

## Salidroside의 RAW 264.7 세포에서 NF- $\kappa$ B 불활성화를 통한 LPS에 의해 유도되는 iNOS, COX-2 및 cytokine들의 발현 저해효과

원소정<sup>1</sup> · 박희준<sup>2</sup> · 이경태<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경희대학교 약학대학, <sup>2</sup>상지대학교 자원식물학과

## Inhibition of LPS induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by salidroside through the NF- $\kappa$ B inactivation in RAW 264.7 cells

So-Jung Won<sup>1</sup>, Hee-Juhn Park<sup>2</sup>, Kyung-Tae Lee<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup>Department of Botanical Resources, Sangji University, Woosan-Dong, Wonju 220-702, South Korea

**Abstract** – In this study, we investigated the anti-inflammatory effects of salidroside (SAL) isolated from the MeOH extract of *Acer tegmentosum* Maxim heartwood in RAW 264.7 macrophage cells. SAL pretreatment significantly inhibited nitric oxide (NO) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) productions in the lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells. Western blot and RT-PCR analyses revealed that SAL inhibited the LPS-induced expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) at the protein and mRNA levels in a concentration-dependent manner. In addition, SAL reduced the release and the mRNA expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6). Furthermore, nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) luciferase reporter assay was performed to know the involvement of SAL in the production of pro-inflammatory cytokines, we confirmed that LPS-induced transcription activity of NF- $\kappa$ B was inhibited by SAL. Taken together, our data indicate that anti-inflammatory property of salidroside might be the result from the inhibition of iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  and IL-6 expressions via the down-regulation of NF- $\kappa$ B activity.

**Key words** – salidroside, *Acer tegmentosum* Maxim, LPS, NF- $\kappa$ B, Anti-inflammation

선천적 면역은 박테리아나 바이러스 감염, 스트레스에 대해 방어할 수 있도록 다양한 작용기전을 통해 빠르게 활성화되는 고전적 숙주 방어 형태이다. 선천적 면역 반응이 결여되면 활성산소 (reactive oxygen species), 보체 (complement) 그리고 항미생물펩티드 (antimicrobial peptides)의 생성이 저해되어 감염에 민감해지고 방어능력이 떨어진다. 그러나 과도한 선천적 면역반응은 오히려 조직 손상을 촉진하여 패혈증이나 만성 염증과 같은 질환을 유발한다.<sup>1)</sup>

염증과정 중에 많은 양의 염증유도 사이토카인 (pro-inflammatory cytokines), nitric oxide (NO) 그리고 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)가 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 생성된다.<sup>2)</sup> 포유 세포에서 NO는 neuronal NOS (nNOS), endothelial

NOS (eNOS) 그리고 iNOS 세가지 형태의 NOS에 의해 합성된다. nNOS와 eNOS는 세포 내에 항상 존재하지만, iNOS는 interferon- $\gamma$ , lipopolysaccharide (LPS) 그리고 다양한 염증유도 사이토카인에 노출되는 경우에만 발현된다.<sup>3-4)</sup> 이들 NOS중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다. 일반적인 NO 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO 형성은 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상 등을 일으킨다.<sup>5-7)</sup> PGE<sub>2</sub>는 cyclooxygenase (COX)에 의해 arachidonic acid로부터 생성되는데,<sup>8)</sup> 이때 작용하는 효소인 COX는 1990년대 초에 두가지 형태로 존재함이 밝혀졌다. COX-1은 거의 모든 조직에서 항상 발현되며 prostaglandins (PGs)을 형성하여 위세포 보호와 신혈류 조절 등의 생리적인 기능을 수행한다.<sup>8-9)</sup> 반면에 COX-2는 대식세포와 활막세포 (synoviocyte)같은 염증세포에서 감염, 상처 또는 다른 스트레스에 의해 유도되

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

며 많은 양의 PGs를 생성하여 침해수용체 (nociceptor)를 활성화시키고 염증상태로 유도한다.<sup>10-11)</sup> 또한 PGs는 새로운 혈관 생성을 유도하고 세포사멸을 억제함으로써 종양생성에 기여한다.<sup>12)</sup>

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )는 활성화된 대식세포, 섬유모세포 (fibroblast) 및 다른 여러 세포에서 생성되는데 이는 종양세포에 영향을 미치는 숙주 방어인자 및 염증 매개물질로 알려져 있다. Interleukin-6 (IL-6)의 생성은 TNF- $\alpha$  나 IL-1 $\beta$  같은 요인 외에도 LPS에 의해 유도된다.<sup>13)</sup> 또한, IL-6는 염증유도 사이토카인으로서 내인성 발열인자 (pyrogen)로 작용하며 면역 체계와 조혈 등에 다양한 영향을 미친다.<sup>14)</sup>

Nuclear transcription factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)는 세포 분화, 염증반응, 세포 부착 등에 관련된 여러 유전자들의 발현에 가장 중요한 역할을 하는 전사인자이다. 활성화된 NF- $\kappa$ B는 iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  그리고 IL-6 등 여러 염증 매개물질들의 전사를 촉진한다.<sup>15)</sup>

