

## 조협의 부위에 따른 항산화 전사인자 Nrf2 활성화 효과

최지연 · 김균하 · 최준용<sup>1</sup> · 한창우<sup>1</sup> · 하기태 · 정한솔\* · 주명수\*

부산대학교 한의학전문대학원 응용의학부, 1: 부산대학교 한방병원 내과학교실

### Identification of the Plant Part of *Gleditsia sinensis* that Activates Nrf2, an Anti-oxidative Transcription Factor

Jiyeon Choi, Kyun Ha Kim, Jun Yong Choi<sup>1</sup>, Chang Woo Han<sup>1</sup>, Ki Tae Ha, Han-Sol Jeong\*, Myungsoo Joo\*

*Division of Applied Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University,  
1: Department of Oriental Internal Medicine, Korean Medicine Hospital, Pusan National University*

The fruit of *Gleditsia sinensis* has been extensively used as a key ingredient of an herbal remedy for the treatment of various inflammatory diseases in traditional Korean Medicine. However, the reason of using the fruit of *G. sinensis* for the remedy is unclear. Since Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) is a key anti-inflammatory transcription factor, which is activated by the fruit of *G. sinensis*, we examined whether other plant parts of *G. sinensis* are also capable of suppressing inflammatory responses by activating Nrf2. Water extracts of various parts of *G. sinensis* were prepared and tested for Nrf2 activation by reporter assay and western blot analysis. Our results show that the hull of *G. sinensis* is the most potent in activating Nrf2. Sequential organic solvent extraction of the hull show that all the fractions had a higher potency in activating Nrf2 than the water extract, albeit differential degrees. The hull originated from Korea in general activated Nrf2 strongly compared to that of China. Chloroform fraction of the hull was further examined, showing that the fraction induced nuclear localization of Nrf2, indicative of activated Nrf2, and Nrf2-dependent gene expression including NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (NQO-1), glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC), and heme oxygenase - 1 (HO-1). Therefore, our results show that, among other plant parts examined in this study, the hull of *G. sinensis* is the most potent, providing the experimental basis for the use of the hull of *G. sinensis* as an active ingredient for an anti-inflammatory remedy.

Key words : Nrf2, Anti-oxidant response element, *Gleditsia sinensis*

## 서 론

대표적인 자유라디칼(Free radical)인 활성산소(Reactive oxygen species; ROS)는 자외선이나 X-선 등의 방사에너지를 흡

\* To whom correspondence should be addressed at : Han-Sol Jeong,

Division of Applied Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49, Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, Korea

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

\*Myungsoo Joo, Division of Applied Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49, Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, Korea

· E-mail : mjoo@pusan.ac.kr, · Tel : 051-510-8462

· Received : 2014/03/31 · Revised : 2014/05/21 · Accepted : 2014/06/09

수했을 경우, 외부로부터 들어온 화학물질을 대사하는 과정에서, 그리고 염증반응시 백혈구가 활성화되었을 때 만들어진다. 이들은 또한 정상시 세포내 미토콘드리아의 호흡과정에서도 생겨난다. 세포 내에서는 이러한 활성산소를 제거하는 기전을 발달시킴으로써 이들로 인한 손상을 최소화하고 있다<sup>1)</sup>. 활성산소의 제거 능력에 비하여 너무 많은 활성산소가 만들어지면 세포는 산화적 스트레스 상황에 놓이게 된다. 다양한 염증성 질환에서 활성산소는 세포 내의 전사인자인 NF- $\kappa$ B와 AP-1을 활성화시킴으로써 염증반응을 증폭시킨다<sup>2)</sup>.

Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)는 산화적 스트레스, 발암과정에 대항하여 세포를 보호하는데 있어서 매우 중요한 전사인자로서, 이들은 antioxidant response element(ARE)와 결합하여 주요한 항산화효소와 phase II detoxifying 효소들의 전사를 활성화시킨다<sup>3-5)</sup>.

평상시 Nrf2가 매개하는 전사는 음성조절자인 Keap-1에 의하여 억제되어 있다. 그러나 세포가 산화적스트레스나 친전자체, 또는 chemopreventive agent에 노출될 경우 Nrf2는 Keap1으로부터 떨어져 나와 핵 안으로 이동하여 antioxidant response element(ARE) 의존성 유전자 발현을 활성화시킴으로써 세포 내 산화환원반응의 항상성을 유지시킨다. 또한 면역반응과 관련하여 T-세포와 B-세포의 effector function과 innate immune cell의 활성화에 관여함으로써 항염증효과를 매개하는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>.

Nrf2 의존성 세포보호반응은 다양한 기관과 조직을 보호할 수 있으므로 Nrf2의 활성화는 암, 신경퇴행성질환, 심혈관계질환, 급·만성 폐손상, 자가면역질환 등 다양한 질병에 대한 방어역할을 수행할 수 있을 것으로 주목받아 왔다<sup>7-10)</sup>.

