

으뜸도라지추출물이 RBL-2H3 세포에서 탈과립과 염증매개물질의 분비 억제에 미치는 영향*

정재인¹ · 김형서² · 지한결² · 이현숙³ · 이재용^{1,4} · 김은지^{1†}

한림대학교 식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터¹, (주)참다한바이오 부설연구소², 동서대학교 식품영양학과³, 한림대학교 의과대학 생화학교실⁴

Inhibitory effect of the aqueous extract of a tetraploid 'etteum' variety in *Platycodon grandiflorum* on degranulation and inflammatory mediator release in RBL-2H3 cells*

Jung, Jae In¹ · Kim, Hyung Seo² · Ji, Han Kyeol² · Lee, Hyun Sook³ · Lee, Jae-Yong^{1,3} · Kim, Eun Ji^{1†}

¹Center for Efficacy Assessment and Development of Functional Foods and Drugs, Hallym University, Chuncheon, Gangwon 24252, Korea

²Research Institute of Chamdahanbio, Chamdahanbio Ltd., Samcheok, Gangwon 25949, Korea

³Department of Food Science & Nutrition, Dongseo University, Busan 47011, Korea

⁴Department of Biochemistry, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon, Gangwon 24252, Korea

ABSTRACT

Purpose: *Platycodon grandiflorum* (a domestic diploid variety, DV-PG) has been used as a food and component of various traditional oriental medicines. Although DV-PG is known to have an anti-allergic effect, little is known about the beneficial health effects of the tetraploid 'Etteum' variety in the *Platycodon grandiflorum* (TV-PG), which is a recently developed variety. In this study, we investigated the effect of TV-PG on the rat basophilic leukemia mast cell (RBL-2H3)-mediated allergic response. **Methods:** To examine the effects of TV-PG on the allergic response, RBL-2H3 cells were sensitized with dinitrophenyl (DNP)-immunoglobulin E, treated with various concentrations of TV-PG, and challenged with DNP-human serum albumin. We estimated cell granulation by measuring the release of β -hexosaminidase and production of inflammatory mediators by ELISA. **Results:** TV-PG had no effect on the proliferation or cytotoxicity of RBL-2H3 cells within the concentration range of 0 to 200 μ g/mL. TV-PG inhibited degranulation of RBL-2H3 cells by antigen stimulation in a dose-dependent manner. TV-PG also suppressed the production of inflammatory cytokines and mediators such as interleukin-4, tumor necrosis factor- α , prostaglandin E2, and leukotriene B4 in RBL-2H3 cells by antigen stimulation. **Conclusion:** These results indicate that TV-PG exhibits anti-allergic activity via inhibition of degranulation as well as suppression of inflammatory mediators and cytokine release. These findings suggest that TV-PG may have potential as a preventive and therapeutic agent for the treatment of various allergic diseases.

KEY WORDS: functional food, *Platycodon grandiflorum*, allergy, mast cell, inflammation mediators

서론

알레르기 (allergy)는 정상적인 경우 인체에 해를 끼치지 않는 물질에 대해 면역체계가 이상 과민반응을 일으키는 것을 일컫으며, 아토피 피부염, 알레르기 비염 및 천식 등이 대표적인 알레르기 질환이다. 서구화된 식생활과 생활환

경의 변화, 각종 환경오염 증가 및 유전적 요인 등의 복합적인 원인에 의해 발병되는 알레르기 질환의 유병률은 세계적으로 2000년까지 급격하게 증가하였고 그 이후 증가 추세는 둔화되고 있다.¹ 우리나라에서 알레르기 질환의 발생률 증가는 최근 정체 경향을 보이고 있으나, 알레르기 질환은 유병률이 높은 질환 중의 하나이며, 특히 10세

Received: February 27, 2018 / Revised: April 1, 2018 / Accepted: April 16, 2018

* This research was supported by the Ministry of Trade, Industry and Energy (MOTIE) and Korea Institute for Advancement of Technology (KIAT) through the Research and Promoting Regional Specialized Industry (R0005131) and by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (R1A6A3A01075809).

† To whom correspondence should be addressed.
tel: +82-33-248-3106, e-mail: myej4@hallym.ac.kr

© 2018 The Korean Nutrition Society

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.

미만의 소아의 경우 그 유병률이 매우 높은 것으로 보고되고 있어,² 해결해야 할 건강 문제 중의 하나이다.

알레르기 질환을 일으키는 알레르기 반응은 immunoglobulin E (IgE)가 관여하여 일어나는 제 1형 과민반응인 즉 시형 알레르기 반응이며, 비만세포는 알레르기 반응에 중요한 역할을 한다.³ 알레르기 반응은 IgE가 비만세포의 표면 수용체 (FcεRI)에 결합되어 있어, 알레르기 원인물질인 항원이 재차 들어오면 비만세포의 표면 수용체에 결합한 IgE와 항원이 특이적으로 결합하여 수용체의 변화가 초래 되고, 이로 인해 비만세포가 활성화되어 일어난다. 비만세포의 활성화는 비만세포의 탈과립을 유도하여 과립 내 존재하던 히스타민, 사이토카인 및 케모카인 등의 화학적 매개물질이 세포 밖으로 분비되고 이것은 혈관투과성 항진, 평활근 수축, 점액분비 항진을 유도하여 제 1형 알레르기 반응을 일으키게 된다.¹ 그러므로 비만세포의 활성화를 조절하여 비만세포의 탈과립 과정을 억제하는 것은 알레르기 반응에 의한 질환의 예방 및 치료의 효과적인 방법이 될 수 있다.

