

지방질다당류로 자극한 마우스 대식세포에 있어서 zaluzanin C의 항염증 효과

강예림[†] · 이희원[†] · 김윤희*
대구대학교 식품영양학과

Anti-inflammatory effect of zaluzanin C on lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages

Ye Rim Kang[†], Hee Won Lee[†], and Yoon Hee Kim*

Department of Food and Nutrition, College of Engineering, Daegu University

Abstract Zaluzanin C is a sesquiterpene lactone isolated from *Ainsliaea acerifolia*, a Korean medicinal plant. In the present study, the anti-inflammatory effects of zaluzanin C were demonstrated in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine macrophages (RAW264.7 cells). Zaluzanin C inhibited the release of nitric oxide (NO) by alleviating the protein expression of inducible NO synthase in LPS-treated RAW264.7 cells. Furthermore, it suppressed the release of interleukin-6 induced by LPS. Zaluzanin C was also found to block the translocation of the p65 subunit of nuclear factor- κ B from the cytosol to the nucleus, which is one of the underlying mechanisms of the anti-inflammatory action of zaluzanin C. These data suggest the potential of zaluzanin C in the treatment of inflammatory diseases.

Keywords: zaluzanin C, *Ainsliaea acerifolia*, macrophage, nitric oxide, interleukin-6

서 론

염증은 물리적, 화학적, 생물학적 자극으로 인한 손상에 대한 생물체의 보호반응으로 염증의 역할은 손상에 의해 생성된 물질을 제거하고, 조직 손상을 예방하며 치료 과정을 시작하고 염증 과정에 의해 영향을 받는 조직이나 기관의 생리학적 기능을 회복시키는 복잡한 과정이다(1). 염증은 다양한 염증매개물질을 활성화시키며, 이들은 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 같은 산화제를 생성시키는 효소를 활성화 시켜 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)과 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)과 같은 자유 라디칼을 고농도로 생성한다(2). RNS와 ROS의 과생산은 산화제와 산화방지제의 균형을 변화시킬 수 있으며 과량의 자유라디칼은 DNA, RNA, 지방질, 단백질과 같은 생체분자를 손상시킬 수 있다. 특히 만성적인 염증반응은 다양한 기관에서 유전적 변이 등을 일으켜 암의 발생 위험을 증가시키는 것으로 알려져 있다(3).

이러한 과정에서 nuclear factor- κ B (NF- κ B)는 염증성 매개 분자의 발현을 유도함으로써 염증반응에 있어서 중심적인 역할을 하는 전사인자이다. 염증 이외에도, NF- κ B는 세포 성장, 선천 면역과 획득 면역과 같은 다양한 생물학적 현상에 관여한다

(4,5). 휴식상태에서 NF- κ B는 I κ B라고 불리는 NF- κ B의 억제단백질과 결합해 세포질에 존재하나, 사이토카인(cytokine), 활성산소종, 세균 세포벽 물질(예: 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)), 바이러스 등과 같은 다양한 자극에 의해 활성화된다. 알레르기, 자가면역반응, 종양과 같은 병적인 상태에서 NF- κ B는 비정상적으로 과잉 활성화된다(5-8). 따라서 NF- κ B의 활성 억제는 다양한 질병 치료를 위한 중요한 타겟으로 여겨진다.

이와 더불어 천연물 중 염증 반응을 효과적으로 억제하는 물질을 탐색하기 위한 많은 연구들이 수행되고 있다(9). 천연물 유래 단일 성분의 항염증 효과에 대한 잠재성을 평가하는 스크리닝의 일환으로, 천연물 유래 11종의 단일 물질의 항염증 효과를 평가한 결과, 단풍취(*Ainsliaea acerifolia*)에서 추출한 zaluzanin C가 대표적인 염증매개인자인 산화질소(NO)의 분비를 가장 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다(supplementary Fig. 1). 따라서, zaluzanin C의 항염증 효과에 대해 검토하고자 하였다.

단풍취는 국화과(compositae)에 속하는 다년생 식물로, 한국에 널리 분포하고 있다. 쓴맛을 내는 단풍취의 어린잎은 식용으로 쓰이며, 예로부터 류머티스 관절염, 장염 치료를 위해 사용되어 왔다(10,11). 단풍취의 생리활성으로는 산화방지와 알파글루코시데이스(α -glucosidase) 억제 활성 효과(12), 알코올 대사 촉진 효과(13,14), 항암효과(10)가 알려져 있다. 한편, Shin 등(15)은 단풍취에서 분리한 zaluzanin C의 항염증효과를 검토하였으나, 염증 관련 마커(marker)와 메커니즘에 대한 연구는 미비하다.

