

## 총울자 EtOAc 분획의 항알러지 및 항염증 효과

정유정 · 전영식 · 김형자\* · 강기성\*\* · 김용기\*\*\* · 김수남<sup>#</sup>

한국과학기술연구원 천연물융합연구센터, \*한국과학기술연구원 분자인식연구센터,

\*\*가천대학교 한의과대학, \*\*\*숙명여자대학교 약학대학

(Received June 10, 2014; Revised August 19, 2014; Accepted September 4, 2014)

## Anti-allergic and Anti-inflammatory Effect of *Leonurus sibiricus* Seed Ethyl Acetate Fractions

Yujung Jung, Youngsic Jeon, Hyung Ja Kim\*, Ki Sung Kang\*\*, Yong Kee Kim\*\*\* and Su-Nam Kim<sup>#</sup>

Natural Products Research Center, KIST Gangneung Institute, Gangneung 210-340, Korea

\*Molecular Recognition Research Center, KIST, Seoul 136-791, Korea

\*\*College of Korean Medicine, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea

\*\*\*College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-741, Korea

**Abstract** — In this study, we investigate anti-allergic and anti-inflammatory effects of *Leonurus sibiricus* seed (LSS) extract in basophilic leukemia RBL-2H3 cells. To identify anti-allergic actions of LSS, the degranulation was evaluated in IgE and DNP-BSA stimulated RBL-2H3 cells. At the concentration of 100 µg/ml of methanol (MeOH) extract and Methylene chloride (MC) and Ethyl acetate (EtOAc) fractions, the degranulation was significantly inhibited 16.7%, 16.7% and 27.9% respectively. And then, to assess anti-inflammatory effects of LSS, IL-4 and IL-13 mRNA level were detected in PMA/ionomycin (PI)-induced RBL-2H3 cells and cell proliferation and IL-4 mRNA level in isolated splenocytes from Balb/c mice. LSS MeOH extract and MC and EtOAc fractions significantly decreased the level of IL-4 and IL-13 mRNA in PI-induced RBL-2H3 cells and showed inhibitory effects on cell proliferation and expression of IL-4 mRNA level in mouse splenocytes. Taken together, these results suggest that LSS has potential anti-allergic and anti-inflammatory effects and EtOAc fraction is the most effective in regulating immune responses.

**Keywords** □ *Leonurus sibiricus* seed, anti-allergy, anti-inflammation

제 1형 과민 반응은 알러지 또는 아토피로 불리우며, 천식, 아토피 질환, 알러지성 비염 등을 포함하는 가장 흔한 면역계 질환으로 전 인구의 약 20% 정도가 가지고 있는 것으로 추정된다. 알러지 질환 발생에 중요한 역할을 하는 세포는 비만세포로, 골수에서 유래되었으며 항원과 항체의 결합을 통하여 활성화되며 세포의 과립 내에 저장되어 있던 히스타민, 프로스타글란딘, 류코트리엔과 같은 화학물질을 분비한다.<sup>1)</sup> 또한 Type-2 helper T cell(Th2)의 활성화에 의해 생산되는 두 종류의 사이토카인인, 인터루킨-4(Interleukin-4, IL-4)와 IL-13이 B림프구를 자극하여, Immunoglobulin E(IgE)의 생성을 촉진시켜 만성 염증질환을 유

도하게 된다.<sup>2,3)</sup> IL-13은 IL-4와 수용체를 공유하여 IL-4와 유사한 작용을 나타낸다.<sup>4)</sup> 최근의 여러 연구에 의하면 Th2 세포에서 생성되는 IL-4와 IL-13이 직·간접적으로 알러지 반응에 밀접한 관계가 있다고 보고되어 왔다.<sup>5,6)</sup> 알러지 반응의 유발에서 가장 핵심적인 역할을 하는 세포는 비만세포와 호염구이며, 특히 호염구인 RBL-2H3 세포는 비만세포와 유사한 특징을 나타내어서 비만세포와 함께 IL-4 및 IL-13 분비에 관여하는 약물의 효과를 연구하고, 항원 항체 반응에 의한 염증 반응을 일으키는 항알러지 약물 개발에 좋은 모델로 알려져 있다.<sup>1)</sup>

