

## 은행잎의 주성분인 bilobalide가 염증반응에 미치는 효과

정제룡<sup>#</sup>, 길기정<sup>\*</sup>

중부대학교 한방 제약학과

### The Effects of bilobalide Extracted from Ginkgonis Folium on Inflammation

Je-Ryong Jung<sup>#</sup>, Ki-Jung Kil<sup>\*</sup>

Department of Herbal pharmaceutical Science, Joongbu University

#### ABSTRACT

**Objectives** : Bilobalide (BIL) is a predominant sesquiterpene trilactone constituent that accounts for a partial portion of the standardized Ginkgonis Folium extract, which has been widely used to treat a variety of neurological disorders involving cerebral ischemia and neurodegeneration. In this study, it was tested whether BIL exhibits anti-inflammatory activities on inflammation response, or not.

**Methods** : To elucidate the molecular mechanisms of BIL on pharmacological and biochemical actions in inflammation, we examined the effect of BIL on pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages. The investigation was focused on how BIL affect on inflammation-related mediators including various signals such as nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), inducible NO synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), mitogen-activated protein kinases(MAPKs) and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

**Results** : We found that BIL inhibited LPS-induced NO, PGE<sub>2</sub>, IL-6 and TNF- $\alpha$  productions as well as the expressions of iNOS and COX-2. Furthermore, BIL suppressed the LPS-induced phosphorylation for MAPK activation.

**Conclusions** : These results suggest that BIL has inhibitory effects on LPS-induced PGE<sub>2</sub>, NO, IL-6 and TNF- $\alpha$  production, as well as the expressions of iNOS and COX-2 in the murine macrophage. It seems that these inhibitory effects occur by blocking the phosphorylation of MAPKs for activation. Then, BIL suppressed the activation of nuclear factor NF- $\kappa$ B in nucleus. These observations suggest that BIL has anti-inflammatory effect by inhibiting.

**Key words** : Bilobalide, RAW 264.7 cells, Lipopolysaccharide, Inflammation

#### 서론

"살아있는 화석"이라 불리는 은행나무(*Ginkgo biloba* L.)는 약 2억 년 전부터 지구상에 존재했던 Ginkgoales로 알려진 식물군 중 지금까지 살아남은 유일한 식물이며<sup>1)</sup>, 암·수나무가 각각 다른 낙엽성 교목으로서 그 수명은 1,000년이 넘는 장수목으로 알려져 있다. 은행나무는 예로부터 한의학에서 사용되었는데, 종자를 銀杏, 또는 白果라고 하였다. 白果의性は平하고 味는 甘苦澁하며, 有小毒하여 소아에게 주의하여 사용

하였다. 효능은 斂肺平喘, 縮小便하고, 痰多喘咳, 帶下白濁, 遺尿頻尿를 치료하였다<sup>2)</sup>. 또한 은행나무잎(Ginkgonis Folium)은 明代 本草品彙精要에 白果葉이라고 최초로 기재된 이래 中藥志, 中草藥手冊, 廣西本草編纂 및 全國中草藥匯編에서 언급되었다<sup>3,4)</sup>. 은행나무잎은 活血養心, 斂肺澀腸의 효능이 있어, 胸痹心痛, 喘咳痰嗽, 泄瀉痢疾, 白帶의 치료에 사용된다<sup>5)</sup>.

은행나무 잎은 flavonoids, terpenes, organic acids 및 기타 다양한 화합물들을 함유하고 있으며<sup>6)</sup> 테르펜류인 ginkgolide,

\*Corresponding author : Ki-Jung Kil, Department of Herbal pharmaceutical Science, Joongbu University  
· Tel : +82-41-750-6225 · FAX : +82-41-750-6174 · E-mail : kildosa@joongbu.ac.kr

#First author : Je-Ryong Jung, Department of Herbal pharmaceutical Science, Joongbu University

· Tel : +82-42-280-2646 · FAX : +82-42-280-2644 · E-mail : qhrrb79@gmail.com  
· Received : 30 December 2014 · Revised : 24 January 2015 · Accepted : 24 January 2015

bilobalide(BIL) 등이 신경계 질병을 치료하는데 일부 이용되고 있으며, flavoneglycoside인 zincomine이 혈액청정제로 상품화되었다<sup>7-9)</sup>. BIL은 은행잎의 약리성분으로 뇌빈혈(cerebral ischemia)과 신경손상(neurodegeneration)을 포함한 다양한 신경질환에 널리 쓰이며 sesquiterpene trilactone 계열의 성분이다<sup>10,11)</sup>. 은행나무 잎의 추출물은 6%의 sesquiterpene trilactone(3.1% ginkgolide, 2.9% bilobalide)와 24%의 flavonoids를 포함하고 있다<sup>11)</sup>. 또한 여러 연구 결과에서 BIL은 신경보호, 항염증, 항경련, 항세포사멸 등 다양한 생리활성을 나타냈다<sup>12-15)</sup>. 특히 염증성 동물모델에서 BIL 경구투여 시 통증과 염증에 효과가 있음을 보여 주었다<sup>14)</sup>. 선천성 면역 체계는 병원체 침입의 1차적 방어 역할을 수행한다<sup>16)</sup>. 생체조직의 방어기전으로 나타나는 염증반응은 염증 매개물질들에 의해 진행된다. 그러나 염증매개물질들은 주변조직의 발적, 발열, 종창, 동통 및 기능장애 등의 증상을 유도하며<sup>17)</sup>, 면역반응이 지나치게 되면 염증성 장염이나 다발성경화증, 류머티즘과 같은 자가면역질환을 야기할 수 있고 나아가 endotoxin shock과 같은 극심한 면역 부작용을 야기한다<sup>18)</sup>. 따라서 적정수준에서의 염증 반응과 항염 반응의 항상성은 필수적이고, 염증성 질환의 치료 및 수술 후의 환자관리에서 염증반응의 적절한 제어는 대단히 중요하다<sup>19)</sup>.

