



Anti-inflammatory effect of a mixture of *Astragalus membranaceus* and *Lithospermum erythrorhizon* extracts by inhibition of MAPK and NF- κ B signaling pathways in RAW264.7 cells

Doo Jin Choi¹ · Geum Soog Kim¹ · Bo-Ram Choi¹ · Young-Seob Lee¹ ·
Kyung Sook Han¹ · Dong-Sung Lee² · Dae Young Lee¹

RAW264.7 대식세포에서 MAPK 및 NF- κ B 신호전달 경로 억제를 통한 황기 및 지치 복합물의 항염증 효과

최두진¹ · 김금숙¹ · 최보람¹ · 이영섭¹ · 한경숙¹ · 이동성² · 이대영¹

Received: 28 September 2020 / Accepted: 13 November 2020 / Published Online: 31 December 2020
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2020

Abstract This study investigated a mixture of *Astragalus membranaceus* (AM) and *Lithospermum erythrorhizon* (LE) extracts (ALM16), exerts anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 macrophage cells, and its underlying mechanism. ALM16 was prepared by mixing AM and LE extracts in a ratio of 7:3 (w/w). Cytotoxicity of ALM16 in RAW264.7 cells was not shown up to 200 μ g/mL of ALM16. The results of this study showed that ALM16 does-dependently inhibits the production of nitric oxide, prostaglandin E₂ and pro-inflammatory cytokines (interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α) in LPS-induced RAW264.7 cells. ALM16 not only markedly reduced the protein expression levels of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-stimulated RAW264.7 cells, but also inhibited the nuclear translocation and DNA-binding activity of nuclear factor-kappa B (NF- κ B). In

addition, ALM16 specifically inhibited the phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinases in LPS-stimulated RAW264.7 cells. In conclusion, these results suggest that ALM16 may exert anti-inflammatory effect by modulating mitogen-activated protein kinase and NF- κ B signaling pathways.

Keywords ALM16 · Anti-inflammatory · Mitogen-activated protein kinase · Nuclear factor-kappa B · RAW264.7 macrophages

서론

염증반응(inflammation response)은 외부의 물리적, 화학적 자극, 외부 병원체의 침입, 독성물질의 침윤 등으로 인한 신체조직의 손상에 대해 다양한 면역세포 및 신호전달 물질 등이 복합적으로 작용하는 내부 생체방어반응 중 하나이다[1]. 염증반응은 크게 급성염증과 만성염증으로 구분되며, 반복적 또는 만성적 염증반응은 조직 손상의 원인이 되어 만성염증성(chronic inflammatory), 자가면역(autoimmune) 및 대사성(metabolic) 질환 등을 야기할 수 있다[2,3]. 따라서, 과도한 염증반응을 억제하는 항염증 물질을 개발하기 위한 연구들이 다양하게 진행되고 있다[4,5].

대식세포(macrophage)는 체내의 염증반응에 관여하는 주요 세포로 알려져 있으며, 그람음성균의 세포외막에 존재하는 물질로 알려진 lipopolysaccharide (LPS) 등의 자극에 노출됨으로써 활성화되어 다양한 염증 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다[6].

Dae Young Lee (✉)
E-mail: dylee0809@gmail.com

¹Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Eumseong 27709, Republic of Korea

²College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 61452, Republic of Korea

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.

LPS는 대식세포 표면의 Toll-like receptor 4를 자극하여 c-Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 kinase를 포함하는 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로를 통해 전사인자(transcriptional factor)인 nuclear factor kappa-B (NF- κ B)의 활성화를 유도한다[7,8]. 이를 통해 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 효소의 발현을 통해 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E₂ (PGE₂)와 같은 다양한 염증매개물질(pro-inflammatory mediators)을 생성하며 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) 등 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)이 생성되어 염증반응이 유발된다[9,10].

황기(*Astragalus membranaceus* Bunge var.)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 초본식물로서, 한국, 중국 등 동아시아 지역에 주로 분포하고 있으며[11], 예로부터 독성이 없고 항산화, 항바이러스, 항고혈압 등 다양한 약리 효능이 있기 때문에 주로 약용으로 사용하였다[12-14]. 황기의 주요 성분으로는 calycosin, calycosin-7-O- β -D-glucoside, formononetin, formononetin-7-O- β -D-glucoside, astragaloside 등이 알려져 있다[15,16]. 이러한 황기 유래 단일성분들은 pro-inflammatory cytokine 발현 및 Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 활성 저해를 통한 항염증 효과 및 새로운 cycloartane-type saponin 물질의 항염증 효과가 보고되기도 하였다[17-19].

지치(*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.)는 지치과(Boraginaceae)에 속하는 다년생 초본으로, 우리나라의 강원도, 제천 등에 자생한다[20]. 한방에서는 주로 감염, 습진 등 피부 질환의 치료에 사용되었으며, 국내 전통주인 홍주의 원료로 이용되어 왔다[21,22]. 지치의 주요성분으로는 shikonin, acetylshikonin을 포함하는 shikonin 유도체, lithospermans A, B, C 등을 포함하는 다당류(polysaccharides) 등이 보고되었다[23,24]. 지치 추출물 및 성분이 대식세포에서 NF- κ B의 활성화와 염증 관련 유전자 발현을 조절하여 항염증 활성을 나타낸다고 보고되었다[25,26].

