

오매 (烏梅)의 다성분 동시분석 및 항알러지 효과

서창섭¹ · 하혜경¹ · 이호영¹ · 이준경^{1,2} · 정다영¹ · 이진아^{1,3} · 신현규^{1*}

¹한국한의약연구원, ²한풍제약, ³이화여자대학교

Simultaneous Analysis and Anti-allergic Effect of Mume Fructus

Chang-Seob Seo¹, Hyekyung Ha¹, Ho Young Lee¹, JunKyung Lee^{1,2}, Dayoung Jung¹,
Jin-Ah Lee^{1,3} and Hyeun Kyoo Shin^{1,*}

¹Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Yuseongdae-ro 1672,
Yuseong-gu, Daejeon, 305-811, Korea

²Department of medical supplies development, HANPOONG PHARM & FOOD Co. Ltd, Jeonju, Republic of Korea

³College of Pharmacy Division of Life and Pharmaceutical Science Ewha Womans University,
Ewhayodae-gill 52, Seodaemun-gu, Seoul 120-750, Republic of Korea

Abstract – The Mume Fructus (MF) has been used for relieves cough, arrests chronic diarrhea, treat fluid depletion, and treat ascariasis in Korea. In this study, a high-performance liquid chromatography (HPLC) method was established for simultaneous determination of six main components of MF. Additionally, we were investigated the anti-inflammatory and anti-allergic effects of MF extract on lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW264.7 cells and tumor necrosis factor (TNF)- α /interferon (IFN)- γ -treated HaCaT cells. The analytical column for separation was used a Gemini C₁₈ column maintained at 40°C. The mobile phase consisted of 1.0% (v/v) acetic acid in water (A) and 1.0% (v/v) acetic acid in acetonitrile (B). The flow rate was 1.0 mL/min and the detector was a photodiode array (PDA) set at 280 nm and 320 nm. We evaluated the inhibitory effect of MF extract on the production of inflammatory markers, nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) in LPS-stimulated RAW264.7 cells and thymus- and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) in TNF- α /IFN- γ -treated HaCaT cells, respectively. We confirmed the genes expression related with TARC, macrophage-derived chemokine (MDC/ CCL22) and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES/CCL5) in HaCaT keratinocyte cells by MF extract. The contents of the five compounds in MF were 0.22-1.01 mg/g. Also, the MF extract show inhibition of about 78% and 75% on NO and PGE₂ production at the concentration 1000 mg/mL in RAW264.7 cells. MF extract suppressed the hTARC level and genes expression such as TARC, MDC, and RANTES on TNF- α /IFN- γ -treated HaCaT cells.

Key words – Mume Fructus, Simultaneous analysis, Anti-allergy, RAW264.7 cell

烏梅(Mume Fructus)는 장미과(Rosaceae)로 매실나무 (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)의 덜익은 열매를 연기를 쪄여 훈증시킨 것으로 한국, 중국 및 일본에 주로 분포하고 있으며, 예로부터 斂肺止咳, 瀉腸止瀉, 生津止渴, 安蛔, 固崩止血 등에 사용되었다.¹⁾ 烏梅의 화학적 성분으로는 3-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid 및 5-O-caffeoylquinic acid 등과 같은 chlorogenic acid 유도체²⁾와 oxalic acid, tartaric acid, malic acid, vitamin C, citric acid 및 succinic acid 등과 같은 유기산³⁾ 및 5-hydroxymethyl-2-

furaldehyde (5-HMF)⁴⁾ 등이 보고되었다. 烏梅 추출물을 이용한 생리활성 연구로는 혈당강화 효과,⁵⁾ 간암 및 자궁암 세포 증식 억제에 대한 효과,⁶⁾ 살모넬라균의 생육 억제 효과⁷⁾ 등이 보고되었다. 그러나 烏梅를 이용한 항알러지 효과에 대한 연구는 미비한 실정이다. 알러지는 과민성 면역 반응으로 표적기관에 염증이 형성되어 발생된다고 알려져 있다. 세포내 염증 반응은 lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1 (IL-1) 및 tumor necros factor- α (TNF- α) 등에 의해서 macrophage나 monocyte에서만 발생하며 그 표적 부위에 prostaglandine (PG)과 leukotriene (LT) 등과 같은 혈관 활성물이 유리되어 혈관 투과성이 증가하면서 염증 반응이 나타난다.⁸⁾ Pro-inflammation 반응이 진행되면 phospholipase