터촛(Gleditsia sinensis; 이하 GS)은 콩과(Leguminosae)에 속한 낙엽교목인 조각자나무 Gleditsia sinensis Lam.의 果實로 性味는 溫辛하고 小毒이 있으며, 祛痰開竅, 散結消腫의 효능이 있다<sup>11)</sup>. 頑痰이 阻塞되어 胸悶喘咳하고 咯痰이 잘 배출되지 않은 증상에 비교적 강한 祛痰작용이 있고, 갑자기 昏迷하여 口噤不開하거나 癲癇에 痰의 壅盛으로 關竅가 阻閉한 證과 腸燥便秘를 치료하는 것으로 알려져 있다<sup>12)</sup>. 用法으로는 두드려서 씨를 버린 다음 물에 넣고 주물러서 사용한다고 기록되어 있다<sup>13)</sup>. GS에 대한 연구보고를 살펴보면 비만세포 의존성 아나필락시스를 억제하였고<sup>14)</sup>, 마우스에서 compound 48/80으로 유도한 전신성 아나필락시스를 억제하였고, 흰쥐에서 히스타민으로 유도한 알레르기 피부염증을 억제하였다<sup>15)</sup>. 또한 GS 열매 추출물은 급만성 골수성 백혈병 세포주와 환자로부터 추출한 세포에서 세포성장을 억제하는 효능이 보고되었으며<sup>16)</sup>, GS의 n-Butanol 추출물은 알레르기 비염을 억제<sup>17)</sup>하며 ethanol 추출물은 염증인자의 효과를 약화시켜 즉각적인 알레르기반응이나 급성 염증에 대한 억제효능을 나타내고<sup>18)</sup>, 또한 GS의 saponin fraction은 감작기 동안 T cell의 분화와 증식을 막고 effector stage의 macrophage 활성을 약화시킴으로써 picryl chloride-induced delayed type hypersensitivity reaction에 대한 억제작용을 가진다고 보고되었다<sup>19)</sup>. 최근 본 연구팀에서는 GS열매가 Nrf2를 활성화시킴으로써 LPS로 유도한 급성 폐손상을 보호하는 효능이 있음을 보고하였다<sup>20)</sup>. 이와 같이 GS는 다양한 염증억제와 항알레르기, 항산화의 효능을 지니고 있음이 보고되고 있으나, GS의 부위별 약용 효과에 대한 보고는 아직 없다. GS는 전통적으로 꼬투리를 주로 사용하고 있다<sup>13)</sup>. 꼬투리 외에 다른 부위에서도 염증억제효과가 있는지 조사하기 위해, 본 연구에서는 GS를 부위별 물 추출물(잎, 줄기-심재, 줄기-수피, 씨앗, 꼬투리)을 한국생명공학연구원서 제공받아 세포 내 항염, 항산화를 조율하는 대표적인 전사인자인 Nrf2의 활성화에 미치는 효능을 비교하였고, 이 중 가장 효능이 높은 꼬투리부분을 용매 분획한 후 각 분획별로 Nrf2 활성화도를 비교함으로써 GS의 약리효능에 대한 과학적 근거를 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. GS 추출물 분양 및 제조

한국생명공학연구원 한국식물추출물은행으로부터 GS의 부위별(잎, 줄기-심재, 줄기-수피, 씨앗, 꼬투리) 물 추출물을 제공 받았으며 한국산, 중국산 GS는 광명당 (울산, 한국) 으로부터 구입하였다. 중량 500 g의 GS 꼬투리를 MeOH로 1일 간 상온에서 추출하고, 추출액을 감압농축 후 MeOH엑스를 증류수 1L로 현탁시키고 동량의 hexane, chloroform, ethylacetate 및 butanol의 순으로 용매분획하여 각각의 분획물을 얻었다. 분획물은 3,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 취하였고, 회전감압농축기로 농축한 후 동결 건조하여 -80°C에서 보관하며 사용하였다.

### 2. 시약 및 항체

Sulforaphane은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 로 부터 구입하였다. TLR4-specific Escherichia coli O111:B4 strain LPS는 Alexis Biochemical (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 본 실험에서 사용한 모든 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로 부터 구입하였다.

### 3. 세포배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell은 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)로부터 분양을 받아 L-glutamine (200 mg/L)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)에 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen)를 첨가하여 배양하였다. 세포는 37°C incubator에서 5% CO<sub>2</sub> 상태에서 배양하였다.

### 4. Reporter Constructs, Reporter Cell line, Luciferase Assay

Nrf2 전사인자 활성도를 측정하기 위하여 Nrf2 reporter cell line을 구축하였다. 여기에 사용된 murine NQO-1 gene의 proximal 1kb-long promoter는 QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen)를 사용하여 분리한 genomic DNA와 5'-GCTATGTGGACCAGTCTGG-3' 와 5'-GGCTCCAGATGTTGAGGGA-3'를 primer로 사용하여 PCR을 통해 증폭시켰다. PCR product를 sequencing을 통해 확인한 후 pGL4.17[luc2/Neo] vector (Promega)에 삽입하여 cloning하였다. 이렇게 생성한 NQO-1[luc/Neo] vector를 RAW 264.7 세포에 transfection 시킨 후 G418 (600µg/ml, Invitrogen)을 처리하여 NQO-1[luc/Neo] vector가 성공적으로 삽입된 RAW 264.7 cell을 선별하였다. 다음 Nrf2 활성제로 잘 알려진 sulforaphane에 대한 반응성이 가장 좋은 것을 골라 Nrf2 reporter cell line으로 사용했다. Luciferase assay는 luciferase assay kit (Promega)를 가지고 제조사에서 제시한 방법에 준하여 실시하였다.

