

## RBL-2H3 세포에서 차조기씨 물 추출물의 항산화 및 항염증 효과\*

김정미<sup>1</sup> · 김대중<sup>1</sup> · 김태혁<sup>1</sup> · 김현숙<sup>2</sup> · 최 먼<sup>1,2§</sup>

강원대학교 생명건강공학과,<sup>1</sup> 강원대학교 웰빙특산물산업화지역혁신센터<sup>2</sup>

### Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Effect of Water Extract from *Perillae Semen* in RBL-2H3 Cells\*

Kim, Jeong Mi<sup>1</sup> · Kim, Dae Jung<sup>1</sup> · Kim, Tae Hyuk<sup>1</sup> · Kim, Hyun Sook<sup>2</sup> · Choe, Myeon<sup>1,2§</sup>

<sup>1</sup>Department of Bio-Health Technology, <sup>2</sup>Well-being Bioproducts RIC Center,  
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

#### ABSTRACT

The present study was to investigate anti-oxidative and anti-inflammatory activity of *Perillae semen* in RBL-2H3 basophilic leukemia cells. Inhibitory effect of *Perillae semen* onto free radical generation was determined by measuring DPPH and hydroxyl radical scavenging activities in vitro. Anti-inflammatory actions of *Perillae semen* extracts (100, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$ ) were assessed by testing their effects on the degranulation of mast cells. For this,  $\beta$ -hexosaminidase released from RBL-2H3 cells was used and proinflammatory cytokines were measured by an ELISA kit. Our results indicated that *Perillae semen* water extracts effectively inhibited free radical generation. At the concentration of 500  $\mu\text{g/mL}$  of water extract, the degranulation of RBL-2H3 cells were inhibited by 42.1%. The IgE-antigen complex increased the accumulation of IL-4 and TNF- $\alpha$  secretion in RBL-2H3 cells and treatments with 250 and 500  $\mu\text{g/mL}$  of *Perillae semen* extracts suppressed the IgE induced secretion of IL-4 and TNF- $\alpha$  protein by 20.5, 26.9% and 14.5, 16.5% respectively. We observed that *Perillae semen* water extract reduced  $\beta$ -hexosaminidase, IL-4, and TNF- $\alpha$  secretion in RBL-2H3 cells. These results provide that *Perillae semen* may be beneficial in the treatment of allergic inflammatory disease. (Korean J Nutr 2010; 43(4): 367~373)

**KEY WORDS:** *perillae semen*, RBL-2H3, anti-allergic,  $\beta$ -hexosaminidase, IL-4, TNF- $\alpha$ .

## 서 론

차조기는 자소 (*Perilla frutescens* Britton var. *crispa* Decne)라고도 불리며 꿀풀과에 속하는 한해살이 초본식물로 그 잎을 자소엽이라 하고 여문 씨를 말린 것을 자소자 (*Perilla frutescens*)라고 한다. 중국이 원산지로서 우리나라 각지에서 재배되며 한방에서 차조기는 맛이 맵고, 성질이 따뜻하며 천식, 기침, 가래, 인후염, 소화불량, 요통, 불면증, 아토피 등의 처방에 이용된다. 차조기는 정유를 함유하며 주성분은 perillaldehyde 약 55%,  $\alpha$ -limonene,  $\alpha$ -pinene 등이

며, 앞에는 cyamin, sterin, linolic, stearic, palmitic acid 등이 함유되어 있다.<sup>1,2)</sup>

차조기에 대한 연구는 소엽의 휘발성 향미성분에 관한 분석<sup>3)</sup>과 차조기 추출물의 항균 효과,<sup>4)</sup> 세포독성 및 항암작용,<sup>5)</sup> 염증성 cytokine 생성억제로 소엽과 진통작용으로 관절염에 효과적임이 보고되었다.<sup>6)</sup> 또한 차조기의 면역 기능과 관련된 연구로는 소엽즙이 염증 부위의 호중성 백혈구 및 대식세포의 수와 질에 절대적으로 영향을 미쳐 탐식능을 증대시키고, 혈관내피세포의 부착능, 활성산소와 산생능 등을 활성화시켜 염증성 피부질환의 치료에 유용하다고 보고하였다.<sup>7)</sup> 가미 소자강기탕은 알레르기 천식에 있어서 호흡 양상을 개선시키고, 기관조직 내의 부종, 호산구 침윤을 감소시키며,<sup>8)</sup> 차조기씨유가 알리지 반응 및 노화 등에 유의적인 효과를 기대할 수 있다고 하였다.<sup>9)</sup> Yang 등<sup>10)</sup>은 소엽 추출물이 허혈성 뇌졸환에 사용되어 뇌손상을 억제할 가능성이 높으며 이와 관련된 기전은 IL-10의 생성량 증가를 통한 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 생성 억제와 관련이 깊다는 것을 천명하였다. 또한 면역

접수일 : 2010년 6월 7일 / 수정일 : 2010년 7월 6일  
채택일 : 2010년 7월 27일

\*This research was partially supported by the Nutraceutical Bio Brain Korea 21 Project Group in Kangwon National University and Well-being Bioproducts Regional Innovation Center Project.

