

Inhibitory Effect of *Dendrobium moniliforme* on Degranulation and Histidine Decarboxylase Expression in RBL-2H3 Cells

Young Ji Lee[†], Iskander Madhi[†] and YoungHee Kim^{*}

Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received January 12, 2023 / Revised January 27, 2023 / Accepted January 28, 2023

The stems of *Dendrobium moniliforme* are used in traditional Oriental medicine as a Yin tonic to nourish the stomach, promote the production of body fluid, and reduce fever. This study investigated the effects of the aqueous extract of *D. moniliforme* stems (DME) on mast cell degranulation and the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-4 (IL-4), and histamine-synthesizing enzyme histidine decarboxylase (HDC). We used rat mast cell line RBL-2H3 cells and stimulated them with PMA plus calcium ionophore (PMACI). Pretreatment with DME significantly inhibited PMACI-induced β -hexosaminidase release and the expression of TNF- α , IL-4, and HDC. Furthermore, DME suppressed PMACI-induced nuclear translocation of the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and activator protein 1 (AP-1). In addition, HDC expression was inhibited by SP600125 (JNK inhibitor), PD98059 (ERK inhibitor), and SB203580 (p38 kinase inhibitor). Finally, the phosphorylation of p38 kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), and c-Jun N-terminal kinase (JNK) was inhibited by pretreatment with DME. These results suggest that DME has inhibitory effects against degranulation, cytokine (TNF- α and IL-4) and HDC expression, and that HDC expression is mediated by MAPK signaling. These findings suggest that DME may have therapeutic potential in the treatment of hypersensitive and inflammatory diseases.

Key words : Degranulation, *Dendrobium moniliforme*, histidine decarboxylase, mast cell, mitogen activated protein kinase

서 론

비만세포(mast cell)는 제 1형 과민반응(알러지 반응)을 유발하는 대표적인 세포로 알려져 있다. 비만세포의 세포막에는 면역글로불린 E (IgE)에 대한 수용체가 존재하는데, 이 수용체에 IgE가 결합한 후 수용체에 결합한 IgE에 항원이 결합하면 비만세포가 활성화되어 세포내로 신호전달 과정이 일어난다[5, 7]. 신호전달 과정의 대표적인 예로 세포내 유리 칼슘이 증가하게 되고 이로 인해 세포질에 있는 과립(그래놀)이 세포막과 융합하여 그래놀내 물질을 분비하는 탈과립화(degranulation)가 일어난다. 이 탈과립화에 의해 히스타민, 사이토카인, 케모카인, 프로스타제, 프로스타글란딘, 류코트리엔 등의 염증 매개 물

질이 분비되고, 알러지 반응이 촉발되거나 심화된다[5, 7].

히스타민은 수용성 아민으로서 히스티딘 탈탄산효소 [histidine decarboxylase (HDC)]에 의해 아미노산인 L-히스티딘으로부터 만들어진다. 히스타민은 혈관을 이완시키고, 혈관투과성을 증가시키며, 기관지를 수축시키고, 점액 분비를 촉진하는 등의 알러지 반응을 유발한다. 또한 위에서 위액의 분비를 촉진하며, 중추신경계에서 신경조절물질의 분비를 조절하고, 호흡기구, 단핵구세포 등에 작용하여 천식, 장염, 피부염, 관절염 등의 염증반응을 촉진하기도 한다[20].

석곡(*Dendrobium moniliforme*)의 줄기는 동양의학에서 예로부터 위를 보하고, 진액을 보충하며, 해열, 진통 작용과 혈압을 내리는 작용을 하며, 소화 촉진, 변비 치료 등에 사용되어 왔다[1]. 석곡은 alkaloids, sesquiterpens, phenanthrens와 같은 이차 대사산물을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다[4, 18, 23, 28, 29]. 석곡은 대식세포의 탐식기능을 향상시키며, 염증반응을 억제하는 것으로 보고되었다[1, 17]. 그러나 알러지 반응이나 비만세포 활성화에 대한 효과는 잘 알려지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 석곡이 비만세포의 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고 그 조절 기전을 밝히고자 한다.

[†]Authors contributed equqlly.

^{*}Corresponding author

Tel : +82-51-510-2526, Fax : +82-51-513-9258

E-mail : yheekim@pusan.ac.kr

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.

재료 및 방법

석곡 추출액(DME) 준비

마른 석곡은 광명당(광주)으로부터 구입하였다. 석곡(300 g)을 증류수에 넣고 100°C에서 4시간 동안 끓이고 식힌 후 0.45 µm 필터로 거르고 동결건조 하여 8 g을 얻어 냉장보관 하였다. 동결건조된 석곡 가루를 PBS (phosphate buffered saline)에서 녹이고 0.22 µm 필터로 걸러 사용하였다.

세포배양

쥐(Rat) 비만세포주(RBL-2H3) 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% FBS를 첨가한 배양액에서 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다.

