pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 3, pp. 189~197 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.3.189

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

천연물 추출물이 대식세포 및 호염구 활성 억제에 미치는 영향

박재현[1] · 장지민[1] · 차상률[1] · 백효신[1] · 이주연[1] · 이유희[2] · 류세민[1]* · 양세란[1]*
[1]강원대학교 의학전문대학원·의학과, [2]㈜큐어슨

Effect of Natural Product Extracts on Inhibition of Macrophage and Basophil

Jaehyun Park[1], Jimin Jang[1], Sang-Ryul Cha[1], Hyosin Baek[1], Jooyeon Lee[1], You-Hui Lee[2], Semin Ryu[1]*, Se-Ran Yang[1]*
[1]*School of Medicine · Department of Medicine, Kangwon National University, Chuncheon, Korea*
[2]*Cureson Co., Ltd, Seoul, Korea*

(Received February 16, 2022/Revised April 26, 2022/Accepted May 20, 2022)

ABSTRACT - Asthma is a chronic inflammatory disease characterized by recurring symptoms, airflow obstruction, and bronchial hyper-responsiveness. The onset of asthma for most patients begins early in life, and current asthma treatment with anti-inflammatory agents can have adverse effects, eventually leading to impaired quality of life. In the pathogenesis of asthma, macrophages and basophils play a vital role during progression. Macrophages not only induce inflammation by secreting inflammatory cytokines but also promote DNA damage and mucus production through nitric oxide (NO) production. Basophils enhance eosinophil recruitment and aggravate asthma through the FcεRIα receptor with high affinity for histamine and IgE. Therefore, in this study, we investigated whether the activation of macrophages and basophils is suppressed by the individual extracts of 28 natural products. RAW 264.7 cells (mouse macrophages) were treated with the natural products in LPS, and 4 natural product extracts resulted in decreased NO production. In β-hexosaminidase assay using RBL-2H3 cells (rat basophils), 19 natural product extracts decreased β-hexosaminidase production. In NO production and β-hexosaminidase assay using macrophages and basophils, 3 natural product extracts (*Plantago asiatica*, *Centella asiatica*, and *Perilla frutescens var. japonica*) significantly inhibited NO production and β-hexosaminidase release. Overall, we examined the inhibitory effects of 28 natural product extracts on macrophage and basophil activity, and the findings demonstrated the potential of natural product extracts for treating asthma and macrophage- and basophil-related diseases.

Key words: Natural product, Asthma, Nitric Oxide, β-hexosaminidase, Macrophage, Basophil

천식은 전 세계적으로 가장 흔한 만성질환 중 하나로써 세포내 염증, 평활근 비대증, 콜라겐 침착 등으로 인한 조직 리모델링의 특징을 가지는 질환이다[1]. 이러한 천식은 호흡곤란, 가슴통증, 기침과 같은 비특이적인 증상을 가지고 있으며[2], 일반적으로 천식 환자들은 Global Initiative for Asthma (GINA)에서 권장하는 예방 요법으로 증상을 제어할 수 있으나, 약 5-10% 환자들은 통제되지 않은 상태로 남아있다[3]. 이러한 환자들은 corticosteroid와 같은 기존 치료제의 부작용을 경험할 수 있으며 이는 경제적 부담과 일상적 기능 및 삶의 질 저하로 이어진다[4]. 이와 같은 이유로 인하여 천연물 추출물을 이용한 치료제가 주목받고 있다. 천연물 추출물은 기존의 치료제보다 저렴한 비용, 적은 부작용, 생체적합성등과 같은 장점이 있다. *Atropa belladonna L* 에서 추출한 ipratropium bromide, *Theobroma cacao L* 에서 추출한 theophylline 등과 같이 천연물에서 추출한 천식 치료제들이 널리 쓰이고 있으며 현재의 천식 치료법들은 지난 수십 년간 연구된 약물과 밀접한 연관이 있기 때문에[5] 다양한 천연물 추출물을 이용한 실험적 연

*Correspondence to: Semin Ryu, Department of Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: +82-33-250-7883, Fax: +82-33-255-8809
E-mail: semin@kangwon.ac.kr
*Co-Correspondence to: Se-Ran Yang, Department of Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: +82-33-250-7883, Fax: +82-33-255-8809
E-mail: seran@kangwon.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

구는 가까운 미래에 천식 치료제 개발을 가능하게 만들 수 있을 것으로 여겨진다.

천식의 병리는 Type2-high 와 Type2-low inflammation으로 나눠질 수 있다. Type2 inflammation은 IL-25 또는 IL-33과 같은 사이토카인에 의해 발생하며 이는 Th2 세포를 자극하여 IL-4, IL-5, IL-13과 같은 사이토카인을 방출하게 된다. 방출된 사이토카인들은 호산구(Eosinophil) 또는 비만세포(Mast cell)를 자극하여 천식 발달에 영향을 미치게 되며, 결국 기도 과민반응(Airway hyperresponsiveness)과 점액 과분비(Mucous hypersecretion)로 이어지게 된다[6]. 이러한 병리에 다른 면역세포들도 관여할 수 있는데, 이 중 대식세포(Macrophage)와 호염구(Basophil)가 큰 영향을 미치는 것으로 여겨진다. 대식세포는 TNF-α 와 IL-1β와 같은 염증성 사이토카인을 방출함으로써 만성 염증을 유발할 수 있다[7]. 또한, 대식세포는 M1 표현형과 M2 표현형으로 분극화할 수 있는데, 일반적으로 M1 대식세포는 염증 발달에 기여하는 반면, M2 대식세포는 조직 복구에 관여하는 것으로 알려져 있으며, M2 대식세포는 염증반응 및 콜라겐 침착을 증가시켜 천식을 악화시킬 수 있다[8]. M1 대식세포의 경우 산화질소를 생성하여 DNA 손상과 염증을 유발하고 점액 생성을 증가시켜 천식을 악화시킬 수 있다[9]. 한편, 호염구는 히스타민 및 IgE에 대한 높은 친화력을 가진 FcεRIα 수용체를 가지고 있으며 이는 천식을 악화시킬 수 있는 기전으로 작용하여[10], 천식에서 FcεRIα를 억제하면 Th2 면역에 관여하는 염증성 수지상세포를 억제할 수 있다는 연구결과가 존재한다[11]. 또한 호염구는 IL-4 분비를 통해 호산구의 침윤을 증가시키는 것으로 보고되었다[12]. 따라서, 본 연구에서는 앞서 언급했던 천연물의 장점을 극대화 하고자 하여 주변에서 접하기 쉬우며 약재 혹은 식용으로 쓰이는 28가지 천연물을 선정하였고, 각 천연물의 특정 분획에서 유래한 추출물을 이용하여 천식 발달에 기여할 수 있는 대식세포와 호염구의 활성을 조절할 수 있는지 분석하였다.

