J. Exp. Biomed. Sci. 2011, 17(3): 225~230

Anti-inflammatory Effect of Indirubin-3'-Monoxime-5-Sulphonic Acid on Lipopolysaccharide-stimulated Murine Macrophage

Gang Baek Park, Hyun Jin Kim, Hye Seon Heo, Geun-Mook Park, Kyung Woo Park and Jin-Kyung Kim†

Department of Biomedical Science, Catholic University of Daegu, Gyeongsan-Si 700-702, Korea

Indirubin is the active ingredient of Danggui Longhui Wan, a mixture of plants that is used in traditional Chinese medicine to treat chronic diseases. In this study we investigated the anti-inflammatory effects of an indirubin derivative, indirubin-3'-monoxime-5-sulphonic acid (I3M-5S, $C_{16}H_{11}N_3O_5S$). We found that I3M-5S inhibits the production of various inflammatory mediators such as nitric oxide (NO) and prostaglandin E_2 (PGE_2) as well as inflammatory cytokines, tumor necrosis factor-α and interleukin-6 in lipopolysaccharide (LPS) stimulated murine macrophage, RAW264.7 cells. In addition, the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2, which are essential enzymes to produce NO and PGE_2, respectively, was blocked by I3M-5S treatment in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Present data suggest that I3M-5S exhibits potent anti-inflammatory activity in cultured macrophages and merit further study as potential therapeutic agents for inflammatory disorders.

Key Words: Inflammation, Indirubin-5-sulphonic acid, Macrophage, Lipopolysaccaride, RAW264.7 cell

서 론

염증이란 인체에 유해한 자극에 노출되었을 때 세포 손상을 일으키는 원인을 제거하거나 희석하기 위한 생체 방어로서, 조직변질, 순환장애, 조직증식의 세 가지를 병발하는 복잡한 현상이다 (Tizard, 1986). 생체에서 염증반응이 유도되면 충혈, 부종, 발열, 통증 등의 증상이 나타난다 (Tizard, 1986). 이 과정에서 호중구를 포함한 다양한 면역세포, 특히 대식세포가 활성화되면서 산화질소 (Nitric oxide, NO)나 프로스타글란딘 (prostaglandin, PG) E_2 등의 염증매개물질들과 tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), IL-1β 등의 염증성 사이토카인들을 분비하게 된다 (Sharma et al., 2007; Goldberg, 2009; Ricciotti and FitzGerald, 2011).

NO는 미생물의 침입 혹은 사이토카인의 자극으로 인해 대식세포를 포함한 다양한 세포가 활성화 되어 생성되는 물질로, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다 (McCartney-Francis et al., 1993; Weisz et al., 1996; Sharma et al., 2007). NOS는 neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS)의 3종류가 존재한다 (Sharma et al., 2007). 이중 iNOS는 염증반응을 조절하는데 중요한 역할을 담당하고 있으며, iNOS에 의해 증가된 NO는 패혈성 쇼크, 조직손상, 류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis) 등과 같은 질병을 유발하는 중요 원인물질의 하나이다 (McCartney-Francis et al., 1993; Weisz et al., 1996; Sharma et al., 2007). PG는 생체 내에 존재하는 다양한 세포로부터 cyclooxygenase (COX)라는 효소에 의해 생성된다 (Ricciotti and FitzGerald, 2011). COX는 두 종류가 존재하는데, COX-1은 대부분의 조직에서 PG 생성에 관여한다. 반면, COX-2는 성장인자, 세포증식인자, 사이토카인 등과 같은 요인에 의해 발현이 증가되어 다량의 PG를 생성함으로써, 염증관련 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Botting, 2006; Ricciotti and FitzGerald, 2011).

내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성균의 세포 외막에 존재하며, 대식세포는 toll-like receptor (TLR)-4를 통해 LPS를 인지하여 다양한 염증매개

*접수일: 2011년 8월 3일 / 수정일: 2011년 9월 18일
채택일: 2011년 9월 20일

*Gang Baek Park, Hyun Jin Kim, Hye Seon Heo, contributed equally to this work.

