

LPS로 자극한 대식세포에서 1,2,3,4,6-Penta-O-Galloyl-β-D-Glucose의 염증 억제 효과

이희원¹ · 강예림¹ · 배민서¹ · 김윤희^{1,2}

¹대구대학교 식품영양학과

²대구대학교 항노화연구소

Anti-Inflammatory Effects of 1,2,3,4,6-Penta-O-Galloyl-β-D-Glucose in LPS-Stimulated Macrophages

Hee Won Lee¹, Ye Rim Kang¹, Min Seo Bae¹, and Yoon Hee Kim^{1,2}

¹Department of Food and Nutrition, College of Engineering and

²Research Institute of Anti-Aging, Daegu University

ABSTRACT 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-β-D-glucose (PGG) is a gallotannin isolated from *Galla Rhois*. In a previous study, PGG was shown to suppress the allergic response by attenuating immunoglobulin E production both *in vitro* and *in vivo*. However, the effect of PGG on bacteria-induced inflammation at physiological concentration remains unclear. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of PGG on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages. PGG inhibited release of nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ by alleviating protein expression of inducible NO synthase and cyclooxygenase-2 in LPS-treated RAW264.7 cells. Furthermore, PGG suppressed the release of interleukin-6 and tumor necrosis factor-α induced by LPS. Further study indicated that PGG blocked translocation of the p65 subunit of nuclear factor-κB from the cytosol into the nucleus, which is one of the underlying mechanisms of the anti-inflammatory action of PGG. Collectively, these data suggest that PGG might be useful for the treatment of inflammatory disease.

Key words: *Galla Rhois*, PGG, gallotannin, inflammation, NF-κB

서 론

염증은 물리적, 화학적, 생물학적 조직 손상에 대한 정상적이고 방어적인 반응으로 손상된 조직을 정상 상태로 수복시키는 과정이다(1,2). 염증반응의 이로운 역할에도 불구하고 과도하고 반복적인 염증은 암, 자가면역질환, 심혈관계 질환 및 당뇨병과 같은 다양한 질병의 병태생리적 반응과 관련된 것으로 알려져 있다(3,4).

일반적으로 염증성 질환의 치료제로는 non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs)와 glucocorticosteroids 등이 사용되었으나, 이들 약물의 심각한 부작용 때문에 상대적으로 부작용이 적은 천연물질로부터 염증반응을 효과적으로 억제할 수 있는 물질의 탐색에 대한 요구가 증가하고 있다(5).

한편 대식세포는 개시, 유지, 회복과 같은 염증반응의 모든 단계에서 중심적인 역할을 한다(6-8). 대식세포는 다양

한 자극으로 활성화되는데(7,8), 특히 lipopolysaccharide (LPS)가 대식세포 세포막의 toll-like receptor(TLR) 4에 결합하면 MyD88이라는 어댑터 단백질을 유도하고 nuclear factor-kappa B(NF-κB)와 같은 전사인자를 활성화한다. 활성화된 NF-κB에 의해 대식세포에서는 다양한 cytokine과 chemokine이 분비되며, 이러한 일련의 과정으로 염증반응이 유도되고 이로 인해 손상된 조직의 치료를 돕는다(6,9).

NF-κB는 interleukin(IL)-6나 tumor necrosis factor (TNF)-α와 같은 염증성 cytokine과 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase(COX)-2와 같은 유도성 효소의 유전자 전사에 있어서 핵심적인 전사인자이다(8,10). 따라서 NF-κB의 억제는 염증반응을 억제하는 데 있어서 유용한 전략이 될 수 있다. 자극이 없는 정상적인 상태에서 NF-κB는 억제단백질인 inhibitory-kappa B(Iκ-B)와 결합하여 heterodimer의 형태로 세포질에 존재한다. LPS와 같은 다양한 염증성 자극으로 Iκ-B는 인산화되고 분해된 후, Iκ-B로부터 자유로워진 NF-κB는 세포질에서 빠르게 핵으로 이동하여 DNA-binding site에 결합하고 위에서 언급한 여러 가지 염증성 매개 물질의 전사를 활성화한다

Received 18 January 2017; Accepted 23 February 2017

Corresponding author: Yoon Hee Kim, Department of Food and Nutrition, College of Engineering, Daegu University, Gyeongbuk 38453, Korea

E-mail: kimyh0128@daegu.ac.kr, Phone: +82-53-850-6834

(11,12).

최근에는 천연물로부터 새로운 항염증 인자를 탐색하기 위한 많은 연구가 진행되고 있으며, 본 연구팀도 천연물에서 분리한 다양한 화합물의 항염증 효과를 검토 중이고, 그중 오배자(五倍子, *Galla Rhois*)로부터 분리한 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose(PGG)의 항염증 효과를 확인하였기에 보고하고자 한다.

