

Anti-inflammatory Effect of *Oxya chinensis sinuosa* Ethanol Extract in LPS-induced RAW 264.7 Cells

Young-Il Yoon¹, Mi Yeon Chung¹, Jae-Sam Hwang¹, Tae-Won Goo¹, Mi-Young Ahn¹, Young-Bo Lee¹, Myung-Sea Han² and Eun-Young Yun^{1*}

¹Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Korea

²Department of Bio Materials and Fiber Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received March 14, 2014 / Revised March 17, 2014 / Accepted March 26, 2014

Although the grasshopper *Oxya chinensis sinuosa* has long been used as food in Korea, there is little data on its functional effects. In this study, we investigated the anti-inflammatory effect of *O. c. sinuosa* ethanol extract (OCE) in RAW 264.7 mouse macrophage cells treated with lipopolysaccharide (LPS) for induction of inflammation. First, we determined that there is no cytotoxicity at 2,000 µg/ml or less of OCE in RAW 264.7 cells. To evaluate the anti-inflammatory effects of OCE, we investigated expression levels of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)-α and interleukin (IL)-6, and pro-inflammatory enzymes such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclo-oxygenase-2 (COX-2) in LPS-induced RAW 264.7 cells. In addition, we examined whether OCE could inhibit translocation of NF-κB p65 into the nucleus in LPS induced RAW 264.7 cells. As a result, we found that the mRNA and protein levels of TNF-α and IL-6 decreased in LPS-induced RAW 264.7 cells after treatment with OCE in a dose-dependent manner. In addition, we confirmed a 2,000 µg/ml concentration of OCE inhibited translocation of NF-κB p65 by immunostaining and Western blot analysis, and a decrease in the protein expression levels of iNOS and COX-2. Accordingly, we suppose that OCE has an anti-inflammatory effect through down-regulation of TNF-α, IL-6, iNOS, and COX-2 related to NF-κB p65 inflammatory signaling pathways.

Key words : Cyclo-oxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), lipopolysaccharide, NF-κB p65, *Oxya chinensis sinuosa*, pro-inflammatory cytokine, RAW 264.7 cells

서 론

염증반응은 상처와 외부 이물질의 침입 시 생체를 방어하기 위해 가장 먼저 일어나는 선천성 면역(innate immunity) 반응이며[8], 염증의 작용과 기간에 따라 급성염증과 만성염증 반응으로 나눌 수 있다. 급성염증 반응은 외부 이물질로 인한 자극에 의해 대식세포(macrophage)가 활성화되어 생성된 염증매개물질인 염증성 사이토카인(cytokine), chemokine, nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E2 (PGE2) 등을 생성하여 이들에 의해 활성화된 백혈구와 대식세포에 의해 이물질을 제거한 후 조직재생을 통해 종료된다[22]. 급성염증 반응은 생체를 방어하기 위한 필수적인 반응이지만, 이 반응에서 과도하게 분비된 염증매개물질은 과도한 혈관확장으로 급성 패혈성 쇼크를 일으킬 수 있으며, 면역세포의 지속적인 생존과

활성을 일으켜 만성염증이나 면역과민반응의 원인이 되어 류마치스 관절염과 같은 만성염증질환 및 자가면역질환으로 발전될 수 있으므로[8, 11, 13, 29], 염증반응 조절은 생명현상 유지를 위해 매우 중요하다.

면역세포에는 대식세포, 단핵구, 백혈구 및 비만세포 등이 있으며, 이 중 대식세포는 모든 조직에 존재하며 체내 유입된 염증의 원인을 가장 먼저 인식한 후 염증매개물질을 생성하여 다른 면역세포의 활성화 및 주화성을 유도시켜 염증원인을 제거하고 염증부위를 복구시키는 등 염증과정에 필수적인 역할을 수행한다. 대식세포는 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)에 속해있는 그람 음성세균의 세포벽 성분인 LPS 처리시 표면에 있는 toll like receptor-4 (TLR-4)가 이를 인식한 후 Toll/IL-1 receptor domain (TIR)과 myeloid differentiation primary response gene 88 (MYD88)로 신호를 전달하여 활성화된 MYD88 단백질은 IL-1 receptor associated kinase-4 (IRAK-4)를 TLR-4에 결합시키고 TNF receptor associated factor-6 (TRAF-6)를 유도시킨다. TRAF-6는 IκK (I kappaB kinase)를 활성화시켜 세포질에 존재하는 전사인자인 NF-κB p50/p65에 결합되어 있는 IκB가 분해되어 NF-κB p50/p65는 핵으로 이동된다. 핵으로 이동된 NF-κB p50/p65 전사인자는 염증성 사이토카인인 TNF-α 및 IL-6와

*Corresponding author

Tel : +82-31-290-8576, Fax : +82-31-290-8543

E-mail : yuney@korea.kr

This is an Open-Access article 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.

염증성 효소인 iNOS 및 COX-2를 발현시킨다[3, 9, 12, 22, 25].

