

# PMA에 의해 유도된 Egr-1, NF-κB 및 COX-2의 활성화에 미치는 지금초 추출물의 영향

김태환 · 김성윤<sup>1</sup> · 박상은 · 김원일 · 박동일 · 김기영<sup>2</sup> · 김남득<sup>3</sup> · 홍상훈 · 최영현<sup>1\*</sup>

동의대학교 한의과대학 내과학교실, 1: 생화학교실 및 대학원 바이오물질제어학과, 2: 제주대학교 해양과학대학,  
3: 부산대학교 약학대학 약학과

## *Euphorbiae Humifusae* Inhibits Egr-1, NF-κB and COX-2 Activity Stimulated by Phorbol 12-myristate-13-acetate

Tae Hwan Kim, Cheng Yun Jin<sup>1</sup>, Sang Eun Park, Won Il Kim, Dong Il Park, Gi Young Kim<sup>2</sup>,  
Nam Deuk Kim<sup>3</sup>, Sang Hoon Hong, Yung Hyun Choi<sup>1\*</sup>

Departments of Internal Medicine, Dongeui University College of Oriental Medicine,  
1: Department of Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine · Department of Biomaterial Control, Dongeui University  
Graduate School, 2: Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University,  
3: Division of Pharmacy and Research Institute for Drug Development, Pusan National University

Pro-inflammatory mediators, such as prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), nitric oxide (NO), and cyclooxygenases-2 (COX-2), play pivotal roles in normal as well as transformed cells. Previous studies have shown that *Euphorbiae humifusae* Wind exhibits anti-proliferative and antioxidant activities. However, the it's anti-inflammatory properties are unclear. In this study, we examine the effects of water extract of *E. humifusae* (WEEH) on the expression of COX-2 and the production of PGE<sub>2</sub> in human lymphatic U937 cells. Treatment of phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) significantly induced COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> production in U937 cells. However, pretreatment WEEH markedly inhibited the PMA-induced COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> production in a dose-dependent manner. Moreover, WEEH prevented the elevated early growth response gene-1 (Egr-1) expression and nuclear factor-kappaB (NF-κB p65) nuclear translocation stimulated by PMA treatment. Taken together, the present data indicate that WEEH exhibits anti-inflammatory properties by suppressing the transcription of pro-inflammatory cytokine genes through the NF-κB and Egr-1 signaling pathway.

Key words : *Euphorbiae humifusae*, cyclooxygenases-2, prostaglandin E2

### 서 론

지금초(地錦草, *Euphorbia humifusae* Wind)는 대극과(大戟, *E. pekinensis*)에 속하는 한해살이 식물로서 비단풀 또는 지면(地綿), 초혈갈(草血竭), 혈견수(血見愁), 오공초(蜈蚣草), 선도초(仙挑草) 등으로도 불린다. 지금초는 민간요법에서 항암작용과 해독 작용, 항균작용, 진정작용 등이 뛰어나 다양한 질병의 치료와 예방에 사용되어져 왔으며, 최근 연구에 의하면 지금초 추출물에는 플라보노이드, 사포닌, 타닌, 메틸에스테르, 마콜라톨, 시토스테놀, 알칼로이드 등이 주성분을 이루고 있는 것으로 알려져 있다

\* 교신저자 : 최영현, 부산시 진구 양정2동 동의대학교 한의과대학 내과학교실

· E-mail : choiyh@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-7413

· 접수 : 2008/02/05 · 채택 : 2008/04/01

<sup>1)</sup> 본초도감에 의하면 지금초의 기미는 쓰고, 시며, 성질은 평하고 독성은 없으며, 웅종과 악창, 갈에 배인 상처와 타박상으로 인한 출혈, 피가 섞여 나오는 설사, 하열 및 여러 부인병을 치료에 사용한다고 기술되어 있으나, 현재까지 이들의 효능에 관한 구체적인 실험적 근거는 아직 제시된 바가 없다.

염증을 포함한 다양한 생체 반응에서 prostaglandin은 세포의 분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀지고 있다<sup>2)</sup>. Prostaglandin의 합성에서 2가지의 cyclooxygenase (COX) isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하며, COX-2는 암을 포함한 세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다<sup>2,3)</sup>. 역학적 조

사와 여러 종류의 암 조직에서 COX-2와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 높은 수준으로 발현되고 있으며 이들 두 유전자의 발현을 증대시킬 경우 apoptosis에 대한 저항성을 가지는 점으로 보아 특히 염증반응과 함께 세포의 암화에 COX-2는 iNOS와 밀접한 관계를 가진다고 볼 수 있다<sup>2,4</sup>). 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 COX-2 특이적 저해제에 의한 angiogenesis와 종양형성의 억제 등의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방전략이 대두되고 있다<sup>5,6</sup>).