알레르기 질환 치료를 위해 항히스타민제 등의 약제가 널리 사용되고 있으나 치료제의 부작용 완화 및 치료 효과 증진을 위해 보완요법이 요구되고 있으며, 유럽의 알레르기 환자의 30% 정도는 보완요법을 병행하고 있는 것으로 보고되고 있다. 예로부터 식용 또는 약용으로 사용되어 온 감초, 강황, 녹차 등의 식물유래 천연물은 부작용이 없으며 치료 효과를 개선하는 알레르기 질환 치료제 및 보완제 개발에 좋은 소재가 될 수 있을 것으로 간주되어 개발에 활용되고 있다.^{4,7}

도라지 (*Platycodon grandiflorum*)는 초롱꽃과에 속하는 여러해살이풀로서 중국, 일본 및 우리나라에 자생한다. 도라지는 예로부터 현재까지 식용 및 약용으로 이용되고 있으며, 널리 재배되어 생산되고 있다. 약용으로는 3년근 이상의 도라지가 사용되며, 한방에서는 감기, 천식, 폐결핵의 거담제로 사용되고 있다.⁸ 도라지는 platycodin A, C, D와 polygalacin D 등의 사포닌을 다량 함유하고 있으며, 다양한 도라지추출물과 platycodin D은 항비만,⁹ 혈당 및 콜레스테롤 대사 개선,¹⁰ 항암,¹¹ 항염¹² 및 아토피 피부염 개선¹³ 효능 등 다양한 효능이 있음이 보고되고 있다.

으뜸도라지 (tetraploid 'Etteum' variety in *Platycodon grandiflorum*)는 재래종 도라지 (domestic diploid variety in *Platycodon grandiflorum*)에 콜히친 처리를 하여 4배체를 육성한 품종으로, 재래종 도라지의 염색체가 18개인데 비해 으뜸도라지는 36개의 염색체를 가지고 있으며, 2007년 4월 18일 으뜸도라지로 명명하여 품종등록을 마친 신품종이다. 재래종 도라지의 재배 기간은 대략 3년이나 으뜸도

라지는 성장이 빨라 1~2년 재배가 가능하며, 생산력이 재래종 도라지에 비해 약 40% 증가한다고 보고되고 있다.¹⁴ Kang 등¹⁵은 으뜸도라지가 재래종 도라지에 비해 조단백, 조사포닌 및 총페놀화합물 함량이 높고 DPPH 라디칼 소거능과 SOD 유사활성 등 항산화 활성이 재래종 도라지에 비해 높음을 보고하였다. 우수한 품종으로 개발된 으뜸도라지가 다양한 생리 활성을 나타낼 것으로 생각되고 있으나 현재까지 Kang 등¹⁵의 연구 외에 연구된 바가 드물어 으뜸도라지의 다양한 효능에 대한 연구가 필요한 실정이다.

본 연구에서는 으뜸도라지의 항알레르기 효능을 갖는 기능성 소재로서의 개발 가능성을 살펴보고자 으뜸도라지 열수추출물이 쥐 호염기성 백혈병 비만세포주 (rat basophilic leukemia mast cell line)인 RBL-2H3에서 탈과립화 및 염증매개 물질 분비능에 미치는 영향을 살펴보았다.

연구방법

시료 추출

실험에 사용한 으뜸도라지는 강원도 횡성에서 재배된 2년근을 구입하여 사용하였고, 재래종 도라지는 경기도 이천에서 재배된 3년근을 구입하여 사용하였다. 으뜸도라지와 재래종 도라지를 각각 흐르는 물에 세척하여 자연건조한 후 분쇄하였다. 분쇄하여 분말로 만든 도라지 100 g에 1 L의 물을 가하여 90°C에서 4시간 열수 추출하였다. 추출을 2회 반복한 후 추출물을 여과지로 여과하고 동결건조기 (FDG400, Mycom, Seoul, Korea)를 사용하여 -40°C에서 동결건조하여 건조분말 형태의 으뜸도라지추출물 (TV-PG) 및 재래종 도라지추출물 (DV-PG)를 얻어 시료로 사용하였다.

세포 배양

RBL-2H3 세포 (rat basophilic leukemia mast cells)은 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. RBL-2H3 세포는 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Welgene, Gyeongsan, Korea)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin을 첨가한 세포배양액을 사용하여 37°C 습윤한 CO₂ 배양기 (5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양 접시의 80% 정도 차면 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세포의 단층을 씻어내고 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA를 처리하여 계대 배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다.

