

Root bark extract of *Cudrania tricuspidata* reduces LPS-induced inflammation in macrophages of atherogenic mice

Mi-Ran Lee*

*Professor, Dept. of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University, Chungbuk, Korea

[Abstract]

In this paper, we propose to evaluate the potential anti-inflammatory properties of root bark extract of *Cudrania (C.) tricuspidata* on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in macrophages of apolipoprotein E (ApoE) knockout (ApoE^{-/-}) mice, murine model of atherosclerosis. Atherosclerosis is a chronic vascular inflammatory disease. *C. tricuspidata* is a small tree of the Moraceae family and its extract has anti-inflammatory activities. However, its role in the progress of atherosclerosis is not yet clear. To determine anti-inflammatory effects of *C. tricuspidata* in atherogenesis, we applied LPS in peritoneal macrophages of ApoE^{-/-} mice and measured cell viability by CCK-8 and expression of pro-inflammatory cytokines by qRT-PCR following treatment with root bark extract of *C. tricuspidata*. Research data was expressed as differences between the cells treated with LPS and root bark extract and the cells treated with LPS alone (control) by a two-tailed non-parametric Mann-Whitney *U*-test using GraphPad InStat program. No cytotoxic effect was observed when the cells were treated with the extract at concentrations $\leq 100 \mu\text{g/mL}$. The expression of inflammatory cytokines, including MCP-1, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , and IL-6 were inhibited by the extract. These results indicated that the extract has an anti-inflammatory effect and therefore a possible role in the treatment of atherosclerosis.

▶ **Key words:** *Cudrania tricuspidata*, Lipopolysaccharide, Inflammation, Peritoneal macrophage, Atherosclerosis

[요 약]

동맥경화증은 동맥 내피세포의 손상으로 인해 내막층에 지질이 축적되어 발생 되는 염증성 질환으로 동맥 내막에 침윤되는 백혈구와 백혈구에서 분비되는 전염증성 사이토카인에 의해 죽종 형성이 시작된다. 꾸지뽕은 뽕나무과의 작은 나무로 그 추출물은 항염증, 항산화, 항암의 효과를 가지고 있다. 그러나, 동맥경화증에서 효능은 명확하게 연구되지 않았다. 본 연구에서는 동맥경화증의 초기 진행에서 꾸지뽕의 항염증 효과를 알아보고자 꾸지뽕 뿌리의 추출물을 수득하였고, 동맥경화증의 동물 모델인 ApoE 결손 생쥐에서 복강대식세포를 분리하였다. 분리된 복강대식세포에 LPS로 염증반응을 유발하고 꾸지뽕 뿌리 추출물을 처리하였을 때 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 세포 생존율의 변화가 관찰되지 않아 이 농도를 추가 실험을 위한 유효 농도로 설정하였다. 또한, LPS에 의해 증가한 염증 사이토카인(MCP-1, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-6)의 발현이 꾸지뽕 뿌리 추출물에 의해 감소하였다. 따라서, 꾸지뽕 뿌리 추출물은 동맥경화의 잠재적 위험성을 가지고 있는 대식세포에서 항염증 효과를 나타내어 동맥경화증의 치료제 개발에 이용 가능할 것이다.

▶ **주제어:** 꾸지뽕, 내독소, 염증, 복강대식세포, 동맥경화

-
- First Author: Mi-Ran Lee, Corresponding Author: Mi-Ran Lee
 - Mi-Ran Lee (leemr@jwu.ac.kr), Dept. of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University
 - Received: 2020. 10. 06, Revised: 2020. 10. 26, Accepted: 2020. 10. 26.

I. Introduction

심혈관계 질환(cardiovascular disease)은 전 세계 사망원인 1위를 차지하는 질환으로, 세계보건기구(World Health Organization)의 통계자료에 따르면 이 질환으로 인한 사망은 전체 사망의 30% 이상 차지하는 것으로 조사되었다. 대표적인 심혈관계 질환으로는 관상동맥 질환(coronary artery disease), 뇌졸중(cerebrovascular disease), 심부전(heart failure), 고혈압성 심장질환(hypertensive heart disease) 등이 있는데, 이 중에서 관상동맥 질환과 뇌졸중이 전체 심혈관계 질환에 의한 사망 대부분을 차지하고 있다[1, 2]. 우리나라도 생활 습관의 서구화와 고령화로 인하여 심혈관계 질환에 의한 사망률이 10년 전 대비 꾸준히 증가하는 추세에 있는데, 2019년 통계청 자료에 의하면 암에 이어 두 번째로 높은 사망원인이 되고 있다[3].

동맥경화증(atherosclerosis)은 혈관벽 내막(intima)에 형성된 죽종(atheroma)이 혈류의 흐름을 방해하여 조직의 저산소증을 유발하게 되는 질환으로, 심혈관계 질환의 발병 위험을 증가시키는 주요 원인으로 알려져 있다[4]. 동맥경화증의 고위험 인자로는 저밀도지단백질(low-density lipoprotein, LDL)의 증가, 비만 및 당뇨병, 고혈압, 흡연 시 유리기(Free radical) 증가로 인한 산화스트레스, 유전적 결함, 감염 등이 있는데, 이로 인해 혈관 내피세포의 기능장애가 유발되어 동맥경화가 시작된다[5]. 대표적인 기능장애로는 백혈구에 대한 내피세포의 부착성과 LDL과 백혈구에 대한 내피 투과성이 증가하는 것인데, 이와 같은 내피세포의 기능장애는 혈관벽 내막층에 지질과 염증세포들의 축적을 일으킨다[6]. 단핵구는 초기 동맥경화 병변 형성에 매우 중요한 작용을 하는 세포로서, 혈관 내막층으로 유입된 후 대식세포로 분화된다[7]. 한편, 내막층에 축적된 LDL은 조직내 산화물질에 의해 산화되는데 대식세포가 이 산화된 지질을 다량 섭취하여 거품세포(foam cell)로 변환된다[8]. 거품세포는 활성산소종을 분비하여 LDL의 산화를 더욱 촉진시키고, 전염증성 사이토카인의 분비와 염증 세포들의 동원(recruitment)을 더욱 증가시킴으로써 동맥경화의 진행을 촉진한다[9]. 이렇듯 동맥경화증의 발생 및 진행에서 염증반응은 매우 중요하게 관여하므로 동맥경화증은 염증성 질환으로 알려져 있다.

