

## 괴화 추출물 루틴의 소염작용: 쥐의 복강대식세포로부터 NO와 TNF-alpha 생산에 있어서 괴화 루틴에 의한 억제효과

이무홍\* · 정재현\*\* · 정명수\*\*\* · 장성호\*\*\*\* · 허역†

\*건국대학교 의학전문대학원 면역학교실, \*\*충주대학교 식품공학과,  
\*\*\* (주)한미양행, \*\*\*\*부산대학교 의학전문대학원 생화학교실,

### Anti-inflammatory Function of the *Sophora japonica* Extract Rutin: The Inhibitory Effect of Rutin of Korean *Sophora japonica* on the Productions of NO and TNF-alpha from Mouse Peritoneal Macrophages

Mu Hong Lee\*, Jae Hyun Jeong\*\*, Myeong Soo Jeong\*\*\*, Sung Ho Chang\*\*\*\* and Erk Her\*†

\*Department of Immunology, Medical School, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea.

\*\*Division of food and Biotechnology, Chungju National University, Jeungpyeong 368-701, Korea.

\*\*\*Hanmi Natural Nutrition Co. Ltd., Uncheon, Munsan, Pajoo 413-901, Korea.

\*\*\*\*Department of Biochemistry, School of Medicine, Pusan National University, Yangsan-city 626-870, Korea.

**ABSTRACT :** Korean *Sophora japonica* has been found to possess an anti-inflammatory activity. In this study, Korean *Sophora japonica* extract, rutin, was used to know whether rutin inhibits to produce inflammatory mediators NO and TNF- $\alpha$  from the mouse peritoneal macrophages that were treated an inflammatory agent LPS. The rutin-1 hr pretreated macrophages were incubated with LPS for 0.5~5 hrs, and then collected the supernatant and the cell lysate for measurements of the level of iNOS, NO, TNF- $\alpha$  mRNA, TNF- $\alpha$ , and p-NF- $\kappa$ B. Minimal and maximal effective doses of the rutin on them were 1 and 100  $\mu$ g/ml, respectively. The maximal effective dose of rutin certainly inhibited the productions of iNOS, NO, TNF- $\alpha$  mRNA, TNF- $\alpha$ , and p-NF- $\kappa$ B from the LPS-treated macrophages ( $p < 0.0001$ ). Its ED<sub>50</sub> for inhibition of TNF- $\alpha$  mRNA and p-NF- $\kappa$ B was 5  $\mu$ g/ml, and for iNOS, NO, and TNF- $\alpha$  was 10  $\mu$ g/ml. The rutin did not have any cytotoxic effect. As the results, the *Sophora japonica* rutin could be a good candidate for an anti-inflammatory action.

**Key Words :** *Sophora japonica*, Rutin, Anti-inflammation, Mouse Peritoneal Macrophages, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B

### 서 언

염증발생 시 염증부위에 면역세포들이 침투되고 이들 세포들에 의해 여러 종류의 화학물질 및 cytokine를 생산 분비하여 생체방어 및 염증반응을 일으킨다. 이들 면역세포 중 탐식 및 항원제공에 관여하는 대식세포는 감염초기에 nitric oxide (NO), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) 등을 생산 분비하여 생체방어에 중요한 역할을 한다 (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1987; Le and Vilcek, 1987; Snyder and Bredt, 1992). 이 물질들에 의한 생체방어과정에서 염증이 유발하기에 염증분야에서는 이 물질들을 일명 염증매개물질이라 하기도 한다. NO는 nitric oxide synthase (NOS)의 촉매에 의해 생산되는데 NOS는 iNOS (inducible NOS), nNOS (neuronal NOS),

eNOS (endothelial NOS) 세 종류가 있는데 NADPH의 도움을 받아 L-arginine를 산화해 NO와 citrulline을 생산한다 (Nathan, 1997). 대식세포에는 주로 iNOS가 존재하며 생성된 NO는 free radical 구조이기 때문에 반감기가 6~10초로 매우 불안정하여 안정화된 최종산물인 NO<sub>2</sub> (nitrite)로 신속히 변환되는 것으로 알려져 있다 (Bredt *et al.*, 1992). TNF- $\alpha$ 는 일명 cachectin이라 하며 중요한 면역 활성물질이며 trimer 형일 때 생물학적 활성이 크며 단구와 대식세포에서 많이 생산되어 진다 (Tracey *et al.*, 1988). NO와 TNF- $\alpha$ 는 감염세균 중의 하나인 그람음성세균의 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 대식세포로부터 많이 유도되어 진다 (Dinerman *et al.*, 1993). 대식세포에서 iNOS와 TNF- $\alpha$ 의 생산은 전사인자 NF- $\kappa$ B에 의해 조절되어지며 NF- $\kappa$ B가 활성 시에는 인산화 NF-

†Corresponding author: (Phone) +82-43-840-3752 (E-mail) erk.her@kku.ac.kr

Received 2010 February 19 / 1st Revised 2010 April 9 / 2nd Revised 2010 April 16 / Accepted 2010 April 20

κB로 된다 (Cutolo *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007). 근래 염증분야 연구에서는 염증매개물질 NO와 TNF-α 생산 분비를 억제하는 천연소염물질을 찾는데 초점이 맞추어져 있는데 그 이유는 cortisol 합성제와 같은 기존 소염제가 부작용이 많기 때문이다 (Wu *et al.*, 2008). 소염효과와 관련된 천연물 중에는 오랜 세월동안 민방요법으로 사용되어 온 한약재들이 많이 포함되어 있다.

