

## Oak Wood Vinegar Suppresses the Expression of Cyclooxygenase-2 Induced by TLR4 Agonist

Sae-mi Yun<sup>1,3</sup>, Se-jeong Park<sup>2,3</sup>, A-neum Lee<sup>1</sup>, Sang-il Ahn<sup>1</sup> and Hyung-Sun Youn<sup>1,2,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Laboratory Science and <sup>2</sup>Department of Medical Biotechnology, College of Medical Sciences, Soonchunhyang University, Chungnam 336-745, Korea

Toll-like receptors (TLRs) recognize molecular structures derived from microbes including bacteria, viruses, yeast, and fungi. TLRs have emerged as a major signaling component of the mammalian host defense. TLR4 is a member of the Toll family that senses lipopolysaccharide (LPS), a cell wall component of gram negative bacteria. LPS recognition by TLR4 requires an additional accessory molecule, MD-2. LPS induces the activation of NF- $\kappa$ B and IRF3 through MyD88 or TRIF-dependent pathways. The activation of NF- $\kappa$ B leads to the induction of inflammatory gene products including cytokines and cyclooxygenase-2 (COX-2). This study was carried out to investigate the anti-inflammatory effects of oak wood vinegar. Oak wood vinegar inhibits the NF- $\kappa$ B activation and COX-2 expression induced by LPS. These results provide new ideas to understand the mechanism of oak wood vinegar for its anti-bacterial and anti-inflammatory activities.

**Key Words:** Toll-like receptors, Oak wood vinegar, Lipopolysaccharide, NF- $\kappa$ B, Cyclooxygenase-2

염증 (inflammation)은 감염 (infection)이나 외상 (trauma)에 대하여 숙주가 반응하는 중요한 요소이다. 특히 염증의 시작은 선천성 (innate)과 후천성 면역 반응을 유도하는 중요한 요소이다. 염증 반응에 있어서 가장 잘 알려진 pathogen-associated molecular pattern (PAMP) receptors는 Toll-like receptors (TLRs)이다. TLRs는 박테리아, 바이러스, 효모, 그리고 곰팡이 등 거의 모든 병원균들이 가지고 있는 독특한 구조를 인식하고, 이러한 병원균들에 대하여 염증 반응 및 선천성 면역 (innate immunity) 반응을 유도한다 (Medzhitov, 2001; O'Neill, 2004; Takeda and Akira, 2005; Vogel et al., 2003). 그러므로 각 TLRs의 활성화에 따른 세포학적인 반응을 밝혀내는 것은 염증 및 선천성 면역 반응에 대한 이해를 돕는데 기본이라 할 수 있을 것이다.

현재까지 13개의 TLRs가 포유동물 안에서 밝혀졌다.

각각의 TLRs는 고유의 신호전달체계를 가지고 있으며, 병원균들에 대한 독특한 생물학적인 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다. TLRs는 세포외부에 leucine-rich repeats (LRRs) domain과 세포내부에 Toll/IL-1R homologous (TIR) region을 가지고 있는 막을 통과하는 수용체이다 (Takeda and Akira, 2005). TLRs에 의해서 PAMPs가 인식되면 신호 전달과정의 활성화가 유도된다. 이렇게 활성화된 신호들은 전사 요소 nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)의 활성화를 유도하여 결국 cytokine이나 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 염증을 유발하는 유전체들을 유도하여 암이나 질병을 유발한다 (Takeda and Akira, 2005).

