

H₂O₂ 처리된 LLC-PK₁ 세포에서 Redox Status 및 NF- κ B Signaling에 대한 夏枯草의 효과

손종석 · 정지천*

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of Prunellae Herba on the H₂O₂-Treated LLC-PK₁ Cell's Redox Status and NF- κ B Signaling

Jong Seok Son, Ji Cheon Jeong*

Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University

This study was to investigate the anti-inflammatory effects of Prunellae Herba(PH). The generation of superoxide anion radical (\cdot O₂⁻), nitric oxide (NO), peroxyxynitrite (ONOO⁻) and Prostaglandin E₂(PGE₂) were measured in the H₂O₂-Treated renal epithelial cells(LLC-PK₁ cell) of mouse. And the effects of Prunellae Spica on the expression of NF- κ B (p50, p65), IKK- α , phospho-I κ B- α and inflammation-related proteins, COX-2, iNOS, IL-1 β and VCAM-1, were examined by western blot. The fluorescent probes, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) and dihydrorhodamine 123 (DHR 123) were used to estimate the scavenging effect of Prunellae Spica on \cdot O₂⁻, NO, ONOO⁻. Western blot was conducted to assess the protein expression levels of NF- κ B (p50, p65), IKK- α , phospho-I κ B- α , inflammation-related proteins, COX-2, iNOS, IL-1 β , VCAM-1. PH inhibited H₂O₂-treated cell death dose-dependently. It reduced the generation of \cdot O₂⁻, NO, ONOO⁻ and PGE₂ in the H₂O₂-treated renal epithelial cells(LLC-PK₁ cell) of mouse in vitro. PH reduced the expression of NF- κ B, IKK- α , phospho-I κ B- α , COX-2, iNOS, IL-1 β and VCAM-1 genes through means of decreasing activation of NF- κ B signaling as well. According to these results, PH has an antioxidative activity and anti-inflammatory effect by regulating the NF- κ B pathway. This suggests that PH is expected to be used to regulating inflammatory process and treating inflammation-related disease.

keywords : Prunellae Herba, Reactive oxygen species, Reactive nitrogen species, NF- κ B, Redox Status, anti-inflammatory

서론

활성산소종과 활성질소종은 생체 내에서 산화적 스트레스를 유발하여 세포막의 지질과산화물을 일으키며, DNA의 산화 및 손상, 염색체의 손상을 가속화시킨다^{1,2}. 특히 활성산소의 과잉생성은 허혈 재관류에 의한 조직 손상, 대사증후군, 파킨슨병, 알츠하이머병과 같은 퇴행성 신경 질환, 암, 심혈관 질환 등과 같은 질병과 관련있는 것으로 보고되고 있다^{3,4}.

NF- κ B는 염증반응 조절, 면역체계 조절, 세포사(apoptosis), 세포증식, 상피세포의 분화 등에 관여하는 단백질군(protein family)으로서 다양한 유전자들의 발현을 조절하고 세포내 신호전달 체계의 중심축을 이루고 있다⁵. NF- κ B에 의해 유도되는 염증 촉진인자들로 COX-2, iNOS, IL-1 β , VCAM-1 등이 있으며,

Prostaglandin E₂ (PGE₂)는 COX-2에 의해 생산되는 물질로 혈관확장, 통각과민, 발열, 면역제어 등에 관여한다⁶. 최근 NF- κ B와 갑상선암, 당뇨병, 죽상경화증 등의 내분비-대사질환의 연관성 및 염증·면역반응에서 NF- κ B의 역할에 대해 보고된 바 있으며 NF- κ B를 표적으로 하는 치료제 개발 연구가 활발히 진행 중이다⁵⁻⁷.

夏枯草(Prunellae Herba)는 꿀풀과(唇形科 : Labiatae)에 속한 다년생 本草인 꿀풀 *Prunella vulgaris* var. *lilacina* Nakai의 꽃이삭(果穗)으로 性은 寒하고, 味는 辛苦하며 淸火明目, 散結消腫하는 효능이 있어 目赤腫痛, 目珠夜痛, 頭痛, 眩暈, 고혈압, 비만, 癭癧, 癭瘤, 乳癰腫痛, 甲狀腺腫大, 淋巴腺結核, 乳腺增生 등의 치료에 활용되고 있다⁸. 최근 연구로는 항알레르기⁹, 항염증¹⁰, 암전이 억제¹¹, 갑상선기능항진증¹² 등에 대한 동물실험, 파골세포 분화 억제¹³, 대식세포 면역활성¹⁴, 항비만 및 산화적 스트레스 억제¹⁵,

* Corresponding author

Ji Cheon Jeong, Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University, 27, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Gyeonggi-do, Korea

E-mail : kyjic1931@daum.net ·Tel : +82-31-961-9030

Received : 2016/07/05 ·Revised : 2016/08/09 ·Accepted : 2016/08/19

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2016.08.30.4.242>

Available online at <http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm>

항노화¹⁶⁾ 등에 대한 세포실험이 있다. 특히 장 등의 연구¹⁰⁾에서는 그람 음성균의 외부세포막에 존재하는 내독소인 LPS를 설치류 대식세포인 Raw 264.7 cell에 처치하여 발생하는 염증매개인자를 관찰하여 夏枯草 추출물이 감염에 의한 염증과 면역치료에 활용될 수 있음을 시사한 바 있다. 이와 같이 夏枯草의 항산화, 항염증 효과에 대한 연구보고는 많으나 산화적 스트레스로 인한 NF- κ B 신호 전달체계에 미치는 영향에 대한 연구는 없었다.

