



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

누리장나무(*Clerodendrum trichotomum*)

잎 추출물의 고요산혈증

개선효과에 관한 연구

제주대학교 대학원

생물학과

김 지 혜

2018년 2월

누리장나무(*Clerodendrum trichotomum*)

잎 추출물의 고요산혈증 개선효과에 관한 연구

지도교수 김 세 재

김 지 혜

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2018년 2월

김지혜의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ ⑩

위 원 _____ ⑩

위 원 _____ ⑩

제주대학교 대학원

2018년 2월



**Study on the Antihyperuricemic Actions of
Clerodendrum trichotomum Leaf Extract in Potassium
Oxonate-Induced Mice**

Ji-Hye Kim

(Supervised by professor Se-Jae Kim)

**A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of Master of Science**

2018. 2.

This thesis has been examined and approved.

.....

Chairperson of the Committee

.....

.....

.....

**Department of Biology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

ABSTRACT

Experimental and clinical studies indicate that uric acid is associated with several risk factors of chronic kidney disease including diabetes, hypertension, oxidative stress, inflammation, and hyperuricemia. *Clerodendrum trichotomum* leaves and stems have been used in folk medicine for their anti-hypertension, arthritis, rheumatism, and anti-inflammatory properties. This study was performed to explore the potential of *C. trichotomum* leaves as an anti-hyperuricemic agent. The hot water extract of *C. trichotomum* leaves (HW) showed higher antioxidant activities and total polyphenol contents comparing with its ethanol extract. Then, we investigated whether HW have the anti-inflammatory and cytoprotective effects in *in vitro* and *in vivo* hyperuricemia models. When RAW 264.7 cells were treated with lipopolysaccharide (LPS) and soluble uric acid, HW suppressed nitric oxide (NO) production and the expression of iNOS (inducible nitric oxide synthase) and COX-2 (cyclooxygenase-2), and it increased the expression of HO-1 (heme oxygenase-1). In uric acid treated HK-2 cells, HW decreased the expression of Bax (Bcl-2-associated X), PARP-1 [poly (ADP-ribose) polymerase-1] and cleaved caspase-3, while it increased Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) protein. In potassium oxonate (PO)-induced mice, HW decreased the levels of serum uric acid, serum creatinine and blood urea nitrogen (BUN), but it increased urine uric acid and urine creatinine. Furthermore, HW decreased the expression of iNOS, COX-2, tumor necrosis factor- α (TNF- α), Bax, cleaved caspase-3 and PARP-1 and it increased the expression of Bcl-2 protein in PO-induced mice kidney. Immunohistochemical analysis showed that HW decreased the TNF- α expression in PO-induced mice liver. In addition, RNA sequencing analysis using liver tissues showed that HW restored the expression profiles of genes implicated in inflammatory and cytoprotective pathways. Taken together, these results suggest that HW have a potential for prevention and treatment of hyperuricemia by exerting anti-inflammatory and cytoprotective effects.

Key Word: Uric acid, *Clerodendrum trichotomum*, Anti-inflammation, Cytopropective effect, antihyperuricemic

목 차

ABSTRACT	I
목 차.....	II
LIST OF TABLE	IV
LIST OF FIGURES	V
LIST OF ABBREVIATIONS.....	VI
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 추출물 제조	3
2. 총 폴리페놀 함량 분석	3
3. 항산화 활성 분석.....	4
4. 세포 배양.....	5
5. 세포독성.....	5
6. NO (nitric oxide) 생성 억제 활성.....	6
7. Western blot.....	7
8. 급성 고요산혈증 모델 제작 및 약물처리	8
9. 생화학적 분석	9
10. Immunohistochemistry.....	9
11. RNA sequencing	10
12. 통계처리.....	11

III. 결	과	12
1.	누리장나무 잎 추출물의 항산화 활성	12
2.	HK-2 세포에서 HW 추출물의 세포 보호 효과	14
3.	RAW 264.7 세포에서 HW 추출물의 항염증 활성	17
4.	PO 로 유도된 고요산혈증 생쥐모델에서 HW 추출물의 고요산혈증 개선효과	20
5.	PO 유도된 생쥐 신장에서 HW 추출물의 세포보호 및 항염증 효과	23
6.	PO 유도된 생쥐 간 조직에서 HW 추출물의 TNF- α 발현에 미치는 영향	26
7.	PO 유도된 생쥐 간 조직에서 HW 추출물의 전사체 발현에 미치는 영향	28
IV. 고	찰	32
V. 인	용 문 헌	37
VI. 요	약	45

LIST OF TABLE

Table 1. Total polyphenol contents and antioxidant activities of *Clerodendrum trichotomum* leaf extract.....13

LIST OF FIGURES

Figure 1. Effects of HW extract on cell viability in uric acid-treated HK-2 cells	15
Figure 2. Effects of HW extract on expression of apoptosis-related protein in uric acid treated HK-2 cells.....	16
Figure 3. Effects of HW extract on cell viability and nitric oxide (NO) production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells with uric acid	18
Figure 4. Effects of HW extract on the expression of iNOS, COX-2 and HO-1 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells with uric acid.....	19
Figure 5. Effects of HW extract on serum uric acid, urine uric acid, serum creatinine, urine uric acid and serum BUN leves in PO-induced hyperuricemia mice.....	22
Figure 6. Effect of HW extract on apoptosis-related protein expression in the renal tissue of hyperuricemia mice	24
Figure 7. Effect of HW extract on inflammation-related protein expression in the renal tissue in hyperurcemia mice using western blot analysis.....	25
Figure 8. Immunohistochemical staining of TNF- α expression in the liver.....	27
Figure 9-11. Pie chart of the enriched biological processes and the percentage of gene counts within each GO category (N, HW, Allo verse PO)	29-31

LIST OF ABBREVIATIONS

LPS	lipopolysaccharide
PO	Potassium oxonate
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
PARP-1	Poly (ADP-ribose) polymerase-1
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
HO-1	Heme oxygenase-1
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
BUN	Blood urea nitrogen
DEGs	Differentially expressed genes
GO	Gene ontology

I. 서 론

요산(uric acid)은 퓨린의 마지막 대사산물로서 xanthine oxidase에 의한 산화반응으로 생성된다. 대부분의 포유류에서 요산은 uricase에 의해 allantoin으로 분해된다. 하지만 사람의 체내에는 요산을 allantoin으로 분해시키는 uricase가 없기 때문에 항상성을 유지하기 위해서 요산은 장과 신장을 통해 배설된다. 총 배설되는 요산의 30%는 장을 통해 이루어지며, 나머지 70%는 신장을 통해 배설된다. 신기능이 저하됨에 따라 사구체 여과율(glomerular filtration rate, GFR)이 감소하게 되면 요산의 clearance가 감소하게 되며 이로 인해 혈중의 요산 농도가 증가하게 된다(Kanellis *et al.*, 2004; Fauci *et al.*, 2008). 요산은 신장 세포에서의 산화적 스트레스를 발생시키며, anti-apoptotic 단백질과 pro-apoptotic 단백질의 불균형을 유도하여 apoptosis를 촉진하고, 염증, 내피 기능 이상(endothelial dysfunction)을 일으킨다고 알려져 있다(Lobo *et al.*, 2011; Quan *et al.*, 2011; Verzola *et al.*, 2014). 혈중 요산 농도가 6.8 mg/dL 이상 넘으면 이를 고요산혈증(hyperuricemia)이라고 한다(Grassi *et al.*, 2013). 혈중 요산 농도의 지속적인 증가는 관절, 연골 등의 monosodium urate의 축적을 일으키며, monosodium urate는 urate 분자에 sodium과 한 개의 물 분자가 결합된 분자 형태로 통풍성 관절염에서 주로 관찰된다(Martillo *et al.*, 2014; Ruoff *et al.*, 2016). 또한 고요산혈증은 TNF- α (tumor necrosis factor- α)의 발현(Johnson *et al.*, 2005)과 신장에서 MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)과 같은 chemokine의 발현, 그리고 혈관에서 COX-2 (cyclooxygenase-2)의 발현을 유도한다(Roncal *et al.*, 2007;

Kang *et al.*, 2002). 고요산혈증 치료제로 가장 흔히 사용되는 allopurinol은 xanthine oxidase 억제제로 요산 생성을 억제한다. 그러나 allopurinol의 부작용은 흔치 않지만, allopurinol 과민성 증후군(allopurinol hypersensitivity syndrome; AHS)과 같은 부작용은 신기능 장애가 있는 환자에서 보고되고 있다(Becker *et al.*, 2005; Hande *et al.*, 1984; Stavric *et al.*, 1975). 따라서 보다 안전하고 효과적인 치료제로서 천연물 소재의 의약 대체품들이 주목 받고 있다. 최근들어 flavonoids와 phenolic compounds, alkaloids, essential oils 등과 같은 식물 유래 항산화제들이 고요산혈증 치료제로서 이용 가능성이 보고되고 있다(Gliozzi *et al.*, 2016; Ling and Bochu, 2014).

누리장나무(*Clerodendrum trichotomum*)는 마편초과(Verbenaceae)에 속하는 낙엽 관목으로 한국, 일본, 중국, 필리핀 북부 등에 널리 분포되어 있다(Inchi *et al.*, 1996; Lee CB, 1973). 누리장나무의 어린 가지와 잎은 취오동(臭梧桐)이라는 한약재로 불려왔으며, 풍습에 의한 반신불수, 고혈압, 편두통, 말라리아, 이질 등을 치료하는데 이용되어왔다(康 외, 1991; 辛民教, 1996). 또한 누리장나무는 항산화, 항염, 항암, 항균 작용 외에도 고지혈증 같은 대사질환 억제 효과 등 다양한 생리활성들을 가진다고 보고되었다(Neeta and Tejas, 2007).

본 연구는 누리장나무 추출물이 고요산혈증 개선/치료 소재로서 활용가능성을 탐색하기 위하여 수행되었다. 우선 고요산혈증의 *in vitro* 모델로서 요산을 처리한 HK-2 세포에서 세포 보호 효과, 그리고 요산과 LPS (lipopolysaccharide)를 공동 처리한 RAW 264.7 세포에서 항염증 활성을 조사하였다. 동물모델로는 uricase의 억제제인 potassium oxonate (PO)으로 고요산혈증을 유도한 생쥐에서 누리장나무 추출물의 고요산혈증 개선 효과를 조사하였다. 또한 간 조직을 이용한 RNA-sequencing 분석을 통해 누리장나무 추출물이 전사체 발현에 미치는 영향을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 추출물 제조

본 연구에 사용된 누리장나무는 제주도 북부지역에서 2016년 7월에 채집하였다. 채집한 누리장나무 잎을 세척하고 60℃에서 24시간 건조시킨 뒤, 분쇄하여 분말시료를 획득 하였다. 열수 추출물(HW)을 얻기 위해 분말시료 100 g에 증류수 1 L를 가하여 4시간 동안 열수 추출하였다. 에탄올(EtOH) 추출물은 시료 100 g에 70% EtOH 1 L를 가하고 24시간 동안 추출하였다. 각 추출물은 여과한 후 회전농축기(Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland)로 농축하고 동결건조하였다. 시료는 실험에 사용하기 전까지 -20℃에 보관하였다.

2. 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법을 일부 변형하여 분석하였다. 각 추출물을 1 mg/mL로 희석하였으며, 각 시료에 10% Folin (Sigma, Missouri, USA) 시약과 2 M Na₂CO₃ 시약을 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 750 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 tannic acid (Sigma, Missouri, USA)를 표준물질로 사용하여 작성한 표준검정곡선을 이용하여 산출하였다(Folin and Denis, 1915).

3. 항산화 활성 분석

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma, Missouri, USA) 소거 활성은 Blois 방법(Blois MS, 1958)에 따라 측정하였다. 먼저 96 well plate에 메탄올에 희석시킨 시료를 여러 가지 농도로 100 μ L씩 분주하고 0.4 mM DPPH 용액을 100 μ L 첨가 하여 차광상태로 10분간 방치 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였고 DPPH 소거 활성은 다음 식으로 산출하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = 100 \times \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}}$$

여기서 A_{control} 은 메탄올만 첨가한 혼합액의 흡광도를 의미하며, A_{sample} 은 시료를 첨가한 반응액의 흡광도를 나타낸다.

2,2'-Azino-bis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS; Sigma, Missouri, USA) radical 소거 활성은 7 mM ABTS와 2.45 mM ammonium persulphate를 동량 혼합하여 24시간 방치 하여 사용하였다. 그 후 에탄올에 여러 가지 농도로 희석 시료를 100 μ L 분주하고 ABTS 용액을 동량 첨가하여 어두운 곳에서 10분간 반응시킨 후 745 nm에서 흡광도를 측정하였고, ABTS 소거 활성은 다음 식으로 산출하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = 100 \times \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}}$$

여기서 A_{control} 은 에탄올만 첨가한 혼합액의 흡광도를 의미하며, A_{sample} 은 시료를 첨가한 반응액의 흡광도를 나타낸다.

4. 세포 배양

사람의 근위 세뇨관 세포인 HK-2 세포와 mouse 대식세포인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank) 으로부터 구입하였다. HK-2 세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Massachusetts, USA)과 1% penicillin/streptomycin (P/S; Gibco, Massachusetts, USA)이 포함된 Rosewell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640; Gibco, Massachusetts, USA) 배지를 이용하여 37 °C, 5% CO₂ 상태에서 배양하였다. RAW 264.7 세포는 10% FBS와 1% P/S이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, Massachusetts, USA) 배지를 이용하여 37 °C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다.

