

## HaCaT 각질형성세포에서 개똥쑥(*Artemisia annua* L) 유래 성분인 Artemisinic acid의 Macrophage-derived Chemokine 억제 효과

강경진<sup>1</sup> · 강나진<sup>1</sup> · 한상철<sup>1</sup> · 구동환<sup>1</sup> · 김영수<sup>2</sup> · 이진혁<sup>2</sup> · 김상철<sup>2</sup> · 박덕훈<sup>2</sup> · 이종성<sup>3</sup> · 강희경<sup>1</sup> · 유은숙<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>제주대학교 의학전문대학원 약리학교실, <sup>2</sup>바이오스펙트럼 생명과학 연구소, <sup>3</sup>울지대학교 피부관리학과

### Inhibitory Effect of Artemisinic Acid Isolated from *Artemisia Annua* L on the MDC in HaCaT Keratinocytes

Gyeong-Jin Kang<sup>1</sup>, Na-Jin Kang<sup>1</sup>, Sang-Chul Han<sup>1</sup>, Dong-Hwan Koo<sup>1</sup>, Young-Soo Kim<sup>2</sup>, Jin-Hyuck Lee<sup>2</sup>, Sang-Chul Kim<sup>2</sup>, Deokhoon Park<sup>2</sup>, Jongsung Lee<sup>3</sup>, Hee-Kyung Kang<sup>1</sup> and Eun-Sook Yoo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, School of Medicine, Jeju National University, Jeju, Republic of Korea

<sup>2</sup> Biospectrum Life Science Institute, Seongnam Si, Gyunggi-Do, Republic of Korea

<sup>3</sup> Department of Dermatological Health Management, Eul-Ji University, Seongnam City, Gyunggi Do, Republic of Korea

**Abstract** – In the present study, we investigated anti-inflammatory activity of artemisinic acid in HaCaT cells and RAW264.7 cells. Artemisinic acid showed inhibitory activity on macrophage-derived chemokines (MDC) expression, a factor related with atopic dermatitis (AD), in interferon (IFN)- $\gamma$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -stimulated HaCaT cells. In the study on action mechanism, pretreated artemisinic acid reduced the phosphorylation of STAT1 and p38 and the degradation of I $\kappa$ B by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  stimulations. However, artemisinic acid didn't show the inhibitory activity on LPS-induced inflammatory mediators (NO, PGE<sub>2</sub>, IL-6) in RAW264.7 cell. These results indicate that artemisinic acid inhibits IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ -induced MDC expression through inhibition of signal factors, STAT1, NF- $\kappa$ B, and p38, in HaCaT keratinocytes.

**Key words** – Artemisinic acid, Inflammation, MDC/CCL22, HaCaT keratinocyte, RAW264.7, Macrophages

염증은 신체로부터 병원균이나 손상된 세포 등의 해로운 자극물질들을 제거하기 위한 복합적인 생물학적 반응의 중요한 요소이다. 하지만, 과도한 염증 반응은 류머티즘 관절염이나 천식과 같은 질환을 유발할 수 있으며, cytokines, chemokines, eicosanoids, nitric oxide (NO)과 같은 매우 다양한 염증성 매개체에 의해 유발된다고 알려져 있다.<sup>1,2)</sup> 특히, 아토피 피부염은 알레르기 또는 유전적 원인에 의해 발생하는 대표적인 염증성 피부질환으로, 소양증과 습진성 피부병변, 혈청 내 면역글로블린 E 증가, Th2-type cells, 호산구, 비만세포, 대식세포 등과 같은 염증성 세포들의 피부 병변내 침윤 등을 특징으로 하는 질환이다.<sup>3,4)</sup>

Chemokines은 T cells, eosinophils, macrophages 등의 염증성 세포가 감염 또는 염증성 부위로 이동하는데 관여하는 물질로서, 다양한 종류의 세포에서 생성된다고 알려져 있다.<sup>5)</sup> 다양한 종류의 chemokine들 중에서, macrophage-

derived chemokines (MDC/CCL22)는 각질형성세포, 수지상 세포, 상피세포 등에서 생성되며, 세포 표면에 CC chemokine receptor 4 (CCR4)를 발현하는 Th2-type 세포의 이주에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이전의 연구결과에서 아토피 피부염 환자의 혈청에서 MDC 수준이 증가하였다는 보고가 있었다.<sup>6-9)</sup>

NO는 다양한 세포들 사이에서 신호전달에 사용되고 바이러스나 박테리아와 같은 외부 침입 인자를 제거하는 중요한 인자이지만, 염증반응에 의해 다량의 NO가 생성될 경우에는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시킨다.<sup>10)</sup> Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)는 통증, 혈압강하, 기도수축, 세포보호 효과, 염증성 세포 활성화, 발열, 점액 생성 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>11,12)</sup>

대식세포는 염증반응에서 중요한 역할을 하는 세포중의 하나로서, 외부 침입 인자에 반응하여 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), IL-1 $\beta$ 와 같은 pro-inflammatory

\*교신저자 (E-mail): eunsyoo@jejunu.ac.kr  
(Tel): +82-64-754-3847

cytokine을 생성하고, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 합성하여 NO 및 PGE<sub>2</sub>를 생성하는 주요한 세포로 알려져 있고,<sup>13)</sup> 이런 염증성 매개체에 대한 억제 활성을 확인함으로써 항염증 효과를 확인하는 *in vitro* 모델이 널리 사용되고 있다. 하지만, 아토피 피부염에 관여한다고 알려진 세포들 중에서, 각질형성세포는 모든 표피층의 95%이상을 구성하는 세포로서, 다양한 자극에 의해서 cytokines, chemokines을 생성할 뿐만 아니라, 다양한 수용체도 발현하고 있어서 주요한 표적으로 작용하기도 한다.<sup>14,15)</sup>

