

Amygdalin의 Murine Macrophage Raw 264.7 세포에서 *in vitro* 항염효과

신경민 · 박영미 · 김인태 · 홍선표 · 홍정표¹ · 이경태*
경희대학교 약학대학, ¹치과대학

In vitro Antiinflammatory Activity of Amygdalin in Murine Macrophage Raw 264.7 Cells

Kyung-Min Shin, Young-Mi Park, In-Tae Kim, Seon-Pyo Hong, Jung-Pyo Hong¹, and Kyung-Tae Lee*
College of Pharmacy, ¹College of Dentistry, Kyung Hee University, Hoegi-Dong, Seoul 130-701, Korea

Abstract – In the present study, anti-inflammatory activity of amygdalin isolated from Persicae Semen have been evaluated on lipopolysaccharide (LPS)-induced release of nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) by the macrophage RAW 264.7 cells. Amygdalin significantly inhibited generation of NO and TNF- α on LPS-stimulated RAW264.7 cells in a concentration-dependent manner. Consistent with these observations, the expression of inducible NO synthase (iNOS) enzyme was also inhibited by amygdalin in a concentration-dependent manner. However, amygdalin did not show any influence on the synthesis of PGE₂ and the expression of COX-2. Thus, this study suggests that amygdalin-mediated inhibition of iNOS expression, and TNF- α release may be one of the mechanisms responsible for the anti-inflammatory effects of Persicae Semen.

Key words – Amygdalin, nitric oxide, RAW 264.7, iNOS, TNF- α , Persicae Semen

체내 염증과정에서는 과량의 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증인자가 유도형 NO synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase (COX)-2에 의해 형성된다. 이 중 NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관 확장 등의 다양한 생리기능을 가지고 있다.^{1,2} 포유동물에서 분리한 nitric oxide synthase(NOS)는 물리 화학적 성상에 따라 type I, II 및 III 등 3종류의 동종 효소로 나누어 진다. Type I (neuronal NOS, nNOS)과 type III (endothelial NOS, eNOS)는 세포속에 지속적으로 존재하기 때문에 구성 NOS (constitutive NOS)로 분류되며, 상대적으로 일부 세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 type II인 유도형 NOS(iNOS)로 나누어 진다.² 이러한 NOS들은 L-arginine을 L-citrulline으로 전환시키면서 NO를 형성한다.³ 이들 NOS 중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다. 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나

종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다.^{4,6}

TNF- α 는 활성화된 macrophage, fibroblast 및 다른 여러 세포에서 생성되는데 이는 종양세포에 영향을 미치는 숙주 방어인자 및 염증 매개물질로 알려져 있다.^{7,8}

Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)으로 전환시키는 효소로써 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지 등 정상적 생체기능에 작용하지만 COX-2는 염증 매개물질인 PGE₂를 형성시킨다.⁹

도인은 Rosaceae에 속하는 낙엽, 활엽, 소교목인 복숭아 나무(*Prunus persica* BATSCH), 개복숭아 나무(*Prunus persica* BATSCH var. *davidiana Maximowicz*)의 씨로서 진해, 거담, 구어혈의 목적으로 한방에서 많이 사용되는 생약이다. 도인의 성분으로는 amygdalin, 지방유, emulsion, estrone등이 보고되어 있다.¹⁰ 도인에 함유되어 있는 배당체 형태의 amygdalin (Fig. 1)이 이들의 주성분인데, 수분의 존

*교신저자(E-mail) : ktleee@khu.ac.kr
(FAX) : 02-966-3885

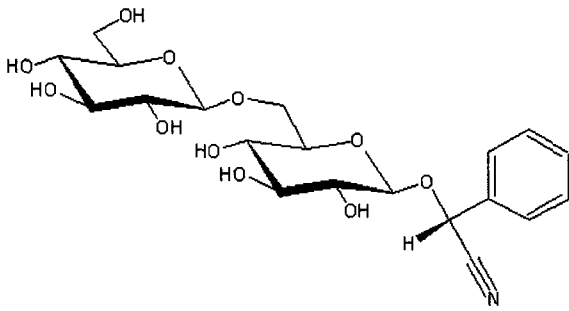


Fig. 1. Chemical structure of amygdalin.