*교신저자 (E-mail): hkshin@kiom.re.kr
(Tel): +82-42-868-9464

A2 (PLA2)가 활성화 되어 phospholipid가 arachidonic acid로 분해되고 prostaglandin H synthase인 cyclooxygenase (COX)의 활성화로 PG로 변환되거나 nitric oxide synthase (NOS)가 활성화 되어 NO를 생성한다.⁹⁾ PGs는 염증 반응의 실질적인 역할을 한다고 알려져 있다.¹⁰⁾ COX의 3가지 type 중 COX-2는 COX-1 및 3과 다르게 endotoxin, cytokine, growth factor 및 종양 같은 염증 반응에 관여하며 만성 염증 질환에서 많이 나타난다고 보고되고 있다.¹¹⁾

본 연구에서는 폐기를 수렴시켜 기침을 멎게 하고, 오랜 설사를 그치게 하며 회충으로 인한 구토와 복통을 없애주는 데 사용되는 烏梅의 품질관리에 기초 자료를 제공하고자 선정하였다. 또한 烏梅의 70% EtOH 추출물에 대한 RAW264.7과 HaCaT 세포에서의 염증효과와 아토피 관련 유전자인 TARC, MDC 및 RANTES의 mRNA 발현과 관련된 항알러지 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 烏梅(Mume Fructus, 중국)는 (주)HMAX (Jecheon, Korea)에서 규격품을 구입한 후 이 제현 교수(Dongguk University, Gyeongju, Korea)로부터 감별 받은 후 사용하였으며, 한약재 표본(2008-ST18)은 한국 한의학연구원 한약기초연구그룹에 보관하였다.

시약 및 기기 - 분석에 사용된 표준물질인 5-HMF, neochlorogenic acid 및 cryptochlorogenic acid는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, chlorogenic acid와 4-hydroxycinnamic acid는 Acros Organics (Pittsburgh, PA, USA)와 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)로부터 각각 구입하였다. 각 표준물질의 순도는 99.0% 이상이었다. HPLC 분석을 위한 물, 아세트나이트릴 및 메탄올은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, 초산은 특급시약으로 Junsei (Tokyo, Japan)

에서 구입하여 사용하였다.

함량분석을 위한 HPLC는 Shimadzu사의 LC-20A 시리즈 (Kyoto, Japan)를 사용하였으며, 이 시스템은 pump (LC-20AT), on-line degasser (DGU-20A₃), column oven (CTO-20A), autosampler (SIL-20AC) 및 PDA detector (SPD-M20A)로 구성되어 있다. 분석 결과는 Shimadzu사의 software인 LCsolution software (Version 1.24)를 이용하여 처리하였다.

표준액의 조제 - 5-HMF, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid 및 4-hydroxycinnamic acid 등 5종의 표준품에 대한 표준용액은 무게를 정확하게 측정 한 후 메탄올로 녹여 모두 1.0 mg/mL의 농도로 조제한 후 4°C에 보관하면서 사용 전에 희석하여 사용하였다. 5종 성분에 대한 검량선은 모두 0.16-20.00 mg/mL의 농도 범위에서 피크 면적에 대하여 8가지 농도에 대해서 각각 작성하였다.

烏梅 추출물 및 검액의 조제 - 건조 및 분쇄된 烏梅 약 400 g을 70% 에탄올을 시료의 10배(w/v, 4 L)로 첨가하여 60분간 초음파 추출방법으로 3회 추출하였다. 추출액은 감압 농축 및 동결건조 하여 약 55.75 g (수율 13.94%)의 추출물을 얻었다. 추출물 40 mg을 정확히 측정 한 후 70% 에탄올을 넣어 20 mL로 맞춘 후 SmartPor GHP (0.2 µm pore size, Woongki Science, Seoul, Korea)로 여과하여 검액으로 하였다.

HPLC 분석조건 - 烏梅 내 주요성분인 5-HMF, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid 및 4-hydroxycinnamic acid의 동시 정량분석을 위해 Shimadzu사의 LC-20A 시리즈를 사용하여 분석하였다. 동시 분석을 위해 사용 된 칼럼은 Phenomenex사의 Gminin C₁₈ (5 µm, 4.6×150 mm, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였으며, 칼럼온도는 40°C로 유지하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 흘러 주었으며 주입량은 10 µL였다. 이동상은 1.0% (v/v) 초산이 함유된 물 (A)과 1.0% (v/v) 초산이 함유된 아세트나이트릴

