

## 미숙과와 성숙과 복분자의 섭취가 복강 Macrophages의 유전자 발현에 미치는 영향

이정은<sup>1</sup> · 조수목<sup>2</sup> · 김진<sup>3</sup> · 김정현<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>중앙대학교 가정교육과

<sup>2</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 한식세계화연구단 기능성식품과

<sup>3</sup>숙명여자대학교 식품영양학과

## Effects Unripe and Ripe *Rubus coreanus* Miquel on Peritoneal Macrophage Gene Expression Using cDNA Microarray Analysis

Jung eun Lee<sup>1</sup>, Soo-Muk Cho<sup>2</sup>, Jin Kim<sup>3</sup>, and Jung-Hyun Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Home Economics Education, ChungAng University, Seoul 156-756, Korea

<sup>2</sup>Functional Food & Nutrition Division, Rural Development Administration, Gyeonggi 411-853, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Food & Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

**ABSTRACT** *Rubus coreanus* Miquel (RCM) has been used as one of the Korean traditional medicines for prostate health. In addition, recent studies have reported that RCM reduced chronic inflammatory diseases such as cancer, and rheumatoid arthritis. Therefore, in this study, we investigated the effects of unripe and ripe RCM on inflammation-related gene expressions in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages. Mice were fed with 2% unripe RCM (U2), 10% unripe RCM (U10), 2% ripe RCM (R2), and 10% ripe RCM (R10) for 8 weeks. Peritoneal macrophages were isolated and stimulated with LPS then proinflammatory mediators (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6), and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) productions were assessed. Moreover, gene expression profiles were analyzed by cDNA microarray method. Unripe and ripe RCM significantly reduced TNF- $\alpha$  production but only unripe RCM decreased IL-1 $\beta$  and IL-6 production. RCM intake significantly reduced inflammatory-related gene expressions such as arachidonate 5-lipoxygenase, interleukin 11, and nitric oxide synthase 2. Furthermore, unripe and ripe RCM significantly decreased ceruloplasmin, tissue plasminogen activator, thrombospondin 1, and vascular endothelial growth factor A expression which modulates symptoms of chronic inflammatory diseases. RCM intake also significantly increased hypoxia inducible factor 3, alpha which is the negative regulators of hypoxia-inducible gene expression. Furthermore, only unripe RCM reduced chemokine (C-C motif) ligand 8, chemokine (C-X-C motif) ligand 14, and phospholipase A2 expression. In this study, we showed that RCM had anti-inflammatory effects by suppression of pro-inflammatory mediator expressions and may reduce chronic inflammatory disease progress through regulation of gene expressions. These findings suggest that RCM might be used as a potential functional material to reduce chronic inflammatory responses.

**Key words:** cDNA microarray, *Rubus coreanus* Miquel, peritoneal macrophage, inflammation

## 서론

최근 생활양식과 식습관이 서구화됨에 따라 암, 심혈관계 질환, 당뇨병과 같은 만성질환의 발병률이 지속적으로 증가하고 있는 추세이며(1), 만성질환의 발병 및 증상은 염증반응과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(2). 정상적인 염증반응은 체내에 bacteria, viruses와 같은 외부물질이 침입하는 경우 면역세포가 이를 인지하여 다양한 염증매개물질을 분비함으로써 몸을 보호해주는 기전이다(3). 그러나 만성질환의 경우, 염증반응으로 인한 염증매개물질이 과

도하게 분비됨으로써 조직이 손상되거나 장기가 정상적으로 기능하지 못하게 되어 그 증상이 더욱 악화된다고 알려져 있다(4). 특히, 만성질환의 염증반응에 많은 영향을 주는 macrophage는 proinflammatory cytokines, nitric oxide(NO), prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)와 같은 염증매개물질을 분비하여 염증 반응을 유발하고(3), 염증 부위로 면역 세포의 이동을 촉진하여 염증 반응을 증폭시켜(5) 암세포의 성장 촉진, 인슐린 저항성 증가, 동맥경화 악화 등 만성염증질환의 증상을 악화시킨다고 보고되고 있다(6-8).

최근 연구 결과에 의하면, 체내의 산화적 스트레스가 증가되면 염증반응이 유발되어 만성질환의 유병률을 증가시킬 뿐 아니라 그 증상을 악화시킨다고 보고되고 있으며(9), 항산화 물질이 다량 함유된 과일과 채소를 많이 섭취할수록

Received 12 June 2013; Accepted 22 July 2013

\*Corresponding author.

E-mail: jjhkim@cau.ac.kr, Phone: 82-2-820-5378

산화적 스트레스가 감소되어 만성질환의 유병률을 감소시키고 증상을 완화시킨다고 보고되고 있다(9,10). 특히 항산화 물질은 체내 항산화력을 향상시켜 만성적인 염증 반응을 감소시킨다고 보고되고 있으며, 여러 항산화 물질 중 polyphenol이 염증반응을 억제하는데 효과적이라고 보고되고 있다(11-13). 또한 polyphenol이 다량 함유된 딸기, 체리, 포도를 정기적으로 섭취하는 경우 산화적 스트레스 감소와 더불어 염증관련 cytokines의 분비가 억제되고(11-13), PGE<sub>2</sub> 및 NO의 분비가 감소됨으로써 만성질환의 증상을 완화시킨다고 보고되었다(14).

