

황금 물추출물의 당화종말산물로 유도한 THP-1 세포의 염증반응 억제효과

박평범 · 김민준 · 신경호 · 이광규 · 이창현² · 이상룡³ · 하기태¹ · 정한솔^{1*}

우석대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 부산대학교 한의학전문대학원 응용의학부, 2: 우석대학교 한의과대학 해부학교실, 3: 우석대학교 한의과대학 경혈학교실

Anti-inflammatory Effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi Water Extract in the THP-1 Cells Activated by Advanced Glycation End Products

Pyeong Beom Park, Min Jun Kim, Kyoung Ho Shin, Kwang Gyu Lee, Chang Hyun Lee², Sang Ryong Lee³, Ki Tae Ha¹, Han Sol Jeong^{1*}

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Woosuk University,
1: Division of Applied Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University,
2: Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Woosuk University,
3: Department of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Woosuk University

Scutellaria baicalensis Georgi, which has been known to be able to clear away heat and remove dampness, was used for febrile disease. It is now clear that Advanced glycation end products (AGEs) play major roles in the pathogenesis of diabetic complications such as atherosclerosis. In this study, we examined whether *Scutellaria baicalensis* Georgi suppress the AGE mediated inflammatory responses in the THP-1 cells. AGE treatment increased the gene expression of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction and Western blot analysis revealed that *S. baicalensis* had inhibitory effects on the expression of pro-inflammatory genes and protein levels in AGE-treated THP-1 cells. *S. baicalensis* had also reduced the production of ROS in the AGE-treated THP-1 cells. These results suggest that *S. baicalensis* has inhibitory effects for the development of diabetic vascular complication.

Key words : advanced glycation end products, AGE, scutellaria baicalensis georgi, THP-1 cells

서 론

생활패턴의 서구화로 인한 과도한 지방섭취, 운동부족, 스트레스 증가로 인한 대사성질환의 발병률이 크게 늘어나고 있다. 대사성 질환 가운데 당뇨는 꾸준히 증가하여 국민건강에 심각한 위협이 되고 있다^{1,2}. 비만이 당뇨의 발병에 미치는 기전이 온전히 밝혀지지 않았으나, 비만이 인슐린의 저항성을 높이는 것과 이런 배경에는 염증의 유발로 인한 세포 내 스트레스가 주요한 작용을 한다고 보고되고 있다³. 비만은 조직에서 인슐린에 대한 민감성을

현저히 떨어뜨림으로써 인슐린에 대한 저항성을 높인다.

당뇨로 인한 치사율의 증가와 삶의 질 저하에는 당뇨합병증이 큰 자리를 차지하고 있다. 오랜 기간 당뇨를 앓는 환자들은 혈관합병증으로 인해 고통을 받는다. 이러한 합병증의 병리기전에는 동맥경화증이 자리 잡고 있는데, 동맥경화증을 일으키는 기전에도 염증반응이 관여하고 있다^{4,5}. 지속된 고혈당으로 인하여 발생하는 당화종말산물은 수용체인 RAGE와 결합하여 ROS (reactive oxygen species) 생산, 염증성 cytokine 분비 등 염증반응을 증폭하고, 혈관평활근세포의 증식과 세포외기질의 합성을 증가시킴으로써 동맥경화증을 촉발한다^{6,7}.

본 연구팀에서는 이전 연구에서 동의보감 소갈문에 수록되어 있는 황금탕이 당화종말산물로 유발시킨 THP-1세포의 염증

* 교신저자 : 정한솔, 경남 양산시 물금읍 부산대학교 한의학전문대학원

· E-mail : jhsol33@pusan.ac.kr, · Tel : 051-510-8461

· 접수 : 2012/05/02 · 수정 : 2012/06/11 · 채택 : 2012/06/16

반응을 억제함을 보고하였다⁹⁾. 이 가운데 황금은 주요 구성 약물로서, 性味가 苦辛寒하며, 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 止血安胎하는 효능을 지니고 있으며, 여러 염증성 질환에 응용되어 왔다^{9,10)}.

본 연구에서는 황금이 AGE 매개성 염증반응에 대한 억제 효과가 있는지 관찰하였다. 黃芩의 free radical 제거 능력을 관찰하였고, 인위적 AGE 산물인 maillard reaction products (MRP)를 단핵세포주인 THP-1 세포에 처리하여 염증반응을 유도시켜 양성대조군을 삼은 후 黃芩 물 추출물을 처리한 실험군에서 양성 대조군에 비해 어느 정도의 염증 억제 효과가 있는지 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

Human monocyte cell line인 THP-1 세포주 (KCNB40202)와 mouse macrophage cell line인 RAW 264.7 세포주 (KCNB40071)는 한국 세포주은행으로부터 분양받았다. 세포배양에 사용된 RPMI1640, DMEM medium과 fetal bovine serum (FBS), penicillin 및 streptomycin은 Gibco BRL (GRAND Island, NY, USA)제품을 사용하였다. 실험에 사용한 세포주는 10 % FBS, 100 unit/mL의 penicillin 및 streptomycin을 포함하는 배지에 분주하여 포화상태 공기조건에서 배양하였다. 배양 후 수거한 세포를 tryphan blue로 염색하고 세포계수기 (Hematocytometry, German)를 이용하여 세포를 계수하여 세포밀도 2×10^6 cell/mL이 되게 하여 6 well plate에 배양하였다.

