

## Parthenolide Inhibits Ovalbumin-Induced cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression

Hyung-Sun Youn<sup>†</sup>

Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Sciences, Soonchunhyang University,  
Asan-Si, Chungnam 336-745, Korea

In recent years, egg allergy has been raised as the most prevalent food hypersensitivity in the pediatric population. One of the major egg allergens is ovalbumin (OVA) which is the major protein in egg white, comprising 54% of its total protein content. Parthenolide isolated from *Tanacetum parthenium* has been used to treat many chronic diseases for many years. In the present report, we present biochemical evidence that parthenolide inhibits the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation induced by OVA. Parthenolide also inhibits OVA-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression. These data suggest new approaches for the efficient alleviation of the allergic symptoms.

**Key Words:** Cyclooxygenase-2; Egg allergy; NF- $\kappa$ B; Inducible nitric oxide synthase; Ovalbumin

식물이나 약초 중에는 항염증·항알러지 효과를 가지고 있는 여러 기능성 물질들이 포함되어 있다. 이러한 기능성 물질들은 박테리아나 바이러스 병원균과 같은 여러 염증자극에 의해서 유도된 전사인자 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)의 활성화를 억제시키는 것으로 알려져 있다 (Siriwatanametanon et al., 2010; Surh, 2003; Youn et al., 2005; Zhao et al., 2011; Zingarelli et al., 2003). 기능성 물질들 중에서 멕시코와 인도의 약용 식물인 *Tanacetum parthenium*로부터 분리 추출된 parthenolide (Fig. 1A)가 있는데, 이 물질은 생물학적 활성을 가지는 중요한 sesquiterpene lactone으로 알려져 있다 (Bork et al., 1997). 특히, 열을 내리는 효과가 있다는 뜻을 가진 이 식물은 수년 전부터 류마티스 관절염, 발열, 편두통, 천식, 알러지와 같은 다양한 염증 질병들에 대처하기 위한 민간요법으로 사용되었다 (Heinrich et al., 1998; Murphy et al., 1988; Schinella et al., 1998). 많은 연구에 의해서 parthenolide는 산화적

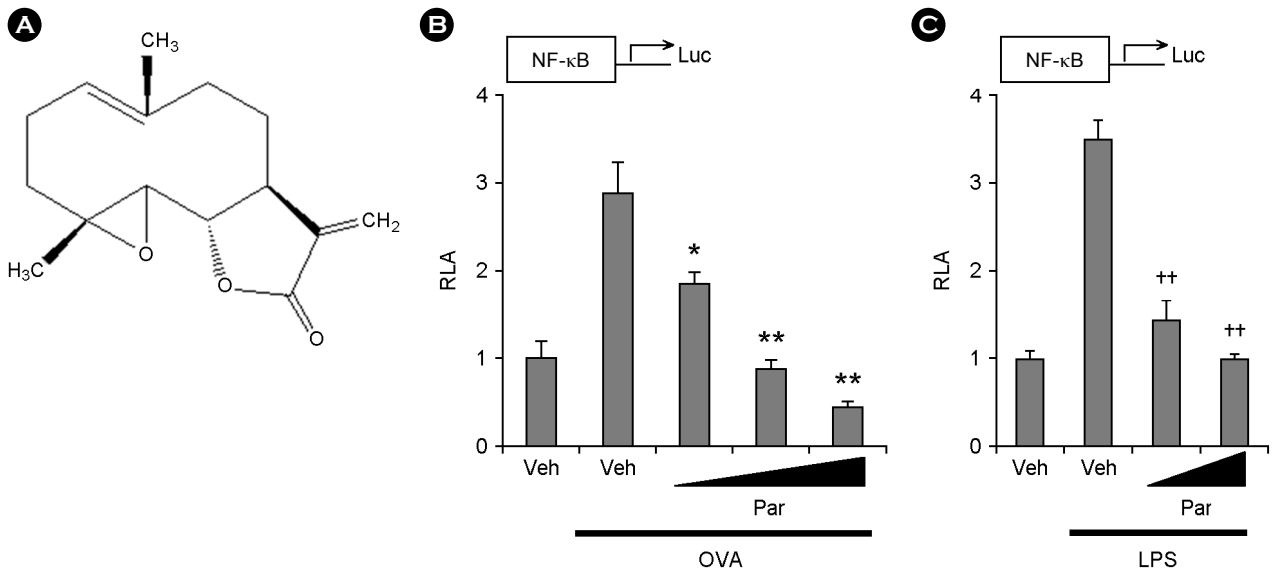
인산화 반응 (oxidative phosphorylation), 혈소판응집 반응 (platelet aggregation), 히스타민 (histamine)과 세로토닌 (serotonin) 분비의 억제에 효과가 있다고 보고되었다 (Groenewegen and Heptinstall, 1990; Sheehan et al., 2002). Parthenolide는 또한 IKK kinase를 타겟으로 하여 ultra violet (UV), lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등 여러 자극제 (agonists)에 의해서 유도된 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 활성화와 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Hegner et al., 1998; Lee et al., 2010; Oka et al., 2007).

