

염증성 종양괴사인자에서 유도된 혈관내피세포의 adhesion molecules 상승조절을 억제하는 flavonoids

김민정
식품기능연구본부

1. 서론

채소와 과일에서 수많이 발견되는 flavonoids는 proanthocyanidins과 phenolic acid 등과 마찬가지로 식물체의 polyphenolics의 섭취의 증가로 인하여 심장혈관 질환의 발병률을 낮추는 역할연구가 보고되고 있다. 일본여성에 있어 flavonols, flavones과 isoflavone의 1일 섭취량과 혈중 LDL의 농도는 반비례라고 하였다. flavonoids와 그와 연관된 polyphenolic은 라디칼 소거활성과 LDL의 산화를 낮추는 역할을 한다. 포도주의 flavonoids는 동맥경화증 장애, paraoxonase 증가로 질병에서 나타나는 산화된 LDL의 축적을 저해함으로써 죽상경화증을 예방하는 효과를 나타내었고 apolipoprotein E가 결핍된 생쥐들의 아테롬 발생(atherogenic)을 없애주었다. 이러한 발견들은 flavonoids가 죽상경화증 초기 발현을 예방하는데 기여하는 것을 증명하고 있다.

flavonoids는 cell adhesion molecules (CAM)과 matrix protease을 억제시키는 항염증 물질로서

보고되고 있다. CAM의 발현은 염증성의 환경에서 일반적으로 나타나고 죽상경화 과정의 초기 단계에 발생한다. Vascular cell molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)과 endothelial-leukocyte adhesion molecular-1 (E-selectin) 등의 CAM은 토끼와 생쥐에서 뿐만 아니라 사람의 관상동맥과 죽상경화성 병변부위에서 발견되며 신생혈관 및 염증성 침범 부위의 죽상경화성 플라그 형성에 관여하는 것으로 보고되어 왔다. DNA binding 연구들은 만성염증성 질환의 중요한 전사 인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)의 필요성을 입증하고 있다. Hydroxyflavones과 flavonols은 NF- κ B 전사적인 활성작용을 통하여 혈관내피세포에서 염증성 cytokine에 의해 유도된 ICAM-1, VCAM-1과 E-selectin의 발현을 억제한다. Apigenin의 CAM 발현에서 가역적인 효과를 나타내었고 유전자전사단계에서 CAM의 up-regulation을 저해하였다.

본 연구는 CAM 발현에 대한 다양한 형태의 flavonoids 항염증성의 활성효과를 측정하였고 혈

관내피세포에서 CAM 발현의 down-regulation의 기작에 flavonoids가 어떠한 효과를 보이는지를 조사하였다. TNF- α 에 의하여 유도된 CAM 발현을 억제효과와 관련한 flavonoids 효과를 조사하기 위하여 flavanols, flavonols, flavanones과 flavones의 4가지 구조적으로 서로 다른 소그룹의 flavonoids를 실험에 사용하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

Polyphenolic flavonoids (flavanols인 (-)epigallocatechin gallate와 (+)catechin, flavonols인 quercetin과 myricetin, flavanones인 naringenin, naringin, hesperetin과 hesperidin 그리고 flavones인 luteolin과 apigenin), M199배지, RPMI배지와 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)은 Sigma Chemical 회사에서 구입하였다. Collagenase 효소는 Worthington Biochemicals로부터 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA, bovine brain extract, human epidermal growth factor 그리고 hydrocortisone은 Clonetics에서 구입하였다. Human monocytic leukemic cell인 THP-1은 American Type Culture Collection으로부터 제공받았다. TNF- α 는 Roche Molecular Biochemicals 회사에서 구입되었다. VCAM-1, ICAM-1, β -actin과 NF- κ B에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnologies으로부터 구입하였다. E-selectin 항체는 R&D Systems에서 얻었다. Horseradish peroxidase로 결합된 goat anti-rabbit IgG과 rabbit anti-goat IgG은 Jackson Immuno Research Laboratories로부터 구입하였다. Fluorescein isothiocyanate로 결합된 goat anti-mouse IgG는 Sigma Chemical 회사로부터 구입되었

다. Reverse transcriptase, Taq DNA polymerase, T4 polynucleotide kinase과 NF- κ B electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 위한 시약 kit는 Promega 회사에서 구입하였다. 사용된 모든 flavonoids는 세포배양실험을 위하여 dimethyl sulfoxid (DMSO)에 녹여서 사용하였는데, 세포배양에 사용된 DMSO의 최종농도는 5 g/L이하였다.

2.2. 세포배양

혈관내피세포 (HUVEC)는 collagenase 효소를 이용하여 분리하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 10% FBS과 2 mmol/L glutamine, 100,000 U/L penicillin, 100 mg/L streptomycin, 0.9g/L bovine brain extract, 0.75 g/L human epidermal growth factor 그리고 0.075 g/L hydrocortisone이 첨가되어 있는 25 mmol/L HEPES M199배지에서 배양하였다. 내피세포의 진위 판별은 형광물질로 표지된 아세틸화된 LDL의 uptake 실험을 통하여 이루어졌다.

