RBL-2H3 cells were treated with 100 µg/ml of PG-Platycodin D (5%) and then challenged with 25 ng/ml DNP-HSA for 1 hr. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR.

PG-Platycodin D에 의한 비만세포 내 IL-3 사이토카인 유전자 발현 억제 효과

알러지 반응에 있어서 IL-3는 염증성 사이토카인으로서 작용한다. IL-3는 호염기구의 히스타민 방출 자극이나 대식세포의 활성화 등의 기능을 하며, 항원에 의해 자극된 T세포에서 특이적으로 작용된다. 쥐의 경우 비만세포에서 생성되기도 하며 염증반응과 같은 과정에도 작용하는 것으로 알려져 있다 [8]. 본 연구에서 IgE/Ag 반응에 의해 활성화된 RBL-2H3 세포에서 PG-Platycodin D가 IL-3의 발현에 있어 어떤 효과를 나타내는지 확인하였다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이, 5%의 platycodin D를 포함하는 PG-Platycodin D 100 µg/ml 처리했을 경우 IgE/Ag 반응에 의한 IL-3의 유전자 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이로부터, PG-Platycodin D가 IL-3의 유전자 발현을 억제함으로써 IgE/Ag 반응에 의한 탈 과립현상을 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 Platycodin D가 포함된 도라지가 비만세포의 IgE/Ag 반응에 의해 매개되는 탈 과립현상을 효과적으로 억제한다는 것을 알 수 있었다. 그러나, 현재까지의 연구로는 알러지 반응 억제 관련 인자로서 PG-Platycodin D가 정확히 어떠한 방식으로 분자 수준의 기전에 작용하는지에 대해 연구가 많이 부족하며, 더 연구가 진행될 필요성이 있다. 결과적으로, PG-Platycodin D가 알러지 반응을 억제하거나 저해할 수 있는 효과를 입증하였고, PG-Platycodin D를 이용하여, 여러 가지 알러지 질환 즉, 알러지성 비염, 알러지성 아토피성 피부염, 알러지성 결막염, 알러지성 천식, 음식 알러지를 포함한 항 알러지의 기능성 천연 소재로서 사용 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림바이오기술산업화지원사업(810007-03-2-SB220)에 의해 이루어진 것임.

References

1. Bansal, G., Xie, S., Rao, K., Nocka, K. H. and Druey, K. 2008. Suppression of immunoglobulin E-mediated allergic responses by regulator of G protein signaling 13. *Nat. Immunol.* **9**, 73-80.
2. Gibbs, B. F., Plath, K. E., Wolff, H. H. and Grabbe, J. 2002. Regulation of mediator secretion in human basophils by p39 mitogen-activated protein kinase: phosphorylation is sensitive to the effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors and calcium mobilization. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 391-400.
3. Han, E. H., Hwang, Y. P., Kim, H. G., Choi, J. H., Im, J. H., Yang, J. H., Lee, H. U., Chun, S. S., Chung, Y. C. and Jeong, H. G. 2011. Inhibitory effect of *Pleurotus eryngii* extracts on the activities of allergic mediators in antigen-stimulated mast cells. *Food Chem Toxicol.* **49**, 1416-1425.
4. Hines, C. 2002. The diverse effects of mast cell mediators. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **22**, 149-160.
5. Huang, K. C. 2000. *The Pharmacology of Chinese Herbs*, CRC Press, Boca Raton.
6. Kay, A. B. 2001. Allergy and allergic diseases. *New Engl. J. Med.* **344**, 30-37.
7. Lee, J. H., Chang, S. H., Park, Y. S., Her, E., Lee, H. Y., Park, J. W., Han, J. W., Kim, Y. M. and Choi, W. S. 2004. *In-vitro* and *in-vivo* anti-allergic actions of *Arecae semen*. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**, 927-933.
8. Lorentz, A., Klopp, I., Gebhardt, T., Manns, M. and Bischoff, S. 2003. Role of activator protein 1, nuclear factor-kappa B, 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.
9. Masahiro, M., Shigehiro, M., Kenji, O., Akira, K. and Kazuhide, H. 2004. Differential regulation of IL-4 expression and degranulation by anti-allergic olopatadine in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochem Pharmacol.* **67**, 1315-1326.
10. Son, I. H., Park, Y. H., Lee, S. I., Yang, H. D. and Moon, H. I. 2007. Neuroprotective activity of triterpenoid saponins from platycodi radix against glutamate-induced toxicity in primary cultured rat cortical cells. *Molecules* **12**, 1147-1152.

초록 : Platycodin D를 포함하는 도라지 추출물이 IgE/Ag 유도 제 1형 과민반응에 미치는 영향

박세진¹ · 김종우² · 박상진² · 김택중^{1*}

(¹연세대학교 과학기술대학 생명과학기술학부, ²주비엔씨바이오팜)

최근 알러지성 비염, 알러지성 피부염, 알러지성 천식, 알러지성 과민반응 등과 같은 질병이 점차 늘어나고 있으며 그에 따른 효과적인 치료제나 효율적인 치료법이 시급한 실정이다. 본 연구에서 동물모델과 비만세포 탈과립작용에서 Platycodin D가 포함된 도라지 추출물(PG-Platycodin D)의 항알러지 효과를 연구하였다. *In vivo* 상에서 PG-Platycodin D가 항원-항체 반응에 의한 알러지 반응을 효과적으로 억제하는지 살펴보기 위한 아나필락틱 쇼크 평가에서 Platycodin D의 함량이 1%에서 5%까지 증가한 도라지 추출물일수록 *in vivo* 수준에서의 알러지 반응이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 항원-항체 반응에 의해 매개된 RBL-2H3 비만세포의 탈 과립현상에 대한 PG-Platycodin D의 효과를 알아보기 위한 β -hexosaminidase의 방출량 측정에서 Platycodin D의 함량이 1%에서 5%까지 포함된 도라지 추출물에서 농도가 증가함에 따라 β -hexosaminidase의 방출량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한, PG-Platycodin D의 처리가 항원-항체 반응에 의해 매개된 RBL-2H3 비만세포 내의 IL-3의 발현이 감소하는 양상을 확인할 수 있었다. 이들의 결과로부터 Platycodin D가 포함된 도라지 추출물이 IL-3의 유전자 발현을 억제함으로써 항원-항체 반응에 의한 탈 과립현상을 억제하여 알러지 작용을 제어하는 가능성을 확인하였다.