

Suppressive Effects of Epigallocatechin Gallate Pretreatment on the Expression of Inflammatory Cytokines in RAW264.7 Cells Activated by Lipopolysaccharide

Eun Ji Seo¹, Jun Go¹, Ji Eun Kim¹, Eun Kyoung Koh¹, Sung Hwa Song¹, Ji Eun Sung¹, Chan Kyu Park¹, Hyun Ah Lee¹, Dong Seob Kim¹, Hong Joo Son¹, Cung Yeoul Lee², Hee Seob Lee³ and Dae Youn Hwang^{1*}

¹College of Natural Resources & Life Science/Life and Industry Convergence Research Institute, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

²Gangrim Organics, Miryang 627-706, Korea

³College of Human Ecology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Received June 15, 2015 / Revised August 5, 2015 / Accepted September 16, 2015

Epigallocatechin gallate (EGCG), the main catechin in green tea, has been shown to have some beneficial effects against various human diseases, including diabetes, neurodegenerative disorders, cancer, cardiovascular disease and obesity. To investigate the mechanism of the suppressive effects of EGCG on inflammatory response in macrophages, alterations on the levels of nitric oxide (NO) regulatory factors and inflammatory cytokines were measured in lipopolysaccharide (LPS)-activated RAW264.7 cells. No significant toxicity was detected in RAW264.7 cells treated with 100-400 μ M EGCG. Moreover, the optimal concentration of LPS was determined to be 1 μ g/ml based on the results of cell viability assay, NO assay and IL-6 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Furthermore, NO levels decreased significantly by 68.2% in the 400 μ M EGCG/LPS treated group, while the level of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression decreased by 12-17% in the 200 and 400 μ M EGCG/LPS treated group. A significant decrease in transcription of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and anti-inflammatory cytokine (IL-10) was also detected in the EGCG/LPS treated group. However, IL-6 transcript and protein was maintained at a constant level when in the LPS treated group relative to the EGCG/LPS treated group. Overall, these results suggest that the differential regulation of inflammatory cytokines is an important factor influencing the suppressive effects of EGCG against LPS-activated inflammatory response in RAW264.7 cells.

Key words : Cytokines, Epigallocatechin gallate (EGCG), inflammatory response, lipopolysaccharide, nitric oxide

서 론

EGCG는 녹차(*Camellia sinensis*, green tea)에 포함되어 있는 총 폴리페놀 혼합물의 40% 이상을 차지하는 대표적인 카테킨(Catechin)이다[13, 25]. 녹차는 EGCG 이외에도 epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin (EGC), epicatechin (EC), 등을 포함하고 있으나 강력한 항산화작용을 통해 인체질화에 대한 가장 우수한 효능을 나타내는 것은 EGCG로 알려져 있다[25].

EGCG는 당뇨병, 중추신경계의 퇴행성질환, 암, 심혈관질환, 비만 등 다양한 인체질화에 대해 우수한 치료효능을 나타낸다[8, 12, 24]. 일부 당뇨병모델동물에서 EGCG는 혈액 내 포도당의 농도를 감소시키고, 인슐린 감수성을 증가시키며, 간에서 포도당생성을 증가시킴으로써 당뇨를 개선시키는 효과를

나타내었다[27-29]. 또한, 대장암 등 다양한 인간의 암세포에서 EGCG는 epidermal growth factor (EGF)와 platelet-derived growth factor (PDGF) signaling pathway의 조절을 통해 세포분열과 세포성장을 억제하고, 세포사(apoptosis)를 촉진시켰으며[17, 20, 22, 30], 췌장암의 invasion, angiogenesis, metastasis를 효과적으로 억제하였다[24]. 더불어, EGCG는 알츠하이머모델인 A β PP/PS-1 (presenilin 1) 이중돌연변이 형질전환마우스에서 뇌조직에서 A β 펩타이드의 침적을 감소시키고, 미토콘드리아의 기능을 보호하는 효과를 나타내었으며[5], 파킨슨질환의 원인단백질인 α -synuclein의 fibrillogenesis를 억제함으로써 독성물질로의 전환을 억제하였다[3].

뿐만 아니라, EGCG는 포유동물세포, 실험동물 그리고 인간에서 우수한 항염증 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. EGCG는 LPS로 자극된 골수유래 수지상세포(bone marrow-derived dendritic cells)와 RAW264.7 세포에서 TNF- α 의 생산을 효과적으로 저해하였지만, 염증사이토카인(inflammatory cytokines)의 생산과 MAPKs (mitogen-activated protein kinases) 인산화과정은 세포에 따라 다양한 반응이 관찰되었다[1, 10, 18, 31]. 또한, EGCG는 BALB/c에서 추출한 peri-

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5388, Fax : +82-55-350-5389

E-mail : dyhwang@pusan.ac.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.

toneal 대식세포에서 LPS에 의해 자극되는 NO 생성 및 iNOS의 발현을 유의적으로 억제하였다[15]. 하지만 LPS에 의해 활성화된 대식세포에서, EGCG의 염증억제과정이 LPS에 의해 유도된 다양한 pro-inflammatory 사이토카인과 anti-inflammatory 사이토카인의 발현에 미치는 서로 다른 조절작용에 대한 연구는 현재까지 수행되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 EGCG가 LPS로 자극된 RAW264.7 세포에서 염증억제과정의 NO관련인자와 사이토카인 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해, NO농도, iNOS 발현량, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 사이토카인의 발현량을 분석하였다. 이러한 결과는 EGCG는 NO생성과 iNOS 발현 억제, IL-1 β , TNF- α , IL-10 발현 억제를 통해 염증반응을 조절하지만 IL-6 발현에는 영향을 미치지 못함을 제시하고 있다.

재료 및 방법

세포배양

EGCG의 세포독성 및 염증반응에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 사용된 RAW264.7 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. RAW264.7 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Carlsbad, CA, USA), L-glutamine, penicillin 및 streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 함유한 Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Gibco)에 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 비활성화 상태로 배양하였다.

