

Lipopolysaccharide로 유도된 RAW264.7 세포에서 MAPK에 의한 홍삼추출물의 항염증 효과

신지수 · 김종명¹ · 안원근*

부산대학교 한의학전문대학원, 1: 부경대학교 수산과학대학

Anti-inflammatory Effect of Red Ginseng through Regulation of MAPK in Lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7

Ji Su Shin, Jong-Myoung Kim¹, Won Gun An*

School of Koran Medicine, Pusan National University, 1: College of Fisheries Sciences, Pukyong National University

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) are important inflammatory mediators implicated in pathogenesis of inflammation and certain types of human cancers. The present study was designed to determine whether Red Ginseng (RG) could modulate I κ B-kinase, iNOS and COX-2 gene expression and immune responses in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS). RG extract suppressed the expression of LPS-induced I κ B, iNOS, COX-2, and immune responses in a dose-dependent manner. It also showed an anti-inflammatory effect by inhibiting NF- κ B immune response induced by LPS treatment. Inhibitory effect of RG on LPS-induced inflammation was mediated by suppressed phosphorylation of ERK, JNK and p38 through the regulation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway leading to a decreased production of NO, iNOS, COX-2 and NF- κ B. The results implied the role of RG as an inflammation regulator and its possible application for curing inflammatory diseases.

Key words : Red Ginseng, RAW264.7 macrophages, I κ B, NF- κ B, iNOS, MAPK, inflammatory diseases

서 론

염증은 여러 가지 형태의 감염이나 생체 내 대사산물 중의 자극성 물질에 대한 생체 방어반응이다. 계통 발생론적으로 가장 오래된 방어기전의 하나인 염증반응에는 cytokines, prostaglandin E₂ (PGE₂), lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여한다. 외부 자극에 의한 대식세포 염증반응에서는 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 전염증성 cytokine의 발현이 유도되고, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2) 유전자의 발현을 자극하여 nitric oxide (NO) 및 PGE₂ 등의 염증인자가 생성된다^{1,2}). 일반적으로 iNOS에 의한 NO의 생성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다³). 이들 염증 매개인자들

(iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6 등)은 활성화된 Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B)에 의해 전사가 촉진되며⁴) 이로 인해 NO가 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응에 의한 조직손상 유발, mutagenesis, 신경조직의 손상 등을 일으킨다^{5,6}). 또한, COX-2가 과발현 될 경우에도 과생성된 PGE₂에 의해 발열, 통증 및 염증반응이 유도된다⁷).

대식세포는 혈액 단핵세포로부터 분화된 조직 세포로 염증반응에서 방어적 역할을 담당한다. Lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포 표면의 TLR (Toll-like receptor)를 자극하여 하부 세포 신호전달경로인 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성화를 유도한다⁸). 활성화된 신호전달경로는 pro-inflammatory cytokines, nitric oxide (NO), prostaglandins (PGs)와 같은 여러 가지 염증성 매개인자들의 발현을 유도한다⁹).

인삼 (人蔘)의 기원은 산삼에서 유래한 우수한 효능과 수요의 증가에 따라 인위적으로 종자를 재배하기 시작하면서 오늘에 이르렀다. 대한약전에 의하면 인삼은 두릅나무과 (Araliaceae)의 다년생 초본인 인삼 (Panax ginseng C.A. Meyer)의 뿌리 그대로

* 교신저자 : 안원근, 양산시 물금읍 범어리 부산대학교 한의학전문대학원

· E-mail : wgan@pusan.ac.kr, · Tel : 051-510-8455

· 접수 : 2012/04/23 · 수정 : 2012/05/04 · 채택 : 2012/05/18

또는 가는 뿌리와 코르크층을 제거한 것으로 건강 유지는 물론 다양한 질병 치료에 우수한 효과를 나타내고 있다¹⁰⁾. 홍삼은 대 한약전에 한약명 (紅蔘, Ginseng Radix rubra)과 영명 (Red Ginseng)을 각각 인삼과 구분하여 표기하며, 기원식물인 인삼 뿌리를 찢 것으로 규정하였다. 홍삼의 여러 가지 효능 중 항암효과는 많은 연구에 의하여 입증되었다¹¹⁾.

인삼은 예로부터 不老, 長生, 益氣, 經身의 명약으로 구전되어 여러 질병을 치료하는데 사용되었다¹²⁾. 전통적 방식인 증숙과정을 통해서 얻어진 홍삼은 백삼에 비하여 유용 사포닌이 더 많아 인삼의 효능을 증대시킨다고 알려져 있다¹³⁾. 현재까지 알려진 인삼의 효능에는 항산화¹⁴⁾, 항균¹⁵⁾, 항염¹⁶⁾ 작용이 있으나, 이는 사람마다 각각의 차이가 있다. 홍삼은 혈액순환 개선, 암발생 억제력, 감염 방어 작용¹⁷⁾ 및 면역력 증대¹⁸⁾에 효과가 좋은 것으로 보고된 바 있다. 홍삼의 항염증 기전 연구에서 NF- κ B¹⁹⁾를 통한 항염증 효능 보고는 있으나 또 다른 주요항염증 기전인 MAPKs를 통한 연구는 아직 보고된 바 없다.

