

## 감송향이 수지상세포 성숙에 미치는 영향

원광대학교 한의과대학 부인과학교실  
오광우, 정지혜, 정현철, 조한백, 김송백, 최창민

### ABSTRACT

#### Inhibitory effects of *Nardostachys Jatamansi* on the maturation of dendritic cells

Kwang-Woo O, Ji-Hye Jeong, Hyun-Cheol Cheong, Han-Baek Cho,  
Song-Baeg Kim, Chang-Min Choe  
Dept. of Oriental Obstetric and Gynecology, college of Oriental Medicine,  
Won-Kwang University

**Purpose:** The purpose of this study is to investigate inhibitory effect on the maturation of dendritic cells from aqueous extract from *Nardostachys Jatamansi*(NJ).

**Methods:** I examined the phenotypic maturation(class II MHC, CD40, CD86), expression of pro-inflammatory cytokine(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12) and endocytosis of FITC-Dextran in the LPS-induced bone marrow-derived dendritic cells(BMDCs) of mice. Furthermore, the Western-blot analysis reveals the mechanism of inhibitory effect.

**Results:**

1. The NJ extract inhibited the phenotypic maturation of BMDCs in a dose-dependent manner.
2. The NJ extract inhibited the LPS induced cytokine production of BMDCs in a dose-dependent manner.
3. The NJ extract enhanced the endocytosis of Dex-FITC in LPS treated DC.
4. The NJ extract inhibited the activation of JNK and p38 phosphorylation, but not ERK phosphorylation of MAPK family and doesn't inhibit Ik-Ba degradation in LPS-stimulated BMDCs.

**Conclusion:** These results suggest that NJ extract is able to attenuate the inflammation and maturation in BMDCs and may inhibit proliferation of T cells. In conclusion, this experiment suggests that NJ extract may be useful in hypersensitivity disease including autoimmune disease.

**Key Words:** *Nardostachys Jatamansi*(NJ), Dendritic cells, Maturation.

“이 논문은 2009년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.”  
“This research was supported by Won-Kwang University in 2009”

## I. 緒 論

수지상세포(dendritic cells, DCs)는 림프기관, 피부와 소화기, 호흡기 등의 상피조직과 대부분의 실질기관의 간질에 존재한다. 모든 수지상세포는 골수 내 전구세포에서 유래하였을 것으로 생각되며, 대부분 골수성 수지상세포(myeloid dendritic cells)로 불리는 단핵 포식세포계와 관련 있다. 수지상세포는 antigens를 섭취하여 말초조직에서 lymphoid organs로 이동하는데 특화된 전문적인 항원제시세포(APCs)이다. naive T cells를 자극하는 능력이 있어서 일차적 면역반응을 개시하는 중심적인 역할을 하며, 미성숙 상태에서 자가관용(self-tolerance)에 관여하므로 면역질환 치료의 수단과 목적으로 여겨지고 있어<sup>1,2)</sup>, 이식, 알레르기, 자가면역질환, 감염과 종양에 대한 저항, 면역결핍, 백신 등에 대한 연구에 이용되고 있다<sup>3)</sup>. 특히 한방부인과의 상견병인 산후풍(産後風)의 한 원인으로 알려진 류마티스 관절염 같은 자가면역질환의 경우 활성화된 수지상세포의 숫자가 증가하고, 수지상세포에 의한 자가항원(self antigen)의 제시는 자가면역질환에 결정적인 역할을 한다<sup>4,5)</sup>. 따라서 수지상세포의 성숙에 대한 조절은 면역학적 치료에 있어 중요한 부분이다.

甘松香은 理氣止痛·醒脾健胃 등의 효능이 있어 위통, 흉복창만, 두통, 히스테리, 각기병을 치료한다고 하였고<sup>6)</sup>, 실험적으로 급성 췌장염 억제 효과<sup>7)</sup>, 항산화 효과 및 항스트레스작용<sup>8,9)</sup>, 항박테리아, 항진균작용<sup>10)</sup>에 관한 보고가 있으나, 수지상세포의 성숙 억제를 통한 염증 및

면역에 관한 연구는 아직까지 접하지 못하였다.

