

MC/9 비만세포에서杏仁 추출물의 Th2 cytokine 발현 억제 효과 및 신호전달 기전 연구

강기연 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

The Suppressive Effect on Th2 Cytokines Expression and the Signal Transduction Mechanism in MC/9 Mast Cells by PRAL

Kang Ki Yeon · Han Jae Kyung · Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Korean Medicine, Daejeon University

Objectives

PRAL (*Prunus armeniaca Linne Var*) is a herbal formula in Oriental Medicine, known for its anti-inflammatory and anti-allergenic properties. However, its mechanism of action and the cellular targets have not yet been found enough. The purpose of this study is to investigate the effects of PRAL on Th2 cytokines expression in MC/9 mast cells.

Methods

The effect of PRAL was analyzed by ELISA, Real-time PCR, Western blot in MC/9 mast cells. mRNA levels of GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α were analyzed with Real-time PCR. Levels of IL-13, MIP-1 α were measured using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). NFAT, AP-1 and NF- κ B p65 were examined by Western blot analysis.

Results

PRAL inhibited GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α mRNA expression in a dose dependent manner. GM-CSF, IL-4, IL-5 mRNA expression were inhibited significantly in comparison to DNP-IgE control group at concentration of 100 μ g/ml and IL-6, IL-13, TNF- α mRNA expression were inhibited at concentration of 50 μ g/ml, 100 μ g/ml.

PRAL also inhibited the IL-13, MIP-1 α production significantly in comparison to DNP-IgE control group in a dose dependent manner. IL-13 production was inhibited at a concentration of 200 μ g/ml, 400 μ g/ml and MIP-1 α was inhibited at a concentration of 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml.

Western blot analysis of transcription factors involving Th2 cytokines expression revealed prominent decrease of the mast cell specific transcription factors including NFAT-1, c-Jun as well as NF- κ B p65 but not NFAT-2 and c-Fos.

Conclusion

These results indicate that PRAL has the effect of suppressing Th2 cytokines production in the MC/9 mast cells. These data represent that PRAL potentiates therapeutic activities to the allergic disease by regulating Th2 cytokines in the MC/9 mast cells.

Key words : PRAL (*Prunus armeniaca Linne Var* 杏仁), MC/9 mast cell, Atopic disease, Anti allergic effect, Th2 cytokines

Received: April 25, 2014 • Revised: May 19, 2014 • Accepted: May 20, 2014

Corresponding Author: Han Jae Kyung

Cheonan korean medicine hospital of Daejeon university, 4 Notsaallo, Seobuk-gu, Cheonan-si, Chungcheongnam-do, Republic of Korea.

Tel: +82-41-521-7570, Fax: +82-41-521-7557

E-mail: hanjk@dju.kr

© The Association of Pediatrics of Korean Medicine. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I. Introduction

아토피 (Atopy)란 다양한 환경 항원에 대한 반응으로 강력한 즉시형 과민반응을 나타내도록 IgE 항체를 생산하는 개체의 특성을 의미한다¹⁾. 아토피성 질환이라 함은, 제1형 과민 반응 형태인 알레르기 질환으로 천식, 두드러기, 알레르기 비염, 아토피 피부염, 아나필락시스 등이 대표적이며, 표적기관에 염증이 형성되고 이로 인해 발생하는 과반응의 증상이 나타나는 것을 말하며, 임상적으로 비슷한 증상이 재발하면서 만성화하는 특징이 있다²⁾. 우리나라는 이러한 아토피 질환을 앓고 있는 환자가 급증하고 있고, 특히 어린이 아토피 질환의 빈도는 약 20%가 되는 것으로 추정되고 있다³⁾.

이러한 아토피, 알레르기 질환의 서양의학적 치료 방법으로는 주로 회피요법과 스테로이드, 화학매개체 길항제, 크로몰린, 면역요법 등의 약물요법이 있다²⁾. 한의학적으로는 면역력을 증강시키고 알레르기 염증을 완화하는 목적으로 韓藥療法 및 鍼灸療法을 포함한 다양한 치료가 이뤄지고 있는 가운데, 한 연구에 따르면 한의학적 치료는 일반인들로부터 체질 개선, 저항력 증강, 적은 부작용, 근본적인 치료라는 장점이 있다고 인식되어, 아토피 질환의 한의학적 치료에 대한 관심과 선호도가 높은 것으로 나타났다⁴⁾.

杏仁 (*Prunus armeniaca* Linne Var, PRAL)은 장미과에 속한 낙엽교목인 살구 및 동속 근연식물의 성숙한 종자로, 性은 微溫하고, 味는 苦하며, 有小毒하고, 肺, 大腸經에 歸經하며 降氣止咳平喘, 潤腸通便의 효능이 있어 咳嗽氣喘, 胸滿痰多, 血虛津枯, 腸燥便秘를 치료⁵⁾하여 한의학 처방에 다용⁶⁾되는 약물이다.

杏仁을 이용한 실험적 연구로는杏仁 추출물과杏仁 약침을 통한 항알레르기 효과 연구⁷⁻¹¹⁾에 대한 연구들이 발표되어 항알레르기 효과가 있음을 일부 밝혔으나,杏仁이 Th2 cytokine 발현에 미치는 영향과 신호전달 기전에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는杏仁을 MC/9 비만세포에 처리하여 Real-Time PCR을 통해 GM-CSF, IL-4, 5, 6, 13, TNF- α 유전자 발현과 ELISA를 통해 IL-13, MIP-1 α 단백질 생성을 분석하였고, western blot으로 NFAT, AP-1, NF- κ B p65 등의 전사인자의 발현을 관찰하여,杏仁의 항아토피 효과와 신호전달 기전을 규명하는데 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. Materials and methods

1. 재료

1) 시약 및 기기

(1) 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배양액, Sulforhodamin B (SRB), 2-isopropanol, sodium dodecyl sulfate (SDS), Fetal bovine serum (FBS), Trypsin-EDTA, Antibiotics (penicillin, streptomycin)는 Gibco-BRL사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS), Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Diethyl pyrocarbonate (DEPC), Chloroform, Isopropanol, Ethanol, Nonidet P-40는 Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였다. Trizol은 Ambion사 (U.S.A.) 제품을, EZ-cytox kit는 Daeil Lab.사 (Korea) 제품을, DEPC water는 Invitrogen사 (U.S.A.) 제품을, Deoxynucleoside triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사 (Japan) 제품을, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, primary antibody (NFAT-1, NFAT-2, c-Jun, c-Fos, NF- κ B p65)는 Santa-Cruz사 (California, U.S.A.) 제품을 사용하였다. ECL-hybrid film은 Amersham사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, SYBR master mix와 Taqman master mix는 Applied Biosystems사 (U.S.A.), nuclear extract kit는 Active motif사 (U.S.A.) 제품을, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용한 기기는 열탕추출기 (DWT-1800T, 대응, Korea), 감압 증류장치 (BUCHI B-480, BUCHI Labortechnik AG, Switzerland), 동결 건조기 (EYELA FDU-540, Japan), CO₂ 배양기 (Forma scientific Co., U.S.A.), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), 원심분리기 (한일 과학, Korea), Spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Quantitative Real-Time PCR (Applied Biosystems, U.S.A.), Image-Rab densitometer (Bio-Rad, U.S.A.), Bio-freezer (Sanyo, Japan), ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A.), HPLC (Waters 2695 system, Waters Co. U.S.A.) 등을 사용하였다.

2) 세포 배양 및 성분 분리

(1) 세포 배양

본 실험에 사용된 MC/9 비만세포주(ATCC, U.S.A.)를 10% FBS, 10% T-stim(U.S.A.), 0.05 mM 2-mercaptoethanol and 2 mM L-glutamine(Sigma, U.S.A.) 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin이 함유된 DMEM 배지에 부유시켜 37 °C, 5% CO₂, 95% 대기에서 배양하였다. 세포는 주 2-3회씩 계대 배양하였다.

(2)杏仁 추출물 분리

본 실험에 사용한杏仁(*Prunus armeniaca Linne Var.*, PRAL)은 대전대학교 한의과대학 부속 둔산한방병원 약제과에서 구입, 정선하여 사용하였다.杏仁 분말(200 g)을 ASE300 Accelerated Solvent Extractor(DIONEX Co. U.S.A.)에서 30% Ethanol(1.5 L)에 3일간 침지한 후 50 °C에서 20분간 추출하였다. 추출액을 여과하고 감압 건조하여 얻어진 추출여액을 동결건조기(Biotrn Co. U.S.A.)에서 cold trap -70 °C와 chamber 온도 40 °C에서 24시간 동안 동결 건조하여 14 g의杏仁 추출물(이하 PRAL)을 얻었다.

(3) HPLC 분리 및 지표성분 분석

PRAL 성분 분석을 위한 High performance liquid chromatography(HPLC)는 Agilent 1200 series로서 auto-sampler, column oven, binary pump, DAD detector(Agilent Technologies, Germany), degasser(Agilent Technologies, Japan)를 사용하였으며, software는 Agilent사의 Chemstation software(Agilent Technologies, U.S.A.)를 사용하였다. HPLC 조건으로 컬럼 오븐의 온도는 25 °C, 분석파장은 250 nm, 유속은 0.3 ml/min을 사용하였고, 컬럼은 Luna C18 column(250 mm x 4.6 mm; particle size 5 μm , Phenomenex, U.S.A.)를 사용하였다. A용매는 100% 3차 증류수에 0.1% 포름산을 첨가하고, B용매는 100% 아세토니트릴에 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하였으며 용매계는 다음과 같다(Table 1). 지표성분으로 Amygdalin을 표준시료와 PRAL에서의 성분분석을 하였다.