한편, 한약재나 생약으로 황기와 지치를 복합 처방했다는 고문헌의 내용은 없으나, 본 연구진의 선행연구에서 황기 및 지치 복합추출물이 IL-1 β 처리에 의한 연골세포에서 matrix metalloproteinases (MMPs)를 억제하고, monosodium iodoacetate (MIA) 유도 골관절염 동물모델에서 손상된 연골조직을 보호하여 관절염에 대한 효과를 나타냄을 보고한 바 있다[27]. 따라서, 염증에 효과가 있는 성분을 함유하고 있는 황기 및 지치의 추출물을 혼합한 복합물(ALM16)이 LPS 처리에 의해 염증반응이 유도된 RAW264.7 대식세포에서 NF- κ B 및 MAPK signaling pathway 조절을 통한 항염증 효능을 나타내는지 분자 수준에서 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서 사용한 황기(*A. membranaceus*) 및 지치(*L. erythrorhizon*)는 충북 제천에서 재배된 것을 구매하여 사용하였다. 표본시료로서 황기(MPS005087)와 지치(MPS004961)는 국립원예특작과학원 인삼특작부에 보관되어 있다. 세포 배양에 사용한 Roswell

Park Memorial Institute (RPMI) 1640, fetal bovine serum (FBS), Streptomycin-penicillin은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, LPS와 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Western blot에 사용한 b-actin, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)에 대한 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였고, COX-2에 대한 1차 항체는 Abcam (Cambridge, UK)사에서 구입하였고, iNOS에 대한 1차 항체는 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)사에서 구입하였고, p65, p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38에 대한 1차 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, anti-mouse, anti-rabbit의 2차 항체는 Millipore (Burlington, MA, USA)에서 구입하였다.

황기, 지치 복합 추출물(ALM16) 제조

황기, 지치 복합 추출물(ALM16)의 제조는 이전 연구에서 보고된 방법으로 제조되었다[27]. 간단하게, 황기 및 지치 건재 시료를 조분쇄한 후(직경 0.5 cm 이하), 황기는 50% 주정(시료 중량의 15배 용량), 지치는 70% 주정(시료 중량의 15배 용량)을 이용하여 80 °C, 4시간 총 2회 환류추출을 하였다. 각 추출물은 1 μ m 필터로 여과한 후 감압농축하여 얻어진 황기 추출물(50 \pm 1 brix) 및 지치 추출물(66 \pm 1 brix)은 80-90 °C에서 1시간 살균한 후 건조하였다. 황기 추출분말(AM, yield 24%)과 지치 추출분말(LE, yield 42%)은 7:3 (w/w)의 비율로 혼합하여 황기, 지치 복합 추출물(ALM16)을 제조하였다.

세포 배양

본 실험에 사용한 RAW264.7 마우스 대식세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 세포 배양을 위해 10% FBS 및 100 units/mL penicillin G, 100 mg/mL streptomycin 및 2 mM L-glutamine을 함유한 RPMI 1640 배지에서 37 °C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

세포독성 측정

RAW264.7 세포에 대한 ALM16의 세포독성(cytotoxicity)을 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 48 well plate에 5 \times 10⁵ cells/well로 분주하고, 12시간 배양하였다. ALM16을 10, 25, 50, 100, 200 μ g/mL 농도로 48시간 동안 처리하였다. 배지를 제거한 후 MTT 시약(5 mg/mL)을 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 형성된 formazan은 200 μ L의 DMSO를 첨가하여 녹인 후, ELISA microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 아무것도 처리하지 않은 정상군(control)의 흡광도 값을 기준으로 상대적인 세포 생존율을 비교하였다.

NO 및 PGE₂ 측정

RAW264.7 세포를 이용하여 5 \times 10⁵ cells/well 농도로 48 well plate에 분주하고 12시간 배양하였다. ALM16을 각 농도별로 3시간 전처리 한 후, LPS (1 μ g/mL)를 24시간 처리하였다. 세포 배양액으로 분비된 NO의 양은 Griss 시약(0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, 1% sulfanilamide in 5% phosphoric

acid)을 사용하여 측정하였다. 세포의 상층액 배지와 Griess 시약을 1:1로 혼합하여 차광상태에서 10분간 반응시킨 후 ELISA microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, sodium nitrite를 이용하여 표준곡선을 작성하여 NO 함량을 계산하였다. 세포 배양액으로 분비된 PGE₂의 양은 PGE₂ enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 측정하였다.

Pro-inflammatory cytokines 분비량 측정

세포 배양액 내의 cytokine의 양을 측정하기 위하여 RAW264.7 세포를 48 well plate에 5×10⁵ cells/well로 분주하여 배양하였다. 이후 ALM16을 농도별로 3시간 전처리하고, LPS (1 µg/mL)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포의 상층액 배지 100 µL를 취하여 IL-1β, IL-6, TNF-α 분비량을 ELISA assay kit (R&D system)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 측정하였다.

NF-κB DNA-binding activity 측정

RAW264.7 세포에 protease inhibitor cocktail I (EMD Biosciences) 과 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 첨가한 PER-Mammalian protein extraction buffer (1:20, w/v) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 첨가하여 균일화한 후, 14,000×g, 4 °C, 5분간 원심분리 하였다. 침전물은 PBS로 세척한 후 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris HCl (pH 7.4), 50 mM glycerophosphate, 20 mM NaF, 20 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 1 mM dithiothreitol, 1 mM Na₃VO₄, protease inhibitors를 포함한 RIPA buffer를 첨가하여 혼합한 후, 16,000×g, 4 °C, 5분간 원심분리 하여 핵 분획물(Nucleus fraction)을 얻었다. 핵 분획물의 NF-κB DNA-binding activity는 NF-κB (p65) Transcription Factor Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 제조업체의 지침에 따라 측정하였다.

Western blot 분석

RAW264.7 세포에 protease inhibitor mixture (0.1 mM PMSF, 5 mg/mL aprotinin, 5 mg/mL pepstatin A, 1 mg/mL chymostatin)가 포함된 20 mM의 Tris-HCl 완충용액(pH 7.4)을 첨가한 후, 16,000 rpm, 4 °C, 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 각 시료의 단백질은 Bradford assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하였고, 7.5%와 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis에서 분리시킨 후 Hybond enhanced chemiluminescence (ECL) nitrocellulose membrane (Bio-Rad)에 transfer하였다. Membrane을 5% 무지방유(skim milk)가 포함된 blocking 완충액에서 blocking 하였다. 각 단백질에 특이적인 1차 항체로 반응시킨 후, 2차 항체로 반응시켰다. 이후 ECL 용액(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)으로 반응시킨 후, X-ray film에 감광하여 현상하였다. Band intensity는 Image J (Wayne Rasband, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 측정하였다.

