

RBL-2H3 세포에서 Hesperidin의 Th2 사이토카인 발현 억제 효과

정화현 · 김순례 · 표명운*

숙명여자대학교 약학대학

Suppressive Effects of Hesperidin on Th2-associated Cytokines Expression in RBL-2H3 Cells

Hwa-hyun Jeong, Soon-rye Kim, and Myoung-yun Pyo*

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

Abstract – Hesperidin (HES), a flavonone glycoside isolated from the citrus fruits such as lemons and oranges, has been reported to have many biological properties including antiinflammatory, antioxidant, and antiallergy activities. In this study, we focused on the action of HES modulating Th2-associated cytokines such as IL-4 and IL-13 expression in PMA/ionomycin (PI)-stimulated rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. The production of IL-4 and IL-13 was quantified by ELISA and the mRNA expression was detected by using RT-PCR assay. In addition, western blot analysis was performed to determine the transcription factors involved in the cytokine expression. We found that HES significantly decreased PI-induced IL-4 and IL-13 productions and also decreased the level of mRNA in a dose-dependent manner. Furthermore, western blot analysis of the transcription factors implied that HES down-regulated the protein level of c-Jun and c-Fos, which are the activating protein 1 (AP-1) family and nuclear factor-kappaB (NF- κ B) characterized as a transcription factors related to the Th2-associated cytokine expression. Taken together, our data showed that the action of HES responsible for antiallergy activities is based on suppression of Th2-associated cytokines through inhibition of AP-1 and NF- κ B transcription factors.

Key words – Hesperidin, Antiallergy, RBL-2H3, IL-4, IL-13

천식, 아토피 질환, 알레르기성 비염 등을 포함하는 알레르기 반응은 가장 흔한 면역계통의 질환으로, 국내의 경우 인구의 10%, 약 600만 명이 알레르기환자로 추정되고, 소아알레르기학회 통계에 따르면 초등학교 1~5학년 어린이의 25~30%가 알레르기 관련 질환을 앓고 있는 것으로 추정된다.¹⁾ 알레르기 반응이 일어나는 과정은 다음과 같다. 우선 체내에 알레르기를 일으키는 알레르겐이 침입함에 따라 이에 대한 반응으로 IgE 항체가 생산되어 순환계로 이동해 비만세포의 표면에 존재하는 Fc 수용체와 결합한다. 그리고 비만세포의 표면을 둘러싼 IgE 항체에 침입한 알레르겐이 결합하면서 비만세포를 활성화하여, 세포의 과립 내에 저장되어 있던 히스타민, 류코트리엔류 대사물질 및 염증반응을 일으키는 사이토카인을 분비한다.²⁾ 알레르기 반응에 관여하는 세포는 주로 비만세포와 호염구로, 호염구는 비만세포와 같이 표면에 Fc 수용체를 갖고 있어 알레르기 반응을 일으

킨다. 특히 RBL-2H3 세포는 세포 표면의 IgE 수용체의 발현과 면역반응을 유발하는 사이토카인의 발현, 히스타민의 분비 등 비만세포와 유사한 특징들을 나타낸다. 따라서 RBL-2H3 세포는 비만세포와 함께 Type-2 helper T cell(Th2)의 면역반응에 관여하는 약물 효과를 연구하는데 좋은 실험모델로 알려져 있다.^{3,4)}

알레르기 반응 초기에 활성화된 Th2가 분비하는 두 종류의 사이토카인, 인터루킨-4(Interleukin-4, IL-4)와 IL-13이 B림프구를 자극하여 IgE를 생산하는 형질세포로 전환시킨다. IL-4는 B세포의 성장인자로서, 면역글로불린의 Ig 중쇄를 IgE 동형으로 전환하도록 자극하는 역할을 한다. 반면 IL-13은 기관지 상피세포나 기관지 평활근세포를 자극하여 이오타신(eotaxin)의 분비를 증가시키고, 호산구 화학주성을 유발하는 강력한 인자로 알려져 있다.⁵⁾ IL-13은 IL-4와 수용체를 공유하여 IL-4와 유사 작용을 나타낸다고 알려져 왔으나, 최근 IL-13이 IL-4와 별개로도 면역반응을 일으킬 수 있음이 발견되었다.⁶⁻⁸⁾ 현재까지 여러 연구에 의해 Th2 세

*교신저자(E-mail): mypyo@sookmyung.ac.kr
(Tel): +82-2-710-9573

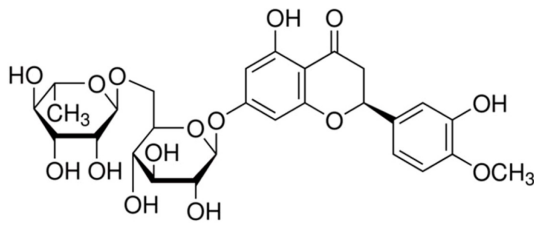


Fig. 1. The structure of hesperidin.

