

## RBL-2H3 세포에서 Cyanidin-3-glucoside의 Th2 사이토카인 발현 억제 효과

정화현 · 윤수정 · 표명윤<sup>#</sup>

숙명여자대학교 약학대학

(Received August 27, 2013; Revised September 26, 2013; Accepted October 1, 2013)

### Suppressive Effects of Cyanidin-3-glucoside on Th2 Cytokines Production in RBL-2H3 Cells

Hwa Hyun Jeong, Soo Jeong Yoon and Myoung Yun Pyo<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

**Abstract** — Cyanidin-3-glucoside (C3G), an anthocyanin, is one of the most widespread dietary flavonoids. We investigated the effects of C3G in PMA/ionomycin (PI)-induced RBL-2H3 cells. C3G inhibited the production of IL-4 and IL-13 and also decreased the level of mRNA in a dose-dependent manner. Furthermore, western blot analysis implied that C3G down-regulated the protein level of c-Jun, NF-ATc1 and NF- $\kappa$ B but not c-Fos. Taken together, we suggest that C3G may have suppressive effects on Th2 cytokines and will be studied further to develop as functional foods that help alleviate allergy symptoms.

**Keywords** □ cyanidin-3-glucoside, IL-4, IL-13, RBL-2H3 cells, antiallergy

IL-4, IL-13 등의 Type-2 helper T cell(Th2) 관련 사이토카인은 Th2 관련 면역 반응을 증가시키고 IgE의 생산을 증가시킴으로써 만성 알레르기 반응에 기여한다.<sup>1)</sup> IL-4는 Th2의 분화를 유도하고 B 세포를 자극하여 IgE를 생산하게 하는 역할을 한다.<sup>2)</sup> IL-4가 결핍된 마우스에서 천식 발병이 억제되었으며, 마우스의 기도에서 IL-4 수용체 길항제를 지속적으로 주입하였을 때, IL-4로 유도된 기도과민반응과 기도 호산구 증가증이 감소했음이 보고되었다.<sup>3,4)</sup> IL-13은 초기 B 세포의 활성화, IgE의 생산 등 IL-4 유사작용을 나타내는 것으로 알려져 왔으나, 최근에는 IL-13이 IL-4와 별개로도 면역반응을 일으킬 수 있음이 발견되었다.<sup>5,6)</sup> IL-13은 점액 변질과 호산구 세포 사멸의 조절, 그리고 기도 개형을 유도한다고 알려져 있으며, 아토피와 아토피 천식 환자에게서 과도한 IL-13의 생산이 보고되었다.<sup>7)</sup>

IL-4와 IL-13의 발현은 AP-1, NF-AT 및 NF- $\kappa$ B 등의 다양한 전사인자들에 의해 조절된다.<sup>8,9)</sup> AP-1은 c-Jun과 c-Fos로 이루어져 있으며, 세포를 활성화시키는 신호전달 체계인 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 경로를 거쳐 활성화되어 사이토카인의 발현을 조절한다.<sup>10)</sup> NF- $\kappa$ B는 평소 T 세포의 세포질

내에서 I $\kappa$ B로 불리는 NF- $\kappa$ B 억제분자와 결합하여 불활성화의 상태로 존재하다 활성화되면 핵으로 이동하여 사이토카인 발현 유전자들의 전사를 촉진한다.<sup>11)</sup> NF-AT는 면역세포의 분화와 면역 반응을 조절하는 전사인자로, 세포질 내 칼슘 농도가 높아지면 일련의 과정을 통해 NF-AT가 탈인산화 되면서 핵으로 이동하여 사이토카인 발현 유전자를 활성화시킨다.<sup>12)</sup>

Cyanidin-3-glucoside(C3G, Fig. 1)는 검은 콩, 검은 쌀, 포도 및 블루베리 등에 다량 존재하는 안토시아닌의 일종으로, 현재까지 항산화 작용,<sup>13,14)</sup> 항염작용,<sup>15,16)</sup> 신경 보호 작용,<sup>17)</sup> 항암작용<sup>18)</sup> 등의 생리활성이 확인되었으며, 최근에는 C3G가 베타-아밀로이드로 유도된 인지능력 손상을 치료함으로써 알츠하이머 질병을 치료할 수 있음이 보고되었다.<sup>19)</sup> C3G의 항알레르기 작용

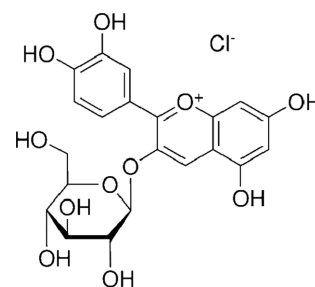


Fig. 1 – Chemical structure of cyaniding-3-glucoside.

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-710-9573 (팩스) 02-710-9573  
(E-mail) mypyo@sookmyung.ac.kr

에 대한 기존의 연구로는, C3G가 compound 48/40로 자극된 쥐의 히스타민 분비량과 가려움증을 억제하고, IgE로 자극된 RBL-2H3 세포의 Th2 사이토카인의 분비를 억제하였다는 보고가 있으며,<sup>20)</sup> 또한 OVA로 자극된 천식모델 쥐에서 C3G가 과도한 점액분비를 억제하고 Th2 사이토카인의 mRNA 발현을 감소시켰다는 보고가 있다.<sup>21)</sup> 그러나, 이에 대한 세포 분자적 기전에 대한 연구는 아직 완전히 밝혀지지 않은 상태이다.

