

검정콩 껍질 유래 안토시아닌의 RBL-2H3 세포에서 탈과립화와 사이토카인 생성 저해 효과

정미자¹ · 하태정² · 최하나¹ · 이지선¹ · 박용일^{1*}

¹가톨릭대학교 생명공학과

²농촌진흥청 국립식량과학원 기능성 작물과

Inhibitory Effects of Anthocyanins Isolated from Black Soybean (*Glycine max* L.) Seed Coat on Degranulation and Cytokine Generation in RBL-2H3 Cells

Mi Ja Chung¹, Tae Joung Ha², Ha Na Choi¹, Ji Sun Lee¹, and Yong Il Park^{1*}

¹Dept. of Biotechnology, The Catholic University of Korea, Gyeonggi-do 420-743, Korea

²Dept. of Functional Crop, National Institute of Crop Science (NCIS),
Rural Development Administration (RDA), Gyeongnam 627-803, Korea

Abstract

Anthocyanins belong to a group of flavonoid compounds and are well known for their various health beneficial effects, which include antioxidative activities. Among them, the major anthocyanins isolated from seed coat of black soybean (*Glycine max* L.) were previously characterized as glycosides containing glucopyranose. Asthma is an allergic disease that is strongly associated with various immune cells, including basophils and mast cells. Eosinophils, basophils, and mast cells play important roles in allergic asthma through the release of inflammatory mediators such as asthma-specific T-helper 2 (Th2) cytokines and subsequent amplification of asthma symptoms via degranulation. Rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells are the most common *in vitro* models for evaluating allergic reactions. In this study, we examined the effects of anthocyanin from seed coat of black soybean on antigen-stimulated degranulation and Th2 cytokine production in RBL-2H3 cells. Cell degranulation was evaluated by measuring the release of β -hexosaminidase. β -Hexosaminidase release and Th2 cytokine production in RBL-2H3 cells was much higher upon stimulation with IgE-antigen complex than those in untreated control cells. Anthocyanins significantly suppressed IgE-antigen complex-induced degranulation of RBL-2H3 cells and inhibited IgE-antigen complex-mediated interleukin (IL)-4, IL-13, and tumor necrosis factor α (TNF- α) production in RBL-2H3 cells. These findings suggest that anthocyanins from seed coat of black soybean effectively inhibit allergic reactions and may have beneficial effects against allergic asthma.

Key words: black soybean, anthocyanins, cytokines, RBL-2H3 cells, allergy

서 론

급속한 산업발달에 의한 환경오염과 바쁜 현대인들은 인공 합성물질이 함유되어 있는 다양한 가공식품 섭취로 인해 알레르기(allergy)를 유발시키는 알레르겐(allergen)이 노출된 환경에 살아가고 있다.

천식은 면역글로불린 E, IgE) 관련 type I 알레르기 반응으로 T helper 2(Th2) 세포에 의해서 조절되며 비만세포, 호염기구 그리고 호산구가 중요한 역할을 하는 염증반응이다. 그 발생기전을 알아보면, 먼저 IgE 항체 생성과 감각의 단계이며, 외부로부터 천식의 원인물질인 항원이 들어오면 이 항원을 제거하기 위해 대식세포가 활성화되고, 이 대식세포는 항체를 생산하도록 B 세포를 자극하여 항원

특이성 IgE를 생산한다. 생성된 IgE 항체는 비만세포나 호염기구의 세포막 표면에 있는 Fc ϵ RI 수용체에 항원과 결합되면 비만세포 및 호염기구가 활성화되어, 탈과립이 일어나 초기 천식반응을 유발하게 된다(1). 이후 항원에 노출된 B 세포는 CD4 T 세포를 자극하여 Th2 세포로 분화되고, 분화된 Th2 세포는 Interleukin(IL)-4, 5, 6 그리고 13 등과 같은 사이토카인 등 여러 가지 화학적 매개물질이 유리하여 호산구를 자극하고 후기 알레르기성 기도반응인 천식을 유발하게 된다(2,3).

IL-4는 B 세포를 자극하여 IgE 생산을 촉진시키고, 염증 세포들을 자극하여 염증매개 물질들을 분비시켜 기관지과민성과 기도폐쇄를 일으켜 천식증상을 일으키며, IL-13은 IL-4와 동등한 생물학적 역할을 수행한다(4). 전염증성 사이

*Corresponding author. E-mail: yongil382@catholic.ac.kr
Phone: 82-2-2164-4512, Fax: 82-2-2164-4846

토카인(proinflammatory cytokines) tumor necrosis factor α (TNF- α)는 천식 유발 모델 마우스의 폐조직, 기관지 폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 및 rat basophilic leukemia RBL-2H3 세포를 이용한 알레르기 모델에서 증가하였다(5,6). 따라서 알레르기성 천식을 예방, 개선 및 치료 효과를 가진 천연물 탐색에 IL-13, IL-4 그리고 TNF- α 가 중요한 지표로 사용되고 있다.

