

오리나무유래 디아릴헵타노이드 허수테논의 T 세포활성억제 및 항아토피 효능연구

이도익 · 서성준¹ · 주성수^{2*}

중앙대학교 약학대학 면역학과, ¹중앙대학교 의학대학 피부과,
²강릉원주대학교 생명과학대학 해양분자생명공학과

T-lymphocyte Inactivation and Anti-atopic Effects of Diarylheptanoid Hirsutenone Isolated from *Alnus japonica*

Do Ik Lee, Seong Jun Seo¹, and Seong Soo Joo^{2*}

Department of Immunology, College of Pharmacy, Chung-Ang University

¹Department of Dermatology, College of Medicine, Chung-Ang University

²Department of Marine Molecular Biotechnology, College of Life Science, Gangneung-Wonju National University

Abstract Recently, we reported that diarylheptanoid hirsutenone (HST) effectively inactivated T lymphocytes. However, it has not been evaluated whether HST is involved in calcineurin or calmodulin inactivation. In the present study, cells were treated with T-cell inhibitors with or without HST. Our results revealed that HST successfully inhibited expression of T-helper type I (Th1) and Th2 cytokines. Co-treatment with HST and nuclear factor-activated T cell (NFAT) activation inhibitor III (INCA-6) showed a more sensitive effect than that with other inhibitors, suggesting that HST contributes to inhibition of dephosphorylation of NFAT in the cytosol. HST up-regulated cell cycle arrest genes and inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*. These effects were confirmed in an NFAT electrophoretic-mobility shift assay via successful inhibition of NFAT translocation and in the histological recovery in a 2,4-dinitrochloro benzene-induced *in vivo* model. Taken together, HST was shown to effectively inhibit T-cell activation via inhibition of cytosolic NFAT dephosphorylation, similar to INCA-6.

Keywords: diarylheptanoid hirsutenone, calcineurin, calmodulin, T lymphocyte, nuclear factor-activated T cell

서 론

사회가 복잡해지고 산업과 문명의 발달로 자연오염의 증가, 식생활의 변화, 스트레스의 가중 등으로 알러지성 질환이 해마다 증가하고 있다(1). 특히 각종 산업 활동에 의해 유발되는 대기오염, 수질오염, 토양오염 및 해양오염 등의 급속한 증가는 사람의 생활 및 건강에 유해한 영향을 수반하게 된다. 인간의 신체 중 가장 큰 기관인 피부의 주된 기능은 자외선, 유독 화학물질 또는 물에 장기간/반복적 노출 등과 같은 유해한 환경으로부터 몸을 보호하는 것이다(2).

접촉피부염 및 아토피피부염(atopic dermatitis, AD) 등을 포함한 다양한 피부질환이 외부 접촉물질에 의해 IgE 유래 즉시형 및 세포매개성 지연형 알러지 반응이 유발된다(3). 이러한 알러지 반응에는 사이토카인 분비유형에 따라 두 개의 T 세포 subset이 관여하고 있으며 B세포로부터 알러지 특이성 immunoglobulin E

(IgE) 항체를 분비하도록 유도하는 T helper 2 (Th2) 반응과 지연형 알러지 반응을 유발하는 T helper 1 (Th1) 반응이 있다(4). 즉시형 알러지 반응은 집먼지 진드기, 꽃가루, 천연고무 라텍스, 우유제품 등에 의해 나타날 수 있으나 AD와 같은 정상적이지 않은 손상된 피부를 통해 침입하여 더욱 악화된다(5). 이와 같이 환경성 항원에 대한 IgE 유도성 알러지 반응으로는 비염, 천식 및 AD가 포함되며 도시화되는 사회와 관련한 것으로 보고되고 있다(6).

알러지성 질환 중 AD는 전 세계적으로 증가하는 추세이며 특히 10-15%의 유아에게서 AD가 발병하는 것으로 보고되었고, 국내의 경우 최근 조사에 의하면 초등학교 24.9%, 중학생 12.8%에서 AD를 앓고 있는 것으로 조사되었다(7). 특히, 유전적인 요소와 환경적인 요인, 면역기능의 불균형 및 피부장벽의 이상 등 복합적 요인에 의해 유발되는 다인성(multifactorial) 질환으로 알려져 있는 AD는 산업화된 나라에서 10-20%의 어린이들 및 1-3%의 성인이 고통을 받는 것으로 보고되었으며(8-10), 농촌에 비해 서구화된 도시에서 그리고 대가족보다 핵가족에서 성장하는 아이들에게 보다 높은 유병율을 나타내고 있어 AD 유발원인에 대해 위생가설(hygiene hypothesis)이 힘을 얻고 있다(11-13). 이는 감염에 대하여 나타나는 정상적인 면역반응의 일부인 Th1 유래 사이토카인 분비 반응이 면역프로그램이 발달된 서구 사회에서 억제되어 결과적으로 AD 유발의 주요 면역세포인 Th2 반응이 우세해진 결과물로 보는 관점이다(14,15). 유발의 원인에 따라 내인성(intrinsic) 및 외인성(extrinsic)으로 나뉘는 AD 중 외인성은

*Corresponding author: Seong Soo Joo, Department of Marine Molecular Biotechnology, College of Life Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, Gangwon 210-702, Korea
Tel: 82-33-640-2856
Fax: 82-33-640-2856
E-mail: ssj66@gwnu.ac.kr
Received May 3, 2013; revised June 3, 2013;
accepted June 27, 2013

외부 환경으로부터 유래되는 알러지성 AD로서 약 70-80%를 차지하며 우세해진 Th2 사이토카인에 의해 혈 중 IgE 수준이 높게 나타나는 특징이 있다(16,17).

