

유색미 겨 추출물의 염증반응 억제활성

최선필 · 강미영¹ · 남석현*

¹경북대학교 식품영양학과, 아주대학교 생명과학과

(2004년 3월 25일 접수, 2004년 5월 20일 수리)

유색미 겨 추출물이 염증반응에 미치는 효과를 백혈구가 분비하는 염증관련 산물인 nitric oxide, histamine 및 matrix metalloproteinase(MMP) 생성에 대한 억제활성을 측정하여 평가하였다. 대식세포 세포주인 RAW264.7 세포에서 nitric oxide에 미치는 효과를 측정한 결과, 일반미와 유색미 추출물 간에 큰 활성의 차이를 보이지 않았다. 호중구 세포주인 RBL-2H3 세포를 이용하여 histamine 분비에 대한 억제활성을 조사한 결과, 유색미 추출물이 일반미에 비해서 약 3.6-5.4배 정도의 우수한 저해능을 보였다. 특히 조사한 유색미 5품종 중 LK1-3-6-12-1-1가 저해활성이 가장 높았다. RAW264.7 세포주를 이용하여 유색미 추출물이 matrix metalloproteinase(MMP) 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 일반미는 농도의 증가에 따라 오히려 효소활성이 증가한 반면, 유색미 경우는 LK1A-2-12-1-1을 제외하고 농도의 증가에 따라 효소활성이 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, 특히 LK1-3-6-12-1-1와 Elwee의 저해활성이 가장 높았다. 이상의 결과는 유색미가 염증반응의 원인인 백혈구의 histamine과 MMP의 분비를 저해하는 능력이 일반미보다 우수함을 나타내었다.

Key words: 유색미, 항산화성, 일산화질소, 히스타민, zymogram

서 론

최근 식생활의 변화에 따른 만성질환이 사회적 문제로 대두됨에 따라 육류보다는 식물성 식품이 가지고 있는 phytochemicals의 생체조절 기능에 대한 관심이 높아지게 되었다. 각종식물성 식품소재로부터 phenolic compound, alkaloids, terpenes, steroids, carotene등이 대표적인 생체 기능성 물질로서 발견되고 있으며, 이들이 가지는 항산화 효과는 신진대사 조절 능력 및 압과 순환기 계통의 질환에 대한 예방 및 치료효과를 보여준다는 것이 계속적으로 밝혀지고 있다.¹⁾ 쌀을 주식으로 하는 우리나라의 경우에는 쌀에 함유된 생체기능성 물질에 관심이 집중하게 되었고, 그 결과 겨층에 α -tocopherol, γ -oryzanol, phytic acid와 같은 생체기능조절에 관련된 화학물질이 가지는 생리활성 조절기능 중 특히 항산화 효과를 중심으로 연구가 집중적으로 수행되었다.²⁾ 그 결과 우리가 일상적으로 섭취하고 있는 일반미 품종보다는 유색미의 겨 추출물에서 항산화 활성 및 활성산소종에 대한 소거활성, 항변이원성, DNA쇄의 산화적 손상에 대한 억제활성, 그리고 발암 promotion에 대한 억제활성과 같은 유색미의 건강 기능성이 일반 취반용 쌀보다 전반적으로 우수하다는 사실을 알았다.^{2,4)} 그러나 hydroxyl radical, superoxide radical과 같은 활성산소종 이외에 최근 신호전달에 관여하는 인자로 알려진 가스형태의 라디칼인 nitric oxide(NO)에 대해서도 유색미 추출물이 소거활성을 갖는지 여부는 아직 연구되어 있지 않다. NO는 초기에 endothelium-derived relaxing factor(내피유래 확장인자)나 세포 내 신호 전달자로서

알려졌지만, 과잉의 NO가 생성되면 DNA의 손상을 일으켜서 carcinogenesis를 일으킨다는 실험결과가 보고 되어 세포내의 조절인자뿐만 아니라 유해활성산소종의 기능을 가지고 있다고 알려져 있다.⁵⁾ 최근 nitric oxide 소거활성에 대한 연구가 과일이나 소염성 한약재를 중심으로 활발하게 수행되고 있다.^{6,8)} 그리고 만성질환 중의 하나인 Type I 알레르기 반응과 같은 급성 반응은 비만세포의 과민반응에 의해 생성되는 histamine에 의해 주로 일어난다.^{9,11)} 이러한 알레르기 질환은 산업화에 따른 환경 알레르기원의 지속적인 자극과 더불어 식생활의 변화가 주요인으로 대두되고 있으며, 기호식품인 녹차에 포함된 EGCG와 같은 polyphenol 화합물이나, 다른 천연물에서 추출한 성분들이 동물실험에서나 세포주를 사용한 실험에서 항알레르기 효과를 나타낸다고 알려졌다.^{9,12)} 또한 만성염증질환성 병반에서 주로 나타나는 연결조직의 심각한 손상은 collagen과 같은 단백질 손상을 일으키며, matrix metalloproteinase를 비롯한 proteinase가 관여한다고 알려져 있다. 특히 MMP-2, MMP-9에 대하여 많은 연구가 진행되어, 체소로부터 얻은 추출물이 MMP-2, MMP-9에 생성 및 분비에 영향을 미친다는 연구결과가 보고되었다.¹³⁻¹⁵⁾ 따라서 본 연구에서는 항산화 활성효과가 우수하다고 알려진 유색미 중에서 5품종을 선발하여 이들의 겨 추출물이 가지는 염증발생에 대한 억제효과를 조사하고자 하였다. 이를 위하여 염증유발의 지표로서 대식세포의 NO 및 matrix metalloproteinase 생성도와 호염구세포(basophils)의 탈과립화에 의한 histamine의 생성도를 조사하여 유색미 추출물이 염증반응에 미치는 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약. Jumlocal-1, DZ78, Elwee, LK1A-2-12-1-1,

