

청피의 항염증효과

예영준 · 김연섭 · 강미숙¹

가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실, ¹침구의학교실

Effects of Citri Reticulatae Viride Pericarpium on 4-Hydroxynonenal-Induced Inflammation in PC12 Cells

Young Jun Ye, Youn Sub Kim, Mi Suk Kang¹

Departments of Anatomy-Pointology and ¹Acupuncture and Moxibustion, College of Korean Medicine, Gachon University

Received: October 7, 2016
Revised: December 13, 2016
Accepted: December 13, 2016

Correspondence to: Mi Suk Kang
Department of Acupuncture and Moxibustion, College of Korean Medicine, Gachon University, 1342 Seongnam-daero, Seongnam 13120, Korea
Tel: +82-32-770-1342
Fax: +82-32-468-4033
E-mail: cyberdoc001@hanmail.net

Copyright © 2016 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

Objectives: The purpose of this study was to observe the effects of Citri Reticulatae Viride Pericarpium (CP) on 4-Hydroxynonenal (4-HNE)-induced inflammation in PC12 cells.

Methods: 4-HNE was treated in PC12 cell to cause inflammatory response, and then treated with CP water extract at 25, 50, and 100 µg/ml. The phosphorylation of Jun N-terminal kinase (JNK) and the expression of NF-κB in PC12 cells were determined by Western blot, respectively.

Results: The phosphorylation of JNK was significantly decreased in 4-HNE-stimulated PC12 cell by the treatment of CP extract at 25 µg/ml. The 4-HNE-induced expression of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) p65 in nuclear of the cells was significantly decreased in PC12 cell by treatment with CP extract at 25, 50, and 100 µg/ml.

Conclusions: These results suggest that CP water extract has an anti-inflammatory activity through suppressing the JNK and NF-κB activation.

Key Words: Citri Reticulatae Viride Pericarpium, 4-HNE, pJNK, pNF-κB

서론

염증(inflammation)은 상해를 방어하며, 사멸되고 손상된 세포를 없애고, 스트레스, 부상 및 감염에 의한 손상 지역을 정상 상태로 되돌리려는 복잡한 세포 및 분자들의 반응으로¹⁾ 적절한 염증반응은 인체를 보호하는 데 필수적이거나 과도하거나 부적절한 염증반응은 만성으로 진행되어 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 경화증, 뇌종양 및 수막염을 비롯한 다양한 퇴행성 신경질환의 발달에 중요한 역할을 한다²⁾. 4-Hydroxynonenal (4-HNE)은 오메가6 불포화 지방산의 과산화반응으로 세포막 지질 과산화에 의해 생성되는 알데히드의 하나로³⁾ 높은 농도의 4-HNE은 PC12 세포에서 Jun N-terminal kinase (JNK)를 활성화시키고⁴⁾, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

(NF-κB)의 인산화를 증가시켜 염증성 사이토카인 상승과 같은 강한 염증작용을 일으킨다⁵⁾. 또한 세포막과 관련된 포도당과 글루타민산염 수송체, 이온이동 ATPase, 아밀로이드의 대사에 관여하는 효소 및 세포골격 단백질의 변화에 의해 비만, 당뇨병, 대사증후군 및 파킨슨병, 알츠하이머병과 같은 신경 퇴행성 질환 등 다양한 질병의 원인이 된다⁶⁾. 최근에는 Purkayastha와 Cai⁷⁾가 염증 신호의 활성화와 비만증에 관한 연구, Ham⁸⁾의 비만과 염증반응 및 산화스트레스에 관한 연구, Cho⁹⁾의 운동이 비만 중년 여성의 염증 지표에 미치는 영향 등의 연구를 통해 비만과 염증과의 관계에 대한 다양한 접근이 활발하게 이루어지고 있는 실정이다.