동맥경화증을 치료하기 위한 많은 연구가 이루어져 왔고, 주로 LDL 수치를 낮추거나 염증반응을 줄일 수 있는 전략을 통해 치료제들이 개발되었다. 대표적인 치료제로는 스타틴(statin) 계열의 약물이 있는데, 1980년대 후반에

개발되어 안전성과 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추는 효과가 우수하여 지금까지 널리 이용되고 있다[10-11]. 그러나, LDL 콜레스테롤뿐만 아니라 동맥경화를 예방하는 효과가 있는 고밀도지단백질(HDL) 콜레스테롤 농도를 동시에 낮추는 부작용이 발생하기도 하며, 근육병증, 인지장애, 간독성, 당뇨병 등의 부작용도 보고되고 있다[12-13]. 또한, 2000년대 후반에는 스타틴보다 안전성과 LDL 콜레스테롤 강하 효과가 더욱 뛰어난 단백질 변환 효소 억제제/독소 타입 9(protein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 억제제가 개발되어 이용되고 있으나, 주사 부위 부작용(injection-site reaction), 근육 통증, 감기 증상, 비인두염, 관절 통증, 피로, 두통 등의 부작용이 여전히 발생하고 있다[14]. 따라서 이러한 부작용을 최소화할 수 있는 신약 타겟 물질의 발굴 및 신약의 개발이 필요하다.

최근 천연물에서 추출한 원료물질을 기반으로 하는 천연물 신약에 관한 관심이 높아지고 있고, 다양한 질환을 치료하기 위해 천연물 신약을 활용하고 있다. 이는 이미 경험적으로 안정성과 유효성이 입증되어 있어 합성 의약품보다 부작용이 적기 때문이다. 꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*)은 뽕나무과에 속하는 낙엽 활엽 교목으로, 주로 동아시아에 전역에 분포하고 있고 우리나라에서도 전국 각지에 서식하고 있다. 꾸지뽕은 예로부터 습진, 유행성 이하선염, 결핵, 타박상, 불면증, 급성 관절염 등의 치료를 위한 민간 상용 약초로 널리 이용되어왔고[15], 이 식물의 뿌리, 줄기, 잎, 열매 유래의 생리활성 물질(phytochemical)은 항염증, 항산화, 항암, 항당뇨, 항비만 등의 효과를 나타낸다고 보고되었다[16-20]. 특히 항염증 효과를 통해 동맥경화 치료제로서 꾸지뽕의 가능성을 제시하였으나[21], 이는 세포주(cell line)를 이용한 *in vitro* 실험이 주를 이루고 있다. 세포주는 연구를 위해 생체 밖에서 지속적인 배양이 가능하도록 변형시킨 세포 집단으로, 암세포화되어 변질된 특성을 가질 뿐만 아니라 배양 조건이나 환경에 따라 세포 본연의 특성을 잃어버릴 수 있기 때문에 세포주 실험 결과만으로 꾸지뽕의 효능을 평가하고 이해하기엔 한계가 있다. 일차세포(primary cell)는 살아있는 동물에서 추출하여 배양 상태가 생체 내(*in vivo*) 환경과 유사한 생물학적 특징을 지니고 있는데, *in vitro* 실험 결과에 대한 신뢰도를 높이기 위해서는 일차세포를 이용하는 *ex vivo* 실험이 추가로 이루어질 필요성이 있다.

이에 본 연구에서는 동맥경화의 동물 모델인 ApoE 유전자 결손 생쥐(ApoE knockout mice)로부터 분리한 대식세포를 이용하여 동맥경화증에서 꾸지뽕의 효능을 확인하고자 하는데, 지금까지 꾸지뽕 추출물 내 다양한 생리활성을 나타낸다고 알려진 158종의 플라보노이드

(flavonoids), 99종의 크산톤(xanthones), 32종의 유기산 성분들의 대부분을 포함하고 있어 효능이 가장 좋을 것으로 생각되는 꾸지뽕 뿌리 추출물을 본 연구에 이용하였다 [22]. 본 논문은 2장에서 국내·외 관련 연구 동향을 살펴보고, 3장에서 본 연구에 이용된 주요 실험 기법에 대해 자세히 설명한다. 4장에서는 본 연구의 실험 결과를 제시하고, 마지막으로 5장에서 결론을 맺는다.

II. Related Works

꾸지뽕을 이용한 국내·외 연구 동향을 살펴보면, 꾸지뽕은 동아시아에 분포하여 주로 우리나라, 일본, 중국에서 연구가 꾸준히 이루어지고 있다. 꾸지뽕은 오랫동안 다양한 질환에서 민간 상용 약초로 사용되어 오다가, 1980년대 초반 꾸지뽕의 성분과 구조를 분석하는 연구가 일본에서 시작되었다[23]. 우리나라에서는 1990년대 초반부터 꾸지뽕 효능을 연구하여 많은 질병에서 그 효능을 입증하였고[15], 중국의 경우 2000년대 후반부터 연구를 이어오고 있다. 지금까지 보고된 바에 의하면, 꾸지뽕 추출물은 피부암, 혈액암, 비뇨생식기관 암, 소화기관 암, 호흡기관 암에 대해 항암효과를 나타내었고[22], 혈당 개선 효과, 항산화 효과, 항알레르기 효과, 피부주름 형성 억제 효과, 항염증 효과, 위점막 보호 등 다양한 질환에서 긍정적인 효과를 나타내었다[16-20, 24, 25]. 또한, 꾸지뽕 추출물 내 플라보노이드(flavonoids), 크산톤(xanthones), 알칼로이드(alkaloids), 유기산과 같은 다양한 생리 활성을 나타내는 성분들이 확인되면서, 이들 성분을 분리, 정제하여 효능을 평가하는 연구가 이루어지고 있다[22]. 그러나 *in vitro*에서의 기전 연구 결과가 대부분이므로 이를 보완하기 위한 연구가 추가적으로 필요하다. 또한, 이들 성분 중에는 분자 수준에서 이해할 수 있는 약리학적 메커니즘이 아직 검증되지 않은 것이 많아 꾸지뽕을 신약 개발에 활용하기 위해서는 각 성분의 작용 원리에 관한 심층적이고 지속적인 연구가 필요하다.