*연락처

Phone: 82-31-219-2619; Fax: 82-31-219-1615

E-mail: shnam@ajou.ac.kr

LK1-3-6-12-1-1의 유색미와 일반미인 추출은 서울대학교 농학 과에서 분양받았다. Sodium nitrite, histamine, Ionophore A23187, MTT[3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium], OPT(o-phthalaldehyde), DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), LPS (lipopolysaccharide) 등 실험에 사용된 시약들은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 또한 지시세포인 RAW264.7 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, RBL-2H3 세포주는 Health Source Research Resource Bank(Osaka, Japan)에서 구입하였다. 세포배양에 사용된 Dulbecco-modified Minimum Essential Medium(D-MEM)은 Life Technologies(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)와 penicillin 및 streptomycin은 Hyclone(Logan, Utah, USA)에서 구입하였다. 도정한 쌀겨에 10배량의 70% 에탄올을 넣고 실온에서 하룻밤 진탕하면서 활성성분을 추출하였다. Whatman paper no.2로 추출물의 잔사를 제거한 다음, rotary evaporator를 사용하여 추출물의 용매를 제거하고 -20°C 에 보관하였다.

전자공여능의 측정. 에탄올 1 ml, 적당량의 추출물을 포함한 시료 10 μl , 100 mM sodium acetate buffer(pH 5.5) 990 μl 를 분주한 tube에 에탄올에 용해시킨 0.5 mM DPPH 용액 0.5 ml를 넣고 30초간 반응을 일으킨 후, 남아있는 radical의 농도를 UV/VIS spectrophotometer(V-550, Jasco, Japan)을 이용하여 517 nm에서 측정하였다. 전자공여능 (%)은 $[(1-\text{As}/\text{Ac}) \times 100]$ 으로 산출하였고, As와 Ac에는 각각 실험군과 대조군의 흡광도를 대입하였다.¹⁶⁾

Nitric oxide(NO)의 측정. Mouse macrophage계열인 RAW264.7 세포주를 지시세포로 사용하였고, 10% FBS, 100 unit/ml penicillin 및 streptomycin을 포함하는 D-MEM 배지에서 37°C 의 5% CO_2 를 포함하는 포화습도 공기조건 하에서 배양하였다. Mg^{2+} , Ca^{2+} 가 포함되지 않은 PBS로 3회 세척한 배양 세포를 0.25% trypsin을 처리하여 세포를 dish에서 떼어낸 후, 세포를 96 well plate에 well당 1×10^5 cells의 밀도가 되도록 분주하였다. 최종농도 100 ng/ml이 되도록 LPS 첨가하여 자극한 세포에 각각 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 유색미 시료를 배지에 첨가하여 5% CO_2 , 37°C 조건 하에서 48시간 배양 후, 회수한 상정액 가운데 100 μl 에 동량의 Griess solution(0.05% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, 0.5% sulanilamide, 2.5% H_3PO_4)을 넣고 15분간 방치한 후, ELISA reader(Model 550, Bio-Rad, USA)에서 측정파장 470 nm, reference 파장 650 nm에서 측정하였다. 정량을 위한 표준곡선은 sodium nitrite (NaNO_2)를 사용하여 작성하였고 이를 기준으로 NO의 양을 계산하였다.⁸⁾

Histamine의 측정. Rat의 basophilic cell line인 RBL-2H3 세포주를 지시세포로 사용하였다. 세포는 10% FBS, 100 unit/ml의 penicillin 및 streptomycin을 포함하는 D-MEM배지를 넣고 37°C 의 5% CO_2 를 포함하는 포화습도 공기조건 하에서 배양하였다. 실험에 사용할 세포는 Mg^{2+} , Ca^{2+} 가 포함되지 않은 PBS로 세척한 다음, 0.25% trypsin으로 처리하여 dish에서 수거하였다. 수거한 세포에 tyroid buffer(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1.1 mM MgCl_2 , 11.9 mM NaHCO_3 , 0.4