세포 생존도 측정

DME의 세포독성 효과를 microculture tetrazolium (MTT)-based colorimetric assay 방법으로 분석하였다. 2×10⁵ 세포를 24-well plate에 배양한 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide [MTT, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)] 용액(최종 농도 62.5 µg/ml)을 넣고 37°C, 5% CO₂ 환경에서 3시간 배양한다. 상층액을 버리고 세포에 남아있는 formazan 결정을 150 µl의 DMSO로 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

β-Hexosaminidase 분비 측정

비만세포의 탈과립화를 측정하기 위해 비만세포의 그 래놀에 존재하는 β-Hexosaminidase 의 분비를 측정하였다. 2.5×10⁴ 세포를 96-well plate에 넣어 DME를 첨가하고 1시간 배양하였다. 50 nM PMA와 1 mM A23187을 첨가하고 1시간 더 배양한 후 세포배양 상층액을 덜어내고 남은 세포에 0.5% Triton X-100 용액을 넣어 세포를 용해하였다. 세포배양 상층액과 세포용해액 각 10 µl를 96-well plate에 따로 넣어 5 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosamine (0.1 M sodium citrate buffer, pH 4.5 용액에 녹임) 용액 10 µl를 첨가하고 37°C에서 40분간 배양하였다. 0.2 M Glycine, pH 10.7 용액 150 µl를 첨가하여 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hexosaminidase 의 분비는 아래 식으로 계산하였다.

$$\frac{\text{세포배양상층액 흡광도}}{\text{세포배양상층액 흡광도} + \text{세포용해액 흡광도}} \times 100(\%)$$

RT-PCR

세포의 전체RNA를 RNA-spin mini RNA isolation kits (GE Healthcare, USA)로 분리한 후 oligo-dT15-primers를 이용하여 Maxime RT PreMix (Intron Biotechnology, Korea)

로 cDNA로 역전사시켰다. 다음의 primer를 이용하여 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa Bio Inc., Japan) 기계로 PCR을 한 후 agarose 겔에 전기영동을 하였다. TNF-α-forward (5'-TTCTCATTCTGCTGTGGC-3'), TNF-α-reverse (5'-GTTTGCTACGACGTGGGCTA-3'), IL-4-forward (5'-ACGAGGTCACAGGAGAAGGG-3'), IL-4-reverse (5'-AAGCCCGAAAGAGTCTCTGC-3'), GAPDH-forward (5'-AGGTGGTCTCCTCTGACTTC-3'), GAPDH-reverse (5'-TACCAGGAAATGAGCTTGAC-3')

단백질 추출 및 Western blot 분석

세포질의 단백질은 세포용해버퍼(1% Triton X-100, 1% deoxycholate, PBS)를 이용하여 추출하였다. 세포핵 단백질은 이전에 설명된 방법으로 추출하였다[2]. 세포를 PBS 용액으로 3번 씻은 후 저장액(10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol, 0.2 mM PMSF)에 4°C에서 15분간 배양하였다. NP-40 (0.1%)을 첨가하고 4°C에서 1분간 배양한 후 1,700 g에서 1분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 침전물에 고장액(20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 0.2 mM PMSF)을 넣고 4°C에서 30분간 가끔 흔들어 주면서 배양하였다. 1,700 g에서 5분간 원심분리하여 세포핵 단백질이 있는 상층액을 -70°C에 보관하였다. 동일량의 단백질을 10% polyacrylamide 겔에서 전기영동 [SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)] 하고 0.45 µm nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Membrane을 α-HDC 항체(Eurodiagnostica, Sweden), α-tubulin, α-p65, α-c-Fos, α-c-Jun, α-HDAC3, anti-JNK, α-p38, α-ERK1/2 항체(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), α-phospho-JNK, α-phospho-p38, α-phospho-ERK1/2 antibody 항체(Cell Signaling Technology, USA)와 각각에 대한 이차 항체로 배양하고 enhanced chemiluminescence detection system (Amersham Co., USA)으로 검출하였다.

면역형광 공초점현미경 관찰(immunofluorescence confocal microscopy)

세포를 cover-slip에 키운 후 -20°C 메탄올로 10분간 고정하고 1:100으로 희석한 항체를 16시간 처리하였다. PBS로 씻은 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 달려있는 2차 항체를 상온에서 4시간 처리하였다. 세포핵을 1 mg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 염색하고 LSM 510 Meta 공초점현미경[confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany)]으로 관찰하였다.

통계 분석

모든 결과는 평균 ± 표준오차로 나타내었고, 각 실험은

세 번 이상 반복하였다. 통계 처리를 위해 Prism 7 소프트웨어(GraphPad Software, inc., USA)를 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) 분석을 하였고, 각 그룹을 비교하기 위해 Tukey's post hoc test을 사용하였다. $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 표시하였다.

