

RAW 264.7 세포에서淫羊藿 물 추출물의 nuclear factor- κ B 억제를 통한 항염증 효과

정지윤[#], 변성희, 박정아, 조일제, 김상찬^{*}

대구한의대학교 한의과대학

Anti-inflammatory Effects of Epimedii Herba Water Extract through Inhibition of Nuclear Factor- κ B in RAW 264.7 Cells

Ji Yun Jung[#], Sung Hui Byun, Chung A Park, Il Je Cho, Sang Chan Kim^{*}

College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Republic of Korea.

ABSTRACT

Objectives : Epimedii Herba has been frequently used in Korean Traditional Medicine to treat impotence, spermatorrhoea, exophthalmos, and forgetfulness. Present study investigated anti-inflammatory effects of Epimedii Herba water extract (EWE) and attempted to elucidate molecular mechanisms involved.

Methods : To explore anti-inflammatory effects of EWE, RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line, were pretreated with 10-100 μ g/ml of EWE, and then subsequently exposed to 1 μ g/ml of lipopolysaccharide (LPS). Levels of nitric oxide (NO), interleukin-6, interleukin- 1β , and tumor necrosis factor- α were monitored in the medium. Expression levels of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 were determined by immunoblot and real-time PCR analyses. Signaling pathways related with nuclear factor- κ B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinases were monitored to elucidate molecular mechanisms involved. Finally, the role of three flavonoid compounds in EWE on LPS-mediated NO production were investigated.

Results : In conditioned medium, pretreatment of EWE (100 μ g/ml) significantly inhibited LPS-stimulated NO and pro-inflammatory cytokine production. In addition, EWE attenuated the expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by LPS. EWE prevented the phosphorylation and degradation of inhibitory κ B α , nuclear translocation of NF- κ B, and DNA binding of NF- κ B, while EWE did not change the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases by LPS. Moreover, icariin, icaritin, and quercetin partly, but significantly, inhibited the LPS-stimulated NO production.

Conclusions : These results suggest that EWE has an ability to prevent inflammation in macrophages through inhibition of NF- κ B signaling pathway.

Key words : Anti-inflammation, Epimedii Herba, Lipopolysaccharide (LPS), Nuclear factor- κ B (NF- κ B), RAW 264.7 cell

I. 서 론

대식세포 (macrophage)는 염증 반응을 통한 감염체의 제

거와 항원제시를 통한 적응 면역반응을 유도하여 인체의 항상성을 유지하는 핵심적인 면역세포 중 하나이다^{1,2)}. 대식세포는 병원체로부터 기인한 병원체-연관 분자 양식 (pathogen-

*Corresponding author : Sang Chan Kim, K.M.D., Ph.D. MRC-GHF, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-819-1862 · Fax : +82-53-819-1860 · E-mail : sckim@dhu.ac.kr

#First author : Ji Yun Jung, Ph.D. MRC-GHF, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-819-1864 · Fax : +82-53-819-1860 · E-mail : wjdw1801@nate.com

· Received : 22 December 2017 · Revised : 4 February 2018 · Accepted : 15 March 2018

associated molecular pattern)과 손상된 세포로부터 기인한 손상-연관 분자 양식 (damage-associated molecular pattern)을 인식하여 nuclear factor- κ B (NF- κ B)와 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 등의 세포 내 신호 전달 분자들을 활성화시키고, 이를 통하여 interleukin (IL)-6, IL-1 β 와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 포함한 다양한 전염증성 cytokine을 분비하여 염증 반응을 개시한다^{2,3}. 그러므로 대식세포의 활성화가 수반되는 염증 반응은 외부로부터 유입된 물질들을 제거하는 적극적인 인체의 방어기전의 하나이나, 지속적이고 반복적인 염증 반응은 정상 조직의 과도한 손상을 초래하여 다양한 만성질환을 유발할 수 있다. 따라서 대식세포를 중심으로 한 염증 반응의 조절은 다양한 만성 질환을 제어하기 위한 중요한 방법 중 하나로 인식되어 활발하게 연구되어 왔다.

淫羊藿 (Epimedium Herba)은 매자나무과 (Berberidaceae)에 속하는 다년생 초본인 三枝九葉草 (*Epimedium koreanum* Nakai)의 전초를 건조한 것으로, 우리나라의 경우 강원도, 경기도, 평안도와 함경도에 주로 분포한다⁴.淫羊藿의 性味는 溫無毒辛甘하고, 命門, 肝, 胃, 大腸, 三焦에 작용하며 補命門, 益精氣, 堅筋骨, 利小便하는 효능이 있어 陽痿不舉, 小便淋瀝, 筋骨攣急, 半身不遂, 腰膝無力, 風濕痺痛, 四肢不仁 등의 치료에 이용되었다^{4,5}.淫羊藿에 대한 현대 의과학적 연구를 통하여淫羊藿 추출물 또는 특정 활성 성분이 정자 생성을 증진시키고, 조골세포의 분화를 촉진하며, 신경세포에 대한 보호 작용이 있음이 보고되었다⁶⁻⁸. 더불어淫羊藿의 항암 활성, 항당뇨 및 지방 대사 조절 효능과 산화적 스트레스로부터 조직을 보호하는 항산화 효능이 보고되었다⁹⁻¹². 특히 육은 음양곽이 대식세포의 염증매개인자들의 발현을 조절할 수 있는 가능성을 제시하였으나¹³, 이와 관련된 약리 기전에 대한 연구는 상대적으로 부족하였다. 본 연구실에서는 선행 연구를 통하여淫羊藿 물 추출물이 아라키돈산과 철 유도성 산화적 스트레스 세포 모델과 사염화탄소 유도 급성 간염 모델에서 nuclear factor erythroid 2-related factor 2의 활성화를 통하여 간 실질세포를 보호하는 항산화 효능이 있음을 규명하였으며, 급성 간염시 증가하는 간 조직으로의 염증세포들의 침윤을淫羊藿 물 추출물이 효과적으로 억제할 수 있음을 보고하였다⁹. 지속적이고 반복된 염증은 급성 간질환을 간섬유화, 간경화 및 간암을 포함한 만성 간질환으로 이행시키는 핵심 병리기전의 하나이므로, 질병 초기에 수반되는 염증 반응의 조절은 다양한 급만성 간질환을 제어하는 핵심적인 치료법의 하나로 인식되고 있다¹. 따라서, 본 연구에서는 lipopolysaccharide (LPS)로 활성화된 RAW 264.7 세포를 이용하여淫羊藿 물 추출물의 염증 억제 효능을 연구하고 이와 관련된 약리 기전을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

Anti-inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 anti-cyclooxygenase (COX)-2 항체는 BD Bioscience (San Diego, CA, USA)와 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 각각 구입하였다. Anti-phospho-inhibitory κ B α (I κ B α), Anti-I κ B α ,

anti-phospho-p38, anti-p38, anti-phospho-extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, anti-ERK1/2, anti-phospho-c-Jun N-terminal kinase (JNK) 1/2, anti-JNK1/2 항체와 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Anti-NF- κ B (p65) 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santacruz, CA, USA)에서 구입하였다. Griess reagent, LPS (*Escherichia coli* 055:B5), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), icariin, icaritin, quercetin, anti- β -actin 항체와 그 외 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.淫羊藿 물 추출물의 제조

淫羊藿 (나눔제약; 원산지, 중국; 규격, 대한약전; 수입원, 미릉생약; 품질검사연월일, 2011년 7월 18일; 품질검사기관, 나눔제약(주)부설실험실; 제조번호, NA1101030101)은 대원 약업사 (Daegu, Korea)에서 구입하였으며, 선행 보고된 방법에 따라淫羊藿 100 g에 1.2 L의 물을 넣어 3시간 동안 전탕 추출한 후, 여과, 농축 및 동결 건조하여淫羊藿 물 추출물 (Epimedium Herba water extract, EWE)을 제조하여 -20°C에 보관하며 실험에 이용하였다⁹. EWE의 최종수율은 11.36%였으며, 100 mg/ml의 농도로 물에 용해하여 0.22 μ m syringe filter (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과 후 실험에 사용하였다.

