

Original Article / 원저

NO와 Pro-Inflammatory Cytokine의 억제를 통한 胡蘿蔔의 항염증효과

이동진¹⁾ · 박상미²⁾ · 황보민¹⁾ · 정태영³⁾ · 김상찬^{2)*} · 지선영^{1)*}

¹⁾대구한의대학교 안이비인후과학교실

²⁾방제학교실

³⁾진단학교실

Roots of *Daucus carota sativa* abrogates acute phase of Inflammation by the Inhibition of NO and Pro-Inflammatory Cytokine Production

Dong-Jin Lee¹⁾ · Sang-Mi Park²⁾ · Min Hwangbo¹⁾ · Tae-Young Jung³⁾ · Sang-Chan Kim²⁾ · Seon-Young Jee¹⁾

Department of ophthalmology and otolaryngology and dermatology,

College of Korean Medicine, Daegu Haany University¹⁾

College of Korean Medicine, Daegu Haany University^{2,3)}

Abstract

Objectives : *Daucus carota sativa* has been frequently used as food supplements in many of the Asian countries, and a nutritional medical drug in traditional medicine. This research investigated the effects of *Daucus carota sativa* extract (DCE) on acute phases of inflammation in Raw 264,7 cells treated with lipopolysaccharide (LPS) in terms of the inhibition of nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) and pro-inflammatory cytokines production.

Methods : NO, PGE₂, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin-1 β and interleukin-6 contents were assayed by ELISA, and expressions of inflammation-related proteins such as inducible NO synthase (iNOS) were determined by immunoblot analyses.

Results : DCE treatment attenuated the LPS ability to increase the productions of NO and PGE₂ as well as the protein level of iNOS in a concentration-dependent manner. Consistently, treatment of the cells with DCE suppressed the production of TNF- α , interleukin-1 β and interleukin-6. DCE also caused decreases of inhibitor of

© 2013 the Society of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

κ B α phosphorylation induced by LPS in the cells, which means DCE inhibition of NF- κ B activity. Furthermore, DCE blocked LPS-induced phosphorylation of p38 and SAPK/JNK.

Conclusion : This study showing here may be of help to understand the action mechanism of DCE, and provide the information for the medical use of *Daucus carota sativa* for the inflammatory disease.

Key words : *Daucus carota sativa*; iNOS; TNF- α ; Interleukin-1 β ; Interleukin-6, MAPK

I. 緒 論

胡蘿蔔은 지중해 연안이 원산인 미나리과 식물 胡蘿蔔 (*Daucus carota var. sativa*)의 뿌리이다. 異名으로 番蘿蔔, 山胡蘿蔔, 紅皮蘿蔔, 野胡蘿蔔, 金筍, 黃蘿蔔, 紅蘿蔔, 홍당무우, 丁香蘿蔔 등으로 불린다^{1,2)}.

胡蘿蔔의 뿌리는 胡蘿蔔으로, 胡蘿蔔의 종자는 胡蘿蔔子로 한약재로 사용된다¹⁾. 胡蘿蔔의 性味는 甘平하며, 歸經은 脾肺經이며, 健脾消滯하는 효능이 있어 消化不良, 慢性泄瀉, 慢性痢疾, 咳嗽 등을 치료한다. 임상적으로는 芫荽, 荸薺 등을 배합하여, 麻疹, 水痘를 치료하고, 風栗, 紅棗를 배합하여, 百日咳를 치료한 기록이 있다. 열매인 胡蘿蔔子는 久痢, 痰喘에 이용되고, 민간에서는 益精, 發毛의 목적으로, 또한 夜盲症, 慢性痢疾 등의 치료에 응용되고 있다^{1,2)}.

현재까지 胡蘿蔔에 대한 연구로는, 다양한 암세포주에 대한 세포생존율억제효과³⁻⁵⁾, 항산화효과, DNA 손상억제효과⁶⁾, 항박테리아효과⁷⁾, 강압효과⁸⁾ 등이 알려져 있으며, 함유 성분으로는 carotinoide, vitamin, anthocyanidin, 정유 등이 있는 것으로 알려져 있다^{1,9)}. 그러나 胡蘿蔔의 항염증효과 및 이의 기전에 관한 연구는 전무한 실정이다.

Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성 세균의 세포벽 구성성분으로, 염증반응을 유발하는 유력한 인자로¹⁻⁵⁾, 대식세포의 toll-like receptor (TLR)와 결합하여 다양한 염증매개반응을 유도하므로 염증 연구

에 다용되고 있다.

Raw 264,7 세포는 murine macrophage cell line 으로 염증반응 시에 다양한 cytokine을 생산하여 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다^{10,11)}. 그러나 대식세포가 염증반응 시 과도하게 염증매개물질을 분비하는 경우에는 생체에 불리한 결과를 초래할 수도 있다¹²⁻¹⁴⁾. 따라서 본 연구에서는 胡蘿蔔의 염증억제효과 및 기전에 대한 연구를 위하여 에탄올로 추출된 胡蘿蔔 (DCE)이 LPS로 활성화된 Raw 264,7 세포에서 나타나는 염증매개물질들에 미치는 영향을 평가하고 이에 관련된 분자기전을 연구하고자 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 추출물의 제조

胡蘿蔔은 2011년 6월 대구광역시 수성구 상동시장에서 구입하였으며, 胡蘿蔔 300 g을 100% 에탄올 3 L에 넣고 3일간 추출한 후, 추출물을 거어즈로 1차 여과하고 3000×g에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후의 상층액을 취하여 0.2 μ m filter (Nalgene, New York, USA)로 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하여 22.2 g을 얻었으며, 사용 때까지 -20℃에서 보관하였다. DCE의 수율은 7.407%였으며 처치 시에는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 사용하였다.

