

## Fupenjic Acid의 대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 iNOS와 COX-2 발현 및 Cytokine들의 생성 저해 효과

윤창현 · 신지선 · 박희준<sup>1</sup> · 박종희<sup>2</sup> · 이경태\*

경희대학교 약학대학, <sup>1</sup>상지대학교 친환경식물학부, <sup>2</sup>부산대학교 약학대학

### Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 Expression and Cytokines Production by Fupenjic Acid in Macrophage Cells

Chang Hyeon Yun, Ji-Sun Shin, Hee-Juhn Park<sup>1</sup>, Jong-Hee Park<sup>2</sup> and Kyung-Tae Lee\*

Department of pharmaceutical Biochemistry, College of Pharmacy, Kyung-Hee University, Seoul 130-701, Republic of Korea

<sup>1</sup>Division of Environmental Botany, Sangji University, Wonju 220-702, Republic of Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 609-735, Republic of Korea

**Abstract** – In this study, we investigated the anti-inflammatory effects of fupenjic acid (FA) isolated from the *Potentilla discolor* in both RAW 264.7 and mouse primary peritoneal macrophage cells. FA pretreatment significantly inhibited nitric oxide (NO) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) productions in the lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 and mouse primary peritoneal macrophage cells. Consistent with these observations, Western blot and RT-PCR analyses revealed that FA inhibited the LPS-induced expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) at the protein and mRNA levels. In addition, FA reduced the release of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6). These results suggest that the down regulation of iNOS and COX-2 expression and TNF- $\alpha$  and IL-6 production by fupenjic acid are responsible for its anti-inflammatory effects.

**Key words** – Fupenjic acid, LPS, Cytokines, iNOS, COX-2

솜양지꽃 (*Potentilla discolor* Bunge)은 장미과(Rosaceae)에 속하는 다년생 초본식물로서 우리나라 전국 각지의 산야지 및 해변의 구릉지 양지에 두루 자생한다. 솜양지꽃의 뿌리는 변백초라 하여 한방에서 약용 혹은 식용하고 있다.<sup>1)</sup> 변백초는 한방에서 청열해독(淸熱解毒)하여 지혈(止血) 및 소종(消腫) 등의 효능이 있다고 알려져 있다.<sup>2)</sup> 또한 중국의 전통민간요법에서는 변백초를 설사, 말라리아, 백선, 토혈, 객혈 등에 사용하고 있다.<sup>3)</sup> 최근 변백초 추출물의 *in vivo*와 *in vitro*에서 혈당강화작용이 밝혀져 제2형 당뇨병의 치료제로서 임상시험 중에 있다.<sup>4,6)</sup>

Fupenjic acid (FA)는 steroid 모핵을 가지고 있으며 (Fig. 1), steroid 구조는 우리 몸에서 성호르몬 및 부신피질 호르몬 등의 모핵을 이루는 구조로서 항염증 약물의 구조에서 자주 볼 수 있는 화합물의 한 형태이다. 솜양지꽃에서는 FA

이외에 sterol, terpenoid, hydrolyzed tannin 및 flavonoid 등의 다양한 형태의 화합물의 구조가 이미 밝혀진바 있다.<sup>1,7)</sup> 본 연구진은 여러 천연물로부터 추출물을 얻고 단일화합물을 분리하여 이들의 항염증 효과를 검색하고 그 기전을 규명하여 새로운 항염증 약물 개발을 개발 하고 있다. 지금까지 항염효과가 보고된바 없는 FA를 대식세포주 및 일차배양 대식세포에서의 실험을 통해 그 항염효과를 확인하고자 하였다.

염증은 물리적 화학적 자극에 의해서 발생하는 피해에 반응하는 생체반응으로 관절염, 천식, 다발성 신경경화증 및 대장염 등 여러 가지 질환의 원인에 중요한 인자이다. 이런 염증 반응은 대개 급성 반응인 경우가 많으나 때로는 체내에 다양한 종류의 염증세포들이 축적되어 만성 염증성 질환을 야기하기도 하는데 이러한 만성 염증은 몇몇 염증관련 매개물질이나 lipid mediator, protease 및 cytokine 등의 분비에 의해 발생 된다.<sup>8)</sup>

대식세포는 능동 및 수동 면역반응에서 매우 중요한 역할

\*교신저자 (E-mail): ktleee@khu.ac.kr  
(Tel): +82-2-961-9199

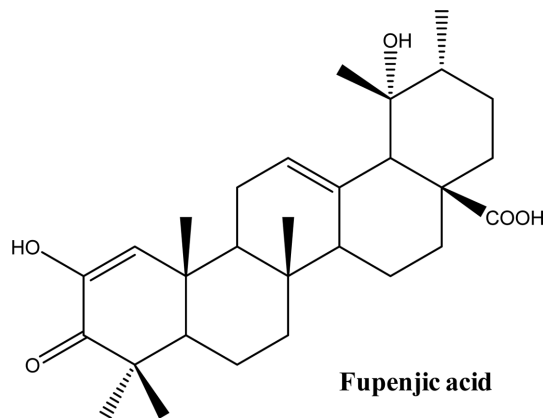


Fig. 1. Chemical structure of fupenjic acid (FA).

