

활성화된 단핵구 및 대식세포의 항원제시기능에 대한 Kaempferitrin의 조절 효과

김병훈 · 조동하 · 조재열[#]

강원대학교 BT학부대학 생명공학부

(Received October 9, 2007; Revised October 29, 2007)

Modulatory Effect of Kaempferitrin, a 3,7-Diglycosylflavone, on the LPS-Mediated Up-regulation of Surface Co-stimulatory Molecules and CD29-Mediated Cell-cell Adhesion in Monocytic- and Macrophage-like Cells

Byung Hun Kim, Dong Ha Cho and Jae Youl Cho[#]

School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract — Kaempferitrin, isolated from Kenaf (*Hibiscus cannabinus*), was examined to evaluate its modulatory effects on antigen-presenting cell functions of macrophages/monocytes such as phagocytosis of foreign materials, up-regulation of co-stimulatory molecules (CD40, CD80 and CD86), adhesion molecule activation, and antigen processing and presentation. Kaempferitrin strongly blocked up-regulation of CD40, CD80 and CD86, but not pattern recognition receptor (PRR) (e.g., TLR2). It also suppressed functional activation of CD29 (β 1-integrins), as assessed by cell-cell adhesion assay, required for T cell-antigen-presenting cell (APC) interaction. Furthermore, this compound did not block a simple activation of CD29, as assessed by cell-fibronectin adhesion assay. However, the compound did not diminish phagocytic uptake, an initial step for antigen processing, and ROS generation in RAW264.7 cells. In particular, to understand molecular mechanism of kaempferitrin-mediated inhibition, the regulatory role of LPS-induced signaling events was examined using immunoblotting analysis. Interestingly, this compound dose dependently suppressed the phosphorylation of $I\kappa$ B α , Src, Akt and Syk, demonstrating that it can negatively modulate the activation of these signaling enzymes. Therefore, our data suggested that kaempferitrin may be involved in regulating APC function-relevant immune responses of macrophages and monocytes by regulating intracellular signaling.

Keywords □ kaempferitrin, macrophages, monocytes, antigen-presenting cell function, co-stimulatory molecules, adhesion molecules

단핵구 및 대식세포는 내재성 면역반응을 담당하는 대표적인 면역세포다. 이들 세포들은 외부로부터 침입한 세균들에서 유래된 세포구성 성분들이나 체내 다른 면역세포에서 분비한 IFN- γ 와 같은 사이토카인에 의해 활성화되어 종양괴사인자(tumor necrosis factor- α)와 같은 사이토카인이나 일산화질소(nitric oxide)나 활성산소(reactive oxygen species) 등과 같은 독성물질, 그리고 프로스타그란딘류와 같은 염증 매개물질의 분비를 조절한다.¹⁾ 특별히, 이들 세포는 세균이나 암세포 등과 같은 면역유발원을 탐식하고 탐식된 면역원을 펩타이드로 가공하여 주조직

적합성 항원에 공여함으로써, T cell의 분열 및 분화를 촉진시키는 항원제시 세포(Antigen-presenting cell[APC])로서의 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.²⁾ 이때 대식세포 혹은 수지상세포와 T cell간의 세포-세포간 상호작용이 필수적이며 이를 조절하는 단백질은 CD80, CD86 및 CD40와 같은 co-stimulatory molecule들과 β 1- 혹은 β 2-integrins와 같은 adhesion molecule로 알려져 있다.^{3,4)} 이들 단백질의 활성 및 발현은 외부 자극에 반응하는 pattern-recognition receptor(PRR)과 같은 수용체의 매개 및 이들 수용체와 결합된 신호전달 단백질 복합체의 활성화에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 특별히 관련 신호전달 단백질은 non-receptor type tyrosine kinases(Src, Syk 및 JAK2), phosphoinositide-3-kinase(PI3K), Akt(protein kinase B) 및 mitogen-activated protein kinases(MAPK) 등으로 구성되어 있

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 033-250-6562 (팩스) 033-253-6560
(E-mail) jaecho@kangwon.ac.kr

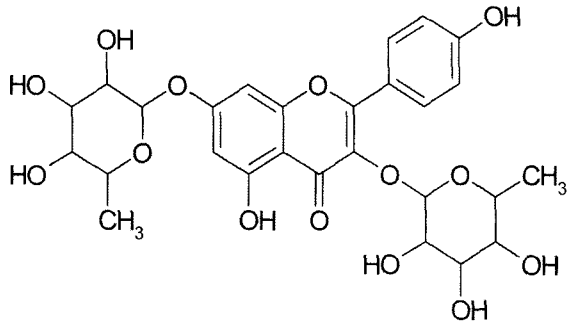


Fig. 1 - Chemical structure of kaempferitrin.

