

Rosmarinic acid와 luteolin의 항염증에 대한 상승효과

조병옥¹ · 윤홍화¹ · 방승주² · 하혜옥² · 김상준³ · 정승일³ · 장선일^{1,2,*}

¹(주)아토크엔에이, ²전주대학교 보건관리학과, ³(재)전주생물소재연구소

Synergistic Anti-inflammatory Effect of Rosmarinic Acid and Luteolin in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Macrophage Cells

Byoung Ok Cho¹, Hong Hua Yin¹, Chong Zhou Fang², Hye Ok Ha², Sang Jun Kim³, Seung Il Jeong³, and Seon Il Jang^{1,2,*}

¹Ato Q&A Corporation Jeonju

²Department of Health & Science, Jeonju University

³Jeonju Biomaterials Institute Jeonju

Abstract The aim of this study was to investigate the synergistic anti-inflammatory effect of rosmarinic acid (RA) and luteolin from perilla (*Perilla frutescens* L.) leaves in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages. A combination of RA and luteolin more strongly inhibited the production of nitric oxide (NO), inducible NOS (iNOS), prostaglandin E₂ (PGE₂), and COX-2 than higher concentrations of RA or luteolin alone in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. The combined RA and luteolin synergistically inhibited the production of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 β (IL-1 β), in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Furthermore, combined RA and luteolin more strongly suppressed NF- κ B activation than RA or luteolin alone, by inhibiting the degradation of inhibitor of NF- κ B (I κ B)- α and nuclear translocation of the p65 subunit of NF- κ B in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Collectively, these results suggest that RA and luteolin in combination exhibit synergistic effects in suppression of LPS-induced inflammation in RAW264.7 macrophages.

Keywords: perilla leaf, rosmarinic acid, luteolin, anti-inflammation, synergistic effect

서 론

염증(inflammation)은 물리적인 상처나 미생물에 감염되었을 때 일어나는 정상적인 생체의 방어기전(defense mechanism)의 일종이며 이 염증작용을 통하여 병원체(pathogen)를 중화시키거나 제거하고, 손상된 조직을 복구시켜 정상적인 구조와 기능을 하게 한다(1). 염증을 동반하는 대부분의 질환은 조직의 손상, 통증 및 가려움증과 같은 삶의 질을 떨어뜨리는 결과를 초래하고(2), 만성적인 염증상태는 관절염, 천식, 뇌와 척수의 다발성 경화증, 염증성 장질환 및 동맥 경화증을 일으킨다(3). 대식세포는 선천면역을 담당하는 주요세포로, 사이토카인 및 박테리아 lipopolysaccharide (LPS) 같은 수많은 인자에 의해 활성화 되고, 활성화된 대식세포는 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 같은 염증 인자는 물론 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) 같은 전염증성 인자를 생산한다. NO는 free radical의 일종으로 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 합성되며, endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS) 및 inducible NOS (iNOS) 세 개의 isoform이 존재한다(4). IL-1,

TNF- α , interferon-gamma 같은 전염증성 사이토카인들은 iNOS 발현을 유발하고 NO 생산을 일으킬 수 있다. 뇌암, 유방암, 폐암, 전립선암, 췌장암 및 흑색종 같은 많은 악성암들이 iNOS 발현과 연관되어 있고, 과도한 NO의 생산은 상피세포암, 돌연변이 및 DNA 구조 손상을 일으킬 수 있다(5). 일반적으로 COX 단백질은 COX-1과 COX-2 두가지 isoforms으로 존재하고, 염증반응동안 COX-2에 의해 PGE₂가 생성된다(6). 또한 COX-2의 발현은 세포손상(6), 고통, 부종 및 열(7), 신생혈관 형성 및 전이 같은 종양생성(5)과 깊은 관련이 있다. NF- κ B는 염증반응에서 중요한 역할을 하는 전사인자이다. LPS와 반응하여 대식세포는 Toll-like receptor 4 (TLR4)에 의한 myeloid differentiation factor (Myd88)을 활성화한다. 활성화된 Myd88은 transforming growth factor- β -activated protein kinase 1 (TAK1)을 활성화하고, TAK1은 inhibitor of NF- κ B (I κ B)의 degradation을 통해서 NF- κ B를 활성화시킨다. 이를 통해 NF- κ B는 최종적으로 염증 매개 인자들을 분비하여 염증을 일으킨다(8). 따라서, 이러한 염증 매개 인자의 효율적인 억제에는 식물유래 화합물의 항염증 억제 개발의 중요한 targets 및 전략으로 여겨진다.

들깨(*Perilla frutescens* L.)는 동아시아에 자생하는 꿀풀과에 속하는 일년생 초본 식물로(9), 종자는 주로 식용 기름 및 차, 죽, 제과 등에 이용되며, 잎은 신선채소, 절임 및 통조림 등에 활용되고 있다(10). 지금까지 들깨는 항 돌연변이, 항산화, 체지방과 중성지방 감소, 인지 기능 개선, anti-infections, 항염, 항알러지, 항암 등에 활성이 있다고 알려져 있다(9,11). 들깨의 기능 성분으로는 주성분인 rosmarinic acid를 비롯하여, luteolin, caffeic acid,

*Corresponding author: Seon Il Jang, Department of Health & Science, Jeonju University, Jeonju, Jeonbuk 560-759, Korea
Tel: 82-63-220-3124
Fax: 82-63-220-2054
E-mail: sonjjang@jj.ac.kr
Received November 25, 2014; revised December 18, 2014;
accepted December 21, 2014

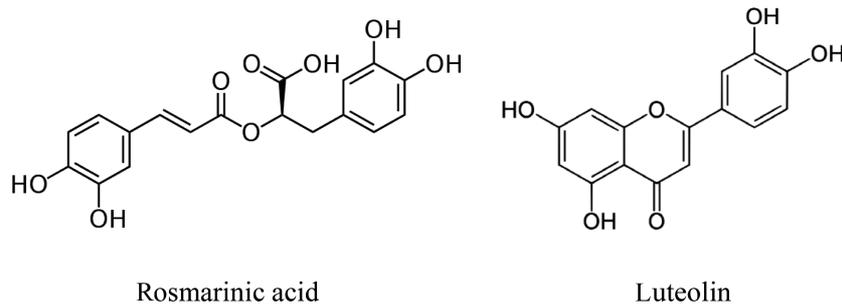


Fig. 1. The structure of rosmarinic acid and luteolin from perilla (*P. frutescens*) leaves.