참나무를 탄화 (열분해)하는 과정에서 발생하는 연기를 냉각시켜 얻어지는 목초액 (oak wood vinegar)은 담갈색 내지는 적갈색을 띠고 특유의 냄새를 지니고 있는 pH 3~4 정도의 산성 액상 천연물질이다 (Jung et al., 2007). 목초액의 성분은 80~90%가 물과 초산이고 나머지는 페놀류, 카르보닐화합물류, 알코올류 등 200여종의 유기화합물과 다수의 미네랄성분이 함유되어 있다 (Lee et al., 2008). 목초액은 당뇨, 변비, 소화불량, 무좀, 중이염 등의 여러 가지 질환에 대하여 효과가 있는 것으로 알려져 있어 민간요법에서 많이 사용되어 오고 있으며, 특히 바이러스, 곰팡이 등의 균에 대하여 항균작용이 뛰어나며 항

\*Received: 2 July, 2009 / Revised: 16 September, 2009

Accepted: 18 September, 2009

†Corresponding author: Hyung-Sun Youn, Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Sciences, Soonchunhyang University, 646 Eupnae-Ri, Shinchang-Myun, Asan-Si, Chungnam 336-745, Korea.

Tel: 82-41-530-3086, Fax: 82-41-530-3085

e-mail: hyoun@sch.ac.kr

<sup>3</sup>Sae-mi Yun and Se-jeong Park contributed equally to this work

산화 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Jung et al., 2007). 최근에는 아토피성 피부염의 치료효과, 면역조절 효과 등 우수한 약리 및 임상 효능이 알려지고 있다. 하지만 목초액이 여러 가지 효능을 가지고 있음에도 불구하고, 타르, 페놀, 메탄올, 크레졸, 벤조피렌 등과 같은 유해성분이 함유되어 그 적용이 제한되어지고 있다 (Lee et al., 2008). 따라서 목초액을 식품, 음료 및 여러 분야에 응용하기 위해서는 탈취 및 정제과정이 요구되며, 앞으로 많은 연구가 체계적으로 수행되어야 할 것이다.

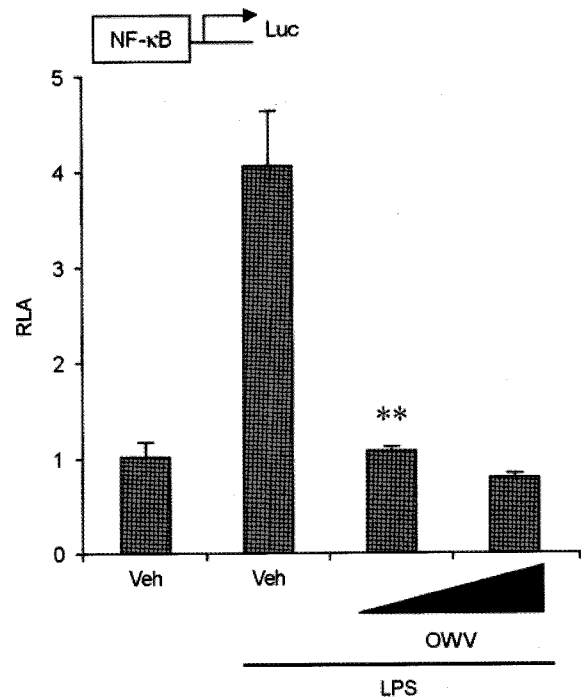
그래서 우리는 이번 연구를 통하여 목초액이 TLR4 길 항제 (agonist)인 지질다당질 (LPS, TLR4 agonist)에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화와 NF- $\kappa$ B 활성화에 의해서 유도되는 유전자인 COX-2 발현 억제효과를 알아보았다.

