호염구세포주와 복강 비만세포에서 유색미 겨 추출물의 알레르기 염증 억제활성

최선필 · 강미영[1] · 남석현*

[1]경북대학교 식품영양학과, 아주대학교 생명과학과

Inhibitory Activity of Pigmented Rice Bran Extract to the Allergic Inflammation in Basophilic Cell Line and Peritoneal Mast Cells

Sun Phil Choi, Mi Young Kang[1] and Seok Hyun Nam*

[1]*Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea*
Department of Biological Science, Ajou University, Suwon 443-749, Korea

Received June 21, 2005; Accepted September 13, 2005

The effects of the extracts from the bran part of pigmented rices on inflammation was evaluated by determining their inhibitory action on the histamine and β-hexosaminidase release, together with inflammatory cytokine productions (IL-1β, TNF-α and IL-6). Examination of the inhibitory effects on the histamine and β-hexosaminidase release from a basophilic cell line RBL-2H3 cells and rat peritoneal mast cells (RPMC) showed that the pigmented rice extract inhibited these inflammation-mediating substances (10.19% and 110.03% inhibition in histamine and β-hexosaminidase release, respectively), while normal brown rice extract rather increased their release. For RPMC, the pigmented rice extract was found to have 8 or 3-fold stronger inhibitory activity than normal brown rice toward histamine or β-hexosaminidase release, respectively. Expression of IL-1β, TNF-α and IL-6 was measured as the representative inflammatory cytokine species showed that the pigmented rice extract had a higher inhibitory activity than the normal rice counterpart. ELISA analysis for determining cytokine release demonstrated a more effective blockading ability of the pigmented rice to the release of IL-β, TNF-α and IL-6 compared to normal rice. These results showed us the superiority of the pigmented rice bran extract not only in suppressing the release of inflammation-mediating substances such as histamine and β-hexosaminidase, but also in repression of the inflammatory cytokine expression.

Key words: pigmented rice, histamine, β-hexosaminidase, inflammatory cytokine

서 론

최근 음식이나 공기 중의 알레르기원에 인한 알레르기 질환이 증가하는 추세이다.[1,2] 알레르기 질환은 크게 4가지의 type으로 나누어지는데,[3] 그 중 type I 알레르기는 음식이나 환경 알레르기원(allergen)에 의해 주로 일어난다.[2] 비만세포 및 호염구세포는 immunoglobulin E(IgE)에 의해 일어나는 type I 알레르기 반응에서 중요한 역할을 하고 있으며, 비만세포 및 호염구의 표면에 존재하는 IgE 수용체에 알레르기원과 IgE 복합체가 결합하면, histamine의 분비뿐만 아니라, 염증 cytokine인 TNFα와 IL-6의 생성을 증가시켜 생체 내의 염증반응을 유도한다.[1,2,4] 염증관련 cytokine에는 tumor necrosis factor(TNF)-α, interleukin(IL)-1β, IL-6 등이 있다. IL-1β와 TNFα는 세포의 상해를 유도하고, 염증반응의 주요 초기인자로 알려져 있는 한편, IL-6는 염증반응과정에서 강력한 중재자로서, 정상적으로는 상당히 낮은 수준으로 조절받고 있으나, 감염, 천식, 다른 스트레스에 의해 발현이 유도된다. 이 cytokine들은 비만세포에서 일반적으로 분비될 뿐 아니라, 다른 염증매개물질을 통하여 염증반응을 유발할 수 있다.[5,6] 이러한 알레르기 및 염증질환은 산업화에 따른 환경 알레르기원의 지속적인 자극과 더불어 식생활의 변화가 주요인으로 생각되고 있다. 최근에는 각종 식물성 식품소재로부터 phenolic compound, alkaloids, terpenes, steroids, carotene 등이 대표적인 생체 기능성 물질로서 발견되고 있으며, 이들이 가지는 항산화 효과는 신진대사 조절능력 및 암과 순환기 계통의 질환에 대한 예방 및 치료효과를 보여주고 있다.[7,8] 또한 전통적인 한약재 식물의 iridoid glycoside,

*Corresponding author
Phone: 82-31-219-2619; Fax: 82-31-219-1615
E-mail: shnam@ajou.ac.kr

phenolic compounds가 비만세포주에서 염증 cytokine의 생성을 억제하고,[5,9,10] 사과의 polyphenol도 histamine의 분비를 억제함이 보고되어 있으나,[11] 곡류에 함유된 생리활성물질에 대한 연구는 그다지 활발하게 진행되어 있지 않다. 우리나라에서 주곡으로 소비되는 쌀의 경우, 겨층에 주로 존재하는 α-tocopherol, γ-oryzanol, phytic acid 등 생체기능조절에 관련된 화학물질에 대하여 항산화 활성을 중심으로 연구가 수행되었다.[12] 그 결과, 유색미의 겨 추출물에서 항산화 활성 및 활성산소종에 대한 소거활성, 항변이원성, DNA쇄의 산화적 손상에 대한 억제활성, 그리고 발암 promotion에 대한 억제활성과 같은 유색미의 건강기능성이 일반 취반용 쌀보다 전반적으로 우수하다는 사실이 검정되었다.[12,14-16] 또한 쌀 추출물은 피부 알레르기나 만성피부염, 기관지염 완화에 유효하다는 보고에 근거하여[13] 본 연구에서는 유색미 겨 추출물이 가지는 염증반응에 대한 억제효과를 체계적으로 평가하기 위한 목적으로 호염구 세포주와 rat mast cell을 지시세포로 사용하여 histamine 및 β-hexosaminidase의 탈과립과 염증 cytokine인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 발현도를 지표로 유색미 겨 추출물이 알러지 염증반응의 제어에 미치는 효과를 측정하였다.

