

## 디엠프리(녹차추출물)에 의한 나균 감염 중간엽줄기세포의 IL-6 생산 억제

†박 란 숙

승의여자대학교 식품영양과

### DMfree<sup>®</sup>(Green Tea Extract) Inhibits IL-6 of *Mycobacterium leprae* Infected Mesenchymal Stem Cells

†Ran-Sook Park

Dept. of Food & Nutrition, Soongui Women's College, Seoul 100-751, Korea

#### Abstract

Previous reports revealed that DMfree (green tea extract) inhibited expression of the IL-6 gene in *Mycobacterium leprae*-infected MSCs (mesenchymal stem cells). This study aimed to measure IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub> production in *M. leprae*-infected MSCs using ELISA. To confirm the effect of DMfree on IL-6 and signal transduction, a western blotting test was performed. DMfree inhibited the expression of IL-6 in the MSCs and the heterodimer of STAT3, which also affects the expression of multiple genes. Though DMfree pre-treatment of control MSCs produced a baseline level of IL-6, it significantly inhibited the production of IL-6 in *M. leprae*-infected MSCs. There was no significant difference in IL-6 production between 1 and 7 day treatment groups. *M. leprae*-infected MSCs produced more IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub>, but DMfree could not inhibit their production at a physiological concentration. This is different from other reports that used higher concentration of EGCG treatment, resulting in significant inhibition of the cytokines. The inhibition appears to be related to the concentration of EGCG. These results indicate that DMfree can alleviate inflammation involving IL-6.

Key words: DMfree, green tea extract, *M. leprae*, MSC, IL-6, STAT3

#### 서 론

전통 음료인 녹차의 건강효과에 대한 많은 연구가 보고되고 있다. 암 발생의 빈도를 낮추고(Nunea-Sanchez 등 2015), 혈중 콜레스테롤을 낮추어 심혈관질환의 위험을 억제한다고 한다(Chacko 등 2010). 또한 녹차의 주성분인 15개의 폴리페놀이 체내의 작용부위에 대한 경로 역시 연구 발표되었다(Zhang 등 2015). 연구자는 시판한 바 있었던 국내산 보성녹차의 추출물인 디엠프리<sup>®</sup>(DMfree<sup>®</sup>)를 이용하여 폴리페놀 량과 항산화 능력에 대한 연구를 이미 보고하였다(Park RS 2014). 아울러 분자유전학적으로 디엠프리 투여가 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSCs)의 유전자 발현에 미치는 영향을 분

석하기 위하여 임의로 친염증(proinflammatory) 사이토카인과 항염증(antiinflammatory) 사이토카인, 핵전사인자(nuclear transcription factor) 등을 포함한 14개의 유전자 array를 이용하여 연구한 결과, 세포생존율을 저해하지 않는 농도의 디엠프리(1  $\mu$ g/mL)의 투여는 대조군에 비하여 MSCs의 유전자 발현의 유의한 변화가 없었다(Park RS 2014). 그러나 MSCs에 편성세포(intracellular obligatory)인 나균을 감염시키면 IL-6(interleukin-6) 유전자 발현이 유의하게 증가하지만, 디엠프리로 전처리한 MSCs에서는 나균 감염에도 불구하고, IL-6 유전자 발현이 증가하지 않았다. 즉, 디엠프리가 감염 관련 사이토카인인 IL-6의 유전자 발현을 억제한다는 사실을 발표하였다(Park RS 2014). IL-6는 대식세포와 림프구가 주로 생산하며(Kishimoto T 2010),

† Corresponding author: Ran-Sook Park, Dept. of Food & Nutrition, Soongui Women's College, Seoul 100-751, Korea. Tel: +82-2-3708-9249, Fax:+82-2-3708-9121, E-mail: ransook@sewc.ac.kr

염증성 장(腸) 질환의 병적 변화를 억제하는 역할이 알려진 바 있었다(Barnett 등 2013).

