

木瓜 추출물이 항알레르기 및 항산화 작용에 미치는 영향

이승연

동의대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

The Antiallergic and Antioxidative Effects of Chaenomeles Sinensis (CS) in RBL 2H3 Cells

Lee Seung Yeon

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongeui University

Objectives

The purpose of this study was to investigate the antiallergic and antioxidative effects of Chaenomeles Sinensis (CS).

Methods

CS pretreatments inhibited anti-DNP IgE in RBL-2H3 mast cells for an hour. we measured cell viability, β -hexosaminidase release, IL-4, TNF- α secretion, and IL-4, TNF- α mRNA expression CS pretreatments inhibited DNP-HSA(10 μ g/ml) for ten minutes, we measured Dichlorodihydrofluorescein(DCF) and DPPH radical-scavenging activity in 0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picryldrazyl(DPPH) radical solution, 0.1ml, 99% ethanol 0.8ml, and CS 0.1 ml mixed solution.

Results

0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml CS treatments were not affect on cell viability and inhibited b-hexosaminidase release, IL-4, TNF- α secretion, CS treatments also decreased IL-4, TNF- α mRNA expression in RBL-2H3 cells.

CS treatments inhibited reactive oxygen species(ROS) and DPPH radical-scavenging activity.

Conclusions

These results suggest that CS may be useful for the prevention or treatment of allergic disease.

Key words : Chaenomeles Sinensis, β -hexosaminidase, IL-4, TNF- α , ROS, DPPH radical-scavenging activity

I. 緒 論

알레르기 질환은 면역계의 방어기능이 인체에 유해하게 작용하는 것으로, 무해한 항원에 응답하여, 특이적인 면역글로불린E(IgE)을 형성한 개체가 다시 같은 항원에 노출되어 일어나는 일련의 반응을 말한다. 알레르기 반응은 통상 4가지 유형으로 나눌 수 있다. 이

중 통상 알레르기 질환으로 일컬어지는 유형은 제 I 형으로, 알레르기 과민 세포에서 분비되는 각종 화학 매체들이 직, 간접적인 약리작용과 이로 인해 야기되는 염증반응에 의한 것으로서, 아토피성 피부염, 기관지 천식, 알레르기성 비염 및 식품 알레르기 등이 있다^{1,3)}.

호염구 및 비만세포는 IgE를 매개로 하는 알레르기 반응에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는데, 이들 세

포 표면에 발현하고 있는 고친화성 IgE 수용체인 FcεR1 이 IgE 및 특이적 항원과 결합함으로써 세포 내의 칼슘 농도가 상승하고, 탈 과립이 일어나 여러 가지 염증매개인자를 분비하게 되며, 이러한 염증 매개인자는 혈관을 이완시키고, 혈관투과도를 증가시키고, 기관지를 수축시키는 역할을 한다^{4,5)}.

에너지 대사를 해야 하는 모든 생명체는 반드시 산소의 공급이 있어야 하는데, 정상적인 대사과정에서 유입된 산소의 2-5% 정도는 정상 산소에 비해 반응성이 왕성하고 수명이 짧은 super-oxide(O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxy radical (OH⁻) 등의 활성산소종(Reactive Oxygen Species ROS)으로 바뀐다. 인체에 생성된 이러한 활성산소들이 적당한 조건에서는 세균이나 외부로부터 침입한 유해한 병원을 없애주어 생체방어의 역할도 하지만, 세포나 조직에 과도한 산화를 일으켜 다양한 질병의 직간접적인 요인이 되기도 한다⁶⁾.

비만세포는 항원에 의해 자극되었을 때 ROS를 생성하고 ROS가 알레르기 염증반응에서 intracellular second messenger로써 작용하여 염증매개 인자들이 생성과 신호전달을 촉진시킨다고 알려져 있다⁷⁻⁹⁾.

木瓜는 장미과에 속한 낙엽관목인 모과나무(*Chaenomeles Sinensis Kuhn*) 및 명자꽃의 성숙한 과실로 《名醫別錄》에 처음 기재된 후 舒筋活絡 和胃化濕, 强筋骨하는 효능 및 治濕痺拘攣 腰膝關節酸疼痛 吐瀉轉筋 脚氣水腫의 효과로 임상에서 널리 쓰이고 있다¹⁰⁾. 또한 감기나 기관지염의 기침, 가래의 완화제로 많이 알려져 있고 특히 류머티즘, 폐렴 등에 좋다고 알려져 있으며 향기가 좋아 방향제로도 많이 이용되고 있다¹¹⁾.

저자는 모과를 호흡기 허약이나 만성 알레르기성 질환에 이환되어 있는 소아들에게 차, 방향제, 흡입제 등 다양한 형태로 응용해 볼 수 있으리라 생각하였고 알레르기 염증 반응의 억제에 대한 효과를 알아 보고자 rat basophilic leukemia cell line(RBL 2H3 cell)을 이용하여 알레르기 염증 반응을 매개하는 인자의 생성과 유출 과정을 실험적으로 관찰하였던 바 유의한 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 시약

본 실험에 사용된 anti-dinitrophenyl(DNP) immunoglobulin E(IgE), DNP-HSA, 1, 1-diphenyl-2-picryldrazyl (DPPH)는 Sigma(USA)로부터, 2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)는 Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA)로부터, Dulbecco's modification Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin 및 trypsin-EDTA solution은 Gibco BRL로부터, tetrazolium bromide salt (MTT) 및 dimethylsulfoxide (DMSO)는 Amresco로부터, Interleukin (IL)-4와 tumor necrosis factor alpha (TNF-α) kit는 BD Biosciences Pharmingen으로부터, RT-PCR kit (AccuPower RT/PCR PreMix)는 Bioneer로부터 구입하여 사용하였다.