익모초(*Leonurus sibiricus* L.)는 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 두해살이 식물이며, 익모초의 여문 씨앗을 말린 것을 총울자라고 한다. 익모초는 혈압강하, 고지혈증 억제, 간기능 회복, 항암 등의 효능이 보고된 바 있으며,<sup>7-11)</sup> 비타민 A, linolenic acid, oleic acid, rutin, leonurin 등의 성분을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며,<sup>7,8)</sup> 총울자 역시 이와 비슷한 효능을 나타내며 leonurin, leonurinine 등을 다량 함유하고 있다. 현재까지 익모초에 관한

### <sup>#</sup>Corresponding Author

Su-Nam Kim

Natural Products Research Center, KIST Gangneung Institute, Gangneung 210-340, Korea

Tel.: 033-650-3503 Fax.: 033-650-3529

E-mail: snkim@kist.re.kr

연구는 유효성분의 탐색이나 약리적 효능을 중심으로 진행되어 왔으며, 최근 익모초를 이용한 기능성 화장품에 대한 연구도 시도되었지만<sup>12)</sup> 총울자에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구는 호염구를 타겟세포로 하여 총울자 추출물 및 분획들을 가하여 알러지 반응에 관여하는  $\beta$ -hexosaminidase의 분비 반응에 대하여 알아보고, PMA/ionomycin(PI)으로 자극하여 알러지 유발 매개물질인 IL-4와 IL-13의 mRNA의 발현 변화를 관찰하고, 마우스 비장세포에서의 증식과 IL-4의 변화를 살펴봄으로써, 아토피 피부염 등 알러지 질환의 예방을 위한 천연물 소재로서의 가능성을 파악하기 위하여 수행하였다.

### 실험방법

#### 추출 및 분획

본 실험에 사용한 익모초(*Leonurus sibiricus*)의 씨앗은 서울 경동시장의 약재상에서 구입하였으며, 정확히 동정한 후 표준품은 한국과학기술연구원 강릉분원 식물표본실(표본번호: KIST-103)에 보관되어 있다. 총울자 1,000 g을 EP급 99.8% 메탄올(MeOH)로 60°C에서 3회 초음파 추출한 후 추출액은 여과지를 이용하여 여과하고, 45°C에서 감압 농축하여 MeOH 엑기스 33.8 g을 얻었으며, 이 중 30 g을 500 ml의 증류수에 현탁시키고 계통학적 분획방법에 따라 동량의 Methylene Chloride(MC), EtOAc, *n*-BuOH로 각각 3회씩 추출하여 분획한 후 감압 농축하여 MC층 16.3 g, EtOAc층 0.4 g, *n*-BuOH층 1.1 g, 물층 11.5 g을 획득하여 실험에 사용하였다.

#### RBL-2H3 세포배양 및 세포 생존능(cell viability) 측정

Rat basophilic leukemia cell인 RBL-2H3 세포는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank; Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였으며, 10% Fetal Bovine Serum(FBS; HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)와 1% penicillin-streptomycin(PS; Hyclone)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium; Hyclone) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 배양하였다. 총울자 추출물 및 분획의 RBL-2H3 세포에 대한 독성 및 증식효능을 측정하기 위하여, 먼저 RBL-2H3 세포를 96-well plates에 1×10<sup>5</sup> cells/well 농도로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후, 총울자 추출물 및 분획을 각 농도별로 세포에 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 MTT 용액(EZ-cytox, Deallab Service, Korea)을 배지에 1/10씩 첨가한 뒤, 37°C에서 추가 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 탈과립화 측정

RBL-2H3 세포로부터 탈과립화 측정은 탈과립의 바이오마커인  $\beta$ -hexosaminidase 분비 저해 활성을 측정하여 조사하였다.

0.5  $\mu$ g/ml 농도의 dinitrophenyl-immunoglobulin E(DNP-IgE)를 함유한 DMEM 배지를 사용하여, 24-well plates에 RBL-2H3 세포를 2×10<sup>5</sup> cells/well의 밀도로 분주한 뒤, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 12시간 배양하였다. 각 세포들을 Siragian 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 동일 buffer로 10분간 전 배양한 후 추출물 및 분획을 농도별(10, 100  $\mu$ g/ml)로 희석시켜 세포에 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 DNP-bovine serum albumin(DNP-BSA)을 최종 농도 100 ng/ml이 되도록 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2시간 반응시키고, ice bath에서 10분간 배양한 후 반응을 종결시켰다. 상층액 40  $\mu$ l를 96-well plate에 옮기고 substrate buffer (2 mM 4-p-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide, 0.05 M Sodium citrate, pH 4.5) 40  $\mu$ l를 가하고 37°C에서 1시간 동안 배양시킨 다음 각 well 당 stop solution(0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH 10.5) 200  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 종결시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Total RNA 추출 및 유전자 발현 분석

