

감잎(*Diospyros kaki* folium) Polyphenol 화합물군의 알레르기 저해효과

박무희·최 청·손규목*·안봉전**·배만종***†

영남대학교 식품가공학과

*창원전문대학 식품영양과

**경산대학교 생명자원공학부

Effect of Polyphenol Compounds from Persimmon Leaves (*Diospyros kaki* folium) on Antiallergy

Mu-Hee Park, Cheong Choi, Gyu-Mok Son*, Bong-Jeon An** and Man-Jong Bae***†

Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyungbuk 712-749, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Changwon Junior College, Changwon 641-771, Korea

**Faculty of Life Resources and Engineering, Kyungsan University, Kyungbuk 712-230, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate antiallergy of the polyphenol fractions isolated from persimmon leaves (*Diospyros kaki* folium). The result of the passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction of experiment on anti-allergy, the allergy remarkably decreased in polyphenol fraction I, II and III groups in comparison with the control group. After antigen challenge, histamine content of blood of the polyphenol groups was lowered to near the normal group.

Key words: persimmon leaves, polyphenol fractions, passive cutaneous anaphylaxis, histamine

서 론

식품은 본래 생체의 항상성을 유지하고, 생존에 필요 불가결한 것이지만, 최근 합성물질의 범람과 환경오염이 가속화 되면서 식품의 부적절한 섭취로 인하여 생체에 부적합한 반응이 발생되기도 하는데, 이러한 부작용의 예가 알레르기 반응이라 할 수 있다. 알레르기는 대부분의 정상적인 사람은 음식물 항원에 대한 면역학적 내성이 발달되어 특별한 과민반응 없이 흡수가 잘 되지만, 섭취하는 식품의 상태가 다변화되었을 뿐만 아니라 가공식품과 인스턴트 식품의 범람 등으로 인하여 식품으로 인한 알레르기 질환이 증대되고 있다(1).

식품으로 인한 알레르기의 발병율은 개인, 연령 및 국가에 따라서 다소 차이는 있으나, Midellton과 Reed(2)에 의하면, 전 인류의 20%가 알레르기로 인하여 고통을 받고 있다고 보고하였으며, 일본의 경우 식품으로 인한 알레르기의 발증이 80년대를 접어들면서 급증하고 있는데 이는 우리나라에서도 최근 알레르기 발병률이 증가되고 있는 것과 일치하고 있다(3,4). 이러한 알레르기 질환을 일으키는 원인 물질과 기전을 구명하기 위한 연구가 진행되면서, 식품 알레르기가 섭취한 식품 항원과 항원에 특이적인

항체 및 소화관 조직의 비만세포, 순환하는 호염기구와 혈소판 사이의 상호작용 등이 관여하며, 그 발현은 IgE, IgG, IL-4, interferon, histamine 및 여러가지 cytokine 등을 매개로 하는 면역학적 기전으로 유도된다는 사실이 보고되었다(5,6).

이러한 알레르기 증상을 치료하기 위한 치료제로서 항히스타민제, ketotifen, corticosteroids, prostaglandin 합성저해제 등이 식품 알레르기에 효과가 있는 것으로 제안되었으나, 이러한 약제는 약간의 증세를 호전시킬 수 있지만, 전반적으로 효과가 적고 부작용이 알려지지 않으며, 초기 피부증상만을 치료하는 단점이 있는 것으로 알려져 있다(7). 따라서 이러한 문제점을 보완할 수 있는 새로운 제제의 탐색이 필요하며, 최근에는 전 세계적으로 널리 응용되고 있는 차(茶)를 이용한 알레르기 억제 효과가 보고되고 있다(8). Kim 등(9)은 우리나라에서 현재 사용되고 있는 생약 중 한방과 민간에서 약리작용을 갖는 것으로 알려진 102종의 생약을 대상으로 171종의 생리활성이 검색되어 있는 것으로 보고한 바 있다

본 연구는 우리나라 전통차 중 열매차(葉材茶)로 이용되는 감잎으로부터 폴리페놀 화합물군을 분리하여 알레르기 저해효능을 실험하여 치료제로서의 가능성을 검토

†To whom all correspondence should be addressed

하기 위한 기초자료로 활용하고자 PCA에 의한 즉시형과 민반응 및 히스타민 유리 억제능 등을 실험하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험의 재료는 경상북도 청도군의 청도 반시 품종의 감나무잎(*Diospyros kaki* folium)을 개화 전 5월 초순에 채집하여 세척한 후 음지에서 건조시켜 실험재료로 사용하였다.