본 연구에서는 夏枯草의 항산화, 항염증 효과와 NF- κ B 신호 전달체계에 미치는 영향을 확인하기 위해 H₂O₂로 세포사를 유도한 LLC-PK₁ cell에서 ·O₂⁻, NO, ONOO⁻ 및 PGE₂의 생성과 NF- κ B pathway, 염증 촉진인자의 발현에 미치는 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

夏枯草(Prunellae Herba, PH)는 시중(태원당약업사, 대구, 대한민국)에서 구입하고 정선하여 사용하였다.

2) 시약 및 기기

세포배양용 시약인 Streptomycin-penicillin, Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) 등을 Gibco BRL (Grand Island, USA)에서, Dihydrorhodamine 123 (DHR 123), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)는 molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서, 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)은 Dai ichi Pure Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서, Carboxy-PTIO sodium salt는 Calbiochem (EMD Biosciences Inc., USA)에서, acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS)는 Bio-Rad (Hercules, USA)에서, NP-40, CAPS, Tris base, ponceau, ammonium persulfate, protease inhibitors, glycerol, bovine serum albumin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서, 1차 항체인 IKK- α , phospho-I κ B- α 는 Cell Signaling Technology (Cell Signaling, USA)에서 구입하였다. NF- κ B(p50, p65), iNOS, COX-2, VCAM-1, IL-1 β , β -actin, histone H1과 2차 항체인 anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat IgG는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)에서 구입하였고, sodium chloride, hydrogen peroxide, ethanol, methanol 및 기타 시약은 시중에서 특급품을 구입하여 사용하였다.

GENios (GENios-basic, Tecan, Austria), UV-VIS spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu Co., Japan) 등의 기기들은 각각 구입하여 사용하였다.

3) 세포

경북대학교 의과대학 해부학교실에서 Mouse의 신장상피세포 (Renal epithelial cells)인 LLC-PK₁ cell을 분양받아 사용하였다.

2. 방법

1) 검액 조제

夏枯草 300 g을 잘게 분쇄하여 3배량의 95% methanol을 가한 것을 60°C에서 증탕으로 24시간씩 3회 반복해서 추출하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 실온으로 냉각시킨 뒤 여지로 여과하여 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시킨 후 추출물 52.22g (수율 17.41 %)을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 세포 배양

LLC-PK₁ cell을 100 mm dish (Corning Co., New York, USA)에 배양하였다. 이때 5% fetal bovine serum, L-sodium bicarbonate (2.438 g/ml)와 L-glutamine (5.84 μ g/ml)을 함유한 DMEM/F12 배지에 penicillin-streptomycin (100 U/ml)을 가하였고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 2일에 1회씩 subculture하여 세포주를 유지하였다.

3) MTT assay

夏枯草의 세포 독성 및 H₂O₂로 인한 세포사에 대한 세포 보호 효과를 확인하기 위해, Tada 등의 방법¹⁷⁾으로 측정하였다. 노란색을 띠는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액은 살아 있는 세포에서 미토콘드리아의 succinyl dehydrogenase에 의해 보라색의 formazan으로 환원된다. spectrophotometer로 formazan의 발색 정도를 측정하여 세포의 생존율을 측정함으로써 夏枯草의 독성 및 세포 보호 효과를 측정할 수 있다. LLC-PK₁ cell을 96 well plate에 1 \times 10⁴/well로 접종하여 24시간 배양하고 serum free 배지로 바꿔준 후, 夏枯草 추출물을 농도별(25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μ g/ml)로 가하여 1시간 전처리한 다음 夏枯草의 세포 독성을 측정하였다. LLC-PK₁ cell을 96 well plate에 1 \times 10⁴/well로 접종하여 24시간 배양하여 夏枯草 추출물을 1시간 전처리하고 H₂O₂를 최종 농도 100 mM이 되도록 가하여 5시간 더 배양한 후 세포보호 효과를 측정하였다. 측정 시 배지를 제거하고 0.5 mg/ml MTT 용액을 세포에 가하여 4시간 추가 배양하고 solubilization 용액 (dimethyl sulfoxide:ethanol, 1:1)을 가하여 24시간 배양한 후, 595 nm에서 발색 정도를 측정하였다.

4) LLC-PK₁ cell에서 ·O₂⁻, NO 및 ONOO⁻ 소거능 측정

LLC-PK₁ cell을 96 well plate에 1 \times 10⁴/well로 분주하여 하루 동안 배양한 뒤 夏枯草 추출물을 농도별(25, 50, 100, 200 μ g/ml)로 전처리한 후 1시간 동안 배양한 뒤 각각 H₂O₂ 100 mM을 처리하여 5시간 동안 배양한 후 각 소거능을 측정하였다.

·O₂⁻ 소거능은 DCFDA assay¹⁸⁾로 측정하였다. DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 통해 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. 96 well microplate의 배지를 제거하고 각 well당 free media 200 μ l와 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 희석한 0.125 mM DCFDA 50 μ l를 첨가한 다음 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 5분 간격으로 7회 측정하였다.

NO 소거능은 Nagata 등의 방법¹⁹⁾으로 측정하였다. 특이적 NO의 indicator인 4,5-diamino fluorescein (DAF-2)은 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여, 490-495 nm의 여기파장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 생성하며 형광의

세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO의 양에 의존적이다. 96 well microplate의 배지를 제거한 후 각 well당 free media 150 μ l와 Dimethyl sulfoxide 414.5 μ l에 DAF-2 1 mg이 녹아 있는 것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1:400배로 희석한 DAF-2 50 μ l를 첨가하여 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 3분 간격으로 7회 측정하였다.