선행연구에서 밝힌 유전자 발현의 증감이 구체적으로 각 사이토카인 생산과 연관되는지 규명하기 위하여 첫째, 디엠프리 투여가 항염증 사이토카인인 IL-6 단백질 생산의 감소를 유도하는지 정량적으로 측정하고, 둘째, 디엠프리 투여기간에 따라 1일, 7일 사이에 경시적, 정량적 차이가 있는지 확인하였다. 셋째, 나균 탐식세포가 생산하는 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PGE $_2$ 에 대한 디엠프리의 억제효과가 있는지 ELISA 방법으로 측정하였다. 넷째, 디엠프리에 의한 IL-6 생산의 감소가 MSCs의 신호전달계 중 어느 경로를 통하여 핵의 전사인자에 영향을 주는지 알기 위하여 기존에 보고된 gp130 경로(Ahmed 등 2008)보다 하부에 있는 STAT3(signal transduction and activator of transcription 3) 단백질의 변화를 웨스턴 블로팅으로 확인하였다. 마지막으로 디엠프리에 의한 나균 감염 MSCs의 IL-6 유전자의 발현억제가 나균 감염에 특이한 것인지, 아니면 일반적 염증 관련 인자인 감마인터페론과 LPS로 자극한 MSCs에서도 관찰할 수 있는 현상인지 확인하였다. 이와 같은 연구를 통하여 녹차 추출물인 디엠프리의 항염증 작용을 분자수준에서 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE $_2$  Quantikine ELISA Kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), IL-6 rabbit polyconal Ab(Abcam, Cambridge, UK), STAT3(F-2)mouse monoclonal Ab와  $\beta$ -actin(C-2) mouse monoclonal Ab(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 등을 구입하여 사용하였다. 특별히 명기하지 않은 시약은 Sigma Chemical Co(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

### 2. MSCs와 디엠프리<sup>®</sup>(DMfree<sup>®</sup>)의 농도

누드마우스의 골수에서 분리하여 가톨릭의대에 보관 중인 MSCs를 사용하였다(Kang 등 2004). 녹차추출물은 보성산 녹차에서 분리한 디엠프리<sup>®</sup>(DMfree<sup>®</sup>) 캡슐을 원액으로 하고, Park RS(2014)의 방법에 따라 MSCs의 증식과 생존율에 영향을 주지 않은 농도인 1  $\mu$ g/mL를 사용하였다.

### 3. 나균 감염 MSCs와 감마인터페론 자극 MSCs의 비교

만성염증의 원인균의 하나이며 편성미생물이고, 클린벤치에서 쉽게 사용할 수 있는 나균(*M. leprae*)을 MSCs에 1:25로 감염시키고, 세포외에 존재하는 나균은 수세로 제거하였다. 나균은 가톨릭의대 한센병연구소에서 제공받았다. 염증관련

사이토카인 유전자 발현을 연구한 지난 실험에서와 같이(Park RS 2014), 각 군은 1) 대조군(MSCs, M), 2) 디엠프리 전처치군(D+M), 3) 나균 전처치군(M+ML), 4) 디엠프리 전처치후 나균 감염군(D+M+ML) 등 4군이다. 또한, 이번 실험에서는 나균 감염 후 IL-6 생산이 대조 MSCs와 활성화 MSCs 사이에 차이가 있는지 밝히기 위해, MSCs에 LPS(lipopolysaccharide 500 ng/mL)와 인터페론 감마(500 U/mL)로 유도한(induced) iMSCs군, D+iM군, iM+ML군, D+iM+ML군으로 나눈 다음, 24시간에 1회 또는 1주일 동안 3회 1  $\mu$ g/mL DMfree로 전처치한 다음 IL-6, IL-1 $\beta$ , PGE $_2$ , TNF- $\alpha$ 의 생산을 측정하였다.

### 4. 사이토카인 생산의 정량적 측정

각각의 실험군의 상청액을 모으고, 1,200 rpm 10분간 원침하여 얻은 상청액을 이용하여 염증에 관련된 단백질(IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE $_2$ , TNF- $\alpha$ )의 생산을 Quantikine ELISA Kit(R&D Systems)을 사용하여 triplicate로 측정하였다.

