

牡丹皮 Methyl Gallate 성분의 항염증효능에 대한 연구

박용기, 민지영, 이제현*

동국대학교 한의과대학 본초학교실

The Effect of Methyl Gallate Isolated from *Paeonia suffruticosa* on Inflammatory Response in LPS-stimulated RAW264.7 Cells

Yong-Ki Park, Ji-Young Min, Je-Hyun Lee*

Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : In this study, we investigated the effect of methyl gallate of *Paeonia suffruticosa*(Moutan Cortex Radicis) on inflammatory response in activated macrophages.

Methods : RAW264.7 cells were incubated with different concentrations of methyl gallate of *Paeonia suffruticosa* for 30 min and then stimulated with or without LPS at indicated times. Cell toxicity was determined by MTT assay. The concentrations of nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) and inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6) were measured in culture medium by Griess assay, enzyme-immuno assay, and ELISA, respectively. The expressions of iNOS, COX-2 and cytokine mRNA and protein were determined by RT-PCR and Western blot, respectively. The I κ -Ba degradation in cytosol and NF- κ B p65 translocation into nuclear of the cells were determined by Western blot.

Results : Methyl gallate was significantly inhibited LPS-induced production of NO and PGE₂ in RAW264.7 cells. Methyl gallate was also suppressed LPS-induced expression of iNOS and COX-2 mRNA and protein in the cells. Methyl gallate was inhibited LPS-induced production of TNF- α and IL-6 via suppression of their mRNA expressions. Methyl gallate blocked the NF- κ B pathway in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

Conclusions : This study suggests that methyl gallate of *Paeonia suffruticosa* may have an anti-inflammatory property through suppressing inflammatory mediator production in activated macrophages.

Key words : *Paeonia suffruticosa*, methyl gallate, inflammation, macrophage, NF- κ B pathway

서론

대식세포는 동물체 내 모든 조직에 분포하며 인체 내 선천적 면역반응을 담당하는 면역세포로서 외부로부터 침입하는 이물질이나 세균, 바이러스, 노화세포 등을 포식하고 소화하는 식균작용과 더불어 다양한 염증매개물질을 분비하여 초기 염증반응 발달에 중요한 역할을 한다¹⁾. Lipopolysaccharide(LPS), interferon(IFN)- γ , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)와 같은 자극원에 의해 활성화되는 대식세포는 혈관활성아민류,

아라키돈산 대사산물(prostaglandins, leukotriene, bradykinin, lipoxin), 염증사이토카인류(TNF- α , interleukin-1 β , IL-6, IL-8), 혈소판활성인자, 세포독성물질(nitric oxide, reactive oxygen species) 등 다양한 염증매개물질을 다량 분비함으로써 면역반응조절을 통해 생체 내 방어기능과 항상성 유지 기능을 조절하는 반면, 염증유발을 통해 각종 만성 염증질환 발병에 기여하게 된다^{2,3)}.

따라서 대식세포의 활성화 조절기전을 이해하고, 활성화된 대식세포로부터 분비되는 염증매개물질을 조절하는 것은 여러 원인에 의해 발생하는 염증질환의 진행을 막

* 교신저자 : 이제현, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 054-770-2661 · E-mail : jeehyunlee@dongguk.ac.kr
· 접수 : 2009년 11월 23일 · 수정 : 2009년 12월 14일 · 채택 : 2009년 12월 21일

아줄 수 있는 유효한 방법이 될 수 있다. 최근에는 각종 한약재로부터 분리되는 단일화합물을 이용하여 염증질환에서의 대식세포 활성조절과 항염증효과를 지닌 약물개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다⁴⁻⁶⁾.

牡丹皮(Moutan Cortex Radicis)는 마리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 落葉小灌木인 모란(*Paeonia suffruticosa* Andrews)의 根皮를 건조한 것으로, 性味는 微寒 苦辛하고, 心肝腎經에 귀경하며, 淸熱涼血, 活血散瘀의 효능이 있어 溫毒發斑, 吐血衄血, 夜熱早涼, 無汗骨蒸, 經閉痛經, 癰腫瘡毒, 跌撲傷痛 등의 증상에 응용된다⁷⁾.

