

재래감귤 팔삭의 과피 추출물이 LPS로 활성화된 RAW264.7 대식세포에서 염증매개물질 억제에 미치는 효과

김철원 · 김성무 · 정승원¹ · 김소미² · 안광석*

경희대학교 한의과대학 기초한의학과 병리학교실

1 : 한국식품연구원, 2 : 제주대학교 생명공학부

Abstract

Inhibition of LPS-induced Inflammatory Biomarkers by Fraction of *Citrus hassaku* pericarp through Suppression of NF- κ B Activation in RAW264.7 Cells

Chulwon Kim, Sung-Moo Kim, Seung-Weon Jeong¹, Somi K. Cho², Kwang Seok Ahn*

Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

1 : Korea Food Research Institute

2 : Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University

Received 5 December 2011, revised 19 December 2011, accepted 23 December 2011

Objectives : Citrus is the fruit that is readily available around us. Therefore, we investigated the anti-inflammatory effects of fraction isolated from the *Citrus hassaku* pericarp in RAW264.7 macrophage cells.

Methods : The effects of fraction from *Citrus hassaku* pericarp on cell viability on RAW264.7 cells were measured by the MTT assay. The mRNA levels of iNOS and COX-2, its protein level by fraction of *Citrus hassaku* pericarp treatment in RAW264.7 macrophage cells were investigated by RT-PCR and immunoblots. Nitrite accumulation in the culture was measured colorimetrically by the Griess reaction using a Griess reagent. The amount of IL-6 and TNF- α production was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.

Results : The results indicated that the fraction of *Citrus hassaku* pericarp concentration highly suppressed lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) and IL-6 productions without a cytotoxic effect on RAW264.7 cells. fraction of *Citrus hassaku* pericarp inhibited the expressions

*Corresponding Authors: Kwang Seok Ahn, Department of Oriental Pathology Collage of Oriental Medicine Kyung Hee University
1 Hoegi-Dong Dongmaemun-Gu 130-701 Seoul Tel: 82-2961-2316, Fax: 82-2961-2316, E-mail: ksahn@khu.ac.kr

of LPS-induced iNOS and COX-2 protein and their mRNA in a dose-dependent manner. Particularly, fraction of *Citrus hassaku* pericarp suppressed the level of nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity, which was linked with the suppression of LPS-induced phosphorylation of p65 at serine 276 and p65 translocation into nuclei, but not MAPK signaling. In addition, treatment with fraction of *Citrus hassaku* pericarp inhibited the production of IL-6 and TNF- α in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

Conclusion : Our results indicate that fraction of *Citrus hassaku* pericarp potentially inhibits the biomarkers related to inflammation through the blocking of NF- κ B p65 activation, and it may be a potential therapeutic candidate for the treatment of inflammatory diseases.

Key Words: fraction of *Citrus hassaku* pericarp; inflammation; NF- κ B; nitric oxide; cyclooxygenase-2.

서론

최근 질병을 예방 혹은 치료할 수 있는 기능은 식품이나 식물체도 가지고 있다는 것이 보고되고 있으며¹⁾, 보다 건강하게 오래 살려는 인류의 필요성에 따라 근래에 이르러 우리나라뿐만 아니라 세계적으로 다양한 자원으로부터 다양한 생리기능을 가진 물질을 탐색하려는 연구가 활발히 진행되고 있는데, 그 중에서도 특히 식물 자원에 포함된 화합물에 많은 관심이 집중되고 있다²⁾. 이러한 식물자원 중 제주 자생 채래굴은 각종 질환의 예방과 치료에 효능을 갖는 것으로 나타나 현재 많은 연구를 필요로 하고 있다.

염증 반응에서 대식세포 (macrophage)는 염증 반응의 유도과 유지를 위하여 병원체에 반응하여 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β 와 같은 염증유발인자 (pro-inflammatory cytokine)를 생성하고, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 합성하여 NO 및 prostaglandin E2 (PGE2)를 생성한다^{3)~7)}. NO는 생리학적으로 매우 중요한 항상성 조절자이며 NO에 의하여 장내의 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하거나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 한다⁸⁾. 그러나 염증이 발생하면 관련된 세포로부터 iNOS의 발현양이 증가하여 다량의 NO를 생성하며, 과도하게 생성된 NO에 의해 조직 손

