

하수오에서 분리한 PM-E와 PM-70M이 GATA-3의존성 Th2세포 조절과 IgE 억제 효과

최은영
알렉스에이피코리아 연구원

Suppression of IgE and GATA-3-dependent Th2 Cell Regulation by PM-E and PM-70M Isolated Polygonum Multiflorum

Eun-Young Choi
Researcher, RXAP KOREA

요약 본 연구는 하수오에서 분리한 PM-E와 PM-70M를 이용하여 GATA-3의존성 Th2세포 조절과 IgE 억제 효과를 실험하였다. 하수오를 물질분리하여 GATA-3 전사인자 활성을 억제하는 하수오 물질분획층이 흡착크로마토그래피를 통하여 70% 메탄올층에 포함되어 있다고 분석하였다. 그 결과 PM-70 %MFL 분획이 Th2 사이토카인을 조절하는 GATA-3를 억제하여 항알레르기 작용 효과가 있다고 생각된다. 하수오를 흡착크로마토그래피로 분리하여 분획들을 anti-CD40/rmIL-4와 동시 배양하여 B세포에서 IgE 분비를 억제하는지를 알아본 결과, PM-30M층, PM-70A, 그리고 PM-30A층의 IL-6와 TNF- α mRNA, IgE 분비량은 대조군과 차이가 없었다. 그러나 IL-6와 TNF- α mRNA 유전자 발현은 각각 0.69 ± 0.058 ($p < 0.001$)과 0.72 ± 0.58 ($p < 0.05$)로 대조군에 비하여 30% 이상 유의하게 억제하였다. IgE 분비량은 94.6 ± 16.0 으로 대조군에 비교하였을 때 45.6% 이상 유의하게 감소를 나타내었다 ($p < 0.01$). 본 연구를 통해 하수오의 분획중 PM-70 %MFL층에 B세포의 분화 및 활성을 억제하는 성분이 포함된 것으로 사료된다.

주제어 : 하수오, 아토피피부염, PM-70 %MFL, IL-6, TNF- α mRNA, IgE

Abstract This study examined the effects of GATA-3-dependent Th2 cells and IgE inhibition by using PM-E and PM-70M isolated from Sasao. It was analyzed that the 70 % methanol layer contained adsorbed chromatograms of the fraction of sodium hypochlorite that inhibited GATA-3 transcription factor activity. As a result, PM-70 %MFL fraction seems to have an antiallergic effect by inhibiting GATA-3 which regulates Th2 cytokine. PM-30A, PM-70A, and PM-30A layers by inhibiting IgE secretion in B cells by co-culturing the fractions with anti-CD40/rmIL-6 and TNF- α mRNA and IgE were not different from control. However, expression of IL-6 and TNF- α mRNA was 0.69 ± 0.058 ($p < 0.001$) and 0.72 ± 0.58 ($p < 0.05$), respectively. The amount of IgE secretion was 94.6 ± 16.0 , which was significantly decreased by 45.6% ($p < 0.01$) compared with the control group. This study suggests that the PM-70% MFL layer in the fraction of Sasao contains the components that inhibit the differentiation and activity of B cells.

Key Words : *Polygonum multiflorum*, Atopic dermatitis PM-70 %MFL, IL-6, TNF- α mRNA, IgE

*Corresponding Author : Eun-Young Choi(eyoung1114@hanmail.net)

1. 서론

아토피 피부염(atopic dermatitis)은 유아나 소아기에 많이 생기며 아토피(atopy) 질환으로 심한 가려움과 습진성 피부염을 나타내는 염증성 피부질환이다. 사이토카인은 알레르기과 연관이 있으며 Th2 림프구에서 분비되어 B림프구의 성숙과 면역글로불린의 생성에 관계가 있는 interleukin (IL)-4와 호산구 분비, 분화, 성숙과 밀접한 관계가 있는 IL-5가 있다[1]. STAT-1, STAT-4, STAT-6, GATA-binding protein-3 (GATA-3), T-box expressed in T-cells (T-bet), c-maf 이 Th1, Th2 분화에 중요한 역할을 하는 전사인자로 알려져 있는데 T-bet, STAT-1, STAT-4 등의 전사인자가 활성화되면 Th1 림프구로 분화가 촉진되고 GATA-3, STAT-6, c-maf, NFAT 등의 전사인자가 활성화되면 IL-4 등이 사이토카인과 함께 Th2 림프구로의 분화를 촉진한다[2]. GATA-3의 활성화로 Th2 세포가 활성화되면 여러 Th2 cytokines의 생성, 분비가 증가하게 되어 B세포 활성화가 이루어지므로 아토피피부염, 기관지천식등의 만성적인 알레르기 염증 질환을 유발한다. 최근 연구결과에 따르면 GATA-3라는 유전자 조절로 알레르기의 항원에 노출된 인체는 체내 Th2세포의 과도한 면역반응을 막을 수 있다고 보고하였다[3]. 또한 GATA-3와 Th2 세포의 상호 관계를 알아보기 위한 실험에서 Th2 사이토카인의 생산에서 GATA-3 손실은 확립된 Th2세포에서 보다 발생중인 Th2반응에서 더 심하게 나타났다고 보고하였다[4]. 발생중인 Th2반응에서 GATA-3의 손실은 효과적으로 Th2반응을 형성할 수 없게 하였고 IL-4, IL-5, IL-13을 생산하는 세포 생성이 줄어드는 것을 확인하였다[5].