산겨릅나무 (*Acer tegmentosum* Maxim)는 단풍나무과에 속하는 식물로서 고산지대의 계곡에서 자라는 낙엽소교목이다.<sup>16)</sup> 중국에서는 줄기를 청해적이라 하여 소종과 외상출혈 치료에 사용하고, 한국에서는 최근에 벌나무 또는 산청목이라 하여 주로 간암, 간염, 간경화 등의 치료제로 민간에서 널리 유통되고 있다.<sup>17)</sup> 이 나무에 주된 성분을 이루고 있는 salidroside (SAL)는 amyloid- $\beta$ 에 의한 산화적 스트레스에 대한 신경세포보호작용,<sup>18)</sup> 지질 과산화 억제,<sup>19)</sup> bone marrow cell cycle에 미치는 영향,<sup>20)</sup> carbohydrate 대사에 미치는 영향<sup>21)</sup> 등 다양한 약리학적 활성을 나타낸다는 것이 보고되어있다. 그러나 SAL에 대한 항염효과와 그 기전에 대한 보고는 거의 없는 실정이다.

본 연구진은 여러 천연물의 추출물 및 분리된 단일화합물들의 항염증 효과를 검색하고 그 기전을 연구함으로써 새로운 항염증 약물의 개발을 시도하고 있다. 본 논문에서는 이러한 연구의 일환으로 산겨릅나무로부터 분리한 salidroside가 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포에서 항염효과를 나타내는 기전을 연구하였으며 염증에 관련된 다양한 단백질, mRNA 그리고 사이토카인 등의 발현을 측정하였다.

## 재료 및 방법

**재료** - Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM), 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 fluoride (PMSF), dithiothreitol (DTT), L-N<sup>6</sup>-(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- $\alpha$ , IL-6 그리고  $\beta$ -actin oligonucleotide primers는 Bioneer (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 그리고 TNF- $\alpha$ , IL-6, PGE<sub>2</sub>측정을 위한 kit는 R&D systems (MN, U.S.A.)에서 구입하였다.

### 시료의 추출 및 분리

산겨릅나무 목부 2.0 kg을 MeOH로 환류 하에 5시간씩 3회 추출하였다. 추출물을 여과하고 얻어진 여액을 모두 합쳐 감압농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. MeOH 추출물을 증류수 1L에 현탁시키고 CHCl<sub>3</sub>로 3회 분획한 다음 농축하여 CHCl<sub>3</sub> 분획물을 얻었다. 남은 수층에 대하여 BuOH로 3회 분획한 다음 농축하여 BuOH 분획물을 얻었다. 남은 수층을 농축하여 물 분획물을 얻었다.

BuOH 분획물 10 g을 silica gel column chromatography에서 CHCl<sub>3</sub>-MeOH 전개용매를 용출용매로 사용하여 9 : 1로 1L 용출하다가 6 : 4로 변경하여 2.5 L 전개하여 소분획 I부터 VIII까지 얻었다. 이 중 소분획 III을 acetone에서 재결정하여 무색분말의 *p*-hydroxyphenylethyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (2.8 g)를 얻었다. 이 화합물의 소분획 VI과 VII을 MeOH에서 재결정하여 무색결정을 얻었으며 이 화합물은 TLC, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR의 분석에 의하여 sucrose로 동정되었다.

Salidroside (*p*-hydroxyphenylethyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, Fig. 1) : Colorless powder, mp 220<sup>o</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 4.17 (1H, d, J=7.5 Hz, H-1'), 6.67 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2,6), 7.04 (2H, d, J=3,5 Hz); <sup>13</sup>C-NMR(125.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 35.3 (C-7), 61.5(C-6'), 70.3 (C-8), 70.5(C-4'), 73.8 (C-2'), 77.1 (C-3'), 77.3 (C-5'), 103.3 (C-1'), 115.4 (C-2,5), 129.2 (C-1), 130.2 (C-3,5), 155.9 (C-4); FAB-MS m/z 323.2 [M + Na]<sup>+</sup>.

**세포의 배양** - RAW 264.7 세포는 10% FBS 및 penicillin (100  $\mu$ g/mL), streptomycin (100 U/mL)이 포함된 DMEM 배지에서 37<sup>o</sup>C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양했다. RAW 264.7 세포에 시료용액의 여러 농도 (25, 50, 100  $\mu$ M) 또는 양성 대조군을 1시간 전처리한 후 LPS (1  $\mu$ g/mL)를 처리하고 24시간 배양하였다.

