

울피추출물의 사람 비만세포주 사이토카인 발현 억제 효과

전동하^{1#}, 장영아¹, 김희영¹, 김수진¹, 김진철², 김세현³, 권대준⁴, 한상익⁵, 이진태^{1*}

1 : 대구한의대학교 화장품약리학과, 2 : 튜링겐코리아,
3 : 국립산림과학원, 4 : 대구테크노파크 바이오헬스융합센터, 5 : 국립식량과학원

Inhibitory Effects of Chestnut Inner Shell Cytokine Production from Human Mast Cell Line

Dong-Ha Jun^{1#}, Young-Ah-Jang¹, Hui-Yeong Kim¹, Su-Jin Kim¹, Jin-Chul Kim²,
Sea-Hyun Kim³, Dae-Jun Kwoen⁴, Sang-Ik Han⁵, Jin-Tae Lee^{1*}

1 : Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyungsan, 712-749, Korea,
2 : THURINGEN KOREA Co., Ltd, Gyeongsan 712-831, Korea
3 : Korea Forest Research Institute, Suwon 441-847, Korea
4 : Biohealth convergence Center, Technopark, Daegu 704-801, Korea
5 : Department of Functional Crop, National Institute of Crop Science, Miryang 627-803, Korea

ABSTRACT

Objectives : Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease characterized by eczematous inflammation of the skin. The chestnut inner shell extracts (CI) has been used as a cosmetic material for a long time in Korea. However, the precise anti-allergy effects of CI have yet to be clearly elucidated. In this study, we attempted to evaluate the effect of CI on mast cell-mediated allergy inflammation.

Methods : To find the anti-allergy and inflammatory effect of CI, we investigated the inhibitory effect of CI on the production of inflammatory mediators using by enzyme-linked immunosorbent assay in phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) plus calcium ionophore (A23187) stimulated-human mast cell (HMC-1).

Results : In this study, we found that CI did not show cytotoxic effect at up to 10 ug/ml on HMC-1. CI inhibited the production of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6 and IL-8 in stimulated HMC-1. Maximal rate of TNF- α , IL-6 and IL-8 inhibition by CI (10 ug/ml) were about 47.6%, 44.1% and 22.5% respectively. In addition, we showed that Fr.3 isolated from n-Butyl alcohol layer of CI attenuated the production of TNF- α , IL-6 and IL-8 in HMC-1.

Conclusion : Taken together, the findings of this study provide us with a novel insight action of CI as a potential molecule for use in the treatment of allergic inflammation diseases.

Key words : Chestnut Inner Shell, HMC-1, Inflammatory cytokine, Allergy

서론

예로부터 제수용품, 기호식품 등으로 사용되어 온 밤 (Castane crenata S. et Z.)은 다년생 나무인 밤나무 (Castane crenata Lieb. et. Zucc)의 열매로 갈색의 껍질로

쌓여있으며 종피를 벗긴 종자를 건조해 사용하는데 과육은 대부분 전분이고 소량의 단백질과 지방을 함유하고 있다¹⁾. 이를 한약재로 건을(乾栗), 황을(黃栗)이라 한다. 한의학적으로 건을(乾栗)의 성질은 평(平)하고 맛은 달면서 약간의 짠 맛이 있다. 건을은 원기를 보하며 비위의 기능을 좋게 하고 강건하게 하여

* 교신저자 : 이진태, 경북 경산시 상대로 115길 대구한의대학교 오성캠퍼스 화장품약리학과 피부면역약리실험실
· Tel : 053-819-1430 · E-mail : jtlee@dhu.ac.kr
제1저자 : 전동하, 경북 경산시 상대로 115길 대구한의대학교 오성캠퍼스 화장품약리학과 피부면역약리실험실
· Tel : 053-819-1749 · E-mail : ulsan80@hanmail.net
· 접수 : 2013년 2월 13일 · 수정 : 2013년 3월 15일 · 채택 : 2013년 3월 22일

