J. Exp. Biomed. Sci. 2013, 19(3): 270~274
pISSN : 1738-3226

Brief Communication

Isoliquiritigenin Inhibits Ovalbumin-induced Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression

Se Jin Lim and Hyung-Sun Youn†

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

Egg allergy has been raised as the most prevalent food hypersensitivity in children. Ovalbumin (OVA), which is one of the major egg allergens, is the major protein in egg white. Isoliquiritigenin (ILG) is an active component present in licorice and has been used to treat many chronic diseases for many years. In this study, we present biochemical evidence that ILG inhibits OVA-induced nuclear factor-κB (NF-κB) activation. ILG also inhibits OVA-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression. These data suggest that ILG has anti-allergy effects.

Key Words: Egg allergy, Isoliquiritigenin, Inducible nitric oxide synthase, Cyclooxygenase-2, Ovalbumin

음식 알러지 (food allergies)는 아토피 피부염 (atopic dermatitis), 알러지 위장장애 (allergic gastrointestinal disorders)와 같은 만성적인 장애를 일으킬 수 있는 음식 단백질에 대한 면역 거부반응이다. 사람마다 차이가 있지만 우유, 계란, 대두, 땅콩, 생선 등이 중요한 식품 알러젠들로 알려져 있다 (Wang and Sampson, 2009). 이러한 알러젠들 중 계란은 아이들에게 두 번째로 흔한 음식 알러젠으로 알려져 있다 (Eggesbo et al., 2001). 계란 알러젠으로는 lysozyme, ovomucin, ovomucoid, ovalbumin (OVA) 등이 있다 (Mine and Yang, 2008). 이 중에서도 OVA은 계란 흰자 단백질 중 약 54%로 가장 많은 비율을 차지하고 있는 주요한 알러젠으로 알려져 있다. OVA은 45 kDa의 분자량을 가지고 있는 인당 단백질 (phosphoglycoprotein)로 단백질의 구조나 기능 연구를 위한 표준 물질로서 뿐만 아니라, 알러지 연구를 위한 실험 동물 모델 안에서 광범위하게 사용되어 왔다 (Mine and Yang, 2008). 현재까지 계란 알러지를 치료하는 가장 효과적인 방법은 계란을 먹지 않는 것이었지만, 음식문화의 발달로 계란을 이용한 음식들이 많아지면서 계란을 피하는 것은 더욱 어려워지게 되었다. 특히 여러 백신들은 계란을 사용해서 제조를 하고 있기 때문에 백신 접종이 점점 늘어나고 있는 현대사회에서 계란 알러지는 바이러스 백신 사용에 있어서 중요한 이슈로 떠오르고 있다.

전통적으로 우리 식생활에서 즐겨먹던 식물들 중에는 항암·항염증 효과를 가지고 있다고 알려져 있는 많은 기능성 소재들이 포함되어 있다. 그러한 식물들 중의 하나가 감초 (Licorice, *Glycyrrhiza uralensis*)이다. 감초는 한약재로 널리 사용되어 왔으며, 오랫동안 음식, 음료수, 담배 등의 맛을 내는 성분으로 사용되어 왔다. 또한 감초는 위궤양 (gastric ulcers), 십이지장 궤양 (duodenal ulcers), 후두염 (sore throats), 기침 (coughs), 기관지염 (bronchitis), 관절염 (arthritis), 부신병 (adrenal insufficiency), 알러지 (allergies) 등의 치료에 널리 사용되어 왔다 (Fintelmann, 1991; Haggag et al., 2003; Kamei et al., 2005; Kim et al., 2008). 감초는 glycyrrhizin, glabridin, isoliquiritigenin (ILG) (Fig. 1)과 같은 의학적으로 효과를 가지고 있는 성분들을 포함하고 있다 (Fukai et al., 2003; Yokota et al., 1998; Zhou et al., 2004). 그 중에서도 ILG는 혈관완화 효과 (vasorelaxant) (Yu and Kuo, 1995), 혈소판 응집 효과 (anti-platelet aggregation) (Tawata et al., 1992), 항알러지 효과 (anti-allergic activity) (Kakegawa et al., 1992)를 가지고 있다고 알려져 있다. 또한 ILG는 lipopolysaccharide (LPS)에 의해서 유도

*Received: May 6, 2013 / Revised: June 7, 2013
Accepted: June 7, 2013
†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.