개똥쭉(*Artemisia annua* L., 생약명: 황화호(黃花蒿))은 민간에서 열병 및 해열제 또는 피부완선의 치료에도 사용된다고 알려져 있다. 활성 성분을 조사한 연구결과에서는 monoterpenoids, sesquiterpenoids, flavonoids, coumarins, aliphatic and lipid compounds와 같은 다양한 종류의 phytochemical을 함유한다고 보고되었다.<sup>16,17)</sup> 그 중에서 artemisinic acid는 강력한 항말라리아 활성을 갖는 artemisinin의 전구체로서 잘 알려져 있다. 최근 artemisinic acid가 지방세포의 분화와 C/EBP  $\delta$  발현을 조절함으로써 anti-adipogenesis 활성을 갖는다는 연구 결과가 보고되었다.<sup>18)</sup> 하지만, 아직까지 artemisinic acid의 항염증 활성에 대한 보고는 없는 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 다양한 염증성 인자들에 대한 artemisinic acid의 활성 및 그 작용기전을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**시약 및 기기** – Lipopolysaccharide (LPS, E. coli 011:B4)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였다. 재조합 interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , fetal bovine serum (FBS)와 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)는 Invitrogen (Grand Island, NY)에서 구입하였다. Anti-p38, anti-I $\kappa$ B- $\alpha$ , and anti-phospho-STAT1 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)에서 구입하여 사용하였다. anti-STAT1 and anti-phospho-p38 항체는 Becton Dickinson (San Diego, CA)에서 구입하였고,  $\beta$ -actin 항체는 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약들은 특급 시약을 사용하였다. MPLC는 CombiFlash companion (Teledyne ISCO)을 사용하였다. MPLC에 사용된 분취용 컬럼은 RediSep column (silica 120 g, 3.5  $\times$  200 mm, Teledyne ISCO)을 사용하였다. 분취용 HPLC는 검출기로서 Waters 2487 Dual  $\lambda$ Absorbance를 포함하는 Waters prep LC 2000 system을 사용하였으며, 사용된 컬럼은 Luna C18(2) column (21.2  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m, Phenomenex)을 사용하였다. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR은 Bruker Avance-500 (500 MHz)를 사용하였으며, GC-MS는 Hewlett Packard사의 HP6890 GC-HP5972

MS를 사용하였다(electron impact, ionization voltage 70 eV). GC column (0.25 mm  $\times$  30 m, 0.25  $\mu$ m film thickness)으로는 HP-5 fused silica capillary column을 사용하였다. TLC용 plate는 precoated silica gel 60 F254 plate (0.25 mm, 20  $\times$  20 cm, Merck)를 사용하였다.

**실험재료** – 본 실험에 사용한 시료는 제주도에서 2010년 6월에서 9월에 걸쳐 채집된 시료를 제주 하이테크 산업진흥원의 종다양성 연구소로부터 분양 받아 사용하였다.

**추출 및 분획** – 개똥쭉 전초 300 g을 세절하고 n-hexane (3 L  $\times$  3)로 추출하였다. 이후 추출물은 진공 농축하였고, chloroform (400 mL)에 6% methanol을 사용하여 다시 추출하였다. 다시 한번 진공 농축한 후, MPLC (RediSep, silica 120 g, 3.5200 mm; detection, UV at 254 nm; flow rate, 85 ml/min)를 실시하여 얻어진 50개의 소분획을 얻고, 이중 10-18번 소분획에 대하여 preparative TLC (Si gel using a 6% ethylacetate in CHCl<sub>3</sub> solvent system)을 실시하여 혼합물 940 mg을 얻었다. 이 혼합물에 대하여 reversed-phase preparative HPLC (Phenomenex Luna C18(2), 21.2250 mm, 5 mm, 60% acetonitrile in water)을 실시하여 480 mg의 artemisinic acid을 얻었다. 이렇게 얻어진 artemisinic acid는 GC-MS와 <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR을 이용하여 동정하였다.

Artemisinic acid. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.45 (1H, s, H-13), 5.55 (1H, s, H-13), 4.98 (1H, s, H-5), 2.69 (1H, m,  $J$ =3.8 Hz, H-7), 2.61 (1H, br s, H-6), 1.92 (2H, d,  $J$ =1.2 Hz, H-2), 1.78 (2H, d,  $J$ =3.5 Hz, H-3), 1.59 (3H, s, H-15), 1.41 (1H, m,  $J$ =5.3 Hz, H-1), 1.39 (1H, m,  $J$ =2.2 Hz, H-10), 1.35 (2H, m,  $J$ =3.4 Hz, H-8), 1.07 (2H, m,  $J$ =3.8 Hz, H-9), 0.90 (3H, d,  $J$ =4.1 Hz, H-14); <sup>13</sup>C-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  172.9 (C-12), 142.8 (C-11), 135.1 (C-4), 126.8 (C-13), 120.3(C-5), 42.2 (C-7), 41.6 (C-1), 38.1 (C-6), 35.4 (C-9), 27.8 (C-10), 26.6 (C-3), 26.1 (C-8), 25.7 (C-2), 23.8 (C-15), 19.5 (C-14); EI-MS, m/z (rel. int.) 234 (M<sup>+</sup>, 19), 189 (9), 161 (4), 136 (20), 121 (100), 93 (49), 79 (41), 67 (11).