재료 및 방법

시약. 일반미인 추청과 흑미인 유색미 품종으로 Elwee 종자를 서울대학교 농학과에서 분양받았다. Histamine, Ionophore A23187, IgE, DNP-BSA, *p*-nitrophenyl-β-acetyl-glucosamide, sodium citrate trihydrorate, sodium bicabonate, Histopaque 1119 등 실험에 사용된 시약들은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 호염구세포주인 RBL-2H3 세포는 Health Source Research Resource Bank(Osaka, Japan)에서 구입하였다. 세포배양에 사용된 Dulbecco-modified Minimum Essential Medium(D-MEM)과 RPMI 1640 medium은 Life Technologies(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)과 penicillin 및 streptomycin은 Hyclone사(Logan, Utah, USA)의 제품을 사용하였다. 실험에 사용한 rat은 7주령의 Sprague Dawley(SD) rat를 샘타코(Osan, Kyunggido, Korea)에서 구입하였고, 실험에 사용하기 전까지 실내온도를 22±2°C로 유지하면서, 충분한 물과 사료로 사육하였다. RT-PCR에 사용한 시약들은 Takara Shuzo(Tokyo, Japan)에서 구입하였고, cytokine 정량을 위한 ELISA kit는 Biosource(Camarillo, California, USA)의 제품을 사용하였다.

시료의 제조. 도정한 쌀겨(현미상태의 일반미와 유색미 100 g당 각각 16 g 및 14.3 g의 겨 회수)에 각각 10배량의 70% 에탄올을 넣고 실온에서 하룻밤 진탕하면서 활성성분을 추출하였다. Whatman paper no. 2로 추출물의 잔사를 제거한 다음, rotary evaporator를 사용하여 겨 추출물의 용매를 제거한 고형물질은 −20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Rat peritoneal mast cell의 분리. Rat peritoneal mast cell은 Lu가 보고한[18] 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 수행하였다. 7주령의 SD rat를 chloroform을 이용하여 희생한 후, rat의 복막이 드러나도록 가죽을 벗긴 뒤, Tyroid B buffer(137 mM NaCl, 5.3 mM glucose, 12 mM $NaHCO_3$, 2.7 mM KCl, 0.3 mM NaH_2PO_4, 0.1% gelatin, pH 7.4) 20 m*l*를 주사기를 사용하여 복강에 넣고, 충분히 세척한 다음 주사기를 이용하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포 부유액은 실온에서 150×g 로 10분간 원심분리를 수행하여, 세포침전물만을 얻었다. Tyroid B buffer 1 m*l*에 재현탁한 세포부유액 1 m*l*을 2 m*l*의 Histopaque 1119 층위에 올려놓고, 실온에서 400×g로 15분간 원심분리하여 buffer와 Histopaque 1119 층 사이에 생성된 세포층을 회수하였다. 회수된 세포를 Tyroid A buffer(10 mM HEPES, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.4 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5.6 mM glucose, 0.1% BSA)로 세척한 다음, RPMI 1640 배지 1 m*l*에 현탁하여 실험에 사용하였다.

Histamine의 측정. Rat의 basophilic cell line인 RBL-2H3 세포주와 rat에서 추출·분리한 peritoneal mast cell을 지시세포로 사용하였다. RBL-2H3 세포주는 10% FBS, 100 unit/m*l*의 penicillin 및 streptomycin를 포함하는 D-MEM배지와 37°C의 5% CO_2를 포함하는 포화습도 공기조건에서 배양하였다. 세포수를 1×10^6 cells/m*l*로 조절한 후, 1 μg/m*l*의 IgE를 20시간 동안 배지에 넣고 재차 배양하였다. 배양 후, 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 cells/m*l*로 조절한 후에 24 well plate에 분주하였다. 여기에 농도별 유색미 시료를 첨가하여, 37°C 배양기에서 15분간 방치한 다음, 20 μg/m*l*의 DNP-BSA를 첨가하고 20분간 배양기에서 재차 방치하였다. Rat peritoneal mast cell는 세포수를 1×10^6 cells/m*l*로 조절한 후, 24 well plate에 분주하였다. 그리고 유색미 시료를 농도별로 첨가하여, 37°C 배양기에서 15분간 방치한 다음, Ionophore A23187을 최종농도가 10 μM이 되도록 첨가하고 20분간 다시 배양하였다. 배양 후 RBL-2H3 세포주와 Rat peritoneal mast cell을 4°C에서 10분간의 방치하여 반응을 종결시키고 상층액을 회수하였다. Histamine의 정량은 Shore가 보고한[17] fluorometer를 이용한 측정방법에 의거하여 수행하였다. 간단히 설명하면, 회수한 상층액 1 m*l*에 0.2 m*l*의 1 N NaOH, 0.1 m*l*의 1% OPT (*o*-phthalaldehyde)를 첨가하고 실온에서 5분간 방치하였다. 여기에 1 N HCl을 0.2 m*l* 첨가하여 반응을 종결시킨 다음, fluorometer(RF-550, Shimazu, Japan)를 사용하여 360 nm의 excitation 파장과 450 nm의 emission 파장을 사용하여 측정하였다.