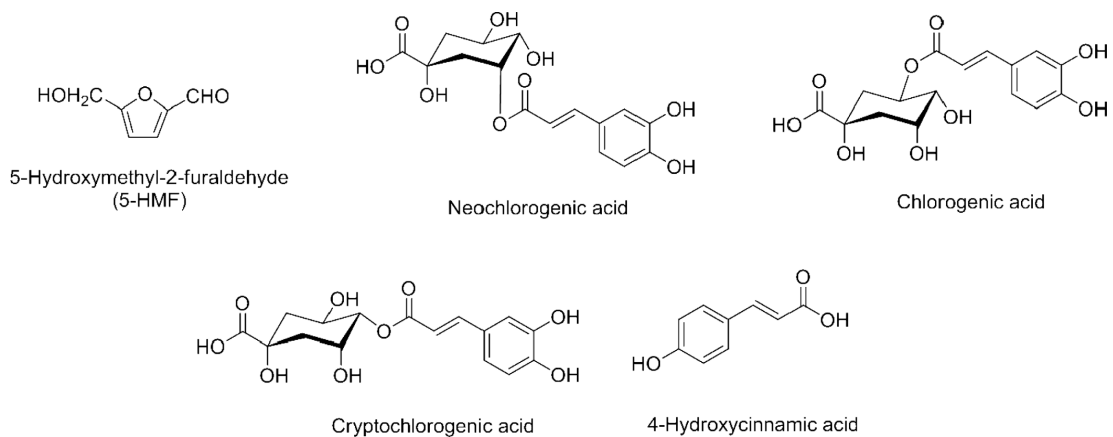


Fig. 1. Chemical structures of five constituents in Mume Fructus.

(B)을 사용하여 다음과 같이 기울기 용매조건 (10% B (0 min), 10% B (5 min), 50% B (30 min), 50% B (35 min), 10% B (40 min))으로 흘려주었으며, 검출파장은 280 nm와 320 nm에서 검출하였다.

세포 배양 - RAW264.7 세포주(mouse macrophage cell line)는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았고, HaCaT 세포주(human keratinocyte cell line)는 세종대학교 이나경 교수님(Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 사용하였다. RAW264.7과 HaCaT 세포는 각각 5.5% FBS 및 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂조건에서 배양하였다.

Murine Macrophage Cell Line (RAW264.7)과 Human Keratinocyte Cell Line (HaCaT)의 세포 독성 검색 - Murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포와 (ATCC, WA, USA)과 human keratinocyte cell line인 HaCaT 세포를 96-well plate에 각각 3×10³ cells/well과 1×10³ cells/well로 분주하고 약제 추출물을 1-1000 µg/mL 농도로 처리하였다. 24시간 배양 후 tetrazolium salt인 CCK-8 kit (Cell Counting Kit-8, Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan) solution을 첨가하여 4시간 더 배양한 다음 microplate reader (Benchmark plus, Bio-Rad, MN U.S.A)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control well의 흡광도에 대한 약물첨가 well의 흡광도 비를 %로 계산하였고, 여러 well의 평균값을 사용하였다. 계산식은 다음과 같다.

$$\% = (\text{약물첨가 well의 Abs}_{450\text{nm}} \text{ 평균값}) - (\text{Blank well의 Abs}_{450\text{nm}} \text{ 평균값}) / (\text{Control well의 Abs}_{450\text{nm}} \text{ 평균값}) - (\text{Blank well의 Abs}_{450\text{nm}} \text{ 평균값}) \times 100$$

RAW264.7 세포에서의 Nitric Oxide (NO) 생성량 측정 - NOS의 활성화에 의해 생성되는 NO의 양을 측정하여 항염증 활성을 검색 하였다. RAW264.7 세포를 48-well plate에 분주한 후 16시간 배양하여 안정화 시킨 후 negative control에는 배지만 처리하고 유발균에는 LPS (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)를 1 µg/mL 되도록 처리하였다.

약물 처리군에는 각 약물을 여러 가지 농도로 처리하고 모든 well에 최종 DMSO농도는 1%가 되도록 하였다. 양성 대조군으로 NOS inhibitor인 N^G-methyl-L-arginine (L-NMMA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 18시간 배양 후 상층액을 분리하고 NO 생성량 측정하기 위해 Griess reagent (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 그 방법에 따라 진행하였으며 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

RAW264.7 세포에서 Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성량 측정 - 시료의 처리로 PGE₂의 생성량이 감소하면 COX의 활성이 억제된 것으로 항염증 효능을 검증하였다. RAW264.7 세포를 48-well plate에 분주한 후 16시간 안정화 시킨 다음 negative control에는 배지만 처리하고 유발균에는 LPS를 1 µg/mL이 되도록 처리하고 약물 처리군에는 각 약물을 여러 가지 농도로 처리 하였다. 양성 대조군으로는 indomethacine (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하였으며 18시간 배양한 다음 arachidonic acid의 최종농도가 30 µM이 되도록 처리 후 상층액을 수집하고 PGE₂ 생성량을 측정하였다. PGE₂ 생성량은 PGE₂ Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)의 방법을 따라서 시행하였으며 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