apigenin, ferulic acid, α -linolenic acid, ursolic acid, oleanolic acid 등이 알려져 있다(9,11). 이 중 주성분인 rosmarinic acid의 경우 항염증(12), 항산화 및 항알러지(13), 간손상 보호(6,14,15) 효과 등이 보고되었고, luteolin의 경우에는 항염증(16,17,19), 항가려움증(18.), 항알러지(19), 항산화(20, 21) 효과 등이 보고된 바 있다. 식물유래 화합물들이 LPS 자극된 RAW264.7 세포에서 NF- κ B의 전사 활성을 억제함으로써 염증반응을 감소시킨다는 많은 연구논문들이 발표되었다(4,16,22,23). 또한, Park 등(24)의 결과에 의하면, luteolin과 chicoric acid를 동시에 처리할 경우 NF- κ B의 translocation을 억제함으로써 두 화합물이 상승작용을 나타내어 염증반응을 억제한다고 보고하였다. 그렇지만, 들깨를 비롯한 다른 식물로부터 유래된 rosmarinic acid와 luteolin을 동시에 사용하여 항염증에 대한 활성을 검증한 연구는 지금까지 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 들깨 유래 기능성 화합물인 rosmarinic acid와 luteolin에 대한 항염증 효과를 검증한 후 이들 두 가지 물질을 동시에 사용하여 RAW264.7 세포에서 항염증작용에 대한 상승효과가 있는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 들깨잎은 전라북도 전주시 전주대학교 천잠산에서 재배하여 2014년 7월 10일에 수확하였고, 잘 건조된 들깨잎 분말로부터 rosmarinic acid (RA)와 luteolin (Fig. 1)의 분리는 Lim 등(25)과 Jeon 등(18)의 방법에 따라 분리하였으며, 구조동정은 LC-MS와 NMR spectroscopy에 의해 확인하였다. Griess reagent와 LPS, NP40 cell lysis buffer, protease inhibitor cocktail은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Prostaglandin E2 (PGE₂), TNF- α , IL-6, IL-1 β ELISA kit는 R&D systems사(Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. 1차 항체 iNOS는 BD Pharmingen사 (San Diego, CA, USA)에서, COX-2는 Cayman Chemical사(Ann Arbor, MI, USA)로부터 구입하였고, β -tubulin, I κ B- α , NF- κ B p65, Lamin B1와 2차 항체 goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. NE-PER Nuclear and Cytoplasmic extraction reagents는 Pierce Biotechnology사(Rockford, IL, USA)로부터 구입하였으며, 기타 분석시약은 reagent grade로 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

세포배양

본 실험에 사용된 세포는 마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포로 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 10% FBS (fetal bovine serum; Invit-

rogen, Carlsbad, CA, USA)와 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 첨가한 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)배지(GIBCO-BRL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 세포 밀도가 90%로 포화되었을 때 계대배양하며 실험에 사용하였다.

세포생존율

세포생존율은 Ez-Cytox cell viability assay kit (DAEIL lab, Seoul, Korea)을 사용하였으며, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다. 먼저 RAW264.7 세포를 96 well plate에 최종 농도가 2 \times 10⁵ cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 RA를 0-200 μ M 농도로 처리하고 luteolin을 0-40 μ M 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 EZ-Cytox 시약 10L를 넣고 3시간 동안 배양한 후 microplate reader (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포생존율은 대조군에 대한 생존율로 나타내었다.

NO 측정

RAW264.7 세포를 96 well plate에 최종농도가 2 \times 10⁵ cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 각 화합물을 처리한 다음, 1시간 후 LPS (1 μ g/mL)를 처리하여 18시간 배양하였다. 세포배양액 100 μ L와 Griess 시약 100 μ L를 혼합하여 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, sodium nitrate로 표준곡선을 작성하여 NO 생성량을 산출하였다.

ELISA assay

RAW264.7 세포를 6 well plate에 최종농도가 2 \times 10⁵ cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 각 화합물을 처리하였다. 1시간 후 LPS (1 μ g/mL)를 처리하여 18시간 배양한 후, 세포배양 상층액을 취하여 PGE₂, TNF- α , IL-6, IL-1 β cytokine의 생산량 측정은 R&D systems사(Minneapolis, MN, USA)에서 구입한 ELISA kit를 사용하여, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다.

Total protein extraction

RAW264.7 세포를 6 well plate에 최종농도가 2 \times 10⁵ cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 각 화합물을 처리하였다. 1시간 후 LPS (1 μ g/mL)를 처리하여 18시간 배양한 후, PBS로 세척하고 세포를 원심분리 하여 얻은 pellet에 NP40 cell lysis buffer를 첨가하여 얼음에 30분 동안 incubation 후 12,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하여 상층액을