2. 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazo-

교신저자 : 지선영, 경북 포항시 남구 새천년대로 411 포항한방병원
(Tel : 054-281-0055, E-mail : jeesy@dhu.ac.kr)
김상찬, 경북 경산시 한의대로 1 대구한의대학교
(Tel : 053-819-1863, E-mail : sckim@dhu.ac.kr)
• 접수 2013/4/11 • 수정 2013/5/3 • 채택 2013/5/10

leum (MTT)와 LPS (serotype 055:B5)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였다. iNOS 항체는 BD biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입하였고 I- κ B α 와 NF- κ B 및 actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Phosphorylated I- κ B α (p-I- κ B α), Phosphorylated p38 MAPK (p-p38), Phosphorylated p44/42 MAPK (p-p44/42), phosphorylated SAPK/JNK (p-SAPK/JNK)와 lamin A/C 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. NC paper는 Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)에서 구입하였다. TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂ 의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였으며, DMSO는 Junsei Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다.

3. 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였으며, DMEM에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator (Sanyo, Japan)에서 배양하였다. Raw 264.7 세포는 80-90%의 confluency에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 세포를 5×10^4 cells/well로 96 well plate에 분주한 다음 DCE를 처치하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 10, 30, 100, 300 μ g/ml의 농도로 DCE를 처치한 후에 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 환경이 유

지되는 배양기에서 배양하였다. 배양 후 각 well 당 MTT 용액(0.1 mg/ml in PBS)을 50 μ 씩 넣고 4시간 배양한 후, well 바닥의 formazan이 훼손되지 않도록 조심스럽게 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다.

Viability (% control) =

$$\frac{\text{Absorbance of treated cell}}{\text{Absorbance of control cell}} \times 100$$

5. NO생성량 측정

Raw 264.7 세포로부터 생성된 nitric oxide (NO)는 세포 배양액에 Griess 시약을 반응시킴으로써 측정하였다. 96 well plate에 세포배양 상등액 50 μ 와 Griess 시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H₂O) 50 μ 를 혼합하고 10분 동안 차광하에서 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO의 생성량은 control의 배수로 나타내었다.

6. Immunoblot analysis

20 mM Tris Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137 mM sodium chloride, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM β -glycerophosphate, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 세포를 용해시켰다. Cell lysates는 10,000 \times g로 10분간 원심 분리하여 debris를 제거하였다. 핵분획은 세포를 phosphate

buffered saline (PBS)으로 세척한 후 수거하여, 4°C에서 3,000×g로 3분간 원심 분리하여 PBS를 제거한 후, 세포에 buffer [10 mM Hepes (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenyl- methylsulfonyl fluoride]를 100 μ l 넣어 10분간 4°C에서 용해 후 7,600×g로 6분간 원심분리 하였다. 원심분리 후, 침전물에 buffer [20 mM Hepes (pH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride]를 50 μ l 넣은 후 4°C에서 1시간 용해하였다. 4°C에서 15,000×g로 10분간 원심분리하여 핵분획인 상층액을 얻었다. 각 단백질의 발현은 각 단백질에 특이적 항체를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였으며, 2차 antibody는 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit와 반응 후 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 발색하였다. 발색 후 각 단백질의 발현량을 평가하기 위하여 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 이용하여 Densitometric analysis를 실시하였다.

7. Cytokine 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 24 well plate에 cells ($1 \times 10^5/ml$)을 분주하여 배양한 다음, DCE를 300 $\mu g/ml$ 으로 처치한 다음, 1시간 후에 LPS를 처치하였다. LPS 처치하고 24시간 후 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 바로 측정하거나, 측정 전까지 -70°C에서 보관하였다. TNF- α , IL-1 β 와 IL-6는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다.

8. PGE₂ 생성 저해능 측정

6 well plates에 Raw 264.7 세포를 5×10^5 cell/ml로 분주하고 DCE를 300 $\mu g/ml$ 으로 처치한 다음, 1시

간 후에 LPS를 처치하였다. LPS를 처치한 후 24시간 이 지난 후 배양액을 회수하여 -70°C에서 보관하였다. 배양액 중의 PGE₂는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)의 PGE₂ assay kit를 사용하여 제조사의 방법에 따라 측정하였다.

9. 통계적 검증

실험 결과는 mean \pm S.D.로 나타내었으며, 처치군 간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newman-Kleuls test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 로 하였다.

III. 結 果

1. DCE가 Raw 264.7 세포의 NO 생성 및 세포 생존율에 미치는 영향

DCE가 LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 NO에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 DCE를 10, 30, 100, 300 $\mu g/ml$ 의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO를 측정하였다. LPS군에서는 control군 (1.00 ± 0.02)에 비교하여 NO의 생성량이 3.17 ± 0.28 배 증가하여, 유의한 NO의 증가를 나타내었다. LPS에 의한 NO의 증가는 10, 30, 100 $\mu g/ml$ 의 DCE 전처치로 각각 3.08 ± 0.17 , 2.97 ± 0.13 , 2.75 ± 0.10 배로 감소하는 경향을 나타내었으며, 300 $\mu g/ml$ 의 DCE는 1.74 ± 0.05 배로 통계적으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 1A). 이러한 DCE가 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, DCE의 세포독성에 기인한 것인지를 평가하기 위하여, DCE 10 - 300 $\mu g/ml$ 을 처리하고 24시간 후에 MTT assay를 실시하여 세포생존율을 측정하였다. Control은 $100.00 \pm 5.56\%$ 에 비교하여 10, 30, 100, 300 $\mu g/ml$ 은 각각 111.19 ± 7.58 , 116.23 ± 5.65 , 119.32 ± 6.60 , $101.56 \pm 7.28\%$ 로 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. 이러한 결과는

DCE가 NO를 유의하게 억제하고, 항염증효과를 가질 수 있음을 의미한다(Fig. 1B).

