

꾸지뽕나무 추출물의 비만세포 억제에 의한 항알레르기 효과 및 기전

김 영 미[#]

덕성여자대학교 약학대학

(Received February 3, 2012, Revised February 14, 2012, Accepted February 15, 2012)

Cudrania tricuspidata Suppresses Mast Cell-Mediated Allergic Response *In Vitro* and *In Vivo*

Young Mi Kim[#]

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract — Mast cells play an important role in early and late phase allergic reactions through allergen and IgE-dependent release of histamine, proteases, prostaglandins, and several multifunctional cytokines. In this study, we investigated whether *Cudrania tricuspidata* extract (CTE) suppresses IgE-mediated allergic responses in mast cells, an allergic animal model, and its mechanism of action in mast cells. We found that CTE inhibited IgE-mediated degranulation and cytokine production in rat basophilic leukemia (RBL)-2H3 mast cells and bone marrow-derived mast cells (BMMC), as well as passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in mice. With regard to its mechanism of action, CTE suppressed the activating phosphorylation of spleen tyrosine kinase (Syk), a key enzyme in mast cell signaling processes and that of LAT, a downstream adaptor molecule of Syk in FcεRI-mediated signal pathways. CTE also suppressed the activating phosphorylation of mitogen-activated protein (MAP) kinases and Akt. The present results strongly suggest that the anti-allergic activity of CTE is mediated through inhibiting degranulation and allergic cytokine secretion by inhibition of Syk kinase in mast cells. Therefore, CTE may be useful for the treatment of allergic diseases.

Keywords *Cudrania tricuspidata* extract (CTE), mast cells, allergy, src-family kinases, syk, passive cutaneous anaphylaxis (PCA)

인체외부에서 이물질(항원)들이 체내로 들어오면 인체에서는 이들로부터 인체를 보호하기 위한 면역반응이 일어나는데, 이러한 면역반응이 지나치면 인체에 이상을 초래하며 이를 면역과민 반응 혹은 알레르기 면역반응이라 한다.¹⁾ 이러한 알레르기 질환은 전 인구의 10~20%에서 관찰될 정도로 흔한 질환으로 뚜렷한 증가 추세에 있다.²⁾

비만세포는 이러한 알레르기 질환의 중요한 원인세포이며 비만세포 표면에 부착되어 있는 IgE는 항원과 결합하여 비만세포의 탈과립을 유도한다. 비만세포의 탈과립은 히스타민, 헤파린, 류코트리엔, 프로스타그란딘 및 다른 알레르기 유도 사이토카인 등을 분비하게 된다. 이렇게 분비된 면역 활성화자들이 면역체계를 활성화시켜 알레르기 증상의 원인이 된다.³⁾

비만세포의 활성화 신호전달계 경로는 다가성 항원(알레르기 항원)이 IgE가 결합되어있는 IgE 고친화성 수용체인 FcεRI와 응

집체를 형성한 후 일어나게 되며, 이 응집이 일어난 후 수용체의 β-subunit에 결합되어있던 Src-family kinase인 Lyn 등에 의해 FcεRI 수용체의 γ-subunit이 인산화 되면서 세포의 신호전달이 시작된다.⁴⁾ FcεRI의 β 및 γ-subunit은 Lyn kinase에 의해 인산화 되는 ITAM(Immuno receptor-based activation motif)을 가진다. ITAM motif의 tyrosine 잔기의 인산화는 이 세포의 활성화에 중요한 Syk kinase의 결합부위를 제공하여 Syk kinase의 구조적 변형에 의해 그 단백질을 활성화 시킨 후 LAT, PLCγ1, Ca²⁺ 및 MAP kinases 등 다양한 하위 신호전달 분자를 활성화시켜 최종적으로 다양한 알레르기 증상을 유도하는 매개물질을 세포 밖으로 분비하게 된다.^{5,6)}

따라서 알레르기 반응관련 세포내 신호전달을 억제하는 물질을 찾아내는 것은 알레르기 반응의 치료제 개발에 중요한 수단이다.^{7,8)} 꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)는 뽕나무과에 속하는 낙엽교목으로 동아시아에 주로 분포하며, 10여종이 알려져 있는데 우리나라에서는 1종만이 전국 각지에서 자생하고 있다. 수피는 회갈색으로 벗겨지고 가지에 길이 0.5~3.5 cm의 가시가 변형된 가시가 있으며 소지에 털이 있다. 가지에 피목이 발달되어

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-901-8455 (팩스) 02-901-8386
(E-mail) kym123@duksung.ac.kr

있고 오래된 수피는 황회색을 띠며 세로로 찢어져 떨어진다. 예로부터 우리나라에서는 *Cudrania tricuspidata extract*를 약재로 사용하였다. 폐결핵, 만성요통, 타박상, 급성관절염 등의 한방치료에 사용되고 있다. 또한 민간에서는 강장, 중풍, 이뇨, 진해 등의 치료약으로 이용되고 있으나 꾸지뽕나무 추출물에 대한 알레르기 질환에 대한 효능은 아직 불분명하다.⁹⁻¹¹⁾

본 연구에서는 비만세포 활성을 억제하는 것을 기전으로 하는 알레르기질환 치료 효능이 우수한 천연식물 추출물을 발굴하고자 본 실험을 진행하였다. 꾸지뽕나무 줄기 추출물은 비만세포의 Syk 활성화 신호 전달 경로를 억제하여 탈과립 및 알레르기 동물모델에서 알레르기 증상을 억제하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

Minimal Essential Medium(MEM) 배양액과 RPMI-1640 배양액은 GIBCO(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. Dinitrophenol-bovine serum albumin(DNP-BSA), DNP-specific monoclonal IgE, formamide, arabic gum 및 diphenylhydramine (DPH)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, PP2는 Calbiochem(La Jolla, CA, USA)에서 구입하였다. Phospho-Syk, Phospho-LAT, LAT 및 phospho-tyrosine에 특이적인 항체는 각각 Cell Signalling Technology(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Syk, phospho-Akt, phospho-Erk1/2, phospho-JNK, phospho-p38 및 actin에 특이적인 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였으며 protein A-agarose는 Roche사에서 구입하였다. 그 외 시약은 시판되는 최고의 품질의 제품을 구입하여 사용하였다.

