

그람음성균 유래 lipopolysaccharide로 활성화된 대식세포의 기능 수행시 갈화 [*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi]의 조절작용

셴 텡 · 김종대 · 조재열[†]

강원대학교 BT학부대학 생명공학부

Immunomodulatory Effect of *Pueraria lobata* on the Functional Activation of Macrophages by Lipopolysaccharide Treatment

Ting Shen, Jong Dai Kim, and Jae Youl Cho[†]

School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

ABSTRACT : *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi was investigated to check its modulatory effects on the activation of macrophages upon inflammatory conditions treatment. For this purpose, we examined several inflammatory responses such as nitric oxide (NO) production, reactive oxygen species (ROS) generation, cytoprotection and phagocytosis under the treatment of methanol extract from *P. lobata* (PI-ME). PI-ME dose-dependently blocked NO production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 cells but not sodium prusside (SNP)-generated NO release. The NO inhibition seemed to be due to blocking inducible NO synthase (iNOS), since PI-ME suppressed its expression in a NF- κ B-independent manner. Similarly, this extract also effectively protected RAW264.7 cells from LPS-induced cytotoxicity. However, PI-ME did not block ROS generation and rather it enhanced. Finally, this extract negatively modulated FITC-dextran uptake. Therefore, our data suggested that PI-ME may be involved in negatively regulating some macrophage-mediated inflammatory responses such as NO production and phagocytic uptake.

Key Words : *Pueraria lobata*, Methanol Extract, Macrophages, NO production, Phagocytic Uptake.

서 언

대식세포는 내재성 면역반응을 담당하는 면역세포로서, 외부로부터 침입한 세균들에서 유래된 세포구성 성분들 [예를 들면, lipopolysaccharide (LPS)]이나 체내 다른 면역세포에서 분비한 사이토카인[예를 들면, interferon (IFN)- γ]에 의해 활성화되어 종양괴사인자 (tumor necrosis factor- α)와 같은 사이토카인이나 일산화질소 (nitric oxide)나 활성산소(reactive oxygen species) 등과 같은 독성물질, 그리고 프로스타그란딘류와 같은 염증 매개물질의 분비를 조절한다 (Tetley, 2005, Shen *et al.*, 2008). 특별히, 이들 세포는 면역반응을 촉진시킬 수 있는 미생물이나 종양세포 등과 같은 면역유발원을 탐식하고 동시에 이들 탐식된 면역 유도분자들을 10개에서 20사이의 단백질 펩타이드로 가공하여 구조적 적합성 항원에 공여함으로써, T 림파구의 활성화, 증식 및 helper type 1 Th1 혹은 Th2로의 분화를 촉진시키는 항원제시 세포 (Antigen-presenting cell [APC])로서의 기능을 담당하게 된다 (Edwards *et al.*, 2006).

대식세포의 기능활성은 외부 자극에 반응하는 pattern-recognition receptor (PRR)과 같은 수용체와 결합된 신호전달 단백질 복합체의 활성화에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 특별히 관련 신호전달 단백질은 non-receptor type tyrosine kinases (Src, Syk 및 JAK2), phosphoinositide-3-kinase (PI3K), Akt (protein kinase B) 및 mitogen-activated protein kinases (MAPK) 등으로 구성되어 있다 (Fang *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2008). 이들 단백질의 활성화는 NF- κ B 및 AP-1과 같은 transcription factor의 활성화 매개로 연결되며, 그 결과 염증 및 내재성 면역반응을 담당하는 관련 단백질이 동시에 발현되게 된다 (Chen and Shi, 2002; Dijkstra *et al.*, 2002).

갈화는 한국이나 일본 및 중국에서 자생하는 칩 (*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi)의 꽃봉오리를 말하며, 한방에서는 주로 과음으로 인한 두통, 발열 및 가슴 속이 답답하고 편안치 않아서 팔다리를 가만히 두지 못하는 증상, 갈증, 식욕부진, 복부팽만, 구토증 등을 치료하는데 사용되어져 왔다. 최근에는 갈화가, 당뇨조절 기능, 간보호 작용, 항산화 효과, 암세포 사

[†]Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6488 (E-mail) jaecho@kangwon.ac.kr
Received September 22, 2008 / Revised January 27, 2009 / Accepted February 3, 2009

멸 효능 등이 있는 것으로 보고되면서 (Hsu *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2007; Zhang and Fang, 1997), 관련 질환의 치료에 적용할 수 있다는 가능성이 보고되기도 하였다. 그러나 아직까지 면역관련 연구나 면역질환의 치료효능에 관한 자세한 연구들은 진행된 바 없다. 현재까지 다양한 천연물화학적 연구를 통해 tectorigenin 및 rutin (Chen *et al.*, 2001) 등과 같은 isoflavonoide류와 soyasaponins 등의 (Arao *et al.*, 1997) saponin 성분 들이 주요 구성화합물로 보고되어져 있다.