Table 1. Solvent Gradient Condition for HPLC-DAD

Final time (min)	Flow rate (ml/min)	A	B
0	0.3	85	15
10	0.3	80	20
30	0.3	65	35
35	0.3	65	35
40	0.3	85	15

A : Water with 0.1% formic acid.

B : Acetonitrile with 0.1% formic acid.

2. 방법

1) 세포 독성 측정

(1) MC/9 비만세포주 배양

MC/9 비만세포주를 10% FBS, 10% T-stim, 0.05 mM 2-mercaptoethanol and 2 mM L-glutamine 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin이 함유된 DMEM 배지에 10⁵ cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

(2) 세포 독성 (cytotoxicity) 측정

세포 독성은 EZ-Cytox assay법¹²⁾을 약간 변형하여 실험에 사용하였으며 MC/9 비만세포는 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후 PRAL(최종 농도 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 6시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 μl 씩 각 well에 가하고 실험 종료시까지 배양하였으며, 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader에서 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) Real-Time Polymerase chain reaction (PCR)

(1) RNA 추출

MC/9 비만세포를 48-well plate에 5×10⁵/ml로 1 ml씩 분주하고 24시간 동안 DNP-IgE 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 자극한 후 PBS로 수세하고 10% FBS-DMEM으로 교체하였다. 3시간 후 PRAL(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 양성대조군으로 Cyclosporin A(이하 CsA) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하고 1시간 후에 DNP-BSA 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 자극한 뒤 6시간 후에 세포를 얻었다. 그 세포에 Trizol 시약을 1 ml 넣고 eppendorf tube에 넣은 후 Chloroform을 100 μl 넣었다. 얼음에 17분 동안 두고 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하여 층이 분리되면 eppendorf tube에 상청액을 옮겨 담고, 동량으로 Isopropanol을 넣어 얼음에 10분 정도 두었다가 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 이때 상청액은 버리고 80% Ethanol로 세척한 후, 13,000

Table 2. Primer Sequence for Real-time PCR Analysis

Target gene	Primer	Sequences
GM-CSF	Forward	5'-ACCACCTATGCGGATTTCAT-3'
	Reverse	5'-TCATTACGCAGGCACAAAAG-3'
IL-4	Forward	5'-GGATGTAACGACAGCCCTCT-3'
	Reverse	5'-GTGTTCCTTGTGCGGTAAG-3'
IL-5	Forward	5'-AGCACAGTGGTAAAAGAGACCTT-3'
	Reverse	5'-TCCAATGCATAGCTGGTGATTT-3'
IL-6	Forward	5'-GGTTGCCAAGCCITATCGGA-3'
	Reverse	5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'
IL-13	Forward	5'-CAGTTGCAATGCCATCCACA-3'
	Reverse	5'-AGCCACATCCGAGGCCTTT-3'
TNF- α	Forward	5'-GGCTTTCCGAATTCAGTGGAGCCT-3'
	Reverse	5'-CCCCGGCCTTCCAAATAAATACATTTCATA-3'
GAPDH-VIC	Probe	5'-CATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG-3'

rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상청액을 완전히 제거하고 투명해질 때까지 말린 후 DEPC water로 cell의 양에 따라 25 μ l를 넣어 녹였다.

무처리한 비만세포는 정상군, DNP-IgE로만 자극한 군은 대조군, CsA 처리 후 DNP-IgE로 자극한 군은 양성대조군, 그리고 PRAL로 처리한 후 DNP-IgE로 자극한 군은 실험군으로 하였다.

(2) RT-PCR

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix와 1 μ l random sequence hexanucleotides 25 pmole/25 μ l 및 RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor 20 U/ μ l, 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/ μ l를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

(3) cDNA PCR

Real time quantitative RT-PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였으며, 사용된 Probe와 Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다(Table 2).

mouse GAPDH probe set; Endogenous Control (VIC[®]

/ MGB Probe, Probe limited) from Applied Biosystems (4352339E) 유전자 발현은 Taqman PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard를 GAPDH를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation을 2 min at 50 $^{\circ}$ C, 10 min 94 $^{\circ}$ C, 그리고 40 cycles를 0.15 min at 95 $^{\circ}$ C, 1 min at 60 $^{\circ}$ C에서 수행하였으며 Target group의 relative quantitative (RQ)는 Quantitative PCR로 다음과 같이 측정하였다.

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

x : starting quantity

y : yield

n : number of cycles

e : efficiency

3) ELISA 측정

MC/9 비만세포를 48-well plate에 5 \times 10⁵/ml로 1 ml씩 분주하고 24시간 동안 DNP-IgE 1 μ g/ml로 자극한 후 PBS로 수세하고 10% FBS-DMEM으로 교체하였으며, 3시간 후 PRAL (400 μ g/ml, 200 μ g/ml, 100 μ g/ml)과 양성대조군으로 CsA 10 μ g/ml를 처리하고 1시간 후에 DNP-BSA 0.5 μ g/ml로 자극한 뒤 16시간 후에 세포를 얻었다.

Mouse IL-13, MIP-1 α (eBioscience, U.S.A.) ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 코팅 antibody를 microwell에 100 μ l씩 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 두었으며 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200 μ l씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상청액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상청액을 100 μ l

씩 넣었으며 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다.

Microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였으며, microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. Stop solution을 각 well에 50 μ l씩 넣고 microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 측정하였다.

무처리한 비만세포는 정상군, DNP-IgE로 자극한 군은 대조군, CsA 처리 후 DNP-IgE로 자극한 군은 양성 대조군 그리고 PRAL로 처리한 후 DNP-IgE로 자극한 군은 실험군으로 하였다.

4) Western blot

MC/9 비만세포를 100 \times 20 mm plate에 4×10^5 /ml로 10 ml씩 분주하고 24시간 동안 DNP-IgE 1 μ g/ml로 자극한 후 PBS로 수세하고 10% FBS-DMEM으로 교체하였다. 그리고 3시간 후 PRAL(100 μ g/ml)를 처리하고 1시간 후에 DNP-BSA 0.5 μ g/ml로 자극한 뒤 1시간 후에 차가운 PBS로 세척한 후 scraper로 세포를 얻고 원심분리하여 상청액을 버렸다. Lysis buffer (RIPA buffer 98 μ l + protease inhibitor cocktail 100 \times 1 μ l + PMSF 100 mM 1 μ l) 100 μ l로 얼음에서 15~20분간 배양한 후 상청액을 얻었다. 또한 nuclear extract kit (Active motif, U.S.A.)를 사용하여 hypotonic buffer를 넣고 얼음에서 15분간 배양한 후 원심분리하여 상청액 (cytoplasmic fraction)을 모았으며, tube에 남아 있는 핵에 complete lysis buffer를 넣고 30초 동안 얼음에서 배양한 후 원심분리 하여 상청액 (nuclear fraction)을 얻었다. 이렇게 얻은 단백질은 BCA단백질 정량법으로 정량하였으며, 10% SDS PAGE gel을 만들어서 running buffer를 채운 뒤 20분 동안 pre-running시키고, 그 사이에 단백질을 loading buffer로 희석하고 끓는 물에 5분 동안 끓여서 단백질이 꼬인 것을 풀어주었다. gel의 첫 번째 빈칸은 띄우고 두 번째 칸에 단백질 마커를 넣고 그 다음 칸부터 샘플을 넣어 120 V로 내렸다. 그렇게 내린 gel을 크기에 맞게 자르고 20분 동안 transfer buffer에 담가 놓고, 그 사이에 membrane을 gel의 크기에 맞게 자르고 transfer buffer에 미리 담가 두었다. 그리고 Transfer buffer로 가득 채우고 뜨거워지지 않게 얼음을 넣은 후 150 V로 1시간 30분 동안 membrane으로 이동시켰다. 또한

Membrane을 크기에 맞게 자르고 5% skim milk (TBST buffer)로 1시간 동안 blocking 해주었으며, Primary antibody (NFAT-1, NFAT-2, c-jun, c-fos, NF- κ B p65, YY-1)로 4 $^{\circ}$ C에서 하루를 반응시킨 후, 다음날 secondary antibody를 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 암실에서 ECL detection 용액을 사용하여 필름에 옮기고 현상용액에 담가 현상하고 고정액에 고정시켜 건조시켰으며 결과에 대한 밴드밀도 (band densities)는 YY-1과 비교하여 Image-Rab densitometer (Bio-Rad, U.S.A.)를 사용하여 최종 측정 분석하였다.

무처리한 비만세포는 정상군, DNP-IgE로만 자극한 군은 대조군, CsA로 처리 후 DNP-IgE로 자극한 군은 양성 대조군 그리고 PRAL로 처리한 후 DNP-IgE로 자극한 군은 실험군으로 하였다.

