

## 금은화의 type I interferon 억제효과 및 기전에 관한 연구

원광대학교 한의과대학 한방부인과학 교실  
강용구, 유익한, 김승백, 최창민, 서윤정, 조한백

### ABSTRACT

#### A Study on the Inhibitory Effect and Mechanism of Lonicera Japonica on Type I Interferon

Yong-Goo Kang, Ik-Han Ryu, Song-Baek Kim  
Chang-Min Choi, Yun-Jung Seo, Han-Baek Cho

Dept. of Oriental Obstetrics & Gynecology, College of Oriental Medicine,  
Won-Kwang University

**Objectives:** The purpose of this study was to investigate whether Lonicera japonica(LJ) could inhibit LPS-induced type I IFN production.

**Methods:** To evaluate inhibitory effect of LJ on type I IFN, we examined type I IFN, IRF-1, 7 and IL-10 production on LPS-induced macrophages using real time RT-PCR. Next, we observed the interaction of type I IFN, IRF-1, 7 and IL-10 using IL-10 neutralizing antibody. Finally we examined the activation of STAT-1, 3 using western blot.

**Results:** LJ inhibited Type I IFN expression of mRNA and increased IL-10 expression of mRNA. Also LJ inhibited the level of IRF-1, 7 mRNA and the nuclear translocation of IRF-3. Further more, LJ reduced the activation of STAT-1, 3 which are involved in continuous secretion of immune cytokines. Blockade of IL-10 action caused a significant reduction of type I IFN and IRF-1, 7 than LPS-induced LJ pretreatment.

**Conclusions:** LJ inhibits LPS-induced production of type I IFN by IL-10. This study may provide a clinical basis for anti-inflammatory properties of LJ.

**Key Words:** Lonicera japonica, Type I interferon(IFN), Interleukin-10(IL-10), Interferon regulatory factor(IRF), Signal transducers and activators of transcription (STAT)

“본 연구는 2011년도 원광대학교 교내 연구비 지원으로 연구되었음”

## I. 서 론

염증 반응은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응으로<sup>1)</sup>, 면역계를 동원하는 생체의 방어기전과 상처의 치유에 핵심적인 역할을 하고 있을 뿐만 아니라 많은 질병의 병리 발생에 관련되어 있는 중요한 과정이다<sup>2)</sup>. 대식세포는 외부 침입물질에 대한 방어기전을 신속하게 보내는 역할을 하며, 염증 반응 중에 대식세포가 활성화되면 많은 염증성 인자들을 생산하는데, 그 인자들에는 TNF- $\alpha$ , interleukin, leukotriens, nitric oxide, interferon 등이 있다<sup>3-6)</sup>. 이러한 염증성 인자 중에 IFN은 항바이러스와 항박테리아 반응, 면역조절의 활성화, 세포증식의 억제, 세포사멸, 항암반응을 유도하는 데 중추적인 역할을 하는 cytokine이다<sup>7-11)</sup>.

IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\beta$ 는 type I IFN으로써 바이러스나 LPS에 의한 type I IFN의 유도는 선천면역에서 중요하며, TLR과 같은 대식세포 표면수용체의 활성화에 의해 매개되어 염증성 cytokine 생성에 영향을 미친다<sup>12,13)</sup>.

IRF는 바이러스에 감염되면 빠른 시간 내에 활성화되는 전사활성인자로, 바이러스 감염 시 IFN 생산을 통하여 면역 반응을 조절하게 되는데<sup>14)</sup>, type I IFN의 조절은 IRF-1, 7이 주로 관련되어 있으며<sup>15-18)</sup>, 대식세포의 TLR4가 LPS와 결합하여 IRF-1, 7을 발현시킴으로써 IFN- $\alpha/\beta$ 를 생성한다<sup>14,19,20)</sup>. 그러나 IFN- $\alpha/\beta$  생성이 지나치게 되면 수지상세포 등 항원 제시세포의 성숙을 촉진하고 세포독성 T 림프구를 활성화시켜 세포파괴를 유

도하는 한편, IFN- $\alpha/\beta$ 와 결합한 세포에서 나오는 자가항원-항체반응을 강화시켜 염증성 장염이나, 류머티즘, 피부 결핵 등과 같은 자가면역질환을 야기할 수 있다<sup>21-23)</sup>.

IL-10은 면역억제와 항염증 작용을 하는 cytokine으로 다핵호중구, 단핵구, 대식세포로부터 생산되는 염증성 cytokine의 생산을 억제하고 IL-10의 항염효과를 증진시키는 물질들의 발현을 상향 조절한다<sup>24)</sup>. 따라서 급성감염 기간 동안 생긴 염증 반응의 악화를 방지하여 염증 반응으로 생기는 병변을 예방할 수 있다<sup>25)</sup>.

금은화는忍冬科에 속한多年生 半常綠木質藤本인忍冬의꽃봉오리를건조한것으로性味는甘寒하며肺, 胃, 心으로歸經하고清熱解毒, 涼散風熱효능이있어<sup>26)</sup> 다양한염증성질환에상용되는대표적인항염증약물중의하나로알려져있다<sup>27)</sup>. 최근금은화에관한연구가항염증<sup>28-31)</sup>, 항균효과<sup>32)</sup>, 항암효과<sup>33,34)</sup> 등의분야에서활발히진행되고있으나주요PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, COX-2 등의cytokine과NO생성억제에관한내용들<sup>35-38)</sup>이보고되었고, 금은화가첨가된처방으로五味消毒飲에대한IFN억제효과<sup>39)</sup>에관하여보고된바있으나, 금은화의직접적인IFN억제효과에대한연구는미미한실정이다.

이에저자는금은화가IFN- $\alpha/\beta$ 의생성에어떻게관여하는지알아보고자금은화의물추출물을제조하여LPS로유도한대식세포에서IFN- $\alpha/\beta$ 의생성에미치는기전에대해서조사하여유의성있는결과를얻었기에보고하는바이다.

## II. 실험방법

### 1. 재 료

#### 1) 약 재

실험에 사용한 금은화(Lonicera japonica, LJ)는 음니허브(경북 영천, 대한민국)에서 구입하여 정선해서 사용하였다.

