

Echinacea 추출물이 단구와 단구유래 수지상세포의 유전자발현에 미치는 효과

아주대학교 의과대학 소아과학교실, 한경대 생물정보통신 대학원*, 경희대학교 동서의학대학원 의과학과†, 울산대학교 의과대학 서울아산병원 소아과‡

박준은 · 김성환 · 최강덕* · 함대현† · 서종진‡

The Effects of Echinacea Extract on the Gene Expression of Monocytes and Monocyte-derived Dendritic Cells

Jun Eun Park, M.D., Kang Duk Choi, M.D.*, Sung Hwan Kim, M.D., Dae-Hyun Hahm, M.D.† and Jong Jin Seo, M.D.‡

Department of Pediatrics, Ajou University School of Medicine, Suwon, The Graduate School of Bio & Information Technology*, Hankyong National University, Ansung, Department of Medical Science†, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Yongin, Department of Pediatrics‡, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose : Echinacea, a traditional plant medicine has been used as immune-stimulant. Recent studies have revealed that extract of Echinacea has immunostimulatory effects on human blood mononuclear cells. This study was designed for the purpose of screening the genes associated with immunologic effects of Echinacea on monocytes and dendritic cells using a cDNA microarray chip.

Methods : CD14⁺ monocyte cells were cultured for one day with Echinacea extract(final concentration : 50 µg/mL) in experiment 1, but were cultured without Echinacea in experiment 2. The gene expression of these cultured monocytes was analyzed using the cDNA microarray chip. Dendritic cells produced from CD14⁺ monocyte were cultured for five days with GM-CSF and IL-4, and then cultured for one day with Echinacea in experiment 3, but were done without Echinacea in experiment 4.

Results : In experiments 1 and 2, there were 17 significantly expressed genes with average expression ratios above 2.5, including interferon gamma-inducible protein 30(IFI 30), CDC(cell-division-cycle)-like kinase 2(CLK 2), syndecan binding protein(syntenin), superoxide dismutase 2, etc. In experiments 3 and 4, there were 24 gene, with significantly expressed genes were 24 genes, which were insulin-like growth factor 2(somatomedin A), methyl-CpG binding domain protein 3, IFI 30, small inducible cytokine subfamily A, member 22, etc. The genes encoding CD44, IFI 30, mannose receptor C type 1(MRC 1), chemokine receptor 7(CCR 7), CLK 2, syntenin and cytochrome C oxidase subunit VIII were significantly expressed in both monocytes and dendritic cells cultured with Echinacea.

Conclusion : This study employed a cDNA microarray chip to elicit the immune-associated gene profile; the expression was enhanced by Echinacea in CD14⁺ monocytes and dendritic cells. Thus we laid the basis for the quantitative and functional analysis of genes induced by Echinacea in monocytes and monocyte-derived dendritic cells. (Korean J Pediatr 2005;48:779-788)

Key Words : Echinacea, Monocyte, Monocyte-derived dendritic cell, cDNA microarray chip

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2002-003-E00093).

접수 : 2004년 12월 6일, 승인 : 2005년 3월 11일
책임저자 : 박준은, 아주대학교 의과대학 소아과학교실

Correspondence : Jun Eun Park, M.D.
Tel : 031)219-5168 Fax : 031)219-5169
E-mail : pedpje@ajou.ac.kr

서 론

Echinacea는 북아메리카의 purple cone flower라는 재래식물

로 이미 아메리카 토착민들은 이 식물을 장티푸스나 호흡기감염 질환에 걸린 사람에게 사용했다^{1,2)}. 최근에 Echinacea의 추출물의 인체 말초혈액 단핵세포들에 대한 면역증강효과에 대한 연구 결과 항체의존성 세포독성(antibody dependent cytotoxicity)과 자연살세포(natural killer cell)의 기능을 증강시키고, 진균 및 세균감염에 대한 면역증강작용이 있음이 밝혀졌다²⁻⁵⁾. Echinacea purpura로부터 정제된 다당질(polysaccharide) 부분은 쥐와 인체 대식세포의 사이토카인(cytokine) 분비를 효과적으로 자극시켰다. 최근에 CD3⁻CD14⁺ 단구에서 TNF α 와 interleukin (IL)-1, IL-6, IL-10의 분비가 촉진한다는 연구보고들이 있는데 CD3⁻CD14⁺ 세포는 수지상세포로 발달할 수 있는 전구세포로 알려져 있다²⁾.

인체 면역 체계에 있어서 수지상세포가 중추적인 역할을 한다는 사실이 밝혀짐에 따라서 수지상세포를 이용한 암면역치료에 대한 관심이 매우 높아졌다⁶⁾. 암세포의 경우는 면역억제에 관여하는 사이토카인을 분비하거나 B7 분자의 발현을 억제하여 정상적인 T세포의 활성을 유도하지 못하게 하거나 Fas 리간드(ligand)의 발현을 유도하여 접근하는 T세포에 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 등의 방법으로 몸의 면역방어 체계를 회한다. 그러나 수지상세포가 활성화되면 IL-12를 발현하면서 T세포의 세포사멸을 막고 T세포의 분화와 세포독성 T세포(cytotoxic T lymphocyte)의 활성을 유도하고 자연살세포의 활성을 증가시켜 암세포에 대항하므로 수지상세포에 암특이 항원을 감작시키고 이를 통한 T세포의 활성화를 유도한다면 강력한 암특이 세포독성 T세포를 유도하여서 암세포만을 공격하게 할 수 있다⁶⁾. 이미 일부에서는 흑색종, 전립선암 및 일부 난치성 암에 대해서 이미 임상실험에서 사용되고 있다⁶⁻⁸⁾. 그러나 아직 수지상세포의 면역능력을 향상시키는 기술에 한계가 있어서 수지상세포의 세포독성 T세포반응을 유도하는 능력을 증가시키는 물질의 개발이 필요하여 이에 대한 많은 연구들이 이루어지고 있다^{8,9)}. 이러한 연구의 일환으로 단구와 단구에서 발달하는 수지상세포의 면역능력을 Echinacea가 어떻게 증가시킬 수 있는지를 유전자 수준에서 알아보면 Echinacea의 면역증강 물질로서의 역할을 좀 더 잘 이해할 수 있을 것이다. Echinacea의 단구에 미치는 영향에 대한 연구는 있으나 수지상세포에 미치는 면역학적 영향에 대한 연구는 전무한 실정이다¹⁻⁵⁾. 최근에 cDNA microarray chip을 이용하여 많은 유전자들을 한번에 다량 검색하는 방법이 유전자 연구 기법으로 사용되기 시작하였다¹⁰⁻¹⁵⁾.