AD에 대한 효과적인 치료법은 아직 정립되지 않았고 높은 재발율의 알러지 질환의 특성상 만성질환으로 진행되는 경우가 대다수이다(18). 적극적 치료법으로 국소 스테로이드제가 수십 년간 선택적 약물로 사용되어왔으나 많은 부작용으로 사용의 제한성이 있으며, 최근 면역조절제가 이와 같은 스테로이드제 연고를 대신할 수 있는 약제로 각광을 받고 있다(19). 현재까지 개발된 면역억제제로는 Tacrolimus와 Pimecrolimus등을 들 수 있으며 이들은 T 림프구의 활성화를 억제하여 알러지 염증반응을 억제한다. 하지만 이 약제들도 장기 사용 시 부작용이 보고되고 있어 완전한 치료법으로는 한계가 있는 것으로 알려져 있다(19). 이와 같은 AD의 증상은 *S. aureus*등과 같은 세균성 슈퍼항원(bacterial superantigens)으로부터 분비되는 독소에 의해 악화되므로 AD 치료 시 항균 치료법도 함께 병용되고 있다(20).

본 연구진은 최근 오리나무(*A. japonica*)로부터 수종의 diaryl-heptanoid compounds를 분리 동정하였으며 이들 중 hirsutenone (HST)에서 우수한 항아토피 효능이 있음을 입증하였다(21). 특히 HST는 기존의 T 세포 억제제와 유사하게 nuclear factor-activated T cell (NFAT)의 활성을 억제하여 T 세포 의존성 사이토카인(i.e. interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- γ , IL-4 및 IL-5)의 분비를 억제하였고 비만세포에서의 탈립현상을 억제하여 AD 증상을 완화시키는 것으로 나타났으나, 아직 HST의 세포내 면역억제기전이 정립되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 HST의 T 세포 비활성화에 대한 기전을 밝혀 천연물유래 항아토피 신소재 개발에 중요한 기전적 배경을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

시료준비

오리나무(*A. japonica*)의 수피(bark)는 2010년 8월 서울 수달산에서 수집하고 증거표본을 중앙대학교 약학대학 식물표본실에 기탁하였다(AJB2010-08). 시료준비는 잘게 자른 신선한 수피 2.5 kg을 80% 수용성 아세톤과 함께 실온에서 72시간동안 추출하였다. 진공 상태에서 아세톤을 제거한 후, 수용성 용액 여과 후 농축시켰다. 농축액을 Sephadex LH-20 컬럼(25-100 μ m, 8 \times 150 cm, Pharmacia, Stockholm, Sweden)에 적용하고 메탄올(0-100%)의 농도를 증가시키면서 용출시켰다. MCI-Gel CHP 20P (75-150 μ m, 5 \times 80 cm, Mitsubishi Chemical Co., Tokyo, Japan)을 사용하여 타겟 분획에 대해 컬럼 크로마토그래피를 반복 수행하였다. 메탄올의 비율 구배를 40%에서 80%으로 증가시키면서 용출을 행하였으며, 마지막으로, 용출된 용액을 YMC ODS-gel (s-75 μ m, 5 \times 60 cm, YMC Co. Ltd, Kyoto, Japan)으로 채워진 컬럼에 적용하고, 메탄올의 비율 구배를 40%에서 80%으로 증가시키면서 저압액체 크로마토그래피(low pressure liquid column chromatography)를 수행하였다. 컬럼은 Gilson 112 UV/VIS 검출기(254/280 nm)가 장착된 연동펌프(Gilson Miniplus 3)에 연결하고 Gilson 740 ProTech 시스템 컨트롤러 소프트웨어 프로그램(Gilson Inc., Middleton, WI, USA)을 사용하였으며, 최종적으로 고 순도의 정제된 허수테논(0.08 g, 0.0032% (w/w))을 얻었다. 본 실험을 위해 감압하에 동결 건조한 분리물질(허수테논, HST)을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시키고 stock solution으로서 50 mg/mL을 준비하였다.

세포배양 및 T 세포 활성화제

7-8주령 수컷 BALB/c 마우스를 희생시킨 후 비장을 무균 처리하여 분리하고, plunger를 이용하여 비장세포를 pH 7.2의 차가운 PBS (phosphate buffered saline)내에서 기계적 분리 공정을 통해 분리하였다. 림프구에 최소한의 영향을 주면서 적혈구 세포를 용해시키는 염화암모늄 포함 RBC lysis buffer (eBioscience, San Diego, CA, USA)를 사용하여 적혈구를 제거한 후 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, UT, USA)이 포함된 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 완전배지 내에서 비장세포를 배양하였다. 비장세포는 humidified 5% CO₂, 37°C의 배양조건에서 96-well plate에 5 \times 10⁶ cell/well의 농도 또는 12-well plate에 1.5 \times 10⁷ cell/mL의 농도로 배양하였으며, 세포가 제거된 상등액은 배양 16시간 후에 회수하고 -70°C에서 분석 시 까지 보관하였다. 하였다. 모든 실험 과정은 국립강릉원주대학교 동물실험윤리위원회 승인 후(승인번호 GWNU-2012-25) 국립 동물 보호 및 이용 위원회의 규정을 준수하였다. 비장 면역세포내 T 세포 의존성 활성화를 위해 anti-CD monoclonal antibody (mAb) (eBioscience) 1 μ g/mL을 처리하고, T 세포 의존성 기전연구를 위해 tacrolimus (FK506, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), calmodulin antagonist (W7, Sigma-Aldrich) 및 NFAT activation inhibitor III (INCA-6, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하였으며, FK506, W7 및 INCA-6의 최적 억제 농도로서 1 ng/mL, 50 μ M 및 250 nM을 각각 단독 및 HST와 병용 처리하여 기전연구를 수행하였다.

