

호흡기 상피세포에서 은행잎
추출물(EGb 761)의 구성 성분별
MUC5AC 발현 억제

연세대학교 대학원

의 학 과

남 지 인

호흡기 상피세포에서 은행잎
추출물(EGb 761)의 구성 성분별
MUC5AC 발현 억제

지도교수 김 경 수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008년 6월

연세대학교 대학원

의 학 과

남 지 인

남지인의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2008년 6월

감사의 글

먼저 여러 문제들과 힘든 과정 중에도 석사과정을 마칠 수 있게 도우신 하나님께 감사드립니다.

부족한 저를 끝까지 지도해주시고 이끌어주신 윤주헌 교수님, 김경수 교수님께 감사드립니다. 특히 미숙한 점들이 많이 있었지만 너그러이 보아주시고 연구의 기본자세부터 자상하게 가르쳐 주신 김경수 교수님께 감사드립니다.

또한 자료 수집 및 여러모로 도움을 주신 이비인후과 의국원 여러분께 감사의 뜻을 표합니다.

못난 아들을 항상 믿어주시고 격려해주시는 부모님, 항상 든든한 후원자가 되는 형에게 감사드리며, 나의 존재의 이유가 되는 사랑하는 아내 진희와 멋진 아들 승재에게 사랑을 전합니다.

저자 씀

차례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 폐 점액상피양 암종 세포주 배양	
2. 재료	
3. <i>MUC5AC</i> mRNA의 역전사-중합효소 연쇄반응 분석	
4. Western blot 분석	
5. 세포증식 분석	
III. 결과	10
1. EGb 761 구성 성분에 의한 IL-1 β 유도 <i>MUC5AC</i> 발현 억제	
2. Kaempferol과 quercetin에 의한 <i>MUC5AC</i> 유전자 발현 억제와 세포생존율	
3. Kaempferol과 quercetin에 의한 NCI-H292 세포의 생존율	
4. Kaempferol과 quercetin의 혼합 투여에 의한 <i>MUC5AC</i> 유전자 발현 억제	
5. ERK와 p38 MAPK 신호전달계에 의한 <i>MUC5AC</i> 유전자 발현억제	
IV. 고찰	19
V. 결론	24
참고문헌	25
영문요약	29

그림 차례

- Figure 1. Suppression of IL-1 β -induced *MUC5AC* expression by the components of EGb 761 11
- Figure 2. Dose-dependent suppression of *MUC5AC* expression by kaempferol and quercetin 13
- Figure 3. Effect on the cell proliferation by kaempferol and quercetin 14
- Figure 4. Comparison between the single and combination treatment of kaempferol and quercetin 16
- Figure 5. Mechanism of *MUC5AC* gene suppression by kaempferol and quercetin 18

국문요약

호흡기 상피세포에서 은행잎 추출물(EGb 761)의 구성 성분별 *MUC5AC* 발현 억제

은행잎 추출물인 EGb 761은 IL-1 β 에 의해 증가된 *MUC5AC*의 발현을 억제하며 이 과정에 mitogen activated protein kinase (MAPK)인 extracellular signal-regulated kinase (ERK)와 p38 MAPK가 관여한다. EGb 761은 여러 성분으로 구성된 복합체이므로 구성 성분중 과연 어떤 성분에 의해 *MUC5AC* 발현이 억제되는지에 대해서는 알려진 바가 없다. 이에 본 연구의 목적으로 첫째, EGb 761의 주요 구성 성분을 각각 투여하여 어떠한 성분에 의해 IL-1 β 에 의해 증가된 *MUC5AC*의 발현 억제가 일어나는지를 알아보고 둘째, *MUC5AC* 발현을 억제하는 각 성분을 혼합 투여하여 이런 경우 단독투여와 비교하여 *MUC5AC* 발현 억제에 어떤 영향을 미치는 가를 비교하고자 하였다. 셋째, 구성 성분에 의한 *MUC5AC* 발현 억제 기전이 MAPK 억제에 의해서인지를 알아보고자 하였다. 사람 호흡기 상피세포인 사람 폐 점액상피양 암종 세포주(human pulmonary mucoepidermoid carcinoma cell line; NCI-H292 세포)에 대해 EGb 761과 주요 구성 성분인 kaempferol, quercetin, ginkgolide A와 B, bilobalide 등을 전처리한 다음 IL-1 β 10 ng/ml를 24시간 동안 투여하여 구성 성분들에 의한 *MUC5AC* 유전자의 발현을 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR) 분석으로 알아보았으며, MAPK 억제에 대해서는 Western blot 분석으로 조사하였다. 결과로 EGb 761의 구성 성분 중 kaempferol과 quercetin이

IL-1 β 에 의해 유도된 *MUC5AC* 유전자의 발현을 40 μ M 농도부터 유의하게 억제하였으며, 억제된 정도가 처리된 구성 성분의 농도와 비례하여 증가하였다. 그러나 ginkgolide A, ginkgolide B, bilobalide 등은 *MUC5AC* 유전자의 발현을 억제하지 못하였다. 한편, kaempferol과 quercetin 40 μ M에서는 세포증식 억제를 보이지 않았으나, 그 농도가 80 μ M로 증가되었을 때 세포증식이 억제됨을 관찰하였다. Kaempferol과 quercetin 단독투여와 혼합투여를 비교한 결과, kaempferol과 quercetin을 각각 40 μ M씩 투여한 경우, kaempferol과 quercetin을 20 μ M씩 혼합하여 투여한 경우, kaempferol과 quercetin을 40 μ M씩 혼합하여 투여한 경우 모두에서 EGb 761 200 μ g/ml를 투여한 경우와 비교 시 *MUC5AC* 발현 억제는 유의한 차이를 보이지 않았다. Kaempferol과 quercetin에 의한 *MUC5AC* 발현 억제과정에는 EGb 761과 동일하게 ERK와 p38이 관여하였다. 결론적으로, 사람 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포주에서 IL-1 β 에 의해 유도된 *MUC5AC* 유전자 발현이 EGb 761의 구성성분 중 kaempferol과 quercetin에 의해 유의하게 억제되며, ERK와 p38 MAPK가 kaempferol과 quercetin의 신호전달계로 관여함을 알 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 EGb 761 구성성분 중 kaempferol과 quercetin이 기도 점액 과분비 조절에 대한 치료제로서의 가능성을 보인다고 생각한다.

