

유근피 추출물이 RBL-2H3 비만세포에서 β -hexosaminidase 및 cytokine 분비에 미치는 효과

박세봉 · 강경화¹⁾ · 윤화정 · 고우신
동의대학교 한방안이비인후피부과학교실
¹⁾ 동의대학교 한의과대학 생리학교실

Inhibitory effect of *Ulmus davidiana* on β -hexosaminidase release and cytokine production in RBL-2H3 cells

Se-Bong Park · Kyung-Hwa Kang¹⁾ · Hwa-Jung Yoon · Woo-Shin Ko

Objectives : *Ulmus davidiana* (UD) has been widely used in Korean herbal medicines used for treatment of acute and chronic inflammatory diseases, such as rhinitis, asthma, and abscess. In this study, To investigated the protective effect of UD on type 1 allergic response, we determined whether UD inhibits early and late allergic response.

Methods : The effect of UD was analyzed by ELISA and RT-PCR in RBL-2H3 cells. Levels of β -hexosaminidase, interleukin (IL)-4 and TNF- α were measured using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). mRNA levels of COX-2 and T-helper type 2(Th2) cytokines were analyzed with RT-PCR.

Results : We found that UD suppressed β -hexosaminidase release in RBL-2H3 not only by the PMA plus A23187 stimulation, but also by the IgE-DNP-HSA stimulation at the antigen-antibody binding stage and antibody-receptor binding stage. UD also significantly inhibited COX2 level, along with reduced Th2 cytokine levels, such as IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF, and TNF- α in RBL-2H3.

Conclusions : Our results indicate that UD protects against type 1 allergic response and exerts an anti-inflammatory effect through the inhibition of degranulation and expression of COX2 and Th2 cytokines.

Key words : *Ulmus davidiana* (UD), type 1 allergic response, β -hexosaminidase, T-helper type 2(Th2) cytokines, RBL-2H3

교신저자 : 고우신, 울산광역시 남구 신정동 479-13번지
동의대학교 울산환방병원
(Tel : 052-226-8101, E-mail : wsko@deu.ac.kr)
• 접수 2011/03/14 • 수정 2011/03/28 • 채택 2011/04/04

I. 서론

제 1형 알러지 반응은 음식, 집먼지, 진드기, 화장품, 꽃가루 등의 특정한 항원에 의해 유도된다. 항원이 인체를 자극하여 IgE를 생성 분비하고 비만세포 수용체와 결합하여 복합체를 이루는데, 동일한 항원에 재감작되어 IgE를 교차결합하였을 때 비만세포가 활성화되고 알러지 반응이 시작된다^{1,2)}. 제 1형 알러지 반응은 초기반응과 후기반응으로 나눌 수 있다. 초기반응은 수분 내에 발생하여 비만세포로부터 histamine, β -hexosaminidase, serotonin과 같은 이미 생성되어 있는 매개물질과 새로 합성된 지방성분의 매개물질을 분비하고, 후기반응은 수시간 내에 발생하여 T-helper type 2(Th2) 사이토카인을 합성하고 분비하여 염증반응을 지속시킨다³⁾.

비만세포에 의해 분비된 histamine은 알러지 초기 반응의 탈과립을 나타내는 주요 인자이다. RBL-2H3 세포는 점막형 비만세포의 특징을 나타내고 세포막표면에 수많은 IgE 수용체를 발현하고 있어 IgE 항체에 감작된 후 항원에 반응하여 histamine을 분비한다. β -Hexosaminidase는 비만세포의 분비과립 내에 저장되어있으며, 비만세포가 면역학적으로 활성화되었을 때 histamine과 함께 분비된다⁴⁻⁶⁾. 비만세포에 의해 새롭게 생성된 지방성분의 매개물질과 사이토카인은 알러지성 급성 및 만성 염증반응을 유발하는 주요인자이다.

그러므로 RBL-2H3 세포는 알러지에 대한 약물의 효능을 연구하는데 좋은 모델이 된다.

