

## LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 *Argyrea capitata* (Vahl) Choisy 추출물의 NF-κB pathway 조절을 통한 항염증 효능 평가

염가희<sup>1</sup> · 소보람<sup>1</sup> · Tran The Bach<sup>2</sup> · 엄상미<sup>3</sup> · 정성근<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 식품공학부 식품응용공학전공, <sup>2</sup>베트남 과학기술원, 생태생물자원 연구소,  
<sup>3</sup>한국생명공학연구원, 해외생물소재센터

### Evaluation of anti-inflammatory effect by regulating NF-κB pathway of *Argyrea capitata* (Vahl) Choisy extract in LPS-induced RAW 264.7 macrophages

Ga Hee Yeum<sup>1</sup>, Bo Ram So<sup>1</sup>, Tran The Bach<sup>2</sup>, Sang Mi Eum<sup>3</sup>, and Sung Keun Jung<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University

<sup>2</sup>Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

<sup>3</sup>International Biological Material Research Center, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology

**Abstract** *Argyrea capitata* (Vahl) Choisy is a species of the genus *Argyrea*. Although many studies have analyzed the biological activity of *A. nervosa*, *A. speciosa*, and *A. acuta*, the anti-inflammatory effect of *A. capitata* extract (ACE) remains unclear. In this study, we evaluated the anti-inflammatory effect of ACE using lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory markers in RAW 264.7 cells. We confirmed that the ACE inhibited the LPS-induced NO (nitric oxide) and iNOS (inducible nitric oxide synthase) expression in RAW 264.7 cells. ACE suppressed not only the LPS-induced phosphorylation of IKK, IκB, and p65 but also IL-1β expression. Collectively, these results suggest that ACE is a novel anti-inflammatory agent that suppresses iNOS expression, NO production, and the NF-κB signaling pathways.

**Keywords:** *Argyrea capitata* (Vahl) Choisy extract (ACE), nitric oxide (NO), NF-κB (nuclear factor kappa-B), inflammatory cytokines, anti-inflammatory effect

## 서 론

*Argyrea capitata* (Vahl) Choisy는 메꽃 또는 나팔꽃이라 불리는 Convolvulaceae과 *Argyrea*속에 속한 쌍떡잎 식물로써 *Argyrea capitiformis* (Poir.) Ooststr와 동의어이다. 메꽃과는 덩굴뿐만 아니라 나무, 관목 및 허브, 고구마 및 기타 식용 덩이줄기를 포함하며 약 60속(屬) 1,650종(種)이 주로 열대와 아열대에서 자라지만 온대지방까지 올라오고 한국에는 3속 10종이 있다. 메꽃은 독이 없어 식용, 약용, 관상용으로 사용되며, 동의보감에 “메꽃은 오래 먹으면 주림을 모른다”고 기록되어 있다. *Argyrea nervosa*, *Argyrea speciosa*, *Argyrea acuta* 등 *Argyrea capitata*를 제외한 여러 종은 상처 회복, 항산화 및 항균 효과에 관련된 선행연구가 보고된 바 있지만(Bachhav 등, 2009; Singhal과 Gupta, 2011; Yadav 등, 2014; Lalan 등, 2015; Azmi 등, 2019), *Argyrea capitata*의 항염증 효과에 대한 연구는 보고된 바 없다.

염증은 병원체 및 손상된 세포와 같은 유해한 자극으로부터 숙

주를 보호하기 위해 조직에서 일어나는 생물학적 반응 중 하나이다. 염증은 면역 시스템을 작동시키고 면역 세포, 혈관 및 분자 생물학적 매개체와 관련된 보호 반응을 중재한다(Martinez 등, 2009; Kauppinen 등, 2013). 과한 염증은 과도한 염증 매개체의 분비, 지속적인 병원체의 노출, 이물질 및 자가 면역 장애 등으로 인해 류마티스 관절염, 제 1형 당뇨병과 같은 대사성 질환 뿐만 아니라 알레르기 반응, 죽상 동맥 경화 및 암과 같은 다양한 염증성 질환을 유발할 수 있다(Ranjha와 Paul, 2013; Chiurchi와 MacCarrone, 2011). 따라서 염증반응의 억제를 통해 염증성 질환을 예방하고 건강을 증진할 수 있으며, 부작용을 나타내는 합성 항염증 치료제를 대체할 보다 안전하고 효과적인 식품 유래의 항염증 소재의 개발이 필요하고 이는 잠재적 건강 기능성 식품소재로서 매우 중요한 의미를 갖는다.

