

Quercetin Inhibits Inflammation Responses via MAPKs and NF- κ B Signaling Pathways in LPS-stimulated RAW264.7 Cells

Woo Young Won, Jeong Tae Kim, Keun Ho Kim, Ji Young Hwang, Chung-Wook Chung and Jong Sik Kim*

Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

Received October 27, 2022 / Revised November 17, 2022 / Accepted November 18, 2022

Quercetin is one of bio-flavonoids which are abundant in fruits and vegetables and has been reported to have various pharmacological potentials such as anti-oxidation, anti-inflammation, anti-cancer, and anti-virus effects. In the present study, the anti-inflammatory effects and its working molecular mechanism of quercetin were investigated in mouse macrophage RAW264.7 cells. Quercetin significantly inhibited nitric oxide (NO) production in a dose-dependent manner without affecting cell viability and decreased inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in LPS-stimulated RAW264.7 cells. In addition, quercetin decreased phosphorylation of p38, JNK, and ERK, and inhibited phosphorylation of NF- κ B p65 protein and its inhibitor I κ B α indicating that quercetin has the anti-inflammatory effects via regulation of MAPKs and NF- κ B signaling pathway. We also detected expression changes of four kinds of pro-inflammatory cytokine genes (CSF2, IL-1 β , IL-6, and TNF- α) with quantitative real-time PCR. The results showed that quercetin decreased the expression of four pro-inflammatory genes in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Overall, our results showed that quercetin effectively suppressed inflammation responses induced by LPS in RAW264.7 cells via regulating MAPK and NF- κ B pathway and down-regulating the expression of pro-inflammatory cytokine genes.

Key words : Anti-inflammation, cytokine, MAPK, NF- κ B, quercetin

서 론

채소, 과일, 약용식물 등 식물에는 파이토케미칼을 비롯한 다양한 천연물이 함유되어 있다. 파이토케미칼은 식물이 생산하는 2차 대사 산물이며 비 영양성 생리활성물질이다[1]. 파이토케미칼은 항산화[7, 28], 항염증[9, 13], 항암[10, 18] 등 다양한 생리활성을 가지고 있으며, 이러한 파이토케미칼의 생리활성은 다양한 세포 신호전달 경로 조절을 통해 이루어진다[8].

본 연구진은 이전 연구에서 어성초와 야관문의 메탄올 추출물의 기능성 성분 분석과 항산화, 항고혈압, 및 항당뇨 활성을 보고하였다[16]. 어성초 메탄올 추출물의 ethyl acetate 분획물에서 확인된 총 12개의 플라보노이드 중 quercetin은 약 2.35%의 비율인 0.554 \pm 0.005 mg/g으로 확인

되었다. 야관문의 경우 총 10개의 플라보노이드가 확인되었으며 야관문 메탄올 추출물의 ethyl acetate 분획물에서 quercetin의 함량은 약 0.022%의 비율인 0.014 \pm 0.001 mg/g으로 확인되었다. 본 연구에서는 두 약용작물에 공통적으로 함유되어 있는 플라보노이드 중 quercetin의 항염증 활성 및 작용기전을 연구하고자 하였다.

파이토케미칼 quercetin은 과일이나 채소에서 발견되는 플라보노이드의 일종으로서 플라보놀(flavonol)에 속한다. Quercetin에 의한 항산화[24], 항염증[15], 항암[17], 항바이러스 활성[5] 등 다양한 생리활성과 작용 기전에 대한 총설들이 보고되었다. 또한, quercetin을 비롯한 다양한 파이토케미칼들이 TLRs (Toll-like receptors) 활성화를 억제함으로써 암예방, 항염증, 및 항산화 활성을 가진다는 연구가 보고되었으며[2], quercetin이 TNF- α 로 유도된 HUVECs (human umbilical vein endothelial cells)의 세포사멸과 염증 반응을 NF- κ B와 AP-1 신호경로를 통해 저해한다는 보고가 있었다[3]. 그리고, quercetin이 다양한 암을 대상으로 세포 주기 억제, 세포 사멸 촉진, angiogenesis와 metastasis 과정 억제 등 다양한 작용기전으로 항암 활성을 가진다는 총설이 보고되었다[22]. 또한 quercetin의 자가면역 질환인 류마티스 관절염, 궤양성 대장염, 다발성 경화증에 대한 치료효과[20]와 신경 퇴행성 질환과 당뇨에 대한 치료효

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5798, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : jsk@anu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

과[4] 등에 대한 총설들이 보고되었다.

본 연구에서는 LPS로 염증이 유도된 마우스 대식세포 RAW264.7에서 플라보노이드 quercetin에 의한 항염증 활성화와 MAPK와 NF- κ B 경로의 신호전달에 미치는 영향 및 염증 관련 cytokine 유전자의 발현에 미치는 영향을 분석함으로써 quercetin의 항염증 활성화 및 작용기전에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

마우스 대식세포 RAW264.7 배양 및 염증 유도

본 연구에서 사용된 세포주는 마우스 대식세포 RAW264.7이며 Korean Type Culture Collection (KTCC, Korea)에서 구입하였다. RAW264.7 세포의 배양은 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, USA)와 1% Penicillin-Streptomycin (WelGene, Korea)을 첨가하여 배양하였다. 염증 반응은 그람 음성세균의 세포벽 성분인 LPS (Lipopolysaccharide, Sigma, St. Louis, MO, USA)로 유도하였다. Quercetin은 Sigma사(USA)로부터 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였다.