혈관내피세포(HUVEC)는 모든 실험에서 90~95% 수준으로 도달되었다. 최근의 연구에서 HUVEC에 TNF- α 를 처리하면 시간에 따라 VCAM-1이 현저하게 증가하고 TNF- α 에 의해 활성화된 후 4시간 만에 발현이 현저하게 증가하였고 6시간에서 정점을 이룬 이후에 감소하기 시작했다. 이정의 24시간의 모든 flavonoids의 최대 비독성 농도는 50 μ mol/L이었다. 본 연구에서는 세포들을 50 μ mol/L 이하의 flavonoids로 30분간 전처리 하였고, 6시간 동안 10 μ g/L TNF- α 에 노출시켰다.

2.3. Cell adhesion 실험

혈관내피세포는 10% FBS와 25 mmol/L HEPES-buffered M199가 포함되어 있는 4-well glass chamber slide에서 6.0×10^4 농도로 배양하였다.

THP-1 세포는 culture flask에서 10% FBS가 포함되어 있는 RPMI-1640 배지에서 배양되었다. flavonoids가 1~50 $\mu\text{mol/L}$ 이 첨가된 M199배지에서 혈관내피세포를 30분간 전처리하여 10 $\mu\text{g/L}$ TNF- α 로 6시간 활성화시켰다. RPMI-1640 배지에서 배양된 THP-1를 5 $\mu\text{mol/L}$ calcein AM (Molecular Probes, Inc.)으로 30분간 염색시키고 혈관내피세포와 동시 배양시켜서 세척한 다음, SPOT II 디지털 카메라가 부착된 형광현미경상에서 486 nm excitation, 538 nm emission 파장으로 THP-1 단핵구의 혈관내피세포에 부착정도를 Fluoroskan ELISA plate reader (Lab systes Oy)로 측정하였다.

2.4. Western blot 분석

세포 extracts의 단백질은 8% SDS-PAGE gel 상에서 전기영동 시켰고, nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 50 g/L nonfat milk가 포함된 Tris-buffered saline-Tween 20 buffer 안에 membrane를 침출시켰다. Membrane은 일차항체로 polyclonal rabbit anti-human VCAM-1(1:1000), polyclonal rabbit anti-human ICAM-1 (1:1000), 또 polyclonal goat anti-human E-selectin (1:500)과 함께 배양한 후에, horseradish peroxidase로 결합된 goat anti-rabbit IgG antibody (1:7500), rabbit anti-goat IgG antibody를 1:500배로 희석하여 이차항체로 배양하였다. 단백질은 Supersignal West Pico chemiluminescence (Pierce Biotech)로 검출하여 Konica X-ray 필름으로 촬영하였다. Polyclonal rabbit anti-human β -actin antibody를 1000배로 희석하여 배양하여 control로 사용하였다.

2.5. RT-PCR 분석

배양실험 후에 혈관내피세포의 RNA를 상업용 Trizol 시약 (Gibco BRL)을 제조회사의 사용법에 따라 사용하여 추출하였다. 분리 추출된 RNA (5 μg)은 10,000 U reverse transcriptase와 500 g/L oligo-(dT)₁₅ primer (Bioneer)로 역전사 과정을 실시하였다. 각 CAMs의 mRNA를 증폭시키기 위하여 적절한 primers를 사용하였는데,

VCAM-1 primer는

5'-ATGCCTGGGAAGATGGTCGTGA-3'와 reverse primer

5'-TGGAGCTGGTAGACCCTCGCTG-3'이었고,

ICAM-1 primer는

5'-GGTGACGCTGAATGGGGTTCC-3'와 reverse primer

5'-GTCCTCATGGTGGGGCTATGACTC-3', E-selectin primer는

5'-ATCATCCTGCAACTTCACC-3'와 reverse primer는

5'-ACACCTCACCAAACCCTTC-3'이었다. 그리고 β -actin의 primer는 5'-GACTACCTCATGAAGAATC-3'와 reverse primer는 5'-GATCCACATCTGCTGGAA-3'이었다. PCR 과정은 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)의 50 μL , 25 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L dNTP, Taq DNA polymerase의 100 U 그리고 각각의 primer (VCAM-1, ICAM-1, E-selectin과 β -actin) 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 를 70°C에서 15분간 가열하므로써 중지시켰다. 증폭된 PCR 산물 (5 μL)은 1% agarose-formaldehyde gel 상에서 전기영동을 하고 thermocycling 한 후에 gel 상의 bands는 UV transilluminator (Amershan Pharmacia Biotech)로 가시화 되었고 photographs하였다. Primer를 첨가하지 않은 negative control sample로 RT-PCR 분석을 실시하여 오염상태를 정기적으로 검사하였다.

2.6. NF- κ B 단백질 localization

4-well glass chamber slide에서 증식한 혈관내피세포는 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 10% normal goat serum에서 1시간동안 배양하였다. 세포는 4% ice-cold formaldehyde에서 30분간 고정하였다. 고정된 세포들은 Tris-buffered saline (TBS)로 세척한 후, rabbit polyclonal anti-human NF- κ B (1:50)가 첨가 되었고 세포는 4°C에서 하룻밤 배양되었다. 다시 세포를 TBS로 세척하고 goat anti-rabbit IgG (1:200)로 배양하였다. Olympus BX50 형광현미경을 사용하여 촬영하였다.

