

碩士學位論文

Pinosylvin(*Pinus densiflora*)의

항염 활성



食品工學科

林志禧

2006年 8月

# Pinosylvin(*Pinus densiflora*)의

## 항염 활성

指導教授 任 尙 彬

林 志 禧

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2006年 8月

林志禧의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 河 璉 桓 (印)

委 員 高 榮 煥 (印)

委 員 任 尙 彬 (印)

濟州大學校 大學院

2006年 8月

Inhibitory effect of pinosylvin(*Pinus densiflora*) on LPS-induced NF- $\kappa$ B activation

Ji-Hee Lim

(Supervised by Professor Sang-bin Lim)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND ENGINEERING  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2006. 8.

# 目 次

|   |     |
|---|-----|
| Summary .....   | vi  |
| 약 어 .....   | vii |
| <br>  |     |
| I. 序 論 .....  | 1   |
| <br>  |     |
| II. 材料 및 方法 .....   | 5   |
| 2.1. 재료 .....   | 5   |
| 2.2. 세포배양 .....   | 5   |
| 2.3. Lipopolysaccharide(LPS) 처리 .....                           | 5   |
| 2.4. Luciferase reporter gene 측정 .....                          | 8   |
| 2.5. Western blotting .....                                     | 8   |
| 2.6. Cytokine 측정 .....  | 10  |
| 2.6.1. Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF)- $\alpha$ 측정 ..... | 10  |
| 2.6.2. Interleukin-8(IL-8) 측정 .....                             | 10  |
| 2.7. Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) 측정 .....  | 10  |
| 2.8. 통계 .....   | 11  |
| <br>  |     |
| III. 結果 및 考察 .....  | 12  |
| 3.1. Pinosylvin의 항염 효과 .....                                    | 12  |
| 3.2. Nuclear factor-kappa B(NF- $\kappa$ B) 활성화에 대한 효과 .....    | 15  |
| 3.3. Inhibitors of kappa B(I $\kappa$ B)의 인산화와 분해에 미치는 효과 ..... | 20  |

|   |    |
|---|----|
| 3.4. Cytokine 생성에 미치는 효과 .....  | 20 |
| 3.4.1. Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 생성에 대한 효과 ..... | 20 |
| 3.4.2. Interleukin-8(IL-8) 생성에 대한 효과 .....                              | 23 |
| 3.5. Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) 생성에 대한 효과 .....   | 26 |
| <br>  |    |
| IV. 要約 .....  | 29 |
| <br>  |    |
| V. 參考文獻 .....   | 31 |



## Summary

Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is a critical transcription factor for maximal expression of many of the cytokines that are involved in the pathogenesis of inflammatory diseases. Although cytokines may act independently, inflammation is usually associated with their coordinated production and action. Therefore, this cytokine network may be important in the pathology of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and asthma. NF- $\kappa$ B exerts a broad influence over this network of cytokines by affecting the transcription of many of the genes involved in its production. Because of its potential ability to influence the production of a variety of cytokines, NF- $\kappa$ B is an appealing target for therapeutic strategies designed to attenuate cytokine-mediated inflammation. In this study, we found that pinosylvin, a natural stilbenoid that is a component of the pine leaf (*Pinus densiflora*), significantly inhibited LPS-induced NF- $\kappa$ B activation in a concentration-dependent manner. Additionally, pinosylvin was found to inhibit the LPS-induced phosphorylation and degradation of I $\kappa$ B in THP-1 cells, which indicates that pinosylvin may act as an NF- $\kappa$ B inhibitor. In order to further confirm this inhibitory effect of pinosylvin, we performed ELISA for pro-inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$ , IL-8, and COX-2 the expressions of which are dependent on NF- $\kappa$ B promoter. As expected, we found that pinosylvin can inhibit the production of these pro-inflammatory mediators. These results

suggest that pinosylvin inhibits the expression of pro-inflammatory mediators through the inhibition of NF- $\kappa$ B signaling.

In conclusion, the data acquired in this study demonstrate that pinosylvin can inhibit LPS-induced expression of pro-inflammatory mediators, and the mechanisms underlying its action may be mediated through the inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway. These findings suggest that pinosylvin could be of therapeutic value in the prevention of inflammatory diseases.



## 약 어

LPS : Lipopolysaccharide

COX-2 : Cyclooxygenase-2

PGE<sub>2</sub> : Prostaglandin E<sub>2</sub>

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor- $\alpha$

IL-8 : Interleukin-8

NF- $\kappa$ B : Nuclear factor-kappa B

I $\kappa$ B : Inhibitors of kappa B



## I. 序 論

그람 양성과 그람 음성 박테리아, 즉 세균에 의한 감염(infection)은 임상적으로 염증(inflammation), 발열( fever)과 같은 주된 증상을 유발하고 (Dziarski 등, 2000a), 이런 임상 증상들은 세포나 그 구성 요소가 박테리아에 노출되고 난 후, 숙주 세포에서 발생한 다양한 매개체에 의해 야기된다 (Dziarski 등, 2000b). 염증은 상처를 줄 수 있는 자극에 대한 생체 방어 반응으로(유 등, 1998), 염증 발현의 가장 주된 요인은 박테리아 세포벽에 존재하는 호염증성 매개체들(pro-inflammatory mediators)이며, 이들을 총칭해서 cytokine이라고 부른다. 이러한 cytokine에는 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1(IL-1), interleukin-6(IL-6) 그리고 interleukin-8(IL-8) 등이 있다(Parrillo, 1993; Bone, 1994; Young, 1995; Mitchell과 Cortran, 1999; Janeway 등, 1999; 변 등, 2005). 염증 매개물질인 cytokine들이 과량 생산되면 adult respiratory distress syndrome(ARDS)와 류머티스성 관절염과 같은 각종 염증성 질환을 유발시키고 악화시킨다(Hyers 등, 1991; Asahara 등, 1995).

Sen과 Baltimore(1986)가 처음으로 발견한 단백질 전사인자(transcriptional factor)인 nuclear factor-kappa B(NF- $\kappa$ B)는 유도된 호염증성 매개체들의 발현을 조절한다. 일반적으로 cytokine은 세포질 내 저장되어 있는 것이 아니라, 새로운 단백질 합성에 의해서 분비되어지는 것으로, 생체 내 염증반응에서 cytokine의 증가는 이에 관여하는 여러 가지 유전자들의 발현에 의해 조절된다. 이러한 유전자 생합성에 따른 발현 조절에 결정적인 역할을 하는 것이 전사인자인 NF- $\kappa$ B이며, 따라서 전사인자 조절이 염증 유발 매개체인 cytokine의 발현을 억제 할 수 있다는 가능성을 제시하게 된 것이다.

NF- $\kappa$ B는 세포질에서 inhibitors of kappa B(I $\kappa$ B)라 불리는 억제성 단백질과 복합체의 상태로 존재한다. 세포를 자극하게 되면, I $\kappa$ B kinase가 활성화 되어 I $\kappa$ B를 인산화 시킨다. 즉, 복합체에서 분리되어 활성화 된 NF- $\kappa$ B는 I $\kappa$ B의 인산화와 분해로 유도되며, 인산화 된 I $\kappa$ B가 떨어져 나간 NF- $\kappa$ B는 핵 내로 이동하여 표적 유전자의 프로모터에 결합하고 여러 염증 관련 유전자들의 전사를 유발하게 된다(Auphan 등, 1995)(Fig. 1).