이에 본 연구는 BIL의 항염증 활성을 조사하기 위하여 LPS로 자극된 RAW 264,7세포에서 세포가 방출하는 NO, PGE<sub>2</sub> 생성량과 iNOS, COX-2의 발현 및 IL-6, TNF- $\alpha$ 의 발현과 MAPKs에 미치는 영향을 알아보고 Ik-B $\alpha$ 와 NF- $\kappa$ B의 활성화를 알아보고 그 기전을 밝히고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

자극원으로 사용한 LPS와 세포배양에 사용되는 RPMI-1640 배지는 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 우태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS) 및 항생제는 김코/RBL사(Gibco/RBL)로부터 구입하였다. 조직배양 플레이트와 직경 100mm 페트리접시는 넉스사(Nunc, Inc, USA)로부터 구입하여 사용하였다. PGE<sub>2</sub>, IL-6와 TNF- $\alpha$ 는 효소결합면역측정(ELISA) 키트를 R&D시스템스(MN, USA)로부터 구입하였으며, COX-2, iNOS, MAPKs(ERK, JNK, p38), 단일세포 항체 및 peroxidase-conjugated된 secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology(CA, USA)에서 구입하였다. BIL은 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA)로부터 구입하였다(Fig 1).

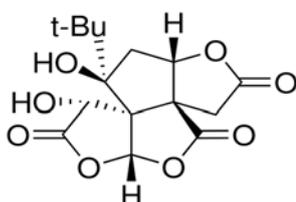


Fig. 1. The structure of Bilobalide

### 2) 시료의 조제

본 실험에 사용한 BIL은 3차 증류수와 DMSO(0.2%)에 용해시킨 다음 0.45  $\mu$ m filter paper로 여과 후 보관하였다. BIL을 실험하기 위하여 인산완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS)에 농도 (10, 25, 50, 100, 및 200  $\mu$ M)로 희석하였다.

### 3) Primer 준비

NCBI(National Center for biotechnology Information)의 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/GenBank>)를 통해 sequence를 얻은 후 증폭할 sequence를 선택하여 primer를 제작하고 annealing temperature를 계산한 후 cycling condition을 최적화하였다. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 위해 여러 개의 primer를 사용하였다. Primer의 구성은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Primer sequences for RT-PCR

cDNA		Primer sequence
iNOS	forward	5'-CATGTTCTCTGGGAAATCGTGG-3'
	reverse	5'-AACGCACCTAGGTTTGCCGAGTA-3'
COX-2	forward	5'-CACTCAGTTTGTGAGTCATTC-3'
	reverse	5'-GATTAGTACTGTAGGGTTAATG-3'
IL-6	forward	5'-CATGTTCTCTGGGAAATCGTGG-3'
	reverse	5'-AACGCACCTAGGTTTGCCGAGTA-3'
TNF- $\alpha$	forward	5'-TTCTGGTTTACAAACGAAATCGTGG-3'
	reverse	5'-AATAGGTTTGCCGGATTGAGTA-3'
GAPDH	forward	5'-ATGAAGATCCTGACCGAGCGT-3'
	reverse	5'-AACGCAGTCTCAGTAACAGTCCG-3'

### 2. 방법

#### 1) 세포 배양

본 실험에 사용된 세포인 murine macrophage cell line, RAW 264,7는 한국 세포주 은행과 ATCC으로부터 구입하여 사용하였다(Korea Research Institute of Bioscience, Biotechnology, American Tissue Culture Collection). 대식 세포주는 항생제 및 항균제로서 100 U/mL의 페니실린 G과 100 U/mL의 스트렙토마이신을 첨가하고 10% 열처리 우태아 혈청(heat inactivated FBS)을 첨가한 완전한 RPMI 1640 배지에서 5% CO<sub>2</sub>의 습한 대기, 37°C의 온도조건으로 배양하였다. 이 때 사용한 FBS는 사용하기 전 55°C에서 1시간 heat-inactivation시켜 사용하였다.

#### 2) 시료의 처리

100 mm culture dish에 부착된 세포들을 cell scraper를 이용하여 세포를 이탈시킨 후, hemocytometer를 이용하여 세포수를 계산하였다. 이 후 실험방법에 따라 적정 농도로 희석한 후 well-plate에 접종하여 배양하였다. BIL은 각각 PBS에 용해시킨 후 접종한지 24 시간 후에 RAW 264,7 세포만을 배양한 정상균인 대조군, lipopolysaccharide(LPS, Sigma Chemical)로 자극한 대조군, LPS와 시료를 농도별로 동시에 처리한 군으로 분류하였다.

### 3) MTT assay 분석

RAW 264.7 세포( $5 \times 10^4$  cells/well)를 96-well culture plate에 100  $\mu$ L의 RPMI 1640 배지와 함께 18시간 배양한 다음, BIL(10, 25, 50, 100, 및 200  $\mu$ M)을 각각 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 5 mg/mL 농도의 MTS 용액을 50  $\mu$ L 씩 넣은 후 2시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도하여 발색정도를 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성(cell toxicity)은 세포만 배양한 무처리군의 생존도 100%를 기준으로 약물처리군의 상대적인 세포 생존률을 계산하였다.

### 4) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

NO 생성에 대한 BIL의 효과를 알아보기 위해 Griess assay 방법을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는  $\text{NO}^{2-}$ 의 형태로 측정하였다. PBS로 희석한 BIL(10, 25, 50, 및 100  $\mu$ M)로 처리하고 여기에 LPS (200 ng/mL)를 각각 주입한 다음 상기 대식세포주 RAW264.7을 24시간 배양하였다. 대식세포주의 상층액을 수집하여 Griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid solution)와 동량으로 주입한 후 10분간 실온에서 방치하였다. 아질산의 농도는 ELISA 리더기를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 세포가 없는 배양액은 아질산이 0-30  $\mu$ M로 나타나, 이 값을 표준으로 하여 여러 실험군의 아질산 값의 흡광도를 측정하였다.

