

## 자소엽의 항알레르기 및 항염증효과

유진수<sup>1</sup> · 김상용<sup>2</sup> · 김상현<sup>3\*</sup> · 신태용<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>우석대학교 약학대학, <sup>2</sup>국립수목원, <sup>3</sup>경북대학교 의과대학

### Antiallergic and Anti-inflammatory Effects of *Perilla frutescens* var. *acuta*

Jin-Su You<sup>1</sup>, Sang-Yong Kim<sup>2</sup>, Sang-Hyun Kim<sup>3\*</sup> and Tae-Yong Shin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Woosuk University, Jeonju, 565-701, Korea

<sup>2</sup>Korea National Arboretum, GyeongGi-Do, Pocheon, 487-821, Korea

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 700-422, Korea

**Abstract** – In the present study, we investigated the effect of the water extract of *Perilla frutescens* var. *acuta* (Labiatae; WEPF) on the mast cell-mediated allergic reactions. WEPF was orally administered to mice for high and fast absorption. WEPF inhibited compound 48/80-induced systemic allergic reaction. WEPF attenuated immunoglobulin E (IgE)-mediated local allergic reaction. In addition, WEPF decreased the gene expression of pro-inflammatory cytokines in phorbol 12-myristate 13-acetate plus calcium ionophore A23187 (PMACI)-stimulated HMC-1 cells. These results indicate that WEPF inhibits mast cell-mediated allergic reactions *in vivo* and *in vitro*.

**Key words** – *Perilla frutescens* var. *acuta*, Allergic inflammation, Mast cell, Tumor necrosis factor- $\alpha$ , Interleukin-6

비만세포는 피부, 호흡기, 위장관의 점막, 혈관 주위, 림프관 주위 등 전신의 장기에 분포하고 있으며 알레르기성 비염, 천식, 아토피성 피부염 등 알레르기 반응의 유발에 필수적인 세포로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 비만세포는 세포막에 있는 여러 가지 수용체를 통해서 활성화된다.<sup>2)</sup> 비만세포의 탈과립을 유도하는 비만세포의 활성화는 IgE 수용체를 통한 자극 외에 compound 48/80, protein kinase C (PKC) activator인 phorbol 12-myristate 13-acetate, calcium ionophore A23187 등이 있다.<sup>1,3,4)</sup> 이들 중 compound 48/80은 비만세포 내의 칼슘 수준을 증가시켜 전신성 알레르기 반응을 일으키는데 가장 많이 사용되며 적당량의 compound 48/80은 아나필락시의 기전을 연구하기 위한 히스타민 유리 촉진제로서 가장 널리 사용되고 있다.<sup>5,6)</sup> 비만세포의 탈과립을 유도하는 자극에 의해 과립내에 저장되어 있는 히스타민을 비롯한 화학적 매개물질이 유리되고 이 매개물질에 의해 말초혈관의 투과성 항진과 확장작용, 기관지 평활근에 대한 확장작용, 점막표면에 대한 선세포의 분비 항진작용 등을 일으켜 알레르기 반응이 발현된다.

그러나 알레르기 염증반응은 이들 화학적 매개물질의 작

용만으로는 설명하기 어렵다. 최근에 발표된 많은 병리소견에서 만성 염증성반응이 알레르기반응에서 공통적으로 발견되고 있으며, 특히 6시간 전후에 나타나는 후기 반응의 기전이 염증반응으로 이해되고 있기 때문이다. 비만세포로부터 유리되는 화학적 매개물질 외에 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 등이 이러한 알레르기성 염증반응의 유도에 결정적인 역할을 하는 인자로 알려지고 있다.<sup>7,8)</sup> 따라서 비만세포로부터 이들 사이토카인의 분비에 대한 조절은 알레르기 염증성 질환에 대한 치료 수단이 될 수 있다.

자소엽 (*Perilla frutescens* var. *acuta*)은 꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 식물로 항염증 및 항알레르기작용,<sup>9-13)</sup> 항균작용,<sup>14)</sup> 항산화작용<sup>15)</sup> 등의 약리작용이 보고되어 있으며 해열약으로 더위 먹은데, 감기, 산욕열, 황달, 각종 신경성열병 등에 사용되며 지혈약으로도 사용된다.<sup>16,17)</sup>