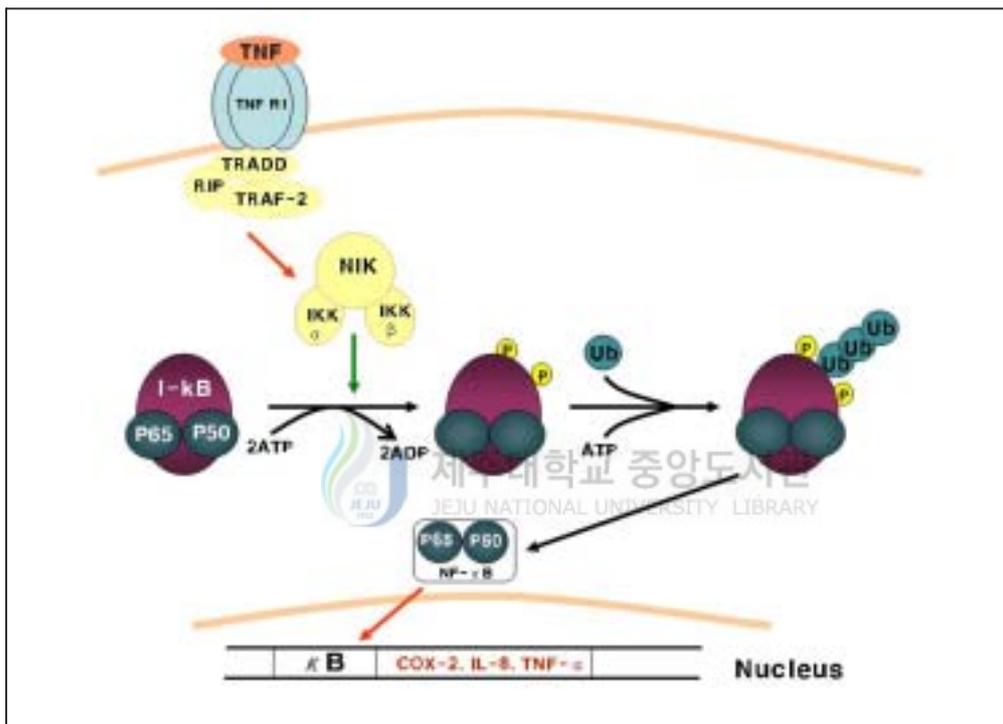


Fig. 1. Signaling pathway of nuclear factor-kappa B(NF- $\kappa$ B).

또한 NF- $\kappa$ B는 염증성 cytokine 외에도 cyclooxygenase-2(COX-2)와 같은 염증효소의 발현까지 유도한다. Cyclooxygenase(COX)는 지방산인 arachidonic acid를 대사시켜 염증반응에서 중요한 매개체인

prostaglandins(PGs)으로 전환시키는 효소로서, COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 정상적 생체기능에 작용하지만, COX-2는 염증기전에 관여하는 효소로 매개물질인 PGE<sub>2</sub>를 형성시키고 이러한 PGs가 염증 반응에 관여하게 된다(Park 등, 2004).

Pinosylvin은 소나무 심재 및 솔잎(*Pinus densiflora*)에서 발견되는 물질로, 천연적인 stilbenoid 계열의 화합물이다. 식물이 미생물과 접촉하였을 때 식물에 의해서 합성, 축적되는 저분자의 항균성 화합물을 총칭해서 phytoalexin이라 하는데, pinosylvin은 phytoalexin의 하나로서, 소나무에서 생물학적으로 병충해와 같은 생물적인 스트레스에 대항하며 자신을 지키고 보호하는 역할을 한다(Holmgren 등, 1999; Sung, 2004). 동의보감에서 솔잎은 “오랫동안 생식하면 늙지 않고 원기가 왕성해지며 머리가 검어지고 추위와 배고픔도 모른다”고 하며, 향약집성방에서도 “솔잎 적당량을 쯤쌀처럼 잘게 썰어 보드랍게 갈아먹으면 몸이 거뜨해지고 힘이 솟으며 추위를 타지 않는다”는 효능을 소개하고 있다. 그리고 중국의 한방고서인 본초강목, 중약대사전에 의하면, 솔잎이 피를 맑게 하고, 혈행을 도우며, 염증, 부기 등을 치료하고, 풍을 제거하며, 진통, 진정의 효과와 감기 및 기관지 천식 예방에 효과가 있다고 전하고 있다(김, 1997). Pinosylvin 에 대한 연구로는 항산화 작용(Fang 등, 2002; Hong 등; 2004), 항균활성 작용(Pacher 등, 2002), tyrosinase 억제 효과(Ohguchi 등, 2003; Sung과 Kim, 2005) 등이 보고 되었다. 뿐만 아니라, COX-2 저해작용(Christopher 등, 1998)과 PGE<sub>2</sub> 생합성 저해 효과(Park 등, 2004)와 같은 염증반응에 관련된 pinosylvin의 연구들도 발표되었다. 이러한 연구사례를 종합해 본 결과, 최근 stilbenoid 계열의 물질이 갖는 약리 작용에 대한 관심이 부각되고 있으며, 이 계열의 물질 중 하나인 pinosylvin의 다양한 생리활성에 대한 세심한 연구가 꾸준히 진행되고 있었다.

본 연구에서는 기존의 실험적인 연구에서 약리작용을 가진 것으로 규명된 pinosylvin의 항염 활성을 확인하고 그 작용 메카니즘을 밝히고자 하였다. 세포벽 지질다당질(lipopolysaccharide, LPS)로 유도된 염증 인자 매개 물질 생성 및 발현을 억제하는 pinosylvin의 항염 효과와 이러한 반응의 기반이 되는 메카니즘을 human monocytic cell line에서 NF- $\kappa$ B의 신호 경로 저해를 통해 매개됨을 확인하고자 하였다.



## II. 材料 및 方法

### 2.1. 재료

재료로 사용한 pinosylvin(trans-3,5-pinosylvin)은 ArboNova(ArboNova, Finland)로부터 구입하였으며(Table 1), 화학적 구조식은 Fig. 2 와 같다.

Table 1. Information of pinosylvin

| Name       | CAS #      | Availability | Purity |
|------------|------------|--------------|--------|
| Pinosylvin | 22139-77-1 | In stock     | >95%   |

### 2.2. 세포 배양

본 실험에 사용한 THP-1 세포(human monocytic cell line)는 culture dish에 부유하여 증식하는 면역세포로 세포주 은행 ATCC(TIB202)에서 분양 받았다. 세포배양은 RPMI-1640 배지(BioWhittaker)에 비활성화 한 10%(v/v) fetal bovine serum(FBS)과 penicillin 100 units/ml, streptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항생제를 첨가하여 만든 복합혈청배지를 사용하여 1주일에 1-2회 계대배양 하였다.

### 2.3. Lipopolysaccharide(LPS) 처리

그람 음성 박테리아의 세포 외막에 존재하는 세균산물인 당지질(lipopolysaccharide, LPS)은 내독소로 잘 알려져 있으며, 박테리아가 죽으면서 세포 외막으로부터 방출되어 염증인자 매개물질의 생산을 유도한다(Toshio, 2002).

THP-1 세포를 24 well dish에 각각 ml 당  $1 \times 10^6$  cells이 되도록 분주한 후, 1 mg/ml 농도로 제조한 LPS(*E.coil* serotype 026:B6, Sigma, USA)를 각 well 당 10  $\mu$ g/ml 씩 가하고 24시간에서 72시간 동안 활성화시켰다.



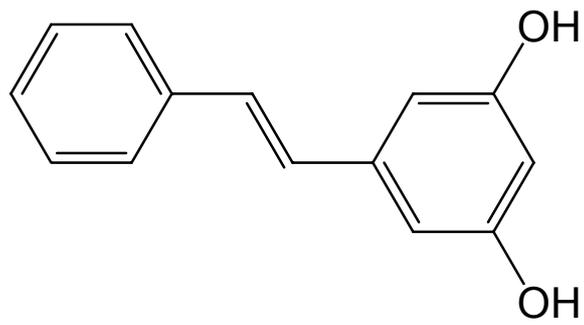


Fig. 2. Structure of pinosylvin.



## 2.4. Luciferase reporter gene 측정

각 well 당  $8 \times 10^5$  cells/ml이 되도록 THP-1 세포를 6 well plate에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. SuperFect reagent(Invitrogen co.)를 이용하여, 배양된 각 세포에 NF- $\kappa$ B 조절 요소에 따른 reporter vector 인 firefly luciferase reporter gene(Stratagene, Germany) 2  $\mu$ g과 control vector로서 *Renilla* luciferase expression vector(Promega, England) 0.2  $\mu$ g을 잘 섞은 뒤, 주입하여 일시적으로 NF- $\kappa$ B luciferase reporter plasmid DNA로 형질 전환 시켰다. 24시간 경과 후, 형질전환 된 세포들을 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 세척하고, LPS를 well 당 10  $\mu$ g/ml의 농도로 가하여 활성화 시키고 난 뒤, pinosylvin을 농도별로 처리하고 5시간 후 세포를 수집하였다. Luciferase activity는 Promega사의 luciferase assay system으로 Luminometer(Berthold, Germany)를 이용하여 측정하였으며, *Renilla* luciferase activity(relative luciferase units)에 대한 firefly luciferase activity(relative luciferase units)의 비율로 계산하였다.



$$\text{Luciferase activity} = \frac{\text{Firefly luciferase activity(*RLU)}}{\text{Renilla luciferase activity(*RLU)}}$$

\*RLU - relative luciferase units

## 2.5. Western blotting

Anti-I $\kappa$ B- $\alpha$ , phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$  그리고  $\beta$ -actin 항체들을 각각 사용하여 단