세포 생존율 측정

RBL-2H3 세포를 5×10^4 cells/well로 24-well plate에 분

주하여 24시간 배양한 후 다양한 농도의 도라지추출물이 함유된 배지로 세포 배양액을 교환하여 세포를 배양하였다. 으뜸도라지추출물을 처리하여 세포를 6시간, 또는 24시간 배양한 후 MTT assay¹⁶로 세포 생존율을 측정하여 으뜸도라지추출물의 세포독성을 평가하였다.

β-hexosaminidase 분비량 측정

RBL-2H3 세포를 2.5×10^5 cells/well로 24-well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 50 ng/mL dinitrophenyl-Immunoglobulin E (DNP-IgE, Sigma, St. Louis, MO, USA)가 포함된 배지로 교환하여 2시간 동안 세포를 배양하여 감작시켰다. 세포를 Siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 5.6 mM glucose, 0.1% bovine serum albumin, pH 7.2)로 3회 세척 후 다양한 농도의 으뜸도라지추출물을 함유한 Siraganian buffer를 넣어 10분간 배양하였다. 이후 50 ng/mL dinitrophenyl-human serum albumin (DNP-HSA, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 30분 동안 자극시킨 후 5분간 얼음에서 냉각시켜 반응을 중지하였다. 상층액 50 μL를 96-well plate에 옮기고 100 μL의 substrate buffer (4-p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide, 3.3 mM, sodium citrate, 0.1 M, pH 4.5)를 넣어 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 stop solution (0.1 M Na₂CO₃, pH 10) 100 μL를 첨가하여 반응을 중지하고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 처리군과 대조군의 흡광도 값으로 다음 식에 의해 억제율 (%)을 산출하였다.

$$\text{억제율 (Inhibition, \%)} = (1 - T/C) \times 100$$

C: Cell (+), DNP-HSA (+), test sample (-)

T: Cell (+), DNP-HSA (+), test sample (+)

Interleukin (IL)-4와 tumor necrosis factor (TNF)-α 함량 측정

RBL-2H3 세포를 2.5×10^5 cells/well로 24-well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. 배양 후 50 ng/mL DNP-IgE가 포함된 배지로 세포배양액을 교환하여 2시간 동안 배양한 후 다양한 농도 (0, 50, 100, 200 μg/mL)의 으뜸도라지추출물이 배지로 세포 배양액을 교환하여 10분 동안 배양하였다. 이후 50 ng/mL DNP-HSA를 가하여 4시간 추가 배양하고 얼음에서 냉각시켜 반응을 중지하였다. 세포 배양액을 수거하여 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 취하였다. 세포 배양액 내의 IL-4와 TNF-α 함량은 각각의 ELISA 키트 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 측정하였다.

Prostaglandin E2 (PGE₂)와 leukotriene B4 (LTB₄) 함량 측정

RBL-2H3 세포를 위와 동일한 방법으로 DNP-IgE를 처리하여 감작하고, 으뜸도라지추출물을 처리하고, DNP-HSA로 자극한 후 세포배양액을 수거하였다. 세포 배양액 내의 PGE₂와 LTB₄ 함량은 각각의 ELISA 키트 (R&D Systems)를 사용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 측정하였다.

통계처리

모든 분석 수치는 mean ± SEM으로 나타내었다. 수집된 결과는 SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 Student t-test, one-way ANOVA 및 Duncan's multiple range test로 통계 분석하였다. p < 0.05 이상일 때만 통계적으로 유의성 있는 것으로 판단하였다.

결 과

으뜸도라지추출물의 세포독성

으뜸도라지추출물이 비만세포인 RBL-2H3 세포에 독성을 야기하는지를 조사하기 위해 세포 배양액에 다양한 농도 (0, 50, 100, 200 μg/mL)의 으뜸도라지추출물을 처리한 후 MTT assay¹³를 실시하여 살아있는 세포수를 측정하였다. 으뜸도라지추출물을 6시간 처리하였을 때 대조군과 비교하여 50 μg/mL 이상의 농도에서 세포증식이 유의적으로 증가하였고, 24시간 배양한 경우 200 μg/mL의 농도에서 대조군과 비교하여 90% 이상의 세포생존율을 나타내어

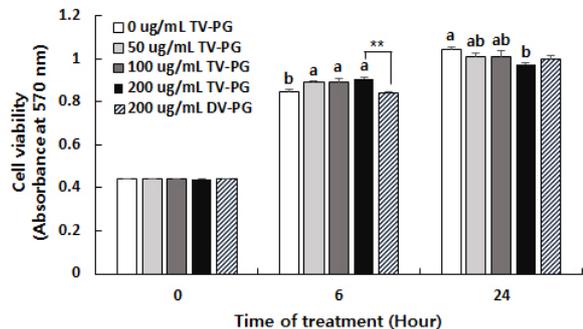


Fig. 1. Effect of TV-PG on the cell viability in RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were plated at a density of 50,000 cells/well in 24-well plates with DMEM supplemented with 10% FBS. Twenty-four hours after plating, the cells were then incubated for 6 or 24 h in medium containing 0, 50, 100 or 200 μg/mL TV-PG or 200 g/mL DV-PG. Cell numbers were estimated by the MIT assay. Each bar represents the mean ± SEM (n = 6). Means at a time without a common letter differ, p < 0.05. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 significantly different from that of 200 μg/mL TV-PG treated group. TV-PG = the aqueous extract of a tetraploid 'Etteum' variety in *Platycodon grandiflorum*, DV-PG = the aqueous extract of a domestic diploid variety in *Platycodon grandiflorum*.

