

Anti-inflammation and Anti-cancer Activity of Methanol Extract of Antarctic Lichen, *Usnea Aurantiaco-atra*

Sung-Suk Suh*

Department of Bioscience, Mokpo National University, Muan 58554, Korea

Received September 1, 2023 / Revised November 22, 2023 / Accepted December 4, 2023

Inflammation by the innate immune system is a protective mechanism of the organism against infection-mediated environmental factors. It is also responsible for the pathogenesis of various human diseases, including the progression of cancer. Lichens are receiving increasing attention as a source of bioactive molecules with therapeutic potential for a variety of diseases. Additionally, the antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer potential of lichen and its secondary metabolites have been widely reported. However, the underlying mechanism is still unknown. In the present study, to investigate molecular mechanisms of anti-inflammation and anti-cancer activity in the Antarctic lichen, *Usnea aurantiaco-atra*, methanol extract of *Usnea aurantiaco-atra* (MEUS) was used *in vitro* assays in RAW 264.7 macrophages cell and HCT116 colon cancer cells. Based on our data, MEUS had the anti-inflammatory activity through the modulation of main inflammatory indicators such as COX-2, IL-6, iNOS, TNF- α and NO production in a concentration-dependent manner. In addition, we observed that MEUS had cytotoxic activity against HCT116 colon cancer cells in a concentration-dependent manner, leading to a significantly reduced proliferation of the cancer cells through apoptotic induction by activating caspase-3. Taken together, this work firstly reported the anti-inflammatory and anti-cancer activities of an Antarctic lichen, *Usnea aurantiaco-atra*, and MEUS may provide a new insight into the molecular mechanisms underlying a link between inflammation and cancer.

Key words : Anti-cancer, anti-inflammation, apoptotic induction, colorectal cancer, inflammation

서 론

염증은 외부 병원체에 대해 세포의 항상성을 회복시키기 위한 선천성 면역 체계에 의해 매개되는 방어 반응이다. 병원성 감염으로 인해 조직이 손상되면 우리 몸의 세포는 사이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine) 등의 신호경로를 활성화시켜 면역반응을 일으킨다[32]. 예를 들어 감염 부위에 주로 위치하는 대식세포는 감염을 인지하고 백혈구, 림프구 등 다른 면역세포를 감염 부위로 끌어들이는 염증성 사이토카인을 분비해 염증을 일으킨다. 감염 부위로 모집된 면역세포는 감염에 대한 면역반응 강화에 기여하며, 감염으로 인해 붕괴된 항상성 상태는 빠르게 정상 상태로 회복된다[4]. 어떤 이유든 급성염증이 해결되지 않은 채로 남아 암을 비롯한 많은 질병의 주요 원인인 만성염증으로 진행되면 염증세포가 파괴되고 TNF- α ,

IL-1과 IL-6 등 다양한 염증유발물질들이 분비되어 DNA 손상이나 돌연변이를 일으켜 종양을 유발한다[31]. 이 과정에서 염증 매개 종양 발달의 주요 조절 분자인 NF- κ B는 염증에 반응하여 IL-6, TNF- α , iNOS, COX-2 및 COX-2와 같은 많은 조절 분자의 발현을 조절하는 전사조절 인자의 역할을 한다[14]. 실제로 NF- κ B와 그 하위 표적 유전자인 iNOS 및 COX-2는 다양한 암 유형에서 활성화되며 세포 증식, 항세포사멸 활성 및 혈관 신생을 조절하고 전이를 촉진시킴으로써 종양 형성에 중요한 역할을 한다[33].

대장암은 폐암과 유방암에 이어 전 세계적으로 세 번째로 많이 진단되는 암이다[10]. 대장암의 초기 단계는 외과적 수술, 방사선 요법 및 약물을 사용하여 치료할 수 있다. 대장암의 화학요법으로는 암, 특히 인접 인접한 조직을 침범하고 다른 장기로 전이하는 경향이 있는 종양에서 중요한 치료법이며 첨단 수술 및 전신 치료의 도입으로 지난 몇 년 동안 대장암 치료법이 개선되고 있지만[13], 화학요법에 따른 내성 발생과 심각한 부작용으로 인해 화학 약물의 사용이 제한되고 있다[20]. 따라서, 정상세포가 아닌 암세포에서 세포사멸 경로의 선택적인 조절암 연구자들의 목표였으며 지난 수십 년 동안 약용식물과 같은 천연물에서 추출한 약제는 안전성, 효능 및 가용성으로 인해 임상으로부터 많은 연구가 진행되고 있다[17].

*Corresponding author

Tel : +82-82-61-450-2346, Fax : +82-61-450-2349

E-mail : sunguksuh@mokpo.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

세포사멸 유형 중 하나인 세포자살은 세포 수축, 핵 응축 그리고 DNA 절단과 같은 몇 가지 형태학적 및 생화학적 변화의 특성을 가지며[7], 이러한 암세포에서 프로그램화된 세포사멸의 유도는 암 치료에 있어 효율적인 전략이다 [29, 30].

최근 지의류는 염증과 암에 대한 약리학적, 치료적 잠재력을 지닌 생리활성 분자의 공급원으로 점점 더 주목받고 있다[18]. 예를 들면, 지의류 추출물에는 대표적인 항산화 물질인 usnic acid 이외에 생물학적 활성을 지닌 다양한 물질들이 포함되어 있으며 특히, *Usnea barbata*는 현대 화장품 및 의약품 제제에 사용되는 있다[21]. 하지만, 지의류 유래 대사산물의 생물학적 활성을 뒷받침하는 생리학적 및 분자적 메커니즘은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 본 연구의 주요 목적은 극지 지의류인 *Usnea aurantiaco-atra*의 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물에 대한 항염증 및 세포독성 효과를 평가하는 것이다. 본 연구에서는 RAW 264.7 세포에서 IL-6, TNF- α , COX-2 그리고 iNOS를 포함한 염증 조절 분자의 발현을 측정함으로써 추출물의 항염증 활성을 평가했다. 또한, 암세포에 대한 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 반응으로 세포 증식이 상당히 억제되고 세포자살이 유도되는 것으로 확인했다. 이러한 결과는 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물이 대장암의 표적 치료를 위한 항암제로서 유망한 후보가 될 수 있음을 시사한다.