RBL-2H3 세포는 세포 표면의 IgE 수용체의 발현과 면역반응을 유발하는 사이토카인의 발현, 히스타민의 분비 등 비만세포와 유사한 특징들을 나타내어 비만세포와 함께 면역반응에 관여하는 약물 효과를 연구하는데 좋은 실험모델로 알려져 있다.

본 연구에서는 PMA/ionomycin으로 자극된 RBL-2H3 세포를 이용하여 C3G에 의한 IL-4와 IL-13의 생성과 mRNA 발현의 변화 및 Th2 관련 사이토카인의 발현에 관여하는 전사인자의 활성 정도를 측정하여 알레르기 질환 예방을 위한 기능성 소재로서 C3G의 개발 가능성을 알아보려고 하였다.

## 실험방법

### 시약

C3G는 Sigma-Aldrich(MO, USA)에서 구입하였으며, 세포 Eagle's minimum essential medium(EMEM) 배지와 fetal bovine serum(FBS)은 Lonza(MD, USA), antibiotic-antimycotic은 Invitrogen(CA, USA)에서 구입하였다. 그 외 PMA, ionomycin, cyclosporine A(CsA) 및 기타시약은 Sigma-Aldrich(MO, USA)에서 구입하였으며, thiazoyl blue tetrazolium bromide(MTT)는 Amresco(OH, USA)에서, Rat IL-4와 Rat IL-13 ELISA kit는 각각 BD Science(CA, USA)와 Invitrogen(CA, USA)에서 구입하였다. PCR 분석에 사용된 Trizol은 Invitrogen(CA, USA)에서, polymerase는 iNtRON Biotechnology(Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였으며, western blot 실험에 사용된 핵분리 kit는 Active Motif(CA, USA)에서, c-Jun, c-Fos, 및 NF- $\kappa$ B 단백질은 Santa Cruz Biotechnology(TX, USA)에서 각각 구입하였다.

### 세포배양

본 실험에 사용된 RBL-2H3 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, MD, USA)사에서 구입하였으며, EMEM에 15% FBS, 1% antibiotic-antimycotic을 첨가한 세포배양액을 세포에 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### 세포생존율 측정

RBL-2H3 세포( $7 \times 10^5$  cells/ml)를 96 well plate에 100  $\mu$ l/well로 분주하여 16시간 배양시킨 후 0, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20  $\mu$ g/ml의 C3G를 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 배양하였다. 이 후

50  $\mu$ l의 MTT(3 mg/ml)를 넣고 37°C에서 4시간 동안 배양하여 crystal violet을 형성하게 하였고, 배양이 끝난 후 배지를 제거하고 50  $\mu$ l의 DMSO로 formazan을 용해시킨 뒤 ELISA microplate reader를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포탈과립 측정

RBL-2H3 세포( $5 \times 10^5$  cells/ml)를 24 well plate에 500  $\mu$ l/well로 분주하여 24시간 배양시킨 후 0.5  $\mu$ M의 CsA 또는 5  $\mu$ g/ml의 C3G를 처리하고, 1시간 후 PMA(50 ng/ml)와 ionomycin(0.5  $\mu$ M)을 가하여 30분 배양한 후 10분간 냉장시켜 반응을 종결하였다. 각 과정마다 siraganian 용액(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7.2)으로 well을 2회씩 세척하였으며, 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>와 0.1% BSA가 포함된 siraganian 용액에 시료를 희석하였다. 이 후 상등액을 취해, 상등액 20  $\mu$ l을 substrate 용액 80  $\mu$ l과 3°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 stop solution(0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>)을 첨가하여 ELISA microplate reader를 이용하여 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 사이토카인 측정

RBL-2H3 세포( $3 \times 10^5$  cells/ml)를 48 well plate에 250  $\mu$ l/well로 분주하여 4시간 배양시킨 후 0.5  $\mu$ M의 CsA 또는 1.25, 2.5, 5  $\mu$ g/ml의 C3G를 처리하고, 1시간 후 PMA(50 ng/ml)와 ionomycin(0.5  $\mu$ M)을 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 16시간 배양하였다. 이 후 상등액만 취해 상등액 중의 사이토카인(IL-4, IL-13)을 ELISA kit를 이용하여 그 농도를 측정하였다.

