

창이자 추출물이 아토피 피부염 유발 생쥐의 비장 세포 Th17의 세포분화 억제에 따른 아토피 피부 상태에 미치는 영향

김금란¹ · 최태부^{1,2*}

¹건국대학교 대학원 생물공학과, ²건국대학교 미생물공학과

Studies of *Xanthium strumarium* Extract Suppressing Th17-cell Differentiation and Anti-dermatitic Effect in BMAC-induced Atopy Dermatitis of NC/Nga Mice

Kim, Kum-Lan¹ and Choe, Tae-Boo^{1,2*}

¹Department of Bioengineering Graduate School at Konkuk University Seoul 143-701, Korea,

²Department of Microbial Engineering, Konkuk University Seoul 143-701, Korea.

Abstract *Xanthii fructus* which is well known as "Chang-ihjah" in Korea is the dried fruit of *Xanthium strumarium* L. (or *Xanthium sibiricum* PATR. Ex WIDD., Asteraceae, XS). Water extract of this fruit has been used for treatment of various inflammatory diseases such as tympanitis, allergic rhinitis, or ozena as alternative therapy material usually by oral administration in far Eastern countries including Korea. In this study, the effect of XS extract (XS-E) or XS-30% acetone fraction layer (XS-30% AFL) on the differentiation of CD4⁺ T cells isolated from NC/Nga mouse and the production of IL-17 was investigated. The experimental results showed that 100 µg/mL of XS-E could decrease the production of IL-17 by CD4⁺ Th17 cells by 2 fold and only 20 µg/mL of XS-30% AFL could inhibit 3.5 fold. The amount of IL-17A and IL-22 mRNA determined by real-time PCR was decreased remarkably when XS-E or XS-30% AFL was treated on CD4⁺ Th17 cells (p<0.01, p<0.001). The amount of IL-17A protein determined by ELISA was also decreased remarkably (p<0.05, p<0.001). To study the effect of XS-E or XS-30% AFL on the proliferation of Th17 cells, CD4⁺ T cells of a NC/Nga mouse was firstly differentiated by rIL-6/TGF-β and then stimulated by rIL-23. The control group of Th17 cells were doubled every each day, while those of XS-E or XS-30% AFL treated group were shown to be delayed remarkably by these extracts. In conclusion, XS can inhibit the differentiation of Th17 cells of NC/Nga mouse and the production of IL-17 successfully, which may be a beneficial result for the treatment of atopic skin dermatitis.

Keywords: *Xanthium strumarium*L, Th17, IL-17, NC/Nga mouse

서 론

알레르기성 습진, 소아 습진, 굴전부 습진, 범발 신경 피부염 등의 병변으로 불리는 아토피 피부염은 영아 습진에서부터 소년기, 사춘기, 성인에 이르기까지 다양한 연령층에 나타난다(1). 아토피 피부염의 원인을 T 림프구의 면역학적 이상이나 백혈구의 비면역학적 이상으로 보고 있으나

근본적인 원인은 밝혀지지 않고 있다(2). 최근 연구에서는 Th1, Th2 세포와 함께 Th17 세포가 대표적인 사이토카인 (cytokine)인 IL-17과 IL-6, TNF-α, IL-22를 발현함으로써(3) 아토피 피부염 (atopic dermatitis), 건선 (psoriasis), 관절염 (arthritis, RA)과 같은 다양한 자가면역질환 (autoimmune disease)과 천식 (asthma)에도 영향을 미친다는 연구 결과가 발표되었다(3, 4). 이 사이토카인 중 IL-17이 알레르기, 면역반응을 야기하고 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀지면서(5), Nograles 등은 Th17 세포의 생산과 기능 조절의 불균형으로 아토피 피부염이 발생한다고 보고 하였다(3). 조력 T 세포 (helper T-cell)가 항원적 자극에

*Corresponding author

Tel: +82-2-450-3523, Fax: +82-2-3436-5594

e-mail: tbchoe@konkuk.ac.kr

의해 반응할 때 사이토카인 환경이 T-cell을 적절히 분화시킨다. 예를 들어 국소적 항원표지세포 (antigen-presenting cells, APC)들이 IL-12를 생산할 때, 특히 IFN- γ 존재 시 CD4⁺ T 세포들은 세포 내 병원균에 대한 세포 매개성 면역 반응을 촉진하는 IFN- γ 를 분비하여 Th1 세포로 우선적으로 분화된다(6). 또한 IL-4가 존재할 때 CD4⁺ T 세포가 우선적으로 IL-4, IL-5, IL-13를 만드는 Th2 세포의 발달로 Th2는 세포 외 병원균에 대한 체액성 면역반응을 촉진시킨다(7, 8). 이러한 세포들은 IL-17A/F (Th1, Th2 CD4⁺T 세포에 의해 생성되지 않는 사이토카인들)라는 생산물에 의해 Th17이라고 명명 되어졌다(9). Th17 세포들은 면역 반응 유발 물질로 알려져 있는 다른 범위의 요소들도 생산하는데 TNF- α , IL-6, GM-CSF, CXCL-1, CCL-20을 들을 수 있다(10). 최적으로 조절된 T 세포 subset의 반응 결과는 병원균의 제거와 기억 (memory) T 세포의 생성이다(11). 비적절하거나 지속적으로 활성을 띤 T 세포 subset들은 자가면역이나 자연적 알레르기와 같은 질병을 유발시킬 수 있다(12). Th17은 orphan nuclear receptor 종류인 ROR γ t라는 전사인자가 활성화되면서 IL-23R가 발현하게 된다(13). 이러한 작용으로 다양한 병원체 (pathogen)들의 자극에 의한 면역반응으로 분비된 IL-23과 결합한 후 세포 내부의 신호전달경로가 활성화되어 IL-17A/F cytokine을 분비함으로써 분화가 이루어진다(14).

전 세계적으로 빠른 증가 추세를 보이고 있는 아토피 피부염(15)의 치료를 위해 글루코코르티코이드 (glucocorticoid), KT&G 101, calcinulin 저해제인 FK-506 (tacrolimus) 등 (16)의 연구와 항히스타민제, 스테로이드 제제, 사이클로스포린, DNA 합성 저해제 등이 전신 투여용으로 사용되고 있으나, 국소적 또는 전신적 부작용이 보고되고 있다(17). 아토피 피부염에 대한 안전하면서도 우수한 효능을 가진 새로운 치료제의 개발이 요구되고 있으며(18, 19), 이에 본 연구에서는 자료검색을 통하여 부작용이 없으며 장기간 복용이 가능한 천연물로 창이자 (*Xanthii fructus*, XS-E, XS-FL)가 아토피 피부의 상태에 미치는 효과를 알아보고자 하였다.