2. 한약재 추출

본 실험에 사용한 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi; 이하 HG)은 우석대학교 본초학교실로부터 공급받아 사용하였고, HG 100 g을 증류수 500 mL로 2회 가열 추출한 후, 여과해서 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조하여 분말 8.4 g (회수율 8.4%)을 얻어 phosphate buffered saline (PBS)에 용해시켜 사용하였다.

3. 항산화 활성 검색

HG의 항산화 활성은 Blois의 방법을 변형하여 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능으로 측정하였다. 안정한 자유 라디칼인 라디칼이 HG와의 반응에 의하여 감소하는 정도를 측정하여 간접적으로 HG의 항산화활성을 측정하였다. 에탄올 3 mL에 DPPH 800 μ l (0.4 mM /EtOH)를 첨가한 후 각 시료 200 μ l를 농도별로 조제하여 vortex하여 10 분 동안 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 기존에 알려진 항산화제인 BHT를 표준시료로 하여 항산화 활성을 관찰하였다. DPPH 라디칼 소거능 = $[1 - \text{시료 흡광도} / \text{대조군 흡광도}] \times 100(\%)$

4. 인위적 당화종말산물(Advanced glycation end products; AGEs)인 MRP의 생성

인위적인 당화종말산물을 생성하기 위하여 D-ribose와

L-lysine을 이용하였다. 500 mM의 D-ribose와 L-Lysine를 동량으로 121°C에서 10 시간 동안 반응하여 인위적 당화종말산물인 maillard reaction products (MRP)를 생성하였다. MRP는 사용전에 pH 8.0으로 맞추고 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 실험에 사용하였다.

5. 세포독성반응 측정

Mitochondrial dehydrogenase activity를 나타내는 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric reduction assay를 수행하여 실험에 사용한 한약재 추출액이 세포의 생존에 미치는 효과를 Mosmann¹¹⁾이 보고한 방법에 따라 측정하였다. THP-1세포를 96 well plate에 well 당 1×10^5 cells 밀도로 분주한 후 HG를 농도별(0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/mL)로 처리하여 37°C, 5% CO₂, 습도 100% 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 새로운 배지로 교환하여 4 시간 동안 배양한 후 PBS에 용해한 MTT(1 mg/mL)용액 50 μ l/mL를 각 well에 넣고 3 시간 동안 배양하였다. 그런 다음 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide (DMSO)를 200 μ l/well씩 넣어 MTT-formazan을 용해하여 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 확인하였다.

6. 세포내 ROS 생성 측정

세포 내 ROS는 형광 표지자인 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)를 사용하여 측정하였다. DCFH-DA는 쉽게 세포막을 뚫고 세포 안으로 확산되어 세포 안의 에스테라아제에 의해 형광을 잃은 DCFH로 가수분해되고, 이 후 ROS가 존재하는 환경에서 높은 형광을 띄는 DCF로 빠르게 산화된다. 따라서 DCF의 형광 강도는 세포 안의 ROS의 양과 비례한다. 우선 세포를 1×10^6 cells/mL의 농도로 PBSG (1 g Glucose/ 1 l PBS)에 부유시켜 96-well plate에 분주하였다. HG를 농도별로 선 처리(0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/mL)한 후 30 분 동안 incubation하였고, MRP와 DCFH-DA를 각각 10 mM, 125 μ M의 농도로 처리한 후 15 분 단위로 측정하였다. DCF 형광도는 excitation 485 nm, emission 530 nm의 파장에서 Wallac 1420 VICTOR3 multilabel counter (PerkinElmer Life Science, Turku, Finland)로 측정하였다.

7. LPS에 의한 nitric oxide(NO)생성 저해

Raw 264.7 세포를 10 % FBS-DMEM으로 1×10^6 cell/mL로 한 다음 12well plate의 well에 well당 1 mL 씩 가하여 4 시간 동안 배양하여 부착시켰다. 이후 lipopolysaccharide (LPS) 1 μ g/mL을 함유한 배지로 교환한 후 HG를 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 상층액을 회수하여 96well plate에 well 당 배양액 100 μ l 씩 넣고 Griess 시약을 100 μ l 씩 가한 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NaNO₂를 표준품으로 하여 검광선을 작성하여 각 시료를 처리한 배양액 중의 NO생성량을 구한 다음 그 값으로부터 각 시료 처리군에서의 저해 활성을 측정하였다.

% 억제율 = [1-(시료처리군의 NO량/용매처리 대조군의 NO량)]×100

8. RT-PCR

Total RNA는 Trizol reagent를 이용하였으며 제조회사의 방법에 준하였다. cDNA는 AMV reverse transcriptase와 oligo(dT)를 primer로 이용하여 합성하였고, Taq DNA polymerase를 이용하여 Perkin Elmer 2400 thermocycler에서 30 cycle을 증폭시켰다. 각각의 cycle은 94℃에서 30 초 동안 denaturation 시킨 후, primer에 따라 48-56℃에서 30 초 동안 annealing 시키고, 72℃에서 45 초 동안 extension시켰다. PCR product는 1 % agarose gel에서 전기영동하였고, ethidium bromide로 염색을 한 후 Gel Doc(Bio-Rad, USA)을 사용하여 관찰하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 1과 같다.

Table 1. Sequence of primer used for RT-PCR.