III. Methodology

1. Preparation of root bark extract of *Cudrania tricuspidata*

본 실험에 사용된 꾸지뽕나무의 뿌리는 충북대학교 산학협력단에서 무농약 인증(인증번호 12303594)을 받은 충

청북도 영동군산으로 인터넷 판매처(산야꾸지뽕)를 통해 구입하였다. 재료의 전처리에는 수도물로 2~3회 수세하여 거름망으로 물기를 제거한 뒤 20 g씩 측정하여 1cm 정도로 잘게 잘라 사용하였고, 400 ml의 70% 에탄올에 넣어 1시간 동안 100 °C에서 가열 추출한 후 냉각하여 2,000 g에서 10분 동안 원심 분리하였다. 투명한 상층액을 수집한 후 남은 침전물은 증류수만 이용해 재차 가열 추출하였고, 이 과정을 총 5회 반복하였다. 추출물을 모아 0.2 µm의 필터로 여과 멸균하였고, 동결 건조기(Ilshin BioBase)에서 건조시켜 9% 정도 수율의 추출물을 수득하였다.

2. Animal study

동맥경화의 동물 모델인 8주령의 수컷 ApoE 유전자 결손 생쥐(ApoE knockout mice; Jackson)를 실내 온도 22 ± 2 °C, 습도 50 ± 10 %, 명암 12시간의 조건이 유지되는 사육실에서 일주일간의 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 사료와 음용수는 제한 없이 공급하였다. 동물 실험이 한양대학교의 동물실험윤리위원회의 승인(IACUC 2020-0120)을 받아 윤리적으로 시행되었다.

3. Isolation and culture of peritoneal macrophage

복강대식세포를 분리하기 위해 동맥경화의 동물 모델인 8주령의 수컷 ApoE 유전자 결손 생쥐(ApoE knockout mice)를 사용하였다. 경추탈골한 생쥐의 복강에 차가운 phosphate buffered saline (PBS; Invitrogen) 용액을 주사하여 세포를 수집하였다. 1,500 rpm으로 5분간 원심 분리 후 10% fetal bovine serum(FBS; Hyclone)과 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen)이 함유된 RPMI-1640 배지(Invitrogen)에 현탁하였고, trypan blue solution (Invitrogen)으로 염색한 후 hemacytometer를 이용하여 세포를 계수하였다. CCK-8 실험을 위해서 96-well plate에 1×10⁵ cells/ml의 농도로 분주하였고, 사이토카인 양을 분석하기 위해서 12-well plate에 1×10⁶ cells/ml의 농도로 분주하였다. 세포를 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이터에 배양하여 2시간 경과 후 비부착 세포(non-adherent cell)를 제거하고 부착세포(adherent cell)만 실험에 사용하였다.

4. CCK-8 cell proliferation assay

세포 생존율을 확인하기 위해 테트라졸리움염(tetrazolium salts)을 미토콘드리아 전자전달계에 존재하는 탈수소 효소(dehydrogenase)가 환원하여 주황색의 formazan이라는 발색물질을 생성하는 원리를 활용한

Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Molecular Technologies)를 사용하였다. 복강대식세포에 100 ng/ml 또는 500 ng/ml의 농도로 lipopolysaccharides (LPS)를 처리하여 12시간 배양한 후, 꾸지뽕을 농도별(0, 25, 50, 100 µg/ml)로 처리하여 12시간을 더 배양하였다. CCK8 용액을 각 well에 첨가하여 3시간 동안 37 °C 배양기에서 반응시킨 후 96 well microplate reader (VERSAmatrix, Madison)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. RNA isolation and qRT-PCR analysis

복강대식세포에 100 ng/ml 또는 500 ng/ml의 농도로 LPS를 처리하여 12시간 배양한 후, 꾸지뽕을 농도별(0, 25, 50, 100 µg/ml)로 처리하여 12시간을 더 배양하였다. 세포의 total RNA를 Trizol 시약(5 PRIME)을 이용하여 추출하였고, 1.5 µg RNA로부터 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR 분석은 StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)을 이용한 SYBR Green (KAPA Biosystems)법으로 실행하였다. 본 실험에 사용된 primer 염기서열에 대한 정보는 Table 1에 정리하였다.

6. Statistical Analysis

모든 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 꾸지뽕 처리군과 비처리군 간의 차이가 양측 비모수적 맨-휘트니 *U* 검정(two-tailed non-parametric Mann-Whitney *U*-test)을 이용하여 평가되었다. 두 그룹간의 평균이 유의 수준 0.05 이하일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 이러한 분석은 통계프로그램인 GraphPad Instat (GraphPad Software)를 사용하여 실시하였다.

IV. Results

1. Experimental Procedures

대식세포의 염증반응은 동맥경화증의 초기 진행에 있어서 매우 중요하게 작용하는데, 본 연구에서는 항염증 효능이 있다고 알려진 꾸지뽕이 동맥경화 동물 모델로부터 분리한 대식세포의 염증반응에 미치는 영향을 알아보고, 동맥경화증의 치료제 개발에 꾸지뽕의 활용 가능성을 평가하고자 하였다.

