

# 마우스에서 황금 유래 Wogonin의 Th1과 Th2 사이토카인 조절 효과

김용준 · 이정치 · 김홍용 · 설광화<sup>1</sup> · 윤용갑<sup>2</sup> · 장선일\*

서경대학 피부미용과, 1: 중국 연변대학교 의과대학 일반외과, 2: 원광대학교 한의과대학 방제학교실

## Immunosuppressive Activity of Wogonin from *Scutellaria Radix* on DNFB-induced Delayed Type Hypersensitivity in Mice

Young Jun Kim, Jeong Chi Lee, Hong Yong Kim, Guanghua Xie<sup>1</sup>, Yong Gab Yun<sup>2</sup>, Seon Il Jang\*

Department of Skin & Beauty, Seojeong College.

1: Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Yanbian University College of Medicine, Yanji 133000, China.

2: Department of Oriental medical prescription, Wonkwang University

In the present study, wogonin, a major flavone isolated from *Scutellaria Radix* were examined for its immunosuppressive activity on the 2,4-dinitro-fluorobenzene (DNFB)-induced delayed type hypersensitivity (DTH) in C3H/HeN mice. This compound inhibited selectively TNF- $\alpha$  and IL-4, but not IL-6, IL-10 and IFN- $\gamma$  on DNFB-induced Th1 and Th2 cytokines in a concentration-dependent manner. Interestingly, this compound increased the expression of heme oxygenase-1 (HO-1) in a concentration-dependent manner. The above results reveal that wogonin possesses anti-inflammatory, humoral and cellular immunomodulatory, and stress reducing activities on the DNFB-induced DTH in mice and these properties may contribute to the anti-atopic dermatitis activity of *Scutellaria Radix*.

Key words : *Scutellaria Radix*, wogonin, DTH, Th1, Th2, HO-1

### 서 론

인간을 비롯한 포유동물은 외부뿐만 아니라 내부의 이물질과 항상 접촉하는 환경에서 살아가고 있다. 이물질이 생체와 접촉하면, 생체는 이물질을 제거하기 위해서 각종 면역세포가 상호 작용하여 면역반응을 일으킨다. 이러한 이물질을 항원이라 하는데, 그 예로 미생물(microbes), 진드기(dust), 화분(pollens), 약물(drugs), 화학물질(chemicals)과 임상에 이용되는 혈액산물(blood products) 등을 들 수 있다. 외부 항원과 접촉되면 생체는 면역 과민반응으로 인한 고열뿐만 아니라 피부의 가려움증을 동반한 피부질환과 같은 증상을 유발한다<sup>1-3</sup>). 과민 반응은 항원과 항체가 상호 반응하는 체액성 면역반응과 세포가 관여하는 세포매개성 반응으로 나타나는데<sup>3</sup>), 그 결과는 조직손상을 야기한다. 조직손

상을 야기하는 주 원인은 면역세포가 생산하는 염증성 cytokine 이라 하는데, 특히 CD4<sup>+</sup> T 세포의 활성화로 인한 지연형 과민반응(delayed-type hypersensitivity, DTH) 때문이다<sup>1,2,4</sup>).

분화된 CD4<sup>+</sup> Th 세포는 Th1과 Th2 세포 아형(subset)으로 구분되는데, 이들은 항원 자극에 따라 서로 다른 cytokine을 생산한다<sup>5-7</sup>). Th1 세포에서 생성되는 cytokine은 IL-6, IFN- $\gamma$ 과 TNF- $\alpha$  등이 있고, 이들은 면역반응을 향상시키는 역할을 한다<sup>6-10</sup>). 그러나 Th2 세포에서 형성되는 대표적인 cytokine은 IL-4, IL-10과 IL-13 등이 있는데, 이들의 과다 생성은 아토피성 피부질환(atopic dermatitis, AD)의 발병 원인으로 알려져 있다<sup>6</sup>). IL-10과 IL-13은 IgE와 IgG 생성에 관여하는 cytokine이지만, 대식세포 활성을 억제하여 염증성 질환을 완화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에 이들 cytokine을 조절하는 약물을 발굴하는 것은 AD의 개선 및 치료에 매우 중요<sup>6,8,10</sup>)할 뿐만 아니라 그 기전을 규명하기 위해서는 여러 가지 면역반응을 야기하여 약물의 효능을 검증하는 일도 중요하다. 더욱이 DTH와 같은 면

\* 교신저자 : 장선일. 경기도 양주시 은현면 용암리 681-1, 서경대학  
· E-mail : sonjjang@seojeong.ac.kr, · Tel : 031-860-5085  
· 접수 : 2005/05/26 · 수정 : 2005/06/28 · 채택 : 2005/07/28

역반응을 유도하여 약물의 효능 및 그 기전을 규명하는 일도 선행되어야 할 것이다.

