

상백피 물 추출물의 항산화 활성 및 항천식 효과

김정미¹ · 백종미¹ · 김현숙² · 최 먼^{1,2*}

¹강원대학교 생명건강공학과

²강원대학교 웰빙특산물산업화지역혁신센터

Antioxidative and Anti-asthma Effect of *Morus* Bark Water Extracts

Jeong Mi Kim¹, Jong Mi Baek¹, Hyun Sook Kim², and Myeon Choe^{1,2*}

¹Dept. of Bio-Health Technology and ²Well-being Bioproducts RIC Center,
Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

Abstract

This study was performed to evaluate the antioxidant activities and anti-asthma effects of *Morus* bark water extracts. Inhibitory effect of *Morus* bark onto free radical generation was determined by measuring DPPH and hydroxyl radical scavenging activities *in vitro*. Anti-asthma activities of *Morus* bark water extracts were assessed by testing their effects on the degranulation of mast cell. For this, β -hexosaminidase released from a basophilic cell line, RBL-2H3 was used and pro-inflammatory cytokines were measured by ELISA kit. The antioxidant activities of water extracts of *Morus* bark was 59.2% in the DPPH assay at 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 78.8% in the hydroxyl radical scavenging assay at 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Our results indicated that *Morus* bark water extracts effectively inhibited free radical generation. *Morus* bark water extracts inhibited inflammation-mediating substances such as histamine and β -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells. Cytokine release demonstrated a more effective blocking ability of the *Morus* bark water extracts to the release of IL-4 and TNF- α compared to control. These results demonstrate that *Morus* bark may be beneficial in the treatment of allergic inflammatory disease.

Key words: *Morus* bark, inflammation, RBL-2H3, IL-4, TNF- α , β -hexosaminidase

서 론

생활환경 및 식생활의 변화로 인하여 전 세계적으로 천식의 발병률이 급격히 증가되고 있으며, 매년 20만 정도가 천식으로 인해 사망하는 것으로 집계되고 있다. 또한 천식은 전 연령층에서 성별이나 인종에 관계없이 발생하고 있어 그 중요성은 여러 보고를 통하여 잘 알려져 있다(1,2). 천식은 비만세포 및 호염구 표면에 존재하는 IgE 수용체에 알레르기원과 IgE 항체가 결합되어 히스타민, 류코트리엔 등의 화학매체를 분비시켜 기관지 평활근 수축, 기관지 내의 점액물질을 증가시켜 기침, 호흡곤란, 천명 등의 증상을 나타내게 한다. 또한 염증성 cytokine TNF- α , IL-4, IL-13 등의 생성을 증가시켜 조직손상과 기도 과민을 증가시켜 만성 염증 질환으로 진행시키는 것으로 알려져 있다(3-6). 염증반응을 일으키는데 있어 중요한 역할을 하는 cytokine들 중 활성화된 비만세포에서 분비되는 cytokine은 TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-14 등이 있으며, 만성적인 알레르기성 염증을 보이는 천식이나 아토피 환자에게서 TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8의 농도가 높다고 알려져 있다(7). 현재 천식의 치료법

은 흡입용 교감신경 자극제, 스테로이드제, 항콜린제, 항히스타민제 등의 약물요법이 주를 이루고 있고, 천식을 유발하는 환경적 요인을 제거하는 환경요법 등이 사용되고 있다. 그러나 천식의 병리학적 특성상 장기간의 약물 치료가 요구되므로 약물에 대한 부작용 및 합병증이 유발될 수 있으므로, 최근 각종 천연 소재로부터 생리활성 물질을 탐색하여 질병의 예방 및 개선을 가지는 기능성식품으로 개발하려는 연구가 진행되고 있다(8,9).

상백피(桑白皮, *Morus* bark, mulberry root bark)는 뽕나무과에 속한 낙엽교목인 뽕나무속 식물의 근피로써 예로부터 해열, 항경련, 항알레르기, 항염증 작용과 더불어 이뇨촉진, 또한 보호, 혈당 강하 작용, 항암, 항균, 미백 효과 등 다양한 효과가 있다고 하였다(10-17). Ju 등(18)은 상백피 추출물이 인간 기관지 상피세포에서 기도점막의 염증을 유발시키는 IL-8과 GM-CSF mRNA를 유의적으로 감소시켰다고 보고하였으며, Kim 등(19)은 상백피가 제1형 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF 내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향을 살펴 본 결과 BALF내 lymphocyte 수, CD4+/CD8+ 비율이 유의적으로 감소하였고, 혈청 IgE의 양은 수치적으

*Corresponding author. E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-8645, Fax: 82-33-250-7451