楡根皮는 느릅나무의 樹皮 및 根皮를 건조한 것으로 利水通淋, 消腫解毒, 滲濕熱의 효능이 있어 水腫, 癰疽發背, 疥癬 및 風熱腫毒, 項生瘰癧, 小兒頭瘡 등에 사용되어 왔으며 임상적으로 알레르기 비염, 축농증 등의 증상에 활용되고 있다⁷⁾.

유근피를 이용한 알러지 연구로는 아나필락시스, 비염, 천식의 억제효능 등에 대한 연구가 발표되었

다⁸⁻¹⁰⁾.

본 연구는 RBL-2H3 세포를 이용한 제 1형 알러지 반응에 초점을 맞추어 in vitro 항알러지 활성을 조사하였다. 초기반응을 유도하는 탈과립으로 인한 β -hexosaminidase 분비와 후기반응을 유도하는 사이토카인의 생산과 mRNA 발현에 미치는 유근피 추출물의 억제효과를 살펴보았다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

본 실험에 사용된 anti-dinitrophenyl (DNP) immunoglobulin E (IgE), DNP-HSA는 Sigma (USA)로부터, Dulbecco's modification Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin 및 trypsin-EDTA solution은 Gibco BRL로부터, tetrazolium bromide salt (MTT) 및 dimethylsulfoxide (DMSO)는 Amresco로부터, Interleukin (IL)-4와 tumor necrosis factor alpha (TNF- α) kit는 BD Biosciences Pharmingen으로부터, RT-PCR kit (AccuPower RT/PCR PreMix)는 Bioneer로부터 구입하여 사용하였다.

2. 시료의 추출

본 실험에 사용된 유근피 (Ulmus davidiana : UD)는 갑당약초 (홍천, 강원도)에서 구입하여 사용하였다. UD 600 g을 증류수로 水洗하여 4 L의 증류수를 가하여 6 시간 동안 가열 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 분리하고, 0.2 mm 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 200 ml가 되도록 減壓濃縮한 후 냉동 건조하여 40 g의 抽出物을 얻었다. -20℃에 보관하였다가 실험직전 생리식염수나 배지에 희석하여 0.2 μ m syringe filtering 후 실험에 사용하였다.

3. 세포배양

RBL-2H3 (rat basophilic leukemia cell line)은 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받아 배양하였다. 세포의 배양을 위하여 10% heat-inactivated FBS (Gibco BRL, USA)과 1% penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL, USA)을 포함한 DMEM (Gibco BRL, USA) 배양액에서 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution (Gibco BRL, USA)을 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대 배양하였다.

4. MTT assay

RBL-2H3 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT법을 사용하였다¹¹⁾. RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 48 well plate (Corning, USA)에 5×10^4 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 24 시간 배양하였다. UD를 농도별 (0, 0.5, 1, 2 및 4 mg/ml)로 처리한 후 1 시간 동안 반응시켰다. 배양액을 제거 한 후 5 mg/ml의 MTT를 각 well에 넣고 잘 섞어 준 후 4 시간 37°C incubator에서 배양한 후 tetrazolium bromide salt를 제거하고 DMSO를 150 μ l씩 분주하여 well에 생성된 formazin이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 모두 녹인 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 평균값과 표준 편차를 구하였다.

5. β -hexosaminidase inhibition assay

알러지 초기반응의 지표인 탈과립에 대한 억제 효과를 살펴보기 위하여 β -hexosaminidase의 분비를 세가지 방법을 사용하여 측정하였다. 비면역

학적 반응으로 UD 처리 후 PMA와 A23187로 자극하였으며, 면역반응으로 항원-항체 결합단계와 항체-수용체 결합단계에서 측정하기 위하여 UD를 IgE 감작단계와 항원자극단계에서 처리하였다.