하수오(何首烏, Polygoni Multiflori Radix)는 마디풀과이며 하수오의 덩이뿌리를 건조한 것으로 중국이 원산지이다. 최근 연구에서 하수오추출물은 고지혈증이 유도된 허혈성 뇌손상을 억제하고[6], 주성분인 anthraquinone 함유 분획이 허혈-재관류에 의한 심근의 손상으로부터 심근세포를 보호하고[7]. emodin은 혈관의 확장 작용과 면역억제 작용등이 보고되었다[8]. 또한 anthraquinone 유도체가 알레르기 접촉성 피부염에 효과가 있다고 보고하였고[9], Emodin, chrysophanol, 그리고 physcion등이 함유된 *Rumex japonicus* Houtt herb를 아토피 유발 생쥐인 NC/Nga 생쥐에 투여하여 Th2-세포반응 및 피부발진이 억제되었다고 보고하였다[10].

본 연구에서는 하수오추출물인 PM-E와 PM-70 %MFL이 아토피 발진 NC/Nga 생쥐의 비장세포에 대한 면역 반

응에 미치는 영향에 대해 알아보려 GATA-3의 조절을 통한 기전으로 FACS 분석과 사이토카인 분석을 real-time PCR를 이용하여 유의한 결과를 확인할 수 있었다.

2. 실험 방법

2.1 시약 및 기기

2.1.1 시약

본 실험에 사용된 시약은 DMEM 배양액, diethyl pyrocarbonate (DEPC), trichloroacetic acid, chloroform, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), 적혈구 용혈액 (ACK lysis solution), 2-isopropanol, Sodium dodecyl sulfate (SDS), Sulforhodamin B (SRB), PMA, Ionomycin, antibiotics는 Sigma사 (USA)를 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (Logan, USA), LS AB kit는 DAKO사 (Glostrup, Denmark), anti-mouse CD4 mAb는 Santa-Cruz 사 (California, USA), anti-CD4, anti-CD11b, anti-Gr-1 Pharmingen사 (Torreyana, USA)의 제품을 사용하였고 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2.1.2 기기

본 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), 열탕추출기 (대용, Korea), CO₂ incubator (Forma scientific Co., USA), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), clean bench (Vision scientific Co., Korea), water bath (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), micro-pipet (Gilson, France), centrifuge (Sigma, USA), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Quantitative Real-Time RT-PCR (Applied Biosystems, USA), deep-freezer (Sanyo, Japan), homogenizer (OMNI, USA), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), ELISA leader (Molecular Devices, USA), Vario MACS (Bergisch Gladbach, Germany), FACS caliber (BD, USA), plate shaker (Lab-Line, USA) 등을 사용하였다.

2.1.3 동물

수컷 7주령의 SPF (specific pathogen-free) NC/Nga 생쥐 (15~20 g)는 Charles River Japan (Yokohama, Ja

pan)사에서 공급받았다. NC/Nga 생쥐는 실험 전까지 고형으로 된 사료(무항생제, 삼양사료 Co.)와 충분한 물을 공급하고 습도 $55 \pm 15 \%$, 온도 $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, 12 시간(light-dark cycle)의 환경에서 7일 동안 적응시키고 실험에 사용하였다.

2.1.4 PM-E와 PM-70의 제조

하수오 200g을 분쇄한 후 Diaion HP-20 수지를 이용하여 PM-E와 PM-70을 분리하였다[11]. 70% 에탄올로 추출한 하수오 원액 (PM-E)을 수지가 들어있는 흡착 크로마토그래피 (HP-20)에 부은 후 그 폭이 약 25~30 cm될 정도로 방치하였다. 이 후 증류수 1000 mL를 부은 후 Diaion HP-20 수지를 통과한(pass층) 하수오 분획을 분리하고 30% MeOH 500 mL (PM-30M), 70% MeOH 500 mL (PM-70 %MFL), 30% Acetone 500 mL (PM-30A), 70% Acetone 500 mL (PM-70A)를 각각 통과시켜 분리된 분획을 분리하였다.

