

桑葉 추출물의 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 항염증 효과

박상미^{1,2}, 변성희¹, 김영우^{1,2}, 조일제^{1,2*}, 김상찬^{1,2*}

1 : 대구광역시 수성구 신천동로 대구한의대학교 한의과대학,

2 : 경상북도 경산시 한의대로 1, 대구한의대학교 한의과대학 방제과학글로벌 연구센터

Inhibitory effect of Mori Folium ethanol extract on pro-inflammatory mediator in lipopolysaccharide - activated RAW 264.7 cells

Sang Mi Park^{1,2}, Sung Hui Byun¹, Young Woo Kim^{1,2}, Il Je Cho^{1,2*}, Sang Chan Kim^{1,2*}

1 : College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Daegu 706-060,

2 : MRC-GHF, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan, Gyeongsangbuk-Do 712-715, KOREA

ABSTRACT

Objectives : Mori Folium is one of the traditional medicinal herb. It was commonly used for sericulture in the world and has been traditionally administered as natural therapeutic agent for the treatment of filariasis, diabetes and dropsy in East Asia. This study investigated an anti-inflammatory potential of Mori Folium ethanol extract (MFE).

Methods : We examined the effects of MFE on the lipopolysaccharide (LPS)-induced production of nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) in a murine macrophage cell line, RAW 264.7.

Results : MFE inhibited production of NO and PGE₂ in a dose dependent manner and also decreased the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2, interleukin (IL)-1, IL-6 and tumor necrosis factor- α . As a plausible molecular mechanism, increased degradation of I- κ B α and phosphorylation of I- κ B α , NF- κ B and MAP kinases by LPS were partly blocked by MFE treatment.

Conclusions : These results suggest that MFE has an anti-inflammatory therapeutic potential, which may result from inhibition of NF- κ B activation and MAPK phosphorylation, thereby decreasing the expression of pro-inflammatory genes.

Key words : Mori Folium; anti-inflammation; iNOS; NF- κ B; MAP kinases

I. 서론

염증은 생체에 침입한 병원체 및 내인적 염증활성인자를 인지하여 이 인자들을 제거하기 위해 활성화되는 적극적인 생체 방어반응의 하나이다¹⁾. 염증은 양날의 칼과 같아서 적절한 염증반응은 내재면역 반응을 바탕으로 적응면역 반응을 매개하여 외인적/내인적 인자로부터 생체를 보호하는 필수 불가결한 반응이나, 과도하고 부적절한 염증반응은 세포 및 조직의 괴사 및 폐혈증에 의한 사망과 더불어 각종 만성질환의 원인이 된다²⁾. 대식세포 및 순환기계에 존재하는 전구세포인 단핵구는 병원체 외부의 lipopolysaccharide (LPS)를 포함한 다양한 pathogen-associated molecular pattern을 인식하여

활성화되며, nitric oxide (NO), 지방대사체 (예, prostanoid 류), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6를 포함한 전염증성 cytokine을 포함한 염증 매개인자를 유리하여 인식된 미생물을 탐식하기 위한 효능세포로서 중요한 역할을 담당한다^{1,2)}. 염증 신호는 세포 내에서 다양한 신호전달 분자들을 활성화시키며, 이 중 mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 nuclear factor- κ B (NF- κ B), activator protein-1 (AP-1), activating transcription factor-2, cAMP-responsive element binding protein를 포함한 다양한 전사인자들의 serine 및 threonine 잔기에 인산화를 통하여 활성화시키는 핵심 신호전달 분자로 보고되고 있다³⁾. 따라서 대식세포를

*교신저자 : 김상찬, 712-715, 경상북도 경산시 한의대로 1, 대구한의대학교 한의과대학 방제과학글로벌 연구센터
· Tel:053-819-1863 · Fax:053-819-1860 · e-mail: sckim@dhu.ac.kr 또는 조일제, · Tel:053-819-1862 · e-mail: skek023@dhu.ac.kr
· 접수: 2012년 4월 15일 · 수정: 2012년 4월 24일 · 채택: 2012년 4월 28일

매개한 염증 반응에 있어 NO 생성 효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS), prostaglandin 생합성의 속도조절 단계 효소인 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 염증성 cytokine 들의 발현 조절과 이들 유전자의 발현에 있어 주요 신호전달 분자인 MAPK와 NF- κ B의 활성화 조절은 염증 반응을 조절하기 위한 핵심요소로서 인식되고 있으며, 이들 인자들의 활성을 조절하여 염증 반응을 조절하기 위한 신규 후보 소재를 찾기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다.

桑葉 (Mori Folium)은 疏散風熱, 清肺潤燥, 清肝明目하는 효능이 있으며 頭痛, 目赤, 口渴, 肺熱로 인한 咳嗽, 風癩, 蕁麻疹을 치료한다⁴⁾. 桑葉에는 flavones, steroids, triterpenes, 아미노산, 비타민 및 다량의 미네랄 성분, 칼슘, 칼륨 등의 전해질과 펩틴, 셀룰로오스 등의 식이섬유, 아미노산 및 단백질 등이 함유되어 있다⁵⁾. 桑葉은 혈당 강하, 혈압 강하, 이노, 및 항균 효능이 있음이 규명되었으며, filaria에 의한 림프관염에 치료 효과가 있고 하지의 상피종(象皮腫) 연화, 부종 제거 작용이 있음이 증명되었다. 최근에는 桑葉의 염증성 지방사이토카인 (adipocytokine) 억제, 항동맥경화 (anti-atherogenic) 효과 및 항우울 (anti-depressant) 효과 등이 보고되고 있다⁶⁻⁸⁾.