TNF- α 는 내분비와 외분비를 통해 자신과 다른 대식세포의 TNF- α 수용체(TNFR)에 리간드(ligand)로 결합하여 NF- κ B p50/p65를 활성화시켜 염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-6와 iNOS, COX-2를 발현시킨다[7, 9, 22, 25]. IL-6는 JAK-STAT (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription) 신호전달과정을 활성화시켜 백혈구와 후천성 면역(acquired immunity)과 관련된 림프구인 T 및 B 세포를 자극하여 급성염증을 만성염증으로 전환시킨다[5, 30]. NO는 iNOS에 의해 생성되며 정상적인 상태에서는 방어작용과 신경전달물질 및 혈관 조절 등의 기능을 하지만 염증과정에서 대량 생성된 NO는 급성 패혈성 쇼크를 일으킬 수 있으며 강한 독성을 갖고 있어 다양한 세포 및 조직에 손상을 일으켜 만성염증과 자가면역질환의 원인이 된다[12, 14]. COX-2는 세포막의 인지질에서 유래한 아라키돈산(arachidonic acid)을 PGE2로 전환시켜 혈관확장과 투과성을 증가시키고, 감각신경세포에 작용하여 통증을 생성시키는 등 염증 반응에 매우 중요한 역할을 수행한다[6, 17, 27].

벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*)는 우리벼메뚜기라고도 불리는 메뚜기목 메뚜기과 벼메뚜기속의 불안전변태 곤충으로 몸길이는 21~35 mm이고 8~10월에 출현하며, 국내에서 오랫동안 식용으로 이용되어 왔다[18]. 하지만, 벼메뚜기의 기능성에 대한 연구는 산화적 스트레스를 유도한 신경아중 세포주인 SH-SY5Y에 대한 항산화 활성과 COX-2 전사 억제에 대한 보고 외에는 전무한 실정이다[19]. 이에 본 연구에서는 식용으로 이용되는 벼메뚜기에 대한 기능성 연구의 일환으로 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에 벼메뚜기 에탄올 추출물을 처리하여 벼메뚜기의 항염증 효능을 검증하였다.

재료 및 방법

벼메뚜기 및 강황 추출물 제조

추출물 제조를 위해 사용된 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*)는 강원도 영월군 영월읍 영흥리에서 채집된 것을 사용하였고 양성대조군으로 사용한 강황은 시중에서 판매되고 있는 국내산 건조 강황(*Curcuma longa*)을 구매하였다. 벼메뚜기 및 강황은 흐르는 물에 2회 세척한 후, 동결 건조기(Eyela, Japan)를 이용하여 건조시켜 수분을 제거하고 다기능 분쇄기(Korea Medi, Korea)로 분쇄하여 분말을 제조하였다. 분말 현탁액 제조를 위해 분말을 70% 에탄올에 용해시킨 후 초음파 파쇄기(LabaX, MA, USA)로 230 jule, 20초간 파쇄 후 4500 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 회수한 상층액을 0.25 μ m syringe filter (Whatman, ND, USA)로 여과 후 건조하여 시료로 사용하였다.

세포 생존률 분석

RAW 264.7 세포는 penicillin-streptomycin 100 unit/ml과 10% fetal bovine serum (Gibco, MD, USA)이 함유된 Duplecco's Modified Eagle Medium (Gibco, MD, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (Thermo Scientific, IL, USA)에서 배양하였으며, 2일 간격으로 계대 배양을 실시하였다. 세포 생존율 측정을 위해 RAW 264.7 세포를 2 \times 10⁵ cells/ml로 96 well plate에 분주하고 벼메뚜기 추출물을 농도별(100, 500, 1,000, 2,000 μ g/ml)로 처리 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. CellTiter 96[®] aqueous non-radioactive cell proliferation assay reagent (Promega, WI, USA)를 첨가한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 반응시켜 microplate reader (Beckman Coulter, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 측정하였다.

Real-time PCR 분석

염증성 사이토카인 유전자의 전사(transcription)에 미치는 OCE의 효과를 검증하기 위해서 real-time PCR을 수행하였다. 100 ng/ml의 LPS (Sigma, MO, USA)로 RAW 264.7 세포를 자극하고, OCE를 농도별(100, 500, 1,000, 2,000 μ g/ml)로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 세포를 PBS로 2회 세척 후 trizol reagent (Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 세포에서 total RNA를 추출한 후, high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, IL, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 Power SYBR[®] Green Maser Mix (Applied Biosystems, IL, USA)를 이용하여 7500 Real-time Thermal Cycler (Applied Biosystems, IL, USA)를 통해 TNF- α 및 IL-6 유전자를 증폭시켰으며, 이때 사용한 프라이머(primer)는 Table 1에 나타내었다. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 endogenous control로 사용하여 GAPDH 대비 TNF- α 및 IL-6 mRNA의 발현량을 ddCT method를 통해 상대정량 분석하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 분석