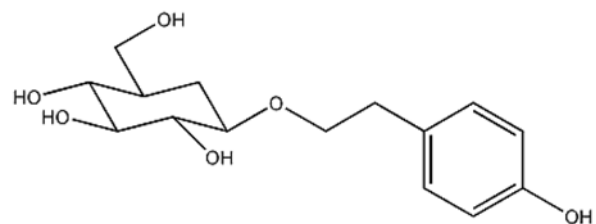
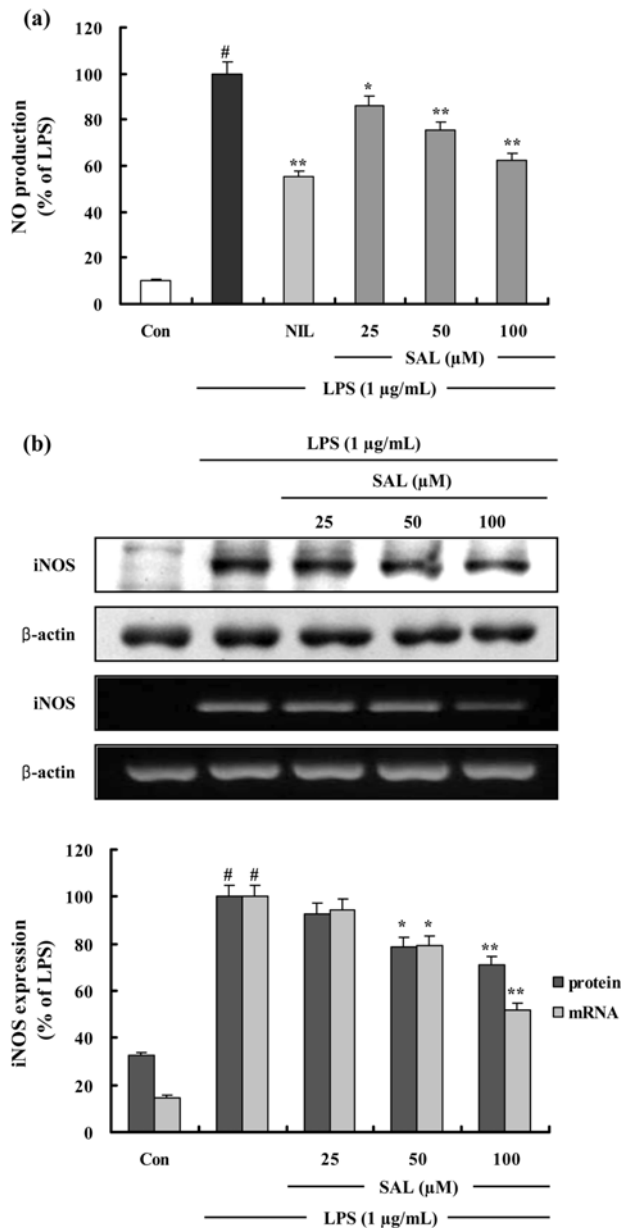


Fig. 1. Chemical structure of salidroside.



**Fig. 2.** The effects of SAL on LPS-induced NO production and iNOS protein and mRNA expression in RAW 264.7 cells. (a) Cells were pretreated with different concentrations (25, 50, 100  $\mu$ M) of SAL for 1 h, LPS (1  $\mu$ g/mL) was then added, and the cells were incubated for 24 h. Control (Con) values were obtained in the absence of LPS or tested samples. L-N<sup>6</sup>-(1-iminoethyl) lysine (L-NIL) was used as an assay positive control at a concentration of 10  $\mu$ M. (b) Cells were treated as described above. Total cellular proteins (40  $\mu$ g) were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and detected with specific antibodies, as described in methods. A representative immunoblot of three separate experiments is shown. Cells were pretreated with different concentrations (25, 50, 100  $\mu$ M) of SAL for 1 h, LPS (1  $\mu$ g/mL) was then added, and the cells were incubated for 4 h. Control (Con) values were obtained in the absence of LPS or tested samples. Total

RNA was prepared for the RT-PCR analysis of iNOS gene expression. iNOS-specific sequences (807 bp) was detected by agarose gel electrophoresis, as described in methods. PCR of  $\beta$ -actin was performed to verify that the initial cDNA contents of the samples were similar. The experiment was repeated three times and similar results were obtained. The Western blot results and the RT-PCR results are shown by relative ratio graphs. The values are the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. <sup>#</sup> $p$ <0.05 vs. the control group; <sup>\*</sup> $p$ <0.05, <sup>\*\*</sup> $p$ <0.01 vs. the LPS-treated group; the significances of the difference between the treated groups was evaluated using the Student's *t*-test.