한편 황금(*Scutellaria Radix*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 속썩은풀(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 주피를 제거한 뿌리를 건조한 것으로, 주성분으로는 baicalin, baicalein 및 wogonin 등 약 40여 종의 flavone 및 관련 화합물이 보고되었다<sup>11)</sup>. 황금의 약리작용은 담즙배설촉진작용<sup>12)</sup>, 항염증작용<sup>13-15)</sup>, 항알러지작용<sup>11)</sup> 등이 알려졌다. 그러나 마우스에서 DTH를 야기하여 황금 유래 단일 화합물의 효능 및 기전 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구는 AD의 개선 및 치료제를 발굴하기 위해 시행된 전 연구 결과<sup>16)</sup>에서 황금 유래 물질의 효능을 밝힌 단일 화합물 중 wogonin(Fig. 1)을 대상으로 DTH 반응에 미치는 효과를 검증한 바 흥미로운 결과를 얻었기에 그 결과를 보고하고자 한다.

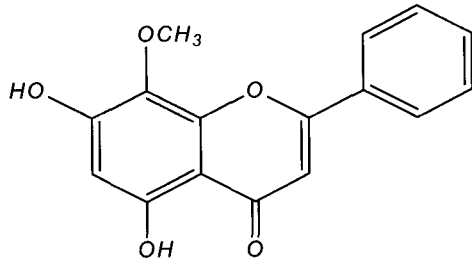


Fig. 1. Chemical structure of wogonin from *S. baicalensis*.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

DMEM과 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco/BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO), Hemin, 2,4-Dinitrofluoro benzen(DNFB)과 Trypan blue는 Sigma Chemical(St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다. Olive oil은 Aromaplus(France)사에서 구입하였다. HO-1 assay kit는 Takara(Japan)사로부터 구입했다. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 및 IL-10 assay kit는 R&D Systems(Minneapolis, USA)사로부터 구입했다. 모든 용매는 분석 등급으로 Sigma와 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. Wogonin은 김 등<sup>16)</sup>의 방법에 구조를 규명하고 사용하였다.

### 2. 실험동물

7주령의 C3H/HeN 마우스 60마리 (다물사이언스, 대전)를 구입하여 6일간 스트레스를 해소한 다음 8주령의 마우스를 실험에 사용하였다. 마우스의 유지는 무균 및 항온, 항습이 유지되는 사육장 (엠제이디, 서울)에서 유지하고 무균 물과 사료를 충분히 공급하면서 실험했다.

### 3. 귀 부종 측정

C3H/HeN 마우스의 복부를 제모한 다음 0.5%의 DNFB (아세톤 : 올리브 오일 = 4 : 1 용액으로 희석하여 사용함)를 복부에 주사함으로써 감작(sensitization) 시켰다. 5일후 0.2% DNFB와 wogonin을 오른쪽 귀에 도포하여 일주일 동안 야기(challenge)

하였다. HO-1의 효능을 검증하기 위하여 1일전에 wogonin을 복부에 주사하고 귀에 일주일동안 도포하였다. 각 실험군에서 귀 부종(ear swelling)과 형태를 측정하고 관찰하였다. 귀 두께는 dial thickness gauge (Model 7326, Tokyo, Japan)를 이용하여 DNFB 야기 전과 후에 각각 측정하여 귀 부종을 산출하였다. 그 과정은 Fig. 2와 같다.