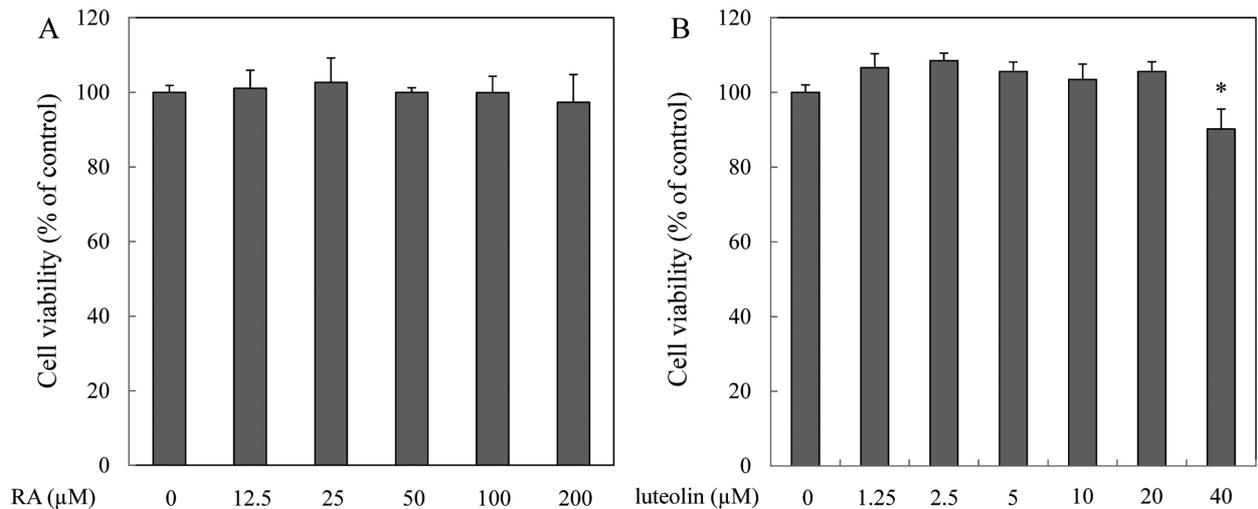


Fig. 2. Effect of rosmarinic acid (RA) and luteolin on cell viability in RAW264.7 cells. Data are presented as the mean±SD. * $p < 0.05$ vs. control.

얻었고, Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 시약을 사용하여 단백질을 정량하였다.

Nuclear protein extraction

RAW264.7 세포를 100 mm dish에 최종농도가 2×10^5 cells/mL 가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 각 화합물을 처리하였다. 1시간 후 LPS (1 μg/mL)를 처리하여 30분 동안 배양한 후, PBS로 세척하고 세포를 원심분리 하여 pellet을 얻었다. Nuclear and cytoplasmic 단백질은 Pierce Biotechnology사(Rockford, IL, USA)로부터 구입한 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic extraction reagents kit를 사용하여, 제조사에서 권장하는 방법에 따라 단백질을 분리하였다.

Western blot

단백질 50 μg을 sample buffer와 섞어 100°C에서 5분간 끓인 후, 10% SDS-PAGE로 분리한 다음, PVDF membrane으로 transfer 한 후 5% skim milk에서 1시간 동안 blocking하였다. 1차 항체(iNOS, COX-2, β-tubulin, IκB-α, NF-κB p65, Lamin B1)는 4°C에서 overnight 시킨 후 TBS-T (tris-buffered saline and tween-20) buffer로 10분간 3회 세척하였고, 2차 항체는 1:5,000으로 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. TBS-T로 10분간 3회 세척한 후 membrane에 ECL (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) 시약을 처리하여 측정하였다.

통계분석

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 대조군과 실험군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Microsoft excel program의 Student's t-test를 사용하여 실시하였으며, 조사 항목들 간의 유의성 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

RA와 luteolin의 세포독성 평가 및 NO 생성 억제에 미치는 영향

Ez-Cytox cell viability assay kit를 이용하여 RAW264.7 세포에서 RA와 luteolin의 세포독성을 측정하였다(Fig. 2). RA (0, 12.5, 25, 50, 100, 200 μM)와 luteolin (0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 μM)을 농도별로 처리한 결과 RA는 200 μM의 농도까지 세포 독

성을 나타내지 않았고, luteolin은 20 μM까지는 독성을 나타내지 않았지만, 40 μM에서는 90%의 세포생존율을 보여 약간의 세포 독성을 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 다음 실험을 수행하였다. 생체 내에서 NO는 반응성이 높은 물질로 NO synthase에 의해 L-arginine으로부터 생성되어지며, 면역반응, 세포독성, 신경 전달계 및 혈관 이완 같은 여러 생물학적인 과정에 관여하며, 세포기능 유지에 중요한 작용을 한다(26). 둘째로부터 분리된 RA와 luteolin이 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포 독성 결과를 토대로 RA (0, 12.5, 25, 50, 100, 200 μM)와 luteolin (0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μM)을 농도별로 처리하고 1시간 후에 LPS (1 μg/mL)로 자극하여 18시간 배양한 다음 Griess reagent를 사용하여 NO 생성량을 확인하였다(Fig. 3). 그 결과 LPS를 처리한 군에서 NO 생성량이 무처리군과 비교하여 크게 증가하였지만, RA와 luteolin을 전처리한 군에서는 LPS 처리군과 비교하여 NO 생성량이 농도 의존적으로 감소하였다. RA의 경우 200 μM에서도 NO 억제 활성이 크지 않았으나 통계적으로 유의한 수준을 나타내었고, luteolin의 NO 생성억제 활성은 뚜렷한 결과를 보였다. Qiao 등(27)에 의하면 RA는 LPS 자극된 RAW264.7 세포에서 NO 생성을 억제한다고 보고하였으며, 본 실험결과 또한 NO 생성을 억제하였다. 또한 Park 등(16)에 의하면 LPS 자극된 RAW264.7 세포에서 50 μM의 luteolin을 처리하였을 때 높은 NO 저해 활성을 보였지만, 본 실험 결과는 더 낮은 농도인 5 μM에서 거의 유사한 활성을 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 RA와 luteolin의 항염증 작용에 대한 상승 효과가 있는지 알아보기 위하여 RA의 농도를 100 μM로 luteolin의 농도는 2 μM로 정하였고, 이들 두 화합물을 동시에 처리할 경우에는 각각의 화합물의 농도를 50:1의 비율인 RA는 50 μM로 luteolin은 1 μM로 정하여 실험을 수행하였다.