**세포배양 및 세포생존능 평가** – 사람 각질형성세포주인 HaCaT 세포는 제주대학교 의학전문대학원 조문제 교수로부터 분양 받았고, 생쥐 대식세포주인 RAW264.7 세포는 ATCC (Rockville, MD)에서 분양 받았다. 각각의 세포주는 10% FBS와 1% 항생제가 첨가된 DMEM을 사용하여 습한 조건의 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 세포생존능은 Naramwongsatit가 기술한 방법을 참고하여 실시하였고,<sup>19)</sup> EZ-cytox enhanced cell viability assay kit (itBIO, Korea)을 사용하여 측정하였다. 간단히 기술하면 먼저 96 well plate에 2  $\times$  10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 동일하게 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 기존의 배지를 제거하고, 다양한 농도의 시료가 포함된 새로운 배지로 처리한 후 다시 24시간 동안 배

양하였다. 배양이 끝난 후, 배지에 WST solution (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium)를 10  $\mu$ L씩 넣고 2~3시간 동안 배양하였다. 각 well의 흡광도는 VerasaMax ELISA microplate reader (Molecular Devices Inc., CA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

**RNA분리 및 RT-PCR - MDC mRNA 발현에 대한 artemisinic acid의 활성은** Xizo등이 기술한 방법을 참고하여 실시하였다.<sup>20)</sup> HaCaT 세포에서 RNA분리 및 RT-PCR은 HaCaT 세포( $5.0 \times 10^5$  cells/mL)를 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 18시간 전배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 와 시료가 포함된 배지를 처리하여 배양한 후, TRI-reagent (MRC)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 분광광도계를 이용하여 260/280 nm 파장에서 정량 하였다. cDNA는 1  $\mu$ g의 total RNA를 사용하여 First-Standard cDNA Synthesis kit (Promega, Madison, WI)에 포함된 절차에 따라 합성하였다. Polymerase Chain Reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 MDC와  $\beta$ -actin을 증폭시키기 위하여, 각 유전자에 대해 특이적인 primer와 i-Taq<sup>TM</sup> DNA polymerase (iNtRON Biotechnology)를 사용하여 수행하였다. Primer sequence는 MDC (497 bp): 5'-GCATGGCTCGCCTACAGACT-3'와 5'-GCAGGGAGGGAGGCAGAGGA-3';  $\beta$ -actin (588 bp): 5'-ATGGGTCAGAAGGATT-CCTATG-3'와 5'-CAGCTCGTAG CTC-TTCTCCA-3'이다. PCR은 Peltier Thermal Cycler (PTC-100, MJ research, Reno, NV)을 사용하였으며, 각 인자에 대해서 denaturing at 94°C, 30 초, annealing at 55-60°C, 30 초, extending at 72°C, 2 분 조건에서 32 cycle로 수행하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel (Promega)로 전기영동 후, ethidium bromide로 염색하고 UV light illumination으로 확인하였다.

**Western Blot Analysis - STAT1, I $\kappa$ B- $\alpha$ , p38에 대한 artemisinic acid의 영향은** 이전에 기술했던 방법과 동일하게 진행하였다.<sup>21)</sup> HaCaT 세포( $5.0 \times 10^5$  cells/mL)를 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 18시간 전배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 시료가 포함된 배지를 처리하여 2시간 동안 전처리 하였고, IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 로 15~30분간 자극하였다. 이렇게 처리된 세포를 ice-cold phosphate buffered saline (PBS)를 사용하여 2~3회 세척 후, lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonident P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 mM NaF, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25  $\mu$ g/mL leupeptin)를 처리하고 얼음 위에서 30분간 lysis시켰다. Cell lysates는 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하였고, 상등액을 Western blot analysis에 사용하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준화 하여 Bio-Rad assay

kit (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 측정하였다. 30  $\mu$ g의 lysate를 10% mini gel sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane (Bio-Rad)에 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk blocking buffer를 사용하여 실온에서 1시간동안 blocking 하였고, 이어서 각 1차 항체를 1% BSA/TTBS (TBS + 0.1% Tween20) buffer에 1:1000으로 희석하여 처리하였다(4°C, overnight). TTBS washing 후, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-primary antibody host IgG 항체는 1:5000으로 희석하여 실온에서 1시간 30분 동안 처리하였다. 면역반응이 완료된 membrane은 WEST-ZOL plus Western blot detection system (iNtRON Biotechnology, Korea)을 이용하여 발광시킨 후, X-ray 필름에 감광시켜 확인하였다.

**NO Assay - 세포배양액 내의 NO는 NO의 분해산물인 nitrite (NO<sup>2-</sup>)를 측정함으로써 NO의 양을 간접적으로 측정하는** Griess reagent (Promega, Madison, WI) 방법으로 측정하였고, 이 등이 기술한 절차에 따라 실행하였다.<sup>22)</sup> RAW264.7세포에 LPS (1  $\mu$ g/mL)와 시료를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 배양 상층액 100  $\mu$ L와 동일량의 Griess reagent (0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride and 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid)를 섞고 실온 암소에서 10분간 반응시켰다. 각 well의 흡광도 값은 540 nm에서 측정하였고, NaNO<sub>2</sub>를 표준물질로 하여 정량 곡선을 작성하였다.

