

Kaempferol-3-O-β-D-sophoroside의 RAW 264.7 세포에서 NF-κB 억제를 통한 LPS에 의해 유도되는 iNOS, COX-2 및 cytokine들의 발현 저해효과

박승재¹ · 신지선¹ · 조웅¹ · 조영욱² · 안은미³ · 백남인⁴ · 이경태^{1*}

¹경희대학교 약학대학, ²경희대학교 의과대학, ³대구한의과대학교 한방식품 약리학과, ⁴경희대학교 생명과학부

Inhibition of LPS induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by kaempferol-3-O-β-D-sophoroside through the NF-κB inactivation in RAW 264.7 cells

Seung Jae Park¹, Ji-Sun Shin¹, Woong Cho¹, Young-Wuk Cho², Eun-Mi Ahn³,
Nam-In Baek⁴, Kyung-Tae Lee^{1*}

¹Department of pharmaceutical Biochemistry, College of Pharmacy, Kyung-Hee University, Seoul 130-701, South Korea

²Department of physiology, College of Medicine, Kyung-Hee University, Seoul 130-701, South Korea

³Department of Herbal Food Science, Daegu Haany University, Gyeongsan, 712-715, South Korea

⁴Department of Life Science, Kyung-Hee University, Suwon 446-701, South Korea

Abstract – In the present study, we investigated the anti-inflammatory effects by kaempferol-3-O-β-D-sophoroside (KS) isolated from *Sophora japonica* (Leguminosae) on the lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) and prostaglandin (PGE₂) production by RAW 264.7 cell line compared with kaempferol. KS significantly inhibited the LPS-induced NO and PGE₂ production. Consistent with these observations, KS reduced the LPS-induced expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) at the protein and mRNA levels in a concentration-dependent manner. In addition, the release and the mRNA expression levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) were also reduced by KS. Moreover, KS attenuated the LPS-induced activation of nuclear factor-kappa B (NF-κB), a transcription factor necessary for pro-inflammatory mediators, iNOS, COX-2, TNF-α and IL-6 expression. These results suggest that the down regulation of iNOS, COX-2, TNF-α, and IL-6 expression by KS are achieved by the downregulation of NF-κB activity, and that is also responsible for its anti-inflammatory effects.

Key words – Kaempferol-3-O-β-D-sophoroside, NF-κB, LPS, Anti-inflammation, *Sophora japonica*

Flavonoid는 2-phenylbenzo-γ-pyrone ring 구조를 공통으로 갖는 화합물로서 당과 결합하여 일반적으로 배당체로 존재한다. 매년 다양한 천연소재들로부터 새로운 천연 flavonoid 화합물들이 계속적으로 추출 분리되고 있으며 생리활성들도 많이 밝혀지고 있다. 이에 따라 flavonoid 화합물들의 적용분야도 간질환, 당뇨병,¹⁾ 전립선암 등 각종 악성종양,^{2,4)} 류마티스관절염 등 각종 염증,⁵⁻⁷⁾ 바이러스성 질환,⁸⁾ 혈관계 질환, 심근관련 질환, 스트레스, 우울증 등 점점 다양해지고 있다. 특히 flavonoid 화합물들의 항염효능에 대하여는 많

은 연구가 되어 있으며 이 중 kaempferol의 항염효능에 관하여서도 보고가 되었다.^{9,10)}

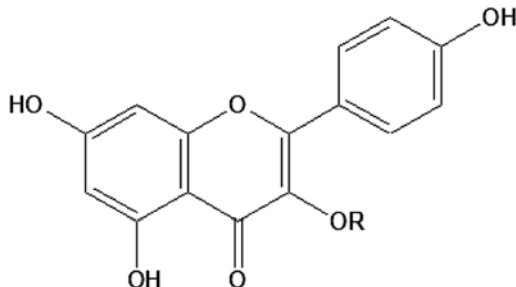
염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) 및 leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다. 그러나 지속적인 염증반응은 오히려 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 유도한다.¹¹⁾

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

내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성균의 세포외막에 존재하며, RAW 264.7 세포와 같은 macrophage 또는 monocyte에서 tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 proinflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다.¹²⁻¹⁶ 또한 이러한 proinflammatory gene들의 유도는 전사인자의 활성화에 의해 일어나게 된다. Nuclear transcription factor-kappa-B (NF- κ B)는 세포 분화, 염증반응, 세포 부착 등에 관련된 여러 유전자들의 발현에 가장 중요한 역할을 하는 전사인자이다. 활성화된 NF- κ B는 핵 내로 translocation 되어 표적 유전자의 promoter regions에 있는 κ B 결합 자리에 결합하여 iNOS, COX-2, TNF- α 그리고 IL-6 등 여러 염증 매개물질의 전사를 촉진한다.¹⁷

회화나무 (*Sophora japonica* L.)는 콩과식물에 속하는 낙엽교목으로 그 높이는 25 m에 달하고 가지가 퍼지며 우리나라, 중국, 일본 등지에 널리 분포한다.¹⁸ 잎은 호생하고 화기는 7-8월로 이 시기의 꽃을 한방에서는 괴화(槐花)라 하고 꽃봉오리는 괴미(槐米), 그 성숙한 열매를 괴각이라 하여 지혈, 토혈, 변혈 등에 이용되며, 혈압강화효과와 항염효과가 있는 것으로 알려져 있다.¹⁹⁻²⁰ 또한 민간에서는 잎을 삶은 물로 치질부위를 수세하고 생(生) 및 초(炒) 괴화를 비(鼻)출혈, 세균성 치질의 치유, 고혈압 환자가 상복하여 증풍의 예방에 사용하여 왔다.²¹

본 연구진은 여러 천연물의 추출물 및 분리된 단일화합물들의 항염증 효과를 검색하고 그기전을 규명함으로써 새로운 항염증 약물의 개발을 시도하고 있다. 본 논문에서는 이러한 연구 중 괴각으로부터 분리한 kaempferol-3-O- β -D-sophoroside (Fig. 1)가 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포에서 항염효과를 나타내는 기전을 연구 하였으며 염증에 관련된 다양한 단백질과, mRNA 그리고 cytokine의 발현을 측정하였다.