TNF- α 및 IL-6와 같은 염증성 사이토카인 생성에 미치는 OCE의 효과를 검증하기 위해서 100 ng/ml의 LPS로 RAW

Table 1. Sequences of primer used in real-time PCR analysis

	Name	Sequences
GAPDH	Forward	5'-GCCTCACCCCATTTGATGTT-3'
	Reverse	5'-GGGAAGCCCATCACCATCT-3'
IL-6	Forward	5'-TTGGGAGTGGTATCCTCTGT-3'
	Reverse	5'-CCACGGCCTTCCCTACTTC-3'
TNF- α	Forward	5'-ACAGCACCGCAGTACCTGAG-3'
	Reverse	5'-CCACGGCCTTCCCTACTTC-3'

264.7 세포를 자극하고, OCE를 농도 별(100, 500, 1,000, 2,000 µg/ml)로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 이 후 배양액을 회수하여 TNF-α 및 IL-6 ELISA kit (Thermo Scientific, IL, USA)을 이용하여 TNF-α 및 IL-6의 사이토카인 생성량을 microplate reader (Beckman Coulter, CA, USA)를 통해 450 nm의 파장에서 측정하였다.

NF-κB p65 면역형광염색

LPS에 의해 활성화되는 염증관련 전사인자 NF-κB p65에 대한 OCE의 효능을 검증하기 위해서 LPS (Sigma, MO, USA) 100 ng/ml의 농도로 RAW 264.7 세포를 자극하고, OCE를 농도별(100, 2,000 µg/ml)로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양하였다. 배양된 세포는 phosphate buffered saline (PBS) (Sigma, MO, USA)으로 2회 세척 후 formaldehyde (Sigma, MO, USA)를 이용하여 상온에서 25분 동안 세포를 고정시켰다. 고정된 세포는 계면활성제인 0.01% Triton X-100 (Sigma, MO, USA)을 이용하여 항체의 세포막 투과성을 증대시킨 다음 5% horse serum (Vector Labs, CA, USA)을 이용하여 상온에서 1시간 동안 blocking 과정을 수행하였다. NF-κB p65 1차 항체(Santa Cruz, CA, USA)를 1:1,000의 비율로 희석하여 4°C에서 밤새 배양 후 상온에서 PBS로 10분씩 4회 세척하고 1:2,000의 비율로 희석한 2차 항체 alexa fluor 488 (Molecular Probes, MD, USA)로 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응된 세포는 PBS로 상온에서 10분씩 4회 세척 후 VECTA SHIELD (Vector Labs, CA, USA) 용액과 함께 슬라이드글라스에 부착시켜 DMI6000B 형광현미경(Leica, NJ, USA)을 이용하여 확인하였다.

Western blot 분석

염증성 효소인 iNOS와 COX-2의 생성에 미치는 OCE의 효과를 검증하기 위해 100 ng/ml 농도의 LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 세포에 OCE를 100, 500, 1,000, 2,000 µg/ml의 농도로 처리하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양 후 세포에서 단백질을 분리하여 Western blot 분석을 수행하였다. 세포를 PBS로 2회 세척 후 cell scraper (SPL Life Science, Korea)로 모은 다음 Cytobuster™ Protein Extraction Reagent (Novagen, ND, USA)를 이용하여 세포를 분쇄한 후, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액은 Bio Rad Protein Assay (Bio Rad, CA, USA)로 농도를 측정하고 10 µg/ml의 농도로 맞춘 후 10% SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동 후 PVDF membrane (GE Healthcare, NJ, USA)에 transfer하고, Blotting Grade Blocker (Bio Rad, CA, USA)를 TBST에 녹여 5%의 농도로 만든 다음 이를 이용하여 PVDF membrane을 1시간 동안 상온에서 blocking시켰다. 1차 항체 COX-2 (Santa Cruz, CA, USA)와 iNOS (Abcam, MA, USA)는 1:1,000으로, β-Actin (Sigma, MO, USA)은

1:10,000의 비율로 희석하여 4°C에서 밤새 반응시킨 후 다음 날 TBST로 15분씩 4번 세척하였다. 2차 항체 HRP-conjugated secondary antibody (Promega, WI, USA)는 1:3,000의 비율로 40분 동안 상온에서 반응 시킨 후 다시 TBST로 15분씩 4번 세척하였다. Western Lightning® Plus ECL (Perkin Elmer, MA, USA)을 PVDF membrane에 처리 후 암실에서 X-ray 필름(Fujifilm, Japan)으로 감광시켜 iNOS와 COX-2의 단백질 발현량을 확인하였다.