알레르기성 질환으로는 천식 외에 비염, 아토피성 피부염 등이 있으며 이들 질병들은 해마다 증가하고 있어, 심각한 사회문제로 대두되고 있으나 이들 질병들을 완전하게 치료할 수 있는 치료제는 아직 개발되지 않았고, 시판되고 있는 치료제들 중 일부는 부작용들이 알려져 있다(5). 따라서 이들 질병들을 예방, 개선 및 치료할 수 있고 부작용을 최소화할 수 있는 천연물 유래 항알레르기 천연소재 발굴에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다(6,7).

안토시아닌(anthocyanins)은 검정콩을 비롯한 식품의 꽃, 과실, 줄기, 잎, 뿌리 등에 존재하는 수용성 색소 배당체(glycoside)로 안토시아닌과 결합된 당의 종류와 아실기의 종류 및 결합 위치에 따라 수백 종으로 구분되며 그 생리활성도 차이가 있다(8). 안토시아닌은 장관에서의 흡수도 매우 용이하며 노화억제작용, 항균작용, 돌연변이성 억제 작용, 강력한 항산화력에 의한 폐에서 급성염증 개선 작용 등이 알려져 있다(8,9). 안토시아닌의 다양한 생리활성은 보고되었지만 검정콩 껍질에서 분리된 안토시아닌의 항알레르기 효과에 대해서는 불명확하다. 따라서 본 연구에서는 검정콩 껍질에서 분리한 안토시아닌의 항알레르기 효과 및 분자생물학적 기전을 밝히기 위하여 IgE-항원 복합체 자극에 의해 활성화된 rat basophilic leukemia RBL-2H3 세포에서 탈과립화 및 천식관련 사이토카인(IL-4, IL-13 그리고 TNF- α) 발현 억제효과를 측정하여 항알레르기 효과와 관련 건강기능식품, 의약품 등에 검정콩 껍질에서 분리한 안토시아닌이 이용될 수 있을지 그 가능성을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분석

본 실험에 사용된 안토시아닌은 농촌진흥청국립식량과학원[National Institute of Crop Science(NICS)]에 의해 품종 개량한 검정콩[*Glycine max*(L.) Merr., cv. Cheongja 3] 껍질로부터 Lee 등(10)에 의해 서술된 방법을 사용하여 분리하였다. 분리된 안토시아닌은 cyanidin-3-O-glucoside(68.3%), delphinidin-3-O-glucoside(25.2%) 및 petunidin-3-O-glucoside(6.5%)가 함유되어 있는 혼합물이고 그들의 순도와 조성은 HPLC로 분석하였다(10).

DPPH 라디칼 소거활성 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Chung 등(11)의 방법에 의하여 일정 농도의 안토시아닌과 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

(DPPH) 용액을 가하여 잘 혼합한 다음 37°C에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 대조구에 대한 시료 첨가구의 흡광도를 비교하여 $(1 - \text{시료의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도}) \times 100$ 에 의하여 %로 나타내었다.

세포 배양

RBL-2H3세포는 Korea Cell Line Bank(Seoul, Korea)에서 구입하여 10% fetal bovine serum(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)과 1% penicillin-streptomycin을 넣은 Eagle's minimum essential medium(MEM; Gibco-BRL) 배양액으로 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 37°C 조건으로 배양한다.

세포 생존율 측정

RBL-2H3 세포는 96-well plates에 1×10^4 cells/mL의 밀도로 깔아주고 24시간 동안 배양한 후 세포를 무혈청 배지로 세척하고 안토시아닌 처리 12시간 전에 FBS가 무 첨가된 배지로 교체하였다. 세포 생존율은 Huang 등(12)의 방법과 같이 처리한 후 MTT[3-(3,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 환원방법을 이용하여 측정하였다.