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr

기능 항진에 의하여 발생하는 천식 또는 류머티스 관절염 등에도 사용할 수 있는 가능성을 발견하였다. 한편, 차조기에 관한 다양한 연구가 진행되었지만 차조기씨의 항산화 및 항알레르기 염증 효능에 관한 연구는 매우 부족한 실정이다.

우리나라 뿐 아니라 전 세계적으로 발병률이 증가되고 있는 천식의 유발 원인으로는 많은 종류들이 알려져 있지만 개인에 대한 차이가 매우 크게 나타나는 질병이다. 각종 알레르기에 노출될 경우 기도와 폐에 면역과민 반응이 발생하여 근육의 수축과 함께 점액물질이 분비되어 호흡곤란이 일어나며, 이러한 증상이 지속될 경우에는 목숨을 잃을 수도 있다.<sup>11,12)</sup> 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.<sup>13,14)</sup> 또한 IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$  등 Type2 cytokine이 eosinophil과 mast cell,  $\beta$ -Cell 등을 활성화시켜 IgE 생성을 촉진시키고 염증 세포들을 기관지로 끌어들여 만성 염증질환을 유도하게 된다.<sup>15,16)</sup> 이에 대한 처방은 주로 스테로이드나 항히스타민 계열의 약물을 이용하여 경직된 근육을 이완시켜주거나 통증을 완화시켜주는 것으로 많은 약물들이 판매되고 있다. 최근 천식과 관련한 신약의 개발 방향은 히스타민을 억제시키는 방법과 천식관련 분자 표적인 IL-4, IL-13 cytokine의 억제하는 방법에 대한 연구로 진행되어지고 있다.<sup>17)</sup>

본 연구에서는 식용과 약용으로 많이 사용되지만 그 효능에 대한 연구가 많이 진행되지 않은 차조기씨의 항산화성 및 항염증 효능을 규명하기 위하여 총 페놀함량, 전자공여능, OH-소거능을 측정하였으며, mast cell line인 RBL-2H3 세포를 이용하여 점액 분비를 일으키는  $\beta$ -hexosaminidase와 IL-4, TNF- $\alpha$ 의 분비에 차조기씨 물 추출물이 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 주출물의 제조

차조기씨는 춘천시 소재 건재상에서 구입하였으며, 수세한 후 10.7배 증류수를 가하여 60°C에서 24시간 교반하면서 유효성분을 추출하였다. 이를 실온에서 방냉하고 여과한 다음 감압농축기 (Eyela, Japan)로 농축하였고, 동결 건조기 (Ilshin FD 8508, Korea)을 이용하여 -70°C에서 건조한 시료를 냉동보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

### 총 폴리페놀 함량 측정

총페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's phenol 시약을 이용한 비색법을 이용하였다.<sup>18)</sup> 증류수에 희석시킨 시료 200  $\mu$ L에 증류수 4.8 mL, 50% Folin-Ciocalteu's phenol 시약 500  $\mu$ L를 넣고 3분간 방치시켰다. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액 1 mL을 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.

### 전자공여능 측정

시료의 전자공여능은 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)을 사용한 방법으로 측정하였다.<sup>19)</sup> 에탄올에 농도별로 희석시킨 추출물 (100, 250, 500, 1000  $\mu$ g/mL) 600  $\mu$ L에 DPPH ( $1.5 \times 10^{-4}$  M) 200  $\mu$ L를 첨가하여 암조건에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능 (%)은 (1-시료의 흡광도/대조구의 흡광도)  $\times$  100에 의하여 산출하였다.

### Hydroxyl radical 소거능 측정

Hydroxyl radical 소거 활성은 Chung 등의 방법을 응용하여 측정하였다.<sup>20)</sup> 농도별로 희석시킨 시료 (100, 250, 500, 1,000  $\mu$ g/mL) 100  $\mu$ L, 100 mM sodium phosphate (pH 7.4) 250  $\mu$ L, 1 mM EDTA 100  $\mu$ L, 36 mM deoxyribose 100  $\mu$ L, 1 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 100  $\mu$ L, 1 mM L-ascorbic acid 100  $\mu$ L, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ L, 증류수 150  $\mu$ L를 첨가하여 38°C acid 1 mL, 10% trichloroacetic acid 1 mL를 첨가하여 100°C에서 10분간 boiling 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식에 의거하여 hydroxyl radical 소거 활성을 구하였다.

Hydroxyl 라디칼 소거능 (%) =

$$\frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}$$

### 세포 배양

Rat basophilic leukemia cell인 RBL-2H3세포는 한국 세포주은행 (Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양 받은 뒤 10% heat-inactivated FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 배양하였다.