2.7. Nuclear extract preparation

NF- κ B의 DNA binding activity를 분석하기 위해 핵단백질 추출액을 HUVEC으로부터 세척제 용해과정을 통해 만들었다. 세포는 20 mmol/L HEPES, pH 7.9, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L NaCl, 1 mmol/L dithiothreitol, 0.01 μ g/L leupeptin과 200 U aprotinin의 buffer에서 용해되었고 얼음에서 10분간 배양되었다. 단백질은 핵 pallet로부터 420 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L HEPES (pH 7.9), 25% glycerol, 1 mmol/L dithiothreitol, 0.4 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.01 μ g/L leupeptin과 200 U aprotinin의 high-salt buffer에서 배양시켜 추출하였다. 핵 파편들은 원심분리 (400 \times g, 3분)에 의해 침전시켰고, 상등액을 -70°C에서 보관하였다. NF- κ B의 location에 대한 판단을 하기 위해 anti-human NF- κ B 1차항체 (1:1000) 사용하여 nuclear protein extracts를 가지고 western blotting을 실행하였다. Western blot 분석법은 위에서 언급하였다.

2.8. EMSA

NF- κ B에 대한 binding site의 염기서열을 가지

고 있는 이중가닥 oligonucleotide는 eletrophoretic mobility shift assay (EMSA) probe로 사용되었다. NF- κ B probe는 [γ - 32 P] ATP (Amersham Pharmacia Biotech)와 T4 polynucleotide kinase에 30 μ Ci가 표지되었다. DNA결합반응은 250 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, 2.5 mmol/L EDTA, 2.5 mmol/L dithiothreitol, 50 mmol/L Tri-HCl (pH 7.5), 25% glycerol, 0.25 g/L poly(dI-dC)·poly(dI-dC), 32 P가 표지된 특이적 oligonucleotide probe, 4 μ g nuclear extract를 포함한 25 μ L reaction mixture에서 수행되었다. Oligonucleotide와 DNA복합체는 0.5XTBE buffer와 5% polyacrylamide gel에서 3시간 동안 전기영동을 통해 free oligonucleotide probe로부터 분리시켰다. Gel은 건조하여 Konica X-필름으로 촬영하였다.

2.9. 통계처리

실험 data는 means \pm SEM으로 표시하였으며, one-way ANOVA로 검증하였고 유의적인 차이를 보이는 그룹에 대해서는 Tukey's으로 검증하였다. p<0.05에서 그룹간의 유의적인 차이를 비교하였다.

3. 결론

<TNF- α 로 활성화된 혈관내피세포에 THP-1단핵구의 adhesion>

실험 결과 flavonoids에 의한 CAM의 발현 억제가 관찰되었고, 이러한 결과는 flavonoids 처리가 TNF- α 에 의하여 유도된 혈관내피세포의 단핵구 결집을 억제하는 것으로 판단되었다. Calcein-AM으로 염색한 기술을 사용한 *in vitro* 상에 혈관내피세포 (HUVEC)의 adhesion assay는 이 가설을 뒷받침 해준다. TNF- α 를 처리하지 않는 혈관내피세포는 소수의 단핵구의 adhesion이 일어났다(Fig. 1). TNF- α 를 처리한 혈관내피세포는 THP-1 단핵구 adhesion이 TNF- α 를 처리하지 않는 혈관내피세

포에 비하여 현저하게 증가하였다. 한편, TNF- α 를 처리한 혈관내피세포에 luteolin 또는 apigenin 50 μ mol/L을 첨가하였을 때, 단핵구 adhesion을 완전히 억제시켰다. TNF- α 를 처리한 세포에 quercetin을 첨가시 THP-1 단핵구 adhesion이 quercetin에서도 상당한 억제 효과가 나타났다. 반면에 flavanol인 catechin은 이러한 억제효과가 전혀 보이지 않았다(Fig. 1). Flavanone과 flavanone 배당체는 50 μ mol/L 첨가시 TNF- α 에 활성화된 혈관내피세포에서 단핵구 adhesion 억제가 없었다(Fig. 2A, 2B).

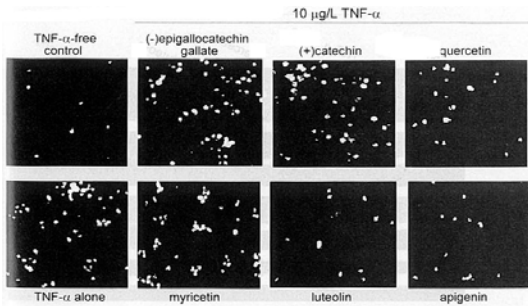


Fig. 1. Inhibition by flavonoids of calcein-AM-labeled THP-1 monocyte adhesion to TNF- α -activated HUVEC. HUVEC were pretreated with 50 μ mol/L of each tested flavonoid and activated with 10 μ g/L TNF- α . Endothelial cells were cocultured with THP-1 monocytes. Microphotographs (4 independent experiments) were obtained using fluorescence microscopy. Original magnification, 200X.