세포독성이 없음을 확인하였다 (Fig. 1). 이후 진행되는 모든 시험은 세포독성이 없는 6시간 이내로 진행되며 200 μ g/mL 농도 범위에서 항 알레르기 효능을 평가하였다.

으뜸도라지추출물이 탈과립화에 미치는 영향

비만세포의 탈과립 지표인 β -hexosaminidase 분비에 으뜸도라지추출물이 미치는 영향을 조사하여 Fig. 2에 나타내었다. RBL-2H3 세포에 으뜸도라지추출물을 50, 100, 200 μ g/mL로 처리하였을 때 β -hexosaminidase 분비 억제율은 각각 $6.92 \pm 0.92\%$, $9.11 \pm 0.74\%$, $41.05 \pm 0.79\%$ 로 으뜸도라지추출물의 처리 농도가 증가할수록 β -hexosaminidase 분비 억제 효과가 뚜렷하게 나타났다. 반면 RBL-2H3 세포에 200 μ g/mL 재래종도라지추출물을 처리한 경우 β -hexosaminidase 분비 억제율은 $4.46 \pm 1.46\%$ 이었으며, 이것은 같은 농도의 으뜸도라지추출물 처리에 비해 유의하게 ($p < 0.001$) β -hexosaminidase 분비 억제율이 감소하였다 (Fig. 2).

으뜸도라지추출물이 IL-4와 TNF- α 분비에 미치는 영향

DNP-IgE와 DNP-HSA에 의해 활성화된 RBL-2H3 세포에 으뜸도라지추출물을 처리하여 으뜸도라지추출물이 염증성

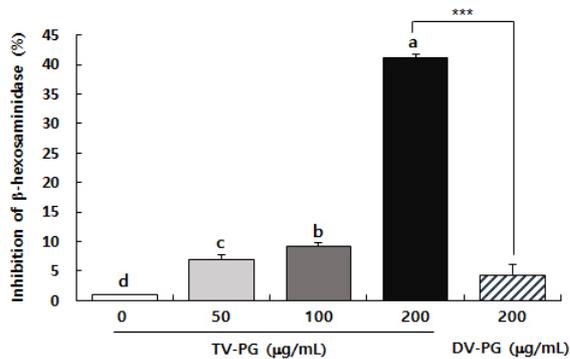


Fig. 2. Effect of TV-PG on degranulation of β -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were plated at a density of 2.5×10^5 cells/well in 24-well plates with DMEM supplemented with 10% FBS. Twenty-four hours after plating, the cells were incubated in a growth medium containing 50 ng/mL DNP-IgE (antibody) for 2 hours. After washed with siraganian buffer, incubated in siraganian buffer containing 5.6 mM CaCl_2 and 0.1% BSA for 10 min, and then treated with 0, 50, 100 or 200 μ g/mL TV-PG or 200 μ g/mL DV-PG for 30 min. To activate the cells and evoke an allergic reaction, the cells were stimulated for 2 h with 10 μ g/mL DNP-HSA. β -hexosaminidase secretion into the supernatant was measured and the inhibition of β -hexosaminidase (%) were estimated. Each bar represents the mean \pm SEM ($n = 6$). Means without a common letter differ, $p < 0.05$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significantly different from that of 200 μ g/mL TV-PG treated group. TV-PG = the aqueous extract of a tetraploid 'Etteum' variety in *Platycodon grandiflorum*, DV-PG = the aqueous extract of a domestic diploid variety in *Platycodon grandiflorum*.

사이토카인인 IL-4와 TNF- α 의 분비에 미치는 영향을 조사하였다. IL-4 분비량은 DNP-HSA를 처리하지 않은 경우 7.49 ± 0.11 ng/L이었으나 세포에 DNP-HSA를 처리하여 자극한 대조군의 경우 15.79 ± 0.23 ng/L로 세포에서 생성 분비된 IL-4 양이 DNP-HSA 자극에 의해 현저히 증가하였다. 으뜸도라지추출물을 50, 100, 200 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때 IL-4 분비량은 각각 13.71 ± 0.26 ng/L, 12.64 ± 0.24 ng/L, 10.78 ± 0.09 ng/L로 으뜸도라지추출물의 처리농도가 증가할수록 생성 분비된 IL-4 양은 통계적으로 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다 (Fig. 3A).