mM NaH_2PO_4 , 5.6 mM glucose, pH 7.2)로 세포밀도를 1×10^6 cell/ml로 조절한 후에 24 well plate에 분주하였다. 여기에 농도별 유색미 시료를 첨가하여, 37°C 배양기에서 15분간 방치한 다음, Ionophore A23187을 최종농도가 10 μM 이 되도록 첨가하고 20분간 배양기에서 재차 방치하였다. 반응 후, 4°C 10 분간의 처리로 반응을 종결시키고 나서 상정액을 회수하였다. Histamine의 정량은 Shore가 보고한¹⁷⁾ fluorometer를 이용한 측정방법을 약간 변형하여 다음과 같이 수행하였다. 회수한 상정액 1 ml에 0.2 ml의 1 N NaOH, 0.1 ml의 1% OPT(o-phthalaldehyde)를 첨가하고 실온에서 5분간 방치하였다. 여기에 1 N HCl을 0.2 ml 첨가하여 반응을 종결시킨 다음, fluorometer(RF-550, Shimadzu, Japan)를 사용하여 360 nm의 excitation 파장과 450 nm의 emission은 파장에서 측정하였다.

세포독성. Mitochondrial dehydrogenase activity 지표를 나타내는 MTT colorimetric reduction assay를 수행하여 검정물질이 세포의 생존에 미치는 효과를 Mosmann이 보고한 방법에 따라 측정하였다.¹⁸⁾ 지시세포인 RAW264.7와 RBL-2H3 세포주를 96-well plate에 well 당 1×10^5 cells 밀도로 분주한 후, 시료를 처리하여 37°C 의 5% CO_2 를 포함한 포화습도 공기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상정액을 제거하고, 5 mg/ml의 MTT 시약을 100 μl 씩 well에 분주하고 3시간 동안 배양기에서 보존하였다. 보존 후, 잔여의 MTT시약을 제거하고 DMSO를 100 μl 씩 분주하여 침전물을 충분히 용해시킨 다음, ELISA reader (Model-550, Bio-Rad, USA)에서 570 nm의 측정파장 및 650 nm의 reference 파장을 기준으로 흡광도를 측정하였다.

Zymography. 96 well plate에 1×10^5 cell씩 분주한 RAW264.7 세포를 적당량의 시료를 처리한 후, 48시간 동안 37°C 의 5% CO_2 를 포함한 포화습도 공기에서 배양하였다. 배양 후, 회수한 상정액 중 100 μl 를 취하여 동량의 비환원조건인 sample buffer (50 mM Tris-Cl, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol, pH 6.8)를 첨가하여 실온에서 10분간 방치하여 단백질 시료를 제조하였다. 시료를 1% gelatin이 포함된 10% acrylamide gel에서 전기영동을 하였고, 전기영동이 끝난 gel을 renaturation buffer(2.5% Triton X-100)로 15분씩 3회 37°C 배양기에서 방치 후, zymogram buffer(50 mM Tris, 10 mM CaCl_2 , 50 mM NaCl, pH 7.6)로 30분간 gel을 세척하고 나서, 20시간 이상 zymogram buffer에 보존하였다. 반응이 끝난 gel을 2.5% coomassie solution에서 염색한 후, destaining buffer(45% methanol, 10% acetic acid)로 탈색시켜 단백질 band를 확인하였다.¹⁹⁾

통계분석. 3회 이상 실험의 평균치는 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 표시하였으며, 반복실험 평균치간의 유의성은 SAS software를 이용하여 Duncan's multiple range test에 의해서 검증하였고 $P < 0.05$ 에서 평균값 간의 유의적 차이를 구하였다.

결과 및 고찰

유색미 거 추출물의 항산화 활성. 항산화능력을 측정하는 여러 가지의 실험방법 중, 간편하게 시료의 항산화 활성을 측정하는 방법이 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 시

Table 1. Electron donating ability of the rice extracts to DPPH radicals

Cultivar	Electron donating ability (%)				
	0.004 mg/ml	0.04 mg/ml	0.4 mg/ml	0.8 mg/ml	1.6 mg/ml
BHT	64.1±4.48 ^a	95.6±1.40 ^a	97.2±0.16 ^a	80.5±1.34 ^f	78.8±0.17 ^f
Chuchung	5.10±0.73 ^e	22.3±1.11 ^c	97.1±0.59 ^a	83.0±1.18 ^c	97.7±2.82 ^{cd}
Jumlalocal-1	15.6±2.95 ^d	78.7±0.05 ^d	85.9±0.76 ^c	125.3±2.37 ^a	148.2±2.17 ^a
DZ78	22.4±2.04 ^{cd}	84.3±2.41 ^b	85.5±0.99 ^c	88.9±0.66 ^d	85.4±3.07 ^c
Elwee	35.8±7.34 ^b	85.4±0.54 ^b	87.4±3.16 ^{bc}	92.1±0.18 ^c	95.1±0.51 ^d
LK1A-2-12-1-1	22.7±10.5 ^{cd}	81.8±1.16 ^c	89.6±1.43 ^{bc}	92.4±0.53 ^c	99.9±1.32 ^c
LK1-3-6-12-1-1	29.8±5.66 ^{bc}	86.4±0.71 ^b	91.5±6.56 ^b	95.3±0.87 ^b	106.1±1.23 ^b

Values not sharing common letter in column were significantly different at $P < 0.05$. Results are expressed as mean±SE (n=3).