Kaempferol : R = H

Kaempferol-3-O- β -D-sophoroside (KS) : -Glc (2 \rightarrow 1)-Glc

Fig. 1. Chemical structures of kaempferol and kaempferol-3-O- β -D-sophoroside (KS)

재료 및 방법

재료 - 시료의 추출과 분획에 사용한 유기 용매는 대정 화학주식회사 (Gyeonggi-do, Korea)에서 생산한 1급 시약을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60 (Merck, Germany)을 사용하였다. NMR 스펙트럼은 Varian Inova AS 400 (Varian, USA)으로, FABMS는 JMS-700 (JEOL, Japan)로 측정하였다. Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 life Technologies Inc. (Grand Island, NY)에서 구입하였다. Kaempferol, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), sulfanilamide, aprotinin, leupeptin, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), dithiothreitol (DTT), L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine (L-NIL), NS-398, *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma Chemical Co. (CA, U.S.A.)에서 구입하였으며, COX-2와 iNOS monoclonal antibodies 및 peroxidase conjugated secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology (CA, U.S.A.)에서 구입하였다. iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6 그리고 β -actin oligonucleotide primers 는 Bioneer (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 그리고 TNF- α , IL-6, prostaglandin E₂ 측정용 위한 kit는 R&D systems (MN, U.S.A.)에서 구입하였다.

시료의 추출 및 분리 - 괴각 1.2 kg을 80% MeOH 용액 (2 L \times 3)으로 24시간 실온에서 3회 추출하였다. 추출물을 여과하고 얻어진 여액을 모두 합쳐 감압농축하여 MeOH 추출물 395 g을 얻었다. MeOH 추출물을 증류수 1리터에 현탁시킨 후 EtOAc (1 L \times 2) 및 *n*-BuOH (750 mL \times 2)로 순차적으로 분획하였다. 각각의 분획물을 농축하여 EtOAc 분획물 (9.42 g), *n*-BuOH 분획물 (81.9 g) 및 물 분획물을 얻었다. *n*-BuOH 분획물 (81 g)을 CHCl₃-MeOH의 혼합용매를 용출 용매로 사용하여 기울기 용리 방식으로 silica gel column chromatography (c.c)를 실시하여 총 11개의 소분획 (B1~B11)으로 나누었다. 이 중 B7번 분획을 silica gel c.c.(CHCl₃-MeOH-H₂O=65:35:10)하여 노란분말상의 kaempferol-3-O- β -D-sophoroside (650 mg)을 분리하였다. 이 화합물의 ¹H, ¹³C-NMR 및 MS의 데이터를 기존 문헌과 비교하여 구조를 동정하였다.²²

Kaempferol-3-O- β -D-sophoroside : yellow amorphous powder, Negative FAB MS *m/z*: 609 ([M-H]⁻) ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ _H): 8.03 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2',6'), 6.89 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3',5'), 6.36 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.17 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.43 (1H, d, *J*=7.6 Hz, glc-1), 4.76 (1H, d, *J*=7.2 Hz, glc-1'), 3.78~3.29 (sugar moieties), ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ _C): 179.44 (C-4), 165.64 (C-7), 162.85 (C-5), 161.30 (C-4'), 158.74 (C-

2), 158.26 (C-9), 134.77 (C-3), 132.19 (C-2', 6'), 122.60 (C-1'), 116.11 (C-3', 5'), 105.68 (C-10), 104.50 (glc-1'), 100.93 (glc-1), 99.74 (C-6), 94.64 (C-8), 82.72 (glc-2), 78.11 (glc-3, 5), 77.81 (glc-3', 5'), 75.41 (glc-2'), 71.22 (glc-4'), 71.03 (glc-4), 62.54 (glc-6'), 62.41 (glc-6).

세포의 배양 - RAW 264.7 세포는 10% FBS 및 penicillin (100 µg/ml), streptomycin (100 U/ml)이 포함된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양했다. RAW 264.7 세포에 시료용액의 여러 농도 (25, 50, 100 µM) 또는 양성 대조군을 1시간 전처리한 후 LPS (1 µg/mL)를 처리하고 24시간 배양하였다.

세포독성 시험 - 96 well plate에 1×10⁵ cells/well로 세포를 동일하게 분주하고 24시간동안 배양한 후 여러 농도의 시료용액을 두 군으로 나누어 배지에 희석하여 첨가 하였다. 1시간후 한 군에만 LPS (1 µg/ml)를 처리하였다. 24시간이 지난 후 MTT시약을 넣고 4시간 동안 방치한 후 상등액을 제거하고 형성된 formazan을 DMSO 100 µl를 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 NO₂의 형태로 측정하였다. 즉 세포배양 상등액 100 µl와 Griess시약 [1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) phosphoric acid 와 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine-HCl] 100 µl를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot 시험 - KS를 처리한 세포 및 대조군을 PBS로 씻어낸 후 lysis buffer인 PRO-PREP (Intron Biotechnology)으로 단백질을 추출한 후 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을 Bradford 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하여 50 µg의 단백질을 취했다. 추출된 단백질은 10%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동시킨 후 nitrocellulose membrane으로 gel의 단백질을 blot시켰다. 5% skim milk로 하루 밤 동안 blocking한 후 1:500의 비율로 iNOS와 COX-2 antibody를 4시간동안 상온에서 방치한 후 TTBS로 15분 간격으로 2회 세척하였다. 1:1000의 비율로 희석한 secondary antibody를 1시간동안 상온에서 방치시켰다. 다시 TTBS로 15분 간격으로 3회 세척한 후 chemiluminescence로 현상하였다.

