

비만세포에서 連翹 추출물의 Th2 사이토카인 발현 및 신호전달 기전 억제 효과

이진화 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

The Suppressive Effect of Th2 Cytokines Expression and the Signal Transduction Mechanism in MC/9 Mast Cells by Forsythiae Fructus Extracts

Lee Jin Hwa · Han Jae Kyung · Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Korean Medicine, Daejeon University

Objectives

Forsythiae Fructus treatment has been used for inflammatory and allergic diseases in Korean Medicine. Nevertheless, the mechanism of action and the cellular targets are not understood well. The pathogenesis of allergic diseases are associated with Th2 cytokines such as IL-13, MIP-1 α , IL-13, IL-5, GM-CSF, IL-4, TNF- α and IL-6, which are secreted by the mast cells. This study was conducted to investigate the effects of Forsythiae Fructus extracts (FF) on Th2 cytokines expression and signal transduction in MC/9 mast cells.

Methods

In the study, MC/9 mast cells were stimulated with DNP-IgE for 24 hours and then treated separately with CsA 10 μ g/ml and varying doses of FF for one hour. MC/9 mast cells stimulated with DNP-IgE was the control group, a treatment with CsA was the positive control group and a treatment with varying doses FF was the experimental groups. The mRNA levels of IL-13, IL-5, GM-CSF, IL-4, TNF- α , IL-6 were analyzed with Real-time PCR. The levels of IL-13, MIP-1 α were measured using enzyme-linked immunosorbent assays(ELISA). NFAT, AP-1 and NF- κ B p65 were examined by Western blot analysis.

Results

1. FF were observed to suppress the mRNA expression of IL-13, IL-5, GM-CSF, IL-4, TNF- α , IL-6 in comparison to DNP-IgE control group.
2. FF also has inhibited the IL-13, MIP-1 α production significantly in comparison to DNP-IgE control group.
3. Western blot analysis of transduction factors involving Th2 cytokines expression has revealed a prominent decrease of the mast cell specific transduction factors including NFAT-1, NFAT-2, c-Jun, and NF- κ B p65 but c-Fos.

Conclusions

In conclusion, the anti-allergenic activities of FF may be strongly related to the regulation of transcription factors NFAT-1, NFAT-2, c-Jun, and NF- κ B p65 causing inhibition of Th2 cytokines in mast cells.

Key words : Forsythiae Fructus, Th2 cytokines, Mast cell, DNP-IgE

Received: July 24, 2014 • Revised: August 7, 2014 • Accepted: August 8, 2014
Corresponding Author: Kim Yun Hee
Korean medicine hospital of Daejeon university, 75, Daedeok-daero 176beon-gil, Seo-gu, Daejeon, Republic of Korea.
Tel: +82-42-470-9138 / Fax: +82-42-477-9007
E-mail: unia67@dju.kr

© The Association of Pediatrics of Korean Medicine. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I. Introduction

連翹 (*Forsythiae Fructus*)는 물푸레나무과 (木犀科, *Oleaceae*) 속하는 개나리 (*Forsythia densitrolra Nakai*)와 의성개나리 (*Forsythia viridissima Lindley*)의 과실을 건조한 것으로 약성이 짙고苦味를 가지고 있으며 淸熱과 消腫의 작용을 통해 瘡瘍腫毒과 癰癤結核을 치료하는 聖藥으로 알려져 있으며 癰疽, 乳癰, 丹毒 등 피부과 염증 질환에도 응용된다¹⁻⁶. 현대에서 아토피 피부염의 내치 또는 외치 요법에 다용되고 있으며^{7,8} 접촉성 피부염에도 사용되고 있다⁹.

連翹의 생리활성 작용에 대한 실험적 연구는 다양하게 진행되어 *in vitro*에서 항균작용¹⁰, 혈압강화작용¹¹ 및 복강 대식세포와 뇌 신경교세포에서 항염증 효과^{12,13}에 대한 보고가 있었으며, 피부 노화 및 상태 개선과 연관된 항산화 활성¹⁴⁻¹⁹에 관한 여러 연구 결과가 보고되었다. 또한 아토피 질환에서 連翹가 배합된 加味淸心蓮子湯^{20,21}, 加減消毒飲²², 仙方敗毒湯²³, 沆瀣丹²⁴ 등의 탕약에서 항염증 기전에 대한 보고가 있었으나 連翹 단일 약물의 항아토피 효과에 대한 보고는 없었다.

아토피 피부염의 원인은 정확하게 밝혀지지 않았으나²⁵ 모계 유전 형태로 알레르기 관여 유전자와 아토피 피부염만의 독립적인 유전자가 연관되며²⁶ 환경 요인과 외부 항원에 대한 면역 반응 등이 복합적으로 관여된다고 알려져 있다²⁷. 특히 급성 아토피 피부염은 면역학적으로 IgE 합성 증가, 호산구 증가와 T세포 면역 반응 중 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-16, IL-3, TNF- α , GM-CSF 등의 사이토카인을 분비하는 Th2 반응의 우세가 핵심적인 요인으로 보고되고 있으며^{28,29}, 이러한 Th2 반응의 우세는 만성으로 이행되는 Th1, Th2 반응과도 연관되는 것으로 보인다³⁰.

이에 저자는 아토피 피부염의 피부 병변에서 관찰되는 비만 세포³¹에서 連翹의 항염증 작용 기전을 알아보기 위하여 생쥐 MC/9 비만 세포에서 다양한 Th2 사이토카인의 활성 억제를 확인하고, 그 기전을 연구하기 위하여 사이토카인 유전자 발현에 관여하는 신호전달 물질의 활성에 대하여 알아보았다. 표준화된 실험을 위하여 HPLC를 통해 실험에 사용된 連翹의 지표 성분을 분석하였으며, Real-Time PCR을 통해 Th2 사이토카인인 IL-13, IL-5, GM-CSF, IL-4, TNF- α , IL-6 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하였고,

ELISA를 통해 IL-13, MIP-1 α 의 단백질 생성 억제 효과를 분석하였다. 또한 Th2 사이토카인 발현 억제 기전 연구를 위하여 western blot으로 NFAT-1, NFAT-2, AP-1 protein (c-Jun, c-Fos), NF- κ B p65 전사인자 단백질 발현 억제를 관찰하여 유의한 결과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

II. Materials and methods

1. 재료

1) 시약 및 기기

(1) 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배양액, sulforhodamin B (SRB), 2-isopropanol, sodium dodecyl sulfate (SDS), Fetal bovine serum (FBS), Trypsin-EDTA, Antibiotics (penicillin, streptomycin)는 Gibco-BRL사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Diethyl pyrocarbonate (DEPC), Chloroform, Isopropanol, Ethanol, Nonidet P-40는 Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였다. Trizol은 Ambion사 (U.S.A.) 제품을, EZ-cytox kit는 Daeil Lab사 (Korea) 제품을, DEPC water는 Invitrogen사 (U.S.A.) 제품을 Deoxynucleoside triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사 (Japan) 제품을, Molecy murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT) 와 RNase inhibitor는 Promega사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, primary antibody (NFAT-1, NFAT-2, c-Jun, c-Fos, NF- κ B p65)는 Santa-Cruz사 (U.S.A.) 제품을 사용하였다. ECL-hybrid film은 Amersham사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, SYBR master mix와 Taqman master mix는 Applied Biosystems사 (U.S.A.), nuclear extract kit는 Active motif사 (U.S.A.), Mouse IL-13, MIP-1 α ELISA kit는 eBioscience사 (U.S.A.) 제품을, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용한 기기는 열탕추출기 DWT-1800T (대웅, Korea), 감압 증류장치 BÜCHI B-480 (BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland), 동결 건조기 FDU-540 (EYELA, Japan), CO₂ 배양기 (Forma scientific Co., U.S.A.), 원심분리기 (한일과학, Korea), plate shaker (Lab-Line,

U.S.A.), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Quantitative Real-Time PCR (Applied Biosystems, U.S.A.), Image-Rab densitometer (Bio-Rad, U.S.A.), Bio-freezer (Sanyo, Japan), ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A.), HPLC Waters 2695 system (Waters Co. U.S.A.) 등을 사용하였다. HPLC 는 Agilent 1200 series로서 autosampler, column oven, binary pump, DAD detector (Agilent Technologies, Germany), degasser (Agilent Technologies, Japan)를 사용하였으며, software는 Agilent사의 Chemstation software (Agilent Technologies, U.S.A.)를 사용하였다.

2) 세포 배양 및 성분 분리

(1) 세포 배양

본 실험에 사용된 MC/9 비만 세포주 (ATCC, U.S.A.) 를 10% FBS, 10% T-stim (U.S.A.), 0.05 mM 2-mercaptoethanol and 2 mM L-glutamine (Sigma, U.S.A.) 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin이 함유된 DMEM 배지에 부유시켜 37 °C, 5% CO₂, 95% 대기에서 배양하였다. 세포는 주 2-3회씩 계대 배양하였다.

