

적소두 추출물이 톨유사수용체 활성화 및 염증유발 사이토카인의 생성에 미치는 영향

김미화[#] · 정시화^{1#} · 이승웅 · 김현규¹ · 박찬선 · 전병훈² · 오현미 · 노문철^{*}

한국생명공학연구원 바이오소재연구소 생물산업공정연구센터, 1: (주)선바이오텍, 2: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

Effect of *Vigna angularis* on Toll-like Receptor Activation and Pro-inflammatory Cytokine Production

Mi Hwa Kim[#], See Hwa Jeoung^{1#}, Seung Woong Lee, Hyun Kyu Kim¹, Chan Sun Park, Byung Hun Jeon², Hyun Mee Oh, Mun Chual Rho^{*}

Bioindustrial Process Research Center, Bio-Materials Research Institute, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 1: Natural Bio R&D Center, Sun Bio Tech, 2: Department of Pathology, College of Oriental Medicine & Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

The mechanisms of Toll-like receptor (TLR) signaling have been the focus of extensive studies because TLRs are the target of therapeutic intervention on multiple diseases. In this study, we investigated the inhibitory potential of *Vigna angularis* (azuki bean) on the TLR signaling. The effect of *Vigna angularis* extract (JSD) on TLR activation was investigated by assessing NF- κ B and AP-1 inducible secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) activity. JSD significantly inhibited SEAP activity induced by poly I:C (TLR3 ligand) and poly I (TLR7 ligand) in a dose-dependent manner at concentration below 100 μ g/ml with no sign of cytotoxicity. Pretreatment of JSD markedly suppressed mRNA expressions of pro-inflammatory cytokines and adhesive molecules such as TNF- α , IL-6, RANTES, MCP-1 and ICAM-1 induced by TLR ligands. It also diminished the phosphorylation of I κ B kinase and I κ B, and followed by I κ B-mediated nuclear translocation of p50, p65, and phosphorylation of p38, JNK, and IRF signaling pathway. In conclusion, our results suggest that *Vigna angularis* has inhibitory activity on TLR-3 and -7 signaling and it can be further developed as a remedy in curing TLR-related multiple diseases.

Key words : Toll-like receptor, *Vigna angularis*, NF- κ B, TNF- α , IL-6

서 론

세균이 침입했을 때 숙주방어작용은 선천면역(innate immunity)과 후천면역(adaptive immunity)의 두 가지 면역체계가 발동한다. 선천성 면역체계는 감염 후 즉각적으로 활성화되어 감염 미생물의 증식을 재빨리 조절할 수 있으므로 림프구가 감염을 담당할 때까지의 감염초기를 담당한다¹⁾. 이러한 선천면역에서 미생물이 공유하는 구조(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)를 인식하는 수용체를 패턴인식수용체(pattern

recognition receptors, PRRs)라고 부르는데, 포유동물에서는 1996년에 톨유사수용체(toll like receptor, TLR)가 발견되었다. TLR은 바이러스(virus), 박테리아(bacteria), 곰팡이(fungi) 등 다양한 병원미생물에 존재하는 공통의 PAMPs를 인식하여 선천면역에 관여 한다²⁾. 지금까지 13가지 아형(subtype)의 TLRs이 포유동물에서 밝혀졌으며, 이 중 plasma membrane에 존재하는 TLR2, TLR4 그리고 TLR5는 각각 lipoproteins, lipopolysacchraide, 그리고 flagellin을 인식하는 것으로 알려져 있다^{3,4)}. 또한, endosome에 위치한 TLR3 와 TLR7은 바이러스의 dsRNA (double strand RNA)와 ssRNA (single strand RNA)를 인식하여 바이러스의 감염에 대한 방어 기작에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{5,6)}. TLRs의 신호전달과정은 크게 2개의 기전으로 나뉘는데, Myd88 의존적 기전과 TRIF 의존적 기전으

* 교신저자 : 노문철, 정읍시 입신길 한국생명공학연구원 바이오소재연구소

· E-mail : rho-m@kribb.re.kr, · Tel : 063-570-5230

· 접수 : 2012/07/23 · 수정 : 2012/08/10 · 채택 : 2012/08/20

Both authors contributed equally to this work

로 나뉘며, TLR3를 제외한 나머지 TLRs은 Myd88 의존적 기전을 통해 신호를 전달한다⁷⁾. TLRs에 리간드(ligand)가 결합하게 되면 세포 내 adaptor molecules인 Myd88 또는 TRIF가 recruiting 되고, I κ B kinase에 의해 활성화된 NF- κ B가 핵내로 이동하여 TNF- α 또는 IL-6와 같은 염증유발 사이토카인(proinflammatory cytokine) 및 MCP-1 케모카인 등의 발현을 유도하게 된다⁸⁾. 특히 TLR3 매개로 이루어지는 바이러스나 dsRNA를 인식하게 되면 TRIF에 의해 TBK1이 활성화되고 IRF3를 인산화시켜 면역반응의 중요한자인 Type 1 interferon 유전자의 발현이 증가하게 된다⁹⁾. 이와 같이 톨 유사 수용체는 박테리아나 바이러스 등이 우리 몸에 들어왔을 때 최초의 방어시스템으로 작동해 선천성 면역반응을 일으켜 질병이 발생하는 것을 막는다. 하지만 톨 유사 수용체의 면역체계에 과부하가 걸리면 염증이 발생하게 된다. 최근 TLRs은 동맥경화(atherosclerosis)¹⁰⁾, 당뇨병(diabetes)¹¹⁾, 암(cancer)¹²⁾ 그리고 allergy¹³⁾ 등과 같은 염증성 질환의 발병에 중요하게 관여하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 이러한 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 target으로 TLRs이 중요하게 대두되고 있으며, 최근 TLRs antagonist 및 inhibitor를 개발하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 적소두는 우리나라에서 중요한 식용작물 및 한약재 중 하나로 해열, 소염, 부종 등의 효과가 있는 것으로 알려져 왔다^{14,15)}. 최근 연구결과에서 적소두 추출물이 콜레스테롤 수치 및 혈압을 낮추고^{16,17)}, 종양형성을 억제하며¹⁸⁾, 당뇨의 진행속도를 늦춘다¹⁹⁾고 보고되었다. 특히 적소두에 풍부한 proanthocyanidins, quercetin glycoside와 같은 polyphenol 성분은 강력한 항산화 작용 및 항염증 효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다^{14,20)}. 따라서 본 연구에서는 적소두 에탄올 추출물이 TLRs의 활성화와 그 신호전달 기전을 저해하고 항염증 효과를 나타내는지 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 항체 및 시약