결과 및 고찰

비만세포 탈과립작용에 대한 DME의 효과

DME의 작용을 관찰하기에 앞서 DME가 세포독성이 있는지를 MTT assay 방법으로 조사하였다. 쥐 비만세포주인 RBL-2H3 세포에 DME를 처리했을 때 DME의 농도에 무관하게 MTT 수준에 변화가 없었다(Fig. 1A). 따라서 1,000 mg/ml 농도 범위에서는 DME가 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었으며, 이후 실험에 DME를 1,000 mg/ml 농도까지 사용하였다.

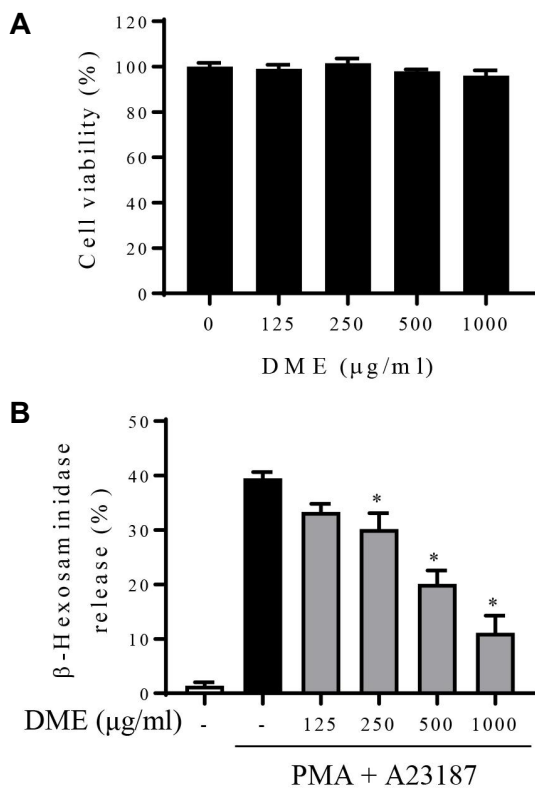


Fig. 1. Effect of DME on mast cell degranulation. (A) Effect of DME on cell viability. RBL-2H3 cells were incubated with various concentration of DME for 24 hr. Then cell viability was measured by MTT assay. (B) Effect of DME on degranulation. RBL-2H3 cells were incubated with various concentration of DME for 1 hr and then treated with 50 nM PMA and 1 mM A23187 for 1 hr. Degranulation was measured by β -hexosaminidase release. * $p < 0.05$ vs PMA plus A23187-treated group.

IgE/항원 뿐 만 아니라 PMA와 Ca ionophore (A23187) 병행 처리[PMA plus Calcium ionophore (PMACI)]가 비만세포를 자극하여 신호전달 경로를 활성화시키는 것으로 알려져 있고, PMACI를 이용하여 비만세포를 활성화시키는 연구가 많이 발표되고 있다[5, 10]. 따라서 본 연구에서는 PMACI를 처리하여 RBL-2H3 세포를 활성화시켰으며, 비만세포의 탈과립은 과립(그레인)안에 들어있는 β -hexosaminidase가 분비되는 퍼센트로 나타내었다. Fig. 1B에서 보듯이, PMACI에 의해 β -hexosaminidase의 분비가 증가하는 반면 DME를 전처리 한 경우 PMACI에 의한 β -hexosaminidase의 분비가 농도의존적으로 억제됨을 관찰하였다. 따라서 이 결과는 DME가 PMACI에 의한 비만세포의 탈과립을 억제한다는 것을 시사한다.

TNF- α , IL-4, HDC 발현에 대한 DME의 억제 효과

비만세포가 활성화되면 TNF- α 와 IL-4의 발현과 분비가 증가되는 것으로 알려져 있다[5, 7]. RBL-2H3 세포에 PMACI를 처리하여 TNF- α 와 IL-4의 발현을 RT-PCR 방법으로 관찰하였다. PMACI를 처리했을 때 TNF- α 는 4시간에서, IL-4는 3시간에서 mRNA양이 최고를 보이고(Fig. 2A), DME 전처리에 의해 그 발현이 현저히 줄어드는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2B). 또한, 히스타민 생성 효소인 HDC의 발현도 PMACI 처리에 의해 8시간에서 최고를 보이는 반면(Fig. 2C), DME 전처리에 의해서는 그 발현이 현저히 감소되었다(Fig. 2D). 따라서 DME가 비만세포가 활성화될 때 분비되는 TNF- α 와 IL-4의 발현을 억제하며, 또한 HDC의 발현을 억제함으로써 히스타민 생성을 억제하여 비만세포로 인한 알러지 반응이나 염증반응을 완화할 것으로 추측된다.

NF- κ B 활성화에 대한 DME의 효과

전사인자인 NF- κ B에 의해 TNF- α 와 IL-4의 발현이 조절된다는 것이 알려져 있기 때문에[26] DME가 NF- κ B p65의 활성을 억제하는지 관찰하였다. NF- κ B가 활성화되면 세포핵으로 가기 때문에 세포핵 추출물에서 p65의 양을 조사해 본 결과 PMACI에 의해서 증가된 p65가 DME에 의해 현저히 감소됨을 볼 수 있었다(Fig. 3A). 또한 세포를 염색하여 형광현미경으로 관찰하였을 때 세포질에 있던 p65가 PMACI에 의해 핵으로 이동한 반면 DME 전처리를 한 경우 세포질에 더 많이 남아있음을 볼 수 있었다(Fig. 3B). 따라서 DME는 NF- κ B의 활성을 억제함으로써 TNF- α 와 IL-4의 발현을 저해하는 것으로 추측된다.

