

혈관내피세포에서 TNF- α 자극에 의해 유도되는 혈관염증에 대한 WK-38의 억제 효과

황선미 · 이윤정 · 김은주 · 윤정주 · 이 혁 · 강대길 · 이호섭*

원광대학교 한의학전문대학원

Inhibitory Effect of WK-38 on TNF- α Induced Vascular Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Sun Mi Hwang, Yun Jung Lee, Eun Ju Kim, Jung Joo Yoon, Hyeok Lee, Dae Gill Kang, Ho Sub Lee*

Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

Vascular inflammation is an important event in the development of vascular diseases such as tumor progression and atherosclerosis. This study was to investigate the inhibitory effects of WK-38, a new herbal prescription for the treatment of atherosclerosis, on vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). WK-38 is composed of *Rhei Rhizoma*, *Magonoliae Cortex*, *Moutan Cortex Radicis*. Pretreatment with WK-38 was significantly blocked TNF- α -induced expression level of cell adhesion molecules such as vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and endothelial cell selectin (E-selectin) in a dose-dependent manner. TNF- α -induced cell adhesion in co-cultured U937 and HUVEC was also blocked by pretreatment with WK-38. Moreover, WK-38 significantly suppressed p65 NF- κ B translocation into the nucleus by TNF- α as well as the phosphorylation and degradation of I κ B- α . In conclusion, the present data suggested that WK-38 could suppress TNF- α -induced vascular inflammatory process, though inhibition of NF- κ B activation in HUVEC.

Key words : WK-38, atherosclerosis, CAMs, NF- κ B, I κ B- α

서 론

최근 혈관질환 중의 하나인 혈관 염증반응에 대한 관심이 높아지고 있다. 혈관염증은 혈관에 염증이 발생하여 혈관내경이 좁아지고 조직의 허혈 및 괴사를 초래하는 질환으로 크기, 위치 및 형태에 관계없이 모든 혈관을 침범하여 다양한 증상을 나타낸다고 보고되어 있다^{1,2}. 혈관은 내피세포와 평활근세포로 대부분 이루어져 있는데, 혈관 내의 염증기작에서 특이한 것은 부착분자인 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), 그리고 endothelial cell selectin (E-selectin) 등의 과발현이 관찰된다는 것이다. 이러한 세포부착분자 (CAMs)는 단핵구의 부착을 중개하여 손상된 내피세포에 다량의 단핵구와 T 림프구가 조직 내로 침투해 들어가도

특 하는데 이런 과정 중에서 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) 등의 많은 종류의 성장인자와 사이토카인이 분비되어 세포간의 chemotaxis와 증식의 신호에 관여한다는 것이 연구되었다³. 혈관 내피세포에서 세포부착분자의 발현은 이러한 염증기작에 의해 각종 동맥경화증이나 심부전, 류머티스 관절염 등과 같은 질환의 병태 생리에 결정적 요인이 될 수 있음이 알려졌다^{4,5}. 특히, 초기 염증반응과 연관된 사이토카인 TNF- α 는 죽상 동맥경화의 손상에서 일반적으로 나타나는데, 화학주성인자, 여러 사이토카인, 그리고 세포부착분자를 유도하며 염증반응 과정에 관여하며, 다량의 혈관 손상에 의한 세포괴사를 유발하는 것으로 보고되었다⁶. 염증 관련 전사인자인 nuclear factor-kappaB (NF- κ B)는 TNF- α 에 의해 활성화되는 것으로 보고되고 있다. NF- κ B는 inhibitory factor kappaB-alpha (I κ B- α)와 결합하여 불활성화 상태로 세포질에 존재하다가 TNF- α 와 같은 사이토카인의 자극을 받으면 인산화에 의해서 활성화되어 세포질에서 핵으로의 이동을 유도하게 된다. 따라서 NF- κ B

* 교신저자 : 이호섭, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원

· E-mail : host@wku.ac.kr · Tel : 063-850-6841

· 접수 : 2009/08/31 · 수정 : 2009/09/14 · 채택 : 2009/09/14

활성의 저해는 잠재적으로 혈관 염증 작용을 억제 할 수 있다^{7,8)}.

WK-38은 대황 (大黃, *Rhei Rhizoma*), 후박 (厚朴, *Magonoliae Cortex*), 목단피 (牡丹皮, *Moutan Cortex Radicis*)의 복합물로서 죽상경화증의 예방 및 치료를 목적으로 구성된 처방이다. 마디풀과에 속하는 대황은 뿌리를 가을에 채취하여 건조시켜 약재로 사용한 것으로 최근 연구에 의하면, 대황이 각종 병리적인 상태의 원인이 되는 활성산소를 제거하는 superoxide dismutase (SOD) 활성을 증가시키며, 항산화 및 항염증 효능을 갖는다고 하였다^{9,10)}. 후박은 녹나무과에 속하며, 그 수피를 약재로 사용하며 항염증 작용¹¹⁾, 항균작용¹²⁻¹⁴⁾을 하고, NO합성과 TNF- α 발현을 억제하는 효과¹⁵⁾ 등이 보고되었다. 목단피는 모란과에 속하는 모란의 근피로서, 목단피에 관한 최근 연구로는 목단피의 항염증 작용¹⁶⁾, 항산화 작용¹⁷⁾, 혈당강화작용¹⁸⁾등이 있다.