### 5. IL-6 및 STAT3 감소 확인을 위한 western blotting

각 군의 MSCs에 0.25% Trypsin-EDTA 처리하여 세포를 분리하여 모으고, DPBS로 2회 수세한 후 cell pellet을 모았다. 1 mM PMSF, protein inhibitors, 1 mM Na $_3$ VO $_4$ 가 첨가된 lysis buffer를 넣고 30분간 얼음에 방치한 후, 14,000 rpm 10분간 원침한 후 각각의 상청 단백질을 Nanodrop 1000 분광계(Thermo Scientific Ltd, Waltham, MA, USA)에서 측정 후 electrophoresis buffer와 5 $\times$  loading buffer로 동일한 양의 단백질이 되도록 조정한 후 끓는 물에서 10분간 변성시키고, 10% SDS-PAGE gel에서 120 volt 1시간 동안 loading하였다. 단백질을 PVDF 막으로 transfer하기 위하여 막을 무수 메탄올에서 30초간 잠겨 활성화시키고, transfer box에 setting하여 500 mA로 1시간 동안 transfer하였다. 0.1% TTBS에 5% skim milk가 포함된 blocking 액에 넣고, 실온에서 1시간 동안 반응시키고, primary antibody를 1:200의 비율로 희석한 0.1% TTBS에 5% skim milk가 들어있는 bag에 막을 넣고 밀봉한 다음 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 overnight 하였다. 다음날 0.1% TTBS에서 10분씩 3회 수세하고, secondary antibody를 1:2,000의 비율로 5% skim milk가 들어있는 액에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 0.1% TTBS에서 10분씩 3회 수세하고, ECL 액에 5분간 노출한 후 암실에서 X-ray film에 노출하여 확인하였다.

### 6. 통계처리

각 실험은 triplicate 하였으며, 각 군의 결과는 student *t* test로 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

1. 디엠프리 전처리에 의한 나균 감염 MSCs의 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> 생산 변화

1) 디엠프리 전처리에 의한 IL-6 생산량

대조군 MSCs 및 디엠프리 전처리 MSCs(D+MSCs)군은 1일 또는 7일에서 IL-6 생산이 거의 없었다. 이로써 디엠프리가 정상적 상태의 MSCs의 사이토카인 분비를 촉진하지는 않고 있음을 알 수 있다. 그러나 세균 감염 상태나 면역계의 변화 등을 모방하여 감마인터페론과 LPS로 자극한 MSCs(iMSCs)군은 1일(Fig. 1A) 및 7일(Fig. 1B)에서 모두 1,400 pg 이상의 IL-6를 분비하였다. 나균을 감염시킨 경우는 1일, 7일의 MSCs, iMSCs 모두 IL-6 생산이 증가하였다. 특이한 것은 디엠프리를 전처리한 군에서는 IL-6 생산이 유의하게( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) 감소하고 있어서, 디엠프리가 iMSCs와 나균 감염 MSCs 및 iMSCs의 IL-6 생산을 억제하고 있음을 확인하였다(Fig. 1 A, B). 이는 디엠프리의 상시 복용은 정상 상태에서는 특별한 변화를 나타내지 않지만, 염증 발생 시에는 친염증성 사이토카인의 하나인 IL-6 분비를 억제하여 염증을 경감시키는 작용이 있음을 알 수 있었다.

디엠프리 처리 1일군이 7일군을 비교해 보면, 두 군 모두 디엠프리 전 처리가 IL-6 감소를 일으키는 경향은 일치하지만, 처리 기간이 길다고 IL-6 분비량이 더 높아지지는 않았으며, 오히려 1일 처리군이 IL-6 분비량이 더 높음을 알 수 있었다.

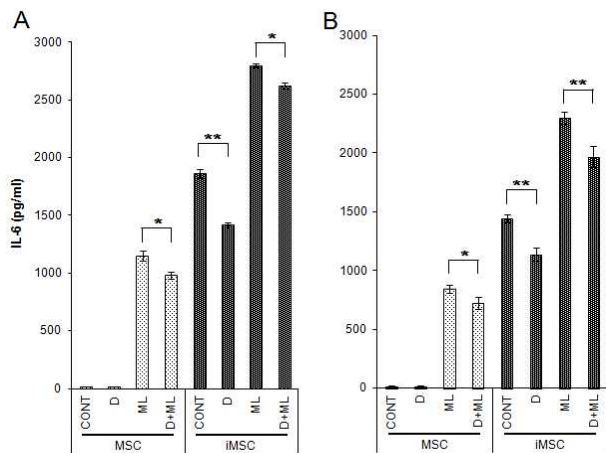


Fig. 1. Effect of DMFree pre-treatment for 1 day (A) and 7 days (B) on IL-6 production of MSCs. Control MSCs (CONT) and DMFree treated MSCs (D+MSCs) showed baseline production of IL-6, but activated MSCs (iMSCs) produced higher IL-6 than that of non activated groups. However, *M. leprae* infection groups (ML, D+ML, iM+ML, and D+iM+ML) revealed increased amount of IL-6. DMFree pre-treatment among the aforementioned groups induced significant inhibition of IL-6 production. \* means  $P < 0.05$ , \*\* for  $P < 0.01$ .