Nitric oxide (NO) 생산 분석

Quercetin이 LPS로 염증 반응이 유도된 RAW264.7 세포에서 nitric oxide (NO) 생산에 미치는 영향을 확인하기 위해 Griess assay를 수행하였다. Griess assay는 RAW264.7 세포를 96-well plate에 well 당 1×10^5 세포로 분주한 후, 19 시간 동안 배양하였다. 그 후 0.2 μ g/ml LPS를 1 시간 동안 처리하고, quercetin을 농도별(5, 10, 20 μ M)로 처리하여 16 시간 동안 배양하였다. NO의 생산은 40 mg/ml Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid)를 사용하여 측정하였다. Griess assay는 세포의 상층액 100 μ l와 Griess reagent 100 μ l를 혼합하여 96-well plate에서 20 분간 반응시키고 Nano Quant Plate™ (Tecan Trading AG, Switzerland)로 540 nm의 파장에서 측정하였다. 실험 결과는 독립적인 3개의 well에서 시행된 값을 sigma plot 10.0 program을 사용하여 분석한 후 mean \pm SD 값을 그래프로 나타내었다.

세포 생존율 연구

Quercetin이 RAW264.7 세포주의 생존에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTS assay를 수행하였다. MTS assay는 RAW264.7 세포를 96-well plate에 well 당 1×10^5 세포로 분주한 후, 19 시간 동안 배양하였다. 그 후 0.2 μ g/ml LPS를 1 시간 동안 처리하고 quercetin을 농도별(5, 10, 20 μ M)로 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 세포 생존율은

Celltiter 96® AQueous Non-Radioative Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 측정하였다. MTS assay는 96-well plate의 well 당 용액을 20 μ l씩 첨가하고 4시간 동안 배양 후, NanoQuant Plate™ (Tecan Trading AG, Switzerland)로 480 nm의 파장에서 측정하였다. 실험 결과는 독립적인 3개의 well에서 시행된 값을 sigma plot 10.0 program으로 분석한 후 mean \pm SD 값을 그래프로 나타내었다.

Western blot analysis와 Image 분석

염증 관련 단백질 발현과 MAPK와 NF- κ B 신호경로 단백질의 인산화를 확인하기 위하여 western blot analysis를 수행하였다. 즉, RAW264.7 세포를 6-well plate에 well 당 5.0×10^5 세포를 분주한 뒤 20 시간 동안 배양하였다. 그 후 LPS를 0.2 μ g/ml 농도로 1 시간 동안 처리하고 quercetin을 농도별(5, 10, 20 μ M)로 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다. MAPK 경로와 NF- κ B 경로 단백질의 경우, quercetin을 농도별(5, 10, 20 μ M)로 4 시간 동안 처리한 후 LPS를 0.2 μ g/ml 농도로 30분 동안 처리하였다. 세포는 수확한 후 sonication하여 lysis를 진행하였으며, 3,000 rpm으로 15분 동안 원심분리한 후, 상층액을 분리하여 단백질을 확보하였다. 추출된 단백질은 Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량하였다. 시료 당 30 μ g의 단백질을 4%~12% SDS-polyacrylamide gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 전기영동 하였으며, 그 후 0.2 μ m nitrocellulose membrane (GE healthcare, USA)으로 전기적으로 전달한 후 5% skim milk로 1 시간 동안 blocking 하였다. 1차 항체를 overnight 처리 후 membrane을 Tris buffered saline with tween 20 (TBS-T, Sigma, USA)로 5분 동안 3번 세척하였다. 그 후, 2차 항체를 1 시간 동안 배양 후, TBS-T로 5분 마다 3번 세척하였다. 최종적으로 단백질 발현은 ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva, USA)를 사용하여 탐지되었다. 1차 항체로는 anti-iNOS, anti-COX-2, anti-p38, anti-p-p38, anti-ERK, anti-p-ERK, anti-JNK, anti-p-JNK, anti-p65, anti-p-p65, anti-I κ B α , anti-p-I κ B α , 및 anti-Actin을 사용하였으며, 2차 항체로는 HRP-conjugated rabbit 항체 및 HRP-conjugated mouse 항체를 사용하였다. Actin과 HRP-conjugated rabbit 항체는 Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였으며, 그 외 1차 항체와 HRP-conjugated mouse 항체는 Cell signaling (Beverly, MA, USA)사에서 구입하였다.

Western blot analysis를 통해 측정된 단백질 발현 정도를 정량화하기 위하여 image studio (Li-cor, USA)를 이용하여 단백질 band의 intensity를 측정하였다. 분석은 LPS만 처리한 단백질 발현을 기준으로 하였으며, 실험군 단백질의 발현 수준을 그래프로 나타내었다.

Total RNA 추출 및 정량적 real-time PCR

RAW264.7을 6-well plate에 well 당 5.0×10^5 세포를 분주한 뒤 20 시간 동안 배양하였다. 그 후 LPS를 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 1 시간 동안 처리하고 quercetin을 농도별(5, 10, 20 μM)로 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 수확한 세포로부터 RNA 추출은 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 추출된 total RNA를 NanoQuant Plate™를 이용하여 정량한 후 실험에 사용하였다.

정량적 real-time PCR 수행을 위하여 total RNA를 주형으로 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성은 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Japan)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행되었다. 즉, 3 μg total RNA에 oligo dT (2.5 mM)와 dNTP mixture (10 mM)를 1 μl 씩 첨가한 뒤 D.W로 최종 부피를 10 μl 로 하여 95°C에서 5 분 동안 반응시켰다. 그 후 5×PrimeScript buffer 4 μl , RNase Inhibitor (40 units/ μl) 0.5 μl , PrimeScript RTase 0.5 μl 및 RNase free DW 5 μl 를 넣어주고 50°C에서 30 분 동안 합성하였다. 이후, 정량적 real-time PCR은 cDNA 300 ng을 주형으로 사용하였으며, SYBR Green (ThermoFisher Scientific, USA)을 이용하여 50°C에서 2 분, 95°C에서 10 분 동안 진행한 후 95°C에서 15 초, 60°C에서 30 초, 72°C에서 30 초를 40 cycles 진행하였다. 정량적 real-time PCR은 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR Instrument system (Life Technologies, USA)을 사용하였으며, 각 유전자의 특이적인 primer는 Table 1에 나타내었다.