2) 검액의 제조

모과(감당약초, 경북) 200 g을 증류수로 씻은 후 2 L의 증류수를 가하여 4 시간 동안 가열하여 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 분리하고, 0.2 mm 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 200 ml가 되도록 감압농축한 후 냉동 건조하여 40 g의 추출물을 얻어 -20℃에 보관하였다가 실험직전 생리식염수나 배지에 희석하여 0.2 μm syringe filtering 후 실험에 사용하였다(Table 1).

2. 방법

1) 세포배양

RBL-2H3 (rat basophilic leukemia cell line)은 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받아 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℃, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution (Gibco BRL, USA)을 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대 배양하였다.

Table 1. Chaenomeles Sinensis

韓藥名	生藥名	學名	重量(g)
木瓜	Chaenomeles Fructus	Chaenomeles Sinensis	200

Table 2. Primer Sequence for RT-PCR Analysis

Target gene		Oligonucleotide sequences (5' to 3' direction)	Expected size
IL-4	F	ACCTTGCTGTCACCCCTGTTC	351
	R	TTGTGAGCGTGGACTCATT	
TNF- α	F	CAAGGAGGAGAAGTTCCCAA	501
	R	CGGACTCCGTGATGTCTAAG	
18S	F	GTAACCCGTTGAACCCATT	140
	R	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	

F: forward, R: reverse

2) MTT assay

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate (Corning, USA)에 5×10^4 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. CS를 농도별 (0, 1, 2, 3, 4 및 5 mg/ml)로 처리한 후 1 시간 동안 반응시킨 다음 배양액을 제거하고 5 mg/ml의 MTT를 각 well에 넣고 잘 섞어 준 후 4 시간 37°C incubator에서 배양하였다가 tetrazolium bromide salt를 제거하고 DMSO를 300 μ l씩 분주하여 well에 생성된 formazin이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 모두 녹인 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 평균값과 표준 편차를 구하였다.

3) β -hexosaminidase 측정

항원-항체 결합단계에서 β -hexosaminidase의 분비에 미치는 영향을 측정하기 위하여 RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate (Corning, USA)에 2.5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE (0.5 μ g/ml)로 감작하고 CS (2 mg/ml)를 처리하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 24 시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7.2) 로 2 번 세척한 다음 각 well 당 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가하였다. 10 분 동안 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 DNP-HSA (10 μ g/ml)를 처리한 후 10, 30, 60 분간 반응시키고 ice bath에서 10 분 동안 방치한 후 반응을 종결시켰다. 상층액 20 μ l를 96 well plate에 옮기고 substrate buffer (4-*p*-Nitrophenyl-*N*-acetyl-b-D-glucosaminide 1 mM, sodium citrate 0.05 M, pH^{4,5}) 80 μ l를 넣고 37°C에서 1 시간 배양시킨 다음 각 well당 stop solution 200 μ l를 첨가하여 반응을 종결시켰다. Microplate reader (Molecular Devices Co. Ltd., USA)를 사용

하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항체-수용체 결합단계에서 β -hexosaminidase의 분비에 미치는 영향을 측정하기 위하여 CS (2 mg/ml)은 IgE 감작단계 전에 세포에 처리되었다. 상층액에서의 측정은 앞의 방법과 같이 측정하였다.

4) IL-4와 TNF- α 측정

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate (Corning, USA)에 2.5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE (0.5 μ g/ml)로 감작하고 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7.2) 로 2 번 세척한 다음 각 well 당 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가하였다. 그 후 CS (2 mg/ml)를 처리하여 1 시간 동안 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 DNP-HSA (10 μ g/ml)를 처리한 후 4 시간 동안 반응시키고 ice bath에서 10 분 동안 방치한 후 반응을 종결시켰다. 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 2 분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 IL-4와 TNF- α ELISA kit (BD Biosciences Pharmingen, USA)를 사용하여 측정하였다. Microplate reader (Molecular Devices Co. Ltd., USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 IL-4와 TNF- α 의 양을 계산하였다.

5) RT-PCR

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 6 well plate (Corning, USA)에 2×10^6 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE (0.5 μ g/ml)로 감작하고 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한다. 새로운 DMEM배지로 교환한 후 CS (2 mg/ml)로 세포에 처리하였다. 1 시간 동안 배양한 후 DNP-HSA (10 μ g/ml)로 자극한 후 4 시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거한 후 1 ml의 TRizol을 넣고 2 분간 방치한 후

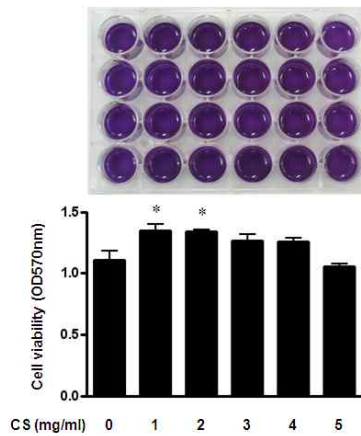


Fig. 1. Effects of CS on the cell viability of RBL-2H3 cells.
 Each column represents the mean \pm S.E. of 3 independent experiments.
 The absorbance was measured at 540 nm using microplate reader.
 * $p < 0.05$ vs untreated cells