세포 생존율 분석

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diohenyl tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)는 살아있는 세포 내 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase의 효소 작용에 의해 환원되어 보라색의 formazan을 형성하게 되며, 이를 용해액으로 완전히 녹여 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 세포 생존율을 예측하는 실험에 사용되는 시약이다. 먼저 RAW264.7 세포를 96 well plate (5×10⁴ 세포/well)에 분주하여 24시간 배양하여 안정화시켰다. EGCG의 적정농도 설정을 위한 실험에서는 이들 세포에 멸균 증류수 (Vehicle)와 100, 200, 400 μ M EGCG를 처리하였고, LPS의 적정농도 설정을 위한 실험에서는 멸균 증류수와 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 μ g/ml LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 최종적으로 준비된 세포로부터 배지를 제거하고, MTT 용액(2,000 μ g/ml)을 50 μ l 첨가한 뒤, 4시간 동안 추가 배양하였다. 세포 내에 보라색 결정이 생성되면 dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co.)용액을 150 μ l씩 첨가하여 formazan을 녹였다. 각 well에 나타난 색깔의 변화를 VersaMax ELISA Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570nm에서 측정하였다. 한편, 각 추출물의 처리조건에 따

른 세포주의 변화를 위상차 도립현미경(Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzer-land)을 이용하여 400x 배율에서 관찰하였다.

NO농도 분석

RAW264.7 세포로부터 생성되는 NO농도는 세포배양액 중

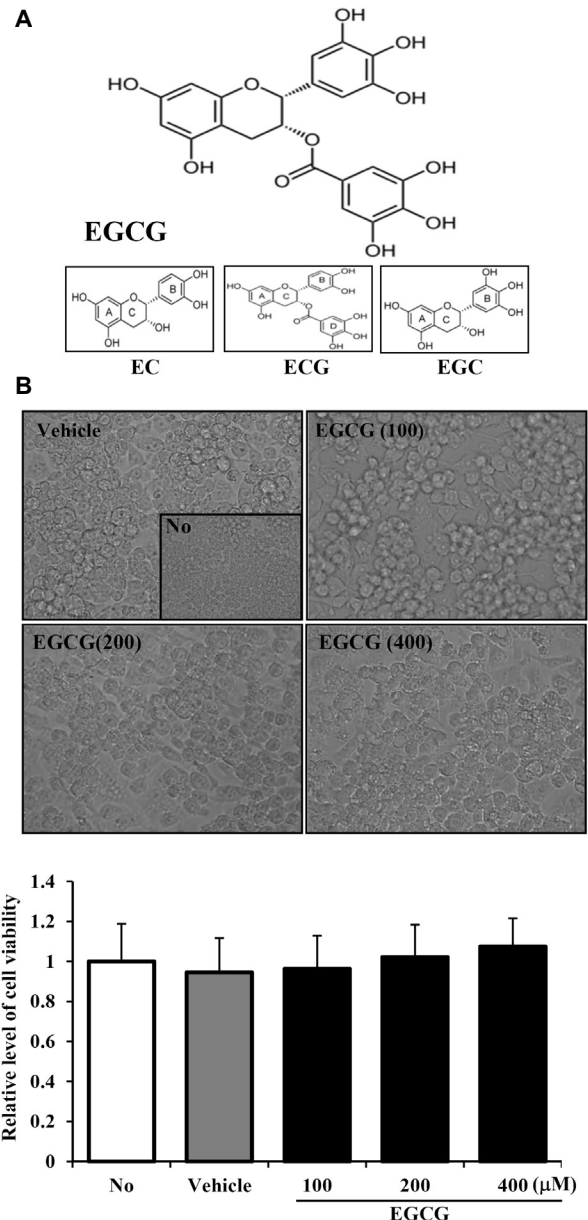


Fig. 1. Structure of main compounds in green tea and cytotoxicity of EGCG. (A) Structure of EGCG, EC, ECG EGC. (B) After the incubation with different concentrations of EGCG for 24 hr, their morphology were observed with microscope at 400x magnification and the cell viability was determined using MTT assay in triplicate. The data shown represent the means \pm SD of three replicates.

존재하는 NO₂의 형태로 Nitric oxide assay kit (ab65328, Abcam, Cambridge, UK) 및 Griess reagent (1% sulfanilamide + 0.2% N-Naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5% H₃PO₄)를 이용하여 측정하였다. LPS의 적정농도 설정을 위한 실험에서 NO 농도는 Nitric oxide assay kit를 이용하여 회사의 권장법에 따라 측정되었다. 먼저, RAW264.7 세포를 5×10⁴ 세포/well 농도로 96 well plate에 분주하여 24시간 배양하여 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 µg/ml LPS로 자극한 후 24시간 배양하였다. 각 세포로부터 배양액(85 µl)을 취하여 96 well plate로 옮긴 후 assay buffer (115 µl) 및 nitrate reductase mixture (5 µl), enzyme cofactor (5 µl)를 혼합하여 실온에서 1시간 동안 반응시켜 nitrate를 nitrite로 환원시켰다. 그 후 enhancer (5 µl)를 첨가하고 10분 동안 반응시킨 다음, Griess reagent R1 (50 µl)과 R2 (50 µl)를 첨가하여 10분 동안 반응시켜 VersaMax ELISA microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 검량선(Standard concentration curve)은 nitrate standard를 단계적으로 희석하여 사용하였다. 또한, EGCG의 항염증 효과를 측정하는 실험에서 NO농도는 Griess reagent를 이용하여 측정되었다. RAW264.7 세포를 5×10⁴ 세포/well 농도로 96 well plate에 분주하여 24시간 배양하여 100, 200, 400 µM EGCG를 2시간 동안 전처리한 후 1.0 µg/ml LPS로 자극하여 24시간 배양하였다. 각 세포배양액 100 µl을 취하여 96 well plate로 옮긴 후 Griess reagent (100 µl)를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 VersaMax ELISA microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 곡선은 sodium nitrite (NaNO₂)를 단계적으로 희석하여 사용하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

