

호흡기 상피세포에서 [6]-gingerol
에 의한 IL-1 β 유도 MUC5AC
유전자 발현의 억제

연세대학교 대학원
의학과
김정홍

호흡기 상피세포에서 [6]-gingerol
에 의한 IL-1 β 유도 MUC5AC
유전자 발현의 억제

지도교수 김 경 수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2006년 12월 6일

연세대학교 대학원
의 학 과
김 정 홍

김정홍의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2006년 12월 6일

감사의 글

비록 시작은 늦고 뒤쳐진 듯했지만 제 자신의 역량을 시험해보고자 도전하여 이제 하나의 작은 결실을 세상에 내놓으려고 합니다. 조금 더 실험적이고 창의적인 연구를 꿈꾸며 시작은 했지만 구석구석 미진한 부분이 마치 제 본연의 거울처럼 비춰져 아쉬운 여운으로 남습니다.

아무쪼록 여러 일상의 바쁘신 시간 속에서도 논문이 완성되기까지 세심하게 격려해주시고 지도편달해주신 김경수 지도교수님께 진심으로 큰 감사드리며, 아울러 부족한 논문을 사랑으로 지도해주시고 쓰디 쓴 조언을 아낌없이 해주신 윤주헌 교수님과 정기양 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 귀찮은 질문에도 아랑곳하지 않고 친절히 가르쳐 주시며 많은 도움을 주신 최수옥 선생님께도 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 늘 관심과 사랑으로 앞길을 걱정해 주시는 저의 두 부모님과 영원히 사랑스런 우리 두 꼬마 왕자님을 키우느라 고생하는 민규·민건 엄마에게 이 글로 고마운 마음을 대신 전합니다.

저자 씬

<차례>

그림 및 표 차례

국문요약	1
I. 서론	2
II. 재료 및 방법	4
III. 결과	7
1. 사람 호흡기 상피세포에서 IL-1 β 에 의한 MUC5AC 유전자의 발현	7
2. [6]-gingerol에 의한 MUC5AC 유전자 발현 억제와 세포 생존율	9
3. [6]-gingerol에 의한 MUC5AC 유전자 및 단백 발현 억제	11
4. [6]-gingerol 투여 시점에 따른 MUC5AC 유전자의 발현 억제	13
5. [6]-gingerol에 의한 MUC5AC 유전자 발현 억제 작용기전	15
6. ERK와 p38 MAPK 특이 억제체에 의한 MUC5AC 발현 억제	17
IV. 고찰	19
V. 결론	22
참고문헌	23
영문요약	26

그림 차례

그림 1. 사람 호흡기 상피세포에서 IL-1 β 에 의한 MUC5AC 유전자의 발현	8
그림 2. [6]-gingerol에 의한 MUC5AC 유전자 발현 억제와 세포 생존율	10
그림 3. [6]-gingerol에 의한 MUC5AC 유전자 및 단백질 발현 억제	12
그림 4. [6]-gingerol 투여 시점에 따른 MUC5AC 유전자의 발현 억제	14
그림 5. [6]-gingerol에 의한 MUC5AC 유전자 발현 억제 작용기전	16
그림 6. ERK와 p38 MAPK 특이 억제체에 의한 MUC5AC 발현 억제	18

국문 요약

호흡기 상피세포에서 [6]-gingerol에 의한 IL-1 β 유도 MUC5AC 유전자 발현의 억제

생강(Ginger)은 특유의 향기와 매운 맛을 지니고 있는 주요 향신료 중의 하나로 향균, 항염, 발한, 진토, 혈액순환장애에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 전통 의학에서 생강이 진해거담 효과 및 천식의 치료에 효능이 있다는 사실에 근거하여, 본 연구에서는 사람 호흡기 상피세포에서 IL-1 β 유도 MUC5AC 유전자의 발현이 [6]-gingerol에 의해 억제되는지 확인하고, [6]-gingerol에 의한 MUC5AC mRNA의 발현 억제 작용기전을 알아보려고 하였다. 재료 및 방법으로 NCI-H292 세포주에 IL-1 β 를 24시간 동안 첨가 배양한 다음 MUC5AC mRNA에 대해 RT-PCR을 시행하였고, IL-1 β 를 첨가 배양 전 [6]-gingerol을 전처치한 다음 MUC5AC mRNA와 단백질 발현에 대해 RT-PCR과 Western blot 분석을 시행하였다. 또한 ERK, p38 MAPK, JNK 등의 MAP kinase 신호전달 경로 중 IL-1 β 에 의해 활성화된 MAP Kinase에 대해 [6]-gingerol을 전처치한 후 MAPK 활성 억제에 대해 Western blot 분석을 시행하였다. 결과로 10 ng/ml의 농도로 24시간 IL-1 β 를 투여 시에 MUC5AC 유전자의 발현이 유의하게 증가하였고, 10 μ M의 [6]-gingerol 농도에서 IL-1 β 유도 MUC5AC 유전자의 발현이 유의하게 억제되었으며 [6]-gingerol의 투여 시점과는 무관하였다. 또한 [6]-gingerol 전처치 후 IL-1 β 첨가 배양시에 ERK와 p38 MAPK의 발현이 유의하게 억제되었다. 이러한 결과로, [6]-gingerol은 사람 호흡기 상피세포에서 IL-1 β 에 의해 유도된 MUC5AC 유전자의 발현을 유의하게 억제하므로 기도 점액 과분비 조절에 대한 치료제로서의 가능성을 보여준다고 생각한다.

핵심되는 말 : [6]-gingerol, IL-1 β , MUC5AC, 사람 호흡기 상피세포

호흡기 상피세포에서 [6]-gingerol에 의한 IL-1 β 유도 MUC5AC
유전자 발현의 억제

<지도교수 김 경 수>

연세대학교 대학원 의학과

김 정 홍

I. 서론

생강(生薑, Ginger)은 이집트, 인도 등의 열대와 아열대 아시아 지역에서 재배되어온 생강과(*Zingiber officinale* Roscoe)에 속하는 다년생 초본식물의 근경(根莖)으로서 특유의 향기와 매운 맛을 지니고 있어 세계적으로 널리 이용되고 있는 주요 향신료 중의 하나이다. 생강은 85%의 수분과 10~12%의 단백질, 탄수화물, 지방산과 무기질 그리고 0.25~3%의 풍미 성분으로 구성되어 있으며 이 속에는 정유(essential oil) 성분인 zingiberol, zingiberene, citral, borneol, phellandrene, camphene 등과 생강 특유의 매운 맛을 내는 올레오레신(oleoresin) 성분인 gingerol, paradol, gingerdione, gingerdiol 등이 함유되어 있다. Gingerol의 여러 유도체 중에서 [6]-gingerol이 주요 약리학적 활성을 나타내며 shogaol과 zingerone으로 분해시 그 효능이 저하되는 것으로 알려져 있다.¹