PGE₂, TNF-α 및 IL-6 양의 측정 - 세포배양액을 취해 각각 R&D kit의 지시에 따라 PGE₂, TNF-α 및 IL-6를 정량하였다.

RT-PCR 시험 - Easy Blue[®] kits (Intron Biotechnology)를 이용하여 kit의 protocol에 따라 전체 cellular RNA를 추출하였다. 각각의 시료에서 MuLV reverse transcriptase, 1mM dNTP 그리고 oligo (dT₁₂₋₁₈) 0.5 µg/µl 를 이용하여 1 µg의 RNA를 역전사 하여 cDNA를 얻었다. cDNA에

Taq DNA polymerase 1 unit, 0.2 mM dNTP, ×10 reaction buffer 그리고 5' 와 3' primers 100 pmol을 포함한 전체 부피 25 µL의 시료를 thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, Foster City, CA, USA)를 이용하여 PCR 분석을 하였다. PCR 반응은 95°C 에서 2분간 initial denaturation 시킨 후 iNOS (95°C 1분 denaturation, 60°C 1분 annealing 그리고 72°C 1.5분 extension), COX-2 (94°C 1분 denaturation, 60°C 1분 annealing 그리고 72°C 1분 extension), TNF-α (95°C 1분 denaturation, 55°C 1분 annealing 그리고 72 1분 extension) 그리고 IL-6 (94°C 1분 denaturation, 56°C 1분 annealing 그리고 72°C 1분 extension) 를 30 회 amplification 하였다. 이번 연구에서 아래의 목록과 같은 PCR primers 가 사용되었으며 Bioneer (Seoul, Korea) 에서 구입하였다. : sense strand iNOS, 5'-ATT GGC AAC ATC AGG- TCG GCC ATC ACT-3', anti-sense strand iNOS, 5'-GCT GTG TGT CAC AGA AGT CTC GAA- CTC-3'; sense strand COX-2, 5'-GGA GAG ACT ATC AAG ATA GT-3' anti-sense strand COX-2, 5'-ATG GTC AGT AGA CTT TTA CA-3'; sense strand TNF-α, 5'-ATG AGC ACA GAA AGC ATG- ATC-3', anti-sense strand TNF-α, 5'-TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT-3'; sense strand IL-6, 5'-GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC-3', anti-sense strand IL-6, 5'-AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA-3'; 5'-GTG CTG CCT- AAT GTC CCC TTG AAT C-3'; sense strand β-actin, 5'-TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA- TCC GT-3', anti-sense strand β-actin, 5'-CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG-3'. Amplification 후에 PCR 반응 시킨 시료를 2% agarose gel 에서 전기영동하고 ethidium bromide 염색과 UV 조사를 통해 확인하였다.

NF-κB Luciferase activity 측정 - RAW 264.7 세포를 dish에 각각 2×10⁵ cells/dish 농도로 분주한 후, Invitrogen (CA, U.S.A.)에서 구입한 Lipofectamine 2000 Reagent를 이용하여 NF-κB luciferase reporter plasmid DNA를 형질감염 (transfection)시켰다. 형질감염 48시간이 경과한 후 3~4×10⁵ cell/well로 12 well plate에 세포를 분주하고 KS를 1시간 동안 전처리 한 후 LPS (1 µg/ml)를 처리하였다. 24시간 후 세포를 수집하여 luciferase assay system (Promega, U.S.A.)와 luminometer (Perkin Elmer Cetus, U.S.A)를 이용하여 luciferase 활성을 측정하였다.

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

결 과

KS의 세포독성에 대한 효과 - KS 와 대조약물로 KS의 aglycone인 kaempferol의 RAW 264.7 세포에 대한 세포독

성을 측정하기 위해 MTT assay를 수행하였다. KS는 100 μM 까지 RAW 264.7 세포의 생존 능력에 영향을 주지 않았으며 (Fig.2a) IC_{50} 는 308.94 μM 로 확인되었다. Kaempferol은 50 μM 에서 14.5%의 세포가 사멸하여 독성을 나타내었으며 IC_{50} 는 196.18 μM 로 KS에 비해 RAW 264.7 세포에서 독성이 높게 나타났다 (Fig.2b).

KS의 Nitrite 형성 및 iNOS 단백질과 mRNA 발현저해 - LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 생성된 nitrite 양을 Griess 시약을 사용하여 KS의 NO 생성저해효과를 조사하였다. KS는 농도 의존적으로 NO 생성을 저해하였으며 (Fig.3a) 100 μM 에서 NO 생성을 34.2% 저해하였다. Kaempferol은 25 μM 에서 NO 생성을 49.4% 저해하였으며 양성 대조군으로는 L-arginine과의 기질경쟁에 의하여 iNOS 저해제로 알려진 L-NIL (10 μM)을 사용하였다. KS에 의한 Nitrite의 생성 억제와 iNOS 발현의 상관성을 알아보기 위하여 Western blot 과 RT-PCR로 iNOS 단백질과 mRNA 발현을 조사하였다. LPS에 의해 iNOS 단백질이 뚜렷하게 증가하였으며, 100 μM KS에 의해 iNOS 단백질의 발현이 81.5% 저해되었다. KS의 aglycone인 kaempferol은 25 μM 에서 iNOS 단백질 발현을 81.4% 저해하였다. KS에 의한 iNOS mRNA 발현저해는 농도 의존적이며 단백질 발현 저해와 상관성 있게 나타났다 (Fig.3b).

