

## 荷葉 메탄올 추출물의 마우스 대식세포 inducible nitric oxide synthase 합성과 신호전달에 대한 조절

이시은<sup>1</sup>, 이미화<sup>2</sup>, 최호영<sup>2</sup>, 손낙원<sup>1</sup>, 강희<sup>1\*</sup>

1 : 경희대학교 동서의학대학원 동서외과학과

2 : 경희대학교 한의과대학 본초학교실

### Nelumbinis Folium Methanol Extract Regulates Inducible Nitric Oxide Synthase Signaling Pathways in Mouse Peritoneal Macrophages

Si-Eun Lee<sup>1</sup>, Mi-Hwa Lee<sup>2</sup>, Ho-Young Choi<sup>2</sup>, Nak-Won Sohn<sup>1</sup>, Hee Kang<sup>1\*</sup>

1 : Department of East-West Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, KyungHee University, Yongin

2 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, KyungHee University, Seoul.

#### ABSTRACT

**Objective :** Nelumbinis Folium (NF) is used for diarrhea, headache and dizziness in traditional medicine. In this paper, we examined the anti-inflammatory effects of the methanol extract of NF in mouse macrophages.

**Methods :** Peritoneal macrophages from thioglycollate medium-injected mice were cultured and stimulated with lipopolysaccharide(LPS) or LPS/interferon(IFN)- $\gamma$  for viability assay, cytokine measurement and Western blotting.

**Results :** NF methanol extract suppressed the levels of nitric oxide (NO) through reduction of inducible NO synthase in a concentration-dependent manner. The extract reduced LPS/IFN- $\gamma$ -stimulated STAT1 phosphorylation and LPS-induced I $\kappa$ B $\alpha$  degradation through inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase activation. The extract also inhibited p38, JNK/SAPK and ERK1/2 activation.

**Conclusions :** Our findings suggested that NF has anti-inflammatory activity, and have a potential for therapeutic application. Further research is required to investigate its anti-inflammatory active compounds.

**Key words :** Nelumbinis Folium, inflammation, macrophages, nitric oxide synthase, signaling

#### 서론

염증반응은 손상을 국소화, 최소화하고 조직의 구조와 기능을 회복하여 인체를 방어하는 중요한 기전으로 백혈구가 감염이 일어나거나 세포가 손상된 부위로 동원되고 체액 및 혈장 단백질의 조직 이동을 촉진하는 혈관벽의 변화로 시작된다. 그러나 염증과정의 조절이 적절히 이루어지지 않고 진행되면 조직손상과 만성염증질환을 일으킬 수 있다<sup>1-2)</sup>.

nitric oxide(NO)는 NO synthases(NOS)로부터 생성되는데 NOS는 칼슘 의존적이고 지속적으로 발현되는 constitutive NO synthases(cNOS)와 칼슘 비의존적이며 자극이 있을 때

유도되는 inducible NO synthases(iNOS)로 분류된다. 대식세포의 경우 LPS나 사이토카인에 의해 자극을 받으면 iNOS를 통해 L-arginine으로부터 다량의 NO를 합성한다<sup>3)</sup>. NO는 혈압과 신경전달을 조절하고 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 등 생리적 기능 조절에 중요한 역할을 하지만 과량의 NO 생성은 과도한 염증반응을 야기할 수 있다<sup>4-5)</sup>.

iNOS의 발현에 관여하는 신호전달경로 중에서 대표적인 단백질은 nuclear factor  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B), mitogen-activated protein(MAP) kinase, signal transducer and activator of transcription(STAT)1이 있다<sup>4-6)</sup>. NF- $\kappa$ B는 자극이 없을 경우 I $\kappa$ B $\alpha$ 에 의해 세포질에 머무르지만 염증성 자극이 오면

\*교신저자 : 강희, 경기도 용인시 서천동1, 경희대학교 국제캠퍼스 동서의학대학원 동서외과학과.  
· Tel : 031-201-3854, · E-mail : shehee@khu.ac.kr  
· 접수 : 2011년 12월 14일 · 수정 : 2012년 1월 6일 · 채택 : 2012년 1월 13일

I $\kappa$ B $\alpha$  kinase(IKK)가 활성화되어 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화 및 분해를 유도하고 이로 인해 NF- $\kappa$ B는 핵내로 이동하여 대다수의 염증성 유전자의 발현을 촉진한다<sup>7)</sup>. MAP kinase는 세포외의 신호를 핵내로 전달하는데 포유류의 세포에서는 대표적으로 extracellular signal-regulated kinase(ERK1/2), c-Jun amino-terminal kinase(JNK), p38이 있다<sup>8)</sup>. STAT1은 정상적인 조건에서 세포질에 존재하다가 cytokine을 매개한 신호에 의해 활성화되면 핵내로 이동하는 전사인자이다<sup>1,9)</sup>.

荷葉(荷葉: *Nelumbo nucifera* Gaertner)은 수련과(Nymphaeaceae)의 여러해살이 수생식물 蓮의 잎으로 한의학에서는 淸暑利濕, 升發淸陽, 止血의 효과가 있어 여름에 설사를 그치게 하고 두통과 어지럼증을 해소시키며 토혈, 코피, 대변출혈, 자궁 출혈, 산후 어혈로 인한 어지럼증을 치료하는데 사용되었다<sup>10-11)</sup>. 荷葉에 함유되어 있는 성분으로는 roemerine, N-methylcoclaurine, quercetin, isoquercetin, coclaurine, norcoclaurine, rutin, hyperin, catechin, hyperoside, astragaloin이 있다<sup>12-15)</sup>.