전통적으로 생강은 소화액을 분비하여 식욕을 증진시키고 위장 운동을 촉진하며 오심, 구토를 멎게 하고, 세균성 질환에 대한 항균, 항염, 그리고 중독의 응급 치료에 효과가 있고, 발한, 천식, 혈액순환장애 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다.² 최근 분자생물학적 연구에 의하면 생강 추출물 중 [6]-gingerol은 iNOS, cyclooxygenase-2, IL-6, TNF- α , GM-CSF와 같은 전구 염증 유전자 및 VEGF(vascular endothelial growth factor)의 발

현 조절에도 관여하여 항산화 기능, 해열진통 기능, 체내 지질저하 및 신생혈관 억제를 통한 항종양 기능 등을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다.³⁻⁵ 또한 전통의학에서는 상기도 감염의 증상으로 비루가 증가하고 기침, 가래 등을 동반할 때 생강을 달여 복용하면 증상 개선에 비교적 좋은 효과가 있는 것으로 알려져 있다.^{6,7}

비염을 비롯한 급, 만성 부비동염, 기관지염과 기관지 천식 같은 염증성 기도 질환에서 과분비된 점액은 기도 점막의 점액섬모운동능을 감소시키고 이차적인 세균 감염을 유발하여 다양한 호흡기 질환을 초래하게 된다. 이때 점액의 과분비는 여러 종류의 사이토카인이나 펩타이드, 염증성 매개물질이 직·간접적으로 관여하여 MUC5AC나 MUC8과 같은 점액 유전자의 발현을 상향 조절시켜 일어나게 되는데, 대표적인 염증 유발 사이토카인인 IL-1 β 가 기도점막 상피세포에서 과다 분비되는 경우에는 기도 염증 반응이 더욱 촉발되는 것으로 알려져 있다.^{8,9} 또한 최근 사람 정상 코점막 상피세포 및 사람 폐 점액상피양 암종 세포주(NCI-H292)에 대한 연구에서, IL-1 β 에 의해 유도되는 MUC5AC의 과발현이 ERK/p38 MAP kinase-MSK1-CREB 신호전달 체계의 순차적인 활성화에 의해 기도 상피세포에서 일어나는 것임이 밝혀진 후 점액 과분비 조절을 통한 염증성 기도 질환의 치료 전략에 새로운 관점을 제공하게 되었다.¹⁰

현재까지는 사람 호흡기 상피세포에서 점액 과분비 조절 물질로서 dexamethasone 혹은 budesonide가 점액 생산 및 점액 유전자의 발현을 억제한다는 연구 결과가 있으나,^{11,12} [6]-gingerol과 같은 천연 추출물 성분에 의한 기도 점액 과분비 조절에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 본 연구의 목적으로 첫째, 폐 점액상피양 암종 세포주인 NCI-H292 세포에서 IL-1 β 에 의해 MUC5AC mRNA가 유도되는지 알아보고 둘째, IL-1 β 유도 MUC5AC mRNA의 발현이 [6]-gingerol에 의해 억제되는지 확인하고 셋째, [6]-gingerol을 IL-1 β 투여 전, 둘을 동시에, IL-1 β 투여 후 처치 시 MUC5AC mRNA의 발현 양상을 알아보고 넷째, [6]-gingerol에 의한 MUC5AC mRNA 발현 억제의 작용기전을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 폐 점액상피양 암종 세포주 배양

사람 호흡기 상피세포인 사람 폐 점액상피양 암종 세포주(human pulmonary mucoepidermoid carcinoma cell lines)인 NCI-H292 세포는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 을 이용하였다. 이 세포주는 95%의 공기와 5%의 이산화탄소, 가습화된 환경에서 37°C의 온도로 10% fetal bovine serum과 2 mM L-glutamine, penicillin(100 µg/ml), streptomycin(100 µg/ml)이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에서 배양하였다. 분주 후 밤새 배양한 다음 세포를 24시간 동안 0.5% fetal bovine serum을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 배양한 후 실험하였다.

2. 재료

[6]-gingerol ((S)-5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone, HPLC 분석 상 순도가 95% 이상), ERK에 대한 특이 억제제(specific inhibitor)인 PD98059, p38 MAPK에 대한 특이 억제제인 SB203580 등은 Calbiochem Biochemicals(San Diego, CA, USA)에서, IL-1β는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였고, anti-phospho-p44/42 MAP kinase (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) 항체, anti-phospho-p38 MAP kinase (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) 항체, anti-phospho-SAPK/c-jun NH2-terminal kinase MAP kinase (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) 항체 등은 Cell Signaling(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다.

3. MUC5AC mRNA의 RT-PCR 분석

전체 RNA는 Tri-Reagent(Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 각 조건으로 배양된 세포에서 얻었으며 전체 RNA에서 cDNA로의 역전사(reverse transcription)는 1 µg/20 µl의 전체 RNA를 random hexanucleotide primer와 Moloney murine leukemia virus reverse

transcriptase(Gibco-BRL)를 이용하였고, polymerase chain reaction은 Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cyclor(Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 이용하였다. PCR에 사용한 oligonucleotide primer는 MUC5AC의 GenBank™ sequence(GenBank™ accession number AJ001402)에 근거하여 5' primer CGACAACACTTCTGCGGTGC; 3' primer GCACTCATCCTTCCTGTCGTT를 사용하여 337 bp를 증폭하였다. 각 반응의 대조군으로 사용된 β_2 -microglobulin의 oligonucleotide primer는 GenBank™ human sequence(GenBank™ accession number XM007650)에 근거하여 5' primer CTCGCGCTACTCTCTTTCTGG; 3' primer GCTTACATGTCTCGATCCCACTTAA로 작성하였다. MUC5AC의 증합 효소 연쇄 반응은 95°C에서 30초간 변성(denaturation) 과정과 60°C에서 60초간 결합(annealing) 반응, 72°C에서 60초간 연장(extension) 반응을 35회 진행하였고 증폭된 PCR 산물은 1% 한천 겔에서 전기영동하여 ethidium bromide 용액으로 염색하여 밴드를 관찰하였고, 이를 sequencing하여 염기 서열을 확인하였다. 확인된 밴드의 세기는 Scion Image(Scion Co., Frederick, MD, USA)를 이용하여 강도를 구한 후 해당하는 β_2 -microglobulin의 강도로 나눈 다음, 이 수치들 중 대조군에서의 수치를 1로 하여 각 실험의 수치를 비율로 나타내어 비교하였다. 실험은 3회 이상 시행하여 평균과 표준편차를 구하였으며 평균값에 대한 차이는 반복 측정자료의 분산분석법(repeated measures ANOVA test)을 이용하였고 다중비교(multiple comparisons)를 추가하여 유의수준 $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