시료추출 및 정제

감잎 10 kg을 추출 탱크에서 60% 아세톤에 침지하여 상온에서 24시간 방치한 후 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 침전물은 다시 위와 같은 조작을 4회 반복하여 상등액을 모아 감압 농축하여 아세톤을 증발시킨 후 수용성 성분만을 회수하기 위하여 증류수로 용해하였다. 용해한 후 여과하여 클로로필을 제거한 다음, 여액을 회수하여 분리용 시료로 사용하였다.

분리에 사용된 크로마토그래피 고정상은 Nonaka(10)의 방법에 준하여 Fig 1과 같이 행하였다. 즉, 분리용 column은 Sephadex LH-20(120×120 cm)에 60% 아세톤으로부터 농축된 2.5 L의 분리용 시료를 loading하고,

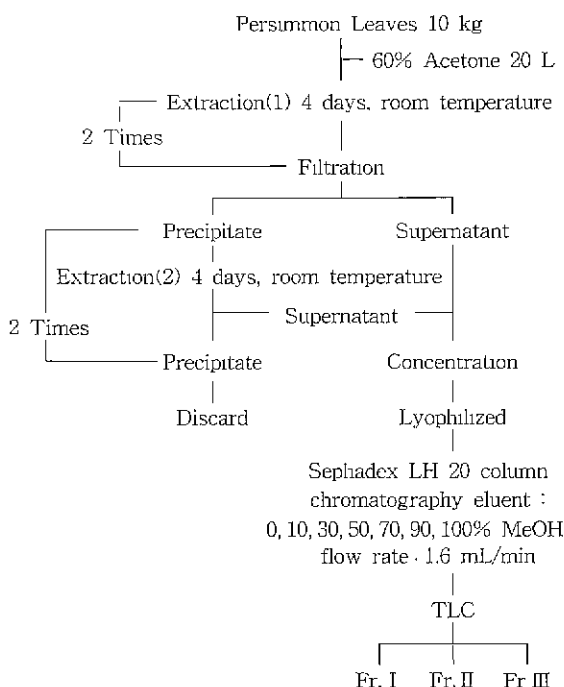


Fig 1. The procedure for isolation of condensed polyphenol compound from persimmon leaves.

전개용매로는 메탄올을 사용하여 메탄올:증류수(0:1→1:0)로 전개하면서, fraction collector에 100 mL씩 분리시킨 후, silicagel TLC(Thin Layer Chromatography: 5.0×5.0 cm) 상에서 An 등(11)이 분리한 폴리페놀성 화합물군과 반응색과 Rf 값과 비교하여 polyphenol 화합물군을 분획하였다. 분획된 폴리페놀 fraction을 분류하여 fraction I, II 및 III를 분류하여 동결건조시킨 것을 냉동 보관하면서 공시재료로 사용하였다

실험동물

실험동물은 4주령된 BALB/c 마우스를 사용하였으며, 흰쥐는 S.D.계(200±2 g)를 분양받아 사육실에서 2주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 실험기간 중 물은 자유로이 섭취시켰으며, 사육실 온도(22±2°C) 및 명암은 12시간 주기(06:00~18:00)로 조절하면서, 7마리를 한 군으로 분리하여 실험하였다

항원 및 항혈청

알레르기를 유발시키기 위해 항원으로서 ovalbumin을 사용하였으며, 항원과 동량의 complete freund's adjuvant (Sigma F-5881)를 주사기로 혼합하여 유효된 것을 마우스 좌우 대퇴부에 각각 50 µL씩 피하주사하였다(12). 최초 면역 후 2주 간격으로 총 3회 면역하고 각 면역 후 3일 동안 감잎에서 분리 정제된 fraction I, II 및 III을 마우스의 복강에 투여한 다음 3시간 경과 후 꼬리정맥에서 채혈하여 600×g에서 10분간 원심분리하여 항혈청을 얻었다.