직장을 통한 약물송달 시스템은 경구투여가 어려운 환자에게 유용하며 흡수속도를 증가시킬 수 있는 약물투여 방법 중 하나이다. 본 연구에서는 자소엽의 물추출물(WEPF)이 즉시형 알레르기 반응 및 염증반응에 미치는 효과를 확인하기 위하여 생체내 실험으로 약물의 직장 투여에 의한 compound 48/80 유도 전신성 알레르기 반응과 anti-DNP

\*교신저자(E-mail): shkim72@knu.ac.kr, tyshin@woosuk.ac.kr  
(Tel): +82-53-420-4838, +82-63-290-1572

IgE 매개 국소성 알레르기 반응에 대한 실험을 하였다. 또 생체의 실험으로 인체 비만세포주인 HMC-1 세포에서 phorbol 12-myristate 13-acetate와 calcium ionophore A23187 (PMACI) 유도 염증유발성 사이토카인의 유전자 발현에 대한 영향을 검토하였다.

## 재료 및 방법

**시약 및 세포배양** - Compound 48/80, anti-dinitrophenyl (DNP) IgE, DNP-human serum albumin (HSA), phorbol 12-myristate 13-acetate, calcium ionophore A23187은 Sigma (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다. TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 R & D사(Minneapolis, MN, USA) 제품을 사용하였다. HMC-1 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 Life Technologies사(Grand Island, NY, USA)의 Iscove's media에서 배양하였다.

**실험동물** - ICR계 생쥐는 대한 바이오링크 (충북)에서 구입하여 실험에 사용할 때까지 온도 22±2°C, 상대습도 55±5%로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 사육하였다.

**실험재료 (WEPF)** - 본 실험에 사용된 자소엽(*Perilla frutescens* var. *acuta*)은 보화당 한의원(전주)에서 구입하여 우석대 약대 임종필교수의 감정을 받은 후 실험에 사용하였다. 자소엽을 정제수로 수욕상에서 5시간 추출하고 감압 농축한 다음 동결 건조하였다. 이 추출물을 사용 직전에 생리식염수 또는 Tyrode buffer A (10 mM HEPES, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.6 mM glucose, 0.1% bovine serum albumin)를 사용하여 일정 농도로 조제하였다.

**Compound 48/80에 의한 전신성 아나필락시** - 신 등<sup>5)</sup>의 방법에 따라 실험하였다. 즉 비만세포의 탈과립제로 compound 48/80 (8 mg/kg, 체중)을 생쥐의 복강 내에 주사하였으며 WEPF (1-1000 mg/kg, 체중)는 compound 48/80 주사 1시간 전에 직장으로 투여하였다. 또 시간의존 실험으로 compound 48/80을 투여하고 5분, 10분, 20분 및 30분 후에 각각 WEPF (1000 mg/kg, 체중)를 직장으로 투여하였다. 치사율 실험은 아나필락시 속을 유발시킨 후 1시간 동안 관찰하였다.

**48시간 동종 수동 피부 아나필락시 (PCA)** - 신 등<sup>5)</sup>의 방법에 따라 실험하였다. 즉 anti-DNP IgE 100  $\mu$ g을 생쥐의 등에 피내 주사하여 감작시킨 다음 48시간 후에 꼬리 정맥에 DNP-HSA 1 mg과 evans blue 16 mg을 포함한 생리식염수를 주사하여 항원 항체 반응을 야기시켰다. anti-DNP IgE로 감작시킨 비만세포를 DNP-HSA로 탈감작시키기 1시간 전에 WEPF (1-1000 mg/kg, 체중)를 직장투여 하고 30분 후에 치사시켰다. Evans blue로 염색된 피부 부위를 잘라 1 M-KOH 1 ml를 가하고 인산과 아세트 (5:13)의 혼액

9 ml를 가하여 색소를 추출한 후 신 등<sup>5)</sup>의 방법에 따라 spectrophotometer로 620 nm에서 색소량을 정량하였다.

**RT-PCR을 이용한 유전자 발현 분석** - RNA를 분리 kit를 사용하여 세포로부터 total RNA를 분리하고, 분리된 total RNA의 흡광도를 측정하여 정량한 후 1  $\mu$ g의 RNA로 cDNA를 합성한 후 주형으로 한 다음 primer를 사용하여 PCR를 증폭하였다.

**통계학적 분석** - 실험 결과는 mean±S.E.로 표시하였으며 ANOVA와 Duncan's multiple range tests에 의해 유의성을 검정하여 p<0.05인 결과를 얻었을 때 유의성이 있는 것으로 하였다.