3. 세포 배양 및 약물 처치

마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 10% FBS (Gibco, Rockville, MD, USA)와 1% penicillin-streptomycin (Gibco)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. RAW 264.7 세포는 24-well plate 또는 6-well plate에 각각 2 \times 10⁵/well 또는 7.5 \times 10⁵/well의 밀도로 분주하였다. 80% 정도 성장한 세포는 8시간 동안 FBS가 없는 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 추가 배양한 후, 10-100 μ g/mL의 EWE를 1시간 동안 전처리한 후 1 μ g/ml의 LPS를 실험 목적에 따라 15분에서 18시간 동안 처치하였다.

4. NO 측정

RAW 264.7 세포에 10-100 μ g/ml의 EWE를 1시간 동안 전처리한 후 1 μ g/ml의 LPS를 18시간 동안 처치하였다. 처치가 완료된 세포로부터 회수한 배양액과 동량의 Griess reagent를 첨가하여 10분간 실온에서 반응시킨 후, microplate reader (Infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양액 중 유리된 NO의 양은 무처리 대조세포에서 측정된 흡광도와와의 비를 계산하여 상대 정량하였다.

5. 세포 생존율 측정

처치가 완료된 세포에서 배양액을 제거한 후, 1 mg/ml의 MTT 용액을 첨가하여 2시간 동안 반응시켰다. 반응으로 생성된 formazan을 dimethylsulfoxide로 용해하여 570 nm에서 microplate reader (Infinite M200 pro)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 무처리 대조세포에서 측정된 흡광도와와의 비를 백분율로 계산하여 나타내었다.

6. 전세포 추출액과 핵 분획 추출액의 제조 및 immunoblot 분석

처치가 완료된 RAW 264.7 세포로부터 전세포 추출액 및 핵 분획 추출액은 기 확립된 방법에 따라 제조하였으며⁹⁾, 추출액 내 총 단백질 함량은 bicinchoninic acid assay (Thermo-Fischer Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 정량하였다. 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 분자량에 따라 분리한 후, nitrocellulose membrane으로 전이하여 1차 항체 및 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체와 반응시켰다. Membrane을 enhanced chemiluminescence detection reagent (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)와 반응시켜 관심 단백질의 발현 정도를 Imager 600 (Amersham Biosciences)에서 관찰하였다. 동량의 단백질에 대한 확인은 β -actin (전세포 추출액) 또는 lamin A/C (핵 분획 추출액)에 대한 immunoblot 분석을 통하여 검증하였으며, ImageJ 프로그램(<http://imagej.nih.gov/ij>)을 이용하여 단백질의 상대적 발현량을 정량하였다.

7. Total RNA의 분리와 real-time polymerase chain reaction (PCR) 분석

Total RNA는 처치된 세포로부터 Tri-solution (Bioscience technology, Daegu, Korea)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 분리하였다. cDNA는 total RNA, d(T)₁₆ 프라이머와 Accupower RT premix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 역전사하여 제조하였으며, real-time PCR은 SYBR green premix (Takara, Shiga, Japan)와 CFX96 Thermal cycler (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. Real-time PCR 분석을 위한 primer로 iNOS (forward, 5'-GACAAGCTGCATGTGACATC-3'; backward, 5'-GCTGGTAGGTTCTGTTGTT-3'), COX-2 (forward, 5'-TCCAGATCACATTTGATTGA-3'; backward, 5'-TCTTTGACTGTGGGAGGATA-3'), IL-6 (forward, 5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3'; backward, 5'-ATTTCCACGATTTCCAGAG-3'), IL-1 β (forward, 5'-ATGGCAACTGTTTCTGAACT-3'; backward, 5'-CAGGACAGGTATAGATTCTT-3'), TNF- α (forward, 5'-ATGAGCACAGAAAGCATGAT-3'; backward, 5'-TACAGGCTTGTCACCTCGAAT-3'), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)(forward,

5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3'; backward, 5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3')를 Bioneer에서 합성하였다. 각 유전자의 발현량은 GAPDH 유전자의 발현량을 기준으로 2^{-DDCT}법에 의해 정량하였으며¹⁴⁾, LPS 단독 처리 세포의 상대 발현량을 100%로 계산하였다. 또한 PCR 산물의 특이성은 melting curve 분석으로 확인하였다.

8. Enzyme-linked immunosorbent assay

IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 는 OptEIA™ kit (BD Bioscience)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 분석하였으며, 재조합 cytokine 단백질들의 표준검량곡선을 이용하여 배양액 내 유리된 cytokine의 절대 농도를 측정하였다.

9. NF- κ B-DNA 결합능 분석

NF- κ B-DNA 결합능 분석은 NF- κ B transcription factor assay kit (Cayman Chemical)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10. 통계 분석

모든 데이터는 3 회 반복 시행 후 mean \pm SD로 표기하였으며, 각 그룹간 통계적 유의성은 one way analysis of variance로 분석한 후, 등분산 가정의 성립 여부에 따라 Tukey's honestly significant difference 또는 Dunnett T3 분석으로 사후 검증하였다. 통계적 유의성은 P값이 0.05 또는 0.01 미만인 값을 기준으로 설정하였다.

III. 결 과

1. RAW 264.7 세포에서 EWE가 LPS에 의한 NO 생성 및 iNOS 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 EWE가 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 연구하기 위하여, 10-100 μ g/ml의 EWE를 1시간 동안 전처리한 후, 1 μ g/ml의 LPS를 18시간 동안 처리하였다. 처치가 완료된 세포의 배양액과 Griess reagent를 반응시켜 배양액 내 유리된 NO를 측정된 결과, LPS는 무처리 대조세포와 비교하여 NO 생성을 2.72 \pm 0.09배 통계적으로 유의하게 증가시켰다. 그러나 10-100 μ g/ml의 EWE의 전처리는 LPS에 의해 증가한 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하는 경향을 나타내었으며, 100 μ g/ml의 EWE 전처리에 의한 NO 생성은 LPS 처리 세포와 비교하여 통계적으로 유의하였다. 10, 30 및 100 μ g/ml의 EWE의 전처리에 의한 NO 생성은 각각 2.63 \pm 0.31, 2.36 \pm 0.26 및 1.47 \pm 0.07배였다 (Fig. 1A). EWE에 의한 NO 생성 억제가 EWE의 세포 독성에 기인한 것이 아님을 확인하기 위하여 처치가 완료된 세포의 세포 생존율을 측정하였다. 선행 연구결과와 유사하게 18시간 동안의 LPS 처리는 RAW 264.7 세포의 세포 생존율을 무처리 대조세포와 비교하여 69.28 \pm 4.60%로 통계적으로 유의하게

감소시켰다^{14,15}. 10, 30 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EWE 전처치에 의한 세포 생존율은 무처치 대조세포와 비교하여 66.30 ± 2.60 , 65.06 ± 3.83 , 및 $64.83 \pm 1.60\%$ 였으며, LPS와 비교하여 통계적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았다 (Fig. 1B). EWE에 의한 NO 생성 억제가 NO 생성에 관여하는 iNOS의 전사조절을 통하여 일어나는 현상인지 연구하기 위하여 iNOS 단백질 및 mRNA를 immunoblot과 real-time PCR 분석에 의해 확인하였다. LPS는 iNOS 단백질과 mRNA를 무처치 대조세포와 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였다. 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의

EWE 전처치는 LPS에 의하여 증가한 iNOS 단백질과 mRNA를 변화시키지 못하였으나, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EWE 전처치는 LPS 처치 세포와 비교하여 iNOS 단백질과 mRNA를 통계적으로 유의하게 감소시켰다. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EWE 단독 처치는 무처치 대조세포와 비교하여 iNOS 단백질과 mRNA를 변화시키지 못하였다 (Fig. 1C and 1D). 이상의 결과는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EWE가 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의한 iNOS mRNA의 전사 조절을 통하여 NO 생성을 억제할 수 있음을 나타낸다.