이에 저자는 甘松香의 수지상세포의 성숙에 대한 영향을 실험적으로 究明하기 위하여 甘松香 추출물로 전처리한 후 LPS로 유도된 골수유래수지상세포(BMDCs)의 세포표면수용체인 class II MHC, CD40, CD86의 발현 정도와 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12의 생산량 및 MPAK family인 ERK, JNK, p38 및 I $\kappa$ -Ba의 발현을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗方法

### 1. 재 료

#### 1) 약 재

본 실험에서 사용된 甘松香(*Nardostachys Jatamansi*)은 옴니허브(경북 영천)에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

#### 2) 시약 및 기기

FBS, RPMI-1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서, 배양조는 Corning(Rochester, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 항체인 FITC-conjugated anti-MHC class II Ab(25-3-17), PE-conjugated anti-CD40 Ab, FITC-conjugated anti-CD86 Ab, APC-conjugated anti-CD11c Ab와 FITC-dextran은 BD Pharmingen (CA, USA)사에서 구입하였다. Antibodies (Abs) against total 과 phosphospecific MAPKs는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)사에서 구입하였다. I $\kappa$ -Ba monoclonal Abs (mAbs)와 peroxidase-conjugated secondary Ab는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)사

에서 구입하였다. Prestained sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE) markers는 Bio-Rad(Hercules, CA, USA)사에서 구입하였다. ELISA에 사용한 anti-mouse TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 antibodies, 재조합 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, GM-CSF는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

### 3) 실험동물

C57BL/6 mouse 6주령 암컷을 오리엔트 바이오(경기도 성남)에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 방 법

### 1) 시료 제조

1ℓ의 3차 증류수에 甘松香 100 g을 넣고 2시간 동안 전탕한 후, 물 추출물은 -80℃에서 동결 건조시켜 13 g의 분말을 얻었다. 얻어진 분말을 농도별로 녹여서 filter로 여과하여 사용하였고, 사용 전까지 4℃에서 보관하였다.

### 2) MTT 분석 - 세포독성 분석<sup>11)</sup>

수지 상세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주 빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT분석법으로 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들을  $2 \times 10^5$ 의 밀도로 현탁하였고, 농도별로 NJ (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리하였다. 24시간 동안 배양한 뒤 5 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT 용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 해액(解液)을 96-well plate에 loading

한 후, 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다.

### 3) BMDCs 배양<sup>12)</sup>

C57BL/6 mouse의 tibia와 femur에서 골수를 채취한다. 채취한 골수를 single 세포로 만든 후 nylon mesh로 거른다. 이 세포를 원심분리 한 후에 상층액을 버리고 0.165M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 넣고 적혈구를 제거한다. 다시 원심분리한 후에 상층액을 버리고 여기에 RPMI1640 complete (10% FBS, 항생제)를 넣는다. 이 세포를 petri dish에 넣고 37℃ ·  $\text{CO}_2$ 배양기에 3시간 정도 배양한다. 3시간 후에 가볍게 pipetting을 한다. 이 과정에서 dish 바닥에 붙어 있는 세포는 거의 대부분이 macrophage이다. 상층액을 채취한 후 원심분리 한다. 그 후에 상층액을 버리고, GM-CSF를 넣고 배양한다. 이틀마다 배지를 버리고 6일째 되는 날에 실험한다. 이 6일째 되는 세포는 거의 대부분이 iDC이거나 DC precursor이다.

### 4) Flow cytometry analysis<sup>13)</sup>

7일째, 수지상세포를 얻어, PBS로 씻은 다음, FACS washing buffer(2% FBS and 0.1% sodium azide in PBS)를 넣은 후 스크래퍼로 긁어서 세포를 얻어냈다. normal rat serum, Fc gamma receptor blocker, anti-CD86-PE, anti-CD11c-APC, anti-I-Ab-FITC(MHC class II)와 anti-CD40-PerCP로 4℃에서 20분간 염색하였다. 염색된 cells은 FACS Calibur flow cytometer(Becton - Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

### 5) Cytokine(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL12)의 측정

LPS(500 ng/ml)로 수지상세포로 자극하기 전 甘松香 추출물을 1시간동안 전처리 하였다. 염증매개물질인 cytokine의

생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해서 LPS(500 ng/ml)로 자극한 후 18 시간 뒤 이들 염증매개물을 세포 상층액에서 ELISA법으로 정량하였다.

#### 6) ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)<sup>14)</sup>

TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12에 특이하게 반응하는 mouse의 monoclonal 항체로 코팅된 96-well plate를 0.05% Tween 20이 포함된 PBS로 세척하고 재조합된 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12를 희석하여 standard로 사용하였다. 희석액은 10 ng/ml를 시작하여 표준커브를 그리게 하였다. 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 well을 다시 세척하고 각각에 biotinylated anti rat TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 0.2 g/ml를 넣는다. Well을 세척한 후 avidin-peroxidase를 넣고, 37°C에서 20분간 배양하였다. 다시 well을 세척하고 ABTS substrate를 넣은 후, 자동 microplate ELISA reader를 사용하여 450 nm로 분석하였다.

#### 7) Endocytosis assay<sup>15)</sup>

수지상세포의 내포 작용을 측정하기 위해, 세포는 1 시간 동안 37°C에서 1 mg/ml FITC-dextran(42,000 Da)으로 염색되었다. 그 후, PBS로 2번 씻어내고, APC 결합된 CD11c 항체를 염색하였다. 이중 염색된 수지상세포는 FACS를 통해 분석되었다. 저온에서 수지상세포의 내포 작용이 억제됨을 확인하기 위해 같은 실험이 4°C에서 이루어졌다.