창이자 (*Xanthii fructus*)는 *Xanthium strumarium* L.의 열매로 중이염 (tympanitis), 알레르기 비염 (allergic rhinitis), 또는 취비증 (ozena) 같은 염증질환에 치료제로 사용되어 온 한국의 전통적인 약재이다(20). Kim(20) 등은 창이자 추출물 (*Xanthium strumarium* extraction, XS-E)이 신이화 (magnoliae flos) 같은 염증질환에 효과가 있다고 하였으나 아직 이 식물이 *in vitro*에서 실험적으로 질환을 억제한다는 기전이 불명확한 상태이다. Yasushi(21) 등은 알레르기 모델인 생쥐를 통하여 비만세포의존성 면역과잉반응에서 XS-E의 성분 중 compound 48/80이 항알레르기 효과가 있다고 보고하였다. 창이자에 대한 연구는 Chu(22) 이래 몇 가지 다른 연구로 시도되었다. Kuo(23) 등은 사람 사구체 내세포 증식과 세균에 대한 억제효과를, Hsu(24) 등은 당뇨병에 걸린 쥐에서 혈장 중 당뇨의 감소 효과 등을 보고

하였다. XS에서 알려진 성분은 사포닌 (saponin), 플라본류 (flavones), 카페익산 (caffeic acid), 1, 4 디카페오닐퀴닉산 (1,4-dicaffeoylquinic acid, di-CQA), 그리고 세스퀴테르펜 락톤 (sesquiterpene lactones) 등이다. Compound 48/80(22)는 N-메틸-p-메티옥시페닐 에틸아민 (N-methyl-p-methoxyphenyl ethylamine)로 구성된 물질로 쥐 복막 비만 세포 (rat peritoneal mast cells, RPMC)와 생쥐에서 항IgE 및 RBL-2H3 세포에서 TNF-a의 생산억제 효과가 있다고 보고하였다(25, 26). 세스퀴테르펜 락톤은 항균인자 자극 유도 반응과 접촉성 피부염에 효과가 있는 것으로 알려졌지만 아직 항알레르기 효과에 대하여서는 보고가 없다(27).

본 연구에서는 창이자 추출물 (XS-E)과 창이자 분획 (XS-FL)이 아토피 피부질환의 동물로 알려진 아토피 피부염 유발 생쥐 (atopy dermatitis-like skin NC/Nga mice, NC/Nga)(28, 29)의 Th17 세포 분화 억제에 따른 아토피 피부 상태에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 하였다. 동물모델인 16 주령 NC/Nga의 비장을 적출하여 CD4⁺T 세포를 회수 하였다. 회수 된 CD4⁺T세포에 XS-E와 XS-30% AFL에 대한 알레르기 반응을 IL-17의 세포 내 염색을 통하여 FACS로 분석하였다(30, 31). 또한 Real-time PCR을 이용하여 IL-17과 IL-22 mRNA 및 ELISA를 분석하였으며(32). XS-E보다 유의성이 크게 나온 XS-30% AFL이 Th17 세포의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester)로 표지 된 Th17 세포(33)를 rIL-23으로 증식시킨 후 FACS로 분석하였다(34). 실험을 통하여 XS-30% AFL이 Th17 세포의 분화 억제 효과로 아토피 피부의 상태 개선에 영향을 준다는 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

실험동물은 8 주령의 암컷 SPF (Specific Pathogen free) NC/Nga 생쥐 (20 g)로 Charles River Japan (Yokohama, Japan)에서 공급받아 실험동물로 사용하였고, BMAC (biostir mite antigen cream)는 진드기 항원으로 제작된 dermatophagoides farinae crude extract (mite antigen, lyophilized) (Biostir, Hiroshima, Japan)를 사용하였다. 창이자 (*Xanthiumstrumarium*)는 경동건재 한약방에서 구입하여 정선한 후 사용하였다.

시약 및 기기

시약

본 실험에 사용된 시약은 다음과 같다. Phorbol myristate

acetate (PMA), ionomycin, diethylpyrocarbonate (DEPC), chloroform, collagenase, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구 용혈액 (RBC lysis solution), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), magnesium chloride는 Sigma사 (U.S.A.), 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)는 Hyclone사 (Logan, U.S.A.), anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-Gr1-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD19-PE, anti-CD23-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-IgE-FITC, anti-B220-PE, anti-CD69-FITC, anti-IL17-PE는 Pharmingen사 (Torreyana, U.S.A.), monensin (GolgiStop™)은 BD Biosciences사에서 구입하였고 기타 일반 시약은 특급 시약을 구입 사용하였다.

기기

본 실험에 사용된 기기는 다음과 같다. 열탕추출기 (대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortexmixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, U.S.A.), deep-freezer (Sanyo, Japan), thermo cycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, U.S.A.), plateshaker (Lab-Line, U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A.)(35, 36).

창이자 건조 분말 제조 및 물질 분획

창이자 건조 약재 분말 500 g을 40°C 70% methanol 2 L에 3번 열탕하여 추출 여과한 후 건조시켜 70% methanol 추출물 145 g을 얻었다. 이 70% methanol 추출물을 다시 40°C 40% methanol 1 L에 현탁시키고 n-Hexane를 가하였다. 이 과정을 3회 반복하여 진탕, 추출하였다. 분액깔때기에서 분획하여 n-Hexane층과 40% methanol로 분취한 후 감압 농축하여 n-Hexane 추출물은 따로 보관하였다. 남은 40% methanol을 감압 농축하여 용매를 완전히 제거한 후에, Diaion HP-20 (Sigma-Aldrich) 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 준비된 Diaion HP-20 수지 column에 40% methanol 추출물 100 g을 부어 그 폭이 약 25~30cm 될 정도로 방치하였다. 이 과정을 거친 후 증류수 1,000 mL를 부어 Diaion HP-20 수지를 통과한 pass층 분리(37, 38)하였고 (XS-E), 30% methanol 500 mL 층 (XS-30% MFL), 70% methanol 500 mL 층 (XS-70% MFL), 30% acetone 500 mL 층 (XS-30% AFL), 70% acetone 500 mL 층 (XS-70% AFL)을 각각 통과시켜 분리된 분획을 얻었다.

세포독성 측정

섬유아세포 (human fibroblast cells, hFCs) 배양

섬유아세포를 인산완충식염수 (D-PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 3회 세척한 후 분리하였다. 분리된 세포를 15 mL conical tube에 넣은 후 5분 동안 1,400 rpm에서 원심분리하였다. Tube에 DMEM (DNase type I, 0.15 mg/mL, antibiotics, penicillin 10⁴ U/mL, streptomycin 10 mg/mL, amphotericin B 25 µg/mL)와 collagenase A (5 mg/mL, BM, IN, U.S.A.)을 첨가한 후 37°C CO₂배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 넣은 후 30분 동안 배양하였다. 배양 후 1,500 rpm에서 인산완충생리식염수로 2회 원심분리하였고, DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 hFCs 세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵cell/mL농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

세포독성 측정

세포독성 측정은 SRB (Sulforhodamine B) assay(39)법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. hFCs 세포는 37°C 5% CO₂배양기에서 1시간 배양한 후 XS-E (최종 농도 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL)과 각각의 XS-FL (최종 농도 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL)을 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후 배양액을 버리고 인산완충용액으로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA (Trichloroacetic acid)를 50 µL/well를 가하고 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 µL/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 이것을 0.1% acetic acid 용액으로 5회 세척한 후 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base 100 µL/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, U.S.A.) 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA Reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(36).