본 연구에서는 아직까지 보고되지 않은, 대식세포에 의해 수행되는 염증 면역반응에 관한 갈화의 조절효과를 조사해 보고자 한다. 이를 위해 특별히 염증유발 물질 (예, LPS 및 dextran 등)에 의해 활성화된 대식세포의 주요 병리적 기능인 nitric oxide (NO) 생성, 탐식작용 및 대식세포 활성화전달과정 등에 미치는 갈화 유래 메탄올 분획의 조절작용을 주로 연구하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

갈화로부터 total methanol extract (PI-ME)는 일반적인 추출방법으로 제조하여 사용하였다 (Miyazawa *et al.*, 2001). 실험에 사용한 마우스 대식세포주인 RAW264.7 및 HEK293 세포는 ATCC (Rockville, MD, USA)로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양을 위한 배양용 배지 RPMI1640 media, fetal bovine serum (FBS) 그리고 항생제 (penicillin/streptomycin)는 Hyclone (Hyclone, South Logan, UT, USA)사 제품을 사용하였다. Akt, ERK, p38 및 IκBα에 대한 phospho-specific 항체는 Cell Signaling Technologies사 (Beverly, MA, USA) 제품을 사용하였다. 그밖에, sodium nitroprusside (SNP), FITC-dextran 및 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 포함한 화학시약은 Sigma 제품 (St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

2. 세포배양

RAW 264.7 및 HEK293 세포들은 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. 배지는 penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 µg/ml)과 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 사용하였다.

3. 세포 생존율 검정

세포성 면역활성 효과를 검증하기 위한 선행실험으로서, PI-ME를 농도 (0, 12.5, 25, 50, 100 및 200, 및 400 µg/ml) 별로 세포생존에 미치는 영향을 MTT assay법을 이용하여 분석하였다 (Cho *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2008). 96-well plate에 1 × 10⁶ 개의 RAW264.7 세포를 plating하고 PI-ME를 농도 별로 처리하였다. 37°C에서 각 면역실험 조건에 상응하

는 배양시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 이후 10 µl MTT 용액 (stock concentration : 5 mg/ml)을 첨가하고 3시간 동안 추가반응을 유도하였다. 반응 종료 및 formazan crystal의 용해를 위해 각 well에 100 µl MTT stopping solution (10% sodium dodecyl sulfate in 0.01 M HCl)을 분주하였다. 세포 생존율은 MTT가 formazan으로 환원된 양을 570 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 OD 값을 통해 산출하였다.

4. NO 억제 효능

RAW264.7세포를 1 × 10⁶ cell/ml의 농도로 조절한 후, 96 well plate에 100 µl 씩 접종하고, 5% CO₂ 및 37°C에서 18시간 동안 전배양 하였다 (Cho *et al.*, 2000). 이후 전배양 배지를 제거하고 4배 농도로 조제된 시험물질 50 µl와 50 µl의 LPS (최종농도 1 µg/ml) 함유 배지를 well에 동시 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3분간)하고, 상층액 100 µl를 취해 정량전까지 -20°C 이하에서 보관하였다. NO의 정량은 Griess reagent를 이용하여 정량하였다. 또한 약물의 직접적인 NO 생성 억제 효능은 NO 유래 약물인 SNP (5 mM)와 다양한 농도로 조제된 PI-ME를 30분간 반응시킨 후 생성된 NO의 양을 Griess reagent로 측정하여 평가하였다. NO의 정량한계는 0.5 µM이었으며, standard NO (sodium nitrite)에 대한 표준곡선의 r² 값은 0.99 이상이었다.

5. Semi-quantitative RT-PCR

iNOS mRNA발현 정도를 조사하기 위해 PI-ME (200 µg/ml)를 일정시간 동안 처리하여 배양한 세포로부터 Trizol reagent를 처리하여 total RNA를 추출하고 First strand cDNA synthesis kit (Fermentas)에 의해 cDNA를 제조한 다음, 동량의 cDNA를 PCR로 증폭시켰다. iNOS mRNA의 sense 및 antisense primer 염기서열은 기존문헌을 참조하여 제조하였다 (Lee *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008). PCR amplification은 i-Master PCR kit (iNtRON)을 사용하여 각 실험군 cDNA와 표적단백질들의 sense 및 antisense primers, 대조군 GAPDH primers 및 dNTP 250 uM, Tris-HCL (pH8.3) 10 mM, KCl 50 mM, NgCl₂ 1.5 mM를 포함한 HiPi solution 20 ul에서 시행하며, PCR은 94°C에서 45초 간 denaturing, 30초 간 annealing 그리고 72°C에서 1분간 extension 하는 조건으로 시행하였고, 각각의 primer에 대한 annealing temperature와 cycle은 60°, 30 cycle 조건에서 실시하였다.