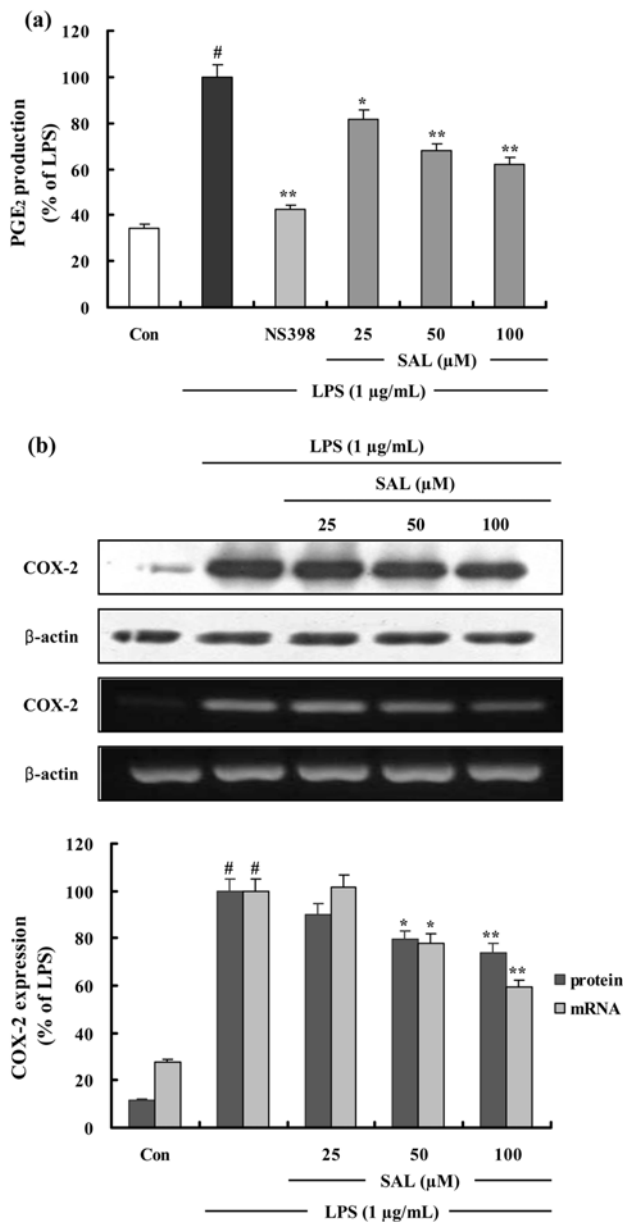
**세포독성 시험** - 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well로 세포를 동일하게 분주하고 24시간 동안 배양한 후 여러 농도의 시료용액을 두 군으로 나누어 배지에 희석하여 첨가하였다. 1시간 후 한 군에만 LPS (1  $\mu$ g/mL)를 처리하였다. 24시간이 지난 후 MTT시약을 넣고 4시간 동안 방치한 후 상등액을 제거하고 형성된 formazan을 DMSO 100  $\mu$ L를 첨가하여 녹였다. 30분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Nitrite 양의 측정** - RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로써 측정하였다. 즉 세포배양 상등액 100  $\mu$ L와 Griess시약 [1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) phosphoric acid 와 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine-HCl] 100  $\mu$ L를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Western blot 시험** - SAL을 처리한 세포 및 대조군을 phosphate buffered saline (PBS)로 씻어낸 후 lysis buffer인 PRO-PREP (Intron Biotechnology)으로 단백질을 추출한 후 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을 Bradford 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하여 40  $\mu$ g의 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 4시간 동안 상온에서 방치한 후 TTBS로 15분 간격으로 2회 세척하였다. 1:1000의 비율로 희석한 secondary antibody를 1시간 동안 상온에서 방치 시켰다. 다시 TTBS로 15분 간격으로 3회 세척한 후 chemiluminescence로 현상하였다.

**PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  및 IL-6 양의 측정** - 세포배양액을 취해 각각 R&D systems (MN, U.S.A.) kit의 지시에 따라 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  및 IL-6를 정량하였다.

**RT-PCR 시험** - Easy Blue<sup>®</sup> kits (Intron Biotechnology)를 이용하여 Kit의 protocol에 따라 전체 cellular RNA를 추출하였다. 각각의 시료에서 MuLV reverse transcriptase, 1 mM dNTP 그리고 oligo (dT<sub>12-18</sub>) 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L를 이용하여 1  $\mu$ g의 RNA를 역전사 하여 cDNA를 얻었다. cDNA에 Taq



**Fig. 3.** The effects of SAL on LPS-Induced PGE<sub>2</sub> production and COX-2 protein and mRNA expression in RAW 264.7 cells. (a) Cells were treated as described in the Figure Legend of 2a. Control (Con) values were obtained in the absence of LPS or tested samples. 10 μM of NS-398 was as a positive control in the assay. (b) Cells were treated as described in the Figure Legend of 2a. Total cellular proteins (40 μg) were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and detected with specific antibodies, as described in methods. A representative immunoblot of three separate experiments is shown. Cells were treated as described in the Figure Legend of 2b. Control (Con) values were obtained in the absence of LPS or tested samples. Total RNA was prepared for the RT-PCR analysis of COX-2 gene expression. COX-2-specific sequences (721 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. The experiment was repeated three times and similar results were obtained. The Western blot results and the RT-PCR results are 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.

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°C 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 primers가 사용되었다 : 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 gel에서 전기영동하고 ethidium bromide 염색과 UV 조사를 통해 확인하였다.