핵심되는 말 : *Ginkgo biloba* extract 761 · Interleukin-1 β · Mucin ·
Kaempferol · Quercetin

호흡기 상피세포에서 은행잎 추출물(EGb 761)의 구성 성분별 *MUC5AC* 발현 억제

<지도교수 김 경 수>

연세대학교 대학원 의학과

남 지 인

I. 서론

은행잎 추출물인 EGb 761은 아세톤과 물을 이용한 추출과정, 지방
친화성분의 제거, 활성물질 강화, 폴리페놀 성분 제거 등의 추출과정
을 거쳐 만들어진다.¹ EGb 761의 주요성분은 flavonoid 성분과 비
flavonoid 성분으로 크게 구분되며, 상제성분은 약 24%의 flavonoid
glycoside, 6%의 terpene trilactone (diterpenoid인 ginkgolide와
sesquiterpene인 bilobalide), 7%의 proanthocyanidin, 소량의 저분자
유기산 등으로 구성된다.²

EGb 761은 뇌 및 말초혈관의 혈류량 저하, 감각신경 질환, 기억력
및 인지능 저하 등 주로 혈관과 신경질환에 대해 효과가 있는 것으로
알려져 있다.^{1,3} 최근 연구에 의하면 대장암이나 전립선암에 대하여 항
암작용이 있는 것으로 보고되고 있는데, 이러한 항암작용의 기전으로
스트레스나 발암기전 시 생성되는 자유기 (free radical) 및 관련된 반
응성 산소류 (reactive oxygen species)를 직접적으로 제거하는 항산

화기능, 항산화효소인 heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) 등의 발현을 증가시키는 기능, 발암기전으로 여겨지는 cyclooxygenase-2 (COX-2) 및 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 증가에 대해 이를 억제하는 작용, DNA topoisomerase I과 II를 억제하여 DNA 손상을 억제하는 기능, 암생성 시 증가되는 신생혈관에 대한 억제기능 등의 여러 기전으로 암을 억제하게 된다.^{4,5} EGb 761은 폐 질환에도 임상효과를 보이는데, 그 구성성분의 하나인 ginkgolide가 천식에 효과가 있다고 한다. 가능한 기전으로 천식의 유발인자인 platelet-activating factor를 억제하는 작용과 그 수용체의 억제 작용, T 림프구의 억제 작용 등이 밝혀져 있다.^{6,7}

비염을 비롯한 급, 만성 부비동염, 기관지염 및 기관지 천식과 같은 염증성 기도 질환에서 과분비된 점액은 기도 점막의 점액섬모운동능을 감소시키고 이차적인 세균 감염을 유발하여 다양한 호흡기 질환을 초래하게 된다. 이 때 점액의 과분비는 여러 종류의 사이토카인이거나 펩타이드, 염증성 매개 물질이 직·간접적으로 관여하여 *MUC5AC*나 *MUC8*과 같은 점액 유전자의 발현을 상향 조절시켜 일어나게 되는데, 대표적인 염증 유발 사이토카인인 IL-1 β 가 기도점막 상피세포에서 과다 분비되는 경우에 있어서는 기도 염증 반응이 더욱 촉발되는 것으로 알려져 있다.^{8,9} 또한 최근 사람 정상 비점막 상피 세포 및 사람 폐 점액상피양 암종 세포주(NCI-H292 세포)를 이용한 연구에서 IL-1 β 에 의해 유도되는 *MUC5AC*의 과발현이 extracellular signal-regulated kinase (ERK)/p38 mitogen activated protein kinase (MAPK)- mitogen- and stress-activated kinase 1 (MSK1)-cyclic-AMP response element binding protein (CREB) 신호전달체계

의 순차적인 활성화에 의해 기도상피의 배세포에서 일어나는 것임이 밝혀진 후 점액 과분비 조절을 통한 치료 전략에 새로운 통찰을 제공하게 되었다.¹⁰

최근 연구를 통해 EGb 761을 200 µg/ml의 농도로 투여 시 IL-1β에 의해 증가된 *MUC5AC*의 발현이 억제되며 이 과정에 MAPK family인 ERK와 p38이 관여한다는 것이 밝혀졌다.¹¹ EGb 761은 여러 성분으로 구성된 복합체이므로 구성 성분중 과연 어떤 성분에 의해 *MUC5AC* 발현이 억제되는지에 대해서는 알려진 바가 없으며, 만약 유효한 성분들이 있다면 이 성분들을 혼합할 경우 *MUC5AC* 발현에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서도 알려진 바가 없다. 이에 다음과 같은 연구의 목적을 설정하였다. 첫째, EGb 761의 주요 구성 성분을 각각 투여하여 어떠한 성분에 의해 IL-1β에 의해 증가된 *MUC5AC*의 발현 억제가 일어나는지를 알아보고 둘째, *MUC5AC* 발현을 억제하는 각 성분을 혼합 투여하여 이런 경우 단독투여와 비교하여 *MUC5AC* 발현 억제에 어떤 영향을 미치는가를 비교하고자 하였다. 셋째, 구성성분에 의한 *MUC5AC* 발현 억제 기전이 MAPK 억제에 의해서인지를 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 line)인 NCI-H292 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 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

EGb 761은 유유산업(Seoul, Korea)에서 기증받아 사용하였다. EGb 761의 구성성분으로 kaempferol, quercetin, ginkgolide A와 B, bilobalide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 등을 사용하였다. IL-1β는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였고, anti-phospho-p44/42 MAPK(Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) 항체, anti-phospho-p38 MAP kinase (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) 항체, anti-phospho-SAPK/c-jun NH2-terminal kinase(JNK) (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) 항체 등은 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다.