#### 2) 동 물

실험동물인 C57BL/6 mice는 Orient Bio Co.(경기도 성남, 대한민국)에서 구입하였다.

#### 3) 시약 및 기기

세포배양에 사용한 RPMI-1640, Fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin은 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Thioglycollate(TG)는 BD Pharmingen(San Diego, CA, USA)에서 구입하였고, Tri-zol reagent와 polymerase chain reaction(PCR) reaction kit, IL-10 중화항체는 Invitrogen cooperation(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였으며, 실험에 사용한 항체인 Phospho STAT-1, 3 항체는 Cell signaling(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 Thermo scientific은 Tewksbury(MA, USA), Bio-rad는 Hercules(CA, USA), Applied Biosystems은 Invitrogen cooperation Carlsbad(CA, USA)에서 구입하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 검액의 제조

금은화 100 g을 물 1 l에 약탕기(대웅, 한국)로 3시간 가열 추출한 다음 여과한 후, 동결 건조하여 건조분말 23.56 g(수득율 : 23.56%)을 얻었으며, 생리식염수에 녹여 stock solution(100 mg/ml)

을 제조하였다. 제조된 stock solution은 -20℃에 보관하면서 분석방법에 적합하도록 희석하여 사용하였다.

#### 2) 복강 대식세포 배양

실험 3~4일 전에 실험 mouse에 염증 물질인 thioglycollate 2~3 ml를 복강 내에 투여하고, RPMI-1640+10% FBS medium 6~7 ml를 복강 내에 투여한 다음 복강액을 뽑아내 원심분리 한 후 cell을 counting 해서 Dish나 Plate에 깔고 5% CO<sub>2</sub> 37℃가 유지되는 incubator에서 3시간 배양하고, suspension 세포를 버린 후에 부착한 세포를 대식세포로 간주하여 실험하였다.

#### 3) MTT 분석

대식세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT 환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. 세포들을 RPMI 배지에서  $2 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 현탁하여 100, 250, 500 µg/ml의 농도로 금은화 물 추출물을 처리하였다. 24시간 배양 후, 5 mg/ml의 농도로 MTT 용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO 200 µl를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 解液을 96-well plate에 loading 하여, spectrophotometer(MD, USA)를 이용하여 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다. 세포의 생존율은 어떠한 처치도 가하지 않은 control cells과의 비율로 나타내었다. [즉, viability(%) =  $100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / (\text{absorbance of control})$ ]

#### 4) RNA 추출

Total RNA는 Tri-zol 시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 금

은화 물 추출물을 전처리하고 LPS로 자극한 후 1시간 배양한 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 PBS를 1 ml 씩 가해 세포를 포집한 후, 원심분리 하여 위에 PBS는 버리고 바닥에 남은 세포를 Tri-zol reagent (Invitrogen, USA) 용액을 1 ml 넣어서 세포를 용해시키고 100  $\mu$ l의 chloroform 용액을 가하여 두세 번 잘 섞어준 뒤 12,000RPM에서 15분간 원심분리 하여 맨 위의 상층액을 취하였다. 그 후 2-propanol 과 1:1로 섞고 12,000RPM에서 10분간 원심분리 하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물을 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시킨 뒤 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15  $\mu$ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다.

추출한 RNA는 reverse transcriptase PCR의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 간단히 기술하자면 역전사 반응을 위하여 1 mg의 total RNA에 0.5 mg의 oligo-(dT)을 넣고 70°C에서 10분간 변성시켰다. 1X single strand buffer, 0.5 mM DTT, 500 mM dNTPs, 200 Unit reverse transcriptase를 첨가하고 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후에 PCR은 각각의 tube에 1 ml cDNA, 1X PCR buffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTPs, 0.2 mM 의 primer를 넣고 PCR 조건인 92°C에서 30초, 58°C에서 45초, 72°C에서 30초를 30cycle을 반복하였다.

#### 5) Primers and probes

Forward(f)와 reverse(r) primer는 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA) 에서 합성하였고 TaqMan probe는 MWG-Biotech AG(Ebersberg, Germany)에서 합성하였으며 TaqMan minor groove binder(MGB) probe(Applied Biosystems, USA)는 Primer

Express 1.5 software(Applied Biosystems, USA)를 사용하여 디자인하였다.

#### 6) 면역염색법

마우스 복강 내에서 추출한 대식세포에 금은화 물 추출물을 3시간 동안 전처리 한 군과 처치하지 않은 대조군에 500 ng/ml LPS로 37°C에서 1시간 동안 자극하고 세포를 고정시키기 위해 PBS로 3회 세척한 후 4% paraformaldehyde용액에 30분간 배양하였다. 그 뒤 0.1% TritonX-100 용액으로 상온에서 15분간 배양하였다. 세척을 하고 blocking serum으로 1시간 blocking 한 뒤 1:100으로 희석한 1차 항체 IRF-3 antibody(Zymed, 51-3200, Invitrogen, Carlsbad, CA92008, USA)를 넣어 하룻밤 동안 배양하고 다음날 1:50으로 희석한 Alexafluor 568 형광이 붙어있는 2차 항체 goat anti-rabbit IgG(Invitrogen, USA)로 4시간 동안 암실에서 반응시키고 핵염색을 위하여 1:1000으로 희석시킨 DAPI로 30분간 염색시켜 형광현미경으로 관찰하였다.

#### 7) Western blot analysis

복강에서 추출한 마우스 대식세포를 60 mm culture dish에  $1 \times 10^6$  cells/ml로 세포를 배양하고 serum free media(RPMI1640)로 12시간 starvation 시키고 금은화 물 추출물을 1시간 전처리 한 뒤에 500 ng/ml의 LPS로 자극하여 cold PBS로 3회 세척하였다. 4시간 후, cell을 수확하여 얻은 뒤 5000RPM으로 5분 동안 원심분리하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거한 후 lysis buffer(lysis buffer 1 ml + phosphatase inhibitor 10  $\mu$ l + protease inhibitor 10  $\mu$ l)를 넣어 단백질을 lysis시켜서 15000RPM으로 20분 동안 원심분리하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질을 정량

하였다. 동일한 양의 단백질에 sampling buffer(4X)를 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 membrane에 옮기고 나서 5% skin milk로 2시간 동안 blocking하였다. STAT-1, 3의 phosphorylation과 STAT-1, 3를 ECL detection 용액(Amersham, Carlsbad, CA, USA)으로 확인하였다.

