

감초 추출물이 RBL-2H3 비만세포에서 β -hexosaminidase 분비 및 Th2 cytokine mRNA 발현에 미치는 효과

김정미* · 김대중* · 김태혁* · 백종미* · 김현숙** · 최 면***†

*강원대학교 생명건강공학과, **강원대학교 웰빙특산물산업화지역혁신센터

Effects of Water Extract of *Glycyrrhiza uralensis* on β -Hexosaminidase Release and Expression of the Cytokines of RBL-2H3 Mast Cells

Jeong Mi Kim*, Dae Jung Kim*, Tae Hyeuk Kim*, Jong Mi Baek*, Hyun Sook Kim** and Myeon Choe***†

*Department of Bio and Health Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

**Well-being Bioproducts RIC Center, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

ABSTRACT : The present study was conducted to investigate the anti-allergic reaction with *Glycyrrhiza uralensis*. We examined cell viability, β -hexosaminidase release, IL-4 and IL-13 mRNA expression from RBL-2H3 cell after pre-treatment with 0, 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *Glycyrrhiza uralensis* water extracts. Effects of *Glycyrrhiza uralensis* on the degranulation and pro-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-13) expression were evaluated with β -hexosaminidase assay, and RT-PCR analysis. We observed that *Glycyrrhiza uralensis* concentrations from 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ had no effect on cell survival. The release of β -hexosaminidase decreased significantly with all concentrations of *Glycyrrhiza uralensis* extracts. The expression of the IL-4 and IL-13 mRNA were decreased by *Glycyrrhiza uralensis* in dose-dependent manner. These results that *Glycyrrhiza uralensis* has an anti-histamin effects and controls IL-4, IL-13 secretion on allergic reaction.

Key Words : *Glycyrrhiza uralensis*, Anti-Allergic, RBL-2H3, IL-4, IL-13, β -hexosaminidase

서 언

알레르기 반응에 의해 유발되는 천식은 유전적인 원인보다는 환경적인 원인으로 인하여 소아에서부터 노년층까지 전 연령층에 걸쳐 발생되는 흔한 질환으로 비만세포에서 히스타민의 분비기전 중 특이 IgE가 관여하여 일어나는 제1형 과민반응으로 알려져 있다. 천식, 비염 등의 알레르기 질환 발생에 중요한 역할을 하는 비만세포는 골수에서 유래되었고 IgE와 알레르겐의 결합을 통해 활성화되면 히스타민, 프로스타글란딘, 류코트리엔과 같은 화학매체를 분비하여 점막부종, 기관지 평활근 수축, 점액의 분비 증가 등을 발생시킨다 (Wuthrich, 1989; Stevens and Austen, 1989). 또한 IL-4, IL-13, TNF- α 등 Type2 cytokine이 eosinophil과 mast cell, β -세포 등을 활성화시켜 IgE 생성을 촉진시키기고 염증 세포들을 기관지로 끌어들여 만성 염증질환을 유도하게 된다 (Richard et al., 2006; Williams and Galli, 2000). 비만세포인 RBL-2H3 세포는 mucosal type mast cell과 유사한 특징을 나타내고 세포

표면에는 수십만 개의 IgE 수용체가 존재하게 된다. 따라서 천식과 같이 항원과 항체반응에 의해 염증이 일어나는 항알레르기 연구에 많이 사용된다 (Jo et al., 2007).

감초 (*Glycyrrhiza uralensis*)는 단맛 성분인 glycyrrhizin을 함유하여 감미료로 사용되고 있으며, 약리작용으로는 해독작용, 진통 및 항경련 작용, 항우울 작용, 면역 작용, 신장염, 전립선암 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다 (Zhao et al., 2008; Fukai et al., 2003; Matsumoto et al., 1996; Fu et al., 2004). Cho 등 (2010)은 감초 추출물을 lipopolysaccharide (LPS)로 자극한 대식세포에 처리하였을 때 NO와 PGE₂를 감소시킨다고 보고하였다. Chung 등 (2001)은 여러 가지 monomer들이 풍부하게 존재하는 감초 조추출물의 효과가 단일 물질인 glycyrrhizin과 그 효소 분해물 보다 더 좋은 효과를 보였고, 감초 추출물은 인간 암세포 성장저해 및 돌연변이 유발 억제 실험에서 50% 억제효과를 나타냈으며, 면역기능은 1.3배 촉진 활성, 혈당강하 효과는 62%의 높은 활성을 보였다고 하였다. Seon 등 (2008)은 인간의 전립선 암세포인 DU145

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-8645 (E-mail) mchoe@kangwon.ac.kr