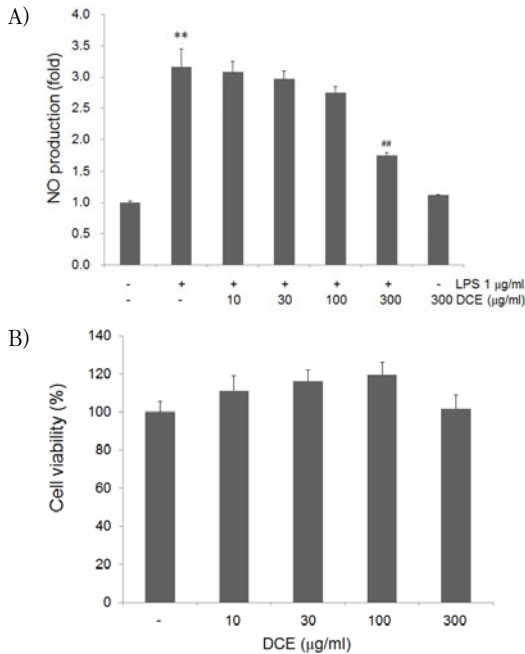


Fig. 1. Effect of DCE on the production of NO in LPS-activated Raw 264.7 cells and cell viability

Raw 264.7 cells were treated with 10 - 300 µg/ml of DCE dissolved in DMSO for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/ml), and the cells were further incubated for 24 h. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were assayed as described in the methods section (A). For MTT assay, Raw 264.7 cells were treated with 10 - 300 µg/ml of DCE dissolved in DMSO, and the cells were further incubated for 24 h (B). Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments (Significant as compared to control, *p<0.01; significant as compared to LPS alone, **p<0.01).

2. DCE가 Raw 264.7 세포의 iNOS 발현에 미치는 영향

DCE는 NO의 생성을 유의하게 억제하였으므로, L-arginine으로부터 NO를 생성하는 iNOS의 발현을 immunoblot으로 평가하였다. LPS 처치시에는 iNOS 단백질의 발현이 control에 비교하여 105092.0 ± 8986.9배로 유의하게 증가되었으나, LPS에 DCE 100

µg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 발현량이 72534.8 ± 29035.2배로 감소하였으며, DCE 300 µg/ml을 처치한 실험군에서는 45420.1 ± 16793.6로 감소하여, 농도 의존적으로 유의성을 나타냈다(Fig. 2).

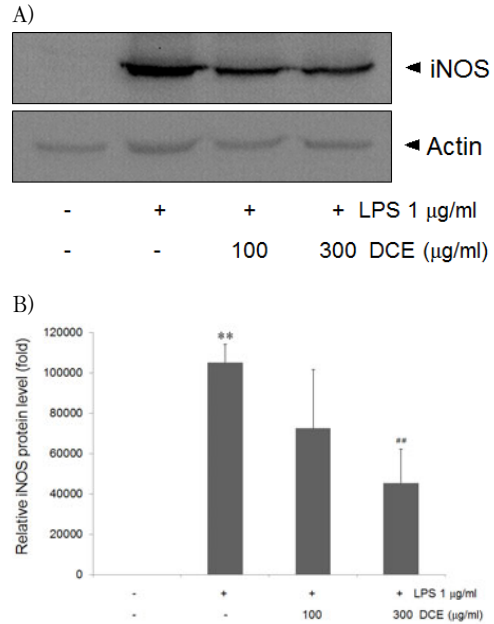


Fig. 2. Effect of DCE on the induction of iNOS expression in LPS-activated Raw 264.7 cells.

The levels of iNOS protein were monitored 24 h after treatment LPS (1 µg/ml) with or without DCE (100, 300 µg/ml) pretreatment (i.e., 1 h before LPS). Equal amounts of whole cell lysate were resolved by SDS-PAGE. Expressions of iNOS protein were visualized by immunoblot analysis using specific iNOS antibodies. The actin was used as a loading control (A). The relative density levels of protein bands were measured by scanning densitometry (B). The data represent the mean ± S.D. of three separate experiments (Significant compared with the control, *p<0.01; significant compared with the LPS alone, **p<0.01).

3. DCE가 Raw 264.7 세포의 염증성 cytokine에 미치는 영향

주로 대식세포, T-cell로 부터 분비되는 TNF-α는 endothelial cell, neutrophil을 활성화하여 염증반응을 매개할 뿐만 아니라, hypothalamus에 작용하여 발열을 유도하고, 혈관내피세포의 표면에 adhesion

molecule의 발현을 유도한다¹⁶⁾. LPS는 TNF- α 의 분비를 control 대비, 35.35 ± 3.50 배로 유의성 있게 증가시켰으며, DCE는 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 26.84 ± 2.17 배로 TNF- α 의 생성량을 유의하게 감소시켰다 (Fig. 3A). IL-1 β 는 TNF- α 처럼 염증반응을 매개하