통계처리

모든 실험은 최소 3회 이상 반복 실험을 실시하였으며 실험 결과는 Average \pm STDEV로 나타냈다. 또한, 실험 결과의 유의성 검토는 시료가 포함되지 않은 대조구인 LPS와 비교하여 student's t-test에 의해 결정되었으며, $p < 0.05$ 일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

Quercetin에 의한 nitric oxide 생산 저해 및 염증 관련 단백질 발현 억제

Quercetin이 LPS로 염증반응이 유도된 RAW264.7에서 nitric oxide (NO) 생산과 세포 생존율에 미치는 영향을 연구하였다. NO는 면역 및 염증 반응에 관여하는 다양한 면역세포가 병원성 미생물에 대하여 신체의 방어적 반응을 위하여 합성한다[14]. 본 연구 결과, Fig. 1A에서 보는 바와 같이 quercetin의 농도별(5, 10, 20 μM) 처리에 의해 RAW264.7의 세포 생존율에는 큰 영향이 없었다. 반면, LPS 처리에 의해 증가된 NO 생산은 quercetin의 처리에 의해 농도 의존적으로 NO 생산이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 즉, quercetin의 농도별 처리는 RAW264.7 세포 생존율에는 영향을 미치지 않으면서, NO 생산을 농도 의존적으로 감소시킴으로써 플라보노이드 quercetin이 항염증 활성을 가지고 있음을 의미한다.

Quercetin에 의해 NO 생산이 억제되는 작용 기전을 연구하기 위해 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 연구하였다. iNOS는 NADPH와 산소로 L-arginine을 citrulline으로 전환시켜 NO를 생성하게 된다[12]. 또한 COX-2는 효소로 PGE₂를 생성하는 것을 촉매하며, PGE₂는 사람에게 가장 많은 prostaglandin으로 염증의 핵심 매개체로 알려져 있다[26]. Fig. 2에서 보는 바와 같이 LPS 처리에 의해 현저하게 증가된 iNOS와 COX-2의 단백질 발현이 quercetin 처리에 의해 농도 의존적으로 iNOS와 COX-2의 발현을 감소시켰다. 이러한 결과는 quercetin이 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 감소시킴으로써 항염증 활성을 나타내는 것을 의미한다.

Quercetin에 의한 MAPK 신호 저해

Quercetin의 항염증 활성과 세포 신호경로인 MAPK 경로와의 관련성을 규명하기 위하여 MAPK 경로 단백질의 인산화를 분석하였다. MAPK 경로는 수용체 TLR에 의해

Table 1. Primer Sequences used for real-time PCR

Gene name	Transcript ID	Gene sequence
CSF2	NM_009969.4	F : 5'-GCTCACTGGCCCCATGTATAG-3' R : 5'-CTGGGCTCACTGCAAAAGAG-3'
IL-1 β	NM_008361.4	F : 5'-GCCACCTTTTGACAGTGATGAG-3' R : 5'-GACAGCCCAGGTCAAAGGTT-3'
IL-6	NM_001314054.1	F : 5'-GACAAAGCCAGAGTCCTTCAGA-3' R : 5'-TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG-3'
TNF- α	NM_001278601.1	F : 5'-GATCGGTCCCCAAAGGGATG-3' R : 5'-CCACTTGGTGGTTTGTGAGTG-3'
GAPDH	NM_001289726.2	F : 5'-AGGAGAGTGTTTCCTCGTCC-3' R : 5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTCG-3'

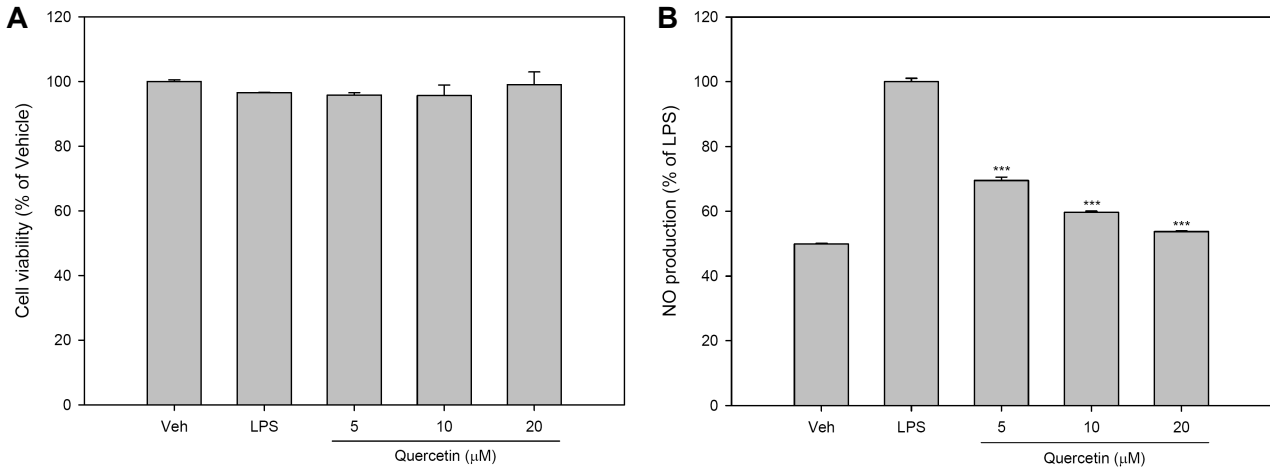


Fig. 1. The effects of quercetin on cell viability and NO production in RAW264.7 cells. (A) LPS-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells were treated with quercetin (5, 10 and 20 μM) for 24 hr, and then cell viability was measured using MTS assay. (B) Nitric oxide production was measured using Griess assay. Significance was determined by t-test. *** $p < 0.001$ vs LPS.