靑皮(Citri Reticulatae Viride Pericarpium, CP)는芸香科(Rutaceae)에 속한 상록 소교목인 굴나무(reticulata Blanco)

의 유목 또는 미성숙 과실의 과피를 건조한 것으로 疏肝破氣, 散結消痰, 胸脇胃脘疼痛을 치료하는 데 사용된다¹⁰. 靑皮의 주요성분은 hesperidin이고 narirutin과 hesperetin도 상당량 함유하고 있으며¹¹ 약리학적으로 靑皮는 α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) free radical-scavenging 활성을 이용한 항산화 작용^{12,13} 외에 허혈성 모델 쥐에서의 뇌 보호¹⁴, compound 48/80로 유발된 모델 쥐에서 항알레르기¹⁵ 및 천식 마우스 모델에서 천식 억제¹⁶, 마우스 면역세포에서 면역조절기능¹⁷ 등이 있는 것으로 보고되고 있다. 이러한 효능들로 보아, 靑皮가 4-HNE에 손상된 신경세포에 대해 보호 작용이 있을 것이라 생각되어 염증반응 시 염증매개물 생성을 유도하는 염증신호전달분자인 JNK와 전사인자인 NF- κ B의 활성화 기전에 대한 억제효과를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

본 실험에 사용한 PC12 세포는 신경세포의 특성을 나타내는 rat adrenal pheochromocytoma cell line으로 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포배양을 위해 10% horse serum, 5% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 2% NaHCO₃가 포함된 RPMI-1640 배지를 배양액으로 사용하였으며 37°C의 온도와 5% CO₂가 포함된 공기가 공급되는 CO₂ incubator에서 배양하였다.

2. 기기 및 시약

1) 기기

본 실험을 위해 사용된 기기로는 Clean Bench (Nuair, Plymouth, MN, USA), CO₂ Incubator (Nuair), Spectrophotometer (Implen, München, Germany), Water Purification (High-Q, Wilmette, IL, USA), Microplate Reader (Dynex, Chantilly, VA, USA), Freezing dryer (Eyela, Tokyo, Japan), Sonicator (Sonics, Newton, CT, USA), Autoclave (Sam Woo, Gimpo, Korea), Balance (Mettler, Greifensee, Switzerland), Automatic X-ray Filmprocessor

(JPI, Seoul, Korea), Centrifuge (Hanil, Suwon, Korea) 등이 있다.

2) 시약

본 실험에 사용된 시약으로는 4-HNE (Cayman, Ann Arbor, MI, USA), MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), RPMI Medium 1640 (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), fetal bovine serum (Gibco; Thermo Fisher Scientific), Horse Serum (Gibco; Thermo Fisher Scientific), Sodium Bicarbonate (Sigma-Aldrich), Sodium Chloride (Sigma-Aldrich), Dimethyl Sulfoxide (Amresco, Solon, OH, USA), Trizma Base (Sigma-Aldrich) 등을 구입하여 사용하였다.

3. 약물 제조

본 실험에 사용한 靑皮 (CP) (주)옴니허브(Daegu, Korea)에서 구입하였다. 추출물 제조를 위해 증류수 500 ml에 靑皮 50 g을 환류추출기에 넣고 2시간 동안 전탕하였으며, 그 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 -85°C에서 동결건조하였다. 이때 얻어진 靑皮 물추출물(CP)은 7 g으로 수율은 14%였다.

4. 단백질 발현 분석(Western blot analysis)

PC12 세포는 100 mm dish에 5×10⁶개씩 분주하고 4-HNE (35 μ mol)과 CP (25, 50, 100 μ g/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포를 수거한 후 1× phosphate buffer saline (pH 7.4)으로 2번 씻어낸 후 1,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. 세포침전물에 세포분해용액 (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)을 넣은 후 초음파 분쇄기로 세포를 균질화하고 다시 20분 동안 12,000 rpm으로 원심 분리하였다. 단백질 정량은 protein assay dye reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 정량한 단백질을 Mini-PROTEAN[®] TGX[™] Gel (Bio-Rad)에 loading하여 분리한 다음 4°C 냉장고 안에서 nitrocellulose membrane (NC; Bio-Rad)으로 이동시켰다. NC membrane에 1차 항체인 mouse anti-actin antibody (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)와 rabbit anti-JNK antibody (CST, Danvers,

