

## 토종과 중국도입종간 꾸지뽕잎의 항알레르기작용 비교

김광연<sup>1#</sup>, 하미애<sup>2</sup>, 신용욱<sup>1,2\*</sup>

1 : 경남과학기술대학교 식물자원학과, 2 : 농학 · 한약자원학부

### Comparison on anti-allergic activities of leaves from Domestic and Chinese species of *Cudrania tricuspidata*

Kwang-Yeon Kim<sup>1#</sup>, Mi-Ae Ha<sup>2</sup>, Yong-Wook Shin<sup>1,2\*</sup>

1 : Dept. of Plant Resources, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea

2 : Department of Agronomy & Medicinal Plant Resources, Gyeongnam national University of Science and Technology, Jinju 52725, Republic of Korea

#### ABSTRACT

**Objectives** : This study was performed to compare the effect of two *Cudrania tricuspidata* cultivars; Sancheong native (CT) and varieties in china(SCT) on immediate hypersensitivity of the anaphylactic type and Ova-induced allergic asthma mouse model by calculating serum cytokines and IgE.

**Methods** : We investigated the free radical scavenging effect and quantify total phenol contents and total flavonoids of two *Cudrania tricuspidata* cultivars; Sancheong native(CT) and varieties in china(SCT). The sample was extracted by 80% EtOH. To induce the allergic asthma, in the control group and the CT group, mice of each group were sensitized intraperitoneally with ovalbumin (OVA) solution at the 1st, the 7th and the 14th day. After then, sensitization was performed by aerosol allergen challenges with 1% OVA solution intratracheally at the 21th, the 23th, 25th and the 27th day. At the 29th day, the mice were killed and the changes of interferon- $\gamma$ , interleukin-4, 5 and 10, total IgE and OVA-specific IgE in serum were checked.

**Results** : CT inhibited compound 48/80-induced systemic anaphylaxis 90% with a dose of 100 mg/kg body weight at 1 hr before injection of compound 48/80. In the allergic asthma mouse model, IFN- $\gamma$  was did not increased in the CT and SCT group than that in the control group. IL-4, IL-5, the total IgE and OVA-specific IgE were decreased in the CT group as compared with the control group and these results were statistically significant.

**Conclusions** : Considering the above experimental results, this study showed that Sancheong native cultivar could reduce the allergic reaction.

**Key words** : compound 48/80, *Cudrania tricuspidata*, OVA-specific IgE, allergic asthma

## I. 서 론

꾸지뽕나무 *Cudrania tricuspidata* Bureau 는 뽕나무과 (Moraceae)갈잎큰키나무로 뿌리는 황색이고 가지에는 가시가 있다. 열매는 수과로 다육질이며 9월에 검게 익는다<sup>1)</sup>. 꾸지뽕

나무의 잎가지와 잎은 자수경엽(柞樹莖葉)으로 불리며 청열해독(淸熱解毒), 서근활락(舒筋活絡)의 효능이 있다고 하였으며 특히 《天目山藥用植物誌》 아토피 피부염과 관련된 증상 ‘治小兒身熱 皮膚生惡瘡’에 꾸지뽕잎을 달여 외용한다고 전해진다<sup>2)</sup>. 피부질환과 관련된 가능성을 시사한 보고에 의하면 꾸지뽕 잎

\*Corresponding author : Yong-Wook Shin, Department of Agronomy & Medicinal Plant Resources, Gyeongnam national University of Science and Technology, Jinju 52725, Republic of Korea.

· Tel : +82-55-751-3226 · Fax : +82-55-751-3229 · E-mail : ywsynn@gntech.ac.kr

#First author : Kwang-Yeon Kim, Dept. of Plant Resources, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea.

· Tel : +82-55-751-3694 · Fax : +82-55-751-3229 · E-mail : yeone69@hanmail.net

· Received : 18 March 2019 · Revised : 09 May 2019 · Accepted : 25 May 2019

메탄을 추출물의 EtOAc 분획에서 항균활성 및 소염작용을 확인한 뒤 kaempferol 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside을 분리하여 보고 한 바 있다<sup>3)</sup>. 꾸지뽕 잎에서 강력한 항산화효과를 지닌 dihydroquercetin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, dihydrokaempferol 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside, quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside를 분리<sup>4)</sup>하여 보고 된 바 있다. 꾸지뽕나무 잎 추출물은 우수한 항산화활성을 가질 뿐만 아니라 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 알코올로 유도된 간 손상으로부터 간세포 보호활성을 나타내어 산화적 스트레스에 의한 간 손상으로부터 간세포 보호효과가 보고<sup>5)</sup>된 바 있다. 꾸지뽕잎에는 quercetin 및 kaempferol 이 배당체형태로 존재하는 데 잎에 함유된 이들 성분의 건조중량 100 g 당 함량은 각각 57.18 $\pm$ 3.96 mg, 25.53 $\pm$ 1.16 mg을 나타내어 뿌리에 비해 각각 52배 9.5배 많은 것으로 보고된 바 있다<sup>6)</sup>. 이와 관련된 연구로는 고지방식이를 급여한 흰쥐에게 꾸지뽕잎 혼합 분말 식이를 급여한 결과 체지방과 혈청 지질 및 혈당농도의 감소, 그리고 배변량 증가 등으로 인한 지질대사 개선 등을 보고<sup>7)</sup> 한 바 있으며 꾸지뽕잎 80% EtOH 추출물의 Pancreatic lipase IC<sub>50</sub> 가 10 $\mu$ g/ml 미만으로 나타나 지방흡수 저해를 통한 비만억제효과가 입증<sup>8)</sup>되었으며, 이와 더불어 꾸지뽕잎 메탄을 추출물은 COX-2 유전자 발현 저해로 인한 PGE2 생성을 억제함으로써 항염증작용과, HT-29세포를 세포자멸사로 유도하여 대장암 억제효과<sup>9)</sup>를 보고한 바 있다. 꾸지뽕은 식용으로 가능한 잎 이외에도 An<sup>10)</sup> 등은 꾸지뽕나무 수피 MeOH 추출물에서 분리한 cudraflavone B, gericudranin E 이 HepG2 cell에 Tacrine으로 유도한 간독성을 저해한다고 보고하였고 Kang<sup>11)</sup> 등은 꾸지뽕나무 수피 물추출물이 L-NAME 로 유도한 수축기 혈압상승을 억제하였으며 이는 혈관 NO/cGMP생성 증가에 기인한 것으로 보고하여 수피 물추출물의 혈압강화 기전을 보고한 바 있다.