PMA+A23187 자극에 의한 β -hexosaminidase의 분비에 미치는 영향을 측정하기 위하여 RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate (Corning, USA)에 5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7.2) 로 2 번 세척한 다음 각 well 당 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가하고 UD를 농도별 (0.5, 1, 2 및 4 mg/ml)로 1 시간 동안 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. Siraganian buffer로 2 번 세척한 다음 각 well 당 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가하고 50 nM PMA 와 1 μ M A23187 를 처리한 후 30 분간 반응시키고 ice bath에서 10 분 동안 방치한 후 반응을 종결시켰다. 상층액 20 μ l를 96 well plate에 옮기고 substrate buffer (4-*p*-Nitrophenyl-*N*-acetyl-b-D- glucosaminide 1 mM, sodium citrate 0.05 M, pH 4.5) 80 μ l를 넣고 37°C에서 30 분 배양시킨 다음 각 well당 stop solution 200 μ l를 첨가하여 반응을 종결시켰다. Microplate reader (Molecular Devices Co. Ltd., USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항원-항체 결합단계에서 β -hexosaminidase의 분비에 미치는 영향을 측정하기 위하여 RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 48 well plate (Corning, USA)에 5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE (0.5 μ g/ml)로 감작하고 37°C 5%

CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7.2) 로 2 번 세척한 다음 각 well 당 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가하고 UD를 농도별 (0.5, 1, 2 및 4 mg/ml)로 1 시간 동안 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양 한 후 DNP-HSA (10 μ g/ml)로 처리하여 1 시간 동안 반응시키고 ice bath에서 10 분 동안 방치한 후 반응을 종결시켰다. 상층액 20 μ l를 96 well plate에 옮기고 substrate buffer (4-*p*-Nitrophenyl-*N*-acetyl-b-D-glucosaminide 1 mM, sodium citrate 0.05 M, pH 4.5) 80 μ l를 넣고 37°C에서 30 분 배양시킨 다음 각 well당 stop solution 200 μ l를 첨가하여 반응을 종결시켰다. Microplate reader (Molecular Devices Co. Ltd., USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항체-수용체 결합단계에서 β -hexosaminidase의 분비에 미치는 영향을 측정하기 위하여 UD를 농도별 (0, 0.5, 1, 2 및 4 mg/ml)은 IgE 감작단계 전에 세포에 처리되었다. 상층액에서의 측정은 앞의 방법과 같이 측정하였다.

UD 처리군과 대조군의 흡광도 값으로 다음 식에 의해 net percent release(%)를 산출하였다.

$$\text{net percent release(\%)} = \frac{[S/(S+P)-S_{\text{control}}/(S_{\text{control}}+P_{\text{control}})] \times 100}{S_{\text{control}}/(S_{\text{control}}+P_{\text{control}})(\%)}$$

S : supernatant, P : pellet
 $S_{\text{control}}/(S_{\text{control}}+P_{\text{control}})(\%)$ is spontaneous release of mediator without a stimulus

6. IL-4 and TNF- α secretion assay

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate (Corning, USA)에 2.5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE (0.5 μ g/ml)로 감작하고 37°C

5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7.2) 로 2 번 세척한 다음 각 well 당 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가 하였다. 그 후 UD (0, 0.5, 1, 2 및 4 mg/ml)를 처리하여 1 시간 동안 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 DNP-HSA (10 μ g/ml)를 처리한 후 4 시간 동안 반응시키고 ice bath에서 10 분 동안 방치한 후 반응을 종결시켰다. 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 IL-4와 TNF- α ELISA kit (BD Biosciences Pharmingen, USA)를 사용하여 측정하였다. Microplate reader (Molecular Devices Co. Ltd., USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 IL-4와 TNF- α 의 양을 계산하였다.

7. RT-PCR

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 6 well plate (Corning, USA)에 1×10^6 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE (0.5 μ g/ml)로 감작하고 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한다. 새로운 DMEM 배지로 교환한 후 UD를 농도별 (0, 1, 2 및 4 mg/ml)로 세포에 처리하였다. 1 시간 동안 배양한 후 PBS로 2 번 세척한 다음 DNP-HSA (10 μ g/ml)로 자극한 후 1 시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거한 후 1 ml의 TRizol을 넣고 2 분간 방치한 후 chloroform을 넣고 10 초간 vortexing하고 5,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합하여 흔들어 주었다. 13,000 rpm에서 25 분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 DEPC (diethyl pyrocarbonate)-DW 20 μ l에 녹여 RT-

PCR에 사용하였다.