본 연구에서는 桑葉 추출물의 염증성 질환에 대한 효과를 확인하기 위하여 桑葉 추출물 (MFE)을 RAW 264.7 세포에 전처리 한 후, lipopolysaccharide (LPS)로 유도한 NO 생성, iNOS 발현 및 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 염증성 cytokine 생성에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 또한 MFE가 염증반응의 주요 신호전달 분자인 NF- κ B의 활성화와 MAPK 인산화를 차단하여 염증매개물질에 대한 염증 억제 효과를 기대할 수 있는지 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 시약

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 GibcoBRL (Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. *E. coli* LPS (serotype 055:B5), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), Griess reagent는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였으며 iNOS 항체는 BD biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입하였고 I- κ B α 와 NF- κ B 및 actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Phospho-I- κ B α (p-I- κ B α), phospho-p38 MAPK (p-p38), phospho-p44/42 MAPK (p-p44/42)와 phospho-SAPK/JNK (p-SAPK/JNK) 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 GAPDH oligonucleotide primer는 바이오니아 (Deajeon, Korea)에서 구입하였다. SYBR Primix Ex Taq은 Takara (Shuzo, Shiga, Japan)에서 구입하였다.

2. 추출물의 제조

桑葉 추출물 (Mori Folium ethanol extract; MFE)은 桑葉 300 g에 3 L의 100% 에탄올을 가하고 상온에서 72시간 동안 추출하여 No.2 filter paper (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과한 후 여액을 진공회전농축기 (EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 농축하였다. 농축액을 Ultra-low temperature freezer (Operon, Korea)에 12시간 동안 동결하여 동결건조기 (LABCONCO, Kansas, MO, USA)로 동결건조하고 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 桑葉의 최종 수율은 2.598%이며 실험 시 DMSO에 용해하여 사용하였다.

3. 세포 배양

RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. RAW 264.7 세포를 1 \times 10⁵/ml 농도로 24 well plate에 각각 분주하고 serum free 배지로 교환한 후 24시간 동안 배양하였다. MFE 10, 30 μ g/ml를 각각 넣고 1시간 후 LPS (2 μ g/ml)를 처리하여 배양하였다.

4. 세포독성 측정

약물 처리된 세포를 24시간 배양한 후, 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 넣고 4시간 추가 배양하였다. 배양액을 제거하고 DMSO를 가하여 생성된 formazan을 용해시킨 후 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. NO 생성 저해능 측정

RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 세포 배양 상등액 50 μ l와 Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, 1% α -naphthylamide in H₂O) 50 μ l를 혼합하여 넣고 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. PGE₂ 생성 저해능 측정

MFE를 처리하고 18시간이 지난 후 배양액을 회수하여 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 배양액 중의 PGE₂는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)의 PGE₂ assay kit를 사용하여 제조사의 방법에 따라 측정하였다.

7. Immunoblot 분석

전세포 추출액 (whole cell lysate), 핵 분획 (nuclear fraction)은 본 실험실에서 기립된 방법에 따라 분리하였다⁹⁾. 정량한 단백질 50 μ g을 취하여 10% SDS-PAGE에 전기영동시킨 후 NC membrane으로 단백질을 전이시켰다.

iNOS, I- κ B α , p-I- κ B α , NF- κ B, p-p38, p-p44/42, p-SAPK/JNK, 및 actin 1차 antibody와 반응시킨 후 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체와 반응시키고 ECL detection reagents (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. Densitometric analysis는 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 사용하였다.

8. RNA 분리 및 realtime PCR 분석

처치된 세포로부터 total RNA의 분리는 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 추출하였다. 추출된 total RNA (2 ug)와 d(T)₁₆ primer 및 AMV 역전사 효소 (reverse transcriptase)를 사용하여 cDNA를 얻었다. 유전자들의 상대적인 양은 SYBR Primix Ex Taq (Takara)을 사용한 realtime RT-PCR법 (Real Time PCR System 7500, Applied biosystems, Foster, CA)에 의해 정량하였다. iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 와 IL-6 유전자 (Table 1)의 C_T 값을 GAPDH 유전자의 C_T 값으로 gene express 2.0 프로그램 (Applied biosystems)을 이용하여 보정하였다. 또한 melting curve 분석을 통하여 증폭된 PCR 산물의 특이성을 확인하였다.

