



Original Article / 원저

LPS가 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 Nrf2/HO-1 경로 조절을 통한 매실 추출물의 NO 생성 억제 효과

강혜주¹, 최은옥^{1,2}, 정진우^{1,2}, 박신행³, 박철⁴, 홍수현², 신순식⁵, 정재훈^{6*}, 최영현^{1,4*}

¹동의대학교 항노화연구소, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실, ³동의대학교 한의과대학 병리학교실, ⁴동의대학교 자연생활과학대학 분자생물학과, ⁵동의대학교 한의과대학 방제학교실, ⁶부산대학교 자연과학대학 분자생물학과

Inhibition of NO Production by Ethanol Extract of *Prunus mume* Fruits in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages through Regulation of the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway

Hye-Joo Kang¹, Eun Ok Choi^{1,2}, Jin-Woo Jeong^{1,2}, Shin-Hyung Park³, Cheol Park⁴, Su Hyun Hong², Soon Shik Shin⁵, Jae-Hun Cheong^{6*}, Yung Hyun Choi^{1,4*}

¹Anti-Aging Research Center, Dong-Eui University, ²Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, ³Department of Pathology, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, ⁴Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Dong-Eui University, ⁵Department of Formula Sciences, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, ⁶Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University

ABSTRACT

Objectives : The fruit of *Prunus mume* Siebold & Zucc. has been used as an alternative medicine and functional food in Korea and Japan for preventive and therapeutic purposes. However, its molecular actions and mechanism on anti-inflammatory activity have not been clearly investigated. The aim of this study was to clarify the anti-inflammatory

activity of the ethanol extract of *P. mume* fruit (EPM) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells, and sought to understand the associated molecular mechanisms.

Methods : Cytotoxicity was assessed by an MTT assay. The amount of nitric oxide (NO) production was determined by nitrite assay. The mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) was analyzed by RT-PCR. In addition, expression levels of iNOS, nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) protein were detected by Western blotting.

Results : Our data indicated that EPM inhibited NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells in a concentration-dependent manner. At the mRNA and protein levels, EPM suppressed LPS-induced iNOS expression. On the other hand, EPM markedly enhanced HO-1 expression, which was associated with an induction and nuclear translocation of Nrf2. Moreover, the inhibitory effect of EPM against LPS-induced NO production was significantly enhanced by hemin, a HO-1 inducer; however, EPM's effect on the production of NO was abolished by zinc protoporphyrin IX, a HO-1 inhibitor.

Conclusion : The results suggest that EPM can act as a suppressor agent on NO production through an activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway, and may be a promising candidate for the treatment of inflammatory diseases.

Key words : *Prunus mume*, NO, HO-1, Nrf2, anti-inflammatory activity

I. 서론

염증은 미생물 감염, 내독소, 조직 손상 등과 같은 외인적인 요인 및 조직의 스트레스와 기능부전에 의한 내인적인 요인에 의해 유도되는 자극에 대한 생체 방어 반응의 하나로서 조직의 구조와 기능을 정상적으로 회복하기 위해 필수적으로 일어나는 반응 중의 하나이다. 정상적인 염증반응은 시간이 지남에 따라 체내에서 스스로 염증반응이 제한되는 조절과정을 거치지만¹⁾ 지속적인 염증반응은 만성염증질환 및 종양 등의 유발 원인이 되기도 한다²⁾. 체내의 염증반응에 관여하는 세포 중 하나인 대식세포(macrophage)는 혈액 단핵세포로부터 분화된 조직세포로 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다. 대식세포가 내독소로 알려진 lipopolysaccharide (LPS)의 자극을 받아 염증반응이 일어나면 interferon- γ (IFN- γ), interleukin (IL)-1 β , IL-6 등과 같은 염증성 cytokine을 방출하게 되고³⁻⁶⁾, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 유도하여 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂와 같은 다양한 염증매개 분자들이 생성되어 염증반응이

개시된다⁷⁻¹⁰⁾. 이 중에서 염증반응의 지표물질인 NO는 L-arginine에서 NO synthase (NOS)에 의해 합성되는데, NO 형성은 체내방어기능, 신호전달기능, 혈관 확장 등의 다양한 생리기능을 가지고 있다. 그러나 과잉 생성된 NO는 염증유발과 조직손상, 유전자변이, 폐혈성쇼크 및 신경손상 등을 일으키고¹¹⁾ 생체조직의 괴사까지 야기할 수 있다¹²⁾. 따라서 염증성 매개체들의 생성을 억제할 수 있는 천연화합물의 발견은 부작용이 적은 항염증 치료제 개발을 위해 필요하다.