따라서 향후 실험에서는 디엠프리 전처리를 1일로 하였다.

대식세포가 세균을 탐식하게 되면 IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> 등과 함께 IL-6를 분비된다. IL-6는 B림프구가 항체를 생산하는데 중요한 역할을 하며, IL-6 수용체와 gp130을 통해 핵내로 신호를 전달한다(Kishimoto T 2010). 디엠프리가 나균 감염 MSCs의 IL-6 유전자 발현이 감소함은 이미 보고한 바 있으며 (Park RS 2014), 이번 연구는 디엠프리 전처리가 iMSCs 및 나균 감염 MSCs, iMSCs의 IL-6 사이토카인 생산을 유의하게 억제하고 있음을 단백질 수준에서 입증하였으며, 지난번 유전자 발현 연구의 결과와 일치하는 바이다. 더 나아가 디엠프리가 IL-6 생산을 감소시켜 염증의 진전을 억제할 수 있음을 유추할 수 있다.

실제 류마치스 관절염 동물모델 중 IL-6 유전자 결핍 마우스는 관절염이 발생하지 않았다는 보고로 미루어 볼 때, IL-6가 염증의 유발에 중요한 분자임을 알 수 있었다(Hirano 등 1988). 류마치스 관절염 펠트에 녹차의 중요한 성분인 EGCG (epigallocatechin-3-gallate)를 투여하면 관절내 섬유모세포의 IL-6 생산이 감소한다는 보고, 역시 본 연구의 결과와 잘 일치하고 있다(Ahmed 등 2008; Riegsecker 등 2013).

2) 디엠프리 전처리에 의한 IL-1 $\beta$  생산량

대조군 MSCs나 염증상태를 모방한 iMSCs 모두 낮은 IL-1 $\beta$  분비를 보였으며, 디엠프리 전처리에 양적인 변화는 없었

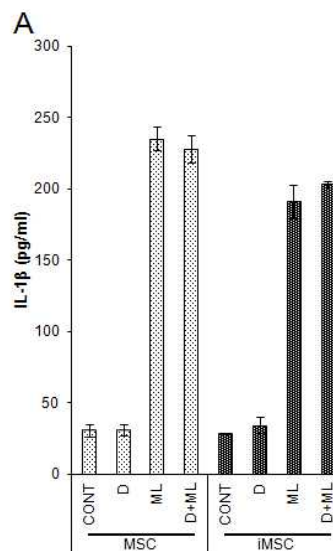


Fig. 2. Effect of DMFree on IL-1 $\beta$  secretion of MSCs and iMSCs. *M. leprae* infected (ML) groups showed IL-1 $\beta$  secretion. But pre-treatment of DMFree (D) didn't exert any inhibitory effect on the production of IL-1 $\beta$  in *M. leprae* infected groups (D+ML in MSCs, and D+ML in iMSCs). A means 1 day treatment of DMFree.

다(Fig. 2). 그리고 나균 감염시킨 네 개의 군에서는 대조군보다 약 5배 많은 200 pg/mL 내외의 IL-1 $\beta$  분비가 관찰되었지만, 디엠프리 전처치가 IL-1 $\beta$ 의 분비를 억제시키지 못하였다. 이는 염증을 모방한 iMSCs에서는 IL-1 $\beta$  분비가 거의 없었기 때문에 나균 감염으로 인하여 분비가 된 것이다. 대식세포에 나균을 감염시킨 경우, 친염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  생산이 증가하였다는 보고로 볼 때 증가의 원인은 나균 감염이다(Kang & Chae 2011). 또한 다균나 환자의 혈중 IL-1 $\beta$ 의 양이 높았으며, 농도가 더 높아지면 나반응의 예후인자로 작용한다는 보고도 있었다(Parida 등 1992).

디엠프리 전처치가 MSCs의 IL-6 생산을 유의하게 억제하였던 것과는 달리 IL-1 $\beta$  생산을 억제하지 못한 것은 EGCG를 복강내 주입한 류마티스 관절염 랫트에서 혈중 IL-6는 억제하였지만, IL-1 $\beta$  및 TNF $\alpha$  치는 감소시키지 못했다는 연구와 일치하고 있다(Ahmed 등 2008).