†Correspondence: Jin-Kyung Kim, Department of Biomedical Science, Catholic University of Daugu, Gyeongsan-Si 712-702, Korea.
Tel: 053-850-3774, Fax: 053-850-3774
e-mail: toto0818@cu.ac.kr

물질들의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Butchar et al., 2006). 이와 같은 염증매개물질들이 생성되기 위해서는 nuclear factor-κB (NF-κB)의 활성화가 필수적이다 (Siebenlist et al., 1994). NF-κB는 면역과 염증반응에 관여하는 유전자의 enhancer 부위에 결합하여 그 유전자의 발현을 조절하는 인자이다 (Siebenlist et al., 1994). 자극되지 않은 세포에서 NF-κB는 inhibitor κB (IκB)라 불려지는 억제 단백질에 결합되어 세포질 내에 존재한다 (Baldwin, 1996). 세포가 자극되면 IκB는 수 분 내에 인산화 과정을 거치게 되고 이어서 proteosomes에 의해 급격히 분해된다 (Palombella et al., 1994; Baldwin, 1996). IκB에서 분리된 NF-κB는 핵 내로 이동해 표적유전자의 promotor 부위의 특정염기서열에 결합하여 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-6 등 다양한 염증매개물질의 전사를 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Palombella et al., 1994; Baldwin, 1996).

본 연구팀은 쪽풀 (*Persicaria tinctoria*)의 생리활성성분의 하나인 indirubin 및 그 유도체가 갖는 다양한 생리활성에 대한 연구를 진행하고 있다. 쪽풀은 마디풀과 (*polygonaceae*)에 속하는 1년 생초로, 그 구성 단백질인 indican은 가수분해 시 산화반응을 거쳐 색소성분인 indigo와 indirubin으로 변형된다 (Christie, 2007). Indigo와 indirubin은 예로부터 천연염료로 사용되어 왔으며 특히, indirubin은 해독, 강장, 해열작용 등 다양한 약리작용이 있어 민간에서는 약용으로도 이용되어 왔다 (Xiao et al., 2002). 최근에는 indirubin이 백혈병 및 치매의 치료효과를 나타내는 주성분으로 보고되면서 이의 유도체의 합성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Eisenbrand et al., 2004). 그러나 indirubin은 용해도가 매우 낮아 체내에서 흡수가 어렵기 때문에 각종 치료제 개발을 위해서는 제한이 따랐다. 본 연구에서는 indirubin에 술폰기 (-SO_3H)를 결합시켜 그 용해도를 개선시킨 indirubin의 유도체인 indirubin-3'-monoxime-5-sulphonic acid (3-[3-(Hydroxyimino)-1,3-dihydro-2H-indol-2-ylidene]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonic acid, I3M-5S, Fig. 1)의 항염증효과를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

생쥐의 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구입을 하여 사용하였으며, I3M-5S는 Merck (Gibbstown, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다.

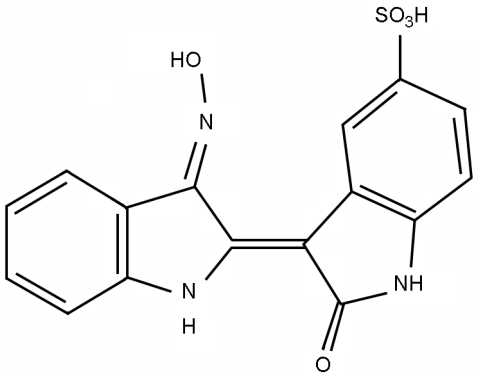

Fig. 1. The structure of indirubin-3'-monoxime-5-sulphonic acid (I3M-5S).