4. Western blot 분석

배양된 NCI-H292 세포주에 대한 각 실험 이후 radioimmunoprecipitation assay buffer(1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)를 이용하여 cell lysates를 만든 다음, 단백질의 양을 bovine serum albumin을 이용한 bicinchronic acid protein assay로 측정한 후 단백질 30 μ g씩을 각 lane

에 넣어 전기영동을 시행하였다. 전기영동은 8% SDS-polyacrylamide gel 을 이용하였고, 전기영동 후 nitrocellulose membrane에 전이시킨 다음 막을 0.05% Tween-20이 함유된 Tris-buffered saline(TBST)로 희석한 다음 10% non-fat dry milk로 4°C에서 12시간 반응시킨 후 p-ERK (1:1,000), p-p38 MAPK (1:1,000), p-JNK (1:1,000) 항체를 각각 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 또한 MUC5AC 단백질의 발현은 MUC5AC 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)(1:1,000)를 첨가하여 반응시켰다. 이후 TBST로 세척한 다음 1:5,000으로 희석한 horseredish peroxidase가 결합된 이차 항체(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)로 1시간 동안 처리하고 수 차례의 세척을 시행한 후 enhanced chemiluminescence와 autoradiography를 이용하여 밴드를 확인하였다. 한편 nitrocellulose 막을 deprobing한 다음 같은 방법을 이용하여 α -tubulin 항체(Santa Cruz Biotechnology)와 반응을 시켰다.

5. 세포증식 분석

NCI-H292 세포주를 well당 2,000개씩 분주하여 96 well plate에서 16시간 동안 배양한 다음 각 조건으로 실험 후 세포증식 분석을 시행하였다. 분석은 Cell Titer 96 AQueous One Solution Proliferation Assay Kit (Promega Inc., Madison, WI, USA)를 사용하였다. 방법으로 kit에 포함된 tetrazolium 합성물 2 ml와 phenazine ethosulfate 100 μ l를 섞은 후 well당 20 μ l의 혼합 용액을 첨가하였다. 이 후 1시간 동안 37°C, 5% CO₂의 환경에서 96 well plate를 배양한 후 spectrophotometer(490 nm 파장)로 optical density(O.D.)를 측정하였다. 실험은 3회 이상 시행하여 평균과 표준편차를 구하였으며 평균값에 대한 차이는 반복 측정자료의 분산분석법(repeated measures ANOVA test)을 이용하였고 다중비교(multiple comparisons)를 추가하여 유의수준 $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

III. 결과

1. 사람 호흡기 상피세포에서 IL-1 β 에 의한 MUC5AC 유전자의 발현

NCI-H292 세포주에 1, 10, 100 ng/ml의 IL-1 β 를 24시간 동안 각각 첨가 배양하여 MUC5AC 유전자의 발현을 알아보았다. IL-1 β 를 첨가하지 않은 대조군의 유전자 발현과 비교한 상대적 비율은 1, 10, 100 ng/ml의 IL-1 β 를 첨가 시 각각 1.2 ± 0.2 , 3.0 ± 0.4 , 2.9 ± 0.3 으로 나와 10 ng/ml 이상의 농도로 IL-1 β 를 투여 시에 MUC5AC 유전자의 발현이 유의하게 증가하였고 ($p<0.05$), 10 ng/ml 농도의 IL-1 β 에서 가장 발현이 증가하였다(Fig. 1A, 1B). 그리고 10 ng/ml IL-1 β 를 시간대별(0-6-12-24-48 시간)로 첨가 배양한 후 MUC5AC 유전자의 발현 정도를 알아보았다. 대조군인 0 시간과 비교한 6, 12, 24, 48 시간의 유전자 발현의 상대적 비율은 각각 1.5 ± 0.1 , 1.6 ± 0.2 , 2.8 ± 0.3 , 1.8 ± 0.3 으로 나와 24시간 동안 첨가 배양한 경우 MUC5AC 유전자의 발현이 최대로 나타났으며 48시간 동안 첨가 배양한 경우 발현이 감소하였다($p<0.05$)(Fig. 1C,1D). 이러한 결과로 이후 실험은 IL-1 β 를 10 ng/ml 농도로 24시간 동안 첨가 배양하여 시행하였다.

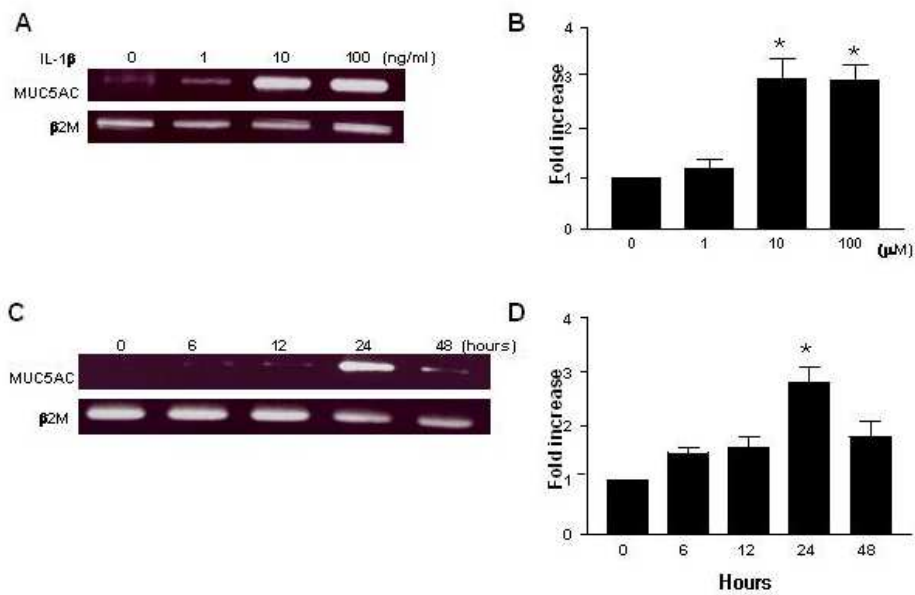


Fig.1. Effect of IL-1 β on MUC5AC gene expression in NCI-H292 cells. A. Confluent cells were treated with various concentrations of IL-1 β for 24 hours, and mRNA levels of MUC5AC were determined by RT-PCR. MUC5AC expression was normalized to the level to β 2M expression and is reported as a ratio of MUC5AC to β 2M. B. Fold increase of MUC5AC mRNA according to the concentration of [6]-gingerol. C. Confluent cells were stimulated for indicated times with 10 ng/ml IL-1 β , and mRNA levels of MUC5AC expressed were determined as the same method. D. Fold increase of MUC5AC mRNA according to the incubation time with [6]-gingerol. The figures shown are representative of three independent experiments. * p <0.05 compared with the control.