### RT-PCR 분석

RBL-2H3 세포( $3 \times 10^5$  cells/ml)를 6 well plate에 2 ml/well로 분주하여 16시간 배양시킨 후 0.5  $\mu$ M의 CsA 또는 1.25, 2.5, 5  $\mu$ g/ml의 C3G를 처리하고, 1시간 후 PMA(50 ng/ml)와 ionomycin(0.5  $\mu$ M)을 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 6시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 500  $\mu$ l의 TRIzol 시약을 가하여 세포를 얻은 다음 200  $\mu$ l의 CHCl<sub>3</sub>를 가한 뒤 원심분리 하여 수 층 200  $\mu$ l를 취하였고, 동량의 iso-propanol을 가한 후 원심분리 하여 미색침전 RNA를 얻었다. RNA는 Maxime RT PreMix kit에 용해시킨 후 45°C에서 1시간, 95°C에서 5분 간 반응시켜 cDNA로 전환하였다. cDNA는 primer, polymerase와 반응시켜 PCR thermal cycler에서 DNA를 증폭시켰다( $\beta$ -actin, IL-4: 95°C-30초, 57°C-45초, 72°C-30초 32 cycles, IL-13: 95°C-30초, 52°C-40초, 72°C-30초 40 cycles). 증폭된 DNA를 1% agarose gel(0.01% ethidium bromide 포함)에 전개시켜 DNA image로 특정 band를 확인함으로써 mRNA 발현 정도를 측정하였다. 사용된 primer의 sequences는 다음과 같다. IL-4 sense, 5'-ATG GGT CTC AAC

CCC CAG C-3'; IL-4 antisense, 5'-GCT CTT TAC GCT TTC CAG GAA GTC-3'; IL-13 sense, 5'-GGA GCT GAG CAA CAT CAC ACA-3'; IL-13 antisense, 5'-GGT CCT GTA GAT GGT GGC ATT GCA-3'.  $\beta$ -actin sense, 5'-ACC GTG AAA AGA TGA CCC AG-3';  $\beta$ -actin antisense, 5'-TGT CAG CTG TGG TGG TGA AG-3'.

### Western blot 분석

RBL-2H3 세포( $4 \times 10^5$  cells/ml)를 60 mm dish에 4 ml/well로 분주하여 16시간 배양시킨 후 0.5  $\mu$ M의 CsA 또는 5  $\mu$ g/ml의 C3G를 처리하고 1시간 뒤 PMA(50 ng/ml)와 ionomycin(0.5  $\mu$ M)을 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 3시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 500  $\mu$ l의 차가운 PBS용액으로 세포를 세척 한 후, 핵 분리 kit를 이용해 핵 단백질을 분리하였다. Hypotonic 용액을 넣고 현탁한 후 원심분리 하여 상등액을 제거하고, protease inhibitor cocktail이 포함된 lysis 용액을 가해 30분 동안 혼합하여 4°C에서 10분간 14,000 g로 원심 분리 한 상등액을 얻었다. 핵 단백질은 BCA 단백질 정량법으로 정량하여 10% SDS page gel에 110 V에서 1시간 30분 동안 전기영동한 뒤, PVDF membrane에 transfer 하였다. Transfer된 membrane은 2% 탈지분유를 함유한 PBS/T 용액에 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 일차항체(200 ng/ml)와 이차항체(100 ng/ml)를 적당한 시간 동안 처리하고, ECL 시약을 사용하여 핵 단백질의 발현을 확인하였다.

### 통계처리

본 연구에서 얻은 실험결과는 mean $\pm$ S.D. 값으로 표시하였고, 실험 군 간의 데이터는 student's *t*-test로 분석하여 유의성을 검정하였으며, *p*값이 0.05 이하인 것만을 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## 실험결과

### C3G가 세포생존율에 미치는 영향

RBL-2H3 세포에 다양한 농도의 C3G를 24시간 처리하고 MTT assay를 실시해 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 정상 세포 군을 대조군으로 하여 생존율을 100%로 나타냈을 때, C3G 0.5~5  $\mu$ g/ml 농도 사이에서 C3G는 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않았다(Table I). 그러므로, 본 연구에서는 1.25, 2.5, 5  $\mu$ g/ml 농도로 실험을 진행하였다.

### C3G가 PI로 유도된 RBL-2H3 세포의 탈과립에 미치는 영향

RBL-2H3 세포에 CsA 또는 C3G를 1시간 처리하고, PI를 처리하여 30분간 반응시킨 후  $\beta$ -hexosaminidase release assay 방법<sup>22)</sup>으로 상등액에 분비된  $\beta$ -hexosaminidase를 측정하였다. 그

**Table I** – Effect of C3G on cell viability of RBL-2H3 cells

C3G ( $\mu$ g/ml)	Cell viability (%)
0	100 $\pm$ 9.0
0.5	102.6 $\pm$ 8.3
1	98.1 $\pm$ 3.4
5	92.8 $\pm$ 6.2
10	78.2 $\pm$ 6.2*
15	58.5 $\pm$ 2.6**
20	41.5 $\pm$ 12.8**

Values are expressed as means $\pm$ SD from three independent experiments (\**p*<0.05; \*\**p*<0.01 vs. normal group).