산화 질소(nitric oxide, NO)는 L-아르기닌으로부터 산화 질소 합성효소(nitric oxide synthases, NOSs)에 의해 생성된 자유 라디칼 분자이다(Nathan 등, 1994). 산화 질소 합성효소는 endothelial (eNOS), neuronal (nNOS)과 inducible (iNOS)이라는 세 가지의 동형단백질을 가지고 있으며 이들은 각각 다른 기능을 한다(Tripathi, 2007; Poulos와 Li, 2013). 인간을 포함한 포유 동물에서 NO는 병원체로부터 숙주세포를 방어하는 역할을 하고, 혈관 확장 및 신경 전달과 같은 다양한 생리적 과정에 관련된 신호를 전달하는 분자임이 알려져 있다(Calabrese 등, 2007; Bogdan 등, 2000; Lowenstein와 Snyder, 1992). 이와 더불어 NO는 감염원을 불활성화 시키고 파괴함으로써 다양한 병원체로부터 숙주를 보호하는

\*Corresponding author: Sung Keun Jung, Ph.D., School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

Tel: +82 53 950 7764

Fax: +82 53 950 7762

E-mail: skjung04@knu.ac.kr

Received March 24, 2020; revised May 15, 2020;

accepted May 20, 2020

전염증성 세포 독성 매개 인자인 것으로 밝혀졌다(Bogdan 등, 2000).

대식세포는 동물 신체의 모든 조직에 분포하며 선천성 면역 반응을 담당하는 백혈구 세포 중 하나이다(Hallam 등, 2009). 병원체가 조직에 침투하면 조직이 손상되고 히스타민과 같은 화학 중간체가 방출된다. 이러한 화학 중간체는 혈관을 이완시키고 혈류를 증가시켜 손상된 조직으로의 대식세포 이동을 증가시킨다. 대식세포는 식세포 작용(phagocytosis)을 통해 병원체 및 죽은 조직을 제거하고 T세포에 항원을 제시한다(Lee 등, 2004). 대식세포가 활성화될 때, 이들은 M1, M2 두 가지 표현형으로 정의된다(Biswas와 Mantovani, 2010; Lawrence와 Natoli, 2011; Martinez 등, 2009; Ruffell 등, 2012). M1 유형은 톨-유사 수용체(Toll-like receptor, TLR) 또는 IFN- $\gamma$ 와 반응하여 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 iNOS와 같은 전염증성 사이토카인을 유도하고 이는 후차적으로 염증성 반응을 유발한다(Martinez 등, 2009; Sica 등, 2012).

NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B)는 감염에 대한 면역 반응을 조절함에 있어 중요한 역할을 하는 전사인자이다. NF- $\kappa$ B는 DNA의 전사, 염증성 사이토카인 생성 및 세포 생존을 조절하는 단백질 복합체이기 때문에, 부적절한 NF- $\kappa$ B의 조절은 암, 염증 및 자가 면역 질환과 관련이 있다(Kauppinen 등, 2013; Huang 등, 2012a; Yang 등, 2013). 불활성화 된 상태에서, NF- $\kappa$ B는 억제 단백질 I $\kappa$ B $\alpha$ 와 결합된 상태로 세포질에 위치한다(Li와 Verma, 2002; Liang 등, 2004). 막 수용체를 통해, 많은 세포 외 신호가 I $\kappa$ B kinase (IKK)효소를 활성화시키면, IKK는 I $\kappa$ B $\alpha$  단백질을 인산화시켜 NF- $\kappa$ B로부터 분리시키고, 최종적으로 단백질 분해효소에 의해 I $\kappa$ B $\alpha$ 는 분해된다. I $\kappa$ B와 분리되며 활성화된 NF- $\kappa$ B는 핵으로 전위되어 iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 와 같은 염증 표적 유전자의 전사개시 서열에 결합한다(Lee 등, 2016; Sheeba 등, 2009). 이렇게 결합한 DNA/NF- $\kappa$ B 복합체는 보조활성자 및 RNA 중합효소를 동원하고 염증성 표적 DNA를 mRNA로 전사한다(Cheung 등, 2013; Yang 등, 2013).

LPS는 gram-negative 세균의 세포벽 구성성분으로 강한 염증 반응을 일으키며 대식세포 표면의 TLR4를 자극하여 하루 세포 신호전달경로인 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성화를 유도하며 활성화된 신호전달경로는 pro-inflammatory cytokines, NO 등과 같은 여러 가지 염증성 매개 인자들을 발현시킴으로써 면역계 기능의 장애를 초래하게 된다(Matthay 등, 2003). 따라서, 본 연구에서 LPS에 의해 유도된 염증성 반응에 대한 *A. capitata* 추출물(ACE)의 억제 효과를 분석하였고, ACE가 NF- $\kappa$ B 신호 경로의 억제를 통해 NO의 생성과 iNOS 발현을 억제한다는 것을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