2. [6]-gingerol에 의한 MUC5AC 유전자 발현 억제와 세포 생존율

NCI-H292 세포주에 10 ng/ml IL-1 β 를 첨가 배양 1시간 전에 0, 1, 10, 100 μ M의 농도로 [6]-gingerol을 투여한 후 IL-1 β 를 첨가 배양하였다. IL-1 β 와 [6]-gingerol을 모두 첨가하지 않은 대조군과 비교한 상대적 비율은 각각 2.8 \pm 0.4, 1.9 \pm 0.3, 1.1 \pm 0.2, 3.6 \pm 0.4였다. 결과 상 [6]-gingerol 10 μ M의 농도에서 MUC5AC 유전자의 발현이 IL-1 β 만을 첨가 배양한 군에 비해 50% 이상 유의하게 억제되었으나(p <0.05), 100 μ M [6]-gingerol에서는 오히려 MUC5AC 유전자의 발현이 IL-1 β 만을 첨가 배양한 군에 비해 증가하는 양상이었다(Fig. 2A,2B). 한편 [6]-gingerol 각 농도에 따른 생존 세포수의 비율을 [6]-gingerol을 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 백분율로 환산한 결과 1, 10, 100 μ M에서 각각 94.5 \pm 2.6(%), 86.8 \pm 3.1(%), 38.0 \pm 4.9(%)로 측정되었다. 즉, 10 μ M [6]-gingerol에서는 세포의 증식 억제가 관찰되지 않으나 100 μ M의 [6]-gingerol을 처리시에는 세포 증식 억제가 통계적으로 유의하게 관찰되었다(p <0.05)(Fig. 2C).

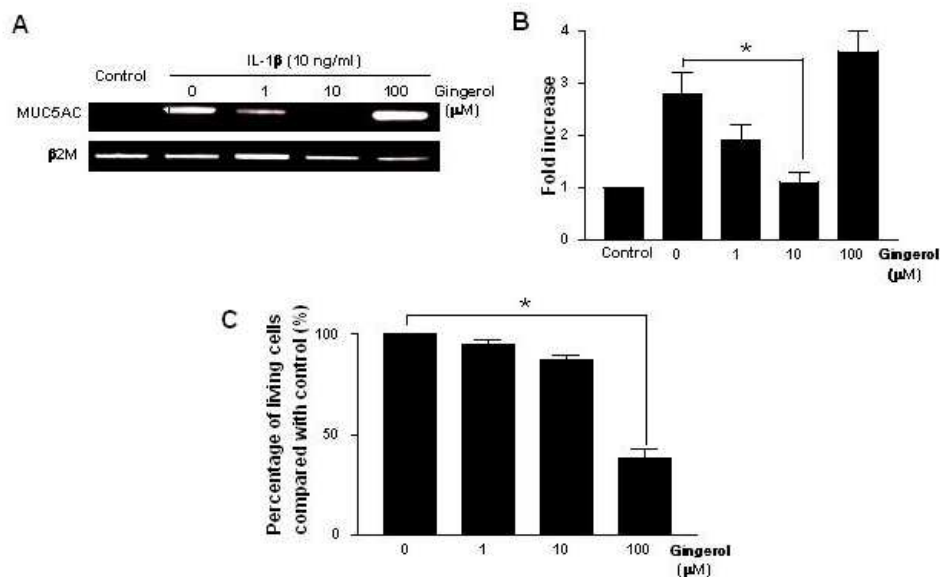


Fig.2. Suppression of MUC5AC gene expression by [6]-gingerol.

A. NCI-H292 cells were pretreated with 1, 10, and 100 μ M [6]-gingerol for 1 hour and then treated with 10 ng/ml IL-1 β for 24 hours. RT-PCR for MUC5AC mRNA expression was performed on each group. Compared with IL-1 β only-treated group, the expression of MUC5AC mRNA is significantly suppressed on treatment with 10 μ M [6]-gingerol. However, the expression of MUC5AC mRNA in 100 μ M [6]-gingerol increases compared with control. B. Fold increase of MUC5AC mRNA treated with the various concentration of [6]-gingerol. C. The percentage of living cells through cell proliferation assay shows no differences in 1 and 10 μ M [6]-gingerol, but shows the decrease of more than 50% on treatment with 100 μ M [6]-gingerol. The figures shown are representative of three independent experiments. * p <0.05

3. [6]-gingerol에 의한 MUC5AC 유전자 및 단백 발현 억제

NCI-H292 세포주에 IL-1 β 첨가 배양 1시간 전에 10 μ M의 [6]-gingerol을 전처리한 다음 10 ng/ml의 IL-1 β 를 투여하였다. MUC5AC 유전자의 발현은 IL-1 β 와 [6]-gingerol을 모두 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 IL-1 β 에 의해 2.9 \pm 0.3배 증가하였으나, [6]-gingerol을 전처리시에는 0.9 \pm 0.2배로 유의하게 발현이 억제되었다(p <0.05)(Fig. 3A,3B). Western blot 분석 상 IL-1 β 에 의해 MUC5AC 단백 발현이 유도되나 [6]-gingerol을 전처리한 경우에 있어서는 MUC5AC 단백 발현이 대조군 수준으로 억제됨을 확인하였다(Fig. 3C).

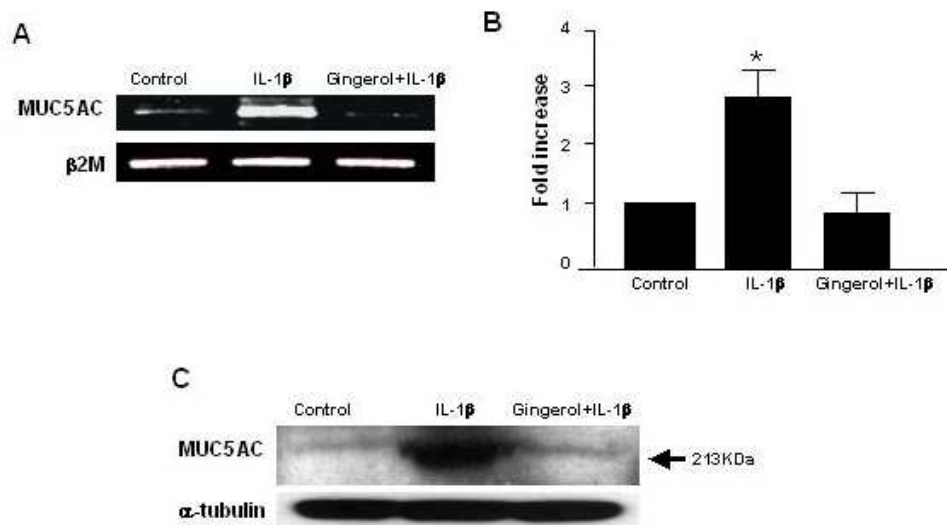


Fig.3. Suppression of MUC5AC gene and protein expression by [6]-gingerol.