### 3. 통계처리

실험 결과에 대한 통계 처리는 SPSS version 10.0을 이용하여 Student's t-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## III. 결 과

### 1. 세포독성

대식세포에 금은화 물 추출물을 처리하여 24시간 후에 세포의 생존율을 측정 한 결과 금은화 물 추출물은 대식세포에 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1).

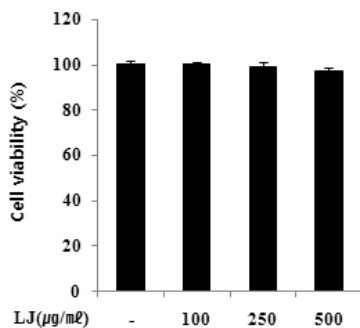


Fig. 1. Cytotoxic Effect of LJ on Murine Peritoneal Macrophages.

Macrophages were incubated with LJ as indicated dose for 24 h. The cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are mean of three independent experiments. The similar results were obtained from three additional experiments.

### 2. IFN- $\alpha/\beta$ 의 mRNA 생성에 미치는 영향

대식세포에 금은화 물 추출물을 3시간 전처리한 다음, LPS로 1시간 자극하고 real time RT-PCR 의 방법을 이용하여 확인한 결과, 금은화 물 추출물은 IFN- $\alpha/\beta$ 의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제 하였다(Fig. 2).

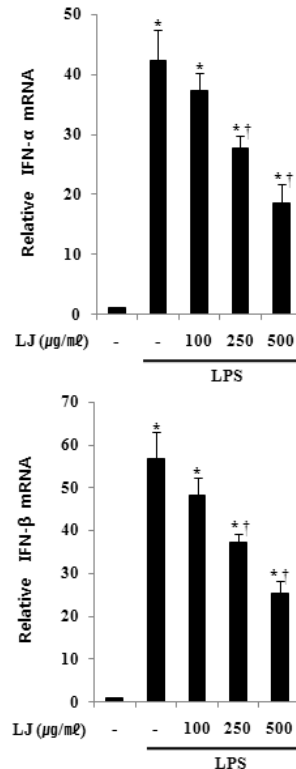


Fig. 2. Effect of LJ on LPS-induced IFN- $\alpha/\beta$  Expression.

The cells were pre-treated with LJ water extract at indicated concentration for 3 h, and then incubated with LPS for 1 h. IFN- $\alpha/\beta$  mRNA expression were examined by real time RT-PCR. \* P<0.05 : significant as compared to saline. † P<0.05 : significant as compared to LPS. Data represent the mean $\pm$ S.E. of three independent experiments.

### 3. IRF-1, 7의 mRNA 생성에 미치는 영향

금은화의 면역조절 기전을 조사하기 위하여 IFN- $\alpha/\beta$ 의 생성에 중요한 역할을 한다고 알려진 IRF-1, 7의 mRNA 생성을 측정하였다. real time RT-PCR을 이용하여 IRF-1, 7에 금은화 물 추출물이 미치는 영향을 조사한 결과 금은화 물 추출물은 IRF-1, 7의 mRNA 생성을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 3).

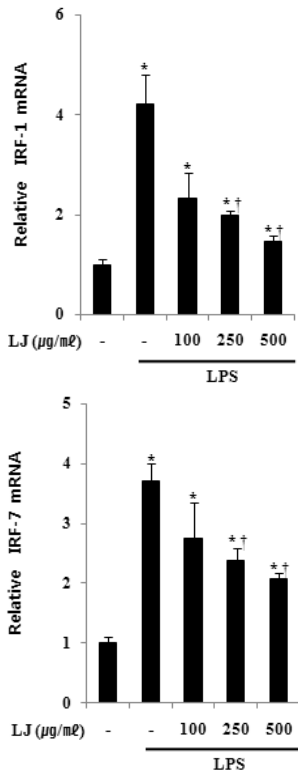


Fig. 3. The Effect of LJ on LPS-induced IRF-1, 7 Expression.

The cells were pre-treated with LJ water extract at indicated concentration for 3 h, and then incubated with LPS for 1 h. IRF-1, 7 mRNA expression were measured using real-time RT-PCR. \* P<0.05 : significant as compared to saline. † P<0.05 : significant as compared to LPS. Data represent the mean±S.E. of three independent experiments.

### 4. IRF-3의 핵 이동 억제에 미치는 영향

금은화의 면역조절 기전을 알아보기 위하여 IFN- $\alpha/\beta$ 의 생성에 중요한 역할을 한다고 알려진 IRF-3가 핵으로 이동하는 지를 관찰하였다. 면역염색법을 이용하여 금은화 물 추출물이 IRF-3에 미치는 영향을 조사한 결과 금은화 물 추출물은 IRF-3가 핵으로 이동하여 IFN을 생성하는 과정을 억제하였다(Fig. 4).

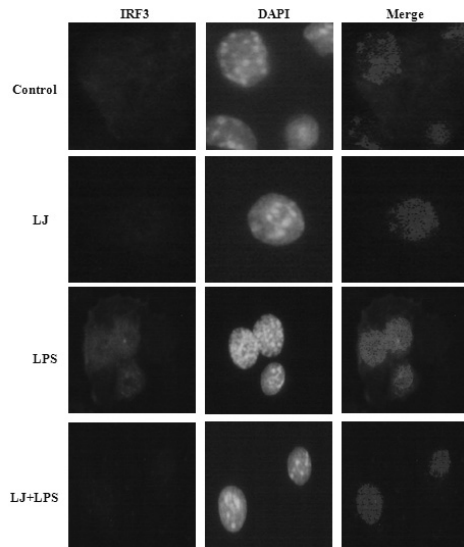


Fig. 4. The Effect of LJ on LPS-induced IRF-3 Translocation.

The cells were pre-treated with LJ water extract at indicated concentration for 3 h, and then incubated with LPS for 1 h. Nuclear translocation of IRF-3 was examined using immunostaining. Data represent the mean±S.E. of three independent experiments.