세포배양에 RPMI1640, penicillin, streptomycin, fetal bovine serum (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 를 사용하였다. TLR ligands인 Pam3CSK4는 InvivoGen (San Diego, CA, USA)에서 구입하여 사용하였으며 그 외 TLR ligands인 polyinosinic-polycytidylic acid potassium salt (poly I:C), Polyinosinic acid potassium salt (poly I) 그리고 lipopolysaccharide (LPS)는 (Sigma-Aldrich Ltd, St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. SEAP assay를 위한 QUANTI-Blue colorimetric assay 시약은 InvivoGen (San Diego, CA, USA)에서 구입하였으며, 세포생존능은 EZ-Cytox Cell viability assay kit (DaeilLab Service, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 핵 단백질은 NE-PER Nuclear Extraction Reagents (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 추출하였으며, 총 단백질은 cell lysis buffer (Cell Signaling Technology Inc, Boston, MA, USA) 를 이용하여 분리하였다. NF- κ B p65 (ab7970) 항체는 Abcam사 (Cambridge, MA, USA)에서 구입했으며, NF- κ B p50

(4D1), p-c-Jun (Ser63173), hnRNP C1/C2 (H-105) 그리고 p-I κ B- α (B-9) 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입해 사용하였다. 또한, p-IKK α / β (S176/180)(16A6), p-p38 (Thr180/Tyr182), 그리고 p-IRF-3 (Ser396, 4D4G) 항체는 Cell Signaling Technology Inc. (Boston, MA, USA) 제품을 사용하였다. p-JNK1/2 (Thr183/Tyr185) 와 β -actin 2차 항체는 각각 Stressgen Biotechnologies (Victoria, BC, Canada)와 Sigma-Aldrich Ltd. (St. Louis, MO, USA) 에서 구입하여 사용하였다.

2. 적소두 에탄올 추출물 제조

적소두는 전라북도 정읍시 소재 한약방에서 구매하였으며 충남대학교 배기환 교수님으로부터 진성을 확인한 후 사용하였다. 적소두는 물로 깨끗이 세척하여 그늘에서 건조한 후, 분쇄기 (Model No. HGB25E1) (waring blender, USA)로 분말화 시켰다. 분말화 된 적소두(20 kg)에 에탄올(90% 이상) 140 L를 넣고 70 $^{\circ}$ C에서 4시간동안 1차 추출한 후, 여지 (pore size, 25 μ m)로 감압 여과하였으며, 이 적소두에 에탄올 (90% 이상) 100 L를 넣고 70 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 2차 추출을 하였다. 여지로 감압 여과한 2차 추출물과 1차 여과 추출물은 진공회전농축기(rotary evaporator)를 사용하여 감압 농축하였으며, 고형분 함량이 70~80 Brix인 적소두 에탄올 추출물 450 g을 수득하였다. 본 실험에 사용된 에탄올 추출물은 40 mg/ml (in DMSO, Sigma-Aldrich Ltd, St. Louis, MO, USA) 농도로 만든 후 -20 $^{\circ}$ C 에 보관하여 사용하였다.

3. 세포배양

Human monocytic leukemia cell line인 THP-1 (ATCC, Manassas, VA) 세포를 사용하였으며 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ incubator에서 배양하였다. THP-1 세포는 penicillin/streptomycin (100 unit/ml)과 10% FBS가 함유된 RPMI1640 배지에 1 mM sodium pyruvate, 1.25 g D-glucose, 0.75 g sodium bicarbonate 그리고 50 μ M mercaptoethanol을 첨가하여 배양하였다. TLRs의 활성을 정량적으로 측정하기 위하여 THP-1 blue 세포를 InvivoGen에서 구입하여 사용하였으며, THP-1 blue 세포는 NF- κ B 전사인자의 활성화에 의존적으로 SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase) 유전자를 발현할 수 있는 시스템을 가지고 있어서 TLRs의 활성을 정량적으로 측정할 수 있다. THP-1 blue 세포는 THP-1과 같은 배지에 zeocin과 normocin 항생제를 각각 200 μ g/ml이 되게 첨가한 후 배양하였다.