PGG는 오배자(13), 붉나무(*Rhus Chinensis* Mill)(14), 모란(*Paeonia Suffruticosa*)(15) 등과 같은 식물에서 검출되는 페놀성 화합물인 gallotannin이다. 선행연구에 따르면 PGG는 당뇨 억제 효과(16), 항암 효과(14), 항알레르기 효과(17)와 같은 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 또한, PGG를 함유하는 식물은 중국에서 예로부터 염증을 치료하는 약용식물로 사용되었다고 한다(18). 따라서 본 연구에서는 오배자에서 분리한 PGG가 LPS로 자극한 마우스 유래 대식세포인 RAW264.7 세포에서의 항염증 작용과 그 분자메커니즘을 검토하는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

Salmonella abortus equi 유래의 LPS는 Sigma-Aldrich Co.(St Louis, MO, USA)로부터, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin 및 0.25% trypsin-EDTA 용액은 HyClone(Logan, UT, USA)으로부터 구입하였다. 단백질 정량에 사용하는 Bio-Rad Protein Assay kit은 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)로부터 구입하였다. Western blotting에 사용된 1차 항체 anti-NF- κ B p65(D14E12) rabbit monoclonal과 anti-Lamin A/C(4C11) mouse monoclonal은 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)로부터, anti-iNOS rabbit polyclonal, anti-COX-2 rabbit polyclonal과 anti- β -actin mouse monoclonal은 Novus Biologicals(Littleton, CO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

PGG의 추출 및 분리

본 실험에 사용한 건조 오배자는 2007년 10월에 충남 아산에서 채집한 것을 세척하여 사용하였다. 건조된 오배자 1 kg을 분쇄기로 잘게 마쇄한 후 80% 메탄올(MeOH) 10 L로 3일간 3회 반복 추출하여 얻어진 용액을 여과한 다음, 감압 농축하여 얻어진 결과물(82 g) 중 450 g에 대하여 10% MeOH 3 L로 현탁하여 저극성 용매인 *n*-hexane으로 먼저 추출한 후 물층을 다시 ethyl acetate(EtOAc), *n*-butyl alcohol(*n*-BuOH)을 이용하여 각각 순차적으로 3회 분획하여 추출하였다. 각 용매추출 분획을 감압 농축하여 건조시킨 후 *n*-hexane 가용분획(24.6 g), EtOAc 가용분획(265.2 g), *n*-BuOH 가용분획(37.2 g), H₂O 가용분획(98.7 g)을 각각 얻었다. 얻어진 EtOAc 가용분획(22.0 g)을 Diaion HP-20

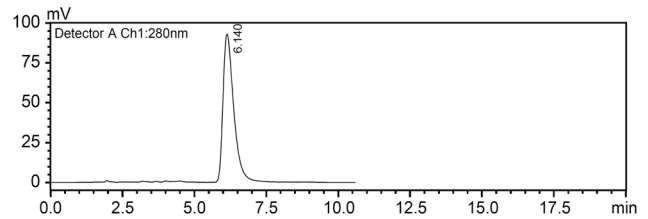


Fig. 1. HPLC chromatogram of 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (PGG) isolated from *Galla Rhois*.

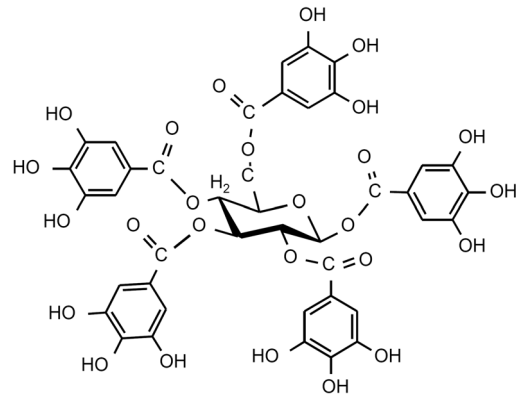


Fig. 2. Chemical structure of PGG.

column(3.2 cm i.d.×35 cm) 및 Toyopearl HW-40 column(coarse grade; 3.2 cm i.d.×57 cm), YMC GEL ODS AQ 120-50S column을 활용한 분리를 실시하여 PGG를 67.3 mg 분리하였으며 순도는 HPLC 분석을 통해 98% 이상인 것을 확인하였다(Fig. 1). PGG(Fig. 2)는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다. 대조군에도 DMSO를 처리하였으며, DMSO의 최종 처리 농도는 0.1% 이하가 되도록 하였다.

세포 및 세포 배양

본 실험에 사용된 마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포는 10% FBS, 100 U/mL penicillin과 100 μ g/mL streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 95% 습도, 5% CO₂ 환경인 배양기에서 배양하였다.

세포 증식 및 세포 독성 측정

PGG가 RAW264.7 세포의 세포 증식 및 세포 독성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 RAW264.7 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/200 μ L/well의 세포수가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 18시간 배양하였다. PGG를 농도별(0, 1, 2.5, 5, 10 μ M)로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 CellTiter96[®] Aqueous One Solution Assay of Cell Proliferation(Promega, Madison, WI, USA)을 이용해 세포 증식능을 microplate reader(Sunrise;

Tecan Austria, Salzburg, Austria)를 사용하여 측정하였다. 측정값은 PGG를 처리하지 않은 0 μ M PGG군에 대한 상대적인 값으로 나타내었다.