계란 흰자 단백질인 ovalbumin (OVA)는 주요한 계란 알러젠으로, 계란 흰자 단백질 중 약 54%로 가장 많은 비율을 차지하고 있는 인당단백질 (phosphoglycoprotein)이다 (Mine and Yang, 2008). 현재까지 알려진 가장 효과적인 계란 알러지 치료방법은 계란을 먹지 않고 피하는 것이지만, 음식문화의 발달로 많은 음식이 계란을 이용하면서 계란을 피하는 것은 더욱 어려워지게 되었다. 특히 계란을 이용해서 MMR (measles, mumps, rubella) 백신을 포함한 여러 바이러스 백신들을 제조하고 있기 때문에, 백신접종이 점점 늘어나고 있는 현대사회에서는 계란 알러진이 중요한 이슈로 떠오르고 있다 (Mine and Yang, 2008).

\*Received: July 8, 2012 / Revised: August 9, 2012  
Accepted: August 16, 2012

<sup>†</sup>Corresponding author: Hyung-Sun Youn. Department of Biomedical Laboratory Science College of Medical Sciences Soonchunhyang University 646 Eupnae-Ri, Shinchang-Myun, Asan-Si, Chungnam 336-745, Korea.  
Tel: +82-41-530-3086, Fax: +82-41-530-3085  
e-mail: hyoun@sch.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.



**Fig. 1. Parthenolide inhibits NF- $\kappa$ B activation induced by ovalbumin.** (A) The structure of parthenolide. (B, C) RAW 264.7 cells were transfected with NF- $\kappa$ B luciferase reporter plasmid and pre-treated with parthenolide [10, 15, 30  $\mu$ M (B) or 10, 15  $\mu$ M (C)] and for 1 h and then treated with OVA (100  $\mu$ g/ml) (B) or LPS (10 ng/ml) (C) for an additional 8 h. Cell lysates were prepared and luciferase and  $\beta$ -galactosidase enzyme activities were measured. Relative luciferase activity (RLA) was normalized with  $\beta$ -galactosidase activity. Values are mean  $\pm$  SEM (n=3). Significantly different from OVA alone (B), \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ . Significantly different from LPS alone (C), \*\*,  $P < 0.01$ . Veh, vehicle; OVA, ovalbumin; Par, parthenolide.

염증은 여러 질병과 관련이 있는 병태생리학 (pathophysiology) 현상으로, 여러 분자학적인 기전에 의해서 유도되는데, 그 중에서도 두 가지 중요한 반응에 의해서 일어난다. 하나는 COX-2에 의한 prostaglandins (PGs)의 생성이고, 다른 하나는 iNOS에 의한 nitric oxide의 생산이다 (Moncada, 1999; Turini and DuBois, 2002). 우리는 선형연구에서 OVA가 NF- $\kappa$ B를 활성화 시키며, 활성화된 NF- $\kappa$ B에 의해서 유도되는 단백질인 COX-2와 iNOS의 발현을 유도하는 것을 알아내었다 (Lee et al., 2011). 그래서 우리는 이번 연구를 통해서 parthenolide가 OVA에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화와 활성화된 NF- $\kappa$ B에 의해서 유도되는 유전자인 COX-2와 iNOS의 발현을 어떻게 조절하는지 알아보려고 한다. 이러한 연구는 앞으로 계란 알러젠에 의한 알러지 예방 및 치료제 개발에 초석이 될 것으로 기대한다.