### 5. 세포내 Reactive Oxygen Species(ROS) 생성 측정

RAW 246.7 세포 내 ROS의 생성은 형광표지자인 carboxy-H2DCFDA 5-(and-6)-carboxy-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 이용하여 측정하였다. 각 추출물의

처리 후 배양액에서 100uM의 carboxy-H2DCFDA을 처리하여 37°C에서 30분간 배양했다. 배양 후 PBS로 세포 세척 후 excitation 488nm, emission 525nm에서 BD FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 형광측정 하였다.

6. 총 RNA의 추출과 RT-PCR

Total RNA는 QIAGEN RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여, 제조회사의 방법에 준하여 분리했다. 총 RNA의 2 µg을 M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하고 GAPDH 유전자의 cDNA의 양을 기준으로 각기 다른 샘플의 PCR 효율을 보정하였다. 측정하고자 하는 mRNA의 양을 측정하기 위해 합성한 cDNA를 3번에 걸쳐 1:5 end-point dilution (1:1, 1:5, 1:125) 하고 dilution한 cDNA를 specific primer들을 이용한 PCR방법을 통하여 cDNA를 증폭하였다. PCR 증폭을 위하여 TaqPCRx DNA polymerase, Recombinant (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였고, 반응조건을 다음과 같이 하였다. 95°C에서 5분간 초기 denaturation 시킨 후 22-30 cycle을 증폭시켰다. 각각의 cycle은 95°C에서 40초 동안 denaturation, 55-60°C에서 40초 동안 annealing, 72°C에서 50 초 동안 extension시켰다.

PCR product는 1.2% Agarose gel을 1× TBE buffer에 담가 100V로 30분 동안 전기영동하였고, ethium bromide로 염색을 한 후 ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA)를 사용하여 관찰하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (NQO-1), glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC), and heme oxygenase - 1 (HO-1)의 상대적인 발현을 측정하기 위해 internal control로 사용하였고, 대표적인 PCR 결과를 ImageJ program (NIH, MA, USA)을 이용하여 분석하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 1과 같다.

Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR in this study

Target gene	PCR primer sequence(5' to 3')	PCR product(bp)	Accession number
NQO-1	sense 5'-GCAGTGCTTTCCATCACCAC-3'	224bp	NM008706
	antisense 5'-TGGAGTGTGCCCAATGCTAT-3'		
HO-1	sense 5'-TGAAGGAGGCCACCAAGGAGG-3'	373bp	NM010442
	antisense 5'-AGAGGTCACCCAGGTAGCGGG-3'		
GCLC	sense 5'-CACTGCCAGAACAACAGACCC-3'	239bp	NM010295
	antisense 5'-ATGGTCTGGCTGAGAAGCCT-3'		
GAPDH	sense 5'-GGAGCCAAAAGGGTCATCAT-3'	203bp	NM008084
	antisense 5'-GTGATGGCATGGACTGTGGT-3'		

7. Western Blot Analysis

RAW 264.7세포를 10cm 배양 용기에 5 × 10<sup>6</sup> 만큼 배양하여 준비하였다. 핵단백질은 NE-PER nuclear extraction kit (Thermo Scientific, IL, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 분리했다. 분리한 단백질은 Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 Nu-PAGE gel (Invitrogen)에 전기영동한 후 PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories)에 transfer 했다. Blot은 1 시간동안 5% nonfat dry milk로 blocking한 뒤 실온에서 1시간 30분 또는 4°C에서 16시간

동안 Nrf2 항체로 처리하였다. 이후 1시간 동안 2차 항체를 반응시켜 chemiluminescence (SuperSignalWest Femto, Thermo Scientific)로 band를 확인하였다. 위 membrane은 stripping buffer (Thermo Scientific)를 이용하여 strip하고 위의 방법으로 다시 blocking한 후, 핵의 house keeping protein인 lamin A/C에 대한 polyclonal 항체로 처리하여 band를 확인함으로써 동일한 단백질의 분석여부를 확인하였다.

8. 통계처리

실험자료들은 Graphpad (Inc., San Diego, CA) 프로그램을 이용하여 P values < 0.05 수준에서 one-way ANOVA분석을 통하여 분석하고 t-test를 통하여 사후 검정하였다. 각 자료는 3회 반복한 실험결과와 평균과 표준편차를 대조군을 기준으로 하여 상대적으로 표시하였다.

결 과

1. GS의 부위별 물 추출물에 의한 Nrf2 전사활성과 단백질 발현에 미치는 영향

GS의 잎(Leaf; L), 줄기-심재(stem heartwood; SH), 줄기-수재(stem bark; SB), 씨앗 (seed), 꼬투리 (hull)의 물 추출물을 5 µg /ml, sulforaphane (이하 SFN)을 5 µmol로 16시간 동안 Nrf2-luciferase reporter construct를 안정적으로 지닌 RAW 264.7 cell 처리하였고, 미처리군을 음성 대조군으로 삼았다. 그림 1에서 보는 바와 같이 양성대조군인 대표적 Nrf2 활성인자인 SFN보다는 약하지만, GS의 꼬투리 물 추출물에서 유의성 있는 luciferase 활성을 보였다(Fig. 1A).