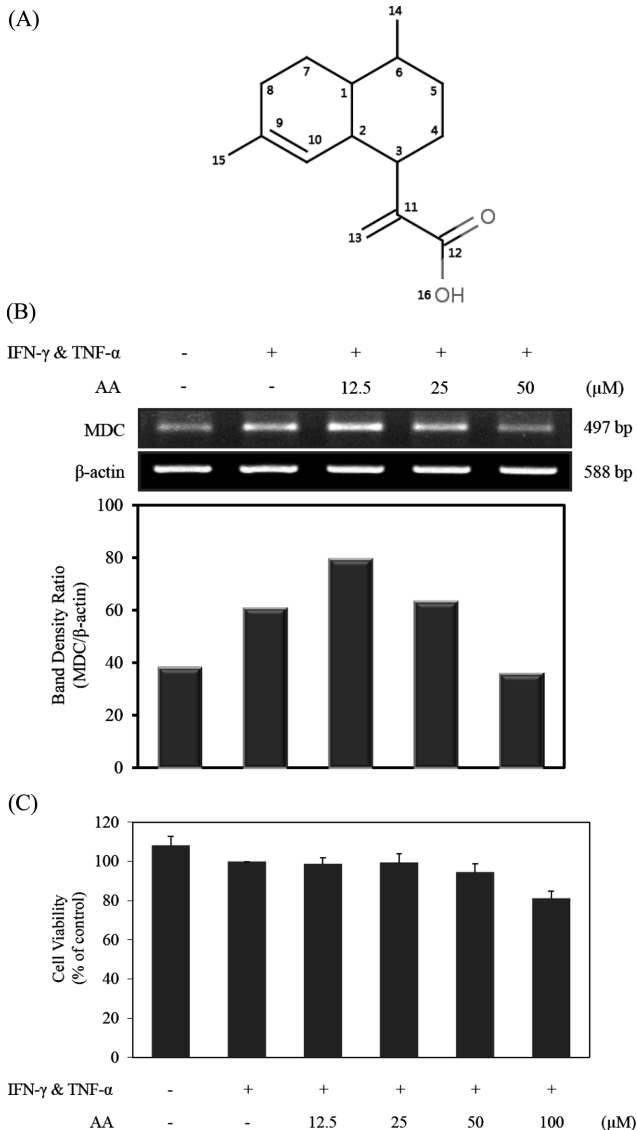
**ELISA - PGE<sub>2</sub>와 IL-6에 대한 artemisinic acid의 활성은** 이 등이 이전에 기술한 방법을 참고로 하여 실시하였다.<sup>22)</sup> RAW264.7 세포( $2.0 \times 10^5$  cells/mL)를 96 well plate에 접종하고 18시간 전배양하였다. 이후 배지를 제거하고 LPS (1  $\mu$ g/mL)와 농도별로 희석된 시료를 처리하고 24시간 배양하였다. 세포 배양액 내 PGE<sub>2</sub>와 IL-6는 Parameter<sup>TM</sup> Prostaglandin E<sub>2</sub> Assay kit와 DuoSet<sup>®</sup> mouse IL-6 (R&D systems, Minneapolis, MN)를 이용하여 각각 측정하였다.

**통계처리 -** 본 실험의 통계처리는 Student's t-test 방법을 사용하였으며, 값은 평균과 표준편차로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

**각질형성세포에서 MDC mRNA 발현에 대한 Artemisinic Acid의 효과 -** 염증성 chemokine인 MDC는 다양한 염증성 세포의 병변으로의 이주에 관여하고, 아토피 피부염 환자의 혈청에서 증가되는 것으로 알려져 있다. 이전의 연구결과에서 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4와 같은 염증성 cytokines들이 각질형성세포나 섬유아세포에서 MDC와 같은 염증성 chemokine의 생성을 유발한다는 보고가 있었다.<sup>23-25)</sup> 따라서, 각질형성 세포인 HaCaT 세포에서 artemisinic acid가 IFN- $\gamma$ 와 TNF-

$\alpha$  자극으로 유도되는 MDC에 대한 억제효과를 갖는지 조사하였다. 먼저, 실험에 사용된 artemisinic acid의 구조는 Figure 1과 같다. HaCaT 세포를 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 로 자극했을 때, MDC mRNA 발현이 자극하지 않은 대조군에 비해



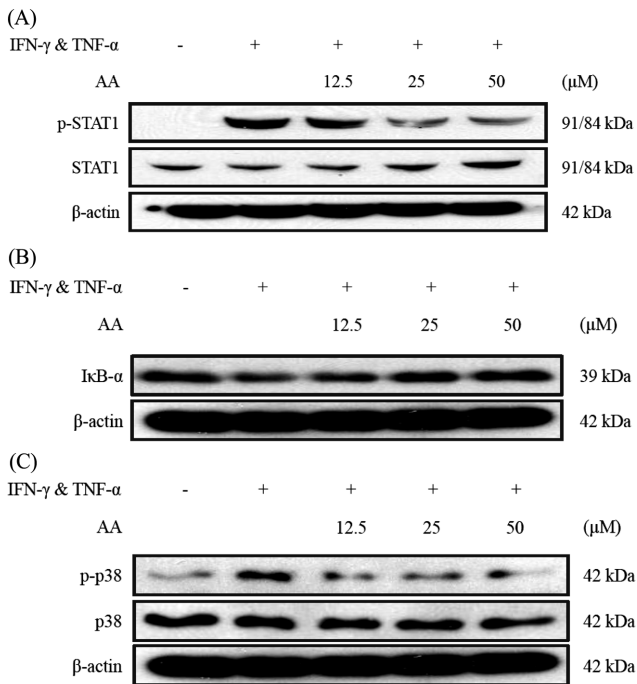
**Fig. 1.** Effect of artemisinic acid (AA) on the MDC mRNA expression and the cell viability in the IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ -stimulated HaCaT human keratinocytes. (A) Chemical structure of artemisinic acid. (B) Cells were pre-incubated for 18 hr, and mRNA expression was determined from the cells stimulated with IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) and TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) in the presence of artemisinic acid (12.5, 25, 50  $\mu$ M) for 18 hr. The mRNA expression was determined by RT-PCR. (C) Cells ( $5.0 \times 10^4$  cells/mL) were pre-incubated for 18 hr, and cell viability was determined from the cells stimulated with IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) and TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) in the presence of artemisinic acid (12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M). Cell viability was measured using WST assay.

