

Anti-inflammatory Properties of Meso-dihydroguaiaretic Acid in Lipopolysaccharide-induced Macrophage

Yong-Jae Kim*, Yeo-Jin Kang* and Tack-Joong Kim†

Division of Biological Science and Technology, College of Science and Technology,
Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

Meso-dihydroguaiaretic acid (MDGA) is a medicinal herbal product isolated from the bark of *Machilus thunbergii* Sieb. et Zucc. (Lauraceae). It exhibits a neuroprotective effect and also exerts cytotoxicity to certain cancer cells. In the present study, we investigated whether or not MDGA inhibits inflammatory reaction through the inhibition of nitric oxide (NO) generation. The results showed that MDGA (5~25 μ M) inhibited 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS)-induced NO generation in macrophage Raw 264.7 cells in a concentration-dependent manner. We also measured the cytotoxic effects of MDGA on Raw 264.7 cells and found no evidence of cytotoxicity. The inhibition of NO generation by MDGA was consistent with the inhibitory effect on the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS). In addition, MDGA inhibited the LPS-induced gene expression of interleukin-1 β (IL-1 β) as well as tumor necrosis factor- α (TNF- α). The present results may provide that MDGA has anti-inflammatory properties through inhibition of the toll-like receptors (TLRs) pathway, and suggest that MDGA can be used as an anti-inflammatory agent.

Key Words: Meso-dihydroguaiaretic acid, Toll-like receptor, Nitric oxide

서 론

염증 반응은 외부 병원균에 대한 숙주의 방어 체제로 알려져 있다. 선천면역은 대부분의 생물체에서 보이는 면역 체계로, 숙주에 침입한 병원균을 인식하고 이를 제거하기 위한 반응이 일어나며, 생체 내에 질병을 일으킬 수 있는 병원균 중의 하나인 그람 음성균의 세포 외벽은 lipopolysaccharide (LPS)로 이루어져 있다 (Ulevitch et al., 2004). 대식세포의 세포벽에는 이와 같은 분자를 인식하여 활성화 하는 toll-like receptor (TLR)들을 갖추고 있다 (Yun et al., 2009). TLR family는 현재 13개의 종류가 밝혀져 있으며, 이 중 LPS를 인지할 수 있는 수용체는 TLR4이다 (Yun et al., 2009). TLR4에 의해서 LPS가 인식되면 그 아래의 분자들의 활성화가 생겨 신호전달 과정이 일어나게 된다 (Moon and Pyo, 2007).

TLR4 신호전달경로에는 MyD88 의존성 신호전달과 비의존성 신호전달 두 가지 과정이 있다. MyD88 의존성 신호전달은 TLR4의 toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain 과 MyD88이 상호 조절하여 IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)을 활성화 시킨다. IRAK는 tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)와 복합체를 이루어 TRAF6를 활성화하여 신호전달을 일으킨다 (Takeda and Akira, 2004).

Nitric oxide (NO)는 체내에서 혈관 확장자로서 조절을 하고 조직을 손상시킨다. 이와 같은 NO를 합성하는 효소가 nitric oxide synthase (NOS)이다. NOS는 neural NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS)의 종류가 있다 (Min et al., 2009). 이 중 nNOS와 eNOS는 체내에 항상 발현되어 생체 내 NO의 양을 소량으로 존재하게 하여 항상성을 유지하는 조절자 역할을 한다. 그러나 LPS에 의해 유도되는 iNOS는 L-arginine을 citrulline으로 전환하며 NO를 대량으로 생성하게 된다 (Min et al., 2009). NO가 과량으로 생성되게 되면 류마티스 관절염이나 천식, 파킨슨병 등의 염증성 질병에 노출되게 되며, 이러한 외부 병원균의 침입에 대한 iNOS의 발현은 염증 반응을 조절한다 (Min et al., 2009).

