

프리스탄 유도한 루푸스 생쥐에서 사이토카인 *Ex vivo* 생산에 미치는 Baicalin의 효과

채 병 숙[#]

우석대학교 약학대학 약학과

(Received December 23, 2015; Revised December 31, 2015; Accepted January 4, 2016)

Effect of Baicalin on the *Ex vivo* Production of Cytokines in Pristane-Induced Lupus Mice

Byeong Suk Chae[#]

College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

Abstract — Systemic lupus erythematosus (SLE) is characterized by dysregulatory production of proinflammatory cytokines and helper T (Th) cytokine-dependent autoantibody production. This study aims to investigate the protective effect of baicalin on the dysregulatory production of proinflammatory cytokines and Th cytokines in pristane-induced lupus mice. Mice were received *i.p.* a single injection of 0.5 ml of pristane, and then, later about 3 months, were used as a pristane-induced lupus model. The pristane-induced lupus mice were administrated orally with baicalin 50 mg/kg once in a day for 10 days. Immune cells obtained from the pristane-primed lupus control group (lupus control) and baicalin-treated pristane-primed lupus mouse group (BAC lupus) were cultured for 24 h or 36 h with/without mitogens. These results demonstrated that LPS-induced production of macrophage and splenic TNF- α and Con A-induced production of thymic IFN- γ were attenuated in BAC lupus compared to lupus control, while LPS-stimulated production of macrophage IL-10, Con A-stimulated production of splenic IL-10 and, PGE₂-reduced production of splenic IFN- γ enhanced. Therefore, these findings suggest that baicalin may protect from autoimmunity and disease activity in lupus via modulatory effect of proinflammatory cytokine overproduction and Th cytokine imbalance.

Keywords □ baicalin, lupus, TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ

Systemic lupus erythematosus(SLE)는 T cell 의존적인 매우 복잡한 자가면역질환으로 전염증성 사이토카인 과생산 및 T cell 과 B cell 간의 상호작용의 이상 등의 특징을 보이며 결국 자가항체 생산과 장기손상을 유발한다.^{1,2)} 활성화된 T cell은 apoptosis에 저항성을 보이며 T cell 조절기능 감소를 유발하여 결국 B cell의 과활성화 및 자가항체 생산을 유도하는 등 루푸스 유발에 있어서 T cell의 활성화는 매우 중요한 역할을 한다.^{3,4)} 자가반응성 T cell은 신장과 피부와 같은 조직에 면역복합체 침착의 결과를 가져오는 자가항체 형성에 기여하였다.⁵⁾ 특히 루푸스의 발병

은 helper T(Th) cell 반응의 형태에 좌우되며,⁶⁾ CD4+ T cell 의존적인 사이토카인 불균형의 특징을 보인다.⁷⁾ 그러나 mitogen에 대한 루푸스 면역세포의 *in vitro* 반응은 물론 루푸스 환자의 *in vivo* 세포성 반응이 저하된 상태를 보였다. 루푸스 환자에서 phytohemagglutinin에 의한 T cell 활성화가 저하되었으며,⁸⁾ 루푸스 T cell이 과활성화를 보이지만 T cell 활성화를 위해 자극되었을 때는 T cell 활성화 발현이 불충분한 것으로 나타나는 등 면역방어시스템이 취약함을 보이고 있다.⁹⁾

과거에는 루푸스 사망의 주요 원인은 질병 활성의 조절력 상실에 있다고 보고 B cell 및 non B cell을 타겟으로 삼았으나, 요즘은 루푸스 질병의 활성정도가 낮음에도 불구하고 동맥경화 합병증, 악성종양, 감염 등이 주요 사망원인이 되고 있어, 이와 같은 2차적 질병의 발생에서 중요한 역할을 하는 myeloid cell 및 T cell에 의한 전신성 염증 및 Th 사이토카인 불균형 환경이 주요 타겟의 하나가 되고 있다.¹⁰⁾

#Corresponding Author

Byeong Suk Chae

College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju, Jeonbuk 565-701, Korea

Tel.: 063-290-1426 Fax.: 063-290-1560

E-mail: cbse@woosuk.ac.kr

마크로파지는 물론 B cell과 T cell 간의 상호작용에 따른 TNF- α , IL-6, IL-10 및 IFN- γ 등을 포함한 염증성 사이토카인 및 Th 사이토카인 불균형은 루푸스 자가면역성 및 전신성 염증 활성화와 연관하다.¹¹⁾ TNF- α 는 루푸스 염증반응의 활성화에 있어서 중요한 역할을 하며,¹²⁾ IL-6, IL-10 및 IFN- γ 의 과생산은 루푸스 T cell 이 매개하는 루푸스 자가면역성 및 염증과 연관하다.^{13,14)} Th1 사이토카인 IFN- γ 는 염증성 손상 및 자가항체 생산을 매개하며,¹⁵⁾ Th2 사이토카인 IL-6는 루푸스 질환에 있어서 질병의 활성화, B cell 분화 및 자가항체 생산에 있어서 중요한 역할을 한다.^{16,17)} IL-10은 T cell 자극을 감소시키고 면역억제작용을 가져 루푸스 자가면역성에 대한 보호효과를 갖는다.¹⁸⁾ 또한 PGE₂는 루푸스에서는 혈중농도 및 뇌척수액의 농도가 높았고,¹⁹⁾ 루푸스의 자가면역성 및 자가항체 생산을 매개하는 것으로 나타났다.^{4,20)}