증가하였다. 하지만, artemisinic acid 50  $\mu$ M을 함께 처리하였을 때, MDC mRNA 발현이 자극하지 않은 대조군 수준으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1-B).

이와 같은 artemisinic acid의 억제활성이 HaCaT 세포에 대한 독성으로 인해 나타나는 영향이 아닌지 확인하기 위하여 세포 생존능에 대한 영향을 확인해 보았다. HaCaT 세포에 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 로 자극하고, artemisinic acid를 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M로 처리한 결과, 100  $\mu$ M에서 세포 생존능을 약 80% 정도로 억제하였지만, 활성을 평가했던 농도인 50  $\mu$ M이하에서는 세포 생존능에 영향을 주지 않았다(Fig. 1-C). 이러한 결과들은 artemisinic acid가 HaCaT 세포에서 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$  자극으로 유도되는 염증성 chemokine인 MDC 발현에 대해 억제 활성을 갖는다는 것을 보여준다.

**각질형성세포에서 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 로 활성화되는 신호전달 인자에 대한 Artemisinic Acid의 효과** - IFN- $\gamma$ 는 세포막에 존재하는 IFNGR1과 R2에 결합하여 작용을 하고, 이후에 Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT), mitogen-activated protein kinases (MAPKs; ERK and p38), nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)와 같은 다양한 신호전달 경로를 활성화 시킨다.<sup>26)</sup> 따라서, MDC mRNA 발현에 대한 억제 활성을 보인 artemisinic acid의 억제 활성 기전을 확인하기 위하여, HaCaT 세포에서 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$  자극으로 활성화 되는 것으로 알려진 신호전달 인자들인 STAT1, p38, NF- $\kappa$ B에 대한 효과를 확인해 보았다. STAT1과 p38의 경우에는 인산화 되는 정도를 직접 확인하였고, NF- $\kappa$ B의 경우에는 NF- $\kappa$ B와 결합하여 활성을 억제시키는 인자인 inhibitor  $\kappa$ B (I $\kappa$ B)의 발현 여부를 확인하였다. HaCaT 세포에 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 를 자극했을 때, STAT1, p38의 인산화 또는 I $\kappa$ B의 degradation이 시간의존적으로 나타났다(data not shown). 이어서, artemisinic acid를 12.5, 25, 50  $\mu$ M로 2시간 동안 전처리한 후, IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 를 자극으로 활성화되는 인자에 대한 영향을 확인한 결과, STAT1과 p38의 인산화가 억제되었고, 감소되었던 I $\kappa$ B의 수준도 농도의존적으로 회복되는 양상을 확인하였다(Fig. 2). 다양한 이전의 연구결과에서, IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 로 자극된 HaCaT 세포에서 MDC 또는 TARC 생성이 Jak/STAT 억제제인 Jak inhibitor I, p38 MAPK 억제제인 SB203580, NF- $\kappa$ B 억제제인 Bay11-7082을 처리했을 때 감소된다는 보고가 있었다.<sup>27-29)</sup> 이전의 결과들과 함께 생각해 보면, artemisinic acid가 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$  자극으로 활성화되는 신호전달 인자들을 억제시킴으로써 MDC 발현을 억제시킨 것으로 생각할 수 있다.

**대식세포에서 염증성 인자들에 대한 Artemisinic Acid의 효과** - 염증반응은 단핵세포나 대식세포와 같은 염증/면역 세포에 의해 매개되는 다양한 인자들에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다. 그람 음성균의 세포벽 성분인



**Fig. 2.** Effects of artemisinin acid (AA) on the factors of signaling pathways activated by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in HaCaT human keratinocytes. HaCaT cells ( $5.0 \times 10^5$  cells/mL) were pre-incubated for 18 hr, and then the cells were pre-treated with artemisinin acid for 2 hr. (A) The phosphorylation of STAT1 was determined from the cells stimulated by IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) and TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) for 30 min. (B) The degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  and (C) the phosphorylation of p38 were determined from the cells stimulated by IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) and TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) for 15 min. Each protein levels were identified by western blotting method.