을 하며 NO, prostaglandin (PG) 그리고 pro-inflammatory cytokine들을 포함한 다양한 염증 매개물질들을 조절한다.<sup>9)</sup> 이중 NO 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거 시키는 중요한 역할을 하기도 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다.<sup>10-12)</sup>

현재 임상에 쓰이고 있는 많은 소염제들의 작용기전은 COX-2의 발현 및 그 활성의 저해로 인한 PG의 합성을 억제하는 것이다. COX는 COX-1과 COX-2 등 2개의 subtype이 있는데, 신체 장기 별로 각기 다른 발현 양상을 나타낸다. COX-1은 주로 위와 신장에 많이 존재하며 이들 장기의 기능 유지 및 혈소판 형성에 필요한 PG를 합성하는 반면 COX-2는 동물이나 사람의 염증부위에 과발현되어 염증반응을 매개하는 것으로 여겨지고 있다.<sup>13-14)</sup>

Cytokine중에 하나인 TNF- $\alpha$ 는 T cell과 대식세포를 활성화하고 다른 pro-inflammatory cytokine들을 증가시켜서 염증반응을 일으키는데 중요한 역할을 한다.<sup>15)</sup> 이와 마찬가지로 IL-6도 LPS에 의해서 대식세포에서 분비되는 중요한 염증성 cytokine중 하나이다. LPS, TNF- $\alpha$ , IL-6같은 요소들은 전사인자인 NF- $\kappa$ B를 활성화시키고 이는 NO, PGE<sub>2</sub>, IL-6, TNF- $\alpha$  등 pro-inflammatory molecule들의 생성량을 증가시킨다.<sup>16)</sup>

본 논문에서는 FA가 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포주 및 마우스 복강에서 분리한 일차 배양 대식세포에서 염증관련 매개물질인 NO, PGE<sub>2</sub>의 생성과 관련 단백질 및 mRNA의 발현 양상 및 염증성 cytokine을 측정함으로써 항염증 작용을 확인하였다.

## 재료 및 방법

**재료** - Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin,

streptomycin은 life Technologies Inc. (Grand Island, NY)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), sulfanilamide, aprotinin, leupeptin, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), dithiothreitol (DTT), L-N6-(1-iminoethyl)lysine (L-NIL), NS-398, *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma Chemical Co. (CA, U.S.A.)에서 구입하였으며, COX-2와 iNOS monoclonal antibodies 및 peroxidase conjugated secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology (CA, U.S.A.)에서 구입하였다. iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6 그리고  $\beta$ -actin oligonucleotide primers는 Bioneer (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 그리고 TNF- $\alpha$ , IL-6, prostaglandin E<sub>2</sub>측정을 위한 kit는 R&D systems (MN, U.S.A.)에서 구입하였다.

**시료의 추출 및 분리** - FA는 솜양지꽃 뿌리로부터 분리한 것을 사용하였으며<sup>1)</sup> 본 실험에 사용한 FA는 HPLC-MS로 확인한 결과 순도가 95% 이상이었다.

**세포의 배양** - RAW 264.7 세포는 10% FBS 및 penicillin (100  $\mu$ g/ml), streptomycin (100 U/ml)이 포함된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건을 유지하여 배양했다. RAW 264.7 세포에 시료용액의 여러 농도 (10, 20, 40  $\mu$ M)를 1시간 전 처리한 후 LPS (1  $\mu$ g/ml)를 처리하고 24시간 배양하였다.

**마우스 복강 대식세포 분리** - C57BL/6 mice에서 복강대식세포를 얻기 위해서 5% thioglycollate 용액 2ml를 복강 주사하고 4일 후에 복강에 추출된 세포를 저온의 DMEM배지를 이용해서 세정하여 얻어냈다. 세포를 2번 세척한 후 HEPES-완충 DMEM 배지로 재구축하여 배양하였다.

**세포독성시험** - 96 well plate에 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml로 세포를 동일하게 분주하고 24시간 동안 배양한 후 여러 농도의 시료용액을 배지에 희석하여 첨가 하였다. 24시간이 지난 후 MTT시약을 넣고 4시간 동안 어두운 곳에서 배양한 후 상등액을 제거하고 형성된 MTT formazan을 DMSO 100  $\mu$ l를 첨가하여 녹였다. 10분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Nitrite 양의 측정** - RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로써 측정하였다. 즉 세포배양 상등액 100  $\mu$ l와 Griess시약 [1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) phosphoric acid 와 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine-HCl] 100  $\mu$ l를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Western blot 시험** - FA를 처리한 세포 및 대조군을 PBS로 씻어낸 후 lysis buffer인 PRO-PREP (Intron Biotechnology)으로 단백질을 추출한 후 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을 Bradford 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하여 30  $\mu$ g의 단백질을 취했다. 추출된 단백질은 8%와

10%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 시킨 후 nitro cellulose membrane으로 gel의 단백질을 blot시켰다. 5% skim milk로 2시간 동안 blocking한 후 1:1000의 비율로 iNOS와 COX-2 antibody를 4시간 동안 상온에서 방치한 후 TTBS로 10분 간격으로 3회 세척하였다. 1:1000의 비율로 희석한 secondary antibody를 1시간 동안 상온에서 방치시켰다. 다시 TTBS로 10분 간격으로 3회 세척한 후 chemiluminescence로 현상하였다.