NO 및 PGE₂ 생성 억제에 대한 rosmarinic acid와 luteolin의 상승작용

RA와 luteolin을 동시에 처리할 경우 NO와 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RA (100 μM), luteolin (2 μM), 각 화합물의 절반 농도인 RA (50 μM)+luteolin (1 μM)을 처리하고 1시간 후에 LPS (1 μg/mL)로 자극하여 18시간 배양한 다음 NO와 PGE₂ 생성량을 확인하였다. Fig. 4에서 나타낸바와 같이 LPS에 의한 NO와 PGE₂ 생성이 RA (50 μM)와 luteolin (1 μM)을 동시

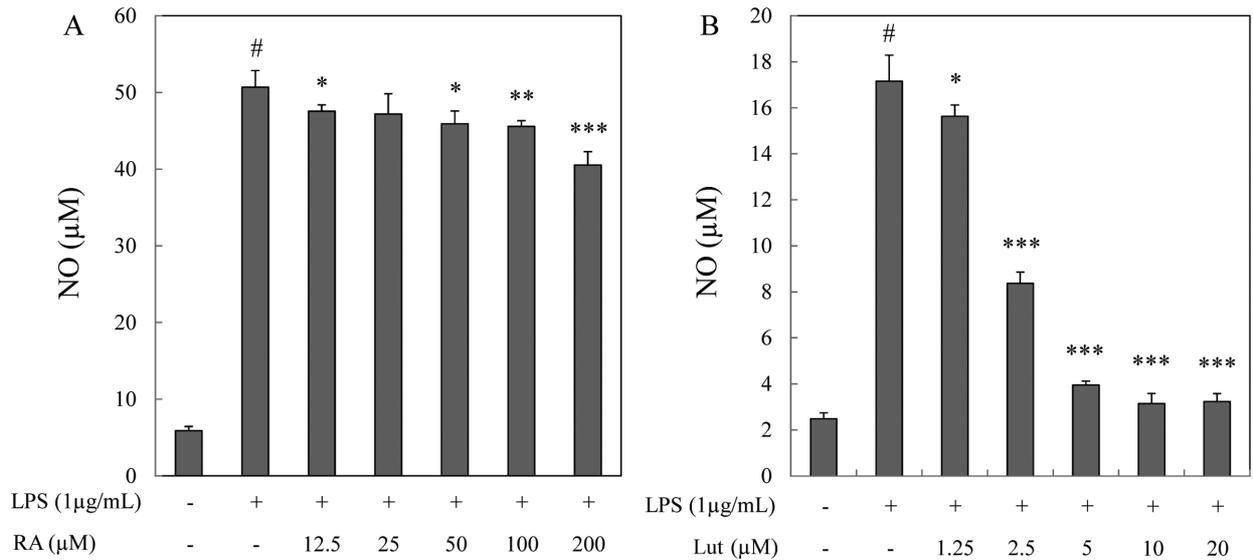


Fig. 3. Effect of rosmarinic acid (RA) and luteolin (Lut) on NO production in RAW264.7 cells. Data are presented as the mean±SD. #*p*<0.001 vs. control, **p*<0.05 vs. LPS, ***p*<0.01 vs. LPS, ****p*<0.001 vs. LPS.

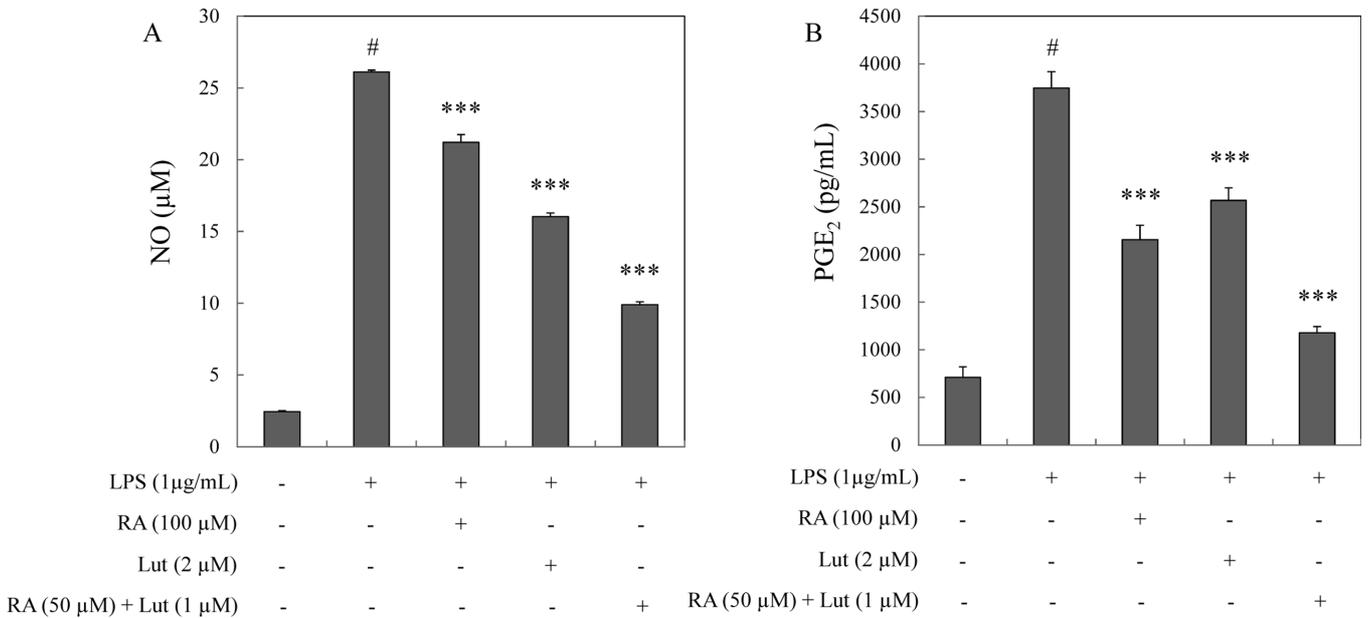


Fig. 4. Synergistic effect of co-treatment of rosmarinic acid (RA) and luteolin (Lut) on NO (A) and PGE₂ (B) production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with RA (100 µM) or Lut (2 µM) and RA (50 µM) plus Lut (1 µM) for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/mL) and the cells were further incubated for 18 h. Data are presented as the mean±SD. #*p*<0.001 vs. control, ****p*<0.001 vs. LPS.