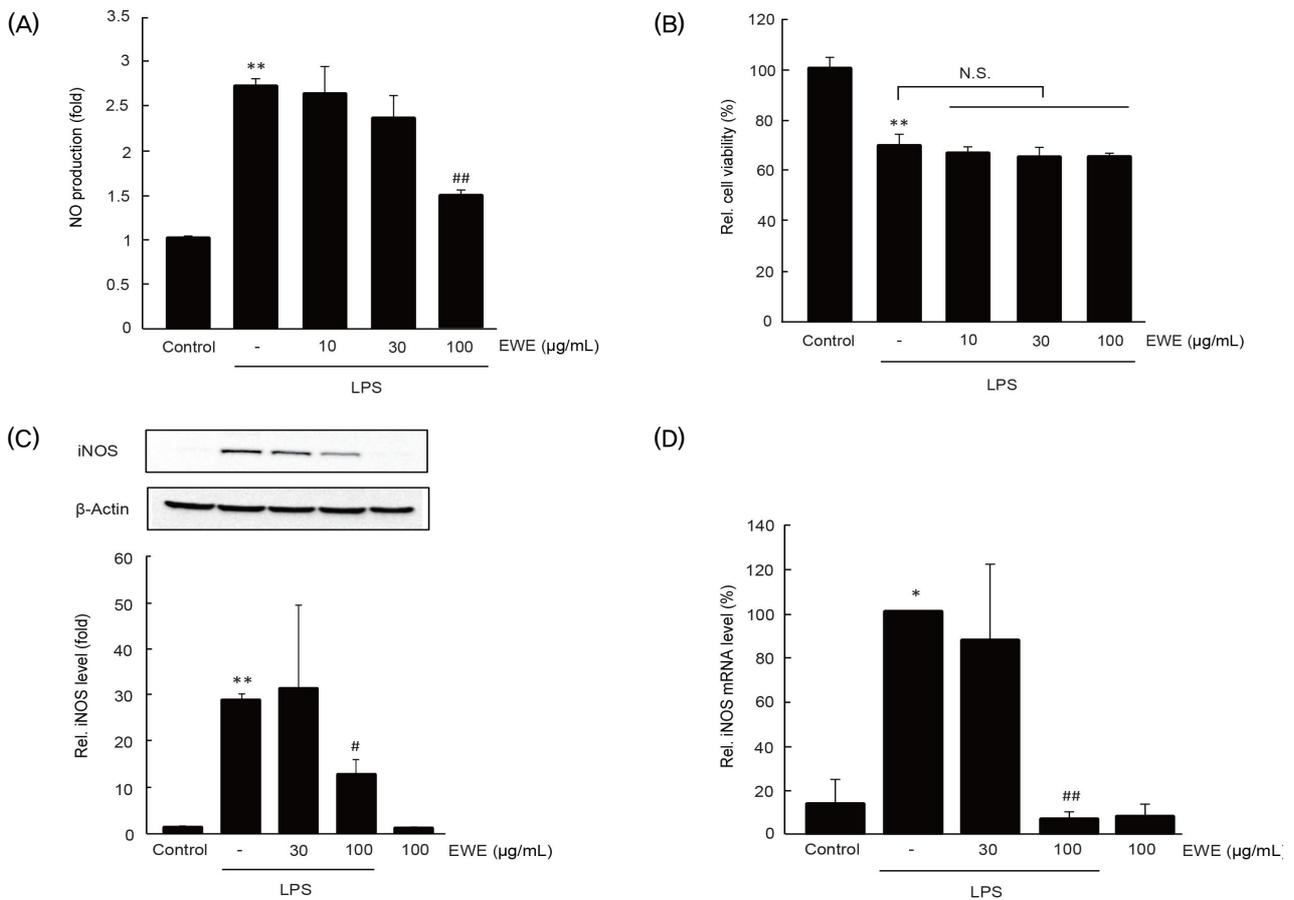


Fig. 1. The effect of EWE on LPS-stimulated NO production and iNOS expression, RAW 264.7 cells were pretreated EWE (10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 h and subsequently treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 18 h (for A–C) or 6 h (for D). A) NO production in the medium was determined by reacting with griess reagent. B) Relative cell viability was measured by MTT assay. iNOS protein (C) and mRNA (D) were determined by immunoblot and real-time PCR analysis, respectively. Significant vs untreated control cells, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; significant vs LPS only treated cells, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; N.S., not significant.

2. RAW 264.7 세포에서 EWE가 LPS에 의한 COX-2 발현에 미치는 영향

대식세포에서 LPS 자극은 prostaglandin의 생합성을 촉진하여 염증 반응을 활성화시킨다²⁾. EWE가 prostaglandin 생합성에 미치는 영향을 연구하기 위하여 prostaglandin 생합성 과정의 율속 단계인 COX-2 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 이를 위해 30–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EWE를 1시간 동안 전처치한 후, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 18시간 (COX-2 단백질) 또는 6시간 (COX-2 mRNA)를 처치하였다. RAW 264.7 세포에서 LPS 자극은 COX-2 단백질 (Fig. 2A) 및 mRNA (Fig. 2B)를 무처치 대조

세포와 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였다. 30와 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EWE 전처치는 LPS에 의해 증가한 COX-2 단백질과 mRNA를 감소하는 경향을 나타내었으며, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EWE 전처치에 의한 COX-2 단백질과 mRNA의 감소만이 LPS 처치 세포와 비교하여 통계적으로 유의하였다. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EWE 단독 처치는 무처치 대조세포와 비교하여 COX-2 단백질과 mRNA 양을 변화시키지 않았다 (Fig. 2). 이상의 결과는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EWE가 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의한 COX-2 mRNA의 전사 조절을 통하여 prostaglandin 생성을 억제할 수 있음을 시사한다.

