

The anti-histamine effect of water soluble alkaloids extracted from *solanum nigrum* L.

Chang Zhe Shen^{1,*}, Jung Keun Park¹, Choul Goo Kim¹, Hyun Ja Chun² and Il Kwang Kim²

¹Chung Jin Biotech Co., Ltd, Hanyang University, Ansan, Kyeonggi-do 15588, Korea

²N. CosmeCeU Co., Ltd, Wonkwang University, Iksan, Jeollabuk-do 54538, Korea

(Received May 3, 2016; Revised August 24, 2016; Accepted August 24, 2016)

용규에서 추출된 수용성 알칼로이드성분의 항히스타민 효과

신장철^{1,*} · 박정근¹ · 김철구¹ · 천현자² · 김일광²

¹칭진바이오텍, 한양대학교 안산캠퍼스

²(주)엔 코스메슈, 원광대학교 나노화학부

(2016. 5. 3. 접수, 2016. 8. 24. 수정, 2016. 8. 24. 승인)

Abstract: The whole herbs of *solanum nigrum* L were extracted in boiling water (SNL-W), and the extracts were separated with butyl alcohol fraction (SNL-W/B) and aqueous fraction (SNL-W/W) by the solvent extraction method. The total alkaloid and total saponin content mensuration were used to identify the alkaloid composition of methanol fraction extracted from the aqueous fraction. The venom of honey bee was used to induce the rat peritoneal mast cell to secreting the histamine. The results show that the water soluble alkaloid composition of *solanum nigrum* L (SNL-W/W/M) has a significant inhibitory effect on the histamine release.

요약: 본 연구는 용규전초로부터 열수추출방법(SNL-W)으로 1차 추출하고 부틸알코올을 이용하여 분별추출을 통해 유기용매분획(SNL-W/B)과 수상분획(SNL-W/W)을 각각 획득하였다. 각 분획의 총 알칼로이드함량과 사포닌함량을 측정하였고 수상분획의 메탄올 용출물은 알칼로이드 성분으로 확인되었다. 꿀벌봉독을 쥐의 복막 비만세포에 처리하여 알러지 유발물질인 히스타민을 분비시키고, 용규의 알칼로이드성분으로 히스타민 분비에 대한 저해효과를 고찰하였다. 그 결과, 용규의 수용성 알칼로이드성분(SNL-W/W/M)은 꿀벌봉독으로 유발된 비만세포의 히스타민 분비에 대하여 강한 저해요인으로 작용하는 것을 확인하였다.

Key words: *solanum nigrum* L, alkaloid, histamine, honey bee venom

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)31-409-3707 Fax : +82-(0)31-409-3709

E-mail : w9w9w8@biovenom.com

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

히스타민(histamine)은 자체 국부격려요소의 활성화 분 중 하나이며 체내에서 히스티딘의 탈 카르복실화 반응을 통해 히스타민으로 형성된다. 일반적으로 비활성의 결합방식으로 비만세포와 호염성 과립 세포내에 과립형태로 존재하며, 피부, 기관지점막, 장 점막 및 신경계에 많이 분포되고 있다. 그리고 외부자극 및 알러지반응을 받으면 히스타민을 세포내부에서 탈과립 방식으로 세포외부 쪽 배출하며, 배출된 히스타민은 수용기와 결합하고 생리활성을 나타낸다.¹

히스타민(Fig. 1)의 생리활성 중 가장 중요한 것은 자극반응이며 알러지반응, 중독반응, 혈관확장, 기관지 경련 등 여러 문제를 발생 할 수 있다.^{2,3} 심지어 히스타민의 자극반응으로 인해 사망 할 수 있다. 이를 방지위해 히스타민과립과 수용기의 결합을 차단하거나 혹은 과립배출을 저해시키는 방법을 필요로 한다.

용규 (*Solanum nigrum* L.)는 속씨문 쌍떡잎강 통화 식물목 가지과의 한해살이풀로서, 또는 전국 각지에 널리 분포하고 산기슭, 양지바른 풀밭이나 길가 등에서 자란다. 전초에 스테로이드알칼로이드 (steroid alkaloid), 아트르핀 (atropine), 플라보노이드 루틴 (flavonoid rutin), 아스파라긴 (asparagine), 솔란구스틴 (Solangustin), 시토스테린 (Sitosterin), 탄닌질 (tannin), 사포닌 (saponin) 및 유기산 등의 다양한 성분을 포함하고 있다. 전초의 열수추출물은 티브스균, 포도알균 (staphylococci), 녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*), 대장균 (*Escherichia coli*), 적리균 (*Shigella*) 등에 억제작용이 있으며, 또한 강한 항염증효과도 가지고 있다.⁴ 그 중에 용규의 알칼로이드성분, 다당류성분 및 사포닌성분 등에 대한 항염증⁵과 항암효과⁶가 가장 많이 기록되어 있다. 그러나 용규의 유효성분 중 항 알러지에 대한 효능과 기작에 대한 보고는 아직까지 거의 없다.