6-well plate에 RBL-2H3 세포 3×10<sup>5</sup> cells/well의 밀도로 분주한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 16시간 배양한 후 총울자 추출물 및 분획들을 1시간 동안 반응시켰다. 이 후 최종농도 50 ng/ml의 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)와 1  $\mu$ M Ionomycin (PI)을 가하여 9시간 반응시키고, PBS로 세척한 후 easy-Blue™ total RNA extraction Kit(iNTRON Biotechnology, Seoul, Korea)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 Agilent 2100 BioAnalyzer(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 integrity를 확인하였다. cDNA는 ImProm-II Reverse Transcription System(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 합성하였으며, PCR은 GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 0.02  $\mu$ l Ex taq polymerase(TAKARA, Otsu, Shiga, Japan), 2  $\mu$ l Ex taq polymerase buffer, 1.6  $\mu$ l dNTP(10 mM), 2  $\mu$ l forward primer (20  $\mu$ M), 2  $\mu$ l reverse primer(20  $\mu$ M), 11.38  $\mu$ l nuclease free water와 1  $\mu$ l의 합성한 first-strand cDNA를 잘 섞어 총 20  $\mu$ l 용량으로 PCR를 수행하였다. 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 1.2% agarose gel에서 전기 영동한 후 유전자 발현 정도를 알아보았다. 밴드의 강도는 SigmaGel(Jandel Scientific, san Fafael, CA, USA) 소프트웨어

어에 의해 분석 정량 하였다. 사용된 Primer의 염기서열은 IL-4, Forward 5'-AACAAAGTCTGGGGTTCTCGG-3', Reverse 5'-AGTGCAGGACTGCCTTGTG-3'; IL-13, Forward 5'-GGAGCTGAGCAACATCACAC-3', Reverse 5'-GGTCCTGTAGATG-GTGGCAT-3'; 그리고 GAPDH Forward 5'-ACCACAGTCCAT-GCCATCAC-3', Reverse 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'이었다.

#### 마우스 비장세포에서 T림파구 분열증식 및 사이토카인 발현 측정

Balb/c 마우스에서 분리된 비장세포를 10% FBS와 1% PS를 함유한 RPMI1640(Hyclone) 배지를 사용하여 96-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주하였다. 최종농도  $2 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 콘카나발린 A(Concanavalin A, Con A)를 처리하고, 충울자 추출물 및 분획을 처리하여 배양한 후 72시간 후에 MTT assay를 통하여 세포증식을 측정하였고, 48시간 후에 IL-4 ELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 배양액 중으로 유리된 IL-4의 양을 측정하였다.

#### Thin Layer Chromatography (TLC)

충울자 MeOH 추출물 및 분획을 TLC plate(Sigma-Aldroch Co., St. Louis, MO, USA)에 점적하여 MC와 MeOH를 9:1 비율로 섞은 용매로 전개하였다. 전개가 완료된 후 TLC plate를 건조하고 10% 황산용액을 분무하여 가열하여 발색하여 전개된 추출물 및 분획의 패턴을 확인하였다.

#### 통계분석

실험 결과는 3회 반복하였으며, 가장 대표적인 실험 결과를 평균  $\pm$  표준편차(mean  $\pm$  SD)로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 평균값의 차이는 one-way analysis of variance(ANOVA) 방법으로 분석하였으며, 유의성 수준은  $*P < 0.05$ 로 표시하였다.

#### 실험결과 및 고찰

Rat 호염구인 RBL-2H3 세포에 충울자 MeOH 추출물 및 MC, EtOAc, n-BuOH, W 분획을  $100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고, 24시간 후 MTT assay를 통해 세포 생존에 미치는 영향을 관찰하였다(Fig. 1A). 상기 농도에서 충울자 시료들은 RBL-2H3 세포에 대해서 독성 및 증식 효능을 보이지 않았다.