Received 2010 June 3 / 1st Revised 2010 June 21 / 2nd Revised 2010 July 27 / 3rd Revised 2010 August 2 / Accepted 2010 August 5

에서 감초의 성분인 isoangustone A가 apoptosis를 유도시키고 cell cycle 억제를 통해 DU145 세포증식을 억제한다고 하여 감초의 항암 효능을 입증하였다. Kwak and Park (2004)은 감초가 혈청 IL-4, IL-5, IL-13 및 IgE 생성을 유의적으로 감소시켰고, Song 등 (2004)은 폐조직 내 IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 생성과 혈장 히스타민의 생성을 유의성 있게 감소시켰다고 하였다. Han and Park (2004)은 기관지 폐포 세척액에서의 호산구, IL-4, IL-5, IL-13, IgE 및 면역 유세포 분석에서 과립구, CCR3, CD4, CD69의 생성을 감소시켜 감초가 염증 반응을 억제시키는 효과가 있음을 입증하였다. 한편, Tanifuji 등 (2010)은 감초의 구성성분인 Licochalcone D의 β -hexosaminidase 및 세포 내 Ca²⁺ 유입과 MEK-ERK pathway의 억제를 통하여 mast cell에서 분비되는 탈과립 메카니즘을 규명하는 동시에 항염증 효과를 확인한 바 있다. 이와 같이 감초에 관한 다양한 연구가 진행되었지만 항천식에 관한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구는 항천식 관련 건강기능소재로서 감초의 이용 가능성을 알아보기 위하여 항원-항체 반응으로 인해 활성화된 RBL-2H3 세포에서 감초 추출물이 천식의 초기 반응에 관여하는 β -hexosaminidase의 분비 및 후기 반응에 관여하는 Th2 세포 관련 IL-4, IL-13 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 추출물의 제조

감초는 2009년 6월 춘천시 소재 건재상에서 건시료로 구입하여 냉장보관하면서 사용하였다. 시료의 추출은 Choe 등 (2008)의 방법에 따라 수세한 후 10.7배 증류수를 가하고 60°C에서 24시간 교반하면서 유효성분을 추출하였다. 이를 실온에서 방냉하고 여과한 다음 감압농축기 (rotary vacuum evaporator N-N series, Eyela, Tokyo, Japan)로 농축하였고, 시료를 동결 건조기 (Ilshin FD 8508, Ilshin, Seoul, Korea)를 이용하여 -70°C에서 건조한 시료를 냉동보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's phenol 시약을 이용한 비색법을 이용하였다(Singleton and Rossi, 1965). 증류수에 희석시킨 시료 200 μl 에 증류수 4.8 mL , 50% Folin-Ciocalteu's phenol 시약 500 μl 를 넣고 3분간 방치시켰다. Na₂CO₃ 포화 용액 1 mL 을 넣은 후 1시간 동안 방치 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 tannic acid (Sigma Co., USA)를 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 총 페놀 함량을 측정하였다.

3. DPPH 라디칼 소거작용 측정

DPPH 라디칼 소거활성을 Blois (1958)의 방법에 따라 각 시료의 DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 라디칼에 대한 환원력을 측정하였다. 에탄올에 희석한 시료 600 μl 에 DPPH ($1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$) 200 μl 를 첨가하여 암조건에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 대조구에 대한 시료 첨가구의 흡광도를 비교하여 다음 계산식에 의거하였다.

$$[1 - (\text{시료 첨가구의 흡광도}/\text{대조구의 흡광도})] \times 100$$

4. 세포주 및 배양

Rat basophilic leukemia 세포주인 RBL-2H3 세포는 한국세동주은행에서 분양받아 사용하였다. RBL-2H3 세포는 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지에서 37°C로 유지되는 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.

5. 세포 생존율

배양이 끝난 세포의 생존율은 Chung 등 (2005)에 의한 MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 환원 방법을 이용하여 측정하였다. RBL-2H3 세포를 96 well plates에 $1 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 농도로 100 μl 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 FBS와 DMEM 배지에 감초 추출물을 각 농도별 (0, 100, 250, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g/mL}$)로 제조한 후 세포에 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. DMEM의 10분의 1에 해당하는 MTT 용액 (5 mg/mL)을 가하고 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 배지에 따라 나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하였다. 그런 다음 암조건에서 30분간 전조한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 100 μl 분주하여 1시간 동안 혼합한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. β -hexosaminidase 측정

β -hexosaminidase 분비량 측정은 Huang 등 (2008)의 방법에 준하여 실시하였다. 24-well plates에 RBL-2H3 세포를 10% FBS와 DMEM 배지에 혼탁시킨 후 24-well plate에 $2 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 세포와 dinitrophenyl-ImmunoglobulinE (DNP-IgE) (0.5 $\mu\text{g/mL}$)를 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. 각 세포들을 Siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA, pH 7.2)로 2회 세척한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 10분간 반응시킨 후 FBS와 DMEM 배지에 감초 추출물을 농도별 (0, 100, 250, 500,

감초의 β -hexosaminidase 분비 및 Th2 cytokine mRNA 발현 효과

1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 dinitrophenyl-Human Serum Albumin(DNP-HSA) (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 반응시키고 염음에서 냉각시키고 반응을 종결시켰다.