Target gene	PCR primer sequence(5' to 3')	PCR product(bp)
TNF-α	sense 5'-GTAGACACGAGGCTGCCTGA-3'	517
	antisense 5'-GGCCACAGGAAAAGCTAACC-3'	
IL-1β	sense 5'-CTCTCTCACCTCTCTACTAC-3'	807
	antisense 5'-ACACTGCTACTTCTTGCCCC-3'	
MCP-1	sense 5'-CAAAGTGAAGCTCGCACTC-3'	239
	antisense 5'-CATTTCCACAATAATATTTAG-3'	
COX-2	sense 5'-ATCTACCCTCCTCAAGCTCC-3'	708
	antisense 5'-TACCAGAAGGCAGGATACA-3'	

9. 단백질 정량 및 Western blot analysis

MRP를 30 분 동안 처리한 THP-1 세포에 각각 0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml의 농도의 HG를 24 시간 동안 반응시킨 후 수집하여 PBS로 washing하고 lysis buffer (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 100 μg/ml PMSF, 10 μg/ml leupeptin, 1%NP-40)를 사용하여 30 분 동안 얼음에 둔 다음 pipetting으로 용해시켰다. 원심분리한 후 상층액을 얻어서 Bradford reagent를 이용하여 단백질을 정량하였고, 전체 lysate 30 μg/lane을 기준으로 12 % SDS PAGE gel에 loading하였다. 전기영동이 끝난 젤의 단백질을 PVDF membrane으로 230 mA에서 1 시간 동안 transfer하였고, 5 % skim milk를 이용하여 1 시간 동안 blocking하였다. 1차 항체는 mouse monoclonal anti-RAGE antibody(1:500 dilution), rabbit polyclonal anti-COX-2 antibody(1: 1000 dilution), mouse monoclonal anti-NFκB antibody(1: 1000 dilution), rabbit polyclonal anti-IκB antibody(1: 1000 dilution)를 3 % BSA/PBS에 희석, 4℃에서 overnight 하여 반응시켰다. 2차 항체는 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 anti-goat IgG를 1: 10000으로 5 % skim milk에 희석하여, 실온에서 1 시간 동안 반응시키고 ECL을 이용하여 band를 확인하였다.

10. 통계처리

실험 자료들은 SPSS 프로그램(v. 9.0)을 이용하여 통계처리하였다. 3회 반복한 실험결과와 평균과 표준편차로 표시하고, 분산분석으로 유의성을 검정하며, a=0.05 수준에서 ANOVA를 실시하여 분석하였다.

결 과

1. Free Radical 소거능

HG의 항산화 활성에 대해 알아보기로 DPPH radical 방법에 준하여 시험관내에서 라디칼 소거능을 측정하였다. HG를 0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml 농도에서 라디칼 소거능을 측정한 결과 처리농도가 증가함에 농도의존적으로 항산화 활성도 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

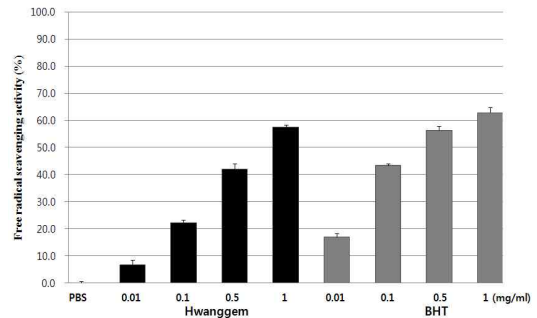


Fig. 1. Antioxidant effect of Hwanggem (HG) by DPPH radical scavenging assay. DPPH radical was significantly erased by treatment of HG in a dose dependant manner.

2. 세포 생존율에 미치는 효과

THP-1세포 배양계를 통한 실험에서 HG를 각각 0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml의 농도로 24 시간 동안 처리한 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 확인한 결과 미처리군과 비교하였을 때 모든 농도의 처리군에서 특별한 세포독성이 관찰되지 않았다(Fig. 2).

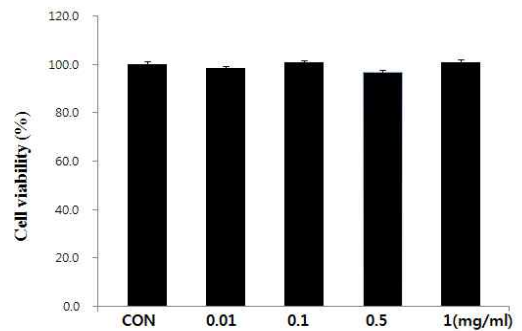


Fig. 2. Cytotoxic effect of HG on THP-1 cells. Treatment with HG resulted in no significant effect on the viability of THP-1 human monocyte cells. Cells were treated with 0.01~1 mg/mL HG for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay.

3. LPS에 의한 nitric oxide(NO)생성 저해

RAW264.7세포를 10% FBS-DMEM으로 1×10⁶ cells/ml로 한 다음 12 well plate의 well에 well당 1 ml 씩 가하여 4 시간 동안 배양하여 부착시켰다. 이후 LPS 1 μg/ml을 함유한 배지로 교환한 후 HG를 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 상층액을 회수하여 96 well plate에 well 당 배양액 100 μl 씩 넣고 Griess 시약을 100 μl 씩 가한 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한 결과 HG처리군에서 농도의존적으로 NO의 생

성량이 감소되었다(Fig. 3).