한편 암 뿐만 아니라 면역계 질환, 심혈관 질환, 당뇨 등과 관련된 유전자의 promoter 영역에 결합하여 그들의 유전자발현을 유도하는 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B p65)에 의하여 COX-2 발현이 조절된다는 보고들에서도 COX-2의 중요성을 잘 알 수 있다<sup>4,6</sup>). 뿐만 아니라 early growth response gene 1 (Egr-1)에 의해서도 다양한 염증매개 물질들이 조절되고 있다는 결론이 최근 많은 연구자들에 의하여 증명되고 있다<sup>7-9</sup>). 이러한 COX-2의 최근 연구 방향은 전사활성 요소와 연관된 상위 신호 전달 경로에 많은 관심이 모아지고 있으며 이들의 활성을 조절할 수 있는 물질의 탐색작업에 많은 비중을 두고 있다.

그러나 이러한 전사활성요소와 연관된 염증매개물질들에 대한 대다수의 연구는 인체의 정상적인 세포에서 많이 연구가 이루어지고 있을 뿐 암세포에서의 그 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않고 있다. 최근 들어 다양한 인체 세포에서 염증매개물질에 의하여 유도되는 COX-2의 발현억제에 관한 연구가 많이 시도됨으로써 암세포를 포함한 비정상적인 세포에서의 염증매개물질들의 기전을 정확히 밝히고자 하는데 비중이 가해지고 있다<sup>10-14</sup>).

이러한 보고를 바탕으로 본 연구에서는 인체혈구암 세포인 U937 세포를 이용하여 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)에 의한 염증매개인자들의 발현과 조절기전에 대하여 조사하고자 하였다. 이러한 시도를 하고자하는 이유는 최근 몇 년간 PMA가 인체정상세포와 암세포에서 염증매개물질인 COX-2, iNOS와 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)의 발현에 관여한다는 연구결과가 밝혀지고 있지만<sup>15-20</sup> 염증매개물질에 대한 발현과정은 아직 잘 알려진 바 없으며 더욱이 지금초와 같은 한약재를 대상으로 시행한 연구는 거의 알려진 바가 없기 때문이다.

따라서 지금초 열수 추출물(water extract of *E. humifusae*, WEEH)의 항염증 효과의 생화학적 기전의 해석을 좀 더 명확히 조사하기 위하여 WEEH 추출물이 COX-2 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 인체 혈구 U937 세포에서 PMA에 의한 COX-2의 발현에 미치는 WEEH의 영향을 조사하였으며, PMA가 COX-2의 발현과정에 관여하는 전사조절 인자 및 이들의 발현에 대한 WEEH의 영향들을 조사하여 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양

본 실험에 사용된 인체 혈구세포인 U937은 한국생명공학원

구소에서 분주 받았으며, 10% fetal bovine serum (FBS)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다.

### 2. 시료의 준비 및 처리

본 실험에 사용된 지금초는 동의대학교 한의과대학 부속 한방병원에서 구입하였으며 WEEH를 얻기 위하여 100 g의 지금초를 1,000 ml의 증류수에 3시간 이상 끓인 후, 3,000 rpm으로 20분간 원심 분리시켜 침전물을 제거하였다. 이를 다시 0.45  $\mu$ m의 여과지를 이용하여 부유 성분을 걸러낸 후 수용성분을 동결 건조하여 사용하였다. WEEH와 PMA의 단독 혹은 혼합 처리를 위하여 U937 세포를 세포배양용 페트리 접시에  $5 \times 10^4$ 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시켰다. WEEH는 세포에 처리하기 직전 적정 농도로 성장배지에 첨가하여 녹인 다음, 0.22  $\mu$ m의 pore size를 가진 주사기용 필터 유닛을 사용하거나 1회용 펌프 필터 유닛을 사용하여 미생물 및 불순물을 걸러낸 다음, 세포의 성장배지를 갈아주면서 직접 처리하였다.

### 3. MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

세포배양용 96 well plate에  $5 \times 10^4$ 개/ml로 희석한 U937 세포를 함유한 배지를 100  $\mu$ l/well로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 WEEH를 배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200  $\mu$ l씩 분주하고 3시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 100  $\mu$ l씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램 (SPSS Ins.)으로 구하였다.