수동피부 아나필락시스(passive cutaneous anaphylaxis) 반응 측정

위에서 얻어진 항혈청 중 IgE 항체가를 측정하기 위해서 6~8주령의 흰쥐의 등 부위의 털을 제거하고, 항혈청을 계대 희석(0~640)하여 흰쥐의 등부위의 피내로 0.1 mL씩 주사하였다. 항혈청을 피내 주사한지 3시간 뒤 ovalbumin과 evans blue dye를 동량으로 PBS에 용해하여, 흰 쥐 당 0.5 mL를 꼬리 정맥을 통해 주입한 다음 3시간 후에 경추 탈골로 희생시켜 등 부위의 피내에 누출된 색소 직경을 측정하여 5 mm 이상인 것을 양성으로 하여 항체가를 측정하였다(13)

히스타민 측정

혈 중 히스타민의 추출 및 측정은 小松의 방법(14)에 따라 시행하였다. 즉 헤파린이 첨가된 시험관에 채혈한 전혈 1.5 mL를 넣고 미리 준비한 1 N HClO₄ 1.0 mL를 넣어, 혼합 원심분리했다. 상층액은 BuOH-chloroform 용매로 추출한 다음 0.2% O-phthaldehyde(OPT) 형광

제로 발광한 것을 fluorometric spectrophotometer (Act 360 nm, Fluor. 440 nm)에서 측정하였다.

결과 및 고찰

수동피부 아나필락시스 반응에 미치는 영향

마우스의 좌우 대퇴부에 Freund's complete adjuvant 와 ovalbumin을 혼합한 항원으로 1차, 2차 및 3차에 걸쳐서 면역시킨 뒤, 각각의 면역 유발 후 폴리페놀 화합물 I, II 및 III을 3일간 복강 투여한 후, 말초 혈액으로부터 혈청을 분리하여 항혈청을 제조하였다. 분리된 항혈청을 2배씩 희석($2^1 \sim 2^6$)하여, rat의 등부위에 피내주사하여 감작시킨 후 3시간이 경과한 후 ovalbumin과 evans blue dye를 말초 정맥에 투여하였다. 정맥에 투여한 뒤 3~5시간이 경과한 후 rat의 등부위에 누출된 색소의 직경이 5 mm 이상인 것을 양성으로 판정하여 PCA 반응을 실험한 결과는 Table 1과 같다.

1차 항원을 투여한 PCA 반응의 결과에서는 대조군이 160인 반면, 실험군인 감잎 폴리페놀 fraction I은 80, II와 III은 40에서 반응을 나타내었으며, 2차 항원과 3차 항원으로 감작시킨 후 대조군은 320 및 160으로 나타났다. 그러나, 모든 시료 투여군에서는 수신피내 아나필락시스 반응이 매우 감소되었으며, 약물 투여군 중 fraction III이 가장 높은 효과가 있는 것으로 나타나 감잎에서 정제된 폴리페놀 화합물들이 PCA를 저감화시키는데 효과가 있는 것으로 나타났다.

수동피부 아나필락시스는 전식질환의 주된 원인으로 생각되는 I형 알레르기 반응으로 인하여 발생하는 것으로, Kiyoshi(15)은 녹차, 우롱차 및 홍차를 150~300 mg/kg을 경구투여했을 때 수동피부 아나필락시스 실험을 행

한 결과 대조군에 비하여 매우 유의성 있는 감소 효과가 인정되었다고 보고하였다. 또한, 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물로부터 (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCg) 및 (-)-epicatechin-3-gallate (ECg)을 분리 정제하여 rat 당 100 mg/kg을 투여한 결과 PCA에 대한 억제율이 매우 높은 것으로 보고하여, 녹차, 우롱차 및 홍차에 있어서의 PCA 저해효과는 이들의 주된 화합물들인 (-)-epigallocatechin, (+)-epigallocatechin-3-gallate를 비롯하여 (+)-epicatechin-3-gallate에 의한 것으로 보고하였다.

An 등(11)의 보고에 의하면 한국산 감잎에는 (+)-gallocatechin, gallo-catechin-(4a→8)-catechin과 prodelpinidin B-3이, Tomoaki와 Saburo(16)는 감에는 catechin, catechin-3-gallate, gallo-catechin 및 gallo-catechin-3-gallate 등의 구조로 구성되어 있음을 보고한 것으로 볼 때, 수동피부 아나필락시스 반응의 저감화는 감잎의 폴리페놀 화합물에 의한 것이라 사료된다. 이러한 천연물인 감잎이 수동피부 아나필락시스 반응을 격감시키고 있는 결과는 최근 알레르기 질환의 치료제로서 탈감작요법이 이루어지고 있으나, 알레르기 유발물질의 다양성, 극심한 부작용과 고도의 치료비 등으로 치료의 한계가 극히 제한되어 있어서, 이에 대한 효율적이고 부작용이 없는 대체제에 대한 개발이 요구되고 있는 실정므로 볼 때(17), 감잎의 폴리페놀 화합물이 유용하리라 사료된다.

혈중 히스타민 함량의 변화

감잎의 폴리페놀 화합물을 1차, 2차 및 3차 항원으로 감작된 마우스의 복강에 3일간 연속 투여한 후 말초정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈중 histamine 함량을 실험한 결과는 Fig. 2와 같다.