### 세포 생존율

배양이 끝난 세포의 생존률은 MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] 환원 방법을 이용하여 측정하였다.<sup>21)</sup> Rat basophilic leukemia cell

line (RBL-2H3) 세포를 96-well plates에  $1 \times 10^6$  cells/mL 농도로 100  $\mu$ L 씩 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 FBS와 1% Penicillin/Streptomycin이 첨가되지 않은 배지에 시료를 농도별 (0, 100, 250, 500, 1,000, 2,000 mg/L)로 제조한 후 세포에 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 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 건조한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 100  $\mu$ L 분주하여 1시간 동안 혼합한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**탈과립화 측정**

RBL-2H3 세포로부터 탈과립화 측정은 탈과립의 바이오마커인  $\beta$ -hexosaminidase 분비 저해 활성을 측정하여 조사하였다.<sup>22)</sup> 24-well plates에 RBL-2H3 세포를 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM 배지에 현탁시킨 후 24-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/mL 세포와 dinitrophenyl-immunoglobulin E (DNP-IgE, 0.5  $\mu$ g/mL)를 분주한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 12시간 배양하였다. 각 세포들을 Siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM PIPES, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA, pH 7.2)로 2회 세척한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 10분간 반응시킨 후 FBS와 1% penicillin-streptomycin가 첨가되지 않은 배지에 시료를 농도별 (0, 100, 250  $\mu$ g/mL)로 희석시켜 세포에 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 dinitrophenyl-human serum albumin (DNP-HSA, 10  $\mu$ g/mL)을 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2시간 반응시키고 ice bath에서 10분간 incubation시켜 반응을 종결시켰다. 상층액 40  $\mu$ L를 96-well plate에 옮기고 substrate buffer (4-p-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide 2 mM, sodium citrate, 0.05 M, pH 4.5) 40  $\mu$ L를 넣고 37°C에서 1시간 동안 배양시킨 다음 각 well 당 stop solution 200  $\mu$ L를 첨가하여 반응을 종결시키고 microplate reader (EL 808 series, BioTek, Vermont, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Secretion of  $\beta$ -Hexosaminidase (%) =

$$\frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

**Cytokine (IL-4, TNF- $\alpha$ ) 분비능 측정**

24-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/mL의 세포와 DNP-IgE (0.5  $\mu$ g/mL)를 분주한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 12시간 배양한 다음 새로운 DMEM 배지에 시료를 농도별 (0, 100, 250  $\mu$ g/mL)로 희석시켜 세포에 처리하였다. 30분 동안 배양한 후 DNP-HAS (10  $\mu$ g/mL)를 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2시간 반응시키고 ice bath에서 10분간 incubation 하여 반응을 종결시켰다. 배양이 끝난 상층액을 96-well ELISA plate에 옮기고, IL-4와 TNF- $\alpha$  IL-4와 TNF- $\alpha$  농도를 측정하였다.

**통계분석**

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 GraphPad InStat (GraphPad InStat Version 3.00, 2003) 프로그램을 이용하여 실험군당 평균  $\pm$  표준오차로 표시하였고, 각 농도 평균치의 통계적 유의성을 p < 0.05 수준에서 Tukey-Kramer multiple comparisons test에 의해 검정하였다.

**결 과**

**수율 및 총 페놀 함량**

차조기씨 물 추출물의 수율은 건시료 30 g을 추출한 후 감압 농축하여 동결 건조된 무게를 측정한 결과, 차조기씨 물 추출물 1.6 g을 얻어 수율 5.6%의 효율을 보였다. 총 페놀 함량은 130.7  $\pm$  5.8 mg/g을 함유하는 것으로 나타났다 (Table 1).

**전자공여능**

차조기씨 물 추출물의 전자공여능을 측정하기 위하여 DPPH radical에 대한 소거활성을 측정하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 차조기씨 물 추출물은 100, 250, 500, 1,000  $\mu$ g/mL에서 각각 11.1  $\pm$  1.8, 22.3  $\pm$  3.1, 36.9  $\pm$  0.9, 38.9  $\pm$  5.4%로 대조군과 비교하였을 때 농도 의존적으로 전자공여능이 증가하였다.

**Table 1.** Extraction efficiency and total amount of phenolic compounds of *perillae* semen water extracts

Sample	Extraction efficiency			Total phenol <sup>1)</sup> (mg/g)
	Sample weight (g, dry)	Extract weight (g, dry)	Yield (%)	
Water extracts	30.0	1.56	5.2	130.7 $\pm$ 5.8

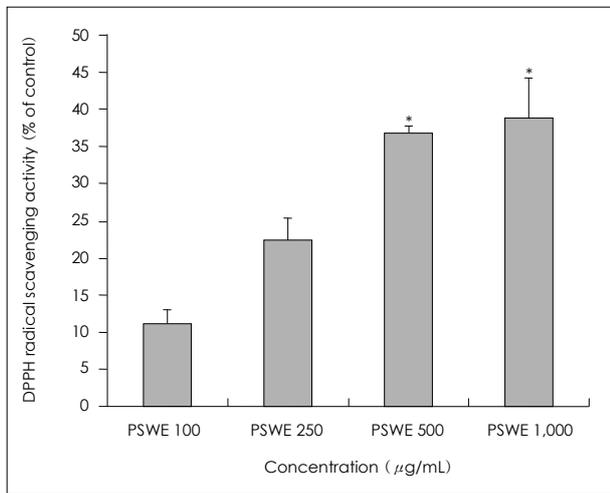
1) Results were represented as mean  $\pm$  SE of three independent experiments