#### 8) Western blot analysis<sup>16)</sup>

수지상세포를 60 mm culture dish에  $5 \times 10^6$  cells/ml로 세포를 배양하고 NJ (50 mg/ml)를 1시간 전처리한 뒤에 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 cold PBS로 3회 세척한 후 시간별(0, 15, 30, 60mins) cell

을 harvest하여 cell을 얻은 뒤 원심분리(5000RPM, 5mins) 하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. lysis buffer (lysis buffer 1 ml + phosphatase inhibitor 10  $\mu$ l + protease inhibitor 10  $\mu$ l)를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리(15000 RPM, 20mins)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼(4x)를 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 멤브레인에 옮기고 나서 5% skim milk로 2hrs blocking 하였다. p-ERK 1/2, p-JNK, p-p38, I $\kappa$ -Ba, ERK 1/2, JNK, p38, actin를 ECL detection 용액으로 확인하였다.

### 3. 통계처리

실험 결과에 대한 통계 처리는 Student's *t*-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## III. 結 果

### 1. 세포독성에 미치는 영향

甘松香 추출물의 세포독성을 알아보기 위하여 골수유래수지상세포(BMDCs)에 농도 별로(1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml) 전처리하고, 24시간 후에 세포의 생존율을 측정한 결과, 모든 농도에서 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1).

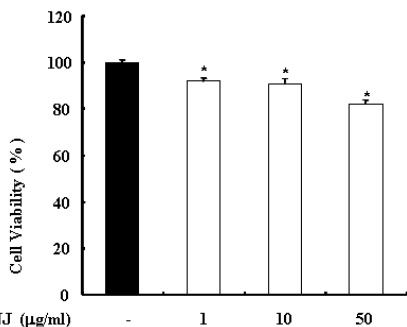


Fig. 1. NJ extract has no cytotoxicity itself in BMDCs.

BMDCs were incubated with NJ extract as indicated dose for 24 hrs. The cell viability was measured by MTT assay. Data are mean ± S.E.M. Significant difference (\*p < 0.05) vs. saline-treated group. The results were similar in 3 additional experiments. Detail methods were described in Materials and Methods.

## 2. BMDCs의 세포표면 수용체 class II MHC와 CD40, CD86에 미치는 영향

LPS(500 ng/ml)에 의한 iBMDCs의 세포표면 수용체 발현정도를 대조군으로 설정하여 실험하였다. 甘松香 추출물을 다양한 농도(1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml)로 1시간 전처리한 후 LPS(500 ng/ml)로 자극하였다. 甘松香 추출물 전처리 집단에서 24시간 후 class II MHC, CD40, CD86의 발현이 LPS 단독 자극 집단보다 감소하였고, 발현 정도는 甘松香 추출물의 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 2).

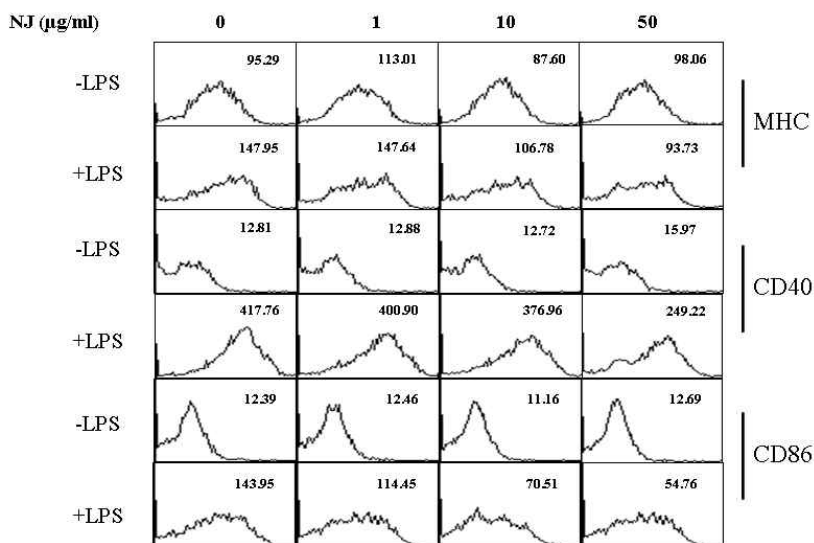


Fig. 2. NJ extract inhibited the phenotypic maturation of BMDCs in a dose-dependent manner.

BMDCs were cultured for 1 hr in the presence of 1, 10, 50 µg/ml NJ extract. Then BMDCs were stimulated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 hrs. The expressions of MHC, CD40, CD86 were measured by FACS analysis as indicated in Material and Method. Data are mean ± S.E.M. The results were similar in 3 additional experiments. Detail methods were described in Materials and Methods.