ONOO- 소거능은 Kooy 등의 방법²⁰⁾으로 측정하였다. 96 well microplate의 배지를 제거한 후 각 well당 free media 20 μ l와 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 μ M diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 μ M DHR 123을 함유하는 sodium phosphate 완충액 (pH 7.4) 180 μ l를 가하여 5분간 방치한 뒤 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 측정하였다.

5) Prostaglandin E₂ 측정

PGE₂의 양은 배지를 사용하여 PGE₂ immunoassay kit (R&D SYSTEMS)의 실험 방법에 따라 측정하였다.

6) Western blot analysis

LLC-PK1 cell을 100 mm dish에서 24시간 배양한 후 夏枯草 추출물을 농도별(25, 50, 100 μ g/ml)로 1시간 전처리하고 H₂O₂ 100 mM을 가한 뒤 5시간 더 배양한 후 PBS로 세척하고 scraper로 모은 LLC-PK1 cell에서 cytosol, nuclear 단백질을 분리하여 염색촉진인자의 단백질 발현을 관찰하였다. 동일량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, nitrocellulose membrane에 단백질을 전이시켜 주었다. 이 membrane을 분리한 뒤 5% skim milk로 단백질이 결합하지 않은 부분의 비특이적 antibody 결합을 차단하고 각 타겟 단백질의 1차 antibody를 2시간 이상 처리하였다. 이 membrane을 0.1% Tween 20을 함유한 TBST로 60분간 세척한 후 2차 antibody를 2시간 이상 반응시키고, TBST로 60분간 세척한 후 membrane에 ECL solution을 반응시켜 발생된 형광을 X-ray film에 감광시켰다.

7) 단백질 정량

Lowry 등의 방법²¹⁾과 Bradford protein assay kit를 사용하였다.

8) 통계 처리

각 실험군 간의 평균치와 평균오차로 실험 성적을 분석하고 student's t-test를 이용하여 각 실험군 간의 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 세포 독성

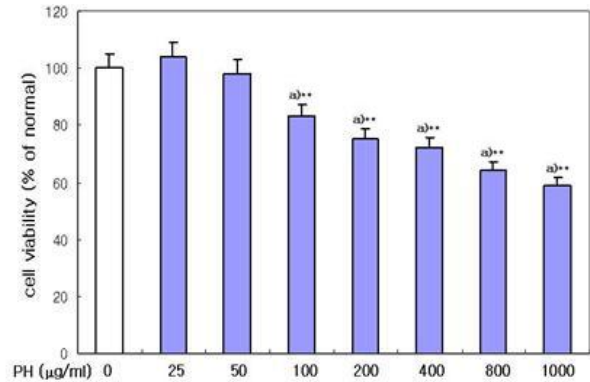
夏枯草를 농도별 (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μ g/ml)로 처리하였을 때 각각의 농도에서 104.28, 98.65, 83.88, 75.68, 72.45, 64.27, 59.13%의 생존율을 나타내어, 100 μ g/ml 이상의 농도에서 유의성이 있는 독성을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 1A).

2. H₂O₂ 처리에 대한 세포 보호 효과

H₂O₂ 처리시 세포 생존율은 42.13%였으나, 夏枯草 추출물을 농도별 (25, 50 μ g/ml)로 전처리한 세포의 생존율은 각각 51.26,

72.54%로 나타나 농도 의존적으로 H₂O₂에 의한 세포사를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1B).

A.



B.

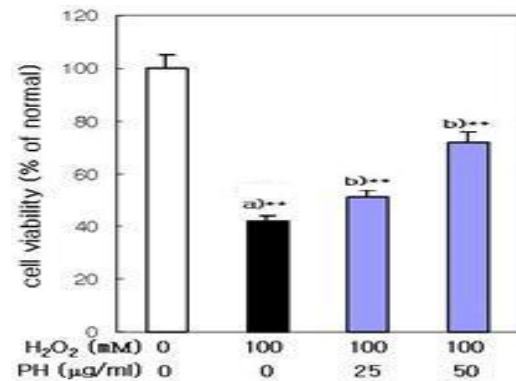


Fig. 1. A. Cytotoxic Effect of Prunellae Herba (PH) in LLC-PK₁ Cells. LLC-PK₁ cells were exposed to PH (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μ g/ml) for 1-hr. And then, the cell viability was evaluated by MTT assay. Each value is the mean \pm S.D. B. Cytoprotective Effect of Prunellae Herba (PH) on H₂O₂-induced Cell Death in LLC-PK₁ Cells. LLC-PK₁ cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) for 5-hrs after 1-hr pre-treatment of PH (25, 50 μ g/ml). And then, the cell viability was measured by MTT assay. Each value is the mean \pm S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01).

3. H₂O₂ 처리에 의한 \cdot O₂⁻, NO 및 ONOO- 생성에 미치는 영향

\cdot O₂⁻는 정상 세포에서 133.28 \pm 7.01 fluorescence/min이며 H₂O₂ 처리에 의해 214.89 \pm 12.58 fluorescence/min으로 생성이 증가하였다. 夏枯草 추출물을 전처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되는 경향을 보였으나 유의성 있는 결과는 보이지 않았다(Fig. 2).

NO는 정상 세포에서 72.58 \pm 3.77 fluorescence/min이며 H₂O₂ 처리에 의해 118.06 \pm 6.7 fluorescence/min으로 생성이 증가하였다. 夏枯草 추출물을 전처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되는 경향을 보였으나 유의성 있는 결과는 보이지 않았다(Fig. 3).