## 결과 및 고찰

**Compound 48/80 유도 전신성 알레르기 반응에 대한 WEPF의 효과** - Compound 48/80은 세포막의 지질이중막 투과성을 증가시키며 세포막의 투과성 증가는 비만세포로부터 화학적 매개물질의 유리를 촉진한다. 즉시형 과민반응에 대한 WEPF의 효과를 검토하기 위하여 비면역학적 자극물질인 compound 48/80을 사용하여 전신성 아나필락시를 유도하였다. Table I에서와 같이 생리 식염수 200  $\mu$ l를 투여한 대조군은 100% 치사율을 나타내었다. 그러나 compound 48/80을 투여하기 1시간 전에 WEPF (1-1000 mg/kg, 체중)를 직장 투여한 후 치사율을 관찰한 결과 농도 의존적으로 치사율이 감소하였다. 또 시간의존 실험으로 compound 48/80을 투여하고 5분, 10분, 20분 및 30분 후에 WEPF (1000 mg/kg, 체중)를 직장 투여한 결과 Table II에서와 같이 치사율은 시간 의존적으로 증가하였다. 이 결과는 WEPF의 전신적 투여에 의해 비만세포 매개 전신성 알레르기 반응이 조절될 수 있음을 시사하고 있으며 이러한 작용은

**Table I.** Effect of WEPF on compound 48/80-induced systemic anaphylaxis

WEPF treatment (mg/kg)	Compound 48/80 (8 mg/kg)	Mortality (%)
None (saline)	+	100
1	+	100
10	+	80
100	+	60
1000	+	20
1000	-	0

Groups of mice (n=10/group) were anally pretreated with saline (200  $\mu$ l) or WEPF. WEPF was given at various doses 1 h before the compound 48/80 injection. The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to the group of mice. Mortality (%) within 1 h following compound 48/80 injection was represented as the number of dead mice $\times$ 100/total number of experimental mice.

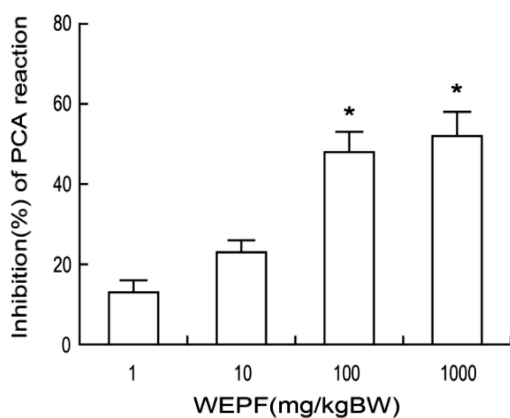
**Table II.** Time-dependent effect of WEPF on compound 48/80-induced systemic anaphylaxis

WEPF treatment (mg/kg)	Time (min)	Compound 48/80 (8 mg/kg)	Mortality (%)
None (saline)		+	100
1000	5	+	0
	10	+	40
	20	+	80
	30	+	100

Groups of mice (n=10/group) were orally pretreated with saline (200 µl) or WEPF. WEPF (1000 mg/kg) was given at 5 min, 10 min, 20 min and 30 min after compound 48/80 injection. The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to the group of mice. Mortality (%) within 1 h following compound 48/80 injection was represented as the number of dead mice×100/total number of experimental mice.

WEPF의 지질이중막 안정화작용에 의한 것으로 사료된다.

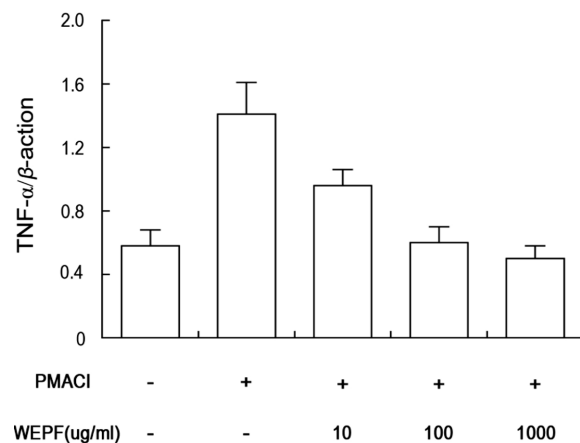
**IgE 매개 PCA 반응에 대한 WEPF의 효과** - 비만세포로부터 히스타민의 유리는 알레르기 반응의 병리적 진행에서 필수적인 단계이며 비만세포의 표면에 존재하는 IgE의 수용체인 FcεRI을 경유하는 비만세포의 자극은 다양한 매개물질의 분비를 일으키며 이러한 매개 물질들은 즉시형 또는 지연형 알레르기 반응을 유도한다.<sup>18,19)</sup> Makino 등은 mice ear-passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 반응으로 자소엽의 항알레르기작용을 실험하였다.<sup>13)</sup> 본 연구에서는 PCA 반응에 미치는 WEPF의 효과를 검토하기 위하여 DNP-HSA와 evans blue의 혼합액을 투여하기 1시간 전에 WEPF (1-1000 mg/kg)를 직장 투여 하였다. WEPF의 투여에 의해 PCA 반응은 농도 의존적으로 억제되었으며 특히 100 mg/kg 및 1000 mg/kg의 농도에서 유의성 있는 억제효과를 나타내었다(Fig. 1). WEPF는 피부에서 세포막의 유동성을 안