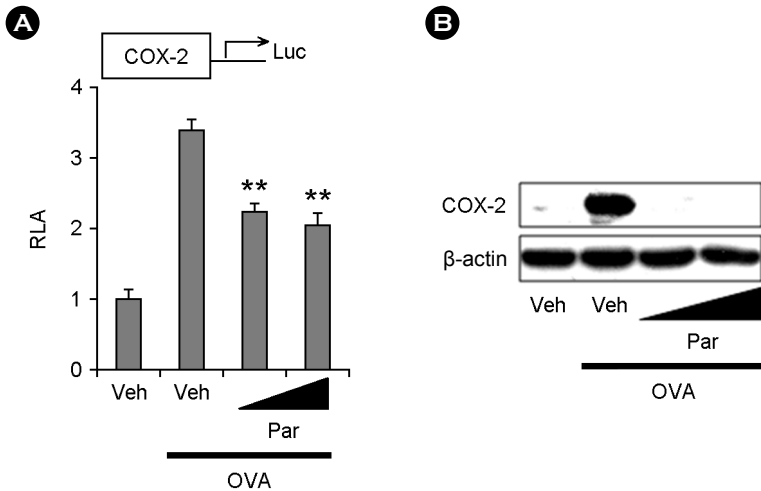
먼저 우리는 parthenolide가 계란 알러젠인 OVA에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화에 어떤 영향을 미치는지 발광효소 유전자 분석법 (luciferase assay)에 의해서 알아보았다 (Park et al., 2011). Parthenolide는 OVA에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B 활성을 억제하였다 (Fig. 1B). 이 실험에서는 양성 반응 대조군으로 Toll-like receptor 4 (TLR4) agonist인 LPS가 사용되었으며, parthenolide는 또한 LPS에 의해서 유도

된 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제하였다 (Fig. 1C).

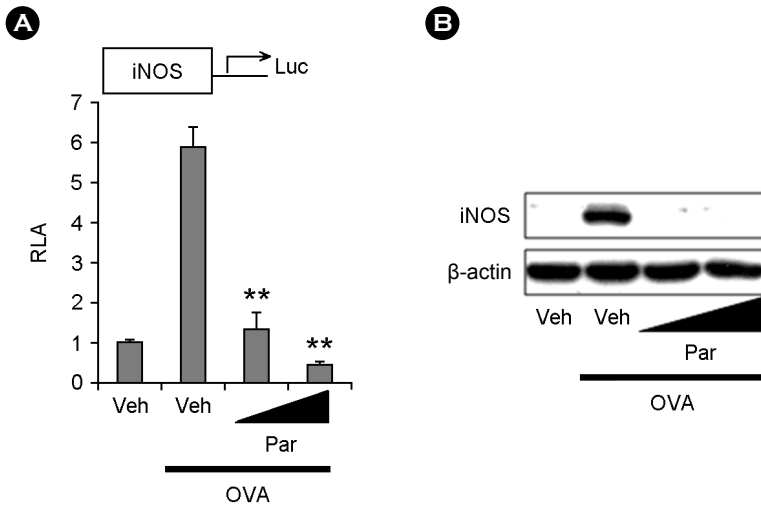
다음 실험으로 OVA이 NF- $\kappa$ B 활성화에 의해서 유도되는 유전자인 COX-2의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 이 실험을 위해서 COX-2 발광효소 유전자 분석법과 Western blotting 방법이 사용되었다 (Yang and Chang, 2012). Parthenolide는 OVA에 의해서 유도된 COX-2의 발현을 억제시켰다 (Figs. 2A and B).

다음 실험으로 parthenolide가 NF- $\kappa$ B 활성화에 의해서 유도되는 또 다른 유전자인 iNOS의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 먼저 iNOS 발광효소 유전자 분석법에 의하면 parthenolide는 OVA에 의해서 유도된 iNOS의 발현을 억제시켰다 (Fig. 3A). 또한 parthenolide는 OVA에 의해서 유도된 iNOS 단백질 발현을 억제시키는 것을 Western blotting 방법을 통하여 확인하였다 (Fig. 3B). 이러한 모든 결과들은 parthenolide가 OVA에 의해서 유도된 알러지 반응을 조절할 수 있다는 것을 보여주는 결과라 할 수 있겠다.

1971년 Vane이 aspirin과 그것에 연관된 Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAID)들이 PG 합성을 억제하여 항염증 효과를 가지고 있다는 것을 발견한 이후로, 많은 연구자들은 PG 합성을 위한 억제제들이 또한 항염증 성질을 가지고 있는지 연구를 하였다. COX-2 억제제



**Fig. 2. Parthenolide inhibits COX-2 expression induced by ovalbumin.** (A) RAW 264.7 cells were transfected with COX-2 luciferase reporter plasmid and pretreated with 10 or 15 μM parthenolide for 1 h and then treated with OVA (100 μg/ml) for an additional 8 h. Cell lysates were prepared and luciferase enzyme activities were determined. Values represent the mean ± SEM (n=3). Significantly different from OVA alone, \*\*,  $P < 0.01$ . (B) RAW 264.7 cells were pretreated with 10 or 15 μM parthenolide for 1 h and then further stimulated with OVA (100 μg/ml) for 8 h. Cell lysates were analyzed for COX-2 and β-actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; OVA, ovalbumin; Par, parthenolide.