A. NCI-H292 cells were pretreated with 10 μ M [6]-gingerol before 1 hour and treated with 10 ng/ml IL-1 β (Gingerol+IL-1 β) for 24 hours. The expression of MUC5AC mRNA notes as 2.9-fold increase by IL-1 β , but this increase is significantly inhibited to the level of control group by the pretreatment with [6]-gingerol. B. Fold increase of MUC5AC mRNA by the treatment with IL-1 β and Gingerol+IL-1 β . C. Western blot analysis for MUC5AC protein expression was performed on each group and α -tubulin was employed as the control. The expression of MUC5AC protein (213 kDa) induced by IL-1 β is suppressed by the pretreatment with [6]-gingerol. The figures shown are representative of three independent experiments. * p <0.05 compared with the control.

4. [6]-gingerol 투여 시점에 따른 MUC5AC 유전자의 발현 억제

IL-1 β 첨가 배양 1시간 전에 [6]-gingerol을 전처리한 군, IL-1 β 와 [6]-gingerol을 동시에 투여한 군, 그리고 IL-1 β 를 첨가 배양한 다음 6시간 후에 [6]-gingerol을 투여한 군 등 세 군에 대하여 각각을 24시간 동안 배양한 후 MUC5AC 유전자의 발현 정도를 알아보았다. IL-1 β 와 [6]-gingerol을 모두 첨가하지 않은 대조군과 비교한 상대적 비율은, IL-1 β 만을 첨가 배양한 경우 2.7 ± 0.4 , [6]-gingerol을 전처리한 경우 0.8 ± 0.2 , 동시 투여한 경우 0.8 ± 0.1 , [6]-gingerol을 후처리한 경우 0.9 ± 0.2 로 나타났다. 이러한 결과로 세 군 모두에서 MUC5AC 유전자의 발현이 유의하게 억제됨을 알 수 있었다($p < 0.05$)(Fig. 4A,4B).

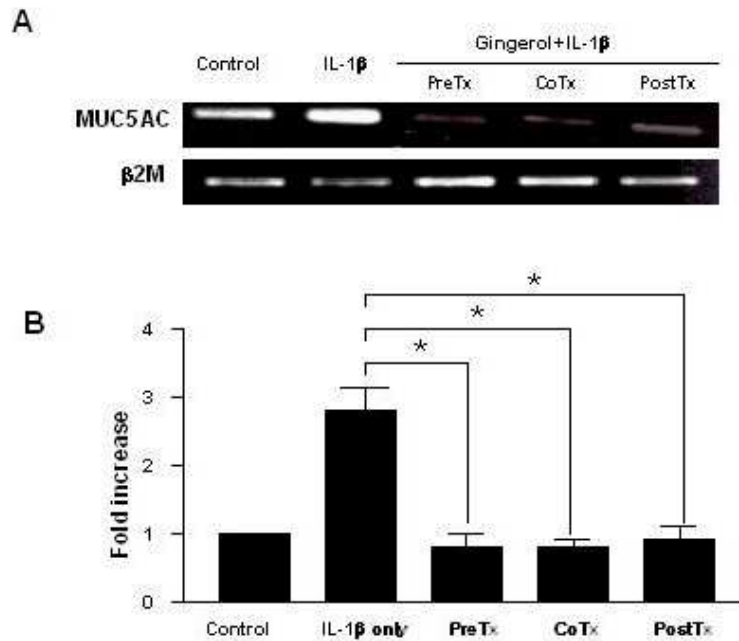


Fig.4. Suppression of MUC5AC gene expression by [6]-gingerol according to the treatment time.

A. NCI-H292 cells were pretreated with 10 μ M [6]-gingerol before 1 hour to treat with 10 ng/ml IL-1 β (PreTx), co-treatment (CoTx), and posttreated with [6]-gingerol after 6 hours (PostTx). The expression of MUC5AC mRNA by [6]-gingerol is significantly suppressed to the level of control in three groups compared with IL-1 β -treated cells (IL-1 β only). B. Fold increase of MUC5AC mRNA according to the treatment time with [6]-gingerol. The figures shown are representative of three independent experiments. * p <0.05

5. [6]-gingerol에 의한 MUC5AC 유전자 발현 억제 작용기전

IL-1 β 에 의해 MAP kinase 신호전달 경로 중 어느 kinase가 활성화되는지를 알아보기 위해 ERK, p38 MAPK, JNK 활성화에 대한 특이항체(phospho-specific antibody)를 이용하여 Western blot 분석을 시행하였다. 활성화된 ERK와 p38 MAPK는 IL-1 β 투여 후 20분경에 최대로 발현되었으며 투여 30분 후에는 인산화가 감소되는 양상을 보였다(Fig. 5A). 그러나 p-JNK의 활성화는 관찰되지 않았다(data not shown). 10 μ M [6]-gingerol을 1시간 전에 전처리하고 10 ng/ml의 IL-1 β 를 첨가 배양한 다음, 20분 후에 p-ERK와 p-p38 MAPK의 발현 양상을 살펴본 결과 IL-1 β 를 단독 처리한 군에 비해 p-ERK와 p-p38 MAPK의 발현이 대조군 수준으로 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 5B). 이러한 결과로 [6]-gingerol이 IL-1 β 에 의한 ERK와 p38 MAPK의 활성화 유도를 억제함을 알 수 있었다.

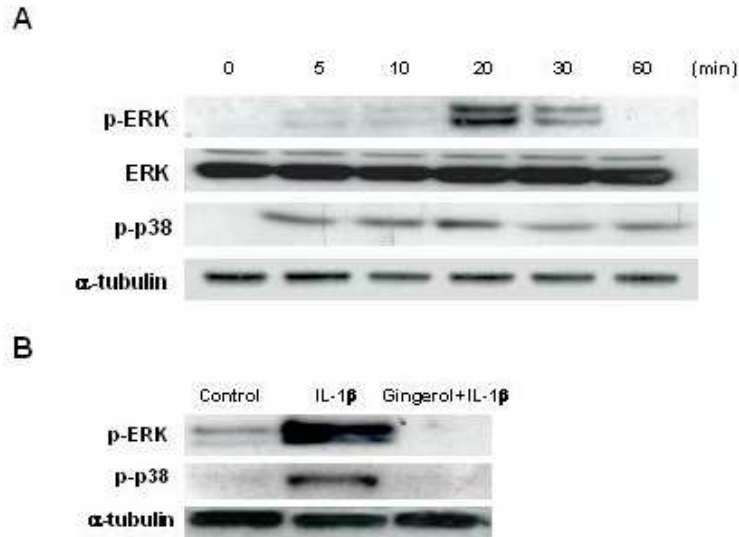


Fig.5. Mechanism of MUC5AC gene suppression by [6]-gingerol.