3. 통계 분석

각 실험군 결과값은 SPSS 통계프로그램을 사용하여 통계처리 하였으며, independent T-test로 $p < 0.05$ 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

III. Result

1. HPLC 분리 및 지표성분 확인

杏仁의 지표성분으로 알려진 Amygdalin을 PRAL 내에서 확인하기 위해, Amygdalin 표준물질을 HPLC로 분석한 결과, chromatogram (A)에서 Retention time을 나타내는 고유의 peak이 12.9분대에서 확인되었으며, PRAL의 chromatogram (B)에서 Amygdalin 지표성분을 확인한 선행실험과 동시간대인 12.7분대에서 elution peak을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). PRAL의 Amygdalin 성분함량은 28.8 mg/g으로 약 2.88%에 해당되었다 (Table 3).

2. MC/9 비만세포에 미치는 영향

1) 세포독성

PRAL의 세포독성을 측정한 결과, 대조군에 비하여 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml, 800 μ g/ml의 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 2).

2) Real-Time PCR 분석

Table 3. Content of Amygdalin as a Marker Compound in PRAL

	Concentration (mg/ml)	RT (min)	Area	Content (%)	Content (mg/g)
Amygdalin	0.1	12.975	1,504,265		
PRAL	50	12.790	22,183,975	2.88	28.8

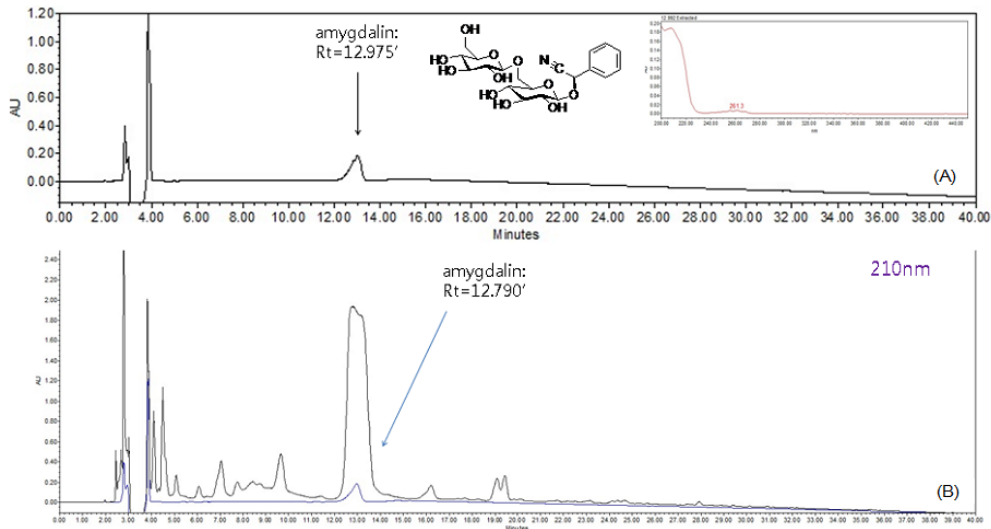


Fig. 1. Chemical structure and chromatogram of peak of amygdalin standard and PRAL extract

(A) Chromatogram of amygdalin standard

(B) Chromatogram of PRAL

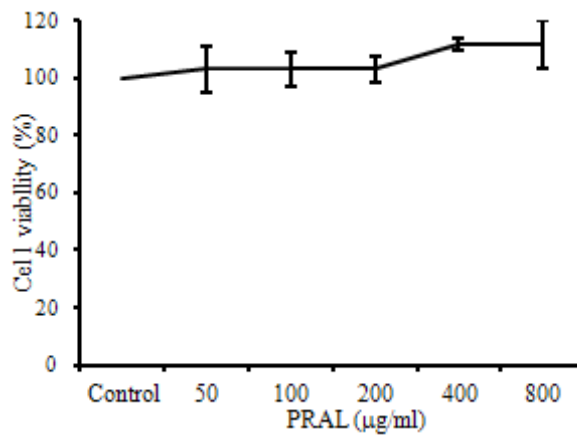


Fig. 2. Cytotoxic effects of PRAL in MC/9 mast cells

MC/9 mast cells were pretreated with various concentration PRAL. The results were expressed as the mean ± S.E.

PRAL이 비만세포에서 GM-CSF와 IL-4, IL-13, IL-5, TNF-α, IL-6 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 각각의 MC/9 비만세포에 CsA와 다양한 농도의 PRAL을 처리한 후 DNP-IgE로 자극한 뒤 Real-Time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석하였다.

(1) GM-CSF mRNA 유전자 발현

GM-CSF mRNA 유전자 발현은 정상군이 0.308 ± 0.093 이었고 대조군이 0.994 ± 0.007 로 정상군에 비해 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은 0.325 ± 0.100 로 대조군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었다. 실험군에서 50 µg/ml에서는 0.965 ± 0.140 으로 대조군에 비하여 큰 차이는 없었고, 100 µg/ml에서는 0.663 ± 0.081 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되

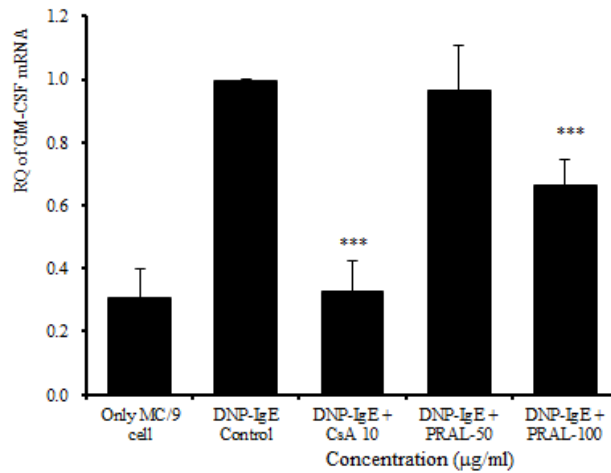


Fig. 3. Effects of PRAL on GM-CSF mRNA expression

MC/9 mast cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or PRAL (50 μg/ml, 100 μg/ml), and then stimulated with DNP-IgE. GM-CSF mRNA expression was analyzed by Real-Time PCR. The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by independent T-test. (***:p<0.001)

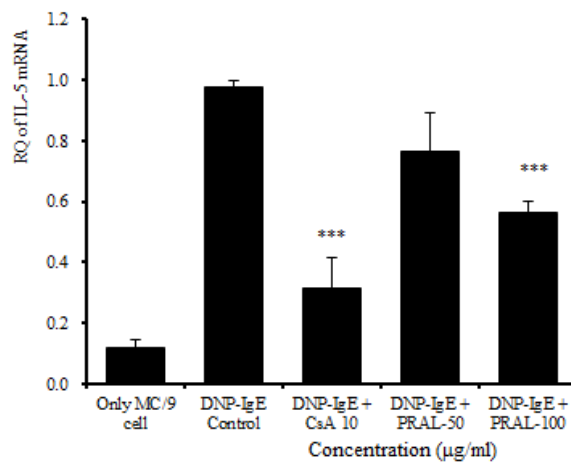


Fig. 4. Effects of PRAL on IL-5 mRNA expression

MC/9 mast cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or PRAL (50 μg/ml, 100 μg/ml), and then stimulated with DNP-IgE. IL-5 mRNA expression was analyzed by Real-Time PCR. The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by independent T-test. (***:p<0.001)

었다 (Fig. 3).

(2) IL-5 mRNA 유전자 발현

IL-5 mRNA 유전자 발현은 정상군이 0.116 ± 0.029 였고, 대조군이 0.979 ± 0.022 로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은 0.314 ± 0.102 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었다. 실험군에서 50 μg/ml은 0.764 ± 0.129 로 대조군에 비하여 억제되었으나 유의성은 없었고, 100 μg/ml에서는 0.562 ± 0.129 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었다 (Fig. 4).

(3) IL-4 mRNA 유전자 발현

IL-4 mRNA 유전자 발현은 정상군이 0.475 ± 0.109 였고 대조군이 1.054 ± 0.054 로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은 0.413 ± 0.016 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었다. 실험군에서 50 μg/ml은 0.935 ± 0.136 으로 대조군에 비하여 억제되었으나 유의성은 없었고, 100 μg/ml에서는 0.769 ± 0.054 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.01$) 억제되었다 (Fig. 5).