β-hexosaminidase의 측정. RBL-2H3 세포주는 10% FBS, 100 unit/m*l*의 penicillin 및 streptomycin을 포함하는 D-MEM 배지와 37°C 5% CO_2를 포함하는 포화습도 공기조건에서 배양하였다. 세포수를 1×10^6 cells/m*l*로 조절한 후, 1 μg/m*l*의 IgE를 20시간동안 배지에 넣고 재차 배양하였다. 배양 후, 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/m*l*로 조절한 후에 24 well plate에 분주하였다. 여기에 유색미 시료를 첨가하여, 37°C 배양기에서 15분간 반응시킨 다음, 20 μg/m*l*의 DNP-BSA를 첨가하고 20분간 배양기에서 재차 방치하였다. Rat peritoneal mast cell는 세포수를 1×10^6 cells/m*l*로 조절한 후,

24 well plate에 분주하였다. 37°C 배양기에서 15분간 유색미 시료를 처리한 다음, Ionophore A23187을 최종농도가 10 μM이 되도록 첨가하고 20분간 배양하였다. 배양 후 4°C에서 10분간 세포를 방치하여 반응을 종결시키고 나서 상징액에 동량의 1 mM p-nitrophenyl-β-acetyl-glucosamide를 넣고 37°C 배양기에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후, 2배량의 sodium bicabonate (pH 10.2)의 첨가로 반응을 종결시키고 나서, ELISA reader (Model-550, Bio-Rad, USA)를 이용하여 407 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, β-hexosaminidase 분비지표(release index)는 다음과 같이 계산하였다.

$$\beta\text{-hexosaminidase release index} = \frac{\text{O.D. at 470 nm of sample}}{\text{O.D. at 470 nm of positive control}} \times 100$$

세포독성. Mitochondrial dehydrogenase activity를 나타내는 MTT colorimetric reduction assay를 수행하여 검정물질이 세포의 생존에 미치는 효과를 Mosmann이 보고한 방법에 따라 측정하였다.[19] 지시세포인 RBL-2H3 세포주와 RPMCs를 96 well plate에 well당 1×10^5 cells 밀도로 분주한 후, 시료를 처리하여 37°C의 5% CO_2를 포함한 포화습도 공기에서 30분간 배양하였다. 배양 후, 상징액을 제거하고, 0.5 mg/ml의 MTT시약을 100 μl씩 well에 분주한 다음, 배양기에 방치하였다. 3시간 방치 후, 잔여 MTT시약을 제거하고 DMSO를 100 μl씩 분주하여 침전물을 충분히 용해시킨 다음, ELISA reader(Model-550, Bio-Rad, USA)를 사용하여 570 nm의 측정파장 및 650 nm의 reference 파장을 기준으로 흡광도를 측정하였다.

RT-PCR. DNP-BSA와 Ionophore A23187로 각각 자극한 1×10^6개의 세포에서 acid phenol-guanidium thiocyanate-chloroform extraction 방법으로 세포내 총 RNA를 추출하였다.[20] 1 μg의 RNA를 주형으로 AMV reverse transcriptase와 oligo(dT)사용하여 cDNA를 합성하였으며, PCR에 사용한 cytokine primer set는 다음과 같다; β-actin sense primer 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3': β-actin antisense primer 5'-GTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3', TNF-α sense primer 5'-TACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC-3': TNF-α antisense primer 5'-CAGCCTTGTCCCTTGAAGAGAACC-3', IL-1β sense primer 5'- GTAGCCCACGTCGTAGCAAA-3': IL-1β antisense primer 5'-CCCTTCTCCAGCTGGGAGAC-3', IL-6 sense primer 5'-GAAATGATGGATGCTTCCAAACTGG-3': IL-6 antisense primer 5'-GGATATATTTTCTGACCACAGTGAGG-3'. PCR 반응조건은 400 μM dNTP mix에 2.5 unit의 Taq DNA polymerase를 넣고 94°C에서 5분간 반응한 다음 94°C에서 30초, 60°C에서 45초, 72°C에서 45초의 순서로 thermocycler(PTC-200, MJ-research, USA)를 이용하여 수행하였다. PCR 로 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에서 전기영동을 하였고, 분획된 band intensity는 densitometer(Bio-Rad, USA)를 사용하여 분석하였다.

ELISA에 의한 cytokine 측정. 1×10^6 cells의 RBL-2H3 세포와 rat peritoneal mast cell을 DNP-BSA 또는 Ionophore A23187로 각각 자극한 다음, 분비된 cytokine이 함유된 배양 상징액을 회수하였다. 상징액에 존재하는 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 양은 Biosource사의 cytokine kit를 사용하여 제조사의 지시에 의거 정량하였다. 간단히 설명하면, 항체가 코팅된 96 well에 시료 및 각 cytokine의 표준용액을 넣고 실온에서 1시간동안 방치한 다음, washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 biotin이 결합된 이차항체를 넣고 실온에서 반응하고, 다시 peroxidase가 결합된 avidin과 재차 반응시킨 다음, 기질의 첨가하고 30분간 반응을 계속하였다. 반응이 끝난 다음, ELISA reader(Model-550, Bio-Rad, USA)를 사용하여 측정된 420 nm 파장의 흡광도를 기준으로 각 cytokine의 양을 계산하였다.