### Hydroxyl radical 소거능

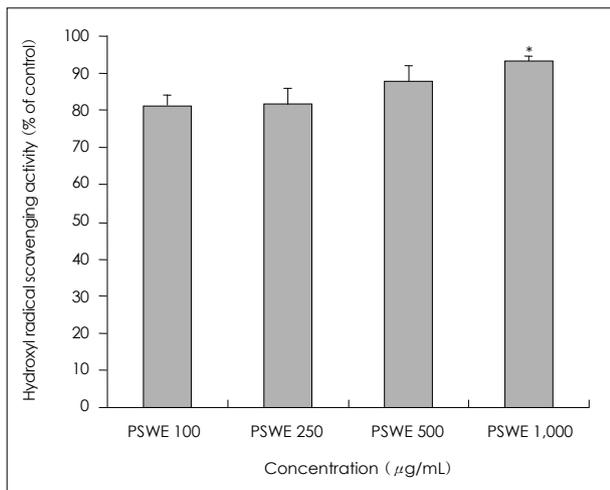
차조기씨 물 추출물 100, 250, 500, 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 hydroxyl 라디칼 소거능을 측정한 결과, Fig. 2와 같이 각각  $81.2 \pm 2.7$ ,  $81.6 \pm 4.2$ ,  $87.6 \pm 4.3$ ,  $93.1 \pm 1.3\%$ 로 차조기씨 물 추출물의 농도가 증가할수록 hydroxyl radical 소거활성이 증가되었으며, 고농도인 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 93.1%로 가장 높았다.

### 세포독성

차조기씨 물 추출물에 대한 세포독성을 알아보기 위해 활성화된 RBL-2H3 세포에 농도 의존적으로 처리하여 24시간 후 세포 생존율을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 시료의



**Fig. 1.** Effect of *Perillae semen* water extracts (PSWE) on DPPH radical scavenging activity. The values shown are means  $\pm$  SE (n = 3). Significant differences were compared with control at \*: p < 0.05 vs. control.



**Fig. 2.** Effect of *Perillae semen* water extracts (PSWE) on hydroxyl radical scavenging activity. The values shown are means  $\pm$  SE (n = 3). Significant differences were compared with control at \*: p < 0.05 vs. control.

100, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위에서 각각  $98.2 \pm 2.7$ ,  $98.1 \pm 2.7$ ,  $96.5 \pm 1.5\%$  세포 생존율을 나타내었고 대조군과 비교했을 때 유의적인 차이가 없었지만, 1,000 및 2,000  $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 약 10%의 세포독성을 나타내었다. 따라서 차조기씨 물 추출물을 이용한 항히스타민과 cytokine 활성 측정 시 세포 생존율에 영향을 주지 않는 500  $\mu\text{g/mL}$ 농도 범위에서 진행하였다.

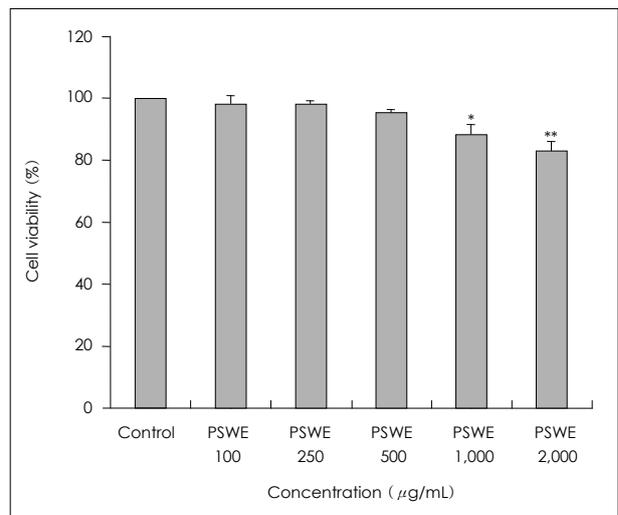
### $\beta$ -Hexosaminidase 분비능

차조기씨 물 추출물의 항염증 효과를 살펴보기 위해 비만 세포나 호염구 세포의 분비과립에 초래하는  $\beta$ -hexosaminidase 분비에 미치는 영향을 RBL-2H3 basophilic 세포주에서 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 차조기씨 물 추출물의 100, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$ 농도에서  $\beta$ -hexosaminidase 분비능은 대조군을 기준으로 각각  $67.8 \pm 11.9$ ,  $65.0 \pm 1.3$ ,  $57.9 \pm 3.2\%$ 로 농도 의존적으로 감소하였고, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$ 에서 유의하게  $\beta$ -hexosaminidase 분비가 억제되었다 (p < 0.05).

