

고욤(*Diospyros lotus*)잎 유래 Ethyl Acetate 분획물의 항산화 및 항가려움 활성

전인화¹ · 강현주¹ · 김상준² · 정승일² · 이현서³ · 장선일^{1,3}

¹(주)아토큐앤에이

²(재)전주생물소재연구소

³전주대학교 보건관리학과

Antioxidant and Antipruritic Activities of Ethyl Acetate Fraction from *Diospyros lotus* Leaves

In Hwa Jeon¹, Hyun Ju Kang¹, Sang Jun Kim², Seung Il Jeong²,
Hyun-Seo Lee³, and Seon Il Jang^{1,3}

¹Ato Q&A Incorporation

²Jeonju Biomaterials Institute

³Department of Healthcare & Science, Jeonju University

ABSTRACT *Diospyros lotus* has been cultivated for its edible fruits, which are considered to have medicinal importance. The aim of this study was to evaluate the antioxidant and antipruritic activities of water-soluble, methanol extract, and ethyl acetate (EA) fractions from *D. lotus* leaves. The EA fraction showed the lowest IC₅₀ value (DPPH: 5.3 µg/mL, ABTS: 53.8 µg/mL). Therefore, we further investigated anti-inflammatory and antipruritic effects of the EA fraction. TNF-α production increased by PMA plus A23187 treatment was significantly inhibited by the EA fraction in a dose-dependent manner. The EA fraction also inhibited histamine release from rat peritoneal mast cells stimulated by compound 48/80, which promotes histamine release. Furthermore, EA fraction had inhibitory effects on scratching behavior induced by compound 48/80 in Balb/c mice. These results suggest that the EA fraction from *D. lotus* leaves has potential as ameliorative agent against oxidative stress and pruritus-related disease.

Key words: *Diospyros lotus* leaf, ethyl acetate fraction, antioxidant, mast cells, antipruritus

서 론

아토피 피부염(atopic dermatitis)은 만성 피부염증과 함께 심한 가려움증(pruritus)을 동반한다(1,2). 긁고 싶은 감정을 불러일으키는 가려움증은 히스타민과 같은 가려움 매개 물질에 의해서 유도되는데, 정상인의 경우 긁으면 그 증상이 쉽게 완화되지만 아토피 환자의 경우 긁으면 긁을수록 더욱 긁고 싶은 감정이 형성되어 심하게 긁게 된다(3). 그러므로 아토피 환자의 경우 긁는 행동으로 인해 피부장벽이 붕괴되면서 2차 감염을 유발하여 염증이 더욱 악화된다(1-3). 아토피 피부염은 일시적으로 완화될 수 있지만 환경 및 식품 등 자극원에 의해서 재발되어 악화되며 악화와 완화가 반복되는 현상으로 그 원인은 아직까지 명확하게 알려지지 않았다(2). 이와 같이 아토피 피부염에 동반되는 염증은 과도한 면역세포 작용으로 인해서 tumor necrosis-α(TNF-α)와 interleukin-1β(IL-1β) 등의 염증성 사이토카인과 하

이드록시 라디칼($\cdot\text{OH}$), 슈퍼옥사이드 라디칼($\cdot\text{O}_2^-$), 과산화수소(H_2O_2) 등의 활성산소류(reactive oxygen species, ROS)를 대량 생산하기 때문에 주변 조직의 손상을 야기한다(4,5). 그러므로 아토피 피부염과 같은 피부질환을 개선하기 위해서는 가려움증을 완화시키고 ROS를 효과적으로 제거할 수 있는 소재가 필요하다(6).

고욤나무(*Diospyros lotus* L.)는 우리나라와 중국을 비롯한 아시아에 분포하는 낙엽성 식물로 성숙한 과일을 고욤이라 하여 직접 섭취할 수 있다. 고욤은 전통의학에서 진정제(sedative), 수렴제(astringent), 항암(anti-tumor), 항당뇨(anti-diabetic), 해열제(febrifuge) 및 변비완화제(laxative) 등으로 사용되어 왔다(7). 최근에는 고욤에 함유된 지방산, 당, 플라보노이드 및 비휘발성 성분이 알려지면서 항응고, 뇌세포 보호 작용, 항산화 및 항암에 대한 효과가 보고되었다(8-10). 또한 최근에 저자들은 고욤잎 수용성 추출물을 대상으로 항산화 및 항알레르기 효과에 대해서 보고한 바 있다(11,12).

본 연구는 고욤잎으로부터 수용성 추출물과 메탄올 추출물을 얻고 메탄올 추출물에서 ethyl acetate(EA) 분획물을 얻어 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 및 2,2'-

Received 29 April 2014; Accepted 26 September 2014

Corresponding author: Seon Il Jang, Department of Healthcare & Science, Jeonju University, Jeonbuk 560-759, Korea
E-mail: sonjjang@jj.ac.kr, Phone: +82-63-220-3124

azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) 라디칼 소거 활성을 조사하였다. 그 후 각 추출물 및 분획물을 대상으로 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)와 calcium ionophore A23187(A23187)로 활성화된 랫트 복강 비만세포(rat peritoneal mast cells, RPMCs)에서 TNF- α 생성 및 히스타민 방출량을 조사한 후 compound 48/80으로 유도한 가려움증 억제제를 조사한 결과 매우 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시약

