

수용성 금은화 추출물이 Trimellitic Anhydride 유도 마우스 접촉성 과민반응에 미치는 영향

이정노^{#1}, 정승일², 장선일^{*3}

1: 한국폴리텍바이오대학 바이오품질관리과, 2: 전주생물소재연구소,
3: 전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부

Effects of Aqueous Extract from *Lonicera Japonica* Flower on Trimellitic Anhydride-induced Contact Hypersensitivity in BALB/c Mice

Jungno Lee^{#1} Seung-Il Jeong², Seon Il Jang^{*3}

1: Dept. of Bio Quality Control, Korea Bio Polytechnic, 2: Jeonju Biomaterials Institute,
3: School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeonju University

ABSTRACT

Objectives : Trimellitic anhydride (TMA), a sensitizer that induces occupational asthma and atopic dermatitis, is widely used industrially to make epoxy and alkyd resins, plasticizers, high temperature polymer, and surfactants. The aim of this study was to investigate the effects of aqueous extracts of *Lonicera japonica* Flower(LJFAE) on TMA-induced contact hypersensitivity (CHS) in Balb/c mice.

Methods : The dried flowers of *L. japonica* were extracted with distilled water at 100°C for 7 h. The extract was freeze-dried following filtration through 0.45 µm filter. Mice were orally administrated with or without LJFE of a different doses(25-100 mg/kg) for 28 days. In the challenge period, mice were externally applied at difference doses of LJFAE one time per day 30 min before TMA treatment. We examined the effects of LJFAE on the the serum levels of IgE and prostaglandin E2 (PGE2), the Th1/Th2 cytokine production of spleen cells, ear swelling responses, and the leukocyte infiltration induced by TMA.

Results : The orally and externally administration of LJFAE dose-dependently reduced the serum levels of IgE and PGE2 production as well as ear swelling responses and leukocyte infiltration in TMA-induced Balb/c mice. Furthermore, the levels of Th1 (TNF-α, IFN-γ, IL-2)/Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) cytokine production from spleen cells stimulated with anti-CD3 and CD28 mAbs was markedly suppressed by the orally and externally treatment with LJFAE in a concentration dependent manner.

Conclusions : These results suggest that LJFAE suppresses the inflammatory mediators and regulates the Th1/Th2 cytokines. Therefore, these properties may contribute to the strong anti-CHS response effect of LJFAE.

* 교신저자 : 장선일, 전북 전주시 완산구 효자동 3가 전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부
· Tel : 063-220-3124 · E-mail : sonjjang@jj.ac.kr
제1저자 : 이정노, 충남 논산시 강경읍 채운리 315-1 한국폴리텍바이오대학 바이오품질관리과
· Tel : 041-746-7312 · E-mail : jungno2@naver.com
· 접수 : 2008년 5월 10일 · 수정 : 2008년 6월 17일 · 채택 : 2008년 6월 20일

Key words : *Lonicera japonica* Flower, IgE, Trimellitic anhydride, Th1/Th2 cytokines, Prostaglandin E2, Leukocytes, Contact hypersensitivity, Ear swelling responses

서론

접촉성 과민반응(contact hypersensitivity (CHS) response)은 T 림프구가 매개하는 제4형 과민반응으로 환경에 있는 다양한 항원(antigen)들에 의해 유발될 수 있는데, 즉시형 과민반응과는 달리 그 속도가 느리게 일어난다는 특징이 있다.^{1,2)} CHS는 주로 금속 또는 유기용매와 같은 물질에 의한 합텐(hapten)에 의해 흥반, 면역세포 침윤 및 접촉성 피부염으로 발전되는데, Th1과 Th2 세포가 매개하는 사이토카인의 작용에 의해 일련의 염증반응이 유발 된다.³⁻⁵⁾

CHS 반응에 대한 기전 및 임상연구에 활용되는 모델동물은 주로 마우스인데, 유기용매와 같은 환경성 화학 항원으로 감작(sensitization)과 공격(challenge)을 통해 CHS 반응 유발에 따른 약물의 기전 및 효능 평가를 할 수 있다. 이때 중요한 평가 생물지표로는 TNF- α , IL-4, 및 IFN- γ 등 과 같은 사이토카인의 생산 및 발현과 관련된 일련의 작용 기전에 초점을 두어 많은 연구들이 진행되어왔다.^{2,5)}