본 연구에서는 홍삼이 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포의 NO와 PGE₂의 생성량, iNOS, COX-2의 발현 및 TNF- α 에 미치는 영향을 살펴보고, 이러한 염증매개물질의 발현에 핵심적인 역할을 담당하는 NF- κ B와 MAPKs의 변화를 확인하여 홍삼의 염증 억제효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 홍삼의 추출, 농축, 건조 과정

홍삼은 홍삼근과 홍삼미를 (주)동경중합상사로부터 구입하였으며, 각 1:1 비율로 혼합한 홍삼 200 g (홍삼근 100 g, 홍삼미 100 g)을 분쇄한 다음 70% 에탄올 500 mL를 가하고 70~80°C에서 한 시간씩 3회 환류추출을 실시하였다. 추출물 여과는 5 μ m의 막공 크기를 갖는 filter paper (ADVANTEC, 110 mm)를 이용하여 감압 여과하였다. 여과액은 최종 고형분 함량이 50%가 될 때까지 rotary vacuum evaporator (EYELA, N-1000)를 이용하여 진공도 700 mmHg, 50~60°C에서 감압 농축하였다. 이 후 농축액은 -70°C 초저온 냉동고에서 동결 후 동결건조기 (EYELA, FDU-2100)로 건조한 분말상태로 분석에 사용하였다.

· 건조 수율

- 건조 분말: 59.81 g,

- 건조 수율: 추출 건조 분말 59.81/원물 200 g (홍삼근 100 g, 홍삼미 100 g) \times 100 = 29.91%

2. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Hyclone (Bremen, Germany)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터, penicillin 및 streptomycin은 Gibco/BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Anti-iNOS monoclonal antibody는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서, Anti- β -actin monoclonal antibody는 Sigma Aldrich Co. 로부터 구입하였다. Anti-NF- κ B p65,

anti-COX-2, anti-I κ B α , 그리고 anti-phospho-I κ B α monoclonal antibody와 p-ERK mouse monoclonal antibody, ERK rabbit polyclonal antibody, Lamin A/C goat polyclonal antibody, 그리고 peroxidase-conjugated secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)부터 구입하였다. p-P38 Rabbit antibody, p-SAPK/JNK rabbit antibody는 cell signaling Technology (Beverly, MA, USA)사에서 구입하였으며, JNK/SAPK mouse antibody는 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)로부터 구입하였다. 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), sulfanilamide, lipopolysaccharide (LPS) 시약들은 Sigma Aldrich Co.에서 구입하였다.

3. 세포배양

실험에 사용한 마우스 대식세포주 RAW 264.7 세포는 ATCC (Rockville, MD, USA)로부터 구입했으며, DMEM에 10% FBS, 100 U/mL penicillin 및 100 μ g/mL streptomycin을 첨가한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 2일마다 계대 배양하였다.

4. 세포 증식을 검증

RAW 264.7 세포는 96 well plate에 5 \times 10⁵ cells/mL로 분주하고 24시간 동안 세포를 안정시킨 후, 시료(RG)를 농도별 (0.1, 1, 10, 100 μ g/mL)로 처리하여 1시간 동안 배양하였다. 그 후, LPS (1 μ g/mL)를 처리하여 20시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 다음 세포 배양액을 교환하고 MTT를 1 mg/mL 농도로 처리하여 2시간 배양 하였다. 상등액을 제거하고 DMSO 150 μ L를 첨가하여 생성된 formazan crystals을 용해시킨 후 ELISA microplate reader (TECAN, Switzerland)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포의 생존율은 대조구에 대한 백분율로 표시하였다.

5. Nitric oxide (NO) 생성 및 정량

RAW 264.7 세포를 60 mm dish에 1 \times 10⁶ cells/mL로 세포를 분주하고 24 시간 동안 안정시킨 후 RG를 농도별 (0.1, 1 및 10 μ g/mL)로 1 시간동안 처리한다. LPS (1 μ g/mL)를 첨가하여 24 시간 배양 후 배양액을 수집하고 원심분리 (10,000x g, 3 분) 후 상등액 100 μ L를 취해 정량하였다. 96 well plate에 상기 배양액 100 μ L와 Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthyl amide in H₂O) 150 μ L를 혼합하여 실온에서 5 분간 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA microplate reader로 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite (NaNO₂)를 이용한 표준곡선으로 NO의 농도를 산출하였다.

6. TNF- α 및 PGE₂의 생성량 측정

RAW 264.7세포를 60 mm dish에서 1 \times 10⁶ cells/mL로 분주하고 24시간 동안 세포를 안정시킨다. RG를 농도별 (1, 5, 10, 50 μ g/mL)로 1시간 동안 처리하고 LPS (1 μ g/mL)를 첨가 하여 6

시간 배양하였다. 배양액을 수집하여 원심분리 (10,000x g, 3 분) 하여 확보한 상등액을 TNF- α 및 PGE₂ ELISA Kits (Pierce Endogen, IL, USA)를 이용하여 정량하였다.