결과 및 고찰

세포 독성 여부 확인

벼메뚜기 에탄올 추출물(OCE)을 RAW 264.7 대식세포에 농도별(100, 500, 1,000, 2,000 µg/ml)로 처리한 후 MTS assay로 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과 OCE는 2,000 µg/ml의 농도까지 세포 생장에 영향을 주지 않아 독성이 없음을 확인하였다. 본 실험에서는 기존에 항염증 효능이 보고된 강황(*Curcuma longa*)을 양성대조군으로 사용하였으며[1], 강황은 본 실험에서 사용한 벼메뚜기 시료와 동일한 방법으로 에탄올 추출물(CLE) 제조 후 1,000 µg/ml의 농도까지 세포독성이 나타나지 않음을 확인하였다(Fig. 1). 따라서, 본 연구에서 사용한 OCE 및 CLE의 최고 농도는 각각 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않는 2,000 및 1,000 µg/ml로 사용하였다.

OCE의 염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향 분석

OCE의 항염증 효능을 분석하기 위해 RAW 264.7 세포에 LPS로 염증 유도 후 OCE를 처리하고 염증성 사이토카인의 발현을 전사체 및 단백질 수준에서 각각 real-time PCR 및 ELISA에 의해 확인하였다(Fig. 2, Fig. 3). PAMPS의 일종인

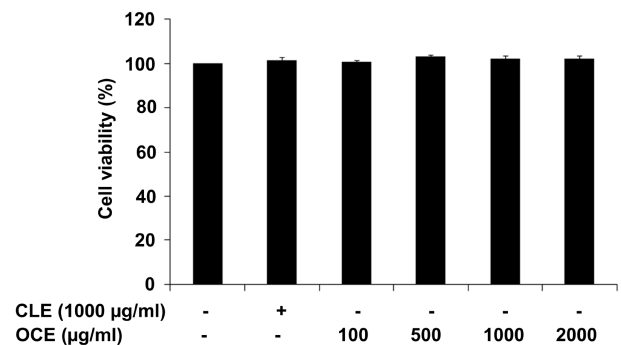


Fig. 1. Viability of RAW 264.7 cells after treatment with OCE (*Oxya chinensis sinuosa* ethanol extract) and CLE (*Curcuma longa* ethanol extract) for 24 hr. Cell viability was determined by (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) tetrazolium (MTS) colorimetric assay. OCE has no cell toxicity at 2,000 µg/ml concentration. The values are expressed as means ± SD (n=4).

LPS 처리시 대식세포 표면에 존재하는 TLR-4가 이를 인식하고 활성화되어 염증매개물질을 발현시키므로[9, 22, 25], 우선 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6에 대한 발현량을 전사체 수준에서 확인하였다. TNF- α 의 경우 LPS 처리시 LPS 무처리군에 비해 약 7.5배 발현량이 증가되었고, LPS와 2,000 μ g/ml OCE 동시처리시 LPS 단독처리군에 대비 약 3.3배 유전자 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). IL-6는 LPS 단독처리군에서 무처리군 대비 약 21.4배 유전자 발현이 증가되었고, LPS와 2,000 μ g/ml OCE 동시처리시 LPS 단독처리 군에 비해 약 10.4배 발현이 억제됨을 확인하였다(Fig. 2B). 양성대조군으로 사용된 CLE의 경우 세포 독성을 나타내지 않는 1,000 μ g/ml의 농도로 LPS와 동시 처리시 LPS 단독처리군 대비 TNF- α 는 약 2.8배, IL-6는 약 1.7배 발현이 감소되었고, 동일농도의 OCE와 LPS 동시처리시 TNF- α 는 약 3.1배, IL-6는 약 2.4배 발현이 감소되었으므로 염증이 유도된 대식세포에서 OCE가 CLE보다 염증성 사이토카인 발현을 보다 강하게 억제함을 확인할 수 있었다.

또한, LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 OCE를 농도별

(100, 500, 1,000, 2,000 μ g/ml)로 처리한 후 배양액 내에서의 ELISA 분석을 통해 염증성 사이토카인의 단백질 발현 후 세포 외 분비량을 확인한 결과, OCE 처리에 의해 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다. LPS 처리 시 LPS 무처리군에 비해 TNF- α 는 약 59.7배, IL-6는 약 34.6배 증가됨을 확인할 수 있었다. 2,000 μ g/ml OCE 처리 시 LPS 단독처리군에 비해 TNF- α 는 약 10.8배, IL-6는 약 7.9배 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 양성대조군으로 사용된 1,000 μ g/ml CLE 처리시 LPS 단독처리군에 비해 TNF- α 는 약 1.9배, IL-6는 약 2.4배 감소됨을 확인할 수 있었다. 한편 동일 농도인 1,000 μ g/ml OCE 처리시 LPS 단독처리군에 비해 TNF- α 는 약 4.6배, IL-6는 약 2.5배 감소됨을 확인함으로써, 전사체 발현뿐만 아니라 단백질 발현 후 세포 외 분비량 또한 OCE 처리시 CLE 처리시 보다 감소됨을 확인할 수 있었다.