통계분석. 3회 이상 실험의 평균치는 mean±SD로 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

RBL-2H3 세포에서 histamine 및 β-hexosaminidase의 방출에 대한 억제활성. 만성염증질환인 알레르기반응의 원인세포로 지목되는 호염구 및 비만세포의 경우, 알레르기원과 면역복합체를 이룬 IgE가 세포막의 Fcε 수용체와 결합하여 histamine 및 acid hydrolase를 분비하여 염증반응을 유도한다. Acid hydrolase인 β-hexosaminidase는 비만세포나 호염구세포의 histamine이 저장된 분비과립 안에 존재하고 있으며, 항원의 자극으로 인한 신호에 의해 세포 밖으로 분비되게 된다. 따라서 histamine과 β-hexosaminidase의 정량은 이들 세포에서 탈과립의 지표이기 때문에 알레르기 억제물질의 생물활성 측정에 유용하게 사용되고 있다.[10] 본 저자들은 이 실험계를 이용하여 유색미 추출물의 알레르기 유발에 대한 억제활성을 측정하고자 하였다. 분비과립의 탈과립을 측정하기 위한 지시세포로는 rat의 호염구 세포주인 RBL-2H3 세포주를 지시세포로 사용하였으며, 생체 내에서 일어나는 알레르기 반응과 유사한 자극을 유도하기 위하여 RBL-2H3 세포주를 IgE로 20시간 동안 감작시킨 후, DNP-BSA 항원자극으로 histamine 및 β-hexosaminidase의 분비를 유도하였다. 우선 실험에 사용할 유색미 겨 추출물의 농도를 결정하기 위하여 각 쌀 추출물이 지시세포에 미치는 세포독성을 MTT법으로 조사하였다. 실험 결과, 1 μg/ml, 10 μg/ml 및 100 μg/ml의 시료농도에서 유색미와 대조구로 사용한 일반미 모두 약 90% 이상의 생존율을 나타내어 100 μg/ml 농도 조건에서 실험을 수행하였다(Table 1). 100 μg/ml의 시료를 15분간 처리한 다음, 항원인 DNP-BSA을 처리하고 30분간 세포를 방치하였다. 그 다음, 상징액을 회수하여 histamine 및 β-hexosaminidase 분비의 양을 측정한 결과, Table 2에서 보는 것과 같이 실험의 대조구로 사용된 일반미 겨 추출물을 처리했을 경우, DNP-BSA만의 자극에 의한 histamine 분비량보다 오히려 증가되는 현상을 보이는 반면(-25.80% 억제), 유색미 추출물은 histamine의 분비를 유의하게 억제하였다(10.19%). 탈과립 측정의 또 다른 지표인 β-hexosaminidase 분비를 조사한 결과도 역시 일반미 겨 추출물은 탈과립을 촉진하는 것으로 나타난 반면(-15.88% 억제), 유색미 겨 추출물에서는 높은 저해활성이 검출되는 것으로 보아(110.03% 억제), 유색미는 염증매개물질인

Table 1. Effects of the rice extracts on cell viability in RBL-2H3 cell

Experiments	Cell viability (%)		
	1 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml
Control	100.00±5.89[a]	100.00±5.89[a]	100.00±5.89[ab]
Brown rice	89.23±2.09[b]	89.27±1.48[b]	93.06±3.39[b]
Pigmented rice	91.59±4.25[ab]	93.36±4.93[ab]	103.29±2.18[a]

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

Table 2. Effects of the pigmented rice extracts on histamine and β-hexosaminidase release in RBL-2H3 cells

Experiments	ng/ml of histamine (% of inhibition)	β-hexosaminidase release index (% of inhibition)
Control (-DNP-BSA)	3.98±1.00[c] (100.00)	36.18±4.30[c] (100.00)
Control (+DNP-BSA)	27.26±0.33[b] (0.00)	100.00±3.92[b] (0.00)
Brown rice	33.21±0.96[a] (-25.80)	110.11±3.85[a] (-15.88)
Pigmented rice	24.84±5.59[b] (10.19)	29.91±4.08[c] (110.03)

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

Table 3. Effects of the rice extracts on cell viability in RPMC

Experiments	Cell viability (%)		
	1 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml
Control	100.00±5.96[a]	100.00±5.96[a]	100.00±5.96[a]
Brown rice	84.51±2.43[b]	85.90±1.74[b]	69.20±7.19[b]
Pigmented rice	87.40±3.72[b]	85.32±1.22[b]	92.16±9.27[a]

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

Table 4. Effects of the colored rice extracts on histamine and β-hexosaminidase release in RPMC

Experiments	ng/ml of histamine (% of inhibition)	β-hexosaminidase release index (% of inhibition)
Control (-A23187)	12.47±6.23[b] (100.00)	39.09±2.36[c] (100.00)
Control (+A23187)	50.42±1.43[a] (0.00)	100.00±2.03[a] (0.00)
Brown rice	45.29±4.98[a] (13.25)	72.05±3.72[b] (44.72)
Pigmented rice	10.21±2.73[b] (104.45)	32.40±6.42[c] (108.16)

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

histamine 및 β-hexosaminidase 분비를 일반미보다 효과적으로 저해한다는 사실을 알 수 있었다. 특히 histamine보다는 β-hexosaminidase 분비에 대한 강력한 저해효과가 관찰되는 것은 아마도 유색미 추출물이 탈과립을 억제할 뿐 아니라 β-hexosaminidase의 효소활성이나 발현과정도 억제하였을 가능성 때문으로 추론된다.