### 5) Enzyme linked immunoassay(ELISA)

RAW 264.7 세포를 RPMI 1640 배지를 이용하여  $5 \times 10^5$  cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 5%  $\text{CO}_2$  항온기에서 18시간 전 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 BIL를 각각 25, 50, 100  $\mu$ M 농도로 1시간 동안 처리한 후, 그람-음성 박테리아 내독소인 LPS(200 ng/mL)로 RAW 264.7 대식세포주를 자극한 후 세포 부유액을 원심분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 IL-6, TNF- $\alpha$  생성량을 ELISA kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 정량해 분석하였다.

### 6) Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)

RAW 264.7 세포를 RPMI 1640 배지를 이용하여  $5 \times 10^5$  cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 5%  $\text{CO}_2$  항온기에서 18시간 전 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 BIL를 각각 25, 50, 100  $\mu$ M 농도로 1시간 동안 처리한 후, 그람-음성 박테리아 내독소인 LPS(200 ng/mL)로 RAW 264.7 대식세포주를 자극한 후 세포부유액을 원심분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 PGE<sub>2</sub> 생성량을 EIA kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 정량해 분석하였다.

### 7) Nuclear factor $\kappa$ B(NF $\kappa$ B) 활성화

RAW 264.7 세포를  $5 \times 10^6$  cells/mL로 조절한 후 6mm dish에 접종하고, 5%  $\text{CO}_2$  항온기에서 18시간 전배양 하였

다. 다음으로 배지를 제거하고 BIL을 25, 50, 100  $\mu$ M 농도로 2시간 동안 처리하고, 그람-음성 박테리아 내독소인 LPS(200 ng/mL)를 RAW 264.7 대식세포주를 자극한 후 2시간 배양하였다. 배지를 제거한 후 PBS로 2회 세척하고, 1 mL RNA lysis buffer[0.6% NP40(Igepal), 0.15M NaCl, 10mM Tris(pH 7.9), 1 mM EDTA를 함유하는 buffer에 1: 0.001의 비율로 protease inhibitor cocktail을 혼합]를 첨가하여 세포를 모았다. 이것을 얼음에서 5분간 incubation 하고 4 $^{\circ}$ C, 2,300 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상등액 중 일부를 이용하여 단백질 농도를 결정하였다.

### 8) RNA 분리 및 Reverse Transcription PCR(RT-PCR)

BIL에 의한 mRNA 발현을 조사하였다. RNA 및 RT-PCR RNA 세포의 준비는 6-well culture plate에  $3 \times 10^5$  세포로 분주하고, 하루 밤 동안 안정화 시켰다. 이 세포에 BIL(25, 50, 100  $\mu$ M)을 처리한 다음, LPS로 자극하고 24시간 후에 세포를 모아 PBS로 세척하여 이지 블루(easy blue, 인트론사) 1 mL를 가하여 실온에서 교반하였다. 클로로포름 200  $\mu$ L를 넣고 다시 교반하여 13,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리 한 후, 상등액 400  $\mu$ L에 이소프로판올을 가하여 다시 원심 분리하여 RNA 펠렛을 얻었다. 여기서 얻어진 RNA에 MuLV 역전사효소(reverse transcriptase), 1 mM dNTP 0.5  $\mu$ g을 넣어 first cDNA를 만들었다. 여기에 프라이머를 넣고 유전자 증폭기(thermal cycler)를 이용하여 증폭시켰다. 증폭되어진 PCR 산물은 2% 아가로스 겔에 전기 영동시켜 UV 검출기로 확인하였다.

### 9) Western blot analysis

배양이 끝난 세포를 수집하여 2-3회 PBS로 세척 한 다음 1 mL의 lysis buffer을 첨가하여 30분간 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 20-30  $\mu$ g의 lysate를 8-12% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TBST(0.1% Tween20 + TBS) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. MAPK의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 JNK, ERK p38 anti-mouse(1 : 1000) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 TBST 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세정 하였다. 2차 항체로는 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG(Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)를 1 : 2,000으로 희석하여 상온에서 1 시간 반응시킨 후, TBST로 3회 세정하여 ECL 기질(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1-3분 간 반응시킨 다음 ImageQuant™ LAS 4,000mini(GE Healthcare, Aweden)을 이용하여 Chemiluminescence을 분석하였다.

### 10) 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과

각 항목에 따라 평균치  $\pm$  표준편차(Mean  $\pm$  SD)로 표시했으며, 통계처리는 IBM SPSS를 이용하였고 analysis of variance(ANOVA)를 구하여 신뢰수준  $*p < 0.05$  및  $**p < 0.01$ 에서 통계적 유의차를 검정하였다.

## 결 과

### 1. BIL의 세포생존율에 대한 영향

RAW 264.7세포에서 BIL의 세포독성을 MTS assay 방법으로 조사하였다. 그 결과, BIL을 10, 25, 50, 100, 및 200  $\mu$ M의 농도로 처리 하였을 때 10~100  $\mu$ M의 농도에서는 RAW 264.7세포의 생존율에 영향을 미치지 않았다(Fig 2). 따라서 이후 실험은 BIL의 세포독성이 없는 농도범위에서 수행하였다.