7. 핵 분획 제조

세포를 PBS로 2 회 세척하고 microtube에 넣은 후 12,000x g로 5 분간 원심분리한다. 상등액을 제거한 세포 침전물에 hypotonic buffer[10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM DTT, & 0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)] 200 μ L를 넣고 10 분간 얼음위에 놓은 후, 15,000 g로 5분간 원심분리한다. 상등액을 제거한 침전물에 20 mM HEPES (pH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF를 함유한 high-salt buffer 50 μ L를 넣어 10 분마다 vortex하며 40 분간 얼음위에 방치한 다음, 16,000x g로 10 분간 원심분리하여 핵 분획이 포함된 상등액을 실험에 이용하였다.

8. Immunoblot analysis

각각의 시료를 처리한 RAW 264.7 세포를 원심분리하고 PBS로 세척한 다음 Lysis buffer [50 mM HEPES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/mL aprotinin]하에서 4 $^{\circ}$ C, 30 분 처리한다. 원심분리 (10,000x g에서 10 분)하여 debris를 제거한 후 확보한 용해액의 단백질을 정량하였다. 동량의 세포용해액은 5 \times sample buffer와 혼합하고 95 $^{\circ}$ C에서 5 분간 끓인 후 SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동 후 단백질을 nitrocellulose membrane상에 이동시키고, 상온 blocking buffer (5% skim milk)하에서 2 시간동안 반응시켰다. 항 COX-2, iNOS, NF- κ B, I κ B α , p-I κ B α , p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38, 그리고 actin 항체는 1:1000으로 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 12 시간 반응 후 TBS-T로 세척하고 horseradish peroxidase가 conjugation된 2차 항체로 1 시간 반응시켰다. TBS-T로 30 분간 세척 한 후, ECL kit (Amersham, GE healthcare, UK)를 사용하여 FluorChemImaging System (Cell Biosciences, USA)으로 detection 하였다.

9. 통계분석

각 실험결과를 mean \pm S.D.으로 표기하였고, 통계학적 분석은 SPSS program (SPSS version 14.0)의 ANOVA 분석과 independent t-test를 수행하여 p값이 0.05이하인 경우를 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. RG 추출물 농도에 따른 세포 생존율

RAW 264.7 세포에 LPS를 처리한 다음, MTT assay 로 세포 생존율을 측정하여 홍삼 농도별(0.1, 1, 10 및 100 μ g/mL) 세포독성을 비교 하였다(Fig. 1). 실험 결과 홍삼 추출물 농도가 10 μ g/mL 까지는 생존율 저하가 나타나지 않았으나, 100 μ g/mL에

서는 급격한 세포생존율 저하가 관찰되었다.

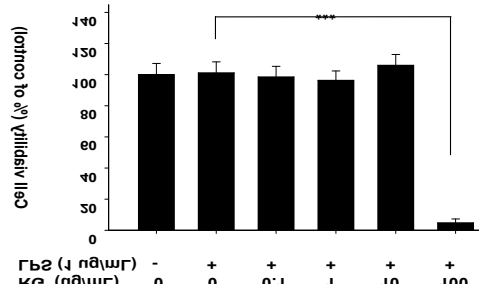


Fig. 1. Effects of Red Ginseng extract on the viability of RAW 264.7 cell treated with LPS. Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments. *** p<0.001.

2. NO 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 유리된 NO 생성량과 홍삼추출물 농도별로 처리한 실험구의 NO 생성량을 비교 하였다(Fig. 2). 홍삼 농도별 (10, 1 및 0.1 μ g/mL) NO 생성 억제활성은 각각 91, 57.6 및 45.6% 이었다. 이 결과는 홍삼이 우수한 항염작용을 가진 약제라는 것을 시사한다.

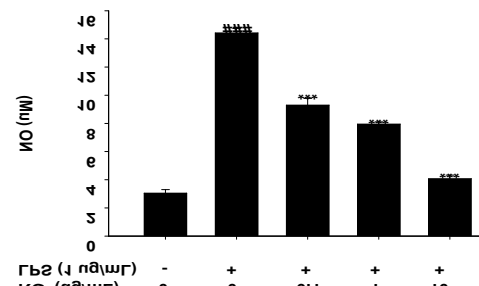


Fig. 2. Effect of Red Ginseng treatment on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments.

3. 홍삼추출물이 PGE₂생성량에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 LPS 를 처리하였을 때 유리된 PGE₂ 생성량과 홍삼 추출물 처리구의 PGE₂ 생성량을 비교하였다. RG 농도별 (0.1, 1 및 10 μ g/mL) PGE₂ 생성 억제활성은 각각 3.7, 11.2 및 22.6% 이었다(Fig. 3).