Cellular antioxidant activity assay(CAA assay)

세포 내 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 양을 측정하는 방법으로 ROS 수준은 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) probe를 이용하여 측정하였다. DCFH-DA는 세포막을 통과하여 세포질에서 세포 내 esterase에 의해 비형광물질인 dichlorofluorescein(DCFH)으로 가수분해 된다. DCFH는 세포 내 활성 산소종에 의해 형광을 띄는 DCF로 전환된다(13). DNP-IgE(0.5 $\mu\text{g/mL}$)를 함유한 배지로 24시간 배양하였고, Siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM PIPES, 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 0.1% BSA, pH 7.2)로 3회 세척한 후 Siraganian buffer를 넣고 10분간 배양한 다음 0, 5, 10, 25 그리고 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 anthocyanins이 함유된 MEM로 2시간 배양하였다. Siraganian buffer로 세포를 3회 세척한 후 2시간 동안 DNP-HSA(2 $\mu\text{g/mL}$)를 처리하였다. 배지를 제거한 후 10 μM DCFH-DA가 함유된 PBS를 넣어 37°C에서 45분 동안 인공배양 시켰다. PBS로 남아 있는 DCFH-DA probe를 제거한 후 PBS를 넣어 5분간 37°C에서 반응시킨 후 DCF의 형광은 fluorescence reader(BioTek, Winooski, VT, USA)로 파장 495 nm(excitation)와 525 nm(emission)에서 측정하였다. DCF 형광 광도는 안토시아닌과 DNP-BSA를 처리하지 않는 대조군을 100%로 하였을 때 상대적인 양을 계산하였다.

β -Hexosaminidase 측정 및 RT-PCR를 위한 시료 준비

β -Hexosaminidase 방출 정도는 Huang 등(12)의 방법을

일부 변경하여 측정하였다. 즉, 24-well plates에 RBL-2H3 세포(2×10^5 cells/mL)를 24시간 동안 배양한 후 세포를 무혈청 배지로 세척하고 FBS가 무 첨가된 배지로 교체하여 2시간 배양하였다. DNP-IgE(0.5 μ g/mL)를 함유한 배지로 24시간 배양하였고, Siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM PIPES, 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl_2 , 0.4 mM MgCl_2 , 0.1% BSA, pH 7.2)로 3회 세척한 후 Siraganian buffer를 넣고 10분간 배양한 다음 0, 5, 10, 25 및 50 μ g/mL의 안토시아닌이 함유된 MEM로 2시간 배양하였다. Siraganian buffer로 세포를 3회 세척한 후 2시간 동안 DNP-HSA(2 μ g/mL)를 처리하였다. 각 plate를 10분간 ice bath에서 덤으로써 반응을 종결시켰고 상층액은 β -hexosaminidase 방출 정도를 확인하기 위해 사용하였으며 세포는 RT-PCR를 위한 시료로 사용하였다. 96-well plate에 상층액 20 μ L와 substrate buffer[2 mM 4-p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide in 0.1 M sodium citrate buffer(pH 4.5)] 20 μ L를 넣어 섞은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 정지를 위해 0.1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH 10.0) 용액 200 μ L를 더한 후 microplate reader(VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Total RNA 추출 및 RT-PCR

24-well plates에서 배양한 RBL-2H3 세포에 TRIzol Reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 0.5 mL씩 가하여 완전히 마쇄시킨 후 Invitrogen사에서 제공한 제품 사용설명서에 따라 RNA를 추출하였다. 본 연구에 First-stand cDNA를 생산하기 위하여 Power cDNA synthesis kits (Intron, Seongnam, Korea)와 oligo(dT)₁₅ primer(500 μ g/mL)를 이용하여 Intron사에서 제공한 제품 사용설명서에 따라 cDNA를 합성하였다. PCR를 합성한 cDNA 1 μ L와 각 primer 2 μ L(forward와 reverse, 10 pmol/ μ L)를 Maxime PCR PreMix kit(Intron)에 더한 후 RNase-free water 17 μ L를 넣어 최종부피 20 μ L로 맞춘 후 PCR를 수행하였다. 본 실험에 사용한 primers는 아래와 같다. TNF- α , F, 5'-CGGAATTCGGCTCCCTCTCATCAGTTC 그리고 R, 5'-GCTCTAGACCCTTGAAGAGAACCTGGG; IL-4, F, 5'-ACCTTGCTGTCCACCCTGTTC and R, 5'-TTGTGAGC-GTGGACTCATTC; and IL-13, F, 5'-GCTCTCGCTT-GCCTTGGTGGTC 그리고 R, 5'-CATCCGAGGCCTT-TGGTTAGAG, GAPDH(F, 5'-ACCACAGTCCATGC-CATCAC 그리고 R, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA)였다. TNF- α , IL-4 그리고 IL-13의 PCR 조건을 보면, 94°C에서 2분, 94°C에서 20초, 60°C에서 30초, 72°C에서 40초, 72°C에서 5분이었고, 내부 표준 유전자로 사용한 GAPDH의 annealing 온도는 55°C였다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가된 2% agarose gel에 80 V에서 30시간 전기영동 한 후 자외선 광으로 유전자 발현 정도를 알아보았다.