또한, 세포용해에 의해 세포질로부터 분비된 lactate dehydrogenase(LDH)의 방출량을 측정하는 CytoTox96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay(Promega)를 이용하여 PGG가 세포에 독성을 나타내는지를 microplate reader (Sunrise; Tecan Austria)를 사용하여 측정하였다. 측정값은 다음의 식으로 계산하여 나타내었다.

$$\% \text{ of cytotoxicity} = \frac{\text{실험군의 LDH 방출}}{\text{최대 LDH 방출}} \times 100$$

염증 매개 물질 측정

PGG가 LPS로 유도된 염증 매개 물질 분비에 미치는 영향을 평가하기 위해 세포배양액에서 nitrite, PGE₂, IL-6 및 TNF- α 의 분비량을 측정하였다. 구체적으로 RAW264.7 세포를 24-well plate에 2×10^5 cells/mL/well의 세포수가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 18시간 배양하였다. 100 ng/mL의 농도가 되도록 LPS의 자극 하에 PGG의 최종농도가 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 μ M이 되도록 처리한 후 24시간 동안 추가 배양하였다. 얼음 위에서 반응을 종결시킨 후 배양 상층액 중으로 분비된 NO는 Griess reagent system(Promega)으로, PGE₂는 Prostaglandin E₂ Parameter Assay kit(R&D Systems, Minneapolis, MI, USA)으로, IL-6는 IL-6 ELISA kit(eBiosciences, San Diego, CA, USA)으로, TNF- α 는 mouse TNF- α ELISA kit(eBiosciences)을 사용하여 반응시킨 후 microplate reader (Sunrise; Tecan Austria)로 흡광도를 측정하였다.

총 단백질 추출

PGG가 LPS로 유도된 NO 및 PGE₂ 합성에 미치는 영향을 평가하기 위해 세포로부터 총 단백질을 추출하여 염증 매개 물질 합성에 관여하는 iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 구체적으로는 위의 염증 매개 물질 측정 실험에는 세포배양액을 사용하고, 같은 실험의 세포를 PBS로 세척한 후 세포에 cell lysis buffer[pH 7.5, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA), 50 mM sodium fluoride(NaF), 30 mM sodium pyrophosphate(Na₄P₂O₇), 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 2 mg/mL aprotinin, 1 mM pervanadate]를 첨가하여 얼음에서 10분 동안 배양한 후 4°C로 설정된 원심분리기에서 12,000 $\times g$ 로 15분 동안 원심분리 하여 상층액을 얻었고, Bio-Rad Protein Assay kit을 사용하여 단백질을 정량하였다.

세포질 및 핵 단백질의 추출, 분리

PGG가 LPS 자극에 의한 NF- κ B의 세포 내 분포에 미치

는 영향을 평가하기 위해 세포질 및 핵 단백질을 분리하였다. RAW264.7 세포를 35 \times 10 mm cell culture dish에 5×10^5 cells/2 mL/dish의 세포수가 되도록 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 18시간 배양하였다. 100 ng/mL의 농도가 되도록 LPS의 자극 하에 PGG의 최종농도가 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 μ M이 되도록 처리한 후 30분간 추가 배양하였다. 얼음 위에서 반응을 종결시키고 세포를 PBS로 세척한 후 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents(Thermo Scientific, Tewksbury, MA, USA)로 세포질과 핵 단백질을 분리하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad Protein Assay kit을 사용하여 정량하였다.

Western blot 분석

NO의 합성에 관여하는 iNOS의 단백질 발현량을 측정하기 위해서 총 단백질 추출물을 10 μ g이 되도록 조정하여 western blot 분석법으로 확인하였다. 이때 일차항체는 anti-iNOS rabbit polyclonal(Novus Biologicals)을 처리하였다. PGE₂ 합성에 관여하는 COX-2의 단백질 발현량을 측정하기 위해서 총 단백질 추출물을 10 μ g이 되도록 조정하였으며, 일차항체는 anti-COX-2 rabbit polyclonal(Novus Biologicals)을 처리하였다.

NF- κ B 전사인자의 세포 내 분포를 확인하기 위해서 세포질 단백질(10 μ g)과 핵 단백질(2.5 μ g) 농도가 동일하도록 조정된 후 2 \times sodium dodecyl sulfate(SDS) sample buffer를 가하고 100°C에서 5분간 단백질 변성시켰다. Mini-PROTEAN system(Bio-Rad)을 이용하여 10% SDS polyacrylamide gel을 만들어 각 well에 단백질 양이 동일하도록 각 시료를 loading 하고 전기영동을 시행하였으며, 이어서 Immobilon[®] transfer membranes 0.45 μ m(Millipore, Billerica, MA, USA)에 transfer 시켰다. Membrane을 1 \times blocking buffer(Biofact Biofactory, Daejeon, Korea)로 실온에서 1시간 동안 blocking 한 후 일차항체 anti-NF- κ B(Cell Signaling Technology), anti- β -actin(Novus Biologicals), anti-Lamin A/C(Cell Signaling Technology)를 처리하여 4°C에서 하룻밤 배양하였다. 0.1% Tween-20을 함유한 Tris-buffered saline(TBST, pH7.6)으로 세척한 다음 이차항체(HRP-conjugated anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG, Cell Signaling Technology)에 1시간 동안 실온에서 배양하였다. TBST로 세척하고 ECL solution(Thermo Scientific) 기질로 반응시킨 후 LAS-3000 Lumino Image Analyzer System(Fujifilm, Tokyo, Japan)을 이용하여 band를 확인하였다. Band의 강도는 Image J free software(NIH, Bethesda, MA, USA)를 이용하여 정량화하였다.

통계 분석

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 GraphPad Prism Version 5.0 software(GraphPad, San Diego, CA,

USA)를 이용하여 분석하였다. 실험 결과는 mean±standard error of mean(SEM)으로 나타냈으며, 각 그룹 간의 통계적 유의성은 one-way ANOVA를 통한 Dunnett's test를 통해서 검정하였다. P 값은 $P<0.05$ 를 통계적 유의차가 있다고 판단했다.