4. SEAP assay 를 이용한 TLR 활성화 저해능 측정

THP-1 blue 세포 (2×10^5 cells/well)를 96-well plates에 seeding한 후 적소두 추출물을 농도별 (10, 30, 60 μ g/ml)로 처리하였다. 적소두 추출물을 1시간 처리한 후 TLRs의 ligands (TLR2, Pam3CSK4; TLR3, poly I:C; TLR4, LPS; TLR7, Poly I)를 각각 처리하고 18시간 반응 후 상층액 20 μ l를 새로운 96-well plates로 옮겼다. 이 상층액에 QUANTI-Blue assay 시약 200 μ l를 첨가하여 1시간 반응시킨 후 ELISA microplate reader를 이용하

여 655 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Cell viability assay

THP-1 cells을 microtiter plate에 5×10^4 cells/well이 되도록 seeding 하고 적소두 추출물을 10 μ g/ml에서 100 μ g/ml까지 순차적인 농도로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후 EZ-Cytox Cell viability assay 시약을 10 μ l/well씩 처리하고 잘 섞어준 후 37°C에서 4시간 배양하였다. ELISA microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Western blot 분석

배양된 세포에 cell lysis buffer (Cell Signaling Technology Inc.)를 첨가하여 용해하고 원심분리(13,000 rpm)를 수행하여 순수한 단백질을 얻었다. 단백질은 DC protein assay kit (BioRad, Hercules, CA, USA) 을 이용하여 정량 하였으며 동량의 단백질을 Nupage® 4-12% Bis-Tris Gels (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 전기영동 하여 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF막 (Millipore Corp, Billerica, MA, USA)으로 옮기고 여러 항체와 반응시켜 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

7. Real-time PCR

Total RNA는 RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA)를 사용하여 분리 하였고, 분리한 RNA의 농도는 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 측정 하였다. Accupower RT Premix (Bioneer, Korea)에 RNA 1 μ g을 넣고 42°C에서 60분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 첨가하고 StepOnePlus™ Real-time Cyclor (Applied Biosystems, Foster City, CA)장비를 사용하여 Real-time PCR을 수행하였다. RNA의 양적 차이를 보정하기 위하여 endogenous reference로 GAPDH를 사용하였다. 결과값 분석은 2^{-ΔΔCT} 방법을 이용하여 분석하였다.

Table 1. Primer sequences for Real-time PCR

Name		Sequence (5' to 3')
TNF- α	F	GCC CAG GCA GTC AGA TCA TCT
	R	TTG AGG GTT TGC TAC AAC ATG G
IL-6	F	CCA CAC AGA CAG CCA CTC AC
	R	AGG TTG TTT TCT GCC AGT GC
MCP-1	F	GCA GAG GCT CGC GAG CT
	R	ACA ATG GTC TTG AAG ATC ACA GC
ICAM-1	F	CCT TCC TCA CCG TGT ACT GG
	R	AGC GTA GGG TAA GGT TCT TGC
RANTES	F	GAG GCT TCC CCT CAC TAT CC
	R	CTC AAG TGA TCC ACC CAC CT
GAPDH	F	CTC AAG ATC ATC AGC AAT GCC T
	R	AAG TTG TCA TGG ATG ACC TTG G

8. 통계분석

정량적인 결과는 평균값과 표준편차를 구하였으며, 통계적

인 차이는 Student's *t*-test를 이용하여 분석하였고 *p* 값이 0.005 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하여 별표(*)로 표시 하였다.

결 과

1. 적소두 에탄올 추출물의 TLR 활성화 저해능 측정

TLR의 활성화에 대한 적소두 에탄올 추출물(JSD)의 효과를 확인하기 위하여 THP-1 blue 세포를 이용하여 SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase) assay를 하였다. THP-1 blue 세포는 NF- κ B 전사인자의 활성화에 의존적으로 SEAP 유전자를 발현할 수 있는 시스템을 가지고 있어서 TLR에 리간드(ligand)가 결합하게 되면 활성화된 NF- κ B에 의해 SEAP 유전자가 발현하므로 TLR의 활성을 정량적으로 측정할 수 있다. THP-1 blue 세포에 적소두 에탄올 추출물 (10, 30, 60 μ g/ml)을 1시간 전처리 하고 각각의 TLR ligands인 Pam3CSK4 (TLR2, 100 ng/ml), poly I:C (TLR3, 50 μ g/ml), LPS (TLR4, 1 μ g/ml) 그리고 Poly I (TLR7, 50 μ g/ml)를 처리한 후 18시간 반응시켰다. 이 후 발현된 SEAP의 활성화에 따른 발색 정도를 측정한 결과, Fig. 1의 결과에서 보듯이 적소두 에탄올 추출물은 TLR3와 TLR7의 활성을 유의성 있게 농도 의존적으로 저해함을 볼 수 있었다. 이에 반해 TLR1/2와 TLR4의 활성화에 대한 적소두 에탄올 추출물의 효과는 적은 것을 볼 수 있다.