백질 검출법인 Western blotting으로 I $\kappa$ B- $\alpha$ 와 인산화 된 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 발현 양을 측정하였다. THP-1 세포를 24 well dish에 각각 ml 당  $1 \times 10^6$  cells이 되도록 분주한 후, LPS를 well 당  $10 \mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 가하여 활성화 시키고 난 뒤, pinosylvin을 농도별로 처리하였다. 수집한 세포를 저온의 PBS로 세척하고, 0.2 ml lysis buffer(10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride,  $10 \mu\text{g/ml}$  leupeptin,  $10 \mu\text{g/ml}$  aprotinin)에 넣어 단백질을 추출하였다.  $16,000 \times \text{G}$ 로  $4^\circ\text{C}$ 에서 30분 동안 원심분리하고 상층액을 취하여 세포의 파편들을 제거한 뒤, 세포 lysate을 5분간 끓는 물에서 변성시키고, bicinchoninic acid(BCA)로 추출한 단백질을 정량하였다. Sodium dodecyl sulfate가 포함된 16% polyacrylamide gel에서 전기 영동한 후, 분리된 단백질을 hybond-C membrane으로  $4^\circ\text{C}$ 에서 전이시키고 면역염색법(immunoblotting)으로 단백질을 검출하였다. 이 때, 비특이적 결합을 차단하기 위하여 PBS로 희석한 5% skin milk에 20 mM TBST(Tris-buffered saline(pH 7.4), 0.1% Tween-20)가 들어있는 buffer로  $25^\circ\text{C}$ 에서 3시간 동안 blocking 하였다. 20 mM TBST buffer 로 1회 세척한 후, 각각 1 : 1000 비율로 희석한 mouse monoclonal 항체 phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$ (Ser32/36), I $\kappa$ B- $\alpha$ (112B2) 그리고  $\beta$ -actin을 1차 항체로 사용하여 4시간 동안 반응시키고, 다시 TBST로 3회 세척하였다. 2차 항체로는 HRP-conjugated anti-mouse IgG를 사용하여  $25^\circ\text{C}$ 에서 1시간 반응시키고 난 다음에, 단백질(protein-band)을 enhanced chemiluminescence(ELC) system (Amersham, USA)으로 암실에서 X-ray film에 감광시켰다. 각 band의 밀도는 광학농도계를 이용하여 정량하였으며 모든 결과는 세 가지 독립적인 실험으로 확인하였다(박, 1998; 이 등; 1995).

## 2.6. Cytokine 측정

### 2.6.1. Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 측정

LPS 처리로 유도된 THP-1 세포를 48시간 배양한 후, 세포배지로 분비된 표면의 TNF- $\alpha$ 의 농도를 ELISA kits(Genzyme, Minneapolis)를 이용하여 정량하였다. 약술하면, THP-1 세포를 각 well 당  $1 \times 10^6$  cells/ml 이 되도록 분주하고 24시간 배양 후에 LPS를 well 당  $10 \mu\text{g/ml}$  씩 가하여 활성화 시키고 난 뒤, pinosylvin을 농도별로 처리하였다. 48시간 배양 후 각 well을 PBS로 1회 세척하고 no serum RPMI-1640으로 배지 교환한 뒤 다시 30분간 배양하고 나서 원심분리하여 상층액을 취하고 세포 배지로 분비된 표면의 TNF- $\alpha$ 의 농도를 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)으로 측정하였다.

### 2.6.2. Interleukin-8(IL-8) 측정

LPS 처리로 유도된 THP-1 세포를 48시간 배양한 후, 세포배지로 분비된 표면의 IL-8의 농도를 ELISA kits(Genzyme, Minneapolis)를 이용하여 정량하였다. 약술하면, THP-1 세포를 각 well 당  $1 \times 10^6$  cells/ml 이 되도록 분주하고 24시간 배양 후에 LPS를 well 당  $10 \mu\text{g/ml}$  씩 가하여 활성화 시키고 난 뒤, pinosylvin을 농도별로 처리하였다. 48시간 배양 후 각 well을 PBS로 1회 세척하고 no serum RPMI-1640 으로 배지 교환한 뒤 다시 30분간 배양하고 나서 원심분리하여 상층액을 취하고 세포 배지로 분비된 표면의 IL-8 농도를 효소면역측정법(ELISA)으로 측정하였다.

## 2.7. Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 측정(COX-2 activity assay)

LPS 처리로 유도된 THP-1 세포를 48시간 배양 후, 배지로 분비되어

세포 표면에 복제된 PGE<sub>2</sub>의 수치를 prostaglandin E<sub>2</sub> Enzyme Immunoassay Kit(IBM, Germam)를 이용하여 정량하였다. 약술하면, THP-1 세포를 각 well 당 1×10<sup>6</sup> cells/ml이 되도록 분주한 뒤, 24시간 배양하여 COX-2를 유도시키고, LPS를 well 당 10 μg/ml 씩 가하여 활성화시키고 난 뒤, pinosylvin을 농도별로 처리하였다. 16시간 배양 후 각 well 을 PBS로 1회 세척하고 no serum RPMI-1640로 배지 교환한 뒤 다시 30 분간 배양하고 나서 원심분리하여 상층액을 취하고 효소면역측정법(ELISA)으로 측정하였다.

## 2.8. 통계

모든 측정값은 평균값 ± 표준오차(mean ± standard error of the mean)로 나타내었으며, student's *t*-test 방법을 이용하여 분석하였다. 유의수준 \**p* < 0.05 이하인 것을 유의하다고 판정하였다.



### Ⅲ. 結果 및 考察

#### 3.1. pinosylvin의 항염 효과

일반적으로 염증반응이 호염증성 매개물질(pro-inflammatory cytokine)에 의해서 매개된다고 알려져 있다(Jain과 Basal, 2003). 특히 TNF- $\alpha$ 나 IL-8는 염증을 일으키는 주요한 cytokine으로 보고 되고 있으며, 염증반응의 정도를 나타내는 지표로 이용되고 있다(Auphan 등, 1995). 또한 이들 cytokine 유전자의 프로모터에 존재하는 NF- $\kappa$ B는 중요한 유전자 발현 조절 인자(Pierce 등, 1996)로 염증 질환 발병에 관여하는 다양한 cytokine들을 가장 효과적으로 조절한다는 사실(Schreck 등, 1992)을 근거로 하여, 천연 생리활성물질인 pinosylvin의 항염 효과와 그 작용 메카니즘을 세포수준에서 탐색하게 되었다(Naofumi 등, 1994).

#### 3.2. Nuclear factor-kappa B(NF- $\kappa$ B) 활성화에 대한 효과

호염증성 매개물질(pro-inflammatory cytokine) 유전자의 프로모터에 존재하는 NF- $\kappa$ B 요소(element)가 유전자 발현에 중요한 역할을 한다는 점을 근거로, 세포 수준에서의 NF- $\kappa$ B reporter 활성화의 증감여부를 통한, pinosylvin의 항염 효과를 측정하기 위한 실험을 수행하였다.

Firefly luciferase reporter gene(Stratagene, Germany)과 *Renilla* luciferase expression vector(Promega, England)로, SuperFect reagent(Invitrogen co.)를 이용하여, THP-1 세포를 일시적으로 형질전환시켰고 24시간 배양 후 pinosylvin을 농도별로 처리하고 LPS로 유도된 NF- $\kappa$ B 활성을 luciferase assay를 통해 측정하였다.