본 연구를 수행하기 위한 전체적인 실험 설계는 다음과 같다 (Fig. 1). 먼저 꾸지뽕나무에서 가장 효능이 높다고 알려진 뿌리로부터 물과 에탄올의 혼합용매를 이용하여 추출물을 얻었다. 동맥경화의 초기 진행에서 이 추출물의 효능을 평가하기 위해서 동맥경화 동물 모델인 ApoE 유전자 결손 생쥐로부터 복강 대식세포를 분리하여 이용하였고, 이 세포에 염증반응을 유도하기 위해서 그람음성 세균의 세포 외막에서 유래하여 내독소 작용을 하는 물질인 LPS를 이용하였다. LPS는 백혈구를 자극하여 염증 매개 물질을 분비하게 하고 염증을 유발한다고 알려져 있다 [26]. 꾸지뽕 뿌리 추출물의 효능을 확인하기에 앞서 본 연구에 이용된 이 추출물의 독성 여부를 확인하기 위해 CCK-8 assay를 시행하였다. 꾸지뽕 뿌리 추출물이 세포 독성을 나타내지 않는다는 것을 확인한 후, 염증 싸이토카인의 발현양을 qRT-PCR을 이용하여 분석함으로써 LPS로 유발된 대식세포 염증반응에서 꾸지뽕 뿌리 추출물의 효과를 확인하였다. 전체 실험의 분석이 통계프로그램인 GraphPad Instat software를 이용하여 양측 비모수적 맨-휘트니 *U* 검정으로 시행되었다.

Table 1. Primer information used in this study

Gene	Direction	Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Size (bp)
TNF-α	Forward	AGCCCACGTAGCAAACCACCAA	60	154
	Reverse	ACACCCATTCCCTTCACAGAGCAAT		
IFN-γ	Forward	CATAAGCGTCATTGAATCACAC	60	145
	Reverse	GACCACTCGGATGAGCTCATT		
IL-1β	Forward	TGAAGTTGACGGACCCAAA	58	101
	Reverse	TGATGTGCTGCTGCGAGATT		
IL-6	Forward	CTTCCATCCAGTTGCCTTCTTG	60	142
	Reverse	AATTAAGCCTCCGACTTGTGAAG		
MCP-1	Forward	GCAAGATGATCCCAATGAGTAG	60	271
	Reverse	GTAGTGGATGCATTAGCTTCAG		
β-actin	Forward	ACGGCCAGGTCATCACTATTG	58	87
	Reverse	CACAGGATCCATACCCAAGAAG		

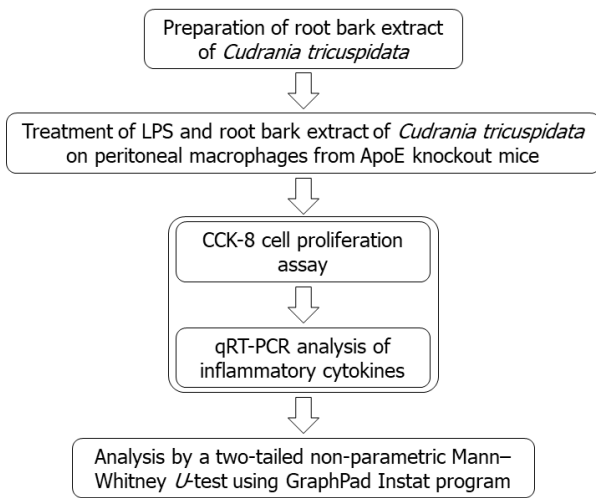


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental design used in the study.

2. Cytotoxicity of root bark extract of *Cudrania tricuspidata* in macrophages from ApoE knockout mice

동맥경화 초기 진행에서 꾸지뽕 뿌리 추출물의 효능을 확인하기에 앞서 본 실험에 사용하고자 하는 꾸지뽕 뿌리 추출물의 독성 여부를 확인하고 세포 생존율에 영향을 주지 않는 유효 농도를 확인하기 위하여 CCK-8 assay를 수행하였다. 꾸지뽕 뿌리 추출물을 25, 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 각각 처리하였고 대조군은 추출물을 처리하지 않았다. 염증반응의 강도에 따른 꾸지뽕의 효과를 비교해 보기 위해서, 세포에 처리한 LPS는 두 가지 농도(100 ng/ml, 500 ng/ml)를 이용하였다.

100 ng/ml LPS를 이용하여 상대적으로 약한 염증반응을 유도한 후 꾸지뽕 뿌리 추출물을 처리하였을 때 200 µg/ml의 농도에서 세포의 생존율이 유의성 있게 감소하였고, 100 µg/ml 이하의 농도로 처리시에는 세포의 생존율이 대조군과 유사하여 세포 독성 효과가 없는 것을 확인하였다 (Fig. 2A). 또한, 100 ng/ml LPS를 대식세포에 단독으로 처리하였을 때에도 대식세포의 생존율이 대조군과 유사하여 이 농도의 LPS는 세포 독성 효과를 나타내지 않는다는 것을 확인하였다 (Fig. 2A).

상대적으로 강한 염증반응을 유도하기 위해서 500 ng/ml LPS를 사용하였는데, 이 농도의 LPS를 대식세포에 단독으로 처리하였을 때 세포의 생존율이 20% 정도 감소하는 것을 확인하였고, 세포 독성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 500 ng/ml LPS를 처리한 세포에서 유발된 세포 생존율 감소는 꾸지뽕 뿌리 추출물을 100 µg/ml 이하의 농도로 처리했을 때 회복이 되는 것을 확인하였고, 특히 50 µg/ml의 농도에서 세포 생존율이 유의성 있게 증가

하였다 (Fig. 2B). 500 ng/ml LPS와 200 µg/ml 꾸지뽕 추출물을 함께 처리했을 때 500 ng/ml LPS를 단독으로 처리한 경우보다 세포 생존율이 더욱 감소하였다 (Fig. 2B). 따라서 본 연구에서는 꾸지뽕 뿌리 추출물의 유효 처리 농도를 25, 50, 100 µg/ml로 설정하였다.