상층액 40 μl 를 96 well plate에 옮기고 substrate buffer (4-p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide 2 mM, sodium citrate, 0.05 M, pH 4.5) 40 μl 를 넣고 37°C에서 1시간 동안 배양시킨 다음 각 well 당 stop solution 200 μl 를 첨가하여 반응을 종결시키고 microplate reader (EL 808 series, BioTek, Vermont, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. Total RNA 추출 및 cDNA 합성

24-well plate에 RBL-2H3 세포 $2 \times 10^5 \text{ cells}/\text{mL}$ 과 DNP-IgE (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양한 후 감초 추출물을 30분 동안 반응시켰다. 이후 DNP-HSA (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 2시간 반응시키고 4°C PBS로 세척한 후 QIAzol lysis buffer를 각 well에 500 μl 씩 분주하여 세포를 lysis한 후 클로로포름 200 μl 를 분주하여 15초간 혼합하였다. 그 후 12,000 × g에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 이소프로판을 500 μl 들어 있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 12,000 × g에서 10분간 원심 분리하였고, 그 상층액을 제거한 후 100% 에탄올과 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 75 : 25로 섞어 만든 75% 에탄올을 각 튜브에 1 mL 씩 분주하여 12,000 × g에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. Nuclease free water를 15 μl 씩 분주하여 녹인 후 RNA 5 μl 에 0.1% DEPC를 995 μl 를 첨가하여 260 nm에서 흡광도를 측정하였고 total RNA 양을 정량하였다.

First-stand cDNA를 합성하기 위하여 SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen)를 이용하였다. Oligo (dT)₁₅ primer (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1 μl , dNTP Mix (10 mM) 1 μl , 추출한 RNA 1 μg 와 RNase free water로 11 μl 을 맞추고 65°C에서 5분간 반응시킨 후 즉시 염음에서 냉각시켰다. 이후 5배 first-stand 완충용액 4 μl , nuclease free water 1 μl , DTT (100 mM) 1 μl , SuperScript III reverse transcriptase 1 μl 를 섞어 7 μl 씩 각 PCR tube에 더한 후 50°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

Primer의 염기서열은 IL-4, Forward) ACCTTGCTGTCAC CCTGTTC and Reverse) TTGTGAGCGTGGACTCATTC 및 IL-13, Forward) GCTCTCGCTTG CCTTGGTG GTC and

Reverse) CATCCGAGGCCTTTGGTTAGAG 그리고 내부 표준유전자 GAPDH, Forward) ACCACAGTCCATGCCATCAC and Reverse) TCCACCACCCTGTTGCTGTA을 사용하였다.

8. Reverse-transcription PCR (polymerase chain reaction) 반응

IL-4와 IL-13의 mRNA 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 RT-PCR을 실시하였다. PCR 튜브에 Go Tag Green Master 10 μl , forward primer (15 μM)와 reverse primer (15 μM)을 각각 0.5 μl , nuclease free water 8 μl , 합성한 first-stand cDNA 1 μl 을 첨가하여 잘 섞은 후 PCR를 실행하였다. IL-4와 IL-13의 PCR 조건은 94°C에서 4분 (1 cycle), 94°C에서 30초, 60°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초 (25 cycles), 72°C에서 5분 (1 cycle)이었고, GAPDH 조건은 94°C에서 4분 (1 cycle), 94°C에서 30초, 55°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초 (20 cycles), 72°C에서 5분 (1 cycle) 이었다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가된 1.2% agarose gel에 100v에서 30분간 전기영동한 후 자외선 광으로 유전자 발현정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도를 SigmaGel (Jandel Scientific) 소프트웨어에 의해 분석 정량하였다.

9. 통계분석

분석 결과는 평균치와 표준오차로 표기하였고, 통계처리는 SPSS (version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 one-way ANOVA 분석을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의성 ($p < 0.05$)을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 수율 및 총 페놀 함량

감초 추출물의 수율은 건시료 30 g을 물 추출한 후 감암 농축하여 동결 건조된 무게를 측정한 결과는 감초 추출물 6.65 g을 얻어 총 수율 22.16%로 높은 추출 효율을 보였으며, 총 페놀 함량은 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 103.0 mg/g의 함량을 나타내었다 (Table 1).

