

## 紫蘇葉 에탄올 추출물이 RBL-2H3 비만세포에서 제 1형 알레르기 반응 조절에 미치는 효과

곡수영 · 유선애 · 이승연

동의대학교 한의과대학 소아과학교실

### Abstract

## Effect of Perillae Folium Extract on Regulation of Type 1 Allergic Response in RBL-2H3 Cells

Gok Su Yeong · Yu Sun Ae · Lee Seung Yeon

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongeui University

### Objectives

Perillae Folium (PF) has been widely used in Korean herbal medicines used for treatment of acute and chronic inflammatory diseases, such as rhinitis, asthma, and enteritis. In this study, to investigate the protective effect of PF on type 1 allergic response, we determined whether PF inhibits early or late allergic responses.

### Methods

The effect of PF was analyzed by ELISA, RT-PCR and Western blot in RBL-2H3 cells. Levels of  $\beta$ -hexosaminidase, interleukin (IL)-4 and TNF- $\alpha$  were measured using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). mRNA levels of cytokines and enzymes were analyzed with RT-PCR. Signal transduction was analyzed with Western blot.

### Results

We found that PF suppressed  $\beta$ -hexosaminidase release in RBL-2H3 by the IgE-DNP-HSA stimulation. PF also significantly inhibited enzymes level, such as COX-1, COX-2, iNOS, and HDC2, along with reduced cytokine levels, such as IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-13, and TNF- $\alpha$  in RBL-2H3. In addition, PF suppressed the phosphorylation of ERK1/2, JNK1/2, and I $\kappa$ B $\alpha$ .

### Conclusions

Our results indicate that PF protects against type 1 allergic response and exert an anti-inflammatory effect through the inhibition of degranulation and expression of cytokines and enzymes via the suppression of signal transduction.

**Key words** : Perillae Folium (PF), Type 1 allergic response,  $\beta$ -hexosaminidase, Cytokine, Signal transduction, RBL-2H3

## I. 緒論

紫蘇葉 (*Perilla frutescens* Britt. var. *acuta* Kudo)은 꿀풀과에 속하는 一年生 草本인 차조기 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 또는 주름소엽 *P. frutescens*(L.) Britt var. *crispa* Decne.의 잎을 건조한 것으로 性味는 辛溫하고 無毒하여 소아 및 임산부에게도 널리 응용되는 약물이다. 解表散寒, 行氣寬中, 解魚蟹毒의 효능이 있어 感冒風寒, 胸腹脹滿, 胎動不安 등에 사용되어 왔으며 임상적으로 알레르기 비염, 천식, 식중독 등의 증상에 활용되고 있다<sup>1)</sup>. 紫蘇葉에 관한 선행연구는 紫蘇葉 및 紫蘇葉 배오 처방에 대해 대부분 천식 모델 등을 이용한 호흡기 증상에 관한 효능을 확인하는 것이었다<sup>2-5)</sup>.

제 1형 알레르기는 음식, 집먼지, 진드기, 꽃가루 등의 특정한 항원에 의해 유도된다. 항원이 인체를 자극하여 IgE를 생성 분비하고 비만세포 수용체와 결합하여 복합체를 이루는데, 동일한 항원에 재감작되어 IgE를 교차결합하였을 때 비만세포가 활성화되고 알레르기 반응이 시작된다<sup>6-7)</sup>. 제 1형 알레르기 반응은 즉시반응과 후기반응으로 나눌 수 있다. 즉시반응은 5-10분 내에 발생하여 비만세포로부터 histamine,  $\beta$ -hexosaminidase, serotonin과 같은 이미 생성되어 있는 매개물질이 분비되고 새로 합성된 지질 매개물질을 분비하여 두드러기, 발진 등 혈관과 평활근 반응이 주된 즉시형 국소형 과민반응이 나타나고 이어 2-4시간 후에 T-helper type 2(Th2), 사이토카인을 합성하고 분비하여 후기반응이 일어나 염증 침윤반응을 지속시킨다<sup>8-9)</sup>.

제 1형 알레르기 반응에 있어 중요한 역할을 하는 RBL-2H3 비만세포는 점막형 비만세포(mucosal mast cell, MMC)의 특징을 나타내고 있으며 세포막 표면에 수 많은 IgE 수용체를 발현하고 있어 IgE 항체에 감작된 후 항원에 반응하여<sup>10-3)</sup> 호흡기 및 소화기 점막 등의 염증반응을 유발하는 알레르기에 대한 약물의 효능을 연구하는데 좋은 모델이 된다. 저자는 紫蘇葉 추출물이 알레르기 반응 조절에 미치는 영향을 확인하고자 RBL-2H3 세포를 이용하여 항알레르기 활성을 조사하여, 즉시반응을 유도하는 탈과립으로 인한  $\beta$ -hexosaminidase 분비와 후기반응을 유도하는 사이토카인의 생산과 mRNA 발현 및 신호전달에 유의한 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 시약