Table 1. The scientific name and fraction source of each natural product

Korean name	Scientific name	Fraction
질경이	*Plantago asiatica*	Aerial part
병풀	*Centella asiatica*	Aerial part
표고버섯	*Lentinula edodes*	Fruit body
양파	*Allium cepa*	Bulb
가시박	*Sicyos angulatus*	Aerial part
생강	*Zingiber officinale*	Rhizoma
들깨	*Perilla frutescens var. japonica*	Leaf
쿠딩차	*Ilex kaushue*	Leaf
브로코리	*Brassica oleracea var. italica*	Floret
대파	*Allium fistulosum*	Whole plant
숙주나물	*Vigna radiata*	Sprout
콩나물	Soybean sprout	Sprout
당귀	*Angelica gigas*	Leaf
보리	*Hordeum vulgare var. hexastichon*	Sprout
밀	*Triticum aestivum*	Sprout
메밀	*Fagopyrum esculentum*	Sprout
도라지	*Platycodon grandiflorum*	Root
토란	*Colocasia esculenta*	Stem
용안	*Dimocarpus longan*	Arillus
호로파	*Trigonella foenum-graecum*	Seed
쓴메밀	*Fagopyrum tataricum*	Seed
키위	*Actinidia deliciosa*	Fruit
하귤	*Citrus natsudaidai*	Fruit
메밀	*Fagopyrum esculentum*	Aerial part
신나무	*Acer tataricum subsp. ginnala*	Leaf
신나무	*Acer tataricum subsp. ginnala*	Root
양하	*Zingiber mioga*	Aerial part
참외	*Cucumis melo var. makuwa*	Leaf
까마귀쪽나무	*Litsea japonica*	Fruit

Materials and Methods

추출물의 제조

모든 천연물 추출물은 ㈜큐어슨에서 제공받았다. 시료의 식물명 또는 학명 및 사용 부위는 Table 1에 정리하였다. 각 식물의 해당하는 분획에 중량 대비 10배의 70% EtOH 를 가하여 100°C에서 2시간 추출하여 얻은 엑기스를 감압 농축하여 건조한 후 실험에 사용하였다.

세포 배양

마우스 대식세포주 Raw 264.7 및 레트 호염구세포주 RBL-2H3 는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포주는 세포 배양기에서 37°C, 5% CO_2 의 조건을 유지하며 배양되었다. Raw 264.7 세포는 1% penicillin streptomycin과 10% 우태아혈청(FBS)을 함유한 RPMI-1640 배지를 사용하였고, RBL-2H3 세포는 1% penicillin streptomycin과 10% 우태아혈청을 함유한 DMEM 배지를 사용하였다.

세포 생존율 분석

세포 생존율 분석을 위하여 이전의 연구방법[13]에 따라 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay를 수행하였다. Raw 264.7 세포를 24 well plate에 1×10^5개만큼 부착하였고 1X PBS로 2번 세척한 뒤 각 천연물 추출물을 각 농도별(10 μg/mL, 30 μg/mL, 100 μg/mL)로 배지에 희석하여 1시간 동안 처치하였다. 그 후, MTT reagent (5 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 배지에 혼합하여 2시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 형성된 결정체를 DMSO를 이용해 융해시켰고, 스펙트럼 분석기를 이용하여 540 nm 흡광도로 측정하였다. 아무런 추출물도 처치하지 않은 군을 대조군으로 하여 세포 생존율을 분석했다.

산화질소 (NO) 측정

산화질소 측정을 위하여 Griess reagent (Sigma-Aldrich)를 사용하였다. Raw 264.7 세포를 24 well plate에 1×10^5 개만큼 부착하였고 1X PBS로 2번 세척한 뒤 각 천연물 추출물을 각 농도별(10 μg/mL, 30 μg/mL, 100 μg/mL)로 배지에 희석하여 1시간 동안 처치하였다. 그 후, lipopolysaccharide (E.coli O26:B6, Sigma-Aldrich) 를 배지에 혼합하여 24시간 동안 배양하였다. 상층 액을 96 well plate로 옮긴 후, griess reagent를 배양액과 1:1 비율로 혼합한 뒤 암실에서 10분간 대기한 후 스펙트럼 분석기를 이용하여 540 nm 흡광도로 측정하였다. 아무런 추출물도 처치하지 않고 LPS 만 처치한 그룹을 양성 대조군으로 하여 산화질소 감소율을 측정하였다.