페놀계 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조를 가지고 있으며 phenolic hydroxyl기가 항산화 등과 같은 생리활성을 나타낸다 (Lee and Min, 2005). Kim 등 (2004)은 예로부터 임상적으로 개년기 및 페

Table 1. Total amount of phenolic compounds of water extracts from *Glycyrrhiza uralensis*.

Sample	Extraction efficiency			Total phenol (mg/g)*
	Sample weight (g)	Extract weight (g)	Product ratio (%)	
GUW**	30.0	6.65	22.16	103.0 ± 1.15***

*Gallic acid equivalent, **GUW : *Glycyrrhiza uralensis* water extract, ***Each value is expressed as mean ± SE of triplicate determinations.

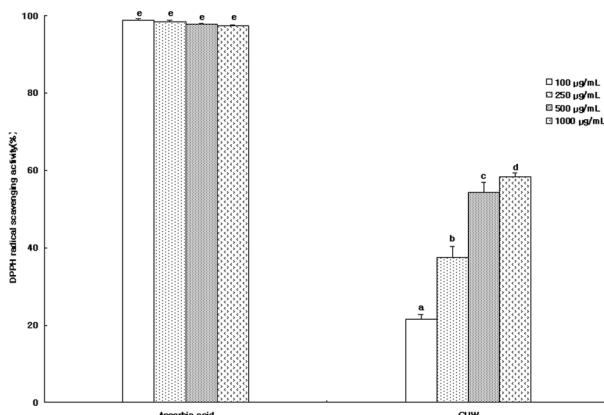


Fig. 1. Effect of *Glycyrrhiza uralensis* on DPPH radical scavenging activity.

*GUW : *Glycyrrhiza uralensis* water extract, **Each value is expressed as mean \pm SE of triplicate determinations. Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

경 후 여성들의 처방에 주로 사용되어 온 생약재 물 추출물의 총 폐놀함량을 측정한 결과, 음양과이 약 81.2 mg/g으로 가장 많았으며, 감초는 34.6 mg/g, 육죽은 약 2.6 mg/g으로 가장 적은 폴리페놀 함량을 나타낸다고 보고하였다. 위 결과와 비교하였을 때 본 실험에 사용된 감초 물 추출물은 상당히 높은 양의 폐놀 함량을 함유하고 있었으며, 이는 시료 추출 온도와 방법, 표준시료의 차이로 인한 것이라 사료된다.

2. 감초 추출물의 DPPH 라디칼 소거작용

DPPH는 화합물내 질소 중심의 라디칼로 자유 라디칼의 안정된 모델로 cystein, glutathion과 같은 함황 아미노산과 L-ascorbic acid 등에 의해 환원되어 탈색되므로 DPPH 전자공여 능을 측정하는 방법은 항산화능을 평가하는데 가장 일반적으로 이용된다 (Choi *et al.*, 2008).

감초 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 결과는 Fig. 1과 같다. 감초 추출물 100, 250, 500, 1000 µg/ml 농도 범위에서 각각 21.2%, 37.4%, 54.2%, 58.3%로 농도 의존적인 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 이는 Table 1에서와 같이 높은 폐놀 함량이 이러한 항산화 작용에 기여한 것으로 사료되며, 폐놀 화합물 함량이 높을수록 전자공여능 또한 높게 나타났다.

Choe 등 (2008)은 7종의 한약재 물 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 알아본 결과 산수유는 농도 의존적으로 라디칼 소거활성이 감소되어 positive control인 L-ascorbic acid와 비슷한 수준의 항산화 활성을 보였으나 1,000 ppm의 산약, 천화분 물 추출물은 50% 이하의 DPPH 라디칼 소거능을 보였다고 보고하였다. 이는 본 실험에 사용한 감초 물 추출물과 같은 농도의 positive control 보다는 낮은 활성이었지만 산약, 천화분에 비교하여 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다.

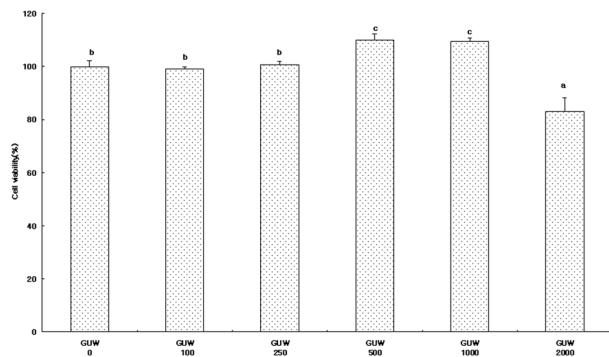


Fig. 2. Effect of *Glycyrrhiza uralensis* on cell viability of RBL-2H3 cells by the MTT assay.