세포배양액 내 IL-6 농도분석은 Mouse IL-6 ELISA MAX (BioLegend, San Diego, CA)를 사용하여 제조사에서 제시한 방법에 따라 실시하였다. RAW264.7 세포를 5×10⁴ 세포/well 농도로 96 well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. LPS 적정농도 설정을 위한 실험에서 RAW264.7 세포를 5×10⁴ 세포/well 농도로 96 well plate에 분주하여 24시간 배양하여 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 µg/ml LPS로 자극하여 24시간 배양하였다. 또한, EGCG의 항염증 효과를 측정하는 실험에서 적절히 배양된 RAW264.7 세포에 100, 200, 400 µM EGCG를 2시간 동안 전처리하고 1.0 µg/ml LPS로 자극하여 24시간 배양하였다. 그 후 항체로 코팅된 well을 washing solution으로 세척한 후 각 well에 assay buffer (200 µl)를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 표준용액(100 µl) 및 세포배양액(100 µl)을 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시키고 washing solution으로 세척한 후 detection antibody (100 µl)를 첨가하여 1시간 동안 결합시켰다. 다시 각 well에 avidin-HRP (100 µl)를 첨가

하고 30분 동안 반응한 후 washing solution으로 세척한 후 TMB (100 µl)를 첨가 후 암실에서 20분 동안 반응시키고 stop solution (100 µl)을 첨가하여 반응을 종료하였다. 최종적으로 반응이 끝난 후 VersaMax ELISA microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

역전사중합연쇄반응(Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

RAW264.7 세포에서 발현되는 IL-1β, iNOS, IL-10, TNF-α, IL-6의 유전자 발현에 대한 EGCG의 효과를 조사하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. RAW264.7 세포를 5×10⁵ 세포/well 농도로 6 well plate에 분주하여 24시간 배양하여 100, 200, 400 µM EGCG를 2시간 동안 전처리하고 1 µg/ml LPS로 자극하여 24시간 배양하였다. 세포를 회수하여 RNA-Bee (Tel- Test, Friendswood, TX) 시약을 이용하여 제조사의 권장법을 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA (3-5 µg)와 oligo-(dT) primer, DEPC 처리된 dH₂O를 이용하여 70°C에서 10분 조건 후 5x buffer (Roche, Mannheim, Germany), 10 mM dNTP (Roche), 0.1 M DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Superscript (Invitrogen)를 이용하여 25°C에서 10분, 42°C에서 50분, 90°C에서 5분 조건에서 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 대한 PCR을 수행하기 위해 cDNA 2.5 µg에 각 10 µM primers (sense, anti-sense) 및 10x buffer (Roche), 2 mM dNTP (Roche), 5 U Taq polymerase (Roche)를 혼합한 후 94°C에서 30초, 60°C-62°C에서 30초 및 72°C에서 45초 조건에서 28-30 cycles을 수행하였다. PCR을 위해 사용된 primer의 염기 서열은 다음과 같다: iNOS, sense, 5'-CACTT GGAGT TCACC CAGT-3', anti-sense, 5'-ACCAC TCGTA CTTGG GATGC-3', 30 cycles; TNF-α, sense, 5'-CCTGT AGCCC ACGTC GTAGC-3', anti-sense, 5'-TTGAC CTCAG CGCTG ACTTG-3', 28 cycles; IL-1β, sense, 5'-GCACA TCAAC AAGAG CTTCA GGCAG-3', anti-sense, 5'-GCTGC TTGTG AGGTG CTGAT GTAC-3', 30 cycles; IL-10, sense, 5'-CCAAG CCTTA TCGGA AATGA-3', anti-sense, 5'-TTTTT ACAGG GGAGA AATCG-3', 28 cycles; IL-6, sense, 5'-TTGGG ACTGA TGTTG TTGACA-3', anti-sense, 5'-TCATC GCTGT TGATA CAATC AGA-3', 28 cycles. 최종 PCR산물은 1% agarose gel에 전기영동하고 EtBr (Roth, Karlsruhe, Germany)로 염색하여 GelDoc (Atto, Kyoto, Japan)에서 band를 관찰하였다.

통계적 유의성 분석

대조그룹과 실험그룹 사이의 통계적 유의성은 일원배치분산분석(SPSS for windows, Release 10.10, Standard Version, Chicago, IL, USA)을 사용하여 분석하였다. 모든 값은 평균 ±SD로 표기하였으며, p<0.05를 유의성으로 간주하였다.