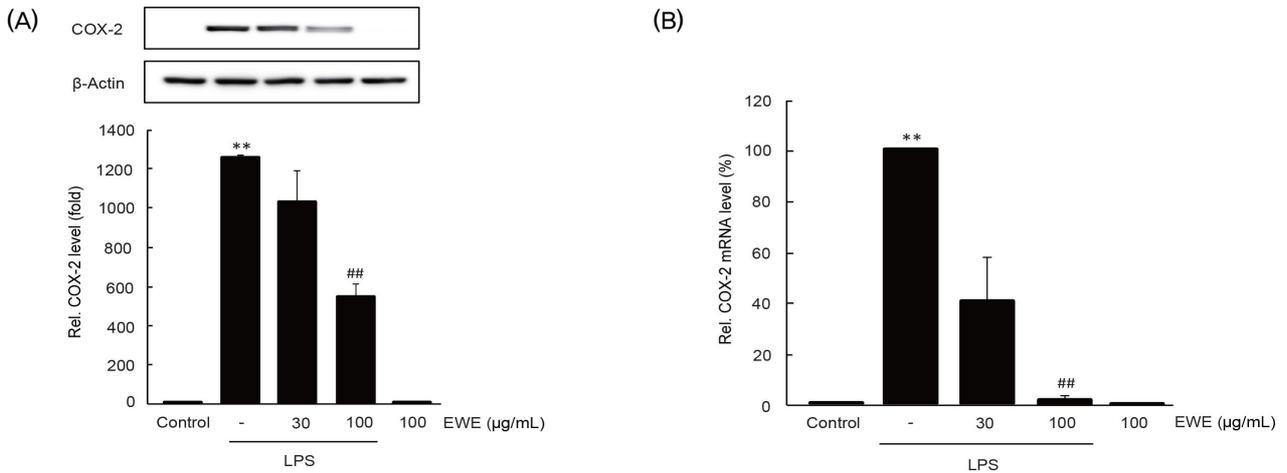


Fig. 2. The effect of EWE on LPS-stimulated COX-2 expression, RAW 264.7 cells were treated with EWE and LPS, as described in figure 1. COX-2 protein (A) and mRNA (B) were determined by immunoblot and real-time PCR analysis, respectively. Significant vs untreated control cells, ** $P < 0.01$; significant vs LPS only treated cells, ## $P < 0.01$.

3. RAW 264.7 세포에서 EWE가 LPS에 의한 전염증성 cytokine 발현에 미치는 영향

IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 는 대식세포가 분비하는 대표적인 전염증성 cytokine이다²⁾. EWE가 전염증성 cytokine 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 EWE가 전처리된 RAW 264.7 세포에 LPS를 18시간 (단백질) 또는 6시간 (mRNA) 동안 처리하였다. 100 μ g/mL의 EWE 단독 처리는 전염증성 cytokine의 유리와 mRNA를 변화시키지 못하였고, LPS 처리는 세포 배양액 중 전염증성 cytokine의 유리 (Fig. 3A)와

세포 내 전염증성 cytokine mRNA의 전사 (Fig. 3B)를 모두 통계적으로 유의하게 증가시켰다. 30 및 100 μ g/mL의 EWE 전처리는 LPS에 의해 증가한 전염증성 cytokine의 유리와 mRNA 생성을 감소시키는 경향을 나타내었다. 배양액 내 유리된 IL-1 β 의 경우, LPS 단독 처리세포와 비교시 30 및 100 μ g/mL의 EWE 전처리에 의한 변화가 모두 통계적으로 유의하였으며, 나머지 전염증성 cytokine의 경우 100 μ g/mL의 EWE 전처리에 의한 변화만이 LPS 단독 처리세포와 비교하여 통계적으로 유의하였다 (Fig. 3).

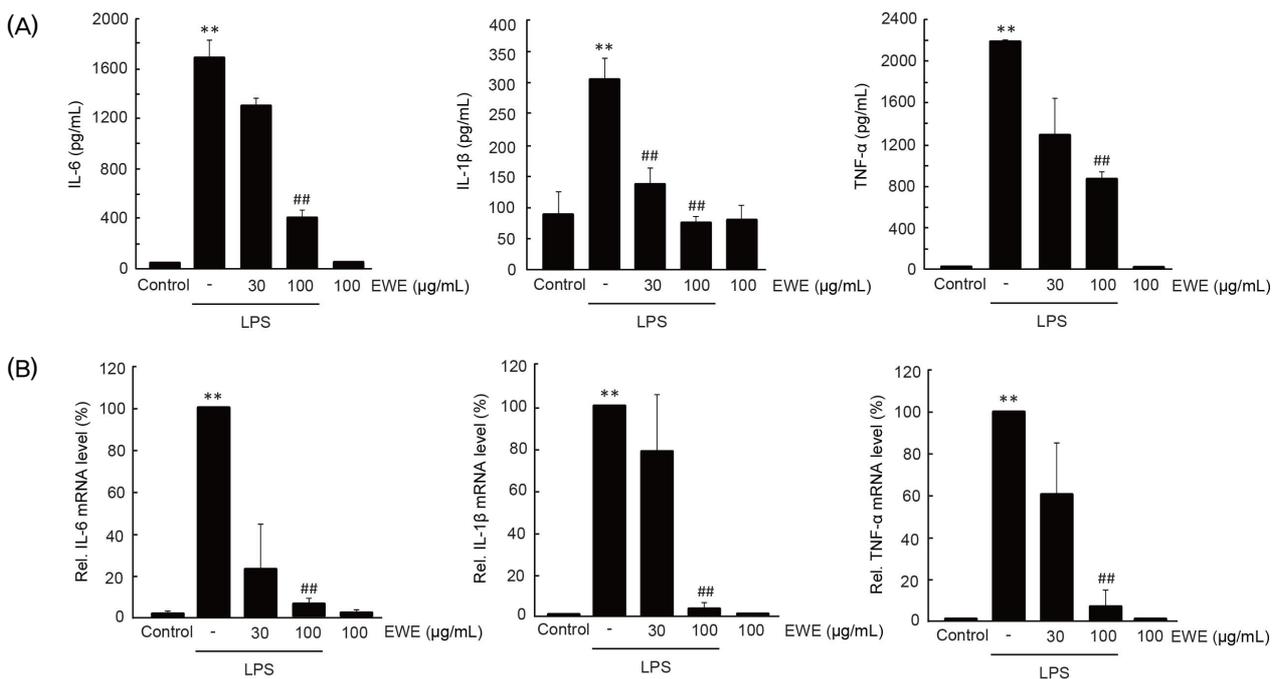


Fig. 3. The effect of EWE on LPS-stimulated pro-inflammatory cytokine production, RAW 264.7 cells were treated with EWE and LPS, as described in figure 1. Levels of pro-inflammatory cytokine in conditioned medium (A) and levels of pro-inflammatory cytokine mRNA (B) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay and real-time PCR analysis, respectively. Significant vs untreated control cells, ** $P < 0.01$; significant vs LPS only treated cells, ## $P < 0.01$.