牡丹皮의 성분으로는 paeonol, paronoside, paeonolide 등의 phenol류, paeoniflorin, oxypaeoniflorin 등의 monoterpene glycoside류, tetragalloylglucose, pentagalloylglucose 등의 tannin류 외 methyl gallate, gallic acid, *p*-hydroxybenzoic acid 등이 알려져 있으며, 약리적 실험연구로는 牡丹皮 메탄올추출물과 에틸아세테이트 분획물의 항균 효과^{8,9)}, 牡丹皮 메탄올추출물의 혈당강하효과¹⁰⁾, 사람의 내피세포부터 eotaxin 분비 억제효과¹¹⁾, 아밀로이드 베타에 의해 유도된 신경세포 독성에 대한 억제효과¹²⁾, 산화적 스트레스에 의한 신경세포 손상에서 ROS 생성의 억제효과¹³⁾가 보고되어 있다. 牡丹皮의 성분에 관한 연구로는 중요성분으로 알려져 있는 paeonol에 대한 동맥경화 억제효과¹⁴⁾, 혈소판 응집억제효과¹⁵⁾, 비만세포로부터 히스타민과 TNF- α 의 분비억제효과¹⁶⁾, 식도암세포 증식억제효과¹⁷⁾, 관절활막세포에서의 TNF- α 와 IL-1 β 분비억제효과¹⁸⁾ 등이 다수 보고되어 있으며, tannin 성분¹⁹⁾과 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose²⁰⁾의 대식세포에서의 nitric oxide(NO)와 COX-2 분비억제 효과가 보고되어 있다.

본 연구에서는 牡丹皮의 淸熱涼血과 活血散瘀에 대한 효능을 나타내는 물질이 어떠한 성분인지를 확인하고자 牡丹皮의 성분 중 하나인 methyl gallate를 이용하여 LPS에 의해 활성화된 쥐의 복강대식세포에서 유발되는 염증반응에 대한 억제효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

실험에 사용된 methyl gallate(Fig. 1; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), ethanol(Merck Co, Germany), lipopolysaccharide(LPS; E. coli B0111: B4; Sigma-Aldrich Co.), 3-(4,5-dimethyl thazol-2-yl)-2,5-tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich Co), TRIzol reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), SuperScript[®] First-Strand Synthesis System (Invitrogen), Protein assay solution (BioRad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA), 30% Acrylamide solution (BioRad Laboratories Inc), NP-40 Cell lysis buffer(Invitrogen), UltraPure[™] DEPC-Treated Water (Invitrogen), N-trityl-1,3-propanediamine acetate/sulfanilamide (Sigma-Aldrich Co),

anti-iNOS mAb(Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA), anti-COX-2 antibody(Santa Cruz Co Ltd), anti-ERK1/2 antibody(Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA), anti-JNK antibody (Chemicon International Inc), anti-p38 MAPK antibody (Chemicon International Inc), biotinylated anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich Co), avidin-biotin peroxidase complex system (ABC Vectastain Kit, Biosys, Lyngby, Denmark), diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich Co), PGE₂ EIA kit (R&D System, Inc, Minneapolis, MN), mouse Sandwich ELISA kits (eBioscience[™], San Diego, CA, USA) 등을 사용하였다.

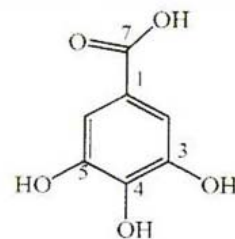


Fig. 1. Chemical structure of methyl gallate

2. 방법

1) 세포배양

쥐의 대식세포주인 RAW264.7 세포는 ATCC (Manassas, VA, USA)로부터 구입하였으며, 10% inactivated fetal bovine serum과 1% penicillin·streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)을 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2) 세포독성 조사

RAW264.7 세포(5×10⁴ cells/well)를 96-well culture plate에 100 μ l의 DMEM 배지와 함께 하룻밤 배양한 다음, 여러 농도의 methyl gallate를 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 50 μ l 씩 넣은 후 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도하였으며, 100 μ l의 DMSO 용액을 첨가하여 보라색의 formazan 결정을 완전히 용해하였다. 발색정도를 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 세포만 배양한 무처리구의 생존도 100%를 기준으로 약물처리군의 상대적 생존도를 계산하였다.

3) Nitric oxide 측정

RAW264.7 세포로부터 생성되는 NO의 양을 세포배양액 중 존재하는 NO₂⁻의 형태로 Griess reagent 반응법을 이용하여 측정하였다. 즉 세포에 다양한 농도의 methyl gallate를 30분간 전처리한 다음, LPS(1 μ g/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포 배양액을 수거하여 배양액 100 μ l에 동일한 양의 Griess 시약(0.1% NED/1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄)을 넣은 후 15분간 암반응 하였다. 발색정

도를 microplate reader의 540 nm 흡광도에서 측정하였으며, 세포배양액 내 NO의 농도(μM)는 NaNO_2 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

4) Prostaglandin E_2 측정

활성화된 대식세포로부터 분비되는 염증물질인 prostaglandin E_2 (PGE_2)의 양을 세포배양액으로부터 효소면역반응법(Enzyme Immuno-Assay; EIA)을 이용하여 측정하였다. 즉 세포에 다양한 농도의 methyl gallate를 처리하여 30분간 배양한 다음 LPS($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하여 18시간 배양하였다. 세포 배양액을 수거하여 배양액 내에 존재하는 PGE_2 의 양을 측정하였으며, 세포배양액 내 존재하는 PGE_2 의 농도는 PGE_2 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