**Table II** – Suppressive effects of C3G on  $\beta$ -hexosaminidase release in PI-stimulated RBL-2H3 cells

	$\beta$ -Hexosaminidase release (%)
Normal	32.4 $\pm$ 1.8
PI	100 $\pm$ 2.6 <sup>###</sup>
CsA	44.5 $\pm$ 27.9**
C3G	97.8 $\pm$ 3.3*

The cells were pre-treated with 5  $\mu$ g/ml of C3G, 0.5  $\mu$ M of CsA for 1 hr, and then stimulated with PI for 30 min. The levels of  $\beta$ -hexosaminidase in RBL-2H3 cells were analyzed by  $\beta$ -hexosaminidase release assay. Values are expressed as means $\pm$ SD from three independent experiments (<sup>###</sup>*p*< 0.001 vs. normal group, \**p*<0.05; \*\**p*<0.01 vs. PI-treated group).

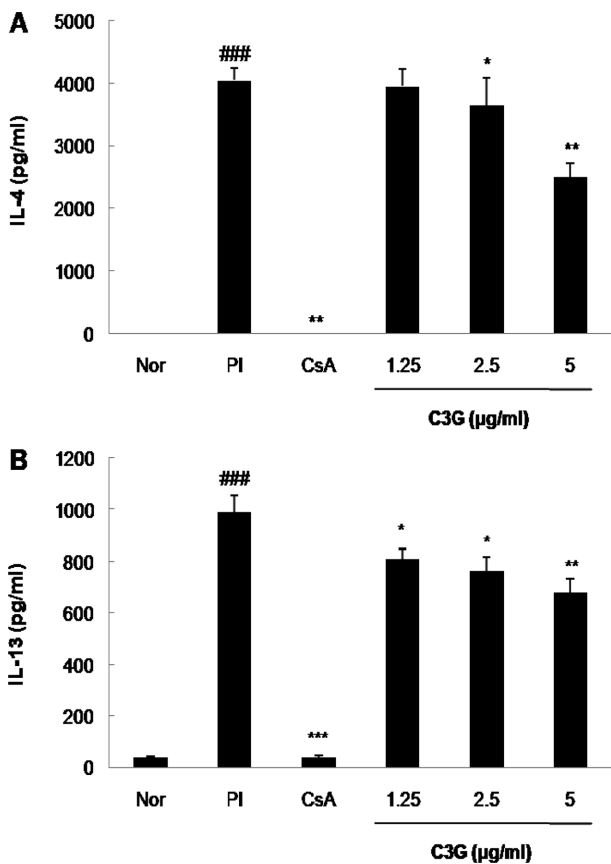
결과, PI군을 대조군으로 하여  $\beta$ -hexosaminidase 분비량을 100%로 나타냈을 때, CsA군은 44.5%로 억제되었으나, C3G 5  $\mu$ g/ml 처리 군은 98.9%로 세포의  $\beta$ -hexosaminidase 분비량을 억제하지 못했다(Table II).

### C3G가 PI로 유도된 RBL-2H3 세포의 IL-4와 IL-13 생성에 미치는 영향

RBL-2H3 세포에 CsA 또는 C3G를 1시간 처리하고, PI를 처리하여 16시간 반응시킨 후 상등액에 분비된 IL-4와 IL-13을 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과, 정상 세포 군에 비해 PI 처리 군의 IL-4와 IL-13 생성량이 각각 4044.0 pg/ml와 991.4 pg/ml로 크게 증가하였고, CsA 처리 군에서 IL-4와 IL-13 생성량은 각각 1.1 pg/ml와 39.2 pg/ml로 PI에 의해 증가한 IL-4와 IL-13의 생성이 현저히 억제되었다. C3G 처리 군에서 IL-4와 IL-13 생성은 농도의존적으로 억제되었으며 PI에 의해 증가한 IL-4, IL-13의 수치와 비교했을 때, C3G 5  $\mu$ g/ml 처리에서 IL-4와 IL-13의 생성량은 2495.5 pg/ml와 679.5 pg/ml로 각각 약 38%와 31% 억제되었다(Fig. 2).