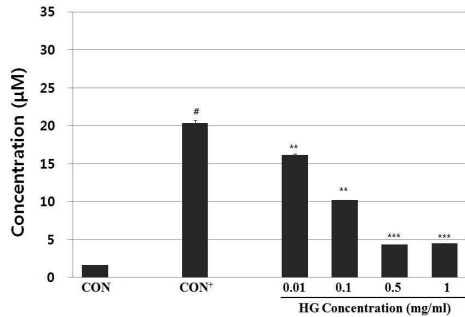


Fig. 3. Inhibitory effects of HG on LPS-induced nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with LPS (1 µg/ml) and sample, dissolved in PBS at the indicated concentrations. After 24h the nitric oxide levels were measured through the Griess reaction in culture medium. All values represent mean ± SDM of triplicate determinations relative to control groups. #p<0.01, **p<0.05, ***p<0.01.

4. MRP에 의한 세포 내 reactive oxygen species(ROS) 생성억제
THP-1세포에 MRP를 처리하여 양성대조군을 만들었고(lane 2), 여기에 0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml 농도의 HG를 처리 한 후 시간 별로 세포내 ROS의 형성을 살펴보았다. 그 결과 처리군에서 농도의존적으로 세포내 ROS의 생성을 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

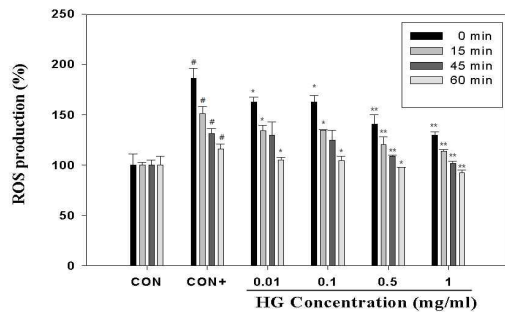


Fig. 4. Effects of HG on intercellular ROS generation. Cells were pretreated with indicated concentration of HG (0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml) for 30 min, followed by MRP (10 mM) and DCFH-DA. We measure the fluorescence intensity which means the intracellular amount of ROS. Significant reduction of ROS was observed after the HG treatment. Values shown are mean ± SD of multiple independent experiments. #P < 0.05 vs. ; * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. MRP alone.

5. MRP처리에 의한 염증성 cytokine mRNA 발현

THP-1세포에 10 mM의 MRP를 30 분 동안 처리하여 양성대조군을 만들었고, 여기에 각각 0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml의 HG를 4 시간 동안 처리 한 후 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 염증성 cytokine인 TNF-α, IL-1β mRNA의 발현이 HG처리군에서 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 5). 또한 백혈구 유주인자로 알려진 MCP-1의 mRNA 발현 역시 농도의존적으로 실험군에서 감소한 것을 확인할 수 있었고, COX-2의 mRNA 발현 역시 0.1 mg/ml 이상에서 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 5).

6. MRP처리에 의한 염증매개 단백질 발현

THP-1세포에 10 mM의 MRP를 30 분 동안 처리하여 양성대조군을 만들었고, 여기에 각각 0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml의 HG를 24 시간 동안 처리 한 후 Western blot analysis를 시행하였다. 그 결과 RAGE와 COX-2 단백질의 발현과 핵 내 NF-κB 전사인자가 처리군에서 농도의존적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

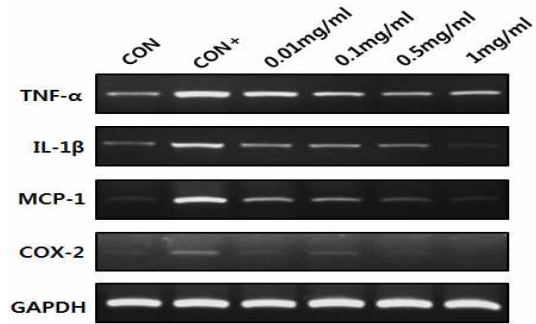


Fig. 5. Effects of HG on the expression of pro-inflammatory cytokine mRNA. We activated THP-1 cells by using MRP (10 mM), then treated indicated amount of HG (0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml) for 4h. Treatment of HG reduced the expression of TNF-α, IL-1β, MCP-1, and COX-2 mRNA. The figure shows ethidium bromide stained agarose gels of RT-PCR product.

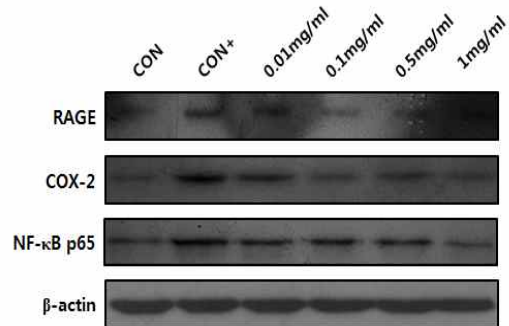


Fig. 6. Effect of HG on the expression of inflammatory mediators in THP-1cells stimulated by AGE. THP-1 cells were activated by MRP. Then cells were treated with indicated amount of HG (0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml) for 24h. RAGE and COX-2 protein expression was inhibited by treatment of HG dose dependent manner. Nucleic NF-κB expression was increased by MRP; however, these pattern was reversed by treatment of HG. This experiment has been repeated three times with similar observations.