Rat 복강 비만세포(RPMC)에서 histamine 및 β-hexosaminidase의 방출에 대한 억제활성. 호염구 세포주인 RBL-2H3 세포에서 관찰된 유색미 추출물의 탈과립 억제활성을 primary cell을 사용하여 *ex vivo*에서 활성을 재차 검토하였다. 이 실험을 위하여 rat에서 peritoneal mast cell을 분리하여 지시세포로 사용하였으며, primary cell의 경우 *ex vivo*에서 IgE와 DNP-BSA에 의한 자극이 비효율적으로 진행될 가능성을 고려하여 Ionophore인 A23187의 자극으로 histamine 및 β-hexosaminidase의 탈과립을 유도하였다. 본 실험에서도 먼저 각 겨 추출물이 RPMC에 세포독성을 일으키지 않은 최대 농도를 RBL-2H3 세포주의 경우와 마찬가지로 MTT 방법으로 결정하였다. 그 결과, 유색미 겨 추출물은 농도에 상관없이 85% 이상의 생존율을 보였으나, 일반미 겨 추출물만은 100 μg/ml에서 70% 정도의 생존율을 나타내었다(Table 3). 100 μg/ml의 시료농도 조건에서 histamine 분비에 대한 억제활성을 측정한 결과, Table 4와 같이 일반미 추출물에서 13.25%의 억제효과를 가지는 것으로 계산되었으나 절대적인 histamine 분비량에서는 양성 대조군으로 사용된 A23178 처리군과 유의성을 발견할 수 없었다. 이에 반하여 유색미 겨 추출물의 경우는 104.45%로 완벽하게 histamine 분비를 저해하는 것으로 관찰되었다. β-hexosaminidase의 탈과립을 지표로 사용한 경우도 histamine과 마찬가지로 일반미 추출물이 44.72%의 억제효과를 보이는 반면, 유색미 추출물은 108.16%의 억제활성을 보였는데, 이것은 유색미 추출물이 일반미에 비하여 histamine은 8배, β-hexosaminidase 2.4배로 염증매

개물질의 탈과립을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다. RBL-2H3 세포주와 RPMC에서의 탈과립 억제효과의 차이는 지시세포와 자극원의 차이에 기인한다고 보여지지만, 유색미 겨 추출물과 일반미 겨 추출물의 억제활성이 비슷한 경향을 보여주고 있어서, 유색미 겨 추출물이 *in vivo*에서도 일반미 겨 추출물보다는 염증반응을 효과적으로 억제할 것으로 추측하였다.

Reverse transcription(RT)-PCR. 염증 반응에 관여하는 내재성 면역세포는 대식세포, 비만세포, 호염구 등이 있지만, 특히 알레르기 염증질환의 촉발에 있어서 대표적인 세포는 비만세포와 호염구로 알려져 있다. 이들 세포들은 histamine과 같은 염증매개물질을 외부자극에 의하여 분비함으로써 염증을 유발하는 이외에도 염증 cytokine을 분비하고 포식작용도 수행하는 등, 각종 염증질환의 초기단계에서 중요한 역할을 수행하고 있다.[21] 염증관련 cytokine으로는 IL-1β, TNF-α 및 IL-6 등이 중요하며, IL-1β와 TNF-α는 주로 급성 염증반응에서 관련된 cytokine으로 염증초기반응에 분비가 된다.[5,6] IL-6는 다양한 표적세포에 대하여 폭넓은 생물활성을 가지고 있는 cytokine으로 급성 및 만성염증, 관절염, 자가면역 T 세포의 활성화에 다기능적 cytokine으로 알려져 있다.[22] 따라서 염증질환의 완화 및 억제에 있어서 염증매개물질의 합성과 분비를 제어하는 방법이외에도 염증 cytokine의 발현을 억제하는 것도 염증질환의 예방 및 치료효과가 있을 것으로 보여, 이들 cytokine이 저해제 개발의 표적분자가 되고 있다. 따라서 본 실험에서는 비만세포와 호염구에서 항원의 자극에 의해 분비하는 염증 cytokine의 발현을 유색미 겨 추출물이 억제할 수 있는지를 알아보기 위하여 쌀겨 추출물의 처리가 염증 cytokine 유전자의 발현에 미치는 효과를 RT-PCR방법을 통하여 알아보고자 하였다. DNP-BSA 항원과 Ionophore A23187로 각각 2시간동안 자극하여 cytokine 유전자의 발현을 유도시킨 RBL-2H3 세포와 RPMC에서 시료처리에 의한 각 유전자 발현양상의 변화를 RT-PCR로 평가하였다. 그 결과, Fig. 1A에 나타난 것처럼 RBL-2H3 세포에서 일반미 겨 추출물과 유색미 겨 추출물에서 IL-1β와 TNF-α의 발현양상이 특별한 차이를 보이지 않았다. 그러나 유색미 추출물 처리가 IL-1β의 발현이 다소 감소시키는 반면, 일반미에서는 TNF-α의 발현이 낮아지는 경향을 보였는데, 특히 유색미는 IL-6의 발현을 거의 항원 무자극 세포수준으로 감소시키는 것으로 나타났다(lane 3, lane 4). 동일한 실험을 *ex vivo* 실험에 사용한 지시세포인 RPMC에서도 수행하였다. 그 결과, 유색미 겨 추출물은 염증 cytokine인 IL-1β, TNF-α 및 IL-6의 발현을 전반적으로 강하게 저해하였다(Fig 1B, lane 4). 반면, 대조구로 사용한 일반미 겨 추출물은 IL-6의 발현을 약하게 저해하는 것을 제외하고는 IL-1β나 TNF-α와 같은 염증 cytokine의 발현을 오히려 항원자극 이상으로 증가시키는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig 1B, lane 3). 정상 비만세포인 RPMC에서 유색미 겨 추출물이 효과적으로 염증 cytokine인 IL-1β, TNF-α와 IL-6 유전자의 발현을 억제했다는 본 실험의 결과는 비만세포가 촉발시키는 생체 내 염증질환의 예방에 유색미 겨 함유물이 적극적인 역할을 할 수 있다는 가능성을 시사하였다.