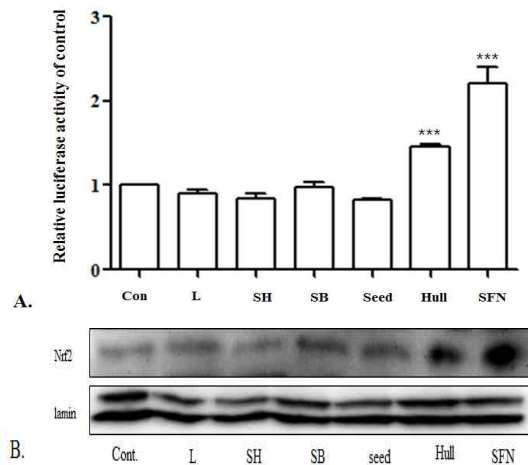


Fig. 1. Effect of various parts of GS on Nrf2 activation. (A) Luciferase assay was performed with total proteins prepared from an Nrf2 reporter cell line, derived from RAW 264.7 cells. Cells were treated with water extracts of various parts of GS (5mg/ml) for 16h, along with 5mM of sulforaphane (SFN). Luciferase activity was normalized by the amount of total proteins. Data represent the mean±SEM of triplicate settings, and experiment was repeated at least three times and shown are representatives (\*\*\*P<0.05, compared to control). (B). RAW264.7 cells were treated similar to (A), and then nuclear Nrf2, indicative of activated Nrf2, was measured by western blot analysis. To ensure equal loading, the membrane was stripped and reprobbed with anti-lamin antibody.

위와 동일한 조건으로 RAW 264.7 cell에 GS의 부위별 물 추출물을 처리한 후 핵 단백질을 추출하여 핵 내 Nrf2 단백질을 western blotting 방법에 의하여 검사하였다. Luciferase activity의 결과와 동일하게 GS 꼬투리의 물 추출물에서 Nrf2 단백질의 강한 발현이 관찰되었으며, 줄기-수재와 씨앗에서도 Nrf2 단백질의 발현증가가 관찰되었다(Fig. 1B).

2. GS 꼬투리의 용매분획과 각 분획물의 Nrf2 전사 활성능력이 미치는 영향

가장 Nrf2 활성능력이 강한 것으로 나타난 GS 꼬투리에 대하여 용매분획을 실시하여 Nrf2 활성능의 분포를 조사하였다. 중량 500 g의 중국산과 한국산 GS를 메탄올 (MeOH)로 상온에서 1일간 추출하고, MeOH 액를 증류수 1 l로 현탁시킨 후, 동량의 hexane, chloroform, ethylacetate 및 butanol의 순으로 용매분획하여 각각의 분획물을 얻었다. 50 µg/ml 농도의 각 분획물을 16 시간 동안 Nrf2-luciferase reporter construct를 안정적으로 지닌 RAW 264.7 cell 처리한 후 luciferase assay를 시행하였고, 양성대조군으로는 5 µmol의 SFN을 사용하였다. 실험결과 중국산 GS보다 한국산 GS의 모든 분획물의 Nrf2 전사활성이 더 두드러졌으며, 분획물 가운데 한국산 GS의 chloroform층의 분획물에서 Nrf2 전사활성을 가장 우수하게 유도하였다(Fig. 2A).

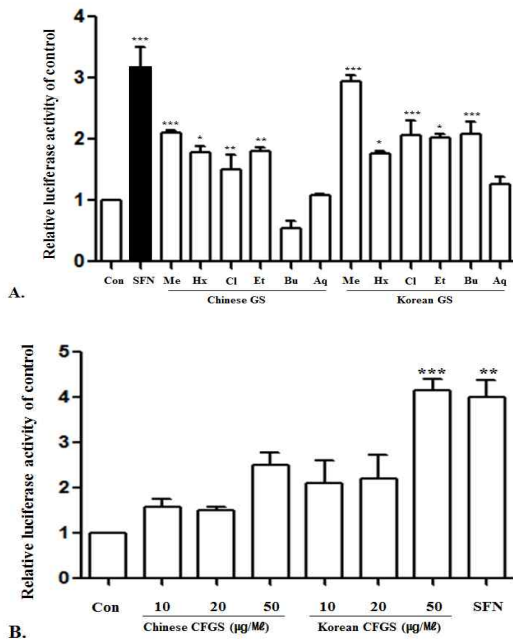


Fig. 2. Effects of regional and differential extracts of GS hull on Nrf2 transcriptional activity. (A) GS hull, originated from China and Korea, was sequentially extracted with methanol (Me), hexane (Hx), chloroform (Cl), ethylacetate (Et), and butanol (Bu). The Nrf2 reporter cells were treated with 50mg/ml of those solvent extracts, along with water extract (Aq) for 16h prior to luciferase activity. Data represent the mean±SEM of triplicate settings, and experiment was repeated at least three times and shown are representatives (\*P<0.05, \*\*P<0.05, and \*\*\*P<0.005, compared to control). (B) Increasing amounts of chloroform extracts of Chinese or Korean GS hull were added to the reporter cells. At 16h after treatments, luciferase activity was performed. Data represent the mean±SEM of triplicate settings, and experiment was repeated at least three times and shown are representatives (\*\*P<0.05 and \*\*\*P<0.001, compared to control).

