생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
44(2) : 118 ~ 124 (2013)

개옻나무 추출물의 IgE 매개성 알레르기 반응 억제 효과 및 기전

임한나 · 김영미*
덕성여자대학교 약학대학

Rhus Trichocarpa Suppresses IgE-mediated Allergic Response *In Vitro* and *In Vivo*

Hannah Lim and Young Mi Kim*
College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract − Mast cells is the key effector cells for IgE-mediated allergic responses. In this study, we investigated whether *Rhus trichocarpa* extract (RT) inhibited IgE-mediated allergic responses in mast cells and an allergic animal model. We further tried to find its mechanism of action in mast cells. We found that RT suppressed antigen-stimulated degranulation and production of TNF-α and IL-4 in rat basophilic leukemia (RBL)-2H3 mast cells and bone marrow-derived mast cells (BMMC), as well as IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in mice. As the mechanism of action of RT, it inhibited the activation of spleen tyrosine kinase (Syk), a pivotal signaling molecule for activation of mast cells and that of LAT, a downstream adaptor molecule of Syk in FcεRI-mediated signal pathways. RT also suppressed the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases and Akt. The current results demonstrated for the first time that RT has the anti-allergic effect through inhibiting degranulation and secretion of cytokines by suppression of Syk in antigen-stimulated mast cells. Therefore, RT might be useful for allergic diseases.

Key words – *Rhus trichocarpa*, Allergy, Mast cells, Syk, Passive cutaneous anaphylaxis

인체외부로부터 체내에 존재하지 않는 이물질(항원)이 몸 안으로 들어오면 몸 안에서는 이들을 제거하기위해 면역반응이 일어난다. 하지만 일부 사람은 우유나 계란 등과 같은 식품이나 우리 몸에 무해한 물질을 섭취 시에 면역반응이 지나치게 일어날 수 있는데 이를 알레르기 면역반응이라 한다.[1] 이러한 면역반응에 의해 초래되는 질환을 알레르기 질환이라 하며 우리나라 전 인구의 10~20%에서 관찰될 정도로 흔한 질환으로 증가 추세가 뚜렷하게 보이고 있다.[1]

비만세포는 항원 자극에 의한 알레르기 유발 염증성 매개체들의 분비를 통해 비염, 천식 및 아토피성 피부염 등 알레르기성 질환의 주요한 원인 세포로 잘 알려져 있다.[2] 항원으로 자극 된 비만세포에서 신호 경로의 활성은 Src-family kinase인 Lyn 및 Fyn, 그리고 Syk 등의 초기 신호전달 단백질의 활성화가 중요하게 작용한다. IgE-고친화성 수용체인 FcεR의 tyrosine phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif(ITAM)를 Lyn이 인산화를 하게 되고 이어 그 인산화된 잔기에 Syk의 결합은 두개의 SH2 domains에 의해 조절되고, 효소의 활성을 증가시키는 Syk에서 구조적인 변화를 일으킨다. 이는 LAT, SLP-76, Gab2, phospholipase(PL) C, PLD 등의 다른 하위 신호전달 단백질들의 활성을 유도하게 된다. 그 결과, 비만세포는 급성과 만성적인 알레르기성 반응을 조절하는 여러 알레르기성 매개체(히스타민, 사이토카인 및 아라키도닉 산 유도체 등)를 빠르게 분비하여 알레르기 반응을 유도하게 된다.[3]

현재, 알레르기 증상을 치료하기 위한 치료적인 접근법은 항원특이면역요법, DNA 백신, 항IgE 항체 투여, 가용성 IL-4 수용체 투여, 류코트리엔과 히스타민 길항제 투여 등이 시도되고 있다. 그러나 이러한 치료법들은 치료 비용, 치료의 불완전성 및 다양한 부작용 등으로 새로운 치료제가 필요한 실정이다. 따라서 최근 단백질인산화효소 억제제를 이용한 비만세포 활성의 억제는 새로운 치료법으로 관심의 대상이 되고있어 연구가 활발히 진행되고 있다.[1] 많은 식물 추출물들은 한국, 일본 및 중국 등 아시아 나라에서 질병 치

*교신저자(E-mail) : kym123@duksung.ac.kr
(Tel) : +82-2-901-8455

료를 위한 전통적인 민간요법으로 이용되어왔다. 따라서 본 연구에서는 비만세포 활성을 억제하는 것을 기전으로 하는 알레르기성 질환을 치료 효능이 우수한 천연식물 추출간 치료약물을 이용하고자한다.[4,5]

개옻나무(*Rhus trichocarpa* Miquel)는 옻나무과(Anacardiaceae)에 속하며, 국내에 서식하는 옻나무속 식물로는 개옻나무(Rhus trichocarpa)외에 옻나무(Rhus Veniciflua), 붉나무(Rhus Chinensis), 검양옻나무(Rhus succedanea), 산검양옻나무(Rhus sylvestris) 등이 있다.[6] 개옻나무는 중국, 일본 및 한국 등 온대지방에 분포하고 일부는 아열대와 열대지방에서도 서식한다. 주로 산기슭이나 중턱에서 자생하며 수액을 채취하여 도료로 이용하기도 하나,[7] 독성이 있어 피부염을 일으킬 수 있다. 건조한 수지는 한방에서 혈액순환을 통해 어혈을 제거하거나 통경 및 항균 효능이 있는 것으로 보고되어있으나,[8] 개옻나무 추출물의 항 알레르기효과에 대한 연구는 보고되어 있지 않다.