세포독성측정

HST의 비장세포독성 및 적정 용량을 확인하기 위해 세포막 손상에 따라 배지로 유출된 lactate dehydrogenase (LDH)량을 측정하는 LDH release assay (CytoTox 96 Kit, Promega, Madison, WI, USA)를 수행하였다. 비장세포 5 \times 10⁶ cells/well은 96 well plate에 분주와 함께 2시간 전 배양 후 HST를 농도별로(0.001, 0.01, 0.1, 1, 2.5 및 5 μ g/mL) 처리하고 24시간 배양하였다. LDH 측정을 위해 배양액을 새로운 96-well plate에 50 μ L 분주하고, 동량의 LDH reagent를 50 μ L씩 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 반응 종료 후 stop solution 동량을 첨가하여 반응을 중지시킨 후, ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 측정된 흡광도 상대수치를 대조군 대비 cell viability (%)로 표시하였다. 사전연구에서 시료용량 2.5 μ g/mL 이하에서 독성이 관찰되지 않아 2 μ g/mL을 적정 최대 용량으로 사용하였다.

피부염유도 및 시료처리

아토피-유사 피부염은 2,4-dinitrochloro benzene (DNCB, Sigma-Aldrich)을 사용하여 Joo 등(22)의 방법에 따라 BALB/c 마우스 외이(n=3)에 도포하여 유발시켰다. 즉, 아세톤에 용해한 1% DNCB 20 μ L를 7일간 도포하여 1차 면역화 반응을 유도한 후 2일 간격으로 추가 5주간 0.5% DNCB 20 μ L를 동일 부위에 반복 도포하였다. 동시에 무처리 대조군에는 아세톤:올리브오일을 4:1의 비율로 혼합하여 도포하였으며, 양성대조군은 0.1% Protopic 연고(tacrolimus, Fujisawa Korea, Seoul, Korea)를 도포하였고, 시험물질(HST)을 5 mg/kg body weight 도포하여 아토피-유사 피부염의 정상화 수준을 비교분석하였다.

Table 1. Primer sequences for Real-Time RT-PCR

Gene	Primer	Primer sequences	Product size (bp)	Accession no.
IL-2	5' Primer	5'-AGCTCTACAGCGGAAGCACA	236	NM_008366
	3' Primer	5'-GTCAAATCCAGAACATGCCG		
IFN- γ	5' Primer	5'-TGAAAATCCTGCAGAGCCAG	193	NM_008337
	3' Primer	5'-TGGACCTGTGGGTTGTTGAC		
IL-4	5' Primer	5'-ATATCCACGGATGCGACAAA	252	NM_021283
	3' Primer	5'-AAGCCCCGAAAGAGTCTCTGC		
IL-5	5' Primer	5'-GGGGTACTGTGGAAATGCT	247	NM_010558
	3' Primer	5'-TTGCACAGTTTTGTGGGGT		
IL-10	5' Primer	5'-CAGTACAGCCGGGAAGACAA	285	NM_010548
	3' Primer	5'-CAGCTTCTCACCCAGGGAAT		
IL-13	5' Primer	5'-TGCCATCTACAGACCCAGA	270	NM_008355
	3' Primer	5'-CTGAGGCATCTCCCTCCTC		
CD25	5' Primer	5'-TAGTACCCAGTTGTCGGGCA	212	NM_008367
	3' Primer	5'-CGATTTGTCATGGGAGTTGC		
p21	5' Primer	5'-AGTGTGCCCGTGTCTCTTCG	108	AB_017817
	3' Primer	5'-TCAAAGTCCACCGTCTCG		
p27	5' Primer	5'-GAACTAACCCGGGACTTGG	259	U10440
	3' Primer	5'-CAGAGTTTGCCTGAGACCCA		
β -actin	5' Primer	5'-TACAGCTTACCACCACAGC	187	NM_007393
	3' Primer	5'-AAGGAAGGCTGAAAAGAGC		

Quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) 분석

각 군의 세포로부터 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 즉, Trizol reagent 1 mL를 첨가하여 세포를 용해시키고 chloroform 200 μ L를 첨가하여 실온에서 5분 동안 방치 후 13,500 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 투명한 상층액(500 μ L)을 취하여 새로운 tube로 옮기고 동량의 isopropyl alcohol을 첨가한 후 13,500 rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 RNA를 침강시켰다. RNA pellet을 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리한 증류수로 희석한 75% EtOH 0.75 mL로 세척한 후 공기 중에서 건조시켜 reverse transcription sample로 사용하였다. First strand cDNA 합성은 추출된 total RNA 1 μ g을 사용하여 수행되었고, Improm-II reverse transcription system (Promega)과 oligo dT primers를 사용하여 역전사 반응을 수행하였다. qPCR 분석은 Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Mortlake, Australia)을 사용하였으며, Table 1의 primer를 이용하여 AD 관련 유전자의 발현을 정량적으로 측정하였고 β -actin에 normalization 시킨 상대 수치를 비교분석 하였다. 본 실험에 사용된 primer는 Table 1에 요약하였다.