혈중 histamine 함량 중 시료와 항원으로 감작시키지 않은 정상군에서의 histamine 함량은 $5.6 \pm 0.34 \mu\text{g/mL}$ 이었으며, 1차 항원투여 후의 대조군은 $5.4 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$ 로 정상군과 비슷한 경향을 나타내었으나, 감잎 폴리페놀 화합물 II은 $2.0 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$ 와 III은 $1.5 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ 으로 정상군보다 혈중 histamine 유리가 억제된 것으로 나타났으나, fraction I은 $5.7 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ 으로 대조군과 차이를 보이지 않았다. 2차 항원으로 감작한 후의 대조군에서의 histamine 함량은 $11.5 \pm 4.69 \mu\text{g/mL}$ 로 시료를 투여한 모든 군에서는 fraction I은 $4.01 \pm 1.53 \mu\text{g/mL}$, II는 $1.84 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$, III은 $3.85 \pm 2.03 \mu\text{g/mL}$ 으로 나타나 높은 유의성($p < 0.01$) 있는 억제효과가 관찰되었으며, 3차 항원으로 감작된 경우에서도 유사한 경향을 보였다. 즉 대조군은 $7.26 \pm 2.7 \mu\text{g/mL}$ 인 반면 폴리페놀 fraction I은 $3.84 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$, II는 $1.8 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ 및 III은 $1.42 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 약물 투여군 중 fraction III이 가장 낮은 함량을 보였으며, 실험 전반에 걸쳐 감잎 폴리페놀 화합물을 투여한 모든 군에서 혈중으로 유리

Table 1. Effect of polyphenol fraction I, II and III from persimmon leaves on passive cutaneous anaphylaxis reaction in the rats (PCA titers)

Group	Immunization		
	1st	2nd	3rd
CON	160	320	160
I	80	40	40
II	40	80	40
III	40	20	20

PCA titers were expressed with the reciprocal of the maximum diluted times showing positive reaction of over 5 mm diameter. BALB/c mice was intraperitoneally injected with saline or polyphenol fraction I, II and III extracted from persimmon leaves for 10 days. The BALB/c mice was immunized with ovalbumine+ Freund's adjuvant at 4 days before assay. Immunization was induced 3 times, 1 week, 3 weeks and 5 weeks. PCA levels were expressed with the serum pool of 7 mice per group. CON Control. I. Polyphenol fraction I from persimmon leaves, II: Polyphenol fraction II from persimmon leaves, III. Polyphenol fraction III from persimmon leaves.

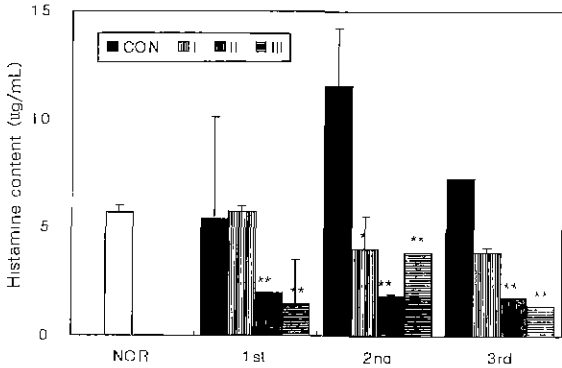


Fig 2. Inhibition effect of polyphenol fraction I, II and III from persimmon leaves on the change of histamine in blood.

Sample was intraperitoneally injected to the BALB/c mice for 3 days, 3 hr before the challenging injection of antigen. Immunization was induced 3 times, 1, 3 and 5 weeks. Histamine levels were expressed with value of 7 mice per group. Values are means \pm S.D. of 7 mice. P-value was determined by t-test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. CON Intra-peritoneal injection with physiological saline to BALB/c mice I, II and III were the same as described in Table 1

되는 histamine 함량이 적은 것으로 나타났다.

히스타민은 혈관확장 작용과 평활근 수축작용을 가지고 있는 혈관작용성 amine으로, 여러 조직에 널리 분포되어 있으며, 비만세포에 고농도로 포함되어 있어서, 즉시형 과민증의 전형적인 혈관병변을 발생시켜 심장진이나 발적반응을 유발시키는 물질로 알려져 있다(18).