에 처리하였을 경우 RA (100 µM) 단독 처리군 보다 NO는 43.3%, PGE₂ 생성은 26.1% 더 높은 억제 활성을 나타내었고, luteolin (2 µM) 단독 처리군 보다 NO는 23.5%, PGE₂ 생성은 37.1% 더 우수한 억제 활성이 있음을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 두 화합물 간의 상승작용에 의한 것으로 생각된다.

iNOS 및 COX-2 발현 억제에 대한 rosmarinic acid와 luteolin의 상승작용

Huang 등(12)의 연구결과에 의하면 RAW264.7 세포에서 RA는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제를 통하여 NO와 PGE₂ 생성 억제 활성을 나타낸다고 보고하였다. 또한, Chen 등(28)의 연구 결과에 따르면 luteolin도 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제를

통하여 NO와 PGE₂ 생성 억제 활성을 나타낸다고 보고되었다. 또한, Guo 등(5)의 결과에 의하면, RAW264.7 세포에서 nobiletin과 sulforaphane를 동시에 처리할 경우 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 억제함으로써 두 화합물이 상승작용을 나타내어 염증반응을 억제한다고 보고하였다. 그러므로 RA와 luteolin을 동시에 처리할 경우 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제를 통하여 NO와 PGE₂ 생성을 억제하는지 알아보기 위하여 western blot을 수행하였다. 그 결과 Fig. 5에 보이는 것처럼, LPS를 처리한 군에서 iNOS와 COX-2의 발현양이 무처리군과 비교하여 크게 증가하였지만, RA (100 M)와 luteolin (2 M)만을 처리한 군에서는 LPS 처리군과 비교하여 iNOS의 발현양이 뚜렷한 감소 활성이 없었고, COX-2의 발현양은 LPS 처리군과 비교하여 뚜렷한 감소 활성을

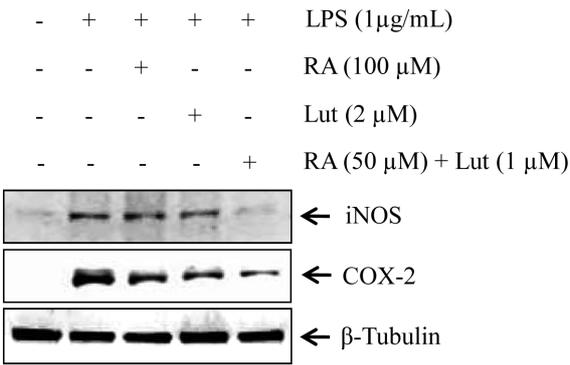


Fig. 5. Synergistic effect of co-treatment of rosmarinic acid (RA) and luteolin (Lut) on iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with RA (100 µM) or Lut (2 µM) and RA (50 µM) plus Lut (1 µM) for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/mL) and the cells were further incubated for 18 h. The iNOS and COX-2 expression levels were determined by western blot analysis.

보였다. 그렇지만, RA (50 µM)와 luteolin (1 µM)을 동시에 처리하였을 경우 RA (100 µM)와 luteolin (2 µM)을 각각 처리하였을 때 보다 iNOS와 COX-2의 발현양을 더 뛰어나게 억제하는 효과가 있어 두 화합물 간의 상승작용이 뚜렷함을 확인 할 수 있었고, 이것은 NO와 PGE₂ 생성 억제 효과와 동일한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 더 낮은 농도로 처리한 두 화합물이 더 높은 농도를 처리한 각각의 화합물보다 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제를 통하여 더 뛰어난 항염증 활성을 나타내는 것으로 판단된다.

염증성 사이토카인 생성 억제에 대한 rosmarinic acid와 luteolin의 상승작용

염증반응은 면역세포가 세균이나 바이러스 같은 미생물 및 생체의 이물질 등 외부의 자극에 노출되면, 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포는 수많은 염증 매개 인자를 분비함으로써 염증반응을 가속화 시킨다(29). 대식세포가 LPS에 노출되면, TNF-α, IL-6, IL-1β를 포함한 많은 전염증성 사이토카인을 분비하여