**Fig. 3. Parthenolide inhibits iNOS expression induced by ovalbumin.** (A) RAW 264.7 cells were transfected with iNOS luciferase reporter plasmid and pretreated with 10 or 15 μM parthenolide for 1 h and then treated with OVA (100 μg/ml) for an additional 8 h. Cell lysates were prepared and luciferase enzyme activities were determined. Values represent the mean ± SEM (n=3). Significantly different from OVA alone, \*\*,  $P < 0.01$ . (B) RAW 264.7 cells were pretreated with 10 or 15 μM parthenolide for 1 h and then further stimulated with OVA (100 μg/ml) for 8 h. Cell lysates were analyzed for iNOS and β-actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; OVA, ovalbumin; Par, parthenolide.

는 잠재적으로 부작용이 있음에도 불구하고 항염증제로서 광범위하게 사용되고 있지만, iNOS 억제제는 치료목적으로 현재 널리 사용되지는 않고 있다 (Flower, 2003; Moncada, 1999; Turini and DuBois, 2002). COX는 적어도 두 개의 isoforms인 COX-1과 COX-2로 존재한다. COX-1은 거의 모든 세포나 조직에서 항상 발현되지만, COX-2는 염증을 유발하는 요소에 의해서 커다랗게 증가되는 것으로 알려져 있다 (Vane et al., 1998). NSAID에 의한 독성효과 중에서 많은 것은 COX-1의 억제에 기인한다고 알려져 있지만, 치료효과는 COX-2의 억제에 기인한다고 알려져 있다 (Grzanna et al., 2005). 이러한 사실에 의해, 현재까지 많은 COX-2 억제제가 개발되었으며, 특히 많은 phytochemicals이 여러 agonists에 의해서 유도된 COX-2 발현을 억제하는 것이 밝혀졌다 (Khanna et al., 2007; Surh,

2003; Surh et al., 2001).

Nitric oxide (NO)는 대기 중의 가장 풍부한 질소와 산소 두 기체의 1:1 조합물로 1987년까지 NO는 전기화학반응의 오염물질이나 부산물로 여겨져 왔다. 하지만 오늘날에는 포유동물 세포가 아미노산 L-arginine으로부터 NO를 만들고, 이 NO는 세포에서 다른 세포 사이의 신호 전달을 위해 사용된다 (Hanafy et al., 2001). NO의 생성은 3개의 NOSs isoforms인 endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS)에 의해서 유도된다 (Vallance, 2003). eNOS, nNOS는 항상 발현되어 있는 효소이지만, iNOS는 감염이나 염증성 인자에 의해서 유도되는 효소이다 (Vallance, 2003). iNOS는 최초로 쥐 대식세포 (murine macrophages) 안에서 발견되었으며, LPS 또는 다양한 pro-inflammatory cytokines (interleukin-1, interferon-γ,

TNF- $\alpha$ 의 자극에 의해서 발현된다 (Green et al., 1990; Palmer et al., 1993). 특히, 사람에서 iNOS의 발현은 말라리아나 비뇨생식기 같은 특정한 장기의 감염에 대한 방어 체계로서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Kun et al., 2001).

우리는 이번 실험에서 parthenolide가 계란 알리젠 중의 하나인 OVA에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화 및 COX-2, iNOS 발현에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. Parthenolide는 OVA에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화와 COX-2, iNOS 발현을 억제시켰다. 이러한 결과는 parthenolide가 계란 알리젠인 OVA에 의해서 유도된 염증 반응이나 알러지와 같은 만성적인 질병들을 조절할 수 있다는 것을 보여주는 중요한 결과라 할 수 있겠다. 이러한 연구는 앞으로 알러지 작용기전 규명 및 알러지 예방 및 치료제 개발에 중요한 역할을 할 것으로 기대한다.

#### 감사의 글

본 연구는 순천향대학교 학술연구비의 일부 지원으로 수행하였으므로 이에 감사를 드립니다.