Baicalin은 속썩은풀(*Scutellaria baicalensis*)의 활성성분으로 *in vivo* 및 *in vitro*에서 항염증효과, 항산화작용 및 항암효과 등을 지니는 것으로 잘 알려져 있다.^{21,22)} Baicalin은 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 등 전염증성 사이토카인의 혈중농도 및 LPS로 자극된 마크로파지의 생산능을 억제하여 항염증효과를 지녔으며, LPS로 자극된 마크로파지나 kupffer cell과 같은 면역세포의 활성화를 저하시켜 endotoxemia에 의해 유도되는 간손상으로부터 보호효과를 지녔다.²³⁻²⁵⁾ Baicalin은 autoimmune encephalomyelitis를 지닌 흰쥐에서 염증성 세포의 apoptosis를 촉진하였으며,²⁶⁾ regulatory T cell 분화와 활성을 촉진하는 것으로 나타났다.²⁷⁾ Pristane-induced lupus BALB/c mice는 혈중 IL-6 및 자가항체 생산의 특징을 지닌 루푸스 자가면역성을 지닌 실험모델로서 사용되고 있는데,²⁸⁾ Chae의 연구²⁹⁾에 의하면 pristane 투여 후 3개월 된 루푸스 생쥐에서 경구투여 한 baicalin은 혈중 IL-6를 저하시켰고, LPS로 유도한 복강 마크로파지의 IL-6, PGE₂ 및 NO 생산, PGE₂로 유도한 마크로파지 IL-6 및 흉선세포 IFN- γ 생산을 억제하였으며, 비장세포 NKT cell 및 Th cell 활성화 등을 저하시켰고 감소된 비장세포 CD4+ T cell의 apoptosis는 증가시켰다. 이는 baicalin이 루푸스의 자가면역성 및 Th cell 면역조절 작용을 하여 보호효과를 지닐 수 있음을 나타내지만 각 면역세포에서 루푸스 자가면역성 및 염증관련 사이토카인의 생산에 미치는 baicalin의 효과 및 기전에 대해서 아직 불확실한 상태로 남아있다. 따라서 본 연구에서 pristane으로 유도한 루푸스 생쥐에서 자가면역성 및 염증관련 사이토카인의 면역세포의 *ex vivo* 생산능에 대한 baicalin의 효과에 대한 실험을 실시하였다.

실험 방법

실험동물

생후 3~4주령 체중 17~21g의 암컷 BALB/c 생쥐를 대한실험동물센터(대한민국 충북)에서 분양 받아 12시간 밤·낮 주기,

22±2°C, 상대습도 50~60%로 유지되는 항온-항습 사육장에서 시판사료(제일사료 제품: 조단백질 22.5% 이상, 조지방 35.0% 이상, 조섬유 7.5% 이하, 조회분 10.0% 이하, 칼슘 0.7% 이상)로 1주간 급식시켜 적용시킨 후 사용하였다. 생쥐는 pristane (Sigma Chemical Co., St., Louse, MO, U.S.A.) 0.5 ml을 1회 *i.p.* 주사를 하였으며 약 3개월 후 각각 pristane으로 유도한 루푸스 실험동물 모델로 사용하였다. 생쥐의 관리 및 처치는 보건 의료정책의 실험동물 사용 및 관리의 가이드라인에 따랐으며 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다.

Baicalin 시료의 조제

속썩은풀(*Scutellaria baicalensis*) 뿌리(대한민국 전북 전주시 보화당한약유통)를 잘게 썰어서 건조된 것(300 g)을 이용하여 Sephadex LH-20(MeOH) column chromatography 및 Lobar-A column(CHCl₃-MeOH-H₂O, 100 : 8 : 1)을 사용하여 분리하여 수득한 baicalin(150 mg)을 Woosuk University(WSU-10-014) 약학대학(김대근교수)에서 받아서 에탄올 및 PBS에 용해시켜 사용하였다. Baicalin (MeOH); 220~222°C, ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.50(1H, s, 5-OH), 8.00~8.03(2H, m, H-2', 6'), 7.55~7.53(3H, m, H-3', 4', 5'), 7.00(1H, s, H-8), 6.95(1H, s, H-3), 4.98(1H, d, J=10.9 Hz, H-1'); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 182.7(C-4), 171.7(C-6"), 163.7(C-2), 151.9(C-7), 149.4(C-9), 146.7(C-5), 132.1(C-4'), 131.0(C-6), 131.0(C-1'), 129.3(C-3', 5'), 126.5(C-2', 6'), 106.4(C-10), 104.9(C-3), 100.9(C-1"), 94.5(C-8), 75.9(C-3"), 74.5(C-5"), 73.0(C-2"), 72.2(C-4").

Baicalin 경구투여

Pristane-induced lupus mice는 2 그룹으로 무작위로 나누었다: pristane-primed lupus control group(lupus control) 및 baicalin-treated pristane-primed lupus mouse group(BAC lupus). Pristane-induced lupus mice는 baicalin 50 mg/kg 또는 PBS를 10일간 하루 1회씩 경구투여 하였다.

비장세포 및 흉선세포 부유액의 조제

Lupus control 및 BAC lupus로부터 비장 및 흉선을 무균적으로 적출하여 Hanks' balanced salt solution(HBSS: Gibco Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)으로 조심스럽게 분쇄한 후 nylon mesh로 여과하여 큰 세포덩어리를 제거하였으며, 4°C 1300 rpm에서 7분간 원심분리하여 상등액을 제거 후 155 mM ammonium chloride, 15 mM sodium bicarbonate 및 1 mM EDTA를 포함하는 lysing buffer(pH 7.3)(Sigma) 용액에 부유시켜 5분간 정치하여 적혈구를 용해시켰다. 이 비장세포 부유액은 한냉 PBS로 4°C에서 3회 원심분리 후, 비장세포 농도 1 × 10⁷ cells/ml가

되도록 RPMI 1640 complete medium(10% fetal bovine serum, penicillin G 10 U/ml 및 streptomycin 10 µg/ml 함유)에 부유시켰다. 또한 매 실험 때마다 비장세포의 생존을 검사를 trypan blue exclusion method로 다음과 같이 실시하였다. 시험관에 0.3 ml의 세포부유액을 넣은 후 0.1 ml의 trypan blue dye 용액을 가하여 5분 경과시킨 다음, 백혈구 계산판에서 무색인 생세포와 청색으로 염색된 사세포 수를 측정 후 그 백분율을 계산하였다.

복강 마크로파지의 조제

Lupus control 및 BAC lupus로부터 복강 마크로파지는 멸균한 3%의 thioglycollate 2 ml를 복강에 주사하여 3일 후 마취 하에서 CO₂ chamber에서 희생시켜 복강에 한병 PBS 10 ml를 주입한 다음 충분히 마사지를 하였으며 해부하여 복강세포를 수집하였다. 수집한 복강세포 현탁액을 4°C, 1300 rpm에서 7분간 원심분리하고 10% FBS(Sigma) 및 1×antibiotic/antimycin(Invitrogen) 처리한 complete DMEM(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 2회 세척한 다음 직경 120 mm petri dish에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양하였으며, 부착되지 않은 세포를 제거하고 부착한 세포만을 cell scraper로 모아 복강 마크로파지로 분리하였다. 복강 마크로파지는 DMEM complete medium에 재부유시켜 사용하였다.