후박나무 (*Machilus thunbergii*)에서 추출한 Meso-

*접수일: 2010년 4월 10일 / 수정일: 2010년 4월 30일
채택일: 2010년 4월 30일

†교신저자: 김택중, (우) 220-710 강원도 원주시 흥업면 매지리 234,
연세대학교 과학기술대학 생명과학기술학부
Tel: 033-760-2242, Fax: 033-760-2183
e-mail: ktj@yonsei.ac.kr

*Yong-Jae Kim and Yeo-Jin Kang contributed equally to this work

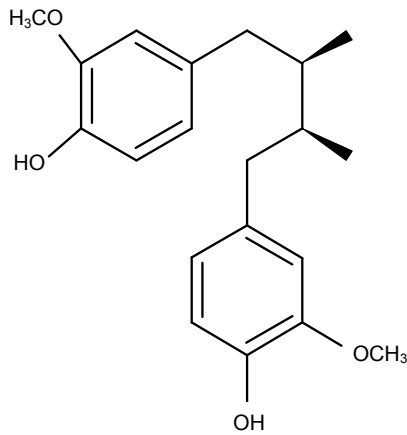


Fig. 1. The structure of meso-dihydroguaiaretic acid (MDGA).

dihydroguaiaretic acid (MDGA)는 glutamate나 staurosporine에 의해 유도되는 신경독성에 대해 신경 보호제로서 효과가 있다고 보고되었다 (Ma et al., 2005, Ma et al., 2006). 그리고, MDGA는 피부노화 예방을 위한 matrix metalloproteinase 억제 효과가 보고되었다 (Moon and Jung, 2005; Moon and Jung, 2006). 최근, MDGA는 골수에서 파생된 비만세포에서 다른 염증과 알러지 매개물질인 prostaglandins D₂ (PGD₂), leukotriene C₄ (LTC₄)를 억제함을 확인하였다 (Moon et al., 2008).

본 연구에서 후박나무에서 분리한 MDGA를 이용하여 Raw 264.7 세포에서 항염증 효과를 연구하였으며, MDGA의 세포독성을 포함해 LPS에 의해 유도된 NO의 생성량 변화와 염증관련 유전자의 발현 변화를 분석 비교하였다.

재료 및 방법

세포배양

MDGA는 Dr. Sang Hyun Sung (Seoul National University, Seoul, Korea)으로 부터 공급받았다 (Ma et al., 2004, Fig. 1). Raw 264.7 세포는 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 들어있는 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 배양하였다. 세포는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

Nitrite Assay

Raw 264.7 세포에 24 well에서 MDGA를 처리하고 LPS (100 ng/ml)를 18시간 동안 처리하였다. 상층액을 동량의 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid)와 혼합하여, 10분간

상온에서 반응시켰다. NaNO₂ standard curve를 사용하여 NO의 생성량을 microplate reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용해 550 nm에서 측정하였다.

세포독성

Raw 264.7 세포에 96 well에서 MDGA를 17시간 동안 처리하였다. EZ-Cytox kit (Daeil Lab., Seoul, Korea)를 10 µl 씩 넣어주고 1시간 동안 37°C에서 배양시킨 후, microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Raw 264.7 세포에 24 well에서 MDGA를 처리하고 LPS (100 ng/ml)를 18시간 동안 처리하였다. Trizol 시약을 이용하여 total RNA를 추출하였다. Total RNA는 1 µg으로 정량하여 PreMix RT/PCR kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이 때 사용한 primer: iNOS (sense) 5'-ATG GCT TGC CCC TGG AAG TTT CTC-3'; iNOS (antisense) 5'-CCT CTG ATG GTG CCA TCG GGC ATC TG-3'; IL-1β (sense) 5'-CAG GATGAG GAC ATG AGC ACC-3'; IL-1β (antisense) 5'-CTC TGC AGA CTC AAA CTC CAC-3'; TNF-α (sense) 5'-ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC-3'; TNF-α (antisense) 5'-TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT-3'; β-actin (sense) 5'-GTG GGC CGC CCT AGG CAC CAG-3'; β-actin (antisense) 5'-GGA GGA AGA GGA TGC GGC AGT-3'이고, PCR은 94°C, 5 min 후에 94°C, 45 sec; 56°C, 45 sec; 72°C, 1 min을 40 cycle 수행하고 72°C, 10 min 수행하였다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 EtBr에 의해 자외선으로 관찰하였다.

통계분석

실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 통계처리는 One-way ANOVA, Dunnett's test를 따랐다. P value가 <0.05와 <0.01인 것을 통계학적으로 의미가 있다고 간주하였다.