결과 및 고찰

세포 성장 및 세포 독성에 미치는 PGG의 영향

PGG가 RAW264.7 세포 성장에 미치는 영향을 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3A에 나타낸 것과 같이 PGG를 24시간 동안 RAW264.7 세포에 처리한 결과 대조군보다 5 μ M의 PGG를 처리한 군에서부터 세포 성장이 유의적으로 감소하였다($P<0.01$). 또한, PGG의 RAW264.7 세포에 대한 독성을 측정된 결과 대조군보다 2.5 μ M의 PGG를 처리한 군에서부터 세포질에서부터 LDH 효소의 방출이 증가하였다(Fig. 3B, $P<0.001$). Jang 등(19), Pan 등(20), Lee 등(21)과 Genfa 등(22)의 선행연구에서는 21.2~191 μ M과 같은 높은 농도에서 PGG의 염증 억제 효과를 평가하였으나, Li 등(23)의 연구에 따르면 20 mg/kg이 되도록 PGG를 C57BL/6 생쥐에 복강투여를 했을 때 혈장에서 최대 3~4 μ M 농도로 PGG가 검출된 것으로부터 기존 연구에서 설정한 PGG 농도는 동물 실험 및 인체에 적용하기에 너무 높은 것으로 판단된다. 또한, 본 실험에 사용한 대식세포에서 2.5 μ M의 PGG에서 세포독성이, 더 높은 농도의 PGG 처리로 세포 성장이 억제되는 것으로 나타나 1 μ M 이상의 농도에서 실험을 진행한 것은 부적합하다고 판단된다. 이상으로부터 PGG가 RAW264.7 세포의 성장을 억제시키지 않고 독성을 나타내지 않으면서 생리적인 농도라고 할 수 있는 1 μ M 이하의 농도에서 이후의 모든 실험을 진행하였다.

PGG의 NO 및 PGE₂ 생성 억제 효과

NO는 iNOS로 생성되는 신호전달분자로 염증질환에 있

어서 중요한 역할을 한다. Dupont 등(24)의 연구에서는 건강한 사람에 비교해 천식환자로부터 분리한 염증성 세포에서 iNOS의 발현이 증가하는 것으로 확인됐으며, 병리학적 상태에서 iNOS의 증가는 NO의 생성 증가에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. LPS 자극에 의한 염증성 반응에 있어서 PGG의 효과를 검토하기 위해 NO의 측정이 필요하나, NO는 반응성이 크고 매우 불안정한 자유기이므로 NO 자체의 농도를 측정할 수 없으므로 NO의 안정적인 대사체인 nitrite 양을 측정함으로써 NO의 생성량을 반영한다(25). 이와 같은 이유로 세포배양액에서 nitrite를 측정된 결과, LPS를 처리하지 않은 vehicle군보다 LPS만 처리한 0 μ M PGG에서 nitrite 생성이 유의적으로 증가한 것으로 보아($P<0.001$), LPS에 의한 염증반응이 충분히 유도된 것을 확인하였다. 0.25 μ M의 PGG 처리군에서부터 농도 의존적으로 LPS 자극에 의한 염증성 매개 물질인 NO의 방출이 유의적으로 억제되었다(Fig. 4A, $P<0.001$).

PGE₂ 또한 핵심적인 염증성 매개 물질로 알려져 있어(26), LPS를 자극한 RAW264.7 세포에 있어서 PGG 처리에 의한 PGE₂ 분비에 미치는 영향을 검토하였다. NO와 마찬가지로 LPS를 처리하지 않은 vehicle군보다 LPS만 처리한 0 μ M PGG에서 PGE₂ 생성이 유의적으로 증가하였으며($P<0.001$), 0.5 μ M PGG 처리로 LPS 자극에 의한 PGE₂의 방출이 유의적으로 억제되었다($P<0.001$)(Fig. 4B). 이상의 결과로부터 PGG는 두 가지 대표적인 염증성 매개 물질의 분비를 억제하는 것으로 나타났다.

PGG의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 저해 효과

PGG가 LPS로 유도된 NO 및 PGE₂ 생성을 억제하는 메커니즘을 확인하기 위해 NO와 PGE₂의 합성효소(27)인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현량에 미치는 PGG의 효과를 western blot법으로 평가하였다. Fig. 5에 나타낸 것과 같이 LPS 처리로 iNOS와 COX-2 단백질 발현량이 현저히 증가하였다. iNOS의 발현량은 0.25 μ M의 PGG 처리에서부터 억제되

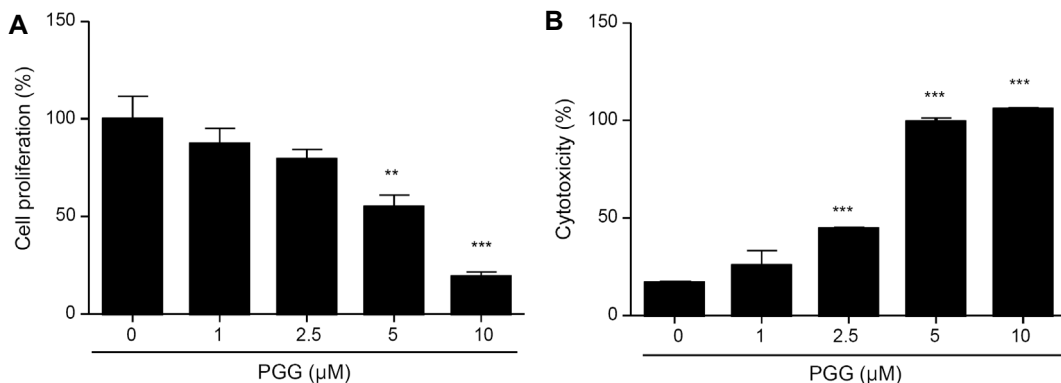


Fig. 3. PGG affects cell proliferation and cell cytotoxicity in murine macrophages. RAW264.7 cells were seeded in a 96-well plate and treated with various concentrations of PGG (0, 1, 2.5, 5, 10 μ M). After 24 h, cell proliferation (A) and cytotoxicity (B) were determined by the methods described in the Material and Methods section. The results are reported as the mean±SEM of three independent experiments (n=4). Statistical significance is based on the difference when compared with 0 μ M PGG (** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