세포 배양

Lupus control 및 BAC lupus로부터 얻은 splenocyte(1×10⁶ cells/ml), thymocyte(1×10⁶ cells/ml) 및 peritoneal macrophage (0.5×10⁶ cells/ml) 각각 24 well plate에 분주하고, LPS (Escherichia coli Serotype 026: B6, Sigma Co., Ltd., U.S.A.) 5 µg/ml, PGE₂ 5 µM 또는 Con A 2 µg/ml를 처리하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 또는 36시간 배양하였으며 그 세포 배양액은 사이토카인 측정 때까지 -70°C에 보관하였다.

Cytokine의 측정

보관된 세포배양액 중 cytokine의 농도측정은 cytokine monoclonal antibodies(BD Biosciences Pharmingen, U.S.A.)를 이용하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 실시되었고, ELISA microplate reader(Molecular Devices Co., Ltd., U.S.A.)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 결과는 ml당 picogram 단위에서 정량하였으며 최저농도의 한계는 5 pg/ml 이상으로 하였다.

통계학적 분석

모든 자료는 means±standard error(S.E.)로 나타냈으며, 유의성 검사는 students' t-test로 행하였다.

실험 결과 및 고찰

Pristane-induced lupus mice에서 LPS로 유도한 TNF-α 생산에 있어서 baicalin의 효과

루푸스를 유도한 실험동물 및 루푸스 환자에서 TNF-α의 혈중 농도 및 유전자 발현은 루푸스 질환의 염증활성 및 고지혈증과 관련되어 있고,^{12,30} 루푸스의 신장병변과 같은 장기손상에도 관여한다.³¹ 본 연구는 pristane-induced lupus mice에서 LPS에 의해 유도되는 마크로파지 및 비장세포의 TNF-α 생산능에 있어서 경구투여 한 baicalin의 효과를 알아보았다. 본 연구에서 lupus control 및 BAC lupus로부터 얻은 각 복강 마크로파지 및 비장 세포에 LPS 5 µg/ml를 처리 한 후 24시간 배양하였고 그 세포

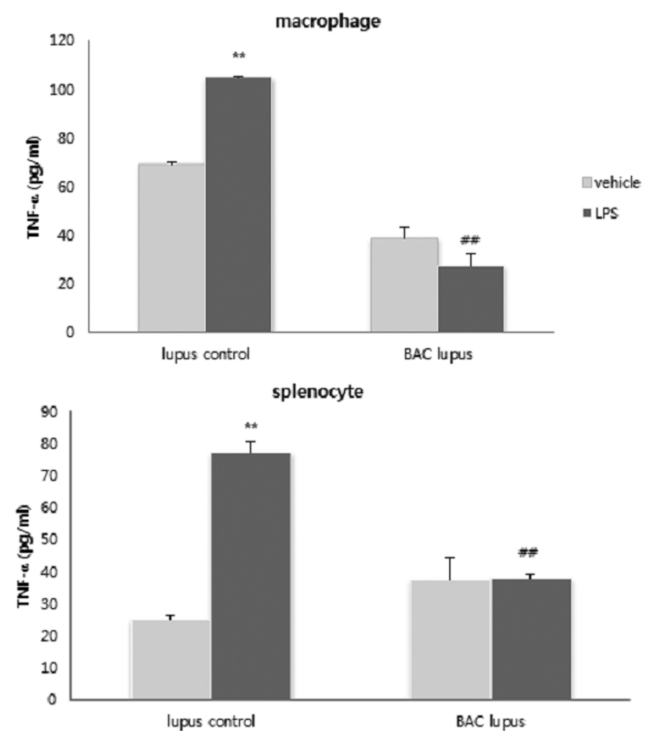


Fig. 1 – Baicalin attenuated LPS-induced production of TNF-α by macrophages and splenocytes in pristane-induced lupus mice. Mice were received *i.p.* a single injection of 0.5 ml of pristane, and then, later about 3 months, were used as a pristane-induced lupus model. The pristane-induced lupus mice were randomly divided into two groups: pristane-primed lupus control group (lupus control), and baicalin-treated pristane-primed lupus mouse group (BAC lupus). The pristane-induced lupus mice were administrated orally with baicalin (BAC) 50 mg/kg or PBS once in a day for 10 days. Peritoneal macrophages and splenocytes obtained from each mice group were incubated with LPS for 24 h. The concentrations of TNF-α were measured at 450 nm using ELISA. Each value represents the mean±S.D. ** (p<0.01): Significantly different from the value in vehicle-treated negative control. ## (p<0.01): Significantly different from the value in LPS-treated positive control.

배양액 중 TNF- α 의 농도를 측정하였다. 그 결과, Fig. 1에서 보여주는 바와 같이, lupus control에서 LPS에 의한 TNF- α 생산은 유의성 있게 유도되었으나, BAC lupus에서는 유도되지 못했다. 또한 BAC lupus에서 LPS에 의한 TNF- α 생산은 lupus control에 비해 유의성 있게 억제됨을 보여주었다. 이는 baicalin은 lupus에서 면역세포 자극에 의해 유도된 TNF- α 생산 억제효과를 지녀 루푸스의 염증활성을 저하시킬 것으로 사료된다.

Pristane-induced lupus mice에서 LPS로 유도한 마크로파지 IL-10 생산 및 IL-10/TNF- α 에 있어서 baicalin의 효과

마크로파지에 의한 염증반응에 있어서 전염증성 사이토카인과 항염증성 사이토카인간의 균형이 중시되고 있다. IL-10은 단핵구/마크로파지계의 활성화를 억제하고 전염증성 사이토카인 합성을 차단함으로써 항염증성 사이토카인으로 잘 알려져 있다. 최근 연구에 의하면, SLE에서 IL-10을 생산하는 regulatory B cell은 루푸스환자의 경우 결함을 보이며,³²⁾ 이러한 결함은 CD4+

T-cell 활성화를 촉진하며 결국 자가면역성 발생을 높였다.³³⁾

본 연구에서 lupus control 및 BAC lupus로부터 얻은 복강 마크로파지를 LPS 처리한 후 24시간 배양하였고 그 세포배양액 중 IL-10의 농도를 측정하였다. 그 결과, lupus control에서 LPS에 의한 IL-10 생산은 유의성 있게 유도되지 않았으나, BAC lupus에서는 유의성 있게 증가하였다. 또한 BAC lupus에서 LPS에 의한 마크로파지 IL-10 생산은 lupus control에 비해 유의성 있게 증가되었으며 IL-10/TNF- α 는 lupus control에서 0.41이었으나 BAC lupus에서는 7.26으로 월등히 증가되었다(Fig. 2). 이는 baicalin이 LPS에 의해 자극된 마크로파지에서 IL-10 생산을 높임으로써 루푸스의 염증을 억제하고 Th cell 활성을 저하시켜 자가면역성으로부터 보호효과를 지닐 것으로 사료된다.

