



## Asiaticoside가 RAW 264.7 세포에서 Inducible nitric oxide synthase와 Cyclooxygenase-2에 미치는 항염증 작용에 관한 연구

주상섭 · 배옥남 · 정진호  
서울대학교 약학대학 종합약학연구소

### Anti-inflammatory Effects of Asiaticoside on Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 Cell Line

Sang-Sup Jew, Ok-Nam Bae and Jin-Ho Chung

Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Seoul National University,  
Seoul 151-742, Korea

Received January 10, 2003; Accepted February 28, 2003

**ABSTRACT.** Asiaticoside has been tested for the ability as an anti-inflammatory drug using lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophage cell line (RAW 264.7 cell). LPS treatment induced dramatically inducible nitric oxide synthase (iNOS) in RAW cells. However, asiaticoside inhibited LPS-stimulated iNOS induction in a concentration-dependent manner. Especially, higher concentrations (> 50  $\mu$ M) of asiaticoside completely blocked iNOS induction. In addition, LPS-stimulated expression of inducible cyclooxygenase (COX-2) and interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) was inhibited by asiaticoside treatment. Asiaticoside up to 50  $\mu$ M still required to inhibit COX-2 and IL-1 $\alpha$  induced by LPS. Consistent with these findings, treatment with asiaticoside suppressed *de novo* synthesis and cellular accumulation of prostaglandin E<sub>2</sub> to a lesser extent, suggesting that asiaticoside blocked the induction as well as the activity of COX-2. These results suggest the possibility that asiaticoside may be effective therapeutic agents for septic shock and other inflammatory diseases.

**Keywords:** Asiaticoside, Inducible nitric oxide synthase, Cyclooxygenase-2, Lipopolysaccharide, Anti-inflammatory activities.

### 서 론

Inflammation은 상처를 줄 수 있는 자극에 대한 생체의 방어 반응으로, 다양한 세포와 cytokine들이 관여하는 일련의 과정이다(Zamora 등, 2000). 이 과정은 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 외부 자극원 또는 arachidonic acid 대사체 같은 내부 자극원들을 주요 매개로 하여 macrophage, granulocyte와 같은 염증성 세포의 염증부위로의 유입과 축적을 주요 특징으로 한다(Trowbridge 등, 1997). 특히 염증 부위의 활성화된 macrophage는

cytokine 뿐 아니라 arachidonic acid 대사체인 prostaglandin(PG) 그리고 nitric oxide(NO) 등을 대량 생성함으로써 염증 매개에 큰 역할을 한다(Nathan, 1987; Salvemini 등, 1990). 그런데 이와 같은 inflammation이 과도한 경우에는 septic shock 혹은 rheumatoid arthritis와 같은 염증성 질병의 원인이 되며, 이 과정에서 NO와 PG의 과도한 생성이 중요한 역할을 담당한다는 사실들이 보고되고 있다(Higgs 등, 1984). 이에 따라, 염증성 질환의 치료를 위해 NO와 PG의 과도한 생성을 억제하는 것이 중요한 목표로 인식되고 있다.

Nitric oxide(NO)는 arginine 으로부터 constitutive nitric oxide synthase(cNOS)와 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 생성된다. cNOS는 일정하게 발현되어 physiological function을 매개하는 NO를 낮은

Correspondence to: Jin-Ho Chung, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea  
E-mail: [jhc302@plaza.snu.ac.kr](mailto:jhc302@plaza.snu.ac.kr)