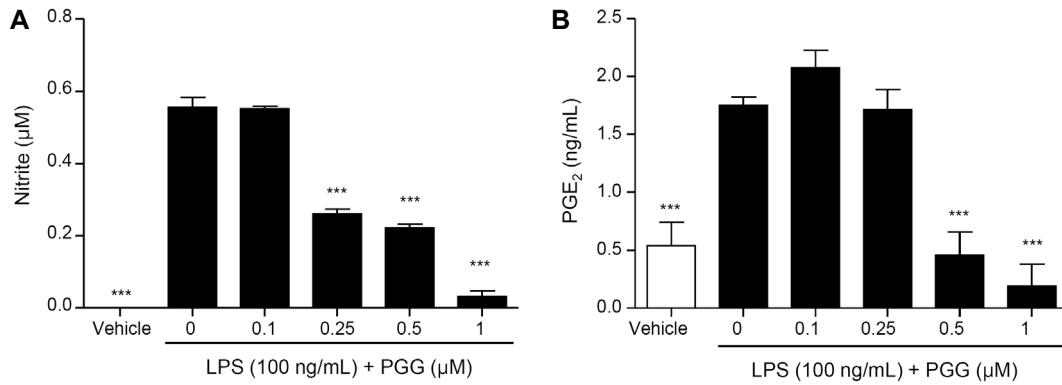


Fig. 4. PGG inhibits production of NO and PGE₂ in LPS-stimulated murine macrophages. RAW264.7 cells were treated with different concentration of PGG (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 µM) in the presence or absence of 100 ng/mL of LPS for 24 h. In the cell culture supernatant, NO (A) and PGE₂ (B) were determined by the methods described in the Material and Methods section. The results are reported as the mean±SEM of three independent experiments (n=4). Statistical significance is based on the difference when compared with 0 µM PGG (***) *P*<0.001).

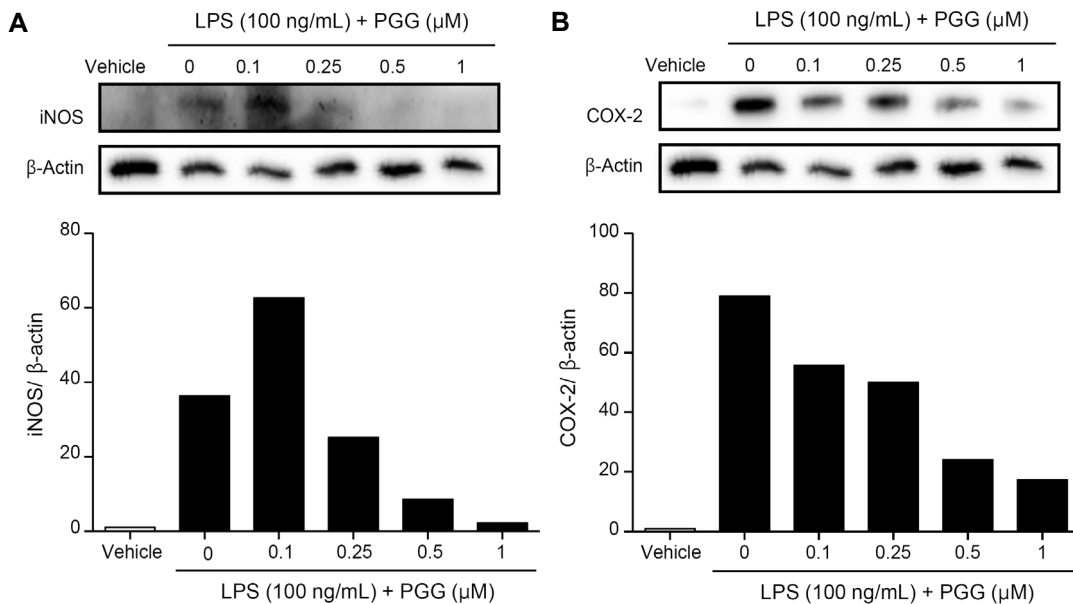


Fig. 5. PGG suppresses expression of NO and PGE₂ synthesizing enzymes in LPS-stimulated murine macrophages. RAW264.7 cells were treated with different concentrations of PGG (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 µM) in the presence or absence of 100 ng/mL of LPS for 24 h. In each whole cell lysate, 10 µg of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE for iNOS and COX-2 determination. β-Actin expression is shown as a loading control. The bands were quantified using image analysis software, and their relative intensities were expressed as iNOS/β-actin or COX-2/β-actin.

었으며, COX-2의 발현량도 PGG 처리에 의해 감소하였다.

iNOS는 휴식상태의 세포에서는 발현되지 않지만 박테리아나 염증성 cytokine과 같은 면역학적 자극으로 발현이 유도되며, 이 효소에 의해 생성된 NO는 상대적으로 길게 신체에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(28,29).