로 억제되었으나 유의성이 없었다고 보고하였다. 또한 Cho 등(20)의 연구에서는 LPS 유발에 의해 자극된 macrophage 264.7 cell에서 상백피 추출물이 IL-1 β 및 TNF- α 의 분비를 유의하게 감소시켰으며, *in vivo*에서 histamine의 분비를 감소시켰다고 보고하였다. 그동안 진행되었던 상백피에 대한 연구를 보면 항염증 및 항알레르기 작용에 대해서 많은 관심을 보이고 있음을 알 수 있다. 그러나 천식 발병 기작에서 중요하게 작용하는 비만세포에 대한 연구와 물 추출물의 항산화 활성에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 상백피 추출물의 생리활성을 측정하기 위하여 DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) radical, hydroxyl radical 소거능을 측정하고, 천식과 관련된 항알레르기 효능을 규명하기 위하여 DNP-IgE-HSA complex reaction에 의해 감작된 RBL-2H3 mast cell에서의 β -hexosaminidase 분비 및 염증성 사이토카인인 IL-4와 TNF- α 에 미치는 영향을 조사하여 건강기능성 식품 원료로서의 유용성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

추출물의 제조

상백피는 춘천시 소재 건재상에서 구입하였으며, 수세한 후 무게 당 10.7배 증류수를 가하여 60°C에서 24시간 동안 교반하면서 3회 유효성분을 추출하였다. 이를 실온에서 방냉하고 여과한 다음 감압농축기(SB-1000, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하였고, 시료를 동결건조기(FD8508, IShin, Yangju, Korea)를 이용하여 -70°C에서 건조한 시료를 냉동 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's phenol 시약을 이용한 비색법을 이용하였다(21). 증류수에 희석시킨 시료 200 μ L에 증류수 4.8 mL, 50% Folin-Ciocalteu's phenol 시약 500 μ L를 넣고 3분간 방치시켰다. Na₂CO₃ 포화용액 1 mL을 넣은 후 1시간 동안 방치 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 tannic acid(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 총 페놀 함량을 측정하였다.

DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical 소거활성은 각 시료의 DPPH radical에 대한 환원력을 측정하였다(22). 에탄올에 희석한 시료 600 μ L에 DPPH(Sigma) 200 μ L를 첨가하여 암조건에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 대조구에 대한 시료 첨가구의 흡광도를 비교하여(1-시료의 흡광도/대조구의 흡광도) \times 100에 의하여 산출하였다.

Hydroxyl radical 소거활성 측정

Hydroxyl radical 소거활성은 Chung 등의 방법을 응용하

여 측정하였다(23). 농도별로 희석한 각 시료 100 μ L, 100 mM sodium phosphate(pH 7.4) 250 μ L, 1 mM EDTA 100 μ L, 36 mM deoxyribose 100 μ L, 1 mM FeCl₃·6H₂O 100 μ L, 1 mM L-ascorbic acid 100 μ L, 10 mM H₂O₂ 100 μ L, 증류수 150 μ L를 첨가하여 38°C water bath에서 1시간 방치 후 1% thiobarbituric acid 1 mL, 10% trichloroacetic acid 1 mL를 첨가하여 100°C에서 10분간 boiling 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며 (1-시료의 흡광도/대조구의 흡광도) \times 100에 의하여 산출하였다.

세포주 및 배양

RBL-2H3 세포는 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM) 배지에서 37°C로 유지되는 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.

세포 생존율

배양이 끝난 세포의 생존율은 MTT(3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; Sigma) 환원 방법을 이용하여 측정하였다(24). RBL-2H3 세포를 96-well plates에 1 \times 10⁶ cells/mL 농도로 100 μ L씩 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가되지 않은 배지에 각 시료를 농도별(0, 100, 250, 500, 1,000, 2,000 μ g/mL)로 제조한 후 세포에 처리하여 37°C, 5% CO₂ 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 DMSO를 100 μ L 분주하여 1시간 동안 혼합한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

β -Hexosaminidase 측정

β -Hexosaminidase release assay는 Choi 등(24)의 방법에 준하여 실시하였다. 24-well plates에 RBL-2H3 세포를 10% FBS와 DMEM 배지에 현탁시킨 후 24-well plate에 2 \times 10⁵ cells/mL 세포와 DNP-IgE(0.5 μ g/mL)를 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 12시간 배양하였다. 각 세포들을 Siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA, pH 7.2)로 2회 세척한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10분간 반응시킨 후 FBS와 DMEM 배지에 각 시료를 농도별(0, 250, 500, 1,000 μ g/mL)로 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 DNP-HSA(2 μ g/mL)을 가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 반응시키고 ice bath에서 10분간 incubation하여 반응을 종결시켰다.