소화불량, 설사를 치료해 준다. 지혈 효능도 있어 토혈, 코피, 혈변에 사용되기도 했다. 어혈을 풀어주는 효능이 있어 근육이나 인대 손상으로 통증이 있으면서 부어오르고 울혈된 경우 건울을 찢어 환부에 붙이면 일정한 효과가 있다. 또한 건울은 맛이 달아서 근육 경련을 가라앉히고 진정 작용을 하며 호흡기를 보하고 기침을 그치게 하는 효능도 있어 만성 기침에 응용하면 도움이 된다. 체질적으로 보면 건울은 체형이 크고 성격이 과묵하며 유난히 땀이 많은 태음인에 좋다. 밤의 딱딱한 껍질을 울각(栗殼)이라고 하는데, 염료로도 사용하고 당뇨병에 의한 갈증을 해소해 준다. 밤나무의 잎은 옷독이나 피부병으로 가려울 때, 습진으로 진물이 날 때 끓인 물로 씻으면 도움이 된다²⁾.

일반적으로 과육만을 사용하지만 생물활성물질을 탐색하기 위한 연구는 잎, 꽃, 껍질 등에서도 진행되었다. 밤에 포함된 생리활성물질 탐색에 대한 연구는 항알레르기 효과³⁾, 밤 귀피의 항산화 활성 및 항산화 물질의 분리⁴⁾ 등이 있고, 저장 및 가공식품 제조⁵⁾, 전분의 제조⁶⁾, 변색⁷⁾ 등에 대한 연구가 진행되어 왔다.

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 있다⁸⁾. 비만세포는 세포막에 있는 여러 가지 수용체를 통해서 활성화된다⁹⁾.

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 항진 작용 등을 일으켜 알레르기 반응이 발현된다. 비만세포로부터 유리되는 화학적 매개물질 외에 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor (TNF)- α , Interleukin (IL)- 1β , IL-6, IL-8 등이 이러한 알레르기성 염증반응의 유도에 결정적인 역할을 하는 인자로 알려지고 있다^{12,13)}.

전사인자인 mitogenactivated protein kinase (MAPK)와 NF- κ B는 세포활성, 염증과 같은 다양한 세포내 반응을 조절하는 인자로서 특히 TNF- α , IL- 1β , IL-6 및 IL-8 와 같은 염증유발 사이토카인의 발현을 조절하고 세포외부로부터의 자극을 세포내부로 전달하는 역할을 주로 담당한다고 알려져 있다^{14,15,16)}.

PKC (protein kinase C)는 세포활성과 기능에 주요한 역할을 하고 있는 것으로 여러 연구를 통해 알려져 있다¹⁷⁾. 특히 면역반응에 있어서 림프구의 생존과 활성 분화 등 많은 부분에서 중요한 역할을 하고 있다. 예를들면 PKC는 B 세포와 관련한 면역 반응에 관여하는 것으로 알려져 있으며 B 세포 수용체의 자극을 통한 B 세포 활성화에도 관여하며, PKC가 B 세포 면역반응을 특이적으로 조절하는 기전이 밝혀지면서 B 세포와 관련된 자가면역질환 치료를 위한 새로운 표적 신호전달 분자로 제시되고 있다¹⁸⁾. 따라서 비만세포로부터 이들 사이토카인의 분비에 대한 조절은 알레르기 염증성 질환에 대한 치료 수단이 될 수 있다. 본 연구에서는 PKC activator로 알려진 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)^{8,10,11)}와 지질막의 이온투과성을 높이는 calcium ionophore A23187을 이용하여 비만세포의 탈과립과 다양한 염증인자의 활성을 유도하여 실험을 진행하였다.

밤 가공에서 수작업에 의해 발생하는 울피의 비율은 약

50%로 밤 생산량의 약 30% 이상을 가공, 수출하고 있는 실정을 감안할 때 폐기량은 무시할 수 없는 양이지만 부산물로서 산업 이용도가 개발되지 않아 대부분 폐기처분하고 있으나¹⁹⁾, 활성산소의 생성을 억제하고 피부 멜라닌 형성을 저해하여 피부미백에 효과가 있음이 항산화 연구를 통하여 밝혀졌으며, 피부의 재생효과를 증가시켜 각질의 제거 및 피지 형성을 조절함으로써 피부 노화 억제를 위한 항장소재로 활용되었다^{20,21,22)}. 이에 본 연구는 한방화장품의 염증개선 화장품소재로 활용 가능성을 확인하고자 울피 추출물 및 용매 분획물의 염증성 사이토카인 분비량을 측정하였다.

