

Original Article / 원저

## 교맥의 RBL-2H3 비만세포 탈과립과 cytokine 생산 억제 효과

강경화<sup>1</sup> · 이승연<sup>2</sup>

<sup>1</sup>동의대학교 한의과대학 생리학교실

<sup>2</sup>동의대학교 한의과대학 소아과학교실

### Inhibitory effect of *Fagopyrum esculentum* on degranulation and production of cytokine in RBL-2H3 cells

*Kyung-Hwa Kang<sup>1</sup> · Seung-Yeon Lee<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Dept. of Oriental Physiology, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

<sup>2</sup> Dept. of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

#### Abstract

**Objectives** : *Fagopyrum esculentum*(FE) has been used for removal of inflammation of internal organs and treatment of sore and ulcer by heat toxin in Korean herbal medicines. In this study, To investigated the protective effect of FE on allergic response, we determined whether FE inhibits allergic response.

**Methods** : The effect of FE was analyzed by ELISA, RT-PCR and Western blot in RBL-2H3 cells. We investigated cell viability,  $\beta$ -hexosaminidase, as a marker of degranulation, cytokine, and intracellular ROS and MAPK and NF- $\kappa$ B signaling.

**Results** : We found that FE suppressed  $\beta$ -hexosaminidase release, the production of IL-4 and TNF- $\alpha$  and intracellular ROS level in RBL-2H3 by the anti-DNP IgE plus DNP-HSA stimulation. FE also significantly inhibited cytokine mRNA expressions, such as IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$  and GM-CSF in RBL-2H3. In addition, PF suppressed the phosphorylation of ERK1/2, JNK1/2, p38 and I $\kappa$ B  $\alpha$  and NF- $\kappa$ B signal transduction pathway.

**Conclusions** : Our results indicate that FE protects against allergic response and exerts an anti-inflammatory effect through the inhibition of degranulation and production of cytokines and ROS via the suppression MAPK and NF- $\kappa$

B of signal transduction.

**Abbreviations** : FE, Fagopyrum esculentum; RBL-2H3, rat basophilic leukemia cell line; ROS, reactive oxygen species; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; TNF $\alpha$ , Tumor necrosis factor alpha; GM-CSF, Granulocyte macrophage colony-stimulating factor; ERK, extracellular-signal-regulated kinase; JNK, c-Jun NH2-terminal kinase; p38, p38 MAP kinase; I $\kappa$ B $\alpha$ , inhibitory-kappa B alpha

**Key words** : Fagopyrum esculentum;  $\beta$ -hexosaminidase; cytokine; ROS; MAPK; NF- $\kappa$ B; RBL-2H3

## 1. 서 론

아토피 피부염, 천식과 알러지 비염과 같은 알러지 질환은 지난 수세기동안 유아와 청소년에서 꾸준히 증가하고 있다<sup>1)</sup>. 알러지는 인체내 T helper type 2 (Th2) 면역반응이 상대적으로 우세하고 immunoglobulin (Ig) 매개 비만세포의 활성화가 나타나는 것이 특징이다<sup>2)</sup>. 비만세포가 활성화되면 탈과립이 일어나 이미 형성되어 있던 매개물질이 분비되고 cytokines과 chemokines를 합성하여 염증반응을 일으킨다<sup>3)</sup>. 비만세포의 활성화에 의한 신호전달에서 ROS는 비만세포의 활성화에 의해 생산되어 탈과립과 류코트리엔과 사이토카인을 분비를 매개하는 이차 전달자로 작용한다<sup>4,5)</sup>. MAPK 신호전달은 비만세포를 포함한 여러 면역세포의 분화, 활성화, 증식, 탈과립에 중요한 역할을 하는데 ERK, JNK 및 p38 MAP kinase로 구성되어 있다<sup>6)</sup>. NF- $\kappa$ B는 염증반응에 관여하는 여러 사이토카인의 발현을 조절하는 중요한 전사인자로 알려져 있다<sup>7)</sup>.

비만세포는 피부, 호흡기계 및 소화기계를 포함하는 인체의 광범위한 부위에 분포하며, 다양한 외부 자극에 의해 염증유발과 면역조절을 할 수 있는 많은 매개물질을 생산할 수 있으므로 선천 면역과 적응 면역에서 중요한 역할을 한다. 특히 비만세포는 항원으로 유발되는 IgE 매개 알러지 반응에 대한 주요한 작

용 세포로 인식되어 왔다<sup>8)</sup>. 그러므로 비만세포 활성화의 조절은 알러지 염증질환의 치료와 예방에 중요하다고 할 수 있다.

교맥에 대한 실험연구로 당뇨, 비만, 고혈압, 고지혈증과 변비를 개선시키는 기능이 있는 것으로 보고 되었으나<sup>9)</sup>, 알러지 질환에 대한 효능 연구는 미흡하였다.