lipopolysaccharide (LPS)는 이와 같은 세포를 자극하여 NO, PGE<sub>2</sub>, 염증성 cytokine과 같은 다양한 염증성 인자들의 생성을 유도한다<sup>30,31</sup>). 따라서, artemisinin acid의 항염증 활성을 평가하고자, 대식세포인 RAW264.7 세포를 LPS로 자극한 후 생성되는 염증성 인자들에 대한 artemisinin acid의 억제 활성을 확인하였다. 먼저, RAW264.7 세포에 LPS (1  $\mu$ g/mL)와 artemisinin acid를 25, 50, 100, 200  $\mu$ M로 처리하여 24시간 배양한 후, 세포 배양 상층액에서 NO 생성량의 변화를 griess 방법으로 확인 하였다. LPS로 자극하지 않은 대조군에 비해 LPS로 자극한 실험군에서 NO의 생성량이 약 14배 이상 증가하였고, 이는 artemisinin acid를 100, 200  $\mu$ M 농도로 처리했을 때, 유의적으로 억제 되었다(Fig. 3-A). 하지만, HaCaT 세포에서 50  $\mu$ M 농도에서 활성을 나타낸 것과 비교했을 때, 비교적 높은 농도에서 활성을 나타낸 것으로서 세포에 따라 또는 세포를 자극하는 인자에 따라 활성에 차이를 보이는 것으로 생각된다.

다음은 artemisinin acid의 PGE<sub>2</sub>에 대한 억제효능을 확인

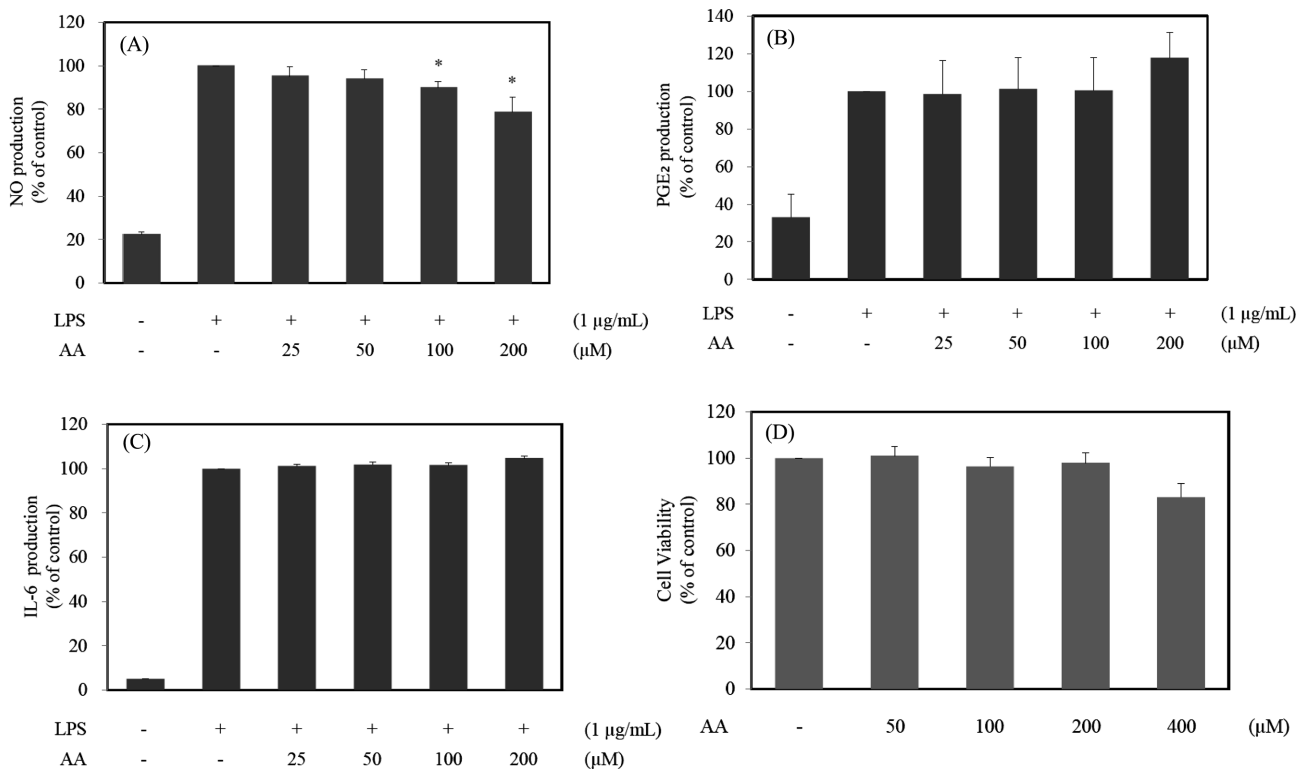
하기 위하여 ELISA를 이용하여 확인하였다. RAW264.7 세포에 25, 50, 100, 200  $\mu$ M의 artemisinin acid를 LPS와 함께 처리한 다음 24시간 후 PGE<sub>2</sub> 생성량을 확인한 결과, LPS를 처리한 후 PGE<sub>2</sub>의 생성량은 LPS를 처리하지 않은 대조군에 비하여 증가되었다. 하지만, 다양한 농도(25, 50, 100, 200  $\mu$ M)의 artemisinin acid를 처리했을 때에도 LPS자극으로 생성된 PGE<sub>2</sub>에 영향을 주지 않았다(Fig. 3-B).