MA, USA), rabbit anti-pJNK antibody (CST), rabbit anti-NF-κB p65 antibody (CST) 및 rabbit anti-pNF-κB p65 antibody (CST)와 4°C에서 overnight 반응시키고, 3회 세척한 후 2차 항체로서 actin은 mouse immunoglobulin G horseradish peroxidase-conjugated antibody (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)와 JNK, phosphorylation of JNK (pJNK), NF-κB p65, pNF-κB p65는 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (CST)를 사용하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 단백질 밴드의 검출은 clarity western ECL substrate (Bio-Rad)를 사용하여 발색시킨 후 X-ray film으로 감광시켜 이미지화한 후 이를 이미지 프로그램(ImageJ)을 사용하여 정량하였다.

5. 통계처리

통계분석은 4-HNE와 4-HNE+靑皮 투여 group 간의 유의성 검증을 위해 GraphPad Prism ver. 3 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)으로 Student's t-test를 사용하였으며, 실험 결과는 평균±평균의 표준오차로 나타났다. 통계적 유의성 검정은 P<0.05로 하였다.

결 과

1. 靑皮추출물의 pJNK 단백질 발현에 대한 효과

세포 외 염증자극을 세포막에서 세포 내 핵까지 전달하는 신호전달분자 중 하나인 JNK MAPK 발현 조절에 대한 靑皮의 효과를 관찰하고자 PC12 세포에 靑皮추출물을 처리하고 염증유도물질인 4-HNE를 처리한 후 JNK의 인산화 단백질(pJNK)의 발현을 Western blot으로 측정하였다.

그 결과, 정상군(normal)에서의 pJNK 단백질 발현량을 100%로 하였을 때 4-HNE만 처리한 대조군(control)의 발현은 200.9%±16.73%로 나타났다. 또한 靑皮추출물(CP)을 25 µg과 4-HNE를 처리한 CP25군에서 pJNK의 발현이 148.3%±8.79%로 나타났고, 50 µg과 4-HNE를 처리한 CP50군에서 145.2%±23.91%, 靑皮추출물 100 µg과 4-HNE를 처리한 CP100군에서 162.6%±30.00%로 모두 대조군에 비해 감소하였으며, CP25군에서 유의성 있는 감소가 관찰되었다(Fig. 1).

2. 靑皮추출물의 pNF-κB p65 단백질 발현에 대한 효과

靑皮추출물의 염증전사인자 중 하나인 NF-κB p65에 대한 억제효과를 확인하고자 PC12 세포에 靑皮추출물(CP)을 투여하고 4-HNE를 처리한 다음 세포질 내의 pNF-κB p65 단백질 발현을 Western blot으로 확인하였다.

그 결과 정상군(normal)에서의 pNF-κB p65 단백질 발현을 100%로 하였을 때, 4-HNE만 처리한 대조군의 pNF-κB p65 발현은 400.2%±17.05%였다. 반면 靑皮추출물 25 µg과 4-HNE를 처리한 CP25군에서 pNF-κB p65 단백질 발현은 181.7%±57.24%, 靑皮추출물 50 µg과 4-HNE를 처리한 CP50군에서는 156.0%±60.13%, 靑皮추출물 100 µg과 4-HNE를 처리한 CP100군에서는 165.9%±50.91%로 모두 대조군에 비해 유의한 감소 효과를 나타내었다(Fig. 2).

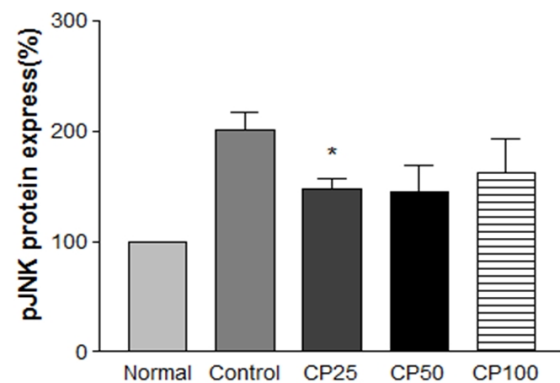
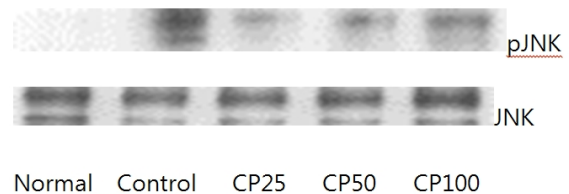


