

Anti-inflammatory Effects of *Houttuynia cordata* and *Lespedeza cuneata* on Lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 Cells

Jeong Tae Kim¹, Chungwook Chung¹, Seong Ik Park², Man Hyo Lee³, Joong Hee Roh⁴, Ho Yong Sohn⁵ and Jong Sik Kim^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

²Gyeongbuk Government Public Institute of Health & Environment, Yeongcheon 38874, Korea

³Gyeongbuk Institute For Bio-Industry, Andong 36728, Korea

⁴Welltural Bio Co., Ltd., Andong 36618

⁵Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 36729, Korea

Received December 5, 2022 / Revised January 9, 2023 / Accepted January 11, 2023

In the present study, we prepared hot water extracts and the subsequent organic solvent fractions of methanol extracts of *Houttuynia cordata* (HC) and *Lespedeza cuneata* (LC), and investigated their anti-inflammatory effects on lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. Among the treated samples, hexane, chloroform, and ethyl-acetate fractions of HC and LC inhibited nitric oxide (NO) production in a dose-dependent manner, and decreased inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein expression. And, we analyzed the flavonoid contents of the ethyl-acetate fraction of HC and LC, and chose apigenin for the further experiments because apigenin was one of flavonoids commonly found in HC and LC. Apigenin dramatically inhibited NO production in a dose-dependent manner without affecting cell viability and decreased iNOS and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression. In addition, apigenin suppressed the phosphorylation of p38 and Jun N-terminal kinase (JNK) indicating that apigenin exerts anti-inflammatory activity via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. Subsequently, we conducted RNA-sequencing analysis to detect differentially expressed genes upon apigenin treatment. Among the down-regulated genes, four cytokine genes (interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, and colony stimulating factor 2 (CSF2)) were selected for the further analysis, and the reduction of their expression by apigenin was confirmed with quantitative real-time polymerase chain reaction. Overall, our results suggest that *Houttuynia cordata* and *Lespedeza cuneata* have the anti-inflammatory effects and apigenin can be the one of key molecules responsible for their anti-inflammatory activities.

Key words : Anti-inflammation, apigenin, *Houttuynia cordata*, *Lespedeza cuneata*, RNA-seq

서 론

어성초(*Houttuynia cordata*)는 삼백초과 약모밀속에 속하는 식물로 동아시아 및 동남아시아에 주로 서식하는 여러해살이 풀이다. 어성초는 예로부터 약재로 사용되어 왔으며 항암[5], 항염증[11], 항산화[6], 항바이러스[9] 활성 등 다양한 생리학적 활성이 보고되었다.

야관문(*Lespedeza cuneata*)은 콩과 씨리속에 속하는 식물로서 아시아, 오스트레일리아에 주로 서식하는 여러해

살이 풀이다. 야관문은 철소파, 삼엽초 등 다양한 이름으로 불리고 있으나 야관문이 대중적으로 잘 알려져 있다. 야관문도 다양한 생리학적 활성을 가지고 있으며 대표적으로 항암[10], 항염증[4], 혈당 조절[8] 등의 약리학적 활성이 보고되었다.

본 연구팀은 이전 연구에서 어성초와 야관문의 메탄올 추출물의 ethyl acetate 분획물의 플라보노이드 성분의 정량 분석결과를 보고하였다[13]. 어성초에서는 12종류, 야관문에서는 10종류의 플라보노이드 성분이 분석되었으며, 야관문 유래의 분획물에 함유된 모든 플라보노이드 성분이 어성초 분획물에서도 공통적으로 분석되었다. 어성초와 야관문에서 공통적으로 발견된 플라보노이드 중 하나인 apigenin의 함량은 어성초에서는 0.02 mg/g, 야관문에서는 0.002 mg/g으로 분석되었다. Apigenin은 다양한 채소, 허브, 과일 등에서 발견되는 파이토케미칼로써[21], 항산화 활성[22], 항염증 활성[15], 암예방 활성[14] 등 다양한 생

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5798, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : jsk@anu.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.

리활성 및 다양한 질환에 대한 치료제로서의 가능성[17]이 보고되었다. 또한, apigenin 항암 활성과 관련된 작용기전으로써 apoptosis [18], cell cycle arrest [19], anti-angiogenesis [7], 그리고 anti-metastasis 활성[1] 등이 보고되었다.

본 연구에서는 *in vitro* 모델에서 어성초와 야관문의 메탄올 추출물의 유기용매 분획물에 의한 항염증 활성을 연구하고, 두 약용작물에 공통적으로 함유되어 있는 플라보노이드 중 하나인 apigenin의 항염증 활성과 작용기전을 연구하였다.

재료 및 방법

어성초와 야관문의 추출물 및 유기용매 분획물 제조

실험 재료인 2종의 약용작물 어성초와 야관문은 영천시 소재 한약업사에서 구입하였다. 어성초와 야관문을 음건 후 분쇄한 시료에 10배량(w/v)의 메탄올과 증류수를 가해 각 80, 90°C에서 4시간씩 2회 환류 추출 후 추출액을 합하여 여과지(5C, Advantec, Tokyo, Japan)로 여과 후 여액을 감압농축기(N-1000, Eyela, Tokyo, Japan)로 감압 농축하여 추출물을 얻었다. 메탄올 조추출물을 10% 메탄올에 현탁 시켜 먼저 비극성 용매인 hexane 분획물을 얻었다. 계통분획법에 의해 chloroform, ethyl acetate, butanol을 순차적으로 가하여 분획물을 얻고 남아있는 수용액층을 감압 농축하여 water 분획물을 얻었다. 농축한 시료는 동결건조기(FD8508, Ilshinbio, Korea)를 이용하여 동결 건조한 후 본 실험의 재료로 사용하였다.

마우스 대식세포 RAW264.7 세포 및 염증반응 유도

마우스 대식세포 RAW264.7 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 세포주 배양은 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% penicillin 및 streptomycin (WelGene, Korea)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Korea)을 이용하였다. 염증 반응은 lipopolysaccharide (LPS, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 0.2 µg/ml 농도로 처리하여 유도하였다.