실험동물

실험동물은 (주) 대한 바이오링크에서 생후 4주령 수컷 BALB/c 마우스를 분양받아서 사용하였다. 물과 사료는 자유롭게 먹도록 하였으며, 사육실의 온도는 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도는 $55 \pm 10\%$ 로 유지하였으며, 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였다. 모든 실험 동물은 1주일 동안 사육실에서 적응기간을 가진 후 실험에 사용되었다. 통계적 유의성을 위해 군 당 마우스의 수는 5마리 이상으로 하였으며, 동물실험은 덕성여자대학교 동물실험 규정에 따라 실험을 수행하였다.

꾸지뽕나무의 에탄올 추출물 제조

꾸지뽕나무의 추출물은 한국식물추출물은행으로부터 구입하여 사용하였다. 간단히 추출 및 농축과정을 기술하면, 100 g의 건조 꾸지뽕나무 줄기를 50°C 에서 에탄올 1000 ml에서 초음파 추출기를 이용 추출하였으며 추출액은 스피드백을 이용하여 40°C 에

서 24시간 동안 건조하였다. 건조후의 수득물은 약 10~15%였으며 추출물은 탈과립 억제 효과를 확인한 후 실험에 사용하였다. 꾸지뽕나무 추출물은 DMSO에 용해시켜 실험에 사용하였으며 알레르기 질환 동물실험은 5% 아라비아검 용액에 현탁액으로 조제 후 경구로 투여 하였다. 음성 대조군으로 세포배양시험에서는 추출물에 포함되어 있는 동일농도의 DMSO 용액을 사용하였으며 동물실험에서는 5% 아라비아검 용액을 사용하였다.

수동 피부 감각 알레르기 동물 모델

Anti-DNP IgE에 의한 수동 피부 감각 알레르기 반응(passive cutaneous anaphylaxis, PCA)을 유발하기 위하여 BALB/c 마우스의 한쪽 귀에 anti-DNP IgE 를 $0.5 \mu\text{g}$ 씩 주입하였다. 주사 후 약 12시간 후에 5% 아라비아검 용액에 녹인 꾸지뽕나무 추출물을 농도별로 경구투여 하였다. 1시간 후 DNP-BSA를 5 mg/ml 에반스 블루 염색액에 1 mg/ml 의 농도로 희석하여 $250 \mu\text{l}$ 를 꼬리정맥에 투여하였다. 1시간이 지난 다음 마우스를 안락사 시키고 귀를 적출하여 $700 \mu\text{l}$ 의 포름아마이드에 넣은 후 63°C 에서 12시간 동안 알레르기 반응에 의해 귀 조직으로 삼출된 염색약을 추출 후 상등액을 620 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하였다.⁷⁾ 삼출된 에반스 블루의 정량은 표준 정량곡선을 이용하여 측정하였다.

비만세포의 분리 및 배양

ATCC(American Type Culture Collection)에서 분양받은 RBL(rat basophil leukemia)-2H3는 200 mM L-glutamin, $10,000 \text{ units/ml}$ penicillin/streptomycin, 15% fetal bovine serum(FBS)이 포함된 minimum essential medium(MEM)을 배양액으로 하여 CO_2 배양기($5\% \text{ CO}_2$, 37°C)에서 배양하였고 2~3 일 간격으로 계대배양 하였다. Bone marrow-derived mast cells (BMMCs)는 5주령의 수컷 Balb/c 마우스로부터 채취한 골수 세포를 10% FBS, $100 \mu\text{g/ml}$ streptomycin, $100 \mu\text{M}$ non-essential amino acid solution을 포함한 RPMI 1640에 10 ng/ml 의 murine recombinant IL-3를 첨가한 배양액을 사용하여 4주 이상 배양 후 98% 이상의 BMMC로 분화시킨 후 실험에 사용하였다.

비만세포에서 탈과립 측정

RBL-2H3 세포를 24 well-plate에 well당 2.0×10^5 개씩 분주하여, 20 ng/ml 의 DNP 특이적인 IgE 가 포함된 MEM 배지에서 12시간 동안 배양하여 감각시켰다. 탈과립(β -hexosaminidase release assay) 실험은 PIPES 완충용액(25 mM PIPES, pH 7.2, 159 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 5.6 mM glucose, 0.1% fatty acid-free fraction V from bovine serum)을 사용하여 진행하였다. 먼저 PIPES 완충용액으로 세포를 1회 세척 후, 추출물을 각 농도별로 PIPES 완충용액에 희석시켜 각 well에 30분 전처리를 하였다. 다음으로, 25 ng/ml 의 항

원(DNP-BSA)를 각 well에 첨가하여 15분 동안 자극시킨 후, 5분간 얼음 위에 두어 반응을 정지시켰다. 상층액을 E-tube에 옮기고, plate에 남아있는 세포는 0.1% triton X-100으로 파쇄시켰다. 상층액과 용해된 세포시료는 96 well plate에 1 mM p-nitrophenyl-N-acetyl- β -d-glucosaminide와 각각 30 μ l씩 섞은 다음 37°C 항온수조 위에서 1시간 동안 배양시킨 다음, 0.1 M carbonate 완충용액을 넣어 반응을 종결시킨 후 microplate reader를 이용하여 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. BMMC 세포를 사용한 경우는 5 ml round bottom tube에 세포를 각각 2.0×10^6 개씩 분주한 후, 50 ng/ml의 DNP에 특이적인 IgE가 포함되어 있는 RPMI-1640 배지와 함께 4시간 동안 배양하여 세포를 감작시켰다. 실험은 Tyrode 완충용액(20 mM HEPES, pH7.4, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.05% BSA)하에서 진행하였다.

RT-PCR(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

6 well plate 에서 자극된 RBL-2H3 세포에 trizol reagent를 분주한다. 피펫으로 cell lysate를 모은 다음, 클로로포름을 200 μ l를 넣어준다. 13,000 rpm에서 10분 원심분리한 후 얻은 상층액과 이소프로판올을 1:1로 섞은 후 -20°C에서 한 시간 동안 방치한다. 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 에탄올로 씻어준 후, RNA pellets을 DEPC-water 50 μ l에 녹여서 total RNA를 얻었다. PCR은 94°C, 30초, 58°C, 30초, 72°C, 40초를 30회 반복하였다. Primer는 Rat TNF- α 는 forward 5'-CACCACGCTCTTCTGTCTACTGAAC-3', reverse는 5'-CCGACTCCGTGATGTCTAAGTACT-3', IL-4는 forward 5'-CCGATATGGTGTAAATTCCTATGCTG-3', reverse 5'-TTGTGAGC GTGGACTCATTC-3'이고, Rat GAPDH forward는 5'-GTGGAGTCTACTGGCGTCTTC-3', reverse는 5'-CCAAGGCTGTGGGCAAGGTCA-3'를 사용하였다.