HaCaT 세포에서의 아토피 관련 인자 발현 변화 - HaCaT 세포 1×10⁶ cells/mL로 6-well plate에 분주한 후 TNF-α/IFN-γ (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 각각 10 µg/mL씩 처리한 후 24시간 후 상층액에서 hTARC를 EIA (TARC Duo set, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 방법으로 검색하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR - HaCaT 세포를 위의 방법과 동일하게 처리 후 상층액을 제거하고 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였으며, 모든 실험은 RNase-free 상태에서 진행하였다. cDNA 합성은 iScript select cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하였으며, 1.5 µg의 total RNA를 oligo(dT)20 primer, iScript reverse transcriptase로 42°C에서 70분, 85°C

Table 1. The sequence of primers and fragment sizes on the investigated genes in RT-PCR analysis

Gene		Primer sequences	Fragment size (bp)
MDC	Sense	5'-AGGACAGAGCATGGCTCGCCTACAGA-3'	362
	Antisense	5'-TAATGGCAGGGAGGTAGGGCTCCTGA-3'	
TARC	Sense	5'-ACTGCTCCAGGGATGCCATCGTTTTT-3'	270
	Antisense	5'-ACAAGGGGATGGGATCTCCCTCACTG-3'	
RANTES	Sense	5'-CCCCGTGCCACATCAAGGAGTATTT-3'	313
	Antisense	5'-CGTCCAGCCTGGGAAGTTTTTGTGTA-3'	
GAPDH	Sense	5'-AAGGGTCATCATCTCTGCCC-3'	204
	Antisense	5'-GTGATGGCATGGACTGTGGT-3'	

에서 5분 반응으로 진행하였다. TARC, MDC 및 RANTES 발현변화를 검색하기 위하여 PCR 반응을 진행하였으며 housekeeping gene으로 GAPDH를 사용하였다. 각 primer는 Table I과 같다. PCR은 iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 각각의 primer에 대해 94°C에서 30초, 55~60°C에서 30초, 72°C에서 2분이며 PCR에 의해 생성된 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ChemiDoc™ XRS⁺ imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 band를 확인하였다.

통계처리 - 실험결과 자료의 통계처리는 SYSTAT 프로그램(SYSTAT Version 8.0 SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하고 각 군 간의 차이를 검증하기 위하여 Bonferroni multiple comparison test를 이용하여 사후분석을 실시하였다. 통계학적인 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결과 및 고찰

분석조건의 확립 - 烏梅의 주요성분인 5-HMF, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid 및 4-hydroxycinnamic acid 등 5종의 성분을 분석 대상으로 각각 1.0% (v/v) 초산이 함유된 물 (A)과 아세트나이트릴 (B)의 이동상을 이용하여 기용기 용매 조건으로 분리능 2.0이상으로 20분 이내에 모두 분리하였다. PDA 검출 파장은 5-HMF는 280 nm, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid 및 4-hydroxycinnamic acid는 320 nm에서 각각 검출하였다. 검액에서의 피크 확인은 표준물질의 피크 머무름 시간과 UV 흡수 파장을 비교하여 확인하였다. 5-HMF, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid 및 4-hydroxycinnamic acid 등 5종의 성분은 5.61분, 7.41분, 11.61분, 13.03분 및 18.03분에 각각 검출되었다(Fig. 2).

함량분석 - 烏梅의 주요성분에 대한 함량분석을 위한 검량선은 상관계수(r^2)를 구하여 직선성을 판단하였으며, 5종 성분에 대한 검량선 작성 결과 상관 계수(r^2) 값이 0.9998 이상으로 1.0에 가까운 양호한 직선성을 나타내었다. 검출