인간의 직업성 천식을 유발하는 감작제로 알려진 trimellitic anhydride (TMA)는 epoxy, alkyd 합성수지, 가소제(plasticizers), 고온중합체(high temperature polymer) 그리고 계면활성제(surfactants)를 제조하는데 일반적으로 활용되는 휘발성 유기용매제다.^{6,7)} TMA에 대한 특이 항체는 이물질에 노출된 노동자들에게서 발견되는데, TMA 유도 직업성 천식(asthma)은 IgE-매개 알레르기 기전에 의해 유발되는 것으로 알려졌다. 또한 TMA에 노출된 마우스는 높은 혈청내 IgE와 폐에 호산구의 침윤이 증가되는데,⁷⁾ IgE 항체는 비만세포(mast cell)와 호염구에서 Fc ϵ RI와 매우 강력한 결합에 의하여 알레르기성 질환을 유발하는 것으로 알려졌다. 이와 같이 일상적인 환경성 화학 항원에 의해 증가된 IgE는 기관지 천식(bronchial asthma), 알레르기성 고초열(allergic rhinitis)과 아토피 피부염(atopic dermatitis) 등 환경성 질환의 핵심적 지표로 알려졌다.⁸⁾ 마우스 모델 연구를 통하여 알레르기성 염증(allergic inflammation), 기도 과민반응(airway hypresponsiveness)과 CHS 반응 등의 기전연구가 진행되어 왔다.⁹⁻¹²⁾

한편 금은화(*Lonicera japonica* flower)는 오래전

부터 한국을 비롯한 동양에서 호흡기 감염증, 당뇨병, 관절염 치료와 독소에 대한 중화 및 해열제로 활용되어왔는데^{13,14)}, 최근 메탄올에 의한 금은화 추출물은 간손상에 대한 보호작용이 있고, 수용성 추출물은 간세포의 NF- κ B의 선택적 조절 능력이 있는 것으로 보고되었다.^{14,15)} 더욱이 금은화 유래 loniceroside A는 항염증작용과 항관절염작용이 있는 것으로 알려졌다.^{16,17)} 최근 저자들은 lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 RAW264.7 세포에서 수용성 금은화 추출물(LJFAE)을 이용하여 일산화질소(nitric oxide, NO)와 유도성 일산화질소 효소inducible NO synthase, iNOS), 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2, PGE2)와 cyclooxygenase-2(COX-2) 등 염증 매개물과 tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 등 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 억제효과를 보고한바 있다.¹⁸⁾

그러나 TMA로 유발한 CHS 반응 모델 마우스에서 LJFAE의 효능에 대한 연구는 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 Balb/c를 대상으로 TMA에 의해 유도된 귀의 부종, 귀 조직의 백혈구 침윤, 혈청내 IgE와 PGE2, 생산량 및 비장세포의 Th₁와 Th₂ 사이토카인 생산 등 CSH에 미치는 LJFAE의 효과를 경구 투여 및 외용도포를 동시에 수행하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

Trimellitic anhydride (TMA), acetone, NH₄Cl는 Sigma-Ardrich사(ST Louis, MO)로부터 구입하였다. RPMI 1640, streptomycin/penicillin, glutamine, 우태아혈청(FBS)은 Gibco/BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-13와 PGE2 immunoassay kits는 R&D사(Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. 96 well immuno plate는 Nunc사(Denmark)로부터 구입하였고, Rat anti-mouse IgE mAb, biotin-conjugated monoclonal rat anti-mouse IgE mAb, rat anti-mouse IgG mAb, anti-mouse CD3 mAb와 anti-mouse CD28 mAb는 PharMingen사(San Diego, CA, USA)로부터 구입하

였으며, aluminium hydroxide (Sigma-Aldrich)로부터 구입하였다. 올리브오일은 Organically Crown & Processed 사(Australia)로부터 구입하였고, 제모제는 Oxy Reckitt Benckiser사(서울)로부터 구입하였다.

2. 금은화 수용성 추출물(LJFAE)의 제조

잘 건조된 금은화(*L. japonica* flower) 125g을 1,000 ml의 증류수가 들어 있는 대용약탕기(DWP-1800T)에 주입하고 100°C에서 7시간 동안 가열한 후 추출물을 얻었다. 추출물은 3,000 rpm으로 10분간 원심시켜 상층액만 주의 깊게 취하여 0.45 µm 필터로 여과한 후 -70°C에서 동결 건조하여 15 g를 얻은 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. 동물사육

7주령의 암컷 Balb/c계 마우스는 중앙동물실험실(서울)사로부터 구입하였다. 마우스는 1주일간 스트레스를 해소하기 위해 1주일간 낮과 밤의 주기를 12시간씩 고정하여 사료(중앙동물실험실)와 멸균 물을 공급하면서 사육한 후 실험동물위원회의 실험 규정에 준하여 실험에 사용하였다.