Dulbecco's Modified Eagle's 배지(DMEM), 항생제(penicillin/streptomycin solution), 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Thermo Scientific HyClone (Logan, UT, USA)으로부터 구입하였다. *Escherichia coli* O111:B4에서 유래된 LPS는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Western blot 실험에 사용하기 위한  $\beta$ -actin 1차 항체는 Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, iNOS, I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ), phospho-IKK $\alpha/\beta$  (Ser176/180), NF- $\kappa$ B p65, phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536), I $\kappa$ B $\alpha$ , phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$  (Ser32) 1차 항체는 Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Peroxidase

가 결합된 Pierce Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Pierce Goat Anti-Mouse IgG (H+L) 2차 항체는 Thermo Fisher Scientific Inc. (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. qPCR 실험을 위한 RNAiso Plus는 Takara Bio (Dalian, China)에서, ReverTra Ace qPCR RT master mix과 SYBR Green Realtime PCR Master Mix는 Toyobo (Osaka, Japan)에서 구매하였다.

### 샘플 준비 및 추출

본 연구에 사용된 *A. capitata* 추출물은 한국생명공학연구원 (Korea research institute of bioscience & biotechnology, KRIBB, Daejeon, Korea, FBM098-57)으로부터 제공받았다. 분석을 위한 시료는 *Argyrea capitata* (Vahl) Choisy의 잎과 가지 65 g을 건조 및 분쇄하였다. 이를 99.9% MeOH (1 L, HPLC 등급)과 섞어 초음파 추출기(SDN-900H, SD-Ultrasonic Co., Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 3일간 실온에서 여러 번 초음파 처리하였다. 총 5.05 g의 MeOH 추출물을 여과 후 40°C에서 감압 하에 증발시켜 건조 추출물을 획득하였으며, 추출물의 수율은 7.77%였다. *Argyrea capitata* (Vahl) Choisy는 베트남 Binh Phuoc 지방 Bu Dang구에 속한 Thong Nhat 마을에서 수집되었고, 식물 추출물 샘플은 베트남 하노이 생태 생명 자원 연구소의 Tran The Bach 박사가 수집하여 확인하였다. 바우처 표본은 KRIB 0032306으로 기록되었고 VK 3355는 한국생명공학연구원(KRIBB)의 식물 표본실에 기록되었다.

### 세포 배양 및 세포 독성 평가

RAW 264.7 대식세포는 한국세포주은행(KCLRF, Korean Cell Line Research Foundation, Seoul, Korea)에서 구입하여 10% FBS와 1% 항생제(100 U/mL penicillin과 100  $\mu$ g/mL streptomycin)를 함유한 DMEM를 이용해 배양하였다. 세포는 37°C의 온도 및 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. ACE에 대한 대식세포의 생존율을 평가하기 위해, RAW 264.7 세포를 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL 농도로 96 well plate에 분주하였다. 세포에 ACE를 농도별로 첨가하고 24시간 동안 배양한 후, 20  $\mu$ L의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) 시약(Promega, Madison, WI, USA)을 첨가하였다. 1시간 후, microplate reader기 (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Nitric oxide 측정

Nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 생산은 Griess 시약과의 비색분석을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 대식세포 3 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mL을 96 well plate에 분주 하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. ACE를 가하고 1시간 후에 LPS (1  $\mu$ g/mL)를 다시 가한 후 24시간 배양하였다. 각 군별 세포 상층액 100  $\mu$ L와 동량의 Griess 시약 (0.2%N-(1-naphthyl)-ethylenediaminedihydrochloride (NED)과 5% phosphoric acid 속 1% sulfanilamide)을 가하고, 15분 배양 후 microplate reader기(Bio-Rad Inc, Hercules, CA, USA)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 농도별로 용해하여 NO의 표준곡선으로 사용하였다.

### Western blot 분석

*In vitro*상의 Western blot 분석을 위해 RAW 264.7 대식세포는 6 cm dish에 3 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mL 농도로 분주 되어 37°C의 온도 및 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였다. 이후 ACE 농도를 25, 50, 100  $\mu$ g/mL로 다르게 하여 1시간 동안 전처리한 후 1  $\mu$ g/mL

의 LPS를 24시간 처리하였다. 그 다음 dish를 얼음 위에 두고 차가운 PBS로 2번 씻은 후 cell lysis buffer (Cell Signaling Technologies)로 용해시켰다. Lysis buffer를 cell scraper로 회수한 후 1.5 mL tube에 옮긴 후 얼음에서 10분에 1번씩 총 3번 vortexing 시켰다. 원심분리기에 4°C에서 15분간 12,000 rpm 조건으로 원심 분리 하여 상층액을 얻은 후 DC Protein Assay Kit reader (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 사용하여 단백질을 정량하였다.