본 실험에 사용된 anti-dinitrophenyl(DNP) immunoglobulin E(IgE), DNP-HSA는 Sigma(USA)로부터, Dulbecco's modification Eagle medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin 및 trypsin-EDTA solution은 Gibco BRL(USA)로부터, tetrazolium bromide salt(MTT) 및 dimethylsulfoxide(DMSO)는 Amresco(USA)로부터, Interleukin(IL-4)와 tumor necrosis factor alpha(TNF- $\alpha$ ) kit는 BD Biosciences Pharmingen(USA)으로부터, RT-PCR kit(one-step RT-PCR PreMix kit)는 iNtRON Biotechnology, Inc.(Korea)로부터, anti-phospho-extracellular-signal-regulated kinase (p-ERK), anti-ERK, anti-phospho-c-Jun NH2-terminal kinase(p-JNK), anti-JNK, anti-phospho-inhibitory-kappa B alpha(pI $\kappa$ B $\alpha$ ), 및 anti- $\beta$ -actin primary antibody는 Cell Signaling Technology(USA)으로부터, Horseradish Peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody는 Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.(USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 2. 시료의 추출

본 실험에 사용된 紫蘇葉(*Perillae Folium*: PF)은 음니허브(대구, 한국)에서 구입하여 사용하였다. PF 100g을 증류수로 水洗하여 1L의 75% Ethanol을 加하여 incubator (iNtRON BIOTECHNOLOGY, Korea)에서 60°C, 90rpm 조건 하에서 24시간 동안 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 분리하고, 0.2mm 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 200ml가 되도록 減壓濃縮한 후 냉동 건조하여 8g의 抽出物을 얻었다. -20°C에 보관하였다가 실험 직전 생리식염수나 배지에 희석하여 0.2 $\mu$ m syringe filtering 후 실험에 사용하였다.

### 3. 세포배양

RBL-2H3(rat basophilic leukemia cell line)은 한국 세포주은행 (Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양 받아 배양하였다. 세포의 배양을 위하여 10% heat-inactivated FBS (Gibco BRL, USA)과 1% penicillin 및 streptomycin(Gibco BRL, USA)을 포함한 DMEM(Gibco BRL, USA) 배양액에서 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였고, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을

해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution(Gibco BRL, USA)을 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대 배양하였다.

#### 4. MTT assay

RBL-2H3 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT법을 사용하였다. RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁 시킨 후 48 well plate(Corning, USA)에  $5 \times 10^4$  cells/ml의 세포 수가 되도록 분주하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간 배양하였다. PF를 농도별 (0, 1, 2, 4, 8 및 10mg/ml)로 처리한 후 1시간 동안 반응시켰다. 배양액을 제거한 후 5mg/ml의 MTT를 각 well에 넣고 잘 섞어준 후 4시간 37°C incubator에서 배양한 후 tetrazolium bromide salt를 제거하고 DMSO를 150  $\mu$ l씩 분주하여 well에 생성된 formazan이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 모두 녹인 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정하여 평균값과 표준 편차를 구하였다.

#### 5. $\beta$ -hexosaminidase release assay

알레르기 즉시반응의 지표인 탈과립에 대한 억제효과를 살펴보기 위하여  $\beta$ -hexosaminidase의 분비를 측정하였다. RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 48 well plate(Corning, USA)에  $5 \times 10^5$  cells/ml의 세포 수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE(0.5 $\mu$ g/ml)로 감작하고 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer(119 mM NaCl, 5mM KCl, 0.4mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM PIPES, 40mM NaOH, pH7.2)로 2번 세척한 다음 각 well당 5.6mM glucose, 1mM CaCl<sub>2</sub>와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가하고 PF를 농도별(0, 5 및 10mg/ml)로 1시간 동안 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 DNP-HSA (10 $\mu$ g/ml)로 처리하여 1시간 동안 반응시키고 ice bath에서 10분 동안 방치한 후 반응을 종결시켰다. 상층액 20 $\mu$ l를 96 well plate에 옮기고 substrate buffer (4-*p*-Nitrophenyl-*N*-acetyl-*b*-D-glucosaminide 1mM, sodium citrate 0.05M, pH4.5) 80 $\mu$ l를 넣고 37°C에서 30분 배양시킨 다음 각 well당 stop solution 200 $\mu$ l를 첨가하여 반응을 종결시켰다. Microplate reader (Molecular Devices Co. Ltd., USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. PF 처리군과 대조군의 흡광도 값으로 다음 식에 의해 inhibition(%)을 산출하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = (1 - T/C) \times 100$$

C: Cell (+), DNP-HSA (+), test sample (-)

T: Cell (+), DNP-HSA (+), test sample (+)

#### 6. IL-4 and TNF- $\alpha$ secretion assay

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁 시킨 후 24well plate(Corning, USA)에  $2.5 \times 10^5$  cells/ml의 세포 수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE(0.5 $\mu$ g/ml)로 감작하고 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer(119mM NaCl, 5mM KCl, 0.4mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM PIPES, 40mM NaOH, pH7.2)로 2번 세척한 다음 각 well당 5.6mM glucose, 1mM CaCl<sub>2</sub>와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가하였다. 그 후 PF(0, 5 및 10mg/ml)를 처리하여 1시간 동안 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 DNP-HSA(10 $\mu$ g/ml)를 처리한 후 4시간 동안 반응시키고 ice bath에서 10분 동안 방치한 후 반응을 종결시켰다. 상층액을 분리하여 5,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 IL-4와 TNF- $\alpha$  ELISA kit(BD Biosciences Pharmingen, USA)를 사용하여 측정하였다. Microplate reader(Molecular Devices Co. Ltd., USA)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 IL-4와 TNF- $\alpha$ 의 양을 계산하였다.