Table 1. Realtime PCR primer sequences

Gene	forward primers	backward primers
iNOS	5'-GACAAGCTGCATGTGACATC-3'	5'-GCTGGTAGGTTCTCTGTTGT-3'
COX-2	5'-TCCAGATCACATTTGATTGA-3'	5'-TCTTTGACTGTGGGAGGATA-3'
TNF- α	5'-ATGAGCACAGAAAGCATGAT-3'	5'-TACAGGCTTGCTCACTCGAAT-3'
IL-1 β	5'-ATGGCAACTGTTCTGAACT-3'	5'-CAGGACAGGTATAGATTCTT-3'
IL-6	5'-TTCCATCCAGTTGCCTCTT-3'	5'-ATTCCACGATTTCCCAGAG-3'

9. 통계적 검증

정규성 검정과 ANOVA test를 실시할 수 있는 등분산 검정을 통해 정규성과 등분산 가정이 성립되는 경우는 One-way ANOVA test를 수행하였으며 ANOVA test 결과에서 유의한 결과를 보여주는 경우에는 Tukey HSD test를 수행하여 사후검정을 실시하였다. 등분산 가정이 성립되지 않는 경우는 일반적으로 One-way ANOVA test를 수행할 수 없으므로 비모수 방법인 Kruskal-wallis test를 통해 유의성 검정을 실시하였으며 유의한 결과가 나온 경우 Tamhane test를 실시하여 사후검정을 하였다. 유의수준은 5% 수준에서 검정하였다.

결 과

1. MFE의 NO 생성 저해능

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 MFE의 NO 생성 저해능을 관찰하기 위하여 MFE를 10, 30 μ g/ml의 농도로 세포에 처치한 후 생성되는 NO의 양을 측정하였다. LPS는 대조 세포에 비교하여 NO 생성량이 LPS를 처치한 24시간 후 유의하게 증가하였으며, 30 μ g/ml MFE에 의해 통계적으로

유의한 NO 생성 저해를 나타내었다 (Figure 1A). LPS로 유도된 NO 생성의 감소가 MFE에 의한 세포독성에 기인한 것인지를 관찰하기 위하여 MTT assay를 이용한 세포 생존율을 측정하였다. 실험결과 LPS는 대조군에 비교하여 84%의 세포 생존율을 나타내었다. 그러나 LPS에 10, 30 μ g/ml MFE를 처치한 세포는 LPS와 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다 (Figure 1B).

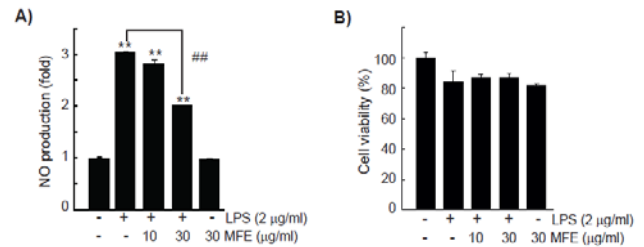


Figure 1. Inhibitory effect of MFE on the LPS-induced NO production. Raw 264.7 cells were treated with 10, 30 μ g/ml of MFE dissolved in DMSO for 1 h prior to the addition of LPS (2 μ g/ml), and the cells were further incubated for 24 h. The concentrations of nitrite in culture medium were measured by Griess reaction assay as described in the Methods section (A). Cell viability was measured by MTT assay and expressed as a percentage of the control without the addition of indicated MFE (B). Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments (significant as compared to control, ** $p < 0.01$, significant as compared to LPS alone, ## $p < 0.01$).

2. MFE의 PGE₂ 생성 저해능

PGE₂는 염증반응 시 COX-2에 의해 생성되며 혈관을 확장시키고 혈관투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로의 화학주성을 증가시킨다¹⁰). LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 MFE의 PGE₂ 생성 저해능을 관찰하기 위하여 MFE를 10, 30 μ g/ml의 농도로 세포에 처치하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 PGE₂ 생성 정도를 측정하였다. LPS는 염증반응 매개물질인 PGE₂의 생성을 유의성 있게 증가시켰고, MFE는 농도 의존적으로 LPS로 유도된 PGE₂를 유의성 있게 감소시켰다 (Figure 2).

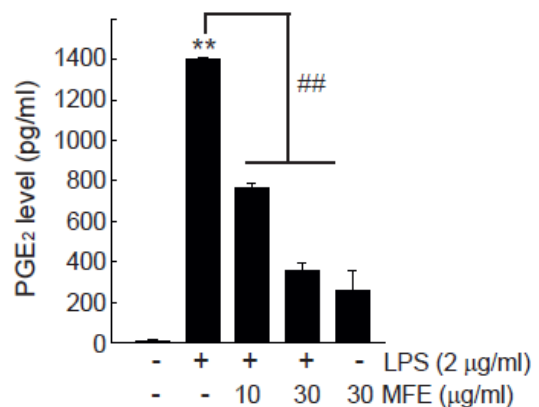


Figure 2. Inhibitory effect of MFE on the LPS-induced PGE₂ production.

Raw 264.7 cells were treated with 10, 30 $\mu\text{g/ml}$ of MFE for 1 h prior to the addition of LPS (2 $\mu\text{g/ml}$), and the cells were further incubated for 18 h. The concentrations of PGE_2 in culture medium were measured by ELISA as described in the Methods section. Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments (significant as compared to control, ** $p < 0.01$, significant as compared to LPS alone, ## $p < 0.01$).