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)는 산화적 스트레스에 대응하는 세포 방어기전을 위한 일차적인 전사인자로 알려져 있다¹³⁾. 일반적인 상황에서 Nrf2는 Keap1이라 불리는 Nrf2 억제단백질과 결합된 채로 세포질에 존재하다가 외부의 자극이나 산화적 스트레스에 의해서 Keap1 단백질에서 떨어져 나와 핵으로 이동한다. 핵에서 Nrf2는 small Maf 단백질과 이합체를 형성하여 antioxidant response element (ARE)에 결합해 항산화 유전자들의 발현을 촉진함으로써 생체 방어기전을 활성화 시킨다¹⁴⁾. 이러한 Nrf2 신호전달을 통해 생성되는 항산화 효소는 지질의 과산

*Corresponding author : Jae-Hun Cheong, Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, 2, Busandaehak-ro 63beon-gil, Geumjeong-gu, Busan, 46241, Republic of Korea.

Tel : +82-51-510-2277, Fax : +82-51-513-9258, E-mail : molecule85@pusan.ac.kr

*Corresponding author : Yung Hyun Choi, Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036, E-mail : choiyh@deu.ac.kr

• Received : January 31, 2017 / Revised : February 8, 2017 / Accepted : February 10, 2017



화, 단백질산화 및 핵산 손상 등에 대한 방어 작용 등 세포 내 산화적 스트레스 제거와 세포 방어 기작에 중요한 역할을 하고 있다¹⁵⁾. 최근의 연구에 의하면, Nrf2는 C6 신경교 세포에서 산화적 스트레스(H₂O₂)로 유도된 DNA손상과 세포사멸에 대해 보호효과를 나타내었으며, 특히 이러한 효과는 heme oxygenase-1 (HO-1)과 thioredoxin reductase 1과 같은 항산화 효소의 조절을 통해 일어난 것으로 보고된 바 있다¹⁶⁾. 또한 Nrf2 활성화에 의해 생성된 HO-1은 RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의해 생성된 염증성 cytokine의 생성을 억제함으로써 항염증 효과를 나타낸다고 보고되어 있다^{17,18)}. 따라서 부작용이 적은 항염증 치료제 개발에 있어서 활성산소종(reactive oxidative species)과 활성질소종(reactive nitrogen species)에 대한 소거제 및 Nrf2 신호전달 경로의 활성을 적절한 수준으로 유도할 수 있는 항산화제의 탐색에 관심이 증가하고 있는 추세이다.

매실은 장미과(Rosaceae)에 속하는 낙엽활엽교목인 매화나무(*Prunus mume* Siebold & Zucc.)의 열매로서 한국, 중국 및 일본에서 주로 재배되고 있다. 매실은 강력한 알칼리성 식품으로 구연산, 사과산, 호박산 등과 같은 유기산과 함께 풍부한 비타민 및 무기질이 많이 함유되어 있어 항균활성, 항산화 활성, 혈관계 질환의 치료와 모세혈관 강화 등 다양한 약리학 및 생물학적 활성을 가지는 것으로 알려져 있다¹⁹⁻²¹⁾. 또한, 유기산들은 식욕촉진 및 위액분비를 증가하여 소화 활동과 피로회복을 도와주는 효과가 있다고 알려져 있으며^{22,23)} 최근 연구에 따르면, U937 혈구암 세포에서 매실 추출물에 의해 extrinsic 및 intrinsic pathway를 거쳐 세포사멸이 유도되어 항암활성을 가짐이 보고된 바 있으며²⁴⁾, C2C12 근아세포에서 매실 추출물이 H₂O₂로 유도되는 산화적인 스트레스와 세포사멸에 대해 보호효과를 가지는데, 이 효과는 Nrf2/HO-1 경로의 활성화를 통해 일어났음을 알 수 있었다²⁵⁾. 그러나 매실이 Nrf2/HO-1의 조절을 통해 항염증 효과를 가진다는 내용은 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 매실 에탄올 추출물(ethanol extract of *P. mume* fruit, EEPM)의 항염증 효과를 알아보기 위하여 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 염증 반응의 주요한 매개분자인 NO생성에 미치는 영향을 조사하고 Nrf2/HO-1 발현에 미치는 영향을 비교하여 매실 추출물에 의한 항염증효과와 작용기전을 규명하고자 하

였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료준비

본 실험에 사용된 매실은 동의대학교 부속한방병원에서 제공받았으며, EEPM을 얻기 위하여 흐르는 물로 충분히 세척하고 건조시킨 후 잘게 분쇄하였다. 건조된 매실 100 g 당 ethanol 1 L를 첨가하여 60°C, 150 rpm으로 3일간 교반 후 상층액만 분리하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리시켜 찌꺼기를 제거하였다. 추출물은 여과한 후 Rotary evaporator (Eyela, A-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하고, 농축물은 동결 건조하여 분말화시켰다. 이를 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 100 mg/ml의 농도로 만든 다음 -20°C에 보관하였고, 사용시 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

2. 세포 배양

RAW 264.7 대식세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하여, 10% fetal bovine serum (FBS, WELGENE, Daegu, Republic of Korea)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 2-3일에 간격으로 세포를 부유시킨 후 적정수의 세포를 유지하였다.