따라서 본 연구에서는 단풍취(*Ainsliaea acerifolia*)에서 분리·정제한 zaluzanin C가 지질다당류로 자극한 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포에서의 항염증효과를 검토하는 것을 목적으로 하였으며, 이를 규명하기 위해 염증매개물질의 분비량을 조사하였고, 관련 메커니즘에 대해 확인하였다. 이를 통하여 단풍취의 항염증 소재로서 활용을 위한 기초자료로 사용하고자 하였다.

[†]Ye Rim Kang and Hee Won Lee contributed equally to this work.

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

Tel: +82-53-850-6834

Fax: +82-53-850-6839

E-mail: kimyh0128@daegu.ac.kr

Received April 27, 2016; revised June 6, 2016;

accepted June 10, 2016

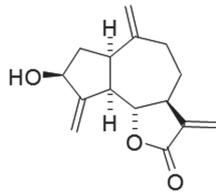


Fig. 1. The structure of zaluzanin C.

재료 및 방법

단풍취 추출물의 제조, 분획과 분리

본 실험에 사용된 zaluzanin C (Fig. 1)는 단풍취로부터 Lee 등 (12)에 의해 서술된 방법으로 추출, 분리하여 실험에 사용하였다. 단풍취 추출물의 제조, 분획과 분리에 사용한 시약은 덕산약품 (Ansan, Korea)에서 구입하였다. 본 실험에 사용한 단풍취는 경북 영양군 수비면에서 2013년도 5월에 채취된 신선한 단풍취를 사용하였으며, 표본시료는 대구대학교의 식품공학과 천연물화학실험실에 보관하고 있다. 신선한 단풍취 5.0 kg을 70% 에탄올로 침지추출을 4회 반복하여 필터 한 후 농축하였다. 얻어진 단풍취 70% 에탄올 추출물(401.0 g)을 물에 현탁하여 저극성 용매인 *n*-hexane으로 먼저 추출한 후 수층을 다시 ethyl acetate과 *n*-butyl alcohol을 이용하여 각각 순차적으로 5회 분획하여 추출하였다. 각 용매추출 분획을 감압 농축하여 건조 시킨 후 각각 노말헥세인 가용분획(73.8 g), 아세트산에틸 가용분획(56.0 g), 노말부틸알코올 가용분획(27.9 g), 물 가용분획(186.0 g)을 각각 얻었다. 물질 분리는 아세트산에틸 가용분획 20.0 g을 물-메틸알코올(H₂O-MeOH) 혼합용매를 용출용매로 사용하여 Toyopearl HW 40 (coarse grade; 1.5 cm i.d.×51 cm)를 사용한 관 크로마토그래피(column chromatography)를 실시하여 총 6개의 분획[TO-1; 물-메틸알코올(100:0), TO-2; 물-메틸알코올(7:3), TO-3; 물-메틸알코올(1:1), TO-4; 물-메틸알코올(3:7), TO-5; 물-메틸알코올(0:10), TO-6; 물-메틸알코올(3:7)]으로 나누었다. 얻어진 소분획 TO-2 (300 mg)에 대해 YMC gel ODS AQ 120S (1.1 cm i.d.×40 cm)를 이용한 관 크로마토그래피를 수행하여 화합물(188.4 mg)을 분리하였다. 화합물의 구조는 ¹H, ¹³C NMR 및 FABMS 스펙트럼을 측정 후 문헌치(16)와 비교하여, 화합물을 zaluzanin C 로 동정하였다.

재료 및 시약

Fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin과 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)를 Hyclone (Logan, Utah, USA)에서 구입하였다. *Salmonella abortus equi* 유래의 지질다당류는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 단백질 정량에 사용하는 Bio-Rad Protein Assay kit는 Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)에서 구입하였다.

웨스턴블롯팅(Western blotting)에 사용된 1차 항체 anti-NF-κB p65 (D14E12) rabbit monoclonal과 anti-Lamin A/C (4C11) mouse monoclonal는 Cell Signaling Technology로부터(Danvers, MA, USA), anti-iNOS rabbit polyclonal, anti-β-actin mouse monoclonal 항체는 Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포 및 세포 배양

본 실험에 사용된 세포는 마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포로 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다.

세포는 10% 소태아혈청, 100 U/mL 페니실린과 100 μg/mL 스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 95% 습도, 5% CO₂ 환경인 배양기에서 배양하였다.