재료 및 방법

재료

연구에 사용한 남극 지의류, *Usnea aurantiaco-atra*는 남극 바톤반도 킹조지섬에서 2021년 2월에 채집하였고, 윤의중 박사가 종을 확인하였다. 표본(Ant-005)은 극지연구소 천연물화학 연구실에 보관 중이다.

추출물

남극 지의류 *Usnea aurantiaco-atra* (10 g)는 연구를 위하여 암실 건조 및 세절하였고, 메탄올 (MeOH) 300ml를 사용하여 2일 동안 실온에서 3회 반복 추출하였다. 메탄올 추출물은 감압 농축기를 사용하여 용매를 제거한 후, 추출물을 얻었다. 메탄올 추출물은 증류수에 현탁한 다음 유기용매, 클로로포름(CHCl₃)로 비교적 저극성 및 지질 등의 물질들을 분획하였고, 다음으로 에틸아세테이트 (EtOAc)를 사용하여 비교적 극성이 높은 물질들로 나누어 분획하였다. 에틸아세테이트 분획은 간단한 Lab 실험에서 thin-layer chromatography (TLC)법을 사용하여 폴리페놀 성분들을 확인하였다.

세포 배양

RAW264.7은 Abelson퀴 백혈병 바이러스로 유도된 수컷 쥐의 종양에서 확립된 대식세포 세포주이며, HCT116는 인간 대장암 세포주이고 MRC5는 인간 섬유아세포주이다. 이들 세포주는 모두 American Type Culture Collection (ATCC)에서 얻었으며 37°C, 5% CO₂인 조건과 10% FBS와 1% P/S가 함유된 DMEM에서 배양하였다.

세포 생존율 측정

96 well plate에 RAW264.7과 HCT116를 각각 5× cells/ml와 3× cells/ml로 분주하고 overnight 배양하였다. MEUS을 농도별로 처리하고 24시간 후에 CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, WI, USA) 용액을 넣고 37°C, 5% CO₂인 조건에서 1시간 동안 반응시킨 후에 490 nm에서 측정하였다.

산화질소(NO) 측정

RAW 264.7 세포 배양액의 NO 농도는 Griess 시약을 사용하여 측정되었다. 100 μ l의 상층액을 동일한 양의 Griess 시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine)과 혼합했다. 혼합물을 실온에서 10분 동안 배양한 후, microplate reader기 (Lonza, MA, USA)를 사용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. NO 농도는 sodium nitrite의 calibration curve (0-100 μ M)을 사용하여 결정되었다.

qRT-PCR 분석

RAW264.7를 1× cells/ml로 6 well plate에 분주하고 overnight 배양한 후 MEUS을 농도별로 처리하였다. 1시간 후에 LPS 0.5 μ g/ml를 처리하여 염증반응을 유도하였다. 24시간 후에 세포를 모아준 후 모든 세포의 RNA를 Trizol, Chloroform, Isopropanol, 그리고 75% Ethanol을 사용하여 분리하였다. RNA 1 ng/ μ l를 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa Bio Inc., Japan)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. LPS 0.5 μ g/ml로 염증 유도된 RAW264.7 세포주에서의 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 통해 확인하였다. β -actin과의 상대적인 유전자 발현 비율을 계산 방법을 사용하여 계산하였다. 사용된 프라이머는 다음과 같다: iNOS: (F) 5'-GGAGCCTTGAACCTCAAACAGA-3', (R) 5'-TGAACGAGGAGGGTGGTG-3'; COX-2: (F) 5'-GAAGTCTTTGGTCTGGTGCGTG-3', (R) 5'-GTCTGCTGGTTTGAATAGTTGC-3'; IL-6: (F) 5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3', (R) 5'-AAGTGCA TCGTTGTTTCATACA-3'; TNF- α : (F) 5'-CATCTTCTCAAA AATTCGAGTGACAA-3', (R) 5'-TGGGAGTAGACAAGGT ACAACCC-3'; β -actin: (F) 5'-TGTGTTGAGACCTTCAACACC-3', (R) 5'-CGCTCATTGCCGATAGTGAT-3'.

Western blot 분석

6 well plate에 RAW264.7과 HCT116를 각각 1× cells/ml, 4× cells/ml로 분주하고 overnight 배양한 후 MEUS을 농도 별로 처리해주었다. RAW264.7은 처리 후 1시간 후에 LPS 0.5 µg/ml로 염증을 유도하였다. 24시간 후에 lysis buffer와 protease inhibitor를 처리해주고 원심분리기로 protein을 얻었다. 10% SDS-page에서 전기 영동을 하였다. 100% 메탄올로 활성화된 PVDF Transfer Membrane (Thermo Fisher, MA, USA)으로 Transfer 하였다. 5% skim milk (BD bio., USA)로 1시간 blocking 하였다. 3% skim milk에 1:1000으로 anti-iNOS, anti-COX-2, 그리고 anti-cleaved-caspase 3 항체를 처리하고 4°C에서 overnight 반응시켰다. anti-iNOS 항체(Cat#N7782)는 Sigma-Aldrich (MA, USA)에서 anti-COX-2 (Cat#4842), anti-cleaved-caspase 3 (Cat#9661), 그리고 GAPDH (Cat#2118) 항체는 Cell Signaling (MA, USA)에서 구입했다.

세포사멸 분석

HCT116 세포를 다양한 농도(0, 25, 50 및 100 µg/ml)의 MEUS로 처리한 후 24시간 동안 배양했다. 그 다음 세포를 수확하고 PBS로 세척한 후 Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit I (BD bio., NJ, USA) protocol에 따라 세포에 시약을 처리해준 후 상온과 암조건에서 반응시켰다. 세포 사멸은 유동 세포측정법(Becton Dickinson, NJ, USA)에 의해 측정하였다.