6. Reporter gene assay

HEK293 세포를 2 × 10⁵ cell/well의 농도로 조절되도록 24 well plate에 접종한 후 5% CO₂ 및 37°C에서 18시간 동안 전배양 하였다 (Cho *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2006). 이후 새

로운 배지로 같이준 후 pNF-κB-Luc 플라스미드 또는 pCMV (대조군) 플라스미드를 lipofectAMINE PLUS (Invitrogen, Carlsbad, AV)를 사용하여 6시간 동안 transfection시킨 후 배지를 제거하고 새로운 배지로 24시간 추가 배양하였다. 그 후 PI-ME를 배지에 처리하여 30분간 전처리 후 TNF-α를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. 이후 배양 배지를 제거한 후 세포를 회수하여 lysis buffer (promega)를 이용하여 total cell lysate를 조제한 후 lysate (20 μl) 와 substrate (20 μl)를 1:1로 반응시켜 그 발광 정도를 Luminoskan Ascent (Thermo Labsystems Oy, Helsinki, Finland)를 사용하여 측정하였다.

7. 표적 단백질의 발현량 검토

RAW 264.7 세포 (5 × 10⁶ cells/ml)를 6-well plate의 해당 well에 1 ml 분주하고, 배지 3 ml 을 더한 후 18시간 동안 전배양하였다. 앞의 실험 방법에서와 같이 PI-ME를 30분 전처리하고, LPS를 2분, 30분 처리한 후, 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 lysis buffer (함유조성 : 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 2 mM ethyleneglycotetraacetic acid, 50 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM dithiothreitol, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml pepstatin, 1 mM benzimidazole, and 2 mM hydrogen peroxide)를 처리하여 total cell lysate를 조제하였다. 동일한 양의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하고, wet-blotting transfer 방법을 이용하여 PVDF membrane으로 단백질을 transfer하였다. Membrane을 5% BSA blocking buffer에서 반응시킨 후 특정 단백질에 특이한 1차 항체를 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 2차 항체를 1시간 동안 추가적으로 처리한 후, ECL chemiluminescence로 반응 정도를 확인하였다.

8. 라디칼 소거능 정량

RAW264.7 세포를 2 × 10⁶ cells/ml의 농도로 조절한 후, 6 well plate에 1 ml를 분주하고, 5% CO₂ 및 37°C에서 18시간 동안 전배양하였다 (Lee et al., 2007; Shen et al., 2008). 전배양 후 배지를 제거하고, PBS 495 μl를 분주하였다. 그리고 4배 농도로 조제된 DHR123 (최종농도 20 μM) 250 μl를 해당 well에 분주 후 10분 배양하였다. 이후, 각 test 농도의 200배 농도로 조제된 PI-ME 5 μl를 처리 후 30분 배양하고, 4배 농도로 조제된 SNP 250 μl (최종농도 0.25 mM)를 처리하여 20분 배양하였다. 라디칼 소거 정도는 flow cytometer를 이용하여 측정하였다.

9. 대식세포의 탐식작용 측정

RAW264.7 세포를 2 × 10⁶ cells/well로 조정하여 6-well plate에 분주하고 18시간 동안 전배양하였다. 전배양 후 PI-ME

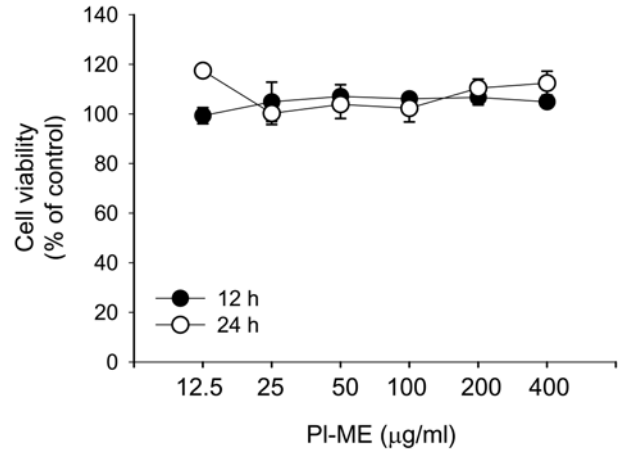


Fig. 1. Effect of PI-ME on the viability of RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (1 × 10⁶ cells/ml) were incubated with PI-ME for 24 h. Cytotoxicity was determined by conventional MTT assay as described in Materials and Methods. Data represent mean ± SEM of three independent observations performed in triplicate.