충울자의 항알러지 효과를 측정하기 위하여  $\beta$ -hexosaminidase assay를 수행하였다.  $\beta$ -Hexosaminidase는 비만세포나 호염구의 과립 안에 존재하며 천식, 비염과 같은 알러지 반응에 의해 세포 밖으로 분비되어 탈과립의 지표로 이용되고, 알러지 억제물질의 생리활성 측정에 유용하게 사용되고 있다.<sup>13,14</sup> RBL-2H3 세포를

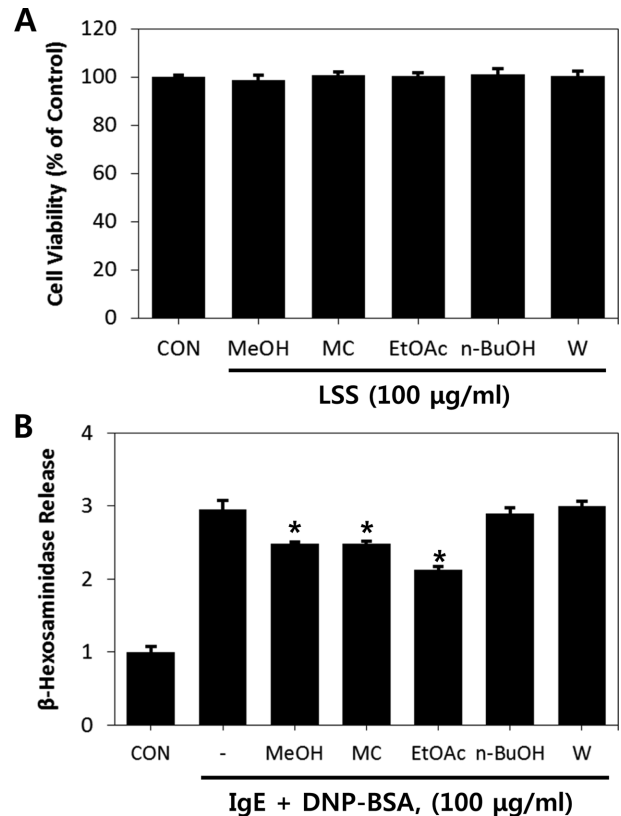
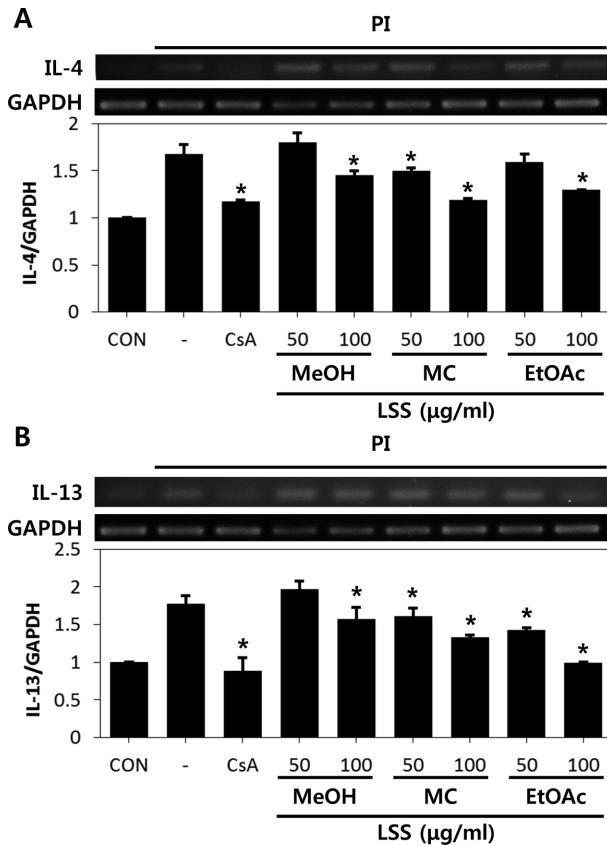