AP-1 활성화에 대한 DME의 효과

인간 HDC의 발현이 전사인자인 AP-1에 의해 조절된다는 보고[13]가 있었기 때문에 DME가 AP-1의 활성을 억제하는지 관찰하였다. AP-1은 c-Jun과 c-Fos로 구성되고 활

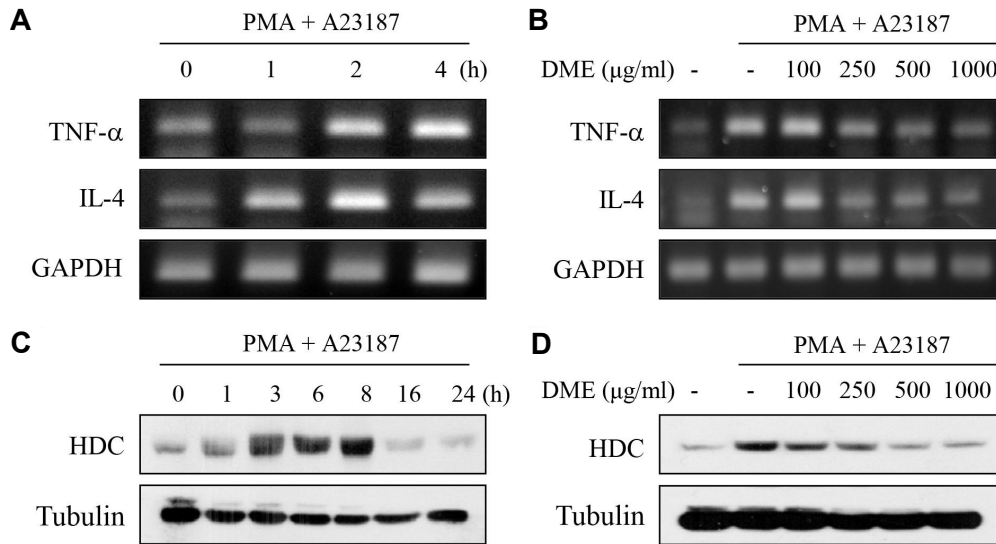


Fig. 2. Effect of DM on the expression of TNF- α , IL-4 and HDC. (A) RBL-2H3 cells were incubated with 50 nM PMA and 1 mM A23187 for indicated time. (B) Cells were incubated with various concentrations of DME for 1 hr and then stimulated with 50 nM PMA and 1 mM A23187 for 4 hr. Total RNA was extracted and RT-PCR was performed. (C) RBL-2H3 cells were incubated with 50 nM PMA and 1 mM A23187 for indicated time. (D) Cells were incubated with various concentrations of DME for 1 hr and then stimulated with 50 nM PMA and 1 mM A23187 for 8 hr. Equal cytosolic extracts were analyzed by Western blotting with α -HDC antibody. Tubulin was estimated protein-loading control for each lane.

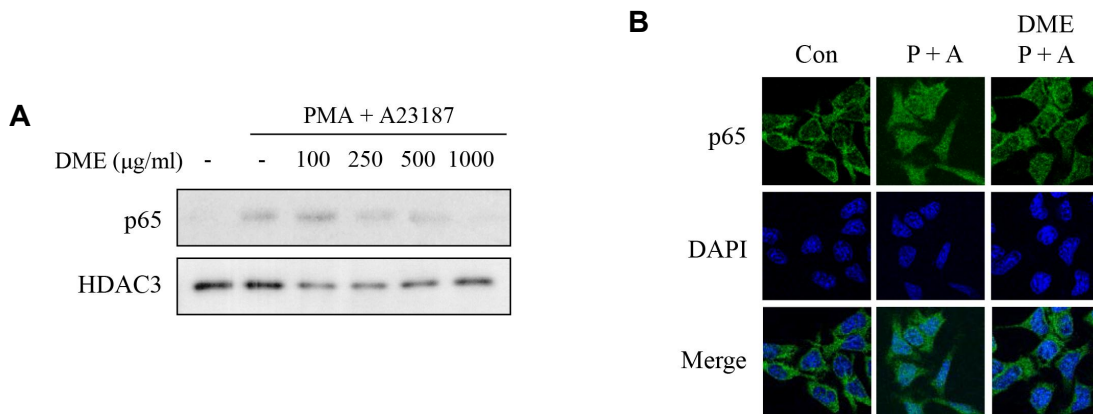


Fig. 3. Inhibitory effect of DME on nuclear translocation of NF- κ B. RBL-2H3 cells were incubated with various concentrations of DME for 1 hr and then stimulated with 50 nM PMA and 1 mM A23187 for 30 min. (A) Nuclear extracts were analyzed by Western blotting with α -p65 antibody. HDAC3 was estimated protein-loading control for each lane. (B) The effects of DME (1,000 mg/ml) on nuclear accumulation of p65 were confirmed by confocal microscopy.