3. MFE의 iNOS 및 COX-2 발현 저해

NO 생성 저해에 관한 iNOS 단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot 분석을 이용하여 세포에서의 iNOS 단백질의 발현을 조사하였다. LPS는 iNOS 단백질의 발현을 증가시켰으나, LPS에 30 $\mu\text{g/ml}$ MFE를 전처리한 세포에서는 iNOS 단백질의 발현이 현저히 감소한 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 3A). 또한 realtime PCR 분석을 통하여 측정된 iNOS의 mRNA 발현 또한 30 $\mu\text{g/ml}$ MFE에 의해 통계적으로 유의한 수준으로 감소하였음을 확인하였다 (Figure 3B). iNOS의 결과와 마찬가지로 LPS에 의해 증가한 COX-2 mRNA를 30 $\mu\text{g/ml}$ MFE 전처치에 의해 COX-2 mRNA 발현을 감소시켰다 (Figure 3C). 이는 MFE가 NO 및 PGE_2 의 생성을 저해한 결과와 일치하며, MFE에 의한 NO 및 PGE_2 생성 저해가 전사단계에서의 iNOS와 COX-2 유전자의 발현 억제를 통해 일어남을 시사한다.

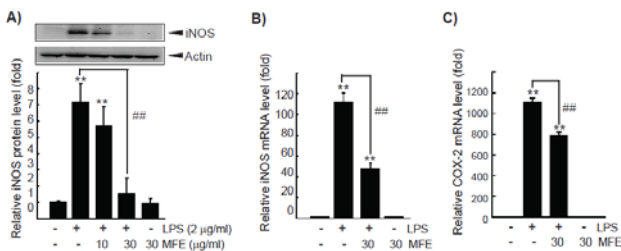


Figure 3. Inhibitory effect of MFE on the LPS-induced iNOS and COX-2 expressions in Raw 264.7 cells.

Lysates were prepared from control, 24 h LPS (2 $\mu\text{g/ml}$) stimulated cells and LPS plus MFE (10, 30 $\mu\text{g/ml}$). Equal amounts of total protein (50 $\mu\text{g/lane}$) were separated by SDS-PAGE. Expressions of iNOS protein were determined by immunoblot using specific anti-iNOS antibodies. Actin was used as a loading control. The relative levels of protein bands were measured by scanning densitometry (A). Cells were treated with 30 $\mu\text{g/ml}$ of MFE for 1 h prior to the addition of LPS (2 $\mu\text{g/ml}$), and the cells were further incubated for 3 h. Total RNA was subjected to real-time PCR as described in the Methods section (B, C). Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments (significant as compared to control, ** $p < 0.01$, significant as compared to LPS alone, ## $p < 0.01$).

4. MFE의 cytokine 생성 저해능

IL-1 β , IL-6, TNF- α 등은 염증성 cytokine으로 서로 간에 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 염증반응이 유발된 대식세포가 주요 생성세포이다¹¹⁾. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 MFE의 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성 저해능을 관찰하기 위하여 MFE를 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 3시간 후 realtime PCR을 이용하여 mRNA 발현을 측정하였다. LPS는 염증성 cytokine들의 생성을 유의성 있게 증가시켰고, 30 $\mu\text{g/ml}$ MFE 전처치는 LPS에 의해 증가한 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 유의성 있게 감소시켰다 (Figure 4).

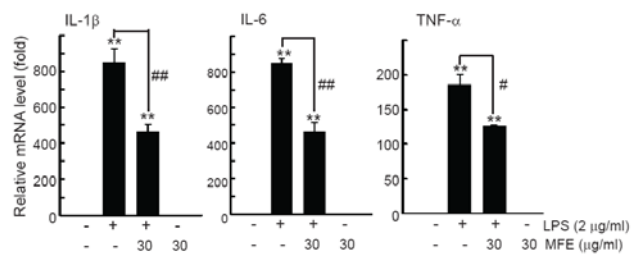


Figure 4. Inhibitory effect of MFE on the LPS-induced mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokines.

Raw 264.7 cells were treated with 30 $\mu\text{g/ml}$ of MFE for 1 h prior to the addition of LPS (2 $\mu\text{g/ml}$), and the cells were further incubated for 3 h. Total RNA was subjected to real-time PCR as described in the Methods section. Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments (significant as compared to control, ** $p < 0.01$, significant as compared to LPS alone, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$).