KS의 PGE₂ 형성 및 COX-2 단백질과 mRNA 발현저해 효과 - LPS 처리에 의해 RAW 264.7 세포에서 PGE₂의

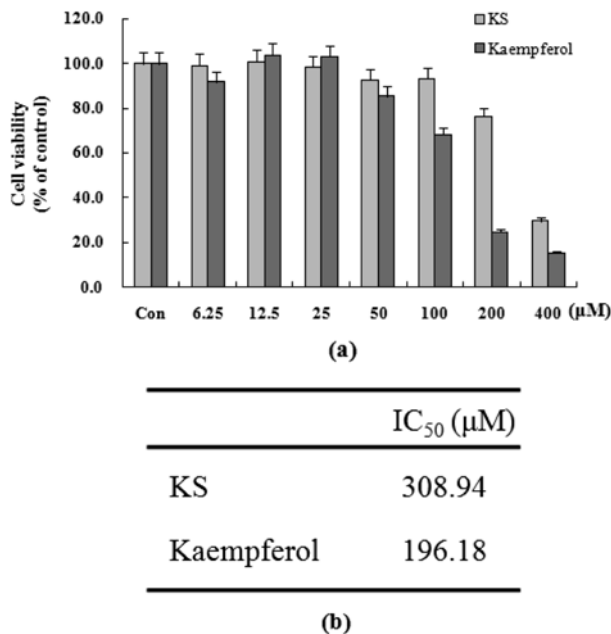


Fig. 2. The cytotoxicity of KS or Kaempferol on RAW 264.7 cells. Cells were exposed to KS and kaempferol (from 6.25 μM to 400 μM). Cytotoxicity was assessed by 3-(4, 5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay after 24 h incubation.

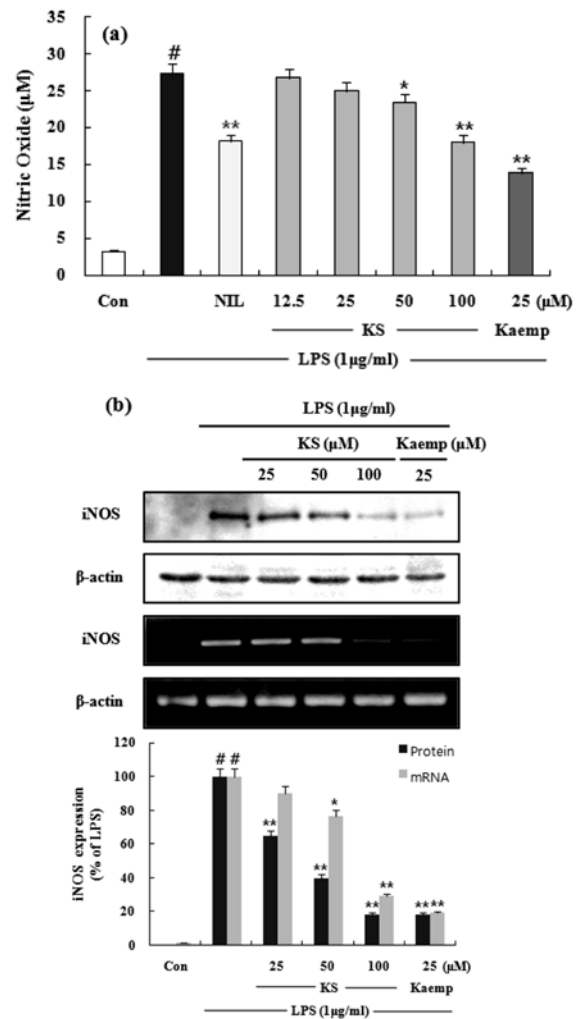


Fig. 3. The effects of KS on LPS-Induced NO production and iNOS protein and mRNA expressions in RAW 264.7 Cells. (a) Cells were treated with different concentrations of KS or kaempferol (25 μM) for 1 h and then LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added and the cells were incubated for 24 h. Control (Con) values were obtained in the absence of LPS or tested samples. L-N⁶-(1-iminoethyl) lysine (L-NIL) was used as an assay positive control at a concentration of 10 μM . (b) Lysates were prepared from control or 24 h LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)-stimulated cells alone or LPS plus with different concentration (25, 50, 100 μM) of KS or kaempferol (25 μM). A representative immunoblot of three separate experiments is shown. Total RNA was prepared for the RT-PCR analysis of iNOS gene expression from RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) with/without different concentration (25, 50, 100 μM) of KS or kaempferol (25 μM) for 4 h. iNOS-specific sequences (807 bp) was detected by agarose gel electrophoresis, as described in methods. The experiment was repeated three times and similar results were obtained. The values are the mean \pm S.D. of three independent experiments. # p <0.05 vs. the control group; * p <0.05, ** p <0.01 vs. the LPS-treated group; the significances of the difference between the treated groups was evaluated using the Student's t -test.