4. CHS 반응 유도

마우스의 등쪽 털을 안가용 가위로 주의 깊게 자른 뒤 제모크림을 바르고 25°C 물을 이용하여 털을 제거한 후 아세톤과 올리브 오일(4 : 1) 500 mg/ml TMA를 용액을 제조하고 감각일에 Lauerma 등¹⁹⁾의 방법에 따라 Fig. 1과 같은 프로그램에 의하여 왼쪽 귀에 25 µl TMA(500 mg/ml)를 바르고 7일 후에 25 µl TMA(250 mg/ml)를 2차 감각시켰다. 그 후 14일, 21일과 28일 등 3차례 왼쪽귀에 25 µl TMA(100 mg/ml)로 공격하였고, 오른쪽 귀에는 단지 아세톤과 올리브오일 용액을 발라주었다.

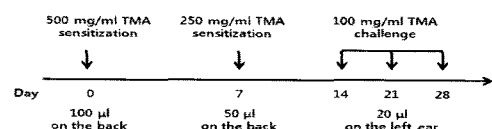


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental protocol.

Mice were sensitization on saved back skin with 100 µl of 500 mg TMA on day 0 and 50 µl of 250 mg TMA in olive oil on day 7. On days 14, 21, and 28, left ears were challenged with 20 µl of 100 mg TMA and right ears were applied with 20 µl of olive oil.

5. 약물의 처리

스트레스가 해소된 8주령의 Balb/c계 마우스를 5 마리씩 분주하여 TMA로 감각하기 1시간 전부터 대조군과 실험군은 각각 생리식염수와 약물(25-100 mg/kg)을 하루에 1회씩 경구투여하였고, 올리브오일과 이멀시파인웍스(아산케미컬) 및 여러 가지 농도의 약물이 함유된 크림을 제조하여 공격 30분 전에 하루에 1회씩 귀에 도포하였다. 이때 대조군은 약물이 함유되지 않은 크림베이스만 도포하였다.

6. 귀 부종의 측정

마우스 귀 부종의 측정은 마지막 TMA를 왼쪽 귀에 공격직전과 공격한 다음 8시간 후에 디지털 두께 측정기(Model 7326, Japan)로 측정하였다. 귀 두께는 10⁻⁴ 인치로 표현하였으며, 귀 부종 반응(ear swelling response, ERS)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{ERS} = \text{TMA 공격 후 귀의 두께} - \text{TMA 공격직 전 귀의 두께}$$

7. 혈청의 IgE와 PGE₂의 측정

혈청내 IgE의 정량은 ELISA법으로 측정하였다. Nunc high binding plate는 코팅완충액(0.1 M NaHCO₃, pH 8.2)에 rSj26을 5 µg/ml의 농도로 희석한 후 4°C에서 24시간 방치한 다음 3회 세척하고 3% (wt/vol) BSA-PBS를 주입하고 2시간 동안 블로킹하였다. 혈청은 IgE를 측정하기 위해서 1:10으로 희석하였다. 혈청과 항원은 4°C 상태에서 12시간 이상 방치한 후 0.05% gelatin 용액에 biotin-conjugated monoclonal rat anti-mouse IgE mAb을 주입하고 실온에서 1시간 동안 방치했다. PGE₂량은 각 immunoassay kit에 제시된 R&D사의 방법에 준하여 수행하였으며, IgE와 PGE₂ 발색은 avidin-alkaline phosphatase (1:1,000)를 주입하고 실온에서 1시간 동안 반응 시킨 다음 6회 세척하여 phosphatase 기질인 p-nitrophenylphosphate, disodium을 첨가하고 발색시켜 405 nm에서 microplate reader(Molecular Devices)로 흡광도를 측정하였다.

8. 비장세포 배양 및 사이토카인 측정

비장세포는 실험종료 후 즉시 마우스를 후경골탈추 방법에 의하여 희생시키고 마우스의 비장으로부터 얻었다. 단일 세포 부유액은 Ficoll 밀도 원심분리를

통하여 얻은 후 RPMI1640 배양액으로 2회 원심 세척 후 적혈구를 제거하기 위해서 0.83% NH₄Cl(pH 7.5)에 37°C에서 10분동안 방치한 다음 다시 배양액으로 3회 세척했다. 그 후 streptomycin (100 μg/mL), penicillin(100 U/mL), glutamine (5 mM)과 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지에 부유시키고 24 well 배양용기에 well 당 5×10⁶ 세포의 농도로 접종하고 3시간 후에 anti-CD3 mAb (2 μg/ml)와 anti-CD28 mAb(1 μg/ml)로 자극하고 48시간 동안 37°C CO₂ 배양기(95대기/5%CO₂)에서 배양한 다음 세포 상층액을 얻고 -70°C에서 보관하면서 사이토카인 측정에 사용하였다. 상층액으로부터 TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5 및 IL-13의 immunoassay는 R&D 사가 제시한 ELISA 방법에 의하여 측정하였다.

