

지질다당체와 펩티도글라이칸 공동 자극으로 유발되는 대식세포의 하이드로젠 퍼록사이드 생성증가에 미치는 바이칼레인의 작용 고찰

박완수*#

가천대학교 한의과대학 병리학교실

Effects of baicalein on hydrogen peroxide productions in mouse macrophages stimulated by lipopolysaccharide and peptidoglycan

Wansu Park*#

Department of Pathology, College of Korean Medicine, Gachon University

ABSTRACT

Objectives : Effects of baicalein (BA) on oxidative stress in RAW 264.7 mouse macrophages stimulated with peptidoglycan (PG) and lipopolysaccharide (LPS) were investigated.

Methods : RAW 264.7 co-stimulated with LPS and PG were incubated with BA at concentrations of 25 and 50 μ M. Incubation time was 18 h, 20 h, 22 h, 24 h, and 26 h. After incubation, the production of hydrogen peroxide in RAW 264.7 was measured with dihydrorhodamine 123 assay. Additionally, RAW 264.7 stimulated with PG were incubated with BA at concentrations of 25 and 50 μ M for 24 h. After incubation, NO production was evaluated by griess reagent assay.

Results : BA significantly inhibited hydrogen peroxide productions ($p < 0.05$). In details, production of hydrogen peroxide in 'LPS and PG'-stimulated RAW 264.7 treated for 18 h with BA at concentrations of 25 and 50 μ M was 91.27% and 89.22% of the control group treated with LPS and PG only, respectively; the production of hydrogen peroxide for 20 h was 92.19% and 90.58%, respectively; production of hydrogen peroxide for 22 h was 91.69% and 89.89%, respectively; production of hydrogen peroxide for 24 h was 92.4% and 90.19%, respectively; production of hydrogen peroxide for 26 h was 91.7% and 89.04%, respectively. Additionally, BA at the concentration of 50 and 100 μ M significantly inhibited NO production in PG-induced RAW 264.7 ($p < 0.05$).

Conclusions : BA might have anti-oxidative activity related to its inhibition of hydrogen peroxide production in 'LPS and PG'-stimulated RAW 264.7 macrophages.

Key words : RAW 264.7, Baicalein, Macrophage, Lipopolysaccharide, Peptidoglycan, Hydrogen peroxide

I. 서 론

산화스트레스는 암 등의 발생 원인이 될 수 있기 때문에, 산화스트레스를 완화할 수 있는 천연물질에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다. 플라보노이드류의 항산화작용에 대해서는 잘

알려져 있기 때문에, 플라보노이드류를 함유한 한약 또는 한의 처방에 대한 연구도 지속되고 있다. 다양한 플라보노이드류를 함유하고 있는 황금(黃芩)은 청열조습약(淸熱燥濕藥)에 속하는 한약으로 폐(肺), 담(膽), 위(胃), 대장(大腸)으로 귀경(歸經)하여 사설화(瀉實火)·제습열(除濕熱)·지혈(止血)·안태(安胎)

*#Corresponding and First author : Wansu Park, Department of Pathology, No. 504, College of Korean Medicine, Gachon University, Seongnam 13120, Republic of Korea.

· Tel : +82-31-750-8821

· E-mail : HANGL98@naver.com

· Received : 10 October 2023

· Revised : 23 October 2023

· Accepted : 25 November 2023

의 효능을 가지고 있으며 그 주요한 성분인 바이칼레인(baicalein; 5,6,7-trihydroxyflavone)은 항염·항산화·항암 등 다양한 약리활성을 가지고 있어서 많은 연구보고들이 이루어져 왔다¹⁾.

예를 들면, Yu 등의 2017년 보고²⁾에 의하면, 생체활성 플라보노이드 중의 하나인 바이칼레인은 항염증 및 항암 작용이 있는 것으로 알려져 있는데, 특히 이 연구에서 생체 내 및 시험관 내에서 시스플라틴(cisplatin)의 화학 감수성을 크게 향상시켰음을 보여주었다. 즉, 시스플라틴 내성 인체 폐암 세포(A549/CDDP)는 상피-중간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition; EMT) 표현형을 가지고 있으며, A549세포에 비하여 PI3K/Akt/NF- κ B 경로를 통한 NF- κ B 활성화의 특징이 있는데, 바이칼레인은 PI3K/Akt/NF- κ B 경로를 유의하게 억제하여 NF- κ B 활성을 조절하며 EMT를 간엽-상피 전이(MET, 간엽세포에서 상피세포로의 역전이)로 전환시킴으로써 결과적으로 인간폐선암중세포의 시스플라틴에 대한 저항성을 완화한다. 2022년 Li 등의 보고³⁾에 의하면, 결장(colon)을 염증성 손상으로부터 보호하는 효과에 대하여 이미 보고된 바 있는 바이칼레인이 궤양성 대장염(ulcerative colitis) 마우스 모델에서의 장장벽(gut barrier) 기능에 대한 보호효과가 있다. 2022년 Li 등의 보고⁴⁾에 의하면, 바이칼레인은 '산소-포도당 박탈과 재산소화(oxygen-glucose deprivation and reoxygenation; OGD/R)'로 촉발되는 HT22(mouse hippocampal cells)세포 손상을 완화하고, 일시적 중간 대뇌 동맥 폐색(transient middle cerebral artery occlusion; tMCAO) 마우스 모델에서 철분 수치, 지질 과산화 생성 및 뇌 조직의 페롭토시스(ferroptosis)의 형태적 특징을 감소시키며, RSL3(a ferroptosis-inducing agent)로 자극된 HT22세포에서의 페롭토시스를 억제한다.