이에 한국산 중국산 GS 꼬투리의 chloroform 분획물을 농도별로 (0, 10, 20, 50 µg/ml)동일한 조건에서 처리한 후 reporter gene assay를 시행한 결과 한국산 GS 꼬투리의 chloroform층의 고농도(50 µg/ml)에서 SFN와 유사한 정도의 Nrf2 활성을 유도하고 있음을 확인하였다(Fig. 2B).

3. 한국산 GS 꼬투리 Chloroform 분획물의 핵 내 Nrf2 발현과 Nrf2 dependent 유전자 발현에 미치는 영향

앞선 실험 결과 Nrf2 전사활성을 가장 우수하게 유도했던 한국산 GS 꼬투리 chloroform 분획물을 농도별로(1, 5, 10, 20, 50 µg/ml) RAW 264.7 cell에 16 시간 동안 처리한 후 western blot assay와 RT-PCR assay를 시행하였고, 미처리군을 음성대조군으로 SFN처리군을 양성대조군으로 설정하였다. 실험 결과 Nrf2의 핵내 발현은 Fig. 3A와 같이 50 µg/ml 농도의 처리군에서 두드러지게 증가하였다. 동일한 조건에서 총 RNA를 추출한 후 Nrf2 dependent 유전자로 알려진 NQO1, GCLC, HO-1에 대한 semi-quantitative RT-PCR을 시행한 결과 western blot 분석의 결과와 상응하게 50 µg/ml에서 Nrf2-dependent 유전자의 발현이 관찰되었다.

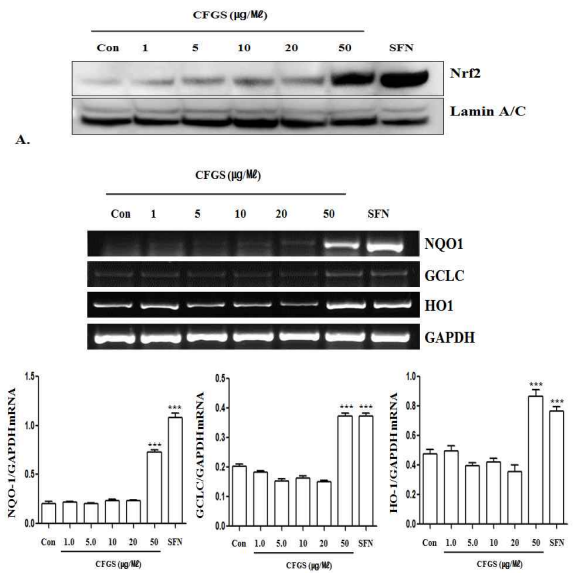
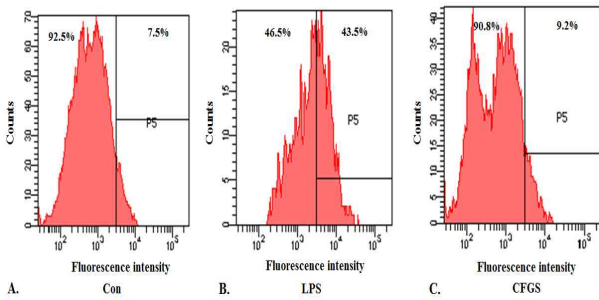


Fig. 3. Effects of the chloroform extract of Korean GS hull on Nrf2 activity and its dependent gene expression. (A) RAW 264.7 cells were treated with increasing amounts of the chloroform extract of Korean GS (CFGS) for 16h. Nuclear localization of Nrf2 induced by CFGS was measured by western blot analysis. Equal loading was attested by western blotting of lamin A/C, house keeping genes in the nucleus. (B) Expressions of representative genes governed by Nrf2, such as NQO-1, GCLC and HO-1, were measured by semi-quantitative RT-PCR. The intensity of each PCR band was measured by densitometer and software (ImageJ), and relative expression of each gene was normalized against that of GAPDH. Data represent the mean±SEM (\*\*\*P<0.05, compared to control).

4. 세포 내 ROS 생성에 미치는 영향 (DCF-DA assay)

ROS는 염증반응을 악화시키고 Nrf2를 활성화시킨다. 한국산 GS 꼬투리의 chloroform 분획물이 ROS의 생성을 유도함으로써 Nrf2의 활성을 일으키는지에 대한 가능성을 조사하고자 50 µg/ml의 농도의 한국산 GS chloroform 분획물을 RAW 264.7

cell에 16시간 동안 처리한 후 carboxy-H<sub>2</sub> DCFDA로 염색하였고, flow cytometric analysis를 통하여 ROS의 생성을 측정하였다. Fig. 4B에서 보는 바와 같이 LPS가 ROS를 생성한 것과는 달리 한국산 GS 꼬투리의 chloroform 분획물은 ROS의 생성을 유도하지 않았다 (Fig. 4C). 이러한 결과는 한국산 GS 꼬투리의 chloroform 분획물이 ROS의 생성과 관계없이 직접적으로 Nrf2의 활성을 유도하였음을 시사한 것이다.