ONOO-는 정상 세포에서 148.26 \pm 6.21 fluorescence/min이며 H₂O₂ 처리에 의해 343.48 \pm 11.41 fluorescence/min으로 생성이 증가되었다.

夏枯草 추출물을 전처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되었으며, 50 μ g/ml 농도에서 307.45 \pm 13.26 fluorescence/min로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

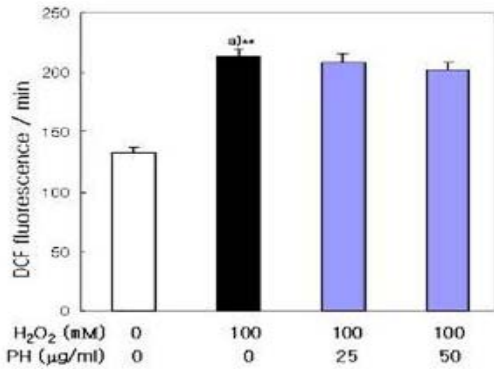


Fig. 2. Effect of Prunellae Herba (PH) on .O₂- Generation in LLC-PK1 Cells. LLC-PK1 cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) for 5-hrs after 1-hr pre-treatment of PH (25, 50μg/ml). And then, the generation of .O₂- was evaluated by DCFH-DA fluorescence probe. Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. (** : p < 0.01).

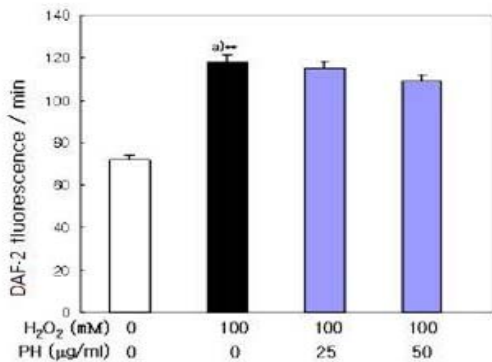


Fig. 3. Effect of Prunellae Herba (PH) on NO Generation in LLC-PK1 Cells. LLC-PK1 cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) for 5-hrs after 1-hr pre-treatment of PH (25, 50μg/ml). And then, the generation of NO was evaluated by DAF-2 fluorescence probe. Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. (** : p < 0.01).

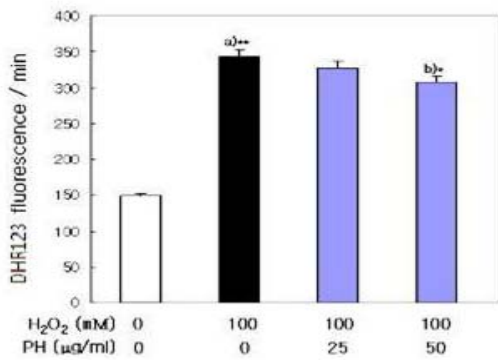


Fig. 4. Effect of Prunellae Herba (PH) on ONOO- Generation in LLC-PK1 Cells. LLC-PK1 cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) for 5-hrs after 1-hr pre-treatment of PH (25, 50μg/ml). And then, the generation of ONOO- was evaluated by DHR 123 fluorescence probe. Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01, * : p < 0.05).

4. H₂O₂ 처리에 의한 PGE₂ 생성에 미치는 영향

PGE₂는 정상 세포에서 16.22±0.81 pg/ml이며 H₂O₂ 처리에 의해 29.67±1.45 pg/ml로 유의성 있게 증가되었다. 夏枯草 추출물

을 전처리한 실험군에서는 50 μg/ml 농도에서 23.13±1.62 pg/ml로 유의성 있게 감소되었다(Fig. 5).

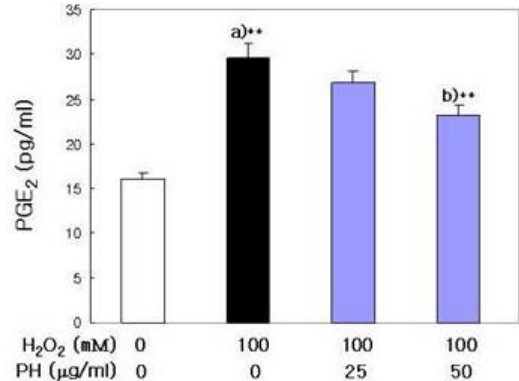


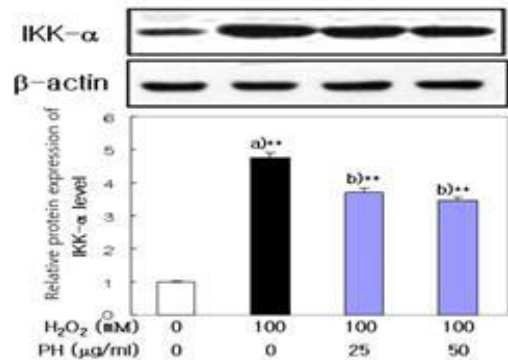
Fig. 5. Effect of Prunellae Herba (PH) on PGE₂ Level in LLC-PK1 Cells. LLC-PK1 cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) for 5-hrs after 1-hr pre-treatment of PH (25, 50μg/ml). And then, the concentration of PGE₂ was evaluated by PGE₂ immunoassay kit. Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01).

5. H₂O₂ 처리에 의한 IKK-α 및 phospho-IκB-α에 미치는 영향

IKK-α는 정상 세포에 비하여 H₂O₂ 처리에 의해 증가되었으나, 夏枯草 추출물을 전처리한 실험군에서는 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 6A).