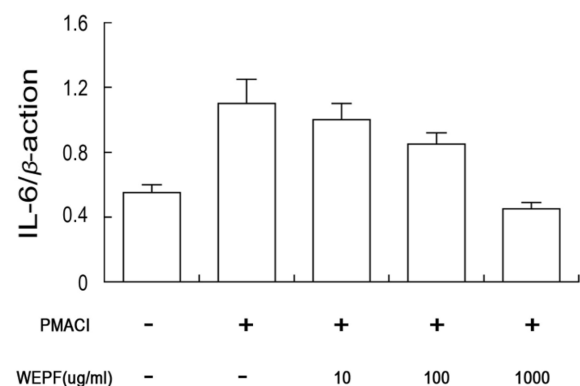
**Fig. 1.** Effect of WEPF on the 48 h PCA. WEPF was orally administered 1 h prior to the challenge with antigen. Each data represents the mean±SEM of three independent experiments. \*Significantly different from the saline value at  $p < 0.05$ .

정화시켜 비만세포의 탈과립을 조절하는 작용이 있을 것으로 사료되며, 이것은 WEPF가 알레르기 질환 특히 피부 알레르기 질환의 치료에 도움이 될 수 있음을 시사하고 있다.

**염증유발성 사이토카인의 유전자 발현에 대한 WEPF의 효과** - HMC-1 세포는 사이토카인의 활성화 경로의 연구에 중요한 세포이다.<sup>20)</sup> TNF-α와 IL-6는 잘 알려진 염증유발물질이며 PMACI의 자극에 의해 비만세포에서 발현된다. 비만세포 유래 염증유발에 대한 WEPF의 효과를 검토하기 위하여 HMC-1 세포를 PMACI로 자극하기 1시간 전에 WEPF를 처리하였다. WEPF (10-1000 µg/ml)는 비만세포에서 PMACI에 의한 TNF-α와 IL-6의 유전자 발현을 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 2, Fig. 3). 이 결과는 WEPF의 항알레르기 염증효과는 WEPF가 비만세포로부터 TNF-α와 IL-6를 감소시키는 작용기전에 의한 것임을 시사하고 있다.



**Fig. 2.** Effect of WEPF on the gene expression of TNF-α in HMC-1 cells. HMC-1 cells were pretreated with WEPF for 30 min prior to PMACI stimulation. The levels of TNF-α was determined by RT-PCR.



**Fig. 3.** Effect of WEPF on the gene expression of IL-6 in HMC-1 cells. HMC-1 cells were pretreated with WEPF for 30 min prior to PMACI stimulation. The levels of IL-6 was determined by RT-PCR.

## 결 론

WEPF의 항알레르기 및 항염증효과를 실험한 결과는 다음과 같다.

1. WEPF는 compound 48/80에 의해 유도된 전신성 알레르기반응 및 anti-DNP IgE로 유도된 국소성 알레르기반응을 농도 의존적으로 억제하였다.

2. WEPF는 PMACI로 자극된 HMC-1 세포에서 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 유전자 발현을 억제하였다.

이러한 결과는 WEPF가 비만세포 매개 즉시형 알레르기 반응의 예방 및 치료에 도움이 될 수 있음을 시사하고 있다.