9. 조직학적 실험

조직학적 실험은 마지막 공격을 다음 72시간 후에 마우스를 희생시키고, 오른쪽과 왼쪽귀를 자르고 10% 중성 포르말린 완충액(pH 7.4)에 고정한 후 일련의 탈수과정을 거쳐 파라핀에 매몰시킨 후 마이크로톰(SM 2000R, Leica, Germany)을 이용하여 4 μm 로 잘라 조직표본을 제작하였다. 그 후 Wighr Giemsa 염색을 하여 다형핵백혈구²⁰⁾의 침윤정도를 평가하였으며, Congo red 용액을 이용하여 호산구의 침윤을 현미경 시야에서 관찰하여 세포수를 계산하여 약물을 평가하였다²¹⁾.

10. 통계처리

모든 실험 값은 평균±표준오차로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 한계는 p<0.05로 정하였다.

결 과

1. 귀 부종 반응에 미치는 LJFAE의 억제 효과

스트레스가 해소된 8주령의 Balb/c계 마우스에 TMA로 감작하기전 1시간 전에 LJFAE를 하루에 1회씩 28일간 농도별(25-100 mg/kg)로 경구투여하였고, 첫 번째부터 마지막 TMA 공격전 30분에 하루에 1회씩 귀에 도포하여 LJFE의 효과를 조사하였다. 그 결과 TMA가 처리된 양성 대조군은 귀의 부종이

Chai 등²²⁾의 결과와 같이 매우 심하게 유발되었으나, LJFAE을 투여한 실험군에서는 농도에 의존적으로 귀의 부종이 감소되었다(Fig. 2). 특히 50 mg/kg과 100 mg/kg LJFAE 투여군에서는 그 억제효과가 현저했다(p<0.01).

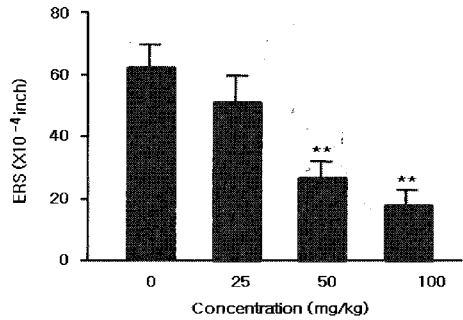


Fig. 2. Effects of LJFAE on ear swelling responses(ERS) following TMA challenges in the ears of Balb/c mice. Mice were orally administrated with or without LJFAE of a different doses(25-100mg/kg) for 28days.

In the challenge period, mice were externally applied at difference doses of LJFE one time per day 30 min before TMA treatment. ERS were analyzed as described in Materials and Methods. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice. *p<0.05 and **p<0.01 indicate significant differences with LJFAE untreated control group(TMA challenge alone).

2. 백혈구 침윤에 미치는 LJFAE의 효과

LJFAE과 TMA 마지막 공격 후 72시간에 귀 조직 표본을 제작하여 만들어 Wright Giemsa와 Congo red 염색을 하여 다형핵 백혈구(polymorphonuclear leukocytes, PMNLs)와 호산구(eosinophils, Eos)의

Table 1. The Number of Polymorphonuclear Leukocytes (PMNLs) and Eosinophils (Eos) Per Unit Area mm² on 72 h after 3 Repeated TMA Challenges in the Ears of Mice Treated with LJFAE

Extract Con. (mg/kg)		No. of PMNL.sa	No. of Eosb)
Vehicle	0	110.7± 28.7	56.8±11.3
	0	537.8±98.7	265.3±57.3
TMA	25	437.5±88.3	220.5±48.9
	50	250.3±78.1**	130.8±40.3**
	100	181.5±63.1**	109.1±31.9**

^{a)}The 4 μm thickness paraffin sections were stained with Wright Giemsa solution. ^{b)}The 4 μm thickness paraffin sections were stained with Congo red. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice. *p<0.05 and **p<0.01 indicate significant differences with LJFAE untreated control group(TMA challenge alone).

침윤에 미치는 금은화 추출물 투여 효과를 조사하였다(Table 1). 그 결과 약물과 TMA가 처리되지 않은 음성 대조군은 귀조직의 진피(dermis)층에 혈관이 확장되었고, 표피층(epidermis)에 다형핵백혈구와 호산구가 mm²당 각각 537.8±98.7개와 265.3±57.3개로 매우 높은 세포의 침윤이 관찰되었다. 그러나 LJFAE 투여군은 농도에 의존적으로 억제되었다. 특히 50 mg/kg 이상의 농도에서는 다형핵백혈구와 호산구가 현저히 억제되었다(p<0.01).