면역침강실험

100 mm 배양접시에 5×10^6 개의 세포를 분주한 후 20 ng/ml의 DNP 특이적인 IgE가 포함된 MEM 배지에서 12시간 동안 배양하며 감작시켰다. PIPES 완충용액으로 3번 씻어준 후 다시 PIPES 완충용액 4 ml을 넣어준다. CO₂ 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 5분간 반응시킨 후, 꾸지뽕나무 추출물을 각 농도별로 PIPES 완충용액에 희석시켜 각 well에 30분 정도 전처리를 하였다. 25 ng/ml의 항원을 처리하여 7분 동안 자극시킨 후 5분간 얼음 위에 두어 반응을 정지시켰다. 차가운 PBS 4 ml로 3번 씻어준 후 lysis buffer 500 μ l를 첨가하여 세포를 용해시켜서 E-tube로 옮겨 담았다. 13,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 얻은 상층액에 확인하고자 하는 단백질에 특이적인 항체를 첨가하여 4°C

에서 3시간 이상 반응시켰다. Protein A-agarose 50 μ l를 넣고 다시 4°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 세척완충액으로 5번 씻어주고 세척완충액을 완전히 제거한 다음, 2x sample buffer를 50 μ l 넣어주고 100°C에서 10분간 반응 후 얼음에서 5분간 놓아두어 반응을 정지 시켰다. 13,000 rpm 1분 원심분리 후 agarose가 포함되지 않도록 조심스럽게 상층액을 50 μ l를 취한다. 이렇게 얻은 단백질시료는 immunoblotting 실험 기법을 이용하여 결과를 확인하였다.

Immunoblotting 분석

RBL-2H3 혹은 BMMC 세포를 6 well-plate에 well당 1.0×10^6 개씩 분주한 후, 20 ng/ml의 DNP 특이적인 IgE가 포함된 MEM 배지에서 12시간 동안 배양하며 감작시켰다. PIPES 완충용액 2 ml로 3번 씻어준 후 다시 PIPES 완충용액 1 ml를 넣어 주었다. CO₂ 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 5분간 반응시킨 후, 추출물을 각 농도별로 PIPES 완충용액에 희석시켜 각 well에 30분 정도 전처리를 하였다. 25 ng/ml의 DNP-BSA를 각 well에 첨가하여 실험에 명시된 시간만큼 자극시킨 후, 5분간 얼음 위에 두어 반응을 정지시켰다. 세포를 ice-cold PBS로 두 번 씻어준 후 lysis buffer(20 mM HEES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet p-40, 10% glycerol, 60 mM octyl- β -glucoside, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2.5 mM nitrophenylphosphate, 0.7 μ g/ml pepstatin, and a protease-inhibitor tablet)를 첨가하여 세포를 용해시켜서 E-tube로 옮겨 담았다. 13,000 rpm으로 5분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 2x sample buffer와 섞어 100°C에서 5분간 단백질변성 과정을 진행하였다. 이렇게 얻은 단백질시료를 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 진행한 후, PVDF membrane(Schleicher & Schuell, BA85)로 transfer 시켰다. TBS-T(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) buffer를 이용 5% BSA를 만들어 한 시간 동안 blocking 시킨 다음, 각각의 특이적인 항체와 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 HRP(horseradish peroxidase)가 붙은 2차 항체로 1시간 동안 반응시킨 다음 TBS-T로 세척 후 ECL detection kit(Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 X-ray 필름에 감광시켰다.

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

감작된 RBL-2H3 세포를 20 ng/ml 항원으로 4시간 동안 자극 후 세포 밖 배지로 분리된 TNF- α 나 IL-4를 ELISA kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

통계학적 분석

각각의 결과를 t-test 를 통해 p 값을 측정하고, $p < 0.05$ 인 경

우에 각 군 간에 유의한 차이점이 있는 것으로 판정하였다.

실험결과

꾸지뽕나무 추출물의 RBL-2H3 세포와 BMMC의 탈과립에 대한 억제 효과

항알레르기 효과를 알아보기 위해 먼저 알레르기유발에 중요한 세포인 비만세포의 탈과립 정도를 측정하는 방법의 하나인 β -hexosaminidase 분비 실험을 하였다. 꾸지뽕나무 추출물은 dimethyl sulphoxide(DMSO)에 100 mg/ml의 농도로 제작 후 농도에 맞게 완충용액에 희석하여 실험에 사용하였다. 꾸지뽕나무

추출물은 RBL-2H3과 BMMC에서 농도 의존적으로 탈과립을 억제하였다(Fig. 1A). 특히, RBL-2H3에서 꾸지뽕나무 추출물은 최고농도인 100 μ g/ml에서 거의 대부분 탈과립을 억제하였으며, 실험에 사용한 최고 농도인 100 μ g/ml에 함유된 0.1% DMSO는 비만세포의 탈과립에 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 꾸지뽕나무 추출물이 비만세포의 항원과 Fc ϵ RI에 의해서 유도되는 탈과립을 억제하는 효과를 갖는다는 것을 보여주었다. 한편, 꾸지뽕나무 추출물(10~100 μ g/ml)을 처리한 실험군에서 모두 세