상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시킨다.⁸⁾ 염증 반응이 일어나면 대식세포의 COX-2에 의해 PGE2가 생성되는데 이것은 통증과 발열에 주로 관여하는 염증 인자이다^{9,10)}. 따라서, 위의 내용을 토대로 염증 반응에서 생성되는 NO, COX-2와 같은 물질의 생성 억제를 확인하여 항염증 효과를 확인할 수 있다.

iNOS, COX-2, IL-6, TNF- α 의 발현을 포함하는 NF- κ B 활성화는 NF- κ B가 iNOS, COX-2, IL-6, TNF- α 유전자의 upstream 프로모터 지역을 공유하기 때문이다^{11,12)}. 이러한 유전자 산물은 염증 반응의 중요한 구성요소이며 여러 염증관련 질병의 발병의 원인임을 나타낸다.¹³⁾ 우리의 연구결과 다른 연구실에서는 그동안 식물에서 얻어진 물질이 NF- κ B 신호 경로의 억제를 통한 항염증 효과에 영향을 미침을 보여왔다.

이번 연구에서, 우리는 RAW264.7 대식세포를 이용하여 팔삭 과피 추출물의 항염증 효과를 설명하고자 노력하였다. 우리는 LPS로 자극되어진 RAW264.7 대식세포에서 팔삭 과피 추출물에 의한 NO 생성, iNOS, COX-2, pro-inflammatory cytokines 등의 inflammatory biomarkers의 억제 효과에 대해 연구를 하였다. 근본적인 메커니즘에 대한 규명을 위하여, NF- κ B의 신호경로에 대한 연구가 포함되었다.

재료 및 방법

1. 시료 추출

팔삭 성숙과일은 2011년 1월 참여기업인 (e) 제주영농조합으로부터 확보하여 시료를 확보한 후 농약 및 기타 불순물의 제거를 위해 수확 즉시 물로 2회 세척하였다. 과육과 과피를 분리하고 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ deep freezer에서 3일간 동결한 후, 72시간 동결건조 하였다. 초임계 추출을 위하여, 동결건조 시킨 팔삭의 과피를 마쇄시킨 뒤, 2시간 동안 1 L Extractor로 300 bar, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 초임계 추출법을 사용하여 추출하였다. 이후 추출물은 상온에서 암 조건에 보관하여 사용 시 DMSO에 녹여 사용하였다.

2. 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT)와 LPS (Escherichia coli 026:B6; Difco, Detroit, MI, U.S.A.), Griess reagent, Sodium Nitrite, Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)과 antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였으며, Antibody는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA), Santa Cruz biotechnology, Inc.에서 구입하였다. TNF- α , IL-6 ELISA Kit는 R&D system, Inc.에서 구입하였다.

3. 세포배양

마우스 대식세포주인 RAW264.7은 한국세포주연구재단 (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco, Grand Island, NY)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin 및 100 mg/mL streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 의 완전 습윤 조건의 CO_2 배양기 내에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passage를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

4. 세포 생존율 측정

생존율 측정은 세포 배양관 (96-well plate)에 세포 (1×10^4 cells/well)를 분주하여 24시간 동안 CO_2 세포 배양기 안에서 안정시킨 후, 팔삭 과피 추출물을 농도별로 처리한 다음, MTT 용액 (2 mg/ml)을 배양액에 첨가하였다. 2시간 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 분광광도계 (ELISA reader, (TECAN)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. NO assay

LPS로 활성화된 RAW264.7 cell에서 팔삭 과피 추출물의 NO 생성 억제를 측정하기 위해 팔삭 과피 추출물을 각 농도별로 처리한 실험군과 대조군을 24시간 세포배양 후 Griess 분석 방법을 이용하여 nitrite를 측정하였다. 96 well plate에 세포 배양 상등액과 Griess reagent를 1:1로 혼합하여 넣고 5분 동안 반응 시킨 후 ELISA microplate reader (SoftMax Pro5, Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 사이토카인의 생성량 측정

RAW264.7 대식세포를 배양하여 6-well plate에 세포 (1×10^6 cells/well)를 분주하고 팔삭 과피 추출물을 농도별로 처리한 다음, 2시간 후에 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하고, LPS 처리 후 22시간 후에 세포 배양액을 취하여 사이토카인을 측정하였다. 수거된 배지는 측정 전까지 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였고, TNF- α 와 IL-6 함량을 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하여 측정하였으며, TNF- α 와 IL-6의 함량은 표준물질의 반응으로부터 얻어진 표준곡선을 이용하여 환산하였다.