(2) 連翹 추출물 분리

본 실험에 사용한 連翹는 대전대학교 한의과대학 부속 둔산한방병원 약제과에서 구입, 정선하여 사용하였다. 連翹 분말 (317 g) 을 ASE300 Accelerated Solvent Extractor (DIONEX Co. U.S.A.) 에서 30% Ethanol (1.5 L) 에 3일간 침지한 후 50 °C에서 20분간 추출하였다. 추출액을 여과하고 감압 건조하여 얻어진 추출여액을 동결건조기 (Biotrn Co., U.S.A.) 에서 cold trap -70 °C와 chamber 온도 40 °C에서 24시간 동안 동결 건조하여 8.5 g의 連翹 추출물 (이하 FF)을 얻었다.

(3) HPLC 분리 및 지표성분 분석

FF 성분 분석을 위한 HPLC 조건은 column oven의 온도가 25 °C, 분석과장은 250 nm, 유속은 0.3 ml/min를

사용하였고, 컬럼은 Luna C18 column (250 mm x 4.6 mm; particle size 5 μm , Phenomenex, U.S.A.) 를 사용하였다. A용매는 100% 3차 증류수에 0.1% 포름산을 첨가하고, B용매는 100% 아세토니트릴에 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하였으며 용매계는 다음과 같다 (Table 1). 지표성분으로 Arctigenin을 표준시료와 FF에서의 성분분석을 하였다.

2. 방법

1) MC/9 비만 세포주 배양

MC/9 비만 세포주를 10% FBS, 10% T-stim, 0.05 mM 2-mercaptoethanol과 2 mM L-glutamine 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin이 함유된 DMEM 배지에 10⁵ cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

2) 세포 독성(cytotoxicity) 측정

세포 독성은 EZ-Cytox assay³²⁾을 약간 변형하여 실험에 사용하였으며 MC/9 비만 세포는 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 1 시간 배양한 후 FF (최종 농도 50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 을 48 시간 동안 처리하였다. 배양 종료 6 시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 μg 씩 각 well에 가하고 실험 종료 시까지 배양하였으며 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader 에서 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Real-Time PCR

(1) RNA 추출

MC/9 비만 세포를 48-well plate에 5×10⁵/ml로 1 ml 씩 분주하고 무처리한 군을 정상군 (only MC/9 cell)으로, 24시간 동안 DNP-IgE 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 만으로 자극한 후 PBS로 수세하고 10% FBS-DMEM으로 교체한 군을 대조군 (DNP- IgE Control)으로 하였다. 3시간 후 Cyclosporin A (CsA) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 FF (100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하고 1시간 후에 DNP-BSA 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 자극한 뒤 6시간 후에

Table 1. Solvent Gradient Condition for HPLC-DAD

Final time (min)	Flow rate (ml/min)	A	B
0	0.3	85	15
10	0.3	80	20
30	0.3	65	35
35	0.3	65	35
40	0.3	85	15

A : Water with 0.1% formic acid.

B : Acetonitrile with 0.1% formic acid.

세포를 얻어 FF 처리한 것을 실험군 (DNP-IgE + FF-100, 50), CsA를 처리한 것을 양성대조군 (DNP-IgE + CsA 10)으로 하였다.

그 세포에 Trizol 시약을 1 ml 넣고 eppendorf tube에 넣은 후 Chloroform을 100 μ l 넣었다. 얼음에 17분 동안 두고 13,000 rpm으로 15분 동안 원심 분리하여 층이 분리되면 eppendorf tube에 상청액을 옮겨 담고, 동량으로 Isopropanol을 넣어 얼음에 10분 정도 두었다가 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 이때 상청액은 버리고 80% Ethanol로 세척한 후, 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상청액을 완전히 제거하고 투명해질 때까지 말린 후 DEPC water로 cell의 양에 따라 25 μ l를 넣어 녹였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성 (denaturation) 시키고, 이에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix와 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/25 μ l) 및 RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT (200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

(3) cDNA PCR

Real time quantitative RT-PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system를 이용하여 수행하였으며, 사용된 Probe와 Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다 (Table 2).

Mouse GAPDH-VIC probe set; Endogenous Control (VIC[®]/MGB Probe, Probe limited) from Applied Biosystems (4352339E) 유전자 발현은 Taqman PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard를 GAPDH를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation을 2 min at 50 $^{\circ}$ C, 10 min 94 $^{\circ}$ C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95 $^{\circ}$ C, 1 min at 60 $^{\circ}$ C에서 수행하였으며 Target group의 RQ (relative quantitative)는 Quantitative PCR로 다음과 같이 측정하였다.

$$y = x(1+e)^n$$

x : starting quantity

y : yield

n : number of cycles

e : efficiency

4) ELISA 측정

MC/9 비만 세포주를 48-well plate에 5×10^5 /ml로 1 ml씩 분주하고 무처리한 군을 정상군 (only MC/9 cell)으로, 24시간 동안 DNP-IgE 1 μ g/ml 만으로 자극한 후 PBS로 수세하고 10% FBS-DMEM으로 교체한 군을 대조군 (DNP-IgE Control)으로 하였다. 3시간 후 대조군에 FF (400, 200, 100 μ g/ml)와 CsA 10 μ g/ml를 처리하고 1시간 후에 DNP-BSA 0.5 μ g/ml로 자극하여 FF 처리한 것을 실험군 (DNP-IgE + FF-100, 200, 400), CsA

Table 2. Primer Sequence for Real-time PCR Analysis

Target gene	Primer	Sequences
GM-CSF	Forward	5'-ACCACCTATGCGATTTCAT-3'
	Reverse	5'-TCATTACGCAGGCACAAAAG-3'
IL-4	Forward	5'-GGATGTAACGACAGCCCTCT-3'
	Reverse	5'-GTGTTCCCTTGTGCCGTAAG-3'
IL-5	Forward	5'-AGCACAGTGGTAAAAGACCTT-3'
	Reverse	5'-TCCAATGCATAGCTGGTGATTT-3'
IL-6	Forward	5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3'
	Reverse	5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'
IL-13	Forward	5'-CAGTTGCAATGCCATCCACA-3'
	Reverse	5'-AGCCACATCCGAGGCCTTT-3'
TNF- α	Forward	5'-GGCTTTCCGAATTCACCTGGAGCCT-3'
	Reverse	5'-CCCCGGCCTTCCAATAAATACATTCATA-3'
GAPDH-VIC	Probe	5'-CATGTTCCAGTATGACTCCACTCAG-3'

로 처리한 것을 양성대조군 (DNP-IgE + CsA 10)으로 하였다.

Mouse IL-13, MIP-1 α ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 코팅 antibody를 microwell에 100 μ l씩 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 두었으며 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200 μ l씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상청액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상청액을 100 μ l씩 넣었으며 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. Microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였으며, microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. Stop solution을 각 well에 50 μ l씩 넣고 microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 측정하였다.

5) Western blot

MC/9 비만 세포를 100 \times 20 mm plate에 4×10^5 /ml로 10 ml씩 분주하고 무처리한 군을 정상군 (only MC/9 cell)으로, 24시간 동안 DNP-IgE 1 μ g/ml로 자극한 후 PBS로 수세하고 10% FBS-DMEM으로 교체한 군을 대조군 (DNP- IgE Control)으로 하였다. 그리고 3시간 후 CsA 10 μ g/ml과 FF 100 μ g/ml를 처리하고 1시간 후에 DNP-BSA 0.5 μ g/ml로 자극한 뒤 1시간 후에 차가운 PBS로 세척한 후 scraper로 세포를 얻고 원심분리하여 상청액을 버린 후 각각 양성대조군 (DNP-IgE + CsA 10)과 실험군 (DNP -IgE + FF)으로 하였다.

Lysis buffer (RIPA buffer 98 μ l + protease inhibitor cocktail (100 \times) 1 μ l + PMSF (100 mM) 1 μ l) 100 μ l로 얼음에서 15~20분간 배양한 후 상청액을 얻었다. 또한 nuclear extract kit를 사용하여 hypotonic buffer를 넣고 얼음에서 15분간 배양한 후 원심분리하여 상청액 (cytoplasmic fraction)을 모았으며, tube에 남아 있는 핵에 complete lysis buffer를 넣고 30초 동안 얼음에서 배양한 후 원심분리 하여 상청액 (nuclear fraction)을 얻었다. 이렇게 얻은 단백질은 BCA단백질 정량법으로 정량하였으며, 10% SDS PAGE gel을 만들어서 running buffer를 채운 뒤 20분 동안 pre-running시키고, 그 사이에 단백질을 loading buffer로 희석하고 끓는 물에 5분 동안 끓여서 단백질이 꼬인 것을 풀어주었다. gel의 첫

번째 빈칸은 띄우고 두 번째 칸에 단백질 마커를 넣고 그 다음 칸부터 샘플을 넣어 120V로 내렸다. 그렇게 내린 gel을 크기에 맞게 자르고 20분 동안 transfer buffer에 담가 놓고, 그 사이에 membrane을 gel의 크기에 맞게 자르고 transfer buffer에 미리 담가 두었다. 그리고 Transfer buffer로 가득 채우고 뜨거워지지 않게 얼음을 넣은 후 150 V로 1시간 30분 동안 membrane으로 이동시켰다. 또한 Membrane을 크기에 맞게 자르고 5% skim milk (TBST buffer) 로 1시간 동안 blocking 해주었으며, Primary antibody (NFAT1, NFAT2, c-Jun, c-Fos, NF- κ B p65) 로 4 $^{\circ}$ C에서 하루를 반응시킨 후, 다음날 secondary antibody를 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 암실에서 ECL detection 용액을 사용하여 필름에 옮기고 현상용액에 담가 현상하고 고정액에 고정시켜 건조시켰으며 결과에 대한 밴드밀도 (band densities)는 YY-1과 비교하여 Image-Rab densitometer를 사용하여 최종 측정 분석하였다.