다.⁵⁾ 이들 단백질의 활성화는 최종적으로 NF- κ B 및 AP-1과 같은 transcription factor의 활성화와 밀접한 관련이 있으며, 이들의 활성화는 염증 및 내재성 면역반응 관련 단백질의 발현을 매개하게 된다.^{6,7)}

Kaempferitrin(Fig. 1)은 남부 아시아가 원산지이며, 무궁화속에 속하는 Kenaf(*Hibiscus cannabinus*)에서 추출한 당함유 플라보노이드계 화합물이다.⁸⁾ 현재까지 kaempferitrin에 관한 약리작용은 많이 보고되어 있지 않다. 하지만 renal cellular membrane의 보호작용,⁹⁾ glucose transporter 조절을 통한 항당뇨 작용^{10,11)} 및 항산화 작용,¹²⁾ 염증유발 물질(종양괴사인자 및 일산화질소 등) 분비 억제를 통한 항염증 작용¹³⁾ 등이 kaempferitrin에 의해서 매개되는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 대식세포 및 단핵구에 의해 수행되는 내재성 면역반응에 관한 kaempferitrin의 조절효과를 검증하고자 하였다. 특히 염증반응 이후 진행되는 대식세포 및 단핵구의 항원제시기능(antigen presentation function)에 대한 kaempferitrin의 조절 기능에 초점을 맞춰 연구하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

이 실험에서는 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포와 인간 단핵구 세포주인 U937 세포를 사용하였다. 세포배양을 위한 배양용 배지 RPMI1640 media, fetal bovine serum(FBS) 그리고 항생제(penicillin/streptomycin)는 Hyclone(Hyclone, South Logan, UT, USA)사 제품을 사용하였다. Human fibronectin은 BD Biosciences(San Jose, CA USA)를 사용했고, CD80(MEM-233, purified IgG1), CD86(BU63, purified IgG1), CD29(MEM 101A, IgG1, ascites)과 CD43(161-46, ascites, IgG1)는 각각 V. Horejsi와 R. Vilella로부터 제공받았다. Src, Akt, JAK-2, Syk 및 I κ B α 에 대한 phospho-specific 항체는 Cell Signaling Technologies사 제품을 사용하였다. 그밖에 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 포함한

화학시약은 Sigma 제품(St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

세포배양

RAW 264.7 및 U937 세포들은 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. 배지는 penicillin(100 IU/ml) 및 streptomycin(100 μ g/ml)과 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 사용하였다.

세포 생존율 검정

세포성 면역활성 효과를 검증하기 위한 선행실험으로서, kaempferitrin 농도(0, 12.5, 25, 50, 100 및 200 μ M)별로 세포생존에 미치는 영향을 MTT assay법을 이용하여 분석하였다.¹⁴⁾ 96-well plate에 1×10^6 개의 RAW264.7 세포를 plating하고 kaempferitrin을 농도 별로 처리하였다. 37°C에서 각 면역실험 조건에 상응하는 배양시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 이후 10 μ l MTT 용액(stock concentration: 5 mg/ml)을 첨가하고 3시간 동안 추가반응을 유도하였다. 반응 종료 및 formazan crystal의 용해를 위해 각 well에 100 μ l MTT stopping solution(10% sodium dodecyl sulfate in 0.01 M HCl)을 분주하였다. 세포 생존율은 MTT가 formazan으로 환원된 양을 570 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 OD 값을 통해 산출하였다.

Co-stimulatory molecules의 발현 정량

RAW 264.7 세포(1×10^6 cells/ml)를 12-well plate에 1 ml/well 씩 분주 후 18시간 동안 전배양하였다. 앞의 실험 방법에서와 같이 kaempferitrin 또는 약물(각종 단백질의 억제자)과 LPS를 처리하여 8시간 배양 후, 세포를 회수하여, 96 well round plate에 세포수를 일정하게 분주하였다. 그리고 FACS buffer(2% FBS in PBS)로 세척하였다. 그리고 10% rabbit serum(in PBS)으로 blocking하고, CD80 항체 및 각종 항체를 처리하여 45분간 배양 후 FACS buffer로 세척하였다. 이후, 3.7% formaldehyde로 고정하고 flow cytometry로 형광정도를 측정하였다.

라디칼 소거능 정량

RAW264.7 세포를 penicillin(100 IU/ml) 및 streptomycin (100 μ g/ml)과 10%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용하여서 2×10^6 cells/ml의 농도로 조절한 후, 6 well plate에 1 ml를 분주하고, 5% CO₂ 및 37°C에서 18시간 동안 전배양하였다.¹⁵⁾ 전배양 후 배지를 제거하고, PBS 495 μ l를 분주하였다. 그리고 4배 농도로 조제된 DHR123(최종농도 20 μ M) 250 μ l를 해당 well에 분주 후 10분 배양하였다. 이후, 200배 농도로 조제된 kaempferitrin 5 μ l를 처리 후 30분 배양하고, 4배 농도로 조제된 SNP 250 μ l(최종농도 0.25 mM)를 처리하여 20분 배양하였다. 라디칼 소거 정도는 flow cytometer를 이용하여 측정하였다.

대식세포의 탐식작용 측정

RAW264.7 세포를 2×10^6 cells/well로 조정하여 6-well plate에 분주하고 18시간 동안 전배양하였다. 전배양 후 kaempferitrin을 처리하고 1시간 동안 37°C에서 배양하였다. 그리고 형광으로 표지된 particle FITC-dextran(2 mg/ml)을 세포에 처리하고 빛을 차단하여 30분간 배양하였다. Cold-PBS로 세포를 세척하여 미탐식된 입자를 제거하고 3.7% formaldehyde로 고정 후 flow cytometer로 형광정도를 측정하였다.¹⁵⁾

세포-세포간 유착반응 분석

Kaempferitrin을 각 농도로 조제해 96-well plate에 각각 10 μ l씩 분주하고, U937 세포(1×10^6 cells/ml) 용액을 80 μ l를 처리하여 37°C에서 30분간 배양하였다.¹⁶⁾ 다시 여기에 10 μ l의 항체(CD43 및 CD29 각 1 μ g/ml)를 분주하여 시간 별로 사진을 촬영하였다.

