

## 당지질로 유도한 염증반응에서 Piceatannol의 항염증 기전 연구

조한진<sup>1</sup> · 심재훈<sup>1</sup> · 소홍섭<sup>2</sup> · 윤정한<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>한림대학교 자연과학대학 식품영양학과  
<sup>2</sup>원광대학교 의과대학 전정와우기관연구센터 & 미생물학교실

### Mechanism Underlying the Anti-Inflammatory Action of Piceatannol Induced by Lipopolysaccharide

Han Jin Cho<sup>1</sup>, Jae-Hoon Shim<sup>1</sup>, Hong-Seob So<sup>2</sup>, and Jung Han Yoon Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Science and Nutrition, Hallym University, Gangwon-do 200-702, Korea

<sup>2</sup>Vestibulocochlear Research Center & Dept. of Microbiology,  
Wonkwang University School of Medicine, Jeonbuk 570-749, Korea

#### Abstract

3,4,3',5'-Tetrahydroxy-trans-stilbene (piceatannol) is a derivative of resveratrol with a variety of biological activities, including anti-inflammatory, anti-proliferative, and anti-cancer activities. We assessed the mechanisms by which piceatannol inhibits inflammatory responses using lipopolysaccharide (LPS)-treated Raw264.7 murine macrophages. Piceatannol (0~10  $\mu$ mol/L) decreased LPS-induced release of nitric oxide, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ , and inhibited LPS-induced protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS). Activation of nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B), activator protein (AP)-1, and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) are crucial steps during an inflammatory response. Piceatannol prevented LPS-induced degradation of inhibitor of  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), translocation of p65 to the nucleus, and phosphorylation of stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase (SAPK/JNK). Additionally, piceatannol inhibited LPS-induced phosphorylation of STAT3 and IL-6-induced translocation of STAT3 to the nucleus. Furthermore, piceatannol increased the protein and mRNA levels of hemeoxygenase (HO)-1, the rate-limiting enzyme of heme catabolism that plays a critical role in mediating antioxidant and anti-inflammatory effects. Piceatannol further induced antioxidant response elements (ARE)-driven luciferase activity in Raw264.7 cells transfected with an ARE-luciferase reporter construct containing the enhancer 2 and minimal promoter region of HO-1. These results suggest that piceatannol exerts anti-inflammatory effects via the down-regulation of iNOS expression and up-regulation of HO-1 expression.

**Key words:** piceatannol, iNOS, NF- $\kappa$ B, STAT3, HO-1

#### 서 론

자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나인 염증반응은 감염에 의한 외인적인 요인 및 조직의 stress와 기능부전에 의한 내인적인 요인에 의해 유도(1)되어 다양한 질병의 생리학적 과정과 병리학적인 과정에 폭넓게 관여한다. 특히 만성질환이 만연한 현대에서 염증반응은 치매, 심혈관질환, 암, 비만, 대사성 증후군 등의 만성질환의 원인이 된다고 보고되고 있다(2). 이는 염증반응을 촉진하는 인자들[예로 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin(IL)-6, IL-1 $\beta$ , inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)]과 신호전달경로[예로 nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B)]가 염증반응뿐 아니라 이들 만성질환에서도 깊숙이 관여하고 있기 때문이며, 따라서 염증반응을 억제하는

물질은 만성질환을 예방하거나 억제하기 위한 기능성 물질로 사용될 가능성이 높다고 볼 수 있다.

Piceatannol(3,4,3',5'-tetrahydroxy-trans-stilbene)은 포도와 와인, 대황 등에서 발견되어지는 polyphenol로서 화학적 암 예방 물질로 주목받는 resveratrol(3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene)의 유도체이다(Fig. 1)(3,4). 많은 연구들을 통하여 piceatannol의 항암활성이 보고되고 있다. 유방암과 전립선암세포에서 piceatannol은 세포주기를 억제하고 세포 사멸을 증가시키며, 암세포의 이동과 전이를 억제하였다(5-9). 항암활성 외에도 piceatannol의 항염증 활성이 보고되었으며, lipopolysaccharide(LPS)로 염증반응을 유도시킨 대식세포에서 piceatannol은 염증반응의 주요 매개체인 nitric oxide(NO)의 생성을 억제하였다(4,10). 또한 선행연구를 통해 piceatannol이 dextran sulfate sodium으로 유도된

\*Corresponding author. E-mail: jyoon@hallym.ac.kr  
Phone: 82-33-248-2134, Fax: 82-33-256-0199

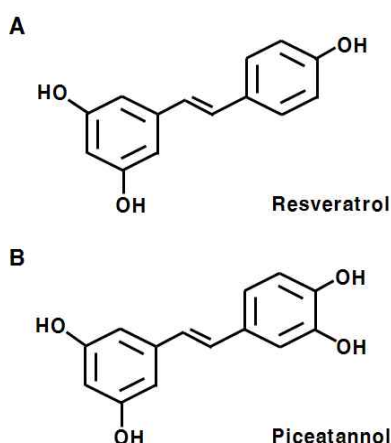


Fig. 1. Chemical structure of resveratrol (A) and piceatannol (B).

대장염을 억제함을 관찰하였다(11). 하지만 다양한 시각에서 작용기전이 밝혀진 항암활성과 달리 piceatannol의 항염증 기전은 여전히 제한적으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 piceatannol의 항염증 기전을 염증반응에서 중요한 NF- $\kappa$ B를 포함한 다양한 신호전달경로를 통해 밝히고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

세포배양에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)은 Welgene(Daegu, Korea)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)과 penicillin-streptomycin(P/S)은 Lonza(Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. Piceatannol, LPS,  $\beta$ -actin 항체, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), propidium iodide (PI)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. p65, Lamin-B, signal transducer and activator of transcription 3(STAT3), hemeoxygenase(HO)-1, NF-E2 related factor 2(Nrf2) 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서, iNOS와 COX-2, P-STAT3(Ser<sup>727</sup>), P-STAT3(Tyr<sup>705</sup>) 항체는 BD Transduction Laboratories(Palo Alto, CA, USA)에서, 그리고 inhibitory  $\kappa$ B(I $\kappa$ B)- $\alpha$ , P-stress-activated protein kinase/c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase(SAPK/JNK) 항체는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Anti-rabbit IgG-Alexa488 항체는 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다.

### 세포배양

본 연구에서 사용한 쥐의 대식세포인 Raw264.7 세포는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. Raw264.7 세포는 DMEM을 사용하여 37°C 습윤한 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>/95% air)에서 배양하였다.