2.2 동물 실험

2.2.1 자연적으로 피부발진된 NC/Nga 생쥐

IgE가 과잉으로 생산된 NC/Nga 생쥐를 선별하기 위하여 눈의 모세관을 이용하여 혈액을 100 mL 채혈하였다. 채혈한 혈액에서 혈장을 분리한 후 IgE 함량이 50 ng/mL 이상, 아토피 피부질환으로 피부 발진이 나타난 NC/Nga 생쥐를 선택하였다.

2.2.2 비장세포 및 B세포 분리 및 배양

비장세포 및 순수한 B세포를 분리하고자 NC/Nga 생쥐의 비장을 적출한 후 100 mesh에서 분쇄하여 얻은 비장세포를 2000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포에 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g K HCO₃, in 1 L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 5분 동안 실온에서 처리하고 적혈구를 제거하였다. 그리고 2%의 FBS가 함유된 비장세포를 PBS (PBS/FBS)에 1×10^8 /mL로 현탁 시킨 후 normal rat serum을 5% 첨가하여 15분 동안 4°C에서 blocking하였다. B세포 분리는 biotinylated antibody cocktail for lineage (CD43 (Ly-48), CD4 (L3T4), Ter-119) (B cell isolation kit, Miltenyi Biotec)를 가한 후 각각 4°C에서 15분 동안 반응시켰다. 각 세포를 PBS/FBS로 세척한 후 1×10^7 /mL로 현탁 하였다. 20 mL의 Anti-Biotin MicroBeads를 가한 후 4°C에

서 15분간 반응시켰다. 이 세포를 magnetic column (CS column, Milteny Biotech)을 이용하여 PBS로 세척하고 준비해 놓은 VarioMACS (Milteny Bio-tech)에 장치하고 magnetic bead가 표지된 세포를 통과시켰다. PBS로 column을 세척한 후 column을 통과시키고 부유액을 원심분리하여 음성인 T세포와 B세포를 모았다[12].

2.2.3 GATA-3+ (transcription factor) CD4+ 세포의 세포내 염색(intracellular staining) 분석

18주의 NC/Nga 생쥐에서 비장세포를 분리한 후 α -CD3/ α -CD28 Ab (1 ng/mL)가 coating된 24 well plate에 분주하고 양성대조군인 PM-E 추출물 100 ng/mL, rIL-10 (10 ng/mL), HP-20 흡착크로마토그래피 분획 PM-30M, PM-70 %MFL, PM-70A, PM-30A를 각각 25 ng/mL 가하고 rmlL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 100 ng/mL, PharMingen)와 TGF- β (10 ng/mL)를 처리한 후 4일 동안 동시배양 하였다. 배양을 종료하기 4시간 전 GolgiS top (1 ng/mL), PMA (30 ng/mL, Sigma-Aldrich), ionomycin (500 ng/mL, Sigma-Aldrich)을 처리하고 실험 종료 한 후 BD Cytotfix/Cytoperm Plus Kit (with BD GolgiPlug, 555028)와 mouse GATA3⁺ (BioLegend)를 이용하여 CD4⁺GATA3⁺세포의 형광염색을 실시하였다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세하고 유세포 형광분석기 (Cytometry, BD, USA)로 분석하였다. 분석프로그램은 Cell Quest 프로그램으로 활성세포(%) 비율을 산출하였다.

2.2.4 NC/Nga 생쥐를 통한 유전자 발현 분석

2.2.4.1 B세포의 RNA 분리과 cDNA 합성

아토피 피부발진이 있는 NC/Nga 생쥐의 B세포를 분리한 후 1×10^6 cell/well로 24 well plate에 분주하고 PM-E 추출물 100 ng/mL, 그리고 하수오 분획 PM-30M, PM-70 %MFL, PM-70A, PM-30A를 25 ng/mL을 처리하고 1시간 후 rmlL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 500 U/mL, PharMingen)와 anti-CD40 mAb (500 ng/mL)를 넣고 6시간 동안 동시 배양하였다. 그 후 50 ng/mL, Endogen, rmlL-10 (recombinant mouse interleukin-10)을 양성대조군으로 하였다. 배양 종료 후 배양 상층액을 제거한 후 RNazol^B 500 mL를 넣고 용해되도록 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 mL를 첨가한 후 다시 15초 동안 혼합하였다. 그 후 얼음에 15분간 방치하고 13,000 rpm에서 원심분리하고 약 200 mL의 상층액을 회수하였다. 2-propanol 200 mL와 동량을 혼합하