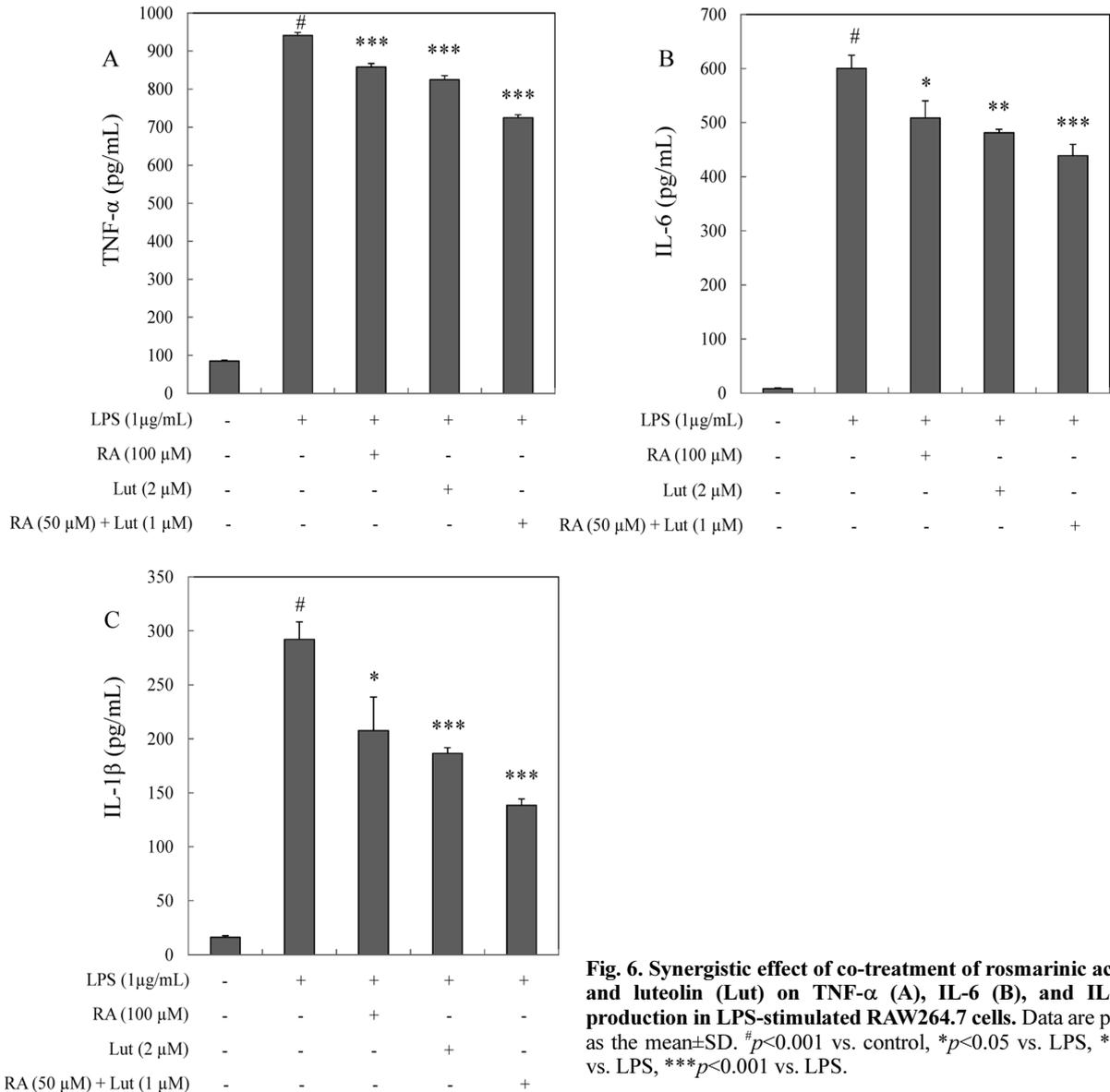


Fig. 6. Synergistic effect of co-treatment of rosmarinic acid (RA) and luteolin (Lut) on TNF-α (A), IL-6 (B), and IL-1β (C) production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Data are presented as the mean±SD. #*p*<0.001 vs. control, **p*<0.05 vs. LPS, ***p*<0.01 vs. LPS, ****p*<0.001 vs. LPS.

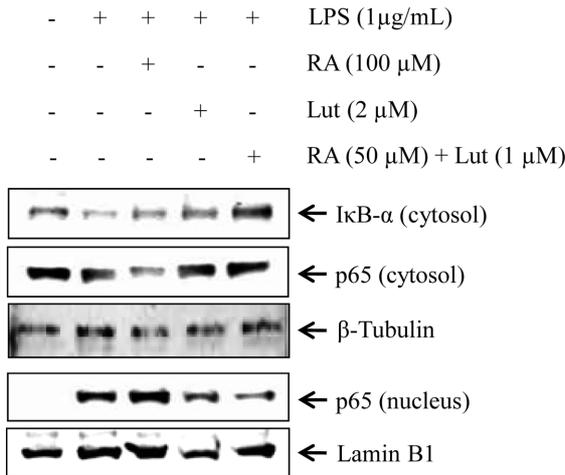


Fig. 7. Synergistic effect of co-treatment of rosmarinic acid (RA) and luteolin (Lut) on NF-κB activation in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with RA (100 µM) or Lut (2 µM) and RA (50 µM) plus Lut (1 µM) for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/mL) and the cells were further incubated for 30 min. The IκB-α degradation and NF-κB p65 nuclear translocation levels were determined by western blot analysis.

미생물에 대하여 염증반응을 매개하고 미생물을 제거하기 위하여 감염 초기에 외부인자를 탐식하는 작용을 하며, TNF-α는 세포독성물질로서 T 림프구의 활성화와 성장을 조절하여 염증부위에서 생성이 증가한다. IL-6는 염증반응으로부터 B 림프구의 항체 생성을 촉진시키고 T 림프구의 분화를 유도하며, IL-1β는 염증반응 초기에 분비되어 숙주면역반응의 염증 매개자로서 작용하는 것으로 알려져 있다(30). Lim 등(25)의 연구에 따르면 들깨의 주 성분인 RA는 LPS에 의한 폐염증 마우스에서 TNF-α 생성을 억제한다고 보고되었고, Osakabe 등(14)의 발표에 따르면 LPS와 D-galactosamine 투여된 쥐에서 TNF-α mRNA와 protein 발현을 억제한다고 보고되었다. 또한 RA는 cadmium에 의해 과생성된 염증인자 IL-6와 IL-1β를 억제한다고 보고되었다(31). Jeon 등(18)의 결과에 따르면 들깨의 성분인 luteolin 또한 TNF-α와 IL-1β의 생성 억제를 통하여 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였고, Wu 등(32)의 발표에 따르면 LPS 처리된 bone marrow macrophages에서 TNF-α와 IL-1β의 mRNA와 protein 발현을 억제한다고 보고되었다. 그러므로 RA와 luteolin을 동시에 처리할 경우 TNF-α, IL-6, IL-1β 같은 전염증성 인자의 생성을 억제하는지 알아보기 위하여 RA (100 µM), luteolin (2 µM), RA (50 µM)+luteolin (1 µM)을 전처리하고 1시간 후에 LPS (1 µg/mL)로 자극하여 18시간 배양한 다음 상층액을 얻어 ELISA 분석을 수행하여 알아본 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 결과에 보이는 것처럼 LPS에 의한 TNF-α, IL-6, IL-1β 사이토카인은 RA (50 µM)와 luteolin (1 µM)을 동시에 처리하였을 경우 RA (100 µM)와 luteolin (2 µM)을 각각 처리하였을 때 보다 더 우수한 억제 효과가 있어 두 화합물 간의 상승작용이 뚜렷함을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 더 낮은 농도로 처리한 두 화합물이 더 높은 농도를 처리한 각각의 화합물보다 전염증성 사이토카인의 생성을 억제하여 더 뛰어난 항염증 활성을 나타내는 것으로 생각된다.