5. 세포독성

세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Amresco, Ohio, USA) 방법을 이용하여 측정하였다(Ferrari *et al.*, 1990). HK-2 세포에 처리될 요산의 적절농도를 결정하기 위해 6 well plate에 2×10^5 cells/mL로 분주하고 요산을 농도 별로 처리 후 48 시간 배양한 후 세포 생존율을 측정하였다. 요산을 처리한 HK-2 세포에서 HW 추출물의 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 6 well plate에 2×10^5 cells/mL로 분주하고 시료를

농도 별로 (50, 100, 200 µg/mL) 처리 하고, 1시간 후에 20 mg/dL의 요산 (in 1 M NaOH)을 처리하여 48시간 배양하였다. 그 후 0.5 mg/mL MTT용액을 첨가하여 1시간 배양 후 배지를 제거한 뒤 200 µL의 dimethyl sulfoxide (DMSO; Biosesang, Gyeonggi-do, KOREA)를 가하여 formazan 침전물을 용해 하여 microplate reader (Bio Tek, Vermont, USA)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리한 군의 세포 생존율은 시료를 처리하지 않은 군의 흡광도를 비교하여 평가하였다. 시료는 3-4회 반복 실험 후 아래 식에 의해 산출된 세포 생존율 값의 평균으로 나타내었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}}$$

여기서 A_{control} 은 시료를 처리하지 않은 세포의 흡광도를 의미하며, A_{sample} 은 시료를 처리한 세포의 흡광도를 나타내었다.

RAW 264.7 세포는 6 well plate에 3×10^5 cells/well로 분주하고 시료를 농도 별 (100, 200 µg/mL)로 처리 후, 1시간 후에 100 ng/mL의 LPS와 20 mg/dL의 요산 (in 1 M NaOH)을 공동 처리하여 24시간 배양 한 후 상기한 방법으로 세포 생존율을 측정하였다.

6. NO (nitric oxide) 생성 억제 활성

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 3×10^5 cells/well로 분주하고 시료를 농도 별(100, 200 µg/mL)로 처리 한 다음, 1시간 후에 100 ng/mL의 LPS와 20 mg/dL의 요산 (in 1 M NaOH)을 co-treatment 하여 24시간 배양하였다. NO 생성 억제

활성은 세포배양 상층액 100 μ L와 Griess 시약 (1% sulfanilamide and 0.1% naphthylethylene di-amine dihydrochloride in 5% phosphoric acid) 100 μ L를 혼합하여 어두운 곳에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다 (Griess P, 1879).

7. Western blot

단백질 분리하기 위해 배양이 끝난 세포를 차가운 PBS 를 이용해 2 회 세척 후 lysis buffer [1 \times RIPA (Millipore, Massachusetts, USA), 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride; Sigma, Missouri, USA), 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 μ g/mL aprotinin (Amresco, Ohio, USA), 1 μ g/mL perstatin (Amresco, Ohio, USA), and 1 μ g/mL leupeptin (Amresco, Ohio, USA)]를 이용해 30 분 동안 lysis 시킨 후 13,000 rpm 으로 20 분간 원심분리 하였다. 단백질 농도는 BSA (bovin serum albumin)를 표준으로 Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad, California, USA)를 이용하여 정량 하였다. 단백질은 10-12%의 SDS-polyacrylamide gel 을 이용하여 전기영동 후 PVDF (poly-vinylidene difluoride) membrane (Millipore, Massachusetts, USA)에 200 mA, 120 분 동안 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane 을 5% BSA (Bovogen, Keilor East, Australia)로 상온에서 1 시간 blocking 시킨 후, 1 차 항체와 반응시켰다. 1 차 항체 반응은 Bax antibody (1:5,000, Santa cruz, California, USA), Bcl-2 antibody (1:5,000, Santa cruz, California, USA), caspase-3 (1:10,000, Santa cruz, California, USA), cleaved caspase-3 (1:5,000, Cell Signaling, Massachusetts, USA), PARP-1 (1:10,000, Santa cruz, California, USA), iNOS antibody (1:10,000, Santa cruz, California, USA), COX-2 antibody (1:10,000, BD biosciences, New jersey, USA), heme oxygenase (HO)-1 (1:10,000, Santa cruz, California, USA), TNF- α (1:5,000, abcam,

Cambridge, UK)를 이용하여 4℃에서 24 시간 반응시켰다. 1 차 항체 반응이 끝난 membrane 은 0.05% TBS/T 용액으로 5 회 세척 후 peroxidase-conjugate 된 anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG (Vector laboratories, California, USA) 혹은 anti-goat IgG (Santa cruz, California, USA)를 1:10,000 으로 희석하여 상온에서 2 시간 반응 뒤 0.05% TBS/T (0.05% Tris-buffered saline/0.05% Tween 20)용액으로 5 회 세척하였다. 단백질을 Westar ETA C (Cyanagen, Bologna, Italia)를 이용해 X-ray 필름으로 검출하였다.

8. 급성 고요산혈증 모델 제작 및 약물처리

5주령 수컷 ICR mice (30 ± 2 g)는 (주)오리엔트바이오에서 구입하였고, 제주대학교 동물연구윤리위원회의 승인(승인번호: 2016-0043)을 받은 후 실험을 진행하였다. 동물사육은 사료 및 음용수를 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육실의 항온($23 \pm 2^\circ\text{C}$), 항습($60 \pm 5\%$) 조건을 유지하였으며, 조명의 주기는 12시간 간격으로 일정하게 수행하였다. 실험 동물군은 정상군(N, normal), 고요산혈증 대조군(PO, potassium oxonate), 누리장나무 HW 추출물 처리군(HW), 양성대조군인 allopurinol 투여군(Allo, Allopurinol)으로 각 그룹당 5 마리씩 4 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. 급성 고요산혈증을 유도하기 위해 요산분해효소 억제제인 potassium oxonate (250 mg/kg)를 매일 1회 복강 내 투여하였다(Yi *et al.*, 2012). 복강 투여 1시간 후 PO군은 생리식염수 50 mg/kg, HW군은 누리장 나무 열수 추출물 400 mg/kg, allopurinol군은 allopurinol 5 mg/kg 농도로 처리하였으며, 7일간 매일 1회 경구 투여하였다.

9. 생화학적 분석

Urine sample은 실험 개시 6일 후 대사 케이지를 이용하여 24시간 동안 채취하여 원심 분리한 뒤 상층액을 분석에 이용하였다. 혈액은 약물투여 후 7일째에 ethyl ether로 마취 후 심장천자(cardiac puncture)법을 통해 얻어 15,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 후 혈청을 얻어 deep freezer에 보관 후 사용하였다. 혈액과 뇨에서의 creatinine과 요산, 혈액의 blood urea nitrogen (BUN)은 각각 uric acid kit (Abnova, Taipei city, Taiwan), creatinine assay kit (Bio Assay Systems, California, USA), BUN assay kit (Asan pharm, Gyeonggi-do, Korea)를 이용하여 각각 kit의 manufacturers instruction에 따라 측정하였다.

10. 면역조직화학염색

간 조직의 면역조직화학적 분석은 간 조직을 4% paraformaldehyde (Biosesang, Gyeonggi-do, Korea)로 고정하여 흐르는 물에 수세한 다음, 에탄올로 탈수, xylene (Junsei, Tokyo, Japan)으로 투명, 파라핀 침투과정을 거쳐 포매하고 microtome을 이용하여 5 μ m 두께의 박절편을 제작하여 coating slide (LumiNano, California, USA)에 부착하였다. 탈파라핀 과정은 xylene으로 5분간 3회 세척 후 흡수과정으로 100%, 90%, 85%, 80%, 70% 에탄올에 3분간 흡수 후, 흐르는 물에 5분간 수세 뒤 증류수로 5분간 3회 세척하여 수행하였다. 항원성을 유지하기 위하여 heat-induced epitope retrieval 기법(0.01 M sodium citrate buffer; pH 6.0)을 적용하여 20분간 반응시켰다. 그 후 내인성 과산화효소 활성을 억제하기 위해

0.3% H₂O₂를 함유한 증류수에 상온에서 20분간 반응 후 증류수로 1회 세척 후 phosphate-buffered saline/0.1% Tween 20 (0.1% PBS/T)를 이용하여 5분간 2회 세척하였다. 이 후 비특이적 반응을 억제하기 위해 5% normal goat serum을 45분간 처리 후, antibody diluent reagent solution (Thermo fisher scientific, California, USA)에 희석한 TNF- α (1:500)를 사용하여 4℃에서 24시간 동안 반응시킨 뒤 PBS-T를 이용하여 5분간 3회 세척하였다. 이 후 vectastain ABC Kit (Vector laboratories, California, USA)의 biotinylated goat-anti-rabbit IgG를 이용하여 45분간 반응 뒤 0.1% PBS/T를 이용하여 5분간 3회 세척 하였으며 Avidin-Biotin complex (ABC) reagent를 이용하여 30분간 반응 시킨 후 0.1% PBS/T를 이용하여 5분간 3회 세척 하였다. 이 후 peroxidase substrate kit (Vector laboratories, California, USA)를 이용하여 DAB + H₂O₂ substrate를 1분간 처리하였다. Hematoxylin으로 대조 염색 후 탈수 과정을 거쳐 슬라이드 글라스를 봉입한 후 광학현미경으로 관찰 하였다.

11. RNA sequencing

실험동물로부터 간 조직을 적출 한 뒤, 액체 질소에 넣고 얼려 -70℃에서 보관하였으며, Trizol (Takara, Shiga, Japan) 용액을 이용하여 RNA를 분리하였다. RNA quality는 6000 Nano Chip (Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands)에 반응시킨 뒤, Agilent 2100 Bioanalyzer을 이용하여 측정하였다. RNA는 ND-2000 spectrophotometer (Thermo, Delaware, USA)을 이용하여 정량 하였다. RNA QC (RNA quality control)을 pass한 샘플에 대하여 QuantSeq 3' mRNA-Seq library prep kit (Lexogen, Vienna, Austria)의 manufacturers instruction에

따라 library 제작을 하였고 NextSeq 500 Sequencer (Illumina, California, USA)를 이용하여 sequencing을 진행하였다. QuantSeq 3' mRNA-Seq read는 Bowtie2를 이용하여 alignment하였다(Langmead and Salzberg, 2012). Alignment file은 transcript의 alignment와 Transcript abundance 평가, differential expression of genes (DEGs)를 detecting 하는데 사용되었다. DEGs는 Bedtools를 이용하여 unique alignment와 multiple alignment에 근거하여 분석하였다(Quinlan and Hall, 2010). Read Count (RT) data는 Quantile-Quantile normalization과 Bioconductor 방법을 이용하여 진행하였다(Gentleman *et al.*, 2004). Gene classification은 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 웹사이트에서 분석을 실시하였다.

12. 통계처리

모든 실험 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었고, 통계학적 분석은 student's t-test로 검정을 하여 $P < 0.05$ 일 때 유의성 있는 값으로 판단하였다. 그래프 작성과 통계 처리는 SigmaPlot 12.0 (Systat Software, California, USA) 프로그램을 사용하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 누리장나무 잎 추출물의 항산화 활성

유리기(free radical)는 체내에서 산화적 스트레스를 일으켜 각종 질병을 일으킨다고 알려져 있다. 따라서 누리장나무 잎의 HW 추출물과 70% EtOH 추출물의 유리기 저해 활성을 확인하기 위해 DPPH, ABTS radical 소거 활성을 측정하였다(Table 1). 그 결과 DPPH radical 소거 활성은 HW 추출물($IC_{50} = 56.37 \pm 0.71 \mu\text{g/mL}$)이 70% EtOH 추출물($IC_{50} = 176.42 \pm 2.22 \mu\text{g/mL}$)보다 높았다. ABTS radical 소거 활성 또한 HW 추출물($IC_{50} = 58.93 \pm 13.31 \mu\text{g/mL}$)에서 70% EtOH 추출물($IC_{50} = 155.94 \pm 35.27 \mu\text{g/mL}$)에 비해 높은 소거 활성을 나타내었다. 유리기 소거활성과 폴리페놀 함량과의 관련성을 확인하기 위하여 HW 추출물과 70% EtOH 추출물의 총 폴리페놀 함량은 tannic acid을 표준용액으로 하여 검량선 작성 후 정량 분석하였다. 총 폴리페놀 함량도 radical 소거 활성과 같이 HW 추출물($74.01 \pm 6.02 \mu\text{g/mg}$)이 70% EtOH 추출물($42.60 \pm 2.25 \mu\text{g/mg}$)보다 높은 값을 나타내었다(Table 1). 항산화 활성 및 총 폴리페놀 함량 측정 결과를 바탕으로 HW 추출물을 이용하여 후속 실험들을 진행하였다.

Table 1. Total polyphenol contents and antioxidant activities of *Clerodendrum trichotomum* leaf extracts.