RT-PCR kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 45℃에서 30 분, 94℃에서 5 분간 반응시킨 후 94℃에서 30 초간 denaturation시키고, 55℃에서 30 초간 annealing시킨 다음, 72℃에서 1 분간 extension시키는 cycle을 32 회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72℃에서 5 분간 PCR machine (GeneAmp, PCR system 9700, USA)에서 수행하였다. 각 PCR products는 2% agarose gel에 loading하여 100 V 조건에서 30 분간 전기영동을 통하여 분석하였다. 각각의 primer의 염기서열은 다음과 같다(Table 1).

8. 통계처리

成績은 SPSS 17.0K for Windows 통계 프로그램 패키지를 사용하여 평균치 ± 표준편차로 나타내었고 유의수준은 P<0.05로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 one way-ANOVA와 Dunnett test 검정을 실시하였다.

III. 결 과

1. 세포생존 및 증식에 미치는 영향

RBL-2H3 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 알아본 결과 UD를 처리하지 않은 세포는 0.58 ± 0.02 의 흡광도를 나타내었고, UD를 농도별 (0.5, 1, 2, and 4 mg/ml)로 처리한 세포에서 각각 0.57 ± 0.02 (98%), 0.81 ± 0.04 (140%), 1.18 ± 0.03 (203%), 1.35 ± 0.04 (233%)의 흡광도를 나타내어 농도 의존적으로 세포생존 및 증식이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

2. β -Hexosaminidase 분비에 미치는 영향

PMA+A23187 자극에 의한 β -hexosaminidase 분비에 미치는 UD의 억제효과를 살펴본 결과 0.5 mg/ml 농도에서 $61.82 \pm 3.81\%$, 1 mg/ml 농도에서 $95.10 \pm 14.34\%$, 2 mg/ml 농도에서 $105.60 \pm 3.84\%$, 4 mg/ml 농도에서 $121.70 \pm 22.43\%$ 로 나

Table 1. Primers for RT-PCR Analysis

Target gene		5' to 3' direction	size
IL-3	F	GTATGCTGCTCCCGCTCCTGATG	473
	R	CATTCCACGGTCATAGGGCGAAAG	
IL-4	F	ACCTTGCTGTCAACCCTCTTC	351
	R	TTGTGAGCGTGACTCATTC	
IL-5	F	CTCTGTTGACGAGCAATGAG	239
	R	CTCTTGCAGGTAATCCAGGA	
IL-13	F	GCTCTCGCTTGCCTTGGTGGTC	276
	R	CATCCGAGGCCCTTTTGTTACAG	
GM-CSF	F	GCATGTAGATGCCATCAAAGAAGC	342
	R	CATTTCTGGACCGGCTTCCAGC	
TNF- α	F	CAAGGAGGAGAAGTTCCCAA	501
	R	CGGACTCCGTGATGTCTAAG	
COX-2	F	ACTTGCTCACITTTGTTGAGTCATTC	583
	R	TTTGATTAGTACTGTAGGGTTAATG	
GAPDH	F	CCACAGTCCATGCCATCAC	568
	R	TCCACCACCTGTTGCTGTA	

F; forward, R; reverse

타나 농도의존적으로 유의성있는 효과를 나타내었다(Fig. 2A).

항원-항체 결합단계에서 β -hexosaminidase 분비에 미치는 UD의 억제효과를 살펴본 결과 0.5 mg/ml 농도에서 $14.41 \pm 3.89\%$, 1 mg/ml 농도에서 $22.46 \pm 9.11\%$, 2 mg/ml 농도에서 $38.81 \pm 11.73\%$, 4 mg/ml 농도에서 $44.48 \pm 4.00\%$ 로 나타나 농도의존적으로 유의성있는 효과를 나타내었다(Fig. 2B).

항체-수용체 결합단계에서 β -hexosaminidase 분비에 미치는 UD의 억제효과를 살펴본 결과 0.5 mg/ml 농도에서 $28.79 \pm 8.61\%$, 1 mg/ml 농도에서 $20.12 \pm 5.09\%$, 2 mg/ml 농도에서 $47.52 \pm 9.05\%$, 4 mg/ml 농도에서 $88.40 \pm 3.96\%$ 로 나타나 모든 농도에서 유의성있는 효과를 나타내었다(Fig. 2C).