고 찰

2000년 WHO의 보고에 따르면 전세계적으로 적어도 1억 7천만명이 당뇨병으로 고통받고 있으며, 발생률은 빠르게 증가하여 2030년이 되면 당뇨병환자의 수는 두 배에 이를 것으로 보았다¹²⁾. 당뇨의 발생률이 빠르게 증가하는 데는 비만을 유도하는 서구적인 생활양식으로서의 변화가 자리잡고 있다. 오랜 기간 당뇨를 앓게 되면 심혈관질환, 만성신장질환, 실명을 유도할 수 있는 망막손상, 신경손상, 혈관손상으로 인한 상처치유의 지연 등의 심각한 합병증이 발생하게 되는데 이러한 합병증에는 동맥경화증이 중추적 역할을 담당 하고 있다. 당뇨로 인한 죽상동맥경화증의 발병은 지속되는 고혈당, 고지혈증^{13,14)}, 및 동맥의 만성염증반응, 산화와 관련되어지는 당화종말산물의 축적으로 더욱 심화되는 것으로 알려져 있다^{15,16)}.

당뇨의 합병증은 대개 고혈당으로 인한 대사기능의 교란 결과로 생겨난다. 오랜 기간 당뇨병을 앓았을 때 지속되는 고혈당의 상태는 비효소적 당화를 일으킨다. 혈액과 세포 내의 당 농도가 증가되면 효소의 도움이 없이 당의 카르보닐기가 단백질의 아미노기에 화학적으로 달라붙게 된다. 이런 반응을 거쳐 당과 단백질의 복합체인 최종당화산물(advanced glycation end products, AGE)이 형성된다¹⁷. AGE는 일생동안 혈관벽에 축적되고, 혈관벽의 아교질과 같은 단백질에 형성된 AGE는 펩타이드 사이에 교차 결합을 일으켜 큰 혈관에서 저밀도지단백과 같은 혈장단백질을 잡아 혈관내벽에 축적시킨다^{18,19}. 또한 혈관내피세포나 대식세포 표면의 AGE 수용체(RAGE)와 결합하여 대식세포로부터 각종 cytokine들과 성장인자들을 분비하도록 하며, 세포내 산화스트레스를 일으키고 유리의 활성화를 초래하여 만성적인 염증을 유도함으로써 동맥경화증을 가속화시킨다²⁰.

비만은 제 2형 당뇨병의 발병에 중요한 원인 인자이다. 인슐린에 대한 조직의 저항성을 높이는데 있어서 비만이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 앞서 서술한 바와 같이 비만은 만성 염증상태와 연결되어 있다. 인슐린은 세포의 표면에 존재하는 수용체와 결합함으로써 작용을 한다. 인슐린 수용체가 인슐린과 결합하게 되면 자신과 여러 기질들을 인산화시킴으로써 신호를 전달해 나간다^{21,22}. 그런데 비만이나 염증성 신호전달 기전은 인슐린의 수용체를 통한 신호전달기전에 교란을 일으켜 조직의 인슐린 저항성을 유도한다. 가령 세포가 TNF- α 나 고농도의 지방산에 노출되면 insulin receptor substrate(IRS)의 인산화를 억제시킴으로써 인슐린 신호전달체계를 억제한다^{23,24}. 또한 비만은 세포내의 세포질세망(ER)의 기능에 과중한 부담을 줌으로써 염증성 신호전달체계를 활성화시키게 되고, 이로 인하여 인슐린의 저항성을 높이는 것으로 알려졌다^{25,26}.

이와 같이 염증은 당뇨의 발병과 고혈당으로 인한 당뇨의 합병증에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있다. 따라서 염증을 억제함으로써 인슐린 저항성을 낮출 뿐 아니라 당뇨 합병증을 일으키는 데 주요한 역할을 하는 동맥경화의 기전을 차단할 수 있을 것을 기대하여 항염에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다.

우리 연구팀에서는 동의보감의 소갈문에 기재된 황금당이 AGE로 유도한 염증반응을 억제하였음을 보고한 바 있다⁸. 이 가운데 주요한 약물인 Hwanggeum(HG)는 性味가 苦辛寒하며, 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 止血安胎하는 효능을 지니고 있으며, 여러 염증성 질환에 응용되어 왔다^{9,10}. 또한 많은 연구에서 HG는 항산화, 항균, 항염, 항종양, 항알레르기의 효능을 지니는 것으로 보고되었으며^{27,28}, HG에서 추출한 flavonoid 성분들의 항염, 항암, 항균, 항바이러스, 항혈전의 효능들이 보고되고 있다²⁹. 이에 본 연구에서는 황금당의 주요 약물인 HG의 물 추출물이 AGE로 유발한 염증반응을 얼마나 효과적으로 차단할 수 있는지 관찰하였다.

자유라디칼 특히 활성산소는 생체 내외의 산화·환원 반응 및 자외선, 방사선 등에 의해 생성되어지며 지방산화와 DNA손상 및 단백질 변성 등을 초래하여 동맥경화, 심혈관질환, 당뇨 및 암 등을 유발하는 것으로 알려져 있다^{30,31}. 본 연구에서는 우선 HG의 자유라디칼 제거능력을 관찰하고자 DPPH라디칼 소거능

실험을 하였다. DPPH 라디칼은 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 라디칼로서 항산화성분에 의해 환원되면 짙은 자색이 탈색된다³². 대표적인 합성 free radical inhibitor인 BHT를 양성대조군으로 삼았으며, HG처리군에서 라디칼 소거능이 농도의존적으로 증가함을 관찰하였다(Fig. 1). 또한 MTT assay를 통하여 세포생존율에 미치는 영향을 살펴본 결과 모든 농도의 처리군에서 특별한 세포독성이 관찰되지 않았다(Fig. 2).