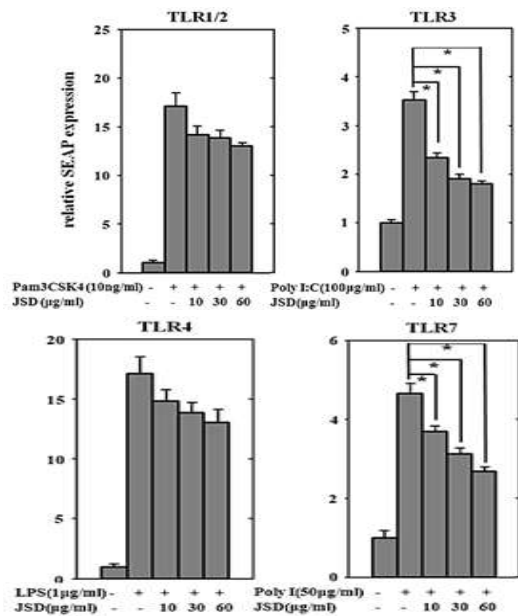


Fig. 1. *Vigna angularis* extract (JSD) significantly inhibited SEAP activity induced by poly I:C (TLR3 ligand) and poly I (TLR7 ligand) in a dose-dependent manner. Cells were treated with each ligand in the presence or absence of JSD for 18 hrs.

2. 적소두 에탄올 추출물의 THP-1 세포에 대한 독성

적소두 추출물에 의한 세포독성을 확인하기 위하여 THP-1 세포에 적소두 에탄올 추출물을 10, 30, 60, 100 μ g/ml로 처리한 후 48시간 배양하였다. 48시간 배양 후 WST-1 시약을 처리하고

수용성의 tetrazolium salt가 살아있는 세포와 반응하여 오렌지색 수용성의 formazan을 형성하는 것을 확인한 결과, 적소두 에탄올 추출물은 100 µg/ml에서도 독성 없이 82.5%의 세포가 살아있는 것을 확인 할 수 있었다.

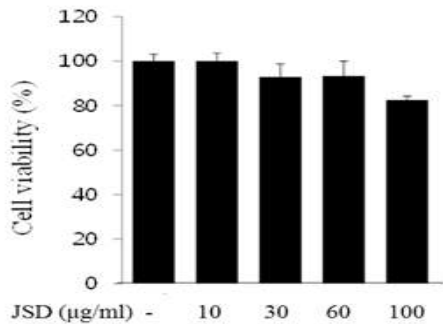


Fig. 2. The effect of *Vigna angularis* extract (JSD) on the viability of THP-1 cells. THP-1 cells were incubated with JSD at indicated dose. After 48hr, cell viability was measured by WST-1 assay.

3. 적소두 에탄올 추출물의 TLR3 활성화에 의한 염증유발인자 발현 저해 효과

TLR3의 활성화가 일어나면 염증유발 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine) 및 세포부착분자(adhesive molecules)의 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다. 적소두 에탄올 추출물이 TLR3의 활성화에 의해 유도되는 IL-6, TNF-α, MCP-1, 그리고 ICAM-1의 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하였다. THP-1 세포에 적소두 추출물을 10, 30, 60 µg/ml의 농도로 1시간 전 처리하고 Poly I:C 100 µg/ml을 6시간 처리한 다음 RNA를 추출하여 quantitative real-time PCR로 IL-6, TNF-α, ICAM-1, MCP-1의 mRNA 발현 정도를 확인하였다. Poly I:C 단독 처리 군에서 IL-6 mRNA의 발현이 21배 증가하였으나 적소두 에탄올 추출물 60 µg/ml과 Poly I:C를 함께 처리한 군에서는 3.6배로 저해되는 것을 확인 할 수 있었다. TNF-α의 mRNA 발현은 Poly I:C 단독 처리시 4.5배 증가하였으나 적소두 에탄올 추출물 60 µg/ml과 Poly I:C를 함께 처리시 2.7배로 저해되는 것을 확인할 수 있었으며, MCP-1의 mRNA 발현은 Poly I:C 단독 처리시 각각 34.2배 증가되고, Poly I:C와 적소두 에탄올 추출물(60 µg/ml)을 함께 처리시 6.1배로 저해되는 것을 확인 할 수 있었다. ICAM-1의 mRNA 발현은 Poly I:C 단독 처리시 50배 증가하였으며, Poly I:C와 적소두 에탄올 추출물 60 µg/ml을 함께 처리시 8.0배로 저해되는 것을 확인하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 적소두 에탄올 추출물은 TLR3의 활성화에 의해 증가되는 염증유발인자들인 IL-6, TNF-α, MCP-1, 그리고 ICAM-1의 mRNA 발현을 농도의존적으로 저해하는 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

4. 적소두 에탄올 추출물의 TLR7 활성화에 의한 염증유발인자 발현 저해 효과

적소두 에탄올 추출물이 TLR7 활성화에 의한 IL-6, TNF-α, MCP-1, 그리고 RANTES의 mRNA 발현에도 영향을 미치는지를 조사하였다. THP-1 세포에 적소두 추출물을 10, 30, 60 µg/ml 농

도로 1시간 전 처리하고 Poly I 50 µg/ml 를 6시간 처리한 후 RNA를 추출하여 quantitative real-time PCR로 IL-6, TNF-α, MCP-1, RANTES의 mRNA 발현 정도를 확인하였다. Poly I 50 µg/ml을 단독 처리한 군에서 IL-6의 mRNA 발현은 49.1배 증가하였으나 적소두 에탄올 추출물 60 µg/ml과 Poly I를 함께 처리한 군에서는 17.2배로 저해되는 것을 확인 할 수 있었으며, TNF-α의 mRNA 발현은 Poly I 단독 처리 시 13.5배 증가하였으나 적소두 에탄올 추출물 60 µg/ml과 Poly I를 함께 처리한 군에서 10.1배로 저해되는 것을 확인 할 수 있었다. 또한, MCP-1의 mRNA 발현은 Poly I 단독 처리 군에서 15.3배 증가하였고 적소두 에탄올 추출물 60 µg/ml을 Poly I와 함께 처리한 군에서는 6.1배로 저해되는 것을 확인 할 수 있었다. RANTES의 mRNA 발현은 Poly I 단독 처리 군에서 6.1배 증가하였고 poly I와 적소두 에탄올 추출물 60 µg/ml을 같이 처리한 군에서 2.8배로 저해되는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 적소두 에탄올 추출물은 TLR7 활성화에 의해 증가되는 염증유발인자들인 IL-6, TNF-α, MCP-1, RANTES의 mRNA 발현을 농도의존적으로 저해하는 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