본 연구에서 개옻나무 추출물은 비만세포 활성화에 중요한 초기 신호전달 단백질인 Syk의 활성화 억제를 통해 하위 신호전달 단백질의 활성화를 억제하였으며 이러한 기전으로 비만세포의 항원자극에 의해 분비되는 히스타민이나 염증성 사이토카인의 억제를 통해 동물모델에서 알레르기 반응을 억제하였다. 따라서 본 연구에서는 개옻나무 추출물이 비만세포에 의해 매개되는 다양한 알레르기 질환 치료제의 재료로 활용될 수 있음을 제시하였다.

재료 및 방법

실험재료 – Minimal Essential Medium(MEM) 및 RPMI-1640 배양액은 GIBCO(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. PP2는 Calbiochem(La Jolla, CA, USA)에서 구입하였으며, Dinitrophenol(DNP)-specific monoclonal IgE, DNP-bovine serum albumin(BSA), diphenylhydramine(DPH), formamide 및 arabic gum은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Phospho(pY)-Syk, Phospho(pY)-LAT, LAT 및 phospho-tyrosine(pY)검출을 위한 항체는 각각 Cell Signalling Technology(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 그 이외에 phospho-Akt, phospho-Erk1/2, phospho-JNK, phospho-p38, Syk 및 actin 등을 검출하기 위한 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였으며 면역침강을 위한 protein A-agarose는 Roche사에서 구입하였다. 그 밖에 시약은 시판되는 최고의 품질의 제품을 구입하여 실험에 사용하였다.

실험동물 – 알레르기 반응 실험에 사용한 마우스는 (주)대한 바이오링크에서 생후 4 주령 수컷 Balb/c 마우스를 구입하여 동물실에서 최소 1주일 동안의 적응기간을 거친 후에 실험에 사용되었다. 사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였고, 동물실의 온도는 22±1°C, 습도는 55±10%로 유지하였으며, 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였다. 모든 실험동물은 군 당 마우스의 수는 5마리로 하였으며, 동물실험은 덕성여자대학교 동물실험윤리 규정에 따라 실험을 수행하였다.

개옻나무의 메탄올 추출물 제조 – 본 연구에 사용된 개옻나무(*Rhus trichocarpa* Miquel) 메탄올 추출물(Code no. 24-009)은 한국식물추출물은행으로부터 구입하여 사용하였다. 개옻나무 추출물은 DMSO에 용해시켜 세포실험 및 기전 연구를 진행하였고 알레르기 질환 동물실험은 5% 아라비아검 용액에 현탁액으로 조제 후 경구로 투여 하였으며, 음성 대조군으로 각각의 용매를 사용하여 실험의 정확성을 증가시켰다.

수동 피부 감작 알레르기 동물 모델 – IgE 및 비만세포 매개성 수동 피부 감작 알레르기 반응(passive cutaneous anaphylaxis, PCA)을 유도하기 위하여 마우스의 왼쪽 귀에 anti-DNP IgE 를 0.5 μg씩 주입하고 약 12시간 후에 5% 아라비아검 용액에 녹인 개옻나무 추출물(100-1000 mg/kg) 및 표준약물(세트리진 20 mg/kg)을 농도별로 경구투여 하였다. 1시간 후 항원(DNP-BSA)을 5 mg/ml 에반스 블루 염색액에 1 mg/ml의 농도로 희석하여 250 μl를 꼬리정맥에 투여하였다. 1시간이 지난 다음 마우스를 안락사 시키고 귀를 적출하여 700 μl의 포름아마이드에 넣은 후 63°C에서 12시간 동안 알레르기 반응에 의해 귀 조직으로 삼출된 에반스블루를 추출 후 상등액을 620 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 삼출된 에반스 블루의 정량은 표준 정량곡선을 이용하여 측정하였다.

비만세포의 배양 – 골수유래의 비만세포(Bone marrow-derived mast cells, BMMCs)는 약 5 주령의 수컷 Balb/c 마우스로부터 채취한 골수 세포를 10% FBS, 100 μg/ml streptomycin, 100 μM non-essential amino acid solution을 포함한 RPMI 1640에 10 ng/ml의 murine recombinant IL-3를 첨가한 배양액을 사용하여 4주 이상 배양 후 98% 이상이 BMMC로 분화된 것을 FACS 분석을 통해 확인 후 실험에 사용하였다. RBL(rat basophilic leukemia)-2H3는 200 mM L-glutamine, 10,000 units/ml penicillin/streptomycin, 15% fetal bovine serum(FBS)이 포함된 minimum essential medium(MEM)을 배양액으로 하여 CO_2 incubator(5% CO_2, 37°C)에서 배양하였고 2~3일 간격으로 계대배양 하였다.