Tian<sup>12)</sup> 등은 꾸지뽕나무 수피 메탄을 추출물에서 분리한 isoprenylated xanthenes 인 cudratricusxanthone A, cudraxanthone L, cudratricusxanthone E, 과 macluraxanthone B, 가 HepG2 cell에 tacrine으로 유도한 간독성을 저해한다고 보고하였다. Park<sup>13)</sup> 등은 꾸지뽕나무 근피에서 분리한 catecholic xanthenes 의 항산화작용으로 인하여 LDL의 산화를 억제함과, 근피유래의 flavonoid는 hACAT-2 를 선택적으로 저해하여 혈청내의 LDL 저해와 장에서의 콜레스테롤 흡수를 억제하여 고지혈증과 동맥경화를 억제함을 시사하였다. Wang<sup>14)</sup> 등은 꾸지뽕 뿌리에서 분리한 isoprenylated xanthone 인 cudrafrutixanthone A 과 toxyloxanthone C 가 *Candida albicans* 균주를 억제하는 항진균작용을 보고하였다.

열매에 대한 연구도 진행되어 Han<sup>15)</sup> 등은 열매 methylene chloride 용해 분획에서 분리한 4'-O-methylalpinumisoflavone이 MAO 저해효과로 항우울 작용 및 파킨슨씨 병에 유효할 것임을 시사했다.

본 연구에서는 꾸지뽕 나무의 부위중에서 식품원료로 사용이 가능한 잎의 약리작용에 대해서 가지없는 토종 꾸지뽕 나무와 중국에서 도입한 가지있는 꾸지뽕 상호간 비교연구를 진행하였다. 특히 알레르기를 유도한 동물모델에서의 알레르기 억제 반응을 비교한 결과 두 식물체 상호간의 유의적인 차가 있어

이에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 시료

본 실험에 사용된 토종 꾸지뽕 나뭇잎은 '산음동의목'으로 품종 등록되어 경남 산청군 생비량면에서 재배 중인 나무를 2014년 5월부터 9월까지 두 달마다 총 3회에 걸쳐 잎을 채취하여 사용하였다. 가지의 유무로 식물간의 특징을 발견하였고, 가지 없는 꾸지뽕나무(CT, 토종 꾸지뽕)의 경우 5월, 7월, 9월 별로 채취 시기별, 멀칭 유무별로 채취 조건을 확립한 뒤 잎을 채취하여 실험의 재료로 사용하였다. 특히 5월 채취분의 경우 잎의 성장세가 크기 때문에 잎의 지름 5 cm를 기준으로 구분하여 분류하였다(Table 1 참조). 가지있는 꾸지뽕(SCT, 중국 도입종)은 관행대로 9월 채취분을 대조군으로 사용하였다. 멀칭은 가지 없는 꾸지뽕나무(CT, 토종 꾸지뽕)의 경우 먼저 멀칭 유무에 따라 M(멀칭)/ N(None, 무멀칭), 채취월에 따라(5, 7, 9) 마지막으로 5월 채취분은 크기에 따라 S(Small)/L(Large) 로 정한 뒤 조합하여 명명하였다(예, 가지없는 토종 꾸지뽕 멀칭한 5월 채취 분 중 잎은 작은 샘플; CTM5S 로 명명).

각각의 꾸지뽕잎은 채취, 건조 후 세절하여 80% 에탄올을 가하여 끓는점에서 2시간 동안 추출한 뒤 whatman (No. 1) filter paper로 감압여과하고, 이를 rotary evaporator로 감압 농축하여 얻은 점조상의 추출물을 동결 건조기에서 건조 (PVTFA10AT, Ilsin, Suwon, Korea)하여 시료를 제조하였다.

Table 1. Nomenclature of testing materials

Name	Scientific name	Mulching (6, 5 ounce felt)	Month of Harvesting leaves	Thorn
CTM5S		O	May	ND
CTN5S		×	May	ND
CTM5L		O	May	ND
CTN5L		×	May	ND
CTM7	<i>Cudrania tricuspidata</i>	O	July	ND
CTN7		×	July	ND
CTM9		O	Sept	ND
CTN9		×	Sept	ND
SCT		×	Sept	O

#### 2) 동물

본 실험에서는 체중 20 $\pm$ 2 g의 male ICR mouse 4주령을 주식회사 코아텍(경기도, 한국)에서 제공받아 항온(22 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C), 항습(55 $\pm$ 3%)과 12시간 명암주기(오전 8시 점등, 오후 8시 소등)가 유지되는 사육장 환경에서 4마리씩 polycarbonate mice cage에 수용하여 7일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

### 3) 시약

Compound 48/80, Evans Blue, Ovalbumin (OVA)과 ketotifen, H&E 염색 시약은 Sigma-Aldrich사(St Louice, CA, USA)로부터 구입하였으며, Al(OH)<sub>3</sub> gel(InvivoGen, San Diego, USA), Superoxide Dismutase(SOD) assay kit (Cayman, michigan, USA), Mouse IgE ELISA kit(BD, San Diego, USA), 또한 실험기기로는 Rotary Evaporator (Eyela, Japan), 동결 건조기(FD 5508, Ilshin Lab, Korea), Digimatic Micrometer (Mitsutoyo Co., Tokyo, Japan), nebulizer(Clenny 2 Aerosol, Medel, Italy), microplatereader (Anthos2020, asys Hitech GmbH, austria), Microtome RM2145, Microscope (LEICA, Germany) 등을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) DPPH 라디칼 소거 활성

꾸지뽕잎 추출물의 항산화력을 측정하기 위해 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 자유기 소거능 측정 Blois법<sup>17)</sup>에 따라 측정하였다.

### 2) 총페놀, 총플라보노이드 함량 분석

총페놀화합물 함량은 Folin-denis 방법<sup>18)</sup>에 의해, 총플라보노이드 함량분석은 Lister 등<sup>19)</sup>의 방법에 따라 실험하였다.