### 4. 위상차 현미경을 이용한 세포의 성장과 형태의 관찰

세포 배양용 100 mm petri dishes에 세포를  $5 \times 10^4$ 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 WEEH 및 PMA를 단독 혹은 혼합 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 도립 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 세포 형태의 변화를 관찰하였다.

### 5. DAPI staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

동일 조건에서 배양된 U937 세포 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 준비된 세포를 모은 다음 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1 : 9의 비율로 섞은 fixing solution을 이용하여 상온에서 10분 동안 고정하였다. 이를 1,000 rpm에서 5분간 cytospin을 이용하여 slide glass 위에 부착시킨 후 0.2%의 Triton X-100 (Amresco)을 첨가하여 상온에서 10분간 고정하였다. 그 후 다시 PBS로 수세하고 4',6-diamidino-2- phenylindole (DAPI, Sigma)

용액을 세포가 고정된 slide glass 위에 적당량을 떨어뜨린 후 빛을 차단하고 상온에서 염색시켰다. 15분 정도 염색시킨 후, PBS로 DAPI 용액을 충분히 세척하고 증류수로 재빨리 세척한 다음 absolute alcohol을 이용하여 탈수과정을 거친 slide glass 위에 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경(fluorescent microscope, Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 세포 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

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

PGE<sub>2</sub> 생성량의 변화 측정을 위한 PGE<sub>2</sub> EIA kit는 Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였으며, PGE<sub>2</sub>의 양을 측정하기 위하여 정상 및 다양한 농도의 WEEH를 1시간 선처리 후 PMA (40 nM)를 처리한 배지에서 6시간 동안 U937 세포를 배양시킨 다음 상층액만 이용하여 제시된 방법에 따라 처리한 다음 ELISA reader를 이용하여 420 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

#### 7. Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

준비된 세포들에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 14,000 pm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다(세포질과 핵내 단백질 추출은 cytosolic lysis buffer 혹은 핵내 lysis buffer를 이용하여 제시된 방법에 따라 단백질 추출).

단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 5% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 1시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분정도 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp, Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp.에서 구입하였다.

## 결과 및 고찰

1. U937 세포의 증식 및 형태에 미치는 PMA와 WEEH의 영향  
실험 조건의 설정을 위하여 준비된 PMA와 WEEH 시료를 U937 세포에 24시간 동안 처리한 후, MTT assay법에 준하여 PMA와 WEEH 처리에 의한 세포증식 변화 여부를 조사하였다. 실험방법에 서술한 것처럼 WEEH 추출물과 PMA가 처리된 U937 세포를 대상으로 ELISA reader를 이용하여 얻은 MTT assay 흡광도 결과는 Fig. 1A와 같다. Fig. 1A에서 알 수 있듯이 PMA (40 nM) 혹은 WEEH 처리 농도 (25-100 ng/ml)의 증가에도 불구하고 흡광도는 큰 변화가 없었다. 즉 40 nM의 PMA 혹은 WEEH의 추출물을 100 ng/ml까지 단독 혹은 혼합 처리했을 때 U937 세포의 증식에는 아무런 영향이 없음을 확인할 수 있었다. PMA와 WEEH 처리에 따른 U937 세포의 전체적인 형태 변화를 알아보기 위하여 PMA와 WEEH를 단독 혹은 함께 처리하여 24시간 동안 배양한 후 도립 현미경을 이용하여 세포의 형태를 관찰하였다. Fig. 1B에서 나타난 바와 같이 U937 세포는 PMA와 WEEH 추출물을 단독 혹은 같이 처리했을 때 세포의 밀도 변화나 세포독성에 의한 세포사멸의 지표로 확인될 수 있는 다양한 형태적 변화도 동반되지 않았다. 뿐만 아니라 Fig. 1C의 U937 세포 핵 모양에 대한 DAPI 염색법에 의한 조사 결과에서도 마찬가지로 위의 결과와 부합되었음을 알 수 있었다. 따라서 본 실험의 조건에서 U937 세포에 PMA (40 nM)와 WEEH (25-100 ng/ml)를 단독 혹은 같이 처리하여도 형태적 변화와 밀도의 감소에 따른 생존율 감소와 증식에는 아무런 영향이 없음을 알 수 있었다.

