大韓本草學會誌 제32권 제6호(2017년 11월)
Kor. J. Herbol. 2017 ; 32(6) : 9-15

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2017.32.6.9.

현삼(玄蔘) 추출물이 RBL-2H3 비만세포에서 β-hexosaminidase 및 cytokine 분비에 미치는 효과

김세기*#

대구가톨릭대학교 제약산업공학과

Inhibitory Effects of Scrophulariae Radix on β-hexosaminidase release and cytokine production in RBL-2H3 cells

Se-Gie Kim*#

Department of Pharmaceutical Science and Technology

ABSTRACT

Objectives : Traditional medicines isolated from natural products often have positive effects in the prevention and healing of various immune disorders, such as allergy and atopic inflammation. Scrophulariae Radix (SR) been used in oriental medicine used for treatment of acute and chronic inflammatory diseases. Mast cells are known to play important roles in the initiation of allergic reactions. In this study, we investigated the effects of SR ethanol extract on inflammatory responses in IgE-stimulated RBL-2H3 mast cells.

Methods : Rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells were purchased from Korean Cell Line Bank (KCLB No. 22256). Cell viability was measured by MTT assay. Assays for β-Hexosaminidase Secretion : RBL-2H3 cells were sensitized with dinitrophenyl-ImmunoglobulinE (DNP IgE). The next antigen DNP-BSA (25 ng / ㎖) was added for 10 minutes and the reaction was terminated after 5 minutes in the ice bath. To determine β-hexosaminidase release, supernatants were aliquoted into 96-well plates. Samples were mixed with substrate solution and incubated for 1 h at 37 ℃. Absorbance was measured with a spectrophotometer at 405 ㎚. IL-4 and tumor necrosis factor-α (TNF-α) concentrations in cell culture supernatants were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits.

Results : The cytotoxicity of SRE in RBL-2H3 cells was less than 5%. SRE inhibited DNP-IgE-imduced degranulation of mast cells in RBL-2H3 cells. Also significantly decreased the levels of inflammatory cytokine, IL-4 and TNF-alpha. In this study, the SRE showed potential anti-allergic and antiinflammatory.

Conclusions : These results indicate that SRE could be inhibit the allergic response through suppressing the mast cell activation.

Key words : Scrophulariae Radix, anti-allergic effect, RBL-2H3 mast cell, inflammatory reactions, β-hexosaminidase, IL-4, TNF-alpha

Ⅰ. 서 론

아토피를 비롯한 각종 피부염의 초기 증상들은 비만세포에서 분비되는 히스타민에 의해 일어나며 치료를 위해 항히스타민 계열의 약물을 사용하는 것이 일반적이다[1]. 히스타민은 비만세포의 탈 과립에 의해 분비되는 물질 중에서 가장 잘 알려져 있고 즉시형 과민 반응을 일으키는 중요한 인자이다[2]. 비만세포는 피부, 호흡기, 림프관주위, 혈관주위, 위장관의 점막, 뇌 등 전신의 장기에 널리 분포하고 있으며, 알레르기(allergy) 반응의 유발에 필수적인 세포로 알려져 있다[3]. 또한, 제Ⅰ형

*#Corresponding author and First author : Se-Gie Kim. Dept. of Pharmaceutical Science and Technology, Catholic Univ, Daegu, Republic of Korea.
· Tel : +82-53-850-2564 · Fax : +82-53-359-6823 · E-mail : sgkim7@cu.ac.kr
· Received : 10 October 2017 · Revised : 19 October 2017 · Accepted : 15 November 2017

알레르기 염증반응에서 중요한 역할을 하며, 세포 표면에 Fc εR I 수용체를 발현하고 있다. 항원들이 수용체에 결합된 IgE와 교차 결합되면 활성화가 시작되고 탈 과립화가 진행된다. 탈 과립화는 항원 결합 후 수분 내에 발생하여 이미 생성되어 있는 다양한 종류의 염증성 매개물질들을 세포 밖으로 방출한다. 그 후 지방성분의 매개물질들을 생성하여 분비하고 수 시간 후에는 사이토카인을 합성 분비하여 염증반응을 지속시킨다. 비만세포에 의해 새롭게 생성된 지방 성분의 매개물질과 사이토카인은 알레르기성 급성 및 만성 염증반응을 유발하는 주요 인자이다[4-6]. 알레르기성 질환으로는 천식 외에 비염, 아토피성 피부염 등이 있으며 이들 질병들은 해마다 증가하고 있어, 심각한 사회문제로 대두되고 있으나 이들 질병들을 완전하게 치료할 수 있는 치료제는 아직 개발되지 못했으며 시판되고 있는 치료제들 중 일부는 부작용들이 알려져 있다[7]. 그러나, 이들 질병들을 예방, 개선 및 치료할 수 있고 부작용을 최소화 할 수 있는 천연물 유래 항알레르기 소재에 대한 연구들은 꾸준히 진행되고 있다[8,9].