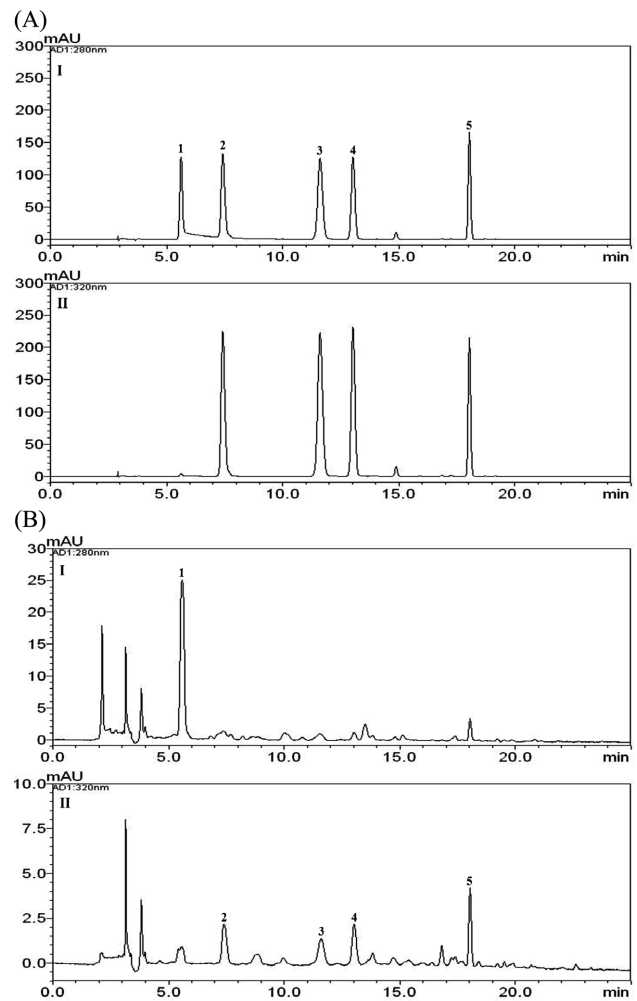


Fig. 2. HPLC chromatogram of a standard mixture (A) and Mume Fructus extract (B) at 280 nm (I) and 320 nm (II). 5-HMF (1), neochlorogenic acid (2), chlorogenic acid (3), cryptochlorogenic acid (4), and 4-hydroxycinnamic acid (5).

한계와 정량한계는 신호(signal; S) 대 잡음(noise; N) 비를 이용하여 각각 3과 10을 기준으로 정하였다. 이들 5종 성분에 대한 검출한계와 정량한계는 15.01-56.01 ng/mL와 50.22-186.70 ng/mL로 각각 나타났다(Table II). 설정된 HPLC-

Table II. Linearities, correlation coefficients, LODs, and LOQs for marker compounds (n=3)

Compound	Linear range (µg/mL)	Slope	Intercept	Correlation coefficient	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Repeatability (RSD, %)	
							Retention time	Peak area
5-HMF	0.16-20.00	80749.38	-6796.37	0.9998	21.17	70.58	0.05	0.85
Neochlorogenic acid	0.16-20.00	25490.13	-2111.69	0.9999	56.01	186.70	0.03	0.82
Chlorogenic acid	0.16-20.00	34164.62	-3030.68	0.9999	54.18	180.59	0.02	0.79
Cryptochlorogenic acid	0.16-20.00	27214.97	-2587.90	0.9999	51.67	172.23	0.02	0.83
4-Hydroxycinnamic acid	0.16-20.00	36291.27	-2435.33	0.9999	15.01	50.22	0.02	0.67

Table III. Analytical results (mg/g) of the five compounds in Mume Fructus

Compound	Content (mg/g)		
	Mean	SD	RSD (%)
5-HMF	1.01	0.01	0.79
Neochlorogenic acid	0.32	0.00	0.61
Chlorogenic acid	0.22	0.00	0.59
Cryptochlorogenic acid	0.29	0.00	0.39
4-Hydroxycinnamic acid	0.24	0.00	0.44

PDA 동시 분석법으로 烏梅의 5종 성분에 대한 함량 분석을 실시한 결과 5-HMF가 1.01 mg/g, neochlorogenic acid가 0.32 mg/g, chlorogenic acid가 0.22 mg/g, cryptochlorogenic acid가 0.29 mg/g 및 4-hydroxycinnamic acid가 0.24 mg/g로 나타났다(Table III).

세포 독성 - 烏梅 추출물의 세포 독성 농도를 검색한 결과, 처리 최고농도인 1000 µg/ml에서 RAW264.7 세포에 대해 대조군의 199.17±1.86%, HaCaT 세포에 대해 130.39±9.80%로 두 가지 세포에서 독성이 나타나지 않았다. 이후 모든 실험에서 1000 µg/mL를 최고 농도로 하여 실험에 적용하였다(data not shown).

RAW264.7 세포에서 NO 생성 억제 효과 - 활성산소 중 하나이며, 염증 유발에 중요한 역할을 하는 NO는 LPS 처리에 의해 배양액 중 유리된 NO 농도를 NO₂의 형태로 측정하였다. 양성 대조군으로 사용된 NMMA의 IC₅₀는 43.71 nM로 나타났으며, 특히 200 µM에서는 LPS 유발군보다 약 80% 억제되는 것으로 나타났다. 烏梅 추출물을 20-1000 µg/mL로 처리 시, 농도 의존적으로 NO의 생성이 억제되는 것으로 나타났고(IC₅₀ = 427.08 µg/mL) 1000 µg/mL에서 약 78%의 NO 생성 억제 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 3).