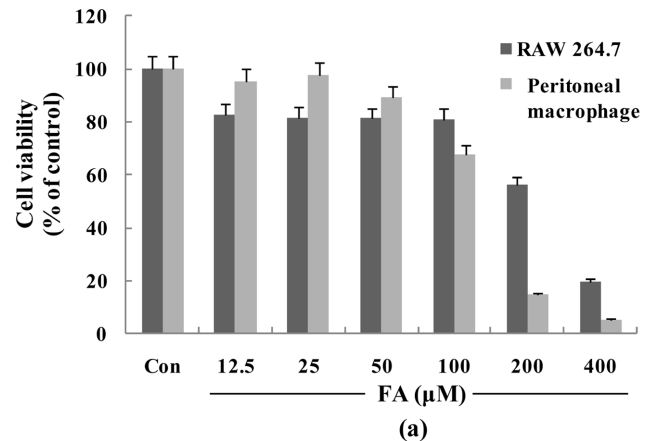
**PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  및 IL-6 양의 측정** - 세포배양액을 취해 각각 R&D kit의 지시에 따라 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  및 IL-6를 정량하였다.

**RT-PCR 시험** - Easy Blue<sup>®</sup> kits (Intron Biotechnology)를 이용하여 kit의 protocol에 따라 전체 cellular RNA를 추출하였다. 각각의 시료에서 MuLV reverse transcriptase, 1mM dNTP 그리고 oligo (dT12-18) 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l를 이용하여 1  $\mu$ g의 RNA를 역전사 하여 cDNA를 얻었다. cDNA에 Taq DNA polymerase 1 unit, 0.2 mM dNTP,  $\times$ 10 reaction buffer 그리고 5'와 3' primers 100 pmol을 포함한 전체 부피 20  $\mu$ L의 시료를 thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, Foster City, CA, USA)를 이용하여 PCR 분석을 하였다. PCR 반응은 95°C에서 2분간 initial denaturation 시킨 후 iNOS (95°C 1분 denaturation, 60°C 1분 annealing 그리고 72°C 1.5분 extension), COX-2 (94°C 1분 denaturation, 60°C 1분 annealing 그리고 72°C 1분 extension), TNF- $\alpha$ (95°C 1분 denaturation, 55°C 1분 annealing 그리고 72°C 1분 extension) 그리고 IL-6 (94°C 1분 denaturation, 56°C 1분 annealing 그리고 72°C 1분 extension)를 30회 amplification 하였다. 이번 연구에서 아래의 목록과 같은 PCR primers가 사용되었으며 Bioneer (Seoul, Korea)에서 구입하였다. : sense strand iNOS, 5'-ATT GGC AAC ATC AGG- TCG GCC ATC ACT-3', anti-sense strand iNOS, 5'-GCT GTG TGT CAC AGA AGT CTC GAA- CTC-3'; sense strand COX-2, 5'-GGA GAG ACT ATC AAG ATA GT-3' anti-sense strand COX-2, 5'-ATG GTC AGT AGA CTT TTA CA-3'; sense strand  $\beta$ -actin, 5'-TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA- TCC GT-3', anti-sense strand  $\beta$ -actin, 5'-CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG-3'. Amplification 후에 PCR 반응 시킨 시료를 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide 염색과 UV 조사를 통해 확인하였다.