CD4⁺ T 세포 분리 및 Th17 세포 내 유세포형광염색

아토피 피부염을 유발하기 위한 감각 및 유발 실험은 16주령 체중 20 ± 2 g의 NC/Nga생쥐(40)를 대상으로 Vestergaard 등(28)의 방법을 수정하여 실행하였다. NC/Nga생쥐 비장을 적출한 후 100 mesh에서 분쇄하여 비장세포를 추출하였다. 추출한 비장세포를 2,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 실온에서 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, 1 L demineralized water, 0.1 mM EDTA)에 5분 동안 처리하여 적혈구를 제거 하였다. 또한 추출한 비장세포를 2%의 FBS가 함유된

PBS (FBS/PBS)에 1×10^8 /mL로 현탁시키고 normal rat serum을 5% 되게 첨가하여 4°C에서 15분 동안 blocking하였다. T 세포는 biotinylated antibody cocktail for lineage(41) (CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , CD235a, glycoporphin A., CD4⁺ T Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec)에 각각 4°C에서 15분간 반응시켜 분리하였다. 분리한 세포를 FBS/PBS로 세척하여 1×10^8 /mL로 현탁하였고 100 μ L의 streptavidin-microbead을 가하여 다시 4°C에서 10분간 반응시켰다. 이 세포를 Magnetic column (CS column, Miltenyi Biotec)을 PBS로 세척하여 준비해 둔 Vario MACS (Miltenyi Biotec)에 장치하였다. Magnetic bead가 표지된 세포를 통과시키고 PBS로 column을 충분히 세척한 다음 column을 통과한 부유액을 원심분리하여 lineage 음성인 T 세포를 모았다(42).

창이자 추출물 및 분획 처리

비장의 CD4⁺ T 세포를 순수분리한 후 미리 anti-CD3/CD28 coating (1 μ g/mL)한 24 well plate에 창이자 추출물 (100 μ g/mL)과 창이자 분획 (30% methanol 층, 70% methanol 층, 30% acetone 층, 70% acetone 층, 각각 20 μ g/mL)과 4일 동안 동시배양 하였다. Th17 세포 분화 유도를 위하여 rIL-6 (20 ng/mL), TGF- β (2 ng/mL), anti-IL-4 (1 ng/mL), 그리고 anti-IFN- γ (2 ng/mL)를 처리하였고, 4일 후 Th17 세포 내 염색을 위하여, 실험 종료 4시간 전에 PMA (30 ng/mL), ionomycin (500 ng/mL), 그리고 monensin (1 μ g/mL)을 배양세포에 처리하였다. 4시간 배양 종료 후 BD GolgiStopTM의 방법에 따라 FITC-anti-mouse CD4과 PE-anti-mouse IL-17을 염색하였다. 유세포형광분석은 FACS calibur와 Cell Quest software를 사용하였다(43, 44).

배양상층액에서 IL-17A ELISA 측정

NC/Nga 생쥐에서 분리한 CD4⁺ T 세포를 Th17 세포로 4일간 분화시킨 후 배양상층액에서 IL-17A (KMC 3021, BioSource, USA)의 생산량을 측정하였다. 배양상층액 내의 IL-17A의 농도 측정은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit로 측정하였다. 각 well에 배양상층액 50 μ L와 dilution buffer 50 μ L를 혼합하여 각 well에 분주하였고, 동안 25°C 실온에서 방치하였다. 2시간 후 완충용액으로 2회 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 다시 2시간 방치하였다. 방치 후 2회 수세하여 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ L를 처리하였고, 1시간 후 실온에서 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ L씩 분주하고 암소에서 30분간 방치하였다. 이것을 100 μ L의 stop 용액에 처리한 다음 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다(45).

분화된 Th17 배양세포에서 IL-17, IL-22 mRNA 유전자 발현 측정

분화된 Th17 세포에서 RNA 분리

NC/Nga생쥐에서 비장을 적출한 후에 비장 CD4⁺ T 세포를 순수 분리하여 미리 anti-CD3/CD28 coating (1 μ g/mL)한 24 well plate에 XS-E (100 μ g/mL)과 XS-30% AFL 20 μ g/mL을 4일 동안 동시배양 하였다. Th17 세포 분화 유도를 위하여 rIL-6 (20 ng/mL, R&D system), TGF- β (2 ng/mL, R&D system), anti-IL-4 (1 ng/mL, R&D system), 그리고 anti-IFN- γ (2 ng/mL, R&D system)를 처리하였고, 4일 후 세포에 RNAzol^B 500 μ L를 넣고 용해될 때까지 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μ L를 첨가한 후 15초 동안 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심분리하였다. 원심분리한 약 200 μ L의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 mL와 동량 혼합하고 천천히 흔든 후 얼음에 15분간 방치하였다. 이것을 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 μ L의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

역전사중합효소 연쇄반응

역전사중합효소 연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)은 준비된 total RNA 2 μ g와 DNase I (10 U/mL) 2U/tube를 37°C heating block에서 30분간 반응 시킨 후 75°C에서 10분 동안 변성시켰다. 여기에 2.5 μ L 10 mM dNTPs와 1 μ L random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 mL), RNA inhibitor로서 1 μ L RNase inhibitor (20 U/mL), 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/mL)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로 최종 부피가 20 mL가 되도록 하였다. 이 20 mL의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강한 후, 37°C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시켰고, 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

Real Time Quantitative RT-PCR

Real time quantitative RT-PCR은 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다. 사용한 primer는 다음과 같다. Mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)의 probe는 CATGTTCCAGTATGACTCCACTCAG (VIC)

이며 (probe; Applied Bio system), Super-Taqman PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건으로는 pre-denaturation은 50°C에서 2분, 94°C에서 10분, 그리고 40 cycles을 95°C에서 15분, 60°C에서 1분 수행하였다. XS와 XS-30% AFL 처리군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 target group의 Quantitative real-time RT-PCR의 RQ (relative quantitative) 값은 Housseau 등(46)과 같은 공식에 의하여 측정하였다.