고 천천히 흔든 후 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심분리한 후 80 % EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조시킨 후 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 mL의 증류수에 녹히고 heating block 75 °C에서 불 활성화시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다[13]. 역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 2 mg을 DNase I (10 U/mL) 2 U/tube를 37 °C heating block에서 30분 동안 반응한 후 75 °C에서 10분 동안 변성시켰다. 이에 2.5 mL 10 mM dNTPs mix, 1 mL random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 mL), RNA inhibitor로서 1 mL RNase inhibitor (20 U/mL), 1 mL 100 mM DTT, 4.5 mL 5 × RT buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가지고 1 mL의 M-mLV RT (200 U/mL)를 다시 가한 후 DEPC 처리된 증류수로 최종 부피가 20 mL가 되도록 하였다. 이 20 mL의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 초 동안 원심침강하여 37 °C heating block에서 60분 동안 반응시키고 first-strand cDNA를 합성한 후 95 °C에서 5분 동안 방치하여 M-mLV RT를 불활성화시킨 후 합성된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

2.2.4.2 Real time quantitative PCR RT-PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, U.S.A.)를 이용하여 Table. 1과 같이 실험하였다.

Table 1. Primers used for real time PCR

Gene	Primer	Sequence
G3PDH	Forward	5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
	Reverse	5'CGAAGGTGAAGAGTGGGAG 3'
TNF- alpha	Forward	5'TTCTGTCTACTGAACCTCGGGTGATCGGTCC 3'
	Reverse	5'GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'
IL-6	Forward	5' TCCAGTTGCCCTTCTGGGAC 3'
	Reverse	5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'

Cytokine 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix (ABI), internal standard로 G3PDH를 사용하였고, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다.

Quantitative real-time RT-PCR의 RQ (relative qua-

titative) 값은 다음과 같은 공식에 의하여 측정하였다.

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

(x: starting quantity, y: yield, n: number of cycles, e: efficiency)

2.2.5 B세포에서 IgE 생산량 분석

아토피 피부발진 NC/Nga 생쥐에서 분리한 B세포를 24 well plate에 1×10^6 cell/well로 분주하고 PM-E 추출물 100 ng/mL, 그리고 하수오 분획 PM-30M, PM-70 %MF L, PM-70A, PM-30A등을 각각 25 ng/mL을 처리하고 1 시간 후 anti-CD40 mAb (500 ng/mL)와 rmlL-4 (recombinant mouse interleukin-4, 500 U/mL, PharMingen)를 넣고 11일간 동시 배양하였다. 그리고 rmlL-10 (recombinant mouse interleukin-10, 50 ng/mL, Endogen)을 양성대조군으로 하였다. 배양 종료 후 배양상층액 50 mL를 혼합하여 각 well에 분주하였다. 2시간 동안 25 °C 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-IgE conjugated를 넣고 2시간 동안 방치하였다. 다시 2회 수세한 후 완충용액으로 세척하고 antibody Avidin-HRP conjugated 100 mL를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 다음 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 mL씩 분주하고 30분간 방치한 후 100 mL의 stop 용액을 처리하고 ELISA reader 450 nm에서 각각 IgE에 대한 흡광도를 측정하였다[14].

2.2.6 통계처리

본 실험의 통계처리는 mean ± standard error로 기록하고 유의성 검증은 Student's *t*-test 분석방법을 이용하였다[14].

3. 결과 및 고찰

3.1 NC/Nga 생쥐의 비장세포에서 CD4+GAT A-3+ 세포내 염색 분석

GATA-3는 Th2 임파구세포로 부터 IL-4, IL-5, IL-13 등의 분비를 조절하여 알레르기 질환의 중심적 역할을 한다 [15]. 이러한 GATA-3의 핵으로 전이는 P38 MAPK에 의하여 serine 잔기의 인산화에 의존하고 핵전달 단백질인 importin- α 와 상호작용으로 촉진되는 것으로 보고되어 있다. GATA-3의 활성화로 인해 Th2 세포의 활성화가 시작되면 여러 Th2 cytokines의 생성, 분비가 증가하고 B세포 활성화가 이루어져 알레르기 염증반응으로 아토피피부, 기관지염