4. EWE가 NF- κ B 관련 신호 분자에 미치는 영향

대식세포에서 LPS 자극은 I κ B α 의 인산화를 통한 분해를 촉진하여 NF- κ B를 핵으로 이동시킨다³⁾. EWE가 NF- κ B 신호 분자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 immunoblot 분석을 수행하였다. RAW 264.7 세포에서 15분 동안의 LPS 자극은 I κ B α 의 인산화를 무처리 대조세포와 비교하여 3.74 ± 0.45 배 통계적으로 유의하게 증가시켰으며, 30 및 100 μ g/ml의 EWE의 전처치는 LPS에 의해 증가한 I κ B α 의 인산화를 농도 의존적으로 억제하는 경향을 나타내었다. 특히, 100 μ g/ml의 EWE 전처치에 의한 I κ B α 의 인산화는 LPS 처리 세포와 비교하여 통계적으로 유의하였다 (무처리 대조세포 대비 1.22 ± 0.21 배) (Fig. 4A). 더불어 EWE는 LPS에 의하여 증가되는 I κ B α 의 분해를 농도 의존적으로 억제하는 경향을 나타내었으며, 100 μ g/ml의 EWE 전처치에 의한 I κ B α 의 발현은 LPS 처리 세포와

비교하여 통계적으로 유의하였다 (Fig. 4B). LPS는 핵 분획 내 NF- κ B (p65 subunit)의 발현을 무처리 대조세포와 비교하여 1.84 ± 0.50 배로 통계적으로 유의하게 증가시켰으며, 30 및 100 μ g/ml의 EWE의 전처치는 무처리 대조세포와 비교하여 각각 0.66 ± 0.14 및 0.46 ± 0.26 배로서 핵 분획 내 NF- κ B (p65 subunit)의 발현을 통계적으로 유의하게 감소시켰다 (Fig. 4C). 또한 LPS는 NF- κ B response element에 대한 NF- κ B의 결합을 통계적으로 유의하게 증가시켰으나, 30 및 100 μ g/ml EWE의 전처치는 NF- κ B 특이적 DNA 결합능을 통계적으로 유의하게 억제하였다 (Fig. 4D). 100 μ g/ml EWE의 단독처치는 I κ B α 의 인산화와 발현, NF- κ B의 핵내 이동과 NF- κ B의 DNA 결합능을 무처리 대조세포와 비교하여 변화시키지 못하였다 (Fig. 4A-4D). 이상의 결과는 EWE가 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의하여 활성화된 NF- κ B 관련 신호 분자를 억제할 수 있음을 나타낸다.

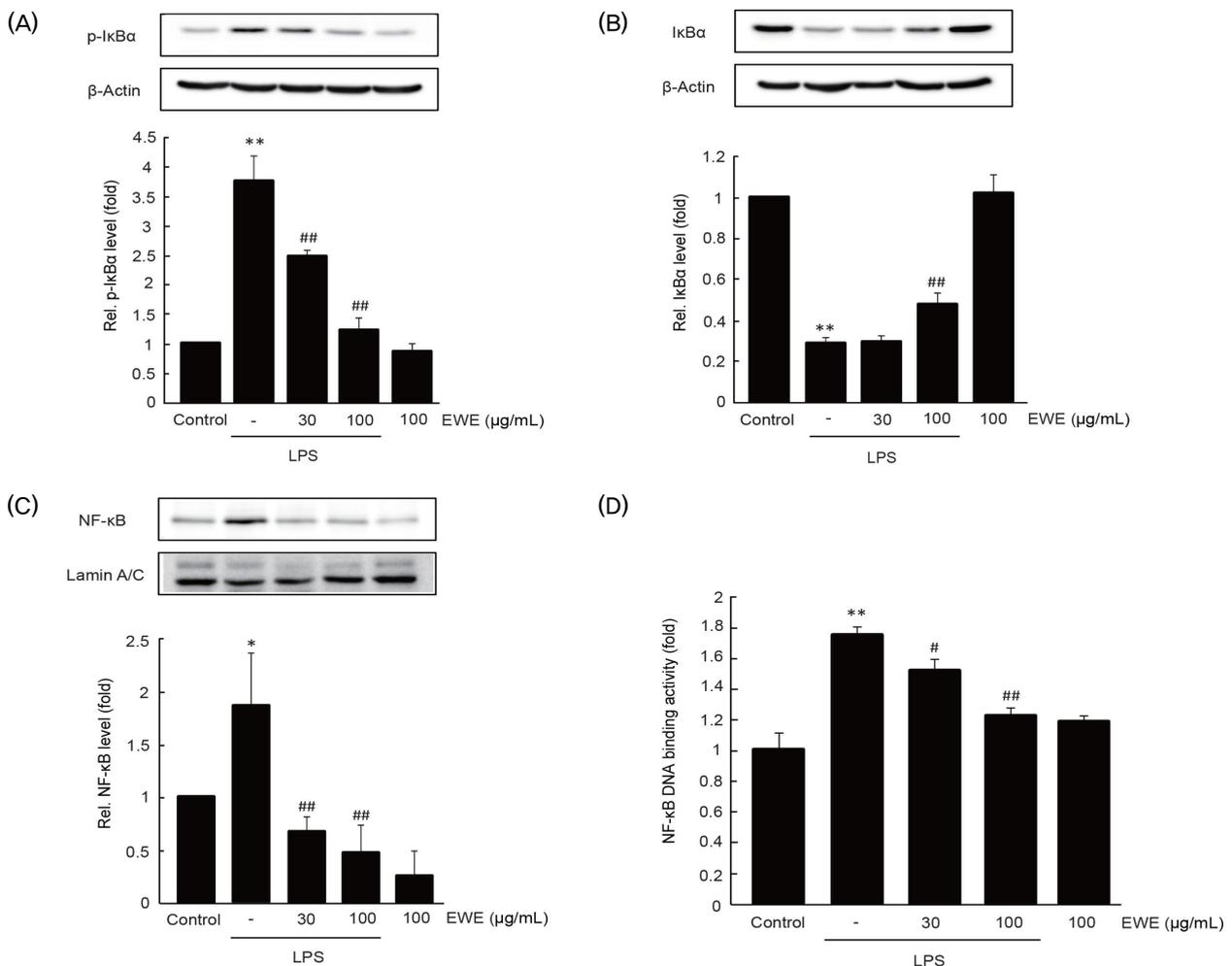


Fig. 4. The effect of EWE on LPS-stimulated NF- κ B signaling molecules. After 1 h of EWE pretreatment, RAW 264.7 cells were further exposed to LPS for 15 min (for A), for 30 min (for B), or for 1 h (for C and D). Relative levels of phosphorylated I κ B α (A), I κ B α (B), and nuclear NF- κ B (C) were determined by immunoblot analysis. (D) NF- κ B-DNA binding activity. Nuclear extract was captured using specific NF- κ B response element in microplate. Bound NF- κ B were detected using p65 antibody and horseradish-conjugated secondary antibody. Significant vs untreated control cells, * P < 0.05, ** P < 0.01; significant vs LPS only treated cells, # P < 0.05, ## P < 0.01.

5. EWE가 MAPK의 인산화에 미치는 영향

대식세포에서 LPS 자극은 세포 내 일련의 신호 전달과정의 활성화를 거쳐, transforming growth factor β -activated kinase (TAK) 1의 인산화를 통하여 MAPK의 인산화를 촉진한다³⁾. 선행 연구결과와 유사하게 RAW 264.7 세포에서 30분

동안의 LPS 자극은 p38, ERK1/2, 및 JNK1/2의 인산화를 통계적으로 유의하게 증가시켰다^{14,15)}. 그러나, 30 및 100 μ g/ml의 EWE의 전처치는 LPS에 의하여 증가한 MAPK의 인산화를 통계적으로 유의하게 변화시키지 못하였다 (Fig. 5). 이상의 결과는 MAPK 신호와 독립적으로 EWE가 염증 억제 효능을 나타낼 수 있음을 시사한다.