세포-fibronectin간의 유착반응 정량

우선 fibronectin(최종농도 50 μ g/ml)을 96-well plate의 해당 well에 100 μ l를 분주하고, 나머지 well에는 PBS를 분주 후, 4°C에서 18시간 동안 전배양하였다. RPMI1640 배지로 세척 후 2 mg/ml bovine serum albumin으로 blocking시켰다. 다른 plate에 여러 가지 처리 농도로 희석된 kaempferitrin 11 μ l를 분주하고, U937(5.6×10^6 cells/ml) 세포용액을 99 μ l를 처리하여 37°C에서 한 시간 동안 배양하였다. Blocking한 plate를 RPMI1640 배지로 세 번 세척 후, kaempferitrin이 처리된 세포용액 100 μ l을 fibronectin-coated plate로 옮겨 넣고, 4시간 추가 배양을 실시하였다. 세포-fibronectin 간 유착 정도는 0.1% crystal violet 용액을 첨가한 후 15분 동안 반응시키고, 10% acetic acid를 처리한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁵⁾

표적 단백질의 발현량 검토

RAW 264.7 세포(5×10^6 cells/ml)를 6-well plate의 해당 well에 1 ml 분주하고, 배지 3 ml를 더한 후 18시간 동안 전배양하였다. 앞의 실험 방법에서와 같이 kaempferitrin을 30분 전처리하고, LPS를 2분, 30분 처리한 후, 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 lysis buffer(함유조성: 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 2 mM ethyleneglycotetraacetic acid, 50 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM dithiothreitol, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 10 μ g/ml a protinin, 10 μ g/ml pepstatin, 1 mM benzimide, and 2 mM hydrogen peroxide)를 처리하여 total cell lysate를 조제하였다. 동일한 양의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하고, wet-blotting transfer 방법을 이용하여 PVDF membrane으로 단백질을 transfer하였다. Membrane을 5% BSA blocking

buffer에서 반응시킨 후 특정 단백질에 특이한 1차 항체를 상온에서 1시간 반응시켰다. 이 후 2차 항체를 1시간 동안 추가적으로 처리한 후, ECL chemiluminescence로 반응 정도를 확인하였다.

통계처리

각 data는 얻어진 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타낸 것이며, 그룹 간의 통계적 유의성은 SAS package를 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중비교법에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

Kaempferitrin의 세포독성에 미치는 효과

우선 kaempferitrin의 세포독성 효과를 알아보기 위해 최대 200 μ M 농도까지 대식세포 및 단핵구 암세포주에 24시간 동안 처리하였다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이 kaempferitrin은 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포에 아무런 독성효과를 나타내지 않았다. 게다가, 사람의 단핵구인 U937 세포에도 동일 조건에서 전혀 세포독성 효과를 유도하지 않았다(data not shown). 특별히 약리적으로 효능이 강한 플라보노이드 류에서 강한 세포독성이 나타난다는 것과 비교 시,¹⁷⁾ 상대적으로 본 화합물이 우수하고 다양한 면역약리 작용을 보일 경우, 세포독성 측면에서 다른 플라보노이드류 보다 약물학적인 장점을 가질 것으로 판단된다. 따라서 면역약리학적 효능을 조사하기 위해, 활성화된 단핵구 및 대식세포를 이용하여 kaempferitrin의 조절능을 연구하여 보았다.

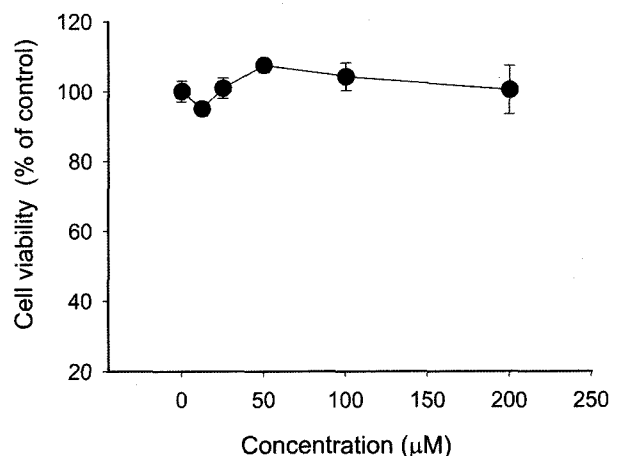


Fig. 2 - Effect of kaempferitrin on the viability of RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with kaempferitrin for 24 h. Cytotoxicity of this drug was determined by conventional MTT assay as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM of three independent observations performed in triplicate.