### 5. IL-10을 통한 면역조절에 미치는 영향

금은화의 IFN- $\alpha/\beta$ 의 생성억제 기전을 알아보기 위하여, IL-10의 mRNA 발현을 조사한 결과 IL-10은 금은화 물 추출물을 전처리하였을 때 생성이 증가하였다(Fig. 5A). 또한 mRNA 수준에서 금

은화 물 추출물의 처리시간에 따른 IL-10의 생성(Fig. 5A)과 IFN- $\alpha/\beta$ , IRF-1의

억제효과가 일치하였다(Fig. 5B, 5C).

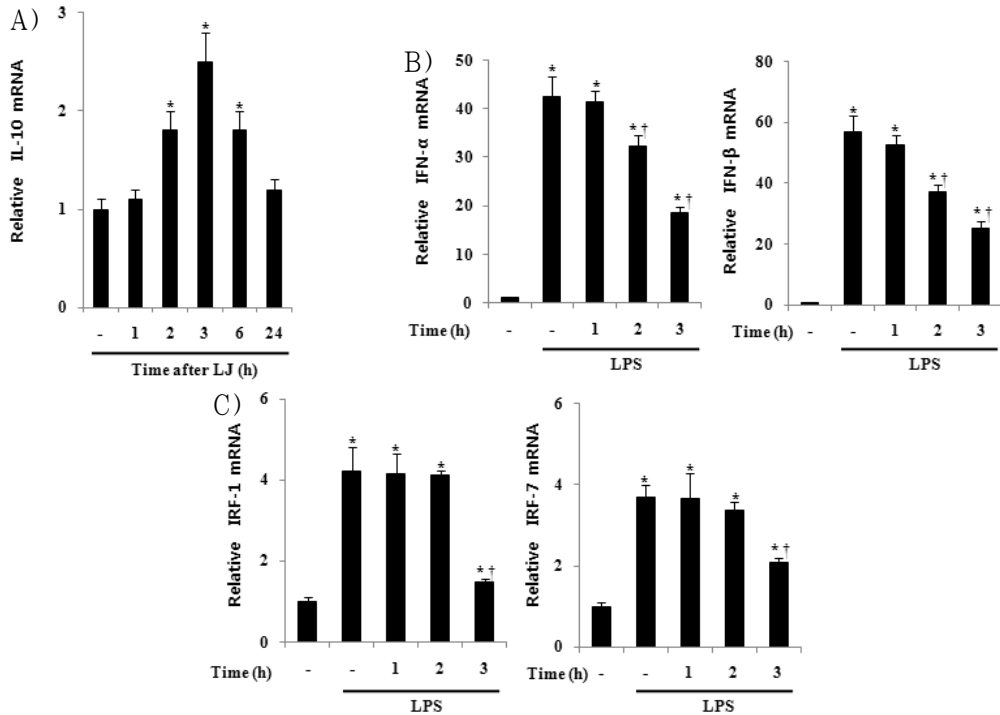


Fig. 5. IL-10 Has Association in LPS- induced IFN- $\alpha/\beta$  Inhibition of LJ.

(A) The cells were pre-treated with LJ water extract (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for indicated times, then IL-10 mRNA expression was measured by real time RT-PCR. (B and C) The cells were pre-treated with LJ water extract (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for indicated times, and then incubated with LPS for 1 h. IFN- $\alpha/\beta$  and IRF-1, 7 mRNA expression were examined by real time RT-PCR. \*  $P < 0.05$  : significant as compared to saline. †  $P < 0.05$  : significant as compared to LPS. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments.

### 6. 중화항체 처리 후 IL-10을 통한 면역조절에 미치는 영향

금은화 물 추출물이 IL-10을 통한 면역조절 기전에 미치는 영향을 더욱 정확하게 검증하기 위해 IL-10 중화항체인 IL-10 neutralizing antibody를 이용하여

실험한 결과, 금은화 물 추출물만을 처리했을 때 IFN- $\alpha/\beta$ , IRF-1, 7의 생성이 억제되는 것에 반해(Fig. 6A, 6B), IL-10 중화항체를 처리 했을 때는 IFN- $\alpha/\beta$ , IRF-1, 7의 억제효과가 나타나지 않았다(Fig. 6A, 6B).

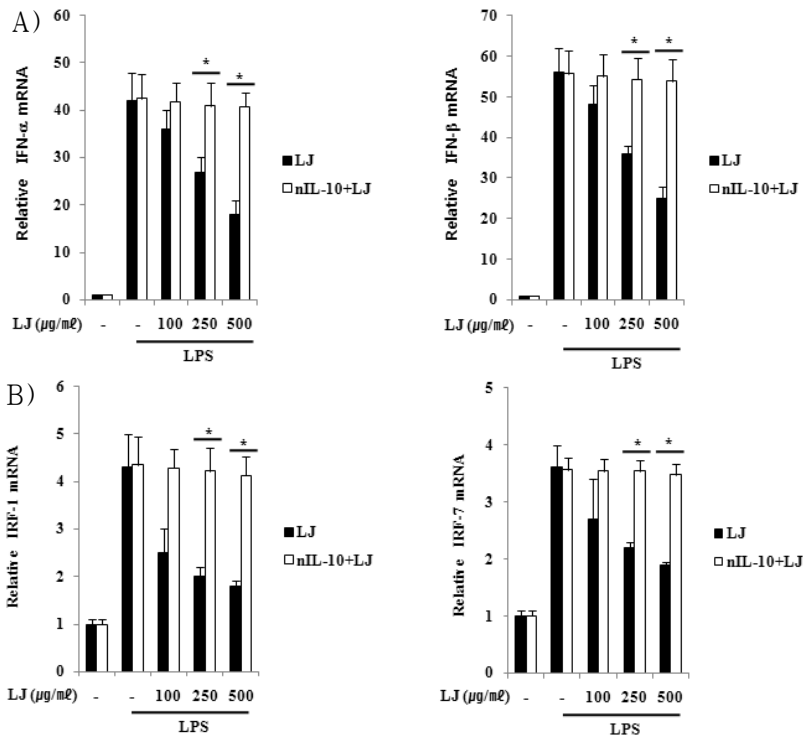


Fig. 6. IL-10 Has Association in LPS-induced IFN- $\alpha/\beta$  Inhibition of LJ. The cells were pre-treated with neutralizing antibody (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 1 h, then treated with LJ water extract for 3 h, and then incubated with LPS for 1 h. IFN- $\alpha/\beta$  (A) and IRF-1, 7 (B) mRNA expression were examined by real time RT-PCR. nIL-10 : IL-10 neutralizing antibody. \*  $P < 0.05$  : significant as compared to saline. †  $P < 0.05$  : significant as compared to LPS. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments.