상층액 40 μ L를 96-well plate에 옮기고 substrate buffer(4-p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide 2 mM, sodium citrate, 0.05 M, pH 4.5) 40 μ L를 넣고 37°C에서 1시

간 동안 배양시킨 다음 각 well 당 stop solution 200 μ L를 첨가하여 반응을 종결시키고 microplate reader(EL808 series, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cytokine(IL-4, TNF- α) 분비능 측정

24-well plate에 2×10^5 cells/mL의 세포와 DNP-IgE(0.5 μ g/mL)를 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양한 다음 새로운 DMEM 배지에 시료를 농도별(0, 250, 500, 1,000 μ g/mL)로 희석시켜 세포에 처리하였다. 30분 동안 배양한 후 DNP-HSA(10 μ g/mL)를 가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 반응시키고 ice bath에서 10분간 incubation 하여 반응을 종결시켰다. 배양이 끝난 상층액을 96-well ELISA plate에 옮기고, IL-4와 TNF- α ELISA kit (Bioscience, San Diego, CA, USA)를 사용하여 IL-4와 TNF- α 농도를 측정하였다.

통계분석

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 GraphPad In-Stat Version 3.00(GraphPad, San Diego, CA, USA) 통계 package를 이용하여 평균 \pm 표준오차로 표시하였고, 각 농도 평균치의 통계적 유의성을 Tukey-Kramer multiple comparisons test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

수율 및 총 페놀 함량

상백피 물 추출물은 3회 반복 추출하여 얻은 평균 수율로 건시료 30 g을 추출하여 감압 농축하였고 동결 건조된 무게를 측정된 결과 2.0 g(약 6.5%)을 얻었다. 상백피 물 추출물은 35.2 \pm 0.1 mg/g의 총 페놀을 함유하는 것으로 나타났다(Table 1).

페놀성 화합물은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사 산물의 하나로서 분자 내 phenolic hydroxyl기가 효소 단백질과 같은 거대분자들과 결합하는 성질이 있기 때문에 페놀이 함량이 증가할수록 항돌연변이, 콜레스테롤 저하, 항암 및 항산화 작용 등의 다양한 생리활성 기능이 증가된다(25, 26). Heo 등(27)에 따르면 한국에 자생하는 약용 식물의 경우 총 페놀 함량이 30 mg/g 이상이면 뛰어난 항산화 활성을 나타낸다고 하였다. 이러한 결과를 토대로 상백피의 경우

Table 1. Extraction efficiency and content of total phenolics of Morus bark water extracts

Sample	Extraction efficiency			Total phenolics ¹⁾ (mg/g)
	Sample weight (g)	Extract weight (g)	Yield (%)	
Morus bark	30.0	2.0	6.5	35.2 \pm 0.1

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

35.2 mg/g의 총 페놀 함량을 보이므로 강한 항산화 활성을 나타낼 것으로 사료된다. 상백피의 항산화 기능에 대한 연구에서 꾸지뽕나무의 잎, 열매, 줄기 및 뿌리의 과산화 지질 함량과 여러 종의 뿌리 추출물에 대한 항산화 효과 등이 보고되어 있다(28,29).

DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical 소거활성의 측정 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 상백피 물 추출물의 250, 500, 1,000 및 2,000 μ g/mL로 처리하였을 때 농도 의존적으로 DPPH 소거활성이 증가되었으며, 각각 35.3 \pm 1.2, 44.4 \pm 0.3, 51.9 \pm 1.1, 59.2 \pm 0.6%로 나타났다. 상백피의 항산화능에 대한 연구에서 Jee(17)는 상백피 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 활성은 농도 의존적으로 증가되었으며, 1000 μ g/mL에서 열수 추출물은 65.8%, 에탄올 추출물은 87.0%의 DPPH radical 소거능을 나타냈다고 하여 상백피의 전자공여능이 우수함을 보고한 바 있다. 이는 상백피의 총 페놀 함량이 높는데 기여한 것으로 사료되며, 페놀 화합물 함량이 높을수록 전자공여능 또한 높게 나타난 것과 일치하였다. Kang 등(28)은 전자공여능이 페놀성 물질에 대한 항산화 지표라 하였으며, 환원력이 큰 물질일수록 높다고 하였다. 따라서 상백피의 항산화 효과가 천식 등 항알레르기 치료에 긍정적으로 작용할 수 있다고 생각된다.

Hydroxyl radical 소거활성 측정

Hydroxyl radical 소거활성은 fenton reaction에 의해 생성된 hydroxyl radical을 deoxyribose를 분해하고 이때 생성된 malonaldehyde의 양을 측정함으로써 시료의 hydroxyl radical 소거활성을 측정하게 된다(29). Fig. 2에서 보는 바와 같이 상백피 물 추출물의 hydroxyl radical 소거활성은 250, 500, 1,000 및 2,000 μ g/mL 농도에서 62.1 \pm 0.5, 73.0 \pm 0.6, 76.4 \pm 3.1, 78.8 \pm 2.0%로 나타나 농도 의존적으로 라디칼 소거능이 증가하였다(p<0.05).