3. *MUC5AC* mRNA의 역전사-중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 분석

전체 RNA는 Tri-Reagent(Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 각 조건으로 배양된 세포에서 얻었으며 전체 RNA에서 cDNA로의 역전사는 1 µg/20 µl의 전체 RNA를 random hexanucleotide primer와 Moloney murine leukemia virus 역전사효소(Gibco-BRL)를 이용하였고, 중합효소 연쇄반응은 Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cycler(Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 이용하였다. 중합효소 연쇄반응에 사용한 oligonucleotide 시발체(primer)는 *MUC5AC*의 GenBankTM sequence (GenBankTM accession number AJ001402)에 근거하여

5' primer CGACAACACTTCTGCGGTGC;

3' primer GACTCATCCTTCCTGTCGTT를 사용하여 337 bp를 증폭하였다. 각 반응의 대조군으로 사용된 β_2 -microglobulin(β_2 M)의 oligonucleotide primer는 Clontech Laboratories(Palo Alto, CA, USA; 335 bp fragment)에서 구입하였다. *MUC5AC*의 중합효소 연쇄반응은 95°C에서 30초간 변성(denaturation) 과정과 60°C에서 60초간 결합(annealing) 반응, 72°C에서 60초간 연장(extension) 반응을 35회 진행하였고 증폭된 PCR 산물은 2% 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 M의 강도로 나눈 다음, 이 수치들 중 대조군에서의 수치를 1로 하여 각 실험의 수치를 비율로 나타내어 비교하였다. 실험은 3회 이상 시행하여 평균과 표준편차를 구하였으며 결과에 대한 차이는 반복 측정

자료의 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 측정된 후 단백질 30 μg 씩을 각 lane에 넣어 전기영동을 시행하였다. 전기영동은 8% SDS-polyacrylamide gel을 이용하였고, 전기영동 후 nitrocellulose막에 전이시킨 다음 이 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 horseradish peroxidase가 결합된 이차 항체(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)로 1시간 동안 처리하고 수 차례의 세척을 시행한 후 enhanced chemiluminescence와 자기방사기록법(autoradiography)을 이용하여 띠(band)를 확인하였다. 한편 nitrocellulose 막을 deprobing한 다음 같은 방법을 이용하여 α -tubulin 항체(Santa Cruz Biotechnology)와 반응을 시켰다. 확인된 밴드의 세기는 Scion Image(Scion Co., Frederick, MD, USA)를 이용하여 강도

를 구한 후 해당하는 α -tubulin의 강도로 나눈 다음, 이 수치들 중 대조군에서의 수치를 1로 하여 각 실험의 수치를 비율로 나타내어 비교하였다. 실험은 3회 이상 시행하여 평균과 표준편차를 구하였으며 결과에 대한 차이는 반복 측정자료의 분산분석법(repeated measures ANOVA test)을 이용하였고 다중비교(multiple comparisons)를 추가하여 유의수준 $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

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 흡광도(optical density)를 측정하였다. 실험은 3회 이상 시행하여 평균과 표준편차를 구하였으며 결과에 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. EGb 761 구성 성분에 의한 IL-1 β 유도 *MUC5AC* 발현 억제

NCI-H292 세포주에 10 ng/ml IL-1 β 를 첨가하기 1시간 전에 40 μ M의 농도로 ginkgolide A와 B, bilobalide, kaempferol, quercetin 등을 각각 투여하였다. 이후 IL-1 β 를 24시간동안 첨가 배양한 다음 *MUC5AC* mRNA의 발현을 보았다. IL-1 β 와 EGb 761 구성 성분을 모두 첨가하지 않은 대조군과 비교한 상대적 비율은 IL-1 β 만 투여한 경우, ginkgolide A, ginkgolide B, bilobalide, kaempferol, quercetin 순으로 3.1 \pm 0.5, 2.3 \pm 0.2, 2.4 \pm 0.4, 2.6 \pm 0.3, 1.4 \pm 0.2, 1.1 \pm 0.3 이었다. 결과상 kaempferol과 quercetin이 IL-1 β 에 의해 유도된 *MUC5AC* 유전자의 발현을 유의하게 억제하였으나(p <0.05), ginkgolide A, ginkgolide B, bilobalide는 억제하지 못하였다(Fig. 1).

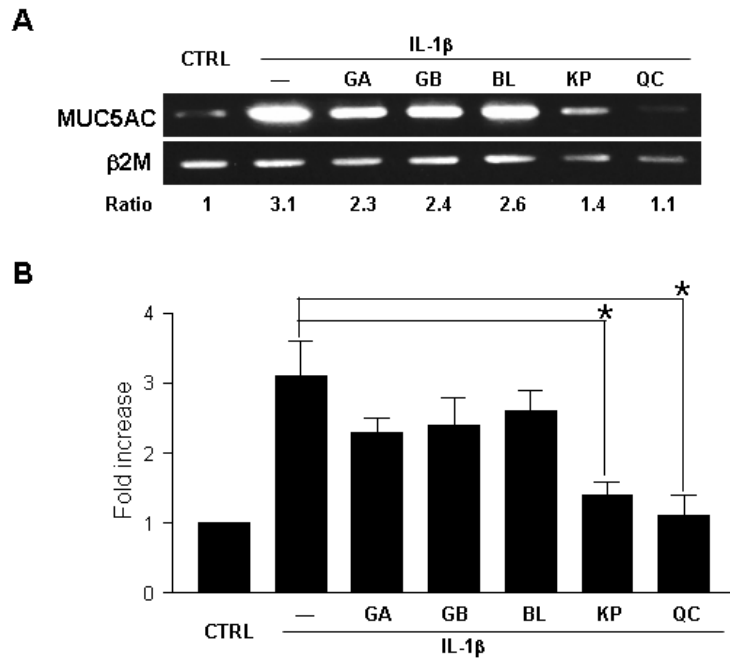


Figure 1. Suppression of IL-1 β -induced *MUC5AC* expression by the components of EGb 761. A. NCI-H292 cells were pretreated with 40 μ M of ginkgolide A (GA), ginkgolide B (GB), bilobalide (BL), kaempferol (KP), and quercetin (QC) for 1 hour, and then treated with 10 ng/ml IL-1 β for 24 hours. RT-PCR for *MUC5AC* mRNA expression was performed on each group. Compared with the only IL-1 β -treated cells, the expression of *MUC5AC* mRNA is significantly suppressed by the pretreatment with kaempferol and quercetin. However, ginkgolide A, ginkgolide B, and bilobalide can't suppress IL-1 β -induced *MUC5AC* expression. B. Fold increase of *MUC5AC* mRNA treated with kaempferol and quercetin. * p <0.05 compared with only IL-1 β -treated cells.