**통계학적 분석** - 실험치의 값은 mean $\pm$ S.D.로 나타냈으며 분석은 Student's *t*-test로 그 유의성을 나타내었다

## 결 과

**FA의 세포독성** - FA의 항염증 효과를 규명하기에 앞서

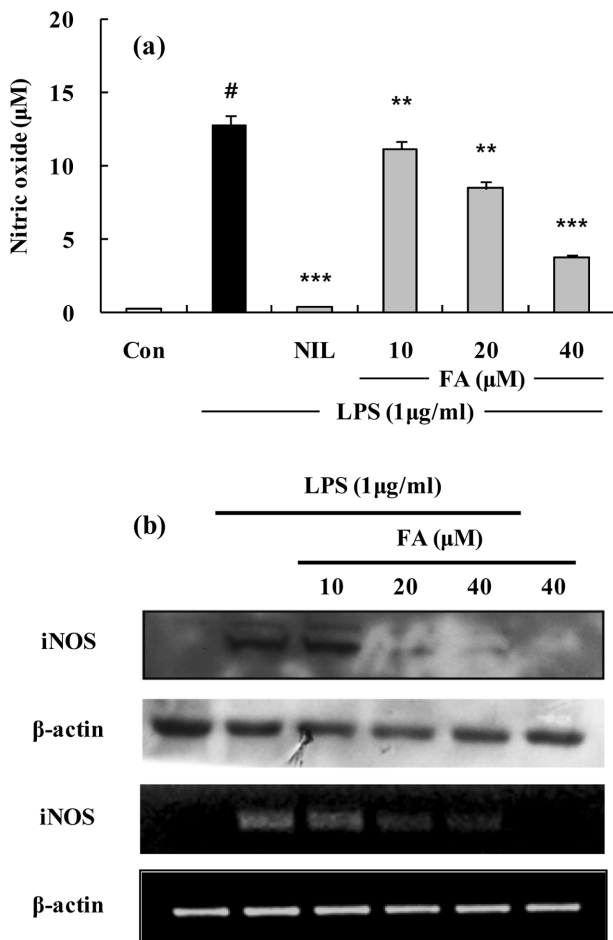


Cell line	IC <sub>50</sub> (μM)
RAW 264.7	129.54
Peritoneal macrophage	239.25

**Fig. 2.** Cytotoxicity of FA on RAW 264.7 cells or mouse primary peritoneal macrophages(ex-vivo) were exposed to FA(from 12.5  $\mu$ M to 400  $\mu$ M). Cytotoxicity was assessed by 3-(4, 5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay after 24 h incubation.

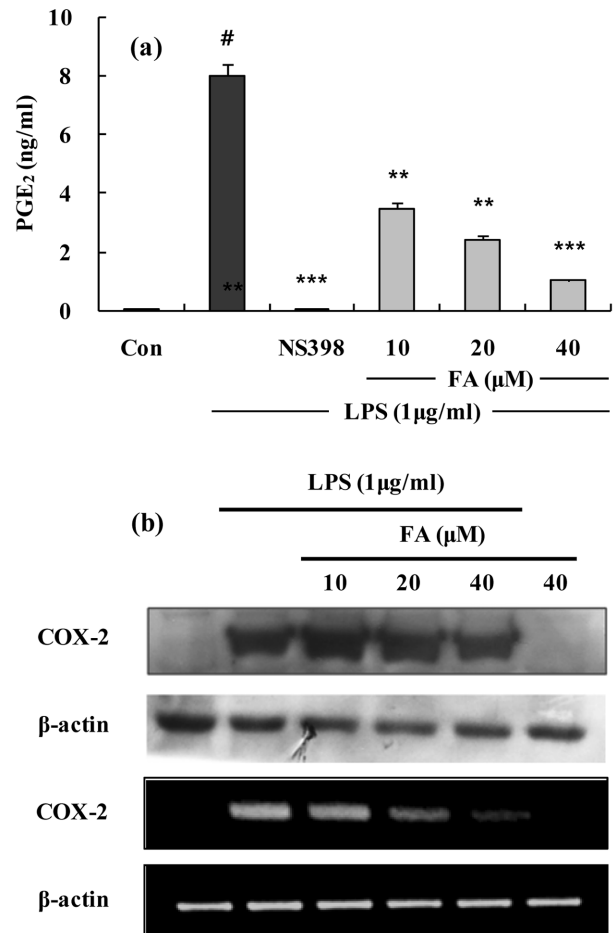
FA가 대식세포에 독성을 통한 염증 매개 물질 저해의 가능성을 배제하고 또한 최적 용량 범위를 설정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 세포에서는 FA를 50  $\mu$ M을 처리했을 때까지 세포에 독성이 나타나지 않았으며 (Fig. 2a) IC<sub>50</sub> value는 129.54  $\mu$ M로 나타났다 (Fig. 2b). C57BL/6 마우스의 복강에서 분리한 일차 배양 대식세포에서는 FA를 100  $\mu$ M까지 처리했을 때 세포에 독성이 크게 나타나지 않았고 (Fig. 2a) IC<sub>50</sub> value는 239.25  $\mu$ M로서 RAW 264.7 세포에 비해 독성이 낮게 나타났다 (Fig. 2b). FA의 항염증 효과를 세포독성이 없는 범위 내에서 실험하기 위해 RAW 264.7 및 일차 배양 마우스 대식세포에서는 각각 40  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M을 최고농도로 설정하고 이후 실험을 진행하였다.

**FA의 Nitrite 생성 및 iNOS 단백질과 mRNA 발현 저해** - LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 생성된 NO의 양을 Griess 시약을 사용해서 측정하였다. FA는 LPS에 의한 NO 생성을 농도 의존적으로 저해하였으며 고농도 (40  $\mu$ M)에서는 70% 저해 효과를 보였다 (Fig. 3a). 양성 대조군으로는 L-arginine과의 기질경쟁에 의하여 iNOS 저해제로 알려진 L-NIL (10  $\mu$ M)을 사용하였다. FA에 의한 NO의 생성 억제 효과가 iNOS의 발현과 관련성이 있는가를 확인하기 위해 Western blot과 RT-PCR로 iNOS의 단백질과 mRNA 발현을 조사했다. LPS에 의해 뚜렷하게 유도된 iNOS