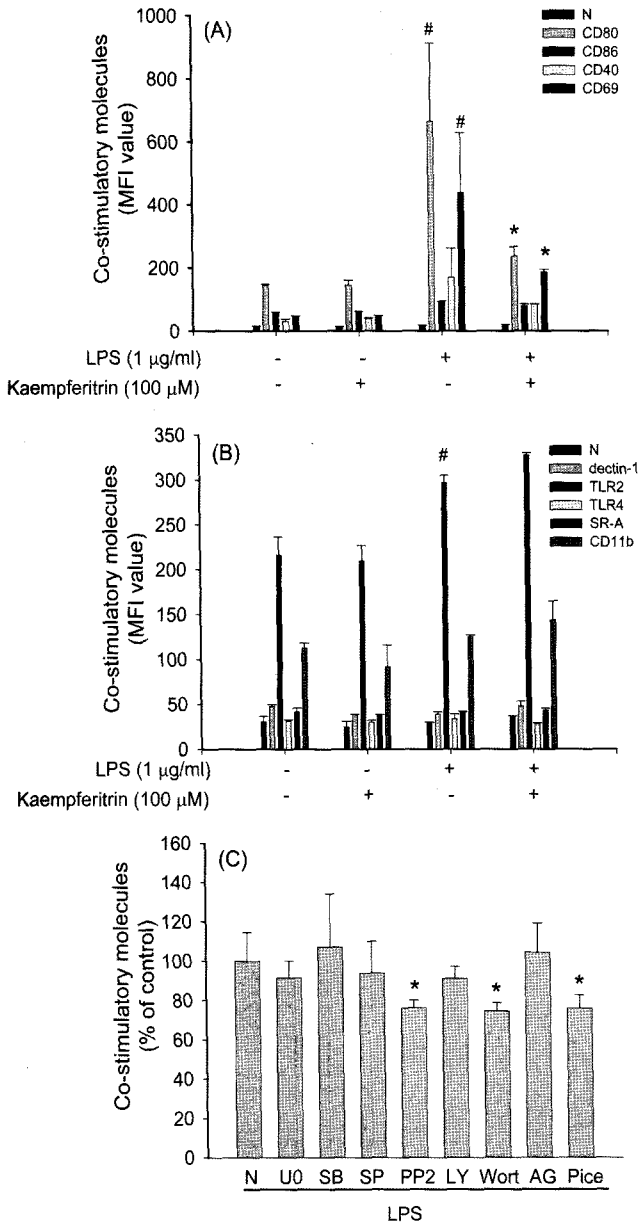


Fig. 3 – Effect of kaempferitrin on the LPS-mediated up-regulation of co-stimulatory molecules. (A and B) RAW264.7 cells (2×10^6 cells/ml) were treated with kaempferitrin in the presence or absence of LPS (1 µg/ml) for 12 h. Surface levels of costimulatory molecules (A) or surface pattern recognition receptors (B) were analysed by flow cytometry, as described in Materials and Methods. (C) RAW264.7 cells (2×10^6 cells/ml) were treated with various inhibitors [U0 (U0126, 40 µM), SB (SB203580, 20 µM), SP (SP600125, 10 µM), PP2 (40 µM), LY (LY294002, 40 µM), Wort (Wortmannin, 20 µM), AG (AG490, 40 µM), Picea (piceatannol, 40 µM)] in the presence or absence of LPS (1 µg/ml) for 12 h. Surface levels of costimulatory molecules were analysed by flow cytometry, as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM of three independent observations performed in triplicate. #: $p < 0.05$ compared to normal group, and *: $p < 0.05$ compared to control group.

Co-stimulatory molecule의 발현에 미치는 Kaempferitrin의 효과

Co-stimulatory molecule(eg. CD40, CD80 및 CD86 등)은 활성화된 대식세포가 T cell의 분열을 촉진시키는 항원제시 세포(Antigen-presenting cell[APC])로서의 역할 수행시 필수적으로 요구되는 세포막 단백질이다.¹⁸⁾ 실제로 LPS를 처리하게 되면 대식세포는 활성화되면서 정상 수준보다 증가된 CD40, CD80 및 CD86의 막표면 발현양태를 보이게 된다(Fig. 3A). 따라서, 본 연구에서는 Kaempferitrin이 LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 높게 발현되는 CD40, CD80, 및 CD86의 세포막단백질의 발현 수준에 미치는 영향을 FACS 실험을 통해 조사하였다. 흥미롭게도, 이들 증가된 CD40, CD80, 및 CD86 발현양은 kaempferitrin 처리시 감소하는 것을 확인할 수가 있었다(Fig. 3A). 게다가 kaempferitrin은 활성화된 대식세포에서 초기에 발현되는 CD69의 상승정도도 억제하는 것으로 나타나 초기 대식세포 활성화 자체를 억제할 가능성이 있는 것으로 판단되었다. 즉, 이는 CD69가 림프구, 단핵구, 혈소판의 초기 활성화시 발현이 증가된다고 보고되었기 때문이다.¹⁹⁾ 그러나 kaempferitrin은 LPS에 의해 증가된 PRR의 하나인 TLR-2의 발현양 증가에는 조절효과를 나타내지 않은 것(Fig. 3B)으로 보아, kaempferitrin의 효과는 co-stimulatory molecule의 발현양 조절에만 관련되어 있는 것으로 판단된다. 한편 가장 발현변화가 큰 CD80을 이용하여 발현 증가시 필수적인 세포내 신호전달 과정을 조사하였다. Fig. 3C에 따르면, 특별히 Src kinase 저해제인 PP2, PI3K/Akt 저해제인 wortmannin, 그리고 Syk 저해제인 piceatannol 처리군에서 CD80의 발현이 유의성 있게 감소된 것으로 나타났다. 이는 LPS 유도에 의해 발현되는 CD80을 포함한 co-stimulatory molecule은 Src, Akt 및 Syk kinase 활성을 필요로 한다고 사료된다. 실제로

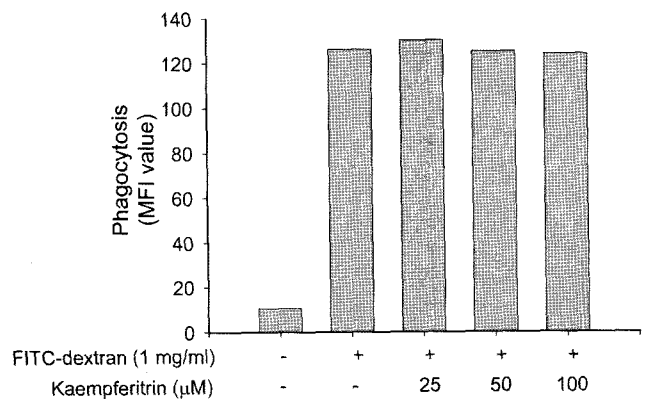


Fig. 4 – Effect of kaempferitrin on the phagocytic uptake of RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (2×10^5 cells/ml), pretreated with kaempferitrin, were stimulated with FITC-dextran (2 mg/ml) for 6 h. The extent of the phagocytic uptake was determined by flow cytometric analysis, as described in Materials and Methods.