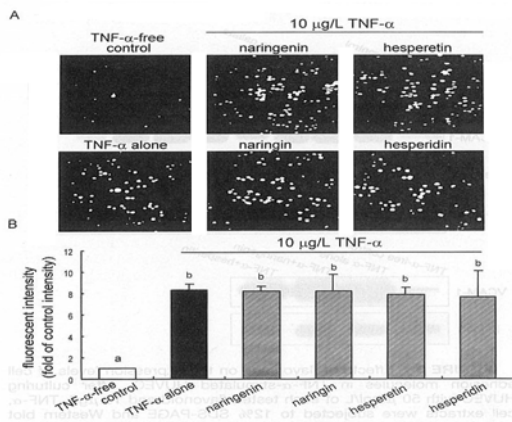


Fig. 2. Effects of hesperetin, naringenin, and their glycosides on THP-1 monocyte adhesion to TNF- α -activated HUVEC. HUVEC were pretreated with 50 μ mol/L flavanone, activated with 10 μ g/L TNF- α , and cocultured with calcein-AM-labeled THP-1. (A) Microphotographs (4 independent experiments) were obtained using fluorescence microscopy. Original magnification, 200X. (B) Values are means \pm SEM, $n = 4$, representing quantitative fluorescence results obtained from an ELISA plate reader. Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

3.1. TNF- α 에 의한 CAM 단백질 발현

TNF- α 로 활성화된 VCAM-1, ICAM-1과 E-selectin에 대한 flavonoids의 억제효과를 western blot 분석을 통해 알아보았다(Fig. 3). TNF- α 로 활성화되지 않은 정상세포는 CAMs 단백질 발현이 아주 미약하게 나타났다. 이들 CAMs 단백질 발현을 정상세포와 TNF- α 를 처리한 세포를 비교시, TNF- α 를 처리하였을 때 CAM 단백질발현은 20~25배 이상 증가되었다. TNF- α 로 처리된 세포를 50 μ mol/L flavonoids를 첨가한 luteolin과 apigenin는 VCAM-1, ICAM-1과 E-selectin 발현을 완전히 억제 시킴을 보여주었다(Fig. 3A). Quercetin을 첨가한 세포는 이들 CAM 단백질 발현을 어느 정도 억제 시킨 반면 flavanol인 catechin은 거의 억제효과를 나타나지 못했다. Flavanones인 naringin과 hesperin의 경우에서도 혈관내피세포의 VCAM-1 단백질 발현은 아주 적은 수준으로 감소되었다(Fig. 3). 이에 따르면 western bolt data(Fig. 3)는 *in vitro* 상의 혈관내피세포에 THP-1의 adhesion 결과를 뒷받침 해주었다(Fig. 1, 2). Naringenin과 hesperetin 그리고 rutinose가 붙어 있지 않은 flavanone인 naringin과 hesperidin 50 μ mol/L을 첨가하여 VCAM-1 단백질 발현량을 시도해보았다(Fig. 3B). Rutinose 존재는 VCAM-1 발현에 대한 영향을 크게 나타나지 못하였다.

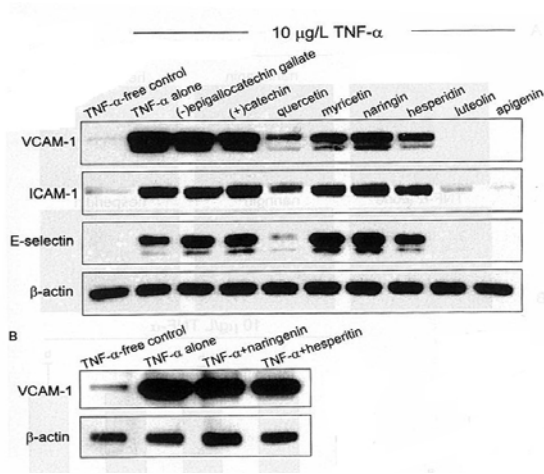


Fig. 3. Effects of flavonoids on the expression levels of cell adhesion molecules in TNF- α -stimulated HUVEC. After culturing HUVEC with 50 μ mol/L of each tested flavonoid and 10 μ g/L TNF- α , cell extracts were subjected to 12% SDS-PAGE and Western blot analysis with the respective primary antibody against VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin (6 separate experiments). β -Actin protein was used as an internal control.