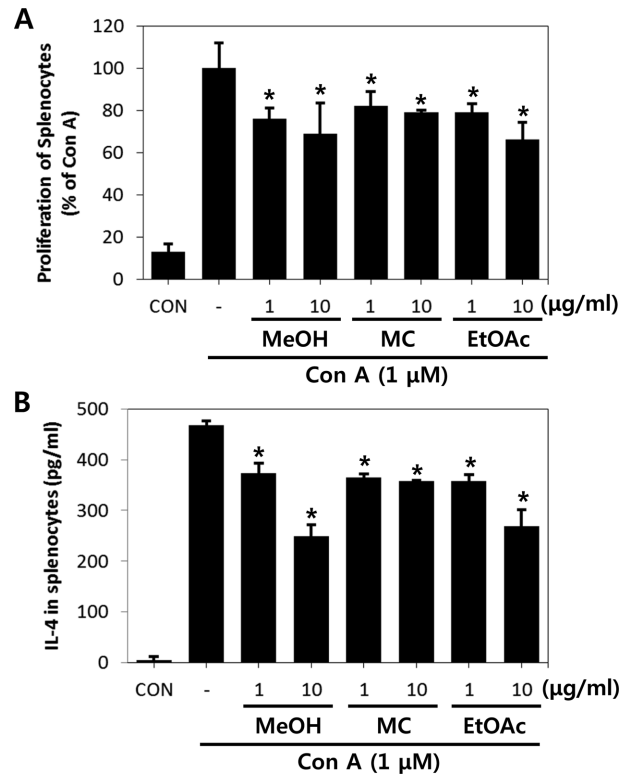
Fig. 1 – Effect of *Leonurus sibiricus* seed (LSS) MeOH extract and standard fractions on cell viability and  $\beta$ -hexosaminidase release in RBL-2H3 cells. (A) The cells were treated with LSS MeOH extract and standard fractions ( $100 \mu\text{g/ml}$ ). The proliferation of RBL-2H3 cells was measured using MTT method. Each bar represents mean  $\pm$  SD of 3 experiments.  $*P < 0.05$  vs. control. (B) The cells were sensitized with IgE and treated with LSS MeOH extract and standard fractions ( $100 \mu\text{g/ml}$ ). And  $\beta$ -hexosaminidase release was detected after stimulation with DNP-BSA. Each bar represents mean  $\pm$  SD of 3 experiments.  $*P < 0.05$  vs. IgE + DNP-BSA-treated group.

IgE로 먼저 감작시킨 후, DNP-BSA로 활성화시키고,  $100 \mu\text{g/ml}$ 의 충울자 추출물 및 분획의 탈과립 억제 여부를 측정하였다. IgE와 DNP-BSA에 의해 RBL-2H3 세포는 무처리군에 비해 약 3배 정도 탈과립이 증가하였으며, 이 때 분비된 탈과립의 정도를 100%로 보았을 때 충울자 MeOH 추출물, MC와 EtOAc 분획의 경우 각각 16.7%, 16.7%, 27.9%의 탈과립 억제 정도를 나타내었다(Fig. 1B). n-BuOH 분획과 물층은 탈과립 억제에 효능이 없었으며, 분획 중에서는 EtOAc 분획이 가장 효능이 우수함을 알 수 있었다. EtOAc 분획이 혼합물임을 감안할 때, 양성대조군으로 주로 사용되는 항히스타민제인 케토티펜( $\text{IC}_{50} = 35.2 \mu\text{M}$ )과 비슷한 효능을 나타낼 것으로 추정되며,<sup>15</sup> 이 분획 내에 탈과립 억제에 대한 효능성분이 가장 많이 함유되어 있을 것으로 사료된다. 활성화된 비만 세포에서 분비되는 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-



**Fig. 2** – Effect of LSS MeOH extract and MC and EtOAc fractions on IL-4 (A) and IL-13 (B) mRNA expression in PMA/Ionomycin (PI)-treated RBL-2H3 cells. One  $\mu$ M Cyclosporin A (CsA) was used as positive control. Each bar represents mean $\pm$ SD of 3 experiments. \*P<0.05 vs. PI-treated group.

5, IL-13 등은 전염증성 신호분자(pro-inflammatory signal molecule) 발현을 촉진시켜 알러지 반응을 일으킨다고 알려져 있다.<sup>16,17)</sup> 그러므로 본 연구에서는 충울자 추출물과 분획이 RBL-2H3 세포에서 PI로 유도된 IL-4와 IL-13의 발현에 미치는 영향을 알아보았다. PI유도에 의해 활성화된 세포에서 IL-4는 1.68배, IL-13은 1.78배 정도 증가하는 것을 확인하였으며, 양성대조군인 1  $\mu$ M Cyclosporin A 처리 시 무처리군과 비슷한 수준으로 발현이 억제됨을 확인하였다. 충울자 추출물 및 MC, EtOAc 분획 100  $\mu$ g/ml로 처리하였을 때 IL-4 mRNA 발현은 각각 13.6%, 29.2%, 22.6% 억제되었으며(Fig. 2A), IL-13 mRNA 발현은 각각 11.3%, 25.2%, 43.9% 감소되었다(Fig. 2B). 즉, 충울자 추출물 및 MC, EtOAc 분획이 알러지와 관련된 Th2 사이토카인을 억제함으로써 이들 사이토카인 반응의 최종산물인 T<sub>H</sub>1과구의 과도한 증식을 억제하여 아토피 피부염 등의 알러지질환에 치료 효과를 나타낼 것으로 사료되며, 특히 EtOAc 분획의 효과가 가장 뛰어나므로 이 분획에 유효 활성 성분이 많이 함유되어 있을 것으로 사료되며, 향후 아토피 등 면역질환의 치료효과를 높이기