또한 RBL-2H3 세포에서 분비된 TNF- α 양은 7.19 ± 0.09 ng/L이었으나, DNP-HSA를 처리하여 자극한 경우 분비된 TNF- α 양은 20.35 ± 0.68 ng/L으로 DNP-HSA에 의해 현저히 증가하였다. DNP-HSA에 의해 자극되어 생성 분비된 TNF- α 양은 으뜸도라지추출물의 처리농도가 증가할수록 유의적으로 감소하였으며, 200 μ g/mL 농도로 으뜸도라지추출물을 처리한 경우 TNF- α 분비량은 10.78 ± 0.09 ng/L로

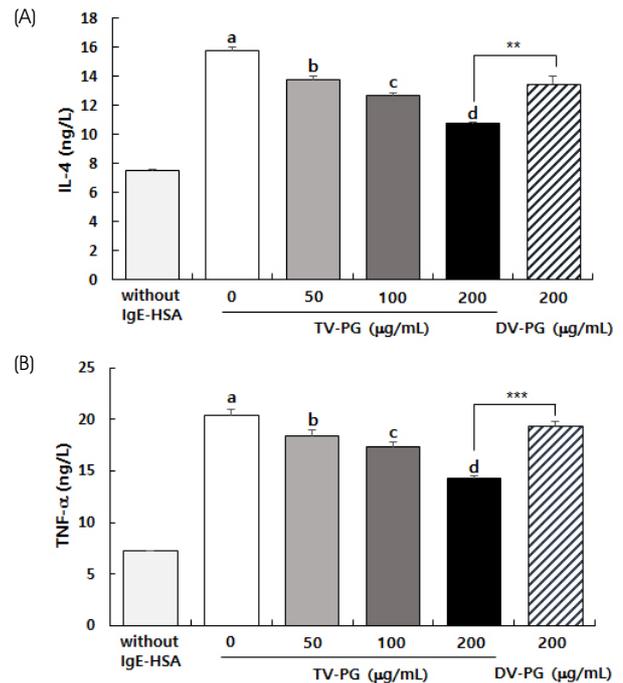


Fig. 3. Effects of TV-PG on the production of IL-4 (A) and TNF- α (B) in RBL-2H3 cells. The cells were sensitized with anti-DNP-IgE (50 ng/ml), stimulated by DNP-HSA (10 μ g/ml) and treated various concentrations of TV-PG as described in Fig 2. Conditioned media were collected after 6 h. The concentrations of IL-6 and TNF- α in the conditioned media were measured using the relevant ELISA kits. Each bar represents mean \pm SEM ($n = 4$). Means without a common letter differ, $p < 0.05$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significantly different from that of 200 μ g/mL TV-PG treated group. TV-PG = the aqueous extract of a tetraploid 'Etteum' variety in *Platycodon grandiflorum*, DV-PG = the aqueous extract of a domestic diploid variety in *Platycodon grandiflorum*.

으뜸도라지추출물을 처리하지 않은 대조군에 비해 30% 감소하였다 (Fig. 3B).

200 µg/mL 재래종도라지추출물을 처리 시 DNP-HSA에 의해 자극되어 생성 분비된 IL-4와 TNF-α 양은 같은 농도의 으뜸도라지추출물 처리에 비해 IL-4와 TNF-α 생성 분비 억제도가 각각 $p < 0.01$, $p < 0.001$ 수준에서 유의적으로 낮게 나타났다 (Fig. 3).

으뜸도라지추출물이 PGE₂와 LTB₄ 분비에 미치는 영향

DNP-IgE와 DNP-HSA에 의해 활성화된 RBL-2H3 세포에 으뜸도라지추출물을 처리하여 으뜸도라지추출물이 염증성 매개체인 PGE₂와 LTB₄ 분비에 미치는 영향을 조사하였다. DNP-HSA를 처리하지 않은 경우 RBL-2H3 세포에서 생성 분비된 PGE₂ 양은 28.17 ± 3.32 ng/L이었으나, DNP-HSA를 처리하여 자극한 대조군의 경우 45.78 ± 3.14 ng/L으로 PGE₂ 양이 유의적으로 증가하였다. DNP-HSA 자극에 의해 증가한 PGE₂ 생성 분비는 으뜸도라지추출물

처리에 의해 현저히 감소하였다 (Fig. 4A). DNP-HSA로 자극하지 않은 RBL-2H3 세포에서 생성 분비된 LTB₄ 양은 28.17 ± 3.32 ng/L이었으나, DNP-HSA로 세포를 자극했을 때 LTB₄ 양은 현저히 증가하여 45.64 ± 3.79 ng/L을 나타내었다. 증가된 LTB₄ 양은 으뜸도라지추출물의 처리 농도가 증가할수록 유의적으로 감소하였으며, 200 µg/mL 농도로 처리하였을 때 LTB₄ 양은 64.9% 감소하였다 (Fig. 4B). 반면 200 µg/mL 농도의 재래종도라지추출물 처리시 DNP-HSA 자극에 의해 유도된 PGE₂는 같은 농도의 으뜸도라지추출물 처리에 의한 값과 통계적 차이가 없었으나, LTB₄는 으뜸도라지추출물 처리에 비해 재래종도라지추출물 처리시에 유의하게 ($p < 0.01$) 높았다 (Fig. 4).