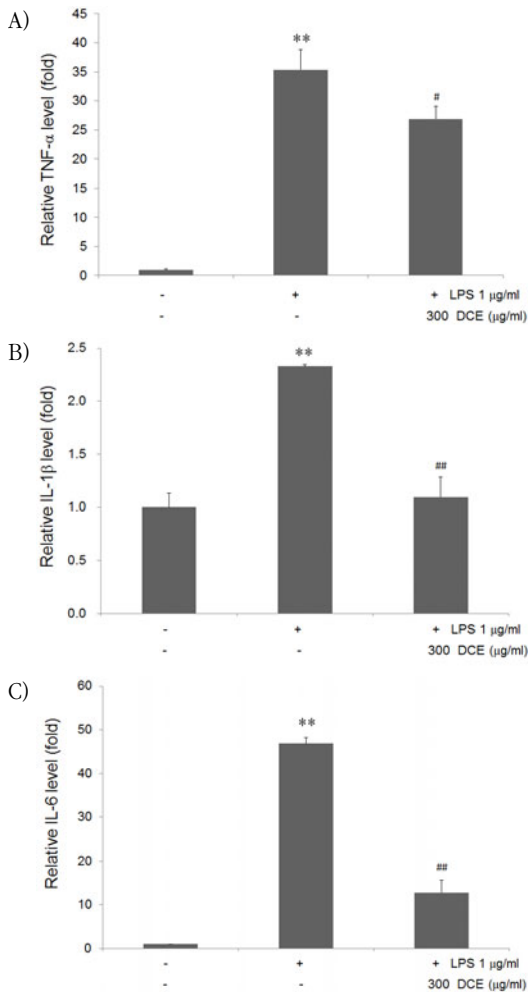


Fig. 3. Effect of DCE on the cytokines in LPS-activated Raw 264.7 cells.

Production of cytokines was measured in the culture medium of Raw 264.7 cells with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of DCE for 24 h. The amount of cytokines was detected by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments (Significant as compared to control, **p<0.01; significant as compared to LPS alone, #p<0.05, ###p<0.01).

고, 발열을 유도하며, T-cell의 활성화, B-cell의 성숙, NK cell의 활성화에도 관련되어 있다^{17,18)}. 본 연구에서도 LPS의 자극에 의하여 IL-1 β 의 분비는 control 대비, 2.33 ± 0.01 배로 유의성 있게 증가하였으며, DCE는 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 1.09 ± 0.19 배로 IL-1 β 의 생성량을 유의하게 감소시켰다(Fig. 3B). IL-6는 외상 시 수치가 증가하고, B-cell의 분화 및 증식을 촉진하고, 항체의 분비를 자극하는 것으로, 염증 부위에서 대부분 높은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있다^{19,20)}. LPS의 자극에 의하여 IL-6의 분비는 control 대비, 46.89 ± 1.309 배로 유의성 있게 증가하였으며, DCE는 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 12.85 ± 2.78 배로 IL-1 β 의 생성량을 유의하게 감소시켰다(Fig. 3C).

4. DCE가 Raw 264.7 세포의 PGE₂에 미치는 영향

염증반응 시 PGE₂는 arachidonic acid로부터 COX-2에 의해 생성되며 혈관을 확장시키고 혈관투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로의 화학주성을 증가시키며, 염증반응 및 암발생에 관여하는 것으로

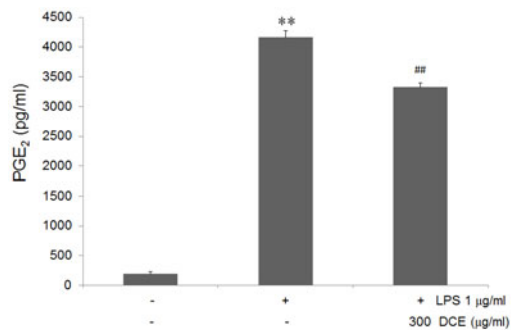


Fig. 4. Effect of DCE on the PGE₂ in LPS-activated Raw 264.7 cells.

Production of PGE₂ was measured in the culture medium of Raw 264.7 cells with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of DCE for 24 h. The cultured medium was collected and directly assayed for PGE₂. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments (Significant as compared to control, **p<0.01; significant as compared to LPS alone, ###p<0.01).

알려져 있다^{21,22}. 본 연구에서 LPS는 PGE₂의 생성을 control 대비, 4165.19 ± 106.69 pg/ml로 유의성 있게 증가시켰으며, DCE 300 μg/ml은 LPS로 유도된 PGE₂를 3324.48 ± 76.30 pg/ml로 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 4).

5. DCE가 Raw 264.7 세포의 NF-κ B 발현에 미치는 영향

DCE는 LPS로 증가된 NO 및 iNOS를 유의하게 억제하였으므로, iNOS의 발현에는 관여하는 전사인자 NF-κB의 발현을 평가하였다. NF-κB는 세포질에서 억제 단백질(I-κB)과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, 염증반응 시 I-κB가 인산화 되면 NF-κB가 핵으로 전위하여 iNOS, COX-2 등의 전사를 유도하게 된다²³.

본 연구에서는 핵 분획에서의 NF-κB 단백질 발현을 평가하였다. NF-κB는 LPS 처치에 의해 핵 분획으로의 이동이 증가하였으나, DCE 100, 300 μg/ml의 전처치에 의하여 NF-κB 발현량이 감소하였다(Fig. 8).

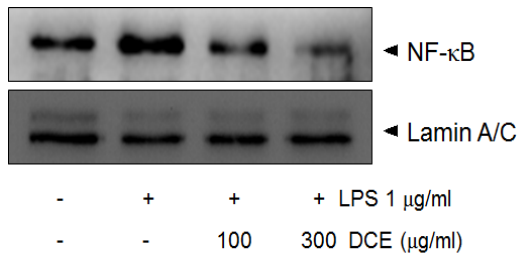


Fig. 5. Effect of DCE on the expression of NF-κ B in LPS-activated Raw 264.7 cells.