염증 전사인자 NF-κB 활성 억제에 대한 rosmarinic acid와 luteolin의 상승작용

NF-κB는 5개의 subunit인 p65 (RelA), RelB, c-Rel, p52, p50

으로 구성되어 있으며(33), iNOS, TNF-α, IL-1β를 포함한 많은 염증 매개 인자의 전사 인자로서 중요한 역할을 한다(34). LPS에 자극되면, 세포는 TLR4-Myd88-TAK1 신호전달 경로를 통한 일련의 반응 경로를 통하여 NF-κB 억제 단백질인 IκB를 degradation 시킨다. IκB로부터 자유로워진 NF-κB는 핵 안으로 이동하여 전염증성 인자들의 발현을 유도한다(8). 따라서 RA와 luteolin을 동시에 처리할 경우 위의 결과에서 감소한 염증 매개 인자들의 생성억제가 NF-κB의 활성 억제를 통하여 일어나는지 알아보기 위하여 RA (100 µM), luteolin (2 µM), RA (50 µM)+luteolin (1 µM)을 전처리하고 1시간 후에 LPS (1 µg/mL)로 자극하여 30분 후 단백질을 얻어 western blot을 수행하여 알아본 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 그림에서 볼 수 있듯이, LPS를 처리한 군에서 NF-κB의 subunit인 p65의 핵 안으로의 이동이 무처리군과 비교하여 크게 증가하였지만, RA (100 µM)만을 처리한 군에서는 LPS 처리군과 비교하여 뚜렷한 감소 활성이 없었고, luteolin (2 µM)만을 처리한 군에서는 LPS 처리군과 비교하여 뚜렷한 감소 활성을 보였다. 그러나 RA (50 µM)와 luteolin (1 µM)을 동시에 처리하였을 경우 RA (100 µM)와 luteolin (2 µM)을 각각 처리하였을 때 보다 NF-κB의 subunit인 p65의 translocation이 더 우수한 억제 효과가 있어 두 화합물 간의 상승작용이 뚜렷함을 확인 할 수 있었다. 또한 LPS를 처리한 군에서 IκB-α의 degradation이 무처리군과 비교하여 뚜렷이 나타났지만, RA (100 µM)와 luteolin (2 µM)만을 처리한 군에서는 LPS 처리군과 비교하여 IκB-α의 degradation이 감소하였다. 그렇지만, RA (50 µM)와 luteolin (1 µM)을 동시에 처리하였을 경우 RA (100 µM)와 luteolin (2 µM)을 각각 처리하였을 때 보다 IκB-α의 degradation을 더 뛰어나게 억제하는 것을 볼 수 있어 두 화합물 간의 상승작용이 뚜렷함을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 더 낮은 농도로 처리한 두 화합물이 더 높은 농도를 처리한 각각의 화합물보다 IκB-α의 degradation과 NF-κB의 subunit인 p65의 translocation을 억제하여 더 뛰어난 항염증 활성을 나타내는 것으로 생각되어지며, 이 두 화합물은 염증관련 질환 약물 개발 및 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 들깨 유래 기능성 물질인 rosmarinic acid (RA)와 luteolin이 RAW264.7 세포에서 항염증작용에 대한 상승 효과가 있는지 알아보려고 하였다. 그 결과 RAW264.7 세포에 RA (50 µM)와 luteolin (1 µM)을 동시에 처리하였을 경우 염증 매개 인자인 NO, iNOS, PGE₂, COX-2의 생성을 RA (100 µM)와 luteolin (2 µM)을 각각 처리하였을 때 보다 더 뛰어나게 억제하였다. 또한 RA (50 µM)와 luteolin (1 µM)을 동시에 처리하였을 경우 TNF-α, IL-6, IL-1β 같은 염증성 사이토카인의 생성량을 RA (100 µM)와 luteolin (2 µM)을 각각 처리하였을 때 보다 더 뛰어나게 억제하는 것을 확인하였다. 그리고 RA (50 µM)와 luteolin (1 µM)을 동시에 처리하였을 경우 RA (100 µM)와 luteolin (2 µM)을 각각 처리하였을 때 보다 NF-κB의 subunit인 p65의 translocation과 IκB-α의 degradation을 더 뛰어나게 억제하는 것을 볼 수 있어 두 화합물 간의 상승작용이 뚜렷함을 확인 할 수 있었고, RA와 luteolin 두 화합물을 동시에 처리할 경우 염증관련 질환 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 과제는 전라북도 R&D지원사업의 지원(2013HaC11)에 의해 수행되었습니다.