세균의 세포벽을 구성하는 지질다당체(lipopolysaccharide; LPS)와 펩티도글라이칸(peptidoglycan; PG)은 대식세포와 같은 선천성 면역세포에 의해서 인지되며, 결과적으로 염증반응을 유발하게 되는데, 이 과정에서 대식세포에서 과산화수소(hydrogen peroxide)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species)이 대량으로 생성되어 주변 조직을 손상시키는 등 산화스트레스(oxidative stress)가 발생한다⁵⁾. 산화스트레스는 암 등의 발생 원인이 될 수 있기 때문에, 산화스트레스를 완화할 수 있는 천연물질에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다.

선행의 연구에서 본 연구팀은 바이칼레인이 펩티도글라이칸으로 유발되는 마우스 대식세포(RAW 264.7)의 과산화수소(H₂O₂) 과잉생성을 억제함⁶⁾과, lipoteichoic acid로 유발되는 RAW 264.7의 과산화수소 과잉생성을 억제함⁷⁾, poly-IC와 lipoteichoic acid의 공동자극으로 유발되는 과산화수소 과잉생성을 억제함⁸⁾에 대해서 보고한 바 있으나, 아직까지 LPS와 PG의 공동자극으로 발생하는 대식세포의 산화스트레스에 대한 바이칼레인의 작용에 대한 보고는 이루어진 바 없다. LPS는 그람음성균의 주요 구성물이고 PG는 그람음성균보다 그람양성균에 더 풍부하기 때문에, LPS 혹은 poly-IC 단독으로 감염성 면역반응을 일으키는 경우와 달리 LPS와 PG의 공동자극은 그람양성균과 그람음성균이 동시에 감염되는 경우와 유사한 면역증반응을 유발한다고 할 수 있다. 그러므로 LPS와 PG의 공동자극세포모델을 통하여 그람양성균과 그람음성균의 동시적 감염에 대한 시료의 억제작용을 추정할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 LPS와 PG의 공동자극으로 발생하는 대식세포의 산화 스트레스에 대한 바이칼레인의 효과를 확인하고 보고하는 바이다.

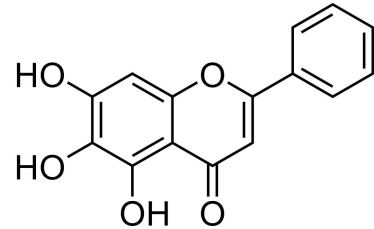


Figure 1. Structural formula of Baicalein.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 바이칼레인(baicalein; Cat No 465119), 에모딘(emodin; Cat No 518-82-1), 베르베린(berberine; Cat No 200275), dihydrorhodamine123(DHR) 시약(Cat No D1054), 지질다당체(lipopolysaccharide; L4391), 황색포도알균류래 펩티도글라이칸(peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*; Cat No 77140), 그리스시약(Griess reagent; Cat No G4410) 등은 Millipore(Billerica, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 세포배양을 위해서는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM; Cat No 11965118), heat-inactivated fetal bovine serum(FBS; Cat No 16000044), Penicillin-Streptomycin(Cat No P4333)등을 써모피셔사이언티픽사(Thermo Fisher Scientific, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2) 기기

실험에 사용된 주요 기기는 세포배양기(NUAIRE, USA), 무균작업대(Jeiothec, Korea), 독립현미경(CK2, Olympus, Japan), 원심분리기(Gyrozen, Korea), 초저온냉동고(Gudero, IlshinLab, Korea), 형광분광기(TRIAD LT spectrofluorometer, Dynex, USA) 등이다.

2. 방법

1) 세포주

본 연구에서 사용된 세포주는 마우스 대식세포인 RAW 264.7 mouse macrophages이며, 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였다.

2) 세포 배양

세포의 배양은 선행연구⁶⁻⁹⁾의 방법에 따라 실시하였으며, 세포들은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin

(100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다.

3) 세포내 과산화수소 생성 측정

세포내 과산화수소(hydrogen peroxide) 생성은 선행연구⁶⁻⁷⁾ 방법에 따라 dihydrorhodamine 123(DHR) assay를 실시하였다. 96 well plate에 well 당 10,000개의 세포들을 분주하고, 24시간 동안 안정화하였다. 안정화가 된 세포에 DHR(10 µM)이 담긴 배지를 30분간 처리한 뒤 배지를 제거하였다. 시료를 각 well에 처리하고 18시간 · 20시간 · 22시간 · 24시간 · 26시간 동안 배양한 후 형광분광기(excitation filter 485 nm and emission filter 535 nm)를 이용하여 세포내 과산화수소 생성량을 측정하였다. 세포내 신호기전 반응 중에는 1시간이 내의 짧은 시간동안에만 발생하고, 곧 소멸되어 확인이 어려운 경우가 있기 때문에 본 연구에서는 2시간의 간격을 두고 과산화수소 생성을 조사하였다.

4) 일산화질소 생성 측정

세포의 일산화질소 생성은 선행연구⁸⁻⁹⁾ 방법에 따라 Griess reagent assay를 실시하였다. 96 well plate에 well 당 10,000개의 세포들을 분주하고, 24시간 동안 안정화하였다. 시료를 처리하고 24시간 배양한 후, 각 well의 배양액 100 µL과 그리스시약 100 µL을 섞어서 15분간 반응시키고 형광분광기를 이용, 540 nm에서의 흡광도를 측정하여 배양액내의 일산화질소량을 비교하였다.

5) 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복된 후 평균±표준편차(Mean±SD)로 표시되었고, 대조군과 각 실험군의 평균 차이는 아노바검증(ANOVA test)으로 통계적 유의성을 분석하였으며, 유의수준은 0.05로 설정하였다.