## 3. BMDCs의 cytokine 생성에 미치는 영향

iBMDCs는 항원의 자극 후 mBMDCs로 성숙하면서 다량의 cytokine을 분비

한다. iBMDCs에 甘松香 추출물을 농도 별로(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 전처리하고 1시간 뒤 LPS(500  $\text{ng}/\text{ml}$ )로 자극하였다. 24시간 후 세포 상층액을 ELISA

방법으로 측정한 결과, LPS 단독 처리한 집단에 비해 甘松香 추출물을 전처리한 집단은 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12의 생성이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3).

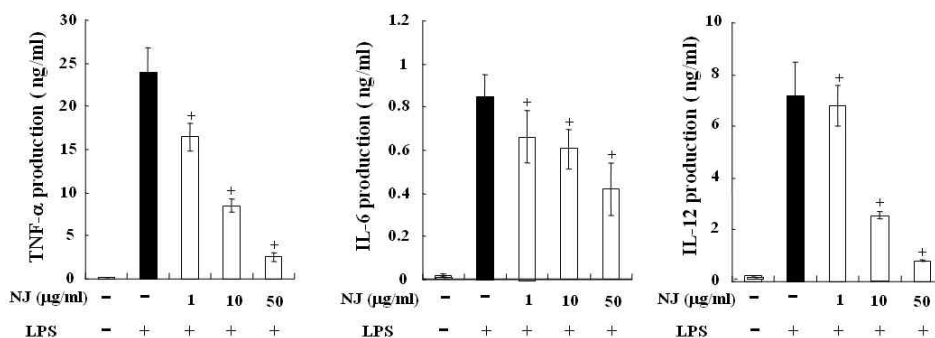


Fig. 3. NJ extract inhibited the LPS-induced cytokine productions of BMDCs in a dose-dependant manner.

The NJ extract pre-treated cells were incubated for 24 hrs with LPS(500  $\text{ng}/\text{ml}$ ). The supernatants were used for checking the cytokine production by ELISA. Data are mean  $\pm$  S.E.M. Significant difference( $p < 0.05$ ) vs. LPS-treated group. The results were similar in 3 additional experiments. Detail methods were described in Materials and Methods.

#### 4. BMDCs의 FITC-Dextran endocytosis 에 미치는 영향

BMDCs의 항원 섭취 능력을 조사하였다. 甘松香 추출물을 iBMDCs에 농도 별로 전처리한 후 1시간 뒤 LPS(500  $\text{ng}/\text{ml}$ )로 자극하였다. 24시간 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 와 37 $^{\circ}\text{C}$ 에

서 Dex-FITC로 1시간 동안 염색한 후 Dex-FITC 섭취 능력을 FACS로 분석하였다. 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 LPS만 처리한 군에 비해 甘松香을 전처리한 군에서 Dex-FITC 섭취 능력 저하가 억제되었다(Fig. 4).

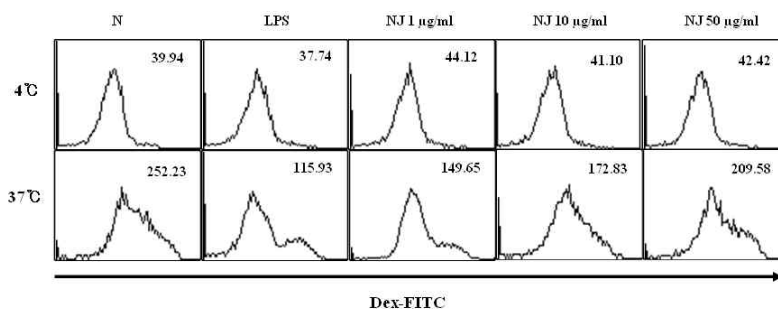


Fig. 4. NJ extract enhanced the endocytosis of Dex-FITC in LPS treated DC. NJ extract was pre-incubated for 1 hr as indicated dose, then stimulated with LPS (500  $\text{ng}/\text{ml}$ ). After 24 hrs, the cells were stained by Dex-FITC for 1 hr in 4 $^{\circ}\text{C}$  or 37 $^{\circ}\text{C}$ . The uptake of Dex-FITC was measured by FACS analysis. Data are mean  $\pm$  S.E.M. The results were similar in 3 additional experiments. Detail methods were described in Materials and Methods.

### 5. NF- $\kappa$ B와 MAPK의 활성화에 미치는 영향

甘松香 추출물이 BMDCs의 성숙을 억제하는 기전을 알아보기 위해 MAPK family인 ERK, JNK, p38의 인산화 정도를 알아보고, NF- $\kappa$ B의 활성을 알아보기 위해 상대적 지표인 I $\kappa$ -Ba의 분해 정도를 시간별(0, 15, 30, 60mins)로 조사하였다. 甘松香 추출물은 LPS에 의한 JNK, p-38의 활성을 억제하였으나, ERK와 I $\kappa$ -Ba의 활성은 억제하지 못하였다(Fig. 5).