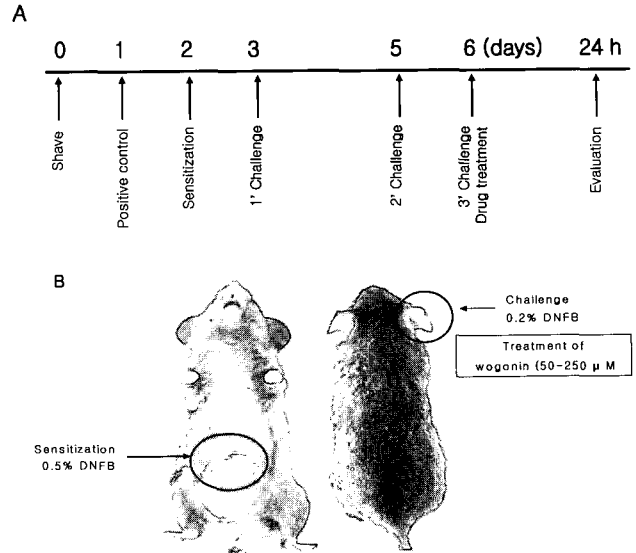


Fig. 2. Ear edema experimental protocol in C3H/HeN mice. A = Time schedule, B = methods in sensitization, challenge and drug treatment.

### 4. Cytokine 측정

DNFB로 활성화된 마우스에서 cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10)의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스 혈청으로부터 각 cytokine assay kit(R&D System Inc., Minneapolis, USA)를 이용하여 ELISA법으로 정량하였다.

### 5. Western Blot 실험방법

조직추출액은 각 조직을 20 mM Tris-HCl 완충용액(0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mg/ml pepstain A, 1 mg/ml chymostatin)에 주입하고 Polytron Homogenizer (German)로 마쇄한 후 세 번의 freezing-thawing cycle로 파쇄하였다. 세포질 용액은 4 $^{\circ}$ C 에서 13,000 g로 20분간 원심 분리 한 후 상층액으로부터 얻었다. 세포질 용액(40 mg 단백질)을 8% SDS-PAGE에서 전기영동하고, 단백질을 nitrocellulose membrane 으로 transfer하였다. Membrane을 5% skim milk를 함유한 PBS-Tween으로 세척하고, HO-1 항체로 1시간 동안 hybridization 하고 3회 세척하였다. Membrane을 horseradish peroxidase로 conjugated된 anti-mouse IgG로 다시 1시간 동안 상온에서 hybridization하였다. Membrane을 PBS-Tween으로 4회 세척한 후 chemiluminescence 시약(ECL)으로 반응시킨 후 X-ray film으로 감광시켜 특정 유전자의 단백질 band를 가시화하였다.

### 6. 통계 분석

각각의 실험들은 실험군당 5마리를 사용하여 반복 실험하였

고, 결과는 평균값으로 표현했다.

### 결과 및 고찰

마우스에서 DTH 반응은 DNFB로 sensitization과 challenge를 통해서 유발할 수 있다<sup>3)</sup>. 이러한 DTH 반응은 세포매개 면역과 비슷한 면역학적 과정을 동반하는데, 대식세포(macrophage)로부터 생산된 IL-12와 IL-18 등 cytokine에 의해 naive T세포는 CD4<sup>+</sup> Th1세포로 분화되며, Th1 세포와 자연살해세포(natural killer cell)에 의해서 생산된 interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )는 대식세포의 활성을 촉진시키는 것으로 알려졌다<sup>17-20)</sup>. 그러므로 DTH 반응은 Th1과 Th2 cytokine의 생성 연구에 중요한 모델로 알려졌다. 따라서 본 연구는 황금 유래 flavonoid 계열 화합물 중 wogonin을 대상으로 C3H/HeN 마우스의 DTH 반응, Th1과 Th2 cytokine의 변화 및 HO-1의 발현에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 그 결과 Table 1과 Fig. 3과 같이 wogonin은 농도 의존적으로 C3H/HeN 마우스의 귀 부종을 현저히 억제시켰다. 특히, 250  $\mu$ M에서는 귀 부종 억제 효과가 63.5%로 나타나 DTH 반응을 억제시키는 우수한 효과가 있었다. 이러한 결과는 DTH로 유발된 Th1과 Th2 cytokine의 생성에 wogonin이 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

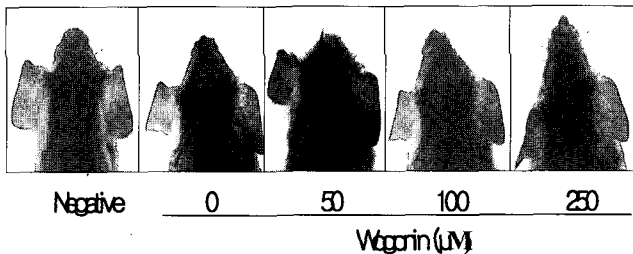


Fig. 3. The morphological finding for inhibitory effects of wogonin in C3H/HeN mouse ear edema. Evaluation of ear thickness were determined as described in materials and methods.