재료 및 방법

1. 울피 추출물의 제조

본 실험에 사용된 울피는 2009년 수확한 것을 (주)푸드웰에서 제공받아 물로 세척하여 음건 후 사용하였다. 아세톤 추출물의 경우 70% 아세톤을 시료중량의 10배의 양을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상층액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하여 시료를 획득하였다. 70% 에탄올 추출물 역시 동일한 방법으로 추출하였고, 열수 추출물은 85℃에서 3시간 진탕추출을 3회 반복추출 뒤 No. 2 filter paper로 여과하여, 여액을 진공회전농축기를 사용하여 농축하고, 동결건조 하였으며, -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다

2. 울피 에탄올 추출물 분획의 제조

상기와 같이 추출된 울피 에탄올 추출물 일부를 용매 분획하기 위하여 Chloroform을 이용하여 분배 추출하였으며, 물층은 다시 ethyl acetate(EtOAc), n-butanol(n-BuOH)로 분배 추출하였다. 각 층은 감압 농축하여 Chloroform 분획, EtOAc 분획, n-BuOH 분획 및 물분획을 얻어 실험에 사용하였다.

3. 울피 분획물의 분리

상기와 같이 분획한 n-BuOH 분획물을 Diaion HP-20 column chromatography (H₂O : EtOH = 0→100%)를 이용하여 Fraction(Fr)1번부터 Fr.6번까지 Fr.1 1.72%, Fr.2 19.97%, Fr.3 53.63%, Fr.4 1.03%, Fr.5 0.28%, Fr.6 0.09%의 수율로 분획물을 얻었으며, 이 6가지 1차 분획물을 이용하여 실험에 사용하였다.

4. 사용시약

세포배양에 필요한 Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM)은 HyClon (Utah, USA) 제품을 사용하였으며, Fetal bovine serum (FBS)는 Gibco (Grand Island, NY, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), calcium ionophore (A23187), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 또한 cytokine 측정에

필요한 human IL-6, IL-8과 TNF- α ELISA Set 는 BD Biosciences (San Diego, USA)에서 구입하여 사용하였다.

5. 세포주 배양

본 실험에 이용한 사람 비만세포주 HMC-1 한국한방산업진흥원에서 분양받아 세포의 배양은 10% FBS를 첨가한 IMDM배지를 사용하였으며, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

6. 세포독성 평가

배양중인 HMC-1을 3 \times 10⁵cells/well의 농도가 되도록 희석하여 96 well culture plate에 분주한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 배양하였다. 배양 후 시료를 농도별로 희석하여 5 μ l/well에 처리한 후 12시간 동안 배양하였다. 그후 0.5 mg/ml의 MTT를 20 μ l/well 씩 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 4시간 배양하였다. 배지를 제거하고 250 μ l/well의 DMSO를 넣어 세포내에 생성된 formazan을 용출한 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

7. 염증성 사이토카인 측정

배양중인 HMC-1 (3 \times 10⁶cells/well)에 시료를 농도별로 처리한 후, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 시료를 처리한 세포는 다시 PMA (50 nM)와 A23187 (2 μ M)을 첨가하여 12시간 동안 반응시킨 후 배양 상층액을 수거하였다. 상층액에 포함된 TNF- α , IL-6, IL-8의 양은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 법을 이용하여 측정하였다. 즉, 일차항체 TNF- α , IL-6, IL-8을 coating buffer (0.1M NaHCO₃)에 희석하여 plate에 100 μ l를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 둔 다음, washing buffer (0.05% Tween 20/PBS)로 세척한 다음, 10 % FBS를 첨가한 PBS(Phosphate buffered saline)로 2시간 동안 blocking 하였다. 다시 세척 후 배양 상층액을 적절하게 희석하여 넣어 반응시키고, 2시간 후에 washing buffer로 세척하고 이차항체를 첨가하였다. 다시 1시간 후에 washing 용액으로 세척한 다음, avidin-peroxidase를 첨가하고, tetramethylbensidine와 H₂O₂를 넣어 발색 후 1M H₃PO₄로 반응을 정지한 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm 에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 이용하여 환산하였다.