III. 결 과

1. 바이칼레인의 18시간 배양이 LPS와 PG에 의해 공동으로 자극받은 RAW 264.7의 과산화수소 생성에 미치는 영향

LPS와 PG로 공동으로 자극받은 RAW 264.7에 바이칼레인(25, 50 µM)으로 18시간 동안 처리한 후 세포내 과산화수소 생성을 측정한 결과, 대조군(LPS와 PG를 공동으로 처리한 군)은 정상군(세포배양액만 처리한 군) 대비 105.15 ± 3.67%로 유의하게 증가하였으며, 바이칼레인을 25, 50 µM의 농도로 처리한 군에서는 정상군 대비 각각 95.96 ± 2.35%, 93.81 ± 3.24%로 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Figure 2), 항산화효능을 가진 비교물질로서 사용된 에모딘(emodin)을 처리한 군에서도 정상군 대비 97.22 ± 4.09%로 유의한 감소를 나타내었다.

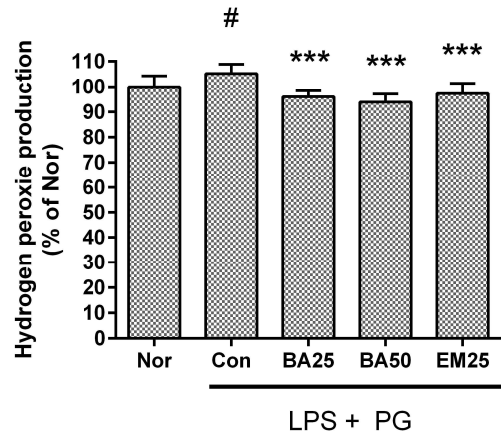


Figure 2. Hydrogen peroxide production in RAW 264.7 mouse macrophages for 18 h incubation. Data represent Mean ± SD. Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 1 µg/ml of lipopolysaccharide (LPS) and 0.5 µg/ml of peptidoglycan (PG). BA25 and BA50 mean 25 µM and 50 µM of baicalein, respectively. EM25 denotes emodin (25 µM). # $p < 0.05$ vs. Nor; *** $p < 0.001$ vs. Con.

2. 바이칼레인의 20시간 배양이 LPS와 PG에 의해 공동으로 자극받은 RAW 264.7의 과산화수소 생성에 미치는 영향

LPS와 PG로 공동으로 자극받은 RAW 264.7에 바이칼레인(25, 50 µM)으로 20시간 동안 처리한 후 세포내 과산화수소 생성을 측정한 결과, 대조군(LPS와 PG를 공동으로 처리한 군)은 정상군(세포배양액만 처리한 군) 대비 107.18 ± 4.85%로 유의하게 증가하였으며, 바이칼레인을 25, 50 µM의 농도로 처리한 군에서는 정상군 대비 각각 98.81 ± 3.85%, 97.08 ± 5.38%로 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Figure 3). 에모딘(emodin)을 처리한 군에서도 정상군 대비 99.4 ± 5.78%로 유의한 감소를 나타내었다.

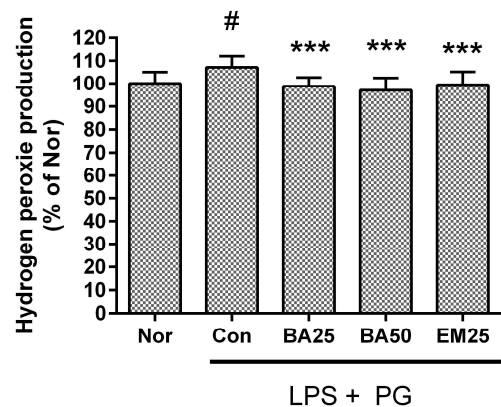


Figure 3. Hydrogen peroxide production in RAW 264.7 mouse macrophages for 20 h incubation. Data represent Mean ± SD. Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 1 µg/ml of lipopolysaccharide (LPS) and 0.5 µg/ml of peptidoglycan (PG). BA25 and BA50 mean 25 µM and 50 µM of baicalein, respectively. EM25 denotes emodin (25 µM). # $p < 0.01$ vs. Nor; *** $p < 0.001$ vs. Con.

3. 바이칼레인의 22시간 배양이 LPS와 PG에 의해 공동으로 자극받은 RAW 264.7의 과산화수소 생성에 미치는 영향

LPS와 PG로 공동으로 자극받은 RAW 264.7에 바이칼레인 (25, 50 μM)으로 22시간 동안 처리한 후 세포내 과산화수소 생성을 측정된 결과, 대조군(LPS와 PG를 공동으로 처리한 군)은 정상군(세포배양액만 처리한 군) 대비 $107.33 \pm 5.14\%$ 로 유의하게 증가하였으며, 바이칼레인을 25, 50 μM 의 농도로 처리한 군에서는 정상군 대비 각각 $98.4 \pm 3.72\%$, $96.47 \pm 5.06\%$ 로 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Figure 4). 에모딘(emodin)을 처리한 군에서도 정상군 대비 $100.12 \pm 5.71\%$ 로 유의한 감소를 나타내었다.

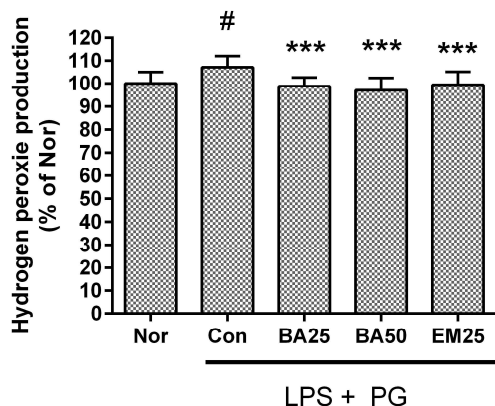


Figure 4. Hydrogen peroxide production in RAW 264.7 mouse macrophages for 22 h incubation. Data represent Mean \pm SD. Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of lipopolysaccharide (LPS) and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of peptidoglycan (PG). BA25 and BA50 mean 25 μM and 50 μM of baicalein, respectively. EM25 denotes emodin (25 μM). # $p < 0.01$ vs. Nor; *** $p < 0.001$ vs. Con.