결 과

EGCG의 최적처리농도 결정

EGCG가 염증반응에 미치는 영향을 분석하기 전에, 먼저 EGCG의 최대처리농도를 결정하기 위하여, RAW264.7 세포

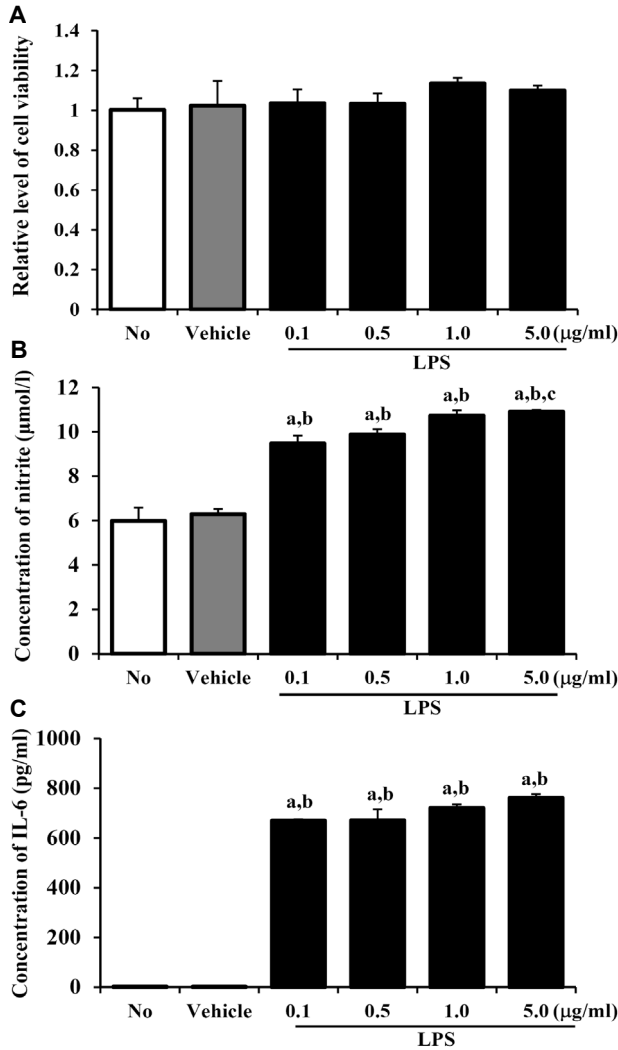


Fig. 2. Determination of optimal concentration of LPS. (A) Cytotoxicity of LPS. The cell viability was determined in RAW264.7 cells treated with different concentrations of LPS for 24 hr. (B) Concentration of nitrite. The level of NO was determined in supernatant collected from RAW264.7 cells treated with different concentrations using Nitric oxide assay kit. (C) IL-6 concentration. After centrifugation of culture supernatant, the concentration of IL-6 was determined in the supernatant collected from the RAW 264.7 cells treated with LPS using a IL-6 ELISA kit that could detect IL-6 at 9.3 pg/ml. Triplicate trials per group were evaluated by NO assay and ELISA assay. The data shown represent the means \pm SD of three replicates. a, $p < 0.05$ relative to the no-treated group. b, $p < 0.05$ relative to the vehicle treated group.

에 EGCG를 농도별로 처리한 뒤 24시간 동안 배양한 후 세포 형태를 관찰하고 MTT분석을 실시하였다. 그 결과, EGCG는 400 μ M 농도까지도 RAW264.7 세포 생존율에 유의적인 감소를 유도하지 않았다. 이러한 결과를 통해 EGCG가 대식세포의 염증반응에 미치는 영향을 평가하기 위한 EGCG의 농도를 100, 200, 400 μ M로 결정하였다.

RAW264.7 세포의 염증을 유발하는 최적 LPS 농도 결정

RAW264.7 세포에서 염증을 유발할 수 있는 최적 LPS 농도를 설정하기 위해, RAW264.7 세포에 4가지 다른 농도(0.1, 0.5, 1.0, 5.0 μ g/ml)의 LPS를 처리한 후 MTT분석, NO농도분석, IL-6농도분석을 실시하였다. 그 결과, RAW264.7 세포의 생존율은 LPS를 처리한 모든 농도에서 Vehicle그룹과 유의적인 차이가 없었다(Fig. 2A). 또한, NO농도는 LPS 처리그룹이 No 그룹이나 Vehicle그룹에 비하여 50% 이상, 농도의존적으로 증가하였다. 특히, 고농도(1.0과 5.0 μ g/ml)의 LPS농도로 처리한 그룹은 저농도(0.1과 0.5 μ g/ml)의 LPS농도로 처리한 그룹에 비하여 16% 정도 증가하였다(Fig. 2B). IL-6의 농도변화는 NO 농도 변화와 유사한 양상을 나타내었다. LPS를 처리한 그룹은 No와 Vehicle그룹에 비하여 IL-6의 농도가 669-761 pg/ml 까지 증가하였으나 LPS농도에 증가에 따라 1.3, 7.3, 5.7%의 증가만을 나타내었다(Fig. 2C). 이러한 결과를 바탕으로, 본 연구에서는 RAW264.7 세포를 활성화시키기 위한 최적의 LPS 농도를 1.0 μ g/ml로 설정하여 EGCG의 억제효능 평가에 적용하였다.

EGCG의 전처리가 LPS로 유도된 RAW264.7 세포의 NO 생성과 iNOS 발현에 미치는 영향

LPS에 의해 유발된 RAW264.7 세포의 염증과정에서 NO 생성과 iNOS 발현에 미치는 EGCG의 예방효과를 평가하기 위하여, RAW264.7 세포에 2시간 동안 50, 100, 200, 400 μ M EGCG를 처리한 후 1 μ g/ml LPS로 24시간 자극하여 NO농도와 iNOS의 발현을 분석하였다. 먼저, RAW264.7 세포의 생존율과 세포형태는 비록 일부 농도에서 통계학적 의미 없이 약간 감소하였으나 EGCG의 농도에 상관없이 일정한 수준을 유지하였으며, 특이적인 변화를 나타내지 않았다(Fig. 3A). 또한, NO농도는 LPS를 처리한 그룹이 No그룹에 비하여 급격히 증가하여 63 μ mol/l까지 증가하였으나 400 μ M EGCG를 처리한 그룹에서만 68.2% 정도 감소하였다. 그러나 100과 200 μ M EGCG를 처리한 그룹에서는 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 3B). 또한, iNOS의 발현은 비록 감소율은 차이가 있지만 전체적으로 NO농도 변화와 유사한 양상을 나타내었다. Vehicle그룹은 38%의 iNOS 발현 증가를 나타내었지만 200과 400 μ M EGCG 처리에 의해 12.3%와 17.4% 감소하였다(Fig. 3C). 이러한 결과는 EGCG는 LPS 자극에 의해 증가된 NO생성과 iNOS 발현을 유의적으로 억제함을 제시하고 있다.