결과

1. 울피 추출물이 HMC-1 생존율에 미치는 효과

다양한 농도의 울피 추출물을 사람 비만세포주에 처리하고 MTT assay로 세포생존율을 비교 측정하였다. 울피추출물의 경우 100 μ g/ml, 50 μ g/ml의 농도에서 각 43%, 64%의 세포생존율을 나타냄에 따라 세포독성에 의한 영향을 배제하기 위하여 이후 실험은 10 μ g/ml이하의 농도에서 수행하였다. 울피 용매분획물의 경우 10 μ g/ml, 5 μ g/ml, 1 μ g/ml의 농

도에서 모두 80% 이상의 세포생존율을 나타내었으나, EtOAc 분획물 10 μ g/ml 농도에서 75%의 세포생존율을 나타냄에 따라 세포독성에 의한 영향을 배제하기 위하여 이후 실험은 10 μ g/ml이하의 농도에서 실험을 수행하였다. Diaion HP-20 column chromatography로 부터 얻어진 분리물의 세포독성은 10 μ g/ml의 농도에서 Fr. 2, Fr. 3에서 각 45%, 62%의 세포생존율을 나타내어 세포독성에 의한 영향을 배제하기 위하여 이후 실험은 10 μ g/ml이하의 농도에서 실험을 수행하였다 (Fig. 1).

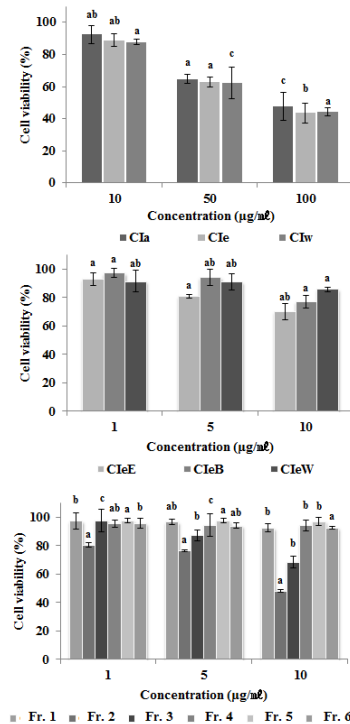


Fig. 1. Effect of Chestnut Inner Shell extracts on cell viability in HMA-1 cells. Cla : Chestnut inner shells extracted with 70% acetone, Cle : Chestnut inner shells extracted with 70% ethanol, Clw : Chestnut inner shells extracted with water, CleE : Ethyl acetate layer of Cle, CleB : n-Butyl alcohol layer of Cle, CleW : Water layer of Cle, Fr.1 : H₂O 100% isolated from CleB, Fr.2 : EtOH 20% isolated from CleB, Fr.3 : EtOH 40% isolated from CleB, Fr.4 : EtOH 60% isolated from CleB, Fr.5 : EtOH 100% isolated from CleB, Fr.6 : Acetone 70% isolated from CleB. Results are means \pm S.D. of triplicate data. Intergroup comparison was done by Tukey test and the level of significance was 0,05

2. 사이토카인 분비량 측정

알레르기 반응에는 비만세포를 포함하는 다양한 면역세포가 관여하는데 이들 세포는 TNF- α , IL-6 등과 같은 염증성 사이토카인을 분비한다²³⁾. TNF- α 는 비만세포가 활성화되면 분비하는 다기능성 사이토카인으로 면역반응과 염증반응에 관여하며, IL-1 β , IL-6, IL-8과 같은 다른 염증성 사이토카인의 분비를 촉진한다^{24,25)}. IL-6 역시 강력한 염증반응을 매개하는 사이토카인이며²⁶⁾, IL-8은 호중구, 림프구, 호산구의 동원을 촉진하는 화학주성인자로서, 호중구를 활성화시켜 리소좀 효소를 방출하고 활성산소 생성을 유발하며, 관절염이나 패혈증 등과 같은 염증성 질환에 관여한다²⁷⁾. 울피 추출물을 농도