현삼(玄蔘)은 우리나라 원산으로 중국 · 일본 등지에 분포한다. 중대(重臺) · 현대(玄臺) · 귀장(鬼藏) · 축마(逐馬)라고도 한다. 다년생 초본으로 높이 80~150 ㎝로 줄기는 사각형이며 잎은 난형이다. 꽃은 8~9월에 피고 황록색이며 열매는 삭과로 난형이다. 뿌리는 약재로 사용하는데, 감자 모양으로 백색이나 자르면 곧 바로 검게 변한다. Scrophularin과 iridoid glycoside를 함유하고,. Iridoid glycoside가 유효성분으로 20~30%는 8-(O-methyl-p-coumaroyl)-harpagide, 70~80%는 harpagoside이며 이 외에도 barbiturate, flavonoid, p-methoxycinnamic acid와 정유 등이 포함되어 있다. 약리작용으로는 항불안 작용[10], 항균작용[11], 혈압 강하 작용[12], 항알레르기 작용[13], 아토피 발진 억제 작용[14], 갑상선기능항진증 억제 효과[15], 항산화효과[16], 항치매작용[17], 항당뇨효과와 항염증효과[18], 간세포 보호 효과[19], 상처치유효과[20] 등이 보고되어 있다. 한방에서는 9월에 뿌리를 채취하여 쪄서 건조하여 解熱, 消痰, 連珠瘡, 咽喉炎, 婦人腰痛, 補血에 사용하며 자음청열 (滋陰淸熱), 해독활장 (解毒滑腸), 치열병상음 (治熱病傷陰), 자음강화 (滋陰降火) 등의 본초학적 효능을 지니며 다양한 약리작용을 가지고 있지만, 알레르기성 질병과 관계된 비만세포에서의 히스타민 방출 억제관련 연구는 아직 부족하다.

RBL-2H3 세포는 점막형 비만세포의 특징을 나타내고 세포막 표면에 수많은 IgE 수용체를 발현하고 있어 IgE 항체에 감작된 후 항원에 반응하여 histamine을 분비한다. β-hexosaminidase는 비만세포의 분비과립에 저장되어 있다가, 비만세포가 면역학적으로 활성화 될 때 histamine과 함께 부수적으로 분비되므로 β-hexosaminidase의 활성화는 비만세포의 탈과립의 표지인자로서 사용된다[4-6]. 비만세포에 의해 분비된 histamine은 알레르기 초기 반응의 탈과립을 나타내는 주요 인자이며, RBL-2H3 세포는 알레르기 반응을 측정하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 *in vitro* 모델이다. IL-4, IL-13, TNF-α등 Type2 cytokine이 eosinophil과 mast cell, β-세포 등을 활성화 시켜 IgE 생성을 촉진시키고 염증세포들을 유도하여 만성 염증질환을 일으킨다. IL-4는 제 I 형 알레르기 반응의 매개체인 IgE와 비만세포 매개성 면역반응의 조절자로 IL-4의 증가는 알레르기의 발생에 중추적인 것으로 알려져 있다[21]. TNF-α는 전구염증인자로서 비만세포와 대식세포 등에서 생성되어 많은 염증반응을 유발하는 인자로 알려져 있으며, 비만세포에서 유리된 TNF-α는 국소의 혈관내피세포에 작용하여 국소 알레르기 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다[22]. 이에 본 연구는 현삼 에탄올추출물의 비만세포(RBL-2H3 basophilic mast cell)에서 β-hexosaminidase 분비억제 및 Type2 cytokine IL-4, TNF-α 생성억제를 조사하여 현삼 에탄올추출물이 알레르기 반응 조절에 미치는 영향을 확인 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 시료의 제조

본 실험에 사용한 현삼은 대구약령시에서 구입하여 실험재료로 사용하였다. Fig. 1과 같이 현삼 300g을 70% 에탄올을 시료 중량의 10배를 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출 하였고, 얻어진 여액은 여과 (Whatman NO. 5) 및 감압 농축(Rotary vaccum evaporatory)하여 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용 하였다. 동결건조 추출물은 96g을 얻었으며, 수율은 32%였다.