6. Western blotting

배양된 세포에 팔삭 과피 추출물을 일정 시

간 처리한 후에 수거하여, 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 세포 파쇄용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, % deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin)과 4°C에서 30분 동안 반응 시켰다. 그 다음 13,000 rpm에서 20분 원심 분리하여 얻은 세포 파쇄액을 protein assay 용액을 이용하여 단백질을 정량 하였다. 동량의 세포 파쇄액 (단백질 30 μ g)은 5 \times sample buffer와 섞어 100°C에서 5분 끓인 후에 8 ~ 12 % SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry방법으로 4°C에서 90V 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. nitrocellulose membrane은 5 % skim milk와 상온에서 2시간 반응시켜 비 특이적 항체결합을 억제시켰다. 측정하고자 하는 항체는 0.1%의 Tween-20이 포함된 5% skim milk에 1:1000으로 희석하여 상온에서 4°C에서 하루 동안 반응 시킨 후 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase을 1시간 처리한 후, enhanced chemiluminescence kit (ECL kit :Amersham, England)를 사용하여 ECL 필름에 노출시켰다.

8. 통계처리

통계처리 방법은 ANOVA를 이용하여 분석한 후 Bonferroni test를 사용하여 검정하였으며, p 값이 0.01미만일 때 통계학적인 유의성을 인정하였다.

결 과

1. RAW264.7 대식세포에 대한 팔삭 과피 추출물이 세포독성에 미치는 영향

세포 생존을 알아보기 위하여 RAW264.7 대식세포를 배양한 후 팔삭 과피 추출물을 다양한 농도로 (0-5-10-20-40 μ g/ml) 24시간 처리하여

MTT assay를 이용해 측정하였다. Fig. 1에서 보았듯이 팔삭 과피 추출물이 RAW264.7 대식세포에 대해 비교적 적은 독성을 나타냄을 보여주고 있다.

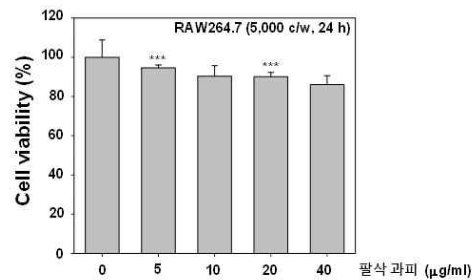


Fig. 1. Effects of fraction from Citrus hassaku pericarp on the cell viability in RAW 264.7 macrophages.

The cells were treated with fraction from Citrus hassaku pericarp (0-5-10-20-40 μ g/ml) for 24 h and cell viability was determined by MTT assay. Results of independent experiments were averaged and are shown as percentage cell viability compared with the viability of untreated control cells. All data are presented as means \pm S.D. of at least three experiment.

2. 팔삭 과피 추출물이 LPS로 유도된 RAW264.7 대식세포의 nitric oxide production에 미치는 영향

팔삭 과피 추출물에 의한 항염증 효과를 검증하기 위하여, LPS로 자극된 RAW264.7 대식세포에서 팔삭 과피 추출물이 nitric oxide의 생성에 영향을 미치는지 확인하였다. 검증 방법은 세포를 배양한 액체 배지에 축적된 nitrite를 Griess reagent를 사용하여 측정하였다. 세포는 추출물을 처리하지 않은 대조군과 추출물을 농도별로 (0-10-20-40 μ g/ml) 처리한 후 2시간 후에 LPS (1 μ g/ml)로 자극하여 22시간 동안 배양하였다. Fig. 2에서 확인할 수 있듯이 LPS로 자극한 세포에서는 NO 생성량이 대조군에 비해 상당히 증가함을 보여주며, 팔삭 과피 추출물을 농도별로 처리한 부분에서는 농도가 증가함에 따라 nitrite의 생성량이 저하되었다.