현재까지 荷葉에 대한 in vivo 연구로는 내장지방조직의 지방분해활성을 촉진하여 비만을 억제한다는 연구보고<sup>15)</sup>, 고지방식으로 유발된 간손상에 효과적이고 체내 지방 축적을 감소시켜 비만을 예방한다는 결과<sup>16)</sup>, 지질과 탄수화물 흡수를 방해하고 지질 대사를 가속화하여 에너지 소비를 증가시킴으로써 비만을 억제한다는 결과<sup>17)</sup>, 총콜레스테롤, 중성지방, low density lipoprotein cholesterol (LDL cholesterol)을 감소시켜 비만을 억제한다는 실험연구<sup>18)</sup>, 내당능(glucose intolerance)을 향상시키고 체중을 감소시켜 당뇨 개선에 효과적이라는 보고<sup>19)</sup>, 인슐린 분비촉진 작용으로 인슐린 비의존형 당뇨병의 혈당조절에 효과적이라는 연구<sup>20)</sup>가 있었다. 또한 荷葉이 Human aortic smooth muscle cell의 증식을 감소시켜 in vitro 수준에서 동맥경화억제를 보여준 연구가 보고되었다.<sup>21)</sup> 동맥경화의 중요한 유발인자인 산화 LDL인데 이것은 혈관내피세포의 adhesion molecule, 케모카인, 염증성 사이토카인을 유도하고 이러한 염증반응은 혈관의 tunica intima에서 대식세포의 활성을 유발하여 염증반응을 가속화한다<sup>22)</sup>. 荷葉 추출물이 동맥경화반의 형성을 억제하였으므로 荷葉에 항염 효과가 있음을 유추할 수 있다.

따라서 비만과 동맥경화와 같은 대사성 관련 염증질환에 대한 荷葉추출물의 억제효과를 바탕으로 하여 본 연구에서는 荷葉의 항염증 효과를 확인하기 위해 마우스 복강 대식세포의 염증반응으로 유도한 NO, iNOS의 합성과 STAT1, I $\kappa$ B $\alpha$ , IKK의 활성화, MAP kinase의 신호전달 경로에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료와 방법

### 1. 약재 추출물 제조

본 실험에서 사용된 荷葉(*Nelumbinis Folium*: NF)의 산지는 전라남도 무안이며 (주)동우당제약(경북영천시)에서 구입하였고 약재의 일부는 경희대학교 동서의학대학원 한의과학 실험실에 보관되어 있다 (Voucher Number: 2011-02NF). 분쇄기로 분쇄하여 가루로 만든 후 50 g을 100% 메탄올에 3

시간씩 3회 열탕하여 반복 추출하였다. 여과액을 rotary evaporator로 이용하여 감압 농축한 후 동결 건조하여 9.1g의 고형 추출물을 얻어 수율은 약 18 %였다. 실험에 사용된 荷葉 메탄올 추출물은 100 mg/ml stock은 dimethyl sulfoxide(Sigma, USA)에 녹인 후 0.45  $\mu$  m sterile syringe filter (Corning, Germany)를 이용하여 여과한 후 사용하였다.

### 2. 실험동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 생후 8주령의 Balb/c 수컷 마우스(Samtako, Korea)이며 항온항습 상태에서 무균음수와 사료를 자유롭게 공급하며 사육하였다.

### 3. 복강대식세포 배양

Balb/c 마우스의 복강에 2 ml의 thioglycollate medium (BD, USA)를 주사하고 3일 후에 마우스를 경추탈골한 후 복강에서 8 ml의 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Welgene, Korea)을 주사하여 세포를 수집하였다. 원심분리 후 10% fetal bovine serum (FBS)(Welgene)와 1% penicillin-streptomycin (Welgene)가 함유된 DMEM에 suspension한 후 2시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에 배양하였다. Non-adherent cell은 제거한 후 실험에 사용하였다.

### 4. 세포독성 검사

荷葉 메탄올 추출물에 대한 대식세포의 생존율을 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS)를 formazan으로 환원하는 세포내 효소활성을 통해 간접적으로 측정하였다. 세포를 4 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 96 well plate에 0.1 ml 접종하고 세포가 well plate에 부착된 것을 확인한 후에 약재추출물을 농도별로 처리하였다. 24시간 후 CellTiter96 One Solution reagent (Promega, USA) 0.02 ml를 첨가한 후에 96 well microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 490 nm로 흡광도를 측정하였다. 각 농도별 흡광도에서 약재추출물의 백그라운드 흡광도를 제거한 후 데이터로 표시하였다.

### 5. Nitrite 측정

Nitrite 양을 측정하기 위해서 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 1 ml을 24 well plate에 접종하고 세포가 부착된 확인한 후에 배지를 새로 교환하였다. 1 ng/ml recombinant interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )(R&D Systems, USA)으로 2시간 sensitization한 후 약물추출물과 100 ng/ml lipopolysaccharide(LPS)(Sigma)을 처리하여 24 시간 배양하였다. 참고약물로서 1  $\mu$  M dexamethasone (Sigma)을 사용하였다. 상등액 0.05 ml과 동량의 Griess reagent (Sigma)를 더하여 96 well plate에 넣고 상온에 15분간 반응한 후 96 well microplate reader를 이용하여 540 nm로 흡광도를 측정하였다.