4. COX-2와 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

홍삼의 NO와 PGE₂ 생성 억제효과가 iNOS와 COX-2의 발현 조절과 관련이 있는지를 조사하기 위하여 western blot 분석을 수행하였다. Fig. 4 에 나타난 바와 같이, iNOS와 COX-2 단백질 발현이 LPS 처리구에서는 현저히 증가하였으나 RG를 50 μ g/mL과 10 μ g/mL로 처리한 세포주에서는 감소하였다(p<0.001). 전반적으로 COX-2와 iNOS 발현이 RG 농도 의존적으로 감소하는 현상을 관찰할 수 있었으며, 이 결과는 NO와 PGE₂ 생성에 대

한 홍삼 추출물의 억제효과와 일치하였다.

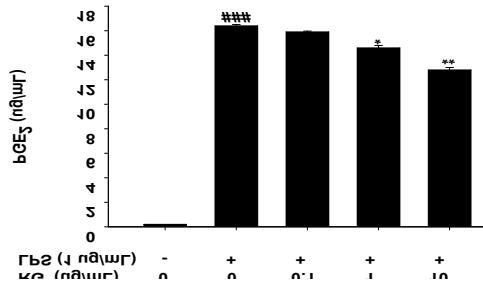
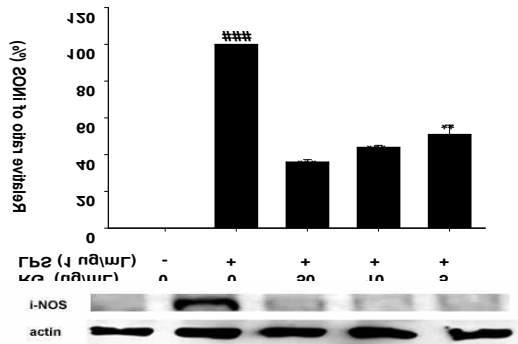


Fig. 3. Effects of Red Ginseng extract on LPS-induced PGE₂ production in RAW 264.7 cell. Values represent mean±SD of three independent experiments. ###p<0.001 compared with vehicle-treated control; *p<0.05, **p<0.01 compared with LPS alone.

A)



B)

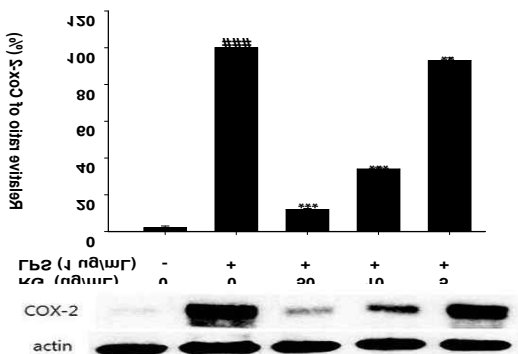


Fig. 4. Effects of Red Ginseng extract on LPS-induced iNOS (A) and COX-2 (B) expression in RAW 264.7 cells. Values represent mean±S.D. of three independent experiments. ###p<0.001 compared with vehicle-treated control; **p<0.01, ***p<0.001 compared with LPS alone.

5. TNF-α의 생성량에 미치는 영향

홍삼추출물의 항염증효과는 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향으로 조사하였다. 본 실험은 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 홍삼 추출물을 농도별

로 처리한 다음 사이토카인의 농도를 측정하였다(Fig. 5). 실험 결과는 LPS에 의해 유도된 TNF-α의 생성량은 홍삼 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소함을 나타낸다.

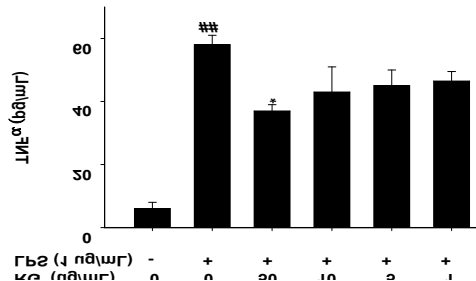


Fig. 5. Effects of Red Ginseng extract on LPS-induced TNF-α production in RAW 264.7 cell. Values represent mean±S.D. of three independent experiments. ## p<0.01 compared with vehicle-treated control; *p<0.05 compared with LPS alone.

6. NF-κB 발현에 미치는 영향

LPS에 의해 유도되는 염증성 매개물질인 iNOS와 COX-2는 전사인자인 NF-κB에 의해 발현된다. 이 과정에서 세포질 내 IκBα가 인산화 되면 결합되어 있던 복합체가 분해되면서 NF-κB가 활성화 되어 핵 내로 전위된다. 핵 분획의 NF-κB 단백질의 발현은 LPS 처리 군에서는 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으나 (p<0.01 (15 분), p<0.001 (30 분, 60 분)), 홍삼 추출물을 전 처리한 구는 시간변화에 따라 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 6).

특히 LPS+홍삼 추출물을 60 분간 처리한 실험구에서는 LPS 처리 군과 비교하여 NF-κB 발현이 유의성 있게 감소하였다 (p<0.05). 이는 LPS 처리 후 60 분 구간에서 NF-κB 활성을 유의성 있게 억제한다는 것을 의미한다.