LPS와 β-actin 항체는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입을 하였다. Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin 및 streptomycin은 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. CellTiter 96 AQueous One Solution과 Griess reagent system은 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였고, PGE_2 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 R&D (Minneapolis, MI, USA)에서 구입하였으며, TNF-α와 IL-6 ELISA kit는 eBioscience (San Diego, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. iNOS, COX-2 항체는 Cell signaling (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Pro-prep™는 iNtRON Biotechnology (Sungnam, Korea)에서 구입하였다. BCA protein assay kit은 Thermo (Waltham, MA. USA)에서 구입하였다. PVDF Western blotting membranes은 Roche (Basel, Switzerland)에서 구입하였다. UVP는 GelDoc-It™ TS Imaging System (Cambridge UK, USA)의 제품을 이용하였다.

세포 배양 및 세포증식 측정

세포 배양액은 DMEM 배양액에 10% FBS와 100 μg/ml penicillin을 첨가한 배양액을 사용하였다. I3M-5S의 독성을 측정하기 위해 RAW264.7 세포를 96 well plate에 well 당 2×10^4 cells/well이 되도록 분주한 후 12시간 배양하였다. 세포를 배양중인 세포 배양액에 I3M-5S을 각각 0, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM 농도로 처리하여 24시간 배양한 후, CellTiter 96AQueous One solution assay를 이용하여 세포증식에 미치는 I3M-5S의 영향을 조사하였다.

NO, PGE_2의 측정

RAW264.7 세포를 48 well plate에 2.5×10^5 cells/well이 되도록 분주한 후 12시간 배양하였다. 다양한 농도의 I3M-5S를 LPS (100 ng/ml)와 함께 처리하여 24시간 배양한 후, 세포 배양액을 얻어 배양액 중에 함유된 NO의 양을 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였고, PGE_2는 PGE_2 ELISA kit을 이용하여 측정하였다.

IL-6 및 TNF-α의 측정

RAW264.7 세포를 48 well plate에 2.5×10^5 cells/well이 되도록 분주한 후 12시간 배양하였다. 다양한 농도의 I3M-5S를 LPS (100 ng/ml)와 함께 처리하여 24시간 배양한 후, 세포 배양액을 얻어 배양액 중에 함유된 TNF-α와 IL-6의 양을 ELISA kit을 이용하여 측정하였다.

Western blot assay

RAW264.7 세포에 Pro-prep™ lysis 용액을 넣은 후 얼음에서 40분간 처리하고 원심분리 (12,000 rpm, 5분, 4℃)하여 단백질이 함유된 상층액만을 회수하였다. 정제한 단백질은 BCA protein assay kit을 이용하여 정량하였다. 정량한 단백질은 SDS-polyacrylamide gel에서 분리시킨 후 Eletroblot system (Bio Rad)을 사용하여 250 mA로 1시간 동안 PVDF membrane에 옮겼다. 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 membrane을 PBS-T (PBS, Tween-20)로 세척하고, 3% skim milk로 1시간 실온에서 blocking한 후, iNOS와 COX-2의 항체를 이용하여 4℃에서 12시간 반응시켰다. 세척 후, horseradish peroxidase (HRP)가 붙어 있는 secondary antibody로 실온에서 1시간 반응 후 HRP chromogenic substrate를 이용하여 iNOS와 COX-2 발현양을 관찰했다. 그 수치를 UVP로 확인하고 분석하였다.

자료의 통계처리

실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 통계처리는 GraphPad Prism 4.0 프로그램 (GraphPad software, San Diego, CA, USA)을 이용하여, One-way analysis variance (ANOVA)를 따랐다. *P* value가 0.05 이하일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

대식세포는 내재면역반응에 핵심적인 역할을 담당하고 있는 면역세포로 내독소, 세포증식인자, 바이러스 등에 의해서 활성화 된다 (Laskin and Pendino, 1995). 활성화된 대식세포는 탐식작용을 하고 면역반응을 조절하는 다양한 물질을 분비한다 (Laskin and Pendino, 1995). 이들 물질 중에는 NO와 같은 산소대사산물, PG와 같은 지질대사물 및 단백질류 (사이토카인 및 케모카인) 등이 있으며, 대식세포는 이들을 생산·분비하여 다양한 생체기능을 수행하게 된다. 따라서 본 연구에서는 생쥐의 대식세포주인 RAW264.7 세포를 이용하여 I3M-5S의 항염증작용을 관찰하였다.