본 연구는 cDNA microarray chip을 사용하여 Echinacea가 단구와 수지상세포의 발현을 변화시키는 면역관련 유전자들을 선별하고 향후 이렇게 선별된 유전자들을 토대로 Echinacea의 면역증강 효과에 대한 연구를 할 때 기초 자료로서 도움이 되고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험의 개요

총 5명의 공여자로부터 백혈구분반술을 실시하여 얻은 말초혈액 단핵구에서 단구를 추출하였다. 실험 1과 2는 3명의 공여자의 단구를 가지고 실험하였고 실험 3과 4는 2명의 공여자의 단구를 가지고 실험하였다. 실험 1은 단구에 Echinacea 추출물(Bionorica GmbH, Germany)을 최종 농도가 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되게 첨가하고 24시간 배양한 뒤에 cDNA microarray chip을 사용하여 유전자분석을 하였고, 실험 2는 단구에 Echinacea를 첨가하지 않고 같은 방법으로 실험하였다. 실험 3은 GM-CSF(100 ng/mL, LG Chemical, Seoul, Korea)와 IL-4(20 ng/mL, Endogen, Woburn, USA)를 첨가하여서 5일간 배양시킨 후 수지상세포로 분화시킨 뒤에 Echinacea를 첨가하고 1일 더 배양시킨 후 유세포분석(flow cytometry) 및 cDNA microarray chip을 이용한 유전자 분석을 하였고, 실험 4는 실험 3과 같은 방법으

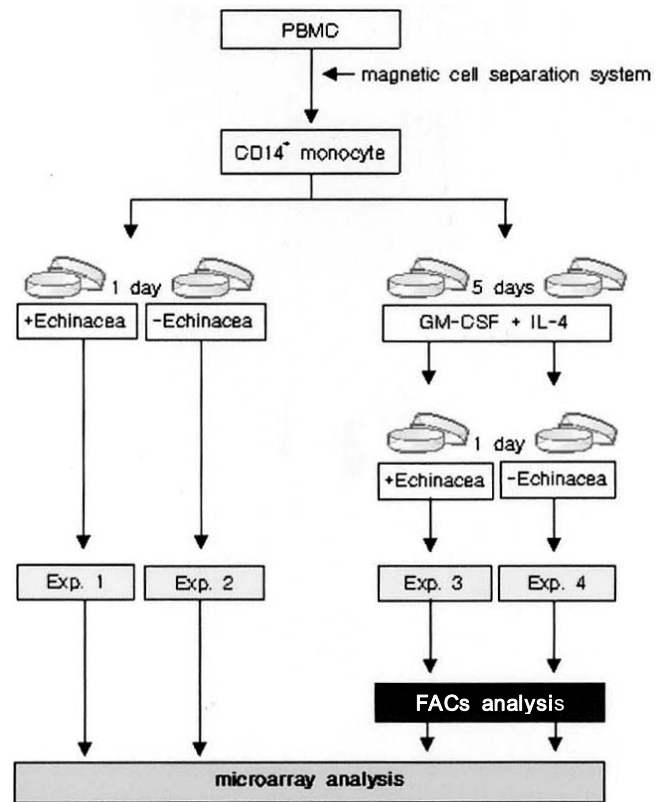


Fig. 1. Schematic overview of experimental procedure. CD14⁺ monocytes were cultured for 1 day with Echinacea in Exp. 1, but were cultured without Echinacea in Exp. 2. Dendritic cells produced from CD14⁺ monocytes which were cultured for 5 days with GM-CSF and IL-4 and cultured for 1 more day with Echinacea in Exp. 3, but were cultured only with GM-CSF and IL-4 without Echinacea in Exp. 4(PBMC, peripheral blood monocyte; Exp., experiment).

로 진행하였으나 배양 5일 뒤에 Echinacea를 첨가하지 않고 1일간 더 배양하였다(Fig. 1).

2. 말초혈 단핵구의 분리

말초혈액 단핵구는 아주대학교 의료원 서식에 따른 동의서를 받은 정상 성인으로부터 백혈구분리술을 이용하여서 분리한 뒤에 팔콘 튜브(falcon tube)에 한 튜브 당 15 mL씩 동등하게 분배하고 EBSS(Earle's balanced salt solution; Jeil Biotech services Inc. Daegu, Korea)로 희석시켜서 한 튜브 당 30 mL씩 되게 하여 4개의 팔콘 튜브에 나누어 담았다. 10 mL 피펫을 사용하여 바닥에서부터 12 mL의 Histopaque(Sigma, St. Louis, MO, USA)가 차 올라오도록 하였다. 20°C에서 30분 동안 400 g로 원심분리하고 계면층의 단핵구를 피펫으로 분리한 후 얻어진 단핵구 분획에 EBSS를 사용하여 50 mL가 되게 한 다음 400 g로 20°C에서 10분간 원심 분리하여 세척하였다. 상층액을 제거한 후 EBSS를 첨가하여 50 mL로 만든 후 20°C에서 10분간 200 g로 3번 반복해서 세척한 후 총 90 mL로 만들었다.

3. 말초혈 단핵구로부터 CD14⁺ 단구의 분리 및 수지상세포로 분화유도

말초혈 단핵구를 항CD14 단일클론항체가 부착된 microbeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)를 사용하여서 배양기에서 보육(incubation)한 후, 자성세포분리장치(magnetic cell separation system)(Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)에 통과시켜서 CD14⁺ 단구를 분리하였다. MACs 완충액(2 mM EDTA, 0.5% 우혈청알부민, phosphate buffered saline pH 7.2)을 나일론 망사(nylon mesh)에 통과시킨 뒤, 총 6×10^8 개의 단핵구를 0.1% 우혈청알부민, 0.05% azide가 포함되어 있는 CD14 MicroBeads(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 1.2 mL에 혼합한 뒤 9×에서 15분간 방치시켰다. LS column 한 개 당 통과시킬 수 있는 최대량인 1×10^8 개의 세포를 통과 시켜서 모두 6개의 LS column을 통과시켰다. 이 때 CD14⁺ 단구들 외의 세포는 자성세포분리장치 통과 후 아래로 분리되었고 CD14⁺ 단구-microbead 복합체는 LS column에 머물러 있었다. 자성체를 분리시킨 후 완충액으로 LS column에 머물러 있던 CD14⁺ 단구-microbead 복합체를 씻어 내어서 다른 용기에 CD14⁺ 단구들을 수거하였다. 수거한 세포들을 각각 5 mL씩 6 well plate로 나누었고 각각 3 well씩 실험에 사용하였다. CD14⁺ 단구들은 GM-CSF와 IL-4를 섞어서 5일 동안 배양시켰고 Echinacea를 넣어서 1일간 더 배양시키거나 Echinacea를 넣지 않고 1일간 더 배양시켜 총 6일간 배양시킨 뒤 세포들을 수확하여 세포 수를 산정하고 유세포 분석을 하였다.

4. Echinacea 추출물 준비

본 실험에서 사용한 Echinacea purpura 추출물은 독일의 Bionorica사에서 생산된 제품을 코오롱 제약 기술연구소에서 수입한 것이다. 이 추출물은 45배 농축된 건조 과립으로 Echi-

nacea purpura 식물체를 3% cichoric acid에 용해시켜 건조한 것으로 이것을 보관할 때 수화(hydrolyzed) 되었기 때문에 신선도의 표지인 4.4% fructofuranosides에 표준화시킨 것이다. 본 실험에는 최종 희석농도가 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 이 되게 사용하였다.

5. 유세포분석을 이용한 세포 표면항원 분석

수지상세포로 분화시킨 세포들의 세포 표면항원 분석은 유세포분석기(FACScalibur cytometer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하였다. Fluorescence isothiocyanate (FITC)와 phycoerythrin(PE) 표지 단일클론항체들로 FITC-CD1a, FITC-CD83, FITC-CD86(PharMingen, San Diego, CA, USA), PE-BDCA-4(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 사용하였다. 결과 자료 분석은 시료 당 10,000개의 세포를 검사하였는데 CellQuest software로 결과를 분석하였다.

6. cDNA microarray 분석

1) 총 RNA의 추출

분석하고자 하는 세포가 담긴 튜브에서 상층액을 제거하고 약간 남은 용액으로 침전물을 재부유하고 세포 10^7 당 1 mL의 TRIzol(Life Technologies, Rockville, MD, USA)을 사용하여 세포를 lysis시켰다. 10분간 상온에서 방치한 후 TRIzol 1 mL 당 0.2 mL chloroform을 첨가하여 15초 정도 심하게 손으로 흔들어 잘 섞어준 후 5분간 상온에서 방치한 후 4°C에서 12,000 g로 15분간 원심분리 하였다. 무색 상층액을 새 튜브로 옮기고 동량의 isopropanol과 혼합함으로써 10분간 상온에서 방치하여 RNA를 침전시켰다. 4°C에서 12,000 g로 10분간 원심분리를 하면 RNA 침전물이 튜브 바닥에 젤 같은 형태로 남아있다. RNA 침전물만 남기고 상층액을 제거한 후 75% 에탄올 1 mL으로 RNA 침전물을 세척하고 다시 원심분리한 후 건조시켰다.