한의학에서 소아의 痘癩疹과 諸瘡는 胎毒과 장부의 열이 잠복하여 발생하는 것으로 보았다<sup>10)</sup>. 또한 교맥은 체내 장부의 열독을 풀어주어 중기 궤양 등의 치료에 활용되어 왔으므로<sup>10,11)</sup>, 알러지성 염증질환에서 핵심적인 역할을 담당하는 비만세포의 활성화를 억제할 수 있는지 조사하였다. 본 연구는 RBL-2H3 세포를 이용하여 anti-DNP IgE와 DNP-HSA으로 알러지성 염증반응을 유발하고 비만세포 탈과립과 cytokine, ROS의 생산과 MAPK 및 NF- $\kappa$ B의 신호전달에 미치는 교맥 추출물의 억제효과를 살펴보았다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 시약

본 실험에 사용된 anti-dinitrophenyl(DNP) immunoglobulin E(IgE), DNP-HSA, DCFH-DA는 Sigma(USA)로부터, Dulbecco's modification Eagle medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin 및 trypsin-EDTA solution은 Gibco BRL로부터, tetrazolium bromide salt(MTT) 및 dimethylsulfoxide(DMSO)는 Amresco로부터, Interleukin

교신저자 : 이승연, 부산시 부산진구 양정 2동 산 45-1  
동의대학교부속한방병원 한방소아과  
(Tel : 051-850-8680, E-mail : synlee@deu.ac.kr)  
• 접수 2012/7/17 • 수정 2012/7/27 • 채택 2012/8/3

(IL)-4와 tumor necrosis factor alpha(TNF- $\alpha$ ) kit는 BD Biosciences Pharmingen으로부터, RT-PCR kit(one-step RT-PCR PreMix kit)는 iNtRON Biotechnology, Inc.로부터, anti-phospho-ERK(p-ERK), anti-ERK, anti-phospho-JNK(p-JNK), anti-JNK, anti-phospho-p38(p-p38), anti-p38, anti-NF $\kappa$ B, anti-phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ (p-I $\kappa$ B $\alpha$ ), anti-I $\kappa$ B $\alpha$  및 anti- $\beta$ -actin primary antibody는 Cell Signaling Technology(Beuerly, MA, USA)으로부터, Horseradish Peroxidase(HRP)-conjugated secondary antibody는 Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.(KPL, Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

## 2) 시료의 추출

본 실험에 사용된 교맥(Fagopyrum esculentum: FE)는 옴니허브(대구, 한국)에서 구입하여 사용하였다. FE 100g을 증류수로 水洗하여 1L의 75% Ethanol을 加하여 incubator(iNtRON BIOTECHNOLOGY CO., Ltd., Korea)에서 60 $^{\circ}$ C, 90rpm 조건 하에서 24시간 동안 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 분리하고, 0.2mm 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 200ml가 되도록 減壓濃縮한 후 냉동 건조하여 4.2g의 抽出物을 얻었다. -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다가 실험직전 생리식염수나 배지에 희석하여 0.2 $\mu$ m syringe filtering 후 실험에 사용하였다.

## 3) 세포배양

RBL-2H3은 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받아 배양하였다. 세포의 배양을 위하여 10% heat-inactivated FBS(Gibco BRL, USA)과 1% penicillin 및 streptomycin(Gibco BRL, USA)을 포함한 DMEM(Gibco BRL, USA) 배양액에서 배양하였다. 세포는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였고, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하

기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution(Gibco BRL, USA)을 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대 배양하였다.

## 4) MTT assay

RBL-2H3 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT법을 사용하였다. RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 48 well plate(Corning, USA)에 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. FE를 농도별(0, 10, 20, 30, 40 및 50mg/ml)로 처리한 후 1시간 동안 반응시켰다. 배양액을 제거 한 후 5mg/ml의 MTT를 각 well에 넣고 잘 섞어 준 후 4시간 37 $^{\circ}$ C incubator에서 배양한 후 tetrazolium bromide salt를 제거하고 DMSO를 150 $\mu$ l 씩 분주하여 well에 생성된 formazan이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들며 모두 녹인 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정하여 평균값과 표준 편차를 구하였다.

## 5) $\beta$ -hexosaminidase release assay

알러지 초기반응의 지표인 탈과립에 대한 억제효과를 살펴보기 위하여  $\beta$ -hexosaminidase의 분비를 측정하였다<sup>12)</sup>. RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 48 well plate(Corning, USA)에 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE(30ng/ml)로 감작하고 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer(119mM NaCl, 5mM KCl, 0.4mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM PIPES, 40mM NaOH, pH 7.2)로 2번 세척한 다음 각 well 당 5.6mM glucose, 1mM CaCl<sub>2</sub>와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가하고 FE를 농도별(0, 20 및 40mg/ml)로 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양 한 후 DNP-HSA(10 $\mu$ g/ml)로 처리하여 1시간 동안 반응시키

고 ice bath에서 10분 동안 방치한 후 반응을 종결시켰다. 상층액 20 $\mu$ l를 96 well plate에 옮기고 substrate buffer(4-*p*-Nitrophenyl-*N*-acetyl-b-D-glucosaminide 1 mM, sodium citrate 0.05 M, pH 4.5) 80 $\mu$ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분 배양시킨 다음 각 well당 stop solution 200 $\mu$ l를 첨가하여 반응을 종결시켰다. Microplate reader (Molecular Devices Co. Ltd., USA)를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. FE 처리군과 대조군의 흡광도 값으로 다음 식에 의해 inhibition(%)를 산출하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = [1 - (T - N) / (C - N)] \times 100$$

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

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

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

## 6) IL-4 and TNF- $\alpha$ secretion assay

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate(Corning, USA)에 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE(30ng/ml)로 감작하고 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer(119mM NaCl, 5mM KCl, 0.4mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM PIPES, 40mM NaOH, pH 7.2)로 2번 세척한 다음 각 well 당 5.6mM glucose, 1mM CaCl<sub>2</sub>와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가하였다. 그 후 FE(0, 20 및 40mg/ml)를 처리하여 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 DNP-HSA(10 $\mu$ g/ml)를 처리한 후 4시간 동안 반응시키고 ice bath에서 10분 동안 방치한 후 반응을 종결시켰다. 상층액을 분리하여 5,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다가 IL-4와 TNF- $\alpha$  ELISA kit(BD Biosciences Pharmingen, USA)를 사용하여 측정하였다. Microplate reader(Molecular Devices Co. Ltd., USA)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하

여 누출된 IL-4와 TNF- $\alpha$ 의 양을 계산하였다.