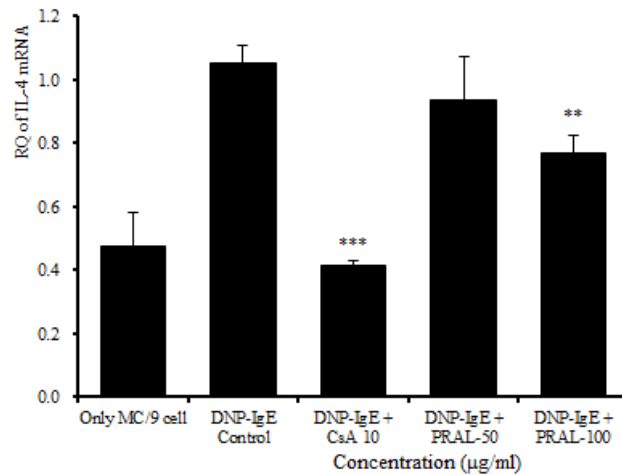


Fig. 5. Effects of PRAL on IL-4 mRNA expression

MC/9 mast cells were pretreated with CsA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or PRAL (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and then stimulated with DNP-IgE. IL-4 mRNA expression was analyzed by Real-Time PCR. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by independent T-test. (***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$)

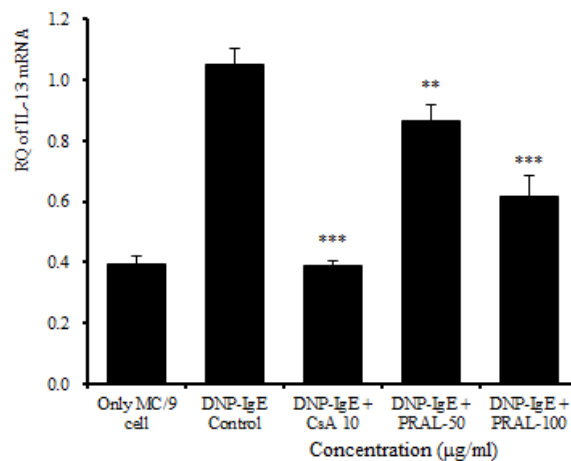


Fig. 6. Effects of PRAL on IL-13 mRNA expression

MC/9 mast cells were pretreated with CsA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or PRAL (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and then stimulated with DNP-IgE. IL-13 mRNA expression was analyzed by Real-Time PCR. The results represent the mean \pm S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by independent T-test. (***: $p < 0.001$)

(4) IL-13 mRNA 유전자 발현

IL-13 mRNA 유전자 발현은 정상군이 0.395 ± 0.027 이었고 대조군이 1.051 ± 0.051 로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은 0.386 ± 0.018 으로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었다. 실험군에서 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 0.868 ± 0.153 으로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.01$) 억제되었고, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 0.619 ± 0.066 으로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었다 (Fig. 6).

(5) TNF- α mRNA 유전자 발현

TNF- α mRNA 유전자 발현은 정상군이 0.338 ± 0.077 이었고 대조군이 1.063 ± 0.063 으로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은 0.542 ± 0.074 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.01$) 억제되었다. 실험군에서 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 0.899 ± 0.015 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.05$) 억제되었고, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 0.736 ± 0.015 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었다 (Fig. 7).

(6) IL-6 mRNA 유전자 발현

IL-6 mRNA 유전자 발현은 정상군이 0.314 ± 0.104

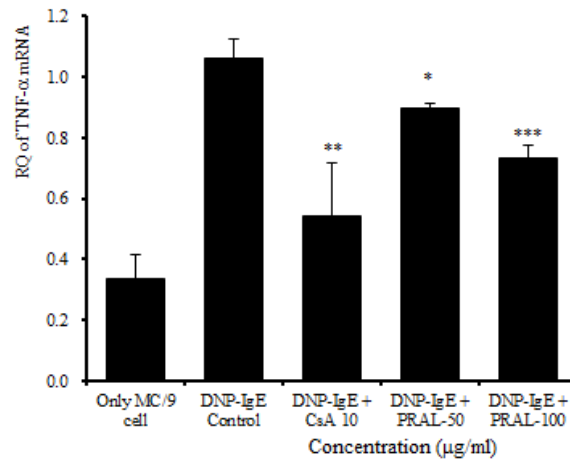


Fig. 7. Effects of PRAL on TNF-α mRNA expression

MC/9 mast cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or PRAL (50 μg/ml, 100 μg/ml), and then stimulated with DNP-IgE. TNF-α mRNA expression was analyzed by Real-Time PCR. The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by independent T-test. (***:p<0.001, **:p<0.01, *:p<0.05)

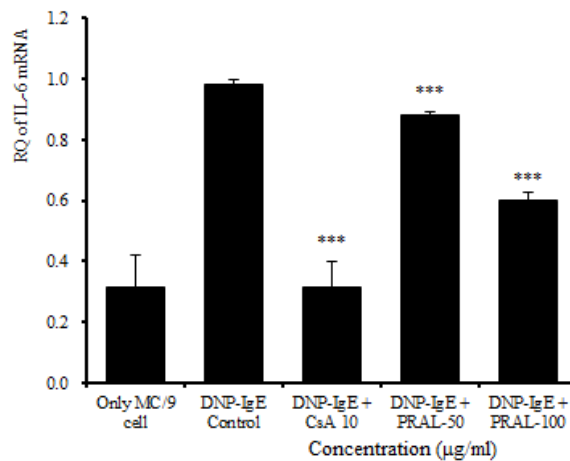


Fig. 8. Effects of PRAL on IL-6 mRNA expression

MC/9 mast cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or PRAL (50 μg/ml, 100 μg/ml), and then stimulated with DNP-IgE. IL-6 mRNA expression was analyzed by Real-Time PCR. The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by independent T-test. (***:p<0.001)

였고 대조군이 0.984 ± 0.016 로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은 0.316 ± 0.085 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었다. 실험군에서 50 μg/ml은 0.884 ± 0.010 으로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었고, 100 μg/ml에서는 0.602 ± 0.024 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 억제되었다 (Fig. 8).

3) ELISA 분석

PRAL이 비만세포에서 IL-13과 MIP-1α 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 MC/9 비만세포에 CsA와

다양한 농도의 PRAL을 처리한 후 DNP-IgE로 자극한 뒤 ELISA로 IL-13과 MIP-1α 생성량을 측정하였다.

(1) IL-13 단백질 생성

IL-13 생성량에서 정상군은 510.29 ± 51.53 이었고, 대조군은 868.85 ± 103.19 로 정상군에 비해 증가되었다. 양성대조군은 630.12 ± 26.77 로 대조군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.05$) 억제되었다. 실험군의 IL-13 생성량은 100 μg/ml에서는 898.97 ± 13.96 으로 대조군과 차이가 나지 않았으나, 200 μg/ml 농도에서 682.26 ± 47.23 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.05$) 억제되었고,

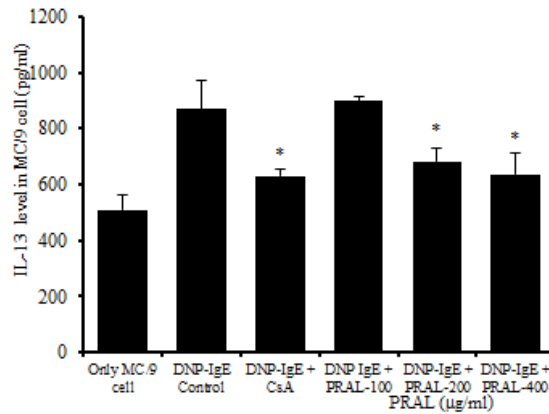


Fig. 9. Suppressive effects of PRAL on IL-13 production

MC/9 mast cells were pretreated with PRAL (100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml), and then stimulated with DNP-IgE. IL-13 production levels were measured by ELISA. The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by independent T-test. (*:p<0.05)

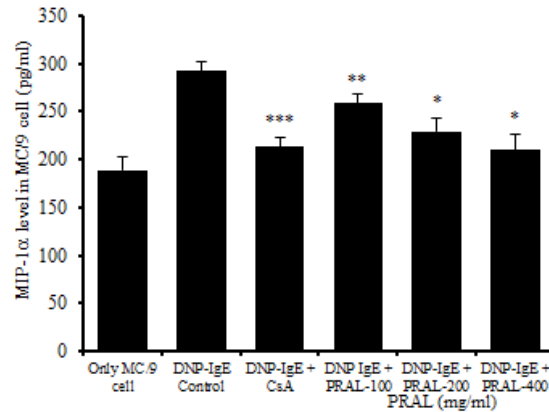


Fig. 10. Suppressive effects of PRAL on MIP-1α production

MC/9 mast cells were pretreated with PRAL (100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml), and then stimulated with DNP-IgE. MIP-1α production levels were measured by ELISA. The results represent the mean ± S.E. Statistically significant value was calculated by compared with control group by independent T-test. (***:p<0.001, **:p<0.01, *:p<0.05)

400 µg/ml 농도에서는 637.42 ± 77.15로 유의성 있게 (p<0.05) 억제되었다 (Fig. 9).

되었다 (Fig. 10).

(2) MIP-1α 단백질 생성

MIP-1α 생성량에서 정상군은 188.90 ± 14.27이었고, 대조군은 291 ± 9.44로 증가되었으며, 양성대조군은 212.96 ± 9.60으로 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.001) 억제되었다. 실험군의 MIP-1α 생성량은 농도에 따라 각각 100 µg/ml에서는 258.98 ± 9.17로 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.01) 억제되었고, 200 µg/ml 농도에서 229.00 ± 13.55로 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.05) 억제되었고, 400 µg/ml 농도에서 210.31 ± 16.67로 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.05) 억제

4) Western blot 분석

PRAL이 비만세포에서 NFAT-1과 NFAT-2, c-Jun, c-Fos 및 NF-κB p65 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 MC/9 비만세포에 CsA와 100 µg/ml 농도의 PRAL을 처리한 후 DNP-IgE로 자극하고 1시간 후 western blot으로 NFAT-1과 NFAT-2, c-Jun, c-Fos, NF-κB p65의 단백질 발현을 측정하였다.