Electrophoretic-Mobility Shift (EMSA) 분석

EMSA에 사용된 nuclear extracts는 제조사의 지시에 따라 Nuclear Extraction Reagents (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 BALB/c 생쥐 비장세포로부터 준비하였으며, EMSA kit (Panomics, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 EMSA 분석을 수행하였다. 즉, 각 군으로부터 동일한 양의 단백질을 포함하는 nuclear extract를 5분간 poly (dI-dC) (1 μ g/mL)와 함께 5분간 방치한 후 binding buffer (20 mM HEPES pH 7.9, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 5% glycerol, 200 μ g/mL BSA) 및 biotinylated oligo (10 ng/mL)를 첨가하였다. 각 군에 대한 결합특

이성을 control하기 위해 unlabeled 과량(5배)의 올리고를 biotinylated probe 첨가 전 추가하였다. 결합 반응 혼합물을 실온에서 30분간 방치하였으며, protein-DNA 복합체는 4°C에서 0.5 \times Tris-borate/EDTA buffer (0.1 M Tris, 1 mM EDTA를 함유한 0.09 M boric acid)에서 6% non-denatured polyacrylamide gel상에서 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel을 Bio-dyne B Nylon Membrane (Thermo, Rockford, IL, USA)으로 transfer한 후 membrane을 10분간 UV crosslinking하여 고정시켰다. 결합된 oligo들을 검출하기 위해, membrane을 blocking buffer (Panomics)을 사용하여 blocking한 후, 기질로서 Streptavidine-HRPO를 첨가하고, 제공된 chemiluminescent nucleic acid detection module (Panomics)을 이용하여 분석하였다.

Staphylococcus aureus 성장저해 측정

AD 상재균인 황색포도상구균(*S. aureus*)에 대한 HST의 성장저해 효과를 확인하기 위해 *S. aureus*를 nutrient agar에 접종한 후, 37°C에서 3일간 2회 계대배양 후 액체 배지(tryptic soy broth)에서 OD₆₀₀ (optical density)이 1일 때 배양을 중지하고 *S. aureus*를 포함하는 배지와 새로운 배지와와의 비율이 1:100이 되게 하였다. 각 시험물질(ampicillin 100 μ g/mL, HST 0.5 mg/mL 및 HST 1 mg/mL)을 혼합하여 4시간 동안 배양을 지속하였고, 반응 종료 후 각 그룹에서 100 μ L씩 취해 600 nm에서 흡광도를 측정(Molecular Devices)하여 각 군간 성장저해 수준을 비교분석하였다.

Hematoxylin & Eosin (H&E) 조직염색

H&E 염색은 아토피-유사 피부염을 유발시켰던 외이를 수거하여 10% neutral buffered formalin으로 고정시킨 다음, 적절한 크기(0.5 \times 0.5 cm)로 잘라 paraffin으로 embedding하여 조직표본을 제작하였고, microtome을 사용하여 5 μ m의 박편으로 조직절편을 준비하여 2일간 건조하였다. Slide glass에 올려진 조직절편을 완전

히 건조시킨 다음, xylene, graded ethanol로 de-paraffin과 re-hydration 과정을 진행하여 수화된 조직을 hemotoxylin과 eosin dye 로 염색하였고, 광학현미경(Nikon Eclips Ti-S inverted microscope, Tokyo, Japan)으로 각 그룹 조직의 형태를 관찰하였다(23).

통계처리

결과분석은 GraphPad Prizm 5.01 software를 이용하여 통계 처리하였다. 결과는 각 군별 mean±SD로 나타내었고 통계적 의의는 student t-test 방법을 이용하여 p<0.05일 때 유의한 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

AD 치료에 지난 수 십 년간 스테로이드 피부 도포제(topical corticosteroids)들이 일차 치료요법으로 사용되어왔으나 장기간 사용 시 피부 atrophy 및 tachyphylaxis 등을 유발시킬 수 있어 사용상 주의가 요구되고 있다(24). 최근 topical calcineurin inhibitor (TCI)에 대해 미국 FDA에서는 이들의 장기 처치 시 림프종(lymphoma)을 포함한 다른 암종 유발과의 연관성에 대한 위험성을 경고하고 있으나 AD 유발의 주요 면역세포인 T 세포와 비만 세포의 활성화를 억제하는 특이적 기전 때문에 기존 스테로이드 제제에 의한 adverse hormonal 반응을 야기 시키지 않는 것으로 알려져 있다(25,26). 따라서 본 연구에서는 오리나무로부터 확보된 HST의 강력한 면역억제 효능에 대한 기전연구를 통해 T 세포의 증식 및 분화를 억제하는 항아토피 소재로서의 기전적 특성을 확인 하였다.

HST는 2.5 µg/mL 이하의 용량에서 세포독성을 나타내지 않는 것으로 확인되어 본 실험에서 유효 적정용량으로 선정하여 사용하였다(Fig. 1). 기전을 확인하기 위해 마우스 비장세포에 T cell receptor (TCR) complex 중 신호전달을 담당하는 CD3를 자극하도록 anti-CD3 mAb를 처리하여 T cell-dependent signal pathway를 확인하였다. T 세포 활성화는 Ca²⁺/calmodulin/calcineurin complex에 의해 NFAT의 탈인산화가 일어나 핵 내로 NFAT translocation에 따른 결과이므로 NFAT의 탈인산화 과정을 제어하는 inhibitors (calcineurin inhibitor (FK506), calmodulin antagonist (W7) 및 NFAT activation inhibitor III (INCA-6)와 HST 병용 또는 단독 처리하여 T 세포 사이토카인 유전자의 발현 정도를 qPCR을 통해 분석하였다. FK506는 세포질 내 FK506-binding protein (FKBP12)와 복합체 형태로 calcineurin의 효소활성을 억제하는 특징을 가지며 W7은 calmodulin과 결합하여 Ca²⁺-calmodulin-regulated 효소활성을 억제하는 반면 INCA-6는 calcineurin activity에 영향을 주지 않고 calcineurin과 결합하여 NFAT의 탈인산화를 억제하는 기전적 특징을 가진다(27).