5) Reverse transcriptase(RT)-PCR

RAW264.7 세포에서 발현되는 iNOS와 COX-2의 유전자 발현에 대한 약물의 효과를 조사하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 먼저 세포에 다양한 농도의 methyl gallate를 30분 동안 배양한 다음, LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 세포를 수거하여 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 TRIzol 시약을 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA와 oligo-(dT) primer, Improm-IIITM reverse transcriptase를 이용하여 25°C 에서 10분, 42°C 에서 60분, 70°C 에서 15분 조건으로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 대한 PCR을 수행하기 위해 cDNA $1 \mu\text{g}$ 에 Table 1의 primers(sense, anti-sense) $1 \mu\text{l}$ 및 $10 \times$ buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μM dNTP, 1U Tag polymerase를 혼합한 후 denaturation을 위해 94°C 에서 30초, annealing을 위해 $55\sim 60^\circ\text{C}$ 에서 30초 및 extension을 위해 70°C 에서 60초 조건에서 25~30 cycles을 수행하였다. PCR 반응의 표준 대조구로 GAPDHs를 사용하였다.

6) Western blot

RAW264.7 세포에서 발현되는 iNOS와 COX-2의 단백질 발현에 대한 약물의 효과를 조사하기 위해 Western blot을 수행하였다. 먼저 세포에 다양한 농도의 methyl gallate를 30분 동안 배양한 다음, LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 각 세포를 수거한 다음 HBSS 용액으로 2회 세척하고, lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin) 0.1 ml로 lysis시켜 12,000 rpm에서 20분 원심분리함으로써 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 protein assay solution으로 정량한 다음, 20 μg 단백질과 2 \times sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM dithithreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)를 섞어 100°C 에서 3분 끓인 후 10~15% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였다. 분리된 gel의 단백질을 NC membrane으로 transfer시킨 후 10% skim milk로 실온에서 1시간 blocking하였다.

iNOS, COX-2, MAPKs(ERK/p-ERK, JNK/p-JNK, p38/pp38), NF- κB /I- $\kappa\text{B}\alpha$ 및 β -actin에 대한 항체를 0.05% Tween이 함유된 TBS-T로 희석하여 4°C 에서 하룻밤 반응시킨 후 TBS-T로 3회 세척하고 anti-IgG conjugated HRP 항체와 1시간 실온에서 반응시켰다. 이를 다시 TBS-T로 세척한 후 ECL 용액을 이용하여 x-ray film에 감광시켰다.

7) 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균(mean) \pm 표준편차(standard deviation; SD)로 나타내었으며, 통계분석은 SPSS program(SPSS vs. 13.0, Sigma STAT, Chicago, IL, USA)의 post-hoc LSD test와 ANOVA 분석을 수행하여 p 값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포독성 검정

RAW264.7 세포에 대한 methyl gallate의 세포독성을 MTT assay 방법으로 조사한 결과(Fig. 2), methyl gallate의 200 μM 과 400 μM 농도에서 세포생존율이 $87.6 \pm 2.74\%$ 와 $64.2 \pm 1.76\%$ 로 독성이 있는 것으로 나타났다. 따라서 이후 실험은 RAW264.7 세포에 methyl gallate의 독성이 나타나지 않는 농도인 100 μM 이내에서 수행하였다.

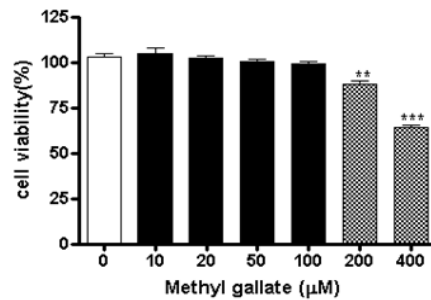


Fig. 2. Effects of methyl gallate on the viability of RAW264.7 cells

Cells were treated with different concentrations of methyl gallate for 24h and then cell viability was determined by MTT assay. The values are means of three independent experiments (SD=bars), and are shown as percentage cell viability compared with the viability of untreated control cells. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. cells only.

2. NO 분비 및 iNOS 발현에 대한 효과

LPS로 활성화 된 RAW264.7 세포의 배양액 중에 생성된 nitrite의 양을 세포배양액으로부터 Griess 시약을 이용하여 측정한 결과, methyl gallate는 농도에 의존적이고 유의적으로 NO의 생성을 감소시켰다(Fig. 3A). 또한 methyl gallate가 NO의 생성과 관련된 iNOS의 유전자와

단백질 발현을 억제하는지 RT-PCR과 Western blot 방법으로 조사하였다.