LPS로 유도되는 다양한 염증성 cytokines 중 대표적인 cytokine인 IL-6에 대한 artemisinin acid의 억제효능도 확인해 보았다. RAW264.7 세포에 25, 50, 100, 200  $\mu$ M의 artemisinin acid와 LPS를 처리한 다음 24시간 후 IL-6의 생성량을 ELISA를 이용하여 확인하였다. 그 결과, LPS를 처리한 후 IL-6의 생성이 LPS를 처리하지 않은 대조군에 비하여 증가되었으나, artemisinin acid를 농도별로 처리한 군에서도 LPS로 자극한 실험군과 유사한 IL-6 생성량을 보였다(Fig. 3-C).

마지막으로 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포에서 artemisinin acid의 세포 생존능에 대한 영향을 확인하였다. 세포에 artemisinin acid를 농도별 50, 100, 200, 400  $\mu$ M로 처리하여 24시간 동안 배양하였고, WST assay를 이용하여 세포 생존능을 측정하였다. 결과에서처럼, artemisinin acid를 400  $\mu$ M로 처리했을 때 세포 생존능이 약 80% 정도로 억제 됐지만, 200  $\mu$ M이하의 농도에서는 RAW264.7 세포의 생존능에 영향을 주지 않았다(Fig. 3-D). 요약하자면, artemisinin acid가 대식세포에서 LPS로 유도되는 NO에 대해서는 약한 억제 효과를 보였지만, 각질형성세포에서 MDC에 대한 억제 활성을 나타낸 농도에 비해 고농도에서 억제 활성을 나타냈고, 또 다른 염증성 인자들인 PGE<sub>2</sub>와 IL-6에 대한 억제 활성이 없었다.

## 결론

본 연구에서는 개뿔썩으로부터 분리된 성분인 artemisinin acid이 각질형성세포주와 대식세포주에서 유도되는 다양한 전염증성 인자들(MDC, NO, PGE<sub>2</sub>, IL-6)에 대한 억제활성을 확인해 보았다. Artemisinin acid는 대식세포인 RAW264.7 세포에서 LPS 자극으로 유도되는 염증성 인자인 NO, PGE<sub>2</sub>, IL-6에 대해서는 억제활성이 약하거나 없었지만, 각질형성세포인 HaCaT 세포에서 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$  자극으로 유도되는 아토피 피부염 관련 인자인 MDC발현에 대해서 억제활성을 나타내었다. 또한, 이런 artemisinin acid에 의한 억제 활성은 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 로 활성화되는 다양한 신호전달인자들인 STAT1, NF- $\kappa$ B, p38의 인산화를 억제함으로써 나타낸 효과라 할 수 있다. 이러한 결과는 개뿔썩 유래 성분인 artemisinin acid가 염증성 피부질환의 예방 및 치료에 도움이 될 수 있음을 보여준다.



**Fig. 3.** Effects of artemisinin acid (AA) on the inflammatory mediators in RAW264.7 macrophages. (A) Cells ( $2.0 \times 10^5$  cells/mL) were pre-incubated for 18 hrs. (A) NO, (B) PGE<sub>2</sub> and (C) IL-6 productions were determined from the culture supernatant of cells stimulated by LPS (1 µg/mL) with indicated concentrations of artemisinin acid for 24 hrs. The NO production was measured by Griess method and PGE<sub>2</sub> and IL-6 levels were measured by ELISA. The error bars indicate standard deviation. (D) Cells ( $1.0 \times 10^5$  cells/mL) were pre-incubated for 18hr, and cell viability was determined from the cells treated concentrations of artemisinin acid (50, 100, 200, 400 µM) for 24hr. Cell viability determined by WST assay. \*,  $P < 0.05$ .

## 사 사

본 연구는 지식경제부 지역산업기술개발사업 (70011029)의 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Coleman, J. W. (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **1**: 1397-1406.
- Tripathi, P., Tripathi, P., Kashyap, L. and Singh, V. (2007) The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**: 443-452.
- Abramovits, W. (2005) Atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **53**: S86-93.
- Bonness, S. and Bieber, T. (2007) Molecular basis of atopic dermatitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **7**: 382-386.
- Pease, J. E. and Williams, T. J. (2006) Chemokines and their receptors in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**: 305-18.
- Imai, T., Nagira, M., Takagi, S., Kakizaki, M., Nishimura, M., Wang, J., Gray, P. W., Matsushima, K. and Yoshie, O. (1999) Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int. Immunol.* **11**: 81-88.
- Kakinuma, T., Nakamura, K., Wakugawa, M., Mitsui, H., Tada, Y., Saeki, H., Torii, H., Komine, M., Asahina, A. and Tamaki, K. (2002) Serum macrophage-derived chemokine (MDC) levels are closely related with the disease activity of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.* **127**: 270-273.
- Leung, T. F., Ma, K. C., Hon, K. L., Lam, C. W., Wan, H., Li, C. Y. and Chan, I. H. (2003) Serum concentration of macrophage-derived chemokine may be a useful inflammatory marker for assessing severity of atopic dermatitis in infants and young children. *Pediatr. Allergy Immunol.* **14**: 296-301.
- Hijnen, D., De Bruin-Weller, M., Oosting, B., Lebre, C., De Jong, E., Bruijnzeel-Koomen, C. and Knol, E. (2004) Serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) levels in allergic diseases: TARC and CTACK are disease-specific markers for atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**: 334-340.