통계 처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 각 구간간의 통계적 유의성 검증은 SPSS 18.0(SPSS Inc., IL, USA)을 이용한 one-way ANOVA로 하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다

결 과

Raw264.7에서 MEUS에 의한 세포독성 및 산화질소(NO)의 생성 효과

RAW 264.7 세포에서 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 세포독성을 확인하기 위해 세포를 추출물의 다양한 농도(1.56 µg/ml ~ 25 µg/ml)로 처리한 후 0.5 µg/ml LPS와 함께 24시간 동안 배양한 다음 MTS 분석과 세포사멸에 따른 세포의 형태학적 변화를 각각 수행하고 관찰하였다. Fig. 1A에서 보듯이, RAW 264.7 세포의 세포 증식은 LPS와 추출물을 처리하지 않은 세포와 비교하여 MEUS의 농도 6.25 µg/ml까지 처리된 세포에서 큰 영향을 미치지 않았다. 또한, 동일한 농도의 추출물에 노출된 세포에서는 세포사멸 형태학적 변화가 관찰되지 않았다. 다음으로는 MEUS이 염증성 매개체인 산화질소(NO)에 대한 억제 효과를 확인하였다. 일반적으로 LPS는 TNF-α, NO 그리고 eicosanoid을 포함한 대식세포 또는 단핵구 및 전염증성 사이토카인에서 toll-like receptor 4(TLR4)을 자극한다[28, 31]. 이러한 염증 매개체들은 급성 또는 과도한 반응이 발생할 경우 숙주에게 치명적인 결과를 초래하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응 초기에 NO와 사이토카인을 생성해 생체 방어에 중요한 역할을 한다[14, 16]. 따라서 메탄올 추출물이 효율적으로 염증을 억제하는 효과를 나타낼 수 있는지 궁금하였다. Griess 시약 분석은 세포독성을 보이지 않는 농도의 메탄올 추출물(1.56 ~ 6.25 µg/ml)에 노출된 RAW 264.7 세포에서 주요 염증 매개체 중 하나인 NO의 생성을 결정하기 위해 수행되었다. 그 결과 Fig. 1B에 나타낸 바와 같이 메탄올 추출물이 LPS에 의해 촉진된 NO 생성을 용량 의존적으로 감소시켰다. 이러한 결과는 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물이 LPS에 의해 유발된 염증을 완화시키는 항염증 활성을 가지고 있음을 보여준다.

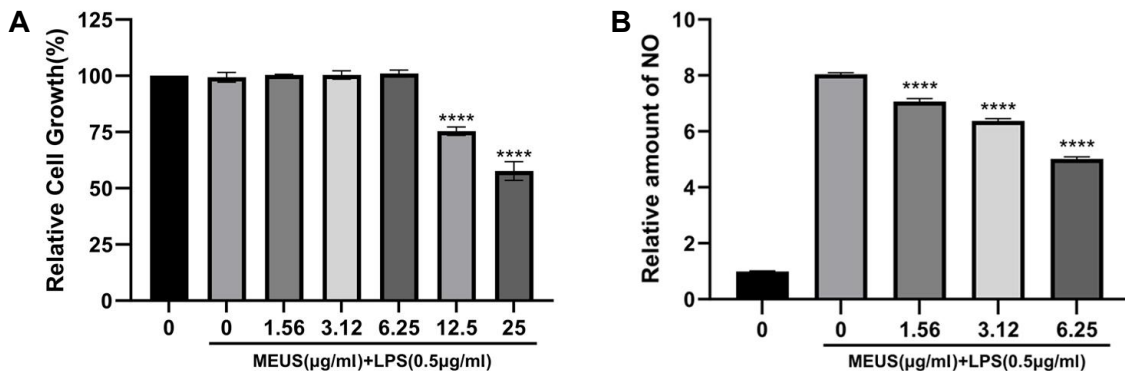


Fig. 1. Effects of MEUS on cell viability and NO production in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. After 24 hr of treatment, cell viability was evaluated using an MTS assay (A) and NO production was determined by Griess reaction (B). The results are shown as mean ± SD values of three experiments. *****p*<0.001. MEUS : methanol extract of *Usnea* sp. LPS : lipopolysaccharide ; NO : nitric oxide.

LPS로 유도된 iNOS/COX-2 발현에 대한 메탄올 추출물의 효과

NO는 NOS에 의하여 세포 내에서 L-arginine을 L-citrulline으로 전환되는 과정에서 함께 생성된다. 이러한 NO의 과잉생산은 염증성 사이토카인의 발현을 유도하고 염증 반응을 일으켜 조직 손상, 유전자 돌연변이 그리고 신경 세포의 손상을 유발한다[22, 27]. 또한 MEKK-1과 NF-κB의 활성화에 의한 산화촉진 또는 염증촉진 자극을 통해 생성되는 COX-2는 prostaglandin 합성을 증가시켜 염증 반응에 핵심적인 역할을 담당한다. 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물에 의해 NO 생성이 억제되는 기전에서 iNOS와 COX-2의 관련성 여부를 조사하기 위해 iNOS와 COX-2의 mRNA와 단백질 발현 수준을 각각 qRT-PCR 및 immunoblot 분석을 통해 측정하였다. 결과에 의하면, LPS에 의해 유도된 iNOS의 발현이 처리된 메탄올 추출물의 농도에 따라 전사(Fig. 2A, 2B) 및 번역 수준(Fig. 2C)에서 유의하게 감소했다. 이러한 결과는 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물이 iNOS와 COX-2의 발현을 억제시켜 NO의 생성을 감소시킨다는 것을 나타낸다.