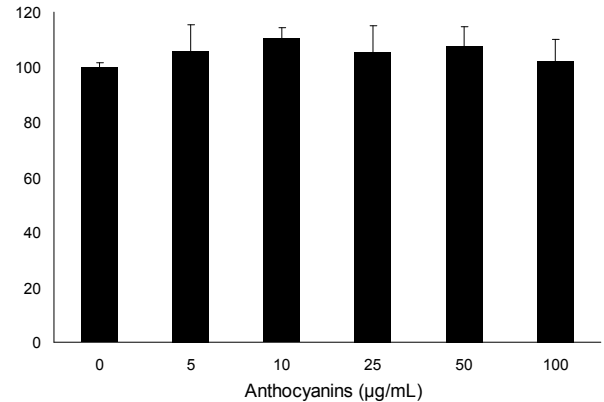


Fig. 1. Cytotoxic effect of anthocyanins on RBL-2H3 cells. The data are the means \pm SD (n=4).

그 밴드의 강도를 SigmaGel(Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) 소프트웨어에 의해 분석 정량하였다.

통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 GraphPad InStat Version 3.05(GraphPad, San Diego, CA, USA) 통계 package를 이용하여 평균 \pm 표준오차로 표시하였고, 각 농도 평균 차의 통계적 유의성을 Tukey-Kramer multiple comparisons test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

세포독성 및 세포내 ROS 생성에 안토시아닌이 미치는 영향

세포 내 세포독성을 측정한 결과 0, 5, 10, 25, 50 및 100 μ g/mL 안토시아닌을 처리했을 때 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1). 따라서 0, 5, 10, 25 및 50 μ g/mL를 계속되는 실험에 사용하였다.

RBL-2H3 세포내에 항원(DNP-HSA) 처리 시 ROS 생성이 유도되었고, 안토시아닌 처리 시 ROS 생성이 억제되었다(Fig. 2A). 한편, 검정콩 껍질에서 분리된 안토시아닌이 DPPH 라디칼 소거작용이 있는지 확인한 결과 안토시아닌은 농도 의존적으로 DPPH 라디칼을 소거하였다(Fig. 2B).

RBL-2H3 세포 내에서 IgE+DNP-HSA와 같은 다양한 자극에 반응하여 ROS가 발생할 수 있다(13). Han 등(13)은 구아바 에틸아세테이트 분획물이 DNP-HSA에 의해 유도된 ROS 생성을 현저하게 줄였다고 보고하였다(13). 카마로사(Camarosa) 종의 딸기로부터 분리한 안토시아닌은 항산화 효과가 있고(14), 검정콩 껍질에서 분리된 안토시아닌 역시 DPPH radical 소거작용, LDL 산화억제, thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 생성억제 효과가 있는 것으로 알려져 있으나(15), 세포내 ROS를 감소할 수 있는지에 대한 연구는 전무하다. 본 연구에서 안토시아닌 처리는 항원에 의해 증가된 세포내 ROS를 감소시켰고, 이는 검정콩 껍