3. 통계 분석

각 실험군 결과값은 SPSS통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, 유의성 검사는 independent T-test로 $p < 0.05$ 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다. (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)

III. Results

1. HPLC 분리 및 지표성분 분석

連翹의 지표성분으로 알려진 Arctigenin을 連翹 추출물 내에서 확인하기 위해 Arctigenin 표준물질을 HPLC로 분석한 결과, chromatogram (Fig. 1-1)에서 Retention time을 나타내는 고유의 peak가 44.59분대에서 확인되었으며, FF의 chromatogram (Fig. 1-2)에서 Arctigenin 지표성분을 확인한 선행실험과 동시간대인 44.60분대에서 elution peak을 확인할 수 있었다. FF의 Arctigenin 성분함량은 2.91 mg/g으로 약 0.291%에 해당되었다 (Table 3).

2. 세포 독성 측정

FF의 세포독성을 측정한 결과 50, 100, 200, 400, 800 μ g/ml의 모든 측정 농도에서 세포독성이 나타나지

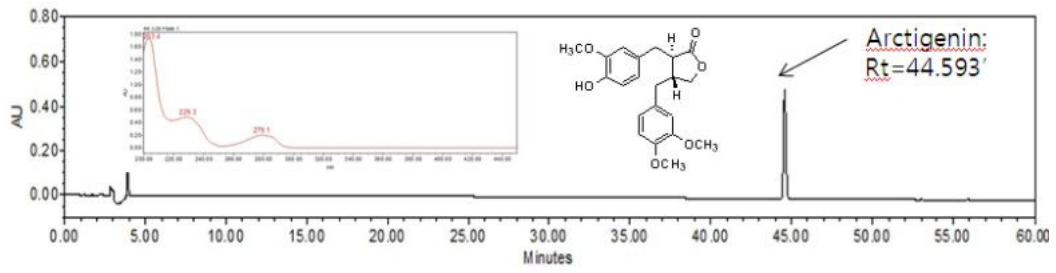


Fig. 1-1. HPLC chromatogram of arctigenin

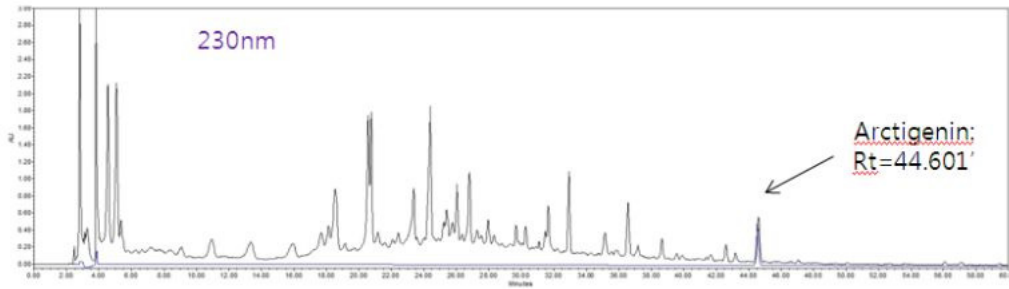


Fig. 1-2. HPLC chromatogram of FF & arctigenin

Table 3. Content of Arctigenin as a Marker Compound in FF

	Concentration (mg/ml)	RT (min)	Area (n=3)	Content (%)	Content (mg/g)
Arctigenin	0.1	44.593	4,901,697		
FF	50	44.601	5,363,683	0.291	2.91

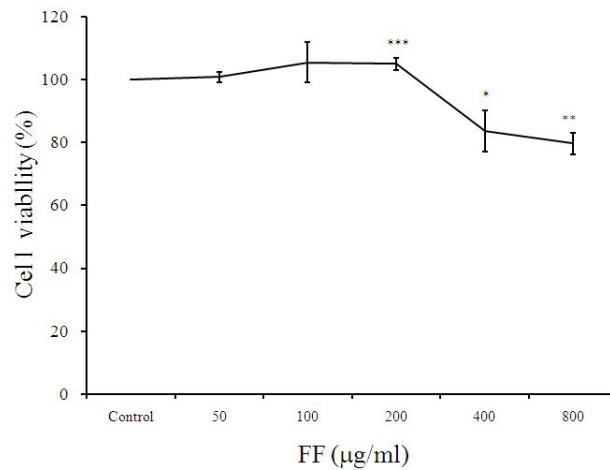


Fig. 2. Cytotoxic effects of FF on MC/9 mast cell

MC/9 mast cells were pretreated with various concentration FF extract. The results were expressed the mean ± S.E. (N=3). Statistically significant value compared with control group data by independent T-test (*** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05).

않았다 (Fig. 2).

와 다양한 농도의 FF을 처리한 후 6시간 뒤 Real-Time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석하였다.

3. Real-Time PCR analysis

FF이 비만세포에서 IL-13, IL-5, GM-CSF, IL-4, TNF-α, IL-6 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, MC/9 비만 세포에 DNP-IgE로 자극한 뒤 CsA

1) IL-13 mRNA 유전자 발현

IL-13 mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.395 ± 0.027 이었고, 대조군은 1.051 ± 0.051 로 정상군에 비하여 유

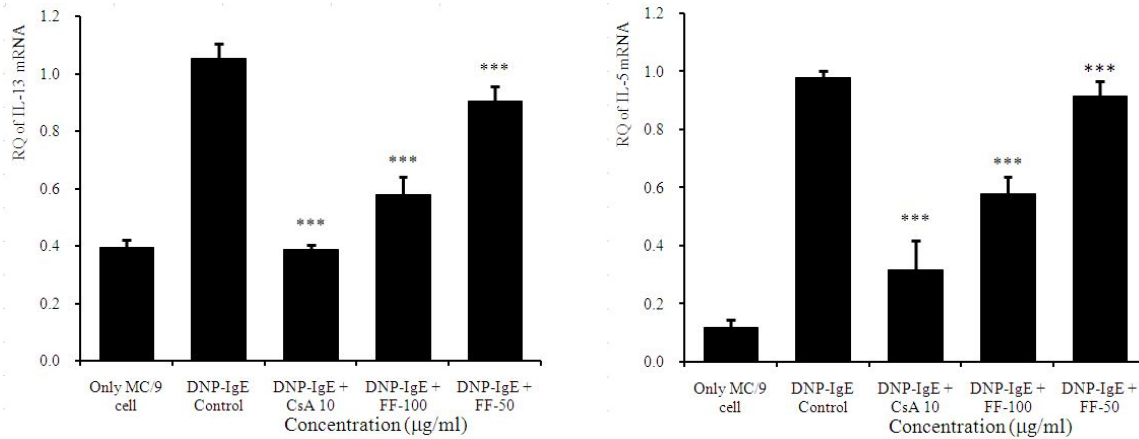


Fig. 3-1. Suppressive effects of FF on IL-13 and IL-5 mRNA expression

MC/9 mast cells were stimulated with DNP-IgE for 24 hours, and then treated with CsA (10 $\mu\text{g/ml}$) or FF (100, 50 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hour. The expression of IL-13 and IL-5 mRNA was analyzed by Real-Time PCR. Values were expressed as means \pm S.E. Statistically significant value compared with control group data by independent T-test (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

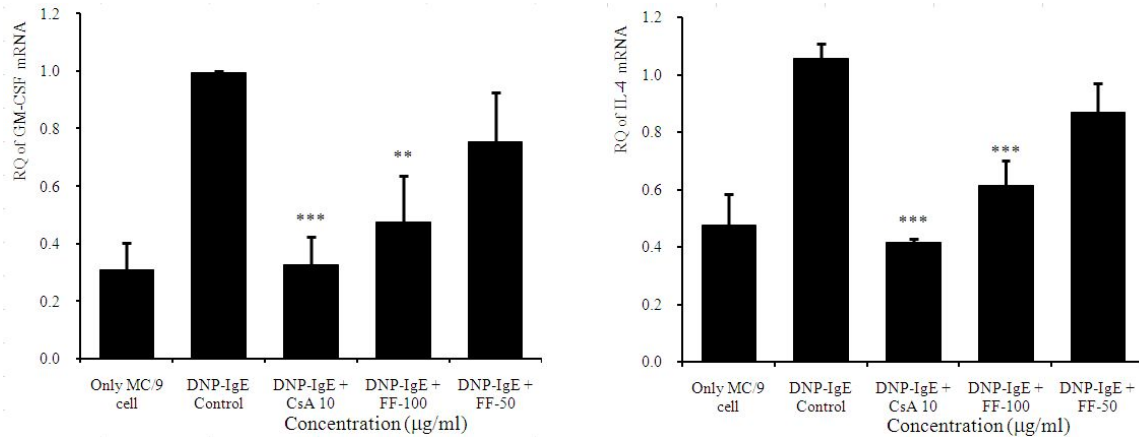


Fig. 3-2. Suppressive effects of FF on GM-CSF and IL-4 mRNA expression

MC/9 mast cells were stimulated with DNP-IgE for 24 hours, and then treated with CsA (10 $\mu\text{g/ml}$) or FF (100, 50 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hour. The expression of GM-CSF and IL-4 mRNA was analyzed by Real-Time PCR. Values were expressed as means \pm S.E. Statistically significant value compared with control group data by independent T-test (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은 0.386 ± 0.018 로 대조군에 비하여 유전자 발현이 억제되었다 ($p < 0.001$). FF 실험군의 IL-13 mRNA 유전자 발현은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 0.578 ± 0.060 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었으며, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 0.902 ± 0.054 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.01$) 억제되었다 (Fig. 3-1).