Fig. 2A-F에 나타난 바와 같이 HST처리 시 T 세포 활성화에 따른 Th1/Th2 사이토카인(IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13)의 발현이 anti-CD3 mAb 단독 처리군 대비 유의하게 감소하여 T 세포의 활성을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 특히 HST에 의한 Th1 사이토카인인 IFN-γ 발현 저해는 Th2 사이토카인 IL-4, IL-5 및 IL-13 등의 생산을 억제시키고 B 세포의 형질 세포(plasma cell) 분화 유도를 조절하여 결국 IgE 생산을 감소시킬 것으로 사료되었다(28,29). HST와 각 inhibitor와의 연관성을 관찰하기 위해 inhibitor 단독 또는 HST와의 병용 처리 후 Th 사이토카인의 발현 수준을 분석한 결과 HST+FK506에 비해 HST+W7또는 HST+INCA-6와의 병용 처리 시 보다 효과적인 사이토카인 발현억제가 나타나는 것으로 확인되었다(Fig. 2B,D,E,F).

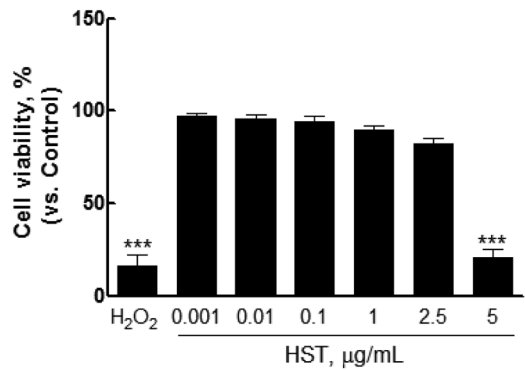


Fig. 1. Cytotoxicity in mouse splenocytes. Splenocytes were prepared from BALB/c mice, seeded in 96-well microplates and cultured with varying concentrations (0.001 to 5 µg/mL) of HST for 24 h. Concentration-dependent cytotoxicity, measured as percent lactate dehydrogenase (LDH) released into the culture supernatant, was compared with non-treated control group (Ctrl). H₂O₂ (1 mM) was used as the positive control. Results are expressed as means±standard deviations from three separate experiments. ***, p<0.001 vs. Ctrl group.

흥미롭게도 Th1 사이토카인(IL-2, IFN-γ)과 비교하여 INCA-6와의 병용 처리 시 INCA-6 단독처리와는 달리(p>0.05) 유의한 수준으로 Th2 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-10, IL-13)의 유전자 발현을 억제하는 결과로부터 HST가 calcineurin과 반응 후 NFAT의 탈인산화를 억제하는 잠재적 기전 특징을 가지고 있는 것으로 예측되었다(Fig. 2C-F). T 세포 early activation marker인 CD25의 유전자 수준을 분석한 결과 W7과 INCA-6 단독 처리와 비교 시 HST를 병용 처리한 경우 HST에 의한 T cell activation이 조절되는 것으로 보아 W7 및 INCA-6와는 다른 구역의 반응 부위가 있을 것으로 판단된다(Fig. 2G).

T 세포의 분화 및 증식은 효과적인 면역반응을 위해 요구되며 따라서 TCR 복합체를 통한 자극유입 시 cell cycling에 진입하게 된다(30). 이 때 calcineurin inhibitor인 cyclosporin A 처리 시 p21 유전자 발현증가에 의해 세포주기 단축의 결과 보다 효과적으로 T 세포 활성을 억제하는 것으로 보고되었다(31). 이러한 관점에서 볼 때 HST에 의한 p21 유전자 발현 증가와, W7 및 INCA-6와 HST 병용 처리 시 약 2-3배 높은 p21 유전자 발현 증가(p<0.001)는 세포주기에 대해 HST의 세포주기조절 또는 W7/INCA-6와의 시너지 효과를 예측할 할 수 있다(Fig. 2H). 이러한 결과는 또 다른 cell-cycle regulator인 p27(cyclin과 cdk에 결합하여 S기로의 진입을 단축하는 단백질)에서도 유사한 결과가 관찰되어 HST가 세포주기조절에 밀접한 연관성을 가짐을 제시하였다(Fig. 2I).

대부분의 AD 환자에서 *S. aureus* colonization이 상재하여 피부 장벽손상, 선천면역계 변형, 세균제거 감소, 세균의 부착 증가, IFN-γ 생산증가 등에 의해 AD의 만성화를 유도하는 것으로 알려져 있어(20,29,32). HST가 AD를 악화시키는 세균인 *S. aureus*의 성장을 매우 효과적으로 억제시키는 결과를 감안할 때 AD 치료에 효과적인 adjuvant 효과를 기대할 수 있다(Fig. 3). 더욱이 HST의 T 세포 활성억제 및 세포주기 조절을 통한 항박테리아 효과는 기존의 항아토피제제에 없는 biphasic한 소재로의 개발 가능성이 매우 높음을 시사하고 있다. T 세포 활성화 신호의 최종 종착지인 핵 내로의 NFAT translocation 억제효과에서도 HST에 의한 NFAT 탈인산화가 거의 완벽하게 이루어지고 있음이 EMSA assay를 통해 확인되었으며(Fig. 4), DNCB-induced atopy-like