세포 증식 및 세포 독성 측정

Zaluzanin C가 RAW264.7 세포의 세포 증식과 세포 독성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 RAW264.7 세포를 96 well plate에 1×10⁴ cells/200 μL/well의 세포수가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 18시간 배양하였다. Zaluzanin C를 농도별(0, 1, 2.5, 5, 10 μM)로 처리한 후 24시간 동안 배양시켰다. 배양 후 CellTiter96[®] Aqueous One Solution Assay of Cell Proliferation (Promega, Madison, WI, USA)을 이용해 세포 증식능을 분광광도계(Sunrise, Tecan Austria, Salzburg, Austria)를 사용하여 측정하였다. 또한, CytoTox96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI, USA)을 이용해 zaluzanin C가 RAW264.7 세포에 대해 독성을 나타내는지를 분광광도계(Sunrise, Tecan, Salzburg, Austria)를 사용하여 측정하였다.

염증 매개 물질 측정

Zaluzanin C가 지질다당류에 의해 유도된 염증 매개 물질 분비에 미치는 영향을 평가하기 위해 세포배양액에서 산화질소(II)와 interleukin-6 (IL-6)의 분비량을 측정하였다. 구체적으로 RAW264.7 세포를 24 well plate에 2×10⁵ cells/1 mL/well의 세포수가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 18시간 배양하였다. 지질다당류(100 ng/mL)의 자극 하에 zaluzanin C의 최종농도가 0, 1, 2.5, 5, 10 μM이 되도록 처리한 후 48시간 동안 추가 배양하였다. 얼음 위에서 반응을 종결 시킨 후 배양 상층액 중으로 분비된 산화질소(II)는 Griess reagent system (Promega)으로, IL-6 분비량은 mouse IL-6 ELISA kit (eBiosciences, San Diego, CA, USA)를 사용하여 반응 시킨 후 분광광도계(Sunrise, Tecan, Salzburg, Austria)로 흡광도를 측정하였다.

총 단백질 추출

Zaluzanin C가 LPS에 의해 유도된 산화질소(II) 합성에 미치는 영향을 평가하기 위해 세포로부터 총 단백질을 추출하여 염증 매개 물질 합성에 관여하는 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 구체적으로는 위의 산화질소(II) 측정 실험에는 세포배양액을 사용하여 측정하고, 같은 실험의 세포를 PBS로 세척한 후 세포에 세포용해완충용액(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 30 mM Na₂P₂O₇, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 2 mg/mL aprotinin, 1 mM pervanadate)을 첨가하여 얼음에서 10분 동안 정지한 후 12,000×g로 15분 동안 원심분리 하여 상층액을 얻었고, Bio-Rad Protein Assay kit를 사용하여 단백질을 정량하였다.

세포질 및 핵 단백질의 분리추출

Zaluzanin C가 LPS 자극에 의한 NF-κB의 세포 내 분포에 미치는 영향을 평가하기 위해 세포질 및 핵 단백질을 분리하였다. RAW264.7 세포를 35×10 mm 세포배양접시에 5×10⁵ cells/2 mL/dish의 세포수가 되도록 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 18시간 배양하였다. 지질다당류(100 ng/mL)의 자극 하에 Zaluzanin C의 최종농도가 0, 1, 2.5, 5, 10 μM이 되도록 처리한 후 30분간 추가 배양하였다. 얼음 위에서 반응을 종결 시키고 세포를 PBS로 세척한 후 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific, Tewksbury, MA, USA)로 세포질과 핵단백질

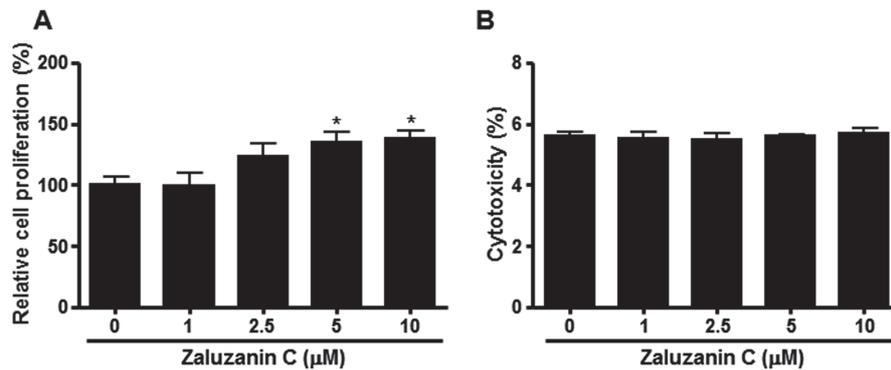


Fig. 2. Zaluzanin C did not affect the proliferation and had no cytotoxicity in murine macrophages. Cells were seeded in a 96 well plate and treated with various concentration of zaluzanin C (0, 1, 2.5, 5, 10 μM). After 24 h, cell proliferation (A) and cytotoxicity (B) were determined by methods described 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 zaluzanin C ($*p<0.05$).