Table 1. Inhibitory effects of wogonin in C3H/HeN mouse ear edema

Wogonin concentration ( $\mu$ M)	Ear thickness (mm)		Inhibition (%)
	Right	Left	
Negative Contl.	22	21	-
0	46	22	0
50	36	21	35.5
100	32	21	51.7
250	29	21	63.5

Evaluation of ear thickness were determined as described in materials and methods. Each value represents the mean from 5 mice.

DNFB로 야기된 DTH 반응에 있어 Th1과 Th2 cytokine 생성에 미치는 wogonin의 효과를 조사한 결과, Table 2와 같이 Th1 cytokine 중 IFN- $\gamma$ 와 IL-6의 현저한 억제 효과는 없었지만, TNF- $\alpha$ 의 경우 현저한 억제 효과가 있는 매우 흥미로운 결과를 얻었다. TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 염증반응을 유도하는 pro-inflammatory cytokine으로 알려졌다<sup>6)</sup>. 특히 TNF- $\alpha$ 는 초기 염증반응을 유도하

는 중요한 cytokine으로 이 cytokine을 억제시킬 수 있는 약물의 발굴은 AD를 비롯한 피부염증 질환의 치료에 중요하다. 최근에 IFN- $\gamma$ 는 AD 치료에 활용되고 있는데, wogonin은 IFN- $\gamma$ 의 생성 억제에 미치는 효과가 없어 선택적으로 염증반응을 제어할 수 있는 물질임을 알 수 있었다.

Th2 cytokine에 속하는 IL-4는 IgE의 생성을 촉진시켜 AD를 유발하는 체액성 면역반응에 매우 중요한 역할을 한다고 알려진 바<sup>6-8)</sup> wogonin이 IL-4 생성에 미치는 영향을 조사하였다(Table 2). 그 결과 wogonin의 농도가 증가할수록 IL-4의 생성억제에 우수한 효과가 있음을 알 수 있었다. 반면, IL-10은 면역반응을 제어할 수 있는 cytokine으로 알려져 있는데, wogonin은 IFN- $\gamma$ 와 같이 IL-10의 생성에 큰 영향을 미치지 못한 결과로 볼 때 선택적으로 Th1과 Th2 cytokine의 생성을 조절할 수 있는 면역생리 활성물질임을 확인할 수 있었다.

Table 2. Inhibitory effects of Th1 and Th2 cytokines in C3H/HeN mouse serum

Wogonin concentration ( $\mu$ M)	Th1 cytokines (ng/ml)			Th2 cytokines (ng/ml)	
	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-4	IL-10
0	125	118	178	125	8.8
50	10.8	9.3	16.8	10.5	7.9
100	9.3	8.4	15.5	6.8	6.6
250	9.0	6.4	13.6	5.9	6.0

Cytokine assay were determined as described in materials and methods. Each value represents the mean from 5 mice.