Nitric oxide 생산 분석

어성초와 야관문의 열수 추출물, 메탄올 추출물의 유기용매 분획물 및 apigenin이 LPS로 염증 반응이 유도된 RAW264.7 cell에서 nitric oxide (NO) 생산에 미치는 영향을 측정하기 위하여 NO production assay를 수행하였다. RAW264.7 세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/well로 접종한 후 19시간 배양한 뒤 LPS를 0.2 µg/ml 로 1시간 처리하고 각 시료를 16시간 동안 처리하였다. NO 생산은 griess reagent (Sigma, USA)를 사용하여 측정하였다. 세포 배양상등액 100 µl와 griess 시약 100 µl를 혼합하여 상온에서

20분 동안 반응시킨 후 Tecan Infinite M200 plate reader (Tecan Austria GmbH, Austria)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성 분석은 4개의 well에서 독립적으로 수행하였으며, 통계 분석은 Microsoft Excel을 이용하였으며 SigmaPlot program을 사용하여 그래프로 나타내었다.

세포 생존율 연구

어성초와 야관문의 열수 추출물과 메탄올 추출물의 유기용매 분획물 및 apigenin이 RAW264.7 cell의 세포생존율에 미치는 영향을 측정하기 위하여 cell viability assay를 수행하였다. RAW264.7 세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/well로 접종한 후 19시간 배양한 뒤 LPS를 0.2 µg/ml로 1시간 처리하고 각 시료를 16시간 동안 처리하였다. 세포 생존율의 측정을 위해 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. 세포를 배양한 well에 각 20 µl를 첨가한 후 4시간 동안 반응시킨 뒤 Tecan Infinite M200 plate reader (Tecan Austria GmbH, Austria)를 사용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율 분석은 4개의 well에서 독립적으로 수행하였으며, 통계 분석은 Microsoft Excel을 이용하였으며 SigmaPlot program을 사용하여 그래프로 나타내었다.

Western blot analysis

RAW264.7 cell을 6 well plate에 3×10^5 cells/well로 접종한 후 19시간 배양시킨 뒤 LPS (0.2 µg/ml)를 1시간 처리하였다. 그 후 각 시료를 처리하여 16시간 배양하였다. MAPK (mitogen-activated protein kinase) 단백질 발현 분석에는 먼저 각 시료를 4시간 처리한 후 LPS (0.2 µg/ml)를 30분 처리하였다. 세포를 수확한 후 2X RIPA (Cell signaling, Beverly, MA, USA)용액을 첨가하여 sonication을 통해 총 단백질을 추출하였다. Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 통하여 단백질을 정량하였다. 단백질 발현을 확인하기 위해 4~12% SDS-polyacrylamide gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 50 µg의 단백질을 분리하였고, 이를 0.2 µm nitrocellulose membrane (GE Healthcare, USA)에 transfer하였다. 1차 항체는 iNOS, COX-2, p38, p-p38, JNK, p-JNK, ERK, p-ERK, p65, p-p65, IκBα, p-IκBα, actin을 사용하였으며, 2차 항체는 HRP-conjugated mouse antibody와 HRP-conjugated rabbit antibody를 사용하였다. 항체반응을 완료한 후 enhanced chemiluminescence kit (ECL™, Amersham, Pittsburgh, PA, USA)을 사용하여 반응시킨 후 C-DIGIT (LI-COR, Lincoln, NE, USA)를 사용하여 측정하였다.

Image analysis

Western blot 분석을 통해 확인한 단백질 발현을 비교하기 위해 image 분석 program인 Image studio (Li-cor, USA)

를 사용하였다. 기준은 아무것도 처리하지 않은 대조군 (Vehicle, VEH)와 LPS 처리군으로 설정하였다. Image studio를 사용하여 단백질 양을 수치화하였으며 SigmaPlot program을 사용하여 그래프로 나타냈다.

RNA-seq 분석

RAW264.7 세포를 6 well plate에 3×10⁵ cells/well로 접종한 후 19시간 배양시킨 뒤 LPS를 0.2 µg/ml 로 1시간 처리하였다. 그 후 apigenin을 50 µM의 농도로 처리한 후 16 시간 배양하였다. Total RNA extraction에 따라 RNA를 추출하였으며 추출된 RNA는 (주) 지노믹트리 사에 의뢰하여 RNA sequencing을 진행하였다.

정량적 real-time PCR

세포로부터 추출한 RNA를 주형으로 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Japan)를 이용하여 메뉴얼에 따라 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 Power SYBR® Green Master Mix (SYBR green, Thermo fisher Scientific, USA)와 primer를 이용하여 real-time PCR을 진행하였다. 사용된 primer는 Table 1에 나타냈으며 Bioneer사(Korea), Macrogen사(Korea)에서 구매하였다. PCR 반응의 조건은 denaturation (95°C, 15초), annealing (60°C, 30초), extension (72°C, 30초)으로 진행되었다.

통계처리

모든 실험은 최소한 3회 이상 반복 실험을 실시하였으며 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 각 실험 결과의 유의성 검토는 시료가 포함되지 않은 LPS 처리군과 비교하여 student's t-test에 의해 판정하였으며 p<0.05일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

어성초와 야관문 메탄올 추출물의 유기용매 분획물에 의한 nitric oxide 생산 저해

어성초(*Houttuynia cordata*, HC)와 야관문(*Lespedeza cuneata*, LC)의 열수 추출물과 메탄올 추출물의 유기용매 분획물이 NO (nitric oxide) 생산에 미치는 영향을 확인하였다. LPS로 염증을 유도한 RAW264.7 세포주에 각 시료를 20 µg/ml의 농도로 16시간 처리한 뒤 NO production assay와 cell viability assay를 수행하였다(Fig. 1A, Fig. 1B). 그 결과, Fig. 1A에서 보는 바와 같이 어성초와 야관문의 hexane (Hex), chloroform (Chl), ethyl acetate (EA) 분획물 처리에 의해 세포 생존율에는 영향을 미치지 않으면서, NO 생산을 유의미하게 감소시켰다. 또한, 항염증 활성을 보여준 어성초와 야관문의 hexane (Hex), chloroform (Chl), ethyl acetate (EA) 분획물을 5, 10, 20 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 cell viability에 큰 영향을 미치지 않으면서 NO 생산을 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 확인되었다 (Fig. 1C, Fig. 1D). 이러한 연구결과는 어성초와 야관문 메탄올 추출물의 Hex, Chl, EA 분획물이 항염증 활성을 가지고 있으며, 이러한 항염증 활성은 두 한약재에 함유된 플라보노이드 성분을 비롯한 다양한 생리활성물질에 의해 이루어지는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 Chun 등에 의한 어성초 추출물의 ethyl acetate 분획물이 RAW 264.7 세포에서 NF-κB와 MAPK 활성을 억제함으로써 항염증 활성을 가진다는 결과와 유사하다[2].