2) 형광물질로 표지된 cDNA 표적(target) 합성

추출된 총RNA의 50 μg 를 1.5 mL의 튜브(Eppendorf tube)에 22 μL 의 DEPC-DW(distilled water)에 용해시키고 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 Oligo dT 2 μL 과 혼합시키고 70°C에서 10분간 방치한 후 얼음에 넣어두었다. 형광핵산(fluorescent nucleotide)으로서 Echinacea 첨가된 세포에는 1 mM Cy3-dUTP(NEN Life Science Products, Inc. Boston, MA, USA)를 사용하였고 Echinacea 첨가되지 않은 세포에는 1 mM Cy5-dUTP(NEN Life Science Products, Inc. Boston, MA, USA)를 사용하여 RNA를 표지하였다. 5×반응 완충액(10 μL), 0.1 M DTT(5 μL), 10×dUTP(5 μL), RNA 분해효소 억제제(RNasin, 1.5 μL)와 200 U/ μL 의 Superscript II 역전사효소(reverse transcriptase) 2.5 μL 을 반응 튜브에 첨가하였고, 2시간 동안 37°C에서 방치하여 cDNA 표적을 합성하였다. 이 반응액에 3 N NaOH 6 μL 을 첨가하여 65°C에서 30분간 반응시켜 RNA를 제거하였고, 1 M Tris(pH 7.5) 20 μL 을 첨가하고 1 N HCl 12

μL 을 첨가하여 반응액을 중화시켰다. Cy3으로 표지된 대조군 cDNA 시료와 Cy5로 표지된 처리군 시료를 동량으로 혼합시킨 후 MinElute spin column(Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 정제하였다.

3) Microarray 보합화

형광물질로 표지된 표적 시료를 증류수 28.2 μL 로 녹인 후 4 mg/mL의 Poly dA 1 μL 과 효모 tRNA(4 mg/mL) 1 μL , 10% SDS 0.8 μL 과 8 μL 의 20 \times SSC를 첨가하여 99 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 반응시키고 실온에 5분간 방치한 후 12,000 g로 1분간 원심분리하여 상층액만 취하였다. 본 연구에서 cDNA microarray chip으로 human 8K chip(Digital Genomics, human 8K, Seoul, Korea)을 사용하였다. 동일한 시료로 실험군과 대조군을 각각 Cy3와 Cy5로 표지하여 반복 실험했을 때 그 차이를 분리비(differential sensitivity)라고 말하며, 본 연구에 사용한 chip으로는 95%이상에서 2.0배(ratio) 이하로 나타난다. 이 chip은 총 8,286개의 cDNA 유전자가 미세하게 찍혀져 있는데 한 점(spot)당 크기는 150 μm 이며 그 유전자들 중에서 현재까지 알려진 유전자의 개수는 6,665개이고 나머지 약 2천 개의 유전자는 알려지지 않는 유전자이다. 이 중에서 Dietz 등¹⁷⁾이 보고한 면역관련 유전자 항목인 세포표면 단백질, 사이토카인/분비성 단백질, 신호전달/성장조절, 대사/효소 유전자들의 항목으로 구성된 천 개의 면역관련 유전자들만 선택하여서 유전자 발현을 보고자 하였다. 이 cDNA microarray chip에 20 μL 의 보합화 용액을 떨어 뜨리고 cover slip을 덮어 기포를 완전히 제거하였다. microarray chip을 보합실(hybridization chamber)에 넣고 42 $^{\circ}\text{C}$ 수조에서 14-18시간 동안 반응시켰다. 0.1 \times SSC로 남아있는 SDS를 제거해주기 위해 2차례 정도 씻어 주고 다시 0.1 \times SSC 50 mL로 10분간 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 세척하였다. 마지막으로 수분을 제거해 주기 위해 30초간 40 g로 슬라이드를 원심분리하였다.

4) 슬라이드 주사(scanning)와 결과 분석

실험 1과 2는 3명의 공여자로부터 추출한 단구로 실험하였고

각 공여자의 세포들에 대해서 cDNA microarray chip을 실험하여 해당 유전자의 평균 발현비를 구하였다. 실험 3과 4는 2명의 공여자로부터 유래된 수지상세포로 동일한 방법으로 해당 유전자의 평균 발현비를 구하였다. 보합화된 microarray chip은 ScanArray 5000(GSI Lumonics, Ottawa, Canada)으로 주사되었고 결과 분석은 GenePix 3.0 프로그램으로 분석하였다.

결 과

1. CD14⁺ 단구에서 미성숙 수지상세포로의 발달에 대한 형태학적 변화

백혈구분반술을 통해 얻어진 말초혈액 단핵구의 수는 총 2×10^{10} 개이었다. 여기서 CD14⁺ 자성단일클론항체 분리법으로 CD14⁺ 단구를 4.8×10^7 개 얻었다(Fig. 2). 각각의 실험은 CD14⁺ 단구 1.2×10^7 개로 실험을 하였는데 실험 1에서 단구에

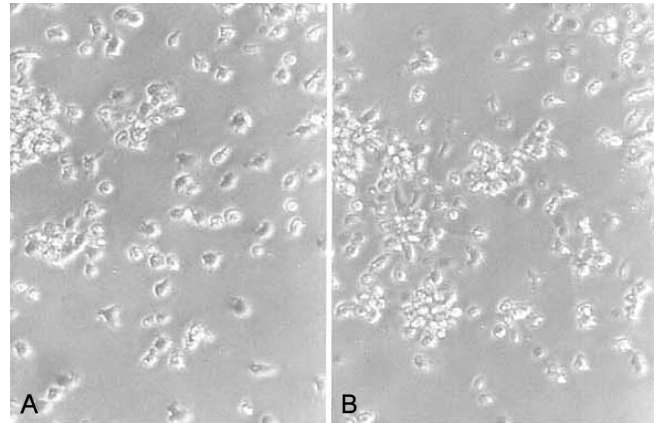


Fig. 3. Morphology of CD14⁺ monocytes cultured for 1 day with Echinacea(A) and without Echinacea(B)($\times 200$). Both A and B showed similar morphology with cytoplasmic veils.

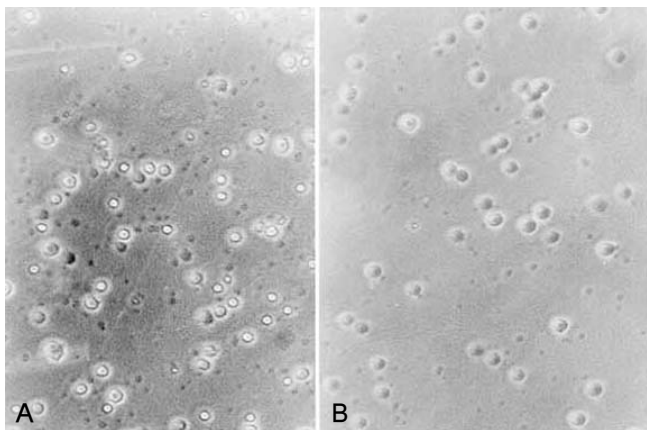


Fig. 2. Morphology of blood mononuclear cells(A), and CD14⁺ monocytes which were isolated from blood mononuclear cells by magnetic cell separation system(B)($\times 200$).