3. MTT assay에 의한 세포 생존율 조사

RAW 264.7 대식세포의 증식에 미치는 EEPM의 영향을 조사하기 위하여 세포 배양용 6 well plate에 3×10⁵ cells/well로 세포를 분주하고 적정 농도의 EEPM 단독, 100 ng/ml의 LPS (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 단독 또는 EEPM을 1 시간 선처리 후 LPS를 처리하였다. 24 시간 후 배지를 제거하고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200 µl씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 다시 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 DMSO를

2 ml씩 각 well에 분주하여 생성된 formazan을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 μ 씩 옮겨서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

4. NO 생성량 측정

LPS 자극에 의한 RAW 264.7 대식세포의 NO 생성에 미치는 EEPM의 영향을 검토하기 위하여 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. 이를 위하여 RAW 264.7 대식세포에 적정 농도의 EEPM 단독, LPS (100 ng/ml)단독 또는 EEPM을 1 시간 전처리 후 LPS를 처리하여 24시간 배양한 후 세포 배양액을 수거하였다. 배양액 100 μ l와 동량의 Griess reagent시약(Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 상온에서 반응 시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였는데, sodium nitrite (NaNO_2)의 농도 별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

5. 핵과 세포질 단백질의 분리

EEPМ의 항염증효과와 관련하여 핵과 세포질에서 Nrf2의 발현 양상을 비교하기 위해 6 well plate에 RAW 264.7 대식세포를 분주하여 안정화시킨 후 EEPM를 1 시간 전처리하고 LPS (100 ng/ml)를 처리하였다. 적정 시간 후 세포를 모아 Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 핵과 세포질을 분리하였다.

6. 총 단백질의 분리, 전기영동 및 Western blot analysis

EEPМ 처리에 따른 번역 수준에서의 유전자 발현 변화의 관찰을 위하여 준비된 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1% Nonidet-P40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM dithiothreitol]를 첨가하여 4°C에서 1 시간 이상 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액에 있는 단백질을 분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량 한 다음 동량의

Laemilni sample buffer (Bio-Rad)와 혼합하여 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다. 이를 다시 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electrotransfer에 의해 전이시키고 분리된 단백질이 전이된 membrane에 5% skim milk를 1 시간 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 적정 1 차 항체를 처리하여 상온에서 2 시간 이상 또는 4°C에서 over night 반응시킨 다음 phosphate buffer saline (PBS)-T (PBS with Tween 20)로 세척하고 1차 항체에 맞는 2차 항체를 사용하여 상온에서 1 시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현 변화를 분석하였다. 본 실험에서 단백질 분석을 위하여 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. 및 Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체로 사용된 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse 및 anti-rabbit 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. 에서 구입하였다.

7. Nrf2 면역형광분석법

EEPМ의 항염증효과와 관련하여 Nrf2의 핵과 세포질에서 발현 양상을 시각적으로 확인하기 위하여 면역형광분석법을 실시하였다. 먼저 세포 배양용 4 well cell culture slide에 RAW 264.7 대식세포를 분주하여 안정화 시킨 후 EEPM을 처리하고 1 시간 후에 LPS (100 ng/ml)를 처리하였다. 적정 시간 처리 후, 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Chemical Co.)가 함유된 PBS 용액으로 coverslip에 부착된 세포를 10 분간 고정하고, 100% methanol을 처리하여 상온에 10 분간 반응시켰다. PBS로 세포를 수세 후, Nrf2 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 1 시간 처리하고, fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated donkey anti-rabbit immunoglobulin G (IgG, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA)로 1 시간 더 반응을 시켰다. 다시 PBS로 수세 후, 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액으로 10 분간 핵을 염색한 후 형광현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany)

하에서 Nrf2의 발현 정도를 관찰하였다.

8. RNA의 분리 및 reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)의 분석

EEPM이 함유된 배지에서 배양된 세포를 대상으로 Tryzol® Reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였으며, iNOS의 primer (iNOS: 5' CGT GTT TAC CAT GAG GCT GA 3' and 5' GCT TCA GGT TCC TGA TCC AA 3')와 ONE-STEP RT-PCR PreMix kit (iNtRON Biotechnology, Republic of Korea)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이후 증폭된 DNA 산물을 1.5% agarose gel를 사용하여 100 volt에서 20분간 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma-Aldrich Chemical Co.)로 염색 후 UV 하에서 관찰하였다. 아울러 PCR 반응의 대조군으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH: 5' GTC ATC ATC TCC GCC CCT TCT GC 3' and 5' GAT GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG 3')를 사용하였다.