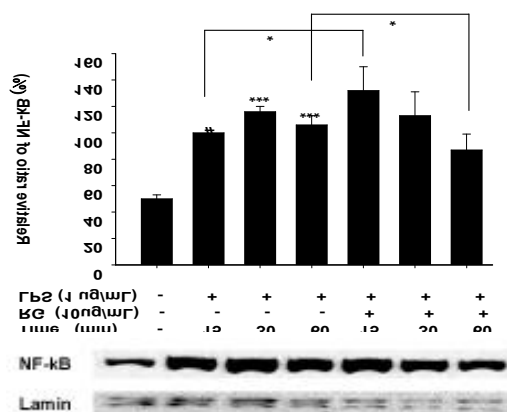


Fig. 6. Effects of Red Ginseng extract on NF-κB expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Values represent mean±S.D. of three independent experiments. ##p<0.01, ###p<0.001 compared with vehicle-treated control; *p<0.05.

7. p-IκBa와 IκBa 단백질에 미치는 영향

세포질 내 NF-κB의 활성 억제효과가 I-κBa의 인산화 억제와

관련이 있는가를 인산화상태를 인식하는 특이항체를 이용하여 조사하였다(Fig. 7).

LPS로 NF- κ B의 억제인자인 I- κ B α 의 phosphorylation을 유도한 다음 홍삼을 시간별로 처리한 결과는 I- κ B α 의 인산화가 유의성 있게 억제됨을 보여준다($p < 0.01$ (15 분), $p < 0.001$ (30 분, 60 분)). 이는 홍삼 추출물이 I- κ B α 의 인산화 억제를 통하여 NF- κ B의 핵 전위를 제어한다는 것을 나타낸다. LPS처리 군에서 I- κ B α 발현이 15 분에서는 감소하다가 30 분이 지나면서 회복하는 경향이 나타났으며, 홍삼 추출물 전처리 군에서도 유사한 경향을 보였다. 특히, 15 분 구간에서 LPS+ 홍삼 추출물 처리군에서 LPS 처리군과 비교하여 I- κ B α 의 인산화가 유의성 있게 증가하는 결과가 나타났다($p < 0.01$). 이는 홍삼 추출물이 LPS 처리 후 15 분에 I- κ B α 활성을 유의성 있게 증가시킨다는 것을 의미하며, 이 결과는 I- κ B α 의 인산화 (p-I- κ B α)와 일치한다.

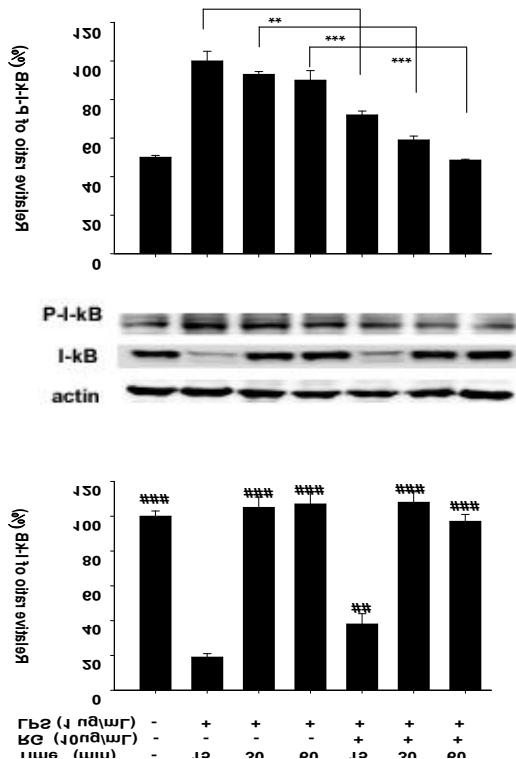


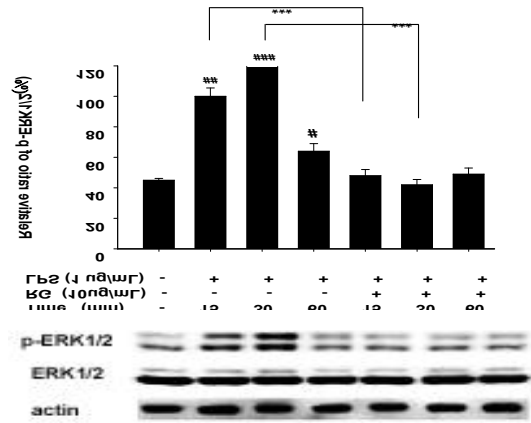
Fig. 7. Effects of Red Ginseng extract on the level of I- κ B α and p-I- κ B α in the LPS- stimulated RAW 264.7 cells. Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared with LPS alone (15min); ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