4. 바이칼레인의 24시간 배양이 LPS와 PG에 의해 공동으로 자극받은 RAW 264.7의 과산화수소 생성에 미치는 영향

LPS와 PG로 공동으로 자극받은 RAW 264.7에 바이칼레인 (25, 50 μM)으로 24시간 동안 처리한 후 세포내 과산화수소 생성을 측정된 결과, 대조군(LPS와 PG를 공동으로 처리한 군)은 정상군(세포배양액만 처리한 군) 대비 $108.16 \pm 5.13\%$ 로 유의하게 증가하였으며, 바이칼레인을 25, 50 μM 의 농도로 처리한 군에서는 정상군 대비 각각 $99.93 \pm 3.85\%$, $97.55 \pm 4.73\%$ 로 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Figure 5). 에모딘(emodin)을 처리한 군에서도 정상군 대비 $100.54 \pm 5.74\%$ 로 유의한 감소를 나타내었다.

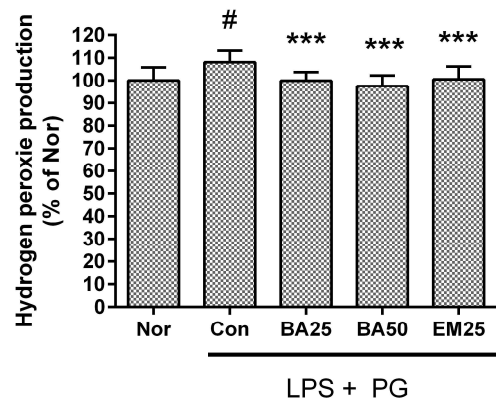


Figure 5. Hydrogen peroxide production in RAW 264.7 mouse macrophages for 24 h incubation. Data represent Mean \pm SD. Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of lipopolysaccharide (LPS) and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of peptidoglycan (PG). BA25 and BA50 mean 25 μM and 50 μM of baicalein, respectively. EM25 denotes emodin (25 μM). # $p < 0.01$ vs. Nor; *** $p < 0.001$ vs. Con.

5. 바이칼레인의 26시간 배양이 LPS와 PG에 의해 공동으로 자극받은 RAW 264.7의 과산화수소 생성에 미치는 영향

LPS와 PG로 공동으로 자극받은 RAW 264.7에 바이칼레인 (25, 50 μM)으로 26시간 동안 처리한 후 세포내 과산화수소 생성을 측정된 결과, 대조군(LPS와 PG를 공동으로 처리한 군)은 정상군(세포배양액만 처리한 군) 대비 $106.5 \pm 4.03\%$ 로 유의하게 증가하였으며, 바이칼레인을 25, 50 μM 의 농도로 처리한 군에서는 정상군 대비 각각 $97.66 \pm 2.33\%$, $94.83 \pm 4.07\%$ 로 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Figure 6). 에모딘(emodin)을 처리한 군에서도 정상군 대비 $98.13 \pm 4.73\%$ 로 유의한 감소를 나타내었다.

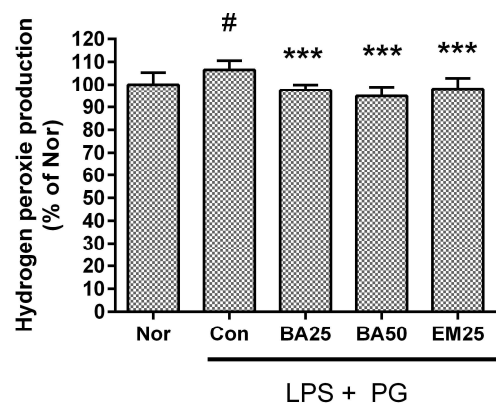


Figure 6. Hydrogen peroxide production in RAW 264.7 mouse macrophages for 26 h incubation. Data represent Mean \pm SD. Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of lipopolysaccharide (LPS) and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of peptidoglycan (PG). BA25 and BA50 mean 25 μM and 50 μM of baicalein, respectively. EM25 denotes emodin (25 μM). # $p < 0.01$ vs. Nor; *** $p < 0.001$ vs. Con.

6. 바이칼레인의 24시간 배양이 펩티도글라이칸 (PG)에 의해 유발되는 RAW 264.7의 일산화 질소 생성증가에 미치는 영향

PG에 의해 유발되는 RAW 264.7의 일산화질소 생성증가에 미치는 바이칼레인의 작용을 조사하기 위하여 PG와 바이칼레인(50, 100 μM)을 24시간 동안 처리한 후 RAW 264.7의 일산화질소 생성을 측정된 결과, 대조군(PG만을 처리한 군)은 정상군(세포배양액만 처리한 군) 대비 147.86 ± 6.08%로 유의한 증가를 나타내었으며, 바이칼레인을 50, 100 μM의 농도로 처리한 군에서는 정상군 대비 각각 108.35 ± 8.6%, 106.77 ± 7.81%로 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Figure 7).

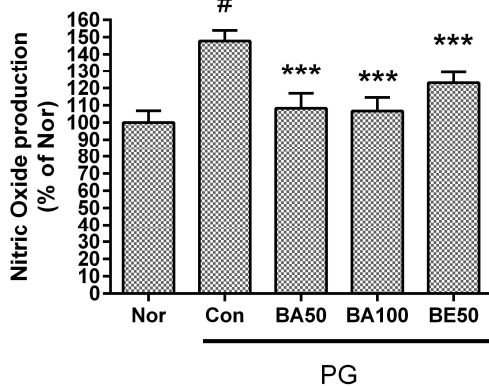


Figure 7. Nitric oxide production in RAW 264.7 mouse macrophages for 24 h incubation. Data represent Mean ± SD. Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 0.5 μg/ml of peptidoglycan (PG). BA50 and BA100 mean 50 μM and 100 μM of baicalein, respectively. BE50 denotes berberine (50 μM). # p < 0.001 vs. Nor; *** p < 0.001 vs. Con.