재 하에서는 emulsin에 의해서 mandelonitrile을 거쳐서 HCN, benzaldehyde 및 glucose로 분해된다.¹¹⁾ 이러한 천연물로부터 유효활성 성분을 분리하여 이들의 약리작용 기전을 규명함으로써 다양한 약품의 개발 가능성을 부여할 수 있다.

본 연구진은 여러 천연물 추출물 및 분리된 물질들로 이러한 염증 인자들의 생성억제를 검색 및 기전연구를 통하여 새로운 항염제의 개발을 시도하고 있다.^{12,13)} 본 논문에서는 이러한 연구 중 도인(Persicae Semen)으로부터 분리한 amygdalin으로부터 LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 NO, PGE₂ 및 TNF- α 의 생성에 미치는 영향을 조사하였으며 또한 iNOS와 COX-2 단백질 발현 등을 검색하였다.

재료 및 방법

재료 - Amygdalin (Fig. 1)은 이미 보고된 논문¹¹⁾에 따라 추출 및 분리하였으며, 본 실험에 사용한 amygdalin은 HPLC에서 순도가 95% 이상의 것을 사용하였다. RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 Life Technologies Inc. (Grand Island, NY)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), sulfanilamide, aprotinin, leupeptin, phenylmethylsulfonyl-fluride, dithiothreitol, L-N⁶-(1-Iminoethyl)lysine (NIL), *E. coli* lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma Chemical Co. (MO, U.S.A.)에서 구입하였으며, COX-2와 iNOS monoclonal antibodies 및 peroxidase conjugated secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology (CA, U.S.A.)에서 구입하였다. 그리고 TNF- α , prostaglandin E₂ 측정을 위한 kit는 R&D systems (MN, U.S.A.)에서 구입하였다.

세포의 배양 - Raw 264.7 세포는 10% FBS 및 penicillin (100 μ g/mL), streptomycin (100 U/mL)이 포함된 RPMI 1640 배지에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양했다. Raw 264.7 세포를 2 \times 10⁵/mL 농도로 24 well plate에 각각 분주

한 후 다음날 시료용액을 여러 농도(100-200-300 μ M)로 넣고 30분 후 LPS (1 μ g/mL)를 처리하고 24시간 배양하였다.

세포독성 시험 - 세포배양 접시에 세포가 충분히 자란 경우 scrapper로 분리한 뒤 96 well plate에 2 \times 10⁵/well로 세포를 분주하고 24시간 동안 배양한 후 여러 농도의 시료용액을 배지에 희석하여 첨가 하였다. 24시간이 지난 후 MTT 시약을 넣고 4시간 동안 배양한 후 상등액을 제거하고 형성된 formazan을 DMSO 100 μ l를 첨가하여 녹였다. 30분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitrite 양의 측정 - Raw 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로써 측정하였다. 즉 세포배양 상등액 100 μ l와 Griess시약 [1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) phosphoric acid와 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine-HCl] 100 μ l를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot 시험 - Amygdalin을 처리한 세포 및 대조군을 PBS로 씻어낸 후 lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.0, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM dithiothreitol, 5 mM NaF, 0.5 mM Na orthovanadate)로 단백질을 추출한 후 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을 Bio-Rad 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하여 50 μ g의 단백질을 취했다. 추출된 단백질은 10%의 SDS-polyarylamide gel에 전기영동시킨 후 nitro cellulose membrane으로 gel의 단백질을 blot 시켰다. 5% skim milk로 하루 밤 동안 blocking한 후 1:500의 비율로 iNOS와 COX-2 antibody를 3시간 동안 상온에서 배양한 후 TTBS로 15분 간격으로 2회 세척하였다. 1:1000의 비율로 희석한 rabbit와 goat secondary antibody를 1시간 동안 상온에서 배양시켰다. 다시 TTBS로 15분 간격으로 3회 씻어낸 후 chemiluminescence로 현상하였다.

TNF- α 및 PGE₂ 양의 측정 - 세포배양액을 취해 각각 R&D kit의 지시에 따라 정량하였다.

