

## 식물추출 복합물(PEM381)의 제 I 형 알레르기 반응 억제 효과

김경범<sup>1</sup> · 이유진<sup>1</sup> · 채옥희<sup>2</sup> · 송창호<sup>2</sup> · 정종문<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>(주)벤스랩 중앙연구소

<sup>2</sup>전북대학교 의학전문대학원 해부학교실

<sup>3</sup>수원대학교 생명과학과

### Inhibitory Effects of Phyto-Extract Mixture (PEM381) on Type I Allergic Reaction

Kyung-Bum Kim<sup>1</sup>, Eu-Gen Lee<sup>1</sup>, Ok-Hee Chai<sup>2</sup>, Chang-Ho Song<sup>2</sup> and Jong-Moon Jeong<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Technology Research Center, Ben's Lab Co., Ltd., Hwasung 445-743, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Anatomy, Chonbuk National University Medical School, Jeonju 561-759, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Life Science, The University of Suwon, Hwasung 445-743, Korea

#### Abstract

The purpose of this study is to investigate the anti-type I allergic effects and mechanisms of the phyto-extract mixture (PEM381) which contains *Camellia sinensis* (leaf), *Psidium guajava* (leaf), and *Rosa hybrida* (flower). PEM381 was tested for its inhibitory effects on arachidonic acid cascade-related enzymes (5-lipoxygenase and cyclooxygenase), the mast cell-mediated allergic reaction and passive cutaneous anaphylaxis. IC<sub>50</sub> value of PEM381 against 5-lipoxygenase was 14.11±0.51 ppm while that of positive control (nordihydroguaiaretic acid) was 0.54±0.08 ppm. PEM381 also exhibited considerable selective inhibition of cyclooxygenase-2. PEM381 could inhibit both degranulation and histamine release in a dose-dependent manner from rat peritoneal mast cells activated by compound 48/80. In addition, oral administration of PEM381 showed an inhibitory effect on passive cutaneous anaphylaxis reaction activated by anti-dinitrophenyl IgE antibody in mice. These results suggest that PEM381 may be useful for the prevention and treatment of type I allergy-related diseases.

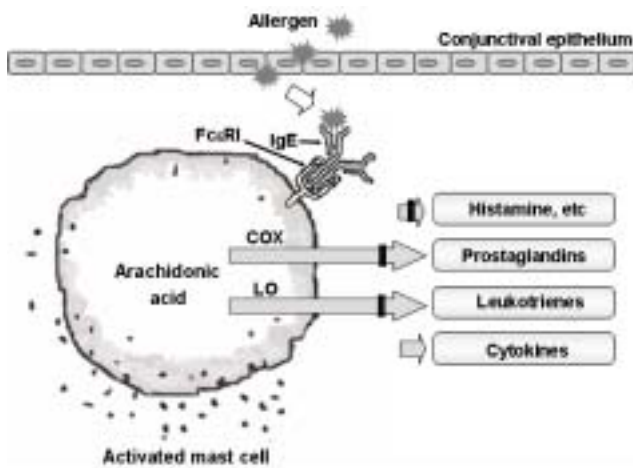
**Key words:** PEM381, 5-lipoxygenase, cyclooxygenase, mast cell, histamine

#### 서 론

최근 산업발달로 인하여 인공 합성물질의 범람과 환경오염이 가속화되면서 알레르기(allergy)를 유발시키는 알레르겐(allergen)이 급증하는 추세이다. 알레르기 반응은 크게 4가지 유형(I~IV)으로 나뉘며 알레르기성 비염, 아토피성 피부염 및 기관지천식 등의 알레르기 질환들은 제 I 형 알레르기 반응(type I allergic reaction)에 속한다(1). 제 I 형 알레르기 반응의 병태생리에 중요한 역할을 하는 비만세포(mast cell)는 피부, 호흡기, 림프관 주위, 혈관 주위, 위장관의 점막, 뇌 등 생체내 결합조직에 널리 분포되어 있다(2-7). 이 비만세포 표면에 존재하는 면역글로불린 E(immunoglobulin E, IgE)의 수용체인 FcεRI에 항원이 결합되면 비만세포가 활성화되어, 탈과립이 유도되고 세포내 과립에 저장되어 있는 히스타민 등과 이후 프로스타글란딘류(prostaglandins)와 류코트리엔류(leukotrienes) 같은 지질 매개

물질 및 사이토카인 등의 여러 가지 화학적 매개물질이 유리된다(Fig. 1). 그 결과 말초혈관에 대한 투과성 항진과 확장 작용, 점막표면에 대한 분비 항진작용, 기관지 평활근에 대한 수축작용 등이 발생하여 제 I 형 알레르기 증상들이 나타난다(8-12). 비만세포내의 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase, COX)와 리폭시게나제(lipoxygenase, LO)는 아라키돈산(arachidonic acid)으로부터 염증과 알레르기 증상 유발 물질인 프로스타글란딘류와 류코트리엔류를 만들어내는 과정의 일부를 촉매한다. COX는 COX-1과 COX-2의 두 종류가 존재하며, COX-1은 위, 신장을 비롯한 여러 조직에서 발현되며 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장 기능의 유지 등 정상적 생체기능에 작용하고, COX-2는 염증성 자극에 의해 단시간에 유도되는 발현 현상을 나타낸다(13-15). 이런 이유로 대표적인 COX 억제제인 비스테로이드성 항염증제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)를 장기간 복용하거나 위장이 약한 사람이 복용 시, COX-1의