**Fig. 4. CFGS does not significantly generate intracellular ROS generation.** RAW 264.7 cells were treated with (A) PBS, (B) LPS (100 ng/ml), or (C) CFGS (50 µg/ml) for 16 h, and ROS were measured by flow cytometric analysis. Experiment was repeated three times, showing no significant production of ROS by CFGS compared to controls.

## 고찰

슈퍼옥사이드 음이온(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 및 수산화라디칼(HO·)과 같은 활성산소(Reactive oxygen species)는 미토콘드리아의 산화적 대사과정에서 불완전한 산소의 환원의 결과 필연적으로 발생하며, 외부의 이물질이나 미생물에 대한 세포내의 반응 과정에서도 생겨난다. 세포 내에서 생성되는 활성산소는 다양한 phase II enzyme들에 의하여 제거되며, 세포 내 항산화 기능을 벗어나는 과도한 활성산소의 생성은 세포를 산화적 스트레스(Oxidative stress)에 빠지게 한다<sup>21</sup>. 이러한 산화적 스트레스는 세포내 단백질과 지질의 산화를 유도하며, 나아가 유전자의 돌연변이를 유도함으로써 세포를 손상시킨다<sup>22</sup>. 이들은 감염, 동맥경화증, 당뇨, 암, 알츠하이머, 비만, 노화 등 다양한 질환의 병리과정에서 중요한 역할을 담당하고 있다<sup>23</sup>. 따라서 세포 내 산화적 스트레스를 조절하는 기전은 상기한 질환을 포함한 다양한 염증성 질환의 예방과 치료에 핵심적인 역할을 한다. 체 내 이러한 항산화 효소들과 항산화 단백질을 암호화하는 유전자들의 발현을 조절하는 중요한 전사인자 가운데 하나가 Nrf2이다. Nrf2는 평상시 cytoskeleton과 결합하고 있는 단백질인 Keap1에 의하여 세포질에 격리되어 있다가 산화적 스트레스 상황에 직면하게 되면 재빨리 Keap1과 분리되어 핵 안으로 들어가 ARE(antioxidant response elements)와 결합하며, 이어서 phase II enzyme 유전자들의 전사를 활성화시키고, 이어서 hemeoxygenase-1(HO-1), NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1), glutamate-cystein ligase subunit (GCLC) 등의 항산화 효소들을 만들어 낸다<sup>24-27</sup>. 또한 Nrf2의 결핍은 자가면역질환, 천식, 폐기종, 및 급성호흡부전증후군과 연관되어 있으며, 또한 위장관, 순환기계통, 신경계

통 등 여러 신체 부위의 염증과도 연관되어 있다<sup>28</sup>. Nrf2는 폐에 편재하여 발현되고 있으며, 폐에서 생성되는 ROS를 억제함으로써, 폐기종, 천식, 폐암 등 다양한 호흡기 질환에 의한 산화적 손상으로부터 폐를 보호하고 있다<sup>29</sup>.

GS는 주로 객담을 수반하는 기침 및 천식, 두통, 중풍을 치료하는데 사용해왔으며<sup>12</sup>, GS에서 추출되는 Saponin은 항염증, 항염증 및 항알러지 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>30</sup>. 본 연구에서는 항염증 및 항알러지 작용에 관여하는 것으로 알려진 GS의 부위별 효능을 Nrf2 전사인자의 활성화와 연관하여 평가하고자 하였다.

본 연구에서는 GS의 꼬투리, 씨앗, 줄기-심재, 줄기-수피, 잎의 물 추출물을 이용하여 luciferase assay를 통해 Nrf2의 전사활성을 확인해 보았다. 그 결과 꼬투리 부위의 물 추출물이 Nrf2 전사활성을 가진 것으로 나타났다(Fig. 1). 다음으로 Nrf2 전사활성에 영향을 미치는 GS 꼬투리의 성분을 더욱 효율적으로 얻을 수 있는 방법을 찾기 위해 중국산, 한국산 GS의 꼬투리를 유기용매인 MeOH, hexane, chloroform, ethylacetate 및 butanol의 순으로 용매분획 후 각각의 분획물을 사용하여 RAW 264.7 cell에서의 Nrf2의 전사활성을 관찰하였다. 그 결과 모든 유기용매 추출물이 RAW 264.7 cell에서 Nrf2 전사활성이 증가하였으나, 한국산 GS의 분획물이 더 활성이 높았으며, 그 가운데 chloroform 분획물의 Nrf2 전사활성이 가장 우수했다(Fig. 2A). 이에 중국산, 한국산 GS 꼬투리의 chloroform 분획물을 RAW 264.7 cell에 농도별로 처리한 후 Nrf2의 전사활성을 관찰한 결과 한국산 GS 꼬투리의 chloroform 분획물의 Nrf2에 대한 전사활성이 더 높았으며, 50 µg/ml의 농도에서 유의성 있는 전사 활성의 유도를 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 이처럼 luciferase assay의 실험 결과 한국산 GS 꼬투리의 chloroform 분획물이 가장 우수한 Nrf2 전사활성을 가지고 있는 것으로 관찰되어, 이들이 RAW 264.7 cell에서 핵 내 Nrf2의 발현을 증가시키는지 확인하고자 western blot assay를 시행하였다. 실험 결과 선행한 luciferase assay와 마찬가지로 한국산 GS 꼬투리의 chloroform 분획물은 50 µg/ml의 농도에서 핵 내 Nrf2의 발현을 뚜렷하게 증가시켰다(Fig. 3A). 이어서 Nrf2에 의존적으로 발현하는 효소인 GCLC, NQO1, HO1의 mRNA 발현을 RT-PCR assay를 통하여 관찰하였다. 전사를 환원시키는 cytochrome P450 reductase 효소와 경쟁작용을 하여 quinone을 해독하는 NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1)<sup>31</sup>, 과산화수소를 물로 변환시키는 중요한 항산화물질인 환원형 글루타치온(GSH)의 합성이 관여하는 효소인 glutamate-cystein ligase subunit (GCLC)<sup>32,33</sup>, 강력한 항산화단백으로 phase II 효소인 heme oxygenase-1 (HO-1)<sup>34,35</sup>의 mRNA 발현은 한국산 GS 꼬투리의 chloroform 분획물의 고농도 처리군(50 µg/ml)에서 모두 두드러지게 증가하였다(Fig. 3B).