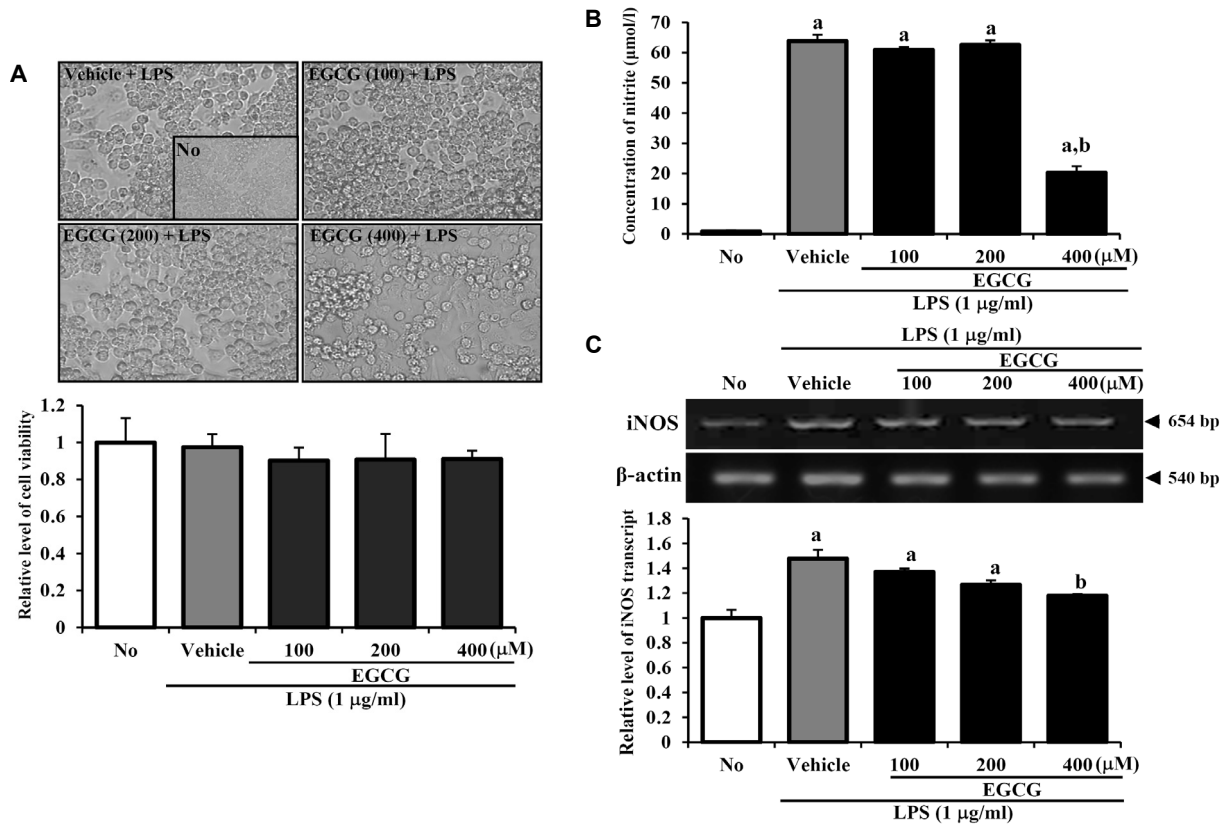


Fig. 3. Effects of EGCG pretreatments on NO production and iNOS expression in LPS-induced inflammation. (A) After the incubation with different concentrations of EGCG and LPS for 24 hr, their morphology were observed with microscope at 400× magnification and the cell viability was determined using MTT assay in triplicate. The data shown represent the means ± SD of three replicates. (B) NO concentration. The level of NO was determined in supernatant collected from EGCG/LPS cotreated RAW264.7 cells using Griess reagent. (C) Transcripts level of iNOS. The mRNA level of the iNOS gene were measured by RT-PCR using specific primer. The data shown represent the means ± SD of three replicates. a, $p < 0.05$ relative to the no-treated group. b, $p < 0.05$ relative to the vehicle treated group.

EGCG의 전처리가 LPS로 유도된 RAW264.7 세포의 염증사이토카인의 발현 조절에 미치는 영향

LPS에 의해 유발된 RAW264.7 세포의 anti-inflammatory 사이토카인과 pro-inflammatory 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해, RT-PCR을 이용하여 IL-1β, TNF-α, IL-10, IL-6의 발현을 관찰하였다. 그 결과, IL-1β과 TNF-α의 발현은 LPS 처리에 의해 급격히 374% 혹은 297% 증가하였지만 EGCG 처리에 의해 감소하였다. 그러나 감소비율에는 차이가 있었으며, TNF-α의 발현은 EGCG 농도의 증가에 따라 14.2-20.7%까지 감소하였고, IL-1β의 발현은 400 µM EGCG를 처리한 그룹에서만 유의적으로 감소하였다(Fig. 4A). 또한, anti-inflammatory 사이토카인인 IL-10과 IL-6의 발현은 pro-inflammatory 사이토카인과 다른 양상을 나타내었다. IL-10과 IL-6의 발현은 LPS 처리에 의해 급격하게 증가하였지만 EGCG 처리에 의한 감소는 IL-10의 발현에서만 관찰되었고 IL-6에서는 유의적인 변화가 없었다. IL-10의 발현은 400 µM EGCG를 처리한 그룹에서만 유의적으로 감소하고 다른 농도

처리그룹에서는 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 4A). 더불어, RT-PCR의 결과에서 관찰된 EGCG 처리에 의해 IL-6의 발현에 변화를 확인하기 위하여, IL-6단백질의 농도를 ELISA로 측정하였다. 그 결과, IL-6단백질의 농도도 RT-PCR의 결과와 유사하게 유의적인 변화가 없었다(Fig. 4B). 이러한 결과는 EGCG 처리가 anti-inflammatory 사이토카인과 pro-inflammatory 사이토카인의 발현에 미치는 영향에 차이가 있음을 제시하고 있으며, 특히, IL-6의 발현에는 유의적인 영향이 없음을 제시하고 있다.

고찰

사이토카인은 감염(infection), 면역반응(immune response), 염증반응(inflammation), 그리고 외상(trauma)에 대한 숙주반응을 조절하는 조절인자(regulator)로서 분자량 8 Da-40 kDa을 갖는 작은 비구조성 단백질이다[4]. 다양한 사이토카인 중에서, IL-1β, TNF-α 등은 pro-inflammatory 사이토카인으로