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

결 과

Nitrite 형성의 억제 - LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 세포의 배양액 중에 생성된 nitrite의 양을 Griess 시약을 사용하여 amygdalin의 NO 생성저해를 조사하였다. Amygdalin은 농도 의존적으로 NO 생성을 저해하였으며(Fig. 2) 실험에 사용된 amygdalin의 최고 농도인 300 μ M에서는 세포독성을 나타내지 않았다. Amygdalin의 nitrite 형성을 억제하

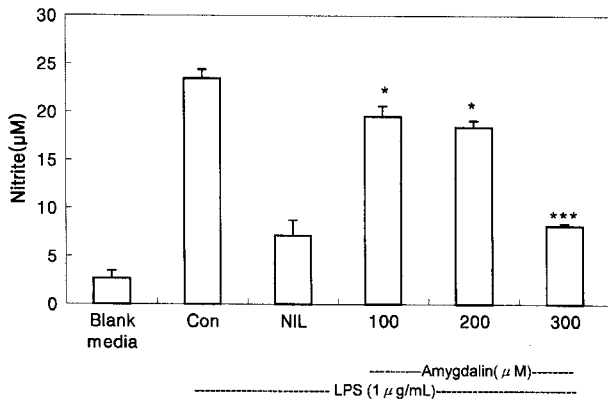


Fig. 2. Evaluation of nitrite production by RAW 264.7 cells stimulated for 24 h with LPS alone or in combination with increasing concentrations (100-200-300 µM) of the amygdalin. L-N⁶-(1-Iminoethyl)lysine (NIL) was present in the assay at 50 µM. The values are the means of at least 3 determinations ±S.D. **p*<0.05, ****p*<0.001 vs. LPS-control group.

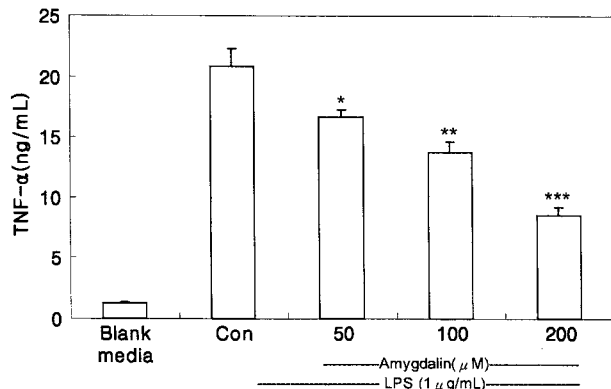


Fig. 3. Effect of the amygdalin on LPS-induced TNF-α production by RAW 264.7 cells. Cells were incubated with LPS for 24 h. The values, expressed as ng/mL of TNF-α, are means of 3 determinations ±S.D. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs. LPS-treated group.

는 IC₅₀는 220 µM로 확인되었으며 양성 대조군으로는 L-arginine과의 기질경쟁에 의하여 iNOS 저해제로 알려진 L-N⁶-(1-Iminoethyl)lysine (NIL) (IC₅₀; 50 µM)을 사용하였다. 그리고 LPS를 처리하지 않은 세포에서는 nitrite가 소량(2.63 ±0.79 µM) 생성되었다.

PGE₂와 TNF-α의 형성 억제 - LPS 처리에 의한 TNF-α의 생성을 100, 200 및 300 µM의 amygdalin에서 모두 유의성있게 농도의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으나(Fig. 3), PGE₂ 생성은 100, 200 및 300 µM amygdalin 농도에서도 감소를 보이지 않았다(Fig. 4).

COX-2와 iNOS 단백질 발현저해 - Amygdalin에 의한 염증인자(NO)의 억제와 iNOS 단백질 발현과 상관성을 알

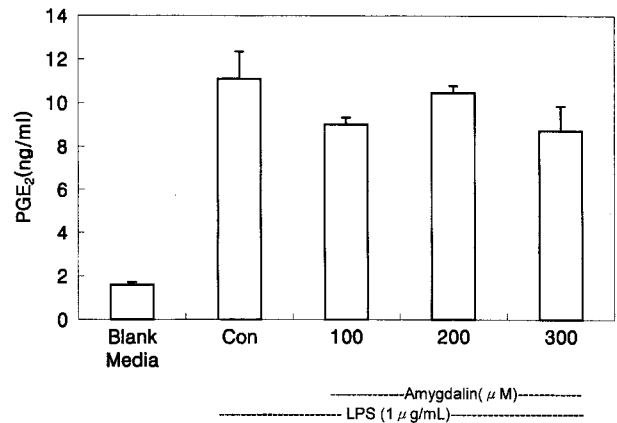


Fig. 4. Effect of the amygdalin on PGE₂ production by LPS-induced RAW 264.7 macrophage for 24 h. The values are means of 3 determinations ±S.D.