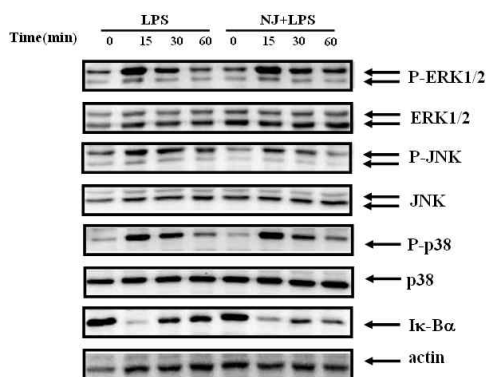


Fig. 5. NJ extract inhibited JNK and p38 phosphorylation, but not ERK1/2, and did not inhibit I $\kappa$ -Ba degradation in LPS-stimulated BMDC.

The cells were pre-treated with 50 mg/ml NJ extract for 1hr, and then incubated with 500 ng/ml of LPS for indicated time. Detail methods were described in Materials and Methods.

## IV. 考 察

면역반응은 세균감염에 대한 방어에 중요한 기능을 하지만, 때로 조직의 손상이나 질병을 일으킨다. 과민 질환(hypersensitivity disease)은 면역반응에 의하여 야기되며, 흔한 원인은 자기 항원에 대해서 면역반응을 일으키지 않는 면역학적 특성인 자가관용의 상실이다.

많은 과민 질환들이 T<sub>H</sub>1 세포가 직접 염증을 야기하거나 또는 조직 손상 및 염증을 유도하는 항체의 형성을 자극함으로써 일어난다<sup>17)</sup>. 이러한 면역 과정에서 수지상세포는 naive T cells의 성숙과 분화에 직접적인 영향을 미친다. 미성숙 수지상세포가 regulatory T cells을 자극하여 말초의 T cells의 관용을 유지하므로, 수지상세포 성숙 억제는 자가면역 질환 즉 산후 류마티스 관절염과 같은 과민 질환 치료에 중요한 요소가 된다<sup>2)</sup>.

甘松香은 敗醬과에 속한 多年生 草本인 甘松香 혹은 寬葉甘松의 根과 根莖으로, 성미는 辛·甘, 溫 하고 無毒 혹은 有小毒하고 脾·胃 二經에 작용한다. 開胃醒脾의 효능이 있기 때문에 氣鬱不舒, 脘腹滿痛, 食慾不振 등의 병증을 다스리고, 또한 收濕拔毒시켜 濕脚氣를 치료한다<sup>6,18,19)</sup>. 甘松香에 대한 실험적 연구 보고에 의하면 항우울작용, 학습과 기억향상, 뇌경색에 대한 보호, 간보호, 기관지이완 효과 등이 있으며, HL-60 세포의 세포자멸사 및 분화에 미치는 영향 등 甘松香의 효과에 대한 다양한 보고가 있으나<sup>20-25)</sup>, 甘松香의 수지상세포에 미치는 영향에 대한 연구는 없었다.

따라서 본 연구에서는 甘松香의 면역학적 자가관용에 대한 효과를 알아보기 위해 수지상세포의 성숙 억제에 미치는 영향에 관한 실험적 연구를 하였다. 본 실험에서는 mouse의 tibia와 femur의 골수에서 채취한 BMDCs를 사용하였으며, LPS로 단독 자극한 iBMDCs를 대조군으로 설정하였고, 甘松香 추출물을 전처리한 후 LPS로 자극한 iBMDCs를 실험군으로 하였다.

甘松香 추출물이 iBMDCs에 독성을

나타내는지 알아보기 위하여 MTT 방식으로 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 세포 생존율을 저하시키지 않아, iBMDCs에 대한 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 1).

상피나 다른 조직 내에 존재하는 수지상세포는 단백질 항원을 포획하여 가까운 림프절로 운반한다<sup>26)</sup>. 세포 표면에 발현되는 TLR이 병원균에 있는 분자 양상을 감지하면서 세포내 신호전달과정이 촉발되고, 수지상세포의 성숙을 통해 T cells의 활성화를 강화한다<sup>27)</sup>. 수지상세포는 자극에 따라 미성숙 수지상세포(iDCs)와 성숙 수지상세포(mDCs)로 구분할 수 있다. 미성숙 수지상세포는 자가항원 감각에 대해 T cells을 비활성화시키는 peripheral T cell tolerance를 유지하게 하고, inflammatory signals 등을 받아 성숙 수지상세포로 전환되면 T cells을 활성화시킨다. 이러한 수지상세포의 성숙 여부는 세포 표면의 수용체 발현, cytokine 분비, 항원 섭취 능력 및 세포 이동 능력 변화 등으로 나타난다<sup>2,3,28)</sup>.