## 7) 세포내 ROS 측정

세포내 ROS의 분비는 Nakano 등<sup>13)</sup>의 방법에 의해 측정하였다. DCFH-DA(2', 7'-dichlorofluorescein diacetate)는 비극성분자로 용이하게 세포내로 들어갈 수 있으며, 세포내 esterase에 의해 비형광성 극성분자인 DCFH로 분리된 후 세포내의 활성산소에 의해 산화되면 형광성 DCF로 전환되고 이를 fluorometer로 측정하는 방법이다.

anti-DNP-IgE(30ng/ml)로 감작된 RBL-2H3 cells (5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml)은 37 $^{\circ}$ C에서 30분동안 10 $\mu$ M DCFH-DA로 배양되었다. 그 후 PBS로 배지에 남아 있는 DCFH-DA를 제거한 후 FE(0, 20 및 40mg/ml)를 처리하여 30분동안 배양하고 DNP-HSA (10 $\mu$ g/ml)에 10분동안 자극하였다. 얼음 위에서 반응을 정지시킨 후 490nm(excitation)과 530nm(emission)에서 fluorometer (SPECTRAMAX M2, Molecular Devices Co. Ltd. USA)를 사용하여 ROS에 의해 산화된 DCF의 양을 측정하였다.

## 8) RNA extraction and RT-PCR

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 6 well plate(Corning, USA)에 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti DNP-IgE(30ng/ml)로 감작하고 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간동안 배양하였다. 새로운 DMEM 배지로 교환한 후 FE를 농도별(0, 20 및 40mg/ml)로 세포에 처리하여 1시간동안 배양한 후 PBS로 2회 세척한 다음 DNP-HSA(10 $\mu$ g/ml)을 4시간동안 처리하여 면역반응을 유도하였다. 상층액을 제거한 후 1ml의 TRizol을 넣고 2분간 방치한 후 chloroform을 넣고 10초간 vortexing하고 5,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합하여 흔들어 주었다. 13,000rpm에서 25분간 원심

분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 DEPC (diethyl pyrocarbonate)-DW 20 $\mu$ l에 녹여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다가 실험에 사용하였다. RT-PCR은 one-step RT-PCR PreMix kit(iNtRON Biotechnology, Inc., Korea)를 사용하여 45 $^{\circ}$ C에서 30분, 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denaturation시키고, 55-60 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing시키고, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension시키는 cycle을 32회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 PCR machine (GeneAmp, PCR system 9700, USA)에서 수행하였다. 각 PCR products는 2% agarose gel에 loading하여 100V 조건에서 30분간 전기영동을 통하여 분석하였다. 각각의 primer의 염기서열은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Primers for RT-PCR Analysis

Target gene	5' to 3' direction	size
IL-1 $\beta$	F AAGCTCTCCACCTCAATGGACA	453
	R GTCTGCTCATTACGAAAAGGGAG	
IL-2	F CGTGAAGCACTGACGCTTGTC	444
	R GAGTCATTGTTGAGATGATGC	
IL-3	F ATGCTGCTCCCGCTCCTGATG	473
	R TCCAGCCACATAGGGCGAAAG	
IL-4	F ACCTTGCTGTCACCCTCTTC	351
	R TTGTGAGCGTGGACTCAAAC	
IL-5	F CTCTGTTGACGAGCAATGAG	239
	R CTCTTGCAGGTAATCCAGGA	
IL-6	F AATGATGGATGCATCCAAAC	414
	R TATATAITCTGACCACAGTG	
IL-13	F CTCTCGCTTGCCCTTGGTGGTC	276
	R TCCGAGGCCTTTTGGTTACAG	
TNF- $\alpha$	F CAAGGAGGAGAAGTCCCAA	501
	R CGGACTCGCTGATGTCTAAG	
GM-CSF	F GCATGTAGATGCCATCAAAGAAGC	342
	R CATTTCTGGACCGCTCCAGC	
GAPDH	F CCACAGTCCATGCCATCAC	568
	R TCCACCACCCTGTGCTGTA	

F; forward, R; reverse

### 9) Protein extraction and Western blot

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 100mm cell culture dishes(Corning, USA)에  $5 \times 10^5$  cells/ml의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti DNP-IgE(30ng/ml)로 감작하고 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간동안 배양하였다. 새로운 DMEM 배지로 교환한 후 FE를 농도별(0, 20 및 40mg/ml)로 세포에 처리하여 1시간동안 배양한 후 PBS로 2회 세척한 다음 DNP-HSA(10 $\mu$ g/ml)을 1시간동안 처리하여 면역반응을 유도하였다. 반응 후 cells는 cold PBS로 2회 세척한 다음, 0 $^{\circ}$ C에서 low salt buffer를 첨가하여 부드럽게 pipetting하고 15분동안 ice위에 방치한 후 10% Igepal CA-630을 첨가하여 강하게 vortexing 하였다. 그 후 4 $^{\circ}$ C, 3,000rpm에서 10분동안 원심분리하여 새 e-tube에 상층액을 옮긴 후 다시 4 $^{\circ}$ C, 13,000 rpm에서 30분동안 원심분리하여 cytosol 분획을 분리하였다. protein content는 Bradford법으로 정량하였으며, 30~50 $\mu$ g의 단백질을 10% SDS-PAGE 로 분리하고, Hybond-PVDF membrane(Amersham Pharmacia Biotech)으로 transfer하였다. Transfer된 membrane은 Tris-buffered saline Tween-20(TBST)(20mM Tris, pH 7.6, 136mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 용해된 5% skim milk에 1시간동안 실온에서 blocking한 후 anti-p-ERK와 anti-ERK, anti-p-JNK와 anti-JNK, anti-p-p38, anti-p38, anti-NF $\kappa$ B, anti-p-I $\kappa$ B $\alpha$ , anti-I $\kappa$ B $\alpha$ 와  $\beta$ -actin primary antibody(1 : 1000 dilution)로 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 반응한 후 TBST로 3회 세척하고, HRP-conjugated secondary antibody(1 : 1000 dilution)로 1시간동안 실온에서 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후 ECL system (Amersham)을 이용하여 발색시켰다.