TNF- α 및 histamine ELISA kit는 R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였으며, percoll, compound 48/80, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), calcium ionophore A23187(A23187), penicillin/streptomycin, methysergide maleate(MM), butylated hydroxytoluene(BHT), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS), potassium persulfate, sodium bicarbonate, azelastine, lipopolysaccharide(LPS), methysergide, (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid(Trolox) 및 기타 시약은 reagent grade로 Sigma-Aldrich Co.(Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

고욤잎 추출

고욤잎은 전라북도 진안군 부귀면 수향리 신기마을에서 2013년 7월 10일에 채취한 후 우석대학교 한의과대학 본초방제학교실 김홍준 교수님으로부터 동정을 받았다. 고욤잎 표본(#2013-07-10)은 전주대학교 의과대학 보건관리 연구실에 보관하고 있다. 채취된 고욤잎은 즉시 증류수로 세척하여 5분간 증기찜을 한 후 실온에서 선풍기를 활용하여 건조한 다음 최종적으로 건조기에서 40°C로 12시간 동안 건조하였다. 건조된 고욤잎은 500 g으로 정량하여 증류수 3,000 mL를 주입하고 10분간 끓인 후 추출물은 0.45 μ m 필터를 사용하여 여과하고 동결건조기(FDU-2100, EYELA WORLD-Tokyo Rikakikaki, Tokyo, Japan)에서 건조하여 45.3 g을 얻었다. 또한 건조된 고욤잎 600 g을 정량하여 메탄올 4,000 mL를 주입하고 7일간 방치한 다음 추출물은 0.45 μ m 필터를 사용하여 여과하고 감압에 의해 유기용매를 제거한 뒤 최종적으로 동결건조 하여 70.3 g을 얻은 후 50 g을 취하여 ethyl acetate 분획물을 약 650 mg 얻고 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH 라디칼 소거 활성은 Blois(13)의 방법으로 측정하였다. 시료를 MeOH로 녹여 최종 농도가 3.91, 7.81, 15.63,

31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1,000 μ g/mL가 되도록 정량하여 96 well plate에 각 시료를 100 μ L 주입하고, 동시에 0.3 mM DPPH 100 μ L를 넣어 총량이 200 μ L가 되도록 하였다. 실온에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군 흡광도}}{\text{시료 무첨가군 흡광도}}\right) \times 100$$

ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등(14)의 방법에 의하여 측정하였다. ABTS 7.4 mM과 potassium persulfate 2.6 mM을 혼합한 후 빛이 차단된 실온에서 24시간 동안 방치하여 radical을 형성한 다음 ABTS 용액을 실험 직전에 732 nm에서 흡광도가 0.70 \pm 0.03이 되도록 메탄올로 희석하여 사용하였다. 각 추출물과 Trolox의 최종 농도가 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1,000 μ g/mL가 되도록 정량하여 50 μ L에 준비된 ABTS 용액 950 μ L를 첨가하여 암소에서 30분간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군 흡광도}}{\text{시료 무첨가군 흡광도}}\right) \times 100$$

실험동물

무균환경에서 사육된 7주령의 수컷 Balb/c 마우스와 10주령의 Sprague Dawley 랫트는 중앙실험동물(주)(Seoul, Korea)에서 구입하였고, 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 낮과 밤의 주기를 12시간씩 하였고, 온도(20~22°C)와 습도(50~60%)는 일정하게 유지하였으며, 전주대학교 실험동물위원회에 준하여 실험하였다.

RPMCs 분리 및 분획물 처리

RPMCs의 분리는 Martynova 등(15)의 방법에 따라 분리하였다. 즉 에테르(ether)로 마취시킨 다음 calcium-free HEPES-Tyrode buffer(10 mM Hepes, 113 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.13 mM MgCl₂, 0.6 mM NaH₂PO₄, 10 mM glucose, pH 7.4) 10 mL를 복강에 주입시켜 약 90초간 복강을 부드럽게 마사지 한 후 복강을 주의 깊게 열어 Pasteur pipette을 사용하여 세포부유액을 얻어 percoll density gradient법으로 RPMCs를 얻었다. 특별히 본 실험 목적에 따라 충분한 세포를 확보하기 위해서 5~10마리 랫트에서 얻은 RPMCs를 혼합하여 사용하였다. EA 분획물(25~100 μ g/mL), 수용성 또는 MeOH 추출물(각각 100 μ g/mL)은 RPMCs(5×10^5)에 10분 또는 2시간 동안 전 처리한 후

compound 48/80이나 PMA와 A23187로 자극하여 히스타민과 전염증성 사이토카인 측정에 사용하였다.