β-Hexosaminidase 분비량 측정

RBL-2H3 세포를 24 well plate에 2×10^5개만큼 부착하였고, 25 ng/mL anti-DNP IgE (D8406, Sigma-Aldrich)가 포함된 DMEM 배지를 넣고 4시간 동안 배양하였다. 그 후, Siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM $MgCl_2$, 25 mM PIPES, 1 mM $CaCl_2$, 0.1% BSA, pH 7.2)로 2회 세척 후, 각 천연물 추출물을 각 농도별(10 μg/mL, 30 μg/mL, 100 μg/mL)로 Siraganian buffer에 희석하여 1시간 동안 처치했다. 양성 대조군으로는 30 μg/mL Ketotifen (K2628, Sigma-Aldrich)을 사용했다. Siraganian buffer를 이용하여 2회 세척 후, 100 ng/mL DNP-BSA (A23018, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 넣고 20분간 배양하였다. 상층액과 substrate buffer (4-p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide) 2 mM (487052, Calbiochem, La Jolla, CA, USA), sodium citrate, 0.05 M, pH 4.5)를 1대 1 비율로 혼합한 뒤 1시간 동안 37°C에서 반응시켰다. Stop solution ($NaHCO_3$, pH 10.0)을 넣고 반응을 종결시킨 후 스펙트럼 분석기를 이용하여 405 nm 흡광도로 측정하였다. 아무런 추출물도 처치하지 않고 IgE만 처치한 그룹을 대조군으로 하여 β-hexosaminidase 분비량을 측정하였다.

통계학적 분석

모든 통계학적 분석은 GraphPad Prism 9 프로그램을 이용하였으며, One-way analysis of variance (ANOVA)검정 Bonferroni post-hoc test 방법으로 실시하였다. 대조군과 비교하여 $P < 0.05$ 일때 유의적이라 하였으며, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 으로 나타내었다.

Results

천연물 유래 추출물이 대식세포 생존율에 미치는 영향

각 시료들은 해당하는 식물의 부위에서 70% EtOH를 이용하여 추출하였다(Table 1). 각 추출물들은 저농도, 적정농도, 고농도로 각각 10 μg/mL, 30 μg/mL, 100 μg/mL로 설정한 뒤 실험에 사용하였다. 각 추출물이 대식세포 생존율에 미치는 영향을 평가하기 위하여 마우스 대식세포주인 Raw 264.7 세포를 이용해 1시간 동안 각 농도별 추출물을 처치한 뒤 생존율을 측정했다(Table 2). 이후 실험인 대식세포 활성화 억제 효과에서 추출물 자체의 독성으로 인해 활성화가 억제될 수 있으므로 추출물의 독성으로 세포를 죽여 활성을 억제시키는 것이 아닌 추출물 자체의 효과로 인해 활성을 억제시키는 것이 중요하다.

아무것도 처치하지 않은 대조군을 100%로 할 때, 각 군의 생존율을 백분율로 나타내었다. 일단 대부분의 시료들은 생존율에 유의미한 변화를 보이지 않았다. 그러나, *Lentinula edodes, Perilla frutescens var. japonica, Brassica*

Table 2. Natural products induced viability in Raw 264.7 cells

Name	Concentration (μg/mL)		
	10	30	100
CTL		100±0	
Plantago asiatica	95.0±0.1	96.0±1.0	95.1±0.6
Centella asiatica	92.1±1.1	90.5±1.6	89.6±0.1
Lentinula edodes	85.4±2.2**	90.9±5.9	85.1±12.2**
Allium cepa	92.7±0.5	96.5±0.1	96.0±2.0
Sicyos angulatus	104.3±0.5	96.3±3.9	85.4±1.7
Zingiber officinale	105.0±1.6	102.3±1.8	101.4±1.4
Perilla frutescens var. japonica	96.5±2.8	91.8±3.6	83.4±0.9***
Ilex kaushue	95.1±4.5	102.6±3.3	92.9±4.0
Brassica oleracea var. italica	104.7±5.9	94.6±0.9	70.5±0.1***
Allium fistulosum	98.7±5.7	91.2±3.4	86.2±0.9**
Vigna radiata	96.8±6.3	93.6±5.1	98.0±4.6
Soybean sprout	98.8±6.7	92.1±0.3	92.7±8.2
Angelica gigas	100.7±7.1	105.7±6.5	108.9±9.7
Hordeum vulgare var. hexastichon	102.0±3.5	95.4±7.9	93.3±6.0
Triticum aestivum	92.7±7.1	90.1±1.5	80.0±0.3
Fagopyrum esculentum	93.1±13.0	89.7±9.5	78.8±4.3
Platycodon grandiflorum	95.4±2.0	93.3±7.3	98.7±2.5
Colocasia esculenta	70.7±12.5	89.2±11.5	95.3±22.8
Dimocarpus longan	95.7±14.6	98.0±1.5	93.3±0.5
Trigonella foenum-graecum	87.7±12.5	94.0±12.8	93.9±19.2
Fagopyrum tataricum	116.1±1.5	117.9±12.3	98.9±3.3
Actinidia deliciosa	94.2±0.3	100.5±27.6	95.3±7.4
Citrus natsudaidai	100.7±4.3	102.4±0.0	93.9±0.8
Fagopyrum esculentum	102.7±12.3	97.1±2.8	87.7±9.5
Acer tataricum subsp. Ginnala (Leaf)	102.7±2.4	99.7±0.7	100.2±1.9
Acer tataricum subsp. Ginnala (Root)	98.3±2.5	95.4±4.6	92.7±2.4
Zingiber mioga	107.3±1.5	106.5±3.5	108.1±1.3
Cucumis melo var. makuwa	107.6±2.7	108.4±1.3	106.9±0.1
Litsea japonica	103.5±6.1	99.7±6.2	101.6±4.6

Raw 264.7 cells were treated with each natural product at each concentration (μg/mL) for 1 hour. Each data means±SD deviation. A value of $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ was compared with CTL group by one-way ANOVA.