이들 한약재들 중에는 민방으로 오랜 세월동안 장풍치료에 사용되어 오고 있는 괴화가 있는데, 이 추출물이 염증성 치주질환 치료효과가 보고된 바 있으며 (Lee *et al.*, 2005), 그리고 microglial cell의 활성화 및 뇌세포죽음을 감소시키는 효과가 있어 인간의 뇌경색 등 뇌질환 치료에 효과가 있을 것이라고 제안한 바 있다 (Lao *et al.*, 2005). 괴화 구성성분에는 flavonoids (Wang *et al.*, 2006), triterpene glycosides (Gorbacheva *et al.*, 1996), agglutinin (Ashworth *et al.*, 1995), phospholipids, alkaloids, amino acids, polysaccharides 등이 있다 (Mukhamedova and Glushenkova, 1997; Sun, 2007). Flavonoids를 isoflavone과 isoflavone glycosides, apigenin, quercitrin, rutin으로 세분화하는데 isoflavone에는 biochanin, irisolidone, genistein이 있고 isoflavone glycosides에는 sissotrin, sophorabioside, genistin, tectoridin이 있다 (Kim and Yun-Choi, 2008). 이들 괴화성분 중 flavonoids가 antiplatelet 활성을 가지고 있으며 (Kim and Yun-Choi, 2008), 그리고 isoflavone glycosides가 IL-6과 COX-2의 활성억제와 죽부종을 억제한다는 것이 보고되었다 (Kim *et al.*, 2003). 그리고 루틴 (Sigma)이 호중구의 탈과립과 화학성을 억제하며 또한 죽부종을 억제한다는 논문이 발표되었다 (Selloum *et al.*, 2003). 그러나 현재까지 괴화 rutin에 대해 다양한 연구가 발표되었지만 대식세포에 있어서 염증매개물질 생산에 있어 작용 및 작용기전에 대한 연구발표가 없다.

이에 본 연구는 괴화 루틴이 대식세포에서 대표적 염증매개물질인 NO와 TNF-α 생산에 있어 작용과 기전 그리고 세포독성을 가지고 있는지를 밝히고자 하였다. 연구수행 결과 괴화 루틴이 대식세포의 주요 전사인자인 NF-κB의 인산화 억제, 그리고 NO와 TNF-α 생산을 억제한다는 것과 세포독성을 가지고 있지 않음을 보였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 실험동물

복강 대식세포 배양을 위하여 배양액 RPMI-1640, fetal bovine serum (FBS), L-glutamine acid, penicillin-streptomycin 및 trypsin-EDTA는 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 각종 culture plates, flasks, 그리고 각종 tube들은 Falcon (Franklin Lakes, NJ, USA)으로부터 구입하

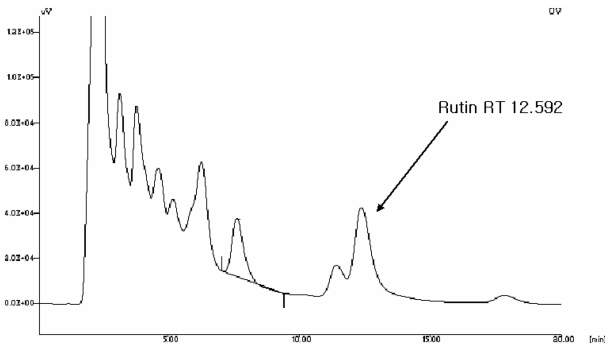
였다. iNOS, TNF, NF-κB, p-NF-κB 검사를 위해 immunoblotting에 사용된 각종 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서, 역전사 증합 연쇄반응 (RT-PCR)을 위한 시약은 Takara (Otsu, Shiga, Japan)에서, ethanol을 비롯한 각종 유기용매들은 Merck (Berlin, Germany)에서, standard rutin 및 각종 시약은 Sigma (St Louis, MO, USA)에서 구입했다. 본 실험에서 복강 대식세포의 추출을 위해 사용된 Balb/c 생쥐들은 분양받아 항온 항습실에 사육하면서 실험하였다. 항온항습실의 조건은 온도 22 ± 1°C, 습도 55 ± 5%, 조명 150 Lux의 조건이었다.

### 2. 괴화 (Flower buds of *Sophora japonica*)로부터 rutin 분리

건재상에서 구입한 한국산 괴화를 물로 세척하고 잘 건조시킨 괴화를 50% 에탄올 수용액에 가한 후 교반하여 주면서 80°C에서 2시간 단위로 2회 추출하였다. 상기 추출물을 상온으로 서서히 냉각시킨 다음 원심여과하여 잔사를 제거하고 여액을 병합하여 60°C에서 감압 농축하여 농축액을 얻었다 (Paniwnyk *et al.*, 2001; Kim and Yun-Choi, 2008). 상기 농축액을 전개용매 50% 에탄올로 칼럼 C-18 COSMOSIL PACKED (10 μm, 4.6 × 250 mm, column 온도 20°C)에서 유속 0.8 ml/min으로 하여 280 nm UV 검출기를 가진 semiprep Waters HPLC (Waters 2690 Separations Module and Waters 2487 Dual Absorbance Detector, Waters, Milford, MA, USA)와 collector (Foxy 200 X-Y Fraction Collector, Isco, Lincoln, Neb. USA)를 이용해 rutin을 분획 분리하였으며, 수율은 분리실험에 따라 차이가 있었으나 5.0~7.0% (w/w) 이었다 (data not shown). 이 때 괴화 루틴 분획을 위한 retention time은 12.592분 이었다 (Fig. 1). 분획을 위한 standard rutin은 Sigma (St Louis, MO, USA)로부터 구입해 사용하였다. 본 추출 분획 과정에서 괴화 루틴내의 세균내독소인 LPS 잔유량 검사는 Limulus ES II kit (Wako, Osaka, Japan)로 검사하였으며, 잔류량은 17 endotoxin units (EU)/ml 이었다 (data not shown). 유럽국가에 있어 시약에 LPS 잔류량 기준 허용범위는 350 EU/ml 인데 (Scheer, 1993), 본 괴화 루틴은 기준 허용범위의 1/20 이하에 불가해 추후 각종 소염 실험에 아무런 문제가 없었다.