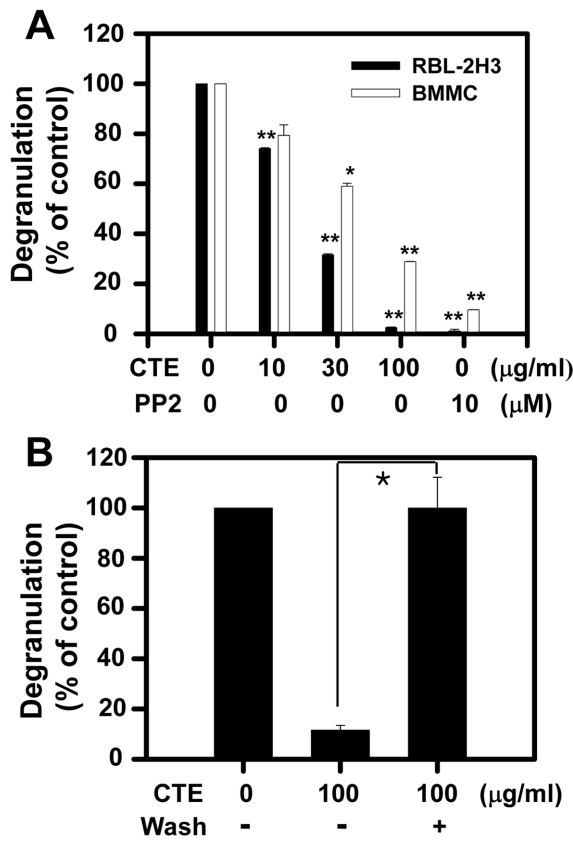


Fig. 1 – Effect and reversibility of *Cudrania tricuspidata* extract (CTE) on Ag-stimulated degranulation in mast cells. (A) After priming RBL-2H3 cells or BMMCs with 50 ng/ml DNP specific IgE, the cells were stimulated with 25 ng/ml antigen for 10 min. The degranulation was determined by measurement of the activity of β -hexosaminidase in culture media. (B) Reversibility of CTE's effect in RBL-2H3 cells. The RBL-2H3 cells were washed out five times with PIPES buffer after incubating with 100 μ g/ml CTE for 1 h and then stimulated for 10 min with antigen. The values indicate mean \pm S.E.M. from three independent experiments. Significant differences with the Ag-stimulated controls without CTE are indicated, * p <0.05 and ** p <0.01. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor.

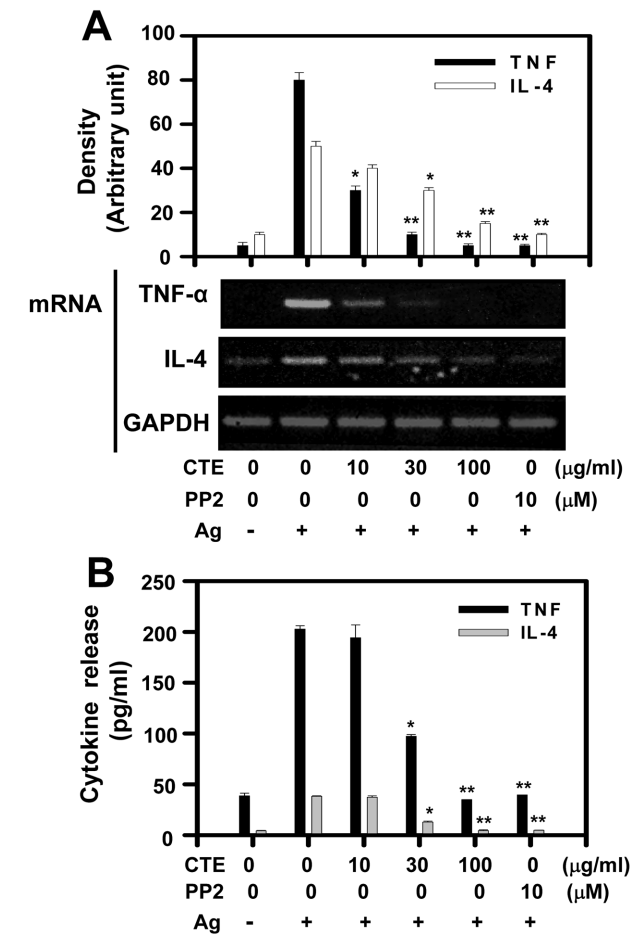


Fig. 2 – Effect of *Cudrania tricuspidata* extract (CTE) on the expression and secretion of tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-4 in RBL-2H3 mast cells. (A) IgE-primed RBL-2H3 cells were stimulated with 25 ng/ml Ag, or not stimulated. Total RNA was isolated and then reversely transcribed. Polymerase chain reaction using IL-4- or TNF- α specific primers was performed as described in the section for "Materials and Methods". The representative images and band density from three independent experiments are shown. (B) The levels of TNF- α and IL-4 in the culture supernatant were determined by using Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. Asterisks indicate significant differences from Ag-stimulated controls, which are not treated with CTE, * p <0.05 and ** p <0.01. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor.

포 생존률에는 전혀 영향이 없었다(data not shown).

꾸지뽕나무 추출물의 탈과립에 대한 가역적 효과

RBL-2H3에서 탈과립에 대한 꾸지뽕나무 추출물의 억제효과가 가역성을 나타내는지 알아보았다. RBL-2H3 세포를 꾸지뽕나무 추출물 100 µg/ml로 30분 동안 전처리 해주었을 경우 항원에 의한 탈과립이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 항원으로 자극하기 전에 꾸지뽕나무 추출물을 3회 이상 세척해 주면 이러한 억제효과가 거의 사라져 항원에 의한 탈과립 현상이 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 이와 같은 결과를 통해 꾸지뽕나무 추출물의 탈과립 억제효과는 가역적임을 알 수 있었다.

꾸지뽕나무 추출물의 항원에 의해 유도된 비만세포의 TNF-α 및 IL-4 생성에 대한 억제 효과

TNF-α나 IL-4는 비만세포에서 분비되어 알레르기 질환 발병

에 중요한 원인이 되는 염증성 사이토카인으로 잘 알려져 있다. 따라서 항원자극에 의한 비만세포로부터 생성되는 이러한 사이토카인의 생성 저해효과를 확인하기 위해, 비만세포에서 항원자극에 의한 TNF-α 및 IL-4 발현에 대한 꾸지뽕나무 추출물의 억제 효과를 RT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과 TNF-α 및 IL-4의 발현을 꾸지뽕나무 추출물이 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 2A). 또한 항원자극에 의해 비만세포로부터 분비되는 사이토카인도 농도 의존적으로 억제되는 경향을 보였다(Fig. 2B).