**Fig. 3.** The effects of FA on LPS-induced NO production and iNOS protein and mRNA expressions in RAW 264.7 cell. (a) RAW 264.7 cells were treated with different concentrations of FA for 1 h and then LPS (1 µg/ml) was added and the cells were incubated for 24 h. Control (Con) values were obtained in the absence of LPS or tested samples. L-N<sup>6</sup>-(1-iminoethyl) lysine (L-NIL) was used as an assay positive control at a concentration of 10 µM. (b) Lysates were prepared from control or 24 h LPS (1 µg/ml)-stimulated cells alone or LPS plus with different concentration (10, 20, 40 µM) of FA. A representative immunoblot of three separate experiments is shown. Total RNA was prepared for the RT-PCR analysis of iNOS gene expression from RAW 264.7 cell stimulated with LPS (1 µg/ml) with/without different concentration (10, 20, 40 µM) of FA for 4 h. iNOS-specific sequences (807 bp) was detected by agarose gel electrophoresis, as described in method. The experiment was repeated three times and similar results were obtained. The values are the mean±S.D. of three independent experiments. #*p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 vs. the LPS-treated group; the significances of the difference between the treated groups were evaluated using the Student's *t*-test.

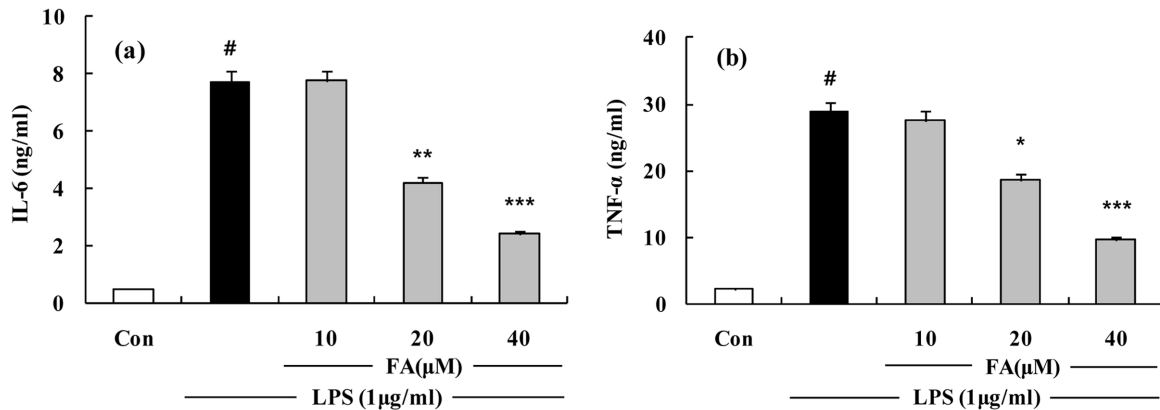
단백질의 발현량이 FA를 20 µM 처리했을 때부터 유의성 있는 현저한 저해를 나타내었으며, RT-PCR을 통한 mRNA



**Fig. 4.** The effects of FA on LPS-induced PGE<sub>2</sub> in RAW 264.7 cells. (a) Effect of the FA on PGE<sub>2</sub> production by LPS-induced RAW 264.7 macrophage for 24 h. 10 µM of NS-398 was as a positive control in the assay. (b) Lysates were prepared from control or 24 h LPS (1 µg/ml)-stimulated cells alone or LPS plus with different concentration (10, 20, 40 µM) of FA. A representative immunoblot of three separate experiments is shown. Total RNA was prepared for the RT-PCR analysis of COX-2 gene expression from RAW 264.7 cell stimulated with LPS (1 µg/ml) with/without different concentration (10, 20, 40 µM) of FA for 4 h. COX-2-specific sequences (721 bp) was detected by agarose gel electrophoresis, as described in method. The values are the mean±S.D. of three independent experiments. #*p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 vs. the LPS-treated group; the significances of the difference between the treated groups were evaluated using the Student's *t*-test.

의 발현 변화의 경우에도 20 µM 처리했을 때부터 유의성 있는 현저한 저해를 보였다 (Fig. 3b).

FA의 PGE<sub>2</sub> 생성 및 COX-2 단백질 및 mRNA 발현 저해효과 -LPS를 전 처리한 RAW 264.7 세포에서 PGE<sub>2</sub>의 생성량이 유의성 있게 증가하였고 FA가 농도 의존적으로 PGE<sub>2</sub>의 생성량을 감소시키는 것을 확인하였다 (Fig. 4a). 양



**Fig. 5.** The effects of FA on LPS-induced IL-6 and TNF- $\alpha$  release in RAW 264.7 cells and mouse primary peritoneal macrophages. (a) Effect of the FA on IL-6 release by LPS-induced RAW 264.7 macrophage for 24 h. Cells were treated with different concentrations of FA for 1 h and then LPS (1  $\mu$ g/ml) was added and the cells were incubated for 24 h. Control (Con) values were obtained in the absence of LPS or tested samples. (b) Effect of the FA on TNF- $\alpha$  release by LPS-induced RAW 264.7 macrophage for 24 h. Cells were treated with different concentrations of FA for 1 h and then LPS (1  $\mu$ g/ml) was added and the cells were incubated for 24 h. Control (Con) values were obtained in the absence of LPS or tested samples. The experiment was repeated three times and similar results were obtained. The values are the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. # $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 vs. the LPS-treated group; the significances of the difference between the treated groups were evaluated using the Student's  $t$ -test.