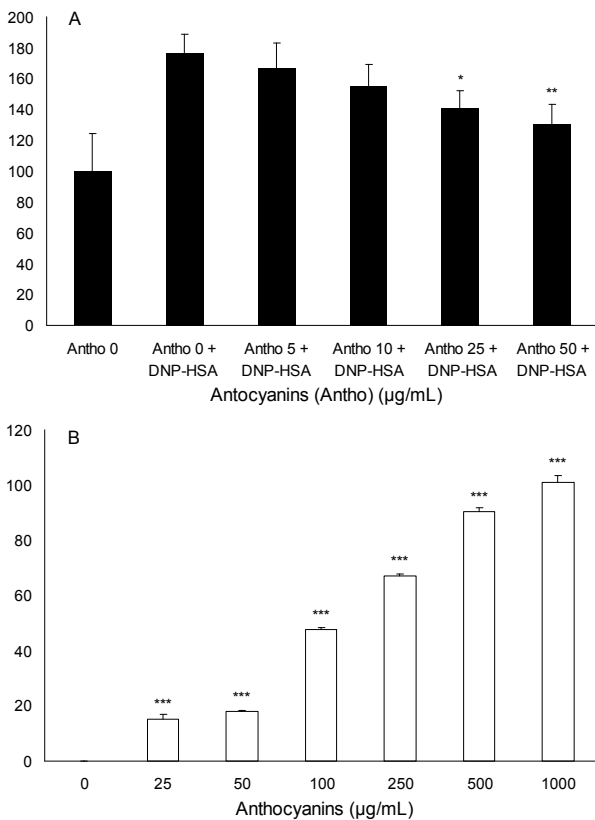


Fig. 2. Effects of anthocyanins on antigen-induced intracellular ROS production (A) in RBL-2H3 cells and DPPH radical scavenger activity (B). The data are the means±SD (n=4). *p<0.05 vs. positive control (DNP-HSA); **p<0.01 vs. positive control (IgE+DNP-HSA); ***p<0.001 vs. control.

질에서 분리한 안토시아닌의 강한 항산화효과에 기인된 것으로 생각되며 이와 같은 항산화력은 알레르기 질환 개선에 유익한 영향력을 미칠 것으로 생각된다.

안토시아닌이 β-hexosaminidase 방출에 미치는 영향

검정콩 껍질에서 분리한 안토시아닌이 RBL-2H2 세포내 β-hexosaminidase 방출에 미치는 영향력을 Fig. 3에 나타내었다. IgE 감작 후 DNP-HSA 처리는 현저하게 β-hexosaminidase 방출을 증가시켰고, 이들 증가는 안토시아닌 처리에 의해 농도 의존적으로 β-hexosaminidase 방출을 억제하였으며 50 µg/mL 안토시아닌 처리에 의해 43.8% 감소하였다(Fig. 3).

항천식 효과를 알아보기 위하여 IgE로부터 감작된 비만세포에 항원을 처리하여 활성화된 비만세포에서 유리된 히스타민의 양을 측정하였으나 이 방법은 비만세포에서 히스타민 농도가 매우 낮으므로 세포 내 많이 함유되어 있고 히스타민과 함께 분비되는 hexosaminidase 활성을 측정함으로써 탈과립 정도를 알 수 있다(16). 비만세포(mast cells)와 호염기 세포(basophils)는 고친화성(high-affinity) IgE 수용체인 FcεRI를 가지고 있고 히스타민(histamine)과 여러 가지 사이토카인(cytokines)과 같은 염증매개체(inflammatory

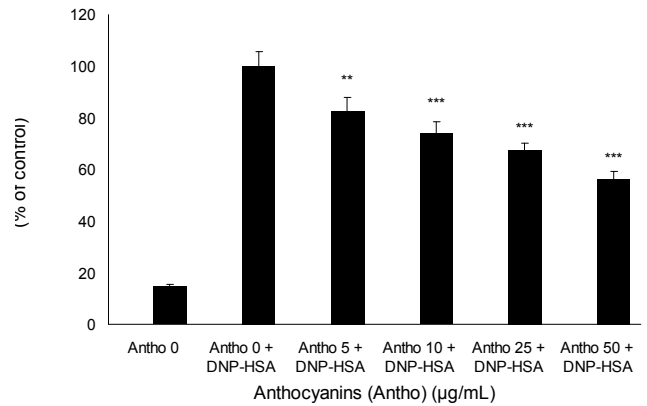


Fig. 3. Effect of anthocyanins on β-hexosaminidase release in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells. The data are the means±SD (n=4). **p<0.01 vs. positive control (DNP-HSA); ***p<0.001 vs. positive control (IgE+DNP-HSA).

mediators)를 방출하여 알레르기 질환 발병에 중요한 역할을 한다(17). 따라서 항알레르기 기전 연구에서 비만세포와 유사한 기전을 가진 rat basophilic leukemia RBL-2H3 세포를 모델로 많이 사용하고 있으며, Vo 등(6)과 Kato 등(18)은 RBL-2H2 세포내 탈과립 및 사이토카인 생성량을 측정하여 알레르기 염증 반응 억제에 의한 항 알레르기 효과를 가진 천연 물질을 탐색하였다.

RBL-2H2 세포에 썩으로부터 분리된 eupatilin과 jaceosidin 처리는 IgE-DNA-HSA 복합체에 의해 유도된 β-hexosaminidase 분비를 현저하게 억제하였고(7), RBL-2H3 세포에 키토 올리고당(chitoologosaccharides)을 처리했을 때 calcium ionophore A23187에 의해 증가된 β-hexosaminidase 과 histamin 분비를 현저하게 감소하였다(6). 본 연구 결과 안토시아닌도 이들 연구와 유사한 경향을 나타내었다.