통계처리

본 실험의 결과는 means ± SD로 나타내었고(n=3), Graph-pad

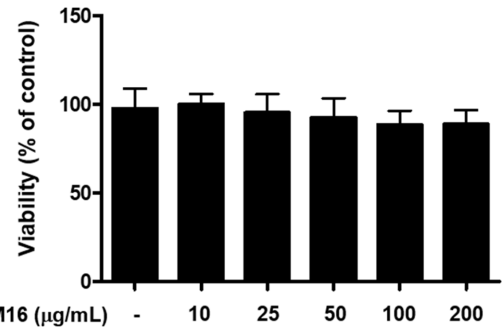


Fig. 1 Effect of ALM16 on cytotoxicity in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated for 24 h with various concentrations of ALM16. Cell viability was determined using MTT assay. All data represent means ± standard deviation (SD) (n =3)

prism (Ver 5.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 ANOVA 분산분석과 Tukey’s multiple comparison test로 유의성 검정을 시행하였다(p <0.05).

결과 및 고찰

ALM16 제조

선행연구에서 황기 및 지치 추출물을 혼합비율별로 제조한 복합물의 MMPs 저해 활성을 비교하여 가장 효과적인 혼합비(7:3, w/w, ALM16) 선별하였고, 활성지표성분으로서 calycosin, calycosin-7-O-β-D-glucoside 및 lithospermic acid에 대한 HPLC 정량 분석을 실시하였다[27]. 추후 연구에서, ALM16은 MIA에 의한 골관절염 동물 모델에서 진통 및 연골 보호 효과가 있음을 입증하였다[28]. 또한, ALM16은 고지방식으로 인한 비알콜성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 동물모델에서 간 지방증(hepatic steatosis) 억제 효과가 있는 것을 확인하였다[29]. 골관절염과 비알콜성 지방간 질환은 만성 염증반응과 관련이 있기때문에 본 연구에서 ALM16의 항염증 활성 및 기전 연구를 확인하고자 하였다.

ALM16이 RAW264.7 세포에 대한 세포독성

ALM16의 RAW264.7 세포에 미치는 세포독성(cytotoxicity)을 확인하고자 세포 생존율을 측정하였다. ALM16의 경우 최고 농도 200 µg/mL까지 아무것도 처리하지 않은 정상군(100%)과 비교하여 유의적인 세포 생존율의 차이가 없는 것을 확인하였으며, 최대 실험농도를 200 µg/mL로 설정하였다.

ALM16의 NO 및 PGE₂ 생성 저해 효과

ALM16의 항염증 효과를 확인하기 위하여 염증반응의 대표적인 지표인 NO와 PGE₂의 생성량을 측정하였다. 염증반응에 의해 활성화된 대식세포에서 iNOS와 COX-2 효소에 의해 NO와 PGE₂ 생성이 촉진되며 초기 염증반응에 중요한 역할을 한다 [30,31]. ALM16을 100, 200 µg/mL 처리하였을 때 NO의 생성량은 LPS 단독 처리군 대비 각각 31.7, 46.2% 유의적으로 감소하였고(Fig. 2A), PGE₂ 생성량은 LPS 단독 처리군과 비교하여 각각 22.6, 42.1% 유의적으로 감소하였다(Fig. 2B).

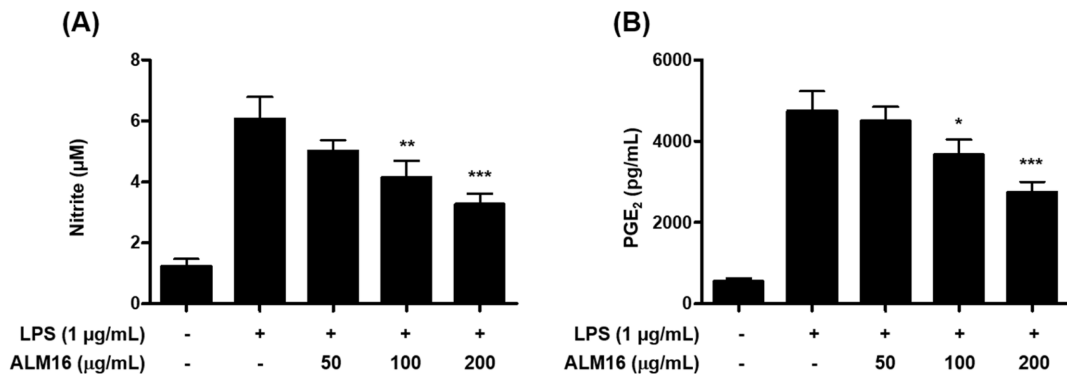


Fig. 2 Effects of ALM16 on production of (A) NO and (B) PGE₂ in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Cells were pretreated for 3 h with indicated concentrations of ALM16 and stimulated for 24 h with LPS (1 µg/mL). The values are means ± SD (n=3). **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared with only LPS-treated cells