\*Corresponding author. E-mail: jmjeong@suwon.ac.kr  
Phone: 82-31-222-6514, Fax: 82-31-222-6552



**Fig. 1. Biochemical events of mast cell activation and expected biochemical mechanism of PEM381.**

Mast cells are activated by cross-linking of Fc $\epsilon$ RI molecules, which occurs by binding of multivalent antigens to the attached IgE molecules. Activation of mast cells results in the extracellular release of biochemical messengers: histamine, lipid mediators (leukotrienes and prostaglandins), and cytokines. PEM381 showed inhibitory effects on both arachidonic acid cascade-related enzymes (5-lipoxygenase pathway to make leukotrienes and cyclooxygenase pathway to make prostaglandins). In addition, PEM381 could inhibit degranulation and histamine release from activated mast cells simultaneously.  $\parallel$ : inhibition by PEM381, COX: cyclooxygenase, LO: lipoxygenase.

활성 억제제로 프로스타글란딘류 생합성이 억제되면서 위궤양 또는 장궤양이 유발되며 과다출혈로 인한 이차적인 빈혈을 일으킬 수도 있다. LO는 현재까지 type 5-, 8-, 9-, 11-, 12- 그리고 type 15-LO 등 다양한 종류가 알려져 있으며 특히 포유동물에서 5-LO에 의해 생성된 류코트리엔류는 제 I 형 알레르기 증상 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다(16-19). 따라서 선택적인 COX-2 억제 활성화와 5-LO 억제 활성을 갖는 물질들은 부작용이 적은 제 I 형 알레르기 치료제로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 녹차(*Camellia sinensis*)잎 추출물, 구아바(*Psidium guajava*)잎 추출물 그리고 장미(*Rosa hybrida*)꽃잎 추출물로 이루어진 식물추출 복합물(PEM381)에 대하여 제 I 형 알레르기 반응 억제 효능 및 생화학적 기전을 밝히기 위하여 COX와 LO 억제 활성화, compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립과 히스타민 유리에 미치는 영향 그리고 수동피부아나필락시스(passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 억제효능을 측정하여 건강기능성 식품으로서의 유용성을 살펴보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 기기

5-lipoxygenase, hematin, arachidonic acid, N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine(TMPD), compound 48/80,

bovine serum albumin(BSA), anti-dinitrophenyl(DNP) IgE, DNP-albumin, Evans blue, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), nordihydroguaiaretic acid, epigallocatechin gallate(EGCG), ellagic acid 그리고 gallic acid는 Sigma사(USA)에서 구입하였다. Lipoxygenase inhibitor screening assay kit(catalog No. 76700), cyclooxygenase-1 그리고 cyclooxygenase-2는 Cayman사(USA)에서, S-adenosyl(methyl- $^{14}$ C)methionine은 Perkin Elmer Life Science사(USA)에서, percoll 용액은 Pharmacia사(USA)에서, cocktail 용액은 Ultima Gold제품(PerkinElmer사, USA), 구아바잎, 녹차잎 그리고 장미꽃잎은 (주)진용내추럴(수원시 팔달구)에서, 첨차(*Rubus suavissimus*)는 농림생약(충남 아산시)에서 각각 구입하였다. UV-VIS 흡광계는 Spectronic Genesys 5(Milton Roy사, USA) 모델, ELISA autoreader는 VERSA max(Molecular devices사, USA) 모델, inverted microscope는 TS100-F(Nikon사, Japan) 모델, liquid scintillation analyzer는 A2300(Canberra사, Australia) 모델, high performance liquid chromatography(HPLC) 시스템 및 컬럼은 Waters(Waters사, USA) 모델을 각각 사용하였다. 그 이외의 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다.

### 실험동물과 관리

SD계 랫드(수컷, 8주령)와 ICR계 마우스(수컷, 7주령)는 (주)오리엔트 바이오(경기도 가평)에서 구입하여 1주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 실험 기간 중에 물은 자유로이 섭취시켰으며, 사육실 온도는  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도는  $55\pm 5\%$  및 명암은 12시간 주기로 자동 조절하였다.

### 식물재료 추출 및 PEM381 제조

식품 소재로 사용 가능한 구아바잎(중국산), 녹차잎(중국산) 그리고 장미꽃잎(파키스탄산)을 세척하고 마쇄하여 건조한 뒤 각각 다음과 같은 방법으로 3회 반복하여 추출하였다. 먼저 구아바잎 추출분말은 건조 중량 1,000 g에 약 10배에 달하는 50% 에탄올을 첨가하여  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 추출하여 감압농축한 뒤 동결 건조시켜 151~210 g의 추출분말을 얻어 약 15~21%의 회수율을 나타내었다. 녹차잎 추출분말은 건조 중량 1,000 g에 약 10배에 달하는 물을 첨가한 다음  $80^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 동안 열수추출하여 식힌 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서  $200\times g$ 로 10분 동안 원심분리하여 상등액을 감압농축한 뒤 동결 건조시켜 303~364 g을 얻어 약 30~36%의 회수율을 나타내었다. 장미꽃잎 추출분말은 건조 중량 1,000 g에 약 10배에 달하는 물을 첨가한 다음  $100^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 열수추출하여 식힌 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서  $200\times g$ 로 10분간 원심분리하여 상등액을 감압농축한 뒤 동결 건조시켜 403~464 g을 얻어 약 40~46%의 회수율을 나타내었다. 위의 방법으로 얻어진 구아바잎 추출분말, 녹차잎 추출분말 그리고 장미꽃잎 추출분말 각각을 일정한 무게비율로 혼합하여 식물추출 복합물