꾸지뽕나무 추출물의 PCA에 대한 억제효과

꾸지뽕나무 추출물의 항알레르기 효과를 동물모델에서 확인하기 위해서 국소적 알레르기 동물모델인 PCA 실험을 수행하였다. PCA는 마우스의 귀에 국소적으로 IgE를 주입 후 항원을 꼬리정맥을 통해 주입하는 방법으로 알레르기 질환 동물 모델로 가장

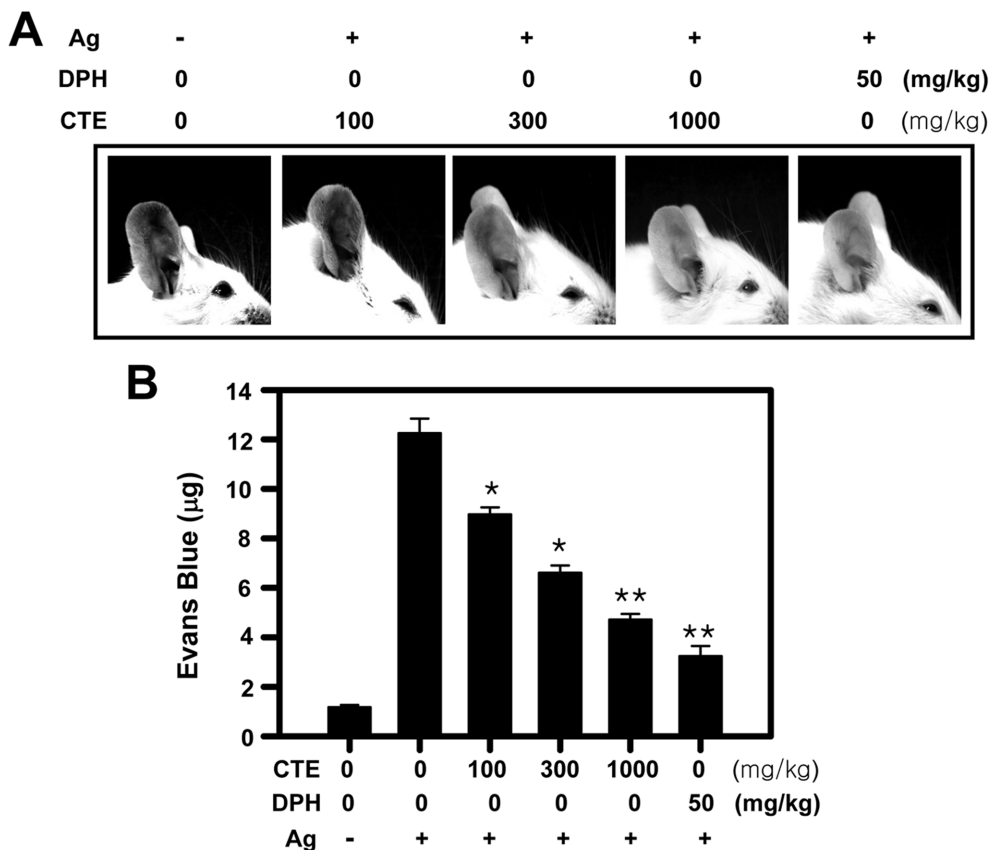


Fig. 3 – Effect of *Cudrania tricuspidata* extract (CTE) on IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis (PCA). (A) The anti-allergic effect was assessed using PCA mouse model. Balb/c mice were intravenously injected with a 250-mg antigen (DNP-BSA) containing 4% Evans blue 24 h after intradermal administration of a dinitrophenol (DNP)-specific IgE antibody (0.5 mg) into a mouse ear. CTE (100~1000 mg/kg) was orally administrated 1 h before an administration of antigen. The dye extravasated by antigen was extracted from the ear and the amount was measured by absorbance. The representative photograph of ears (A) and the mean±S.E.M. of values (B) from three independent experiments, each with 10 mice, are shown. The asterisks indicate significant difference from Ag-stimulated controls without CTE (**p*<0.05; ***p*<0.01). Diphenylhydramine (DPH, 50 mg/kg) was used as a typical anti-histamine reference drug.

많이 사용되고 있다. PCA 모델을 제작 후 vehicle을 투여한 쥐의 귀에는 에반스 블루 색소가 비교적 많이 삼출되는데 비해서 꾸지뽕나무 추출물을 100, 300, 1000 mg/kg의 농도로 경구 투여한 쥐들의 귀에는 상대적으로 색소의 삼출이 농도 의존적으로 유의하게 억제되었다(Fig. 3). 이 결과를 통해 꾸지뽕나무 추출물이 동물모델에서도 항 알레르기 효과가 있는 것으로 확인되었다.

꾸지뽕나무 추출물의 RBL-2H3 세포에서 Syk의 인산화에 대한 억제 효과

앞의 실험에서 꾸지뽕나무 추출물은 항원에 의해 유도되는 비만 세포의 탈과립을 억제한다는 것은 알 수 있었다. 이러한 꾸지뽕나무 추출물의 탈과립 억제 효능이 어떤 신호 전달 과정을 억제하여 발생하는 것인지를 알아보기 위해서, 항원자극에 의해서 매개되는 비만 세포의 활성화 신호 전달 과정에서 초기 신호 전달을 담당하는 Syk kinase의 인산화에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하는 실험을 수행하였다. 꾸지뽕나무 추출물은 비만세포에

서 농도 의존적으로 항원에 의한 Syk kinase의 인산화를 억제시켰다(Fig. 4). 따라서 꾸지뽕나무 추출물은 Syk kinase의 인산화를 억제하여 그 활성을 감소시킴으로써 항원에 의해 유도되는 비만세포의 탈과립을 억제할 가능성이 있었다.