COX-2는 arachidonic acid를 PGE₂로 전환하는 효소로 통증, 열, 염증성 반응에 있어서 중요하다(30). NSAIDs는 COX를 방해함으로써 PGE₂의 형성을 억제하여 염증을 완화하는 것으로 알려져 있지만, 비선택적인 COX 억제제는 위장관손상과 같은 심각한 부작용을 초래하는 것으로 알려져 있다(31). 이러한 사실로부터 염증성 매개 물질을 합성하는

iNOS나 COX-2의 발현을 억제하는 것은 다양한 염증성 질환을 치료하는 데 있어서 중요한 치료 타겟이 될 수 있다.

PGG는 생물학적 농도(3~4 µM)보다 낮은 농도에서 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 억제함으로써 NO 및 PGE₂의 분비를 억제하는 것으로 나타났다.

PGG의 염증성 cytokine 생성 억제 효과

LPS를 처리한 대식세포에서는 IL-6 및 TNF-α와 같은 염증성 cytokine이 분비되며, 이러한 염증성 cytokine의 과도한 생성은 자가면역질환이나 암과 같은 바람직하지 않은 병리학적 상태를 유도할 수 있다(32,33). 따라서 본 연구에

서는 PGG가 LPS로 자극한 대식세포에서의 IL-6 및 TNF- α 분비에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 vehicle군과 비교해 LPS를 처리함으로써 IL-6 및 TNF- α 분비가 증가하였으며($P < 0.001$), 0.5 μ M 또는 1 μ M의 PGG 처리로 염증성 cytokine 분비가 억제되었다(Fig. 6, $P < 0.05$, $P < 0.001$). 또한, 0.1 μ M이나 0.25 μ M PGG와 같이 낮은 농도에서는 오히려 IL-6나 TNF- α 의 분비를 촉진시켜 PGG의 면역활성화 효과도 일부 가지는 것으로 나타났으나 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

PGG의 NF- κ B 이동 억제 효과

NF- κ B는 NO, PGE₂, IL-6 및 TNF- α 와 같은 염증성 매개 물질의 유전적 발현을 조절하는 주요한 전사인자로 알려져 있다(3-5,34). 이러한 염증성 매개 물질의 발현 조절에 NF- κ B가 관여하기 때문에 NF- κ B를 억제하는 것은 염증성 질환을 치료 또는 완화하는 효과적인 방법일 수 있다. 따라서 PGG가 RAW264.7 세포에서 LPS 자극에 의해 NF- κ B가 세포질과 핵에서 어떻게 분포하는지를 측정하고 단백질 band의 강도를 수치화하여 그래프로 나타내었다. 그 결과

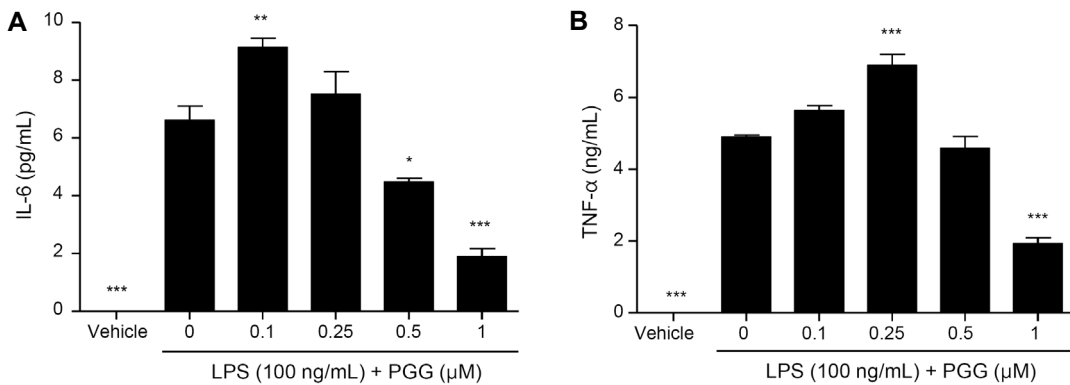


Fig. 6. PGG inhibits inflammatory cytokine production in LPS-stimulated murine macrophages. RAW264.7 cells were treated with different concentrations of PGG (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 μ M) in the presence or absence of 100 ng/mL of LPS for 24 h. In the cell culture supernatant, IL-6 (A) and TNF- α (B) were determined by the methods described in Material and Methods section. Statistical significance is based on the difference when compared with LPS-stimulated cells (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