을 분리하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad Protein Assay kit를 사용하여 정량하였다.

웨스턴블롯 분석

산화질소(II)의 합성에 관여하는 iNOS의 단백질 발현량을 측정하기 위해서 총 단백질을 추출물을 35 μg이 되도록 조정하여 웨스턴블롯 분석법으로 확인하였다. 이때 일차항체로 anti-iNOS rabbit polyclonal (1:2000, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)을 처리하였다.

NF-κB 전사인자의 세포 내 분포를 확인하기 위해서 세포질 단백질을(10 μg)과 핵 단백질을(2.5 μg) 농도가 동일하도록 조정 후 2×도데실황산소듐(sodium dodecyl sulfate, SDS) 시료 완충용액(sample buffer)을 가하고 100°C에서 5분간 단백질을 변성시켰다. Mini-PROTEAN system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 10% SDS 폴리아크릴아마이드젤(polyacrylamide gel)을 만들어 각 well에 단백질 양이 동일하도록 각 시료를 loading 하고 전기영동을 시행하였으며 이어서 Immobilon transfer membranes 0.45 μm (Millipore, Billerica, MA, USA)에 transfer시켰다. Membrane을 1× blocking buffer (Biofact Biofactory, Daejeon, Korea)로 실온에서 1시간 동안 blocking 한 후 일차항체 anti-NF-κB (1:3000, Cell Signaling), anti-β-actin(1:1000, Novusbio), anti-Lamin A/C (1:5000, Cell Signaling)를 처리하여 4°C에서 하룻밤 배양하였다. 0.1% Tween-20을 함유한 Tris-buffered saline (TBST, pH 7.6)로 세척한 다음 이차항체(HRP-conjugated anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG, 1:5000, Cell Signaling)에 1시간 동안 실온에서 배양하였다. TBST로 세척하고 ECL solution (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 기질로 반응시킨 후 LAS-3000 Lumino Image Analyzer System (Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 단백질 발현량은 Image J free software (NIH, Bethesda, MA, USA)를 이용하여 정량화하였다.

통계분석

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 GraphPad Prism Version 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 실험결과는 mean±standard error of mean (SEM)으로 나타냈으며, 각 그룹간의 통계적 유의성을 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 통한 Dunnett test를 통해서 검정하였다. p 값은 $p<0.05$ 를 통계적 유의차가 있다고 판단했다.

결과 및 고찰

세포 성장 및 세포 독성에 미치는 zaluzanin C의 영향

Zaluzanin C가 RAW264.7 세포 성장에 미치는 영향을 Fig. 2에 나타내었다. Zaluzanin C를 24시간 동안 RAW264.7 세포에 처리한 결과, 대조군에 비해 2.5 μM의 zaluzanin C를 처리한 군에서부터 세포 성장이 유의적으로 증가하였다(Fig. 2A). 또한, Zaluzanin C의 RAW264.7 세포에 대한 독성을 측정한 결과, 대조군에 비해 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 2B). 이상의 결과로부터 zaluzanin C가 RAW264.7 세포의 성장을 억제시키거나 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였으며, 따라서 이후의 모든 실험에서 0-10 μM의 농도로 zaluzanin C를 처리하였다.

Zaluzanin C의 iNOS 단백질 발현 억제에 따른 산화질소(II) 생성 억제 효과

일반적으로 산화질소(II)는 혈관이완제로서 이로운 역할을 하지만, 산화질소(II)의 역할은 생리학적 환경에 따라 결정된다(17). 특히 염증성 환경은 상피세포나 염증성 세포로부터 산화질소(II)와 같은 RNS와 ROS를 과량으로 생성하고 이들은 DNA를 손상시킨다. 이러한 DNA 손상은 줄기세포에 있어서의 변이 및 발암 등으로 이어지는 것으로 알려져 있다(17). 따라서 염증성 질환에 있어서 산화질소(II)의 과도한 생성을 억제하는 것은 중요한 타깃이 될 수 있다.