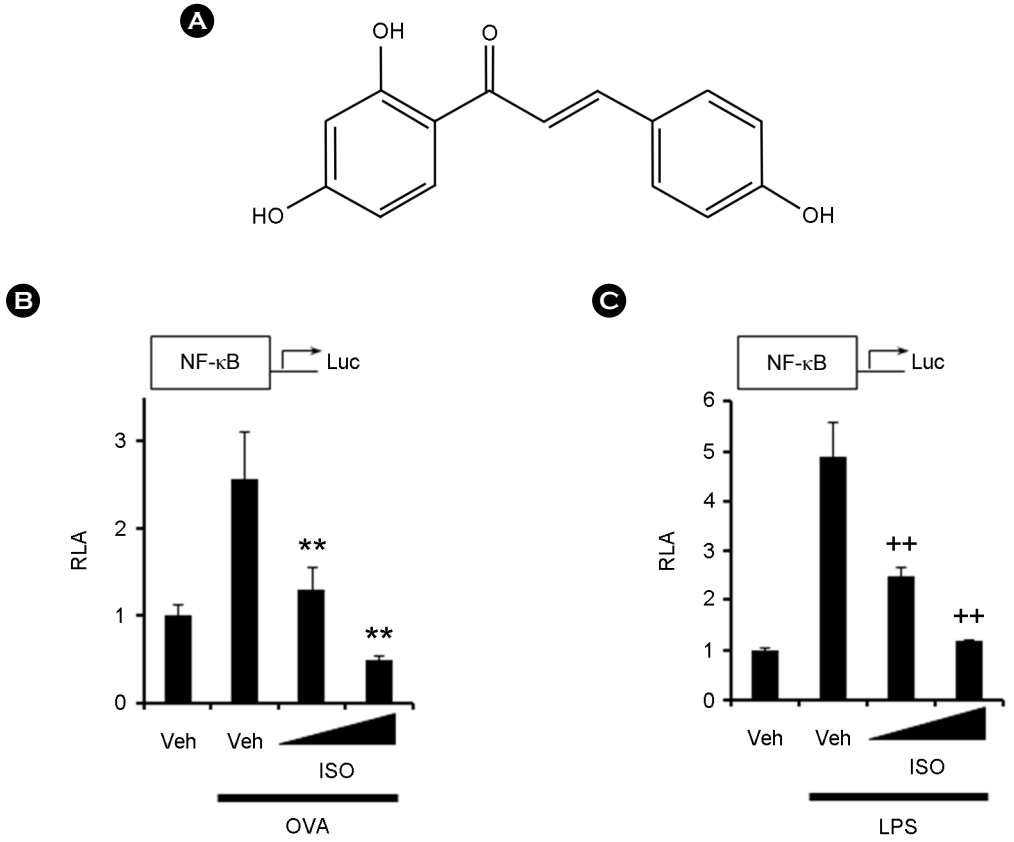

Fig. 1. ILG inhibits NF-κB activation induced by OVA. (A) The structure of isoliquiritigenin (ILG). (B, C) RAW264.7 cells were transfected with NF-κB luciferase reporter plasmid and pretreated with ILG (20, 50 μM) for 1h and then treated with OVA (100 μg/ml) (B) or LPS (10 ng/ml) (C) for an additional 8 h. Cell lysates were prepared and luciferase enzyme activities were determined. Values are expressed as the mean ± SEM (n=3). *, Significantly different from OVA alone, P<0.01 (**). +, Significantly different from LPS alone, P<0.01 (++). Veh, vehicle; ILG, isoliquiritigenin; RLA, relative luciferase activity.

된 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현을 억제하여 항염증 효과를 가지고 있다고 알려져 있다 (Kim et al., 2008).

NF-κB는 거의 모든 알려져 있는 세포 (cells)에서 발견되는 인간의 면역반응을 위해서 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 전사 요소이다 (Pahl, 1999). NF-κB는 발달 (development), 염증 (inflammation), 면역 (immunity)을 위해서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 활성화된 NF-κB는 cytokine과 chemokine을 포함한 면역·염증에 관여하는 여러 종류 타깃 유전자의 발현을 조절하여 후천성 면역반응을 유도해서 여러 질병으로부터 숙주를 보호하여 주는 것으로 알려져 있다 (Pahl, 1999). 하지만 계속된 병원균의 자극에 의해 숙주의 면역시스템에 과부하가 걸렸을 때에는 오히려 염증을 유발해 암이나 여러 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 그래서 NF-κB 활성화를 미리 막을 수만 있다면 COX-2, iNOS와 같은 염증 유도 물질들을 줄여서 여러 질병으로부터 숙주를 보호할 수 있게 되는 것이다 (Pahl, 1999).