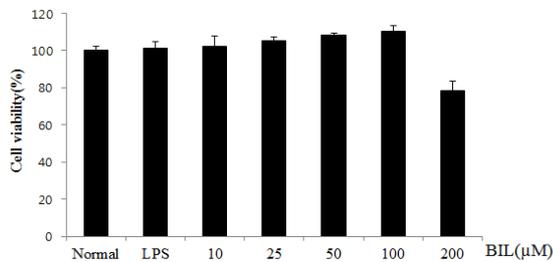


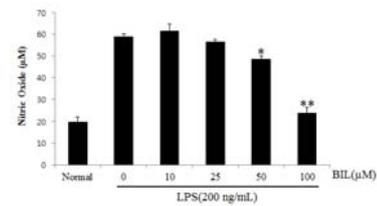
Fig. 2. Effect of BIL on cell viability in RAW 264.7 cells. The cell viability assessed using an MTS assay following incubation with different doses(10, 25, 50, 100 and 200  $\mu$ M) of BIL for 24 hours. Values are the mean  $\pm$  S.D. of duplicate determinations from three separate experiments.

### 2. NO 생성과 iNOS 발현에 대한 BIL의 억제 효과

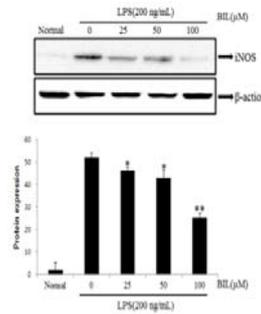
NO는 NOS에 의해 L-arginine으로부터 생성되며, NOS는 혈관 내피세포, 상피세포 및 신경세포 등에서 구성요소로서 발현되는 cNOS와 대식세포 등에서 유도성으로 발현되는 iNOS가 있다. 일반적으로 cNOS는 acetylcholine 또는 세균성 독소(endotoxin, LPS) 등에 의한 세포내  $Ca^{2+}$  농도에 따라 조절되며, 혈압조절 및 신경전달에 중요한 역할을 한다<sup>20</sup>. 그러나 iNOS의 발현은 세포내  $Ca^{2+}$  농도와 관계없이 세균성 독소 또는 염증 및 면역반응, 허혈, 조직손상, 산화성 스트레스 등에 따라 유리되는 여러 종류의 cytokine(IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  등)에 의해서 유전자 전사단계에서 유도되며, 이에 따라 NO가 대량 생성 유리될 경우에는 질병의 병태생리에 중요한 인자로 관여할 수 있다<sup>21</sup>.

NO 생성과 iNOS protein 발현, mRNA 발현을 알아보기 위해 Western blot과 RT-PCR을 수행하였다. BIL의 효과를 알아보기 위해 BIL 25, 50, 100  $\mu$ M 농도로 처리하였다. 이후 측정하였을 때 농도 의존적이고 유의적으로 억제되는 것으로 나타났다(Fig 3 A,B,C).

A)



B)



C)

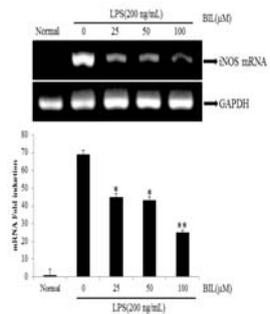


Fig. 3. Effect of BIL on LPS-induced NO production and iNOS expression in RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of BIL for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/ml) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. (B) RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of BIL for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/ml) for 24 hours. Equal amounts of protein (20  $\mu$ g) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with iNOS and  $\beta$ -actin antibodies. Equal loading of protein was verified by  $\beta$ -actin. (C) iNOS mRNAs were assessed by RT-PCR in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of BIL for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/ml) for 24 hours. The GAPDH mRNA was assayed in parallel to confirm equivalency of the cDNA preparation. The experiment was repeated three times, and similar results were obtained.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ . Values shown are the mean  $\pm$  S.D. of duplicate determinations from three separate experiments.

### 3. PGE<sub>2</sub> 생성과 COX-2 발현에 대한 BIL의 억제 효과

PGE<sub>2</sub>는 NO와 마찬가지로 손상된 부위나 조직에서 통증과 발열의 전달에 주로 관여하는 중요한 염증매개물질로서 COX-2에 의해 합성되는데, 과량 생산되면 과도한 면역반응을 야기하여 다발성 경화증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 대장암과 같은 각종 염증성 질환을 유발시키게 된다<sup>22</sup>. PGE<sub>2</sub>는 국소적으로 활성화되며 arachidonic acid로부터 COX 효소의 작용에 의해 합성된다<sup>23</sup>. COX는 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 정상적인 상황에서 발현하여 위장관 보호, 체내에서 혈소판의 형성, 신장 기능의 조절 등 신체의 항상성 유지에 관여한다<sup>24</sup>. 따라서 BIL의 PGE<sub>2</sub>, COX-2 protein 과 mRNA 발현에 대한 효과를 알아보기 위해 Western blot 과 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, LPS 처리에 의해 증가된 COX-2 발현은 50, 100  $\mu$ M 농도에서 현저하게 억제되는 것을 확인하였다(Fig 4).