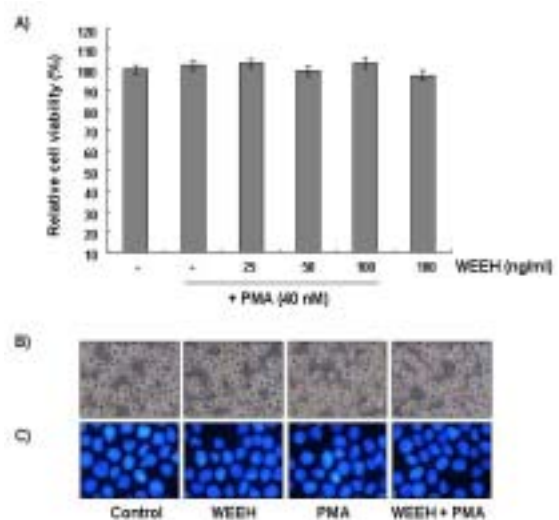


Fig. 1. Effect of the water extract of *E. humifusae* (WEEH) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on the cell proliferation and morphology of U937 cells. (A) U937 cells were seeded as described in materials and methods, and treated with various concentrations of WEEH and 40 nM PMA. After 24 h incubation with WEEH and PMA, MTT assay was performed. Results are expressed as average from three separate experiments. (B) The cells were seeded and treated with 100 ng/ml WEEH, 10 nM PMA or WEEH + TRAIL for 24 h. Cell morphology was visualized by inverted microscope. Magnification, X200. (C) The cells were stained with DAPI solution. Stained nuclei were then observed under fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

2. iNOS 및 COXs의 발현에 미치는 PMA의 영향

U937 세포에서 PMA에 의한 COX-2의 과발현 현상을 관찰하기 위하여 정상 및 PMA가 농도별 혹은 시간별로 처리된 배지에서 자란 세포들을 모아서 Western blotting을 실시하였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 PMA를 농도별로 6시간 처리했을 때 처리되지 않은 세포의 경우 COX-2의 발현이 매우 적은 반면 PMA가 처리된 배지에서 자란 U937 세포에는 COX-2 단백질의 발현이 강하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었으나, iNOS 또는 COX-1의 발현에는 큰 변화가 없었다. Fig. 2A의 결과를 바탕으로 PMA 농도를 40 nM로 고정하고 처리 시간의 증가에 따라서 COX-2의 발현변화에 대하여 조사해 본 결과, Fig. 2B에서 나타난 바와 같이 iNOS나 COX-1의 발현은 PMA 처리 시간의 증가에 의해서도 큰 변화가 없었으나, COX-2의 발현은 4시간째부터 시작하여 6시간째까지 지속적인 증가를 관찰할 수 있었다. 이로 부터 U937 세포에 PMA를 처리했을 때 염증발현조절에 큰 작용을 하고 COX-2가 현저하게 증가됨을 확인 할 수 있는 반면 iNOS 혹은 COX-1의 발현은 큰 변화가 없었으며, 이는 U937 세포의 증식과는 아무런 연관성이 없었다.

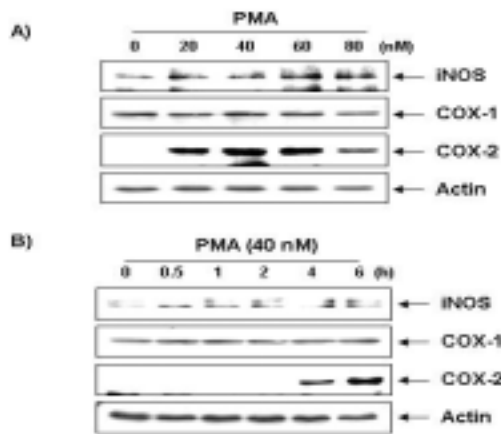


Fig. 2. Effects of PMA treatment on the levels of iNOS and COXs protein expression in U937 cells. Cells were incubated with various concentrations PMA for 6 h (A), or incubated with 40 nM PMA for indicated times (B). The cells were lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

3. PMA에 의한 COX-2의 발현 및 PGE<sub>2</sub> 생성 증가에 미치는 WEEH의 영향

대부분의 세포에서 COX-2 발현 변화는 다양한 질병을 일으키는 요인이 되는 것으로 밝혀지면서 이러한 염증매개인자의 억제에 관한 연구가 많이 진행되고 있다<sup>21-23</sup>. 따라서 PMA에 의한 COX-2의 과발현 현상에 대한 WEEH의 영향을 조사하기 위하여 WEEH를 농도별로 1시간 전 처리 한 후 및 PMA가 처리된 배지에서 자란 세포들을 모아서 Western blotting을 실시하였다. Fig. 3A에 나타난 바와 같이 Fig. 2의 결과와 마찬가지로 iNOS 또는 COX-1의 발현은 PMA 단독처리 시 변화가 없었으며 WEEH와 함께 처리했을 때에도 큰 변화가 없었다(iNOS의 약간의 변화가