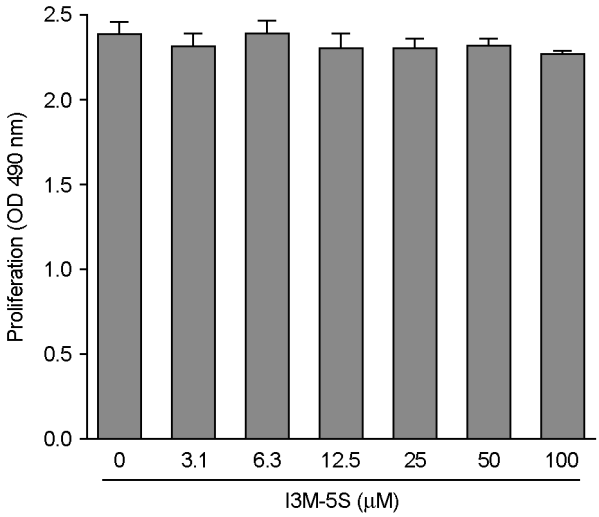

Fig. 2. Effects of I3M-5S on murine macrophage viability. RAW264.7 cells were treated with indicated concentrations of I3M-5S for 24 hr, and proliferation was determined as described in Materials and Methods.

먼저, I3M-5S가 생쥐의 대식세포 RAW264.7 세포의 생존에 영향을 끼치는지 알아보기 위해 CellTiter 96AQueous One solution assay를 이용하여 세포증식에 미치는 I3M-5S의 영향을 조사하였다. 그 결과 실험에서 사용한 최고농도인 100 μM의 농도에서도 세포의 증식에 영향을 끼치지 않음이 밝혀졌다 (Fig. 2). 이 결과는 본 실험에서 사용한 I3M-5S가 생쥐의 대식세포에 대해 독성을 나타내지 않음을 시사한다. 따라서 이하의 실험에서는 I3M-5S의 최고농도를 100 μM로 하여 실험을 진행하였다.

내독소로 잘 알려진 LPS는 그람음성균의 세포 외막에 존재하며, 대식세포 또는 단핵구에 존재하는 염증매개물질의 생성을 증강시키는 것으로 알려져 있다 (Laskin and Pendino 1995; Baldwin, 1996; Butchar et al., 2006). LPS는 대식세포에 존재하는 TLR4를 활성화시켜 세포 내 정보전달 흐름 (intracellular signaling cascades)의 활성이 유