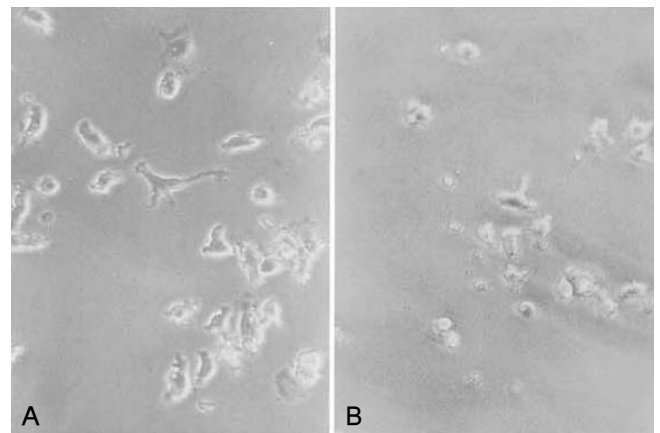


Fig. 4. Morphology of dendritic cells stimulated with GM-CSF and IL-4 (arrow indicates elongated dendrite), and cultured with Echinacea(A) and without Echinacea(B). Cytoplasmic veils were more prominent on cells cultured with Echinacea($\times 200$).

Echinacea 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 을 첨가하고 24시간을 배양한 뒤에 현미경으로 세포의 모양을 관찰하였고(Fig. 3A), 실험 2는 단구에 Echinacea를 첨가하지 않고 관찰하였는데 두 종류의 세포들이 대부분 cytoplasmic veil¹⁶⁾을 갖는 형태를 보였다(Fig. 3B). 실험 3에서 CD14⁺ 단구에 GM-CSF와 IL-4를 첨가하여서 5일간 배양시켜 수지상세포로 분화시킨 뒤에 Echinacea를 첨가하고 1일간 더 배양시킨 뒤 세포의 모양을 관찰하였고(Fig. 4A), 실험 4는 실험 3과 같은 방법으로 진행하였으나 배양 5일 뒤에 Echinacea를 첨가하지 않고 1일간 더 배양한 후 관찰하였는데(Fig. 4B) 약간의 세포에서는 수지상 형태를 나타내는 세포들도 관찰되었다.

2. 수지상세포 표면항원의 유세포 분석

실험 3에서 CD14⁺ 단구들은 5일간 GM-CSF와 IL-4의 존재 하에 배양한 후 Echinacea를 첨가하여 1일간 더 배양하였고, 실험

4에서는 Echinacea를 첨가하지 않고 GM-CSF와 IL-4 존재 하에 총 6일간 수지상세포로 분화시켜서 이 세포들을 유세포 분석하였다(Fig. 5).

Echinacea를 첨가하여 1일간 더 배양한 수지상세포는 CD1a, CD83, CD86, BDCA-4가 각각 56.3%, 5.6%, 48.9%, 95.0%로 표면항원을 발현하였고, Echinacea를 첨가하지 않고 배양한 수지상세포는 CD1a, CD83, CD86, BDCA-4가 각각 67.7%, 4.6%, 39.0%, 96.1%로 발현되었다(Fig. 5). 실험 3이나 실험 4에서 분석한 세포들 모두가 미성숙 수지상세포의 표면항원들의 특징적인 발현을 보였다^{17, 18)}.

3. CD14⁺ 단구와 수지상세포의 유전자 발현 분석

Echinacea를 첨가하지 않은 단구에 대한 Echinacea를 첨가한 단구의 유전자 발현비가 2.5 이상으로 증가된 것들 중 면역과 관계된 유전자들은 17개였다(Table 1). Echinacea를 첨가하지 않은 수지상세포에 대한 Echinacea를 첨가한 수지상세포의 유전자 발현비가 2.5 이상으로 증가된 것들 중 면역과 관계된 유전자들은 24개였다(Table 2).

Echinacea가 단구와 수지상세포 둘 다에서 의미있게 유전자 발현비가 증가된 것들이 7개 있었는데, 이들은 CD44, interferon gamma-inducible protein 30(IFI 30), mannose receptor C type 1(MRC 1), chemokine receptor 7(CCR 7), CDC (cell-division-cycle)-like kinase 2(CLK 2), syndecan bind-

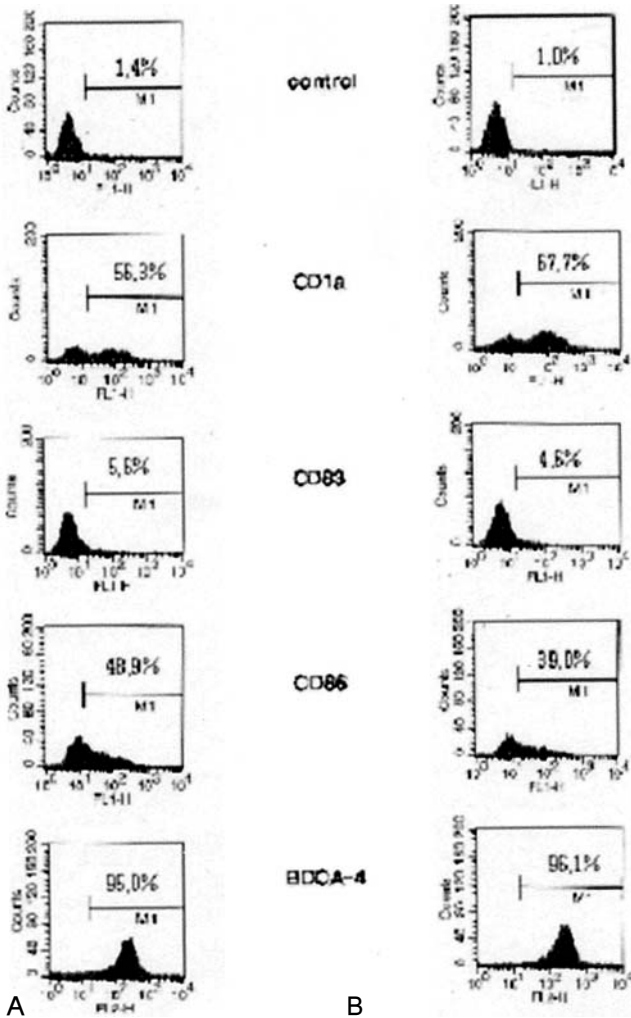


Fig. 5. Flow cytometric analysis of dendritic cells. Immunophenotyping of the dendritic cells cultured with Echinacea(A) and without Echinacea(B)

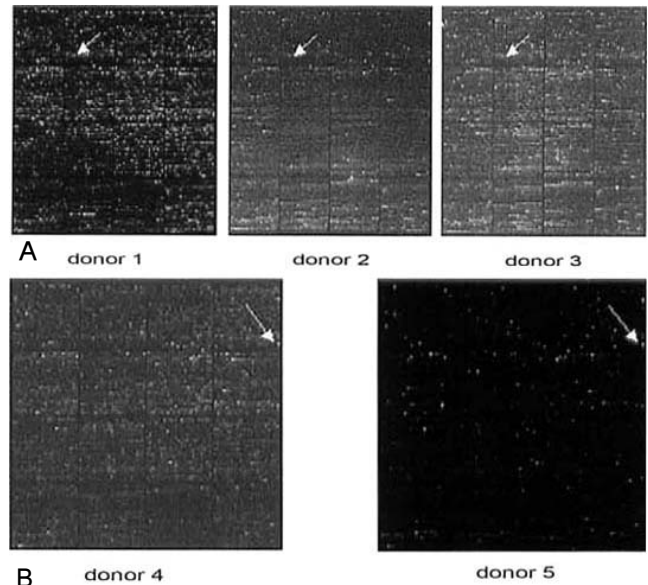


Fig. 6. (A) The scanned features of hybridized cDNA microarray chips of monocytes. Results obtained from 3 donors were similar. For instance, the site of the gene for MRC 1 expression was shown to occur in identical sites in all 3 donors(arrows). (B) The scanned features of hybridized cDNA microarray chips of dendritic cells in experiment 3 and 4. Results obtained from 2 donors were similar. For instance, the site of the gene for CCR 7 expression was shown to occur in identical sites in both 2 donors(arrows).