## 6. iNOS 측정

iNOS 측정은 western blotting 방법으로 분석하였다. 먼저 세포를  $1 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 2 ml을 6 well plate에 접종하여 세포가 well plate에 부착된 것을 확인한 후 1 ng/ml IFN- $\gamma$ 로 2시간 sensitization한 후 약물추출물과 100 ng/ml LPS를 처리하여 24 시간 배양하였다. 상등액을 제거한 후 cold phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하였다. Complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Germany)가 들어있는 lysis solution (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 20mM NaF, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100)으로 세포를 파괴하였다. Bradford 방법에 준하여 단백질 농도를 정량한 후 sodium dodecyl sulfate (SDS) loading buffer를 넣고 3분간 boiling 하였다. 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 단백질을 분리한 후에 젤을 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 transfer 하였다. Transfer가 제대로 되었는지를 확인하기 위해 ponceau S staining을 실시하였다. 5% skim milk를 0.1% Tween이 함유된 Tris-buffered saline (TBST)에 녹인 blocking buffer를 만든 후 여기에 membrane을 상온에서 한 시간 blocking하였다. Anti-iNOS(BD) antibody를 blocking buffer에 1 : 1000으로 희석하여 4°C에 overnight 반응시켰다. Internal control로써 1 : 1000으로 희석한 actin (Santa Cruz, USA)을 사용하였다. TBST로 3회 세척 후 1 : 5000으로 희석한 HRP-conjugated anti-mouse antibody나 HRP-conjugated anti-rabbit antibody로 상온에서 한 시간 반응하였다. TBST로 3회 세척 후 chemiluminescent substrate (ECL, GE healthcare, UK)로 밴드를 확인한 후 Image J 프로그램을 통해 분석하였다.

## 7. Cell signaling 분자 측정

Cell signaling 분자를 확인하기 위해서 세포를  $1.5 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 2 ml을 6 well plate에 접종하여 세포가 well plate에 부착된 것을 확인한 후 배지를 갈아주었다. Phospho-STAT1을 측정하기 위해서는 먼저 1 ng/ml IFN- $\gamma$ 로 2시간 sensitization하였고 100 ng/ml LPS와 약물을 넣고 3시간 자극하였다. I $\kappa$ B $\alpha$ 와 phospho-MAPK를 측정하기 위해서는 동량의 세포에 약물추출물을 한 시간 먼저 처리한 후에 LPS로 15분간 자극하였다. 단백질 분리는 iNOS 분자확인 과 같은 방법으로 하되 단백질 lysis buffer에 phosphatase inhibitor (Sigma)을 첨가하였다. 10% SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리한 후에 젤을 PVDF membrane으로 transfer하였다. 1 : 1000으로 희석한 I $\kappa$ B $\alpha$ , GAPDH,  $\beta$ -tubulin (모두 Santa Cruz, USA), STAT1, phospho-STAT1, phospho-IK $\kappa$  $\alpha$ / $\beta$ , phospho-JNK/SAPK, JNK/SAPK, phospho-p38, p38, phospho-ERK1/2, ERK1/2 (모두 Cell Signaling, USA) 로 4°C에 overnight 반응시켰다. TBST로 세척 후 1 : 2000으로 희석한 HRP-conjugated anti-rabbit antibody로 상온에서 한 시

간 반응하였다. TBST로 세척 후 chemiluminescent substrate (ECL, GE healthcare, UK)로 밴드를 확인한 후 Image J 프로그램을 통해 분석하였다.

## 8. 통계분석

모든 결과는 SPSS 12.0 버전을 이용하여 분석하였으며, 평균의 차이는 non-paired Student's t-test로 분석하였다. P 값이 0.05 미만의 것만을 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

# 결 과

### 1. 荷葉 메탄올 추출물의 세포 독성

마우스 복강에서 분리한 대식세포를 이용하여 메탄올로 추출한 荷葉을 농도별로 처리한 후 24시간 후에 MTS assay를 이용하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 실험 결과 荷葉 메탄올 추출물은 25~400  $\mu$ g/ml의 농도에서 약물을 처리하지 않은 대조군과 세포독성 차이가 유의하게 나타나지 않았으나 800  $\mu$ g/ml의 농도에서 17%의 감소가 일어났다. 이와 같은 결과를 바탕으로 향후 실험은 400  $\mu$ g/ml 이하의 농도에서 진행하였다 (Figure 1).

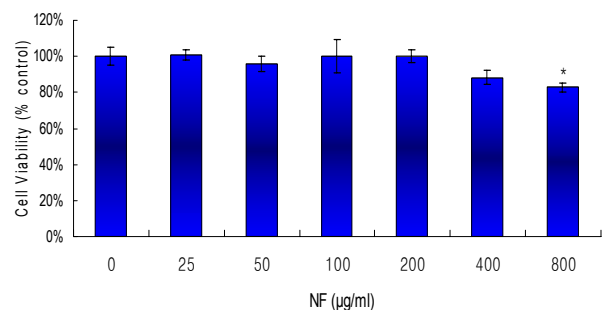


Figure 1. Effect of Nelumbinis Folium (NF) methanol extract on cell viability. Mouse peritoneal macrophages were cultured with various concentrations of NF methanol extract for 24 h. The number of live cells was determined using the MTS method. Data are mean  $\pm$  SD of four independent assays.

