

Stephania brachyandra 추출물의 LPS에 의한 염증 반응 억제효과

신진학[†] · 김선숙[†] · 서수련*[‡]

강원대학교 분자생명과학과

Anti-inflammatory effects of *Stephania brachyandra* extract in LPS-triggered inflammatory signaling

Jin Hak Shin[†], Seon Sook Kim[†], and Su Ryeon Seo*[‡]

Department of Molecular Bioscience, College of Biomedical Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

(Received August 4, 2022; Revised August 29, 2022; Accepted September 8, 2022)

Inflammation is a protective mechanism against various stimuli, such as infection, tissue damage, and lipopolysaccharide (LPS). LPS is an endotoxin mainly found in the cell walls of Gram-negative bacteria. It is recognized by toll-like receptor 4 (TLR4) of macrophages and plays important roles in secreting pro-inflammatory cytokines to protect host cells. However, an excessive inflammation causes damage to cells or tissues, leading to inflammatory diseases. To discover novel inflammatory regulators derived from natural product, native plant extract libraries existing in Asia were screened, and found *Stephania brachyandra* (*S. brachyandra*) as a candidate. Although *S. brachyandra* has traditionally been known to have anti-inflammatory and antioxidant effects in Asia, there is no scientific evidence. In this study, we confirmed the anti-inflammatory effect and signaling mechanism of *S. brachyandra* extract in the inflammation induced by LPS. LPS-induced expression of pro-inflammatory mediators, such as interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) was inhibited by *S. brachyandra* extract in the macrophage cell line RAW264.7. Furthermore, the inhibitory effect of *S. brachyandra* extract on pro-inflammatory cytokine expression was accompanied by inhibiting the activities of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and nuclear factor of activated T-cell (NFAT) transcription factors. Therefore, we suggest that *S. brachyandra* has the possibility

of future development as a natural product candidate for regulating inflammation.

Keywords: *Stephania brachyandra*, inflammation, LPS, pro-inflammatory mediators

Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성균의 세포벽에서 가장 풍부한 성분으로, 다양한 세포에서 염증성 사이토카인의 분비를 자극하여 염증 반응을 유발한다(Sweet and Hume, 1996; Ngkelo *et al.*, 2012). LPS는 인터루킨(interleukin)-1 β , IL-6 및 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor)- α 와 같은 염증성 사이토카인 및 염증 매개 단백질의 염증 연구 모델에서 광범위하게 사용된다. LPS는 toll-like receptor 4 (TLR4)에 결합하여 전사 인자인 nuclear factor of activated T-cell (NFAT)와 nuclear factor-kappa B (NF- κ B)를 활성화시킨다(Liu *et al.*, 2017). 특히, NF- κ B는 염증 반응과 관련된 유전자의 발현을 조절하는데 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것이 알려져 있다(Lawrence, 2009).

염증 반응은 병원체에 의한 감염과 상처에 의해 활성화되어 다양한 염증성 사이토카인을 분비함으로써 신체를 보호하는 방어 기전이다(Zamora *et al.*, 2000). 특히, 대식 세포는 외부에서 침입한 세균, 바이러스에 의해 활성화되어 다양한 염증성 사이토카인을 분비함으로써 초기 염증 반응에 매우 중요한 역할을 한다. 활성화된 대식 세포는 IL-1 β , IL-6, TNF- α , 과립구 대식구 집락 자극 인자(granulocyte macrophage colony

[†]These authors contributed equally to this work.

*For correspondence. E-mail: suryeonseo@kangwon.ac.kr;
Tel.: +82-33-250-8541; Fax: +82-33-241-4627

stimulating factors; GM-CSF) 및 활성산소종(reactive oxygen species)과 같은 염증 매개 물질을 분비하여 염증 반응을 유발한다(Fu *et al.*, 1990; Salvemini *et al.*, 1990). 이러한 염증 반응을 통해서 병원성 물질을 제거하고 항상성을 유지하지만, 과도하고 만성적인 염증 반응은 다양한 만성 염증 질환을 유발하는 원인이 된다(Kindt *et al.*, 2007). 따라서 대식 세포에서 분비되는 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 것이 만성 염증 질환의 치료 방법으로 여겨지고 있다(Guzik *et al.*, 2003). 최근에는 부작용이 적은 천연물로부터 유래된 염증성 사이토카인의 분비를 감소시키는 항염증 제제와 보조치료제 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구실에서는 아시아권에서 존재하는 자생식물 라이브리리를 활용하여 항염 효능이 있는 새로운 물질을 발굴하고자 하였고, 그 결과 *Stephania brachyandra* (*S. brachyandra*)가 그 후보 물질로 가능성이 있음을 문헌을 통해 예측하였다.