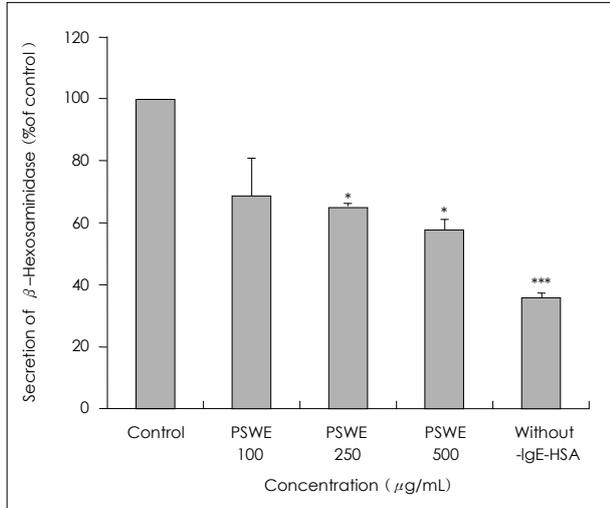
### Cytokine 분비능

차조기씨 물 추출물이 DNP-IgE와 HSA로 염증을 유도시킨 RBL-2H3 세포에서 cytokine IL-4와 TNF- $\alpha$  생성량에 미치는 영향을 알아보기 위해 시료를 100, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$ 농도로 전처리하여 cytokine의 분비량을 측정한 결과는 Fig. 5와 Fig. 6에 나타내었다.

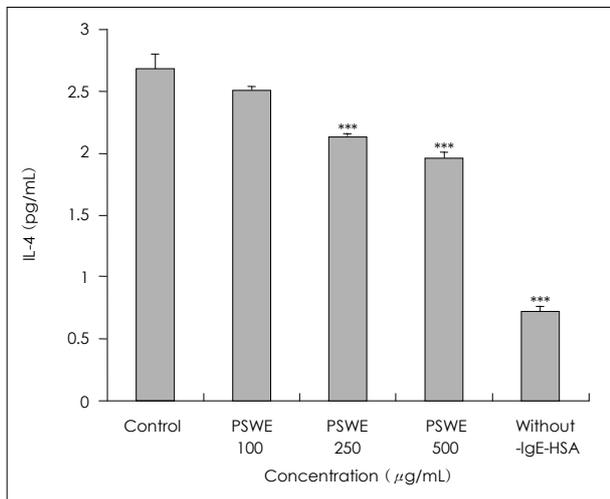
IL-4의 분비량은 항원-항체로 염증을 유도시키지 않은 안정 세포 (without IgE-HSA)에 비해 염증을 유도시킨 대



**Fig. 3.** Effect of *Perillae semen* water extract (PSWE) on the cell viability in RBL-2H3 cells. Results are from three experiments and are expressed as mean  $\pm$  SE. Significant differences were compared with control at \*: p < 0.05 vs. control, \*\*: p < 0.01 vs. control.

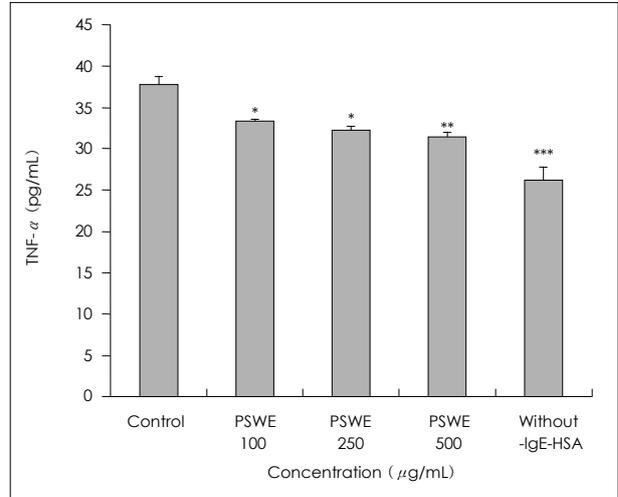


**Fig. 4.** Effect of *Perillae semen* water extract (PSWE) on  $\beta$ -hexosaminidase release from RBL-2H3 cell. RBL-2H3 cells ( $2 \times 10^5$  cells) in 24-well plates were preincubated with  $0.5 \mu\text{g/mL}$  anti-DNP IgE (antibody) for 12h, washed with Siraganian buffer, incubated in Siraganian buffer containing  $5.6 \text{ mM CaCl}_2$  and  $0.1\%$  BSA for 10 min, and then treated with 1 mL of PSWE for 30 min. To activate the cells and evoke an allergic reaction, the cells were stimulated for 2h with DNP-HSA (antigen;  $10 \mu\text{g/mL}$ ). The control group stimulated a cell with an antigen and antibody. However, without IgE-HSA group did not stimulate.  $\beta$ -Hexosaminidase secretion into the supernatant was then measured. Results are from three experiments and are expressed as mean  $\pm$  SE. Significant differences were compared with control at \*:  $p < 0.05$  vs. control, \*\*\*:  $p < 0.001$  vs. control.



**Fig. 5.** Effects of *Perillae semen* water extract (PSWE) on IL-4 secretion from RBL-2H3 cell. The cells were treated primed with anti-DNP IgE, treated with PSWE and stimulated with DNP-HSA as described in Fig. 4, and the supernatant was subjected to ELISA. Results are from three experiments and are expressed as mean  $\pm$  SE. Significant differences were compared with control at \*\*\*:  $p < 0.001$  vs. control.