### 3. 마우스로부터 대식세포의 추출 및 자극

7 주령의 Balb/c 마우스에 2 개월 이상 배양된 thioglycollate medium (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)을 마우스에 투여한지 4일 후 마우스를 경추 탈골시켜 희생시킨 후 대식세포를 무균상태에서 회수하여 cold incomplete RPMI-1640 medium으로 씻은 후 배양하였다 (Chang *et al.*, 2001). 실험동물은 건국대 실험동물 윤리위원회가 인정한 미국 국립 보건원 권고 가이드라인 (NIH publication #85-23, 1985)에



**Fig. 1.** HPLC-profile of rutin purified from *Sophora japonica*. In the HPLC condition, column temperature was 20°C, mobile phase was 50% ethanol, and flow rate was 0.8 ml/min. The rutin was detected at RT 12.592 by 280 nm set UV detector as standard. All other details are described in "materials and methods".

따라 수행되었다. 괴화 루틴으로 자극하기 전에 incomplete RPMI-1640 medium으로 씻어낸 후, serum free RPMI-1640 medium을 주입하였다. 주입 후 30분에 괴화 루틴을 여러 농도로 1시간 동안 자극한 후 염증 유도물질인 LPS (10 µg/ml)로 30분 (인산화 분석위해), 2시간(mRNA 분석위해) 또는 5시간 (NO 및 단백질분석 위해) 동안 더 자극하였다. 자극시간은 예비실험에서 얻은 최적의 시간 조건이었다 (data not shown).

#### 4. NO detection assay

NO 생산량 분석은 다른 참고문헌을 참고하였다 (Green *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 2007). 활성화된 대식세포로부터 생산된 NO는 곧바로 산소와 반응해 nitrite로 변환되므로 (Bredt *et al.*, 1992), 배양액에 있는 nitrite를 측정하여 NO 생산을 검사하였다. Nitrite는 Griess reagent를 사용하여 측정하며 간단히 설명하면 다음과 같다. 반응은 100 µl 배양 상등액과 100 µl Griess reagent를 함께 혼합한 후 10분 동안 상온의 어두운 곳에서 배양하고, 배양이 끝난 후 multiwell plate reader (Bio-Tek Instrument Inc, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이 때 표준곡선을 위한 시약은 sodium nitrite (Sigma, St Louis, MO, USA)를 사용하였다.

#### 5. Immunoblotting

자극을 위한 배양이 모두 끝난 즉시 세포를 차가운 PBS 완충용액으로 3회 씻은 후 각종 protease inhibitor가 함유된 lysis buffer를 사용해 세포를 용해시켰다. 세포 용해 후 시료를 immunoblotting 기법을 사용해 세포 내에 존재하는 iNOS, TNF-α, NF-κB, NF-κB 인산화 (p-NF-κB) 량을 조사하였다. Immunoblotting에 관한 자세한 사항은 다른 문헌을 참조하였다 (Lee *et al.*, 2007; Jeoung *et al.*, 2009). 간단히 설명하면, 각각의 시료는 동일한 총 단백질 량을 gel에 loading한 후

0.1% SDS-PAGE에서 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 gel내의 단백질은 nitrocellulose membrane (NC; Schleicher and Schuell, Verkaufsleiter, Germany) 위에 이동시켰다. 이동시킨 후, NC를 blocking buffer (5% nonfat dry milk in TBS-T buffer)와 배양시켜 항체와의 비특이적 결합을 억제시켰다. TBS-T buffer로 씻어낸 후, rabbit anti-murine iNOS, TNF-α, NF-κB, phospho-NF-κB polyclonal primary antibody를 첨가하였다. 그리고 난 뒤 hybridization incubator (Robbins, CA, USA; speed 10 rpm)에서 4°C에서 12시간 동안 배양하였다. TBS-T buffer로 씻어낸 후, 2차 항체 (goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated affinity purified antibody)를 첨가하여 4°C에서 3시간 동안 배양하였고, TBS-T로 씻어내었다. 그 후 NC를 ECL (peroxidase substrate, Amersham, Cleveland, Ohio, USA)로 잘 적신 후 5분간 배양하였다. 배양한 후, 10W safety lamp (Kodak, Rochester, NY, USA)가 설치된 암실에서 x-ray film (Agfa, Devaert, Belgium)에 감광시킨 후 x-ray film을 developing, washing, fixing 및 washing 순서과정을 거친 후 iNOS, TNF-α, NF-κB, phospho-NF-κB band의 크기와 강도를 분석하였다.