Fig. 1. Effect of CP on pJNK expression. Data are represented by mean±standard error of mean (n=4 in each group). CP: Citri Reticulatae Viride Pericarpium, pJNK: phosphorylation of Jun N-terminal kinase, JNK: Jun N-terminal kinase, Normal: only media-treated group, Control: 35 µmol 4-Hydroxynonenal (4-HNE)-treated group, CP25: 35 µmol 4-HNE and 25 µg/ml CP-treated group, CP50: 35 µmol 4-HNE and 50 µg/ml CP-treated group, CP100: 35 µmol 4-HNE and 100 µg/ml CP-treated group. Statistical significances are based on comparison to the control group (*P<0.05).

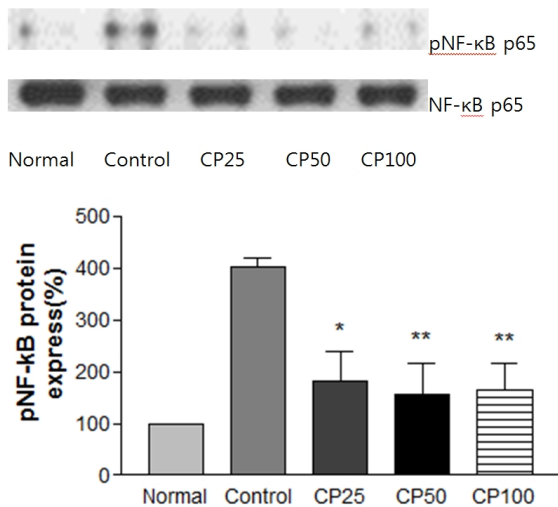


Fig. 2. Effect of CP on pNF-κB expression. Data are represented by mean ± standard error of mean (n=4 in each group). CP: Citri Reticulatae Viride Pericarpium, pNF-κB: phospho-nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κ: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, Normal: only media- treated group, Control: 35 μmol 4-Hydroxynonenal (4-HNE)-treated group, CP25: 35 μmol 4-HNE and 25 μg/ml CP-treated group, CP50: 35 μmol 4-HNE and 50 μg/ml CP-treated group, CP100: 35 μmol 4-HNE and 100 μg/ml CP-treated group. Statistical significances are based on comparison to the control group (*P < 0.05; **P < 0.01).

고찰

靑皮는 性味가 苦辛하고 溫하여 辛味는 發散하고 溫性은 通氣시키며 苦味는 泄氣시켜 下행하게 하여 肝膽二經에 들어가 肝氣鬱滯로 인한 脇肋脹痛과 乳房脹痛 및 疝氣 疼通 등을 치료하는데 효과가 있다¹⁰.

비만과 진피에 관한 연구는 여러 방면에서 이루어지고 있는데^{18,19}, Choi²⁰는 청피와 진피가 항비만 소재로 사용될 수 있음을 말하였다. 청피에 관한 기존연구로는 Joo²¹는 청피가 PC12 신경세포에서 4-HNE에 의한 세포사멸에 항산화 효과가 있음을 또한 염증반응은 산화 스트레스의 증가와 관련이 있다는 연구도 있었다²². 이에 저자는 靑皮를 이용하여 세포손상에 의한 염증반응에 어떤 영향을 미치는지를 연구하기 위해 PC12 세포에 靑皮추출물을 투여하고 4-HNE를 처리한 다음 염증반응에 관여하는 대표적인 인자인 JNK와 NF-κB 인산화 단백질 발현량을 관찰하기 위해 Western blot을 실시하였다.