*oleracea var. italic, Allium fistulosum*은 농도 의존적으로 생존율이 감소하는 모습을 보였다. *B. oleracea* 고농도의 경우, 약 70%까지 유의적으로 감소하는 경향을 보이기도 하였다. 그 외에, 흥미롭게도 *Colocasia esculent*의 경우엔 저농도에서 고농도로 갈수록 생존율이 증가하는 모습을 보였다. 세포 생존율에서 *L. edodes*의 저농도와 고농도, *P. frutescens*의 고농도, *B. oleracea*의 고농도, *A. fistulosum*의 고농도에서 유의적인 생존율 하락을 보였다. 이는 천연물 추출물 자체의 독성에 대한 평가로, 추후 실험인 대식세포 활성 억제 효과 평가에서 천연물 효능에 의한 대식세포 활성 억제 보다 천연물 추출물의 독성으로 인한 활성 억제일 수 있으므로 주의가 필요할 것으로 생각된다.

천연물 유래 추출물의 대식세포 활성 억제 효과

대식세포에서 분비되어 생성되는 산화질소는 DNA 손상과 염증을 유발하고 점액 생성을 증가시켜 천식을 악화시킬 수 있기 때문에[8,14], 염증 상황에서 각 추출물들이 얼마나 산화질소를 억제할 수 있는지를 규명하고자 하였다.

Raw 264.7 세포에서 각 추출물들을 1시간 동안 처치한 뒤, 24시간 동안 LPS로 자극시켜 생성된 산화질소를 측정하였다(Table 3). 아무런 추출물도 처치하지 않은 양성 대조군(LPS 그룹)을 100%로 하여, 감소 정도를 inhibition rate로 나타내었다. 천연물 유래 추출물들은 저농도에서 고농도로 갈수록 산화질소를 감소시키는 양상을 나타내었으나, 유의성은 나타나지 않았다. 이들 중 유의적으로 산화질소를 감소시켰던 천연물은 4가지(*Plantago asiatica, Centella asiatica, Perilla frutescens var. japonica, Litsea japonica*)였다. *P. asiatica* 는 저농도에서는 산화질소를 감소시키지 않았지만 적정농도 및 고농도에선 유의적으로 감소시켰다. *C. asiatica* 는 저농도에서도 산화질소를 86%가량 억제하였고, 고농도에서는 유의적으로 감소시켰다. *P. frutescens* 는 저농도에서는 변화가 없었지만 적정농도 및 고농도에서 유의적인 감소를 보였다. *L. japonica* 또한 저농도에서는 변화가 없었고, 적정농도 및 고농도에서 유의적인 감

Table 3. The inhibition rate (%) of nitric oxide in Raw 264.7 cells

Name	Concentration (μg/mL)		
	10	30	100
CTL		4.4±0.6	
LPS		100.0±1.6	
Plantago asiatica	109.5±16.1	73.8±9.6**	56.5±7.5***
Centella asiatica	86.1±7.4	72.7±1.3**	68.5±6.7***
Lentinula edodes	97.7±11.5	92.1±6.4	92.3±6.8
Allium cepa	89.5±0.9	83.5±1.3	96.8±11.8
Sicyos angulatus	102.5±0.5	99.7±0.4	83.2±0.3***
Zingiber officinale	95.4±1.6**	94.1±0.7***	86.6±0.7***
Perilla frutescens var. japonica	99.9±4.9	69.6±4.8**	19.4±3.1***
Ilex kaushue	110.1±4.9	106.2±10.2	85.2±8.6
Brassica oleracea var. italica	116.8±8.2	96.2±11.7	92.6±9.8
Allium fistulosum	91.4±3.7	92.9±5.5	102.4±2.6
Vigna radiata	132.0±16.9***	116.2±2.9	107.3±4.5
Soybean sprout	123.6±5.9***	110.9±7.9	106.9±11.8
Angelica gigas	115.6±5.8	115.0±3.9	126.3±10.3***
Hordeum vulgare var. hexastichon	114.9±11.7	104.9±3.5	121.2±5.9**
Triticum aestivum	108.3±2.1	87.0±11.5	85.7±1.4
Fagopyrum esculentum	119.0±5.8*	97.2±11.2	84.0±3.1
Platycodon grandiflorum	111.3±2.9	100.6±1.6	112.0±0.8
Colocasia esculenta	108.4±0.5***	107.5±0.7***	107.0±1.5**
Dimocarpus longan	104.7±3.7	105.2±2.3	106.5±3.1**
Trigonella foenum-graecum	104.8±1.7	106.9±0.8**	109.5±0.7***
Fagopyrum tataricum	101.1±3.8	97.8±1.0	93.2±0.2**
Actinidia deliciosa	104.0±1.0	103.0±1.9	102.6±0.5
Citrus natsudaidai	101.9±1.9	100.5±1.0	104.3±0.8
Fagopyrum esculentum	100.3±1.6	103.7±0.6	101.3±1.0
Acer tataricum subsp. Ginnala (Leaf)	106.2±2.1***	104.6±0.9**	101.3±1.0
Acer tataricum subsp. Ginnala (Root)	104.6±1.8**	99.5±1.3	98.5±0.7
Zingiber mioga	105.6±1.4***	100.4±0.5	88.0±1.6***
Cucumis melo var. makuwa	103.3±0.6	101.7±2.6	99.2±1.4
Litsea japonica	100.3±0.4	41.7±0.9***	13.6±1.4***

Raw 264.7 cells were treated with each natural product at each concentration (μg/mL) for 1 hour. And then, LPS (1μg/mL) were treated for 24 hours. A value of $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, and $***P < 0.001$ was compared with CTL group by one-way ANOVA.

소를 보였다. 이 외에도 *Zingiber officinale* 가 적정농도 및 고농도에서 유의적인 감소를 보였지만, 감소 정도가 적었다. 4가지 천연물, *P. asiatica, C. asiatica, P. frutescens, L. japonica* 은 적정농도에서 약 70%의 억제율을 보였고, *L. japonica* 고농도의 경우 약 13%의 가장 높은 억제력을 보여주었다.