결과 및 고찰

대식세포에서 LPS에 의해 유도된 NO 생산에 있어 MDGA의 억제 효과

대식세포가 LPS를 인식하게 되면, 이를 세포 내 TLR4에서 인지하여, 세포 내 신호전달 과정이 생긴다. 이 과

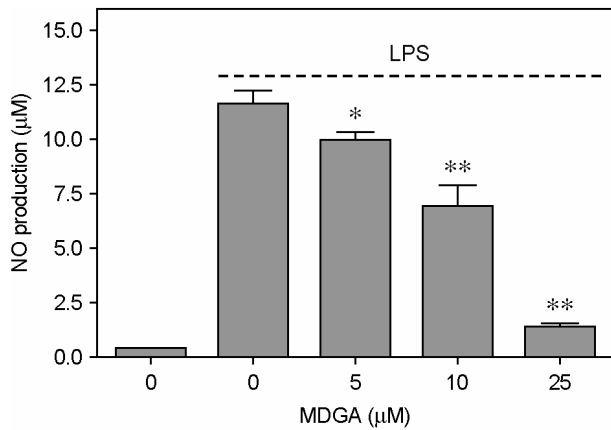


Fig. 2. Effect of MDGA on LPS-induced NO production in Raw 264.7 cells. Cells were plated at 1×10^6 cells/ml in 24 well plates and stimulated with LPS (100 ng/ml) in the absence or presence of MDGA (5 μ M, 10 μ M, and 25 μ M) for 18 h. The isolated supernatant analyzed for NO levels by Griess reaction. Each 100 μ l of culture supernatant was mixed with an equal volume of Griess reagent. The culture supernatant incubated at room temperature for 10 min. The absorbance at 550 nm was measured by ELISA. The results are presented as the mean values (\pm S.D.) from three independent experiments, each performed in triplicate (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$).

정에서 MyD88 의존적인 신호전달이 생기게 되고, 이들의 결과로 염증 매개물질들을 방출한다 (Yun et al., 2009). 우리는 먼저 대식세포로 알려진 Raw 264.7 세포에서 MDGA가 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 억제할 수 있는지 연구하였다. NO의 생성량을 측정하기 위하여 Raw 264.7 세포에, MDGA를 각각 5, 10, 25 μ M이 되도록 전처리하고 30분 후, LPS를 100 ng/ml의 농도로 처리하여 18시간 배양하였다. 실험 결과, Raw 264.7 세포에서 LPS 처리에 의해 0.36 μ M에서 11.56 μ M로 NO의 양이 증가됨을 확인할 수가 있었다. 또한 MDGA에 의해 농도 5, 10, 25 μ M에 의해 각각 9.90, 6.86, 1.32 μ M까지 농도 의존적으로 NO의 생성량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 이러한 연구 결과는 MDGA가 대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 신호전달 과정에 관여하여 농도 의존적으로 염증 매개물질인 NO를 억제한다는 것을 보여준다.

MDGA의 세포독성 효과

MDGA에 의한 NO 생성량의 감소가 세포독성에 의한 세포 수의 감소가 원인이었는지 확인하기 위해 세포 생존률 실험을 진행하였다. Raw 264.7 세포에 MDGA를 각 5, 10, 25 μ M를 처리하여, NO 생성량 측정과 동일한 조건으로 18시간 배양하였다. 우선 광학현미경을 이용하여

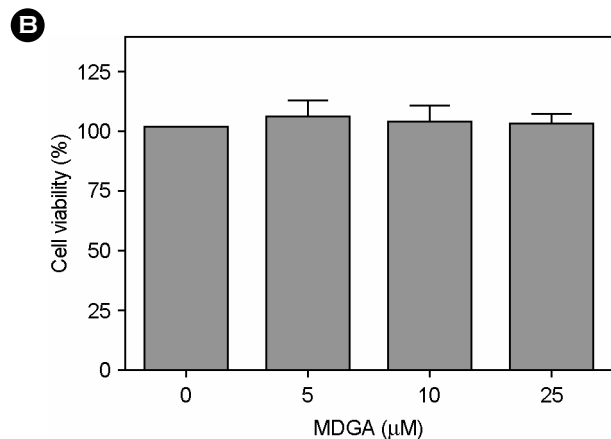
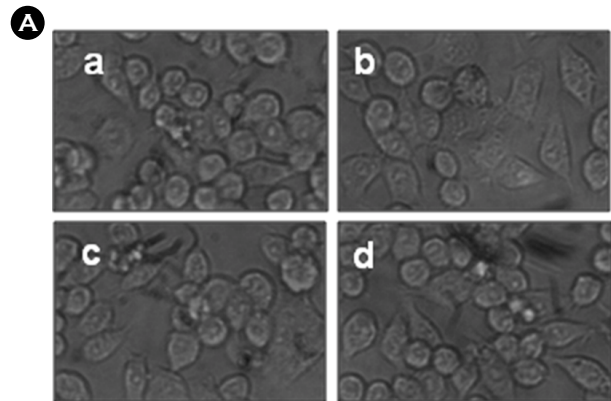