2. Kaempferol과 quercetin에 의한 *MUC5AC* 유전자 발현 억제와 세포생존율

MUC5AC 유전자 발현 억제 효과를 보인 kaempferol과 quercetin을 각각 0, 20, 40, 80 μM 의 농도로 전처리한 다음 IL-1 β 를 24시간 동안 첨가 배양하고 *MUC5AC* mRNA의 발현을 보았다. IL-1 β 와 kaempferol을 모두 첨가하지 않은 대조군과 비교한 상대적 비율은 kaempferol 0, 20, 40, 80 μM 순으로 3.2 ± 0.6 , 2.4 ± 0.4 , 1.4 ± 0.2 , 1.1 ± 0.3 이었다. IL-1 β 와 quercetin을 모두 첨가하지 않은 대조군과 비교한 상대적 비율은 quercetin 0, 20, 40, 80 μM 순으로 3.3 ± 0.6 , 2.1 ± 0.4 , 1.4 ± 0.2 , 1.1 ± 0.2 이었다. 이 결과는 kaempferol과 quercetin 모두가 IL-1 β 에 의해 유도된 *MUC5AC* 유전자의 발현을 40 μM 농도부터 유의하게 억제하였으며, 억제의 정도가 처리한 구성 성분의 농도와 비례한다는 것을 보여주고 있다. ($p < 0.05$) (Fig. 2).

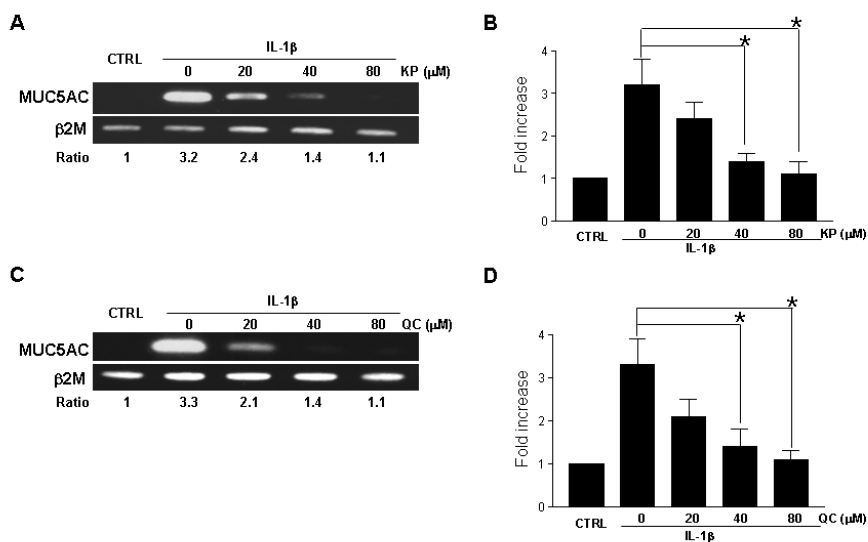


Figure 2. Dose-dependent suppression of *MUC5AC* expression by kaempferol and quercetin. A. NCI-H292 cells were pretreated with 0, 20, 40, and 80 μ M of kaempferol (KP) for 1 hour, and then treated with 10 ng/ml IL-1 β for 24 hours. *MUC5AC* mRNA expression of each group was determined by RT-PCR. Compared with the *MUC5AC* mRNA level of IL-1 β -treated cells, the expression of *MUC5AC* mRNA is significantly suppressed in the kaempferol-treated cells in a dose-dependent manner. B. Fold decrease of *MUC5AC* mRNA treated with kaempferol. C. NCI-H292 cells were pretreated with 0, 20, 40, and 80 μ M of quercetin (QC) for 1 hour and then treated with 10 ng/ml IL-1 β for 24 hours. *MUC5AC* mRNA expression of each group was determined by RT-PCR. Compared with the *MUC5AC* mRNA level of IL-1 β -treated cells, the expression of *MUC5AC* mRNA is significantly suppressed from in the quercetin-treated cells in a dose-dependent manner. D. Fold decrease of *MUC5AC* mRNA treated with quercetin. * $p < 0.05$ compared with only IL-1 β -treated cells.

3. Kaempferol과 quercetin에 의한 NCI-H292 세포의 생존율

Kaempferol과 quercetin에 의한 IL-1 β 유도 *MUC5AC* 발현 억제 작용이 이 물질들의 독성에 의해 일어나는지를 알아 보기 위해 이 두 물질 처리시 NCI-H292 세포의 생존율을 관찰하였다. Kaempferol과 quercetin을 첨가하지 않은 대조군을 100%로 하였을 때 이와 비교한 상대적인 세포 생존율은 kaempferol의 경우 20, 40, 80 μ M에서 각각 91 \pm 8%, 78 \pm 9%, 46 \pm 5% 이었고, quercetin의 경우 20, 40, 80 μ M에서 각각 90 \pm 7%, 75 \pm 6%, 41 \pm 7% 이었다. Kaempferol과 quercetin을 처리한 실험 모두에서 40 μ M 농도까지는 NCI-H292 세포에 유의한 세포 증식 억제가 일어나지 않았으며, 80 μ M에서는 50% 이상의 세포 증식 억제가 일어났다(Fig. 3).