성 대조군으로는 선택적인 COX-2 저해제로 알려진 NS398 (5  $\mu$ M)을 사용하였다. PGH<sub>2</sub>로부터 PGE<sub>2</sub>를 생성하는데 관여한다고 알려진 효소인 COX-2의 단백질 발현량은 FA의 최고 농도인 20  $\mu$ M에서 유의성 있는 저해를 확인 하였으며, RT-PCR 결과 20  $\mu$ M에서 단백질 저해 와 유사하게 COX-2의 mRNA 발현을 유의성 있게 저해하였다 (Fig. 4b).

**FA의 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 형성 저해 효과** - FA가 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해서 생성된 pro-inflammatory cytokine의 형성을 억제하는지 알아보기 위해서 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 생성을 측정하였다. IL-6의 경우 20  $\mu$ M 에서 45%의 저해효과를 보이며 농도 의존적으로 생성이 억제 되었다 (Fig. 5a). TNF- $\alpha$ 의 경우 역시 농도 의존적인 저해 양상을 보였고, 최고농도인 40  $\mu$ M에서는 55%가 저해되었다 (Fig. 5b).

**FA의 일차 배양 복강대식세포에서의 항염효과 확인** - FA가 RAW 264.7 세포에서 뿐만 아니라 C57BL/6 mice에서 얻은 일차 배양 복강대식세포에서도 항염효과를 가지는지 확인하기 위해 RAW 264.7 세포와 동일한 조건에서 LPS에 의해 생성된 NO, PGE<sub>2</sub>의 양을 측정해본 결과 FA가 NO, PGE<sub>2</sub> 생성량을 고농도인 100  $\mu$ M에서 각각 77%, 43% 저해하였다 (Fig. 6a,b). LPS에 의해서 생성된 pro-inflammatory cytokine인 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 생성을 측정해본 결과 IL-6의 경우 농도 의존적으로 생성이 감소하였고 특히 100  $\mu$ M에서 43% 저해되었으며 TNF- $\alpha$ 의 경우 역시 농도 의존적인 저해 양상을 보였고, 최고농도인 100  $\mu$ M에서는 34%가 저해되었다 (Fig. 6c,d).