*Stephania brachyandra*는 중국과 미얀마, 베트남에 걸쳐 분포한다. *Stephania brachyandra*이 속한 *Stephania* (함박이) 속은 Menispermaceae (방기과)에 속하며 아시아와 아프리카의 열대 및 아열대 지역에 분포하는 것으로 알려져 있으며 일부 종은 오세아니아에서도 발견된다(Christenhusz and Byng, 2016). 함박이 속에 속하는 일부 식물의 덩이줄기와 잎, 뿌리 등에는 tetrahydropalmatine (THP), stepharine, roemerine (ROE), cycleanine과 같은 다양한 알칼로이드(alkaloid)가 함유되어 있어, 혈압안정, 친식, 결핵, 이질, 고혈당, 말라리아 및 암과 같은 다양한 질병을 치료하기 위해 전통 의학에서 오랫동안 사용되어져 왔다(Martínez *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 2015; Chinh *et al.*, 2019). 그러나, *S. brachyandra*의 항염효과에 관한 과학적인 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 RAW264.7 대식 세포에 LPS를 처리하여 염증 반응을 유도하고, *S. brachyandra* 추출물이 이러한 염증 반응을 어떻게 조절하는지를 과학적인 증거를 통해 제시하였다.

재료 및 방법

실험재료: *S. brachyandra*의 잎을 99.9% 메탄올로 45°C에서 3일 동안 2시간씩 15분씩 초음파 처리하였다. 추출물은 여과한 후 회전증발기(N-1000S WD, EYELA)로 45°C에서 농축하였다. 농축된 시료는 동결 건조하였다. 추출과정은 한국생명공학연구원 해외생물소재센터에서 수행하였고, 분양 받은 추출물을 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다(분양번호 FBMI 168-001). DMSO를 처리한 균을 대조군으로 모든 실험을 수

행하였다.

세포배양: ATCC에서 구입한 RAW264.7 세포주는 1% streptomycin, penicillin (Gibco) 및 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco)이 첨가된 DMEM(Gibco) 배지를 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

Cell viability assay: *S. brachyandra*를 농도(0, 20, 50, 100, 200 µg/ml)로 처리하거나 시간(0, 3, 6, 12, 24 h)에 의존적으로 RAW264.7 세포주에 처리했을 때 생존율을 Trypan blue dye (Sigma-Aldrich)로 염색하여 확인하였다. 이후 hemocytometer로 살아있는 세포의 수를 확인하고, 단위 부피 당 세포의 수를 계산하였다.

Western blot: RAW264.7 세포주에 LPS (100 ng/ml)와 *S. brachyandra* (20, 100 µg/ml)을 6시간 처리한다. 이후 얻어진 세포를 PBS로 세척하고, lysis buffer (10 mM NaF, 150 mM NaCl, 1 µg/ml leupeptin, 1% Nonidet P-40, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM Tris-Cl; pH 7.9, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM EGTA and 10% glycerol and 1 µg/ml aprotinin)를 이용하여 세포를 lysis하였다. Cell lysate는 Bradford assay 방법을 이용하여 단백질을 정량한 다음 SDS-PAGE와 Western blot을 수행하였다. COX-2, phospho-STAT3, phospho-IκBα (Cell Signaling Technology), mouse IL-1β/IL-1F2 (R&D systems), β-actin (Santa Cruz Biotechnology)에 대한 항체를 이용하여 단백질 발현 정도를 확인하였다.

Reporter gene assay: RAW264.7 세포주에 NFAT luciferase reporter vector 또는 NF-κB luciferase reporter vector를 *renilla* reporter vector와 함께 transfection하고 24시간 이후 LPS (100 ng/ml)와 *S. brachyandra* (20, 100 µg/ml)을 6시간 처리하였다. 이후 세포를 lysis하여 luciferase 측정 kit (Promega)를 이용하여 promoter 활성을 확인하였다.

RNA 분리 및 quantitative real-time PCR: RAW264.7 세포주에서 배지를 제거하고 TRIzol reagent (Invitrogen) 1 ml을 처리하여 RNA를 분리하였다. ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)를 이용하여 cDNA를 합성하고 quantitative PCR을 수행하였다. Quantitative PCR은 SYBR Green real-time PCR master mix (TOYOBO)를 사용하여, AriaMx Real-time PCR System (Agilent Technologies)에서 수행하였다. 데이터는 β-actin을 이용하여 normalization 하였다. 사용한 primer는 다음과 같다. β-actin forward: 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3', β-actin reverse: 5'-CGATAGTGATGACCTGACCGT-3'; IL-6 forward: 5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3', IL-6 reverse: 5'-TTCTGCAAGTGCATCATCGT-3'; iNOS forward: 5'-ATCATGGACCACCACACAG

C-3', iNOS reverse: 5'-GGTGTGAAGGCGTAGCT-GA-3'; IL-1 β forward: 5'-CCTCACAAGCAGAGCACAAG-3', IL-1 β reverse: 5'-TGTCTTGGC-CGAGGACTAAG-3'.

통계처리: 실험의 모든 결과는 3회 반복 실험하여 평균(mean) \pm 표준 편차(SD)로 나타냈고, unpaired student's *t*-test를 통해 $p < 0.05$ 인 경우에만 유의적인 것으로 판정하였다.