등의 만성적인 질환이 생기게 된다. 또한 GATA-3라는 유전자 조절로 알레르기 항원에 노출된 인체는 체내 Th2세포의 과도한 면역반응을 억제할 수 있다고 하였다[16]. 또한 GATA-3와 Th2 세포의 상호 관계를 알아본 실험에서 Th2 사이토카인의 생산에서의 GATA-3 손실의 영향은 확립된 Th2 세포에서 보다는 발생중인 Th2반응에서 더 심하게 나타났다[17]. 발생중인 Th2반응에서 GATA-3의 손실은 효과적인 Th2반응을 형성하지 못하였고 IL-4, IL-5, IL-13을 생산하는 세포의 생성이 유의하게 줄었다[18]. 본 연구에서는 GATA-3 활성의 억제로 Th2 사이토카인의 분비를 PM-E와 PM-70 %MFL에 의하여 억제되는지를 알아본 결과 Fig. 1과 같이 anti-CD3 /anti-CD28 (1 ng/mL)로 자극하지 않은 on ly splenocytes 세포군의 CD4⁺GATA-3⁺는 0.9 ± 0.13 % 이었고, anti - CD3 /anti - CD28 (1 ng/mL)과 rmlL-4 (100 ng/mL)와 TGF-β (10 ng/mL)로 자극한 대조군의 CD4⁺GATA-3⁺는 8.6 ± 1.0 %이었다. 양성대조군으로 rIL-10 (10 ng/mL)를 anti-CD3 /anti-CD28 (1 ng/mL)과 rmlL-4 (100 ng/mL)와 TGF-β (10 ng/mL)를 동시 배양한 rIL-10처리군의 CD4⁺GATA-3⁺는 1.9 ± 0.3 %로 대조군에 비하여 유의하게 감소를 나타내었다 (p<0.001). 실험군인 PM-E 추출물 (100 ng/mL)을 anti-CD3/anti-CD28 (1 ng/mL)과 rmlL-4 (100 ng/mL)와 TGF-β (10 ng/mL)를 동시 배양한 PM-E 추출물 처리군의 CD4⁺GATA-3⁺는 4.9 ± 0.2 %로 대조군에 비하여 43% 이상 CD4⁺GATA-3⁺ Th2 세포의 전사인자를 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (p<0.01). 하수오추출물 (PM-E)을 흡착크로마토그래피로 분리하여 분획들을 anti-CD3/anti-CD28 (1 ng/mL)과 rmlL-4 (100 ng/mL)와 TGF-β (10 ng/mL)와 동시 배양하여 GATA-3활성을 억제하는 분획을 찾아 내고자, 25 ng/mL 농도로 동시배양한 결과, PM-30M층의 CD4⁺GATA-3⁺는 6.8 ± 0.9 %, PM-70 %MFL층의 CD4⁺GATA-3⁺는 3.5 ± 0.2 %로 대조군에 비하여 59.3 % 이상 GATA-3 전사인자의 유의성 있는 억제를 나타내었고 (p<0.001), PM-70A층의 CD4⁺GATA-3⁺는 6.6 ± 0.85 %, PM-30A층의 CD4⁺GATA-3⁺는 5.4 ± 0.85%로 대조군에 비하여 약간 감소를 나타내었다 (p<0.05). 이러한 우리의 연구결과는 하수오를 물질분리하여 GATA-3 전사인자 활성을 억제하는 하수오 물질분획층이 흡착크로마토그래피를 통하여 70 % 메탄올층에 포함되어 있다고 분석되어 PM-70 %MFL 분획이 Th2 사이토카인을 조절하는 GATA-3를 억제하여 항알레르기 작용 효과가 있다고 생각된다.

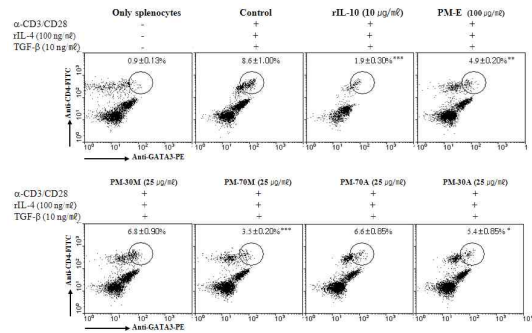


Fig. 1. Effects of PM-E and PM fraction layer on CD4⁺GATA-3⁺ intracellular staining analysis by anti-CD3/anti-CD28-stimulated NC/Nga splenocytes.

3.2 NC/Nga 생쥐의 B세포에서 IL-6, TNF-α mRNA 유전자 발현 분석

체액성 면역반응을 하는 B세포는 IL-4와 anti-CD40 mAb로 동시 자극하면 IgE 생산을 증가시키는 B세포 분화 및 활성이 촉진되어 IL-1, IL-6, 그리고 TNF-α mRNA 유전자 발현이 증가한다고 보고하였다[19].

본 연구에서는 NC/Nga 생쥐의 B세포를 IL-4와 anti-CD40 mAb로 동시 자극하여 PM-E와 PM-70 %MFL이 B세포 분화 및 활성을 억제하는지를 알아보려고 하였다. Fig. 2는 아토피피부발진 NC/Nga 생쥐의 B세포를 anti-CD40 / rmlL-4으로 자극하여 활성화시킨 후 PM-E와 PM-70 %MFL에 의하여 IL-6, 그리고 TNF-α mRNA 유전자 발현이 억제 되는지를 관찰한 결과이다. 대조군에 대한 PM-E와 PM-70 분획층의 상대정량(RQ)값으로 분석하였다. 무 처리군 (B cells)의 IL-6과 TNF-α mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ값이 각각 1.06 ± 0.063과 1.16 ± 0.162이었고, anti-CD40 / rmlL-4와 PM-E를 동시 배양한 대조군의 RQ값과 비교한 IL-6과 TNF-α mRNA 유전자 발현은 0.76 ± 0.064와 1.16 ± 0.056으로 IL-6 mRNA 유전자 발현은 유의하게 억제되었고 (p<0.01), TNF-α mRNA 유전자 발현은 대조군과 차이가 없었다. 또한 양성대조군인 rIL-10을 처리하고 anti-CD40 / rmlL-4으로 자극한 실험군의 유전자 발현은 대조군의 RQ값과 비교한 IL-6과 TNF-α mRNA 유전자 발현은 각각 0.52 ± 0.069 (p<0.001)과 0.58 ± 0.024 (p<0.01)로 IL-6,와 TNF-α mRNA 유전자 발현 모두 대조군에 비하여 50 % 이상 유전자 발현이 억제 되었다.