실험에 사용할 세포를 유지하기 위해서 DMEM에 10% FBS와 100 kU/L penicillin, 0.17 mmol/L streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 세포가 80% confluent해지면 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 세포의 단층을 씻어낸 후, scraper를 사용하여 세포를 긁어서 계대 배양하였다.

### MTT 분석

Piceatannol의 농도에 따른 Raw264.7 세포의 독성을 조사하기 위하여 MTT assay를 통해 살아있는 세포의 수를 조사하였다. Raw264.7 세포를 10% FBS가 포함된 배지에 희석하여 50,000 cells/well의 밀도로 24-well plate에 분주하였다. 24시간 후, 1% FBS가 함유되어 있는 DMEM(serum-deprivation medium, SDM)으로 24시간 serum deprivation 하였다. 그 후, LPS(1 mg/L)와 다양한 농도(0~10  $\mu$ mol/L)의 piceatannol이 포함된 SDM으로 세포를 24시간 배양한 후, MTT(2.4 mmol/L)가 포함된 배양액으로 교체하였다. 3시간 후에 배양액을 제거한 후, 형성된 푸른색의 formazan을 isopropanol로 용해하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### NO 및 염증성 사이토카인의 분비 측정

Piceatannol이 LPS에 의해 유도되는 NO 및 염증성 사이토카인의 분비에 미치는 영향을 조사하기 위하여 위에서 언급한 바와 같이 Raw264.7 세포를 LPS와 piceatannol을 첨가한 배양액으로 배양하였다. 그 후 24시간 conditioned medium을 수집한 후, 세포배양액에 분비된 NO의 양은 Griess reagent system(Promega, Madison, WI, USA)으로, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 양은 각각의 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(eBioscience, San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

### Total cell lysates와 nuclear extracts의 준비

Raw264.7 세포를 100-mm 배양 접시에 1.5 $\times$ 10<sup>6</sup> 세포를 분주한 후, 위에서 언급한 바와 같이 LPS와 piceatannol을 첨가한 배양액으로 배양하였다. 세포를 1 mmol/L iodoacetic acid와 1 mmol/L phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)가 포함된 ice-cold PBS(washing buffer)로 헹구었다. 배양 접시에 washing buffer 2 mL를 넣고 얼음 위에서 scraper를 사용하여 세포를 모은 후 원심분리(4,000 $\times$ g, 3 min, 4°C)하였다. Pellet에 lysis buffer(20 mmol/L HEPES, 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 100 mmol/L NaF, 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 1 mmol/L iodoacetic acid, 0.2 mmol/L PMSF, 20 mg/L aprotinin, 15  $\mu$ mol/L antipain, 21  $\mu$ mol/L leupeptin, and 0.5 mmol/L benzamidine HCl)를 넣고 40분 동안 4°C에서 세포를 용해하였다. Total cell lysates는 원심분리(13,400 $\times$ g, 10 min, 4°C)하여 cell debris를 제외한 상층액을 수집하여 준비하였다.

핵분획을 준비하기 위하여 scraper를 사용하여 모은 세포

에 hypotonic buffer[10 mmol/L HEPES, pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L dithiothreitol(DTT), 0.5% NP-40, 10 mmol/L iodoacetic acid, 20 mg/L aprotinin, 15 μmol/L antipain, 21 μmol/L leupeptin, 0.5 mmol/L benzamidine HCl]를 첨가하여 얼음에서 10분간 용해하였다. 원심분리(2,300×g, 15 min, 4°C)하여 상층액(세포질분획)을 수집한 후, NP-40가 포함되지 않은 hypotonic buffer로 pellet를 한차례 헹구었다. 이 pellet를 150 μL low salt buffer(20 mmol/L HEPES, pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L PMSF, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 10% glycerol)로 resuspension한 후, 50 μL high salt buffer(1.6 mol/L KCl이 포함)를 한 방울씩 첨가하여 섞어주고 얼음에서 한 시간 동안 두었다. 핵분획은 원심분리(25,000×g, 30 min, 4°C)하여 상층액을 수집한 후 -70°C에 보관하였다. Total cell lysates, 세포질과 핵분획의 단백질의 양은 BCA protein assay(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 정량하였다.

#### Western blot analysis

Cell lysates(50 μg protein)를 4~20% gradient sodium-dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에서 크기에 따라 분리한 뒤, polyvinylidene fluoride membrane(Millipore, Bedford, MA, USA)으로 이동시켰다. Membrane은 5% milk-TBST(20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5)로 1시간 incubation한 후, TBST로 10분간 3회 헹구었다. 각각의 항체를 5% milk/TBST(iNOS, COX-2, β-actin, p65, Lamin-B, HO-1) 혹은 5% BSA/TBST(IκB-α, P-SAPK/JNK, P-STAT3, STAT3)로 희석(1:1,000)한 후, membrane을 1시간 incubation하고 TBST로 10분간 3회 헹구었다. Anti-rabbit 또는 anti-mouse HRP-conjugated antibody를 5% milk/TBST에 희석(1:5,000)하여 membrane을 1시간 동안 incubation하고 TBST로 10분간 3회 헹구었다. Antibody에 결합된 단백질들의 signal은 SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate(Pierce)를 사용한 chemiluminescence 방법을 통하여 가시화하였다.

#### Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

위에서 언급한 바와 같이 Raw264.7 세포를 LPS와 piceatannol을 첨가한 배양액에서 배양한 후, RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. Oligo dT와 superscript II reverse transcriptase를 이용하여 template RNA로부터 cDNA를 합성하고 HO-1(12)의 primer(sense: 5'-TTACCTTCCCGAACATCGAC-3', antisense: 5'-GCATAAATTCCCACTGCCAC-3') 혹은 β-actin(13)의 primer(sense: 5'-GTTTGAGACCTTCAACACCCC-3', antisense: 5'-GTGGCCATCTCC-

TGCTCGAAGTC-3')를 사용하여 PCR을 수행하였다(annealing temperature: 60°C). PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide를 사용하여 가시화하였다.