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

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

Primers used for real time PCR

| Gene | Primer | Sequence |
|--------|---------|----------------------------|
| IL-22 | Forward | 5'-CGATCTCTGATGGCTGTCCT-3' |
| | Reverse | 5'-ACGCAAGCATTCTCAGAGA-3' |
| IL-17A | Forward | 5'-AACATGAGTCCAGGGAGAGC-3' |
| | Reverse | 5'-CTGCCTGGCGACAATCGAG-3' |

Th17 세포 분화 억제 효과 측정

CD4⁺ T 세포를 4일간 rIL-6와 TGF-β로 자극하여 Th17 세포로 분화시킨 후 D-PBS에 5 × 10⁶ cell/mL로 부유시켰다. CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) tube (4,100 M, Renovarinc, USA)에 넣어 다시 부유시킨 후 37°C 5% CO² 배양기에서 10분 동안 배양시켰다. 15 mL conical tube에 옮긴 후 cold 배양액으로 2회 원심분리 하였다. 24 well plate에 CFSE-Th17 label 세포를 각각 2 × 10⁶ cell/mL로 분주한 후 rIL-23 (10 ng/mL, R&D system, USA)을 처리하여 분화증식을 유도하였다. 실험군은 XS-30% AFL (20 µg/mL)을 처리하여 4일 동안 37°C 5% CO²배양기에서 배양하였다. CFSE는 FACS calibur의 green fluorescence (CFSE, 525 nm band pass filter)에서 측정하였고, 분석은 Cell Quest software (BD Biosciences)를 사용하였다(47, 48).

통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's *t-test* 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

세포독성

화학물질 내의 독성 성분은 세포의 증식·분화기능을 저해하며, 세포 분열 시 염색체 복제 이전 단계에서 염색체 활

성을 저해한다. 창이자 추출물을 컬럼 크로마토그래피를 실시하여, XS-E와 XS-FL 분획을 얻은 후 이들이 정상세포에 미치는 영향을 SRB법으로 측정하여 세포 내 안정성 여부를 관찰하였다(49). 본 실험에서 사용된 섬유아세포는 일반적으로 세포독성 판정에 있어서 기준이 되는 정상세포로 세포의 성장, 분열, 약물에 대한 반응이 최소한으로 조절되는 세포로 알려져 있다(50). 그러나 본 실험에 사용된 NC/Nga 생쥐의 T 세포와 B 세포는 약물에 대한 반응이 세포분열, 사이토카인의 자가분비 및 타가분비 등이 다양하게 나타나 세포독성 측정에 적합하지 않아 hFCs로 대체하여 실험을 하였다. XS-E와 XS-FL은 세포독성을 측정할 결과 실험범위 내 농도인 100 µg/mL 이하에서는 세포생존도 85% 이상으로 세포독성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 1).

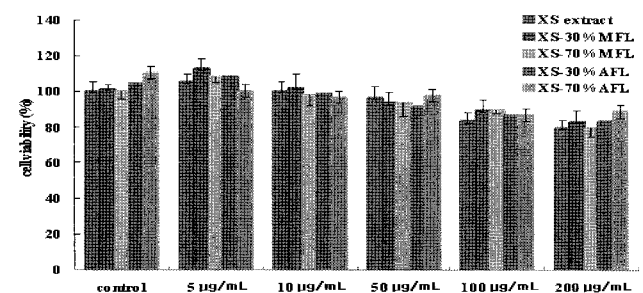


Fig. 1. Cytotoxicity effects of XS extract and XS-fraction layer on human fibroblast cells (hFCs). hFCs were pretreated with various concentration XS extract and XS-fraction layer. The results represent the mean ± S.E of 6 animals per group. Significance was determined using the Student's *t-test*.

NC/Nga생쥐의 CD4⁺ T 세포에서 IL-17 세포의 세포 내 형광 염색

자가면역성 염증에서 IL-23과 Th-17 T 세포가 중심적 역할을 하는데, 아토피 피부염(atopy dermatitis), 자가면역성 뇌척수염 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), 콜라겐 유도성 관절염 (collagen-induced arthritis, CIA), 염증성 장질환 (inflammatory bowel disease, IBD) 같은 인체 자가면역성 염증 질환은, Th1와 Th2의 불균형에 의한 CD4⁺ T 세포 중재로 발생하는 질병의 대표적인 예이다(51, 52). 그러나 최근 이러한 질병들의 연구에서 Th1 기능과 자가 염증과의 모순된 관계가 밝혀졌다(53, 54). IL-12p35, IL-12Rβ2, IFN-γ, IFN-γR 그리고 신호전달 분자인 Stat-1을 포함한 IL-12/IFN-γ의 성분이 부족한 생쥐에서 평균적인 또는 더 진전된 정도의 EAE와 CIA가 발생했다(7). 반면에, IL-12p40이 부족한 생쥐들이 CIA와 EAE의 유발에 저항성을 나타내었고, IL-12p40 subunit에 저항하는 항체는 자가면역성 질환의 발달을 억제하였다. 이러한 모순들은 최근에 와서 IL-23의 Th17 발달을 활성화하는 기능적인 작용이 발견됨에 따라 해결되었다(8, 52). 자가면역성 질환 모델에서 IL-12가 아닌 IL-23의 결정적인 역할은

knockout 생쥐와 p19와 p40에 대한 항체를 사용한 연구 결과로 알아냈다(8). 자가면역성 염증에서 Th17계통의 역할을 보여주는 실험을 통해 IL-6, GM-CSF 또는 IL-17이 부족한 생쥐들은 EAE와 CIA의 유발에 저항성을 띠거나 질병 정도가 감소됨을 보여주었다(55). 또한 CIA, EAE, IBD 모델에서 anti-IL-6, anti-GM-CSF 또는 anti-IL-17 mAb의 투여는 질병의 발현 정도를 현격히 감소시켰다(56). 이렇듯 최근 집중되는 많은 분자들이 자가면역 염증 치료에 대한 치료 방법적인 목표가 IL-23/Th 17 axis와 연관되어 있다는 점은 주목할 만하다(57, 58). 본 실험에서는 NC/Nga 생쥐의 CD4⁺ T 세포를 Th-17 세포로 분화시켰고, 분화과정 중 XS-E와 XS-FL의 억제효과를 관찰하였다(Fig 2).