chloroform을 넣고 10 초간 vortexing하고 12,000 rpm에서 15 분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol 을 혼합하여 흔들어 주었다. 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 DEPC (diethyl pyrocarbonate)-DW 20 μ l에 녹여 RT-PCR에 사용하였다. RT-PCR kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 45°C에서 30 분, 94°C에서 5 분간 반응시킨 후 94°C에서 30 초간 denaturation시키고, 55°C에서 30 초간 annealing시킨 다음, 72°C에서 1 분간 extension시키는 cycle을 32 회 반복한 후, 마지막 extension은 72°C에서 5 분간 PCR machine (GeneAmp, PCR system 9700, USA)에서 수행하였다. 각 PCR products는 2% agarose gel에 loading하여 100 V 조건에서 30 분간 전기영동을 통하여 분석하였다. mRNA 발현 밴드는 Scion Image Release Beta3b software (Maryland, USA)를 사용하여 정량하였다. 각 밴드영역에서 측정된 pixels의 수를 정량하여 비자극군에 대한 비율로 나타내었다. 각각의 primer의 염기서열은 다음과 같다 (Table 2).

6) 세포내 활성산소종(reactive oxygen species ROS) 측정

anti-DNP-IgE (0.5 μ g/ml)로 감작된 RBL-2H3 cells (5×10^5 cells/ml, 500 μ l/well)은 37°C에서 30 분동안 10 μ M H2DCF-DA로 배양되었다. 그 후 PBS로 배지에 남아 있는 H2DCF-DA를 제거한 후 CS (2 mg/ml)를 처리하여 30 분동안 배양하고 DNP-HSA (10 μ g/ml)에 10 분동안 자극하였다. 그 후 얼음 위에서 반응을 정지시킨 후 490nm (excitation)과 530nm (emission)에서 fluorometer (SPECTRAMAX M2, Molecular Devices Co. Ltd. USA)를 사용하여 ROS에 의해 산화된 DCF의 양을 측정하였다.

7) DPPH 라디칼 소거능 측정

항산화활성을 측정하기 위하여 DPPH 라디칼 소거능 활성법을 Itoh T 등의¹²⁾ 방법으로 수행하였는데, 0.5 mM DPPH 라디칼 용액 0.1 ml, 99% 에탄올 0.8 ml과 CS 용액 0.1 ml의 반응 혼합물로 측정하였다. 각 용액을 잘 혼합한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군으로 Vitamin C (L-ascorbic acid)가 사용되었다. DPPH 라디칼 소거활성은 억제율로 나타내었으며, 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{(C-T)}{C} \times 100, \text{ C; control, T; test sample}$$

8) 통계

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

III. 結果

1. 세포생존률에 대한 영향

RBL-2H3 cells의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 아무런 처리를 하지 않은 대조군에서 1.11 ± 0.15 의 흡광도를 나타내었으며, CS (1, 2, 3, 4 and 5 mg/ml)의 농도를 처리한 세포에서 각각 1.35 ± 0.10 , 1.34 ± 0.03 , 1.27 ± 0.10 , 1.26 ± 0.05 및 1.06 ± 0.04 의 흡광도를 나타내어 모든 농도에서 정상세포에 비해 세포생존률의 감소를 보이지 않았다(Fig. 1).

2. β -hexosaminidase 분비에 대한 영향

항원-항체 결합단계의 RBL-2H3 cells에서 누출된 β -hexosaminidase의 양은 항원 자극 후 시간별로 관찰하였다. 항원자극 10분, 30분 및 60분 후 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 각각 0.09 ± 0.00 , 0.10 ± 0.01 , 0.10 ± 0.01 의 흡광도를 나타내었으며, 항원으로 자극한 세포에서 각각 0.16 ± 0.00 , 0.20 ± 0.00 , 0.21 ± 0.00 의 흡광도를 나타내어 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었으며, CS (2 mg/ml)을 처리한

세포에서 0.14 ± 0.00 , 0.17 ± 0.00 , 0.18 ± 0.01 의 흡광도를 나타내어 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 2A).

항체-수용체 결합단계의 RBL-2H3 cells에서 누출된 β -hexosaminidase의 양은 항원 자극 후 시간별로 관찰하였다. 항원자극 10분, 30분 및 60분 후 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 각각 0.09 ± 0.00 , 0.10 ± 0.01 , 0.10 ± 0.00 의 흡광도를 나타내었으며, 항원으로 자극한 세포에서 각각 0.15 ± 0.00 , 0.20 ± 0.00 , 0.21 ± 0.00 의 흡광도를 나타

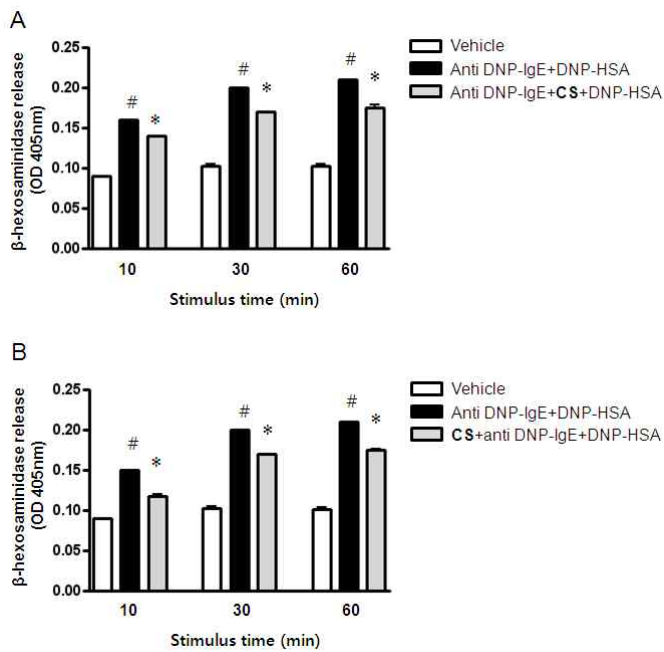


Fig. 2. Effects of CS on the β -hexosaminidase release at the antigen-antibody binding stage (A) and the antibody-receptor binding stage (B).