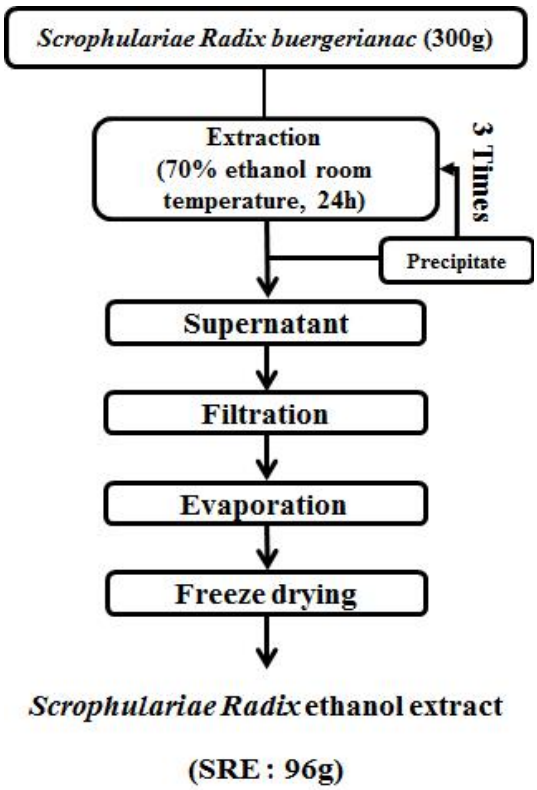

Fig. 1. The procedure for extraction from Scrophulariae Radix.

2) 시약 및 기기

실험에 사용되어진 전 배양 및 본 배양을 위한 액체배지는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) fetal bovine serum (FBS), trypsin 250, 0.4% trypan blue stain은 Gibco

(New York, USA)에서 구입하여 사용하였다. mouse dinitrophenyl (DNP)-specific IgE(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), DNP IgE (Sigma-Aldrich), DNP-bovine serum albumin (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA), IL-4, TNF-α ELISA kit(R&D Systems Inc), p-nitrophenyl N-acetyl-beta-D-glucosamine(Sigma-Aldrich) 그 외 각종 시약은 특급 시약을 사용하였다. 실험에 사용되어진 기기는 microplater reader(Bio-Rad, USA), rotary evaporator (Eyela, Tokyo, Japan), vaccuo freeze-dryer(Eyela, Tokyo, Japan) 등이다.

2. 방법

1) 세포배양

RBL-2H3 (rat basophilic leukemia cell line)은 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, KCLB No. 22256)에서 분양받아 배양하였다. 세포의 배양을 위하여 10% heat-inactivated FBS (Gibco BRL, USA)과 1% penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL, USA)을 포함한 DMEM (Gibco BRL, USA)에서 배양하였다 세포는37℃, 5% CO_2 조건하에서 배양하였고 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution(GibcoBRL, USA)을 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대배양 하였다.

2) MTT assay

SRE의 RBL-2H3 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Camichael 등[23]에 따라 측정하였다. RBL-2H3 cells (1×10^6 cells/well)을 96 well culture plate에 180 ㎕ 분주하고 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양한 다음, 시료를 농도별 (1, 5, 10, 50, 100, 500 ㎍/㎖)로 20 ㎕ 처리한 후 24시간동안 반응시켰다. 대조군은 시료와 동량의 멸균수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 무혈청 배지로 교체한 후 MTT(5 ㎎/㎖) 용액 20㎕를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO : Ethanol (1 : 1) 150 ㎕를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 550 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

3) β-hexosaminidase release assay

알레르기 즉시반응의 지표인 탈과립 억제효과를 확인하기 위해 β-hexosaminidase를 측정 하였다. RBL-2H3 cells을 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate에 2×10^5 cells/㎖의 세포수가 되도록 분주한 후 dinitrophenyl-ImmunoglobulinE (DNP IgE)(20 ng/㎖)로 감작하고 37℃ 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 각 세포들을 Siraganian buffer(159 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6mM glucose, 0.4 mM $MgCl_2$, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, 1mM $CaCl_2$, 0.1% BSA, pH 7.2)로 2번 세척한 다음 37℃ 5% CO_2 incubator에서 10분간 반응시킨 후 SRE를 농도별 (10, 50, 100, 500 ㎍/㎖)로 처리하여 30분 동안 반응시켰다. 이후 항원 DNP-BSA(25 ng/㎖)을 가하여 10분 반응시키고 ice bath에서 5분 방치한 후 반응을 종결시켰다. 상층액 40 ㎕ 를 96 well plate에 옮기고 substrate buffer(4-p-Nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide 2 mM, sodium citrate 0.05 M, pH4.5) 40 ㎕를넣고 37℃에서 1시간 배양시킨 다음 각well당 stop solution 200 ㎕를 첨가하여 반응을 종결시켰다. Microplate reader(Molecular Devices Co. Ltd.,USA)를 사용하여 405 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

4) IL-4 and TNF-α secretion assay

RBL-2H3 cells를 10% FBS를포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate에 2×10^5 cells/㎖의 세포수가 되도록 분주한 후 anti-DNP-IgE (20 ng/㎖)로 감작하고 37℃ 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 배지교환 후 SRE를 농도별(10, 50, 100 ㎍/㎖)를 처리하여 1시간동안 37℃ 5% CO_2 incubator에서 배양한 후 DNP-BSA (25 ng/㎖)를 처리하여 4시간동안 자극시키고 ice bath에서 반응을 종결시켰다. 배양이 끝난 상층액을 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상층액을 96-well plate에 옮기고 IL-4, TNF-α ELISA kit(R&D systems, USA)를 사용하였으며 microplater reader(Bio-Rad, USA), 450㎚에서 흡광도를 측정하였다.