MEUS에 의한 염증성 사이토카인 유전자의 발현 억제

TNF-α, IL-6 등을 포함한 LPS에 의해 유도되는 다양한 염증성 사이토카인의 발현에 대한 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 영향을 조사하기 위해 사이토카인의 발현을 조사하였다. 추출물의 다양한 농도(1.56-6.25 μg/ml)로 1시간 처리한 후 0.5 mg/ml LPS로 24시간 동안

자극된 RAW 264.7 세포에서 TNF-α와 IL-6 mRNA의 발현을 qRT-PCR로 측정하였다. 메탄올 추출물을 첨가하지 않은 LPS 처리군과 비교하여 TNF-α mRNA 수준이 메탄올 추출물의 농도가 높아질수록 점차 감소한 반면(Fig. 3A), IL-6는 3.12 μg/ml의 농도에서 가장 많이 감소하는 것을 확인했다(Fig. 3B). 따라서 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물에는 염증과 관련된 유전자의 mRNA 수준을 감소시킬 수 있는 생리활성 물질이 다량 함유되어 있을 것으로 판단된다.

MEUS로 처리된 HCT116 생존율에 대한 효과

만성 염증은 발암 신호 전달 경로의 조절을 통해 암을 유발하는 것으로 보고되었다[31, 32]. 여기서 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물이 항염증 활성으로 종양 형성을 억제할 수 있는지 평가했다. 정상세포인 MRC-5 인간 섬유아세포와 인간 대장암 세포인 HCT116에서 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물에 의한 세포성장의 억제 효과를 평가하기 위해 MTS 분석을 수행하였다. MRC-5와 HCT116 세포를 추출물의 다양한 농도(25 μg/ml, 50 μg/ml 그리고 100 μg/ml)로 처리해 준 다음 24시간 후에 세포의 생존율을 확인하였다. 추출물을 처리한 세포의 형태학적 관찰을 통해, 50 μg/ml의 추출물 농도에서부터 암 세포의 모양이 필라멘트 모양의 돌출부가 있는 길쭉한 모양과 원형으로 극적으로 변환(Fig. 4C) 반면에 정상세포에서는 나타나지 않았다(Fig. 4A). 이러한 형태학적 변화는 세포사멸의 전형적인 징후 중 하나이며 또한 암세포

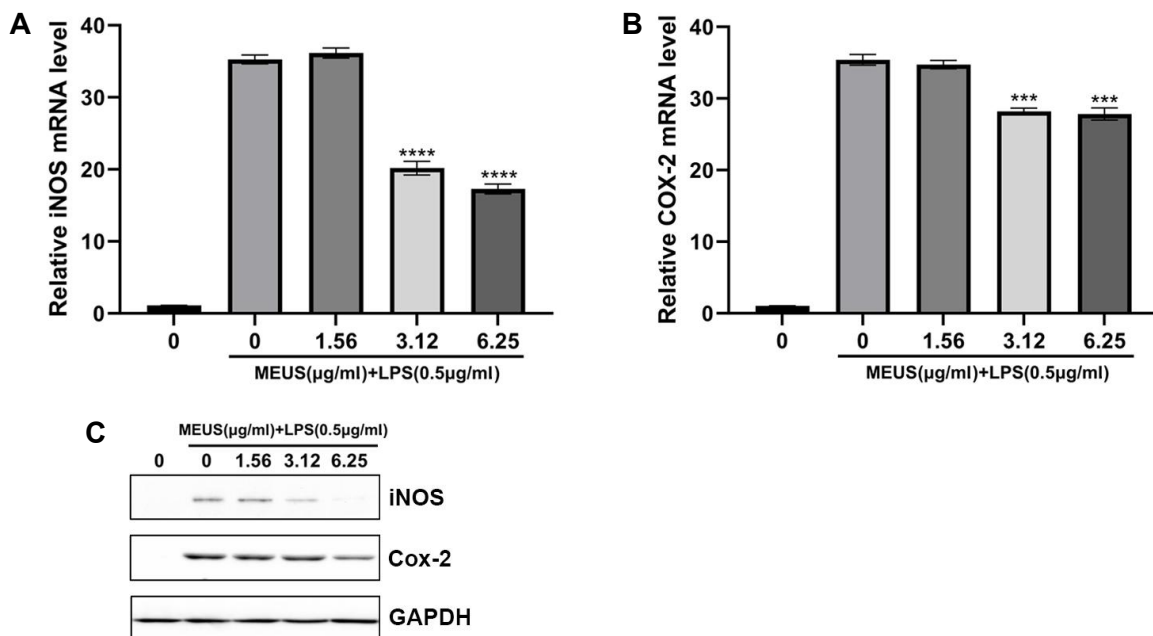


Fig. 2. Effects of MEUS on the expression levels of proinflammatory mediators. The transcriptional (A, B) and translational (C) levels of iNOS and COX-2 genes in response to MEUS treatment. The results are shown as mean ± SD values of three experiments; ****p*<0.005, and *****p*<0.001. iNOS: inducible nitric oxide synthase; COX: cyclooxygenase.

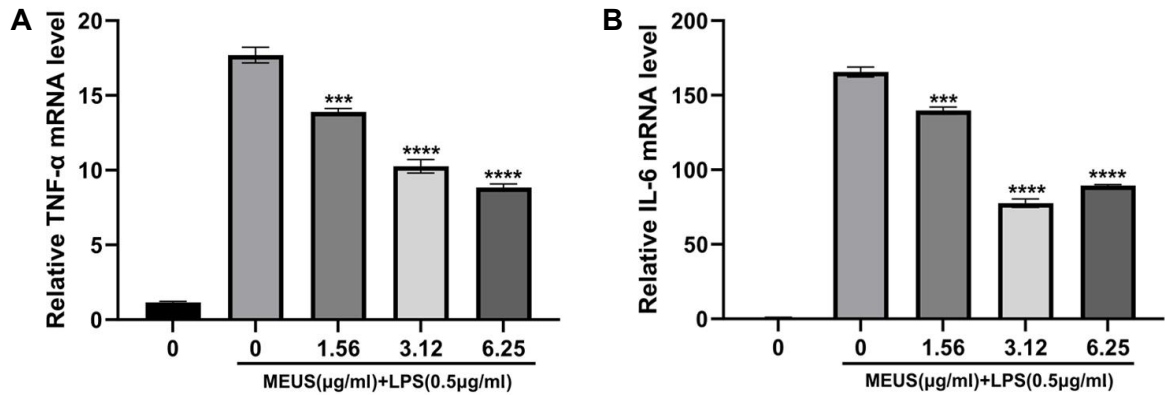


Fig. 3. MEUS suppressed the mRNA expression levels of proinflammatory cytokines, iNOS (A) and COX2 (B). The results are shown as mean ± SD values of three experiments; *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$. TNF : tumor necrosis factor ; IL : interleukin.