본 실험에 사용한 목초액은 충남 계룡시 엄사면 엄사리 소재 숯가마에서 만든 참나무 목초액을 사용하였다. LPS는 List Biological Lab (San Jose, CA, USA) 회사로부터 구입하였다. COX-2와  $\beta$ -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 회사로부터 구입하였다. 그 밖의 다른 시약들은 Sigma-Aldrich 회사로부터 구입하였다. RAW264.7 cells (a murine monocytic cell line, ATCC TIB-71)은 10% (v/v) FBS, 100 units/mL Penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin을 포함하고 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다. 세포들은 5% CO<sub>2</sub>/air를 포함하고 있는 37°C 배양기 안에서 배양하였다. NF- $\kappa$ B 발광 plasmid는 F. Mercurio (Signal Pharmaceuticals, San Diego, CA, USA)로부터 제공받았다. Transfection을 위한 모든 DNA는 EndoFree Plasmid Maxi kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 준비되었다. NF- $\kappa$ B 발광 효소 유전자 분석은 선행연구에서 사용한 방법에 의하여 분석하였다 (Youn et al., 2005; Youn et al., 2006). 발광 효소 plasmid와 HSP70- $\beta$ -galactosidase plasmid는 Superfect transfection 시약 (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 세포 안으로 transfection 시켰다. 발광효소의 활성화는 luciferase assay system (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정하였다. 발광효소의 활성화는  $\beta$ -galactosidase의 활성화를 측정하여 표준화시켰다. 각각의 데이터 값은 세 개가 한벌의 실험으로 얻어졌으며, mean  $\pm$  standard error mean (SEM)으로 표현되었다. 통계처리는 Mann Whitney U 검사를 사용하였다.

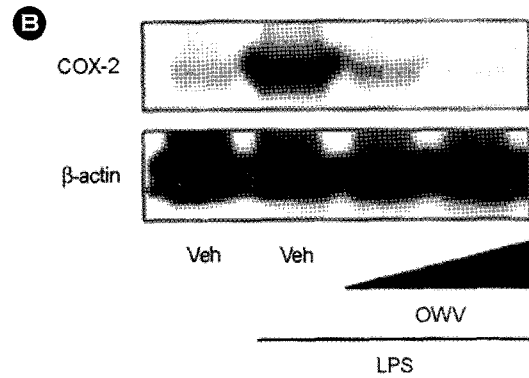
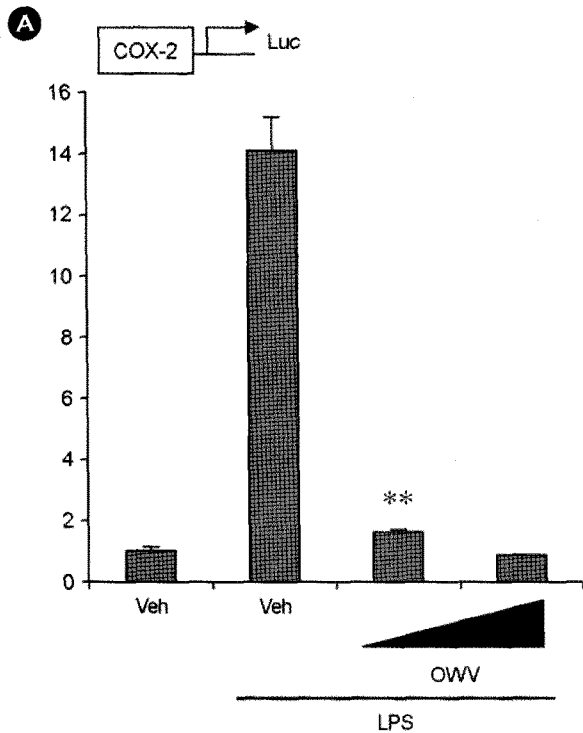
단백질 추출물들은 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에서 분리되어 polyvinylidene difluoride membrane으로 전기영동에 의해서 이전되

었다. Membrane은 0.1% Tween 20 그리고 5% 탈지 건조된 우유를 포함하고 있는 phosphate-buffered saline을 가지고 blocking 하였다. Membrane은 1차 항체를 가지고 블러팅하고, horseradish peroxidase와 복합된 2차 항체에 노출시킨 다음, ECL western blot detection 시약을 사용하여 원하는 단백질을 규명하였다.