천연물 유래 추출물의 β-hexosaminidase 분비 억제 효과

호염구가 IgE에 감작되면 β-hexosaminidase이 방출되면서 천식 악화에 기여할 수 있다[14]. 따라서, 레트 호염구세포인 RBL-2H3 세포에서 β-hexosaminidase 분비량을 측정하였다. 전과 마찬가지로, IgE로 감작시킨 군을 100%로 하여 감소한 정도를 측정하였다. 또한 히스타민 억제제로 알려진 Ketotifen[15]을 양성 대조군으로 하여 감소 정도를

Table 4. The inhibition rate (%) of β-hexosaminidase in RBL-2H3 cells

Name	Concentration (μg/mL)		
	10	30	100
CTL		14.9±2.6	
IgE		100.0±5.7	
Ketotifen		72.4±0.9[a]	
Plantago asiatica	87.7±1.3[a]	76.2±2.1[a]	70.0±3.0[a]
Centella asiatica	72.8±4.1[a]	68.7±4.9[a]	79.9±1.6[a]
Lentinula edodes	104.5±0.9[b]	83.6±2.3[a]	71.6±1.6[a]
Allium cepa	99.2±4.1[b]	88.9±1.2[a,b]	96.7±1.0[b]
Sicyos angulatus	80.4±3.0[a]	75.7±3.0[a]	57.8±3.8[a]
Zingiber officinale	66.9±7.7[a]	64.2±1.8[a]	77.9±2.9[a]
Perilla frutescens var. japonica	67.3±4.0[a]	68.2±0.8[a]	42.5±1.4[a,b]
Ilex kaushue	81.7±1.1[a]	78.2±5.4[a]	74.2±0.5[a]
Brassica oleracea var. italica	89.7±3.2[b]	90.9±1.4[b]	86.3±6.3[a,b]
Allium fistulosum	82.3±6.1[a]	86.3±3.3[a,b]	82.6±2.7[a]
Vigna radiata	85.3±3.9[a,b]	77.5±10.1[a]	74.5±6.7[a]
Soybean sprout	88.8±1.7[a,b]	81.7±7.3[a]	71.0±5.9[a]
Angelica gigas	78.5±4.6[a]	72.3±0.8[a]	72.0±1.9[a]
Hordeum vulgare var. hexastichon	81.7±2.2[a]	76.6±2.9[a]	73.3±6.7[a]
Triticum aestivum	103.2±2.7[b]	96.8±10.0[b]	91.3±2.6[b]
Fagopyrum esculentum	107.2±6.8[b]	94.0±5.2[b]	80.1±4.3[a]
Platycodon grandiflorum	105.1±0.8[b]	106.8±4.0[b]	100.9±3.2[b]
Colocasia esculenta	81.8±4.1	74.4±1.1[a]	72.7±3.0[a]
Dimocarpus longan	87.0±3.5	80.5±1.3	70.7±6.7[a]
Trigonella foenum-graecum	65.6±3.1[a]	75.8±6.8[a]	79.2±2.7[a]
Fagopyrum tataricum	73.4±7.2[a]	74.5±1.2[a]	62.4±9.6[a]
Actinidia deliciosa	101.5±5.4[b]	89.3±7.7	88.2±5.0
Citrus natsudaidai	99.2±5.2[b]	92.8±9.6[b]	89.4±7.6[b]
Fagopyrum esculentum	87.8±9.7	88.7±4.3	94.8±2.6
Acer tataricum subsp. Ginnala (Leaf)	79.9±8.5[a]	60.7±3.5[a]	39.7±3.4[a,b]
Acer tataricum subsp. Ginnala (Root)	78.0±9.2[a]	63.5±5.3[a]	64.7±0.9[a]
Zingiber mioga	70.3±2.0[a]	65.3±4.0[a]	60.9±0.6[a]
Cucumis melo var. makuwa	70.1±9.3[a]	58.6±3.3[a]	66.1±1.5[a]
Litsea japonica	99.5±5.9[b]	96.5±2.6[b]	95.5±8.0[b]

RBL-2H3 cells were treated with DNP-IgE (25 ng/mL) for 4 hours. And then, ketotifen and each natural product were treated at each concentration (μg/mL) for 1 hour. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA (P<0.05, [a]IgE, [b]Ketotifen).

비교하였다(Table 4).

IgE 감작시 β-hexosaminidase 분비량이 약 6배가량 증가하였으며, ketotifen은 분비량을 약 72%까지 감소시켰다. 28가지 추출물 중, *Allium cepa, Brassica oleracea var. italic, Allium fistulosum, Soybean sprout, Triticum aestivum, Fagopyrum esculentum, Platycodon grandiflorum, Actinidia deliciosa, Citrus natsudaidai, Fagopyrum esculentum, Litsea japonica* 을 제외한 나머지 추출물들은 적정농도에서 80% 가량의 억제력을 보였다. Ketotifen 과 비교하였을 때 *Sicyos angulatus, Perilla frutescens var. japonica, Fagopyrum tataricum, Acer tataricum subsp. ginnala (leaf, root), Zingiber mioga, Cucumis melo var. makuwa* 는 억제 효과를 나타냈다. *S. angulatus, F. tataricum* 의 경우 고농도에서 ketotifen 보다 억제 효과가 높았으므로, *P. frutescens, A. tataricum (leaf, root), Z. mioga, C. melo* 이 유의적인 β-hexosaminidase 억제 효과를 보이는 것으로 조사되었다. *A. tataricum* 의 경우, root 추출물보다 leaf 추출물이 효과가 더 좋았다. Leaf 추출물의 고농도의 경우 39.7%의 억제력을 보였으며 이는 ketotifen과 비교해도 유의적인 억제 효과를 보였다. 적정농도의 경우 *C. melo* 이 58.6%의 억제 효과를 나타내었다.