죽상경화증 등 장기간에 걸쳐 약물투여를 해야 하는 만성질환에는 천연의약품이 부작용면에서 매우 유리 할 수 있다. 그러나 일부 한약재들은 잠재적 독성을 가지고 있어 장기간 복용하는 경우 건강에 치명적인 영향을 초래할 수 있음이 보고되어 있다^{19,20)}. 이에 우리는 WK-38의 안전성과 독성에 관한 연구의 일환으로 단회경구투여 실험 및 13주간 반복투여 실험을 통하여 WK-38의 안전성을 확인하였다^{21,22)}. 효능 면에서 대황, 후박, 목단피 각각에 대한 항염증작용, 항산화 작용 등이 보고되었으나 항염증 작용이 뛰어난 이 세 가지 한약재 복합물의 항염증 작용에 관한 연구는 아직 보고되지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 초대 배양한 사람의 혈관 내피 세포 (HUVEC)에서 CAMs 발현을 유도하는 염증성 종양 피사인자인 TNF- α 에 의한 혈관염증을 WK-38 추출물이 차단할 수 있는지를 세포의 유주에 관여하는 부착분자인 ICAM-1, VCAM-1, 그리고 E-selectin의 발현 정도를 그 지표로서 실험하였다. 또한 내피세포와 단핵구의 부착을 및 관련 신호전달인자의 비교를 통해 항염증작용에 대한 WK-38 추출물이 미치는 영향에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 제조

WK-38은 전탕 추출법을 이용하여 제조하였다. 대황, 후박, 목단피 각 100 g을 증류수 2.5 L에 넣고 냉각기가 설치된 삼각플라스크에 넣은 후 120 분간 가열하였다. 추출액을 3,000 rpm으로 30 분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 회전식 증발기로 감압 농축한 후 동결 건조하여 추출물 45 g (수득율 15%)의 분말을 얻었다.

2. 세포 배양

인간 혈관 내피 세포 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)는 Cascade Biologics (Portland Oregon, USA)로부터 구입하였고 구입 즉시, LSGS가 포함되어 있는 Medium 200에서 37°C, 5% CO₂의 공기 상태로 배양하였다. Human monocytic leukemic cells인 U937 단핵구 세포주는 American type culture collection (ATCC) (Bethesda, MD, USA)로부터 구입하여 10% FBS가 포함되어 있는 RPMI 1640 (GIBCO, USA)에

서 37°C, 5% CO₂의 공기 상태로 배양하였다.

3. ELISA 측정 (Cell Enzyme-Linked Immunosorbent assay)

혈관 내피 세포를 96 well에 2×10⁴ cells/well로 분주한 후 세포가 70% 정도 자라면 serum free Medium 200과 함께 WK-38을 농도별로 18 시간 동안 전처리하고, TNF- α 를 최종농도 10 ng/ml이 되도록 가하여 6 시간 더 배양하였다. 배양 후, 1% paraformaldehyde로 1 시간 고정하고 1% BSA가 함유된 PBS를 well 당 200 μ l씩 넣고 1 시간 동안 상온에서 blocking하였다. 각 well을 세척용 완충용액으로 3회 세척한 후 ICAM-1 (ZYMED, USA), VCAM-1, 그리고 E-selectin (R&D Systems, USA)을 1% BSA가 함유된 PBS에 1:1000으로 희석하여 96 well에 200 μ l씩 분주하여 4°C에서 overnight 반응시켰다. 반응시킨 후 3회 세척하였고 세척 후에 biotin이 결합된 2차 항체 (Santa cruz Biotechnology, USA)를 상온에서 1 시간 동안 처리하였다. 20 μ l 0.05 M Citrate-phosphate buffer에 O-phenylenediamine (Sigma, USA)과 2 μ l H₂O₂가 포함된 peroxidase substrate 발색용액을 각 well에 100 μ l씩 넣어 반응시킨 후 반응을 중지시키기 위해 2 N H₂SO₄ 용액을 100 μ l씩 넣어주었다. ICAM-1, VCAM-1, E-selectin의 발현 정도는 microplate reader (Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 490 nm 파장으로 측정하였다.

4. 단백질 분리와 Western blot 분석

WK-38과 TNF- α 가 처리된 세포를 PBS로 2회 세척하고, RIPA buffer로 세포를 용해하여 단백질을 추출하였다. 단백질 정량은 Bradford (Bio-Rad, USA)법을 이용하여 단백질의 동량을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (단백SDS-PAGE)로 전기 영동하여 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. 비특이적 antibody 결합을 방지하기 위해 membrane을 5% skim milk가 함유된 TBS-buffered saline (TBS) 용액에 상온에서 1 시간 동안 blocking하였다. Blocking된 membrane을 1:1000으로 희석한 각 타겟 단백질의 1차 antibody로 2 시간 이상 처리하였다. 그 후 TBS-Tween 20으로 3회 세척한 다음 1:2000으로 희석시킨 2차 antibody를 상온에서 1 시간 반응시키고 TBS-tween 20으로 3회 세척한 후 ECL solution을 반응시켜 발현 정도를 Chemidoc image analyzer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정 후 정량하였다.