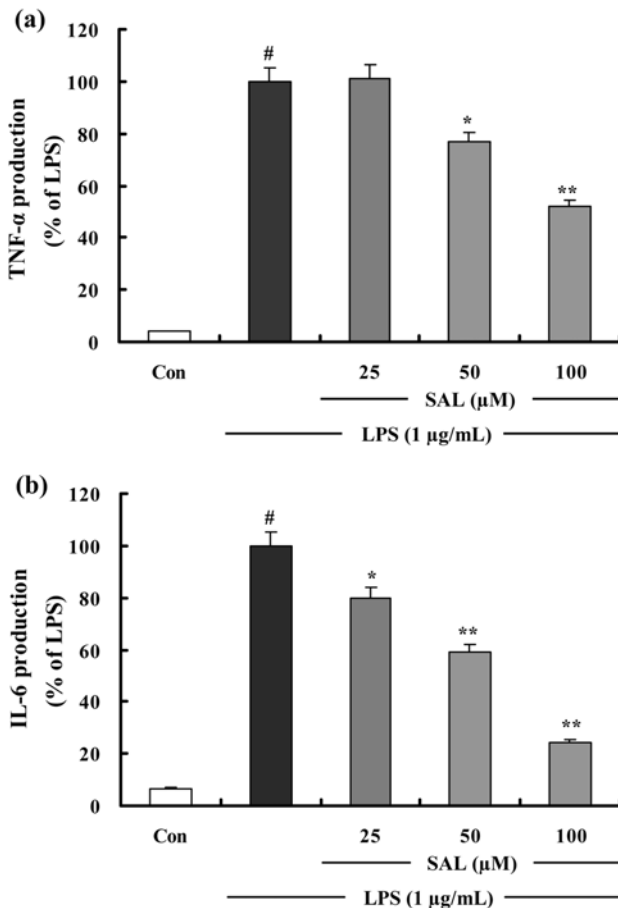
**NF-κB Luciferase activity 측정** - RAW 264.7 세포를 dish에 각각 2×10<sup>5</sup> cells/dish 농도로 분주한 후, Invitrogen (CA, U.S.A.)에서 구입한 Lipofectamine 2000 Reagent를 이용하여 NF-κB luciferase reporter plasmid DNA를 형질감염 (transfection)시켰다. 형질감염 48시간이 경과한 후 3~4×10<sup>5</sup> cell/well로 12 well plate에 세포를 분주하고 SAL를 1시간 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  $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 로 나타냈으며 분석은 Student's *t*-test로 그 유의성을 나타내었다.

## 결 과

**SAL의 Nitrite 생성 저해** - iNOS에 의한 NO 생성은 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 존재하는 nitrite ( $\text{NO}_2^-$ )의 양을 Griess 시약을 사용하여 측정함으로써 조사하였으며, 양성 대조군으로는 L-arginine과의 기질경쟁에 의하여 iNOS를 저해하는 것으로 알려진 L-NIL (10  $\mu\text{M}$ )을 사용하였다. SAL은 농도 의존적으로 NO 생성



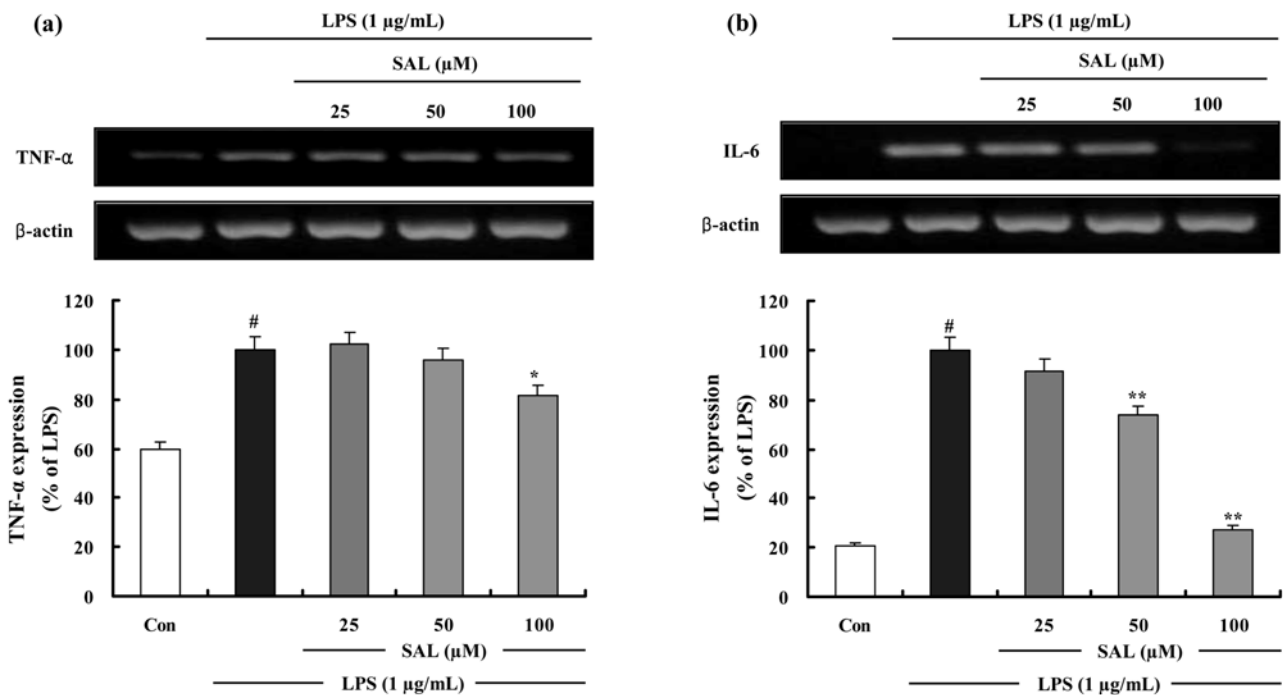
**Fig. 4.** The effects of SAL on LPS-induced TNF- $\alpha$  and IL-6 production in RAW 264.7 cells. (a) Effect of the SAL on TNF- $\alpha$  production by LPS-induced RAW 264.7 macrophages for 24 h. (b) Effect of the SAL on IL-6 production by LPS-induced RAW 264.7 macrophages for 24 h. TNF- $\alpha$  and IL-6 production results are shown by relative ratio graphs. The values are the  $\text{mean} \pm \text{S.D.}$  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.