포에서 생성되는 IL-4와 IL-13이 직접, 간접적으로 알레르기 반응에 밀접한 관계가 있다고 보고되어 있다. IL-4가 결핍된 마우스에서 천식 발병이 억제되었으며, 마우스의 기도 IL-4 수용체 길항제를 지속적으로 주입하였을 때, IL-4로 유도된 기도과민반응과 기도 호산구 증가증이 감소했다는 보고가 있다.^{9,10)} 또한 아토피와 아토피 천식 환자에서 과도한 IL-13의 생산되었고, IL-13 프로모터와 코딩 영역의 다형성이 천식과 밀접하게 관련되어있다고 보고되어 있다.¹¹⁾

Hesperidin(HES, Fig. 1)은 감귤류의 과피인 진피에 존재하는 flavonone glycoside로, 지금까지 항산화 작용,¹²⁾ 항염증 작용,¹³⁾ 항암작용,^{14,15)} 관절염 완화 작용¹⁶⁾ 등 다양한 생리활성이 확인되었다. 최근에는 쥐의 당뇨 모델에 HES를 투여했을 때 당뇨망막변증의 유발을 줄일 수 있으며, HES가 항암제인 cisplatin으로 유도된 신장 손상을 보호할 수 있다는 연구가 보고되었다.^{17,18)}

HES의 항알레르기 작용에 대한 기존의 연구들에서, HES가 OVA로 감작된 생쥐의 증가한 호산구 수치와 기도과민 반응을 정상수준 이하로 감소시켰으며, 혈중 IgE의 농도와 Th2 관련 사이토카인의 양을 유의적으로 감소시켰다는 보고가 있다.^{19,20)} 또한 생쥐에 HES를 경구투여했을 때 전신성 과민반응이 억제되고 귀 부종을 억제해 항알레르기의 효과를 가진다는 보고가 있다.^{21,22)} 그러나 면역반응에 관여하는 주요한 세포인 호염구에서 HES가 Th2 관련 사이토카인의 발현에 미치는 영향과 기전은 아직 보고되지 않은 상태이다.

본 연구자는 PMA/ionomycin으로 자극된 RBL-2H3 세포를 이용하여 HES에 의한 IL-4와 IL-13의 생성과 유전자 발현의 변화 및 Th2 관련 사이토카인의 발현에 관여하는 전사인자의 활성 정도를 살펴 HES의 Th2관련 사이토카인 발현억제 작용을 세포 분자적 수준에서 이해함으로써, 알레르기 질환 예방을 위한 기능성 소재로서 HES의 개발 가능성을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약 - Hesperidin은 Sigma사에서 구입하였으며, EMEM 배지와 FBS는 Lonza사, PMA, ionomycin, cyclosporine A(CsA) 및 기타시약은 Sigma사에서 구입하였

다. MTT시약은 Amresco사에서 구입하였고, ELISA 실험에 사용된 Rat IL-4와 Rat IL-13 ELISA kit는 각각 BD사와 Invitrogen사에서 구입하였으며, PCR분리 실험에 사용된 Trizol은 Ambion사, polymerase는 Intron사, western blot 실험에 사용된 핵분리 kit는 Active Motif사, c-Jun, c-Fos, 및 NF-κB 단백질은 Santacruz사에서 각각 구입하였다.

세포 배양 - RBL-2H3 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC)사에서 구입하였으며, Antibiotic-Antimycotic을 함유한 15% FBS-EMEM을 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

세포생존율 측정 - HES가 세포생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RBL-2H3 세포(7×10⁵ cells/ml)를 96 well plate에 100 μl/well로 분주하여 16시간 부착시킨 후 0, 1.57, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM의 HES를 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양하였다. 이 후 50 μl의 MTT 시약 (3 mg/ml)을 넣고 37°C에서 4시간 동안 배양하여 crystal violet을 형성하게 하였고, 배양이 끝난 후 배지를 제거하고 50 μl의 DMSO로 formazan을 용해시킨 뒤 ELISA microplate reader를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