(PEM381)을 제조하였다. 또한 첨차 20 g을 세척하고 마쇄하여 건조한 다음 건조 중량 20 g에 약 10배에 달하는 물을 가한 다음 100°C에서 2시간 동안 열수추출하여 식힌 후 감압 농축하여 동결 건조시켜 4 g의 추출분말을 얻어 회수율 20%를 나타내었다.

**HPLC를 이용한 PEM381 지표성분 분석**

PEM381 대량제조시 품질관리를 위하여 3가지(EGCG, ellagic acid 그리고 gallic acid)를 지표성분으로 설정하고 HPLC를 이용하여 그들의 함량을 측정하였다(Fig. 2). 또한 각각의 추출분말을 대량공정시 나타날 수 있는 수열변동성을 감안하여 10여종의 PEM381을 제조하여 각각 분석하였다. 분석에 사용된 HPLC는 Waters 시스템으로 600 controller, Delta 600 pump 그리고 2487 UV detector를 사용하였고 컬럼은 Symmetry C<sub>18</sub>(5 μm, 4.6×250 mm)을 사용하였다. 각각의 성분에 대한 분석조건은 다음과 같다(Table 1). EGCG는 이동상을 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(pH 2.4)와 메탄올을 75:25(v/v), 이동상 유속을 1.0 mL/min으로 하여 시료를 5 μL 주입한 뒤 UV 280 nm에서 분석하였다. Ellagic acid는 이동상을 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(pH 2.4)와 메탄올을 60:40(v/v), 이동상 유속을 1.0 mL/min으로 하여 시료를 5 μL 주입한 뒤 UV 360 nm에서 분석하였다. Gallic acid는 이동상을 H<sub>2</sub>O-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(pH 3.0)와 메탄올을 95:5(v/v), 이동상 유속을 1.0 mL/min으로 하여 시료를 5 μL 주입한 뒤 UV 280 nm에서 분석하였다.

**COX-1과 COX-2의 억제 효능 측정**

PEM381에 대한 COX 억제 효능은 Reddy 등의 방법을 변형하여 실험하였다(20). 효소 20 μL(COX-1: 60 units or

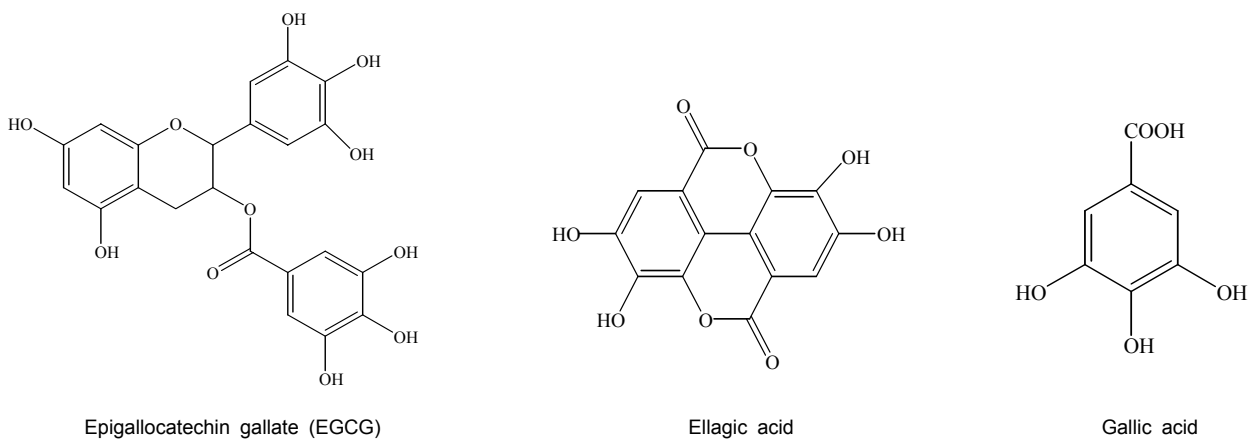
COX-2: 30 units), 100 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0) 90 μL, 30 μM EDTA 20 μL, 150 μM hematin 20 μL 그리고 샘플 20 μL를 혼합하여 25°C에서 5분간 반응시키고 5 mM TMPD 5 μL와 20 mM 아라키돈산 5 μL를 첨가하여 25°C에서 5분간 반응시킨 후 ELISA autoreader 603 nm에서 흡광도를 측정하였다. COX 억제율(%)은 다음과 같은 식을 이용하여 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었으며 양성대조군으로 항알레르기 효능이 우수한 식물소재로 알려져 있는 첨차(21)와 NSAIDs 중의 하나인 인도메타신(indomethacin, Inteban<sup>®</sup>)을 사용하였다. COX 억제율(%)=[(대조군의 흡광도-실험군의 흡광도)/대조군의 흡광도]×100