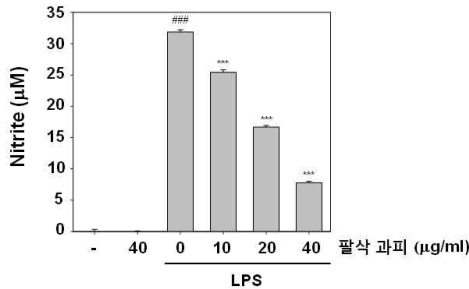


Fig. 2. Effects of fraction from *Citrus hassaku* pericarp on the LPS induced nitric oxide (NO) in RAW 264.7 macrophages.

The nitrite production was measured by the Griess reaction assay method as described in the methods section. Cells were pretreated with different concentrations of fraction from *Citrus hassaku* pericarp for 2 h and stimulated with LPS (1 µg/ml) for 22 h. The values obtained were compared with those of standard concentrations of sodium nitrite dissolved in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM), and the concentrations of nitrite in a conditioned media of sample treated cells were calculated. Data were obtained from three independent experiments and were expressed as means ± SD. ***P < 0.001 indicates significant differences from the LPS treated group, ###P < 0.001 indicates significant differences from the unstimulated control group.

3. 팔삭 과피 추출물의 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2 유전자의 발현 억제 효과

RAW264.7 대식세포에서 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 팔삭 과피 추출물이 미치는 영향을 확인하기 위해 Western blot analysis를 하였다. Fig. 3에 나타난 것과 같이, LPS로 자극받지 않은 세포에서는 극히 낮은 수준의 iNOS와 COX-2 단백질이 발현되었다. 그러나 LPS (1 µg/ml)를 처리한 후 22시간이 지난 세포에서는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 매우 높게 증가하였다. 팔삭 과피 추출물로 2시간 전처리한 (0-10-20-40 µg/ml) 세포에서는 LPS에 의해 유도된 iNOS와 COX-2의 발현이 농도 의존적으로 억제되었다. 팔삭 과피 추출물의 단독 처리 (40

µg/ml)는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현에 영향을 주지 않음을 보였다.

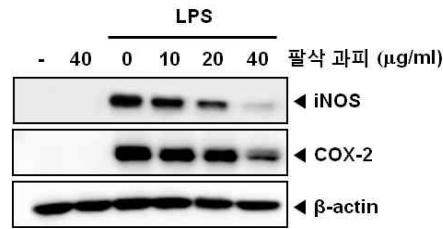


Fig. 3. Inhibition of the fraction from *Citrus hassaku* pericarp on LPS induced iNOS, COX-2 gene products in RAW 264.7 macrophages.

RAW264.7 cells were pretreated with different concentrations of the fraction from *Citrus hassaku* pericarp for 2 h and stimulated with LPS (1 µg/ml) for 22 h. Equal amounts of total proteins (25 µg/lane) were subjected to 8% (for iNOS) and 10% (for COX-2) SDS-PAGE, and the expressions of iNOS and COX-2 proteins were detected by Western blotting using specific anti iNOS and anti COX-2 antibodies. β-actin was used as a loading control.

4. 팔삭 과피 추출물의 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2 mRNA의 발현 억제 효과

우리는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 mRNA와 관계가 있는지 확인하였다. RAW264.7 대식세포에 팔삭 과피 추출물을 2시간 전처리한 후, LPS를 처리하여 22시간동안 자극하여 얻은 세포를 RT-PCR에 의해 iNOS와 COX-2 mRNA 발현을 확인하였다. Fig. 4에서 얻어진 결과를 통하여 LPS 처리 후 22시간 자극을 준 부분의 mRNA level은 증가하였고, LPS를 처리하지 않은 부분은 mRNA가 관찰되지 않았다. 팔삭 과피 추출물로 2시간 전처리한 후 LPS로 자극한 세포에서는 iNOS와 COX-2가 억제됨을 보였다. 종합적으로, RT-PCR의 결과는 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2 mRNA의 발현은 팔삭 과피 추출물에 의해 농도 의존적으로 억제됨을 나타냈다.

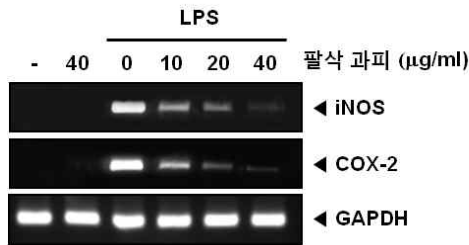


Fig. 4. Inhibition of iNOS and COX-2 mRNA expressions by fraction from *Citrus hassaku* pericarp in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of fraction from *Citrus hassaku* pericarp for 2 h before being incubated with LPS (1 µg/ml) for 22h. Total RNA was isolated, and iNOS and COX-2 mRNA expressions were examined by RT-PCR analysis. PCR of glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH, was performed to control for a similar initial cDNA content of the sample.