Maeda 등(8)은 차 추출액의 비만세포 histamine 유리억제 활성에 관한 보고에서 compound 48/80으로 유도된 비만세포로부터의 histamine 유리에서 모든 차 추출물이 histamine 유리억제 효과를 나타내었으며, 추출물의 억제능이 phenolic 화합물에 의한 것이라고 보고하고 있어, 대조군에 비하여 모든 실험군에서 혈중으로 유리되는 히스타민이 유의성 있게 감소되는 경향을 보인 본 실험결과와 유사한 경향을 나타내었다.

요 약

한국산 감잎으로부터 분리한 폴리페놀 화합물군으로부터 알레르기 저해효과에 관한 연구 결과를 얻고자 수동피부 아나필락시스 반응에 대한 효과 및 비만세포에서 유리되는 히스타민의 유리억제능을 관찰하였다. 수동피부 아나필락시스에서는 대조군에 비하여 모든 군에서 유의하게 격감되었으며, 3차에 걸친 항원투여 기간에 있어서도 이러한 경향은 계속되었으며, 항원 투여 후 혈중의 히스타민을 측정된 결과 거의 정상군에 가깝게 혈중 히스타민 함량을 낮추는 역할을 하였다. 이러한 결과는 알레르기 치료제들이 갖는 부작용을 최소화시킬 수 있는 새

로운 치료제로서의 가능성을 보여주는 것으로 사료된다.

문 헌

- Kang, S Y. Hue, S.H. and Kim, S.I. Immunologic aspects of hypersensitivity disease in Korea. *The Seoul Journal of Medicine*, **19**, 45-53 (1978)
- Midellton, E.J and Reed, C.E : *Allergy, principles and practice*. 3rd ed., The Mosby Co., St. Louise, Missouri, p 37-40 (1988)
- 太田伸生. アレルゲンに關するT細胞反應の發現と抑制記傳. *臨床免疫*, **26**, 325-334 (1994)
- Chio, K.U. and Paek, D.M : Asthma and air pollution in Korea *Korean J. Epidemiology*, **17**, 64-75 (1995)
- Metcalf, D.D. : Food hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **73**, 749-762 (1984)
- Sgn, D. : Medications and their use in the treatment of adverse reactions to foods. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **78**, 238-243 (1986)
- Ha, T.Y., Lee, H.K and Lee, J.H. : Effects of monoclonal anti-IL4 antibody (11B11) and interterons on IgE production *in vivo* and hypersensitivity reactions I Induction of systemic anaphylaxis in mice by antigen-specific IgG and IgG subclasses monoclonal antibodies. *Kor. J Immunol.*, **14**, 277-283 (1992)
- Maeda, Y., Yamamoto, M, Masui, T., Sugiyama, K., Yokota, M., Nakagomi, K., Tanaka, H., Takahashi, I and Kobayashi, T : Inhibitory effect of tea extracts on histamine release from mast cells. *Food J Hygiene*, **30**, 295-299 (1989)
- Kim, H.K., Kim, Y.E., Do, J.R., Lee, Y.C and Lee, B.Y. : Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 80-85 (1995)
- Nonaka, G.H. : Isolation and structure elucidation of Tannins *Pure and Appl. Chem.*, **61**, 357-360 (1989)
- An, B.J., Bae, M.J and Choi, C : Chemical structures and isolation of glucosyltransferase inhibitor from the leaves of Korean persimmon *Food Sci Biotechnol.*, **7**, 23-27 (1998)
- 石田後介, 嶋本哲夫, 太田英産. 免疫化學 試驗法. 西村書店, Japan. p26-28 (1992)
- Permi, A. and Mola, I. : The production of Ig E and Ig G antibodies in guinea pigs immunized with antigen and bacterial lipopolysaccharide *Immunology*, **25**, 259- 305 (1973)
- 小松道侯. 氣管支喘息における histamineに關する研究. *アレルギー*, **27**, 67-74 (1978)
- Kiyoshi, S. Anti-allergic effects of tea. *Food Sci. Industry*, **28**, 43-46 (1995)
- Tomoaki, M and Saburo, I. The chemical structure of kaki-tannin from unmmature fruit of the persimmon (*Diospyros kaki* L.) *Agric Biol. Chem.*, **42**, 1637-1640 (1978)
- Lcc, J.H., Shin, S.J., Shin, Y.M., Song, W.J. and Lee, H.K. : Inhibitory effect of *Euonymus alatus* on the chicken gamma globulin and platele activating factor-induced anaphylaxis in mice. *Korean J Immunol.*, **18**, 105-113 (1996)
- 織田栞次, 狩野添一, 多田富雄, 木林一郎. 免疫學用語辭典 最新醫學士. Japan, p.191-192 (1991)