#### REFERENCES

- Bork PM, Schmitz ML, Kuhnt M, Escher C, Heinrich M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kappaB. *FEBS Lett.* 1997. 402: 85-90.
- Flower RJ. The development of COX2 inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2003. 2: 179-191.
- Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB Jr., Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular Leishmania major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol.* 1990. 144: 278-283.
- Greenewegen WA, Heptinstall S. A comparison of the effects of an extract of feverfew and parthenolide, a component of feverfew, on human platelet activity *in-vitro*. *J Pharm Pharmacol.* 1990. 42: 553-557.
- Grzanna R, Lindmark L, Frondoza CG. Ginger—an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. *J Med Food.* 2005. 8: 125-132.
- Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit.* 2001. 7: 801-819.
- Hehner SP, Heinrich M, Bork PM, Vogt M, Ratter F, Lehmann V, Schulze-Osthoff K, Droge W, Schmitz ML. Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta. *J Biol Chem.* 1998. 273: 1288-1297.
- Heinrich M, Robles M, West JE, Ortiz de Montellano BR, Rodriguez E. Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (Compositae). *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998. 38: 539-565.
- Khanna D, Sethi G, Ahn KS, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Aggarwal A, Aggarwal BB. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Curr Opin Pharmacol.* 2007. 7: 344-351.
- Kun JF, Mordmuller B, Perkins DJ, May J, Mercereau-Puijalon O, Alpers M, Weinberg JB, Kremsner PG. Nitric oxide synthase 2 (Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. *J Infect Dis.* 2001. 184: 330-336.
- Lee AN, Park SJ, Jeong AR, Lee JR, Park HJ, Kim SJ, Min IS, Youn HS. Ovalbumin induces cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression. *Korean J Food Sci Technol.* 2011. 43: 110-113.
- Lee AN, Park SJ, Yun SM, Lee MY, Son BS, Youn HS. Parthenolide Suppresses the Expression of Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase Induced by Toll-Like Receptor 2 and 4 Agonists. *J. Exp. Biomed Sci.* 2010. 16: 39-45.
- Mine Y, Yang M. Recent advances in the understanding of egg allergens: basic, industrial, and clinical perspectives. *J Agric Food Chem.* 2008. 56: 4874-4900.
- Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med.* 1999. 92: 164-169.
- Murphy JJ, Heptinstall S, Mitchell JR. Randomised double-blind placebo-controlled trial of feverfew in migraine prevention. *Lancet.* 1988. 2: 189-192.
- Oka D, Nishimura K, Shiba M, Nakai Y, Arai Y, Nakayama M, Takayama H, Inoue H, Okuyama A, Nonomura N. Sesquiterpene lactone parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of renal cell carcinoma by inhibiting the activation of NF-kappaB. *Int J Cancer.* 2007. 120: 2576-2581.
- Palmer RM, Hickery MS, Charles IG, Moncada S, Bayliss MT. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993. 193: 398-405.
- Park SJ, Shin HJ, Youn HS. Parthenolide inhibits TRIF-dependent signaling pathway of Toll-like receptors in RAW264.7

- macrophages. *Mol Cells*. 2011. 31: 261-265.
- Schinella GR, Giner RM, Recio MC, Mordujovich de Buschiazzo P, Rios JL, Manez S. Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*. *J Pharm Pharmacol*. 1998. 50: 1069-1074.
- Sheehan M, Wong HR, Hake PW, Malhotra V, O'Connor M, Zingarelli B. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-kappaB pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. *Mol Pharmacol*. 2002. 61: 953-963.
- Siriwatanametanon N, Fiebich BL, Efferth T, Prieto JM, Heinrich M. Traditionally used Thai medicinal plants: *in vitro* anti-inflammatory, anticancer and antioxidant activities. *J Ethnopharmacol*. 2010. 130: 196-207.
- Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*. 2003. 3: 768-780.
- Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res*. 2001. 480: 243-268.
- Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med*. 2002. 53: 35-57.
- Vallance P. Nitric oxide: therapeutic opportunities. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003. 17: 1-10.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998. 38: 97-120.
- Yang EJ, Chang JH. The extract of *Pseudomonas aeruginosa* induces the apoptosis of the human colorectal cancer cell line, HCT 116 cells, via mitochondrial pathway. *J Exp Biomed Sci*. 2012. 18: 16-21.
- Youn HS, Lee JY, Fitzgerald KA, Young HA, Akira S, Hwang DH. Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J Immunol*. 2005. 175: 3339-3346.
- Zhao L, Lee JY, Hwang DH. Inhibition of pattern recognition receptor-mediated inflammation by bioactive phytochemicals. *Nutr Rev*. 2011. 69: 310-320.
- Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med*. 2003. 31: S105-111.
-