The level of nuclear NF-κB protein was monitored 30 min after treatment of cells with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of DCE (i.e. 1 h before LPS). The Lamin A/C was used as a loading control.

6. DCE가 Raw 264.7 세포의 I-κ Bα 의 인산화에 미치는 영향

DCE는 LPS에 의한 NF-κB의 핵으로의 전위를 억

제하였으므로, 세포질에서의 인산화된 I-κBα (p-I-κBα)와 I-κBα의 발현을 평가하였다. p-I-κBα는 LPS의 자극에 의하여 control 대비 2.85 ± 0.43배로 유의하게 증가하였으나, 100 및 300 μg/ml DCE의 전처치에 의하여 각각 1.08 ± 0.63, 0.94 ± 0.40배로

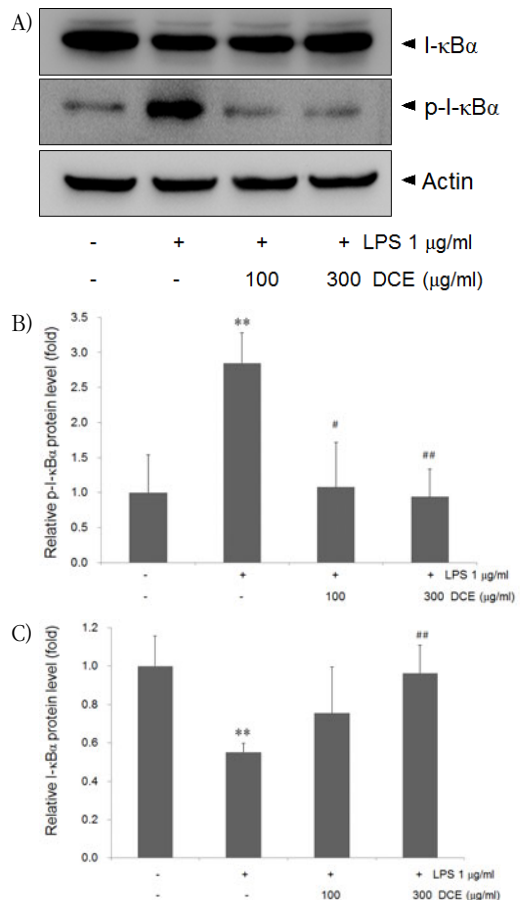


Fig. 6. Effect of DCE on the expression of p-I-κ Bα and I-κ Bα in LPS-activated Raw 264.7 cells.

The levels of p-I-κBα and I-κBα protein were monitored 30 min and 15 min after treatment of cells with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of DCE (i.e. 1 h before LPS) respectively. The actin was used as a loading control (A). The relative density level of the bands was measured by scanning densitometry (B, C). The protein blots were detected western blotting assay as described in materials and methods. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments (Significant as compared to control, **p < 0.01; Significant as compared to LPS alone, #p < 0.05, ##p < 0.01).

유의하게 감소되었다(Fig. 6, A-B). 이와는 대비되게 I- κ B α 는 LPS의 자극에 의하여 control 대비 0.55 \pm 0.05배로 유의하게 감소하였으며, DCE 100 μ g/ml에서는 0.75 \pm 0.24배로 증가하였고, DCE 300 μ g/ml에서는 0.96 \pm 0.15배로 유의성있게 증가하였다(Fig. 6, A and C).

7. DCE가 Raw 264.7 세포의 MAPK에 미치는 영향

MAPK (Mitogen-activated protein kinase)는 ERK (extracellular signal-regulated kinase, p44/42), JNK (c-Jun N-terminal kinases), p38의 3종으로 주로 인산화되지 않은 상태로 세포질에 존재하다가, LPS 등에 의해 인산화되어 핵으로 전위하여 NF- κ B, activating protein-1 등을 포함한 다양한 전사인자들의 활성화를 유도하는 핵심 신호전달 분자로 보고되고 있다²⁴⁾. LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서 DCE에 의한 MAPK 활성변화를 측정하기 위하여 p38,

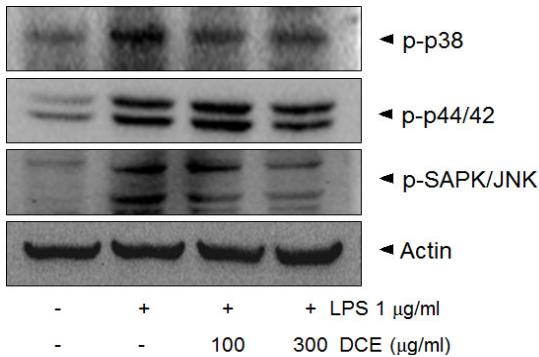


Fig. 7. Effect of DCE on the expression of MAPKs phosphorylation in LPS-activated Raw 264.7 cells.

The levels of p-p38, p-p44/42 and p-SAPK/JNK protein were monitored 30 min after treatment of cells with LPS (1 μ g/ml) in the presence or absence of DCE (i.e. 1 h before LPS). Equal amounts of total protein (50 μ g/lane) were separated by SDS-PAGE. Expressions of MAPK protein were determined by western blotting assay using specific anti-p-p38, anti-p-p44/42 and anti-p-SAPK/JNK antibodies as described in materials and methods. The Actin was used as a loading control.

p44/42 및 SAPK/JNK 단백질의 인산화를 관찰하였다. LPS에 의해 증가하는 3종의 MAPK 인산화 중, DCE는 p-p-44/42는 뚜렷하게 억제하지 못하였으나, p-p38과 p-SAPK/JNK는 100, 300 μ g/ml의 DCE 전 처치에 의해 뚜렷하게 감소하였다(Fig. 7). 이러한 결과는 DCE가 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 MAPK 신호 네트워크를 억제함을 의미한다.