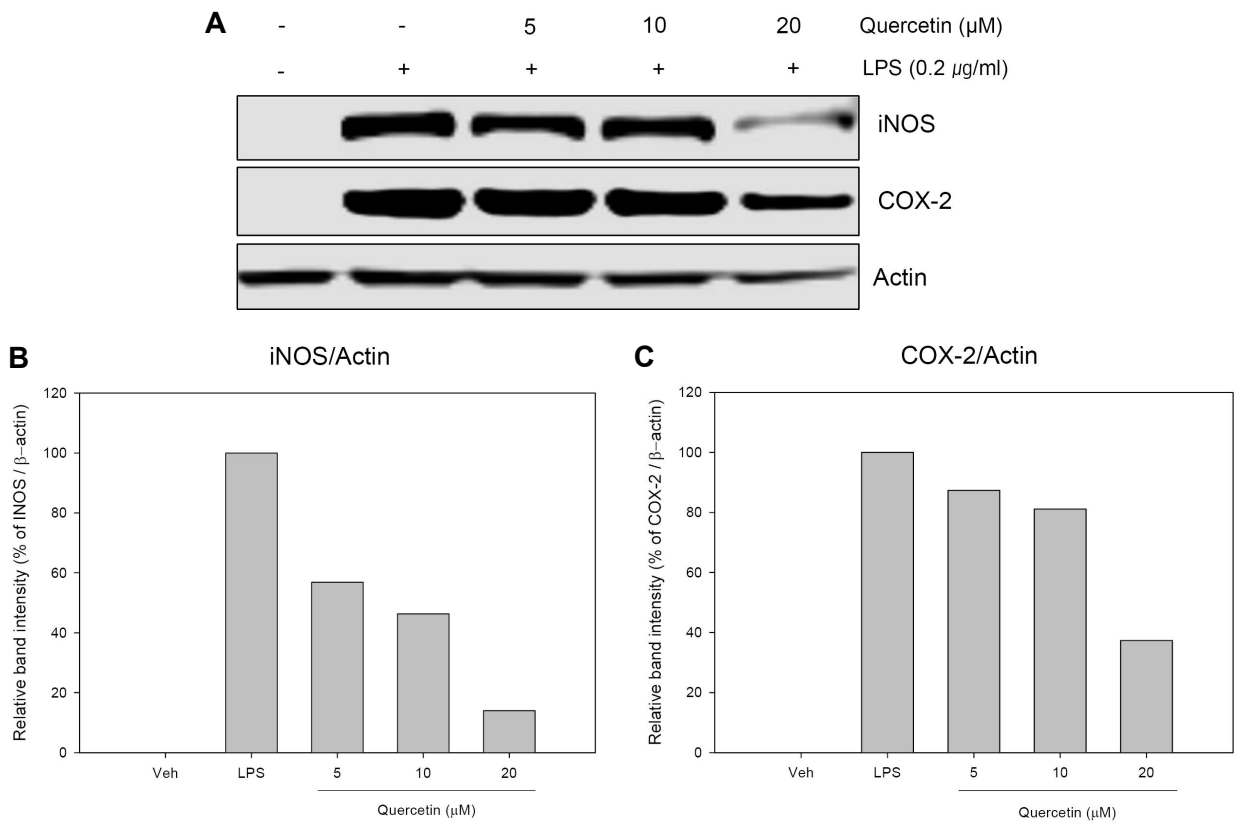


Fig. 2. Down-regulation of iNOS and COX-2 protein by quercetin. RAW264.7 macrophage was pre-treated with LPS (0.2 μg/ml) for 1 hr. And, cells were treated with quercetin (5, 10, and 20 μM) for 24 hr, and then cell lysates were prepared. (A) Western blot analysis was performed by using anti-iNOS, anti-COX-2, and anti-Actin antibodies. Protein expression was quantified with “image studio” program. (B) iNOS/Actin, (C) COX-2/Actin.

시작되어 TNF 및 IL-1β와 같은 염증성 cytokine의 생성을 증가시킨다[6]. 본 연구 결과 LPS는 MAPK 경로 단백질인 p38, JNK, ERK의 인산화 수준을 확연하게 증가시켰으며,

증가된 인산화는 quercetin에 의해 농도 의존적으로 인산화 수준이 감소되었다(Fig. 3). 먼저, p38의 경우 quercetin은 농도 5, 10 μM의 경우 확연한 감소를 보여주진 않았지