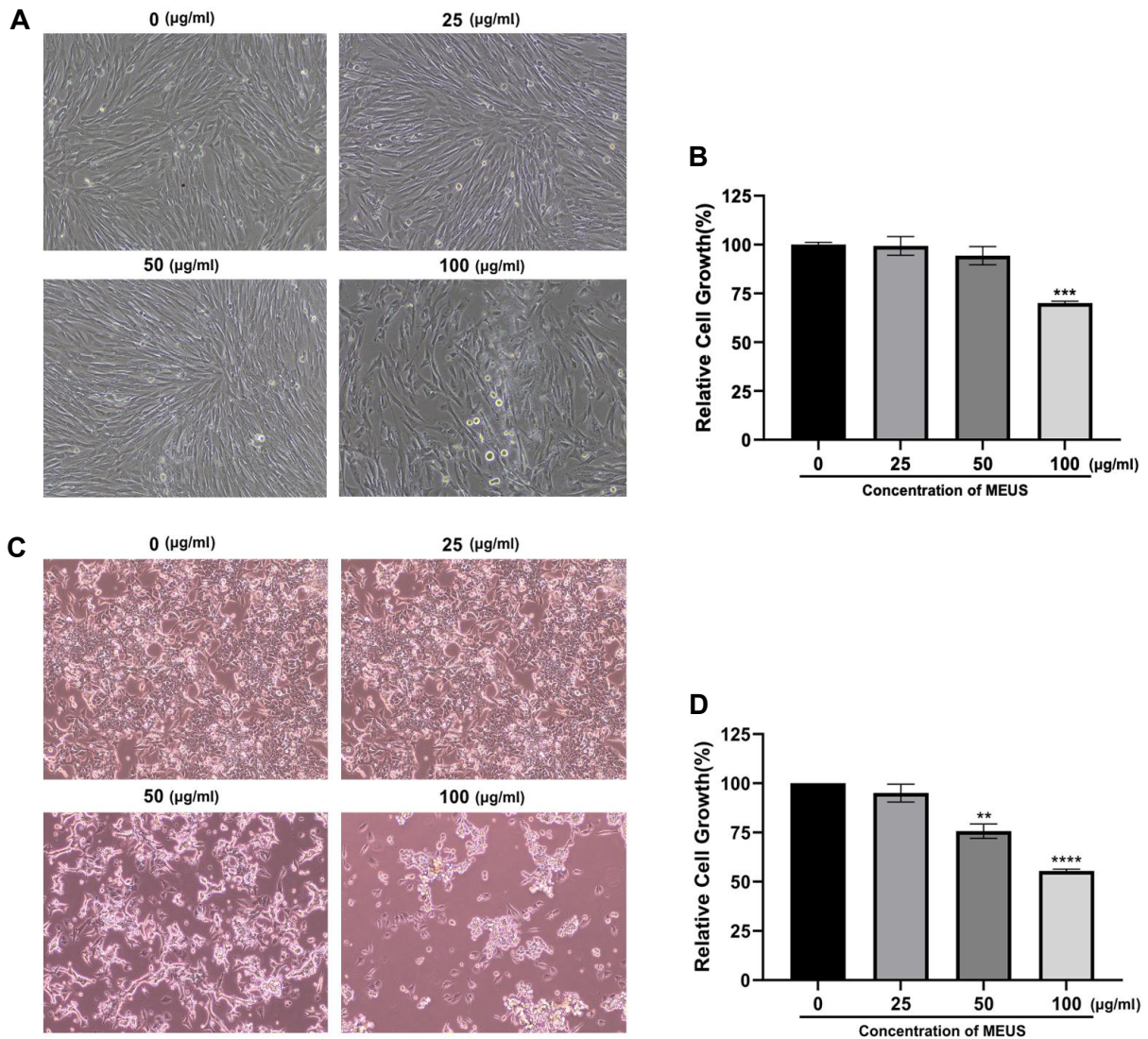


Fig. 4. Effects of MEUS on the growth of human lung fibroblast cells, MRC-5 and human colon cancer cells, HCT116. Morphology (A, C) and cell viability (B, D) in MRC-5 and HCT116 cells, respectively, in response to MEUS treatment. The results are shown as mean ± SD values of three experiments; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$.