그 결과 iNOS의 유전자 발현(Fig. 3B)과 단백질 발현(Fig. 3C)은 세포만 배양했을 때와 methyl gallate (100 μ M)만 단독 처리하였을 때는 관찰되지 않았으며, LPS 처리에 의해 증가되었고, methyl gallate의 처리 농도(20, 50, 100 μ M)에 의존적으로 억제되었다. 따라서 牧丹皮의 methyl gallate는 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 iNOS 단백질의 발현과정을 농도의존적으로 억제함으로써 NO 합성을 감소시키는 것으로 조사되었다.

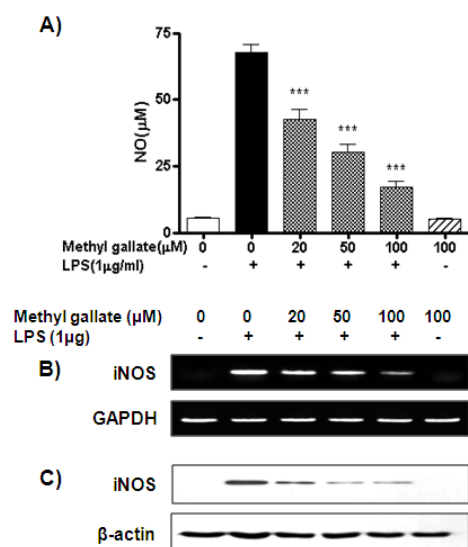


Fig. 3. Effects of methyl gallate on NO production in LPS-stimulated of RAW264.7 cells

Cells were treated with different concentrations of methyl gallate for 30 min, and then stimulated with or without LPS(1 μ g/ml) for 24h. (A) The nitrite concentrations in culture supernatants were measured by Griess assay. The values are means of three independent experiments (SD=bars). *** $p < 0.001$ vs. LPS alone. The expression of iNOS mRNA (B) and protein (C) was determined by as det and mined by as , respectively.

3. PGE₂ 분비 및 COX-2 발현에 대한 효과

LPS로 활성화 된 RAW264.7 세포의 배양액 중에 생성된 PGE₂의 양을 세포배양액으로부터 효소면역반응법으로 측정된 결과, methyl gallate는 농도에 의존적이고 유의적으로 PGE₂의 생성을 감소시켰다(Fig. 4A). 또한 methyl gallate가 PGE₂의 생성과 관련된 COX-2의 유전자와 단백질 발현을 억제하는지 RT-PCR과 Western blot 방법으로 조사하였다.

그 결과 LPS에 의해 증가된 COX-2의 유전자 발현(Fig. 4B)과 단백질 발현(Fig. 4C)이 methyl gallate의 처리 농도(20, 50, 100 μ M)에 의존적으로 억제되었다. 따라서 牧丹皮의 methyl gallate는 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 COX-2 단백질의 발현과정을 농도의존적으로 억제함으로써 PGE₂ 합성을 감소시키는 것으로 조사되었다.

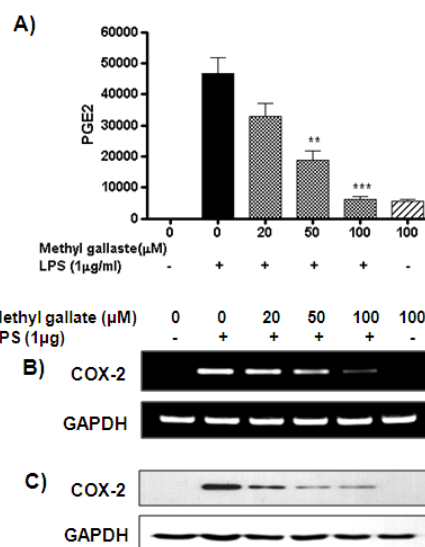


Fig. 4. Effects of methyl gallate on PGE₂ production in LPS-stimulated of RAW264.7 cells

Cells were treated with different concentrations of methyl gallate for 30 min, and then stimulated with or without LPS(1 μ g/ml) for 18h. (A) The PGE₂ concentrations in culture supernatants were measured by enzyme-immunoassay. The values are means of three independent experiments (SD=bars). *** $p < 0.001$ vs. LPS alone. The expression of COX-2 mRNA (B) and protein (C) was determined by RT-PCR and Western blot, respectively.

4. 염증사이토카인 분비 및 유전자 발현에 대한 효과

LPS로 활성화 된 RAW264.7 세포의 배양액 중에 생성된 염증사이토카인(TNF- α , IL-6)의 양을 세포배양액으로부터 ELISA 방법으로 측정된 결과, methyl gallate 20 μ M과 50 μ M 농도에서는 TNF- α 와 IL-6의 분비 억제가 관찰되지 않았으며, 100 μ M 처리 농도에서만 유의적으로 TNF- α , IL-6의 분비가 억제되었다(Fig. 5). 또한 TNF- α 와 IL-6의 유전자 발현을 관찰한 결과, methyl gallate 100 μ M를 처리 하였을 때 감소되는 것을 확인하였다.