5) 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 SPSS 17.0K for Windows 통계프로그램 패키지를 사용하여 평균치±표준편차로 나타내었고 유의수준은 $p<0.05$로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 one way-ANOVA와 Dunett test 검정을 실시하였다

Ⅲ. 결 과

1. RBL-2H3의 세포독성 측정결과

RBL-2H3 세포에서 SRE의 생존 및 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay 측정 결과, Fig. 2 에서와 같이 SRE를 첨가하지 않은 대조군의 경우 세포 생존율은 109.3% 였으며, SR을 10, 50, 100, 500 ㎍/㎖ 농도로 처리하였을 때 각각 101.3%, 101.1%, 98.8%, 97.8% 으로 현삼 에탄올추출물은 RBL-2H3 세포에서 500 ㎍/㎖ 농도까지 처리하였을 때 독성이 미미한 것으로 확인 되었다. 따라서 이후 실험에서는 세포 생존 및 증식에 영향을 미치지 않는 농도범위인 500 ㎍/㎖ 이하 농도에서 수행하였다.

2. β-hexosaminidase 측정결과

SRE의 RBL-2H3 비만세포의 탈과립에 미치는 효과를 확인하기 위해 IgE로 부터 감작된 비만세포에서 유리된 히스타민의 양을 측정하는 것이 일반적이나 비만세포에서 분비되는 히스타민의 농도가 낮고 측정과정이 복잡하여 항원-항체 반응에 의한 β-hexosaminidase 농도를 측정 하였다. β-hexosaminidase는 호염구나 비만세포의 히스타민이 저장된

과립 안에 존재하여 알레르기 반응에 의해 세포 밖으로 분비되므로 탈과립의 지표로 이용되며 알레르기 억제물질의 측정에 이용된다.SRE가 β-hexosaminidase 유리에 미치는 영향을 RBL-2H3 세포에서 확인 한 결과, Fig 3. 과 같이 DNP-IgE와 DNP-BSA에 의해 활성화된 control군 세포에서 분비된 탈과립의 억제능을 0%로 볼 때 SRE 500, 100, 50, 10, ㎍/㎖ 농도에서 41.01 ± 0.05, 40.28 ± 0.05, 34.62 ± 0.04 및 31.2 ± 0.03의 억제효과를 확인하였다.SRE 첨가량의 농도가 증가하면서 β-hexosaminidase 분비량이 감소하는 양상을 나타내었다.

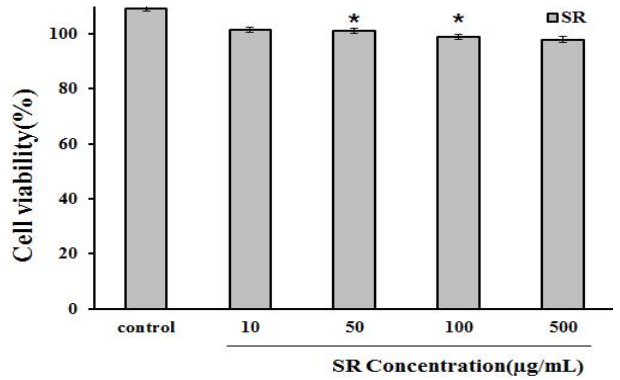

Fig. 2. Effects of SRE on the cell viability and cytotoxicity of RBL-2H3 cells.
RBL-2H3 cells(1×10^6 cells/㎖) were treated with the indicated concentrations(10, 50, 100, 500 ㎍/㎖) of SRE for 1h. Cell viability was evaluated using a colorimetric assay based on MTT assay. The absorbance was measured at 550 mn using ELISA reader. Each values represents mean ± S.D. of three individual experiments.

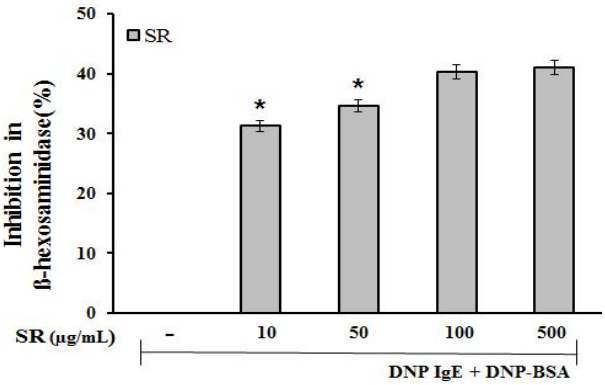

Fig 3. Ability of SR to inhibit β-hexosaminidase release of IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells.
SRE : Scrophulariae Radix ethanol extracts. Each values represents mean ± S.D. of three individual experiments.