5. 핵과 세포질에서 단백질 분리

WK-38과 TNF- α 가 처리된 세포를 PBS로 2회 세척한 후 세포를 모아 원심 분리하여 상층액을 제거 하였다. 이 세포에 buffer A [10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), Nonidet P-40 (NP-40), 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]를 넣어 15 초간 vortexing한 후 ice에서 15 분간 두었다. 그 후 12,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 세포질의 단백질이 포함되어있는 상층액을 tube에 옮겨 -70°C에서 보관하고, pellet에 buffer B [20 mM

HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, protease inhibitor cocktail을 넣고 10 초간 vortexing한 후 매 10 분마다 3회 vortexing 하였다. 그 후 12,000 rpm에서 10 분간 원심 분리하여 핵단백질 부분을 포함하는 그 상층액을 새로운 tube에 옮겨 -70°C에서 보관하였다.

6. 실시간 역전사 증합 효소 연쇄 반응 (Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction, Real-time qRT-PCR)

Total RNA는 RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 분리하였고 분리된 RNA는 Biophotometer plus (Eppendorf North America Inc., NY, USA)를 사용하여 정량하였다. cDNA 합성을 위해 1 µg의 RNA와 1 µl의 Oligo(dt) primer을 ddH₂O와 섞은 후 70°C에 10 분간 반응시킨 후 ice에 5 분간 냉각시켰다. 그 후 반응액을 4 µl의 5X M-MLV buffer, 2 µl의 0.1 M DTT, 1 µl의 2.5 mM dNTP, 1 µl의 M-MLV enzyme에 ddH₂O를 넣어 최종 부피가 20 µl가 되도록 만들고 42°C에서 1 시간 반응시킨 후 80°C에서 15 분간 가열하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 real-time qRT-PCR을 실시하였다. cDNA와 10 µl의 SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen, USA), 각각의 forward, reward primer를 1 µl씩 ddH₂O와 함께 최종 부피가 20 µl가 되도록 한 후 Opticon을 이용하여 PCR을 수행하였다 (MJ Research instrument, CA, USA). PCR 조건은 95°C에서 10 분 denaturation한 후, 95°C에서 20 초, 60°C에서 30 초, 72°C에서 60 초를 40 cycle 반복하였다. 각 실험은 Opticon MJ Research instrument Software를 사용하여 분석하였고, 얻어진 데이터는 GAPDH의 발현량을 이용하여 각 유전자의 발현량을 분석하였다.

7. 세포 부착율 측정 (Cell adhesion assay)

혈관 내피 세포를 24 well에 4×10⁶ cells/well로 분주한 후 세포가 70% 정도 자라면 serum free Medium (M200)과 함께 WK-38을 농도별로 18 시간 전처리 후 TNF-α를 최종농도 10 ng/ml이 되도록 가하여 6 시간 배양하였다. U937 세포는 culture dish에서 10% FBS가 함유된 RPMI 1640배지로 배양한 후 10 µM 2,7-bis(2-carboxyethyl)-5(6) -carboxyfluorescein acetoxymethylester (BCECF-AM, Sigma, USA) 으로 1 시간 동안 염색하였다. 그 후 PBS로 3회 세척하였고 염색된 U937 세포를 혈관 내피 세포와 함께 1 시간 배양시킨 후 부착되지 않은 U937 세포를 제거하기 위하여 3회 세척하였다. 혈관 내피 세포에 부착된 U937 세포는 Fluorescence microscopy를 사용하여 측정하였다. 또한 측정한 후 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)가 함유된 Tris-HCl (pH 8.0)으로 세포를 용해시켜 spectrofluorometer (Varioskan, Thermo Electron Co., Vantaa, Finland)를 사용하여 485 nm excitation 와 535 nm emission의 파장으로 부착율을 측정하였다.

8. 통계분석

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 표준편차로 표시하였고 통계 처리는 student's t-test를 이용하여 각 실험군 간의 유의성을 검정하였다.

결 과

1. TNF-α에 의한 혈관 내피 세포의 세포부착분자 발현에 대한 WK-38의 효과

HUVEC에 WK-38 추출물을 농도별로 18 시간 동안 전 처리한 후 6 시간 동안 염증유발 인자인 TNF-α를 최종농도 10 ng/ml이 되도록 가하여 배양하였다. 이를 이용하여 WK-38 추출물의 항염증 효과를 입증하기 위해 cell based ELISA를 수행하였다. 그 결과, TNF-α에 의한 VCAM-1, ICAM-1, 그리고 E-selectin의 발현 증가는 150 µg/ml와 200 µg/ml WK-38 추출물의 전처리에 의해서 유의성 있게 감소됨을 보였다(Fig. 1). Cell-based ELISA 결과를 바탕으로 VCAM-1, ICAM-1, 그리고 E-selectin의 단백질 발현을 Western blotting으로 측정하였다. 그 결과, TNF-α에 의해 VCAM-1, ICAM-1, 그리고 E-selectin의 발현이 유의성 있게 증가하였으나, 150 µg/ml와 200 µg/ml WK-38 추출물의 전처리로 인하여 발현이 감소됨을 나타내었다(Fig. 2).