RAW 264.7 세포에서 PGE₂ 억제 효과 - PGE₂는 염증 매개물의 대사과정에서 간접하여 염증반응을 유도하는 작용을 한다고 알려져 있다. COX-2 inhibitor로 알려진 indomethacin은 농도 의존적으로 PGE₂ 생성을 억제하며 20 ng/mL에서는 유발군에 비해 약 86% 감소되었다. 烏梅 추출물(100-1000 µg/mL) 처리 결과, 농도 의존적으로 PGE₂ 생성이 억제되었고 특히 처리한 전체적인 농도에서 PGE₂를 억제함을 확인하였다(Fig. 4). 烏梅 추출물은 NO생성 억제뿐만 아니라 PGE₂ 생성 억제 반응을 통해 항염증 활성을 나타냄을 확인하였다.

HaCaT 세포에서 hTARC 억제 효과 - 본 연구에서는 두 가지의 양성 대조군, silymarin과 forskolin을 사용하여 烏梅 추출물에 대한 항 아토피 효과를 확인하고자 하였다. TI처리 후 hTARC 분비 억제 효과를 검색한 결과, 유발군인 TI군은 정상군(3.12±0.31 ng/mL)에 비해 약 7.9배 (24.79±2.01)

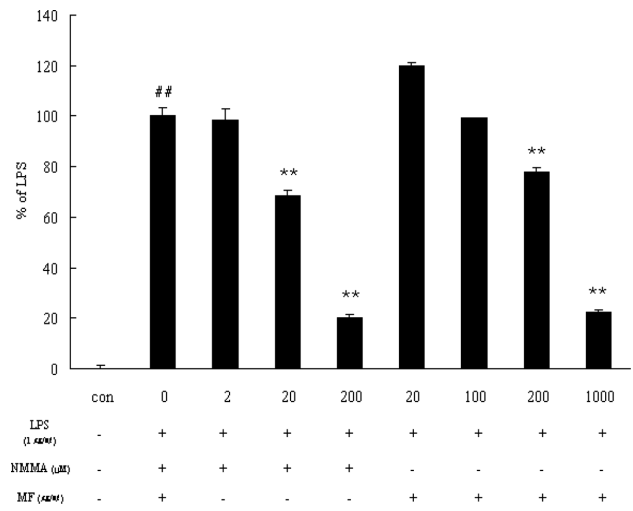


Fig. 3. Effect of Mume Fructus extracts (MF) on NO inhibition in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Cells were treated with LPS (1 µg/mL) for 18 hr in the presence or absence of MF extracts (##p<0.01 compare with control group, *p<0.05, **p<0.01 compare with LPS group).

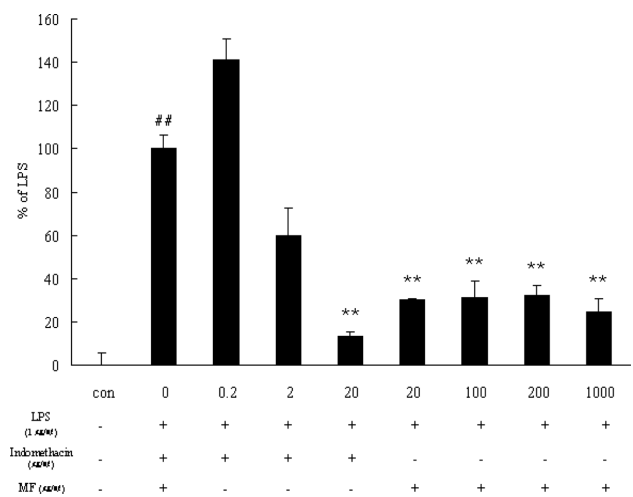


Fig. 4. Effect of Mume Fructus extracts (MF) on PGE₂ production in LPS-stimulated RAW264.7 cell. Cells were treated with LPS (1 µg/mL) for 18 hr in the presence or absence of MF (##p<0.01 compare with control group, *p<0.05, **p<0.01 compare with LPS group).

의 hTARC을 분비함을 확인 하였다. 양성대조군으로 사용된 silymarin을 20 µg/mL로 처리 시 9.46±0.98 ng/mL로 유발군에 비해 약 70%, forskolin을 30 µM로 처리 시 15.97±1.66 ng/mL로 약 41% 억제됨을 확인하였다. 烏梅 추출물은 200 µg/mL에서 약 54% (13.00±0.62 ng/mL)의 억제 효과를 나타내 양성 대조군인 forskolin에 비해 우수한 효과를 나타내었으며 최고농도인 1000 µg/mL에서는 6.97±0.81 ng/mL로 hTARC 생성을 약 82% 억제하였다(Fig. 5).