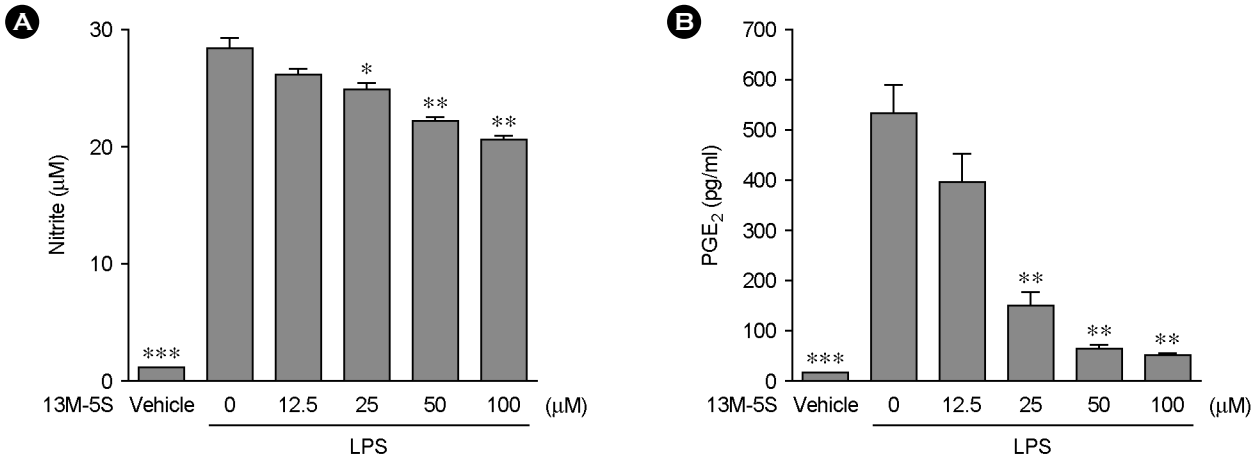

Fig. 3. Effects of I3M-5S on LPS-induced NO and PGE_2 production. RAW264.7 cells were treated with indicated concentrations of I3M-5S in the presence of 100 ng/ml of LPS or with LPS alone for 24 hr, and NO (A) and PGE_2 (B) release were determined. The results are reported as mean ± SE of three independent experiments in triplicate. Statistical significance is based on the difference when compared with LPS-stimulated cells ($^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$).

도되고 결과적으로 다양하면서도 독특한 염증 및 면역반응 관련 유전자들의 전사가 이루어진다 (Laskin and Pendino 1995; Baldwin, 1996; Butchar et al., 2006; Ricciotti and FitzGerald, 2011). 따라서 본 연구에서는 LPS로 RAW264.7 세포를 자극하여 염증반응을 유도하였다.

LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 세포의 배양액 중에 생성된 NO의 양에 미치는 I3M-5S의 영향을 관찰하고자 RAW264.7 세포에 LPS와 I3M-5S를 동시처리 후, 세포 배양액 중으로 분비된 NO와 PGE_2의 농도를 측정하였다. I3M-5S의 농도를 12.5 μM로 처리한 그룹에서는 LPS를 단독으로 처리한 그룹과의 NO 생성량의 유의적인 차이는 관찰할 수 없었으나, I3M-5S의 농도를 25 μM 이상으로 처리한 그룹에서는 LPS 자극에 의한 NO의 생성을 유의적으로 억제함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3A).

또한, I3M-5S를 처리한 그룹에서의 PGE_2 생성량을 관찰한 결과, I3M-5S의 농도를 25 μM 이상으로 처리한 그룹에서의 PGE_2 생성량은 LPS 자극에 의한 PGE_2의 생성을 유의적으로 억제하였다 (Fig. 3B). NO및 PGE_2가 염증반응을 매개하는 핵심적인 물질임을 고려할 때, I3M-5S는 NO 및 PGE_2의 생성을 억제하여 항염증작용을 나타내는 것으로 사료된다.

NO와 PGE_2의 억제와 관련된 I3M-5S의 작용 기전을 확인하기 위해, LPS에 의해 유도되는 염증반응에 핵심적으로 작용하는 주요 효소, iNOS 및 COX-2의 발현량에 대한 I3M-5S의 효과를 관찰하였다. RAW264.7 세포에 다양한 농도의 I3M-5S와 LPS를 처리하여 iNOS와 COX-2의 발현량을 Western blot 방법을 이용하여 관찰한 결과,

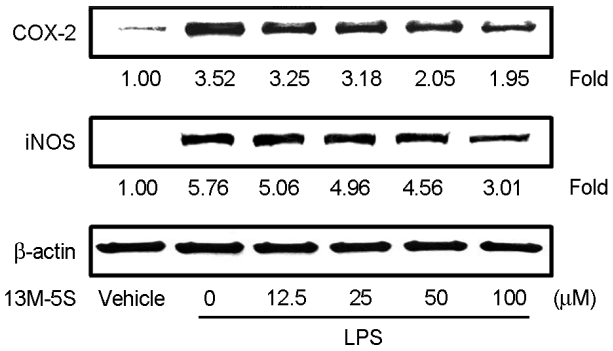

Fig. 4. Effects of I3M-5S on COX-2 and iNOS expression. RAW264.7 cells were treated the same as in Fig. 3. Thirty μg of protein obtained from each cell lysate was resolved on 10% SDS-PAGE for iNOS and COX-2 determination. β-actin expression is shown as a loading control.