를 처리하고 1시간 동안 37°C에서 배양하였다. 그리고 형광으로 표지된 particle FITC-dextran (3 mg/ml)을 세포에 처리하고 빛을 차단하여 30분간 배양하였다. Cold-PBS로 세포를 세척하여 미탐식된 입자를 제거하고 3.7% formaldehyde로 고정 후 flow cytometer로 형광정도를 측정하였다 (Lee et al., 2007; Shen et al., 2008).

10. 통계처리

각 data는 얻어진 결과는 평균 ± 표준편차로 나타낸 것이며, 그룹 간의 통계적 유의성은 SAS package를 이용하여 P < 0.05 수준에서 Duncan의 다중비교법에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

1. PI-ME가 세포독성에 미치는 효과

우선 PI-ME의 세포독성 효과를 알아보기 위해 최대 400 μg/ml 농도까지 대식세포주인 RAW264.7 cell에 12시간 혹은 24시간 동안 처리하였다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이 PI-ME는 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포에 아무런 독성효과를 나타내지 않았다. 따라서 PI-ME의 대식세포 염증과정 조절효능을 조사하기 위해, LPS, SNP 및 FITC-dextran 등으로 활성화된 대식세포를 이용하여 PI-ME의 조절능을 연구하였다.

2. NO 분비 억제 효과 및 조절기전

NO는 세균이나 암세포의 사멸시 중요하게 작용하는 대표적인 독성 라디칼의 하나이다. 특별히 대식세포가 세균감염에 의해 활성화 되면, iNOS의 합성을 통해 과량의 NO가 생성되게 된다. 실제로 그람음성균 유래 내독소인 LPS처리는 약 45