ELISA를 사용한 분비 cytokine의 측정. 다음으로 유색미 겨 추출물이 각각 DNP-BSA와 A23187로 활성화된 RBL-2H3 세포와 RPMC에서 염증 cytokine의 생산에 미치는 효과를 ELISA방법을 통하여 분비된 cytokine의 양을 측정함으로써 평가하였다. 실험 결과, RBL-2H3 세포에서 유색미 추출물이 TNF-α의 생산을 45.6% 정도로 뚜렷하게 억제하는 것으로 나타났지만, IL-1β와 IL-6의 생산에 대하여 유의한 억제효과를 보이지 못하였다. 반면, 일반미 추출물의 처리는 항원으로 자극할 때보다도 오히려 이들 cytokine의 생산을 증가시키는 것을 알 수 있었다(Fig. 2A). RPMC을 지시세포로 조사한 결과도 RBL-2H3 세포에서의 결과와 비슷한 경향을 보였는데, 일반미와 유색미 겨 추출물 모두 세포의 IL-1β 생산을 약 12.9% 정도 유의하게 억제하였다. TNF-α의 생산제어에 있어서도 일반미 겨 추출물이 26.1%의 저해활성을 보이는데 반하여 유색미 겨 추출물의 억제활성은 52.4%로서, 유색미 겨 추출물의 처리는 항원자극 대조군은 물론 대조구 시료로 사용된 일반미 겨 추출물

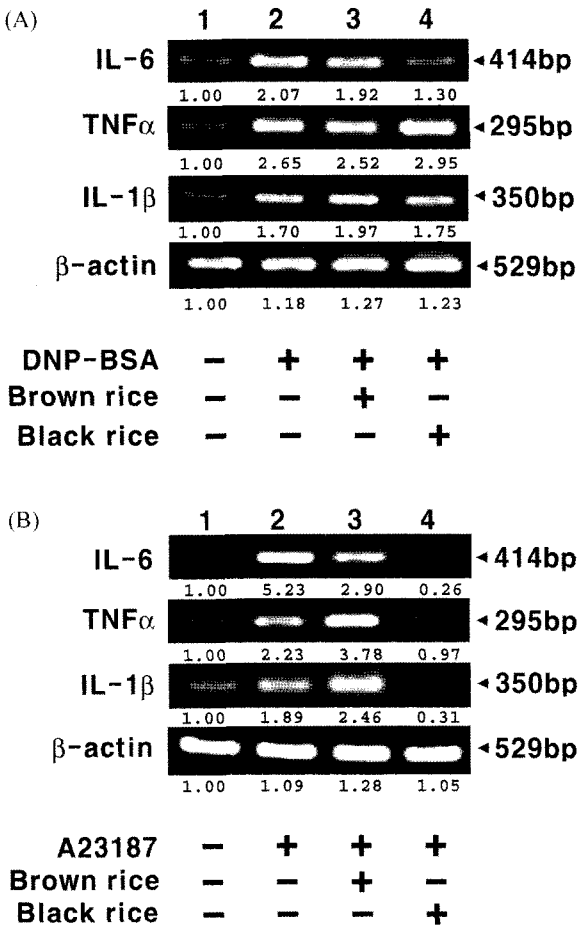

Fig. 1. Semi-quantative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis for cytokine gene expressions in RBL-2H3 cells and rat peritoneal mast cells (RPMCs). Panel A indicates the results of semi-quantitative RT-PCR of cyokine gene expressions in RBL-2H3 cells. The rice extracts in each panel A and B treated at a concentration of 100 μg/ml. The lanes in panel A indicate the followings. lane 1; unstimulated (absence of DNP-BSA), lane 2; stimulated (presence of DNP-BSA), lane 3; brown rice extract treated, lane 4; pigmented rice extract treated. Panel B indicates the results of semi-quantitative RT-PCR of cyokine gene expressions in RPMCs. The lanes in panel B indicate the followings. lane 1; unstimulated (absence of A23187), lane 2; stimulated (presence of A23187), lane 3; brown rice extract treated, lane 4; pigmented rice extract treated.

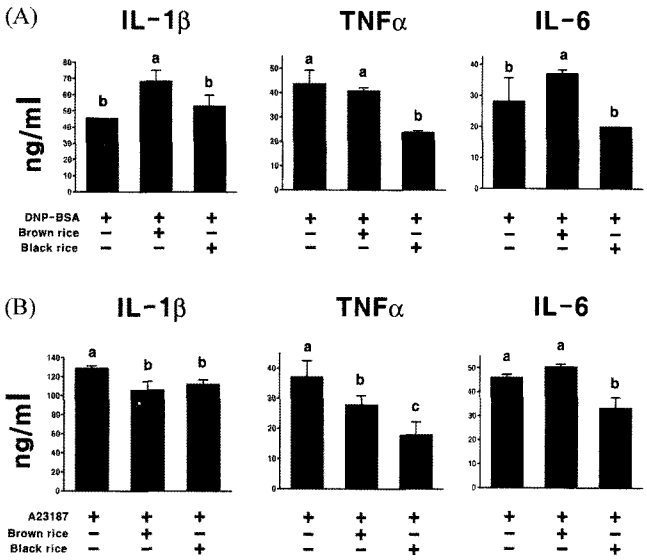

Fig. 2. ELISA analysis for cytokine productions in RBL-2H3 cells and rat peritoneal mast cells (RPMCs). Panel A indicates the results of ELISA quantitation of cyokine productions in RBL-2H3 cells. The rice extracts in each panel A and B treated at a concentration of 100 μg/ml. The histograms in panel A indicate the followings. lane 1; stimulated (presence of DNP-BSA), lane 2; brown rice extract treated, lane 3; pigmented rice extract treated. Panel B indicates the result of ELISA quantitation of cyokine productions in RPMCs. The histograms in panel B indicate the followings. lane 1; stimulated (presence of A23187), lane 2; brown rice extract treated, lane 3; pigmented rice extract treated. Values not common letter were significantly different at $p < 0.05$. Results are expressed as mean±SD (n=3).