Table 2. Effects of the rice extracts on generation of nitric oxide in RAW264.7 cells

Cultivar	μM of NO (% of inhibition)		
	1 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml
Unstimulation (-LPS)	3.82±5.22 ^b (100)	3.82±5.22 ^c (100)	3.82±5.22 ^d (100)
Stimulation (+LPS)	61.0±2.92 ^a (0)	61.0±2.92 ^a (0)	61.0±2.92 ^a (0)
Chuchung	59.2±5.63 ^a (3.15)	54.4±6.17 ^{ab} (11.5)	44.9±2.57 ^c (28.2)
Jumlalocal-1	55.9±4.85 ^a (8.92)	53.8±4.86 ^{ab} (12.6)	51.8±2.11 ^{bc} (16.1)
DZ78	56.9±2.55 ^a (7.17)	52.7±3.08 ^b (14.5)	50.3±3.15 ^{bc} (18.7)
Elwee	53.6±6.95 ^a (12.9)	50.4±4.79 ^b (18.5)	55.9±2.87 ^{ab} (8.92)
LK1A-2-12-1-1	54.0±2.63 ^a (12.2)	48.9±3.13 ^b (21.2)	49.1±6.07 ^{bc} (20.8)
LK1-3-6-12-1-1	57.5±1.63 ^a (6.12)	54.1±2.41 ^{ab} (12.1)	55.1±4.09 ^{ab} (10.3)

Values not sharing common letter in column were significantly different at $P < 0.05$. Results are expressed as mean±SE (n=3).

료의 전자공여능을 측정하는 것이다. 우리는 이 방법을 사용하여 유색미 추출물의 항산화 능력을 일반미와 정량적으로 비교하고자 하였다. Table 1의 실험 결과와 같이, 일반미와 유색미 추출물의 항산화 능력을 비교하였을 때, 유색미 추출물의 항산화 능력이 0.004 mg/ml, 0.04 mg/ml의 시료농도에서 일반미와 비교하여 3-7배 정도 우수한 능력을 보였다. 또한 합성 항산화제로 잘 알려진 BHT(butylated hydroxytoluene)에 대한 활성과 비교하면, 0.04 mg/ml의 시료농도에서 유색미는 BHT의 82-90% 수준으로서, 23% 정도인 일반미에 비하여 항산화 활성이 우수하다는 사실을 확인할 수 있었다. 특히 유색미 시료 중, Jumlalocal-1은 0.8 mg/ml 이상의 농도에서 합성 항산화제인 BHT와 같은 수준의 높은 항산화 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 일반적으로 0.4 mg/ml 이상의 농도는 유색미 추출물뿐만 아니라 일반미에서도 항산화 활성이 80% 이상을 보이고 있어서 이 농도에서 항산화 활성이 포화상태가 되는 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 실험 결과에서 시료의 항산화 활성이 포화되지 않은 농도인 0.04 mg/ml에서 각 쌀겨 추출물의 항산화 활성은 LK1-3-6-12-1-1, Elwee, DZ78, > LK1-A-2-12-1-1 > Jumlalocal-1 > Chuchung의 순서로 나타났다.

유색미 겨 추출물의 NO(nitric oxide) 소거활성. Hydroxy radical, superoxide radical과 더불어 활성산소종의 일종인 NO에 대한 소거능력을 유색미 추출물이 보유하고 있는지 여부를 조사하였다. 이미 기술한 바와 같이 NO는 대식세포의 항균활성 및 세포의 신호전달에 중요한 역할을 담당할 뿐 아니라, 생체에서 생성된 superoxide radical과 반응하여 더욱 세포독성이

강한 reactive peroxynitrite와 같은 이차적인 라디칼 생성을 일으킨다고 보고되어 있다.²⁰⁾ 본 실험에서는 생쥐의 대식세포주인 RAW264.7를 사용하여 배양세포계에서 유색미 추출물의 NO 소거활성을 평가하였다. RAW264.7 세포주를 세균 유래의 LPS로 자극하면 NO와 다른 염증관련 cytokine이 분비되므로 시료의 첨가에 의하여 억제되는 NO의 양을 정량함으로써 유색미 추출물의 NO 소거활성을 측정할 수 있다. 실험 결과, 대조군으로 사용한 일반미를 포함한 쌀 추출물을 1 μg/ml, 10 μg/ml 및 100 μg/ml의 농도로 반응에 첨가하였을 때, 시료 농도의 증가에 의하여 NO 생성량이 감소하는 경향을 발견할 수 있었다. 그러나 저농도(1, 10 μg/ml)의 시료 조건에서 유색미의 NO 소거능이 일반미에 비하여 다소 높은 것은 사실이지만, 뚜렷하게 NO 소거능이 우수한 유색미 품종을 발견하기 어려웠으며, 특히 100 μg/ml의 고농도 조건에서는 유색미의 NO 소거능(8.9-20.8% 억제)에 비하여 오히려 일반미의 소거능(28.2% 억제)이 더 높은 것으로 나타났다(Table 2). 이 결과는 라디칼 소거능과 같은 항산화 활성이 높으면 NO 소거능도 높을 것이라는 예상과는 상반된 것으로서, 이것은 아마도 *in vitro*의 활성산소종 소거조건과 배양세포계의 NO 소거조건에 차이가 기인할 가능성을 배제할 수 없다. 이 부분에 대해서는 향후 *in vitro* 조건에서 유색미 추출물의 NO 소거능을 조사해야 할 필요성이 있다. 쌀 추출물 자체의 세포독성에 의하여 지시세포가 사멸함으로써 NO 소거능이 나타났을 가능성을 배제하기 위하여 시료 처리에 의한 지시세포의 cell viability를 조사하였다(Table 3). 실험 결과, 모든 쌀 추출물에서 95% 이상의 cell viability가 관찰되는