#### 6. 역전사 중합연쇄 반응 (RT-PCR)

RT-PCR에 관한 자세한 사항은 다른 문헌을 참조하였으며 (Chang *et al.*, 2005), 역전사 kit 및 중합연쇄반응 kit (Takara, Otsu, Shiga, Japan)를 이용하여 실시하였다. 간단히 설명하면, Trisol (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 2 µg의 total RNA를 역전사 반응액 (total volume: 50 µl; 10 µl of 5x RAV-RTase buffer, 20 µl of 2.5 mM dNTP, 0.02 µM of TNF-α 또는 β-actin anti-sense primer, 10 units of RAV-RTase)과 혼합하여 42°C에서 1시간 동안 반응시켜 TNF-α와 β-actin의 cDNA를 합성하였다. 합성한 각각의 cDNA를 중합연쇄 반응액 (total volume: 50 µl; 5 µl of 10x Taq buffer, 4 µl of 2.5 mM dNTP, 1 µl of 10 pmoles/µl TNF-α 또는 β-actin sense or anti-sense primer, 8 units of Taq)과 혼합하여 TNF-α와 β-actin의 RT-PCR 증폭산물을 얻었다. 이 증폭 산물은 1% agarose gel 전기영동상에서 분석하였다. 유전자 증폭을 위하여 TNF-α forward primer: 5'-GGCAGGTCCTTG GAGTCATTGC-3'와 reverse primer: 5'-CATTTCGAGGCT CCAGTGAATTCCAG-3', 그리고 β-actin forward primer: 5'-CAAAGAAAATGGACGCCGCCGAAGCTTGG-3'와 reverse primer: 5'-CCTGCTTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'를 사용하였다.

#### 7. MTT assay

세포독성 검사인 MTT기법 (Lind *et al.*, 1997)과 쥐의 비

장세포분리 (Jun *et al.*, 2007)에 관한 자세한 사항은 다른 문헌을 참조하였다. 간단히 설명하면, 96 well microplate (Falcon, USA)에 있는 비장세포 ( $5 \times 10^3$  cells/200  $\mu$ l) 또는 복강대식세포 ( $5 \times 10^3$  cells/200  $\mu$ l)를 여러 농도의 괴화 루틴으로 8시간 동안 자극한 후 50  $\mu$ l MTT 용액 (1 mg/ml) 첨가한 후 formazan 생성을 위해 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 formazan crystal을 용해하기 위해 100  $\mu$ l DMSO를 첨가하여 15분 동안 천천히 저어준 후 multiwell plate reader (Bio-Tek Instrument Inc, USA)를 사용해 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

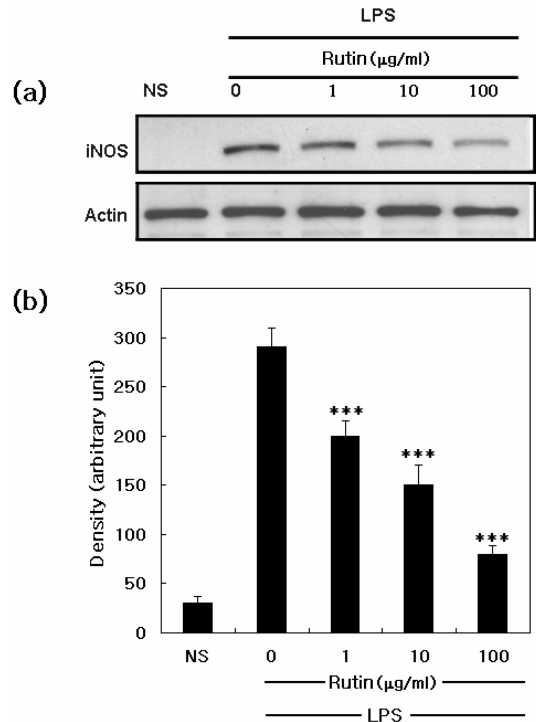
### 8. 통계 처리

실험성적은 평균 또는 mean  $\pm$  s.e.m.으로 나타냈으며, 각 group 간의 통계학적 검정에는 SAS ANOVA 프로그램 (SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하였다. p 값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의 있는 값으로 간주하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. iNOS와 NO 생산에 있어 괴화 루틴의 억제효과

대식세포에는 주로 iNOS가 존재하며 LPS에 의해 많은 NO가 생산되어진다 (Dinerman *et al.*, 1993). iNOS에 의해 생성된 NO는 항균 및 항바이러스 물질로서 면역방어기전에 중요한 역할을 함과 동시에 염증을 유발하기에 염증매개물질이라 한다 (Snyder and Bredt, 1992). NO의 생산을 억제하면 소염제 역할을 하는 것으로 추측되는데 괴화추출물이 소염작용을 한다고 보고 (Lao *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005)된 바 있고 그리고 괴화 flavonoid 중의 하나인 isoflavone glycosides가 IL-6와 COX-2 활성을 억제해 소염작용을 한다는 보고가 있다 (Kim *et al.*, 2003). 그래서 괴화 flavonoid 중의 하나인 루틴의 소염효과를 알아보기 위해 먼저 iNOS와 NO의 생산에 있어 괴화 루틴의 작용을 검사하였다. 그 결과, 괴화 루틴 1  $\mu$ g/ml 농도에서 LPS에 의한 iNOS 단백질의 생산이 억제되기 시작하다가 괴화 루틴 100  $\mu$ g/ml 농도에서 LPS에 의한 iNOS 생산이 최대로 억제됨을 보여 주었다 (각각  $P < 0.0001$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 2). 괴화 루틴은 염증유발물질인 LPS에 자극된 대식세포로부터 iNOS 생산을 억제하게 하는 작용이 있다는 것을 알 수 있었고, 괴화 루틴이 농도 의존적으로 강한 억제효과가 있음을 나타내었다. 이러한 괴화 루틴의 iNOS 생산억제 효과는 염증매개물질 NO 생산억제 여부를 궁금하게 해 연구를 수행하였다. 그 결과, 괴화 추출물인 루틴 1  $\mu$ g/ml 농도에서 염증유발물질인 LPS에 의한 NO 생산억제를 보이기 시작하다가 100  $\mu$ g/ml 농도에서는 최고의 NO 생산억제를 보였다 (각각  $P < 0.0001$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig 3). 이러한 NO 생산억제 현상은 괴화 루틴의 농도 의존적이었다. 이러한