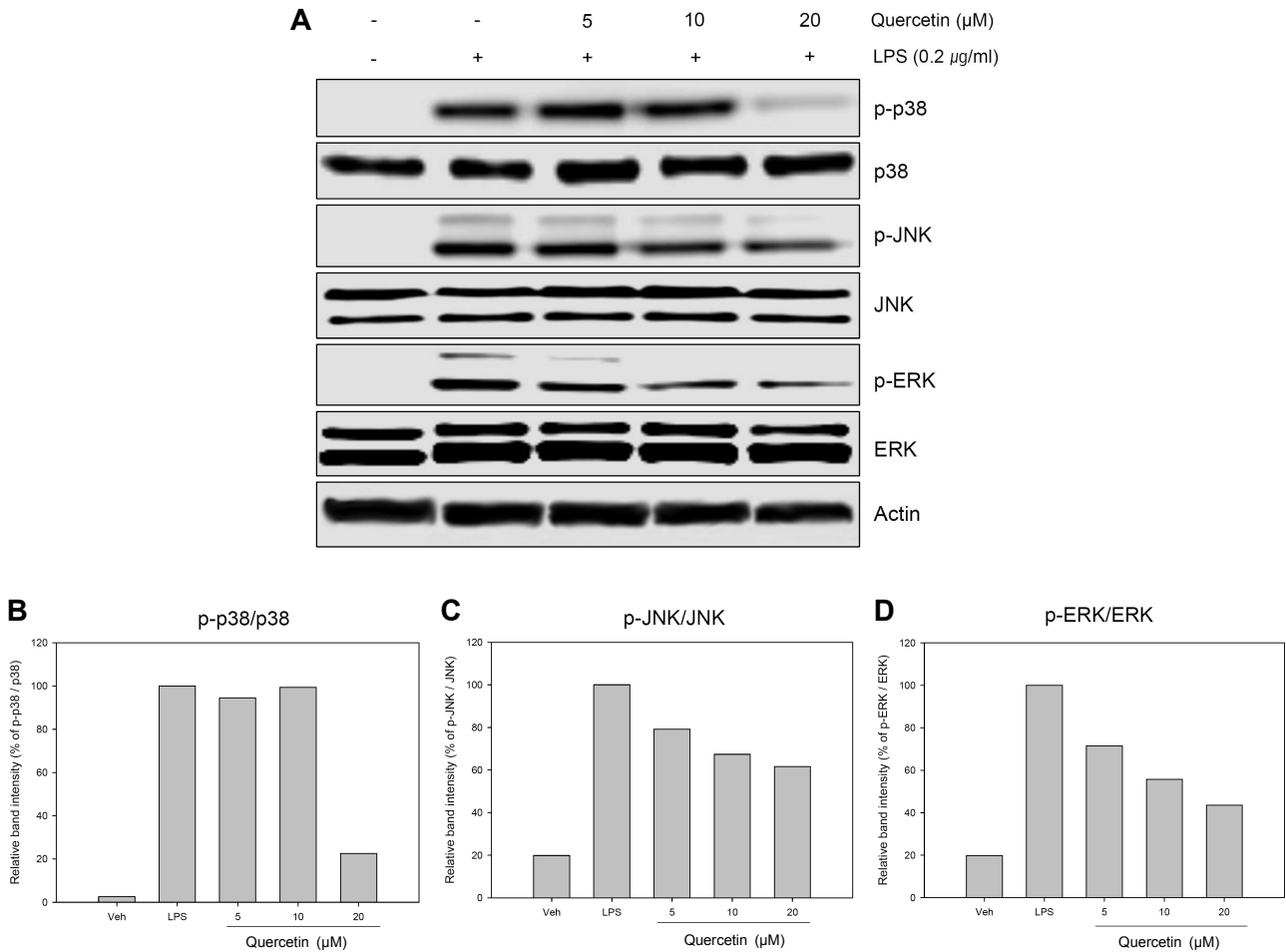


Fig. 3. Suppression of MAPKs phosphorylation by quercetin. RAW264.7 cells were treated with quercetin (5, 10, and 20 μM) for 4 hr and then stimulated with LPS (0.2 μg/ml) for 30 min. After treatment, cell lysates were prepared and subjected to Western blot. (A) Western blot analysis was performed by using anti-p-p38, anti-p38, anti-p-JNK, anti-JNK, anti-p-ERK, anti-ERK and anti-Actin antibodies. Protein expression was quantified with “image studio” program. (B) p-p38/p38, (C) p-JNK/JNK, (D) p-ERK/ERK.

만, 20 μM의 농도에서 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A, Fig. 3B). 그리고 JNK의 경우 quercetin이 농도 의존적으로 JNK의 인산화를 감소시킨 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A, Fig. 3C). 마지막으로 ERK의 경우 quercetin이 농도 의존적으로 감소시켰지만, 5 μM 처리군에서부터 현저하게 감소시킨 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A, Fig. 3D). 이러한 연구결과는 quercetin이 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 세포에서 MAPK 경로 억제제를 통해 염증반응을 저해할 수 있음을 의미한다.

Quercetin에 의한 NF-κB 신호 경로 저해

Quercetin의 항염증 활성과 세포 신호경로인 NF-κB 경로와의 관련성을 규명하기 위해 NF-κB 경로 단백질의 발현과 인산화를 분석하였다. NF-κB family는 p50, p52, p65 (RelA), c-Rel 그리고 RelB의 subunit로 구성되어 있는 전사

인자이며, IκB family의 결합에 의해 불활성화 된다[23]. 이러한 IκB는 IKK에 의해 인산화 되어 ubiquitin proteasome 경로를 통해 분해되며, 이때 NF-κB는 활성 상태가 되어 핵으로 전위된 후 친 염증성 cytokines 유전자 발현의 전사 인자로 작용한다[23]. 본 연구 결과, LPS는 NF-κB 경로의 단백질인 p65와 IκBα의 인산화 수준을 확연히 증가시킨 반면, quercetin은 농도 의존적으로 p65와 IκBα의 인산화 수준을 감소시켰다(Fig. 4). 먼저, p65의 인산화 수준은 농도 의존적으로 감소한 것을 확인하였지만 20 μM의 농도에서는 현저한 감소가 확인되었다(Fig. 4B). 또한, IκBα의 인산화 수준은 농도 의존적으로 감소한 것을 확인하였고, 20 μM의 농도에서는 vehicle (DMSO) 처리군과 비슷한 수준으로 관찰되었다(Fig. 4C). 이러한 결과는 quercetin이 NF-κB 경로를 저해함으로써 친 염증성 유전자의 발현을 억제시키는 것으로 생각된다.