5. I- κ B 및 NF- κ B 발현에 대한 효과

대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증유발 핵심전사인자인 I- κ B α 와 NF- κ B에 대한 methyl gallate의 효과를 조사하기 위하여 세포질과 핵으로부터 I- κ B α 와 NF- κ B p65 subunit의 발현을 Western blot로 조사하였다(Fig. 6). 그 결과 세포질에서 LPS에 의해 유도된 I- κ B α 의 degradation은 methyl gallate를 50 μ M과 100 μ M 농도로 처리하였을 때 억제되었으며(Fig. 6A), LPS에 의해 증가된 NF- κ B p65 subunit의 세포 핵 내로의 이동 역시 methyl gallate의 처리에 의해 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 6B). 즉 牧丹皮의 methyl gallate는 대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 주요 염증신호전달경로인 NF- κ B

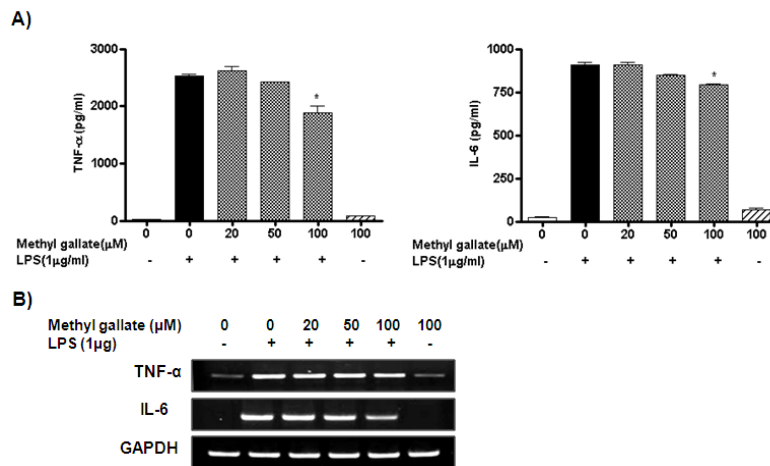


Fig. 5 Effects of methyl gallate on TNF-α and IL-6 production in LPS-stimulated RAW264.7 cells

Cells were treated with different concentrations of methyl gallate for 30 min, and then stimulated with or without LPS(1 μg/ml) for 24h. (A) The cytokine concentrations in culture supernatants were measured by ELISA. The values are means of three independent experiments (SD=bars). * p < 0.05 vs. LPS alone. (B) The expression of cytokine mRNA was determined by RT-PCR.

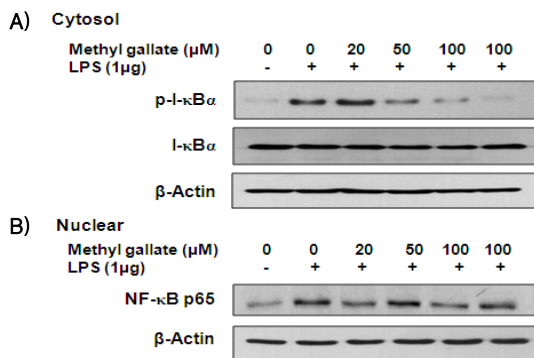


Fig. 6. Effect of methyl gallate on the NF-κB activation in LPS-stimulated RAW264.7 cells

Cells were treated with different concentrations of methyl gallate for 30 min, and then stimulated with or without LPS(1 μg/ml) for 30 min. The NF-κB p65 subunit (A) and I-κBα(B) were assessed in the cytosolic and nuclear extract isolated from cell lysates by Western blot.

pathway를 차단함으로써 염증매개물질 생성을 억제시킬 수 있는 것으로 조사되었다.

고찰

염증반응은 어떤 자극에 대한 생체 조직의 비특이적 면역반응으로써 조직의 변성, 순환장애와 滲出, 조직增殖의 세 가지를 유발하는 복잡한 병변이다³⁾. 대식세포는 초기 염증반응에 관여하는 대표적인 면역세포로서 동물체 내 모든 조직에 존재하며 외부 이물질을 탐지하고 포식하여 죽은 세포를 제거하는 고전적인 기능과 함께 단백질 분해효소, 지질대사물질, 염증사이토카인 등을 분비함으로써 염증반응의 조절에 중요한 역할을 한다^{21,22)}. 즉

외부자극으로부터 활성화된 대식세포는 염증매개물질 분비를 통해 염증반응을 유발함으로써 천식, 기관지염, 관절염, 다발성경화증, 동맥경화증, 뇌졸중, 알츠하이머 병이나 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌질환 등의 만성 염증질환을 유발하게 되며, 질환을 악화시키는 데 기여하게 된다²³⁾.