어성초와 야관문 추출물의 유기용매 분획물에 의한 iNOS 단백질 발현 억제

어성초와 야관문의 메탄올 추출물의 hexane, chloroform, ethyl acetate 유기용매 분획물 처리에 의한 NO 생산을 담당하는 iNOS 단백질 발현을 확인하기 위해 western blot analysis를 수행하였다. LPS를 처리한 RAW264.7 세포주에 각 시료를 20 µg/ml 농도로 16시간 처리한 후 iNOS 발현을 확인하였다. 그 결과, LPS의 단독처리에 의해 증가된 iNOS 단백질 발현이 어성초의 유기용매 분획물(Hex, Chl, EA) 처리군에서 iNOS 단백질 발현이 완전히 저해되었으며, 야관문의 유기용매 분획물(Hex, Chl, EA) 처리군에서는 현저하게 iNOS 단백질 발현이 감소됨을 확인하였

Table 1. Sequences of primers used for quantitative real time-PCR

Gene symbol	Transcript_ID	Primer sequences
IL-1α	NM_010554	F: 5'-CATGAATGATTCCCTCAACCAA-3' R: 5'-CCCGACGAGTAGGCATACATGT-3'
IL-1β	NM_008361	F: 5'-GCCCATCCTCTGTGACTCAT-3' R: 5'-AGGCCACAGGTATTTTGTGTCG-3'
IL6	NM_031168	F: 5'-CTTCACAAGTCCGGAGAGGA-3' R: 5'-TCCACGATTTCCCAGAGAAC-3'
Csf2	NM_009969	F: 5'-ATGCCTGTACACGTTGAATGA-3' R: 5'-CCGTAGACCCTGCTCGAATA-3'
GAPDH	NM_008084	F: 5'-TGCACCACCAACTGCTT-3' R: 5'-GGATGCAGGGATGATGTT-3'

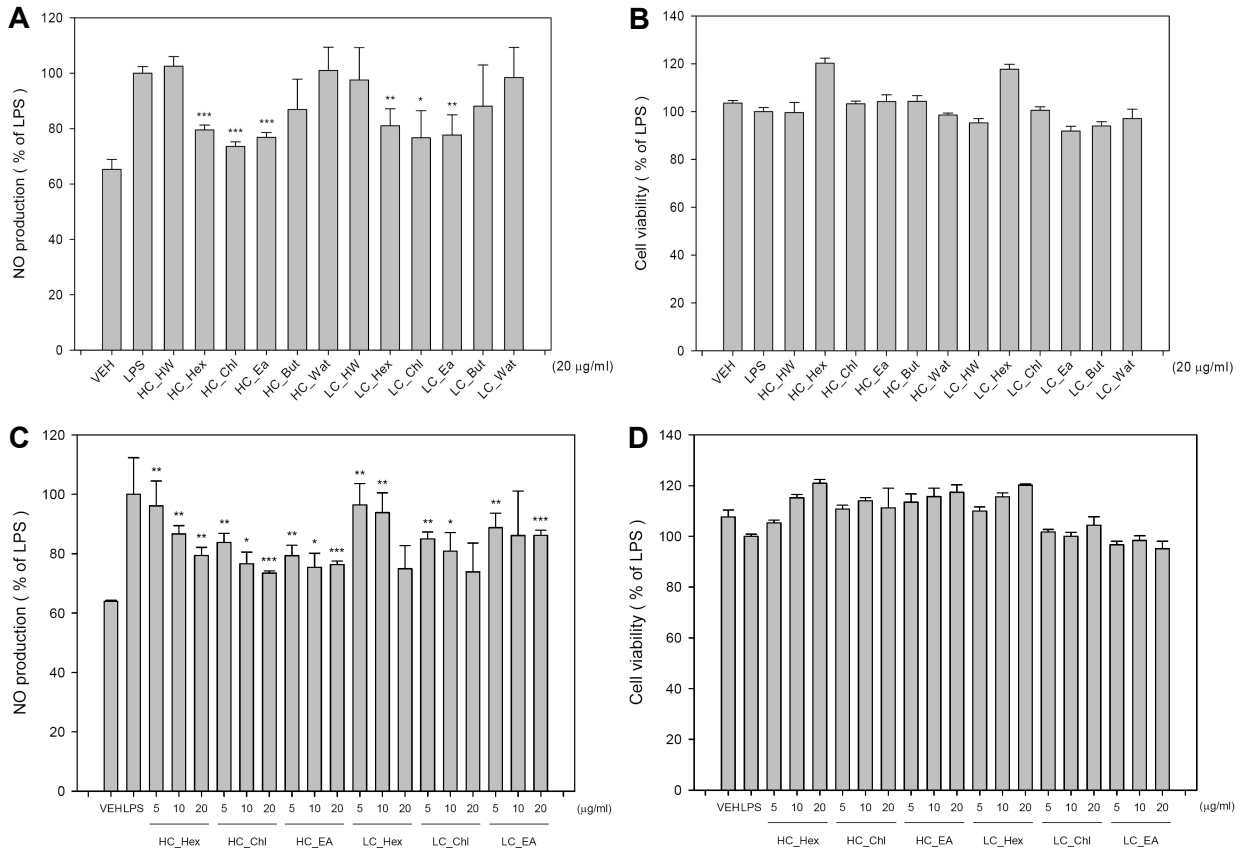


Fig. 1. Effects of extract and its organic solvent fractions of *Houttuynia cordata* (HC) and *Lespedeza cuneate* (LC) on NO production and cell viability in RAW264.7 cells. LPS-activated RAW264.7 cells were treated with water extracts and solvent fractions of methanol extracts of HC and LC for 16 hr. (A) Nitric oxide production was measured by Griess assay. (B) Cell viability was measured using MTS assay. RAW264.7 cells were incubated with various concentrations of hexane (Hex), Chloroform (Chl), and ethyl acetate (EA) fractions of methanol extracts of HC and LC for 16 hr. (C) NO production was measured by NO assay. (D) Cell viability was measured using MTS assay. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS.