Table 3. Effects of the rice extracts on cell viability in RAW264.7 cells

Cultivar	Cell viability (%)		
	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
Control	100.0±1.59 ^a	100.0±1.59 ^a	100.0±1.59 ^{ab}
Chuchung	99.2±3.28 ^{ab}	92.6±3.41 ^b	89.5±2.32 ^c
Jumlalocal-1	89.7±3.45 ^c	94.4±1.59 ^b	100.2±4.75 ^{ab}
DZ78	98.3±1.66 ^{ab}	95.0±3.62 ^{ab}	102.3±2.19 ^a
Elwee	100.2±1.50 ^a	95.7±3.43 ^{ab}	96.8±3.13 ^{ab}
LK1A-2-12-1-1	95.0±1.11 ^b	93.0±0.79 ^b	95.5±3.56 ^b
LK1-3-6-12-1-1	97.3±2.18 ^{ab}	97.7±3.05 ^{ab}	97.5±4.86 ^{ab}

Values not sharing common letter in column were significantly different at $P < 0.05$.

Results are expressed as mean±SE (n=3).

것으로 볼 때, 관찰된 NO 소거능이 시료의 세포독성에 의한 것임은 아니라는 사실을 보여주었다.

유색미 겨 추출물의 히스타민 생성억제능력. 만성염증질환의 대표적인 질환인 알레르기를 일으키는 주된 반응에 관여하는 비만세포 및 호염구는 알레르기원에 의해 자극을 받아 히스타민을 분비하여 염증반응을 유발한다.²¹⁾ 본 실험에서는 유색미 추출물이 알레르기원에 의한 비만세포 및 호염구의 히스타민 분비를 억제할 수 있는지 여부를 조사하기 위하여, rat의 호염구 세포주인 RBL-2H3 세포를 Ionophore인 A23187로 자극했을 때 히스타민이 분비되는 현상을 이용하여 각 유색미 추출물의 첨가가 히스타민의 분비에 미치는 영향을 분비된 histamine을 정량하여 평가하고자 하였다.^{10,11)} Table 4에 나타 것처럼, 1 µg/ml의 시료농도에서 유색미는 일반미에 비해 1-3 배 정도의 히스타민 생성 억제능력을 보였으며, 농도가 증가할수록 히스타민 분비 억제능력도 증가하는 것을 보여주었다. 특히 100 µg/ml 시료농도에서 유색미 품종 중 LK1-3-6-12-1-1의 억제활성이 같은 농도의 일반미 추출물에 비하여 약 5배 정도로 높았고(50.9% 억제), Elwee도 비슷한 수준의 높은 억제활성을 가지고 있음을 알았다(46.4% 억제). 100 µg/ml 시료농도에서 전반적으로 유색미 추출물의 억제활성(22.8-50.9% 억제)이 일반미의 활성보다 우수하였지만(9.44% 억제), 유색미 중에서 LK1A-2-12-1-1은 조사한 시료의 농도범위에서 히스타민 억제활성이 가장 낮은 것으로 나타났다. Histamine 분비 억제활성이 시료의 첨가에 의한 지시세포의 생존율의 차이에 의한 영향

Table 5. Effects of the rice extracts on cell viability in RBL-2H3 cells

Cultivar	Cell viability (%)		
	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
Control	99.9±4.71 ^a	99.9±4.71 ^a	99.9±4.71 ^b
Chuchung	99.5±4.76 ^a	100.1±1.51 ^a	97.5±4.51 ^b
Jumlalocal-1	96.3±4.61 ^a	102.3±5.08 ^a	108.6±1.97 ^a
DZ78	103.3±3.47 ^a	104.4±6.67 ^a	75.0±1.44 ^d
Elwee	101.6±2.76 ^a	101.2±1.65 ^a	71.3±1.24 ^d
LK1A-2-12-1-1	98.3±4.55 ^a	102.4±0.59 ^a	101.9±0.55 ^b
LK1-3-6-12-1-1	102.7±3.37 ^a	105.0±1.94 ^a	82.3±3.07 ^c

Values not sharing common letter in column were significantly different at $P < 0.05$.

Results are expressed as mean±SE (n=3).