별로 HMC-1에 처리한 후에 PMA/A23187로 사이토카인의 분비를 유도하였다. 그 결과 TNF- α 경우에 대조군 63 pg/ml과 비교하여 율피추출물에서는 에탄올 추출물이 10 μ g/ml 농도에서 47.6%의 억제효과를 나타냈으며, 용매분획물에서는 EtOAc 분획물과 n-BuOH 분획물이 5 μ g/ml 농도에서 19.0% 억제되었으며, 분리물에서는 5 μ g/ml 농도에서 Fr. 3이 41.3%의 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2). IL-6의 분비량은 대조군 34.67 pg/ml과 비교하여 율피추출물에서는 에탄올 추출물이 44.1% 정도로 분비량이 억제되었으며, 용매분획물에서는 n-BuOH 분획물이 5 μ g/ml 농도에서 26.5%의 억제 효과를 나타냈으며, 분리물에서는 Fr. 3에서 41.2%의 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3). IL-8 분비량은 PMA/A23187 단독 처리(41.8pg/ml)와 비교하여 에탄올 추출물 10 μ g/ml 농도에서 22.5%의 억제효과를 나타내었으며, 용매분획물에서는 n-BuOH 분획물 5 μ g/ml 농도에서 23.4%의 가장 높은 억제를 나타내었다. 분리물에서는 Fr. 3 분리물 5 μ g/ml 농도에서 21.1% 분비량이 억제되는것을 확인하였다(Fig. 4). IL-6와 TNF- α 의 분비량은 실험한 농도에서 비슷한 억제효과를 나타내었는데 이는 율피 추출물이 두 종류의 사이토카인 생산에 더 민감한 작용을 나타내는 것으로 IL-8과는 다른 신호전달 과정에 관여할 가능성이 있는 것으로 생각된다.

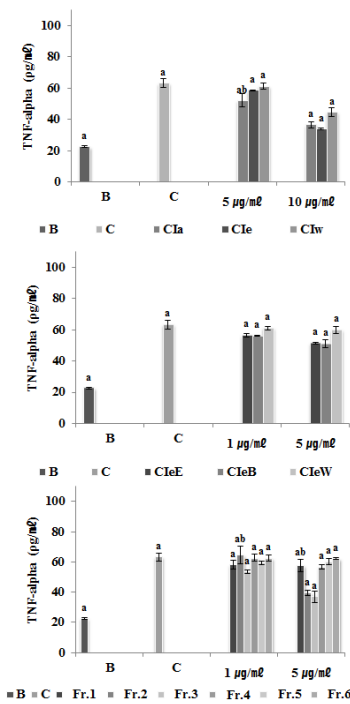


Fig. 2. Effect of Chestnut Inner Shell extracts on PMA/A23187-stimulated TNF- α expression levels. B : Blank, unstimulated cells, C : Control, PMA/A23187-induced cells, Cla : Chestnut inner shells extracted with 70% acetone, Cle : Chestnut inner shells extracted with 70% ethanol, Clw : Chestnut inner shells extracted with water, CleE : Ethyl acetate layer of Cle, CleB : n-Butyl alcohol layer of Cle, CleW : Water layer of Cle, Fr.1 : H2O 100% isolated from CleB, Fr.2 : EtOH 20% isolated from CleB, Fr.3 : EtOH 40% isolated from CleB, Fr.4 : EtOH 60% isolated from CleB, Fr.5 : EtOH 100% isolated from CleB, Fr.6 : Acetone 70% isolated from CleB. Results are expressed as means \pm S.D. of triplicate data. Intergroup comparison was done by Tukey test and the level of significance was 0.05