Sample	Total polyphenol content ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
		DPPH radical Scavenging activity	ABTS radical scavenging activity
HW	74.01 ± 6.02	56.37 ± 0.71	58.93 ± 13.31
EtOH	42.60 ± 2.25	176.42 ± 2.22	155.94 ± 35.27
Ascorbic acid	N/A	10.12 ± 0.33	9.66 ± 3.51

Each value is mean \pm SE ($n = 3$). IC_{50} values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments. HW, hot water extract; 70% EtOH, 70% ethanol extract; N/A, not assayed.

2. HK-2 세포에서 HW 추출물의 세포 보호 효과

고요산혈증의 *in vitro* 모델로 요산을 처리한 HK-2 세포에서 HW 추출물의 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT assay 방법으로 분석하였다. 우선 HK-2 세포에 처리될 요산의 적절 처리 농도를 결정하기 위해 HK-2 세포에 요산을 10, 15, 20, 40 mg/dL로 처리하여 48시간 배양하였다. 처리한 모든 농도에서 세포 생존율이 유의하게 감소하였으며(Figure 1A), 20, 40 mg/dL 농도에서 생존율은 각각 $85.62 \pm 3.03\%$ 와 $64.70 \pm 1.79\%$ 였다. 따라서 후속 실험에서 요산의 적절 처리 농도는 20 mg/dL로 결정하여 수행하였다.

HK-2 세포에서 HW 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 HW 추출물을 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 1시간 전 처리 후 20 mg/dL의 요산을 처리하여 48시간 배양한 후 세포 생존율을 측정하였다. HW 추출물은 요산에 의해 감소된 세포 생존율($85.20 \pm 2.02\%$)을 농도-의존적으로 증가시켰다(Figure 1B). HW 추출물 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서 생존율이 각각 95.37 ± 5.79 , 104.31 ± 3.86 , $105.30 \pm 3.66\%$ 로 유의성 있게 증가하였다. 따라서 요산을 처리한 HK-2 세포에서 HW 추출물이 apoptosis 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 western blot 기법으로 분석하였다. 그 결과 HW 추출물은 요산에 의해 감소된 Bcl-2 단백질의 발현을 유의적으로 증가 시켰고, 요산에 의해 증가된 Bax, PARP-1, cleaved caspase-3의 단백질의 발현을 유의적으로 감소시켰다(Figure 2).

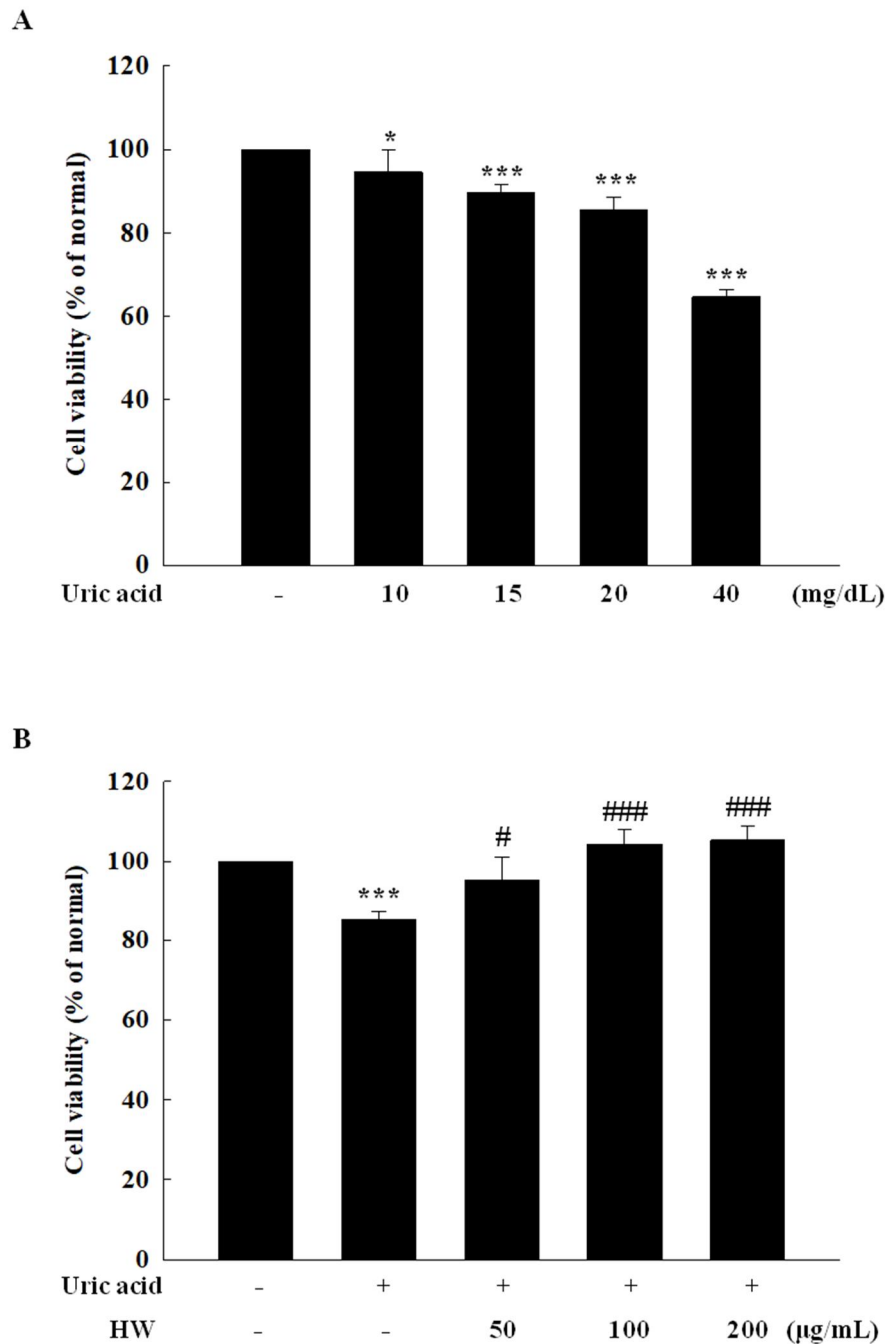


Figure 1. Effects of HW extract on cell viability in uric acid-treated HK-2 cells. Cell viability was measured by MTT assay. (A) HK-2 cells were treated with 10, 15, 20 and 40 mg/dL uric acid for 48 h. (B) HK-2 cells were pretreated with 50, 100 and 200 µg/mL of HW extract for 1 h, and then the cell were treated with uric acid (20 mg/dL) for 48 h. Each value is expressed as mean \pm SE ($n = 3$). * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$, compared to non-treated group. # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ compared to uric acid treated group.

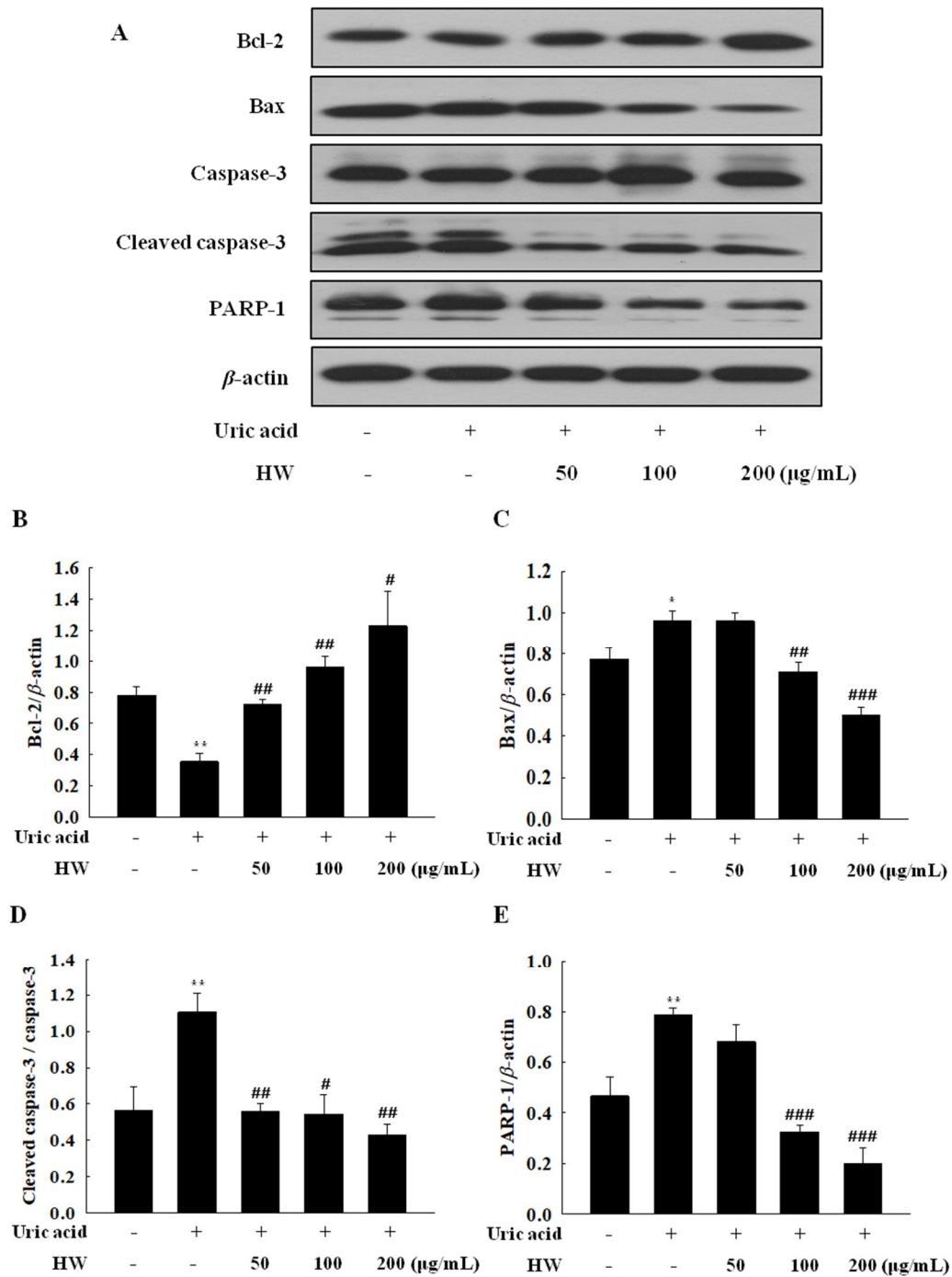


Figure 2. Effects of HW extract on expression of apoptosis-related protein in uric acid treated HK-2 cells. HK-2 cells were treated with the 50, 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$ of HW extract for 1 h, and then the cell were treated with uric acid (20 mg/dL) for 48 h. The relative protein levels were determined by densitometry. (A) Western blot, (B) Bcl-2, (C) Bax, (D) Cleaved caspase-3 and (E) PARP-1. Data shown are presented as the mean \pm SE ($n = 3$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to non-treated group. # $P < 0.01$, ### $P < 0.05$ and #### $P < 0.001$ compared to uric acid treated group.

3. RAW 264.7 세포에서 HW 추출물의 항염증 활성

고요산혈증이 지속되면 요산의 결정이 관절에 침착 되어 관절에 염증반응을 촉발한다고 알려져 있다. 따라서 고요산혈증의 *in vitro* 모델로 요산과 LPS를 공동 처리한 RAW 264.7 세포에서 HW 추출물의 항염증 활성을 조사하였다. RAW 264.7 세포에 HW 추출물 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 을 1시간 동안 전 처리 후 요산 (20 mg/dL)과 LPS (100 ng/mL)를 처리하여 NO 생성과 MTT assay 방법으로 세포 생존율을 조사 하였다(Figure 3). 세포 생존율 측정된 결과 요산 처리군($71.78 \pm 7.33\%$)과 공동 처리군($66.64 \pm 3.2\%$)에서 세포 생존율이 감소하였지만, HW 추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리군($72.59 \pm 2.15\%$)에서는 세포 생존율이 유의적으로 증가하였다(Figure 3A). 그리고 LPS 처리군($18.46 \pm 0.44 \mu\text{M}$)과 공동 처리군($18.33 \pm 0.21 \mu\text{M}$)에서 NO 생성이 유의적으로 증가하였지만, HW 추출물 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리군($15.25 \pm 0.42, 12.05 \pm 0.81 \mu\text{M}$)에서 NO 생성이 농도 의존적으로 감소하였다(Figure 3B).

요산과 LPS를 공동 처리한 RAW 264.7 세포에서 HW 추출물이 iNOS, COX-2, HO-1 단백질의 발현에 미치는 영향을 western blot으로 확인하였다. 공동 처리군은 LPS 단독 처리군에 비해 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 유의적으로 증가하였지만, HW 추출물은 공동 처리에 의해 증가된 iNOS, COX-2 단백질의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. 그리고 LPS 처리군과 공동 처리군에서 HO-1 단백질 발현이 증가하였으며 HW 추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서 공동 처리에 의해 증가된 HO-1 단백질 발현 유의하게 증가시켰다.