Each column represents the mean \pm S.D. of 3 independent experiments.

The absorbance was measured at 405 nm using microplate reader.

$p < 0.05$ vs vehicle, * $p < 0.05$ vs anti DNP-IgE+DNP-HSA

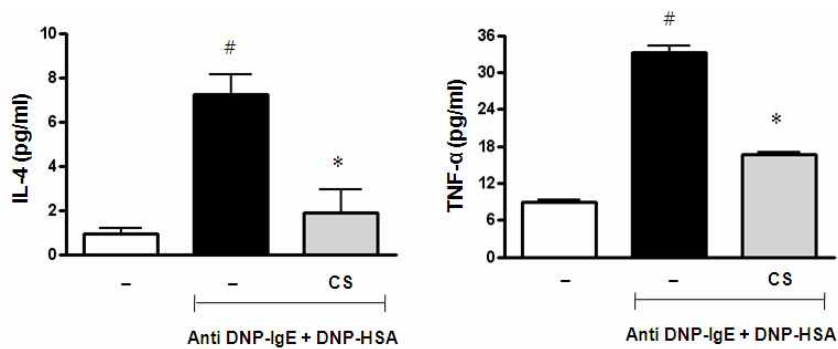


Fig. 3. Effects of CS on the production of IL-4 and TNF- α from RBL-2H3 cells.

Each column represents the mean \pm S.D. of 3 independent experiments.

The absorbance was measured at 450 nm using microplate reader.

$p < 0.05$ vs vehicle, * $p < 0.05$ vs anti DNP-IgE+DNP-HSA

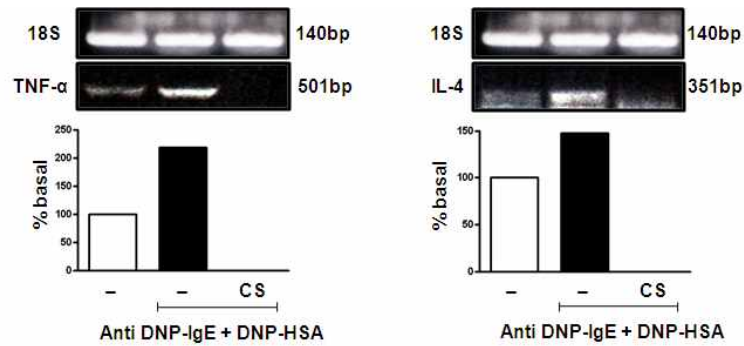


Fig. 4. Effects of CS on the induction of the IL-4 and TNF-α mRNA expression in RBL-2H3 cells.

Expression of the cytokines IL-4 and TNF-α was induced with anti-DNP IgE+ DNP-HSA stimulation in RBL-2H3 cells. The time of maximal mRNA induction was 4 hours after pre-treated with 2 mg/ml CS. IL-4 and TNF-α mRNAs were expressed by RT-PCR method. Fig. 1. Effects of CS on the cell viability of RBL-2H3 cells.

Each column represents the mean ± S.E. of 3 independent experiments.

The absorbance was measured at 540 nm using microplate reader.

* p<0.05 vs untreated cells

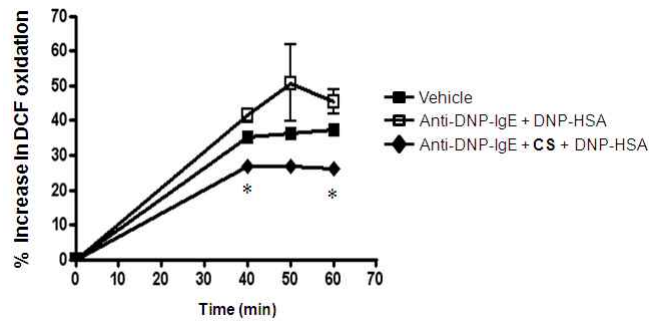


Fig. 5. Effects of CS on FcεRI-triggered ROS production in RBL-2H3 cells

IgE-sensitized RBL-2H3 cells were pre-incubated with 2mg/ml of CS and 10 μM of CM-H2DCF-DA for 30 min, washed twice with PBS, and resuspended in Straganian buffer. CM-H2DCF-DA-loaded cells were stimulated with Ag for 10 min, and ROS-mediated DCF oxidation was measured with excitation at 490 nm and emission at 530 nm with a fluorometer. The data are expressed as the percent increase in DCF oxidation above the unstimulated controls. * p<0.05 vs anti DNP-IgE+DNP-HSA

내어 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 증가를 나타내었으며, CS (2 mg/ml)을 처리한 세포에서 0.12±0.00, 0.17±0.00, 0.17±0.00의 흡광도를 나타내어 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 감소를 보였다(Fig. 2B).

3. IL-4와 TNF-α 생산에 대한 영향

RBL-2H3 cells에서 분비된 IL-4의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 0.93±0.47 pg/ml이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 7.24±1.80 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 증가를 나타내었다. 반면 CS (2 mg/ml)을 처리한 세포에서 1.88±2.13 pg/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 감소를 보였다.