본 연구에서는 지질다당류의 자극에 의해 염증반응을 유도한 RAW264.7 세포에서 zaluzanin C 처리에 의한 산화질소(II)의 생성에 미치는 영향을 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과, 지질다당류를 처리 하지 않은 대조군에 비해 지질다당류만 처리한 0 μM zaluzanin C에서 산화질소(II) 생성량이 유의적으로 증가한 것으로 보아($p<0.001$) 지질다당류에 의한 염증반응이 충분히 유도된 것을 확인하였다. 이에 비해 2.5 μM zaluzanin C 부터 지질다당류 자극에 의한 산화질소(II)의 방출을 유의적으로 억제하였다($p<0.05$, Fig. 3). 산화질소(II)는 아르지닌(L-arginine)이 시트룰린(citrulline)으로 산화되는 과정에서 생성되는 부산물로서(18), 생리학적 상태에 따라 3가지 형태의 산화질소(II) 합성효소(NOS) 중 하나에 의해 생성된다. 그 중에서 inducible NO(iNOS)는 휴식상태의 세포에서는 발현되지 않지만 박테리아나 염증성 사이토카인과 같은 면역학적 자극에 의해 그 발현이 유도된다(18). 염증성 자극에 의해 발현된 iNOS에 의해 다른 합성효소 보다도 더 많은 양

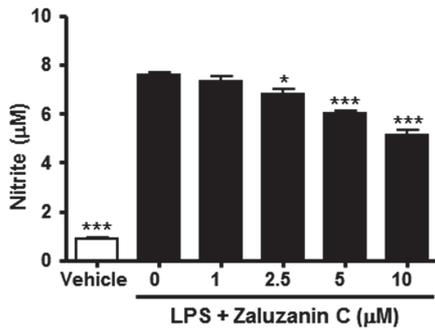


Fig. 3. Zaluzanin C inhibits production of NO in LPS-stimulated murine macrophages. RAW264.7 cells were treated with different concentration of zaluzanin C in the presence of 100 ng/mL LPS or in the absence for 48 h. In the cell culture supernatant, NO was determined by methods described Material and Methods section. Statistical significance is based on the difference when compared with LPS-stimulated cells (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

의 산화질소(II)가 생성되며 이때 생성된 산화질소(II)는 상대적으로 길게 신체에 영향을 미친다(17). 특히, iNOS의 유도는 간 섬유증의 발생과 발암 등과 같은 다양한 질환과 관련된 것으로 알려져 있다(17,18).

Zaluzanin C에 의한 산화질소(II)생성의 억제에 의한 것인지를 확인하기 위해 지질다당류로 자극한 RAW264.7 세포에 zaluzanin C를 처리한 세포로부터 단백질을 추출하여 iNOS의 단백질 발현양을 웨스턴블롯법에 의해 분석하였다. Fig. 4A에 나타난 것과 같이, 지질다당류 처리에 의해 iNOS의 발현양이 증가하였으나, 2.5 µM zaluzanin C를 처리한 군에서부터 iNOS의 발현양이 유의적으로 감소하였다(Fig. 4B). 이상의 결과로부터 zaluzanin C에 의한 산화질소(II)의 생성 억제는 그 합성 효소인 iNOS의 발현양 감소에 따른 것임을 알 수 있다.

Zaluzanin C의 IL-6의 생성 억제 효과

Interleukin-6 (IL-6)는 염증 유발 사이토카인의 하나로, 대표적인 염증의 마커로 알려져 있다(19). 염증성 자극에 의해 생성된 IL-6는 NF-κB 및 STAT3를 통해 iNOS의 발현을 유도해 반응성이 강한 산화질소(II)의 생성을 촉진하며 이를 통해 DNA의 메틸화(methylation)를 통제하는 것으로 알려져 있다(20).

Zaluzanin C가 지질다당류 자극에 의해 활성화된 RAW264.7 세포에서 iNOS 단백질 발현을 억제함으로써 산화질소(II) 생성을 억제한 것이 IL-6 분비와 관련이 있는지를 확인하기 위해서 산화질소(II)을 측정된 세포배양액에서 IL-6 분비량을 ELISA kit를 이용해 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 지질다당류 처리함으로써 IL-6 분비가 증가하는 것을 확인하였으며, 5 µM zaluzanin C 처리에 의해 IL-6 분비가 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이상의 결과로부터 Zaluzanin C는 지질다당류 자극에 의한 대표적인 염증 유발 사이토카인 중의 하나인 IL-6 생성을 억제하는 것으로 나타났다.