3. IL-4 and TNF-α secretion assay

활성화된 비만세포로부터 분비되는 염증사이토카인인 IL-4와 TNF-α에 대한 SRE의 효과를 확인하기 위해 세포배양액으로부터 IL-4, TNF-α의 농도를 ELISA kit을 사용하여 측정하였다. 그 결과, Fig 4. 5.에서와 같이 RBL-2H3에서 분비된 IL-4의 양은 DNP-IgE와 SRE 모두 처리하지 않은 세포에서 5.42 ± 1.13 pg/㎖이 였으며, DNP-IgE으로 자극한 세포는 29.9 ± 0.89 pg/㎖로 분비된 IL-4의 양에 유의한 차이가 있음을 확인 하였다. DNP-IgE 자극 및 SRE 10, 50, 100 ㎍/㎖을 첨가한 세포에서는 각 20.6 ± 1.89 pg/㎖, 18.5 ± 2.36 pg/㎖, 12.7 ± 2.88 pg/㎖의 IL-4 분비 억제능을 확인하였으며, SRE를 첨가하지 않은 대조군에서 29.9 ± 0.89 pg/㎖의 IL-4 농도에 비해 낮은 억제 효과를 확인 하였다. 또한, TNF-α 억제 효과는 정상세포에서 TNF-α의 농도가 3.89 ± 1.19 pg/㎖로 측정되었으며, DNP-IgE에 의해 활성화됨으로써 TNF-α의 농도가 29.20 ± 0.98 pg/㎖로 증가되었다. 또한 SRE 10, 50, 100 ㎍/㎖ 농도로 처리하였을 때 각각 21.56 ± 1.56 pg/㎖, 17.1 ± 2.41 pg/㎖, 11.25 ± 1.14 pg/㎖로 TNF-α 의 분비가 감소함으로써 SRE가 활성화된 비만세포에서 염증반응에 억제 효과가 있음을 확인 할 수 있었다.

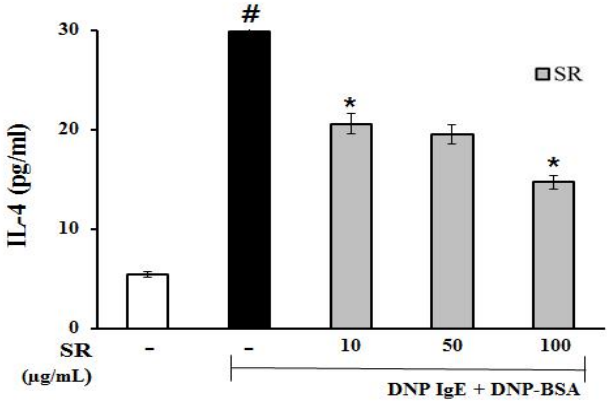

Fig. 4. Effect of modified SRE on IgE-antigen complex-induced production of IL-4 from RBL-2H3 cells.
Cells were incubated with anti-DNP-IgE (20 ng/㎖) for overnight, treated with modified SRE (10, 50, 100 ㎍/㎖) for 1 h, and then stimulated with DNP-BSA (25 ng/㎖) for 4 h. The levels of IL-4 in culture supernatant was measured by enzyme-immunoassay. Each values represents mean ± S.D. of three individual experiments. Each values represents mean ± S.D. of three individual experiments. Results represent as the mean±SD. #p <0.05 vs vehicle group, *p<0.05 vs stimulated group.

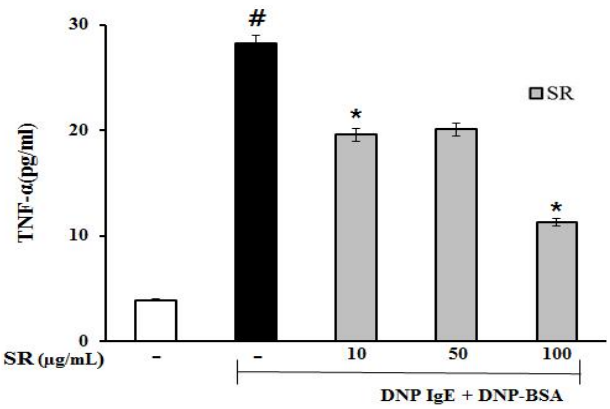

Fig. 5. Effect of modified SRE on IgE-antigen complex-induced production of TNF-α from RBL-2H3 cells.
Cells were incubated with anti-DNP-IgE (20 ng/㎖) for overnight, treated with modified SRE (10, 50, 100 ㎍/㎖) for 1 h, and then stimulated with DNP-BSA (25 ng/㎖) for 4 h. The levels of TNF-α in culture supernatant was measured by enzyme-immunoassay. Each values represents mean ± S.D. of three individual experiments. Each values represents mean ± S.D. of three individual experiments. Results represent as the mean±SD. #p<0.05 vs vehicle group, *p<0.05 vs stimulated group.