사이토카인 생성 저해능 측정 - HES의 사이토카인 생성 저해능을 알아보기 위하여 ELISA를 수행하였다. RBL-2H3 세포(3×10⁵ cells/ml)를 48 well plate에 250 μl/well로 분주하여 4시간 부착시킨 후 0.5 μM의 cyclosporin A(CsA) 또는 25, 50, 100 μM의 HES를 처리하고, 1시간 뒤 PMA(50 ng/ml)와 ionomycin(0.5 μM)을 가하여 37°C, 5% CO₂에서 16시간 배양하였다. 이 후 상등액만 취해 상등액 중의 사이토카인(IL-4, IL-13)을 ELISA kit를 이용하여 그 농도를 측정하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR 분석 - RBL-2H3 세포(3×10⁵ cells/ml)를 6 well plate에 2 ml/well로 분주하여 16시간 부착시킨 후 0.5 μM의 CsA 또는 25, 50, 100 μM의 HES를 처리하고, 1시간 뒤 PMA(50 ng/ml)와 ionomycin(0.5 μM)을 가하여 37°C, 5% CO₂에서 6시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 500 μl의 TRIZOL 시약을 가하여 세포를 얻은 다음 200 μl의 CHCl₃ 를 가한 뒤 원심분리하여 수층 200 μl를 취하였고, 동량의 iso-propanol 을 가한 후 원심분리하여 미색

Table I. The primers used for RT-PCR

Gene		5' to 3' direction	Size
IL-4	F	ATGGGTCTCAACCCCCAGC	346
	R	GCTCTTTACGCTTTCCAGGAAGTC	
IL-13	F	GGAGCTGAGCAACATCACACA	213
	R	GGTCCTGTAGATGGTGGCATTGCA	
β-actin	F	ACCGTGAAAAGATGACCCAG	200
	R	TGTCAGCTGTGGTGGTGAAG	

F; forward, R; reverse

침전의 RNA를 얻었다. RNA는 Maxime RT PreMix kit에 용해시킨 후 45°C에서 1시간, 95°C에서 5분 간 반응시켜 cDNA로 전환하였다. cDNA는 primer(Table I), polymerase와 반응시켜 PCR thermal cycler에서 DNA를 증폭시켰다 (β -actin, IL-4 : 95°C-30초, 57°C-45초, 72°C-30초 32cycles, IL-13 : 95°C-30초, 52°C-40초, 72°C-30초 40cycles). 증폭된 DNA를 1% agarose gel(0.01% ethidium bromide 포함)에 전개시켜 DNA image로 특정 band를 확인함으로써 mRNA 발현정도를 측정하였다.

핵 단백질 분리 및 Western Blot 분석 - RBL-2H3 세포 (4×10^5 cells/ml)를 60 mm dish에 4 ml/well로 분주하여 16시간 부착시킨 후 0.5 μ M의 CsA와 100 μ M의 HES를 처리하고 1시간 뒤 PMA(50 ng/ml)와 ionomycin(0.5 μ M)을 가하여 37°C, 5% CO₂에서 3시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 500 μ l의 차가운 PBS용액으로 세포를 세척 한 후, 핵 분리 kit를 이용해 핵 단백질을 분리하였다. Hypotonic 용액을 넣고 현탁한 후 원심분리하여 상등액을 제거하고, protease inhibitor cocktail이 포함된 lysis 용액을 가해 30분 동안 혼합하여 4°C에서 10분간 24,000 g로 원심분리한 상등액을 얻었다. 핵 단백질은 BCA 단백질 정량법으로 정량하여 10% SDS page gel에 110V에서 1시간 30분 동안 전기영동한 뒤, PVDF membrane에 transfer 하였다. Transfer된 membrane은 2% 탈지분유를 함유한 PBS/T 용액에 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 1,000배 희석된 일차항체와 2,000배 희석된 이차항체를 적당한 시간 동안 처리하고, ECL 시약을 사용하여 핵 단백질의 활성을 확인하였다.

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

결 과

HES가 RBL-2H3 세포의 생존율에 미치는 영향 - HES를 다양한 농도로 RBL-2H3 세포에 24시간 처리하고 MTT assay를 실시해 세포 생존율을 살펴보았다. 정상 세포군을 대조군으로 하여 생존율을 100%로 나타냈을 때, HES 1.56~100 μ M 농도 사이에서 HES는 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않았다(Table II).