복분자(*Rubus coreanus* Miquel)는 예로부터 한국과 중국에서 사용되어 온 약용식물로서 미국과를 몰에 달여 발기 부전, 정액루, 유노증, 천식, 알레르기 질환 및 당뇨병에 사용되어 왔다(15-17). 복분자의 효능은 복분자 내 다량 함유된 polyphenol에 의한 것으로 알려졌다(16,18-20), 주요 성분으로는 ellagic acid, gallic acid, cinnamic acid, protocatechuic acid, sangiin H-4, sanguin H-6, 2,3(s)-HHPP-D-glucose, 23-hydroxy tormentic acid 및 nigaichigoside F<sub>1</sub> 등이 보고되었다(18,21-23). 특히 성숙과보다 미숙과 복분자내 polyphenol 함량이 더 높은 것으로 보고되었으며(23), 복분자의 섭취가 체내 항산화력을 향상시킬 뿐 아니라 류마티즘, 전립선암 등의 만성질환, 피로, 신장 질환 및 골다공증 등의 증상을 억제하는 것으로 보고되었다(16,18,19,24-27).

Polyphenol이 다량 함유된 복분자의 섭취가 염증 반응을 억제하는 효과가 있다고 보고되고 있으나(27-29) 아직까지 명확한 분자기전이 규명되지 않고 있으므로, 본 연구에서는 미숙과와 성숙과 복분자 섭취에 의한 복강 대식세포의 염증 반응에 미치는 영향과 함께 관련 유전자 발현의 변화를 microarray 기법을 사용하여 분석함으로써 복분자에 의한 항염증 효과 및 그 영향을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 동물

성숙도와 섭취량에 따른 복분자의 항염증 효과를 알아보기 위해 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 5주령 ICR male을 구입하여 5그룹(대조군(CON), 2% 미숙과 복분자 섭취군(U2), 10% 미숙과 복분자 섭취군(U10), 2% 성숙과 복분자 섭취군(R2), 10% 성숙과 복분자 섭취군(R10))으로 나누고 7일간 적응시킨 후 각 그룹에 해당되는 실험식이를 공급하였다. 동물은 중앙대학교 내 청정동물연구센터에서 사육되었으며, 동물실험실은 온도 22±1°C, 습도 50±1%를 유지하였고 12시간 간격으로 점등과 소등을 반복하였다. 실험 식이에 사용된 미숙과와 성숙과 복분자는 동결건조한 후 분말화하여 사용하였다. 실험 식이는 AIN-93 purified rodent diet base를 기초로 하였으며, 미숙과와 성숙과 복분자를 각각 2%와 10%를 첨가하여 pellet 형태로 제조(주)유니

**Table 1.** Experimental diet

Group	Diet
CON	AIG-93G
U2	AIG-93G+2% <i>unripe Rubus coreanus</i> Miquel
U10	AIG-93G+10% <i>unripe Rubus coreanus</i> Miquel
R2	AIG-93G+2% <i>ripe Rubus coreanus</i> Miquel
R10	AIG-93G+10% <i>ripe Rubus coreanus</i> Miquel

페이스, 서울)한 후 4°C에서 냉장 보관하였다. 실험식이의 조성은 Table 1과 같다.

### Peritoneal macrophage 추출

Peritoneal macrophage는 mouse 복강 내막에 4% thioglycollate를 2 mL 투여하고, 3일 후 mouse를 CO<sub>2</sub>로 희생시킨 뒤 cold RPMI 1640 media(WelGENE, Seoul, Korea)를 이용하여 복강으로부터 추출하였다. Macrophage가 포함된 RPMI를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, RPMI로 2번 더 세정하였다. 적정수의 세포를 10% fetal bovine serum(FBS, v/v), 1% penicillin/streptomycin(P/S, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이 함유된 RPMI 1640 media로 희석한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 측정

Peritoneal macrophage를 24-well plate에 well당 5×10<sup>5</sup>씩 분주하여 16시간 배양한 후, LPS(1 µg/mL)로 18시간 염증반응을 유도하였다. 그 후 세포 배양액 상층액을 수거하여 PGE<sub>2</sub>와 cytokines 측정에 사용하였다. PGE<sub>2</sub>는 Prostaglandin E<sub>2</sub> enzyme immunoassay(EIA) kit(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)을 사용하여 제시된 실험 방법에 따라 측정하였다. 항체가 코팅된 96-well plate에 배양액 상층액이나 standard, EIA Buffer, prostaglandin E<sub>2</sub> AChETracer, prostaglandin E<sub>2</sub> monoclonal antibody를 넣어 18시간 동안 4°C에서 반응시킨 후 Ellman's reagent를 처리하여 90분 동안 반응시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하여 PGE<sub>2</sub> 분비량을 계산하였다.

### Cytokines 측정

TNF-α, IL-1β, IL-6의 발현량은 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(R&D System, Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 측정하였다. 항체가 코팅된 96-well plate에 macrophage의 배양액 상층액이나 standard를 2시간 동안 반응시킨 후 세척하여 conjugate를 넣었다. 세척 후 substrate solution으로 반응시키고 stop solution을 첨가하여 반응을 정지시켜 450 nm에서 흡광도를 측정함으로써 cytokines의 분비량을 계산하였다.