IV. 고찰

한의학(韓醫學)에서 사실화(瀉實火)·제습열(除濕熱)·지혈(止血)·안태(安胎)의 효능으로 치료에 이용되는 황금(黃芩)은 청열조습약(淸熱燥濕藥)에 속하며, 폐(肺), 담(膽), 위(胃), 대장(大腸)으로 귀경(歸經)하는데, 그 주요한 성분이 플라보노이드 중 하나인 바이칼레인이다. 많은 연구자들에 의해서 바이칼레인의 다양한 약리활성에 대하여 보고¹⁾되어 왔으며, 항염 및 항산화작용뿐만 아니라 항암작용, 신경보호 효능 등에 대해서도 지속적으로 보고되고 있는데, 구체적인 내용을 살펴보면 다음과 같다. 2020년 Tuli 등의 보고¹⁰⁾에 의하면, 항염증 효과, 항혈관신생 효과, 항전이 효과 등의 약리학적 작용이 보고된 바이칼레인의 항암성 잠재력에 대한 과학적 증거가 많이 발견되는데, 이러한 바이칼레인의 약리작용과 관련된 신호기전에는 미토겐 활성화 단백질 키나아제(mitogen activated protein kinase; MAPK), 포유류 라파마이신 표적(mammalian target of rapamycin; mTOR), AKT 세린/트레오닌 단백질 키나아제

B(AKT serine/threonine protein kinase B; AKT), 폴리(ADP-리보스) 중합효소(poly(ADP-ribose) polymerase; PARP), 매트릭스 메탈로프로테이나제(matrix metalloproteinases; MMP)-2, MMP-9, 카스파제(caspase)-3/-8/-9 등이 포함된다. 2021년 Wang 등의 보고¹¹⁾에 의하면, 고지혈증은 췌장염의 주요 원인인데, 바이칼레인이 고지혈증성 췌장염(hyperlipidemic pancreatitis; HP) 쥐 모델에서 트리글리세리드(t riglyceride) 및 총콜레스테롤(total cholesterol)의 농도, 아밀라아제(Amylase) 활성을 감소시키고 젖산 탈수소효소(Lactate dehydrogenase) 활성과 파이롭토시스(pyroptosis)를 감소시켰고 생체 내 및 시험관 내에서 염증을 완화한다. 특히 파이롭토시스 관련 단백질들(GSDMD, IL-1β, IL-18)의 수준을 낮추며 NLRP3/Caspase-1 경로를 억제하여 고지혈증성 췌장염을 완화한다. 이러한 바이칼레인의 항염작용은 ancreatic acinar cells에 있어서 miRNA에 해당하는 'miR-192-5p'를 상향 조절하고 'Thioredoxin interacting protein(TXNIP)'를 하향 조절함에 의한 것이다. 즉, 'miR-192-5p'은 TXNIP를 표적으로 삼기 때문에 바이칼레인이 'miR-192-5p'의 발현을 증폭함으로써 결과적으로 TXNIP를 억제하는 것이다. 'miR-192-5p'은 TXNIP의 발현 정도는 RT-qPCR에 의해 조사되었다. 2021년 Ran 등의 보고¹²⁾에 의하면, 바이칼레인은 중대뇌동맥 폐색(MCAO) 마우스 모델의 뇌경색 부피를 감소시키며, MCAO 후 감각 운동 기능을 개선한다. MCAO 마우스 모델과 소교세포(microglia)를 이용한 시험관실험에서도 실시간 PCR실험을 통하여 바이칼레인이 염증성 마커의 발현을 증가시키면서, 전염증성 마커의 발현을 감소시키는 것이 확인되었고, 웨스턴 블롯 및 면역형광 염색실험을 통해 바이칼레인이 전염증성 마커 CD16 수준을 감소시키고 항염증성 마커 CD206 또는 Arg-1 수준을 강화함이 확인되었다. 바이칼레인은 전염증성 사이토카인과 산화질소의 방출을 억제하고, TLR4 단백질 수준의 증가·IKBα p65의 인산화·NF-κB p65의 핵 전위를 방지하며 전염증성 미세아교세포 분극화(microglial polarization)에 대하여 억제효과를 나타낸다. 즉, 바이칼레인은 TLR4/NF-κB 경로의 억제와 인산화된 STAT1의 하향 조절을 통해 미세아교세포를 항염증성 표현형으로 분극화함으로써 뇌졸중 후 신경 손상을 간접적으로 개선함으로써 뇌졸중에 대한 잠재적인 치료법으로 제시될 수 있음을 시사한다. 2021년 Zhao 등의 보고¹³⁾에 의하면, 4주간의 바이칼레인 치료가 로테논 유도 마우스 모델(the rotenone-induced mice model)에서의 우울증과 유사한 행동을 상당히 완화시키고, 반복적인 바이칼레인 치료는 알파-시누클레인(α-synuclein) 응집을 감소시키며, 신경 염증을 억제하고, 신경 전달 물질 항상성을 유지한다. 로테논 유도 마우스 모델의 해마(hippocampus)에서는 postsynaptic density protein 95(PSD95)·synaptophysin(SYP)·brain-derived neurotrophic factor(BDNF)의 발현과 tyrosine kinase B(TrkB) 인산화 및 cAMP-response element-binding protein(CREB) 인산화가 억제되는데, 바이칼레인의 처리는 PSD95·SYP·BDNF의 발현을 증가시키고, TrkB 인산화 및 CREB 인산화를 회복시킨다. 즉 전통적인 도파민 대체 요법이 우울증과 같은 증상 완화 및 시냅스 기능 보호에 거의 영향을 미치지 않음을 고려할 때, 바이칼레인이 나타내는 파킨슨병 관련 우