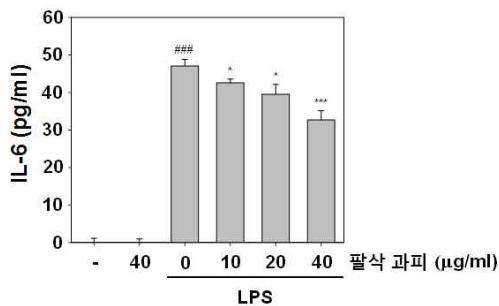


Fig. 5. Inhibition of the fraction from *Citrus hassaku* pericarp on LPS induced IL-6 production in RAW 264.7 macrophages.

Cells were pretreated with different concentrations of fraction from *Citrus hassaku* pericarp for 2 h and stimulated with LPS (1 µg/ml) for 22 h. The amount of IL-6 release was determined by an IL-6 antibody coated enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit, as described in Materials and Methods. Data were obtained from three independent experiments and were expressed as means ± SD. *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 indicate significant differences from the LPS treated group, ###P < 0.001 indicates significant differences from the unstimulated control group.

5. RAW264.7 대식세포에서 팔삭 과피 추출물에 의한 LPS로 유도된 IL-6의 분비 억제 효과

RAW264.7 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 interleukin-6 (IL-6)의 생성에 대한 팔삭 과피 추출물의 잠재적인 항염증 능력을 측정하기 위하여, 세포를 팔삭 과피 추출물로 2시간 전처리 (0-10-20-40 µg/ml) 한 후 LPS (1 µg/ml)로 22시간 자극하였다. IL-6의 농도는 세포를 배양한 액체 배지를 ELISA assay에 의해 측정하였다. Fig. 5.를 통하여 우리의 결과는 팔삭 과피 추출물이 IL-6의 생성에 대해 농도 의존적으로 잠재적인 억제 능력을 가짐을 보였다.

6. RAW264.7 대식세포에서 팔삭 과피 추출물에 의한 LPS로 유도된 TNF-α의 분비 억제 효과

추가적으로 RAW264.7 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)

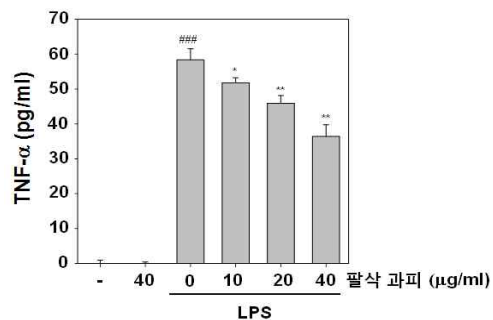


Fig. 6. Inhibition of the fraction from *Citrus hassaku* pericarp on LPS induced TNF-α production in RAW 264.7 macrophages.

Cells were pretreated with different concentrations of fraction from *Citrus hassaku* pericarp for 2 h and stimulated with LPS (1 µg/ml) for 22 h. The amount of TNF-α release was determined by an TNF-α antibody coated enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit, as described in Materials and Methods. Data were obtained from three independent experiments and were expressed as means ± SD. *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 indicate significant differences from the LPS treated group, ###P < 0.001 indicates significant differences from the unstimulated control group.

의 생성에 대한 껍질 과피 추출물의 항염증 능력을 측정하기 위하여, 세포를 껍질 과피 추출물로 2시간 전처리 (0-10-20-40 µg/ml) 한 후 LPS (1 µg/ml)로 22시간 자극하였다. TNF-α의 농도는 세포를 배양한 액체 배지를 ELISA assay에 의해 측정하였다. Fig. 6.을 통하여 우리의 결과는 껍질 과피 추출물이 TNF-α의 생성에 대해 농도 의존적으로 잠재적인 억제 능력을 가짐을 보였다.