Table 1. The Profile of Gene Expression Ratio in CD14+ Monocytes Cultured for 1 Day with Echinacea compared to Those Cultured without Echinacea

Up-regulated genes	Expression ratio*	Genbank
Cell surface proteins		
mannose receptor C type 1	3.49	NM002438
complement component 5 receptor 1 (C5a ligand)	2.95	M62505
opiate receptor-like 1	2.92	U30185
CD44 antigen	2.87	BC004372
integrin, beta 1(fibronectin receptor, beta polypeptide)	2.67	W38716
vasoactive intestinal peptide receptor 2	2.57	X95097
chemokine receptor 7 [†]	2.15	L08176
Cytokines/secreted proteins		
interferon gamma-inducible protein 30	4.07	AL120395
syndecan binding protein(syntenin)	3.68	AF000652
actin related protein 2/3 complex subunit 3(21 kD)	2.94	AI929678
spectrin SH3 domain binding protein 1	2.88	AF006516
IL-8	2.58	Y00787
lectin, galactoside-binding, soluble 9 (galectin 9)	2.51	AB005894
Signal transduction/growth control		
CDC-like kinase 2	3.87	L29218
prefoldin 5	2.53	AA287397
Metabolism/enzymes		
superoxide dismutase 2 (mitochondrial)	3.56	Y00472
cytochrome C oxidase subunit VIII	3.15	AI184515
ubiquitin C	2.65	AI565117

*Expression ratio: average gene expression ratios from 3 donors and expression ratio above 2.5 was considered as significant. chemokine receptor 7[†]: chemokine receptor 7 was listed as significant because some authors considered expression ratio above 2.0¹¹⁾

ing protein(syntenin), cytochrome C oxidase subunit VIII 등의 유전자들이었다. 특히 발현비가 3.5 이상으로 높은 유전자들을 그 발현비 순으로 나열하면 단구에서는 IFI 30, CLK 2, syntenin, superoxide dismutase 2 등 4개의 유전자들이 있었고, 수지상세포에서는 insulin-like growth factor 2(somatomedin A), methyl-CpG binding domain protein 3, IFI 30, small inducible cytokine subfamily A(Cys-Cys), member 22, ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6, hexosaminidase B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor epsilon, CCR 7 등 8개의 유전자들이 있었다.

Table 2. The Profile of Gene Expression Ratio in Dendritic Cells cultured for 1 Day with Echinacea compared to Those cultured without Echinacea

Up-regulated genes	Expression ratio*	Genbank
Cell surface proteins		
chemokine receptor 7	3.57	L08176
CD83 antigen	3.41	Z11697
CD44 antigen	2.85	BC004372
Fc fragment of IgG, receptor, transporter, alpha	2.75	AI859570
desmoglein 2	2.70	Z26317
mannose receptor C type 1	2.59	NM002438
Cytokines/secreted proteins		
interferon gamma-inducible protein 30	4.32	AL120395
small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys) member 22	4.30	NM002990
small inducible cytokine A4	2.93	AI688619
syndecan binding protein(syntenin)	2.54	AF000652
Signal transduction/growth control		
insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	5.84	X00910
methyl-CpG binding domain protein 3	5.68	NM003926
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor epsilon	3.80	U91616
TRAF family member-associated NFKB activator	3.07	N54823
BH3 interacting domain death agonist	3.04	AI669308
CDC-like kinase 2	2.87	L29218
insulin-like growth factor binding protein 7	2.75	AA451821
Metabolism/enzymes		
ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	4.00	AA828226
hexosaminidase B	3.90	M13519
Nedd-4-like ubiquitin-protein ligase	3.37	U96114
zinc finger protein	2.72	AF060503
ubiquinol-cytochrome C reductase hinge protein	2.70	NM006004
NADH dehydrogenase(ubiquinone) 1 beta subcomplex 5	2.61	AF047181
cytochrome C oxidase subunit VIII	2.51	AI184515

*Expression ratio: average gene expression ratios from 2 donors and expression ratio above 2.5 was considered as significant

고 찰

Echinacea의 추출물은 유럽, 미국뿐만 아니라 대한민국에서도 약 10여 개의 제약회사에서 상품화되어서 면역증강제로 시판되고 있으나 체계적인 면역증강 기전에 대한 연구가 부족하였다.

그러나 최근에 Echinacea의 면역증강 효과를 입증하고 그 기전을 알기 위해서 인체 말초혈액에서 분리한 단구와 림프구를 대상으로 면역학적 연구가 이루어지고 있다. 그 대표적인 연구로 Burger 등²⁾의 연구를 들 수가 있는데 그의 연구에 의하면 CD3⁻CD14⁺ 단구와 Echinacea 추출물을 배양시키면 단구들이 TNF α , IL-1, IL-10 같은 사이토카인의 분비를 야기하며 단구에서 나오는 이러한 사이토카인들이 면역을 증가시키는 과정에 작용한 것이라고 하였다. 이 연구 외에도 Echinacea의 단구에 미치는 면역증강 작용에 대한 연구들이 있으나, 면역의 중추역할로 알려진 수지상세포의 역할에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 Echinacea가 미치는 면역기전 연구에 단구뿐만 아니라 수지상세포에 미치는 작용까지 연구의 대상으로 삼았다.

GM-CSF와 IL-4를 넣고 CD14⁺ 단구를 5일간 배양시키면 미성숙 수지상세포로 분화되고 여기서 수일간 TNF α 같은 성숙 자극인자를 첨가하여 수일간 더 배양하면 성숙 수지상세포로 분화한다. 본 연구의 대상인 수지상세포가 과연 CD14⁺ 단구로부터 제대로 수지상세포로 발달했는지 확인하고, 배양된 수지상세포의 면역표현형에 Echinacea가 어떠한 영향을 미치는지 알기 위해서 수지상세포 표지자로 쓰이는 4가지 형광표지된 단일클론 항체를 수지상세포에 결합시켜 유세포분석을 하였다.

Echinacea를 첨가하여 1일간 더 배양한 수지상세포는 CD1a, CD83, CD86, BDCA-4가 각각 56.3%, 5.6%, 48.9%, 95.0%로 표면항원을 발현하였고, Echinacea를 첨가하지 않고 배양한 수지상세포는 CD1a, CD83, CD86, BDCA-4가 각각 67.7%, 4.6%, 39.0%, 96.1%로 발현되었다(Fig. 5). 미성숙 수지상세포들은 CD80, CD83은 거의 표현이 되지 않고 HLA Class I, HLA-DR, CD1a, CD40, CD54, CD86은 중간정도로 발현이 되는 특징을 갖고 있다¹⁶⁻¹⁸⁾. 본 연구에서 CD14⁺ 단구를 GM-CSF, IL-4로 5일간 배양하고 Echinacea를 첨가 또는 첨가하지 않은 세포들이 수지상세포로 배양되었는지를 확인하기 위해서 한 공여자의 수지상세포를 유세포분석으로 표면항원을 검사하였다. 실험 3과 4에서 배양된 세포들은 미성숙 수지상세포의 특징적인 표면항원을 나타내었다. 그러므로 본 실험에서 사용된 수지상세포는 전형적인 단구유래 미성숙 수지상세포임을 확인할 수 있었다.