인가를 알아보기 위하여 쌀 추출물의 세포독성을 MTT 방법에 의하여 측정하였다(Table 5). 실험 결과, 1 µg/ml 및 100 µg/ml에서는 거의 100%의 세포 생존율을 나타내어, 시료가 세포독성이 없음을 알 수 있었으며, 100 µg/ml에서 DZ78과 Elwee가 70% 수준의 세포 생존율을 보였지만, histamine 분비 억제활성은 일치하지 않음을 보여주었다. 이상의 실험은 유색미가 일반미에 비하여 유의하게 호염구의 histamine 분비를 억제함을 보여주어, 유색미가 알레르기 예방을 위한 식품으로 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

유색미 겨 추출물의 metalloproteinase 활성저해 능력. 염증 관련 cytokine이나 proteinase 활성능력은 염증성 만성질환의 정도를 판별하는 지표가 된다. 특히 proteinase 활성에 의하여 만성염증질환에서 유발되는 병반에 주로 대식세포의 침윤현상이 관찰되고 있으며, 활성화된 대식세포는 proteinase를 분비하여 조직의 상해를 일으키기도 한다.¹⁵⁾ 활성화된 대식세포가 분비하는 proteinase 중에 MMP(matrix metalloproteinase)가 가장 잘 알려져 있으며, MMP9와 MMP2에 대하여 많은 연구가 되어 있다. 그 중에서 MMP9는 동맥경화증성 병반의 진행에 관여하고, 일반적으로는 거의 발현을 하고 있지 않지만, TNF-α(tumor necrosis factor-α)에 의해서 발현이 조절된다고 알려져 있다.¹⁴⁾ 따라서 MMP의 활성을 측정함으로써 유색미 추출물의 염증반응에 대한 억제능력을 평가하고자 하였으며, 생쥐 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포를 지시세포로 하여 그 활성을 측정하고자 하였다. 즉, 세포주를 LPS(lipopolysaccharide)으로 자극할

Table 4. Effects of the rice extracts on histamine release in RBL-2H3 cells

Cultivar	ng/ml of Histamine (% of Inhibition)		
	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
Control (+A23187)	74.1±6.40 ^a (0.00)	74.1±6.40 ^a (0.00)	74.1±6.40 ^a (0.00)
Chuchung	69.9±7.46 ^a (5.68)	69.4±4.19 ^a (6.34)	67.1±4.49 ^a (9.44)
Jumlalocal-1	58.1±6.24 ^{bc} (21.6)	57.5±5.38 ^{bc} (22.4)	49.0±4.75 ^{bc} (33.9)
DZ78	51.9±2.49 ^c (30.0)	55.0±4.82 ^{bc} (25.8)	42.9±2.41 ^{cd} (42.1)
Elwee	50.5±3.91 ^c (31.8)	43.0±3.67 ^d (42.0)	39.7±7.73 ^{cd} (46.4)
LK1A-2-12-1-1	67.5±10.6 ^{ab} (8.91)	63.8±12.8 ^{ab} (13.9)	57.2±9.89 ^b (22.8)
LK1-3-6-12-1-1	58.6±3.02 ^{bc} (20.9)	48.6±2.72 ^{cd} (34.4)	36.4±0.51 ^d (50.9)

Values not sharing common letter in column were significantly different at $P < 0.05$.

Results are expressed as mean±SE (n=3).

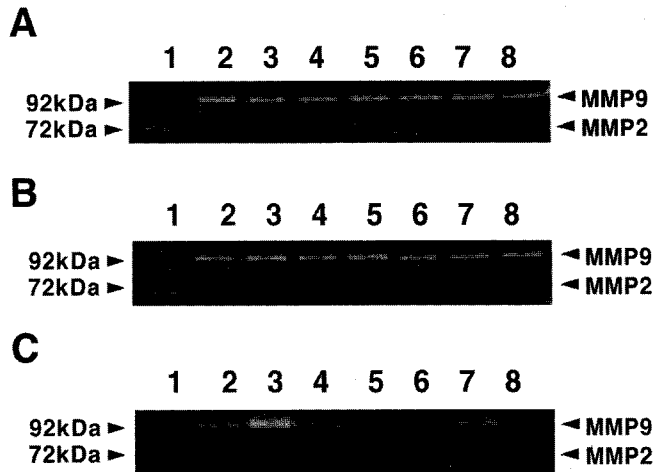


Fig. 1. Inhibitory effects of the rice extracts on the matrix metalloproteinase activity in RAW264.7 cells. Panel A, B, and C indicate the activity profiles when treated with the rice extracts at a concentrations of 1 µg/ml, 10 µg/ml and 100 µg/ml, respectively. The lanes in each panels indicate the followings: lane 1, unstimulated (-LPS); lane 2, stimulated (+LPS); lane 3, Chuchung; lane 4, Jumlalocal-1; lane 5, DZ78; lane 6, Elwee; lane 7, LK1A-2-12-1-1; lane 8, LK1-3-6-12-1-1.