성화되면 세포핵으로 가서 DNA에 결합한다. 세포핵 추출물에서 c-Jun과 c-Fos의 양을 조사해 본 결과 PMACI에 의해서 증가된 c-Jun 및 c-Fos가 DME에 의해 현저히 감소됨을 볼 수 있었다(Fig. 4A). 또한 세포를 염색하여 형광현미경으로 관찰하였을 때 세포질에 있던 c-Jun과 c-Fos가 PMACI에 의해 핵으로 이동한 반면 DME 전처리를 한 경우 핵으로 많이 이동하지 않음을 볼 수 있었다(Fig. 4B, Fig. 4C). 따라서 DME는 AP-1의 활성을 억제함으로써 HDC의 발현을 저해하는 것으로 추측된다.

Mitogen activated protein kinase (MAPK) 활성화에 미치는 DME의 효과

HDC 발현에 관여하는 신호전달 경로에 대해서 알려진 바가 많지 않으나 c-Jun kinase (JNK), extracellular signal regulated kinase (ERK), p38 kinase 등과 같은 MAPK에 의해 조절된다는 보고가 있다. 인간 HDC의 발현이 ERK와 p38 kinase에 의해 조절되고 JNK와는 상관없다는 보고가 발표된 반면[3, 12], 생쥐의 대식세포에서 LPS에 의한 HDC 발현은 ERK와 JNK에 의해 조절된다는 보고가 있다

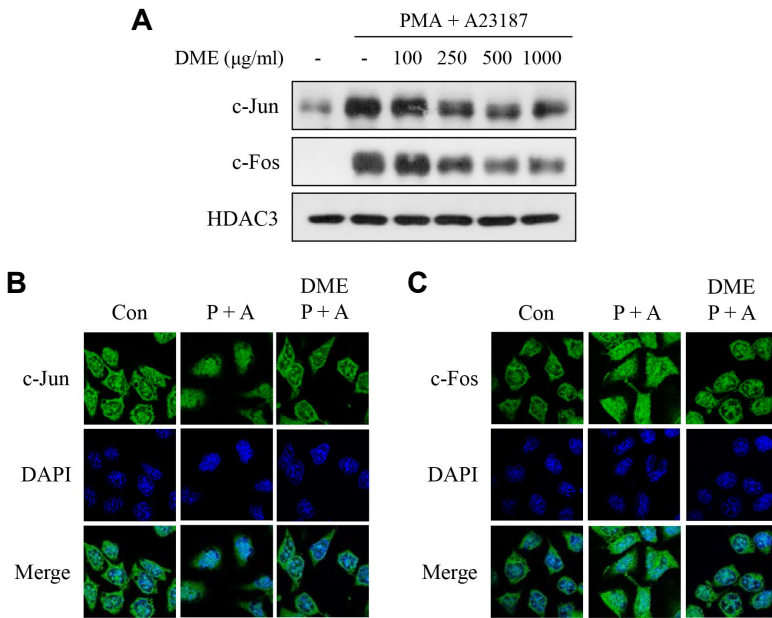


Fig. 4. Nuclear translocation of AP-1 is inhibited by DME. RBL-2H3 cells were incubated with various concentrations of DME for 1 hr and then stimulated with 50 nM PMA and 1 mM A23187 for 30 min. (A) Nuclear extracts were analyzed by Western blotting with α -c-Jun or α -c-Fos antibodies. HDAC3 was estimated protein-loading control for each lane. The effects of DME (1000 mg/ml) on nuclear accumulation of c-Jun (B) or c-Fos (C) were confirmed by confocal microscopy.

[11]. 따라서, 쥐 비만세포에서 HDC 발현에 MAPK가 관여하는지 확인하였다. RBL-2H3 세포에 SP600125 (JNK 저해제), PD98059 (ERK 저해제), SB203580 (p38 kinase 저해제) 등의 단백질 인산화효소 저해제를 전처리한 후 PMACI를 처리하고 HDC 발현을 관찰한 결과 이들 인산화효소 저해제에 의해 HDC의 발현이 현저히 억제되었다(Fig. 5A). 이 결과는 p38 kinase, ERK, JNK가 PMACI에 의한 HDC 발현에 주요한 신호전달경로로 작용함을 시사한다. 한편, 각 MAPK 활성화에 미치는 DME의 영향을 알아본 결과 DME 전처리를 한 경우 p38 kinase, ERK, JNK의 활성이 모두 감소하였고 특히 p38 kinase의 활성이 가장 현저히 감소하였다(Fig. 5B). 이러한 결과들로 보아 DME가 MAPK 활성을 억제함으로써 HDC의 발현을 저해할 것으로 추측된다.