A. NCI-H292 cells were stimulated for the indicated times with 10 ng/ml of IL-1 β . The phosphorylation of ERK and p38 MAPK was detected by Western immunoblot analysis using phospho-specific antibodies. ERK is a positive internal control. The phosphorylation of ERK and p38 MAPK is maximally activated at 20 minutes and this effect decreases after 30 minutes. B. NCI-H292 cells were pretreated with 10 μ M of [6]-gingerol before 1 hour and treated with 10 ng/ml of IL-1 β (Gingerol+IL-1 β). After 20 minutes incubation, the activation of p-ERK and p-p38 MAPK is strongly inhibited in [6]-gingerol+IL-1 β cells compared with IL-1 β -treated cells. The figures shown are representative of three independent experiments.

6. ERK와 p38 MAPK 특이 억제제에 의한 MUC5AC 발현 억제

ERK 활성화에 대한 특이 억제제인 PD98059와 p38 MAPK 활성화에 대한 특이 억제제인 SB203580을 각각 20 μ M의 농도로 1시간 전에 전처리한 다음 10 ng/ml의 IL-1 β 를 24시간 동안 첨가 배양하여 p-ERK와 p-p38이 억제되는가를 알아보았다. PD98059로 전처치시 p-ERK는 발현이 억제되나 ERK와 p-p38은 변화가 없었으며, 또한 SB203580으로 전처치시 p-ERK와 ERK는 변화가 없었으나 p-p38의 발현은 억제가 되었다(Fig. 6A). 이러한 결과로 각 억제제가 ERK와 p38의 활성을 특이하게 억제하는 것을 확인하였다. 다음 단계로 ERK와 p38 MAPK 경로가 [6]-gingerol에 의한 MUC5AC 발현 억제에 관여함을 확인하기 위해 같은 방법으로 실험한 후 MUC5AC 유전자의 발현을 보았다. IL-1 β 와 ERK, p38 특이 억제제를 첨가하지 않은 대조군과 비교한 상대적 비율은 IL-1 β 만을 첨가 배양한 경우 3.3 ± 0.5 , PD98059를 전처치한 경우 1.3 ± 0.3 , SB203580을 전처치한 경우 1.1 ± 0.2 로 나와, ERK와 p38 MAPK 신호전달 경로를 억제함으로써 IL-1 β 에 의한 MUC5AC 발현이 유의하게 억제되었다($p < 0.05$)(Fig. 6B,6C). 이러한 결과로 ERK와 p38 MAPK 신호전달 경로가 [6]-gingerol에 의한 MUC5AC 유전자 발현 억제에 관여함을 알 수 있었다.

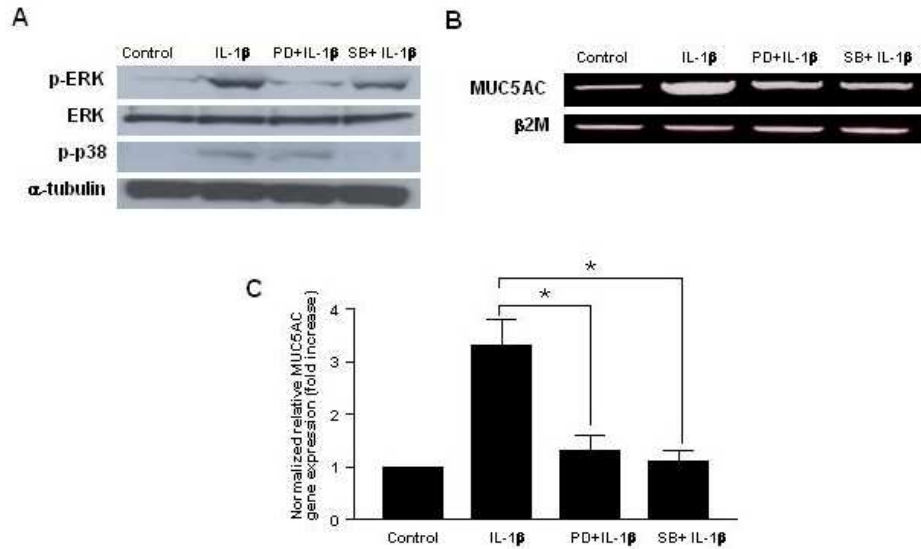


Fig. 6. Suppression of MUC5AC gene expression by MAPK inhibitors

A. NCI-H292 cells were separately pretreated for 1 hour with 20 μ M PD98059 or 20 μ M SB203580 and then stimulated for 24 hours with 10 ng/ml IL-1 β . The Western blot assays show that PD98059 (PD+IL-1 β) and SB203580 (SB+IL-1 β) clearly inhibit p-ERK and p-p38 MAP kinases respectively. B. The inhibition of either ERK or p38 MAP kinase pathway with PD98059 or SB203580 significantly suppresses MUC5AC mRNA expression. C. Fold increase of MUC5AC mRNA by MAPK inhibitors. The figures shown are representative of three independent experiments. * p <0.05

IV. 고찰

기도 염증 반응에서 점액의 과분비는 부비동염, 비염, 기관지염, 혹은 천식 등과 같은 질환의 주된 병태생리로 작용하므로 여러 사이토카인과 점액 유전자의 상호 관련성과 신호전달 기전에 대한 연구를 통해 점액분비를 조절할 수 있는 약제의 개발이 염증성 기도 질환의 발생을 억제하고 개선하는데 중요하다.

[6]-gingerol은 생강의 약리학적 활성을 나타내는 주요 성분으로서 포도에서 추출되는 resveratrol, 고추의 매운 맛을 내는 capsaicin, 카레의 주성분인 curcumin, 녹차의 활성 성분인 epigallocatechin gallate, 콩에서 나오는 genistein 등과 같은 식이 polyphenol의 하나로서 생체 실험과 세포 실험에서 다양한 약리학적 효과를 갖고 있는 것으로 보고되고 있다.¹⁴⁻¹⁶ 본 연구는 전통 의학에서 생강이 진해거담 효과 및 천식의 치료에 효능이 있다는 사실에 근거하여, 호흡기 상피 세포에서 점액 유전자의 과발현과 점액 분비 증가를 유발하는 염증성 전구사이토카인인 IL-1 β 에 의해서 분비 점액의 주요 유전자인 MUC5AC 발현이 유도되는 가를 알아보고, IL-1 β 에 의해 유도된 MUC5AC 유전자가 과연 [6]-gingerol에 의해 발현이 감소되는 가를 알아보고자 하였다.