Discussion

본 연구에서 대식세포의 활성 지표인 산화질소 생성량을 비교해 보았을 때 *Plantago asiatica, Centella asiatica, Perilla frutescens var. japonica, Litsea japonica* 이 유의적인 감소율을 보였다. 이들의 국문명은 각각 질경이, 병풀, 들깨, 까마귀쪽나무로서 이들 모두 고농도에서 유의적인 억제 효과를 보였고, 적정농도에서도 약 70%가량의 감소율을 보였다. 이들 중 *P. frutescens, L. japonica* 을 제외한 나머지는 세포생존율 결과에서 독성을 나타내지 않았으므로 세포 사멸에 의한 산화질소 감소는 아닌 것으로 사료된다. *P. frutescens, L. japonica* 또한 고농도에서만 유의적인 생존율 감소가 있었고, 적정 농도에서는 유의적인 감소를 보이지 않았다. 적정농도에서 까마귀쪽나무가 유의한 억제 효과를 나타내었으며, 호염구 활성지표 중 하나인 β-hexosaminidase 에서는 대부분의 물질들이 감소능을 보였다. 산화질소 생성량을 유의적으로 감소시켜 주었던 질경이, 병풀, 들깨 또한 β-hexosaminidase 생성을 억제시켰지만, 까마귀쪽나무는 β-hexosaminidase 를 유의적으로 억제하지 못했다. 이를 토대로, 질경이, 병풀, 들깨가 대식세포와 호염구에서 모두 억제 효과가 있는 천연물 추출물일 것으로 사료된다.

질경이는 예로부터 식용 및 약재로 쓰인 식물로써 혈압을 낮추고, 항암작용이 있다고 알려져 있다[16,17]. 자발성 고혈압을 유도한 레트에서 구강투여로 질경이를 처치한 후 혈압을 측정하니 유의적으로 감소했으며 유방암을 유도한 마우스에서 질경이가 수지상세포 성숙 및 대식세포, T 세포를 유도함으로써 치료효과를 나타내었다. 또한, 고지방식이요법으로 유도된 비만 마우스 모델에서 콜레스테롤 및 지방조직 등을 감소시켰다[18]. 이 외에도, 질경이는 TNF-α, IL-6, IL-1β와 같은 전염증성 사이토카인의 방출을 억제했으며 대식세포의 지표인 NO 정도 및 COX-2, iNOS 단백질 발현을 억제함으로써 LPS에 의한 간 손상을 줄여주었다[19]. 그리고 히스타민을 방출하는 비만세포에서도 억제력을 보였다[20]. 폐 질환의 경우, 급성폐손상 모델에서 치료효과를 보여주었지만[21] 천식에 대한 연구결과는 아직 존재하지 않는다. 여러 연구결과 및 본 실험결과를 종합해 보면, 질경이는 천식의 병리에 중요한 대식세포 및 호염구세포를 유의적으로 억제시킬 수 있으며 이는 새로운 천식 치료제 개발로 이어질 수 있을 것으로 생각된다.

병풀은 꾸준히 약재로 사용되어 왔으며 섬유아세포 증식을 촉진하고 콜라겐과 세포내 파이브로넥틴 합성을 증가시킴으로써 건선 및 피부 상처 재생에 좋은 효과가 있어 화장품등으로 많이 쓰였다[22,23]. 또한 폐 고혈압, 신장혈관 고혈압, 죽상동맥경화증, 간 섬유화 등 여러 장기에 발생한 질환에도 치료효과를 보였다[24]. 이와 같이 병풀은 폐암, 폐고혈압, 만성폐쇄성폐질환 등 여러 폐 질환에서 효과를 보여주었지만 천식에서의 연구결과는 아직 보고된 바 없다[25-27]. 병풀은 대식세포의 NO 정도 및 COX-2 단백질 발현을 감소시켰고 TNF-α 및 IL-6 와 같은 전염증성 사이토카인의 발현을 감소시켰다[28]. 또한 비만세포 탈과립을 유도하기도 하였다[29]. 이는 질경이와 마찬가지로 여러 연구결과 및 본 실험결과를 종합해보았을 때, 천식 치료제 개발 후보군으로 가능할 것으로 보인다.

들깨는 약재보다는 식용으로 쓰인 식물이지만 항암작용, 염증에 효과가 있다고 알려져 있다[30,31]. 이 중 들깨는 마우스 천식모델에서 Th2 반응을 억제하여 기도 염증을 줄여준다는 연구결과가 존재한다[32,33]. 들깨 추출물은 히스타민 및 에오탁신을 억제했으며 IL-4, IL-5, IL-13 과 같은 Th2 반응으로 유도된 사이토카인 생성을 감소시켰다. 본 결과에서 들깨는 고농도로 갈수록 억제 효과가 좋았지만 생존율도 감소 시켰으므로 적정 농도에서의 사용이 필요해 보인다.

본 연구에서는 28 종류의 천연물 유래 추출물을 처치하여 천식 발달과 관련한 면역세포인 대식세포와 호염구의 기능을 억제할 수 있는지 조사하였다. 이들 추출물 중 질경이, 병풀 및 들깨는 기존에 알려져 있던 치료 효과 이외 천식과 관련한 대식세포 및 호염구 활성 억제를 보였다. 이들은 여러 알레르기 질환 및 섬유화 질환 등에도 적용할 수 있을 것으로 여겨진다. 본 실험에서는 천식의 특성상 대식세포와 호염구 활성 모두를 억제할 수 있는 천연물들을 선정하였다. 하지만 산화질소 및 β-hexosaminidase 를 모두 억제시키지는 못했지만 각 실험에서 유의적으로

억제시켰던 천연물들이 존재한다. 이러한 천연물들은 각 세포들이 주된 병인인 질병들에 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

Acknowledgement

이 결과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No.2020R1A5A8019180).