10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)에 단백질 혼합액을 loading하여 전기영동을 통해 단백질을 분리한 후 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P, Millipore, Burlington, MA, USA)에 transfer하였다. 5%의 skim milk로 상온에서 1시간 blocking한 후 각각의 1차 항체를 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후 membrane을 TBST (tris-buffered saline Tween-20)를 바꿔가며 5분마다 한번씩 총 3번 씻어주고, skim milk에 녹인 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Thermo Scientific) 2차 항체로 실온에서 1시간 반응시켰다. Membrane 세척 후 EzWestLumi plus를 처리해 단백질 발현 및 인산화 정도를 측정하였다. 단백질 band는 chemiluminescence detection kit (ATTO, Tokyo, Japan)과 GeneGnome XRQ NPC (Syngene, Cambridge, UK)을 각각 이용해 정량 및 시각화 하였다.

**통계 분석**

실험 데이터는 평균(mean)±표준편차(standard deviation)로 표시 하였다. LPS와 ACE 실험군의 유의적인 차이는 one-way ANOVA (analysis of variance)로 분석하였고, 사후 검증은 SPSS program (ver. 19.0, Chicago, IL, USA)을 통해 최소유의차(least significant difference, LSD)를 이용하였다. 통계적 유의성에 대한 기준으로 대조군과 비교하여  $p < 0.05$  일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

**실험 결과 및 고찰**

염증은 병원성 균이나 외부독성물질을 제거하기 위한 체내의 면역반응의 균형이 깨지면 발생하게 된다. 반복적인 염증은 심혈관계질환, 신경계질환, 소화기계의 질환 등을 유발하는 것으로 알려져 있다(Libby, 2006; Chiruchi와 MacCarrone, 2011; Ranjha와

Paul, 2013; Landskron 등, 2014). 이러한 염증을 억제하기 위하여, 다양한 비스테로이드성 항염증제제가 염증억제제로 사용되고 있다. 하지만, 이러한 약제의 장기적인 사용은 여러 부작용을 동반 하는 것으로 알려져 있다(Rashad 등, 1989). 이에 따라 식품 혹은 천연물로부터 항염증 소재를 발견하기 위한 여러 연구들이 진행중이다(Huang 등, 2012b; Jiang 등, 2012). 따라서, 본 연구에서는 염증질환을 예방 또는 개선할 수 있는 천연소재를 발굴하고자 하였다.

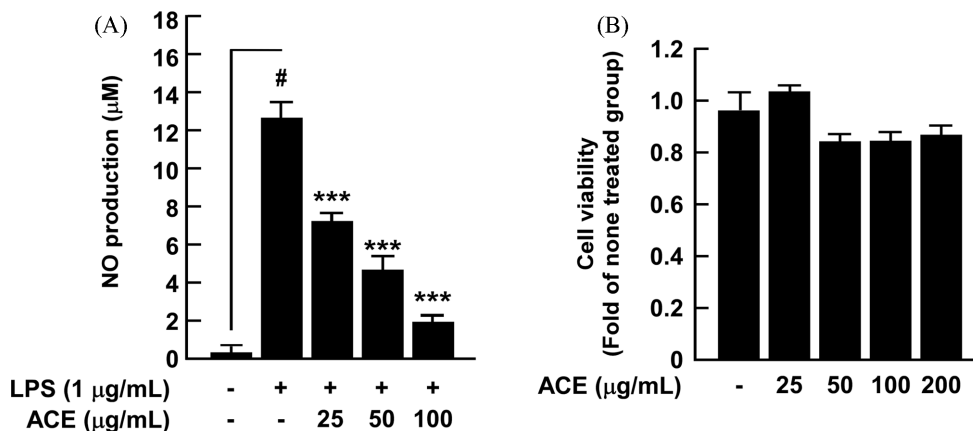
**RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 nitrite 생성 및 iNOS 발현에 대한 ACE의 저해 효과**

NO는 세포의 기능을 유지하는 역할을 하지만, 과도하게 생성된 NO는 세포 독성을 유발할 뿐만 아니라 염증 반응, 세포 돌연변이 및 종양 발생의 원인이 된다(Bogdan 등, 2000; Tripathi, 2007). 우리는 한국생명공학연구원(KRIBB)에서 제공받은 해외생물소재 15종 추출물(100 µg/mL)의 항염증 효능을 평가하기 위해 LPS에 의해 RAW 264.7 세포에서 증가한 NO의 생성에 추출물이 미치는 영향을 평가하였고, *A. capitata* 추출물(이하 ACE)이 NO 생성을 가장 효과적으로 억제함을 확인하였다(데이터는 표시하지 않음). ACE의 농도를 다르게 처리하여(25, 50, 100 µg/mL) RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO에 대한 ACE의 효과를 분석한 결과, ACE가 LPS로 인한 NO의 생성을 유의적으로 억제함을 확인하였다(Fig. 1A). 그리고 처리한 농도에서 세포독성은 나타나지 않았다(Fig. 1B).