본 연구에서 DME는 비만세포의 탈과립을 억제하고 히스타민 생성 효소인 HDC의 발현을 억제하였다. 비만세포가 탈과립 될 때 그레놀 안에 이미 만들어져 있던 히스타민, 헤파린, 단백분해 효소(비만세포-특이 프로테아제, chymase, tryptase)가 세포 밖으로 분비되는데, 이러한 탈과립이 억제되면 히스타민에 의해 유도되는 혈관이완, 혈관투과성 증가, 기도수축 등이 억제되고, 단백분해 효소에 의해 유도되는 ILC2 (innate lymphoid cell 2)와 호산구 활성화, 호중구 및 호산구 이동 등이 억제되어 염증이 감소된다[5, 7]. 또한 TNF- α 와 IL-4도 비만세포의 그레놀에 이미 만들어져 있다는 것이 밝혀졌는데[5], 본 연구에서는 DME가 TNF- α 와 IL-4의 발현을 저해하였다. 비만세포에서 만들어진 TNF- α 는 수지상세포(dendritic cell)를 활성화시키고, IL-4는 비만세포와 호염기구의 분화를 촉진화시키고 B 세포에서 IgE 생성을 촉진하며 Th2 반응을 유도한

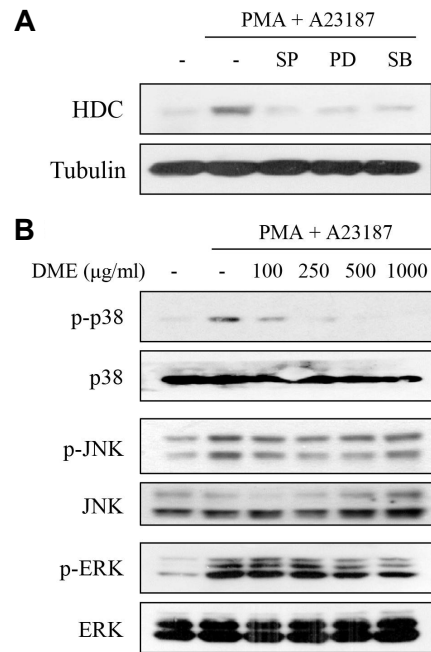


Fig. 5. Effect of DM on ERK, p38 and JNK activity. (A) RBL-2H3 cells were treated with SP600125 (10 mM), PD98059 (10 mM), or SB203580 (10 mM) for 30 min and stimulated with 50 nM PMA and 1 mM A23187 for 8 hr. Equal cytosolic extracts were analyzed by Western blotting with α -HDC antibody. (B) Cells were treated with various concentrations of DM for 1 hr and stimulated with 50 nM PMA and 1 mM A23187 for 15 min. Equal amount of cell extracts was analyzed by Western blotting with α -phospho-ERK1/2, α -phospho-p38 or α -phospho-JNK antibody. Western blot detection of non-phosphorylated kinases was estimated protein-loading control for each lane.

다고 알려져있다[7]. 따라서 DME는 TNF- α 와 IL-4의 발현을 억제함으로써 비만세포의 분화와 활성화를 억제하고 Th2 반응을 억제할 수 있을 것으로 추측된다.

쥐의 전신에 알러젠을 투여하면 HDC 발현이 증가되며 [6], 알러지 증상을 보이는 비강 점막, 만성 두드러기, 아토피 환자의 keratinocyte에서 HDC 발현이 증가되어 있다고 보고되었다[9, 14, 15, 22]. HDC-knockout (HDC-KO) 생쥐는 기도의 과민반응과 호산구 증가증을 낮추고 알러젠 특이 IgE 양을 감소시킨다고 발표되었다[16]. 또한 HDC 유전자 다형성(polymorphism) 중 특정 형태가 알러지 비염 유발 위험을 높인다는 것이 발견되었다[8]. 더군다나 HDC의 발현을 조절함으로써 과민반응을 낮출 수 있다는 보고들이 발표되고 있다[10, 16, 19, 21, 24, 27]. 그러므로 HDC의 발현이 알러지 비염이나 아토피, 두드러기 등의 과민반응에 매우 중요하게 작용한다는 것을 알 수 있고, DME가 HDC 발현을 저해함으로써 이러한 과민반응을 억제할 수 있을 것으로 추측할 수 있다. 또한 비만세포는 과민반응뿐만 아니라 관절염, 다발성 경화증, 제 1형 당뇨병, 패혈증, 장염, 심혈관계 질환, 암 등 질환의 유발이나 진행에 관여하는 것으로 알려져 있으므로[5, 7, 20, 25], 비만세포 활성을 억제하는 DME는 이러한 다양한 질환들을 예방하거나 경감시키는 효과적인 약물로 개발될 가능성을 가지고 있다고 사료된다.