TNF- α 는 주로 활성화된 대식세포에서 생성되어 염증반응에서 다른 면역세포의 TNFR에 결합하여 염증매개물질의 발현을 증가시키는 등의 역할을 수행하고[6, 7], IL-6는 IL-6 수용체(receptor)에 결합하여 후천성면역과 관계된 림프구를 활

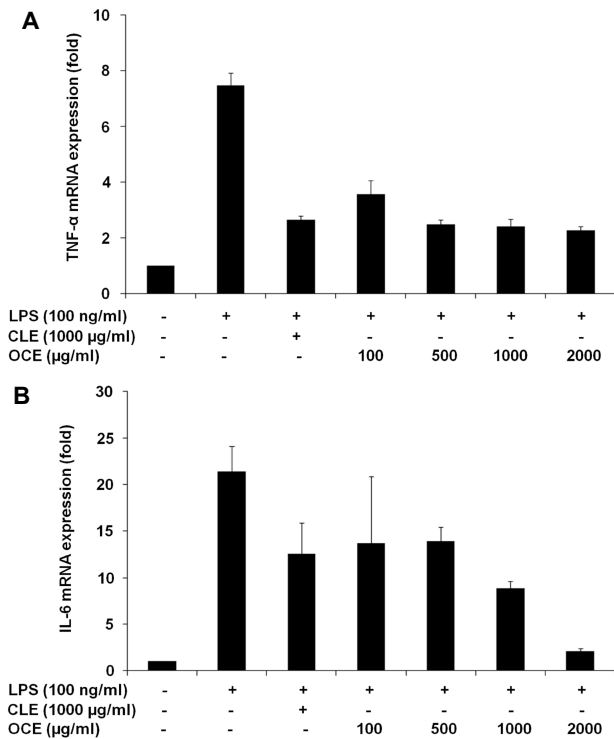


Fig. 2. Effect of OCE (*Oxya chinensis sinuosa* ethanol extract) on TNF- α (A) and IL-6 (B) mRNA expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were co-treated with OCE (100-2,000 μ g/ml) and with or without LPS (100 ng/ml) for 24 hr. TNF- α and IL-6 mRNA expression were decreased in LPS-induced RAW 264.7 cells after treatment with OCE in a dose-dependent manner. The values are expressed as means \pm SD (n=4).

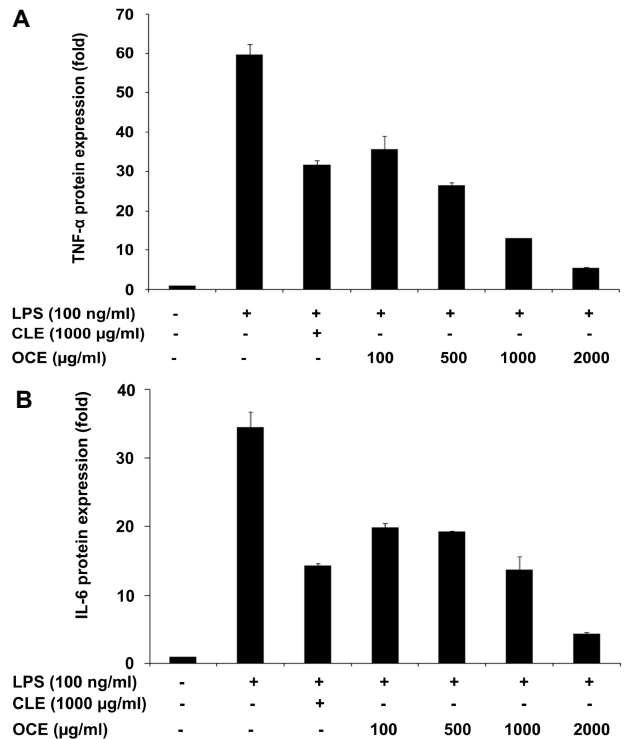


Fig. 3. Effect of OCE (*Oxya chinensis sinuosa* ethanol extract) on LPS-induced TNF- α (A) and IL-6 (B) protein expression on in RAW 264.7 cells. The cells were co-treated with OCE (100-2,000 μ g/ml) and with or without LPS (100 ng/ml) for 24 hr. TNF- α and IL-6 protein expression were decreased in LPS-induced RAW 264.7 cells after treatment with OCE in a dose-dependent manner. The values are expressed as means \pm SD (n=4).

성화시키는 역할을 한다[5, 30]. 그러나 과도하게 분비된 TNF- α 및 IL-6는 면역계 항상성의 불균형을 초래하여 다양한 세포와 조직에 기능저해를 일으켜 제 2형 당뇨, 염증성 장질환, 류마치스 등과 같은 만성염증 및 자가면역질환을 유발할 수 있으므로 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 생성을 조절할 수 있는 물질은 만성염증 및 자가면역질환에 대한 치료제로 사용될 수 있다[4, 5, 22, 30]. 본 연구에서 사용한 OCE는 염증매개물 중 하나인 염증성 사이토카인을 강하게 억제하므로 항염증 효능을 갖고 있을 뿐만 아니라 OCE 처리시 기존에 항염증 효능이 보고된 강황을 동일한 농도로 처리한 경우 보다 TNF- α 및 IL-6 분비량이 감소됨을 확인할 수 있으므로 천연물 유래 항염증 물질로 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