비만세포에서 탈과립 측정 – 비만세포(2.0×10^5/well)를 배양기에 분주하고 20 ng/ml의 DNP 특이적인 IgE가 포함된 MEM 배지에서 12시간 동안 배양하여 IgE가 비만세포의 표면 수용체에 부착하게 하였다. 탈과립(β-hexosaminidase release assay) 측정은 RBL-2H3 세포는 PIPES 완충용액(25 mM PIPES, pH 7.2, 159 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 5.6 mM glucose, 0.1% fatty acid-

free fraction V from bovine serum) 그리고 BMMCs는 Tyrode 완충용액(20 mM HEPES, pH7.4, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 1.8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 0.05% BSA)을 사용하여 진행하였다. 먼저 완충용액으로 세포를 2회 세척 후, 추출물을 각 농도별로 완충용액에 희석시켜 각 well에 30분 전처리를 하였다. 다음으로, 25 ng/ml의 항원(DNP-BSA)를 각 well에 첨가하여 15분 동안 자극시킨 후, 5분간 얼음 위에 두어 자극을 정지시켰다. 탈과립에 의해 세포밖으로 분비된 β-hexosaminidase을 측정하기위해 상층액을 E-tube에 옮기고, plate에 남아있는 세포는 0.1% triton X-100으로 파쇄시켰다. 상층액과 파쇄된 시료는 96 well plate에 1 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-d-glucosaminide와 각각 30 μl 씩 섞은 다음 37°C 항온수조에서 1시간 동안 반응시킨 후, 0.1 M carbonate 완충용액을 넣어 반응을 종결시킨 후 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

RT-PCR(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) – 항원에 의해 자극된 RBL-2H3 세포(6 well plate)에 trizol reagent를 처리한 후 피펫으로 cell lysate를 모은 다음, 클로로포름을 200 μl를 넣어준다. 15,000 g에서 10분 원심분리한 후 얻은 상층액과 이소프로파놀을 1:1로 섞은 후 -20°C에서 한 시간 동안 반응시킨다. 15,000 g에서 10분 동안 원심분리 후 에탄올로 씻어준 후, RNA pellets을 DEPC-water 50 μl에 녹여서 total RNA를 얻었다. PCR은 94°C, 30초, 58°C, 30초, 72°C, 40초를 30회 반복하였다. PCR을 위한 Primer는 Rat TNF-α는 forward 5'-CACCACGCTCTTCTGTCTACTGAAC-3', reverse는 5'-CCGGACTCCGTGATGTCTAA GTACT-3', IL-4는 forward 5'-CCGATATGGTGTAATTTCCTATGCTG-3', reverse 5'-TTGTGAGCGTGGACTCATTC-3'이고, Rat GAPDH forward는 5'-GTGGAGTCTACTGGCGTCTTC-3', reverse는 5'-CCAAGGCTGTGGGCAAGGTCA-3'를 사용하였다.

면역침강실험 – 비만세포는 6 well plates에서 25 ng/ml 항원으로 7분간 자극시키고, 얼음위에서 자극을 정지시켰다. 세포는 차가운 PBS로 2번 세척하고, 차가운 lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet p-40, 10% glycerol, 60 mM octyl b-glucoside, 10 mM NaF, 1 mM Na3VO4, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 2.5 mM nitrophenylphosphate, 0.7 mg/ml pepstatin, protease-inhibitor cocktail tablet)로 파쇄하였다. 세포파쇄과정은 얼음위에서 30 min동안 진행시키고, 15,000 g, 4°C에서 15분 동안 원심분리하였다. 세포파쇄 찌꺼기를 제거한 상층액에 확인하고자 하는 단백질에 특이적인 항체를 첨가하여 4°C에서 3시간 이상 반응시킨 후, Protein A-agarose 50 μl를 넣고 다시 4°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 비특이적인 면역침강을 방지하기 위해 세척완충액으로 5회 씻어주고 세척완충액을 완전히 제거한 다음, immunoblotting 분석을 위해 2x sample buffer를 50 μl 넣어주고 100°C에서 5분간 반응 후 얼음에서 5분간 놓아두어 반응을 정지시켰다. 15,000 g, 1분 원심분리 후 agarose가 포함되지 않도록 조심스럽게 상층액을 50 μl를 취하여 얻은 단백질시료는 immunoblotting 분석을 통하여 단백질의 양을 측정하였다.

Immunoblotting **분석** – 비만세포는 6 well plates에서 25 ng/ml 항원으로 7분간 자극시키고, 얼음위에서 자극을 정지시켰다. 세포는 차가운 PBS로 2번 세척하고, 차가운 lysis HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet p-40, 10% glycerol, 60 mM octyl b-glucoside, 10 mM NaF, 1 mM Na3VO4, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 2.5 mM nitrophenylphosphate, 0.7 mg/ml pepstatin, protease-inhibitor cocktail tablet)로 세포는 파쇄되었다. 세포파쇄물은 30분 동안 얼음위에 두고, 15,000 g, 15분, 4°C에서 원심분리후 세포파쇄 찌꺼기를 제거하였다. 세포파쇄물은 95°C에서 2X Laemmli buffer에서 변성시키고, 변성된 단백질은 SDS-PAGE에서 분리 후, nitrocellulose membrane으로 transfer되었다. membrane은 5% 탈지분유가 포함된 TBS-T buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20)로 blocking시킨 후 1차 항체와 함께 반응시켰다. 1차 항체는 1:1000으로 희석하였고, 4°C에서 overnight으로 반응시킨후, membrane을 5분씩 3번 세척하고, 1:2000로 희석된 horseradish peroxidase(HRP)-coupled 2차 항체로 1시간동안 상온에서 반응시켰다. 그 후 5분씩 5번 TBS-T 완충액으로 세척하고, chemoluminescence 방법으로 단백질 밴드를 확인하였다.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay(ELISA) – IgE로 감작된 RBL-2H3 세포를 20 ng/ml 항원으로 4시간 동안 자극 후 세포 밖 배지로 분비된 TNF-α나 IL-4를 ELISA kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 사이토카인의 양을 측정하였다.