#### Luciferase reporter gene assay

Raw264.7 세포는 실험 당일에 배양 접시를 80%로 덮도록 분주하고, P/S이 첨가되지 않은 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 24시간 동안 배양하였다. Antioxidant response elements(ARE)의 transcriptional activity는 mouse HO-1의 enhancer 2와 minimal promoter region을 포함하는 ARE reporter plasmid(14)를 이용하여 측정하였다. 먼저 Nucleofector-II(Amaxa, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 ARE reporter plasmid를 pCMV-β-galactosidase control vector와 co-transfection 하였다. Transfection된 세포를 24-well plate에 분주하고, 다음날 SDM으로 24시간 동안 serum deprivation한 후, 다양한 농도의 piceatannol이 첨가된 배양액에서 6시간 배양하였다. Transcriptional activity는 luciferase assay system(Promega)를 이용하여 측정하였고 β-galactosidase activity로 normalize 하였다.

#### Immunocytochemistry

Raw264.7 세포를 4-well chamber slide에 분주하고 다음날 SDM으로 serum deprivation 하였다. 24시간 후 10 μmol/L piceatannol이 첨가되거나 첨가되지 않은 배양액에서 4시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 4% paraformaldehyde로 15분간 고정된 후, 0.1% Triton X-100으로 30분간 permeabilization 하였다. Nrf2 항체(1:100)로 4°C에서 incubation(overnight)한 후, TBST로 헹구었다. Anti-rabbit IgG-Alexa488 항체(1:1,000)로 상온에서 1시간 incubation한 후, TBST로 헹구었다. 핵은 PI(1.5 μmol/L)로 염색한 후, 봉합하여 형광현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany)으로 관찰하였다.

#### 통계처리

본 연구의 모든 실험 분석 결과는 각 실험군의 평균과 표준오차로 계산하고 각 실험 군들의 평균치간의 유의성은 SAS statistical software, version 8.12(SAS Institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 ANOVA 분석 후 Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 검증하였다.

## 결과 및 고찰

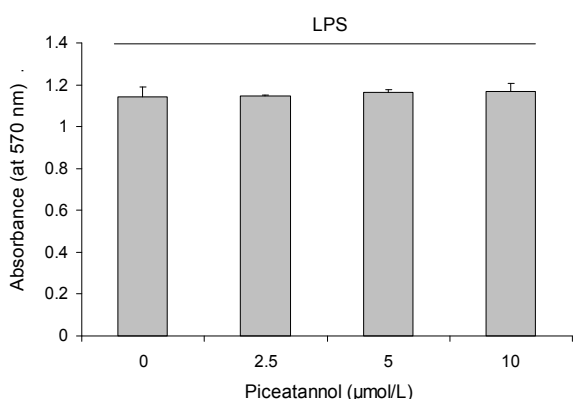
#### Piceatannol이 NO의 생성에 미치는 영향

선천 면역을 담당하는 대식세포는 염증반응을 일으키는 대표적인 면역세포로서 활성산소종, 활성질소종, 사이토카인과 같은 염증성 인자들의 분비를 통해 염증반응을 매개한다. 쥐의 대식세포인 Raw264.7은 염증반응을 위한 세포실험에 폭넓게 사용되는 세포주로서, 염증반응을 유도하기 위한 자극제로 그람음성균 세포막의 당지질인 LPS가 주로 사용

된다. LPS 외에도 protein kinase C(PKC)의 활성화를 통해 암의 촉진인자로 작용하는 phorbol myristate acetate(PMA)도 염증유도 물질로 사용되며, 이러한 유도물질에 따라 염증성 인자들의 발현에 차이가 생기기도 한다. 예를 들어 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 는 LPS에 의해 유도되지만 PMA는 IL-6와 IL-1 $\beta$ 의 발현을 유도하지 못하였다(15). 이는 LPS가 세포막의 Toll-like receptor 4 (TLR4)에 결합하여 PKC를 포함한 다양한 신호전달경로를 활성화시키기 때문으로 사료된다. 본 연구에서는 LPS로 염증반응을 유도한 Raw264.7 세포에서 piceatannol의 항염증 기전을 조사하였다.

먼저 MTT assay를 통해 Raw264.7 세포에 독성을 나타내지 않는 piceatannol의 농도를 선정하고자 하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 piceatannol은 10  $\mu\text{mol/L}$ 의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. Matsuda 등(4)의 연구에 따르면 piceatannol은 peritoneal macrophages에서 100  $\mu\text{mol/L}$ 의 높은 농도에서도 세포독성을 나타내지 않고 NO의 생성을 억제하였다. 반면 Raw264.7 세포를 사용한 실험에서는 세포독성에 대한 IC<sub>50</sub>가 19  $\mu\text{mol/L}$ 였다고 보고되었다(10). 따라서 이후의 실험에서는 세포독성을 나타내지 않은 농도인 10  $\mu\text{mol/L}$  이내로 piceatannol을 처리하였다.

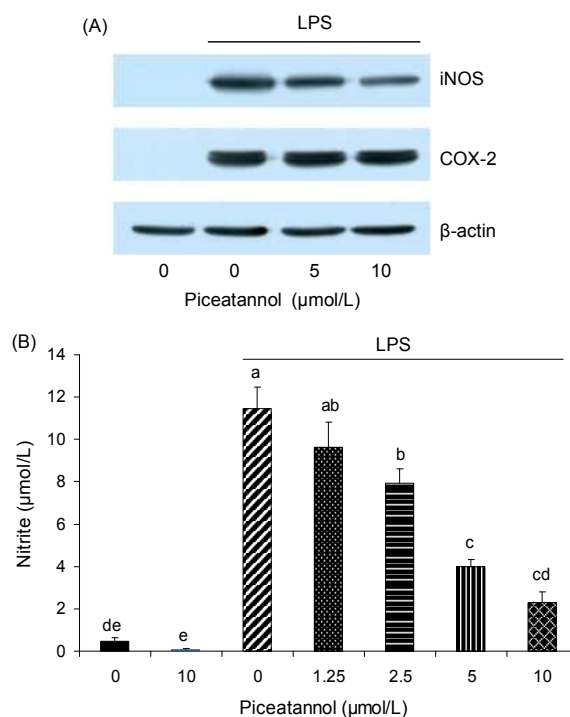
염증반응에서 중요한 역할을 하는 염증 매개체인 NO와 prostaglandin(PG)<sub>E2</sub>는 각각 NOS와 COX에 의해 생성된다. NOS에는 3가지 isoform(neuronal NOS, inducible NOS, endothelial NOS)이 존재하며, 이들 중 iNOS가 염증 반응에서 중요한 역할을 차지한다(16). 또한 COX는 2가지 isoform(COX-1, COX-2)이 존재하며, 대부분의 조직에서 발현되어 PGs의 항상성에 관여하는 COX-1과 달리 COX-2의 발현은 성장인자, 사이토카인 등의 자극에 의해 유도된다(17). Piceatannol이 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Western blot를 수행하였다. iNOS와 COX-2의 발현은 LPS 처리에 의해 유도되었으며, piceatannol은 iNOS



**Fig. 2.** Effects of piceatannol on viable Raw264.7 cell number. Raw264.7 cells were plated in 24-well plates at 50,000 cells/well. After serum deprivation, cells were treated with various concentrations (0~10  $\mu\text{mol/L}$ ) of piceatannol in the presence of LPS for 24 hr. Cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean $\pm$ SEM (n=4).