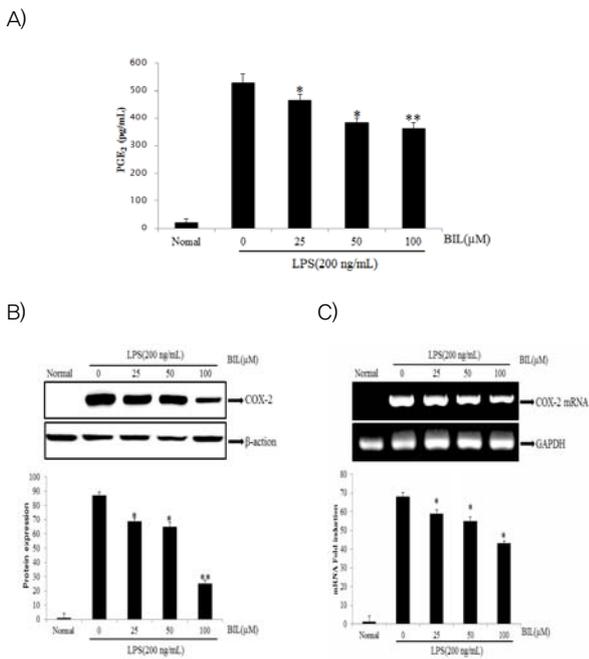


Fig. 4. Effect of BIL on LPS-induced PGE<sub>2</sub> production and COX-2 expression in RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of BIL for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/ml) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. (B) RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of BIL for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. Equal amounts of protein (20 μg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with COX-2 and β-actin antibodies. Equal loading of protein was verified by β-actin. (C) COX-2 mRNAs were assessed by RT-PCR in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of BIL for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. The GAPDH mRNA was assayed in parallel to confirm equivalency of the cDNA preparation. The experiment was repeated three times, and similar results were obtained. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01. Values shown are the mean ± S.D of duplicate determinations from three separate experiments.

#### 4. Pro-inflammatory cytokine IL-6 생성에 대한 BIL의 억제 효과

IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine은 염증단계에서 중추적 역할은 한다고 알려져 있다. IL-6는 B세포 분화증식, 급성기 단백 합성자극, 혈소판 생산자극의 작용뿐만 아니라 신장의 메산지움세포, 세뇨관세포에서 생산되며 메산지움세포의 증식 및 세뇨관간질조직의 손상과 관련이 있는 등에도 관여하는 사이토카인으로서<sup>25-27</sup> 면역세포를 활성화시키고 항체 생산을 촉진하는 작용을 하며 염증 정도를 나타내는 marker로 이용되고 있으며<sup>28</sup>,

대식세포주인 RAW 264.7 세포로부터 염증성 사이토카인 IL-6의 생성을 ELISA 와 RT-PCR 이용하여 실험한 결과, LPS 자극원을 처리하였을 때 IL-6 생성이 현저히 증가하였고, BIL를 처리하였을 때 IL-6 생성 억제 효과가 나타났다 (Fig 5).

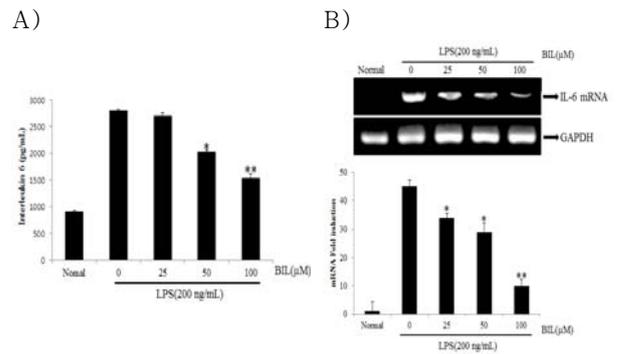


Fig. 5. Effect of BIL on LPS-induced IL-6 production, RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of BIL for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/ml) for 24 hours. Production of IL-6 was measured by ELISA. Cells were pretreated with the indicated concentrations of BIL for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/ml) for 24 hours. The experiment was repeated three times, and similar results were obtained. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01. Values shown are the mean ± S.D of duplicate determinations from three separate experiments.

#### 5. Pro-inflammatory cytokine TNF-α 생성에 대한 BIL의 억제 효과

TNF-α는 급성 염증반응의 주된 매개자이며 많은 중증 감염의 전신적 합병증의 원인이 되고, 메산지움, 내피세포, 외피세포를 자극함으로써 사구체 손상을 일으킨다<sup>25</sup>. 일반적 사구체 손상의 원인 중의 하나인 염증성 매개 TNF-α는 많은 면역 질환과 염증질환에서 중요한 매개자로서, 또는 특이한 길항체에 대한 표적물질로 작용을 한다고 보고되었다<sup>28</sup>. IgA 신증이나 막성 사구체신염, 초점성 분절성 사구체경화증 환자의 혈청과 소변에서 TNF-α가 증가한다고 보고<sup>29</sup>되었다.

대식세포주인 RAW 264.7 세포로부터 염증성 사이토카인 TNF-α의 생성을 ELISA를 이용하여 확인하였다. 그 결과, LPS 자극원을 처리하였을 때 TNF-α 생성이 현저히 증가하였고, BIL을 처리하였을 때 TNF-α 생성 억제 효과가 나타났다(Fig 6).

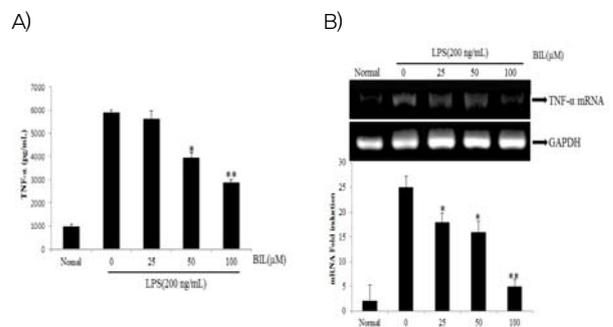


Fig. 6. Effect of BIL on LPS-induced TNF-α production, RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of BIL for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/ml) for 24 hours. Production of TNF-α was measured by ELISA. Cells were pretreated with the indicated concentrations of BIL for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/ml) for 24 hours. The experiment was repeated three times, and similar results were obtained. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01. Values shown are the mean ± S.D of duplicate determinations from three separate experiments.