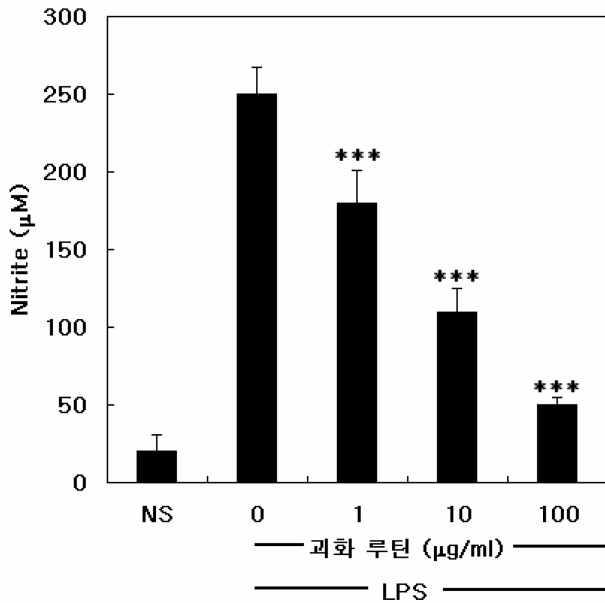


**Fig. 2.** Inhibitory effect of *Sophora japonica* rutin on LPS-induced iNOS synthesis in mouse peritoneal macrophages. The cells were treated with the rutin in the indicated doses 1 hr before incubating them with LPS (1  $\mu$ g/ml) for 5 hrs and the levels of iNOS protein were measured by means of (a) Western blot analysis and (b) densitometric analysis. Bars represent as the means  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments with triplicates. All other details are described in "materials and methods". NS represented as the non-stimulated group was treated with media alone. \*\*\* $P < 0.0001$  compared with the control (0).

결과들은 괴화 루틴이 충분한 소염효과를 가지고 있음을 시사했다.

### 2. TNF- $\alpha$ 의 mRNA와 단백질 생산에 있어 괴화 루틴의 억제효과

TNF- $\alpha$ 는 주요한 대식세포의 생체방어물질이며 또한 염증매개물질이다 (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1987; Le and Vilcek, 1987). 그리고 이 cytokine은 그람음성세균의 내독소인 LPS에 의해 대식세포로부터 많이 유도된다 (Dinerman *et al.*, 1993; Tracey *et al.*, 1988). 괴화 루틴이 대식세포의 주요한 염증매개물질 중의 하나인 NO 생산을 억제 했으며 (Fig. 3), 루틴 (Sigma, USA)이 호중구의 탈과립과 화학주성을 억제하며 또한 죽부종을 억제한다는 논문이 발표되었다 (Selloum *et al.*, 2003). 이러한 결과들은 괴화 루틴이 TNF- $\alpha$ 의 생산에도 영향을 분명히 미칠 수 있다는 가능성을 암시하였다. 그래서 TNF- $\alpha$ 에 대한 괴화 루틴의 영향에 대해 알고자 연구를 수행하고자

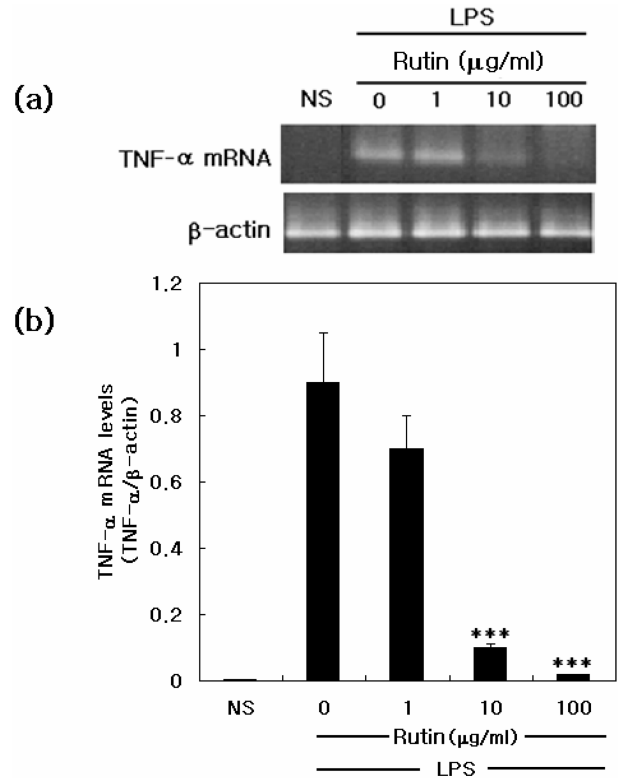


**Fig. 3.** Inhibitory effect of *Sophora japonica* rutin on LPS-induced NO production in mouse peritoneal macrophages. The cells were treated with the rutin in the indicated doses 1 hr before incubating them with LPS (1 µg/ml) for 5 hrs and the concentration of nitrite in the culture media was measured through the Griess reaction as described in "materials and methods". Bars represent as the means ± s.e.m. from three independent experiments with triplicates. NS represented as the non-stimulated group was treated with media alone. \*\*\* $P < 0.0001$  compared with the control (0).