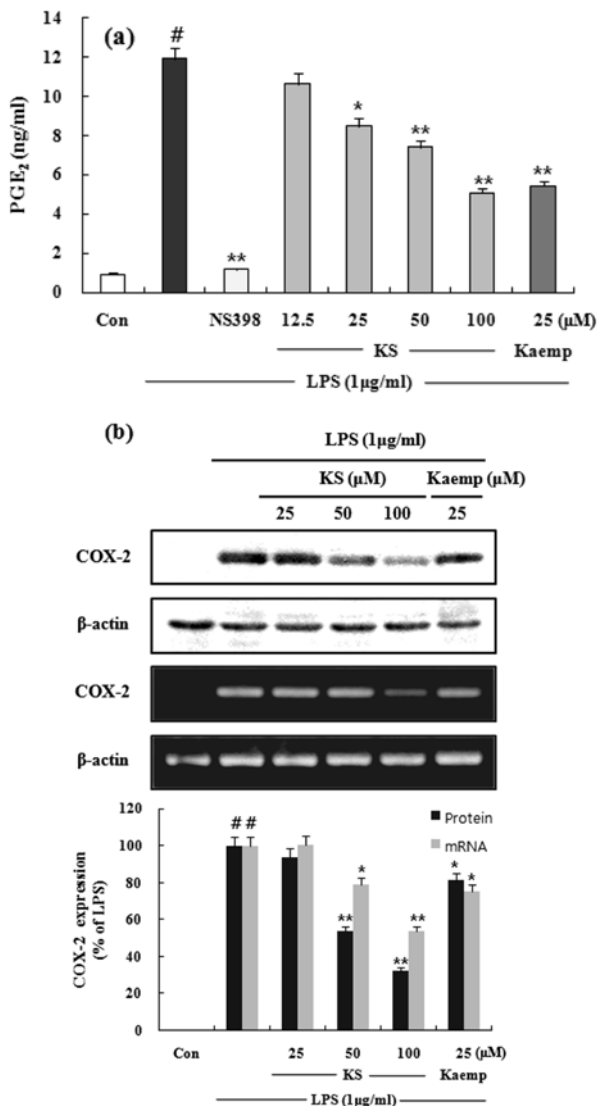


Fig. 4. The effects of KS on LPS-induced PGE₂ and COX-2 protein and mRNA expressions in RAW 264.7 Cells. (a) Effect of the KS and kaempferol on PGE₂ production by LPS-induced RAW 264.7 macrophage for 24 h. 10 μM of NS-398 was as a positive control in the assay. (b) Lysates were prepared from control or 24 h LPS (1 μg/ml)-stimulated cells alone or LPS plus with different concentration (25, 50, 100 μM) of KS or kaempferol (25 μM). A representative immunoblot of three separate experiments is shown. Total RNA was prepared for the RT-PCR analysis of COX-2 gene expression from RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS (1 μg/ml) with/without different concentration (25, 50, 100 μM) of KS or kaempferol (25 μM) for 4 h. COX-2-specific sequences (721 bp) was detected by agarose gel electrophoresis, as described in methods. The experiment was repeated three times and similar results were obtained. The values are the mean±S.D. of three independent experiments. #*p*<0.05 vs. the control group; **p*<0.05, ***p*<0.01 vs. the LPS-treated group; the significances of the difference between the treated groups was evaluated using the Student's *t*-test.

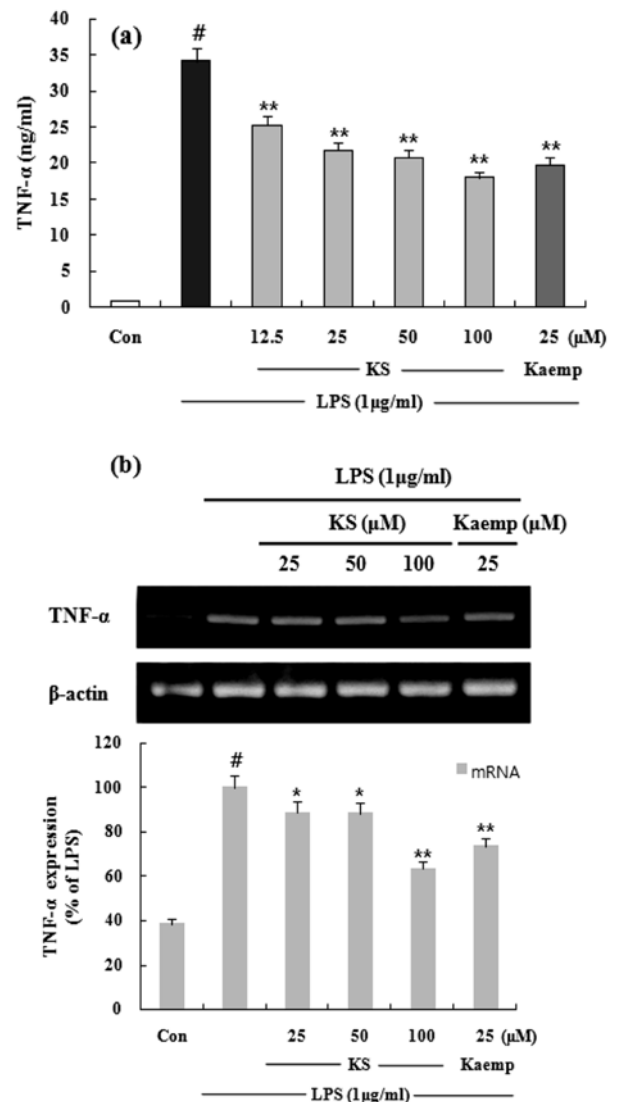


Fig. 5. The effects of KS and kaempferol on LPS-induced TNF-α release and mRNA expression in RAW 264.7 cells. Cells were treated with different concentrations of KS or kaempferol (25 μM) for 1 h and then LPS (1 μg/ml) was added and the cells were incubated for 24 h. Control (Con) values were obtained in the absence of LPS or tested samples. Total RNA was prepared for the RT-PCR analysis of TNF-α gene expression from RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS (1 μg/ml) with/without different concentration (25, 50, 100 μM) of KS or kaempferol (25 μM) for 4 h. TNF-α-specific sequences (351 bp) was detected by agarose gel electrophoresis, as described in methods. PCR of β-actin was performed to verify that the initial cDNA contents of the samples were similar. TNF-α release results have some analogy with the RT-PCR results and these are also shown by relative ratio graphs. The values are the mean±S.D. of three independent experiments. #*p*<0.05 vs. the control group; **p*<0.05, ***p*<0.01 vs. the LPS-treated group; the significances of the difference between the treated groups was evaluated using the Student's *t*-test.