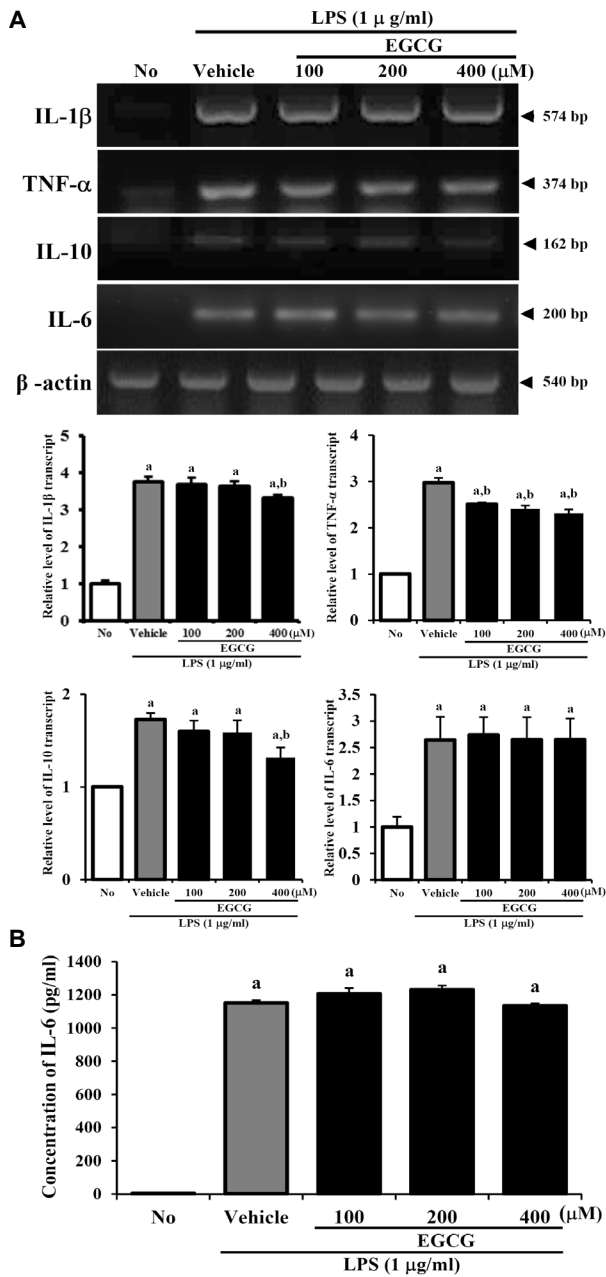


Fig. 4. Effects of EGCG on the expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-activated RAW 264.7 cells. (A) Changes in the mRNA level of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the No, Vehicle/LPS and EGCG/LPS treated group. The mRNA levels of the IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-10 genes were examined by RT-PCR using specific primers. (B) IL-6 concentration. After the collection of culture supernatant from the RAW264.7 cells cotreated with LPS and EGCG, IL-6 concentration were measured using a IL-6 ELISA kit that could detect IL-6 at 9.3 pg/ml. The data shown represent the means \pm SD of three replicates. a, $p < 0.05$ relative to the no-treated group. b, $p < 0.05$ relative to the vehicle treated group.

염증반응을 촉진시키는 작용을 유도하며, IL-4, IL-10, IL-13 등은 anti-inflammatory 사이토카인으로 pro-inflammatory 사이토카인의 활성을 억제하는 효과를 나타낸다[4, 19]. 최근 까지 염증반응에 효과적으로 작용하는 다양한 치료제들이 염증사이토카인의 발현이나 분비를 조절한다는 기전들이 알려져 있으나, EGCG가 RAW264.7 세포에 미치는 항염증 작용 기전에 대한 분석은 부족한 상황이다. 따라서, 본 연구에서는 LPS에 의해 유도된 염증반응에서 NO농도, iNOS 발현, pro-inflammatory와 anti-inflammatory 사이토카인의 발현에 미치는 EGCG의 영향을 분석하고자 하였다. 특히, 본 연구에서는 EGCG가 LPS에 의해 유도된 IL-1 β , TNF- α , IL-10의 발현을 억제하는 효과를 나타내었지만 IL-6의 발현에는 영향을 주지 못함을 제시하고 있다.

다양한 천연물질의 효능을 평가하기 위해서는 MTT분석을 통해 세포에 독성을 미치지 않는 최대농도를 설정하여야 한다. EGCG는 다양한 농도에서 RAW264.7 세포의 생존율에 미치는 영향이 분석되었다. RAW264.7 세포의 생존율은 10 μ M EGCG 농도까지 유의적인 변화를 나타내지 못하였으며[14], 150 μ g/ml (약 327.25 μ M) 혹은 500 μ g/ml (약 1090.81 μ M) 농도까지도 생존율에 특이적인 영향을 미치지 않았다[16, 30]. 본 연구에서는 RAW264.7 세포는 400 μ M EGCG까지 특이적인 독성을 나타내지 않아 이전의 결과와 동일한 경향을 나타내었다.

LPS는 지질과 다당류로 구성된 거대분자로서 그람음성 박테리아의 외막에서 발견되며, 많은 세포에서 CD14/TLR4/MD2 수용체에 결합하는 원형내독소(prototypical endotoxin)으로 작용한다[21, 26]. 특별히, LPS는 pro-inflammatory 사이토카인, NO, eicosanoid의 분비를 촉진하는 단핵구(monocytes), 수지상세포(dendritic cells), 대식세포(macrophage), B세포(B cells) 등을 자극하기 위해 사용된다[26]. 대식세포인 RAW264.7 세포를 자극하기 위해서 사용되는 LPS의 농도는 매우 다양하며, 대부분 50 ng/ml [14], 100 ng/ml [7], 10 μ g/ml [30]의 범위에서 사용되고 있다. 본 연구에서는 0.1, 0.5, 1.5 μ g/ml의 낮은 농도의 LPS를 사용하여 RAW264.7 세포를 자극하였으나 성공적으로 염증반응을 유발하였다. 또한, LPS 농도 증가에 따른 NO생성량과 IL-6분비량은 특이적인 변화가 관찰되지 않았지만 일부 고농도에서 증가하는 현상을 관찰할 수 있었다. 더불어 이러한 결과는 이전에 보고된 연구결과와 일치함을 제시하고 있다.

사람을 포함한 포유동물에서 NO는 다양한 생리적, 병리적 과정에 포함되는 중요한 세포신호전달분자(cellular signaling molecule)이며, NO의 전구체로는 nitroglycerine과 amyl nitrite가 알려져 있다[9]. NO는 박테리아, 식품, 균류, 포유동물 등 모든 생물체에서 NOS에 의해 생산되며, 사람의 면역반응에서는 식세포(phagocyte)에 의해 iNOS가 주로 생산된다. iNOS는 TNF- α 에 의한 강한 억제신호를 받으며, IL-4와 IL-10

에 의해 약한 억제신호를 받지만, TNF에 의해 촉진신호를 받는다[6, 11]. EGCG는 효과적으로 LPS에 의해 증가된 NO생성량을 감소시킨다. NO생성은 400-500 μ M EGCG 처리로 80-90% 저해되었고[2], 1 μ M EGCG 처리로 42% 저해되었으며[14], 10 μ M에서는 29% 저해되었다[1]. 또한, iNOS 발현도 다양한 EGCG의 농도 증가(1-15 μ M)에 따라 점진적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 본 연구에서, 비록 실험조건이나 저해 비율은 다르지만 EGCG 처리에 의한 NO농도와 iNOS 발현 감소는 이전의 결과와 매우 유사하게 관찰되지만 이전 실험과의 저해비율 차이는 처리농도와 처리방법의 차이에 의한 것으로 추정된다. 또한 두 가지 nitric oxide assay방법으로 측정된 NO농도의 차이는 비록 Greiss reagent는 동일하지만 enhancer, enzyme cofactor, nitrate reductase 등의 차이에 의한 영향으로 사료된다.