#### 7. RNA extraction and RT-PCR

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁 시킨 후 6 well plate(Corning, USA)에  $1 \times 10^6$  cells/ml의 세포 수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti DNP-IgE(0.5 $\mu$ g/ml)로 감작하고 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 새로운 DMEM배지로 교환한 후 PF를 농도별(0, 5 및 10mg/ml)로 세포에 처리하여 1시간 동안 배양한 후 PBS로 2회 세척한 다음 DNP-HSA(10 $\mu$ g/ml)를 4시간 동안 처리하여 면역반응을 유도하였다. 상층액을 제거한 후 1ml의 TRizol을 넣고 2분간 방치한 후 chloroform을 넣고 10초간 vortexing하고 5,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합하여 흔들어 주었다. 13,000rpm에서 25분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 DEPC (diethyl pyrocarbonate)-DW 20 $\mu$ l에 녹여 -20°C에 보관하였다가 실험에 사용하였다. RT-PCR은 one-step RT-PCR PreMix kit(iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 45°C에서 30분, 94°C에서 5분간 반응시킨 후 94°C에서

30초간 denaturation시키고, 55°C에서 30초간 annealing 시킨 다음, 72°C에서 1분간 extension시키는 cycle을 32 회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72°C에서 5분간 PCR machine(GeneAmp, PCR system 9700, USA)에서 수행하였다. 각 PCR products는 2% agarose gel에 loading하여 100V 조건에서 30분간 전기영동을 통하여 분석하였다. 각각의 primer의 염기서열은 다음과 같다 (Table 1).

**8. Protein extraction and Western blot**

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁 시킨 후 100mm cell culture dishes(Corning, USA)에 5×10<sup>5</sup>cells/ml의 세포 수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti DNP-IgE(0.5µg/ml)로 감작하고 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 새로운 DMEM배지로 교환한 후 PF를 농도별(0, 5 및 10mg/ml)로 세포에 처리하여 1 시간 동안 배양한 후 PBS로 2회 세척한 다음 DNP-HSA(10 µg/ml)을 1시간 동안 처리하여 면역반응을 유도하였다. 반응 후 cells는 cold PBS로 2회 세척한 다음, 0°C에서 low salt buffer를 첨가하여 부드럽게

pipetting하고 15분 동안 ice위에 방치한 후 10% Igepal CA-630을 첨가하여 강하게 vortexing하였다. 그 후 4°C, 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 새 e-tube에 상층액을 옮긴 후 다시 4°C, 13,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 cytosol 분획을 분리하였다. protein content는 Bradford법으로 정량하였으며, 30~50µg의 단백질을 10% SDS-PAGE로 분리하고, Hypond-PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech)으로 transfer하였다. Transfer된 membrane은 Tris-buffered saline Tween-20 (TBST, 20mM Tris, pH7.6, 136mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 용해된 5% skim milk에 1시간 동안 실온에서 blocking한 후 anti-phospho-ERK(p-ERK)와 anti-ERK, anti-phospho-JNK(p-JNK)와 anti-JNK, anti-phospho-IκBα (p-IκBα)와 β-actin primary antibody(1:1000 dilution)로 4°C에서 overnight 반응한 후 TBST로 3회 세척하고, HRP-conjugated secondary antibody (1:1000 dilution)로 1 시간 동안 실온에서 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후 ECL system (Amersham)을 이용하여 발색시켰다.

Table 1. Primers for RT-PCR Analysis

Target gene		5' to 3' direction	Size
IL-2	F	TCGTGTTGCACITGACGCTTGTC	444
	R	CTGAGTCATTGTTGAGATGATGC	
IL-3	F	GTATGCTGCTCCGCTCCTGATG	473
	R	CATTCCACGGTCATAGGGCGAAAG	
IL-4	F	ACCITGCTGTCACCCCTCTTC	351
	R	TTGTGAGCGTGGACTCATTG	
IL-6	F	GAAATGATGGATGCTTCCAACTGG	414
	R	GGATATATTTTCTGACCACAGTGAGG	
IL-13	F	GCTCTCGCTTGCCCTTGGTGGTC	276
	R	CATCCGAGGCCCTTTTGGTTACAG	
TNF-α	F	CAAGGAGGAGAAGTCCCAA	501
	R	CGGACTCCGTGATGTCTAAG	
COX-1	F	TGCATGTGGCCGAGGATGTCATCAA	448
	R	CACGAAGACAGACCCGTCATCTCCA	
COX-2	F	ACTTGCTCACITTTGTTGAGTCATTG	583
	R	TTTGATTAGTACTGTAGGGTTAATG	
iNOS	F	TTGCCAGGAAGAGACGCAC	131
	R	CAGGCACACGCAATGATGGG	
HDC2	F	ATGCTGGGGCTCCCGGACTTC	779
	R	AGCCATGTCTGTACCGTGTCT	
GAPDH	F	CCACAGTCCATGCCATCAC	568
	R	TCCACCACCTGTTGCTGTA	