### 10) 통계처리

成績은 SPSS 17.0K for Windows 통계 프로그램 패키지를 사용하여 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었고 유

의수준은  $P < 0.05$ 로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 one way-ANOVA와 Dunnett test 검정을 실시하였다.

### 3. 결 과

#### 1) 세포생존 및 $\beta$ -hexosaminidase 분비에 미치는 영향

RBL-2H3 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 알아본 결과 FE를 처리하지 않은 세포는  $0.89 \pm 0.05$ 의 흡광도를 나타내었고, FE를 농도별(10, 20, 30, 40 및  $50 \text{ mg/ml}$ )로 처리한 세포에서 각각  $0.93 \pm 0.04$ ,  $0.91 \pm 0.09$ ,  $0.94 \pm 0.06$ ,  $0.97 \pm 0.05$ , 및  $1.04 \pm 0.06$ 의 흡광도를 나타내어 모든 농도에서 세포생존에 영향을 미치지 않았고  $50 \text{ mg/ml}$ 의 농도에서 유의한 세포증식이 관찰되었다(Fig. 1A). 항원-항체 결합단계에서  $\beta$ -hexosaminidase 분비에 미치는 FE의 효과를 살펴본 결과 FE  $20 \text{ mg/ml}$  농도에서  $47.39 \pm 10.50\%$ 의 억제효과를 나타내었고, FE  $40 \text{ mg/ml}$  농도에서  $46.36 \pm 6.06\%$ 의 억제효과를 나타내 모든 농도에서 유

의성있는 억제효과를 나타내었다(Fig. 1B).

#### 2) IL-4와 TNF- $\alpha$ cytokine 생산에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 분비된 IL-4의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서  $1.27 \pm 0.14 \text{ pg/ml}$ 이었으며, 항원으로 자극한 세포에서  $10.05 \pm 0.82 \text{ pg/ml}$ 로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한( $p < 0.05$ ) 증가를 나타내었다. 반면 FE를 농도별( $20$  and  $40 \text{ mg/ml}$ )로 처리한 세포에서 각각  $8.20 \pm 0.42 \text{ pg/ml}$ 과  $6.04 \pm 0.22 \text{ pg/ml}$ 로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한( $p < 0.05$ ) 감소를 보였다. 또한 RBL-2H3 cells에서 분비된 TNF- $\alpha$ 의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서  $15.50 \pm 0.68 \text{ pg/ml}$ 이었으며, 항원으로 자극한 세포에서  $34.84 \pm 1.11 \text{ pg/ml}$ 로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한( $p < 0.05$ ) 증가를 나타내었다. 반면 FE를 농도별( $20$  and  $40 \text{ mg/ml}$ )로 처리한 세포에서 각각  $31.25 \pm 0.92 \text{ pg/ml}$ 과  $27.43 \pm 1.25 \text{ pg/ml}$ 로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한( $p < 0.05$ ) 감소를 보였다(Fig. 2).

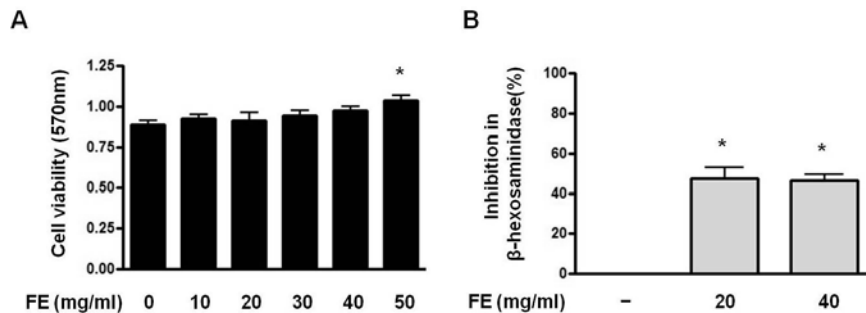


Fig. 1. Effects of FE on the cell viability (A) and  $\beta$ -Hexosaminidase release (B) of RBL-2H3 cells

(A) The cells ( $5 \times 10^4$  cells/ml) were treated with the indicated concentrations (0, 10, 20, 30, 40, and  $50 \text{ mg/ml}$ ) of FE for 1 hr. Cell viability was evaluated using a colorimetric assay based on MTT assay. Results represent as the mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs untreated group. The absorbance was measured at 570nm using ELISA reader.