에 비해서도 우수한 억제활성을 보여주었다(Fig. 2B). IL-6의 생산에 대한 억제활성도 일반미 겨 추출물은 항원자극세포를 사용한 대조구와 비슷하거나 약간 높은 경향을 보였으나, 유색미에서는 27.4%로 뚜렷하게 IL-6의 생산을 억제하였다. 이상의 실험결과에서 유색미 겨 추출물은 RBL-2H3 세포 및 RPMC 모두에서 TNF-α의 생산에 대한 가장 효과적인 억제자로 작용하며 IL-6의 생산에 대해서도 유의한 억제효과를 보이지만, IL-1β의 생산에 미치는 억제효과는 미약하다는 사실을 알 수 있었다.

호염구 세포주인 RBL-2H3와 primary cell인 RPMC을 대상으로 대표적인 알레르기 반응 염증매개물질인 histamine과 β-hexosaminidase의 탈과립 및 염증 cytokine의 생산에 대한 유색미 겨 추출물의 억제효과를 조사하였다. 그 결과, 유색미 겨 추출물은 일반미에 비하여 탈과립의 저해에 의한 염증매개물질의 분비를 억제하는 능력이 우수하게 나타났을 뿐 아니라, RT-PCR과 ELISA로 대표적인 염증 cytokine인 IL-1β, TNF-α, IL-6의 발현 및 단백질 생산에 미치는 효과를 각각 조사한 결과에서도 일반미 겨 추출물의 염증 cytokine의 생산에 대한 억제활성을 발견하기 어려운데 반하여, 유색미 겨 추출물은 유의하고도 효과적으로 이들의 억제할 수 있음이 나타났다. 특히 RBL-2H3 세포주보다 RPMC에서 histamine 분비 및 염증 cytokine 생산에 대한 억제활성이 뚜렷하게 나타났는데, 이 현상은 각 세포의 활성화를 유도한 자극원의 차이 및 이에 따른 세포 활성화의 효율성 및 동조성의 차이 때문으로 추정된다. 즉, 본 실험에서 RBL-2H3 세포를 IgE와 DNP-BSA로 2시간 자극한 다음 cytokine 유전자의 전사활성도를 조사하였으나, 30분만 자극하는 경우 IL-1β와 TNF-α의 발현양상은 ionophore로 자극한 RPMC의 경우와 비슷한 양상을 보이고 있었다(미발표 결과). 또한 대표적인 예로 TNF-α에서 보는 것처럼, cytokine mRNA의 발현 수준과 단백질 분비 수준에 있어서 유색미의 억제활성이 차이가 나는 경우도 관찰되었는데, RT-PCR 실험은 2시간의 자극원 처리조건에서 조사한 반면, ELISA에 의한 cytokine의 정량은 4시간의 자극원 처리 후 수행되었다는 사실을 감안한다면, 이들의 차이는 아마도 자극원에 의한 자극시간과 관계가 있을 것으로 생각된다.[23] 그러나 유색미 겨 추출물이 염증 cytokine의 발현에 대하여 미치는 효과는 mRNA와 단백질 수준에서 비슷한 경향을 보이고 있었으며, 특히 유색미는 TNF-α의 생산을 강하게 억제하였다(Fig. 1B, Fig. 2A, B). TNF-α는 비만세포가 미리 합성하여 자극 후 방출하는 cytokine으로서, 항원이 존재하는 곳에 호중구의 조직 내 침윤을 유도시킬 뿐 아니라, IL-1β과 더불어 iNOS 발현의 유도인자로도 작용한다는 사실이 알려져 있다.[21] 따라서 호중구 iNOS가 생산한 다량의 NO에 의한 세포독성 및 호중구의 대량 침윤이 국지적 염증반응을 촉진하는 요인으로 작용하기 때문에, 유색미에 의한 TNF-α 생산억제는 중요한 의미를 갖는다고 보겠다.[24] 이상의 결과는 유색미를 만성 알레르기 염증의 예방을 위한 기능성 식품의 개발에 중요한 지표로서 사용될 것으로 생각되며, 향후 알러지 염증의 억제에 효과가 우수한 기능성 유색미 품종 개발이 활발히 이루어지기를 기대한다.

감사의 글

본 연구는 과학제단 특정기초연구비 지원(과제번호: 1999-2-220-003-3)에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드리며, 아울러 쌀 시료를 공급해 주신 서울대 농학과 고 희종 교수님께도 감사드립니다.