### 3) 전신성 아나필라시스

Amir 등<sup>20)</sup>의 방법에 따라 실험하였다. 즉, 비만세로의 탈과립제로 compound 48/80(8 µg/g, 체중)을 생쥐 복강내에 투여하기 60분 전에 생리식염수로 조제한 꾸지뽕 추출물을 경구로 투여하였다. 치사율은 아나필라시스를 유발 시킨 후 60분 동안 관찰하였다.

### 4) Compound 48/80 으로 유도한 혈관투과성 억제작용

Compound 48/80 으로 유도한 혈관투과성 억제작용은 Sugimoto<sup>21)</sup> 법을 약간 변형하여 행하였다. 즉, 시료를 농도별로 경구투여하고 1시간 뒤에 Compound 48/80 50µg을 생쥐의 등에 피내주사한 뒤 즉시 꼬리정맥에 Evans Blue 1%를 포함한 생리식염수를 주사하여 1시간 뒤에 치사시켰다. Evans Blue 로 염색된 피부부위(1 × 1 cm)를 잘라 KOH 1 ml를 가하고 37℃에서 익일 배양한 다음 인산과 아세톤 (5:13)의 혼합액을 가하여 색소를 추출한 후 spectrophotometer 로 620 nm에서 색소량을 정량한 후 색소투과 억제율을 산출하였다.

$$\text{색소투과억제율 (\%)} = \left(1 - \frac{D_c - D_t}{D_c}\right) \times 100$$

D<sub>c</sub> : 대조군의 색소투과 증가량

D<sub>t</sub> : 약물투여군의 색소투과 증가량

### 5) TPA 유도의 귀부종억제 효과

TPA 로 유도된 피부부염 억제작용을 측정하기 위해 Park 등<sup>22)</sup>의 방법에 준하여 5주령 웅성 ICR 마우스 귀에 아세톤에 녹인 TPA(0.15 µg/µl)를 20 µl 도포하였다.

### 6) OVA 유도 기관지 알레르기 질환 억제효과

Gong<sup>23)</sup> 등의 방법에 준하여서 난알부민(OVA)으로 알레르기 면역반응이 유도된 동물모델을 제작하였다. 먼저 난황 발부민(chicken egg albumin, grade V) 0.2 % 함유 용액에 수산화알루미늄겔[Al(OH)<sub>3</sub> gel]을 1:1로 혼합한 액을 0.2 ml 복강투여로 최초 감작시키고, 복강투여 후 14일에 최초감작과 같은 방법으로 재 감작시킨다. 최초 복강투여 21일부터 30일까지 10일간 매일 네블라이저를 이용하여 1 %의 OVA를 1시간 흡입시켰다. 마지막 분무를 시행한 12시간 후에 케타민(1 mg/kg)을 마우스의 복강 내에 주사하여 마취하여, 개복하여 대정맥으로부터 혈액을 채취했다. 채취한 혈액은 4℃에서 2~4시간 보관 후 원심분리(1,200 g, 15분)를 시행하여 혈청을 분리하고 혈청은 -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다

#### 6-1) 혈청을 이용한 측정

##### (1) Serum-total IgE level

채취한 혈액에서 분리한 혈청에서의 총 IgE양을 ELISA kit (Mouse IgE ELISA Set Cat, No. 555248, BD)로 정량하였다. Capture 항체를 coating 완충용액에 희석하여 96-well에 코팅하고 4℃에서 20시간 배양한다. 각 well을 3회 세척하고 혈청(2배 희석)을 100 µl씩 분주하고, 2시간 동안 실온에서 배양한다. 5회 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 µl를 처리하고, 1시간 실온에서 배양하고, 다시 세척하고, 여기에 TMB 기질을 100 µl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 µl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정했다.

##### (2) Serum-OVA-specific IgE level

분리한 혈청에서 OVA-specific IgE level을 측정하기 위하여 ELISA로 측정하였다. 항원으로 OVA 20 µg/ml의 농도로 코팅완충용액에 희석하여 96-well에 코팅하고 4℃에서 20시간 방치하고, 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 혈청(2배희석)을 100 µl씩 분주했다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 5회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 µl를 처리하고, 1시간 실온에서 방치하고 이어서 세척했다. 여기에 TMB 기질을 100 µl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 µl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정했다.

##### (3) IL-4, 6, 10 및 IFN-γ, TNF-α level 측정

위에서 얻은 혈청의 IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α의 양은 ELISA kit(Assay Designs, Ann Arbor, MI)를 이용하여 측정했다.

## 8. 통계학적 검정

실험결과는 3회 반복실험에 대한 평균과 표준편차(mean ± SD)로 나타내었으며, 통계학적 유의성 검증은 GraphPad Prism5.0 분석프로그램의 one-way ANOVA와 Tukey's test를 이용하였고, p값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

### Ⅲ. 결 과

토종 꾸지뽕잎과 중국 도입종 꾸지뽕은 외부성상에서 유의적인 차이가 있다. 줄기에 가시의 유무로써 구분하는데 가시가 없는 것이 토종이고 가시가 있는 것이 중국도입종이다. 이에 대한 정확한 식물 동정을 위해서 계통판별용 마커를 이용하여 두 식물체를 비교한 뒤 실험에 사용하였다<sup>24</sup>. 꾸지뽕잎의 수집 종간, 채취시기별의 항산화작용을 비교하기 위해 먼저 DPPH 저해력을 측정하였다(Fig 1). 채취시기 별로는 5월 채취분이 다른 시기 채취분 보다 현저하게 저해하였고 멸칭유무에 있어서는 멸칭한 시험군이 그렇지 않은 시험군에 비해 우수한 것으로 나타났다.

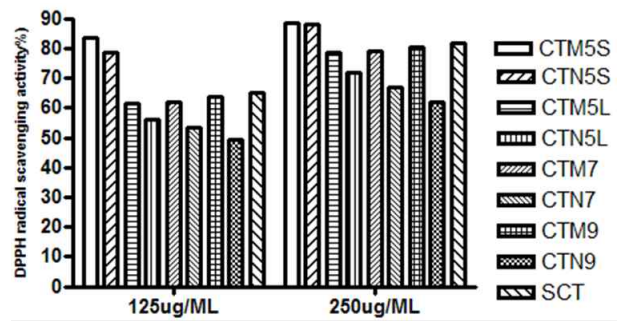


Fig 1. Comparison on the DPPH Radical Scavenging of leaves from collected lines of *Cudrania tricuspidata* extracts according to harvesting time.