(B) The cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were sensitized with IgE ( $30 \text{ ng/ml}$ ) overnight and treated with FE ( $20$  and  $40 \text{ mg/ml}$ ) for 1 hr prior to their DNP-HSA stimulation. The absorbance was measured with a microplate reader at 405 nm. Results represent as the mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs stimulated group.

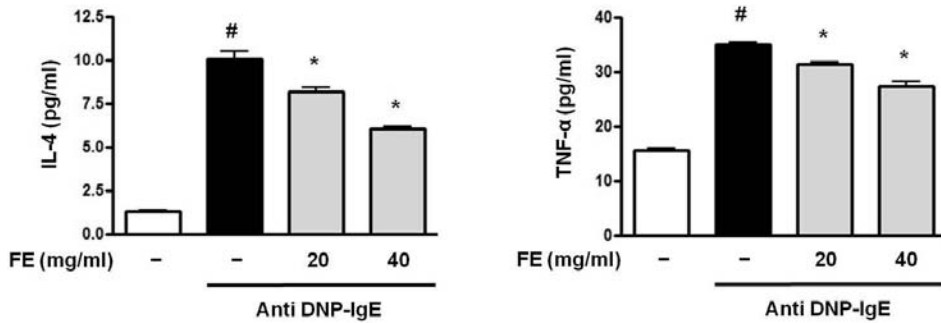


Fig. 2. Effects of FE on the production of IL-4 and TNF- $\alpha$  cytokine in RBL-2H3 cells

The cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were sensitized with anti-DNP IgE (30 ng/ml) for 24 h and stimulated by DNP-HSA (10  $\mu$ g/ml). FE (20 and 40 mg/ml) was pretreated for 1 h prior to DNP-HSA stimulation for 4 h. IL-4 and TNF- $\alpha$  concentration was measured from cell supernatant using ELISA method. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader. Results represent as the mean  $\pm$  SD. #  $p < 0.05$  vs vehicle group, \*  $p < 0.05$  vs stimulated group.

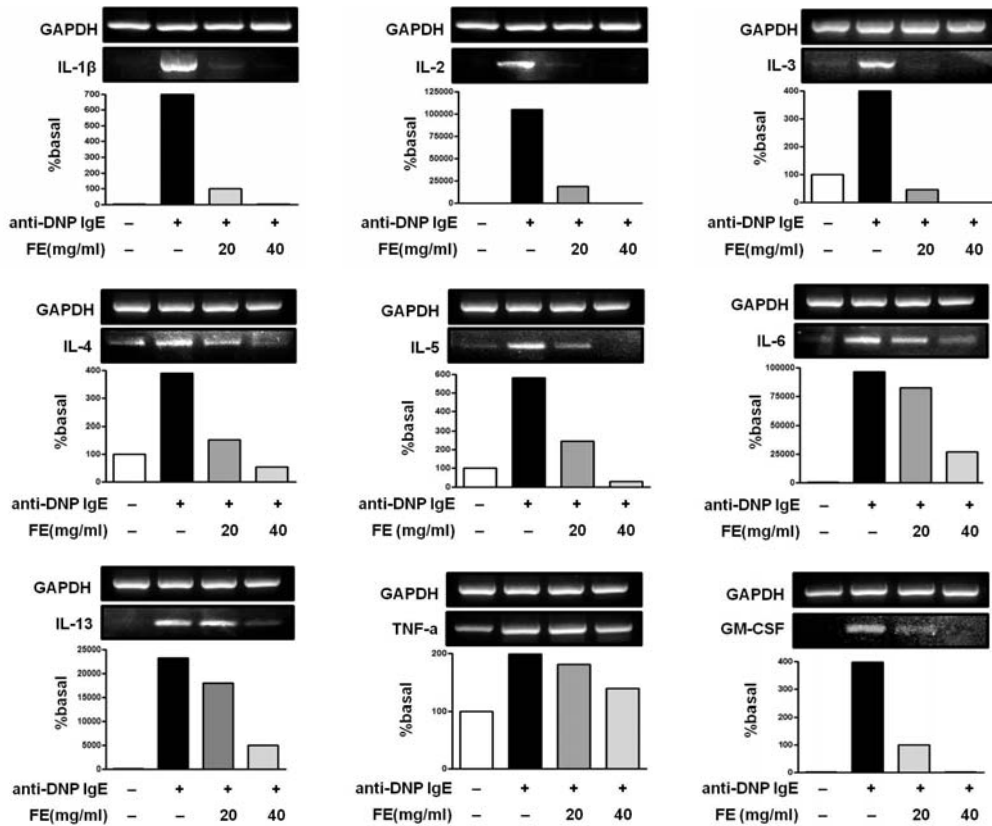


Fig. 3. Effects of FE on the expression of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$  and GM-CSF mRNA in the anti-DNP IgE-sensitized RBL-2H3

Detection of cytokines secretion was examined by RT-PCR analysis. GAPDH was used as internal control genes.