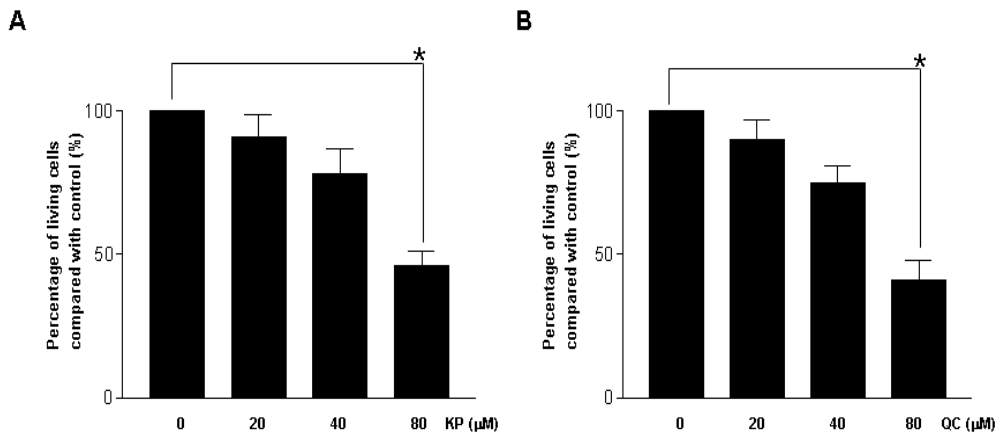


Figure 3. Effect on cell proliferation by kaempferol and quercetin. Kaempferol (KP, Fig. A) and quercetin (QC, Fig. B) show no damage on the cell proliferation up to the dose of 40 μ M. However, in the dose of 80 μ M of kaempferol and quercetin, cell proliferation is inhibited. * p <0.05

4. Kaempferol과 quercetin의 혼합 투여에 의한 *MUC5AC* 유전자 발현 억제

Kaempferol과 quercetin을 각각 투여하는 것과 이 둘을 혼합하여 투여하는 것이 EGb 761에 의한 IL-1 β 유도 *MUC5AC* 억제작용에 어떠한 차이를 보이는지 알고자 하였다. IL-1 β 만 투여한 경우, kaempferol 40 μ M, quercetin 40 μ M, kaempferol 20 μ M + quercetin 20 μ M, kaempferol 40 μ M + quercetin 40 μ M, EGb 761 200 μ g/ml 등을 투여한 경우에서의 IL-1 β 유도 *MUC5AC* 억제 정도를 IL-1 β 와 EGb 761이나 구성 성분을 모두 첨가하지 않은 대조군과 비교한 상대적 비율은 위의 순서대로, 3.0 ± 0.5 , 1.5 ± 0.3 , 1.2 ± 0.2 , 1.4 ± 0.4 , 0.9 ± 0.3 , 0.9 ± 0.2 이었다. 그 결과, kaempferol과 quercetin을 각각 투여하는 것과 이 둘을 혼합하여 투여하는 모든 경우에서 IL-1 β 유도 *MUC5AC*의 발현을 유의하게 억제하였다($p<0.05$). 그러나 EGb 761만을 투여한 경우와 비교 시, kaempferol과 quercetin을 각각 투여하는 것과 이 둘을 혼합하여 투여하는 모든 경우에서 유의한 *MUC5AC*의 발현 억제를 보이지 않았다(Fig. 4).

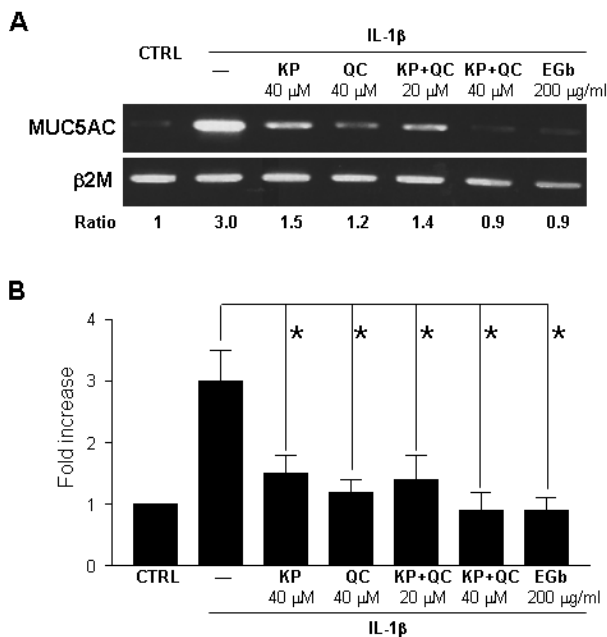


Figure 4. Comparative inhibitory effect of the single and combination treatment of kaempferol and quercetin on IL-1 β -induced *MUC5AC* expression. NCI-H292 cells were pretreated with 40 μ M of kaempferol (KP), 40 μ M of quercetin (QC), 20 μ M of kaempferol and quercetin (KP+QC 20 μ M), 40 μ M of kaempferol and quercetin (KP+QC 40 μ M), or 200 μ g/ml of EGb 761 (EGb) 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 the only IL-1 β -treated cells, the expression of *MUC5AC* mRNA is significantly suppressed from the all pretreatment groups. The amount of suppression in the expression of *MUC5AC* mRNA is nearly same between the pretreatment groups. B. Fold decrease of *MUC5AC* mRNA treated with the single and combination treatment of kaempferol and quercetin. * p <0.05 compared with only IL-1 β -treated cells.

5. ERK와 p38 MAPK 신호전달계에 의한 *MUC5AC* 유전자 발현 억제

10 ng/ml IL-1 β 에 의해 MAPK 신호계 중 어느 kinase가 활성화되는지를 알아보기 위해 ERK, p38 MAPK, JNK 활성화 특이항체 (phospho-specific antibody)를 이용하여 Western blot 분석을 시행하였다. 활성화된 ERK와 p38 MAPK는 IL-1 β 투여 후 20분에 최대로 발현되었으며 투여 30분 후에는 활성화가 감소되는 양상을 보였다 (Fig. 5A). 그러나 JNK의 활성화는 관찰되지 않았다. Kaempferol 40 μ M, quercetin 40 μ M, EGb 761 200 μ g/ml 각각을 1시간 전에 전처치하고 IL-1 β 를 첨가 배양한 20분 후에 p-ERK와 p-p38 MAPK의 발현 양상을 살펴본 결과, IL-1 β 를 단독 처치한 군에 비해 kaempferol, quercetin, EGb 761 투여군 모두에서 p-ERK와 p-p38 MAPK의 발현이 대조군 수준으로 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 5B). 이러한 결과로 EGb 761, kaempferol, quercetin 모두에서 IL-1 β 에 의한 ERK와 p38 MAPK의 활성화를 억제하는 것을 알 수 있었다.