꾸지뽕나무 추출물의 BMMC에서 Syk kinase 및 LAT의 인산화에 대한 억제 효과

비만세포에서 항원에 의한 Syk kinase의 인산화는 주로 Lyn kinase에 의해 주로 진행되는 것으로 보고되고 있으며, Syk kinase의 346번 아미노산 잔기인 tyrosine은 Lyn kinase의 직접적인 기질로 잘 알려져 있다.¹⁴⁾ 따라서 꾸지뽕나무 추출물이 Lyn kinase의 활성의 억제를 통해 Syk kinase의 인산화를 억제하는지를 확인하기 위해 계속 실험을 진행하였다. 꾸지뽕나무 추출물은 BMMC에서 Lyn kinase의 기질로 잘 알려진 Syk kinase의

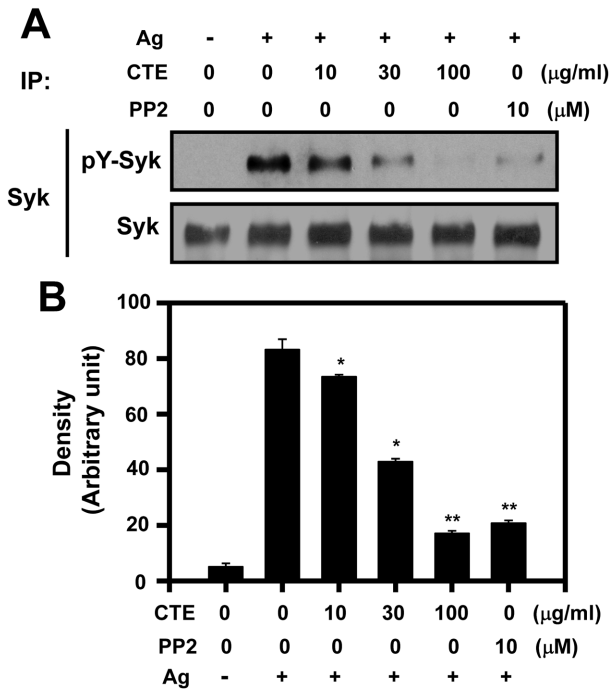


Fig. 4 – Effect of *Cudrania tricuspidata* extract (CTE) on the activating phosphorylation of Syk in Ag-stimulated RBL-2H3 mast cells. The IgE-primed RBL-2H3 cells were stimulated with 25 ng/ml Ag (DNP-BSA), with or without CTE at the indicated doses, for 7 min. Syk kinase was immunoprecipitated with specific antibody and then subjected to immunoblot analysis. Representative immunoblot images (A) and band density (B) are shown from three independent experiments. Asterisks indicate significant differences from Ag-stimulated controls, which are not treated with CTE, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor.

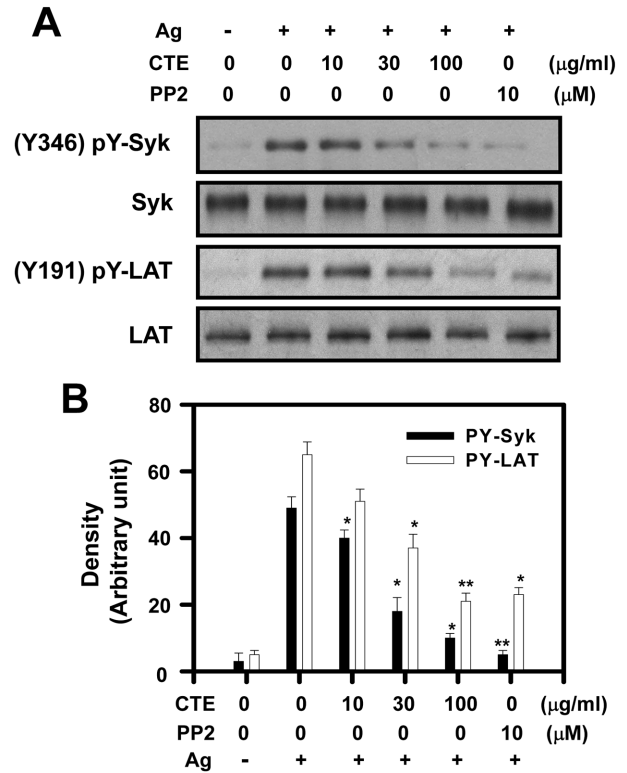


Fig. 5 – Effect of *Cudrania tricuspidata* extract (CTE) on the activating phosphorylation of Syk and LAT in Ag-stimulated mast cells. The IgE-primed BMMCs were stimulated with 25 ng/ml Ag (DNP-BSA), with or without CTE at the indicated doses, for 7 min. The whole cell lysates were subjected to immunoblot analysis to detect the phosphorylated forms of Syk and LAT. Representative immunoblot images (A) and band density (B) are shown from three independent experiments. Asterisks indicate significant differences from Ag-stimulated controls, which are not treated with CTE, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor.

346번 tyrosine의 인산화 뿐 아니라 LAT의 인산화를 농도 의존적으로 억제하는 효과를 확인하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 꾸지뽕나무 추출물은 Lyn kinase의 활성 억제를 통한 Syk kinase의 활성화를 저해하는 특성을 갖고 있으며, 이러한 특성 때문에 항원에 의해서 유도되는 비만 세포의 탈과립을 억제시킨다는 것을 알 수 있었다.