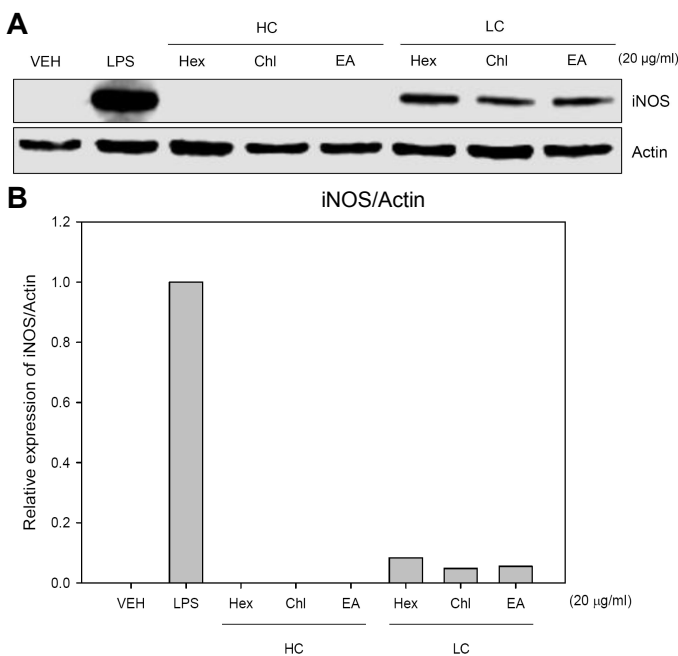


Fig. 2. Down-regulation of iNOS protein by the treatment of Hex, Chl, and EA fractions. LPS-stimulated RAW264.7 cells were incubated with 20 $\mu\text{g/ml}$ of Hex, Chl, EA fractions for 16 hr. (A) Cell lysates were prepared from treated cells and western blot analysis was performed by using anti-iNOS and anti-Actin antibodies. (B) iNOS protein expression was quantified with “Image studio” program.

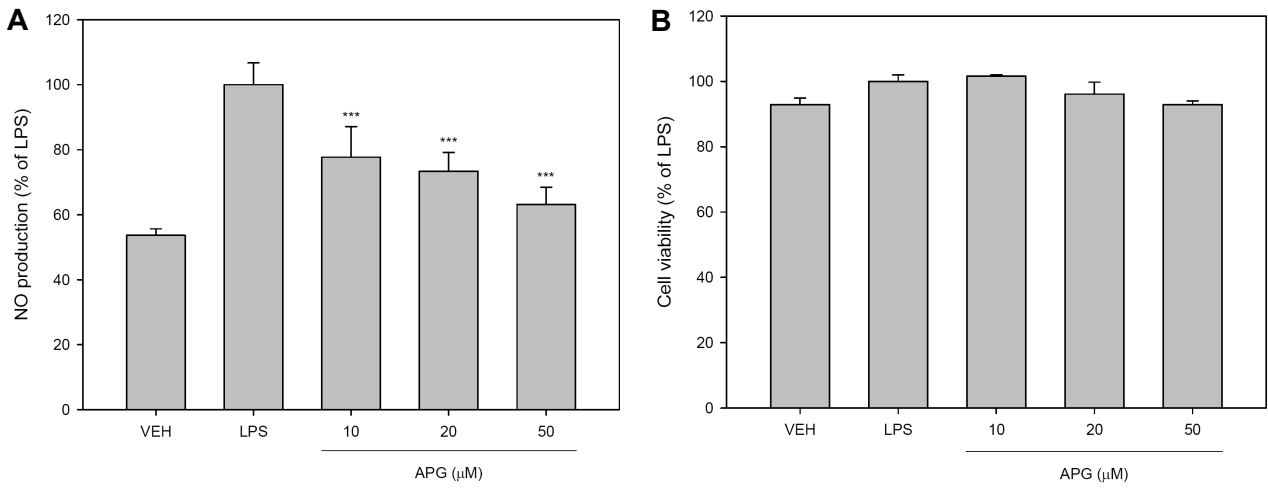


Fig. 3. Effects of apigenin (APG) on NO production and cell viability in RAW264.7 cells. LPS-treated RAW264.7 cells were treated with various concentrations (10, 20, 50, and 100 μM) of apigenin for 16 hr. (A) NO production was measured by NO assay. (B) Cell viability was measured using MTS assay. *** $p < 0.001$ vs LPS.

다(Fig. 2A). iNOS 단백질 발현을 정량화하여 그래프로 나타내었다(Fig. 2B).

Apigenin에 의한 NO 생산 저해

본 연구에서는 어성초와 야관문의 메탄올 추출물의

ethyl acetate 분획물에 공통적으로 함유되어 있는 플라보노이드 성분 중 apigenin을 선택하여 항염증 활성 및 작용 기전을 연구하였다. LPS를 처리한 RAW264.7 세포주에 apigenin을 10, 20, 50, 100 μM의 농도로 16시간 처리한 결과 50 μM apigenin 처리군까지는 세포 생존율에 큰 영