조 균 세포에서 IL-4의 분비량은  $2.68 \pm 0.1 \text{ pg/mL}$ 로 현저히 증가되었다. 그러나 차조기씨 추출물을 250, 500  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하였을 때에는 각각 2.13  $\text{pg/mL}$ , 1.96



**Fig. 6.** Effects of *Perillae semen* water extract (PSWE) on TNF- $\alpha$  secretion from RBL-2H3 cell. The cells were treated primed with anti-DNP IgE, treated with PSWE and stimulated with DNP-HSA as described in Fig. 4, and the supernatant was subjected to ELISA. Results are from three experiments and are expressed as mean  $\pm$  SE. Significant differences were compared with control at \*:  $p < 0.05$  vs. control, \*\*:  $p < 0.01$  vs. control, \*\*\*:  $p < 0.001$  vs. control.

$\text{pg/mL}$ 로 대조군과 비교했을 때 유의적으로 감소되었다 ( $p < 0.001$ ).

TNF- $\alpha$ 의 경우에도 DNP-IgE와 HSA로 처리하지 않은 세포에서  $26.1 \pm 1.6 \text{ pg/mL}$ 로 대조군의  $37.8 \pm 1.00 \text{ pg/mL}$ 보다 현저히 낮은 분비량을 나타내었다. 그러나 차조기씨 물 추출물을 100, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하였을 때에는 각각  $33.3 \pm 0.3$ ,  $32.3 \pm 0.4$ ,  $31.5 \pm 0.5 \text{ pg/mL}$ 로 대조군과 비교하였을 때 유의성 있는 감소를 보였다 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ).

따라서 차조기씨 물 추출물은 IL-4와 TNF- $\alpha$  생성량을 감소시킴으로서 항염증에 대한 작용을 나타낼 수 있음을 보여주는 결과라 하겠다.

## 고 찰

본 연구는 RBL-2H3 세포에서 차조기씨 물 추출물의 항산화 및 항염증 효과를 알아보기 위하여 DNP-IgE와 HSA로 세포를 활성화시켰다. 활성화된 비만 세포에서 분비되어 나오는 히스타민을 효소적 방법으로 측정하였으며, 염증성 사이토카인 IL-4과 TNF- $\alpha$ 의 생성량은 ELISA 방법으로 측정하였다.

차조기씨 물 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH 및 hydroxyl radical 소거능을 측정한 결과, 100, 250, 500, 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 범위에서 농도 의존적으로 증가되었으며, 1,000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 각각 38.9, 93.1%로 가장 높

았다. 차조기씨 물 추출물의 항산화 효과는 차조기씨에 함유된 130.7 mg/g의 높은 페놀 함량에 기인한다고 사료된다. 차조기 잎의 항산화 활성에 대한 연구에서 물과 에탄올 추출물의 전자 공여능은 18~30% 정도로 낮았으나, 분획물에서는 50% 이상의 활성이 나타났다고 보고하였다.<sup>23)</sup> 자소자 탈지 시료로부터 페놀성 물질을 추출하여 측정된 전자 공여능은 93.0%로 항산화 활성이 높게 나타났고, 이는 BHA (82.5%), BHT (76.2%) 보다 더 높았다고 보고하였다.<sup>24)</sup> Kim 등<sup>25)</sup>은 소엽의 에탄올 추출물의 전자공여능, 아질산염 소거능이 우수한 것으로 보고하였는데, 이는 소엽의 총 페놀성 화합물 함량이 열수 추출물 (96.8 mg/g)에 비해 에탄올 추출물 (120.5 mg/g)에서 1.2배 이상 높게 함유되었기 때문이라고 하였다.

차조기씨 물 추출물이 항원-항체 복합 반응에 의해 유발되는 제1형 알레르기 반응에서의 항알레르기 염증 효과를 알아보기 위하여 알레르기 반응으로 인해 생성되는 히스타민과 사이토카인의 분비를 측정하였다. 차조기씨 물 추출물을 염증 유발시킨 비만세포주인 RBL-2H3 세포에 처리하여 탈과립에 미치는 영향을 측정한 결과, DNP-IgE와 HSA를 처리하지 않은 안정상태의 RBL-2H3 세포에서 분비된 탈과립은  $36.0 \pm 1.3\%$ 로 나타났고, 대조군에서는 현저한 증가를 나타내었으며, 각 추출물 처리군은 100, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각  $68.8 \pm 11.9$ ,  $64.9 \pm 1.3$ ,  $57.8 \pm 3.2\%$ 의 분비로 농도가 증가할수록 유의적인 감소를 나타내었다. 차조기씨 물 추출물의 항히스타민 효과는 동일한 농도 (100  $\mu\text{g/mL}$ )의 비파엽 열수추출물과 비교 시 약 2배 정도 높았다.<sup>26)</sup>

항히스타민제는 주로 알레르기 질환의 치료에 이용되고 있는 약물로 1세대와 2세대로 나누어 볼 수 있는데 1세대에서는 진정, 구갈, 기도분비 억제와 2세대에서는 녹내장, 전립선 비대와 같은 부작용들이 보고되고 있다.<sup>27)</sup> 그러나 환경오염과 식생활의 변화로 인하여 아토피, 천식, 비염과 같은 알레르기 질환은 가속화 될 것으로 예상되며, 이러한 알레르기 치료에 있어서 점액 분비, 가려움 및 통증 억제를 위해 항히스타민 약제의 사용은 부작용에도 불구하고 계속적으로 증가될 것이다. 따라서 차조기씨 물 추출물의 항히스타민 효과는 추가적인 연구를 통해 천연 히스타민 저해제로의 개발이 가능성을 제시해준다.