때 유도된 MMP의 활성을 유색미 추출물이 억제하는 정도를 zymogram 방법으로 측정, 비교하였다. 실험 결과, LPS로 자극하지 않은 대조군에서 92 kDa의 MMP9의 활성은 거의 보이지 않았으나, 72 kDa의 MMP2의 활성은 관찰된 반면(Fig. 1, lane 1), LPS로 자극하면 MMP9의 활성은 검출된 반면, MMP2의 활성은 거의 관찰할 수가 없었다(lane 2). 시료와 LPS를 동시에 처리한 실험군을 보면, MMP9의 활성은 관찰할 수 있었지만, LPS만으로 자극한 경우와 마찬가지로 MMP2의 활성은 거의 관찰할 수가 없었다. 1 µg/ml의 시료 농도조건에서 전반적으로 LPS만을 처리한 대조군에 비하여 16-20% 정도로 활성이 억제되는 것을 보였으나, 일반미와 유색미간의 차이는 거의 보이지 않았다(Fig. 1A). 10 µg/ml에서는 LK1-3-6-12-1-1가 약 36% 정도의 억제활성을 보여, 21-25%의 활성 저해를 보인 일반미와 다른 유색미에 비하여 억제활성을 높게 나타냈지만, 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 1B). 그러나 100 µg/ml에서는 품종 간 뚜렷한 활성의 차이를 보였는데, 일반미의 처리는 metalloproteinase의 활성이 오히려 증가시키는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1C, lane 3). 반면, 유색미 추출물을 처리한 경우는 LK1A-2-12-1-1(5.3% 억제)를 제외하고 50% 이상의 저해능력을 보였으며(Fig. 1C, Table 6), 전체적으로 MMP9에 대한 저해활성은 LK1-3-6-12-1-1, Elwee > DZ78 > Jumlalocal-1 > LK1A-2-12-1-1 > Chuchung의 순서로 나타났다. 특히 Elwee와 LK1-3-6-12-1-1는 metalloproteinase의 활성을 완전히 억제하는 것을 볼 수 있었는데(Fig. 1C, lane 6, 8), 이 사실은 유색미가 일반미에 비하여 염증반응의 중요한 지표인 대식세포의 metalloproteinase 활성을 저해하는데 유효하게 작용함을 알 수 있었다.

본 연구를 통하여 유색미는 일반미에 비하여 전반적인 항산화 활성은 높지만, 대식세포가 생성하는 활성산소종인 NO에 대

Table 6. Inhibitory effects of the colored rice extracts on matrix metalloproteinase activity in RAW264.7 cells

Cultivar	Inhibition (%)		
	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
Control (+LPS)	0	0	0
Chuchung	20.3	25.0	-185.8
Jumlalocal-1	18.0	24.5	52.5
DZ78	18.1	21.1	77.6
Elwee	20.0	23.0	102.5
LK1A-2-12-1-1	16.1	27.5	5.3
LK1-3-6-12-1-1	17.0	36.2	102.6

하여 유의한 수준의 소거활성을 보이지 않았다. 그러나 알레르기 병증의 주요 원인인 호중구로부터의 histamine을 분비를 일반미에 비하여 효율적으로 억제한다는 사실이 나타났다. 또한 대식세포의 활성화 말기에 과다 분비되어 조직상해를 일으킴으로써 염증반응의 지표로 사용되는 MMP에 대한 유색미 추출물의 억제활성을 조사한 결과, 유색미들이 전반적으로 MMP의 활성을 효율적으로 저해한다는 사실을 알았다. 특히 유색미 품종 중에서 LK1-3-6-12-1-1은 항산화활성, 히스타민 생성 저해능 및 MMP 활성저해능이 모두 우수하다는 사실이 밝혀졌다. 따라서 본 연구의 결과 나타난 염증억제능이 높다고 생각되는 LK1-3-6-12-1-1 품종을 실험동물에 식이하여 *in vivo*에서 유색미가 염증관련 세포에 미치는 활성을 체계적으로 조사할 필요가 있다고 본다.

감사의 글

본 연구는 2000년-2002년도 과학재단 특정기초 연구비 지원(과제번호: R01-1999-00165)에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드리며, 아울러 쌀시료를 공급해 주신 서울대 농학과 고희중 교수님께도 감사드립니다.

참고문헌

- Nam, S. H. and Kang, M. Y. (2003) Screening of antioxidative activity of legume species. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 32-38.
- Juliano, B. O. (1985) In *Rice-Chemistry and Technology*. AACC Press, New York.
- Nam, S. H. and Kang, M. Y. (1997) *In vitro* inhibitory effect of colored rice bran extracts against carcinogenicity. *Agri. Chem. Biotechnol.* **40**, 307-312.
- Nam, S. H., Chang, S. M. and Kang, M. Y. (2002) Screening of mutagenicity and antimutagenic activity against chemical direct mutagens of ethanolic extracts from colored rice bran. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **45**, 195-202.
- Ohshima, H., Bartsch, H. (1994) Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factor: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mut. Res.* **305**, 253-264.
- Miyake, Y., Murakami, A., Sugiyama, Y., Isobe, M., Koshimizu, K. and Ohigash, H. (1999) Identification of