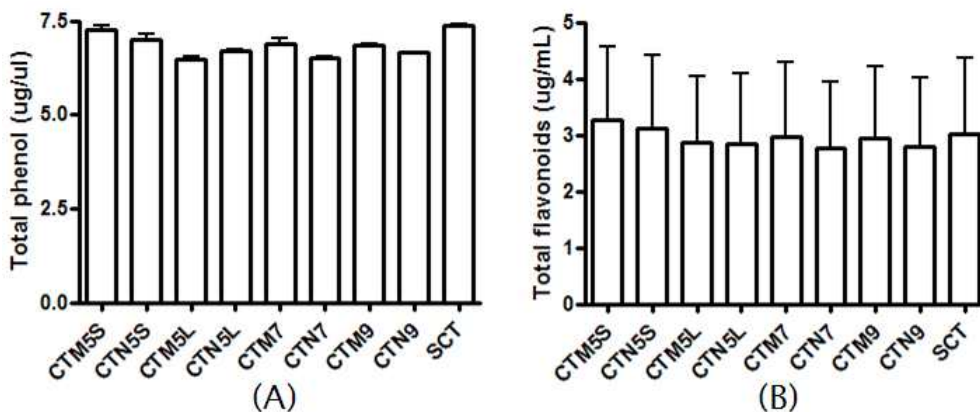


Fig 2. Comparison on the Total phenol (A) and Total flavonoids content (B) of leaves from collected lines of *Cudrania tricuspidata* according to harvesting time. All values are means  $\pm$  S.D.

Fig.2 에 제시한 바와 같이 총페놀량과 총플라보노이드 양도 DPPH소거능과 유사한 경향을 나타내어, 멸칭한 시험군이 다소 증가됨을 알 수 있고 채취시기별로는 5월 채취분 중에서도 앞이

작을수록 총페놀량과 총플라보노이드 양이 많은 것으로 나타났다. 특히 총플라보노이드의 양은 멸칭한 토종 꾸지뽕 5월 채취분(CTM5S)이 가장 많은 것으로 확인되었다.

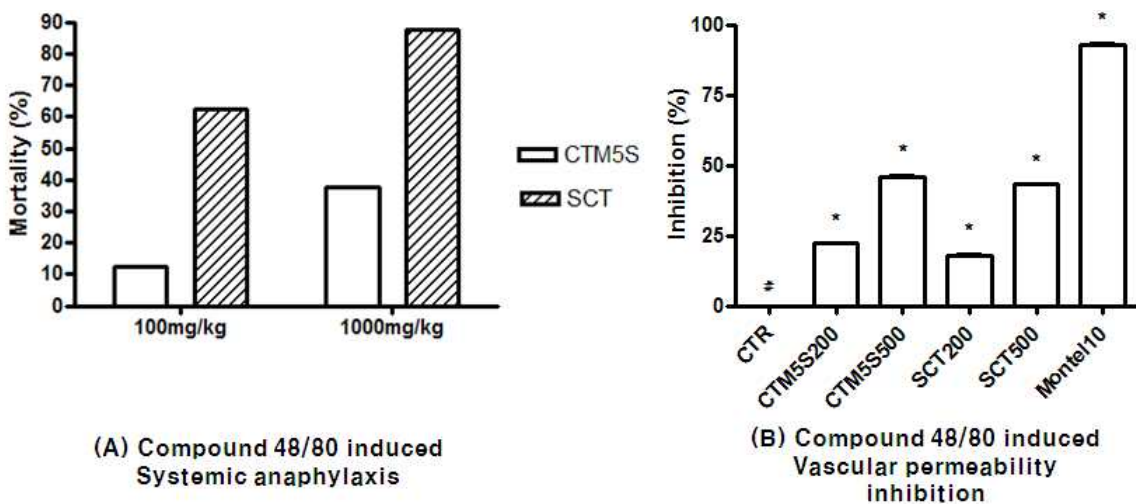


Fig 3. Comparison on the inhibitory effects of leaves from collected lines of *Cudrania tricuspidata* systemic anaphylaxis (A) and vascular permeability (B) in mice induced by Compound 48/80. CTR, Compound 48/80 mice; CTM5s 200, CTM5s (200 mg/kg,p.o) + Compound 48/80 challenged mice; CTM5s 500, CTM5s (500 mg/kg,p.o) + Compound 48/80 challenged mice; SCT 200, SCT (200 mg/kg,p.o) + Compound 48/80 challenged mice; SCT 500, CTM5s (500 mg/kg, p.o) + Compound 48/80 challenged mice; Montel, montelukast (10 mg /kg,i.p) + Compound 48/80 challenged mice. All values are means  $\pm$  S.D. (n=6)

꾸지뽕잎 수집종간의 항알레르기 효과를 비교하였다. 총플라보노이드 양으로 볼 때 가지 없는 꾸지뽕 어린잎의 플라보노이드 함량이 많았다. 이에 토종 꾸지뽕 잎 5월채취분(CTM5S)과 중국 도입종 꾸지뽕잎 추출물의 Compound 48/80을 이용한 전신감작과 국소 혈관투과성을 비교하였다. 실험결과 Fig 3-A의 경우 compound 48/80으로 유도한 전신성 감작으로 인해 중국도입종 꾸지뽕잎 추출물(SCT) 투여군에서는 치사율이 90%대 였으나 토종 꾸지뽕잎 중에서 채취시기, 멸칭, 잎의 크기를 고려하여 가장 총플라보노이드량이 많은 멸칭하여 식재한 토종 꾸지뽕 5월채취분 중에서도 작은잎의 추출물(CTM5S) 투여군에서는 치사율이 최대 1/4로 감소함을 확인하였고 그림(3-B)번에서도 compound 48/80으로 유도한 국소 혈관투과성의 억제효과도 용량의존적으로 확인되었다(Fig 3).

토종 꾸지뽕잎과 중국 도입종 꾸지뽕잎 추출물의 각질 비후 증상 저해 유무를 확인한 결과 TPA로 염증을 유도한 뒤 시료 처치군 별로 비교한 결과 토종 꾸지뽕 추출물이 저농도 및 고농도에서 고르게 생쥐의 귀 두께의 현저한 증가를 억제한 것으로 관찰되었다(Fig 4).