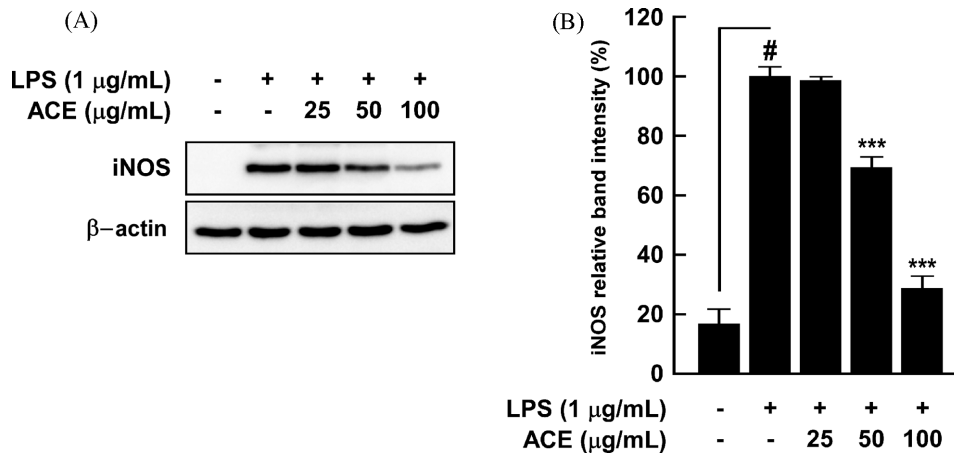
염증 반응에 관여하는 NO는 일반적으로 iNOS에 의해 생성된다(Bogdan 등, 2000; Korhonen 등, 2005). 따라서 우리는 ACE가 iNOS 발현에 영향을 나타내는지 분석하였다. Western blot 분석 결과, ACE가 LPS에 의해 유도된 iNOS 발현을 유의적으로 저해하였다(Fig. 2A와 2B). Lalan 등은 *Argyrea speciosa* 뿌리 추출물이 carrageenan로 유발한 rat paw edema를 38% 저해하였다고 보고하였고, Gokhale 등은 12.89-34.93% 억제함을 보고하였다(Gokhale 등, 2002; Bachhav 등, 2009; Lalan 등, 2015).

**LPS에 의해 유도된 NF-κB 신호 전달 경로에 대한 ACE의 저해 효과**

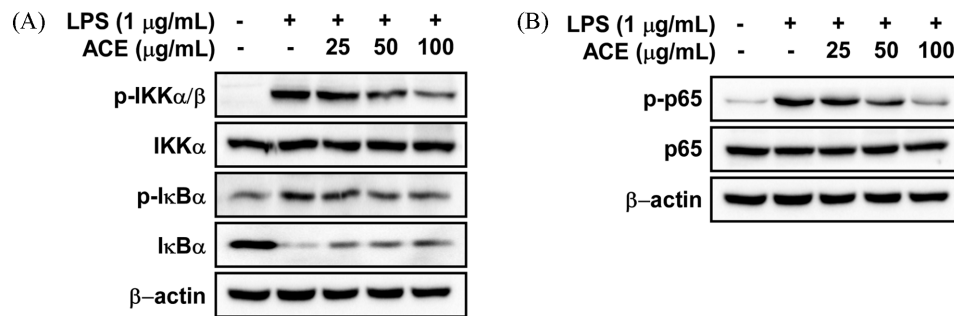
Macrophage와 같은 면역세포가 LPS에 의해 자극을 받으면,



**Fig. 1. Effects of ACE on LPS-induced nitrites production in RAW 264.7 mouse macrophage cells.** The cells were treated with the indicated concentrations of ACE in the presence or absence of LPS (1 µg/mL) for 24 h. (A) ACE inhibits LPS-induced nitrites production in RAW 264.7 cells. Nitrite levels were assayed by the Griess reaction. (B) ACE did not affect viability of RAW 264.7 cells. <sup>#</sup> $p < 0.05$  between control group and the group exposed LPS alone; <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  between the LPS+ACE groups and the group exposed to LPS alone. Data are presented as mean±SD of three independent experiments.



**Fig. 2. Effects of ACE on LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 mouse macrophage cells.** The cells were treated with the indicated concentrations of ACE in the presence or absence of LPS (1  $\mu$ g/mL) for 24 h. ACE significantly inhibits LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 cells. Cells were pre-treated with the indicated concentrations of ACE for 1 h and then stimulated with LPS (1  $\mu$ g/mL) for 24 h. (A) Expression levels of iNOS and  $\beta$ -actin were determined by Western blot assay. (B) Each band was quantified using software-based densitometry. # $p$ <0.05 between the control group and the group exposed to LPS alone; \*\*\* $p$ <0.001 between the LPS+ACE groups and the group exposed to LPS alone. Data are presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments.