미성숙 수지상세포가 LPS 등 항원의 자극을 받아 성숙 수지상세포로 변하면서, antigen capturing devices를 잃게 되고, 대신 T-cell stimulatory functions이 증가하여, 세포 표면의 class II MHC와 CD40, CD80, CD86의 발현이 증가하게 된다<sup>3)</sup>.

MHC는 T cells에 항원을 제시하여 인식하게 하는데 필수적인 다형성 당단백질로, 그 중 class I MHC는 T<sub>H</sub> cells에서 유래한 cytokines의 영향 아래에서 Tc cells(CD8<sup>+</sup> T cells)와 결합하여 Tc cells이 증식, 분화하고, class II MHC는 T<sub>H</sub> cells(CD4<sup>+</sup> T cells)에 항원을 제시하여

다양한 cytokines을 분비하는 효과세포로 작용하게 한다<sup>28)</sup>.

CD86은 수지상세포, B cells, monocytes에서 표현되는 동시자극자(costimulatory molecules)의 하나이며, CD40은 macrophages, 수지상세포, endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes 등에서 표현되어, B cells의 성장, 분화, 변화에 기여하며, macrophage와 수지상세포에서 cytokine 생산을 자극하며, 수지상세포의 부착 분자의 up-regulation을 담당한다<sup>29)</sup>. T cells이 동시자극자 결합 없이 항원 인식만 한 경우에는 무반응(anergy)이 일어나는 반면, 항원과 동시자극자에 의하여 활성화된 T cells은 CD40 ligand(CD40L)를 발현하여 APCs 표면의 CD40과 결합하며 APCs의 cytokine 생산을 증강시키고, cytokine 유전자 전사를 자극한다<sup>17,27)</sup>.

甘松香 추출물이 BMDCs의 세포표면 수용체 발현 정도에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 농도별로 전처리한 후 LPS로 자극하여 측정한 결과, 甘松香 추출물은 class II MHC, CD40, CD86의 발현을 억제하였다(Fig. 2). 따라서 甘松香 추출물은 LPS에 의한 iBMDCs의 성숙을 억제시켜 class II MHC, CD40, CD86 등의 세포표면 수용체 발현을 억제하며, 이는 naive T cells의 분화를 억제함을 의미한다.

미성숙 수지상세포는 항원에 의한 자극 후 성숙 수지상세포로 전환되면서 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 등의 proinflammatory cytokine을 생산한다. TNF- $\alpha$ 는 monocytes와 macrophage 등에서 생산되어 염증과면역기능의 강력한 매개체로서 감염부위로 호중구 및 단핵구의 보충을 자극하는 기능을 한다. IL-6은 T cells, B cells,



macrophages 등에서 생산되며, B cells과 T cells의 기능을 조절하여, 급·만성 감염, neoplasia, 자가면역 질환, 건선 그리고 3도 화상 등에서 증가된다<sup>17,28)</sup>. IL-12는 수지상세포와 macrophages에서 생산되며, 세포 내 미생물에 대한 초기 선천 면역반응의 주요한 매개자로, 세포매개 면역을 유도하고, CD4<sup>+</sup> T cell에서 IFN- $\gamma$ 를 생산하는 T<sub>H</sub>1으로 분화하게 한다<sup>17)</sup>.

甘松香 추출물이 BMDCs의 cytokine의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 iBMDCs에 농도별로 전처리한 후 LPS에 의해 유도된 cytokine의 생산 정도를 측정하였다. 그 결과 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 모두 억제되었다(Fig. 3). 따라서 甘松香 추출물은 수지상세포의 성숙에 따른 염증성 cytokine 생산을 감소시킬 수 있으며, IL-12에 의한 CD4<sup>+</sup> T cell에서 T<sub>H</sub>1 세포로의 분화를 억제할 수 있음을 의미한다.

항원의 섭취와 제시에 있어 미성숙 수지상세포는 항원제시의 준비 단계로 항원을 활발하게 섭취하지만, 성숙 수지상세포는 T cells에 항원을 전달하기 위해 이동성이 증가하므로, 미성숙 수지상세포와 성숙 수지상세포는 항원 섭취 능력에서도 차이를 보이게 된다<sup>29)</sup>. 따라서 미성숙 수지상세포에서는 높은 항원 섭취 능력과 낮은 항원 제시 능력을 보이고, 반대로 성숙 수지상세포에서는 낮은 항원 섭취 능력과 높은 항원 제시 능력을 나타낸다<sup>28)</sup>.