을 저해하였으며 100  $\mu\text{M}$ 에서 NO 생성을 38.0% 저해하였다 (Fig. 2a). 이러한 NO 생성 저해가 세포독성에 기인하는 것을 확인하기 위하여 MTT법을 이용하여 세포독성을 관찰하였으나 최대 200  $\mu\text{M}$ 에서 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다 (data not shown).

**SAL의 iNOS 단백질 생성과 mRNA 발현 저해** - SAL에 의한 NO 생성 저해기전을 확인하기 위해 Western blot과 RT-PCR로 iNOS의 단백질 생성과 mRNA 발현을 조사하였다. LPS에 의해 증가된 iNOS 단백질 생성과 mRNA 발현이 SAL을 처리하였을 때 농도 의존적으로 감소되었으며 50  $\mu\text{M}$ 과 100  $\mu\text{M}$ 에서 유의성있게 감소되었다 (Fig. 2b).  $\beta$ -actin의 band density 비율에 따라 iNOS 단백질 생성과 mRNA 발현 정도를 보정하였을 때 SAL은 100  $\mu\text{M}$  농도에서 iNOS 단백질 생성을 29.0%, mRNA 발현을 47.9% 저해함을 확인하였다. 이를 통해 SAL은 iNOS의 생성과 발현을 저해함으로써 NO의 생성을 저해함을 알 수 있었다.

**SAL의 PGE<sub>2</sub> 형성 및 COX-2 단백질 생성과 mRNA 발현 저해 효과** - RAW 264.7 세포에서 염증인자인 PGE<sub>2</sub>의 SAL에 의한 억제효과를 ELISA kit를 이용하여 정량하였다. LPS에 의한 PGE<sub>2</sub> 생성이 SAL을 처리하였을 때 농도 의존적으로 유의성있게 감소되었으며 (Fig. 3a), 100  $\mu\text{M}$  농도의 SAL에 의해 PGE<sub>2</sub> 형성이 38.1% 저해되었다. 선택적인 COX-2 저해제로 알려진 NS398 (5  $\mu\text{M}$ )을 양성대조군으로 사용하여 PGE<sub>2</sub>의 형성이 뚜렷하게 저해되는 것을 확인하였다. SAL에 의한 PGE<sub>2</sub> 형성 저해기전을 확인하기 위해 Western blot과 RT-PCR로 COX-2 단백질 생성과 mRNA 발현을 조사하였다. LPS에 의해 증가된 COX-2 단백질 생성과 mRNA 발현이 SAL을 처리하였을 때 농도 의존적으로 유의성있게 감소되었다 (Fig. 3b).  $\beta$ -actin의 band density 비율에 따라 iNOS 단백질 생성과 mRNA 발현 정도를 보정하였을 때 SAL은 100  $\mu\text{M}$  농도에서 COX-2 단백질 생성을 25.9%, mRNA 발현을 40.6% 저해함을 확인하였다. 이를 통해 SAL은 iNOS의 mRNA 발현을 억제하여 단백질 생성을 저해함으로써 NO의 생성을 저해함을 알 수 있었다.

**SAL의 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 형성 및 mRNA 발현 저해 효과** - SAL이 RAW 264.7 세포에서 염증유도 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6을 억제하는지 알아보기 위해 ELISA kit와 RT-PCR을 이용하여 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 형성 및 mRNA 발현을 조사하였다. LPS 처리에 의해 생성된 TNF- $\alpha$ 는 고농도 (100  $\mu\text{M}$ )의 SAL에 의해 48.1% 저해되었다 (Fig. 4a). LPS에 의한 IL-6 형성은 SAL에 의해 농도 의존적으로 감소되었으며, 100  $\mu\text{M}$  농도의 SAL에서 75.6% 저해됨을 확인하였다 (Fig. 4b). 또한 SAL은 LPS에 의한 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 mRNA의 발현을 유의성있게 저해하며 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 형성 억제효과와 상관성이 있음을 확인하였다 (Fig. 5a, Fig. 5b).



**Fig. 5.** The effects of SAL on LPS-induced TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA expressions in RAW 264.7 cells. Cells were treated as described in the Figure Legend of 2b. Control (Con) values were obtained in the absence of LPS or tested samples. (a) Total RNA was prepared for the RT-PCR analysis of TNF- $\alpha$  gene expression. TNF- $\alpha$ -specific sequences (351 bp) was detected by agarose gel electrophoresis, as described in methods. (b) Total RNA was prepared for the RT-PCR analysis of IL-6 gene expression. IL-6-specific sequences (142 bp) was detected by agarose gel electrophoresis, as described in methods. PCR of  $\beta$ -actin was performed to verify that the initial cDNA contents of the samples were similar. TNF- $\alpha$  and IL-6 RT-PCR results are shown by relative ratio graphs. The values are the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments. <sup>#</sup> $p$ <0.05 vs. the control group; <sup>\*</sup> $p$ <0.05, <sup>\*\*</sup> $p$ <0.01 vs. the LPS-treated group; the significances of the difference between the treated groups was evaluated using the Student's  $t$ -test.