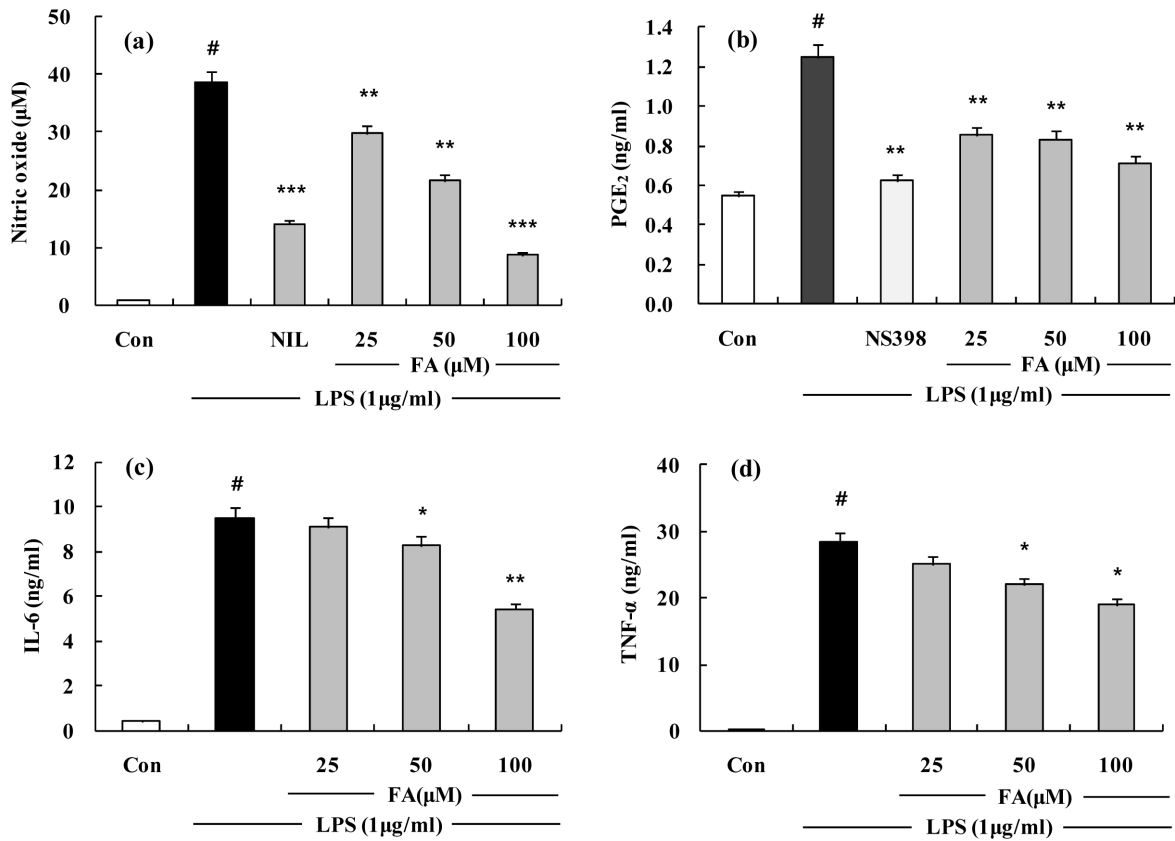
## 고 찰

대식세포는 NO, PG, leukotriene 및 pro-inflammatory cytokine들의 2차 매개물을 생산하고 분비한다. 이런 물질들은 선천성 및 후천성 면역을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 한다.<sup>9)</sup> 그러나 이런 물질들이 과잉 생산 되었을 때에는 세균성 패혈증, 류마티스성 관절염, 만성 염증, 자가면역 질환 등을 유발하기도 한다.<sup>17-18)</sup>

본 연구는 처음으로 솜양지뿔 뿌리에서 분리한 FA의 LPS로 유도한 RAW 264.7 및 C57BL/6 마우스에서 분리한 복강 대식세포에서 염증 매개 물질인 NO, PGE<sub>2</sub>, IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 생성 저해를 통한 항염증 효과를 확인하고자 하였다.

선천성 면역체계에서, 미생물 성분중의 하나인 LPS 대식세포를 자극하여 많은 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, iNOS 및 COX-2 등과 같은 많은 염증 매개 물질을 생성하며, 이러한 물질들은 급성 및 만성 염증 질환 발병에 중요한 역할을 담당하고 있다.<sup>19-20)</sup> 결국 이러한 물질을 저해하는 것은 항염증 물질 개발에 있어 중요한 전략중의 하나이다.

FA는 RAW 264.7 세포에 독성이 20% 미만 농도에 대해서 실시한 NO 생성 실험에서 LPS에 의해 증가된 NO 생성이 FA에 의해 농도 의존적으로 저해되었다. 또한 Western blot 과 RT-PCR을 통해 iNOS의 단백질 및 mRNA 수준의 발현 저해 효과를 확인해본 결과 FA에 의해 그 발현량이 저해됨을 통해 FA에 의한 NO 생성량의 저해는 iNOS에 의한 것임을 밝혔다. 또 다른 염증매개 물질인 PGE<sub>2</sub> 역시 FA에 의해 그 생성량이 저해함을 확인하였다. Western blot과



**Fig. 6.** The effects of FA on LPS-induced NO, PGE<sub>2</sub> production and IL-6 and TNF-α release in mouse primary peritoneal macrophages. (a) Mouse primary peritoneal macrophages were treated with different concentrations of FA for 1 h and then LPS (1 µg/ml) was added and the cells were incubated for 24 h. Control (Con) values were obtained in the absence of LPS or tested samples. L-N<sup>6</sup>-(1-iminoethyl) lysine (L-NIL) was used as an assay positive control at a concentration of 10 µM. (b) Effect of the FA on PGE<sub>2</sub> production by LPS-induced Mouse primary peritoneal macrophages for 24 h. 10 µM of NS-398 was as a positive control in the assay. (c) Effect of the FA on IL-6 release by LPS-induced RAW 264.7 macrophage for 24 h. Cells were treated with different concentrations of FA for 1 h and then LPS (1 µg/ml) was added and the cells were incubated for 24 h. Control (Con) values were obtained in the absence of LPS or tested samples. (d) Effect of the FA on TNF-α release by LPS-induced mouse primary peritoneal macrophage for 24 h. Cells were treated with different concentrations of FA for 1 h and then LPS (1 µg/ml) was added and the cells were incubated for 24 h. Control (Con) values were obtained in the absence of LPS or tested samples. The experiment was repeated three times and similar results were obtained. The values are the mean ± S.D. of three independent experiments. #*p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 vs. the LPS-treated group; the significances of the difference between the treated groups were evaluated using the Student's *t*-test.

RT-PCR을 통해 COX-2 단백질의 경우 최고 농도에서만 발현이 저해되었고 mRNA는 농도 의존적인 저해를 보였다. 이는 FA에 의한 PGE<sub>2</sub> 생성량 저해가 유전자 단계에서 조절됨을 확인 할 수 있었다. 하지만 mRNA 단계에서의 조절이 COX-2의 단백질 발현까지는 영향을 주지 않았는데 이는 COX-2 단백질의 활성이 저해되어 PGE<sub>2</sub>의 생성량이 감소했기 때문인 것으로 추정된다. 앞으로 COX-2 activity assay를 실시하여 COX-2의 단백질 발현량과는 별개로 COX-2의 활성과 PGE<sub>2</sub>의 생성량 간의 관계를 규명할 계획이다.

염증의 주요 매개물질로써 잘 알려진 IL-6와 TNF-α는 *in vivo* 및 *in vitro*에서 염증반응을 조절한다. 두 cytokine은 상호작용을 하며, LPS의 자극에 의해 생성이 유도된다고 알

려져 있다.<sup>21)</sup> FA는 LPS에 의해 유도된 IL-6와 TNF-α의 생성을 유의성 있게 감소시켰다.