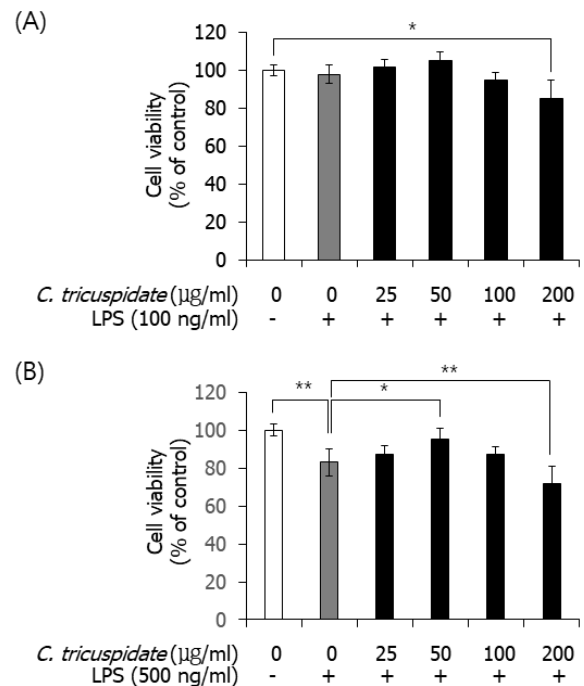


Fig. 2. Effect of root bark extract of *Cudrania tricuspidata* on viability of peritoneal macrophages from ApoE knockout mice. The cells were pretreated with (A) 100 ng/ml or (B) 500 ng/ml of LPS for 1h, followed stimulation with the indicated concentrations of root bark extract of *Cudrania tricuspidata* for 24h. Cell viability was measured by CCK8. The results are presented as the mean \pm s.d. according to the Mann-Whitney U-test; * P <0.05; ** P <0.01.

3. Regulation of LPS-induced inflammation by root bark extract of *Cudrania tricuspidata* in macrophages from ApoE knockout mice

동맥경화 병변 내에는 무수히 많은 염증 세포들이 발견되는데 이것은 동맥경화 초기 진행에서 대식세포가 활성화되어 염증성 사이토카인을 분비하여 많은 염증 세포들을 동원(recruitment)하기 때문이다. 따라서 이 염증반응을 줄이는 것은 동맥경화증을 억제할 수 있는 좋은 방안이 될 수 있다. 본 연구에서는 꾸지뽕 뿌리 추출물이 동맥경화 동물 모델의 복강대식세포에 작용하여 염증을 억제하는 효과가 있는지 확인하고자, ApoE 유전자 결손 생쥐의 대식세포에 LPS를 처리하여 염증을 유발한 후 꾸지뽕 뿌리 추출물을 처리하여 염증 사이토카인의 발현양을 분석하였다. 분석한 염증 사이토카인은 혈관 내피세포에 단핵