### 2. 荷葉 메탄올 추출물이 활성화된 대식세포의 NO 분비에 미치는 영향

대식세포는 IFN- $\gamma$ 와 LPS로 활성화하면 free radical의 일종인 NO를 만들어낸다. NO는 반감기가 짧아 측정이 어려우므로 NO 대사의 최종산물의 일종인 nitrite를 측정함으로써 NO 생성량에 대한 荷葉 메탄올 추출물의 영향을 확인하고자 하였다. 대식세포를 먼저 IFN- $\gamma$ 로 sensitization을 한 후에 LPS로 자극하고 동시에 荷葉 추출물을 농도별로 처리하였다. Figure 2에 보여지듯이 荷葉 메탄올 추출물은 농도의 존적으로 억제하였으며 400  $\mu$ g/ml에서의 억제는 참고약물로 사용된 dexamethasone과 비슷한 수준이었다 (Figure 2).

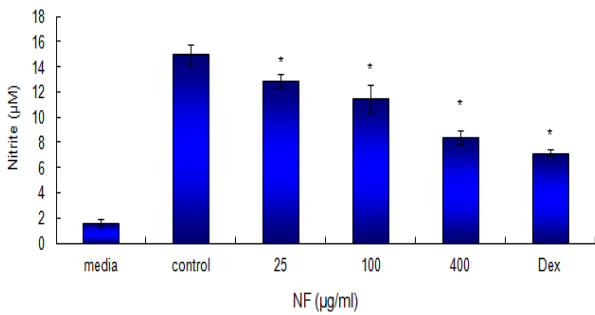


Figure 2. Effect of NF methanol extract on NO production in lipopolysaccharide (LPS)/interferon (IFN)- $\gamma$  stimulated macrophages. Cells were sensitized with 1 ng/ml IFN- $\gamma$  for 2 h and then incubated with 100 ng/ml LPS and various concentrations of NF methanol extract for 24 h. As a reference drug, 1  $\mu$  M of dexamethasone(Dex) was used. The levels of nitrite were determined by the Griess method. Data represent the mean  $\pm$  SD of three independent assays. \* p <0.05 compared to control ( 0  $\mu$ g/ml ).

### 3. 荷葉 메탄올 추출물이 활성화된 대식세포의 iNOS 합성에 미치는 영향

iNOS는 L-arginine을 산화하여 L-citrulline과 NO를 합성한다. 荷葉 메탄올 추출물이 LPS/IFN- $\gamma$ 에 의한 iNOS 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 24시간 자극한 세포의 단백질을 분리하여 western blotting 방법으로 iNOS 단백질의 양을 측정하였다. 荷葉 메탄올 추출물은 농도의존적인 억제력을 보여주었으며 NO와 마찬가지로 400  $\mu$ g/ml에서는 dexamethasone과 비슷한 수준의 억제력을 보여주었다 (Figure 3).

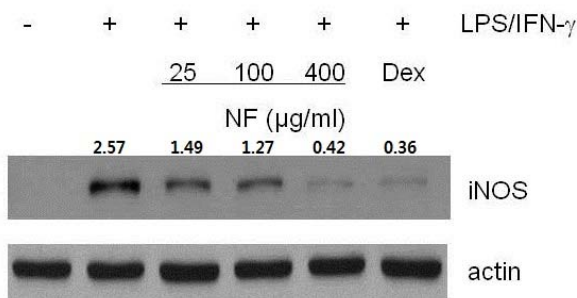


Figure 3. Effect of NF methanol extract on iNOS synthesis. Macrophages were sensitized with 1 ng/ml IFN- $\gamma$  for 2 h and then incubated with 100 ng/ml LPS and various concentrations of NF methanol extract for 24 h. 1  $\mu$  M of dexamethasone(Dex) was used. The levels of iNOS were determined by western blotting. Actin was loaded as internal controls. One of three independent assays was shown.

### 4. 荷葉 메탄올 추출물이 STAT1 활성화에 미치는 영향

IFN- $\gamma$ 에 의한 자극은 Janus kinase를 통한 STAT1 전사 인자의 인산화로 이어지고 이렇게 활성화된 STAT1은 핵내로 이동하여 iNOS 발현에 영향을 미친다<sup>4)</sup>. 荷葉 메탄올 추출물

이 IFN- $\gamma$ 에 의해 활성화된 STAT1에 영향을 미치는지 확인하기 위해 대식세포를 IFN- $\gamma$ 로 priming한 후 荷葉과 LPS로 3시간 자극 후에 western blotting으로 분석하였다. iNOS와 마찬가지로 荷葉 메탄올 추출물은 25  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml에서 phospho-STAT1의 발현을 억제하였고 400  $\mu$ g/ml에서는 거의 발현이 되지 않았다 (Figure 4). 따라서 荷葉 메탄올 추출물의 iNOS 억제는 STAT1 활성조절이 부분적으로 기여함을 알 수 있었다.