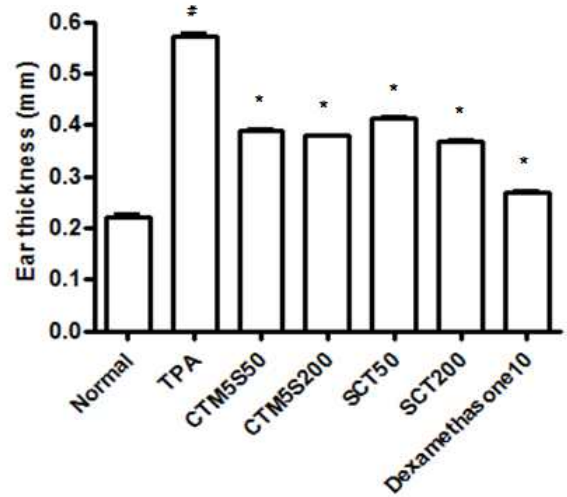


Fig 4. Comparison on the inhibitory effects of leaves from collected lines of *Cudrania tricuspidata* on the ear thickness of mice induced by TPA. Normal, Normal control; TPA, TPA alone treated control ;Dexa 10, Detamethasone. TPA(3ug in 20ul acetone) was applied to the inner and outer surfaces of a mouse ear, to induce dermatitis. Then, 20ul of 50 and 200 test agent (dissolved in acetone: Olive=4:1)were topically applied to the same site And 36hr after TPA treatment. Normal group received the vehicle alone. Control group received TPA and the vehicle. All values are means  $\pm$  S.D. (n=6)

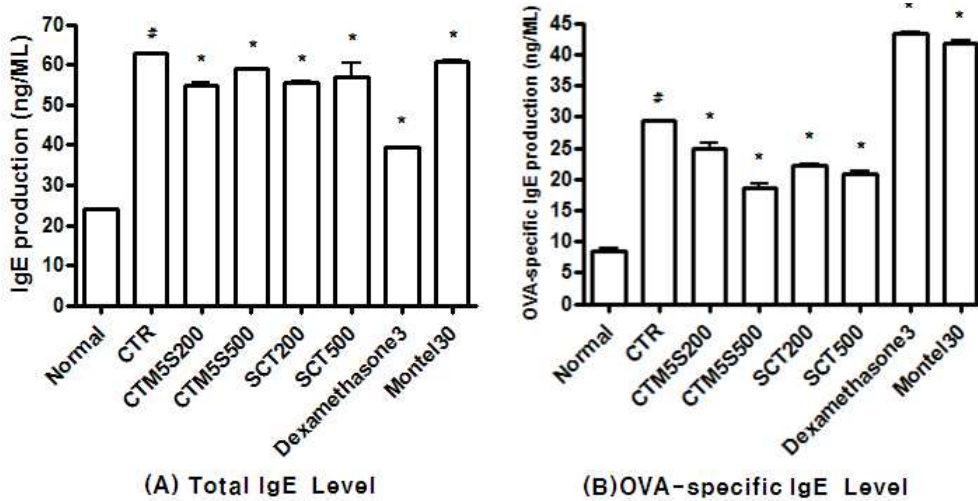


Fig 5. Comparison on the inhibitory effects of leaves from collected lines of *Cudrania tricuspidata* on total (A) and OVA-specific IgE levels(B) in serum. Serum was collected 48 h after the final OVA challenge in mice.Each sample was analyzed using ELISA. Normal, Normal control (PBS only); CTR, OVA-sensitized/challenged mice; CTM5s 200, CTM5s (200 mg/kg) + OVA-sensitized/ challenged mice; CTM5s 500, CTM5s (500 mg/kg) + OVA-sensitized/ challenged mice; SCT 200, SCT(200 mg/kg) + OVA-sensitized/ challenged mice; SCT 500, CTM5s (500 mg/kg) + OVA-sensitized/ challenged mice; Montel, montelukast (30 mg/kg) + OVA-sensitized/ challenged mice. Dexamethasone, Dexamethasone (3 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice. All values are means  $\pm$  S.D. (n=6)

다음으로 두 샘플간의 천식억제를 비교하기 위해 난알부민으로 천식을 유도하였다. 실험결과 그림 5-A에서 제시한 바와 같이 알레르기 증상의 시작에 관여되는 혈중 IgE의 양과 5-B에서 제시한 OVA 알부민 특이적 IgE 생산량을 꾸지뽕잎 별로 비교한 결과 A와 B 모두에서 토종 꾸지뽕잎 (CTM5S)투여군의 억제효과가 더욱 우수함을 확인 할 수 있었다(Fig 5).

본 연구에서 꾸지뽕 추출물은 난알부민 유도 천식 마우스

에서 Th2 사이토카인인 IL-4의 분비는 효과적으로 억제시키나 IFN- $\gamma$ 에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며, 이는 꾸지뽕 추출물이 천식의 알레르기 면역반응에 있어서 Th1/Th2 길항 작용을 통한 면역조절작용으로 알려지성 염증을 억제하지는 않는 것을 알 수 있었다. 하지만 염증지표인 TNF- $\alpha$ 는 (CTM5S) 투여로 인해 선택적으로 현저히 억제됨을 알 수 있었다(Fig 6).