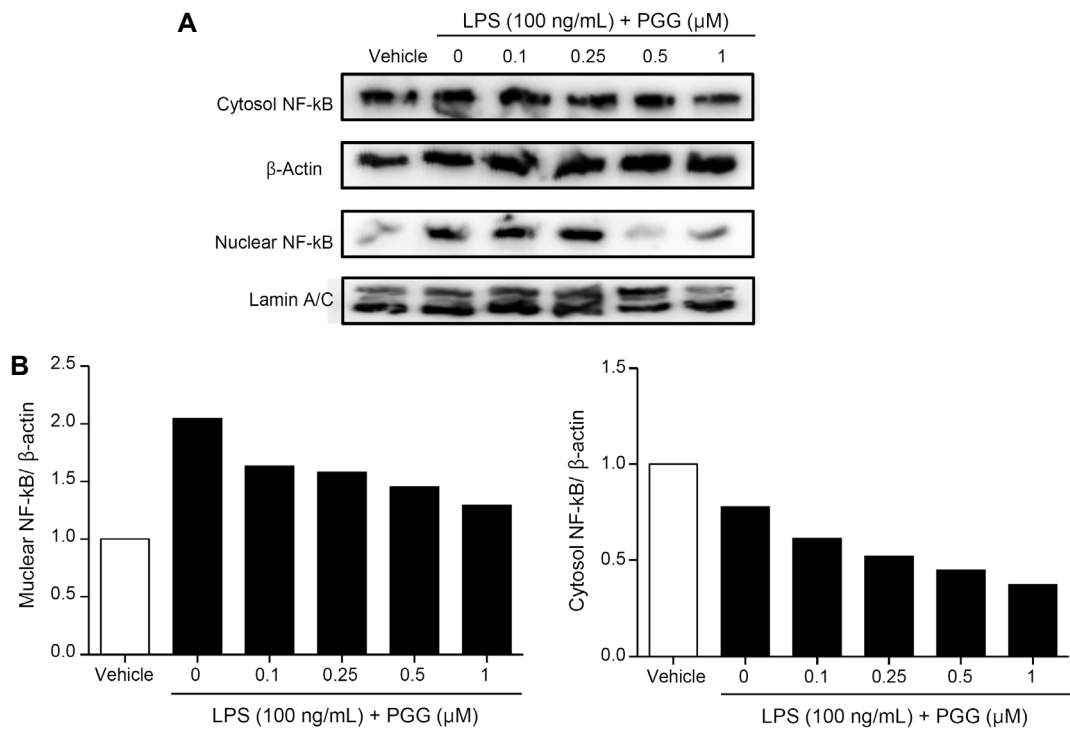


Fig. 7. PGG blocks translocation of NF- κ B from the cytosol into the nucleus in LPS-stimulated murine macrophages. RAW264.7 cells were treated with different concentrations of PGG in the presence or absence of 100 ng/mL of LPS for 30 min. Cytosol protein (10 μ g) and nuclear protein (2.5 μ g) from each cell lysate were resolved by 10% SDS-PAGE for NF- κ B determination. β -Actin or Lamin A/C expression is shown as a loading control. Western blot analysis was performed as described in Materials and Methods.

LPS 처리에 의해 NF- κ B의 소단위인 p65가 세포질에서 핵으로 이동한 것으로 나타났으며, PGG 처리에 의해 NF- κ B의 핵으로의 이동이 억제되었다(Fig. 7). 이러한 결과로부터 PGG가 LPS에 의한 NF- κ B의 핵으로의 이동을 저해함으로써 NF- κ B 관련 염증성 매개 물질의 생성이 억제되는 것으로 판단된다.

요약

천연물 유래 물질의 항염증 활성에 대한 잠재성을 평가하기 위한 일환으로 오배자에서 분리한 PGG가 LPS로 자극한 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포에서 염증반응에 미치는 영향에 대해 평가하고 관련 메커니즘에 대해 검토하였다. PGG는 LPS 자극에 의해 유도된 iNOS 및 COX-2 단백질 발현량을 감소함으로써 NO와 PGE₂ 생성을 억제할 뿐만 아니라 IL-6, TNF- α 와 같은 pro-inflammatory cytokine의 분비를 억제하였다. 이러한 효과는 전사인자인 NF- κ B의 세포질에서 핵으로의 이동을 억제함으로써 나타나는 것으로 판단된다. 이러한 결과로부터 PGG가 염증 반응을 저해하는 효과가 있는 것으로 나타나 향후 염증성 질환을 예방, 개선 및 치료하는 데 유용한 물질로 사용될 가능성이 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2015학년도 대구대학교 학술연구비지원(2015 0224)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다. 본 연구를 수행함에 있어서 PGG를 제공해주신 대구대학교 김태훈 교수님께 감사드립니다.