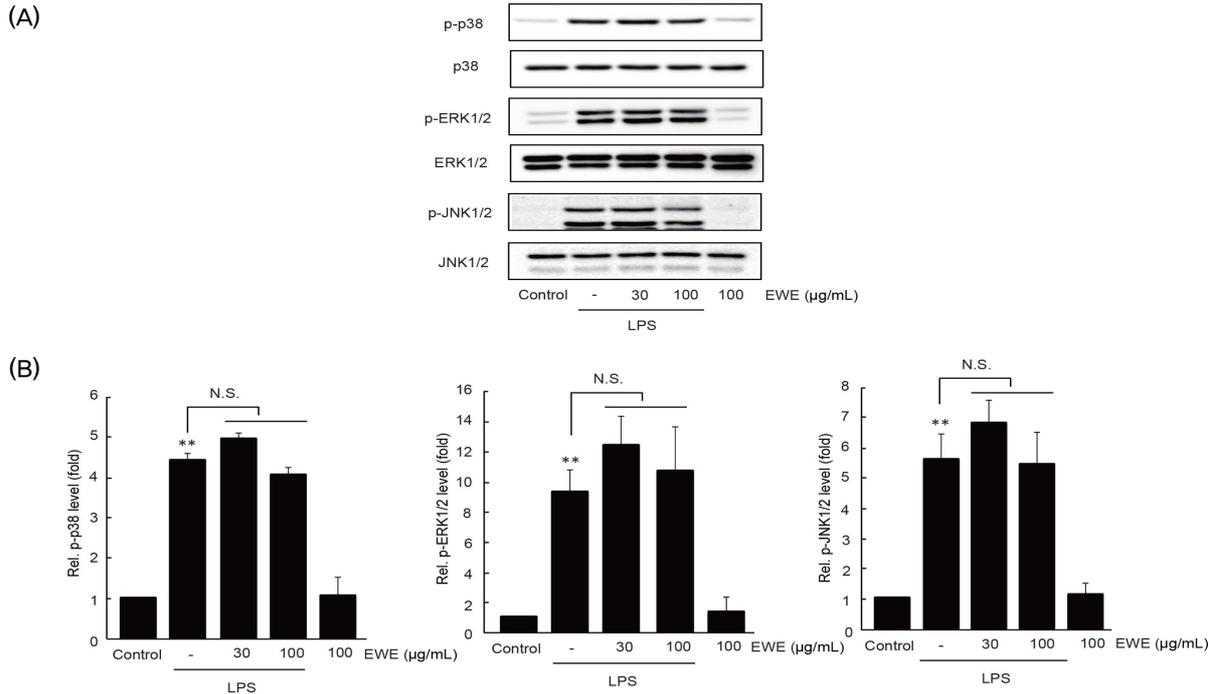


Fig. 5. The effect of EWE on LPS-stimulated MAPKs phosphorylation. EWE pretreated RAW 264.7 cells were incubated with LPS for 30 min. (A) Phosphorylations of MAPKs were determined by immunoblot analysis. (B) Relative levels of phosphorylated MAPKs were measured by scanning densitometry. Significant vs untreated control cells, ** $P < 0.01$; N.S., not significant.

6. RAW 264.7 세포에서 EWE 지표성분이 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향

선행 연구를 통하여 보고한 EWE 내 함유된 3종의 지표성분 icariin, icaritin, quercetin이 EWE에 의한 염증 억제 효능에 기여하는지 여부를 확인하기 위하여, 3-30 μ M의 지표성분을 1시간 동안 전처치한 후 LPS를 처치하여 세포 배양액에 유리

된 NO를 측정하였다⁹⁾. RAW 264.7 세포에서 3-30 μ M의 icariin, icaritin 또는 quercetin의 전처치는 LPS에 의하여 증가한 NO 생성을 통계적으로 유의하게 억제하였다 (Fig. 6A). 더불어 3종의 지표성분의 전처치는 LPS에 의하여 감소된 RAW 264.7 세포의 생존율을 변화시키지 못하였다 (Fig. 6B). 따라서, 이상의 연구결과는 EWE에 의한 염증 억제 효능에 3종의 지표 성분이 기여함을 나타낸다.

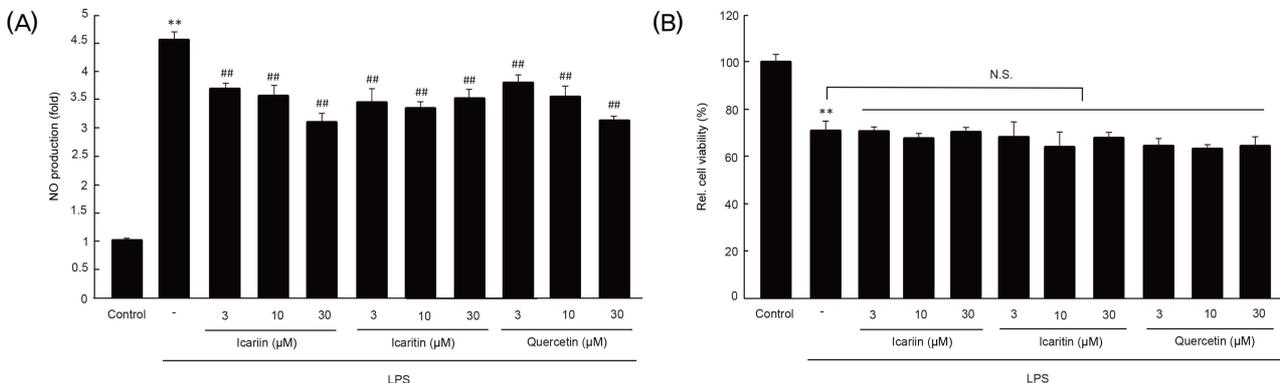


Fig. 6. The effect of icariin, icaritin, or quercetin on LPS-stimulated NO production, RAW 264.7 cells were pretreated with 3-30 μ M of icariin, icaritin, or quercetin for 1 h, and then subsequently exposed to LPS for 18 h. NO production in the medium (A) and relative cell viability (B) were determined. Significant vs untreated control cells, ** $P < 0.01$; significant vs LPS only treated cells, ## $P < 0.01$; N.S., not significant.

IV. 고찰

매자나무과에 포함된 52종의 식물 중淫羊藿은 우리나라를 중심으로 분포하는 다년생 초본 식물이다⁴⁾. 현대 의과학적 연구를 통하여淫羊藿 물 추출물이 RAW 264.7 세포 모델에서 influenza A virus, vesicular stomatitis virus, herpes simplex virus 및 newcastle disease virus에서 항바이러스 cytokine의 분비를 통하여 증식을 억제하였으며, BALB/c mouse에서 고농도의 H1N1, H5N2, H7N3 및 H9N2형의 influenza A virus 감염에 대한 치사율을 감소시키는 항바이러스 효능이 있음이 규명되었다¹⁶⁾. 더불어淫羊藿으로부터 추출된 다당체가 대식세포의 항암 관련 cytokine의 유리를 증가시키고, 제 II형 주조직항원복합체 및 보조자극인자의 발현을 촉진하여 Lewis lung carcinoma 세포를 이식한 동물세포의 암세포의 증식을 억제하는 면역 활성능이 있음이 규명되었다¹⁷⁾. 이와는 대조적으로淫羊藿 메탄올 분획에서 추출된 2-phenoxychromone와 prenylflavonoid 계열의 화합물 및 ikarisoside A가 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포의 염증 반응을 억제할 수 있음이 규명되었으며^{18,19)}, 본 연구실의 선행 연구를 통하여淫羊藿 물 추출물이 사염화탄소로 유도한 급성 간염모델에서 간 조직 내 염증세포들의 침윤을 억제할 수 있음을 보고하였다⁹⁾. 특히 육 (2009)은 환류추출로 제조한淫羊藿 물추출물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포가 분비하는 NO, IL-12, IL-1 β , IL-4, monocyte chemoattractant protein-1, granulocyte macrophage-colony stimulating factor와 IL-10의 유리를 조절할 수 있는 가능성을 제시하였다¹³⁾. 따라서 이들 선행 연구들은 대식세포의 활성을淫羊藿 또는 특정 생리 활성 성분들이 조절할 수 있는 가능성을 제시하나, 한의학에서 활용 가능성이 높은淫羊藿 전당 물추출물이 직접적으로 대식세포의 활성을 조절할 수 있는지 여부와 이와 관련된 약리 기전과 활성성분에 대한 연구는 상대적으로 부족하였다. 따라서 본 연구에서는淫羊藿 물 추출물이 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의한 염증 반응의 활성화에 미치는 영향과 이와 관련된 약리 기전을 연구하고자 하였다.