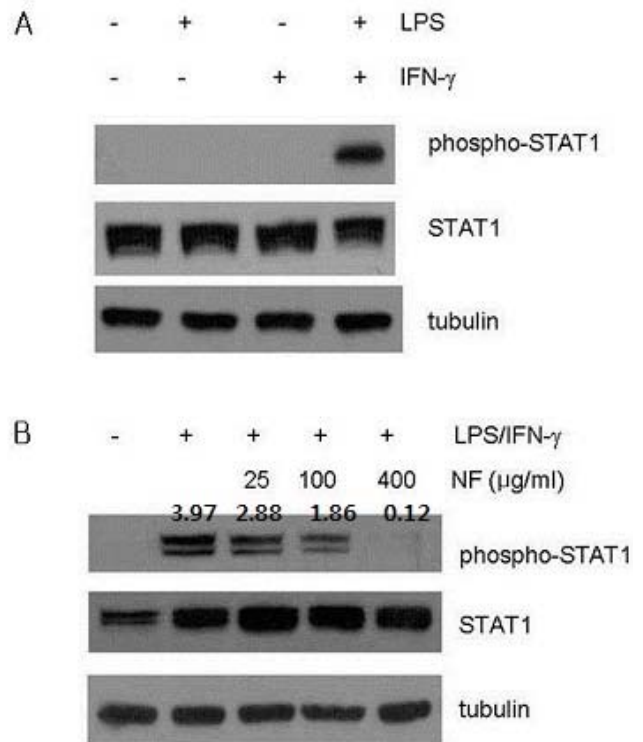


Figure 4. Effect of NF methanol extract on STAT activation. Macrophages were sensitized with 1 ng/ml IFN- $\gamma$  for 2 h and then incubated with 100 ng/ml LPS and various concentrations of NF methanol extract for 3 h. The levels of phospho-STAT1 and STAT1 were determined by western blotting. Tubulin was loaded as internal controls. One of three independent assays was shown.

### 5. 荷葉 메탄올 추출물이 I $\kappa$ B $\alpha$ 분해 및 I $\kappa$ B $\alpha$ kinase 활성화에 미치는 영향

I $\kappa$ B $\alpha$ 는 염증성 물질의 발현을 조절하는 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하는 역할을 하며 LPS를 처리시 인산화가 되면서 ubiquitination이 되어 분해되므로 NF- $\kappa$ B가 핵내로 이동하게 된다. 대식세포를 LPS로 15분간 자극하였을 때 I $\kappa$ B $\alpha$ 는 거의 분해되어 밴드에 거의 나타나지 않았으나 100  $\mu$ g/ml, 400  $\mu$ g/ml에서 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 밴드는 LPS를 처리하지 않은 세포와 비슷한 수준으로 나타났다 (Figure 5). 또한 I $\kappa$ B $\alpha$  인산화를 촉매하는 IKK의 활성은 25  $\mu$ g/ml에서 억제되었으며 100  $\mu$ g/ml, 400  $\mu$ g/ml에서 완전히 억제되었다 (Figure 5). 따라서 荷葉 메탄올 추출물은 IKK 인산화 조절을 통해 I $\kappa$ B $\alpha$  분해를 억제하는 것으로 확인되었다.



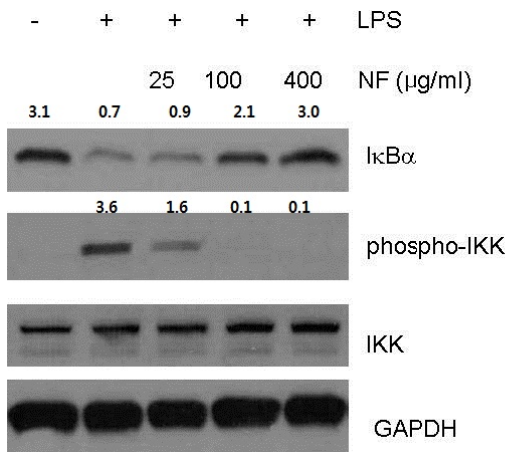


Figure 5. Effect of NF methanol extract on  $\text{IkB}\alpha$  activation. Macrophages were incubated with various concentrations of NF methanol extract for 1 h and then stimulated with 100 ng/ml LPS for 15 min. The levels of  $\text{IkB}\alpha$ , phospho-IKK and IKK were determined by western blotting. GAPDH was loaded as internal controls. One of three independent assays was shown.

### 6. 荷葉 메탄올 추출물이 p38, JNK, ERK1/2 활성화에 미치는 영향

대식세포를 LPS로 자극하면 p38, JNK, ERK1/2와 같은 MAP kinase가 활성화되어 세포질이나 핵내의 단백질을 조절한다. 荷葉 메탄올 추출물이 이러한 MAP kinases의 활성화에 주는 영향을 확인하기 위해 대식세포에 荷葉 메탄올 추출물을 전처리한 후 15분간 LPS로 자극하였다. 실험 결과 荷葉은 p38, JNK, ERK1/2의 인산화를 농도의존적으로 억제하였다 (Figure 6).