### 7. STAT에 미치는 영향

LPS로 자극한 대식세포에서는 2~3시간부터 인산화가 진행되어 신호전달이 시작되는 것에 비해 금은화 물 추출물을 전처리한 곳에서는 STAT-1, 3 모두 인산화되지 않았다(Fig. 7).

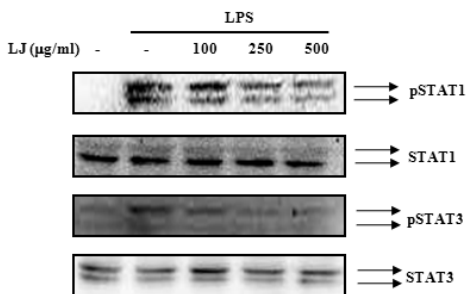


Fig. 7. Effect of LJ on STAT-1, 3

### Phosphorylation.

The cell were pre-treated with LJ water extract at indicated concentration for 3 h, and then incubated with LPS for 4 h. Western blot analysis was performed to detect the phosphorylation of STAT-1, 3 (pSTAT-1, 3). STAT-1, 3 were loading control. Similar results were obtained in three independent experiments.

## IV. 고찰

금은화(Lonicera japonica)는忍冬科(Caprifoliaceae)에 속한忍冬(Lonicera japonica Thunb)의花蕾를 건조한 것으로 여름철 꽃이 피기 전에 채취한 것을 약재로 사용하며, 性은寒하고, 味는甘



하며, 淸熱解毒, 涼血止血, 散風熱의 효능이 있어<sup>26)</sup> 癰腫疔瘡, 腫瘍, 喉痺, 丹毒, 疥癬, 楊梅惡瘡, 五種尸疔, 瘰癧, 痔漏, 熱毒血痢, 風熱感冒, 溫病發熱 등을 치료하는<sup>40)</sup> 대표적인 항염증 약물이다<sup>41)</sup>. 알콜 또는 물을 용매로 추출하여 사용되며<sup>41)</sup> 주성분으로는 luteolin, inositol, saponin, tannin과 ginnol, sterols, glycoside, chlorogenic acid, flavonoid 화합물 및 isochlorogenic acid 등이 있다<sup>42-44)</sup>.

한의학적으로 금은화가 배합된 방제를 보면 《東醫寶鑑》에는 金銀花散, 內托千金散, 仙傳化毒湯, 連翹敗毒散, 天花散, 淸熱消毒飲, 托裏消毒飲 등<sup>45)</sup>이 수록되어 瘰癧, 癰疽, 疔疽, 天疱瘡, 便癰, 乳癰 등 넓은 의미의 化膿性 炎症 병변 치료에 응용되었다<sup>46)</sup>.

염증 반응이 일어나면 대식세포는 외부 침입물에 대한 방어 기전으로 많은 염증성 인자들을 생산하게 되는데<sup>3,4)</sup> 염증성 매개물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되어 인체의 각종 질환을 악화시키는 요인이 된다. 따라서 염증 반응을 억제하는 것은 염증성 질환을 치료하는데 중요하다<sup>47,48)</sup>.

LPS(Lipopolysaccharide)는 그람 음성 세균의 균체내 독소로 외부 세포막을 구성하는 성분으로 이전부터 대식세포의 활성화 인자이며 내독소성 쇼크의 원인 물질로 알려져 있다<sup>49)</sup>. LPS 자극에 의해서 대식세포가 활성화되면 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, NO, IFN<sup>5,6,49)</sup> 같은 물질들을 생산한다.

이 연구는 금은화가 염증 반응에서 발생하는 type I IFN 생성의 억제에 미치는 효과를 확인하기 위하여, LPS로 활성화된 대식세포에서 생성되는 IFN- $\alpha/\beta$

와, IFN의 전사활성인자인 IRF, 항염증 cytokine으로 알려진 IL-10, IFN에 의해 활성화되는 STAT 기전에 미치는 영향을 관찰하였다.

금은화 물 추출물이 세포 생존률에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 대식세포에 금은화 물 추출물을 100, 250, 500  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 결과 모든 농도에서 세포의 생존율에 영향을 주지 않았다(Fig. 1).

바이러스에 감염되면 IFN에 의해 면역반응을 유도하게 된다. IFN은 크게 type I, II 로 구별되며 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\beta$ 를 포함하는 type I IFN은 선천성 면역반응을 구성하는 요소로써, 바이러스 감염에 대한 첫 번째 방어기작으로 알려져 있다<sup>50)</sup>. 그러나 IFN- $\alpha/\beta$ 의 과다 생성은 면역계의 말초 내성(peripheral tolerance)을 깨뜨릴 수 있어 자가면역질환을 유발할 수 있다. 실제로 암이나 감염환자에게 치료목적으로 쓰인 IFN- $\alpha/\beta$ 로 인해 systemic lupus erythematosus(SLE), 인슐린의존성 당뇨병, 쇼그렌증후군 등 자가면역질환이 발생했다는 보고가 있어<sup>23)</sup> IFN- $\alpha/\beta$ 와 같은 염증매개 물질의 과량 생산을 억제하는 것은 각종 면역질환 및 염증성 질환의 치료에 중요하다.

이 연구에서 금은화 물 추출물이 IFN- $\alpha/\beta$ 의 mRNA 수준의 발현을 농도의존적으로 억제함을 알 수 있었다(Fig. 2). 이는 금은화 물 추출물이 IFN- $\alpha/\beta$ 를 억제함으로써 염증 반응을 감소시킬 수 있다는 것을 보여주고 있다.