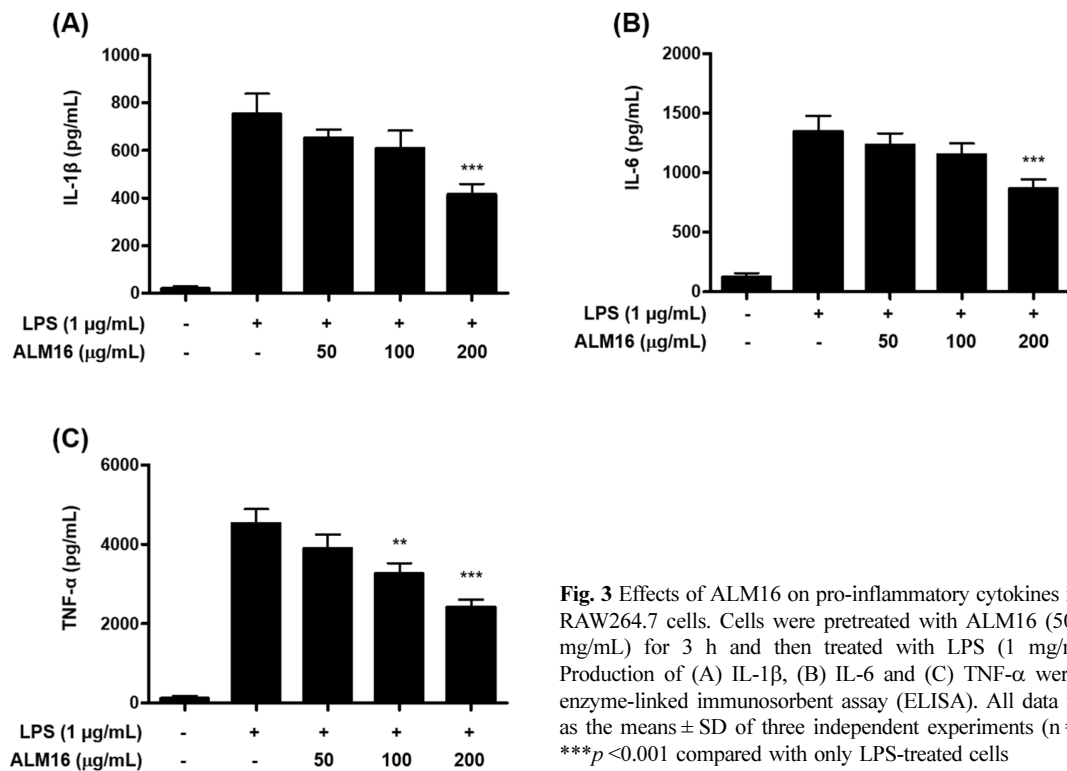


Fig. 3 Effects of ALM16 on pro-inflammatory cytokines in LPS-induced RAW264.7 cells. Cells were pretreated with ALM16 (50, 100 and 200 mg/mL) for 3 h and then treated with LPS (1 mg/mL) for 24 h. Production of (A) IL-1β, (B) IL-6 and (C) TNF-α were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). All data were expressed as the means ± SD of three independent experiments (n=3). ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared with only LPS-treated cells

ALM16의 pro-inflammatory cytokine 생성 억제 효과

Pro-inflammatory cytokines은 염증반응이 유도되는 과정에서 NO와 PGE₂와 같은 염증매개물질과 동반되어 염증반응을 촉매하기 때문에 중요한 염증 지표가 된다[32]. TNF-α는 체내에서 대식세포, 백혈구 등에 의해 생성되며, 지속적으로 생성되면 다른 Pro-inflammatory cytokine과 iNOS, COX-2의 발현을 증가시켜 NO, PGE₂의 생성이 증가된다[33]. IL-1β는 대표적인 pro-inflammatory cytokine의 하나로서, NO의 생성을 유도하며, 과잉 생성될 경우 T-cell 활성화 및 B-cell의 성숙을 유도하여 염증성 질환을 유발한다[34]. IL-6는 TNF-α, IL-1β와 함께 대표적인 pro-inflammatory cytokine이며, 림프구를 활성화시켜 항체 생산을 증가시킨다[35].

본 연구에서 LPS 처리된 대식세포의 IL-1β, IL-6, TNF-α의

생성량은 각각 753.20, 1348.10, 4533.85 pg/mL로 아무것도 처리하지 않은 세포(19.35, 126.45, 119.32 pg/mL)에 비해 현저히 증가하였으나, ALM16을 200 µg/mL 처리했을 경우 각각 415.16, 865.24, 2416.57 pg/mL로 유의적으로 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 3A-C).

Park 등[36]은 발효한 층꽃나무 추출물이 LPS 처리에 의해 활성화된 대식세포에서 NO 및 PGE₂의 생성과 pro-inflammatory cytokine (IL-1β, IL-6, TNF-α)의 생성을 저해시켜 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였다. 따라서, 이러한 결과들은 ALM16이 LPS 처리된 대식세포에서 NO 및 PGE₂와 같은 염증매개물질과 pro-inflammatory cytokine의 생성을 억제하여 염증반응을 조절할 수 있음을 의미한다.