### 3) Cytokine 유전자 발현에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 염증성 cytokine의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$  과 GM-CSF mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, FE(20 and 40mg/ml)를 처리한 세포에서 mRNA의 발현이 농도의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

### 4) Fc $\epsilon$ RI 활성화에 의해 유도된 ROS 생산에 대한 영향

RBL-2H3 cells에서의 항원자극에 의해 유도된 ROS의 양을 60분 동안 조사한 결과, 항원으로 자극한 후 FE를 전처리하지 않은 세포에서 ROS 증가율은 시간에 비례하여 증가하는데 비해, FE(20 and 40mg/ml)을 처리한 세포에서 ROS 증가율은 농도에 비례하여 상대적으로 낮은 농도를 유지하며 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

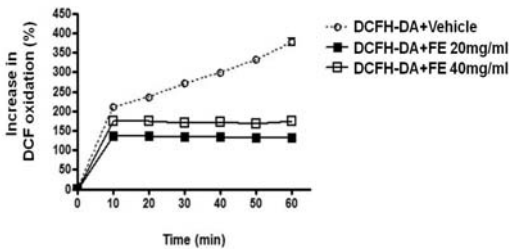


Fig. 4. Effects of FE on Fc $\epsilon$  RI-triggered ROS production in RBL-2H3 cells

IgE-sensitized RBL-2H3 cells were pre-incubated with 20 and 40mg/ml of FE and 10 $\mu$ M of DCFH-DA for 30 min, washed twice with PBS, and resuspended in Siraganian buffer. DCFH-DA-loaded cells were stimulated with Ag for 10 min, and ROS-mediated DCF oxidation was measured with excitation at 490 nm and emission at 530 nm with a fluorometer. The data are expressed as the percent increase in DCF oxidation above the unstimulated controls. \* p<0.05 vs anti DNP-IgE+DNP-HSA

### 5) 세포내 ERK1/2, JNK1/2 및 p38의 발현에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서의 ERK1/2, JNK1/2와 p38의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 p-ERK1/2, p-JNK1/2와 p38의 발현이 증가하였으며, FE(20 and 40mg/ml)를 처리한 세포에서 p-ERK1/2, p-JNK1/2와 p38의 발현이 억제하는 것으로 보아 FE가 ERK1/2, JNK1/2와 p38의 인산화를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

### 6) 세포내 NF $\kappa$ B 및 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서의 핵내로 전이된 NF $\kappa$ B의 발현에 대해 조사한 결과 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 NF $\kappa$ B의 발현이 증가하였으며, FE(20 and 40mg/ml)를 처리한 세포에서 NF $\kappa$ B의 발현이 억제하였다(Fig. 6A). 세포질 내 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 항원으로 자극한 세포에서 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현이 증가하였으며, I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현은 감소하였다. FE(20 and 40mg/ml)를 처리한 세포에서 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현이 억제되고 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현이 증가하였다(Fig. 6B).

## 4. 고찰

알러지 증상은 인체내 비정상적인 비만세포의 탈과립과 사이토카인의 불균형에 의해 야기된다. 본 연구는 FE가 알러지의 발생기작에서 중요한 역할을 담당하는 비만세포의 탈과립과 후기 염증반응을 유발하는 cytokine 및 ROS의 생산에 대한 억제효과를 조사하고 MAPK와 NF- $\kappa$ B 신호전달기전에 대해 연구하였다.



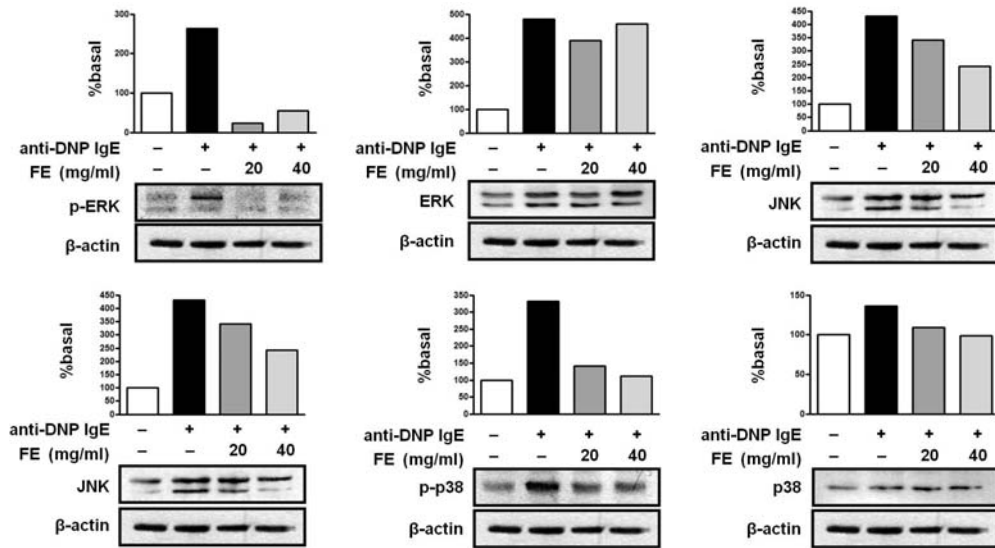


Fig. 5. Effects of FE on the ERK1/2, JNK1/2 and p38 activation in Fc $\epsilon$  RI-mediated signal transduction of RBL-2H3

The cells were pretreated with FE(20 and 40mg/ml) for 1 hr prior to Ag exposure for 15 min. The phosphorylation of ERK1/2, JNK1/2 and p38 and ERK1/2, JNK1/2, p38 and  $\beta$ -actin were assayed by western blot analysis as described in Materials and Methods.