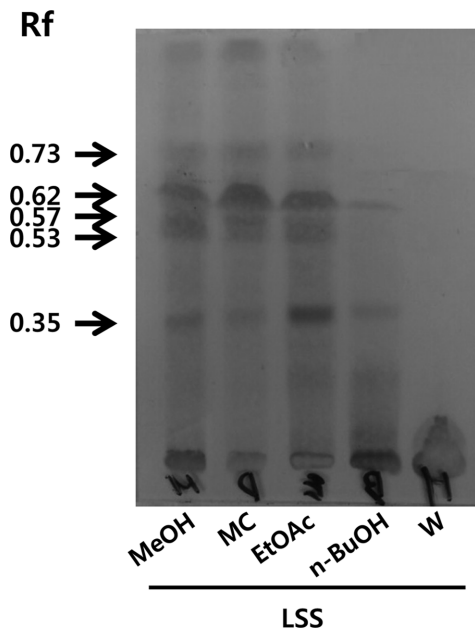


**Fig. 3** – Effect of LSS MeOH extract and MC and EtOAc fractions on proliferation (A) and IL-4 mRNA expression (B) in splenocytes isolate from Balb/c mice. The cells were treated with LSS MeOH extract and MC and EtOAc fractions (1 and 10  $\mu$ g/ml) under stimulation of 1  $\mu$ M Con A. The proliferation of splenocytes was measured using MTT method after 72 h Con A stimulation and the expression level of IL-4 mRNA was evaluated by RT-PCR after 48 h Con A stimulation. Each bar represents mean $\pm$ SD of 3 experiments. \*P<0.05 vs. Con A-treated group.

위해서는 MeOH 추출물을 사용하기 보다는 EtOAc 분획을 사용하는 것이 훨씬 효율적인 것으로 판단된다.

다음으로, 충울자 추출물 및 분획이 마우스 비장세포에서 T<sub>H</sub>1과구의 증식을 억제하는지 여부를 Balb/c 마우스의 비장 세포를 분리하여 확인하였다. 임과구와 세포분열 촉진제인 콘카나발린 A는 T<sub>H</sub>1과구 집단을 안정 상태에서 활성화 상태로 전환하여 증식을 촉진시킨다. 이는 감염 발생시 생체에서 일어나는 반응과 비슷하여 염증 반응에 대한 효능 측정에 유용하게 사용되고 있다. 본 연구에서는 마우스 비장세포에 콘카나발린 A 처리군과 콘카나발린 A와 충울자 추출물 및 분획 동시 처리군의 세포 증식 정도를 비교 조사하였으며, 또한 각각의 처리군에서 생성되는 IL-4의 발현을 ELISA kit을 사용하여 측정하였다. 그 결과, 충울자 추출물과 분획이 농도 의존적으로 T<sub>H</sub>1과구의 증식을 억제시키는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 3A), IL-4 발현 역시 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B).

충울자의 면역조절 활성은 충울자 추출물과 MC, EtOAc 분획



**Fig. 4** – TLC chromatogram of LSS MeOH extract and standard fractions. LSS MeOH extract and standard fractions are loaded on Silica TLC plate, run with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH = 9 : 1 solvent, and then developed with 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  under heating.

에서 확인되었으며, n-BuOH, 물층에서는 거의 효능이 확인되지 않았다. 각 추출물 및 분획 사이의 성분 차이를 확인하기 위하여 TLC를 실시하여 각각의 전개된 spot을 확인한 결과, 메탄올 추출물 및 MC, EtOAc 분획에서 극성을 나타내는 물질들이 많이 검출되었으며, n-BuOH 분획 및 물층에서는 극성을 나타내는 spot들이 거의 검출이 안되는 것으로 보아 활성성분들은 유기층에 존재하는 것으로 추정할 수 있다(Fig. 4). Rf 0.73, 0.62, 0.57, 0.53에 있는 물질들이 유효활성 성분으로 생각되며, 특히 Rf 0.35에서는 EtOAc 분획에서 가장 강한 spot이 나타났으므로 여기에 포함된 성분이 강한 면역조절활성을 나타내는 주성분인 것으로 추정할 수 있다.