세포 생존율 측정

RPMCs 세포 생존율은 MTT assay 방법에 의해 측정하였다. 즉 RPMCs(5×10^5 /mL)를 24 well plate에 접종하고 상기와 같이 EA 분획물(25~100 μ g/mL), 수용성 또는 MeOH 추출물(각각 100 μ g/mL)을 처리한 후에 PMA(20 nM)와 A23187(1 μ M)을 동시에 자극한 후 12시간 후에 MTT 용액(5 mg/mL)을 주입하고 4시간 동안 37°C에서 방치한 후 상층액을 제거하고 formazan 산물을 demethyl sulfate로 용해하여 96 well plate로 옮겨 540 nm ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

히스타민 방출량 측정

RPMCs(5×10^5 cells/mL)는 각 추출물(100 μ g/mL) 또는 여러 가지 농도(25~100 μ g/mL)의 EA 분획물을 37°C에서 10분간 전 처리한 다음 compound 48/80(0.5 μ g/mL)으로 자극하여 30분간 방치한 후, 반응을 중지시키기 위하여 배양튜브를 빙수에 넣어 충분히 냉각시킨 후 1,200 rpm으로 15분간 원심 침전시키고 상층액을 얻어 히스타민을 측정하였다. 즉 anti-histamine antibody를 활용하여 상기와 같이 얻은 상층액 시료에 반응시키고, anti-histamine antibody에 특이적으로 작용하는 기질효소가 부착된 2차 항체를 주입한 후 발색시켜 R&D Systems Inc.가 제공하는 방법에 따라 ELISA reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였으며, 히스타민의 정량은 농도별로 히스타민을 처리하여 반응시킨 후 표준곡선을 작성하여 계산하였다.

TNF- α 측정

RPMCs로부터 사이토카인의 측정은 EA 분획물(25~100 μ g/mL), 수용성 또는 MeOH 추출물(각각 100 μ g/mL)을 2시간 동안 전 처리한 후 PMA(20 nM)와 A23187(1 μ M)로 동시에 자극한 다음 12시간 후에 세포 상층액으로부터 TNF- α 를 측정하였다. TNF- α 는 anti-mouse TNF- α antibody를 사용하여 각각에 특이적으로 작용하는 ELISA kit을 사용하여 R&D Systems Inc.가 제공하는 방법에 준하여 측정하고 정량하였다. 즉 세포 상층액 또는 5배 희석 혈청 100 μ L를 각각의 항체가 코팅된 plate에 주입하고 반응시킨 후 잘 세척한 다음 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체를 주입하고 반응시킨 후 발색 기질을 주입하고 반응시켜 ELISA reader로 측정하였으며, 각 물질에 대한 정량은 각각의 물질을 농도별로 처리하여 반응시켜 표준곡선을 작성하고 세포 상층액에 함유된 TNF- α 의 양을 계산하였다.

가려움증 유도 및 긁는 행동 측정

Balb/c 마우스는 실험군당 5마리의 마우스를 각각 투명

아크릴 케이지(20×26×13 cm)에 한 마리씩 넣고 안정을 위해 30분 동안 동일한 실험환경에 방치하였다. 그 후 대조군은 생리식염수를 경구 투여하였고, 실험군은 EA 분획물(2.5~10 mg/kg), 수용성 또는 MeOH 추출물(각각 10 mg/kg), 항가려움증 약제로 알려진 methysergide(10 mg/kg), azelastine(10 mg/kg)을 경구 투여하고, 60분 후에 compound 48/80(50 μ g/site)을 100 μ L씩 마우스 등의 양쪽 어깨 높이 사이에 피하 주사하였다. 가려움증 유발 물질을 주사한 마우스는 곧바로 Mihara 등(16)의 방법을 따라 micro-camera(ONCCTV, 서울, 대한민국)를 사용하여 60분 동안 녹화하였으며, 뒷발로 가려움증 유발 물질이 주입된 부위를 긁는 횟수를 이중맹검법으로 계수하여 평가하였다. 각 유발 물질에 따른 실험은 각각 다른 날에 진행되었으며 매 실험에 사용된 마우스는 1회 사용되었다.

통계처리

모든 실험값은 평균±표준오차로 표시하였으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리하였으며, 유의성 한계는 $P < 0.05$ 로 정하였다.

결과 및 고찰

고욤잎 EA 분획물의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성

고욤잎 유래 EA 분획물의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성을 알아보기 위하여 수용성 추출물과 메탄올 추출물 그리고 합성항산화제로 알려진 BHT 또는 Trolox와 비교하였다. 그 결과 Fig. 1A에서 보여준 바와 같이 고욤잎 유래 EA 분획물은 모든 농도에서 수용성 추출물과 MeOH 추출물뿐만 아니라 BHT보다 DPPH 라디칼 소거 활성이 매우 우수하였다. 수용성 추출물과 MeOH 추출물의 경우도 31.3 μ g/mL 이하의 저농도에서는 BHT와 DPPH 라디칼 소거 활성이 유사하였지만, 그 이상의 농도에서는 BHT보다 DPPH 라디칼 소거 활성이 우수하였다. 더불어 EA 분획물의 DPPH 라디칼 소거 활성에 대한 IC₅₀은 5.3 μ g/mL로 수용성 추출물(37.9 μ g/mL), MeOH 추출물(41.2 μ g/mL)과 BHT(50.3 μ g/mL)보다 약 5~7배 낮은 농도에서 그 활성을 보여주었다. 또한 Fig. 1B에서 나타낸 바와 같이 ABTS 라디칼 소거 활성의 경우에서도 고욤잎 유래 EA 분획물은 모든 농도에서 수용성 추출물과 MeOH 추출물뿐만 아니라 Trolox보다 ABTS 라디칼 소거 활성이 매우 우수하였다. 수용성 추출물과 MeOH 추출물은 Trolox보다 각 농도에서 ABTS 라디칼 농도가 낮았지만 농도가 증가할수록 그 활성이 증가하는 효과가 있었다. EA 분획물의 ABTS 라디칼 소거 활성에 대한 IC₅₀은 53.8 μ g/mL로 수용성 추출물(311.2 μ g/mL), MeOH 추출물(402.5 μ g/mL)과 BHT(178.6 μ g/mL)보다 약 3~7배 낮은 농도에서 그 활성을 보여주었다.