NO는 가스상 신호전달물질로서 표적세포내의 특별한 단백질의 활성을 직접 조절한다³³. 만성적인 NO의 발현은 다양한 압중과 염증성 질환과 연관되어 있다³⁴. NO는 염증반응의 과정 중에 대식세포나 호중구와 같은 식세포에 의해 만들어진다. 식세포 안에는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)가 존재하는데 이들은 염증반응의 중요한 매개체인 TNF나 IFN- γ 에 의해 활성화된다. IKK β - NF- κ B 에 의해 발현이 조절되는 iNOS는³⁵ 다양한 염증성 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 공복시 고혈당과 인슐린 저항상태에서의 iNOS의 역할이 보고되었다³⁶. 또한 iNOS에 의하여 생산된 고농도의 NO는 동맥경화의 발전에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다³⁷. 본 실험에서는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 HG의 처리에 따라 LPS로 유도시킨 iNOS의 발현으로 생성되는 NO의 양이 농도의존적으로 감소되었다.

Maillard reaction에 의하여 비효소적으로 만들어지는 당화종말산물(AGE)은 당뇨병환자의 조직에서 발견되며, 이들의 축적은 당뇨병성 미세혈관병변에 영향을 끼친다³⁸. 과도한 reactive oxygen species(ROS)의 생성은 산화적 스트레스를 야기시키며³⁹, 자유라디칼에 의한 산화적 손상은 동맥경화나 당뇨와 같은 다양한 질병과 밀접하게 연관되어 있다⁴⁰. 본 실험에서는 당화종말산물인 MRP를 10 mM의 농도로 처리한 결과 THP-1 세포내 ROS의 양이 증가됨을 관찰하였다. 농도별로 HG를 30분간 미리 반응시킨 실험군에 MRP를 처리한 후 세포내 ROS생성의 양을 측정한 결과 모든 농도의 HG처리군에서 ROS의 생성이 감소되었다(Fig. 4). 이러한 HG의 항산화능력은 세포내에서 염증 발현시 증가되는 산화스트레스에 대해 효과적인 방어를 할 수 있을 것으로 사료된다.

대식세포에서 분비하는 TNF- α , IL-1는 대표적인 염증성 cytokine이다. MRP를 처리한 양성대조군에서 TNF- α 와 IL-1의 mRNA 발현이 증가한 반면 HG를 처리한 실험군에서는 처리한 모든 농도에서 TNF- α 와 IL-1의 mRNA 발현이 감소되었다(Fig. 5). 단핵세포에 대한 화학주성효과를 가지고 있어서 급만성 염증에 주요한 역할을 담당하는 것으로 생각되는 MCP-1⁴¹은 MRP를 처리한 양성 대조군에서 유의성 있게 증가되었으며, 실험군에서는 농도의존적으로 감소됨을 관찰하였다(Fig. 5). 이러한 결과를 살펴볼 때 HG는 MCP-1 mRNA 발현을 억제시킴으로써 단핵구에 대한 화학주성을 조절하는데 일정한 역할을 갖고 있음을 알 수 있었다.

Cyclooxygenase(COX)는 프로스타글란딘을 합성하는 효소로 두 가지 유형이 존재한다. COX-1이 위, 콩팥, 혈소판 등의 조직에서 항상성을 유지시키며 지속적으로 발현하면서 프로스타글

란딘을 생산하는 효소인 반면, COX-2는 정상조직에서는 낮게 발현되다가 조직손상이나 염증반응시 짧은 시간동안 유도되어 염증성 프로스타글란딘을 생산해 내는 효소이다⁴²⁾. COX-2는 동맥경화의 병리과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며⁴³⁾, 제 1형 당뇨와 연관된 도세포의 기능부전에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다⁴⁴⁾. 본 연구에서는 MRP로 유도된 COX-2 mRNA와 단백질 발현을 HG처리 실험군에서 현저히 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5, 6). 실험군에서의 COX-2 mRNA와 단백질 발현의 감소는 염증반응의 중요한 매개체인 프로스타글란딘의 생성을 억제함으로써 염증반응을 억제하는 효과가 있음을 시사하는 것이다.

당화종말산물(advanced glycation end products; AGE)은 당뇨병성 신병증을 포함한 당뇨의 수많은 합병증과 밀접히 연관되어 있다⁴⁵⁾. AGE는 교차결합을 형성하거나 수용체와 결합하면서 세포의 산화적 스트레스를 촉진시키거나 면역체계에서 중요한 세포들을 활성화시킨다⁴⁶⁾. AGE는 이에 대한 대표적인 수용체인 RAGE과 결합하게 되면 NF-κB, p38, MAP kinase 등을 포함하는 많은 신호전달체계를 활성화시켜 염증반응을 촉진시키는 것으로 알려져 있다^{47,48)}. 본 실험에서는 당화종말산물인 MRP를 처리한 결과 RAGE 단백질의 발현이 증가됨을 확인하였고, HG 처리 실험군에서는 RAGE의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6). AGE로 자극한 후 RAGE 단백질 발현이 증가되었다는 것은 이 경로를 통하여 염증반응을 증폭시키는 것으로 사료되며, HG처리 결과 RAGE의 발현이 감소되었다는 것은 AGE와 RAGE와의 결합을 억제하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