3. 혈청 IgE와 PGE₂의 생산에 미치는 추출물의 억제 효과

TMA 화학 항원의 감작과 공격에 의한 IgE와 PGE₂ 생산에 금은화 추출물의 효능을 조사하기 위하여 귀 부종 실험과 같이 LJFAE가 처리된 마우스의 귀 두께를 측정된 후 안구로부터 혈액을 얻어 4℃ 냉장상태에서 충분히 응고시킨 후 원심분리하여 혈청을 얻고 IgE와 PGE₂ 생산에 미치는 LJFAE의 효과를 조사하였다.

그 결과 Fig. 3과 같이 TMA으로 처리되지 않은 음성대조군의 경우 IgE는 거의 생산되지 않은 반면, TMA가 처리된 양성대조군에서는 현저히 증가되었다. 그러나 TMA와 LJFAE가 처리된 저농도(25 mg/kg)에서는 IgE량이 감소되지 않았지만, 50 mg/kg 처리군(p<0.05)과 100 mg/kg 처리군(p<0.01)에서는 현저히 감소되었다.

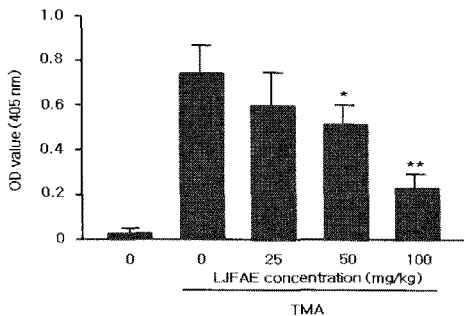


Fig. 3. Effects of LJFAE on IgE production following TMA challenges in the ears of Balb/c mice

Mice were orally administrated with or without LJFAE of a different doses(25-100 mg/kg) for 28 days. In the challenge period, mice were externally applied at difference doses of LJFAE one time per day 30 min before TMA treatment. Serum was collected at 4 weeks. IgE production was analysed using an ELISA assay. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice. *p<0.05 and **p<0.01 indicate significant differences with LJFAE untreated control group(TMA challenge alone).

한편 염증 매개물인 PGE₂의 생산에 미치는 LJFAE의 효과를 조사한 결과 Fig. 4와 같이 25 mg/kg 투여군에서도 유의하게 감소(p<0.05)되었을 뿐만 아니라 50 mg/kg 이상의 투여군에서는 현저히 감소되었다(p<0.01).

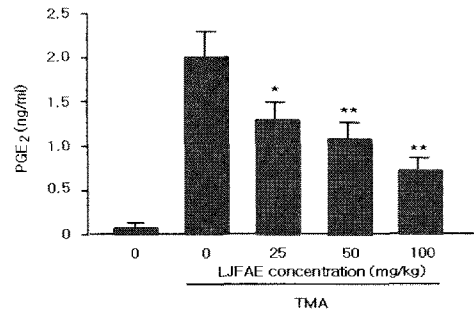


Fig. 4. Effects of LJFAE on PGE₂ production following TMA challenges in the ears of Balb/c mice

Mice were orally administrated with or without LJFE of a different doses(25-100 mg/kg) for 28 days. In the challenge period, mice were externally applied at difference doses of LJFAE one time per day 30 min before TMA treatment. Serum was collected at 4 weeks. PGE₂ production was analysed using an ELISA assay. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice. *p<0.05 and **p<0.01 indicate significant differences with LJFAE untreated control group(TMA challenge alone).

Table 2. Th1 and Th2 Cytokine Production from Spleen Cells of Balb/c Mice Treated with Extracts of LJFAE

Extract Con. (mg/kg)		Th1 cytokines (pg/ml)		Th2 cytokines (pg/ml)	
		IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-5
Vehicle	0	2.535±320	3.820±230	120.3±12.5	114.3±9.9
	0	2.980±211	4.115±370	250.5±20.3	267.1±31.4
TMA	25	2.120±230	3.410±735	180.5±19.1*	164.1±21.7*
	50	1.980±312*	2.930±227*	123.2±20.3**	131.5±18.9**
	100	1.567±259**	2.538±312**	68.7±10.4**	50.3±12.5**

Mice were orally administrated with or without LJFAE of a different doses(25-100 mg/kg) for 28 days. In the challenge period, mice were externally applied at difference doses one time per day 30 min before TMA treatment. Mice were sensitized and challenged by TMA as described in Materials and Methods. After the treatment, levels of Th1 and Th2 cytokine production from spleen cells were determined by culturing cells in vitro with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. Cytokines from cell soup were analysed using an ELISA assay. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice. *p<0.05 and **p<0.01 indicate significant differences with LJFAE untreated control group(TMA challenge alone).