**Fig. 3. Effects of ACE on LPS-induced NF- $\kappa$ B signaling pathway in RAW 264.7 cells.** Cells were pre-treated with the indicated concentrations of ACE for 1 h and then stimulated with LPS (1  $\mu$ g/mL) for 15 min. (A) ACE inhibits LPS-induced IKK phosphorylation and weakly at I $\kappa$ B phosphorylation. (B) ACE inhibits LPS-induced p65 phosphorylation in RAW 264.7 cells. Phosphorylation and expression were detected by Western blot assay with specific antibodies.

LPS는 TLR4와 같은 pattern recognition receptor에 결합하고 신호 전달 네트워크를 활성화하여 염증관련 인자를 발현하게 된다 (Martinez 등, 2009; Huang 등, 2012a). LPS에 의해 활성화된 IKK는 I $\kappa$ B를 해리시키고, NF- $\kappa$ B는 핵 안으로 이동하여 iNOS 유전자를 발현한다. 따라서, 우리는 NF- $\kappa$ B 신호 전달 경로가 ACE에 의해 영향을 받는지 확인하기 위해 ACE가 LPS에 의해 증가한 IKK, I $\kappa$ B 및 p65의 인산화에 미치는 영향을 평가하였다. Western blot 분석결과, RAW 264.7 세포에서 ACE는 LPS로 인해 유도된 IKK $\alpha/\beta$ 와 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화를 억제하였다(Fig. 3A). 또한, ACE는 p65 인산화도 억제하였다(Fig. 3B).

p65의 인산화는 세포질에서 핵으로의 p65 이동을 조절하기 때문에 NF- $\kappa$ B활성에 주요한 역할을 한다(Hsieh 등, 2011). 따라서, p65 인산화의 저해는 NF- $\kappa$ B의 활성화억제와 직접적인 관계가 있다. Bachhav 등도 *Argyrea speciosa* root 소재가 p65의 인산화를 억제함으로써 항염증 효능을 나타냄을 보였다(Bachhav 등, 2009). 따라서, ACE 추출물이 p65의 인산화를 억제함으로써 항염증 효능을 나타냄을 증명할 수 있다.

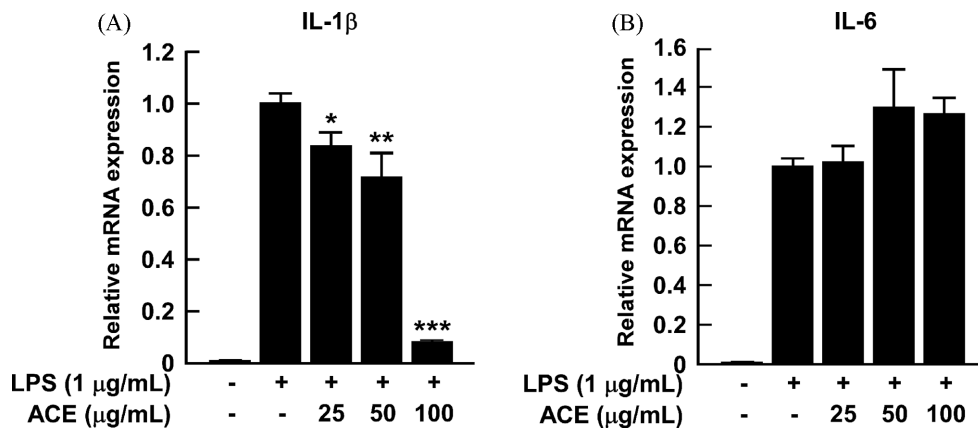
NF- $\kappa$ B 신호전달 네트워크와 함께, MAPKs는 핵내 전사인자로서 LPS 등 다양한 자극에 의해 인산화가 증가되어 AP-1 전사인

자의 활성을 촉진하여 염증 매개체의 생성에 결정적인 역할을 한다(Liu 등, 2009). 따라서, ACE가 MAPKs의 활성에 미치는지에 대한 추가 분석이 필요하다.

#### RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 염증성 사이토카인 생성에 대한 ACE의 저해 효과

IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성 사이토카인은 염증에 관여하는 세포 신호 전달 단백질이며, 염증반응에 필수적이다(Yang과 Tang, 2013). 따라서, 우리는 ACE가 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 효과를 평가하였다. 실험결과 ACE가 LPS에 의해 증가한 IL-1 $\beta$ 의 생성을 유의적으로 억제하였다(Fig. 4A). 하지만, IL-6 저해 효과는 보이지 않았다(Fig. 4B). 이처럼 염증성 사이토카인 중 IL-1 $\beta$ 에 대한 ACE의 억제효과는 또 다른 염증표적 유전자인 iNOS의 단백질 발현을 억제시키는 것과 유사한 경향을 보였다(Fig. 2A).

