

〈연구노트〉

## 머위(*Petasites japonicum*) 추출물의 항알레르기 효과

최 옥 범

정인대학 호텔조리영양과

### Anti-allergic Effects of *Petasites japonicum*

Ok-Beom Choi

Dept. of Hotel Culinary Arts and Nutrition, Chongin College, Jeongup 580-712, Korea

#### Abstract

It is well known that the *Petasites japonicum* have been used for a long time in traditional medicine for the treatment of allergic diseases such as lacquer poisoning and asthma. Anti-allergic actions of *Petasites japonicum* extracts were assessed by testing their effects on the degranulation of mast cells. For this, hexosaminidase released (degranulation marker) from RBL-2H3 cells(mast cell line) was used. At the concentration of 300  $\mu$ g/mL of the methanol, ethylacetate and hot water extract, the degranulation of RBL-2H3 cells were inhibited 83.33, 69.75 and 35.4%, respectively. These results suggest that the *Petasites japonicum* could be provide a effective resource for the control of allergic diseases.

Key words : *Petasites japonicum*, anti-allergic effects, hexosaminidase assay.

#### 서 론

알레르기성 질환으로는 기관지 천식, 고초염, 담마진, 비염, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염 및 위장염 등이 있는데, 현대사회의 각종 환경오염 등으로 인해 알레르기성 질환은 해마다 증가하고 있으며, 국내외에서 심각한 문제로 대두되고 있고 우리나라에서도 인구의 약 12~20% 정도가 알레르기성 질환에 반응을 보이고 있는 실정이다. 이러한 알레르기 반응은 시간적 경과와 초기의 주요한 양상에 따라 즉시형, 면역 복합체형 및 지연형 반응 등 몇 가지로 분류되며, 보통 알레르기라고 불리는 제 I 형 anaphylaxis는 일정한 항원에 대하여 이미 감작된 개체에 부착되어 있는 항체에 항원이 결합한 후 수분 내에 일어나는 즉시형 반응이며, 3단계로 구분하여 설명할 수 있다<sup>1,2)</sup>.

I 단계는 IgE 항체의 생성과 감작의 단계이며 인체에 들어온 외인성 항원이나 생체에서 유래한 내인성

항원은 macrophage에 의해 처리되어 T세포와 B세포를 자극한다. 이때 B세포는 helper T세포의 보조를 받아 형질세포로 분화되어 IgE 항체를 생성·분비하며, 생성된 IgE 항체는 비만세포나 호염기구의 세포막 표면에 있는 Fc $\epsilon$  수용체에 결합하여 감작이 성립된다<sup>3,4)</sup>. 2 단계는 탈 과립 단계이다. 즉, 다시 침입한 동일한 항원이 비만세포나 호염기구에 결합되어 있는 IgE 항체 사이에 cross linking을 형성하면 세포막이 활성화 되고 일련의 효소반응을 거친 다음 짧은 시간내에 탈 과립되어 화학적 전달물의 유리가 일어난다<sup>5,6)</sup>. 3 단계는 화학적 전달물질들에 의한 모세혈관 투과성 항진, 평활근 수축 및 분비항진 등으로 인한 조직장해가 일어난다.

한편, 이러한 알레르기성 질환의 치료약으로 종래에는 bronchodilator, antihistamines, antispasmodic drugs, steroids 등의 allopathic drugs가 사용되어 왔고, 근래에는 화학적 전달물질의 유리억제 및 길항작용이 있는

† Corresponding author : Ok-Beom Choi

disodium cromoglycate(DSCG), tranilast, ketotifen, azelastine 등이 사용되고 있으며<sup>7-9)</sup>, 다양한 새로운 약제의 개발이 시도되고 있다. 특히 식물유래의 민간약 및 천연물을 이용한 항알레르기 물질의 탐색과 개발에 많은 연구가 진행되고 있으며, 일부 생약과 한방제를 이용하여 알레르기 반응에 미치는 영향을 실험한 결과 지실, 시호, 오미자, 황금 및 대추 등에서 유의성 있는 억제효과를 보고한 바 있다<sup>10)</sup>.