실험 결과 배양된 NCI-H292 세포주에서 10 ng/ml 농도의 IL-1 β 로 24시간 동안 첨가 배양 시 MUC5AC 유전자의 발현이 유의하게 증가하였으며 이 때 [6]-gingerol 10 μ M의 농도로 전처리 시 MUC5AC 유전자의 발현이 유의하게 억제되었다. 이러한 결과는 NCI-H292 세포주에서 dexametasone이 MUC2와 MUC5AC 점액 유전자의 발현을 억제시켰다는 보고¹¹와 budesonide가 IL-1 β 에 의해 항진된 MUC2/5AC 점액 유전자와 점액 단백질의 생성을 억제하였다는 보고^{12,13}와 일치하는 결과였다. 이러한 결과는 [6]-gingerol이 점액 과분비 조절 효능을 갖고 있는 물질들 중 하나라고 간주할 수 있으며 추후 점액 과분비 조절 능력을 지닌 것으로 알려진 물질들에 대한 상호 비교 연구를 통해 더욱 효과적이고 안전한 약제를 선택할 수 있을 것으로 생각한다.

한편, 100 μ M의 [6]-gingerol로 전처치시 MUC5AC 유전자의 발현이 오히려 증가하는 양상을 보이므로 가능한 이유를 알아보려고 세포 증식 분석을 시행한 결과 생존 세포수의 비율이 50% 이상 감소하는 것으로 나타났다. [6]-gingerol에 의한 고래회충(*Anisakis*) 유충에 대한 유효 치사량 연구에서 [6]-gingerol 125 μ g/ml의 농도에서 약 12.5%의 유충이 죽고 250 μ g/ml의 농도에서는 모든 유충이 사멸하였으며 최소 유효 [6]-gingerol의 농도는 62.5 μ g/ml로 보고된 바가 있다.¹⁷ 또한 쥐 표피 JB6 세포주에서 [6]-gingerol에 의한 EGF 유도 세포 형질변환 및 AP(activator protein)-1 활성 억제에 대한 연구에서 200 μ M 이상의 농도에서는 형질변환 억제가 일어나지 않고 결국 세포고사로 진행된다고 보고되었다.¹⁸ 100 μ M을 환산하면 약 30 μ g/ml로 두 연구에서 사용된 농도나 용량보다는 적은 용량이다. 그러나 [6]-gingerol의 작용이 세포 특이적으로 발생하므로 100 μ M의 [6]-gingerol은 NCI-H292 세포주에서는 세포 증식을 억제하고 세포독성을 유발하는 농도이며 이 농도에 노출시 NCI-H292 세포주에서는 과자극 상태가 되어 결국 IL-1 β 에 의한 발현 유도보다 더 강하게 MUC5AC 유전자의 발현 증가를 초래한 것으로 생각한다.

일반적으로 약제를 복용하는 시기는 증상이 보인 다음 즉, 증상을 유발하는 유전자가 증가된 상태이다. 이에 IL-1 β 에 의한 MUC5AC 점액 유전자가 발현된 후에 [6]-gingerol이 MUC5AC 유전자를 감소시킬 수 있는가에 대해 의문이 들었다. 결과를 보면, [6]-gingerol은 투여 시점에 관계없이 MUC5AC 점액 유전자의 발현을 억제하였다. 이러한 결과의 해석으로, MUC5AC 유전자의 반감기가 6-8시간이므로¹⁹ 6시간 동안 IL-1 β 에 의해 증가된 점액 유전자가 이후 24시간이 경과하면서 분해되어 없어지고, 24시간 동안에 새로운 유전자를 만드는 신호는 6시간 이후 후처치한 [6]-gingerol에 의해 억제되어 결과상으로는 MUC5AC 유전자 발현이 감소한 것으로 생각된다. 본 실험에서 [6]-gingerol과 IL-1 β 를 동시에 투여한 경우에 있어서 MUC5AC 유전자 발현이 감소한 것도 [6]-gingerol 후처치에 의한 유전자 발현 감소 현상을 뒷받침한다 하겠다. 이러한 결과는 기도

점액 과분비로 인한 호흡기계 질환의 발생 이후에도 [6]-gingerol이 점액 생산을 억제할 수 있다는 가능성을 보여준다고 하겠다. 그러나 이를 입증하기 위해서는 유전자 안정성(stability)에 대한 연구가 추가로 필요하며 생체내에서 중요한 산물은 단백질이므로 점액 단백질이 어떻게 변화하는가에 대한 연구와 아울러 유전암호해독 후 변화(post-translational modification)에 대한 연구가 추가로 필요하다고 본다.

다음 단계로 [6]-gingerol이 어떤 경로를 통해 IL-1 β 에 의해 유도된 MUC5AC 점액 유전자의 발현을 억제하는가를 알아보려고 하였다. MAPK는 점액의 생성과 상피세포의 증식 및 분화, 세포고사와 관련된 신호전달 경로에서 중요한 효소 단백질로서 호흡기 상피세포에서 IL-1 β 의 자극에 의해 세포질내 ERK와 p38 MAPK가 활성화되고 핵내 MSK1과 CREB 신호전달 경로가 활성화되면서 MUC5AC 유전자와 그 단백질의 합성을 상향 조절한다고 하였다.¹⁰ 본 연구에서도 IL-1 β 투여 후 p-JNK의 발현은 관찰되지 않았으며(data not shown), IL-1 β 투여 20분 경과 후에 ERK와 p38 MAPK의 발현이 최대로 나타났으며 이에 근거하여 [6]-gingerol을 전처치한 후 IL-1 β 투여 20분 후 ERK와 p38 MAPK의 활성을 살펴본 결과 두 단백질의 발현이 감소하여 이들이 [6]-gingerol에 의한 MUC5AC 발현에 관여함을 알 수 있었다. 또한 ERK와 p38 MAPK에 대한 특이 억제제를 이용하여 MUC5AC 유전자 발현 양상을 살펴본 결과에서도 유의하게 MUC5AC 발현이 억제되어 ERK와 p38 MAPK가 [6]-gingerol에 의한 MUC5AC 발현에서 중요한 신호전달 경로임을 확인할 수 있었다. 한편 호흡기 상피세포에서 IL-1 β 에 의한 MUC5AC 유전자의 발현에 있어서 ERK와 p38 MAPK 경로 외에 상위 신호전달 경로로 PKC(protein kinase C)와 하위 신호전달 경로로 COX-2와 PGE₂가 관여한다는 보고²⁰가 있으므로 향후 이들 신호전달 물질과의 연관성을 비롯하여 다른 경로에 의한 MUC5AC 발현 억제의 가능성에도 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

V. 결론

본 연구 결과로 사람 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포주에서 IL-1 β 에 의해 유도된 MUC5AC 유전자와 단백질 발현은 [6]-gingerol의 투여에 의해 유의하게 억제되었으며, 또한 [6]-gingerol의 투여 시점과는 무관하였다. 이러한 MUC5AC 유전자 발현 억제에는 ERK와 p38 MAPK 신호전달 경로가 관여하였다. 이러한 결과를 바탕으로 [6]-gingerol이 기도 점액 과분비 조절에 대한 치료제로서의 가능성을 보여준다고 생각한다.