본 연구는 천연약초로부터 항 알러지 신약재료를 탐색하는 목적에 따라 용규추출물에 대한 기본연구를 진행하였고, 비만세포의 히스타민 방출에 대한 우수한 저해효과를 발견하였다.

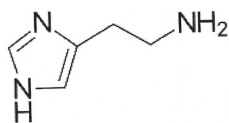


Fig. 1. Molecular structure of Histamine.

2. 시약, 기기, 및 실험방법

2.1. 원료 및 시약

본 연구에 사용된 용규 (*solanum nigrum* L.)전초는 (주)동광종합물산을 통해 한국 충청북도지역에서 생산한 용규를 구입하고 냉수세척, 건조 및 분쇄 등의 과정을 거친 후 사용하였다. 비만세포에서 히스타민을 유발-분비시키는 꿀벌봉독은 (주)청진바이오텍 (한국) 회사에서 정제와 동결건조를 통해 생산한 정제봉독 PBV (멜리틴 64%, PLA2 11.5%)을 사용하였다.

본 연구에 사용한 천연 표준물 solanidine (98%), dioscin (98%)는 Chem Faces Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (중국)에서 구매하여 사용하였다. 실험 시약 acetic acid (≥99%), vanillin (99%), perchloric acid (70%), Histamine liberator, compound 48/80, thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 Sigma Aldrich (St. Louis, USA)에서 구매하여 사용하였다. 또한 세포실험용 fetal bovine serum (FBS), antibiotic antimycotic solution (ABAM), dulbecco's modified eagles medium (DMEM)등 Gibco, (NY., USA)의 제품을 사용하였다. 히스타민 분석 장치는 histamine enzymatic assay kit (Bio Scientific, New South Wales, Australia)를 사용하였다. 기타 bromothymol blue solution (BTB, 0.1%, 삼전순약공업), chloroform (HPLC grade, Duksan), methanol (≥99.9%, HPLC grade, J.T. Baker, Seoul, Korea), 1-butanol (99%, 삼전순약공업), buffer (Tech& Innovation, Korea) 제품을 사용하였다. 실험에 사용 한 물은 초순수제조기 (water purification system, optimum 100P, 신화사이언스)를 이용하여 즉시제조 사용하였다.

2.2. 기기

초고속 진공저온(냉축)추출기는 COSMOS660-80L (경서기계산업, 한국)제품을 사용하였다. UV spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Japen), 마이크로플레이트 분광광도계 (Epoch, BioTek, VT, USA), 원심분리기 (FLETA 40, Hanil, Korea), 진공농축기 (HS-2000NS, Bucheon, Korea), 초정밀저울은 XP 105 (Columbus, USA), 현미경 (Eclipse Ti-S, Nikon), CO₂ 배양기 (Galaxy 48S, Eppendorf, New York, USA) 제품을 사용하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 용규의 수용성 알칼로이드성분 추출

용규 (*Solanum Nigrum* L, SNL)의 열수 추출은 전

초시료 4.8 kg를 부직포자루에 싸서 cosmos 660 추출기의 용기에 넣고, 정제수 60 L를 용기에 첨가하였다. 냉각장치를 작동시키고 120 °C를 설정하여 용기의 물을 끓이면서 약 3시간동안 열수순환 추출하였다. 추출이 끝나면 추출기의 압착기능을 통해 찌꺼기를 제거하였다. 용기에 남은 추출액을 보조 용기를 이용하여 기계의 저온진공 농축기능을 통해 농축하였고, 최종 용구의 열수추출물 (SNL-W)분말가루는 동결건조방법으로 획득하였다. 총 회수량은 2.98 kg이었으며, 수율은 62.08%이었다.

용구에서 히스타민 저해효과의 유효성분인 알칼로이드분획은 열수추출물 (SNL-W)로부터 부탄올 분별추출과 메탄올용해추출방법으로 획득하였다. 열수추출물 (SNL-W) 1.0 kg을 2.0 L의 정제수에 녹인 후 유기용매 부탄올 (1-butanol)과 분별깔때기를 사용하여 유기용매 층을 무색이 될때까지 반복 추출하였다. 그리고 진공농축과 동결건조 방법으로 각각 부탄올 분획물 (SNL-W/B) 520.0 g 및 수상 (水相) 분획물 (SNL-W/W) 476.5 g을 획득하였다. 수상 분획물 (SNL-W/W)분말을 무수에탄올 (≥99.9%)과 초음파를 이용하여 용해 추출하였으며, 추출용액을 filter paper (NO.5C, advantec)상에서 침전물과 알칼로이드분획액으로 분리하였다. 건조 후 알칼로이드분획물 (SNL-W/W/M) 분말 111.0 g과 잔재 (SNL-W/W/W) 363.4 g을 획득하였다.