*GUW : *Glycyrrhiza uralensis* water extract, **Each value is expressed as mean \pm SE of triplicate determinations. Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3. 감초 추출물이 세포독성에 미치는 영향

감초의 항천식 활성 측정을 위해 비만세포인 RBL-2H3 세포주에 대한 세포독성을 MTT assay를 통해 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 아무런 처리를 하지 않은 세포의 생존율은 100% 이었으며, 감초 추출물 100, 250 µg/ml의 농도를 처리한 세포에서 각각 99.2%, 100%를 나타내어 유의성 있는 변화는 없었다. 한편 감초 추출물 2000 µg/ml 농도에서는 83.0% 세포 생존율을 보여 약 17% 세포독성을 나타내었다.

결과적으로 감초 추출물 100~1,000 µg/ml의 농도에서는 항천식 활성 측정 시 세포사멸에 큰 영향을 주지 않는 것으로 분석되었다. 따라서 이하의 실험에서는 감초 추출물의 0, 100, 250, 500, 1000 µg/ml 농도 범위에서 세포 내 β -hexosaminidase 분비와 Th2 cytokine의 발현 억제 정도를 확인하였다.

4. 감초 추출물이 탈과립 억제에 미치는 영향

항천식 효과를 측정하기 위한 방법으로는 IgE로부터 감작된 비만세포에서 유리된 히스타민의 양을 측정하는 것이 일반적이지만 비만세포에서 분비되는 히스타민의 농도가 매우 낮고 측정과정이 복잡하여 현재는 β -hexosaminidase assay가 널리 이용된다. β -hexosaminidase는 호염구나 비만세포의 히스타민이 저장된 과립 안에 존재하여 천식, 비염과 같은 알레르기 반응에 의해 세포 밖으로 분비되므로 탈과립의 지표로 이용되며 알레르기 억제물질의 생리활성 측정에 유용하게 사용되고 있다 (Lee *et al.*, 1999; Choi, 2002). 따라서 본 연구에서는 이러한 실험계를 이용하여 감초 추출물이 천식 초기 반응에 관여하는 화학매체의 탈과립 억제 활성을 간접적으로 측정하였다.

감초의 항천식 효과를 살펴보기 위해 비만세포나 호염구 세포의 분비과립에 초래하는 β -hexosaminidase 유리에 미치는 영향을 RBL-2H3 세포주에서 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다.

감초의 β -hexosaminidase 분비 및 Th2 cytokine mRNA 발현 효과

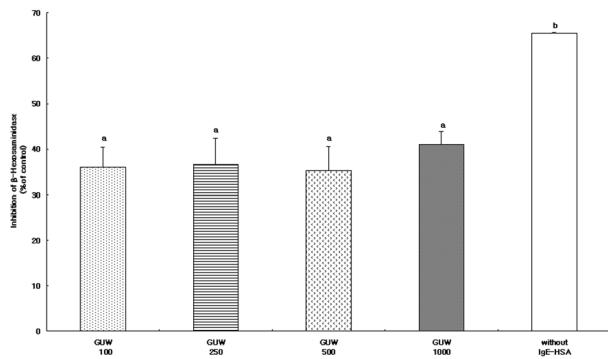


Fig. 3. Ability of *Glycyrrhiza uralensis* to inhibit the β -hexosaminidase release of IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells

*GUW : *Glycyrrhiza uralensis* water extract, **Each value is expressed as mean \pm SE of triplicate determinations. Means with different letters differ significantly from each other ($p < 0.05$), as determined by Duncan's multiple range test.

DNP-IgE와 HSA에 의해 활성화된 RBL-2H3 세포에서 분비된 탈과립의 양을 100%로 보았을 때 자극되지 않은 안정 상태의 세포에서는 $65.5 \pm 0.26\%$ 억제율을 보였으며, 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 감초 추출물을 처리하였을 때에는 항원과 항체에 의해 활성화된 세포를 기준으로 각각 $36.1 \pm 4.28\%$, $36.6 \pm 5.84\%$, $35.3 \pm 5.29\%$, $40.99 \pm 2.90\%$ 로 억제율을 나타내었다. 본 연구와 유사한 조건으로 실험한 Jung 등 (2006)과 Kang 등 (2007)의 승마 (29.8%), 백선피 (14.9%) 보다는 높은 활성 억제를 나타냈지만, 비파염 95%와 유색미겨 추출물 110.0%와 비교해서는 낮은 활성을 보였다 (Jeong et al., 2009; Choi et al., 2005).