level로 생성한다. 반면 iNOS는 LPS, cytokine 같은 자극에 의해 급격하게 유도되어, 과량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다(Liang 등, 1999). 따라서 염증 반응에서의 NO 생성은 대부분 iNOS에 의한 것이라 할 수 있다(Huang 등, 2001). 한편, prostaglandin(PG)은 constitutive cyclooxygenase(COX-1)과 inducible cyclooxygenase(COX-2)에 의해 arachidonic acid로부터 생성된다. cNOS의 경우와 마찬가지로 COX-1은 일정하게 발현되어 physiological function을 조절하는 반면, COX-2는 염증 자극원에 의해 macrophage, fibroblast와 같은 염증성 세포에서 유도되며(Herscham, 1996; Liang 등, 1999), 역시 염증반응에서의 prostaglandin은 대부분 COX-2에 의해 생성된다(Reddy 등, 1994). 현재 inflammatory injury를 예방하기 위해 개발된 많은 후보물질들이 iNOS 또는 COX-2의 활성을 직접 억제하거나, 전사 단계를 조절하는 NF- $\kappa$ B signaling 등을 억제함으로써 inducible form의 iNOS와 COX-2의 발현을 선택적으로 조절할 수 있는 기능을 가지는 물질들이다(Suh 등, 1998; Ogden 등, 1995).

*Centella asiatica*로 부터 얻어진 asiaticoside 유도체는 상처 치유 효능이 뛰어난 후보물질이다(Bonte 등, 1994). 상처 치유 과정은 복잡한 생리 작용을 거쳐 발생하는데 즉, 미생물 침투와 같은 감염으로부터 보호하는 염증(inflammation) 반응뿐만이 아니라 growth factors 및 cytokines 분비 등을 통한 조직 재생과정을 수반한다(Maquart 등, 1990). 상처가 발생하면 염증 반응을 유발시켜 macrophage 및 granulocytes, platelets 등이 동원되어 LPS와 같은 미생물 산물과 더불어 cytokines, growth factor 등을 분비한다. 이러한 물질들은 macrophage 등의 iNOS 및 COX-2 등을 활성화 시켜 NO 및 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)를 생성함으로써 비특이적 host defense에 관여함으로써 상처 치유에 early response를 담당한다(Fu 등, 1990). 따라서 본 연구에서는 상처치유 효과가 *in vivo*에서 확인된 asiaticoside 유도체가 염증세포에 의한 염증반응을 억제함으로써 세포 증식을 촉진시킬 수 있는지 여부를 검색하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

Dimethyl sulfoxide(DMSO), lipopolysaccharide, arachidonic acid와 phosphate buffered saline(PBS), cell lysis buffer 조제에 사용된 시약은 모두 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), penicillin/

streptomycin, fetal bovine serum은 Gibco BRL Life Technologies Inc.(Grand Island, NY)에서 구입하였다. Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) EIA enzyme immunoassay kit는 Amersham(Arlington Heights, IL) 으로부터 구입하였다.

### RAW 264.7 세포주의 배양 조건

RAW 264.7 세포는 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin을 포함하고 있는 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/air mixture 조건에서 배양하였다. 세포가 80~90% confluency에 이르렀을 때 세포를 수득하여 재배양하거나 실험에 사용하였다.

### LPS에 의한 iNOS와 COX-2 효소 발현의 측정

RAW 세포를 60 mm tissue culture dish에 4×10<sup>6</sup> cells/well로 하루동안 배양하여 well에 부착시킨 후 LPS (0.1 μg/ml)와 각 농도의 asiaticoside를 8 시간 동안 처리하였다. 그 후 lysis buffer[50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 1 mM diethyldithiocarbamic acid(DDTC)-sodium, 10 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1% Tween-20, 1% Triton X-100, 10 μM leupeptin]를 4°C에서 20 분 동안 가하여 세포를 lysis 시켰다. 이 세포를 dish로부터 긁어내어 sonication을 한 후 10,000 g, 4°C에서 20 분간 원심분리하여 protein을 얻었다. Protein의 농도는 Bio-Rad protein 시약(BioRad Laboratories, Hercules, CA)을 이용하여 Bradford 방법으로 정량하였다. 얻어낸 protein은 8% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 시킨 후 PVDF membrane으로 transblotting 하였다. iNOS와 COX-2에 대한 polyclonal antibodies(Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA)를 membrane에 처리한 후 horseradish peroxidase가 부착되어 있는 anti-rabbit IgG(Amersham Corp., Arlington Heights, IL)를 가하여 ECL detection system(Amersham)을 이용하여 분석하였다.