RBL-2H3 cells에서 분비된 TNF-α의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 9.01±0.71 pg/ml이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 33.30±2.09 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 증가를 나타내었다. 반면 CS (2 mg/ml)을 처리한 세포에서 16.72±0.77 pg/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 감소를 보였다(Fig. 3).

4. IL-4 mRNA와 TNF-α mRNA 발현에 대한 영향

RBL-2H3 cells에서의 IL-4와 TNF-α의 mRNA의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, CS(2 mg/ml)을 처리한 세포에서 IL-4와 TNF-α mRNA의 발현이 현저하게 감소하는 것으

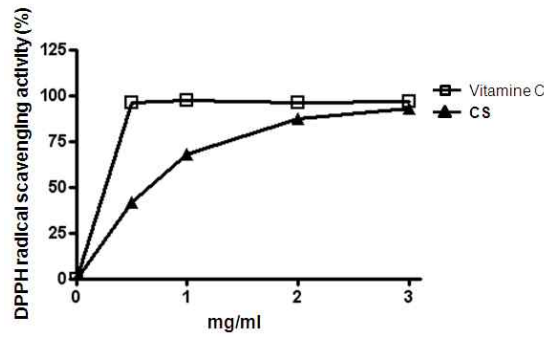


Fig. 6. DPPH radical scavenging activity of CS.

The reaction mixture contained 0.1 ml of 1 mM DPPH radical solution, 0.8 ml of 99% ethanol, and 0.1 ml of CS. The scavenging capacity was measured by monitoring the decrease in absorbance at 517 nm. All data are expressed as % inhibition of the inhibition of DPPH radical. Inhibition(%)=(C-T)/C×100, C; control, T; test sample

로 나타났다(Fig. 4).

5. FceRI 활성화에 의해 유도된 ROS 생산에 대한 영향

RBL-2H3 cells에서의 항원자극에 의해 유도된 ROS의 양을 조사한 결과, 40분, 50분, 및 60분 후 항원자극을 하지 않은 세포에서 ROS 증가율은 각각 35.36±3.17%, 36.42±0.90%, 및 37.41±1.41%이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 ROS 증가율은 각각 41.47±3.30%, 50.80±18.82%, 및 45.47±6.12%로 증가하였으며, CS (2 mg/ml)을 처리한 세포에서 ROS 증가율은 각각 26.88±3.20% (p<0.05), 26.86±2.32%, 및 26.06±2.60% (p<0.05)로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

6. DPPH 라디칼 소거능에 대한 영향

CS의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH 라디칼 소거능에 대해 조사한 결과 Vitamine C는 0.5, 1, 2, 및 3 mg/ml의 농도에서 각각 96.3, 97.6, 96.3, 및 96.5%로 나타났다, CS는 0.5, 1, 2, 및 3 mg/ml의 농도에서 각각 41.6, 68.1, 87.4, 및 92.8%로 나타났다 Vitamin C와 유사하게 강한 free radical 소거활성을 보였다(Fig. 6).

IV. 考 察

모과나무(*Chaenactis sinensis* Kochne)는 장미과에 속하는 낙엽교목으로서 높이가 10m에 달한다¹¹⁾. 일반적으로 한국에서 모과라 함은 *C. sinensis*의 성숙한 과실을 건조한 것을 일컫으며 중국에서는 이것을 광피목과라 하며 일본에서는 *C. lagenaria*의 성숙한 과실을 모과라 하며 *C. japonica*를 화목과라 칭하고 있다¹³⁾. 모과나무의 열매

는 진해, 진통 이수약으로 脚氣浮腫 四肢轉筋 霍亂 久咳 등의 증상에 응용되고 있으며 그 종자는 霍亂 煩燥 등에 사용되고 있다¹⁴⁾.

한의서에서는 性溫 味酸 無毒하며 肝脾經으로 들어가 舒筋活絡, 化濕和胃 祛風鎮痛 祛痰 消水腫하는 효능이 있어 임상상 濕痺脚氣 風濕筋骨痺痛 腰膝關節酸重疼痛 水腫 癰亂大吐下 轉筋不止 心腹痛 등에 사용하여 왔다¹⁵⁻⁸⁾.

소아는 臟腑機能과 衛外機能이 취약하여 질병의 이환과 전변이 쉬우며, 특히 外因으로 六淫의 侵襲과 內因으로 음식에 상하는 것이 쉬우므로 특히 脾肺의 병증이 가장 많다¹⁹⁾. 최근에는 맛벌이 부부의 증가 등으로 인하여 어린이집이나 유치원 등에서 조기에 공동생활이 이루어지므로 특히 호흡기 질환이 반복된 감염으로 만성 호흡기 허약증을 나타내는 아이들을 임상에서 자주 접하게 된다.

저자는 모과의 溫酸한 氣味가 호흡기 허약이나 호흡기 질환의 허증 상태 또한 만성 알레르기성 질환을 가진 소아들에게 있어 生津과 祛痰을 통해 補肺시킴으로써 염증상태를 개선할 수 있으며 방향성이 좋아 방향제나 흡입제 등 다양하게 활용할 수 있으리라 생각되었다.

모과에 대한 연구로는 모과의 정미 성분인 polyphenol, 아미노산, 유기산 및 당 함량측정, 모과의 휘발성과 비휘발성 향기성분 분석, 모과주류의 생리기능성, 모과의 가공에 관한 연구 등²⁰⁻²⁾이 있고, 항균, 항응혈, 항산화 작용, 간독성 보호 등²⁴⁻⁶⁾에 관한 효능 연구가 보고되고 있다.