Kim과 Choi(30)는 BHT, ascorbic acid 및 오미자 추출물

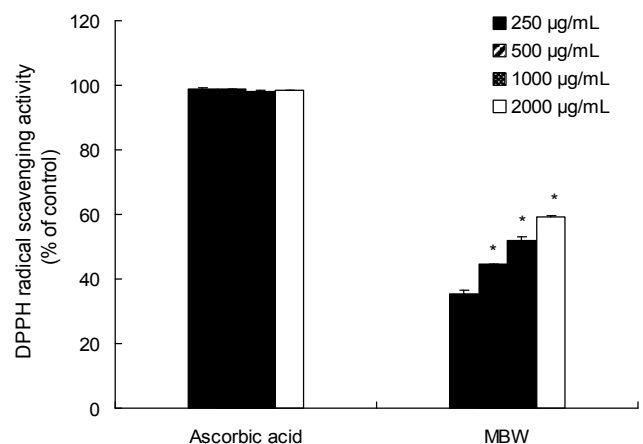


Fig. 1. Effect of Morus bark water extracts (MBW) on DPPH radical scavenging activity. Results are from three experiments and are expressed as mean \pm SE. Significant differences were compared with control at *p<0.05.

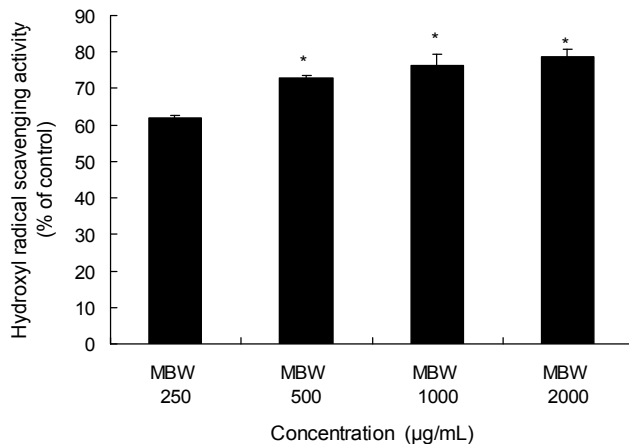


Fig. 2. Effect of Morus bark water extracts (MBW) on hydroxyl radical scavenging activity. Results are from three experiments and are expressed as mean \pm SE. Significant differences were compared with control at * $p < 0.05$.

을 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 hydroxyl radical 소거능을 측정된 결과 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 오미자 추출물 (33.6%)은 ascorbic acid(59.3%)와 BHT(56.4%)보다 낮았으나 농도가 증가된 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 오미자 추출물(72.1%)은 ascorbic acid(79.4%)와 BHT(74.5%)의 결과만큼 높은 hydroxyl radical 소거능을 나타냈다. 이는 본 연구에 사용된 상백피 물 추출물과 비교해 볼 때 천연 항산화제인 ascorbic acid 만큼이나 높은 라디칼 소거능을 가지므로 항산화능이 높다고 판단되어진다. 활성산소와 관련된 free radical이 염증을 비롯해 많은 질병의 병인인이 추측되고 있으므로 항산화 물질이 이러한 질병의 치료제로서 이용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정

RBL-2H3 세포에 대한 상백피 물 추출물의 정상세포 보호 및 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였다(Fig. 3). 상백피 물 추출물을 농도별(0, 100, 250, 500, 1,000 및 2,000 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 결과, 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다. 그러므로 상백피 물 추출물의 항히스타민 및 염증성 사이토카인 측정을 할 때 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 선택하여 실험을 진행하였다.

β -Hexosaminidase 분비량 측정

항원과 항체가 비만세포에 반응하면 세포 내에서 히스타민, 프로스타글란딘 등의 과립물질이 세포외로 분비하게 되는데, 항알레르기 효과를 확인하기 위해서는 세포외로 분비된 과립의 양을 측정함으로써 확인할 수 있다(31). 본 연구에서는 탈과립의 지표로 사용되고 있는 β -hexosaminidase 효소의 분비를 측정함으로써 상백피 물 추출물의 항알레르기 효과를 측정하였다(Fig. 4). RBL-2H3 세포에 상백피 물 추출물을 0, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리했을 때 β -hexosaminidase 방출 억제능은 각각 42.2 ± 13.1 , 38.5 ± 9.6 , $41.1 \pm 2.1\%$ 로 무처리 대조군과 비교했을 때 유의적인 감소를 나타

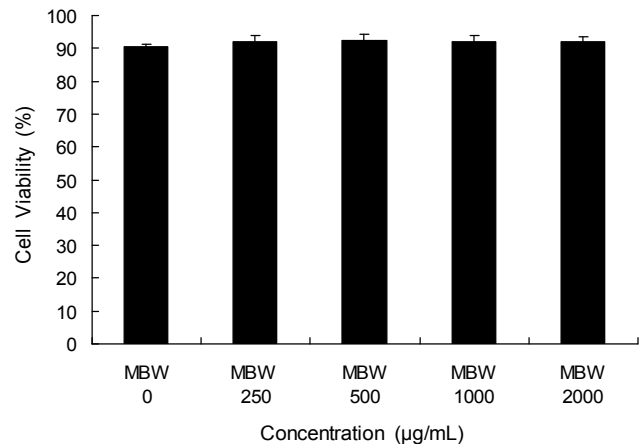


Fig. 3. Effect of Morus bark water extracts (MBW) on the cell viability in RBL-2H3 cells. Results are from three experiments and are expressed as mean \pm SE.