8. MAPKs 활성화에 미치는 영향

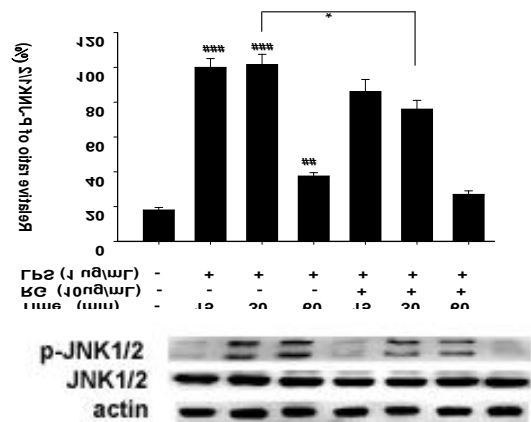
LPS로 자극한 RAW 264.7 cell에서 홍삼 추출물이 ERK1/2, JNK, p38의 인산화에 미치는 영향을 살펴본 결과, LPS 처리 군에서는 대조군에 비해 30 분까지는 증가하다가 60 분에서는 감소하는 경향이 보였다(Fig. 8). 다른 신호 매개분자인 p-ERK/ERK와 p-p38/p38의 분석(15, 30 분)에서는 LPS+홍삼 추출물 처리군이 LPS 처리군에 비해 p38 인산화가 유의성 있게 감소하는 결과를

나타내었으며 ($p < 0.001$), p-JNK/JNK의 분석도 동일한 결과를 나타내었다($p < 0.05$). 이는 홍삼 추출물이 LPS 처리 후 15, 30 분에서 MAPKs의 인산화를 억제한다는 것을 의미한다.

A)



B)



C)

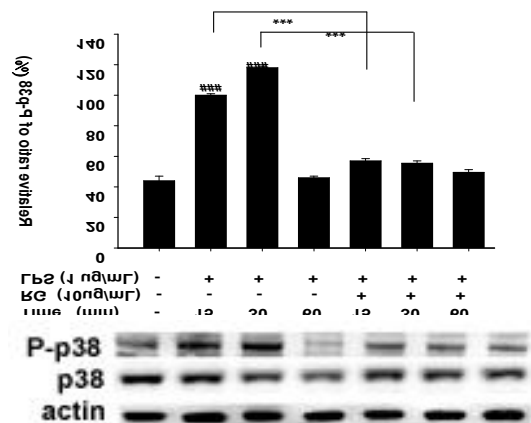


Fig. 8. Effects of Red Ginseng extract on the levels of phosphorylated ERK1/2 (A), JNK1/2(B), and p38 (C) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ compared with vehicle-treated control; *** $p < 0.001$.

고찰

본 연구는 RAW 264.7 murine macrophage 세포주를 사용하여 NF- κ B 및 MAPKs 신호전달을 통한 RG의 항염 조절 기전을 밝히기 위해 수행되었다(Fig. 9).

염증은 조직 손상과 병원균의 침입으로부터 인체를 방어하는 가장 중요한 기전중의 하나이다. 정상적인 염증반응은 전구염증 단백질의 발현을 감소시키고, 항염증 단백질의 발현을 증가시키며, 초기 면역세포 보충을 촉진시키기 위한 변화 등의 조절이 일어난다^{20,21}. Macrophages는 인체 전반에 걸쳐 분포하며 염증과정에서 백혈구 유주에 앞서 병원체에 대항하는 즉각적인 방어를 제공하는 역할을 담당한다. LPS는 macrophages에서 interleukins (ILs), TNF- α , iNOS, 그리고 COX-2와 같은 염증매개인자의 생산을 촉진한다. LPS로 유도된 염증 매개인자를 감소시키는 물질은 macrophages의 활성화에 의해 야기되는 염증반응 등 여러 증상을 완화시키는 효과적인 방법으로 간주되고 있다²².

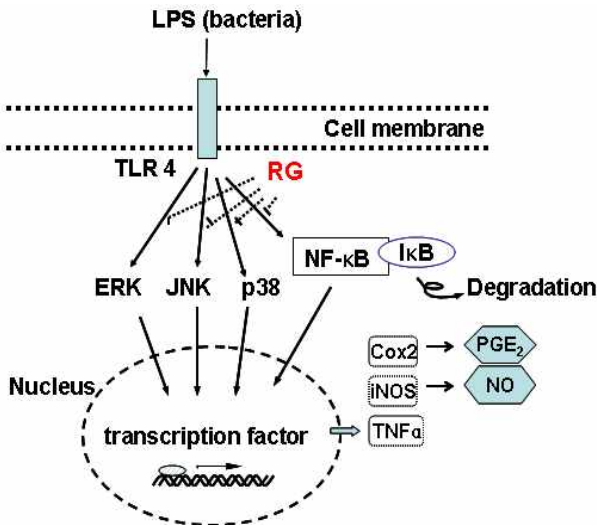


Fig. 9. Suggested diagram showing the role of Red Ginseng (RG) extract in LPS-induced signaling pathways of NF- κ B and MAPKs.