추출물에 존재하는 화합물을 분석하는 것은 활성성분의 동정과 향후 산업화를 위한 품질관리 측면에서 매우 중요한 부분이다. 따라서, 향후, 건강기능식품 또는 의약품으로 적용하는데 있어 ACE의 활성성분 동정연구가 요구된다.



**Fig. 4. Effects of ACE on LPS-induced inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells.** Cells were pre-treated with the indicated concentrations of ACE for 1 h and then stimulated with LPS (1 μg/mL) for 24 hr. The production of IL-1β and IL-6 was examined using real time PCR detection system. ACE inhibits IL-1β production but did not affect IL-6 production at the concentration of 25, 50, 100 μg/mL. # $p < 0.05$  between the control group and the group exposed to LPS alone; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  between the LPS+ACE groups and the group exposed to LPS alone. Data are presented as mean±SD of three independent experiments.

## 요약

우리는 한국생명공학연구원에서 제공한 소재를 탐색 후 ACE를 선별하였고 이 소재의 항염증 효능을 평가하였다. ACE는 세포독성이 없는 농도에서 LPS에 의한 iNOS의 발현과 NO의 생성을 유의적으로 억제하였다. ACE는 LPS에 의해 증가한 IKK, IκB, p65의 인산화와 IL-1β의 생성을 유의적으로 억제하였다.

이 논문은 ACE가 NO/iNOS 발현 및 NF-κB 신호 전달 경로의 억제를 통해 항염증 효능을 나타냄을 밝힌 최초의 논문으로서 의의를 가진다. 또한 이 결과를 바탕으로 ACE는 항염증 기능성식품 또는 의약품소재로써 활용가치가 높을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

이 논문은 2018학년도 경북대학교 신입교수 정착연구비에 의하여 연구되었음.

## 기호 및 용어 설명

ACC *Argyrea capitata* (Vahl) Choisy  
 ACE *Argyrea capitata* (Vahl) Choisy extract  
 NO Nitric oxide  
 iNOS Inducible nitric oxide synthase  
 NF-κB nuclear factor- kappa B  
 FBS fetal bovine serum

## References

Azmi L, Shukla I, Goutam A, Rao CV, Jawaid T, Awaad AS, Alqasoumi SI, AlKhamees OA, Kamal M. Oxidative free radicals scavenging activity (*in vitro* and *in vivo* assay) of standardized fractions from the seeds of *Argyrea speciosa* (Ghav-patta) a traditional Indian medicine. Saudi Pharmaceutical Journal. 27: 1210-1215 (2019)  
 Bachhav RS, Gulecha VS, Upasani CD. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Argyrea speciosa* root. Indian. J. Pharmacology. 41: 158-161 (2009)  
 Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with

lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. Nat. Immunol. 11: 889-896 (2010)  
 Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. Immunol. Rev. 173: 17-26 (2000)  
 Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield. Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity. Nat. Rev. Neurosci. 8: 766-775 (2007)  
 Cheung DW, Koon CM, Wat E, Ko CH, Chan JY, Yew DT, Leung PC, Chan WY, Lau CB, Fung KP. A herbal formula containing roots of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) and *Pueraria lobata* (Gegen) inhibits inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages through inhibition of nuclear factor κB (NFκB) pathway. J. Ethnopharmacol. 145: 776-783 (2013)  
 Chiurchiù V, MacCarrone M. Chronic inflammatory disorders and their redox control: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxid. Redox Sign. 15: 2605-2641 (2011)  
 Gokhale AB, Damre AS, Kulkarni KR, Saraf MN. Preliminary evaluation of anti-inflammatory and anti-arthritis activity of *S. lappa*, *A. speciosa* and *A. aspera* Phytomedicine. 9: 433-437 (2002)  
 Hallam S, Escorcio-Correia M, Soper R, Schultheiss A, Hagemann T. Activated macrophages in the tumour microenvironment-Dancing to the tune of TLR and NF-κB. J. Pathol. 219: 143-152 (2009)  
 Hsieh CY, Hsu MJ, Hsiao G, Wang YH, Huang CW, Chen SW, Jayakumar T, Chiu PT, Chiu YH, Sheu JR. Andrographolide enhances nuclear factor-κB subunit p65 Ser 536 dephosphorylation through activation of protein phosphatase 2A in vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 286: 5942-5955 (2011)  
 Huang GJ, Huang SS, Deng JS. Anti-inflammatory activities of inositolone from *Phellinus linteus* through the inhibition of MMP-9, NF-κB, and MAPK activation *in vitro* and *in vivo*. PLoS ONE. 7 (2012a)  
 Huang J, Zhu M, Tao Y, Wang S, Chen J, Sun W, Li S. Therapeutic properties of quercetin on monosodium urate crystal-induced inflammation in rat. J. Pharm. Pharmacol. 64: 1119-1127 (2012b)  
 Jiang Y, You XY, Fu KL, Yin WL. Effects of extract from *Mangifera indica* leaf on monosodium urate crystal-induced gouty arthritis in rats. Evid.-Based Complementary Altern. Med. (2012)  
 Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, Kaarniranta K, Salminen A. Antagonistic crosstalk between NF-κB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. Cell. Signal. 25: 1939-1948 (2013)  
 Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. Current Drug Targets-Inflammation & Allergy. 4: 471-479 (2005)  
 Lalan BK, Hiray RS, Ghongane BB. Evaluation of Analgesic and Anti-Inflammatory Activity of Extract of *Holoptelea Integriifolia* and *Argyrea Speciosa* in Animal Models. J. Clin. Diagn. Res. 9:

- 1-4 (2015)
- Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J. Immunol. Res.* (2014)
- Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: Enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 750-761 (2011)
- Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee E, Jahng Y, Lee SH, Son JK, Baek SH, Chang HW. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B activation in cultured murine macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (2004)
- Lee SH, Kwak CH, Lee SK, Ha SH, Park J, Chung TW, Ha KT, Suh SJ, Chang YC, Chang HW, Lee YC, Kang BS, Magae J, Kim CH. Anti-Inflammatory Effect of Ascochlorin in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells is Accompanied with the Down-Regulation of iNOS, COX-2 and Proinflammatory Cytokines Through NF- $\kappa$ B, ERK1/2, and p38 Signaling Pathway. *J. Cell. Biochem.* 117: 978-987 (2016)
- Li Q, Verma IM. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 725-734 (2002)
- Liang Y, Zhou Y, Shen P. NF- $\kappa$ B and its regulation on the immune system. *Cell. Mol. Immunol.* 1 (2004)
- Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 83 (2006)
- Liu W, Ouyang X, Yang J, Liu J, Li Q, Gu Y, Fukata M, Lin T, He JC, Abreu M, Unkeless JC, Mayer L, Xiong H. AP-1 activated by toll-like receptors regulates expression of IL-23. *J. Biol. Chem.* 284: 24006-24016 (2009)
- Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *In Cell.* 70: 705-707 (1992)
- Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu Rev Immunol.* 27: 451-483 (2009)
- Matthay MA, Zimmerman GA, Esmon C, Bhattacharya J, Collier B, Doerschuk CM, Floros J, Gimbrone MA Jr, Hoffman E, Hubmayr RD, Leppert M, Matalon S, Munford R, Parsons P, Slutsky AS, Tracey KJ, Ward P, Gail DB, Harabin AL. Future research directions in acute lung injury: Summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167: 1027-1035 (2003)
- Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell.* 78: 915-918 (1994)
- Poulos TL, Li H. Structural basis for isoform-selective inhibition in nitric oxide synthase. *Acc. Chem. Res.* 46: 390-398 (2013)
- Ranjha R, Paul J. Micro-RNAs in inflammatory diseases and as a link between inflammation and cancer. *Inflamm. Res.* 62: 343-355 (2013)
- Rashad S, Hemingway A, Rainsford K, Revell P, Low F, Walker F. Effect of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on the Course of Osteoarthritis. *Lancet.* 334: 519-522 (1989)
- Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* 33: 119-126 (2012)
- Sheeba MS, Asha VV. *Cardiospermum halicacabum* ethanol extract inhibits LPS induced COX-2, TNF- and iNOS expression, which is mediated by NF- $\kappa$ B regulation, in RAW264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* 124: 39-44 (2009)
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *In vivo* veritas. *J. Clin. Investig.* 122: 787-795 (2012)
- Singhal A, Gupta H, Bhati V. Wound healing activity of *Argyrea nervosa* leaves extract. *Int J App Basic Med Res.* 1:36-39 (2011)
- Tripathi P. Nitric oxide and immune response. *Indian J. Biochem. Biophys.* 44: 310-319 (2007)
- Yadav KS, Yadav NP, Rawat B, Rai VK, Shanker K, Venkateswara Rao C. An assessment of wound healing potential of *Argyrea speciosa* leaves. *The Scientific World.* (2014)
- Yang YZ, Tang YZ, Liu YH. Wogonoside displays anti-inflammatory effects through modulating inflammatory mediator expression using RAW264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* 148: 271-276 (2013)