Interferon regulatory factor(IRF)는 지금까지 IRF-1부터 IRF-9까지 총 9개의 유전자가 IRF계로 밝혀져 있으며<sup>14,51)</sup> 바이러스 감염시 IFN 생산으로 감염된 세포에서 면역반응을 조절한다<sup>14)</sup>. IRF-1

은 IFN을 유도하고<sup>52,53)</sup> IRF-3, 7은 바이러스 감염에 반응하여 type I IFN 발현을 조절한다. IRF-3, 7은 세포질에 단량체(monomer)로 존재하고 있다가 바이러스 감염시 인산화되어 이량체(homodimer) 및 이종체(heterodimer)를 형성하고 핵으로 이동하여, type I IFN 유전자 프로모터의 interferon stimulated response element(ISLE)에 결합하여 IFN의 전사를 활성화시킨다<sup>52,54-56)</sup>.

금은화 물 추출물이 IFN- $\alpha/\beta$  생성을 억제하는 기전을 알아보기 위하여 금은화 물 추출물이 IRF-1, 7의 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 금은화 물 추출물은 IRF-1, 7의 mRNA 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 3). 또한 IRF-3가 핵으로 이동하는 것을 막는 것을 보여주었다(Fig. 4). 이는 금은화가 IFN- $\alpha/\beta$ 의 생성을 억제하는 기전이 IRF-1, 3, 7 과 관련되어 있다는 것을 나타낸다.

IL-10은 염증세포의 침윤 혹은 그 활성화를 감소시키는 중요한 항염증성 cytokine이다<sup>57)</sup>. 생체 내에서 IL-10은 면역억제 역할과 부분적으로 림프구의 성장촉진 역할을 동시에 수행하고 있다. 또한 단핵세포 MHC class II 발현을 감소시키며<sup>58)</sup>, 면역억제 기능으로는 Th1 type 세포와 단핵구에 의해 생산되는 pro-inflammatory cytokine(IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18)의 생산을 억제함<sup>59-61)</sup>으로써 염증세포의 화학적 주성(chemotaxis)을 방해하여 염증을 억제하는 기능을 한다<sup>62)</sup>.

정 등<sup>63)</sup>은 금은화의 성분 중 하나인 luteolin이 LPS로 유도한 IFN- $\alpha/\beta$ 를 억제하는 기전과 IFN 전사활성인자인 IRF와의 연관성을 증명하였으나 IL-10과의

연관성은 밝혀내지 못하였다. 이에 금은화가 항염증 cytokine인 IL-10의 생성에 영향을 미치는 영향을 알아보기 위하여 IL-10의 mRNA 생산량을 관찰하였다. 금은화 물 추출물을 처리한 지 2시간 이후부터 IL-10의 mRNA 생산량이 유의성 있게 증가하는 것을 관찰할 수 있고, 3시간 경과하였을 때 가장 많은 증가량을 보였다(Fig. 5A). 또한 IL-10의 생산량이 증가하는 2~3시간 사이에 IFN- $\alpha/\beta$ 와 IRF-1, 7의 생산량이 유의성 있게 억제되는 것을 볼 수 있다(Fig. 5B, 5C). 이는 금은화가 IFN- $\alpha/\beta$  생산을 억제하는 기전에 IL-10이 관련될 수 있는 가능성을 보여준다. 이에 금은화가 IFN- $\alpha/\beta$  생산을 억제하는 기전이 금은화에 의해 생산 유도된 IL-10과 관련이 있을 것이라는 가설을 세우고 이를 검증하기 위하여, IL-10 중화항체를 사용하여 그 기능을 억제시킨 후 IFN- $\alpha/\beta$ 와 IRF-1, 7의 mRNA 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 실험결과 IL-10의 기능을 억제하지 않은 상태에서는 IFN- $\alpha/\beta$ 와 IRF-1, 7의 생성이 억제되는 것에 비해(Fig. 6A, 6B), IL-10 중화항체를 사용하여 IL-10의 기능을 억제시켰을 때에는 IFN- $\alpha/\beta$ 와 IRF-1, 7의 생성이 억제되지 않는 것을 관찰하였다(Fig. 6A, 6B). 이는 금은화가 IFN- $\alpha/\beta$ 와 그 전사활성인자인 IRF-1, 7 생성을 억제하는 기전에 IL-10이 관련이 있다는 것을 보여준다.

이 결과는 기존에 luteolin을 통한 연구에서 luteolin 전처리하는 IL-10의 생성을 증가시키지만, IL-10의 기능이 억제된 상태 하에서는 IFN- $\alpha/\beta$ 의 생성에 미치는 영향이 없었다는 결과<sup>63)</sup>와는 상이한 것으로, 금은화의 다른 성분 혹은 아

직 밝혀지지 않은 성분이 IL-10을 통한 type I IFN의 억제효과에 기여할 것으로 판단되며 향후 이에 대한 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

Cytokine이 목적 세포에서 생물학적 반응을 유발하려면 세포 표면에 위치한 cytokine 수용체에 결합한 후 세포 내 신호전달을 통해 핵 내에 위치한 특정 유전인자를 활성화시켜야 한다<sup>64</sup>). STAT는 세포질 내에서는 비활성으로 있다가 여러 가지 cytokine이나 호르몬의 자극으로 인산화를 통해 활성화되고, 이합체(dimer)를 형성한 후 핵 내로 이동하여 유전자의 전사를 조절하는 단백질 군이다<sup>65</sup>). 일반적인 cytokine과 peptide 호르몬들의 세포내 신호전달은 다양한 단백 키나제 연쇄반응을 통해 다단계로 작용하는 여러 분자들을 경유하여 이루어지는 것에 반하여, JAK-STAT 경로는 신호전달 과정에서 다른 분자들의 참여를 제외시킴으로써 매우 신속하고 정확하게 특정 ligand에 대한 반응을 유발시킬 수 있는 독특한 신호전달 경로로써 주목 받고 있다<sup>66-68</sup>). 특정 cytokine이 그에 대항하는 수용체와 결합하게 되면, JAK이 수용체에 있는 tyrosin의 인산화를 유도하게 되고, 이렇게 인산화된 tyrosin은 STAT 단백질이 수용체에 결합하도록 도와준다. 이후 STAT 단백질은 스스로 인산화되어 p-STAT(phosphorylated STAT)의 형태로 수용기에서 떨어져 나와 이량체를 형성하여 핵 내로 이동하여 표적 유전자 발현에 관여하게 된다<sup>69</sup>).