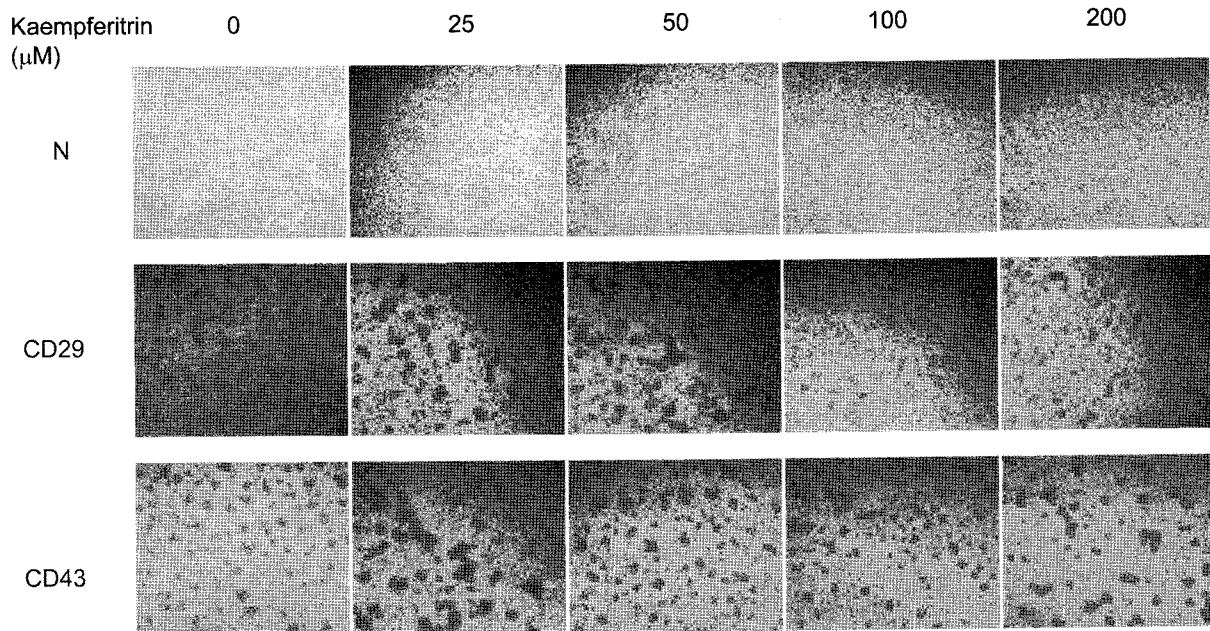


Fig. 5 - Effect of kaempferitrin on CD29-mediated cell-cell adhesion. U937 cells were incubated with kaempferitrin in the presence or absence of pro-aggregative (activating) antibodies [antibodies (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each) to CD29 (MEM 101A) and CD43 (161-46)] for 2 h. The images of the cells in culture were obtained using an inverted phase contrast microscope attached to a video camera.

NF- κB 를 포함한 이들 효소들이 LPS 매개에 의한 대식세포의 pro-inflammatory 단백질 생합성에 중요한 신호전달 매개 단백질로 알려져 있다.²⁰⁾

식세포 작용에 미치는 kaempferitrin의 효과

내재성 면역반응에서 보여지는 중요한 현상이 식세포(대식세포와 호중구) 매개에 의한 식세포 작용으로 알려져 있다.²¹⁾ 특별히 이 과정은 세균들을 제거하기 위한 과정이면서 동시에 APC의 항원가공 및 제시 기능을 위해 필수적인 전단계 이므로 kaempferitrin의 조절작용을 조사하여 보았다. 그러나 Fig. 4에서 확인되었듯이, kaempferitrin은 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 보여지는 FITC-dextran의 식세포작용에 아무런 영향도 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 5).

세포-세포간 및 세포-matrix protein간 유착반응에 미치는 kaempferitrin의 효과

세포-세포간 유착반응은 APC 기능 수행시 보여지는 대표적인 반응중 하나이다. 즉 대식세포 혹은 수지상세포와 T cell간의 상호작용은 T cell의 분열과정 조절시 필수적²²⁾이기 때문이다. 특별히 이들 과정을 조절하는 단백질은 CD18($\beta 2$ -integrins) 및 CD29($\beta 1$ -integrins) 등과 같은 adhesion molecule들로 알려져 있으며, 실제로 이들 단백질의 기능을 선택적으로 저해하는 특이 항체 처리시 APC 기능매개에 의한 T cell 증식과정이 억제된 것으로 보고 되었다.²³⁾ 따라서 APC 기능 수행에 필수적인 co-

stimulatory molecule의 막표면 발현을 매우 효과적으로 억제한 kaempferitrin이 adhesion molecule의 활성조절은 어떤 영향을 나타내는지 조사하고자 하였다.