국문요약

천식은 호흡곤란, 기침, 가슴통증과 같은 증상을 가지는 만성질환으로써 세포내 염증으로 인한 조직 리모델링을 특징으로 한다. 이러한 천식은 잘 조절되지 않을 시 치료제의 부작용을 경험할 수 있으며 일상 기능 및 삶의 질 저하로까지 이어질 수 있다. 천식은 여러 면역세포들에 의한 염증반응이 주원인으로 대식세포와 호염구 또한 천식에 악영향을 미칠 수 있다. 대식세포는 여러 염증성 사이토카인을 분비하여 염증을 유발할 뿐만 아니라 산화질소를 통한 DNA 손상과 점액 생성을 유도하여 천식을 악화시킬 수 있다. 호염구는 호산구 침윤을 증가시킬 수 있으며 히스타민 및 IgE에 대한 높은 친화력을 가진 FcεRIα 수용체로 인해 천식을 악화시킬 수 있다. 따라서 본 연구에서는 28여 가지의 천연물의 각 분획에서 추출한 추출물을 가지고 이러한 세포들의 반응을 억제할 수 있는지 실험하였다. 마우스 대식세포인 Raw 264.7 세포에서 LPS에 의한 산화질소 생성 억제력 및 레트 호염구세포인 RBL-2H3 세포에서 IgE 감작에 의한 β-hexosaminidase 생성 억제력을 평가하였다. 4가지 천연물 추출물이 산화질소를 유의적으로 감소시켰으며 19가지 천연물 추출물이 β-hexosaminidase 생성을 유의적으로 감소시켰다. 이 중 두 실험 모두 유의적인 결과를 보였던 천연물 추출물은 질경이(*Plantago asiatica*), 병풀(*Centella asiatica*), 들깨(*Perilla frutescens var. japonica*) 이렇게 3가지이었다. 본 연구는 여러 천연물 추출물이 천식에 관여하는 대식세포 및 호염구 활성 억제에 미치는 영향을 분석하였다. 천식뿐 아니라 대식세포 및 호염구가 관여하는 타 질환에도 적용할 수 있는 천연물 추출물에 대한 기초 연구를 제공한다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Jaehyun Park https://orcid.org/0000-0002-5344-8875
Jimin Jang https://orcid.org/0000-0002-1796-2164
Sang-Ryul Cha https://orcid.org/0000-0002-9447-6434
Hyosin Baek https://orcid.org/0000-0003-0276-5149
Jooyeon Lee https://orcid.org/0000-0002-4681-7046
You-Hui Lee https://orcid.org/0000-0001-5183-3529
Semin Ryu https://orcid.org/0000-0003-2290-5778
Se-Ran Yang https://orcid.org/0000-0002-2422-213X

References

1. Mims, J.W., Asthma: definitions and pathophysiology. *Int. Forum Allergy Rhinol.*, **5 Suppl 1**, S2-6 (2015).
2. Papi, A., Brightling, C., Pedersen, S.E., Reddel, H.K., Asthma. *Lancet.*, **391**, 783-800 (2018).
3. Chung, K.F., Wenzel, S.E., Brozek, J.L., Bush, A., Castro, M., Sterk, P.J., Adcock, I.M., Bateman, E.D., Bel, E.H., Bleecker, E.R., Boulet, L.P., Brightling, C., Chanez, P., Dahlen, S.E., Djukanovic, R., Frey, U., Gaga, M., Gibson, P., Hamid, Q., Jajour, N.N., Mauad, T., Sorkness, R.L., Teague, W.G. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur. Respir. J.*, **43**, 343-373 (2014).
4. Hyland, M.E., Whalley, B., Jones, R.C., Masoli, M., A qualitative study of the impact of severe asthma and its treatment showing that treatment burden is neglected in existing asthma assessment scales. *Qual Life Res.*, **24**, 631-639 (2015).
5. Amaral-Machado, L., Oliveira, W.N., Moreira-Oliveira, S.S., Pereira, D.T., Alencar, E.N., Tsapis, N., Egito, E.S.T., Use of Natural Products in Asthma Treatment. *Evid Based Complement Alternat Med.*, **2020**, 1021258 (2020).
6. Tan, R., Liew, M.F., Lim, H.F., Leung, B.P., Wong, W.S.F., Promises and challenges of biologics for severe asthma. *Biochem. Pharmacol.*, **179**, 114012 (2020).
7. van der Veen, T.A., de Groot, L.E.S., Melgert, B.N., The different faces of the macrophage in asthma. *Curr. Opin. Pulm Med.*, **26**, 62-68 (2020).
8. Moreira, A.P., Cavassani, K.A., Hullinger, R., Rosada, R.S., Fong, D.J., Murray, L., Hesson, D.P., Hogaboam, C.M., Serum amyloid P attenuates M2 macrophage activation and protects against fungal spore-induced allergic airway disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **126**, 712-721 e717 (2010).
9. Naura, A.S., Zerfaoui, M., Kim, H., Abd Elmageed, Z.Y., Rodriguez, P.C., Hans, C.P., Ju, J., Errami, Y., Park, J., Ochoa, A.C., Boulares, A.H., Requirement for inducible nitric oxide synthase in chronic allergen exposure-induced pulmonary fibrosis but not inflammation. *J. Immunol.*, **185**, 3076-3085 (2010).
10. Siracusa, M.C., Kim, B.S., Spergel, J.M., Artis, D., Basophils and allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **132**, 789-801, quiz 788 (2013).
11. Lambrecht, B.N., Persson, E.K. Hammad, H., Myeloid Cells in Asthma. *Microbiol Spectr.*, **5**, (2017).
12. Brooks, C.R., van Dalen, C.J., Hermans, I.F., Gibson, P.G.,