결 과

Stephania brachyandra 추출물의 세포독성 확인

염증 반응의 주요 조절 세포인 대식 세포에서 *S. brachyandra* 추출물이 세포독성을 나타내는 농도와 시간을 확인하고자 하였다. RAW264.7 세포주에 *S. brachyandra* 추출물을 농도별로(0, 20, 50, 100, 200 μ g/ml) 처리하고, 12시간 후 Trypan blue dye exclusion을 이용하여 세포생존율을 확인하였다. 그 결과, 20 μ g/ml의 농도에서 99.5%, 50 μ g/ml의 농도에서 98%, 100 μ g/ml의 농도에서 96.5%, 200 μ g/ml의 농도에서 94.5%의 생존율을 보였다(Fig. 1A).

다음으로 RAW264.7 세포주에 *S. brachyandra* 추출물의 농도를 100 μ g/ml로 고정하고, 시간을 다르게 처리하여 세포생

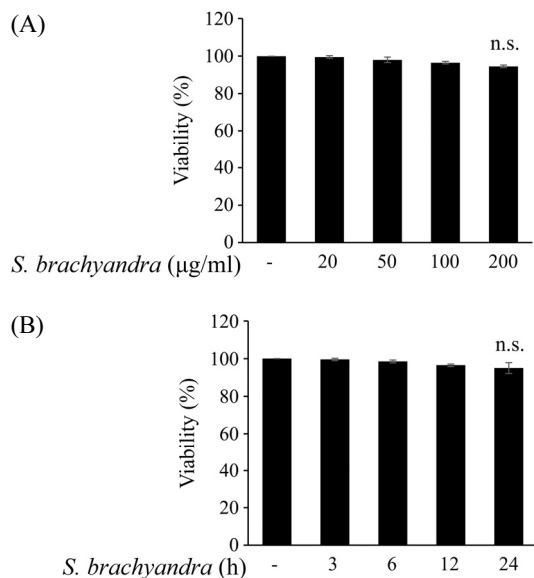


Fig. 1. Dose- and time-dependent cytotoxicity of *Stephania brachyandra* extract. (A) RAW264.7 cells were treated with different concentrations of *S. brachyandra* extract for 12 h. The cell viability was measured using the Trypan blue dye exclusion assay. (B) RAW264.7 cells were treated for different times of *S. brachyandra* extract (100 μ g/ml), and the cell viability was measured using the Trypan blue dye exclusion assay. The graphs are presented as the means \pm SD of three independent experiments. n.s., nonsignificant.

존율을 확인하였다(0, 3, 6, 12, 24시간). 그 결과, 3시간에서는 99.95%, 6시간에서는 98.5%, 12시간에서는 96.5%, 24시간에서는 95%의 생존율을 보였다(Fig. 1B). *S. brachyandra* 추출물은 RAW264.7 세포주에서 크게 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다. 따라서 이후의 실험에서는 *S. brachyandra* 추출물의 처리 농도를 20, 100 μ g/ml로 사용하고, LPS에 의한 염증 반응 유도시간을 고려하여 처리시간은 6시간으로 고정하였다.

Stephania brachyandra 추출물에 의한 염증 매개 단백질 발현 조절 효과

LPS는 대식 세포에서 TLR4 신호전달기전을 통해 다양한 염증성 사이토카인과 염증 매개 단백질의 발현을 유도함이 알려져 있다. *Stephania brachyandra* 추출물의 항염 효능을 확인하기 위해 염증성 사이토카인과 염증 매개 단백질의 발현량을 확인하였다. RAW264.7 세포주에 LPS (100 ng/ml)와 *S. brachyandra* 추출물(20, 100 μ g/ml)을 처리하고 6시간 후 세포를 lysis 하여 Western blot을 통해 COX-2와 IL-1 β 의 단백질 발현량을 확인하였다. 그 결과 LPS에 의해 증가했던 COX-2와 IL-1 β 의 단백질 발현이 *S. brachyandra* 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다(Fig. 2A-C). 따라서, *S. brachyandra* 추출물은 염증매개 COX-2와 IL-1 β 의 단백질 발현량을 감소를 통해 염증 반응을 억제할 수 있음을 확인하였다.

Stephania brachyandra 추출물에 의한 염증성 사이토카인의 mRNA 발현 억제 효과

Stephania brachyandra 추출물에 의한 염증성 사이토카인과 염증 매개 단백질의 발현량 감소가 mRNA 수준에서 나타나는 현상인지 확인하기 위해 quantitative real-time PCR을 수행하였다. RAW264.7 세포주에 LPS (100 ng/ml)와 *S. brachyandra* 추출물(20, 100 μ g/ml)을 6시간 처리한 후, RNA를 분리하여 quantitative real-time PCR을 수행하였다. 그 결과, LPS에 의한 염증 반응 과정의 매개 분자인 IL-6, inducible nitric oxide synthase (iNOS), IL-1 β 의 mRNA 발현량이 *S. brachyandra* 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3A-C). 따라서 *S. brachyandra* 추출물은 LPS에 의해 유도되는 염증 매개 단백질의 발현을 mRNA 수준에서 감소시킴을 확인할 수 있었다.