따라서 최근에는 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가되는 각종 염증매개물질들을 효과적으로 감소시킬 수 있는 항염증 제제 및 치료보조제 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며, 특히 한약재로부터 유래되는 생리활성물질이나 단일화합물들이 약물개발 타겟이 되고 있다⁴⁻⁶⁾.

牡丹皮는 한의학적으로 淸熱涼血, 活血散瘀의 효능이 있어 溫毒發斑, 吐血衄血, 夜熱早涼, 無汗骨蒸, 經閉痛經, 癰腫瘡毒, 跌撲傷痛 등의 증상에 응용되고 있으며⁷⁾, paeonol, paeonoside, paeonolide, paeoniflorin 등의 phenol 성분이 잘 알려져 있다. 특히 paeonol 성분의 약리효능 연구가 많이 보고되고 있는데 동맥경화 억제효과¹⁴⁾, 혈소판 응집억제효과¹⁵⁾, 비만세포로부터 히스타민과 TNF-α의 분비억제효과¹⁶⁾, 식도암세포 증식억제효과¹⁷⁾, 관절활막 세포에서의 TNF-α와 IL-1β 분비억제효과¹⁸⁾ 등이 있다. 그 외 paeoniflorin의 체온저하 효과²⁴⁾, 항염·퀘양 예방효과, 일반 평활근 이완 효과, 진정·진통작용 및 해열작용 등이 보고되고 있다²⁵⁾. 본 연구에서는 牡丹皮의 성분 중 하나인 methyl gallate에 대한 실험연구가 이루어져 있지 않은 것에 착안하여 methyl gallate의 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 유도되는 염증반응에 대한 억제효과를 조사하였다.

NO는 심혈관계, 신경계, 면역계 등의 전달물질 또는 세포사멸에 관여하는 물질로서 체내 여러 조직에서 다양한 생리기능을 하고 있으며 세포 내 항상성 유지, 신경전

달물질 운반, 항암작용, 세포독성 등 매우 다양한 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다²⁾.

NO의 합성효소인 iNOS는 대식세포에서 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 와 같은 염증성 자극에 의해 지속적으로 다량 생성되는 것으로 알려져 있는데, 특히 LPS와 세균의 lipopeptide를 처리하였을 때 그 생성이 급격히 증가한다고 보고되어 있다^{2,25)}. NO는 원래 염증성과 항염증성의 기능을 동시에 하는 것으로 알려져 있지만, 생체 내 과도한 분비는 오히려 세포독성을 통해 세포를 파괴하고 쇼크에 의한 혈관 확장 및 염증반응 가속화를 통해 조직 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다^{2,25)}. 따라서 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가하는 NO, iNOS의 생성을 효과적으로 억제하는 것은 다양한 염증질환에서 유용한 치료법으로 여겨지고 있다.

NO 생성을 억제하는 약물의 경우 전처리에 의해 iNOS의 promoter activity가 억제되거나, iNOS 유전자 전사가 억제되는 경우 외에 세포 밖으로 분비된 NO를 소거하는 것과 관련이 있는 것으로 알려져 있는데^{2,26)}, 본 연구결과에서 牡丹皮의 성분인 methyl gallate는 iNOS의 유전자 전사를 억제함으로써 NO 생성을 억제할 수 있는 것으로 나타났다.

Prostaglandins은 아라키돈산으로부터 cyclooxygenase (COX) 효소에 의해 합성되는 염증물질로서 COX-1은 대부분의 조직에서 꾸준히 만들어져 housekeeping 효소의 역할을 하는 반면, COX-2는 염증과 같은 병적인 환경에서 다량 분비되는 것으로 알려져 있다²⁷⁾. 최근 COX-2를 선택적으로 억제하는 약물들이 COX-2 유도에 의한 염증 반응을 줄이기 때문에 치료제로서 많이 개발되고 있다. 조직이 손상되면 물리적인 손상뿐 아니라 염증매개물질이 다량 분비되기 때문에 염증과 통증이 유발되게 되며 특히 COX-2로부터 합성되는 PGE₂는 조직손상이 일어나는 부위에서 국부적으로 생성되어 말초신경 말단부위에 작용함으로써 통증에 대한 역치를 감소시키게 된다²⁸⁾.

본 연구에서 牡丹皮의 성분인 methyl gallate는 대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 PGE₂ 분비를 유의적으로 감소시켰다. 만성 염증질환에 현재 사용하고 있는 비스테로이드성 소염제는 PGE₂ 억제를 통해 단기적으로 염증 증상을 조절하는데 도움이 되지만 Th1 반응의 편향을 초래하여 오히려 질병을 지속시키게 되므로 PGE₂가 중요한 역할을 하는 염증질환에서 methyl gallate의 PGE₂ 작용과 선택적 조절에 대한 연구가 추후 필요할 것으로 생각된다.