의 발현을 억제하였지만 COX-2의 발현에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 3A). LPS와 piceatannol을 첨가한 배양액으로 세포를 배양하여 수집한 24시간 conditioned medium으로 세포가 분비한 NO의 양을 정량한 결과, piceatannol은 LPS에 의해 증가된 NO의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 3B). 이 결과를 통해 piceatannol은 iNOS의 발현 억제를 통해 NO의 생성을 억제함을 알 수 있다. Peritoneal macrophages와 BV2 microglia를 이용한 실험에서 piceatannol은 iNOS의 발현을 억제하여 NO의 생성을 억제함이 보고되었다(4,18). 반면 Raw264.7 세포를 이용한 실험에서 piceatannol은 iNOS의 발현에는 영향을 미치지 않고 NO의 생성을 억제하였다(10). 이러한 결과의 차이는 실험방법(본 연구에서는 24시간 동안 처리함)의 차이인 것으로 여겨진다.

Piceatannol이 염증관련 신호전달에 미치는 영향  
iNOS gene promoter에는 NF- $\kappa$ B, activator protein-1(AP-1), CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP)과 같



**Fig. 3.** Piceatannol decreases LPS-induced NO production via the inhibition of iNOS expression in Raw264.7 cells. (A) Raw264.7 cells were plated in 100 mm dishes at  $1.5 \times 10^5$  cells/dish. After serum deprivation, cells were treated with various concentrations (0~10  $\mu\text{mol/L}$ ) of piceatannol in the absence or presence of LPS. Cells were lysed, and the lysates were subjected to Western blotting with their relevant antibodies. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of three independent experiments, are shown. (B) Raw264.7 cells were plated in 24-well plates at 50,000 cells/well. After serum deprivation, cells were treated with various concentrations (0~10  $\mu\text{mol/L}$ ) of piceatannol in the absence or presence of LPS. 24 hr conditioned media were collected and the NO concentrations were measured using the Griess reagent system. Each bar represents the mean $\pm$ SEM (n=4). Means without the same letter differ,  $p < 0.05$ .

은 전사인자들의 결합을 위한 homologous consensus sequence들이 포함되어 있다(19,20). Piceatannol은 Raw264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 C/EBP $\delta$ 의 발현을 감소시킴이 보고(10)되었으나 NF- $\kappa$ B와 AP-1 신호전달계에 미치는 영향에 대해서는 명확하게 보고되지 않았다. I $\kappa$ B는 NF- $\kappa$ B subunit(p65, p50)과 결합하여 세포질에 묶어두는 역할을 한다. NF- $\kappa$ B 신호전달경로가 활성화되면 I $\kappa$ B의 인산화가 유도되어 I $\kappa$ B의 분해가 이루어지고, 결과적으로 NF- $\kappa$ B subunit들은 I $\kappa$ B로부터 자유롭게 되어 핵으로 이동하여 전사인자로 작용하게 된다(21). Raw264.7 세포를 18시간 동안 piceatannol로 전처리한 후, LPS를 20분 동안 처리하여 염증 반응을 유도하였다. Western blot 결과, I $\kappa$ B의 단백질 수준은 LPS 처리에 의해 감소하였으며, piceatannol의 처리는 LPS에 의해 유도된 I $\kappa$ B의 분해를 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 4A). 또한 piceatannol의 처리는 LPS에 의해 유도된 p65의 핵으로 이동을 억제하였다(Fig. 4B). Piceatannol에 의한 NF- $\kappa$ B 신호전달의 억제는 다양한 연구를 통해 보고되었다. Piceatannol은 Jurkat과 BV2 microglia와 같은 면역세포 외에도 암세포(MCF-7과 Hela 세포) 및 정상상피세포(MCF-10A)에서 염증유도 물질(LPS, TNF, PMA)에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제(18,22-24)하였으며, 이는 IKK $\beta$ 를 통해 이루어짐이 관찰되었다(24).

또 다른 전사인자로서 AP-1은 c-Jun, c-Fos로 구성되며, 이들은 각각 SAPK/JNK와 extracellular signal-regulated kinase1/2의 영향을 받는다(25). c-Jun의 upstream 단백질로 작용하는 SAPK/JNK의 인산화는 LPS 처리에 의해 증가하였으며, 증가된 SAPK/JNK의 인산화는 piceatannol 처리에 의해 유의적으로 감소하였다(Fig. 4A). 이 결과를 통해 piceatannol은 C/EBP 뿐만 아니라 NF- $\kappa$ B와 AP-1의 신호전달경로의 억제를 통해 iNOS의 발현을 억제함을 알 수 있다.

#### Piceatannol이 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향

대식세포는 NO와 PGE $_2$  외에도 염증성 사이토카인을 분비하여 염증반응에 관여한다. Raw264.7 세포에서 LPS와 piceatannol이 염증성 사이토카인에 미치는 영향을 ELISA kit를 사용하여 조사하였다. Piceatannol의 처리는 LPS에 의해 증가된 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 분비를 유의적으로 감소시켰다(Fig. 5). NF- $\kappa$ B와 AP-1은 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  gene의 transactivation에 필요한 전사인자로서 작용한다(26). 따라서 piceatannol에 의한 NF- $\kappa$ B와 AP-1 신호전달경로의 억제는 iNOS의 발현 감소뿐만 아니라 염증성 사이토카인의 생성을 감소시킴을 알 수 있다.