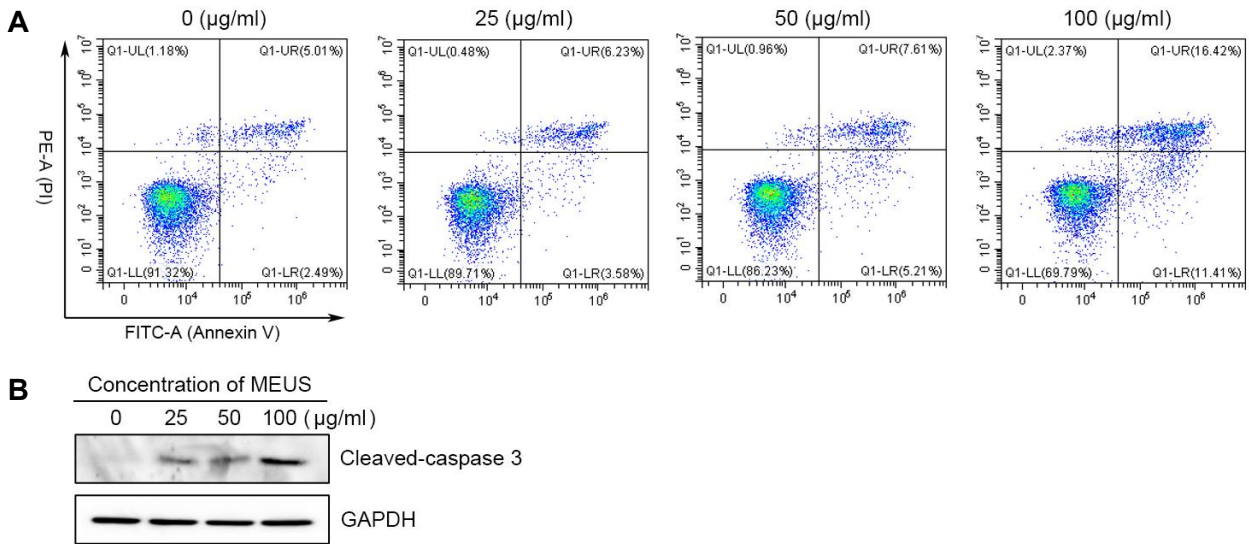


Fig. 5. Induction of apoptosis (A) and expression pattern of the apoptotic gene, cleaved-caspase-3 (B), in response to MEUS treatment.

수의 현저한 감소와 부유 세포 수의 증가가 관찰되었다 (Fig. 4C). 게다가, MTS 분석을 실행하여 처리된 추출물의 농도가 증가할수록 정상세포에 비해(Fig. 4B) 암세포의 생존율이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4D).

HCT116에서 MEUS의 세포사멸 유도

다음으로 유세포 분석을 통해 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 암세포에 대한 세포독성 효과가 세포사멸을 통해 일어나는지 확인하였다. Fig. 5에서 보듯이, 세포사멸에 해당하는 세포 집단은 추출물의 농도에 따라 증가했다. HCT116 세포에서 Annexin V에 대하여 양성인 세포의 비율은 추출물의 처리 농도(0 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml 그리고 100 µg/ml)에 따라 각각 7.50%, 9.81%, 12.82%, 27.83%로 증가했다(Fig. 5A). 다음으로, 추출물에 의해 유도된 세포사멸의 메커니즘을 이해하기 위해, 추출물이 처리된 세포에서 세포사멸의 주요한 조절 인자의 발현을 조사했다. 유세포 분석의 결과와 일치하는 추출물의 농도에 따라 caspase-3의 절단을 증가시키는 것을 발견했다 (Fig. 5B). 이러한 결과는 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물이 농도 의존적으로 HCT116 세포의 세포사멸을 유도한다는 것을 나타낸다.

고 찰

대장암(CRC)은 전 세계적으로 세 번째로 많이 진단되는 암으로 외과적 수술, 방사선 요법 및 항생제 처방 등을 통해 지난 50년 동안 대장암 치료가 향상되어 왔다[10, 13]. 그러나 대장암 치료의 발전에도 불구하고 항암제 내성 및 부작용에 의해서 사망률 감소에 큰 영향을 주지

못하고 있다[19]. 따라서, 정상세포가 아닌 암세포에서 세포사멸을 혹은 세포주기 억제를 목표로 하여 많은 연구가 이루어지고 있으며 약용식물과 같은 천연물에서 추출한 약제는 안정성과 효능에 대한 연구가 진행되고 있다[17, 20]. 지의류는 극한 환경조건에서도 생존할 수 있으며 식물계에서 항균 및 항암 약물의 유망한 공급원으로 취급되고 있다[11, 18].

대식세포는 interleukin (IL)-2, -4, -6, -10 및 -1β 및 사이토카인 인터페론과 같은 매개체의 방출에 의해 반응하는 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 염증 개시체에 민감하며 IFN-γ, Nitric oxide (NO), inducible NOS (iNOS)등 염증과 관련된 염증성 유전자 발현을 유도한다[27]. 대식세포의 과활성화는 여러 염증, 자가면역 및 만성 질환의 병원성 메커니즘과 관련이 있으며 염증이 가라앉지 못하면 돌이킬 수 없는 조직 손상을 동반한 만성 염증성 자가 면역 질환으로 이어질 수 있다[22]. 대식세포는 면역 세포 중에서 가장 많이 차지하며, 중앙에서 전체 질량의 40% 까지 차지한다[9]. 따라서, 만성 대장염 환자의 경우 대장암이 발생율이 현저하게 높아지며 염증 세포에서 유래되는 사이토카인이 암세포의 성장을 직간접적으로 자극시킨다 [4, 32]. NOS는 prostaglandin (PG)과 염증성 사이토카인과 같은 염증 매개체로 포유류에는 세 가지 유형이 있으며, 그 중 유형 III인 iNOS는 일부 세포에서 LPS, 사이토카인 및 박테리아 독소와 같은 자극에 대한 반응으로만 발현된다[9]. 염증 매개체와 건강한 상태에서 iNOS는 발현되지 않으며 iNOS의 발현은 질병의 발달에 해로운 역할을 하는 것으로 나타났다[1]. 또 다른 염증 매개 효소인 COX-2는 필수 지방산, 즉 arachidonic acid (AA)에서 prostaglandin (PG)로의 합성에 관여하는 COX-1 및 COX-3과 함께 cy-