한편 heme-oxygenase (HO)는 산화 스트레스(oxidative stress)로부터 내피세포(endothelial cell)를 보호하는 생체 보호 효소로 알려졌다<sup>21)</sup>. HO는 크게 HO-1과 HO-2로 구분되는데, 이들은 heme을 붕괴시키는 역할을 한다<sup>22,23)</sup>. HO-2는 생체에 일정한 양을 유지하고 있으나, HO-1은 여러 가지 약물에 의해 유도되는 inducible enzyme으로 알려졌다<sup>20)</sup>. HO-1은 heme을 분해하여 biliverdin을 생성하는 가수분해 효소의 일종으로, HO-1에 의해 생성된 biliverdin은 TNF- $\alpha$ 와 angiotensin II와 같은 유해물질로부터 혈관 내피세포를 보호해주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>22,23)</sup>. 매우 낮은 농도에서도 biliverdin은 반응산소 중간물질(reactive oxygen species, ROS)과 세포 손상을 제거해주는 항산화 및 세포보호역할을 하는 중요 분자로 알려졌다<sup>24)</sup>. 따라서 본 연구는 DTH 반응에서 야기되는 조직 손상과 염증반응 유도(Fig. 3)에 중요한 역할을 하는 TNF- $\alpha$ 와 같은 pro-inflammatory cytokine을 억제하는데 있어, wogonin의 작용기전을 알아보기 위하여 HO-1의 발현을 조사하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 wogonin의 농도가 증가할수록 HO-1의 발현은 크게 증가하였다. 따라서 wogonin은 면역반응으로 야기되는 조직손상의 보호와 염증반응을 억제하는 면역생리 활성 물질임을 확인하였고, 그 기전은 TNF- $\alpha$ 와 IL-4와 같은 cytokine들을 선택적으로 억제하여 염증반응을 제어하고, HO-1의 발현을 유도함으로써 조직손상을 보호하는 효과가 있음을 규명하였다.

최근 황금 유래 wogonin은 항염증 효과가 매우 좋은 것으로 알려졌다는데, 그 기전은 케모카인과 결합함으로써 염증성사이토

카인의 생성능을 억제시키는 것으로 보고되었다<sup>11-15)</sup>. 또한 baicalin, baicalein 등 flavonoid 성분은 염증 매개물질로 잘 알려진 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)를 효과적으로 억제시키는 효과가 있는 것으로 보고되어<sup>25)</sup>, 황금 유래 flavonoid 성분은 염증성 면역질환에 활용될 수 있음을 시사하고 있다.

이상의 결과를 종합하면, 황금유래 wogonin은 Th2뿐만 아니라 Th1 cytokine을 선택적으로 조절할 수 있는 면역조절자로서의 효능과 HO-1 유도물질을 유도할 수 있는 면역생리 활성물질로 향후 AD의 개선 및 치료에 활용될 수 있는 천연약제라 사료된다.

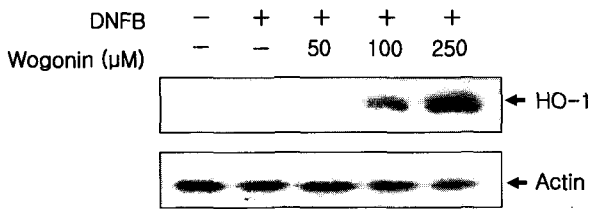


Fig. 4. Effects of wogonin on HO-1 mRNA expression in C3H/HeN mouse. Mice were administrated with or without wogonin at indicated concentrations and then taken ear tissues. Each tissue was homogenized using polytron homogenizer. HO-1 mRNA expression was carried out as described in materials and methods.

## 결론

본 연구는 C3H/HeN 마우스에서 2,4-dinitro-fluorobenzene (DNFB)로 delayed type hypersensitivity(DTH) 반응을 유도하여 wogonin의 효능과 기전을 연구하였다. Wogonin은 농도 의존적으로 DNFB가 유도하는 Th1과 Th2 cytokine들 중 IL-6, IL-10과 IFN- $\gamma$ 가 아닌 TNF- $\alpha$ 와 IL-4를 선택적으로 억제하는 효과를 나타내었다. 흥미롭게도 wogonin은 농도가 증가할수록 HO-1 mRNA 발현을 증가시키는 놀라운 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 황금 유래 flavonoid 계열인 wogonin이 항염증 효과, 체액성 및 세포 매개성 면역반응을 조절하는 동시에 스트레스를 감소시키는 활성을 가지고 있음을 시사한다. 이러한 wogonin의 효능은 황금(*Scutellaria Radix*)이 아토피성 피부질환의 개선 및 치료에 도움을 줄 수 있을 것이라 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 “2004년도 한국학술진흥재단의 지원”에 의하여 연구되었다(KRF-2004- 003-E00303).

## 참고문헌

- Cotran, R.S., Kumar, V. and Collins, T. Diseases of Immunity. In: Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. editors. Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia: Saunders. p 188-259, 1999.
- Galli, S.J. and Lantz, C.S. Allergy. In: Paul, W.E. editor.