## 6. MAPKs의 인산화에 대한 BIL의 억제 효과

지금까지 잘 알려진 염증반응의 세포내 분자전달신호체계 중에 MAPKs는 염증반응에 관련된 신호전달기전이며, 그 중에서 ERK, JNK와 p38 MAPK 등이 주요한 전달 기전이다<sup>30)</sup>. 활성화된 MAPKs는 다른 kinase, 전사인자 등을 활성화하여 표적유전자의 발현을 변화시키고, 유전자 발현의 변화는 세포의 여러 소기관과 효소에 영향을 주게 된다. 따라서 이러한 전염증성 사이토카인의 활성을 억제함으로써 염증반응의 분자신호 전달기전인 MAPK superfamily에 속하는 세 가지 효소들인 ERK, JNK, p38 MAPK 등의 염증매개체들의 신호전달을 통해 억제하는지 알아보았다. 따라서 BIL의 억제 메커니즘이 MAPKs를 경유하는지 알아보기 위해 MAPKs의 인산화를 Western blot을 통해 확인하였다. 그 결과 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 대식세포에 BIL을 25, 50, 100  $\mu$ M을 처리한 경우 JNK와 ERK 인산화를 억제하는 것을 확인하였다(Fig 7). 이는 LPS로 유도한 대식세포의 염증반응은 JNK와 ERK의 신호전달 경로를 경유 하지만 p38은 경로를 경유하지 않는다는 것을 보여준다. 결론적으로, BIL의 세포내의 전염증성 인자들을 현저하게 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

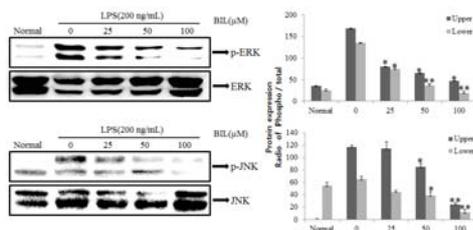


Fig. 7. Effect of BIL on the phosphorylation (P-) of MAPKs in LPS-stimulated RAW 264.7 cells: RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of BIL for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 30 minutes. Whole-cell lysates were analyzed by Western blot analysis. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01. Values shown are the mean  $\pm$  S.D of duplicate determinations from three separate experiments.

## 8. I- $\kappa$ B 분해와 핵 내의 NF- $\kappa$ B 활성화에 대한 BIL의 억제 효과

전사인자 NF- $\kappa$ B 활성화의 연관성을 확인하기 위해 I- $\kappa$ B 분해와 NF- $\kappa$ B 활성 저해를 측정하였다. LPS로 활성화된 대식세포에 BIL을 25, 50, 100  $\mu$ M로 처리한 경우 NF- $\kappa$ B 결합 활성 저해를 핵의 추출물에서 보였고, 세포질에서 I- $\kappa$ B 분해 역시 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig 8). NF- $\kappa$ B는 cytokine 반응, 염증, 세포 성장 조절과 같은 다양한 단계에 참여하는 전사 인자로 최근에 연구들은 inducible NF- $\kappa$ B가 죽상동맥경화 발병에 관여함을 강하게 제기되고 있다<sup>31)</sup>. 많은 세포에서 NF- $\kappa$ B는 세포질에서 핵으로의 다양한 신호전달에 관여하는 redox-sensitive transcription factor<sup>32)</sup>. 세포질속에서 p50/p65 heterodimer가 핵 속으로 이동하여 연속적인 DNA결합을 초래하는 것으로 알려져 있다<sup>33)</sup>. 따라서 ERK와 p38 인산화 저해는 I- $\kappa$ B분해 억제와 NF- $\kappa$ B 결합 활성저해에 의한 세포내 신호전달체계에 의한 것으로 확인되었다.

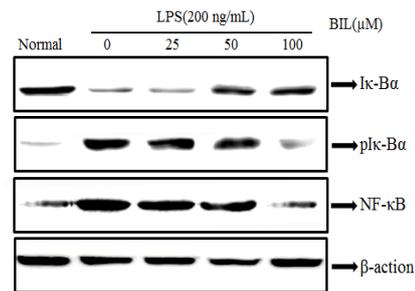


Fig. 8. Effect of BIL on LPS-induced release of I $\kappa$ B into the cytosol (p65) subunit into the nucleus and translocation of the NF- $\kappa$ B (p65) subunit into the nucleus. The cells were treated with LPS (200 ng/mL) alone or with LPS and the indicated concentration of BIL for 30 minutes (I $\kappa$ B) or for 1 hour (NF- $\kappa$ B). The expressions of I $\kappa$ B in the cytosol extracts and p65 in the nuclear extracts were determined by Western blot analysis using anti-I $\kappa$ B and anti-NF- $\kappa$ B antibodies, as described in Materials and Methods. The experiment was repeated three times, and similar results were obtained

## 고찰

염증은 물리적인 외상, 유해화학물질, 미생물 또는 약품 등에 의해 야기되는 조직손상에 대한 정상적인 보호반응으로 침입하는 유기체를 불활성화시키거나 파괴해서 이를 제거하고 조직을 정상적으로 유지시키는데 기여한다. 면역세포들은 조직 사이를 이동하거나 혈관을 통과하여 염증장소까지 이동하게 되는데, 항원이 있는 곳으로 면역세포를 유인하기 위해 혈관이 확장되어 조직이 붉어지게 되며 다양한 생리활성물질들이 분비되어 통증이 나타나게 된다. 염증반응이 일어나면 항원이 효과적으로 제거되는데 반응이 오히려 과도하게 나타나거나 지속적으로 나타내게 되면 주변조직이 손상되어 급성 또는 만성 염증질환이 발병하기도 한다.

현재까지 효과와 안전성이 우수한 새로운 항염증제를 개발하기 위해 천연물을 이용한 많은 연구들이 수행되었으며<sup>34)</sup>, 이와 같은 연구결과들은 천연물로부터 염증반응의 조절기능에 관여하는 기능성 물질의 개발 가능성을 시사해 주었으며, 한편으로는 보다 더 광범위하게 많은 천연 자원으로부터 염증반응에 관여하는 기능성물질들에 대한 탐색이 필요함을 인식시켜 주었다. 그람 음성균의 외막성분인 LPS는 국소염증, 항체생성, 패혈증과 같은 다양한 반응을 일으킨다. 초기 염증반응에 깊이 관여하는 염증매개물질인 proinflammatory cytokine들의 형성은 phospholipase A2(PLA2)의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO 등을 대량 생성함으로써 염증매개에 큰 역할을 한다<sup>35)</sup>.