Pristane-induced lupus mice에서 PGE₂로 유도한 비장세포 IFN- γ 및 IL-10 생산에 있어서 baicalin의 효과

PGE₂는 세포성 면역반응 및 T cell 증식을 억제하며,³⁴⁾ Th1 반응에서 Th2 반응으로 향하게 하고 IL-6 및 IL-10 등을 유도함으로써 B cell 활성화에 관여한다.³⁵⁾ PGE₂는 루푸스에서 혈중농도 및 뇌척수액의 농도가 높게 나타났으며,¹⁹⁾ 루푸스 신우신염의 활성 마커로 작용하였다.³⁶⁾ Chae 등²⁰⁾의 보고에 의하면, pristane으로 6~10개월 동안 유도된 루푸스 생쥐에서 PGE₂가 루푸스 자가면역성 활성을 매개하는 것으로 나타났다. 루푸스 면역세포는 COX-2 과발현을 보였으며, PGE₂는 T cell 자연사를 억제하고 자가항체 생산 증가 및 자가항원에 대한 T cell 반응의 증가 등에 관여하였다.⁴⁾ 루푸스는 B cell의 과활성화에 따른 자가항체 생산 유도의 특징을 보이는 것으로 잘 알려져 있는데,³⁾ 이는 Th1 반응에서 Th2 반응으로 향하게 하는 PGE₂의 중요한 역할을 시사한다고 할 수 있다.

본 연구는 pristane으로 3개월 동안 유도된 루푸스 생쥐에서 자가면역성을 매개하는 PGE₂의 세포성 면역억제효과 및 Th1 반응에서 Th2로의 전환효과에 있어서 baicalin의 영향을 알아보았다. 본 연구에서 lupus control 및 BAC lupus로부터 분리한 비장세포에 PGE₂ 5 μ M로 36시간 자극을 주었다. 그 결과 PGE₂은 lupus control에서 IL-10 및 IFN- γ 생산을 유의성 있게 억제시켰으며, BAC lupus에서는 IL-10 생산을 유의성 있게 억제시켰으나 IFN- γ 생산은 오히려 유의성 있게 증가시켰다. 또한 BAC lupus에서 PGE₂에 의한 IFN- γ 생산은 lupus control에 비해 유의성 있게 증가되었으며, PGE₂에 의한 IFN- γ /IL-10는 lupus control에서 1.33이었으나 BAC lupus에서는 2.97로 증가됨을 보여주었다(Fig. 3). 이는 루푸스에서 T cell 억제작용을 갖는 PGE₂의 자극으로 비장의 T cell 면역능이 저하되나 baicalin은 PGE₂에 의해 억제된 Th1 사이토카인 생산을 증가시키고 Th1의 Th2 반응으로의 이동효과를 억제하여 PGE₂의 매개작용에 따른 루푸스 자가면역성을 조절할 것으로 사료된다.

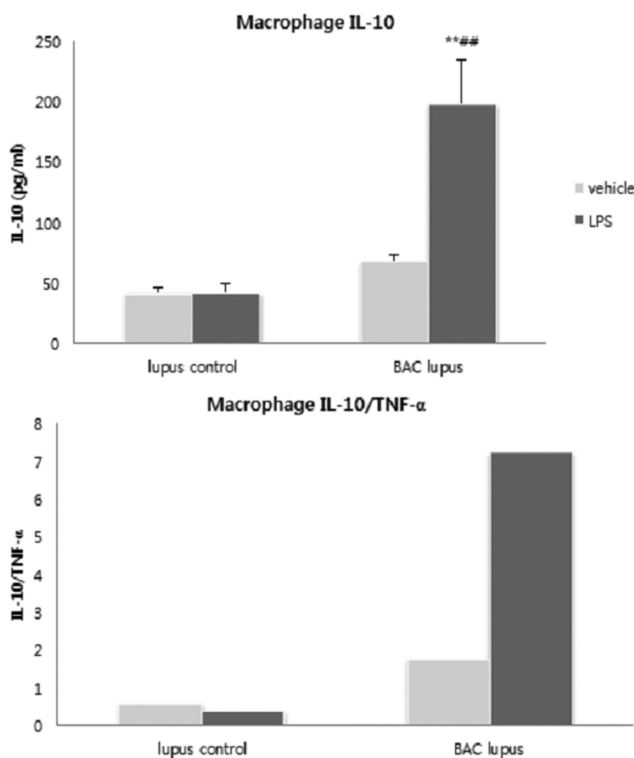


Fig. 2 – Baicalin increased LPS-induced production of macrophage IL-10 and IL-10/TNF- α ratio in pristane-induced lupus mice. Peritoneal macrophages obtained from in lupus control and BAC lupus were incubated with LPS for 24 h. The concentrations of cytokines were measured at 450 nm using ELISA. Each value represents the mean \pm S.D. Other legends and methods are the same as in Fig. 1. ** (p<0.01): Significantly different from the value in vehicle-treated negative control. *** (p<0.01): Significantly different from the value in LPS-treated positive control.