3) 디엠프리 전처치와 나균 감염에 의한 PGE<sub>2</sub> 생산량

대조군 MSCs와 디엠프리를 전처치한 MSCs는 PGE<sub>2</sub>의 생산량이 낮았지만, 나균을 감염시킨 MSCs군(M+ML, iM+ML) 및 디엠프리 전처치 후 나균을 감염시킨 MSCs군(D+M+ML, D+iM+ML) 모두 대조군에 비하여 10배 이상의 PGE<sub>2</sub>를 생산하였다(Fig. 3). 감마인터페론과 LPS로 유도한 MSCs에서 PGE<sub>2</sub> 생산이 100 pg 이하인 점으로 볼 때, PGE<sub>2</sub> 생산의 증가는 전적으로 나균 감염에 의한 것으로 보인다. PGE<sub>2</sub>는 혈관의 투

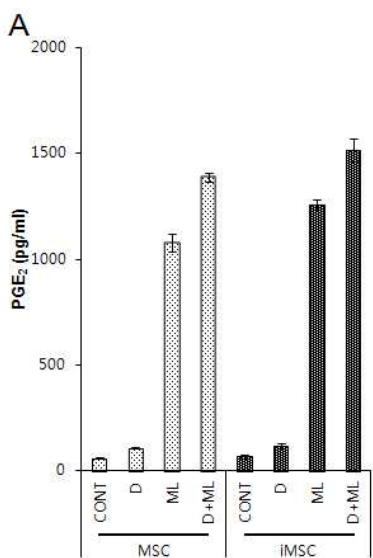


Fig 3. Effect of DMFree on PGE<sub>2</sub> production MSCs. *M. leprae* infected groups showed higher amount of PGE<sub>2</sub> than those of non-infected groups. Pre-treatment with DMFree could not inhibit PGE<sub>2</sub> secretion than that of non-treated *M. leprae* infected groups. A means 1 day treatment of DMFree.

과성을 증대시키고, 발열시키며 IL-12를 감소시켜 T 림프구에 영향을 준다고 한다(Chizzolini & Brembilla 2009). 나균 감염 누두마우스의 육아종 대식세포에서 PGE<sub>2</sub> 생산이 증가하였다는 보고(Sibley & Krahenbuhl 1988)로 볼 때 MSCs의 PGE<sub>2</sub> 생산 증가는 나균 감염 때문이라고 할 수 있다. 아울러 나균으로 유도된 PGE<sub>2</sub> 생산 증가는 면역반응의 억제제로 작용할 수 있다고 하였다(Adams 등 1997).

4) 디엠프리 전처치와 나균 감염에 의한 TNF- $\alpha$  생산량

MSCs에 나균을 감염시킨 군의 TNF- $\alpha$  생산량이 대조군에 비하여 유의하게 높았으며( $P<0.05$ ), 디엠프리를 전처치한 iMSCs에 비하여 나균을 감염시킨 군(D+iM+ML)에서 TNF- $\alpha$  생산이 유의하게 높았다( $P<0.01$ )(Fig. 4). 대식세포에 나균의 감염비를 높이면 TNF- $\alpha$  생산이 증가하였다는 보고가 있었다(Kang 등 2010). 따라서 TNF- $\alpha$  생산은 나균 감염에 의하여 발생한 것으로 보인다.

선행연구에서 디엠프리의 전처치가 친염증성 IL-6 유전자를 선택적으로 억제하고 있음을 보고한 바 있으며(Park RS 2014), 이번 실험을 통하여 IL-6 단백질 생산도 선택적으로 억제하고 있음을 밝혔다. 대식세포에 나균을 감염시키면 친염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6와 PGE<sub>2</sub>가 증가됨은 잘 알려진 사실이지만(Kang 등 2010; Kang & Chae 2011; Mattos 등 2009), 나균을 탐식한 MSCs가 생산하는 친염증성 사이토카인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6와 PGE<sub>2</sub> 생산에 대해서는 알려진 바 없었다. MSCs는 여러 세포로 변할 수 있는 줄기세포의 특성

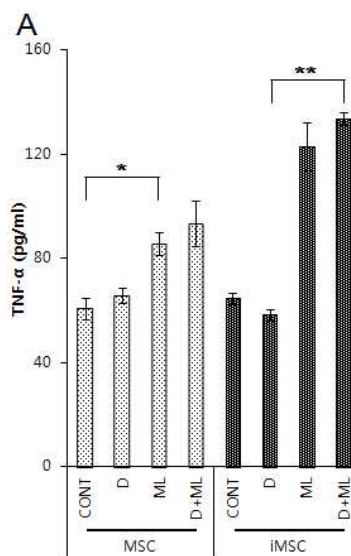


Fig 4. Effect of DMFree on TNF- $\alpha$  production of MSCs. *M. leprae* infected groups showed more higher level of TNF- $\alpha$ , but not significant. A means 1 day treatment of DMFree. \* means  $P<0.05$ , \*\* for  $P<0.01$ .