### Peritoneal macrophage RNA 분리

Peritoneal macrophage로부터 mRNA를 추출하기 위해 60 mm culture dish에 2×10<sup>6</sup>개의 세포를 분주하여 16시간

배양한 후, 1 µg/mL의 LPS로 18시간 활성화 시켰다. 세포를 cold PBS로 2회 세척하고 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 mRNA를 추출하였다. 세포에 Trizol을 넣고 실온에 보관한 후 chloroform을 넣고 혼합하여 실온에 보관하였다. 10,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 분리한 후 isopropanol과 혼합하여 mRNA를 침전시키기 위해 10,000 rpm에서 원심분리 하였다. RNA pellet을 75% ethanol로 세척한 후 원심분리하고, RNase-free water로 녹여 실험 전까지 -80°C에서 보관하였다. RNA의 농도는 흡광도를 이용하여 측정하였으며, RNA의 quality는 agarose gel을 내려 확인하였다.

### cDNA Microarray 실험

**형광 표지 cDNA 준비:** 각 군에서 추출한 RNA(2 µg)에 oligo-dT primer(2 µg/µL)를 첨가하여 65°C에서 10분간 annealing 반응을 시킨 후, pre-reaction mixture(5× first-strand buffer, 0.1 M DTT, unlabeled dNTPs)와 reverse transcriptase enzyme과 함께 넣고 형광표지인 Cy3-dUTP(대조군)와 Cy5-dUTP(실험군)를 넣어 역전사하여 cDNA를 준비하였다.

**교잡 반응 및 유전자 발현 측정:** 제조된 형광표지 cDNA를 blocking agent, nuclease-free water, fragmentation buffer와 함께 잘 섞은 후 60°C에서 30분간 반응시키고, hybridization buffer HI-RPM을 혼합한다. Agilent Mouse Whole Genome 8×60 Oligo chip(Agilent, Wilmington, DE, USA)을 Agilent prehybridization buffer로 65°C에서 세척한 후, 준비한 cDNA 샘플을 chip에 넣고 65°C에서 17시간 동안 교잡반응 시켰다. 반응이 끝난 microarray chip을 GE wash buffer 1으로 세척하고, GE washbuffer 2로 37°C에서 세척한 후, 30°C에서 2분간 말렸다. 유전자 발현은 laser fluorescence scanner(Agilent Bioanalyzer 2100, Agilent)를 이용하여 cDNA의 형광 정도를 측정하였으며, 총 2번 반복실험 하였다.

### 통계 분석

복분자 식이에 따른 PGE<sub>2</sub>의 생성과 cytokines의 발현은 3회 이상 반복실험에 대한 mean±SEM(평균±표준오차)으로 표시하였으며 그룹간 차이는 Statistical Package for the Social Sciences(SPSS, Chicago, IL, USA) 18.0을 사용하여 일원배치 분산분석 후 Duncan법으로 사후검정을 실시하였다. 통계적 유의수준은  $P < 0.05$ 으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 복분자 섭취에 따른 peritoneal macrophage의 proinflammatory mediator 분비

본 연구에서는 2%와 10%의 미숙과와 성숙과 복분자 섭취가 염증반응에 미치는 영향을 살펴보았으며, 복분자의 섭

취량은 blueberry가 유선발달 및 지방암 억제 작용을 연구한 선행연구를 바탕으로 결정하였다(30,31).

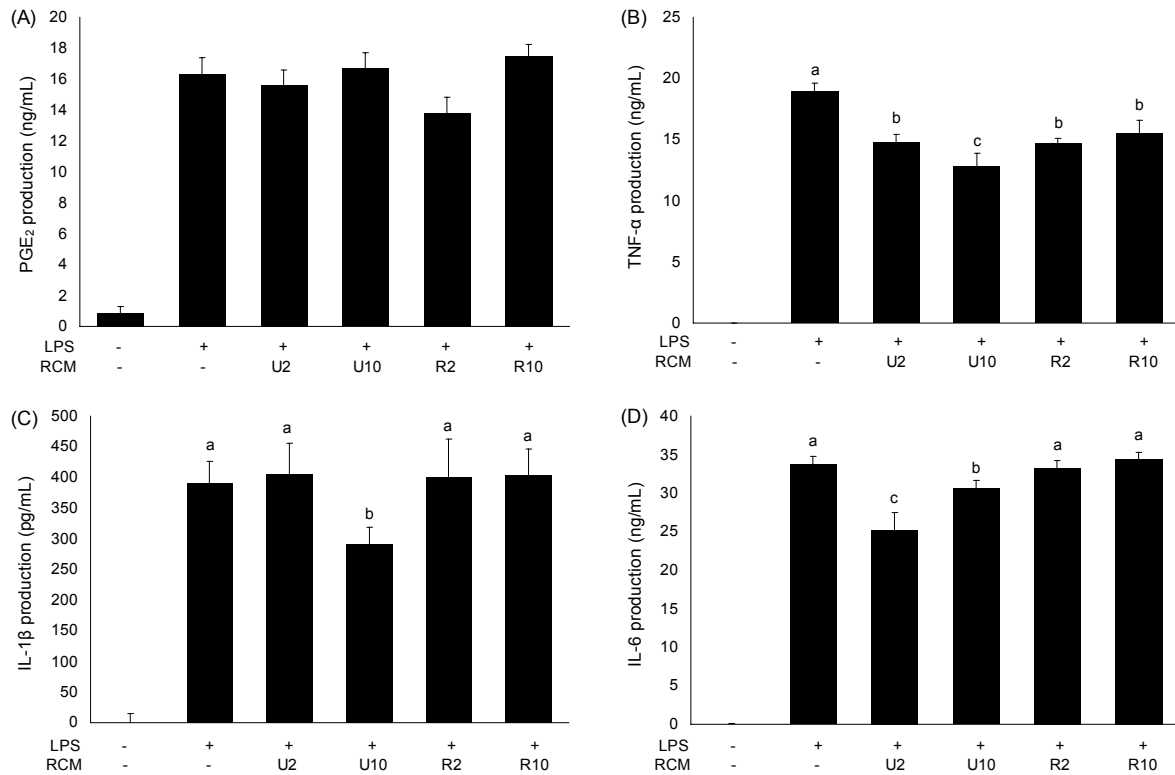
미숙과와 성숙과 복분자를 섭취시킨 쥐에서 peritoneal macrophage를 분리하여 LPS로 염증반응을 유도한 후, 주요 염증 매개 물질인 PGE<sub>2</sub>의 분비량과 proinflammatory cytokines인 TNF-α, IL-6와 IL-1β의 분비량을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 성숙도와 섭취량에 상관없이 복분자 섭취는 PGE<sub>2</sub>의 분비에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1A). 반면 복분자의 섭취는 TNF-α, IL-1β와 IL-6의 분비량을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1B~D). 우선 TNF-α 분비는 복분자의 성숙도에 관계없이 복분자 섭취에 의해 분비량이 유의적으로 감소하였으며, U2와 U10 섭취 그룹에서는 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 1B). 그러나 IL-1β의 분비는 U10 섭취 그룹에서만 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였으며(Fig. 1C), IL-6의 분비는 미숙과 복분자군(U2와 U10)에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1D). 따라서 성숙도에 따라서는 미숙과 복분자가 성숙과보다 항염증 반응이 뛰어난 것으로 사료되며, 농도 의존적인 경향을 보이는 것으로 나타났다.