Nrf2의 활성은 염증반응이나 산화제에 노출된 병리적 상황에서 이를 극복하기 위한 대응수단으로 증가하는 양상을 보인다<sup>36</sup>. 세포 내 ROS의 생성이 증가하게 되면 이를 처리하기 위해 Nrf2의 ubiquitination을 촉진하는 인자들의 활성을 줄임으로써 Nrf2의 안정성이 높아지게 된다<sup>37</sup>. 이와 같이 Nrf2 경로의 활성

은 세포 내 ROS의 축적에 의해서도 촉진될 수 있는 것이다. 본 실험에서는 Nrf2 활성을 유도하고 있는 한국산 GS 꼬투리의 chloroform 분획물이 ROS의 생성을 통하여 Nrf2 활성을 유도하는지 확인하고자 이들을 RAW 264.7 세포에 처리 한 후 ROS의 생성을 측정하였다. 실험결과 GS 꼬투리의 chloroform 분획물의 고농도 처리군(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서 세포내 ROS의 생성을 증가시키지 않았다(Fig. 4C). 따라서 이들의 Nrf2 활성을 유도는 ROS의 생성과는 무관한 것임을 확인할 수 있었다.

## 결 론

GS의 부위별 Nrf2 활성 효능을 관찰한 결과 GS는 잎이나 줄기, 씨앗에서는 Nrf2 활성효능이 관찰되지 않았으나, 꼬투리부분에서는 Nrf2 활성유도 효능이 관찰되었고, 용매분획결과 이 가운데 chloroform 분획물에서 가장 우수한 Nrf2 활성 효능을 지니고 있었다. 또한 한국산 GS가 중국산 GS보다 Nrf2 활성 효능이 우수하였다. 한국산 GS 꼬투리부분의 chloroform 분획물은 Nrf2의 전사를 활성화시켰으며, 핵 내 Nrf2의 발현과 Nrf2-dependent 유전자 발현을 증가시켰을 뿐만 아니라 ROS의 생성을 유도하지도 않았다.

이상의 결과 Nrf2를 활성효능은 GS의 꼬투리 부위의 주요한 성분에 의한 것임을 유추할 수 있었고, 이들의 Nrf2 활성화 기전이 ROS의 생성과 상관없음을 확인하였다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 GS 꼬투리를 이용한 Nrf2 매개 항산화, 항염증 효능에 대한 전임상 연구를 심화시켜 나갈 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 주요사업 “한사의 병태생리 연구를 통한 육음이론의 과학화(K14305)”의 지원을 받아 수행되었습니다.

## References

1. Itoh, K., Ishii, T., Wakabayashi, N., Yamamoto, M. Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. *Free Radic Res* 31: 319-324, 1999.
2. Rahman, I., Biswas, S.K., Kirkham, P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol* 72: 1439-1452, 2006.
3. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 313-322, 1997.
4. Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S., Yamamoto, M. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem* 275: 16023-16029, 2000.
5. Cho, H.Y., Jedlicka, A.E., Reddy, S.P., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Zhang, L.Y., Kleeberger, S.R. Role of Nrf2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am J Resp Cell Mol* 26: 175-182, 2002.
6. Lugade, A.A., Vethanayagam, R.R., Nasirikenari, M., Bogner, P.N., Segal, B.H., Thanavala, Y. Nrf2 Regulates Chronic Lung Inflammation and B-Cell Responses to Nontypeable Haemophilus influenzae. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45(3):557-565, 2011.
7. Satoh, T., Lipton, S.A. Redox regulation of neuronal survival by electrophilic compounds. *Trends Neurosci* 30: 38-45, 2007.
8. Vargas, M.R., Johnson, J.A. The Nrf2-ARE cytoprotective pathway in astrocytes. *Expert Rev Mol Med* 11: e17, 2009.
9. Surh, Y.J., Na, H.K. NF-kappaB and Nrf2 as prime molecular targets for chemoprevention and cytoprotection with anti-inflammatory and antioxidant phytochemicals. *Genes & Nutrition* 2(4):313-317, 2008.
10. Zhang, D.D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev* 38: 769-789, 2006.
11. Herbology textbook compilation committee. *Herbology*. Seoul. Younglimsa. p 491, 2008.
12. Ju, Y.S. *Ungok Herbology*. Jeonju. Woosuk Press. p 1035, 2013.
13. Literature research institute of Eastern Medicine. *Korean version of Donguibogam*. Seoul. Bubin. p 724, 2007.
14. Shin, T.Y., Kim, D.K. Inhibitory effect of mast cell-dependent anaphylaxis by *Gleditsia sinensis*. *Arch Pharm Res* 23: 401-406, 2000.
15. Dai, Y., Chan, Y.P., Chu, L.M., Bu, P.P. Antiallergic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract from *Gleditsia sinensis*. *Biol Pharm Bull* 25: 1179-1182, 2002.
16. Chow, L.M.C., Chui, C.H., Tang, J.C.O., Teo, I.T.N., Lau, F.Y., Cheng, G.Y.M., Wong, R.S.M., Leung, T.W.T., Lai, K.B., Yau, M.Y.C., Gou, D., Chan, A.S.C. *Gleditsia sinensis* fruit extract is a potential chemotherapeutic agent in chronic and acute myelogenous leukemia. *Oncol Rep* 10: 1601-1607, 2003.
17. Fu, L.J., Dai, Y., Wang, Z.T., Zhang, M. Inhibition of experimental allergic rhinitis by the n-butanol fraction from the anomalous fruits of *Gleditsia sinensis*. *Biol Pharm Bull* 26: 974-977, 2003.
18. Dai, Y., Chan, Y.P., Chu, L.M., Bu, P.P. Antiallergic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract from *Gleditsia sinensis*. *Biol Pharm Bull* 25: 1179-1182, 2002.