사이토카인은 다양한 세포에서 분비되어 세포의 분화, 증식, 발달을 조절하는 활성을 나타내며, 인터루킨(interlukins), 인터페론(interferons), 클론자극인자(colony-stimulating factors), 많은 성장인자(growth factors) 등을 포함한다[23]. 다양한 농도의 EGCG는 LPS 자극에 의해 증가된 사이토카인의 발현이나 분비를 저해하였다. TNF- α 단백질농도는 100-200 μ M EGCG에서 51-78% 저해되었으며, TNF- α mRNA발현도 30-40% 감소되었다[30]. 다양한 사이토카인 중에서 IL-6는 감염이나 염증반응에도 포함되지만 대사, 재생 혹은 신경과정에도 관여하는 다양한 활성을 갖기 때문에 pro-inflammatory 사이토카인 혹은 anti-inflammatory 사이토카인으로 간주된다[23]. 그러나 EGCG에 대한 IL-6의 반응에 대한 보고는 거의 없다. 본 연구에서는 LPS 자극에 대한 EGCG의 저해효과에 관여하는 사이토카인을 확인하기 위해 4가지 종류의 사이토카인의 발현변화를 관찰하였으며, 대부분은 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타내었지만 IL-6는 유의적인 변화가 없었다. 따라서, 이러한 결과는 다른 사이토카인과 다르게 IL-6는 LPS 자극에 의한 EGCG 억제효능에 관여하지 못함을 제시하는 최초의 결과이다.

이상의 결과를 종합하면, 이전의 연구결과에서는 200 μ M 이하의 낮은 농도의 EGCG를 처리하고 고농도의 LPS를 자극한 후 1-2종류의 사이토카인과 iNOS를 분석한 연구를 수행하였지만, 본 연구의 결과는 400 μ M까지의 고농도 EGCG를 처리한 후 다양한 pro-inflammatory와 anti-inflammatory 사이토카인을 분석함으로써 차별화된 연구를 수행하였다. 특히, 본 연구의 결과는 EGCG가 LPS의 자극에 의해 활성화된 RAW264.7 세포를 효과적으로 억제하는 효능을 나타냄을 제시하고 있으며, 이러한 과정에 사이토카인들이 서로 다르게 특이적 반응을 중계함을 제시하고 있다. 또한, 이러한 결과는 EGCG의 염증반응에 미치는 효능작용기전의 해석에 중요한 정보를 제공할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산물식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업(114034-03)의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Bae, H. B., Li, M., Kim, J. P., Kim, S. J., Jeong, C. W., Lee, H. G., Kim, W. M., Kim, H. S. and Kwak, S. H. 2009. The effect of epigallocatechin gallate on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in a murine model. *Inflammation* **33**, 82-91.
- Beutler, B. 2002. LPS in microbial pathogenesis: promise and fulfillment. *J. Endotoxin Res.* **8**, 329-335.
- Dagmar, E. E., Jan, B., Annett, B., Martin, H., Laura, M., Rudi, L., Sabine, E., Annalisa, P. and Erich, E., W. 2008. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 558-566.
- Dinarello, C. A. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* **118**, 503-508.
- Dragicevic, N., Smith, A., Lin, X., Yuan, F., Copes, N., Delic, V., Tan, J., Cao, C., Shytle, R. D. and Bradshaw, P. C. 2011. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and other flavonoids reduce Alzheimer's amyloid-induced mitochondrial dysfunction. *J. Alzheimers Dis.* **26**, 507-521.
- Green, S. J., Nacy, C. A., Schreiber, R. D., Granger, D. L., Crawford, R. M., Meltzer, M. S. and Fortier, A. H. 1993. Neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha blocks *in vivo* synthesis of nitrogen oxides from L-arginine and protection against *Francisella tularensis* infection in *Mycobacterium bovis* BCG-treated mice. *Infect. Immun.* **61**, 689-698.
- Hashimoto, K. and Sakagami, H. 2008. Induction of apoptosis by Epigallocatechin gallate and autophagy inhibitors in a mouse macrophage-like cell line. *Anticancer Res.* **28**, 1713-1718.
- Higdon, J. V. and Frei, B. 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **43**, 89-143.
- Hou, Y. C., Janczuk, A. and Wang, P. G. 1999. Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr. Pharm. Des.* **5**, 417-441.
- Ichikawa, D., Matusui, A., Imai, M., Sonoda, Y. and Kasahara, T. 2004. Effect of various catechins on the IL-12p40 production by murine peritoneal macrophages and a macrophage cell line, J774.1. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1353-1358.
- Kamijo, R., Gerecitano, J., Shapiro, D., Green, S. J., Aguet, M., Le, J. and Vilcek, J. 1995. Generation of nitric oxide and clearance of interferon-gamma after BCG infection are impaired in mice that lack the interferon-gamma receptor. *J. Inflamm.* **46**, 23-31.
- Khan, N., Afaq, F., Saleem, M., Ahmad, N. and Mukhtar, H. 2006. Targeting multiple signaling pathways by green

- tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res.* **66**, 2500-2505.
13. Kim, M. K., Jung, H. S., Yoon, C. S., Kwon, M. J., Koh, K. S., Rhee, B. D. and Park, J. H. 2008. The protective effect of EGCG on INS-1 cell in the oxidative stress and mechanism. *Kor. Diabetes J.* **32**, 121-130.
 14. Lee, S. J., Kang, H. Y., Lee, S. Y. and Hur, S. J. 2014. Green tea polyphenol Epigallocatechin-3-O-gallate attenuates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. *J. Food Nutr. Res.* **2**, 425-428.
 15. Lin, Y. L. and Lin, J. K. 1997. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol. Pharmacol.* **52**, 465-472.
 16. Macedo, J. A., Ferreira, L. R., Camara, L. E., Santos, J. C., Gambero, A., Macedo, G. A. and Ribeiro, M. L. 2012. Chemopreventive potential of the tannase-mediated bio-transformation of green tea. *Food Chem.* **133**, 358-365.
 17. Masuda, M., Suzui, M. and Weinstein, I. B. 2001. Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin. Cancer Res.* **7**, 4220-4229.
 18. Netsch, M. I., Gutmann, H., Aydogan, C. and Drewe, J. 2006. Green tea extract induces interleukin-8 (IL-8) mRNA and protein expression but specifically inhibits IL-8 secretion in caco-2 cells. *Planta. Med.* **72**, 697-702.
 19. Opal, S. M. and Depalo, V. A. 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* **117**, 1162-1172.
 20. Peng, G., Wargovich, M. J. and Dixon, D. A. 2006. Anti-proliferative effects of green tea polyphenol EGCG on Ha-Ras-induced transformation of intestinal epithelial cells. *Cancer Lett.* **238**, 260-270.
 21. Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zähringer, U., Seydel, U. and Padova, F. D. 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **8**, 217-225.
 22. Sachinidis, A., Seul, C., Seewald, S., Ahn, H., Ko, Y. and Vetter, H. 2000. Green tea compounds inhibit tyrosine phosphorylation of PDGF β -receptor and transformation of A172 human glioblastoma. *FEBS Lett.* **471**, 51-55.
 23. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D, and Rose-John, S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta.* **1813**, 878-888.
 24. Shankar, S., Ganapathy, S., Hingorani, S. R. and Srivastava, R. K. 2008. EGCG inhibits growth, invasion, angiogenesis and metastasis of pancreatic cancer. *Front. Biosci.* **13**, 440-452.
 25. Singh, B. N., Shankar, S. and Srivastava, R. K. 2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *J. Biochem. Pharmacol. Res.* **82**, 1807-1821.
 26. Stewart, I., Schluter, P. J. and Shaw, G. R. 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health-a review. *Environ. Health* **5**, 7.
 27. Tsuneki, H., Ishizaka, M., Terasawa, M., Wu, J. B., Sasaoko, T. and Kimura, I. 2004. Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. *BMC Pharmacol.* **4**, 18.
 28. Waltner-Law, M. E., Wang, X. L., Law, B. K., Hall, R. K. and Nawano, M. 2002. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea represses hepatic glucose production. *J. Biol. Chem.* **277**, 34933-34940.
 29. Wu, L. Y., Juan, C. C., Ho, L. T., Hsu, Y. P. and Hwang, L. S. 2004. Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague-Dawley rats. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 643-648.
 30. Yang, G. Y., Liao, J., Li, C., Chung, J., Yurkow, E. J., Ho, C. T. and Yang, C. S. 2000. Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis* **21**, 2035-2039.
 31. Yun, H. J., Yoo, W. H., Han, M. K., Lee, Y. R., Kim, J. S. and Lee, S. I. 2008. Epigallocatechin-3-gallate suppresses TNF- α -induced production of MMP-1 and -3 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatol. Int.* **29**, 23-29.

초록 : Lipopolysaccharide로 활성화된 RAW264.7세포에서 염증반응사이토카인 발현에 대한 Epigallocatechin gallate의 억제효능연구

서은지¹ · 고준¹ · 김지은¹ · 고은경¹ · 송성화¹ · 성지은¹ · 박찬규¹ · 이현아¹ · 김동섭¹ · 손홍주¹ · 이충열² · 이희섭³ · 황대연^{1*}

(¹부산대학교 생명자원과학대학/생명산업융합연구원, ²강림오가닉, ³부산대학교 생활환경대학)

Epigallocatechin gallate (EGCG)는 녹차(*Camellia sinensis*, green tea)에 포함되어 있는 대표적인 카테킨(Catechin)으로, 당뇨(diabetes), 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disorders), 암(cancer), 심혈관계 질환(cardiovascular disease), 비만(obesity) 등의 다양한 임상질환에 우수한 치료효과를 나타내는 것으로 알려졌다. 본 연구에서는 EGCG가 LPS (Lipopolysaccharide)로 자극된 RAW264.7 세포의 염증억제과정에서 Nitric oxide (NO)관련인자와 사이토카인 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해, NO농도, inducible NO synthase (iNOS) 발현량, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 사이토카인의 발현량을 분석하였다. 먼저, EGCG (100-400 μ M)를 처리한 Raw264.7 세포에서 특이적인 독성이 나타나지 않음을 확인하였으며, 이후 Raw264.7 세포에 4가지 다른 농도(0.1, 0.5, 1.0, 5.0 μ g/ml)의 LPS를 처리한 후 MTT분석, NO농도분석, IL-6농도분석을 실시하여, 염증을 유발할 수 있는 최적 LPS 농도를 1 μ g/ml로 설정하였다. NO농도를 분석한 결과, LPS를 처리한 그룹이 No그룹에 비하여 급속히 증가하여 63 μ mol/l까지 증가하였으나 400 μ M EGCG를 처리한 그룹에서만 68.2% 정도 감소하였으며, 동시에 iNOS 발현 양상은 200, 400 μ M EGCG/LPS 처리 그룹에서 각각 12.3%, 17.4% 감소하였다. 또한, 감소비율에는 차이가 있었으나, anti-inflammatory 사이토카인(IL-1 β , TNF- α)과 pro-inflammatory 사이토카인(IL-10)의 발현은 EGCG/LPS 처리에 따라 유의적으로 감소하였다. 그러나, IL-6단백질과 mRNA 농도는 Vehicle/LPS 처리 그룹과 EGCG/LPS 처리 그룹에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서, 본 연구의 결과는 EGCG가 LPS의 자극에 의해 활성화된 Raw264.7 세포를 효과적으로 억제하는 효능을 나타냄을 제시하고 있으며, 이러한 과정에 사이토카인들이 서로 다르게 특이적 반응을 중계함을 제시하고 있다.