미생물들이 숙주안에 침입하면, 최초의 면역체계인 TLRs가 병원균들을 인식해서 신호를 아래로 보내 NF- $\kappa$ B 활성화를 유도한다. 일반적으로 NF- $\kappa$ B 활성화는 후천성 면역 반응을 유도하여 여러 질병으로부터 숙주를 보호하여 주지만 병원균들의 계속된 자극에 의하여 숙주의 면역체계에 과부하가 걸리게 되면 NF- $\kappa$ B 활성화는 오히려 염증을 유도하여 여러 질병을 발생하게 한다. 그래서 여러 병원균들로부터 유도되는 NF- $\kappa$ B 활성화를 미리 막을 수만 있다면 COX-2와 같은 염증 유전자 생성물들을 줄여서 여러 질병으로부터 숙주를 보호할 수 있게 되는 것이다.



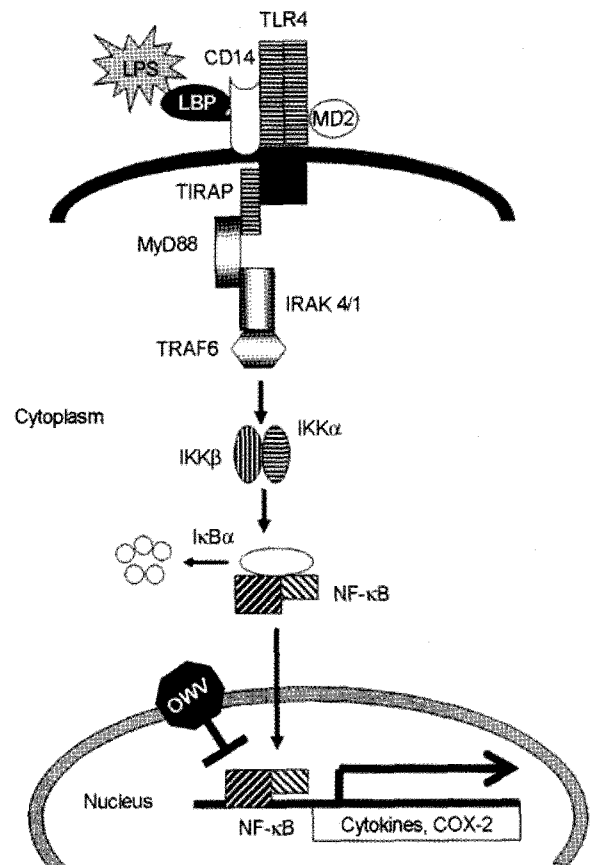
**Fig. 1.** Oak wood vinegar suppresses the NF- $\kappa$ B activation induced by LPS. RAW264.7 cells were transfected with NF- $\kappa$ B luciferase reporter plasmid and pre-treated with oak wood vinegar (5, 10  $\mu$ l) for 1 hr and then treated with LPS (10 ng/mL) for an additional 6 hrs. Cell lysates were prepared and luciferase and  $\beta$ -galactosidase enzyme activities were measured as described in "Materials and Methods". Relative luciferase activity (RLA) was normalized with  $\beta$ -galactosidase activity. Values are mean  $\pm$  SEM (n=3). \*\*, Significantly different from LPS alone,  $P < 0.01$ . Veh, vehicle; OWV, oak wood vinegar.



**Fig. 2.** Oak wood vinegar suppresses the COX-2 expression induced by LPS. **A)** RAW264.7 cells were transfected with COX-2 luciferase reporter plasmid and pre-treated with oak wood vinegar (5, 10  $\mu$ l) for 1 hr and then treated with LPS (10 ng/mL) for an additional 6 hrs. Cell lysates were prepared and luciferase and  $\beta$ -galactosidase enzyme activities were measured as described in "Materials and Methods". Relative luciferase activity (RLA) was normalized with  $\beta$ -galactosidase activity. Values are mean  $\pm$  SEM (n=3). \*\*Significantly different from LPS alone,  $P < 0.01$ . **B)** RAW-264.7 cells were pretreated with oak wood vinegar (5, 10  $\mu$ l) for 1 hr and then further stimulated with LPS (10 ng/mL) for 6 hrs. Cell lysates were analyzed for COX-2 and  $\beta$ -actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; OWV, oak wood vinegar.