세포의 탈과립 정도를 알 수 있는 histamin과 β-hexosaminidase 방출 저해 효과를 가진 천연소재 발굴은 항알레르기 신약 개발 및 건강기능식품개발을 가능하게 할 수 있을 것이다(6,16). 본 연구 결과 검정콩 껍질에서 분리된 안토시아닌은 탈과립화를 억제함으로써 항알레르기 효과를 나타내는 신소재임을 알 수 있었다.

안토시아닌이 사이토카인 발현에 미치는 영향

IgE-항원(DNA-HSA)에 의해 활성화된 RBL-2H3 세포내 안토시아닌 처리가 IL-4, IL-13 그리고 TNF-α 발현에 미치는 영향은 Fig. 4와 같다.

IgE에 의해 감작된 RBL-2H3세포에 DNA-HSA를 처리했을 때 IL-4, IL-13 그리고 TNF-α mRNA 발현이 현저하게 증가하였고, 안토시아닌 처리는 이들 사이토사인 발현을 현저하게 감소시켰다. 50 µg/mL 안토시아닌을 처리했을 때 IL-4, IL-13 그리고 TNF-α mRNA 수준이 IgE-DNA-HSA 복합체만 처리한 군(1배)과 비교하여 각각 0.7, 0.7, 0.2배를 나타내었다.

Vo 등(6)과 Matsuda 등(17)은 DNP-HSA 또는 calcium

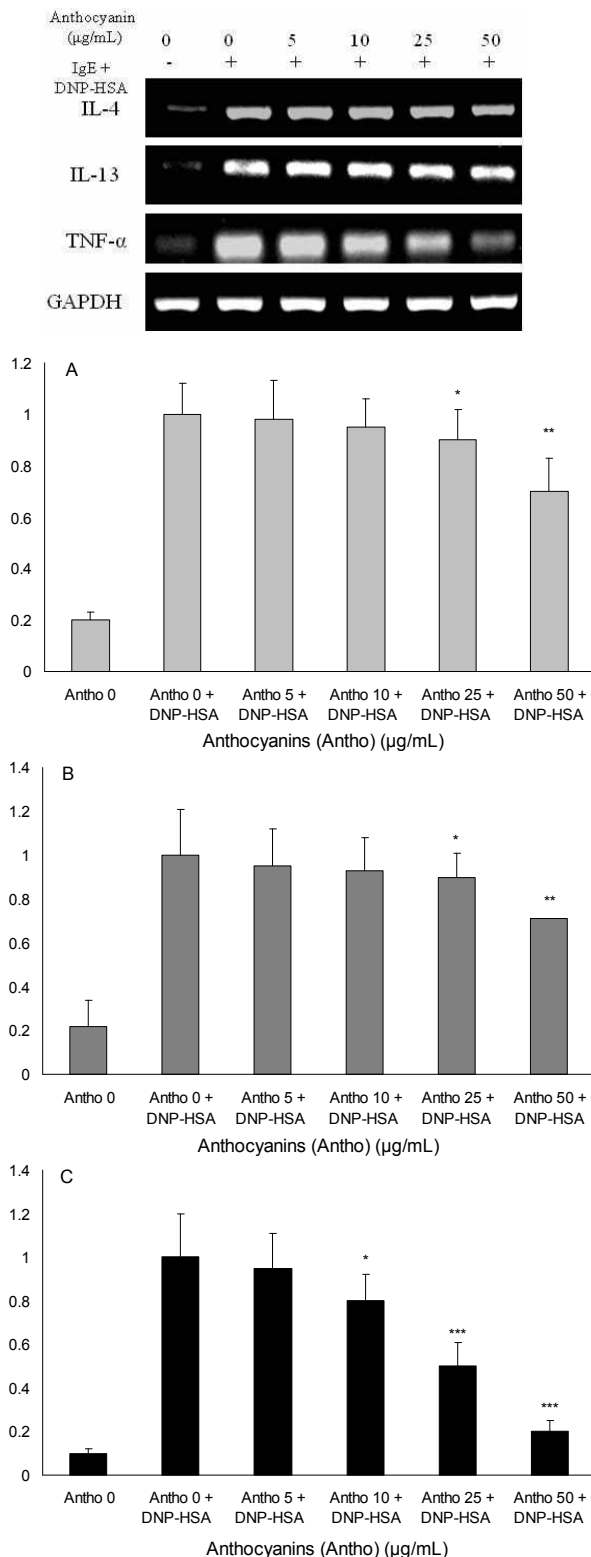


Fig. 4. Effect of anthocyanins on mRNA expression of the IL-4, IL-13 and TNF- α . The data are the means \pm SD (n=3). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 vs. positive control (IgE+DNP-HSA). The amount of IL-4, IL-13 and TNF- α mRNA in each sample was normalized to the amount of GAPDH. The "fold-induction" of each mRNA species was calculated as the ratio of the level of mRNA in treated cells to that of the corresponding mean value in control cells.