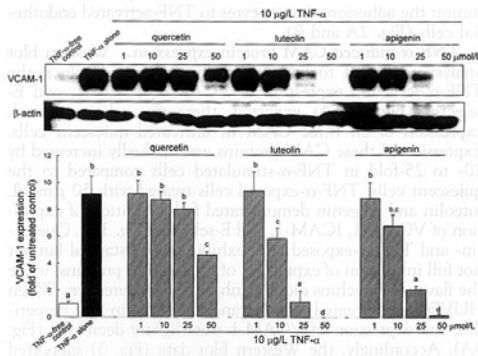


Fig. 4. Inhibitory dose responses of quercetin and flavones to VCAM-1 induction in TNF- α -stimulated HUVEC. After culturing HUVEC with 1-50 μ mol/L of each tested flavonoid and 10 μ g/L TNF- α , cell extracts were subjected to 12% SDS-PAGE and Western blot analysis with VCAM-1 primary antibody (3 separate experiments). β -Actin protein was used as an internal control. Values are means \pm SEM, $n = 3$, representing quantitative densitometric results. Means without a common letter differ, $P < 0.05$

Luteolin과 apigenin을 1~50 μ mol/L 농도로 첨가하였을 때, >10 μ mol/L에서 TNF- α 에 유도된 VCAM-1 를 감소하였다(Fig. 4). 반면에 25 μ mol/L 이상에서 quercetin도 TNF- α 에 유도된 VCAM-1 발현 억제효과를 대체적으로 보였다. Flavones과 quercetin은 10~25 μ mol/L 첨가한 실험군은 VCAM-1 발현을 완전히 억제한 효과를 나타냈다. 일관된 결과로 25 μ mol/L 이상의 luteolin 또는 apigenin 과 함께 TNF- α 로 처리한 세포는 TNF- α 로 유도된 THP-1 adhesion이 현저하게 감소되었다(Fig. 5).

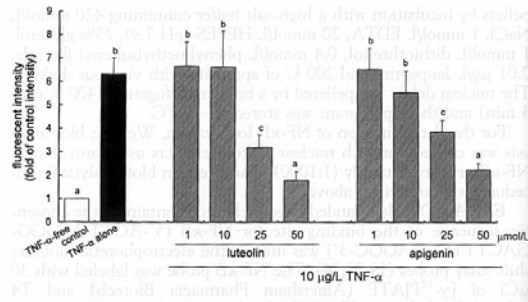


Fig. 5. Inhibitory dose responses of luteolin and apigenin to THP-1 monocyte adhesion in TNF- α -exposed HUVEC. HUVEC were pretreated with 10 μ mol/L luteolin and apigenin and activated with 10 μ g/L TNF- α , and cells were cocultured with calcein-AM-labeled THP-1 monocytes. Values are means \pm SEM, $n = 5$, representing fluorescent adhesion data measured by an ELISA plate reader. Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

3.2. TNF- α 에 활성화된 CAM 단백질 전사 작용

정상 혈관내피세포는 CAMs 단백질의 mRNA 발현에 대한 신호가 아주 미약하였다(Fig. 6). 대조적으로 TNF- α 에 의하여 활성화된 혈관내피세포에서는 mRNA 발현이 급격하게 증가하였다. 그러나 RT-PCR data는 luteolin과 apigenin이 CAMs

단백질의 mRNA 발현에 대해 낮지만 억제효과를 발견할 수 있었다. 그리고 quercetin은 TNF- α 에 의한 VCAM-1, ICAM-1과 E-selectin의 mRNA가 약하게 억제된다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). Quercetin과 flavones로 인한 CAM 단백질 발현에 대한 Fig. 3에서와 같이 뚜렷한 효과를 보여주지 못하였다. 이러한 결과는 flavonoids들은 CAM 발현 억제효과를 유전자 전사단계에서 직접 작용하는 것을 암시하고 있다.

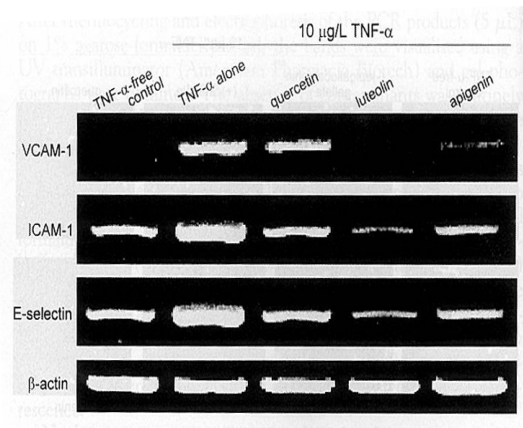


Fig. 6. Steady-state mRNA transcriptional levels of VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in flavonoid-treated and TNF- α -stimulated HUVEC as demonstrated by RT-PCR. HUVEC were incubated with 50 μ mol/L quercetin, luteolin, or apigenin and exposed to 10 μ g/L TNF- α . β -Actin was used as an internal control for coamplification with VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin (3 separate experiments).