IV. 考 察

胡蘿蔔은 미나리과 식물 胡蘿蔔 (*Daucus carota* var. *sativa*)의 뿌리이다. 性味는 甘平하며, 脾肺經에 入하며, 健脾 消滯하는 효능으로 消化不良, 慢性泄瀉, 慢性痢疾, 咳嗽 등을 치료한다^{1,2)}. 胡蘿蔔에 대한 성미 및 효능은 本草綱目, 日用本草, 本草求原, 本草求真, 本草撮要, 醫林纂要 등 서적에 기재되어 있지만¹⁾, 한 의계에서는 胡蘿蔔에 대한 연구가 많이 이루어지지 않았다.

현재까지의 胡蘿蔔에 대한 연구로는, 胡蘿蔔의 생즙과 메탄올 추출물은 인체폐암세포주 NCI-H1299에 대하여 세포생존율을 억제함이 보고되었고³⁾, 胡蘿蔔의 에틸아세테이트분획은 HepG2, Hela, C6, SW626, MCF-7, NB41A3 등의 암세포주에 대하여 강한 세포 독성을 나타내며^{4,5)}, 胡蘿蔔즙은 항산화능과 DNA 손상억제효과를 지님이 보고되었다⁶⁾.

또한 胡蘿蔔 에탄올추출물은 식중독을 일으키는 *Clostridium perfringens* 세균에 대하여 성장억제효과를 나타내며⁷⁾, Ca²⁺ channel 차단을 통하여 수축기와 이완기의 동맥혈압의 강압효과를 나타냄이 보고되었다⁸⁾.

성분연구로서 胡蘿蔔은 α -, β -, γ -, ϵ -carotene, lycopene, phytofluene 등의 carotinoide와 vitamine B1 (0.1mg%), B2 (0.3mg%), anthocyanidin, 당 3-15%, 지방유 0.7%, 정유 0.014%, umbelliferone을 함유하고 있으며, 정유에는 α -pinene, camphorene,

myrcene, α -phellandrene, bisabolene 등을 함유하는 것으로 알려져 있다^{1,2,9)}. 또한 胡蘿蔔의 잎에는 다량의 carotene, luteolin-7-glucoside가 들어 있으며, 지상부분은 daucine과 pyrrolidine를 함유하고 있으며, 胡蘿蔔子是 flavonoid, 정유 (1.6%), 지방유 (11-13%)를 함유하고 있으며, 정유에는 α -pinene, 1-limonene, 1,8-linole, geraniol, geraniol-acetate, citronellal, citral, caryophyllen, carotol, daucol, P-cymene, asarone, bisabolene 등이 함유되어 있고, 지방유에는 petroselinic acid, palmitic acid, oleic acid, linoleic acid 등의 glyceride와 daucosterol 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다^{1,2)}.

그러나 胡蘿蔔의 염증억제효과 및 이의 기전에 관한 연구는 전무한 실정므로, 본 연구에서는 胡蘿蔔의 염증억제효과 및 기전에 대한 연구를 위하여 에탄올로 추출된 胡蘿蔔 (DCE)이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 나타나는 항염증효과를 평가하고자 하였다.

NO는 반응성이 높은 생체 생성 radical로 nitric oxide synthase에 의해 L-arginine과 O₂로부터 생성되며 신경전달, 혈관의 이완 및 세포매개성 면역 등에서 중요한 역할을 한다²⁵⁾. 일반적으로 LPS에 의해 활성화된 대식세포의 염증반응시에는 NO가 iNOS에 의해 다량 생성된다²⁶⁾. 포유류의 세포에서 NO는 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) 그리고 iNOS 세가지 형태의 NOS에 의해 합성되며²⁷⁻²⁹⁾, 이들 NOS 중 iNOS에 의한 NO 생성이 가장 많은 것으로 알려져 있다. 정상 생리 상태에서의 NO는 신호전달 및 박테리아를 죽이는 등 생리적으로 중요한 역할을 하지만, 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상 등을 일으키므로³⁰⁻³⁴⁾, NO 생성 억제제는 염증반응의 조절제로서의 가능성이 있다.

DCE가 LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 NO에 미치는 영향을 관찰한 결과 DCE는 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 감소하는 경향을 나타내었으며, 300 $\mu\text{g/ml}$ 에서

는 통계적으로 유의하게 감소시켰다(Fig. 1). 또한 DCE는 10-300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다.

DCE가 NO의 생성을 유의하게 억제하였으므로, L-arginine으로부터 NO를 생성하는 iNOS의 발현을 평가하였다. LPS 처치시에는 iNOS 단백질의 발현이 control에 비교하여 105092.0 ± 8986.9 배로 유의하게 증가되었으나, LPS에 DCE 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ 을 처치한 실험군에서는 iNOS의 발현량이 72534.8 ± 29035.2 , 45420.1 ± 16793.6 배로 감소하여, 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 3). 이러한 결과는 DCE의 NO억제는 DCE의 iNOS발현억제에서 기인함을 의미한다.