본 실험 결과는 polyphenol을 다량 함유하고 있는 blueberry의 섭취가 TNF-α와 IL-6의 분비를 감소시켰다는 보고와 유사한 경향을 보였다(32). 또한 Kim 등(23)과 Park 등(33)은 복분자의 성숙도에 따라 구성 성분과 함유 물질에 차이가 나며, 이는 항산화 효과에 영향을 미친다고 보고하고 있어 성숙도에 따른 차이를 설명하였다(5). 선행연구에 의하면 복분자의 성숙도에 따라 phenolic compounds의 함유량이 차이가 있는 것으로 나타났다(23). 미숙과 복분자가 성숙과 복분자보다 16배의 cinnamic acid, 6배의 ferulic acid와 epicatechine, 4배의 protocatechuic acid, 3배의 gallic acid, 2.5배의 vanillic acid를 함유하는 것으로 나타났다(23). 본 실험 결과에서도 복분자의 성숙도에 따른 구성 성분의 차이로 항산화 활성뿐 아니라 항염증 반응에도 영향을 미쳐 미숙과 복분자가 성숙과보다 항염증 효과가 크다는 Yang 등(16)의 연구결과와 본 실험결과와도 같은 경향을 보였다.

따라서 복분자의 섭취는 마우스 대식세포의 TNF-α, IL-1β와 IL-6의 분비를 억제함으로써 항염증 효과를 나타내며, 성숙도에 따른 생리활성물질의 차이로 인해 미성숙 복분자 섭취의 항염증 효과가 더 뛰어난 것으로 사료된다.

### 복분자 섭취에 따른 peritoneal macrophage의 유전자 발현 분석

미숙과와 성숙과 복분자 섭취에 의한 복강 대식세포의 유전자 발현을 분석한 결과, 염증반응 관련 유전자중에서 미숙과와 성숙과의 섭취에 의해 발현이 감소한 유전자는 Table 2와 같다. 미숙과와 성숙과 복분자는 arachidonate 5-lipoxygenase(5-LOX)의 발현을 유의적으로 감소시켰으며, 복분자 섭취에 의해 농도 의존적으로 그 발현이 감소하는



**Fig. 1.** Effects of unripe and ripe *Rubus coreanus* Miquel on PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 productions in peritoneal macrophage. Mice were fed with U2, U10, R2, and R10 diet for 8 weeks then peritoneal macrophages were isolated. Isolated peritoneal macrophages were stimulated with 1  $\mu$ g/mL of LPS for 18 hr then PGE<sub>2</sub> (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C), and IL-6 (D) productions were measured from supernatants.

**Table 2.** Gene down-regulated of inflammatory and immune regulating genes in peritoneal macrophages by unripe and ripe *Rubus coreanus* Miquel

Genes	Functions	U2	U10	R2	R10
Arachidonate 5-lipoxygenase	Transforms arachidonic acid into leukotrienes and is a current target for pharmaceutical intervention in a number of diseases.	0.87	0.42	0.57	0.47
Ceruloplasmin	The major copper-carrying protein in the blood, and in addition plays a role in iron metabolism.	0.22	0.17	0.26	0.14
Dynamin 1	A member of the dynamin subfamily of GTP-binding proteins.	0.49	0.65	0.58	0.43
Interleukin 11	A key regulator of multiple events in hematopoiesis, most notably the stimulation of megakaryocyte maturation.	0.20	0.45	0.19	0.29
Nitric oxide synthase 2, inducible	Involved in immune response, binds calmodulin at physiologically relevant concentrations, and produces NO as an immune defense mechanism, as NO is a free radical with an unpaired electron.	0.42	0.78	0.58	0.48
Plasminogen activator, tissue	Catalyzes the conversion of plasminogen to plasmin, the major enzyme responsible for clot breakdown.	0.97	0.40	0.64	0.40
Thrombospondin 1	An adhesive glycoprotein that mediates cell-to-cell and cell-to-matrix interactions. Play roles in platelet aggregation, angiogenesis, and tumorigenesis.	0.43	0.32	0.54	0.49
Vascular endothelial growth factor A	Mediating increased vascular permeability, inducing angiogenesis, vasculogenesis and endothelial cell growth, promoting cell migration, and inhibiting apoptosis.	0.51	0.37	0.48	0.38