7. 껍질 과피 추출물에 의한 LPS로 유도된 NF-κB의 활성 억제 효과 확인

염증에 중요한 전사인자인 NF-κB는 염증반응에 있어서 iNOS와 COX-2을 조절함으로써 염증 반응을 매개한다고 잘 보고되었다. 이에 본 실험에서는 NF-κB의 Subunit인 p65의 인산화 정도를 평가하였다. 그 결과 Fig. 7.에 나타난 것과 같이 LPS에 의한 p65의 인산화는 15분에서 극도로 인산화 되며 껍질 과피 추출물을 전처리한 세포군에서는 이 p65의 인산화가 억제됨을 보였다. 따라서 껍질 과피 추출물은 LPS에 유도되는 NF-κB의 활성을 억제하고 결과적으로 iNOS와 COX-2을 발현을 억제하는 것으로 판단된다.

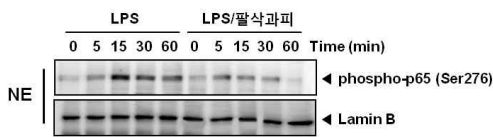


Fig. 7. Suppression of LPS induced NF-κB activity by fraction from *Citrus hassaku* pericarp in RAW 264.7 macrophages.

Cells were pretreated with 40 µg/ml of fraction from *Citrus hassaku* pericarp for 2 h and stimulated with LPS (1 µg/ml) for the indicated times; nuclear extracts were prepared, resolved by SDS PAGE, and electrotransferred to a nitrocellulose membrane, after which Western blot analyses using phospho-specific anti-p65 (ser276) antibody was performed. Lamin B protein was used as a loading control. The results shown are representative of three independent experiments.

8. 껍질 과피 추출물에 의한 LPS로 유도된 p38, ERK1/2, JNK의 인산화 반응 억제능 평가

또 다른 염증인자 카이네아제인 MAPKs (p38, ERK, JNK)에 대한 인산화 정도가 억제되는지 확인 하였다. 이 결과 Fig. 8.에서 확인할 수 있듯이 껍질 과피 추출물은 LPS에 의해 유도되는 어떠한 MAPKs (p38, ERK, JNK)의 인산화도 억제하지 않음을 확인할 수 있었다. 위의 결과로 껍질 과피 추출물의 소염효과는 MAPKs (p38, ERK, JNK)의 인산화 억제를 통해서 일어나는 것이 아니라 NF-κB의 활성억제를 통해서 일어난다는 것을 다시 한번 확인해주었다.

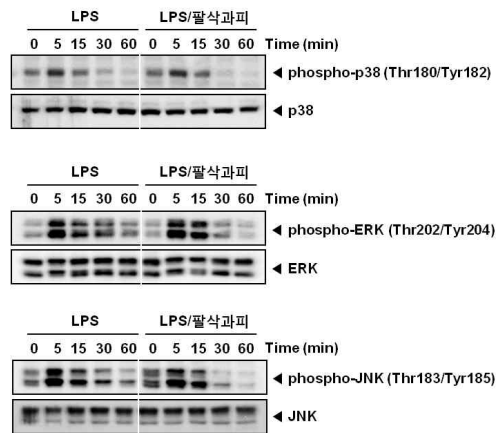


Fig. 8. Effects of fraction from *Citrus hassaku* pericarp on LPS induced activation of p38, ERK, and JNK.

Cells were pretreated with 40 µg/ml fraction from *Citrus hassaku* pericarp for 2 h and stimulated with LPS (1 µg/ml) for the indicated times; whole cell extracts were prepared, resolved by SDS PAGE, and electrotransferred to a nitrocellulose membrane, after which Western blot analyses using phospho-specific anti-p38, phospho-specific anti-ERK, and phospho-specific anti-JNK antibodies were performed. The same membranes were reblotted with anti-p38, and ERK, and anti-JNK antibodies. The results shown are representative of three independent experiments.

결론

본 연구의 목표는 LPS로 자극되어진 RAW264.7 대식세포에서 재래 감귤인 팔삭의 과피 추출물이 NF- κ B 신호 경로의 억제를 통해 항염증 효과를 나타내는지 조사하는 것이었다. 우리는 결론적으로 팔삭 과피 추출물이 LPS로 유도된 NF- κ B p65의 인산화와 translocation을 억제함을 보였다. 또한 RAW 264.7 대식세포의 염증에 있어서 NF- κ B에 의존적인 유전자 산물들 (iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6)의 발현을 down-regulated 함을 보였다.