References

- Sirisinha S. Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease. *Asian Pac. J. Allergy* 29: 1-14 (2011)
- Mok JY, Jeong SI, Kim JH, Jang SI. Synergic effect of quercetin and astragaloside from Mulberry leaves on anti-inflammation. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.* 25: 830-836 (2011)
- Shin JS, Park YM, Choi JH, Park HJ, Shin MC, Lee YS, Lee KT. Sulfuretin isolated from heartwood of *Rhus verniciflua* inhibits LPS-induced inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and pro-inflammatory cytokines expression via the down-regulation of NF- κ B in RAW 264.7 murine macrophage cells. *Int. Immunopharmacol.* 10: 943-950 (2010)
- Cho BO, Ryu HW, So Y, Lee CW, Jin CH, Yook HS, Jeong YW, Park JC, Jeong IY. Anti-inflammatory effect of mangostenone F in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages by suppressing NF- κ B and MAPK activation. *Biomol. Ther.* 22: 288-294 (2014)
- Guo S, Qiu P, Xu G, Wu X, Dong P, Yang G, Zheng J, McClements DJ, Xiao H. Synergistic anti-inflammatory effects of nobilletin and sulforaphane in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Agr. Food Chem.* 60: 2157-2164 (2012)
- Jeon YJ, Song KS, Han HJ, Park SH, Chang W, Lee MY. Rosmarinic acid inhibits chemical hypoxia-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Arch. Pharm. Res.* 37: 907-915 (2014)
- Ojha D, Mukherjee H, Mondal S, Jena A, Dwivedi VP, Mondal KC, Malhotra B, Samanta A, Chattopadhyay D. Anti-inflammatory activity of *Odina wodier* Roxb, an Indian folk remedy, through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway. *PLoS One.* 9: e104939 (2014)
- Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13: 816-825 (2006)
- Lee Y, Song B, Ju J. Anti-inflammatory activity of *Perilla frutescens* Britton seed in RAW 264.7 macrophages and an ulcerative colitis mouse model. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 61-67 (2014)
- Jeong SI, Kim HS, Jeon IH, Kang HJ, Mok JY, Cheon CJ, Yu HH, Jang SI. Antioxidant and anti-inflammatory effects of ethanol extracts from *Perilla frutescens*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 87-93 (2014)
- Cho BO, Park HY, Ryu HW, Jin CH, Choi DS, Kim DS, Lim ST, Seo KI, Byun MW, Jeong IY. Protective effect of *Perilla frutescens* cv. chookyoupjaso mutant water extract against oxidative injury *in vitro* and *in vivo*. *Food Sci. Biotechnol.* 20: 1705-1711 (2011)
- Huang N, Hauck C, Yum MY, Rizshsky L, Widrechner MP, McCoy JA, Murphy PA, Dixon PM, Nikolau BJ, Birt DF. Rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* ethanol extract inhibits lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 and nitric oxide in RAW 264.7 mouse macrophages. *J. Agr. Food Chem.* 57: 10579-10589 (2009)
- Zhu F, Asada T, Sato A, Koi Y, Nishiwaki H, Tamura H. Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and α -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from *Perilla* leaves. *J. Agr. Food Chem.* 62: 885-892 (2014)
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Sanbongi C, Kato Y, Osawa T, Yoshikawa T. Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized mice. *Free Radical Biol. Med.* 33: 798-806 (2002)
- DomitroviR, Skoda M, Vasiljev Marchesi V, Cvijanovi O, Pernjak Pugel E, Stefan MB. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Food Chem. Toxicol.* 51: 370-378 (2013)
- Park CM, Song YS. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF- κ B/AP-1/PI3K-Akt signaling cascades in RAW 264.7 cells. *Nutr. Res. Pract.* 7: 423-429 (2013)
- Xagorari A, Roussos C, Papapetropoulos A. Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin. *Br. J. Pharmacol.* 136: 1058-1064 (2002)
- Jeon IH, Kim HS, Kang HJ, Lee HS, Jeong SI, Kim SJ, Jang SI. Anti-inflammatory and antipruritic effects of luteolin from *Perilla (P. frutescens L.)* leaves. *Molecules* 19: 6941-6951 (2014)
- Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 1197-1202 (2002)
- Cai Q, Rahn RO, Zhang R. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Lett.* 119: 99-107 (1997)
- Nazari QA, Kume T, Takada-Takatori Y, Izumi Y, Akaike A. Protective effect of luteolin on an oxidative-stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 122: 109-117 (2013)
- Gao Y, Jiang W, Dong C, Li C, Fu X, Min L, Tian J, Jin H, Shen J. Anti-inflammatory effects of sophocarpine in LPS-induced RAW 264.7 cells via NF- κ B and MAPKs signaling pathways. *Toxicol. In Vitro.* 26: 1-6 (2012)
- Park HY, Kim GY, Hyun JW, Hwang HJ, Kim ND, Kim BW, Choi YH. 7,8-Dihydroxyflavone exhibits anti-inflammatory properties by downregulating the NF- κ B and MAPK signaling pathways in lipopolysaccharide-treated RAW264.7 cells. *Int. J. Mol. Med.* 29: 1146-1152 (2012)
- Park CM, Jin KS, Lee YW, Song YS. Luteolin and chicoric acid synergistically inhibited inflammatory responses via inactivation of PI3K-Akt pathway and impairment of NF- κ B translocation in LPS stimulated RAW 264.7 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 660: 454-459 (2011)
- Lim HJ, Woo KW, Lee KR, Lee SK, Kim HP. Inhibition of proinflammatory cytokine generation in lung inflammation by the leaves of *Perilla frutescens* and its constituents. *Biomol. Ther.* 22: 62-67 (2014)
- Kim JY, Jung KS, Jeong HG. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett.* 569: 321-326 (2004)
- Qiao S, Li W, Tsubouchi R, Haneda M, Murakami K, Takeuchi F, Nisimoto Y, Yoshino M. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. *Free Radical Res.* 39: 995-1003 (2005)
- Chen CY, Peng WH, Tsai KD, Hsu SL. Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF- κ B and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sci.* 81: 1602-1614 (2007)
- De Nardin E. The role of inflammatory and immunological mediators in periodontitis and cardiovascular disease. *Ann. Periodontol.* 6: 30-40 (2001)
- Seo MJ, Kang BW, Kim MJ, Lee HH, Seo KI, Kim KH, Jeong YK. The effect of cordycepin on the production of pro-inflammatory cytokines in mouse peritoneal macrophages. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 68-72 (2014)
- Kim SJ, Um JY, Kim SH, Hong SH. Protective effect of rosmarinic acid is through regulation of inflammatory cytokine in cadmium-induced ototoxicity. *Am. J. Chin. Med.* 41: 391-404 (2013)
- Wu W, Li D, Zong Y, Zhu H, Pan D, Xu T, Wang T, Wang T. Luteolin inhibits inflammatory responses via p38/MK2/TTP-mediated mRNA stability. *Molecules* 18: 8083-8094 (2013)
- Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* 12: 695-708 (2011)
- Lee JW, Bae CJ, Choi YJ, Kim SI, Kim NH, Lee HJ, Kim SS, Kwon YS, Chun W. 3,4,5-Trihydroxycinnamic acid inhibits LPS-induced iNOS expression by suppressing NF- κ B activation in BV2 microglial cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 16: 107-112 (2012)