것으로 나타났다. 5-LOX는 arachidonic acid 대사체를 생성하는 효소로 leukotrienes를 합성하여 염증반응을 유발할 뿐 아니라, 만성질환자의 경우 5-LOX의 발현과 활성이 높아 동맥경화증이나 암세포의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다(34-38). 또한 복분자의 섭취는 interleukin 11(IL-11)과 nitric oxide synthase 2, inducible(iNOS)의 발현도 80%와 50% 정도 감소시키는 것으로 나타났다. IL-11은 염증반응과 함께 암세포의 침윤을 조절하는 cytokine으로 알려져 있으며, iNOS 또한 nitric oxide(NO)를 생성하여 NO-sensitive enzyme을 활성화시켜 생리적인 반응을 유발하거나 만성적인 염증질환에서 과량 분비되어 림프구의 증식을 억제하고, 정상세포와 조직에 손상을 주는 것으로 보고되고 있다(39-41).

복분자의 섭취는 염증 관련 물질 이외에도 만성질환을 조절하는 인자인 ceruloplasmin, vascular endothelial growth factor A(VEGF A), tissue plasminogen activator(tPA), thrombospondin 1의 발현을 감소시키는 것으로 나타났다. 우선, 혈장에서 구리를 운반하는 단백질로 알려진 ceruloplasmin의 발현을 80~90%까지 감소시켰는데, 최근 보고에 의하면 ceruloplasmin은 염증 반응뿐 아니라 심혈관계 질환과 같은 만성질환과도 관련이 있는 것으로 보고되었으며(42-45), 신생혈관생성을 조절하는 중요한 성장인자인 VEGF A도 암세포의 성장과 전이에 영향을 주는 것으로 보고되었다(46-48). 또한 tPA는 혈액 응고와 관련 있는 성분으로 plasminogen을 plasmin으로 전환하여 혈액 응고를 유도할 뿐 아니라 세포의 이동과 세포 remodeling을 유도하고, 혈액응고로 인한 뇌졸중, myocardial infarction, acute ischemic stroke와도 관련이 있는 것으로 보고되고 있으며, tPA의 발현을 억제함으로써 심혈관계 질환을 억제하려는

연구가 수행되고 있다(49-52). 마지막으로 복분자 섭취는 adhesion molecules인 thrombospondin 1의 발현을 감소시키는 것으로 나타났는데, thrombospondin 1은 대식세포가 extracellular matrix에 부착되기 위해 필요한 membrane receptor로 세포의 모양이나 움직임, 세포주기를 조절하는 것으로 알려져 있으며, 혈액 응고와도 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(53-57). 따라서 미숙과와 성숙과 복분자의 섭취가 염증반응 관련 물질의 발현을 억제할 뿐 아니라 만성질환, 특히 심혈관계 관련 물질인 ceruloplasmin, VEGF A, tPA, thrombospondin 1의 발현을 억제하는 것으로 보아 혈전생성이나 심혈관계질환 예방에 효과가 있을 것으로 사료된다.

마지막으로 복분자의 섭취가 유의적이지는 않았으나 TNF- $\alpha$ , IL-17, IFN $\gamma$  등의 pro-inflammatory cytokines의 발현을 억제되었으며, phospholipase C(PLC) beta와 mitogen-activated protein kinase kinase 6(MAPKK)의 발현도 복분자 섭취에 의해 감소하는 것으로 나타나(data not shown), PLC와 MAPKK signaling에 의해 염증반응이 억제되었을 것으로 사료된다.

미숙과와 성숙과 복분자 섭취에 의해 hypoxia inducible factor 3, alpha(HIF3A)가 2배 이상 발현이 증가된 것으로 나타났다(Table 3). 이 유전자는 산소의 농도가 낮은 경우 발현되어 HIF의 기능을 억제하는 전사조절인자로 암의 성장과 전이를 억제하는 것으로 알려져 있다(58-60).

미숙과 복분자의 섭취에 의해서만 발현이 조절되는 유전자로는 chemokine(C-C motif) ligand 8(CCL8), chemokine(C-X-C motif) ligand 14(CXCL14), phospholipase A2(PLA2) 등이 있는 것으로 나타났다(Table 4). CCL8은 monocyte chemoattractant protein(MCP) 중 하나로 피부

**Table 3.** Gene up-regulated of inflammatory and immune regulating genes in peritoneal macrophages by unripe and ripe *Rubus coreanus* Miquel

Genes	Functions	U2	U10	R2	R10
Hypoxia inducible factor 3, alpha subunit	Regulate many adaptive responses to low oxygen tension (hypoxia). Negative regulators of hypoxia-inducible gene expression.	2.43	2.26	2.05	2.48

**Table 4.** Gene down-regulated of inflammatory and immune regulating genes in peritoneal macrophages by unripe *Rubus coreanus* Miquel