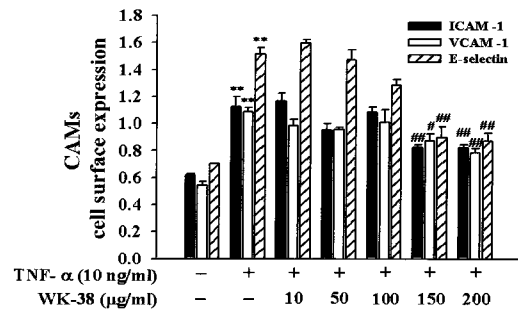


Fig. 1. Effects of WK-38 on TNF-α-induced cell surface expressions of CAMs. HUVEC were pretreated with WK-38 (10-200 µg/ml) for 18 h and then stimulated with TNF-α (10 ng/ml) for 6 h. Cell surface expressions of ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin were analyzed by cell ELISA, as described in Materials and methods. The data are expressed as fold of basal value and are the means ± S.E. of three independent experiments. ** p<0.01 vs. control; # p<0.05; ## p<0.01 vs. TNF-α alone.

2. TNF-α에 의한 혈관 내피 세포의 세포부착분자 mRNA 발현에 대한 WK-38의 효과

WK-38에 의한 VCAM-1, ICAM-1, 그리고 E-selectin 발현의 억제가 전사수준에서 일어나는지를 확인하기 위하여 HUVEC에 WK-38 추출물을 농도별로 18 시간 동안 전 처리한 후 6 시간 동안 염증유발인자인 TNF-α를 최종농도 10 ng/ml이 되도록 가하여 배양하였다. 염증유발인자인 TNF-α에 의한 VCAM-1, ICAM-1, 그리고 E-selectin mRNA 발현을 보기 위하여 real-time qRT-PCR으로 발현 정도를 측정하였다. 그 결과, 단백질 발현과 마찬가지로 TNF-α 처리에 의하여 증가된 VCAM-1, ICAM-1, 그리고 E-selectin의 mRNA 발현이 WK-38 추출물 전처리에 의해 감소하는 경향을 보여주었다(Fig. 3).

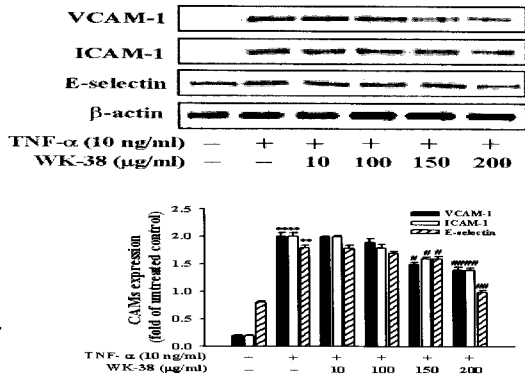


Fig. 2. Effects of WK-38 on TNF- α -induced increases protein expressions of CAMs. HUVEC were pretreated with WK-38 (10-200 μ g/ml) for 18 h and then stimulated with TNF- α (10 ng/ml) for 6 h. Western blots of ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin are detected as described in Materials and methods. The data are expressed as fold of basal value and are the means \pm S.E. of three independent experiments. ** $p < 0.01$ vs. control; # $p < 0.01$ vs. TNF- α alone.

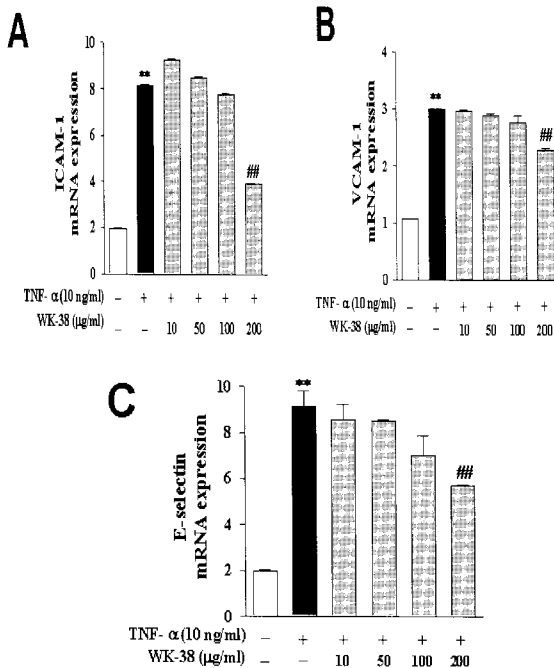


Fig. 3. Effects of WK-38 on TNF- α -induced increases mRNA expressions of CAMs. HUVEC were pretreated with WK-38 (10-200 μ g/ml) for 18 h and then stimulated with TNF- α (10 ng/ml) for 6 h. Levels of the mRNA for CAMs were determined Real-time qRT-PCR. Real-time qRT-PCR analysis was performed using specific primer for ICAM-1 (A), VCAM-1 (B), and E-selectin (C). The data are expressed as fold of basal value and are the means \pm S.E. of three independent experiments. ** $p < 0.01$ vs. control; ## $p < 0.01$ vs. TNF- α alone.