한편, LPS에 의해 활성화된 대식세포는 TNF- α , IL-1, IL-6, G-CSF, M-CSF, GM-CSF 등의 사이토카인 및 IL-8, MCP-1등의 케모카인의 발현을 증가시킨다³⁵⁾. 이 중 TNF- α 는 주로 대식세포, T-cell로부터 분비되며 endothelial cell, neutrophil을 활성화하여 염증반응을 매개할 뿐만 아니라, hypothalamus에 작용하여 발열을 유도하고 혈관내피세포의 표면에 adhesion molecule의 발현을 유도하는 cytokine이며¹⁶⁾, IL-1 β 는 TNF- α 처럼 염증반응을 매개하고 발열을 유도하는 cytokine으로서, T-cell의 활성화, B-cell의 성숙, NK cell의 활성화에도 관련되어 있으며, hypothalamus에 작용하여 발열을 유도한다^{17,18)}. 또한 화상시 IL-1은 prostaglandins, leukotrienes, platelet-activating factor, NO 등의 매개물질합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다^{36,37)}.

IL-6는 급성기 단백질합성을 촉진하므로 감염, 외상시 수치가 증가하고, B-cell의 분화와 증식을 촉진하고, 항체의 분비를 자극하는 cytokine으로, 염증 부위에서 대부분 높은 수치를 나타내는 것으로도 알려져 있으며^{19,20)}, 염증성 질환에서는 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다¹⁷⁾.

본 연구에서 TNF- α 는 LPS에 의해 control 대비, 35.35 ± 3.50 배로 유의성있게 증가하였으며, DCE의

처치에 의해 26.84 ± 2.17 배로 생성량이 유의하게 감소하였고(Fig. 4), IL-1 β 역시 LPS에서는 control 대비, 2.33 ± 0.01 배로 유의성 있게 증가하였으며, DCE에서는 1.09 ± 0.19 배로 유의하게 감소하였고(Fig. 5), IL-6도 LPS에서는 46.89 ± 1.309 배로 유의성 있게 증가하였으며, DCE에서는 12.85 ± 2.78 배로 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

염증반응시 PGE₂는 arachidonic acid로부터 phospholipase A2 및 COX-2에 의해 생성되며 혈관을 확장시키고 혈관투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로의 화학주성을 증가시키며, 암발생에도 관여하는 것으로 알려져 있으며^{21,22)}, 특히 염증과 관련이 깊은 것으로 알려져 있다^{2,38,39)}.

본 연구에서 LPS는 PGE₂의 생성을 4165.19 ± 106.69 pg/ml로 유의성 있게 증가시켰으며, DCE 300 μ g/ml은 3324.48 ± 76.30 pg/ml로 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 7). 이러한 결과는 DCE가 전염증성물질로 매개되는 염증성 질환을 유의하게 개선시킬 수 있음을 의미한다.

NF- κ B는 염증에 관련되는 iNOS의 발현에 핵심적인 전사조절인자로 알려져 있으며, 대식세포는 LPS의 자극에 의해 NF- κ B pathway가 활성화되어 iNOS나 TNF- α 등의 유전자 발현에 관련한다⁴⁰⁾. NF- κ B는 세포질에서 억제 단백질(I- κ B)과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, 염증반응시 I- κ B가 인산화되면 NF- κ B가 핵으로 이동하여 iNOS, COX-2 등의 전사를 유도하게 된다²³⁾.

본 연구에서 핵 분획에서의 NF- κ B 및 세포질에서의 I- κ B α 와 p-I- κ B α 의 인산화 정도를 평가하였다. 핵분획에서 세포질에서 p-I- κ B α 는 LPS 처치시 유의하게 증가하였으나, DCE를 전처치한 실험군에서는 p-I- κ B α 의 양이 유의하게 감소하였다. 또한 핵 분획에서의 NF- κ B는 LPS 처치에 의해 발현이 증가하였으나, DCE 100, 300 μ g/ml의 전처치에 의하여 NF- κ B 발현량이 감소하였다(Fig. 8). 이러한 DCE에 의한 핵분획에서의 NF- κ B의 감소는 세포질에서의

p-I- κ B α 의 발현이 감소함과, 이와 동일하게 I- κ B α 의 발현이 증가하는 것으로 보아 DCE가 I- κ B α 의 인산화를 억제함에서 기인한다(Fig. 9).

I- κ B α 의 인산화는 세포질의 NF- κ B를 유리하고, 유리된 NF- κ B가 핵으로 이동하여 다양한 염증매개 인자의 발현을 증가시킨다⁴⁰⁾. 이러한 NF- κ B pathway의 활성화에 영향을 주는 대표적인 신호분자는 MAPK이다³⁵⁾. MAPK는 ERK, JNK, p38의 3종으로 주로 인산화되지 않은 상태로 세포질에 존재하다가, LPS등에 의해 염증반응이 활성화되면 인산화되어 핵으로 전위하여 NF- κ B, activator protein-1 등을 포함한 다양한 전사인자들의 활성화를 유도하는 핵심 신호전달 분자로 보고되고 있다²⁴⁾. LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서 DCE 100, 300 μ g/ml은 p38과 SAPK/JNK의 인산화를 뚜렷하게 감소시켰다(Fig. 10). 이러한 결과는 DCE가 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 NF- κ B, MAPK의 억제를 통해 염증매개 반응을 억제함을 의미한다.

V. 結 論

본 연구에서는 胡蘿蔔의 염증억제 효과 및 기전에 대한 연구를 위하여 胡蘿蔔에탄올 추출물(DCE)이 LPS로 활성화된 마우스 대식세포주인 Raw 264.7 세포에 미치는 영향을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DCE는 Raw 264.7 세포에서 LPS에 의해 증가한 NO 생성을 유의하게 억제하였으며, NO를 억제한 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다. 또한 이러한 NO의 감소는 iNOS의 발현억제에서 기인하였다.
2. DCE는 LPS에 의해 증가한 PGE₂ 및 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성을 유의하게 억제하였다.
3. DCE는 LPS에 의해 증가된 I- κ B α 의 인산화를

감소시켰으며, 핵으로의 NF- κ B 전위를 억제하였다.