이러한 고욤잎 유래 EA 분획물의 DPPH 라디칼 소거 활성(IC₅₀: 5.3 μ g/mL)은 고욤(*D. lotus* fruit) 추출물(72.6 μ g

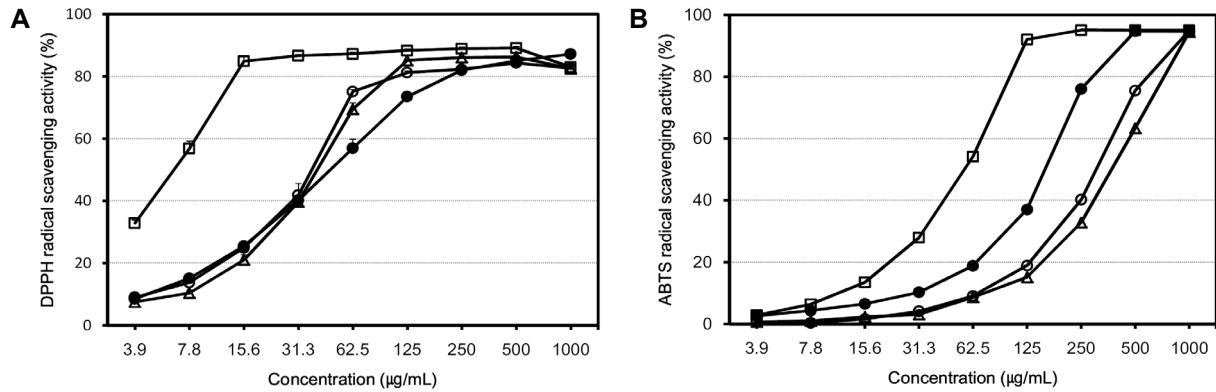


Fig. 1. Effects of EA fraction from *D. lotus* leaf on DPPH radical and ABTS radical scavenging activity. A: DPPH radical scavenging activity, B: ABTS radical scavenging activity. ○: water soluble extract, △: MeOH extract, □: EA fraction, ●: butylated hydroxytoluene or Trolox. Values are shown as mean±SD of 3 replicates.

/mL)보다 높았으며(9), 고욤씨 유래 quercetin(IC₅₀: 5.8 µg/mL)과 유사하였고(7), Zadra 등(17)이 보고한 가지과(Solanaceae)에 속하는 *Solanum guaraniticum*(9.11 µg/mL)보다 우수한 효과를 보였다. 그러므로 고욤잎 유래 EA 분획물은 강력한 항산화 효과를 발휘할 수 있는 소재라 사료된다.

고욤잎 EA 분획물이 세포생존율에 미치는 영향

고욤잎 EA 분획물의 농도에 따른 세포 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여, RPMCs를 활성화하기 위해 compound 48/80(0.5 µg/mL)을 처리하기 전에 고욤 EA 분획물(25~100 µg/mL), 수용성 추출물 또는 MeOH 추출물을 2 시간 동안 처리하여 MTT assay법으로 세포생존율을 비교 조사하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보여준 바와 같이 compound 48/80을 처리한 대조군은 정상군에 비해 세포독성이 있었지만, 사용된 EA 분획물의 모든 농도에서 정상군과 유사한 세포생존율을 보였고, 더불어 수용성 추출물과 MeOH

추출물에서도 유사한 결과를 얻었다(Fig. 2). 따라서 본 연구에서 사용한 모든 EA 분획물과 수용성 및 MeOH 추출물은 세포독성이 없었다.

고욤잎 EA 분획물의 히스타민 방출 억제 효과

한편 본 연구는 고욤잎 유래 EA 분획물이 가려움증 유발의 핵심 물질인 히스타민 방출에 대한 억제 효과를 알아보기 위하여 RPMCs를 접종하고 EA 분획물(25~100 µg/mL)을 주입하고 37°C에서 10분간 전 처리한 다음 compound 48/80(0.5 µg/mL)으로 자극하여 히스타민의 양을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 RPMCs를 compound 48/80으로 자극할 경우 히스타민 방출량은 63.49±5.67 ng/mL로 정상대조군(10.17±1.40 ng/mL)에 비해서 현저히 증가하였다($P<0.001$). 그러나 EA 분획물을 처리하였을 경우 농도에 의존적으로 억제하는 효과가 있었다. 특히 100 µg/mL 처리군에서는 히스타민 방출이 31.57±1.40 ng/mL로 대조군에 비해서 약 47.6%가 억제되는 우수한 효과가 있었다($P<$