3. WK-38에 의한 혈관내피세포와 U937 단핵구의 부착 억제 효과
혈관 내피 세포와 백혈구의 부착은 초기 혈관 염증과정의 표지인자로 볼 수 있다. 그러므로 WK-38에 의한 백혈구 부착의 변화 정도를 알아보기 위하여 WK-38 추출물을 전 처리한 후 형광 현미경을 이용하여 부착 여부를 촬영하고 정량화하였다. 그 결과 Fig. 4 에서 보는 바와 같이 TNF- α 를 처리한 군 (B)는 아무 것도 처리하지 않은 대조군 (A)와 비교해 볼 때 U937 단핵구의

세포 부착이 유의성 있게 증가함을 보였다. 하지만 TNF- α 를 처리한 혈관 내피 세포에 WK-38 추출물을 농도별로 전 처리 하였을 때 200 μ g/ml WK-38 추출물을 처리한 군에서 단핵구의 세포 부착이 억제 되는 것을 볼 수 있었다. 이 결과를 정량화한 그래프에서도 WK-38이 TNF- α 에 의한 단핵구 부착의 증가를 유의성 있게 감소시킴을 확인하였다. 그러므로, WK-38 추출물이 혈관 염증과정에서 활성화된 혈관 내피 조직 부위에 단핵구의 부착을 억제함으로써 죽상경화과정의 초기단계를 억제시킬 수 있는 효능을 가지고 있음을 보여주는 결과이다.

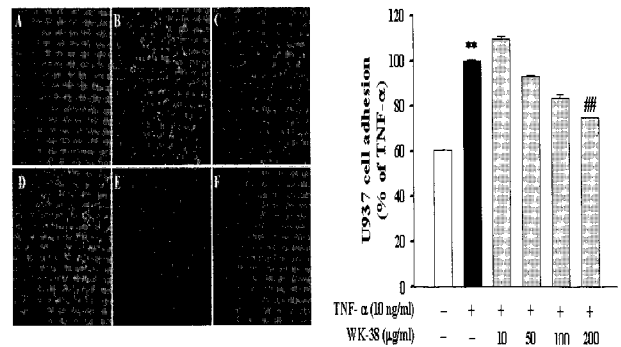


Fig. 4. Effects of WK-38 on TNF- α -induced adhesion of U937 cells to HUVEC. HUVEC were pretreated with WK-38 (10-200 μ g/ml) for 18 h and then stimulated with TNF- α (10 ng/ml) for 6 h. Adhesion of fluorescence-labeled U937 cells were added to the HUVEC and allowed to adhere for 1 h. [A] Control; [B] TNF- α (10 ng/ml); [C] co-treated with TNF- α and WK-38 (10 μ g/ml); [D] co-treated with TNF- α and WK-38 (50 μ g/ml); [E] co-treated with TNF- α and WK-38 (100 μ g/ml); [F] co-treated with TNF- α and WK-38 (200 μ g/ml). The amounts of adherent U937 cells were monitored by fluorescence microscopy. Values are expressed as mean \pm S.E. ** $p < 0.01$ vs. control; ## $p < 0.01$ vs. TNF- α alone.

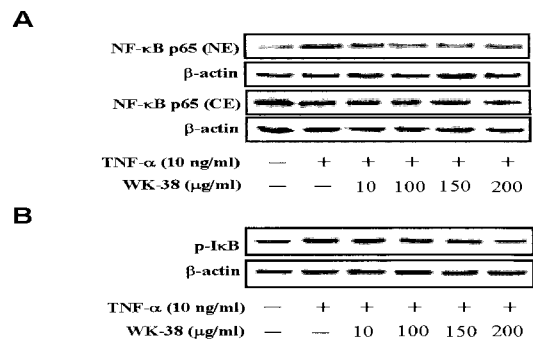


Fig. 5. Effects of WK-38 on TNF- α -induced NF- κ B translocation into the nucleus (A), and (B) I κ B- α phosphorylation in HUVEC. Cells were pretreated with WK-38 (10-200 μ g/ml) for 18 h and then stimulated with TNF- α (10 ng/ml) for 6 h. After treatment, nuclear and cytoplasmic fractions were extracted and protein levels determined by Western blot analysis. Western blots of ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin are detected as described in Materials and methods. The data are confirmed from three independent experiments.

4. WK-38의 NF- κ B 활성 억제 효과

WK-38 추출물이 VCAM-1, ICAM-1, 그리고 E-selectin 발현을 억제시키는 데 있어 관여할 수 있는 혈관염증 전사인자인 NF- κ B와의 관련성을 알아보기 위하여 핵과 세포질 단백질을 각각 추출한 후 western blotting을 수행하였다. 그 결과, TNF- α 를 단독 처리했을 때 핵 부분의 p65 NF- κ B의 발현이 유의성 있게

증가하였고, 이는 NF- κ B가 세포질에서 핵 부분으로 translocation이 되었으며 활성화되었음을 보여준 것이다. 그러나 WK-38 추출물을 농도별로 전 처리 하였을 때는 TNF- α 에 의한 NF- κ B translocation이 억제됨을 보여주었다(Fig 5A). 또한, TNF- α 에 의한 I κ B- α 의 인산화 역시 WK-38에 의하여 농도 의존적으로 감소하였다(Fig 5B).