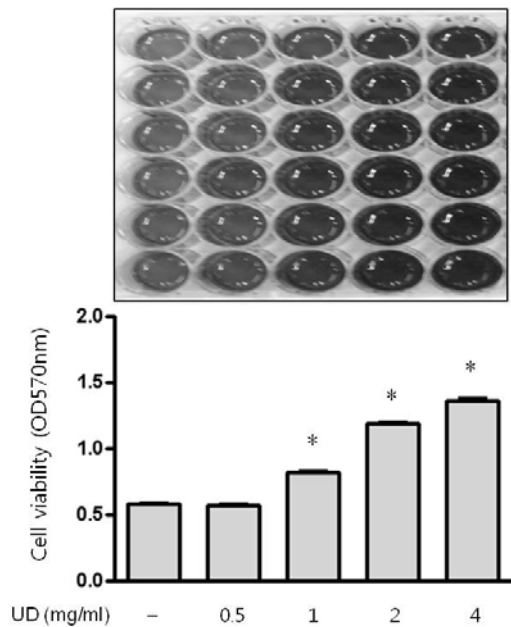


Fig. 1. Effect of UD on RBL-2H3 Cells by MTT Assay. The Cells (5×10^4 cells/ml) were incubated with UD at 37°C for 1 h in 5% CO_2 . The absorbance was measured at 570 nm using ELISA reader. Results represent as the mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs untreated group.

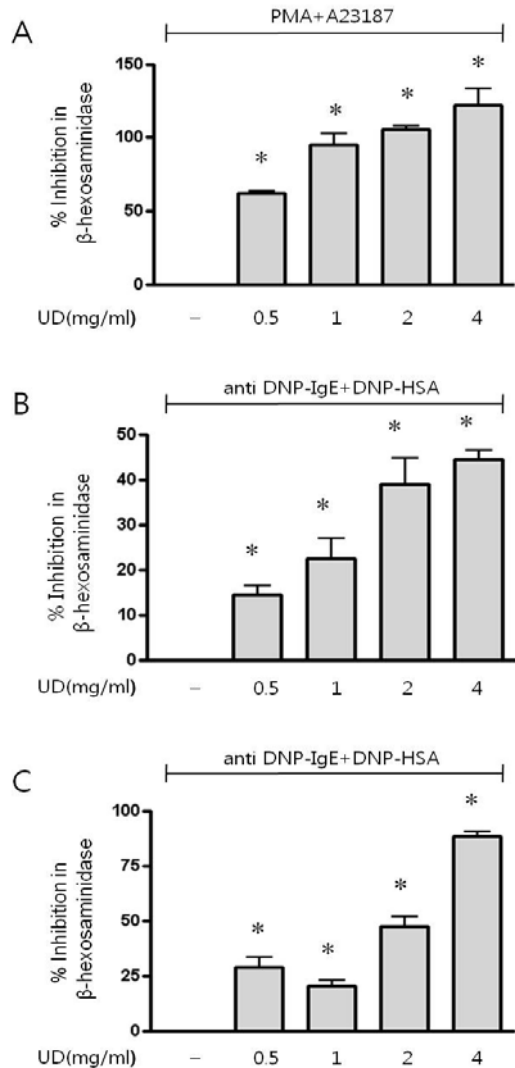


Fig. 2. Effect of UD on the β -Hexosaminidase release from RBL-2H3.

(A) The cells (5×10^5 cells/ml) were preincubated with UD (0.5, 1, 2, and 4 mg/ml) for 30 min prior to their PMA plus A23187 stimulation.

(B) The cells (5×10^5 cells/ml) were sensitized with IgE ($0.5 \mu\text{g/ml}$) overnight and treated with UD (0.5, 1, 2, and 4 mg/ml) for 1 h prior to their DNP-HSA stimulation.

(C) The cells (5×10^5 cells/ml) were preincubated with UD (0.5, 1, 2, and 4 mg/ml) for 1 h prior to their IgE sensitization, and then preincubated with UD (0.5, 1, 2, and 4 mg/ml) for 24 prior to their DNP-HSA stimulation.

The absorbance was measured with a microplate reader at 405 nm. Results represent as the mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs stimulated group.