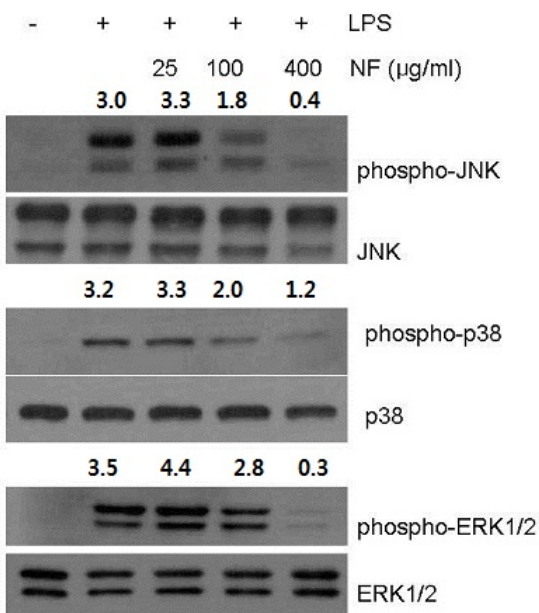


Figure 6. Effect of NF methanol extract on p38 activation. Macrophages were incubated with various concentrations of NF methanol extract for 1 h and then stimulated with 100 ng/ml LPS for 15 min. The levels of phospho-JNK, JNK, phospho-p38, p38, phospho-ERK1/2, and ERK1/2 were determined by western blotting. One of three independent assays was shown

## 고찰

荷葉은 《本草綱目》에서는 "원기를 생기게 하고 수종과 부스럼을 제거하고 두창을 치료하고 여러 출혈증을 다스린다."하였고 《本草拾遺》에서는 "血脹 복통을 다스리고 산후 태반이 나오지 않을 때에는 술로 달여 복용하며 버섯독에 중독된 경우에는 물로 달여 복용한다."하였으며 배뇨곤란과 지혈에 응용된다고 하였다. 《現代實用中藥》에서는 "부인의 만성 자궁염, 적백 대하, 남자의 유정 또는 야뇨증, 해독약으로 쓴다"하여 주로 해독하고 지혈하는 효능으로 사용되어 왔다<sup>23)</sup>.

대식세포는 외부 병원체와 세포 잔해, 세포자연사 (apoptosis)가 진행 중인 세포를 제거하여 손상받은 조직을 재생하지만 동시에 iNOS나 염증성 사이토카인과 같은 물질들을 합성하여 염증반응에 중요한 역할을 한다. 이러한 물질들이 과잉으로 발현되면 정상조직에도 손상을 초래하는데 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 만성 기관지염, 폐기종 등이 여기에 포함된다<sup>1,24)</sup>.

NO는 혈액응고, 혈압 및 신경전달 기능의 조절과 미생물이나 종양세포의 제거 등 생리적 역할을 하지만 고농도의 NO 생성은 peroxynitrite, nitrogen dioxide와 같은 유해물질을 생성하여 암의 형성과 진행에 중요한 역할을 하고 세포내 유해한 산화물질의 축적, DNA 손상을 일으키며 mitochondria에 감지되어 mitochondria 내의 cytochrome c, apoptosis inducing factor(AIF)를 방출하게 하고 세포자연사를 조장하여 조직의 상해를 초래하는 이중적 특성을 갖는 것으로 알려져 있다<sup>3,25,26)</sup>.

NOS는 물리화학적 성상에 따라 type I, II, III의 동종효소로 나뉘는데 type I인 neuronal NOS(nNOS)과 type III인 endothelial NOS(eNOS)는 세포 속에 항상 존재하므로 cNOS로 분류되며 type II인 iNOS는 LPS와 같은 박테리아의 자극, IFN- $\gamma$ , interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )와 같은 사이토카인의 자극에 노출되는 경우에만 발현된다<sup>3,27)</sup>. 대식세포, 쿠퍼세포(Kupffer cells), 간세포(hepatocytes), 평활근 세포(smooth muscle cells)와 같은 세포에서 과도하게 발현된 iNOS는 장시간 동안 다량의 NO를 생성하여 인체에 병리적으로 작용한다<sup>26)</sup>. 따라서 염증이 인체에 유해하게 작용하지 않게 하기 위해서는 iNOS의 과도한 발현을 억제하는 것이 중요하다고 볼 수 있다.

荷葉 메탄올 추출물이 NO 생성에 미치는 영향에 대해 알아보고자 마우스 복강에서 분리한 대식세포를 IFN- $\gamma$ 와 LPS로 자극하고 荷葉 추출물을 농도별로 처리한 결과 NO 생성이 농도의존적으로 억제되었다. NO 생성 저해 기전을 확인하기 위해 iNOS 양을 western blotting 방법으로 측정된 결과 저농도에서도 억제되어 iNOS 억제에 의한 NO 생성 감소를 확인할 수 있었다.