(1) NFAT-1, NFAT-2 신호전달 기전

NFAT-1의 단백질 발현은 정상군에서 NFAT-1 densities가 2.1로 나타났고 (Fig. 11-1, NFAT-1 band lane

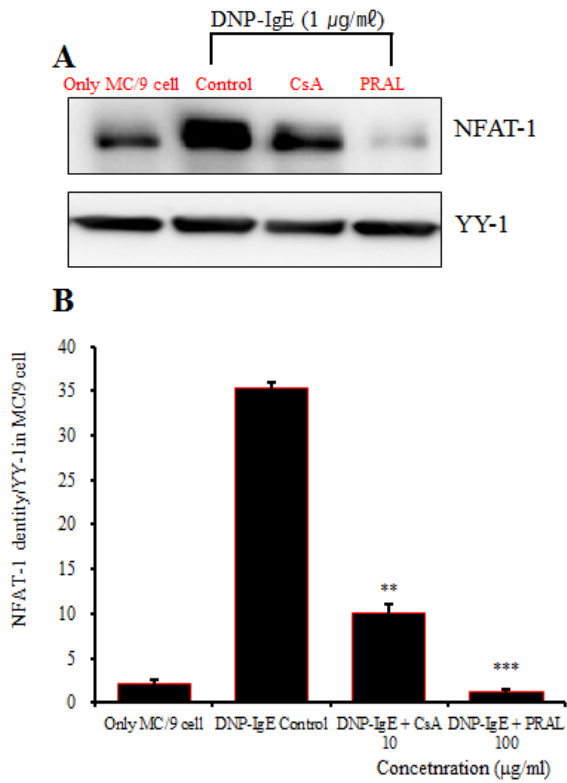


Fig. 11-1. Effect of PRAL on NFAT-1 signal events in MC/9 mast cells induced with DNP-IgE

MC/9 mast cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or PRAL (100 µg/ml), and then stimulated with DNP-IgE. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with NFAT-1 proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of NFAT-1 proteins were selected as the positive control for Anti-NFAT-1. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer. Statistically significant value was calculated by compared with control group by independent T-test. (***:p<0.001, **:p<0.01)

1), 대조군의 densities는 35.40으로 나타났으며 (Fig. 11-1, NFAT-1 band lane 2), 양성대조군의 densities는 10.10으로 대조군에 비하여 억제되었고 (Fig. 11-1, NFAT-1 band lane 3), 실험군의 NFAT-1 단백질 발현은 대조군에 비하여 100 µg/ml에서 1.24로 대조군에 비하여 단백질 발현이 억제되었다 (Fig. 11-1, NFAT-1 band lane 4).

NFAT-2의 단백질 발현은 정상군에서 NFAT-2 densities가 1.0 (Fig. 11-2, NFAT-2 band lane 1), 대조군에서 2.80으로 나타났다 (Fig. 11-2, NFAT-2 band lane 2). 양성대조군의 경우 densities는 0.31로 대조군에 비하여 억제되었으나 (Fig. 11-2, NFAT-2 band lane 3), 실험군의 NFAT-2 단백질 발현은 대조군에 비하여 100 µg/ml 농도에서 densities가 2.50으로 나타나, 대조군과 비하

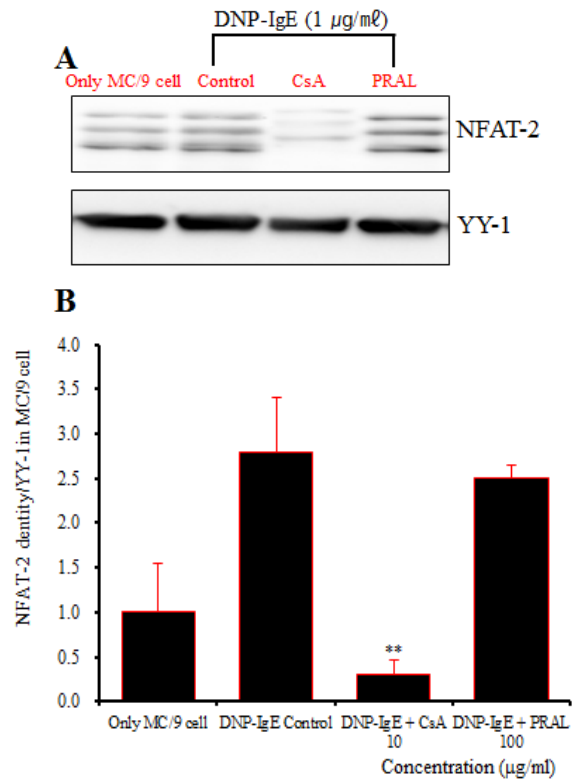


Fig. 11-2. Effect of PRAL on NFAT-2 signal events in MC/9 mast cells induced with DNP-IgE

MC/9 mast cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or PRAL (100 µg/ml), and then stimulated with DNP-IgE. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with NFAT-2 proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of NFAT-2 proteins were selected as the positive control for Anti-NFAT-2. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer. Statistically significant value was calculated by compared with control group by independent T-test. (**:p<0.01)

여 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 11-2, NFAT-2 band lane 4).

(2) AP-1 신호전달 기전

c-Jun의 단백질 발현은 정상군에서 c-Jun densities는 1.5였고 (Fig. 12-1, c-Jun band lane 1), 대조군의 경우 densities가 63.00으로 정상군에 비하여 증가되었고 (Fig. 12-1, c-Jun band lane 2), 양성 대조군의 densities는 7.80으로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 12-1, c-Jun band lane 3). 실험군의 c-Jun 단백질 발현은 대조군에 비하여 100 µg/ml 농도에서 densities가 12.10으로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 12-1, c-Jun band lane 4).

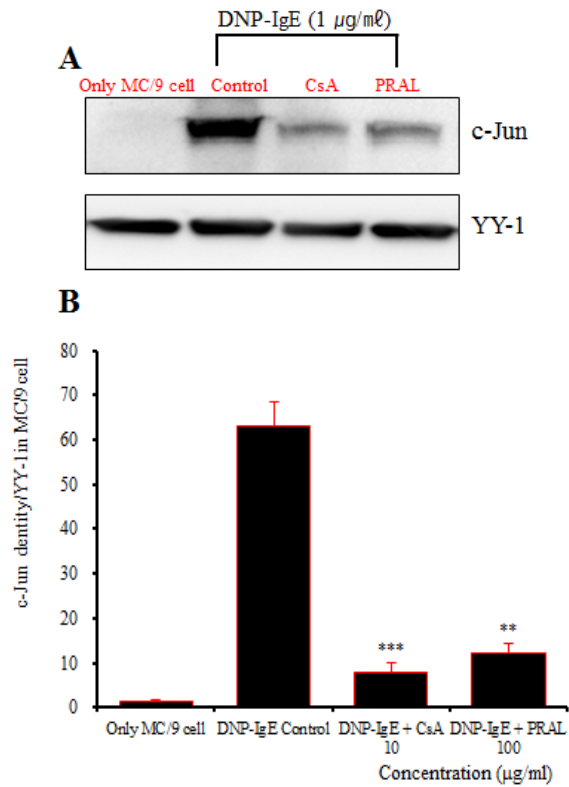


Fig. 12-1. Effect of PRAL on c-Jun signal events in MC/9 mast cells induced with DNP-IgE

MC/9 mast cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or PRAL (100 µg/ml), and then stimulated with DNP-IgE. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with c-Jun proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of c-Jun proteins were selected as the positive control for Anti-c-Jun. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer. Statistically significant value was calculated by compared with control group by independent T-test. (***:p<0.001, **:p<0.01)

c-Fos의 단백질 발현은 정상군에서 c-Fos densities는 1.1이었고 (Fig. 12-2, c-Fos band lane 1), 대조군의 경우 densities가 5.50으로 정상군에 비하여 증가되었고 (Fig. 12-2, c-Fos band lane 2), 양성 대조군의 densities는 1.60으로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 12-2, c-Fos band lane 3). 실험군의 c-Fos 단백질 발현은 대조군에 비하여 100 µg/ml 농도에서 densities가 4.90으로 나타나, 대조군에 비해 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 12-2, c-Fos band lane 4).

(3) NF-κ B p65 신호전달 기전

NF-kB p65 단백질 발현은 정상군에서 NF-kB p65 densities가 1.1로 나타났고 (Fig. 13, NF-kB p65 band lane 1), 대조군에서 densities가 4.87로 정상군에 비하여

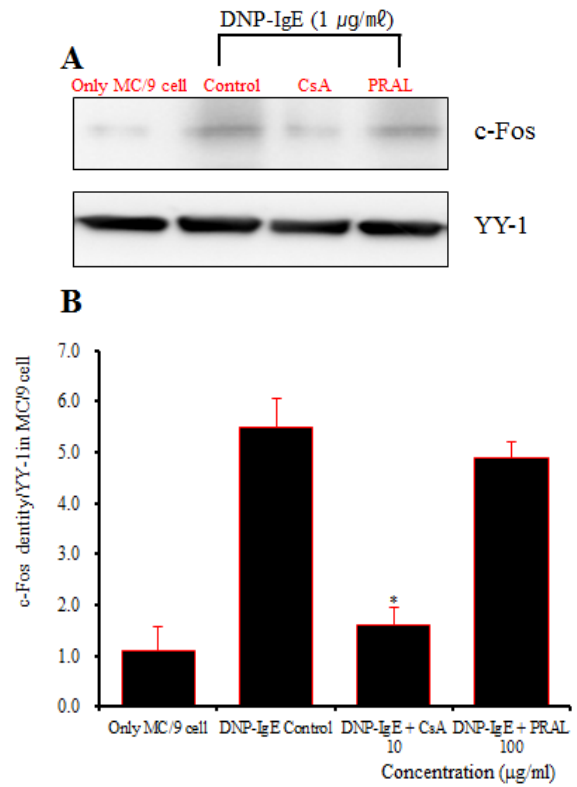


Fig. 12-2 Effect of PRAL on c-Fos signal events in MC/9 mast cells induced with DNP-IgE

MC/9 mast cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or PRAL (100 µg/ml), and then stimulated with DNP-IgE. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with c-Fos proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of c-Fos proteins were selected as the positive control for Anti-c-Fos. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer. Statistically significant value was calculated by compared with control group by independent T-test. (*:p<0.05)

증가되었다 (Fig. 13, NF-kB p65 band lane 2). 양성대조군의 densities는 1.21로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 13, NF-kB p65 band lane 3). 실험군의 NF-kB p65 단백질 발현은 100 µg/ml에서 densities가 1.05로 대조군에 비하여 단백질 발현이 억제된 것으로 나타났다 (Fig. 13, NF-kB p65 band lane 4).