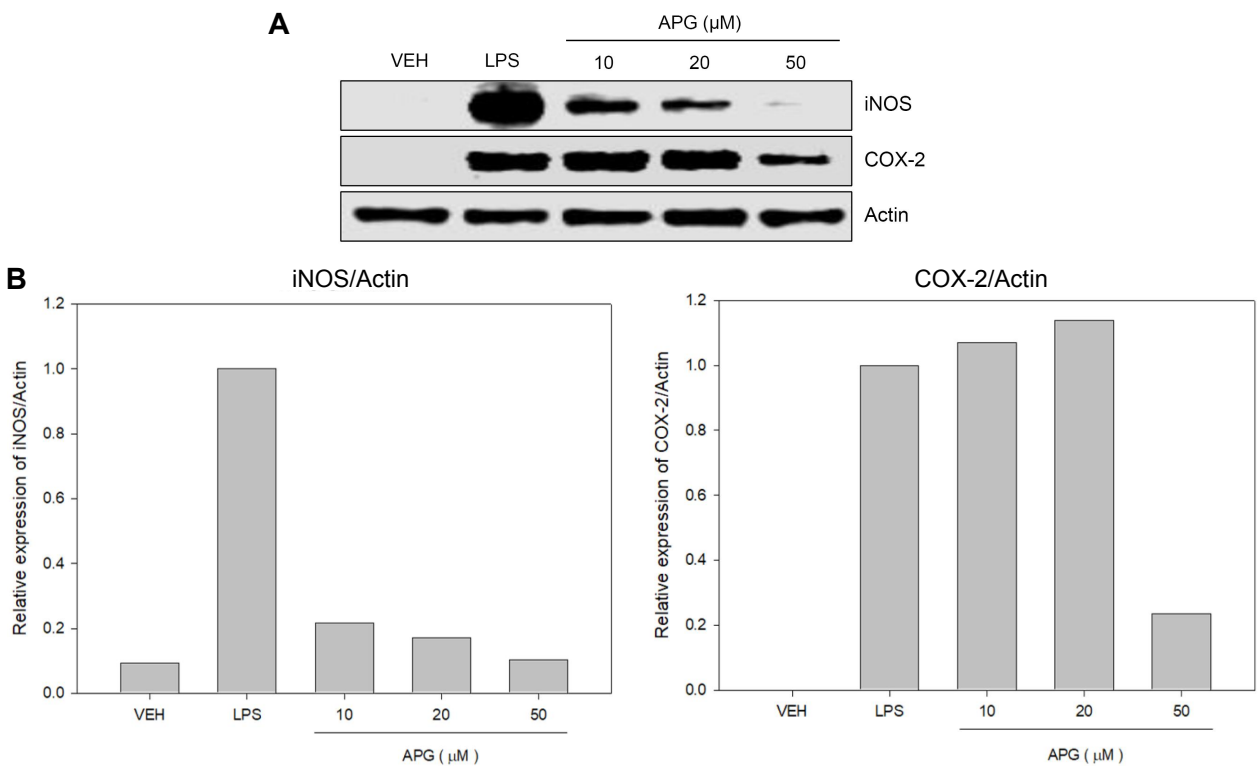


Fig. 4. Down-regulation of iNOS and COX-2 protein expression by apigenin. LPS-activated RAW264.7 cells were incubated with apigenin (APG) for 16 hr. (A) Cell lysates were prepared from treated cells and Western blot analysis was performed by using anti-iNOS, anti-COX-2 and anti-Actin antibodies. And, protein expression was quantified with “Image studio” program. (B) iNOS/Actin, (C) COX-2/Actin.

향이 없으면서 NO 생산을 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 확인되었다(Fig. 3A, Fig. 3B). 이러한 결과는 apigenin이 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 세포에서 염증 저해 활성을 가지고 있다는 것을 의미한다.

Apigenin에 의한 iNOS와 COX-2 단백질 발현 억제

Apigenin의 항염증 활성과 관련하여 염증 단백질인 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 확인하였다. LPS를 처리한 RAW264.7 세포주에 apigenin을 10, 20, 50 μM 농도로 16시간 처리한 후 iNOS와 COX-2의 발현을 확인하였다. 그 결과, LPS의 단독처리에 의해 증가된 iNOS 단백질이 apigenin의 처리에 의해 농도 의존적으로 감소함을 확인하였으며, COX-2의 경우 50 μM apigenin 처리군에서 현저하게 발현이 감소됨을 확인하였다(Fig. 4A). iNOS와 COX-2 단

백질의 발현을 정량화하여 발현량을 그래프로 나타내었다(Fig. 4B, Fig. 4C). 이러한 연구결과는 apigenin의 항염증 활성이 친 염증성 단백질인 iNOS와 COX-2의 발현 억제와 관련이 있다는 것을 시사한다.

Apigenin에 의한 MAPK 신호 저해

Apigenin의 항염증 활성과 MAPK 신호전달 경로와의 관련성을 규명하기 위하여 MAPK 단백질 발현과 인산화를 확인하였다. MAPK 신호전달 경로의 인산화 시간을 고려하여 50 μM apigenin을 4시간 처리한 후 LPS를 0.2 μg/ml의 농도로 30분 처리한 다음 Western blot analysis를 수행하였다. 그 결과, 50 μM apigenin을 처리한 경우 p38, JNK의 인산화는 억제된 반면, ERK의 인산화에는 큰 변화가 없음을 확인하였다(Fig. 5A). 총 MAPK 단백질의 발현