이 연구는 LPS에 의해 활성화되는 NF- κ B에 대한 팔삭 과피 추출물의 항염증 효과에 대해 확인하였다. 우리의 결과는 팔삭 과피 추출물이 LPS에 의해 활성화된 NF- κ B를 억제함을 보였고, LPS 신호경로를 통한 염증 반응의 중요한 down-regulation 역할을 함을 확인하였다.

iNOS에 의한 NO의 과도한 생성은 급성, 만성 염증을 유발하므로 NO는 중요한 매개자라고 할 수 있다. 그렇기 때문에, NO 생성의 억제는 염증 관련 질병을 치료하고 예방하기 위한 약리적인 치료 전략으로 제시되어 왔다¹⁴. 우리의 결과는 팔삭의 과피 추출물이 LPS로 자극된 RAW264.7 대식세포의 NO 생성을 억제함을 보였다. 추가적으로, 다양한 세포주에서 종양 증식인자, 사이토카인, 유사분열물질은 COX-2의 발현을 급격히 증가시킨다^{15,16}. COX-2는 prostaglandin E2 (PGE2)의 생성을 촉진시키는 염증 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그렇기 때문에, 염증과 관련된 대식세포, 내피세포, 섬유 아세포 등 많은 세포주들은 유도에 의해 COX-2 유전자를 발현시킬 수 있다. 이러한 이유로 우리는 팔삭의 과피 추출물이 LPS로 자극된 RAW264.7 대식세포의 COX-2 단백질의 생성이 농도 의존적으로 억제됨을 보였다.

많은 연구들은 LPS 또는 IFN- γ 에 의한

iNOS와 COX-2 프로모터의 upstream site에 NF- κ B의 결합이 iNOS와 COX-2 유전자 발현의 극대화에 중요한 역할을 함을 보였다¹⁷⁻¹⁹. RAW264.7 대식세포에서 LPS 자극에 의해 iNOS와 COX-2의 전사와 번역을 유도할 수 있고, 이것에 의해 NO와 PGE2가 생성된다²⁰. 이러한 내용에 기초하여, 우리는 팔삭 과피의 추출물이 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 낮춰줌으로써 iNOS와 COX-2의 단백질 발현도 억제함을 확인하였다. 유전자 수준에서, 마우스 대식세포의 iNOS와 COX-2의 발현은 전사 활성화에 의해 크게 조절되었다. 이러한 결과들은 팔삭의 과피 추출물이 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2 유전자의 발현을 NF- κ B 활성화의 차단을 통해 억제함을 나타낸다. 그러나 우리는 다른 전사 인자들의 억제 가능성은 배제하였다. 이러한 이유들을 통하여, 팔삭의 과피 추출물은 잠재적으로 NF- κ B 신호 경로의 차단을 통하여 biomarkers를 조절한다고 할 수 있다.

TNF- α 와 IL-6는 *in vitro* 와 *in vivo* 모두에서 염증을 유발하는 효과를 가진 것으로 알려져 있다. 이러한 사이토카인들은 대식세포에서 분비되며 LPS의해 유도되는 열과 같은 염증성 반응들의 내재적인 매개자이다^{21,22}. 활성화된 대식세포는 염증을 유발하는 TNF- α 나 IL-6 등의 사이토카인을 생성할 수 있다. 이러한 사이토카인들은 염증성 장 질환²³, 류마티스성 관절염²⁴, 혈관염²⁵, 폐혈성 쇼크²⁶ 등을 포함하는 많은 병리학적 상태의 급격한 악화에 관련되어 있다. 이번 연구를 통하여, 우리는 팔삭의 과피 추출물이 RAW264.7 대식세포에서 LPS로 유도된 TNF- α 와 IL-6의 생성을 억제함을 확인하였다.