알레르기성 질환은 현대사회의 산업화에 따른 환경오염, 식생활의 변화, 그리고 유전적인 영향 등의 복합

적인 원인으로 그 발병율은 남녀노소를 불문하고 급격히 증가하고 있다²⁷⁾. 일상생활에서 흔히 볼 수 있는 애완동물과의 접촉, 음식물이나 약물의 복용, 자동차 배기가스나 매연 등의 호흡물질로 인해 우리 몸의 면역체계가 민감하게 반응함으로써 면역글로불린의 하나인 IgE가 과도하게 생성되고, 이에 따라 여러 가지 매개 물질들의 유리와 염증세포의 침윤을 복합적인 원인으로 추측하고 있다²⁸⁾.

비만세포는 피부, 림프관 주위, 호흡기, 혈관 주위, 위장관의 점막, 뇌 등 전신의 장기에 분포하고 있으며 천식이나 알레르기성 비염과 같은 알레르기 반응을 매개하는 중요한 세포이다³⁰⁾. 이 세포는 표면의 IgE 수용체에 IgE 항체와 multivalent antigen이 결합할 때 특이적으로 antigen과 FcεRI의 cross-linking으로 활성화되면 비만세포의 과립 내에 화학매개체(histamine, proteoglycan, serine protease, carboxypeptidase A, sulfatase, exoglycosidases) 등과 특이적인 사이토카인을 분비하면서 알레르기 염증의 초기 반응과 후기 반응을 일으킨다. 게다가 이러한 화학매개체들이 세포 속으로 지속적으로 생성되고 방출되면 만성적으로 염증반응을 일으킨다^{29,30)}.

Histamine은 비만세포의 과립으로부터 가장 빠르게 유리되는 화학매개체로서 말초혈관에 대한 투과성 항진과 확장작용, 기관지 평활근에 대한 수축작용, 점막 표면에 대한 선상세포의 분비항진 작용 등을 나타내어 과민반응 및 만성 염증을 일으킨다^{31,32)}.

RBL-2H3 cells은 mucosal type mast cell과 유사한 특징들을 나타내고, 세포표면에 수십만 개의 IgE수용체가 존재한다. IgE에 감작된 후에 이 세포는 항원에 반응하고 histamine을 방출하는데 b-hexosaminidase는 비만세포의 분비과립에 저장되어 있다가, 비만세포가 면역학적으로 활성화될때 histamine과 함께 부수적으로 분비되므로 b-hexosaminidase의 활성화는 비만세포 탈과립의 표지인자로서 사용된다^{33,34)}. 따라서 RBL-2H3 cells은 histamine과 b-hexosaminidase 분비에 알려지지 않은 약물의 효과를 연구하는데 좋은 실험모델로 알려져 있다.

본 실험에서 CS가 RBL-2H3 cells의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였는데 아무런 처리를 하지 않은 대조군에서 1.11±0.15의 흡광도를 나타내었으나, CS (1, 2, 3, 4 and 5 mg/ml)의 농도를 처리한 세포에서 각각 1.35±0.10, 1.34±0.03, 1.27±0.10, 1.26±0.05 및 1.06±0.04의 흡광도를 나타내어 모든 농도에서 정상세포에 비해 세포생존률의 감소를 보이지 않았다(Fig. 1).

항원-항체 결합단계의 RBL-2H3 cells에서 누출된 β-hexosaminidase의 양은 항원 자극 후 시간별로 관찰하였는데 항원자극 10분, 30분 및 60분 후 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 각각 0.09±0.00, 0.10±0.01, 0.10±0.01의 흡광도를 나타내었으나, 항원으로 자극한 세포에서 각각 0.16±0.00, 0.20±0.00, 0.21±0.00의 흡광도를 나타내어 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 증가를 나타내었으며, CS (2 mg/ml)을 처리한 세포에서 0.14±0.00, 0.17±0.00, 0.18±0.01의 흡광도를 나타내어 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 감소를 보였다(Fig. 2A).

항체-수용체 결합단계에서 RBL-2H3 cells에서 누출된 β-hexosaminidase의 양도 항원 자극 후 시간별로 관찰하였는데, 항원자극 10분, 30분 및 60분 후 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 각각 0.09±0.00, 0.10±0.01, 0.10±0.00의 흡광도를 나타내었으나, 항원으로 자극한 세포에서 각각 0.15±0.00, 0.20±0.00, 0.21±0.00의 흡광도를 나타내어 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한(p<0.05) 증가를 나타내었으며, CS (2 mg/ml)을 처리한 세포에서 0.12±0.00, 0.17±0.00, 0.17±0.00의 흡광도를 나타내어 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 감소를 보였다(Fig. 2B). 그러므로 CS는 세포 생존률 감소를 보이지 않는 농도하에서 β-hexosaminidase의 유리를 억제한다고 볼 수 있다.

IL-4는 즉시형 과민반응의 매개자인 IgE와 비만세포 매개성 면역반응의 조절자로 IL-4의 생산 증가는 알러지의 발생에 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁵⁾.

RBL-2H3 cells에서 분비된 IL-4의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 0.93±0.47 pg/ml이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 7.24±1.80 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 증가를 나타내었다. 반면 CS (2 mg/ml)을 처리한 세포에서 1.88±2.13 pg/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 감소를 보였다.

비만세포에서 유리된 TNF-α는 국소의 혈관내피세포에 작용하여 백혈구의 혈관외 유주를 유도하는 것으로서 특히 알러지 국소의 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다³⁶⁾.