본 연구에서 대식세포인 RAW 264.7의 생존율과 증식을 저해하지 않는 RG 농도를 조사한 결과, 10 μ g/mL 이하에서는 정상세포와 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 상기 농도 범위 내의 RG를 사용하여 항염증효과를 조사하였다. RAW 264.7 세포에 각각의 시료를 처리한 다음 세포의 증식률과 NO, PGE₂ 및 TNF- α 의 생성량, COX-2, iNOS, NF- κ B, I κ Ba, phospho-I κ Ba protein 및 MAPKs (ERK, JNK, p38)의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

Immunoblot analysis를 이용하여 RG가 세포질 내 iNOS와 COX-2 단백질발현에 미치는 영향을 살펴보았다. RG 전처리가 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현을 억제하였으며 그 결과로 발생하는 NO 및 PGE₂의 생성 또한 감소시켰다는 것을 확인하였다. 이 결과는 대식세포에 LPS를 사용하여 iNOS 및 COX-2 발현을 유도한 후, RG를 50 μ g/mL로 처리하여 iNOS 및 COX-2 발현

에 대한 억제 정도를 조사한 Hyun²³ 등의 보고와 일치하였다. 이는 RG가 iNOS, COX-2 발현 및 NO, PGE₂ 생성을 억제하여 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 비활성화 시킬 뿐 아니라 염증매개체생합성을 억제할 수 있다는 것을 의미한다.

TNF- α 와 같은 pro-inflammatory cytokine은 정상조직에서도 발견되나 병변과정에서는 그 발현정도가 증가되어 암 촉진과정에서 일어나는 염증에 중요한 역할을 한다. 본 연구 결과는 RG가 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 TNF- α 의 생성을 감소시킴을 보여준다. 이는 RG가 염증단계의 중추적 역할을 맡고 있는 cytokine인 TNF- α 의 발현을 저해하여 염증과정을 조절할 가능성이 있다는 것으로 해석된다.

대부분의 천연물 또는 기존의 항염증제는 핵 전사인자인 NF- κ B 활성을 억제하여 항염증 효과를 나타낸다^{24,25}. NF- κ B의 비정상적인 활성은 다수의 만성적인 염증성질환 및 종양생성과 관련이 있으므로, NF- κ B 활성을 억제시키는 것이 염증성 질병과 암의 예방 및 치료에 효과적이다^{26,27}. RG 추출물이 NF- κ B 경로를 통하여 염증반응을 조절하는 지를 조사한 결과, RG는 I κ Ba의 인산화를 저해하여 NF- κ B 활성을 차단함으로써 iNOS와 COX-2 발현을 억제함을 알 수 있었다. 이는 NF- κ B가 iNOS 및 COX-2 발현 조절에 관련하며, 몇몇 화학방어적인 phytochemicals은 과도한 NF- κ B 활성 억제를 통하여 iNOS 및 COX-2 발현을 억제한다는²⁸ 보고와 일치하였다. 세포질 내 I κ Ba의 phosphorylation을 유도한 후, RG를 시간별로 처리하여 인산화 저해 정도를 조사한 결과, 10 μ g/mL의 RG 농도에서 시간 의존적으로 phospho-I κ Ba의 발현정도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 이 결과는 홍삼 및 발효홍삼이 염증유발유전자 조절에 관여하는 I κ Ba의 인산화를 억제하였다는 Hyun²³ 등의 보고와 일치하였다.

MAPKs는 세포성장과 분화의 조절, 사이토카인과 stress에 대한 세포반응 조절에 중요한 역할을 한다²⁹. 세포의 환경으로부터 세포질을 통해 핵으로 정보를 전달하는데 중요한 역할을 하는 MAPKs 신호전달경로는 진화적으로 보존되어 왔으며 최소 3가지의 신호전달경로가 존재한다³⁰. ERK 신호전달경로에서 활성화된 ERK는 다양한 전사인자를 인산화 할 수 있다. ERK가 자극인자에 의해 광범위하게 활성화 되는 반면, p38와 JNK는 stress 반응경로를 구성하며 염증성 사이토카인 같은 인자로 유도된 세포 스트레스에 의해 활성화된다. JNK 신호전달 경로는 LPS와 TNF- α 와 같은 면역염증자극에 반응하는 세포에서 활성화되고, 세포의 형태적 증대와 사이토카인 전사에 관여한다³¹. 본 연구에서 RG가 MAPKs 신호전달경로에 미치는 영향을 조사한 결과, RAW 264.7 세포에서 RG가 LPS로 유도된 ERK, JNK와 p38의 인산화를 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 RG가 LPS로 유도된 상기 인자들의 활성화와 관련된 MAPKs 신호전달경로의 억제를 통해 항염증 작용을 발휘하는 것으로 보인다(Fig. 9).

결론적으로, RG가 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 및 MAPKs (ERK1/2, JNK, p38)의 신호전달경로를 억제하며, 염증반응을 촉발하는 염증매개인자들 (NO, PGE₂, TNF- α)의 생성을 효과적으로 제한한다는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비 (2년)에 의해 수행 되었습니다.