2) IL-5 mRNA 유전자 발현

IL-5 mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.116 ± 0.029 이었고, 대조군은 0.979 ± 0.022 로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은 0.314 ± 0.102 로 대조군에 비하여 유전자 발현이 억제되었다 ($p < 0.001$).

FF 실험군의 IL-5 mRNA 유전자 발현은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 0.577 ± 0.059 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었으며, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 0.914 ± 0.052 로 대조군과 거의 차이가 나지 않았다 (Fig. 3-1).

3) GM-CSF mRNA 유전자 발현

GM-CSF mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.308 ± 0.093 이었고, 대조군은 0.994 ± 0.007 로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은 0.324 ± 0.100 로 대조군에 비하여 유전자 발현이 억제되었다 ($p < 0.001$). FF 실험군의 GM-CSF mRNA 유전자 발현이 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 0.475 ± 0.160 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었으며, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는

0.753 ± 0.172로 억제되었으나 유의성은 없었다 (Fig. 3-2).

4) IL-4 mRNA 유전자 발현

IL-4 mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.475 ± 0.109 이었고, 대조군은 1.054 ± 0.054로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은 0.413 ± 0.016로 대조군에 비하여 유전자 발현이 억제되었다 (p<0.001). FF 실험군의 IL-4 mRNA 유전자 발현은 100 µg/ml에서 0.613 ± 0.088로 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.001) 억제되었으며, 50 µg/ml에서는 0.868 ± 0.100로 억제되었으나 유의성은 없었다 (Fig. 3-2).

5) TNF-α mRNA 유전자 발현

TNF-α mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.338 ± 0.077이었고, 대조군은 1.063 ± 0.063로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은 0.542 ± 0.174로 대조군에 비하여 유전자 발현이 억제되었다 (p<0.001). FF 실험군의 TNF-α mRNA 유전자 발현은 100 µg/ml에서 0.700 ± 0.016로 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.001) 억제되었으며, 50 µg/ml에서는 0.781 ± 0.084로 억제되었으나 유의성은 없었다 (Fig. 3-3).

6) IL-6 mRNA 유전자 발현

IL-6 mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.314 ± 0.104 이었고, 대조군은 0.984 ± 0.016로 정상군에 비하여 유전자 발현 증가가 나타났다. 양성대조군은 0.316 ±

0.085로 대조군에 비하여 유전자 발현이 억제되었다 (p<0.001). FF 실험군의 IL-6 mRNA 유전자 발현은 100 µg/ml에서 0.586 ± 0.099로 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.001) 억제되었으며, 50 µg/ml에서는 0.786 ± 0.087로 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.001) 억제되었다 (Fig. 3-3).

4. ELISA analysis

FF이 비만세포에서 IL-13, MIP-1α 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, MC/9 비만 세포에 DNP-IgE로 자극한 뒤 CsA와 100, 200, 400 µg/ml 농도의 FF을 처리한 후 6시간 후 ELISA로 IL-13와 MIP-1α 생성량을 측정하였다.

1) IL-13 단백질 생성

IL-13 생성량은 정상군은 261.043 ± 26.11 pg/ml이었고, 대조군은 680.087 ± 16.31 pg/ml으로 정상군에 비해 증가하였고, 양성대조군은 388.238 ± 17.50 pg/ml로 대조군에 비해 억제되었다 (p<0.001). FF 실험군의 IL-13 생성량은 100 µg/ml에서는 589.406 ± 18.75 pg/ml으로 억제되었고 (p<0.001), 200 µg/ml에서는 535 ± 40.30 pg/ml으로 억제되었으며 (p<0.05), 400 µg/ml에서는 387.913 ± 20.19 pg/ml으로 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.01) 억제되었다 (Fig. 4-1).

2) MIP-1α 단백질 생성

MIP-1α 생성량은 정상군은 264.931 ± 23.73 pg/ml

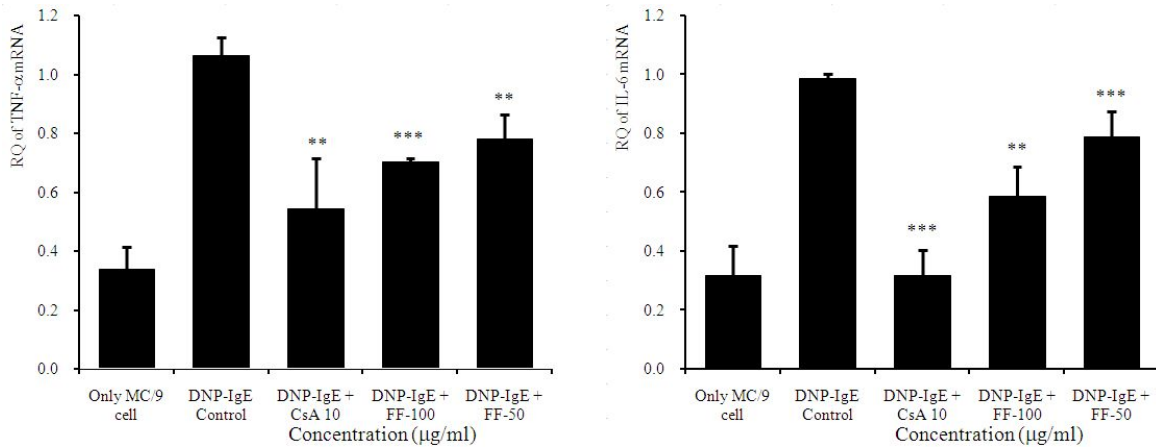


Fig. 3-3. Suppressive effects of FF on TNF-α and IL-6 mRNA expression

MC/9 mast cells were stimulated with DNP-IgE for 24 hours, and then treated with CsA (10 µg/ml) or FF (100, 50 µg/ml) for 1 hour. The expression of TNF-α and IL-6 mRNA was analyzed by Real-Time PCR. Values were expressed as means ± S.E. Statistically significant value compared with control group data by independent T-test (***) p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05).

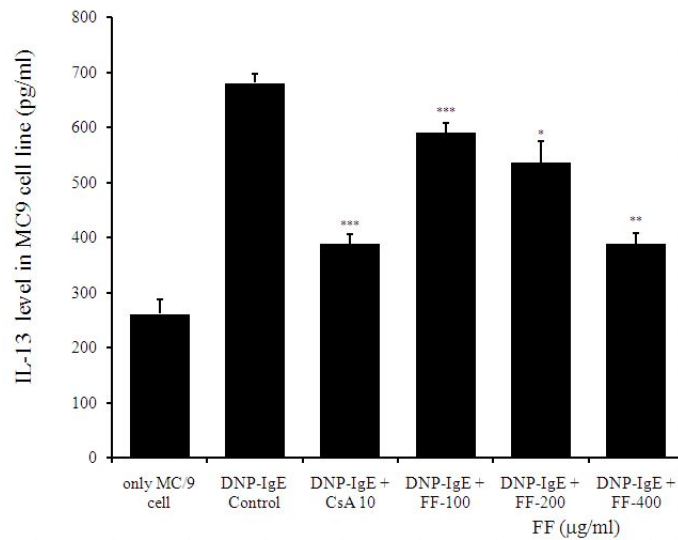


Fig. 4-1. Suppressive effects of FF on IL-13 production

MC/9 mast cells were stimulated with DNP-IgE for 24 hours, and then treated with CsA (10 $\mu\text{g/ml}$) or FF (100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hour. IL-13 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Values were expressed as means \pm S.E. Statistically significant value compared with control group data by independent T-test (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