2.3.2. 총 알칼로이드함량 측정

용구 추출물의 총 알칼로이드함량은 Khalil⁷의 방법을 적용하여 산염기지시약 bromothymol blue (BTB 용액)와 반응시키고 분광광도계의 417 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

초정밀저울을 이용하여 표준물 solanidine 10 mg을 정확히 취하고 25 mL의 무수메탄올에 용해하여 0.4 mg/mL 농도로 제조하였다. 건조시킨 코니칼 튜브 (50015/PP)에 각각 20, 40, 60, 80, 160, 600, 1250, 1875 µL씩 분주하고 80 °C물중탕을 이용하여 메탄올을 제거하였다. 희석된 산염기지시약 bromothymol blue (0.0125%)를 6.0 mL씩 첨가하고 vortex mixer를 이용하여 1분 동안 혼합하였다. 클로로포름 6.0 mL씩 각 튜브에 첨가하여 다시 강하게 3분 동안 혼합하였다. 원심분리기를 이용하여 에멀전을 제거하고 하층의 클로로포름 분획을 취하여 417 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도와 표준물농도로 표준곡선의 관계방정식을 산출하고, 시료는 표준물의 반응과정과 동일하

게 측정하여 비교하였다. 알칼로이드 표준곡선의 회수율은 solanidine (98%) 10 µg에 표준물 각각 20, 40, 60, 80, 160 µL를 첨가하고 아래 식의 계산법으로 계산하였다.

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{\text{측정값-Solanidine량}(10 \mu\text{g})}{\text{표준물첨가량}(\mu\text{g})} \times 100$$

2.3.3. 총 사포닌함량 측정

총 사포닌함량 측정은 vanillin/perchloric acid를 트리테르페노이드와 반응하여 생성되는 발색화합물의 농도를 452 nm에서 측정하는 원리를 이용하였다.⁸ 초정밀 저울을 이용하여 일정한 시료와 사포닌표준물 dioscin (98%) 10 mg를 정확히 취하고 1.0 mL의 무수메탄올에 용해하여 10 mg/mL 농도로 제조하였다. 상기 알칼로이드 측정에서와 같은 방법으로 코니칼튜브 (50015/PP)에 각각 6, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 150, 300, 450 µg이 되도록 준비하였다. 5% vanillin (w/v)의 acetic acid용액과 perchloric acid가 2:8로 혼합된 용액 1.0 mL를 각각 첨가하고 vortex mixer를 이용하여 반응혼합액을 만들었다. 80 °C 물중탕에서 25분 동안 반응 시키고 반응정지를 위해 냉수로 냉각시킨 후 5.0 mL의 acetic acid를 첨가하여 452 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 측정은 표준물 dioscin의 반응과정과 동일하였으며, dioscin 10 µg에 표준물 각각 50, 100, 200, 300, 500 µL를 첨가하고 흡광도를 측정하여 아래식과 같이 회수율을 계산하였다.

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{\text{측정값-Dioscin량}(10 \mu\text{g})}{\text{표준물첨가량}(\mu\text{g})} \times 100$$

2.3.4. 세포배양

비만세포의 일종인 RBL-2H3 세포 (rat basophilic leukemia)는 American Type Culture Collection (ATCC) 으로부터 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% Antibiotic Antimycotic solution (ABAM, 1X)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)을 배양액으로 하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cell은 subculture passages 10 이하의 cell을 사용하였으며 80~90%의 배양도를 기준으로 측정하였다.

2.3.5. MTT법을 이용한 세포독성검정

MTT 분석법은 MTT 시약이 세포내로 흡수된 후 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해 formazan을 형성하는데, 이 물질의 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하는 것으로서

세포의 생존율을 측정하는 대표적인 방법이다.

시료에 의한 세포에 미치는 영향은 Mosmann⁹의 MTT 방법을 참고하여 측정하였다. 10% FBS와 1% ABAM (1X)이 함유된 DMEM을 배양액으로 하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 RBL-2H3 cell을 96-well plate에 2.0 × 10⁵ cells/well로 이식하여 24시간 배양하였다. 0.10~10.0 mg/mL의 시료로 처리하고 18~20시간 배양한 후 MTT 용액 (5.0 mg/mL in D-PBS)을 가하여 4시간 동안 환원반응을 유도하였다. DMSO로 용해하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, cell의 90% 생존 농도를 확인하여 세포생존율로 평가하였다.