### PGE<sub>2</sub> 생성 억제 측정

PGE<sub>2</sub>의 생성에 미치는 asiaticoside의 영향을 측정하기 위해서, 24-well plate에 5×10<sup>5</sup> cells/well로 하루 동안 배양한 후, LPS 0.1 μg/ml 과 각 농도의 asiaticoside를 8시간 동안 처리하였다. 이로부터 얻은 media에서 enzyme immunoassay(EIA)를 사용하여 PGE<sub>2</sub>의 양을 측정함으로써 PGE<sub>2</sub>의 accumulation 정도를 파악하였다. 또한, PGE<sub>2</sub>의 *de novo* synthesis에 주는 영향을 측정하기 위한 실험에서는 LPS 0.1 μg/ml 과 각 농도의 asiaticoside를 8 시간 동안 처리한 후, media를 제거하고 arachidonic

acid 30  $\mu\text{M}$ 를 15 분간 가하였다. 이로부터 얻은 media 를 EIA를 사용하여  $\text{PGE}_2$ 의 *de novo* 생성을 측정하였다.

### 통계 처리

iNOS 및 COX-2에 대한 western blotting data는 3 회 이상 실험하여 동일한 경향이 나오는 것을 확인하고 대표적인 그림을 실었다.  $\text{PGE}_2$  data는 3 회 이상 실험한 후, 값을  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ 로 표시하였다. 각 군 간의 차이는 one-way ANOVA test를 실시한 후, Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성 정도를 판정하였다.

## 결 과

창상치료제 후보물질인 asiaticoside를 대상으로 염증 억제 효과를 연구하였다. 염증세포인 macrophage cell line을 이용하여 endotoxin(LPS)에 의하여 유도되는 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 발현 억제 여부를 western blotting으로 확인하였다(Fig. 1). 0.1  $\mu\text{g/ml}$  LPS 처리에 따라 85 kDa 근처에 iNOS의 발현이 현저히 증가됨을 알 수 있다. 여기에 asiaticoside 5, 10, 50, 100  $\mu\text{M}$ 를 처리한 결과 5, 10  $\mu\text{M}$ 에서는 억제효과가 관찰되지 않았으나 50, 100  $\mu\text{M}$ 에서는 LPS에 의하여 유도된 iNOS의 발현을 거의 완전히 억제시킴을 확인하였다.

iNOS와 더불어 염증반응에서 주요한 역할을 하는 cyclooxygenase-2(COX-2) 및 interleukin-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )의 gene expression에 대한 효과를 연구하였다(Fig. 2). iNOS와 마찬가지로 asiaticoside 5, 10  $\mu\text{M}$ 에서는 COX-2 발현 억제효과가 관찰되지 않았으나 50, 100  $\mu\text{M}$ 에서는 농도 의존적으로 억제효과가 관찰되었다. 또한 LPS 처리에 의하여 염증반응을 매개하는 cytokine인 IL-1 $\alpha$ 는 발현이 현저히 증가하였으며, asiaticoside를 처리한 경우, 50  $\mu\text{M}$ 부터 IL-1 $\alpha$ 의 발현을 억제하기 시작하여 100  $\mu\text{M}$ 에서는 거의 완전히 억제함을 확인하였다.

Asiaticoside가 염증세포에서 생성되는 COX products의 생성을 실제로 억제하는지를 확인하기 위하여 enzyme immunoassay(EIA)를 실시하여 COX-2의 주요 대사체인  $\text{PGE}_2$ 의 생성량을 측정하였다(Fig. 3). LPS와 asiaticoside를 8 시간 동안 처리하여 media에 축적된  $\text{PGE}_2$ 의 양을 측정된 결과, asiaticoside의 농도에 의존적으로  $\text{PGE}_2$ 의 accumulation 양이 감소하는 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, asiaticoside는  $\text{PGE}_2$ 의 accumulation 뿐만 아니라, exogenous arachidonic acid에 의한  $\text{PGE}_2$ 의 *de novo* synthesis도 농도 의존적으로 억제하는 경향성을 나타내었다(data not shown). 이러한  $\text{PGE}_2$  생성량의 감소 효과는 western blotting 결과와 함께 염증 반

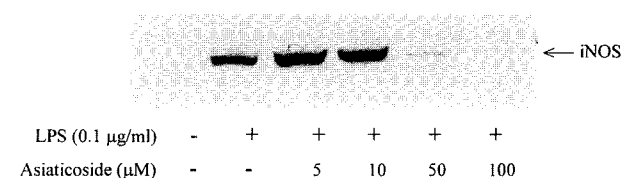
응을 실제적으로 억제할 수 있는 정도를 반영한다.