갈화의 대식세포 활성 조절작용

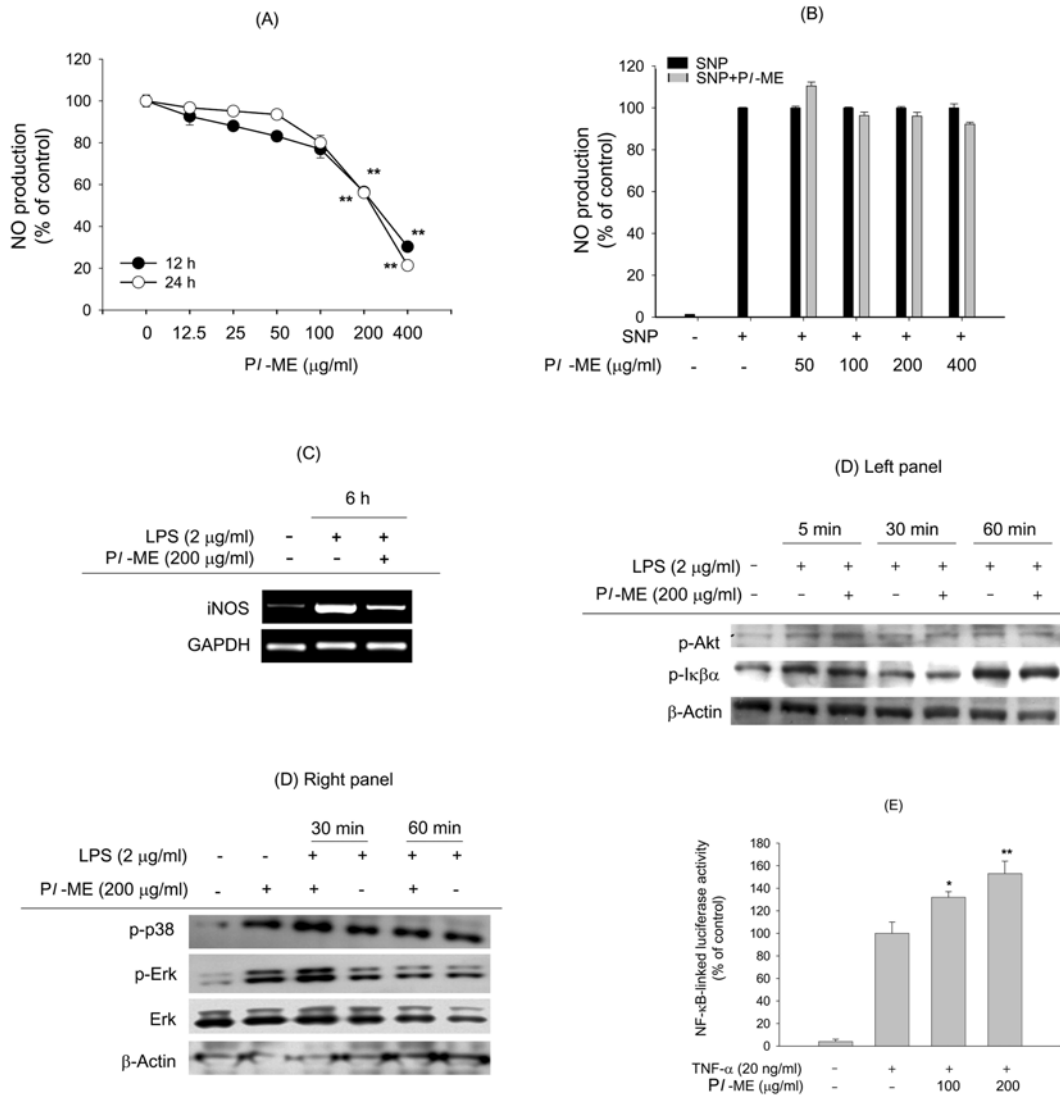


Fig. 2. Effect of PI-ME on NO production, iNOS expression, and signaling activation in LPS-activated RAW264.7 cells. (A) RAW264.7 cells (1×10^6 cells/ml) were stimulated with PI-ME in the presence or absence of LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 12 or 24 h. NO levels were determined by Griess assay (B) Direct NO inhibitory effect of PI-ME on SNP-derived NO production was examined by Griess assay after incubation of PI-ME with SNP (5 mM). (C) RAW264.7 cells (5×10^6 cells/ml) were stimulated with PI-ME in the presence or absence of LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 6 h. The iNOS mRNA level was determined by RT-PCR method. (D) RAW264.7 cells (1×10^6 cells/ml) were stimulated with PI-ME in the presence or absence of LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for indicated times. After immunoblotting, the total or phospho-protein levels of Akt, IκBα, p38, ERK and β-actin were identified by their total protein- or phospho-specific antibodies. (E) HEK cells (1×10^6 cells/ml) transfected with NF-κB-Luc ($1 \mu\text{g/ml}$) were stimulated with PI-ME in the presence or absence of TNF-α (20 ng/ml) for 18 h. Luciferase activity was determined by luminometry, as described in Materials and Methods. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ compared to control group.

μM까지의 NO가 생성되는 것을 확인할 수 있다. Fig. 2A에서 보여주듯, PI-ME는 12시간 및 24시간 동안 LPS에 의해 자극된 RAW264.7 세포로부터의 NO 생성을 매우 효과적으로 억제하였다 ($IC_{50} = 195 \sim 210 \mu\text{g/ml}$). 이와 같은 갈화의 NO 생성 억제 효능은 비록 curcumin 등과 같은 단일 화합물의 효과 (Lee and Cho, 2007)와는 많은 차이를 보이나, 반지련 (Shen *et al.*, 2008)이나 케나프 (Lee *et al.*, 2007)등에서 추출한 추출물이 보이는 효능과는 유사한 것으로 나타났다. 한

편, 갈화가 직접적인 중화작용에 의한 NO 생성을 억제하였는지를 확인하기 위해 NO releasing reagent인 SNP를 이용하여 동일한 억제능을 보이는지 시험하여 보았다. Fig. 2B에서 확인할 수 있듯이, PI-ME는 전혀 억제작용을 나타내지 않았다. 이는 PI-ME의 NO억제 작용은 직접적인 NO 소거 작용보다는 세포내에서 NO를 생성하는 생성단계에서의 저해작용이 중요한 약리기전으로 판단된다.

따라서, 다음으로 NO 생성을 조절하는 iNOS 효소의 발현

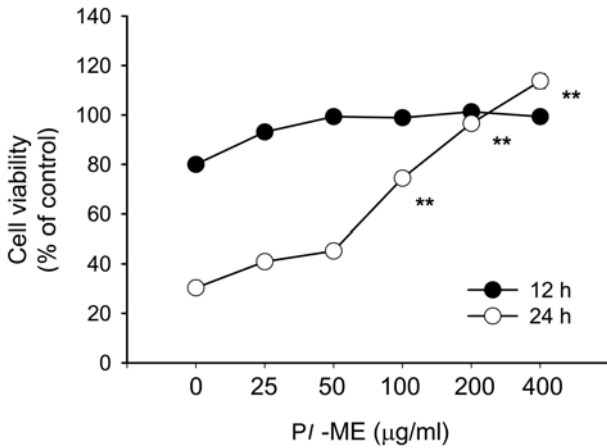


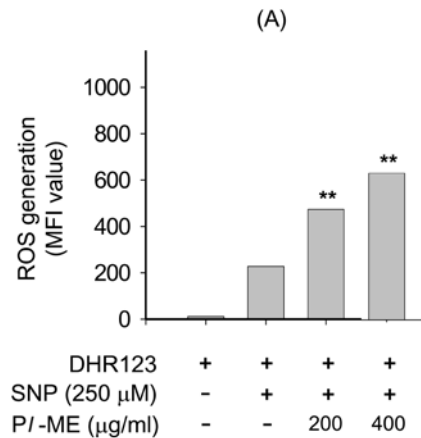
Fig. 3. Cytoprotective effect of PI-ME on LPS-induced cytotoxicity of RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with PI-ME in the presence or absence of LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24 h. Cell viability was determined by conventional MTT assay as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM of three independent observations performed in triplicate. **: $p < 0.01$ compared to normal group.