고 찰

도라지는 다양한 약리작용으로 주목받는 약용식물로 약효를 나타내는 주성분은 사포닌계로서 platycodin A, C, D와 polygalacin D 등의 성분이 알려져 있다. Kang 등¹⁵은 도라지의 대표적 활성성분인 사포닌 함량이 일반도라지와 비교하여 으뜸도라지가 약 2배 이상 함유하고 있어 으뜸도라지가 일반도라지에 비해 높은 생리활성을 기대할 수 있을 것이라 예상하였다. 최근 platycodin D의 항염, 아토피 피부염 개선 및 아나필락틱 쇼크 억제효과¹³ 등 도라지의 알레르기질환 개선 효과를 보고하였다. 그러나 높은 생리활성이 예상되는 으뜸도라지의 알레르기 질환에 미치는 영향에 대한 연구된 바가 없다. 본 연구는 으뜸도라지추출물이 알레르기 반응에 중요한 역할을 하는 비만세포의 활성화 억제 및 항알레르기 효과에 대해 조사하였다. 먼저 으뜸도라지추출물 (50, 100 및 200 µg/mL) 처리에 따른 RBL-2H3 비만세포의 세포독성을 조사한 결과 으뜸도라지추출물은 모든 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다 (Fig. 1). 이는 으뜸도라지추출물을 향후 안전하게 건강 기능성 식품 소재로 사용할 수 있음을 간접적으로 나타낸다.

비만세포는 세포질 내에 과립을 갖고 있는 세포로 주로 피부, 호흡기, 위장관 점막 등에 존재하면서 알레르기 염증 반응에 관여한다. 특히 IgE-FcεRI 반응에 의해 과립 내의 화학 매개체와 염증성 사이토카인들을 분비하면서 알레르기의 초기반응과 후기반응을 일으키며 만성적으로 염증을 지속시키는데 중요한 역할을 하는 세포이다.¹⁷⁻²⁰ 비만세포의 과립 내에는 외부자극을 받기 전에 이미 생성되어 저장되어있는 물질과 자극 받은 후에 새롭게 생성 분비되는 물질이 있다. 그 중 히스타민 (histamine), 프로테오글리칸 (proteoglycan), 세린 프로테아제 (serine proteases) 등은 알레르기 반응 이전에 생성되어 존재하고 있으며, 알레르기

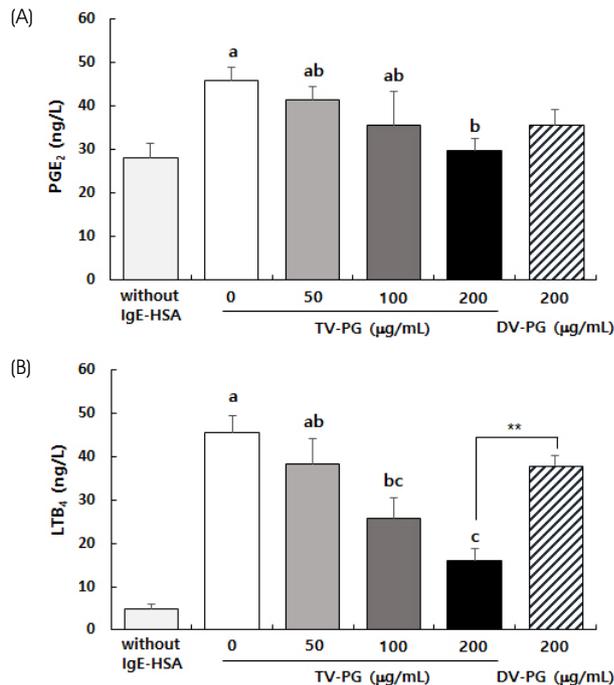


Fig. 4. Effects of TV-PG on the production of PGE₂ (A) and LTB₄ (B) in RBL-2H3 cells. The cells were sensitized with anti-DNP IgE (50 ng/ml), stimulated by DNP-HSA (10 µg/ml) and treated various concentrations of TV-PG as described in Fig 2. Conditioned media were collected after 6 h. The concentrations of PGE₂ and LTB₄ in the conditioned media were measured using the relevant ELISA kits. Each bar represents mean ± SEM (n = 4). Means without a common letter differ, $p < 0.05$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significantly different from that of 200 µg/mL TV-PG treated group. TV-PG = the aqueous extract of a tetraploid 'Etteum' variety in *Platycodon grandiflorum*, DV-PG = the aqueous extract of a domestic diploid variety in *Platycodon grandiflorum*.

자극을 받으면 화학 매개체들이 외부로 유리된다.²¹ β -hexosaminidase은 비만세포의 히스타민이 저장된 과립 안에 존재하며 알레르기 반응에 의해 세포 밖으로 분비되므로 탈과립현상의 생체지표물질로 이용된다.²² 비만세포의 탈과립현상에 대한 으뜸도라지추출물의 효과를 알아보기 위해 측정된 β -hexosaminidase의 분비량은 으뜸도라지추출물의 처리농도가 증가함에 따라 β -hexosaminidase의 분비를 유의적으로 억제하였으며, 특히 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 재래종도라지추출물과 비교했을 때 으뜸도라지추출물의 탈과립 억제효과가 약 10배 높게 나타났다 (Fig. 2). 이것은 으뜸도라지추출물이 초기 알레르기 반응을 매우 효과적으로 제어할 수 있음을 시사한다.