요약을 하면, DME는 비만세포의 탈과립을 억제하고 TNF- α , IL-4, HDC 발현을 감소시켰으며, 신호전달 경로인 MAPK 활성을 낮추고 NF- κ B와 AP-1을 저해하였다. 이러한 결과들로 보아 DME는 비만세포가 관여하는 과민반응, 관절염, 다발성 경화증 등 다양한 질환들의 치료제로 개발될 가능성을 가지는 것으로 사료된다. 후속 연구로 DME의 이러한 질환들에 관련된 생체내(*in vivo*) 효과를 검증할 필요가 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2021학년도 부산대학교 BK21 FOUR 대학원 혁신지원사업에 의한 연구임.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Ahn, D. K. 2003. Illustrated book of Korean medicinal herbs. pp707, Kyohak Publishing Co.
- Andrews, N. C. and Faller, D. V. 1991. A rapid micro-preparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2499.
- Babina, M., Wang, Z., Franke, K., Guhl, S., Artuc, M. and Zuberbier, T. 2019. Yin-yang of IL-33 in human skin mast cells: Reduced degranulation, but augmented histamine synthesis through p38 activation. *J. Invest. Dermatol.* **139**, 1516-1525. e1513.
- Chen, Y. L., Zhang, M., Hua, Y. F. and He, G. Q. 2001. Studies on polysaccharide alkaloids and minerals from *Dendrobium moniliforme* (L.) sw. *China J. Chin. Mater. Med.* **26**, 709-710, 704.
- Da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C. and Oliver, C. 2014. Mast cell function. *J. Histochem. Cytochem.* **62**, 698-738.
- Deng, X., Wu, X., Yu, Z., Arai, I., Sasano, T., Sugawara, S. and Endo, Y. 2007. Inductions of histidine decarboxylase in mouse tissues following systemic antigen challenge: Contributions made by mast cells, non-mast cells and IL-1. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **144**, 69-78.
- Elieh Ali Komi, D., Wöhr, S. and Bielory, L. 2020. Mast cell biology at molecular level: A comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **58**, 342-365.
- Gervasini, G., Agúndez, J. A. G., García-Menaya, J., Martínez, C., Cordobés, C., Ayuso, P., Cornejo, J. A., Blanca, M. and García-Martín, E. 2010. Variability of the L-histidine decarboxylase gene in allergic rhinitis. *Allergy* **65**, 1576-1584.
- Gutowska-Owsiak, D., Greenwald, L., Watson, C., Selvakumar, T. A., Wang, X. and Ogg, G. S. 2014. The histamine-synthesizing enzyme histidine decarboxylase is upregulated by keratinocytes in atopic skin. *Br. J. Dermatol.* **171**, 771-778.
- Han, N. R., Moon, P. D., Ryu, K. J., Jang, J. B., Kim, H. M. and Jeong, H. J. 2017. β -Eudesmol suppresses allergic reactions via inhibiting mast cell degranulation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **44**, 257-265.
- Hirasawa, N., Torigoe, M., Ohgawara, R., Murakami, A. and Ohuchi, K. 2006. Involvement of MAP kinases in lipopolysaccharide-induced histamine production in RAW264 cells. *Life Sci.* **80**, 36-42.
- Höcker, M., Rosenberg, I., Xavier, R., Henihan, R. J., Wiedenmann, B., Rosewicz, S., Podolsky, D. K. and Wang, T. C. 1998. Oxidative stress activates the human histidine decarboxylase promoter in AGS gastric cancer cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 23046-23054.
- Höcker, M., Zhang, Z., Merchant, J. L. and Wang, T. C. 1997. Gastrin regulates the human histidine decarboxylase promoter through an AP-1-dependent mechanism. *Am. J. Physiol.* **272**, G822-830.
- Inami, Y., Fukushima, M. and Murota, H. 2021. Correlation between histidine decarboxylase expression of keratinocytes and visual analogue scale in patients with atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* **103**, 120-123.
- Kitamura, Y., Miyoshi, A., Murata, Y., Maeyama, K., Takeda, N. and Fukui, H. 2004. Increase in the level of histidine decarboxylase mrna expression in nasal mucosa of rats sensitized by toluene diisocyanate. *Inflamm. Res.*