대식세포에서 IFN- $\alpha/\beta$ 가 생성되어 분비되면 STAT 경로가 활성화되어, 염증 반응 중에 cytokine의 지속적인 분비에 관여한다. 이에 금은화 물 추출물이 IFN- $\alpha/\beta$ 에 의해서 활성화 되는 STAT 경로의 활

성여부를 알아보기 위해 실험한 결과, LPS로 자극한 대식세포에서 금은화 물 추출물을 전처리한 군에서는 STAT-1, 3 모두 인산화하지 않았다(Fig. 7). 이 결과는 금은화 물 추출물이 type I IFN의 생성 억제에 관여하고, 그 이후의 기전인 STAT signaling의 활성화 또한 감소시킨다는 것을 보여준다.

한의학에서 사용되는 대표적인 항염증 약물인 금은화 물 추출물로 대식세포의 type I IFN 억제와 그 기전에 미치는 영향을 검증한 결과 금은화 물 추출물은 IRF-1, 3, 7의 억제를 통해 type I IFN 생산을 감소시키는 효과를 보여주었으며, 이러한 억제 기전에 IL-10이 관여하고 있음을 알 수 있었다. 이는 이전 정등<sup>63</sup>의 연구에서 luteolin의 IFN- $\alpha/\beta$  억제효과가 IL-10 경로를 통한 것이 아니라는 결과와는 상이하였다. 또한 금은화 물 추출물은 STAT-1, 3의 인산화를 억제하여 염증 반응 중에 cytokine의 지속적인 분비에도 관여하는 것을 알 수 있었다.

따라서 금은화는 type I IFN 생성억제 기전을 이용한 항염증약물로서의 개발 가능성이 있다고 판단되며, 향후 금은화의 type I IFN 생성억제 기전에 미치는 영향에 대한 세밀하고 다양한 방법으로의 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

## V. 결 론

금은화가 IFN- $\alpha/\beta$ 의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 금은화 물 추출물을 제조하여 LPS로 유도한 대식세포에서

IFN- $\alpha/\beta$ 의 생산에 미치는 기전에 대해서 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 금은화 물 추출물은 IFN- $\alpha/\beta$ 의 mRNA의 발현을 농도 의존적으로 억제하였다.
2. 금은화 물 추출물은 IRF-1, 7의 mRNA의 발현을 농도 의존적으로 억제하고, IRF-3가 핵으로 이동하여 IFN- $\alpha/\beta$ 를 생성하는 과정 또한 억제하였다.
3. 금은화 물 추출물은 IL-10의 분비를 증가시키며, 금은화 물 추출물 처리시간에 따른 IL-10의 생성효과와 IRF-1, 7, IFN- $\alpha/\beta$  생성억제 효과가 일치하였다.
4. IL-10의 중화항체 처리를 했을 때 IRF-1, 7, IFN- $\alpha/\beta$  생성억제 효과가 유의성 있게 감소됨으로써 IRF-1, 7, IFN- $\alpha/\beta$  생성억제에 IL-10이 관여함을 확인할 수 있었다.
5. IFN- $\alpha/\beta$ 가 관여하는 STAT-1, 3의 인산화를 조사하여, 금은화 물 추출물이 LPS로 유도된 IFN- $\alpha/\beta$ 의 생성억제에 관여하고 그 이후의 기전인 STAT-1, 3의 활성화를 감소시키는 것을 확인하였다.

- 투 고 일 : 2013년 4월 24일
- 심 사 일 : 2013년 5월 2일
- 게재확정일 : 2013년 5월 9일

## 참고문헌

1. Abul K, Abbas AK. Cellular and Molecular Immunology. 6th edition. Philadelphia:Saunders Elsevier. 2006
2. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1997 :65-6.
3. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cellular Signal. 2001;13:85-94.
4. Kubes P, Mccafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. American J Medicine. 2000;109:150-8.
5. Rietschel ET, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J. 1994; 8(2):217-25.
6. Galdiero F, et al. Release of cytokines induced by Salmonella typhimurium porins. Infect Immun. 1993;61(1):155-61.
7. Plataniias LC, Fish EN. Signaling pathways activated by interferons. Exp Hematol. 1999;27:1583-92.
8. Sen GC. Viruses and interferons. Annu Rev Microbiol. 2001;55:255-81.
9. Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators - a new look. Immunity. 2001;14(6):661-4.
10. Chawla-Sarkar M, et al. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. Apoptosis. 2003;8:237-49.
11. Pestka S, et al. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. Immunol Rev. 2004;202:8-32.
12. Honda K, et al. Type I Interferon Gene Induction by the Interferon Regulatory Factor Family of Transcription Factors. Immunity. 2006;25:349-60.
13. Bogdan C. The function of type I Interferons in antimicrobial immunity. :75-97.