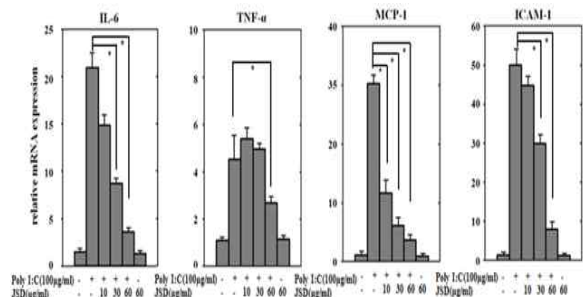


Fig. 3. *Vigna angularis* extract (JSD) inhibit the mRNA expressions of Poly I:C-induced inflammation-related genes. THP-1 cells were treated with poly I:C (100 µg/ml) in the presence or absence of *Vigna angularis* extract (JSD) for 6hr, and the expression levels of inflammation-related genes were measured by quantitative real-time PCR.

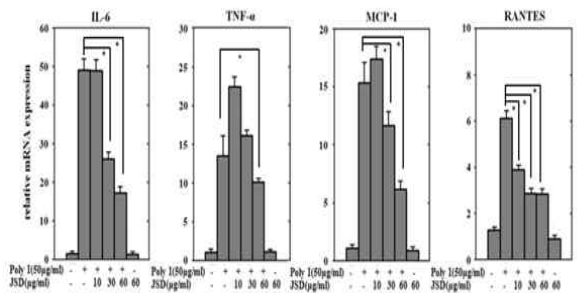


Fig. 4. *Vigna angularis* extract (JSD) inhibit the mRNA expressions of Poly I-induced inflammatory cytokines and chemokines. THP-1 cells were treated with poly I (50 µg/ml) in the presence or absence of *Vigna angularis* extract (JSD) for 6hr, and the expression levels of cytokines and chemokines were measured by quantitative real-time PCR.

5. 적소두 에탄올 추출물에 의한 TLR3 하위기전 저해효과

TLR ligand가 TLR에 결합하면 세포내부의 MAPKs, IKKα/β, 그리고 NF-κB와 같은 기전이 활성화 되어 염증유발인자의 발현이 유도된다. 적소두 에탄올 추출물이 TLR3의 신호전달기전에

서 TRAF3의 하위기전인 MAPKs, NF- κ B, 그리고 IKK α / β 의 활성화와 TBK에 의한 IRF3의 인산화에 영향을 미치는지 확인하였다. THP-1 세포에 적소두 에탄올 추출물을 30, 60, 100 μ g/ml 농도로 1시간 전 처리하고 poly I:C (100 μ g/ml)를 3시간 처리한 후 핵단백질을 추출하여 전사인자 NF- κ B p65와 p50 단백질의 핵 내 이동(nuclear translocation)을 확인하였다. Poly I:C (100 μ g/ml)를 단독 처리한 군에서 NF- κ B p65와 p50, 그리고 p-c-Jun의 핵 내 이동이 증가하는데 반하여, 적소두 에탄올 추출물을 같이 처리한 군에서는 핵 내 이동이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. NF- κ B의 상위 단계인 IKK α / β 와 I κ B의 인산화 활성이 적소두 에탄올 추출물에 의해 저해되는지를 확인하였다. IKK α / β 와 I κ B의 인산화 정도를 확인하기 위하여 THP-1 세포에 적소두 에탄올 추출물을 30, 60, 100 μ g/ml 농도로 1시간 전 처리한 후 poly I:C (100 μ g/ml)를 1시간 처리하였다. IRF3의 인산화 정도를 보기 위해서는 적소두 추출물의 전 처리는 같고 poly I:C (100 μ g/ml)를 2시간 처리하였으며, MAPKs의 인산화를 보기 위해서는 poly I:C (100 μ g/ml)를 30분 처리하였다. Poly I:C (100 μ g/ml)를 단독 처리한 군에서 증가했던 IKK α / β 와 I κ B의 인산화 활성이 적소두 추출물의 전 처리에 의해서 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. MAPKs (P38 and JNK)의 인산화 또한 poly I:C (100 μ g/ml)의 처리에 의해 증가되었다가 적소두 추출물의 전 처리에 의해 감소되는 것을 볼 수 있었다. 마지막으로 적소두 추출물이 TBK의 활성화에 따른 IRF3의 인산화에 영향을 미치는 지를 확인하였다. Poly I:C (100 μ g/ml)를 단독 처리한 군에서 IRF3의 인산화 활성이 증가하였으며 이 인산화 활성은 적소두 추출물의 전 처리에 의해서 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 poly I:C에 의해 활성화된 TLR3의 하위기전은 적소두 에탄올 추출물에 의해 잘 억제되는 것을 볼 수 있었다.