Stephania brachyandra 추출물에 의한 NF- κ B와 NFAT의 전사활성 억제

LPS에 의한 염증성 사이토카인과 염증 매개 단백질의 발현이 *S. brachyandra* 추출물에 의해 전사수준에서 억제되는 것

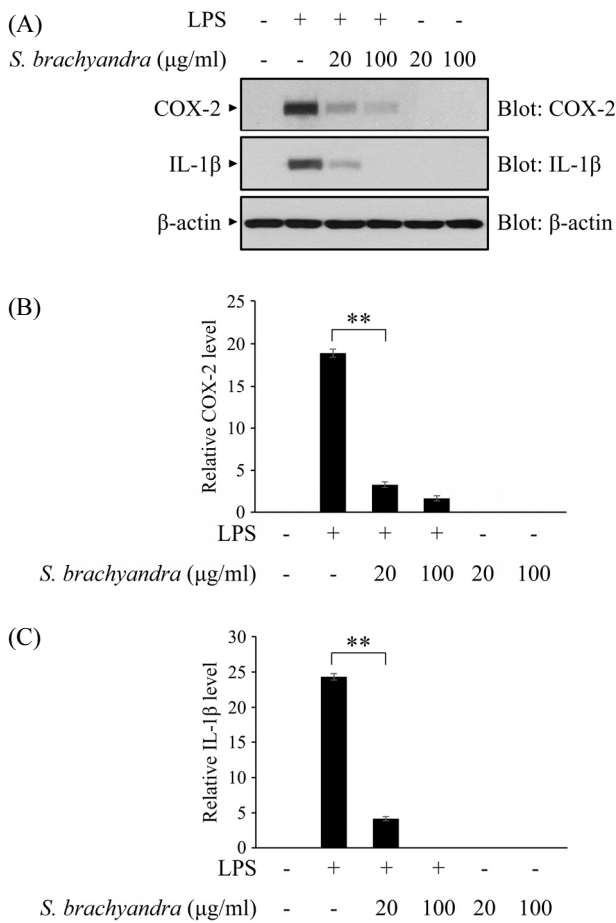


Fig. 2. The effects of *Stephania brachyandra* extract in the protein expression of LPS-induced pro-inflammatory mediators. (A) RAW264.7 cells were treated with *S. brachyandra* extract (20 or 100 µg/ml) in the presence of LPS (100 ng/ml) for 6 h. COX-2, IL-1β and β-actin protein levels were analyzed by Western blot analysis. (B-E) The relative levels of protein bands were measured by densitometry. The results are presented as the means ± SD of three independent experiments. ** $p < 0.01$.

을 확인하였으므로, 이들 유전자의 전사를 유도하는 것으로 알려진 염증 전사 인자의 활성을 확인하였다. LPS에 의한 염증성 사이토카인과 염증 매개 단백질의 발현은 전사 인자인 NF-κB와 NFAT와 의해 조절될 수 있다(Liu *et al.*, 2017). 먼저, NF-κB의 활성화를 측정하기 위하여 IκB의 인산화 수준을 Western blot을 통해 확인하였다(Fig. 4A and B). IκB의 인산화는 NF-κB를 핵으로 이동하도록 하여 전사를 유도하게 한다. LPS를 처리하면 IκB의 인산화는 증가되고 *S. brachyandra* 추출물은 농도 의존적으로 LPS에 의해 증가된 IκB의 인산화를 감소시킬 수 있었다(Fig. 4A and B). NF-κB의 유전자 발현 조절을 직접 확인하기 위해 NF-κB 의존적인 luciferase reporter 활성을 측정하였다(Fig. 4C). NF-κB 의존적인 luciferase reporter를 transfection한 RAW264.7 세포주에 LPS (100 ng/ml)