F: forward, R: reverse

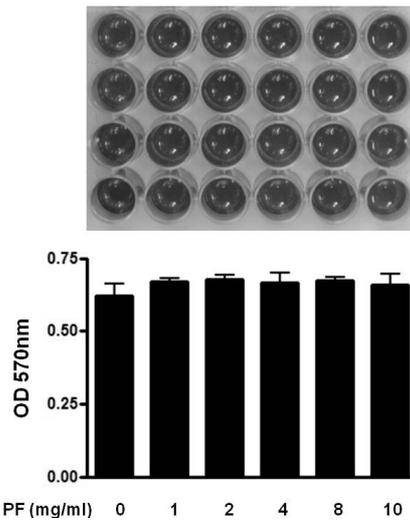


Fig. 1. Effects of PF on the cell viability and cytotoxicity of RBL-2H3 cells

RBL-2H3 cells ( $5 \times 10^4$  cells/ml) were treated with the indicated concentrations (0, 1, 2, 4, 8, and 10 mg/ml) of PF for 1h. Cell viability was evaluated using a colorimetric assay based on MTT assay. Results represent as the mean $\pm$ SD. \*  $p < 0.05$  vs untreated group. The absorbance was measured at 570nm using ELISA reader.

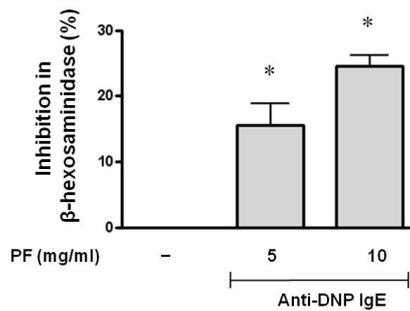


Fig. 2. Inhibition Effect of PF on the  $\beta$ -Hexosaminidase release from RBL-2H3

The cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were sensitized with IgE ( $0.5 \mu\text{g/ml}$ ) overnight and treated with PF (5 and 10 mg/ml) for 1h prior to their DNP-HSA stimulation. The absorbance was measured with a microplate reader at 405nm. Results represent as the mean $\pm$ SD. \*  $p < 0.05$  vs stimulated group.

### 9. 통계처리

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

## III. 結果

### 1. 세포생존 및 증식에 미치는 영향

RBL-2H3 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 알아본 결과 PF를 처리하지 않은 세포는  $0.62 \pm 0.08$ 의 흡광도를 나타내었고, PF를 농도별 (1, 2, 4, 8 및 10 mg/ml)

로 처리한 세포에서 각각  $0.67 \pm 0.03$ ,  $0.68 \pm 0.03$ ,  $0.67 \pm 0.07$ ,  $0.67 \pm 0.03$ , 및  $0.66 \pm 0.08$ 의 흡광도를 나타내어 10 mg/ml 농도 이하에서 세포생존 및 증식에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1).

### 2. $\beta$ -Hexosaminidase 분비에 미치는 영향

항원-항체 결합단계에서  $\beta$ -hexosaminidase 분비에 미치는 PF의 효과를 살펴본 결과 PF 5 mg/ml 농도에서  $15.61 \pm 8.10\%$ 의 억제효과를 나타내었고, PF 10 mg/ml 농도에서  $24.58 \pm 3.82\%$ 의 억제효과를 나타내 유의한 ( $p < 0.05$ ) 억제효과를 나타내었다(Fig. 2).

### 3. IL-4와 TNF- $\alpha$ cytokine 생산에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 분비된 IL-4의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서  $9.7 \pm 1.4$  pg/ml이었으며, 항원으

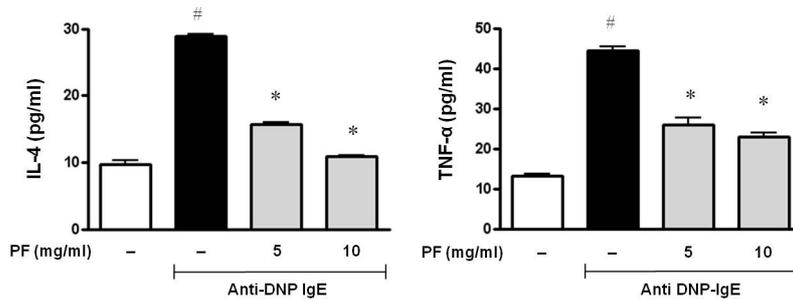


Fig. 3. Effects of PF on the production of IL-4 and TNF- $\alpha$  cytokine in RBL-2H3 cells

The cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were sensitized with anti-DNP IgE (0.5  $\mu$ g/ml) for 24h and stimulated by DNP-HSA (10  $\mu$ g/ml). PF (5 and 10 mg/ml) was pretreated for 1h prior to DNP-HSA stimulation for 4h. IL-4 and TNF- $\alpha$  concentration was measured from cell supernatant using ELISA method. The absorbance was measured at 450nm using ELISA reader. Results represent as the mean  $\pm$  SD. #  $p < 0.05$  vs vehicle group, \*  $p < 0.05$  vs stimulated group.