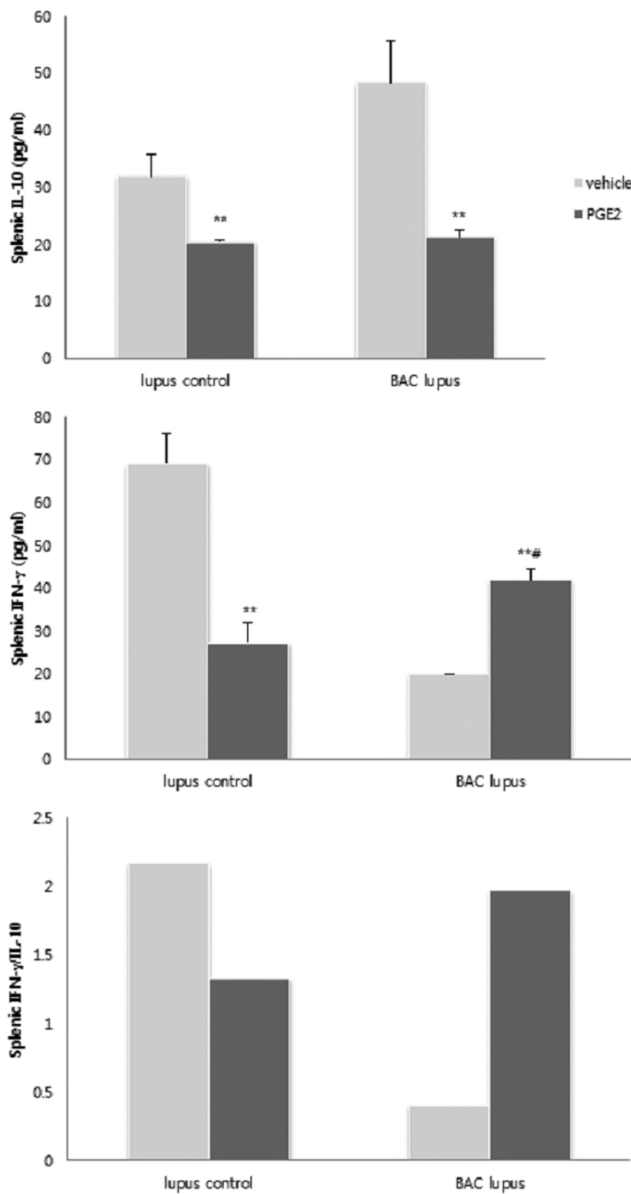


Fig. 3 – Effect of baicalin on PGE₂-induced production of splenic cytokines in pristane-induced lupus mice. The harvested splenocytes from lupus control and BAC lupus were incubated with PGE₂ for 36 h. Each value represents the mean ± S.D. Other legends and methods are the same as in Fig. 1. ** (p < 0.01): Significantly different from the value in vehicle-treated negative control. # (p < 0.05): Significantly different from the value in PGE₂-treated positive control.

Pristane-induced lupus mice에서 Con A로 유도한 비장세포 IL-10 및 IFN-γ 생산에 있어서 baicalin의 효과

비장은 2차적 면역장기로써 잘 알려져 있고 면역능에 있어서 중요한 역할을 하는데, 루푸스는 비장기능이 저하되어 있다.³⁷⁾ 루푸스 환자는 phytohemagglutinin에 의한 T cell 활성화가 저하되었으며,⁸⁾ 면역방어시스템이 취약함을 보이고 있다.³⁸⁾ 루푸스 T cell이 과활성화를 보이지만 T cell 활성화를 위해 자극되었을

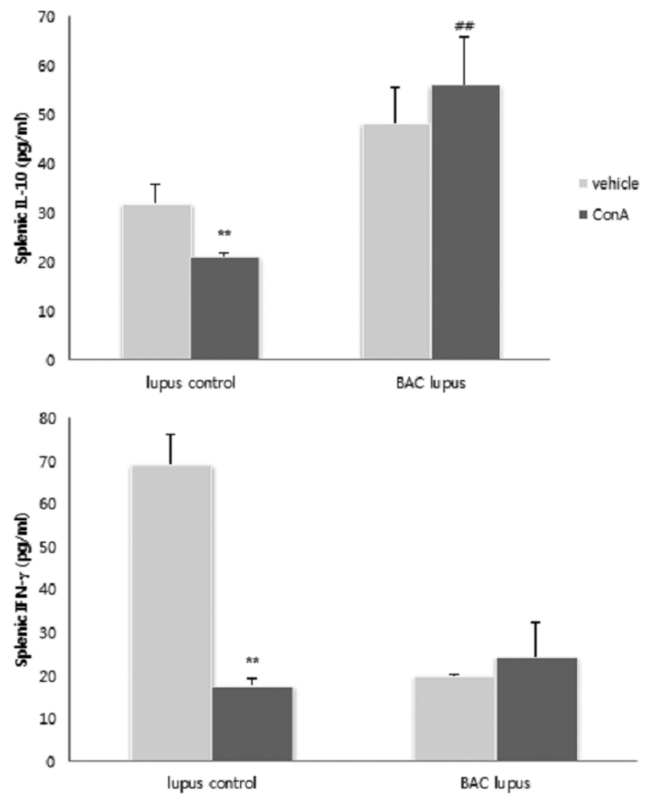


Fig. 4 – Effect of baicalin on Con A-induced production of splenic cytokines in pristane-induced lupus mice. The harvested splenocytes from lupus control and BAC lupus were incubated with Con A for 36 h. Each value represents the mean ± S.D. Other legends and methods are the same as in Fig. 1. ** (p < 0.01): Significantly different from the value in vehicle-treated negative control. ## (p < 0.01): Significantly different from the value in Con A-treated positive control.

때는 T cell 활성화 발현이 불충분한 것으로 나타났다.⁹⁾ 또한 몇몇 연구에서는 mitogen에 대한 루푸스 면역세포의 *in vitro* 반응은 물론 루푸스 환자의 *in vivo* 세포성 반응에서 저하된 상태를 보임이 관찰되었다.²⁾

본 연구는 pristane으로 유도한 루푸스 생쥐에서 T cell의 활성유도제인 Con A로 자극된 비장세포에서 IL-10 및 IFN-γ의 생산에 미치는 baicalin의 경구투여 효과를 알아보았다. 본 연구에서 lupus control 및 BAC lupus로부터 분리한 비장세포는 Con A 2 μg/ml 존재 하에 36시간 배양하였다. 그 결과 lupus control에서 Con A는 비장세포 IL-10 및 IFN-γ 생산을 유도하지 못하고 오히려 억제됨을 보였는데 이는 루푸스 비장세포의 T cell이 과활성화를 보이지만 mitogen에 의해서는 T cell 활성화의 발현이 불충분하다는 연구들^{8,9)}을 지지하고 있다. 그런데 BAC lupus에서는 Con A의 자극으로 비장세포 IL-10 및 IFN-γ 생산에 있어서 억제되지 않았다. 또한 BAC lupus에서 Con A에 의한 비장세포 IL-10 생산은 lupus control에 비해 유의성 있게 증가되었다(Fig. 4). 루푸스에 있어서 Th1 사이토카인 IFN-γ는 염증성

손상 및 자가항체 생산을 매개하지만,¹⁵⁾ IL-10는 루푸스 T cell 활성을 저하시키고 IFN- γ 생산을 억제하는 등 면역억제작용을 가져 루푸스 자가면역성으로부터 보호효과에 관여한다.¹⁸⁾ 또한 루푸스 환자에서 높은 IL-10 혈중농도는 CD4+ T cell surface의 Fas 및 FasL 발현을 유도하여 이 Th cell의 apoptosis를 촉진하는데 관여하는 것이 관찰되었다.³⁹⁾ 따라서 baicalin은 Th 사이토카인 생산능의 저하를 보여주는 루푸스 비장세포에서 T cell의 IL-10 생산능 높여 Th cell에 의한 자가면역성을 억제할 것으로 사료된다.