5. MFE의 p-I- κ B α 및 NF- κ B 단백질 발현 저해

대식세포는 LPS 자극에 의해 I- κ B kinase가 활성화되며 I- κ B α 의 인산화에 의한 분해가 촉진되고, I- κ B α 로부터 유리된 NF- κ B가 핵으로 이동하여 iNOS, COX-2 등을 포함한 염증 매개 유전자의 프로모터에 결합하여 전사를 유도하게 된다¹²⁾. 염증반응에 관여하는 I- κ B α , p-I- κ B α 및 NF- κ B의 단백질 발현 정도를 조사하기 위하여 immunoblot 분석을 이용하여 세포질 내에서 NF- κ B의 억제 단백질인 I- κ B α 와 I- κ B α 의 인산화된 형태인 p-I- κ B α 단백질 발현 및 핵 내에서의 NF- κ B 단백질 발현을 관찰하였다. I- κ B α 의 발현은 LPS에 의해 감소하였고, 30 $\mu\text{g/ml}$ MFE 전처치는 LPS에 의하여 감소된 I- κ B α 단백질의 발현을 유의성 있게 증가시켰다. I- κ B α 의 발현 조절 결과와 마찬가지로 MFE는 LPS에 의해 증가한 I- κ B α 의 인산화를 감소시켰다. 이와 더불어 LPS에 의해 증가하는 NF- κ B의 핵으로의 이동이 10, 30 $\mu\text{g/ml}$ MFE에 의해 농도 의존적으로 억제되었다 (Figure 5). 이 결과는 MFE가 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 NF- κ B 신호 네트워크를 억제할 수 있음을 시사한다.

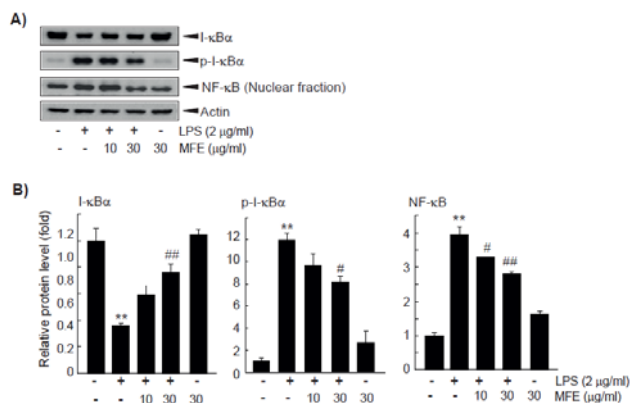


Figure 5. Inhibitory effect of MFE on the LPS-induced p-I- κ B α and NF- κ B protein expressions in RAW 264.7 cells.

The level of I- κ B α protein was monitored 15 min after treatment of cells with LPS (2 $\mu\text{g/ml}$) with or without MFE pretreatment (i.e. 1 h before LPS). The levels of p-I- κ B α and nuclear NF- κ B

protein were monitored 30 min after treatment of cells with LPS (2 μ g/ml) with or without MFE pretreatment (i.e. 1 h before LPS). The actin was used as a loading control (A). The relative levels of I- κ B α , p-I- κ B α and nuclear NF- κ B were measured by scanning densitometry (B). Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments (significant as compared to control, ** $p < 0.01$, significant as compared to LPS alone, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$).

6. MFE의 MAP Kinases 인산화 저해

MAPK는 NF- κ B, AP-1을 포함한 다양한 전사인자들의 serine 및 threonine 잔기에 인산화를 통하여 활성화시키는 핵심 신호전달 분자로 보고되고 있다³⁾. LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 MFE에 의한 MAPK 활성화변화를 측정하기 위하여 인산화된 형태의 p38, p44/42 및 SAPK/JNK 단백질의 발현을 관찰하였다. LPS에 의해 증가하는 3종의 MAPK 인산화가 10, 30 μ g/ml MFE 전처치에 의해 감소하였다 (Figure 6). 이 결과는 MFE가 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 MAPK 신호 네트워크를 억제할 수 있음을 시사한다.

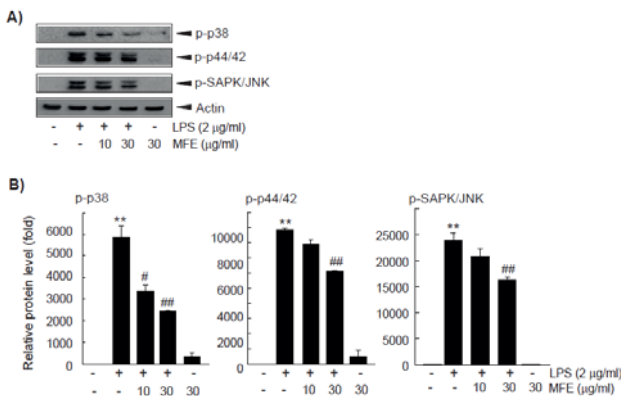


Figure 6. Inhibitory effect of MFE on the LPS-induced MAPK phosphorylations in Raw 264.7 cells. Lysates were prepared from control, 30 min LPS (2 μ g/ml) stimulated cells and LPS plus MFE (10, 30 μ g/ml). Equal amounts of total protein (50 μ g/lane) were separated by SDS-PAGE. Expressions of MAP Kinases protein were determined by immunoblot using specific anti-p-p38, anti-p-p44/42 and anti-p-SAPK/JNK antibodies. The actin was used as a loading control (A). The relative levels of protein bands were measured by scanning densitometry (B). Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments (significant as compared to control, ** $p < 0.01$, significant as compared to LPS alone, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$).