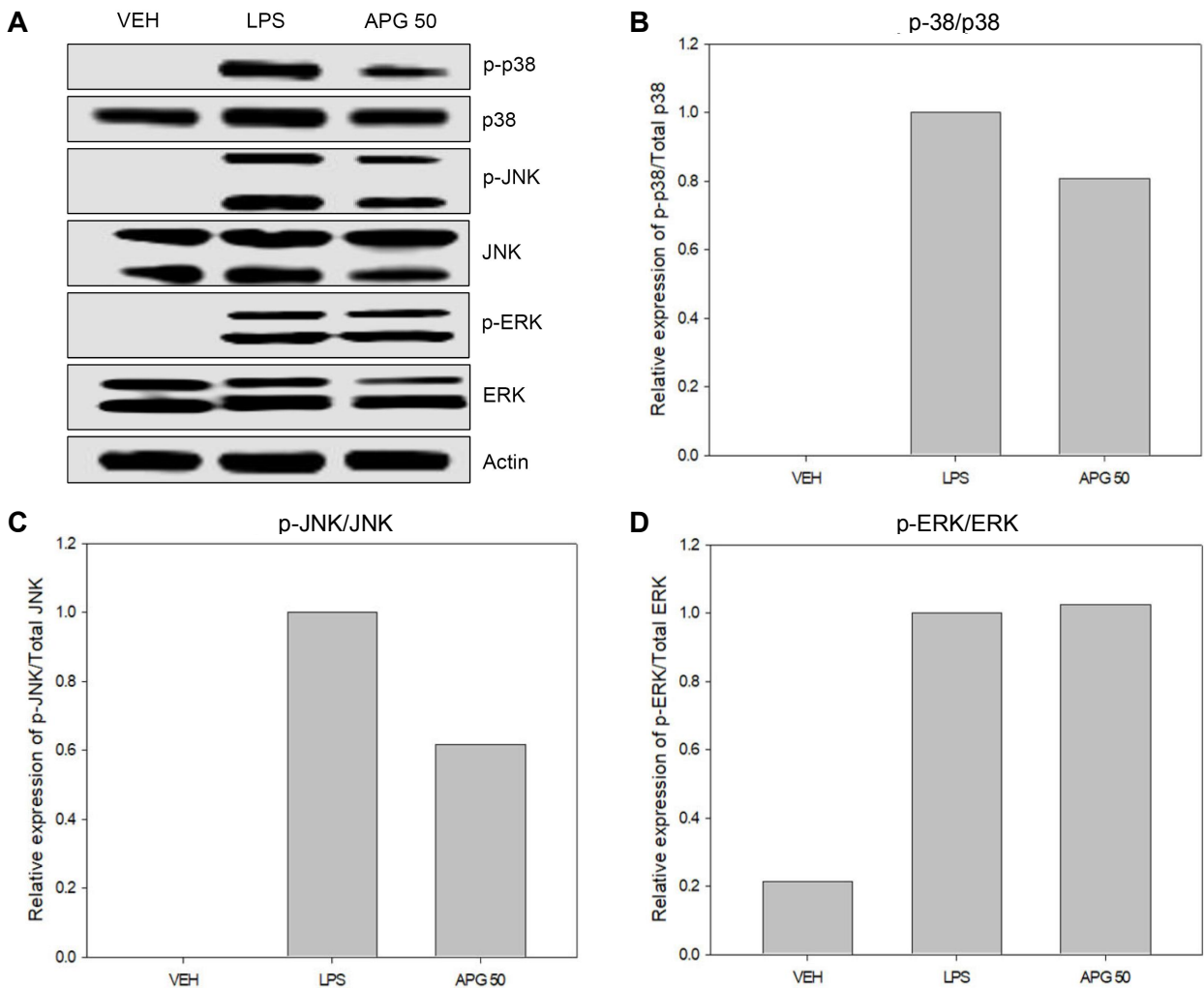


Fig. 5. Suppression of p38 and JNK phosphorylation by apigenin. RAW264.7 cells were pre-treated with 50 μM of apigenin (APG) for 4 hr and then stimulated with LPS (0.2 μg/ml) for 30 min. (A) Cell lysates were prepared from treated cells and Western blot analysis was performed by using anti-p-p38, anti-p38, anti-p-JNK, anti-JNK, anti-p-ERK, anti-ERK and anti-Actin antibodies. And, protein expression was quantified with “Image studio” program. (B) p-38/p38, (C) p-JNK/JNK, (D) p-ERK/ERK.

Table 2. Several selected cytokine genes which were down-regulated by apigenin

Gene_symbol	Transcript_ID	Fold change
IL1- α	NM_010554	-83.45706
IL1- β	NM_008361	-72.91318
IL6	NM_031168	-44.28396
CSF3	NM_009971	-35.03583
CCL4	NM_013652	-30.89909
CCL9	NM_011338	-25.66874
CCL22	NM_009137	-16.72345
CCL3	NM_011337	-16.54447
IL18	NM_008360	-13.71790
CCL5	NM_013653	-12.84745
Csf2	NM_009969	-4.662137
TGF- β 1	NM_011577	-3.944325

과 각각의 인산화된 단백질의 양을 비교하여 그래프로 나타내었다(Fig. 5B, Fig. 5C, Fig. 5D). 이러한 연구 결과는 apigenin이 p38 MAPK와 JNK 경로를 억제함으로써 염증 반응을 억제한다는 것을 의미한다.

Apigenin에 의해 차별적으로 발현되는 유전자 발현 분석

Apigenin의 항염증 활성을 전사체 수준에서 분석하기 위해 RNA-seq 분석을 수행하였다. RNA-seq 분석은 대량의 cDNA 염기서열 분석을 통해 전사체(transcriptome) 분석이 가능한 실험 방법이다[12]. 본 연구결과 LPS만 처리한 군에 비해 50 μ M apigenin을 처리한 경우 발현이 2배 이상 증가된 유전자는 1,246개, 2배 이상 발현이 감소된 유전자는 1,478개로 확인되었다. 발현이 2배 이상 감소된 유전자 중 염증과 관련된 일부 cytokine 유전자의 RNA-