대로 대식세포처럼 나균을 탐식하였고, 대식세포가 생산하는 친염증성 사이토카인들과 PGE<sub>2</sub>를 생산하였다.

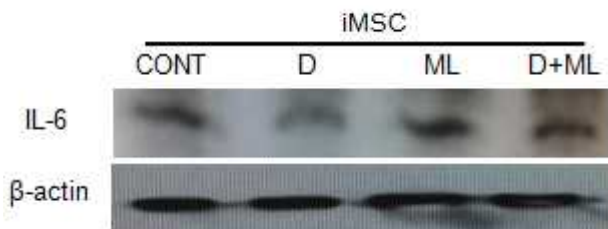
이번에 측정된 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6와 PGE<sub>2</sub> 중에서 어느 것이 주된 작용을 하는지는 직접적으로 비교해 보지는 못했지만, 사람 골관절염의 연골세포 역시 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 등 친염증성 사이토카인을 생산한다고 알려져 있다. 이때 연골세포를 IL-1 $\beta$ 로 자극하면 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  등의 expression이 증가하고, EGCG(10~100  $\mu$ M) 처치가 이들의 expression을 억제한다고 발표하였다(Akhtar & Haqji 2011). 따라서 IL-1 $\beta$ 가 주된 역할을 하고 있음을 추론할 수 있다. 본 실험에서는 이들과 달리 TNF- $\alpha$  생산의 감소가 없었던 이유는 이들이 정제된 EGCG를 10~100  $\mu$ M이라는 많은 양을 사용하였지만, 이번 실험은 녹차추출물인 디엠프리가 1  $\mu$ g/mL의 소량이고, 이 중 EGCG 양은 더욱 소량이어서 이들과 다른 결과를 보였다고 생각한다. 또한 소의 연골세포와 사람의 골관절염 연골세포를 IL-1 $\beta$ 로 자극하면 IL-6 expression의 증가가 있었고, green tea extract는 이를 억제하였지만, PGE<sub>2</sub> 생산을 감소시키지는 못하였다고 하였다(Comblain 등 2015).

## 2. 디엠프리에 의한 IL-6의 억제 확인

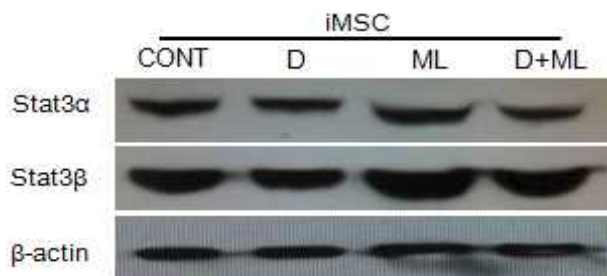
ELISA 방법으로 MSCs가 생산하는 IL-6의 양을 측정하였고, 이 단백질이 IL-6 단일 항체와 결합하는 진정한 IL-6이고, 디엠프리가 이 단백질의 발현을 억제하는지 여부를 웨스턴 블로팅으로 확인하였다(Fig. 5). 유도 MSCs보다 디엠프리를 전처리한 군(Fig. 5, lane 2), 나균 감염 MSCs보다 디엠프리 전처리한 나균 감염 MSCs(lane 4)에서 IL-6 단백질 발현이 감소되어 있음을 알 수 있었다. 이로써 디엠프리가 IL-6 유전자 발현을 감소시키고, 이는 IL-6 단백질의 감소로 연결되고, 최종적으로 IL-6 생산량의 억제로 나타남을 확인하였다.

## 3. IL-6 신호전달계 중 STAT3 단백질 억제 확인

EGCG가 IL-6 합성을 감소시키고, soluble gp130 생산을 증가시켜서 IL-6 신호전달을 억제한다는 보고가 있었기 때문에



**Fig. 5.** DMFree pre-treatment (D, D+ML) inhibited expression of IL-6 (21 kDa) in lane 2 and 4 than those of gamma interferon and LPS induced CONT, and *M. leprae* infected (ML) group.  $\beta$ -actin (42 kDa) is control.