이에 본 연구에서는 국화과에 속하는 다년초로 우리나라 전역에 걸쳐 자생 또는 재배되고 있으며<sup>11)</sup>, 예로부터 어린잎을 채취하여 찜과 생채로 이용하거나 염병은 나물로 이용하고 말려서 탕의 재료로 이용해 온 머위(*Petasites japonicum*)가 민간요법 및 한방<sup>12)</sup>을 통해 조사해본 바에 의하면 새순을 건조한 후 달여서 마시거나 태워 연기를 쏘이는 방법으로 기침, 기관지 천식, 태독의 치료 등에 이용해 왔고 일부 지역에서는 염병을 옷나무에 의한 알레르기의 치료의 민간약으로 이용되고 있는 것으로 나타나 *in vitro*에서 머위 추출물의 항알레르기 효과를 실험하여 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

본 실험에 사용된 머위(*Petasites japonicum*)는 전남 순천 농가의 텃밭에서 자생하고 있는 것을 2002년 5월에 50 cm 크기의 자장부를 채취하여 잎을 제거하고 염병만을 음건한 후 시료로 하였으며, 이때 시료의 수분 함량은 89%였다.

### 2. 시료의 추출 및 제조

항알레르기 효과를 실험하기 위한 머위 추출물의 제조는 methanol 추출물과 ethylacetate 추출물은 40 mesh로 분쇄한 시료 100 g에 각각의 용매 500 mL를 가하여 상온에서 24시간 동안 추출한 다음 glass filter (G3)로 여과하여 추출물과 잔사로 분리하고 잔사는 같은 용매로 반복 추출·여과하였다. 이때 얻어진 용매 추출물은 다시 cooling aspirator가 장착된 vacuum evaporator (TYPE N-2N, Eyela, Japan)로 37°C에서 감압농축하여 용매를 제거한 후 시료로 하였다. 물추출물은 시료 10 g에 100 mL의 증류수로 30분간 열수 추출한 후 냉각하고 추출물을 1,400×g에서 20분간 원심분리 (J2-21, Beckman, UK)한 다음 얻어진 상징액을 동결건조(FDU-500, Eyela, Tokyo, Japan)하여 시료로 하였다.

### 3. 항알레르기 효과

머위 추출물의 알레르기 효과의 검정은 Choi 등<sup>13)</sup>의 enzyme assay 방법을 이용하여 RBL-2H3 세포로부터 hexosaminidase의 방출 억제 효과를 측정하여 실험하였다. 즉, Fig. 1에 제시한 바와 같이 미국 국립보건원에서 분양받은 RBL-2H3 세포를 3% fetal bovine serum(FBS)를 포함한 Eagle's minimum essential medium (EMEM)에 현탁시킨 후 24-well plate에 각 well당  $2 \times 10^5$ 개의 세포가 들어가도록 한 다음 각 well당 50  $\mu$ g /EMEM 1 mL의 IgE로 감작시킨 후 5%의 CO<sub>2</sub> incubator에서 하룻밤 배양하였다. 8시간 후 각 well의 세포들을 Siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM Glucose, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA, pH 7.2)로 세척한 다음 37°C에서 10분간 각 well당 Siraganian buffer 160  $\mu$ L로 전반응 시키고, 시험물질과 대조구를 각각 첨가한 후 10분간 다시 반응시켰다. 이후 세포를 37°C에서 30분간 antigen(chicken egg albumin, 20  $\mu$ L, 10  $\mu$ g/mL)을

#### RBL-2H3 Cells culture

Suspension in EMEM(containing 3% FBS)

#### Cell counting, Dillution

$2 \times 10^5$  cells/well into 24-well plate

#### Cell sensitization

Add IgE

Incubation O/N, 37°C(5% CO<sub>2</sub> Incubator)

#### Washing

Siraganian buffer(3 times)

#### Cell stimulation

1 Preincubate at 37°C/10 min in water bath (add Sir. buffer)

2 Add test substances(stock H<sub>2</sub>O)

3 Add antigen

4 Incubate at 37°C/15 min in water bath

#### Terminate reaction

(in ice bath)

Take supernatants

#### Centrifuging

12,000 rpm/90 sec

Take supernatants into 96-well plate(add p-NAG)