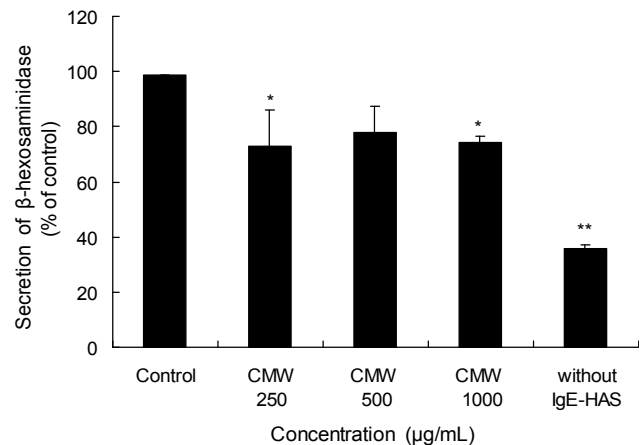


Fig. 4. Effect of Morus bark water extract (MBW) on β -hexosaminidase release of anti-DNP IgE-primed RBL-2H3 cells that were stimulated with DNP-HSA. Results are from three experiments and are expressed as mean \pm SE. Significant differences were compared with control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

내었다($p < 0.05$).

Lee 등(32)은 상백피의 물 추출물로부터 항알레르기 활성을 나타내는 고분자 물질을 분리하였고, 상백피 중의 항알레르기 활성을 나타내는 성분은 lignincarbohydrate complex로 추정되며, positive control인 ketotifen과의 비교실험에서 72.7, 69.5%의 히스타민 유리억제 작용을 보였다고 하였다. Lyu 등(33)은 창이자 추출물 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 PMA로 자극된 RBL-2H3 세포에 처리하였을 때 65.1%의 분비 억제를 나타냈다고 보고하였고, Lee 등(34)은 짓산균으로 발효시키지 않았을 때 사자발췌 추출물의 분비 억제능은 29.0%이었으나 짓산균으로 발효시켰을 경우에는 활성이 2배로 늘어난 46%의 분비 억제를 나타냈다고 보고하였다.

한편, 히스타민은 혈관확장과 근육 수축 등의 알레르기 증상을 일으키는 물질로서 compound 48/80 처리 시 비만세포에서 히스타민 분비가 촉진된다. Ye 등(35)은 무처리군에 비해 히스타민을 유도하는 compound 48/80을 처리하였을

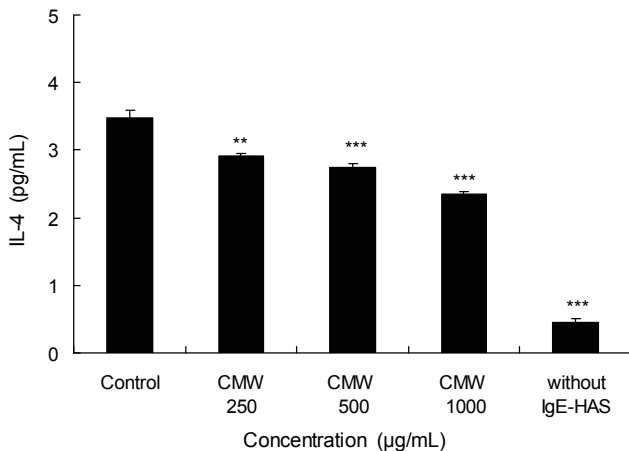


Fig. 5. Effects of Morus bark water extracts (MBW) on IL-4 production from RBL-2H3 cells. Results are from three experiments and are expressed as mean±SE. Significant differences were compared with control at **p<0.01, ***p<0.001.

때 히스타민의 분비량이 증가하였으며, 뽕잎발효차의 열수 추출물을 100 µg/mL로 처리하였을 때 히스타민의 분비량이 21.0% 억제되었다고 보고하여 본 실험의 상백피 물 추출물의 억제율이 더 높은 결과를 얻었다.

상백피 물 추출물에 의한 IL-4 생성의 변화

활성화된 비만세포에 상백피 물 추출물을 처리하였을 때 생성되는 IL-4의 양을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 항원-항체 반응을 적용시키지 않은 세포에서 IL-4는 0.4±0.1 pg/mL 분비되었으나 활성화된 세포인 대조군에서는 3.5±0.1 pg/mL로 현저히 높은 양의 사이토카인이 분비되었다. 활성화된 비만세포에 상백피 물 추출물을 1000 µg/mL의 농도로 처리하였을 때에는 2.3±0.1 pg/mL 나타나 대조군과 비교하였을 때 약 1.5배의 활성을 유의적으로 감소시켰다.