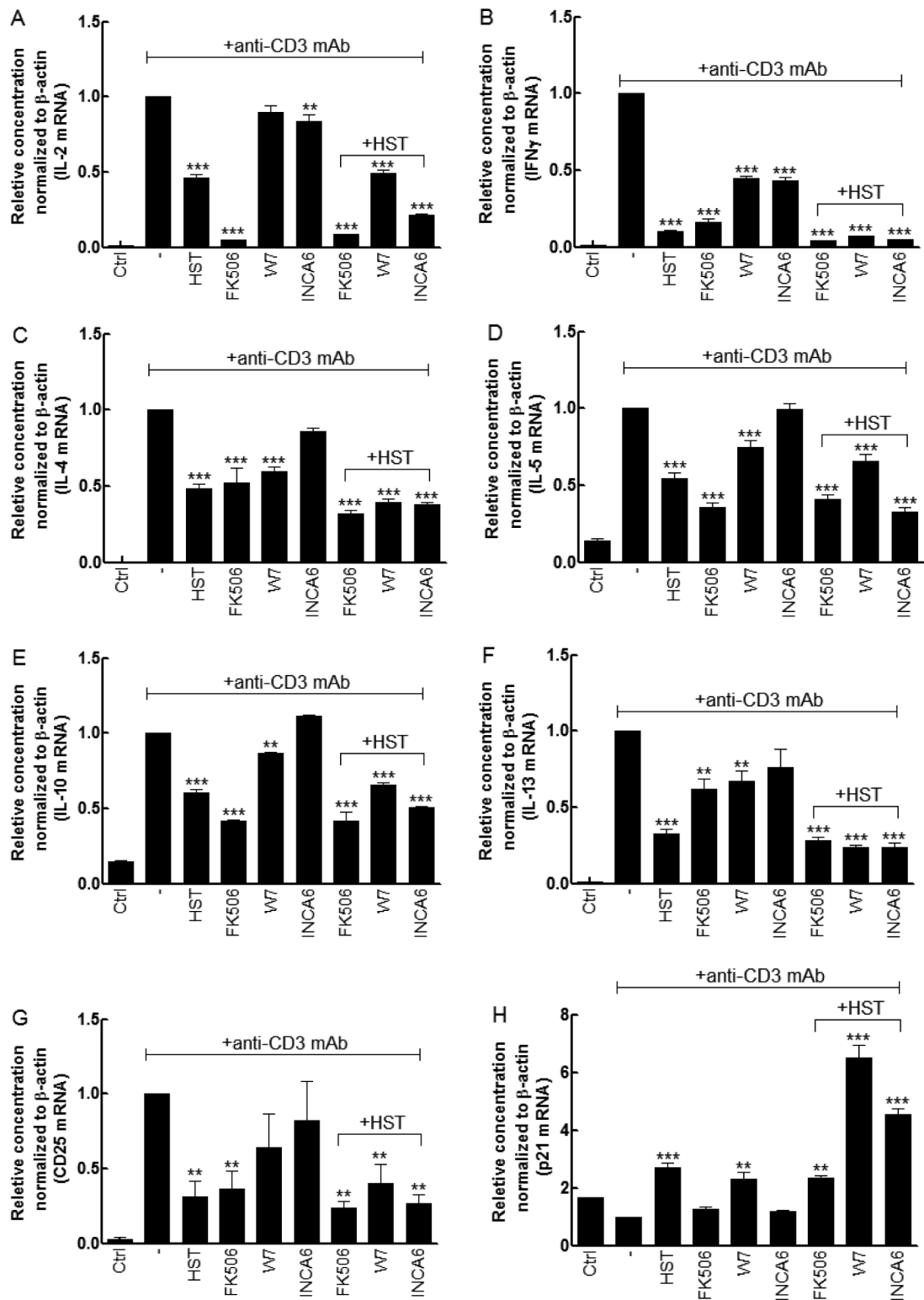


Fig. 2 Th cytokine mRNA expression in splenocytes. Cells were cultured for 16 h under the conventional culture methods, and T cell inactivators, FK506 (tacrolimus), W7 (calmodulin antagonist), INCA-6 (NFAT activation inhibitor III) were treated for determining the mechanisms of action by HST. Isolated mRNA was analyzed by qPCR for IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ , CD25, p21 and p27 (A to I). Results were internally confirmed by the comparative cycle count (Ct, cycle number threshold) against β -actin as the standard gene. 1 μ g/mL anti-CD3 mAb-activated group was used as a calibrator for a relative comparison for each group. Results are means \pm SD ($n=3$). Experiments were performed in triplicate, and the results are expressed as the mean \pm SD. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. vs. anti-CD3 mAb group.

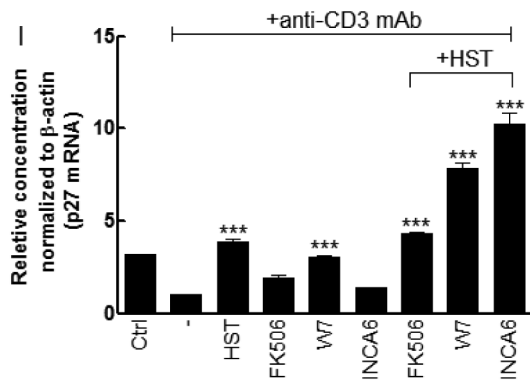


Fig. 2. Continued

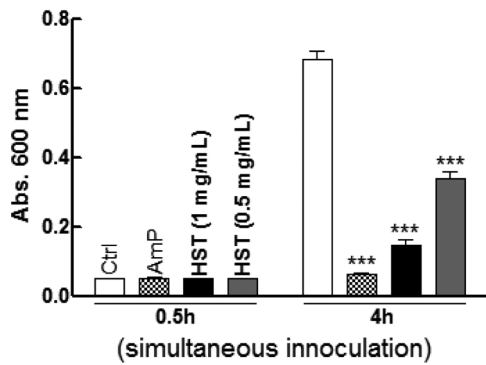


Fig. 3. *S. aureus* growth inhibition. *S. aureus*, a Gram(-) bacteria, were grown in Tryptic Soy Broth, passed into new media at 1:100 ratio and pre-cultured for 2 h. Then, HST was mixed with cell-containing media, and cultured for 4 h. Antibiotics, ampicillin (100 μ g/mL), was used as a positive control. Results are expressed as means \pm standard deviations from three separate experiments. ***, $p < 0.001$ vs. Ctrl group. Ctrl; non-treated control, Amp; ampicillin.