**5-LO 억제 효능 측정**

PEM381에 대한 5-LO 억제 효능 측정은 lipoyxygenase inhibitor screening assay kit를 이용하여 실험하였다. 샘플 10 μL에 5-LO(220 units/mL) 90 μL와 1 mM 아라키돈산 10 μL를 첨가하여 5분간 상온에서 반응시킨 후, 색원체(chromogen) 100 μL를 가하여 상온에서 5분 동안 반응시키고 ELISA autoreader 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 5-LO 억제율(%) 다음과 같은 식을 이용하여 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었으며 양성대조군으로 첨차와 노르디히드로구아야레틱산(nordihydroguaiaretic acid, NDGA)을 사용하였다. 5-LO 억제율(%)=[(대조군의 흡광도-실험군의 흡광도)/대조군의 흡광도]×100

**복강비만세포 부유액 준비**

Li 등의 방법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다(22). 즉, SD계 랫드를 에테르로 마취시켜 희생시킨 후 HEPES-Tyrode buffer(136 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.6



**Fig. 2. Chemical structure of three indicator ingredients in PEM381.**

**Table 1. HPLC conditions for three indicator ingredients in PEM381**

	Mobile phase	Wavelength	Flow rate	Injection vol.
Epigallocatechin gallate (EGCG)	20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2.4) : MeOH=75:25 (v/v)	UV 280 nm	1.0 mL/min	5 μL
Ellagic acid	20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2.4) : MeOH=60:40 (v/v)	UV 360 nm	1.0 mL/min	5 μL
Gallic acid	H <sub>2</sub> O-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3.0) : MeOH=95:5 (v/v)	UV 280 nm	1.0 mL/min	5 μL

mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.4 mM HEPES, 1.0 mg/mL bovine serum albumin, 1.0 mg/mL glucose, pH 7.4) 10 mL를 랫드의 복강내에 주입하고 90초간 복벽을 가볍게 마사지 하였다. 복벽 중앙선을 절개하고 복강 세척액을 스포이드로 채취하여 4°C에서 200×g로 10분간 원심분리시킨 뒤 상층 부유액을 버리고, HEPES-Tyrode buffer로 비만세포 수가 1×10<sup>6</sup> cells/mL되도록 재부유시켜 실험에 사용하였다. 복강 비만세포 부유액으로부터 비만세포의 순수분리는 Hachisuka 등의 방법을 이용하여 다음과 같이 분리하였다(23). Isotonic Percoll 용액(10×Hank's 용액 1 mL + Percoll 9 mL) 3.5 mL에 세포 부유액 0.75 mL와 HEPES-Tyrode buffer 0.5 mL를 첨가하여 4°C에서 125×g로 15분간 원심분리시켜 상층액을 버리고 HEPES-Tyrode buffer로 2번 세척하여 순수한 비만세포 부유액을 만들었다.

#### 세포독성 실험

분리한 복강 비만세포에 대한 PEM381의 독성을 알아보기 위하여 Sladowski 등의 방법으로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 측정을 실시하였다(24). 분리한 복강 비만세포 0.2 mL(2×10<sup>5</sup> cells)에 샘플 20 µL를 처리한 후 37°C에서 2시간 배양한 다음 MTT 용액(2 mg/mL) 20 µL를 첨가하여 2시간 배양하였다. 그 후 상층액을 제거하여 디메틸 술폭사이드(dimethyl sulfoxide)를 well 당 100 µL씩 넣고 20분간 반응시킨 다음 ELISA autoreader 570 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 식으로 생존율을 계산하였다. 생존율(%)=(실험군의 흡광도/대조군의 흡광도)×100

#### 비만세포의 약물반응 실험

PEM381이 compound 48/80에 의한 비만세포 활성화 억제 유무를 알아보기 위하여, 분리한 복강 비만세포 0.2 mL(1×10<sup>6</sup> cells)에 샘플 25 µL를 넣어 37°C 항온조에서 10분 동안 반응시키고 다시 compound 48/80 용액(10 µg/mL) 25 µL를 첨가하여 20분 동안 반응시켰다. 이렇게 반응시킨 후 비만세포의 탈과립 및 비만세포로부터 유리되는 히스타민의 양을 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

#### 비만세포 탈과립 관찰과 탈과립을 산출

비만세포의 형태와 탈과립 유무의 관찰은 Cochrane과 Douglas의 방법으로 실시하였다(25). 반응이 끝난 비만세포가 들어 있는 복강 부유액 20 µL를 슬라이드글라스 위에 올려놓은 후 비만세포가 침전될 수 있도록 실온에서 10분간 정지시켰다. 광학현미경으로 1,000배의 배율 하에서 비만세포를 관찰하여 정상형과 탈과립형으로 구분하였다. 실험군 임의로 선택한 10곳의 시야에서 관찰된 비만세포의 수를 세어, 다음과 같은 식으로 탈과립율을 계산하였다. 탈과립율(%)=(탈과립된 비만세포 수/비만세포 총수)×100