4. 비장세포의 Th1과 Th2 사이토카인의 생성에 미치는 추출물의 효과

TMA 화학 항원의 감작과 공격에 의한 비장세포

의 Th1과 Th2 사이토카인의 생산에 미치는 LJFAE의 효과를 알아보기 위하여 LJFAE와 TMA가 처리된 마우스를 대상으로 비장세포를 분리한 후 anti-CD3 mAb와 anti-CD28 mAb로 동시에 자극한 다음 48시간 배양 후 사이토카인을 측정하였다.

그 결과 Table 2와 같이 TMA가 처리되지 않은 음성대조군에서는 Th1과 Th2 사이토카인이 거의 검출되지 않았지만, TMA를 처리한 양성대조군에서는 Th1 사이토카인(TFN- α , IFN- γ , IL-2)과 Th2 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13)의 경우 현저히 증가되었다. 그러나 LJFAE과 TMA가 처리된 경우 Table 2와 같이 LJFAE의 농도에 의존적으로 Th1과 Th2 사이토카인을 모두 억제시키는 효과가 있었다.

고찰

금은화(*L. japonica* flower)는 호흡기 감염증, 당뇨병, 관절염 치료와 독소에 대한 중화 및 해열제로 한국을 비롯한 동양에서 활용되어왔다^{13,14}. 금은화 추출물은 NF- κ B의 선택적 조절에 의한 간 손상에 대한 보호 작용이 있고, 또한 금은화 유래 loniceroside A는 항염증작용과 항관절염작용이 있는 것으로 알려졌다^{16,17}.

최근 저자들은 LPS로 자극된 RAW264.7 세포에서 금은화 수용성 추출물인 LJFAE가 iNOS와 COX-2 분자발현을 억제함으로써 NO와 PGE₂를 억제하는 기전을 밝혔을 뿐만 아니라 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등 전염증성 사이토카인의 억제효과를 보고한 바 있다¹⁸. 그러나 TMA로 유발한 CHS 모델 마우스에서 금은화 추출물의 효능에 대한 연구는 없는 실정으로 본 연구는 TMA 유도 CHS Balb/c 마우스를 대상으로 귀 부종, 혈청내 IgE와 PGE₂의 생산량과 anti-CD3과 anti-CD28 mAbs로 자극된 비장세포의 Th1과 Th2 사이토카인 생산량 그리고 조직내 백혈구 침윤에 대한 LJFAE의 효과를 조사한 결과 매우 흥미로운 결과를 얻었다.

휘발성 유기용매인 TMA에 노출되면 이 화합물에 대한 특이 항원이 생체에 검출되는데, TMA 유도 직업성 천식은 IgE 매개 알레르기 기전에 의해 유발되는 것으로 알려졌다. 또한 TMA로 감염된 마우스는 폐에 호산구의 침윤이 높게 일어나고⁷, IgE 항체는 비만세포(mast cell)와 호염구에서 Fc ϵ RI와 매우 강력한 결합에 의하여 알레르기성 질환을 유발하는 것으로 알려졌다. 이와 같이 TMA 화학 항원에 의해

증가된 IgE는 기관지 천식, 알레르기성 고초열과 아토피 피부염 등 환경성 질환의 핵심적 마커로 알려졌다^{11,23}.

본 연구는 Lauerma 등¹⁹의 방법에 따라 TMA를 이용하여 Balb/c 마우스를 대상으로 CHS를 유도하여 Chai 등²²의 자료와 비슷한 결과(Fig. 2)를 확인한 후 LJFAE의 투여한 결과 TMA 유도 귀의 부종이 LJFAE의 농도에 의존적으로 현저한 억제효과가 있음을 증명하였다. TMA를 반복적으로 피부에 노출시킨 결과 진피층의 혈관이 확장되어 있음을 확인하고, 표피층에 다형핵백혈구와 호산구의 침윤이 매우 높게 나타났음을 확인하였다. 그러나 LJFAE가 투여된 실험군에서는 진피의 혈관 확장이 줄어들었을 뿐만 아니라 표피층내 백혈구 침윤이 현저히 억제된 결과를 얻었다(Table 1). 피부의 조직학적 관찰은 인간에서 나타나는 지연형 CHS 반응의 진단에 핵심적 도구²⁴⁻²⁵일 뿐만 아니라 모델동물에서도 귀 부종에 원인인 호산구 및 호염구의 진피 및 표피층에 침윤되는 정도에 따라 귀의 부종의 정도를 확인하는데 필수적인 자료로 이용된다²⁶.

환경성 항원은 일반적으로 인체 및 모델 동물의 혈청내 IgE 항체량을 높이는 것으로 알려져 있는데, 증가된 IgE는 비만세포와 호염구에서 Fc ϵ RI와 매우 높은 결합을 통하여 기관지염, 알레르기성 고초열, 아토피성 피부염 등과 같은 환경성 알레르기성 질환을 유발 한다⁸⁻¹². 또한 PGE₂는 COX-2로부터 생산되는 염증 매개물인데, 본 연구의 결과 TMA에 의해 유도된 높은 혈청내 IgE와 PGE₂의 생산량 역시 LJFAE의 농도에 의존적으로 현저한 억제효과가 있음을 확인하였다(Fig. 3, 4). 이러한 결과는 LJFAE가 TMA와 같은 휘발성 유기용매에 노출되어 발생된 CHS 반응을 억제시키는 효과가 있음을 나타내 주었다.