5. 감초 추출물이 Th2 Cytokine 발현에 미치는 영향

천식을 포함하는 제1형 과민 반응은 히스타민, 류코트리엔, 프로스타그란딘 등의 화학 액티브物质으로 신속히 일차 반응이 일어나고, 활성화된 비만 세포에서 분비되는 IL-4, IL-5, IL-13 등의 Th2 cytokine 작용으로 pro-inflammatory signal molecule

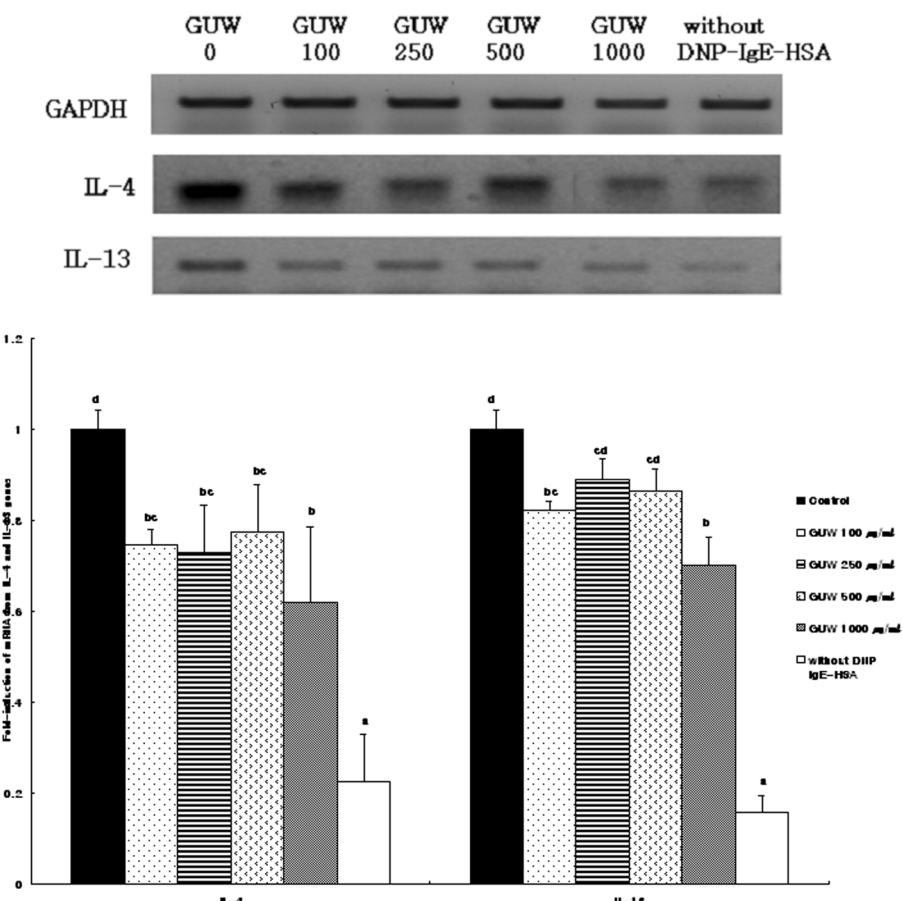


Fig. 4. Effects of *Glycyrrhiza uralensis* on IL-4 and IL-13 mRNA expression on RBL-2H3 cells.

*GUW : *Glycyrrhiza uralensis* water extract, **Each value is expressed as mean \pm SE of triplicate determinations. For each gene, means with different letters differ significantly from each other ($p < 0.05$), as determined by Duncan's multiple range test.

발현을 촉진시켜 알레르기 반응을 일으킨다 (Ngoc *et al.*, 2005; Renauld, 2001). 본 연구에서는 항원-항체 반응을 일으키기 위하여 DNP-IgE와 DNP-HSA를 사용하였는데, DNP는 두 개의 폐놀 기능기를 포함하는 작은 분자로 DNP 자체는 어떤 면역반응이나 항원을 일으키지 않지만 DBP 합텐에 대한 항체로 BSA와 같은 단백질에 결합시키면 항원 역할만 하던 합텐이 면역원의 역할을하게 된다.