STAT1은 감염에 대한 방어, 세포 주기 조절, 세포자연사, 세포 형질전환(cellular transformation) 등의 작용을 하는 전사인자이다<sup>28,29)</sup>. c-fos, protooncogene, caspases, p21 등의 유전자 발현 조절에 관여하며 정상적인 조건에서는 세포질 내에 불활성 단량체(monomer)로 존재하다가 growth factor나 사이토카인과 같은 자극이 있을 때 해당 수용체와 이에 연결된 Janus kinase에 의해 활성화되어 이합체

(dimer)를 이루어 핵으로 이동하여 다양한 유전자의 promoter 영역의 특이 염기서열에 부착하여 전사를 자극한다<sup>2)</sup>. 이들 중 STAT1은 IFN- $\gamma$  자극에 대해 iNOS promoter에 존재하는 IFN- $\gamma$ -activated sequence(GAS)에 결합하여 전사를 촉진하며 이로써 iNOS 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>. 荷葉 메탄올 추출물이 IFN- $\gamma$ 에 의해 활성화된 STAT1에 영향을 미치는지 확인한 결과 농도의존적으로 STAT1의 인산화가 억제되어 iNOS 발현억제에 부분적으로 STAT1 억제가 관여함을 알 수 있었다.

NF- $\kappa$ B는 TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인, 케모카인 등의 염증성 매개물질과 세포부착분자 등의 유전자 발현에 중요한 역할을 하는 전사 인자이다. NF- $\kappa$ B의 활성화는 I $\kappa$ B $\alpha$ 에 의해 조절된다. 정상 상태에서는 세포질에서 NF- $\kappa$ B는 I $\kappa$ B $\alpha$ 와 결합하고 있어 불활성화된 상태로 존재하다가 TNF- $\alpha$ , IL-1와 같은 염증성 사이토카인, LPS와 같은 박테리아 감염에 노출되면 IKK에 의해 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 특정 serine 잔기가 인산화되며 ubiquitination 과정을 거쳐 proteasome에 의해 분해되어 NF- $\kappa$ B가 유리된다. 이러한 NF- $\kappa$ B는 핵으로 이동하여  $\kappa$ B-sites에 결합하여 iNOS를 포함한 여러 염증성 유전자, anti-apoptosis 유전자 등의 발현을 촉진하여 염증을 가속화한다<sup>7,30)</sup>. 荷葉 메탄올 추출물은 100 $\mu$ g/ml, 400 $\mu$ g/ml에서 I $\kappa$ B $\alpha$  분해를 억제하였고 IKK 역시 25  $\mu$ g/ml에서 억제되기 시작하여 100  $\mu$ g/ml, 400  $\mu$ g/ml에서 완전히 억제되었다. 따라서 荷葉 메탄올 추출물은 IKK 억제를 통해 I $\kappa$ B $\alpha$  분해를 부분적으로 억제함으로써 NF- $\kappa$ B의 활성화에 영향을 줄 수 있음을 본 실험으로 확인할 수 있다.

MAP kinases는 세포 외부의 신호를 세포질 및 세포핵 내로 전달하는 과정에 관여하는 신호전달체계로 세포의 성장, 발생, 분화, 사멸을 조절한다<sup>6,8,31)</sup>. 세포외의 자극을 인지하면 세포질 또는 핵 내의 전사인자를 인산화하고 활성화하여 표적 유전자의 발현을 촉진한다. ERK pathway는 growth factor, 사이토카인, virus 감염, 형질전환 물질(transforming agents), 발암물질과 같은 다양한 자극에 의해 활성화되고 세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 한다. JNK는 세포 사멸을 촉진하는 세포 내외의 stress 자극, 즉, growth factor와 염증성 사이토카인, 방사선 조사 등에 의해 유도되며 세포 성장을 저해한다. p38은 삼투 shock나 열 충격과 같은 stress와 hormone 등에 의해 활성화되며 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, cyclooxygenase-2와 같은 염증성 유전자의 발현을 조절하는 역할을 한다. 荷葉 메탄올 추출물이 p38, JNK, ERK1/2의 인산화에 미치는 영향을 알아본 결과 p38과 JNK의 인산화를 100 $\mu$ g/ml, 400 $\mu$ g/ml에서 비슷하게 억제하였으며 ERK1/2는 농도의존적인 억제를 보여주었다.

이상에서와 같이 荷葉 메탄올 추출물의 항염증 효과를 규명하기 위하여 NO, iNOS 합성과 이들의 발현을 조절하는 전사인자들에 대한 영향을 확인한 결과 荷葉은 iNOS의 발현을 억제함으로써 NO 생성을 저해하며 여기에는 STAT1, NF- $\kappa$ B, p38, JNK, ERK1/2가 관여함을 알 수 있었다. 향후 유효성분의 확인과 질환별 동물모델에 대한 검증이 필요할 것으로 사료된다.

## 결론

荷葉 메탄올 추출물의 항염 효과를 알아보기 위하여 NO, iNOS, STAT1, NF- $\kappa$ B, MAP kinases를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 荷葉 메탄올 추출물은 LPS와 IFN- $\gamma$ 로 자극한 대식세포의 NO 생성과 iNOS 단백질합성을 농도의존적으로 억제하였다.
2. 荷葉 메탄올 추출물은 LPS와 IFN- $\gamma$ 에 의해 유도된 STAT1의 발현을 농도의존적으로 억제하였다.
3. 荷葉 메탄올 추출물은 LPS에 의한 IKK 활성을 억제하여 I $\kappa$ B $\alpha$  분해를 감소하였고 p38, JNK, ERK1/2의 인산화를 농도의존적으로 억제하였다.