우리는 이번 연구를 통해서 ILG가 계란 알러젠인 OVA에 의해서 유도된 COX-2와 iNOS 발현을 억제하는지 알아보았다. 먼저 우리는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입한 ILG가 계란 알러젠인 OVA에 의해서 유도된 NF-κB 활성화에 어떤 영향을 미치는지 발광효소 유전자 분석법 (luciferase assay)에 의해서 알아보았다. 발광효소 plasmid와 HSP70-β-galactosidase plasmid는 Superfect transfection 시약 (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 세포 안으로 transfection 시켰다. 발광효소의 활성화는 luciferase assay system (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정하였다. 발광효소의 활성화는 β-galactosidase의 활성화를 측정하여 표준화시켰다. ILG는 OVA에 의해서 유도된 NF-κB 활성을 억제하였다 (Fig. 1B). 또한 양성반응 대조군으로 Toll-like receptor 4 (TLR4) 자극제인 LPS가

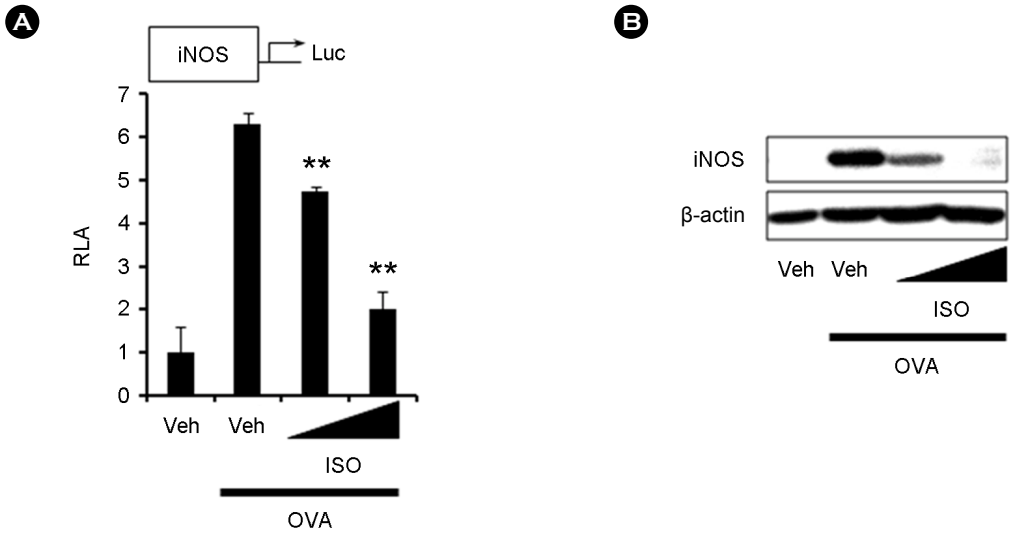

Fig. 2. ILG inhibits iNOS expression induced by OVA. (A) RAW264.7 cells were transfected with iNOS luciferase reporter plasmid and pretreated with ILG (20, 50 μM) for 1h and then treated with OVA (100 μg/ml) for an additional 8 h. Cell lysates were prepared and luciferase enzyme activities were determined. Values represent the mean ± SEM (n=3). *, Significantly different from OVA alone, $P<$ 0.01 (**). (B) RAW264.7 cells were pretreated with ILG (20, 50 μM) for 1 h and then further stimulated with OVA (100 μg/ml) for an additional 8 h. Cell lysates were analyzed for iNOS and β-actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; ILG, isoliquiritigenin; RLA, relative luciferase activity.

사용되었으며, ILG는 LPS에 의해서 유도된 NF-κB 활성화를 억제하였다 (Fig. 1C).

다음 실험으로 ILG가 NF-κB 활성화에 의해서 유도되는 유전자인 iNOS 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 이 실험을 위해서 발광효소 유전자 분석법과 Western blotting 방법이 사용되었다. 먼저 iNOS 발광효소 유전자 분석법에 의하면 ILG는 OVA에 의해서 유도된 iNOS 발현을 억제시켰다 (Fig. 2A). 또한 ILG는 OVA에 의해서 유도된 iNOS 단백질 발현을 억제시키는 것을 Western blotting 방법을 통하여 확인하였다 (Fig. 2B).

다음 실험으로 OVA이 NF-κB 활성화에 의해서 유도되는 또 다른 유전자인 COX-2 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 발광효소 유전자 분석법과 Western blotting 방법에 의하면 ILG는 OVA에 의해서 유도된 COX-2 발현을 억제시켰다 (Figs. 3A, B). 이러한 모든 결과들은 ILG가 OVA에 의해서 유도된 알러지 반응을 조절할 수 있다는 것을 보여주는 결과라 할 수 있겠다.