NO는 혈관확장, 비 특이적 면역반응, 허혈후 재관류 조직 손상과 만성 염증과 같은 생태병리학적 과정과 관계가 깊다<sup>36)</sup>. 또한 COX-2에 의해 형성된 PGE<sub>2</sub>는 염증반응에 중요한 역할을 하며, 혈관생성을 유도하여 종양생성에 기여한다<sup>37)</sup>. LPS는 RAW 264.7과 같은 대식세포 또는 단핵구에서 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  같은 proinflammatory cytokine들을 증가시키는 것으로 알려져 있고<sup>38)</sup>, 정상적인 세포기능을 방해할 수 있고 그것은 다발성 장기손상 증후군이나 패혈증을 야기한다<sup>39)</sup>.

Cytokine의 분비는 신호전달경로에서 JNK, ERK와 p38 같은 MARKs와 NF- $\kappa$ B에 의해 조절되어 인산화가 활성화가 일어나게 된다. NF- $\kappa$ B는 활성화 되면 결합해 있던 I $\kappa$ -B $\alpha$ 가

분해되면서 세포질에서 핵 내로 이동하여 cytokine 발현을 촉진시키는 전사인자로서 작용한다<sup>40,41</sup>.

BIL은 pro-inflammatory cytokine의 억제기전과 관련이 있을 것으로 예상됨에 따라, 염증반응의 주체가 되는 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유하여 IL-6와 TNF- $\alpha$  pro-inflammatory cytokine과 NO의 생성억제 효과를 확인하였다. 또 한 iNOS와 COX-2의 단백질 억제와의 관련성을 조사하기 위해 Western blot 분석법을 이용하여 세포질 내의 iNOS 단백질 양을 조사하였고 COX-2의 단백질 발현 억제효과 및 PGE<sub>2</sub>생성 억제 효과를 확인하였다. 그 결과 iNOS와 COX-2의 단백질 발현이 BIL에 의해 농도 의존적으로 억제 되었음을 확인 하였고, MAPKs의 인산화에서는 JNK 와 ERK 인산화는 억제하는 반면 와 p38 MAPK의 인산화에는 아무런 영향을 주지 못했다. 이는 LPS로 유도한 대식세포의 염증반응은 JNK와 ERK의 신호전달 경로를 경유하는 반면 p38 의 경로와는 다르다는 것을 보여준다. 다음으로 전사인자 NF- $\kappa$ B 활성화와의 연관성을 확인하기 위해 I- $\kappa$ B 분해와 NF- $\kappa$ B 활성 저해를 측정하였다. 그 결과 LPS로 활성화 된 대식세포에 BIL을 처리한 경우 NF- $\kappa$ B 결합 활성 저해를 나타냈으며, 세포질에서 I- $\kappa$ B분해 역시 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

본 실험 결과를 요약하면, BIL은 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 iNOS, COX-2, IL-6 그리고 IL-12 유전자의 발현, PGE<sub>2</sub> 생성을 효과적으로 저해한다. 그러므로 이러한 결과들은 한의학에서 BIL의 항염증 기전을 밝힘으로써 그 과학적 근거를 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

## 결론

BIL의 RAW 264.7 cell 에서의 항염증효과의 기전에 관한 연구는 매우 미흡한 실정으로, iNOS 억제 기전 및 염증성관련 cytokine의 발현에 대한 연구를 수행하기 위하여 LPS 로 자극한 RAW 264.7 세포에서 나타나는 염증매개물질들에 미치는 영향을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BIL은 LPS로 유도된 대식세포에서 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성을 농도 의존적으로 억제한 것이 관찰되었다.
2. BIL은 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 protein 생성과 mRNA발현을 억제하는 것이 관찰되었다.
3. BIL은 LPS로 유도된 전염증성 사이토카인 IL-6와 TNF- $\alpha$ 발현을 현저하게 억제되는 것이 관찰되었다.
4. BIL처리 시 LPS로 유도된 MAPKs 인산화의 활성을 저해 하는지 알아보기 위해 Western blot을 수행한 결과 MAPKs (JNK, ERK), 인산화가 억제된 것이 관찰되었다.
5. BIL처리 시 LPS 유도된 NF- $\kappa$ B의 활성을 저해 하는지 알아보기 위해 Western blot을 수행한 결과 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해, NF- $\kappa$ B의 활성이 저해된 것이 관찰되었다.

이와 같은 결과로 보아 BIL은 대식세포에 작용하여 MAPKs의 인산화와 I $\kappa$ B $\alpha$  분해, NF- $\kappa$ B 활성의 저해를 통해 NO, PGE<sub>2</sub>, IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 생성과 iNOS, COX-2 발현을 억제함으로써 항염증에 효과가 있음을 알 수 있었다. 그러므로 이러한 결과들은 BIL의 항염증 기전 효과를 밝힘으로써 그 과학적 근거를 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