비만세포는 천식이나 알레르기성 비염과 같은 알레르기 반응을 매개하는 중요한 세포이다(36). 비만세포가 활성화되면 비만세포는 탈과립되고 또한 아라키돈산 대사물질과 염증반응을 유발하는 다양한 사이토카인이 분비된다(37). IL-4는 B-세포를 활성화하여 IgE 항체를 생성하며, Th2 세포의 분화를 촉진시키므로 천식과 같은 알레르기 질환에서 중요한 역할을 하는 사이토카인이다. 정상인의 경우는 같은 알레르겐에 대해서 IFN-γ를 분비하는 Th1 세포의 기능을 갖고 있으나, 천식 환자의 기관지 생검, 아토피 환자의 피부 생검, 알레르기성 비염 환자의 비점막에서는 IL-4, IL-5, IL-9 등과 같은 Th2 세포가 분비하는 사이토카인의 양상이 관찰된다(38). 본 연구 결과는 임상 이론과 같이 특이 알레르겐에 의해 활성화된 세포에서는 IL-4 사이토카인이 증가되었으나, 상백피 물 추출물을 투여하였을 때 사이토카인의 분비가 유의적으로 감소된 것을 통해 상백피 물 추출물에는 세포가 Th2 세포의 기능을 획득하는 것을 억제함으로써 항천식 작용이 있을 것이라 생각된다.

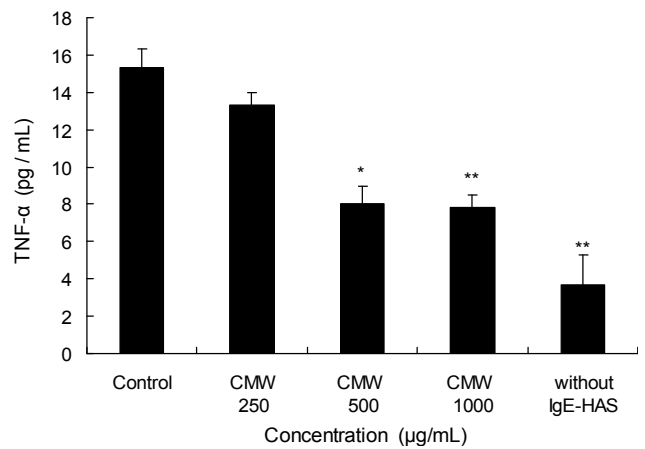


Fig. 6. Effects of Morus bark water extracts (MBW) on TNF-α production from RBL-2H3 cells. Results are from three experiments and are expressed as mean±SE. Significant differences were compared with control at *p<0.05, **p<0.01.

상백피 물 추출물에 의한 TNF-α 생성의 변화

상백피 물 추출물을 처리하였을 때 생성되는 TNF-α의 생성량은 Fig. 6과 같다. 항원-항체 반응에 의하여 활성화된 비만세포에서 생성된 TNF-α는 15.3±1.0 pg/mL로 현저히 높은 양이 분비되었다. 그러나 상백피 물 추출물을 처리하였을 때에는 농도 의존적으로 감소되었고, 추출물 농도별 250, 500, 1,000 µg/mL에서 각각 13.3±0.7, 8.0±1.0, 7.8±0.7 pg/mL을 나타내었다.

TNF-α는 중요한 염증 매개 인자 중 하나로서 어떤 환경에서든 생체에 매우 해로운 영향을 미친다. 비만세포에서 TNF-α가 분비하게 되면 혈관내피세포의 점착분자의 발현을 증가시켜 호산구 및 T 림프구의 표적기관으로의 유입을 촉진시키며, 화학 매체들의 생산을 유도하는 역할을 하게 된다(39). 그러므로 항알레르기 효과를 갖기 위해서는 TNF-α의 분비를 억제시켜야 하는데, 본 연구 결과에서 상백피 물 추출물은 활성화된 비만세포에서 TNF-α 사이토카인의 생성 억제능을 가지는 것을 확인하였다. 결과적으로 DNP-IgE와 HSA로 활성화된 RBL-2H3 cell에서 상백피 물 추출물의 전처리하는 천식과 관련된 지표를 억제하며, 천식 예방 및 개선에 효과적으로 사용될 수 있을 것이라 판단된다.