고 찰

본 연구에서는 부작용 없이 탁월한 약리작용을 보이는 대황, 후박, 목단피의 한약리학적 효능에 착안하여 초대 배양한 사람의 혈관 내피 세포에서 WK-38 추출물을 전 처리한 후 TNF- α 로 염증을 유발하고 대조군과 처리군을 비교함으로써 항염증 효능을 알아보았다. 혈관 염증은 혈관에 염증이 발생하여 혈관내경이 좁아지고 조직의 허혈 및 괴사를 초래하는 질환으로 크기, 위치 및 형태에 관계없이 모든 혈관을 침범하여 다양한 증상을 나타낸다고 보고되어 있다¹²⁾. 이에 본 실험에서는 사람의 혈관 내피 세포주인 HUVEC에서 대표적인 pro-inflammation인 TNF- α 에 의해 유도된 CAMs 발현에 대한 WK-38 추출물의 영향을 조사하였다²³⁻²⁵⁾. TNF- α (10 ng/ml) 처리에 의하여 증가된 VCAM-1, ICAM-1, 그리고 E-selectin의 발현이 WK-38 추출물 전처리에 의해 농도 의존적으로 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 세포 수준에서의 단백질 양 및 mRNA의 양을 측정하기 위해 western blot 및 real-time qRT-PCR을 시행한 결과, TNF- α 를 단독 처리한 군에 비해 WK-38 추출물을 전 처리한 군에서 VCAM-1, ICAM-1, 그리고 E-selectin 단백질 및 mRNA 발현율이 유의성 있게 감소함을 보여주었다. 이러한 실험 결과들로 보아 WK-38 추출물이 TNF- α 로 유도된 VCAM-1, ICAM-1, 그리고 E-selectin의 발현을 조절함으로써 죽상경화증을 유발하는 혈관 염증의 초기단계를 억제하여 항염증 작용에 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다.

혈관염증의 초기 단계는 단핵구의 내피세포로의 부착으로 인해 단핵구와 세포부착분자 간 상호 작용이 일어난다. 세포부착분자는 단핵구의 부착을 중개하는데 이것은 특히 혈관이 많은 내피의 혈관손상에서 잘 발견된다^{26,27)}. 사람 혈관 내피세포에서는 VCAM-1이나 ICAM-1과 같은 세포에서 선택적으로 발현하는 다양한 세포부착분자를 통해서 단핵구와 결합한다²⁸⁾. 이에 본 실험에서는 WK-38 추출물이 TNF- α 로 유도된 단핵구의 세포 부착에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 TNF- α 에 의해 유도된 단핵구의 세포 부착이 WK-38 추출물에 의해 감소됨이 나타났다.

NF- κ B는 염증반응, 면역, 세포 분화, apoptosis 등에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 조절하는 중심 역할을 하는 전사 인자이다^{29,30)}. NF- κ B는 세포질 속에 p50과 p65의 heterodimer와 저해제인 I κ B- α 와 함께 불활성형으로 존재하다 cytokine 같은 염증성 자극에 의해 I κ B가 분해되면, NF- κ B는 활성화된 후 핵으로 이동하여 염증발현을 유도하는 유전자의 발현을 촉진시켜 염증 반응을 일으킨다^{31,32)}. 본 연구에서는 WK-38 추출물이 염증조절 인자인 NF- κ B의 활성화에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 알아

보았다. 그 결과, TNF- α 처리는 핵 내의 NF- κ B p65 단백질 양을 증가시켰으나 WK-38 추출물 전처리에 의해 억제되는 것으로 나타났다. 또한 WK-38에 의한 NF- κ B의 활성화 억제가 NF- κ B의 활성을 조절하는 I κ B- α 의 인산화 억제 때문인지를 조사한 결과, WK-38 추출물은 TNF- α 에 의한 I κ B- α 인산화를 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 실험 결과로 보아, WK-38 추출물은 I κ B- α 의 인산화 억제를 통해 NF- κ B 활성을 조절하는 것으로 예상되며 NF- κ B의 활성화로 인한 여러 가지 염증성 단백질의 발현을 억제하여 염증 과정을 조절하는 것으로 생각되어진다.

결과적으로, 이 실험에서는 TNF- α 로 유도된 HUVEC에서의 염증 반응에서 WK-38 추출물의 VCAM-1, ICAM-1, 그리고 E-selectin과 같은 CAMs 발현 및 NF- κ B 활성화에 대해 어떠한 영향을 미치는지 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. WK-38 추출물은 TNF- α 로 유도된 CAMs 발현과 p65 NF- κ B 활성을 저해함을 보였다. 특히 200 μ g/ml의 농도에서는 ICAM-1, VCAM-1, 그리고 E-selectin의 단백질 및 mRNA 발현 모두 확실한 저해 효과를 나타내었으며 핵 내 NF- κ B 활성화 역시 현저하게 저해시키는 것을 알 수 있었다. 이런 결과들로 보아 WK-38 추출물은 염증 및 염증성 질환 치료에 효과적일 수 있다고 생각되어진다.