#### 복강 비만세포로부터 유리되는 히스타민양 측정

약물 반응 후 복강 비만세포를 4°C에서 150×g로 10분간

원심분리한 다음, 상층액내의 히스타민양을 측정하였다. 히스타민 측정은 Harvima 등의 방법을 수정, 보완하여 다음과 같이 실시하였다(26). 상층액 10 µL와 S-adenosyl(methyl-<sup>14</sup>C)methionine(2 µCi/mL) 1.5 µL, histamine N-methyl transferase(3,000 units/mL) 5 µL, 300 mM Tris-glycine buffer(pH 6.8) 40 µL, 3차 증류수 43.5 µL를 37°C 항온조에서 90분간 반응시킨 후 3 N 과염소산(perchloric acid) 20 µL를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 과염소산을 중화시키기 위하여 10 N NaOH 20 µL를 첨가하였다. 그 다음 톨루엔-이소아밀 알코올(toluene-isoamyl alcohol) 1 mL로 추출한 후 상층액 700 µL를 얻어 cocktail 용액 3 mL로 scintillation시킨 다음 β-counter를 사용하여 cpm(counts per minute) 값을 측정하였다. 히스타민양은 히스타민 표준곡선을 이용하여 산출하였고 히스타민 총량에 대한 백분율로 표시하였다. 히스타민 유리율(%)은 다음과 같은 식으로 계산하였다. 히스타민 유리율(%)=(실험군 히스타민 유리양/총 히스타민 유리양)×100

#### 수동피부아나필락시스 반응 억제 효능 측정

PEM381에 대하여 수동피부아나필락시스 반응 억제 효능을 알아보기 위하여 Kim 등의 방법을 이용하여 실험하였다(27). 수컷 마우스 양쪽 귀에 anti-DNP IgE(1.2 µg/mL) 10 µL씩 주사하고 47시간 경과 후, 샘플을 경구 투여하였다. 한 시간 뒤(즉, anti-DNP IgE 주사 48시간 경과 후) DNP-albumin 0.25 mg과 Evans blue 1.25 mg을 용해한 생리식염수 0.25 mL를 꼬리정맥에 주사하여 반응을 일으켰다. 30분 후 경추 탈골하여 치사시킨 다음 양쪽 귀 혈관으로부터 누출된 Evans blue 색소량을 측정하였다. 양성대조군으로 프로메타진 하이드로클로라이드(promethazine hydrochloride, Phenergan®: H1 histamine receptor antagonist)를 사용하였다.

#### 통계분석

실험결과는 3회 반복하여 평균±표준오차로 나타내었고, 유의수준은 p<0.05로 Student's t-test를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

#### HPLC를 이용한 PEM381 지표성분 분석 결과

PEM381 대량공정시 품질관리를 위하여 선정된 3가지 지표성분(EGCG, ellagic acid 그리고 gallic acid)에 대하여 HPLC 분석결과 Table 2와 같은 결과를 얻었다. PEM381내에 EGCG, ellagic acid 그리고 gallic acid의 머무름시간(retention time)은 각각 14.1 min, 16.1 min, 그리고 8.4 min을 나타내었고, 함량은 12.31±4.51%, 0.44±0.19%, 그리고 0.21±0.08%를 나타내었다.

#### COX-1과 COX-2의 억제 효능 측정 결과

PEM381에 대하여 COX억제 효과를 측정한 결과 COX-2

**Table 2. Composition of three indicator ingredients in PEM381 by HPLC**

	Composition (%)
Epigallocatechin gallate (EGCG)	12.31±4.51
Ellagic acid	0.44±0.19
Gallic acid	0.21±0.08

Results were represented as mean±SEM of three independent experiments.

**Table 3. Inhibitory effect of cyclooxygenase by PEM381**

	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (ppm)		Ratio of COX-2 IC <sub>50</sub> /COX-1 IC <sub>50</sub>
	COX-1	COX-2	
PEM381	14.61±0.51	5.57±0.41	0.38
<i>Rubus suavissimus</i>	5.41±0.49	34.23±0.91	6.32
Indomethacin	0.02±0.01	2.79±0.71	139.50

Results were represented as mean±SEM of three independent experiments.

<sup>1)</sup>IC<sub>50</sub>: 50% inhibitory concentration of cyclooxygenase.

의 IC<sub>50</sub>값은 5.57±0.41 ppm으로 나타나 시중에서 항알레르기 효능이 우수한 식물소재로 알려져 있는 첨차 추출분말보다는 약 6배(34.23/5.57) 우수한 활성을 나타냈고 인도메타신보다는 약 2배(5.57/2.79) 떨어지는 활성을 나타냈다. PEM381에 대한 COX-1의 IC<sub>50</sub>값은 14.61±0.51 ppm으로 나타나 첨차 추출분말보다는 약 3배(14.61/5.41), 인도메타신보다는 약 730배(14.6/0.02) 떨어지는 활성을 지니고 있는 것으로 나타났다. 따라서 PEM381은 COX-1의 높은 억제로 인한 위장관 및 신장의 부작용을 최소화할 수 있을 것으로 사료된다. 실제로 PEM381의 COX-2 IC<sub>50</sub>/COX-1 IC<sub>50</sub>의 비가 첨차 추출분말보다는 약 16배(6.32/0.38), 인도메타신보다는 약 367배(139.50/0.38) 떨어지는 것으로 나타나 첨차 추출분말과 인도메타신보다 더 선택적으로 COX-2를 억제하는 것으로 나타났다(Table 3).

**5-LO 억제 효능 측정 결과**

PEM381에 대하여 5-LO 억제 효능을 측정한 결과 PEM381의 IC<sub>50</sub>값은 14.11±0.51 ppm으로 알레르기 유발 물질인 류코트리엔류 합성을 효과적으로 억제하였다. 또한 첨차추출분말에 대한 5-LO 억제능은 100 ppm 이상으로 나타나 PEM381과 비교시 현저하게 억제능이 떨어지는 것으로 나타났다(Table 4).