전 세계적으로 알러지성 질환의 발병율은 20세기 후반부터 점차 증가되고 있으며, 우리나라도 천식, 알러지성 비염, 아토피 피부염 등의 알러지성 질환들이 늘어나는 추세이다. 하지만 알러지성 질환은 복잡한 발병의 원인들로 인하여 명확한 치료법이 제시되지 못하는 실정이다. 현재 알러지에 대한 치료제는 스테로이드제나 면역억제제, 항히스타민제 등과 같은 치료제가 사용되고 있지만, 장기적으로 사용할 경우 많은 부작용들이 나타나는 문제가 보고 되었다.<sup>18)</sup> 따라서 보다 안전하고 다양한 성분들이 함유되어 있는 천연물을 대상으로 알러지 질환은 예방할 수 있는 유효물질을 찾아내는 것이 중요하며, 많은 연구자들이 천연물로부터 알러지 예방 물질을 찾기 위해 노력해 왔다.<sup>19,20)</sup>

본 연구에서는 익모초의 씨앗인 충율자 추출물을 이용하여

MeOH 추출물과 MC, EtOAc 분획이 호염구인 RBL-2H3 세포에서 항원 항체 반응으로 인한  $\beta$ -hexosaminidase의 분비를 억제하고 PI 유도로 인한 Th2 사이토카인 IL-4, IL-13의 발현을 감소시킴을 확인하였다. 즉, 알러지성 질환의 원인과 관련된 사이토카인들을 억제함으로써 이러한 질환에 대한 치료 효과를 나타낼 것으로 생각된다. 비장은 T 림프구, B 림프구를 포함하여 자연살해세포, 대식구와 수지상세포 등으로 구성되어 있고, 림프구는 면역기능을 나타내는 세포들이다. 림프구들은 면역반응을 효과적으로 나타내기 위하여 분열 증식을 해야 하는데, IL-2나 IL-4는 면역 세포의 분화와 증식을 촉진하는 사이토카인이다. 본 실험에서 충율자 추출물이 콘카나발린 A에 의한 마우스 비장세포의 증식을 억제하였으며, IL-4의 생성도 억제시키는 것으로 보아 염증반응에 효과가 있다고 사료된다.

향후, 충율자 추출물에 대해서 추가적으로 유효성분에 대한 명확한 규명이 필요할 것이며, 피부세포를 사용한 보다 정확한 기전 연구가 필요할 것이다. 항알러지성 효능을 나타내는 유효한 화합물을 분리해내어 동물실험에서도 유효한 효능이 확인된다면, 충율자 추출물은 새로운 항알러지성 기능성 소재로 개발될 가치가 매우 높을 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구에서는 충율자 추출물의 항알러지 및 항염증 효능을 측정하기 위하여 백서 호염구인 RBL-2H3 세포에 충율자 추출물 및 분획을 처리하여 탈과립화 및 염증성 사이토카인의 발현 정도, 비장세포의 증식정도 및 기전연구를 수행하였다. 충율자 MeOH 추출물 및 MC, EtOAc, n-BuOH, 물층에 대하여 실험을 수행한 결과, 항알러지 및 항염증 활성은 주로 지용성인 MC, EtOAc 분획에서 나타났으며, 탈과립화를 측정하기 위한  $\beta$ -hexosaminidase assay를 수행한 결과, MeOH 추출물, MC, EtOAc 분획에서 약 16.7%, 167%, 27.9% 저해함을 확인하였다. 또한, 동 추출물과 분획이 RBL-2H3 세포에서 PI로 유도한 IL-4 및 IL-13의 발현 억제에도 효능이 있음을 확인하였으며, 마우스에서 분리한 비장세포에 대해서도 증식 및 IL-4 mRNA 발현을 억제함 또한 확인하였다. 결론적으로 충율자 MeOH 추출물 및 MC, EtOAc 분획은 항알러지 및 항염증 효과를 가지며, 특히 EtOAc 분획이 유효분획으로 판단되며, 아토피 피부염 등의 과면역 및 염증질환을 개선할 수 있는 천연 유용자원으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: HN12C0061(A103017)).