울증 마우스 모델에서의 시냅스 가소성(synaptic plasticity)을 보호함과 해마(hippocampus)에서의 BDNF/TrkB/CREB 경로를 활성화하는 바이칼레인이 파킨슨병 관련 우울증 치료약물로서의 가능성을 가지고 있음을 의미한다. 2023년 Ji-Hong 등의 보고¹⁴⁾에 의하면, 블레오마이신(bleomycin)으로 유발되는 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis) 마우스 모델에 대한 바이칼레인(100mg/kg/일)의 경구투여는 bleomycin으로 명백하게 나타나는 마우스의 폐 섬유증(lung fibrosis) 및 섬유아세포 노화(fibroblast senescence)를 완화한다. 즉, 바이칼레인은 마우스의 폐 섬유증에서 증가되는 콜라겐(collagen) 침착을 완화하고, 히드록시프롤린(hydroxyproline) · 콜라겐 I(collagen I) · p53 · p21 · p16 · MCP-1 · PAI-1 · TNF- α · MMP-10 · MMP-12 증가를 약화시킨다. 또한 바이칼레인은 TGF- β 1/Smad 신호 전달 경로의 bleomycin 매개 활성화를 완화하고, bleomycin으로 하향 유도되는 폐 조직에서의 sirtuin 3 발현을 회복시킨다. 이는 바이칼레인이 폐섬유증 치료에 적용될 수 있는 근거를 제시하는 것이다. 2022년 Rahmani 등의 보고¹⁵⁾에 의하면, 약용 식물에서 정제된 생리활성 화합물의 역할은 독성이 낮고 부작용이 적기 때문에 건강 과학 분야에서 주목을 받고 있는데, 예를 들면, *Scutellaria baicalensis*에서 분리된 활성 폴리페놀 화합물인 바이칼레인은 염증 및 세포증식 억제를 통해 항암 활성을 나타내는데, 이러한 바이칼레인의 항암 잠재력은 주로 세포 사멸 유도, 자가포식, 세포 주기의 정지, 혈관신생 억제, PI3K/Akt 경로와 같은 다양한 세포 신호 경로의 조절을 통해 매개된다. 또한 Rahmani 등은 이 연구에서 다른 항암제와 바이칼레인의 나노 제형 기반 전달과의 시너지 효과에 대해서도 제안하였다. 2023년도 Gasowska-Bajger와 Wojtasek의 보고¹⁶⁾에 의하면, 티로시나아제(tyrosinase)의 억제제로 보고된 바 있는 바이칼레인은 티로시나아제(tyrosinase)나 과요오드산 나트륨(sodium periodate)에 의하여 카테콜에서 생성된 o-퀴논(o-quinones)에 의해 빠르게 산화된다. 2013년에 이루어진 RAW 264.7 모델을 이용한 Fan 등의 보고¹⁷⁾에 의하면, 바이칼레인은 NF- κ B 경로 및 에스트로젠 유사 활성의 조절을 통해 LPS로 유발된 염증성 사이토카인(IL-1 β , TNF- α 등) 생성을 억제하며 이는 iNOS와 COX-2, TNF- α mRNA 발현 억제와 동반된다. 이러한 연구보고는 바이칼레인이 염증 관련 질병을 예방하는 데 유용할 수 있음을 시사하는 것이다. LPS에 의한 RAW 264.7의 일산화질소 생성증가에 대한 바이칼레인의 억제작용은 이미 충분히 보고¹⁸⁾되었기 때문에 본 연구에서는 우선적으로 PG에 의한 RAW 264.7의 일산화질소 생성증가에 대한 바이칼레인의 작용에 대하여 조사하였다. 또한 선행 연구¹⁹⁾에서 바이칼레인의 일산화질소 생성 억제 효과가 25 μ M의 농도보다 50, 100 μ M의 농도에서 더욱 큰 것으로 보고되었기 때문에 본 연구에서는 바이칼레인을 50, 100 μ M의 농도로 처리하여 일산화질소 생성 억제 효과를 측정하였다.

세균의 세포벽을 구성하는 LPS와 PG는 대식세포와 같은 선천성 면역세포를 자극하여 염증반응을 일으키며, 그 과정에서 활성산소종과 활성질소종이 대량으로 생성되는 산화스트레스가 발생된다⁵⁾. 산화스트레스는 암 등의 발생 원인이 될 수 있기 때문에, 산화스트레스를 완화할 수 있는 천연물질에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다. 바이칼레인의 가지고 있는 항산화

효능과 관련하여, 본 연구팀은 RAW 264.7를 이용하여 바이칼레인이 펩티도글라이칸으로 유발되는 과산화수소 과잉생성을 억제함⁶⁾과, lipoteichoic acid로 유발되는 과산화수소 과잉생성을 억제함⁷⁾, poly-IC와 lipoteichoic acid의 공동자극으로 유발되는 과산화수소 과잉생성을 억제함⁸⁾에 대해서 보고한 바 있으나, 아직까지 LPS와 PG의 공동자극으로 발생하는 대식세포의 산화스트레스에 대한 바이칼레인의 작용에 대한 보고는 이루어진 바 없다.

본 연구에서는 바이칼레인이 LPS와 PG의 공동자극으로 유발되는 RAW 264.7의 과산화수소 과잉생성에 미치는 영향과 PG로 유발되는 일산화질소 생성증가에 미치는 영향을 조사하였다. Emodin의 항산화효능에 대해서 이미 보고된 바²⁰⁾ 있기 때문에 본 연구에서 비교물질로 사용되었다. 바이칼레인이 RAW 264.7의 세포생존율에 미치는 영향에 대해서는 선행의 연구⁶⁾에서 이미 이루어졌기 때문에 본 연구에서는 세포생존율에 대한 조사는 하지 않았다.