Zaluzanin C의 NF-κB 이동 억제 효과

염증성 자극에 의한 iNOS의 유도적 특성 때문에, iNOS 전사 조절은 iNOS 활성을 조절하는데 있어서 가장 중요한 단계이다. iNOS의 전사를 조절하는 신호전달체계 중 가장 잘 알려진 것이 NF-κB이다(21). 자극이 없는 휴식상태에서 NF-κB는 IκB와 결합하여 세포질에 존재하지만, 염증성 자극에 의해 IκB kinase가 활

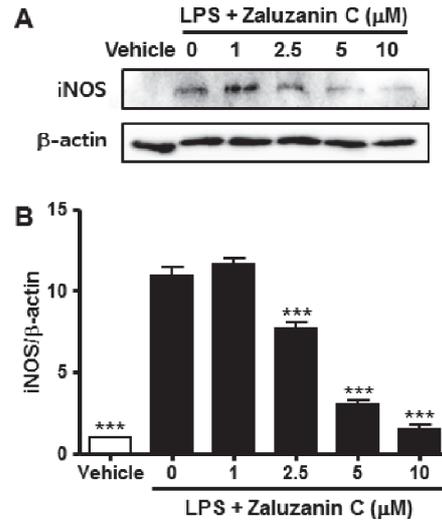


Fig. 4. Zaluzanin C inhibits protein expression of iNOS in LPS-stimulated murine macrophages. RAW264.7 cells were treated with different concentration of zaluzanin C in the presence of 100 ng/mL LPS or in the absence for 48 h. In each whole cell lysate, 35 µg proteins were resolved by 10% SDS-PAGE for iNOS determination. β-Actin expression is shown as a loading control. The bands were quantified using image analysis software and their relative intensity was expressed as iNOS/β-actin. Statistical significance is based on the difference when compared with LPS-stimulated cells (***) $p < 0.001$.

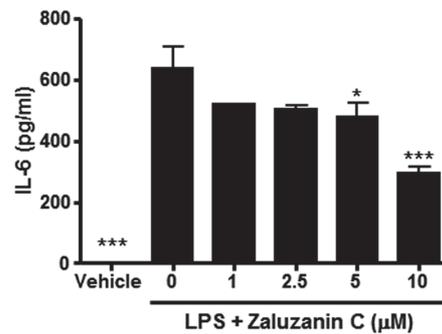


Fig. 5. Zaluzanin C inhibits inflammatory cytokine production in LPS-stimulated murine macrophages. RAW264.7 cells were treated with different concentration of zaluzanin C in the presence of 100 ng/mL LPS or in the absence for 48 h. In the cell culture supernatant, IL-6 levels were determined by methods described Material and Methods section. Statistical significance is based on the difference when compared with LPS-stimulated cells (* $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

성화 되고, IκB의 인산화에 의해 분해가 촉진된다. IκB가 분해되면 자유로워진 NF-κB는 핵 내로의 이동이 촉진되어 전사조절인자로 작용하면서(22) iNOS의 촉진유전자(promoter)에 결합할 수 있고 iNOS의 발현을 촉진한다(18). 또한, NF-κB의 활성화는 IL-6와 같은 다양한 염증성 유전자의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다(23). 이처럼 iNOS의 발현과 IL-6 생성에는 전사인자 NF-κB가 관여하므로 NF-κB의 활성을 억제하는 것은 염증성 질환을 억제하는 효과적인 방법일 수 있다. 따라서 zaluzanin C가 RAW264.7 세포에서 지질다당류의 자극에 의해 NF-κB가 세포질과 핵에서 어떻게 분포하는지를 측정하고 단백질 발현양을 수치화하여 그래프로 나타내었다.