Fig. 3. Effect of MDGA on viability of Raw 264.7 cells. Cells were treated with MDGA (5 μ M, 10 μ M, and 25 μ M) for 18 h. (A) Cell morphology was observed under an optical microscope. a: Control, b: 5 μ M MDGA, c: 10 μ M MDGA, d: 25 μ M MDGA. (B) Cell viability was examined by EZ-Cytox kit. The results were expressed as percentage of surviving cells relative to control cells.

세포의 형태와 생존률을 확인한 결과 MDGA의 처리한 세포군과 처리하지 않은 세포군에서 특별한 변화를 관찰할 수 없었다 (Fig. 3A). 생화학적인 방법을 이용한 Ez-Cytox kit에 의해 세포 생존률을 확인한 결과, 세포 생존률은 MDGA 5, 10, 25 μ M 처리한 실험군에서 감소하지 않음을 확인하였다 (Fig. 3B). 이는 현미경을 이용한 형태학적으로 관찰한 결과와 일치한다. 이러한 연구 결과들은 MDGA가 세포에 직접적인 독성을 나타내지 않고, 염증 매개물질인 NO를 억제한다는 것을 나타낸다.

LPS에 의해 유도된 염증 매개물질에 있어서 MDGA의 효과

NO 생성량의 억제와 관련하여 MDGA의 세포 내 작용 기작을 확인하기 위해, 우리는 LPS에 의해 유도되는 염증 매개물질의 유전자 발현량에 대한 MDGA의 효과에 대한 실험을 진행하였다. 면역 반응 중에 생성되는

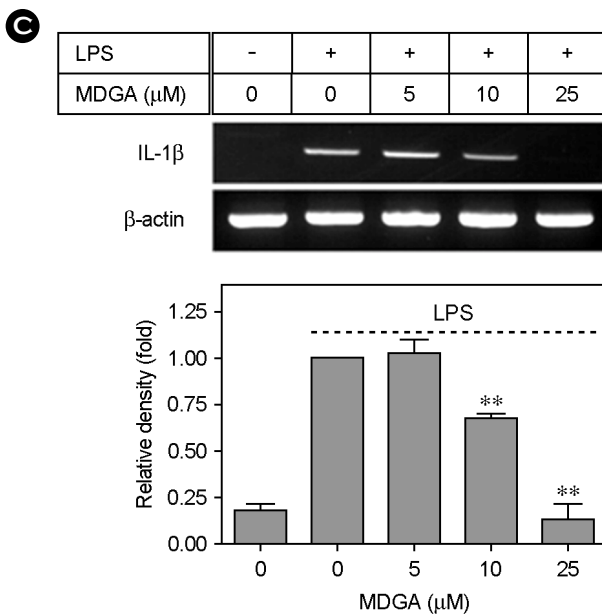
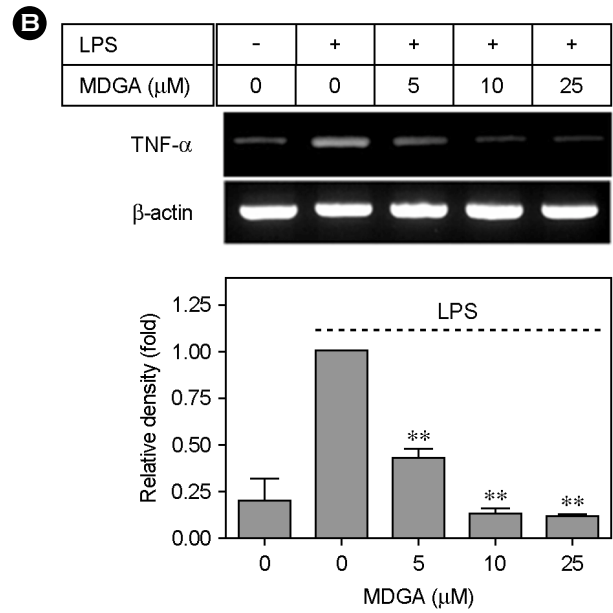
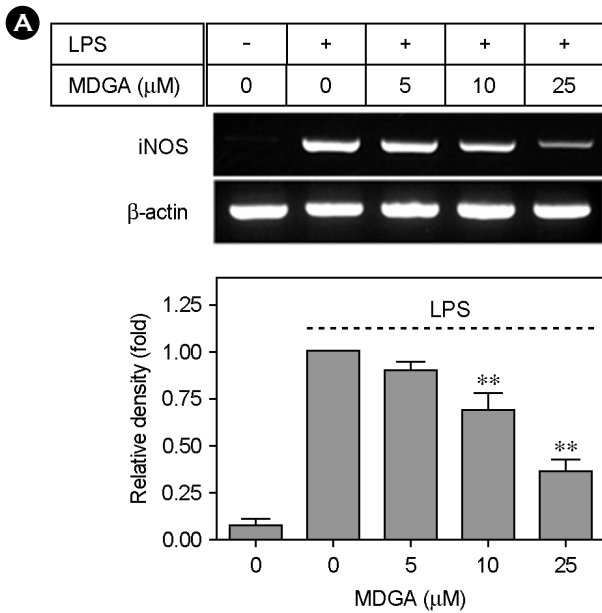