19. Hou, L.F., Dai, Y., Xia, Y.F., Gong, Z.N. Alleviation of Picryl Chloride-Induced Delayed Type Hypersensitivity Reaction by Saponin Fraction of *Gleditsia sinensis*. *Biol Pharm Bull* 29: 1056-1059, 2006.
20. Choi, J.Y., Kwun, M.J., Kim, K.H., Lyu, J.H., Han, C.W., Jeong, H.S., Ha, K.T., Jung, H.J., Lee, B.J., Sadikot, R.T., Christman, J.W., Jung, S.K., Joo, M. Protective Effect of the Fruit Hull of *Gleditsia sinensis* on LPS-Induced Acute Lung Injury Is Associated with Nrf2 Activation. *Evid-Based Compl Alt: eCAM*, 974713, 2012.
21. Durackova, Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 59: 459-469, 2010.
22. Schraufstatter, I., Hyslop, P.A., Jackson J.H, Cochrane, C.G. Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J Clin Invest*, 82: 1040-1050, 1988.
23. Lee, J.M., Johnson, J.A. An important role of Nrf2 - ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 37: 139-143, 2004.
24. Kang, M.I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.G., Yamamoto, M. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci* 101: 2046-2051, 2004.
25. Padmanabhan, B., Tong, K.I., Ohta, T., Nakamura, Y., Scharlock, M., Ohtsuji, M., Kang, M.I., Kobayashi, A., Yokoyama, S., Yamamoto, M. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell* 21: 689-700, 2006.
26. Itoh, K., Tong, K.I., Yamamoto, M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36: 1208-1213, 2004.
27. Vodovotz, Y., Constantine, G., Faeder, J., Mi, Q., Rubin, J., Bartels, J., Sarkar, J., Squires, R.H., Okonkwo, D.O., Gerlach, J., Zamora, R., Luckhart, S., Ermentrout, B., An, G. Translational systems approaches to the biology of inflammation and healing. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 32: 181-195, 2010.
28. Kobayashi, A., Kang, M.I., Watai, Y., Tong, K.I., Shibata, T., Uchida, K., Yamamoto, M. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol* 26: 221-229, 2006.
29. Tong, K.I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., Yamamoto, M. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol* 26: 2887-2900, 2006.
30. Yamahara, J., Shintani, Y., Konoshima, T., Swada, T., Fugimura, H. Biological active principles of the crude drugs. II. Antiulcerogenic and anti-inflammatory actions of the crude drugs containing saponin. *Yakugaku Zasshi* 95: 1179-1182, 1975.
31. Dhakshinamoorthy, S., Long, D.J. 2nd. Jaiswal, A.K. Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curr Top Cell Regul* 36: 201-216, 2000.
32. Dalton, T.P., Dieter, M.Z., Yang Y., Shertzer H.G., Neber, D.W. Knockout of the mouse glutamate cysteine ligase catalytic subunit (Gclc) gene: Embryonic lethal when homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 324-329, 2000.
33. Pompella, A., Visviki, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 66(8):1499-1503, 2003.
34. Okinaga, S., Takahashi, K., Takeda, K., Yoshizawa, M., Fujita, H., Sasaki, H., Shibahara, S. Regulation of human heme oxygenase-1 gene expression under thermal stress. *Blood* 87: 5074-5084, 1996.
35. Willis, D., Moore, A.R., Frederick, R., Willoughby, D.A. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 2: 87-90, 1996.
36. Zhang, D.D., Hannink, M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* 23: 8137-8151, 2003.
37. Kobayashi, A., Kang, M.I., Watai, Y., Tong, K.I., Shibata, T., Uchida, K., Yamamoto, M. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol* 26: 221-229, 2006.