알러지는 여러 단백질에 대한 숙주 면역시스템의 과민반응이라 할 수 있다. 이러한 면역반응의 중요한 측면은 붉어짐 (redness), 발열 (heat), 부종 (swelling), 통증 (pain)을 포함하는 증상에 의해서 특징지어지는 염증 (inflammation)이라 할 수 있다. 염증 (inflammation)은 여러 분자학적인 기전에 의해서 유도되는데, 그 중에서도 COX-2에 의한 prostaglandins (PGs) 생산과 iNOS에 의한 nitric oxide (NO) 생산이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Moncada, 1999; Turini and DuBois, 2002). COX는 적어도 두 개의 isoforms인 COX-1과 COX-2로 존재한다. COX-1은 거의 모든 세포나 조직에서 항상 발현되며 신장 (kidney)에서 위장관 세포보호작용 (gastrointestinal cytoprotection)과 전해질 항상성 (electrolyte homeostasis)과 같은 중요한 생리적 과정을 조절하지만 COX-2는 염증을 유발하는 요소에 의해서 커다랗게 증가된다 (Vane et al., 1998). Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAID)에 의한 독성효과 중에서 많은 것은 COX-1 억제에 기인한다고 알려져 있지만, 치료효과는 COX-2 억제에 기인한다고 알려져 있다 (Grzanna et al., 2005). 이러한 결과들은 많은 연구자들에게 NSAID 개발에 있어서 COX-2 억제제를 개발하도록 유도하였으며, 현재까지 많은 COX-2 억제제가 개발되었다. 특히 천연물에서 유래한 많은 phytochemicals이 여러 자극제에 의해서 유도된 COX-2 발현을 억제하는 것으로 밝혀졌다 (Khanna et al., 2007; Surh, 2003; Surh et al., 2001).

NO는 대기중의 가장 풍부한 원소인 질소와 산소 두 기체의 1:1 조합물이다. 1987년까지 NO는 전기화학반응의 오염물질이나 부산물로 여겨져 왔지만 오늘날에는 포유동물 세포가 아미노산 L-arginine으로부터 NO를 만들

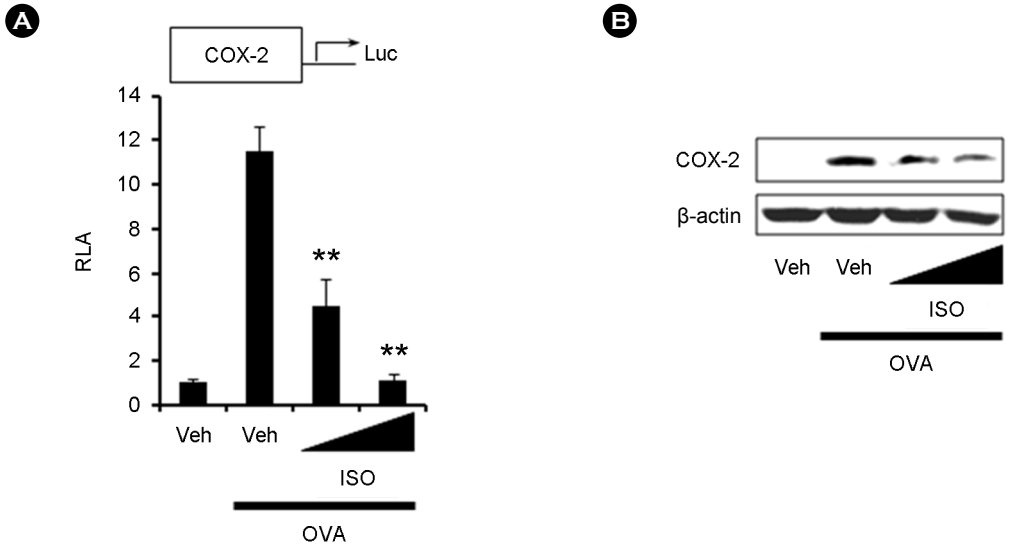

Fig. 3. ILG inhibits COX-2 expression induced by OVA. (A) RAW264.7 cells were transfected with COX-2 luciferase reporter plasmid and pretreated with ILG (20, 50 μM) for 1h and then treated with OVA (100 μg/ml) for an additional 8 h. Cell lysates were prepared and luciferase enzyme activities were determined. Values represent the mean ± SEM (n=3). *, Significantly different from OVA alone, $P<0.01$ (**). (B) RAW264.7 cells were pretreated with ILG (20, 50 μM) for 1 h and then further stimulated with OVA (100 μg/ml) for an additional 8 h. Cell lysates were analyzed for COX-2 and β-actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; ILG, isoliquiritigenin; RLA, relative luciferase activity.