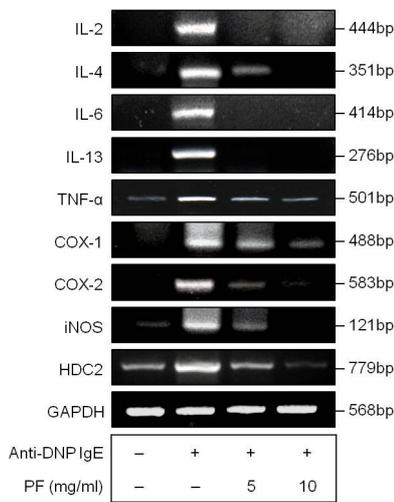


Fig. 4. Effects of PF on the expression of IL-2, IL-4, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ , COX-1, COX-2, iNOS, and HDC2 mRNA in the anti-DNP IgE-sensitized RBL-2H3

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

로 자극한 세포에서  $28.9 \pm 0.7$  pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ( $p < 0.05$ ) 증가를 나타내었다. 반면 PF를 농도별 (5 and 10 mg/ml)로 처리한 세포에서 각각  $15.8 \pm 0.6$  pg/ml과  $10.9 \pm 0.5$  pg/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 ( $p < 0.05$ ) 감소를 보였다. 또한 RBL-2H3 cells에서 분비된 TNF- $\alpha$ 의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서  $13.18 \pm 1.11$  pg/ml이었으며, 항원으로 자극한 세포에서  $44.34 \pm 2.39$  pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ( $p < 0.05$ ) 증가를 나타내었다. 반면 PF를 농도별 (5 and 10 mg/ml)로 처리한 세포에서 각각  $25.92 \pm 3.54$  pg/ml과  $22.88 \pm 2.19$  pg/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 ( $p < 0.05$ ) 감소를 보였다 (Fig. 3).

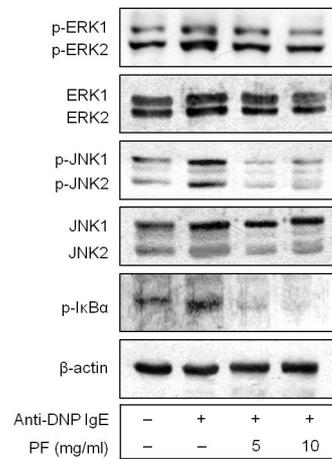


Fig. 5. Effects of PF on the ERK1/2, JNK1/2 and I $\kappa$ B $\alpha$  activation in Fc $\epsilon$  RI-mediated signal transduction of RBL-2H3

The cells was pretreated with PF (5 and 10 mg/ml) for 1h. prior to Ag exposure for 15min. The phosphorylation of ERK1/2, JNK1/2 and I $\kappa$ B $\alpha$  and ERK1/2, JNK1/2 and  $\beta$ -actin were assayed by western blot analysis as described in Materials and Methods.

#### 4. Cytokine 및 Enzyme 유전자 발현에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 Th2 type cytokine 및 염증성 enzyme 유전자의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ , COX-1, COX-2, iNOS 와 HDC2 mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, PF (5 and 10 mg/ml)를 처리한 세포에서 mRNA의 발현이 농도의존적으로 감소한 것으로 나타났다 (Fig. 4).

#### 5. 세포내 ERK1/2, JNK1/2 및 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서의 ERK1/2, JNK1/2와 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발

현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 p-ERK1/2, p-JNK1/2와 p-IκBα의 발현이 증가하였으며, PF(5 and 10mg/ml)를 처리한 세포에서 p-ERK1/2, p-JNK1/2와 p-IκBα의 발현이 억제하는 것으로 보아 PF가 ERK1/2, JNK1/2와 IκBα의 인산화를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

#### IV. 考察

紫蘇葉은 *Perilla frutescens* Britt. var. *acuta* Kudo의 일로 一年草로 재배하고 있으며 높이는 20-80cm이고 둔한 사각을 지며 곧추 자란다. 휘발성 정유가 0.5% 함유되어 있으며 그 중 perillaldehyde 55%, limonene 20-30%, cumic acid, perillalcohol 등이 있어<sup>14)</sup> 방향성이 강할수록 약효를 극대화할 수 있다. 《景岳全書·本草正》<sup>15)</sup>에서는 “紫蘇葉의 氣味는 辛溫하여 그 사용이 溫散하는데 있다”고 하였다. 風寒의 邪氣를 빨리 없애고 順氣하는데 반드시 사용하며 大小腸을 通하고 痰을 없애 肺를 잘 疏通시키며 止痛溫中, 安胎, 定喘한다”고 하였다. 이<sup>16)</sup> 등의 연구를 보면 《東醫寶鑑》에 수록된 紫蘇葉이 君藥으로 配伍된 처방 중 氣, 聲音, 咽喉, 胸, 咳嗽 등 咳嗽病에 가장 많이 사용되었으며 그 다음으로 寒病, 婦人病 순이었다. 또 《東醫寶鑑·小兒》<sup>17)</sup>에서 痘形에 의해 분류되는 倒靨에 紫蘇葉이 配伍된 調解散이 수록되어 소아의 호흡기계 및 피부증상에 널리 응용할 수 있음을 시사하고 있다.