REFERENCES

- Dunster JL. 2016. The macrophage and its role in inflammation and tissue repair: mathematical and systems biology approaches. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 8: 87-99.
- Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. 2006. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *J Athl Train* 41: 457-465.
- Pal S, Bhattacharjee A, Ali A, Mandal NC, Mandal SC, Pal M. 2014. Chronic inflammation and cancer: potential chemoprevention through nuclear factor kappa B and p53 mutual antagonism. *J Inflamm* 11: 23.
- Verstrepen L, Beyaert R. 2014. Receptor proximal kinases in NF- κ B signaling as potential therapeutic targets in cancer and inflammation. *Biochem Pharmacol* 92: 519-529.
- Smale ST. 2010. Selective transcription in response to an inflammatory stimulus. *Cell* 140: 833-844.
- Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RHJ. 2011. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology* 216: 753-762.
- Liu J, Tang J, Zuo Y, Yu Y, Luo P, Yao X, Dong Y, Wang P, Liu L, Zhou H. 2016. Stauroside B inhibits macrophage activation by inhibiting NF- κ B and ERK MAPK signalling. *Pharmacol Res* 111: 303-315.
- Wu S, Ma C, Gao X, Zhang L, Miao Q, Li M, Li W, Song X, Wang X, Liu J, Wei L. 2016. Group A Streptococcus induces less p65 nuclear translocation and non-classical nuclear factor kappa B activation in macrophages, which possibly leads to a weaker inflammatory response. *Int J Infect Dis* 44: 50-60.
- Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR, Laskin JD. 2011. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51: 267-288.
- Giuliani C, Napolitano G, Bucci I, Montani V, Monaco F. 2001. NF- κ B transcription factor: Role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune, and neoplastic diseases and therapy implications. *Clin Ter* 152: 249-253.
- Wan F, Anderson DE, Barnitz RA, Snow A, Bidere N, Zheng L, Hegde V, Lam LT, Staudt LM, Levens D, Deutsch WA, Lenardo MJ. 2007. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF- κ B complexes that mediates selective gene regulation. *Cell* 131: 927-939.
- Feldmann M, Gasparini C. 2012. NF- κ B as a target for modulating inflammatory responses. *Curr Pharm Des* 18: 5735-5745.
- Kwon OJ, Bae JS, Lee HY, Hwang JY, Lee EW, Ito H, Kim TH. 2013. Pancreatic lipase inhibitory gallotannins from *Galla Rhois* with inhibitory effects on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Molecules* 18: 10629-10638.
- Deiab S, Mazzi E, Eyunni S, McTier O, Mateeva N, Elshami F, Soliman KFA. 2015. 1,2,3,4,6-Penta-O-galloylglucose within *Galla Chinensis* inhibits human LDH-A and attenuates cell proliferation in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 276946.
- Fujiwara H, Tabuchi M, Yamaguchi T, Iwasaki K, Furukawa K, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kudo Y, Higuchi M, Saïdo TC, Maeda S, Takashima A, Hara M, Yaegashi N, Kase Y, Arai H. 2009. A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid β proteins *in vitro* and *in vivo*. *J Neurochem* 109: 1648-1657.
- Zhang J, Li L, Kim SH, Hagerman AE, Lü J. 2009. Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. *Pharm Res* 26: 2066-2080.
- Kim YH, Yang X, Yamashita S, Kumazoe M, Huang Y, Nakahara K, Won YS, Murata M, Lin IC, Tachibana H. 2015. 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose increases a population of T regulatory cells and inhibits IgE production in ovalbumin-sensitized mice. *Int Immunopharmacol* 26: 30-36.
- Lin MH, Chang FR, Hua MY, Wu YC, Liu ST. 2011. Inhibitory effects of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose on biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 1021-1027.
- Jang SE, Hyam SR, Jeong JJ, Han MJ, Kim DH. 2013. Penta-O-galloyl- β -D-glucose ameliorates inflammation by inhibiting MyD88/NF- κ B and MyD88/MAPK signalling pathways. *Br J Pharmacol* 170: 1078-1091.
- Pan MH, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JH, Lin JK. 2000. Suppression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor- κ B activity by theaflavin-3,3'-digallate from black tea and other polyphenols through down-regulation of I κ B kinase activity in macrophages. *Biochem Pharmacol* 59: 357-367.
- Lee SJ, Lee IS, Mar W. 2003. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 activity by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose in murine macrophage cells.

- Arch Pharmacol Res* 26: 832-839.
22. Genfa L, Jiang Z, Hong Z, Yimin Z, Liangxi W, Guo W, Ming H, Donglen J, Lizhao W. 2005. The screening and isolation of an effective anti-endotoxin monomer from *Radix Paeoniae Rubra* using affinity biosensor technology. *Int Immunopharmacol* 5: 1007-1017.
 23. Li L, Shaik AA, Zhang J, Nhkata K, Wang L, Zhang Y, Xing C, Kim SH, Lü J. 2011. Preparation of penta-O-galloyl- β -D-glucose from tannic acid and plasma pharmacokinetic analyses by liquid-liquid extraction and reverse-phase HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 54: 545-550.
 24. Dupont LL, Glynos C, Bracke KR, Brouckaert P, Brusselle GG. 2014. Role of nitric oxide-soluble guanylyl cyclase pathway in obstructive airway diseases. *Pulm Pharmacol Ther* 29: 1-6.
 25. Wennmalm Å, Benthin G, Edlund A, Kieler-Jensen N, Lundin S, Petersson AS, Waagstein F. 1994. Nitric oxide synthesis and metabolism in man. *Ann N Y Acad Sci* 714: 158-164.
 26. Ulmann L, Hirbec H, Rassendren F. 2010. P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *EMBO J* 29: 2290-2300.
 27. Redington AE, Meng QH, Springall DR, Evans TJ, Créminon C, Maclouf J, Holgate ST, Howarth PH, Polak JM. 2001. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in the airway epithelium of asthmatic subjects and regulation by corticosteroid treatment. *Thorax* 56: 351-357.
 28. Vahora H, Khan MA, Alalami U, Hussain A. 2016. The potential role of nitric oxide in halting cancer progression through chemoprevention. *J Cancer Prev* 21: 1-12.
 29. Iwakiri Y. 2015. Nitric oxide in liver fibrosis: The role of inducible nitric oxide synthase. *Clin Mol Hepatol* 21: 319-325.
 30. Koeberle A, Werz O. 2015. Perspective of microsomal prostaglandin E₂ synthase-1 as drug target in inflammation-related disorders. *Biochem Pharmacol* 98: 1-15.
 31. Hayashi S, Sumi Y, Ueno N, Murase A, Takada J. 2011. Discovery of a novel COX-2 inhibitor as an orally potent anti-pyretic and anti-inflammatory drug: Design, synthesis, and structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol* 82: 755-768.
 32. Ho LJ, Luo SF, Lai JH. 2015. Biological effects of interleukin-6: Clinical applications in autoimmune diseases and cancers. *Biochem Pharmacol* 97: 16-26.
 33. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. 2008. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci* 13: 5094-5107.
 34. Morgan MJ, Liu ZG. 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 21: 103-115.