**SAL의 NF- $\kappa$ B 활성 저해 효과** - LPS에 의해 유도되는 iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , 그리고 IL-6 등의 유전자 프로모터에 존재하는 NF- $\kappa$ B 요소 (element)가 이들의 유전자 발현에 중요한 역할을 한다는 보고를 통해,<sup>22)</sup> SAL이 LPS에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제하는지 알아보기 위해 luciferase assay를 수행하였다. RAW 264.7 세포에 일시적으로 pNF- $\kappa$ B-luc plasmid를 형질감염 시키고 SAL을 처리한 군과 처리하지 않은 대조군에 LPS (1  $\mu$ g/mL)로 자극을 가한다. SAL이 LPS에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B 의존적인 luciferase 효소의 발현을 농도 의존적으로 유의성있게 감소시키는 것을 확인하였다 (Fig.6).

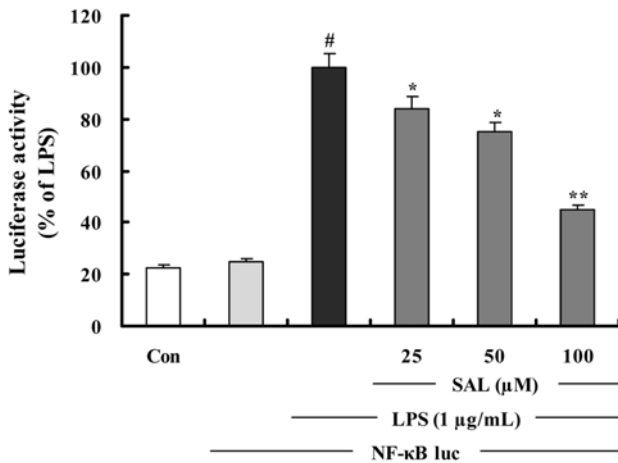
### 고찰

본 연구진은 여러 천연물의 성분 중에서 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 유도되는 NO 생성을 저해하는 물질을 검색하는 과정에서, 산겨릅나무 (*Acer tegmentosum* Maxim)의 목부에서 분리한 salidroside (SAL)이 RAW 264.7 세포에서 항염증 효과를 나타냄을 발견하였

다. SAL은 이전의 연구에서 COX와 5-lipoxygenase를 억제하여 PGE<sub>2</sub>와 thromboxane B<sub>2</sub>를 감소시키는 antieicosanoid 작용이 보고되어 있으나<sup>23)</sup> 염증인자 억제효과와 그 기전은 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서 SAL이 어떤 기전을 통해 항염증 효과를 나타내는지 연구하였다.

대식세포는 LPS와 같은 염증유발물질에 의해 활성화되어 toll-like receptor-4 (TLR-4)의 발현을 자극한다.<sup>24)</sup> TLR-4는 LPS/CD-14 복합체에 대한 막투과성 수용체로서 NF- $\kappa$ B를 통해 염증유도의 단계적 과정(cascade)을 활성화한다.<sup>25-27)</sup> 이러한 기전을 통해 NO, PGs, 염증유도 사이토카인 등의 다양한 염증매개물질이 유도된다.<sup>28)</sup>

본 실험에서는 먼저 SAL이 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 농도 의존적으로 뚜렷하게 감소시키는 것을 확인하였으며 위의 사실에 기초하여 NO 생성저해의 기전을 알아보기 위하여 Western blot과 RT-PCR로 iNOS의 발현을 분석한 결과 SAL에 의한 iNOS의 발현억제가 NO 생성억제와 유사한 경향을 나타냄으로써 NO 생성억제는 iNOS의 발현저해를 경유한 것임을 알 수 있었다. 또한 다수 항염증 약물들의 작용기전이 되는 COX-2의 생성



**Fig. 6.** The inhibition of NF- $\kappa$ B-DNA binding by SAL. Cells were transiently cotransfected with pNF- $\kappa$ B-luc reporter and then left untreated (Con) or were pretreated with different concentrations (25, 50, 100  $\mu$ M) of SAL. LPS (1  $\mu$ g/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 $\pm$ S.D. of three independent experiments. <sup>#</sup> $p$ <0.05 vs. the control group; <sup>\*</sup> $p$ <0.05, <sup>\*\*</sup> $p$ <0.01 vs. the LPS-treated group; the significances of the difference between the treated groups was evaluated using the Student's  $t$ -test.

억제와 그에 따른 PGE<sub>2</sub> 형성억제가 SAL에 의해서 나타나는지 조사하였다. SAL은 LPS에 의해 형성되는 PGE<sub>2</sub>를 유의성있게 감소시키며 이는 COX-2 단백질 생성과 mRNA의 발현저해에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

염증매개물질인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 *in vivo* 및 *in vitro* 모두에서 염증반응을 조절하는 물질로 알려져 있다. 이러한 사이토카인들은 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 LPS와 같은 염증자극물질에 의해 형성이 유도된다.<sup>29)</sup> LPS에 의해 유도된 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 형성을 SAL이 농도 의존적으로 뚜렷이 저해하였으며 RT-PCR로 분석한 결과 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 mRNA 발현과 매우 유사한 경향을 나타냄으로써 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 형성억제는 그것의 전사단계를 저해함에 의한 것임을 알 수 있었다.