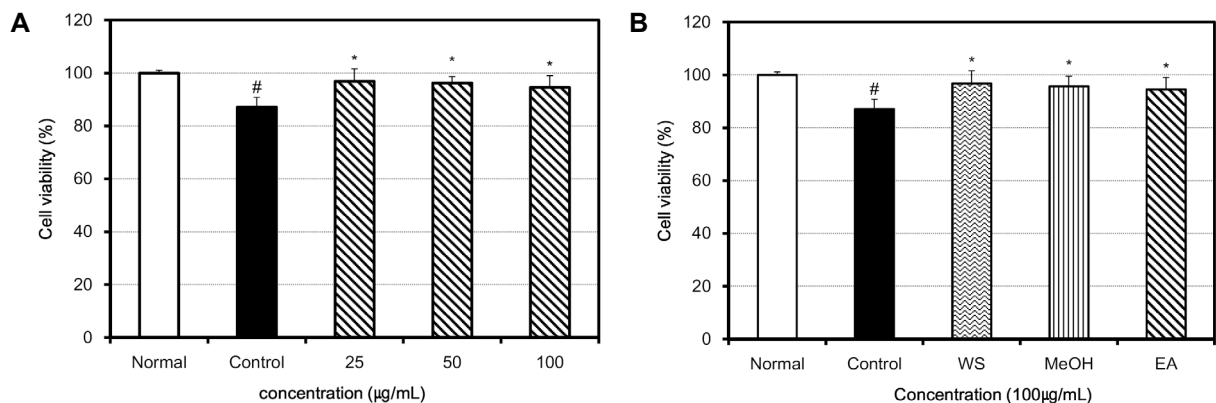


Fig. 2. Effects of EA fraction from *D. lotus* leaf on cell viability. RPMCs (5×10^5 /mL) were pre-treated with or without each extract and EA fraction at indicated concentrations for 2 hr, and then stimulated with or without PMA (20 nM) plus A23187 (1 µM) for 12 hr. Cell viability were measured by MTT assay as described in the section of Materials and Methods. A: effect of a various concentration of EA fraction, B: effect of water soluble extract (WS), MeOH extract and EA fraction at the same concentration (100 µg/mL). Values represent the means±SD of three independent experiments. # $P<0.01$ versus the non-treated normal group. * $P<0.05$ versus control group treated with PMA plus A23187 alone control group.

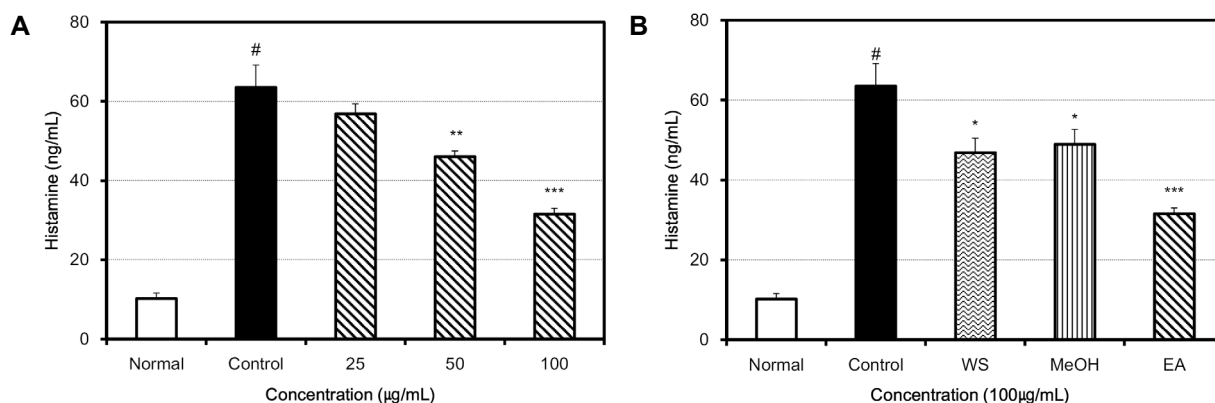


Fig. 3. Effects of EA fraction from *D. lotus* leaf on compound 48/80-induced histamine release in RPMCs cells. RPMCs cells (5×10^5 /mL) were pre-treated with or without each extract and EA fraction at indicated concentrations for 2 hr, and then stimulated with or without compound 48/80 (0.5 µg/mL). Histamine assay was performed by ELISA method on supernatant from RPMCs. A: effect of a various concentration of EA fraction, B: effect of water soluble extract (WS), MeOH extract and EA fraction at the same concentration (100 µg/mL). Values represent the means±SD of three independent experiments. # $P < 0.001$ versus the non-treated normal group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus compound 48/80 alone control group.

0.001). 또한 본 연구는 EA 분획물과 고욤잎 수용성 및 MeOH 추출물의 히스타민 방출 억제에 대한 효과를 비교하기 위해서 100 µg/mL 농도로 고정하여 실험한 결과 Fig. 3B에서 나타낸 바와 같이 고욤잎 수용성 추출물과 MeOH 추출물은 각각 48.97 ± 3.70 ng/mL와 46.87 ± 3.54 ng/mL로 유사하게 히스타민 방출 억제 효과가 있었고($P < 0.05$), EA 분획물은 고욤잎 수용성 및 MeOH 추출물보다 히스타민 방출 억제 효과가 우수하였다.