하였다. 연구수행결과, 괴화 루틴은 1 µg/ml 농도에서 TNF-α mRNA 발현억제를 미미하게 ( $P > 0.05$ ) 보이기 시작하다가 100 µg/ml 농도에서는 최고조로 TNF-α mRNA 발현억제 ( $P < 0.0001$ )를 보였다 (Fig 4). 이러한 TNF-α mRNA 발현억제가 TNF-α 단백질 생산억제로도 이어지는지 여부를 조사하였다. 그 결과, 괴화 루틴 1 µg/ml 농도에서 TNF-α 단백질의 생산억제 ( $P < 0.0001$ )를 보이기 시작하다가, 100 µg/ml 농도에서는 최고조의 TNF-α의 분비억제 ( $P < 0.0001$ )를 보였다 (Fig. 5). 이는 괴화 루틴에 의한 TNF-α 생산억제는 농도 의존적임을 보여 주었다. 괴화 루틴이 LPS로 유도된 대식세포로부터 iNOS, NO, TNF-α mRNA, TNF-α 생산을 확실히 억제한다는 결과들 (Fig. 2~5)은 괴화 루틴이 좋은 소염제 후보가 될 수 있음을 말해주고 있다.

### 3. NF-κB 인산화 (p-NF-κB) 생산에 있어 괴화 루틴의 억제 효과

대식세포에서 NO 및 TNF-α가 생산되기 위한 전단계로 전사인자 NF-κB가 활성화해 인산화가 일어난다 (Cutolo *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007). 그러면 앞에서 보여준 괴화 루틴에 의한 iNOS와 TNF-α 생산억제도 (Fig. 2, 5) NF-κB 인산화

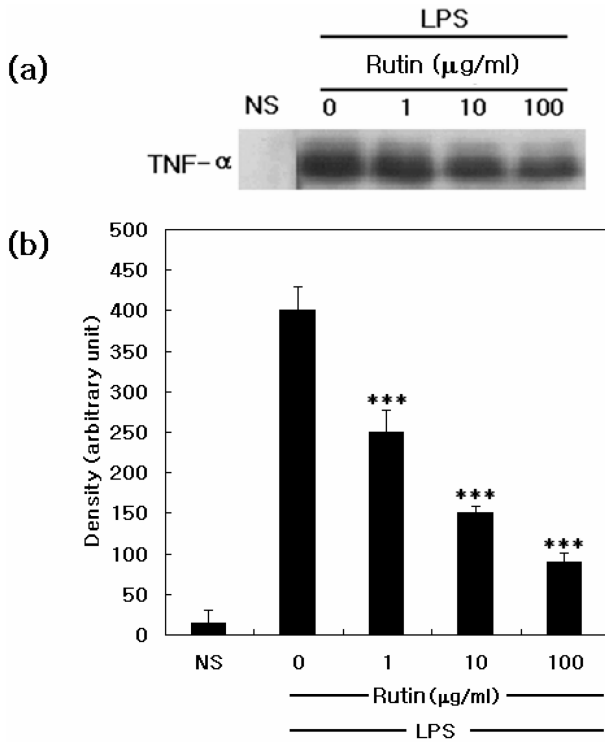


**Fig. 4.** Inhibitory effect of *Sophora japonica* rutin on LPS-induced TNF-α mRNA expression in mouse peritoneal macrophages. The cells were treated with the rutin in the indicated doses 1 hr before incubating them with LPS (1 µg/ml) for 2 hrs and the levels of TNF-α mRNA were determined using (a) RT-PCR analysis and (b) densitometric analysis. Bars represent as the means ± s.e.m. from three independent experiments with triplicates. All other details are described in "materials and methods". NS represented as the non-stimulated group was treated with media alone. \*\*\* $P < 0.0001$  compared with the control (0).

억제에 기인한 것인지 알아 보고자 하였다. 그 결과 괴화 루틴 1 µg/ml 농도에서 LPS에 의한 NF-κB의 인산화를 억제 ( $P < 0.0001$ )되기 시작하다가 괴화 루틴 100 µg/ml 농도에서 LPS에 의한 NF-κB의 인산화를 최대로 억제 ( $P < 0.0001$ )됨을 보여 주었다 (Fig. 6). 이러한 괴화 루틴의 억제작용은 농도 의존적이었으나, 10 µg/ml 과 100 µg/ml 사이에서는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 괴화 루틴이 LPS에 유도된 대식세포에서 NF-κB 인산화를 억제해 결과적으로 iNOS, NO, TNF-α mRNA, TNF-α 생산이 억제됨을 유추할 수 있다. 즉 괴화 루틴이 iNOS와 TNF-α의 전사 후가 아니라 전사 전 신호전달체계를 억제함을 시사하고 있다.