Genes	Functions	U2	U10
Chemokine (C-C motif) ligand 8	Activates a many different immune cells, including mast cells, eosinophils and basophils, (that are implicated in allergic responses), and monocytes, T cells, and NK cells that are involved in the inflammatory response.	0.41	0.35
Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Chemotactic for monocytes and can activate these cells in the presence of an inflammatory mediator called prostaglandin-E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ).	0.43	0.35
Phospholipase A2	Recognizes the sn-2 acyl bond of phospholipids and catalytically hydrolyzes the bond releasing arachidonic acid and lysophospholipids. Upon downstream modification by cyclooxygenases, arachidonic acid is modified into active compounds called eicosanoids.	0.43	0.14

에서 eosinophilic inflammation을 유도하고, T(H)2 세포의 recruitment 등 염증반응을 조절하는 것으로 알려져 있으며(61), CXCL14은 염증 반응뿐 아니라 체중 조절과 중추 신경계에서 식행동을 조절하는 chemokine으로 CXCL14의 분비가 적을수록 비만과 식욕이 억제되는 것으로 보고되었다(62). 또한 PLA2는 인지질의 sn-2에 위치한 arachidonic acid(AA)를 분리시키는 효소로 분리된 AA는 cyclooxygenase나 lipoxygenase에 의해 PG나 leukotrienes를 생성하여 염증반응을 유도한다고 알려져 있으며, PLA2의 활성이 높을수록 류마티스나 심장질환, 암과 같은 만성질환의 발생이나 증상이 악화되는 것으로 보고되고 있다(63).

현재 성숙과는 발효청이나 주스, 추출주로 활용되고 있으며, 미숙과의 경우 예전에는 차로 섭취하였으나, 현재 간 건강에 도움을 주는 기능성 원료로 개별인정을 받아 발효유에 첨가되어 기능성 유제품으로 판매되고 있다. 본 연구 결과 복분자 특히 미숙과 복분자 섭취는 염증관련 유전자의 발현뿐 아니라 동맥경화나 심혈관계 관련 물질의 발현을 억제하는 것으로 나타나 차후 항염증성 약물이나 만성염증성 질환을 위한 기능성 식품을 개발하는데 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구에서는 미숙과와 성숙과의 복분자 섭취에 의한 쥐 복강 대식세포의 염증반응을 조사하였다. 8주간 농도별 미숙과와 성숙과 복분자 식이를 섭취시킨 후 복강대식세포를 분리한 다음, LPS로 염증반응을 유도하여 염증매개 cytokines인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 분비와 PGE<sub>2</sub>의 분비량을 측정하였으며, cDNA microarray 방법으로 유전자 발현을 측정하였다. 미숙과와 성숙과 복분자 섭취는 TNF- $\alpha$ 의 생성을 유의적으로 억제하였으나, IL-1 $\beta$ , IL-6는 미숙과 복분자 섭취에 의해서만 감소하였으며 PGE<sub>2</sub>의 분비에는 영향을 주지 않았다. 본 연구결과, 미숙과와 성숙과 복분자 섭취에 의해 8개의 유전자 발현이 감소된 것으로 확인되었는데, 이중 세포의 면역반응과 관련된 5-LOX, iNOS, IL-11의 발현이 유의적으로 감소되었으며, 만성질환 특히 심혈관계 질환을 유발하는 인자인 tPA, thrombospondin 1, ceruloplasmin과 암의 성장 및 전이와 관련된 VEGF A의 발현을 유의적으로 억제하였다. 한편 혐기성 관련 유전자의 발현을 억제하는 HIF3A의 발현을 유의적으로 증가시켰다. 또한 미숙과 복분자의 섭취만이 CCL8, CXCL14, PLA2의 발현을 감소시키는 것으로 나타났다. 따라서 복분자의 섭취, 특히 미숙과 복분자의 섭취는 항염증 효과를 보일 뿐 아니라 만성염증성 질환 관련 인자의 발현을 유의적으로 감소시키므로 이와 관련된 기능성 식품 개발에 활용될 수 있을 것으로 사료되며, 차후 복분자내 항염증 효능을 갖는 생리활성 성분에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 아젠다과제(과제번호: PJ006387) 예산으로 추진된 연구의 일부로서 연구비를 지원해 주신 농촌진흥청에 감사를 드립니다.

## REFERENCES

1. Statistics Korea. 2011. Available from: [https://www.index.go.kr/egams/stts/jsp/potal/stts/PO\\_STTS\\_IdxMain.jsp?idx\\_cd=1438&bbs=INDX\\_001](https://www.index.go.kr/egams/stts/jsp/potal/stts/PO_STTS_IdxMain.jsp?idx_cd=1438&bbs=INDX_001).
2. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 49: 1603-1616.
3. Laroux FS. 2004. Mechanisms of inflammation: the good, the bad and the ugly. *Front Biosci* 9: 3156-3162.
4. Blackwell TS, Christman JW. 1997. The role of nuclear factor- $\kappa$ B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 3-9.
5. Barnes PJ, Karin M. 1997. Nuclear factor- $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336: 1066-1071.
6. Ben-Neriah Y, Karin M. 2011. Inflammation meets cancer, with NF- $\kappa$ B as the matchmaker. *Nat Immunol* 12: 715-723.
7. Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, Azambuja MI, Tracy RP, Heiss G. 1999. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet* 353: 1649-1652.
8. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC Jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. 2003. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 107: 499-511.
9. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 76: 560-568.
10. Arts ICW, Hollman PCH. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81: 317S-325S.
11. Ellis CL, Edirisinghe I, Kappagoda T, Burton-Freeman B. 2011. Attenuation of meal-induced inflammatory and thrombotic responses in overweight men and women after 6-week daily strawberry (*Fragaria*) intake. A randomized placebo-controlled trial. *J Atheroscler Thromb* 18: 318-327.
12. Terra X, Montagut G, Bustos M, Llopiz N, Ardèvol A, Bladé C, Fernández-Larrea J, Pujadas G, Salvadó J, Arola L, Blay M. 2009. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem* 20: 210-218.
13. Seymour EM, Lewis SK, Urcuyo-Llanes DE, Tanone II, Kirakosyan A, Kaufman PB, Bolling SF. 2009. Regular tart cherry intake alters abdominal adiposity, adipose gene transcription, and inflammation in obesity-prone rats fed a high fat diet. *J Med Food* 12: 935-942.
14. Santangelo C, Vari R, Sczacchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. 2007. Polyphenols, intracellular signalling