- Curr Opin Immunol. 2000;12(4):419-24.
14. Taniguchi T, et al. IRF Family of transcription factors as regulators of host defense. Annu Rev Immunol. 2001;19:623-55.
  15. Colonna M. TLR pathways and IFN-regulatory factors: To each its own. Eur J Immunol. 2007;37:306-9.
  16. Baccala R, et al. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induced in systemic autoimmunity. Nature Med. 2007;13(5):543-51.
  17. Karaghiosoff M, et al. Central role for type I Interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. Nat Immunol. 2003;4(5):471-7.
  18. Servera M, Fitzgerald KA. TLR-mediated activation of type I IFN during antiviral responses. Current topics in microbiology and immunology. 2007;316:167-92.
  19. Marie I, et al. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. EMBO J. 1998;17(22):6660-9.
  20. Sato M, et al. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. Immunity. 2000;13(4):539-48.
  21. Cabuk M, et al. Arthritis induced by interferon-alpha therapy in a patient with essential thrombocythemia. Leukmia and Lymphoma. 2003;44(2):377-8.
  22. Nieworld TB, Gibofsky A. Concomitant interferon-alpha therapy and tumor necrosis factor alpha inhibition for rheumatoid arthritis and hepatitis C. Arthritis Rheum. 2006;54:2335-7.
  23. Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune disease. Immunity. 2006;25:383-92.
  24. Moore KW, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annual review of immunology. 2001;19:683-765.
  25. Mege JL, et al. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. The Lancet infectious diseases. 2006;6:557-69.
  26. 전국한의과대학본초학교수 공편. 본초학. 서울:영림사. 2004:198-9.
  27. 김동현 등. 한방약리학. 서울:신일상사. 2006:133-5.
  28. 이상철. LPS 유도 생쥐 관절염에서 금은화의 MIF 활성 조절이 COX-2와 MMP-9 생성 억제에 미치는 영향. 동국대학교 대학원 석사학위논문집. 2009.
  29. 채기원. 금은화의 항염작용과 파골세포 형성 억제효과. 경희대학교 대학원 박사학위논문집. 2008.
  30. 윤용갑 등. 금은화 수용성 추출물의 LPS 유도 염증매개물 억제 효과. 대한본초학회지. 2007;22(3):117-25.
  31. Kang OH, et al. Inhibition of trypsin-induced mast cell activation by water fraction of flowers of *Lonicera japonica*. Archives of pharmacal research. 2004;27(11):1141-6.
  32. 배지현 등. 식중독 유발세균의 증식

- 에 미치는 금은화 추출물의 항균효과. 한국식품과학회지. 2005;37(4):642-7.
33. 박희수. 금은화 약침의 항암효과에 관한 연구. 대한침구학회지. 2005;22(5):91-7.
  34. 한재섭, 박희수. 금은화약침의 항암 및 면역반응에 관한 실험적 연구. 대한침구학회지. 2006;23(4):205-18.
  35. 이동연. 金銀花 및 金銀花全草가 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 NO의 생성, iNOS, COX-2 및 cytokine에 미치는 영향. 대구한의대학교 대학원 박사학위논문집. 2005.
  36. 김진호. 금은화 물 추출물이 Cerulein 으로 誘發된 白鼠의 급성 췌장염에 미치는 영향. 동신대학교 대학원 박사학위논문집. 2009.
  37. 이창건 등. 금은화가 LPS로 유발된 급성 폐 손상에 미치는 영향. 대한예방의학회지. 2011;15(4):49-69.
  38. 윤경진, 이은용. 금은화 추출액이 RAW 264.7 Macrophage에서의 NO와 PGE2 생성에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2012;29(1):67-74.
  39. 서윤정. 오미소독음의 항염효과 및 기전에 관한 실험적 연구. 대한한방부인과학회지. 2008;21(1):39-54.
  40. 염병수, 김영판. 방제의 체계적 구성을 위한 임상배합본초학. 서울:영림사. 1994:230-1.
  41. 김형균 등. 한약의 약리. 서울:고려의학. 2000:335-6.
  42. Han DS, et al. Development of anticancer agents from korean medical plants. part 6, cytoxic activity of the ethyl acetate soluble fraction of *Lonicera Flos* against human oral epitheloid carcinoma cells. Korean J Pharmacogn. 1998;29(1):22-7.
  43. Son KH, et al. Flavonoids from aerial parts of *Lonicera japonica*. Arch Pharmacol Res. 1992;15:365-70.
  44. Lee SJ, et al. Anti-inflammatory activity of the major constituents of *Lonicera japonica*. Arch Pharm Res. 1995;18(2):133-5.
  45. 동의보감국역위원회. 국역증보동의보감. 서울:남산당. 1995:508, 537, 538, 540.
  46. 김상찬 등. 방제학. 서울:영림사. 1999:83-4.
  47. Matsuda H, et al. Structural requirements of flavonoid for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. Bioorganic Med Chem. 2003; 11:1995-2000.
  48. Calixto JB, et al. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. Planta Med. 2004;70(2):93-103.
  49. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature. 2000;406(6797):782-7.
  50. Sadler AJ, Williams BR. Interferon-inducible antiviral effectors. Nat Rev Immunol. 2008;8:559-68.
  51. Mamane Y, et al. Interferon regulatory factors: the next generation. Gene. 1999;237:1-14.
  52. Takaoka A, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. Nature.

- 2005;434:43-9.
53. Miyamoto M, et al. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell*. 1988;54:903-13.
  54. Barnes BJ, et al. Virus-specific activation of novel interferon regulatory factor, IRF-5, result in the induction of distinct interferon alpha genes. *J Biol Chem*. 2001;276(26):23382-90.
  55. Barnes BJ, et al. Virus-induced heterodimer formation between IRF-5 and IRF-7 modulates assembly of the IFN enhanceosome in vivo and transcriptional activity of IFN- $\alpha$  genes. *J Biol Chem*. 2003;278:16630-41.
  56. Servant MJ, et al. Overlapping and distinct mechanisms regulating IRF-3 and IRF-7 function. *J Interferon Cytokine Res*. 2002;22:49-58.
  57. Fiorentino DF, et al. Two type of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989;170:2081-95.
  58. Fiorentino DF, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*. 1991;146:3444-51.
  59. Berkaman, et al. Inhibition of induced expression of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  in human blood monocytes and alveolar macrophages by interleukin-10. *J Immunol*. 1995;155:4412-8.
  60. John M, et al. Expression and release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells: inhibition by Th2 cytokines and corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol J*. 1998;18(1):84-90.
  61. Cunha FQ, et al. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;182:1155-9.
  62. De Waal Malefyt R, et al. Interleukin (IL-10) and viral IL-10 strongly reduced antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*. 1991;174(4):915-24.
  63. 정원석 등. 플라보노이드 루테올린의 lipopolysaccharide로 유도한 type I interferon 억제효과. *동의생리병리학 회지*. 2009;23(5):986-92.
  64. Schindler C, Darnell JE Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:621-51.
  65. Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science*. 1997;277:1630-5.
  66. Darnell JE Jr, et al. JAK-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science*. 1994;264:1415-21.
  67. Leonard WJ. Stats and cytokine specificity. *Nature Med*. 1996;2:968-9.
  68. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: Biological implications. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:293-322.

69. Zhong Z, et al. Stat3: a STAT family member activated by tyrosin phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. Science. 1994;264:95-8.