9. 통계 분석

실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석 (ANOVA)을 실시한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range tests를 실시하였으며, 그 결과는 평균 (mean) \pm 표준편차 (standard deviation, SD)로 표시하였다.

III. 결과

1. RAW 264.7 대식세포의 세포 생존도에 미치는 EEPM의 영향

EEPM의 항염증 효능 실험조건을 설정하기 위하여 24시간 동안 적정 농도로 RAW 264.7 세포에 처리한 후 MTT assay를 실시하여 세포 생존도 변화를 측정하였다. Fig. 1에 나타난 것처럼, EEPM 2 mg/ml까지 세포 생존도에 전혀 영향을 미치지 않았으며, LPS와 동시처리 했을 경우도 유의적인 영향을 미치지 않았기 때문에 최고 농도를 2 mg/ml로 설정하였다.

2. LPS로 인해 유도되는 NO 생성 및 iNOS 발현에 미치는 EEPM의 영향

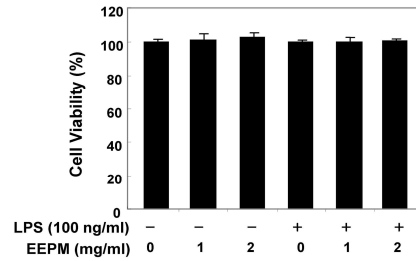


Fig. 1. Effects of EEPM and LPS on the cell viability of RAW 264.7 macrophages. After RAW 264.7 cells were seeded, the cells were treated with the indicated concentrations of EEPM alone or pretreated with EEPM for 1 h before 100 ng/ml of LPS treatment. After 24 h, the cell viability was assessed using an MTT assay. The data are shown as means \pm SD of three independent experiments.

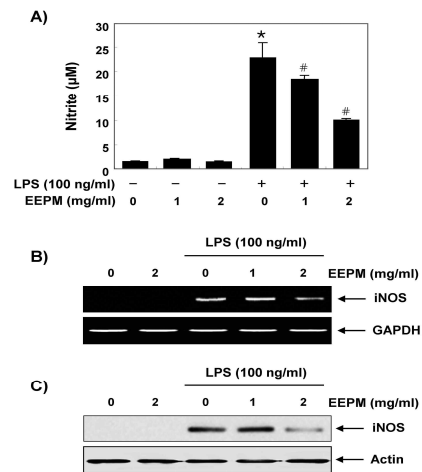


Fig. 2. Effects of EEPM on LPS-induced NO production, and iNOS expression in RAW 264.7 macrophages. Cells were treated with the indicated concentrations of EEPM for 1 h before 100 ng/ml LPS treatment for 24 h. (A) Amounts of NO were determined using Griess reagent. The data are shown as means \pm SD of three independent experiments (* $p < 0.05$ compared with untreated group; # $p < 0.05$ compared with LPS-treated group). The levels of iNOS mRNA (B) and protein (C) were assessed by RT-PCR and Western blot analysis after 24 h treatment. GAPDH and actin were used as internal controls for the RT-PCR and Western blot assays, respectively.

RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증 매개체인 NO의 생성과 NO 생성에 관여하는 iNOS 단백질의 발현 증가에 미치는 EEPM의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 RAW 264.7 세포에 1 및 2 mg/ml의 EEPM을 1시간 전처리하고, LPS로 24시간 자극하여 상층의 배지로 방출되는 NO의 생성량을 분석하였다. Fig. 2A에 제시한 바와 같이, LPS (100 ng/ml) 단독 처리에 의해 현저히 증가된 NO의 생성이 EEPM 전처리에 의하여 유의적으로 억제되었다. 이러한 NO의 생성변화가 iNOS 발현의 변화와 연관성이 있는지를 확인해 본 결과, NO 생성 억제와 유사하게 mRNA 및 단백질 수준에서의 iNOS 발현이 억제되었다(Fig. 2B 및 C).

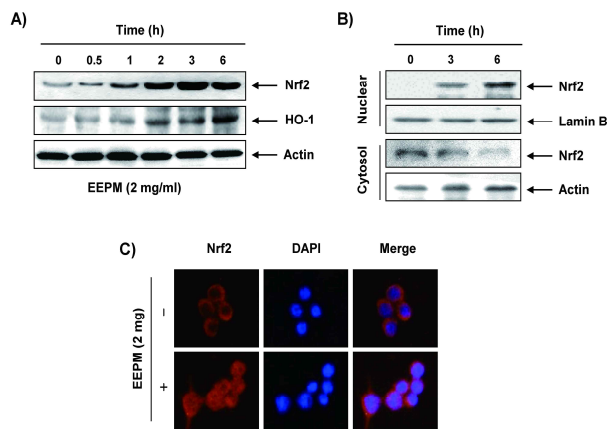


Fig. 3. Effects of EEPM on Nrf2 and HO-1 expressions in RAW 264.7 macrophages. Cells were treated with 2 mg/mL of EEPM for the indicated times. (A) Nrf2 and HO-1 protein expressions were detected by Western blot analysis, and representative blots of three independent experiments are shown. (B) The nuclei were fractionated from the cytosol using Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit as described in Experimental part. Lamin B and actin were used as internal controls for the nuclear and cytosolic fractions, respectively. (C) Cells were stimulated with EEPM (2 mg/ml) for 6 h. Localization of Nrf2 was visualized with a fluorescence microscope following immunofluorescence staining with anti-Nrf2 and FITC-labeled IgG antibodies (red). Nuclei of the corresponding cells were also visualized with DAPI (blue). The cells were visualized using a fluorescence microscope.