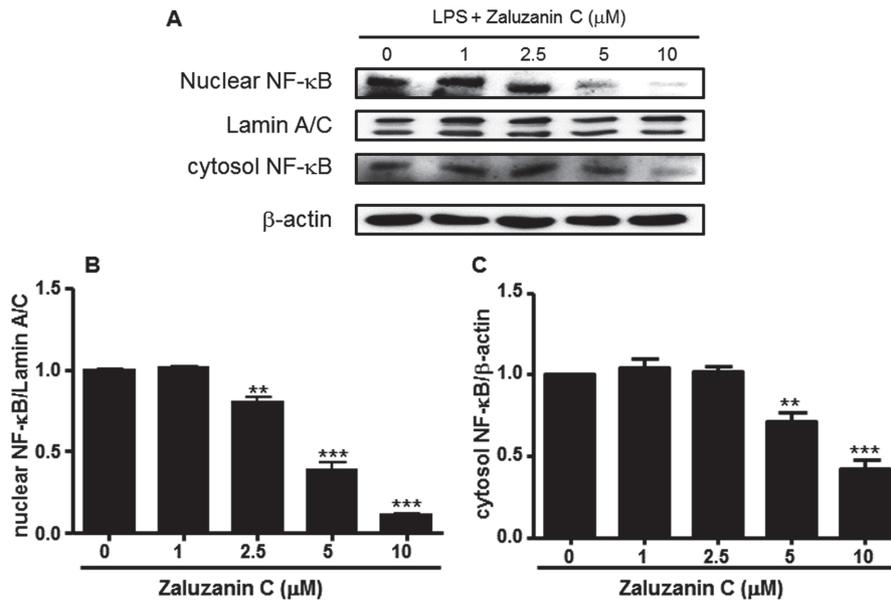


Fig. 6. Zaluzanin C blocks translocation of NF- κ B from cytosol to nuclear in LPS-stimulated murine macrophages. RAW264.7 cells were treated with different concentration of zaluzanin C in the presence of 100 ng/mL LPS for 30 min. 10 μ g of cytosol protein and 2.5 μ g of nuclear protein from each cell 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 for cytosol or nuclear protein, respectively. Western blot analysis was performed as described in Materials and Methods. Statistical significance is based on the difference when compared with LPS-stimulated cells (** p <0.01, *** p <0.001).

그 결과, zaluzanin C 처리에 의해 2.5 μ M 농도부터 NF- κ B의 핵으로의 이동이 억제되었으며 특히 5 μ M zaluzanin C 처리에 의해 NF- κ B의 핵 내에서의 발현이 현저히 감소하였다(Fig. 6A & Fig. 6B). 한편, 세포질에서는 2.5 μ M zaluzanin C 처리에 의해 NF- κ B의 발현양이 거의 변화가 없었으나 5 μ M zaluzanin C 처리에 의해 그 발현양이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6A & 6C). Zaluzanin C 처리에 의해 핵에서의 NF- κ B와 관련해 세포질에서는 NF- κ B의 발현이 증가할 것으로 예상하였으나, 세포질에서도 NF- κ B의 발현이 감소하는 것으로 나타났다. NF- κ B의 신호전달 체계는 유비퀴틴 의존 단백질가수분해(ubiquitin-dependent proteolysis)에 의해 조절 된다(24,25). NF- κ B의 p65 소단위도 유비퀴틴 연결효소(ubiquitin ligase)에 의해 유비퀴틴화(ubiquitylation)가 일어나고, 프로테오솜(proteasome)에 의해 분해되는 것으로 알려져 있다(26). 이는 NF- κ B의 대표적인 소단위인 p65가 일정농도 이상의 zaluzanin C에 의해 NF- κ B 자체의 분해를 촉진하는 것으로 판단되나, 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

요 약

천연물 유래 단일 성분의 항염증 효과에 대한 잠재성을 평가하는 스크리닝의 일환으로 11종의 단일 물질을 대상으로 항염증 효과를 탐색한 결과, 단풍취에서 분리정제한 zaluzanin C의 산화질소(NO) 생성 억제능이 뛰어난 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 단풍취에서 분리정제한 zaluzanin C가 지질다당류로 자극한 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포에서 염증반응에 미치는 영향에 대해 평가하고, 관련 메커니즘에 대해 검토하였다.

Zaluzanin C는 LPS 자극에 의해 유도된 iNOS 단백질 발현양을 감소시킴으로써 산화질소(NO) 생성을 억제할 뿐만 아니라 IL-6와 같은 염증 유발 사이토카인의 분비를 억제하였다. 이러한 효과는 전사인자인 NF- κ B의 세포질에서 핵으로의 이동을 억제함으로써 나타나는 것으로 판단된다. 이러한 결과로부터, zaluzanin

C가 염증 반응을 저해하는 효과가 있는 것으로 나타나, 향후 염증성 질환을 예방, 개선 및 치료하는데 유용한 물질로 사용될 가능성이 있을 것으로 생각된다. 하지만 이를 위해서는 zaluzanin C의 생체 내 이용률 및 생리적 활성 농도 등에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구를 수행함에 있어서 zaluzanin C를 분리정제 해 주신 대구대학교 김태훈 교수님께 감사 드립니다.