본 실험에서는 DNP-IgE (항체)와 HSA (항원)으로 RBL-2H3 세포를 활성화된 감초 추출물이 Th2 cytokine (IL-4과 IL-13)의 발현에 미치는 영향은 Fig. 4와 같다. 항원-항체 반응에 의해 활성화된 세포의 cytokine 분비를 100%로 보았을 때, 활성화되지 않은 세포에서 IL-4와 IL-13은 현저한 감소를 나타내었다. 그러나 감초 추출물 100 µg/ml을 처리하였을 때 IL-4와 IL-13 mRNA 발현량은 각각 $25.4 \pm 0.04\%$, $17.7 \pm 0.02\%$ 억제되었으며, 1,000 µg/ml에서 mRNA 발현은 각각 $38 \pm 0.17\%$, $30 \pm 0.06\%$ 로 유의적인 감소를 나타내었다. 결과적으로 감초 추출물이 천식 병리와 관련된 Th2 cell 관련 cytokine을 억제함으로써 치료 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

IL-4와 IL-13은 Th2에서 분비되는 세포로 B-림프구의 증식과 항체 생산에 관여하며, IL-13 수용체는 IL-4 수용체의 α-사슬을 공유하고 있어 IL-4와 유사한 기능을 가지는 것으로 보고되어 있다 (Hogan and Foster, 1997). 본 실험 결과를 보면 농도별 차이는 있지만 IL-4와 IL-13 mRNA 발현의 전체 경향은 유사한 것을 확인할 수 있었다.

Lim 등 (2004)은 천식유발 생쥐의 기관지 폐포 세척액에서 알레르기 반응을 촉진시키는 IL-4, IL-5, IL-13의 양을 관찰한 결과 대조군에 비해 상백피 추출물을 투여한 군에서 유의성 있는 감소가 나타났다. Baek 등 (2008)은 PMA와 A23187로 자극한 RBL-2H3 세포에 항응해독탕을 처리시킨 결과 농도 의존적으로 IL-4와 TNF-α의 생성과 분비를 저해하는 효과를 확인하였으며, 이러한 결과는 mast cell 및 basophil 등의 면역세포의 탈과립을 억제하고 알레르기 및 염증 반응과 관련된 cytokine 등을 억제하는 기전에 의한 결과로 알레르기의 발병을 예방하고 억제하는 효과가 있다고 판단하였다.

감사의 글

본 연구는 산학연협력 기업부설연구소 설치지원사업의 연구 결과이며 강원대학교 Nutraceutical Bio Brain Korea 21 및 강원의료융합인재양성 센터의 일부 지원으로 수행한 연구결과로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

Baek SI, Bae JH, Kim JY, Sim SH, Kang KH, Lee SY, Kam

- CW and Park DI.** (2008). Anti-allergic inflammatory effects of Hwangyounhaedog-tang on PMA plus A23187-stimulated RBL-2H3 cells. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology.* 22:600-606.
- Blois MS.** (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 181:1199-1200.
- Cho HJ, Lim SS, Lee YS, Kim JS, Lee CH, Kwon DY and Yoon JH.** (2010). Hexane/ethanol extract of *Glycyrrhiza uralensis* licorice exerts potent anti-inflammatory effects in murine macrophages and in mouse skin. *Food Chemistry.* 121:959-966.
- Choe M, Kim DJ, Lee HJ, You JK, Seo DJ, Lee JH and Chung MJ.** (2008). A study on the glucose-regulating enzymes and antioxidant activities of water extracts from medicinal herbs. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition.* 37:542-547.
- Choi OB.** (2002). Anti-allergic effects of *Petasites japonicum*. *Korean Journal of Food and Nutrition.* 15:382-385.
- Choi SP, Kang MY and Nam SH.** (2005). Inhibitory activity of pigmented rice bran extract to the allergic inflammation in basophilic cell line and peritoneal mast cells. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry.* 48:315-321.
- Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Ryu J, Kim DH and Eun JS.** (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of *Artemisia capillaris* thunberg. *Korean Journal of Medicinal Crop Science.* 16:112-117.
- Chung MJ, Walker PA, Brown RW and Hogstrand C.** (2005). Zinc-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 205:225-236.
- Chung WT, Lee SH, Cha MS, Sung NS, Hwang B and Lee HY.** (2001). Biological activities in roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Korean Journal Medicinal Crop Science.* 9:45-54.
- Fu Y, Hsieh TC, Guo J, Kunicki J, Lee MYWT, Darzymkiewicz Z and Wu J.** (2004). Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 322:263-270.
- Fukai T, Satoh K, Nomura T and Sakagami H.** (2003). Preliminary evaluation of antinephritis and radical scavenging activities of glabridin from *Glycyrrhiza glabra*. *Fitoterapia.* 74:624-629.
- Han YJ and Park YC.** (2004). Effects of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch on immunocyte and cytokine production in asthma model mouse. *Korean Journal of Oriental Internal Medicine.* 25:408-417.
- Hogan SP and Foster PS.** (1997). Cytokines as targets for the inhibition of eosinophilic inflammation. *Journal of Pharmacology & Therapeutics.* 74:259-283.
- Huang F, Yamaki K, Tong X, Fu L, Zhang R, Cai Y, Yanagisawa R, Inoue KI, Takano H and Yoshino S.** (2008). Inhibition of the antigen-induced activation of RBL-2H3 cells by sinomenine. *International Immunopharmacology.* 8:502-507.
- Jeong YS, Jung HK, Youn KS, Kim MO and Hong JH.** (2009). Physiological activities of the hot water extract from *Eriobotrya*