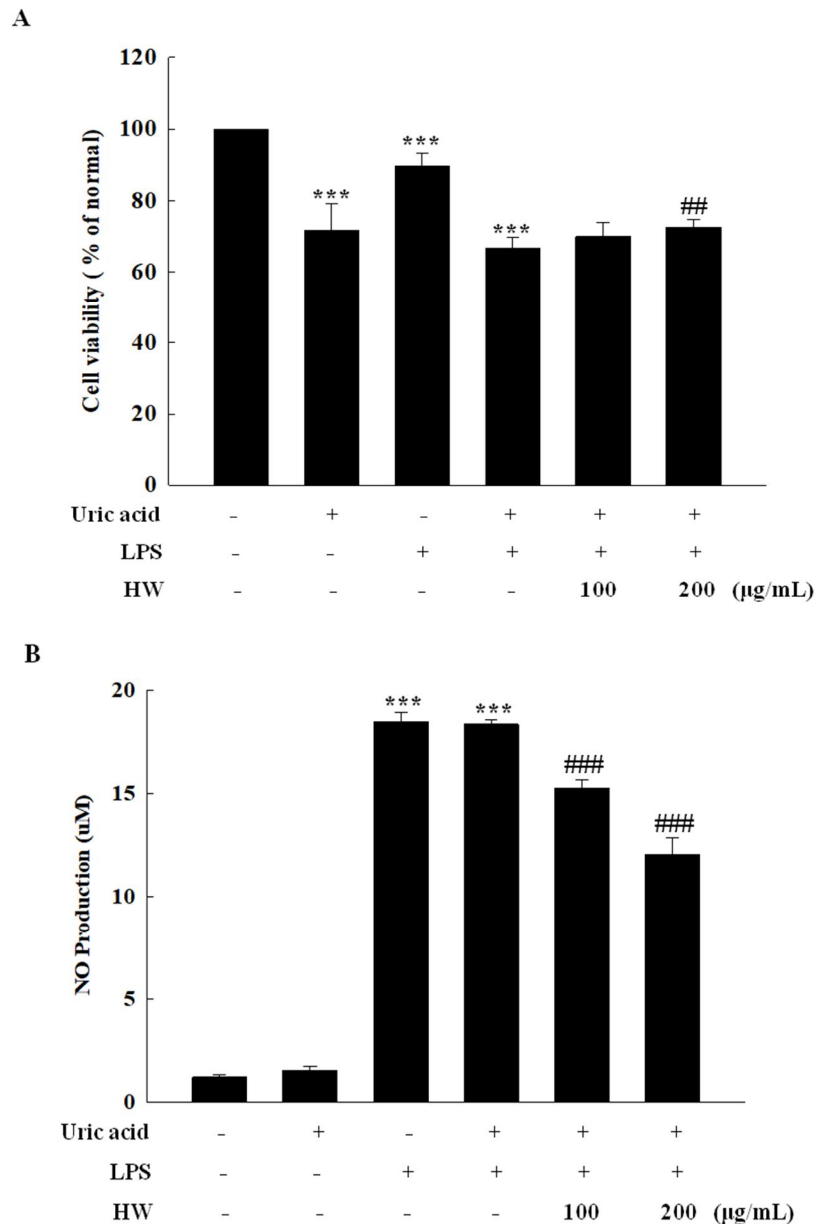


Figure 3. Effect of HW extract on cell viability and nitric oxide (NO) production in LPS –stimulated RAW 264.7 cells with uric acid. RAW 264.7 cell were incubated with 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of HW extract for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) and uric acid (20 mg/dL) for 24 h. (A) Cell viability and (B) NO production. The data expressed as a mean \pm SE ($n = 3$). *** $P < 0.001$ compared to non-treated group. ### $P < 0.01$ and #### $P < 0.001$ compared to LPS and uric acid co-treated group.

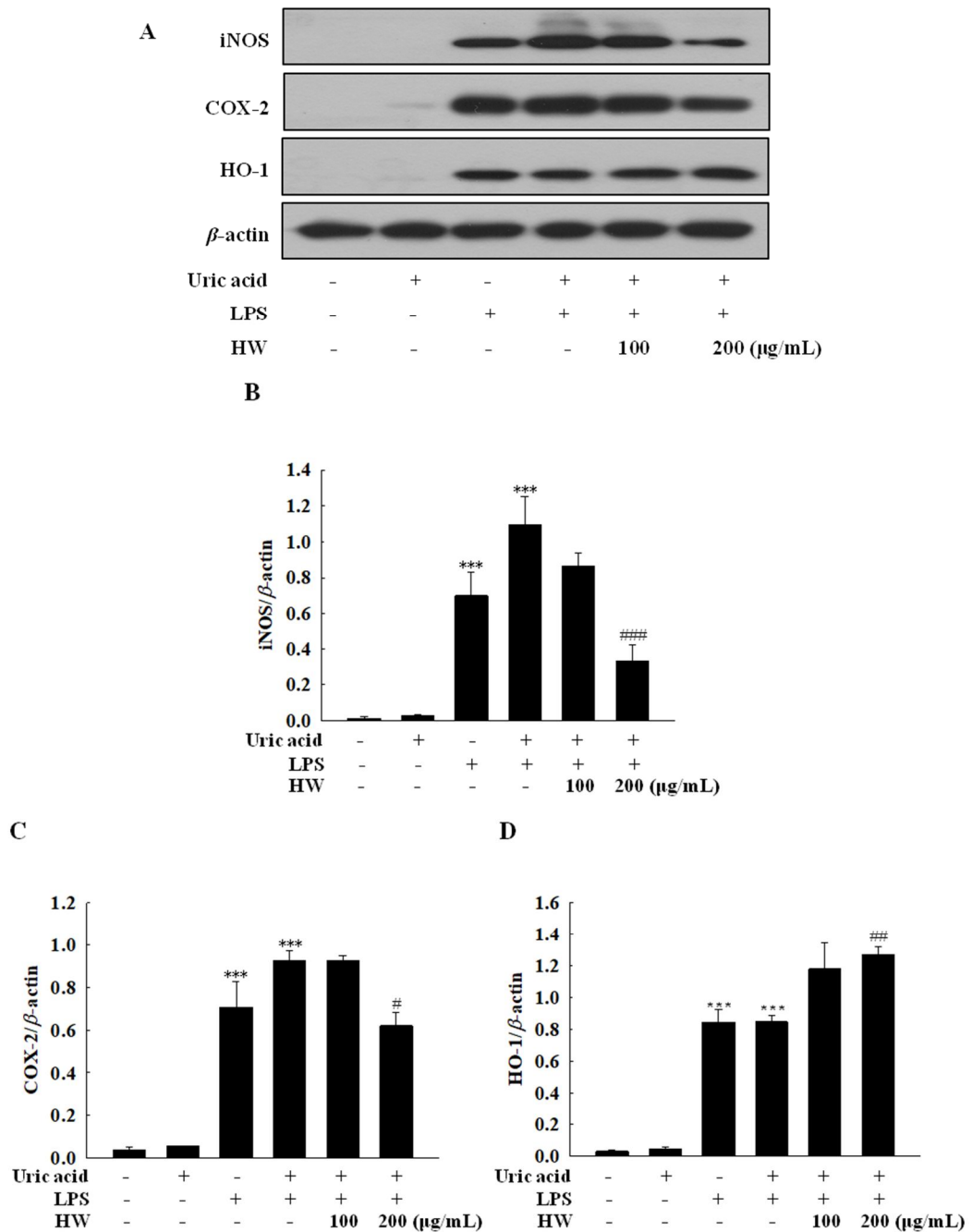


Figure 4. Effect of HW extract on the expression of iNOS, COX-2 and HO-1 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells with uric acid. RAW 264.7 cells were treated with the 100 and 200 μg/mL of HW extract for 1 h, and then the cell were co-treated with LPS (100 ng/mL) and uric acid (20 mg/dL) for 24 h. Relative protein levels were determined by densitometry. (A) Western blot, (B) iNOS, (C) COX-2 and (D) HO-1. Each value is expressed as mean ± SE ($n = 3$). $***P < 0.001$ compared to non-treated group. $\#P < 0.05$ and $###P < 0.001$ compared to LPS and uric acid co-treated group.

4. PO로 유도된 고요산혈증 생쥐모델에서 HW 추출물의 고요산혈증 개선효과

PO로 유도된 고요산혈증 생쥐모델에서 HW 추출물의 고요산혈증 개선효과를 확인하기 위하여 실험동물에서 혈액과 뇨에서의 요산, creatinine, BUN 농도를 측정하였다. 혈중 요산 농도는 정상군(N) 6.61 ± 0.18 mg/dL, PO 유도군(PO) 8.43 ± 0.68 mg/dL, PO + HW 추출물 처리군(HW) 6.44 ± 1.21 mg/dL, PO + allopurinol 처리군(Allo) 4.14 ± 0.08 mg/dL로 측정되었다. N군에 비해 PO군에서 혈중 요산 농도가 유의하게 증가하였고, HW와 Allo군에서 PO군에 의해 증가된 혈중 요산 농도가 유의하게 감소되었다(Figure 5A). 뇨의 요산 농도를 측정한 결과, N군에서 37.62 ± 3.44 mg/dL, PO군 24.19 ± 0.75 mg/dL, HW군 31.44 ± 4.81 mg/dL, Allo군 30.31 ± 3.53 mg/dL로 측정되었다. N군에 비해 PO군에서 뇨의 요산 농도가 유의하게 감소하였으며, HW 군과 Allo군에서 PO군에 의해 감소된 뇨의 요산 농도가 유의하게 증가하였다(Figure 5B).

혈중 creatinine 농도 측정 결과, N군에서 0.19 ± 0.04 mg/dL, PO군 0.37 ± 0.04 mg/dL, HW군 0.25 ± 0.15 mg/dL, Allo군 0.23 ± 0.02 mg/dL로 측정되었다. N군에 비해 PO군에서 혈중 creatinine 농도가 유의하게 증가하였고, HW와 Allo군에서 PO군에 의해 증가된 혈중 creatinine 농도가 유의하게 감소되었다(Figure 5C). 뇨의 creatinine 농도 측정 결과, N군에서 37.62 ± 3.44 mg/dL, PO군 24.19 ± 0.75 mg/dL, HW군 31.44 ± 4.81 mg/dL, Allo군에서 30.31 ± 3.53 mg/dL로 측정되었다. N군에 비해 PO군에서 뇨의 creatinine 농도가 유의하게 감소하였으며, HW군과 Allo군에서 PO군에 의해 감소된 뇨의 creatinine 농도가 유의하게 증가하였다(Figure 5D).

혈청의 BUN 농도를 측정한 결과, N군에서 25.31 ± 1.29 mg/dL, PO군 31.92 ± 2.01 mg/dL, HW군 22.89 ± 0.94 mg/dL, Allo군 23.91 ± 1.32 mg/dL로 측정되었다. N군에 비해 PO군에서 BUN 농도가 유의하게 증가하였으며, HW와 Allo군에서 PO군에 의해 증가된 BUN 농도를 유의적으로 감소시켰다(Figure 5E).

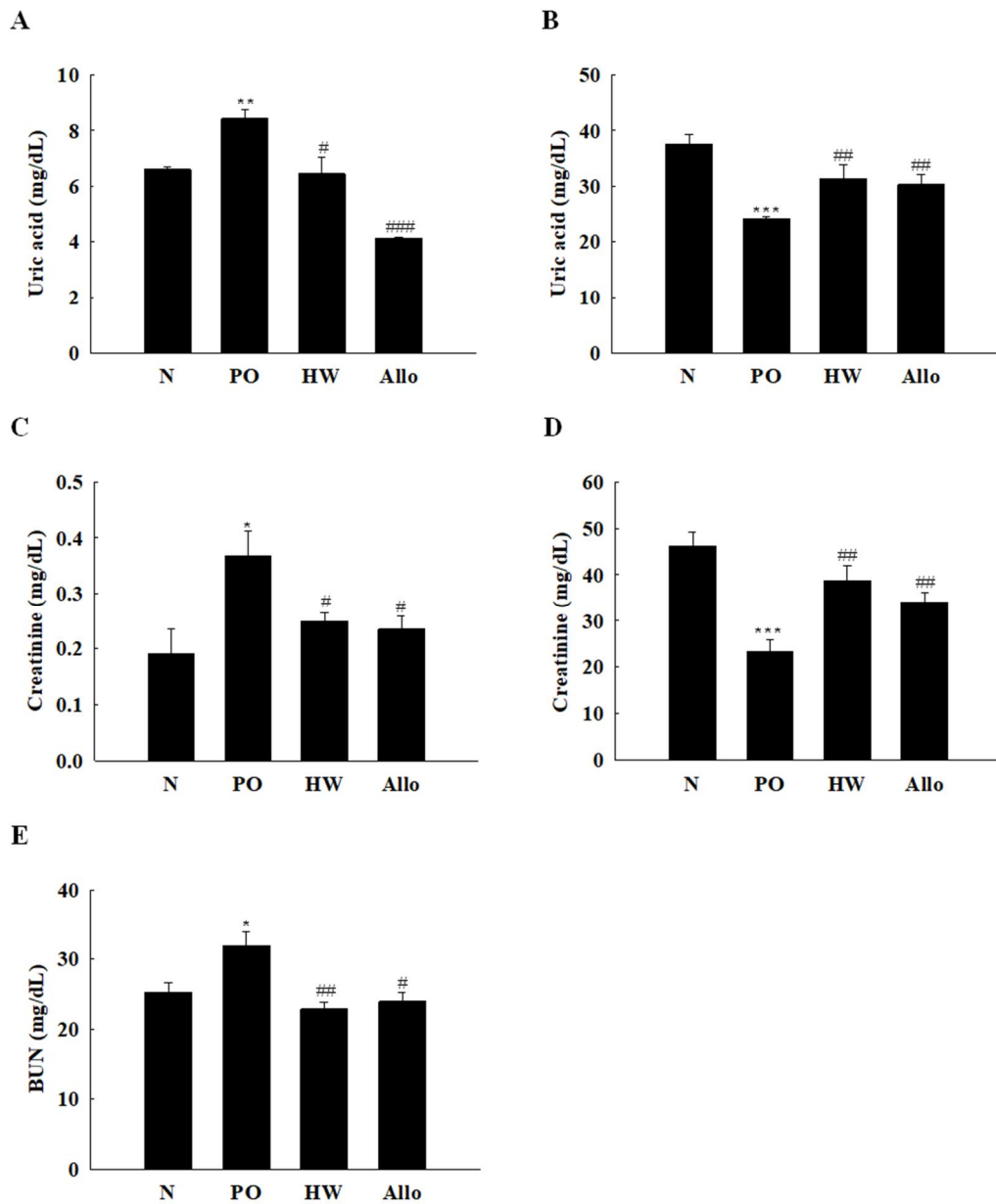


Figure 5. Effects of HW extract on (A) serum uric acid, (B) urine uric acid, (C) serum creatinine, (D) urine uric acid and (E) serum BUN levels in PO-induced hyperuricemia mice. N, normal group; PO, potassium oxonate (250 mg/kg) group; HW, PO + HW extract (400 mg/kg) group and Allo, PO + allopurinol (5 mg/kg) group. Each value is expressed as mean \pm SE ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to normal group. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ compared to PO-induced hyperuricemia group.