고찰

桑葉은 疏散風熱, 清肺潤燥, 清肝明目하는 효능이 있어, 風溫發熱, 頭痛, 目赤腫痛, 口渴, 肺熱燥咳, 風痹, 隱疹을 치료하는데 최근에는 혈당강하, 혈압강하, 이뇨, 항균, 항부종, 항필라리아병, 항동맥경화, 항우울 등의 효과가 보고되고 있다⁴⁻⁸⁾. 본 연구는 桑葉 에탄올 추출물 (MFE)이 LPS로 활성화된 대식세포에서 나타나는 염증관련 지표들에 미치는 영향을 평가하여, MFE의 항염증 효능을 알아보고자 하였다.

NO는 염증반응을 조절할 수 있는 인자 중 하나로 알려져

있으며 다른 free radical이나 중금속과 쉽게 반응하고 혈관 확장, 신경전달체제, 항균물질, 면역조절 등의 생체 내 작용에 관여하며 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOS)를 경유하여 생성되는 radical로 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 한다. NOS는 크게 constitutive NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS) 두 가지로 분류되는데, cNOS는 신경세포에 존재하는 neuronal constitutive NOS (ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial constitutive NOS (ecNOS)로 나뉘며 주로 혈관확장 및 신경전달물질 (neurotransmission)에 관여하고, cNOS에 의한 NO의 생성은 생체 내 항상성 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹³⁾. iNOS는 면역독성에 관여하여 lipopolysaccharide (LPS), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 (IL-1) 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 다양한 자극에 의해 활성화되고, 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포, 심근세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾. NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나, 생체 내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다^{13,14)}. 따라서 NO 생성을 저해할 수 있는 소재는 septic shock, hemorrhagic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응을 조절할 수 있는 약물로의 개발 가능성이 높아 이에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

RAW 264.7 세포에서 MFE의 NO 생성 저해 정도를 관찰하기 위하여 MFE를 10, 30 μ g/ml의 농도로 세포에 처치하여 생성되는 NO의 양을 측정하였다. 24시간의 LPS는 NO 생성량을 증가시켰으며, MFE는 LPS에 의해 증가된 NO 생성을 유의적으로 저해하였다. LPS로 유도된 NO 생성의 감소가 MFE의 세포독성에 기인한 것인지 평가하기 위하여 MTT assay를 실시한 결과 MFE에 의한 세포 독성은 관찰할 수 없었다. 이와 더불어 MFE에 의한 NO 생성 억제가 NO 생성에 관여하는 iNOS의 발현조절에 기인한 것인지 평가하기 위하여 iNOS의 단백질과 mRNA 발현을 관찰한 결과, 30 μ g/ml MFE에 의해 iNOS의 단백질과 mRNA 발현이 억제되었다. 이상의 결과는 MFE가 LPS에 의해 활성화되는 세포 내 신호분자 및 전사인자의 억제를 통해 전사 수준에서 iNOS 발현을 억제할 수 있음을 시사한다.

COX는 중요한 생물학적 매개체인 prostaglandins, prostacyclin, thromboxanes 등을 포함하는 prostanoids 형성에 관여하는 속도조절 단계 효소이다. COX에는 COX-1과 COX-2가 존재하는데 COX-1은 항상성을 조절하기 위한 prostaglandin 합성에 관여하고 COX-2는 염증반응 부위에서 활성화된 대식세포에 의해 염증반응을 매개하는 prostaglandin 합성에 관여한다. PGE₂는 COX-2 활성화 후에 생성되며 주로 비만세포나 대식세포에 의해 분비된다. 또한 염증부위의 부종, 통증, 감각과민을 초래하는 histamine, bradykinin, NO 등과 더불어 혈관 투과성을 증가시킨다¹⁰⁾. 본 연구에서는 MFE 10, 30 μ g/ml은 LPS에 의해 증가한 PGE₂의 생성을 효과적으로 억제하였으나, MFE alone 역시 PGE₂를 증가시켰다. 이러한 결과는 일부 연구 결과¹⁵⁾에서도 나타나는 현상으로서, 약제가 특이적으로 PEG₂를

유도하는 것인지, 흡광도의 문제인지는 분명하지 않으므로 좀 더 연구가 필요한 것으로 생각된다. MFE에 의한 PGE₂의 생성 저해가 COX-2의 전사단계의 조절에 기인한 것인지 평가하기 위하여 realtime PCR 분석을 이용하여 COX-2의 mRNA 발현을 조사하였다. LPS는 COX-2 mRNA의 발현을 증가시켰으나, 30 µg/ml MFE는 COX-2의 mRNA 발현을 감소시켰다. 이는 LPS와 MFE를 동시에 처치하였을 때 PGE₂의 생성이 저해된 결과와 일치함을 보여주고 있다. 따라서 MFE에 의한 COX-2 mRNA 발현 저해는 PGE₂ 생성 저해와 매우 유사한 경향을 나타냄으로써 PGE₂ 생성 저해는 COX-2 발현 저해를 경유한 것임을 확인할 수 있었다.