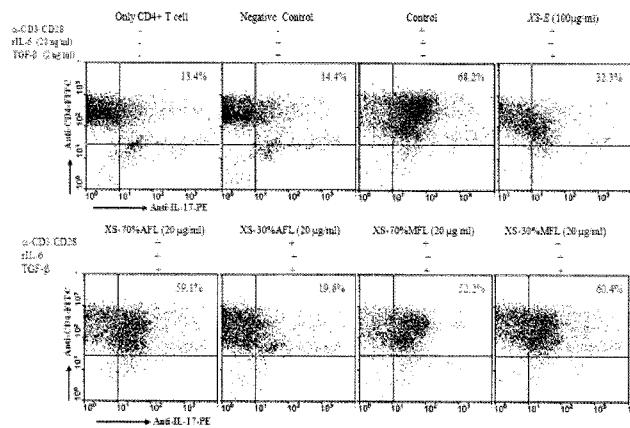


Fig. 2. Inhibitory effects of XS-E and XS-FL on the differentiation of Th17 cells: CD4⁺/IL-17⁺ intracellular staining analysis by anti-CD3/anti-CD28-stimulated murine CD4⁺ T cells. Isolated CD4⁺ T cells from atopy dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/mL) or treated with XS-E (100 µg/mL) or XS-FL (20 µg/mL). CD4⁺ T cells were not treated (normal; only T cells) or co-cultured with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/mL) plus rIL-6 (20 ng/mL)/TGF-β (2 ng/mL) (Negative Control), and with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/mL) plus rIL-6/TGF-β plus XS-E (100 µg/mL) or with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/mL) plus rIL-6/TGF-β plus XS-FL (20 µg/mL) for 4 days. After 4 days stimulation, 1 µL/mL monensin was added and included in subsequent incubations until fixation. Cells were stained with FITC-labeled anti-CD4. After fixation in Cytotfix/Cytoperm and were washed twice and permeabilized in Perm/Wash buffer, stained with PE-labeled anti-IL-17mAb and immediately analyzed on a FACS calibur using Cell Quest software.

분화 시키기전 IL-17⁺ CD4⁺ Th17 세포는 전체 세포 중 13.4%를 차지하였고, α-CD3/α-CD28 Ab coating 처리를 하지 않은 음성 대조군 (negative control)군은 14.4% 정도만 Th17 세포로 분화되어 분화하기 전과 별다른 차이가 없었다. 반면 α-CD3/ α-CD28 Ab coating와 rIL-6와 TGF-β로 Th17 세포를 유도한 대조군의 Th17 세포는 68.2%로 세포의 분화가 유도되었다. 여기에 100 µg/mL XS-E를 처리한

경우 Th17 세포는 32.3%로 만 분화가 이루어져 대조군에 비하여 2배 이상의 감소를 나타내었으며, 창이자의 물질분리 분획 중 20 µg/mL XS-30% AFL 처리군은 19.6%으로 대조군에 비하여 3.5배 Th17 세포 분화를 억제하는 것으로 관찰되었다. 반면에 XS-70% AFL 처리군은 Th17 세포군이 59.1%로 나타나 별다른 분화억제를 하지 못하는 것으로 나타났다.

Th17 세포에서 IL-17A와 IL-22 mRNA 유전자 발현 분석

최근 조력 T세포의 새로운 타입으로 확인된 Th17 세포는 특징적으로 IL-17A, IL-17F, IL-22등을 분비하여 염증 반응, 자가면역질환 등에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(59). Th17 세포에 의해 생산되는 IL-22가 IL-23에 의해 극세포증, 진피의 염증 등을 조절한다. IL-17은 염증 세포들로부터 TNF-α와 IL-1 같은 주요 사이토카인들과 IL-6, IL-8, 단백분해 효소 등의 분비를 유도하여 염증 반응을 항진 시키고, RANKL 발현을 촉진하여 염증 세포의 분화를 유도한다(60). 또한, 기존의 사이토카인들 (TNF-α, IL-1)과 상승작용을 통하여 염증반응을 더욱 심화시킨다(61).

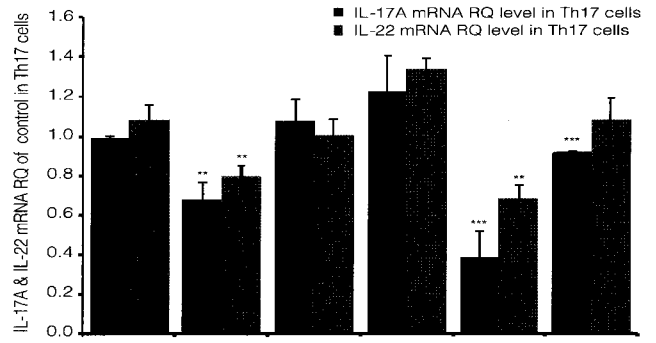


Fig. 3. Inhibitory effects of XS-E and XS-FL on the IL-17A and IL-22 mRNA expression by anti-CD3/anti-CD28-stimulated murine CD4⁺ T cells.

Isolated CD4⁺ T cells from atopy dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/mL) or treated with XS-E (100 µg/mL) or XS-FL (20 µg/mL). CD4⁺ T cells were co-cultured with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/mL) plus rIL-6 (20 ng/mL)/TGF-β (2 ng/mL) (Control), and with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/mL) plus rIL-6/TGF-β plus XS-E (100 µg/mL) or with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/mL) plus rIL-6/TGF-β plus XS-FL (20 µg/mL) for 4 days. After a 4 days stimulation, IL-17A and IL-22 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the base line is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real-time PCR was performed in duplicate and analyzed by a applied Biosystems 7,500 Real-Time PCR system (**p < 0.01, ***p < 0.001).

Fig. 3에서 나타내는 바와 같이, Th17 세포를 분화시킨 CD4⁺ T 세포에서 cDNA를 합성한 후 real-time PCR을 이용하여 IL-17A와 IL-22 mRNA의 유전자 발현량을 비교 분석한 결과, 대조군에 대한 IL-17A와 IL-22 mRNA의 유전자발현의 상대정량 값 (RQ)은, XS-E와 XS-30% AFL를 처리한 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(**p < 0.01, ***p < 0.001). 또한 IL-17A의 단백질 생산량의 변화를 조사하기 위해 Th17 세포를 분화시킨 CD4⁺ T 세포 배양 상층액을 분리하여 ELISA 법을 이용하여 IL-17A의 생산량을 측정된 결과(Fig. 4)를 보면, 대조군에 비하여 XS-E와 XS-30% AFL를 처리한 실험군에서 IL-17A 생산량이 유의성 있는 감소를 나타내었다(*p < 0.05, ***p < 0.001). 이러한 결과로 미루어 볼때 XS-E와 XS-30% AFL은 Th17 세포에서 IL-17A와 IL-22 mRNA 유전자 발현을 억제하거나 IL-17 생성을 억제하는 것으로 볼 수 있다.