IV. Discussion

1970년대 이후 전세계적으로 알레르기 질환이 급격히 증가하고 있으며, 특히 서구화된 생활 환경을 가지고 있는 국가에서 더욱 두드러진 현상이다. 조사에 따르면, 1995년부터 2010년까지 15년간 우리나라의 알

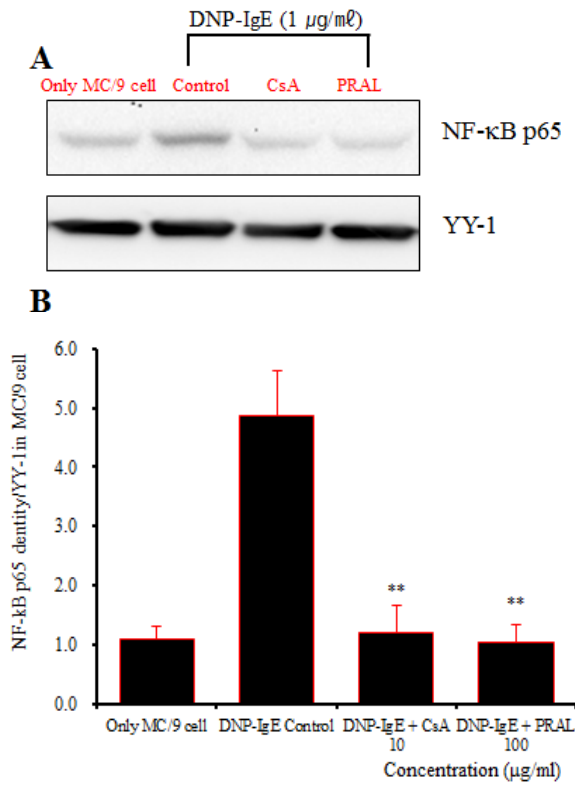


Fig. 13. Effect of PRAL on NF-κ B p65 signal events in MC/9 mast cells induced with DNP-IgE

MC/9 mast cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or PRAL (100 μg/ml), and then stimulated with DNP-IgE. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with NF-κB p65 proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of NF-κB p65 proteins were selected as the positive control for Anti-NF-κB p65. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer. Statistically significant value was calculated by compared with control group by independent T-test. (*:p<0.05)

레르기 비염 유병률이 초등학생은 28.9%, 중학생은 34.9%가 증가하였으며, 아토피 피부염의 경우 초등학생은 1995년 4%, 중학생은 5.6% 증가하였다^{2,3)}. 이처럼 우리나라도 알레르기 질환 유병률은 증가하는 추세이며 오랜 기간 치료가 필요하고 비슷한 증상이 반복되면서 만성화되는 경향으로 이 질환을 앓고 있는 환자의 삶의 질을 저하시키고 있다.

필요 이상의 면역반응을 보이는 과민반응에 대해 알레르기라고 하며 크게 네 가지로 분류한다. 아토피 질환은 이 가운데 제 I형 즉시형 과민반응으로 설명할 수 있으며, 아토피 피부염, 알레르기 비염, 천식, 두드러기 등의 질환이 해당된다. I형 과민반응에서 항원은 체액성 IgE 면역 반응을 일으킨다. 항원에 처음 노출되면, 각 개인마다 그 알레르기 항원에 대한 특이적

인 IgE가 만들어지는데 Fc 수용체와 결합하여 비만세포와 호염기성 세포를 자극한다. 다음 노출시 막에 결합된 IgE와 연계하여 탈과립을 유발시킨다¹⁵⁾.

즉시형 과민반응의 전형적인 경과는 항원노출, 항원 특이 Th2 세포와 B세포의 활성화, IgE 항체의 생산, 비만세포 Fc 수용체에 항체결합, 항원의 재차 노출에 의한 비만세포의 자극으로 설명할 수 있으며, 이러한 경과에 의한 비만세포의 매개자 방출과 병리학적 반응이라고 볼 수 있다. 알레르기 질환의 특징은 Th2 세포의 활성화와 IgE 항체의 생산이라 요약할 수 있다¹⁾.

杏仁은 장미과에 속한 낙엽교목인 살구 및 동속 근연식물의 성숙한 종자로, 여름에 과실이 성숙할 때 과육과 핵의 껍질을 제거하고 杏仁만 취하여 말린 것을 약재로 쓴다. 종자에는 청산배당체의 Amygdalin이 약 3%, 지방유가 약 50%, 단백질 및 각종 유리 amino acid 뿐만 아니라 emulsin, amygdalase, prunase 등이 포함되어 있으며性は微溫하고,味는苦하며,有小毒하다.肺,大腸經에歸經하며降氣止咳平喘,潤腸通便의 효능이 있어治咳嗽氣喘,胸滿痰多,血虛津枯,腸燥便秘하는데,특히咳嗽을 치료하는要藥이 된다. 또한 중앙세포에 선택적인 항종양작용이 있는 것으로 알려져 있다^{5,13)}.

杏仁의 알레르기 질환에 대한 연구로, 황⁷⁾은杏仁이 대조군에 비하여 기관지 폐포세척액 내 염증세포 중 호산구와 혈청 내 IgE 항체를 감소시키며,수동 피부아나필락시 반응을 억제한다고 보고하였고, 주⁸⁾는杏仁이 호산구 화학주성 chemokine 중 eotaxin과 IL-8에 대한 억제효과가 있고, 이 효과가 호산구의 이동을 억제하는 결과를 보인다고 보고하였다. 또한 정 등⁹⁾의 연구에서는 RBL-2H3 세포주를 이용하여 IL-4, IL-5, IL-6의 전사에 있어杏仁 투여군에서 대조군에 비해 전사 억제효과가 있음을 보고한 바 있다.杏仁 추출물뿐 아니라杏仁藥鍼에 대한 연구^{10,11)}도 시행되었는데, 신¹¹⁾은 알레르기 천식모델 생쥐를 대상으로杏仁藥鍼이 IgE, IL-4, IL-5 양과 TNF-α, IL-4, IL-5, IL-13 등의 mRNA 발현을 감소시키고 CCR3+, CD4+/CD8+ 세포수를 감소시킴으로써 천식억제 및 면역조절효과가 있음을 보고하였다. 이처럼杏仁은 알레르기 질환 치료에 우수한 효능을 나타내는 것으로 밝혀졌지만,杏仁 추출물이 제I형 과민반응인 아토피 질환에 어떤 효능이 있는지 보다 구체적으로 확인할 필요가 있다고 판단되었다.

이에 저자는 MC/9 비만세포에서杏仁이 Th2 cyto-

kine의 발현에 미치는 영향을 알아보았고, 신호전달 기전 연구를 통해杏仁 추출물이 아토피 염증 반응의 억제에 어떤 효과가 있는지 확인하였다.

비만세포는 모든 결합조직과 모든 상피세포 아래층에 있으므로 즉시형 과민반응의 가장 흔한 부위가 되며, 아토피 피부염의 피부 병변에서 비만세포가 관찰된다¹⁴⁾. 비만세포는 IgE 수용체에 의해 활성화되며, 비만세포는 FCεRI의 자극을 통해 다양한 cytokine을 생산, 분비하게 되는데 여기에는 IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, TNF-α, GM-CSF, SCF, MIP-1α 등이 포함된다. 비만세포가 이와 같은 물질들을 분비함으로써 점막부종, 기관지 평활근 수축, 점액분비 증가 등을 유발하는 초기 알레르기 반응뿐만 아니라 후기반응이나 만성 알레르기 반응에도 기여한다. 비만세포에서 생성되어 분비되는 TNF-α는 혈관내피세포의 유착분자 발현을 증가시켜 호산구 및 T 림프구의 표적 기관으로의 유입을 촉진시킨다. 또한 tryptase, PAF, IL-5, GM-CSF 등을 분비하여 호산구에 대한 화학주성, 증식 등을 도와준다. 비만세포에서 생산되는 IL-4, IL-13, IL-6 등은 Th2 세포의 반응을 증가시키고, 결국 IgE의 생산을 증가시킴으로써 만성 알레르기 반응에 기여한다¹⁵⁾.

본 실험에서 PRAL의 유효성분 및 지표성분을 확인하기 위하여 HPLC로 분석하였다. 그 결과 본 실험에 사용된 PRAL은 Amygdalin을 지표성분으로 사용할 수 있으며, 그 함량은 28.8 mg/g으로 나타났다 (Fig. 1, Table 3).