Ⅳ. 고 찰

현삼의 약리작용으로는 항불안 작용[10], 항균작용[11], 혈압강하 작용[12], 항알레르기 작용[13], 아토피 발진 억제 작용[14], 갑상선기능항진증 억제 효과[15], 항산화효과[16], 항치매작용[17], 항당뇨효과와 항염증효과[18], 간세포 보호 효과[19], 상처치유효과[20] 등이 보고되어 있으며, 본초로 解熱, 消痰, 連珠瘡, 咽喉炎, 婦人腰痛, 寶血에 사용하며 자음청열 (滋陰淸熱), 해독활장(解毒滑腸), 치열병상음 (治熱病傷陰), 자음강화 (滋陰降火)등의 효능이 있다고 알려져 있다. 알레르기 질환은 비정상적인 면역학적 기전에 의해 발생되는 과민반응의 일종으로 알레르기 초기 반응은 주로 알레르겐 자극에 의해 비만세포나 호염구로부터 히스타민이나 proteoglycan 같은 화학매개물질들이 저장된 분비성 과립으로부터 방출됨으로써 아라키돈산 대사산물이나 cytokine(IL-4, TNF-α, GM-CSF)의 합성과 분비 촉진으로 만성 염증성 알레르기 반응이 유발되게 된다[23-25]. 따라서 활성화된 비만세포로부터 분비되는 화학매개물질들과 염증 사이토카인을 조절하는 것은 알레르기 질환의 발병과 진행을 막을 수 있는 치료 전략이 될 수 있다. IL-4와 TNF-α은 비만세포에 의해 저장되고 분비되는 주요한 cytokine이다. TNF-α는 비만세포에 의해 분비되고 저장되는 주요 cytokine으로 내피세포와 상피세포 부착분자를 증가시키고, 기도 과민성을 증가시킨다. IL-4는 IgE 합성과 즉시형 과민반응을 유발할 수 있으며, IgE 생산을 위한 B세포를 전환시키고, 내피세포의 vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 발현, Th2 세포와 호산구 분화에 필수적인 IL-5의 분화를 유도한다[26]. 본 연구에서 사용한 RBL-2H3 세포는 흰쥐의 중성구에서 유래한 비만세포이며 세포 표면에 IgE 수용체가 있어 IgE 자극에 의한 사이토카인의 발현, 히스타민의 방출, 염증물질 분비 등 사람의 비만세포와 유사한 특징을 나타내기 때문에 알레르기 질환에서의 항염증, 항알러지 소재 개발연구에 많이 사용하고 있다[27]. 알레르기 질환의 약물치료는 주로 비만세포 안정화, 비만세포 탈과립 억제, 비만세포로 부터 히스타민 유리 억제 등 주로 비만세포 조절과 관련된 약물들로 항히스타민제, 항알레르기제, 항염증제, 화학매체에 대한 길항제 등 다양하게 사용하고 있다, 그러나 현재까지도 일시적인 증상개선은 가능하나 근본적인 치료가 되지 않고 있는 실정이며 부작용도 다양하게 보고되고 있다[28]. 따라서 최근에는 한약을 이용하여 면역기능을 조절하거나 강화시킴으로써 원인 치료제를 개발하려는 노력이 많이 이루어지고 있다[29,30]. 현삼에서 항염 효과에 대한 연구는 LPS로 유발된 대식세포의 염증인자에 미치는 영향[31]이 보고되어 있으나, RBL-2H3 비만세포에 대한 탈과립 및 다양한 염증매개인자들에 대한 연구는 부족한 것으로 판단되었다. 본 연구에서는 비만세포(RBL-2H3 basophilic mast cell)에서 현삼의 알레르기 반응조절에 미치는 영향을 확인 하였다. 현삼 에탄올추출물(SRE)이 RBL-2H3 세포에서 500 ㎍/㎖ 농도까지 처리하였을 때 세포 생존 및 증식에 영향을 미치지 않는 것으로 확인 되어 SRE 500 ㎍/㎖ 이하의 농도에서 각 실험을 진행하였다. RBL-2H3 비만세포에서 알레르기 반응에 의해 세포밖으로 분비되어 탈과립의 지표로 이용되는 β-hexosaminidase 억제 효과에서 SRE 500, 100, 50, 10, ㎍/㎖ 농도에서 41.01 ± 0.05, 40.28 ± 0.05, 34.62 ± 0.04 및 31.2 ± 0.03의 억제효과를 확인 하였다. SRE의 농도가 증가함에 따라 억제효과도 증가하였다. IL-4와 TNF-α는 비만세포에 의해 저장되고 분비되는 중요한 cytokine 이다. DNP-IgE 자극으로 활성화된 비만세포로부터 합성, 분비되는 IL-4와 TNF-α를 SRE 10, 50, 100 ㎍/㎖을 첨가한 세포에서 각 20.6 ± 1.89 pg/㎖, 18.5 ± 2.36 pg/㎖, 12.7 ± 2.88 pg/㎖의 IL-4 분비 억제능을 확인 하였으며 SRE를 첨가하지 않은 대조군에 비해 유의한 억제 효과를 확인 하였다. 또한, TNF-α 억제 효과는 정상세포에서 TNF-α의 농도가 3.89 ± 1.19 pg/㎖로 낮게 측정되었으며, DNP-IgE에 의해 활성화됨으로써 TNF-α의 농도가 29.20 ± 0.98 pg/㎖로 증가되었다. 또한 SRE 10, 50, 100 ㎍/㎖ 농도로 처리하였을 때 각각 21.56 ± 1.56 pg/㎖, 17.1 ± 2.41 pg/㎖, 11.25 ± 1.14 pg/㎖로 TNF-α의 분비가 농도 의존적으로 감소한것으로 나타났다. 이와 같이 SRE가 RBL-2H3에서 생존 및 증식에 미치지 않으면서 비만세포의 탈과립 및 염증매개 관련 cytokin을 생성을 억제하는 것은 알레르기 및 염증반응 완화에 효능이 있음으로 판단된다. 본 연구를 바탕으로 염증질환에 효과적인 한약재 개발을 위해 현삼에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 여겨지는 바이다.