甘松香 추출물이 BMDCs의 성숙에 따른 항원 섭취 능력의 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 甘松香 추출물을 iBMDCs에 농도별로 전처리한 후 LPS로 자극하고, FITC-dextran의 섭취능력을

측정하였다. 아무런 자극도 가하지 않은 집단에 비해 LPS를 처리한 집단에서는 46%정도로 섭취 능력이 현저히 감소한 반면, 甘松香 추출물을 전처리한 집단에서는 농도 의존적으로 FITC-dextran 섭취 능력이 향상되었으며, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 甘松香 추출물로 전처리한 집단에서는 83%로 섭취 능력의 저하가 억제되었다(Fig. 4). 따라서 감송향 추출물은 LPS (500nm/ml)로 유도된 iBMDCs가 mBMDCs로 전환되는 과정에서 FITC-dextran 섭취능 감소가 억제된 사실을 통해서 iBMDCs의 성숙을 억제하였음을 알 수 있다.

TLR은 미성숙 수지상세포가 병원균과 접촉할 경우 병원균 특이적 분자양상(PAMP)을 감지하고 신호를 전달하여 미성숙 수지상세포가 성숙 수지상세포로 분화하게 하는 역할을 한다<sup>26)</sup>. LPS는 TLR의 여러 유형 중 주로 TLR4에 결합한다. LPS가 수지상세포의 TLR4에 결합하게 되면, NF- $\kappa$ B와 ERK, p38, JNK를 포함하는 MPAK를 활성화시키게 된다<sup>30)</sup>.

NF- $\kappa$ B는 TLR 신호전달에 의해 활성화되는 주요한 전사 인자들 중 하나로, 염증 cytokine, chemokine 및 혈관내피세포 부착 분자들 등의 면역반응에 관여하는 많은 분자들의 유전자 발현을 자극하는 중요한 전사 인자이다<sup>17)</sup>. NF- $\kappa$ B는 NF- $\kappa$ B가 핵으로 이동하는 것을 막아주는 I $\kappa$ -Ba와 결합하고 있다가, I $\kappa$ -Ba가 인산화 되어 떨어져 나가면 핵으로 이동하여 유전자를 전사함으로써 수지상세포의 발달, 생존, cytokine 생성을 조절하게 된다<sup>31)</sup>.

MAPK는 선천 면역과 획득 면역에서 모두 중요한 조절 인자로 작용하고, ERK,

p38, JNK 3가지 유형이 포유류에 존재한다. MAPK는 세포 안팎의 변화에 대해 폭 넓게 반응하며, 다른 신호 전달 pathway와 상호 작용하여, 세포내 유전자 발현과 세포 기능 조절에 기여함으로써 염증을 유발하는 cytokines의 생성 조절에 결정적인 역할을 한다<sup>30,32</sup>).

이러한 기전을 바탕으로 甘松香 추출물이 수지상세포의 성숙을 억제하는 기전을 알아보기 위하여, 본 실험에서는 ERK, JNK, p38의 MAPK와 NF- $\kappa$ B의 발현 정도를 반영하는 I $\kappa$ -Ba의 활성을 조사하였다. 실험 결과 甘松香 추출물은 I $\kappa$ -Ba와 ERK는 억제하지 못했지만 JNK, p38의 활성에 대해서는 억제하였다(Fig. 5).

따라서 甘松香 추출물은 MAPK의 JNK와 p38의 활성 억제를 통해 class II MHC와 CD40, CD86의 발현과 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12의 생성을 억제함으로써 수지상세포의 성숙을 억제하는 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과로 볼 때 甘松香 추출물은 염증성 cytokine의 생성을 억제하여 항염증효과를 가지며, 또한 T cells을 성숙하게 하는 수지상세포의 성숙을 억제하므로, T cells에 의해 매개되는 많은 과민 질환에 대해 활용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

## V. 結 論

甘松香 추출물의 수지상세포 성숙에 미치는 영향을 조사하기 위하여 mouse의 iBMDCs를 LPS로 자극한 후, class II MHC, CD40, CD86의 발현 정도와 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL12의 생성을 관찰하고,

수지상세포의 항원 섭취 능력 조사를 위해 Dextran의 세포내 이입을 관찰하였으며, 작용기전을 구명하고자 ERK, JNK, p38 및 I $\kappa$ -Ba의 활성에 미치는 영향을 분석한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 甘松香 추출물의 세포 독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행한 결과, 甘松香의 농도별 처리는 iBMDCs에 대한 세포 독성을 나타내지 않았다.
2. 甘松香 추출물은 iBMDCs에서 LPS에 의한 class II MHC, CD40, CD86의 발현을 억제하였다.
3. 甘松香 추출물은 iBMDCs에서 LPS에 의한 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL12 생성을 농도 의존적으로 억제하였다.
4. 甘松香 추출물은 iBMDCs에서 LPS에 의해 저하되는 FITC-Dextran 세포내 이입을 향상시켰다.
5. 甘松香 추출물은 ERK와 I $\kappa$ -Ba의 활성을 억제하지는 못하였으나, JNK, p38의 활성을 억제하였다.