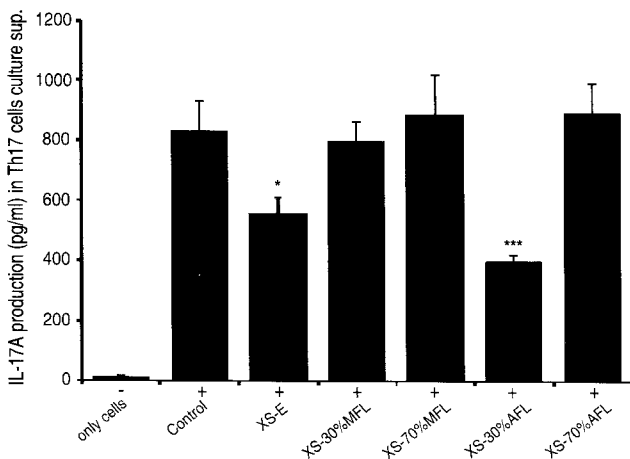


Fig. 4. Inhibitory effects of XS-E and XS-FL on IL-17A production by anti-CD3/anti-CD28-stimulated murine CD4⁺ T cells. Isolated CD4⁺ T cells from atopy dermatitis-like skin NC/Nga mice were either stimulated with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/mL) or treated with XS-E (100 µg/mL) or XS-FL (20 µg/mL). CD4⁺ T cells were not treated (only cells) or co-cultured with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/mL) plus rIL-6 (20 ng/mL)/TGF-β (2 ng/mL) (Control), and with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/mL) plus rIL-6/TGF-β plus XS-E (100 µg/mL) or with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/mL) plus rIL-6/TGF-β plus XS-FL(20 µg/mL) for 4 days. After a 4 days stimulation, IL-17A production were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (BioSource, USA). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p < 0.05, ***p < 0.001).

Th17 세포분화 억제 효과

IL-23은 APC에 의해서 생성되고, 증식과 Th17라는 T 세포의 명확한 혈통의 생존을 촉진하는 것으로 알려져 있다(52). 조력 T 세포들은 TGF-β1과 IL-6존재 하에서 배양되고, INF-γ, IL-4의 결핍 시 Th17 세포와 과도하게 증가된

IL-23R의 증식이 일어난다(62). 그 결과 IL-23은 Th17 세포의 확장과 생존에 절대적으로 관여한다(63). IL-23의 수용체-리간드 상호작용은 Stat3를 활성화시킨다고 보여지고 있고, 그 결과로 IL-17A와 IL-17F촉진제와 결합한다(64). IL-17A는 homodimeric protein으로서, 사이토카인의 IL-17 family에 속해있다. 대부분의 IL-17A는 활성화된 memory CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포들에 의해 생성된다. Th17 세포의 리간드의 결합은 다양한 세포 종류로부터 염증 이전 단계의 사이토카인, 케모카인 (chemokine), 메탈로프로테아제 (metalloprotease)의 분비를 유발하고, 세포운동과 조직손상을 가능하게 함과 동시에 그 결과로 호중구와 거핵구가 염증부위로 보급되어 만성염증반응이 유발되는 것으로 알려져 있다(65).

Fig. 5에 나타난 바와 같이 Th17 세포를 rIL-6와 TGF-β로 분화시킨 후 CFSE로 표지하였다. CFSE-labelled Th17 세포를 rIL-23을 처리하여 4일간 배양하였고, Th17 세포의 증식을 유도한 후 XS-30% AFL을 처리한 결과 Th17 세포의 증식이 억제되는 것을 확인하였다. 대조군에서는 Th17 세포의 분열이 4일 동안 4번에 걸쳐 세포 수가 거의 비슷한 수로 증식이 일어나는 것을 CFSE를 통하여 확인하였고, XS-30%AFL 처리군은 CFSE의 형광이 점점 감소하여 Th17 세포의 분열증식이 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때 NC/Nga 생쥐에서 창이차 추출물인 XS-E와 XS-30% AFL은 염증유전자 IL-17 발현을 억제시키고 Th17 세포의 증식의 감소효과로 아토피 피부에 적용할 경우 아토피 피부 상태 개선에 효능이 있을 것으로 사료된다.

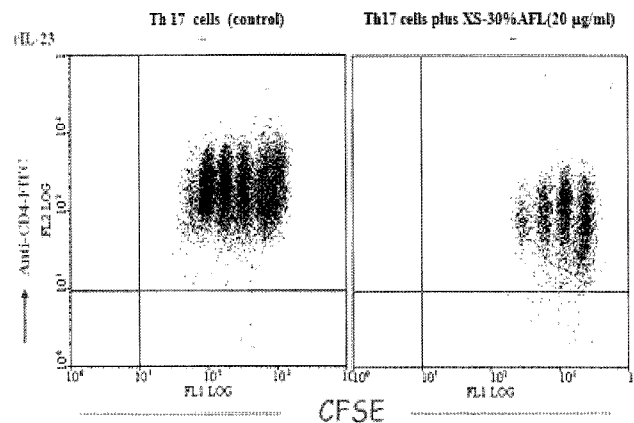


Fig. 5. Effects of XS-E and XS-FL on the Th17 cells differentiation. Isolated CD4⁺ T cells from atopy dermatitis-like skin NC/Nga mice were co-cultured with anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/mL) plus rIL-6 (20 ng/mL)/TGF-β (2 ng/mL) for 4 days. After a 4 days stimulation, CFSE-labeled Th17 cells were stimulated with rIL-23 or rIL-23 plus XS-30% AFL(20 µg/mL) and harvested in the presence of PI as described. The CFSE division was analysed by Fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis at 4th days. Th17 cells (rIL-23) and Th17 cells (rIL-23) plus XS-30% AFL to determine gates for division number.

요약

아토피피부염 (AD)은 천식, 음식 알레르기, 비염 같은 전신아토피질환을 동반하는 만성재발성 피부염증질환이다. 아토피피부염과 관련된 IL-17의 임상적 역할은 다양한 조건에서 보고되고 있으며, 또한 건선 피부 상태에 깊숙이 관여하고 있다. IL-17은 각질세포 (keratinocytes)에서 과잉으로 생산되며, 아토피피부염의 말초임파구에서도 다량 생성됨을 세포내염색을 통하여 확인된 바 있다. 본 연구에서는 창이자 추출물 (XS-E와 XS-FL)이 NC/Nga 생쥐의 CD4⁺ T 세포에서 유도된 Th17 세포의 분화억제 및 IL-17의 생산량 감소 효과에 대한 실험을 하였다. 그 결과 XS-E와 XS-FL을 처리한 섬유아세포에서 세포독성은 나타나지 않았고, 4일간 XS-E와 XS-FL에 동시배양 한 CD4⁺ T 세포의 IL-17 생산량을 FACS로 분석한 결과 100 µg/mL XS-E 처리군의 IL-17 생산량은 32.3%로 대조군에 비하여 2배 이상의 감소를 나타내었으며, 20 µg/mL XS-30% AFL (acetone XS-FL) 처리군의 Th17 세포는 19.6%으로 대조군에 비하여 3.5배 억제되었다. 또한 real-time PCR을 이용하여 IL-17A와 IL-22 mRNA의 유전자 발현량을 비교 분석한 결과, IL-17A와 IL-22 mRNA의 유전자발현의 RQ값은 XS-E와 XS-30% AFL를 처리한 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다($p < 0.01$, $p < 0.001$). ELISA로 측정된 IL-17A 생산량은 XS-E와 XS-30% AFL를 처리한 실험군이 대조군에 비하여 현저히 감소 ($p < 0.05$, $p < 0.001$)하였다. Th17 세포의 증식을 알아보기 위하여, rIL-6와 TGF-β로 분화시킨 Th17 세포를 CFSE로 표지한 후 rIL-23 처리를 하여 4일간 배양하여 증식을 유도시켰다. 대조군의 Th17 세포 분열은 4일 동안 4번에 걸쳐 비슷한 세포수의 증식이 일어나는 것을 CFSE를 통하여 확인하였고, XS-30% AFL 처리군은 CFSE의 형광 분포가 점점 감소하여 Th17 세포의 증식이 억제됨을 알 수 있었다.