제 1형 알레르기 반응의 대표적인 질환인 아토피 피부염, 천식, 비염 등이 한 환아에게 동시에 혹은 시간차이를 두고 나타나는 현상을 알레르기 대행진(allergy march)이라 하며 이러한 현상은 小兒의 臟腑機能과 衛外機能의 未固로 인하여 易于發病하고 易于變化하는 病理的 特徵을 잘 나타내고 있다. 영유아기에 아토피 성 피부염이 먼저 나타나고 잦은 호흡기증상을 보이다가 만 2세를 지나면서부터 전형적인 천식증상을 보이는 경우가 많다<sup>13,18)</sup>. 김<sup>19)</sup> 등의 2009년 학동 전기 소아에서 알레르기 질환의 유병률과 위험인자의 연구 결과를 보면 천식은 2세 이전에 세기관지염의 과거병력, 항생제를 1세 이전에 3일 이상 사용한 경험이 5회 이상인 경우에 위험도가 증가한 것으로 나타나 영유아 시기에 항생제를 사용하게 되면 장내세균 분포에 영향을 미쳐 초기 면역체계 형성에 변화를 유도하게 되는 위생가설

의 근거가 되고 항생제 조기사용의 위험성을 설명하고 있다. 소아 알레르기 환자는 체계적인 관리와 더불어 소아의 특성에 적합한 치료가 중요하다. 이에 저자는 우리나라 각지에서 재배가 용이하고 藥性이 無毒하며 峻烈하지 않고 適用이 廣範圍한 장점이 있는 紫蘇葉을 선정하여 점막형 비만세포인 RBL-2H3 세포의 제 1형 알레르기 반응에 대한 즉시반응과 후기반응의 억제 효과를 조사하였다.

알레르기 반응 연구에 앞서 紫蘇葉(*Perillae Folium*, PF) 농도(0.5, 1, 2, and 4mg/ml)에 따른 RBL-2H3 비만세포에 대한 독성을 MTT법을 사용하여 조사하였다. 그 결과 PF는 모든 농도에서 세포독성은 관찰되지 않았고, 2 and 4mg/ml의 농도에서 세포성장을 촉진시키는 것으로 나타났다(Fig. 1).

알레르기 반응에 중요한 역할을 하는 비만세포는 골수에 존재하는 근원세포로부터 기원한다. 가장 특징적인 형태는 세포핵 내에 50-200개 정도의 많은 과립이 있으며 위치하는 조직에 따라 화학적 매개물질이 결정을 이루고 있다. 한 사람이 약  $10^{12}$ 개의 비만세포를 가지고 있으며 체내에 고르게 분포되어 있으나 외부 환경과 접촉이 많은 부위에서 다량 발견된다. 세포표면에 FcεR1 수용체를 발현하고 있으며 항원들이 이 수용체에 결합된 IgE와 교차 결합되면 활성화가 시작되고 탈과립화가 진행된다. 탈과립화는 즉시반응인 항원 결합 후 5-10분 내에 발생하여 histamine 등 이미 생성되어 있는 다양한 종류의 염증성 매개물질들을 세포 밖으로 방출한다. 그 후 활성화에 의해 지질 매개물질을 생성하여 분비하고 수 시간 후에는 사이토카인을 합성 분비하는 후기반응에 의해 염증반응을 지속시킨다<sup>9,13)</sup>.

비만세포로부터 탈과립을 유도하는 방법에는 비만세포 표면의 고친화성 FcεR1 수용체에 결합된 IgE 항체에 다항원, 항IgE항체 등의 결합에 의한 면역학적 자극법과 렉틴, compound 48/80, anaphylatoxin 등에 의한 비면역학적 자극법이 있다. 또한 칼슘이온 운반체, 폴리믹신 B, 코데인, 몰핀 등의 약제도 비만세포를 직접 활성화할 수 있다<sup>9)</sup>. 본 연구에서는 국소성 즉각형 알레르기 반응을 유도하는 anti-DNP IgE를 사용한 면역학적 자극법을 사용하였다.

즉시반응의 조사에 있어 IgE로 부터 감작된 비만세포에서 유리된 히스타민의 양을 측정하는 것이 일반적이지만 비만세포에서 분비되는 히스타민의 농도가 매우 낮고 측정과정이 복잡하여 현재는 β-hexosaminidase assay가 널리 이용된다. β-hexosaminidase는 호염구나 비

만세포의 히스타민이 저장된 과립 안에 존재하여 천식, 비염과 같은 알레르기 반응에 의해 세포 밖으로 분비되므로 탈과립의 지표로 이용되며 알레르기 억제물질의 생리활성 측정에 유용하게 사용되고 있다<sup>11,20</sup>. 본 실험에서 PF는  $\beta$ -hexosaminidase의 분비를 효과적으로 억제하는 것으로 나타나 제 1형 알레르기 반응의 즉시 반응에 억제효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2).