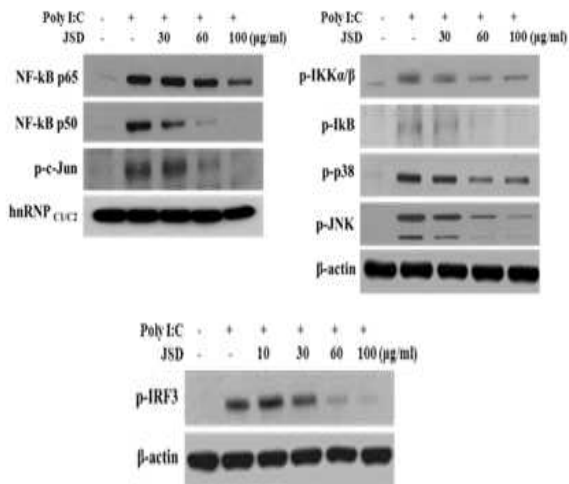


Fig. 5. Effects of *Vigna angularis* extract (JSD) on Poly I:C-induced signaling pathways. THP-1 cells were pretreated with *Vigna angularis* extract (JSD) for 1hr and then stimulated with Poly I:C (100 μ g/ml). Cell lysates were used for western blot to detect the phosphorylation of signaling molecules.

6. 적소두 에탄올 추출물에 의한 TLR7 하위기전 저해효과

적소두 에탄올 추출물이 TLR7 하위기전인 NF- κ B, IKK α / β , 그리고 MAPKs의 활성을 저해하는지 확인하였다. THP-1 세포에 적소두 에탄올 추출물을 10, 30, 60 μ g/ml로 1시간 전 처리하고 poly I (50 μ g/ml)를 3시간 처리한 후 핵단백질을 추출하여 NF- κ B p65와 p50 단백질의 핵 내 이동을 확인하였다. p-IKK α / β , p-I κ B의 발현 정도를 확인하기 위해서 poly I (50 μ g/ml)를 1시간 처리하였고, MAPKs의 인산화 활성을 보기 위해서 poly I (50 μ g/ml)를 30분 처리하였다. Poly I (50 μ g/ml)를 단독 처리한 군에서 NF- κ B p65와 p50 단백질의 핵 내 이동이 증가하였고, 적소두 추출물을 같이 처리한 군에서 이들의 핵 내 이동이 저해되는 것을 확인할 수 있었다. 적소두 추출물이 NF- κ B의 상위 단계를 저해하는지를 확인한 결과, p-IKK α / β , p-I κ B의 발현 또한 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다. Poly I에 의해 유도됐던 P38과 JNK의 인산화 또한 적소두 추출물에 의해 저해되었으며, Fig. 6에서 보는 바와 같이 적소두 추출물은 Poly I에 의해 활성화된 TLR7의 하위기전을 잘 억제하는 것을 볼 수 있었다.

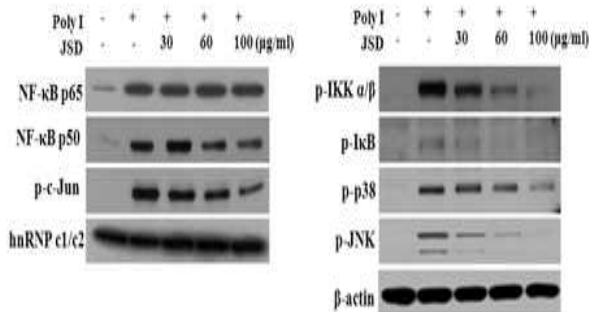


Fig. 6. Effects of *Vigna angularis* extract (JSD) on Poly I-induced signaling pathways. THP-1 cells were pretreated with *vigna angularis* extract (JSD) for 1hr and then stimulated with Poly I (50 μ g/ml). Cell lysates were used for western blot to detect the phosphorylation of signaling molecules.

고찰

최근 10년 사이에 천식, 관절염, 아토피, 비염, 암, 다발성 경화증 등 염증성 질환들이 지속적으로 증가하고 있으며, 염증과 관련된 세포 내 분자표적들을 타겟으로 하는 치료제 개발 연구의 중요성이 떠오르고 있다²¹⁾. 감염초기 비 특이적 선천성 면역 반응에서 병원체의 특정부분을 인지하는 유전자가 톨유사수용체 (TLRs)로 밝혀지고 TLRs의 활성화에 의해 염증유발인자들의 발현이 조절된다는 것이 알려지면서, 염증의 발생과정에 대한 새로운 분자적 기전 해석이 이루어지고 있다¹⁾. TLRs의 과도한 활성화에 의해 염증매개물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 대장염, 췌장염, 류마티스 관절염, 천식 등의 각종 인체질환을 악화시키는 원인이 된다¹¹⁾. 따라서, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 염증 매개물질을 억제하는 물질을 개발할 수 있다면, 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다. 현재 염증질환을 치료하기 위한 방법으로 chemotherapy, radiotherapy 등이 사용되고 있으며 염증치료제로는 스테로이드성 약물이 주로 사용되고 있으나 이는 많은 부작용을 유발하여

지속적인 치료방법으로 사용하기가 어렵다. 또한 세포 내 분자표적들을 타깃으로 한 치료제로 small molecule inhibitor 또는 다양한 항체, peptides들이 개발되고 있지만 이 또한 많은 부작용이 우려된다^{21,22)}. 따라서 약물에 대한 부작용을 극복하고 인체에 안정성이 뛰어난 천연물에서 활성물질을 찾는 연구가 필요하다.