OCE의 NF- κ B p65 활성화 억제 확인

OCE 처리 후 LPS 및 TNF- α 에 의해 활성화되며 신호전달 과정에서 염증매개물질의 상류에 존재하는 전사인자 NF- κ B p65의 활성화 억제 여부를 확인하기 위해 LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 세포에 OCE를 농도별(100, 2,000 μ g/ml) 처리 후 면역형광염색을 통해 NF- κ B p65의 세포 내 위치를 확인하였다. NF- κ B p65는 염증이 유도되지 않을 경우에는 I κ B α 와 결합된 상태로 세포질에 존재하여 염증매개물질관련 유전자 전사를 활성화시킬 수 없지만, LPS 및 TNF- α 에 의한 신호전달이 활성화 되면 I κ B α 가 분해되고 NF- κ B p65가 핵으로 이동하여 염증매개물질 유전자의 프로모터에 존재하는 NF- κ B element에 결합하여 전사를 활성화 시킨다[9, 25].

염증 유도된 RAW 264.7 세포에 2,000 μ g/ml OCE 처리 후 NF- κ B p65 항체로 면역형광염색 결과 NF- κ B p65는 대부분 핵으로 이동되지 않고 세포질에 존재하였으므로 OCE에 의해 NF- κ B p65 활성화가 억제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한 NF- κ B p65 활성이 억제되었으므로 IL-1 β 와 같은 다른 염증성 사이토카인이나 면역세포의 주화성을 증가시키는 chemokine 등의 생성도 추가로 차단할 것이라 추정된다.

OCE의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 확인

LPS 처리시 대식세포 표면에 있는 TLR-4 (toll like receptor-4)에 의해 활성화되어 발현되는 염증성 효소인 iNOS와 COX-2의 발현 억제를 통한 항염증 효능을 확인하기 위해, LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 세포에 OCE를 100, 500, 1,000, 2,000 μ g/ml의 농도로 처리한 후 iNOS와 COX-2 단백질 발현량을 Western blot 분석을 통해 확인하였다. iNOS와 COX-2 단백질 모두 2,000 μ g/ml OCE 처리시 단백질 발현이 현저히 감소된 것을 확인하였다(Fig. 5).

NO는 염증반응에서 혈관확장과 외부 이물질에 대한 방어 기능을 수행하지만[23, 30], 염증성 사이토카인에 의해 과도하게 분비된 NO는 DNA손상, 염증매개물 과다 생성을 통한 염증 증폭, 과도한 혈관확장으로 인한 패혈성 쇼크, 강한 세포독

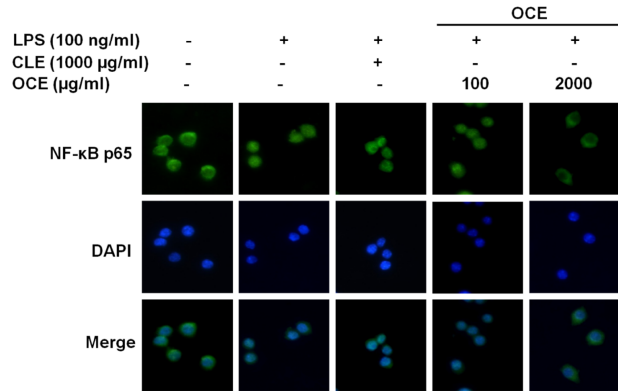


Fig. 4. Effect of OCE (*Oxya chinensis sinuosa* ethanol extract) on LPS-induced NF- κ B p65 translocation into the nucleus. The cell were co-treated with OCE (100, 2,000 μ g/ml) and with or without LPS (100 ng/ml) for 1 hr. The 2,000 μ g/ml concentration of OCE inhibited on LPS induced NF- κ B p65 translocation into the nucleus.

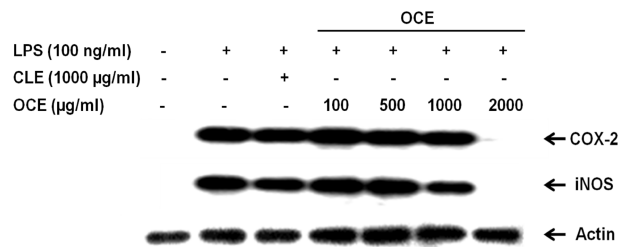


Fig. 5. Effect of OCE (*Oxya chinensis sinuosa* ethanol extract) on COX-2 and iNOS protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cell were co-treated with OCE (100-2,000 μ g/ml) and with or without LPS (100 ng/ml) for 24 hr. The 2,000 μ g/ml concentration of OCE decreased COX-2 and iNOS protein expression.