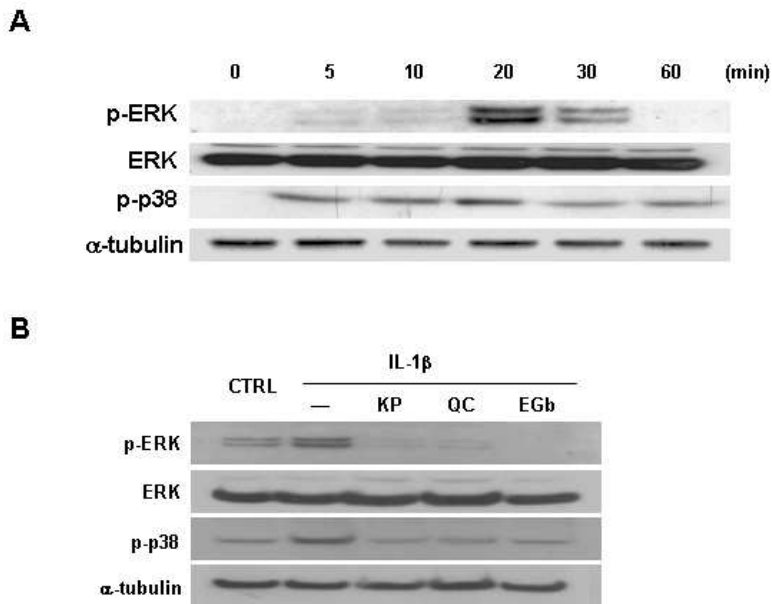


Figure 5. Role of ERK and p38 MAPK on *MUC5AC* gene suppression by kaempferol and quercetin. A. NCI-H292 cells were stimulated for the indicated times with 10ng/ml of IL-1 β . The phosphorylation of ERK and p38 MAPK was detected by Western immunoblot analysis using phospho-specific antibodies. ERK is 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 40 μ M of kaempferol (KP), 40 μ M of quercetin (QC), or 200 μ g/ml of EGb 761 (EGb) before 1 hour, and then treated with 10 ng/ml of IL-1 β . After 20 minutes incubation, the activation of p-ERK and p-p38 MAPK is inhibited in all pretreatment groups compared with only IL-1 β -treated cells. The figures shown are a representative of three independent experiments.

IV. 고찰

기도 염증 반응에서 점액의 과분비는 부비동염, 비염, 기관지염, 천식 등과 같은 질환의 주요한 병태생리이므로 여러 사이토카인과 점액 유전자의 상호 연관성과 신호전달 기전에 대한 연구를 통해 점액 분비를 조절할 수 있는 물질을 개발하는 것이 염증성 기도질환의 발생을 억제하고 개선하는데 중요하다. EGb 761에 대한 이전 연구의 실험결에서 배양된 NCI-H292 세포주의 경우 10 ng/ml 농도의 IL-1 β 로 24시간 동안 첨가 배양 시 *MUC5AC* 유전자의 발현이 증가하였으며, EGb 761을 200 μ g/ml의 농도로 전처리시 *MUC5AC* 유전자의 발현이 유의하게 억제되었고 이러한 발현 억제는 농도의존성이었다. 또한 *MUC5AC* 단백질의 양도 처리된 EGb 761의 농도에 따라 비례하여 억제되었다. 이러한 결과를 토대로 EGb 761이 점액 과분비 조절 기능을 갖고 있는 물질 중 하나라고 간주할 수 있었다.¹¹

이전 연구의 문제점 중 하나가 사용된 EGb 761의 농도이다. EGb 761 200 μ g/ml의 농도는 세포증식 억제를 하지 않고 동물실험 상 급성과 만성 독성을 야기하는 농도보다 낮은 농도로 안전한 농도이다.^{11,12} 그러나 혈중 농도 200 μ g/ml에 도달하기 위해서는 10 mg/kg의 용량을 정맥주사해야 하는데, 구강 섭취된 EGb 761중 약 15%가 3시간에 정맥혈에서 검출된다는 동물실험을 참조하면 70 kg인 사람인 경우 4690 mg (66.7 mg/kg X 70 kg), 약 5 g을 1회에 섭취해야 한다는 계산이 나온다.¹³ 더욱이 EGb 761의 반감기가 4.5시간이므로 혈중 농도를 유지하기 위해서는 1일 2회로 회당 5 g을 섭취해야 한다.¹³ 이처럼 EGb 761의 투여용량이 많으므로 이를 줄이기 위해 불필요한 성분을 제거하여 총 투여 용량을 줄이고 최소한의 성분 투여에 의해 부

작용을 극소화시킬 수 있는 성분별 투여가 연구되어 왔다. 성분별 투여의 예로 MDA-231 세포주에 대해 EGb 761의 성분중 하나인 IPS 200은 2-200 µg/ml, ginkgolide B는 0.2-20 µg/ml의 농도에서 세포증식을 억제하였다.¹⁴ 다른 예로, 대장암 세포주에서 quercetin과 kaempferol과 같은 flavonoid 성분이 암치료에 유효하며,⁵ 전립선암에 대해서는 kaempferol이 암 발생 위험도를 감소시키고,¹⁵ flavonoid glycoside의 하나인 rutin은 aflatoxin B1과 N-nitrosodimethylamine에 의한 간암을 억제한다고 한다.¹⁶ 이처럼 EGb 761의 구성성분에 의한 투여가 EGb 761 자체 투여보다 더욱 효과적이라는 점이 여러 암종에서 연구되었으나 EGb 761에 의한 점액과분비 조절에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서는 연구된 바가 없어 이를 연구하게 되었다. 본 실험결과로 사용한 5종의 구성성분 중 kaempferol과 quercetin이 IL-1β에 의해 유도된 *MUC5AC* 유전자의 발현을 40 µM부터 유의하게 억제하였고 농도의존성으로 발현을 억제하였다. 이러한 결과로 kaempferol과 quercetin이 IL-1β에 의한 점액과분비를 억제하는 구성성분임을 알 수 있었다.