실험결과, 바이칼레인은 LPS와 PG의 공동자극으로 유발되는 RAW 264.7의 과산화수소 과잉생성을 유의하게 억제하였다. 구체적으로 살펴보면, 바이칼레인(25, 50 μ M)을 'LPS와 PG'와 함께 RAW 264.7에 18시간, 20시간, 22시간, 24시간, 26시간 처리한 후 RAW 264.7의 과산화수소 생성을 비교하였는데, 특히 24시간의 처리에서 108.16 \pm 5.13%로 가장 높은 생성증가율을 나타내었다. LPS와 PG의 공동자극으로 유발되는 과산화수소 생성에 대한 바이칼레인의 억제효과를 살펴본 결과를 살펴보면, 바이칼레인(25, 50 μ M)을 'LPS와 PG'와 함께 RAW 264.7에 18시간 처리한 결과에서는 대조군 대비 각각 91.27 \pm 2.23%, 89.22 \pm 3.08%로, 20시간 처리한 결과에서는 대조군 대비 각각 92.19 \pm 3.6%, 90.58 \pm 5.02%로, 22시간 처리한 결과에서는 대조군 대비 각각 91.69 \pm 3.46%, 89.89 \pm 4.71%로, 24시간 처리한 결과에서는 바이칼레인이 25, 50 μ M의 농도에서 대조군 대비 각각 92.4 \pm 3.56%, 90.19 \pm 4.37%로 유의한 억제를 나타내었으며, 26시간 처리한 결과에서는 대조군 대비 각각 91.7 \pm 2.19%, 89.04 \pm 3.82%로 유의한 억제를 나타내었다. 즉 바이칼레인 25 μ M의 농도에서는 18시간의 처리에서 억제효과가 가장 컸으며(억제율 약 8.73%), 50 μ M의 농도에서는 26시간의 처리에서 억제효과가 가장 컸다(억제율 약 10.96%). 또한 바이칼레인은 50, 100 μ M의 농도에서 PG에 의해 유발되는 RAW 264.7의 일산화질소 생성증가를 PG만 처리한 군에 비하여 각각 73.28 \pm 5.82%, 72.21 \pm 5.28%로서 유의한 억제를 나타내었다. 이러한 결과는 바이칼레인이 'LPS와 PG'의 공동자극으로 유발되는 대식세포내 활성산소종을 유의하게 완화함과 PG로 유발되는 활성질소종생성을 유의하게 억제함을 의미한다. 본 연구를 통하여 세균의 세포벽 구성물질들로 야기되는 산화 스트레스를 바이칼레인이 완화할 수 있음을 확인하였으며, 후속 연구를 통하여 산화스트레스와 관련된 질환 치료에 바이칼레인의 적용 가능성을 살펴보는 것이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 바이칼레인을 'LPS와 PG'와 함께 RAW 264.7에 18시간, 20시간, 22시간, 24시간, 26시간 처리한 후 RAW 264.7의 과산화수소 생성을 조사하고, 바이칼레인을 PG와 함께 24시간 처리한 후 일산화질소 생성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 18시간 처리한 결과, 바이칼레인은 25, 50 μ M의 농도에서 대조군(LPS와 PG 공동처리군) 대비 각각 $91.27 \pm 2.23\%$, $89.22 \pm 3.08\%$ 로서 유의하게 억제하였다.
2. 20시간 처리한 결과, 바이칼레인은 25, 50 μ M의 농도에서 대조군(LPS와 PG 공동처리군) 대비 각각 $92.19 \pm 3.6\%$, $90.58 \pm 5.02\%$ 로서 유의하게 억제하였다.
3. 22시간 처리한 결과, 바이칼레인은 25, 50 μ M의 농도에서 대조군(LPS와 PG 공동처리군) 대비 각각 $91.69 \pm 3.46\%$, $89.89 \pm 4.71\%$ 로서 유의하게 억제하였다.
4. 24시간 처리한 결과, 바이칼레인은 25, 50 μ M의 농도에서 대조군(LPS와 PG 공동처리군) 대비 각각 $92.4 \pm 3.56\%$, $90.19 \pm 4.37\%$ 로서 유의하게 억제하였다.
5. 26시간 처리한 결과, 바이칼레인은 25, 50 μ M의 농도에서 대조군(LPS와 PG 공동처리군) 대비 각각 $91.7 \pm 2.19\%$, $89.04 \pm 3.82\%$ 로서 유의하게 억제하였다.
6. RAW 264.7에 바이칼레인을 24시간 처리하고 일산화질소 생성을 측정된 결과, 바이칼레인은 50, 100 μ M의 농도에서 대조군(PG 처리군) 대비 각각 $73.28 \pm 5.82\%$, $72.21 \pm 5.28\%$ 로서 유의하게 억제하였다.

이러한 결과는 바이칼레인이 'LPS와 PG'의 공동자극으로 유발되는 세포내 활성산소종 생성을 유의하게 감소시키고 PG로 유발되는 일산화질소생성을 유의하게 억제함으로써 산화스트레스를 완화한다는 것을 의미한다. 향후 세균의 감염으로 유발되는 산화스트레스 관련 질환 치료에 바이칼레인이 적용되기 위해 보다 자세한 연구가 필요할 것이다.

References

1. Chandrashekar N, Pandi A. Baicalein: A review on its anti-cancer effects and mechanisms in lung carcinoma. *J Food Biochem.* 2022;46(9):e14230. doi: 10.1111/jfbc.14230.
2. Yu M, Qi B, Xiaoxiang W, Xu J, Liu X. Baicalein increases cisplatin sensitivity of A549 lung adenocarcinoma cells via PI3K/Akt/NF- κ B pathway.