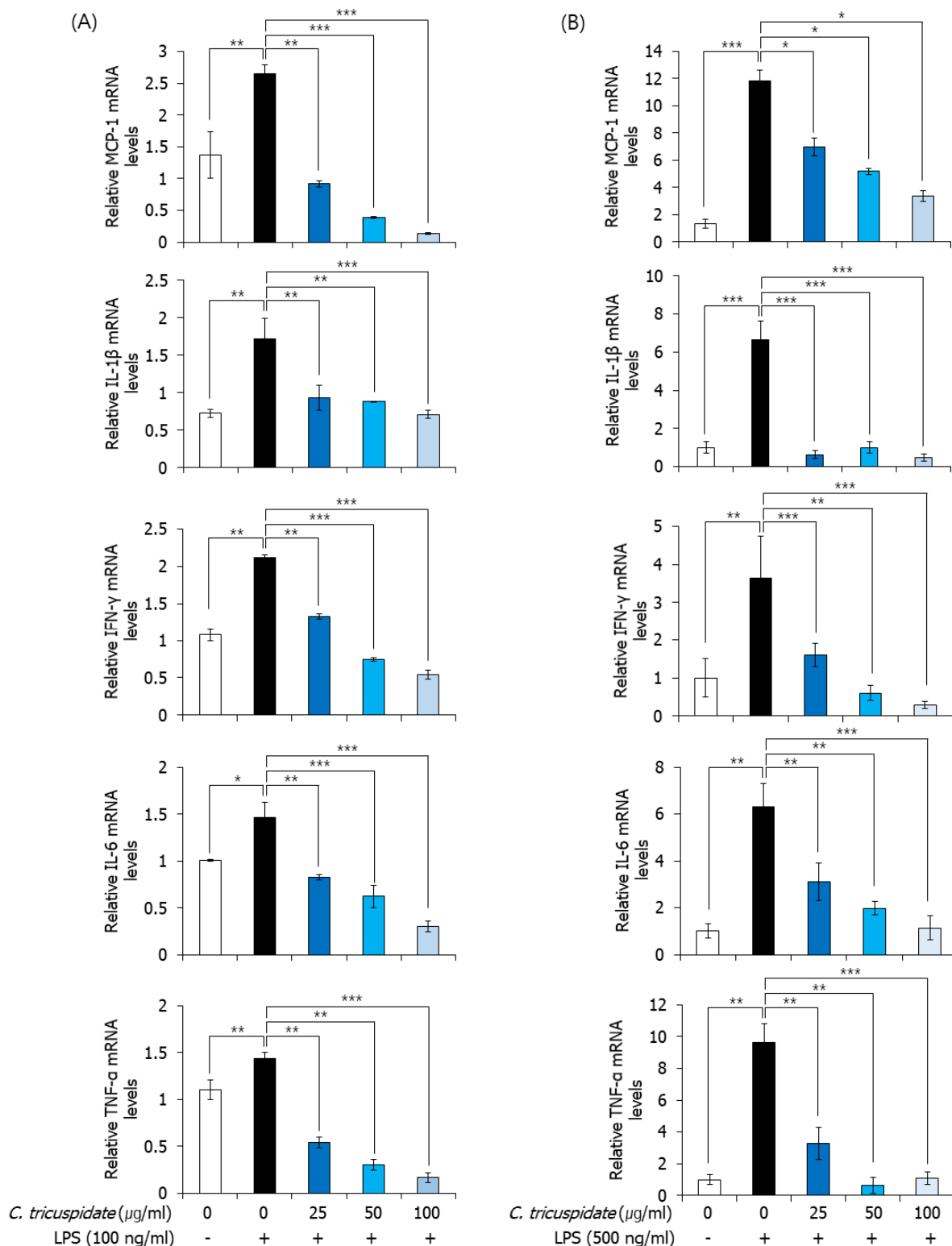


Fig. 3. Effect of root bark extract of *Cudrania tricuspidata* on LPS-induced inflammation in peritoneal macrophages from ApoE knockout mice. The cells were pretreated with (A) 100 ng/ml or (B) 500 ng/ml of LPS for 1h, followed stimulation with the indicated concentrations of root bark extract of *Cudrania tricuspidata* for 12h. The mRNA levels of MCP-1, IL-1β, IFN-γ, IL-6, TNF-α were determined by qRT-PCR analysis. The results are presented as the mean ± s.d. according to the Mann-Whitney U-test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

구의 부착과 내피 안으로 단핵구의 침윤을 증가시키는 MCP-1[27], 싸이토카인 폭풍을 유발할 수 있는 강력한 염증 매개체인 IL-1 β [28], 대식세포와 T 림프구를 활성화해서 염증을 증폭시키는 IFN- γ 와 TNF- α [29], 간에서 전신성 염증 반응물질인 C-reactive protein(CRP)의 생성을 촉진하고 림프구의 증식과 분화를 촉진하는 IL-6 이다 [30]. 100 ng/ml LPS를 처리하여 상대적으로 약한 염증 반응을 유도한 경우와 500 ng/ml LPS를 처리하여 상대적으로 강한 염증반응을 유도한 경우의 두 가지 조건에서 꾸지뽕 뿌리 추출물이 이들 염증성 싸이토카인의 발현을 조절하는지를 qRT-PCR법으로 확인하였다. 그 결과, 두 조건 모두에서 LPS 처리 후 염증 싸이토카인의 발현이 증가하였으나, 꾸지뽕 뿌리 추출물을 처리하였을 때 그 발현이 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 3).

V. Discussion

동맥경화증의 치료제 개발이 지속해서 이루어지고 있고, 스타틴 요법은 동맥경화증의 치료 및 심혈관계 질환의 예방에 초석이 된 치료법이다. 1976년에 개발된 메바스타틴 (mevastatin)을 시작으로 하여 현재까지 많은 스타틴 계열의 약물이 개발되었고 스타틴은 안전성 면에서 우수한 약물로 인정받고 있다. 스타틴은 HMG-CoA 환원효소를 억제하여 콜레스테롤의 합성을 억제하고 간세포 막의 LDL 수용체 발현을 증가시켜 혈중 LDL 콜레스테롤의 양을 줄이는 효과를 나타내지만, 근육통, 관절통, 소화 불량 등의 부작용도 발생한다. 스타틴 과민증이 있는 환자나 스타틴 요법만으로 LDL 콜레스테롤 농도가 목표 수치에 도달하지 못하는 환자는 소장의 콜레스테롤 흡수를 억제하는 에제티미브 (ezetimibe)나 혈중 LDL 콜레스테롤 농도를 낮추는 PCSK9 억제제를 스타틴과 병용해서 사용하고 있다[31]. 이와 같은 지질 강하제 이외에도 항염증제인 카나키누맙 (canakinumab) 및 메토티렉세이트 (methotrexate)가 동맥경화 치료를 위해 이용되고 있는 약물이다[31].

많은 동맥경화증 치료제가 개발되었음에도 전 세계적으로 여전히 동맥경화증의 유병률은 높고 이로 인해 발생되는 심혈관계 질환에 의한 사망률도 매우 높게 나타나고 있다[1, 2]. 그러므로 동맥경화증의 발생 기작 연구를 통한 새로운 치료 표적의 발굴이 필요하고, 보다 효과적인 치료 전략을 개발하기 위한 끊임없는 노력이 필요하다. 천연물 유래의 의약품은 안정성과 유효성 면에서 이미 경험적으로 입증되어 합성 의약품보다 부작용의 우려가 적기 때문

에 다양한 질환에서 각종 천연물의 효과에 관한 연구가 이루어지고 있고 국내·외 제약회사에서는 천연물 소재를 이용한 신약 개발 연구가 활발히 이루어지고 있다. 본 연구에서 이용한 꾸지뽕 뿌리 추출물은 오랫동안 치료를 위한 민간 상용 약초로 널리 이용되었고, 꾸지뽕 추출물의 유효 성분들은 다양한 질환에서 긍정적인 효과를 나타내고 있다[15-25]. 그러나 여전히 꾸지뽕 나무에 대한 임상 연구 및 안정성 연구는 진행이 되어 있지 않아 현대 의학이 발달한 상황에서도 민간요법이나 전통적인 한약 처방이 지속되고 있는 실정이다. 이와 같이 임상결과가 제대로 확인되지 않은 채 치료가 시행되는 경우 부작용이 발생할 수 있는데, 꾸지뽕의 경우 아직까지 해외에서 보고된 사례는 없으나 국내에서 한약 복용 후 전격성 간염 및 급성 전신성 발진성 농포증이 나타난다는 사례가 보고 되었다 [32-34]. 그러므로 꾸지뽕 뿌리 추출물을 동맥경화 치료를 위한 소재로 이용하기 위해서는 꾸지뽕 성분 중에서 아직까지 약리학적 메커니즘이 검증되지 않은 성분의 분석과 임상 연구 및 안정성 연구가 필요하다.