Pristane-induced lupus mice에서 Con A로 유도한 흥선 세포 cytokine 생산에 있어서 baicalin의 효과

흥선은 1차 면역장기로서 Th cell 및 T-suppressor/cytotoxic cell을 포함하는 T cell의 분화 조절을 통한 면역반응 조절에 있어서 중요한 역할을 하는데, 흥선을 제거하면 Th cell의 활성이 감소되고 동시에 T-suppressor 활성은 증가된다.⁴⁰⁾ 이는 흥선세포는 Th cell의 활성의 비이상적 증가와 Th cell 의존적인 루푸스 자가면역성과 연관할 수 있음을 시사한다. 흥선은 자가면역성에 있어서 내성 조절 및 예방에 관여한다. 흥선에서 유도된 regulatory T cell은 흥선면역세포의 전염증성 사이토카인 생산

을 억제하여 자가면역성을 억제하는 역할을 한다. 그런데 루푸스에서는 흥선의 크기 및 Con A에 의한 흥선세포 증식이 증가되었고, 루푸스에서 T cell 활성화는 T cell 조절능력 상실, B cell의 과활성화 및 결국 자가항체 생산과 연관하다.^{3,5,7)}

루푸스의 발생은 특히 CD4+ T cell 의존적인 Th 반응의 유형 및 Th 사이토카인 불균형이 중요한 역할을 한다.^{6,7)} IL-6 생산은 CD4+ T cell 활성화, B cell 과활성 및 자가항체 생산과 연관하다.⁴¹⁾ IL-10는 루푸스 T cell 활성을 저하시키고 IFN- γ 생산을 억제하는 등 면역억제작용을 가져 루푸스 자가면역성으로부터 보호효과에 관여한다.¹⁸⁾ 루푸스 환자에서 높은 IL-10 혈중농도는 CD4+ T cell surface의 Fas 및 FasL 발현을 유도하여 이 Th cell의 apoptosis를 촉진하는데 관여하는 것이 관찰되었다.³⁹⁾ 루푸스 환자의 T cell에서 IFN- γ 생산이 높게 나타나며 IFN- γ 는 Th1 반응관련 루푸스의 B cell 활성화 및 성숙을 촉진시켜 자가면역성 유도에 있어서 중요한 역할을 한다.^{14,42)} IFN- γ 는 MRL-lpr 생쥐에서 lymphoaccumulation에 관여하였고,⁴³⁾ 루푸스환자의 말초혈액 중 T cell을 anti-CD3 mAb 및 anti-CD28 mAb로 자극 시 IFN- γ 생산이 증가되었다.⁴⁴⁾ 따라서 흥선 T cell 활성화에 따른 Th1 사이토카인의 생산패턴은 루푸스 자가면역성에 있어서 중요한 역할을 하며 루푸스 병인에 있어서 치료 타

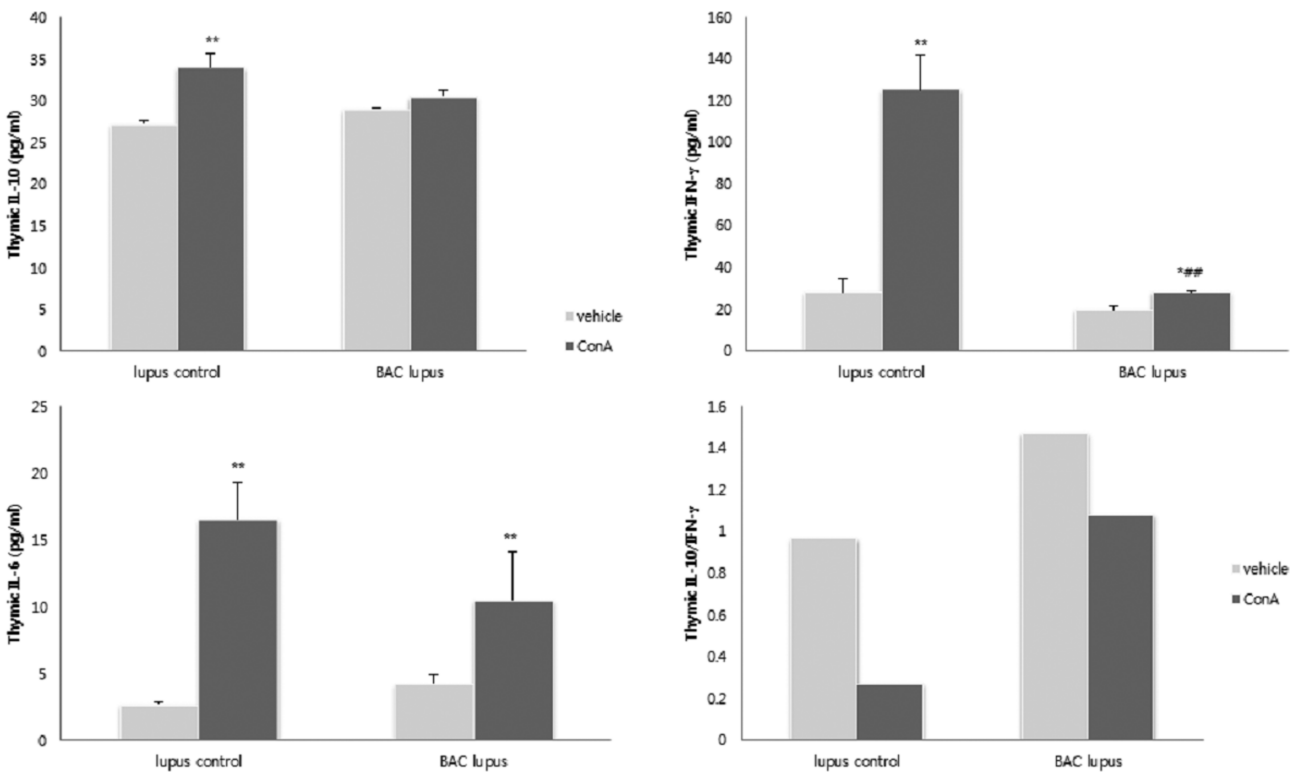


Fig. 5 – Effect of baicalin on Con A-induced production of thymic cytokines in pristane-induced lupus mice. The harvested thymocytes from lupus control and BAC lupus were incubated with Con A for 36 h. Each value represents the mean±S.D. Other legends and methods are the same as in Fig. 1 (p<0.05) and ** (p<0.01): Significantly different from the value in vehicle-treated negative control. ### (p<0.01): Significantly different from the value in Con A-treated positive control.