#### Incubation

37°C/1 hr, After 1 hr add stop solution

(0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>)

#### Read absorbance

(405 nm)

**Fig. 1. Flow diagram of hexosaminidase assay for anti-allergic action.**

처리하여 탈 과립상태로 만든 후 반응을 ice bath에서 종결시키고 상징액 100  $\mu$ L를 취해 12,000 rpm에서 90 초 동안 원심분리한 뒤 다시 상징액 20  $\mu$ L를 96-well plate에 옮긴 후 기질(20  $\mu$ L, 1 mM p-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide)을 넣고 37°C에서 1시간 동안 배양시킨 다음 각 well당 stop solution(0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>) 200  $\mu$ L를 넣은 후 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시험물질의 대조구는 hexosaminidase assay를 비롯한 항알레르기 효과의 enzyme assay에서 안정된 실험값을 나타내며 항알레르기 효과가 증명된 quercetin을 이용하였으며, 시료와 대조구의 흡광도 값으로 다음 식에 의해 억제율을 산출하였다.

$$\text{Inhibition \%} = \frac{(\text{Control absorbance} - \text{Sample absorbance})}{\text{Control absorbance}} \times 100$$

## 결과 및 고찰

### 1. 머위 추출물의 항알레르기 효과

시험물질의 항알레르기 효과를 측정하기 위한 방법으로 한때는 IgE로부터 감작된 비만세포에서 유리된 히스타민의 양을 측정하였다. 그러나 이 방법은 비만세포에서 히스타민 농도가 매우 낮고 또한 복잡한 여러 단계를 거쳐야 하기 때문에 큰 편차를 나타내기가 쉽다. 따라서 새로운 측정방법이 요구되어 현재는 hexosaminidase assay가 널리 이용되고 있다. Hexosaminidase는 높은 농도로 cell내에 존재할 뿐 아니라 다른 화학적 매개체들이 탈 과립되어 방출될 때 함께 배출되므로 hexosaminidase 활성 측정은 탈 과립의 지표로 이용될 수 있으며, 또한 이 효소의 반응으로 생성된 생성물은 자외선 영역에서 용이하게 측정될 수 있기 때문에 유리된 히스타민의 양을 측정하는 방법을 대체할 수 있는 assay법으로 이용될 수 있다.

이와 같은 실험 방법에 따라 RBL-2H3 세포로부터 hexosaminidase의 방출 억제 활성을 측정하는 enzyme assay법으로 머위 추출물의 항알레르기 효과를 검정한 결과 Table 1에 나타난 바와 같이 실험결과의 오차가 낮은 추출물 300  $\mu$ g/mL 농도 수준에서 methanol 추출물은 83.33%, ethylacetate 추출물은 69.75%, 열수 추출물은 50.62%의 억제 효과를 나타냈으며, 대조구로 사용한 quercetin은 같은 농도에서 85.80%의 저해 효과를 나타냈다. 따라서 극성이 높은 용매에서 활성물질의 추출이 용이한 점과 물 추출물에서의 효과가 탐색된 점은 기능성 식품재료로의 가치를 검증한 결과로 사

**Table 1. Inhibition effects of solvent extracts from *Petasites japonicum* on hexosaminidase release from RBL-2H3**

Sample	Dose ( $\mu$ g/mL)	Absorbance (405nm)	Inhibition (%) <sup>1)</sup>
Total <sup>2)</sup>		0.852 $\pm$ 0.045 <sup>3)</sup>	
Control		0.324 $\pm$ 0.010	
Methanol extract	300	0.054 $\pm$ 0.020	83.33 $\pm$ 5.30
Ethylacetate extract	300	0.098 $\pm$ 0.020	69.75 $\pm$ 5.20
Hot water extract	300	0.160 $\pm$ 0.025	50.62 $\pm$ 6.50
Quercetin	300	0.046 $\pm$ 0.005	85.80 $\pm$ 3.05

<sup>1)</sup>Inhibition(%) = (Control absorbance - Sample absorbance) / Control absorbance  $\times$  100

Spontaneously released hexosaminidase(not challenged with antigen) was subtracted from the control and *Petasites japonicum* extracts treated group.

<sup>2)</sup>Total represents the whole amount of hexosaminidase in the cell.