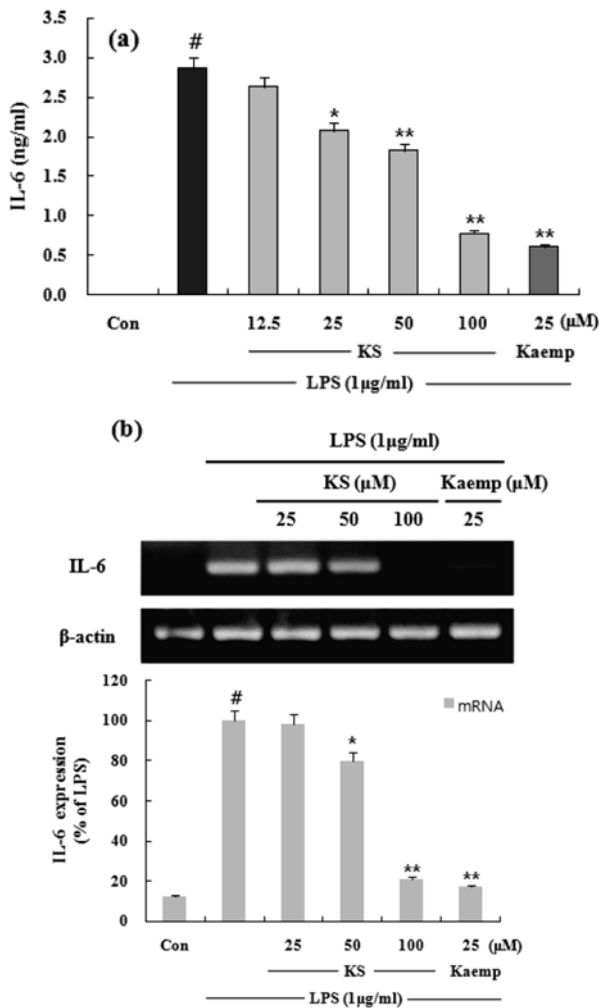


Fig. 6. The effects of KS and kaempferol on LPS-induced IL-6 release and their mRNA expression in RAW 264.7 cells. Cells were treated with different concentrations of KS or kaempferol (25 µM) for 1 h and then LPS (1 µg/ml) was added and the cells were incubated for 24 h. Control (Con) values were obtained in the absence of LPS or tested samples. Total RNA was prepared for the RT-PCR analysis of IL-6 gene expression from RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS (1 µg/ml) with/without different concentration (25, 50, 100 µM) of KS or kaempferol (25 µM) for 4 h. IL-6-specific sequences (142 bp) was detected by agarose gel electrophoresis, as described in methods. PCR of β-actin was performed to verify that the initial cDNA contents of the samples were similar. IL-6 release results have some analogy with the RT-PCR results and these are also shown by relative ratio graphs. The values are the mean±S.D. of three independent experiments. #*p*<0.05 vs. the control group; **p*<0.05, ***p*<0.01 vs. the LPS-treated group; the significances of the difference between the treated groups was evaluated using the Student's *t*-test.

생성이 뚜렷하게 증가하였으며, KS가 농도 의존적으로 유의성있게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다 (Fig.4a).

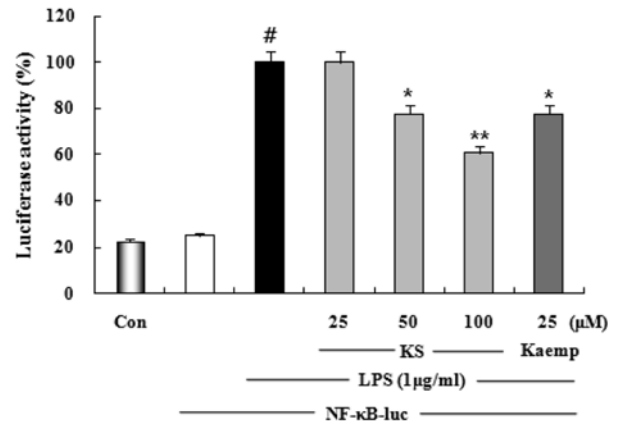


Fig. 7. The inhibition of NF-κB-DNA Binding by KS and kaempferol. Cells were transiently cotransfected with pNF-κB-luc reporter and then left untreated (Con) or were pretreated with different concentrations (25, 50, 100 µM) of KS or kaempferol (25 µM). LPS (1 µg/ml) was then added and the cells were further incubated for 3 h. The cells were then harvested and luciferase activities were determined using a Promega luciferase assay system and a luminometer. The values are the mean±S.D. of three independent experiments. #*p*<0.05 vs. the control group; **p*<0.05, ***p*<0.01 vs. the LPS-treated group; the significances of the difference between the treated groups was evaluated using the Student's *t*-test.

100 µM KS에서 57.4%의 PGE₂ 생성억제 효과를 나타내었으며, KS의 aglycone인 kaempferol (25 µM) 에서 PGE₂의 생성을 54.5% 저해하였다. 양성 대조군으로는 선택적인 COX-2 저해제로 알려진 NS398 (5 µM)을 사용하였다. KS에 의한 PGE₂ 생성 저해와 COX-2 발현의 상관성을 알아보기 위하여 Western blot 과 RT-PCR로 COX-2 단백질과 mRNA 발현을 조사하였다. LPS에 의해 COX-2 단백질이 뚜렷하게 증가하였으며, 50 µM KS에서 50.0%의 저해효과를 나타내었다. KS의 aglycone인 kaempferol (25 µM)은 18.6%의 감소효과를 나타내었다. KS에 의해 COX-2 mRNA 발현 또한 농도 의존적으로 저해되었으며 단백질 발현 저해와 상관성 있게 나타났다 (Fig.4b).