고, 이 NO는 세포에서 다른 세포 사이의 신호 전달을 위해 사용된다고 알려져 있다 (Hanafy et al., 2001). NOS는 3개의 isoforms인 endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS)로 존재한다 (Vallance, 2003). eNOS, nNOS는 항상 발현되어 존재하지만, iNOS는 감염이나 염증성 인자 (proinflammatory stimuli)에 의해서 유도된다 (Vallance, 2003). iNOS는 LPS 또는 다양한 pro-inflammatory cytokines (interleukin-1, interferon-γ, tumor necrosis factor-α)의 자극에 의해서 유도되는 것으로 알려져 있다 (Green et al., 1990; Palmer et al., 1993). 특히, 사람에서 iNOS 유도는 말라리아나 비뇨생식기 같은 특정한 장기의 감염에 대한 방어 체계로써 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Kun et al., 2001). 오늘날 COX-2 억제제는 잠재적으로 부작용이 있음에도 불구하고 항염증제로서 광범위하게 사용되고 있는 반면에, iNOS 억제제는 치료목적으로 현재 널리 사용되지는 않고 있다 (Flower, 2003; Moncada, 1999; Turini and DuBois, 2002).

이번 연구에서 ILG가 계란 알러젠 중의 하나인 OVA에 의해서 유도된 COX-2, iNOS 발현에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. ILG는 OVA에 의해서 유도된 COX-2, iNOS 발현을 억제시켰다. 이러한 결과는 감초 추출물인 ILG가 OVA에 의해서 유도된 알러지와 같은 만성적인 질병들을 조절할 수 있다는 것을 보여주는 중요한 결과라 할 수 있겠다. 이러한 연구는 천연물 추출물들이 알러지 예방 및 치료제 개발에 중요한 역할을 할 것으로 기대한다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 순천향대학교 교수 연구년제에 의하여 수행하였으므로 이에 감사를 드립니다.

REFERENCES

Eggesbo M, Botten G, Halvorsen R, Magnus P. The prevalence of allergy to egg: a population-based study in young children. Allergy 2001. 56: 403-411.

Fintelmann V. Modern phytotherapy and its uses in gastrointestinal conditions. Planta Med. 1991. 57: S48-S52.

Flower RJ. The development of COX2 inhibitors. Nat Rev Drug Discov. 2003. 2: 179-191.

Fukai T, Satoh K, Nomura T, Sakagami H. Preliminary evaluation of antinephritis and radical scavenging activities of glabridin from Glycyrrhiza glabra. Fitoterapia 2003. 74: 624-629.

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.

Grzanna R, Lindmark L, Frondoza CG. Ginger--an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. J Med Food 2005. 8: 125-132.

Haggag EG, Abou-Moustafa MA, Boucher W, Theoharides TC. The effect of a herbal water-extract on histamine release from mast cells and on allergic asthma. J Herb Pharmacother 2003. 3: 41-54.

Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. Med Sci Monit. 2001. 7: 801-819.

Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T. Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their anti-allergic actions. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1992. 40: 1439-1442.

Kamei J, Saitoh A, Asano T, Nakamura R, Ichiki H, Iiduka A, Kubo M. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of the antitussive principles of Glycyrrhizae radix (licorice), a main component of the Kampo preparation Bakumondo-to (Mai-men-dong-tang). Eur J Pharmacol. 2005. 507: 163-168.

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.

Kim JY, Park SJ, Yun KJ, Cho YW, Park HJ, Lee KT. Isoliquiritigenin isolated from the roots of Glycyrrhiza uralensis inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF-kappaB in RAW 264.7 macrophages. Eur J Pharmacol. 2008. 584: 175-184.

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.

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.

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene 1999. 18: 6853-6866.

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.

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.

Tawata M, Aida K, Noguchi T, Ozaki Y, Kume S, Sasaki H, Chin M, Onaya T. Anti-platelet action of isoliquiritigenin, an aldose reductase inhibitor in licorice. Eur J Pharmacol. 1992. 212: 87-92.

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.

Wang J, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. Allergy Asthma Immunol Res. 2009. 1: 19-29.

Yokota T, Nishio H, Kubota Y, Mizoguchi M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. Pigment Cell Res. 1998. 11: 355-361.

Yu SM, Kuo SC. Vasorelaxant effect of isoliquiritigenin, a novel soluble guanylate cyclase activator, in rat aorta. Br J Pharmacol. 1995. 114: 1587-1594.

Zhou S, Koh HL, Gao Y, Gong ZY, Lee EJ. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. Life Sci. 2004. 74: 935-968.