- and inflammation. *Ann Ist Super Sanita* 43: 394-405.
15. Ra J, Lee HY, Choi MK, Park HG, Kang KS. 2004. Effect of decreasing body weight with plant extracts containing *Rubi fructus*. *J Toxicol Pub Health* 20: 167-172.
  16. Yang HM, Oh SM, Lim SS, Shin HK, Oh YS, Kim JK. 2008. Antiinflammatory activities of *Rubus coreanus* depend on the degree of fruit ripening. *Phytother Res* 22: 102-107.
  17. Yang HM, Lim SS, Lee YS, Shin HK, Oh YS, Kim JK. 2007. Comparison of the anti-inflammatory effects of the extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. *Korean J Food Sci Tech* 39: 342-347.
  18. Kim YH, Choi JH, Rim HK, Kang HJ, Chang SG, Park JH, Park HJ, Choi JW, Kim SD, Lee KT. 2011. 23-Hydroxytormentonic acid and niga-ichigoside F<sub>1</sub> isolated from *Rubus coreanus* attenuate cisplatin-induced cytotoxicity by reducing oxidative stress in renal epithelial LLC-PK<sub>1</sub> cells. *Biol Pharm Bull* 34: 906-911.
  19. Sohn SI, Rim HK, Kim YH, Choi JH, Park JH, Park HJ, Choi JW, Kim SD, Jeong SY, Lee KT. 2011. The ameliorative effect of 23-hydroxytormentonic acid isolated from *Rubus coreanus* on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol Pharm Bull* 34: 1508-1513.
  20. Choi J, Lee KT, Ha J, Yun SY, Ko CD, Jung HJ, Park HJ. 2003. Antinociceptive and antiinflammatory effects of niga-ichigoside F<sub>1</sub> and 23-hydroxytormentonic acid obtained from *Rubus coreanus*. *Biol Pharm Bull* 26: 1436-1441.
  21. Lee J, Dossett M, Finn CE. 2012. *Rubus* fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chem* 130: 785-796.
  22. Pang KC, Kim MS, Lee MW. 1996. Hydrolyzable tannins from the fruits of *Rubus coreanum*. *Kor J Pharmacogn* 27: 366-370.
  23. Kim HS, Park SJ, Hyun SH, Yang SO, Lee J, Auh JH, Kim JH, Cho SM, Marriott PJ, Choi HK. 2011. Biochemical monitoring of black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel) fruits according to maturation stage by <sup>1</sup>H-NMR using multiple solvent systems. *Food Res Int* 44: 1977-1987.
  24. Nam JH, Jung HJ, Choi J, Lee KT, Park HJ. 2006. The anti-gastropathic and anti-rheumatic effect of niga-ichigoside F<sub>1</sub> and 23-hydroxytormentonic acid isolated from the unripe fruits of *Rubus coreanus* in a rat model. *Biol Pharm Bull* 29: 967-970.
  25. Jung KA, Han D, Kwon EK, Lee CH, Kim YE. 2007. Anti-fatigue effect of *Rubus coreanus* Miquel extract in mice. *J Med Food* 10: 689-693.
  26. Do SH, Lee JW, Jeong WI, Chung JY, Park SJ, Hong IH, Jeon SK, Lee IS, Jeong KS. 2008. Bone-protecting effect of *Rubus coreanus* by dual regulation of osteoblasts and osteoclasts. *Menopause* 15: 676-683.
  27. Park JH, Oh SM, Lim SS, Lee YS, Shin HK, Oh YS, Choe NH, Park JH, Kim JK. 2006. Induction of heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Rubus coreanus* in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 146-152.
  28. Biesalski HK. 2007. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10: 724-728.
  29. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol* 72: 1439-1452.
  30. Wu X, Rahal O, Kang J, Till SR, Prior RL, Simmen RC. 2009. In utero and lactational exposure to blueberry via maternal diet promotes mammary epithelial differentiation in prepubescent female rats. *Nutr Res* 29: 802-811.
  31. Adams LS, Kanaya N, Phung S, Liu Z, Chen S. 2011. Whole blueberry powder modulates the growth and metastasis of MDA-MB-231 triple negative breast tumors in nude mice. *J Nutr* 141: 1805-1812.
  32. Xie C, Kang J, Ferguson ME, Nagarajan S, Badger TM, Wu X. 2011. Blueberries reduce pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  and IL-6 production in mouse macrophages by inhibiting NF- $\kappa$ B activation and the MAPK pathway. *Mol Nutr Food Res* 55: 1587-1591.
  33. Park Y, Kim SH, Choi SH, Han J, Chung HG. 2008. Changes of antioxidant capacity, total phenolics, and vitamin C contents during *Rubus coreanus* fruit ripening. *Food Sci Biotechnol* 17: 251-256.
  34. de Gaetano G, Donati MB, Cerletti C. 2003. Prevention of thrombosis and vascular inflammation: benefits and limitations of selective or combined COX-1, COX-2 and 5-LOX inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 24: 245-252.
  35. Hoque A, Lippman SM, Wu TT, Xu Y, Liang ZD, Swisher S, Zhang H, Cao L, Ajani JA, Xu XC. 2005. Increased 5-lipoxygenase expression and induction of apoptosis by its inhibitors in esophageal cancer: a potential target for prevention. *Carcinogenesis* 26: 785-791.
  36. Melstrom LG, Bentrem DJ, Salabat MR, Kennedy TJ, Ding XZ, Strouch M, Rao SM, Witt RC, Ternent CA, Talamonti MS, Bell RH, Adrian TA. 2008. Overexpression of 5-lipoxygenase in colon polyps and cancer and the effect of 5-LOX inhibitors *in vitro* and in a murine model. *Clin Cancer Res* 14: 6525-6530.
  37. Ding XZ, Iversen P, Cluck MW, Knezetic JA, Adrian TE. 1999. Lipoxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 218-223.
  38. Manev H, Manev R. 2007. 5-lipoxygenase as a possible biological link between depressive symptoms and atherosclerosis. *Arch Gen Psychiatry* 64: 1333.
  39. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets* 4: 471-479.
  40. Nussler AK, Billiar TR. 1993. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 54: 171-178.
  41. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15: 323-350.
  42. Giurgea N, Constantinescu MI, Stanciu R, Suci S, Muresan A. 2005. Ceruloplasmin-acute-phase reactant or endogenous antioxidant? The case of cardiovascular disease. *Med Sci Monit* 11: RA48-51.
  43. Denko CW. 1979. Protective role of ceruloplasmin in inflammation. *Agents Actions* 9: 333-336.
  44. Fox PL, Mazumder B, Ehrenwald E, Mukhopadhyay CK. 2000. Ceruloplasmin and cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 28: 1735-1744.
  45. Goldstein I, Kaplan HB, Edelson HS, Weissmann G. 1979. A new function for ceruloplasmin as an acute-phase reactant in inflammation: a scavenger of superoxide anion radicals. *Trans Assoc Am Physicians* 92: 360-369.
  46. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. 2005. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* 201: 1089-1099.
  47. George ML, Tutton MG, Janssen F, Arnaoutz A, Abulafi AM, Eccles SA, Swift RI. 2001. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia* 3: 420-427.
  48. Carmeliet P. 2005. VEGF as a key mediator of angiogenesis