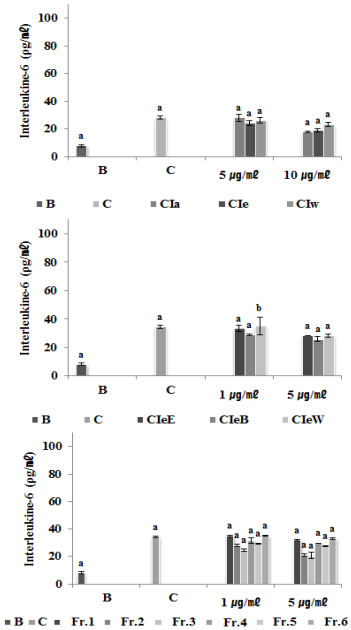


Fig. 3. Effect of Chestnut Inner Shell extracts on PMA/A23187-stimulated IL-6 expression levels. B : Blank, unstimulated cells, C : Control, PMA/A23187-induced cells, Cla : Chestnut inner shells extracted with 70% acetone, Cle : Chestnut inner shells extracted with 70% ethanol, Clw : Chestnut inner shells extracted with water, CleE : Ethyl acetate layer of Cle, CleB : n-Butyl alcohol layer of Cle, CleW : Water layer of Cle, Fr.1 : H2O 100% isolated from CleB, Fr.2 : EtOH 20% isolated from CleB, Fr.3 : EtOH 40% isolated from CleB, Fr.4 : EtOH 60% isolated from CleB, Fr.5 : EtOH 100% isolated from CleB, Fr.6 : Acetone 70% isolated from CleB. Results are expressed as means \pm S.D. of triplicate data. Intergroup comparison was done by Tukey test and the level of significance was 0.05

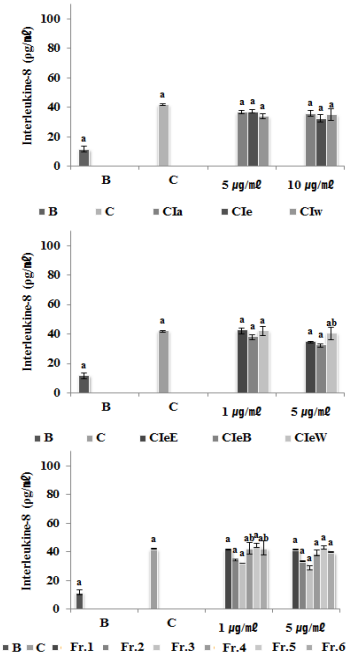


Fig. 4. Effect of Chestnut Inner Shell extracts on PMA/A23187-stimulated IL-8 expression levels. B : Blank, unstimulated cells, C : Control, PMA/A23187-induced cells,

Cla : Chestnut inner shells extracted with 70% acetone, Cle : Chestnut inner shells extracted with 70% ethanol, Clw : Chestnut inner shells extracted with water, CleE : Ethyl acetate layer of Cle, CleB : n-Butyl alcohol layer of Cle, CleW : Water layer of Cle, Fr.1 : H₂O 100% isolated from CleB, Fr.2 : EtOH 20% isolated from CleB, Fr.3 : EtOH 40% isolated from CleB, Fr.4 : EtOH 60% isolated from CleB, Fr.5 : EtOH 100% isolated from CleB, Fr.6 : Acetone 70% isolated from CleB. Results are expressed as means ± S.D. of triplicate data. Intergroup comparison was done by Tukey test and the level of significance was 0.05

고찰

울피는 밤나무 열매의 속껍질로 밤의 가공과정 중에 식품소재로서의 이용도가 개발되지 않아 대부분 폐기처분하고 있으나, 박피 시 함께 소량 제거되는 밤 과육의 전분과 항산화 물질로 알려진 탄닌계 화합물들은 그 이용가치가 높다고 할 수 있다. 밤 생산량의 약 30% 이상을 가공, 수출하고 있는 실정을 감안할 때 밤껍질의 약 50%를 차지하고 있는 속껍질의 폐기량 또한 무시할 수 없는 양이다¹⁹⁾.