3. IL-4와 TNF- α cytokine 생산에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 분비된 IL-4의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 2.05 ± 0.49 pg/ml이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 35.27 ± 6.84 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 UD를 농도별 (0.5, 1, 2, and 4 mg/ml)로 처리한 세포에서 각각 28.57 ± 1.74 pg/ml, 24.35 ± 1.00 pg/ml, 16.00 ± 0.35 pg/ml, 11.74 ± 3.07 pg/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 3A).

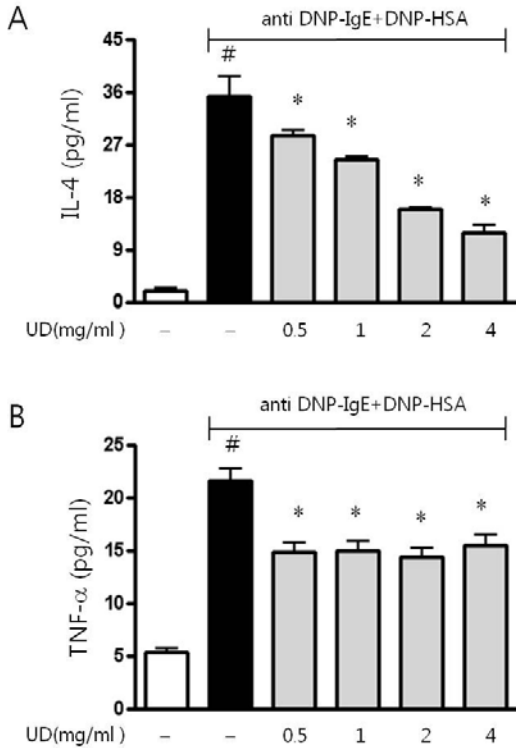


Fig. 3. Effects of UD on the production of IL-4 and TNF- α cytokine in the anti-DNP IgE- sensitized RBL-2H3.

IL-4 (A) and TNF- α (B) concentration was measured from cell supernatant using ELISA method. Results represent as the mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs stimulated group.

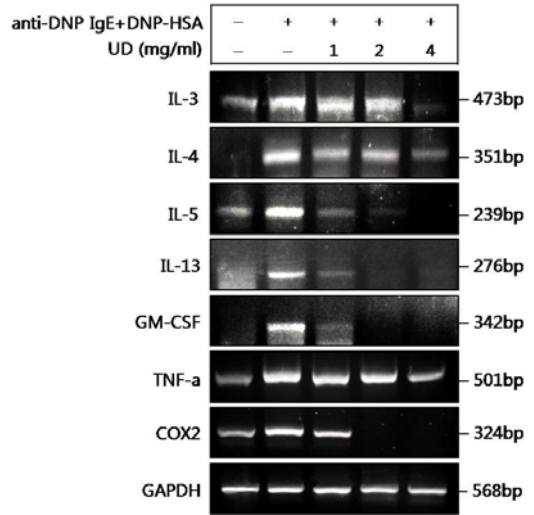


Fig. 4. Effects of UD on the expression of IL-3, IL-4, IL-5, TNF- α , and COX-2 mRNA in the anti-DNP IgE-sensitized RBL-2H3.

Detection of cytokines secretion was examined by RT-PCR analysis. GAPDH was used as internal control genes.

또한 RBL-2H3 cells에서 분비된 TNF- α 의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 5.35 ± 0.72 pg/ml이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 21.58 ± 2.38 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 UD를 농도별 (0.5, 1, 2, and 4 mg/ml)로 처리한 세포에서 각각 14.84 ± 1.68 pg/ml, 14.92 ± 1.72 pg/ml, 14.35 ± 1.59 pg/ml, 15.46 ± 2.04 pg/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 3B).

4. IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF, TNF- α , COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서의 IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF, TNF- α 와 COX-2 mRNA의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 mRNA의 발현량

이 현저하게 증가하였으며, UD (1, 2, and 4 mg/ml)를 처리한 세포에서 mRNA의 발현이 감소하는 것으로 나타났다. 특히 IL-5, IL-13, GM-CSF와 COX2 mRNA의 발현은 UD (1, 2, and 4 mg/ml) 모든 농도에서 현저하게 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 4).