하수오추출물 (PM-E)을 흡착크로마토그래피로 분리하여 분획들을 anti-CD40 /rmlIL-4와 동시 배양하여 B세포 분화 및 활성을 억제하는지를 알아보고자, 25 ng/mL 농도로 동시 배양한 결과, PM-30M층, PM-70A, 그리고 PM-30A층의 IL-6와 TNF- α mRNA 유전자 발현은 대조군의 RQ 값과 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 PM-70 %MFL층의 IL-6와 TNF- α mRNA 유전자 발현은 각각 0.69 ± 0.058 ($p < 0.001$)과 0.72 ± 0.58 ($p < 0.05$)로 대조군에 비하여 30 % 이상 유전자 발현을 유의하게 억제하였다. 이러한 우리의 연구결과는 하수오의 분획중 PM-70 %MFL층에 B세포의 분화 및 활성을 억제하는 성분이 포함된 것으로 사료된다. 최근 retinoic acid가 생쥐의 B세포에 anti-CD40 mAb와 rIL-4를 동시 자극으로 B세포의 활성화 및 분화 유도된 B세포의 IgE 및 사이토카인의 생산을 조절한다는 결과를 보고하였다[20]. 또한 세가지 한약재를 혼합한 Mix-1을 anti-CD40 mAb와 rIL-4를 동시 자극한 생쥐 B세포에서 IgE와 사이토카인 생산을 감소시킨다고 보고하였다[21].

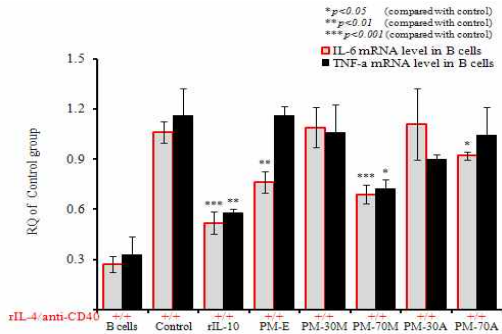


Fig. 2. Effects of PM-E and PM-70 %MFL on IL-6 and TNF- α mRNA expression by anti-CD40 /rmlIL-4-stimulated NC/Nga murine B cells.

3.3 NC/Nga 생쥐의 B세포에서 IgE 분비 측정

아토피질환의 치료는 IgE 분비를 억제시키는 것으로 CD40 + IL-4로 유도된 B세포 활성으로 증가된 IgE 분비를 retinoic acid가 억제한다고 보고하였다[22]. 또한 사람 B세포에 anti-CD40 + IL-4로 자극한 결과 B세포 증식과 IgE 생산이 증가된다고 보고하였고[23] 또한 IL-10이 CD40 + IL-4로 유도된 사람 임파구세포에서 IgE 분비를 감소시킨다는 결과를 발표하였다[24].

우리의 연구는 NC/Nga 생쥐의 B세포를 rIL-4와 anti-CD40 mAb로 동시 자극하여 PM-E와 PM-70 %MFL

이 B세포에서 IgE 분비에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. Fig. 3은 아토피피부발진 NC/Nga 생쥐의 B세포를 anti-CD40 /rmlIL-4로 자극하여 활성화 시킨 후 PM-E와 PM-70 %MFL에 의하여 IgE 분비를 억제 되는지 관찰한 결과이다. 무 처리군 (B cells)의 IgE 분비량은 8.6 ± 2.7 (pg/mL)이었고, anti-CD40 /rmlIL-4로 자극하여 동시 배양한 대조군의 IgE 분비량은 174.1 ± 15.5 로 무 처리군에 비하여 약 20배 이상 증가를 나타내었다. 양성대조군인 rIL-10을 처리하고 anti-CD40 /rmlIL-4로 자극한 실험군의 IgE 분비량은 73.3 ± 28.1 로 대조군에 비하여 57 % 이상 유의하게 감소를 나타내었다 ($p < 0.01$). 하수오추출물 (PM-E)를 처리하고 anti-CD40 /rmlIL-4로 자극한 실험군의 IgE 분비량은 111.6 ± 14.8 로 대조군에 비하여 35 % 이상 유의하게 감소를 나타내었다 ($p < 0.01$). 하수오추출물 (PM-E)을 흡착크로마토그래피로 분리하여 분획들을 anti-CD40 /rmlIL-4와 동시 배양하여 B세포에서 IgE 분비를 억제하는지를 알아본 결과, PM-30M층, PM-70A, 그리고 PM-30A층의 IgE 분비량은 대조군과 차이가 없었다. 그러나 PM-70 %MFL층의 IgE 분비량은 94.6 ± 16.0 로 대조군에 비하여 45.6% 이상 유의하게 감소를 나타내었다 ($p < 0.01$). 본 연구결과를 통해 하수오의 분획중 PM-70 %MFL층에 B세포의 분화 및 활성을 억제하는 성분이 포함된 것으로 사료된다.