NF-κB는 자연면역과 염증반응에 있어서 중심적인 역할을 담당하는 조절단백이다. 다양한 세포표면의 수용체들이 NF-κB signaling pathway를 활성화시키는데, 앞에서 언급한 RAGE 뿐만 아니라 대표적인 염증성 cytoine인 TNF-α나 IL-1의 수용체는 리간드와 결합하게 되면 NF-κB의 signaling pathway를 활성화시켜 염증반응을 증폭하는 것으로 알려져 있다^{49,50)}. NF-κB는 정상시 세포질의 억제단백질인 IκB와 결합되어 있다가 활성화가 될 경우 억제단백으로부터 떨어져 나와 세포질로부터 핵으로 들어간 후 염증반응에 관여하는 수많은 유전자들의 전사를 유도한다⁵¹⁾. NF-κB의 지속적인 활성화는 당뇨와 그 합병증과 같은 만성 염증성 상황을 야기시키는데 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다⁵²⁾. 본 실험에서는 MRP의 처리로 핵 내의 NF-κB 단백질 발현이 증가함을 확인하였고, 여기에 HG를 농도별로 처리한 결과 NF-κB는 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

결론적으로 본 연구에서는 HG의 DPPH라디칼 제거능력과 ROS와 같은 산소유래 자유라디칼, NO 라디칼에 대한 제거능력이 있음을 관찰할 수 있었다. AGE인 MRP를 단핵세포주인 THP-1 세포에 처리한 결과 TNF-α, IL-1β와 같은 염증성 cytokine, 화학주성인자인 MCP-1, 염증반응에서 증가하는 효소인 COX-2의 mRNA 발현이 증가하였고, AGE에 대한 수용체인 RAGE를 비롯한 COX-2, NF-κB의 단백질 발현 또한 증가하여 MRP가 THP-1 세포에 염증성 반응을 야기함을 확인할 수 있었다. 또 여기에 HG를 처리한 결과 전술한 염증성 인자의 발현을

억제함을 확인할 수 있었다.

결 론

황금은 DPPH radical 소거능 검사 결과 항산화활성을 보유하고 있었고, 세포독성을 보이지 않았다. 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포에 LPS를 처리하여 유도한 NO의 생성을 실험군에서는 농도의존적으로 억제하였으며, AGE로 활성화시킨 THP-1 세포 내의 ROS 생성을 억제하였다. 뿐만 아니라 AGE로 활성화시킨 THP-1 세포에서 과발현된 염증성 사이토카인인 TNF-α과 IL-1β, 화학주성인자인 MCP-1, 염증매개효소인 COX-2의 mRNA 발현을 억제시켰고, RAGE, COX-2, NF-κB의 단백질 발현을 감소시켰다.

이상의 결과 황금은 인위적으로 고혈당의 상황에서 동맥경화증의 합병증의 유발에 주요한 역할을 하는 AGE매개성 염증반응을 억제하였다.

감사의 글

본 연구는 2010학년도 부산대학교 교내학술연구비(신임교수 연구정착금)에 의한 연구임.

참고문헌

- Hu, F.B., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C.G., Willett, W.C. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med.* 345: 790-797, 2001.
- Zimmet, P., Alberti, K.G., Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 414: 782-787, 2001.
- Kahn, S.E., Hull, R.L., Utzschneider, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 444: 840-846, 2006.
- Kathryn, E., Wellen, Gökhan, S. Hotamisligil. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 115(5):1111-1119, 2005.
- Schmidt, M.I., Saad, M.J.A., Duncan, B.B. Subclinical inflammation and obesity, diabetes and related disorders. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.* 3(3):307-312, 2005.
- Harja, E., Bu, D.X., Hudson, B., Chang, J.S., Shen, X., Hallam, K., et al. Vascular and inflammatory stress mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE-/-mice. *J Clin Invest.* 118: 183-191, 2008.
- Yamamoto, Y., Kato, I., Doi, T., Yonekura, H., Ohashi, S., Takeuchi, M., Watanabe, T., Yamagishi, S., Sakurai, S., Takasawa, S., Okamoto, H., Yamamoto, H. Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in