Ⅴ. 결 론

현삼 에탄올추출물(SRE)의 항알레르기 효과를 확인하기 위해 DNP-IgE 자극으로 활성화된 RBL-2H3 비만세포에서의 알레르기 염증반응에 대한 억제효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SRE은 RBL-2H3 비만세포에서 500 ㎍/㎖ 농도까지 세포 독성이 나타나지 않았다.

2. DNP-IgE-BSA 자극에 의해 활성화된 비만세포로부터 분비되는 beta-hexosaminidase를 측정 한 결과, SRE 500 ㎍/㎖ 농도 첨가된 세포에서 41.01 ± 0.05 % 의 저해효과를 확인 하였으며 시료의 농도가 증가함에 따라 beta-hexosaminidase의 양이 감소하는 것을 확인 하였다. 이 결과는SRE가 비만세포에서 초기 염증반응을 억제 할 수 있는 효과를 가지고 있음을 의미한다.

3. SRE가 첨가된 활성화된 비만세포에서 cytokine IL-4, TNF-α 분비를 농도 의존적으로 감소시킴으로써 이결과는 비만세포에서 후기 염증반응을 억제에도 관여하는 것으로 판단된다.

따라서 SRE은 활성화된 비만세포로부터 탈과립 현상을 막아 히스타민, beta-hexosaminidase, IL-TNF-α 등의 화학매개물질의 분비를 유의적으로 억제함으로써 알레르기 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 나타났다.