Phospho-IκB-α는 정상 세포에 비하여 H₂O₂ 처리에 의해 증가하여 IκB-α의 인산화가 진행되었으나, 夏枯草 추출물을 전처리한 실험군에서는 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 6B).

A.



B.

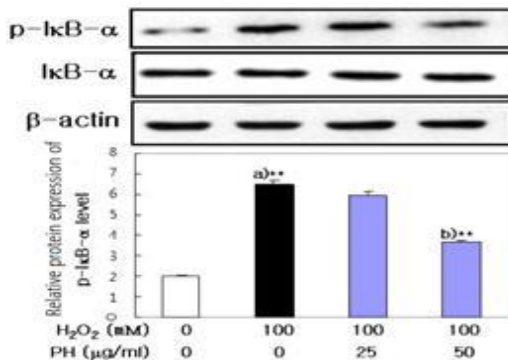
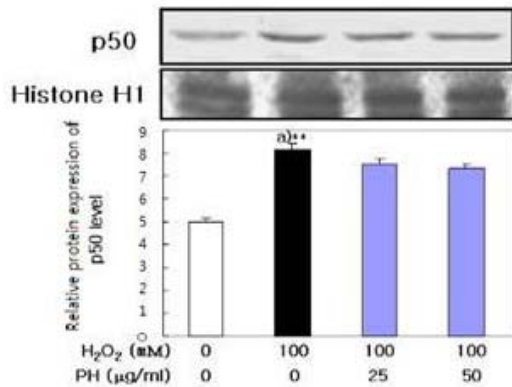


Fig. 6. Effect of Prunellae Herba (PH) on IKK- α and phospho-IkB- α Expression in LLC-PK1 Cells. LLC-PK1 Cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) for 5-hrs after 1-hr pre-treatment of PH (25, 50 μ g/ml). And then, Western blot was performed to detect IKK- α and phospho-IkB- α protein level in cytosol fractions from LLC-PK1. Results are mean \pm S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01). A : IKK- α protein, B : phospho-IkB- α protein.

6. H₂O₂ 처리에 의한 NF- κ B에 미치는 영향

夏枯草 추출물이 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 검토하기 위하여 핵내의 p50, p65 양을 조사하였다. NF- κ B의 subunit인 p50, p65 핵내 양을 관찰한 결과 정상 세포에 비하여 H₂O₂ 처리에 의해 증가되었으나, 夏枯草 추출물을 전처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 7).

A.



B.

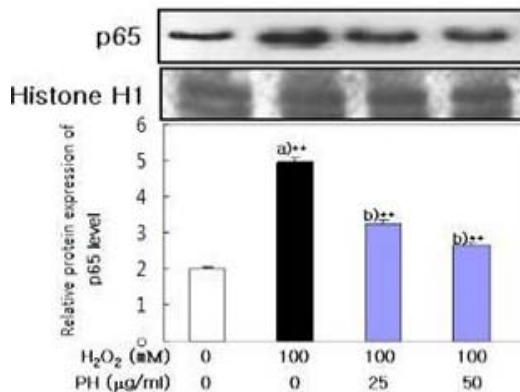
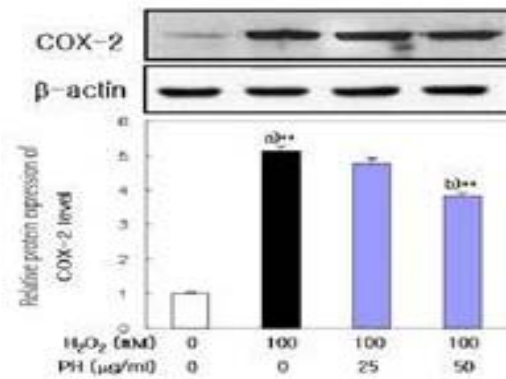


Fig. 7. Effect of Prunellae Herba (PH) on NF- κ B Expression in LLC-PK1 Cells. LLC-PK1 Cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) for 5-hrs after 1-hr pre-treatment of PH (25, 50 μ g/ml). And then, Western blot was performed to detect NF- κ B protein level in nuclear fractions from LLC-PK1. Results are mean \pm S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01). A : p50, B : p65.

7. H₂O₂ 처리에 의한 COX-2, iNOS, IL-1 β , VCAM-1 발현에 미치는 영향

夏枯草 추출물이 COX-2, iNOS, IL-1 β 및 VCAM-1의 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상 세포에 비하여 H₂O₂ 처리에 의해 증가되었으나, 夏枯草 추출물을 전처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 8).

A.



B.

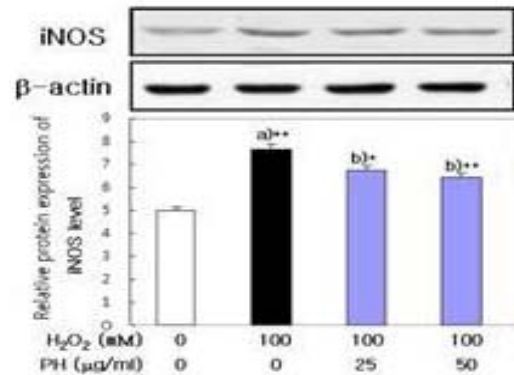


Fig. 8. Effect of Prunellae Herba (PH) on COX-2, iNOS, IL-1 β and VCAM-1 Expression in LLC-PK1 Cells. LLC-PK1 Cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) for 5-hrs after 1-hr pre-treatment PH (25, 50 μ g/ml). And then, Western blot was performed to detect COX-2, iNOS, IL-1 β and VCAM-1 protein level in cytosol fractions from LLC-PK1. Results are mean \pm S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01, * : p < 0.05). A : COX-2 protein, B : iNOS protein, C : IL-1 β protein, D : VCAM-1 protein.