cloxygenase 효소 계열의 이소형(isoforms)이다[27]. COX-2는 스트레스 조건(예를 들면 손상, 다양한 endotoxin, mitogen 및 사이토카인에 대한 노출에 대한 반응 등)에서 유도되며 염증 부위에서 상당히 과발현이 된다[5]. 따라서, 우리는 LPS에 의해 염증 반응 자극시킨 RAW264.7에서 NO의 생성량 감소에 대한 측정과 NO 합성 효소인 iNOS 및 염증 매개체 합성 관여 효소인 COX-2의 mRNAs와 단백질 발현양을 확인하였다. 실험결과에 의하면 RAW264.7에서 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 농도가 8증가할수록 산화질소(NO)의 생성량과 iNOS 및 COX-2의 발현양이 감소함을 확인하였다. 염증성 사이토카인 중 하나인 TNF- α 는 대식세포 및 T-세포를 포함하는 다양한 세포 유형에서 다발성 효과를 발휘하는 강력한 염증성 사이토카인이다[8]. TNF- α 는 interleukin (IL)-1 β 및 IL-6과 같은 염증성 반응 유도에 관여하는 것으로 나타났으며, 만성 염증성 질환의 발병에 중요한 역할을 한다[8, 16]. IL-6는 대식세포와 같은 면역 세포가 외인성 병원체의 감염 등을 인식하였을 경우 전신에 신호를 전달하는 중재자의 역할을 하는 사이토카인이다[26]. IL-6 합성 및 분비는 LPS에 의한 Toll-like receptor-4 (TLR-4)의 자극 또는, IL-1 또는 tumor necrosis factor- α (TNF- α)에 의한 세포 자극과 같은 염증상태에서 유도된다. 대식세포는 TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 IL-12와 같은 사이토카인의 방출을 자극하여 주변 수용자 면역 세포를 활성화시킨다[28]. 실험결과에 의하면 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물이 RAW264.7에서 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 유전자 발현 및 생성을 현저히 억제 시킨다는 사실을 확인하였다. 또한, LPS에 의해 염증반응이 유도된 RAW264.7에서 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 다양한 사이토카인(COX-2, TNF- α , IL-6)의 발현이 감소됨을 확인하였다.

세포자살(apoptosis)은 유전자 수준에서 미세하게 조절되어 DNA 손상에 따른 세포를 질서 있고 효율적으로 제거하는 예정된 세포사멸 유형 중 하나이다[17]. 세포자살은 caspase에 의해 매개하는 외인성(extrinsic) 또는 내인성(intrinsic) 경로를 통해 세포에서 유발될 수 있다. 두가지 경로 모두 최종적으로 세포사멸의 특징인 형태학적 그리고 생화학적 세포의 변화를 초래하는 caspase를 활성화시키게 된다[2, 28]. 본 연구에서 HCT116 세포에서 추출물의 농도가 증가함에 따라 활성화된 caspase3 (cleaved caspase)의 발현양이 증가하는 것을 확인하였다. 암세포에 대한 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 반응으로 세포 증식이 상당히 억제되고 세포자살이 유도되는 것으로 확인했다. 이러한 결과는 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물이 향후 대장암의 표적 치료를 위한 항암제로서 유망한 후보가 될 수 있음을 의미한다.

감사의 글

본 논문은 2018학년도 목포대학교 교내연구비 지원에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Alimoradi, H., Greish, K., Gamble, A. B. and Giles, G. I. 2019. Controlled delivery of nitric oxide for cancer therapy. *Pharm. Nanotechnol.* **7**, 279-303.
- Beroske, L., Van den Wyngaert, T., Stroobants, S., Van der Veken, P. and Elvas, F. 2021. Molecular imaging of apoptosis: the case of caspase-3 radiotracers. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3948.
- Chae, H. J., Kim, G. J., Deshar, B., Kim, H. J., Shin, M. J., Kwon, H., Youn, U. J., Nam, J. W., Kim, S. H. and Choi, H. 2021. Anticancer activity of 2-O-caffeoyl aliphatic acid extracted from the lichen, *Usnea barbata* 2017-KL-10. *Molecules* **26**, 3937.
- De Simone, V., Franze, E., Ronchetti, G., Colantoni, A., Fantini, M., Di Fusco, D., Sica, G., Sileri, P., MacDonald, T. and Pallone, F. 2015. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF- κ B to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene* **34**, 3493-3503.
- Erbecka, M., Forma, A., Baj, J., Furtak-Niczyporuk, M., Maciejewski, R. and Sitarz, R. 2021. A systematic review of the cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy or radiochemotherapy. *J. Clin. Med.* **10**, 4443.
- Gutierrez, R. M. P. and Hoyo-Vadillo, C. 2017. Anti-inflammatory potential of *Petiveria alliacea* on activated RAW264. 7 murine macrophages. *Pharmacogn. Mag.* **13**, S174.
- Han, Y. H., Mun, J. G., Jeon, H. D., Kee, J. Y. and Hong, S. H. 2019. Betulin inhibits lung metastasis by inducing cell cycle arrest, autophagy, and apoptosis of metastatic colorectal cancer cells. *Nutrients* **12**, 66.
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. I., Tsukamoto, H. and Shimoda, T. 2010. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* **49**, 1215-1228.
- Jiang, S., Wang, R., Han, L., Kuerban, K., Ye, L., Pan, S., Li, S. and Yuan, Y. 2021. Activation of autophagy reverses gemcitabine-induced immune inhibition of RAW264. 7 macrophages by promoting TNF- α , IL-6 and MHC-II expression. *Immunol. Res.* **69**, 352-362.
- Khamphio, M., Barusrux, S. and Weerapreeyakul, N. 2016. Sesamol induces mitochondrial apoptosis pathway in