이러한 COX-2, iNOS 그리고 염증유도 사이토카인들의 발현에 있어서 NF- $\kappa$ B가 promoter에 작용하여 중요한 조절 인자로 작용한다.<sup>30)</sup> 본 실험에서는 luciferase assay를 이용하여 NF- $\kappa$ B 전사활성을 측정함으로써 SAL이 NF- $\kappa$ B 신호 전달의 조절에 의해 염증전구물질의 형성을 억제함을 확인하였다.

이상의 결과들을 요약하면 SAL은 RAW 264.7 세포에서 NF- $\kappa$ B의 전사작용을 억제함으로써 LPS에 의해 유도되는 iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  그리고 IL-6의 생성과 유전자 발현을 효과적으로 저해한다. 이러한 결과들은 salidroside을 이

용하여 염증성 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 약물로서 개발될 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

## 사 사

이 논문은 경희대학교 대학원의 2007학년도 2차 우수연구논문 장학금으로 지원을 받아 수행된 연구임.

## 인용문헌

- Brown, K. L., Cosseau, C., Gardy, J. L. and Hancock, R. E. (2007) Complexities of targeting innate immunity to treat infection. *Trends. Immunol.* **28**: 260-266.
- Posadas, I., Terencio, M. C., Guillén, I., Ferrández, M. L., Coloma, J., Payá, M., Alcaraz, M. J. (2000) Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **361**: 98-106.
- Moncada, S., Palmer, R. M., Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-142.
- Yun, H. Y., Dawson, V. L. and Dawson, T. M. (1996) Neurobiology of nitric oxide. *Crit. Rev. Neurobiol.* **10**: 291-316.
- 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.
- 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.
- Vane, J. R., Botting, R. M. (1998) Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.* **104**: 2S-8S.
- Vane, J. R., Bakhle, Y. S., Botting, R. M. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**: 97-120.
- Needleman, P. and Isakson, P. C. (1997) The discovery and function of COX-2. *J. Rheumatol. Suppl.* **49**: 6-8.
- Seybold, V. S., Jia, Y. P. and Abrahams, L. G. (2003) Cyclooxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation. *Pain* **105**: 47-55.
- Bishop-Bailey, D., Calatayud, S., Warner, T. D., Hla, T. and Mitchell J. A. (2002) Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **21**: 93-101.
- Willeaume, V., Krays, 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.
14. Van Snick, J. (1990) IL-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.* **8**: 253-278.
  15. Liu, S.F. and Malik, A.B. (2005) NF- $\kappa$ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **290**: L622-L645.
  16. 이창복 (1993) 대한식물도감, 522. 향문사, 서울.
  17. 소매근 (1994) 중국본초도감 (3권), 193. 여강출판사, 서울.
  18. Jang, S. I., Pae, H. O., Choi, B. M., Oh, G. S., Jeong, S., Lee, H. J., Kim, H. Y., Kang, K. H., Yum, Y. G., Kim, Y. C. and Chung, H. T. (2003) Salidroside from *Rhodiola sachalinensis* protects neuronal PC12 cells against cytotoxicity induced by amyloid- $\beta$ . *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **25**: 295-304.
  19. Zhang, Y. and Liu, Y. (2005) Study on effects of salidroside on lipid peroxidation on oxidative stress in rat hepatic stellate cells. *Zhong Yao Cai* **28**: 794-796.
  20. Zhang, X. S., Zhu, B. D., Hung, X. Q. and Chen, Y. F. (2005) Effect of salidroside on bone marrow cell cycle and expression of apoptosis-related proteins in bone marrow cells of bone marrow depressed anemia mice. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **36**: 820-823.
  21. Wang, S. H., Wang, W. J., Wang, X. F., Chen, W. H. (2004) Effects of salidroside on carbohydrate metabolism and differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Zhong Xi Yi He Xue Bao* **2**: 193-195.
  22. Surh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K. K. and Lee, S. S. (2001) Molecular mechanisms 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.
  23. Lanza, A. M. D., Martinez M. J. A., Matellano, L. F., Carretero, C. R., Castillo, L. V., Sen, A. M. S. and Benito, P. B. (2001) Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Phillyrea latifolia* and their in vitro anti-inflammatory activity. *Planta Med.* **67**: 219-223.
  24. 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.
  25. Means, T. K., Golenbock, D. T and Fenton, M. J. The biology of toll-like receptors. (2000) *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**: 219-232.
  26. Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J. and Gusovsky, F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**: 10689-10692.
  27. Faure, E., Equils, O., Sieling, P. A., Thomas, L., Zhang, F.X., Kirschning, C. J., Polentarutti, N., Muzio, M. and Arditì, M. (2000) Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappa B through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **275**: 11058-11063.
  28. Gomez, P. F., Pillinger, M. H., Attur, M., Marjanovic, N., Dave, M., Park, J., Bingham, C. O., Al-Mussawir, H. and Abramson, S. B. (2005) Resolution of inflammation: prostaglandin E<sub>2</sub> dissociates nuclear trafficking of individual NF-kappa B subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *J. Immunol.* **175**: 6924-6930.
  29. Feldmann, M., Brennan, F. M. and Maini, R. N. (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 397-440.
  30. Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 621-663.

(2008년 5월 22일 접수)