것으로 생각되고 있다.

본 연구는 lupus control 및 BAC lupus로부터 흉선세포를 분리하여 Con A 2 µg/ml 존재 하에서 36시간 배양하였고 그 배양액의 Th 사이토카인을 측정하였다. 그 결과 lupus control에서 Con A는 흉선세포의 IL-6, IL-10 및 IFN-γ 생산을 현저하게 증가시켰는데 BAC lupus에서는 IL-6 및 IFN-γ 생산을 약간 증가시켰다. 또한 BAC lupus에서는 lupus control에 비해 Con A에 의한 IFN-γ 생산이 유의성 있게 억제되었고, IL-10/IFN-γ 비는 lupus control에서 0.27이었으나 BAC lupus에서는 1.08로 증가됨을 보여주었다(Fig. 5). 이는 루푸스에서 baicalin이 흉선세포의 Th cell 활성화로 인해 증가된 Th1 사이토카인 IFN-γ 생산을 억제하고 IL-10/IFN-γ 비를 증가하여 그에 따른 자가면역성을 억제시킬 것으로 사료된다.

결론

결론적으로 루푸스에 있어서 baicalin은 LPS 자극에 의해 마크로파지 및 비장세포의 TNF-α 생산 및 Con A에 의해 증가된 흉선세포의 IFN-γ 생산을 유의성 있게 억제시켰으나, LPS 자극에 의한 마크로파지의 IL-10 생산 및 Con A로 자극된 비장세포의 IL-10 생산을 증가시켰고, 비장세포의 PGE₂에 의해 억제된 IFN-γ의 생산능을 회복시켰다. 따라서 baicalin은 면역세포의 IL-10 증가와 TNF-α 및 IFN-γ 억제를 통해 루푸스의 염증 활성 및 자가면역성으로부터 보호효과를 지닐 것이다.

References

- 1) Nagy, G., Koncz, A. and Perl, A. : T- and B-cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Crit. Rev. Immunol.* **25**, 123 (2005).
- 2) Takeuchi, T., Tsuzaka, K., Abe, T., Yoshimoto, K., Shiraiishi, K., Kameda, H. and Amano, K. : T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* **38**, 339 (2005).
- 3) Chae, B. S. and Shin, T. Y. : Immunoregulatory abnormalities of T cells and hyperreactivity of B cells in the *in vitro* immune response in pristane-induced lupus mice. *Arch. Pharm. Res.* **30**, 191 (2007).
- 4) Xu, L., Zhang, L., Yi, Y., Kang, H. K. and Datta, S. K. : Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nat. Med.* **10**, 411 (2004).
- 5) Takeno, M., Nagafuchi, H., Kaneko, S., Wakisaka, S., Oneda, K., Takeba, Y., Yamashita, N., Suzuki, N., Kaneoka, H. and Sakane, T. : Autoreactive T cell clones from patients with systemic lupus erythematosus support polyclonal autoantibody production. *J. Immunol.* **158**, 3529 (1997).
- 6) Reininger, L., Santiago, M. L., Takahashi, S., Fossati, L. and Izui, S. : T helper cell subsets in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Ann. Med. Interne. (Paris)* **147**, 467 (1996).
- 7) Ishikawa, S., Akakura, S., Abe, M., Terashima, K., Chijiwa, K., Nishimura, H., Hirose, S. and Shirai, T. : A subset of CD4+ T cells expressing early activation antigen CD69 in murine lupus: possible abnormal regulatory role for cytokine imbalance. *J. Immunol.* **161**, 1267 (1998).
- 8) Portales-Perez, D., Gonzalez-Amaro, R., Abud-Mendoza, C. and Sanchez-Armass, S. : Abnormalities in CD69 expression, cytosolic pH and Ca²⁺ during activation of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **6**, 48 (1997).
- 9) Crispin, J. C., Martinez, A., de Pablo, P., Velasquillo, C. and Alcocer-Varela, J. : Participation of the CD69 antigen in the T-cell activation process of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.* **48**, 196 (1998).
- 10) Jordan, N. and D'Cruz, D. : Key issues in the management of patients with systemic lupus erythematosus: latest developments and clinical implications. *Ther. Adv. Musculoskelet Dis.* **7**, 234 (2015).
- 11) Steiman, A. J., Gladman, D. D., Ibañez, D., Noamani, B., Landolt-Marticorena, C., Urowitz, M. B. and Wither, J. E. : Lack of Interferon and proinflammatory cyto/chemokines in serologically active clinically quiescent systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* **42**, 2318 (2015).
- 12) Aringer, M. and Smolen, J. S. : SLE - Complex cytokine effects in a complex autoimmune disease: tumor necrosis factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **5**, 172 (2003).
- 13) Chun, H. Y., Chung, J. W., Kim, H. A., Yun, J. M., Jeon, J. Y., Ye, Y. M., Kim, S. H., Park, H. S. and Suh, C. H. : Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Immunol.* **27**, 461 (2007).
- 14) Dean, G. S., Tirrell-Price, J., Crawley, E. and Isenberg, D. A. : Cytokines and systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **59**, 243 (2000).
- 15) Haas, C., Ryffel, B. and Le Hir, M. : IFN-gamma receptor deletion prevents autoantibody production and glomerulonephritis in lupus-prone (NZB x NZW)F1 mice. *J. Immunol.* **160**, 3713 (1998).
- 16) Liang, B., Gardner, D. B., Griswold, D. E., Bugelski, P. J. and Song, X. Y. : Anti-interleukin-6 monoclonal antibody inhibits autoimmune responses in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Immunology* **119**, 296 (2006).
- 17) Richards, H. B., Satoh, M., Shaw, M., Libert, C., Poli, V. and Reeves, W. H. : Interleukin 6 dependence of anti-DNA antibody production: evidence for two pathways of autoantibody formation in pristane-induced lupus. *J. Exp. Med.* **188**, 985 (1998).