- in cancer. *Oncology* 69: 4-10.
49. Mirshahi M, Soria J, Soria C, Faivre R, Lu H, Courtney M, Roitsch C, Tripier D, Caen JP. 1989. Evaluation of the inhibition by heparin and hirudin of coagulation activation during r-tPA-induced thrombolysis. *Blood* 74: 1025-1030.
  50. Demchuk AM, Tanne D, Hill MD, Kasner SE, Hanson S, Grond M, Levine SR. 2001. Predictors of good outcome after intravenous tPA for acute ischemic stroke. *Neurology* 57: 474-480.
  51. Saver JL, Yafeh B. 2007. Confirmation of tPA treatment effect by baseline severity-adjusted end point reanalysis of the NINDS-tPA stroke trials. *Stroke* 38: 414-416.
  52. Tanne D, Gorman MJ, Bates VE, Kasner SE, Scott P, Verro P, Binder JR, Dayno JM, Schultz LR, Levine SR. 2000. Intravenous tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke in patients aged 80 years and older: the tPA stroke survey experience. *Stroke* 31: 370-375.
  53. DiPietro LA, Polverini PJ. 1993. Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor thrombospondin 1. *Am J Pathol* 143: 678-684.
  54. Lawler J. 2000. The functions of thrombospondin-1 and -2. *Curr Opin Cell Biol* 12: 634-640.
  55. Salvesen HB, Akslen LA. 1999. Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Int J Cancer* 84: 538-543.
  56. Majack RA, Goodman LV, Dixit VM. 1998. Cell surface thrombospondin is functionally essential for vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cell Biol* 106: 415-422.
  57. Yamauchi M, Imajoh-Ohmi S, Shibuya M. 2007. Novel antiangiogenic pathway of thrombospondin-1 mediated by suppression of the cell cycle. *Cancer Sci* 98: 1491-1497.
  58. Dang CV, Kim JW, Gao P, Yustein J. 2008. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 51-56.
  59. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. 1999. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59: 5830-5835.
  60. Yeo EJ, Chun YS, Park JW. 2004. New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol* 68: 1061-1069.
  61. Islam SA, Chang DS, Colvin RA, Byrne MH, McCully ML, Moser B, Lira SA, Charo IF, Luster AD. 2011. Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting IL-5<sup>+</sup> T(H)2 cells. *Nat Immunol* 12: 167-177.
  62. Tanegashima K, Okamoto S, Nakayama Y, Taya C, Shitara H, Ishii R, Yonekawa H, Minokoshi Y, Hara T. 2010. CXCL14 deficiency in mice attenuates obesity and inhibits feeding behavior in a novel environment. *PLoS One* 5: e10321.
  63. Magrioti V, Kokotos G. 2013. Phospholipase A2 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases: a patent review (2010-present). *Expert Opin Ther Pat* 23: 333-344.