LPS는 그람 음성균의 세포벽에 포함된 내독소로서 대식세포 표면에 존재하는 대표적인 분자 양식 인식 수용체의 일종인 Toll-like receptor 4 (TLR4)와 결합하여 iNOS, COX-2, IL-6, IL-1 β 와 TNF- α 를 포함한 다양한 염증매개 인자들의 전사를 촉진한다^{2,3)}. 대식세포에서 LPS 자극에 의하여 유도된 염증 매개 인자들 중 NO는 활성질소종으로 전환되어 포식소체 내부 또는 세포 주변의 병원체와 감염세포들의 제거에 관여한다^{2,20)}. 더불어 비교적 간단한 실험에 의하여 NO 생성 유무를 분석할 수 있어, 대식세포를 활용한 다양한 연구에서 후보소재의 염증 제어 유무를 검색하는데 활용되어 왔다^{14,15)}. 본 연구에서도淫羊藿 물 추출물, EWE의 전처치는 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의하여 증가된 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하는 경향을 나타내었으나, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 EWE 전처치에 의한 NO 생성의 감소만이 LPS 처치세포와 비교하여 통계적으로 유의하였다. 또한 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 EWE에 의한 NO 생성의 억제가 EWE의 세포 독성이나 iNOS 단백질 차원의 효소 활성 저해가 아닌 iNOS의 전사 조절에 기인함을 MTT 분석, immunoblot

분석 및 real-time PCR 분석을 통해 확인하였다. 본 연구에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 EWE가 iNOS 이외에 LPS에 의하여 증가한 COX-2, IL-6, IL-1 β 와 TNF- α 의 전사를 억제하였다. 그러나, 육 (2009)은 환류추출에 의해 제조한淫羊藿 물 추출물이 LPS에 의하여 유도된 NO, IL-1 β 의 유리를 감소시켰으나, TNF- α 의 유리는 억제하지 못함을 보고하였다¹³⁾. 이와 같은 결과의 차이는淫羊藿의 산지, 추출물 제조법에 따른 활성성분들의 용해도, LPS 농도 및 처치 시간과 전염증성 cytokine 정량법이 상이하여 다른 결과를 도출한 것으로 추정되며 이에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다. 이상의 결과는 EWE가 RAW 264.7 세포에서 다양한 염증 매개 인자들의 생성에 관여하는 공통 전사인자의 조절을 통하여 염증 억제 효능이 있음을 나타낸다.

NF- κ B는 iNOS, COX-2, IL-6, IL-1 β 와 TNF- α 의 전사를 조절하는 공통 전사인자 중 하나이다²¹⁻²⁵⁾. LPS와 결합하여 활성화된 TLR4는 TIRAP, MyD88, IRAK, TRAP6 등의 분자들과 복합체를 형성하여 TRAP6의 63 번째 lysine 잔기에 유비퀴틴화를 촉진하고, I κ B kinase (IKK)와 TAK1을 활성화시킨다³⁾. 활성화된 IKK는 I κ B α 의 인산화와 분해를 촉진하고, NF- κ B/I κ B α 복합체로부터 해리된 NF- κ B는 핵으로 이동하여 표적 유전자의 프로모터 영역에 존재하는 5'-GGGRNNYYCC-3' (R, purine; N, any base; Y, pyrimidine)를 인식하여 결합한다²⁶⁾. 본 연구에서도 LPS가 I κ B α 의 인산화, I κ B α 의 분해, NF- κ B의 핵 내 축적 및 NF- κ B의 DNA 결합능을 증가시켰으며, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 EWE의 전처치는 LPS에 의한 NF- κ B 관련 신호 분자들의 활성화를 모두 억제하였다. 또한 LPS는 TLR4를 통한 신호 전달 과정을 통하여 MAPK kinase kinase인 TAK1을 활성화시켜 MAPK의 인산화를 촉진하고, MAPK 의존적 전사인자들의 활성화 (예, activating protein-1)를 통하여 염증 반응을 촉진한다³⁾. 그러나, 본 연구에서 EWE가 MAPK 신호 분자의 인산화에 미치는 영향을 연구한 결과, EWE의 전처치는 LPS에 의하여 증가한 p38, ERK1/2, JNK1/2의 인산화를 변화시키지 못하였다. 따라서 EWE는 IKK의 활성화 단계를 조절하여 NF- κ B 신호 분자만을 선택적으로 억제하였을 것으로 추정된다.

본 연구에 사용된淫羊藿 물추출물은 본 연구실의 선행 연구에서 추출, 보관된 동일한 시료를 사용하였으며⁹⁾, 선행연구에서 ultra-performance liquid chromatography 분석을 통하여 EWE에 icariin, icaritin 및 quercetin이 각각 83.64 \pm 4.17, 20.41 \pm 0.03 및 1.83 \pm 0.08 ppm 함유되어 있음을 확인하였으며 (data not shown), icaritin과 quercetin이 아라키돈산과 철에 의해 유도된 산화적 스트레스로부터 nuclear factor erythroid 2-related factor 2의 활성화를 통하여 세포를 보호하는데 기여함을 규명하였다⁹⁾. 더불어 icaritin은 zymosan 유도성 복막염 모델과 LPS로 활성화된 대식세포 모델에서 p38과 JNK의 인산화 억제를 통하여 염증성 cytokine의 생성, 백혈구 침윤 및 포식 작용을 억제하였으며²⁷⁾, icariin과 quercetin은 phosphoinositide 3-kinase/Akt와 NF- κ B 신호 전달 분자의 조절을 통하여 염증 억제 효능을 나타내었다^{28,29)}. 본 연구에서도 EWE에 함유된 3종의 지표성분의 염증 억제 효능을 연구한 결과, 3-30 μM 의 지표성분의 전처치가 LPS에 의하여 증가한 NO 생성을 통계적으로 유의

하게 억제할 수 있음을 규명하였다. 그러나 본 연구에서 염증 억제 효능을 나타내었던 100 μ g/ml의 EWE에 함유된 3 종의 지표성분의 실제 농도는 매우 적으므로, EWE에 의한 염증 억제 효능은 3 종의 지표성분과 선행 문헌에서 규명되었던 2-phenoxychromone, prenylflavonoid, ikarisoside A를 포함한 다양한 화합물들이 복합적으로 작용하였을 것으로 추정되며 이에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서淫羊藿 물 추출물이 염증 매개 인자 및 세포 내 신호 분자에 미치는 영향을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서淫羊藿 물 추출물의 전처치는 iNOS의 전사 조절을 통하여 NO 생성을 억제하였다.
2. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서淫羊藿 물 추출물의 전처치는 COX-2의 전사를 억제하였다.
3. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서淫羊藿 물 추출물의 전처치는 IL-6, IL-1 β , 및 TNF- α 의 전사를 억제하였다.
4. RAW 264.7 세포에서淫羊藿 물 추출물의 전처치는 LPS에 의한 I κ B α 의 인산화, I κ B α 의 분해, NF- κ B의 핵 내 축적과 NF- κ B의 DNA 결합을 억제하였다.
- 5.淫羊藿의 지표 성분인 icariin, icaritin, quercetin은 LPS에 의한 NO 생성을 억제하였다.