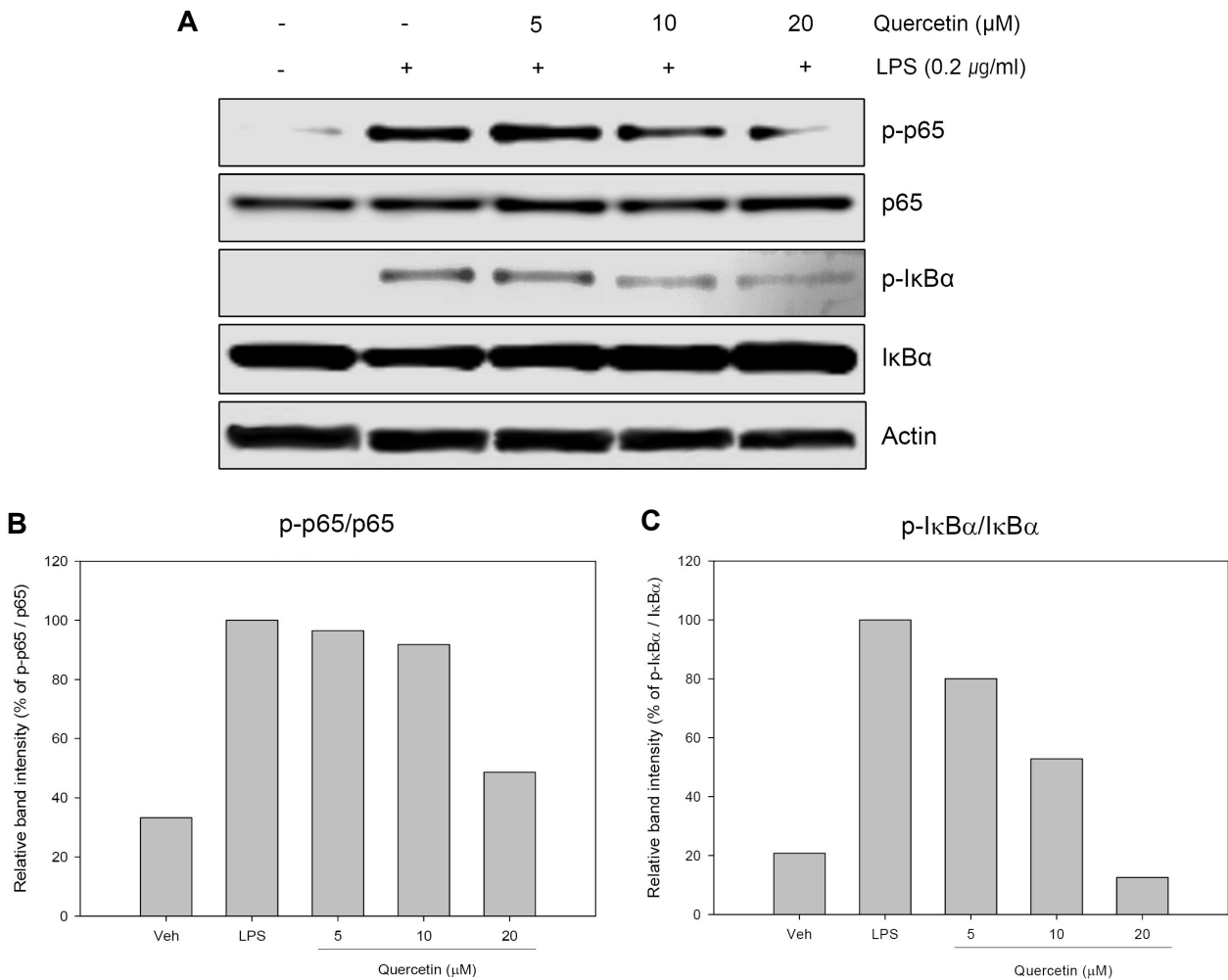


Fig. 4. Inhibition of NF-κB signaling pathway by quercetin. RAW264.7 macrophage was treated with quercetin (5, 10, and 20 μM) for 4 hr and then activated with LPS (0.2 μg/ml) for 30 min. After treatment, cell lysates were prepared and subjected to Western blot. (A) Western blot analysis was performed by using anti-p-p65, anti-p65, anti-p-IκBα, anti-IκBα and anti-Actin antibodies. Protein expression was quantified with “image studio” program. (B) p-p65/p65, (C) p-IκBα/IκBα.

Quercetin에 의해 염증 관련 cytokine의 발현 억제

Quercetin의 처리에 의한 4종류의 친 염증성 cytokines의 유전자(CSF2, IL-1β, IL-6, TNF-α) 발현 변화를 확인하기 위하여 정량적 real-time PCR을 수행하였다. CSF2는 골수 세포로부터 과립구나 대식세포 colony 형성을 자극하는 조혈 성장 인자로 cytokines 생산을 유도하여 염증을 유발하는 역할을 한다[19]. IL-1α와 IL-1β의 전사는 일반적으로 NF-κB 계열의 전사 인자에 의해 활성화되고[27], IL-1α와 IL-1β가 세포에서 배출되면 초기에는 국소 염증을 유발하지만 결국 전신 염증을 유발한다[25]. IL-6는 항상성을 유지하기 위한 cytokine으로 감염이나 조직 손상으로 항상성이 손상되면 IL-6가 생성되어 긴급 스트레스에 대한 숙주 방어에 기여한다[21]. 하지만, 과하고 지속적인 IL-6 생성은 급성 전신 염증 반응 증후군 및 만성 면역매개 질환에 병리학적 영향을 미친다[21]. TNF-α는 다양

한 세포에 다면 발현 효과를 가지는 cytokine으로 염증 반응의 주요 조절자로 확인되었으며, 일부 염증 및 자가면역 질환의 발병기전에 관여하는 것으로 보고되었다[11]. 이러한 4개의 친 염증성 cytokine의 유전자 발현 변화를 확인한 결과 quercetin처리에 의해 CSF2, IL-1β, IL-6, 그리고 TNF-α 유전자의 발현이 농도 의존적으로 감소되는 것이 확인되었다(Fig. 5). CSF2는 5 μM quercetin 처리군부터 유전자의 발현이 현저하게 감소되었으며 quercetin 처리 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 5A). IL-1β의 경우 20 μM 처리군에서 현저하게 유전자의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5B). 또한 IL-6와 TNF-α는 quercetin의 처리에 의해 농도 의존적으로 유전자의 발현이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 5C, Fig. 5D). 이러한 연구결과는 quercetin의 항염증 활성이 친 염증성 유전자의 발현을 억제함으로써 작용한다는 것을 시사한다.