Compound 48/80은 비만세포를 활성화시키는 물질로 알려져 있는데, 활성화된 비만세포는 히스타민, serotonin 또는 substance P와 같은 가려움증 매개물질을 분비한다(18). 이러한 비만세포에서 분비되는 물질로 인해 유발되는 가려움증은 아토피 피부염 등 알레르기성 피부질환 환자에서 흔히 발견되는 가려움증과 유사한 증상을 유발한다. 그러므로 저자들은 전 연구에서 고욤잎 추출물을 전 처리할 경우

compound 48/80으로 자극하였을 때 히스타민을 억제하는 효과를 규명하여 보고한 바 있으며(11), 본 연구에서는 고욤잎 EA 분획물의 히스타민 방출 억제 효과에 있어 우수한 소재임을 확인하였다.

고욤잎 EA 분획물의 TNF-α 생성 억제 효과

본 연구는 고욤잎 유래 EA 분획물이 활성화된 RPMCs의 전염증성 사이토카인인 TNF-α의 생성 억제에 대한 효과를 알아보기 위하여 RPMCs를 접종하고 EA 분획물(25~100 µg/mL)을 2시간 전 처리한 다음 PMA와 A23187을 동시에 처리하고 12시간 후 배양액에 측정된 TNF-α 양을 측정하였다. 그 결과 Fig. 4A와 같이 PMA와 A23187을 처리한 대조군은 정상 대조군에 비해서 TNF-α의 생성이 594.51 ± 28.99 pg/mL로 현저히 증가($P < 0.001$)한 반면, EA 분획물을 처리한 실험군은 농도 의존적으로 TNF-α 생성이 억제되

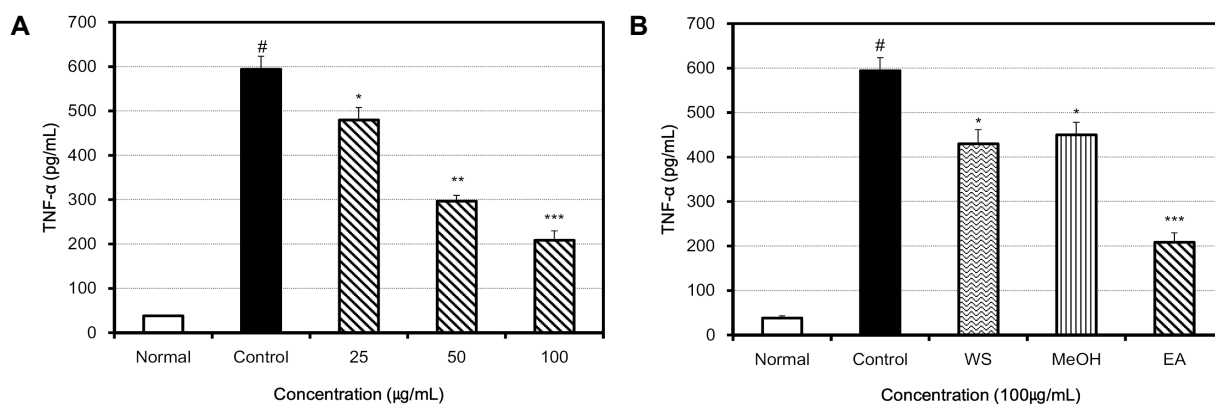


Fig. 4. Effects of EA fraction from *D. lotus* leaf on PMA plus A23187-induced TNF-α production in RPMCs cells. RPMCs cells (5×10^5 /mL) were pre-treated with or without each extraction and EA fraction at indicated concentrations for 2 hr, and then stimulated with or without PMA (30 ng/mL) plus A23187 (10 µM) for 12 hr. Cytokine concentrations were measured in cell supernatants using the ELISA method. A: effect of a various concentration of EA fraction, B: effect of water soluble extract (WS), MeOH extract and EA fraction at the same concentration (100 µg/mL). Values represent the means±SD of three independent experiments. # $P < 0.001$ versus the non-treated normal group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus PMA plus A23187 alone control group.