PC12 세포는 신경세포의 특성을 가지고 있어 세포사멸과 항산화효능 실험이 일반적이지만 과산화와 염증은 밀접

한 관계가 있어 PC12 세포로 염증인자를 볼 수 있다²³. MAPKS는 세포외부의 자극을 세포막에서부터 세포핵까지 전달하는 대표적인 신호전달 경로로 extracellular signal-activated kinases, JNK, p38 MAPK 세 가지로 분류되며²⁴, 염증성 매개 물질의 생성에 관여하는 중요한 신호 전달 경로이기도 하다²⁵. 이 중 JNK는 세포외부의 스트레스 자극에 의해 활성화되며 염증반응을 매개하는 것으로 알려져 있다²⁶.

따라서 본 실험은 PC12 세포에서 pJNK 단백질 발현을 Western blot을 통해 관찰한 결과, 靑皮추출물 25 μg, 50 μg 및 100 μg을 투여한 모든 군은 대조군에 비해 감소하였으며, 25 μg을 투여한 군에서는 유의성이 있는 감소가 관찰되었다.

NF-κB는 염증조절의 중요한 인자로 NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), RELA (p65), C-REL 및 RelB와 같은 5개의 소단위체로 구성되어 있으며 면역과 염증반응 및 세포증식과 세포사멸을 조절한다⁵. NF-κB 계열 중 가장 일반적이고 특성화된 형태인 P50/P65는 자극이 없는 상태에서 억제 단백질인 inhibitor kappa-B (IκB)와 결합하여 보통 세포질에서 비활성 이중이량체로 존재한다. 그러나 염증반응과 같은 세포의 자극에 반응하여 IκB kinase가 활성화된 후 인산화 과정을 통해 IκB는 분리되고, 자유롭게 된 NF-κB 염증성 매개 물질의 전사를 조절하는 표적 유전자의 promoter에 결합하게 된다²⁷. 또한 pNF-κB 역시 염증반응의 마커로 확인하기도 하지만 핵안으로 NF-κB의 이동을 확인하는 지표로 사용된다.

따라서 본 실험은 PC12 세포에서 pNF-κB p65 단백질 발현을 Western blot을 통해 관찰한 결과, 靑皮추출물 25 μg, 50 μg 및 100 μg 투여한 모든 군은 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다.

이상의 결과들을 종합해보면 靑皮는 항염증과 관련된 JNK와 NF-κB의 인산화를 억제하였다.

결론

靑皮가 신경세포에서 항염증 작용을 나타내는지 확인하기 위하여 PC12 세포에 4-HNE을 처리하여 염증반응을 유도한 후 염증신호전달분자인 JNK와 전사인자인 NF-κB

인산화 단백질 발현을 관찰하여 아래와 같은 결과를 얻었다

1. pJNK 단백질 발현량은 靑皮 물추출물 25 µg/ml 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다.
 2. pNF-κB p65 단백질 발현량은 靑皮 물추출물 25, 50 및 100 µg/ml 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다.
- 이상의 결과로 보아, 靑皮 물추출물은 신경세포에서 JNK와 NF-κB의 활성화를 억제하여 항염증효과를 나타냈다.