염증 유발 매개 인자에 대한 유전자 발현 및 활성화의 저해 방법은 다양한 염증성 질환을 예방하거나 억제할 수 있는 치료 원리 및 방법이 될 수 있다. 한약재와 같은 천연소재로부터 치료제를 발굴할 경우 부작용이 적고 안전성이 높기 때문에 대황, 후박, 목단피의 한약재 복합 처방물인 WK-38은 혈관 염증 질환 치료제의 좋은 후보 물질이 되리라 예상된다.

결 론

WK-38 추출물은 대황 (大黃, *Rhei Rhizoma*), 후박 (厚朴, *Machilus thunbergii*), 목단피 (牡丹皮, *Moutan Cortex Radicis*)의 복합물로서 죽상경화증의 예방 및 치료를 목적으로 구성된 처방이다. 본 연구는 사람 혈관 내피 세포주인 HUVEC에서 WK-38 추출물이 이러한 죽상경화증의 초기과정에서 TNF- α 에 의한 CAMs 발현과 NF- κ B 활성화에 미치는 효과에 대해 조사하였다. TNF- α 처리에 의하여 증가된 VCAM-1, ICAM-1, 그리고 E-selectin의 발현은 WK-38 추출물 전처리에 의해 농도 의존적으로 감소되었다. 또한 TNF- α 를 단독 처리한 군에 비해 WK-38 추출물을 전 처리한 군에서 VCAM-1, ICAM-1, 그리고 E-selectin 단백질 및 mRNA 발현율이 유의적으로 감소됨을 보였다. 뿐만 아니라 WK-38 추출물의 전처리는 HUVEC에서 TNF- α 에 의해 유도된 단핵구 U937의 부착을 현저하게 감소시켰다. WK-38 추출물이 중요한 염증조절인자인 NF- κ B의 활성화에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 알아본 결과에서 TNF- α 에 의한 핵 내의 NF- κ B p65 단백질 양의 증가가 WK-38 추출물 전처리에 의해 억제되며 NF- κ B의 활성을 조절하는 I κ B- α 의 인산화 역시 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 실험 결과로 보아, WK-38 추출물은 혈관 내피 세포에서 NF- κ B 활성을 억제시켜 이를 통해 TNF- α 로 유도된 혈관염증을 저해하는 효과를 가지고 있으며, 혈관 내의 염증