#### IL-6의 autocrine/paracrine action에 대한 piceatannol의 영향

NF- $\kappa$ B는 LPS 외에도 TNF, IL-1, IL-6, H $_2$ O $_2$  등의 자극에 의해서도 활성화된다(27). 이는 LPS에 의해 증가된 염증성 사이토카인이 autocrine 및 paracrine 방식으로 NF- $\kappa$ B

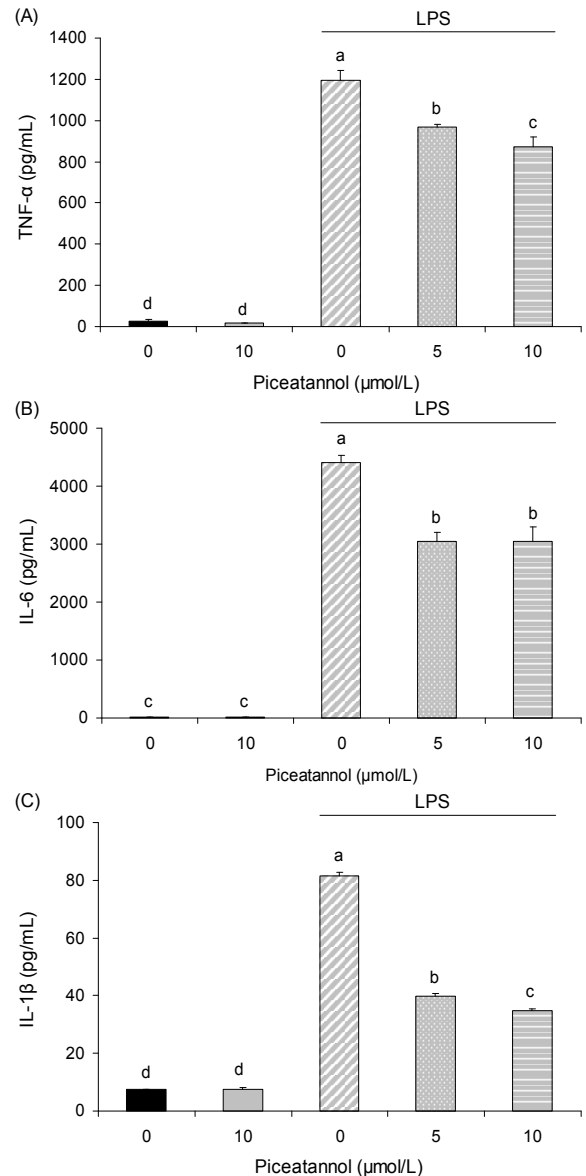
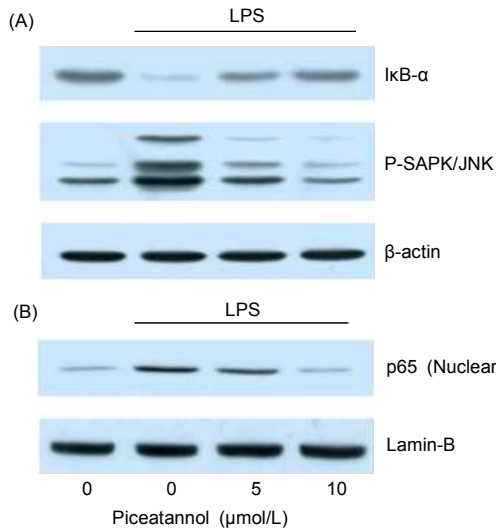


Fig. 4. Piceatannol decreases LPS-induced production of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  in Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with piceatannol and/or LPS as described in Fig. 3. 24 hr-conditioned media were collected, and the amount of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  released within them was measured using the relevant ELISA kits. Each bar represents the mean $\pm$ SEM (n=4). Means without the same letter differ,  $p < 0.05$ .

신호전달 경로를 통해 염증반응에 관여할 수 있음을 보여준다. Piceatannol은 TNF에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제함이 보고되었다(23). 최근 염증반응과 STAT3에 대한 관심이 증가하고 있다. STAT3는 다양한 사이토카인과 성장인자의 신호전달을 매개하는 중요한 molecule로서 작용하며, 이들 신호전달의 활성화로 인하여 각각 Tyr $^{705}$ 와 Ser $^{727}$  잔기의 인산화가 이루어진다. STAT3의 인산화로 인하여 STAT3는 핵으로 이동하여 전사인자로서 작용한다(28). STAT3는 염증과정 중 독성환경으로부터 세포를 보호하고 세포사멸을 막는 역할을 하며, 이는 STAT3의 downstream

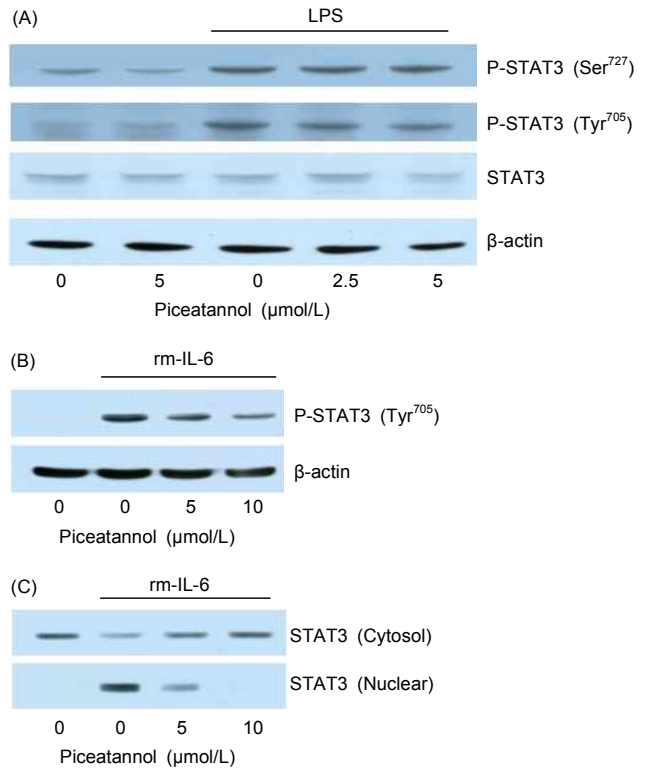


**Fig. 5. Piceatannol inhibits LPS-stimulated NF-κB and AP-1 signaling in Raw264.7 cells.** Raw264.7 cells were plated and serum-deprived. After serum deprivation, cells were incubated for 18 hr in 1% FBS medium containing various concentrations (0~10 μmol/L) of piceatannol. Cells were then treated with LPS for another 15 min. (A) Cells were lysed, and the cell lysates were subjected to Western blotting with their relevant antibodies. (B) Cells were subjected to subcellular fractionation. The resulting nuclear fraction were analysed by Western blotting with their relevant antibodies. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of three independent experiments, are shown.

target gene과 관련이 있다(29).