을 semi-quantitative RT-PCR로 정량하여 보았다. Fig. 2C는 상기의 결과들과 일치해서 PI-ME유래 성분들이 세포내 NO 생성성과 관련된다는 것으로 증명해주고 있다. 즉 PI-ME (200 $\mu\text{g/ml}$)는 iNOS발현을 현저하게 억제한 것으로 확인할 수 있었다. 이는 PI-ME가 활성화된 대식세포의 NO생성시 필수적으로 요구되는 iNOS의 전사과정을 억제하고, 전사관련 신호 전달과정 및 전사조절인자의 활성을 억제할 수 있다는 것을 시사한다고 하겠다.

그러나, Fig. 2D 및 2E의 결과에 따르면, 적어도 PI-ME는 염증단백질 합성에 매우 중요한 전사인자로 알려져 있는 NF- κ B의 활성을 억제하지 않는 것으로 판단된다. 즉 PI-ME는 NF- κ B 활성 조절 상부신호전달 단백질 (ERK, p38, Akt 및 I κ B α)의 인산화 과정을 억제하지 못하였다. 게다가 NF- κ B활성 매개에 의해 유도되는 luciferase 활성을 측정하는 reporter gene assay에서도 curcumin 등이 보였던 효과 (Lee and Cho, 2007)와는 달리 PI-ME는 전혀 억제효능을 보이지 않았으며, 오히려 그 활성을 증가시켰다. 이는 PI-ME가 NF- κ B 관련 활성을 증가시킬 수 있는 다양한 세포내 환경을 유도할 가능성이 높다는 것을 시사한다고 하겠다 (Fig. 2E).

3. PI-ME의 LPS유도 세포독성 억제효과

한편, 그람 음성균 유래 LPS를 대식세포에 처리하게 되면 NO 및 ROS등의 생성을 통해 감염된 세균을 제거하게 된다. 그러나 동시에, 주위 조직이나 자신의 세포까지도 apoptosis를 통해 세포사멸을 유도하게 되는 것으로 알려져 있다. 실제로, LPS를 RA264.7 세포에 처리시 최대 70%의 세포가 세포독성



(B)

DHR123	+	+
SNP(250 μM)	+	+
PI-ME ($\mu\text{g/ml}$)	-	200

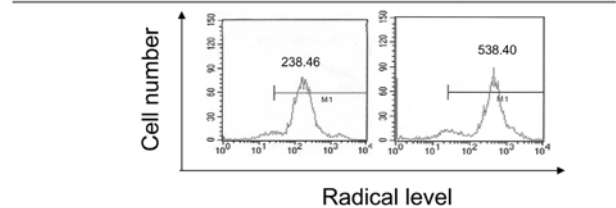


Fig. 4. Effect of PI-ME on SNP-released radical generation. RAW264.7 cells (0.5×10^6) were pretreated with PI-ME for 30 min and further incubated in the presence of absence of SNP (250 μM) for 0.5 h. The level of radicals was determined by flow cytometric analysis as described in Materials and Methods. **: $p < 0.01$ compared to control group.

에 의해 사멸되었다 (Fig. 3). 따라서, PI-ME가 LPS 조건하에서 보여지는 세포독성에 대한 보호효과가 있는지를 조사하여 보았다. 흥미롭게도, Fig. 3에서 보여지듯, PI-ME는 매우 효과적으로 LPS에 의해 유도된 세포독성을 거의 정상적 상태로 회복시킨 것으로 나타났다. 이는 PI-ME가 강력하게 NO 생성을 억제한 것으로 미루어 볼 때, NO생성 억제 효능을 통해 진행되는 것으로 판단된다.