기작으로 인한 동맥경화나 죽상경화 같은 만성질환의 치료에 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 자생식물 이용기술사업단 (PF03201-01-00) 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Tay, S.S., Mc Cormack, A., Rose, M.L. Effect of cognate human CD4⁺ T cell and endothelial cell interactions upon chemokine production. *Transplantation*. 78(7):987-994, 2004.
2. Uzel, G., Pachman, L.M. Cytokines in juvenile dermatomyositis pathophysiology: potential and challenge. *Curr. Opin. Rheumatol.* 15(6):691-697, 2003.
3. Frostegard, J., Wu, R., Haegerstrand, A., patarroyo, M., Lefvert, A.K. Mononuclear leukocytes exposed to oxidized low density lipoprotein secrete a factor that stimulates endothelial cells to express adhesion molecules. *Atherosclerosis*. 103: 213-219, 1993.
4. Mes Bouhlel, M.A., Staels, B., Chinetti-Gbaguidi, G. Peroxisome proliferator-activated receptors-from active regulators of macrophage biology to pharmacological targets in the treatment of cardiovascular disease. *J. Intern. Med.* 263(1):28-42, 2008.
5. Li, J.J., Zhu, C.G., Yu, B., Liu, Y.X., Yu, M.Y. The role of inflammation in coronary artery calcification. *Ageing. Res. Rev.* 6(4):263-270, 2007.
6. Di Donato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E., Karin, M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*. 388: 548-554, 1997.
7. Thurberg, B.L., Collins, T. The nuclear factor- κ B/inhibitor of κ B autoregulatory system and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 9: 387-396, 1998.
8. Park, M.H., Song, H.S., Kim, K.H., Son, D.J., Lee, S.H., Yoon, D.Y., Kim, Y.S., Park, I.Y., Song, S.K., Hwang, B.Y., Jung, J.K., Hong, J.T. Cobrotoxin inhibits NF- κ B activation and target gene expression through reaction with signal molecules. *Biochemistry*. 44(23):8326-8336, 2005.
9. Tian, J., Du, H., Yang, H., Liu, X., Li, Z. A clinical study on compound da huang (radix et rhizoma rhei) preparations for improvement of senile person's memory ability. *J. Tradit. Chin. Med.* 17(3):168-173, 1997.
10. Yokozawa, T., Chen, C.P., Tanaka, T. Direct scavenging of nitric oxide by traditional crude drugs. *Phytomedicine*. 6(6):453-463, 2000.
11. Kim, G.J., Song, H.S. Obovatol extracted from *Magnolia obovata* inhibits inflammation mediator generation and prostate carcinoma PC-3, LNCap cell growth through induction of apoptotic cell death via inactivation of NF- κ B. *J. Kor. Acu. Mox. Soc.* 24: 15-29, 2007.
12. Lee, Y.S., Park, H.J., You, J.S., Park, H.H., Kwon, I.B., Lee, H.Y. Isolation of an anticariogenic compound from *Magnolia Bark*. *Kor. J. Food. Soc. Technol.* 30: 230-236, 1998.
13. Chung, C.P., Ku, Y., Bae, K.H. Biological effect of *Magnolia* and *Ginkgo biloba* extract to the antimicrobial, antiinflammatory and cellular activity. *J. Korean. Acad. Periodontol.* 25: 478-486, 1995.
14. Kim, T.I., Choi, E.J., Chung, C.P., Han, S.B., Ku, Y. Antimicrobial effect of *Zea mays* L. and *Magnoliae Cortex* extract mixtures in periodontal pathogen and effect on human gingival fibroblast cellular activity. *J. Korean. Acad. Periodontol.* 32: 249-255, 2002.
15. Son, H.J., Lee, H.J., Choi, Y., Ryu, J.H. Inhibitors of nitric oxide synthesis and TNF- α expression from *Magnolia obovata* in activated macrophages. *Planta. Med.* 66: 467-471, 2000.
16. Mitsuo, M., Maruyama, H., Kameoka, H. Essential oil constituents of "Moutan Radix Cortex" *Paeonia moutan* Sims.(=P. *suffruticosa* Andrews). *Agric. Biol. Chem.* 47: 2925-2927, 1983.
17. Boo, Y.C., Jeon, C.O. Antioxidants of *Theae Folium* and *Moutan Cortex*. *J. Korean Agric. Chem. Biotechnol.* 36: 326-331, 1993.
18. 박선민, 전동화, 박춘희, 장진선, 박성규, 고병섭, 김보중, 최수봉. 목단피 추출물의 혈당 강하 효과. *한국식품과학회지* 36(3):472-477, 2004.
19. Mei, N., Arlt, V.M., Phillips, D.H., Heflich, R.H. Chen, T. DNA adduct formation and mutation induction by aristolochic acid in rat kidney and liver. *Mutat. Res.* 602: 83-91, 2006.
20. 안병민, 이동수, 백종태, 장성희, 장이선. 식물제제에 의한 간손상 빈도. *식품의약품안전청 연구보고서*. 6: 1045-1046, 2002.
21. 장보윤, 김윤철, 이안숙, 강대길, 이호섭, 김성연. 랫트에서 WK-38의 단회경구투여 독성에 관한 연구. *한국식품위생안전성학회지* 22: 93-98, 2007.
22. 장보윤, 김윤철, 이안숙, 강대길, 이호섭, 김성연. 랫트에서 WK-38에 대한 13주 반복경구 투여 독성에 관한 연구. *생약학회지* 23: 169-175, 2008.
23. Gedeit, R.G. Tumor necrosis factor-induced E-selectin expression on vascular endothelial cells. *Crit. Care. Med.* 24: 1543-1546, 1996.

24. Imhof, B.A., Dunun, D. Basic mechanism of leukocyte migration. *Horm. Metab. Res.* 29: 614-621, 1997.
25. Baran, D., Vendeville, B., Ogborn, M., Katz, N. Cell adhesion molecule expression in murine lupus-like nephritis induced by lipopolysaccharide. *Nephron.* 84: 167-176, 2000.
26. Cleman, J.E., Huentelman M.J., Kasparov, S., Metcalfe, B.L., Paton, J.F., Katovich, M.J., Semple-Rowland, S.L. Raizada, M.K. Efficient large-scale production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors for use in vivo. *Physiol. Genomics.* 12: 221-228, 2003.
27. Luo, S.F., Wang, C.C., Chen, C.S., Helenius, L.D., Yang, C.M. Induction of cyclooxygenase-2 by lipopolysaccharide in canine tracheal smooth muscle cells : involvement of p 42, 44 and p 38 mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappa B pathways. *Cell. Signal.* 15: 497-509, 2003.
28. Iiyama, K., Hajra, L., Iiyama, M., DiChiara, M., Medoff, B.D., Cybulsky, M.I. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ. Res.* 85: 199-207, 1999.
29. Korhonen, P., Helenius, M., Salminen, A. Age-related changes in the regulation of transcription factor NF-kappaB in rat brain. *Neurosci Lett.* 255: 61-64, 1997.
30. Lawrence, T., Gilroy, D.W. Possible new role for NF-kB in the resolution of inflammation. *Nat Med.* 7: 1291-1297, 2001.
31. Allenm, R. Tresini, M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 28: 463-499, 2000.
32. Jin, H.Z., Lee, J.H., Lee, D., Hong, Y.S., Kim, Y.H., Lee, J.J. Inhibitors of the LPS-induced NF-kB activation from *Artemisia sylvatica*. *Phytochemistry.* 65: 2247-2253, 2004.