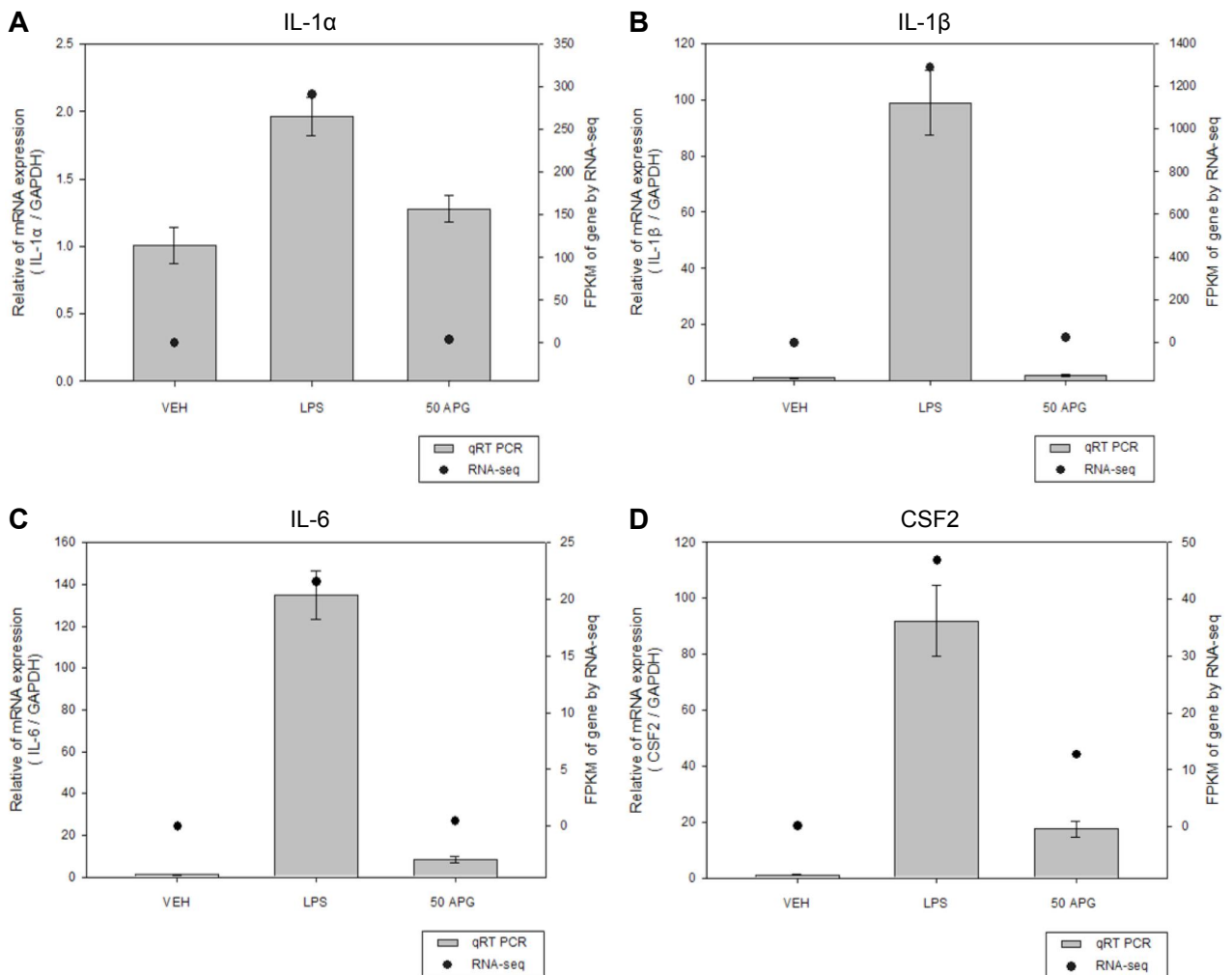


Fig. 6. Down-regulation of pro-inflammatory cytokine expression by apigenin. LPS-treated RAW264.7 cells were incubated with 50 μ M of apigenin (APG) for 16 hr. Total RNAs were prepared from treated cells and then cDNA was synthesized. Real-time PCR was performed using gene-specific gene primers whereas *GAPDH* was used as an internal control. The result of qRT-PCR was indicated as a bar graph, whereas the result of FPKM measured by RNA-seq was indicated by dot. (FPKM: Fragments Per Kilobase of transcript per Million).

seq 결과를 표로 나타내었다(Table 2). 이 중에서 4개의 유전자(IL-1 α , IL-1 β , IL-6, CSF2)를 선택하여 정량적 real-time PCR을 수행하였다. IL-1 α 와 IL-1 β 는 염증반응 동안 NO, Prostaglandin E2 (PGE₂), collagenase를 합성하여 만성 염증에 관여한다고 보고되었다[3]. IL-6도 친 염증성 cytokine으로 잘 알려져 있으며 염증반응에서 만성염증, 자가면역에 영향을 미친다고 보고되었다[20]. CSF2(colony-stimulating factor 2)는 대식세포와 호중구 등에 작용하여 염증성 cytokine의 생산을 유도함으로써 염증 반응에 관여한다고 알려져 있다[16]. 이렇게 선별한 4개의 유전자를 정량적 real-time PCR로 발현을 분석하고 이를 RNA-seq 결과와 비교 분석하였다. 그 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 4개의 유전자 모두 RNA-seq 결과(dot으로 표시)와 유사한 양상으로 LPS 처리에 의해 발현이 증가된 cytokine 유전자들의 발현이 apigenin에 의해 감소되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 apigenin의 항염증 활성이 이러한 친염증성 cytokine 유전자들의 발현을 억제함으로써 작용한다는 것을 의미한다.

종합적으로, 본 연구에서는 어성초와 야관문의 메탄올 추출물의 유기용매 분획물이 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에서 항염증 활성을 가지고 있음을 보고하였다. 또한, 두 약용작물의 메탄올 추출물의 ethyl acetate 분획물에 공통적으로 함유되어 있는 플라보노이드 apigenin이 항염증 활성을 가지고 있으며, 이러한 항염증 활성은 p38 MAPK와 JNK 경로를 억제하고 친염증성 cytokine들의 발현을 억제함으로써 작용한다는 것을 제시하였다. 이러한 결과는 apigenin이 어성초와 야관문의 항염증 활성을 담당하는 핵심 물질 중 하나가 될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 경상북도가 지원한 네이처 생명산업 기술개발 사업으로 수행한 연구결과입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Cao, H. H., Chu, J. H., Kwan, H. Y., Su, T., Yu, H., Cheng, C. Y., Fu, X. Q., Guo, H., Li, T., Tse, A. K., Chou, G. X., Mo, H. B. and Yu, Z. L. 2016. Inhibition of the STAT3 signaling pathway contributes to apigenin-mediated anti-metastatic effect in melanoma. *Sci. Rep.* **6**, 21731.
- Chun, J. M., Nho, K. J., Kim, H. S., Lee, A. Y., Moon, B. C. and Kim, H. K. 2014. An ethyl acetate fraction derived from *Houttuynia cordata* extract inhibits the production of inflammatory markers by suppressing NF- κ B and MAPK activation in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *BMC Complement. Altern. Med.* **14**, 234.
- Gabay, C., Lamacchia, C. and Palmer, G. 2010. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 232-41.
- Ha, S. J., Lee, J. H., Song, K. M., Kim, Y. H., Lee, N. H., Kim, Y. E. and Jung, S. K. 2018. Ultrasonicated *Lespedeza cuneata* extract prevents TNF- α -induced early atherosclerosis *in vitro* and *in vivo*. *Food Funct.* **25**, 2090-2101.
- Han, K., Jin, C., Chen, H., Wang, P., Yu, M. and Ding, K. 2018. Structural characterization and anti-A549 lung cancer cells bioactivity of a polysaccharide from *Houttuynia cordata*. *Int. J. Biol. Macromol.* **120**, 288-296.
- Ju, L., Zhang, J., Wang, F., Zhu, D., Pei, T., He, Z., Han, Z., Wang, M., Ma, Y. and Xiao, W. 2021. Chemical profiling of *Houttuynia cordata* Thunb. by UPLC-Q-TOF-MS and analysis of its antioxidant activity in C2C12 cells. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **204**, 114271.
- Kim, B. R., Jeon, Y. K. and Nam, M. J. 2011. A mechanism of apigenin-induced apoptosis is potentially related to anti-angiogenesis and anti-migration in human hepatocellular carcinoma cells. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 1626-1632.
- Kim, M. S., Sharma, B. R. and Rhyu, D. Y. 2016. Beneficial Effect of *Lespedeza cuneata* (G. Don) water extract on streptozotocin-induced type 1 diabetes and cytokine-induced beta-cell damage. *Nat. Prod. Sci.* **22**, 175-179.
- Lau, K. M., Lee, K. M., Koon, C. M., Cheung, C. S., Lau, C. P., Ho, H. M., Lee, M. Y., Au, S. W., Cheng, C. H., Lau, C. B., Tsui, S. K., Wan, D. C., Waye, M. M., Wong, K. B., Wong, C. K., Lam, C. W., Leung, P. C. and Fung, K. P. 2008. Immunomodulatory and anti-SARS activities of *Houttuynia cordata*. *J. Ethnopharmacol.* **118**, 79-85.
- Lee, D. H., Lee, Y. H., Lee, K. H., Lee, B. S., Alishir, A., Ko, Y. J., Kang, K. S. and Kim, K. H. 2020. Aviculin Isolated from *Lespedeza cuneata* induce apoptosis in breast cancer cells through mitochondria-mediated caspase activation pathway. *Molecules* **25**, 7108.
- Li, W., Yang, F., Zhan, H., Liu, B., Cai, J., Luo, Y. and Zhou, X. 2020. *Houttuynia cordata* extract ameliorates bladder damage and improves bladder symptoms via anti-inflammatory effect in rats with interstitial cystitis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2020**, 9026901.
- Ozsolak, F. and Milos, P. M. 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 87-98.
- Park, S. I., Sohn, H. Y., Lee, C. I., Hwang, H. Y., Park, S. W. and Kim, J. S. 2020. Functional chemical components and their biological activities of *Houttuynia cordata* and *Lespedeza cuneata*. *J. Life Sci.* **30**, 169-177.
- Patel, D., Shukla, S. and Gupta, S. 2007. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise

- (review). *Int. J. Oncol.* **30**, 233-245.
15. Patil, R. H., Babu, R. L., Naveen Kumar, M., Kiran Kumar, K. M., Hegde, S. M., Ramesh, G. T. and Chidananda Sharma, S. 2015. Apigenin inhibits PMA-induced expression of pro-inflammatory cytokines and AP-1 factors in A549 cells. *Mol. Cell. Biochem.* **403**, 95-106.
 16. Saita, K., Moriuchi, Y., Iwagaw, T., Aihara, M., Takai, Y., Uchida, K. and Watanabe, S. 2022. Roles of CSF2 as a modulator of inflammation during retinal degeneration. *Cytokine* **158**, 155996.
 17. Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kęregiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Souto, E. B., Novellino, E., Antolak, H., Azzini, E., Setzer, W. N. and Martins, N. 2019. The therapeutic potential of apigenin. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1305.
 18. Shukla, S., Fu, P. and Gupta, S. 2014. Apigenin induces apoptosis by targeting inhibitor of apoptosis proteins and Ku70-Bax interaction in prostate cancer. *Apoptosis* **19**, 883-894.
 19. Takagaki, N., Sowa, Y., Oki, T., Nakanishi, R., Yogosawa, S. and Sakai, T. 2005. Apigenin induces cell cycle arrest and p21/WAF1 expression in a p53-independent pathway. *Int. J. Oncol.* **26**, 185-189.
 20. Tanaka, T., Narazaki, M. and Kishimoto, T. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a016295.
 21. Wang, M., Firrman, J., Liu, L. and Yam, K. 2019. A review on flavonoid apigenin: dietary intake, ADME, antimicrobial effects, and interactions with human gut microbiota. *Biomed. Res. Int.* **2019**, 7010467.
 22. Xu, X., Li, M., Chen, W., Yu, H., Yang, Y. and Hang, L. 2016. Apigenin attenuates oxidative injury in ARPE-19 cells through activation of nrf-2 pathway. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, 4378461.

초록 : 마우스 대식세포 RAW264.7에서 어성초와 야관문의 항염증 효과

김정태¹ · 정정욱¹ · 박성익² · 이만호³ · 노중희⁴ · 손호용⁵ · 김종식^{1*}

(¹국립안동대학교 생명과학과, ²경북보건환경연구원, ³경북바이오산업연구원, ⁴웰츄럴바이오, ⁵국립안동대학교 식품영양학과)

본 연구에서는 어성초(*Houttuynia cordata*, HC)와 야관문(*Lepedeza cuneata*, LC)의 열수 추출물과 메탄올 추출물의 순차적 유기용매 분획물을 제조하였다. LPS를 처리한 RAW264.7세포에서 HC와 LC의 열수 추출물과 메탄올 추출물의 유기용매 분획물의 항염증 활성을 연구하였다. 어성초와 야관문의 hexane, chloroform, ethyl acetate 분획물의 처리에 의해 농도의존적으로 nitric oxide (NO) 생산을 저해하였으며, iNOS의 발현도 감소되었다. 이전 연구에서 HC와 LC의 메탄올 추출물의 ethyl acetate 분획물의 플라보노이드 함량을 분석하였다. 분석된 플라보노이드 중 HC와 LC에 공통적으로 함유된 apigenin을 선택하여 추가실험을 진행하였다. Apigenin은 세포 생존율에 영향을 주지 않으면서 NO 생산을 저해하였으며, iNOS와 COX-2의 단백질 발현도 억제하였다. 또한, apigenin은 p38 MAPK와 JNK의 인산화를 억제함으로써 항염증 활성을 가지는 것으로 생각된다. Apigenin 처리에 의해 차별적으로 발현되는 유전자 발현을 확인하기 위하여 RNA-seq 분석을 수행하였다. 발현이 감소된 유전자 중 4개의 cytokine 유전자(IL-1 α , IL-1 β , IL-6, CSF2)의 발현 감소를 정량적 real-time PCR을 통해 확인하였다. 종합적으로, 본 연구결과는 어성초와 야관문은 항염증 활성을 가지고 있으며, apigenin이 두 약용 작물의 항염증 활성을 담당하는 중요한 성분 중의 하나가 될 수 있다는 것을 제시한다.