참고문헌

1. Jolad SD, Clark Lantz R, Solyom AM, Chen GJ, Bates RB, Timmermann BN. Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-induced PGE2 production. *Phytochemistry* 2004;65:1937-1954.
2. Chrubasik S, Pittler MH, Roufogalis BD. *Zingiberis rhizoma*: a comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. *Phytomedicine* 2005;12(9):684-701.
3. Kim HW, Murakami A, Abe M, Ozawa Y, Morimitsu Y, Williams MV, et al. Suppressive effects of mioga ginger and ginger constituents on reactive oxygen and nitrogen species generation, and the expression of inducible pro-inflammatory genes in macrophages. *Antioxidants & Redox Signaling* 2005;7:1621-1629.
4. Young HW, Luo YL, Cheng HY, Hsieh WC, Liao JC, Peng WH. Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol. *J Ethnopharmacol* 2005;96:207-210.
5. Kim EC, Min JK, Kim TY, Lee SJ, Yang HO, Han S, et al. [6]-gingerol, a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335:300-308.
6. Grzanna R, Lindmark L, Frondoza CG. Ginger-an herbal medicinal product with anti-inflammatory actions. *J Medicinal Food* 2005;8:125-132.
7. Suekawa M, Ishige A, Yuasa K, Sudo K, Aburada M, Hosoya E. Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of pungent constituents, (6)-gingerol and (6)-shogaol. *J Pharmacobiodyn* 1984;7(11):836-848.
8. Lee JG, Moon HJ, Kim SS, Kim CW, Yoon JH. Expression and

regulation of MUC8 & MUC5AC by various cytokines in normal human nasal epithelial cells. Korean J Otolaryngol 2001;44:600-605.

9. Gray T, Coakley R, Hirsh A, Thornton D, Kirkham S, Koo JS, et al. Regulation of MUC5AC mucin secretion and airway surface liquid metabolism by IL-1 β in human bronchial epithelia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;286:320-330.

10. Song KS, Lee WJ, Chung KC, Koo JS, Yang EJ, Choi JY, et al. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α induce MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. J Biol Chem 2003;278:23243-23250.

11. Kai H, Yoshitake K, Hisatsune A, Kido T, Isohama Y, Takahama K, et al. Dexamethasone suppresses mucus production and MUC-2 and MUC-5AC gene expression by NCI-H292 cells. Am J Physiol 1996;271:484-488.

12. Kim YD, Cho JS, Chang KY, Sin JH, Song SY, Yoon SK. Budesonide down-regulates IL-1 β -mediated MUC2/MUC5AC genes expression and mucin secretion in human airway epithelial cells. Korean J Otolaryngol 2002;45:873-877.

13. Kim YD, Kwon EJ, Kwon TK, Baek SH, Song SY, Suh JS. Regulation of IL-1 β -mediated MUC2 gene in NCI-H292 human airway epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2000;274:112-116.

14. Bharat BA, Shishir S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. Biochem Pharmacol 2006;71(10):1397-1421.

15. Yoon JH, Baek SJ. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. J yonsei med 2005;46:585-596.

16. Surh YJ. Molecular mechanism of chemopreventive effects of

selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res* 1999;428:305-327.

17. Goto C, Kasuya S, Koga K, Ohtomo H, Kagei N. Lethal efficacy of extract from *Zingiber officinale* (traditional chinese medicine) or [6]-shogaol and [6]-gingerol in anisakis larvae in vitro. *Parasitol Res* 1990;76:653-656.

18. Bode AM, Ma WY, Surh YJ, Dong Zigang. Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and activator protein 1 activation by [6]-gingerol. *Can Res* 2001;61:850-853.

19. Chen Y, NickolaTJ, DiFronzo NL, Anamaris M, Colberg-Poley AM, Rose MC. Dexamethasone-mediated repression of MUC5AC gene expression in human lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:338-347.

20. Kim YD, Bai CH, Woo HJ. Interleukin-1 β -mediated MUC5AC gene expression and mucin secretion via PKC-ERK/p38-COX-2-PGE₂ in human airway epithelial cells. *Korean J Otolaryngol* 2003;46:27-34.

Abstract

[6]-Gingerol suppresses IL-1 β -induced MUC5AC gene expression in human airway epithelial cells via both ERK and p38 MAPK signal transduction pathways

Jeong Hong Kim

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyung-Su Kim)

[6]-gingerol, a pungent ingredient of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe, Zingiberaceae) has a wide range of potential pharmacologic activities including anti-oxidant, anti-pyretic, anti-inflammatory, and anti-angiogenic effects. The present study was aimed to investigate whether [6]-gingerol could suppress IL-1 β -induced MUC5AC gene expression in human airway epithelial cells and what its possible mechanism is. MUC5AC mRNA and protein were measured using RT-PCR and Western blot analysis in cultured NCI-H292 human airway epithelial cells. ERK and p38 MAP kinase involvement were determined by Western blot analysis using phospho-specific antibodies. The results showed that MUC5AC was induced by the treatment with 10 ng/ml of IL-1 β for 24 hours treatment in NCI-H292 cells. MUC5AC expression by IL-1 β was significantly suppressed by 10 μ M of [6]-gingerol. In addition, MUC5AC gene expression was found to be suppressed regardless of the treatment time with [6]-gingerol. Furthermore, the inhibition of MUC5AC gene expression by [6]-gingerol was noted to be suppressed via both ERK and p38 MAP kinase pathways. In conclusion, [6]-gingerol suppresses IL-1 β -induced

MUC5AC gene expression in human airway epithelial cells and, therefore, it may be considered as a possible anti-hypersecretory agent.

Key Words : [6]-gingerol, Interleukin-1 β , MUC5AC, Human airway epithelial cells