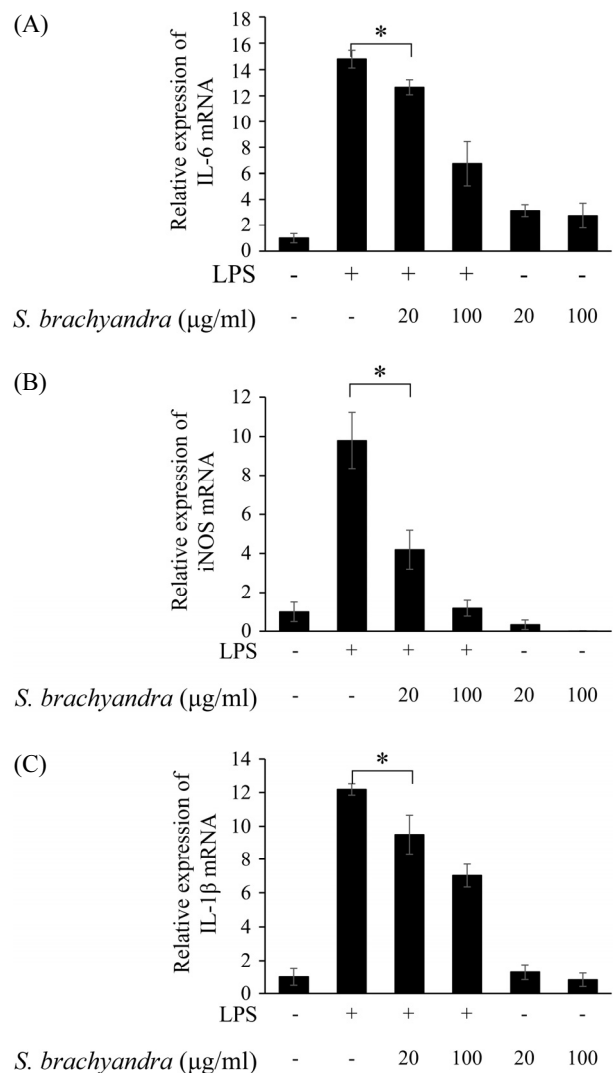


Fig. 3. The effects of *Stephania brachyandra* extract in the mRNA expression of LPS-induced pro-inflammatory mediators. RAW264.7 cells were treated with *S. brachyandra* extract (20 or 100 µg/ml) in the presence of LPS (100 ng/ml) for 6 h. The mRNA levels of IL-6 (A), iNOS (B), and IL-1β (C) were determined by qRT-PCR. The results are presented as the means ± SD of three independent experiments. * $p < 0.05$.

와 *S. brachyandra* 추출물(20, 100 µg/ml)을 6시간 처리하였다. Reporter analysis 결과, LPS에 의해 증가했던 NF-κB의 전사 활성이 *S. brachyandra* 추출물에 크게 감소함을 확인하였다(Fig. 4C). 또한, NFAT 의존적인 luciferase reporter 활성을 동일한 방법을 통해 측정하였을 때도, *S. brachyandra* 추출물에 의해 전사 활성이 크게 감소됨을 확인하였다(Fig. 4D). 종합적으로 *S. brachyandra* 추출물이 전사 인자인 NFAT와 NF-κB 활성을 억제함으로써 LPS에 의해 유도되는 염증매개 유전자의 mRNA 발현을 감소시키는 기전을 통해 염증 단백질의 발현을 조절함을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