3.3. 세포의 localization과 NF- κ B의 전이활성

본 실험에서는 quercetin, luteolin과 apigenin이 전사인자의 전이활성을 방해함으로써 TNF- α 에 유도되는 CAM 발현에 대한 자극을 억제하는지를 조사하였다. 10 μ g/L TNF- α 를 첨가한 후에 핵의

NF- κ B p65는 증가되었다(Fig. 7A). TNF- α 를 처리한 세포에 50 μ mol/L quercetin, luteolin과 apigenin을 첨가하였을 때, nuclear에 p65 단백질의 양이 현저하게 감소하였다. 대조적으로 cytosolic extract에서 NF- κ B p65 단백질은 flavonoids를 첨가하였을 시 증가하였다. HUVEC에 NF- κ B p65의 intracellular localization은 특이적인 NF- κ B p65 항체를 사용하여 형광현미경에 의해 측정하였다(Fig. 7B). 세포질의 면역형광염색은 정상세포에서는 나타난 반면, TNF- α 만 처리한 세포에서는 핵에서도 면역형광염색이 관찰되었다. 이는 단일 세포내에서 활성화된 NF- κ B p65의 nuclear localization을 의미한다. 그러나 flavonoids와 TNF- α 로 처리한 세포는 핵에서 NF- κ B p65의 염색수준은 감소하는 것으로 나타내었다.

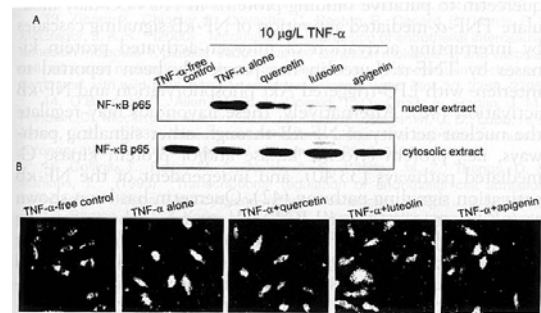


Fig. 7. Effects of quercetin, luteolin, and apigenin on translocation of NF- κ B p65 in TNF- α -treated HUVEC. HUVEC extracts pretreated with 50 μ mol/L quercetin or flavone and exposed to 10 μ g/L TNF- α were electrophoresed on 8% SDS-PAGE gel, followed by Western blot analysis with a primary antibody against human NF- κ B p65(4independent experiments) (A). NF- κ B localization was visualized by binding with a fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary anti-body. (B) Microscopic images were obtained using fluorescence microscopy (3 independent experiments). Original magnification, 200X.

Quercetin, luteolin과 apigenin의 첨가 유무에 따라 TNF- α 가 처리된 HUVEC의 nuclear extract에서 전사조절 인자인 NF- κ B의 DNA binding activity를 조사하기위해 EMSA (Electrophoretic mobility shift assays) 방법을 수행하였다. TNF- α 가 처리된 세포의 nuclear extract에서 NF- κ B binding activity는 유의적인 증가를 나타내었고 (Fig. 8), 이는 protein-NF- κ B DNA complex가 TNF- α 에 의해 활성화 된다는 것을 보여준다. NF- κ B DNA binding activity의 특이성은 표지되지 않는(unlabeled) oligonucleotide의 첨가에 의해 측정되었다(Fig. 8, line 3). 활성화된 NF- κ B 결합은 quercetin, luteolin과 apigenin의 처리에 의해 감소하였다. 이것은 이러한 flavonoids들이 NF- κ B에 의한 DNA-단백질 복합체 형성을 방해함으로써 특이적으로 세포내에 CAM 활성을 저해시킬 수 있는 효과가 있음을 보여주고 있다.

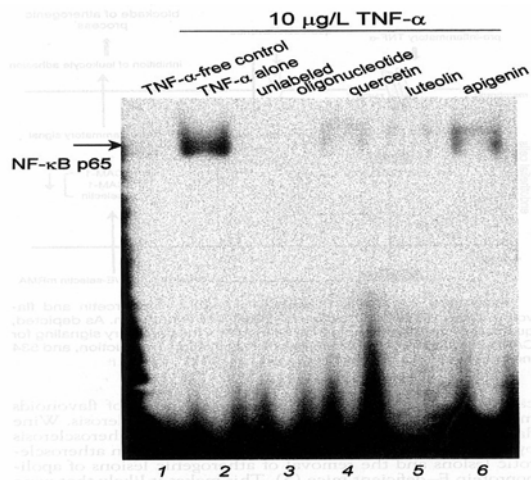


Fig. 8. Effects of flavonoids on the activation of NF- κ B in TNF- α -treated HUVEC. HUVEC were preincubated with 50 μ mol/L quercetin, luteolin, or apigenin and treated with 10 μ g/L TNF- α . DNA binding activity of NF- κ B was measured by EMSA (3 independent experiments). The binding specificity of NF- κ B was identified by binding with unlabeled oligonucleotide containing the NF- κ B binding site.