CHS 반응은 T 림프구가 매개하는 제4형 과민반응으로 환경에 있는 다양한 항원들에 의해 유발될 수 있는 것으로 알려졌다¹². CHS는 TMA와 같은 유기용매에 의한 합텐(hapten)에 의해 흥반, 면역세포 침윤 및 접촉성 피부염으로 발전되는데, Th2 세포가 매개하는 사이토카인의 작용에 의해 일련의 염증반응이 동반 된다²⁷. 최근 Hopkins 등²⁷은 림프절 유래 세포에 TMA를 노출시킨 결과 Th1 사이토카인이 아닌 Th2 사이토카인을 선택적으로 증가시키는 결과를 얻고 TMA를 Th2 유도성 화학 항원으로 규정한 바 있다. 본 연구에서는 TMA에 노출된 마우스의 혈청이 아닌 비장세포를 anti-CD3와 anti-CD28 mAbs를 자극하여 Th1과 Th2 사이토카인을 조사해보았다. 그

결과 Table 1과 같이 Th1과 Th2 사이토카인을 모두 증가시켰다. 이와 같이 Hopkins 등²⁷⁾의 결과와 다른 Th1 사이토카인의 증가 이유는 TMA를 비장세포에 직접 노출시키지 않고, 마우스 생체에 TMA를 노출시킨 후 비장세포에 anti-CD3와 anti-CD28 mAbs를 동시에 자극했기 때문이라 사료된다.

한편 마우스 생체에 TMA를 노출시킨 후 비장세포에 anti-CD3와 anti-CD28 mAbs를 동시에 자극하여 유도된 Th1과 Th2 사이토카인 생산에 미치는 LJFAE의 효과를 알아본 결과 Table 2와 같이 LJFAE 농도가 증가 될수록 Th1과 Th2 사이토카인을 동시에 현저히 억제하는 효과가 있었음을 확인하였다. 앞으로 이러한 결과를 바탕으로 TMA에 노출되고 anti-CD3와 anti-CD28 mAbs에 의해 유도된 Th1과 Th2 사이토카인 생산 억제에 대한 LJFAE의 약물 기전을 더 조사해보아야 할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해볼 때 LJFAE는 TMA로 유도된 귀 부종과 혈청내 IgE와 PGE₂, 비장세포의 Th1과 Th2 생산 및 귀 조직내 진피층의 백혈구 침윤을 억제하는 효과가 있었다. 따라서 TMA와 같은 환경성 화학 항원에 노출된 알레르기성 질환 치료에 대한 LJFAE의 약물기전을 밝힌다면, 환경성 알레르기 질환 환자에 적용할 수 있을 것이라 사료된다.

참고문헌

- Grabbe S, Schwarz T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol. Today*. 1998 ; 19 : 37-44.
- Kim JY, Choi SP, La SJ, Seo JS, Kim KK, Nam SH, Kwon BS. Constitutive expression of 4-1BB on T cells enhances CD4(+) T cell responses. *Exp. Mol. Med*. 2003 ; 35 : 509-17.
- Piguet PF, Grau GE, Vassalli P. Subcutaneous perfusion of tumor necrosis factor induces local proliferation of fibroblasts, capillaries, and epidermal cells, or massive tissue necrosis. *Am. J. Pathol*. 1990 ; 136 : 103-10.
- Kondo S, Pastor S, Fujisawa H, Shivji GM, McKenzie RC, Dinarello CA, Sauder DN. Interleukin-1 receptor antagonist suppresses contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 1995 ; 105 : 334-8.
- Wang B, Esche C, Mamelak A, Freed I, Watanabe H, Sauder DN. Cytokine knockouts in contact hypersensitivity research. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 ; 14 : 381-9.
- Mapp C, Boschetto P, Miotto D, de Rosa E, Fabbri LM. Mechanisms of occupational asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 1999 ; 23 : 214-64.
- Zhang XD, Murray DK, Lewis DM, Siegel PD. Dose-response and time course of specific IgE and IgG after single and repeated topical skin exposure to dry trimellitic anhydride powder in a Brown Norway rat model. *Allergy* 2002 ; 57 : 620-6.
- Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*. 1989 ; 7 : 625-55.
- Haile S, Lefort J, Eum EY, Dumerey C, Huerre M, Heusser C, Vargaftig BB. Suppression of immediate and late responses to antigen by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody in a murine model of asthma. *Eur Respir J*. 1999 ; 13 : 961-9.
- Tumas DB, Chan B, Werther W, Wrin T, Vennari J, Desjardin N, Shields RL, Jardieu P. Anti-IgE efficacy in murine asthma models is dependent on the method of allergen sensitization. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 ; 107 : 1025-33.
- Yokozeki H, Wu MH, Sumi K, Igawa K, Miyazaki Y, Katayama I, Takeda K, Akira S, Nishioka K. Th2 cytokines, IgE and mast cells play a crucial role in the induction of para-phenylenediamine-induced contact hypersensitivity in mice. *Clin Exp Immunol*. 2003 ; 132 : 385-92.
- Coyle AJ, Wagner K, Bertrand C, Tsuyuki S, Bews J, Heusser C. Central role of immunoglobulin (Ig) E in the induction of lung eosinophil infiltration and T helper 2 cell cytokine production: Inhibition by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody. *J Exp Med*. 1996 ; 183 : 1303-10.
- Tae J, Han SW, Yoo JY, Kim JA, Kang OH, Baek OS, Lim JP, Kim DK, Kim YH, Bae KH, Lee YM. Anti-inflammatory effect of *Lonicera japonica* in proteinase-activated receptor 2-mediated paw edema. *Clinica Chimica Acta*. 2003 ; 330 : 165-71.