2.3.6. 비만세포의 탈과립

비만세포에서의 탈과립 (degranulation)을 관찰하기 위하여 Jung¹⁰의 방법에 따라 RBL-2H3 세포 (2 × 10⁵ cells/mL)를 6-well 배양판에서 24시간 동안 배양하고, 여러 농도의 북강활 물추출물을 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 그리고 C48/80 (50 µg/mL)을 처리하여 20분 동안 배양하고 현미경을 이용하여 탈과립 정도를 관찰하였다.

2.3.7. 히스타민 방출에 대한 저해효과

RBL-2H3 세포 (2 × 10⁵ cells/mL)를 24-well plate에 24시간 동안 배양한 후 suction 통해 배지를 제거하고 새 배지를 160 µL를 분주하였다. 그리고 여러 농도의 용규 알칼로이드추출물 20 µL로 처리하여 1시간 동안 배양하였다. 여기에 C48/80 (50 µg/mL) 및 꿀벌봉독을 각 20 µL씩 가하여 10~20분 동안 배양한 다음 세포배지 상층액 100 µL를 96well plate에 분주하고 200 µL histamine enzyme assay kit 용액을 첨가하였다.¹¹ 실온에 30분 동안 방치하고 마이크로플레이트 분광광도계를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

2.3.8. 통계처리

모든 실험은 3 회 반복 실시하였고 실험에 대한 평균과 표준편차 (mean ± SD)로 나타내었다. 통계분석은 OriginPro 8.5 프로그램을 이용하였고, 유의차 검증은 평균 표준편차 분석을 한 후 $p < 0.05$ 수준을 따라 분석하였다.

3. 결 과

3.1. 용규의 추출

용규전초를 열수추출과 유기용매 분별추출 또는 무수 메탄올용해추출 과정을 거쳐 용매조건별 5 가지의 분획물을 획득하였다. 용규 전초 4.8 kg으로부터 1차 열수추출물은 2.98 kg (62.08%)가 얻어졌으며 각 분획물의 회수양과 수율은 Table 1에 정리하여 나타내었다.

용규전초로부터 열수추출방법으로 얻어진 분획물은 주로 다당류, 사포닌, 알칼로이드 및 색소 등의 성분으로 구성되어 있으며, butanol을 이용한 유기용매 분별추출방법으로 다당류와 사포닌성분을 분리하였다. 분리된 butanol 분획물로부터 C18 column을 이용한 크로마토그래피 방법으로 지용성 알칼로이드(BA) 함량 51.35%의 분획물을 획득하였다. 지용성 알칼로이드분획(BA)의 RAW 264.7cell세포에 대한 항염증 (anti-inflammation-nitric oxide test) 효과는 1.25 mg/mL 처리수준에서 5.2 µM 이었으며, 수상 알칼로이드분획 (WA)은 18 µM로 나타난 것으로 보아 BA의 항염증 효과가 현저하게 증가된 결과를 보였다(Fig. 2).

이것은 염증저해율로 계산할 때 76%에 해당하는 것으로 G. Arunachalam⁵가 보고한 메탄올 추출물에서 염증 저해율 48%과 비교하여 매우 양호한 결과라 할 수 있다.

3.2. 총 알칼로이드함량

용규 알칼로이드의 표준물 solanidine를 BTB용액과

Table 1. The extraction yield in the different fraction

(Solanum nigrum L.) (4.8 kg)			
	Recovery(kg)	(%)	Extract Method
SNL-W	2.98	62.08	Boiling water extract from SNL
SNL-W/B	1.55	32.29	Solvent extract from SNL-W
SNL-W/W	1.42	29.58	Solvent extract from SNL-W
SNL-W/W/M	0.53	11.04	Dissolved extract from SNL-W/W
SNL-W/W/W	1.74	36.33	Dissolved extract from SNL-W/W

SNL: Solanum nigrum L, W: water, B:butanol, M: methanol

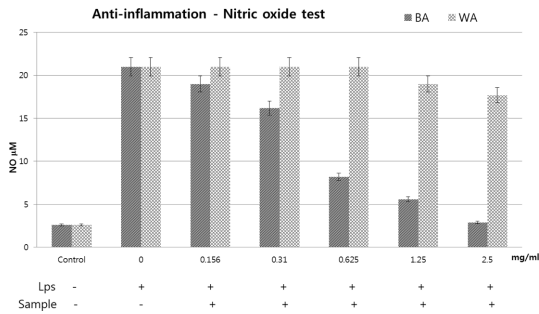


Fig. 2. The different effect of WA and BA on antiinflammation nitric oxide test in RAW 264.7cell.