IL-4는 주로 T림프구, 비만세포, 호염기성세포에서 생성되며, B 세포를 증식, 분화시켜 IgE의 생성을 촉진시키는 사이토카인으로 실제 알레르기 천식환자에 있어서 IL-4, IL-5가 증가되어 있음이 여러 연구에서 보고되었다.<sup>28,29)</sup> 차조기씨 물 추출물의 사이토카인 분비능에 대한 연구에서 IL-4 분비량에 대한 결과는 낮은 농도인 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 차조

기씨를 처리하지 않은 군과 비교하였을 때 유의적인 감소를 나타내지 않았으나, 250 및 500  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 처리하였을 때 20.5, 26.9%로 IL-4의 분비를 유의적으로 감소시켰다. 이는 동일한 농도 (500  $\mu\text{g/mL}$ )에서 실험한 방기 추출물의 시노메닌 성분 결과 (12.5%)와 포공영 추출물의 결과 (9.6%)와 비교하면 높은 억제율을 보였다.<sup>22,30)</sup>

TNF- $\alpha$ 는 전구염증인자로서 비만세포와 대식세포 등에서 생성되어 많은 염증반응을 유발하는 인자로 알레르기 염증 반응에 중요한 역할을 미친다. 알레르기 반응이 시작되면 비만세포에서 탈과립되면서 내부의 TNF- $\alpha$ 는 히스타민 및 다른 염증 매개인자들과 함께 유출되게 되어 증상을 더욱 악화시킨다.<sup>31)</sup> RBL-2H3 세포로부터의 TNF- $\alpha$ 의 분비량은 아무런 처리를 하지 않은 군에서는  $26.2 \pm 2.6$  pg/mL로 DNP-IgE와 HSA로 세포를 자극시킨 군  $37.8 \pm 1.0$  pg/mL에 비하여 현저히 낮았다. 그러나 차조기씨 추출물을 처리시킨 군에서는 아무 것도 처리시키지 않은 안정 세포에 비해서는 분비량이 높았으나 대조군과 비교하였을 때에는 유의적인 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 차조기씨 추출물이 DNP-IgE와 HSA로 자극한 RBL-2H3 세포에서 IL-4와 TNF- $\alpha$ 의 발현을 억제하여 염증을 억제하는 기전을 가지고 있음을 보여준다.

결론적으로 차조기씨 물 추출물은 활성화된 비만세포에서의 탈과립을 억제하며, 염증성 사이토카인인 IL-4와 TNF- $\alpha$  분비량을 억제함으로써 항원-항체 반응으로 발병되는 알레르기 질환의 예방 및 개선에 유용할 것이라 생각된다.

## 요 약

RBL-2H3 세포에서 차조기씨 물 추출물의 항산화성 및 항염증 효과를 알아보기 위하여 DNP-IgE와 HSA로 세포를 활성화시켰다. 활성화된 비만 세포에서 분비되어 나오는 히스타민을 효소적 방법으로 측정하였으며, 염증성 사이토카인 IL-4과 TNF- $\alpha$ 의 생성량은 ELISA 방법으로 측정하였다. 차조기씨 물 추출물은 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가되었으며, 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 DPPH와 hydroxyl radical 소거능이 각각 38.9, 93.1%로 가장 높게 나타났다. 이는 차조기씨에 함유된 130.7 mg/g의 높은 페놀 함량에 기인하여 항산화 효과를 나타내었다. 한편 차조기씨 물 추출물을 처리하지 않은 세포에서는 현저히 높은 양의 히스타민을 분비하였지만, 각 추출물의 농도로 처리시킨 세포에서의 분비량은 유의적으로 감소되었고, IL-4와 TNF- $\alpha$ 의 분비량 모두 차조기씨 물 추출물을 처리군은 대조군에 비해서 유의적으로 낮은 생성량을 보여주었다. 결과적으로 차조기씨 물

추출물은 비만세포에 항원-항체 반응으로 인해 발병되는 제 1형 알레르기 반응의 약학적 효능을 가진 것으로 나타나 임상적으로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사용되며, 향후이에 대한 심층적이고 체계적인 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