적소두는 성질이 평(平)하고 맛이 달면서 시고, 심(心)과 소장(小腸)을 다스리며, 이수소종(利水消腫), 이습퇴황(利濕退黃), 청열해독(靑熱解毒)의 효능에 의해서 수종, 각기, 소변불리, 황달, 창독 등에 사용되는 약재로 알려져 있다²³⁾. 뿐만 아니라 적소두는 항염증 효과가 뛰어난 식용작물 및 한약재로 당뇨, 멜라닌 생성, 동맥경화 등과 같은 염증성 질환에 치료효과를 나타내며 *in vitro*에서 inflammation에 의한 NO생성을 억제하고 항산화 역할을 한다고 보고되었다. 최근에 적소두 메탄올 추출물이 동물 고혈압모델에서 혈압을 약화시킨다는 연구도 보고되었다^{24,26)}.

본 연구에서는 TLRs의 활성화에 대한 적소두 에탄올 추출물의 효과를 조사하고 TLRs 활성화에 의해 유도되는 염증유발인자들의 발현을 조절하는 기전을 밝히고자 하였다. Plasma membrane에 존재하는 TLR 1/2, TLR4 와 endosome에 위치한 TLR3 및 TLR7 기전에서 적소두 에탄올 추출물이 활성을 가지는 지 확인하기 위한 SEAP assay 결과, 적소두 에탄올 추출물은 TLR 1/2 및 TLR4 에 대해서는 약한 활성을 나타냈으며, TLR3 및 TLR7에 대해서는 농도의존적인 높은 저해활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. TNF- α 와 IL-6는 대표적인 염증 유발인자로 세포사멸을 유도하고, 대식세포를 활성화하여 염증반응을 촉진하는 등 내재면역 반응에 폭 넓게 관여 하는 것으로 보고되고 있다²⁷⁾. 또한, 세포접착인자인 ICAM-1과 chemokine인 MCP-1, RANTES 는 염증부위에서 T cell과 monocyte를 포함한 백혈구를 모이게 하는 역할을 하여 선천면역에 중요하다²⁸⁾. 이런 염증유발인자들의 mRNA 발현은 TLR3의 경우 TRIF 의존적인 세포 내 신호전달기전을 통하여, TLR7은 MyD88 의존적인 세포 내 신호전달 기전으로 유도되는 것으로 알려져 있다⁷⁾. 이에 본 연구에서는 적소두 에탄올 추출물이 TLR3 또는 TLR7 활성화에 의해 증가되는 TNF- α , IL-6, MCP-1, RANTES, ICAM-1의 mRNA 발현에 영향을 주는 지 확인해 보았다. 적소두 에탄올 추출물은 TLR3 활성화기전에서는 TNF- α , IL-6, MCP-1 그리고 ICAM-1의 mRNA 발현을 저해하고, TLR7활성기전에서는 TNF- α , IL-6, MCP-1, RANTES의 mRNA 발현을 저해하는 것을 확인하였다. 그러나, 적소두 에탄올 추출물은 TLR3 활성화 기전에서 RANTES의 mRNA 발현을 저해하지 않으며, TLR7 활성화 기전에서는 ICAM-1의 mRNA 발현을 저해하지 않는 것으로 확인 되었다. 이와 같은 결과는 TLR3와 TLR7 활성화에 의해 유도되는 세포 내 신호전달기전의 차이로 생각되며, 추후 심화연구를 통해 확인하고자 한다. TLR3, TLR7 활성화기전에서 TNF- α 의 mRNA 발현은 고농도의 적소두 에탄올 추출물 처리시 저해하는 경향을 나타내나 저농도 처리시 증가하는 경향을 보이며, TLR7 활성화기전에서 MCP-1의 mRNA 발현 또한 유사한 경향을 보인다. 이에 TNF- α 및 MCP-1의 단백질 발현수준을 확인하여 두 인자의 저해활성이 확실한지 추가적인 연구가 필요하다. TLR3와 TLR7기전이 활성화되면 NF- κ B과 AP-1, MAPKs의

발현이 증가하여 염증유발인자가 발현되기 때문에 적소두 에탄올 추출물이 단백질 수준에서 저해하는지 확인하였다. Poly I:C, poly I에 의해 TLR3와 TLR7가 활성화 되면 하위 신호인 IKK가 인산화되고 이로 인해 I κ B의 인산화와 ubiquitination으로 분해되어 NF- κ B가 핵 속으로 들어가 전사된다. 적소두 에탄올 추출물이 NF- κ B, AP-1의 활성화에 따른 NF- κ B p50, c-Jun, IKK α / β 의 인산화와 MAPKs의 활성화에 따른 JNK 1/2, p38의 인산화를 저해하는 것을 확인 하였다. 이로 인해 TLR3 활성화기전에서 TNF- α , IL-6, MCP-1, ICAM-1의 발현이 저해되며, TLR7 활성화기전에서는 TNF- α , IL-6, MCP-1, RANTES의 발현이 저해되는 것으로 생각된다.