### C3G가 PI로 유도된 RBL-2H3 세포의 IL-4와 IL-13 mRNA 발현에 미치는 영향

RBL-2H3 세포에 CsA 또는 C3G를 1시간 처리하고, PI를 처리하여 6시간 반응시킨 후 세포를 얻어 RNA를 분리하고 cDNA

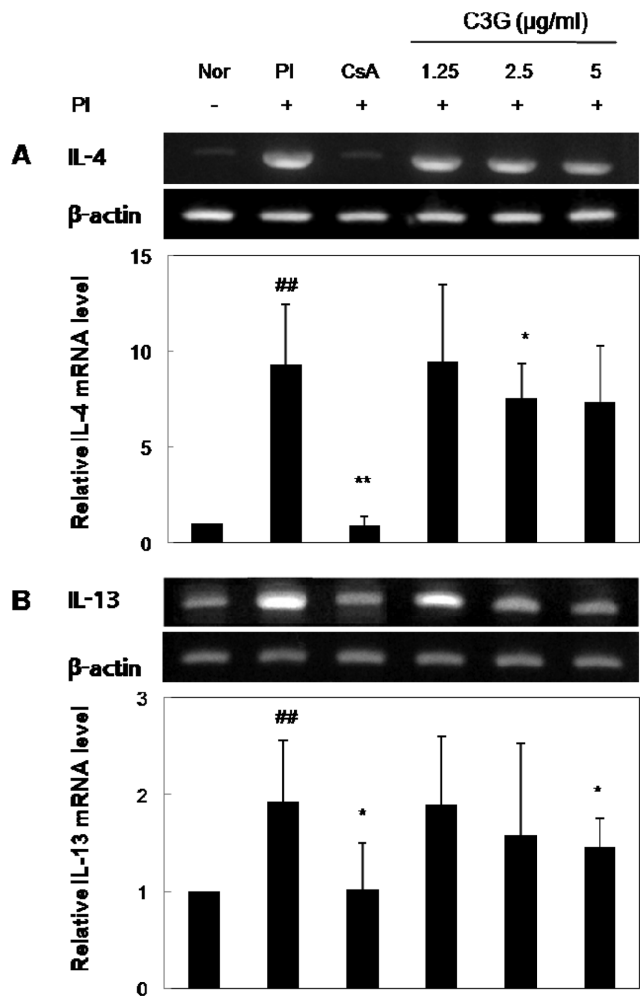


**Fig. 2** – Suppressive effects of C3G on cytokine production in PI-stimulated RBL-2H3 cells. The cells were pre-treated with C3G or 0.5 µM of CsA for 1 hr, and then stimulated with 50 ng/ml of PMA and 0.5 µM of ionomycin for 16 hr. The levels of (A) IL-4 and (B) IL-13 in RBL-2H3 cells were determined by ELISA. Values are expressed as mean±SD from three independent experiments (###*p*<0.001 vs. normal group, \**p*<0.05; \*\**p*<0.01; \*\*\**p*<0.001 vs. PI-treated group).

를 제조하여 RT-PCR 방법으로 mRNA 발현 정도를 측정하였다. 그 결과, 정상 세포에 비해 PI 처리에서 IL-4와 IL-13의 mRNA 발현량이 크게 증가하였고, CsA가 PI에 의해 증가한 IL-4와 IL-13의 발현을 억제하였다. C3G군에서 IL-4와 IL-13 발현은 농도 의존적으로 억제되었으며 PI에 의해 증가한 IL-4, IL-13의 수치와 비교했을 때, C3G 5 µg/ml 처리에서 IL-4와 IL-13의 mRNA 발현은 각각 약 31%와 35% 억제되었다(Fig. 3).

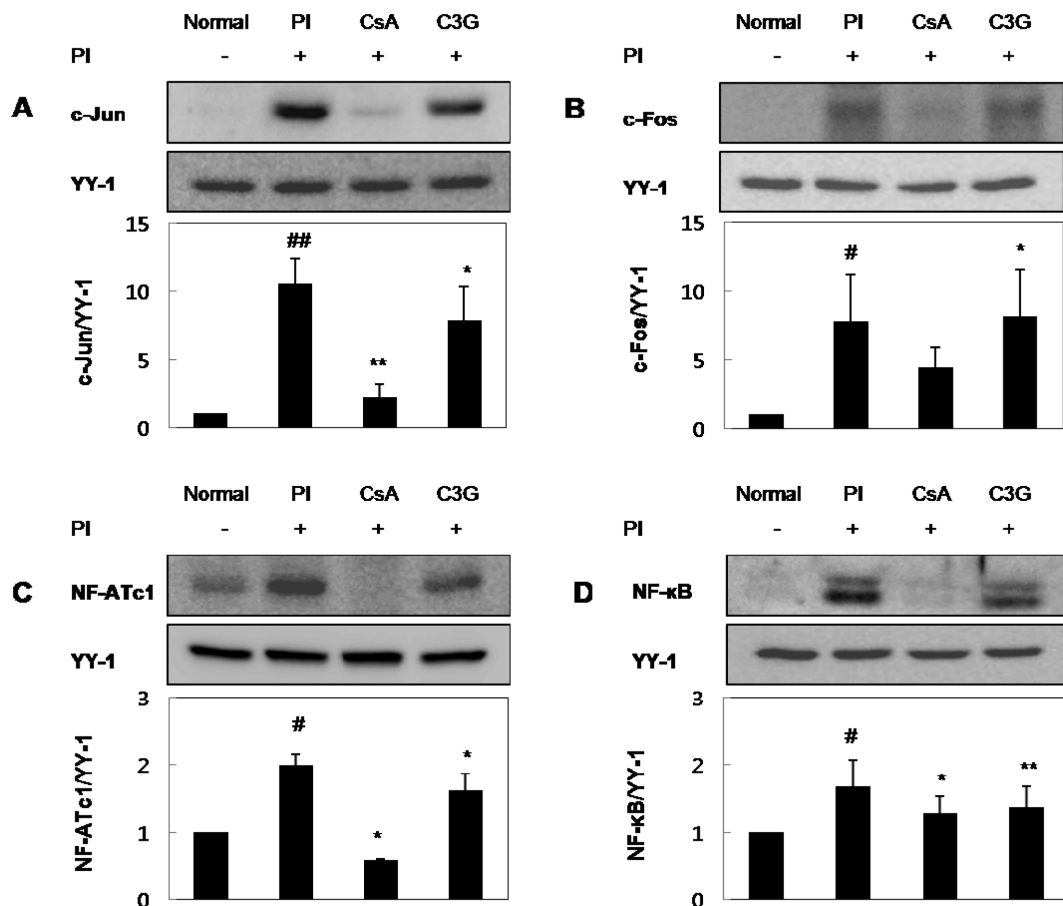
**C3G가 PI로 유도된 RBL-2H3 세포의 사이토카인 발현에 관여하는 전사인자에 미치는 영향**