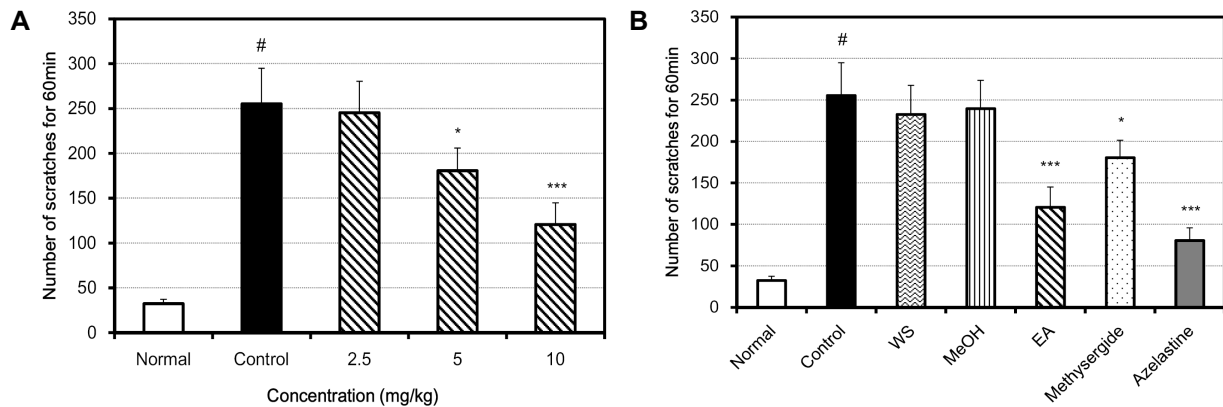


Fig. 5. Anti-pruritic effects of EA fraction on the scratching behavior induced by compound 48/80 (A) in Balb/c mice. EA fraction (2.5~10 mg/kg), 10 mg/kg of water soluble extract (WS), MeOH extract, methysergide or azelastine was treatment 1 hr before compound 48/80 (50 μ g/site) was injected into rostral back. The scratching of the injected site by the hind paw was counted for 60 min. A: effect of a various concentration of EA fraction, B: effect of water soluble extract (WS), MeOH extract and EA fraction at the same concentration (10 mg/kg). Values represent the means \pm SE of 5 individuals. # P <0.001 versus normal group. * P <0.01 and *** P <0.001 versus C 48/80 alone control group.

었으며 모든 농도에서 유의한 효과가 있었다(각각 P <0.05, P <0.01, P <0.001). 더불어 본 연구는 EA 분획물과 고음일 수용성 및 MeOH 추출물의 TNF- α 생성 억제에 대한 효과를 비교하기 위해서 100 μ g/mL 농도로 고정하여 실험한 결과 Fig. 4B에서 나타난 바와 같이 고음일 수용성 추출물과 MeOH 추출물은 각각 430.45 ± 31.87 ng/mL와 450.45 ± 27.74 ng/mL로 유사하게 TNF- α 생성 억제 효과가 있었고 (P <0.05), EA 분획물은 고음일 수용성 및 MeOH 추출물보다 TNF- α 생성 억제 효과가 우수하였다(P <0.001).

TNF- α 는 생체의 염증반응을 야기하는 대표적인 사이토카인으로 주로 활성화된 대식세포(macrophages)에서 대량 생산되지만, 림포이드계의 세포(lymphoid cells), 비만세포, 내피세포(endothelial cells)를 비롯하여 생체에 존재하는 다양한 세포에서도 생산된다(18,19). 특히 비만세포는 PMA와 A23187로 동시에 자극할 경우 TNF- α 가 대량 생산되는 것으로 잘 알려져 있다(19). 그러므로 염증반응을 완화하기 위해서는 TNF- α 를 효과적으로 제어할 수 있는 물질이 필요한 바, 본 고음일 유래 EA 분획물은 이러한 관점에서 염증반응을 제어할 수 있는 효과적인 물질이라 사료된다.

고음일 EA 분획물의 가려움 억제 효과

본 연구는 고음일 유래 EA 분획물이 피부 가려움증 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 EA 분획물(2.5~10 mg/kg)과 수용성 및 MeOH 추출물(각각 10 mg/kg)을 Balb/c 마우스에 경구 투여하고 1시간 후에 가려움 유발 물질을 마우스 등의 양쪽 어깨 높이 사이에 피하 주사하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 compound 48/80을 피하에 주입한 대조군은 255.3 ± 39.5 회/60 min으로 정상 대조군(32.3 ± 4.9 회/60 min)에 비해서 급는 횟수가 현저히 증가하였다(P <0.001). 그러나 EA 분획물을 처리한 실험군은 compound 48/80이 유도하는 가려움증을 농도에 의존적으로 억제하는 효과가

있었다. 특히 고음일 유래 EA 분획물 10 mg/kg 투여군에서는 compound 48/80이 유도하는 가려움 횟수가 $120.7 \pm 24.2/60$ min으로 약 53% 억제 효과가 있었다(P <0.001). 항가려움증 효과가 우수한 약물로 알려진 azelastine(177.5 ± 55.7 회/60 min) 및 methysergide와 같은 농도로 비교하였을 때 EA 분획물의 효과는 azelastine보다 낮았을지라도 methysergide보다는 효과가 높았다(Fig. 5B).

Azelastine는 H1 히스타민 수용체에 대한 길항제로(antagonist)로 알려진 항가려움증 약물로 히스타민과 substance P뿐만 아니라 compound 48/80과 같은 가려움 유발 물질로 유도된 가려움증을 효과적으로 완화하는 것으로 알려졌다(20). 또한 methysergide도 compound 48/80 유도 가려움증을 완화시킬 수 있는 약물로 잘 알려져 있다(21). 앞으로 EA 분획물을 대상으로 가려움 억제에 대한 분자적 기전을 규명할 필요가 있으며, 본 연구 결과 고음일 유래 EA 분획물의 우수한 항가려움증 효과는 아토피 피부질환과 같은 피부 가려움증에 사용될 수 있는 매우 우수한 소재라 사료된다.