3. Nrf2 경로 활성화에 미치는 EEPM의 영향

다음은 HO-1과 HO-1의 발현을 조절하는 전사인자인 Nrf2의 발현에 미치는 EEPM의 영향을 조사하였다. Fig. 3A에 나타난 바와 같이, HO-1의 단백질 발현이 EEPM 처리 시간 의존적으로 증가하였으며, Nrf2 발현 또한 EEPM 처리 시간 의존적으로 증가되었다. EEPM 처리에 의해 증가된 Nrf2가 핵으로 이동되었는지의 여부를 조사하기 위하여 EEPM가 처리된 세포의 세포질과 핵을 분획하여 이들에 Nrf2의 발현 정도를 분석하였다. Fig. 3B에 나타난 것과 같이, EEPM 처리에 의해 세포질의 Nrf2 발현은 감소되었고 핵 내에서의 Nrf2 발현이 증가되었으며, 이를 면역형광염색을 통하여 재확인하였다(Fig. 3C).

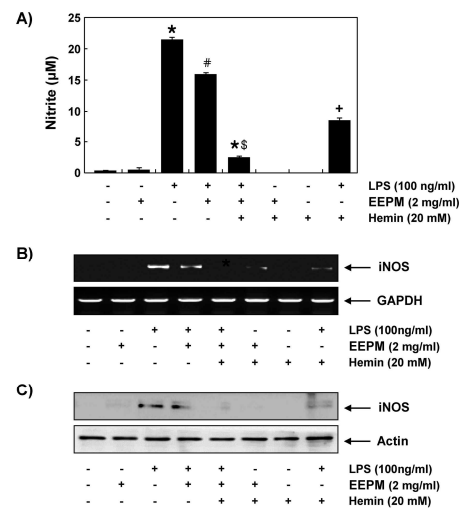


Fig. 4. Effects of a HO-1 inducer on the EEPM-mediated attenuation of NO production and iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Cells were pretreated for 1 h with 2 mg/ml EEPM and then treated for 24 h with or without 100 ng/ml LPS in the absence or presence of 20 mM Hemin. (A) Amounts of NO were determined using Griess reagent. The data are shown as means \pm SD of three independent experiments (* p <0.05 compared with untreated group; # p <0.05 compared with LPS-treated group; § p <0.05 compared with LPS and EEPM-treated group). The levels of iNOS mRNA (B) and protein (C) were assessed by RT-PCR and Western blot analysis after 24 h treatment. GAPDH and actin were used as internal controls for the RT-PCR and Western blot assays, respectively.

4. EEPM의 NO 생성 억제에 미치는 hemin의 영향

EEPМ의 NO 생성 억제 효과에 미치는 HO-1의 영향을 알아보기 위하여, HO-1 발현 유도제인 hemin를 이용하여 EEPМ에 의한 NO 생성과 iNOS 발현 억제에 미치는 영향을 조사하였다. HO-1 발현 유도제인 hemin을 EEPМ과 함께 처리하여 HO-1 발현을 유도하였을 때 EEPМ에 의해 억제되었던 NO의 생성과 iNOS 발현 억제 효과를 더욱 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 4). 또한 EEPМ을 처리하지 않고 hemin 전처리 후 LPS로 24시간 자극하였을 때에도 NO의 생성과 iNOS의 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인하여 HO-1의 증가가 항염증 효과와 관련이 있는 것을 확인 할 수 있었다.

5. EEPМ의 NO 생성 억제에 미치는 ZnPP의 영향

이상에서 확인된 EEPМ의 NO 생성억제에 HO-1이 직접 관여할 가능성을 재확인하기 위하여 HO-1 발현 억제제인 ZnPP를 이용하여 EEPМ에 의한 NO 생성과 iNOS 발현 억제에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이, HO-1 발현 억제제인 ZnPP를 EEPМ과 함께 처리하여 HO-1 발현을 억제하였을 때 EEPМ에 의해 억제되었던 NO의 생성과 iNOS의 발현 저하 효과가 유의적으로 상쇄되었다. 이러한 결과는 EEPМ의 항염증 효과에 Nrf2/HO-1 경로가 직접적으로 관여하고 있음을 의미하는 것이다.