Amygdalin은 PRAL의 주성분 중 하나로 살구나무류, 아몬드 같은 장미과 식물들의 씨, 견과, 뿌리, 줄기, 잎에 널리 존재하는 청산배당체의 일종으로, 비타민 B17 또는 laetrile로 불린다. Amygdalin을 구성하는 benzaldehyde는 진통작용을 하고, cyanide (hydrocyanic acid)는 항암 작용을 하며, 이 둘은 서로 상승작용을 하여 그 효과를 증대시키는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 또한 Amygdalin은 체내에서 분해되어 미량의 청산을 생성하여 호흡중추에 대한 진정작용을 유발하며 호흡운동을 안정시키고 진해작용을 나타낸다고 한다¹⁷⁾. 김 등¹⁸⁾의 연구에 따르면, Amygdalin이 항암, 진통 효과가 있을 뿐 아니라, 경구 투여시 대식세포의 활성화와 지연형 과민반응을 유의하게 억제하는 효과도 있다. 그러나 아직 Amygdalin의 제1형 즉시형 과민반응 억제 효과에 대한 연구는 보고되지 않아, 향후 연구 가치가 있을 것으로 보인다.

본 실험에서는 MC/9 비만세포에서杏仁의 항알레르기 효과를 연구하기 위하여 GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF-α의 조절을 Real-Time PCR로 분석하였고, IL-13, MIP-1α를 ELISA로 분석하였다. Th2 cytokine 발현을 조절하는 메커니즘을 확인하기 위하여 western blot으로 NFAT-1, NFAT-2, c-Jun, c-Fos, NF-κB p65 전사인자 발현을 관찰하였다.

모든 실험에 앞서, PRAL의 세포독성을 측정한 결과, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml, 400 μg/ml, 800 μg/ml의 모든 농도에서 cell viability가 증가하여 세포독성은 거의 없는 것으로 나타났다 (Fig. 2).

T helper 세포는 전구세포로 존재하다가 항원 자극에 의해 미분화 상태인 Th0로 분화되고 항원과 면역반응의 방향성에 의해 세포성 면역에 작용하는 Th1 세포와 알레르기 반응에 작용하는 Th2로 분화된다. Th1 세포는 IL-2, IFN-γ같은 cytokine을 분비하여 세포매개성 면역 작용을 활성화시킨다¹⁴⁾. 반면 Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 등과 같은 cytokine을 분비하는데 이중 IL-4와 IL-13은 알레르기성 염증의 초기에 중요한 매개체로써 B 세포를 활성화시키고 형질세포로 분화시켜 IgE를 생성하는데 작용한다¹⁹⁾. 정상적인 사람은 알레르겐과 접촉시 대부분 Th1 세포의 증식이 일어나는 반면, 알레르기 소인을 가지고 있는 사람은 Th2 세포가 활발히 증식된다²⁾.

비만세포는 Th2를 유도하는 IL-4, IL-5, IL-13과 GM-CSF cytokine과 염증을 유도하는 TNF-α, IL-6 cytokine을 분비한다^{2,20)}.

GM-CSF와 IL-5는 비만세포에서 생산, 분비되어 호산구에 대한 화학주성, 증식을 돕는다¹⁵⁾. 알레르기 환자의 late phase 후기 피부반응 생검에서 증가된 GM-CSF mRNA가 관찰되었으며, 몇몇 연구는 GM-CSF가 TNF-α와 같은 염증 사이토카인 분비를 유발할 수 있다고 보고한다²¹⁾. 세포자멸사의 지연에 GM-CSF, IL-5가 관여하며, 호산구의 자생력에는 IL-5가 관여한다고 알려져 있는데 이와 같은 cytokine의 작용은 만성 알레르기 반응에 기여한다²⁾.

비만세포에서 생산되는 IL-4, IL-13은 Th2 세포의 반응을 증가시킬 뿐만 아니라, 점액분비와 점액세포의 변질에 관여하며, 섬유모세포의 성장과 세포외 기질 단백질의 합성에 관여하여 만성 알레르기 반응을 초래한다^{2,15)}.

TNF-α는 조직 손상을 유발하고 염증의 중요한 개시인자로 알려져 있는데 혈관내피세포에 새로운 표면 부

착인자의 발현을 유도하여 호중구, 단핵구, 림프구를 축적시켜 염증반응을 야기한다. 또한 단핵구 및 다른 형태의 세포에 작용하여 chemokine을 분비하게 한다^{15,22}.

IL-6는 염증반응이 일어나는 동안 강력한 매개자 역할을 하는 세포활성물질로, IL-1 및 TNF- α 에 의해 단핵 식균세포, 혈관내피세포 등에서 생성되는데, TNF- α 와 IL-6의 발현은 전사인자 NF- κ B p65 활성 의존적이다²². 일반적으로 TNF- α 와 IL-6은 염증반응 초기에 관여하며 염증 유발 초기에 급격히 분비가 증가했다가 감소하는 경향을 보인다고 알려져 있다²³.

본 실험에서는 MC/9 비만세포에 CsA와 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도의 PRAL을 처리하고 DNP-IgE로 자극하여 Real-Time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석한 결과 PRAL이 대조군에 비하여 100 μ g/ml 농도에서 GM-CSF, IL-5, IL-4 mRNA 유전자 발현을 농도 의존적으로 억제하였고 (Fig. 3~5) IL-13, IL-6, TNF- α mRNA 유전자 발현은 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도에서 모두 억제하였다 (Fig. 6~8). 이 같은 결과를 미루어 볼 때, PRAL이 GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α mRNA 유전자 발현을 억제함으로써, 초기 알레르기 염증 반응을 억제하고, Th2 세포 반응 유도를 억제하여 만성 알레르기 반응을 조절할 수 있는 것으로 생각된다.

CC Chemokine은 염증 부위에서 monocyte와 macrophage 계열의 세포들을 강하게 유인한다. CC Chemokine 중 하나인 MIP-1 α 는 CCR3에 해당하며, 사람의 macrophage와 monocyte cell에서 TNF- α 에 대한 반응을 확연하게 증가시키고, NF- κ B p65를 활성화시킨다²⁴. IL-3, IL-5, IL-16, GM-CSF같은 cytokine과 더불어, MIP-1 α 는 호산구를 직접적으로 유인하거나 유인을 도와주는 역할을 하여, 호산구의 활성화와 탈과립화에 관여하고, 호산구의 활성화는 GM-CSF, IL-5에 의해 유도된다^{11,25}. 또한 MIP-1 α 는 호염구를 자극하여 히스타민을 방출하게 하며 비만세포의 탈과립과 TNF- α 의 생산을 유도한다²⁶.

이에 저자는 PRAL이 비만세포에서 MIP-1 α 와 IL-13 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 ELISA로 생성량을 측정한 결과, MIP-1 α 와 IL-13의 단백질 생성이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고 PRAL의 농도에 따른 억제효과가 있었다 (Fig. 9, 10). 이 같은 결과를 미루어 볼 때, PRAL이 비만세포에서 IL-13 및 MIP-1 α 의 단백질 생성을 억제하여 항알레르기 효능을 나타낸다고 생각된다.

NFAT는 활성화된 면역세포에서 면역반응의 유도

와 조절에 필수적인 여러 cytokine 유전자의 발현에 중요한 역할을 하는 조절자로, 면역세포의 신호전달에 중요한 역할을 하는 칼시뉴린에 의해 NFAT 단백질의 활성화가 매우 엄격하게 조절된다. NFAT 전사인자들은 세포질 내에 존재하다가 항원 수용체의 자극을 받으면 칼시뉴린에 의해 탈인산화가 된 후 핵 내로 이동하고, 탈인산화된 NFAT는 핵 내로 이동하여 DNA와 결합함으로써 면역세포들에서 면역반응의 유도와 조절에 필수적인 여러 cytokine 유전자와 세포표면인자 등의 발현에 중요한 역할을 한다²⁷⁻²⁹. NFAT는 IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF, TNF- α , MIP-1 α 유전자 조절에 관여하는 것으로 입증되어 왔으며, 이러한 유전자의 대다수가 필수적으로 AP-1과 더불어 유발된다³⁰.

PRAL이 비만세포에서 NFAT-1과, NFAT-2 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot으로 NFAT-1과 NFAT-2 단백질 발현을 측정된 결과, 100 μ g/ml 농도의 실험군에서 NFAT-1의 단백질 발현은 억제되었으나 (Fig. 11-1, NFAT-1, band lane 4), NFAT-2 단백질 발현은 대조군에 비하여 큰 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 11-2, NFAT-2, band lane 4). 이러한 결과로 PRAL은 비만세포에서 NFAT-1 기전을 조절하여 항알레르기 효과를 보이거나, NFAT-2의 신호전달에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

c-Jun과 c-Fos는 AP-1 단백질 복합체의 중요한 구성 원으로서 heterodimer의 형태로 AP-1 결합부위를 통해 전사를 조절한다. IL-13의 생산은 NFAT, GATA, AP-1을 포함하는 여러 전사인자와의 협동에 의해 조절된다³¹. 또한 AP-1은 NFAT와 함께 IL-4 프로모터에 존재하는 결합부위에 결합하여 IL-4 활성을 촉진시키는 전사인자이다³².