C57BL/6 복강에서 직접 분리하여 배양한 대식세포를 사용하여 PGE<sub>2</sub> 와 NO 생성량을 측정해 본 결과 LPS에 의해 증가된 PGE<sub>2</sub> 와 NO의 형성을 FA는 농도 의존적으로 유의성 있게 모두 억제하였으며 염증성 cytokine인 IL-6와 TNF-α의 생성 역시 농도 의존적인 감소를 보였다.

본 연구는 솜양지꽃(*Potentilla discolor*)에서 분리한 단일 화합물인 FA의 항염증 작용 및 기전을 LPS로 유도된 대식세포를 사용하여 항염증 효과를 밝혔다. 이러한 COX-2, iNOS 그리고 pro-inflammatory cytokine들의 발현에는 nuclear factor kappa B (NF-κB)가 promoter부위에 결합하

여 조절인자로 작용한다고 보고되었다.<sup>22-23)</sup> 본 연구진은 앞으로 염증 매개 물질의 발현을 조절하는 전사인자인 NF- $\kappa$ B 및 cAMP response element (CRE), SRE (serum response element), activator protein-1 (AP-1), mitogen-activated protein kinase (MAPK) 등의 다양한 전사 조절인자들의 신호전달 양상을 연구를 함으로써 FA가 어떠한 경로를 통해 항염증 효과를 가지는지 그 기전을 밝히고 추후의 *in vivo* 실험을 바탕으로 향후 염증성 질환의 예방 및 치료 약물의 개발가능성을 제시하고 있다.

### 인용문헌

1. Park, H.-J., Lee, K.-T. and Park, J.-H. (2007) Isolation of Two steroids and a triterpenoid from the roots of *Potentilla discolor*. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**: 354-357
2. Shoyakan (ed.) (1985) Encyclopedia of Chinese Medicinal Drugs, 2438-2438, Shanghai Science & Technology, Tokyo.
3. Tomczyk M, Latté KP. (2009) *Potentilla*--a review of its phytochemical and pharmacological profile. *J. Ethnopharmacol.* **122**: 184-204
4. Syiem, D., Syngai G, Khup, P. Z., Khongwir. B. S., Kharbuli, B. and Kayang, H. (2002) Hypoglycemic effects of *Potentilla fulgens* L in normal and alloxan-induced diabetic mice. *J. Ethnopharmacol.* **83**: 55-61.
5. Zhao, C., Qiao, W., Zhang, Y. W., Lu, B. and Duan, H. Q. (2008) Study on anti-diabetes active fraction and constituents from *Potentilla chinensis*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **33**: 680-682.
6. Xue, P. F., Zhao, Y. Y., Wang, B. and Liang, H. (2006) Secondary metabolites from *Potentilla discolor* Bunge (Rosaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **34**: 825-828.
7. Jie, Y., Xiao-Qing, C., Xiao-Xiao, L., Yuan, C., Mao-Xiang, L. and Qiang, W. (2008) Structural determination of two new triterpenoids from *Potentilla discolor* Bunge by NMR techniques *Magn. Reson. Chem.* **46**: 794-797
8. Cho, W., Nam, J.-W., Kang, H.-J., Windono, T., Seo E.-K. and Lee, K.-T. (2009) Zedoarondiol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the down-regulation of NF- $\kappa$ B pathway in LPS-stimulated murine macrophages *Int. Immunopharmacol.* **9**: 1049-1057
9. Iontcheva, I., Amar, S., Zawawi, K. H., Kantarci, A. and Van Dyke, T. E. (2004) Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. *Infect Immun.* **72**: 2312-2320.
10. Stuehr, H. H. J., Kwon, N. S., Weise, M. and Nathan, C. (1991) Purification of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN- containing flavoprotein. *Proc. Natl. Sci. USA.* **88**: 7773-7777.
11. McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M. (1993) Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **178**: 749-754.
12. Weisz, A., Cicatiello, I. and Esumi, H. (1996) Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* **316**: 209-215.
13. Masferrer, J., Zweifel B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isacson, P. C. and Seibert, K. (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 3228-3232.
14. Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L. and Ksaxon, P. (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 12013-12017.
15. Beutler, B. and Cerami, A. (1989) The biology of cachectin/TNF-R primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* **7**: 625-655.
16. Dendorfer, U. (1996) Molecular biology of cytokines. *Artif. Organs.* **20**: 437-444.
17. Hilliquin P, Borderie D, Hernvann A, Menkès CJ, Ekindjian OG. (1997) Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **40**(8): 1512-1517
18. Nava, E., Palmer, R. M. and Moncada, S. (1992) The role of nitric oxide in endotoxic shock: effects of NG-monomethyl-L-arginine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **12**: 132-134
19. Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. and Ezekowitz, R. A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**: 1313-1318
20. Janeway, C. A. Jr. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 197-216.
21. Liu, S. F. and Malik, A. B. (2005) NF- $\kappa$ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **290**: L622-L645.
22. Feldmann, M., Brennan, F. M. and Maini, R. N. (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 397-440.
23. Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 621-663.

(2010년 1월 6일 접수)