본 연구자는 adhesion molecule인 CD29의 기능적 활성을 검증하기 위해서 U937 cell 및 CD29 활성 유도 항체를 이용하여, CD29 활성 매개성 세포-세포간 유착 모델을 확립한 바 있다.¹⁶⁾ 이들 모델은 CD29의 기능 매개에 의한 세포간 상호작용을 확인할 수 있는 실험법이므로, 본 연구에서 kaempferitrin의 효과 검증에 적용하여 보았다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이, kaempferitrin은 농도 의존적으로 CD29 기능을 억제한 것으로 나타났다. 즉 kaempferitrin은 100 및 200 μM 에서 강력히 CD29 매개성 세포간 유착현상을 억제하였다. 그러나, CD43 매개에 의한 세포간 유착현상은 억제하지 않았다(Fig. 5). 이는 kaempferitrin에 의한 CD29 기능억제는 단순히 약물 비특이적인 억제가 아닌, adhesion molecule 선택적인 것으로 사료되었다.

특별히 세포간 유착과정은 세포질내 신호전달 과정의 활성 및 이를 통한 막표면 CD29의 활성에서 기인된 유착과정 매개 등으로 구성되어 있다.²⁴⁾ 따라서, kaempferitrin에 의한 세포간 유착과정 억제가 어떤 과정의 간섭에서 기인하는지 확인하기 위해 먼저 CD29 단백질 자체의 활성을 측정할 수 있는 세포-matrix protein(fibronectin)간의 유착실험 모델을 이용하여 연구하였다. 흥미롭게도, kaempferitrin은 U937 세포가 fibronectin에 유착되는 현상을 억제하지 못한 것으로 나타났다(Fig. 6). 즉 본 결과는 kaempferitrin의 세포간 유착현상 억제는 adhesion molecule인

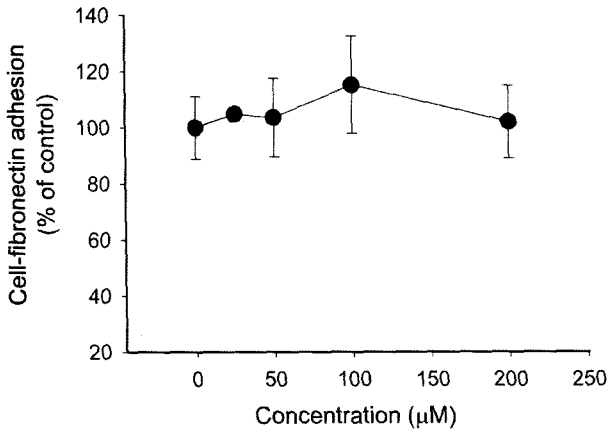


Fig. 6 - Effect of kaempferitrin on cell-fibronectin adhesion. U937 cells (5×10^5 cells/well), pretreated with kaempferitrin, were seeded on fibronectin ($50 \mu\text{g/ml}$)-coated plates and further incubated for 3 hours. The attached cells were determined by crystal violet assay, as described in Materials and Methods.

CD29 자체의 단순한 활성억제에서 기인되는 것보다는 CD29의 활성을 유도하는 세포내 신호전달 과정 억제에 의해 매개되는 것으로 판단된다.

Kaempferitrin의 라디칼 소거능

ROS(reactive oxygen species)는 대개 산소가 필요한 대사과정 중에서 부산물로 생성되는데, 세포의 신호전달에서 중요한 역할을 수행하기도 한다. 그러나 환경적인 스트레스로 인해 ROS가 급격히 증가되면, 라디칼이 발생되어 세포구조에 심각한 손

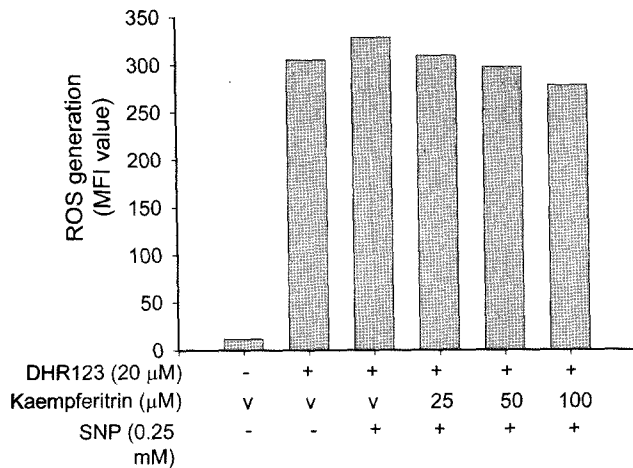


Fig. 7 - Scavenging effect of kaempferitrin on SNP-released radical generation. RAW264.7 cells (2×10^6) were pretreated with kaempferitrin for 30 min and further incubated in the presence of absence of SNP ($250 \mu\text{M}$) for 20 min. The level of radicals was determined by flow cytometric analysis as described in Materials and Methods.

상을 초래하여 세포사멸과 같은 현상을 유도하게 된다.²⁵⁾ 반면에 면역반응에서는 활성산소 유래 라디칼을 이용하여 대식세포나 과립구 등이 몸 안으로 침입한 미생물이나 종양세포를 공격하는 방어용 수단으로 사용한다. 병리적으로는 이들 활성산소종 유래 라디칼이 과량으로 분비될 경우 노화나 암 및 염증질환의 발생과 깊은 관련이 있어 ROS의 라디칼 소거능을 가지는 플라보노이드류 같은 항산화제들은 관련 질환의 치료 효능이 있는 것으로 보고되고 있다.²⁶⁾ 따라서, kaempferitrin이 대식세포내에서 유도되는 라디칼 발생에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. 그러나, Fig. 7에서 보여지듯이, kaempferitrin은 SNP에 의해 유리되는 라디칼을 중화시키지 못하는 것으로 나타났다. 반면에 대조군으로 사용된 토코페롤은 강력하게 라디칼 생성을 억제하는 것으로 나타났다(data not shown).