고 찰

夏枯草는 성이 寒하고, 味는 辛苦하며 주로 肝經에 들어가 肝火를 清하고 鬱結을 散하는 효능이 있기 때문에 肝熱과 痰火가 鬱結되어 나타나는 질환을 치료하는 要藥이다. 근래에는 고혈압, 비만, 갑상선 종대, 임파선 결핵, 유선종식 등의 내분비-대사질환 및 염증-면역반응과 관련된 질환에 사용되고 있다⁸⁾. 夏枯草에 대한 연구로 면역반응을 유발한 rats에서 항히스타민효과⁹⁾가 있으며, LPS로 염증을 유발한 세포에서 NO, PGE₂와 IL- β , IL-6 등의 cytokine을 감소시켰고¹⁰⁾, in vitro와 in vivo에서 macrophage 및 NK cell 활성화와 암전이 억제효과가 있었다¹¹⁾. 또한 夏枯草 약침의 항갑상선호르몬 효과¹²⁾, 夏枯草에서 추출한 ursolic acid의 파골세포 분화 억제효과¹³⁾, 대식세포 면역반응의 활성화¹⁴⁾, 지방세포 분화 및 산화적 스트레스 억제¹⁵⁾, 피부의 콜라겐 생성촉진 및 자외라디칼 소거효과 등의 보고가 있다¹⁶⁾.

본 실험에서는 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유발한 LLC-PK1 cell에서 夏枯草가 O₂⁻, NO, ONOO⁻ 등의 활성산소종, 활성질소종과 염증 촉진인자, PGE₂ 생성에 미치는 영향을 통해 항산화·항염증효과를 확인하고, 그와 관련된 신호전달체계인 NF- κ B pathway

에 미치는 영향을 관찰하였다.

夏枯草 methanol 추출액을 농도별 (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μ g/ml)로 처리한 결과 100 μ g/ml 이상의 농도에서는 유의성 있는 세포 독성이 나타났다. H₂O₂ 처리시 세포 생존율은 42.13%였으나, 夏枯草 추출물을 농도별로 전처리한 경우에는 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가되는 것으로 나타났다. 따라서 夏枯草는 H₂O₂에 의한 세포사를 억제하여 세포 보호효과가 있는 것으로 사료된다.

활성산소는 매우 큰 반응성으로 인하여 세포 내 단백질, 지질, 핵산 등과 결합하여 구조를 변화시킨다. 일반적으로 가장 처음 만들어지는 활성산소의 형태는 \cdot O₂-이며, 이는 H₂O₂로 전환되어 세포 바깥으로 배출되기도 한다. 처리되지 못한 H₂O₂의 일부는 펜톤반응(Fenton's reaction)에 의해 활성산소 중 가장 반응성이 강한 OH-로 전환되어 세포 내 소기관을 손상시킨다²²⁾.

NO는 혈관확장, 세포독성, 조직손상을 일으키며²³⁾, 염증반응으로 인한 활성산소의 과잉 생성과 NO의 대량 생성이 ONOO-를 더욱 증가시키고, 이는 세포와 조직손상을 가져와 노화과정을 촉진한다²⁴⁾. ONOO-는 지질, 단백질, DNA의 산화 및 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 억제와 아미노산의 변형, 지질과산화에 의한 세포독성 등에 관여하는 강력한 산화제이다^{25,26)}.

본 실험에서 夏枯草 추출액은 H₂O₂ 처리한 LLC-PK1 cell에서 \cdot O₂-, NO, ONOO-의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 50 μ g/ml 농도에서 ONOO-의 생성을 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

따라서 夏枯草는 \cdot O₂-, NO, ONOO-의 생성을 억제하여 항산화 효과를 갖는 것으로 사료된다.

NF- κ B는 염증, 면역, 세포자연사, 발암, 조직재생 등 다양한 기능을 수행하는 전사인자이다. NF- κ B는 p65, C-rel, RelB, p50/105, p52/100 등으로 구성되어 있으며, 공통적으로 DNA 결합, 이합체화, I κ B와의 상호작용 등의 기능을 수행하는 Rel homology domain를 갖는다²⁷⁾. IKK complex는 NF- κ B의 상위 kinase로서 α , β , γ 3개의 성분으로 구성되어 있으며, IKK β 는 NF- κ B의 정규 활성화 경로에서 필수적으로 관여하고, IKK α 는 비정규 활성화 경로에 관여하며, IKK γ 는 조절 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 정규활성화 경로는 TNF- α , IL-1, LPS, dsDNA에 의해 IKK β 가 활성화되면 I κ B를 인산화시키고, 유비퀴틴화에 의해 분해되어 복합물을 이루고 있던 p65:p50 이합체가 유리되어 세포질로부터 핵으로 이동하여 전사인자로 작용한다. 또한 lymphotoxin 또는 B cell-activating factor로 자극되는 비정규 활성화 경로에서는 IKK- α 가 활성화되어 p100을 인산화, 분해시켜 p52로 변환시키고, RelB:p52 이합체가 활성화된다. 정규 활성화 경로는 선천면역, 염증에 관여하며 비정규 활성화 경로는 림프계 기관형성, B세포 성숙, 적응면역에 관여한다. 또한 NF- κ B는 비면역계 세포에서 항세포자연사 인자로 작용하며²⁹⁾, 발암현상에서도 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.³⁰⁾ 또한 섬유육종, 대장암, 직장암 세포주에서 NF- κ B의 활성화를 통해 세포고사가 쉽게 발생할 수 있게 하여 방사선 치료나 항암제치료에 대한 좋은 결과를 보인 연구가 있다³¹⁾.