제 1형 알레르기 후기반응과 관련된 IL-4는 제 1형 알레르기 반응의 매개자인 IgE와 비만세포 매개성 면역반응의 조절자로 IL-4의 생산 증가는 알레르기의 발생에 중추적인 것으로 알려져 있다<sup>21</sup>. IL-4는 B세포의 Ig중쇄를 IgE 동형으로 전환자극하며 Th2 세포발달의 주된 자극제가 된다. 또 활성화된 비만세포에 의해 많은 양의 TNF- $\alpha$ 들이 분비되는데, 일부는 비만세포 과립들 내에 저장된 것들로부터 유래하며, 다른 일부는 활성화된 비만세포들 자체에 의해 새로 생성된 것들로 내피세포들을 활성화하여 부착분자 발현을 증가시킴으로써 염증성 백혈구와 림프구의 유입을 조장하는 것으로 알려져 있다. 비만세포에서 유리된 TNF- $\alpha$ 는 국소의 혈관내피세포에 작용하여 백혈구의 혈관의 유주를 유도하는 것으로서 특히 알레르기 국소의 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다<sup>22,3</sup>. 본 실험에서 PF는 IgE 매개 알레르기 반응에서 염증침윤단계인 후기반응과 관련된 IL-4와 TNF- $\alpha$ 의 생산을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 3A and B).

비만세포가 활성화되어 다양한 염증효과를 나타내는 지질유래 매개물질들은 세포막 인지질들에서 유래한 전구물질인 아라키돈산(arachidonic acid, AA)으로부터 만들어지는데, 크게 cyclooxygenase 활성을 거쳐 prostaglandin을 생성하는 경로와 lipoxygenase 활성을 거쳐 leukotriene을 생성하는 경로로 나누어 진다. 이러한 지질 매개물질은 조직내에서 혈관 확장, 기관지 수축 등의 효과를 나타낸다<sup>24,5</sup>. 또한 지질 매개물과 함께 Th2의 후기반응을 지속시키는 IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 및 GM-CSF와 같은 추가적인 사이토카인들도 새로이 전사, 합성 및 분비된다<sup>26</sup>.

본 실험에서 PF가 IgE 매개 알레르기 반응에서 염증효과를 나타내는 cyclooxygenase 활성을 억제하는지 조사한 결과 COX-2 mRNA의 발현을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. 특히 2mg/ml과 4mg/ml의 농도에서 현저하게 억제하였다. 또한 PF가 Th2 후기반응을 지속시키는 사이토카인의 생성을 억제하는지 조사한 결과 IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$  mRNA

의 발현을 억제하였고, 특히 IL-5, IL-13과 GM-CSF mRNA의 발현은 PF(1, 2, and 4mg/ml) 모든 농도에서 현저하게 감소시켰다(Fig. 4).

외부 자극에 대하여 세포의 반응은 핵으로 전달되기 위해서 세포내 신호전달체계의 활성화에 의해 이루어지며 특히 MAPK(mitogen-activated protein kinase)를 인산화 시켜 NF- $\kappa$ B나 activator protein-1(AP-1)과 같은 전사조절인자들의 활성을 초래한다. MAPK는 ERK(Extracellular signal-regulated kinase), JNK(c-Jun N-terminal kinase), p38 kinase 3개의 집합체로 구성되어 있다. ERK 효소가 원형(prototype)으로 신호체계에 있는 효소들을 단계적으로 활성화시키는 작용을 한다. JNK는 ERK에 의해 인산화될 뿐만 아니라 자외선, 삼투압스트레스, TNF나 IL-1 등 항염증성 사이토카인에 의해서도 활성화되어 SAP(stress activated protein)이라 불린다. 휴지기 T세포에서 NF- $\kappa$ B는 이것을 핵 내로 이동하는 것을 차단하는 I $\kappa$ B와 복합체를 형성하며 세포질 내에 있다, TCR 신호에 의해 인산화 되어 NF- $\kappa$ B를 활성화하며 사이토카인의 합성에 필수 역할을 수행하게 된다<sup>9</sup>.

본 실험에서 세포자극에 반응하는 ERK1/2, JNK1/2와 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 p-ERK1/2, p-JNK1/2와 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현이 증가하였으며, PF(5 and 10mg/ml)를 처리한 세포에서 p-ERK1/2, p-JNK1/2와 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현이 억제하는 것으로 보아 PF가 ERK1/2, JNK1/2와 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

결론적으로 PF는 비만세포의 활성을 효과적으로 억제하여 제 1형 알레르기의 즉시반응과 후기반응을 조절하였다. 면역학적 경로를 통한 비만세포 탈과립을 효과적으로 억제하여 초기 화학적 매개물질의 방출을 감소시켰고, 비만세포 자체에서 생산된 IL-4와 TNF- $\alpha$ 을 감소시켰다. 또한 지질 매개물질과 후기 Th2 사이토카인 mRNA의 발현을 감소시켰다.

이것으로 볼 때 PF는 제 1형 알레르기의 염증반응의 예방 또는 치료에 응용할 수 있는 가능성을 시사하는 것으로 사료된다.