통계학적 분석 – 결과는 3번이상의 독립된 실험의 평균치±SEM으로 정리하였다. 통계적 분석은 ANOVA와 Dunnett's test를 통해 실시하였다. 모든 통계적 계산은(*P<0.05 and **P<0.01) SigmaStat 소프트웨어를 사용하여 실시하였다.

결 과

개옻나무 추출물의 RBL-2H3 세포와 BMMC에서 항원자극에 의한 탈과립 억제 효과 – 개옻나무의 알레르기 치료 효과를 알아보기 위해 우선 알레르기유발에 중요한 원인 세포인 비만세포의 항원자극에 의한 탈과립 억제 정도를 RBL-2H3 세포 및 BMMC를 이용하여 실험을 수행하였다. 개옻나무 추출물은 RBL-2H3(Fig. 1A) 및 BMMC(Fig. 1B)에서 농도 의존적으로 탈과립을 억제하였으며, 최고농도인 100 μg/ml에서 거의 대부분 탈과립을 억제하였다. 하지

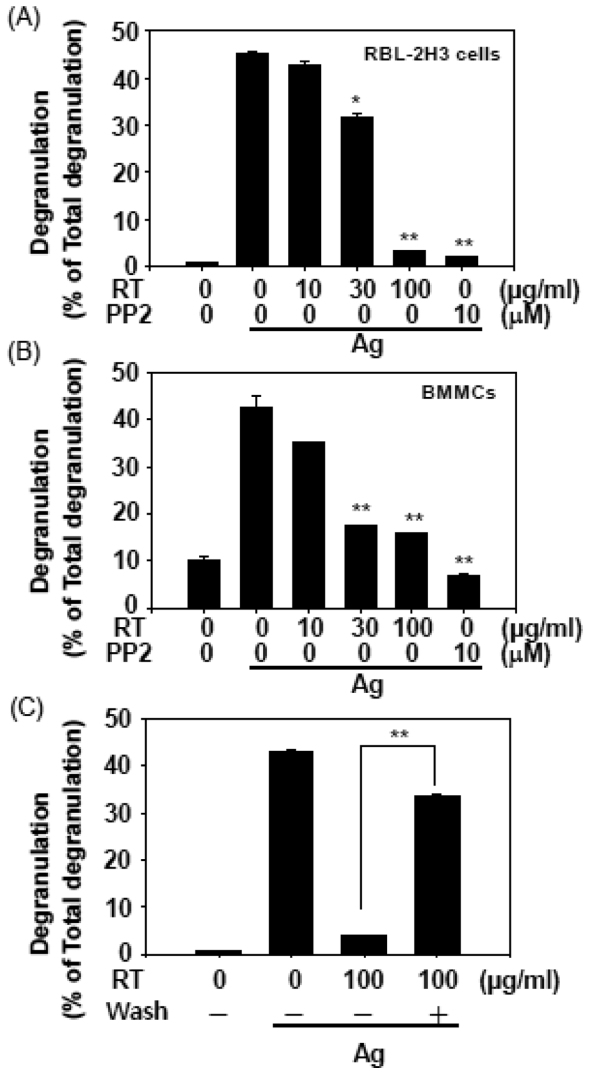

Fig. 1. Effect and reversibility of *Rhus trichocarpa* extract (RT) on antigen (Ag)-stimulated degranulation in mast cells. After priming RBL-2H3 cells (A) or BMMCs (B) with 25 ng/ml dinitrophenol-specific IgE, the cells were stimulated with 25 ng/ml antigen (Ag) for 15 min. The degranulation was determined by measurement of the activity of β-hexosaminidase in whole cells and culture media. (C) Reversibility of RT's effect in RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were washed out five times with PIPES buffer after incubating with 100 μg/ml RT for 1 h and then stimulated for 15 min with antigen. The values indicate mean±S.E.M. from three independent experiments. Significant differences with the Ag-stimulated controls without RT are indicated, *p<0.05 and **p <0.01. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor.

만 개옻나무 추출물(10-100 μg/ml)을 처리한 실험군에서 세포독성은 관찰되지 않았다(data not shown). 이러한 결과는 개옻나무 추출물의 항원자극에 의한 비만세포 탈과립 억제 효과는 세포독성에 기인한 것이 아니라 비만세포의 탈과립 과정을 억제하는 기전에 의한 것으로 추측되었다.