억제기전 연구

Fig. 3C에서 보여주듯, CD80의 막표면 발현양 증가를 위해서는 Src kinase, PI3K 및 Syk kinase 활성이 요구된다는 것과, Fig. 5 및 6에서 확인되었듯이, kaempferitrin의 세포간 유착과정 억제는 CD29 자체의 단순한 구조적 활성보다는 CD29 활성을 유도하는 세포내 신호전달 과정을 억제할 가능성 등이 있다는 것으로 고려하여, kaempferitrin의 약리작용에 대한 억제 기전을 Western blot을 통해 세포내 신호전달 과정 측면에서 조사하였

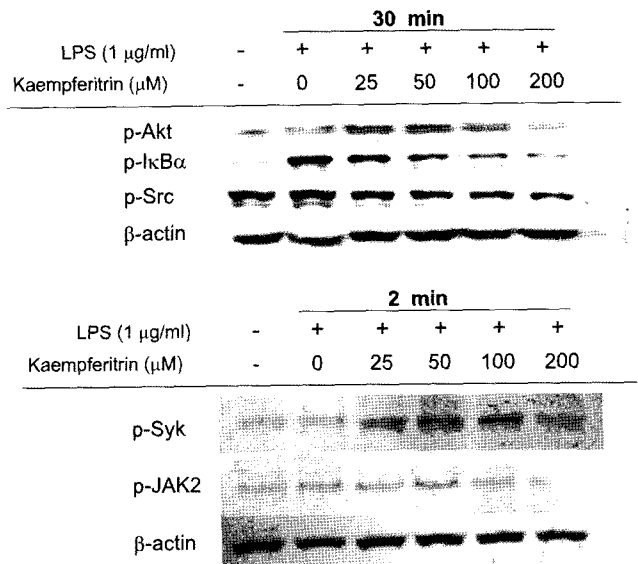


Fig. 8 - Effect of kaempferitrin on LPS-mediated signaling enzyme activation in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (5×10^6 cells/ml) were stimulated with kaempferitrin in the presence or absence of LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 2 and 30 min. After immunoblotting, the total or phospho-protein levels of Src, JAK-2, Akt, Syk, IκBα, and β-actin were identified by their total protein- or phospho-specific antibodies. The results show one experiment out of three.

다. Fig. 8에서 확인되듯이, kaempferitrin은 농도의존적으로 I κ B α 및 Src 인산화 과정을 억제하였다. 또한 200 μ M에서는 Akt 및 Syk kinase의 인산화 과정을 억제한 것으로 나타났다. 이는 LPS 신호전달 과정시 각 신호전달 단백질의 인산화 과정이 이들 단백질의 활성화와 비례한다는 관점에서 볼 때 본 약물은 NF- κ B 및 Src 활성을 강력하게 억제할 것으로 판단되며, 이외에도 Akt 및 Syk 등의 활성화도 고농도에서는 억제하는 것으로 추측된다. 반면에, 25 및 50 μ M 농도에서는 Akt 인산화과정을 증가시킨 것으로 볼 때, 저농도의 kaempferitrin은 인산화 과정을 조절하는 세포내 효소(예를 들면, phosphatase 등) 활성화에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단된다. 또 다른 한편으로, 당을 함유한 구조적 특징은 효과가 매우 우수한 모핵구조인 kaempferin과 달리 세포막 투과성을 저해할 것으로 생각된다. 즉, 이 경우 kaempferitrin은 세포내 보다는 세포막에 존재하는 단백질의 활성화 조절을 통한 세포내 신호전달 과정에 참여할 가능성이 더 클 것으로 사료된다. 이들 가능성은 추가적인 관련 연구를 통해 구체적으로 확인할 예정이다. 그럼에도 불구하고 현재까지의 결과로 볼 때, kaempferitrin에 의한 내재성면역 조절은 활성화된 면역세포들이 갖는 신호전달 현상조절을 통해 매개되는 것으로 판단된다.

결 론

Kenaf(*Hibiscus cannabinus*)에서 추출한 kaempferitrin은 대식세포의 T cell 분열 및 분화 조절시 필수적인 co-stimulatory molecule의 막표면 발현을 억제하였으며, CD29-매개성 세포-세포간 유착현상을 효과적으로 억제하였다. 그러나 본 화합물은 식세포작용, 라디칼 소거능은 매우 미약한 것으로 나타났다. 세포-fibronectin간 유착과정 및 CD80 발현에 대한 kinase 저해제 처리 효과 등의 결과를 고려해 볼 때, kaempferitrin의 면역억제 작용은 세포 표면 단백질의 활성화억제 보다는 NF- κ B, Src, Akt 및 Syk를 포함하는 신호전달 과정 억제를 통해 진행되는 것으로 사료된다. 향후 보다 자세한 신호전달 억제 기전에 관한 추가연구를 진행하고자 한다.

감사의 글

표준 kaempferitrin을 제공해주신 강원대학교 약학대학 권용수 박사 및 농업생명과학대학 김명조 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

1) Tetley, T. D. : Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Drug. Targets. Inflamm. Allergy* **4**, 607 (2005).