대식세포는 IL-1β, IL-6, TNF-α와 같은 cytokine을 생산하여 감염 초기의 생체 방어에서 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다^{1,16}. IL-1β, IL-6, TNF-α 등은 전염증성 cytokine으로 *in vivo* 및 *in vitro*에서 모두 염증반응을 조절하며 서로 간에 상호작용이 있는 것으로 보고되었다¹⁰. 면역반응과 염증반응을 유도하는 염증매개 cytokine인 IL-1β는 다양한 lymphokine을 분비시켜 세포증식과 세포외 기질 축적을 자극하고, IL-6는 숙주방어, 면역반응, 신경세포의 기능 등에서 중요한 기능을 하며, TNF-α는 대식세포나 단핵세포에서 세포의 분화와 성장 등의 기능에 관여한다^{2,11}. 본 연구에서 LPS는 IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, 30 µg/ml MFE는 LPS로 유도된 IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 생성을 유의성 있게 감소시켰다. 따라서 MFE에 의한 IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 생성 저해는 전염증성 cytokine의 생성 저해를 나타내는 것임을 확인할 수 있었다.

NF-κB는 저해 단백질인 I-κBα와 복합체의 형태로 존재되며 불활성화되어 세포질에 존재한다. 염증신호를 포함한 외부자극은 I-κB kinase를 활성화시키고 이에 의해 I-κBα의 N-terminal로부터 serine이 인산화를 시작으로 lysine에 multi-ubiquitination되면서 proteasome에서 분해된다. NF-κB/I-κBα 복합체에서 I-κBα의 분해는 세포질의 NF-κB를 유리하고, 유리된 NF-κB가 핵으로 이동하여, 표적유전자 프로모터에 결합하여 다양한 유전자의 발현을 증가시킨다¹². NF-κB의 활성화는 세포 내 다양한 신호분자의 활성화와 서로 영향을 주고 받으며, NF-κB의 활성화에 영향을 주는 가장 대표적인 신호분자는 MAPK이다¹⁷. MAPK는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 MAPK, c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)/stress-activated protein kinases (SAPK)의 3종의 member가 보고되었으며, JNK의 경우 I-κB kinase의 직접적인 인산화를 통하여 NF-κB 신호 네트워크를 활성화시키는 것으로 보고되었다^{3,18}. 이와 더불어 MAPK는 activator protein-1 (AP-1), activating transcription factor-2, cAMP-responsive element binding protein을 포함한 다양한 전사인자들의 활성화에 관여하는 핵심 신호전달 분자이다³.

본 연구에서 관찰한 iNOS, COX-2, IL-1β, IL-6, TNF-α는 공통적으로 NF-κB와 MAPK 신호 네트워크에 의해 조절받는 대표적인 염증매개 유전자군이다. 따라서 MFE에 의한 염증매개 유전자군의 발현 억제가 NF-κB와 MAPK 신호 네트워크의 제어에 기인한 것인지 평가하기 위하여 NF-

κB와 MAPK 활성을 immunoblot 분석에 의해 관찰하였다. 세포질에서 I-κBα는 LPS 처치에 의하여 감소하였고, 30 µg/ml MFE는 LPS에 의하여 감소된 I-κBα의 발현을 유의성 있게 회복시켰다. 이와 더불어 LPS에 의해 증가한 I-κBα의 인산화와 NF-κB 단백질의 핵으로의 이동을 10, 30 µg/ml MFE는 유의성 있게 억제하였다. 또한 LPS에 의해 증가하는 3종의 MAPK의 인산화가 10, 30 µg/ml MFE에 의해 효과적으로 억제되었다. 이는 MFE가 염증신호에 의해 활성화되는 NF-κB와 MAPK 신호 네트워크의 조절에 의해 염증매개 유전자의 발현을 조절하였음을 시사한다.

桑葉에는 quercetin, rutin, scopoletin, morin 등의 항염 효능을 가진 성분이 함유되어 있는 것으로 보고되었다¹⁹. Quercetin은 대표적인 polyphenol flavonoid 화합물로서 MAPK, NF-κB, STAT-1의 활성억제를 통해 염증매개 유전자의 발현을 억제하는 것으로 보고되었으며²⁰⁻²³, rutin, scopoletin 또한 LPS에 의해 활성화된 NO 및 PGE₂의 생성을 억제할 수 있음이 보고되었다²³⁻²⁵. Morin은 LPS에 의한 NO 생성 억제와 더불어 동물모델에서 폐혈증을 예방하였다²⁶. 따라서 桑葉 에탄올 추출물에 의한 항염증 효능은 추출물 속에 존재하는 항염 효능을 가진 성분과 아직 보고되지 않은 성분들의 복합적 약리작용에 기인한 것으로 판단되며 이에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 이용하여 LPS에 의해 활성화된 염증 매개 유전자와 관련 신호 네트워크의 변화에 桑葉 에탄올 추출물이 미치는 영향을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 桑葉 에탄올 추출물 (MFE)은 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 증가한 NO 생성을 억제하였으며, 사용한 농도 내에서 세포 독성은 관찰되지 않았다.
2. 桑葉 에탄올 추출물은 LPS에 의해 증가한 PGE₂의 생성을 농도 의존적으로 억제하였다.
3. 桑葉 에탄올 추출물은 NO 생성 및 PGE₂ 생성에 관계되는 iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현을 억제하였다.
4. 桑葉 에탄올 추출물은 LPS에 의해 유도된 염증성 Cytokine류들의 mRNA 발현을 억제하였다.
5. 桑葉 에탄올 추출물은 LPS에 의해 활성화된 NF-κB 신호 네트워크와 MAPK의 인산화를 억제하였다.