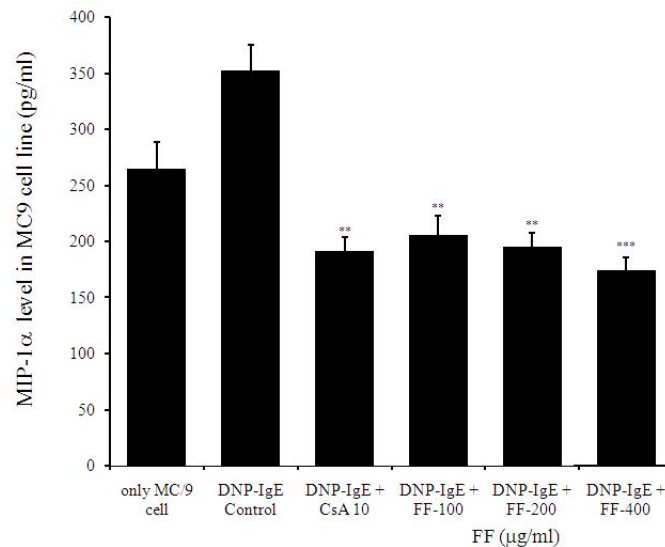


Fig. 4-2. Suppressive effects of FF on MIP-1 α production

MC/9 mast cells were stimulated with DNP-IgE for 24 hours, and then treated with CsA (10 $\mu\text{g/ml}$) or FF (100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hour. IL-13 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Values were expressed as means \pm S.E. Statistically significant value compared with control group data by independent T-test (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

이었고, 대조군은 352.631 ± 22.43 pg/ml로 정상군에 비해 증가하였고, 양성대조군은 191.641 ± 16.78 으로 대조군에 비해 억제되었다 ($p < 0.001$). FF 실험군의 MIP-1 α 생성량은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 205.729 ± 16.78 pg/ml로 억제되었고 ($p < 0.01$), 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 195.495 ± 11.64 pg/ml로 억제되었으며 ($p < 0.01$), 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 173.997 ± 11.17 pg/ml로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었다 (Fig. 4-2).

5. Western blot analysis

FF이 비만세포에서 NFAT-1과 NFAT-2, AP-1 protein (c-Jun, c-Fos), NF- κ B p65 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, MC/9 비만 세포에 DNP-IgE로 자극한 뒤 1시간 동안 CsA와 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 FF을 처리한 후 6시간 후 western blot으로 NFAT-1과 NFAT-2, AP-1 protein (c-Jun, c-Fos), NF- κ B p65의 단백질을 발현을 측정하였다.

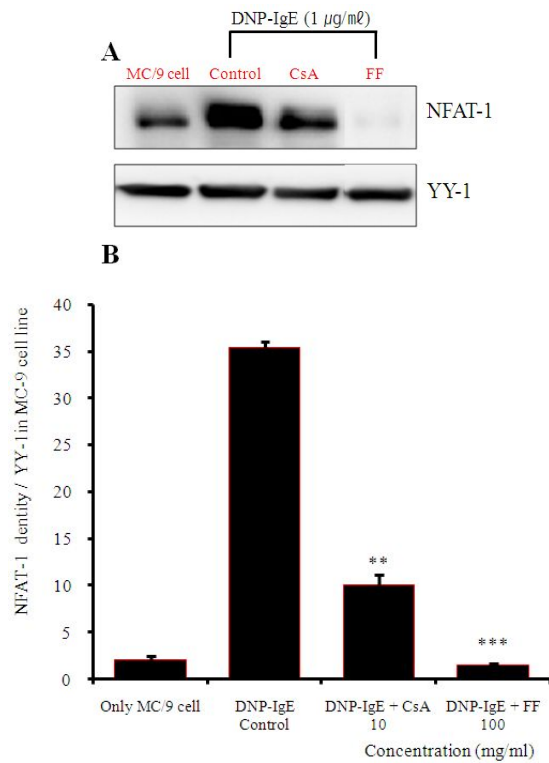


Fig. 5-1. Effect of FF on NFAT-1 signal events in MC/9 cells induced with DNP-IgE

MC/9 mast cells were stimulated with DNP-IgE for 24 hours, and then treated with CsA (10 µg/ml) or FF (100 µg/ml) for 1 hour. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with NFAT proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of NFAT proteins were selected as the positive control for Anti-NFAT-1 respectively. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) (***) p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05).

1) NFAT-1, NFAT-2 신호전달 기전

NFAT-1의 단백질 발현은 정상군에서 NFAT-1 densities (이하 DT)가 2.1로 나타났고 (Fig. 5-1, NFAT-1 band lane 1), 대조군에서 35.40로 정상군에 비하여 증가하였으며 (Fig. 5-1, NFAT-1 band lane 2), 양성대조군의 DT는 10.10으로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다 (p<0.01) (Fig. 5-1, NFAT-1 band lane 3). 실험군의 100 µg/ml에서 DT는 1.45로 대조군에 비하여 NFAT-1의 단백질 발현이 유의성 있게 억제되었다 (p<0.001) (Fig. 5-1, NFAT-1 band lane 4).

NFAT-2의 단백질 발현은 정상군에서 DT가 1로 나타났고 (Fig. 5-2, NFAT-2 band lane 1), 대조군에서 2.8로 정상군에 비하여 증가하였으며 (Fig. 5-2, NFAT-2 band lane 2), 양성대조군의 DT는 0.31로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다 (p<0.01) (Fig. 5-2,

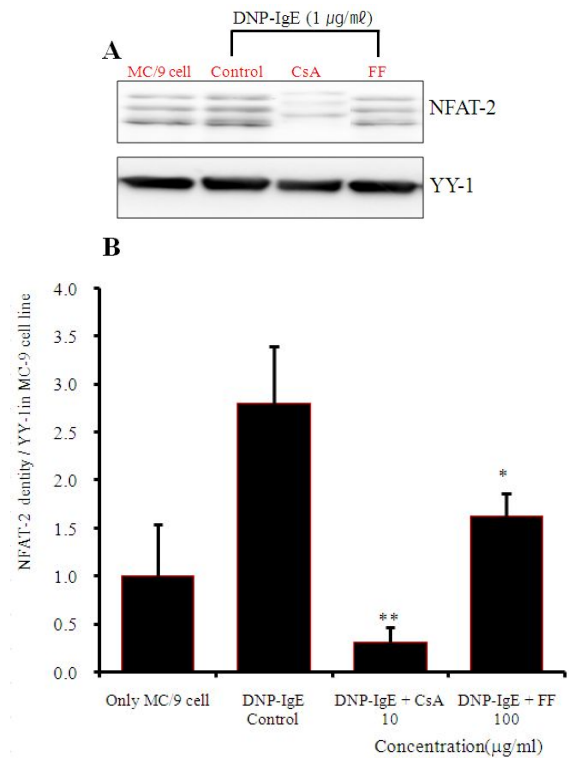


Fig. 5-2. Effect of FF on NFAT-2 signal events in MC/9 cells induced with DNP-IgE

MC/9 mast cells were stimulated with DNP-IgE for 24 hours, and then treated with CsA (10 µg/ml) or FF (100 µg/ml) for 1 hour. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with NFAT proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of NFAT proteins were selected as the positive control for Anti-NFAT-2 respectively. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) (***) p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05).

NFAT-2 band lane 3). 실험군의 100 µg/ml에서의 DT는 1.62로 대조군에 비하여 NFAT-2의 단백질 발현이 유의성 있게 억제되었다 (p<0.05) (Fig. 5-2, NFAT-2 band lane 4).

2) AP-1 신호전달 기전

c-Jun의 단백질 발현은 정상군에서 DT가 1.5로 나타났으며 (Fig. 6-1, c-Jun band lane 1), 대조군에서 DT가 63.00로 정상군에 비하여 증가하였고 (Fig. 6-1, c-Jun band lane 2), 양성대조군의 DT는 7.80로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다 (p<0.001) (Fig. 6-1, c-Jun band lane 3). 실험군의 100 µg/ml에서 DT는 5.70으로 c-Jun 단백질 발현이 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다 (p<0.001) (Fig. 6-1, c-Jun band lane 4).

c-Fos의 단백질 발현은 정상군에서 DT가 1로 나타

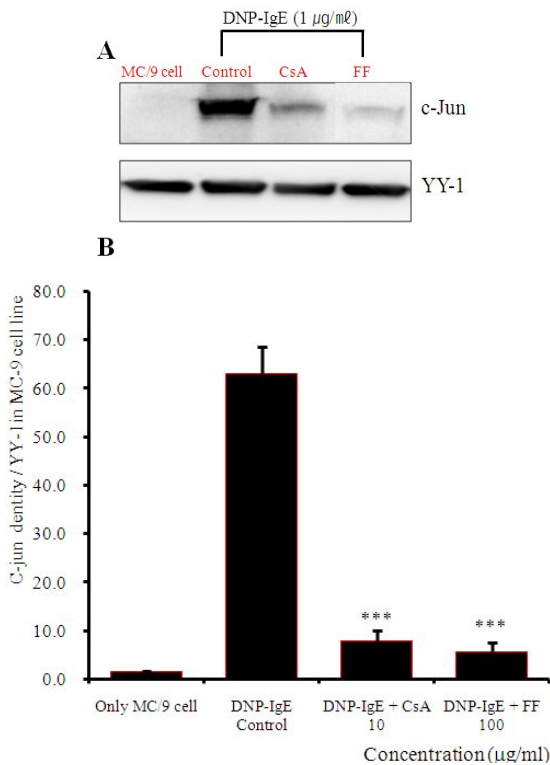


Fig. 6-1. Effect of FF on AP-1 proteins (c-Jun) in MC/9 cells induced with DNP-IgE

MC/9 mast cells were stimulated with DNP-IgE for 24 hours, and then treated with CsA (10 µg/ml) or FF (100 µg/ml) for 1 hour. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with AP-1 proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of AP-1 proteins were selected as the positive control for anti-c-Jun respectively. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

났으며 (Fig. 6-2, c-Fos band lane 1), 대조군에서 DT가 5.5로 정상군에 비하여 증가하였고 (Fig. 6-2, c-Fos band lane 2), 양성대조군의 DT는 1.6로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 6-2, c-Fos band lane 3). 실험군의 100 µg/ml에서의 DT는 4.75으로 대조군에 비하여 차이가 나지 않았으며 유의성은 없었다 (Fig. 6-2, c-Fos band lane 4).