HES가 PI로 유도된 RBL-2H3 세포의 IL-4와 IL-13 생성에 미치는 영향 - HES가 RBL-2H3 세포에서 PI의 유도에 의한 IL-4와 IL-13 생성에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여, RBL-2H3 세포에 CsA, HES를 1시간 동안 전처리한 다음, PI를 처리하여 16시간 반응시킨 후 상등액에 분비된 IL-4와 IL-13을 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과, 정상 세포군에 비해 PI 처리군의 IL-4와 IL-13 생성량이 각

Table II. Effects of HES on cell viability of RBL-2H3 cells

Concentration (μ M)	Cell viability (%)
0	100 \pm 1.0
1.56	102.2 \pm 2.7
3.13	100.8 \pm 1.0
6.25	109.1 \pm 3.7*
12.5	103.8 \pm 2.3*
25	102.9 \pm 3.0
50	103.2 \pm 2.3*
100	96.4 \pm 0.9***

RBL-2H3 cells were treated with various concentration of hesperidin for 24 h, and then cell viability was measured by MTT assay. Relative cell viability was calculated by comparing with the hesperidin non-treated group. Values are expressed as mean \pm SD from three-independent experiments. (*: *p*<0.05, ***: *p*<0.001)

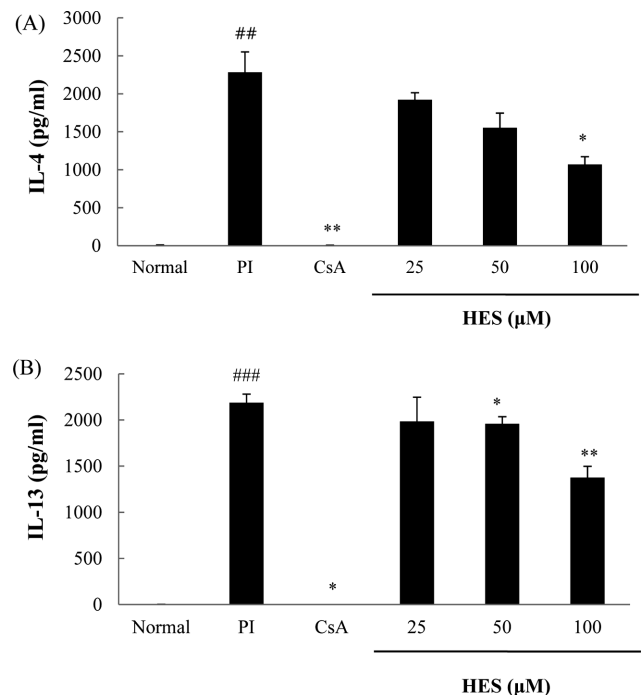


Fig. 2. Suppressive effects of HES on (A) IL-4 and (B) IL-13 cytokine production in RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were pre-treated with various concentrations of HES or 0.5 μ M of CsA for 1 h, and then stimulated with PI for 16 h. The levels of IL-4 and IL-13 in RBL-2H3 cells were determined by ELISA. Values are expressed as mean \pm SD from three-independent experiments. (##: *p*<0.01, ###: *p*<0.001 vs. normal group. *: *p*<0.05, **: *p*<0.01 vs. PI-treated group)

각 2,284.3 pg/ml와 2,188.4 pg/ml 로 크게 증가하였고, CsA 처리군에서 IL-4와 IL-13 생성량은 각각 6.1 pg/ml와 0.7 pg/ml로 PI에 의해 증가한 IL-4와 IL-13의 생성이 억제되었다. HES 처리군에서 IL-4와 IL-13 생성은 농도의존적으로 억제

되었으며 PI에 의해 증가한 IL-4, IL-13의 수치와 비교했을 때, HES 100 μM 처리군에서 IL-4와 IL-13의 생성은 1,069.1 pg/mL와 1,376.4 pg/ml로 각각 약 53%와 37% 억제되었다 (Fig. 2).

HES가 PI로 유도된 RBL-2H3 세포의 IL-4와 IL-13 유전자 발현에 미치는 영향 - HES가 RBL-2H3 세포에서 PI의 유도에 의한 IL-4와 IL-13 유전자 발현에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여, RBL-2H3 세포에 CsA, HES를 1시간 동안 전처리 한 다음, PI를 처리하여 6시간 반응시킨 후 세포를 얻어 RNA를 분리하고 cDNA를 제조하여 RT-PCR 방법으로 mRNA 발현 정도를 측정하였다. 그 결과, 정상 세포군에 비해 PI 처리군에서 IL-4와 IL-13의 mRNA 발현량이 크게 증가하였고, CsA가 PI에 의해 증가한 IL-4와 IL-13의 발현을 억제하였다. HES 처리군에서 IL-4와 IL-13 발현은 농도의존적으로 억제되었으며 PI에 의해 증가한 IL-4, IL-13의 수치와 비교했을 때, HES 100 μM 처리군에서 IL-4와 IL-13의 발현은 각각 약 25%와 40% 억제되었다(Fig. 3).