참고문헌

- Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., Osawa, T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *Journal of Immunology*. 144: 1425-1431, 1990.
- 한외과대학 방제학교수 공편저. 방제학. 서울, 영림사, pp 535-536, 1999.
- McCartney-Francis, N., Allen, J.B., Mizel, D.E., Albina, J.E., Xie, Q.W., Nathan, C.F., Wahl, S.M. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine*. 178: 749-754, 1993.
- Baeurle, P.A. I κ B-NF- κ B structure: at the interface of inflammation control. *Cell*. 95: 729-731, 1998.
- Knowles, R.G., Moncada, S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends in Biochemical Sciences*. 17: 399-402, 1992.
- Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal*. 6: 3051-3064, 1992.
- Harris, S.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., Phipps, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*. 23: 144-150, 2002.
- Akira, S., Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 4: 499-511, 2004.
- Gomez, P.F., Pillinger, M.H., Attur, M., Marjanovic, N., Dave, M., Park, J., Bingham, C.O., Al Mussawir, H., Abramson, S.B. Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NF- κ B subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *Journal of Immunology*. 175: 6924-6930, 2005.
- Shin, H.M. Wild Ginseng exerts anti-inflammatory effects via NF- κ B inactivation in RAW 264.7 cells. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*. 21: 498-503, 2007.
- 최성규. 한약생산물학 각론. 서울, 신광. pp 159-178, 2009.
- 조재열. 홍삼 유효 성분들의 면역조절 효능. *한국식품저장유통학회*. 8: 6-12, 2009.
- Jang, S.K., Kim, J.H., Chung, Y.S., Ahn, D.C., Kang, M.J., Lee, D.G., Kim, S.H. An Experimental Study on the Effect of Immunopotential and the Anticancer Effect of RG. *Journal of Ginseng Research*. 18: 151-159, 1994.
- Shao, Z.H., Xie, J.T., Vanden Hoek, T.L., Mehendale, S., Aung, H., Li, C.Q., Qin, Y., Schumacker, P.T., Becker, L.B., Yuan, C.S. Antioxidant effects of American ginseng berry extract in cardiomyocytes exposed to acute oxidant stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1670: 165-171, 2004.
- Bae, E.A., Han, M.J., Baek, N.I., Kim, D.H. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of panaxytriol isolate from ginseng. *Archives of Pharmacol Research*. 24: 297-299, 2001.
- Park, E.K., Choo, M.K., Han, M.J., Kim, D.H. Ginsenoside Rh1 possesses antiallergic and anti-inflammatory activities. *International Archives of Allergy & Immunology*. 133: 113-120, 2004.
- Nam, K.Y. The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs, processed ginsengs (Panax ginseng C. A. Meyer). *Journal of Ginseng Research*. 29: 1-18, 2005.
- 김동청, 황우익, 인만진, 이성동. 인삼의 지용성 추출물 투여가 면역기능에 미치는 영향. *Journal of Ginseng Research*. 32: 19-25, 2008.
- Baldwin As. The NF kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*. 14: 649-683, 1996.
- Lawrence, T., Willoughby, D.A., Gilroy, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation *Nature Reviews Immunology*. 2: 787-795, 2002.
- Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A., Farnarier, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends in Immunology*. 24: 25-29, 2003.
- Namazi, M.R. Cetirizine and allopurinol as novel weapons against cellular autoimmune disorders. *International Immunopharmacology*. 4: 349-353, 2004.
- Hyun, M.S., Hur, J.M., Shin, Y.S., Song, B.J., Mun, Y.J., Woo, W.H. Comparison study of white ginseng, red ginseng, and fermented red ginseng on the protective effect of LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 52: 21-27, 2009.
- Pande, V., Ramos, M.J. NF- κ B in human disease : current inhibitors and prospects for de novo structure based design of inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*. 12: 357-374, 2005.
- Berg, J., Fellier, H., Christoph, T., Grarup, J., Podolsky, D.K. Peroxynitrite-induced rat colitis-a new model of colonic inflammation. *Gastroenterology*. 105: 1681-1688, 1993.
- Aggarwal, B.B. Nuclear factor- κ B : The enemy within. *Cancer Cell*. 6: 203-208, 2004.
- Johnson, G.L., Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases.

- Science. 298: 1911-1912, 2002.
28. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research*. 480-481: 243-268, 2001.
29. Robinson, M.J., Cobb, M.H. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology*. 9: 180-186, 1997.
30. Hidding, U., Mielke, K., Waetzig, V., Brecht, S., Hanisch, U., Behrens, A., Wagner, E., Herdegen, T. The c-Jun N-terminal kinases in cerebral microglia: immunological functions in the brain. *Biochemical Pharmacology*. 64: 781-788, 2002.
31. Waetzig, V., Czeloth, K., Hidding, U., Mielke, K., Kanzow, M., Brecht, S., Goetz, M., Lucius, R., Herdegen, T., Hanisch, U.K. c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia*. 50: 235-246, 2005.