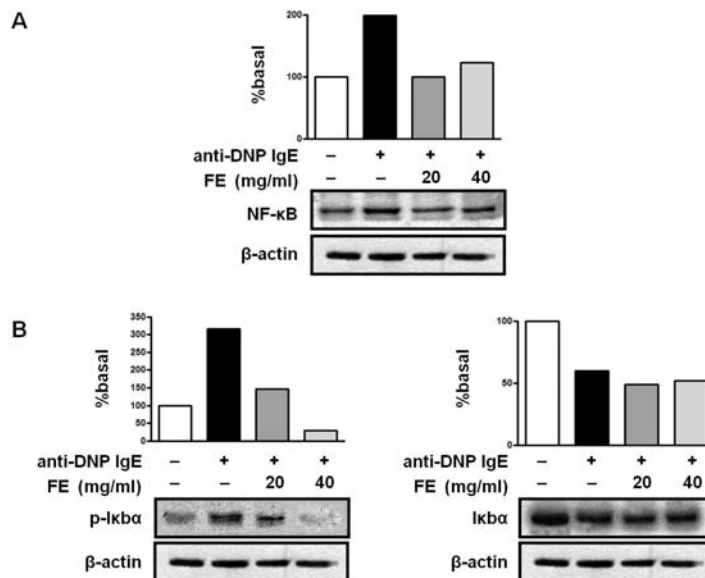


Fig. 6. Effects of FE on the NF $\kappa$ B(A) and I $\kappa$ B $\alpha$  (B) activation in Fc $\epsilon$  RI-mediated signal transduction of RBL-2H3

The cells were pretreated with FE(20 and 40mg/ml) for 1 hr prior to Ag exposure for 24 hr(A) and 15 min(B). The expression of nuclear NF $\kappa$ B and  $\beta$ -actin and phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  were assayed by western blot analysis as described in Materials and Methods.

$\beta$ -hexosaminidase는 비만세포의 과립내에 저장되어 있으며 비만세포가 면역적 활성을 일으킬 때 탈과립되어 분비된다<sup>14</sup>). 그러므로  $\beta$ -hexosaminidase의 측정은 비만세포의 활성과 탈과립을 억제하는 효능을 조사하는데 널리 활용되는 방법이다<sup>15</sup>). 본 연구에서 FE은 비만세포 생존률에 영향을 미치지 않는 농도에서 처리되었고, 항원으로 유도된 비만세포의 탈과립을 현저히 억제하였다.

비만세포는 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF 같은 전구염증 사이토카인과 IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6,와 IL-13 같은 Th2 사이토카인을 합성하여 분비한다<sup>16</sup>). 이러한 사이토카인은 염증세포의 조직 침투와 후기 알러지 반응의 유도에 중요한 역할을 한다<sup>17</sup>). 특히, IL-4는 IgE 생산에 필수적이며<sup>18</sup>), naive T cell을 알러지형 Th2 cell로 전환시키는데 관여한다<sup>19</sup>). IL-13은 염증, 섬유형성, 점액생성과 같은 알러지 천식의 발병에 많은 영향을 미친다<sup>20</sup>). TNF- $\alpha$ 는 주로 비만세포, 대식세포, 호염기구, 호중구, 호산구와 상피세포 등 알러지성 폐의 염증에 반응하여 활성화된 여러 세포에 의해 생산되며, 비만세포와 호염기구에서 항원항체반응의 결과로 합성, 분비되는 강력한 염증매개물질이다<sup>21</sup>). 본 연구에서 FE는 IL-4과 TNF- $\alpha$ 의 생산을 유효하게 억제하였고, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ 와 GM-CSF 같은 다양한 비만세포 유래 사이토카인의 유전자 발현을 억제하였다.

ROS는 대식세포, 호중구와 비만세포에 의해 생성되며, 비만세포 활성화시 비만세포의 탈과립을 촉진시키고 알러지 염증반응을 매개한다<sup>22,23</sup>). 본 연구에서 FE는 세포내 ROS의 생산을 억제하는 결과를 나타내었고 이는 FE의 항산화 효능<sup>24</sup>)에 대한 보고와 일치하는 결과로서 ROS 억제를 통한 탈과립과 사이토카인 생산을 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

MAPK(ERK, JNK 및 p38)은 사이토카인의 발현을 매개한다고 알려져 있으며, p38 MAPK가 RBL-2H3세포에서 IL-4의 발현을 부분적으로 조절한다고 보고되었다<sup>25,26</sup>). NF- $\kappa$ B는 많은 다양한 세포에

서 염증성 유전자의 발현을 조절하는 중요한 전사인자이다<sup>27</sup>). 활성화된 비만세포에서 발현되는 많은 전구염증 사이토카인도 NF- $\kappa$ B에 의해 조절된다<sup>14,28,29</sup>).

일반적으로 NF- $\kappa$ B의 활성은 I $\kappa$ B에 의해 조절되는데, NF- $\kappa$ B가 세포질 내에서 I $\kappa$ B와 복합체를 형성하여 불활성 상태로 존재하다가 세포의 자극에 의해 I $\kappa$ B가 인산화되어 불활성화되면 NF- $\kappa$ B가 핵내로 전이하여 핵내로 전이하여 활성화되고 사이토카인 유전자 생산을 조절한다<sup>30</sup>).

본 연구에서 FE는 MAPK(ERK, JNK 및 p38)의 활성을 억제하고, I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화를 억제하여 NF- $\kappa$ B의 핵내 전이를 감소시켰다.