ionophore A23187에 의해 활성화된 RBL-2H3 세포에서 TNF- α , IL-4 그리고 IL-13 mRNA가 현저히 증가하였다고 하였는데 본 연구 결과와 같은 경향을 나타내었다. 썩에서 분리된 eupatilin과 jaceosidin 처리가 탈과립 및 알레르기 관련 사이토카인(TNF- α 그리고 IL-4)의 발현 감소를 나타내어 항알레르기 효과를 증명함으로써, eupatilin과 jaceosidin이 천식과 같은 알레르기 질병에 활용될 가능성을 제시하였다(7). 플라보노이드의 일종인 sulfuretin은 천식모델 마우스의 BALF에서 TNF- α 와 IL-13을 감소시켰고 알레르기 기도 염증 감소 효과를 나타내었다고 보고하였으며(19), 도라지 물 추출물은 천식 동물 모델의 BALF내 IL-4, IL-13 그리고 TNF- α 생성을 억제시켰고 항염증 효과가 있었다(20). 따라서 본 연구 결과 검정콩 껍질에서 분리한 안토시아닌 처리에 의한 IL-4, IL-13 그리고 TNF- α 의 발현 억제는 염증반응 관련 알레르기성 천식을 개선 및 예방할 수 있을 것을 시사하고 있다.

본 연구 결과 검정콩 껍질에서 분리된 안토시아닌은 β -hexosaminidase 방출 및 사이토카인 생성을 현저하게 억제하였으므로 항알레르기 효과를 나타내는 건강기능식품 개발 등 다양한 산업적 용도로 사용 가능할 것으로 생각된다.

요 약

안토시아닌(anthocyanins)은 플라보노이드에 속하고 항산화 활성들을 포함한 그들의 다양한 건강 유익성에 대해 알려져 있다. 그들 중 검정콩 껍질에서 분리한 주요 안토시아닌은 glycopyranose를 함유하고 있는 배당체이다. 천식은 호염기성 세포(basophils)와 비만세포(mast cells)를 포함한 다양한 면역세포와 관련된 알레르기 관련 질병이다. 호산구(eosinophils), 호염기성 세포, 비만세포는 탈과립화에 의한 천식-특이적 보조 2(T-helper 2) 사이토카인 분비 그리고 계속해서 일어나는 증폭과 같은 염증을 일으키는 매개체의 증가를 통해 알레르기 천식(allergic asthma)에서 중요한 역할을 한다. 흰쥐 호염기성 백혈병(rat basophilic leukemia) RBL-2H3 세포는 알레르기 반응을 측정하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 *in vitro* 모델이다. 본 연구에서는 검정콩 껍질 안토시아닌이 항원으로 자극한 RBL-2H3 세포에서 탈과립 그리고 Th2 사이토카인 생산에 미치는 효과를 조사하였다. 세포 탈과립은 β -hexosaminidase의 방출을 검출함으로써 평가하였다. IgE-항원 복합체로 자극한 RBL-2H3 세포내 β -hexosaminidase 방출과 Th2 사이토카인 생산이 무처리군의 그것과 비교하여 더 높았다. 안토시아닌은 RBL-2H3 세포의 IgE-항원 복합체 유도 탈과립을 현저하게 억제시켰고 RBL-2H3 세포내 IgE-항원 복합체-매개체 interleukin(IL)-4, IL-13 그리고 TNF- α 생산을 저해하였다. 이러한 결과는 검정콩 껍질 유래 안토시아닌이 알레르기 반응

(allergic reaction)을 현저히 저해하는 효과가 있음을 보였고, 이들 안토시아닌이 향후 알레르기 천식을 억제하거나 개선하는데 유용한 물질로 사용될 가능성이 있을 것으로 판단되었다.