관찰되었으나 유의적이지는 않은 것 같음). 반면 PMA에 의하여 과발현된 COX-2의 단백질 발현은 WEEH의 선 처리에 의하여 현저하게 감소하였으며, WEEH 농도 의존적으로 COX-2의 단백질 발현을 억제하였음을 알 수 있었다(Fig. 3A). 최근의 많은 연구결과 보고에 의하면 정상세포뿐만 아니라 암세포와 같은 형질 전환된 세포에서도 PMA가 전사조절인자들의 발현을 통한 PGE<sub>2</sub> 발현을 현저하게 증가시킴으로써 염증 및 관련된 다양한 질환을 일으키는 것으로 보고되고 있다<sup>24-26</sup>. 따라서 PMA가 처리된 U937 세포를 대상으로 WEEH의 PGE<sub>2</sub>의 생성 변화 가능성을 조사하였다. Fig. 3B의 결과에서 알 수 있듯이 PMA 단독 처리에 의하여 PGE<sub>2</sub>의 생성이 현저하게 증가되었으나, WEEH와의 혼합 처리에 의하여 WEEH 농도 의존적으로 유의적인 감소 현상을 관찰할 수 있었으며, WEEH 단독처리는 PGE<sub>2</sub> 생성에 큰 영향이 없음을 알 수 있었다. 이러한 PMA 처리에 따른 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제에 미치는 WEEH의 효능은 COX-2의 발현 억제에 미치는 WEEH의 경향성과 유사하여 WEEH 처리에 의한 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제는 COX-2 발현 억제와 상관성이 있음을 알 수 있었다.

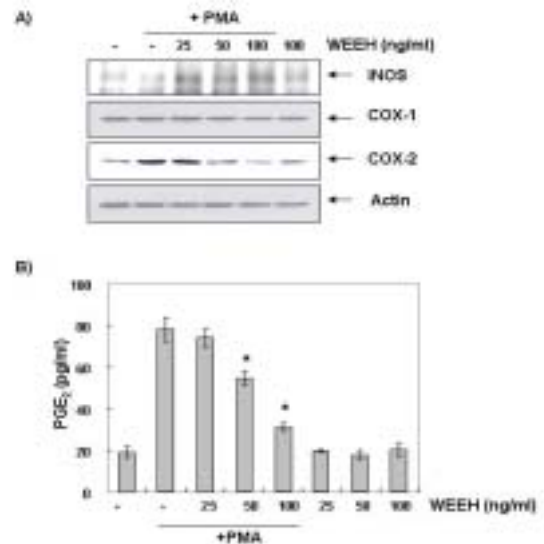
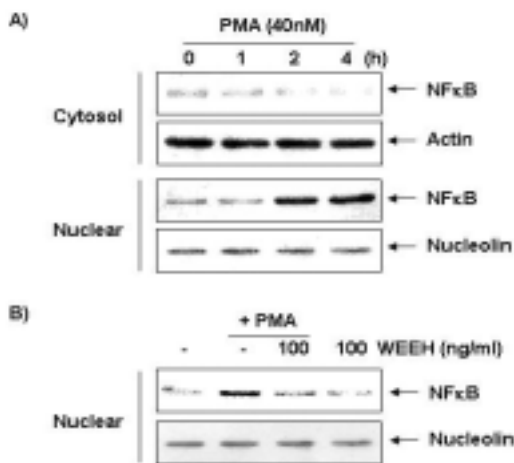


Fig. 3. Effects of WEEH on the PMA-induced COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> production in U937 cells. (A) The cells were pretreated with various concentrations (25, 50 and 100 ng/ml) of WEEH for 1 h followed by incubation with PMA (40 nM) for 6 h and collected. The cells were lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-iNOS, COX-1 and COX-2 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control. (B) The cells were pretreated with various concentrations (25, 50 and 100 ng/ml) of WEEH for 1 h followed by incubation with PMA (40 nM) for 6 h, then the medium was collected, and the release of PGE<sub>2</sub> was measured as described in materials and methods. The significance was determined using Student's t-test (\*p < 0.05 vs. untreated control).