5. PO 유도된 생쥐 신장에서 HW 추출물의 세포보호 및 항염증 효과

신장 조직에서 고요산혈증에 의한 HW 추출물의 세포보호 및 항염증 효과를 확인하기 위해서 apoptosis 관련 단백질과 염증관련 단백질의 발현을 분석하였다.

Apoptosis 관련 단백질 발현을 분석한 결과, N군에 비해 PO군에서 Bax, PARP-1, cleaved caspase-3의 발현이 증가한 반면에 Bcl-2 단백질의 발현이 유의성 있게 감소하였다. PO군에서 증가된 Bax와 cleaved caspase-3, PARP-1 단백질의 발현은 HW군에서 유의적으로 감소하였으며 양성대조군인 Allo군에서도 HW와 동일한 결과를 보였다. 하지만 PARP-1의 발현은 유의적이지 않았다. 또한 PO군에서 감소된 Bcl-2 단백질의 발현이 HW군과 Allo군에서 유의적으로 증가하였다(Figure 6). 염증관련 단백질 발현을 분석한 결과, N군에 비해 PO군에서 iNOS, COX-2, TNF- α 의 발현이 증가하였다. PO군에서 증가된 iNOS 단백질의 발현은 HW군에서 감소하였고, 유의적이지 않았으나 COX-2와 TNF- α 의 발현이 감소하였다. 양성대조군인 Allo군에서 iNOS, COX-2의 발현이 유의적으로 감소하였고, TNF- α 의 발현은 유의적이지 않았으나 감소하였다(Figure 7).

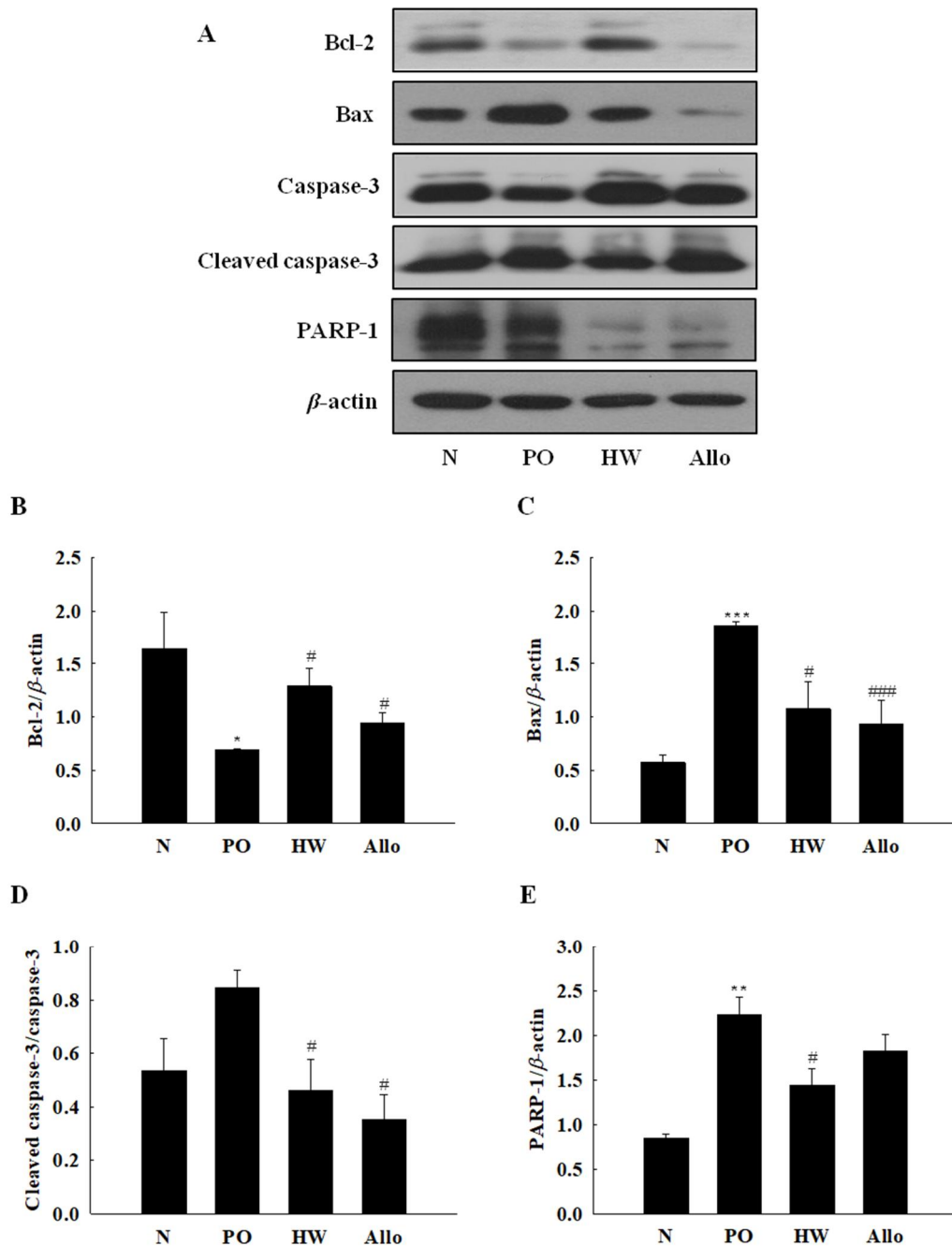


Figure 6. Effect of HW extract on apoptosis-related protein expression in the renal tissue of hyperuricemia mice. Relative protein levels were determined by densitometry. (A) Western blot, (B) Bcl-2, (C) Bax, (D) Cleaved caspase-3 and (E) PARP-1. N, normal group; PO, potassium oxonate (250 mg/kg) group; HW, PO + HW extract (400 mg/kg) group and Allo, PO + allopurinol (5 mg/kg) group. Each value is expressed as mean \pm SE ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to normal group. # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ and #### $P < 0.001$ compared to PO-induced hyperuricemia group.

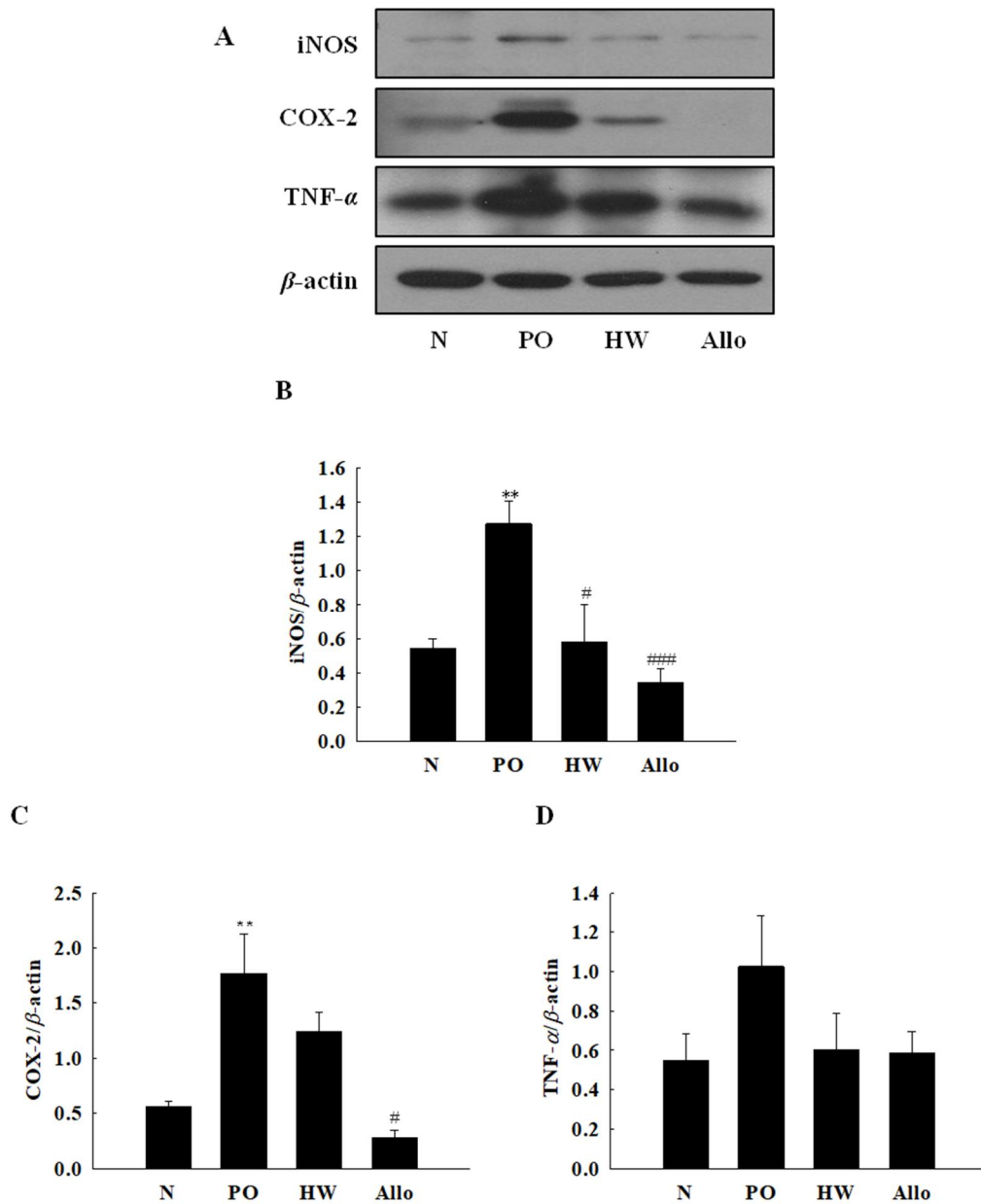


Figure 7. Effect of HW on inflammation-related protein expression in the renal tissue in hyperuricemia mice. Relative protein levels were determined by densitometry. (A) Western blot, (B) iNOS, (C) COX-2 and (D) TNF- α were measured by western blot. N, Normal group; PO, potassium oxonate (250 mg/kg) group; HW, PO + HW extract (400 mg/kg) group and Allo, PO + allopurinol (5 mg/kg) group. Each value is expressed as mean \pm SE ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to normal group. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ compared to PO-induced hyperuricemia group.

6. PO 유도된 생쥐 간 조직에서 HW 추출물의 TNF- α 발현에 미치는 영향

PO 유도 생쥐 간 조직에서 HW 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위하여 면역조직화학염색을 통하여 TNF- α 의 발현을 확인하였다. 면역조직화학 염색 결과 TNF- α 에 반응하는 세포막, 세포질이 갈색으로 염색된 곳을 확인할 수 있었다. 25배와 100배에서 TNF- α 의 발현을 관찰한 결과 PO군에서 전체적으로 TNF- α 의 발현이 나타났으며, HW군과 양성 대조군인 Allo군에서는 PO군에 비해 TNF- α 의 발현이 감소되었다(Figure 8).