성으로 인한 세포 및 조직 괴사, 기능장애 등을 일으켜 만성염증 및 자가면역질환의 원인이 될 수 있다[16, 23, 24, 26]. 또한 NO는 COX-2와 함께 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)의 생성량을 크게 증가시켜 혈관신생(angiogenesis) 효과를 통해 종양생성에도 밀접한 관계가 있음이 보고되었다[17].

염증반응에서 생성된 NO는 iNOS 생성량을 통해 간접적으로 확인할 수 있으므로[24], 본 연구에서는 염증 유도된 RAW 264.7 세포에 OCE 처리 후 Western blot 분석을 통해 iNOS 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과 2,000 μ g/ml OCE 처리시 iNOS가 거의 발현되지 않음을 확인할 수 있었으며, iNOS의 발현은 LPS에 의한 NF- κ B p65의 활성화에 의해 유도되기 때문에 이 농도에서 NF- κ B p65의 활성이 차단되어 iNOS의 발현 감소가 이루어진 것으로 추정되었다(Fig. 3, Fig. 4).

NF- κ B p65와 NO에 의해 생성된 COX-2는 염증과정에서 인지질을 대사시켜 생성된 아라키돈산에서 PGE2를 생성시키는 효소이고, COX-2에 의해 생성된 PGE2는 혈관확장, 통

증 및 발열작용을 수행한다[3]. 염증 유도된 RAW 264.7 세포에 2,000 µg/ml OCE 처리 시 COX-2가 감소된 이유는 이 농도에서 NF-κB p65의 활성화 억제를 통해 TNF-α 및 NO를 생성하는 효소인 iNOS 단백질 발현이 현저히 감소되었기 때문으로 추정된다.

비스테로이드성 진통제(non-steroidal anti-inflammatory drug; NSAID)의 일종인 아스피린과 indomethacin이 COX-2의 발현 억제를 통해 항염증 효능이 있음이 발견된 이후[28], 많은 NSAID가 발명되어 항염증 치료제로 사용되어 왔다[15]. 그러나 최근 연구에 의하면 NSAID 장기 투여 시 위장과 신장의 기능저하를 일으키며 특히, 혈관을 확장시키는 PGE2와 prostacyclin의 생성을 억제하여 심혈관과 관련된 여러 부작용이 보고되고 있다[10, 13]. 따라서 최근에는 천연물 유래의 COX-2 억제제가 NSAID에 비해 생체에 잘 흡수되고 대사되므로 부작용이 좀 더 적을 것으로 판단하여[6], 우유영경귀 유래의 silymarin과 천연허브 6종을 혼합하여 만든 신바로(shinbaro) 등과 같은 천연물에서 COX-2 억제제를 찾으려는 노력이 진행되고 있다[2, 13]. 따라서 본 연구에서 이용한 벼메뚜기 추출물(OCE)은 곤충 유래 천연물이며 TNF-α와 IL-6와 같은 염증성 사이토카인과 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하고 NF-κB p65의 활성화를 억제하므로 천연물 유래 항염증 물질로 개발될 수 있을 것이라 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청에서 지원하는 어젠다 프로그램(PJ008706, PJ010022) 및 농림수산식품부에서 지원하는 2011년도 생명산업기술개발사업(311006-3)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

- Arora, R. B., Kapoor, V., Basu, N. and Jain, A. P. 1971. Anti-inflammatory studies on *Curcuma longa* (turmeric). *Indian J Med Res* **59**, 1289-1295.
- Ahmadi-Ashtiani, H. R., Rastegar, H. and Arkam, M. 2013. The inhibitory effect of silymarin on cell viability and cellular COX-2 and iNOS level in HepG2 cell line. *Health Med* **7**, 2008-2014.
- Baldwin, A. S. Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**, 649-683.
- Brennan, F. M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R. and Feldmann, M. 1989. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* **2**, 244-247.
- Gabay, C. 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* **8**, S3.
- Cerella, C., Sobolewski, C., Dicato, M. and Diederich, M. 2010. Targeting COX-2 expression by natural compounds: a promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy. *Biochem Pharmacol* **15**, 1801-1815.
- Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J. G. and Tak, P. P. 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* **117**, 244-279.
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, P. S. and Girardin, S. E. 2007. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol* **147**, 227-235.
- Giuliani, C., Napolitano, G., Bucci, I., Montani, V. and Monaco, F. 2001. NF-κB transcription factor: role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune, and neoplastic diseases and therapy implications. *Clin Ter* **152**, 249-253.
- Howes, L. G. 2007. Selective COX-2 inhibitors, NSAIDs and cardiovascular events - is celecoxib the safest choice? *Ther Clin Risk Manag* **3**, 831-845.
- Iwalewa, E. O., McGaw, L. J., Naidoo, V. and Eloff, J. N. 2007. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytochemicals of south african origin used to treat pain and inflammatory conditions. *Afr J Biotechnol* **6**, 2868-2885.
- Kang, C. H., Choi, Y. H., Choi, I. W., Lee, J. D. and Kim, G. Y. 2011. Inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, and TNF-α expression by aqueous extract of *Orixa Japonica* in RAW 264.7 cells via suppression of NF-κB activity. *Trop J Pharm Res* **10**, 161-168.
- Lee, S. Y., Kwon, H. K. and Lee, S. M. 2011. SHINBARO, a new herbal medicine with multifunctional mechanism for joint disease: first therapeutic application for the treatment of osteoarthritis. *Arch Pharm Res* **34**, 1773-1777.
- Miyataka, M., Rich, K. A., Ingram, M., Yamamoto, T. and Bing, R. J. 2002. Nitric oxide, anti-inflammatory drugs on renal prostaglandins and cyclooxygenase-2. *Hypertension* **39**, 785-789.
- Mitchell, J. A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R. J. and Vane, J. R. 1993. Selectivity of nonsteroid anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclo-oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11693-11697.
- Monaco, C., Andreakos, E., Kiriakidis, S., Mauri, C., Bicknell, C., Foxwell, B., Cheshire, N., Paleolog, E. and Feldmann, M. 2004. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 5634-5639.
- Nakanishi, M. and Rosenberg, D. W. 2013. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol* **35**, 123-137.
- Paek, M. K., Hwang, J. M., Jung, K. S., Kim, T. W., Kim, M. C., Lee, Y. J., Cho, Y. B., Park, S. W., Lee, H. S., Ku, D. S., Jeong, J. C., Kim, K. G., Choi, D. S., Shin, E. H., Jwang, J. H., Lee, J. S., Kim, S. S. and Bea, Y. S. 2010. *Checklist of Korean Insects*, pp. 36, Nature and Ecology:

- Seoul, Korea.
19. Park, J. Y., Heo, J. C., Woo, S. U., Yun, C. Y., Kang S. W., Hwang, J. S. and Lee, S. H. 2006. Anti-inflammatory and cellular protective effects on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity of grasshopper extracts. *Korean J Food Preserv* **13**, 796-802.
 20. Rajendram, R., Saraswathy, S. and Rao, N. A. 2007. Photoreceptor mitochondrial oxidative stress in early experimental autoimmune uveoretinitis. *Br J Ophthalmol* **91**, 531-537.
 21. Rao, C. V., Indranie, C., Simi, B., Manning, P. T., Connor, J. R. and Reddy, B. S. 2002. Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* **62**, 165-170.
 22. Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 24.
 23. Salvemini, D., Milko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. and Needleman, P. 1993. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 7240-7244.
 24. Shafran, Y., Zurgil, N., Afrimzon, E., Tauber, Y., Sobolev, M., Shainberg, A. and Deutsch, M. 2012. Correlative analyses of nitric oxide generation rates and nitric oxide synthase levels in individual cells using a modular cell-retaining device. *Anal Chem* **84**, 7315-7322.
 25. Tak, P. P. and Firestein, G. S. 2001. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* **107**, 7-11.
 26. Swierkosz, T. A., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Botting, R. M. and Vane, J. R. 1995. Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. *Br J Pharmacol* **114**, 1335-1342.
 27. Hink, U. and Münzel, T. 2006. COX-2, another important player in the nitric oxide-endothelin cross-talk: good news for COX-2 inhibitors? *Circ Res* **98**, 1344-1346.
 28. Vane, J. R. 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. *Nature* **231**, 232-235.
 29. Vlassara, H. 2005. Advanced glycation in health and disease role of the modern environment. *Ann N Y Acad Sci* **1043**, 452-460.
 30. Wang, X., Luo, Y., Liao, W. B., Zhang, J. and Chen, T. M. 2013. Effect of osteoprotegerin in combination with interleukin-6 on inhibition of osteoclast differentiation. *Chin J Traumatol* **16**, 277-280.

초록 : LPS로 유도된 RAW 264.7세포에 대한 버메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*) 에탄올 추출물의 항염증 효과

윤영일¹ · 정미연¹ · 황재삼¹ · 구태원¹ · 안미영¹ · 이영보¹ · 한명세² · 윤은영^{1*}

(¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부, ²경북대학교 농생명과학대학 바이오섬유소재학과)

본 연구에서는 버메뚜기 에탄올 추출물의 항염증 효능을 분석하기 위해 LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 세포를 이용하였다. OCE의 항염증 효능을 확인 하기 위해서, 염증 유도된 RAW 264.7 세포에 대해 OCE 농도 의존적으로 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 유전자발현 및 단백질 생성을 감소시킴을 real-time PCR과 ELISA로 확인하였다. 또한, NF- κ B p65의 핵으로 이동이 차단됨을 면역형광염색으로 확인하였으며, iNOS와 COX-2 단백질 발현을 감소시키는 것을 Western blot 분석으로 확인하였다. 이상의 연구결과를 통해 버메뚜기는 염증에 의한 NF- κ B p65의 활성화와 TNF- α 와 IL-6의 생성과 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하는 항염증 효능을 갖고 있는 것을 확인하였다.