Raw264.7 세포에서의 LPS의 처리는 STAT3의 Ser<sup>727</sup> 잔기의 인산화를 증가시켰다(Fig. 6A). Mouse mesangial cells에서 IL-1β와 LPS는 STAT3를 활성화시킨다고 보고되었다(30). Piceatannol의 처리는 LPS에 의해 유도된 STAT3의 Tyr<sup>705</sup>와 Ser<sup>727</sup> 잔기의 인산화를 억제하였다(Fig. 6A). LPS의 작용은 수용체인 TLR4를 통해 이루어지는데, 최근 LPS가 TLR4의 adapter protein인 myeloid differentiation primary-response protein 88을 통해 STAT3를 활성화시킨다고 보고되었다(31). 또한 LPS의 처리는 STAT3의 Tyr<sup>705</sup> 잔기의 인산화도 증가시켰으며, 이로써 LPS에 의해 증가된 사이토카인에 의해 STAT3의 Tyr<sup>705</sup> 잔기의 인산화가 이루어졌으리라 예상할 수 있다.

STAT3의 Tyr<sup>705</sup> 잔기의 인산화를 유도하는 대표적인 사이토카인으로 IL-6를 들 수 있다. IL-6가 수용체에 결합하면 Janus family kinase와 SRC tyrosine kinase가 활성화되어 STAT3를 인산화시킨다. Recombinant IL-6의 처리는 p-STAT3(Tyr<sup>705</sup>)를 증가시키고 STAT3의 핵으로의 이동을 증가시켰다. 그리고 piceatannol의 처리는 IL-6에 의해 유도된 STAT3의 Tyr<sup>705</sup> 잔기의 인산화를 억제하고 STAT3의 핵으로의 이동을 억제하였다(Fig. 6B, 6C). Yu 등(32)은 myocytes에서 IL-6에 의해 활성화된 STAT3가 iNOS의 발현을 증가시킴을 보고하였다. Piceatannol은 STAT3 inhibitor(33)로 잘 알려져 있는데, 위 결과는 piceatannol이



**Fig. 6. Piceatannol inhibits STAT3 signaling in Raw264.7 cells.** Raw264.7 cells were plated and serum-deprived. (A) After serum deprivation, cells were treated with various concentrations (0~5 μmol/L) of piceatannol in the absence or presence of LPS for 24 hr. Cells were lysed, and the lysates were subjected to Western blotting with their relevant antibodies. (B, C) Cells were incubated for 1 hr in 1% FBS medium containing various concentrations (0~10 μmol/L) of piceatannol. Cells were then treated with recombinant mouse IL-6 (rm-IL-6) for another 5 min. (B) Cells were lysed, and the lysates were subjected to Western blotting with their relevant antibodies. (C) Cells were subjected to subcellular fractionation. The resulting fraction were analysed by Western blotting with an anti-STAT3 antibody. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of three independent experiments, are shown.

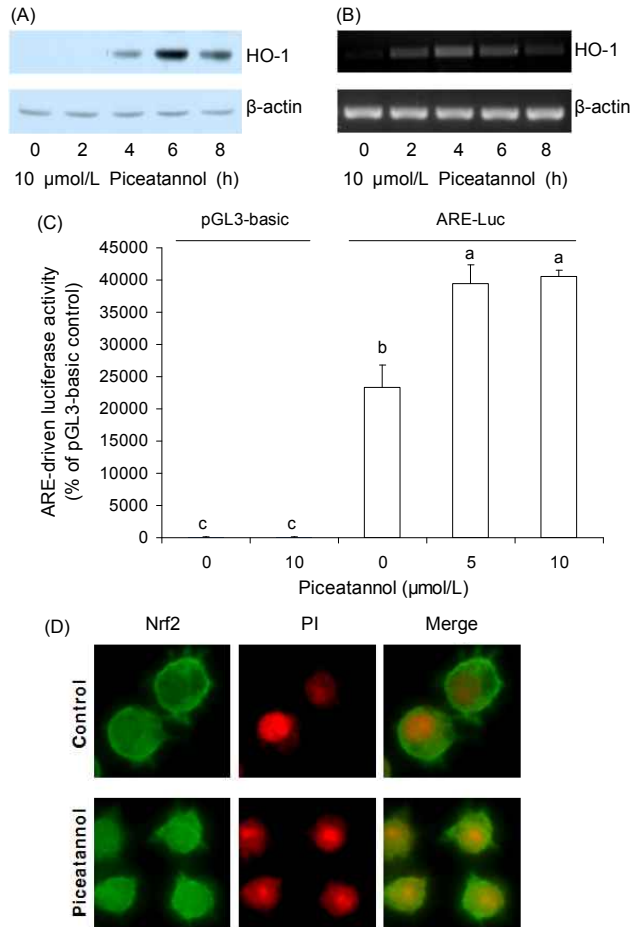
IL-6의 발현을 억제(Fig. 5)함으로써 STAT3 경로를 억제함을 보여준다.

**Piceatannol이 HO-1의 발현이 미치는 영향**

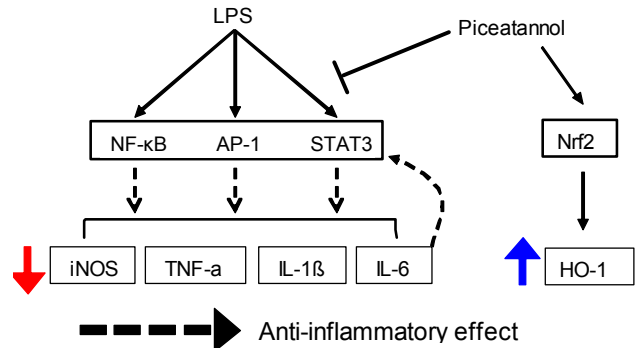
염증반응에서 late-limiting enzyme으로 작용하는 heme oxygenase(HO)는 heme이 carbon monoxide, biliverdin, ferrous ion으로 산화되는 반응을 촉매 하여 세포내의 항상성을 유지하고, 산화적 손상의 감소, 염증반응을 억제, 세포사멸 억제, 세포증식을 조절함으로써 조직을 보호하는 중요한 역할을 한다(34). 3가지 mammalian HO isoform이 존재하며, 이 중 HO-1은 stress-responsive protein으로서 Nrf2에 매개되는 ARE의 transcriptional activation을 통하여 다양한 산화제에 의해 유도된다.