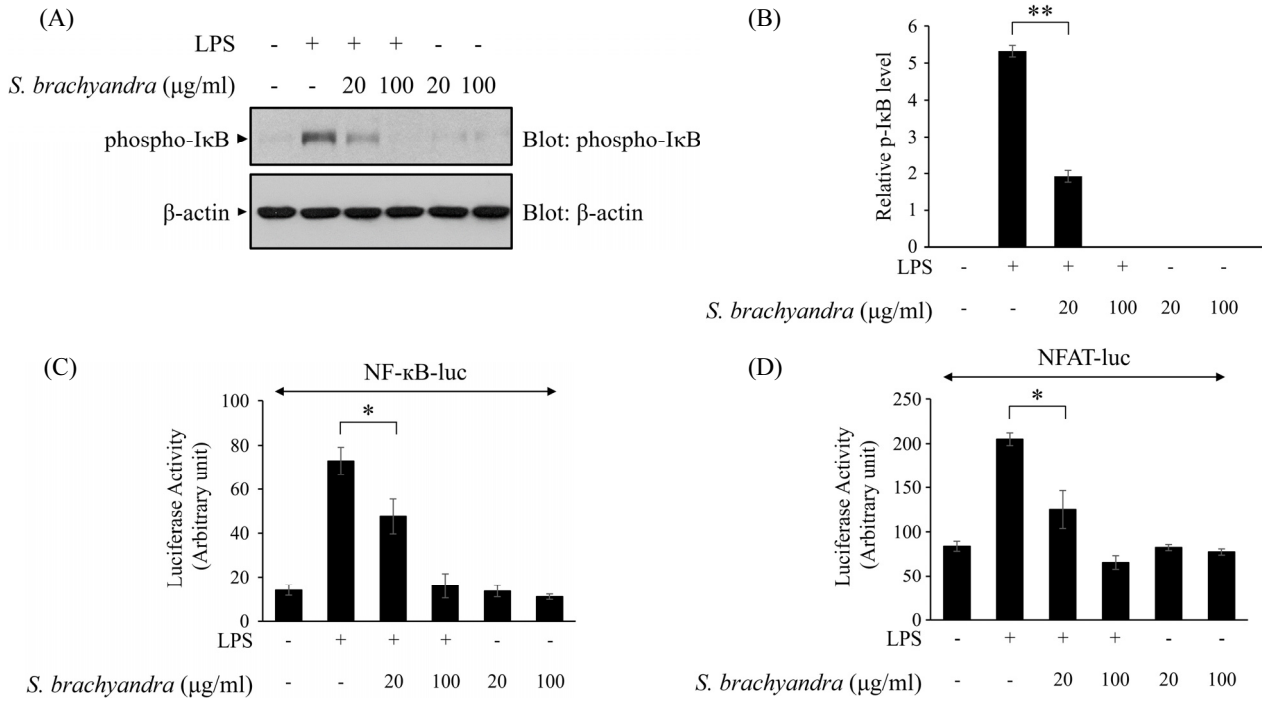


Fig. 4. The effect of *Stephania brachyandra* extract in LPS-induced gene transcriptional activation. (A) RAW264.7 cells were treated with *S. brachyandra* extract (20 or 100 μg/ml) in the presence of LPS (100 ng/ml) for 6 h. Phospho-IκB and β-actin protein levels were analyzed by Western blot analysis. (B) The relative levels of protein bands were measured by densitometry. (C, D) The NF-κB-luciferase (C) or the NFAT-luciferase (D) reporter vector was transfected into RAW264.7 cells. After 24 h, cells were incubated with the *S. brachyandra* extract (20 or 100 μg/ml) in the presence of LPS (100 ng/ml) for 6 h. Cell lysates were analyzed for luciferase activity. The results are presented as the means ±SD of three independent experiments. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

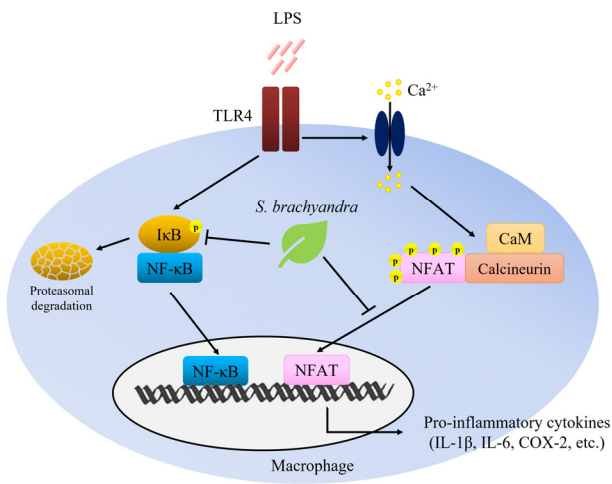


Fig. 5. A model of *Stephania brachyandra* extract in the suppression of LPS-induced inflammatory responses. *Stephania brachyandra* extract exerts anti-inflammatory effects by inhibiting NF-κB and NFAT gene transcriptional activation in macrophages.

고찰

염증 반응은 세균이나 바이러스 등의 병원체에 의한 감염 또는 상처로부터 신체를 보호하기 위한 주요 방어작용으로 선천

면역 및 후천면역에서 중요한 역할을 한다(Lawrence and Fong, 2010). 정상적인 상황에서는 면역계가 염증 신호전달 경로를 억제함으로써 염증 반응을 조절한다(Bonizzi and Karin, 2004). 하지만, 과도하고 만성적인 염증 반응은 오히려 조직에 손상을 유발하고 항상성을 무너뜨림으로써 당뇨병, 자가면역질환, 심혈관질환, 암과 같은 질병의 유병률을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Furman *et al.*, 2019). 특히 감염에 의해 사이토카인이 과도하게 분비되어 정상세포를 공격하는 현상인 사이토카인 폭풍(cytokine storm)은 패혈증(sepsis)과 패혈증 쇼크(septic shock)을 유발하게 되므로 과도하게 증가된 염증 반응을 조절하는 것은 이를 예방하기 위한 방법이 될 수 있다(Noori *et al.*, 2020). 다양한 면역세포와 마우스에서 LPS에 의해 유도되는 강한 염증 반응 모델은 염증 반응 신호전달 기전을 밝히기 위한 연구와 이를 조절하기 위한 약물을 찾는 연구에서 널리 사용되고 있다. 최근에는 세포독성과 부작용이 적은 천연물 추출물에서 항염 효능을 밝히는 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

염증 반응에 관여하는 다양한 면역세포들 중에서도 대식세포는 염증 반응을 시작하고 증폭시키는 초기 면역반응에 중요한 역할을 한다(Chae *et al.*, 2009). 염증 반응에서 대식세포는 병원체에 의해 활성화되어 IL-1β, IL-6 등의 염증성 사이토

카인뿐만 아니라 TNF- α , COX-2와 같은 염증 매개 단백질을 생성하여 염증 반응을 유발한다(Storck *et al.*, 1994).