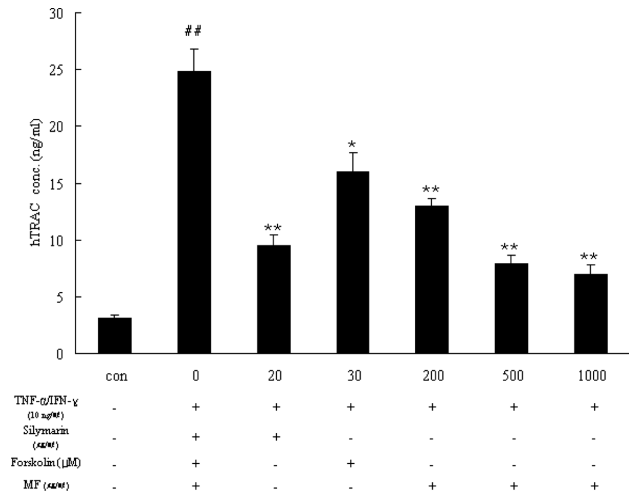


Fig. 5. Inhibitory effects of the Mume Fructus extracts (MF) on TNF-α plus IFN-γ-treated HaCaT cell. The HaCaT cells were incubated in medium containing MF treated with TNF-α plus IFN-γ (TI) (10 ng/mL, each) for 24 hr. MF significantly inhibited the production of TARC on the TI-treated HaCaT cells. The concentration of TARC in the supernatant was determined using TARC-specific ELISA assays (###p<0.01 compare with control group, *p<0.05, **p<0.01 compare with TI group).

HaCaT 세포에서 아토피 관련 유전자 발현 변화 – HaCaT 세포에 TI를 처리하면 TARC, MDC 및 RNATES의 발현이 증가됨을 확인하고 양성대조군인 silymarin (50 μg/mL)과 forskolin (30 μM)에서 각각의 유전자가 감소됨을 확인하였고 烏梅 추출물을 농도별로 처리 시 양성대조군인 silymarin의 억제 효과만큼 억제됨을 확인하였다(Fig. 6A). HaCaT 세포에 TI로 chemokine을 유도하고 烏梅 추출물을 처리한 결과, 烏梅 추출물은 MDC, TARC 및 RANTES의 발현을 농도 의존적으로 억제시킴을 확인 하였다(Fig. 6B, 6C, and 6D). 烏梅 추출물은 배양액에서 TARC 분비를 억제시킴과 동시에 염증이 유도된 HaCaT 세포에서 항아토피 유전자들의 발현을 억제한다는 것을 확인하였다.

결론

본 시험에 사용된 烏梅의 품질관리를 위해 주요성분인 5-HMF, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid 및 4-hydroxycinnamic acid 등 5종에 대하여 다성분 동시분석법을 확립하였다. 또한 烏梅 추출물의 NO와 PGE₂을 억제하는 항염증 효과와 HaCaT 세포에서의 알러지 관련 유전자인 TARC, MDC 및 RANTES 발현을 감소시키는 항아