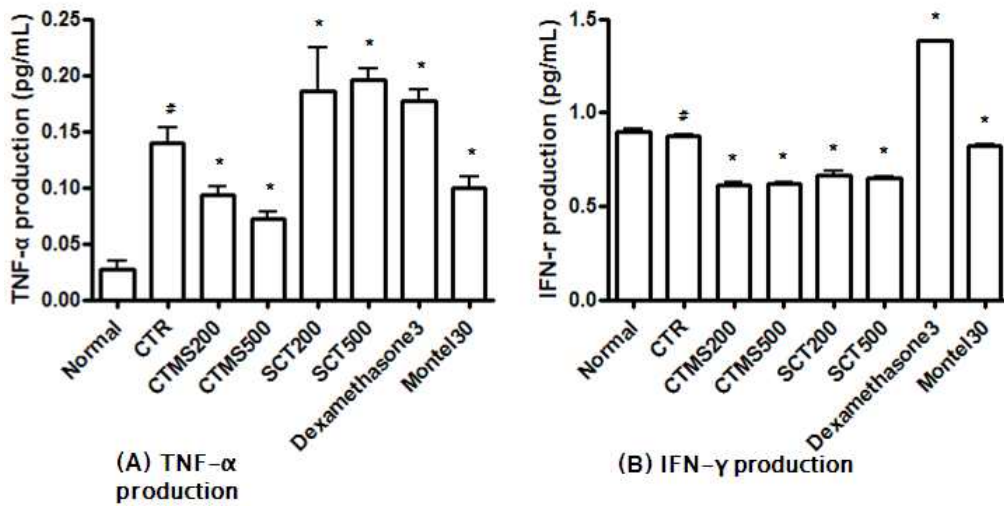


Fig 6. Comparison on the inhibitory effects of leaves from collected lines of *Cudrania tricuspidata* on TNF- $\alpha$  (A) and IFN- $\gamma$  levels (B) in serum. Serum was collected 48 h after the final OVA challenge in mice. Normal, Normal control (PBS only); CTR, OVA-sensitized/challenged mice; CTMS 200, CTMS (200 mg/kg) + OVA-sensitized /challenged mice; CTMS 500, CTMS (500 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; SCT 200, SCT (200 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; SCT 500, CTMS (500 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; Montel, montelukast (30 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice. Dexamethasone, Dexamethasone (3 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice. All values are means  $\pm$  S.D. (n=6)

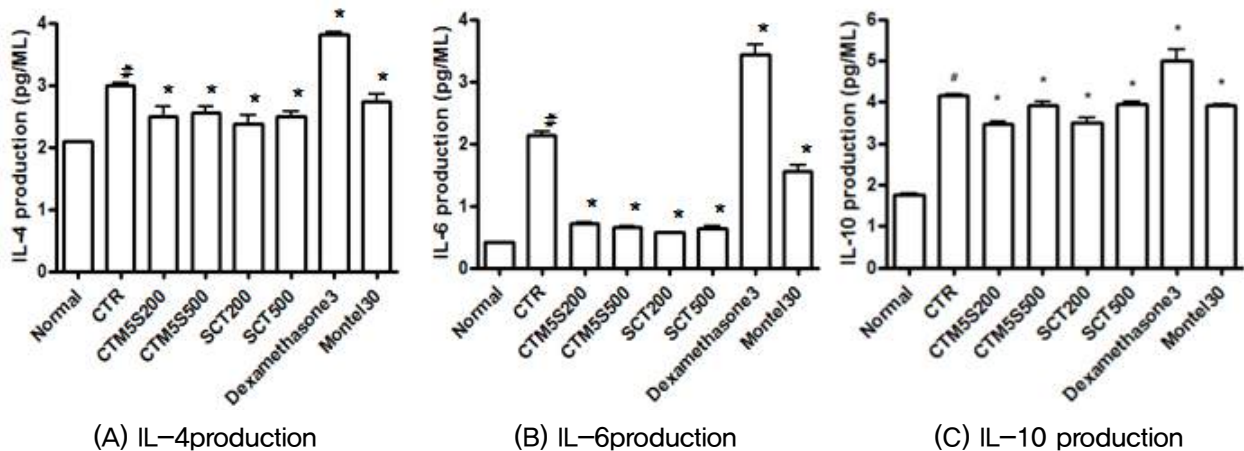


Fig 7. Comparison on the inhibitory effects of leaves from collected lines of *Cudrania tricuspidata* on cytokine levels in serum. Serum was collected 48 h after the final OVA challenge in mice. Each sample was analyzed using ELISA. (A) IL-4 (B) IL-6 (C) IL-10 production. Normal, Normal control (PBS only); CTR, OVA-sensitized/challenged mice; CTMS 200, CTMS (200 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; CTMS 500, CTMS (500 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; SCT 200, SCT (200 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; SCT 500, CTMS (500 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice; Montel, montelukast (30 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice. Dexamethasone, Dexamethasone (3 mg/kg) + OVA-sensitized/challenged mice. All values are means  $\pm$  S.D. (n=6)

이에 B세포의 IgE 항체생성 촉진작용을 나타내는 IL-4와 B세포의 분화 및 항체생성을 자극하므로 혈청 내 Th2 사이토카인인 IL-4의 농도를 효소면역반응법으로 측정하였다. 측정 결과 꾸지뽕 가지유무에 따른 유의적인 차이는 없었으나 두 군 모두에서 대조군(CTR)에 비해 유의하게 감소됨을 확인할 수 있어 천식을 억제하는 효과가 나타남이 확인되었다(Fig 7).

#### IV. 고찰

알레르기성 질환은 피부염과 같이 국소적인 병변을 비롯하여 천식등과 같이 전신적 반응을 나타내며 그 질환의 종류도 다양한 양상을 나타낸다. 이에 본 실험에서는 토종 및 중국도입종 꾸지뽕잎의 알레르기의 전신성 및 국소적인 비만세포 탈과립

현상을 억제 여부를 비교하기 위해 먼저 Compound 48/80을 이용하여 실험을 수행하였다. Compound 48/80은 혼합 다당체 성분으로 비만세포막 수용체에 작용하여 세포외의 칼슘을 세포내로 유입시킴으로써 세포내 자유칼슘의 양을 증가시켜 비만세포의 탈과립 및 히스타민 유리를 강력하게 일으키며 세포내 cAMP-phosphodiesterase의 파괴를 억제하여 세포내 cAMP양을 감소시킨다고 알려져 있다<sup>25,26</sup>. 꾸지뽕의 품종에 따른 Compound 48/80 유도 of 전신감작에 대한 결과를 비교한 결과 토종 꾸지뽕잎 추출물이 중국도입종에 비해 치사율을 최대 1/4수준으로 경감시켰다. 또한 아토피 피부염 특징 중의 하나인 염증증상억제 효과를 비교하기 위해 TPA를 사용하였다.

TPA는 급성 접촉성 피부염을 유발하여 피부를 자극시키며 국소염증의 임상양상으로 표피의 각질세포가 증식되어 피부의

두께가 두꺼워 지는 것이 두드러진 특징이다. 또한 혈관 투과성을 증가시켜 진피에 부종이 유발되고 염증세포의 침윤이 증가<sup>27)</sup>된다고 알려져 있다. 품종간의 큰 차이는 없었으나 두 품종 모두 피부에서의 염증을 완화시키는 결과를 나타내었으므로, 꾸지뽕잎 추출물을 이용한 피부염 개선의 가능성을 시사하였다. 난알부민을 이용하여 유도한 동물모델을 이용하여 꾸지뽕잎의 천식억제효과를 비교하였다.