H₂O₂ 처리한 LLC-PK1 cell에서 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 검토한 결과 핵내의 p50, p65의 양이 H₂O₂에 의해 증가하였으나 夏枯草 추출액에 의해 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. 또한 IKK- α 및 phospho-I κ B- α 에 미치는 영향을 검토한 결과 夏枯草 추출액에 의해 감소되었다. 따라서 夏枯草는 세포내 신호전달체계인 NF- κ B pathway의 활성화를 억제하는 것으로 사료된다.

Eicosanoid는 염증과 세포신호전달에 다양한 역할을 하는 여러 대사경로에 중요하게 연관되어 있는데, 그 중 cyclooxygenase 경로에 의해 prostaglandin, prostacyclin, thromboxane 생산을 유도한다. cyclooxygenase는 COX-1과 COX-2로 알려져 있는 두 개의 아이소형이 존재하는데, COX-1은 혈관항상성, 콩팥과 위장관의 혈류유지, 콩팥기능, 장점막증식, 혈소판 기능, 그리고 항혈전과 같은 생리적 혹은 일상적인 활성화에 관여하고, COX-2는 염증, 고열, 통증, 척수에서의 통증자극을 전달, 유사분열 촉진, 스트레스에 대한 콩팥 적응, 기동뼈의 침전, 배란, 태반형성, 그리고 분만 시 자궁수축 등과 같은 다수의 특화된, 또는 필요에 따른 기능을 갖는다. 현재 염증, 통증과 발열에 대한 임상적 관리에서 유용하게 사용되고 있는 약물 중 하나가 COX-2 억제제이다. Eicosanoid로부터 cyclooxygenase 경로를 거쳐 생산되는 물질인 Prostaglandin은 광범위한 생리과정을 매개하는 강력한 물질로, Prostaglandin 중 PGE₂는 여러 조직에서 합성되어 혈관확장, 통각과민, 발열, 면역제어 등에 관여한다⁶⁾.

NOS는 산화질소를 형성하는데 필요한 효소로, 그 중 iNOS는 분자 산소와 L-arginine에 의한 NO의 생성 반응을 촉매하는 효소이다. 일시적인 NO의 대량 생산은 외부로부터 생체를 방어하지만, iNOS의 과잉 유도가 지속될 경우 생체에 유해한 영향을 미친다³²⁾.

IL-1 β 는 대식세포에 의해 분비되는 cytokine으로, 급성염증시 백혈구의 활성을 조절하기 위해 분비되는 단백질이다. cytokine은 면역반응을 매개하는 세포들의 증식과 기능에 영향을 미치기 때문에 cytokine 작용의 선택적 저해나 촉진을 통해 면역 및 염증반응을 조절할 수 있다³³⁾.

VCAM-1은 cytokine에 의해 유도되는 혈관내피세포의 접착분자이다. 혈관 표면의 접착분자들과 백혈구의 상호작용이 염증반응을 조절하며, 이러한 접착분자들은 염증 초기단계에서 감염되거나 염증이 생긴 부위로 백혈구를 끌어들이는다³⁴⁾.

본 실험에서 夏枯草 methanol 추출액은 염증촉진 단백질인 COX-2, iNOS, IL-1 β , VCAM-1의 단백질 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 검토한 결과 夏枯草 methanol 추출액 전처리에 의해 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 夏枯草 methanol 추출액에 의해 염증촉진인자와 PGE₂의 생성이 억제되어 항염증 효과가 있는 것으로 사료된다.

이상의 연구에서 夏枯草 methanol 추출액은 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유발한 LLC-PK1 cell에서 \cdot O₂-, NO, ONOO-의 생성을 억제하고, PGE₂와 염증촉진인자의 생성을 억제하여 항산화·항염증효과를 나타내었으며, 세포내 신호전달체계인 NF- κ B pathway의 활성화를 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 夏枯草는 NF- κ B pathway를 조절하여 항염증·항산화 약물로 유효하게 작용할 수 있

을 것으로 사료된다.

결 론

夏枯草가 H₂O₂ 처리한 LLC-PK1 cell에서 세포보호와 염증 억제 효능이 있는지를 확인하기 위하여 ·O₂⁻, NO, ONOO⁻ 및 PGE₂ 생성과 NF-κB, 염증 촉진인자에 미치는 영향을 확인하였다. 夏枯草 추출액은 H₂O₂로 인한 세포사를 농도 의존적으로 감소시켜 세포생존율을 증가시켰으며, ·O₂⁻, NO, ONOO⁻ 및 PGE₂의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다. 또한 염증 촉진 인자인 COX-2, iNOS, IL-1β, VCAM-1의 발현을 억제시켰으며, IKK-α, phospho-IκB-α, NF-κB(p50, p65)를 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 夏枯草는 산화적 스트레스로 인한 활성산소종과 활성질소종의 생성을 억제하고 NF-κB pathway에 의한 염증 촉진 인자의 발현을 억제하므로 염증 및 염증성 질환의 조절 약물로서 작용할 가능성이 시사되었다.