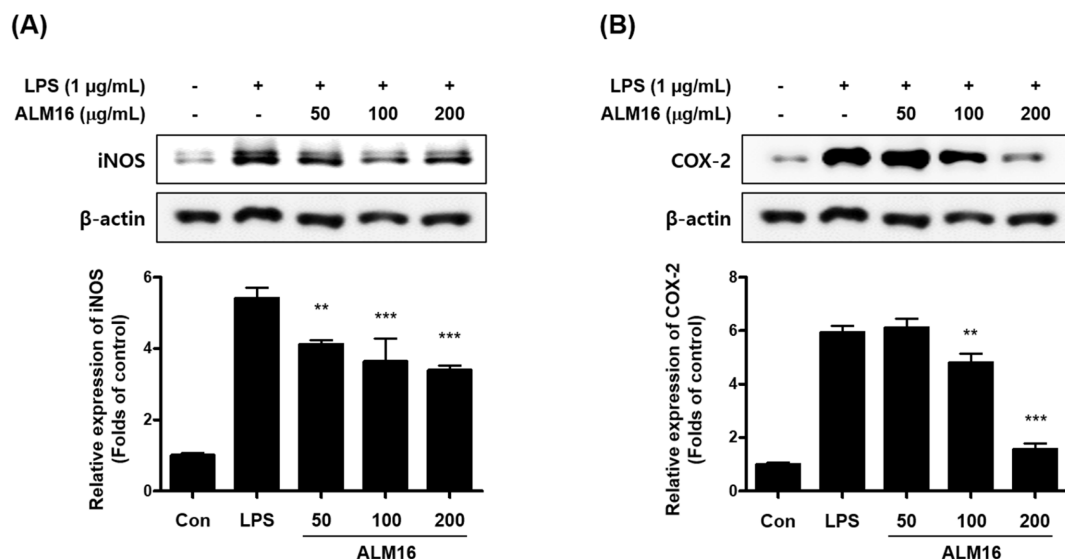


Fig. 4 Effects of ALM16 on the iNOS and COX-2 protein expressions in RAW264.7 cells stimulated with LPS. Cells were pretreated with ALM16 (50, 100 and 200 µg/mL) for 3 h, followed by treatment with LPS (1 mg/mL) for 24 h. Protein expression levels of (A) iNOS and (B) COX-2 were determined by Western blot analysis. b-actin was used as a loading control. The related protein expressions of iNOS and COX-2 were represented with as the means ± SD (n = 3). ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 compared with only LPS-treated cells

ALM16이 iNOS 및 COX-2 효소 발현에 미치는 영향

iNOS는 interferon-gamma, TNF-α, LPS 자극 등에 의해 활성화되어 L-arginine으로부터 NO를 생성하며, NF-κB에 의해 발현이 조절된다[37]. COX-2는 arachidonic acid로부터 prostaglandins (PGs)을 합성하며 pro-inflammatory cytokine의 생성을 증가시키는 요인 중 하나로 NF-κB의 활성화에 의해 발현이 증가된다[38]. 기존 항염증 약물들의 주요 작용기전은 선택적인 COX-2의 발현 및 활성 저해에 의한 PGs 합성을 억제하는 것으로 보고되었다[39]. 따라서, 본 실험에서는 LPS 처리에 의해 염증매개물질의 생성량 증가에 따른 관련 효소인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현량을 확인하였다. 그 결과 LPS 처리에 의해 증가된 iNOS 단백질 발현량은 ALM16 50, 100, 200 µg/mL 처리에 의해 각각 23.9, 32.8, 37.3% 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4A). COX-2의 경우, LPS 단독 처리군에 비해 ALM16 100, 200 µg/mL 처리한 경우 각각 19.3, 73.6% 유의적으로 감소하였다(Fig. 4B). Yang 등[40]은 LPS로 자극된 RAW264.7 세포에서 암대극 추출물 처리에 따라 NO와 PGE₂의 생성이 감소되었으며, 이는 iNOS와 COX-2 단백질 발현의 조절에 의한 것임을 보고하였다. 본 연구에서도 ALM16이 NO, PGE₂와 같은 염증 매개체 생성과 관련 있는 효소의 발현을 조절하여 염증반응을 억제할 수 있음을 확인하였다.

ALM16이 NF-κB 활성화에 미치는 영향

최근 연구들에서 두개의 서브유닛으로 구성된 NF-κB는 pro-inflammatory cytokines과 iNOS, COX-2의 발현을 조절하는 전사인자로 보고되었으며, LPS와 같은 외부자극에 의해 활성화되어 신속히 세포의 핵 안으로 이동(nuclear translocation)하여 염증 매개체를 발현시킨다[41,42]. 따라서 염증 조절 연구에 있어서 NF-κB의 활성화 및 핵 안으로 이동에 대한 조절은 가장 중요한 요소이다. 본 연구에서는 ALM16이 대식세포에서 LPS에

의한 NF-κB의 활성화 및 핵 안으로의 이동을 억제할 수 있는지 확인하였다. Fig. 5A의 결과를 보면, LPS 처리에 의해 세포의 핵으로 이동한 NF-κB의 단백질 양이 아무것도 처리하지 않은 세포에 대비하여 약 6.1배 증가하였다. 하지만 ALM16 50, 100, 200 µg/mL 처리시 핵으로 이동한 NF-κB의 단백질 양이 LPS 단독 처리군 대비 각각 34.3, 47.6, 50.1% 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 또한, NF-κB의 활성화를 측정하기 위해 DNA-binding activity를 측정한 결과, LPS 처리된 대식세포의 NF-κB DNA-binding activity는 아무것도 처리하지 않은 세포와 비교하여 약 2.7배 증가하였다. 이외는 대조적으로 ALM16 100, 200 mg/mL 처리한 경우 LPS 단독 처리군과 비교하여 NF-κB의 DNA-binding activity가 각각 30.8, 40.8% 감소하였다(Fig. 5B). 이러한 결과는 ALM16은 LPS와 같은 외부자극에 의한 염증반응을 조절하는 주요 인자인 NF-κB의 활성화에 대한 조절 효과가 있음을 시사한다.

ALM16이 MAPK (JNK, ERK, p38) pathway 활성화에 미치는 영향

대식세포에서 LPS 등의 외부자극에 의해 MAPK 신호전달경로의 활성화가 진행된다. MAPK는 JNK, ERK, p38로 이루어져 있으며, NF-κB를 포함한 전사인자들의 활성화에 관여하여 염증반응 활성화에 중요한 역할을 한다[43]. ERK 및 p38의 활성화는 pro-inflammatory cytokine의 생성 및 방출에 관여하며, JNK의 활성화는 iNOS 및 COX-2 발현에 관여한다고 보고되었다[44]. 본 연구에서 ALM16이 LPS 자극에 의한 대식세포에서 MAPK에 미치는 영향을 알아본 결과(Fig. 6A,B), LPS 처리에 의해 인산화된 JNK, ERK, p38은 아무것도 처리하지 않은 세포 대비 각각 2.5, 20.8, 16.1배 증가하였고, MAPK 신호전달경로가 활성화된 것을 확인하였다. ALM16을 50, 100, 200 µg/mL 처리했을 경우 JNK의 인산화가 LPS 단독 처리군 대비 각