**Fig 6.** DMFree (D) pre-treatment groups (D, D+ML) inhibited expression of IL-6 transcriptional factor (STAT3) for nuclear trans-location than those of untreated CONT, and ML group. Heterodimer of STAT3 are STAT3 $\alpha$  (91 kDa) and STAT3 $\beta$  (86 kDa).  $\beta$ -actin (42 kDa) is control.

(Ahmed 등 2008), 이보다 더 아래 경로에 있으며, 핵과 결합하여 여러 가지 유전자를 활성화시키는 STAT3 발현을 관찰하였다. 디엠프리 전처치는 IL-6 생산을 억제하였고, IL-6 신호전달 경로 중 세포 내에 있는 STAT3의 dimer인 STAT3 $\alpha$  (91 kDa)와 STAT3 $\beta$ (86 kDa)의 발현을 웨스턴 블로팅한 결과, 디엠프리 전 처리군에서 대조군에 비하여 band가 감소하고 있음을 관찰하였다(Fig. 6). 이 결과는 자가면역 관절염 동물에서 EGCG가 STAT3를 억제함으로써 증상을 완화시켰다는 연구와 일치하고 있다(Yang 등 2014). STAT3의 억제는 다양한 유전자 활성의 억제로 연결된다. 과거 류마티스 관절염 등의 염증 치료제로 사용했던 땅두류(*Aralia continetalis*)의 뿌리에서 얻은 pimaradienoic acid 역시 IL-6로 유도한 STAT3 활성을 억제한다는 보고도 있었다(Oh 등 2014).

## 요약 및 결론

이상의 연구를 통하여 녹차추출물인 디엠프리<sup>®</sup>(DMfree<sup>®</sup>)로 전처리하면 resting 상태의 MSCs는 별 변화가 없지만 나균 감염된 MSCs의 IL-6 유전자 발현이 유의하게 감소됨을 보고한 바 있었다. 유전자 발현 감소가 실제로 IL-6 생산의 감소로 연관되는지 밝히고, 디엠프리 전처리 기간이 1, 7일에 따라 변화가 있는지 연구하였다. 아울러 나균 탐식 MSCs 및 감마 인터페론과 LPS로 자극한 MSCs가 생산하는 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>에 대한 디엠프리의 억제효과가 있는지 ELISA 방법으로 측정하였다. 디엠프리에 의한 IL-6 생산의 감소가 신호전달계 중 어느 경로를 통하여 핵의 전사인자에 영향을 주는지 알기 위하여 STAT3 heterodimer 단백질의 변화를 웨스턴 블로팅으로 확인하였다.

디엠프리 전처리한 MSCs는 대조군과 마찬가지로 매우 낮은 IL-6 양을 생산하였다. 그러나 나균 감염(1:25) MSCs와 유도 MSCs는 모두 높은 양의 IL-6를 생산하였고, 디엠프리 전

치치균에서는 나균 감염이 되어도 IL-6 생산이 유의하게 감소되었다. 즉, 디엠프리는 IL-6 생산을 억제하였으며, 1일균과 7일균 사이에 유의한 차이가 없었다. 나균 감염 MSCs는 나균 감염 대식세포의 경우와 같이 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PGE $_2$  등의 생산이 증가하였다. 그러나 디엠프리 전처치는 이들의 생산을 억제하지 못하였다. 디엠프리 전처치하면 IL-6 생산이 감소됨을 웨스턴 블로팅에서 확인하였으며, 신호전달체의 STAT3 heterodimer 역시 디엠프리 전처치로 감소되었다. 본 실험을 통하여 디엠프리의 단백질 수준에서의 기능 즉 IL-6 생산 억제를 확인하였으며, 디엠프리의 건강증진 효과를 더 자세히 연구하는데 도움이 될 것 자료를 제공하였다.

### 감사의 글

본 논문을 위해 중간엽줄기세포와 나균을 지원해준 가톨릭의대 연구팀에게 감사드립니다.