감초의 β -hexosaminidase 분비 및 Th2 cytokine mRNA 발현 효과

- japonica* Lindl. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 38:977-982.
- Jo JH, Lyu JH, Kim CH, Kang KH, Yoon HJ, Lee SY, Ko WS and Kim WI.** (2007). The anti-allergic effects of *Taraxaci herba* on the RBL-2H3 cells. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 20:209-217.
- Jung HS, Kang KH, Choi YH, Choi BT and Lee YT.** (2006). Anti allergic effects of *Cimicifuga racemosa* on allergic models. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 20:404-409.
- Kang HG, Lyu JH, Lyu SA, Kang KH, Yoon HJ, Kim YH, Kim GY, Lee SY and Ko WS.** (2007). The anti-allergic effects of *Dictamni radicis* cortex on the PMA plus A23187-stimulated RBL-2H3 cells. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 20:201-208.
- Kim YE, Baik IH, Kim JH, Kim SR and Rhyu MR.** (2004). Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. Korean Journal of Food Science Technology. 36:333-338.
- Kwak SK and Park YC.** (2004). Effects of Gamcho on cytokine production in asthma model mouse. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 18:463-467.
- Lee E, Choi EJ, Cheong H, Kim YR, Ryu SY and Kim KM.** (1999). Anti-allergic actions of the leaves of *Castanea crenata* and isolation of an active component responsible for the inhibition of mast cell degranulation. Archives of Pharmacal Research. 22:320-323.
- Lee JH and Min DB.** 2005. Nutraceuticals, aging, and food oxidation. Akoh *et al* (ed.) in Handbook of Functional Lipids. Taylor & Francis Group, CRC Press. New York, USA. p. 325-350.
- Lim HJ, Kim JK, Shim EK, Hong CH and Hwang CY.** (2004). The inhibitory effects of *Cortex mori* water extract in a mouse model of allergic asthma. Journal of Traditional Korean Medicine. 14:79-99.
- Matsumoto T, Tanaka M, Yamada H and Cyong JC.** (1996). Effect of licorice roots on carrageenan-induced decrease in immune complexes clearance in mice. Journal of Ethnopharmacology. 53:1-4.
- Ngoc LP, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST and Celedon JC.** (2005). Cytokines, allergy, and asthma. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology. 5:161-166.
- Renaud JC.** (2001). New insights into the role of cytokines in asthma. Journal of Clinical Pathology. 54:577-589.
- Richard A, Goldsby, Thomas J, Kindt, Barbara A, Osborne and Kuby J.** (2006). Generation of B-Cell and T-Cell responses. Kang *et al*(ed.) in Kuby Immunology. World science. Seoul, Korea. p. 426-427.
- Seon MR, Park SY, Lim SS, Yoon JH and Kim JS.** (2008). Isoangustone A isolated from the hexane/ethanol extract of *Glycyrrhiza uralensis* induces apoptosis and cell cycle arrest in DU145 human prostate cancer cells. Proceedings of The Convention of The Korean Society of Applied Pharmacology. 352-353.
- Song SJ, Bae HH and Park YC.** (2004). The effects of Gamcho on histamine and cytokine production in murine asthma model. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 18:841-845.
- Stevens RL and Austen KE.** (1989). Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. Immunology Today. 10:381-386.
- Tanifuji S, Aizu-Yokota E, Funakoshi-Tago M, Sonoda Y, Inoue H and Kasahara T.** (2010). Licochalcones suppress degranulation by decreasing the intracellular Ca^{2+} level and tyrosine phosphorylation of ERK in RBL-2H3 cells. International Immunopharmacology. 10:769-776.
- Williams CM and Galli SJ.** (2000). The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 105:847-859.
- Wuthrich B.** (1989). Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase?. International Archives of Allergy and Applied Immunology. 90:3-10.
- Zhao Z, Wang W, Guo H and Zhou D.** (2008). Antidepressant-like effect of liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in chronic variable stress induced depression model rats. Behavioural Brain Research. 194:108-113.