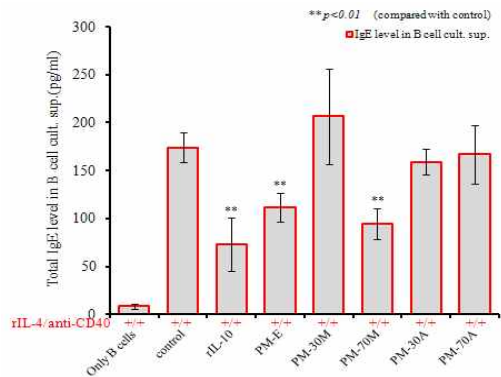


Fig. 3. Effects of PM-E and PM-70 %MFL on IgE secretion by anti-CD40 /rmlIL-4-stimulated

4. 결론

하수오에서 분리한 PM-E와 PM-70M이 GATA-3의존성 Th2세포 조절과 IgE 억제 효과를 알아보기 위해 실험한 결과는 다음과 같다.

하수오를 물질 분리하여 GATA-3 전사인자 활성을 억제하는 하수오 물질 분획층이 흡착크로마토그래피를 통해 70% 메탄올층에 포함되어 있다고 분석하였다. 그 결과 PM-70%MFL 분획이 Th2 사이토카인을 조절하는 GATA-3를 억제하여 항알레르기에 효과가 있는 것으로 생각된다.

하수오를 흡착크로마토그래피로 분리하여 분획들을 anti-CD40 /rmlL-4와 동시 배양하여 B세포에서 IgE 분비를 억제하는지를 알아본 결과, PM-30M층, PM-70A, 그리고 PM-30A층의 IL-6와 TNF- α mRNA, IgE 분비량은 대조군과 차이가 없었다. 그러나 IL-6와 TNF- α mRNA 유전자 발현은 각각 0.69 ± 0.058 ($p < 0.001$)과 0.72 ± 0.58 ($p < 0.05$)로 대조군에 비하여 30% 이상 유의하게 억제하였다. IgE 분비량은 94.6 ± 16.0 으로 대조군에 비하여 45.6% 이상 유의하게 감소를 나타내었다 ($p < 0.01$). 본 연구결과를 통해 하수오의 분획 중 PM-70 %MFL층에 B세포의 분화 및 활성을 억제하는 성분이 포함된 것으로 사료된다.

REFERENCES

[1] M. Ricci, O. Rossi, M. Bertoni, S. Matucci. (1993). The importance of Th2-like cells in the pathogenesis of airway allergic inflammation. *Clin Exp Allergy*, 23, 360-369.

[2] D. Agnello, S. D. Lankford, J. Bream, A. Morinobu, M. Gadina & J. O Shea. (2003). Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation new players and new insights. *J. Clin Immuno*, 23, 147-161.

[3] P. Y. Mantel, K. Harm, J. An, B. Onur, R. Claudior, O. Nadia, R. Beate, K. Christian, N. Bart & R. W. Lambrecht. (2007). GATA3-Driven Th2 Responses Inhibit TGF- β 1-induced FOXP3 Expression and the Formation of Regulatory T Cells. *PLoS Biol*, 5(12), 2847-2861.

[4] M. Yamashita, T. Ukai, T. Miyamoto, K. Sugaya, H. Hosokawa, A. Hasegawa, M. Kimura, M. Taniguchi, J. Gregori & T. Nakayama. (2004). *J. Biol Chem*, 279, 26983-26990.

[5] S. Y. Pai, M. L. Truitt & I. C. Ho. (2004). GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proc Natl Acad Sci*, 101, 1993-1998.

[6] Y. H. Lee & W. C. Lee. (2005). Effects of Polygoni

Multiflori Radix on Cerebral Ischemia of Hyperlipidemic Rats. *J. Korean Medicine*, 26(3), 146-161.