- coumarins from lemon fruit (*Citrus limon*) as inhibitors of in vitro tumor promotion and superoxide and nitric oxide generation. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3151-3157.
7. Moon, E. Y. and Pyo, S. K. (2000) Aflatoxin B1 inhibits CD14-mediated nitric oxide production in murine peritoneal macrophages. *Int. J. Immunopharmacol.* **22**, 237-246.
 8. Murakami, A., Gao, G., Kim, O. K., Omura, M., Yano, M., Ito, C., Furukawa, H., Jiwjinda, S., Koshimizu, K. and Ohigash, H. (1999) Identification of coumarins from the fruit of *Citrus hystrix* DC as inhibitors of nitric oxide generation in mouse macrophage RAW264.7 cells. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 333-339.
 9. Kim, H. M., Yi, D. K. and Shin, H. Y. (1999) The evaluation of antianaphylactic effect of *Oryza sativa* L. in rats. *Am. J. Chin. Med.* **1**, 63-71.
 10. Yamashita, K., Suzuki, Y., Matsui, T., Yoshimaru, T., Yamaki, M., Suzuki-Karasaki, M., Hayakawa, S. and Shimizu, K. (2000) Epigallocatechin gallate inhibits histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: role of tyrosine phosphorylation pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 603-608.
 11. Matsuo, N., Yamada, N., Shoji, K., Mori, M. and Sugano, M. (1997) Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure-inhibitory activity relationship. *Allergy* **52**, 58-64.
 12. Matsuo, N., Yamada, K., Yamashita, K., Shoji, K., Mori, M. and Sugano, M. (1996) Inhibitory effect of tea polyphenols on histamine and leukotriene B4 release from rat peritoneal exudate cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **32**, 340-344.
 13. Gaultier, F., Foucault-Bertaud, A., Lamy, E., Ejeil, A.L., Dridi, S.M., Piccardi, N., Msiks, P., Godeau, G. and Gogly, B. (2003) Effects of a vegetable extract from *Lupinus albus* (LU105) on the production of matrix metalloproteinases (MMP1, MMP2, MMP9) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP1, TIMP2) by human gingival fibroblasts in culture. *Clin. Oral Invest.* **7**, 198-205.
 14. Moon, S. K., Cha, B. Y., Lee, Y. C., Nam, K. S., Runge, M. S., Patterson, C. and Kim, C. H. (2004) Age-related changes in matrix metalloproteinase-9 regulation in cultured mouse aortic smooth muscle cells. *Exp. Gerontol.* **39**, 123-131.
 15. Hong, B. K., Kwon, H. M., Lee, B. K., Kim, D., Kim, I. J., Kang, S. M., Jang, Y., Cho, S. H., Kim, H. K., Jang, B. C., Cho, S. Y., Kim, H. S., Kim, M. S., Kwon, H. C. and Lee, N. (2000) Coexpression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinases in human aortic atherosclerotic lesions. *Yonsei Medical J.* **41**, 82-88.
 16. Yen, G. C. and Chem, H. Y. (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 27-32.
 17. Shore, P. A., Burkhalter, A. and Cohn, V. H. (1959) A method for the fluorometric assay of histamine in tissue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **127**, 182-186.
 18. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
 19. Birkedal-Hansen, H. and Taylor, R. E. (1982) Detergent activation of latent collagenase and resolution of its component molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 1173-1178.
 20. Pryor, W. A. and Squadrito, G. L. (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* **268**, L699-L722.
 21. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. (2001) In *Immunobiology: The immune system in health and disease* (5th ed.), Garland Publishing, New York.

Inhibitory Activity of the Extracts from the Pigmented Rice Brans on Inflammatory Reactions

Sun Phil Choi, Mi Young Kang¹ and Seok Hyun Nam* (¹Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea; Department of Biological Science, Ajou University, Suwon 443-749, Korea)

Abstract: Effects of the extracts from bran part of the pigmented rices on inflammation was evaluated by determining their inhibitory action on the production of nitric oxides, histamines and matrix metalloproteinase(MMP) from inflammatory leukocytes. Effects on the production of nitric oxides in a macrophage cell line, RAW264.7 cells, were determined, demonstrating that any significant difference was not detected between the normal rice and the pigmented rice extracts. Inhibitory effects on the histamine-release from a basophilic cell line, RBL-2H3, were examined, showing 3.6 to 5.4-fold increase in the inhibitory activity compared to that of the normal rices. Among the pigmented rice cultivars tested, especially, inhibitory activity of LK1-3-6-12-1-1 was the greatest. Using RAW264.7 cells, we examined the effect of the pigmented rice extracts on the MMP activity. The results showed that the enzyme activity increased with the increasing concentration of the normal rice extract. However, the pigmented rice extracts, except LK1A-2-12-1-1, acted to decrease the MMP activity with their increasing concentrations. The results described above showed the superiority of the pigmented rice extracts in inhibition on release of histamine and MMP, pivotal factors for causing inflammatory responses, from the leukocytes.

Key words: pigmented rice, anti-mutagenicity, nitric oxide, histamine, zymogram

*Corresponding author