References

1. Baroody FM, Naclerio RM. Antiallergic effects of H_1-receptor antagonists. *Allergy*. 2000 ; 55(64):17-27.
2. Moon PD, Na HJ and Kim HM. Action of enzyme food, Green Life Enzyme of systemic and local ana-phylaxis. *J OPEM*. 2003 ; 3(1) : 46-50.
3. Sin TY. allergy and Oriental medicine, Sin-il, seoul 2010 ; p. 13.
4. Schwartz LB, Lewis RA, Seldin D, Austen KF. Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. *J Immunol*. 1981 ;1 26(4) : 1290-4.
5. Marquardt DL, Wasserman SI. Modulation of rat serosal mast cell biochemistry by in vivo dexamethasone administration. *J Immunol*. 1983 ; 131(2) : 934-9.
6. Mastuda H, Morikawa T, Ueda K, Managi H, Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-Induced degranulation, TNF-α and IL-4 production from RBL-2H3 cells. Bioorg Med Chem. 2002 ; 10(10) : 3123-8.
7. Lee MY, Seo CS, Lee JA, Lee NH, Kim JH, Ha HK, Zheng MS, Son JK, Shin HK. Anti-asthmatic effects of Angelica dahurica against ovalbumin-induced airway inflammation via upregulation of heme oxygenase-1. *Food Chem Toxicol*. 2011 ; 49(4) ; 829-837.
8. Vo TS, Kong CS, Kim SK. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on degranulation and cyt kine generation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. Carbohyd Polym 2011 ; 84(1) : 649-655.
9. Lee SH, Bae EA, Park EK, Shin YW, Baek NI, Han EJ, Chung HG, Kim DH. Inhibitory effect of eupatilin and jaceosidin isolated from Artemisia princepsin IgE-induced hypersensitivity. *Int Immunopharmacol*. 2007 ; 7(13) : 1678-1684.
10. Choi YH, Jung JW. Anxiolytic-like Effects of Scrophularia buergeriana Miquel Using the Elevated Plus-Maze in Mice - Involvement of GABAergic Nervous System. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2010 ; 24(3) : 476-483.
11. Yook KD. Antimicrobial activity and cytotoxicity test of Scrophularia ningpoensis hemsl extracts against Klebsiella pneumoniae. *Journal of The Korea Society of Computer and Information*. 2016 ; 21(5) : 135-139.
12. Park KH, Ham IH, Choi HY. Hypotensive Effect of Scrophularia buergeriana and Gene Analysis of Scrophularia Species. *J of Herbology*. 2008 ; 23(2) : 213-23.
13. Song JS, Lee JC, Choi JH, Kim JH, Park SY. Effects of Scrophulariae Radix (SR) on Allergic Contact Dermatitis (ACD) induced by DNCB in mice. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*. 2011 ; 24(3) : 1-16.
14. Yeo EJ, HAN JK, Kim YH. Inhibitory Studies of Scrophulariae Radix on Development of Dermatitis in NC/Nga Mice. *J Korean Oriental Pediatrics*. 2007 ; 21(2) : 13-34.
15. Park CU, Cho CS, Kim CJ. The Effects of Radix Scrophulariae on the Hyperthyroidism of Rats. *J Korean Oriental Med*. 2006 ; 27(3) : 178-186.
16. Park YK, Kang BS. Effects of Scrophulariae radix on Antioxidation in Rat' s live. *J of Herbology*. 1998 ; 13(1) : 201-20.
17. Kim SR, Kang SY, Lee KY, Kim SH, Markelonis GJ, Oh TH, Kim YC. Anti-amnestic activity of E-Pmethoxycinnamic acid from Scrophularia buergeriana. *Cognitive Brain Research*. 2003 ; 17(2) : 454-61.
18. Ahmed B, Al-Rehaily AJ, A1-Howiriny TA, El-Sayed KA, Ahmad MS. Scropolioside-D2 and harpagoside-B : two new iridoid glycosides and antiinflammatory activity. *Biol. Pharm. Bull*. 2003 ; 26(4) : 462-7.
19. Lee EJ, Kim SR, Kim J, Kim YC. Hepatoprotective Phenylpropanoids from Scrophularia buergeriana roots against CCl4-Induced toxicity: Action mechanism and structure-activity relationship. *Planta Med*. 2002 ; 68(5) : 407-11.
20. Tohda C, Kakihara Y, Komatsu K, Kuraishi, Y. lnhibitory effects of methanol extracts of herbal medicines on substance P-induced itch-scratch response. *Biol. Pharm. Bull*. 2000 ; 23(5) : 599-601.
21. Iikura M, Yamaguchi M, Hirai K, Miyamasu M, Yamada H, Nakajima T, et al. Regulationof surface FcepsilonRI expression on human eosinophils by IL-4 and IgE. International Achives of Allergy & Immunology. 2001 ; 124(4) : 470-7.
22. Govan A, Macfarlane P, Callander R, Lee JD. Pathology illustrated. 2nd ed. Seoul : Koryeohwahak. 1991 : 29.
23. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*. 1987 ; 47(4) : 936-942.
24. Park YJ. Allergy drug developments. *KISTI. Seoul : KISTI*. 2006 : 1-5.
25. Brown JM, Wilson TM, Metcalfe DD. The mast cell and allergic diseases : role in pathogenesis and implications for therapy. Clin. Exp. Allergy 2008 ;

38 : 4-18.
26. Hu ZQ, Zhao WH, Shimamura T. Regulation of mast cell development by inflammatory factors. Curr Med Chem. 2007 ; 14(28) : 3044-50.
27. Gordon JR. Burd PR. Galli SJ. Mast cells as a source multifunctional cytokines. Immunol. Today. 1990 ; 11 : 458-64.
28. Song Z, Casolaro V, Chen R. Georas S.N, Monos D, Ono, S.J, Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene. *J Immunol* 1996 ; 156(2) : 424-429.
29. Egle P, Neil F. The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell. *Inflamm Res*. 2009 ; 58(11) : 737-45.
30. Kim D, Kim SH, Park EJ, Kang CY, Cho SH, Kim S. Anti-allergic effects of PG102, a water-soluble extract prepared from Actinidia arguta, in a murine ovalbumin-induced asthma model Clin Exp *Allergy*. 2009 ; 39(2) : 280-9.
31. Ahn K. Role of mast cells in allergic inflammation and innate immunity. *Kor J Pediatrics*. 2004 ; 47(11) : 1137-1141.