4. 고찰

본 연구는 4가지 중요한 결과를 보였다. 1) 서로 다른 소그룹의 flavonoids는 TNF- α 에 의해 유도된 단핵구의 adhesion의 저해가 다르게 나타났다. Flavones은 억제효과가 가장 뛰어난 flavonoids였고, flavanols과 flavanones의 flavonoids는 이러한 억제효과를 전혀 보여주지 못하였다. 2) Flavones인 luteolin과 apigenin은 ≥ 10 μ mol/L 투여량에 독성이 없었고, 유전자 전사단계에서 직접 작용하여 VCAM-1, ICAM-1과 E-selectin 단백질 발현을 완전히 억제시켰다. 3) Flavonoid인 quercetin은 ≥ 25 μ mol/L에서 CAMs 단백질의 발현에서 상당한 억제효과를 보였으나, flavanol인 catechin과 flavanones인 hesperetin과 naringenin과 그들의 배당체들은 50 μ mol/L에서도 저해활성을 나타나지 못하였다. 4) Flavones은 TNF- α 에 의해 자극된 NF- κ B의 활성을 저하함으로써 CAM 유전 발현을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과는 죽상경화증 초기 단계를 예방하는 효과는 flavonoids의 소그룹마다 다른 다는 것을 말해준다. 그 결과는 또한 TNF- α 에 의해 유도된 CAM 발현의 활성을 억제하는 flavones의 능력은 전사기작에서 조절된다는 것이 제시되었다 (Fig. 9).

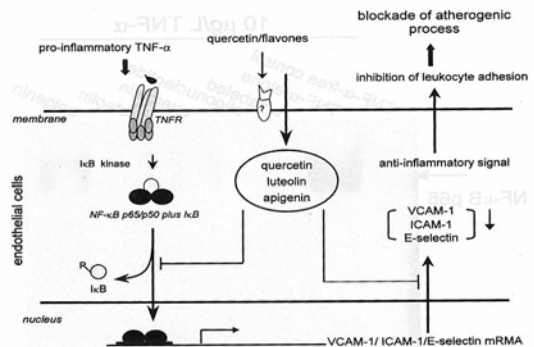


Fig. 9. The anti-inflammatory feature of quercetin and flavones in the TNF- α -induced endothelial CAM expression. As depicted, quercetin, luteolin, and apigenin inhibit direct inflammatory signaling for CAM induction by TNF- α . 601 indicates activation or induction, and 534 indicates inhibition or blocking.

많은 연구들은 flavonoids가 화학적 산화과정의 넓은 범위에서 상당한 항산화제 역할을 가지고 있음을 보여주었다. 이러한 flavonoids의 항산화제 활성은 flavonoids의 화학적인 구조와 연관이 있다는 보고들이 있다. 이전에 연구에서 flavanols, flavonols과 같은 flavonoids의 몇몇 그룹의 DPPH 라디칼 소거작용에 있어서 탁월한 자연적인 항산화제의 역할을 지니고 있었다고 하였다. 그리고 이러한 항산화제 flavonoids들은 H_2O_2 에 의한 apoptosis(세포사멸)작용으로부터 세포를 보호하였다. 그러나 flavones인 luteolin, apigenin은 세포사멸 라디칼 소거활성이 거의 없었고, 세포사멸현상을 초래하였다. 산화성물질로 유도된 내피세포에서 항산화와 항세포사멸작용은 flavonoids마다 크게 다르다. Polyphenolic flavonoids는 그들의 항산화능력을 통해 LDL의 산화를 지연시킨다고 하였다. 이것은 flavonoids가 죽상경화증의 진행을 예방하고 또는 지연시킬 수 있다는 것을 의미하고 있다. 포도주의 flavonoids는 죽상경화증에서 산화된 LDL의 축적을 저해함으로써 죽상경화증에 대한 예방을 나타내었고, apolipoprotein E가 결핍된 생쥐들의 atherogenic 발생을 제거해주었다. 이것은 포도주의 flavonoids가 혈관손상에 의해 유도된 죽상경화증 발생을 예방할 수 있다는 것을 의미한다. Flavonoids는 단핵구의 adhesion과 transmigration을 조절함으로써 죽상경화과정 초기단계를 억제하는 것과 상관이 있다고 본다. 비록 세부적으로 flavonoids의 죽상경화증 초기과정의 차단에 대한 정확한 기작은 완전하게 밝혀지지 않았지만 flavonoids는 염증성 cytokine과 chemokines, matrix proteases, CAM을 down-regulation을 일으키는 것으로 나타났다. 이 연구는 TNF- α 에 활성화된 혈관내피세포의 THP-1 단핵구 adhesion은 flavone 형태의 flavonoids는 ≥ 10 -25 $\mu\text{mol/L}$ 을 처리 시 완전한 억제효과를 보였으며 quercetin

$>25 \mu\text{mol/L}$ 에서도 상당한 억제효과를 보여주었다. 이러한 adhesion 억제작용을 가지는 flavonoids는 CAM 단백질 발현도 차단시킨다고 확인할 수 있었다. Flavanones인 naringenin, hesperitin과 그들의 배당체 naringin과 hesperidin은 저해활성을 가지지 못했으며, flavanones의 rutinose의 존재유무는 활성화된 내피세포의 단핵구의 adhesion의 억제에 영향을 주지 못하였다.