비만세포는 Fc ϵ RI의 자극을 통해 다양한 사이토카인 (IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α) 들을 생산, 분비하게 되는데 이는 전염증성 신호분자 (pro-inflammatory signal molecule)의 발현을 촉진시켜 알레르기 염증반응을 일으킨다.²³ 이중 IL-4는 활성화된 T세포의 Th2형 림프구로의 분화유도 및 활성화된 B세포에서 IgE의 생성을 촉진시키는 사이토카인으로 실제 알레르기환자에서 IL-4의 농도가 증가되어 있음이 보고되었다.²⁴⁻²⁷ RBL-2H3세포에서 DNP-HSA 자극에 의해 현저히 증가된 IL-4 분비량은 으뜸도라지추출물에 의해 유의적으로 감소하였고, 이는 동일농도의 재래종도라지추출물과 비교하였을 때 높은 억제효과를 나타냈다 (Fig. 3A).

전구염증성인자인 TNF- α 는 알레르기 반응이 시작되면 비만세포에서 탈과립되면서 히스타민 및 다른 염증 매개인자들과 함께 유출되게 되며, 유출된 TNF- α 는 아라키돈산 대사산물, IL-2, IL-6, IL-8등의 여러 사이토카인 및 염증매개체들의 생성을 유도, 증가시켜 알레르기 증상을 더욱 악화시킨다.²⁸⁻³¹ 특히, 아라키돈산의 대표적 대사산물인 PGE₂, Leukotriene (LT)C₄, LTD₄, LTE₄의 증가는 기도 내 염증세포의 침윤증가, 점액분비 증가, 혈관 투과성의 증가 및 부종을 일으킨다.^{32,33} RBL-2H3 세포에서 분비된 TNF- α 양은 DNP-HSA 자극에 증가하였고, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 으뜸도라지추출물을 처리는 TNF- α 분비량을 대조군에 비해 30% 감소시켰다 (Fig. 3B). 또한 RBL-2H3 세포에서 DNP-HSA 자극에 의해 증가한 염증성 매개인자인 PGE₂와 LTB₄ 분비도 으뜸도라지추출물 처리에 의해 현저히 감소하였다 (Fig. 4A).

이러한 결과는 으뜸도라지추출물이 DNP-HSA로 자극한 RBL-2H3 세포에서 전염증성 사이토카인인 IL-4와 TNF- α 의 생성 및 화학적 매개물질인 PGE₂와 LTE₄의 생성을 효과적으로 억제하여 염증성 알레르기를 억제하는 기전을 가지고 있음을 보여준다.

이상의 결과로 볼 때, 으뜸도라지추출물은 세포독성이 활성화된 비만세포의 탈과립을 억제하고 초기 화학적 매개물질의 방출을 감소시키며, 전염증성 사이토인과 염증매개체의 분비를 감소시키는 효과가 있어 알레르기질환의 기능성소재로 활용될 수 있을 것으로 보인다. 향후 알레르기 반응 억제 관련 소재로서 으뜸도라지추출물을 사용하기 위해서는 으뜸도라지추출물 내 유효성분의 탐색 및 작용기전 연구와 동물실험을 통한 생체 내 효능 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 으뜸도라지추출물의 항알레르기 효과를 조사하기 위해 실시하였다. 으뜸도라지추출물 (50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처리에 따른 RBL-2H3 비만세포의 세포독성을 조사한 결과 으뜸도라지추출물은 모든 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았고, β -hexosaminidase assay를 통해 비만세포의 탈과립 억제능을 평가한 결과 재래종도라지추출물과 비교하여 β -hexosaminidase 억제능이 10배 뛰어남을 확인하였다. 또한 으뜸도라지추출물은 RBL-2H3 비만세포에서 탈과립 후 유리되는 대표물질인 IL-4, TNF- α , PGE₂ 및 LTB₄의 생성 분비를 현저히 감소시켰고, 이러한 효과는 재래종도라지와 비교하여 월등한 것으로 나타났다. 이상의 결과는 으뜸도라지추출물이 알레르기 반응을 효과적으로 억제함을 제시하며 향후 항알레르기 기능성 소재로 개발 가능성이 있음을 나타낸다.

ORCID

정재인: <https://orcid.org/0000-0002-4475-1434>

김형서: <https://orcid.org/0000-0002-7191-8201>

지한결: <https://orcid.org/0000-0002-2097-393X>

이현숙: <https://orcid.org/0000-0002-8642-1978>

이재용: <https://orcid.org/0000-0002-9820-1235>

김은지: <https://orcid.org/0000-0001-9305-4769>

References

1. Nauta AJ, Engels F, Knippels LM, Garssen J, Nijkamp FP, Redegeld FA. Mechanisms of allergy and asthma. *Eur J Pharmacol* 2008; 585(2-3): 354-360.
2. Kim BK, Kim JY, Kang MK, Yang MS, Park HW, Min KU, Cho SH, Kang HR. Allergies are still on the ride? A 6-year nationwide population-based study in Korea. *Allergol Int* 2016; 65(2): 186-191.
3. Galli SJ. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med*