KS의 TNF-α 와 IL-6 의 형성 및 mRNA 발현저해 효과 - KS가 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의한 pro-inflammatory cytokine의 형성을 억제하는지 알아보기 위해 ELISA 와 RT-PCR 을 이용하여 TNF-α와 IL-6 의 생성 및 mRNA 발현을 측정하였다. LPS 처리에 의한 TNF-α의 생성이 KS의 12.5 µM에서 유의성 감소되는 것을 확인하였으며 (26.1%), 25 µM에서 TNF-α의 생성을 36.4% 저해하여 같은 농도의 kaempferol (42.2% 저해)과 비슷한 효과를 나타내었다 (Fig.5a). LPS에 의한 IL-6생성은 100 µM KS에서 73.1% 저해 되었으며 KS의 aglycone인 kaempferol (25 µM) 에서는 78.9%가 저해됨을 확인하였다 (Fig.6a). 또한

KS는 LPS에 의한 TNF- α 와 IL-6 mRNA의 발현을 유의성 있게 저해하며 TNF- α 와 IL-6 생성 저해효과와 상관성이 있음을 확인하였다 (Fig.5b and 6b).

KS의 NF- κ B 활성 저해 효과 - LPS에 의해 유도되는 iNOS, COX-2, TNF- α , 그리고 IL-6의 발현에 NF- κ B의 활성이 중요한 역할을 한다고 보고되어 있으므로²³⁾ KS가 LPS에 의한 NF- κ B의 활성화를 억제하는지 알아보기 위해 luciferase assay를 수행하였다. Lipofectamine 2000시약을 사용하여 RAW 264.7 세포에 일시적으로 pNF- κ B-luc plasmid를 transfection 시키고 KS 또는 kaempferol을 처리한 군과 처리하지 않은 대조군에 LPS (1 μ g/ml)로 자극을 가한다. KS가 LPS에 의해 유도된 NF- κ B 의존적인 luciferase 효소의 발현을 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰으며 50 μ M에서 22.4% 감소하였다. kaempferol은 25 μ M에서 이와 비슷한 효과(22.4%)를 나타내었다 (Fig.7).

고 찰

본 연구진은 이전의 보고에서 회화나무(*Sophora japonica* L.)의 성숙한 열매인 껍질에서 분리한 genistein-4'-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (GRG)가 RAW 264.7 세포에서 항염증 효과가 있음을 밝혔다.²⁴⁾ 본 연구에서는 껍질에서 분리한 새로운 검색물질인 kaempferol-3-O- β -D-sophoroside (KS)의 항염증 효과와 그 aglycone인 kaempferol과의 작용을 비교하여 KS가 어떤 기전을 통해 항염증 효과를 나타내는지 연구하였다.

대식세포는 능동 및 수동 면역반응에서 매우 중요한 역할을 하며 NO, prostaglandins (PGs) 그리고 pro-inflammatory cytokines을 포함한 다양한 염증 매개물질을 조절한다.²⁵⁾ 이중 NO 형성은 박테리아를 죽이거나 중양을 제거 시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다.²⁶⁻²⁸⁾ 이러한 사실에 기초하여 KS와 kaempferol이 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 저해함을 확인하였다. 또한 Western blot과 RT-PCR로 분석한 결과 KS와 kaempferol에 의한 iNOS의 발현 억제는 NO 형성 억제와 유사한 경향을 나타냄으로 NO 형성 억제는 iNOS의 발현저해를 경유한 것임을 알 수 있었다.

다수의 항염증 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성을 억제하며 이는 COX-2의 생성 및 효소 활성저해에 의한 것이다. COX는 COX-1과 COX-2로 구분되는데, 다양한 세포에서 각각 다른 발현 경향을 나타낸다. COX-1은 위 및 신장기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 prostaglandin을 합성한다.²⁹⁾ 상대적으로 COX-2는 동물이나 인간의 염증반응 부위에서 발현된다.²⁹⁻³⁰⁾ 따라서 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨지고 있다. KS

는 LPS에 의해 형성되는 PGE₂를 유의성 있게 감소시키며 NO 생성저해 보다 더 뚜렷하게 나타났다. Western blot과 PCR을 이용하여 COX-2 단백질과 mRNA의 발현을 확인한 결과 KS와 kaempferol에 의한 PGE₂ 생성 저해가 유전자 단계에서 조절됨을 확인 할 수 있었다.

염증매개물질인 TNF- α 와 IL-6는 *In vivo* 및 *In vitro*에서 모두 염증반응을 조절하는 물질로 알려져 있다. 이러한 cytokine 들은 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 LPS등의 염증 자극 물질에 의해 생성이 유도된다고 보고되었다.³¹⁾ KS는 LPS에 의해 유도된 TNF- α 의 생성을 12.5 iM에서부터 유의성 있게 감소 시켰으며 IL-6의 생성도 농도의존적으로 유의성 있게 저해하였다. PCR로 분석한 결과 TNF- α 와 IL-6 mRNA 발현과 매우 유사한 경향을 나타냄으로써 TNF- α 와 IL-6 형성 억제는 mRNA의 발현저해를 경유한 것임을 알 수 있었다.

이러한 COX-2, iNOS 그리고 pro-inflammatory cytokines의 발현에 NF- κ B가 promoter 부위에 작용하여 중요한 조절인자로 작용한다.³²⁾ 본 실험에서는 luciferase assay를 이용하여 KS와 kaempferol이 NF- κ B 전사 활성을 감소시킴을 확인 함으로써 KS와 kaempferol이 NF- κ B 신호전달의 조절에 의해 염증 전구물질의 형성을 억제함을 확인하였다.

Kaempferol은 이전의 연구에서 항염증 효과가 보고되어 있다. 이의 배당체인 KS는 LPS에 의한 PGE₂, NO 그리고 여러 cytokines들의 형성억제에 있어 kaempferol에 비해 효과가 낮게 나타났다. 그러나 kaempferol은 RAW 264.7 세포에서 KS (IC₅₀: 308.94 μ M)에 비해 높은 세포독성(IC₅₀: 196.18 μ M)을 나타내었다. 이러한 차이는 이전에 발표한 genistein과 그 배당체인 배당체인 genistein-4'-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside의 경우와 같이 KS가 kaempferol에 비해 높은 극성을 가짐으로써 세포막투과 정도가 kaempferol보다 낮기 때문인 것으로 추정된다.