- 18) Beebe, A. M., Cuab, D. J. and de Waal Malefyt, R. : The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). *Cytokine & Growth Factor Reviews* **13**, 403 (2002).
- 19) Tsai, C. Y., Wu, T. H., Tsai, S. T., Chen, K. H., Thajeb, P., Lin, W. M., Yu, H. S. and Yu, C.L. : Cerebrospinal fluid interleukin-6, prostaglandin E₂ and autoantibodies in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and central nervous system infections. *Scand. J. Rheumatol.* **23**, 57 (1994).
- 20) Chae, B. S., Shin, T. Y., Kim, D. K., Eun, J. S., Leem, J. Y. and Yang, J. H. : Prostaglandin E₂-mediated dysregulation of pro-inflammatory cytokine production in pristane-induced lupus mice. *Arch. Pharm. Res.* **31**, 503 (2008).
- 21) Li-Weber, M. : New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treat. Rev.* **35**, 57 (2009).
- 22) Gao, Z., Huang, K., Yang, X. and Xu, H. : Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of Scutellaria baicalensis Georgi. *Biochim. Biophys. Acta.* **1472**, 643 (1999).
- 23) Wang, H. and Liu, D. : Baicalin inhibits high-mobility group box 1 release and improves survival in experimental sepsis. *Shock* **41**, 324 (2014).
- 24) Zhu, J., Wang, J., Sheng, Y., Zou, Y., Bo, L., Wang, F., Lou, J., Fan, X., Bao, R., Wu, Y., Chen, F., Deng, X. and Li, J. : Baicalin improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis via suppressing inflammatory response and lymphocyte apoptosis. *PLoS One* **7**, e35523 (2012).
- 25) Liu, L. L., Gong, L. K., Wang, H., Xiao, Y., Wu, X. F., Zhang, Y. H., Xue, X., Qi, X. M. and Ren, J. : Baicalin inhibits macrophage activation by lipopolysaccharide and protects mice from endotoxin shock. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 914 (2008).
- 26) Xu, J., Huang, R., Yang, Y. J., Jin, S. J. and Zhang, J. F. : Effects of baicalin on apoptosis in rats with autoimmune encephalomyelitis. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* **13**, 665 (2011).
- 27) Yang, J., Yang, X. and Li, M. : Baicalin, a natural compound, promotes regulatory T cell differentiation. *BMC Complement Altern. Med.* **12**, 64 (2012).
- 28) Shacter, E., Arzadon, G. K. and Williams, J. : Elevation of interleukin-6 in response to a chronic inflammatory stimulus in mice: inhibition by indomethacin. *Blood* **80**, 194 (1992).
- 29) Chae, B. S. : Baicalin ameliorates dysimmunoregulation in pristane-induced lupus mice: production of IL-6 and PGE₂ and activation of T cells. *Nat. Prod. Sci.* **17**, 354 (2011).
- 30) Svenungsson, E., Fei, G. Z., Jensen-Urstad, K., de Faire, U., Hamsten, A. and Frostegard, J. : TNF-alpha: a link between hypertriglyceridaemia and inflammation in SLE patients with cardiovascular disease. *Lupus* **12**, 454 (2003).
- 31) Qu, H., Bian, W. and Xu, Y. : A novel NF-κB inhibitor, DHMEQ, ameliorates pristane-induced lupus in mice. *Exp. Ther. Med.* **8**, 100 (2014).
- 32) Miyagaki, T., Fujimoto, M. and Sato, S. : Regulatory B cells in human inflammatory and autoimmune diseases: from mouse models to clinical research. *Int. Immunol.* **27**, 495 (2015).
- 33) Sim, J. H., Kim, H. R., Chang, S. H., Kim, I. J., Lipsky, P. E. and Lee, J. : Autoregulatory function of interleukin-10-producing pre-naïve B cells is defective in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 190 (2015).
- 34) Kalinski, P. : Regulation of immune responses by prostaglandin E₂. *J. Immunol.* **188**, 21 (2012).
- 35) Hinson, R. M., Williams, J. A. and Shacter, E. : Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E₂ in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 4885 (1996).
- 36) Menè, P., Pecci, G., Cinotti, G. A., Pugliese, G., Pricci, F. and Pugliese, F. : Eicosanoid synthesis in peripheral blood monocytes: a of disease activity in lupus nephritis. *Am. J. Kidney Dis.* **32**, 778 (1998).
- 37) Dillon, A. M., Stein, H. B. and English, R. A. : Splenic atrophy in systemic lupus erythematosus. *Ann. Intern. Med.* **96**, 40 (1982).
- 38) Pileri, P. and Furie, R. : Functional asplenia in systemic lupus erythematosus. *Semin. Arthritis Rheum.* **20**, 185 (1990).
- 39) Yang, X., Sun, B., Wang, H., Yin, C., Wang, X. and Ji, X. : Increased serum IL-10 in lupus patients promotes apoptosis of T cell subsets via the caspase 8 pathway initiated by Fas signaling. *J. Biomed. Res.* **29**, 232 (2015).
- 40) Panarese, A., D'Andrea, V., Pironi, D. and Filippini, A. : Thymectomy and systemic lupus erythematosus (SLE). *Ann. Ital. Chir.* **85**, 617 (2014).
- 41) Gottschalk, T. A., Tsantikos, E. and Hibbs, M. L. : Pathogenic inflammation and its therapeutic targeting in systemic lupus erythematosus. *Front. Immunol.* **6**, 550 (2015).
- 42) Mathian, A., Hie, M., Cohen-Aubart, F. and Amoura, Z. : Targeting interferons in systemic lupus erythematosus: current and future prospects. *Drugs* **75**, 835 (2015).
- 43) Balomenos, D., Rumold, R. and Theofilopoulos, A. N. : Interferon-gamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *J. Clin. Invest.* **101**, 364 (1998).
- 44) Harigai, M., Kawamoto, M., Hara, M., Kubota, T., Kamatani, N. and Miyasaka, N. : Excessive production of IFN-gamma in patients with systemic lupus erythematosus and its contribution to induction of B lymphocyte stimulator/B cell-activating factor/TNF ligand superfamily-13B. *J. Immunol.* **181**, 2211 (2008).