IV. 고 찰

유근피는 《東醫寶鑑》에서 “성질이 평하고 맛이 달며 독이 없다. 오줌을 잘 나가게 하고 腸胃의 邪熱을 없애며, 부은 것을 가라앉힌다”고 하였다¹²⁾. 유근피를 이용한 알러지 질환에 관한 연구는 아나필락시스, 비염, 천식 등이 발표되었다⁸⁻¹⁰⁾. 본 연구에서는 RBL-2H3 비만세포를 이용하여 제 1형 알러지 반응에서 초기반응과 후기반응의 억제 효과를 조사하였다.

본 실험에서 UD (0.5, 1, 2, and 4 mg/ml) 농도에 따른 RBL-2H3 비만세포에 대한 독성을 MTT법을 사용하여 조사하였다. 그 결과 UD는 모든 농도에서 세포독성은 관찰되지 않았고, 2, and 4 mg/ml의 농도에서 세포성장을 촉진시키는 것으로 나타났다(Fig. 1).

비만세포는 제 1형 알러지 염증 반응에서 중요한 역할을 하며, 세포표면에 Fc ϵ R1 수용체를 발현하고 있다. 항원들이 수용체에 결합된 IgE와 교차결합되면 활성화가 시작되고 탈과립화가 진행된다. 탈과립화는 항원 결합 후 수분 내에 발생하여 이미 생성되어 있는 다양한 종류의 염증성 매개물질들을 세포 밖으로 방출한다. 그 후 지방성분의 매개물질들을 생성하여 분비하고 수시간 후에는 사이토카인을 합성 분비하여 염증반응을 지속시킨다. β -hexosaminidase는 비만세포의 분비과립에 저장되어 있다가, 비만세포가 면역학적으로 활성화될 때 histamine과 함께 부수적으로 분비되므로 β -

hexosaminidase의 활성화는 비만세포 탈과립의 표지인자로서 사용된다^{6,13)}.

본 실험에서 UD는 비면역학적 자극에 대해 β -hexosaminidase의 분비를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 2A). 또한 UD는 IgE 매개 면역자극에서 항원-항체 결합과 항체-수용체 결합을 모두 제어함으로써 β -hexosaminidase의 분비를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 2B, 2C).

IL-4는 제 1형 알러지 반응의 매개자인 IgE와 비만세포 매개성 면역반응의 조절자로 IL-4의 생산 증가는 알러지의 발생에 중추적인 것으로 알려져 있다¹⁴⁾. 또 활성화된 비만세포에 의해 많은 양의 TNF- α 들이 분비되는데, 일부는 비만세포 과립들 내에 저장된 것들로부터 유래하며, 다른 일부는 활성화된 비만세포들 자체에 의해 새로 생성된 것들로 내피세포들을 활성화하여 부착분자 발현을 증가시킴으로써 염증성 백혈구와 림프구의 유입을 조장하는 것으로 알려져 있다. 비만세포에서 유리된 TNF- α 는 국소의 혈관내피세포에 작용하여 백혈구의 혈관의 유주를 유도하는 것으로써 특히 알러지 국소의 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다^{15,16)}.

본 실험에서 UD는 IgE 매개 알러지 반응에서 IL-4와 TNF- α 의 생산을 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 3A, 3B).

일단 비만세포가 활성화되면, 지방성분의 매개물질들은 세포막 인지질들에서 유래한 전구물질인 아라키돈산으로부터 만들어지는데, 크게 cyclooxygenase 활성을 거쳐 prostaglandin을 생성하는 경로와 lipoxygenase 활성을 거쳐 leukotriene을 생성하는 경로로 나누어지며, 조직 내에서 염증반응들을 지속시키는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 또한 지방성분의 매개물질과 함께 Th2 반응을 지속시키는 IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 및 GM-CSF와 같은 추가적인 사이토카인들도 새로이 합성되고 분비된다¹⁸⁾.