이번 연구에서 우리는 팔삭의 과피 추출물이 항염증 효과를 보임을 확인하였다. 그러나 추출물에는 다양한 compound들이 존재할 것이다. 이 다음의 연구에서는 팔삭의 과피 추출물로부터 compound들을 분리하여 어떠한 compound가 이러한 항염증 효과를 보이는지 구체적인 메커

니즘에 대해 밝힐 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림수산물식품부 농림수산물식품기술 기획평가원(2010)에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. Robert IL. In Functional Foods Phytochemicals and antioxidants. Goldberg, I. (Ed.) p. 393, Chapman & Hall, New York, 1994.
2. Lee SE, Bang JK, Song J, Seong NS, Park, HW, Chung HG, Kim GS, An TJ. Inhibitory Activity on Angiotensin Converting Enzyme (ACE) of Korean Medicinal Herbs. Korean J. Medicinal Crop Sci. 12: 73-78, 2004.
3. Gallin JI, Snyderman R. Overview. In: Gallin, J.I., Snyderman, R. (Eds.), Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates, 3rd ed. p. 1 - 4. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 1999.
4. Jin HJ, Kim JS, Kang SS, Son KH, Chang HW, Kim HP. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of the roots of *Sophora flavescens*. J Ethnopharmacol. 127(3):589-595, 2010
5. Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. Transpl. Int. 7(Suppl 1):647-649, 1994
6. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev, 43:109-142, 1991
7. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radic Biol Med, 25(4-5):434-456, 1998
8. Kubes P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. Gut, 47(1):6-9, 2000
9. Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids and tumor progression. Cancer Metastasis Rev, 26(3-4):525-534, 2007
10. Sarkar D, Saha P, Gamre S, Bhattacharjee S, Hariharan C, Ganguly S, et al. Anti-inflammatory effect of allylpyrocatechol in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2 via the NF- κ B pathway. Int. Immunopharmacol 8(9):1264-1271 (2005) 218-233, 2008
11. Ahn KS, Aggarwal BB. Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals, Ann N Y Acad Sci. 1056:218-233, 2005
12. Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B: from clone to clinic, Curr Mol Med. 7:619-637, 2007
13. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases, N Engl J Med. 336:1066-1071, 1997
14. Tinker AC, Wallace AV. Selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase: potential agents for the treatment of inflammatory diseases?, Curr Top Med Chem. 6:77-92, 2006
15. Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in

- rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids, *J Clin Invest.* 93:1095-1101, 1994
16. Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T. Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element, *J Biol Chem.* 270:24965-24971, 1995
 17. Weisz A, Oguchi S, Cicatiello L, Esumi H. Dual mechanism for the control of inducible-type NO synthase gene expression in macrophages during activation by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. Transcriptional and post-transcriptional regulation, *J Biol Chem.* 269:8324-8333, 1994
 18. Xie QW, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide, *J Exp Med.* 177:1779-1784, 1993
 19. Kim YM, Lee BS, Yi KY, Paik SG. Upstream NF-kappaB site is required for the maximal expression of mouse inducible nitric oxide synthase gene in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages, *Biochem Biophys Res Commun.* 236:655-660, 1997
 20. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages, *Carcinogenesis.* 20:1945-1952, 1999
 21. Molloy RG, Mannick JA, Rodrick ML. Cytokines, sepsis and immunomodulation, *Br J Surg.* 80:289-297, 1993
 22. West MA, Li MH, Seatter SC, Bubrick MP. Pre-exposure to hypoxia or septic stimuli differentially regulates endotoxin release of tumor necrosis factor, interleukin-6, interleukin-1, prostaglandin E2, nitric oxide, and superoxide by macrophages, *J Trauma.* 37:82-89; discussion 89-90, 1994
 23. Funakoshi K, Sugimura K, Anezaki K, Bannai H, Ishizuka K, Asakura H. Spectrum of cytokine gene expression in intestinal mucosal lesions of Crohn's disease and ulcerative colitis, *Digestion.* 59:73-78, 1998
 24. Bottomley MJ, Webb NJ, Watson CJ, Holt PJ, Freemont AJ, Brenchley PE. Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor (VEGF): specific up-regulation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in synovial fluid, *Clin Exp Immunol.* 117:171-176, 1999
 25. Noris M, Daina E, Gamba S, Bonazzola S, Remuzzi G. Interleukin-6 and RANTES in Takayasu arteritis: a guide for therapeutic decisions?, *Circulation.* 100:55-60, 1999
 26. Lauzurica P, Martinez-Martinez S, Marazuela M, Gomez del Arco P, Martinez C, Sanchez-Madrid F, Redondo JM. Pyrrolidine dithiocarbamate protects mice from lethal shock induced by LPS or TNF-alpha, *Eur J Immunol.* 29:1890-1900, 1999