Table 2. The total alkaloid contents in each extracts fraction

	Sample (mg)	Absorbance	Contents (µg)	%
SNL-W	1.61	0.044	36.1 ± 0.19	2.24
SNL-W/B	1.60	0.131	99.61 ± 0.35	6.23
SNL-W/W	1.55	0.112	85.74 ± 0.29	5.53
SNL-W/W/M (WA)	1.17	0.349	258.75 ± 0.67	22.12
SNL-W/W/W (BA)	1.31	0.071	55.81 ± 0.26	4.26
	1.01	0.698	513.52 ± 1.11	51.35

(BA) : Alkaloid extracts from SNL-W/B
(WA) : Alkaloid extracts from SNL-W/W

반응 시키고 분광광도계를 이용하여 348-520 nm에서 흡수피크를 측정하여 Fig. 3(a)에 나타내었다. 471 nm에서 측정된 표준물의 농도와 흡광도 표준검정곡선은 Fig. 2(b)와 같으며, $y = 0.00137x + 0.00545$, ($R^2 = 0.9995$)의 직선식을 얻었다(Fig. 3(b)).

평균회수율은 98.3 %, RSD: ±0.0098 (n = 5)이었고,

각 추출분획물의 측정흡광도를 정량곡선에 대입하여 각 함량을 산출하였으며 결과를 Table 2에 나타내었다. 용구의 알칼로이드 성분은 수상 분획에서 21 % 지용성으로 butanol 분획에서 52 %가 얻어졌다.

3.3. 총 사포닌함량

스테로이드 사포닌 (Steroidal saponins)은 용구의 중요한 활성성분으로 가장 많은 연구결과가 보고되고 있으며, 특히 암세포에 현저한 세포독성을 나타내었다. 일반적으로 항암효과와 면역작용은 관련이 있으며 알레르기자극성도 면역작용과 밀접히 관련되어 있다. 본 연구 중 수상분획물 (SNL-W/W/M, WA)의 히스타민 저해효과는 사포닌성분 때문인지 아닌지 확인할 필요가 있다. 용구의 사포닌 표준물(dioscin)을 vanillin/acetic acid/perchloric acid의 혼합용액과 반응시키고, 400-800 nm에서 나타나는 특성피크의 결과를 Fig. 4(a)에 나타냈다.

각 농도와 상응하는 최대흡광도 (ϵ_{max})의 비례식으로부터 $y = 0.021 + 0.005x$, ($R^2 = 0.999$)의 직선방정식을 얻었다. 또한 평균회수율은 101.2 %, RSD: ± 0.013 (n = 5)으로 측정 되었으며 표준물 dioscin의 측정값과 비교하여 사포닌함량을 계산하였고 그 결과를 Table 3에 나타내었다.

Table 3에 나타난 결과를 보면, 대부분의 사포닌은 butanol층인 W/B에서 얻어지고(15.82 %), 수용상(W/W)에서는 겨우 2.74 %만 얻어지며, SNL-W/W/M분획, 즉 수상분획에서는 0.35 %가 얻어지는 것을 알 수 있으며, 이것은 Ren¹³이 보고한 ethanol에서 추출한 결과와 비슷하였다. 0.35 %의 사포닌성분만을 함유한 결과로 볼때 용구사포닌은 히스타민 저해의 원인이 아닌

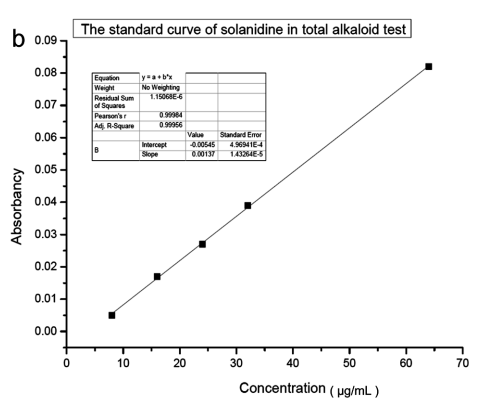
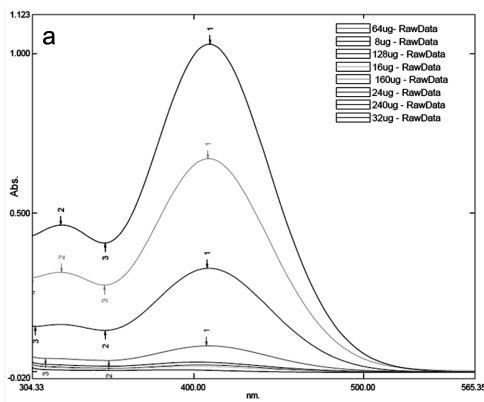


Fig. 3. (a) The standard characteristic absorption peak of solanidine, (b) The standard calibration curve of solanidine.