꾸지뽕나무 추출물의 RBL-2H3세포의 Akt 및 MAP kinase의 인산화에 대한 억제 효과

비만세포에서 항원 자극에 의한 TNF- α 및 IL-4 생성은 MAP kinase 신호전달 경로를 통해 기인한다는 기존 보고에 착안하여,

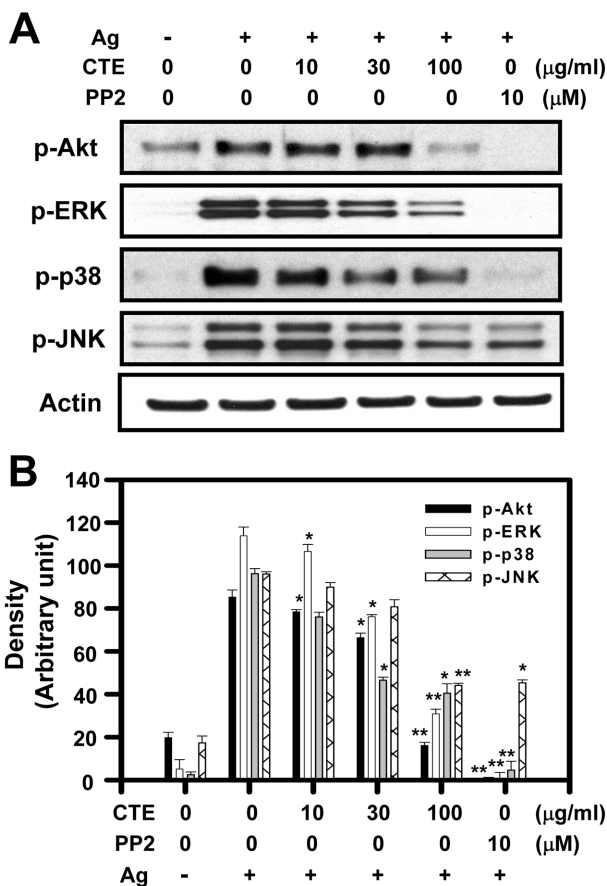


Fig. 6 – Effect of *Cudrania tricuspidata* extract (CTE) on the activating phosphorylation of MAP kinases and Akt in Ag-stimulated mast cells. The IgE-primed BMMCs were stimulated with 25 ng/ml Ag (DNP-BSA), with or without CTE at the indicated doses, for 7 min. The proteins derived from BMMC lysates were subjected to immunoblot analysis to detect phosphorylated forms of Akt and three typical MAP kinases. Representative immunoblot images (A) and band density (B) are shown from three independent experiments. Asterisks indicate significant differences from Ag-stimulated controls, which are not treated with CTE, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. PP2 is a general Src-family kinase inhibitor.

MAP kinase와 Akt 신호전달경로의 인산화에 대한 꾸지뽕나무 추출물의 효과를 보기 위해 immunoblotting 분석을 실시하였다. Akt의 인산화는 고농도인 100 mg/ml에서 현저히 억제되는 것으로 나타났으며, 세가지의 전형적인 MAP kinase는 모두 꾸지뽕나무 추출물 10, 30, 100 mg/ml 농도에서 농도 의존적으로 인산화가 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

고 찰

알레르기 질환은 세계 인구의 약 30% 가량이 경험하고 있으며, 알레르기의 발병률은 계속 증가하고 있다. 상대적으로 건강에 취약 계층인 소아기에 많이 발생하며 선진화 될수록 거의 모든 국민이 계절성 알레르기 등에 노출되어 있다.³⁾ 알레르기 질환은 비만세포 및 호염구에서 분비되는 히스타민, 헤파린, 류코트리엔, 프로스타글란딘 및 사이토카인 등 다른 알레르기 인자 등에 의해 증상이 유발되며 치료제로는 이미 분비된 인자들의 활성을 억제하는 항히스타민제, 스테로이드 제등 및 면역세포 자체를 억제하는 면역억제제들이 있으나 그 약물들은 알레르기 증상을 원천적으로 차단하지 못하거나 약물의 내성 문제 때문에 근본적 치료 방법이 되지 못하고 있다. 따라서 최근의 천연추출물 이용한 알레르기 질환의 근본 원인 세포중의 하나인 비만세포의 히스타민 분비 및 염증성 사이토카인 분비를 근본적으로 억제할 수 있는 소재의 발굴은 알레르기 질환 치료제 개발에서 중요한 의미가 있다고 할 수 있다.

고친화성 IgE 수용체(Fc ϵ RI)를 통한 비만세포의 활성화는 기형성된 여러 알레르기 증상을 유발하는 물질을 분비하는 탈과립 현상과 사이토카인의 생성 및 분비 등을 유도한다.²⁾ 비만세포의 분비를 억제시키는 기전은 일반적으로 두 가지 활성화 단계에 착안한 것인데, 첫째는 항원이 Fc ϵ RI와 응집체를 형성하는 것을 억제하는 기전과 둘째는 응집체를 형성한 후 Fc ϵ RI의 신호전달 경로를 억제하는 기전이 있다. 본 연구에서는 비만세포의 항원에 의한 신호전달과정을 억제하는 기전을 가진 천연 추출물 발굴을 목표로 하였다. 많은 추출물의 스크리닝 과정을 거쳐 발굴한 꾸지뽕나무 추출물은 비만세포의 비만세포주인 RBL-2H3 세포 및 골수에서 분화시킨 BMMC에서 항원에 의한 탈과립 현상 및 염증성 사이토카인의 생성 및 분비를 효과적으로 억제하였다(Fig. 1과 Fig. 2). 꾸지뽕나무 추출물은 비만세포에 의해 유도되는 알레르기 동물모델 실험에서도 농도 의존적으로 알레르기 반응을 억제하였다(Fig. 3). 이러한 비만세포를 이용한 실험과 알레르기 동물모델을 이용한 실험결과를 고려 할 때 꾸지뽕나무 추출물은 알레르기 질환 개선 효과가 우수한 것으로 생각되어 본 연구자는 그 기전을 연구하였다.