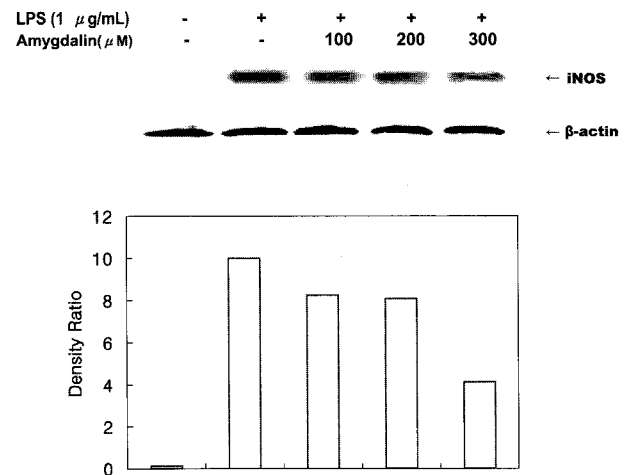


Fig. 5. Modulation by the amygdalin of LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 cells. Lysates were prepared from control or 24 h-LPS (1 µg/mL)stimulated cells alone or in combination with increasing concentrations (100-200-300 µM) of amygdalin. All lanes contained 50 µg of total proteins. A representative immunoblot from three separate experiments is shown.

아보기 위하여 Western blot으로 단백질의 발현을 조사하였다. LPS에 의해 iNOS 단백질은 뚜렷하게 증가하였으며, amygdalin은 iNOS의 발현을 농도 의존적으로 저해하였다. 최고 농도인 300 µM amygdalin 농도에서는 58% 이상의 감소를 나타내었다(Fig. 5). iNOS 발현 결과와는 달리 amygdalin은 LPS에 의해 유도되는 COX-2 단백질의 발현은 감소시키지 않았으며(Fig. 6), 이는 PGE₂의 생성 저해가 나타나지 않는 결과와 일치함을 보여주고 있다. 이상의 실험 결과를 바탕으로 amygdalin에 의한 NO 생성 감소는 iNOS 단백질 발현의 조절에 의한 것임을 알 수 있었다.

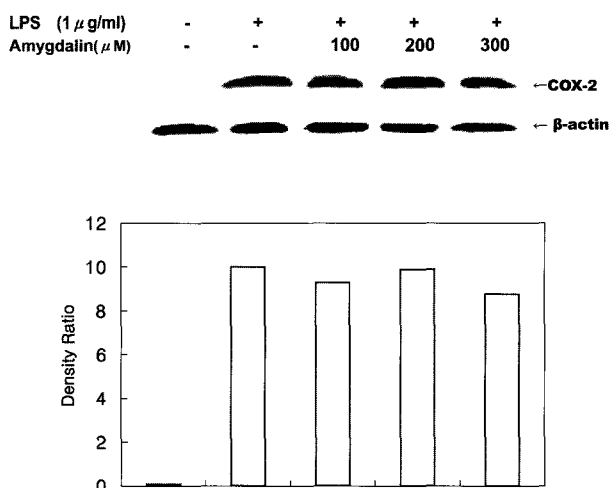


Fig. 6. Modulation by the amygdalin of LPS-induced COX-2 expression in RAW 264.7 cells. Lysates were prepared from control or 24 h-LPS (1 μg/mL) stimulated cells alone or in combination with increasing concentrations (100-200-300 μM) of amygdalin. All lanes contained 50 μg of total proteins. A representative immunoblot from three separate experiments is shown.

고찰

대식세포는 능동 및 수동 면역반응에서 매우 중요한 역할을 한다. LPS에 의한 대식세포의 활성화는 다양한 염증매개물질(IL-1, IL-6, TNF-α) 등을 유도하며, 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A₂의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO 형성 과정으로 이어지게 된다.^{9,14)} 이러한 과정을 설명하기 위해서 Raw 264.7 세포를 LPS에 24시간 노출시키게 되면 뚜렷하게 NO가 축적되는데 amygdalin은 이러한 NO의 생성억제를 세포독성이 없는 농도에서 농도 의존적으로 억제하였다. Western blot으로 분석한 결과 amygdalin에 의한 iNOS의 발현 억제는 NO 형성 억제와 매우 유사한 경향을 나타냄으로서 NO 형성 억제는 iNOS의 발현저해를 경유한 것임을 알 수 있었다.