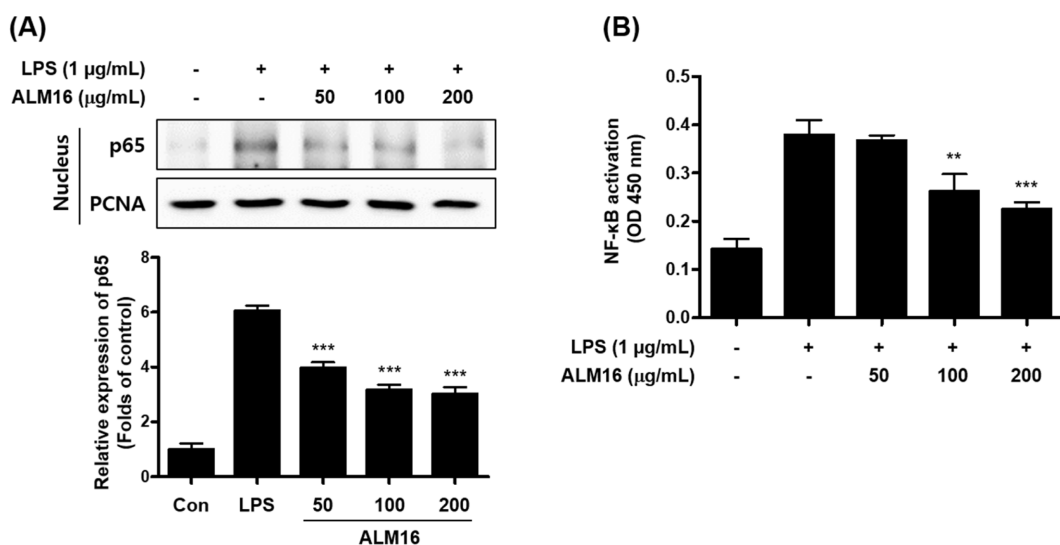


Fig. 5 Inhibitory effect of ALM16 on NF-κB activation in RAW264.7 cells stimulated with LPS. Cells were pretreated with different doses of ALM16 (50, 100 and 200 µg/mL) for 3 h, and then treated with LPS (1 µg/mL) for 1 h. Nuclear extracts of RAW264.7 cells were used to measure the nuclear translocation of NF-κB (A) using western blotting and to determine the DNA-binding activity of NF-κB (B) by ELISA. PCNA in nucleus was used as an internal standard. The data are expressed as the means ± SD (n=3). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with only LPS-treated cells

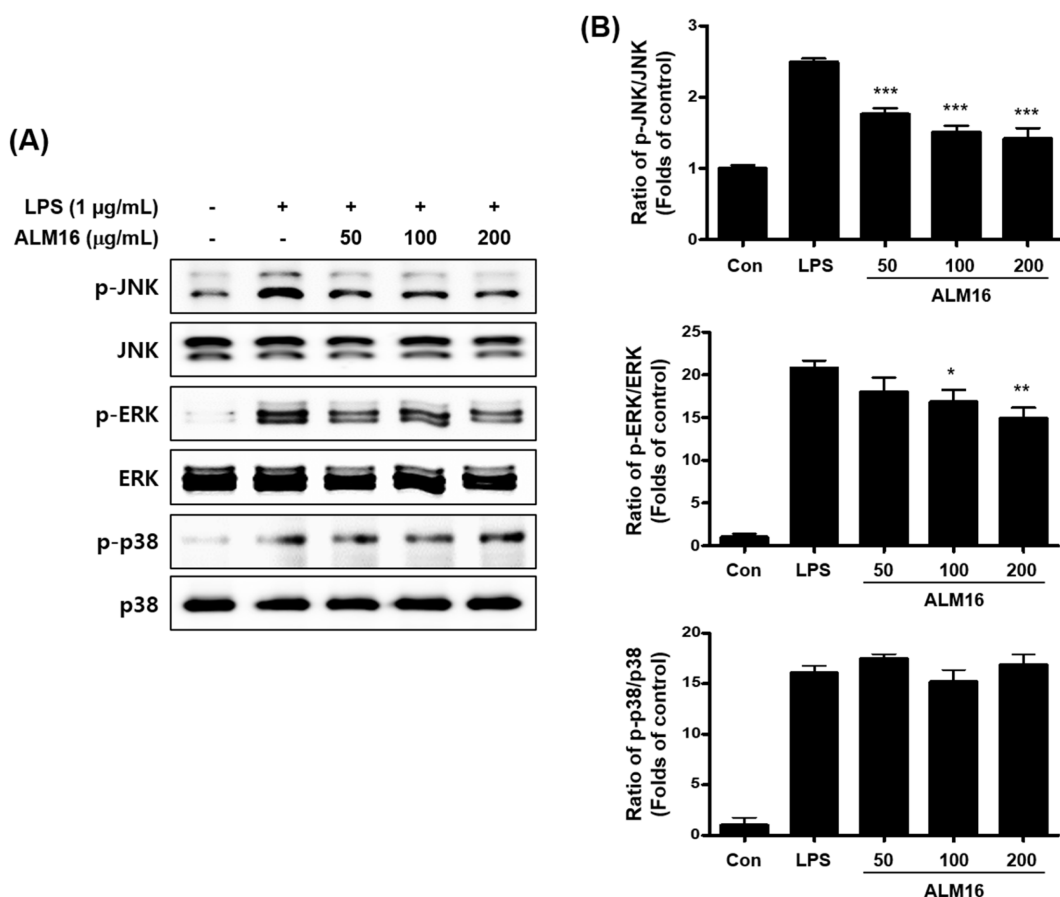


Fig. 6 Effects of ALM16 on MAPK signaling pathway in LPS-induced RAW264.7 cells. Cells were pretreated with ALM16 (50, 100 and 200 mg/mL) for 3 h and then treated with LPS (1 µg/mL) for 15 min. (A) Cell lysates were analyzed using western blotting with specific JNK, p-JNK, ERK, p-ERK, p38, and p-p38 antibodies. (B) The p-JNK, p-ERK, and p-p38 were normalized to the JNK, ERK, and p38, respectively. The data were represented with as the mean ± SD (n=3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with only LPS-treated cells