접수 : 2009년 6월 24일, 게재승인 : 2009년 8월 27일

REFERENCES

- Johansson, S. G., L. O. Cardell, T. Foucard, P. Montan, P. Odeback, and M. Palmqvist (2006), Revised, global nomenclature for allergy. Unambiguous terms create clarity and prevent misunderstandings, *Lakartidningen* 8-14, **103**, 379-383.
- Ma, D., X. Zhu, P. Zhao, C. Zhao, X. Li, and Y. Zhu (2008), Profile of Th17 cytokines (IL-17, TGF-beta, IL-6) and Th1 cytokine (IFN-gamma) in patients with immune thrombo cytopenic purpura, *Ann Hemato* **87**, 899-904.
- Nogralles, K. E., L. C. Zaba, E. Guttman-Yassky, J. Fuentes-Duculan, and M. Suarez-Farinas (2008), Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br. J. Dermatol.* **159**, 1092-1102.
- Tesmer, L. A., S. K. Lundy, S. Sarkar, and D. A. Fox (2008), Th17 cells in human disease. *Immunol.* **223**, 87-113.
- Zelante, T., A. De Luca, C. D'Angelo, S. Moretti, and L. Romani (2009), IL-17/Th17 in anti-fungal immunity : what's new? *Eur J Immunol.* **39**, 645-648.
- Infante-Duarte, C., H. F. Horton, M. C. Byrne, and T. Kamradt (2000), Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.* **165**, 6107-6115.
- Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, and J. D. Sedgwick (2005), IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **201**, 233-240.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, and K. M. Murphy (2005), Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123-1132.
- McAllister, F., A. Henry, J. L. Kreindler, P. J. Dubin, and L. Ulrich (2005), Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium : implications for airway inflammation in cystic fibrosis, *J. Immunol.* **175**, 404-412.
- Conte, F. P., C. Barja-Fidalgo, W. A. Verri, F. Q. Cunha, G. A. Rae, and C. Penido (2008), Endo the lins modulate inflammatory reaction in zymosan-induce d arthritis : participation of LTβ4, TNF-alpha, and CXCL-1, *J. Leukoc. Biol.* **84**, 652-660.
- Kleinewietfeld, M., F. Puentes, G. Borsellino, L. Battistini, O. Rotzschke, and K. Falk (2005), CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4⁺ T-cell subset, *Blood.* **105**, 2877-2886.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, and Y. H. Wang (2005), A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17, *Nat Immunol.* **6**, 1133-1141.
- Manel, N., D. Unutmaz, and D. R. Littman (2008), The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR gamma, *Nat. Immunol.* **9**, 641-649.
- Zhou, L., J. E. Lopes, M. M. Chong, II. Ivanov, R. Min, and G. D. Victora (2008), TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR gamma function, *Nature* **453**, 236-240.
- Cookson, W. (1999), The alliance of genes and environment in asthma and allergy, *Nature* **402**, 5-11.

16. Zhan, Y., S. Gerondakis, E. Coghil, D. Bourges, Y. Xu, and J. L. Brady (2008), Glucocorticoid-induced TNF receptor expression by T cells is reciprocally regulated by NF-kappa B and NFA T, *J. Immunol.* **181**, 5405-5413.
17. Barnes, P. J. (1999), Therapeutic strategies for allergic diseases, *Nature* **402**, 31-38.
18. Leung, D. Y. (2000), Atopic dermatitis : new insights and opportunities for therapeutic intervention, *J. Allergy Clin Immunol.* **105**, 860-876.
19. Novak, N., T. Bieber, and D. Y. Leung (2003), Immune mechanisms leading to atopic dermatitis, *J. Allergy Clin Immunol.* **112**, 128-139.
20. Kim, H. M., J. M. Yi, and K. S. Lim (1999), Magnoliae flos inhibits mast cell-dependent immediate-type allergic reactions, *Pharmacol. Res.* **39**, 107-111.
21. Koibuchi, Y., A. Ichikawa, M. Nakagawa, and K. Tomita (1985), Histamine release induced from mast cells by active components of compound 48/80, *Eur J. Pharmacol.* **115**, 163-170.
22. Chu, T. R. and Y. C. Wei (1965), Studies on the principal unsaturated fatty acids of the seed oil of *Xanthium strumarium* L, *Yao. Xue Xue Bao* **12**, 709-712.
23. Baltzly, R. and J. S. Buck (1949), A family of long-acting depressors, *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 1301-1305.
24. Hsu, F. L., Y. C. Chen, and J. T. Cheng (2000), Caffeic acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats, *Planta Med.* **66**, 228-230.
25. Segal, D. M., J. D. Taurog, and H. Metzger (1977), Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 2993-2997.
26. Radunz, H. E. (1988), Screening in drug design-modern methods in active-substance finding, *Pharm Unserer Zeit.* **17**, 161-176.
27. Kim, Y. S., J. S. Kim, S. H. Park, S. U. Choi, C. O. Lee, and Kim, S. K. (2003), Two cytotoxic sesquiterpene lactones from the leaves of *Xanthium strumarium* and their in vitro inhibitory activity on farnesyl transferase, *Planta Med.* **69**, 375-377.
28. Vestergaard, C., H. Yoneyama, and K. Matsushima (2000), The NC/Nga mouse : a model for atopic dermatitis, *Mol. Med. Today* **6**, 209-210.
29. Tohda, C., H. Sugahara, Y. Kuraishi, and K. Komatsu (2000), Inhibitory effect of Byakko-ka-ninjin-to on itch in a mouse model of atopic dermatitis, *Phytother Res.* **14**, 192-194.
30. Maric, D. and J. L. Barker (2004), Neural stem cells redefined : a FACS perspective, *Mol. Neurobiol.* **30**, 49-76.
31. Klein, D., B. Bugl, W. H. Gunzburg, and B. Salmons (2000), Accurate estimation of transduction efficiency necessitates a multiplex real-time PCR, *Gene Ther.* **7**, 458-463.
32. Steuerwald, N., J. Cohen, R. J. Herrera, and C. A. Brenner (2000), Quantification of mRNA in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR, *Mol. Hum Reprod.* **6**, 448-453.
33. Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, and M. Collins (2006), Interleukin(IL)-22 and IL-17a reexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides, *J. Exp. Med.* **203**, 2271-2279.
34. Thone, F., B. Schwanhauser, D. Becker, M. Ballmaier, and D. Bumann, D. (2007), FACS-isolation of Salmonella-infected cells with defined bacterial load from mouse spleen, *J. Microbiol Methods* **71**, 220-224.
35. Ghosh, S., S. Gepstein, J. J. Heikkila, and E. B. Dumbroff (1988), Use of a scanning densitometer or an ELISA plate reader for measurement of nanogram amounts of protein in crude extracts from biological tissues, *Anal Biochem.* **169**, 227-233.
36. Carson, S. D. and P. G. Archer (1986), Tissue factor activity in HeLa cells measured with a continuous chromogenic assay and ELISA reader, *ThrombRes.* **41**, 185-195.
37. Korda, A., Z. Wrobel, and K. Gwardiak (2006), An efficient route from trifluoroacetates to water soluble free amines using Diaion HP-20, *Amino Acids* **30**, 95-98.
38. Soylak, M., F. Armagan, L. Elci, and M. Dogan (2001), A new preconcentration and separation method for flame atomic absorption spectrometric determinations of some trace metal ions on a Diaion HP-20 column, *Ann Chim.* **91**, 637-647.
39. Vichai, V. and K. Kirtikara (2006), Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nat. Protoc.* **1**, 1112-1116.
40. Suto, H., H. Matsuda, K. Mitsuishi, K. Hira, T. Uchida, and T. Unno (1999), NC/Nga mice : a mouse model for atopic dermatitis, *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **120**, 70-75.
41. Lee, J. B., J. M. Kim, S. J. Kim, J. H. Park, S. H. Hong, and S. I. Roh (2005), Comparative characteristics of three human embryonic stem cell lines, *Mol. Cells.* **19**, 31-38.
42. Kobayashi, T., S. Okamoto, T. Hisamatsu, N. Kamada, H. Chinen, and R. Saito (2008), IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease, *Gut* **57**, 1682-1689.
43. Baecher-Allan, C. M., and D. A. Hafler (2005), Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+CD25+ T cells, *Clin. Immunol.* **117**, 192-193.
44. Hadjantonakis, A. K. and A. Nagy (2000), FACS