## 사 사

이 논문은 우석대학교 산학협력선도(LINC)사업단의 지원을 받아 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. Metcalfe, D. D., Kaliner, M. and Donlon, M. A. (1981) The mast cell. *Crit. Rev. Immunol.* **3**: 23-74.
2. Metzger, H., Alcaraz, G., Hohman, R., Kinet, J. P., Pribluda, V. and Quarto, R. (1986) The receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Annu. Rev. Immunol.* **4**: 419-470.
3. Chand, N., Pillar, J., Diamantis, W., Perhach, J. L. and Sophia, R.D. (1983) Inhibition of calcium ionophore (A23187) stimulated histamine release from rat peritoneal mast cells by azelastine: implications for its mode of action. *Eur. J. Pharmacol.* **96**: 227-233.
4. Takei, M., Umeyama, A., Shoji, N., Arihara, S. and Endo, K. (1995) Mechanism of inhibition of IgE-dependent histamine release from rat mast cells by penasterol and penasterone. *J. Pharm. Sci.* **84**: 228-230.
5. Shin, T. Y., Kim, S. H., Suk, K., Ha, J. H., Kim, I., Lee, M. G., Jun, C. D., Kim, S. Y., Lim, J. P., Eun, J. S., Shin, H. Y. and Kim, H. M. (2005) Anti-allergic effects of *Lycopus lucidus* on mast cell-mediated allergy model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **209**: 255-262.
6. Kim, S. H., Kwon, T. K. and Shin, T. Y. (2008) Antiallergic effects of *Vitis amurensis* on mast cell-mediated allergy model. *Exp. Biol. Med.* **233**: 192-199.
7. Galli, S. J., Gordon, J. R. and Wershil, B. K. (1991) Cytokine production by mast cells and basophils. *Curr. Opin. Immunol.* **3**: 865-872.
8. Galli, S. J., Tsai, M. and Piliponsky, A. M. (2008) The development of allergic inflammation. *Nature* **454**: 445-454.
9. Ueda, H., Yamazaki, C. and Yamazaki, M. (2003) Inhibitory effect of *Perilla* leaf extract and luteolin on mouse skin tumor promotion. *Biol. Pharm. Bull.* **26**: 560-563.
10. Makino, T., Furuta, A., Fujii, H., Nakagawa, T., Wakushima, H., Saito, K. and Kano, Y. (2001) Effect of oral treatment of *perilla frutescens* and its constituents on type-1 allergy in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **24**: 1206-1209.
11. Shin, T. Y., Kim, S. H., Kim, S. H., Kim, Y. K., Park, H. J., Chae, B. S., Jung, H. J. and Kim, H. M. (2000) Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by *Perilla frutescens*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **22**: 489-500.
12. Oh, H.A., Park, C., Ahn, H.J., Park, Y.S. and Kim H.M. (2011) Effect of *Perilla frutescens* var. *acuta* Kudo and rosmarinic acid on allergic inflammatory reactions. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). **236**: 99-106.
13. Makino, T., Furuta, Y., Wakushima, H., Fujii, H., Saito, K. and Kano, Y. (2003) Anti-allergic effect of *Perilla frutescens* and its active constituents. *Phytother. Res.* **17**: 240-243.
14. Choi, U. K., Lee, O. H., Lim, S. I. and Kim, Y. C. (2010) Optimization of antibacterial activity of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf against *Pseudomonas aeruginosa* using the evolutionary operation factorial design technique. *Int. J. Mol. Sci.* **11**: 3922-3932.
15. Meng, L., Lozano, Y. F., Gaydou, E. M. and Li, B. (2008) Antioxidant activities of polyphenols extracted from *Perilla frutescens* varieties. *Molecules* **14**: 133-140.
16. 생약학교재편찬위원회 (2009) 생약학, 475. 동명사, 서울.
17. Kimura, T., But, P. P. H., Guo, J. X., Sung, C. K. and Han, B. H. (1996) *International Collation of Traditional and Folk Medicine(1)*, 145, World Scientific, Singapore.
18. Gurish, M. F., Ghildyal, N., Arm, J., Austen, K. F., Avraham, S., Reynolds, D. S. and Stevens, R. L. (1991) Cytokine mRNA are preferentially increased relative to secretory granule protein mRNA in mouse bone marrow-derived mast cells that have undergone IgE-mediated activation and degranulation. *J. Immunol.* **146**: 1527-1533.
19. Plaut, M., Pierce, J.H., Watson, C.J., Hanley-Hyde, J., Nordon, R.P. and Paul, W.E. (1989) Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc $\epsilon$ RI or to calcium ionophores. *Nature* **339**: 64-67.
20. Moller, A., Henz, B. M., Grutzkau, A., Lippert, U., Aragan, Y., Schwarz, T. and Kruger-Krasagakes, S. (1998) Comparative cytokine gene expression: regulation and release by human mast cells. *Immunol.* **93**: 289-295.

(2012. 2. 24 접수; 2012. 4. 3 심사; 2012. 5. 2 게재확정)