### References

- Adams L, Gillis TP, Hwang DH, Krahenbuhl JL. 1997. Effects of essential fatty acid deficiency on prostaglandin E $_2$  production and cell-mediated immunity in a mouse model of leprosy. *Infect Immun* 65:1152-1157
- Ahmed S, Marotte H, Kwan K, Ruth JL, Campbell PL, Rabquer BJ, Pakozdi A, Koch AE. 2008. Epigallocatechin-3-gallate inhibits IL-6 synthesis and suppresses transsignaling by enhancing soluble gp130 production. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14692-14697
- Akhtar N, Haqqi TM. 2011. Epigallocatechin-3-gallate suppresses the global interleukin-1 $\beta$ -induced inflammatory response in human chondrocytes. *Arthritis Res Therapy* 13:R93
- Barnett M, Cooney JM, Dommels YE, Nones K, Brewster DT, Park Z, Butts CA, McNabbWc, Laing WA, Roy NC. 2013. Modulation of colonic inflammation in Mdr1a $^{-/-}$  mice by green tea polyphenols and their effects on the colon transcriptome and proteome. *J Nutr Biochem* 24:1678-1690
- Chacko SM, Thambi PT, Kuttan R, Nishigaki I. 2010. Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chinese Medicine* 5:13-21
- Chizzolini C, Brembilla NC. 2009. Prostaglandin E $_2$ : igniting the fire. *Immunol Cell Biol* 87:510-511
- Comblain F, Sanchez C, Lespoune I, Balligand M, Serisler S, Henrotin Y. 2015. Curcuminoids extract, hydrolyzed collagen and green tea extract synergically inhibit inflammatory and catabolic mediator's synthesis by normal bovine and osteoarthritic human chondrocytes in monolayer. *PLoS ONE* 10:e0121654
- Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, Sato K, Shimizu M, Maini R, Feldmann M, Kishimoto T. 1988. Excessive production of interleukin6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 18:1797-1801
- Kang TJ, Yeom JE, Lee HJ, Rho SH, Han H, Chae GT. 2004. Growth kinetics of human mesenchymal stem cells from bone marrow and umbilical cord blood. *Acta Haematol* 112:230-233
- Kang TJ, Chae GT. 2011. The role of intracellular receptor NODs for cytokine production by macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *Immune Network* 11:424-427
- Kang TJ, Lee GS, Kim SK, Jin SH, Chae GT. 2010. Comparison of two mice strains, A/J and C57BL/6, in caspase-1 activity and IL-1 $\beta$  secretion of macrophage to *Mycobacterium leprae* infection. *Mediators Inflamm* 2010:708-713
- Kishimoto T. 2010. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 22:347-352
- Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, Sarno EN, Atella GC, Pereira GM, Bozza PT, Pessolani MC. 2010. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leuko Biol* 87:371-384
- McKay DL, Blumberg JB. 2002. The role of tea in human health: An update. *J Amer Coll Nutr* 21:1-13
- Nunea-Sanches MA, Gonzalez-Sarrias A, Romo-Vaquero M, Barcia-Villalba R, Selma MV, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT, Espin JC. 2015. Dietary phenolics against colorectal cancer. From promising preclinical results to poor translation into clinical trials: Pitfalls and future needs. *Mol Nutr Food Res* 59:1274-1291
- Oh TS, Bae EY, Kim MH, Oh HM, Lee SW, Kim CH. 2014. Inhibition of IL-6-induced STAT3 activation by pimaradienoic acid from *Aralia continentalis*. *Bull Korean Chem Soc* 35:3661-3664
- Parida SK, Grau GE, Zaheer SA, Mukherjee R. 1992. Serum tumor necrosis factor and interleukin 1 in leprosy and during lepra reaction. *Clin Immunol Immunopathol* 63:23-27
- Park RS. 2014. Effect of DMfree<sup>®</sup>(GTE) on gene array profile of *M. leprae* infected mesenchymal stem cells. *Korean J Food & Nutr* 27:267-273

- Riegsecker S, Wiczynski D, Kaplan MJ, Ahmed S. 2013. Potential benefits of green tea polyphenol EGCG in the prevention and treatment of vascular inflammation in rheumatoid arthritis. *Life Sci* 93:307-312
- Sibley LD, Krahenbuhl JL. 1988. Defective activation of granuloma macrophages from *Mycobacterium leprae*-infected nude mice. *J Leukoc Biol* 43:60-66
- Yang EJ, Lee J, Lee SY, Kim EK, Moon YM, Jung YO, Park SH, Cho ML. 2014. EGCG attenuates autoimmune arthritis by inhibition of STAT3 and HIF-1 $\alpha$  with TH17/Treg control.

*PLoS ONE* 9:e86062

- Zhang S, Shan L, Li Q, Wang X, Li S, Zhang Y, Gu J, Liu X, Li H, Zhang W. 2014. Systematic analysis of the multiple bioactivities of green tea through a network pharmacology approach. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014: article ID 512081, 11 pages

---

Received 11 June, 2015  
Revised 3 August, 2015  
Accepted 21 August, 2015