본 실험에서 UD가 IgE 매개 알러지 반응에서 cyclooxygenase 활성을 억제하는지 조사한 결과 COX2 mRNA의 발현을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. 특히 2 mg/ml과 4 mg/ml의 농도에서 현저하게 억제하였다. 또한 UD가 Th2 반응을 지속시키는 사이토카인의 생성을 억제하는지 조사한 결과 IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF 및 TNF- α mRNA의 발현을 억제하였고, 특히 IL-5, IL-13과 GM-CSF mRNA의 발현은 UD (1, 2, and 4 mg/ml) 모든 농도에서 현저하게 감소시켰다(Fig. 4).

결론적으로 UD는 비만세포의 활성을 효과적으로 억제하여 제 1형 알러지의 초기반응과 후기반응을 조절하였다. 비면역학적 또는 면역학적 경로를 통한 비만세포 탈과립을 효과적으로 억제하여 초기 화학적 매개물질의 방출을 감소시켰고, 비만세포 자체에서 생산된 IL-4와 TNF- α 을 감소시켰다. 또한 지방성분의 매개물질과 후기 Th2 사이토카인 mRNA의 발현을 감소시켰다.

이것으로 볼 때 UD는 제 1형 알러지의 염증반응의 예방 또는 치료에 응용할 수 있는 가능성이 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Metcalfe DD, Kaliner M, Donlon MA. The mast cell. *Crit. Rev. Immunol.* 1981; 3:23-74.
2. Church MK, Levi-Schaffer F. The human mast cell. *J. Allergy Clin. Imm.* 1997; 99:155-60.
3. Chang TW, Shiung YY. Anti-IgE as a mast cell-stabilizing therapeutic agent, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006;117(6):1203-12.
4. Schwartz LB, Lewis RA, Seldin D, Austen KF. Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. *J Immunol.* 1981;126(4):1290-4.
5. Marquardt DL, Wasserman SI. Modulation of rat serosal mast cell biochemistry by in vivo dexamethasone administration. *J Immunol.* 1983;131(2):934-9.
6. Mastuda H, Morikawa T, Ueda K, Managi H, Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-Induced degranulation, TNF-alpha and IL-4 production from RBL-2H3 cells. *Bioorg Med Chem.* 2002;10(10):3123-8.
7. 전국한과의과대학 본초학교수. 본초학. 서울:영림사. 1991:418-9.
8. 오명진, 이언정, 송봉근, 김형균, 김동혁, 김성재. 유근피가 전신적 및 국소적 아나필락시스에 미치는 효과. *대한한방내과학회지.* 1998;19(2):249-60.
9. 이형구, 한동하. 청비소염환(淸鼻消炎丸)이 알레르기성 비염환자의 삶의 질에 미치는 임상적 효과. *대한한방내과학회지.* 2002;23(1): 73-81.
10. Lee MY, Seo CS, Ha H, Jung D, Lee H, Lee NH, Lee JA, Kim JH, Lee YK, Son JK, Shin HK. Protective effects of *Ulmus davidiana* var. *japonica* against OVA-induced murine asthma model via upregulation of heme oxygenase-1. *J Ethnopharmacol.* 2010;130(1):61-9.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
12. 허준. 동의보감. 서울:법인문화사. 2008:1968.

13. Marquardt DL, Wasserman SI. Modulation of rat serosal mast cell biochemistry by in vivo dexamethasone administration. *J Immunol*. 1983;131:934-9.
14. Iikura M, Yamaguchi M, Hirai K, Miyamasu M, Yamada H, Nakajima T, Fujisawa T, Ra C, Morita Y, Yamamoto K. Regulation of surface FcepsilonRI expression on human eosinophils by IL-4 and IgE. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;124:470-7.
15. 이중달. 그림으로 설명한 병리학. 서울:고려의학. 1991:29.
16. Chai OH, Han EH, Lee HK, Song CH. Mast cells play a key role in Th2 cytokine-dependent asthma model through production of adhesion molecules by liberation of TNF- α . *Exp Mol Med*. 2001;43(1):35-43.
17. Taketomi Y, Murakami M. Lipid networks in mast cell biology. *Yakugaku Zasshi*. 2001;131(1):73-84.
18. Deo SS, Mistry KJ, Kakade AM, Niphadkar PV. Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lung India*. 2010;27(2):66-71.