알레르기 천식을 유도하는 대표적인 물질로 알려진 난알부민(ovalbumin, OVA)은 B세포의 활성화에 의한 혈청 내 IgE 농도의 증가와 더불어 T세포 매개에 의한 염증성 사이토카인들은 물론, 화학주성의 원인인 케모카인(chemokine)의 생산을 증가<sup>28)</sup>시키며 OVA로 염증사이토카인이 증가하고 염증세포의 침투 증가로 인해 염증부위에서는 활성산소가 생성되어 천식과 같은 다양한 질환이 유발된다<sup>29)</sup>. 이때 IgE 는 기도 염증이 확장되거나 특히 급성 알레르기반응으로 나타나는 기관지 천식 발증에 중추적인 역할을 담당한다<sup>30)</sup>. 실험결과에서 토종 꾸지뽕잎 이 중국도입종에 비해 OVA 알부민 특이적 IgE 생산을 저해하는 작용이 컸음을 확인할 수 있었다. 한편, IFN- $\gamma$ 가 호산구 침윤을 억제함이 밝혀지면서 천식의 발생에 Th1과 Th2 면역반응이 서로 길항작용<sup>31)</sup>을 하고 있으므로 Th2 반응을 억제하기 위해서 샘플 투여에 따른 IFN- $\gamma$ 에 미치는 영향을 살펴보았으나 별다른 영향을 끼치지 못하는 것으로 나타났다.

알러지를 일으키는 항원이 생체에 들어오면, macrophage가 인식, helper T 세포에서 관련 cytokine이 유리, 그리고 B세포에서 IgE 항체가 만들어져 비만 세포에 부착시킨다. 그 다음 비만세포는 히스타민, ECF-A, prostaglandin, tromboxane, leucotriene C4, leucotriene D4, leucotriene E4 및 PAF를 생성하여 유리하는 특징을 갖고 있는데, 특히 히스타민의 유리는 혈액에서 기관지조직에 호산구를 침윤시켜 활성화하는 작용을 하여 알레르기 기관지 천식발증에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>32)</sup>. 기관지 천식의 염증반응에 있어서 IL-6는 폐포 대식세포에서 주로 생성되고 혈중 단핵구와 비만세포에서도 생성되는 것으로 주로 알려져 있으며 기관지 내피세포에서도 유착분자발현 증진에 관여하여 기도점막 과증식과 분비물의 이상 증가를 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>33)</sup>. IL-10은 단핵구와 대식구에서 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12의 분비를 억제<sup>34)</sup>하는 것으로 알려져 있어서 본 실험에서 측정된 결과 두 품종 모두에서 억제함을 나타내었으나 품종 상호간의 차이는 나타내지 않았다.

## V. 결 론

본 연구는 경남 산청에서 자생하는 토종 꾸지뽕과 중국도입종 꾸지뽕의 잎을 채취하고 추출하여 두 식물체간 수집종차이로 발생하는 약리작용을 비교하였다. 잎을 채취하여 각각 80% 에탄올로 추출한 추출물을 이용하여 항알러지 작용과 항산화 효과를 측정한 실험으로 그 수행한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 중국 도입종 꾸지뽕잎과 국내 토종 꾸지뽕잎은 가지에서 가지 유무와 유전자 검사를 통해 식물외형적인 특성이

분명한 것을 사용하였다. 토종 꾸지뽕은 채취시기를 달리하여 항산화 실험을 한 결과 5월채취 분이 가장 플라보노이드를 많이 함유하고 있는 것을 확인하였다.

2. 꾸지뽕 수집종간 및 이의 채취시기에 따른 항산화력을 평가하기 위해 총페놀함량, 총플라보노이드 함량, DPPH 소거능력 등을 비교한 결과 전체적인 항산화능력은 관행적으로 잎을 채취하는 시기에 채취한 중국도입종 꾸지뽕잎이 우세했으며 총페놀함량은 중국도입종 꾸지뽕잎에서, 그리고 총플라보노이드 함량은 토종 꾸지뽕잎에서 많다는 것을 확인하였다.
3. 토종 꾸지뽕잎 과 중국도입종 꾸지뽕잎의 전신성 아나필라시스 억제작용을 비교한 결과 토종 꾸지뽕잎 추출물이 전신성 아나필라시스를 유의적으로 억제하여 항알레르기작용이 있음을 확인하였으며 Ovalumin 으로 유도한 천식의 억제효과를 비교한 결과 OVA specific IgE 저해 와 염증지표인 TNF- $\alpha$  저해 효과, 그리고 Th2 사이토카인인 IL-4의 분비를 억제시킴으로써 토종 꾸지뽕 5월 채취분 잎의 추출물이 우수한 것으로 확인되었다. 이는 알레르기성 천식의 개선효과를 기대할 수 있는 약물로서 치료제 개발 가능성을 갖고 있음을 의미한다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 토종 꾸지뽕잎 과 중국도입종 꾸지뽕잎은 기원식물에서부터 차이를 나타내며 그 잎의 추출물 특히 플라보노이드 화합물에 의한 항알러지 작용을 비롯한 약리 작용에서 차이를 나타내는 것으로 결론지을 수 있다.

## 감사의 글

본 연구는 2016년도 중소기업청에서 시행한 산학연협력 기술개발사업 (과제번호 : C0442718)의 지원에 의해 진행된 결과입니다.

## References

1. Shin JH, Shin YW. Illustrated book of medicinal Herbs from Hyangyakjipseongbang. Daegu : Keimyung Univ. Press, 2006 : 275.
2. Chinese Herbalism Editorial Board, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China. Chinese Herbalism, vol2. Shanghai : Shanghai science and Technology Press, 1999 : 520.
3. Kim SH, Kim NJ, Choi JS, Park JC. Determination of flavonoid by HPLC and biological activities from the leaves of *Cudrania tricuspidata* Bureau, J. Korean Soc. Food Sci, Nutr. 1993 ; 22 : 68-72.
4. Chon IJ, Lee SW, Cha JH, Han JH, Whang WK. Anti-oxidant compounds of *Cudrania tricuspidata* leaves. Yakhak Hoeji, 2005 ; 49(5) : 416-421.