Fig. 3 에서와 같이, relative luciferase activity(RLU) 수치를 비교하였을 때, LPS를 처리한 대조군이 LPS를 처리하지 않은 대조군보다 약 3 배 정도 수치가 높았다. Pinosylvin을 0.001  $\mu$ M에서 10  $\mu$ M까지 농도별로 처리한 결과, LPS로 유도된 THP-1 세포에서 RLU 값이 유의성 있게(\*,  $p<0.05$ ) 감소하였으며, 그 농도가 증가함에 따라 NF- $\kappa$ B 억제율도 증가하는 농도 의존적인 경향을 나타내었다. 특히, pinosylvin을 0.1  $\mu$ M 처리하였을 경우, reporter 활성이 50% 이하 수준으로 감소하였고, 이로써 pinosylvin의 reporter 활성을 50% 저해하는 농도인 IC<sub>50</sub>의 값이 약 0.1  $\mu$ M임을 알 수 있었다. 그리고 이런 결과에 대한 pinosylvin과 용매 50% ethanol의 영향을 확인하기 위한 실험을 수행한 결과, LPS를 처리 하지 않고 pinosylvin만을 농도별로 처리한 경우, LPS 단독 처리한 대조군과 비교 시, 거의 유사한 수치가 나왔고, pinosylvin을 용해한 용매 50% ethanol의 경우도 각각의 대조군과 비교 시, 거의 유사한 수치의 결과가 나왔다. 이 결과로 pinosylvin의 NF- $\kappa$ B 활성화 억제 효과에 대해 pinosylvin 자체적인 영향이나, 용매인 50% ethanol 의 단독적인 영향은 없었음을 확인할 수 있었다. NF- $\kappa$ B의 음성 대조군으로 NF- $\kappa$ B의 저해제인 pyrrolidone dithiocarbamate(PDTC)를 처리 비교한 결과, PDTC가 NF- $\kappa$ B를 억제 시킨 것만큼 pinosylvin이 NF- $\kappa$ B 활성을 억제시켰다. 세포 수준에서 NF- $\kappa$ B 활성화를 저해하는 이러한 결과를 토대로, pinosylvin이 NF- $\kappa$ B 활성화를 저해시키는 항염증 효과를 확인할 수 있었고, NF- $\kappa$ B signaling 저해하여 호염증성 cytokine 유전자 발현을 억제함으로써 생성을 억제할 수 있다는 가능성을 발견하게 되었다.

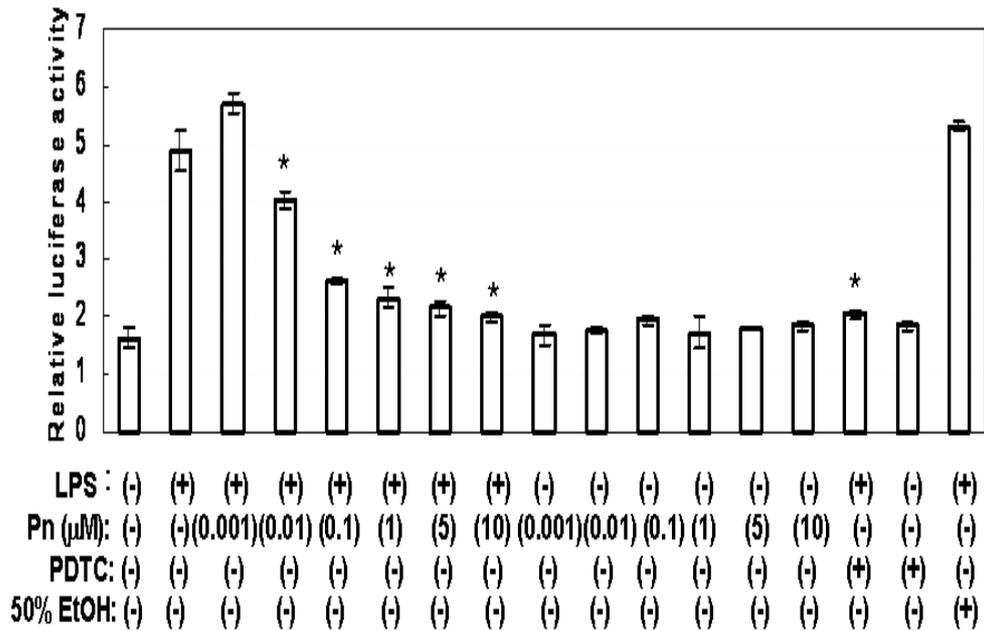


Fig. 3. Inhibitory effect of pinosylvin on LPS-induced NF-κB activation.

THP-1 cells were transiently co-transformed with 2 mg of the firefly luciferase reporter gene under the control of NF-κB responsible elements and 0.2 mg of *Renilla* luciferase expression vector driven by thymidine kinase promoter using Superfect™ reagent, as described in Materials and Methods. After 24 hr, cells were stimulated with 10 mg/ml LPS in the presence or absence of pinosylvin. Luciferase activity is expressed as the ratio of NF-κB dependent firefly luciferase activity divided by control thymidine kinase *Renilla* luciferase activity(relative luciferase units). Data are expressed as means S.E.M. \*,  $p < 0.05$  compared with LPS alone.

Pn : pinosylvin, PDTC : pyrrolidone dithiocarbamate

### 3.3. Inhibitors of kappa B(I $\kappa$ B)의 인산화와 분해에 미치는 효과

NF- $\kappa$ B 활성화 경로 중의 하나는 I $\kappa$ B가 인산화 되어 파괴되면 결합되어 있는 NF- $\kappa$ B가 세포질로부터 핵 내로 이동하는 것이다. 이와 같은 NF- $\kappa$ B 활성화 신호 전달 경로에 중심적인 역할을 하는 I $\kappa$ B의 인산화와 분해에 대한 pinosylvin의 효과를 측정하기 위하여 LPS로 처리된 THP-1 세포에 pinosylvin을 농도별로 처리하고, anti-phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$ (Ser32/36)와 anti-I $\kappa$ B- $\alpha$ (112B2)를 사용하여 Western blotting 하였다. 이 때,  $\beta$ -actin 항체를 이용하여 동량의 단백질로 실험을 수행하였는지 확인하였다.

Fig. 4 에서와 같이, I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 경우, LPS를 처리하지 않은 정상적인 대조군에서는 band가 발현되었으나, LPS를 처리한 경우에는 발현되지 않았고, pinosylvin의 농도 0.1  $\mu$ M 이상일 때부터 다시 band가 발현되었다. 이와 반대로 phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 경우, LPS 처리 시 발현되었지만, pinosylvin의 농도 0.1  $\mu$ M 이상일 때부터는 발현 정도가 약해져 band를 형성하지 않는 것으로 미루어 pinosylvin이 I $\kappa$ B의 인산화와 분해를 저해하고 있음을 알 수 있었다.



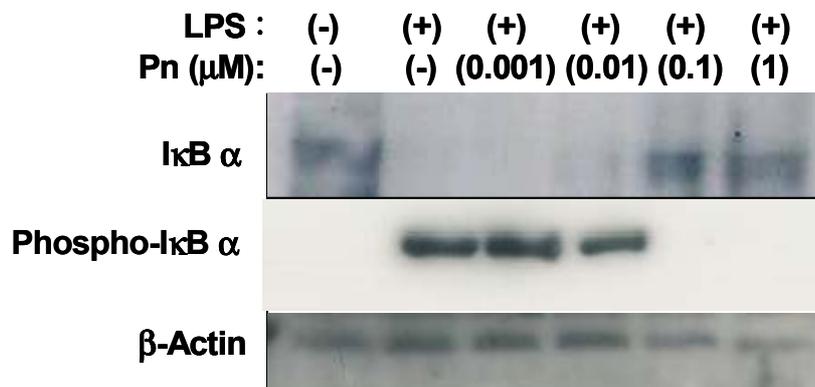


Fig. 4. Inhibitory effect of pinosylvin on the protein level of LPS-induced phosphorylation and degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ .

THP-1 cells were incubated in the presence or absence of LPS, along with the indicated concentrations of pinosylvin, for 30 min. The cultured THP-1 cells were subjected to Western blotting using anti-phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$ (Ser32/36) antibody or anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  antibody.

Pn : pinosylvin

이를 광학농도계로 정확히 수치화한 결과,  $\beta$ -actin에 대한 phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 수치가 LPS를 처리하지 않은 대조군 0.09 정도에 비해 LPS만 처리한 대조군에서는 0.92 정도로 약 10 배 정도 증가하였고, pinosylvin을 0.001  $\mu$ M에서부터 1  $\mu$ M까지 농도별로 처리한 결과, 유의성 있게(\*,  $p < 0.05$ ) 감소하였으며, 그 농도가 증가함에 따라 억제율도 증가하는 농도 의존적인 경향을 보여(Fig. 5) pinosylvin이 phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 억제하고 있음을 알 수 있었다. 이와 반대로,  $\beta$ -actin에 대한 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 수치는 LPS를 처리하지 않은 대조군 0.95 에 비해 LPS만 처리한 대조군에서는 0.12 정도로 약 1/8 로 감소하였다. pinosylvin을 0.001  $\mu$ M에서부터 1  $\mu$ M까지 농도별로 처리한 결과, I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 수치가 유의성 있게(\*,  $p < 0.05$ ) 증가하였으며, 그 농도가 증가함에 따라 억제율도 증가하는 농도 의존적인 경향을 나타내어(Fig. 6), pinosylvin이 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화를 억제하고 있음을 보여주었다. 이러한 결과로부터 pinosylvin이 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화와 분해를 억제함으로써, 세포질로부터 핵 내로의 NF- $\kappa$ B 이동 경로를 차단, NF- $\kappa$ B signal을 저해한다는 사실(Auphan 등, 1995)을 확인하였다. 또한 pinosylvin이 NF- $\kappa$ B signal을 저해하는 사실을 근거로 호염증성 cytokine 유전자 발현을 억제, 염증 발현 매개물질 생성을 감소시키는 가능성을 확인할 수 있었다.