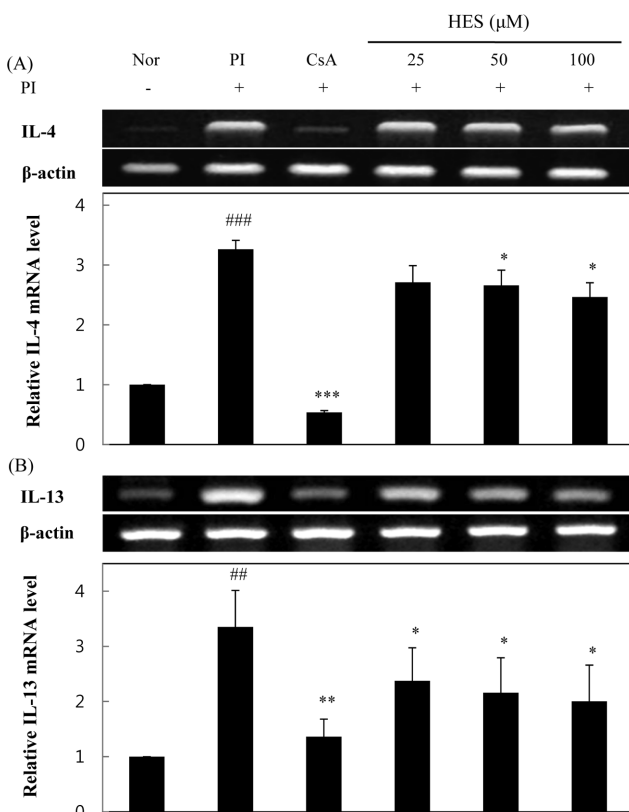


Fig. 3. Inhibitory effects of HES on (A) IL-4 and (B) IL-13 mRNA expression in RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were pre-treated with various concentrations of HES or 0.5 μM of CsA for 1 h, and then stimulated with PI for 6 h. Cellular RNA from each treatment was extracted and the mRNA expression for cytokine in RBL-2H3 cells was analyzed by RT-PCR. (###: p<0.01, ####: p<0.001 vs. normal group, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 vs. control group)

HES가 PI로 유도된 RBL-2H3 세포의 AP-1 발현에 미치는 영향 - HES가 RBL-2H3 세포에서 PI의 유도에 의한 AP-1의 발현에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여, RBL-2H3 세포에 CsA, HES를 1시간 동안 전처리 한 다음, PI를 처리하여 3시간 반응시킨 후 세포를 얻어 핵 단백질을 분리하고 western blot 방법으로 c-Jun과 c-Fos의 활성 정도를 측정하였다. 그 결과, 정상 세포군에 비해 PI 처리군에서 c-Jun과 c-Fos의 활성이 크게 증가하였고, CsA와 HES 처리군에서 각각 PI에 의해 증가한 c-Jun과 c-Fos의 활성이 억제되었다. PI에 의해 증가한 c-Jun과 c-Fos의 활성과 비교했을 때, HES 100 μM 처리군에서 c-Jun과 c-Fos의 활성은 각각 약 60%와 43% 억제되었다(Fig. 4).

HES가 PI로 유도된 RBL-2H3 세포의 NF-κB 발현에 미치는 영향 - HES가 RBL-2H3 세포에서 PI의 유도에 의

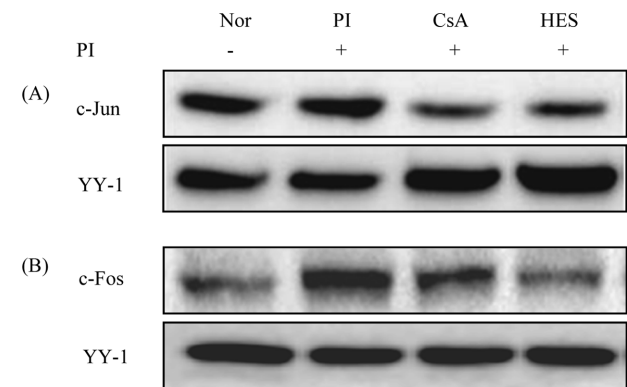


Fig. 4. Suppressive effects of HES on PI-induced activation of transcription factors (A) c-Jun, (B) c-Fos in RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were pre-treated with 100 μM of HES or 0.5 μM of CsA for 1 h, and then stimulated with PI for 3 h. Nuclear extracts were isolated and separated by SDS-PAGE. The level of each transcription factors was determined by western blot analysis using specific antibody. YY-1 was used as a loading control. The data presented are representative of three independent experiments.