References

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine 3rd edition. Oxford. pp 246-350, 1999.
- Ryu, S.N., Han, S.J., Park, S.Z., Kim, H.Y. Antioxidative activity and varietal difference of cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside contents in pigmented rice. Kor J. Crop Sci. 45(4):257-260, 2000.
- Alfadda, A.A., Sallam, R.M. Reactive oxygen species in health and disease. J Biomed Biotechnol. 2012: 936486, 2012.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 39: 44-84, 2007.
- Chae, S.W. Function and Activation of NF-κB in Immune System. Korean J Otolaryngol 48: 284-288, 2005.
- Golan, D.E., Tashjian, A.H., Armstrong, E.J., Armstrong, A.W. Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy, Second Edition. EPUBLIC. pp 743-750, 2008.
- Lee, M.S., Kim, K.A. NF-κB Pathway in Metabolic/endocrine Diseases. Endocrinol Metab. 21(5):352-363, 2006.
- University of Korean Medicine Joint Publication Committee. Bonchohak. Yeongnimsa. pp 209-210, 2007.
- Seo, B.I., Kim, S.H. The effects of Prunellae Spica on immune response and anti-allergic reaction. J. of Herbology. 12(1):7-24, 1997.
- Chang, H.J., Park, S.J., Lee, J.R., Kim, S.C. Inhibitory Effects of Water Extract of Prunellae Spica on the Production of Pro-inflammatory Mediator in LPS-activated Raw 264.7 Cells. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 23(3):599-607, 2009.
- Heo, J.K., Lee, J.M., Lee, C.H., Cho, J.H., Lee, K.S. Effect of Prunellae Spica Extracts on Anti-tumor Metastasis by Immune Activity. J Korean Obstet Gyneco. 22(1):41-52, 2009.
- Im, S.B.N., Lee, H.J. Effects of Labiatae Herba Prunellae Aqua-acupuncture in Hyperthyroidism Rats. The Journal of Korean Oriental Medical Society. 18(1):399-410, 1997.
- Heo, J.K., Hwang, D.S., Lee, J.M., Lee, C.H., Jang, J.B., Lee, K.S. Inhibitory Effects of Ursolic Acid from Prunella Vulgaris on Osteoclast Differentiation. J Korean Obstet Gyneco. 27(2):59-70, 2014.
- Cha, J.H., Kim, Y.S., Lee, E.M. Effects of Prunellae Spica Water Extract on Immune Response in Macrophage Cells. J Korean Obstet Gyneco. 23(3):91-100, 2010.
- Kim, N.S., Shon, M.S., Kim, G.N., Hwang, Y.I. Anti-obese and Antioxidant activities of Spica prunellae Extract in 3T3-L1 and HepG2 cells. Food Eng. Prog. 18(4):413-418, 2014.
- Hong, E.S., Ahn, G.W., Jo, B.K. The Study on the Potential Anti-aging Properties of Prunella vulgaris Extract In Vitro and In Vivo. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea. 34(2):129-135, 2008.
- Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. J Immunol Methods. 93(2):157-165, 1986.
- Cathcart, R., Schwieters, E., Ames, B.N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. Anal Biochem. 134: 111-116, 1983.
- Nagata, N., Momose, K., Ishida, Y. Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. J Biochem Tokyo. 125: 658-661, 1999.
- Kooy, N.W., Royall, J.A., Ischiropoulos, H., Beckman, J. S. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. Free Radic Res Commun. 16: 149-156, 1994.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193(1):265-275, 1951.
- Rubin, E., Reisner, H.M. Essentials of Rubin's Pathology. KOONJA. pp 7-8, 2013.
- Carr, A.C. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and

- reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 1716-1723, 2000.
24. Chung, H.Y., Kim, H.J., Kim, J.W. The inflammation hypothesis of aging: Molecular modulation by calorie restriction. *Ann N Y Acad Sci.* 928: 327-335, 2001.
25. Kim, H.J., Kim, K.W., Yu, B.P., Chung, H.Y. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF- κ B activation and I κ B α degradation. *Free Radic Biol Med.* 28(5):683-692, 2000.
26. Crow, J.P., Beckman, J.S., McCord, J.M. Sensitivity of the essential zinc-thiolate moiety of yeast alcohol dehydrogenase to hypochlorite and peroxynitrite. *Biochemistry.* 34(11):3533-3552, 1995.
27. DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandim E., Karin, M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcriptional factor NF- κ B. *Nature.* 388: 548-554, 1997.
28. Lin, A., Karin, M. NF- κ B in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol.* 13: 107-114, 2003.
29. Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K.F., Verma, I.M. Severe liver degeneration in mice lacking the I κ B kinase 2 gene. *Science.* 284: 321-325, 1999.
30. Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, J.W., Egan, L.J., et al. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell.* 118: 285-296, 2004.
31. Duyao, M.P., Kessler, D.J., Spicer, D.B., Bartholomew, C., Cleveland, J.L., Siekevitz, M., et al. Transactivation of the c-myc promoter by human T cell leukemia virus type 1 tax is mediated by NF- κ B. *J Biol Chem.* 267: 16288-16291, 1992.
32. Chung, H.Y., Kim, H.J., Kim, K.W., Choi, J.S., Yu, B.P. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Micro Res Technol.* 59: 264-272, 2002.
33. Baeuerle, P.A., Henkei, T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 12: 141-179, 1994.
34. Osborn, L., Hession, C., Lizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., et al. Direct Expression Cloning of Vascular Cell Adhesion Molecule 1, a Cytokine-Induced Endothelial Protein That Binds to Lymphocytes. *Cell.* 59: 1203-1211, 1989.