본 실험 결과를 요약하면 KS는 kaempferol에 비해 낮은 세포독성을 나타내며 RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 전사 활성을 억제 함으로써 LPS에 의해 유도되는 iNOS 그리고 COX-2 단백질과 iNOS, COX-2, TNF- α 그리고 IL-6 유전자의 발현을 효과적으로 저해한다. 그러므로 이러한 결과들은 KS를 이용하여 염증성 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 의약품의 개발가능성을 제시 하고 있다

사 사

이 논문은 2007년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. R13-2002-020-03002-0 (2007)).

인용문헌

1. Song, E. K., Hur, H., and Han, M. K. (2003) Epigallocatechin gallate prevents autoimmune diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. *Arch. Pharm. Res.* **26**: 559-563.
2. Kashiwada, Y., Nonada, G., Nishioka, I., Chang, J. J., and Lee, K. H. (1992) Antitumor agents, 129. tannins and related compounds as selective cytotoxic agents. *J. Nat. Prod.* **55**: 1033-1043.
3. Kashiwada, Y., Nonada, G., Nishioka, I., Ballas, L. M., Jiang, J. B., Janzeng, W. P., and Lee, K. H. (1992) Tannins as selective inhibitors of protein kinase C. *Bioorg. Med. Chem. Letters.* **2**: 239-244.
4. Yu, H. N., Yin, J. J., and Shen, S. R. (2004) Growth inhibition of prostate cancer cells by epigallocatechin gallate in the presence of Cu⁺⁺. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 462-466.
5. Theoharides, T. C., Alexandrakis, M., Kempuraj, D., and Lytinas, M. (2001) Anti-inflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new design. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **14**: 119-127.
6. Shen, S. C., Ko, C. H., Hsu, K. C., and Chen, Y. C. (2004) 3-OH flavone inhibition of epidermal growth factor-induced proliferation through blocking prostaglandin E2 production. *Int. J. Cancer.* **108**: 502-510.
7. Waffo-Teguo, P., Hawthorne, M. E., Cuendet, M., Merillon, J. M., Kinghorn, A. D., Pezzuto, J. M., and Mehta, R. G. (2001) Potential cancer chemopreventive activities of wine stilbenoids and flavans extracted from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *Nutr. Cancer.* **40**: 173-179.
8. Du, J., He, Z. D., Jiang, R. W., Ye, W. C., Xu, H. X., and But, P. P. (2003) Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. *Phytochemistry.* **62**: 1235-1238.
9. Garcia-Mediabilla, V., Crespo, I., Collado, P. S., Esteller, A., Sanchez-Campos, S., Tunon, M. J., and Gonzalez-Gallego, J. (2007) The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur. J. Pharmacol.* **28**: 221-229.
10. Kowalski, J., Samojedny, A., Paul, M., Pietsz, G., and Wilczok, T. (2005) Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol. Rep.* **57**: 390-394.
11. Willoughby, D. A. (1975) Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann. Rheum. Dis.* **34**: 471-478.
12. Axtelle, T. and Pribble, J. (2001) IC14, a CD14 specific monoclonal antibody is a potential treatment for patients with severe sepsis. *J. Endotoxin. Res.* **7**: 310-314.
13. Lee, E. S., Ju, H. K., Moon, T. C., Lee, E., Jahng, Y., Lee S. H., Son, J. K., Baek, S. H. and Chang, H. W. (2004) Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophage. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 617-620.
14. Mukai, N., Ishikawa, Y., Ikeda, N., Fujioka, N., Watanabe, S. and Kuno, K. (1996) Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock; biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kappaB and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin in vivo. *J. Leukoc. Biol.* **59**: 145-151.
15. Lazarov, S., Balutsov, M. and Ivanov, E. (2000) The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic(endotoxin) shock. *Vutr. Boles.* **32**: 33-40.
16. Scott, M. G. and Hancock, R. E. (2000) Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* **20**: 407-431.
17. Liu, S.F. and Malik, A.B. (2005) NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **290**: L622-L645.
18. Michael, E. E. (1986) Manual of cultivated broad-leaved trees & shrubs. *Volume, Timber Press, Portland, Oregon.* pp. 325-327.
19. Harborne, J. B. and Wiliam, C. A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* **55**: 481-504.
20. Wenzel, U., Kuntz, S., Brendel, M. D. and Daniel, H. (2000) Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* **60**: 3823-3831.
21. Nature, and Medicine study association of Korea, Life-Chinese Medicine 'Folk Medicine. *DongBu-MunHwaSa.* pp. 21 (1985).
22. Kim, H. J., Kim, M. K., Shim, J. G., Yeom, S. H., Kwon, S. H. and Lee, M. W. (2004) Anti-oxidative phenolic compounds from *Sophora fructus*. *Nat. Prod. Sci.* **10**: 330-334.
23. Surh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K. K. and Lee, S. S. (2001) Molecular mechanism underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat. Res.* **480-481**: 243-268.
24. Park, S. J., Kim, J. Y., Jang, Y. P., Cho, Y. W., Ahn, E. M., Beek, N. I., Lee, K. T. (2007) Inhibition of LPS induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by genistein-4'-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-glucopyranoside through the NF- κ B inactivation in RAW 264.7 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**: 339-348.
25. Iontcheva, I., Amar, S., Zawawi, K. H., Kantarci, A. and Van Dyke, T. E. (2004). Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. *Infect Immun.* **72**: 2312-2320.
26. 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. USA.* **88**: 7773-7777.

27. 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.
28. 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.
29. Masferrer, J., Zweifel B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G, Isacson, P. C. and Seibert, K. (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 3228-3232.
30. 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.
31. Feldmann, M., Brennan, F. M. and Maini, R. N. (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 397-440.
32. Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 621-663.

(2008년 4월 26일 접수)