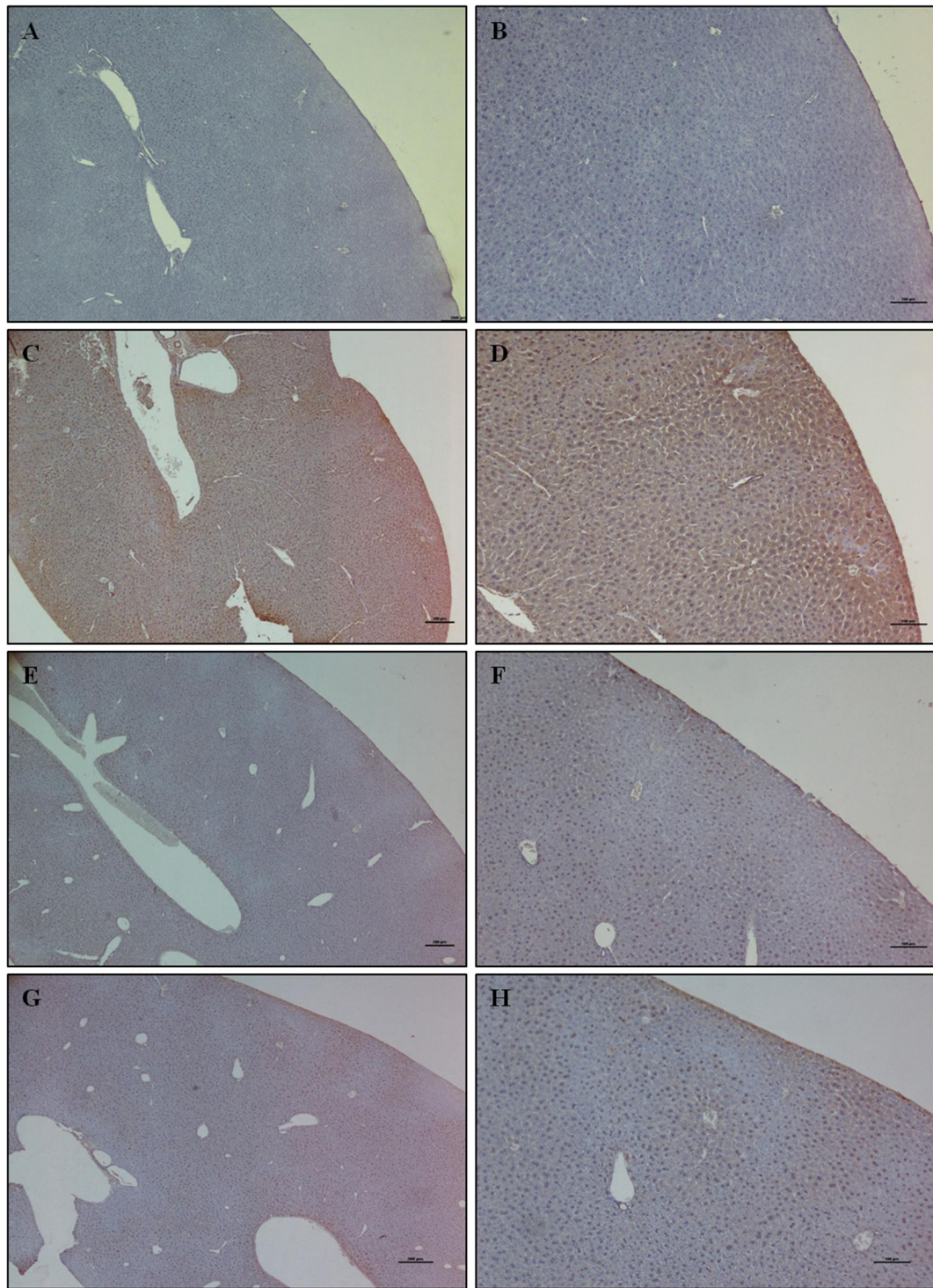


Figure 8. Immunohistochemical staining of TNF- α expression in the liver. (A, B) Normal, (C, D) PO, (E, F) PO + HW and (G, H) PO + Allo. Magnification : (A, C, E and G) $\times 25$ and (B, D, F and H) $\times 100$. Scale bar = $200 \mu\text{m}$ (A, C, E and G) and $100 \mu\text{m}$ (B, D, F and H). N, Normal group; PO, potassium oxonate (250 mg/kg) group; HW, PO + HW extract (400 mg/kg) group and Allo, PO + allopurinol (5 mg/kg) group.

7. PO 유도된 생쥐 간 조직에서 HW 추출물의 전사체 발현에 미치는 영향

고요산혈증이 유도된 생쥐의 간 조직을 이용하여 HW 추출물이 global transcription changes에 미치는 영향을 분석하기 위하여 RNA Sequencing 방법으로 24,481개의 transcriptomes를 분석하였다. 유전자 발현 분석은 PO군을 기준으로 비교 시 N군, HW군, Allo군에서 Fold change 2, Normalized RC (log2) 4배 이상 차등적으로 발현되는 유전자(differentially expressed genes, DEGs)를 선별하여 GO (Gene Ontology)를 비교 분석 하였으며, 면역, 염증과 관련된 유전자들의 발현을 주로 확인하였다.

우선 PO군과 비교 시 N군에서 차등적으로 발현된 유전자들의 그룹을 확인한 결과 혈관신생(angiogenesis), 염증반응(inflammatory response), 면역반응(immune response), 과 관련된 유전자가 각각 16.56, 10.98, 10.83%로 관련된 유전자의 수가 가장 많았다. 염증과 면역 반응에 관여하는 DEGs 중에서 발현이 증가된 것은 각각 26와 51개, 발현이 감소된 것은 각각 40, 19개였다(Figure 9).

PO군과 비교 시 HW군에서 혈관신생과 관련된 DEGs가 22.52%로 가장 많았으며, 염증 및 면역 반응에 관련된 유전자들이 13.41, 10.36%를 차지하였다. 염증과 면역 반응에 관여하는 DEGs 중에서 발현이 증가된 것은 각각 34, 56개 이고, 감소된 것은 각각 21, 31개였다(Figure 10).

PO군과 비교 시 Allo군에서는 염증관련 DEGs가 25.37%으로 가장 많았고, 면역반응 관련 DEGs는 17.02%를 차지하였다. 염증과 면역 반응에 관련된 DEGs 중에서 83, 103개는 발현이 증가되었으며, 21, 40개는 발현이 감소되었다(Figure 11).

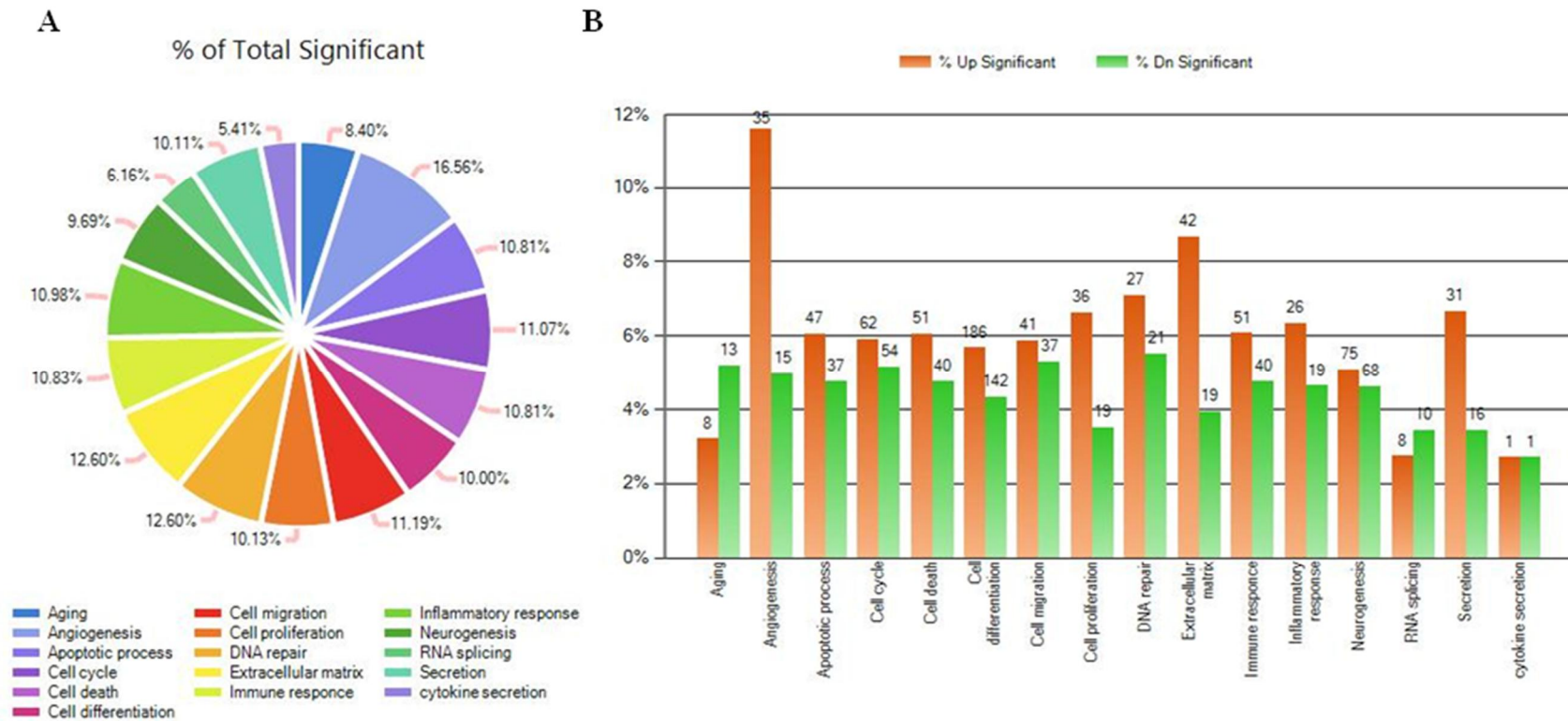


Figure 9. GO comparison analysis of DEGs (N verse PO). (A) Pie chart of the enriched biological processes generated from the DEGs (N verse PO). (B) Number of DEGs. The bar plot represent the percentage of gene counts within each GO category. Up-and down-regulated gene counts are shown in orange and green, respectively. N, Normal group and PO, potassium oxonate (250 mg/kg) group.

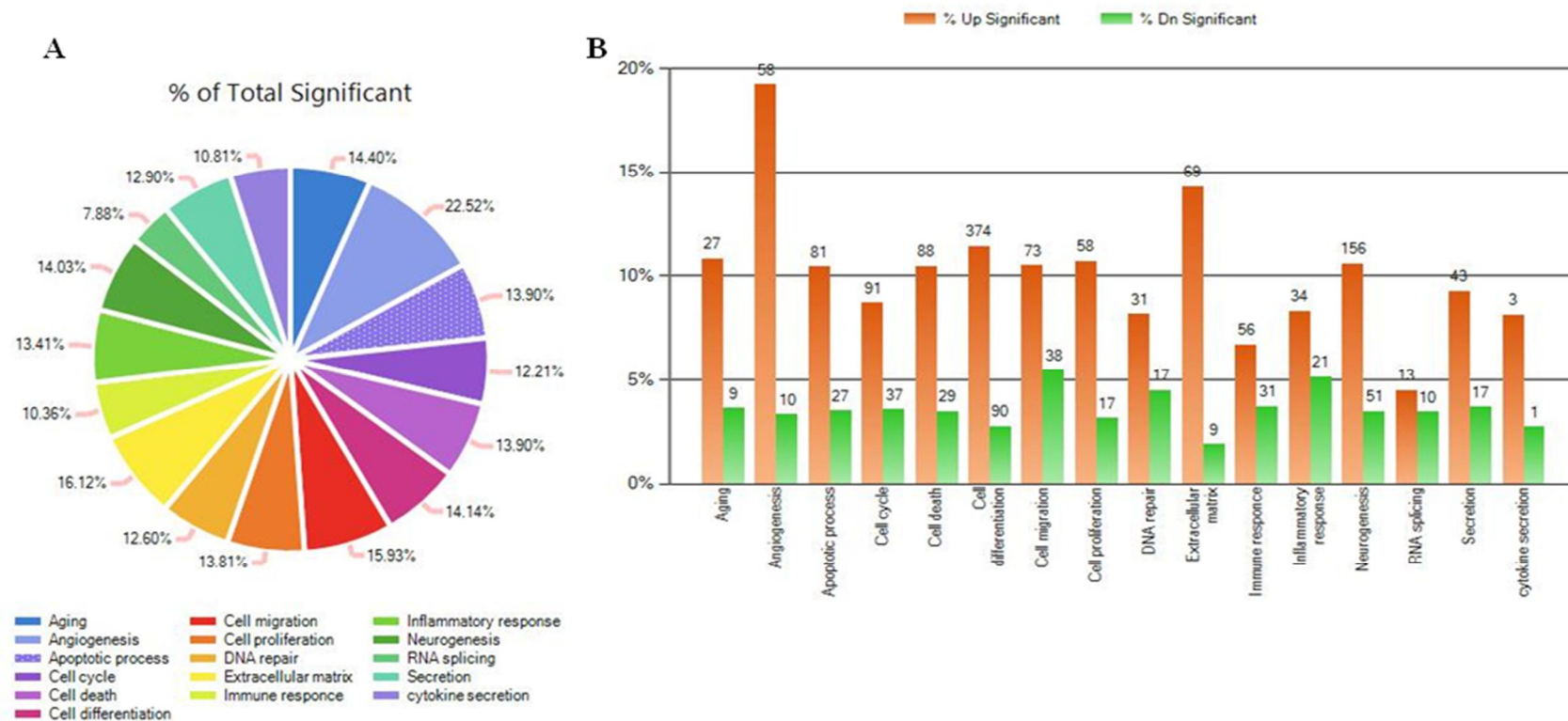


Figure 10. GO comparison analysis of DEGs (HW verse PO). (A) Pie chart of the enriched biological processes generated from the DEGs (HW verse PO). (B) Number of DEGs. The bar plot represent the percentage of gene counts within each GO category. Up-and down-regulated gene counts are shown in orange and green, respectively. PO, potassium oxonate (250 mg/kg) group and HW, HW (400 mg/kg) group.