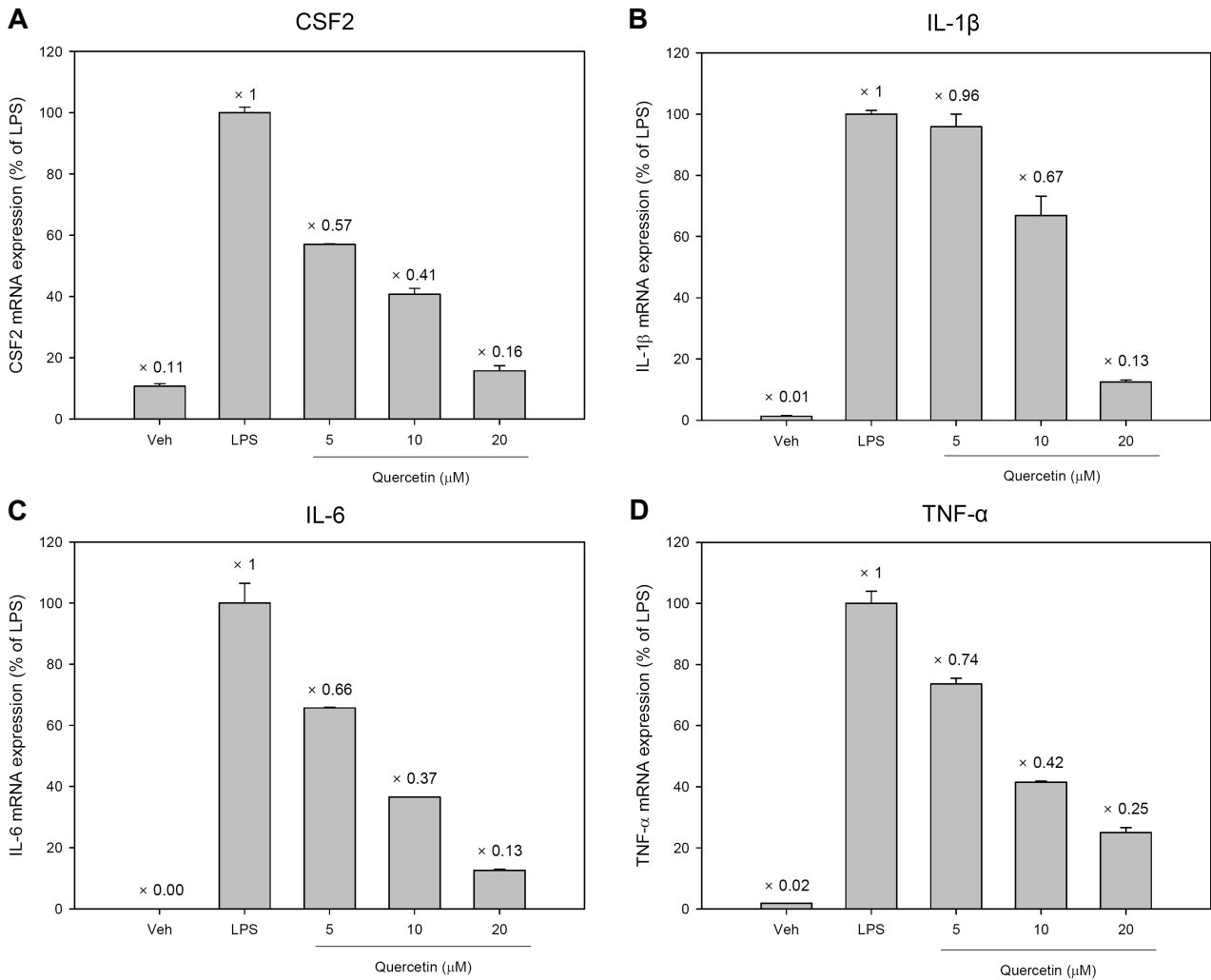


Fig. 5. Down-regulation of pro-inflammatory cytokine genes by quercetin. LPS-activated RAW264.7 macrophage was pre-treated with LPS (0.2 μg/ml) before quercetin treatment. And then, quercetin was incubated with quercetin (5, 10, and 20 μM). After 24 hr treatment of quercetin, total RNAs were prepared. The mRNA expression of (A) CSF2, (B) IL-1β, (C) IL-6, and (D) TNF-α was determined by quantitative real-time PCR.

종합적으로, 본 연구는 플라보노이드 quercetin이 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서의 염증 반응을 MAPK 경로와 NF-κB 경로를 억제함으로써 조절하고, 친 염증성 cytokine의 발현을 저해함으로써 억제한다는 것을 제시한다.

감사의 글

이 논문은 안동대학교 기본연구지원사업에 의하여 연구되었습니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Al-Oshaq, R. K., Overy, A. J. and Büsselberg, D. 2020. Phytochemicals and gastrointestinal cancer: Cellular mechanisms and effects to change cancer progression. *Bio-molecules* **10**, 105.
2. Chen, C. Y., Kao, C. L. and Liu, C. M. 2018. The cancer prevention, anti-inflammatory and anti-oxidation of bioactive phytochemicals targeting the TLR4 signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2729.
3. Chen, T., Zhang, X., Zhu, G., Liu, H., Chen, J., Wang, Y. and He, X. 2020. Quercetin inhibits TNF-α induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF-κB and AP-1 signaling pathway *in vitro*. *Medicine (Baltimore)* **99**, e22241.
4. Deepika and Maurya, P. K. 2022. Health benefits of quercetin in age-related diseases. *Molecules* **27**, 2498.