비만세포의 항원에 의한 신경전달 활성화 과정 중 Fc ϵ RI와 근접한 초기 신호전달단계에 해당하는 Lyn-Syk-LAT으로 이어지는

경로와 Fyn-Gab2-PI3K로 이어지는 두가지 경로가 있는데 이러한 과정은 다가성 항원이 FcεRI와 응집체를 형성한 후 일어나게 되며, 이 응집이 일어난 후 수용체의 β-subunit에 결합되어있던 Lyn kinase 등 Src-family kinase에 의해 수용체가 인산화 되면서 이 세포의 신호전달이 시작된다.¹²⁾ FcεRI는 각각 하나의 α-subunit, β-subunit 및 disulfide 결합으로 연결되어있는 두개의 γ-subunit으로 구성되어 있으며, β와 subunit은 수용체에 결합되어있는 Lyn kinase에 의해 빠르게 인산화되는 Immunoreceptor-based activation motif(ITAM)을 가진다. γ-Subunit ITAM의 tyrosine 인산화는 이 세포의 활성화에 중요한 Syk kinase의 결합부위를 제공하여 이 kinase를 수용체로 유도함으로써 Syk kinase를 활성화 시킨다.¹³⁾ Syk kinase활성화 이후 LAT, PLCγ1 및 PKC 등 많은 다른 하위 신호전달분자와 adaptor 분자들이 수용체/Syk 복합체로 유도되어 전체적인 신호전달계가 활성화된다.⁵⁾ 꾸지뽕나무 추출물은 비만세포 억제 효능에 대한 기전으로 비만세포 활성화에 필수적인 Syk kinase의 인산화 과정을 억제 하였다(Fig. 4). 이러한 Syk kinase 인산화의 억제는 Syk kinase를 인산화 시키는 Src-family kinase인 Lyn kinase를 꾸지뽕나무 추출물이 억제할 가능성을 제시했다. 따라서 본 연구자는 Lyn kinase의 활성화에 미치는 꾸지뽕나무 추출물의 억제를 알아보기 위하여 Lyn kinase의 비만세포내에서 기질로 잘 알려진 Syk kinase의 346번 위치의 타이로신 아미노산 잔기의 인산화를 특이 항체를 이용하여 측정하였다.¹⁴⁾ 결과로 꾸지뽕나무 추출물은 Lyn kinase의 기질인 Syk kinase의 346번 위치의 타이로신 아미노산 잔기의 인산화를 농도 의존적으로 억제하는 것을 근거로 꾸지뽕나무 추출물은 Lyn kinase의 활성을 억제함으로써 비만세포의 활성을 억제함을 알 수 있었다. 하지만 본실험에서는 다른 Fyn 이나 Fgr 등 Src-family kinase에 대한 활성 억제 가능성도 완전히 배제할 수 없었다. BMMC에서의 항원 자극을 통한 탈과립에서 꾸지뽕나무 추출물의 가역성에 대해 알아보는 실험에서는 꾸지뽕나무 추출물에 의한 억제 효과가 유의적인 가역성을 띠고 있어 세척을 통해 전 처치했던 추출물을 제거 시 그 억제효과가 계속 이어지지 않음을 알 수 있었다. 이것으로 보아 꾸지뽕나무 추출물은 항원에 의한 비만세포 탈과립의 가역적인 억제제임을 알 수 있어 알레르기 질환 치료소재로서도 충분히 개발될 수 있다는 것을 알 수 있었다.

항원에 의한 FcεRI 신호전달 기전 중 하위단계에 해당하는 MAP kinase와 Akt에 대한 꾸지뽕나무 추출물의 억제효과를 알아보기 위해 Akt, ERK, JNK, p38의 인산화를 immunoblotting을 통해 확인하였다. 꾸지뽕나무 추출물은 ERK, JNK 및 p38의 항원에 의한 활성화를 농도 의존적으로 억제하였다. 이러한 MAP kinase는 비만세포에서 항원자극을 통한 TNF-α와 IL-4 등을 포함하는 다양한 cytokine들을 만들어 내는데 중요한 역할을 한다.¹⁵⁾ 예상한 대로 꾸지뽕나무 추출물은 비만세포에서 생성되고 분비

되는 알레르기를 유도하는 사이토카인 생성을 억제하는 효과가 있었다.

결 론

본 연구에서는 꾸지뽕나무 추출물에 의한 비만세포에서의 탈과립 및 사이토카인 생성억제 연구 및 그 기전을 연구하였다. 최종적으로 알레르기 동물모델에서 꾸지뽕나무 추출물의 알레르기 증상 억제 효능을 측정하였다. 꾸지뽕나무 추출물은 가역적으로 항원 자극에 의한 비만세포의 탈과립 및 사이토카인 생성을 억제 하였으며 동물모델에서 알레르기 증상을 농도 의존적으로 억제하였다. 기전으로 초기 신호 단백질인 Syk kinase의 인산화를 억제하였고, Syk kinase의 하위 단계인 LAT의 인산화를 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다. 또한 사이토카인 등의 생성에 중요한 하위 신호전달경로인 MAP kinase 및 Akt의 인산화를 억제하였다. 이상의 결과로, 꾸지뽕나무 추출물은 비만세포에서 Syk kinase 경로의 억제를 통해 비만세포의 활성화 및 동물모델에서 알레르기 증상을 억제함을 알 수 있었다. 따라서 꾸지뽕나무 추출물은 항알레르기 치료제 후보소재로서 개발의 가치가 충분히 있는 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 2010년도 덕성여자대학교 연구지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Holgate, S. T. and Polosa, R. : Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 218 (2008).
- Beaven, M. A. : Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *Eur. J. Immunol.* **39**, 11 (2009).
- Galli, S. J. : New concepts about the mast cells. *New Eng. J. Med.* **328**, 257 (1993).
- Paolini, R., Jouvin, M. H. and Kinet, J. P. : Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement. *Nature* **353**, 855 (1991).
- Gilfillan, A. M. and Tkaczyk, C. : Integrated signalling pathways for mast-cellactivation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 218 (2006).
- Rivera, J. and Gilfillan, A. M. : Molecular regulation of mast cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 1214 (2006).
- Lee, J. H., Kim, J. W., Ko, N. Y., Mun, S. H., Kim, D. K. and Kim, J. D. : *Camellia japonica* suppresses immunoglobulin E-

- mediated allergic response by the inhibition of Syk kinase activation in mast cells. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 1365 (2008).
- 8) Lee, J. H., Kim, J. W., Ko, N. Y., Mun, S. H., Kim, D. K. and Kim, J. D. : Mast cell-mediated allergic response is suppressed by *Sophorae Flos*: Inhibition of Src-family kinase. *Exp. Biol. Med.* **233**, 1271 (2008).
- 9) Lee, H., Ha, H., Lee, J. K., Seo, C. S., Lee, N. H., Jung, D. Y., Park, S. J. and Shin, H. K. : The fruits of *Cudrania tricuspidata* suppress development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Phytother. Res.* doi: 10.1002/ptr.3577 (2011).
- 10) Oh, P. S. and Lim, K. T. : Anti-inflammatory effect of glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* Bureau: involvement of MAPK/NF-B signaling. *Immunol. Invest.* **40**, 76 (2011).
- 11) Lee, Y. J., Kim, S., Lee, S. J., Ham, I. and Whang, W. K. : Antioxidant activities of new flavonoids from *Cudrania tricuspidata* root bark. *Arch. Pharm. Res.* **32**, 195 (2009).
- 12) Rivera, J. : Molecular adapters in FcεRI signaling and the allergic response. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 688 (2002).
- 13) Sada, K., Takano, T., Yanantigeni, S. and Yamamura, H. : Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J. Biochem.* **130**, 177, (2001).
- 14) Chu, D. H., Morita, C. T. and Weiss, A. : The syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol. Rev.* **165**, 167 (1998).
- 15) Theoharides, T. C. and Kalogeromitros, D. : The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1088**, 78 (2006).