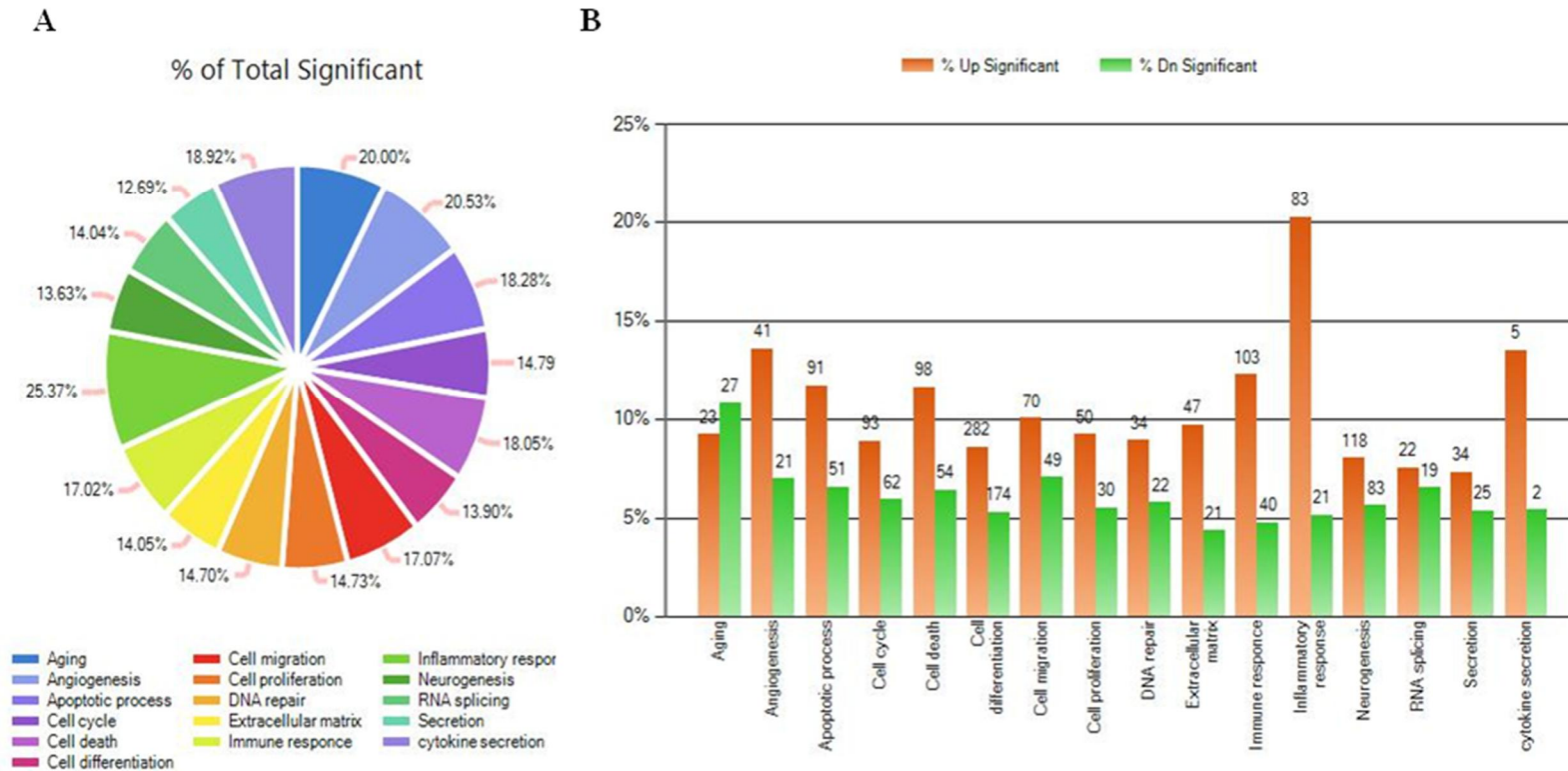


Figure 11. GO comparison analysis of DEGs (Allo verse PO). (A) Pie chart of the enriched biological processes generated from the DEGs (Allo verse PO). (B) Number of DEGs . The bar plot represent the percentage of gene counts within each GO category. Up-and down-regulated gene counts are shown in orange and green, respectively. PO, potassium oxonate (250 mg/kg) group; Allo, allopurinol (5 mg/kg) group.

IV. 고 찰

누리장나무 잎은 취오동(臭梧桐)이라는 한약재로 사용되어왔으며, 많은 생리활성들을 가진다고 보고되었다. 본 연구는 누리장나무 추출물이 *in vitro*와 *in vivo*에서 고요산혈증 개선/치료 소재로서의 활용 가능성을 확인하기 위하여 수행하였다. 누리장나무 추출물이 요산을 처리한 HK-2 세포에서의 세포 보호 효과와 요산과 LPS에 의한 RAW 264.7 세포에서의 항염증 활성을 조사하였다. 그리고 고요산혈증이 유도된 생쥐에서 혈중 요산 농도 저해 및 항염증, 세포 보호 효과와 전사체 발현이 미치는 누리장나무 추출물의 영향을 조사하였다.

누리장나무 잎 추출물의 DPPH, ABTS radical 소거 활성과 총 폴리페놀 함량 측정 결과 HW 추출물에서 70% EtOH 추출물보다 높은 유리기 소거활성을 보였고 폴리페놀 함량 또한 높게 나타났다. 폴리페놀은 자외선(ultraviolet radiation)과 식물에서 병원균과 같은 자극에 대한 반응으로 발생하는 방어기전과 관련된 2차 대사산물이다. 폴리페놀의 항산화 활성은 많은 종류의 활성 산소종(ROS) 소거 활성 능력과 관련되어 있다. 또한 폴리페놀과 NOS의 상호작용은 NO의 생성을 조절하며, iNOS, COX-2와 같은 전염증성 매개인자의 활성을 억제하여 항염증 작용을 한다(Hussain *et al.*, 2016).

요산은 HK-2 세포에서 ROS 생성을 통하여 미토콘드리아 막의 투과성을 변화시키고, Bax의 발현의 증가와 procaspase의 절편화를 통하여 apoptosis를 유도한다고 보고되어 있으며(Verzola *et al.*, 2014), immune system에 있어서 activator로 작용하며, monosodium urate crystal는 inflammasome을 통하여 염증과정을 매개한다고 알려져 있다(Krishnan E, 2010).

따라서 요산에 의한 apoptosis와 염증 반응을 HW 추출물이 억제함으로써 고요산혈증의 개선효과 및 세포 보호 효과를 확인하였다. HW 추출물은 HK-2 세포에서 요산에 의해 감소된 세포 생존율을 증가시켰다. HK-2 세포에서 요산은 apoptosis를 억제하는 단백질인 Bcl-2의 발현을 유의적으로 감소시켰고, apoptosis 과정에서 생성되는 Bax, cleaved caspase-3와 PARP-1 단백질의 발현을 증가시켰다. 따라서 Verzola *et al.*, (2014)의 연구와 같이 요산은 HK-2 세포에서 apoptosis에 영향을 미치는 것으로 사료된다. HW 추출물은 요산을 처리한 HK-2 세포에서 Bcl-2의 발현을 증가시켰으며 Bax, cleaved caspase-3, PARP-1 단백질의 발현을 감소 시켰다. 따라서 HW 추출물은 요산에 의해 유도된 apoptosis 관련 단백질들의 발현을 조절함으로써 신장 세포의 보호작용을 한다고 사료된다.

NO는 대부분 iNOS에 의해 생성되며 체내에서 염증 반응, 신호 전달 기능, 혈압 조절 기능 등의 역할을 한다고 알려져 있다(Nathan 1997; Palmer *et al.*, 1987). 그러나 병리적인 원인이나 LPS 또는 interleukin-1 (IL-1)과 같은 자극에 의해 NO가 과도하게 생성될 경우 염증과 이로 인해 조직과 신경의 손상이 일어나게 된다(Kim *et al.*, 2015; Nathan, 1992). COX-2는 정상 상태에서는 발현되지 않지만, LPS에 의해 자극을 받아 단핵구와 대식세포에서 발현되며, prostaglandins를 생성하여 염증 반응을 지속시킨다(DeWitt and Smith, 1995). HO-1은 heme을 분해하여 일산화탄소와 철, biliverdin을 만들며, biliverdin은 환원효소에 bilirubin으로 전환 된다(Ryter *et al.*, 2002). 이러한 생성물은 iNOS와 COX-2의 발현 및 NO의 생성을 억제하며, 다양한 조직과 세포에서 anti-apoptotic 특성과 항산화, 항염증과 같은 작용을 한다고 알려져 있다(Choi *et al.*, 2012).

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에 요산 혹은 LPS와 요산을 공동 처리하면 세포 생존율이 감소하였으며 NO 생성이 증가하였다. 또한 요산 처리군에서 염증 매개성 단백질인 iNOS와 COX-2는 발현되지 않지만, LPS 처리군에서 보다 LPS와 요산 공동 처리군에서 iNOS와 COX-2의 발현이 증가하였다. 이러한 결과는 Braga *et al.*, (2017) 의 보고와 일치하는 결과로 요산이 염증 반응에 영향을 미치는 것으로 사료된다. HW 추출물은 요산과 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서 염증 관련 단백질의 발현과 NO 생성을 저해하였다. 특히, HW 추출물은 LPS 처리군과 공동 처리군에서 HO-1의 발현을 유의적으로 증가시켰다. 이러한 결과는 HW 추출물이 요산과 LPS에 의한 전염증인자의 생성 억제와 HO-1의 발현 증가를 통하여 항염증 작용을 나타낼 것으로 사료된다.

상기한 *in vitro* 결과를 바탕으로 고요산혈증 모델 생쥐에서 HW 추출물의 고요산혈증 억제 활성을 확인한 결과, 고요산혈증 생쥐에서 추출물은 요산생성 억제와 요산 배출 촉진을 통하여 고요산혈증을 개선하는 효과를 나타내었다. Creatinine은 creatine의 최종 대사산물로 신장의 이상이 생기게 되면 creatinine의 혈중 농도가 높아지기 때문에 뇨와 혈장의 creatinine 농도를 측정하여 신장 독성을 평가한다(Perrone *et al.*, 1992). BUN은 질소화합물의 최종 대사 산물로, 단백질이 분해되어 여러 가지 과정을 통해 신장으로 분비된다(Kajimoto *et al.*, 2015; Meijer *et al.*, 1990). 이러한 BUN이나 creatinine는 신장의 여과 및 재흡수 기능을 평가할 수 있으며 측정법이 비교적 간단하기 때문에 신장 독성을 평가하는데 자주 사용되어왔다(Hall *et al.*, 2014; Hall *et al.*, 2015). BUN 농도 측정결과 N군에 비해 PO군에서 BUN이 유의하게 증가하였으며, PO군에 비해 HW와 Allo군에서 BUN이 유의하게 감소하였다.

N군에 비해 PO군에서 혈중 creatinine이 증가하였으며, HW와 Allo군에서 creatinine이 PO군에 비해 감소하였다. 뇨의 creatinine은 N군에 비해 PO군에서 감소되었으며, HW와 Allo군에서 뇨의 creatinine이 증가하였다. 이러한 결과는 HW 추출물이 고요산혈증에 의해 손상된 신장 기능을 회복 시킬 수 있음을 암시해 준다.