10. Aktan, F. (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* **75**: 639-653.
11. Flower, R. J. (2006) Prostaglandins, bioassay and inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **147**: S182-92.
12. Ricciotti, E. and FitzGerald, G. A. (2011) Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**: 986-1000.
13. Maruotti, N., Cantatore, F. P., Crivellato, E., Vacca, A. and Ribatti, D. (2007) Macrophages in rheumatoid arthritis. *Histol. Histopathol.* **22**: 581-586.
14. Pivarsci, A., Nagy, I. and Kemeny, L. (2005) Innate Immunity in the Skin: How Keratinocytes Fight Against Pathogens. *Curr. Immunol. Rev.* **1**: 29-42.
15. Homey, B., Steinhoff, M., Ruzicka, T. and Leung, D. Y. (2006) Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J. Allergy Clin Immunol.* **118**: 178-89.
16. Bhakuni, R. S., Jain, D. C., Sharma, R. P. and Kumar, S. (2001) Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Curr. Sci.* **80**: 35-48.
17. Iqbal, S., Younas, U., Chan, K. W., Zia-Ul-Haq, M. and Ismail, M. (2012) Chemical composition of *artemisia annua* L. leaves and antioxidant potential of extracts as a function of extraction solvents. *Molecules* **17**: 6020-6032.
18. Lee, J., Kim, M. H., Lee, J. H., Jung, E., Yoo, E. S. and Park, D. (2012) Artemisinic acid is a regulator of adipocyte differentiation and C/EBP delta expression. *J. Cell. Biochem.* **113**: 2488-2499.
19. Ngamwongsatit, P., Banada, P. P., Panbangred, W. and Bhunia, A. K. (2008) WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *J. Microbiol. Methods* **73**: 211-215.
20. Xiao, T., Kagami, S., Saeki, H., Sugaya, M., Kakinuma, T., Fujita, H., Yano, S., Mitsui, H., Torii, H., Komine, M., Asahina, A., Nakamura, K. and Tamaki, K. (2003) Both IL-4 and IL-13 inhibit the TNF-alpha and IFN-gamma enhanced MDC production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. *J. Dermatol. Sci.* **31**(2): 111-7.
21. Kang, G. J., Lee, H. J., Yoon, W. J., Yang E. J., Park, S. S., Kang H. K., Park, M. H. and Yoo, E. S. (2008) *Prunus Yedoensis* Inhibits the Inflammatory Chemokines, MDC and TARC, by Regulating the STAT1-Signaling Pathway in IFN- $\gamma$ -stimulated HaCaT Human Keratinocytes. *Biomol. Ther.* **16**: 394-402.
22. Lee, H. J., Oh, T. H., Yoon, W. J., Kang, G. J., Yang E. J., Park, S. S., Lee, N. H., Kang H. K. and Yoo, E. S. (2008) Eutigoside C inhibits the production of inflammatory mediators (NO, PGE<sub>2</sub>, IL-6) by down-regulating NF- $\kappa$ B and MAP kinase activity in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **60**: 917-924.
23. Horikawa, T., Nakayama, T., Hikita, I., Yamada, H., Fujisawa, R., Bito, T., Harada, S., Fukunaga, A., Chantry, D., Gray, P. W., Morita, A., Suzuki, R., Tezuka, T., Ichihashi, M. and Yoshie, O. (2002) IFN-gamma-inducible expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis. *Int. Immunol.* **14**: 767-773.
24. Pivarsci, A. and Homey, B. (2005) Chemokine networks in atopic dermatitis: traffic signals of disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **5**: 284-290.
25. Yamashita, U. and Kuroda, E. (2002) Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. *Crit. Rev. Immunol.* **22**: 105-114.
26. Gough, D. J., Levy, D. E., Johnstone, R. W. and Clarke, C. J. (2008) IFN $\gamma$  signaling-does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**: 383-394.
27. Hongqin, T., Xinyu, L., Heng, G., Lanfang, X., Yongfang, W. and Shasha, S. (2011) Triptolide Inhibits IFN-gamma Signaling via the Jak/STAT Pathway in HaCaT Keratinocytes. *Phytother. Res.* **25**(11): 1678-1685
28. Jeong, S. I., Choi, B. M. and Jang, S. I. (2010) Sulforaphane suppresses TARC/CCL17 and MDC/CCL22 expression through heme oxygenase-1 and NF-kappaB in human keratinocytes. *Arch. Pharm. Res.* **33**: 1867-1876.
29. Ju, S. M., Song, H. Y., Lee, S. J., Seo, W. Y., Sin, D. H., Goh, A. R., Kang, Y. H., Kang, I. J., Won, M. H., Yi, J. S., Kwon, D. J., Bae, Y. S., Choi, S. Y. and Park, J. (2009) Suppression of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) production by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose via blockade of NF-kappaB and STAT1 activation in the HaCaT cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387**: 115-120.
30. Himaya, S. W., Ryu, B., Qian, Z. J. and Kim, S. K. (2010) Sea cucumber, *Stichopus japonicus* ethyl acetate fraction modulates the lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathway in murine macrophages. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **30**: 68-75.
31. Kim, H. J., Tsoyi, K., Heo, J. M., Kang, Y. J., Park, M. K., Lee, Y. S., Lee, J. H., Seo, H. G., Yun-Choi, H. S. and Chang, K. C. (2007) Regulation of lipopolysaccharide-induced inducible nitric-oxide synthase expression through the nuclear factor-kappaB pathway and interferon-beta/tyrosine kinase 2/Janus tyrosine kinase 2-signal transducer and activator of transcription-1 signaling cascades by 2-naphthyl-ethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (THI 53), a new synthetic isoquinoline alkaloid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **320**: 782-789.

(2012. 8. 10 접수; 2012. 9. 3 심사; 2012. 9. 18 게재확정)