VI. Conclusions

본 연구에서 꾸지뽕 뿌리 추출물을 동맥경화 동물 모델인 ApoE 유전자 결손 생쥐의 복강대식세포에 처리할 적절한 농도를 확인할 수 있었고, 이 추출물이 100 μ g/ml 이하의 농도에서 복강대식세포의 생존율에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다. 그리고 50 μ g/ml 농도의 꾸지뽕 뿌리 추출물이 고농도 LPS (500 μ g/ml)의 자극으로 유도된 복강대식세포의 생존율 감소를 대조군과 유사하게 회복시킬 수 있는 효능을 확인할 수 있었다. MCP-1, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-6의 유전자 발현 측정에서 100 μ g/ml 이하 농도의 꾸지뽕 뿌리 추출물이 저농도와 고농도 LPS에 의해 증가된 염증 싸이토카인의 발현을 모두 유의성 있게 회복시키는 결과를 나타내었다. 이는 동맥경화증의 진행을 억제할 수 있는 새로운 염증 개선 후보물질로서 꾸지뽕 뿌리 추출물의 가능성을 보여준다.

본 연구에서 꾸지뽕 뿌리 추출물의 항염증 효능이 동맥경화 동물 모델의 대식세포에서 평가되었다는 것은 지금까지의 *in vitro* 대식세포를 이용한 연구 결과의 한계를 보완하였다는 점에서 매우 의미 있다. 본 연구 결과는 꾸지뽕 뿌리 추출물이 동맥경화증의 치료제 개발을 위해 활용될 수 있음을 보여주는 기초적인 자료가 될 것으로 사료된다. 또한, 향후 꾸지뽕 뿌리 추출물이 어떠한 기전으로

염증반응을 개선하는지에 관한 추가연구와 심도 있는 임상 연구가 필요할 것으로 사료 된다.

REFERENCES

- [1] Zaman S, Goldberger JJ, Kovoor P., "Sudden Death Risk-Stratification in 2018-2019: The Old and the New" *Heart Lung Circ.* Vol. 28, No. 1, pp. 57-64, Jan 2019. DOI: 10.1016/j.hlc.2018.08.027
- [2] Naghavi M, Wang H, Lozano R, Davis A, Liang X, Zhou M, et al. "Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013", *Lancet.* Vol. 385, No. 9963, pp. 117-171, Jan 2015. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61682-2
- [3] Statistics Korea. 2019. 『Cause-of-death statistics in 2019』 pp. 1-56
- [4] Gallino A, Aboyans V, Diehm C, et al. "Non-coronary atherosclerosis", *Eur Heart J.* Vol. 35, No. 17, pp. 1112-1119, May 2014. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu071
- [5] Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G. "Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis", *Circ Res.* Vol. 118, No. 4, pp. 620-636, Feb 2016. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301
- [6] Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD., "Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation", *Oxid Med Cell Longev.* Vol. 2019, pp. 8563845, July 2019. DOI: 10.1155/2019/8563845
- [7] Ridker, P.M. "Residual inflammatory risk: addressing the obverse side of the atherosclerosis prevention coin", *Eur. Heart J.* Vol. 37, No. 22, pp. 1720-1722, Feb 2016. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw024
- [8] Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, Grechko AV, Orekhov AN. "Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis", *J Mol Med (Berl).* Vol. 95, No. 11, pp. 1153-1165, Nov 2017. DOI: 10.1007/s00109-017-1575-8
- [9] Malekmohammad K, Sewell RD, Rafieian-Kopaei M, "Antioxidants and Atherosclerosis: Mechanistic Aspects", *Biomolecules.* Vol. 9, No. 8, pp.301, July 2019. DOI: 10.3390/biom9080301
- [10] Mihaylova B, Emberson J, Blackwell L, Keech A, Simes J, et al. "Cholesterol Treatment Trialists'(CTT) Collaborators. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials", *Lancet.* Vol. 380, No. 9841, pp. 581-590. May 2012. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60367-5
- [11] Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, et al. "Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein", *N Engl J Med.* Vol. 359, No. 21, pp. 2195-2207, Nov 2008. DOI: 10.1056/NEJMoa0807646
- [12] Guyton JR, Bays HE, Grundy SM, et al. "An assessment by the statin intolerance panel", *J Clin Lipidol.* Vol. 8, No. 3, pp. S72-81, May 2014. DOI: 10.1016/j.jacl.2014.03.002
- [13] Sung J, Kim SH, Song HR, et al. "Lipid-lowering treatment practice patterns in Korea: comparison with the data obtained from the CEPHEUS pan-Asian study", *J Atheroscler Thromb.* Vol. 21, No. 11, pp. 1219-1227, July 2014. DOI: 10.5551/jat.23242
- [14] Robert M., Merel L., Roger R., Douwe D., Erik S., et al. "PCSK9 inhibitors in clinical practice: Delivering on the promise?", *Atherosclerosis.* Vol. 270, pp. 205-210, Mar 2018. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.11.027
- [15] Xin LT., Yue SJ., Fan YC., Wu JS., Yan D., Guan HS, et al. "Cudrania tricuspidata: an updated review on ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology", *RSC Adv.* Vol. 7, No. 51, pp. 31807-31832, Dec 2017. DOI: org/10.1039/C7RA04322H
- [16] Jo YH., Kim SB., Liu Q., Hwang BY., Lee MK. "Prenylated xanthenes from the roots of Cudrania tricuspidata as inhibitors of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production" *Arch Pharm.* Vol. 350, No. 1, pp. e1600263, Jan 2017. DOI: 10.1002/ardp.201600263
- [17] Cho SS., Yang JH., Seo KH., Shin SM., Park EY., Cho SS, et al. "Cudrania tricuspidata extract and its major constituents inhibit oxidative stress-induced liver injury" *J Med Food.* Vol. 22, No. 6, pp. 602-613, June 2019. DOI: 10.1089/jmf.2018.4322
- [18] Jiang X, Cao C, Sun W, Chen Z, Li X, et al. "Scandanolone from Cudrania tricuspidata fruit extract suppresses the viability of breast cancer cells (MCF-7) in vitro and in vivo", *Food Chem Toxicol.* Vol. 126, pp. 56-66, Feb 2019. DOI: 10.1016/j.ft.2019.02.020
- [19] Jo YH., Kim SB., Ahn JH., Turk A., Kwon EB., Kim MO, et al. "Xanthenes from the stems of Cudrania tricuspidata and their inhibitory effects on pancreatic lipase and fat accumulation. *Bioorg Chem.* Vol. 92, pp. 103234, Nov 2019. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103234
- [20] Lee SB, Shin JS, Han HS, Lee HH, Park JC, et al. "Kaempferol 7-O-β-D-glucoside isolated from the leaves of Cudrania tricuspidata inhibits LPS-induced expression of pro-inflammatory mediators through inactivation of NF-κB, AP-1, and JAK-STAT in RAW 264.7 macrophages", *Chem Biol Interact.* Vol. 284, pp. 101-111, Mar 2018. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.02.022
- [21] Park KH., Park YD., Han JM. Im KR., Lee BW., et al. "Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthenes and flavonoids isolated from Cudrania tricuspidata", *Bioorg Med Chem Lett.* Vol. 16, No. 21, pp. 5580-5583, Nov 2006. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.08.032
- [22] Li X, Yao Z, Jiang X, Sun J, Ran G, et al. "Bioactive compounds from Cudrania tricuspidata: A natural anticancer source", *Crit Rev*