## 고 찰

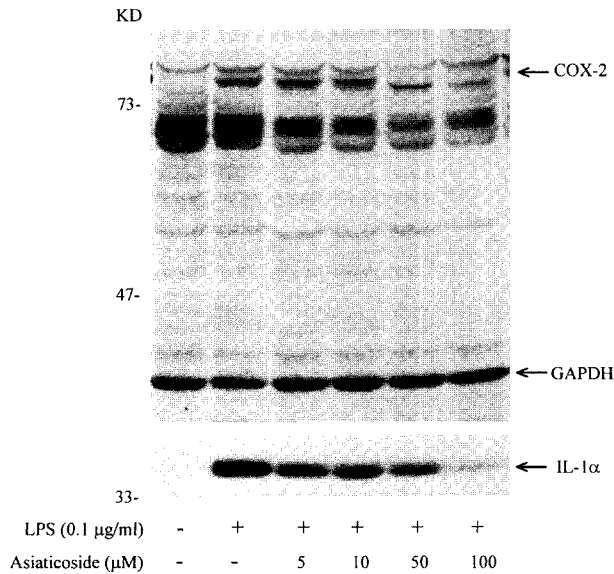
본 연구에서는 asiaticoside 유도체가 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의한 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2), interleukin-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ ) 발현을 억제함을 확인하였고, 또한, 실제적으로 COX-2의 주요 대사체인  $\text{PGE}_2$ 의 생성을 감소시키는 경향이 있음을 확인하였다.

Asiaticoside는 RAW 세포에서 LPS에 의해 증가된  $\text{PGE}_2$ 의 생성을 고농도에서 감소시키는 경향을 나타냈다. 이러한 효과는 western blotting 결과에서 확인된 바와 같이 COX-2의 발현을 억제함과 함께, 이 물질이 COX-2의 활성을 억제할 수 있음을 시사한다. 일반적으로 prostaglandin은 염증반응의 중요 매개체이며, 염증성 질환에서는 이 대부분이 발현이 증가되어 있는 COX-2에 의해 생성된다 할 수 있다(Reddy 등, 1994). 현재까지 염증성 질환의 치료를 위해 수많은 COX-2 저해제에 대한 연구가 이루어져 Celebrex나 Vioxx와 같은 선택적 COX-2 저해제가 임상적으로 사용단계에 있다. 뿐만 아니라 *in vitro*에서 선택적으로 COX-2를 저해한 NS-398, L-745337, SC-58125 등이 carrageenin으로 유도한 air pouch, edema 모델에서 항염증 작용을 나타냄이 보고된 바 있다(Futaki 등, 1993; Seibert 등, 1994). 본 연구에서 asiaticoside 유도체는 직접적으로 COX-2 발현을 억제하였으며, 또한 COX-2 활성을 억제할 가능성이 있음이 확인되었다. Asiaticoside의 COX-2 및 iNOS 직접적인 활성 억제 효과에 관하여 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다. 또한 본 연구에서 사용된 asiaticoside 유도체의 iNOS 및 COX-2 발현을 억제하는 농도가 창상 치료효과를 보이는 농도보다는 다소 높기 때문에 새로운 유도체에 대한 항염증 효능 검색이 필요하다고 사료된다.