RBL-2H3 세포에 CsA 또는 C3G를 1시간 동안 전처리 한 다음, PI를 처리하여 3시간 반응시킨 후 세포를 얻어 핵 단백질을 분리하고 western blot 방법으로 핵 내 전사인자의 발현 정도를 측정하였다. c-Jun의 경우, 정상 세포에 비해 PI군에서 c-Jun의



**Fig. 3** – Suppressive effects of C3G on gene expression in PI-stimulated RBL-2H3 cells. The cells were pre-treated with C3G or 0.5 µM of CsA for 1 hr, and then stimulated with 50 ng/ml of PMA and 0.5 µM of ionomycin for 6 hr. Cellular RNA from each treatment was extracted and the mRNA expression for cytokine in RBL-2H3 cells was analyzed by RT-PCR. The mRNA expression was quantitated by densitometric analysis with that of the control being 1 fold. Values are expressed as mean±SD from three independent experiments (##*p*<0.01 vs. normal group, \**p*<0.05; \*\**p*<0.01 vs. PI-treated group).

발현이 크게 증가하였고, CsA와 C3G군에서 PI에 의해 증가한 c-Jun의 발현이 억제되었다. PI에 의해 증가한 c-Jun의 발현과 비교했을 때, C3G 5 µg/ml 처리에서 c-Jun의 발현은 약 25% 억제되었다(Fig. 4A). c-Fos의 경우, 정상 세포에 비해 PI군에서 c-Fos의 발현이 크게 증가하였고, CsA군에서 PI에 의해 증가한 c-Fos의 발현이 억제되었다. 그러나 C3G군에서 c-Fos의 발현에는 영향을 미치지 못했다(Fig. 4B). NF-ATc1의 경우, 정상 세포에 비해 PI군에서 NF-ATc1의 발현이 크게 증가하였고, CsA와 C3G군에서 PI에 의해 증가한 NF-ATc1의 발현이 억제되었다. PI에



**Fig. 4** – Effects of C3G on PI-induced activation of transcription factors involved in the Th2-associated cytokines expression. The cells were pre-treated with 5  $\mu\text{g/ml}$  of C3G or 0.5  $\mu\text{M}$  of CsA for 1 hr, and then stimulated with 50 ng/ml of PMA and 0.5  $\mu\text{M}$  of ionomycin for 3 hr. Nuclear extracts were isolated and separated by SDS-PAGE. The level of each transcription factor, (A) c-Jun, (B) c-Fos, (C) NF-ATc1 and (D) NF- $\kappa$ B p65 was determined by Western blot analysis using specific antibodies. Values are expressed as mean  $\pm$  SD from three independent experiments ( $^{\#}p < 0.05$ ;  $^{\#\#}p < 0.01$  vs. normal group,  $^*p < 0.05$ ;  $^{**}p < 0.01$  vs. PI-treated group).

의해 증가한 NF-ATc1의 발현과 비교했을 때, C3G 5  $\mu\text{g/ml}$  처리에서 NF-ATc1의 발현은 약 23% 억제되었다(Fig. 4C). NF- $\kappa$ B의 경우, 정상 세포에 비해 PI군에서 NF- $\kappa$ B의 발현이 크게 증가하였고, CsA와 C3G군에서 PI에 의해 증가한 NF- $\kappa$ B의 발현이 억제되었다. PI에 의해 증가한 NF- $\kappa$ B의 발현과 비교했을 때, C3G 5  $\mu\text{g/ml}$  처리에서 NF- $\kappa$ B의 발현은 약 19% 억제되었다(Fig. 4D).

### 고찰 및 결론

최근에는 인체에 대한 안전성이 보장되어 있고, 주위에서 쉽게 접할 수 있는 천연물을 이용해 선천면역계를 조절함으로써 알레르기 질병을 예방 또는 치료하려는 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 안토시아닌은 꽃, 과일 및 야채에 다량 존재하는 천연 색소로, 본 연구에서는 안토시아닌 성분인 C3G가 RBL-2H3 세포에서 Th2 관련 사이토카인의 발현을 억제하는 효과를 확인해, 항 알레르기 소재로서 C3G의 개발가능성을 평가하였다.