Piceatannol이 HO-1의 발현에 미치는 영향을 Western blot과 RT-PCR을 통하여 조사한 결과, HO-1의 단백질 발현은 piceatannol 처리 4시간부터 증가하기 시작하여 처리

6시간에 최고치에 달하였으며, 이후 다소 감소하였다(Fig. 7A). 그리고 HO-1 transcripts는 단백질 발현보다 앞선 piceatannol 처리 2시간부터 증가하였으며 처리 4시간에 최고치에 달하였다(Fig. 7B). HO-1 transcription activity를 조사하기 위하여 mouse HO-1의 enhancer 2와 minimal pro-



**Fig. 7. Piceatannol increases the expression of HO-1 in Raw264.7 cells.** (A, B) Raw264.7 cells were plated and serum-deprived. After serum deprivation, cells were treated with 10  $\mu$ mol/L piceatannol for indicated times. (A) Cells were lysed, and the lysates were subjected to Western blotting with their relevant antibodies. (B) Total RNA was isolated and RT-PCR was performed. Photographs of chemiluminescent detection of the blots or the ethidium bromide-stained gels, which were representative of three independent experiments, are shown. (C) Cells were co-transfected with ARE reporter gene construct containing the enhancer 2 and minimal promoter region of mouse HO-1 and pCMV- $\beta$ -galactosidase control vector using Nucleofector-II, and the transfected cells were plated in 6-well plates at  $2 \times 10^5$  cells/well. After serum deprivation, cells were treated with various concentrations (0~10  $\mu$ mol/L) of piceatannol for 6 hr. Luciferase and  $\beta$ -galactosidase activities were measured with total cell lysates. Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM (n=4). Means without the same letter differ,  $p < 0.05$ . (D) Cells were plated in 4-well chamber slides and treated with 10  $\mu$ mol/L piceatannol and subjected to immunocytochemistry with Nrf2 antibody. Cell nuclear DNA was stained with PI (red color). Bright yellow coloration of the merged image represents Nrf2 translocated from the cytosol to the nucleus.



**Fig. 8. Proposed schemata of the mechanisms by which piceatannol inhibits LPS-stimulated inflammatory responses.**

moter region을 포함한 ARE reporter plasmid를 사용하여 luciferase assay를 수행하였다. 5  $\mu$ mol/L piceatannol의 처리에서부터 ARE-driven luciferase의 transcriptional activity가 증가하였다(Fig. 7C). 또한 immunocytochemistry 결과, piceatannol은 Nrf2의 핵내 축적을 증가시켰다(Fig. 7D). HO-1과 carbon monoxide는 iNOS의 발현과 NO의 생성을 억제한다고 보고되었다(35,36). 또한 HO-1은 IL-10의 항염증효과를 매개한다고 보고되었다(37). 따라서 이 결과를 통해 piceatannol은 Nrf2-ARE를 통해 HO-1의 발현을 증가시킴으로 항염증 효과를 나타낼을 보여준다.

대표적인 stilbene으로서 화학적 암 예방 물질로 주목받는 resveratrol은 항암활성 외에도 항염증 효과가 있다고 보고되었다(38). Resveratrol은 piceatannol과 마찬가지로 NF- $\kappa$ B를 억제하고 iNOS와 COX-2의 발현을 감소시킴이 관찰되었다(39). 반면 resveratrol과 trans-stilbene은 HO-1의 발현을 유도하지 못하였다고 보고되었다(40). 이는 resveratrol과 piceatannol의 구조적인 차이(Fig. 1)에 의한 것으로 생각되며, 특히 OH기의 위치가 HO-1의 발현에 중요하게 작용하는 것으로 여겨진다.

본 연구에서 piceatannol은 HO-1의 발현을 증가시켰으며, 이는 iNOS와 염증성 사이토카인의 발현 억제와 함께 piceatannol의 항염증 활성의 주요 요인으로 사료된다(Fig. 8).

## 요약

본 연구에서는 염증반응을 조절하는 다양한 신호전달체계를 중심으로 분자생물학적 방법을 통해 piceatannol의 항염증 기전을 규명하였다. LPS로 염증반응을 유도한 Raw 264.7 대식세포에서 piceatannol은 iNOS의 발현 억제를 통해 NO의 생성을 감소시키고 염증성 사이토카인(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ )의 생성을 감소시켰다. 염증반응을 조절하는 신호전달체계 중 piceatannol은 LPS에 의해 유도된 I $\kappa$ B의 분해와 p65의 핵으로의 이동을 억제하고, LPS에 의해 유도된 SAPK/JNK의 인산화를 억제하였다. 또한 piceatannol은 LPS와 IL-6(LPS에 의해 증가됨)에 의한 STAT3의 활성화

를 억제하였다. 뿐만 아니라 piceatannol은 Nrf2의 핵 내 축적을 야기하고 ARE의 transcriptional activity를 증가시켜 HO-1의 발현을 증가시켰다. 본 연구의 결과, piceatannol은 NF- $\kappa$ B와 AP-1, STAT3 신호전달의 억제를 통해, 그리고 HO-1의 발현 증가를 통해 항염증 효과를 나타내었다(Fig. 8).

## 감사의 글

본 연구논문은 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 중견연구지원사업(2012-0004903)과 선도연구센터육성사업(2012-0000642), 그리고 지식경제부 지역혁신센터사업(한림대 식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문헌