Fig. 4. Effect of MDGA on the LPS-induced expression of iNOS, TNF- α and IL-1 β in Raw 264.7 cells. Cells were plated at 1×10^6 cells/ml, stimulated with LPS (100 ng/ml) in the absence or presence of MDGA (5 μ M, 10 μ M, and 25 μ M) for 18 h. Total RNA (1 μ g) was prepared and analyzed by RT-PCR as described in Materials and methods. RT-PCR performed for iNOS (A), TNF- α (B), IL-1 β (C) and β -actin expression. The β -actin gene was used for normalization and relative activities were quantified by scanning densitometry, with the shown values representing the mean \pm SD of three different assays. (** $P < 0.001$).

iNOS에 의해 세포 내 NO의 양이 과도하게 증가되고, NO는 세포 내 전달자 역할을 함으로써 중추 신경계, 심혈관계, 면역 시스템 등에 중요한 역할을 하게 된다 (Oh et al., 2008). 그러므로, 먼저 LPS에 의해 유도된 iNOS 유전자 발현량의 변화를 분석하였다. 그 결과, MDGA를 5, 10, 25 μ M 처리한 실험군에서 iNOS 유전자 발현이 각각 11, 32, 65%가 감소함을 확인하였다 (Fig. 4A). LPS에 의해 유도되는 TLR4 신호전달을 통해 NF- κ B가 활성화 되어 TNF- α , IL-1 β 등 염증을 유발시키는 pro-inflammatory cytokine이나 염증 매개물질들이 생성된다

(Yun et al., 2009). 그렇기 때문에, TNF- α 와 IL-1 β 의 유전자 발현에 있어 MDGA의 효과를 확인한 결과, MDGA는 TNF- α 유전자의 발현량을 농도 의존적으로 감소시켰으며 (Fig. 4B), IL-1 β 유전자 발현에서도 MDGA에 의해 농도 의존적인 감소의 결과를 확인할 수 있었다 (Fig. 4C). 이들의 결과는 MDGA가 LPS에 의해 유도되는 pro-inflammatory cytokine으로 알려진 iNOS, IL-1 β 와 TNF- α 의 유전자 발현 억제를 통해 항염증 반응이 나타남을 알 수 있었다.