실험 1과 3에서 CD14⁺ 단구와 수지상세포들에 Echinacea를 처리하는 농도는 50 ug/mL로 하였고¹⁹⁾, Echinacea를 첨가하여 배양한 기간은 24시간으로 하였다. 말초혈 단핵구 또는 단구들을 이용한 논문들 중에 Burger 등²⁾은 Echinacea의 단구에 대한 영향을 보기 위해 IL-1에 대해서는 18시간, TNF α 와 IL-6에 대해서는 36시간, IL-10에 대해서는 72시간 동안 Echinacea를 첨가 배양하여 세포 배양한 상층액을 수거하여서 ELISA법으로 측정하였다. See 등¹⁹⁾은 단지 4시간 동안만 Echinacea와 단구를 배양하여서 자연살세포와 항원의존세포독성 반응정도를 측정하였다. 본 연구에서는 이 두 논문에 발표된 배양 시간을 모두 고

려하였다. 이 두 논문들에서는 사이토카인을 직접 측정하는 방법을 사용하였는데, 본 연구에서는 Burger 등²⁾이 정한 18-72시간 사이에서 결정하되 유전자 발현이 사이토카인의 분비보다 더 일찍 발생하는 것을 고려하여서 24시간 배양 후에 유전자 발현을 측정하였다.

최근에 수천 개에서 수만 개의 유전자 발현을 일시에 검증하고 그 결과를 토대로 생물학적 의미를 찾아내는 효율적인 유전자 발현 검색 방법이 개발되었는데 가장 널리 사용하는 것이 SAGE(serial analysis of gene expression)와 cDNA microarray chip을 이용하는 방법이다. 연구의 시작이 가설의 설정부터가 아닌 먼저 유전자의 발견으로부터 출발된 새로운 개념의 연구방법이 생겨나게 되었다²⁰⁾. 이는 SAGE나 cDNA microarray chip 같은 효율적인 유전자 검색방법이 생겨났기 때문이다. 이전에도 Echinacea의 단구와 림프구에 미치는 영향들에 대한 여러 연구들이 있었지만 이들은 소수의 단백질이나 유전자의 변화들을 관찰하고 증명하였다. 그러나 본 연구는 cDNA microarray chip을 사용하여 광범위한 유전자의 발현을 검색하여서 향후 특정한 유전자나 단백질을 연구하는데 도움을 주고자 하는 취지에서 시행하게 되었다.

cDNA microarray chip을 이용한 유전자 수준에서 전사인자(transcription factor)들의 발현에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 물론 mRNA 수준에서 유전자의 발현이 된다고 해서 목표 단백질의 활성화 단계까지 다 일어나지 않을 수도 있지만, 연구의 대상을 세포의 유전자 수준에서 그들의 발현상태를 살펴봄으로써 세포의 내부에서 어떠한 변화가 일어날 것이라는 것에 대한 추측을 가능케 하고, 향후 이 대상을 연구할 때 유전자 수준에서 그 대상의 기초적인 정보를 제공할 수 있다. cDNA microarray chip 실험에서는 대조군과 실험군 2가지의 mRNA를 cDNA로 만들고 각각 Cy3(붉은색 형광)과 Cy5(녹색 형광)로 표지시킨 후 동시에 동량을 사용하여 보합화를 실시해야 한다. 결과적으로 녹색과 붉은 색의 상대적인 비교치만을 얻을 수 있다. 그러므로 실험군에서 대조군에 비하여 유전자 발현이 몇 배 증가하였다 또는 몇 분의 일로 감소하였다 하는 형태로 실험 결과를 제시하게 된다. 본 연구에서는 CD14⁺ 단구나 수지상세포들에 Echinacea를 첨가 배양한 것을 실험군으로 설정하여 cDNA를 Cy3으로 형광표지 하였고 Echinacea를 첨가하지 않은 것을 대조군으로 설정하여 Cy5로 형광표지하여 실험하였다(Fig. 6). cDNA microarray 실험에서 실험군과 대조군의 상대적인 발현비가 2.5 이상을 일반적으로 의미있는 수치로 해석한다¹⁵⁾. 본 연구에서도 상대적 발현비가 2.5 이상일 때 그 유전자의 발현이 의미가 있다고 해석하였다.

세포표면단백질(cell surface protein)들에는 세포표면항원인 CD 항원들과 세포부착분자(cell adhesion molecule)들과 여러 사이토카인의 수용체들이 포함된다. 본 연구에서 CD 항원 유전자로는 CD44 항원이 의미있게 발현되었다. 세포 부착분자로서 integrin beta 1 유전자가 의미있게 발현되었다. 그 외에도

MRC 1과 C5a ligand, opiate receptor-like 1, vasoactive intestinal peptide receptor 2, CCR 7 등의 사이토카인 수용체 및 세포표면 단백질들의 유전자가 발현되었다.

분비성 단백질(secreted protein)들로는 IFI 30, syntenin, actin related protein 2/3 complex subunit 3(21 kD), spectrin SH3 domain binding protein 1, IL-8, galectin 9, galectin 3의 유전자들이 증가되었는데 IFI 30은 평균 발현비가 4.07로 CD14⁺ 단구 유전자 중에 가장 높게 발현되었다. 이들 분비성 단백질의 유전자들은 대부분 사이토카인 유전자들로서 Echinacea에 의해서 CD14⁺ 단구에서 유전자의 발현이 증가하였다. 지금까지 Echinacea에 의한 단구의 사이토카인 분비에 대해서 여러 연구들이 있었다^{2,5}. 그러나 IL-1, IL-6, IL-10, TNF α 에 대한 연구는 있었으나 IL-8의 분비가 증가된다는 연구는 없었다. 그러나 본 실험에서는 IL-8의 유전자의 평균 발현비가 의미 있게 증가되어 있었으며, 이는 Echinacea의 면역작용 과정에서 IL-8도 관여한다는 새로운 사실을 발견한 것이다. IL-8은 CXC 사이토카인으로서 화학주성과 활성화를 자극시키는 물질이다. CD11b/CD18의 결합능력을 증가시켜서 호중구의 부착능력과 운동성을 증가시킨다.

세포신호전달과 성장 조절하는 인자들로는 CDC-like kinase 2, prefoldin 5의 유전자들이 발현되었다. 이들은 세포의 성장과 주기 및 세포 사멸과 관련이 있다.

대사과정에 관여하는 인자나 효소들의 유전자들로 superoxide dismutase 2, cytochrome C oxidase subunit VIII, ubiquitin C의 유전자들이 발현되었다. 이를 볼 때 Echinacea가 CD14⁺ 단구의 성장과 주기를 조절하고 세포사멸과 관련하여 대사과정과 여러 효소들의 기능을 조절한다는 것을 유전자발현을 통해서 간접적으로 알 수 있다.

미성숙 수지상세포 단계에서 Echinacea를 첨가하여 1일간 더 배양한 실험 3을 실험군으로 Echinacea를 첨가하지 않은 실험 4를 대조군으로 설정하여 배양된 세포들을 cDNA microarray chip을 이용하여 면역과 관계하는 유전자들의 발현을 조사하여서 Table 2에 나타내었다. 세포표면단백질의 유전자들에는 CD 항원들과 여러 케모카인(chemokine)들과 사이토카인들의 수용체들의 발현이 증가되었다.