- Medzhitov R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428-435.
- Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, Carter C, Yu BP, Leeuwenburgh C. 2009. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 8: 18-30.
- Rimando AM, Kalt W, Magee JB, Dewey J, Ballington JR. 2004. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. *J Agric Food Chem* 52: 4713-4719.
- Matsuda H, Kageura T, Morikawa T, Toguchida I, Harima S, Yoshikawa M. 2000. Effects of stilbene constituents from rhubarb on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Bioorg Med Chem Lett* 10: 323-327.
- Vo NT, Madlener S, Bago-Horvath Z, Herbacek I, Stark N, Gridling M, Probst P, Giessrigl B, Bauer S, Vonach C, Saiko P, Grusch M, Szekeres T, Fritzer-Szekeres M, Jäger W, Krupitza G, Soleiman A. 2010. Pro- and anticarcinogenic mechanisms of piceatannol are activated dose dependently in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 31: 2074-2081.
- Ko HS, Lee HJ, Kim SH, Lee EO. 2012. Piceatannol suppresses breast cancer cell invasion through the inhibition of MMP-9: involvement of PI3K/AKT and NF- $\kappa$ B pathways. *J Agric Food Chem* 60: 4083-4089.
- Lee YM, Lim DY, Cho HJ, Seon MR, Kim JK, Lee BY, Park JH. 2009. Piceatannol, a natural stilbene from grapes, induces G1 cell cycle arrest in androgen-insensitive DU145 human prostate cancer cells via the inhibition of CDK activity. *Cancer Lett* 285: 166-173.
- Kim EJ, Park H, Park SY, Jun JG, Park JH. 2009. The grape component piceatannol induces apoptosis in DU145 human prostate cancer cells via the activation of extrinsic and intrinsic pathways. *J Med Food* 12: 943-951.
- Kwon GT, Jung JI, Song HR, Woo EY, Jun JG, Kim JK, Her S, Park JH. 2012. Piceatannol inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased interleukin-6 signaling. *J Nutr Biochem* 23: 228-238.
- Djoko B, Chiou RY, Shee JJ, Liu YW. 2007. Characterization of immunological activities of Peanut stilbenoids, arachidin-1, piceatannol, and resveratrol on lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 55: 2376-2383.
- Kim YH, Kwon HS, Kim DH, Cho HJ, Lee HS, Jun JG, Park JH, Kim JK. 2008. Piceatannol, a stilbene present in grapes, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int Immunopharmacol* 8: 1695-1702.
- Hu CM, Liu YH, Cheah KP, Li JS, Lam CS, Yu WY, Choy CS. 2009. Heme oxygenase-1 mediates the inhibitory actions of brazilin in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Ethnopharmacol* 121: 79-85.
- Cho HJ, Kim WK, Kim EJ, Jung KC, Park S, Lee HS, Tyner AL, Park JH. 2003. Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G996-1005.
- So HS, Kim HJ, Lee JH, Lee JH, Park SY, Park C, Kim YH, Kim JK, Lee KM, Kim KS, Chung SY, Jang WC, Moon SK, Chung HT, Park RK. 2006. Flunarizine induces Nrf2-mediated transcriptional activation of heme oxygenase-1 in protection of auditory cells from cisplatin. *Cell Death Differ* 13: 1763-1775.
- Schoeniger A, Adolph S, Fuhrmann H, Schumann J. 2011. The impact of membrane lipid composition on macrophage activation in the immune defense against *Rhodococcus equi* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* 12: 7510-7528.
- Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
- Crofford LJ. 1997. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl* 49: 15-19.
- Jin CY, Moon DO, Lee KJ, Kim MO, Lee JD, Choi YH, Park YM, Kim GY. 2006. Piceatannol attenuates lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B activation and NF- $\kappa$ B-related proinflammatory mediators in BV2 microglia. *Pharmacol Res* 54: 461-467.
- Eberhardt W, Plüss C, Hummel R, Pfeilschifter J. 1998. Molecular mechanisms of inducible nitric oxide synthase gene expression by IL-1 $\beta$  and cAMP in rat mesangial cells. *J Immunol* 160: 4961-4969.
- Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. 2003. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- $\alpha$  and COX-2 expression by sauchinone effects on I- $\kappa$ B phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br J Pharmacol* 139: 11-20.
- Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. 2000. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor  $\kappa$ B. *Free Radic Biol Med* 28: 1317-1327.
- Liu D, Kim DH, Park JM, Na HK, Surh YJ. 2009. Piceatannol inhibits phorbol ester-induced NF- $\kappa$ B activation and COX-2 expression in cultured human mammary epithelial cells. *Nutr Cancer* 61: 855-863.
- Ashikawa K, Majumdar S, Banerjee S, Bharti AC, Shishodia S, Aggarwal BB. 2002. Piceatannol inhibits TNF-induced NF- $\kappa$ B activation and NF- $\kappa$ B-mediated gene expression through suppression of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase and p65 phosphorylation. *J Immunol* 169: 6490-6497.
- Son PS, Park SA, Na HK, Jue DM, Kim S, Surh YJ. 2010. Piceatannol, a catechol-type polyphenol, inhibits phorbol ester-induced NF- $\kappa$ B activation and cyclooxygenase-2 expression in human breast epithelial cells: cysteine 179 of IKK $\beta$  as a potential target. *Carcinogenesis* 31: 1442-1449.
- Abe J, Kusuhara M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD. 1996. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* 271: 16586-16590.
- Baud V, Karin M. 2009. Is NF- $\kappa$ B a good target for cancer



- therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* 8: 33-40.
27. Wang L, Walia B, Evans J, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV. 2003. IL-6 induces NF- $\kappa$ B activation in the intestinal epithelia. *J Immunol* 171: 3194-3201.
  28. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415-1421.
  29. Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. 2005. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* 41: 2502-2512.
  30. Yu Z, Zhang W, Kone BC. 2002. Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) inhibits transcription of the inducible nitric oxide synthase gene by interacting with nuclear factor kappaB. *Biochem J* 367: 97-105.
  31. Yamawaki Y, Kimura H, Hosoi T, Ozawa K. 2010. MyD88 plays a key role in LPS-induced Stat3 activation in the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R403-R410.
  32. Yu XW, Kennedy RH, Liu SJ. 2003. JAK2/STAT3, not ERK1/2, mediates interleukin-6-induced activation of inducible nitric-oxide synthase and decrease in contractility of adult ventricular myocytes. *J Biol Chem* 278: 16304-16309.
  33. Su L, David M. 2000. Distinct mechanisms of STAT phosphorylation via the interferon- $\alpha/\beta$  receptor. Selective inhibition of STAT3 and STAT5 by piceatannol. *J Biol Chem* 275: 12661-12666.
  34. Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, Immenschuh S. 2010. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol* 80: 1895-1903.
  35. Lin HY, Juan SH, Shen SC, Hsu FL, Chen YC. 2003. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. *Biochem Pharmacol* 66: 1821-1832.
  36. Srisook K, Han SS, Choi HS, Li MH, Ueda H, Kim C, Cha YN. 2006. CO from enhanced HO activity or from CORM-2 inhibits both O<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO production and downregulates HO-1 expression in LPS-stimulated macrophages. *Biochem Pharmacol* 71: 307-318.
  37. Lee TS, Chau LY. 2002. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 8: 240-246.
  38. Udenigwe CC, Ramprasath VR, Aluko RE, Jones PJ. 2008. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutr Rev* 66: 445-454.
  39. Youn HS, Lee JY, Fitzgerald KA, Young HA, Akira S, Hwang DH. 2005. Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J Immunol* 175: 3339-3346.
  40. Wung BS, Hsu MC, Wu CC, Hsieh CW. 2006. Piceatannol upregulates endothelial heme oxygenase-1 expression via novel protein kinase C and tyrosine kinase pathways. *Pharmacol Res* 53: 113-122.

(2012년 5월 9일 접수; 2012년 6월 20일 채택)