TNF- α 에 의한 CAM 발현의 억제의 flavonoids의 능력은 항산화제 특성에 기인한다. 산화적인 스트레스는 산화-환원 전위에 민감한 전위적인 활성에 의해 VCAM-1과 E-selectin 단백질 발현을 상승시키고, pyrrolidin dithiocarbamate과 N-acetylcysteine의 황산화제에 의해 억제되었다고 보고되었다. 게다가, 항산화제 분류인 vitamin E는 내피세포에서 단핵구의 adhesion과 CAM 단백질 발현을 억제한다고 하였다. (-)Epigallocatechin gallate는 탁월한 항산화력을 가지고 있다. 그럼에도 불구하고 EGCG는 염증성인자에 의한 단핵구 adhesion과 CAM 단백질 발현에 억제효과를 나타내지 못하였다. Western blot 분석은 5 mmol/L N-actylecystein이 TNF- α 로 유도된 VCAM-1 발현을 down-regulation하지 못한 것을 보여주고 있다. flavonoids의 항산화제 역할은 TNF- α 에 의한 내피세포의 CAM 유도억제와 flavones에 동맥경화방지 작용에는 무관한 것으로 추정된다. TNF- α 를 처리하고 flavones을 첨가한 혈관내피세포는 독성을 보이지 않았다고 MTT assay에 의해 측정되었다.

CAM 유전자는 어떻게 pro-inflammatory cytokines에 반응하여 선택적으로 조절되는지, 어떠한 신호체계가 그 유전자를 선택적으로 제어하는지는 불명확하다. 확실한건 TNF- α 에 의한 VCAM-1, ICAM-1과 E-selectin의 발현에 대한 활성은 quercetin과 flavones (luteolin, apigenin)에 반응하는 새로운 기작에 의해 차단되었다. 이러한 flavonoids의 저해기작은 flavonoids가 죽상경화조직에서 활

성화되고 세포의 염증성 유전자를 유도시키는 물질인 NF- κ B의 CAM 전사활성에 관련된 연쇄 신호체계를 방해할지 모른다는 가능성으로부터 추정된다. Pheolinc gallate는 혈관내피세포에서 cytokines에 의해 유도된 NF- κ B의 핵으로 translocation과 백혈구 결집분자의 발현을 저해한다고 하였다. 게다가 luteolin은 쥐의 대식구(macrophage)에서 LPS 유도된 저해단백질인 I κ B- α 인산화, NF- κ B에 조절되는 유전자 발현과 pro-inflammatory cytokine 생성의 증가를 차단시켰다고 밝혀졌다. 포도와 포도주에 자연적으로 발생하는 phytoalexin인 resveratrol의 항염증작용은 NF- κ B에 의한 전사를 방해함으로써 일어난다. 이 연구에서 quercetin, luteolin과 apigenin은 p65 단백질의 핵으로 위치 이동과 TNF- α 의 자극된 NF- κ B의 DNA binding activity를 차단하거나 감소시켜서 전사단계에서 CAM 단백질 발현을 억제시키도록 하였다. 그러나 이러한 억제작용의 근본적인 기작은 아직 알려지지 않았다. Quercetin은 ECV304 혈관내피세포주에서 phorbol 12-myristate 13-acetate 또는 NF- κ B의 활성이 없는 TNF- α 에 의해 유도된 ICAM-1 발현을 억제한다고 보고되었다. 게다가 flavonoid 2-(3-amino-phenyl)-8-methoxy-chromene-4-one은 NF- κ B에 독립적인 기작에 의해 HAEC에서 TNF- α 에 유도된 VCAM-1 발현을 선택적으로 차단시켰다.

Quercetin과 flavones이 NF- κ B의 활성저해를 통해 CAM 단백질 발현을 차단시킨 기작은 완전히 밝혀지지 않았다. Luteolin은 이전 논문에서

LPS-triggered Akt 인산화와 NF- κ B을 방해하였다고 하였다. 이런 flavonoids는 protein tyrosine 또는 protein kinase C가 조절하는 과정과 그리고 독립적인 NF- κ B 활성신호전달과정 같은 다른 신호체계과정을 통해 NF- κ B의 핵의 위치이동 등 핵의 활성을 조정하는 것으로 추측되어진다. Quercetin은 c-Jun NH2 terminal kinase pathway와 activator protein-1의 활성을 방해함으로써 agonist에 유도된 ICAM-1발현을 저해하였다.

요약하면, 본 연구는 유도성 CAM 단백질 발현에 대한 flavonoids의 효과는 서로 다른 소그룹의 flavonoids마다 차이가 있었다. Quercetin과 flavones는 TNF- α 에 의해 활성화된 혈관내피세포에서 단핵구의 adhesion 억제효과를 보여주었고 CAM 단백질 발현도 차단시킨다는 것을 확인할 수 있었다. Quercetin과 flavones인 luteolin과 apigenin의 CAMs 단백질 발현의 선택적 저해는 NF- κ B의 translocation과 transactivation의 조절로 인하여 나타난다고 알 수 있었다. 이러한 결과는 염증성 질환의 감소와 예방작용에 관계가 있다고 보여주었다(Fig. 9). Flavones의 이러한 저해 기작은 항산화 전사조절기작과는 무관한 것으로 보이며 flavones의 항동맥경화작용은 주요한 타겟으로서의 어떠한 전사기작으로 이러한 생리활성이 이루어지는 지에 대해서는 더 많은 논의가 이루어져야 할 것이다.

<출처 : J. Nutr., 134(5), 1013~1019, 2004>