Simpson, J.L., Douwes, J., Sputum basophils are increased in eosinophilic asthma compared with non-eosinophilic asthma phenotypes. *Allergy*, **72**, 1583-1586 (2017).
13. Lee, J., Park, J.R., Jang, A., Yang, S.R. The Anti-Proliferation and Oxidative Damage-Related Mechanism of L-Carnitine in Human Colorectal Cancer Cells. *J. Food Hyg. Saf.*, **34**, 303-308 (2019).
14. Tomasiak, M.M., Tomasiak, M., Zietkowski, Z., Skiepko, R., Bodzenta-Lukaszyk, A., N-acetyl-beta-hexosaminidase activity in asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **146**, 133-137 (2008).
15. Grant, S.M., Goa, K.L., Fitton, A., Sorkin, E.M., Ketotifen. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in asthma and allergic disorders. *Drugs.*, **40**, 412-448 (1990).
16. Fu, Y.S., Lue, S.I., Lin, S.Y., Luo, C.L., Chou, C.C., Weng, C.F., Plantago asiatica Seed Extracts Alleviated Blood Pressure in Phase I(-)Spontaneous Hypertension Rats. *Molecules.*, **24**, (2019).
17. Gao, J., Zhang, Y.N., Cui, J., Zhang, J., Ming, Y., Hao, Z., Xu, H., Cheng, N., Zhang, D., Jin, Y., Lin, D. Lin, J., A Polysaccharide From the Whole Plant of Plantago asiatica L. Enhances the Antitumor Activity of Dendritic Cell-Based Immunotherapy Against Breast Cancer. *Front Pharmacol.*, **12**, 678865 (2021).
18. Yang, Q., Qi, M., Tong, R., Wang, D., Ding, L., Li, Z., Huang, C., Wang, Z., Yang, L., Plantago asiatica L. Seed Extract Improves Lipid Accumulation and Hyperglycemia in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, (2017).
19. Li, F., Huang, D., Nie, S., Xie, M., Polysaccharide from the Seeds of Plantago asiatica L. Protect Against Lipopolysaccharide-Induced Liver Injury. *J. Med. Food*, **22**, 1058-1066 (2019).
20. Bak, J.P., Kim, J.B., Park, J.H., Yang, Y.J., Kim, I.S., Choung, E.S., Kang, S.C., Screening and compound isolation from natural plants for anti-allergic activity. *J. Kor. Soc. Appl. Biological Chem.*, **54**, 367-375 (2011).
21. Wu, H., Zhao, G., Jiang, K., Chen, X., Zhu, Z., Qiu, C., Li, C., Deng, G., Plantamajoside ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via suppressing NF-kappaB and MAPK activation. *Int. Immunopharmacol.*, **35**, 315-322 (2016).
22. Bylka, W., Znajdek-Awizen, P., Studzinska-Sroka, E., Danczak-Pazdrowska, A., Brzezinska, M., Centella asiatica in dermatology: an overview. *Phytother Res.*, **28**, 1117-1124 (2014).
23. Bylka, W., Znajdek-Awizen, P., Studzinska-Sroka, E., Brzezinska, M., Centella asiatica in cosmetology. *Postepy Dermatol Alergol.*, **30**, 46-49 (2013).
24. Sun, B., Wu, L., Wu, Y., Zhang, C., Qin, L., Hayashi, M., Kudo, M., Gao, M., Liu, T., Therapeutic Potential of Centella asiatica and Its Triterpenes: A Review. *Front Pharmacol.*, **11**, 568032 (2020).
25. Han, A.R., Lee, S., Han, S., Lee, Y.J., Kim, J.B., Seo, E.K., Jung, C.H., Triterpenoids from the Leaves of Centella asiatica Inhibit Ionizing Radiation-Induced Migration and Invasion of Human Lung Cancer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.*, **2020**, 3683460 (2020).
26. Wang, X., Cai, X., Wang, W., Jin, Y., Chen, M., Huang, X., Zhu, X., Wang, L., Effect of asiaticoside on endothelial cells in hypoxiainduced pulmonary hypertension. *Mol. Med. Rep.*, **17**, 2893-2900 (2018).
27. Lee, J.W., Park, H.A., Kwon, O.K., Jang, Y.G., Kim, J.Y., Choi, B.K., Lee, H.J., Lee, S., Paik, J.H., Oh, S.R., Ahn, K.S., Lee, H.J., Asiatic acid inhibits pulmonary inflammation induced by cigarette smoke. *Int Immunopharmacol.*, **39**, 208-217 (2016).
28. Cho, Y.C., Vuong, H.L., Ha, J., Lee, S., Park, J., Wibow, A.E., Cho, S., Inhibition of Inflammatory Responses by Centella asiatica via Suppression of IRAK1-TAK1 in Mouse Macrophages. *Am. J. Chin. Med.*, **48**, 1103-1120 (2020).
29. George, M., Joseph, L., Ramaswamy. Anti-allergic, anti-pruritic, and anti-inflammatory activities of Centella asiatica extracts. *Afr. J. Tradit Complement Altern Med.*, **6**, 554-559 (2009).
30. Kwak, Y., Ju, J., Inhibitory activities of Perilla frutescens britton leaf extract against the growth, migration, and adhesion of human cancer cells. *Nutr. Res. Pract*, **9**, 11-16 (2015).
31. Lim, H.J., Woo, K.W., Lee, K.R., Lee, S.K., Kim, H.P., Inhibition of Proinflammatory Cytokine Generation in Lung Inflammation by the Leaves of Perilla frutescens and Its Constituents. *Biomol. Ther. (Seoul)*, **22**, 62-67 (2014).
32. Chen, M.L., Wu, C.H., Hung, L.S., Lin, B.F., Ethanol Extract of Perilla frutescens Suppresses Allergen-Specific Th2 Responses and Alleviates Airway Inflammation and Hyperreactivity in Ovalbumin-Sensitized Murine Model of Asthma. *Evid Based Complement Alternat Med.*, **2015**, 324265 (2015).
33. Yang, H., Sun, W., Fan, Y.N., Li, S.Y., Yuan, J.Q., Zhang, Z.Q., Li, X.Y., Lin, M.B., Hou, Q., Perilla Leaf Extract Attenuates Asthma Airway Inflammation by Blocking the Syk Pathway. *Mediators Inflamm.*, **2021**, 6611219 (2021).