요 약

본 연구는 고음일 유래 EA 분획물의 항산화 및 항가려움 활성을 조사하였다. EA 분획물은 DPPH 라디칼 소거 활성이 수용성 및 MeOH 추출물보다 매우 우수하였을 뿐만 아니라 합성 항산화제인 BHT보다 현저히 높았다. 또한 ABTS 라디칼 소거 활성도 수용성과 MeOH 추출물뿐만 아니라 Trolox보다 현저히 높았다. 본 연구에 사용된 EA 분획물과 수용성 및 MeOH 추출물은 세포에 대한 독성이 없었다. 또한 EA 분획물은 농도에 의존적으로 활성화된 비만세포로부터 히스타민 방출 억제와 TNF- α 생성 억제 효과가 있었으며, 같은 농도에서 수용성 및 MeOH 추출물보다 억제 효과

가 우수하였다. 더욱이 EA 분획물은 농도 의존적으로 compound 48/80으로 유도된 가려움증을 효과적으로 억제하는 활성이 있었고, 같은 농도에서 항가려움 약제로 알려진 azelastine보다는 그 효과가 낮았지만 수용성 및 MeOH 추출물뿐만 아니라 methysergide보다 우수한 항가려움 효과를 발휘하였다. 앞으로 이러한 항가려움 효과에 대한 EA 분획물의 분자적 작용기전을 규명해야 할 필요가 있으며, 고요잎 유래 EA 분획물은 강력한 항산화 및 항가려움 활성을 지닌 우수한 소재라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 지역산업기술개발사업(과제번호: R0002271)으로 산업통상자원부의 지원을 받아 연구되었다.

REFERENCES

- Eichenfield LF, Ellis CN, Mancini AJ, Paller AS, Simpson EL. 2012. Atopic dermatitis: epidemiology and pathogenesis update. *Semin Cutan Med Surg* 31: S3-5.
- Boguniewicz M, Leung DY. 2012. Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications. *J Allergy Clin Immunol* 125: 4-13.
- Tominaga M, Takamori K. 2014. Itch and nerve fibers with special reference to atopic dermatitis: therapeutic implications. *J Dermatol* 41: 205-212.
- Hosoda M, Yamaya M, Suzuki T, Yamada N, Kamanaka M, Sekizawa K, Butterfield JH, Watanabe T, Nishimura H, Sasaki H. 2002. Effects of rhinovirus infection on histamine and cytokine production by cell lines from human mast cells and basophils. *J Immunol* 169: 1482-1491.
- Wiseman H. 1996. Dietary influences on membrane function: importance in protection against oxidative damage and disease. *Nutr Biochem* 7: 2-6.
- Bouayed J, Bohn T. 2010. Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev* 3: 228-237.
- Moghaddam AH, Nabavi SM, Nabavi SF, Bigdellou R, Mohammadzadeh S, Ebrahimzadeh MA. 2012. Antioxidant, antihemolytic and nephroprotective activity of aqueous extract of *Diospyros lotus* seeds. *Acta Pol Pharm* 69: 687-692.
- Ayaz FA, Kadioglu A. 1999. Fatty acid compositional changes in developing persimmon (*Diospyros lotus* L.) fruit. *N Z J Crop Hortic Sci* 27: 257-261.
- Loizzo MR, Said A, Tundis R, Hawas UW, Rashed K, Menichini F, Frega NG, Menichini F. 2009. Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds. *Plant Foods Hum Nutr* 64: 264-270.
- Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Fazelian M, Eslami B. 2009. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Diospyros lotus* and *Pyrus boissieriana* growing in Iran. *Pharmacogn Mag* 5: 122-126.
- Kim HS, Jeon IH, Mok JY, Kang HJ, Shin JH, Park YK, Jeong SI, Jang SI. 2013. Anti-allergy and anti-pruritic effects of *Diospyros lotus* L. leaf extract. *Kor J Pharmacogn* 44: 60-69.
- Kim HS, Kang HJ, Jeon IH, Mok JY, Park YK, Shin JH, Kim JH, Jang SI. 2012. Antioxidant activity and protective effect of leaf extract from *Diospyros lotus* on oxidative stress of red blood cells. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 27: 631-636.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Re R, Pelligrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
- Martynova MG, Bystrova OA, Moiseeva OM, Evdonin AL, Kondratov KA, Medvedeva ND. 2005. The presence of ANP in rat peritoneal mast cells. *Cell Res* 15: 811-816.
- Mihara K, Kuratani K, Matsui T, Nakamura M, Yokota K. 2004. Vital role of the itch-scratch response in development of spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. *Br J Dermatol* 151: 335-345.
- Zadra M, Piana M, Brum TF, Boligon AA, Freitas RB, Machado MM, Stefanello ST, Soares FA, Athayde ML. 2012. Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. *Molecules* 17: 12560-12574.
- Benyon RC, Robinson C, Church MK. 1989. Differential release of histamine and eicosanoids from human skin mast cells activated by IgE-dependent and non-immunological stimuli. *Br J Pharmacol* 97: 898-904.
- Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF. 1991. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4220-4224.
- Andoh T, Zhang Q, Yamamoto T, Tayama M, Hattori M, Tanaka K, Kuraishi Y. 2010. Inhibitory effects of the methanol extract of *Ganoderma lucidum* on mosquito allergy-induced itch-associated responses in mice. *J Pharmacol Sci* 114: 292-297.
- Takubo M, Ueda Y, Yatsuzuka R, Jiang S, Fujii Y, Kamei C. 2006. Characteristics of scratching behavior induced by some chemical mediators in hairless mice. *J Pharmacol Sci* 100: 285-288.