IV. 고찰

장미과에 속하며 동아시아에 널리 분포하는 과일나무인 매화의 열매인 매실은 예로부터 민간요법에서 널리 이용되어 왔고 최근 약용식품으로서 효능이 재평가되고 있다. 특히 풍부한 유기산과 섬유소 및 생리활성 성분을 함유하고 있어서 다양한 약리학 및 생물학적 활성을 가지는 것으로 보고되어 있으나¹⁹⁻²¹, 매실 추출물에 의한 항염증작용 및 그에 따른 분자생물학적 기전에 대해서는 명확히 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 매실 추출물(EEPМ)의 항염증 효능을 NO 생성 측면에서 검토하고 이러한 효능의 분자생물학적 기전에 대해 규명하고자 하였다.

NO는 미생물 침입 또는 염증성 cytokine의 자극 등으로 인해 NO 합성 효소(NOS)에 의하여 L-arginine으로부터 생성된다. 병리적인 조건 하에서 iNOS에 의

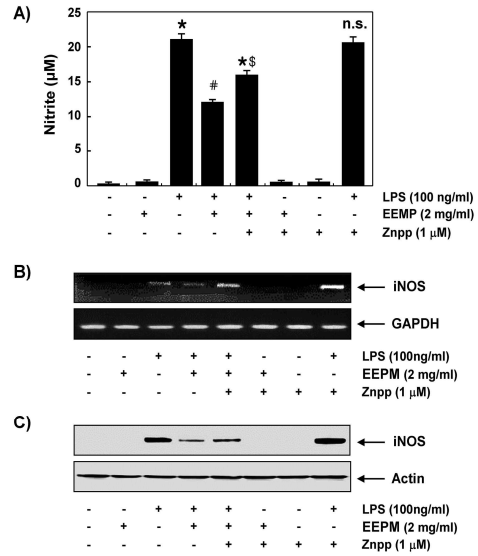


Fig. 5. Effects of a HO-1 inhibitor on the EEPМ-mediated attenuation of NO production and iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Cells were pretreated for 1 h with 2 mg/ml EEPМ and then treated for 24 h with or without 100 ng/ml LPS in the absence or presence of 1 µM zinc protoporphyrin (ZnPP). (A) Amounts of NO were determined using Griess reagent. The data are shown as means ± SD of three independent experiments (*p<0.05 compared with untreated group; #p<0.05 compared with LPS-treated group; \$p<0.05 compared with LPS and EEPМ-treated group; n.s., not significant). The levels of iNOS mRNA (B) and protein (C) were assessed by RT-PCR and Western blot analysis after 24 h treatment. GAPDH and Actin were used as internal controls for the RT-PCR and Western blot assays, respectively.

해 과잉 생성된 NO는 다른 염증성 매개체들과 함께 과도한 염증을 유발하고, 조직 손상을 유도하며, 세포의 돌연변이 및 종양 발생 등에도 관여하는 것으로 알려져 있다^{9,26}. 본 연구의 결과에 의하면, LPS로 유도된 NO 생성이 EEPМ에 의하여 현저하게 감소되었다(Fig. 2A). NO 생성에 관여하는 NOS는 3가지 이성질체로 존재하는데 endothelial NOS (eNOS)와 neuronal NOS (nNOS)는 상피세포와 신경에 존재하여 정상적 생리기능을 조절하는 반면에, 대식세포나 혈관세포의 inducible NOS (iNOS)는 과량생성 될 경우 면역질환 및 패혈증을 초래한다²⁷. LPS에 의한 NO의 생성을

감소시킨 EEPM의 효과가 iNOS의 발현억제에 의한 것인지 알아보기 위하여 RT-PCR과 western blot을 수행하였다. LPS가 자극되지 않은 상태의 RAW 264.7 세포에서는 iNOS의 mRNA와 단백질이 거의 발현되지 않았지만 LPS 자극에 의하여 현저하게 증가하였다. 그러나 LPS에 의해 증가한 iNOS mRNA와 단백질의 발현이 EEPM 처리 농도 의존적으로 감소되어 (Fig. 2B 및 C), NO의 생성 억제는 전사 수준에서의 iNOS의 발현 억제에 의한 것임을 알 수 있었다.