<sup>3)</sup>Each of absorbance represents the mean  $\pm$  S.E. of 4 experiments.

료되며, 정제된 quercetin의 hexosaminidase의 방출 억제 활성을 비교해 볼 때 머위 추출물이 조추출물상태인 점을 고려한다면 상당한 항알레르기 효과가 있음을 시사하고 있어 48시간 수동피부아나필락시스(48 hr-passive cutaneous anaphylaxis, 48 hr-PCA) 등의 *in vivo* test와 활성물질의 분리 정제를 통해 활성 본체를 규명하여 새로운 항알레르기성 신기능 물질로의 이용 방안을 탐색하는 기초자료가 되리라 사료된다.

## 요 약

본 연구에서는 민간에서 옷나무에 의한 알레르기반응 및 기관지천식의 치료 효과가 있는 것으로 알려진 머위(*Petasites japonicum*)추출물의 항알레르기 효과를 RBL-2H3 세포로부터 hexosaminidase의 방출 억제 정도를 측정하는 enzyme assay를 이용하여 검색하였다. 실험결과에 대한 오차범위가 낮은 추출물 300  $\mu$ g/mL 농도의 수준에서 methanol 추출물은 83.33%, ethylacetate 추출물은 69.75%, 열수 추출물은 50.62%의 저해 효과를 나타냈으며, 대조구로 사용한 quercetin은 같은 농도에서 85.80%의 저해 효과를 나타냈다. 따라서 정제된 quercetin의 hexosaminidase의 방출 억제 활성을 비교해 볼 때 머위 추출물이 조추출물 상태인 점을 고려한다면 상당한 항알레르기 효과가 있음을 시사하고 있어 새로운 항알레르기성 신기능 물질로의 이용방안을 탐색하는 기초자료가 되리라 사료된다.

## 참고문헌

1. Coombs, R. R. A and Gell, P. G. H. : Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. *Clinical Aspects of Immunology*, 3rd ed., Blackwell Sci. Pub., Oxford, 761~779 (1975).
2. Siraganian, R. P., Hook, W. A. and Levine, B. B. : Specific *in vitro* histamine release from basophils by bivalent haprens: The evidence for activation by simple bridging of membrane bound antibody. *Immunochemistry*, **12**, 149~157 (1975).
3. Kinet, J. P., Metzger, H., Hakimi, J. and Kochan, J. : A cDNA presumptively coding for the alpha subunit of the receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Biochemistry*, **26**, 4605~4610 (1987).
4. Conard, D. H., Bazin, H., Sehon, A. H. and Foese, A. : Binding parameters of the interaction between rat IgE and rat mast cell receptors. *J. Immunol.*, **114**, 1688~1691 (1975).
5. Samuelsson, B. : Leukotrienes, mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, **228**, 568~575 (1983).
6. Ishizaka, T., Ishizaka, K., Conard, D. H and Foese, A. : A new concept of triggering mechanisms of IgE-mediated histamine release. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **61**, 320~330. (1978).
7. Tasaka, K : Antiallergic drugs. *Drugs of Today*, **22**, 101~133 (1986).
8. Sakamoto, K., Nagai., and Koda, A. : Role of hyaluronidase in immediate hypersensitivity reaction. *Immunopharmacology*, **2**, 139~146 (1980).
9. Kakegawa, H., Matsumoto, H., and Satoh, H. : Activation of hyaluronidase by metallic salts and compounds 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 642~646 (1985).
10. Kim, Young-Ran : Anti-allergic action of some crude drugs. *Ph. D. thesis*, Chonnam National Univ., Kwangju, Korea (1992).
11. Lee, Tchang-bok : Illustrated flora of Korea. *Hyangmoon Press*, Seoul, Korea p.742 (1994).
12. Lim, Woong-gyu : The wild plants for food and medicine. *Five star Press*, Seoul, Korea p. 115 (1990).
13. Choi, O. H., Kim, J. H. and Kinet, J. H. : Calcium mobilization via sphingosine kinase in signaling by the Fc  $\epsilon$  RI antigen receptor. *Nature*, **380**(6575), 634~656 (1996).

---

(2002년 10월 20일 접수)