References

1. Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem*. 2009 ; 108(6) : 1343-59.
2. Kannappan R, Gupta SC, Kim JH, Reuter S, Aggarwal BB. Neuroprotection by spice-derived nutraceuticals: you are what you eat! *Mol Neurobiol*. 2011 ; 44(2) : 142-59.
3. Siddiqui MA, Kumar V, Kashyap MP, Agarwal M, Singh AK, Khanna VK, et al. Short-term exposure of 4-hydroxynonenal induces mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells. *Hum Exp Toxicol*. 2012 ; 31(4) : 336-45.
4. Bruckner SR, Estus S. JNK3 contributes to c-jun induction and apoptosis in 4-hydroxynonenal-treated sympathetic neurons. *J Neurosci Res*. 2002 ; 70(5) : 665-70.
5. Yin G, Wang Y, Cen XM, Yang M, Liang Y, Xie QB. Lipid peroxidation-mediated inflammation promotes cell apoptosis through activation of NF-κB pathway in rheumatoid arthritis synovial cells. *Mediators Inflamm*. 2015 : 460310.
6. Mattson MP. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol*. 2009 ; 44(10) : 625-33.
7. Purkayastha S, Cai D. Disruption of neurogenesis by hypothalamic inflammation in obesity or aging. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013 ; 14(4) : 351-6.
8. Ham MR. Role of macrophage glucose-6-phosphate dehydrogenase in proinflammatory responses and oxidative stress associated with obesity. Doctor thesis. Seoul: Seoul University. 2013.
9. Cho WJ. Effects of combined and walking exercises on inflammatory markers in obese middle-aged women. *Korea J Sport*. 2013 ; 11(1) : 251-63.
10. Oriental University Edit Committee. *Herbology*. Seoul : YoungLim Co. 2011 : 217.
11. Baik SO, Bock JY, Chun HJ, Jeong SI, Baek SH, Oh HB, et al. Analysis and quantitative distribution of glycosided flavonoids in citrus and Korean Chung-pi. *Anal Sci Technol*. 2001 ; 14(4) : 340-8.
12. Min SS, Yuan TS, Po JC. Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. *Food Chem*. 2008 ; 111 : 892-6.
13. Li X, Huang Y, Chen D. Protective effect against hydroxyl-induced DNA damage and antioxidant activity of citri reticulatae pericarpium. *Adv Pharm Bull*. 2013 ; 3(1) : 175-81.
14. Rho YH, Jeong HW, Lee WS. Experimental study of fraction of Citri Reticulatae Viride Pericarpium extract on the brain damage in cerebral ischemia. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2002 ; 16 : 893-8.
15. Kim DK, Lee KT, Eun JS, Zee OP, Lim JP, Eum SS, et al. Anti-allergic components from the peels of Citrus unshiu. *Arch Pharm Res*. 1999 ; 22(6) : 642-5.
16. Lee HJ. Effects of citro reticulatae viride pericarpium on the vascular endothelial growth factor (VEGF) in the bronchial asthma mouse model. *J Pediatr Korean Med*. 2006 ; 4 : 181-94.
17. Jeong HY, Oh CH, Eun JS. Effect of Citri Reticulatae Viride Pericarpium water extract on immunocytes in mice. *Korean J Orient Med Pathol*. 1998 ; 12 : 55-62.
18. Jung SY. Anti-obesity effect of Citrus unshiu peel in rats fed a high-fat diet. Master thesis. Seoul: Kyunghee University. 2013.
19. Jo HK, Han MH, Hong SH, Choi YH, Park C. Ethanol extracts of citrus peel inhibits adipogenesis through AMPK signaling pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *J Life Sci*. 2015 ; 25(3) : 285-92.
20. Choi ES. Effect of citri unshiu pericarpium and citri unshiu pericarpium immaturus on differentiation of pre-adipocyte. Master thesis. Iksan: Wonkwang University. 2014.
21. Joo KG. Effects of Citri Reticulatae Viride Pericarpium on apoptosis in PC-12 cell. Master thesis. Seongnam: Gachon University. 2016.
22. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1994 ; 269(7) : 4705-8.
23. Fu J, Shi Q, Song X, Xia X, Su C, Liu Z, et al. Tetrachlorobenzoquinone exhibits neurotoxicity by inducing inflammatory responses through ROS-mediated IKK/IκB/NF-κB signaling. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016 ; 6 : 241-50.
24. Yoon JH, Youn K, Ho CT, Karwe MV, Jeong WS, Jun M. P coumaric acid and ursolic acid from corni fructus attenuated β amyloid25 – 35-induced toxicity through regulation of the NF-κB signaling pathway in PC12 cells. *J Agric Food Chem*. 2014 ; 62(21) : 4911-6.
25. Kang SY, Jung HW, Lee MY, Lee HW, Chae SW, Park YK. Effect of the semen extract of Cuscuta chinensis on inflammatory responses in LPS-stimulated BV-2 microglia. *Chin J Nat Med*. 2014 ; 12(8) : 573-81.

26. Caivano M. Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transporters and nitric oxide synthetase in RAW264 macrophages. FEBS Lett. 1998 ; 429(3) : 249-53.
27. Nolan GP, Ghosh S, Liou HC, Tempst P, Baltimore D. DNA binding and I κ B inhibition of the cloned p65 subunit of NF- κ B, a rel-related polypeptide. Cell. 1991 ; 64(5) : 961-9.