Nrf2/HO-1 신호전달 경로는 산화적 스트레스에 대응하는 주요한 방어 기전이다. HO-1은 heme을 biliverdin, 유리 철분 및 일산화탄소로 분해하고 biliverdin은 biliverdin 환원효소에 의하여 bilirubin으로 전환된다. Heme의 대사산물인 bilirubin은 강력한 항산화 활성을 지니며 일산화탄소는 항염증 활성을 지닌다^{15,28-30}. 따라서 HO-1은 염증반응의 억제는 물론 산화적 스트레스를 감소시킴으로써 세포의 항상성을 유지시키는 필수 인자인 것으로 알려져 있다. 또한, HO-1 단백질 발현은 Nrf2 의존적으로 조절되는데, 핵으로 이동된 Nrf2는 ARE에 결합하여 이들 유전자의 전사 활성을 향진시킴으로써 산화적 스트레스에 대한 생체 방어기전에 핵심적인 역할을 담당한다^{13,14}. 따라서 EEPM의 항염증효과가 Nrf2/HO-1 신호전달경로와 관련이 있는지를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 EEPM을 처리하여 HO-1과 HO-1의 발현을 조절하는 전사인자인 Nrf2의 발현을 분석한 결과, EEPM 처리에 의하여 Nrf2 뿐만 아니라 HO-1의 단백질 발현이 시간 의존적으로 현저히 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3A). 또한 EEPM에 의해 증가된 Nrf2 단백질이 핵 내로 이동하였음을 확인하였으며, 이는 Nrf2가 HO-1의 발현을 증가시키기 위한 전사인자로서 작용할 가능성이 높음을 의미한다(Fig. 3B 및 C).

따라서 EEPM의 iNOS 발현 제어를 통한 NO의 생성 억제 효과가 Nrf2/HO-1 신호 전달계와 직접 연관성을 가지는지의 여부를 조사하기 위하여 EEPM의 NO 생성과 iNOS 발현 억제에 미치는 HO-1 inducer 및 inhibitor의 영향을 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면, HO-1 inducer인 hemin을 처리하여 HO-1 활성을 유도하였을 때 EEPM에 의해 감소되었던 NO의 생성과 iNOS의 발현이 더욱 감소되었다(Fig. 4). 그러나 HO-1 inhibitor인 ZnPP를 처리하여 HO-1 활성을 억제하였을 때에는 EEPM에 의해 감소되었던

NO 함량 및 iNOS의 발현이 다시 증가되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 EEPM이 Nrf2/HO-1 신호전달경로 활성을 통하여 LPS 자극에 의한 iNOS의 발현을 억제할 수 있으며, 이로 인해 결국 NO의 생성을 감소시켰음을 의미한다. 이상의 결과는 엉겅퀴 또는 개망초 추출물에서 보여준 선행 연구의 결과들과도 매우 일치된다^{31,32}. 비록 본 연구에서 항염증의 지표로서 NO만을 대상으로 조사하였으나, 향후 다양한 염증성 cytokine의 생성과 조절인자들에 미치는 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다. 아울러 본 연구의 결과는 매실의 항염증 유효 성분 탐색과 기능성 소재로서의 활용을 위한 기초 자료로서 사용될 것이다.

V. 결론

본 연구에서는 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 대식세포에서의 NO 생성 및 iNOS 발현에 미치는 EEPM의 효능을 확인하였다. LPS가 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 NO의 함량이 현저하게 증가하였으나 EEPM 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였으며, 이는 전사 및 번역 수준에서 iNOS의 발현억제와 연관성이 있었다. 아울러 EEPM은 Nrf2의 발현 증가를 통하여 HO-1의 활성을 촉진시켰을 가능성을 확인하였으며, HO-1의 활성 조절제를 통한 결과들은 EEPM에 의한 NO 생성 억제가 Nrf2/HO-1 신호전달 경로 의존적임을 보여주었다. 이러한 결과는 EEPM의 항산화 활성이 염증성 반응의 억제에 관여하고 있음을 보는 주는 것이다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

References

1. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):787-95.
2. Shabbir A, Shahzad M, Ali A, Zia-Ur-Rehman M. Discovery of new benzothiazine derivative as