5. Kim OK, Ho JN, Nam DE, Jun WJ, Hwang KT, Kang JE, Chae OS, Lee JM. Hepatoprotective Effect of *Cudrania tricuspidata* Extracts against Oxidative Damage. *J Kor. Soc Food Sci Nutr.* 2012 ; 41(1) : 7-13.
6. Kim JY, Chung JH, Hwang I, Kwan YS, Chai JK, Lee KH, Han TH, Moon JH. Quantification of Quercetin and Kaempferol Contents in Different Parts of *Cudrania tricuspidata* and Their Processed Foods. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 2009 ; 27(3) : 489-496.
7. Park JH, Lee KW, Sung KS, Kim SS, Cho KD, Lee BH, Han CK. Effect of Diets with Job's Tears and *Cudrania tricuspidata* Leaf Mixed-powder Supplements on Body Fat and Serum Lipid Levels in Rats Fed a High-Fat Diet. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* 2012 ; 41(7): 943-949.
8. Kim YS, Lee YS, Kim JH, Sohn EJ, Kim CS, Lee YM, Jo KH, Shin SD, Song YJ, Kim JH, Lim JS. Inhibitory activities of *Cudrania tricuspidata* leaves on pancreatic lipase in vitro and lipolysis in vivo. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2012 ; Article ID 878365, 8 pages
9. Kim MS, Kim IA, KO YJ, Jeong JA, Kim JE, Song BJ, Lim WB, Lim HS, Park JI, Kim SY, Choi HR, Kim OJ. Methanol Extract of Leaves from *Cudrania tricuspidata* Effects in HT-29 Colorectal Adenocarcinoma. *Kor J Oral Maxillofac Pathol.* 2009 ; 33(1) : 19-26.
10. An RB, Sohn DH, Kim YC. Hepatoprotective compounds of the roots of *Cudrania tricuspidata* on taurine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Biol Pharm Bull* 2006 ; 29 : 838-840.
11. Kang DG, Hur TY, Lee GM, Oh H, Kwon TO, Lee HS. Effects of *Cudrania tricuspidata* water extract on blood pressure and renal functions in NO-dependent hypertension. *Life Sci.* 2002 ; 70 : 2599-2609.
12. Tian YH, Kim HC, Cui JM, Kim YC. Hepatoprotective constituents of *Cudrania tricuspidata*. *Arch Pharm Res.* 2005 ; 28(1) : 44-8.
13. Park KH, Park YD, Han JM, Im KR, Lee BW, Jeong IY, Jeong TS, Lee WS. Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthenes and flavonoids isolated from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006 ; 16 : 5580-3.
14. Wang YH, Hou AJ, Zhu GF, Chen DF, Sun HD. Cytotoxic and antifungal isoprenylated xanthenes and flavonoids from *Cudrania fruticosa*. *Planta Med.* 2005 ; 71(3) : 273-4.
15. Han XH, Hong SS, Hwang JS, Jeong SH, Hwang JH, Lee MH, Lee MK, Lee D, Ro JS, Hwang BY. Monoamine oxidase inhibitory constituents from the fruits of *Cudrania tricuspidata*. *Arch Pharm Res.* 2005 ; 28(12) : 1324-7.
16. Wang HZ, Chang CH, Lin CP, Tsai MC. Using MTT viability assay to test the cytotoxicity of antibiotics and steroid to cultured porcine corneal endothelial cells. *J. Ocular Pharm Therapeutics.* 2006 ; 12 : 35-43.
17. Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958 ; 181: 1199-200.
18. Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 1912 ; 12: 239-43.
19. Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JRL. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *J. Sci. Food. Agric.* 1994 ; 64(2) : 155-61.
20. Amir S, English AM. An inhibitor of nitric oxide production, NG-nitro-L-arginine-methyl ester, improves survival in anaphylactic shock. *Eur. J. Pharmacol.* 1991 ; 203(1):125-7.
21. Sugimoto Y, Umakoshi K, Nojiri N, Kamei C. Effect of histamine H1 receptor antagonists on compound 48/80-induced scratching behavior in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1998 ; 351 : 1-5.
22. Park BK, Heo MY, Park H, Kim HP. Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase-2 expression and skin inflammation in mice by wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*. *Eur. J. Pharmacol.* 2001 ; 425(2) : 153-7.
23. Gong JH, Shin D, Han SY, Kim JL, Kang YH. Kaempferol suppresses eosinophil infiltration and airway inflammation in airway epithelial cells and in mice with allergic asthma. *J. Nutr.* 2012 ; 142 (1) : 47 - 56.
24. Lee SJ, Shin YW, Kim YH, Lee SW. Molecular markers based on chloroplast and nuclear ribosomal DNA regions which distinguish Korean-specific ecotypes of the medicinal plant *Cudrania tricuspidata* Bureau. *J Plant Biotechnol.* 2017 ; 44 : 235-42.
25. Kang KJ, Jun BD, Chai OH, Lee MS. Inhibitory Effects of Mori Cortex on Compound 48/80 - induced Histamine Release and Calcium Uptake of Rat Peritoneal Mast Cells. *Korean J. of Immunology.* 1993 ; 15 : 91-9.
26. Kang KJ, Chai OH, Choi MH, Shin IH, Lee MS, Jun BD. Inhibitory Effects of Mori Cortex on Compound 48/80-induced Histamine Release and cAMP of Rat Peritoneal Mast Cells. *Korean J Biol Response Modif* 1994 ; 4 : 111-22.
27. Lee DY, Choi GY, Yoon TS, Cheon MS, Choo BK, Kim



- HK. Anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum indicum* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. *J Ethnopharmacol*, 2009 ; 123(1) : 149-54.
28. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med*, 2001 ; 194(10) : 1541-7.
29. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996 ; 12(4) : 274-7.
30. Kuhl K, Hanania NA. Targeting IgE in asthma. *Curr Opin Pulm Med*, 2012 ; 18(1) : 1-5.
31. Iwamoto I, Nakajima H, Endo H, Yoshida S. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *J Exp Med*, 1993 ; 177(2) : 573-6.
32. Thomas A, Platts-Mills E and Woodfolk JA. Allergens and their role in the allergic immune response. *Immunological Reviews*, 2011 ; 242 : 51-68.
33. Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, Holgate ST. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J. Immunol*, 1995 ; 155(1) : 297-307.
34. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp Med*, 1991 ; 174(5) : 1209-20.