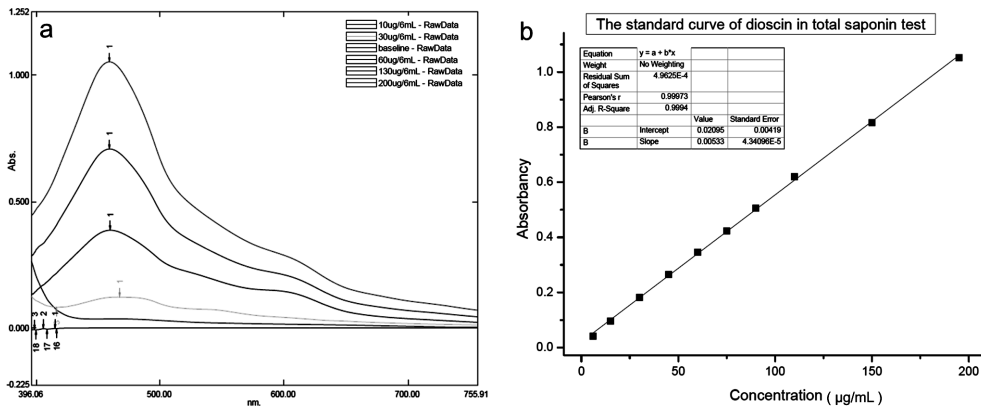


Fig. 4. (a) The standard characteristic absorption peak of dioscin, (b) The standard calibration curve of dioscin.

Table 3. The total saponin content in each extracts fraction

Sample	Absorbance	Contents (µg)	%
SNL-W	1.07	23.64 ± 0.11	2.21
SNL-W/B	1.60	253.20 ± 0.63	15.82
SNL-W/W	1.45	39.77 ± 0.23	2.74
SNL-W/W/M (WA)	1.62	5.64 ± 0.06	0.35
SNL-W/W/W	1.50	33.95 ± 0.24	2.26
BA	1.31	13.887 ± 0.09	1.06

(BA) : Saponin extracts from SNL-W/B

것으로 판단된다(히스타민을 저해하는 유효농도는 0.2 mg/mL 경우 SNL-W/W/M분획의 사포닌함유량은 단지 0.7 µg에 불과하다). 또한 용규의 다당류성분이 항암, 항염증 및 면역 활성을 갖는 것으로 보고되고 있지만,^{2,3,6} 일반적으로 다당류는 수용성이며 알코올에 용해되는 양은 작다. 분획물 SNL-W/W/M은 무수메탄올로 추출하기 때문에 다당류성분일 가능성에 대하여는 수궁하기 어렵다.

3.4. 세포시험

3.4.1. 세포독성검정

RBL-2H3비만세포의 히스타민분비 저해효과를 분석하기 위해 MTT assay 방법으로 용규 알칼로이드분획물의 독성을 측정하여 Fig. 5에 보였다. Fig. 5와 같이 세포생존율(cell viability)은 정상 배양의 경우 99.64 ± 2.63 %, 용규의 수용성 알칼로이드 (SNL-W/W/M) 분획물 0.01, 0.1, 0.2 mg/mL (최종농도)농도로 처리한 경우 각 97.83 ± 2.31, 95.56 ± 2.89 및 90.36 ± 0.17 %의 생존율을 보였으며 독성이 유의하게 나타나지 않았다.

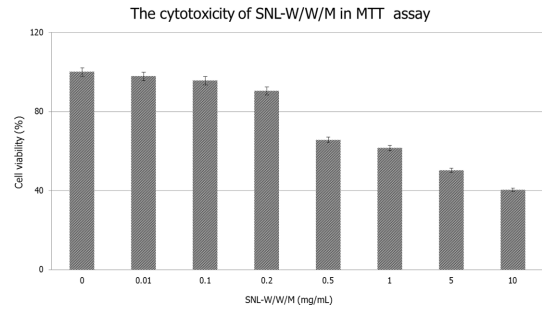


Fig. 5. Cytotoxicity of SNL-W/W/M fraction in RBL-2H3 mast cell (2×10^5 cells/well) by the MTT assay.

3.4.2. 탈과립에 대한 효과

RBL-2H3 세포는 호중성세포이며 비만세포와 같이 세포질 내 다양한 화학매개물질이 과립으로 함유되어 있다. 히스타민은 그 중에 하나이며 외부자극에 의해 탈과립하여 히스타민과립을 방출하고 알러지 반응을 유도한다. Pinxteren¹²의 방법에 따라 C48/80 또는 봉독을 이용하여 세포막의 G단백질을 자극시키고 세포의 탈과립을 유발하였으며, 그 과정의 세포사진을 Fig. 6에 보였다.