Asiaticoside는 LPS에 의하여 유도된 iNOS 및 COX-2의



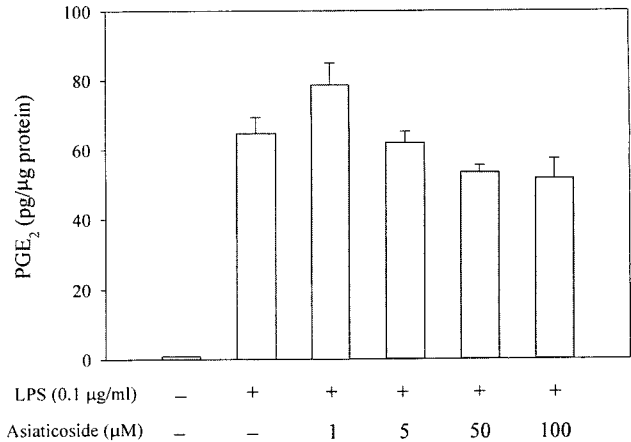
**Fig. 1.** Effect of asiaticoside on expression of inducible nitric oxide synthase. After RAW 264.7 cells were treated with LPS (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) and various concentrations of asiaticoside for 8 hr, western blotting analysis for iNOS were performed as described in Methods section. Data represent of 3 independent experiments.



**Fig. 2.** Effect of asiaticoside on expression of cyclooxygenase-2 and interleukin-1 $\alpha$ . After RAW 264.7 cells were treated with LPS (0.1  $\mu$ g/ml) and various concentrations of asiaticoside for 8 hr, western blotting analysis for COX-2 and IL-1 $\alpha$  were performed as described in Methods section. Data represent of 3 independent experiments.

증가된 발현을 유사한 농도에서 억제시켰다(Fig. 1 & Fig. 2). 따라서 공통된 mechanism을 통해 이루어진 iNOS와 COX-2의 protein 발현을 asiaticoside가 억제할 가능성이 있다. 일반적으로 iNOS와 COX-2의 발현에는 공통적으로 NF- $\kappa$ B가 중요하다는 사실이 잘 알려져 있으므로 asiaticoside가 NF- $\kappa$ B 경로를 차단시킴으로서 이들의 발현을 억제하였을 수 있다. 이외에도, LPS로 자극시킨 murine macrophage에서 MAP kinase를 경유한 mechanism은 COX-2의 유도에는 관여하지만, iNOS의 유도에는 관여하지 않는다는 사실이 보고된 바 있다(Paul 등, 1999). 또한 iNOS와 COX-2 유전자의 promoter 부분에는 여러 가지 transcription factor들이 작용할 수 있는 response element들이 존재하는데, iNOS의 경우에는 NF- $\kappa$ B 외에 AP-1, ISREs/IREs, GAS, NF-IL-6, Oct 등이(Weisz 등, 1996), COX-2의 경우에는 CREB, C/EBP 등이(Tazawa 등, 1994; Xie 등, 1994), 보고되어 있으므로, asiaticoside와 신호 전달 경로에 미치는 영향에 대한 더 많은 연구가 필요하다.

이상의 내용을 요약하면 asiaticoside는 염증세포 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의하여 유도된 85 kDa 근처에 iNOS의 발현을 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다. 또한 염증반응에서 또 다른 주요한 factors 인 COX-2 및 IL-1 $\alpha$ 의 gene expression에 대하여도 iNOS와 유사하게 농도 의존적으로 억제함이 확인되었으며 이는 염증 억제



**Fig. 3.** Effects of asiaticoside on PGE<sub>2</sub> accumulation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. After RAW 264.7 cells were treated with LPS (0.1  $\mu$ g/ml) and various concentrations of asiaticoside for 8 hr, PGE<sub>2</sub> accumulation was determined as described in Methods section. Data represent means $\pm$ SEM of 3 independent experiments.

에 효과가 있음을 제시하고 있다. 실제로 asiaticoside가 염증세포에서 생성하는 COX products를 억제하는지를 확인하기 위하여 PGE<sub>2</sub>의 생성 정도를 enzyme immunoassay(EIA)를 이용하여 측정된 결과 고농도에서 PGE<sub>2</sub> 생성을 억제시키는 경향을 나타냈다.