Literature cited

- 1) Jang SM, Noh SH, Park SD. Botany of herbal resource, Hakmun publishing Co.; 1999. p.473-476
- 2) Noh SH, Kim SH, Lee Kh, Ahn DK, Lee YJ, Kang BS, Ko WC, Song HJ, Joo YS. Medicinal plants, Young Lim Publishing Co.; 1991. p.125-128.
- 3) Chung MS, Lee MS. Analysis of Volatile Flavor Components from *Perilla frutescens* var. *acuta* and Sensory Evaluation as Natural Spice. *Korean J Soc Food Sci* 2000; 16(3): 221-224
- 4) Lee ES, Seo BI. Growth inhibition of *Perilla frutescens* var. *acuta* extract. *Kor J Herbology* 2005; 20(2): 83-89
- 5) Han DS, Chung BH, Yoo HG, Kim YO, Baek SH. Studies on the cytotoxicity and antitumor activity of *Perilla frutescens*. *Kor J Pharmacogn* 1994; 25(3): 249-257
- 6) Kim SN, Lee EJ, Lee HJ, Nam GS, Kim HS, Hwang SW, Hwang SY. Effect on inflammatory-cytokines production inhibition and analgesic activity of *Perilla frutescens* extracts. *Korean J Oriental Physiology* 2006; 20(2): 414-419
- 7) Yamazaki M, Ueda H, Du D. Inhibition of *Perilla kuice* of tumor necrosis factor production. *Biosci Biotech Biochem* 1992; 56(1): 151-152
- 8) Park DI, Kang RW. The Effects of Gami-Sojagangki-Tang on the Respiratory Patterns and Tracheal Tissues in Allergic Asthma, *J Dong-Eui Oriental Medicine* 2000; 4(1): 14-24.
- 9) Okuyama H. Minium requirements of n-3 and n-6 essential fatty acids for the function of central mervous system and for the prevention of chronic dease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 200(2): 174-176
- 10) Yang GH, Kim HW, Cho SJ, Kim SD, Yoon KH, Kim BY, Jeong HW, Cho SI. Effects fo *Folium perillae* on cytokine productions in ischemic rats. *Kor J Herbology* 2007; 22(3): 93-99
- 11) Kim K, Mckinley L, Nataraja S, Bolgos GL, Siddiqui J, Copeland S, Remick DG. Anti-tumor necrosis factor-alpha antibody treatment reduces pulmonary inflammation and methacholine hyper-responsiveness in a murine asthma model indyced by house dust. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(1): 122-132
- 12) Ludy SK, Berlin AA, Nartens TF, Lukacs NW. Deficiency of regulatory B cells increases allergic aitway inflammation. *Inflamm Res* 2005; 54(12): 514-521
- 13) Stevens RL, Austen KF. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol Today* 1989; 10(11): 381-386
- 14) Wuthrich B. Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase? *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 90(1): 3-10
- 15) Richard A, Goldsby, Thomas J, Kindt, Barbara A, Osborne, Kuby J. *Kuby immunology*. Seoul: Worldscience; 2006. p.426-427
- 16) Williams CM, Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(5): 847-859
- 17) Trottein F, Mallevaet T, Faceeuw C, Capron M, Leite-de-Moraes M. Role of the natural killer T lymphocytes in Th2 responses during allergic asthma and helminth parasitic disease. *Chem. Immunol Allergy* 2006; 90(1): 113-127
- 18) Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* 2007; 2(4): 875-877
- 19) Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 26(1): 1199-1200
- 20) Chung MJ, Walker PA, Brown RW, Hogstrand C. Zinc-mediated gene expression offers protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 205(3): 225-236
- 21) Chung MJ, Sung NJ, Park CS, Kweon DK, Mantovani A, Moon TW, Lee SJ, Park KH. Antioxidantive and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and in C57BL/6J mice. *Eur J Pharmacol* 2008; 578(2-3): 159-170
- 22) Hung F, Yamaki K, Tong X, Fu L, Zhang R, Cai Y, Yanagisawa R, Inoue KI, Takano H, Yoshino S. Inhibition of the antigen-induced activation of RBL-2H3 cells by sinomenine. *Int Immunopharmacol* 2008; 8(3): 502-507
- 23) Kim MH, Kang WW, Lee NH, Kwoen DJ, Choi UK. Antioxidant activities of extract with water and ethanol of *Perilla frutescens* var. *acuta* kudo Leaf. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2007; 50(4): 327-333
- 24) Kim YJ, Kim CK, Kwon YJ. Isolation of antioxidative components of *Perillae* semen. *Korean J Food Sci Technol* 1997; 29(1): 38-43
- 25) Kim JO, Lee GD, Im AG, Lee JT, Choe HJ, Kim DI. Antioxidative and biological activity of extracts from *Perilla frutescens* var. *acuta*. The Korean Society of Food Preservation Semiannual; 2007. p.233.
- 26) Jeong YS, Jung HK, Youn KS, Kim MO, Hong JH. Physiological activities of the hot water extract from *Eriobotrya japonica* Lindl. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2009; 38(8): 977-982
- 27) Lee SW, Lee YJ, Son JK. Antihistaminic action of the several medicinal plan extracts. *J Appl Pharmacol* 1996; 1(4): 36-45
- 28) Ngoc LP, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedon JC. Cytokine, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5(1): 161-166
- 29) Boushey HA, Fahy JV. Targeting Cytokines in asthma therapy: round one. *Lancet* 2000; 356(9248): 2114-2116
- 30) Jo JH, Lyu JH, Kim CH, Kang KH, Yoon HJ, Lee SY, Ko WH, Kim WI. The Anti- allergic effects of Tarazaci Herba on the RBL-2H3 Cells. *J Korean Oriental Medical Ophthalmology Otolaryngology Dermatology* 2007; 20(1): 209-217
- 31) Chung KF, Barnes PJ. Cytokine in asthma. *Thorax* 1999; 54(1): 825-857