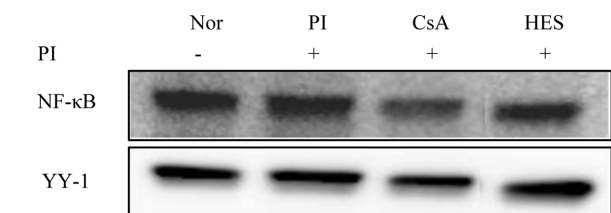


Fig. 5. Suppressive effects of HES on PI-induced activation of NF-κB in RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were pre-treated with 100 μM of HES or 0.5 μM of CsA for 1 h, and then stimulated with PI for 3 h. Nuclear extracts were isolated and separated by SDS-PAGE. The level of NF-κB was determined by Western blot analysis using specific antibody. YY-1 was used as a loading control. The data presented are representative of three independent experiments.

한 NF- κ B의 발현에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여, RBL-2H3 세포에 CsA, HES를 1시간 동안 전처리 한 다음, PI를 처리하여 3시간 반응시킨 후 세포를 얻어 핵 단백질을 분리하고 western blot 방법으로 NF- κ B의 활성 정도를 측정하였다. 그 결과, 정상 세포군에 비해 PI 처리군에서 NF- κ B의 활성이 크게 증가하였고, CsA와 HES 처리군에서 PI에 의해 증가한 NF- κ B의 활성이 억제되었다. PI에 의해 증가한 NF- κ B의 활성과 비교했을 때, HES 100 μ M 처리군에서 NF- κ B의 활성은 약 28% 억제되었다(Fig. 5).

고 찰

최근에는 천연물을 이용해 선천면역계를 조절함으로써 알레르기 질병을 예방 또는 치료하려는 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 현재 알레르기에 대한 치료제로는 항히스타민제, 스테로이드제, 면역억제제인 tacrolimus, cyclosporin 등이 사용되고 있으나, 그 효과가 일시적이고 제한적이어서 근본적인 치료가 미흡하고 장기적으로 사용할 경우 성장 지연, 백내장, 고혈압, 신기능 장애 등 부작용이 문제되고 있기 때문이다.²³⁻²⁵ 따라서 인체에 대한 안전성이 보장되어 있고, 주위에서 쉽게 접할 수 있는 천연물을 대상으로 알레르기 질환을 예방할 수 있는 유효 물질을 찾아내는 것이 중요하다.

본 연구에서 저자는 진피의 flavonone glycoside 성분인 HES가 호염구에서 Th2 사이토카인의 발현을 억제하는 효과를 확인해, 항알레르기 소재로서 HES의 가능성을 평가하였다. 그 결과, PI로 활성화 된 호염구에서 분비된 Th2 면역반응을 유발하는 사이토카인 IL-4와 IL-13의 발현이 HES에 의해 농도의존적으로 억제되는 것을 확인하였다. PMA 및 ionomycin은 호염구를 자극하여 세포 내 Ca^{2+} 유입과 증가를 유도하는 역할을 하며, 증가된 Ca^{2+} 은 호염구를 활성화시키는 필수적인 매개인자로 여겨지고 있다.²⁶ HES에 의한 IL-4와 IL-13의 생성억제는 OVA로 자극된 비장 세포와 기관지폐포세척액(BALF)을 이용한 실험 및 LPS로 자극된 BALF를 이용한 실험 등에서 얻은 결과와 일치한다.^{27,28} 또한 HES가 OVA 특이적인 IgE의 생성을 감소시켰으며, OVA가 감작된 생쥐의 기도반응과 폐의 염증 증상을 완화시켰음이 보고되었다.¹⁹

반면, 세포의 탈과립을 나타내는 지표인 히스타민과 β -hexosaminidase 분비량을 측정 한 여러 실험에서, HES는 RBL-2H3세포에서 IgE로 유도된 히스타민과 β -hexosaminidase 분비를 억제하지 못했다고 보고되었다.^{22,29}

비만세포를 활성화시키는 신호전달 체계 중 mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 NF- κ B, AP-1, activating transcription factor-2, cAMP- responsive element binding protein을 포함한 다양한 전사인자들의 세포 내 반