- 53, S13-S14.
16. Kozma, G. T., Losonczy, G., Keszei, M., Komlósi, Z., Buzás, E., Pállinger, E., Appel, J., Szabó, T., Magyar, P., Falus, A. and Szalai, C. 2003. Histamine deficiency in gene-targeted mice strongly reduces antigen-induced airway hyper-responsiveness, eosinophilia and allergen-specific IgE. *Int. Immunol.* **15**, 963-973.
 17. Lee, Y. J., Kim, J. H. and Kim, Y. 2018. *Dendrobium moniliforme* stem extract inhibits lipoteichoic acid-induced inflammatory responses by upregulation of heme oxygenase-1. *J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 1310-1317.
 18. Lin, T. H., Chang, S. J., Chen, C. C., Wang, J. P. and Tsao, L. T. 2001. Two phenanthraquinones from *Dendrobium moniliforme*. *J. Nat. Prod.* **64**, 1084-1086.
 19. Mizuguchi, H., Das, A. K., Maeyama, K., Dev, S., Shahriar, M., Kitamura, Y., Takeda, N. and Fukui, H. 2016. Antihistamines suppress upregulation of histidine decarboxylase gene expression with potencies different from their binding affinities for histamine H1 receptor in toluene 2,4-dinitrobenzene-sensitized rats. *J. Pharmacol. Sci.* **130**, 212-218.
 20. Moriguchi, T. and Takai, J. 2020. Histamine and histidine decarboxylase: Immunomodulatory functions and regulatory mechanisms. *Genes Cells* **25**, 443-449.
 21. Nurul, I. M., Mizuguchi, H., Shahriar, M., Venkatesh, P., Maeyama, K., Mukherjee, P. K., Hattori, M., Choudhuri, M. S., Takeda, N. and Fukui, H. 2011. Albizia lebbeck suppresses histamine signaling by the inhibition of histamine H1 receptor and histidine decarboxylase gene transcriptions. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 1766-1772.
 22. Papadopoulou, N., Kalogeromitros, D., Staurianias, N. G., Tiblalex, D. and Theoharides, T. C. 2005. Corticotropin-releasing hormone receptor-1 and histidine decarboxylase expression in chronic urticaria. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 952-955.
 23. Sanchez-Duffhues, G., Calzado, M. A., de Vinuesa, A. G., Appendino, G., Fiebich, B. L., Looock, U., Lefarth-Risse, A., Krohn, K. and Munoz, E. 2009. Denbinobin inhibits nuclear factor-kappaB and induces apoptosis via reactive oxygen species generation in human leukemic cells. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1401-1409.
 24. Tachibana, M., Wada, K., Katayama, K., Kamisaki, Y., Maeyama, K., Kadowaki, T., Blumberg, R. S. and Nakajima, A. 2008. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses mast cell maturation involved in allergic diseases. *Allergy* **63**, 1136-1147.
 25. Wechsler, J. B., Szabo, A., Hsu, C. L., Krier-Burris, R. A., Schroeder, H. A., Wang, M. Y., Carter, R. G., Velez, T. E., Aguiniga, L. M., Brown, J. B., Miller, M. L., Wershil, B. K., Barrett, T. A. and Bryce, P. J. 2018. Histamine drives severity of innate inflammation via histamine 4 receptor in murine experimental colitis. *Mucosal Immunol.* **11**, 861-870.
 26. Yan, J. and Greer, J. M. 2008. NF-kappa B, a potential therapeutic target for the treatment of multiple sclerosis. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **7**, 536-557.
 27. Yoshihisa, Y., Andoh, T., Matsunaga, K., Rehman, M. U., Maoka, T. and Shimizu, T. 2016. Efficacy of astaxanthin for the treatment of atopic dermatitis in a murine model. *PLoS One* **11**, e0152288.
 28. Zhao, C., Liu, Q., Halaweish, F., Shao, B., Ye, Y. and Zhao, W. 2003. Copacamphane, picrotoxane, and alloaromadendrane sesquiterpene glycosides and phenolic glycosides from *Dendrobium moniliforme*. *J. Nat. Prod.* **66**, 1140-1143.
 29. Zhao, W., Ye, Q., Dai, J., Martin, M. T. and Zhu, J. 2003. Allo-aromadendrane- and picrotoxane-type sesquiterpenes from *Dendrobium moniliforme*. *Planta Med.* **69**, 1136-1140.

초록 : RBL-2H3 세포에서 탈과립과 histidine decarboxylase 발현에 미치는 석곡(*Dendrobium moniliforme*)의 효과

이영지[†] · 마디 이스칸데르[†] · 김영희^{*}

(부산대학교 자연과학대학 분자생물학과)

석곡의 줄기는 전통 동양의학에서 위를 보하고, 진액을 보충하며, 열을 내리는 것에 사용되어 왔다. 본 연구에서는 RBL-2H3 세포에서 비만세포 탈과립과 TNF- α , IL-4, histidine decarboxylase (HDC) 발현에 미치는 석곡 열수추출물(DME)의 효과를 조사하였다. DME는 PMA와 Calcium ionophore 병행처리(PMACI)에 의해 유도되는 β -hexosaminidase 분비와 TNF- α , IL-4, HDC 발현을 현저히 억제하였다. 또한 PMACI에 의해 유도되는 NF- κ B, AP-1 활성화와 p38 kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)과 c-Jun N-terminal kinase (JNK)의 인산화가 DME 전처리에 의해 저해되었다. 이러한 결과들은 DME가 비만세포 탈과립을 억제하고, MAPKs/NF- κ B/AP-1 신호전달 경로를 통해 TNF- α , IL-4, HDC 발현을 억제한다는 것을 시사한다. 본 연구결과들로 보아 DME는 과민반응과 염증성 질환을 치료하는 약물로 개발될 가능성을 가지는 것으로 사료된다.