각 29.3, 39.5, 43.0% 유의하게 감소하였다. LPS처리에 의해 증가된 인산화된 ERK는 ALM16 100, 200 µg/mL 처리하였을 때 각각 19.0, 28.3% 유의적인 감소를 보였다. 하지만 p38 인산화에 대해서는 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다. 따라서, 이러한 결과를 통해 ALM16이 인산화된 JNK, ERK 특이적인 MAPK 신호전달 경로를 억제함을 확인하였다. Lee 등[45]은 차 추출물이 특이적으로 JNK 활성화와 NF-κB 활성 억제를 통한 항염증 활성을 보고하였고, Choi 등[5]은 rebaudioside A가 MAPK 중 특이적으로 ERK의 인산화를 감소시켜 NF-κB 조절 기작에 관여한다고 보고하였다. 이러한 결과들을 종합해보면, ALM16은 JNK, ERK 특이적인 MAPK 신호전달 경로와 NF-κB의 활성 억제를 통해 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하여 염증 매개체와 pro-inflammatory cytokine의 생성을 감소시켜 항염증 활성을 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 ALM16은 염증 조절 효능을 통해 만성 염증성 질환의 예방과 치료에 효과적으로 사용할 수 있는 유용한 소재임을 확인하였다.

초 록

본 연구는 황기와 지치 복합물인 ALM16이 lipopolysaccharide 처리에 의해 자극된 RAW264.7 대식세포의 염증반응에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. ALM16은 RAW264.7 대식세포에 대하여 최대 200 µg/mL의 농도까지 독성은 보이지 않았다. 항염증 활성을 검증하기 위해 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) 및 pro-inflammatory cytokines 생성량을 측정된 결과, ALM16은 각각의 생성량을 농도의존적으로 감소시켰다. 또한 ALM16은 NO와 PGE₂ 생성에 관여하는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 단백질 발현을 억제하였다. 한편, 항염증 활성 조절 기전을 확인하기 위하여 NF-κB의 핵으로의 이동과 DNA-binding activity 및 MAPK 신호전달 경로에 대한 ALM16의 영향을 확인한 결과, ALM16은 NF-κB의 핵으로 이동과 DNA-binding activity를 유의적으로 억제하였으며, JNK와 ERK 특이적으로 인산화를 억제함으로써 MAPK 신호전달 경로 활성을 억제하였다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 ALM16이 MAPK와 NF-κB의 신호전달 경로 억제를 통한 iNOS와 COX-2의 발현을 조절하고, 이로 인하여 NO, PGE₂ 및 pro-inflammatory cytokines의 생성이 감소하여 염증 반응을 조절하는 능력이 있는 것으로 판단된다.

Keywords 대식세포 · 지치 · 항염증 · 황기 · ALM16 · Mitogen-activated protein kinase · Nuclear factor-kappa B

감사의 글 본 논문은 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ01329101)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

References

1. Medzhitov R (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140: 771–776
2. Zhou Y, Hong Y, Huang H (2016) Triptolide attenuates inflammatory response in membranous glomerulo-nephritis rat via downregulation of

- NF-κB signaling pathway. *Kidney Blood Press Res* 41: 901–910
3. Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, Kumar SS (2016) Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 5276130
4. Lee EH, Park HJ, Kim BO, Choi HW, Park KI, Kang IK, Cho YJ (2020) Anti-inflammatory effect of *Malus domestica* cv. Green ball apple peel extract on Raw 264.7 macrophages. *J Appl Biol Chem* 63: 117–123
5. Choi DH, Cho UM, Hwang HS (2018) Anti-inflammation effect of rebaudioside A by inhibition of the MAPK and NF-κB signal pathway in RAW264.7 macrophage. *J Appl Biol Chem* 61: 205–211
6. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805–820
7. Negishi H, Fujita Y, Yanai H, Sakaguchi S, Ouyang X, Shinohara M, Takayanagi H, Ohba Y, Taniguchi T, Honda K (2006) Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15136–15141
8. Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND (2007) Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC Immunol* 8: 1
9. Cagiola M, Giulio S, Miriam M, Katia F, Paola P, Macri A, Pasquali P (2006) In vitro down regulation of proinflammatory cytokines induced by LPS tolerance in pig CD14+ cells. *Vet Immunol Immunopathol* 112: 316–320
10. Yoon YK, Woo HJ, Kim Y (2015) *Orostachys japonicus* inhibits expression of the TLR4, NOD2, iNOS, and COX-2 genes in LPS-stimulated human PMA-differentiated THP-1 cells by inhibiting NF-κB and MAPK activation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 682019
11. Kim GS, Lee DY, Lee SE, Noh HJ, Choi JH, Park CG, Choi SI, Hong SJ, Kim SY (2013) Evaluation on extraction conditions and HPLC analysis method for bioactive compounds of Astragali radix. *Korean J Medicinal Crop Sci* 21: 486–492
12. Shahzad M, Shabbir A, Wojcikowski K, Wohlmuth H, Gobe GC (2016) The antioxidant effects of Radix Astragali (*Astragalus membranaceus* and related species) in protecting tissues from injury and disease. *Curr Drug Targets* 17: 1331–1340
13. Zhu H, Zhang Y, Ye G, Li Z, Zhou P, Huang C (2009) *In vivo* and *in vitro* antiviral activities of calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside against coxsackie virus B3. *Biol Pharm Bull* 32: 68–73
14. Chan JY, Lam F, Leung P, Che C, Fung K (2009) Antihyperglycemic and antioxidative effects of an herbal formulation of *radix astragali*, *radix codonopsis* and *cortex lycii* in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Phytother Res* 23: 658–665
15. Xiao W, Han L, Shi B (2009) Isolation and purification of flavonoid glucosides from *Radix Astragali* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877: 697–702
16. Zhang Y, Shi S, Guo J, You Q, Feng D (2013) On-line surface plasmon resonance-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for analysis of human serum albumin binders from Radix Astragali. *J Chromatogr A* 1293: 92–99
17. Su X, Huang Q, Chen J, Wang M, Pan H, Wang R, Zhou H, Zhou Z, Liu J, Yang F, Li T, Liu L (2016) Calycosin suppresses expression of pro-inflammatory cytokines via the activation of p62/Nrf2-linked heme oxygenase 1 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Pharmacol Res* 113: 695–704
18. Zhang WJ, Hufnagl P, Binder BR, Wojta J (2003) Antiinflammatory activity of astragaloside IV is mediated by inhibition of NF-kappa B activation and adhesion molecule expression. *Thromb Haemost* 90: 904–914
19. Lee DY, Noh HJ, Choi J, Lee KH, Lee MH, Lee JH, Hong Y, Lee SE, Kim SY, Kim GS (2013) Anti-inflammatory cycloartane-type saponins of *Astragalus membranaceus*. *Molecules*. 18: 3725–3732
20. Kim GS, Kim HJ, Lee DY, Choi SM, Lee SE, Noh HJ, Choi JG, Choi SI