References

1. Das UN. Molecular basis of health and disease. Springer publishing, New York, USA. pp. 15-16. (2011)
2. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature 420: 860-867 (2002)
3. Murata M, Thanan R, Ma N, Kawanishi S. Role of nitrate and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. J. Biomed. Biotechnol. 623019 (2012)
4. Baltimore D. Discovering NF-kappaB. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 1: a000026 (2009)
5. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. Cell 132: 344-362 (2008)
6. Staudt LM. Oncogenic activation of NF-kappaB. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2: a000109 (2010)
7. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-kB as the matchmaker. Nat. Immunol. 12: 715-723 (2011)
8. Brasier AR. The NF-kappaB regulatory network. Cardiovasc. Toxicol. 6: 111-130 (2006)
9. Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery. Eur. J. Med. Chem. 46: 4769-4807 (2011)
10. Choi SZ, Yang MS, Choi SU, Lee KR. Cytotoxic terpenes and lignans from the roots of *Ainsliaea acerifolia*. Arch. Pharm. Res. 29: 203-208 (2006)
11. Jung CM, Kwon HC, Choi SZ, Lee JH, Lee DJ, Ryu SN, Lee KR. Phytochemical constituents of *Ainsliaea acerifolia*. Korean J.

- Pharmacogn. 31: 125-129 (2000)
12. Lee EW, Kim TW, Kim HS, Park YM, Kim SH, Im MH, Kwak JH, Kim TH. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory effects of ethanolic extract of *Ainsliaea acerifolia* and organic solvent-soluble fractions. Korean J. Food Preserv. 22: 275-280 (2015)
 13. Moon HI, Ji OP, Shin MS. Effects of compounds isolated from *Ainsliaea acerifolia* on the hepatic alcohol dehydrogenase activity. J. Appl. Biol. Chem. 42: 162-165 (1999)
 14. Moon HI, Ji OP, Moon SH, Shin MS. Effect of *Ainsliaea acerifolia* fraction extract on alcohol dehydrogenase activity. J. Appl. Biol. Chem. 41: 447-450 (1998)
 15. Shin SG, Kang JK, Lee KR, Lee HW, Han JW, Choi WS. Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages by sesquiterpene lactones. J. Toxicol. Environ. Health A. 68: 2119-2131 (2005)
 16. Ando M, Kusaka H, Ohara H, Takase K, Yamaoka H, Yanagi Y. Studies on the syntheses of sesquiterpene lactones. 11. The syntheses of 3-epizaluzanin C zaluzanin C, zaluzanin D, and related compounds 3a-hydroxyguaia-1(10),4 (15),11(13)-trieno-12,6a-lactone and 3a-hydroxyguaia-4(15),9,11(13)-trieno-12, 6a-lactone. J. Org. Chem. 54: 1952-1960 (1989)
 17. Vahora H, Khan MA, Alalami U, Hussain A. The potential role of nitric oxide in halting cancer progression through chemoprevention. J. Cancer Prev. 21: 1-12 (2016)
 18. Iwakiri Y. Nitric oxide in liver fibrosis: The role of inducible nitric oxide synthase. Clin. Mol. Hepatol. 21: 319-325 (2015)
 19. Olszowski T, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. Pro-inflammatory properties of cadmium. Acta. Biochim. Pol. 59: 475-482 (2012)
 20. Ma N, Kawanishi M, Hiraku Y, Murata M, Huang GW, Huang Y, Luo DZ, Mo WG, Kawanishi S. Reactive nitrogen species-dependent DNA damage in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma: The relation to STAT3 activation and EGFR expression. Int. J. Cancer 122: 2517-2525 (2008)
 21. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF-kappaB functions as a tumor promoter in inflammation-associated cancer. Nature 431: 461-466 (2004)
 22. Bannon A, Zhang SD, Schock BC, Ennis M. Cystic fibrosis from laboratory to bedside: The role of A20 in NF- κ B-mediated inflammation. Med. Princ. Pract. 24: 301-310 (2015)
 23. Pamukcu B, Lip GY, Shantsila E. The nuclear factor-kappa B pathway in atherosclerosis: A potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease. Thromb. Res. 128: 117-123 (2011)
 24. Neumann M, Naumann M. Beyond IkappaBs: Alternative regulation of NF-kappaB activity. FASEB J. 21: 2642-2654 (2007)
 25. Tokunaga F. Linear ubiquitination-mediated NF- κ B regulation and its related disorders. J. Biochem. 154: 313-323 (2013)
 26. Maine GN, Mao X, Komarck CM, Burstein E. COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. EMBO J. 26: 436-447 (2007)