LPS는 염증을 유발하는 주요 자극원이며 다양한 염증 사이토카인의 분비를 자극함으로써 신체 각 부위의 면역세포의 염증 반응을 유발하게 된다^{21,22)}. 본 연구에서 牡丹皮의 성분인 methyl gallate는 대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 주요 염증사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 유전자 발현 억제를 통해 이들의 분비를 감소시켰다. 이는 methyl gallate가 활성화된 대식세포로부터 분비되는 염증매개물질인 NO, PGE₂와 더불어 염증사이토카인 분비

또한 억제시킴으로써 항염증 효과가 있으며, 이는 다양한 염증질환 치료에 효과적일 수 있음을 의미한다.

NF- κ B는 염증반응 조절에 관여하는 핵심 전사인자 중 하나이며 세포생존, 면역조절, 급성반응 및 세포주기 조절 등 다양한 조절 역할을 하고 있다²⁸⁾. 외부 자극에 의해 세포질에 존재하던 NF- κ B는 NF- κ B inhibitor인 I- κ B와 degradation을 통해 핵 안으로 이동하면서 염증매개물질 유전자의 전사를 유도하게 된다. NF- κ B는 염증사이토카인과 면역세포 이동에 중요한 접합 분자들, 케모카인 등의 유전자 발현을 유도하기 때문에 초기 염증반응 조절에 중요한 역할을 하게 된다. 본 연구에서 methyl gallate는 세포질 내 I- κ B의 degradation을 억제하여 NF- κ B의 핵 내로의 이동을 차단함으로써 염증매개물질 발현을 유도하는 NF- κ B pathway를 차단할 수 있는 것으로 나타났다. 이는 methyl gallate가 활성화된 대식세포에서 NF- κ B pathway를 차단함으로써 염증매개물질의 생성을 감소시킬 수 있음을 의미한다.

한편 methyl gallate에 대한 효능 연구로는 오배자 (Chinensis Galla) methyl gallate의 항균효과²⁹⁾와 芍藥 (Paeoniae Radix Alba) methyl gallate의 비만세포에서의 COX-2와 5-LOX 저해효과³⁰⁾가 보고되어 있다.

결론적으로 牡丹皮의 성분인 methyl gallate는 대식세포에서 염증신호전달경로인 NF- κ B pathway의 차단을 통해 LPS에 의해 유도되는 염증매개물질들의 생성을 억제시킴으로써 항염증 효과를 나타내었다.

결론

牡丹皮의 성분인 methyl gallate의 항염증효과를 조사하기 위하여 대식세포로부터 LPS에 의해 유도되는 염증매개물질에 대한 억제효과를 조사하였다.

1. Methyl gallate는 100 μ M 농도까지 RAW264.7 세포에 독성을 나타내지 않았다.
2. Methyl gallate는 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO와 PGE₂의 생성을 유의적으로 감소시켰으며, 합성효소인 iNOS와 COX-2의 유전자와 단백질의 발현을 억제하였다.
3. Methyl gallate는 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 생성을 유의적으로 감소시켰으며, 이들의 유전자 발현을 억제하였다.
4. Methyl gallate는 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NF- κ B pathway를 차단하였다.

따라서 methyl gallate는 활성화된 대식세포로부터 생성되는 염증매개물질을 유의적으로 억제함으로써 항염증 효과가 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 동국대학교 교내연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드린다.