- RAGE-overexpressing mice. *J Clin Invest* 108: 261-268, 2001.
8. Jeong, S.H., Lee, K.G., Lee, C.H., Lee, S.R., Kim, J.E., Ha, K.T., Shin, S.W., Jeong, H.S. Effects of Hwanggeum-tang water extract on the expression of pro-inflammatory response elicited by advanced glycation end products in THP-1 cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 26(2):147-154, 2012.
 9. 전국한의과대학본초학교수 공편. 本草學, 서울, 도서출판 영림사. pp 178-179, 1992.
 10. 楊艷, 梁日欣, 楊濱, 王怡薇, 王嵐, 王彥禮. 黃芩 등5種中藥提物的抗脂質過氧化作用研究. *中國實驗方劑學雜誌*. 15(9):46-48, 2009.
 11. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods*. 65: 55-63, 1983.
 12. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(5):1047-1053, 2004.
 13. Ruderman, N., Williamson, J.R., Brownlee, M. Glucose and diabetic vascular disease. *FASEB J*. 6: 2905-2914, 1992.
 14. Pugliese, G., Tilton, R.G., Williamson, J.R. Glucose-induced metabolic imbalances in the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabete Metab Rev*. 7: 35-59, 1991.
 15. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 414: 813-820, 2001.
 16. Brownlee, M., Cerami, A., Vlassara, H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 318: 1315-1321, 1988.
 17. Bucala, R., Cerami, A., Vlassara, H. Advanced glycosylation end products in diabetic complications. *Diabetes Rev*. 3: 258-268, 1995.
 18. Vlassara, H. Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes*. 46(2):S19-S25, 1997.
 19. Bierhaus, A., Hofmann, M.A., Ziegler, R., Nawroth, P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res*. 37: 586-600, 1998.
 20. Chappy, O., Dosquet, C., Wautier, M.P., Wautier, J.L. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest*. 27: 97-108, 1997.
 21. White, M.F. The insulin signaling system and the IRS protein. *Diabetologia*. 40: S2-S17, 1997.
 22. Saltiel, A.R., Pessin, J.E. Insulin signaling pathway in time and space. *Trends Cell Biol*. 12: 65-71, 2002.
 23. Yin, M.J., Yamamoto, Y., Gaynor, R.B. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature*. 396: 77-80, 1998.
 24. Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., White, M.F. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J. Biol. Chem*. 275: 9047-9054, 2000.
 25. Özcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Özdelen, E., et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 306: 457-461, 2004.
 26. Nakatani, Y., Kaneto, H., Kawamori, D., Yoshiuchi, K., Hatazaki, M., Matsuoka, T., et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J. Biol. Chem*. 280: 847-851, 2005.
 27. Martin, J., Dusek, J. The Baikal scullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi)-a potential source of new drugs. *Ceska Slov Farm*. 51(6):277-283, 2002.
 28. Broncel, M. Antiatherosclerotic properties of flavones from the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Wiad Lek*. 60(5-6):294-297, 2007.
 29. Kowalczyk, E., Krzesiński, P., Kura, M., Niedworok, J., Kowalski, J., Błaszczak, J. Pharmacological effects of flavonoids from *scutellaria baicalensis*. *Przegl Lek*. 63(2):95-96, 2006.
 30. Ames, N.B., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 90: 7915-7922, 1993.
 31. Cerutti, P.A., Trump, B.F. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells*. 3: 1-7, 1991.
 32. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use a stable free radicals. *Nature*. 26: 1191-1204, 1958.
 33. Hou, Y.C., Janczuk, A., Wang, P.G. Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr. Pharm. Des*. 5(6):417-471, 1999.
 34. Tylor, B.S., Kion, Y.M., Wang, Q.I., Sharpio, R.A., Billiar, T.R., Geller, D.A. Nitric oxide down regulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression. *Arch. Surg*. 1(32):1177-1182, 1997.
 35. Xie, Q.W., Kashiwabara, Y., Nathan, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 269: 4705-4708, 1994.
 36. Hiroki, S., Masao, K., Eriko, T., Michiko, S., Chieko, K., Shingo, Y., et al. Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282: 386-394, 2002.
 37. Esaki, T., Hayashi, T., Muto, E., Yamada, K., Kuzuya, M., Iguchi, A. Expression of inducible nitric oxide synthase in

- T lymphocytes and macrophages of cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*. 128: 39-46, 1997.
38. Schleicher, E.D., Wagner, E., Nerlich, A.G. Increased accumulation of glycoxidation product Nε-(carboxymethyl)lysine in human tissue in diabetes and aging. *J Clin Invest*. 99: 457-468, 1997.
39. Maxwell, S.R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. 49: 345-361, 1995.
40. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed. Oxford, Clarendon Press. pp 416-494, 1989.
41. Gu, L., Tseng, S.C., Rollins, B.J. Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem Immunol*. 72: 7-29, 1999.
42. Langenbach, R., Morham, S.G., Tian, H.F., Loftin, C.D., Ghanayem, B.I., Chulada, P.C., et al. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell*. 83: 483-492, 1995.
43. Inoue, H., Umesono, K., Nishimori, T., Hirata, T., Tanabe, T. Glucocorticoid-mediated suppression of the promoter activity of the cyclooxygenase-2 gene is modulated by expression of its receptor in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 254: 292-298, 1999.
44. Tabatabaie, T., Vasquez-Weldon, A., Moore, D.R., Kotake, Y. Free Radicals and the Pathogenesis of Type 1 Diabetes: beta-Cell Cytokine-Mediated Free Radical Generation Via Cyclooxygenase-2. *Diabetes*. 52: 1994-1999, 2003.
45. Skata, N., Uesugi, N., Takebayashi, S., Nagai, R., Jono, T., Horiuchi, S., et al. Glycoxidation and lipid peroxidation of low-density lipoprotein can synergistically enhance atherogenesis. *Cardiovasc Res* 49: 466-475, 2001.
46. Imani, F., Horii, Y., Suthanthiran, M., Skolnik, E.Y., Makita, Z., Sharma, V., et al. Advanced glycosylation endproduct-specific receptors on human and rat T-lymphocytes mediate synthesis of interferon-γ. *J Exp Med*. 178: 2165-2172, 1993.
47. Lander, H.M., Tauras, J.M., Ogiste, J.S., Hori, O., Moss, R.A., Schmidt, A.M. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21ras-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem*. 272: 17810-17814, 1997.
48. Yeh, C.H., Sturgis, L., Haidacher, J., Zhang, X.N., Sherwood, S.J., Bjercke, R.J., et al. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-κB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes*. 50: 1495-1504, 2001.
49. Baeuerle, P.A., Baltimore, D. NF-κB: ten years after. *Cell*. 87: 13-20, 1996.
50. Barnes, P.J., Karin, M. Nuclear Factor-κB-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 336: 1066-1071, 1997.
51. Jacobs, M.D., Harrison, S.C. Structure of an IκBα/NF-κB Complex. *Cell*. 95(6):749-758, 1998.
52. Bierhaus, A., Schiekfer, S., Schwaninger, M., Andrassy, M., Humpert, Per, M., Chen, J., et al. Diabetes-Associated Sustained Activation of the Transcription Factor Nuclear Factor-B. *Diabetes*. 50: 2792-2808, 2001.