3) NF-κ B p65 신호전달 기전

NF-κB p65 단백질 발현은 정상군에서 DT가 1로 나타났고 (Fig. 7, NF-κB p65 band lane 1), 대조군에서 DT가 4.87로 정상군에 비하여 증가하였고 (Fig. 7, NF-κB p65 band lane 2), 양성대조군의 DT는 1.21로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다 ($p < 0.01$) (Fig. 7, NF-κB p65 band lane 3). 실험군의 100 µg/ml에서의

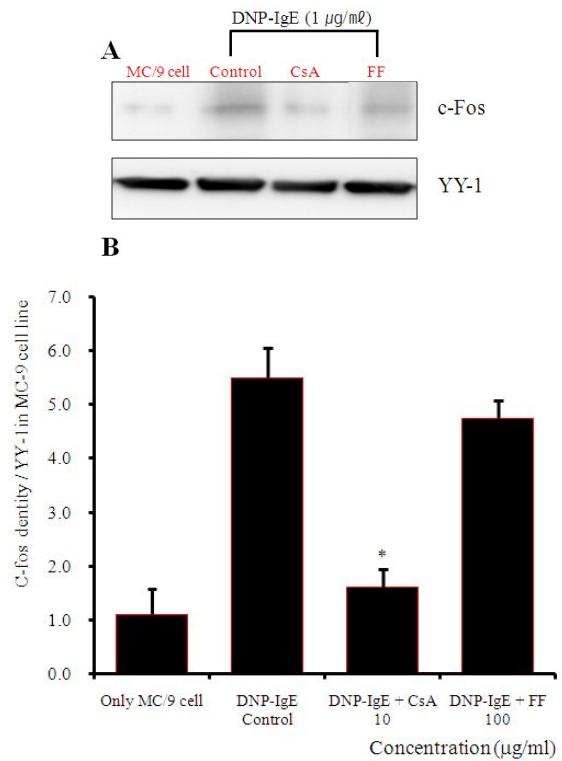


Fig. 6-2. Effect of FF on AP-1 proteins (c-Fos) in MC/9 cells induced with DNP-IgE

MC/9 mast cells were stimulated with DNP-IgE for 24 hours, and then treated with CsA (10 µg/ml) or FF (100 µg/ml) for 1 hour. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with AP-1 proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of AP-1 proteins were selected as the positive control for anti-c-Fos respectively. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

DT는 0.64로 NF-κB p65 단백질 발현이 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다 ($p < 0.01$) (Fig. 7, NF-κB p65 band lane 4).

IV. Discussion

아토피 피부염은 영, 유아기의 대표적인 알레르기 질환으로 재발이 잦고 만성으로 경과하는 염증성 질환으로 심한 소양감과 함께 홍반, 부종, 삼출, 가피, 인설, 태선화 등을 특징으로 한다²⁶⁾.

최근 수십 년간 선진국을 중심으로 아토피 피부염의 이환율은 급격히 증가하는 추세이며³³⁾ 알레르기 비염, 천식으로 이어지는 아토피 행진의 시발점³⁴⁾으로써

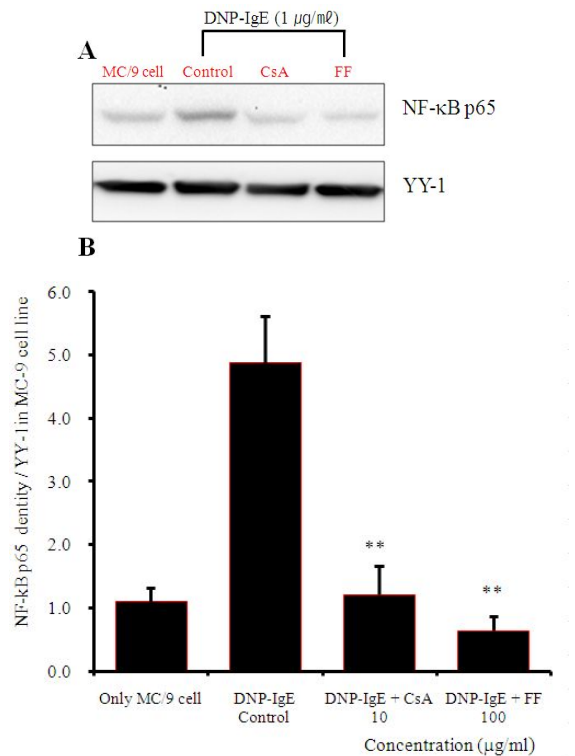


Fig. 7. Effect of FF on NF-κB p65 signal events in MC/9 cells induced with DNP-IgE

MC/9 mast cells were stimulated with DNP-IgE for 24 hours, and then treated with CsA (10 μg/ml) or FF (100 μg/ml) for 1 hour. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with NF-κB p65 protein. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of NF-κB p65 proteins were selected as the positive control for Anti-NF-κB p65, respectively. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) (***) p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05).

그 중요성과 사회적 관심이 증가하고 있다.

아토피 피부염의 원인은 아직 정확하게 밝혀지지 않았으나²⁵⁾ 가족력이 현저하게 나타나며 모계 유전 형태로 알레르기 관련 유전자인 5q31-33의 역할이 두드러지며, 3p21과 1q21, 17q25 등 연관 있는 유전자들이 밝혀지고 있어 아토피 피부염만의 독립적인 유전적인 원인이 있음을 알 수 있다²⁶⁾. 또한 식품, 집먼지 진드기와 세균과 같은 환경으로부터 유입된 항원 물질에 대한 면역반응이 유전적인 원인과 복합적으로 아토피 피부염을 발생시킨다고 알려져 있다²⁷⁾.

급성 아토피 피부염의 면역학적 기전은 IgE 합성의 증가와 호산구 증가증과 함께 T세포 면역반응에서 Th1에 비해 Th2 반응의 우세로 인한 불균형이 핵심적인 원인으로 보고되고 있다³¹⁾. 인체에 항원이 침입하였을 때 T세포에 의해 면역이 조절되는데 CD4⁺ T세포는

생성하는 사이토카인의 종류에 따라 Th1과 Th2로 분류된다²⁸⁾. Th1 세포는 IFN-γ, IL-2 등을 특징적으로 분비하며 세균 감염에 있어서 방어적 기능을 담당하고 지연형 과민 반응에 관여하며³⁵⁾, Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-16 등 일련의 사이토카인을 분비하는데, 이 중 IL-4와 IL-13은 B세포에서 IgE 생성을 유도하고, IL-5는 호산구의 분비, 분화와 성숙에 관여하여 즉시형 아토피 반응에 관여한다³⁶⁾. IL-3, TNF-α, GM-CSF는 두 세포 모두에서 특징적으로 분비되는 사이토카인으로 염증 반응을 일으키며 비만세포의 발달에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다³⁷⁾.

만성 아토피 피부염에서는 급성기에 생성된 IL-1과 TNF-α 같은 사이토카인의 영향으로 대식세포, 호산구 같은 속발 반응에 관여하는 세포들이 피부에 침투하여 염증반응을 일으키는 것으로 보이며 이 시기 주 사이토카인은 IL-4, IL-5, IFN-γ, IL-12, GM-CSF, MIP-1α, IL-8 등으로 침윤된 T세포는 Th2 사이토카인의 성향이 약해지면서 Th1과 Th2 사이토카인이 함께 존재하게 된다²⁸⁾. 이로써 아토피 피부염이 급성에서 만성으로 경과 중에 Th2의 활성화에 이어 Th1의 활성화가 이어지는 것으로 보인다³⁸⁾. 따라서 급성기의 과 활성화된 Th2 반응의 조절을 통하여 만성으로 이어지는 아토피 질환의 억제시킬 수 있다³⁰⁾.