염증관련 cytokine은 세포 간 상호작용에 관여하는 가용성 peptide로 각종 세포가 자극을 받게 되면 생성된다. 염증 반응 시 macrophage cell은 ROS와 interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor (TNF)-α 및 interleukin (IL)-6등을 생산한다. IL-6와 IL-8, TNF-α는 cytokine으로서 단핵구 등 면역세포 뿐만 아니라 내피세포, 상피세포, 성상세포 등에서도 물리적, 화학적, 면역학적 자극에 의해 분비된다. 이러한 cytokine은 여러 피부질환의 병태생리에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 보고되고 있으며, 이들의 합성 분비를 자극하는 인자로 phorbolmyristate acetate (PMA), lipopolysaccharide (LPS), 자외선 등이 있다.

울피 추출물의 세포독성여부를 판단하기 위하여 실험대상이 HMC-1세포주를 이용하여, MTT 법으로 측정된 결과 울피추출물에서 100μg/ml, 50μg/ml의 농도에서 각 43%, 64%의 세포생존율을 나타냄에 따라 세포독성에 의한 영향을 배제하기위하여 이후 실험은 10 μg/ml이하의 농도에서 수행하였으며, 용매분획물과 Diaion HP-20 column chromatography로 부터 얻어진 분리물은 세포독성에 의한 영향을 배제하기위하여 이후 실험은 10 μg/ml이하의 농도에서 실험을 수행하였다.

A23187(200μM)은 칼슘 이온 운반체이고, PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)(50nM)는 PGE2의 합성을 촉진하여 결과적으로 골흡수를 증가시켜 혈장 칼슘 항상성 조절에 중요한 생리적 기능을 가지며, PKC 활성화 촉진제의 역할을 한다. 염증에 관여하는 cytokine을 측정하기 위하여 HMC-1 cells에 PMA/A23187와 시료를 처리한 후, 세포 배양액을 회수하여 TNF-α, IL-6, IL-8을 측정하였다. 울피추출물, 용매분획물과 분리물 모두에서 TNF-α, IL-6, IL-8의 분비량은 억제되었지만 IL-8의 경우 억제량이 다른 cytokine보다 억제 효과가 감소하는 것으로 나타났다.

결론

울피 추출물 및 분획물이 활성화된 비만세포에서 분비되는 다양한 사이토카인의 생성량을 억제함을 확인하였다.

1. 울피추출물 및 Diaion HP-20 column chromatography로 부터 얻어진 분리물이 비만세포주의 생존율에는 유의적으로 영향을 나타내지 않았다.
2. 사이토카인 분비량 측정에서 울피 에탄올 추출물과 Fr. 3 분리물이 40% 이상의 TNF-α와 IL-6의 발현을 억제하였다.
3. IL-8의 분비량 측정에서 울피 에탄올 추출물, n-BuOH 분획물과 Fr. 3 분리물이 20% 이상의 발현 억제율을 나타내었다.

이러한 결과 울피는 TNF-α와 IL-6 두 종류의 사이토카인 생산에 더 민감한 작용을 나타내며, IL-8과는 다른 신호전달 과정에 관여할 가능성이 높은 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2012년도 산학연협력 기업부설연구소 지원사업 (No. C0019259), 산림청에서 지원하는 2012년도 임업기술연구개발사업(No. S121012L060100), 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호:SA00004524)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝히며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kim MJ, Lee U, Hwang MS, Kim SC, Lee MH. Blooming, fructification and nut characteristics of chestnut cultivars cultivated in Korea. J Kor Food Soc. 2003 ; 92 : 321-32.
2. Kim CM, Lee JS, An DK, Sim MK. The encyclopedia of China oriental herbal medicine. 1st rev. ed, Seoul : Jungdamsa, 2006. 4372-3
3. Choi OB, Kim KM, Yoo GS, Park KH. Anti-allergic effect of Castanea crenata leaf tea. Kor J Food Sci Technol. 1998 ; 30 : 468-71.
4. Kwon EJ, Kim YC, Kwon MS, Kim CS, Kang WW, Lee JB, Chung SK. Antioxidative activity of solvent fraction and isolation of antioxidant compound from chestnut husk. J Kor Soc Food Nutr. 2001 ; 30 : 726-31.
5. Kim SK, Jeon YJ, Kim YT, Lee BJ, Kang OJ. Sensory evaluation and retrogradation properties of chestnut mook. J Kor Soc Food Nutr. 1995 ; 24: 601-5.
6. Park YH, Kim SK, Lee SY, Kim JB. Rheological properties of gelatinized chestnut starch solution. Kor J Food Technol. 1984 ; 16 : 314-18.
7. Cho SH, Sung NK, Ki WK, Hur JH, Shim KH, Chung