Quercetin은 flavonoid로 알려진 polyphenol 물질로 flavonol과에 속한다. Quercetin은 과일이나 나무 껍질에 많이 존재하는데 특히 양파, 적포도주, 녹차, 맥아즙 등에 많이 함유되어 있다.¹⁷ Quercetin의 작용에 대해서는 많은 연구가 되어왔는데, 지방 과산화반응을 억제하여 항궤양과 위장관 보호작용을 하며 비만세포, 염기성구, 중성구 등의 탈과립을 억제하여 항염증, 항알레르기 및 염증 조절작용을 한다.^{18,19} 또한 tyrosine kinase와 nitric oxide synthase를 억제하여 염증 매개체인 NF-κB의 활동을 조절하고, 항바이러스와 항암작용도 하는 것으로 밝혀졌다.²⁰⁻²³ 최근 임상연구에서 quercetin의 항응고 작용은

미미하여 임상적으로는 큰 변화를 야기하지 않는다고 한다.²⁴ 그러나 category III 만성 전립선염 증후군의 경우 임상적으로 증상 개선효과가 있다고 한다.²⁵ 일반적인 하루 용량은 200-1200 mg으로 만성 전립선염의 경우 1000 mg의 용량이 권장되며, 섭취된 quercetin의 25%가 체내로 순환되며 반감기는 25시간이다.²⁶ 이처럼 quercetin은 많은 작용을 하고 임상적으로 사용되고 있지만 점액과분비 억제작용에 대한 것은 찾을 수 없어 본 연구가 이를 밝힌 것에 의의를 둘 수 있겠다. Kaempferol도 flavonoid의 하나로 대부분의 flavonoid와 마찬가지로 항산화 기능을 보인다.^{17,27} Kaempferol은 여러 딸기류에서 발견할 수 있는데 딸기(strawberry)와 덩굴월귤 열매(cranberry)에 많다.²⁸ Kaempferol은 quercetin에 비해 양이 적고 함유된 식물이 적어 상대적으로 연구가 많지 않으며 특히 점액과분비 억제작용에 대한 것은 찾을 수 없어 본 연구가 이를 규명한 것으로 생각한다.

다음 단계로 quercetin과 kaempferol이 flavonoid로 세포증식 억제 작용이 있으므로 본 실험에 사용한 NCI-H292 세포에 대한 세포생존율을 알아보았다. 그 결과, *MUC5AC* 발현 억제를 보이는 40 μ M에서는 quercetin과 kaempferol 모두 세포증식 억제를 보이지 않아 quercetin과 kaempferol의 *MUC5AC* 억제 작용이 세포독작용이 아님을 알 수 있었다. Quercetin과 kaempferol의 세포증식 억제 혹은 세포고사 유도는 대장암종 세포주, 전립선암종 세포주 등 여러 세포에서 보이며 세포고사를 유도하는 농도는 세포에 따라 상이하여 세포특이적 세포증식 억제를 보인다 하겠다.

다음 실험으로 quercetin과 kaempferol을 각각 투여하는 것과 혼합하여 투여하는 것이 EGb 761을 투여한 것과 어느 정도 *MUC5AC* 발현을 억제하는 가를 밝혀 각 투여별 억제 효과를 비교하고자 하였다.

결과를 보면 quercetin과 kaempferol을 각각 40 μ M씩 투여한 경우, quercetin과 kaempferol을 20 μ M씩 혼합하여 투여한 경우, quercetin과 kaempferol을 40 μ M씩 혼합하여 투여한 경우 모두에서 EGb 761 200 μ g/ml를 투여한 경우와 *MUC5AC* 억제 정도는 유의한 차이를 보이지 않았다. Quercetin과 kaempferol이 각각 *MUC5AC* 발현을 억제하므로 이론상으로 둘을 각각 40 μ M씩 투여하는 것과 둘을 20 μ M씩 투여하여 총량이 40 μ M이 되는 것이 *MUC5AC* 발현 억제 면에서 동일한 효과를 보이는 것은 이해가 되었다. 이러한 측면에서 둘을 40 μ M씩 혼합하여 투여하는 경우가 단독투여에 비해 *MUC5AC* 발현을 더 억제하리라 생각했었다. 그러나 실험결과상 둘을 혼합하여 투여하는 경우가 수치상으로는 *MUC5AC* 발현을 억제하나 통계적으로 유의한 정도는 아니었다. 이 결과가 가능한 이유로 quercetin과 kaempferol이 각각 80 μ M에서 세포증식을 억제하므로 이 둘을 40 μ M씩 혼합하여 총량이 80 μ M이 되면 세포증식을 억제하므로, 이러한 세포 독작용으로 인해 *MUC5AC* 발현이 더 이상 증가하지 않을 가능성이 있다. 그러나 다른 이유도 가능하므로 이에 대해서는 추가 연구가 필요하리라 본다.

MAPK는 점액의 생성과 상피세포의 증식 및 분화, 세포고사와 관련된 신호전달 경로에서 중요한 효소 단백질로서 호흡기 상피세포에서 IL-1 β 의 자극에 의해 세포질 내 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 활성화는 관찰되지 않았으며, IL-1 β 투여 20분 경과 후에 p-ERK와 p-p38 MAPK의 활성화가 최대로 나타났다. 이에 근거하여 quercetin, kaempferol, EGb 761 등을 전처치한

후 IL-1 β 투여 20분 후 ERK와 p38 MAPK의 활성을 살펴보았다. 결과로 p-ERK와 p-p38 MAPK의 발현이 감소하여 이들이 quercetin과 kaempferol에 의한 *MUC5AC* 발현 억제에 관여함을 알 수 있었으며 이러한 결과는 기존의 EGb 761에 의한 p-ERK와 p-p38 MAPK 억제와 동일한 결과였다.¹¹ 한편 호흡기 상피세포에서 IL-1 β 에 의한 *MUC5AC* 유전자의 발현에 있어서 ERK와 p38 MAPK 경로 외에 protein kinase C와 하위 신호전달 경로로 COX-2와 PGE2가 관여한다는 보고가 있으므로,²⁹ 향후 이들에 의한 *MUC5AC* 발현 억제의 가능성에도 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

V. 결론

사람 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포주에서 IL-1 β 에 의해 유도된 *MUC5AC* 유전자 발현이 EGb 761의 구성성분 중 kaempferol과 quercetin에 의해 유의하게 억제되며, ERK와 p38 MAPK가 kaempferol과 quercetin의 억제과정에 관여함을 알 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 EGb 761 구성성분 중 kaempferol과 quercetin이 기도 점액 과분비 조절에 대한 치료제로서의 가능성을 보인다고 생각한다.