4. 라디칼 소거능에 미치는 PI-ME의 효과

ROS (reactive oxygen species)는 산소가 요구되는 대사과정 중에서 발생하는 부산물이지만, 세포의 신호전달 과정을 촉매하는 중요한 생리적 역할을 담당하기도 한다. 그러나 스트레스 작용으로 기인된 ROS의 상승은, 라디칼 발생을 유도하여 이로 인한 세포구조의 심각한 손상을 경유한 세포사멸을 유도하게 된다 (Migliaccio *et al.*, 2006). 반면에 면역반응에서는 활성산소 유래 라디칼이 오히려 대식세포나 과립구 등이

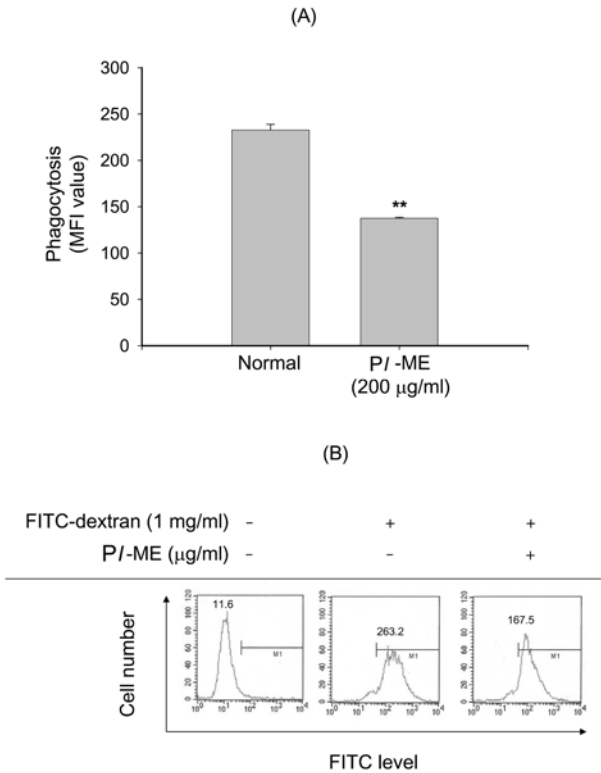


Fig. 5. Effect of PI-ME on the phagocytic uptake of RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (2×10^5 cells/ml), pretreated with PI-ME, were stimulated with FITC-dextran (1 mg/ml) for 6 h. The extent of the phagocytic uptake was determined by flow cytometric analysis, as described in Materials and Methods. **: $p < 0.01$ compared to control group.

몸 안으로 침입한 바이러스나 박테리아와 같은 미생물이나 암세포를 공격하는 방어용 물질로 이용된다. 병리적으로는 이들 활성산소종 유래 라디칼이 과량으로 분비될 경우 노화나 암 및 염증질환의 발생과 깊은 관련이 있어 ROS의 라디칼 소거능을 가지는 플라보노이드류 같은 항산화제들은 관련 질환의 치료 효능이 있는 것으로 보고되어져 있다 (Katiyar *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2008). 따라서, PI-ME가 대식세포내에서 발생하는 라디칼 생성에 어떤 조절 영향을 미치는 지 검토하였다. 그러나, Fig. 4에서 보여지듯이, PI-ME는 SNP에 의해 유리되는 라디칼을 소거시키지 못하는 것으로 나타났다. 이전 결과 (Shen *et al.*, 2008)와 유사하게, 대조군으로 사용된 토코페롤은 강력하게 라디칼 생성을 억제하는 것으로 나타났다 (data not shown). 이는, 기존에 알려진 플라보노이드류 및 케나프 등과 달리 (Lee *et al.*, 2007), 갈화의 경우 직접적인 라디칼 소거작용인 항산화능은 크지 않은 것으로 판단된다.

5. 식세포 작용에 미치는 PI-ME의 효과

내재성 면역반응에서 보여지는 대표적인 면역작용의 하나가 식세포 (대식세포와 호중구) 매개에 의한 식균작용으로 알려

져 있다 (Savina and Amigorena, 2007). 특별히 이 과정은 세균들을 제거하기 위한 과정이면서 동시에 APC의 항원가공 및 제시 기능을 획득하기 위한 필수적인 전단계 이므로 PI-ME의 조절작용을 조사하여 보았다. Fig. 5에서 확인되듯이, PI-ME는 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 보여지는 FITC-dextran의 식세포작용을 매우 효과적으로 억제하였다.

결론적으로, LPS, SNP 및 FITC-dextran으로 활성화된 대식세포를 이용하여 갈화 (*Pueraria lobata*)의 methanol 추출물 (PI-ME) 이 가지는 면역학적 조절효능을 분석하여 다음과 같은 결론을 도출하였다. 1. PI-ME는 농도의존적으로 NO 생성을 억제하였으며, NF- κ B 비의존적으로 iNOS의 발현저해를 유도하였다. 2. PI-ME는 LPS매개성 세포독성 작용을 저해하였다. 3. PI-ME는 ROS 생성저해 효과는 나타내지 않았다. 4. PI-ME는 대식세포의 탐식과정을 감소시켰다. 현재까지 어떻게 PI-ME가 NO 생성을 억제한 것에 관한 분자적 수준에서의 억제 기전이 불명확하므로, 향후 보다 자세한 신호전달 억제 기전에 관한 추가연구를 진행하고자 한다. 또한 주요 염증과정 지표인 NO 생성억제 및 탐식과정의 저해 효과들을 바탕으로 *in vivo* 항염증 효능에 관한 추가적인 연구들을 진행하고자 한다.