응을 조절하여 인터루킨과 같은 사이토카인의 발현을 조절하고 세포 외 신호를 세포 내로 전달하는 역할을 한다. 이중 c-Jun과 c-Fos로 구성된 AP-1과 NF- κ B는 활성화 되어 핵 안으로 이동해 사이토카인의 발현에 관여하는 promoter 또는 enhancer 부위에 결합하여 유전자의 전사를 유도하는 것으로 알려져 있다.^{30,31} 본 연구에서는 PI로 활성화된 호염구의 HES 처리군에서 AP-1과 NF- κ B의 활성이 억제되는 것을 확인하였으며, 따라서 HES가 AP-1과 NF- κ B의 활성을 억제시킴으로써 Th2 면역반응을 유발하는 사이토카인의 발현을 조절하여 알레르기 반응을 감소시킴을 확인하였다. 이는 LPS로 활성화된 폐 조직과 TNF- α 또는 IL-1 β 로 활성화된 폐암 상피세포, A549 세포에 HES를 처리했을 때, AP-1과 NF- κ B의 활성이 억제되어 HES가 면역 반응에 작용한다는 보고와 일치한다.²⁸ 이 외에도 HES가 GATA-3의 억제를 통해 IL-5, 이오탁신 및 OVA-특이 IgE의 생성을 억제하고, serine-threonine kinase(Akt)의 인산화를 억제함으로써 항알레르기 작용을 갖는다는 보고가 있다.^{27, 32}

따라서, 본 연구 결과를 통해 HES가 호염구에서 AP-1과 NF- κ B의 활성을 억제함으로써 IL-4 및 IL-13의 생성과 유전자 발현을 하향 조절하여 알레르기 반응을 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

결 론

본 연구에서는 HES의 Th2 관련 사이토카인의 발현 억제 작용을 알아보기 위해 PI로 자극된 RBL-2H3 세포에 HES를 농도별로 처리하여 HES에 의한 IL-4와 IL-13의 발현 억제 능력을 평가하였다. 먼저, IL-4와 IL-13의 생성 억제 정도와 mRNA의 발현 정도를 살펴본 결과, HES의 처리 농도에 따른 뚜렷한 IL-4와 IL-13의 생성 억제와 mRNA의 발현 억제 효과를 확인하였다. 또한 AP-1과 NF- κ B 활성을 확인한 결과, HES 처리군에서 c-Jun과 c-Fos 및 NF- κ B의 억제 효과를 확인하였다. 이를 바탕으로 HES가 호염구에서 AP-1과 NF- κ B의 활성을 조절함으로써 Th2 면역반응을 유발하는 사이토카인의 발현을 억제해 알레르기 예방과 치료에 효과적으로 작용할 것으로 기대되며, 추후 기능성 소재로 개발하기 위한 기전 연구가 필요하다고 사료된다.

인용문헌

1. 한국약학교육협의회 예방약학분과회 (2013) 질환별로 본 건강기능식품학, 251. (주)신일북스, 서울.
2. Abbas, A. K., L. A. H., and Baker, D. L. (2008) Basic Immunology, 205-211. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
3. Prussin, C. and Metcalfe, D. D. (2003) 4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**: S486-494.