Fig. 6의 세포사진과 같이 정상 배양한 RBL-2H3세포는 원형과 타원형으로 핵은 세포내의 한쪽에 차지하고 매개물과립은 그 바깥쪽을 차지하고 있다. C48/80과 봉독으로 처리하면 세포내부의 매개물들이 세포막 밖으로 이탈되며, 특히 봉독 추가로 처리한 경우 현저한 탈과립 현상을 나타내었다. 그러나 SNL-W/W/M분획물을 추가로 처리한 세포는 핵과 매개물이 세포내에 함께 존재하여 히스타민 방출을 억제하는 것으로 확인되었다.

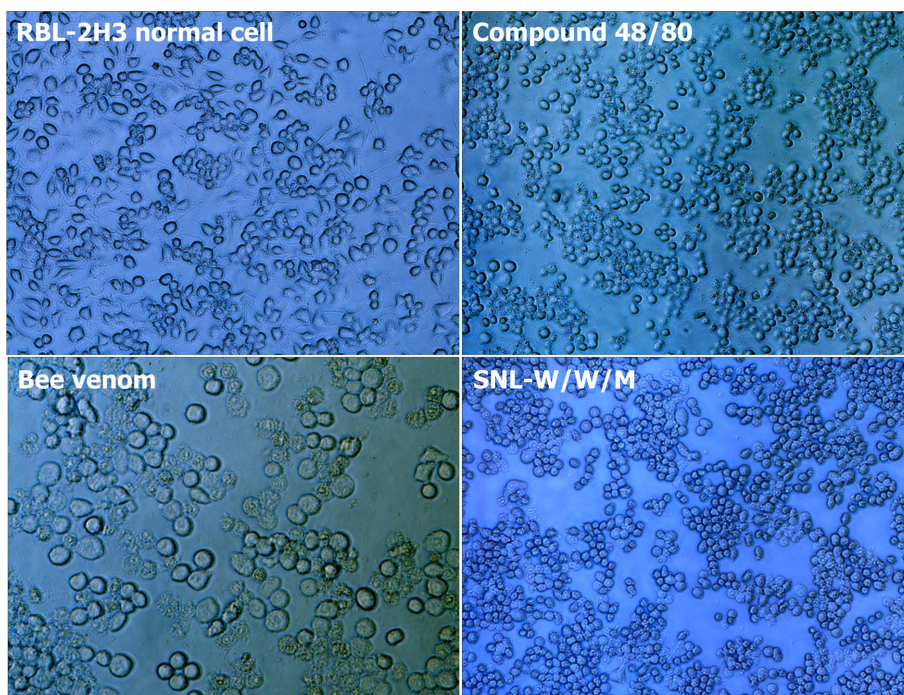


Fig. 6. The degranulation effect of the RBL-2H3 mast cell (2×10^5 cells/well) with compound 48/80, bee venom and SNL-W/W/M.

3.4.3. 히스타민 방출에 대한 저해효과

RBL-2H3세포를 C48/80으로 자극시키면 히스타민 과립은 세포내부에서 외부로 이탈하게 된다. Histamine enzyme assay kit의 히스타민 표준곡선 ($y = 0.078x +$

0.1103 , $R^2 = 0.999$)을 이용하여 세포에서 방출되는 히스타민의 량을 계산하였고 Table 4에 그 결과를 나타내었다. Table 4에서 C48/80과 봉독으로 처리한 경우에 히스타민 분비량이 16.31과 16.80 ppm으로 가장 높은 결과를 보였다.

히스타민 방출에 대한 분획물의 처리효과를 비교하여 Fig. 7에 보였다. Fig. 7에서, 자극유발물질 C48/80과 봉독 (bee venom)을 함께 작용시킬 경우의 히스타민 방출량을 기준 (100%)으로 하면, C48/80 단독으로 유발한 경우 정상세포의 방출량보다 88.2%가 증

Table 4. The histamine secretory volume of the RBL-2H3 mast cell within extracts treatment

	Treatment of cell	Absorbance	Histamine (ppm)
	Normal	0.129	0.24 ± 0.013
Compound 48/80	C48/80	1.377	16.31 ± 0.032
	BV	1.416	16.80 ± 0.035
	BA	1.261	14.82 ± 0.028
	WA	0.757	8.33 ± 0.021
	BV+WA	0.909	10.28 ± 0.026
	BV+BA	1.287	15.15 ± 0.029
Standard		0.137	0.35 ± 0.012
		0.165	0.70 ± 0.011
		0.219	1.40 ± 0.010
		0.328	2.80 ± 0.015
		0.654	7.00 ± 0.014