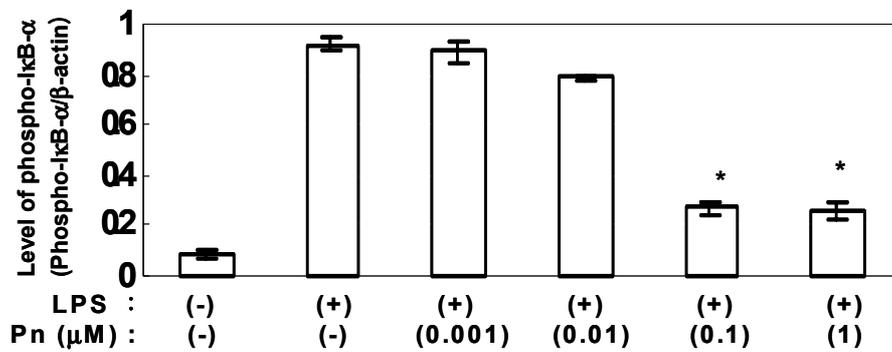


Fig. 5. Inhibitory effect of pinosylvin on LPS-induced phosphorylation of IκB-α.

THP-1 cells were incubated in the presence or absence of LPS, along with the indicated concentrations of pinosylvin, for 30 min. The cultured THP-1 cells were subjected to Western blotting using anti-phospho-IκB-α(Ser32/36) antibody. Bands were visualized by an ECL method and quantified using a densitometer. Similar results were obtained in three independent experiments. Data are expressed as means ± S.E.M. of three independent experiments (bar graph). \* $p < 0.05$  versus LPS (10 mg/ml) only.

Pn : pinosylvin

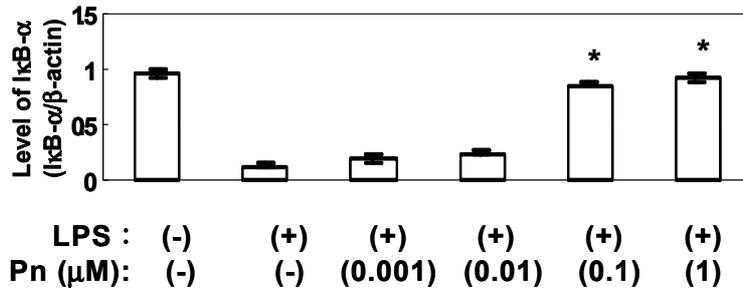


Fig. 6. Inhibitory effect of pinosylvin on LPS-induced degradation of IκB-α.

THP-1 cells were incubated in the presence or absence of LPS, along with the indicated concentrations of pinosylvin, for 30 min. The cultured THP-1 cells were subjected to Western blotting using anti-IκB-α antibody. Bands were visualized by an ECL method and quantified using a densitometer. Similar results were obtained in three independent experiments. Data are expressed as means ± S.E.M. of three independent experiments (bar graph). \* $p < 0.05$  versus LPS (10 mg/ml) only. Pn : pinosylvin

### 3.4. Cytokine 생성에 미치는 효과

앞선 실험을 통해 pinosylvin이 염증반응을 유도하는 cytokine 유전자 발현을 억제할 수 있을 거라는 예비적인 자료를 확보하였고, 이는 pinosylvin이 NF- $\kappa$ B의 저해제로 작용할 수 있다는 가능성을 보여주었다. 이러한 결과(Fig. 3)를 토대로 pinosylvin이 호염증성 cytokine 생산에 직접적으로 관여하는지와 그 저해 효과를 확인하기 위하여, 이미 알려져 있는(Wright와 Christman, 2003), TNF- $\alpha$ , IL-8 그리고 COX-2와 같은 NF- $\kappa$ B에 종속적인 프로모터에 대해 ELISA을 수행하였다.

#### 3.4.1. Tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ 생성에 미치는 효과

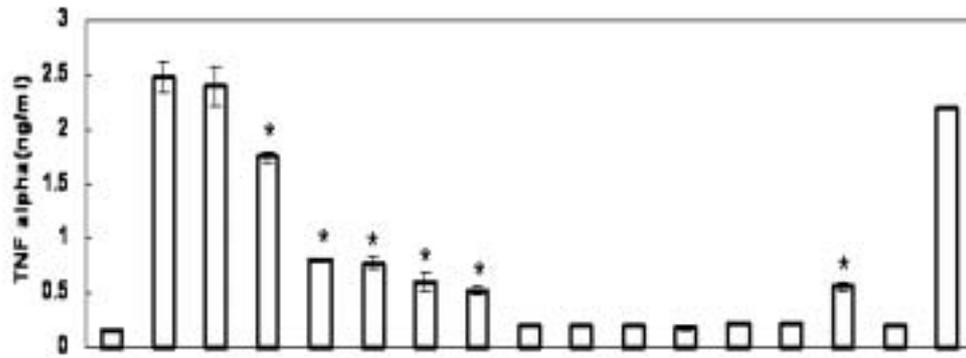
LPS로 자극한 THP-1 세포로부터 pinosylvin을 각각 농도별로 처리한 후, 세포배지 내로 분비되는 TNF- $\alpha$ 의 농도를 ELISA kits(Genzyme, Minneapolis, MN)를 이용하여 측정하였다.

Table 2 및 Fig. 7 에서와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 0.152(ng/ml), LPS를 처리한 대조군에서는 2.470(ng/ml)의 TNF- $\alpha$ 가 생성되었다. LPS를 처리하여 자극한 THP-1 세포에 pinosylvin을 0.001  $\mu$ M에서부터 0.1  $\mu$ M까지 농도별로 처리 한 결과, 0.001  $\mu$ M에서 2.393(ng/ml), 0.1  $\mu$ M에서 0.519(ng/ml)의 TNF- $\alpha$ 가 생성되었다. 이러한 저해 작용은 농도 의존적으로 유의성 있게(\*,  $p < 0.05$ ) 나타났으며, 특히 pinosylvin의 처리 농도가 0.1  $\mu$ M 인 경우, TNF- $\alpha$  생성 억제가 50% 이상 지속되어, pinosylvin의 TNF- $\alpha$  생성을 50% 저해하는 농도인 IC<sub>50</sub>이 0.1  $\mu$ M임을 알 수 있었다. 그리고 이런 결과에 대한 pinosylvin과 용매 50% ethanol의 영향을 확인하기 위한 실험을 수행한 결과, LPS를 처리 하지 않고 pinosylvin 만을 각각 농도별로 처리한 경우, LPS 단독 처리한 대조군과 비교 시, 거의 유사한 수치가 나왔고, pinosylvin을 용해한 용매 50%

ethanol의 경우도 각각의 대조군과 비교 시, 거의 유사한 수치 결과가 나왔다. 이 결과로 pinosylvin의 NF- $\kappa$ B 활성화 억제 효과에 대해 pinosylvin 자체적인 영향이나, 용매인 50% ethanol의 단독적인 영향은 없었음을 확인할 수 있었다. NF- $\kappa$ B의 음성 대조군으로 NF- $\kappa$ B의 저해제인 PDTC를 처리하여 비교한 결과, PDTC가 NF- $\kappa$ B를 억제 시킨 것만큼 pinosylvin이 NF- $\kappa$ B 활성을 억제시켰다.