連翹는 清熱解毒 작용이 우수하며¹⁻⁵⁾ 소염, 해열, 진통 등 항염증 작용과 항산화, 각종 세균에 대한 항균작용 (suspensaside, forsythoside A·B) 등의 약리 작용이 있는 것으로 알려져 있어¹⁰⁾ 김⁷⁾ 등은 아토피 피부염의 급성-濕熱型에 일반적으로 사용되는 약제로 분류하였다. 連翹의 항염증 기전에 관한 연구로는 김¹³⁾ 등의 BV-microglia cell에서의 LPS에 의해 유도된 NO, iNOS, TNF-α, IL-1β, IL-6 유전자 발현 및 DHHP 자유기 억제제를 통한 항염 효과 연구와 남¹²⁾ 등의 마우스 복강 대식세포에서 LPS/IFN-γ로 유도된 TNF-α와 IL-6의 분비 및 IκBα, MARK의 억제에 따른 항염증 작용¹²⁾에 대한 연구가 있었다. 이들 연구를 통해 連翹의 항염증 작용이 Th2 사이토카인 억제와 연관되는 것을 알 수 있다.

이에 저자는 連翹의 항염증 기전을 보다 명확하게 밝히기 위하여 생쥐 MC/9 비만 세포에서 Th2 사이토카인의 생성 억제를 확인하고, 그 억제 기전 연구를 위하여 Th2 사이토카인의 유전자 발현에 영향을 미치는 신호전달 물질의 활성화에 대하여 알아보았다.

비만세포는 주로 외부 환경과 접하는 부분인 피부, 내장 및 호흡기관에 존재하며³⁹⁾, 모든 결합조직과 상피

세포 아래층에 있어 즉시형 과민반응이 일어나는 가장 흔한 부위로 아토피 피부염의 피부 병변에서도 비만세포가 관찰된다³¹⁾. 비만세포는 세포표면에 본질적으로 고친화성 IgE 수용체 (FcεER1)를 발현하는데, 인체에 침입한 항원과 IgE가 비만세포 표면에 교차결합하면서 활성화된다⁴⁰⁾. 활성화된 비만세포는 각종 염증매개 물질들이 탈과립하여 분비되는데 이들 매개 물질은 히스타민 (histamine)과 비만세포 키마제 (mast-cell chymase), 트립타제 (tryptase), 그리고 세린에스테라제 (serin esterases)와 같은 효소들과 Th2 사이토카인 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-16)을 포함한다⁴¹⁾. 이들 효소들은 차례로 조직 간질 메탈로프로테아제 (matrix metalloprotease)를 활성화시켜 피부에 염증을 일으키며, IL-4, IL-13, IL-5 등의 사이토카인을 통해 염증반응을 확장하며 Th2 세포 반응을 우세하게 만든다⁴²⁾.

連翹의 약리성분은 중전의 연구를 통하여 lignans (Phillygenin, Pinoresinol, Arctigenin, Matairesinol), lignan glucosides (Phillyrin, Pinoresinol-D-glucose, Arctiin, Matairesinoside), flavonoid (Rutin) 및 3,4-Dihydroxyphenethyl alcohol의 caffeoylglucosides (Forsythiaside, Acteoside, Suspensaside 및 β-Hydroxy acteoside) 등이 있는 것으로 알려져있다^{20,22)}. 이중 Arctigenin, Pinoresinol, Rutin, Acteoside 등이 항염 성분들이 함유되었다고 보고되었으며, 특히 Arctigenin는 JAK-STAT 신호전달경로를 억제하여 iNOS 발현을 억제 하며^{43,44)} 알레르기 질환 및 뇌신경에서의 항염 효과^{45,46)}와 멜라닌세포에서의 항산화 효과⁴⁷⁾가 나타난다고 알려져 있다.

본 실험에서 사용된 連翹를 HPLC를 통해 분석한 결과 Arctigenin을 2.91% 함유하고 있음이 확인되었다 (Table 3).

連翹 추출물의 세포독성을 측정한 결과, 대조군에 비하여 50, 100, 200, 400, 800 μg/ml의 모든 측정 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 2).

MC/9 비만 세포에 24시간 동안 DNP-IgE을 자극하여 활성화 상태를 만든 후 連翹 추출물 (100, 50 μg/ml)을 처리하고 Real-time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석한 결과 IL-13, IL-6, IL-5, GM-CSF, IL-4, TNF-α의 mRNA 유전자 발현이 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 3-1,2,3). 또한 連翹 추출물 (400, 200, 100 μg/ml)을 처리하고 ELISA를 통해 IL-13, MIP-1α의 단백질 발현을 측정한 결과 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 4-1,2). 두 실험 결과를 통하여 連翹 추출물이 Th2 사이토카인 분비를 억제하여 아토피

피 피부염에서 Th1과 Th2 세포 반응의 평형을 유지하여 치료효과를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

사이토카인과 mRNA는 유전자 발현의 결과물로 비만 세포내의 신호전달 체계에 의해 생성된다. 이러한 일련의 신호전달 과정에서 連翹의 작용 부위를 확인하기 위하여 western blot을 통하여 전사인자의 단백질 발현을 연구하였다.

전사인자 NFAT은 IL-2 promoter에 존재하는 antigen receptor response element에 결합함으로써 염증 반응에 필요한 사이토카인 (IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, TNF-α, IFN-γ)과 세포표면인자 (CD40L, FasL, IL-2Rα)등의 발현에 핵심적인 역할을 한다⁴⁸⁾.

본 실험에서 NFAT-1, NFAT-2 단백질 발현은 連翹를 처리한 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었으며 특히 NFAT-1의 경우 Cyclosporin A 10 μg/ml를 처리한 양성대조군보다도 높은 억제효과를 나타냈다 (Fig. 5-1,2).

또한 AP-1 전사전달계의 c-Jun 단백질 발현은 連翹를 처리한 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었으나 (Fig. 6-1), c-Fos의 경우 양성대조군에서는 유의성 있게 억제 되었으나, 連翹를 처리한 실험군에서는 대조군과 거의 차이가 나지 않았다 (Fig. 6-2). c-Fos는 c-Jun과 함께 AP-1 단백질 복합체의 중요한 구성원으로서 AP-1 결합 부위를 통해 전사를 조절하여 IL-8, IL-10 등의 사이토카인 발현에 영향을 미친다⁴⁹⁾. 이로써 連翹 추출물은 c-Jun에 특이적으로 작용하여 AP-1 단백질 복합체를 형성을 억제할 것으로 예상되며 c-Fos의 억제 조절 여부는 추후 농도 의존성에 대해 추가 실험이 필요하다.

NF-κB는 외부의 자극에 의한 면역반응의 경로에서 중요한 역할을 하는 전사인자로 p50과 p65의 heterodimer 형태가 대표적이다. 거의 대부분의 세포의 세포질 내에 IκB와 결합되어 비활성화된 상태로 존재하는데 자극이 일어난 후 IKK로 인해 IκB가 인산화되어 분해되면 세포질에 존재하던 NF-κB가 핵 속으로 이동해 많은 염증 유전자를 활성화 시킨다⁵⁰⁾. 이러한 신호전달 기전을 통해 TNF-α, IL-2, IL-6, IL-8, lymphotoxin, GM-CSF, β-IFN, adhesion molecule 등의 염증 사이토카인들이 생성된다⁵¹⁾.

본 실험에서 NF-κB p65 단백질 발현은 대조군에 비하여 連翹를 처리한 실험군에서 현저히 억제되었으며 양성대조군보다도 억제되었다 (Fig. 7).

이상의 결과로 連翹 추출물은 IgE에 의해 활성화된

비만세포에서 발현하는 IL-13, IL-6, IL-5, GM-CSF, IL-4, TNF- α , MIP-1 α 의 생성을 억제하여 아토피 염증 반응을 조절하는 것으로 예상되며, 그 중 NFAT-1, NFAT-2, c-Fos, NF- κ B p65 전사인자 활성을 억제하여 염증성 사이토카인의 발현에 핵심적인 NFAT, AP-1, NF- κ B의 신호전달 기전을 차단하는 것으로 볼 수 있다.

이로써 임상에서 連翹의 아토피 피부염을 비롯한 알레르기 질환에 적용이 가능할 것으로 판단되며, 향후 *in vivo* 실험을 통하여 아토피 피부염에서의 임상적 효과를 확인하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. Conclusion

連翹 추출물이 생쥐 MC/9 비만 세포의 Th2 사이토카인 분비에 미치는 영향과 그 기전을 실험적으로 규명한 결과는 다음과 같다.

1. 連翹 추출물은 IL-13, IL-5, GM-CSF, IL-4, TNF- α , IL-6 mRNA 유전자 발현을 억제하였다.
2. 連翹 추출물은 IL-13 와 MIP-1 α 단백질을 생성을 억제하였다.
3. 連翹 추출물은 전사인자 NFAT-1 및 NFAT-2 단백질을 발현을 억제하였다.
4. 連翹 추출물은 전사인자 c-Jun 단백질을 발현을 억제하였다.
5. 連翹 추출물은 전사인자 NF- κ B p65 단백질을 발현을 억제하였다.

References

1. Herbology Association of Korea's Colleges of Oriental Medicine. Textbook of herbology, 1st ed. Seoul: Younglimsa. 1991:199.
2. Ju YS. Ungok herbology. Jeonju: Woosuk Press. 2013: 494-7.
3. Wangang. Benchobeiyao. Beijing: Zhongguoyiyaokechichuban. 2012:29.
4. Quanchuncong. Yimenzhuiyan. Wonju: Yibang medical-books. 2009:464.
5. GongtingXian. Wanbinghuichun. Seoul: Bubun Publishers.