한편 의약품의 가역성은 부작용 관점에서 중요한 의미를 가지므로 위의 개옻나무 추출물의 억제효과가 비만세포에서의 가역성을 나타내는지 확인하였다. RBL-2H3 세포를 개옻나무 추출물 100 μg/ml로 30분 동안 전처리 해주었을 때 항원에 의한 탈과립이 현저히 억제되는 것을 확인할 수 있었으나 항원으로 자극하기 전에 개옻나무 추출물을 완충액으로 3회 세척해 주면 억제효과가 줄어들어 탈과립 현상이 거의 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1C). 이러한 결과를 바탕으로 개옻나무 추출물의 비만세포 활성화 억제효과는 가역적이라는 사실을 알 수 있었다.

개옻나무 추출물의 비만세포에서 TNF-α 및 IL-4 생성 및 분비에 대한 억제 효과 – 비만세포는 항원 자극에 의해 다양한 종류의 사이토카인을 분비하며, 그 중 TNF-α나 IL-4는 알레르기 질환과 밀접한 관련이 있는 알레르기 염증성 사이토카인으로 보고되고 있다.[9] 따라서 개옻나무 추출물이 항원자극에 의해 비만세포로부터 생성되는 이러한 사이토카인의 생성 저해효과가 있는지를 확인하였다. 그 결과 개옻나무 추출물이 항원자극에 의해 비만세포에 의해 분비되는 TNF-α 및 IL-4의 발현을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 2A). 더 나아가 항원 자극에 의해 비만세포로부터 세포 밖으로 분비되는 사이토카인도 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 2B and 2C).

개옻나무 추출물의 비만세포 활성화 억제 기전 – 비만세포는 항원자극에 의해 수용체와 근접하게 존재하는 Lyn 및 Fyn 활성화에 이어 Syk의 활성화를 유도하여 LAT 및 MAP kinase등의 하위 신호전달경로를 활성화 시킨다.[10] 따라서 우리는 개옻나무 추출물이 이러한 초기신호전달 단백질에 어떤 억제 효과를 가지는지를 실험하였다. 개옻나무 추출물은 RBL-2H3 및 BMMC에서 농도 의존적으로 항원자극에 의한 Syk의 인산화를 억제하였으며 100 μg/ml에서는 인산화를 거의 완벽하게 억제시켰다(Fig. 3). 또한 비만세포에서 항원자극에의한 Syk의 직접적 기질단백질로 잘 알려진 LAT의 인산화도 농도의존적으로 억제됨을 알수 있었다(Fig. 3). 따라서 개옻나무 추출물은 비만세포 활성화의 중요한 축인 Lyn-Syk-LAT 경로의 활성화 억제를 통하여 항원에 의해 유도되는 비만세포의 탈과립 억제를 유도함 알 수 있었다.

개옻나무 추출물의 항원자극에의한 비만세포에서 Akt 및 MAP Kinase의 활성화에 억제 효과 – 항원자극에 의한 활성을 위해 비만세포에서 Fyn-Gab2-PI3K 신호경로는 기존의 Lyn-LAT-Syk 신호경로의 보완적 신호전달경로로서 보고되어지고 있다.[11] 따라서 우리는 이러한 신호전달경로에 대한 개옻나무의 억제효과를 알아보기 위해 Akt 활성화를 측정하였다. 결과로 개옻나무 추출물은 항원자극에 의한 Akt의 인산화를 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 3).