4. DCE는 LPS에 의해 증가된 p38, SAPK/JNK의 인산화를 억제하였다.

위와 같은 결과로 보아, 胡蘿蔔은 I κ B α 의 인산화를 억제하고 또한 MAPK의 인산화를 일부분 억제하여, NO와 전염증성 cytokine 등의 염증매개물질을 억제하여 항염증효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No.2012-0009400).

參考文獻

1. Kim CM, Shin MG, Ahn DG, Lee GS, Kang BS, Kang SS. The Chinese Herbal Dictionary. Seoul:Jeongdam. 1997;6124-6.
2. Kim TJ. Wild Flowers and Resources Plants in Korea (3). Seoul:SNU Press. 2008;451.
3. Roh SR, Kim DH. Anti-tumor Effect of Carrot(*Ducus carota* L.) Extracts in the Human Lung Cancer Cell Line NCI-H1299. J East Asian Soc Dietary Life. 2002;12:289-98.
4. Han EJ, Roh SB, Bae SJ. Cytotoxicity of *Daucus Carota* L. on Various Cancer Cells. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2000;29:153-60.
5. Jeon EJ, Kim JS, Park YK, Kim TS, Kang MH. Protective Effect of Yellow-Green Vegetable Juices on DNA Damage in Chinese Hamster Lung Cell Using Comet Assay. The Korean Nutrition Society. 2003;36:24-31.
6. Kim M, Kim M, Shin D, Song C, Lee H. Growth-inhibiting effects of vegetable extracts on Beneficial and Harmful Human Intestinal Bacteria. Agric Chem Biotechnol. 2001;44:65-70.
7. Gilani AH, Shaheen F, Saeed SA. Cardiovascular Actions of *Daucus carota*. Arch Pharm Res. 1994;17:150-3.
8. Ha JL, Bae JS, Park MK, Kim YU, Ha SH, Bae JM, et al. Quantitative Analysis of Carotenoids in Carrot Cultivars Produced in Korea. Journal of the Environmental Sciences. 2009;18:1135-41.
9. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*. J Microbiol Biotechnol. 2000;10:8-15.
10. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolitic mechanism of activated macrophages. J Immunol. 1990;144:1425-31.
11. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. Proc Soc Exp Biol Med. 1996;211:24-32.
12. Corbett JA, Mac Daniel ML. Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. J Exp Med. 1995; 181:559-68.
13. Cetkovic-Cvrlje M, Eizirik DL. TNF and IFN γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β

- on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine*. 1994; 6:399-406.
14. Kook YB. Effect of Hwangryunhaedok-tang on Blood Pressure and Renal Functions in Spontaneously Hypertensive Rats. *J of Herbal Prescription*. 2002;10:113-29.
 15. Aeberli D, Oertle S, Mauron H, Reichenbach S, Jordi B, Villiger PM. Inhibition of the TNF-pathway: use of infliximab and etanercept as remission-inducing agents in cases of therapy-resistant chronic inflammatory disorders. *Swiss Med Wkly*. 2002;132:414-22.
 16. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P Neuropeptides. 2003;37:355-61.
 17. The Korean Society of Pathologists, Pathology. Seoul:KMS. 2007;76-108.
 18. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol*. 2001; 159:387-97.
 19. Jirik FR, Podor TJ, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff DJ, Carson DA, et al. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol*. 1989;142:144-7.
 20. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992;6:3051-64.
 21. Grösch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:736-47.
 22. Sohn GH, Kim SH. Antitumor Activity of Bupleuri Radix and Artemisiae capillaris Herba and Synergistic Effect with Anticancer Drugs. *KOMS*. 1995;16:414-32.
 23. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:55-72.
 24. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr*. 2007;137:1616S-20S.
 25. Posadas I, Terencio MC, Guillen I, Ferrandiz ML, Coloma J, Paya M, et al. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000;361: 98-106.
 26. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol*. 1996;10:291-316.
 27. Weisz A, Cicatiello I, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG- monomethyl-L-arginine. *Biochem J*. 1996;316:209-15.
 28. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, et al. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med*. 1993; 178:749-54.
 29. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, et al. Inhibitory effects of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon and lipopolysaccharide. *Gen*

- Pharmacol. 2000;35:21-8.
30. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264,7 macrophages. *Life Sci*, 2001;69:625-35.
 31. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264,7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol*, 2000;406:301-9.
 32. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, et al. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW 264,7 macrophages. *J Ethnopharmacol*, 2001;76:119-23.
 33. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264,7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med*, 2000;28:217-26.
 34. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, 2001;13:85-94.
 35. Wogensen L, Jensen M, Svensson P, Worsaae H, Welinder B, Nerup J. Pancreatic beta-cell function and interleukin-1 β in plasma during the acute phase response in patients with major burn injuries. *Eur J Clin Invest*, 1993;23:311-9.
 36. Takabayashi T, Shimizu S, Clark BD, Beinborn M, Burke JF, Gelfand JA. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. *Surgery*, 2004;135:544-54.
 37. Noh MS, Ha JY, Lee CH, Lee WY, Lee SH, Lee JJ. Inhibitory activities of natural products on lipopolysaccharide induced prostaglandin production in mouse macrophages. *Yakhak Hoeji*, 1998;42:558-66.
 38. Surh YJ. Role of Cyclooxygenase-2 in Carcinogenesis and Its Selective Inhibition for Cancer Chemoprevention. *Molecules and cells*, 2001;13:8-17.
 39. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Brit J Pharmacol*, 2003;139:11-20.
 40. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitinproteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell*, 1996;78:773-85.