- modulator of pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid Arthritis. *Inflammation*. 2016;39(6): 1918–29.
3. Tzeng YL, Datta A, Kolli VK, Carlson RW, Stephens DS. Endotoxin of *Neisseria meningitidis* composed only of intact lipid A: Inactivation of the meningococcal 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase. *J Bacteriol*. 2002;184(9):2379–88.
 4. Hou YC, Janczuk A, Wang PG. Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr Pharm Design*. 1999;5(6):417–41.
 5. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol*. 1993;54(2):171–8.
 6. 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*. 1993;177(6):1779–84.
 7. Albina JE, Reichner JS. Nitric oxide in inflammation and immunity. *New Horiz*. 1995;3(1):46–64.
 8. Lee SJ, Lim KT. Phytyglycoprotein inhibits interleukin-1 β and interleukin-6 via p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2008;377(1):45–54.
 9. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992;6(12):3051–64.
 10. Zhang G and Ghosh S. Molecular mechanisms of NF- κ B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res*. 2000;6(6):453–57.
 11. Madhu BP, Singh KP, Saminathan M, Singh R, Shivasharanappa N, Sharma AK, Malik YS, Dhama K, Manjunatha V. Role of nitric oxide in the regulation of immune responses during rabies virus infection in mice. *Virusdisease*. 2016;27(4):387–99.
 12. Sadowska-Bartosz I, Gajewska A, Skolimowski J, Szewczyk R, Bartosz G. Nitroxides protect against peroxynitrite-induced nitration and oxidation. *Free Radic Biol Med*. 2015;89(1):1165–175.
 13. Chen XL and Kunsch C. Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Pharm Des*. 2004;10(8):879–91.
 14. Dhakshinamoorthy S, Porter AG. Nitric oxide-induced transcriptional up-regulation of protective genes by Nrf2 via the antioxidant response element counteracts apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 2004;279(19):20096–107.
 15. Otterbein LE, Choi AM. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(6):L1029–37.
 16. Choi EO, Jeong JW, Park C, Hong SH, Kim GY, Hwang HJ, Cho EJ, Choi YH. Baicalein protects C6 glial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis through regulation of the Nrf2 signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2016;37(3):798–806.
 17. Lin HY, Juan SH, Shen SC, Hsu FL, Chen YC. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW 264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(9):1821–32.
 18. Bornman L, Baladi S, Richard MJ, Tyrrell RM, Polla BS. Differential regulation and expression of stress proteins and ferritin in human monocytes. *J Cell Physiol*. 1999;178(1):1–8.
 19. Otsuka T, Tsukamoto T, Tanaka H, Inada K, Utsunomiya H, Mizoshita T, Kumagai T, Katsuyama T, Miki K, Tatematsu M. Suppressive effects of fruit-juice concentrate of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. (Japanese apricot, Ume) on *Helicobacter pylori*-induced glandular stomach lesions in Mongolian gerbils. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2005;6(3):337–41.
 20. Utsunomiya H, Takekoshi S, Gato N, Utatsu H, Motley ED, Eguchi K, Fitzgerald TG, Mifune M, Frank GD, Eguchi S. Fruit-juice concentrate of Asian plum inhibits growth signals of vascular smooth muscle cells induced by angiotensin II.

- Life Sci. 2002;72(6):659–67.
21. Yan XT, Lee SH, Li W, Sun YN, Yang SY, Jang HD, Kim YH. Evaluation of the antioxidant and anti-osteoporosis activities of chemical constituents of the fruits of *Prunus mume*. Food Chem. 2014;156:408–15.
 22. Mitani T, Horinishi A, Kishida K, Kawabata T, Yano F, Mimura H, Inaba N, Yamanishi H, Oe T, Negoro K, Mori H, Miyake Y, Hosoda A, Tanaka Y, Mori M, Ozaki Y. Phenolics profile of mume, Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) fruit. Biosci Biotechnol Biochem. 2013;77(8):1623–7.
 23. Kim S, Park SH, Lee HN, Park T. *Prunus mume* extract ameliorates exercise-induced fatigue in trained rats. J Med Food. 2008;11(3):460–8.
 24. Park C, Jin CY, Kim GY, Jeong YK, Kim WJ, Choi YH. Induction of apoptosis by ethanol extract of *Prunus mume* in U937 human leukemia cells through activation of caspases. Oncol Rep. 2011;26(4):987–93.
 25. Kang JS, Kim DJ, Kim GY, Cha HJ, Kim S, Kim HS, Park C, Hwang HJ, Kim BW, Kim CM, Choi YH. Ethanol extract of *Prunus mume* fruit attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis involving Nrf2/HO-1 activation in C2C12 myoblasts. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2016;26(2):184–90
 26. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide, and NG-monomethyl-L-arginine. Biochem J. 1996;316(Pt1):209–15.
 27. Garcia X, Stein F. Nitric oxide. Semin Pediatr Infect Dis. 2006;17(2):55–7.
 28. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. Physiol Rev. 2006;86(2):583–650.
 29. Lin HY, Juan SH, Shen SC, Hsu FL, Chen YC. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. Biochem Pharmacol. 2003;66(9):1821–32.
 30. Tamion F, Richard V, Bonmarchand G, Leroy J, Lebreton JP, Thuillez C. Induction of heme-oxygenase-1 prevents the systemic responses to hemorrhagic shock. Am J Respir Crit Care Med. 2001;164(10Pt1):1933–8.
 31. Lee DS, Kim KS, Li B, Choi HG, Keo S, Jun KY, Park JH, Kim YC. Anti-inflammatory effect of the *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* 70% ethanolic extract in Raw 264.7 cells by heme oxygenase-1 expression. Kor J Pharmacogn. 2012;43(1): 39–45.
 32. Sung MS, Kim YH, Choi YM, Ham Hm, Jeong HS, Lee JS. Anti-inflammatory effect of *Erigeron annuus* L. flower extract through heme oxygenase-1 induction in RAW 264.7 macrophages. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2011;40(11):1507–11