- DH. Effect of blanching on the prevention of discoloration in the thermal-treated chestnut power. *J Kor Soc Food Nutr.* 1988 ; 17 : 211-14.
8. Metcalfe DD, Kaliner M, Donlon MA. The mast cell. *Crit Rev Immunol.* 1981 ; 3 : 23-74.
9. Metzger H, Alcaraz G, Hohman R, Kinet JP, Pribluda V, Quarto R. The receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Annu Rev Immunol.* 1986 ; 4 : 419-70.
10. Chand N, Pillar J, Diamantis W, Perhach JL, Sophia RD. Inhibition of calcium ionophore(A23187) stimulated histamine release from rat peritoneal mast cells by azelastine: implications for its mode of action. *Eur J Pharmacol.* 1983 ; 96 : 227-33.
11. Takei M, Umeyama A, Shoji N, Arihara S, Endo K. Mechanism of inhibition of IgE-dependent histamine release from rat mast cells by penasterol and penasterone. *J Pharm Sci.* 1995 ; 84 : 228-30.
12. Galli SJ, Gordon JR, Wershil BK. Cytokine production by mast cells and basophils. *Curr Opin Immunol.* 1991 ; 3 : 865-72.
13. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature.* 2008 ; 454 : 445-54.
14. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol.* 2005 ; 23 : 749-86.
15. Azzolina A, Bongiovanni A, Lampiasi N. Substance p induces TNF- α and IL-6 production through NF κ B in peritoneal mast cells. *Biochim Biophys Acta.* 2003 ; 1643 : 75-83.
16. Kim SH, Jun CD, Suk K, Choi BJ, Lim H, Park S, Lee SH, Shin HY, Kim DK, Shin TY. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol. Sci.* 2006 ; 91 : 123-31.
17. Spitaler M, Cantrell DA. Protein kinase C and beyond. *Nature immuno.* 2004 ; 5 : 785-90.
18. Tan SL, Parker PJ. Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signaling. *Biochem J.* 2003 ; 376 : 545-52.
19. Moon JS. A study of physicochemical properties of starch separated from chestnut inner shell waste. Dongshin University. 1999.
20. Yoon WJ. The study on the humidity preserving effect with several natural packs. Dong Duck Women's University. 1997.
21. Oh SH, Kim YW, Kim MA. The antioxidant activities of acetone extract of chestnut inner shell, Pine needle and Hop. *Kor J Food Cult.* 2004 ; 19 : 339-406.
22. Jung SH, Jo WA, Son JH, Park CI, Lee IC, An BJ, Son AR, Kim SK, Kim YS, Jung YS, Kang BY, Choi EY, Lee JT. A study on the application of new cosmetic materials of whitening effect and the physiological activities of chestnut inner shell. *Kor J Herbology.* 2005 ; 20 : 27-33.
23. Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effect of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995 ; 38 : 151-60.
24. Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Pharmacol Sci.* 1993 ; 14 : 436-41.
25. Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF- α antibody with the IL-1 receptor antagonist. *Eur Cyto Netw.* 1995 ; 6 : 225-30.
26. Erchler WB, Keller ET. Age-associated increased IL-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med.* 2000 ; 51 : 245-70.
27. Harada A, Mukaida N, Matsushima K. IL-8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory disease. *Mol Med Today.* 1996 ; 2 : 482-9.