**세포독성 실험 결과**

PEM381(최종농도: 0.01, 0.1 그리고 1 mg/mL)에 대하여

**Table 4. Inhibitory effect of 5-lipoxygenase by PEM381**

	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (ppm)
PEM381	14.11±0.51
<i>Rubus suavissimus</i>	> 100
Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)	0.54±0.08

Results were represented as mean±SEM of three independent experiments.

<sup>1)</sup>IC<sub>50</sub>: 50% inhibitory concentration of 5-lipoxygenase.

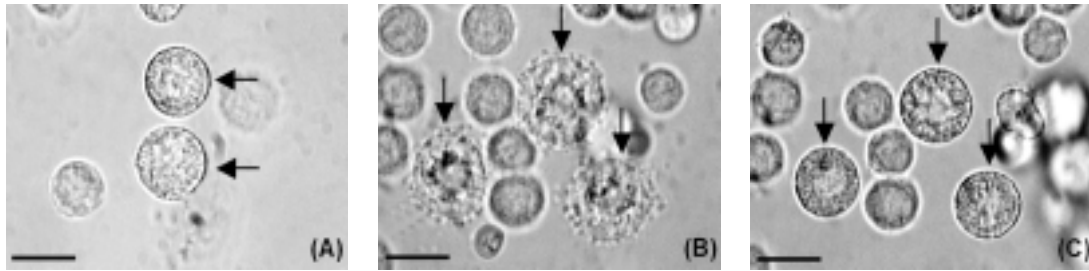
**Fig. 3. Cytotoxicity of PEM381 on rat peritoneal mast cells by using MTT test.**

All data were represented as mean±SEM of three independent experiments. \*p<0.05: Significantly different from the control.

MTT 방법으로 복강 비만세포의 독성을 측정한 결과 각각 94.8±2.7, 114.0±0.9 그리고 160.6±9.0% 생존율을 나타내었다. PEM381은 실험에 사용된 범위의 농도까지 세포독성은 없었으며 오히려 0.1 mg/mL 농도 이상에서는 복강 비만세포의 생존율을 다소 증가시키는 양상을 보였다(Fig. 3).

**비만세포 탈과립 관찰과 탈과립을 산출 결과**

비만세포 탈과립을 유도하기 위하여 사용된 compound 48/80은 비만세포 내의 칼슘 농도를 증가시켜 탈과립을 유도시킨다. 대부분 복강 비만세포들은 원형 또는 난원형으로 세포질 안에 많은 과립들로 충만되어 있고, 세포윤곽이 뚜렷하였다. 이렇게 세포의 모양이 원형이나 타원형으로 세포윤곽이 분명하고, 세포질내에 광굴절율이 높은 과립들로 충만된 상태를 정상형 비만세포로 구분하였다. 반면, 세포윤곽이 불분명하고 세포질내 과립들이 세포표면으로 돌출되어 있거나 세포 주위에 흩어져 있는 경우를 탈과립형으로 구분하였다. 비만세포 부유액에 compound 48/80 용액을 첨가한 후 1분이 지난 뒤 관찰하면 비만세포의 형태, 크기, 표면윤곽 등에서 원래 완충용액에 부유된 정상비만세포와 매우 유사하였다. 다시 20분 경과 후 현미경을 통해 관찰된 비만세포들은 약 95% 정도의 비만세포들에서 세포막의 불연속성과 약간의 광굴절을 감소, 과립들의 돌출 현상들이 관찰되었다(Fig. 4). 비만세포 부유액에 PEM381(최종농도: 0.01, 0.1 그리고 1 mg/mL)을 10분간 처리하고 compound 48/80을 첨가하여 20분간 반응 후 비만세포 탈과립율을 측정한 결과 각각 14.2±1.9%, 11.3±2.1%, 그리고 5.5±3.0%를 나타내어 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 5). 따라서 PEM381은 제 I 형 알레르기 반응의 병태생리에 중요한 역할을 하는 비만세포막을 안정화시켜 비만세포의 탈과립을 조절하여 제 I 형 알레르기 반응을 억제할 것으로 사료된다.



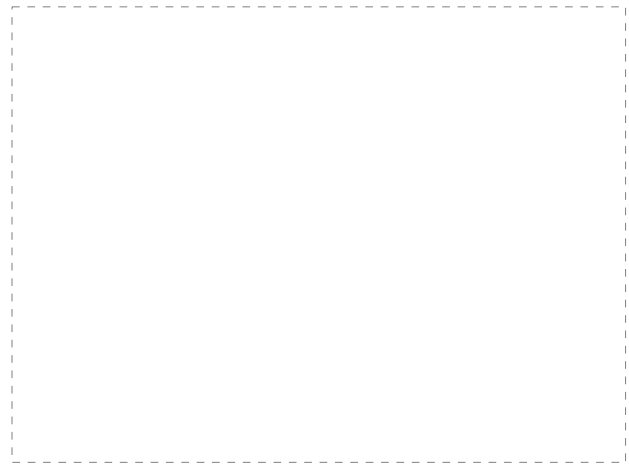
**Fig. 4. Light microphotographs of rat peritoneal mast cells ( $\times 1,000$ ).**

Morphology of rat peritoneal mast cells was photographed in HEPES-Tyrode buffer (A), after stimulation with compound 48/80 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 25  $\mu\text{L}$  (B), after the same stimulation as the (B) except pretreatment with PEM381 (final concentration: 0.01  $\text{mg}/\text{mL}$ ) (C).