먼저 우리는 목초액이 LPS (TLR4 agonist)에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제하는지를 알아보았다. 목초액은 LPS에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제하였다 (Fig. 1). 다음 실험으로 NF- $\kappa$ B 활성화에 의해서 조절되는 유전자인 COX-2 발현이 목초액에 의해서 억제되는지 알아보았다. 이 실험을 위해서 COX-2 발광효소 유전자 분석과 웨스턴 블롯팅 방법이 사용되었다. 목초액은 LPS에 의해서 유도된 COX-2 발현을 억제시켰다 (Fig. 2). 이러한 결과는 목초액이 TLR ligand에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화와 COX-2 발현을 억제함으로써 염증 억제제로써 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 제시해 준다고 할 수 있겠다.

TLRs 중에서 특별히 TLR4는 LPS를 인식하는 수용체로써 알려져 있다. LPS는 그람 음성 세균의 세포벽 구성 요소이다. LPS는 lipid A (endotoxin), core oligosaccharide, 그리고 O-antigen으로 구성되어 있다 (Raetz and Whitfield, 2002). TLR4는 LPS의 lipid A를 인식하며, 이것은 대식세포나 수지상세포와 같은 여러 세포에 존재하는 TLR4/MD2/CD14 복합체를 통하여 일어난다. LPS는 최초의 반응으로 TLR4의 이합체 형성을 요구한다. 이합체 형성은 adaptor molecule인 myeloid differential factor 88 (MyD88) 또는 TIR domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$  (TRIF)를 유도한다 (Kawai and Akira, 2007). MyD88은



**Fig. 3.** Oak wood vinegar suppresses the NF- $\kappa$ B activation in TLR signaling pathway.

TLR3를 제외한 모든 포유동물에서 발견되는 adaptor 분자이다. MyD88은 IRAK(IL-1 receptor associate kinase)을 유도하고, IRAK은 TRAF6 (TNF receptor associated factor 6)를 유도하며, TRAF6는 I $\kappa$ B kinase (inhibitor of kappa B kinase)를 활성화 시켜 전사 요소 NF- $\kappa$ B 활성화를 유도한다 (Fig. 3). NF- $\kappa$ B 활성화는 결국 cytokine이나 COX-2와 같은 염증 유전자 발현을 유도하여 여러 질병을 유도하게 된다. 그러므로 TLR를 통한 NF- $\kappa$ B 활성화나 COX-2 발현을 억제할 수 있다면 여러 병원균들로부터 유도되는 염증 반응이나 만성적인 질병들을 막거나 치유할 수 있을 것이다.

우리는 이번 연구를 통하여 목초액이 LPS에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화와 COX-2 발현을 억제시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 목초액이 TLRs 신호전달체에 의해서 조절되는 염증 반응이나 또는 뒤이어 발생하는 여러 만성질환들을 조절할 수 있다는 중요한 가능성을 제시해 준다고 할 수 있겠다.

## REFERENCES

- Jung IS, Kim YJ, Gal SW, Choi YJ. Antimicrobial and antioxidant activities and inhibition of nitric oxide synthesis of oak wood vinegar. *J Life Sci.* 2007. 17: 105-109.
- Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* 2007. 13: 460-469.
- Lee GW, Kim AR, Cho JS. HPLC analysis of organic acids, phenol, and benzopyrene in wood vinegar. *Yakhak Hoeji* 2008. 52: 12-19.
- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001. 1: 135-145.
- O'Neill LA. TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol.* 2004. 25: 687-693.
- Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002. 71: 635-700.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005. 17: 1-14.
- Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv.* 2003. 3: 466-477.
- Youn HS, Lee JY, Fitzgerald KA, Young HA, Akira S, Hwang DH. Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J Immunol.* 2005. 175: 3339-3346.
- Youn HS, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem Pharmacol.* 2006. 72: 62-69.