감사의 글

본 연구는 2017년도 미래창조과학부/한국연구재단 (Grant No. 2012R1A5A2A42671316)와 보건복지부/보건산업진흥원 (Grant No. HI15C0185)의 연구개발비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *J Hepatol*. 2017 ; 66 : 1300-12.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Phillai S. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia : Saunders, 2012 : 41-88.
3. Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in

- inflammation and sepsis. *Vaccines*. 2017 ; 5 : 34.
4. Lee SI. *Herbology*. Seoul : Suseowon, 1981 : 71-2.
5. Kang BS, Ko UC, Kim SH, Rho SH, Song HJ, Shin MK, Ahn DK, Lee SI, Lee YJ, Lee TH, Ju YS. *Herbology*. Seoul : Younglimsa, 1992 : 553-4.
6. Park HJ, Koo YK, Park MJ, Hwang YK, Hwang SY, Park NC. Restoration of spermatogenesis using a new combined herbal formula of *Epimedium koreanum* Nakai and *Angelica gigas* Nakai in an luteinizing hormone-releasing hormone agonist-induced rat model of male infertility. *World J Mens Health*. 2018, in press.
7. Wu L, Du ZR, Xu AL, Yan Z, Xiao HH, Wong MS, Yao XS, Chen WF. Neuroprotective effects of total flavonoid fraction of the *Epimedium koreanum* Nakai extract on dopaminergic neurons: In vivo and in vitro. *Biomed Pharmacother*. 2017 ; 91 : 656-63.
8. Luo G, Gu F, Zhang Y, Liu T, Guo P, Huang Y. Icariside II promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells in beagle canine. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 ; 8 : 4367-77.
9. Jung JY, Park SM, Ko HL, Lee JR, Park CA, Byun SH, Ku SK, Cho IJ, Kim SC. *Epimedium koreanum* Nakai water extract ameliorates oxidative stress-mediated liver injury by activating nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Am J Chin Med*. 2018 ; 46 : 1-20.
10. Kim DH, Jung HA, Sohn HS, Kim JW, Choi JS. Potential of icariin metabolites from *Epimedium koreanum* Nakai as antidiabetic therapeutic agents. *Molecules*. 2017 ; 22 : 986.
11. Lee W, Nam JH, Cho HJ, Lee JY, Cho WK, Kim Y, We YM, Ma JY, Hoe HS. *Epimedium koreanum* Nakai inhibits PMA-induced cancer cell migration and invasion by modulating NF- κ B/MMP-9 signaling in monomorphic malignant human glioma cells. *Oncol Rep*. 2017 ; 38 : 3619-31.
12. Han YY, Song MY, Hwang MS, Hwang JH, Park YK, Jung HW. *Epimedium koreanum* Nakai and its main constituent icariin suppress lipid accumulation during adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Chin J Nat Med*. 2016 ; 14 : 671-6.
13. Yuk SS. Effects of *Epimedium Herba* water extract on the inflammatory mediators in macrophage cells. Kyungwon University. 2009.
14. Kim JK, Lee JE, Jung EH, Jung JY, Jung DH, Ku SK, Cho IJ, Kim SC. Hemistepsin A ameliorates acute inflammation in macrophages via inhibition of nuclear factor- κ B and activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Food Chem Toxicol*. 2018 ; 111 : 176-88.
15. Hwangbo M, Jung JY, Ki SH, Park SM, Jegal KH,

- Cho IJ, Lee JH, Kang SH, Park SD, Ku SK, Kim SC, Zhao RJ, Jee SY, Kim YW. U-Bang-Haequi Tang: A Herbal Prescription that Prevents Acute Inflammation through Inhibition of NF- κ B-Mediated Inducible Nitric Oxide Synthase. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014 ; 2014 : 542825.
16. Cho WK, Weeratunga P, Lee BH, Park JS, Kim CJ, Ma JY, Lee JS. Epimedium koreanum Nakai displays broad spectrum of antiviral activity in vitro and in vivo by inducing cellular antiviral state. *Viruses*. 2015 ; 7 : 352-77.
 17. Wang C, Feng L, Su J, Cui L, Dan Liu, Yan J, Ding C, Tan X, Jia X. Polysaccharides from Epimedium koreanum Nakai with immunomodulatory activity and inhibitory effect on tumor growth in LLC-bearing mice. *J Ethnopharmacol*. 2017 ; 207 : 8-18.
 18. Jin Q, Lee C, Lee JW, Yeon ET, Lee D, Han SB, Hong JT, Kim Y, Lee MK, Hwang BY. 2-Phenoxychromones and prenylflavonoids from Epimedium koreanum and their inhibitory effects on LPS-induced nitric oxide and interleukin- 1β production. *J Nat Prod*. 2014 ; 77 : 1724-8.
 19. Choi HJ, Eun JS, Park YR, Kim DK, Li R, Moon WS, Park JM, Kim HS, Cho NP, Cho SD, Soh Y. Ikariside A inhibits inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells via p38 kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *Eur J Pharmacol*. 2008 ; 601 : 171-8.
 20. Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*. 2003 ; 54 : 469-87.
 21. Schulze J, Weber K, Baranowsky A, Streichert T, Lange T, Spiro AS, Albers J, Seitz S, Zustin J, Amling M, Fehse B, Schinke T. p65-Dependent production of interleukin- 1β by osteolytic prostate cancer cells causes an induction of chemokine expression in osteoblasts. *Cancer Lett*. 2012 ; 317 : 106-13.
 22. Vila-del Sol V, Fresno M. Involvement of TNF and NF- κ B in the transcriptional control of cyclooxygenase-2 expression by IFN- γ in macrophages. *J Immunol*. 2005 ; 174 : 2825-33.
 23. Qiao-Wen X, Richard W, and Carl N. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon-g and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1993 ; 177 : 1779-84.
 24. Rhodes KL, Golub SH, Economou JS. The regulation of the human tumor necrosis factor alpha promoter region in macrophage, T cell, and B cell lines. *J Biol Chem*. 1992 ; 267 : 22102-7.
 25. Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- κ B transcription factor. *Mol Cell Biol*. 1990 ; 10 : 2327-34.
 26. Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the Nf-Kappab signaling module. *Oncogene*. 2006 ; 25 : 6706-16.
 27. Lai X, Ye Y, Sun C, Huang X, Tang X, Zeng X, Yin P, Zeng Y. Icaritin exhibits anti-inflammatory effects in the mouse peritoneal macrophages and peritonitis model. *Int Immunopharmacol*. 2013 ; 16 : 41-9.
 28. Xu CQ, Liu BJ, Wu JF, Xu YC, Duan XH, Cao YX, Dong JC. Icaritin attenuates LPS-induced acute inflammatory responses involvement of PI3K Akt and NF-kappaB signaling pathway. *Eur J Pharmacol*. 2010 ; 642 : 146-53.
 29. Endale M, Park SC, Kim S, Kim SH, Yang Y, Cho JY, Rhee MH. Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK AP-1 and IKK NF- κ B-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells. *Immunobiology*. 2013 ; 218 : 1452-67.