CD83 항원의 유전자 발현이 증가되어 있었다. CD83 항원은 본 연구의 유세포분석 결과에선 Echinacea를 첨가한 것과 하지 않은 세포의 비율이 5.6% vs. 4.6% 정도로 큰 차이를 보이지 않았으나 cDNA microarray 분석에서는 의미있게 유전자가 Echinacea 첨가배양에 의해 증가된 것으로 나타났다. CD83 항원은 수지상세포가 성숙할수록 그 표현이 증가되기 때문에 단구 유래 미성숙 수지상세포에 다른 성숙자극인자를 사용하지도 않았는데도 CD83의 발현이 증가된다는 사실은 Echinacea의 수지상세포의 성숙자극 인자로서의 사용 가능성을 말해준다. 그러므로 CD83의 발현에 대한 연구는 향후 더 관심을 가지고 연구가 필요할 것으로 사료된다. 그 외에도 CCR 7, CD44 항원, Fc

fragment of IgG receptor transporter alpha, desmoglein 2, MRC 1의 유전자들이 발현되었다.

Mannose receptor C type 1은 항원표지세포들에 있어서 항원을 포음작용(pinocytosis) 하는데 관련하는 것으로 알려져 있다²¹. 미성숙 수지상세포는 항원의 포식에 매우 효과적인 방법들을 사용하는데 첫째로는 macropinocytosis를 통해서이고 둘째로 latex beads, apoptotic and necrotic cell fragments같은 입자들을 탐식하고, 세 번째로 C-type lectin receptor들 즉 mannose receptor나 DEC-205 또는 Fc γ receptor type I(CD64)와 type II(CD32)를 통한 수용체매개(receptor-mediated)로 endocytosis를 한다. Mannosylated 항원들은 특히 간질성 수지상세포에 의해 재빨리 탐식되나 랑게르한스성 수지상세포들은 mannose 수용체들이 부족하여서 endocytic 능력이 부족하다²². CD14⁺ 단구에 1일간 Echinacea를 첨가해서 배양한 세포들은 본 연구의 결과와 같이 높은 mannose receptor C type 1 유전자를 발현하였기 때문에 mannosylated 항원에 대한 친화력과 항원처리 능력이 Echinacea에 의해서 증가되었음을 알 수 있다.

CD44 항원은 일종의 부착분자로서 염색체 11번의 단일 유전자에서 유래된 세포표면 당단백질(glycoprotein)의 일종으로서 그 역할은 세포와 세포, 세포와 기질에 작용하여 림프구의 homing에 관여한다²³. CD44 항원이 발현되면 백혈구가 내피세포들에 부착되어서 구르기(rolling)를 한 후 말초 림프절로 귀환(homing)하여 염증조직으로 이동한다. 또한 조혈기능, 세포의 이동과 압전이에 관여한다. 특히 백혈구의 응집에 관련되어 있는데 CD44 항원을 통한 정보전달은 사이토카인의 분비를 촉진하고 T세포 활성성을 증가시킨다²⁴. Allan 등²⁵은 성숙수지상세포로 갈수록 CD44 항원의 발현은 오히려 감소한다고 보고하였다. 본 연구는 단구와 미성숙 수지상세포의 단계에서만 실험을 하였기 때문에 두 단계 모두에서 Echinacea에 대한 CD44 항원을 암호화하는 유전자의 발현이 증가된 것을 볼 수 있었다.

CCR 7 유전자는 주로 성숙한 수지상세포에 발현되는 유전자이다²⁶. CCR 7은 수지상세포가 미성숙 단계에 있다가 항원을 만나면 항원을 T세포에 전달하기 위해서 조직으로부터 림프절로 여행하는 능력을 가진 성숙 수지상세포의 기능을 갖게 될 때에 많이 발현된다^{11, 27}.

CDC-like kinase 2는 protein serine/threonine kinase의 일종으로서 serine/threonine의 인산화와 관련 있는 세포주기 조절 분자이다. 효모의 세포주기를 조절하는 cdc 2/CDC 28 kinase에 상동성(homology)을 띄고 있는 인간 protein kinase를 나타낼 때 CLK라고 표시한다²⁸. 이러한 세포주기와 관련된 분자가 Echinacea가 첨가한 단구나 수지상세포에서 상대적 발현율이 매우 높은 사실은 이 세포들의 세포주기 조절에 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다.

Syntenin은 세포내 신호전달과 부착분자들인 syndecan, ephrin, eph-수용체, neurexin의 세포질 내에 있는 domain과 결합하는 adaptor-like PDZ 분자이다²⁹. IFI 30과 cytochrome

C oxidase subunit VIII 유전자들은 최근에 유전자 서열 및 기능이 밝혀지고 있는 중이다³⁰⁾. 지금까지 언급된 6가지 유전자들은 CD14⁺ 단구와 단구 유래 미성숙 수지상세포에서 둘 다 Echinacea에서 그 유전자 발현이 의미있게 증가한 것들이다.

본 연구에서 유전자 발현이 새롭게 밝혀진 것들을 종합해서 보면, 첫째, Echinacea는 화학주성과 면역세포의 이동성을 촉진시키는 IL-8과 CCR 7 같은 사이토카인의 유전자들의 발현을 증가시킴으로 단구와 수지상세포에 면역증가 작용을 하고 있음을 말해준다. 둘째, Echinacea는 탐식작용에 관련된 MRC 1의 증가와 세포부착물질인 CD44 항원 등의 유전자의 발현을 증가시킴으로 탐식구의 면역력을 증가시킬 것으로 추정된다.

셋째, CCR 7과 CD83항원이 미성숙 수지상세포에서 유전자 발현이 증가한 것은 Echinacea가 수지상세포의 성숙자극인자로서의 사용 가능성을 시사한다. 그러나 본 연구는 유전자 수준에서 검색된 것이므로 향후 이에 대한 세부적인 연구가 필요하다.

넷째, 단구 및 수지상세포에서 매우 높은 유전자발현을 보인 것들로 MRC 1, CD44, CCR 7, IFI 30, syntenin, CLK 2, cytochrome C oxidase subunit VIII 등의 유전자들이 있었고 특히 CD14⁺ 단구에서 IFI 30이, 수지상세포에서는 insulin-like growth factor 2 유전자의 발현비가 가장 높게 검색되었다. 그러므로 본 연구는 Echinacea가 CD14⁺ 단구 및 수지상세포에서 발현을 증가시키는 면역관련 유전자들을 cDNA microarray chip을 이용하여 검색하였고, 향후 이 유전자들의 명단을 기초로 정량적이고 기능적으로 분석할 수 있는 토대를 마련하였으며 발현이 증가된 유전자들에 대하여 더 자세한 연구를 하면 Echinacea의 면역작용을 이해하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

목적 : Echinacea는 면역증강제로 이미 사용되고 있는 재래식물로서 최근에 Echinacea의 추출물로 단구를 중심으로 면역세포들에 의한 면역증강효과에 대한 연구가 이루어지고 있다. 본 연구는 단구와 수지상세포에서 Echinacea에 의해 유전자의 발현이 증가되는 면역관련 유전자들을 cDNA microarray chip을 사용하여 선별하고 이들을 토대로 Echinacea의 면역증강 효과에 대한 연구를 할 때 기초 자료가 되고자 하였다.