RBL-2H3 cells에서 분비된 TNF-α의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 9.01±0.71 pg/ml이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 33.30±2.09 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 증가를 나타내었다. 반면 CS (2 mg/ml)을 처리한 세포에서 16.72±0.77

pg/ml로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 3).

또한 RBL-2H3 cells에서의 IL-4와 TNF- α 의 mRNA의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, CS (2 mg/ml)을 처리한 세포에서 IL-4와 TNF- α mRNA의 발현이 현저하게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

활성산소종(reactive oxygen species)과 활성질소종(reactive nitrogen species)에 의한 oxidative stress는 생체내 여러 가지 세포의 작용을 조절하는 염증 반응과 깊이 관련되어 있다. 이들은 반응 시간이 매우 짧은 반면에 반응력은 매우 커서 세포 내의 여러 구성 성분인 지질, 단백질 핵산 그리고 DNA를 산화시켜 염증을 유발하고 세포사를 일으키며 고혈압, 동맥경화 심부전, 류마티스 관절염, 알레르기, 암 등에 깊이 관련되어 있다³⁷⁻⁴⁰).

BL-2H3 cell은 항원에 의해 자극을 받으면 FcεRI cross-linking에 의해 ROS를 생산하여 세포외로 방출하며, FcεRI활성으로 유도된 세포내 ROS는 calcium 유출과 매개물질 분비 조절에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다^{8,9}).

본 실험에서는 세포내 ROS의 양을 측정하기 위해 H2DCF-DA를 사용하였는데, 이는 ROS 측정에 특이적인 세포에 침투가 가능한 형광 탐촉자이다. 형광을 띠지 않는 H2DCF-DA는 세포내 에스테르 활성에 의해 디아세틸화되고 ROS에 의한 세포내 산화를 통해 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 형광을 띠게 된다.

CS처치에 의한 세포내 ROS 생산의 영향을 알아보기 위하여 세포내 ROS양을 H2DCF-DA fluorescent probe를 사용하여 측정하였는데, RBL-2H3 cells에서의 항원자극에 의해 유도된 ROS의 양을 조사한 결과, 40분, 50분, 및 60분 후 항원자극을 하지 않은 세포에서 ROS 증가율은 각각 $35.36 \pm 3.17\%$, $36.42 \pm 0.90\%$, 및 $37.41 \pm 1.41\%$ 이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 ROS 증가율은 각각 $41.47 \pm 3.30\%$, $50.80 \pm 18.82\%$, 및 $45.47 \pm 6.12\%$ 로 증가하였으며, CS (2 mg/ml)을 처리한 세포에서 ROS 증가율은 각각 $26.88 \pm 3.20\%$ ($p < 0.05$), $26.86 \pm 2.32\%$, 및 $26.06 \pm 2.60\%$ ($p < 0.05$)로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

인체 내의 항산화 방어계는 항산화 효소계와 비효소적 항산화 물질들로 이루어져 있다. 항산화 효소계는 자유 라디칼의 초기 생성을 억제하고 이미 생성된 자유 라디칼에 대해서는 항산화 물질들이 산화 연쇄 반

응을 차단함으로써 우리 인체 내에서 항산화 물질과 과산화물질, 자유기 등의 산화 촉진물질 사이에 균형이 유지되게 한다. 그러나 항산화 영양소의 부족한 섭취와 환경오염, 자외선 또는 부적절한 운동, 스트레스, 흡연, 음주 등의 잘못된 생활습관은 인체의 산화적 스트레스를 증가시키고 항산화 방어계의 교란을 초래하게 된다⁴¹).

CS의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH 라디칼 소거능에 대해 조사한 결과 Vitamine C는 0.5, 1, 2, 및 3 mg/ml의 농도에서 각각 96.3, 97.6, 96.3, 및 96.5%로 나타났으며, CS는 0.5, 1, 2, 및 3 mg/ml의 농도에서 각각 41.6, 68.1, 87.4, 및 92.8%로 나타나 Vitamin C와 유사하게 강한 free radical 소거활성을 보였다(Fig. 6).

이러한 결과는 CS에 의한 세포내 ROS 생산의 억제는 강한 항산화 활성에 기인하는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해 보면 모과는 알레르기 염증반응을 일으키는 사이토카인의 분비를 통제하고 강한 항산화 작용이 있어 제반 알레르기성 질환의 치료 및 관리에 효과가 있으리라 생각된다.

V. 結 論

RBL-2H3 세포를 이용한 木瓜 추출물의 항알레르기 및 항산화 염증반응을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 木瓜 추출물은 β -hexosaminidase 분비를 감소시켰다.
2. 木瓜 추출물은 IL-4의 생산을 감소시켰다.
3. 木瓜 추출물은 TNF- α 생산을 감소시켰다.
4. 木瓜 추출물은 IL-4 mRNA와 TNF- α mRNA 발현을 억제시켰다.
5. 木瓜 추출물은 FcεRI 활성화에 의해 유도된 ROS 생산을 감소시켰다.
6. 木瓜 추출물은 DPPH 라디칼 소거 활성을 억제시켰다.

VI. 感謝의 글

이 논문은 2008학년도 동의대학교 연구년 지원에 의하여 연구되었음.