참고문헌

- 1) Smith JV, Luo Y. Studies on molecular mechanism of Ginkgo biloba extract. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;64(4):465-72.
- 2) DeFeudis FV, Papadopoulos V, Drieu K. Ginkgo biloba extracts and cancer: A research area in its infancy. *Fundam Clin Pharmacol* 2003;17:405-17.
- 3) Michel PF. The doyen of trees: the Ginkgo biloba. *Presse Med* 1986;15(31):1450-4.
- 4) DeFeudis FV. Ginkgo biloba extract (EGb 761): Pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier;1991. p.1-8.
- 5) Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, et al. Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. *Carcinogenesis* 2000;21:959-63.
- 6) DeFeudis FV. Ginkgo biloba extract (EGb 761): Pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier;1991. p.61-96.
- 7) Meade CJ, Heuer H. PAF antagonism as an approach to the treatment of airway hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:S79-82.
- 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. *Kor J Otolaryngol* 2001;44:600-5.
- 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:L320-30.

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;278:23243-50.

11) Chang JH, Kim JH, Lee KW, Cho CI, Chunn JH, Kim KS. Suppression of IL-1 β -induced *MUC5AC* gene expression by *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in human airway epithelial cells. J Rhinol 2007;14:49-55.

12) DeFeudis FV. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761): Pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier;1991. p.143-6.

13) DeFeudis FV. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761): Pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier;1991. p.25-60.

14) Papadopoulos V, Kapsis A, Li H, Amri H, Hardwick M, Culty M, et al. Drug-induced inhibition of the peripheral-type benzodiazepine receptor expression and cell proliferation in human breast cancer cells. Anticancer Res 2000;20:2835-47.

15) Griffiths K, Morton MS, Denis L. Certain aspects of molecular endocrinology that relate to the influence of dietary factors on the pathogenesis of prostate cancer. Eur Urol 1999;35:443-55.

16) Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK. Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. Cancer Lett 1996;109:185-91.

17) de Vries JH, Jenssen PL, Hollman PC, van Staveren WA, Katan MB. Consumption of quercetin and Kaempferol in free-living subjects eating a

variety of diets. *Cancer Lett* 1997;114:141-4.

18) Alarcon de la Lastra AC, Martin MJ, Motilve V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. *Pharmacol.* 1994;48:56-62.

19) Martin MJ, La-Casa C, Alarcon-de-la-Lastra C, Cabeza J, Villegas I, Motilva V. Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. *Z Naturforsch[C]* 1998; 53:82-8.

20) Middleton Jr E, Anne S. Quercetin inhibits lipopolysaccharide-induced expression of endothelial cell intracellular adhesion molecule-1. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107:435-6.

21) Sato M, Miyazaki T, Kambe F, Maeda K, Seo H. Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the induction of interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression by tumor necrosis factor-alpha in cultured human synovial cells. *J Rheumatol* 1997; 24:1680-4.

22) Hollman PC, van Trijp JM, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB. Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Lett* 1997; 114:139-40.

23) Stavric B. Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clin Biochem* 1994; 27:245-8.

24) Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, et al. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetine: pharmacokinetics and evidence for tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 1996; 2:659-68.

25) Shoskes DA, Zeitlin SI, Shahed A, Rajfer J. Quercetin in men with category III chronic prostatitis: a preliminary prospective double-blind, placebo-controlled trial. *Urology* 1999; 54:960-3.

- 26) Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:1276-82.
- 27) DuPont MS, Day AJ, Bennett RN, Mellon FA, Kroon PA. Absorption of kaempferol from endive, a source of kaempferol-3-glucuronide, in humans. *Eur J Clin Nutr* 2004;58(6):947-54
- 28) Hakkinen SH, Karenlampi SO, Mykkanen HM, Torronen AR. Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. *J Agric Food Chem* 1999;47(6):2274-9
- 29) 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. *Kor J Otolaryngol* 2003;46:27-34.

Abstract

Suppression of *MUC5AC* gene expression by the components of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in human airway epithelial cells

Ji In Nam

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyung-Su Kim)

According to the previous study, *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) suppressed IL-1 β -induced *MUC5AC* gene expression in NCI-H292 human airway epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase (ERK)- and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent pathway. As EGb 761 is composed of various components, it is efficient that the anti-hypersecretory component is treated to cells instead of EGb 761 itself. Therefore, this study was aimed to investigate which components of EGb 761 can suppress IL-1 β -induced *MUC5AC* gene expression in NCI-H292 cells and to compare the efficacy of the combination treatment of the components with the single treatment of the components, and to investigate what its possible mechanism is. NCI-H292 human pulmonary mucoepidermoid carcinoma cell line was used. *MUC5AC* mRNA was measured using reverse transcription-polymerase chain

reaction (RT-PCR). The activation of mitogen activated protein kinases (MAPKs) were determined by Western blot analysis. *MUC5AC* expression by IL-1 β (10 ng/ml) was significantly suppressed by kaempferol and quercetin (40 μ M) and this suppression was dose-dependent. However, ginkgolide A, ginkgolide B, and bilobalide being another component of EGb 761 couldn't suppress the *MUC5AC* expression induced by IL-1 β . Comparing the combination and single treatment of kaempferol and quercetin, there was no significant difference between them and the amount of suppression was nearly equal to that of EGb 761. The suppression of *MUC5AC* gene expression by kaempferol and quercetin was conducted via both ERK- and p38 MAPK-dependent pathway. As a conclusion, kaempferol and quercetin being the components of EGb 761 can suppress IL-1 β -induced *MUC5AC* gene expression in human airway epithelial cells and, therefore, they may be considered as possible anti-hypersecretory agents.

Key Words : *Ginkgo biloba* extract 761 · Interleukin-1 β · Mucin · Kaempferol · Quercetin