Table 2. Pinosylvin inhibits LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine, TNF- $\alpha$

| Treatment          | TNF- $\alpha$ (ng/ml) | Treatment      | TNF- $\alpha$ (ng/ml) |
|--------------------|-----------------------|----------------|-----------------------|
| Control            | 0.152 $\pm$ 0.016     |                |                       |
| LPS                | 2.470 $\pm$ 0.143     |                |                       |
| LPS/Pn(1 nM)       | 2.393 $\pm$ 0.185     | Pn(1 nM)       | 0.210 $\pm$ 0.010     |
| LPS/Pn(10 nM)      | 2.144 $\pm$ 0.045     | Pn(10 nM)      | 0.204 $\pm$ 0.011     |
| LPS/Pn(100 nM)     | 1.207 $\pm$ 0.002     | Pn(100 nM)     | 0.211 $\pm$ 0.011     |
| LPS/Pn(1 $\mu$ M)  | 0.770 $\pm$ 0.050     | Pn(1 $\mu$ M)  | 0.177 $\pm$ 0.009     |
| LPS/Pn(5 $\mu$ M)  | 0.606 $\pm$ 0.088     | Pn(5 $\mu$ M)  | 0.228 $\pm$ 0.001     |
| LPS/Pn(10 $\mu$ M) | 0.519 $\pm$ 0.036     | Pn(10 $\mu$ M) | 0.231 $\pm$ 0.011     |
| LPS/PDTC           | 0.570 $\pm$ 0.039     | 50%EtOH        | 2.201 $\pm$ 0.004     |
| PDTC               | 0.202 $\pm$ 0.008     |                |                       |



|                  |     |     |         |        |       |     |     |      |         |        |       |     |     |      |     |     |     |
|------------------|-----|-----|---------|--------|-------|-----|-----|------|---------|--------|-------|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| <b>LPS :</b>     | (-) | (+) | (+)     | (+)    | (+)   | (+) | (+) | (+)  | (-)     | (-)    | (-)   | (-) | (-) | (-)  | (+) | (-) | (+) |
| <b>Pn (μM):</b>  | (-) | (-) | (0.001) | (0.01) | (0.1) | (1) | (5) | (10) | (0.001) | (0.01) | (0.1) | (1) | (5) | (10) | (-) | (-) | (-) |
| <b>PDTC:</b>     | (-) | (-) | (-)     | (-)    | (-)   | (-) | (-) | (-)  | (-)     | (-)    | (-)   | (-) | (-) | (-)  | (+) | (+) | (-) |
| <b>50% EtOH:</b> | (-) | (-) | (-)     | (-)    | (-)   | (-) | (-) | (-)  | (-)     | (-)    | (-)   | (-) | (-) | (-)  | (-) | (-) | (+) |

Fig. 7. Inhibitory effect of pinosylvin on LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine, TNF- $\alpha$ .

THP-1 cells ( $10^6$ ) were incubated with LPS (10 mg/ml), LPS plus pinosylvin, or without LPS for 24 hr, after which the supernatant was assessed for TNF- $\alpha$  by ELISA. Data are presented as means S.E.M. of four independent experiments. All values were significant ( $p < 0.05$ ) compared with values for LPS alone.

Pn : pinosylvin, PDTC : pyrrolidone dithiocarbamate

### 3.4.2. Interleukin-8(IL-8) 생성에 미치는 효과

LPS로 자극한 THP-1 세포로부터 pinosylvin의 농도에 따라 세포배지 내로 분비되는 IL-8의 농도를 ELISA kits(Genzyme, Minneapolis, MN)를 이용하여 측정하였다.

Table 3 및 Fig. 8 에서와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 0.575(ng/ml), LPS를 처리한 대조군에서는 10.229(ng/ml)의 IL-8이 생성되었다. LPS를 처리하여 자극한 THP-1 세포에 pinosylvin을 0.001  $\mu$ M에서 10  $\mu$ M까지 농도별로 처리한 결과, 초기농도에서 11.499(ng/ml), 최종농도에서 3.531(ng/ml)의 IL-8이 생성되었다. 이러한 저해 작용은 농도 의존적으로 유의성 있게(\*,  $p < 0.05$ ) 나타났으며, 특히 pinosylvin의 농도가 0.1  $\mu$ M인 경우, 생성 억제가 50% 이상 지속되어, pinosylvin의 IL-8 생성을 50% 저해하는 농도인 IC<sub>50</sub> 이 0.1  $\mu$ M임을 알 수 있었다. 그리고 이런 결과에 대한 pinosylvin과 용매 50% ethanol의 영향을 확인하기 위한 실험을 수행한 결과, LPS를 처리 하지 않고 pinosylvin 만을 농도별로 처리한 경우, LPS 단독 처리한 대조군과 비교 시, 거의 유사한 수치가 나왔고, pinosylvin을 용해한 용매 50% ethanol의 경우도 각각의 대조군과 비교 시, 거의 유사한 수치 결과가 나왔다. 이 결과로 pinosylvin의 NF- $\kappa$ B 활성화 억제 효과에 대해 pinosylvin 자체적인 영향이나, 용매인 50% ethanol의 단독적인 영향은 없었음을 확인할 수 있었다. NF- $\kappa$ B의 음성 대조군으로 NF- $\kappa$ B의 저해제인 PDTC를 처리 비교한 결과, PDTC가 NF- $\kappa$ B를 억제 시킨 것만큼 pinosylvin이 NF- $\kappa$ B 활성을 억제시켰다.

Table 2 및 Fig. 7 과 Table 3 및 Fig. 8 은 pinosylvin이 LPS에 의해 증가된 TNF- $\alpha$ 와 IL-8 모두의 생성을 감소시켜, 염증반응을 유도하는 cytokine 유전자 발현을 억제하는 것을 볼 수 있어서, 앞선 실험 결과(Fig. 3)와 잘 부합하였다. 그리고 이러한 결과는 pinosylvin이 호염증성

cytokine 생성에 직접 관여하여, NF- $\kappa$ B luciferase assay의 경우처럼, NF- $\kappa$ B의 활성을 억제시키고 있음을 보여주었다(Parrillo 1993; Bone 1994; Young 1995; Mitchell 등, 1999; Janeway 등, 1999; 변 등, 2005).

Table 3. Pinosylvin inhibits LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine, IL-8

| Treatment          | IL-8 (ng/ml)   | Treatment      | IL-8 (ng/ml)   |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| Control            | 0.575 ± 0.016  |                |                |
| LPS                | 10.229 ± 0.462 |                |                |
| LPS/Pn(1 nM)       | 11.499 ± 1.008 | Pn(1 nM)       | 0.539 ± 0.033  |
| LPS/Pn(10 nM)      | 8.042 ± 0.524  | Pn(10 nM)      | 0.541 ± 0.038  |
| LPS/Pn(100 nM)     | 7.185 ± 0.135  | Pn(100 nM)     | 0.565 ± 0.004  |
| LPS/Pn(1 $\mu$ M)  | 4.252 ± 0.292  | Pn(1 $\mu$ M)  | 0.577 ± 0.007  |
| LPS/Pn(5 $\mu$ M)  | 4.075 ± 0.504  | Pn(5 $\mu$ M)  | 0.619 ± 0.015  |
| LPS/Pn(10 $\mu$ M) | 3.531 ± 0.024  | Pn(10 $\mu$ M) | 0.451 ± 0.020  |
| LPS/PDTC           | 5.489 ± 0.049  | 50%EtOH        | 11.653 ± 1.003 |
| PDTC               | 0.513 ± 0.058  |                |                |

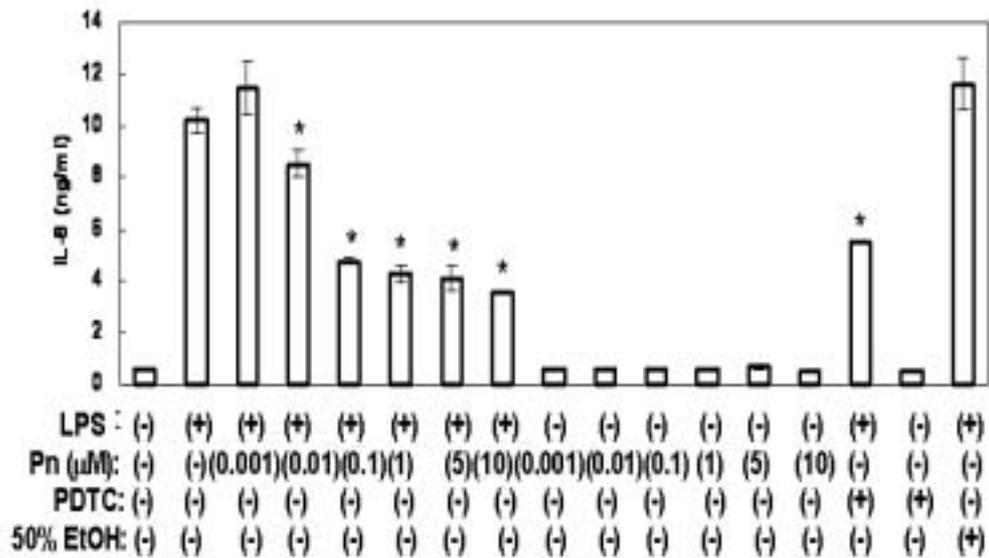


Fig. 8. Inhibitory effect of pinosylvin on LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine, IL-8.