- Food Sci Nutr. Vol. 60, No. 3, pp. 494-514. Dec 2020. DOI: 10.1080/10408398.2018.1541866
- [23] Fujimoto T, Hano Y, Nomura T. "Components of Root Bark of *Cudrania tricuspidata* 1,1,2 Structures of Four New Isoprenylated Xanthenes, Cudraxanthenes A, B, C and D", *Planta Med.* Vol. 50, No. 3, pp. 218-221, June 1984. DOI: 10.1055/s-2007-969682
- [24] Kim OK., Nam DE., Jun W., Lee J. "Anti-wrinkle Activity of a *Cudrania tricuspidata* Extract on Ultraviolet-induced Photoaging", *J Korean Soc Food Sci Nutr.* Vol. 42, No. 4, pp. 608-614, June 2013. DOI: 10.3746/jkfn.2013.42.4.608
- [25] Lee T, Kwon J, Lee D, Mar W. "Effects of *Cudrania tricuspidata* Fruit Extract and Its Active Compound, 5,7,3',4'-Tetrahydroxy-6,8-diprenylisoflavone, on the High-Affinity IgE Receptor-Mediated Activation of Syk in Mast Cells", *J Agric Food Chem.* Vol. 63, No. 22, pp. 5459-5467, June 2015. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00903
- [26] Cheng N, Liang Y, Du X, Ye RD. "Serum amyloid A promotes LPS clearance and suppresses LPS-induced inflammation and tissue injury," *EMBO Rep.* Vol. 19 No. 10, pp. e45517, Oct 2018. DOI: 10.15252/embr.201745517
- [27] Lin J, Kakkar V, Lu X. "Impact of MCP-1 in atherosclerosis", *Curr Pharm Des.* Vol. 20, No. 28, pp.4580-4588, Jan 2014. DOI: 10.2174/1381612820666140522115801
- [28] D'Elia, R. V., Harrison, K., Oyston, P. C., Lukaszewski, R. A. & Clark, G. C. Targeting the "cytokine storm" for therapeutic benefit. *Clin. Vaccine Immunol.* Vol. 20, No. 3 pp. 319-327, Jan 2013. DOI: 10.1128/CVI.00636-12
- [29] Bartekova M., Radosinska J, Jelemensky M, Dhalla SD. "Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease" *Heart Fail Rev.* Vol. 23, No. 5, pp. 733-758, Sep 2018. DOI: 10.1007/s10741-018-9716-x
- [30] Hartman J, Frishman WH. "Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy", *Cardiol Rev.* Vol. 22, No. 3, pp. 147-151, May-June 2014. DOI: 10.1097/CRD.0000000000000021
- [31] Park JG and Oh GT. "Current pharmacotherapies for atherosclerotic cardiovascular diseases", *BMB Rep.* Vol. 44. No. 8, pp. 497-505, Aug 2011. DOI: 10.5483/bmbrep.2011.44.8.497
- [32] Koh BS, Park HJ, Kim SR, Monn IJ, Leem D, et al. "Adverse drug reactions after taking the extract of *Cudrania tricuspidata*", *Allergy Asthma Respir Dis.* Vol. 2, No. 5, pp. 387-390, Jan 2014. DOI: 10.4168/aard.2014.2.5.387
- [33] Chang SL, Huang YH, Yang CH, Hu S, Hong HS. Clinical manifestations and characteristics of patients with acute generalized exanthematous pustulosis in Asia. *Acta Derm Venereol* Vol. 88, pp. 363-365, Jan 2008. DOI: 10.2340/00015555-0438

Authors



Mi-Ran Lee received the B.S. degree in Biomedical Laboratory Science from Inje University, Korea, in 2002. She received M.S. degree in Pathology from Chungnam National University, Korea, in 2004 and

Ph.D. degree in Life Science from Ewha Womans University, Korea, 2012. Dr. Lee joined the faculty of the Department of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University, in 2015. She is currently a Professor in the Department of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University. She is interested in health care, life sciences and clinical research.