이러한 桑葉 에탄올 추출물의 항염증 효능은 桑葉을 활용한 염증성 질환의 예방 및 면역치료 약물의 개발 가능성을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 한국연구재단 (No.2011-0030124) 및 대구한의대학교 기린연구비 (2011-901-22)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. Acute and chronic inflammation : Mitchell S. Pathologic basis of disease, 7th ed. Philadelphia : W. B. Saunders Co, 2006 : 47-86.
2. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Innate immunity : Tenney S. Kuby Immunology, 6th ed, New York : Freeman press, 2007 : 52-73.
3. Dong C, Davis RJ, Flavell RA, MAP kinases in the immune response. Annu Rev Immunol, 2002 ; 20 : 55-72.
4. The Korean Medical Dictionary Compilation Committee. The Korean Medical Dictionary, Seoul : Jungdam, 1998 : 727.
5. Kim CM, Shin MG, An DG, Lee KS. The chinese herbal Dictionary, Seoul : Jungdam, 1998 : 2817-21.
6. Sugimoto M, Arai H, Tamura Y, Murayama T, Khaengkhan P, Nishio T, Ono K, Ariyasu H, Akamizu T, Ueda Y, Kita T, Harada S, Kamei K, Yokode M, Mulberry leaf ameliorates the expression profile of adipocytokines by inhibiting oxidative stress in white adipose tissue in db/db mice. Atherosclerosis, 2009 ; 204 : 388-94.
7. Harauma A, Murayama T, Ikeyama K, Sano H, Arai H, Takano R, Kita T, Hara S, Kamei K, Yokode M, Mulberry leaf powder prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Biochem Biophys Res Commun, 2007 ; 358 : 751-6.
8. Sattayasai J, Tiamkao S, Puapairoj P. Biphasic effects of Morus alba leaves green tea extract on mice in chronic forced swimming model. Phytother Res, 2008 ; 22 : 487-92.
9. Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, Lee JR, Cho IJ, Yang CH, Kim SG, Kim SC. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. Br J Pharmacol, 2008 ; 154 : 165-73.
10. Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. Cancer Metastasis Rev, 2007 ; 26 : 525-34.
11. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. Neuropeptides, 2003 ; 37 : 355-61.
12. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. Cell, 1996 ; 78(5) : 773-85.
13. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radic Biol Med, 1998 ; 25 : 434-56.
14. Kubes P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. Gut, 2000 ; 47 : 6-9.
15. Park YK, Min JY, Lee JH. The effect of Methyl Gallate Isolated from *Paeonia suffruticosa* on Inflammatory Response in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. Kor J Herbology, 2009 ; 24 : 181-8.
16. Byun SH, Yang CH, Kim SC. Inhibitory effect of Sctophulariae Radix extract on TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 and Nitric Oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. Kor J Herbology, 2005 ; 20(2) : 7-16.
17. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell Signal, 2001 ; 13 : 85-94.
18. Ki SH, Choi MJ, Lee CH, Kim SG. Galpha12 specifically regulates COX-2 induction by sphingosine 1-phosphate. Role for JNK-dependent ubiquitination and degradation of IkappaBalpha. J Biol Chem, 2007 ; 282 : 1938-47.
19. Doi K, Kojima T, Makino M, Kimura Y, Fujimoto Y. Studies on the constituents of the leaves of Morus alba L. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2001 ; 49 : 151-3.
20. Lee S, Park HS, Notsu Y, Ban HS, Kim YP, Ishihara K, Hirasawa N, Jung SH, Lee YS, Lim SS, Park EH, Shin KH, Seyama T, Hong J, Ohuchi K. Effects of hyperin, isoquercitrin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitrite production in rat peritoneal macrophages. Phytother Res, 2008 ; 22 : 1552-6.
21. Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. Mediators Inflamm, 2007 ; 2007 : 45673.
22. Cho SY, Park SJ, Kwon MJ, Jeong TS, Bok SH, Choi WY, Jeong WI, Ryu SY, Do SH, Lee CS, Song JC, Jeong KS. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. Mol Cell Biochem, 2003 ; 243 : 153-60.
23. Chen YC, Shen SC, Lee WR, Hou WC, Yang LL, Lee TJ. Inhibition of nitric oxide synthase

- inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem*, 2001 ; 82 : 537-48.
24. Kazłowska K, Hsu T, Hou CC, Yang WC, Tsai GJ. Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentata*. *J Ethnopharmacol*. 2010 ; 128 : 123-30.
25. Kim HJ, Jang SI, Kim YJ, Chung HT, Yun YG, Kang TH, Jeong OS, Kim YC. Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE2 from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. *Fitoterapia*. 2004 ; 75 : 261-6.
26. Fang SH, Hou YC, Chang WC, Hsiu SL, Chao PD, Chiang BL. Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock. *Life Sci*. 2003 ; 74 : 743-56.