- (2013) Effects of supercritical fluid extract, shikonin and acetylshikonin from *Lithospermum erythrorhizon* on chondrocytes and MIA-induced osteoarthritis in rats. *Korean J Medicinal Crop Sci* 21: 466–473
21. Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Couladouros EA, Hepworth D, Nicolaou KC (1999) The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products. *Angew Chem Int Ed Engl* 38: 270–301
 22. Gwon SY, Ahn JY, Chung CH, Moon BK, Ha TY (2012) *Lithospermum erythrorhizon* suppresses high-fat diet-induced obesity, and acetylshikonin, a main compound of *Lithospermum erythrorhizon*, inhibits adipocyte differentiation. *J Agric Food Chem* 60: 9089–9096
 23. Kim GS, Park CG, Lee KH, Choi JH, Lee SE, Noh HJ, Lee JH, Kim SY (2011) Investigation of shikonin pigments and antioxidant activity of the roots from *Lithospermum erythrorhizon* according to the different growth stages and areas of cultivation. *Korean J Medicinal Crop Sci* 19: 435–440
 24. Kim JS, Han YS, Kang MH (2006) Identification of shikonin and its derivatives from *Lithospermum erythrorhizon*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 177–181
 25. Chung HS, Kang M, Cho C, Park S, Kim H, Yoon YS, Kang J, Shin MK, Hong MC, Bae H (2005) Inhibition of lipopolysaccharide and interferon-gamma-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha by *Lithospermi radix* in mouse peritoneal macrophages. *J Ethnopharmacol* 102: 412–417
 26. Yoshida LS, Kakegawa T, Yuda Y, Takano-Ohmuro H (2017) Shikonin changes the lipopolysaccharide-induced expression of inflammation-related genes in macrophages. *J Nat Med* 71: 723–734
 27. Choi DJ, Choi BR, Lee DY, Choi SI, Lee YS, Kim GS (2019) Inhibitory effect of mixed extracts obtained from *Astragali Radix* and *Lithospermi Radix* on matrix metalloproteinases in IL-1 β -induced SW1353 cells and quantitative analysis of active compounds. *Korean J Medicinal Crop Sci* 27: 247–258
 28. Choi DJ, Choi SI, Choi BR, Lee YS, Lee DY, Kim GS (2019) Cartilage protective and anti-analgesic effects of ALM16 on monosodium iodoacetate induced osteoarthritis in rats. *BMC Complement Altern Med* 19: 325
 29. Choi DJ, Kim SC, Park GE, Choi BR, Lee DY, Lee YS, Park SB, Park YI, Kim GS (2020) Protective effect of a mixture of *Astragalus membranaceus* and *Lithospermum erythrorhizon* extract against hepatic steatosis in high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020: 8370698
 30. Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871–1875
 31. Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051–3064
 32. Hanada T, Yoshimura A (2002) Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth F R* 13: 413–421
 33. Dinarello CA (1999) Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis* 179: 294–304
 34. Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL (2009) *Horror autoinflammaticus*: The molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annu Rev Immunol* 27: 621–668
 35. Chung YS, Choi M, Park I, Park KY, Kim KH (2010) Effects of chitosan on the production of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in mice. *Cancer Prev Res* 15: 204–210
 36. Park MJ, Park HJ, Lee EH, Jung HY, Cho YJ (2018) Anti-inflammatory effect potentials of ethanol extracts from fermented *Caryopteris incana* by *Lactobacillus plantarum* in induced to LPS with Raw 264.7 cell. *J Appl Biol Chem* 61: 141–150
 37. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev* 43: 109–142
 38. Liu SF, Malik AB (2006) NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L622–L645
 39. Chan AT (2003) Aspirin, non-steroidal anti-inflammatory drugs and colorectal neoplasia: Future challenges in chemoprevention. *Cancer Causes Control* 14: 413–418
 40. Yang EJ, Kim MS, Kim SY, Hyun CG (2019) Anti-inflammatory activity of *Euphorbia jolkini* extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *KSBB J* 34: 120–125
 41. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS (2001) Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat Res* 480: 243–268
 42. Roberts PJ, Der CJ (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26: 3291–3310
 43. Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911–1912
 44. Kim HK (2014) Role of ERK/MAPK signalling pathway in anti-inflammatory effects of *Ecklonia cava* in activated human mast cell line-1 cells. *Asian Pac J Trop Med* 7: 703–708
 45. Lee SC, Sim SY, Kim YS (2016) Effects of *Gardeniae Fructus* on the metabolic process of antioxidant and anti-inflammation by JNK and NF- κ B. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 29: 56–64