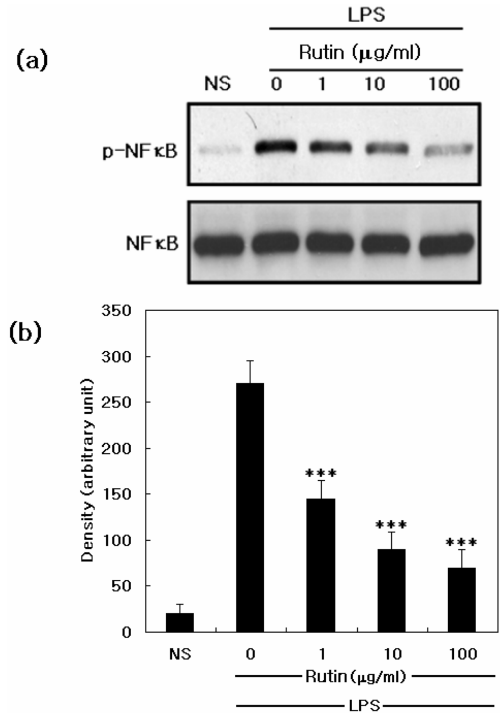
### 4. 괴화 루틴의 세포독성에 대한 안전성 효과

기존 cortisol 합성제제는 소염효과가 탁월하지만 워낙 부작용이 많아 약재 사용에 많은 제한을 두고 있다 (Wu *et al.*,

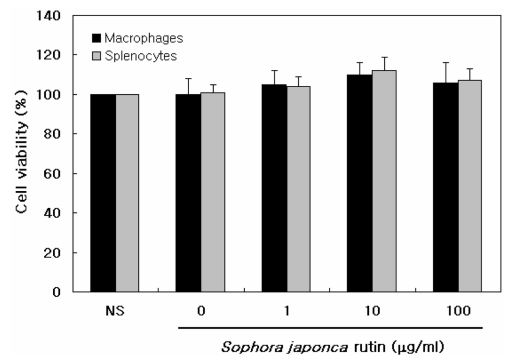


**Fig. 5.** Inhibitory effect of *Sophora japonica* rutin on LPS-induced TNF- $\alpha$  production in mouse peritoneal macrophages. The cells were treated with the rutin in the indicated doses 1 hr before incubating them with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 5 hrs and the levels of TNF- $\alpha$  protein in the culture media were determined using (a) Western blot analysis and (b) densitometric analysis. Bars represent as the means  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments with triplicates. All other details are described in "materials and methods". NS represented as the non-stimulated group was treated with media alone. \*\*\* $P < 0.0001$  compared with the control (0).

2008). 그리고 메틸 루틴 및 괴화 루틴이 독성이 있다고 보고 된 (Harrison *et al.*, 1950) 바가 있으나, 최근 세포독성 실험에서는 루틴이 어떠한 독성도 보이지 않았다고 발표했다 (Soaresa *et al.*, 2006). 괴화 추출물이 기생충에는 독성이 있어 항기생충 물질로 추천되기도 하지만 (Youn *et al.*, 2003) 쥐에는 간독성이 없을 뿐만 아니라 streptozotocin에 의해 유발된 당뇨쥐에 있어 탁월한 간 해독작용이 있음이 보고되었다 ((Jung *et al.*, 2006). 이와 같이 괴화의 독성 유무에 대한 논점이 연구시기와 생물 종에 따라 동일하지 않았다. 그래서 괴화 루틴의 세포 독성에 대한 안전성을 검사하였다. 결과에서 보는 바와 같이, 괴화 루틴은 높은 농도인 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  에서도 쥐의 비장세포 또는 대식세포에 독성 효과를 미치지 않았으며 오히려 대조군과 비교하여 미미하나 더 높은 생존율을 보여 주었다 (Fig. 7). 이러한 결과로 미루어 괴화 루틴은 세포 독성이 없는 소염제로서 안전성을 확인하였으며 또한 괴화의



**Fig. 6.** Inhibitory effect of *Sophora japonica* rutin on LPS-induced phosphorylation of NF- $\kappa\text{B}$  in mouse peritoneal macrophages. The cells were treated with the rutin in the indicated doses 1 hr before incubating them with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 30 min. and the activating phosphorylation of NF- $\kappa\text{B}$  were measured by (a) Western blot analysis and (b) densitometric analysis. Bars represent as the means  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments with triplicates. All other details are described in "materials and methods". NS represented as the non-stimulated group was treated with media alone. \*\*\* $P < 0.0001$  compared with the control (0).



**Fig. 7.** Cytotoxic effect of *Sophora japonica* rutin on the mouse splenocytes and peritoneal macrophages. The cells were treated with the rutin in the indicated doses for 8 hrs and the viability of the cells were measured by MTT analysis. Bars represent as the means  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments with triplicates. All other details are described in "materials and methods". NS represented as the non-stimulated group was treated with media alone. 0 group was treated with the only rutin-solving buffer alone.

iNOS, NO, TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  mRNA, p-NF- $\kappa$ B 억제효과가 세포독성에 기인한 것이 아니라는 것도 더불어 확인하였다.

## 감사의 글

본 논문은 2008학년도 건국대학교의 지원에 의하여 연구되었기에 이에 감사드립니다.