RAW264.7 세포에 LPS를 단독처리 했을 때 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 유도되었고, I3M-5S의 처리가 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 농도의존적으로 억제함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 이와 같은 결과는 I3M-5S의 처리에 의한 iNOS와 COX-2의 발현량의 감소가 NO와 PGE_2 생성을 억제시킴을 시사하고 있다.

LPS에 의해 자극된 대식세포는 염증반응을 조절하는 다수의 사이토카인을 생성·분비한다. 그 중 TNF-α는 T 세포와 대식세포를 활성화 시켜 다른 염증성 사이토카인들의 생성을 유도하여 염증반응을 촉진한다 (Parameswaran and Patial, 2010). IL-6는 LPS의 자극에 의해 대식세포에서 분비되는 중요한 염증성 사이토카인이다 (Bryniarski et al., 2003). 따라서, I3M-5S가 염증성 사이토카

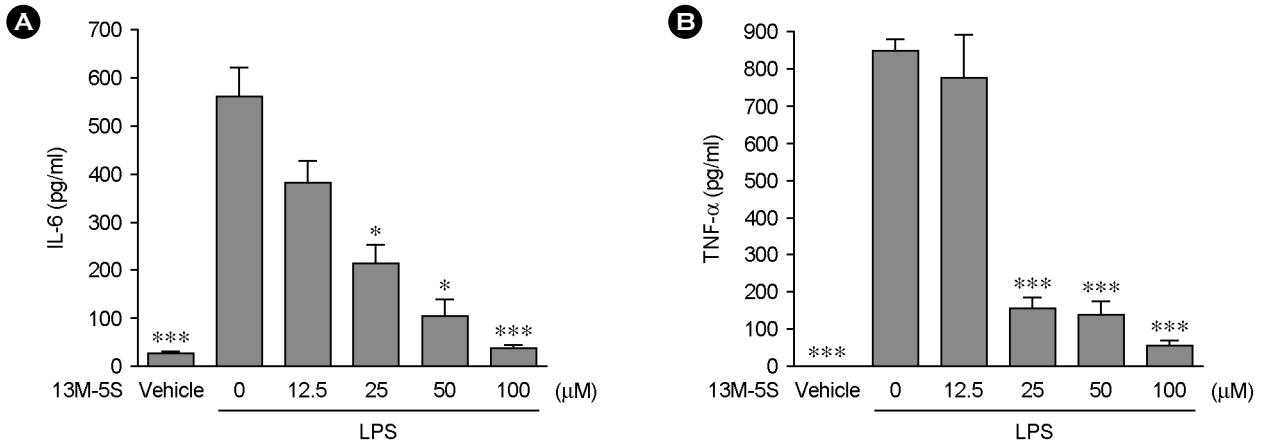

Fig. 5. Effects of I3M-5S on LPS-induced IL-6 and TNF-α production. RAW264.7 cells were treated with indicated concentrations of I3M-5S in the presence of 100 ng/ml of LPS or with LPS alone for 24 hr, and IL-6 (A) and TNF-α (B) release were determined. The results are reported as mean ± SE of three independent experiments in triplicate. Statistical significance is based on the difference when compared with LPS-stimulated cells ($^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$).