$\beta$ -hexosaminidase는 평소 비만세포의 과립 내에 저장되어있다가, 세포가 알레르겐과 IgE/Fc $\epsilon$ RI의 결합에 의해 활성화되면 histamine과 함께 분비되어 세포의 탈과립을 측정하는 지표로 사용된다.<sup>23)</sup> C3G가 PI로 활성화된 RBL-2H3 세포의  $\beta$ -hexosaminidase 분비량에 미치는 영향을 측정한 결과, C3G는  $\beta$ -hexosaminidase 분비에 영향을 미치지 못했다. 이는 C3G가 IgE로 활성화된 RBL-2H3 세포의  $\beta$ -hexosaminidase 분비를 억제하지 못했다는 결과와 일치한다.<sup>20)</sup>

반면, PI로 활성화된 RBL-2H3 세포에서 분비된 Th2 면역반응을 유발하는 사이토카인 IL-4와 IL-13의 생성과 mRNA의 발현이 C3G에 의해 농도의존적으로 억제되는 것을 확인하였다. 이는 IgE로 유도된 RBL-2H3 세포의 IL-4가 C3G에 의해 억제되었고, OVA로 유도된 천식모델의 쥐에서 IL-4와 IL-13의 mRNA 발현이 억제되었다는 보고와 일치한다.<sup>20,21)</sup> 또한 안토시아닌 혼합 캡슐을 건강한 성인에게 섭취시킨 결과, IL-4와 IL-13의 생성이 감소되었다는 보고가 있다.<sup>24)</sup>

비만세포에서 IL-4와 IL-13의 발현은 AP-1, NF-AT 및 NF-κB와 같은 전사인자들이 상호작용함으로써 유전자의 전사를 유도하는 것으로 알려져 있다. NF-κB와 AP-1은 알레르겐 침입 시 동시에 활성화되어 면역반응을 일으키며 일정한 시간이 지나면 활성화된 두 신호전달체계가 서로의 활성을 억제하여 전체 면역 방어 반응을 중지시킨다고 알려져 있다.<sup>25)</sup> 또한 NF-AT는 AP-1과 협동하여 IL-4의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다.<sup>26)</sup> 이때 CsA는 NF-AT가 핵으로 이동하는 것을 억제함으로써 특이적 면역억제제로 작용한다. 본 연구에서는 PI로 활성화된 RBL-2H3 세포의 C3G 처리군에서 c-Jun과 NF-ATc1 및 NF-κB의 발현이 억제되는 것을 확인하였다. C3G가 AP-1과 NF-ATc1에 미치는 영향은 아직 보고된 바가 없으나, IgE로 활성화된 RBL-2H3 세포를 이용한 연구에서 C3G에 의한 NF-κB의 억제가 보고되었으며, 인형 대식세포 THP-1 세포와 인형 체대정맥내피세포 HUVECs, 그리고 미세아교세포 BV-2 세포를 이용한 실험에서도 각각 C3G에 의한 NF-κB의 억제가 보고되어 있다.<sup>20,27-29)</sup>

따라서, 본 연구 결과를 통해 C3G가 RBL-2H3 세포에서 AP-1과 NF-ATc1 및 NF-κB의 활성을 억제함으로써 IL-4 및 IL-13의 생성과 mRNA 발현을 하향 조절하여 알레르기 반응을 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 C3G가 RBL-2H3 세포에서 AP-1, NF-ATc1, 그리고 NF-κB의 활성을 조절함으로써 Th2 면역반응을 유발하는 사이토카인의 발현을 억제해 알레르기 예방과 치료에 효과적으로 작용할 것으로 기대되며, 추후 기능성 소재로 개발하기 위한 기전 연구가 필요하다고 사료된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2013학년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