알레르기 반응에서 비만세포는 다양한 염증성 사이토카

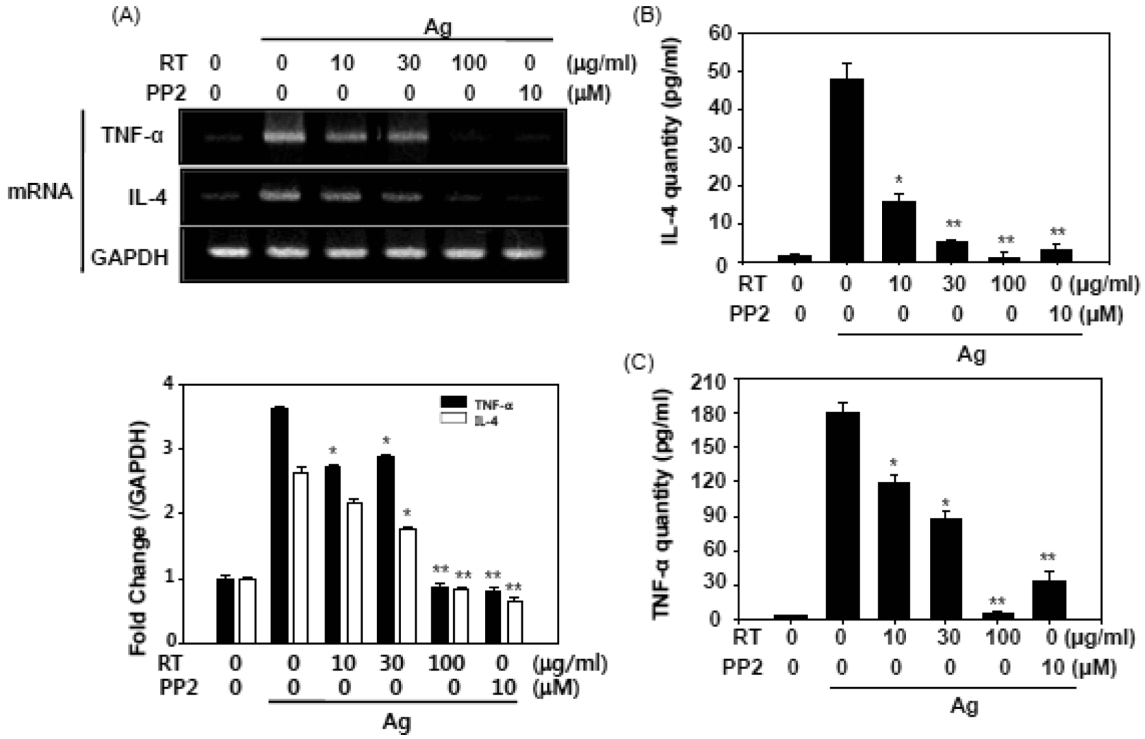

Fig. 2. Effect of *Rhus trichocarpa* extract (RT) on the expression and secretion of tumor necrosis factor (TNF)-α and interleukin (IL)-4 in RBL-2H3 mast cells. (A) IgE-primed RBL-2H3 cells were stimulated with 25 ng/ml antigen (Ag), or not stimulated. Total RNA was isolated and then reversely transcribed. Polymerase chain reaction using IL-4- or TNF-α specific primers was performed as described in the section for "Materials and Methods". The representative images and band density from three independent experiments are shown. The levels of TNF-a (B) and IL-4 (C) in the culture supernatant were determined by using Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. Asterisks indicate significant differences from Ag-stimulated controls, which are not treated with RT, *p<0.05 and **p<0.01. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor.

인을 분비함으로서 알레르기 반응을 증가시킨다.[9] 개옻나무 추출물은 항원 자극에 의한 비만세포의 TNF-α 및 IL-4의 생산 및 분비를 억제 시켰다(Fig. 2). 한편, 비만세포에서 항원 자극에 의한 TNF-α 및 IL-4 생성은 MAP kinase 신호전달 경로가 중요한 역할을 한다는 기존 보고에 기초하여, MAP kinase 신호경로활성화에서 인산화에 대한 개옻나무 추출물의 효과를 확인하였다. 그 결과, 세가지의 전형적인 MAP kinase인 Erk, p38 및 JNK 모두 개옻나무 추출물 10, 30, 100 μg/ml 농도에서 농도 의존적으로 인산화가 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

마우스에서 개옻나무 추출물의 IgE 매개된 알레르기 반응 억제효과 – 마우스에서의 IgE 및 비만세포에 매개한 알레르기 반응인 PCA는 마우스의 귀에 국소적으로 IgE를 피내 주사 하여 국소적으로 비만세포를 IgE로 최소 12시간 감작시킨 후 Evans blue 색소와 동시에 항원을 꼬리정맥을 통해 주입하여 알레르기 질환 동물 모델을 유도하였다. 그 후 vehicle 및 개옻나무 추출물을 농도에 맞게 경구투여 하여 알레르기 반응억제 정도를 측정하였다. 그 결과 개옻나무 추출물 투여군에서 Evans blue의 귀 조직으로의 항원자극에 의한 삼출이 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 4A). 특히, 1000 mg/kg 투여군에서는 거의 완벽하게 알레르기 반응을 억제함을 알 수 있었다. 이 결과를 통해 개옻나무 추출물은 동물모델에서도 항알레르기 효과를 가지는 것으로 확인되었다.

고 찰

국내외적으로 알레르기 질환의 발병률은 계속 증가하고 있으며 생활환경이 서구화 선진화될수록 환자 수는 지속적으로 증가하고 있다.[1] 알레르기 질환은 비만세포 및 호염구에서 분비되는 히스타민, 헤파린, 류코트리엔, 프로스타글란딘 및 사이토카인 등 다른 알레르기 인자 등에 의해 증상이 유발된다.[1] 알레르기 질환 치료제는 현재 대부분 분비된 알레르기 인자들의 활성 억제를 통한 증상을 억제하는데 초점이 맞추어져 있어 알레르기 질환을 원천적으로 치료하지 못하고 약물의 내성 문제 때문에 근본적 치료 방법이 되지 못하고 있다. 따라서 비만세포의 알레르기성 매개체 분비의 원천적 차단은 알레르기 질환 치료제 개발에서 중요한 의미가 있다고 할 수 있다.