이번 연구를 통해 MDGA가 LPS에 의해 유도되는

iNOS mRNA의 억제를 통해 NO의 생산을 억제하는 효과를 확인하였다. 또 LPS에 의해 유도되는 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β mRNA와 TNF- α mRNA의 발현량도 억제하는 것을 확인하였다. 최근 Moon et al.은 MDGA가 골수에서 파생된 비만세포에서 다른 염증 매개물질인 각각 COX-2와 5-LOX에 의해 생성되는 PGD₂, LTC₄를 억제함을 보고하였다 (Moon et al., 2008). 이는 이번 결과와 함께 MDGA가 염증 및 알러지성 질병의 치료제로서 개발 가능성이 있음을 의미한다. 이번 실험 결과를 통해 MDGA가 대식세포에서 TLR 신호전달에 의해 조절되는 염증 반응이나 류마티스 관절염이나 천식, 파킨슨병 등의 여러 가지 염증성 질병들의 치료제로서 사용될 수 있는 가능성을 제시하지만, MDGA에 의한 Raw 264.7 세포에서의 이러한 세포 내 반응을 조절하는 인자는 매우 다양하며 복잡하기 때문에 본 연구를 바탕으로 더 명확하고 구체적인 신호전달경로를 파악하는 것이 필요하다. 그러므로 앞으로 항염증 작용과 관련된 MDGA의 신호전달경로에 대한 지속적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구를 위해 MDGA를 제공해 주신 Dr. Sang Hyun Sung (Seoul National University, Seoul, Korea)과 Dr. Seung Hyun Kim (Elcomscience Co. Ltd., Seoul, Korea)께 감사의 말씀을 전합니다.

REFERENCES

- Ma CJ, Kim SR, Kim J, Kim YC. Meso-dihydroguaiaretic acid and licarin A of *Machilus thunbergii* protect against glutamate-induced toxicity in primary cultures of a rat cortical cells. *Br J Pharmacol*. 2005. 146: 752-759.
- Ma CJ, Lee MK, Kim YC. Meso-Dihydroguaiaretic acid attenuates the neurotoxic effect of staurosporine in primary rat cortical cultures. *Neuropharmacology* 2006. 50: 733-740.
- Ma CJ, Sung SH, Kim YC. Neuroprotective lignans from the bark of *Machilus thunbergii*. *Planta Med*. 2004. 70: 79-80.
- Min HY, Kim MS, Jang DS, Park EJ, Seo EK, Lee SK. Suppression of lipopolysaccharide-stimulated inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by a novel humulene derivative in macrophage cells. *Int Immunopharmacol* 2009. 9: 844-849.
- Moon EY, Pyo S. Lipopolysaccharide stimulates Epac1-mediated Rap1/NF-kappaB pathway in Raw 264.7 murine macrophages. *Immunol Lett*. 2007. 110: 121-125.
- Moon HI, Chung JH. Meso-dihydroguaiaretic acid from *Machilus thunbergii* SIEB et ZUCC., and its effects on the expression of matrix metalloproteinase-2, 9 cause by ultraviolet irradiated cultured human keratinocyte cells (HaCaT). *Biol Pharm Bull*. 2005. 28: 2176-2179.
- Moon HI, Jung JC. Effect of meso-dihydroguaiaretic acid from *Machilus thunbergii* Sieb et Zucc on MMP-1 expression in heat shock-induced cultured primary human fibroblasts. *Phytother Res*. 2006. 20: 714-716.
- Moon TC, Seo CS, Haa K, Kim JC, Hwang NK, Hong TG, Kim JH, Kim do H, Son JK, Chang HW. Meso-dihydroguaiaretic acid isolated from *Saururus chinensis* inhibits cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells. *Arch Pharm Res*. 2008. 31: 606-610.
- Oh JH, Lee TJ, Park JW, Kwon TK. Withaferin A inhibits iNOS expression and nitric oxide production by Akt inactivation and down-regulating LPS-induced activity of NF-kappaB in RAW 264.7 cells. *Eur J Pharmacol*. 2008. 599: 11-17.
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004. 16: 3-9.
- Ulevitch RJ, Mathison JC, da Silva Correia J. Innate immune responses during infection. *Vaccine* 2004. 22: 25-30.
- Yun SM, Park SJ, Lee AN, Ahn SI, Youn HS. Oak Wood Vinegar Suppresses the Expression of Cyclooxygenase-2 Induced by TLR4 Agonist. *J Exp Biomed Sci*. 2009. 15: 257-260.