[7] T. K. Yim, W. K. Wu, D. H. Ma & K. M. Ko. (1998). Myocardial protective effect of an anthraquinone-containing extract of Polygonum multiflorum ex vivo. *Planta Med*, 64(7), 607-611.

[8] H. C. Huang, S. H. Chu & C. P. Lee. (1991). Vasorelaxants from chinese herbs, emodin and scoparone, possess immunosuppressive properties. *Eur. J. Pharmaco*, 198(2), 211-213.

[9] S. M. Wilkinson, J. Brittain & M. H. Beck. (2006). Allergic contact dermatitis from an anthraquinone derivative in a chemical plant. *Contact Dermatitis*, 30(4), 241-242.

[10] H. S. Lee, S. K. Kim, J. B. Han, H. M. Choi, J. H. Park, E. C. Kim, M. S. Choi, H. J. An, J. Y. Um & H. M. Kim. (2006). Inhibitory effects of Rumex J.aponicus Houtt. on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *British J. Dermatology*, 155, 33-38.

[11] S. Dong & S. H. J. eng. (2004). Antioxidant activities of clove by extraction solvent. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr*, 33, 609-613.

[12] A. S. Luminita & D. Ratko. (2000). Isolation of T & B-Cell Subsets by Magnetic Cell Sorting. *Methods in Molecular Biology*, 134, 133-141.

[13] L. A. Brunsting, W. B. Reed & H. L. Bair. (1996). Occurrence of cataract and keratoconus with atopic dermatitis. *Arch Dermatol*, 72, 237-241.

[14] W. W. (1983). Dannel. A foundation for analysis in the health science. *Biostics*, 136-146.

[15] G. R. Lee, P. E. Fields & R. A. Flavell. (2001). Regulation of IL-4 gene expression by distal regulatory elements and GATA-3 at the chromatin level. *Immunity*, 14, 447-459.

[16] M Kittipong, X. Yao, I. Kazuhiro, J. Elen, K. Y. Lee, S. Omar, J. Peter & M. Ian. (2007). Regulation of Th2 Cytokine Genes by p38 MAPK-Mediated Phosphorylation of GATA-3. *J. Immunology*, 178, 2491-2498.

[17] M. Yamashita, M. U. Tadenuma, T. Miyamoto, K. Sugaya, H. Hosokawa, H. Hasegawa, A. Kimura, M. Taniguchi, M. DeGregori & J. Nakayama. (2004). Genome-Wide Analysis Reveals Unique Regulation of Transcription of Th2-Specific Genes by GATA3. *J. Biol Chem*, 279, 26983-26990.

[18] J. Zhu, B. Min, J. Hu, C. Watson, J. Grinberg, A. Q.

- Wang, N. Killeen, N. Urban & W. E. Paul. (2004). Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol*, 5, 1157-1165.
- [19] H. S. Kang, M. J. Lee, H. K. Song, S. H. Han, Y. M. Kim, J. Y. Im & I. P. Choi. (2001). Molecular Identification of IgE-Dependent Histamine-Releasing Factor as a B Cell Growth Factor. *The J. Immunology*, 166, 6545-6554.
- [20] C. Qiuyan & A. Catharine. (2007). Retinoic acid regulates mouse B-cell activation and differentiation induced by engagement of CD40, B-cell antigen receptor and cytokine IL-4. *The FASEB Journal*, 21, 702-713.
- [21] J. H. Kim, S. M. Choi, Y. G. Lee, G. U. Nam & D. H. Kim. (2004). Effects of Mix-1 on Anti-CD40 Antibody and Recombinant IL4-Induced Cytokine Production and Immunoglobulin E in Highly Purified Mouse B Cells. *The Korean Association of Oriental Medical Physiology*, 18(6), 1869-1869.
- [22] M. Worm, J. M. Krah, R. A. Manz, B. M. Henz. Retinoic Acid Inhibits CD40 1 Interleukin-4-Mediated IgE Production In Vitro. *Blood*, 92(5), 1713-1720.
- [23] H. J. abara, S. M. Fu, R. S. Geha, & D. Vercelli. (1990). CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *J. Exp. Med*, 172, 1861-1864.
- [24] Y. U. J.ima, K. Takahashi, K. Komoriya, S. Kurozumi & H. D. Ochs. (1996). Effect of interleukin-10 on anti-CD40 and interleukin-4-induced immunoglobulin E production by human lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol*, 110(3), 225-230.

최은영(Eun-Young Choi)

[정회원]



- 2002년 2월 : 홍익대학교 경영정보학과 (경영학 학사)
- 2006년 8월 : 건국대학교 향장미용학 (향장학 석사)
- 2011년 8월 : 건국대학교 향장생물학 (이학박사)

- 현재 : RXAP KOREA 연구원
- 관심분야 : 향장, 미용, 천연화장품
- E-Mail : eyoung1114@hanmaill.net