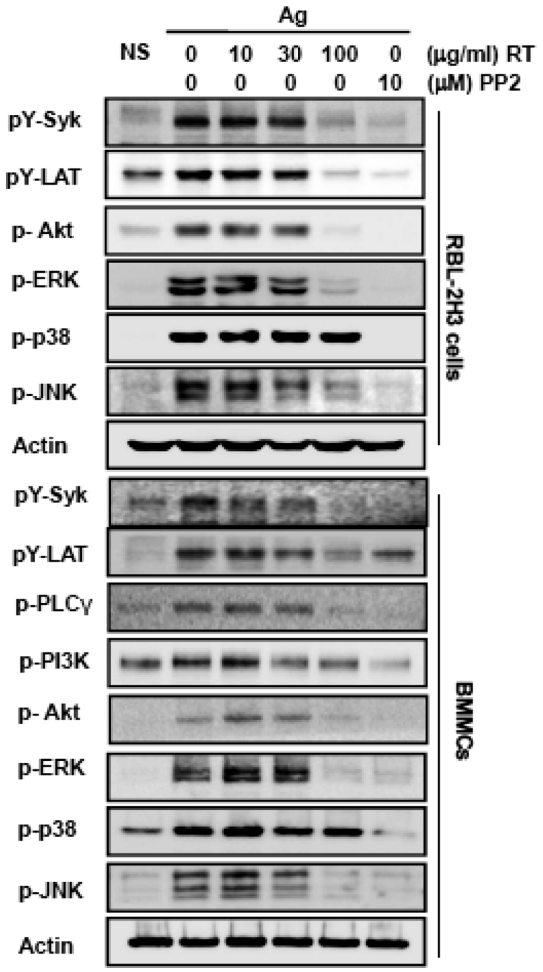

Fig. 3. Effect of *Rhus trichocarpa* extract (RT) on the activating phosphorylation of Syk and other downstream signaling molecules in antigen (Ag)-stimulated mast cells. The IgE-primed RBL-2H3 cells (upper part) or BMMCs (lower part) were stimulated with 25 ng/ml antigen, with or without RT at the indicated doses, for 7 min. The whole cell lysates were subjected to immunoblot analysis by using specific antibodies. Representative immunoblot images are shown from three independent experiments. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor.

1형 과민성 알레르기 반응은 신속하고, 알레르기 염증성 매개체인인 히스타민, 세로토닌, 헤파린 등 다양한 염증성 사이토카인이 비만세포에서 온몸으로 분비되면서 발생한다.[2] 본 연구에서 개옻나무 추출물은 RBL-2H3 세포 및 BMMC에서 탈과립(Fig. 1)과 여러 알레르기성 매개 물질(Fig. 2)의 분비를 억제하였다. 비만세포 활성화는 항원에 의한 IgE 수용체의 응집에 의하여 Src-family kinase인 Lyn과 Fyn이 활성화되고,[12] 그 다음으로 FcεRI의 β와 γ subunit의 ITAM motifs가 인산화되면서 신호전달경로가 시작된다. ITAM의 타이로신 잔기가 인산화되어 LAT등의 부착단백질 및 기타 하위 신호전달단백질들이 결합하는 scaffold 기능을

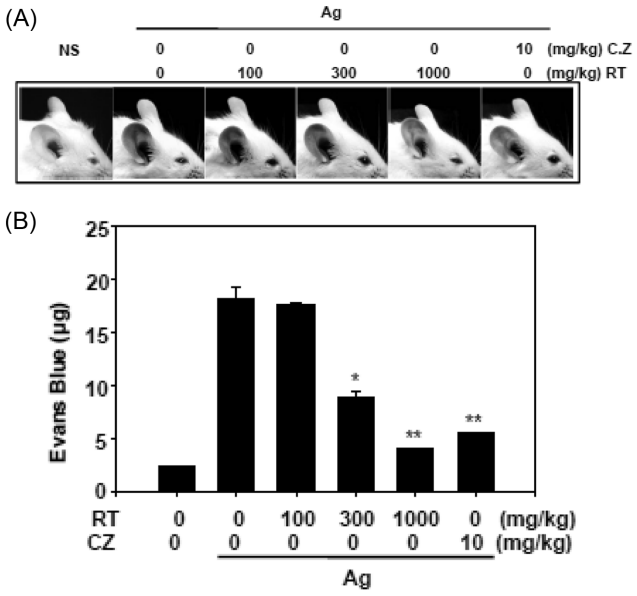

Fig. 4. Effect of *Rhus trichocarpa* extract (RT) on IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis (PCA). (A) The anti-allergic effect was assessed using PCA mouse model. Balb/c mice were intravenously injected with a 250 μg antigen (Ag) containing 4% Evans blue 24 h after intradermal administration of a DNP-specific IgE antibody (0.5 μg) into a mouse ear. RT (100-1000 mg/kg) was orally administrated 1 h before an administration of antigen. The dye extravasated by antigen was extracted from the ear and the amount was measured by absorbance at 620 nm. The representative photograph of ears (A) and the mean±S.E.M. of values (B) from three independent experiments, each with 7 mice, are shown. The asterisks indicate significant difference from Ag-stimulated controls without RT (*p<0.05; **p< 0.01). Cetrizine (CZ, 20 mg/kg) was used as a typical anti-histamine reference drug.

가진다. Syk은 인산화된 FcεRI 수용체의 감마 subunit (ITAM motif)에 붙어 활성화되고,[13] LAT, Gab2, PLCγ등의 하위신호전달 단백질을 활성화하며 세포질내 Ca^{2+} 농도를 증가시킨다.[11] 개옻나무 추출물은 Syk의 인산화를 농도 의존적으로 억제하였으며(Fig. 3), 이러한 결과를 비추어 볼 때 개옻나무의 항원에 의해 자극된 비만세포 억제 효과는 Syk의 활성화를 억제함으로써 나타남을 알 수 있다.