이를 종합해 볼 때 FE는 비만세포 탈과립과 cytokine의 생산이 유전자의 발현 억제하는데 이는 세포내 ROS의 생성을 억제하고, MAPK 신호전달경로와 NF- $\kappa$ B의 핵내 전이를 저해함으로써 비만세포의 활성을 억제하는 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 논문은 동의대학교 교내연구비를 지원받아 수행되었음 (2011AA121)

## 참고문헌

1. Beasley R, Ellwood P, Asher I. International patterns of the prevalence of pediatric asthma. The ISAAC program. *Pediatr. Clin. North Am.* 2003;50:539-53.
2. Jaakkola JJK, Parise H, Kisilitsin V, Lebedeva NI, Spengler JD. Asthma, Wheezing, and Allergies in Russian Schoolchildren in Relation to New Surface Materials in the Home. *Am J Public Health*, 2004;94(4):560-2.
3. Amin K. The role of mast cells in allergic

- inflammation, *Respiratory Medicine*, 2012;106(1):9-14.
4. Brooks AC, Whelan CJ, Purcell WM. Reactive oxygen species generation and histamine release by activated mast cells: modulation by nitric oxide synthase inhibition. *Br J Pharmacol*, 1999;128(3):585-90.
  5. Matsui T, Suzuki Y, Yamashita K, Yoshimaru T, Suzuki-Karasaki M, Hayakawa S, et al. Diphenyleneiodonium Prevents Reactive Oxygen Species Generation, Tyrosine Phosphorylation, and Histamine Release in RBL-2H3 Mast Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000; 276(2):742-8.
  6. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nature Reviews Immunology*, 2006;6(3):218-30.
  7. Klemm S, Ruland J. Inflammatory signal transduction from the Fc $\epsilon$ RI to NF- $\kappa$ B. *Immunobiology*, 2006 12;211(10):815-20.
  8. Hofmann AM, Abraham SN. New Roles for Mast Cells in Modulating Allergic Reactions and Immunity Against Pathogens. *Curr Opin Immunol*, 2009 12;21(6):679-86.
  9. Li SQ, Zhang QH. Advances in the development of functional foods from buckwheat. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2001;41(6):451-64.
  10. Heo J. Dongeuibogam, 1st ed, Seoul: Beobin munhwasa, 2007;1808,1718-9.
  11. Jugyakdaesajeon pyeonchanwiwonhoe. Jugyakdaesajeon. Seoul:Jeongdam, 2006;392-3.
  12. Matsuda H, Tewtrakul S, Morikawa T, Nakamura A, Yoshikawa M. Anti-allergic principles from Thai zedoary: structural requirements of curcuminoids for inhibition of degranulation and effect on the release of TNF- $\alpha$  and IL-4 in RBL-2H3 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004;12(22):5891-8.
  13. Nakano N, Nakao A, Uchida T, Shirasaka N, Yoshizumi H, Okumura K, et al. Effects of arachidonic acid analogs on FcepsilonRI-mediated activation of mast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005;1738(1-3):19-28.
  14. Marquardt DL, Walker LL. Dependence of mast cell IgE-mediated cytokine production on nuclear factor- $\kappa$ B activity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000;105(3):500-5.
  15. Granberg M, Fowler C, Jacobsson S. Effects of the cannabimimetic fatty acid derivatives 2-arachidonoylglycerol, anandamide, palmitoylethanolamide and methanandamide upon IgE-dependent antigen-induced  $\beta$ -hexosaminidase, serotonin and TNFa release from rat RBL-2H3 basophilic leukaemia cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2001;364(1):66-73.
  16. Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nature Reviews Immunology*, 2007;7(2):93-104.
  17. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev*, 1997;77(4):1033-79.
  18. Kühn R, Rajewsky K, Müller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science*, 1991;254(5032):707-10.
  19. Hines C. The diverse effects of mast cell mediators. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 2002;22(2):149-60.
  20. Grünig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, et al.

- Requirement for IL-13 Independently of IL-4 in Experimental Asthma. *Science*, 1998; 282(5397):2261-3.
21. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- $\alpha$ /cachectin. Published online: 19 July 1990; | doi:10.1038/346274a. 1990;346(6281):274-6.
22. Suzuki Y, Yoshimaru T, Matsui T, Inoue T, Niide O, Nunomura S, et al. Fc $\epsilon$ RI Signaling of Mast Cells Activates Intracellular Production of Hydrogen Peroxide: Role in the Regulation of Calcium Signals. *J Immunol*, 2003;171(11):6119-27.
23. Swindle EJ, Metcalfe DD, Coleman JW. Rodent and Human Mast Cells Produce Functionally Significant Intracellular Reactive Oxygen Species but Not Nitric Oxide. *J. Biol. Chem*, 2004;279(47):48751-9.
24. Hur SJ, Park SJ, Jeong CH. Effect of buckwheat extract on the antioxidant activity of lipid in mouse brain and its structural change during in vitro human digestion. *J. Agric. Food Chem*, 2011;59(19):10699-704.
25. Zhang C, Baumgartner RA, Yamada K, Beaven MA. Mitogen-activated Protein(MAP) Kinase Regulates Production of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Release of Arachidonic Acid in Mast Cells Indication of Communication between p38 and p42 Map Kinases. *J. Biol. Chem*.
26. Hirasawa N, Sato Y, Fujita Y, Ohuchi K. Involvement of a phosphatidylinositol 3-kinase-p38 mitogen activated protein kinase pathway in antigen-induced IL-4 production in mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA) - Bioenergetics*, 2000;1456(1):45-55.
27. Li Q, Verma IM. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2002;2(10):725-34.
28. Azzolina A, Bongiovanni A, Lampiasi N. Substance P induces TNF- $\alpha$  and IL-6 production through NF $\kappa$ B in peritoneal mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA) - Molecular Cell Research*, 2003;1643(1-3):75-83.
29. Karin M. NF- $\kappa$ B and cancer: Mechanisms and targets. *Molecular Carcinogenesis*, 2006; 45(6):355-61.
30. Karin M, Greten FR. NF- $\kappa$ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*, 2005;5(10):749-59.