參考文獻

1. Adams LS, Seeram NP Aggarwal BB, Takada Y, Sand D, Heber D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J.Agr.Food Chem.* 2006;54:980-5.
2. Ahn DG, Illustrated book of korean medicinal herbs. Seoul:kyohak publishing Co. 2000;742.
3. Jung KH, Kim MJ, Ha E, Uhm YK, Chung JH, Yim SV. Suppressive effect of Punica granatum on the production of tumor necrosis factor in BV2 microglial cells. *Biol.Pharm.Bull.* 2006;29:1258-61.
4. Lansky EP, Newman RA. Punica granatum and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J.Ethnopharmacol.* 2007;109:177-206.
5. Li Y, Qi Y, Huang TH, Yamahara J, Roufogalis BD. Pomegranate flower : A unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR-alpha/gamma activator properties. *Diabetes Obes. Metab.* 2008;10:10-7.
6. Marletta MA, Tayeh MA, Hevel JH. Unraveling the biological significance of nitric oxide. *Bidfactors.* 1009;2:219-25.
7. Wolfreys K, Oliviera D. Alterations in intracellular reactive oxygen species generation and redox potential modulate mast cell function. *Eur. J. Immunol.* 1997;27:297-306.
8. Gushchin I, Petyaev I, Tsinkalovsky O. Kinetics of oxygen metabolism indices in the course of histamine secretion from rat mast cells. *Agents Actions,* 1009;30:85-8.
9. Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem. Sci.* 200;25:7-9.
10. 이상인, 안덕균, 신민교, 이영중. 한약임상응용. 서울:성보사. 1986:182-3.
11. Lee C B. Forest Economics-mokchogangmok, korean plant map. Hyangmunsa. 1982:133.
12. Itoh T, Umekawa H, Furuichi Y. Potential ability of hot water adzuki (*Vigna angularis*) extracts to inhibit the adhesion, invasion, and metastasis of murine B16 melanoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005; 69(3):448-54.
13. 難波恒雄. 原色和漢藥圖鑑. 保育社. 大阪. 1980:195.
14. 赤松金芳. 新訂 和漢藥. 東京:醫齒藥出版社. 1970: 355.
15. 전국한의과대학 공동교재 편찬위원회. 본초학. 서울:영림사. 1007:315-6.
16. 김창민 등. 중약대사전. 서울:정담. 1998:1688-94.
17. 이상인. 본초학. 서울:의약사. 1975:179-180
18. 허준. 동의보감. 서울:법민문화사. 1999:1888-9.
19. 김덕곤 외. 동의 소아과학. 서울:정담. 2002:29.
20. Kim YS, Lee SW, Lee KR Cho SY, Lee JH. Studies on the tasty constituents in various foodstuffs. *Korean J. Food Sci Technol* 3. 1971:163-7.
21. Chung TY, Cho DS, Song JC. Nonvolatile/volatile flavor components in chinese auinine. *Korean J. Food Sci Technol.* 20:293-302.
22. Lee DH, Kim JH, Kim NM, Choi JS, LJS. Physiological functionality of chinese quinine wine and liquors. *Korean J Biotechnol Bioeng.* 2002;17:266-70.
23. 이태진 등. 목과 호장근 및 유향 추출물이 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 nitric oxide 생성에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2006;20(3):603-8.
25. 유지현, 한신희, 길기정. 모과 추출물의 항응혈 활성. *대한본초학회지.* 2009;24(2):7-11.
24. 이유미, 신덕형, 이재준, 이명렬, 모과 에탄올 추출물의 항산화 효과. *Koeran J.Food Preserv.* 2007;14(2); 177-82.
25. 이유미, 이재누, 신덕형, 이명렬. 에탄올에 의해 유발된 간독성에 대한 모과 추출물의 보호 효과. *J Korean Soc Food SCI Nutr.* 2006;35(10):1336-42.
26. Metcalfe DD, Kaliner M, Donlon MA. The mast cell. *Crit. Rev. Immunol.* 1981;3;23-74.
27. Ahn K. Role of mast cells in allergic inflammation and innate immunity. *Korean J. Pediatr.* 2004;47;1137-41.
28. Marshall JS. Mast cell responses to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4;787-99.
29. Nadler MJ, Matthews SA, Turner H, Kinet JP. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor FcεRI: Coupling form to function. *Adv. Immunol.* 2000;76;325-55.
30. Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cells in innate immunity. *Immunol. Rev.* 2000;173;131-40.
31. Petersen LJ, Mosbech H, Skov PS. Allergen-induced histamine release in intact human skin in vivo assessed by skin microdialysis technique: Characterization of factors influencing histamine releasability. *J. Allergy Clin. Immun.* 1996;97;672-9.

33. Marquardt DL, Wasserman SI. Modulation of rat serosal mast cell biochemistry by in vivo dexamethasone administration. *J Immunol.* 1983;131:934-9.
34. Mastuda 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;10:3123-8.
35. 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.
36. 이중달. 그림으로 설명한 병리학. 서울: 고려의학. 1991:29.
37. De Martinis M, Franceschi C, Monti d, Ginaldi L. Inflammation-ageing and lifelong antigenic load as major determinants of aging rate and longevity. *FEBS Lett.* 2005;579:2035-9.
38. Ginaldi L, De Martinis M, Monti D, Franceschi C. Chronic antigenic load and apoptosis in immunosenescence. *trends Immunol.* 2005;26:79-84.
39. Virag LE, Szabo Gergely and C Szabo. Peroxynitrite induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett.* 2003;140-1:113-24.
40. Balavoine GGA and YV Geletii. Peroxynitrite scavenging by different antioxidants part I: convenient assay, Nitric Oxide: Biology and Chemistry 1999;3:40-54.
41. Davis KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc Symp.* 1999:21-36.