IL-4와 TNF-α를 포함하는 많은 염증성 사이토카인들은 항원에 의해 자극된 비만세포에서 발현되고, 알레르기 반응의 후기 단계에서 염증성 증상에 중요한 역할을 한다.[9] ERK1/2는 비만세포에서 IL-5, TNF-α, IL-3 및 IL-13 생산하는데 있어 필수적인 신호이고 p38은 비만세포에서 IL-4 생성에 중요하다.[14] 본 연구 결과에서 개옻나무 추출물은 TNF-α와 IL-4의 발현 및 분비를 농도 의존적으로 유의하게 억제하였다(Fig. 2). 기전으로 개옻나무 추출물은 ERK1/2, p38 및 JNK의 3가지 타입의 MAP kinase를 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 3). 따라서 개옻나무 추출물에 의한 항

원에 의해 자극된 비만세포에서의 염증성 사이토카인의 억제는 Syk-MAP kinase 억제에 의한 것임을 시사하였다.

본 연구를 통해 개옻나무 추출물이 비만세포에서 탈과립 및 염증성 사이토카인의 억제를 통해 동물모델에서 알레르기 반응을 억제한 것으로 생각된다. 이러한 결과를 바탕으로 볼 때 개옻나무 추출물은 향후 알레르기 치료용 천연물 의약품 소재로의 활용이 가능할 것으로 생각되며 추후 항알레르기 효능을 가지는 성분 분석 및 독성에 연구가 추가로 진행될 필요가 있다고 생각된다.

결 론

본 연구에서는 개옻나무 추출물에 의한 항원자극에 의한 비만세포 활성화 억제 및 기전을 연구하였고, 최종적으로 알레르기 동물모델에서 개옻나무 추출물의 알레르기 증상 억제 효능을 측정하였다. 개옻나무 추출물의 항원 자극에 의한 비만세포의 활성화 억제는 가역적이었으며 동물모델에서 알레르기 증상을 농도 의존적으로 유의하게 억제하였다. 그 작용기전으로 초기 신호 단백질인 Syk의 활성을 억제하였고, Syk의 하위 신호전달단백질인 LAT의 인산화를 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다. 또한 사이토카인 등의 생성에 중요한 신호전달단백질인 ERK1/2, p38 및 JNK MAP kinase의 활성을 억제하였다. 이상의 결과 미루어 볼 때 개옻나무 추출물은 비만세포에서 Syk 의존성 신호전달 경로의 억제를 통해 알레르기 동물모델에서 그 증상을 억제함을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 2012년도 덕성여자대학교 연구지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Holgate, S. T. and Polosa, R. (2008) Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 218-230.
2. Galli, S. J. (1993) New concepts about the mast cells. *New Eng. J. Med.* **328**: 257-265.
3. Beaven, M. A. (2009) Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *Eur. J. Immunol.* **39**: 11-25.
4. 김삼식, 정재민 (1995) 한국산 옻나무과의 분류학적 연구. 한국임학회지 **84**: 151-165.
5. 김만조, 김갑태, 최태봉, 현정오 (1998) 기상요인과 채취시기가 옻나무 칠액채취량 및 칠액의 질에 미치는 영향. 한국자원식물학회지 **11**: 70-79.
6. Namba, T. (1980) Coloured illustrations of Wakan Yaku, 215. Hoikusha Publishing Co., Ltd., Osaka.
7. Lee, J. H., Kim, J. W., Ko, N. Y., Mun, S. H., Kim, D. K. and Kim, J. D. (2008) *Camellia japonica* suppresses immunoglobulin E-mediated allergic response by the inhibition of Syk kinase activation in mast cells. *Clin. Exp. Allergy* **38**: 794-804.
8. Lee, J. H., Kim, J. W., Ko, N. Y., Mun, S. H., Kim, D. K. and Kim, J. D. (2008) Mast Cell-Mediated allergic response is suppressed by *Sophorae Flos*: Inhibition of Src-Family kinase. *Exp. Biol. Med.* **233**: 1271-1279.
9. Tete, S., Tripodi, D., Rosati, M., Conti, F., Maccauro, G., Saggini, A., Salini, V., Cianchetti, E., Caraffa, A., Antinolfi, P., Toniato, E., Castellani, M. L., Pandolfi, F., Frydas, S., Conti, P., Theoharides, T. C. (2012) Role of mast cells in innate and adaptive immunity. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **26**: 193-201.
10. Gilfillan, A. M. and Tkaczyk, C. (2006) Integrated signalling pathways for mast cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 218-230.
11. Rivera, J. and Gilfillan, A. M. (2006) Molecular regulation of mast cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**: 1214-1225.
12. Paolini, R., Jouvin, M. H. and Kinet, J. P. (1991) Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engantigenement and disengantigenement. *Nature* **353:** 855-858.
13. Sada, K., Takano, T., Yanantigeni, S. and Yamamura, H. (2001) Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J. Biochem.* **130**: 177-186.
14. Theoharidies, T. C. and Kalogeromitros, D. (2006) The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1088**: 78-99.

(2013. 2. 6 접수; 2012. 2. 26 심사; 2013. 4. 9 게재확정)