한편, Ye 등(35)은 뽕잎차 및 뽕잎발효차 열수 추출물의 처리 시 TNF-α을 억제시키지 못하거나 미미하였으나, 에탄올 추출물에서는 각각 29.7, 47.9%로 TNF-α의 억제율이 높은 것으로 보고하였다. Cho 등(39)은 상백피로 전처리한 후 LPS로 자극한 실험군에서는 모든 농도에서 TNF-α 억제 효과가 없었고, 일부 농도에서는 오히려 TNF-α의 분비를 증가시키는 결과를 보고하였다. 수용성 상백피 추출물이 비자극 대식세포의 TNF 생산에 미치는 영향을 관찰한 결과 대조군과 별 차이를 보이지 않아 상백피는 자발적으로 대식세포로부터 TNF 생산을 유도하거나 억제시키지 못하였다고 하여 본 연구와는 차이를 보였다(40).

요 약

상백피의 기능성식품 소재로서의 이용 가능성을 조사하기 위하여 상백피 물 추출물의 항산화 활성 및 *in vitro*에서의 항천식 효과를 확인하였다. 항산화 측정 결과는 총 페놀 함량은 35.2 mg/g로 나타났으며, DPPH radical 소거능은 35.3~59.8%, hydroxyl radical 소거능은 62.1~78.8% 범위로 높은 항산화 효능을 나타내었다. DNP-IgE와 HSA로 활성화된 RBL-2H3 세포에서의 항천식 효과는 농도가 증가할수록 유의적으로 β -hexosaminidase를 감소시켰으며, 염증성 cytokine인 IL-4, TNF- α 사이토카인 분비량 또한 유의적($p < 0.05$)으로 감소시켰다. 결과적으로 상백피는 높은 항산화력을 가지며, 항천식과 관련된 지표들을 유의적으로 감소시킴으로써 천식 예방 및 개선을 위한 기능성 소재로서 이용가치가 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 중소기업 산학협력 지원사업의 연구 결과이며, 강원대학교 Nutraceutical Bio Brain Korea 21, 강원의료융합인재양성센터의 일부 지원에 감사드립니다.

문 헌

- Lee SI. 2001. Prevalences of symptoms of asthma and other allergic diseases in Korean children: a nationwide questionnaire survey. *J Korea Med Sci* 16: 155-164.
- Lee JT, Kim H, Song H, Hong YC, Cho YS, Shin SY, Hyun YJ, Kim YS. 2002. Air pollution and asthma among children in Seoul, Korea. *Epidemiology* 13: 481-484.
- Jonasson S, Hjoberg J, Hedenstierna G, Basu S. 2009. Allergen-induced formation of F₂-isoprostanes in a murine asthma model identifies oxidative stress in acute airway inflammation *in vivo*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 80: 1-7.
- Bloemen K, Verstraelen S, Heuvel RVD, Witters H, Nelissen I, Schoeters G. 2007. The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunol Lett* 113: 6-18.
- Chung KF, Barnes PJ. 1999. Cytokines in asthma. *Thorax* 54: 825-857.
- Stevens RL, Austen KF. 1989. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol Today* 10: 381-386.
- Kim HK, Lim YM, Kim DK, Nho YC. 2008. Effect of natural extracts mixture from *Houttuynia cordata* and *Ulmus davidiana* var. *japonica* in mast cell-induced allergic inflammatory response. *Lab Anim Res* 24: 1-7.
- Sherman J, Patel P, Chesrown S, Hendeles L. 2001. Adherence to oral montelukast and inhaled fluticasone in children with persistent asthma. *Pharmacotherapy* 21: 1464-1467.
- Horwitz RJ, McGill KA, Busse WW. 1998. The role of leukotriene modifiers in the treatment of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1363-1371.
- Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. 1995. Anti-oxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 27: 80-85.
- Lee HG, Lee MS, Yang MS, Lee YG, Heo H, Son YT, Jun BD. 1994. Anti-allergic effect of *Cortex Mori*. Proceedings of the Korean Society of Applied Pharmacology. p 176.
- Kim SY, Lee HS, Ryu KS, Lee EJ, Kim YC. 1999. Protective effects of extracts of *Mori Cortex Radicis* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Yakhak Hoeji* 43: 391-396.
- Kim YY, Choue RW, Chung SH, Koo SJ. 1999. Anti-hyperglycemic effect of *Cortex Mori radicis* in db/db mice. *Korean J Food Sci Technol* 31: 1057-1064.
- Singab AN, Beshbishy HA, Yonekawa M, Nomura T, Fukai T. 2005. Hypoglycemic effect of Egyptian *Morus alba* root bark extract: effect on diabetes and lipid peroxidation of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacology* 100: 333-338.
- Park KM, You JS, Lee HY, Baek NI, Hwang JK, Kuwanon G. 2003. An antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *J Ethnopharmacology* 84: 181-185.
- Jeong JH, Lee JM, Lee CH, Cho JH, Jang JB, Lee KS. 2009. Anti-tumor metastatic effect and activation of innate immunity by extract of *Mori Radicis Cortex*. *J Oriental Obstetrics Gynecology* 22: 31-40.
- Jee SO. 2009. Antioxidant activities and whitening effect of the mulberry (*Morus alba* L.) root bark extracts. *Korean J Plant Res* 22: 145-151.
- Ju CY, Hwang WS, Heo TS, Jung HJ, Jung SK, Rhee HK. 2001. The inhibitory effects of Yukmijihwang-tang-hap-sabaek-sun and root cortex of *Morus alba* L. on the IL-6, IL-8 and GM-CSF mRNA levels in human epithelial cells. *Korean J Orient Int Med* 22: 415-422.
- Kim DK, Lee SJ, Kim KH. The effects of Sangbaekpi (SBP) on immune cell & serum OA-specific IgE in BALF in rat asthma model. *Kor J Oriental Preventive Med Soc* 6: 140-155.
- Cho HJ, Lee JY, Kim DG. 2005. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory and anti-allergic responses caused by water extract of *Mori Cortex*. *J Korean Oriental Pediatrics* 19: 175-195.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enology & Viticulture* 16: 144-158.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Chung MJ, Walker PA, Brown RW, Hogstrand C. 2005. Zinc-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. *Toxicology Appl Pharmacol* 205: 225-236.
- Choi SP, Kang MY, Nam SH. 2005. Inhibitory activity of pigmented rice bran extract to the allergic inflammation in basophilic cell line and peritoneal mast cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 315-321.
- Lee KD, Kim JS, Bae JO, Yoon HS. 1992. Antioxidative effectiveness of water extract and ether in wormwood (*Artemisia montana* Pampan). *J Korean Soc Food Nutr* 21: 17-22.
- Jeong HJ, Park SB, Kim S, Kim HK. 2007. Total polyphenol content and antioxidative activity of wild grape (*Vitis-coignetiae*) extracts depending on ethanol concentrations. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1491-1496.
- Heo SI, Jung MJ, Kim MK, Wang MH. 2007. Antioxidative activities and tyrosinase inhibitory effects of Korean medicinal plants. *J Appl Biol Chem* 50: 115-119.
- Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort

- extracts. *Korean J Food Sci Technol* 27: 978-984.
29. Kwon GJ, Choi DS, Wang MH. 2007. Biological activities of hot water extracts from *Euonymus alatus* leaf. *Korean J Food Sci Technol* 39: 569-574.
 30. Kim JS, Choi SY. 2008. Physicochemical properties and antioxidative activities of *omija* (*Schizandra chinensis* Bailon). *Korean J Food Nutr* 21: 35-42.
 31. Yamada P, Zarrouk M, Kawasaki K, Isoda H. 2008. Inhibitory effect of various Tunisian olive oils on chemical mediator release and cytokine production by basophilic cells. *J Ethnopharmacol* 116: 279-287.
 32. Lee EJ, Chae OH, Lee MS, Lee HK, Huh H. 1998. Purification of anti-allergic compound from Mori cortex radices extract. *Yakhak Hoeji* 42: 395-402.
 33. Lyu JH, Yoon HJ, Hong SH, Ko WS. 2008. *Xanthium strumarium* suppresses degranulation and pro-inflammatory cytokines secretion on the mast cells. *J Korean Oriental Medical Ophthalmol Otolaryngol Dermatol Soc* 21: 82-93.
 34. Lee SH, Shin YW, Bae EA, Lee BM, Min SW, Baek NI, Chung HG, Kim NJ, Kim DH. 2006. Lactic acid bacteria increase anti-allergic effect of *Artemisia princeps* pampalini SS-1. *Arch Pharm Res* 29: 752-756.
 35. Ye EJ, Yee ST, Bae MJ. 2010. Anti-allergy activity and *in vivo* for S-180 solid anti-cancer effects in manufacturing fermented mulberry leaf tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 337-342.
 36. Metcalfe DD, Kaliner M, Donlon MA. 1981. The mast cell. *Crit Rev Immunol* 3: 23-74.
 37. Church MK, Levi-Schaffer F. 1997. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol* 99: 155-160.
 38. Park JC, Choi JS, Choi JW. 1995. Effects of the fractions from the leaves, fruits, stems and roots of *Cudrania tricuspidata* and flavonoids on lipid peroxidation. *Kor J Pharmacogn* 26: 377-384.
 39. Cho YJ, Chun SS, Kwon HJ, Kim JH, Lee KH, An BJ, Choo JW. 2006. Inhibitory effects of water and 80% ethanol extracts from mulberry leaves (*Morus alba* L.) on angiotensin converting enzyme and xanthine oxidase. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 114-124.
 40. Ahn JK, Ahn DK, Cho JC. 1998. The effects of *Cortex mori* on NO, TNF- α and IL-1 α production by macrophage. *J Korean Oriental Med Soc* 19: 485-501.

(2010년 6월 8일 접수; 2010년 7월 12일 채택)