- for the isolation of individual cells from transgenic mice harboring a fluorescent protein reporter. *Genesis* **27**, 95-98.
45. Chevrel, G., P. Garnero, and P. Miossec (2002), Addition of interleukin 1 (IL1) and IL17 soluble receptors to a tumour necrosis factor alpha soluble receptor more effectively reduces the production of IL6 and macrophage inhibitory protein-3alpha and increases that of collagen in an in vitro model of rheumatoid synoviocyte activation, *Ann Rheum Dis.* **61**, 730-733.
 46. Housseau, F., K. R. Lindsey, S. D. Oberholtzer, M. I. Gonzales, P. Boutin, and A. K. Moorthy (2002), Quantitative real-time RT-PCR as a method for monitoring T lymphocyte reactivity of full-length tyrosinase protein in vaccinated melanoma patients, *J. Immunol. Methods* **266**, 87-103.
 47. Lyons, A. B. (2000), Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution, *J. Immunol. Methods* **243**, 147-154.
 48. Godfrey, W. R., M. R. Krampf, P. A. Taylor, and B. R. Blazar (2004), Ex vivo depletion of alloreactive cells based on CFSE dye dilution, activation antigen selection, and dendritic cell stimulation, *Blood* **103**, 1158-1165.
 49. Martin, A. and M. Clynes (1993), Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays, *Cytotechnology* **11**, 49-58.
 50. Gurbay, A., C. Garrel, M. Osman, M. J. Richard, A. Favier, and F. Hincal (2002), Cytotoxicity in ciprofloxacin-treated human fibroblast cells and protection by vitamin E, *Hum. Exp. Toxicol.* **21**, 635-641.
 51. McKenzie, B. S., R. A. Kastelein, and D. J. Cua (2006), Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway, *Trends Immunol.* **27**, 17-23.
 52. Hunter, C. A. (2005), New IL-12-family members : IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions, *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 521-531.
 53. Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quin, W. S. Helms, D. C. Bullard, and C. O. Elson (2006 May), Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage, *Nature* **441**, 231-234.
 54. Chen, Z., A. Laurence, Y. Kanno, M. Pacher-Zavisin, B. M. Zhu, and C. Tato (2006), Selective regulatory function of SOCS 3 in the formation of IL-17 secreting T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 8137-8142.
 55. Hoeve, M. A., N. D. Savage, T. de Boer, D. M., de, Langenberg, Waal. R. Malefyt, and T. H. Ottenhoff (2006), Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells. *Eur. J. Immunol.* **36**, 661-670.
 56. Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger (2006), TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells, *Immunity* **24**, 179-189.
 57. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, and M. Oukka (2006), Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells, *Nature* **441**, 235-238.
 58. Kolls, J. K. and A. Linden (2004), Interleukin-17 family members and inflammation, *Immunity* **21**, 67-476.
 59. Korn, T., M. Oukka, V. Kuchroo, and E. Bettelli (2007), Th17 cells : effector T cells with inflammatory properties, *Semin. Immunol.* **19**, 362-371.
 60. Lubberts, E., P. Schwarzenberger, W. Huang, J. R. Schurr, J. J. Peschon, and W. B. van den Berg (2005), Requirement of IL-17 receptor signaling in radiation-resistant cells in the joint for full progression of destructive synovitis, *J. Immunol.* **175**, 3360-3368.
 61. Chabaud, M. and P. Miossec (2001), The combination of tumor necrosis factor alpha blockade with interleukin-1 and interleukin-17 blockade is more effective for controlling synovial inflammation and bone resorption in an ex vivo model, *Arthritis Rheum* **44**, 1293-1303.
 62. Yen, D., J. Cheung, H. Scheerens, F. Poulet, T. McClanahan, and B. McKenzie (2006), IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6, *J. Clin. Invest.* **116**, 1310-1316.
 63. Chabaud, M., J. M. Durand, N. Buchs, F. Fossiez, G. Page, and L. Frappart (1999), Human interleukin-17 : A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium, *Arthritis Rheum* **42**, 963-970.
 64. Joosten, L. A., T. R. Radstake, E. Lubberts, L. A. Bersselaar, P. L. van Riel, and P. L. van Lent (2003), Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* **48**, 339-347.
 65. Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, and Y. Araki (2003), Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease, *Gut.* **52**, 65-70.