초 록

유색미 겨 추출물이 염증반응에 미치는 효과를 호중구 세포주 및 비만세포가 분비하는 염증매개물질인 histamine과 β-hexosaminidase의 분비 및 염증 cytokine 생성에 대한 억제활성을 측정하여 평가하였다. 호중구 세포주인 RBL-2H3 세포와 rat에서 분리·추출한 복강 비만세포(RPMC, peritoneal mast cell)를 이용하여 histamine과 β-hexosaminidase 분비에 대한 억제활성을 조사한 결과, 일반미 겨 추출물은 RBL-2H3 세포에서 염증매개물질들의 분비량을 증가시킨 반면, 유색미 겨 추출물은 이들의 분비를 억제하였다(histamine 10.19% 억제, β-hexosaminidase 110.03% 억제). RPMC에서는 유색미가 histamine과 β-hexosaminidase의 분비를 일반미보다 각각 8배와 3배나 높게 억제하는 것으로 나타났다. 염증관련 cytokine으로서 IL-1β, TNF-α 및 IL-6의 발현을 RT-PCR로 측정한 결과, 유색미가 일반미보다 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 발현을 억제하는 효과가 우수하였다. ELISA를 이용하여 cytokine의 분비량을 측정한 실험에서

도 유색미가 일반미보다 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 분비를 효과적으로 억제하였다. 이상의 결과는 유색미가 염증반응의 원인물질인 histamine과 β-hexosaminidase의 분비에 대한 억제효과뿐 아니라, 염증 cytokine의 발현을 저해하는 효과도 일반미보다 우수하다는 사실을 보여주었다.

Key words: 유색미, 히스타민, RT-PCR, 염증 cytokine

참고문헌

1. 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 Vito Cell. Dev. Biol. Anim.* **32**, 340-344.
2. Coombs, R. R. A. and Gell, P. G. H. (1968) Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In *Clinical aspects of immunology*, Blackwell Scientific Publication, Oxford. pp. 575-596.
3. 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.
4. Yamashita, K., Suzuki, Y., Matsui, T., Yoshimaru, T., Yamaki, M., Suzuki-Karasaki, M., Hayakawa, S. and Shimizu, K. (2000) Epigllocatechin gallate inhibits histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: role of tyrosine phosphorylation pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 603-608.
5. Jeong, H. J., Koo, H. N., Na, H. J., Kim, M. S., Hong, S. H., Eom, J. W., Kim, K. S., Shin, T. Y. and Kim, H. M. (2002) Inhibition of TNF-α and IL-6 production by acubin through blockage of NF-κB activation in RBL-2H3 mast cells. *Cytokine* **18**, 252-259.
6. Jeong, H. J., Hong, S. H., Lee, D. J., Park, J. H., Kim, K. S. and Kim, H. M. (2002) Role of Ca^{2+} on TNF-α and IL-6 secretion from RBL-2H3 mast cells. *Cell. Signal.* **14**, 633-639.
7. Nam, S. H. and Kang, M. Y. (2003) Screening of antioxidative activity of legume species. *Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 32-38.
8. Choi, S. P., Kang, M. Y. and Nam, S. H. (2004) Inhibitory activity of the extracts from the pigmented rice brans on inflammatory reactions. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 222-227.
9. Kim, S. H., Kim, S. A., Park, M. K., Kim, S. H., Park, Y. D., Na, H. J., Kim, H. M., Shin, M. K. and Ahn, K. S. (2004) Paeonol inhibits anaphylactic reaction by regulating histamine and TNF-α. *Int. Immunopharmacol.* **4**, 279-287.
10. Lee, E., Choi, E. J., Cheong, H., Kim, Y. R., Ryu, S. Y. and Kim, K. M. (1999) 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**, 320-323.
11. Kanda, T., Akiyama, H., Yanagida, A., Tanabe, M., Goda, Y., Toyoda, M., Teshima, R. and Saito, Y. (1998) Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1284-1289.
12. Juliano, B. O. (1985) In *Rice-Chemistry and Technology*. AACC Press, New York.
13. Kim, H. M., Yi, D. K. and Shin, H. Y. (1999) The evaluation of antianaphylactic effect of *Oryza sativa* L. in rats. *Am. J. Chinese Med.* **27**, 63-71.
14. Nam, S. H. and Kang, M. Y. (1997) In vitro inhibitory effect of colored rice bran extracts against carcinogenicity. *Agric. Chem. Biotechnol.* **40**, 307-312.
15. Nam, S. H., Chang, S. M. and Kang, M. Y. (2002) Screening of mutagenicity and antimutagenic activity against chemical direct mutagens of ethanolic extracts form colored rice bran. *Agric. Chem. Biotechnol.* **45**, 195-202.
16. Hu, C., Zawistowski, J., Ling, W. and Kitts, D. D. (2003) Black rice (*Oryza sativa* L. *indica*) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. *J. Agric. Food. Chem.* **51**, 5271-5277.
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. Lu, Y. B., Wu, M. and Zhou, H. L. (2004) Changes of phospholipase D activity of rat peritoneal mast cells in degranulation. *Acta Pharmacol Sin.* **25**, 104-109.
19. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
20. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
21. Abraham, S. N. and Malaviya, R. (1997) Mast cells in infection and immunity. *Infect. Immun.* **65**, 3501-3508.
22. Nishimoto, N. and Kishimoto, T. (2004) Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 386-391.
23. Lee, D. U., Kang, Y. J., Park, M. K., Lee, Y. S., Seo, H. G., Kim, T. S., Kim, C. H. and Chang, K. C. (2003) Effects of 13-akyl-substituted berberine alkaloids on the expression of COX-II, TNF-α, iNOS and IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. *Life Science* **73**, 1401-1412.
24. Bogdan, C., Rollinghoff, M. and Diefenbach, A. (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol. Rev.* **173**, 17-26.