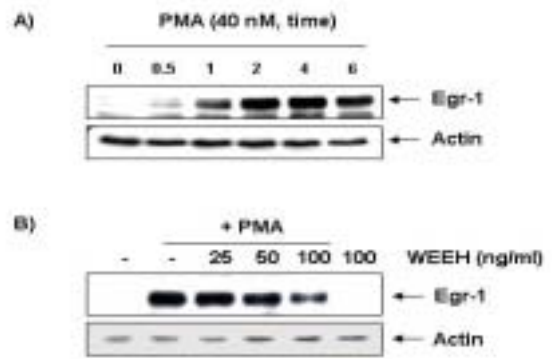
4. PMA에 의한 NF-κB 및 Egr-1 발현 증가에 미치는 WEEH의 영향

최근 COX-2의 발현이 몇 가지 중요한 전사조절인자들의 활성과 밀접한 연관성이 있다는 연구결과들이 다양한 실험 방법들에 의하여 밝혀지고 있다. 특히 최근 연구결과 보고에 의하면 다양한 조건에서 COX-2의 발현 조절에 NF-κB 전사조절인자의 연

관성이 밝혀지고 있으며<sup>27,28)</sup>, Egr-1 역시 다양한 염증매개 산물들의 발현에 중요한 역할을 하고 있음이 알려지고 있다<sup>7)</sup>. 즉 COX-2의 최근 연구 방향은 이러한 전사활성 요소와 연관된 상위 신호전달 경로에 많은 관심이 모아지고 있으며 이들의 활성을 조절할 수 있는 물질의 탐색작업에 많은 비중을 두고 있다. 따라서 본 연구에서는 WEEH가 처리된 U937 세포를 대상으로 NF- $\kappa$ B와 Egr-1 발현 변화 가능성에 대하여 조사해보았다. Fig. 4A에 나타난 바와 같이 NF- $\kappa$ B 전사인자 단백질은 PMA 처리에 의하여 2-4시간 전후에 세포질로부터 핵 속으로 이동하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 WEEH 처리에 의하여 현저하게 억제되는 것을 확인할 수가 있었다(Fig. 4B). 뿐만 아니라 Fig. 5A에서 나타난 바와 같이 Egr-1 단백질 발현은 PMA 처리 시간 의존적으로 현저하게 증가하였음을 확인하였으나 이는 WEEH 처리 농도 의존적인 선 처리에 의하여 현저하게 감소되었음을 알 수 있었다(Fig. 5B). 이상의 연구 결과에 의하면 본 실험의 조건에서는 WEEH와 PMA의 처리에 의하여 U937 세포의 증식에 큰 영향을 미치지 않았으나, 동일 조건에서 PMA에 의한 COX-2 단백질의 과발현은 WEEH 농도 의존적인 선 처리에 의하여 현저하게 억제된다는 것을 확인할 수가 있었다. 또한 WEEH의 이러한 COX-2 발현 억제과정은 NF- $\kappa$ B의 핵 속으로의 전이와 Egr-1 단백질의 발현 억제와 연관성이 있음을 알 수 있었으나 염증매개 신호전달 인자로 알려진 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 및 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로와는 연관성이 없는 것으로 나타났다(data not shown). 특히 COX-2의 선택적 저해효과는 WEEH가 U937 세포에서 뿐만 아니라 기타 다양한 세포의 항염증작용 및 면역증진효과도 매우 높을 것으로 추측되어지므로, 본 연구 결과는 지금초의 생화학적 항염증기전 해석을 위한 이해와 향후 지속적인 연구를 위한 귀중한 자료가 될 것으로 생각된다.



**Fig. 4.** Effects of WEEH on the PMA-induced NF- $\kappa$ B translocation in U937 cells. (A) The cells were treated with PMA (40 nM) for 0, 1, 2 and 4 h. Each time, cytosolic and nuclear proteins were prepared and immunodetected with the indicated antibodies. (B) U937 cells were pretreated with WEEH (100 ng/ml) for 1 h followed by incubation of PMA (40 nM) for 2 h. The nuclear levels of p65 NF- $\kappa$ B were determined by Western blotting using the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.