LPS는 그람 음성균의 세포벽 구성 성분으로 병원체 관련 분자 패턴(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)로서 TLR4에 의해 인지된다(Guijarro-Muñoz *et al.*, 2014). TLR4는 단핵구, 대식 세포, 수지상세포, T세포에서 발견된다. TLR4는 전사 인자인 NF- κ B의 활성화를 통해 신호전달 경로를 증폭시킨다(Vaure and Liu, 2014). 이외에도 LPS는 대식 세포의 NFAT3와 4의 활성화를 유도할 수 있음이 알려져 있으며 LPS에 의한 IL-1 β 의 발현에 STAT3 활성화가 중요하다는 것이 최근 연구에서 보고된 바 있다(Balic *et al.*, 2020; Manabe *et al.*, 2021).

본 논문에서는 *S. brachyandra* 추출물이 NF- κ B와 NFAT 신호전달 기전을 억제함으로써 염증성 사이토카인과 염증 매개 단백질의 발현을 mRNA 수준에서 감소시키는 강력한 항염 효능을 확인하였다. 현재까지 *S. brachyandra*의 효능성분을 분석한 연구결과는 보고된 바 없으나, *S. brachyandra*이 속한 다른 함박이속 식물들의 추출물을 분석한 연구들에서 THP, stepharine, roemerine, cycleanine, palmatine (PAL), jatrorrhizine 과 같은 다양한 알칼로이드(alkaloid)가 발견되었다(Bory *et al.*, 2013; Dary *et al.*, 2017). Stepharine의 경우 천연 알칼로이드로 TLR4와 직접 결합하여 그 작용을 억제하는 TLR4 inhibitor로써 알려져 있으며, BV2 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증매개 인자들의 mRNA와 단백질 발현량을 효과적으로 감소시키고 I κ B의 인산화와 NF- κ B의 핵으로의 이동을 억제할 수 있는 것이 보고되었다(Hao *et al.*, 2020). THP의 경우 몇 가지 동물모델에서 TLR4와 TNF-receptor associated factor-6 (TRAF-6)의 mRNA와 단백질 발현을 억제하거나 활성산소를 감소시킴으로써 항염 효과와 세포 보호 효능을 나타내는 것이 보고된 바 있다(Yu *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018). 본 논문에서 확인된 *S. brachyandra* 추출물의 항염 효능은 NF- κ B와 NFAT 신호전달 기전을 모두 억제하였으므로 stepharine 과 THP에 의한 TLR4 억제기전에 의한 효과일 가능성이 있으나 향후 성분분석에 대한 연구가 수반되어야 할 것이다.

본 논문에서는 LPS에 의해 유도되는 염증 반응에서 *S. brachyandra* 추출물의 항염 효능을 처음으로 확인하였고, 잠재적으로 만성적인 염증 반응을 억제하는 치료제로서의 개발 가능성을 제시한다.

적 요

염증 반응은 감염, 조직손상 및 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 다양한 자극으로부터 보호하는 방어 기전이다. LPS는 지

질다당류로 그람 음성균의 세포벽에서 주로 발견되는 내독소이다. 특히, 대식 세포의 toll-like receptor 4 (TLR4)에 의해 인지되어 염증성 사이토카인을 분비하는데 매우 중요한 역할을 하지만, 과도한 염증 반응은 세포나 조직의 손상을 유발하여 염증 질환을 유발한다. 천연물 유래 신규 염증 반응 조절 물질을 발굴하기 위하여 아시아권에서 존재하는 자생식물 라이브리리를 스크리닝 하였고, 그 결과 *Stephania brachyandra* (*S. brachyandra*)가 항염 효능을 가지는 것을 확인하였다. *Stephania brachyandra*는 아시아권에서 전통적으로 항산화 효능 및 항염 효능이 있는 것으로 알려져 있으나, 과학적인 증거는 없는 상태이다. 본 논문에서는 LPS에 의해 염증 반응을 유도하였을 때 *S. brachyandra* 추출물의 항염 효과를 실제로 검증하였고, 또한 그 신호전달 기전을 확인하였다. LPS를 대식 세포주인 RAW264.7에 처리하였을 때 유도되는 IL-1 β , IL-6 및 COX-2와 같은 염증성 사이토카인의 발현이 *S. brachyandra* 추출물에 의해 억제되었다. 이러한 염증 반응의 억제효과는 *S. brachyandra* 추출물이 전사 인자인 NF- κ B와 NFAT의 활성을 억제함으로써 나타났다. 따라서 본 연구를 통해 *S. brachyandra* 추출물이 항염 효과를 유도하는 과학적인 결과를 처음으로 확인하였고, 향후 염증 제어 조절 천연물 후보로 개발할 가능성을 제시하였다.

감사의 말

이 논문은 한국연구재단(NRF-2021R1A2C1008170)과 KRIBB Initiative Program의 지원을 받아 수행되었음. 천연물을 제공한 Kongmany Sydara (라오스 전통 의학 연구소), 이상우(한국생명공학연구원) 박사에게 감사의 말을 전함.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to report.

References

- Balic JJ, Albargy H, Luu K, Kirby FJ, Jayasekara WSN, Mansell F, Garama DJ, De Nardo D, Baschuk N, Louis C, *et al.* 2020. STAT3 serine phosphorylation is required for TLR4 metabolic reprogramming and IL-1 β expression. *Nat. Commun.* **11**, 3816.
- Bonizzi G and Karin M. 2004. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**,

280–288.