방법 : 실험 1과 2는 3명의 공여자의 말초혈 단구로 실험하였는데 실험 1은 단구에 최종 농도가 50 µg/mL 되게 Echinacea를 첨가하여 1일간 배양하였고, 실험 2는 실험 1의 대조군으로서 Echinacea를 첨가하지 않고 배양하였다. 실험 3과 4는 2명의 공여자의 단구로 실험하였는데 실험 3은 GM-CSF와 IL-4를 첨가하여 5일간 배양시켜 수지상세포로 분화시킨 뒤 Echinacea를 첨가하여 1일간 더 배양시켰고, 실험 4는 실험 3의 대조군으로서 수지상세포로 분화시킨 뒤 Echinacea를 첨가하지 않고 1일간 더 배양하였다. Echinacea에 의한 단구와 수지상세포의 유전자발현 효과를 알아보기 위해서 cDNA microarray chip을 이

용하여 대조군에 대한 실험군의 각 유전자의 발현비를 구하였다. Echinacea를 첨가하지 않은 단구(실험 2의 단구)에 대한 Echinacea를 첨가한 단구(실험 1의 단구)의 각 유전자들의 발현비를 구하였고, Echinacea를 첨가하지 않은 수지상세포(실험 4의 수지상세포)에 대한 Echinacea를 첨가한 수지상세포(실험 3의 수지상세포)의 각 유전자들의 발현비를 구하였다. 여기서 실험 1과 2에서는 세 공여자의 단구에서 나온 유전자 발현비의 결과를, 실험 3과 4에서는 두 공여자의 수지상세포에서 나온 유전자 발현비의 결과를 평균하여 그 발현비가 2.5 이상 되는 것을 의미있게 발현된 유전자로 보았다.

결과 : Echinacea를 첨가하지 않은 단구를 대조군으로 하여 Echinacea를 첨가한 단구의 유전자 발현비가 2.5 이상으로 증가한 것들 중 면역과 관계된 유전자들은 17개였다. Echinacea를 첨가하지 않은 수지상세포를 대조군으로 하여 Echinacea를 첨가한 수지상세포의 유전자 발현비가 2.5 이상으로 증가한 것들 중 면역과 관계된 유전자들은 24개였고, 실험에 사용한 수지상세포들은 모두 미성숙 수지상세포의 특징적인 표면항원들을 가지고 있음을 유세포 분석으로 확인하였다. Echinacea가 단구와 수지상세포 둘 다에서 의미있게 유전자발현비가 증가된 것들이 7개 있었는데, 이들은 CD44, IFI 30, MRC 1, CCR 7, CLK 2, syntenin, cytochrome C oxidase subunit VIII 등의 유전자들이었다. 특히 발현비가 3.5 이상으로 높은 유전자들을 그 발현비순으로 나열하면 단구에서는 IFI 30, CLK 2, syntenin, superoxide dismutase 2 등 4개의 유전자들이 있었고, 수지상세포에서는 somatomedin A, methyl-CpG binding domain protein 3, IFI 30, small inducible cytokine subfamily A(Cys-Cys), member 22, ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6, hexosaminidase B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor epsilon, CCR 7 등 8개의 유전자들이 있었다.

결론 : 본 연구는 Echinacea가 CD14⁺ 단구 및 수지상세포에서 발현을 증가시키는 면역관련 유전자들을 cDNA microarray chip을 이용하여 검색하였고, 향후 이 유전자들을 기초로 정량적이고 기능적으로 분석할 수 있는 토대를 마련하였다.

References

- 1) Ringer JA, Kickner S, Chigurupati P, McLean A, Franck Z. Immunopharmacological activity of Echinacea preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol* 2000;68:503-10.
- 2) Burger RA, Torres AR, Warren RP, Caldwell VD, Hughes BG. Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. *Int J Immunopharmacol* 1997;19:371-9.
- 3) Izzo AA, Ernst E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs. a systemic review. *Drugs* 2001;61:2163-75.

- 4) Rehman J, Dillow JM, Carter SM, Chou J, Le B, Maisel AS. Increase production of antigen-specific immunoglobulins G and M following in vivo treatment with the medicinal plants *Echinacea angustifolia* and *hydrastis canadensis*. *Immunol Lett* 1999;68:391-5.
- 5) Melchart D, Linde K, Worku F, Sarkady L, Holzmann M, Jurcic K, et al. Results of five randomized studies on the immunomodulatory activity of preparations of *Echinacea*. *J Altern Complement Med* 1995;1:145-60.
- 6) Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol* 2001;29:1247-55.
- 7) Small EJ, Fratesi P, Reese DM, Strang G, Laus Reiner, Peshwa MV, et al. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol* 2000;18:3894-903.
- 8) Matsuzaki A, Suminoe A, Hattori H, Hoshina T, Hara T. Immunotherapy with autologous dendritic cells and tumor-specific synthetic peptides for synovial sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:220-3.
- 9) Maraskovsky E, Daro E, Roux E, Teepe M, Maliszewski CR, Hoek J, et al. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 2000;96:878-84.
- 10) Le Naour F, Hohenkirk L, Grolleau A, Misek DE, Lescure P, Geiger JD, et al. Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J Biol Chem* 2001;276:17920-31.
- 11) Ahn JH, Lee Y, Jeon C, Lee SJ, Lee BH, Choi KD, et al. Identification of the genes differentially expressed in human dendritic cell subsets by cDNA subtraction and microarray analysis. *Blood* 2002;100:1742-54.
- 12) Granucci F, Castagnoli PR, Rogge L, Sinigaglia F. Gene expression profiling in immune cells using microarray. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;126:257-66.
- 13) Le Naour F. Contribution of proteomics to tumor immunology. *Proteomics* 2001;1:1295-302.
- 14) Cortesini SN, Piazza F, Ho E, Ciobotariu R, LeMaout J, Dalla-Favera R, et al. Distinct mRNA microarray profiles of tolerogenic dendritic cells. *Hum Immunol* 2001;62:1065-72.
- 15) Lapteva N, Nieda M, Ando Y, Ide K, Hatta-Ohashi Y, Dymshits G, et al. Expression of renin-angiotensin system genes in immature and mature dendritic cells identified using human cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:1059-65.
- 16) Yoo KH, Kim DH, Kim SH, Sung KW, Koo HH. Generation of Mature dendritic cells from peripheral blood. *Korean J Pediatr Hematol Oncol* 2001;8:305-13.
- 17) Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasic R, Vuk-Pavlovic S. Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:731-8.
- 18) Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000;165:6037-46.
- 19) See DM, Broumand N, Sahl L, Tilles JG. In vitro effects of *echinacea* and *ginseng* on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology* 1997;35:229-35.
- 20) Chen H, Centola M, Altschul SF, Metzger H. Characterization of gene expression in resting and activated mast cells. *J Exp Med* 1998;188:1657-68.
- 21) East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572:364-86.
- 22) Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
- 23) Brown KL, Maiti A, Johnson P. Role of sulfation in CD44-mediated hyaluronan binding induced by inflammatory mediators in human CD14(+) peripheral blood monocytes. *J Immunol* 2001;167:5367-74.
- 24) Bankfalvi A, Krassort M, Buchwalow IB, Vegh A, Felszeghy E, Piffko J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and beta-catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. *J Pathol* 2002;198:343-51.
- 25) Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasic R, Vuk-Pavlovic S. Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:731-8.
- 26) Ploix C, Lo D, Carson MJ. A ligand for the chemokine receptor CCR 7 can influence the homeostatic proliferation of CD4 T cells and progression of autoimmunity. *J Immunol* 2001;167:6724-30.
- 27) Mushiaki H, Tsunoda T, Nukatsuka M, Shimao K, Fukushima M, Tahara H. Dendritic cells might be one of key factors for eliciting antitumor effect by chemioimmunotherapy in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:120-8.
- 28) Johnson KW, Smith KA. Molecular cloning of a novel human cdc2/CDC28-like protein kinase. *J Biol Chem* 1991;266:3402-7.
- 29) Grootjans JJ, Reekmans G, Ceulemans H, David G. Syntenin-syndecan binding requires syndecan-syntenin and the co-operation of both PDZ domains of syntenin. *J Biol Chem* 2000;275:19933-41.
- 30) Hegeman AD, Brown JS, Lomax MI. Sequence of the cDNA for the heart/muscle isoform of mouse cytochrome C oxidase subunit VIII. *Biochim Biophys Acta* 1995;1261:311-4.