### 참고문헌

- 1) Passante, E., Ehrhardt, C., Sheridan, H. and Frankish, N. : RBL-2H3 cells are an imprecise model for mast cell mediator release. *Inflamm Res.* **58**, 611 (2009).
- 2) Schuijs, M. J., Willart, M. A., Hammad, H. and Lambrecht, B. N. : Cytokine targets in airway inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol.* **13**, 351 (2013).
- 3) Brusselle, G. G., Kips, J. C., Tavernier, J. H., van der Heyden, J. G., Cuvelier, C. A., Pauwels, R. A. and Bluethmann, H. : Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin. Exp. Allergy.* **24**, 73 (1994).
- 4) Zavorotinskaya, T., Tomkinson, A. and Murphy, J. E. : Treatment of experimental asthma by long-term gene therapy directed against IL-4 and IL-13. *Mol. Ther.* **7**, 155 (2003).
- 5) Gallo, E., Katzman, S. and Villarino, A. V. : IL-13-producing Th1 and Th17 cells characterize adaptive responses to both self and foreign antigens. *Eur. J. Immunol.* **42**, 2322 (2012).
- 6) Liang, H. E., Reinhardt, R. L., Bando, J. K., Sullivan, B. M., Ho, I. C. and Locksley, R. M. : Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity. *Nat. Immunol.* **13**, 58 (2012).
- 7) Elias, J. A., Zheng, T., Lee, C. G., Homer, R. J., Chen, Q., Ma, B., Blackburn, M. and Zhu, Z. : Transgenic modeling of interleukin-13 in the lung. *Chest.* **123**, 339S (2003).
- 8) Li-Weber, M. and Krammer, P. H. : Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 534 (2003).
- 9) Choi, J. J., Park, B. K., Park, S., Yun, C. Y., Kim, D. H., Kim, J. S., Hwang, E. S. and Jin, M. : Development of an in vitro test system measuring transcriptional downregulatory activities on IL-13. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 331 (2009).
- 10) Hipskind, R. A. and Bilbe, G. : MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblasts. *Front Biosci.* **3**, d804 (1998).
- 11) Hayden, M. S. and Ghosh, S. : Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* **18**, 2195 (2004).
- 12) Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. and Rao, A. : Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **17**, 2205 (2003).
- 13) Cui, C., Zhang, S., You, L., Ren, J., Luo, W., Chen, W. and Zhao, M. : Antioxidant capacity of anthocyanins from *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) and identification of the major anthocyanins. *Food Chem.* **139**, 1 (2013).
- 14) Johnson, M. H., de Mejia, E. G., Fan, J., Lila, M. A. and Yousef, G. G. : Anthocyanins and proanthocyanidins from blueberry-blackberry fermented beverages inhibit markers of inflammation in macrophages and carbohydrate-utilizing enzymes *in vitro*. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 1182 (2013).
- 15) Desjardins, J., Tanabe, S., Bergeron, C., Gafner, S. and Grenier, D. : Anthocyanin-rich black currant extract and cyanidin-3-O-glucoside have cytoprotective and anti-inflammatory properties. *J. Med. Food* **15**, 1045 (2012).
- 16) Lai, Y. S., Hsu, W. H., Huang, J. J. and Wu, S. C. : Antioxidant and anti-inflammatory effects of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) extracts on hydrogen peroxide- and lipopolysaccharide-treated RAW264.7 macrophages. *Food Funct.* **3**, 1294 (2012).
- 17) Kim, S. M., Chung, M. J., Ha, T. J., Choi, H. N., Jang, S. J., Kim, S. O., Chun, M. H., Do, S. I., Choo, Y. K. and Park, Y. I. : Neuroprotective effects of black soybean anthocyanins via inactivation of ASK1-JNK/p38 pathways and mobilization of cellular sialic acids. *Life Sci.* **90**, 874 (2012).
- 18) Zeng, L., Gao, J. and Zhang, R. : [Study on anti-tumor effect of cyanidin-3-glucoside on ovarian cancer]. *Zhongguo Zhong Yao*

- Za Zhi.* **37**, 1651 (2012).
- 19) Qin, L., Zhang, J. and Qin, M. : Protective effect of cyanidin 3-O-glucoside on beta-amyloid peptide-induced cognitive impairment in rats. *Neurosci Lett.* **534**, 285 (2013).
- 20) Han, S. J., Ryu, S. N., Trinh, H. T., Joh, E. H., Jang, S. Y., Han, M. J. and Kim, D. H. : Metabolism of cyanidin-3-O-beta-D-glucoside isolated from black colored rice and its antiscratching behavioral effect in mice. *J Food Sci.* **74**, H253 (2009).
- 21) Park, S. J., Shin, W. H., Seo, J. W. and Kim, E. J. : Anthocyanins inhibit airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine asthma model. *Food Chem Toxicol.* **45**, 1459 (2007).
- 22) Park, S. B., Kang, K. H., Yoon, H. J. and Ko, W. S. : Inhibitory effect of *Ulmus davidiana* on  $\alpha$ -hexosaminidase release and cytokine production in RBL-2H3 cells. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology* **24**, 10 (2011).
- 23) Aketani, S., Teshima, R., Umezawa, Y. and Sawada, J. : Correlation between cytosolic calcium concentration and degranulation in RBL-2H3 cells in the presence of various concentrations of antigen-specific IgEs. *Immunol Lett.* **75**, 185 (2001).
- 24) Karlsen, A., Retterstol, L., Laake, P., Paur, I., Bohn, S. K., Sandvik, L. and Blomhoff, R. : Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J. Nutr.* **137**, 1951 (2007).
- 25) Kim, L. K., Choi, U. Y., Cho, H. S., Lee, J. S., Lee, W. B., Kim, J., Jeong, K., Shim, J., Kim-Ha, J. and Kim, Y. J. : Down-regulation of NF-kappaB target genes by the AP-1 and STAT complex during the innate immune response in *Drosophila*. *PLoS Biol.* **5**, e238 (2007).
- 26) Macian, F., Lopez-Rodriguez, C. and Rao, A. : Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene.* **20**, 2476 (2001).
- 27) Zhang, Y., Lian, F., Zhu, Y., Xia, M., Wang, Q., Ling, W. and Wang, X. D. : Cyanidin-3-O-beta-glucoside inhibits LPS-induced expression of inflammatory mediators through decreasing IkappaBalpha phosphorylation in THP-1 cells. *Inflamm Res.* **59**, 723 (2010).
- 28) Jeong, J. W., Lee, W. S., Shin, S. C., Kim, G. Y., Choi, B. T. and Choi, Y. H. : Anthocyanins Downregulate Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in BV2 Microglial Cells by Suppressing the NF- $\kappa$ B and Akt/MAPKs Signaling Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1502 (2013).
- 29) Speciale, A., Anwar, S., Canali, R., Chirafisi, J., Saija, A., Virgili, F. and Cimino, F. : Cyanidin-3-O-glucoside counters the response to TNF-alpha of endothelial cells by activating Nrf2 pathway. *Mol. Nutr. Food Res.* **00**, 1 (2013).