- Bory S, Bun SS, Baghdikian B, Dumètre A, Hutter S, Mabrouki F, Bun H, Elias R, Azas N, and Ollivier E.** 2013. HPLC analysis of *Stephania rotunda* extracts and correlation with antiplasmodial activity. *Phytother. Res.* **27**, 278–284.
- Chae HS, Kang OH, Choi JG, Oh YC, Lee YS, Jang HJ, Kim JH, Park H, Jung KY, Sohn DH, et al.** 2009. 5-Hydroxytryptophan acts on the mitogen-activated protein kinase extracellular-signal regulated protein kinase pathway to modulate cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 553–557.
- Chinh VT, Van DN, Tran VT, and Xia N.** 2019. *Stephania polygona* (Menispermaceae), a new species from Southern Vietnam. *Phytotaxa* **400**, 211–214.
- Christenhusz MJM and Byng JW.** 2016. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* **261**, 201–217.
- Dary C, Bun SS, Herbette G, Mabrouki F, Bun H, Kim S, Jabbour F, Hul S, Baghdikian B, and Ollivier E.** 2017. Chemical profiling of the tuber of *Stephania cambodica* gagnep. (Menispermaceae) and analytical control by UHPLC-DAD. *Nat. Prod. Res.* **31**, 802–809.
- Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, and Needleman P.** 1990. The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chem.* **265**, 16737–16740.
- Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, Ferrucci L, Gilroy DW, Fasano A, Miller GW, et al.** 2019. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat. Med.* **25**, 1822–1832.
- Guijaro-Muñoz I, Compte M, Álvarez-Cienfuegos A, Álvarez-Vallina L, and Sanz L.** 2014. Lipopolysaccharide activates Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF-κB signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes. *J. Biol. Chem.* **289**, 2457–2468.
- Guzik TJ, Korb R, and Adamek-Guzik T.** 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**, 469–487.
- Hao T, Yang Y, Li N, Mi Y, Zhang G, Song J, Liang Y, Xiao J, Zhou D, He D, et al.** 2020. Inflammatory mechanism of cerebral ischemia-reperfusion injury with treatment of stepharine in rats. *Phytomedicine* **79**, 153353.
- Kindt T, Goldsby R, Osborne B, and Kuby J.** 2007. Part I. Introduction: Innate Immunity, pp. 52–75. In *Kuby Immunology*, 6th edn. W.H. Freeman and Co., New York, USA.
- Lawrence T.** 2009. The nuclear factor NF-κB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a001651.
- Lawrence T and Fong C.** 2010. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-κB. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 519–523.
- Liu T, Zhang L, Joo D, and Sun SC.** 2017. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2**, 17023.
- Manabe T, Park H, and Minami T.** 2021. Calcineurin-nuclear factor for activated t cells (NFAT) signaling in pathophysiology of wound healing. *Inflamm. Regen.* **41**, 26.
- Martínez J, Bello A, Rubio L, Rodríguez C, Galán L, Caudales E, and Alvarez JL.** 1998. Calcium antagonist properties of the bisbenzylisoquinoline alkaloid cycleanine. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **12**, 182–187.
- Ngkelo A, Meja K, Yeadon M, Adcock I, and Kirkham PA.** 2012. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and G_iα dependent PI-3kinase signalling. *J. Inflamm.* **9**, 1.
- Noori MS, Courreges MC, Bergmeier SC, McCall KD, and Goetz DJ.** 2020. Modulation of LPS-induced inflammatory cytokine production by a novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* **883**, 173340.
- Salvemini D, Korb R, Anggård E, and Vane J.** 1990. Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2593–2597.
- Storck M, Schilling M, Prestel R, Abendroth D, Burkhardt K, Prestel R, and Hammer C.** 1994. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. *Transpl. Int.* **7**, S647–S649.
- Sun C, Chen Z, Wang H, and Ding K.** 2018. Tetrahydropalmatine prevents high-fat diet-induced hyperlipidemia in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Med. Sci. Monit.* **24**, 6564–6572.
- Sweet MJ and Hume DA.** 1996. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 8–26.
- Vaure C and Liu Y.** 2014. A comparative review of Toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front. Immunol.* **5**, 316.
- Xie D, He J, Huang J, Xie H, Wang Y, Kang Y, Jabbour F, and Guo J.** 2015. Molecular phylogeny of chinese *Stephania* (Menispermaceae) and reassessment of the subgeneric and sectional classifications. *Aust. Syst. Bot.* **28**, 246–255.
- Yu J, Che J, Liu L, Yang F, Zhu X, and Cao B.** 2016. Tetrahydropalmatine attenuates irradiation induced lung injuries in rats. *Life Sci.* **153**, 74–81.
- Zamora R, Vodovotz Y, and Billiar TR.** 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol. Med.* **6**, 347–373.