감사의 글

본 논문은 본 연구논문은 2008년도 지식경제부 지역혁신센터사업 (한림대 식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터) 의 일부 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Arao T, Kinjo J, Nohara T and Isobe R. (1997). Oleanene-type triterpene glycosides from puerariae radix. IV. Six new saponins from *Pueraria lobata*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo). 45:362-366.
- Chen F and Shi X. (2002). NF-kappaB, a pivotal transcription factor in silica-induced diseases. Molecular Cell Biochemistry. 234-235: 169-176.
- Chen G, Zhang J and Jiannong Y. (2001). Determination of puerarin, daidzein and rutin in *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi by capillary electrophoresis with electrochemical detection. Journal of Chromatography A. 923:255-262.
- Cho JY, Baik KU, Jung JH and Park MH. (2000). In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. European Journal of Pharmacology. 398:399-407.
- Cho JY, Grigura V, Murphy TL and Murphy K. (2003). Identification of cooperative monomeric Brachyury sites conferring T-bet responsiveness to the proximal IFN-gamma promoter. International Immunology. 15:1149-1160.
- Dijkstra G, Moshage H and Jansen PL. (2002). Blockade of NF-kappaB activation and donation of nitric oxide: new treatment options in inflammatory bowel disease? Scandinavian Journal

- of Gastroenterology. Supplement:37-41.
- Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA and Mosser DM.** (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Journal of Leukocyte Biology.* 80: 1298-1307.
- Fang H, Pengal RA, Cao X, Ganesan LP, Wewers MD, Marsh CB and Tridandapani S.** (2004). Lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory response is regulated by SHIP. *Journal of Immunology.* 173:360-366.
- Hsu FL, Liu IM, Kuo DH, Chen WC, Su HC and Cheng JT.** (2003). Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Natural Products.* 66:788-792.
- Hwang YP, Choi CY, Chung YC, Jeon SS and Jeong HG.** (2007). Protective effects of puerarin on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Archives of Pharmacal Research.* 30:1309-1317.
- Jung KK, Lee HS, Cho JY, Shin WC, Rhee MH, Kim TG, Kang JH, Kim SH, Hong S and Kang SY.** (2006). Inhibitory effect of curcumin on nitric oxide production from lipopolysaccharide-activated primary microglia. *Life Sciences.* 79:2022-2031.
- Katiyar SK, Matsui MS, Elmets CA and Mukhtar H.** (1999). Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochemistry and Photobiology.* 69:148-153.
- Lee YG, Byeon SE, Kim JY, Lee JY, Rhee MH, Hong S, Wu JC, Lee HS, Kim MJ, Cho DH and Cho JY.** (2007). Immunomodulatory effect of *Hibiscus cannabinus* extract on macrophage functions. *Journal of Ethnopharmacology.* 113:62-71.
- Lee YG and Cho JY.** (2007). Inhibitory effect of curcumin on nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells and its suppressive mechanism. *Korean Journal of Medicinal Crop Science.* 15:451-456.
- Lee YG, Lee WM, Kim JY, Lee JY, Lee IK, Yun BS, Rhee MH and Cho JY.** (2008). Src kinase-targeted anti-inflammatory activity of davallialactone from *Inonotus xeranticus* in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells. *British Journal of Pharmacology.* 154:852-863.
- Migliaccio E, Giorgio M and Pelicci PG.** (2006). Apoptosis and aging: role of p66Shc redox protein. *Antioxidants & Redox Signaling.* 8:600-608.
- Miyazawa M, Sakano K, Nakamura S and Kosaka H.** (2001). Antimutagenic activity of isoflavone from *Pueraria lobata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 49:336-341.
- Savina A and Amigorena S.** (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological Reviews.* 219:143-156.
- Shen T, Lee YJ and Cho JY.** (2008). Effect of Hot Water Extract from *Scutellaria barbata* on the Macrophages Activated by Lipopolysaccharide. *Korean Journal of Medicinal Crop Science.* 16:313-319.
- Tetley TD.** (2005). Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy.* 4:607-618.
- Zhang G and Fang S.** (1997). Antioxidation of *Pueraria lobata* isoflavones (PLIs). *Zhong Yao Cai.* 20:358-360.