이러한 실험 결과로 보아 荷葉 메탄올 추출물의 NO, iNOS의 합성 억제에는 STAT1, I $\kappa$ B $\alpha$ , MAP kinases의 활성 억제와 관련되었음을 확인할 수 있었고 향후 동물실험의 소염증명과 활성성분의 확인이 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Lawrence T, Willoughby D, Gilroy D. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2002 ; 2 : 787-95.
2. Khatami M. Inflammation, aging, and cancer : Tumoricidal versus tumorigenesis of immunity. *Cell Biochem Biophys.* 2009 ; 55 : 55-79.
3. Förstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase : expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1995 ; 352 : 351-64.
4. Julie B, Jaramillo M, Olivier M. Signalling events involved in interferon- $\gamma$ -inducible macrophage nitric oxide generation. *Immunology.* 2003 ; 108 : 513-22.
5. Boscá L, Zeini M, Través P, Hortelano S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells : a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology.* 2005 ; 208(2) : 249-58.
6. Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2005 ; 1754 : 253-62.
7. Sankar G, Fulvio D, May M. Inhibition of Nuclear Factor Kappa B(NF- $\kappa$ B) : An emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Molecular interventions.* 2002 ; 2(1) : 22-35.

8. Dirk B, Sorokin A, Dunn M. Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. *Kidney International*. 1996 ; 49 : 1187-98.
9. Rawlings J, Rosler K, Harrison D. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*. 2004 ; 117 : 1281-3.
10. Ahn DG. Illustrated Book of Korean Medical Herbs. 7th ed. Kyohaksa. 1998 : 684.
11. Shin MG. Clinical Traditional Herbology. 4th ed. Younglimsa. 1994 : 358.
12. Kashiwada Y, Aoshima A, Ikeshiro Y, Hen YP, Furukawa H, Itoigawa M, Fujioka T, Mihashi K, Cosentino M, Natschke SM, Lee KS. Anti-HIV benzyloisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids. *Bioorg Med Chem*. 2005 ; 13(2) : 443-8.
13. Agnihotri V, Elsohly H, Khan S, Jacob M, Joshi V, Smillie T, Khan I, Walker L. Constituents of *Nelumbo nucifera* leaves and their antimalarial and antifungal activity. *Phytochemistry Lett*. 2008 ; 1(2) : 89-93.
14. Kim KH, Chang SW, Ryu SY, Choi Su, Lee KR. Phytochemical constituents of *Nelumbo nucifera*. *Natural Product Sciences*. 2009 ; 15(2) : 90-5.
15. Ohkoshi E, Miyazaki H, Shindo K, Watanabe H, Yoshida A, Yajima H. Constituents from the leaves of *Nelumbo nucifera* stimulate lipolysis in the white adipose tissue of mice. *Planta Med*. 2007 ; 73(12) : 1255-9.
16. Lin MC, Kao SH, Chung PJ, Chan KC, Yang MY, Wang CJ. Improvement for high fat diet-induced hepatic injuries and oxidative stress by flavonoid-enriched extract from *Nelumbo nucifera* leaf. *J Agric Food Chem*. 2009 ; 57(13) : 5925-32.
17. Ono Y, H Eri, Fukaya Y, Imai S, Ohizumi Y. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *J Ethnopharmacol*. 2006 ; 106(2) : 238-44.
18. Du H, You JS, Zhao X, Park JY, Kim SH, Chang KJ. Antiobesity and hypolipidemic effects of lotus leaf hot water extract with taurine supplementation in rats fed a high fat diet. *J Biomed Sci*. 2010 ; 17(1) : S42.
19. Jung HA, Jung YJ, Yoon NY, Jeong DM, Bae HJ, Kim DW, Na DH, Choi JS. Inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* leaves on rat lens aldose reductase, advanced glycation endproducts formation, and oxidative stress. *Food Chem Toxicol*. 2008 ; 46(12) : 3818-26.
20. Huang CF, Chen YW, Yang CY, Lin HY, Way TD, Chiang W, Liu SH. Extract of lotus leaf(*Nelumbo nucifera*) and its active constituent catechin with insulin secretagogue activity. *J Agric food chem*. 2011 ; 59(4) : 1087-94.
21. Kim SM, Yun HJ, Yi HS, Won CW, Kim JE, Park SD. *Nelumbo nucifera* leaves inhibit HASMC proliferation and migration activated by TNF- $\alpha$ . *Kor J Herbology*. 2009 ; 24(4) : 77-86.
22. Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta* 2010 ; 411 : 1875-1862.
23. Jiangsu New Medical College, Chinese Materia Medica, 1th Jungdam. 1998 ; 5957.
24. Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J of Pathology*. 2008 ; 214 : 161-78.
25. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *J. FASEB* 1992 ; 6 : 3051-64.
26. Abramson S, Amin A, Clancy R, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Practice & Research clinical rheumatology*. 2001 ; 15(5) : 831-45.
27. Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz P. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol*. 2004 ; 500 : 255-66.
28. Ihle J. STATs : signal transducers and activators of transcription. *Cell*. 1996 ; 84 : 331-4.
29. Simon A, Rai U, Fanburg B, Cochran B. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *AJP Cell Physiology*. 1998 ; 275 : 1640-52.
30. Adcock I, Chung KF, Caramori G, Ito K. Kinase inhibitors and airway inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2006 ; 533 : 118-32.
31. Johnson G, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002 ; 298 : 1911-2.