THP-1 cells ( $10^6$ ) were incubated with LPS (10 mg/ml), LPS plus pinosylvin, or without LPS for 24 hr, after which the supernatant was assessed for IL-8 by ELISA. Data are presented as means  $\pm$  S.E.M. of four independent experiments. All values were significant ( $*p < 0.05$ ) compared with values for LPS alone.

Pn : pinosylvin, PDTC : pyrrolidone dithiocarbamate

### 3.5. Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 생성에 대한 효과

Cyclooxygenase-2는 염증성 반응 생성을 유발하는 액성 매개체인 prostaglandin(PG)을 생성하는 효소로서, Smith와 Kobolt(1998)가 염증성 cytokine에 의한 COX-2의 발현 과정에 있어서 NF-κB의 활성화와 연관되어 있음을 보고하였다. 따라서 COX-2 생성에 대한 pinosylvin의 효과로 NF-κB의 활성화 여부를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

LPS로 활성화시킨 THP-1 세포에 pinosylvin을 각각 농도별로 처리한 다음 16시간 후에 세포 배지 표면에 분비된 PGE<sub>2</sub> 수치를 ELISA로 측정하였다.

Table 4 및 Fig. 9 에서와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 0.038(ng/ml), LPS를 처리한 대조군에서는 0.887(ng/ml)의 PGE<sub>2</sub>가 생성되었다. LPS로 활성화시킨 THP-1 세포에 pinosylvin을 0.001 μM에서부터 10 μM까지 농도별로 처리한 결과, 각각 0.845(ng/ml), 0.215(ng/ml)의 PGE<sub>2</sub>가 생성되었다. LPS에 의해 증가된 PGE<sub>2</sub>의 생성이 pinosylvin 처리에 의해 0.001 μM 보다 10 μM에서 약 4배 정도 감소하였고, 이러한 저해 작용이 농도 의존적으로 유의성 있게(\*,  $p < 0.05$ ) 나타났다. 특히 pinosylvin의 농도가 0.1 μM 인 경우, 생성 억제가 50% 이상 지속되어, pinosylvin의 PGE<sub>2</sub> 생성을 50% 저해하는 농도인 IC<sub>50</sub>이 0.1 μM임을 알 수 있었다. 그리고 이런 결과에 대한 pinosylvin과 용매 50% ethanol의 영향을 확인하기 위한 실험을 수행한 결과, LPS를 처리 하지 않고 pinosylvin 만을 각각 농도별로 처리한 경우, LPS 단독 처리한 대조군과 비교 시, 거의 유사한 수치가 나왔고, pinosylvin을 용해한 용매 50% ethanol의 경우도 각각의 대조군과 비교 시, 거의 유사한 수치 결과가 나왔다. 이 결과로 pinosylvin의 NF-κB 활성화 억제 효과에 대해 pinosylvin 자체적인 영향이나, 용매인 50% ethanol의 단독적인 영향은 없었음을 확인할 수 있었다. NF-κB의 음

성 대조군으로 NF- $\kappa$ B의 저해제인 PDTC를 처리 비교한 결과, PDTC가 NF- $\kappa$ B를 억제 시킨 것만큼 pinosylvin이 NF- $\kappa$ B 활성을 억제시켰다. 이러한 결과로부터 pinosylvin이 COX-2의 생성물인 PGE<sub>2</sub> 생성을 저해한다는 것(Smith 와 Kobolt, 1998; 박 등, 2005), 즉 COX-2 유전자 합성에 관여하고 이를 억제한다는 사실을 알 수 있었다.

Table 4. Pinosylvin inhibits LPS-induced PGE<sub>2</sub>

| Treatment          | PGE <sub>2</sub> (ng/ml) | Treatment      | PGE <sub>2</sub> (ng/ml) |
|--------------------|--------------------------|----------------|--------------------------|
| Control            | 0.038 ± 0.002            |                |                          |
| LPS                | 0.887 ± 0.050            |                |                          |
| LPS/Pn(1 nM)       | 0.845 ± 0.019            | Pn(1 nM)       | 0.038 ± 0.001            |
| LPS/Pn(10 nM)      | 0.764 ± 0.030            | Pn(10 nM)      | 0.039 ± 0.001            |
| LPS/Pn(100 nM)     | 0.537 ± 0.001            | Pn(100 nM)     | 0.040 ± 0.010            |
| LPS/Pn(1 $\mu$ M)  | 0.288 ± 0.051            | Pn(1 $\mu$ M)  | 0.050 ± 0.020            |
| LPS/Pn(5 $\mu$ M)  | 0.336 ± 0.002            | Pn(5 $\mu$ M)  | 0.089 ± 0.005            |
| LPS/Pn(10 $\mu$ M) | 0.215 ± 0.021            | Pn(10 $\mu$ M) | 0.080 ± 0.010            |
| LPS/PDTC           | 0.366 ± 0.028            | 50%EtOH        | 0.785 ± 0.049            |
| PDTC               | 0.073 ± 0.000            |                |                          |

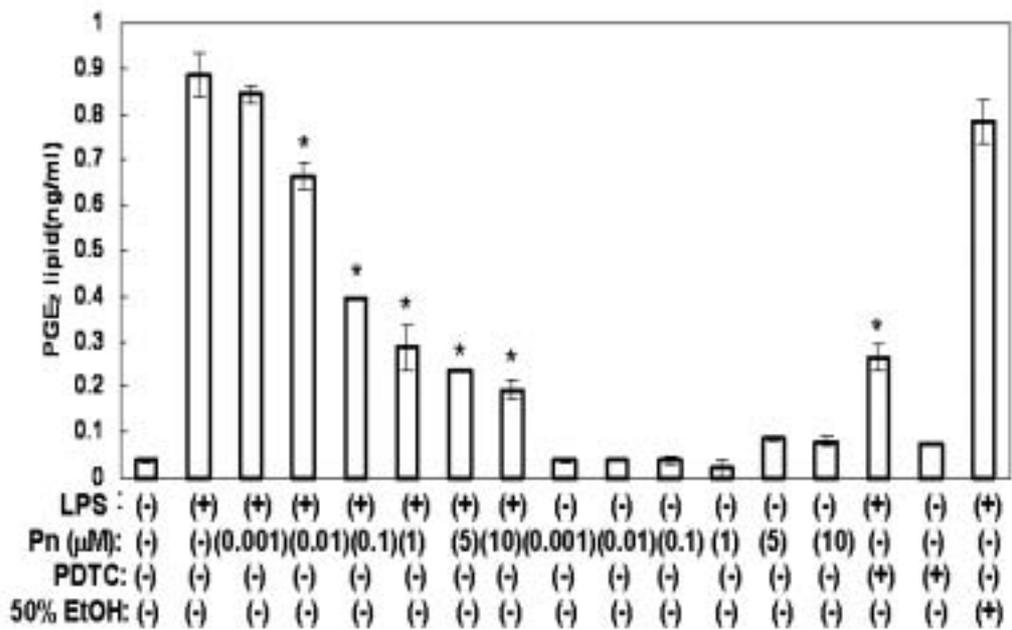


Fig. 9. Inhibitory effect of pinosylvin on LPS-induced PGE<sub>2</sub>.

THP-1 cells were stimulated with LPS (10 mg/ml) for 16 h in the presence or absence of pinosylvin. The PGE<sub>2</sub> lipid concentrations in the culture supernatants were determined by ELISA. Data are expressed as means ± S.E.M. of three independent experiments. All values were significant (\**p*<0.05) compared with values for LPS alone.

Pn : pinosylvin, PDTC : pyrrolidone dithiocarbamate

## IV. 要 約

Nuclear factor-kappa B(NF- $\kappa$ B)는 중요한 유전자 발현 조절 인자로 염증 질환 발병에 관여하는 다양한 cytokine을 가장 효과적으로 조절한다. 염증은 염증유발 cytokine의 독립적인 작용일 수도 있으나, 일반적으로 염증 cytokine의 발현으로 유발되는 생성물질과의 상호작용에 수반되는 반응으로, 이런 cytokine network은 류머티스, 천식과 같은 염증성 질병 경로에서 매우 중요하다. 따라서, NF- $\kappa$ B는 유전자 생성을 포함하는 많은 유전자 발현과 연계되고 있는 cytokine network에 중대한 영향을 미친다. 이러한 사실 때문에 임의적 조절에 의한 염증성 cytokine의 생성을 저해하는 치료 방법으로 효과적이다.

본 연구에서는 소나무 잎(*Pinus densiflora*)의 천연 stilbenoid 성분으로 알려진 pinosylvin의 NF- $\kappa$ B 활성화에 대한 실험을 시도하였다.