염증전구물질인 TNF-α, IL-1 그리고 IL-6는 *in vivo* 및 *in vitro*에서 모두 염증반응을 조절하는 물질로 알려져 있다. 이러한 cytokine들은 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 염증반응을 일으키는 동안 일정하게 생성된다.^{15,16)} Amygdalin에 의한 TNF-α의 생성 저해는 염증전구물질의 형성억제를 나타내는 것이다.

다수의 항염증 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성을 억제하며 이는 COX-2의 생성 및 효소 활성저해에 의한 것이다.¹⁷⁾ COX는 COX-1과 COX-2로 나뉘어 지는데 다양한 세포에서 각각 다른 발현 경향을 나타낸다. COX-1은 위 및 신장기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 prostaglandin을

합성한다.¹⁸⁾ 상대적으로 COX-2는 동물이나 인간의 염증반응 부위에서 발현된다.^{17,18)} 따라서 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨지고 있다. Amygdalin은 LPS에 의해 형성되는 COX-2 발현 억제 및 이에 따른 PGE₂의 형성을 감소시키지는 못하였다. 이러한 iNOS의 발현에는 NF-κB가 promoter로 작용하여 발현을 조절하므로 앞으로 이러한 유전자의 발현 조절물질 등의 활성화도 연구되어야 한다.

본 실험 결과를 요약하면 nitrite, TNF-α 형성억제 및 iNOS의 발현억제는 amygdalin이 염증성 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 의약품의 개발가능성을 제시하고 있는 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥 사업의 지원(HMP-00-CH-10-0009)에 의해 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

- Moncada, S., Palmer, R. M., and Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-142.
- Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**: 3051-3064.
- Knowles, R. G. and Moncada, S. (1992) Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS.* **17**: 399-402.
- Stuehr, H. H. J., Kwon, N. S., Weise, M., and Nathan, C. (1991) Purification of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Sci. U. S. A.* **88**: 7773-7777.
- McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F., and Wahl, S. M. (1993) Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **178**: 749-754.
- Weisz, A., Cicatiello, I., and Esumi, H. (1996) Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* **316**: 209-215.
- Duerksen-Hughes, P. J., Day, D., Laster, S. M. A., Zachariades, N. A., Aquino, L., and Gooding, L. R. (1992) Both tumor necrosis factor and nitric oxide participate in lysis of simian virus 40-transformed cells by activated macrophages. *J. Immunol.* **149**: 2114-2122.
- Willeaume, V., Kruys, V., Mijatovic, T., and Huez, G. (1995) Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and

- differences. *J. Inflamm.* **46**: 1-12.
9. Vane, J. R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New Biol.* **23**: 232-235.
 10. 생약학연구회(1997) 현대생약학, 322. 학창사, 서울.
 11. Hwang, E. Y, Lee, S. S., Lee, J. H., and Hong, S. P. (2002) *Arch. Pharm. Res.* **5**: 453-456.
 12. Kim, Y. K., Kim, R. G., Park, S. J., Ha, J. H., Choi, J. W., Park H. J., and Lee, K. T. (2002) *In vitro* antiinflammatory activity of kalopanaxsaponin A isolated from *Kalopanax pictus* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 472-476.
 13. Kim, R. G., Shin, K. M., Kim, Y. K., Jeong, H. J., Ha, J., Choi, J. W., Park, H. J., and Lee K. T. (2003) Inhibition of methanol extract from the aerial parts of *Saururus chinensis* on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production from murine macrophage RAW 264.7 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **26**: 481-486.
 14. Funk, C. D., Frunk, L. B., Kennedy, M. E., Pong, A. S., and Fitzgerald, G. A. (1991) Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* **5**: 2304-2312.
 15. Feldmann, M., Brennan, F. M., and Maini, R. N. (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 397-440.
 16. Harada, A., Sekido, N., Akahoshi, T., Wada, T., Mukaida, N., and Matsushima, K. J. (1994) Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **56**: 559-564.
 17. Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., and Ksaxon, P. (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 12013-12017.
 18. Masferrer, J., Zweifel B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson, P. C., and Seibert, K. (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 3228-3232.

(2003년 5월 1일 접수)