## References

1. Major RT. The ginkgo, the most ancient living tree. The resistance of Ginkgo biloba L. to pests accounts in part for the longevity of this species. Science. 1967 ; 157(3794) : 1270-3.
2. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine Schools. Herbology. Seoul : Younglimsa, 2004 : 525-6.
3. Kim CM, Shin MK, Ahn DK, Lee KS. (The) Encyclopedia of oriental herbal medicine. Seoul, Jungdam, 1999 : 1559-61.
4. State Administration of Traditional chinese medicine of the People's Republic of China. Zhonghuabencao. Vol. 4. Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999 : 280-4.
5. Ahn DK. Illustrated book of korean medicinal herbs. Seoul : Kyo-Hak Publishing, 1998 : 584.
6. Defeudis FV. Ginkgo biloba Extract (EGb761). Paris : Elsevier, 1991.
7. Jaracz S, Malik S, Nakanishi K. Isolation of ginkgolides A, B, C, J and bilobalide from G. biloba extracts. Phytochemistry, 2004 ; 65(21) : 2897-902.
8. Tang C, Wei X, Yin C. Analysis of ginkgolides and bilobalide in Ginkgo biloba L. extract injections by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. J Pharm Biomed Anal, 2003 ; 33(4) : 811-7.
9. Deng F, Zito SW. Development and validation of a gas chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous identification and quantification of marker compounds including bilobalide, ginkgolides and flavonoids in Ginkgo biloba L. extract and pharmaceutical preparations. J Chromatogr A, 2003 ; 986(1) : 121-7.
10. Ahlemeyer B, Kriegelstein J. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract. Cell Mol Life Sci, 2003 ; 60(9) : 1779-92.
11. Strømggaard K, Nakanishi K. Chemistry and biology of terpene trilactones from Ginkgo biloba. Angew Chem Int Ed Engl, 2004 ; 43(13) : 1640-58.
12. Defeudis FV. Bilobalide and neuroprotection. Pharmacol Res, 2002 ; 46(6) : 565-8.
13. Schwarzkopf TM, Koch KA, Klein J. Neurodegeneration after transient brain ischemia in aged mice:

- beneficial effects of bilobalide. *Brain Res.* 2013 ; 1529 : 178–87.
14. Goldie M, Dolan S. Bilobalide, a unique constituent of *Ginkgo biloba*, inhibits inflammatory pain in rats. *Behav Pharmacol.* 2013 ; 24(4) : 298–306.
  15. Sasaki K, Wada K, Hatta S, Ohshika H, Haga M. Bilobalide, a constituent of *Ginkgo biloba* L., potentiates drug-metabolizing enzyme activities in mice: possible mechanism for anticonvulsant activity against 4-O-methylpyridoxine-induced convulsions. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1997 ; 96(1) : 45–56.
  16. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002 ; 20 : 197–216.
  17. Yun HJ, Heo SK, Yi HS, Kim CH, Kim BW, Park SD. Anti-inflammatory effect of Injinho-tang in RAW 264.7 Cells. *Kor J Herbology.* 2008 ; 23(2) : 169–78.
  18. López-Bojórquez LN, Dehesa AZ, Reyes-Terán G. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. *Arch Med Res.* 2004 ; 35(6) : 465–79.
  19. Chao CY, Yeh SL, Lin MT, Chen WJ. Effects of parenteral infusion with fish-oil or safflower-oil emulsion on hepatic lipids, plasma amino acids, and inflammatory mediators in septic rats. *Nutrition.* 2000 ; 16(4) : 284–8.
  20. Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor derived from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. USA : In Vanhouttem Raven press. 1998 : 401–4.
  21. Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, Lee JH. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF- $\kappa$ B. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 ; 261(3) : 917–22.
  22. Kuo CL, Chi CW, Liu TY. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer letters.* 2004 ; 203(2) : 127–37.
  23. Rocca B, FitzGerald GA. Cyclooxygenases and prostaglandins : shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol.* 2002 ; 2(5) : 603–30.
  24. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 ; 91(25) : 12013–7.
  25. Papiyanni A. Cytokines, growth factors, and other inflammatory mediators in glomerulonephritis. *Ren Fail.* 1996 ; 18(5) : 725–40.
  26. Lim CS, Kim YS, Ahn C, Han JS. Internal expression of interleukin-6 and the -174 G/C polymorphism in IgA nephropathy. *Korean J Nephrol.* 2002 ; 21 : 595–601.
  27. Rantala I, Mustonen J, Hurme M. Pathogenic aspects of IgA nephropathy. *Nephron.* 2001 ; 88 : 193–8.
  28. Kang JS. Cellular and molecular immunology. Seoul : Bummusa. 2004 : 480–7.
  29. Suranyi MG, Guasch A, Hall BM, Myers BD. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha in the nephrotic syndrome in humans. *Am J Kidney Dis.* 1993 ; 21(3) : 251–9.
  30. Caivano M. Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transporters and nitric oxide synthetase in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Lett.* 1998 ; 429(3) : 249–53.
  31. Hernández-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tuñon J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor- $\kappa$ B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation.* 1997 ; 95(6) : 1532–41.
  32. Grimm S, Baeuerle PA. The inducible transcription factor NF- $\kappa$ B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J.* 1993 ; 290(Pt2) : 297–308.
  33. Henkel T, Machleidt T, Alkalay II, Krönke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA. Rapid proteolysis of I $\kappa$ B- $\alpha$  is necessary for activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature.* 1993 ; 365(6442) : 182–5.
  34. Lee E. Anti-inflammatory effect of *Scutellariae Radix*. *Korean J Plant Res.* 2007 ; 20(6) : 548–52.
  35. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996 ; 211(1) : 24–32.
  36. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 1990 ; 347(6295) : 768–70.
  37. Bishop-Bailey D, Calatayud S, Warner TD, Hla T, Mitchell JA. Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2002 ; 21(2) : 93–101.
  38. Willeaume V, Kruijs V, Mijatovic T, Huez G. Tumor necrosis factor- $\alpha$  production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *J Inflamm.* 1995–1996 ; 46(1) : 1–12.
  39. Shen FM, Guan YF, Xie HH, Su DF. Arterial baroreflex function determines the survival time in lipopolysaccharide-induced shock in rats. *Shock.*

- 2004 ; 21(6) : 556-60.
40. Athman R, Philpott D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol.* 2004 ; 7(1) : 25-32.
  41. Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J.* 2004 ; 382(2) : 393-409.