결 론

Human monocyte의 TLR활성화 기전에서 적소두 에탄올 추출물이 항염증 효과를 나타내는지를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 적소두 에탄올 추출물은 100 μ g/ml 농도에서도 세포독성 없이 TNF- α , IL-6, MCP-1과 같은 염증유발인자와 ICAM-1 세포부착인자, RANTES의 발현을 저해하는 것은 이들의 발현을 유도하는 NF- κ B과 AP-1, MAPKs의 활성을 억제함으로써 이루어짐을 알 수 있었다. 본 연구에서는 다양한 화합물로 구성된 추출물을 이용하였으므로 세부적인 활성물질을 찾아 TLR 신호전달체계 중 어떤 과정에 관여하는지 연구 할 계획이다. 또한 적소두 에탄올 추출물의 *in vitro* 결과로 보아 염증성 질환인 류마티스 관절염, 아토피, 천식에 항염증 효과가 있을 것으로 생각된다. 따라서 염증질환의 *in vivo* model에서 이를 검증하는 실험을 통해 염증치료제로서의 가능성을 제시 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단(No. 2012-000113) 및 KRIBB 기관과유사업의 연구비 지원에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

참고문헌

1. Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*. 2(8):675-680, 2001.
2. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124(4):783-801, 2006.
3. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 408(7):740-745, 2000.
4. Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A. The innate immune response to bacterial

- flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 410(6832):1099-1103, 2001.
5. Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 413(6857):732-738, 2001.
 6. Lee, J., Mo, J.H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A.N., Liu, Y.T., Lee, H.K., Shen, C., Cojocaru, G., Shenouda, S., Kagnoff, M., Eckmann, L., Ben-Neriah, Y., Raz, E. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nature Cell Biology*. 8(12):1327-1336, 2006.
 7. Takeda, K., Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. 17(1):1-14, 2005.
 8. Rhee, S.H., Hwang, D. Murine Toll-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responses as determined by activation of NF kappa B and expression of the induction cyclooxygenase. *Journal of Biological Chemistry*. 275(44):34035-34040, 2000.
 9. Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M., Maniatis, T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature Immunology*. 4(5):491-496, 2003.
 10. Curtiss, L.K., Tobias, P.S. Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*. Suppl(50):S340-S345, 2009.
 11. Zipris, D., Lien, E., Xie, J.X., Greiner, D.L., Mordes, J.P., Rossini, A.A. TLR activation synergizes with Kilham rat virus infection to induce diabetes in BBDR rats. *Journal of Immunology*. 174(1):131-142, 2005.
 12. Cook, D.N., Pisetsky, D.S., Schwartz, D.A. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature Immunology*. 5(10):975-979, 2004.
 13. Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., Blanchard, C., Hegde, R.S., Madan, R., Thorne, P.S., Wills-Karp, M., Giovannini, T.L., Weiss, J.P., Karp, C.L. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature*. 457(7229):585-588, 2009.
 14. Ariga, T., Hamano, M. Radical scavenging action and its mode in procyanidins B-1 and B-3 from azuki beans to peroxy radicals. *Agricultural Biology and Chemistry*. 54: 2499-2504, 1990.
 15. Itoh, T., Umekawa, H., Furuichi, Y. Potential ability of hot water adzuki (*Vigna angularis*) extracts to inhibit the adhesion, invasion and metastasis of murine B16 melanoma cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 69(3):448-454, 2005.
 16. Itoh, T., Furuichi, Y. Lowering serum cholesterol level by feeding a 40% ethanol-eluted fraction from HP-20 resin treated with hot water extract of adzuki beans (*Vigna angularis*) to rats fed a high-fat cholesterol diet. *Nutrition*. 25(3):318-321, 2009.
 17. Mukai, Y., Sato, S. Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract attenuates blood pressure elevation and modulates nitric oxide synthase and caveolin-1 expressions in rats with hypertension. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 19(7):491-497, 2009.
 18. Facchini, F.S., Saylor, K.L. A low-iron-available, polyphenol-enriched, carbohydrate-restricted diet to slow progression of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 52(5):1204-1209, 2003.
 19. Mukai, Y., Sato, S. Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) seed coats attenuate vascular oxidative stress and inflammation in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 22(1):16-21, 2011.
 20. Kawai, T., Akira, S. Signaling to NF-kB by Toll-like receptors. *Trends in Molecular Medicine*. 13(11):460-469, 2007.
 21. Hoffman, E.S., Smith, R.E., Renaud, R.C. Jr. From the analyst's couch: TLR-targeted therapeutics. *Nature review drug discovery*. 4(11):879-880, 2005.
 22. O'Neill, L.A., Bryant, C.E., Doyle, S.L. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacological reviews*. 61(2):177-197, 2009.
 23. 李時珍. 本草綱目. 北京. 人民衛生出版社, pp 833-837, 1456-1457, 508-512, 1982.
 24. Ward, J.R., Francis, S.E., Marsden, L., Suddason, T., Lord, G.M., Dower, S.K., Crossman, D.C., Sabroe, I. A central role for monocytes in Toll-like receptor-mediated activation of the vasculature. *Immunology*. 128(1):58-68, 2009.
 25. Farina, C., Theil, D., Semlinger, B., Hohlfeld, R., Meinl, E. Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *International Immunology*. 16(6):799-809, 2004.
 26. Sato, S., Mukai, Y., Yamate, J., Kato, J., Kurasaki, M., Hatai, A., Sagai, M. Effect of polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract on blood pressure elevation and macrophage infiltration in the heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 35(1):43-49, 2008.
 27. Bendtzen, K. Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity.

Immunology Letters. 19(3):183-191, 1988.
28. Charo, I.F., Ransohoff, R.M. The many roles of chemokines

and chemokine receptors in inflammation. The New
England journal of medicine. 354: 610-621, 2006.