BV: Bee Venom, BA: Alkaloid extracts from SNL-W/B
WA: Alkaloid extracts from SNL-W/W/M

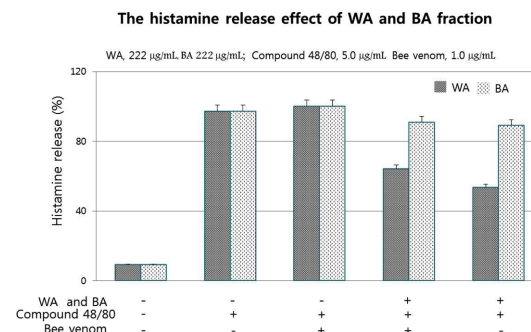


Fig. 7. The effect of WA and BA fraction on histamine release in the RBL-2H3 cell (2×10^5 cells/well).

가되었고, 붕독과 함께 유발한 경우 90.9%가 증가되었다. SNL-W/W/M분획물 (WA)로 세포를 처리하면 C48/80로 유발한 양은 45.8% 감소되었으며, 또한 붕독과 함께 유발한 양은 36.1%가 감소되었다. 그리고 지용성 알칼로이드 (BA)와 비교하여 수용성 알칼로이드 (WA)는 월등히 우수한 항히스타민 효과를 나타내는 결과를 보였다.

4. 결론 및 고찰

본 연구는 용규전초로부터 용매별로 수용성과 비수용성 분획을 얻어 분획별 알칼로이드 함량, 사포닌 함량을 측정하였고, 세포독성, 탈과립현상, 히스타민 방출의 분획별 저해효과를 분석하였다. 알칼로이드 성분은 수상분획에 21%, 부탄올 분획에 52%가 함유되었으며, 사포닌은 총 24.4% 중 부탄올에 15.8%, 수상분획에 0.35%가 분포된 것으로 보아 사포닌과 알칼로이드는 물층보다 부탄올 층에서 더 쉽게 얻어지는 것이 확인되었고, MTT 측정결과 세포독성은 유의성이 없는 것으로 나타났다. 히스타민 방출은 compound 40/80과 붕독으로 처리했을 때 16.31과 16.80 ppm으로 높게 나타났으며 용규추출물로 처리하면 방출이 저해되는 결과를 보였다. 용규추출물 중에서도 부탄올 분획보다 수용성 알칼로이드 분획(45.8%)의 항히스타민 효과가 더 현저하였다. 이로써 용규 수용성 알칼로이드 분획물은 히스타민 방출 저해효과와 함께 히스타민으로 유발된 염증 및 알러지 자극반응 완화용으로 이용할 수 있는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청 2014년 수행하는 중소기업기

술혁신개발사업(2014)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. E. G. Erdos, *Dental Pharmacology, Histamine and Antihistamine*, Univ. of Chicago, Spring, 2005.
2. C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport and M. J. Shlomchik, *Garland Science, NewYork*, 2001.
3. L. Maintz and N. Novak, *Am. J. Clin. Nutr.*, **85**(5), 1185-96 (2007).
4. O. J. Choi, *Ingredients and use of Herbs*, Sun Moon Publisher, Seoul, 540-541, 1991.
5. G. Arunachalama, N. Subramanianb, G. P. Pazhanic, M. Karunanithid and V. Ravichandrane, *Iran. J. Pharm. Sci.*, **5**(3), 151-156 (2009).
6. Y. O Sona, J. Kimb, J. C. Lima, Y. Chunga, G H. Chungb and J. C. Leeb, *Food Chem. Toxicology*, **41**(10), 1421-1428 (2003).
7. S. E. Masry and S. A. H. Khalil, *J. Pharm. Sci.*, **62**(8), 1332-1334 (1973).
8. C. Y. Fu, Y. H. Liu, M. J. Li, X. H. Wang and W. Q. Yin, *Nat. Prod. Res. Dev.*, **24**(5), 682 (2012).
9. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, **65**(1-2), 55-63 (1983).
10. J. K. Jung, H. M. Jung, W. G. Seo and Y. K. Park, *Kor. J. Herbology*, **25**(3), 35-41 (2010).
11. M. J. Kim, J. Y. Kim, B. Kwon and G. E. Ji, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **54**(1), 95-98 (2011).
12. J. A. Pinxteren, A. J. O'Sullivan, K. Y. Larbi, P. E. Tatham and B. D. Gomperts, *Biochimie*, **82**(4), 385-393 (2000).
13. F. L. Ren, C. G. Qiu and Y. Lian, *J. Cent. South Univ.*, **36**(1), 69-72 (2005).