- 1993; 328(4): 257-265.
4. Mainardi T, Kapoor S, Bielory L. Complementary and alternative medicine: herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123(2): 283-294.
 5. Kim JM, Kim DJ, Kim TH, Baek JM, Kim HS, Cho M. Effects of water extract of glycyrrhiza uralensis on β -hexosaminidase release and expression of the cytokines of RBL-2H3 mast cells. *Korean J Med Crop Sci* 2010; 18(4): 231-237.
 6. Kim SB, Kang BH, Kwon HS, Kang JH. Antiinflammatory and antiallergic activity of fermented turmeric by *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203. *Korean J Microbiol Biotechnol* 2011; 39(3): 266-273.
 7. Fu M, Fu S, Ni S, Zou L, Liu Y, Hong T. Anti-inflammatory effect of epigallocatechin gallate in a mouse model of ovalbumin-induced allergic rhinitis. *Int Immunopharmacol* 2017; 49: 102-108.
 8. Lee EB. Pharmacological studies on "platycodi radix". *Korean J Pharmacogn* 1974; 5(1): 49-51.
 9. Byun BH. Antiobesity effects of *Platycodon grandiflorum* extract on body weight changes and serum lipid profiles of obese rats induced high fat diet. *J Life Sci* 2003; 13(6): 896-902.
 10. Zhao HL, Cho KH, Ha YW, Jeong TS, Lee WS, Kim YS. Cholesterol-lowering effect of platycodin D in hypercholesterolemic ICR mice. *Eur J Pharmacol* 2006; 537(1-3): 166-173.
 11. Kim SH, Chung MJ. Safety and anticancer effects of platycodon grandiflorum extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2015; 44(4): 516-523.
 12. Kim YP, Lee EB, Kim SY, Li D, Ban HS, Lim SS, Shin KH, Ohuchi K. Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of *platycodon grandiflorum*. *Planta Med* 2001; 67(4): 362-364.
 13. Park SJ, Kim YS, Kim TJ. Inhibitory effect of PG-platycodin D on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in ICR mice. *J Life Sci* 2012; 22(10): 1339-1343.
 14. Joe SY. Short-term cultivation of bell-flower roots. Suwon: Rural Development Administration; 2012.
 15. Kang DK, Kim EJ, Park YJ, Kim TJ, Kim MR. Comparison of antioxidant activities and quality characteristics between domestic diploid variety and tetraploid 'etteum' variety in *Platycodon grandiflorum*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2017; 46(2): 196-201.
 16. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89(2): 271-277.
 17. Nakae S, Suto H, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell-derived TNF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(18): 6467-6472.
 18. Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev* 2000; 173: 131-140.
 19. Gurish MF, Austen KF. The diverse roles of mast cells. *J Exp Med* 2001; 194(1): F1-5.
 20. Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344(1): 30-37.
 21. Schwartz LB, Huff TF. Biology of mast cells. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkins NF, Yunginger JW, Busse WW, editors. *Allergy: Principles and Practice*. 5th ed. St. Louis (MO): Mosby; 1998. p.261-276.
 22. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005; 6(2): 135-142.
 23. Ngoc PL, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedón JC. Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5(2): 161-166.
 24. Borish L, Rosenwasser LJ. Cytokines in allergic inflammation. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkins NF, Yunginger JW, Busse WW, editors. *Allergy Principles and Practice*. 5th ed. St. Louis (MO): Mosby; 1998. p.108-123.
 25. Lee CH, Rhee CS, Oh SH, Min YG, Lee MS. Increase in expression of IL-4 and IL-5 mRNA in the nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis during natural allergen exposure. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106(3): 215-219.
 26. Boushey HA, Fahy JV. Targeting cytokines in asthma therapy: round one. *Lancet* 2000; 356(9248): 2114-2116.
 27. Kariya S, Okano M, Hattori H, Sugata Y, Matsumoto R, Fukushima K, Schachem PA, Cureoglu S, Paparella MM, Nishizaki K. Th1/Th2 and regulatory cytokines in adults with otitis media with effusion. *Otol Neurotol* 2006; 27(8): 1089-1093.
 28. Chung KF, Barnes PJ. Cytokine in asthma. *Thorax* 1999; 54(9): 825-857.
 29. Nonomura N, Giebink GS, Zelterman D, Harada T, Juhn SK. Early biochemical events in pneumococcal otitis media: arachidonic acid metabolites in middle ear fluid. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991; 100(5 Pt 1): 385-388.
 30. Norris JG, Tang LP, Sparacio SM, Benveniste EN. Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1994; 152(2): 841-850.
 31. Maxwell KS, Fitzgerald JE, Burleson JA, Leonard G, Carpenter R, Kreutzer DL. Interleukin-8 expression in otitis media. *Laryngoscope* 1994; 104(8 Pt 1): 989-995.
 32. Ennis M, Pearce FL, Weston PM. Some studies on the release of histamine from mast cells stimulated with polylysine. *Br J Pharmacol* 1980; 70(2): 329-334.
 33. Kemp SF, Lockey RF. Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110(3): 341-348.