**Fig. 5.** Effects of WEEH on the PMA-induced Egr-1 protein expression in U937 cells. (A) The cells were treated with PMA (40 nM) for the indicated times. Each time, total proteins were prepared and immunodetected with anti-Egr-1 antibody. (B) The cells were pretreated with various concentrations (25, 50 and 100 ng/ml) of WEEH for 1 h followed by incubation of PMA (40 nM) for 6 h, and the levels of Egr-1 protein were determined by Western blotting anti-Egr-1 antibody. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

## 결론

염증유발인자로서 COX-2와 PGE2는 정상세포뿐만 아니라 형질전환된 세포의 증식 조절에서도 매우 중요한 역할을 한다. 선행연구에 의하면 지금초는 암세포와 같은 비정상세포의 증식 억제 및 항산화 작용 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있으나, 항염증기전에 대한 구체적인 자료는 제시된 바 없다. 본 연구에서는 지금초 열수 추출물(WEEH)의 항염증 작용에 대한 효능을 COX-2의 발현 조절에 중점을 두어 인체혈구 U937 세포를 대상으로 조사하였다. PMA가 처리된 U937 세포에서 COX-2의 발현 증가에 따른 PGE2의 생성이 증가되었으나, COX-1 및 iNOS의 발현에는 큰 변화가 없었다. 그러나 WEEH의 선 처리에 의하여 PMA에 의하여 유도된 COX-2의 발현이 거의 완벽하게 차단되었으며, 그에 따른 PGE2의 생성도 WEEH 처리 농도 의존적으로 감소되었다. 아울러 WEEH는 PMA에 의한 Egr-1의 발현 증가 및 NF- $\kappa$ B의 세포질에서 핵 내로의 이동의 억제하였다. 이는 WEEH가 PMA에 의한 Egr-1 및 NF- $\kappa$ B 활성을 통한 COX-2의 발현 증가 및 PGE2의 생성을 효과적으로 억제함으로써 항염증 효능을 억제할 수 있음을 의미하는 결과이다.

## 감사의 글

자자 중 김성운은 2006년 2단계 두뇌한국21 사업의 박사후 연구원 지원을 받았으며, 논문은 2006년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구 결과 (R01-2006-000-1117-0)의 일부입니다.

## 참고문헌

1. Chu, X.L., Fan, C.S., Luo, Y.Z. Identification of *Euphorbia humifusa* Wind, and *E. maculata* Raf. from its confused species *E. thymifolia* L. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 19:

- 325-357, 1997.
2. Vainio, H. Is COX-2 inhibition a panacea for cancer prevention? *Int. J. Cancer* 94: 613-614, 2001.
  3. Dempke, W., Rie, C., Grothey, A., Schmoll, H.J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127: 411-417, 2001.
  4. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutat. Res.* 480: 243-268, 2001.
  5. Sawaoka, H., Tsuji, S., Tsujii, M., Gunawan, E.S., Sasaki, Y., Kawano, S., Hori, M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth *in vivo*. *Lab. Invest.* 79: 1469-1477, 1999.
  6. Yamamoto, Y., Gaynor, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* 107: 135-142, 2001.
  7. Reynolds, P.R., Cosio, M.C., Hoidal, J.R. Cigarette smoke-induced Egr-1 upregulates pro-inflammatory cytokines in pulmonary epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35: S314-319, 2006.
  8. Kramer, E.L., Deutsch, G.H., Sartor, M.A., Hardie, W.D., Ikegami, M., Korfhagen, T.R., Le Cras, T.D. Perinatal increases in TGF- $\beta$  disrupt the sacular phase of lung morphogenesis and cause remodeling: microarray analysis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293: L314-L327, 2007.
  9. Rabe, K.F., Beghe, B., Luppi, F., Fabbri, L.M. Update in chronic obstructive pulmonary disease 2006. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175: 1222-1232, 2007.
  10. Chen, K.H., Weng, M.S., Lin, J.K. Tangeretin suppresses IL-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase (COX)-2 expression through inhibition of p38 MAPK, JNK, and AKT activation in human lung carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 73: 215-227, 2007.
  11. Chen, P., Cai, Y., Yang, Z.G., Zhou, R., Zhang, G.S., Domann, F., Fang, X. Involvement of PKC, p38 MAPK and AP-2 in IL-1 $\beta$ -induced expression of cyclooxygenase-2 in human pulmonary epithelial cells. *Respirology* 11: 18-23, 2006.
  12. Nieminen, R., Leinonen, S., Lahti, A., Vuolteenaho, K., Jalonen, U., Kankaanranta, H., Goldring, M.B., Moilanen, E. Inhibitors of mitogen-activated protein kinases downregulate COX-2 expression in human chondrocytes. *Mediators Inflamm* 2005: 249-255, 2005.
  13. Rosch, S., Ramer, R., Brune, K., Hinz, B. Prostaglandin E2 induces cyclooxygenase-2 expression in human nonpigmented ciliary epithelial cells through activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 338: 1171-1178, 2005.
  14. Cho, J.W., Park, K., Kweon, G.R., Jang, B.C., Baek, W.K., Suh, M.H., Kim, C.W., Lee, K.S., Suh, S.I. Curcumin inhibits the expression of COX-2 in UVB-irradiated human keratinocytes (HaCaT) by inhibiting activation of AP-1: p38 MAP kinase and JNK as potential upstream targets. *Exp. Mol. Med.* 37: 186-192, 2005.
  15. Schafer, B., Hansen, M., Lang, B.F. Transcription and RNA-processing in fission yeast mitochondria. *RNA*, 11: 785-795, 2005.
  16. Parent, J., Fortier, M.A. Expression and contribution of three different isoforms of prostaglandin E synthase in the bovine endometrium. *Biol. Reprod.* 73: 36-44, 2005.
  17. Soodvilai, S., Chatsudthipong, V., Evans, K.K., Wright, S.H., Dantzer, W.H. Acute regulation of OAT3-mediated estrone sulfate transport in isolated rabbit renal proximal tubules. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 287: F1021-1029, 2004.
  18. Sarkar, A., Sreenivasan, Y., Ramesh, G.T., Manna, S.K.  $\beta$ -D-glucoside suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor kappaB but potentiates apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279: 33768-33781, 2004.
  19. Ghosh, M., Stewart, A., Tucker, D.E., Bonventre, J.V., Murphy, R.C., Leslie, C.C. Role of cytosolic phospholipase A(2) in prostaglandin E(2) production by lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 30: 91-100, 2004.
  20. Creminon, C., Habib, A., Maclouf, J., Pradelles, P., Grassi, J., Frobort, Y. Differential measurement of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase expression in human umbilical vein endothelial cells using specific immunometric enzyme immunoassays. *Biochim. Biophys. Acta.* 1254: 341-348, 1995.
  21. Seo, Y.J., Kwon, M.S., Shim, E.J., Lee, J.Y., Suh, H.W. The effects of phorbol 12-myristate 13-acetate, cholera toxin, prostaglandin E2 and norepinephrine on inducible nitric oxide synthase activation induced by lipopolysaccharide in C6 cells. *Pharmacology* 78: 178-184, 2006.
  22. Jin, D.Z., Yin, L.L., Ji, X.Q., Zhu, X.Z. Cryptotanshinone inhibits cyclooxygenase-2 enzyme activity but not its expression. *Eur. J. Pharmacol.* 549: 166-172, 2006.
  23. Brunelle, M., Sartin, E.A., Wolfe, L.G., Sirois, J., Dore, M. Cyclooxygenase-2 expression in normal and neoplastic canine mammary cell lines. *Vet. Pathol.* 43: 656-666, 2006.
  24. Lee, E., Choi, M.K., Lee, Y.J., Ku, J.L., Kim, K.H., Choi, J.S., Lim, S.J.  $\alpha$ -tocopheryl succinate, in contrast to  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate, inhibits prostaglandin E2 production in human lung epithelial cells. *Carcinogenesis* 27: 2308-2315, 2006.

25. Tong, M., Ding, Y., Tai, H.H. Reciprocal regulation of cyclooxygenase-2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in A549 human lung adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 27: 2170-2109, 2006.
26. Heuze-Vourc'h, N., Liu, M., Dalwadi, H., Baratelli, F.E., Zhu, L., Goodglick, L., Pold, M., Sharma, S., Ramirez, R.D., Shay, J.W., Minna, J.D., Strieter, R.M., Dubinett, S.M. IL-20, an anti-angiogenic cytokine that inhibits COX-2 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 333: 470-475, 2005.
27. Yucel-Lindberg, T., Olsson, T., Kawakami, T. Signal pathways involved in the regulation of prostaglandin E synthase-1 in human gingival fibroblasts. *Cell Signal* 18: 2131-2142, 2006.
28. Takada, Y., Andreeff, M., Aggarwal, B.B. Indole-3-carbinol suppresses NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$  kinase activation, causing inhibition of expression of NF- $\kappa$ B-regulated antiapoptotic and metastatic gene products and enhancement of apoptosis in myeloid and leukemia cells. *Blood* 106: 641-649, 2005.