그 결과, pinosylvin이 LPS를 처리한 THP-1 세포에서 NF- $\kappa$ B signaling을 저해하여 호염증성 매개물질(pro-inflammatory mediators)생성을 억제한다는 사실을 발견하였다. 또한 LPS로 유도된 THP-1 세포에서 I $\kappa$ B의 인산화와 분해를 억제하여 pinosylvin이 NF- $\kappa$ B의 저해제로서 작용할 수 있음을 보여주었다. 따라서 이런 pinosylvin의 저해 효과를 확인하기 위하여, tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-8(IL-8) 그리고 cyclooxygenase-2(COX-2)와 같은 NF- $\kappa$ B에 종속적인 프로모터에 대해 ELISA 함으로써 효과적으로 저해할 수 있는지를 연구하였다. 결과적으로, pinosylvin은 LPS를 처리하여 유도된 TNF- $\alpha$ 와 IL-8의 생성을 모두 저해하였다. 또한 LPS로 유도된 염증 효소인 COX-2 발현도 억제하였다. 이상의 결과들은 pinosylvin이 NF- $\kappa$ B signaling을 저해함으로써 호염증 매개체

들을 억제한다는 사실을 확인시켜 주었다.

결론적으로, 이 연구에서 pinosylvin이 LPS로 유도된 염증 유발 매개체의 반응을 저해하고, 메카니즘에 근거한 NF- $\kappa$ B signaling 경로의 저해를 통하여 조절될 수 있는 가능성을 보여주었다. 이러한 결과로 pinosylvin이 염증 질환 예방의 치료적인 차원에서 가치가 있음을 제안할 수 있게 되었다.



## V. 參考文獻

Asahara, H., M. Asanuma, N. Ogawa, S. Nishibayashi and H. Inoue, 1995. High DNA-binding activity of transcription factor NF-kappa B in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 37, 827~832.

Auphan, N., J.A. DiDonato, C. Rosette, A. Helmberg and M. Karin, 1995. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, 270, 286~290.

Bone, R.C., 1994. Gram-positive organisms and sepsis, *Arch. Intern. Med.*, 154, 26~34.

변성희, 양재하, 김상찬, 2005. 현삼메탄올 추출물이 LPS로 유도된 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 nitro oxide 생성에 미치는 영향. *대한본초학회지*, 20, 7~16.



Dziarski, R., A.J. Ulmer and D. Gupta, 2000a. Glycomicrobiology(Doyle RJ, ed). Kluwer Academic, NY, pp.145~186.

Dziarski, R., A.J. Ulmer and D. Gupta, 2000b. Interactions of CD14 with components of gram-positive bacteria. *Chem. Immunol.*, 74, 83~107.

Fang, J.G., M. Lu, Z.H. Chen, H.H. Zhu, Y. Li, L. Yang, L.M. Wu and Z.L. Liu, 2002. Antioxidant effects of resveratrol and its analogues against the free-radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. *Chem.*, 28, 4191~4198.

Hong, G.T., R.Y. Lee, M.H. Ylm and N.H. Choung, 2004. Physiological

Functionality and Nitrite Scavenging Ability of Fermentation Extracts from Pine Needles. *J. Food Preserv.*, 11, 94~99.

Holmgren, A., B. Bergstorm, R. Gref and A. Ericsson, 1999. Detection of pinosylvin in solid wood of Scots pine using Fourier transform Raman and infrared spectroscopy. *J. Wood Chem. Technol.*, 19, 139~150.

Hyers, T.M., S.M. Tricomi, P.A. Dettenmeier and A.A. Fowler, 1991. Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 144, 268~271.

Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport and J.D. Capra, 1999. Immunobiology, 4<sup>th</sup> Edition. Current Biology, London, pp.375~390.

Jain, A. and E. Basal, 2003. Inhibition of *Propionibacterium acnes*-induced mediators of inflammation by Indian herbs. *Phytomedicine*, 10, 34~38.



김창민, 1997. 중약대사전, 도서출판 정담, 서울.

이동호, 이승관, 김성욱, 1995. 임상분자생물학, 퍼넴홍, 서울, pp.103~273.

문태철, 정규찬, 손건호, 김현표, 강삼식, 장현욱, 1998. 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색. 약학회지, 42, 214~219.

Mitchell, R.N. and R.S. Cortran, 1999. Robbins Pathologic Basis of Disease, 6<sup>th</sup> Edition. W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp.113~138.

Naofumi, M., O. Shu-ichi, I. Yuji and M. Kouji, 1994. Molecular

mechanism of interleukin-8 gene expression. *J. Leukocyte Biology*, 56, 554~558.

Ohguchi, K., T. Tanaka, T. Kido, K. Baba, M. Inuma, K. Matsumoto, Y. Akao and Y. Nozawa, 2003. Effects of hydroxystilbene derivatives on tyrosinase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307, 861~863.

Pacher, T., C. Seger, D. Engelmeier, S. Vajrodaya, O. Hofer and H. Greger, 2002. Antifungal stilbenoids from stemona collinsae. *J. Nat. Prod.*, 65, 820~827.

Park, E.J., H.Y. Min, Y.H. Ahn, C.M. Bae, J.H. Pyee and S.K Lee, 2004. Synthesis and inhibitory effects of pinosylvin derivatives on prostaglandin E<sub>2</sub> production in lipopolysaccharide-induced mouse macrophage cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 5895~5898.

박희준, 이지숙, 이재동, 김남재, 표지희, 강전모, 최일환, 김수영, 심범상, 이제현, 임사비나, 2005. 계지의 항염 효과에 관한 연구. 대한한의학회지, 26, 140~151.



박상대, 1998. 필수세포생물학, 교보문고, 서울.

Parrillo, J.E., 1993. Pathogenetic mechanisms of septic shock, *N. Engl. J. Med.*, 328, 1471~1477.

Pierce, J.W., M.A. Read, H. Ding, F.W. Luscinskas and T. Collins, 1996. Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J. Immunol.*, 156, 3961~3969.

Schreck, R., K. Albermann and P.A. Baeuerle, 1992. Nuclear factor

kappa B : an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radic. Res. Commun.*, 17, 221~237.

Sen, R. and D. Baltimore, 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 46, 705~716.

Smith, C.J., Y. Zhang and C.M. Kobolt, 1998. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 13313~13318.

Sung, K.C., 2004. Characteristics and Analysis of Natural Pine-Needles Extract. *J. Kor. Oil Chem. Soc.*, 21, 320~326.

Sung, K.C. and K.J. Kim, 2005. Tyrosinase Activated Inhibition Effect & Analysis of Pine-Needles Extract. *J. Kor. Oil Chem. Soc.*, 22, 71~76.

Toshio H., 2002. 사이토카인 분자생물학, 월드사이언스, 서울, pp. 87~102.

유태무, 이숙영, 정수연, 송상매, 류항목, 이은방, 양지선, 1998. 천연물의 항염증작용에 관한 연구. *응용약물학회지*, 6, 269~275.

Wright, J.G. and J.W. Christman, 2003. The role of nuclear factor kappa B in the pathogenesis of pulmonary diseases: implications for therapy. *Am. J. Respir. Med.*, 2, 211~219.

Young, L.S., 1995. Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, NY, pp. 690~705.

## 謝 辭

오랜 시간동안 너무도 많은 분들의 도움과 격려 그리고 믿음이 있었기에 가능했던 논문이었습니다.

먼저, 미흡한 저에게 커다란 가르침을 주신 임상빈 교수님께 마음 속 깊이 감사드립니다. 바쁘신 가운데도 논문심사를 맡아 세심하게 검토, 지도하여 주신 하진환 교수님, 고영환 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 평소 많은 조언과 아낌없는 격려를 해 주신 송대진 교수님, 강영주 교수님, 김수현 교수님께도 감사드립니다.

학위과정 중 많은 도움을 주신 좌미경 선생님, 선희 그리고 대학원 선배님께 고마운 마음을 전합니다.

또한 이 논문을 가능하게 해 주신 박덕훈 사장님과 바이오스펙트럼 식구들에게 잊을 수 없는 감사함을 전합니다.

힘들었던 순간에도 믿고 용기를 북돋아주며 진한 사랑을 느끼게 해 주었던 주연, 손영, 경희, 라영, 정민, 윤선, 은옥, 성란, 지연이와 이 기쁨을 같이 나누고 싶습니다.

오늘이 있기까지 변함없는 사랑으로 지켜 봐 주시며 격려해 주신 아버지, 어머니 그리고 자랑스런 오빠에게 이 논문을 바칩니다.