**Fig. 5. Inhibitory effect of PEM381 on the compound 48/80-induced degranulation of rat peritoneal mast cells.**

All data were represented as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$ : Significantly different from the control.



**Fig. 6. Inhibitory effect of PEM381 on the compound 48/80-induced histamine release of rat peritoneal mast cells.**

All data were represented as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$ : Significantly different from the control.

**복강 비만세포로부터 유리되는 히스타민양 측정 결과**

비만세포에 compound 48/80을 처리하면 세포내 과립들이 세포 밖으로 나오면서 세포내의 주함유물질인 히스타민이 유리된다. 유리된 히스타민은 혈관확장과 근육수축을 일으켜 알레르기 증상을 유발한다. 복강 비만세포 부유액에 compound 48/80을 처리하였을 때 히스타민 유리율은  $104.0 \pm 9.3\%$ 이었으나, PEM381(최종농도: 0.01, 0.1 그리고 1  $\text{mg}/\text{mL}$ )을 전처리하고 compound 48/80을 처리할 경우 히스타민 유리율은 각각  $24.8 \pm 2.2$ ,  $20.8 \pm 1.8$  그리고  $12.1 \pm$

$5.2\%$ 를 나타내어 농도 의존적으로 히스타민 유리를 억제하였다(Fig. 6). 비만세포 탈과립 관찰과 비만세포 탈과립으로 유리되는 히스타민양 측정 결과로부터 PEM381은 비만세포 탈과립 자체를 억제할 뿐만 아니라 탈과립으로 인한 히스타민 유리를 억제함으로써 제 I 형 알레르기 반응을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

**수동피부아나필락시스 억제효능 측정 결과**

수동피부아나필락시스 반응은 IgE 관련 작용기전에 의해

**Table 5. Effect of PEM381 on passive cutaneous anaphylaxis reaction**

Group (n=10/group)	Dose (mg/kg of body weight)	Amount of dye <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{a pair of ears}$ )	Inhibition (%)
Control	-	$17.6 \pm 2.1$	-
PEM381	0.5	$17.1 \pm 3.1$	2.8
	2	$12.3 \pm 2.4$	30.1
	5	$10.5 \pm 2.9$	40.3
	15	$8.8 \pm 1.8$	50.0
	50	$6.6 \pm 1.5$	62.5
Promethazine hydrochloride	2	$7.4 \pm 1.5$	58.0
	10	$5.7 \pm 0.8$	67.6

Samples were administered intraperitoneally 1 hr prior to challenge with antigen.

<sup>1)</sup>Each amount of dye was represented as mean  $\pm$  SEM.

비만세포로부터 히스타민, 프로스타글란딘류, 류코트리엔류 등과 같은 화학 매개물질의 작용으로 혈관벽의 투과성이 증가됨에 따라 마우스의 조직으로 청색 색소인 Evans blue 가 누출된다. PEM381을 0.5, 2, 5, 15 그리고 50 mg/kg(체중) 경구 투여 시 마우스 양쪽 귀에 누출된 Evans blue 양은 각각  $17.1 \pm 3.1$ ,  $12.3 \pm 2.4$ ,  $10.5 \pm 2.9$ ,  $8.8 \pm 1.8$  그리고  $6.6 \pm 1.5$   $\mu\text{g}$ 을 나타내어 농도 의존적으로 수동피부아나필락시스 반응을 억제하였다. 특히 PEM381 15 mg/kg(체중) 이상 경구 투여군부터 50% 이상의 억제율을 나타내었다(Table 5).

결론적으로 PEM381이 아라키돈산을 염증과 알레르기 유발물질인 프로스타글란딘류과 류코트리엔류로 각각 전환시키는 COX와 LO의 활성을 억제하였고, 비만세포의 탈과립, 탈과립으로 인한 히스타민 유리 및 수동피부아나필락시스 반응을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 본 연구에서 얻어진 결과들은 PEM381이 알레르기성 비염, 아토피 피부염 및 기관지천식 같은 제 I 형 알레르기 반응의 예방과 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 시사한다.

### 요 약

본 연구에서는 녹차(*Camellia sinensis*)잎 추출물, 구아바(*Psidium guajava*)잎 추출물 그리고 장미(*Rosa hybrida*)꽃 잎 추출물로 이루어진 식물추출 복합물(PEM381)에 대하여 제 I 형 알레르기 반응 억제 효능 및 생화학적 기전을 밝히기 위하여 COX 억제 활성, LO 억제 활성, compound 48/80에 의한 랫드 복강 비만세포의 탈과립과 히스타민 유리에 미치는 영향 그리고 수동피부아나필락시스 반응 억제효능을 측정하였다. 그 결과 PEM381은 5-LO IC<sub>50</sub> 값이  $14.11 \pm 0.51$  ppm으로 나타났고, COX-1에 비해 COX-2를 선택적으로 억제하는 것으로 나타났다. 또한 PEM381은 compound 48/80에 의한 비만세포의 탈과립과 히스타민 유리를 농도 의존적으로 억제할 뿐만 아니라 수동피부아나필락시스 반응도 억제하였다. 이상의 결과로 PEM381은 알레르기성 비염, 아토피 피부염 및 기관지천식 같은 제 I 형 알레르기 질환에 대하여 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업(과제고유번호: A06-00042717)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