이상의 결과에서 甘松香 추출물은 iBMDCs의 성숙을 억제하였으며, iBMDCs에서 JNK와 p38의 활성을 억제함으로써, 염증 관련 cytokine의 생성을 억제하는 것으로 나타나, 임상에서 급·만성 염증질환 및 수지상세포의 성숙 억제와 관련된 면역 질환의 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

투 고 일 : 2010년 7월 29일

심 사 일 : 2010년 8월 3일

심사완료일 : 2010년 8월 10일

## 參考文獻

1. Bayry J et al. Dendritic cells and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2004 ;3(3): 183-7.
2. Cools N et al. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *Journal of Leukocyte Biology.* 2007;82:1365-74.
3. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *NATURE.* 1998;392:245-52.
4. 김태규. 수지상세포를 이용한 종양 면역치료. 암심포지움, 가톨릭대학교 가톨릭암센터. 2006;1:41-2.
5. Thomas R et al. Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Journal of Leukocyte Biology.* 1999;66.
6. 김창민 등. 중약대사전 1권. 서울:정담. 1998:74-7.
7. 송제문. 감송향의 췌장염 억제효과. 원광대학교 대학원. 2009.
8. Lyle N et al. The role of antioxidant properties of *Nardostachys jatamansi* in alleviation of the symptoms of the chronic fatigue syndrome. *Behav Brain Res.* 2009;202(2):285-90.
9. Lyle N et al. Stress modulating antioxidant effect of *Nardostachys jatamansi*. *Indian J Biochem Biophys.* 2009;46(1):93-8.
10. Kumar VP et al. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2006;107(2):182-8.
11. Wilson AP. *Cytotoxicity and Viability Assays in Animal Cell Culture: A Practical Approach.* Oxford University Press:Oxford. 2000:1.
12. Inaba K et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp med.* 1992 ;176(6):1693-702.
13. Crowley M et al. The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell Immunol.* 1989 ;118(1):108-25.
14. Bergsdorf N et al. An enzyme linked immunosorbent assay for determination of tissue plasminogen activator applied to patients with thromboembolic disease. *Thromb Haemost.* 1983;50(3):740-4.
15. Hoppe HC et al. Antimalarial Quinolines and Artemisinin Inhibit Endocytosis in *Plasmodium falciparum*. 2004;48(7) :2370-8.
16. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiolabeled protein A. *Anal Biochem.* 1981;112(2):195-203.
17. 세포분자면역학 교재연구회 역. 세포분자면역학(6판). 서울:이퍼블릭. 2008: 11, 25, 121, 231, 313, 362, 367, 429-31, 520, 529, 626.
18. 한의과대학 본초학 편찬위원회. 본초학. 서울:영림사. 2007:409-10.

19. 신민교. 임상본초학. 서울:영림사. 2000 :458-9.
20. Dhingra D, Goyal PK. Inhibition of MAO and GABA: probable mechanisms for antidepressant-like activity of *Nardostachys jatamansi* DC. in mice. Indian J Exp Biol. 2008;46(4):212-8.
21. Joshi H, Parle M. *Nardostachys jatamansi* improves learning and memory in mice. J Med Food. 2006 ;9(1):113-8.
22. Salim S et al. Protective effect of *Nardostachys jatamansi* in rat cerebral ischemia. Pharmacol Biochem Behav. 2003;74(2):481-6.
23. Ali S et al. *Nardostachys jatamansi* protects against liver damage induced by thioacetamide in rats. J Ethnopharmacol. 2000;71(3):359-63.
24. Gupta SS et al. Effect of *Nardostachys jatamansi* fumes and aerosols in histamine-induced bronchial asthma in guinea pigs. J Indian Med Assoc. 1961;37:223-5.
25. 이준. 감송향이 HL-60 세포의 세포 자멸사 및 분화에 미치는 영향. 원광대 대학원. 2008.
26. 이원하. Innate immunity에서 Toll like receptor(TLR)의 기능. 생화학분자생물학뉴스. 2003;23(3):195-201.
27. Dearman RJ et al. Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells. Immunology. 2009;126(4):475-84.
28. 강호영 등 역. Kuby 면역학(5판). 서울:월드사이언스. 2006:10, 11, 635, 637, 629.
29. Granucci F et al. Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. Microbes and Infection. 1999; 1(13):1079-84.
30. Yao Y et al. ERK and p38 MAPK Signaling Pathways Negatively Regulate CIITA Gene Expression in Dendritic Cells and Macrophages. The Journal of Immunology. 2006;177:70-6.
31. Ouaz F et al. Dendritic Cell Development and Survival Require Distinct NF- $\kappa$ B Subunits. Immunity. 2002;16:257-70.
32. Zhang YL, Dong C. MAP Kinase in Immune Responses. Cellular & Immunology. 2005;2(1):20-7.