참고문헌

- Guo LY, Hung TM, Bae KH, Shin EM, Zhou HY, Hong YN, Kang SS, Kim HP, Kim YS. Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *Eur J Pharmacol.* 2008 ; 591 : 293-9.
- Boscá L, Zeini M, Través PG, Hortelano S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology.* 2005 ; 208 : 249-58.
- Wei W, Li XY, Zhang HQ, Wu SG. Anti-inflammatory and immunopharmacology. 1st ed. Beijing : Renminweishengchubanshe. 2004 : 10-7.
- Wang H, Xu T, Lewin MR. Future possibilities for the treatment of septic shock with herbal components. *Am J Emerg Med.* 2009 ; 27 : 107-12.
- Clement-Kruzel S, Hwang SA, Kruzel MC, Dasgupta A, Actor JK. Immune modulation of macrophage pro-inflammatory response by goldenseal and Astragalus extracts. *J Med Food.* 2008 ; 11 : 493-8.
- Talhok RS, Karam C, Fostok S, El-Jouni W, Barbour EK. Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. *J Med Food.* 2007 ; 10 : 1-10.
- 全國韓醫科大學 共同教材編輯委員會 編著. 本草學. 永林社. 2007 : 235-6.
- OG Kweon, JC Son, SC Kim, SK Chung, SW Park. Antimicrobial and Antioxidative Activities from Moutan Cortex Extract. *Korean J Postharvest Sci. Technol.* 1998 ; 5 : 281-5.
- HJ Seon, HY Sil. Isolation and Identification of Antimicrobial Compound from Mokdan Bark (*Paeonia suffruticosa* ANDR). *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2003 ; 32 : 1059-65.
- SM Park, DW Jun, CH Park, JS Jang, SK Park, BS Ko, BJ Kim, SB Choi. Hyperglycemic effects of crude extracts of Moutan Radicis Cortex. *Kor J Food Sci Technol.* 2004 ; 36 : 472-7.
- Rho S, Chung HS, Kang M, Lee E, Cho C, Kim H, Park S, Kim HY, Hong M, Shin M, Bae H. Inhibition of production of reactive oxygen species and gene expression profile by treatment of ethanol extract of Moutan Cortex Radicis in oxidative stressed PC12 cells. *Biol Pharm Bull.* 2005 ; 28 : 661-6.
- JY Kim, HS Ju, JY Ban, KS Song, YH Seong. Moutan Cortex Extract Inhibits Amyloid β Protein (25-35)-induced Neurotoxicity in Cultured Rat Cortical Neurons. *Kor J Pharmacogn.* 2008 ; 16 : 409-15.
- Kim J, Lee H, Lee Y, Oh BG, Cho C, Kim Y, Shin M, Hong M, Jung SK, Bae H. Inhibition effects of Moutan Cortex Radicis on secretion of eotaxin in A549 human epithelial cells and eosinophil migration. *J Ethnopharmacol.* 2007 ; 114 : 186-93.
- Li H, Dai M, Jia W. Paeonol attenuates high-fat-diet-induced atherosclerosis in rabbits by anti-inflammatory activity. *Planta Med.* 2009 ; 75 : 7-11.
- Hirai A, Terano T, Hamazaki T, Sajiki J, Saito H, Tahara K, Tamura Y, Kumagai A. Studies on the mechanism of antiaggregatory effect of Moutan Cortex. *Thromb Res.* 1983 ; 31 : 29-40.
- Kim SH, Kim SA, Park MK, Kim SH, Park YD, Na HJ, Kim HM, Shin MK, Ahn KS. Paeonol inhibits anaphylactic reaction by regulating histamine and TNF- α . *Int Immunopharmacol.* 2004 ; 4 : 279-87.
- Sun GP, Wan X, Xu SP, Wang H, Liu SH, Wang ZG. Antiproliferation and apoptosis induction of paeonol in human esophageal cancer cell lines. *Dis Esophagus.* 2008 ; 21 : 723-9.
- Wu M, Gu Z. Screening of bioactive compounds from moutan cortex and their anti-inflammatory activities in rat synoviocytes. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2009 ; 6(1) : 57-63.
- HJ Park, MY Choi. In vitro Antiinflammatory Activity of Paeonol from the Essential Oil and Its Derivative Methylpaeonol. *Kor J Pharmacogn.* 2005 ; 36 : 116-20.
- Lee SJ, Lee IS, Mar W. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 activity by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose in murine macrophage cells. *Arch Pharm Res.* 2003 ; 26 : 832-9.
- Hume DA, Wells CA, Ravasi T. Transcriptional regulatory networks in macrophages. *Novartis Found Symp.* 2007 ; 281 : 2-18.
- Lin WJ, Yeh WC. Implication of Toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock. *Shock.* 2005 ; 24 : 206-9.
- Van der Meide PH, Schellekens H. Cytokines and the immune response. *Biotherapy.* 1996 ; 8 : 243-9.
- Yan D, Saito K, Ohmi Y, Fujie N, Ohtsuka K. Paeoniflorin, a novel heat shock protein-inducing

- compound. *Cell Stress Chaperones*. 2004 ; 9 : 378-89.
25. Jiang WL, Chen XG, Zhu HB, Gao YB, Tian JW, Fu FH. Paeoniflorin inhibits systemic inflammation and improves survival in experimental sepsis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009 ; 105 : 64-71.
26. Boscá L, Zeini M, Través PG, Hortelano S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology*. 2005 ; 208 : 249-58.
27. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med*. 2002 ; 53 : 35-57.
28. Witkamp R, Monshouwer M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. *Vet Q*. 2000 ; 22 : 11-6.
29. Kang MS, Oh JS, Kang IC, Hong SJ, Choi CH. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. *J Microbiol*. 2008 ; 46 : 744-50.
30. Kim JI, Kim HH, Kim S, Lee KT, Ham IH, Whang WK. Antioxidative compounds from *Quercus salicina* Blume stem. *Arch Pharm Res*. 2008 ; 31 : 274-8.