### 문 헌

- Patterson R, Dykewicz MS, Grammer LC, Greenberger PA, Lawrence ID, Walker CL, Wong S, Zeiss CR. 1990. Classification of immediate-type, life-threatening allergic

- or pseudoallergic reactions. *Chest* 98: 257-259.
- Gomes JC, Di Stasi LC, Sgarbosa F, Barata LE. 1994. Pharmacological evaluation of the inhibitory effect of extracts from *Anchietia salutaris* on the histamine release induced in the rat and the guinea pig. *Int Arch Allergy Immunol* 103: 188-193.
- Ando A, Martin TR, Galli SJ. 1993. Effects of chronic treatment with the c-kit ligand, stem cell factor, on immunoglobulin E-dependent anaphylaxis in mice. Genetically mast cell-deficient SI/Sld mice acquire anaphylactic responsiveness, but the congenic normal mice do not exhibit augmented responses. *J Clin Invest* 92: 1639-1649.
- Lee YM, Kim DK, Kim SH, Shin TY, Kim HM. 1996. Antianaphylactic activity of *Poncirus trifoliata* fruit extract. *J Ethnopharmacol* 54: 77-84.
- Martin TR, Ando A, Takeishi T, Katona IM, Drazen JM, Galli SJ. 1993. Mast cells contribute to the changes in heart rate, but not hypotension or death, associated with active anaphylaxis in mice. *J Immunol* 151: 367-376.
- Dombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, Koller BH, Kinet JP. 1993. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. *Cell* 75: 969-976.
- Kim HM, Hirota S, Chung HT, Ohno S, Osada S, Shin T, Ko KI, Kim JB, Kitamura Y, Nomura S. 1994. Differential expression of protein kinase C genes in cultured mast cells derived from normal and mast cell-deficient mice and mast cell lines. *Int Arch Allergy Immunol* 105: 258-263.
- Ennis M, Pearce FL, Weston PM. 1980. Some studies on the release of histamine from mast cells stimulated with polylysine. *Br J Pharmacol* 70: 329-334.
- Metcalf DD, Kaliner M, Donlon MA. 1981. The mast cell. *Crit Rev Immunol* 3: 23-74.
- Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, Ravetch JV, Kinet JP, Galli SJ. 1997. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J Clin Invest* 99: 901-914.
- Church MK, Levi-Schaffer F. 1997. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol* 99: 155-160.
- Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. 1993. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* 268: 9049-9054.
- Otto JC, Smith WL. 1994. The orientation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 269: 19868-19875.
- Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL. 1995. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 270: 10902-10908.
- Yokoyama C, Takai T, Tanabe T. 1988. Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett* 231: 347-351.
- Kemal C, Louis-Flamberg P, Krupinski-Olsen R, Shorter AL. 1987. Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols: a possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity. *Biochemistry* 26: 7064-7072.
- Nakatsuka M, Osawa Y. 1983. Selective inhibition of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism by L-arginine or sodium nitroprusside in intact human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 1630-1640.

18. Neichi T, Koshihara Y, Murota S. 1983. Inhibitory effect of esculetin on 5-lipoxygenase and leukotriene biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 753: 130-132.
19. Sekiya K, Okuda H, Arichi S. 1982. Selective inhibition of platelet lipoxygenase by esculetin. *Biochim Biophys Acta* 713: 68-72.
20. Reddy CM, Bhat VB, Kiranmai G, Reddy MN, Reddanna P, Madyastha KM. 2000. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoerythrin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 599-603.
21. Nakatani K, Atsumi M, Arakawa T, Oosawa K, Shimura S, Nakahata N, Ohizumi Y. 2002. Inhibitions of histamine release and prostaglandin E2 synthesis by mangosteen, a Thai medicinal plant. *Biol Pharm Bull* 25: 1137-1141.
22. Li GZ, Chai OH, Song CH. 2005. Inhibitory effects of epigallocatechin gallate on compound 48/80-induced mast cell activation and passive cutaneous anaphylaxis. *Exp Mol Med* 37: 290-296.
23. Hachisuka H, Kusuhara M, Higuchi M, Okubo K, Sasai Y. 1988. Purification of rat cutaneous mast cells with Percoll density centrifugation. *Arch Dermatol Res* 280: 358-362.
24. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. 1993. An improved MTT assay. *J Immunol Methods* 157: 203-207.
25. Cochrane DE, Douglas WW. 1974. Calcium-induced extrusion of secretory granule (exocytosis) in the mast cells exposed to 48/80 or the ionophores A23187 and X-537A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 408-412.
26. Harvima RJ, Harvima IT, Fraki JE. 1988. Optimization of histamine radio enzyme assay with purified histamine-N-methyltransferase. *Clin Chim Acta* 171: 247-256.
27. Kim YR, Choi SH, Kim KM. 1994. Anti-allergic and anti-inflammatory actions of *Cimicifuga heracleifolia*: partial purification of active compounds. *J Appl Pharmacol* 2: 149-154.

(2006년 12월 5일 접수; 2007년 2월 2일 채택)