인의 생성에 미치는 영향을 관찰하고자, RAW264.7 세포에 LPS와 함께 다양한 농도의 I3M-5S를 처리하여 세포 배양액 중으로 분비된 IL-6 및 TNF-α의 양을 측정하였다. LPS의 처리에 의해 유도된 IL-6와 TNF-α의 농도는 각각 561.8±59.2 pg/ml과 851.4±36.7 pg/ml이였으나 50 μM의 I3M-5S를 LPS와 함께 처리한 결과, IL-6는 92.4±40.9 pg/ml로 TNF-α는 135.1±33.18 pg/ml로 그 분비량이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

최근 다양한 식물자원으로부터 분리된 생리활성성분을 중심으로 기능성식품 및 의약품의 개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 식물자원 중 쪽풀은 그 색소로 인해 오래 전부터 염료로 사용되어 왔다. 또한, 쪽풀은 해독, 강장, 해열작용이 있어 민간에서 약용으로 이용되어 왔고, 특히, 쪽풀의 성분인 indirubin은 백혈병을 치료하는데 효과가 있다고 보고되었다 (Xiao et al., 2002; Eisenbrand et al., 2004). 이후 indirubin-3'-oxime을 포함한 다양한 indirubin 유도체가 합성되고 있다 (Eisenbrand et al., 2004). Indirubin-3'-oxime은 glycogen synthase kinase (GSK)-3β와 cyclin-dependent kinases의 강력한 저해제로 항종양효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Eisenbrand et al., 2004). 또한 본 연구팀은 indirubin의 또 다른 유도체인 indirubin-3'-monoxime이 혈관신생을 억제한다는 것을 밝혔다 (Kim et al., 2011). 이와 같이 다양한 indirubin 유도체가 상이한 생리활성을 보이고 있어 이에 대한 자세한 연구가 앞으로도 진행되어야 할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 indirubin 유도체 중의 하나인 I3M-5S가 대식세포에서 LPS로 유도되는 NO, PGE_2, 염증성 사이토카인들의 생성을 억제하여 항염증효과를 나타내는 것을 밝혔다. 본 연구결과를 바탕으로 차후 I3M-5S의 항염증작용의 기전 및 *in vivo*에서의 I3M-5S의 항염증작용에 대한 검증이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 학부교육선진화 선도대학 지원 사업에 의해 지원되었음에 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

Baldwin AS Jr. The NF-κB and IκB proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol. 1996. 14: 649-683.

Botting RM. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. J Physiol Pharmacol. 2006. 5: S113-S124.

Bryniarski K, Maresz K, Szczepanik M, Ptak M, Ptak W. Modulation of macrophage activity by proteolytic enzymes. Differential regulation of IL-6 and reactive oxygen intermediates (ROIs) synthesis as a possible homeostatic mechanism in the control of inflammation. Inflammation 2003. 27: 333-340.

Butchar JP, Parsa KV, Marsh CB, Tridandapani S. Negative regulators of toll-like receptor 4-mediated macrophage inflammatory response. Curr Pharm Des. 2006. 12: 4143-4153.

Christie RM. Why is indigo blue? Biotech Histochem. 2007. 82: 51-56.

Eisenbrand G, Hippe F, Jakobs S, Muehlbeyer S. Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer

molecules with their origin in traditional Chinese phyto-medicine. J Cancer Res Clin Oncol. 2004. 130: 627-635.

Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. J Clin Endocrinol Metab. 2009. 94: 3171-3182.

Kim JK, Shin EK, Kang YH, Park JH. Indirubin-3'-monoxime, a derivative of a chinese antileukemia medicine, inhibits angio-genesis. J Cell Biochem. 2011. 112:1384-1391.

Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1995. 35: 655 -677.

McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitic oxide synthase. J Exp Med. 1993. 178: 749-754.

Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-κB1 precursor protein and the activation of NF-κB. Cell 1994. 78: 773-785.

Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor-α signaling in macrophages. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2010. 20: 87-103.

Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011. 31: 986-1000.

Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. Inflammopharmacology 2007. 15: 252 -259.

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-κB. Annu Rev Cell Biol. 1994. 10: 405-455.

Tizard IR. Immunology: an introduction inflammation. 2nd ed. 1986. pp. 423-441. Saunders College Publishing.

Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterical lipopolysaccharideand NG-monomethyl-L-arginene. Biochem J. 1996. 316: 209-215.

Xiao Z, Hao Y, Liu B, Qian L. Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China. Leuk Lymphoma 2002. 43: 1763-1768.