## LITERATURE CITED

- Arenzana-Seisdedos F, Teyton L and Virelizier JL.** (1987). Immunoregulatory mediators in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology (Supplement)*. 66:13-17.
- Ashworth PJ, Harrison RA, Miller NG, Plummer JM and Watson PF.** (1995). Flow cytometric detection of bicarbonate-induced changes in lectin binding in boar and ram sperm populations. *Molecular Reproduction and Development*. 40:164-176.
- Bredt DS, Ferris CD and Snyder SH.** (1992). Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *The Journal of Biological Chemistry*. 267:10976-10981.
- Chang SH, Jun MH, Kang TB, Mun SH, Lee JH, Seong NS, Lee ST, Kim JB and Her E.** (2001). The effect of Korean mistletoe extract M11C (non-lectin components) on IL-1 $\beta$  release and expression from macrophages. *Immune Network*. 1:170-178.
- Chang SH, Mun SH, Ko NY, Lee JH, Jun MH, Seo JY, Kim YM, Choi WS and Her E.** (2005). The synergistic effect of phytohemagglutinin and interferon-gamma on the expression of tumor necrosis factor-alpha from RAW 264.7 cells. *Immunology Letters*. 98:137-143.
- Cutolo M, Capellino S, Montagna P, Villaggio B, Sulli B, Serio B, Straub B and Straub RH.** (2003). New roles of estrogen in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 21:687-690.
- Dinerman JL, Lowenstein CJ and Snyder SH.** (1993). Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease. *Circulation Research*. 73:217-222.
- Gorbacheva LA, Grishkovets VI, Drozd GA and Chirva VYa.** (1996). Triterpene glycosides from *Sophora japonica* L. seeds. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 404:501-504.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS and Tannenbaum SR.** (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 126:131-138.
- Harrison JW, Seltzer BW and Martin EW.** (1950). The spectrophotometric examination and acute toxicity of rutins obtained from *Fagopyrum esculentum* (buckwheat) and *Sophora japonica*. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 39:556-559.
- Jeoung YJ, Choi SY, An CS, Jeon YH, Park DK and Lim BO.** (2009). Comparative effect on anti-inflammatory activity on the *Phellinus linteus* and *Phellinus linteus* grown in germinated brown rice extracts in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Korean Journal Medicinal Corp Science*. 17:97-101.
- Jun MH, Kang TB, Chang SH, Choi WS, Seong NS and Her E.** (2007). Effect of M11C (non-lectin components) obtained from Korean mistletoe on the IL-1 $\beta$  secretion from mouse splenocytes. *Korean Journal Medicinal Corp Science*. 15:38-45.
- Jung CH, Zhou S, Ding GX, Kim JH, Hong MH, Shin YC, Kim GJ and Ko SG.** (2006). Antihyperglycemic activity of herb extracts on streptozotocin-induced diabetic rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 70:2556-2559.
- Kim BH, Chung EY, Min BK, Lee SH, Kim MK, Min KR and Kim Y.** (2003). Anti-inflammatory action of legume isoflavonoid sophoricoside through inhibition on cyclooxygenase-2 activity. *Planta Medica*. 69:474-476.
- Kim BH, Chung EY, Ryu JC, Jung SH, Min KR and Kim Y.** (2003). Anti-inflammatory mode of isoflavone glycoside sophoricoside by inhibition of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 in inflammatory response. *Archives of Pharmacal Research*. 26:306-311.
- Kim JM and Yun-Choi HS.** (2008). Anti-platelet effects of flavonoids and flavonoid-glycosides from *Sophora japonica*. *Archives of Pharmacal Research*. 31:886-890.
- Lao CJ, Lin JG, Kuo JS, Chao PD, Cheng CY, Tang NY and Hsieh CL.** (2005). Microglia, apoptosis and interleukin-1 beta expression in the effect of *Sophora japonica* on cerebral infarct induced by ischemia-reperfusion in rats. *The American Journal of Chinese Medicine*. 33:425-438.
- Le J and Vilecek J.** (1987). Tumor necrosis factor and interleukin I: Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Laboratory Investigation*. 56:234-248.
- Lee JE, Lee JY, Choi JI, Kim CK and Kim SJ.** (2005). Suppression of nitric oxide and interleukin-6 production by methanol extract of *Sophora flos* in macrophage cells. *Journal of Korean Academy of Periodontology*. 35:9-17.
- Lind DS, Kontaridis MI, Edwards PD, Josephs MD, Moldawer LL and Copeland EM 3rd.** (1997). Nitric oxide contributes to adriamycin's antitumor effect. *The Journal of Surgical Research*. 69:283-287.
- Lee MH, Lee ML, Jun SH, Ha CG, Lee SH, Kim NW, Lee JH, Ko NY, Mun SH, Park SH, Kim BK, Her E, Kim YM and Choi WS.** (2007). In-vitro and in-vivo anti-inflammatory action of the ethanol extract of *Trachelospermi caulis*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 59:123-130.
- Mukhamedova KS and Glushenkova AI.** (1997). Phospholipids of ripe *Sophora japonica* seeds. *Chemistry of Natural Compounds*. 33:445-448.
- Nathan C.** (1997). Inucible nitric oxide synthase: what difference does it make? *The Journal of Clinical Investigation*. 94:5243-5248.
- Paniwnyk L, Beaufoy E, Lorimer JP and Mason TJ.** (2001). The extraction of rutin flower buds of *Sophora japonica*. *Ultrasonics Sonochemistry*. 8:299-301.
- Scheer R.** (1993). The effect of mistletoe lectins on the limulus amebocyte lysate test. *Arzneimittelforschung*. 43:795-800.

- Selloum L, Bouriche H, Tigrine C and Boudoukha C.** (2003). Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 54:313-318.
- Snyder SH and Brecht DS.** (1992). Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*. 266(5):68-71, 74-77.
- Soares VCG, Varandab EA and Raddib MSG.** (2006). In vitro basal and metabolism-mediated cytotoxicity of flavonoids. *Food and Chemical Toxicology*. 44:835-838.
- Sun A, Sun Q and Liu R.** (2007). Preparative isolation and purification of flavone compounds from *Sophora japonica* L. by high speed counter-current chromatography combined with macroporous resin column separation. *Journal of Separation Science*. 30:1013-1018.
- Tracey KJ, Lowry SF and Cerami A.** (1988). Cachectin: a hormone that triggers acute shock and chronic cachexia. *The Journal of Infectious Diseases*. 157:413-420.
- Wang ZL, Sun JY, Wang DN, Xie YH, Wang SW and Zhao WM.** (2006). Pharmacological studies of the large-scale purified genistein from Huajiao (*Sophora japonica*-Leguminosae) on anti-osteoporosis. *Phytomedicine*. 13:718-723.
- Wu K, Goyal N, Stark JG and Hochhaus G.** (2008). Evaluation of the administration time effect on the cumulative cortisol suppression and cumulative lymphocytes suppression for once-daily inhaled corticosteroids: A population modeling/simulation approach. *Journal of Clinical Pharmacology*. 48:1069-1080.
- Youn HJ, Lakritz J, Kim DY, Rottinghaus GE and Marsh AE.** (2003). Anti-protozoal efficacy of medicinal herb extracts against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. 116:7-14.