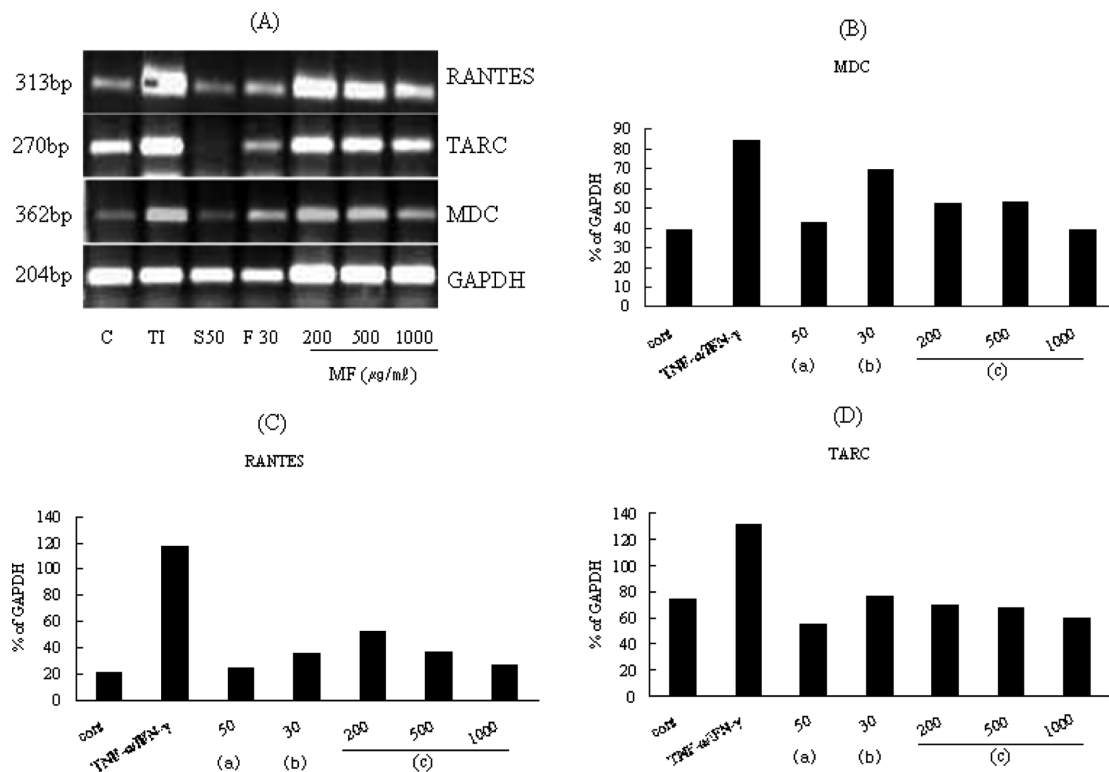


Fig. 6. The TARC, MDC and RANTES mRNA expression levels were determined by RT-PCR analysis and Mume Fructus (MF) suppressed the mRNA expression of TARC, MDC and RANTES. The picture of gene expressions on agarose gel (A), graph of density of genes of MDC (B), RANTES (C), and TARC (D). The cells were treated by the silymarin (50 mg/mL) (a), forskolin (30 μM) (b), and MF (200, 500, and 1000 μg/mL) (c).

토포 효과가 있음을 확인하였다. 이에 烏梅의 품질관리와 항염증 및 항아토포 효과에 대한 기전 연구에 필요한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 기초기술연구회에서 지원하는 ‘알러지 질환 치료 및 예방을 위한 천연 한방 소재 개발 (G10101)’과 한국 한의학연구원에서 지원하는 ‘표준한방처방 EBM 구축사업 (K11030)’에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 김호철 (2001) 한약약리학, 490-492. 집문당, 서울.
2. Xia, D., Wu, X., Shi, J., Yang, Q. and Zhang, Y. (2011) Phenolic compounds from the edible seeds extract of Chinese Mei (*Prunus mume* Sieb. Et Zucc) and their antimicrobial activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **44**: 347-349.
3. Zhanguo, C. and Jiuru, L. (2002) Simultaneous and direct determination of oxalic acid, tartaric acid, malic acid, vitamin C, citric acid, and succinic acid in Fructus Mume by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **40**: 35-39.
4. Lee, I. S., Han, C. H., Lee, C., Hwang, B. Y., Jung, S. H., Lee, Y. J. and Jeon, W. K. (2011) Simultaneous determination and acute toxicity study of Fructus Mume extracts in ICR mice. *Kor. J. Oriental Preventive Medical Society* **15**: 37-47.
5. Ko, B. S., Park, S. K., Choi, S. B., Jun, D. H., Jang, J. S. and Park, S. (2004) Hypoglycemic effects of crude extracts of *Prunus mume*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**: 951-957.
6. Jung, S. E. and Bae, J. H. (2002) The effect of *Prunus mume* extracts on the growth of HepG2 and HeLa cell lines. *Korean J. Nutr.* **35**: 439-445.
7. Seo, M. H. and Bae, J. H. (2002) Effect of butanol extracts from *Prunus mume* on the growth of *Salmonella typhimurium*. *Korean J. Nutr.* **35**: 926-391.
8. Han, J., Kim, Y., Sung, J., Um, Y., Lee, Y. and Lee J. (2009) Suppressive effects of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* flower extracts on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**: 1685-1690.
9. Chun, K. S. and Surh, Y. J. (2004) Signal transduction pathway regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem. Pharmacol.* **15**: 1089-1100.
10. Fu, J. Y., Masferrer, J. L., Seibert, K., Raz, A. and Needleman, P. (1990) The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocyte. *J. Biol. Chem.* **265**: 16737-40.
11. Shin, E. M., Zhou, H. U., Guo, L. Y., Kim, J. A., Lee, S. H., Merfort, I., Kang, S. S., Kim, H. S., Kim, S. and Kim, Y. S. (2008) Anti-inflammatory effect of glycyrol isolated from *Glycyrrhiza uralensis* in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **8**: 1524-1532.

(2012. 9. 7 접수; 2012. 10. 20 심사; 2012. 11. 2 게재확정)