5. Di Petrillo, A., Orrù, G., Fais, A. and Fantini, M. C. 2022. Quercetin and its derivatives as antiviral potentials: A comprehensive review. *Phytother. Res.* **36**, 266-278.
6. Donohoe, F., Wilkinson, M., Baxter, E. and Brennan, D. J. 2020. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) and obesity-related cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1241.
7. Dunkhunthod, B., Talabnin, C., Murphy, M., Thumanu, K., Sittisart, P., Hengpratom, T. and Eumkeb, G. 2020. Intracellular ROS scavenging and anti-inflammatory activities of *Oroxylum indicum* Kurz (L.) extract in LPS plus IFN- γ -activated RAW264.7 macrophages. *eCAM.* **2020**, 7436920.
8. González-Vallinas, M., González-Castejón, M., Rodríguez-Casado, A. and Ramírez De Molina, A. 2013. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. *Nutr. Rev.* **71**, 585-599.
9. Gu, I., Brownmiller, C., Stebbins, N. B., Mauromoustakos, A., Howard, L. and Lee, S. 2020. Berry phenolic and volatile extracts inhibit pro-inflammatory cytokine secretion in LPS-stimulated RAW264.7 cells through suppression of NF- κ B signaling pathway. *Antioxidants* **9**, 871
10. Imran, A., Butt, M. S., Xiao, H., Imran, M., Rauf, A., Mubarak, M. S. and Ramadan, M. F. 2019. Inhibitory effect of black tea (*Camellia sinensis*) theaflavins and thearubigins against HCT 116 colon cancer cells and HT 460 lung cancer cells. *J. Food Biochem.* **43**, 12822.
11. Jang, D., Lee, A., Shin, H., Song, H., Park, J., Kang, T., Lee, S. and Yang, S. 2021. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2719.
12. Kashfi, K., Kannikal, J. and Nath, N. 2021. Macrophage reprogramming and cancer therapeutics: Role of iNOS-derived NO. *Cells* **10**, 3194.
13. Kim, J. K., Choi, E., Hong, Y. H., Kim, H., Jang, Y., Lee, J. S., Choung, E. S., Woo, B. Y., Hong, Y. D., Lee, S., Lee, B., Bach, T., Kim, J. H., Kim, J. and Cho, J. Y. 2021. Syk/NF- κ B-targeted anti-inflammatory activity of *Melicope accedens* (Blume) T.G. Hartley methanol extract. *J. Ethnopharmacol.* **271**, 113887.
14. Król, M. and Kepinska, M. 2020. Human nitric oxide synthase-Its functions, polymorphisms, and inhibitors in the context of inflammation, diabetes and cardiovascular diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 56.
15. Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., Liu, H. and Yin, Y. 2016. Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients* **8**, 167.
16. Park, S. I., Sohn, H. Y., Lee, C. I., Hwang, H. Y., Park, S. W. and Kim, J. S. 2020. Functional chemical components and their biological activities of *Houttuynia cordata* and *Lespedeza cuneata*. *J. Life Sci.* **30**, 169-177.
17. Rauf, A., Imran, M., Khan, I. A., Ur-Rehman, M., Gilani, S. A., Mehmood, Z. and Mubarak, M. S. 2018. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. *Phytother. Res.* **32**, 2109-2130.
18. Ranjan, A., Ramachandran, S., Gupta, N., Kaushik, I., Wright, S., Srivastava, S., Das, H., Srivastava, S., Reasad, S. and Srivastava, S. K. 2019. Role of phytochemicals in cancer prevention. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4981.
19. Saita, K., Moriuchi, Y., Iwagawa, T., Aihara, M., Takai, Y., Uchida, K. and Watanabe, S. 2022. Roles of CSF2 as a modulator of inflammation during retinal degeneration. *Cytokine* **158**, 155996.
20. Shen, P., Lin, W., Deng, X., Ba, X., Han, L., Chen, Z., Qin, K., Huang, Y. and Tu, S. 2021. Potential implications of quercetin in autoimmune diseases. *Front. Immunol.* **12**, 689044.
21. Tanaka, T., Narazaki, M. and Kishimoto, T. 2018. Interleukin (IL-6) immunotherapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a028456.
22. Tang, S. M., Deng, X. T., Zhou, J., Li, Q. P., Ge, X. X. and Miao, L. 2020. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomed. Pharmacother.* **121**, 109604.
23. Thoma, A. and Lightfoot, A. P. 2018. NF- κ B and inflammatory cytokine signalling: Role in skeletal muscle atrophy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1088**, 267-279.
24. Xu, D., Hu, M. J., Wang, Y. Q. and Cui, Y. L. 2019. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules* **24**, 1123.
25. Yazdi, A. S. and Ghoreschi, K. 2016. The interleukin-1 family. *Adv. Exp. Med. Biol.* **941**, 21-29.
26. Ye, Y., Wang, X., Jeschke, U. and Schönfeldt, V. V. 2020. COX-2-PGE2-EPs in gynecological cancers. *Arch. Gynecol. Obstet.* **301**, 1365-1375.
27. Zhang, W., Borcherdig, N. and Kolb, R. 2020. IL-1 signaling in tumor microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1240**, 1-23.
28. Zhang, Y., Gan, R., Li, S., Zhou, Y., Li, A., Xu, D. and Li, H. 2015. Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules* **20**, 21138-21156.

초록 : 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에서 MAPK와 NF- κ B 경로를 통한 quercetin의 염증 반응 저해 활성

원우영 · 김정태 · 김근호 · 황지영 · 정정욱 · 김종식*
(국립안동대학교 생명과학과)

Quercetin은 과일과 채소에 풍부한 플라보노이드 중의 하나로써, 항산화, 항염증, 항암, 항바이러스 활성 등 다양한 약리학적 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 *in vitro* 모델에서 quercetin의 항염증 활성과 작용기전을 연구하였다. Quercetin은 LPS로 자극된 RAW264.7에서 세포 생존율에 영향 없이 NO 생산을 농도 의존적으로 저해하였고, iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 억제하였다. 게다가, quercetin은 LPS로 유도된 p38, JNK, ERK의 인산화를 농도 의존적으로 저해하였고, NF- κ B p65 단백질과 억제자인 I κ B α 단백질의 인산화를 저해하였다. 이러한 결과는 quercetin의 항염증 활성이 MAPK 경로와 NF- κ B를 조절함으로써 이루어진다는 것을 시사한다. Quercetin에 의해 4종류의 친염증성 cytokine (CSF2, IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 발현 변화를 정량적 real-time PCR 방법으로 확인한 결과, 모든 cytokine 유전자의 발현이 감소됨을 확인하였다. 종합적으로, 본 연구결과는 플라보노이드 quercetin이 RAW264.7 세포에서 LPS로 유도된 염증반응을 MAPK 경로와 NF- κ B 경로를 통해 억제하고 친염증성 cytokine 유전자의 발현을 억제함으로써 조절한다는 것을 제시한다.