## References

- 1) Kindt, T. J., Goldsby, R. A. Osborne, B. A. and Kuby, J. : Kuby Immunology (7<sup>th</sup> ed.), W. H. Freeman Publishers, New York, NY, USA, p. 426 (2007).
- 2) Bradding, P., Walls, A. F. and Holgate, S. T. : The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 1277 (2006).
- 3) Maggi, E. : The TH1/TH2 paradigm in allergy. *Immunotechnology* **3**, 233 (1998).
- 4) Schmid-Grendelmeier, P., Altnauer, F., Fischer, B., Bizer, C., Straumann, A., Menz, G., Blaser, K., Wüthrich, B. and Simon, J. U. : Eosinophils express functional IL-13 in eosinophilic inflammatory diseases. *J. Immunol.* **169**, 1021 (2002).
- 5) Zavorotinskaya, T., Tomkinson, A. and Murphy, J. E. : Treatment of experimental asthma by long-term gene therapy directed against IL-4 and IL-13. *Mol. Ther.* **7**, 155 (2003).
- 6) Simon, D. and Simon, H. U. : New drug targets in atopic dermatitis. *Chem. Immunol. Allergy* **96**, 126 (2012).
- 7) Choi, G. P., Dhung, B. H., Lee, D. I., Lee, H. Y., Lee, J. H. and Kim, J. D. : Screening of inhibitory activities on angiotensin converting enzyme from medicinal plants. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* **10**, 399 (2002).
- 8) Park, K. K., Ryu, J. W., Choi, E. K. and Ro, H. S. : Anti-hypertensive effects of Pini folium and Leonuri herba extract on spontaneously hypertensive rat (SHR). *J. Appl. Pharmacology* **8**, 27 (2000).
- 9) Kim, S. J., Han, H. S. and Lee, Y. J. : Effects of Leonuri herba and Leonuri semen on hypercholesterolemia. *Kor. J. Herbology* **25**, 73 (2010).
- 10) Ghee, S. S., Kil, G. J. and Lee, Y. J. : Effects of Chrthami Flos and Leonuri herba on the liver damaged with carbon tetrachloride treatment in rats. *Kor. J. Herbology* **16**, 79 (2001).
- 11) Nagasawa, H., Inatomi, H., Suzuki, M. and Mori, T. : Further study on the effects of motherwort (*Leonurus sibiricus* L) on preneoplastic and neoplastic mammary gland growth in multiparous GR/A mice. *Anticancer. Res.* **12**, 141 (1992).
- 12) Jo, Y. K. : The development of anti-wrinkle cosmeceutical ingredients from Leonuri herba extract. Doctoral Dissertation, Joongang University, Seoul, Korea (2011).
- 13) Choi, O. B. : Anti-allergic effects of *Petasites japonicum*. *Korean J. Food & Nutr.* **15**, 382 (2002).
- 14) Lee, E., Choi, E. J., Cheong, H., Kim, Y. R., Ryu, S. Y. and Kim, K. M. : Anti-allergic actions of the leaves of *Castanea crenata* and isolation of an active component responsible for the inhibition of mast cell degranulation. *Arch. Pharm. Res.* **22**, 320 (1999).
- 15) Park, E., Yang, Y. J., Kim, A., Kwak, J. H., Jung, Y. H., Kang, S. C. and Kim, I. S. : Synthesis of norlignans and *in vitro* inhibitory activity of antigen-induced degranulation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 3653 (2012).
- 16) Ngoc, L. P., Gold, D. R., Tzianabos, A. O., Weiss, S. T. and Celedon, J. C. : Cytokines, allergy, and asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **5**, 161 (2005).
- 17) Renauld, J. C. : New insights into the role of cytokines in asthma. *J. Clin. Pathol.* **54**, 577 (2001).
- 18) Hogan, S. P. and Foster, P. S. : Cytokines as targets for the inhibition of eosinophilic inflammation. *Pharmacol. Ther.* **74**, 259 (1997).
- 19) Kim, Y. J., Kang, S. C., Namkoong, S., Choung, M. G. and Sohn, E. H. : Anti-inflammatory Effects by *Arctium lappa* L. Root Extracts through the Regulation of ICAM-1 and Nitric Oxide. *Korean J. Plant Res.* **25**, 1 (2012).
- 20) Park, S. Y., Shin, H. S., Yang, J. E., Han, S. N. and Kim, D. S. : The effect of extract from sea buckthorn on DNCB-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Korean J. Plant Res.* **25**, 682 (2012).