Biomed Pharmacother. 2017;90:677-685. doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.001.

3. Li YY, Wang XJ, Su YL, Wang Q, Huang SW, Pan ZF, Chen YP, Liang JJ, Zhang ML, Xie XQ, Wu ZY, Chen JY, Zhou L, Luo X. Baicalein ameliorates ulcerative colitis by improving intestinal epithelial barrier via AhR/IL-22 pathway in ILC3s. *Acta Pharmacol Sin.* 2022;43(6):1495-1507. doi: 10.1038/s41401-021-00781-7.
4. Li M, Meng Z, Yu S, Li J, Wang Y, Yang W, Wu H. Baicalein ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis via regulating GPX4/ACSL4/ACSL3 axis. *Chem Biol Interact.* 2022;366:110137. doi: 10.1016/j.cbi.2022.110137.
5. Ramery E, O'Brien PJ. Evaluation of the cytotoxicity of organic dust components on THP1 monocytes-derived macrophages using high content analysis. *Environ Toxicol.* 2014;29(3):310-9. doi: 10.1002/tox.21759.
6. Park W. Effects of Baicalein on hydrogen peroxide productions in RAW 264.7 mouse macrophages stimulated by peptidoglycan. *Kor. J. Herbology.* 2023;38(1):1-9. doi: 10.6116/kjh.2023.38.1.1.
7. Oh CS, Park W. Effects of Baicalein on hydrogen peroxide productions in RAW 264.7 macrophages stimulated by lipoteichoic acid. *Kor. J. Herbology.* 2022 ; 37(5) : 53-61. doi: 10.6116/kjh.2022.37.5.53.
8. Park W. Effects of baicalein on hydrogen peroxide productions in RAW 264.7 mouse macrophages stimulated by poly-IC and lipoteichoic acid. 2023;38(4): 11-19. doi.org/10.6116/kjh.2023.38.4.11
9. Park W. Effect of Scutellariae Radix Water Extract on Hydrogen Peroxide Production in RAW 264.7 Mouse Macrophages. *Kor. J. Herbology.* 2011;26(1): 53-8. doi: 10.6116/kjh.2011.26.1.053.
10. Tuli HS, Aggarwal V, Kaur J, Aggarwal D, Parashar G, Parashar NC, Tuorkey M, Kaur G, Savla R, Sak K, Kumar M. Baicalein: A metabolite with promising antineoplastic activity. *Life Sci.* 2020;259:118183. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118183.
11. Wang X, Cai H, Chen Z, Zhang Y, Wu M, Xu X, Yang L. Baicalein alleviates pyroptosis and inflammation in hyperlipidemic pancreatitis by inhibiting NLRP3/Caspase-1 pathway through the miR-192-5p/TXNIP axis. *Int Immunopharmacol.* 2021;101(Pt B):108315. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108315.
12. Ran Y, Qie S, Gao F, Ding Z, Yang S, Tian G, Liu Z, Xi J. Baicalein ameliorates ischemic brain damage through suppressing proinflammatory microglia polarization via inhibiting the TLR4/NF- κ B and STAT1 pathway. *Brain Res.* 2021;1770:147626. doi: 10.1016/j.brainres.2021.147626.

13. Zhao X, Kong D, Zhou Q, Wei G, Song J, Liang Y, Du G. Baicalein alleviates depression-like behavior in rotenone-induced Parkinson's disease model in mice through activating the BDNF/TrkB/CREB pathway. *Biomed Pharmacother.* 2021; 140:111556. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111556.
14. Ji-Hong Y, Yu M, Ling-Hong Y, Jing-Jing G, Ling-Li X, Lv W, Yong-Mei J. Baicalein attenuates bleomycin-induced lung fibroblast senescence and lung fibrosis through restoration of Sirt3 expression. *Pharm Biol.* 2023;61(1): 288–297. doi: 10.1080/13880209.2022.2160767.
15. Rahmani AH, Almatroudi A, Khan AA, Babiker AY, Alanezi M, Allemailem KS. The Multifaceted Role of Baicalein in Cancer Management through Modulation of Cell Signalling Pathways. *Molecules.* 2022;27(22):8023. doi: 10.3390/molecules27228023.
16. Gašowska-Bajger B, Wojtasek H. Oxidation of baicalein by tyrosinase and by o-quinones. *Int J Biol Macromol.* 2023;231:123317. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123317.
17. Fan GW, Zhang Y, Jiang X, Zhu Y, Wang B, Su L, Cao W, Zhang H, Gao X. Anti-inflammatory activity of baicalein in LPS-stimulated RAW264,7 macrophages via estrogen receptor and NF- κ B-dependent pathways. *Inflammation.* 2013;36(6):1584–91. doi: 10.1007/s10753-013-9703-2.
18. Qi Z, Yin F, Lu L, Shen L, Qi S, Lan L, Luo L, Yin Z. Baicalein reduces lipopolysaccharide-induced inflammation via suppressing JAK/STATs activation and ROS production. *Inflamm Res.* 2013 Sep; 62(9):845–55. doi: 10.1007/s00011-013-0639-7.
19. Kim YJ, Kim HJ, Lee JY, Kim DH, Kang MS, Park W. Anti-Inflammatory Effect of Baicalein on Polyinosinic Polycytidylic Acid-Induced RAW 264,7 Mouse Macrophages. *Viruses.* 2018;10(5):224. doi: 10.3390/v10050224.
20. Ding Z, Da HH, Osama A, Xi J, Hou Y, Fang J. Emodin ameliorates antioxidant capacity and exerts neuroprotective effect via PKM2-mediated Nrf2 transactivation. *Food Chem Toxicol.* 2022;160: 112790. doi: 10.1016/j.fct.2021.112790.