- 2) Edwards, J. P., Zhang, X., Frauwirth, K. A. and Mosser, D. M. : Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 1298 (2006).
- 3) Murtaugh, M. P. and Foss, D. L. : Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **87**, 109 (2002).
- 4) Caulfield, J. J., Fernandez, M. H., Sousa, A. R., Lane, S. J., Lee, T. H. and Hawrylowicz, C. M. : Regulation of major histocompatibility complex class II antigens on human alveolar macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the presence of glucocorticoids. *Immunology* **98**, 104 (1999).
- 5) Fang, H., Pengal, R. A., Cao, X., Ganesan, L. P., Wewers, M. D., Marsh, C. B. and Tridandapani, S. : Lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory response is regulated by SHIP. *J. Immunol.* **173**, 360 (2004).
- 6) Chen, F. and Shi, X. : NF-kappaB, a pivotal transcription factor in silica-induced diseases. *Mol. Cell. Biochem.* **234-235**, 169 (2002).
- 7) Dijkstra, G., Moshage, H. and Jansen, P. L. : Blockade of NF-kappaB activation and donation of nitric oxide: new treatment options in inflammatory bowel disease? *Scand J. Gastroenterol. Suppl.* **37** (2002).
- 8) Uргаonkar, S. and Shaw, J. T. : Synthesis of kaempferitrin. *J. Org. Chem.* **72**, 4582 (2007).
- 9) Yokozawa, T., Dong, E., Kawai, Y., Gemba, M. and Shimizu, M. : Protective effects of some flavonoids on the renal cellular membrane. *Exp. Toxicol. Pathol.* **51**, 9 (1999).
- 10) Jorge, A. P., Horst, H., de Sousa, E., Pizzolatti, M. G. and Silva, F. R. : Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on 14C-glucose uptake in rat soleus muscle. *Chem. Biol. Interact.* **149**, 89 (2004).
- 11) de Sousa, E., Zanatta, L., Seifriz, I., Creczynski-Pasa, T. B., Pizzolatti, M. G., Szpoganicz, B. and Silva, F. R. : Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(alpha)-dirhamnoside from Bauhinia forficata leaves. *J. Nat. Prod.* **67**, 829 (2004).
- 12) da Silva, K. L., Biavatti, M. W., Leite, S. N., Yunes, R. A., Delle Monache, F. and Cechinel Filho, V. : Phytochemical and pharmacognosic investigation of Bauhinia forficata Link (Leguminosae). *Z Naturforsch [C]* **55**, 478 (2000).
- 13) Fang, S. H., Rao, Y. K. and Tzeng, Y. M. : Inhibitory effects of flavonol glycosides from Cinnamomum osmophloeum on inflammatory mediators in LPS/IFN-gamma-activated murine macrophages. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 2381 (2005).
- 14) Cho, J. Y., Baik, K. U., Jung, J. H. and Park, M. H. : *In vitro* anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from Saussurea lappa. *Eur. J. Pharmacol.* **398**, 399 (2000).
- 15) Lee, Y. G., Byeon, S. E., Kim, J. Y., Lee, J. Y., Rhee, M. H.,

- Hong, S., Wu, J. C., Lee, H. S., Kim, M. J., Cho, D. H. and Cho, J. Y. : Immunomodulatory effect of Hibiscus cannabinus extract on macrophage functions. *J. Ethnopharmacol.* **113**, 62 (2007).
- 16) Cho, J. Y., Fox, D. A., Horejsi, V., Sagawa, K., Skubitz, K. M., Katz, D. R. and Chain, B. : The functional interactions between CD98, beta1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation. *Blood* **98**, 374 (2001).
- 17) Kim, A. R., Cho, J. Y., Zou, Y., Choi, J. S. and Chung, H. Y. : Flavonoids differentially modulate nitric oxide production pathways in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells. *Arch. Pharm. Res.* **28**, 297 (2005).
- 18) Burastero, S. E. and Rossi, G. A. : Immunomodulation by interference with co-stimulatory molecules: therapeutic perspectives in asthma. *Thorax* **54**, 554 (1999).
- 19) Marzio, R., Mauel, J. and Betz-Corradin, S. : CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **21**, 565 (1999).
- 20) Kang, J. L., Lee, H. W., Kim, H. J., Lee, H. S., Castranova, V., Lim, C. M. and Koh, Y. : Inhibition of SRC tyrosine kinases suppresses activation of nuclear factor-kappaB, and serine and tyrosine phosphorylation of IkappaB-alpha in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health A* **68**, 1643 (2005).
- 21) Savina, A. and Amigorena, S. : Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.* **219**, 143 (2007).
- 22) Stonehouse, T. J., Woodhead, V. E., Herridge, P. S., Ashrafian, H., George, M., Chain, B. M. and Katz, D. R. : Molecular characterization of U937-dependent T-cell co-stimulation. *Immunology* **96**, 35 (1999).
- 23) Woodhead, V. E., Stonehouse, T. J., Binks, M. H., Speidel, K., Fox, D. A., Gaya, A., Hardie, D., Henniker, A. J., Horejsi, V., Sagawa, K., Skubitz, K. M., Taskov, H., Todd, R. F., 3rd, van Agthoven, A., Katz, D. R. and Chain, B. M. : Novel molecular mechanisms of dendritic cell-induced T cell activation. *Int. Immunol.* **12**, 1051 (2000).
- 24) Longhurst, C. M. and Jennings, L. K. : Integrin-mediated signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 514 (1998).
- 25) Migliaccio, E., Giorgio, M. and Pelicci, P. G. : Apoptosis and aging: role of p66Shc redox protein. *Antioxid. Redox. Signal.* **8**, 600 (2006).
- 26) Katiyar, S. K., Matsui, M. S., Elmets, C. A. and Mukhtar, H. : Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochem. Photobiol.* **69**, 148 (1999).