고요산혈증이 유도된 쥐의 신장에서 apoptosis 관련 단백질과 염증 관련 단백질의 발현에 대한 HW의 활성을 확인한 결과 N군에 비해 PO군에서 Bax, PARP-1, cleaved caspase-3의 발현이 증가하였으며, Bcl-2의 발현이 유의적으로 감소되었다. PO군에서 증가된 Bax, cleaved caspase-3와 PARP-1의 발현이 HW군에서 유의적으로 감소되었고, Bcl-2의 발현이 증가되었다. 그리고 염증 관련 단백질인 iNOS, COX-2, TNF- α 와 같은 단백질의 발현이 N군과 비교하여 PO군에서 증가하였으며, HW군에서 iNOS, COX-2, TNF- α 의 단백질 발현이 감소되었다. 이러한 결과는 HW 추출물이 고요산혈증에 의한 apoptosis 및 염증 반응 억제를 통하여 세포 보호 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

HW 추출물은 간 조직에서 TNF- α 의 발현을 감소시킬 뿐만 아니라 세포케사를 보호하였다. TNF- α 는 일반적인 상태에서 발현되지 않으며, 염증이나 감염이 발생되었을 때 혈장이나 조직에서 발현이 증가하며, T림프구나 대식세포에 의해 주로 생성되는 전염증성 cytokine으로 잘 알려져 있으며 면역, 염증, differentiation, apoptosis 과정에 중요한 역할을 한다(Baud and Karin, 2001; Bradley JR, 2008). TNF- α 는 NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) pathway와 MAPK (mitogen-activated protein kinases) pathway를 통한 염증반응을 발생시키고 caspase-8를 활성화 시키며 apoptosis 반응을 유도한다고 알려져 있다(Mohamed *et al.*, 2002; Karin and Gallagher 2009)

또한 TNF- α 는 염증성 질환인 류마티스 관절염, 크론병, 건선에서 많이 발현되며(Koch *et al.*, 1994; Breese *et al.*, 1994; Ettehad *et al.*, 1994), 심혈관 질병이나 신장 질환의 발병에도 영향을 끼친다고 알려져 있다(Higuchi *et al.*, 2004; Al-Lamki *et al.*, 2005). 따라서 HW 추출물이 고요산혈증에 의해 발현된 TNF- α 의 발현 억제를 통하여 간 조직에서 항염증 활성 및 세포 보호 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

PO에 의해 유도된 생쥐에서 HW 추출물의 고요산혈증 개선 작용에 대한 분자적 특성을 알아보기 위하여 N군, PO군, HW군, Allo군의 간 조직의 전사체 발현을 RNA sequencing 방법으로 분석하였다. 염증, 면역반응과 관련된 DEGs는 N군에서 10.98, 10.83%, HW군에서 13.41, 10.36%, Allo군에서 25.37, 17.02%로 비교적 높았다. PO군과 비교 시 염증과 면역반응을 포함한 대부분의 GO에서 증가된 유전자의 수가 높게 나타났으며, N군에 비해 HW와 Allo군에서 증가된 유전자의 수가 높게 나타났다. 이러한 결과는 PO에 의해 발현이 유도되는 유전자들이 HW 추출물과 allopurinol의 처리에 의해 정상수준으로 발현이 회복되는 기전을 통해 PO에 의해 유도된 고요산혈증이 개선될 것이라 사료되지만 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

따라서, 누리장나무 추출물이 염증반응과 apoptosis 억제를 통하여 고요산혈증의 개선/치료 소재로 활용가능성이 있을 것이라 사료된다. 하지만 누리장나무의 항염증, apoptosis 억제, 고요산혈증 저감 활성에 있어 어떤 기전을 통하여 작용하는지 *in vitro*와 *in vivo*에서의 추가적인 연구가 필요하다.

V. 인용 문헌

康秉秀 外 (1991) 本草學, 永林社, pp.280-281

辛民教 (1996) 原色臨床本草學, 永林社, pp.676-677

Al-Lamki RS, Wang J, Vandenabeele P, Bradley JA, Thiru S, Luo D, Min W, Pober JS and Bradley JR (2005) TNFR-1 and TNFR2-mediated signaling pathways in human kidney are cell type-specific and differentially contribute to renal injury, *FASEB J.*, 19(12):1637-1645

Baud V and Karin M (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives, *Trends Cell Biol.*, 11(9):372-377

Becker MA, Schumacher HR Jr, Wortmann RL, MacDonald PA, Eustace D, Palo WA, Streit J and Joseph-Ridge N (2005) Febuxostat compared with allopurinol in patients with hyperuricemia and gout, *N. Engl. J. Med.*, 353(23):2450-2461

Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, 181: 1199-1200

Bradley JR (2008) TNF-mediated inflammatory disease, *J. Pathol.*, 214(2):149-160

Braga TT, Forni MF, Correa-costa M, Ramos RN, Barbuto JA, Branco P, Castoldi A,

Hiyane ML, Davanzo MR, Latz, S. Franklin B, Kowaltowski AJ and Saraiva Camara NO (2017) Soluble Uric Acid Activates the NLRP3 Inflammasome, *Sci. Rep.*, 7(39884):1-14

Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CH, Domizio P, Walker-Smith JA and MacDonald TT (1994) Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*, 106(6):1455-1466

Choi HG, Lee DS, Li B, Choi YH, Lee SH and Kim YC (2012) Santamarin, a sesquiterpene lactone isolated from *Saussurea lappa*, represses LPS-induced inflammatory responses via expression of heme oxygenase-1 in murine macrophage cells, *Int. Immunopharmacol.*, 13(3):271-279.

DeWitt D and Smith WL (1995) Yes, but do they still get headaches?, *Cell*, 83(3):345-8

Ettehadi P, Greaves MW, Wallach D, Aderka D and CAMP RDR (1994) Elevated tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) biological activity in psoriatic skin lesions, *Clin. Exp. Immunol.*, 96(1):146-151

Fauci AS, Braunwald E, Kasper D, Hauser SL, Longo DL and Jameson JL (2008) Harrison's principles of internal medicine, *Mc. Graw-Hill Medical.*, pp.1530-1540

Ferrari M, Fornasiero MC and Isetta AM (1990) MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro, *J. Immunol. Methods.*, 131(2):165-172

Folin O and Denis WA (1915) colorimetric method for determination of phenols (and

phenol derivatives) in urine, *J. Biol. Chem.*, 22(2):305-308.

Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Detting M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY and Zhang J (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics, *Genome Biol.*, 5(10):R80

Gliozzi M, Malara N, Muscoli S and Mollace V (2016) The treatment of hyperuricemia, *Int. J. Cardiol.*, 213:23-27

Grassi D, Ferri L, Desideri G, Di Giosia P, Cheli P, Del PR, Properzi G and Ferri C (2013) Chronic hyperuricemia, uric acid deposit and cardiovascular risk, *Curr. Pharm. Des.*, 19(13):2432-2438

Griess P (1879) Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. weselsky und benedikt "ueber einige azoverbindungen.", *Chem. Ber.*, 12(1):426-428

Hall JA, Yerramilli M., Obare E and Jewell DE (2014) Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease, *J. Vet. Intern. Med.*, 28(6): 1676-1683.

Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Melendez LD and Jewell DE (2015) Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs, *J. Vet. Intern. Med.*, 29(3):808-814.

Hande KR, Noone RM and Stone WJ (1984) Severe allopurinol toxicity. Description and guidelines for prevention in patients with renal insufficiency, *Am. J. Med.*, 76(1):47-56.

Higuchi Y, MC Tiernan CF, Frye CB, McGowan BS, Chan TO and Feldman AM (2004) Tumor necrosis factor receptors 1 and 2 differentially regulate survival, cardiac dysfunction, and Remodeling in Transgenic mice with tumor necrosis factor- α -induced cardiomyopathy, *Circulation*, 109(15):1892-1897

Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou M. C and Rahu N (2016) Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 7432797:1-9

Inchi T, Shimizu T and Yoshihira, K (1996) In biotechnology in agriculture and forestry, *Berlin Heidelberg*, pp.108

Johnson RJ, Feig DI, Herrera-Acosta J and Kang DH (2005) Resurrection of uric acid as a causal risk factor in essential hypertension, *Hypertension*, 45(1):18-20

Kajimoto K, Sato N and Takano T (2015) Relation between elevated blood urea nitrogen, clinical features or comorbidities, and clinical outcome in patients hospitalized for acute heart failure syndromes, *Int. J. Cardiol.*, 201(15):311-314

Kanellis J, Feig DI and Johnson RJ (2004) Does asymptomatic hyperuricemia contribute to the development of renal and cardiovascular disease? An old controversy renewed, *Nephrology*, 9(6):394-399

Kang DH, Nakagawa T, Feng L, Watanabe S, Han L, Mazzali M, Truong L, Harris R and Johnson RJ (2002) A role for uric acid in the progression of renal disease, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13(12):2888–2897.

Karin M and Gallagher E (2009) TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF6 signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes, *Immunol. Rev.*, 228(1):225-240

Kim MK and Kim DY (2015) Anti-inflammatory Effect of Barley Leaf Ethanol Extract in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage, *Korean. J. Food. Preserv.*, 22(5): 735-743

Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, Pope RM and Ferrara N (1994) Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis, *J. Immunol.*, 15:152(8):4149-4156

Krishnan E (2010) Inflammation, oxidative stress and lipids: the risk triad for atherosclerosis in gout, *Rheumatology*, 49(7):1229-1238

Langmead B and Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, *Nat. Methods.*, 9(4):357-359

Lee CB (1973) An illustrated book of Korean plant, *Hyang Mun publishing company*, pp. 491

Ling X and Bochu W (2014) A review of phytotherapy of gout: perspective of new pharmacological treatment, *Pharmazie.*, 69(4):243-256

Lobo JC, Stockler-Pinto MB, da Nóbrega AC, Carraro-Eduardo JC and Mafra D (2011) Is there association between uric acid and inflammation in hemodialysis patients?, *Ren. Fail.*, 35(3):361-366

Martillo MA, Nazzari L and Crittenden DB (2014). The crystallization of Monosodium urate, *Curr. Rheumatol. Rep.*, 16(2):400

Meijer AJ, Lamers WH and Chamuleau R (1990) Nitrogen Metabolism and Ornithine cycle function, *Physiol. Rev.*, 70(3):701-748

Mohamed A.AA, Jupp OJ, Anderson HM, Littlejohn AF, Vandenabeele P and MacEwan DJ (2002) Tumor necrosis factor-induced activation of c-Jun N-terminal kinase is sensitive to caspase-dependent modulation while activation of mitogen-activated protein kinase(MAPK) or p38 MAPK is not, *Biochem. J.*, 366(1):145-155

Nathan C (1997) Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?, *J. Clin. Invest.*, 15;100(10):2417-2423

Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J.*, 6(12):3051-3064

Neeta S and Tejas P (2007) Clerodendrum and Healthcare: An Overview, *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.*, 1(1):142-150

Palmer RM, Ferrige AG and Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature*, 327(6122):524-526

Perrone RD, Madias NE and Levey AS (1992) Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts, *Clin. Chem.*, 38(10):1933-1953.

Quan H, Peng X, Liu S, Bo F, Yang L, Huang Z, Li H, Chen X and Di W (2011) Differentially expressed protein profile of renal tubule cell stimulated by elevated uric acid using SILAC coupled to LC-MS, *Cell. Physiol. Biochem.*, 27(1):91-98

Quinlan AR and Hall IM (2010) BED Tools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features, *Bioinformatics*, 26(6):841-842

Roncal CA, Mu W, Croker B, Reungjui S, Quyang X, Tabah-Fisch I, Johnson RJ and Ejaz AA (2007) Effect of elevated serum uric acid on cisplatin-induced acute renal failure, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 292(1): 116-122.

Ruoff G and Edwards NL (2016) Overview of Serum Uric Acid treatment Targets in Gout: Why Less Than 6 mg/dL?, *Postgrad. Med.*, 128(7):706-715

Ryter SW, Otterbein LE, Morse D and Choi AM (2002) Heme oxygenase, carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance, *Mol. Cell. Biochem.*, 234(1): 249-263

Stavric B, S. Clayman, R.E.A. Gradd, D. Hebert (1975) some *in vivo* effects in the rat induced by chlorprothixene and potassium oxonate, *Pharmacol. Res. Comm.*, 7(2):117-124

Verzola D, Ratto E, Villaggio B, Parodi EL, Pontremoli R, Garibotto G and Viazzi F (2014) Uric acid promotes apoptosis in human proximal tubule cells by oxidative stress and the activation NADPH oxidase NOX4, *PLoS One*, 9(12):e11520

Yi LT, Li J, Su DX, Dong JF and Li CF (2012) Hypouricemic effect of the methanol extract from prunus mume fruit in mice, *Pharm. Biol.*, 50(11):1423-1427

VI. 요약

누리장나무는 예로부터 고혈압, 편두통, 이질 등의 민간약재로 사용되어 왔으며, 항산화, 항염증, 항고혈압, 항암 등과 같은 다양한 생리 활성들이 보고되어왔다. 본 연구에서는 누리장나무 열수 추출물(HW)과 분획추출물의 총 폴리페놀 함량과 항산화 활성을 확인하고, *in vitro*와 *in vivo*에서 HW 추출물의 항염증 및 세포보호효과를 확인하고자 하였다. HW 추출물은 요산과 LPS를 co-treatment한 RAW264.7 세포에서 NO (nitric oxide)의 생성을 억제시켰으며, iNOS (inducible nitric oxide synthase)와 COX (cyclooxygenase)-2 단백질의 발현을 억제하였으며, HO-1 (heme oxygenase)-1 단백질 발현을 증가시켰다. 요산을 처리한 HK-2 세포에서 HW 추출물이 Bax (Bcl-2 associated X)의 발현과 PARP-1 [poly (ADP-ribose) polymerase-1]의 발현을 감소시켰으며, Bcl-2 (B-cell lymphoma-2)의 발현을 증가시켰다. Potassium oxonate (PO)에 의해 고요산혈증이 유도된 생쥐의 HW 처리군에서 혈중 요산 농도와 크레아티닌(creatinine), 혈중요소질소 (blood urea nitrogen, BUN)가 감소되었으며, 뇨(尿)에서의 요산 농도와 크레아티닌 농도가 증가되었다. 그리고 신장에서 iNOS, COX-2, TNF (tumor necrosis factor)- α , Bax, cleaved caspase-3, PARP-1의 단백질 발현을 감소시켰으며, Bcl-2의 발현을 증가시켰다. 면역조직화학적 방법을 통하여 누리장나무 추출물의 간 조직에서 TNF- α 발현억제를 확인하였다. 또한 RNA sequencing 방법으로 고요산혈증 유도군과 HW군의 간과 신장조직에서의 차등적인 전사체 발현(differential gene expression)을 확인하였고, DAVID database를 통하여 Gene Ontology comparison 분석을 실시하였다. 본 연구를 통하여 누리장나무 잎 추출물이 *in vitro*와 *in vivo* 모델에서의 항염증, 세포보호 효과 및 고요산혈증 개선효과를 확인하였다.