## V. 結論

RBL-2H3 세포를 이용한 紫蘇葉 에탄올 추출물의 제 1형 알레르기 반응 조절에 대해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 紫蘇葉 추출물은 10mg/ml 농도 이하에서 세포생존 및 증식에 영향을 미치지 않았다.
2. 紫蘇葉 추출물은  $\beta$ -hexosaminidase 분비를 억제시켰다.
3. 紫蘇葉 추출물은 IL-4와 TNF- $\alpha$ 의 생산을 억제시켰다.
4. 紫蘇葉 추출물은 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ , COX-1, COX-2, iNOS와 HDC2 mRNA의 발현량을 억제시켰다.
5. 紫蘇葉 추출물은 ERK1/2, JNK1/2와 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화를 억제시켰다.

## 참고문헌

1. 전국 한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:영림사. 2000:125-6.
2. 강영성, 이성철, 신호동, 신민교, 김재홍, 송호준. 소엽에 의한 알레르기 천식효과에 대한 연구. 대한본초학회지. 2004;19(3):25-34.
3. 김승수, 정희재, 정승기, 이형구. 神秘湯 및 加味神秘湯이 Allergy 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향에 관한 연구. 대한한의학회지. 2002;23(2):198-210.
4. 김민수, 박동일. 加味解表二陳湯이 알레르기 喘息 白鼠의 呼吸 樣相과 氣管 組織에 미치는 影響. 동의생리병리학회지. 2002;16(3):557-62.
5. 김성훈, 송호철. 柴胡治喘湯과 補益定喘湯이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 조직에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2005;19(1):106-13.
6. Metcalfe DD, Kaliner M, Donlon MA. The mast cell. Crit. Rev. Immunol. 1981;3:23-74.
7. Church MK, Levi-Schaffer F. The human mast cell. J. Allergy Clin. Imm. 1997;99:155-60.
8. Chang TW, Shiung YY. Anti-IgE as a mast cell - stabilizing therapeutic agent. The Journal of Allergy and Clinical

- Immunology. 2006;117(6):1203-12.
9. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. 세포분자면역학. 제6판. 서울:이퍼블릭. 2008. 191-217, 451-71.
10. Schwartz LB, Lewis RA, Seldin D, Austen KF. Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. J Immunol. 1981;126(4):1290-4.
11. Marquardt DL, Wasserman SI. Modulation of rat serosal mast cell biochemistry by in vivo dexamethasone administration. J Immunol. 1983;131(2):934-9.
12. Matsuda H, Morikawa T, Ueda K, Managi H, Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-Induced degranulation, TNF-alpha and IL-4 production from RBL-2H3 cells. Bioorg Med Chem. 2002;10(10):3123-8.
13. 신태용. 한약과 알레르기 질환. 서울:신일북스. 2010: 15-33,92-9.
14. 안덕균. 원색한국본초도감. 서울:교학사. 2002:46.
15. 張介賓. 景岳全書. 서울:한미의학. 2006:2461.
16. 이부근, 국윤범. 東醫寶鑑 中 蘇葉이 主藥으로 配伍된 方劑의 活用に 대한 考察. 대한한의학방제학회지. 2005;13(1):179-94.
17. 許浚. 對譯東醫寶鑑. 서울:법인문화사. 1999:1749.
18. 한방소아과 교재편찬위원회 공저. 한방소아청소년의학. 서울:의성당. 2010:38-9.
19. 김영휘, 엄상화, 김우경. 2009년 학동 전기 소아에서 알레르기질환의 유병률과 위험인자. 소아알레르기호흡기학회지. 2011;21(3):165-75.
20. 김정미, 김대중, 김태혁, 백종미, 김현숙, 최면. 감초 추출물이 RBL-2H3 비만세포에서  $\beta$ -hexosaminidase 분비 및 Th2 cytokine mRNA 발현에 미치는 효과. 韓藥作誌. 2010;18(4):231-7.
21. Iikura M, Yamaguchi M, Hirai K, Miyamasu M, Yamada H, Nakajima T, Fujisawa T, Ra C, Morita Y, Yamamoto K. Regulation of surface FcepsilonRI expression on human eosinophils by IL-4 and IgE. Int Arch Allergy Immunol. 2001;124:470-7.
22. 이종달. 그림으로 설명한 병리학. 서울:고려의학. 1991: 29.
23. Chai OH, Han EH, Lee HK, Song CH. Mast cells play a key role in Th2 cytokine-dependent asthma model through production of adhesion molecules by liberation of TNF- $\alpha$ . Exp Mol Med. 2011;43(1):35-43.
24. Taketomi Y, Murakami M. Lipid networks in mast cell

- biology. *Yakugaku Zasshi*. 2001;131(1):73-84.
25. 이일수. 시호의 생쥐 소교세포에서 지질다당질에 의한 cyclooxygenase-2와 inducible nitric oxide synthase 발현 억제작용. 경원대 대학원 석사학위논문. 2006.
26. Deo SS, Mistry KJ, Kakade AM, Niphadkar PV. Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lung India*. 2010;27(2):66-71.