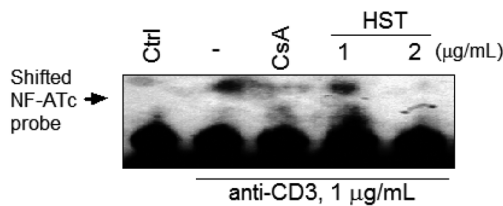


Fig. 4. Electrophoretic-mobility Shift Assay for NFATc in anti-CD3-activated mouse splenocytes. Anti-CD3-activated splenocytes were treated with HST or cyclosporine A (CsA, a positive control) for 60 min, followed by preparation of nuclear extracts for EMSA according to the manufacturer's indication. One representative of three repeat experiments is shown.

mouse model에 HST 도포 후 유발된 AD의 조직학적 정상화가 양성대조군인 0.1% protopic 연고(tacrolimus)와 유사한 수준의 정상화를 보였을 뿐 아니라 적출된 비장의 Th1 및 Th2 사이토카인(각각 IL-2 및 IL-4) 유전자의 발현 수준도 대조군 수준으로 억제되었다(Fig. 5A-C). 이와 같은 결과로부터 만성기(chronic phase)의 AD에서 우세하게 나타나는 IL-2와 급성기(acute phase) 나타나는 IL-4를 효과적으로 억제하여 반복되는 AD 발병기전을 조절할 것으로 사료되었다(10).

결론적으로 HST는 AD를 유발하는 주요 면역세포인 T 세포의

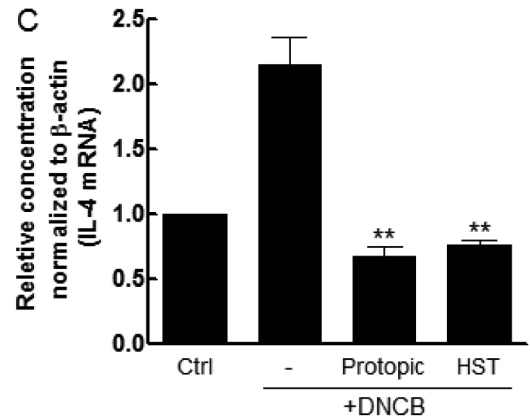
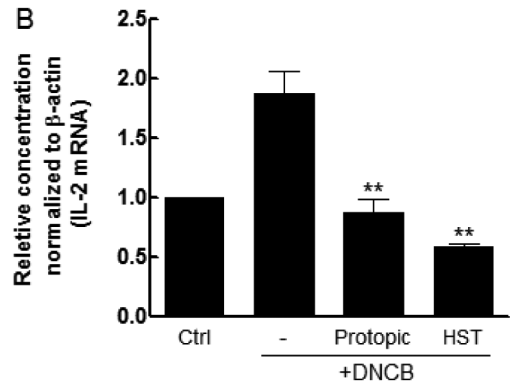
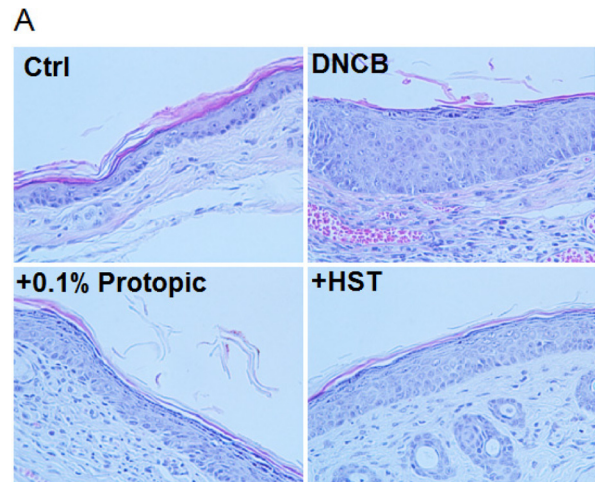


Fig. 5. Histological recovery of skin lesions five weeks after treatment of 0.1% protopic or 5 mg/kg in DNCB-treated BALB/c mice. (A) Tissues were fixed with 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, and stained with the H&E. One representative of three repeat experiments is shown. Ctrl; control. (B,C) Splenocytes were prepared from each group and Th1/Th2 cytokine (IL-2/IL-4) gene expression was analyzed by qPCR. Results are expressed as means \pm standard deviations from three separate experiments. **, $p < 0.01$ vs. Ctrl group.

활성을 효과적으로 억제하며, 이와 같은 효과는 NFAT 탈인산화 조절에 의한 Th 사이토카인의 발현 억제의 결과로 생각된다. 특히 HST는 FK506 및 W7 등과 같은 calcineurin 효소활성 억제효과 보다는 INCA-6와 유사하게 calcineurin과 반응 후 NFAT 탈인산화억제를 유도하는 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 오리나무유래 HST의 T 세포 비활성화 효능을 확인하고 그 기전을 탐색하여 새로운 항아토피 천연소재로의 개발 가능성을 제시하고자 하였다. HST는 T 세포 mitogen으로서 anti-CD3 mAb가 처리된 마우스 비장에서 Th 사이토카인(IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10)의 발현을 효과적으로 억제하였으며, T 세포 early activation marker인 CD25 유전자 발현이 INCA-6에서 매우 효과적으로 억제되는 것으로 보아, NFAT inactivator-유사 NFAT 탈인산화 억제 기전을 가지는 것으로 예측되었다. 또한 세포주기조절 단백질인 p21과 p27의 유전자도 HST에 의해 upregulation이 되어 효과적인 T 세포 증식 및 분화를 억제할 것으로 생각되었다. 이러한 세포주기조절 효과는 AD를 악화시키는 세균인 *S. aureus* 성장억제 실험에서 확인되어 향후 항박테리아 효능을 갖는 우수한 항아토피피부염 천연소재로서 HST의 활용 가치가 높을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업(A091121)의 지원에 의해 수행 되었기에, 이에 감사드립니다.