감사의 글

이 논문은 농촌진흥청의 공동연구사업(Project No. PJ0071862011)과 차세대 바이오그린 21사업(과제번호: PJ0071862011), 2011 가톨릭대학교 교비연구비의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문헌

1. Fels AO, Cohn ZA. 1986. The alveolar macrophages. *J Appl Physiol* 60: 355-369.
2. Larche M, Robinson DS, Kay AB. 2003. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 111: 450-463.
3. Romagnani S. 2001. T-cell responses in allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1: 73-78.
4. Oshita A, Hamelmann E, Haczku A, Takeda K, Conrad DH, Kikutani H, Gelfand W. 1997. Modulation of antigen-induced B and T cell responses by antigen-specific IgE antibodies. *J Immunol* 159: 4056-4063.
5. Lee MY, Seo CS, Lee JA, Lee NH, Kim JH, Ha HK, Zheng MS, Son JK, Shin HK. 2011. Anti-asthmatic effects of *Angelica dahurica* against ovalbumin-induced airway inflammation via upregulation of heme oxygenase-1. *Food Chem Toxicol* 49: 829-837.
6. Vo TS, Kong CS, Kim SK. 2011. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on degranulation and cytokine generation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *Carbohydr Polym* 84: 649-655.
7. Lee SH, Bae EA, Park EK, Shin YW, Baek NI, Han EJ, Chung HG, Kim DH. 2007. Inhibitory effect of eupatilin and jaceosidin isolated from *Artemisia princeps* IgE-induced hypersensitivity. *Int Immunopharmacol* 7: 1678-1684.
8. Lila MA. 2004. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. *J Biomed Biotechnol* 2004: 306-313.
9. Amorini AM, Lazzarino G, Galvano F, Fazzina G, Tavazzi B, Galvano G. 2003. Cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside protects myocardium and erythrocytes from oxygen radical-mediated damages. *Free Radic Res* 37: 453-460.
10. Lee JH, Kang NS, Shin SO, Shin SH, Lim SG, Suh DY, Baek IY, Park KY, Ha TJ. 2009. Characterization of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. *Food Chem* 112: 226-231.
11. Chung MJ, Sung NJ, Park CS, Kweon DK, Mantovani A, Moon TW, Lee SJ, Park KH. 2008. Antioxidant and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and in C57 BL/6J mice. *Eur J Pharmacol* 578: 159-170.
12. Huang F, Yamaki K, Tong X, Fu L, Zhang R, Cai Y, Yanagisawa R, Inoue KI, Takano H, Yoshino S. 2008. Inhibition of the antigen-induced activation of RBL-2H3 cells by sinomenine. *Int Immunopharmacol* 8: 502-507.
13. Han EH, Hwang YP, Kim HG, Park JH, Choi JH, Im JH, Khanal T, Park BH, Yang JH, Choi JM, Chun SS, Seo JK, Chung YC, Jeong HG. 2011. Ethyl acetate extract of *Psidium guajava* inhibits IgE-mediated allergic responses by blocking FcεRI signaling. *Food Chem Toxicol* 49: 100-108.
14. Cerezo AB, Cuevas E, Winterhalter P, Garcia-Parrilla MC, Troncoso AM. 2010. Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. *Food Chem* 123: 574-582.
15. Astadi IR, Astuti M, Santoso U, Nugraheni PS. 2009. In vitro antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL). *Food Chem* 112: 659-663.
16. Wendeler M, Sandhoff K. 2009. Hexosaminidase assays. *Glycoconjugate J* 26: 945-952.
17. Matsuda H, Wang Q, Matsuhira K, Nakamura S, Yuan D, Yoshikawa M. 2008. Inhibitory effects of thunberginols A and B isolated from *Hydrangeae Dulcis Folium* on mRNA expression of cytokines and on activation of activator protein-1 in RBL-2H3 cells. *Phytomedicine* 15: 177-184.
18. Kato N, Motohashi S, Okada T, Ozawa T, Mashima K. 2008. PICOT, protein kinase C θ -interacting protein, is a novel regulator of FcεRI-mediated mast cell activation. *Cell Immunol* 251: 62-67.
19. Song MY, Jeong GS, Lee HS, Kwon KS, Lee SM, Park JW, Kim YC, Park BH. 2010. Sulfuretin attenuates allergic airway inflammation in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 400: 83-88.
20. Choi JH, Hwang YP, Lee HS, Jeong HG. 2009. Inhibitory effect of Platycodi Radix on ovalbumin-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *Food Chem Toxicol* 47: 1272-1279.

(2011년 10월 4일 접수; 2011년 10월 12일 채택)