PRAL이 비만세포에서 c-Jun, c-Fos의 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, western blot으로 c-Jun, c-Fos의 단백질 발현을 측정된 결과 100 μ g/ml 농도의 실험군에서 c-Jun 단백질 발현이 억제되었으나 (Fig. 12-1, c-Jun, band lane 4), c-Fos 단백질 발현은 대조군과 비하여 큰 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 12-2, c-Fos, band lane 4).

이러한 결과는 PRAL은 비만세포에서 c-Jun 발현을 억제하여 AP-1 신호전달 기전을 제어함으로써 알레르기 염증 반응을 억제한다고 볼 수 있다.

NF- κ B p65는 TNF- α 와 IL-6 유전자의 프로모터 부위에 존재하는 DNA에 부착하여 TNF- α 와 IL-6를 포함한 염증성 세포활성물질의 전사를 개시하는데 관여한

다³³⁾. NF-κB p65는 거의 모든 세포에 존재하면서 면역 반응과 염증반응, 세포성장, 세포사멸 등을 조절하는 중요한 역할을 하는 전사인자로서, 만성염증, 천식 등과 같은 질병의 조직이나 세포 모델에서 NF-κB p65의 활성이 증가되어 있는 것이 보고되어 있다³⁴⁻³⁶⁾.

PRAL이 비만세포에서 NF-κB p65의 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot으로 NF-κB p65 단백질 발현을 측정 한 결과, 100 μg/ml 농도의 실험군에서 NF-κB p65 단백질 발현이 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 13, NF-κB p65 band lane 4).

이러한 결과는 PRAL이 NF-κB p65 단백질 발현을 억제함으로써 NF-κB p65 신호전달 기전을 조절하여 염증유발물질인 TNF-α와 IL-6의 생성을 억제함으로써 알레르기 반응을 억제하고 항염 효과를 나타낸다고 볼 수 있다.

이상의 결과를 미루어 보아 PRAL은 MC/9 비만세포에서 발현하는 GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF-α mRNA 유전자 발현을 억제하고 IL-13, MIP-1α 단백질의 생성을 억제함으로써 알레르기 염증 반응을 제어하는 것으로 판단되며, NFAT-1, c-Jun 신호전달 기전 및 IL-6, TNF-α 억제 기전인 NF-κB p65 전사인자를 차단하여 항알레르기 효능을 나타내는 것으로 보인다. 이 같은 결과는 PRAL이 임상에서 천식뿐만 아니라 제 I 형 과민반응에 해당하는 아토피 질환 치료에 적용할 수 있는 근거가 되리라 판단되며, 향후 아토피 질환의 치료제로 가능성을 알아보기 위해 아토피 질환 모델을 이용한 동물실험 연구 등의 보다 깊이 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. Conclusion

杏仁 추출물이 MC/9 비만세포에서 Th2 cytokine 발현에 미치는 효과와 신호전달 기전을 실험적으로 규명하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1.杏仁 추출물은 Real-Time PCR에서 GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF-α mRNA 유전자 발현을 억제하였다.
- 2.杏仁 추출물은 ELISA에서 IL-13, MIP-1α 단백질을 억제하였다.
- 3.杏仁 추출물은 western blot에서 전사인자 NFAT-1,

c-Jun, NF-κB p65 단백질 발현을 억제하였다.

References

1. Abbas Ak, Lichtman AH, Pillai S. Cellular & Molecular Immunology. 6th ed. Seoul: Epublic Publishing Co. 2008:451-71.
2. An HS. Textbook of pediatrics. 9th ed. Seoul: Korea Textbook Publishing Co. 2010:1104-21.
3. Seo SH. Prevalence of allergic diseases in Korean children, 2010. Public health weekly report, KCDC. 2011;4(24): 425-31.
4. Ju CY, Heo TS, Han DH, Jung HJ, Jung SK, Rhee HK. A questionnaire analysis about the understanding allergic disease and the attitude toward oriental medical treatment. Korean J Orient Int Med. 2000;21(4):565-73.
5. Hanuigwadaehak Bonchohak Pyeonchanwiwonhoe. Bonchohak. Seoul: Yeongrimsa Publishing Co. 2005: 515-6.
6. Jeon YK, Kook YB, Kim YK, Yun YG. A study on application of semen armeniacae amarum main blended prescription from Donguibogam. Korean J Orient Med Prescription. 2004;12(2):31-46.
7. Hwang DR, Kang YS, Kim SS, Kim DH, Shin MK, Son HJ. Studies on the allergic asthma effect of semen armeniacae amarum. Korean J Herbology. 2003;18(2) 201-8.
8. Ju CY, Jung HJ, Jung SK, Rhee HK. Armeniacae amarum semen contributes to the chemotaxis of eosinophils and secretion of chemokines in A549 human epithelial cells. Korean J Orient Int Med. 2006;27(1):208-20.
9. Chung W, Jung HJ, Jung SK, Rhee HK. The effects of armeniacae arnarum semen and platycodi radix on IL-4, IL-5, IL-6 in asthma model. Korean J Orient Int Med. 2000;21(1):31-8.
10. Kim YS, Song CH. Study on the anti-allergic effect of armeniacae semen herbal acupuncture solution. Korean J Acupunct. 2007;24(2):151-62.
11. Shin HW. The experimental study on the asthma-suppressive & immune response of armeniacae amarum semen herbal-acupuncture at ST36 in OVA-induced asthma mouse. Grad School Daejeon Univ. 2006.

12. Munetaka I, Yoko M, Kazumi S, Yosuke O, Keiyu U. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*. 1997;44(7):1299-305.
13. Han JH, Kim KY. *Hanbangyakrihak*. Seoul: Euisung-dang Pub. 2004:405-6.
14. An SK, Park BD, Won JH, Sung YO, Chun SH. Atopic dermatitis. Seoul: Pacific Pub. 2007:13-82.
15. The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology. *Asthma and allergic disease*. Seoul: Koonja Pub. 2002:13-116.
16. Kim DM, Hong SP. Development of quantitative extraction method of amygdalin without enzymatic hydrolysis from tonin & kyonin by HPLC. Grad School Kyunghee Univ. 2003.
17. Choi JY. The analgesic and anti-inflammatory effects of armenicae semen: Potential role of bradykinin and COX-II-mediated signaling. Grad School Kyunghee Univ. 2004.
18. Kim JH, Kang TW, Park CB, Cha KJ, Ahn YK. Immunobiological studies on route of administration of amygdalin. *Yakhak Hoeji*. 1996;40(2):202-11.
19. Park YM. Lecture of medical science : Advances in the pathophysiology of atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Respir Dis (Korea)*. 2006;16(3):189-96.
20. Prieschl EE, Gouileux-Gruart V, Walker C, Hrrer NE, Baumruker T. A nuclear factor of activated T cell-like transcription factor in mast cells is involved in IL-5 gene regulation after IgE plus antigen stimulation. *J Immunol*. 1995;154(11):6112-9.
21. John A, Hamilton. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol*. 2002;23(8):403-8.
22. Kim YK, Kim HJ, Kim WS, Park HJ, Moon G, Kim DW, Won JH. Inhibitory effect of *Jaeumganghwa-tang* on allergic inflammatory reaction. *Korean J Orient Int Med*. 2004;25(2):174-82.
23. Koh DK, Yun JM, Lee TH. Effects of aconiti tuber on the change of interleukin-6 and TNF- α level induced by LPS I.C.V. injection in mice. *Korean J Orient Med Prescription*. 2004;12(1):195-208.
24. Lee JE. Stimulation of osteoclastogenesis by enhanced levels of MIP-1 α in BALB/c mice in vitro. Grad School Ulsan Univ. 2008.
25. Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nature Immunology Rev*. 2001;1(2):108-16.
26. Donald NC. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*. 1996;59(1):61-6.
27. Lee IS, Nguyen TD, Xing FC, Guanghai S, Kim YH. Inhibitory effects of natural products against NFAT (nuclear factor of activated T cells) transcription factor. *Korean J Pharmacogn*. 2003;34(2):150-5.
28. Park JC. Role of casein kinase in the regulation of NFAT function. *KSBMB News*. 2000;20(2):1-7.
29. Monticelli S, Solymar DC, Rao A. Role of NFAT proteins in IL-13 gene transcription in mast cells. *J Biol Chem*. 2004;279(35):36210-8.
30. Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner EF. Activator protein 1 functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(1):201.
31. Lee KJ, Kim BK, Kil KJ. Suppressive effects of *Morus alba* Linne Root Bark(MRAL) on activation of MC/9 mast cells. *Korean J Herbology*. 2013;28(1):33-42.
32. Rooney JW, Hoey T, Glimcher LH. Coordinate and cooperative roles for NFAT and AP-1 in the regulation of the murine IL-4 gene. *Immunity*. 1995;2(5):473-83.
33. Schreck R, Albermann K, Baeurele PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radic Res Commun*. 1992;17(4):221-37.
34. Park GY, Lee SH, Hwangbo B, Im JJ, Lee CT, Kim YH, Han SG, Sim YS, Yu CG. Pro-inflammatory cytokine expression through NF-kB/IkB pathway in lung epithelial cells. *Tuberc Respir Dis*. 2000;49(3):332-42.
35. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986;46(5):705-71.
36. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factor. *Oncogene*. 1999;18(49):6853-66.