- Fundamental immunology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. p 1127-1174, 1999.
- Kobayashi, K., Kaneda, K. and Kasama, T. Immunopathogenesis of Delayed-Type Hypersensitivity. Microsc Res Tech. 53(4):241-245, 2001.
- Majno, G. and Joris, I. Hypersensitivity reactions. In: Cells, tissues, and diseases. The principles of general pathology. Cambridge: Blackwell Science. p 509-556, 1996.
- Mosmann, T.R. and Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today 17:138-146, 1996.
- Maggi, E. The Th1/Th2 paradigm in allergy. Immunotech. 3(4):233-244, 1998.
- Walker, C. and Zuany-Amorim, C. New trends in immunotherapy to prevent atopic diseases. Trends Pharmacol Sci. 22(2):84-90, 2001.
- Griffin, C.E. and Hillier, A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. Vet Immunol Immunopathol. 81(3-4):363-383, 2001.
- Ring, J., Kramer, U. Schafer, T. and Behrendt, H. Why are allergies increasing? Curr Opin Immunol. 13(6):701-708, 2001.
- Curotto, de, Lafaille, M.A. and Lafaille, J.J. The role of regulatory T cells in allergy. Springer Semin Immunopathol. 25(3-4):295-310, 2004.
- Tang, W. and Eisenbrand, G. Chinese Drugs of plant origin. Springer-Verg. 919-929, 1992.
- Abe, K., Inoue, O. and Yumioka, E. Biliary excretion of metabolites of baicalin and baicalein in rats. Chem Pharm Bull (Tokyo). 38(1):209-211, 1990.
- Li, B.Q., Fu, T., Gong, W.H., Dunlop, N., Kung, H., Yan, Y., Kang, J. and Wang, J.M. The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. Immunopharm. 49(3):295-306, 2000.
- Krakauer, T., Li, B.Q. and Young, H.A. The flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines. FEBS Lett. 500(1-2):52-55, 2001.
- Chen, Y.C., Shen, S.C., Chen, L.G., Lee, T.J. and Yang, L.L. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. Biochem Pharmacol. 61(11):1417-1427, 2001.
- 김용준, 이정치, 김홍용, 설광화, 윤용갑, 장선일. CD4+ Jurkat T 세포주에서 Th1과 Th2 사이토카인 조절에 미치는 황금 유래 baicalin, baicalein 및 wogonin의 효과. 동의생리병리학회지, 2005.
- Romagnani, P., Annunziato, F., Piccinni, M.P., Maggi, E. and Romagnani, S. Cytokines and chemokines in T

- lymphopoiesis and T-cell effector function. *Immunol. Today*. 21:416-418, 2000.
18. Sullivan, L., Sano, S., Pirmez, C., Salgame, P., Mueller, C., Hofman, F., Uyemura, K., Rea, T.H., Bloom, B.R. and Modlin, R.L. Expression of adhesion molecules in leprosy lesions. *Infect. Immun.* 59:4154-4160, 1991.
  19. Power, C., Kobayashi, K., Nishimura, T. and Yoshida, T. CD11/CD18 and ICAM-1 expression in a murine foreign body granulomatous lung model. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 73:321-329, 1994.
  20. Bevilacqua M.P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11:767-804, 1993.
  21. Abraham, N.G., Drummond, G.S., Lutton, J.D. and Kappas, A. The biological significance and physiological role of heme oxygenase. *Cell. Physiol. Biochem.* 6:129-168, 1996.
  22. Cruse, I. and Maines, M.D. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J. Biol. Chem.* 263:3348-3353, 1988.
  23. Dennery, P.A., Spitz, D.R., Yang, G., Tatarov, A., Lee, C.S., Shegog, M.L. and Poss, K.D. Oxygen toxicity and iron accumulation in the lungs of mice lacking heme oxygenase-2. *J. Clin. Invest.* 101:1001-1011, 1998.
  24. Abraham N.G. and Kappas A. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic Biol Med.* 39(1):1-25, 2005.
  25. Kim, Y.J., Yang, J.S. and Jang, I.S. Antiinflammatory effects of baicalin, bacalein, and wogonin isolated from *Scutellaria Radix*, on Lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 macrophages. *The Korean Association of Immunologists. Poster NO. P-63*, 2004.