References

- Strannegard O, Strannegard IL. The causes of the increasing prevalence of allergy: is atopy a microbial deprivation disorder? *Allergy* 56: 91-102 (2001)
- English JSC, Dawe RS, Ferguson J. Environmental effects and skin disease. *Brit. Med. Bull.* 68: 129-142 (2003)
- Leung DY. Molecular basis of allergic diseases. *Mol. Genet. Metab.* 63: 157-167 (1998)
- Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann. Allerg. Asthma Im.* 85: 9-18 (2000)
- Yura A, Shimizu T. Trends in the prevalence of atopic dermatitis in school children: longitudinal study in Osaka prefecture, Japan, from 1985 to 1997. *Brit. J. Dermatol.* 145: 966-973 (2001)
- Diaz-Sanchez D. Pollution and the immune response: atopic diseases-are we too dirty or too clean? *Immunology* 101: 11-18 (2000)
- Jee HM, Kim KW, Kim CS, Sohn MH, Shin DC, Kim KE. Prevalence of asthma, rhinitis and eczema in Korean children using the international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC) questionnaires. *Pediatr. Allergy Respir. Dis.* 19: 165-172 (2009)
- Wollenberg A, Bieber T. Atopic dermatitis: From the genes to skin lesions. *Allergy* 55: 205-213 (2000)
- Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* 361: 151-160 (2003)
- Dokmeci E, Herrick CA. The immune system and atopic dermatitis. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 27: 138-143 (2008)
- Hjern A, Haglund B, Hedlin G. Ethnicity, childhood environment and atopic disorder. *Clin. Exp. Allergy* 30: 521-528 (2000)
- Williams HC, Robertson CF, Stewart AW, At-Khaled N, Anabwani G, Anderson R, Asher I, Beasley R, Bjrkstn B, Burr M, Clayton T, Crane J, Ellwood P, Keil U, Lai C, Mallol J, Martinez F, Mitchell E, Montefort S, Pearce N, Shah J, Sibbald B, Strachan D, von Mutius E, Weiland SK. Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the international study of asthma and allergies in childhood. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103: 125-138 (1999)
- McKeever TM, Lewis SA, Smith C, Collins J, Heatlie H, Frischer M, Hubbard R. Siblings, multiple births, and the incidence of allergic disease: a birth cohort study using the West Midlands general practice research database. *Thorax* 56: 758-762 (2001)
- Serafini U. Do infections protect against asthma and atopy? *Allergy* 52: 955-957 (1997)
- Holt PG. Environmental factors and primary T-cell sensitisation to inhalent allergens in infancy: reappraisal of the role of infections and air pollution. *Pediatr. Allergy Immunol.* 6: 1-10 (1995)
- Novac N, Bieber T, Leung DY. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112: S128-S139 (2003)
- Yang HJ, Park KW, Kim HS, Cho SM, Park KM. Effect of anti-atopic allergic reaction in response to oriental herb extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42: 109-114 (2010)
- Sehra S, Tuana FM, Holbreich M, Mousdicas N, Tepper RS, Chang CH, Travers JB, Kaplan MH. Scratching the surface: towards understanding the pathogenesis of atopic dermatitis. *Crit. Rev. Immunol.* 28: 15-43 (2008)
- Buyts LM. Treatment options for atopic dermatitis. *Am. Fam. Physician* 75: 523-528 (2007)
- Petry V, Bessa GR, Poziomeczyk CS, Oliveira CF, Weber MB, Bonamigo RR, d'Azevedo PA. Bacterial skin colonization and infections in patients with atopic dermatitis. *An. Bras. Dermatol.* 87: 729-734 (2012)
- Joo SS, Kim SG, Choi SE, Kim YB, Park HY, Seo SJ, Choi YW, Lee MW, Lee do I. Suppression of T cell activation by hirsutenone, isolated from the bark of *Alnus japonica*, and its therapeutic advantages for atopic dermatitis. *Eur. J. Pharmacol.* 614: 98-105 (2009)
- Joo SS, Yoo YM, Ko SH, Choi W, Park MJ, Kang HY, Choi KC, Choi IG, Jeung EB. Effects of essential oil from *Chamaecyparis obtusa* on the development of atopic dermatitis-like skin lesions and the suppression of Th cytokines. *J. Dermatol. Sci.* 60: 122-125 (2010)
- Joo SS. *In vitro* and *in vivo* hair growth promotion effects of *Lactobacillus plantarum*-fermented plant extracts (MBN). *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 381-386 (2011)
- Leung D. Superantigens, steroid insensitivity and innate immunity in atopic eczema. *Acta Derm. Venereol. Suppl.* 215: 11-15 (2005)
- Plotz SG, Ring J. What's new in atopic eczema? *Expert Opin. Emerg. Dr.* 15: 249-267 (2010)
- Bornhvd EC, Burgdorf WH, Wollenberg A. Immunomodulatory macrolactams for topical treatment of inflammatory skin diseases. *Curr. Opin. Invest. Dr.* 3: 708-712 (2002)
- Sieber M, Baumgrass R. Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub - alternatives to CsA and FK506? *Cell Commun. Signal.* 7: 25 (2009)
- Juho K, Renz H, Abe J, Gelfand EW, Leung DY. Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90: 323-331 (1992)
- Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 113: 651-657 (2004)
- Firpo EJ, Koff A, Solomon MJ, Roberts JM. Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 14: 4889-4901 (1994)
- Khanna AK, Hosenpud JD. *In vitro* and *in vivo* transfection of p21 gene enhances cyclosporin A-mediated inhibition of lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* 165: 1882-1888 (2000)
- Baker BS. The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 144: 1-9 (2006)