14. Lee JH, Ko WS, Kim YH, Kang HS, Kim HD, Choi BT. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from *Lonicera japonica* flower is related to inhibition of NF-kappaB activation through reducing I-kappaBalpha degradation in rat liver. *Inter J Molecul Med.* 2001 ; 7 : 79-83.
15. Ohta S, Sato N, Tu SH, Shinoda M. Protective effects of Taiwan crude drugs on experimental liver injuries. *Yakugaku Zasshi* 1993 ; 113 : 870-80.
16. Kim SY, Moon TC, Chang HW, Son KH, Kang SS, Kim HP. Inhibition of mouse ear edema by steroidal and triterpenoid saponins. *Arch. Pharmacol Res.* 1999 ; 22 : 313-6.
17. Kwak WJ, Han CK, Chang HW, Kim HP, Kang SS, Son KH. Loniceroside C, an Antiinflammatory Saponin from *Lonicera japonica*. *Tokyo : Chem Pharma Bull.* 2003 ; 51 : 333-5.
18. Yun YG, Kim GM, Lee SJ, Ryu SH, Jang SI. Inhibitory effect of aqueous extract from *Lonicera japonica* flower on LPS-induced inflammatory mediators in RAW 264.7 macrophages. *Kor J Herbology.* 2007 ; 22(3) : 117-25.
19. Lauerma AI, Fenn B, Maibach HI. Trimellitic anhydridesensitive mouse as an animal model for contact urticaria. *J Appl Toxicol.* 1997 ; 17 : 357-60.
20. Stern RL, Manders SM, Buttress SH, Heymann WR. Urticaria pigmentosa presenting with massive peripheral eosinophilia. *Pediatr Dermatol.* 1997 ; 14 : 284-6.
21. Song CH, Galli SJ, Lantz CS, Hu X, Stevens RL, Friend DS. 13 congo red staining of intraepithelial mucosal mast cells. *J Histochem Cytochem.* 1999 ; 47 : 1645C-1645.
22. Chai OH, Lee HK, Lee YC, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH. Roles of TNF- α and IgE in the late phase of contact hypersensitivity induced by trimellitic anhydride. *Exp Mol Med.* 2005 ; 37(5) : 408-17.
23. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF-A primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol.* 1989 ; 7 : 625-55.
24. Dvorak AM, Mihm MC, Dvorak HF. Morphology of delayedtype hypersensitivity reactions in man. II. Ultrastructural alterations affecting the microvasculature and the tissue mast cells. *Lab Invest.* 1976a ; 34 : 179-91.
25. Dvorak HF, Mihm MC, Dvorak AM, Johnson RA, Manseau EJ, Morgan E, Colvin RB. Morphology of delayed-type hypersensitivity reactions in man. I. Quantitative description of the inflammatory response. *Lab Invest.* 1974 ; 31 : 111-30.
26. Sugawara Y, Okamoto Y, Sawahata T, Tanaka K. Skin reactivity in guinea pigs sensitized with 2,4-toluene diisocyanate. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993 ; 100 : 190-6.
27. Hopkins JE, Naisbitt DJ, Kitteringham NR, Dearman RJ, Kimber I, Park BK. Selective haptentation of cellular or extracellular protein by chemical allergens: association with cytokine polarization. *Chem Res Toxicol.* 2005 ; 18(2) : 375-81.