## 참고문헌

- Bonte, F., Dumas, M., Chaudagne, C. and Meybeck, A. (1994): Influence of asiatic acid, madecassic acid, and asiaticoside on hyman collagen I synthesis, *Planta Med.*, **60**, 133-135.
- Fu, J.Y., Masferrer, J.L., Seibert, K., Raz, A. and Needleman, P. (1990): The induction and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human monocytes, *J. Biol. Chem.*, **265**, 16737-16740.
- Futaki, N., Arai, I., Hamasaka, Y., Takahashi, S., Higuchi, S. and Otomo, S. (1993): Selective inhibition of NS-398 on prostanoid production in inflamed tissue in rat carrageenan-air-pouch inflammation, *J. Pharm. Pharmacol.*, **45**, 753-755.
- Herschman, H.R. (1996): Prostaglandin synthase 2, *Biochim. Biophys. Acta*, **1299**, 125-140.
- Higgs, G.A., Moncada, S. and Vane, J.R. (1984): Eicosanoids in inflammation, *Ann. Clin. Res.*, **16**, 287-299.
- Huang, Y.C., Guh, J.H., Cheng, Z.J., Chang, Y.L., Hwang, T.L., Liao, C.H., Tzeng, C.C. and Teng, C.M. (2001): Inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in macrophages by 7HQ derivatives: involvement of I $\kappa$ B $\alpha$  stabilization, *Eur. J. Pharmacol.*, **418**, 133-139.
- Liang, Y.C., Huang, Y.T., Tsai, S.H., Lin-Shiau, S.Y., Chen, C.F. and Lin, J.K. (1999): Suppression of inducible cy-

- cloxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages, *Carcinogenesis*, **20**, 1945-1952.
- Maquart, F.V., Bellon, G., Gillery, P., Wegrowski, Y. and Borel, J.P. (1990): Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella Asiatica*, *Connective Tissue Res.*, **24**, 107-120.
- Nathan, C.F. (1987): Secretory products of macrophages, *J. Clin. Invest.*, **79**, 319-326.
- Ogden, J.E. and Moore, P.K. (1995): Inhibition of nitric oxide synthase—potential for a novel class of therapeutic agent?, *Trends Biotechnol.*, **13**, 70-78.
- Paul, A., Cuenda, A., Bryant, C.E., Murray, J., Chilvers, E.R., Cohen, P., Gould, G.W. and Plevin, R. (1999): Involvement of mitogen-activated protein kinase homologues in the regulation of lipopolysaccharide-mediated induction of cyclooxygenase-2 but not nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages, *Cell Signal.*, **11**, 491-497.
- Reddy, S.T. and Herschman, H.R. (1994): Ligand-induced prostaglandin synthesis requires expression of the TIS10/PGS-2 prostaglandin synthase gene in murine fibroblasts and macrophages, *J. Biol. Chem.*, **269**, 15473-15480.
- Salvemini, D., Korb, R., Anggard, E. and Vane, J. (1990): Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 6007
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L. and Isakson, P. (1994): Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 12013-12017.
- Suh, N., Honda, T., Finlay, H.J., Barchowsky, A., Williams, C., Benoit, N.E., Xie, Q.W., Nathan, C., Gribble, G.W. and Sporn, M.B. (1998): Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages, *Cancer Res.*, **58**, 717-723.
- Tazawa, R., Xu, X.M., Wu, K.K. and Wang, L.H. (1994): Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**, 190-199.
- Trowbridge, H.O. and Emling, R.C. (1997): In: *Inflammation: a review of the process*, 5 th Ed. Quintessence Pub. Co., Chicago.
- Weisz, A., Cicatiello, L. and Esumi, H. (1996): Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine, *Biochem. J.*, **316 (Pt 1)**, 209-215.
- Xie, W., Fletcher, B.S., Andersen, R.D. and Herschman, H.R. (1994): v-src induction of the TIS10/PGS2 prostaglandin synthase gene is mediated by an ATF/CRE transcription response element, *Mol. Cell Biol.*, **14**, 6531-6539.
- Zamora, R., Vodovotz, Y. and Billiar, T.R. (2000): Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases, *Mol. Med.*, **6**, 347-373.