- 2007:50, 82.
6. Huh J. Donguibogam. Seoul: Bubun Publishers. 2007: 1997.
7. Kim MJ, Lee SY. A literature study of atopic dermatitis for children. J Korean Orient Med. 2000;14(2):169-84.
8. Min DL, Park EJ, Kang KH. Review of clinical and experimental studies on external application treatment for atopic dermatitis in the Korean literature. J Pediatr Korean Med. 2013;27(1):36-49.
9. Kwon OS, Kim JT, Park IS, Ahn SH, Lee HP, Kim HH, Gang YH. The effect of Yunkyoepadosangamibang on allergic contact dermatitis : Based on the mitigation of skin damage and distributive change of mast cell on DNCB re - exposure region of mice. Dongguk J Institute Orient Med. 1999;8(1):77-91.
10. Li ZX, Wang XH, Zhao JH, Yang JF, Wang X. Investigation on antibacterial activity of forsythia suspense vahl in vitro with Mueller-Hinton agar. Zhongguo Zhon Yoo Zhi. 2000;25(12):742-5.
11. Lee EB, Keum HJ. Pharmacological studies on Forsythiae Fructus. Kor J Pharmacogn. 1998;19(4):262-9.
12. Nam JB, Lee MH, Choi HY, Sohn NW, Kang H. Effect of Forsythiae Fructus ethanol extract on inflammatory cytokine production and cellular signaling pathways in mouse macrophages. Kor J Herbology. 2012; 27(1):59-64.
13. Kim SY, Park YK. Ethanol extract of Forsythiae Fructus inhibits the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated BV-2 Microglial Cells. Kor J Herbology 2008;23(3):93-102.
14. Lee JM, Choi SW, Cho SH, Phee SJ. Effect of Forsythia viridissima extracts on antioxidative system and lipid peroxidation of liver in rats fed high-cholesterol die. Kor J Nutr Health. 2003;36(10):990-6.
15. Rim YS, Park MS, Kim KY, Kim MJ, Choi YH. Screening of antioxidant and antimicrobial activity in native plants. Korean J Medicinal Crop Sci. 2000;4(8):342-50.
16. Lim DK, Choi U, Shin DH. Antioxidative activity of ethanol extract from Korean medicinal plants. Korean J Food Sci Techno. 2000;8(4):342-50.
17. Lue LF, Rydel R, Brigham EF, Yang LB, Hampel H, Murphy GM Jr, Brachova L, Yan SD, Walker DG, Shen Y, Rogers J. Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease

- and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia*. 2001;35:72-9.
18. Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Modujovich D, Rios JL. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci*. 2002;70:1023-33.
 19. Kim MJ, Kim JY, Jung TK, Choi SW, Yoon KS. Skin anti-aging effect of Forsythia Vridissima L. extract. *Korean J Biotechnol Bioeng*. 2006;21(6):444-50.
 20. Yoon JY, Han JK, Kim YH. Effect of Kami-chungsi-myeunjangtang on atopic dermatitis-like skin lesions induced in NC/Nga mice by mite antigen stimulation. *J Korean Oriental Pediatrics*. 2007;21(1):87-116.
 21. Park SK, Han JK, Kim YH. Anti-dermatitis effects of Kamichengsimyeonjangtang on GATA-3 regulation in NC/Nga mouse. *J Pediatr Korean Med*. 2009;23(2):29-50.
 22. Song HJ, Han JK, Kim YH. Effects of Kakamsodokum (KKSDU) on atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mouse. *J Pediatr Korean Med*. 2009;23(1):23-35.
 23. Shin DG, Kim WY, Lee JY, Kim DK. Effect of Sunbangpaedoktang on the cytokine secretory function of monocyte isolated and cultured from peripheral blood of AD patients. *J Pediatr Korean Med*. 2002;16(1):13-82.
 24. Kim WY, Lee JY. Effects of Hanghaedan on the cytokine secretory function of monocytes of atopic dermatitis patients. *J Pediatr Korean Med*. 2007;21(2):169-84.
 25. Park YM. Advances in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Pediatr Allergy Respir Dis (Korea)*. 2006; 16(3):189-96.
 26. Ahn HS. *Hongchangui pediatrics* 9th edition. Seoul: Miraen. 2010:1142.
 27. Park Y. Moisturizers in atopic dermatitis. *J Skin Barrier Research (Korean)*. 2007;9(1):37-40.
 28. Kim JW. Atopic dermatitis at allergic and immunological aspects. *J Korean Dermatol Assoc*. 2003;41(6):687-9.
 29. Renz H, Jujo K, Bradley KL, Domenico J, Gelfand EW, Leung DY. Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma. *J Invest Dermatol*. 1992; 99(4):403-8.
 30. Valent P, Spanblöchl E, Sperr WR, Sillaber C, Zsebo KM, Agis H, Strobl H, Geissler K, Bettelheim P, Lechner K. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood*. 1992;80(9):2237-45.
 31. Ahn SG, Pack BD, Won JH, Sung YY, Cheon SH. Atopic dermatitis for the opening doctor. Seoul: Pacific Publisher Co. 2007:13-82.
 32. Munetaka I, Yoko M, Kazumi S, Yosuke O, Keiyu U. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*. 1997;44(7):1299-305.
 33. Greer FR, Sicherer SH, Burks AW. Effect of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics*. 2008;111:608-16.
 34. Van der Hulst AE, Klip H, Brand PI. Risk of developing asthma in young children with atopic eczema; a systemic review. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:565-9.
 35. Mosmann TR, Coffman RI. Th1 and Th2 cells; Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.
 36. Foster PS, Martinez-Moczygemba M, Huston DP, Corry DB. Interleukins-4, -5, and -13: emerging therapeutic targets in allergic disease. *Pharmacol Ther*. 2002;94(3): 253-624.
 37. Gibbs BF, Haas H, Wolff HH, Grabbe J. Early IgE-dependent release of IL-4 and IL-13 from leukocytes is restricted to basophils : a comparison with other granulocytes and mononuclear cells. *Inflamm Res*. 2000; 49(1):9-10.
 38. Kim JT. Evaluation of inflammation in childhood asthma; Non-invasive measurement. *J Korean Pediatr Soc*. 2001; 44(3):334-9.
 39. Weber A, Knop J, Maurer M. Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *Br J Dermatol*. 2003;148(2):224-8.
 40. Humbert M, Grant JA, Taborda-Barata L, Durham SR, Pfister R, Menz G. High-affinity IgE receptor(Fcεpsilon RI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 153:1931-7.
 41. Toru H, Pawankar R, Ra C, Yata J, Nakahata T. Human mast cells produce IL-13 by high-affinity IgE receptor

- cross-linking: enhanced IL-13 production by IL-4-primed human mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;102(3):491-502.
42. Matsubara M, Masaki S, Ohmori K, Karasawa A, Hasegawa K. Differential regulation of IL-4 expression and degranulation by anti-allergic olopatadine in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(7):1315-26.
43. Kou X, Qi S, Dai W, Luo D, Yin Z. Arctigenin inhibits lipopolysaccharide -induced iNOS expression in RAW264.7 cells through suppressing JAK-STAT signal pathway. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(8):1095-102.
44. Jang HH. Effects of arctigenin on nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells. *Grad School Chonnam Univ.* 2010.
45. Lee JY, Kim CJ. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits type I-IV allergic inflammation and pro-inflammatory enzymes. *Arch Pharm Res.* 2010;33(6):947-57.
46. Park JH, Hong YJ, Moon EJ, Kim SA, Kim SY. Forsythiae Fructus and its active component, arctigenin, provide neuroprotection by inhibiting neuroinflammation. *Biomol Ther (Seoul).* 2011;19(4):425-30.
47. Lee DJ, Shim SS. Effect of arctigenin on tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells. *J Pharm Soc Korea.* 2012;56(6):395-400.
48. Lee IS, Nguyen Tien Dat, Cai XF, Shen GG, Kim YH. Inhibitory effects of natural products against NFAT(nuclear factor of activated T cells) transcription factor. *Kor J Pharmacogn.* 2003;34(2):150-5.
49. Lewin I, Nechushtan H, Ke Q, Razin E. Regulation of AP-1 expression and activity in antigen-stimulated mast cells: the role played by protein kinase C and the possible involvement of Fos interacting protein. *Blood.* 1993;82(12):3745-51.
50. D'Acquisto F, May MJ, Ghosh S. Inhibition of Nuclear Factor Kappa B(NF-κB) : An emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Mol Interv.* 2002;2(1):22-35.
51. Park GY, Lee SH, Hwangbo B, Im JJ, Lee CT, Kim YH, Han SG, Sim YS, Yu CG. Pro-inflammatory cytokine expression through NF-κB/IκB pathway in lung epithelial cells. *Tuberc Respir Dis.* 2000;49(3):332-42.