4. Falcone, F. H., Zillikens, D., and Gibbs, B. F. (2006) The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity. *Exp. Dermatol.* **15**: 855-864.
 5. Schmid-Grendelmeier, P., Altnauer, F., Fischer, B., Bizer, C., Straumann, A., Menz, G., Blaser, K., Wuthrich, B., and Simon, H. U. (2002) Eosinophils express functional IL-13 in eosinophilic inflammatory diseases. *J. Immunol.* **169**: 1021-1027.
 6. Juntila, I. S., Mizukami, K., Dickensheets, H., Meier-Schellersheim, M., Yamane, H., Donnelly, R. P., and Paul, W. E. (2008) Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13: differential expression of IL-4R α , IL-13R α 1, and γ c regulates relative cytokine sensitivity. *J. Exp. Med.* **205**: 2595-2608.
 7. Liang, H. E., Reinhardt, R. L., Bando, J. K., Sullivan, B. M., Ho, I. C., and Locksley, R. M. (2012) Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity. *Nat. Immunol.* **13**: 58-66.
 8. Wynn, T. A. (2003) IL-13 effector functions. *Annu. Rev. Immunol.* **21**: 425-456.
 9. Brusselle, G. G., Kips, J. C., Tavernier, J. H., van der Heyden, J. G., Cuvelier, C. A., Pauwels, R. A., and Bluethmann, H. (1994) Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin. Exp. Allergy* **24**: 73-80.
 10. Zavorotinskaya, T., Tomkinson, A. and Murphy, J. E. (2003) Treatment of experimental asthma by long-term gene therapy directed against IL-4 and IL-13. *Mol. Ther.* **7**: 155-162.
 11. Elias, J. A., Zheng, T., Lee, C. G., Homer, R. J., Chen, Q., Ma, B., Blackburn, M. and Zhu, Z. (2003) Transgenic modeling of interleukin-13 in the lung. *Chest* **123**: 339S-345S.
 12. Yu, M. W., Lou, S. N., Chiu, E. M., and Ho, C. T. (2013) Antioxidant activity and effective compounds of immature calamondin peel. *Food Chem.* **136**: 1130-1135.
 13. Jain, M. and Parmar, H. S. (2011) Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. *Inflamm. Res.* **60**: 483-491.
 14. Hosseinimehr, S. J., Jalayer, Z., Naghshvar, F., and Mahmoudzadeh, A. (2012) Hesperidin inhibits cyclophosphamide-induced tumor growth delay in mice. *Integr. Cancer Ther.* **11**: 251-256.
 15. Meiyanto, E., Hermawan, A., and Anindyajati (2012) Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **13**: 427-436.
 16. Li, R., Li, J., Cai, L., Hu, C. M., and Zhang, L. (2008) Suppression of adjuvant arthritis by hesperidin in rats and its mechanisms. *J. Pharm. Pharmacol.* **60**: 221-228.
 17. Shi, X., Liao, S., Mi, H., Guo, C., Qi, D., Li, F., Zhang, C., and Yang, Z. (2012) Hesperidin prevents retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules* **17**: 12868-12881.
 18. Sahu, B. D., Kuncha, M., Sindhura, G. J., and Sistla, R. (2013) Hesperidin attenuates cisplatin-induced acute renal injury by decreasing oxidative stress, inflammation and DNA damage. *Phytomedicine* **20**: 453-460.
 19. Wei, D., Ci, X., Chu, X., Wei, M., Hua, S., and Deng, X. (2012) Hesperidin suppresses ovalbumin-induced airway inflammation in a mouse allergic asthma model. *Inflammation* **35**: 114-121.
 20. Chang, J. H. (2010) Anti-inflammatory effects and its mechanisms of hesperidin in an asthmatic mouse model induced by ovalbumin. *J. Exp. Biomed. Sci.* **16**: 83-90.
 21. Han, N. R., Kim, H. M., and Jeong, H. J. (2012) Pyeongwee-San extract (KMP6): a new anti-allergic effect. *J. Pharm. Pharmacol.* **64**: 308-316.
 22. Park, S. H., Park, E. K., and Kim, D. H. (2005) Passive cutaneous anaphylaxis-inhibitory activity of flavanones from Citrus unshiu and Poncirus trifoliata. *Planta Med.* **71**: 24-27.
 23. Klein, P. A. and Clark, R. A. (1999) An evidence-based review of the efficacy of antihistamines in relieving pruritus in atopic dermatitis. *Arch. Dermatol.* **135**: 1522-1525.
 24. Sidbury, R. and Hanifin, J. M. (2000) Systemic therapy of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Dermatol.* **25**: 559-566.
 25. Behnam, S. M., Behnam, S. E., and Koo, J. Y. (2005) Review of cyclosporine immunosuppressive safety data in dermatology patients after two decades of use. *J. Drugs Dermatol.* **4**: 189-194.
 26. Apgar, J. R. (1991) Association of the crosslinked IgE receptor with the membrane skeleton is independent of the known signaling mechanisms in rat basophilic leukemia cells. *Cell Regul.* **2**: 181-191.
 27. Kim, S. H., Kim, B. K., and Lee, Y. C. (2011) Antiasthmatic effects of hesperidin, a potential Th2 cytokine antagonist, in a mouse model of allergic asthma. *Mediators Inflamm.* **2011**: 1-12.
 28. Yeh, C. C., Kao, S. J., Lin, C. C., Wang, S. D., Liu, C. J., and Kao, S. T. (2007) The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin *in vivo* and *in vitro*. *Life Sci.* **80**: 1821-1831.
 29. Lee, N. K., Choi, S. H., Park, S. H., Park, E. K., and Kim, D. H. (2004) Antiallergic activity of hesperidin is activated by intestinal microflora. *Pharmacology* **71**: 174-180.
 30. Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2004) Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* **18**: 2195-2224.
 31. Boguniewicz, M., Schmid-Grendelmeier, P., & Leung, D. Y. (2006) Atopic dermatitis. *J. Allergy Clin Immunol.* **118**: 40-43.
 32. Kobayashi, S. and Tanabe, S. (2006) Evaluation of the anti-allergic activity of Citrus unshiu using rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells as well as basophils of patients with seasonal allergic rhinitis to pollen. *Int. J. Mol. Med.* **17**: 511-515.
- (2013. 4. 23 접수; 2013. 5. 23 심사; 2013. 6. 3 게재확정)