- HCT116 human colon cancer cells via pro-oxidant effect. *Life Sci.* **158**, 46-56.
11. Kim, M. K., Park, H. and Oh, T. J. 2013. Antioxidant properties of various microorganisms isolated from arctic lichen *Stereocaulon* spp. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **41**, 350-357.
 12. Li, P., Hao, Z., Wu, J., Ma, C., Xu, Y., Li, J., Lan, R., Zhu, B., Ren, P. and Fan, D. 2021. Comparative proteomic analysis of polarized human THP-1 and mouse RAW264.7 macrophages. *Front. Immunol.* **12**, 700009.
 13. Lie, M. R., van der Giessen, J., Fuhler, G. M., de Lima, A., Peppelenbosch, M. P., van der Ent, C. and van der Woude, C. J. 2018. Low dose Naltrexone for induction of remission in inflammatory bowel disease patients. *J. Transl. Med.* **16**, 1-11.
 14. Mondalek, F. G., Ponnurangam, S., Govind, J., Houchen, C., Anant, S., Pantazis, P. and Ramanujam, R. P. 2010. Inhibition of angiogenesis-and inflammation-inducing factors in human colon cancer cells *in vitro* and *in ovo* by free and nanoparticle-encapsulated redox dye, DCPIP. *J. Nanobiotechnology* **8**, 1-9.
 15. Park, C. H., Min, S. Y., Yu, H. W., Kim, K., Kim, S., Lee, H. J., Kim, J. H. and Park, Y. J. 2020. Effects of apigenin on RBL-2H3, RAW264.7, and HaCaT cells: anti-allergic, anti-inflammatory, and skin-protective activities. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4620.
 16. Pasquereau, S., Kumar, A. and Herbein, G. 2017. Targeting TNF and TNF receptor pathway in HIV-1 infection: from immune activation to viral reservoirs. *Viruses* **9**, 64.
 17. Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. and D'Orazi, G. 2016. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* **8**, 603.
 18. Popovici, V., Matei, E., Cozaru, G. C., Bucur, L., Gîrd, C. E., Schröder, V., Ozon, E. A., Musuc, A. M., Mitu, M. A. and Atkinson, I. 2022. *In vitro* anticancer activity of mucoadhesive oral films loaded with *Usnea barbata* (L.) FH wigg dry acetone extract, with potential applications in oral squamous cell carcinoma complementary therapy. *Antioxidants* **11**, 1934.
 19. Sánchez-Guillén, L. and Arroyo, A. 2020. Immunonutrition in patients with colon cancer. *Future Medicine*, pp. 5-8.
 20. Santos, L. D. S., Silva, V. R., Menezes, L. R. A., Soares, M. B. P., Costa, E. V. and Bezerra, D. P. 2017. Xylopine induces oxidative stress and causes G2/M phase arrest, triggering caspase-mediated apoptosis by p53-independent pathway in HCT116 cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 7126872.
 21. Sepahvand, A., Studzińska-Sroka, E., Ramak, P. and Karimian, V. 2021. *Usnea* sp.: Antimicrobial potential, bioactive compounds, ethnopharmacological uses and other pharmacological properties; a review article. *J. Ethnopharmacol.* **268**, 113656.
 22. Silveira, T. L., Pang, L. Y., Di Domenico, A., Veloso, E. S., Silva, I. L., Puerto, H. L. D., Ferreria, E. and Argyle, D. J. 2021. COX-2 silencing in canine malignant melanoma inhibits malignant behaviour. *Front. Vet. Sci.* **8**, 633170.
 23. Sim, H. S., Jang, B. C., Park, H. M., Jeng, B. Y. and Oh, M. J. 2008. Isolation of cucurbitacin E from sprouted pumpkin seed and analysis of its anti-cancer and anti-inflammatory activities. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 834-840.
 24. Suh, S. S., Hong, J. M., Kim, E. J., Jung, S. W., Chae, H., Kim, J. E., Kim, J. H., Kim, I. C. and Kim, S. 2019. Antarctic freshwater microalga, *Chloromonas reticulata*, suppresses inflammation and carcinogenesis. *Int. J. Med. Sci.* **16**, 189.
 25. Sung, B., Kang, Y. J., Kim, D. H., Hwang, S. Y., Lee, Y., Kim, M., Yoon, J. H., Kim, C. M., Chung, H. Y. and Kim, N. D. 2014. Corosolic acid induces apoptotic cell death in HCT116 human colon cancer cells through a caspase-dependent pathway. *Int. J. Mol. Med.* **33**, 943-949.
 26. Tanaka, T., Narazaki, M. and Kishimoto, T. 2018. Interleukin (IL-6) immunotherapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a028456.
 27. Tyagi, A., Kamal, M. A. and Poddar, N. K. 2020. Integrated pathways of COX-2 and mTOR: Roles in cell sensing and Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* **14**, 693.
 28. Wang, P., Wang, H., Huang, Q., Peng, C., Yao, L., Chen, H., Qiu, Z., Wu, Y., Wang, L. and Chen, W. 2019. Exosomes from M1-polarized macrophages enhance paclitaxel antitumor activity by activating macrophages-mediated inflammation. *Theranostics* **9**, 1714.
 29. Xu, X., Lai, Y. and Hua, Z. C. 2019. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci. Rep.* **39**.
 30. Yang, H. J., Li, Y. N., Yan, C., Yang, J., Zeng, Y. R., Yi, P., Li, Y. M., Hao, X. J. and Yuan, C. M. 2021. Discovery and synthesis of rocaglaol derivatives inducing apoptosis in HCT116 cells via suppression of MAPK signaling pathway. *Fitoterapia* **151**, 104876.
 31. Yang, Y., Yang, L., Jiang, S., Yang, T., Lan, J., Lei, Y., Tan, H. and Pan, K. 2020. HMGB1 mediates lipopolysaccharide-induced inflammation via interacting with GPX4 in colon cancer cells. *Cancer Cell Int.* **20**, 1-11.
 32. Zappavigna, S., Cossu, A. M., Grimaldi, A., Bocchetti, M., Ferraro, G. A., Nicoletti, G. F., Filosa, R. and Caraglia, M. 2020. Anti-inflammatory drugs as anticancer agents. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2605.
 33. Zhang, Y., Pu, W., Bousquenaud, M., Cattin, S., Zaric, J., Sun, L. K. and Rüegg, C. 2021. Emodin inhibits inflammation, carcinogenesis, and cancer progression in the AOM/DSS model of colitis-associated intestinal tumorigenesis. *Front. Oncol.* **10**, 564674.

초록 : 남극 지의류 *Usnea Aurantiaco-atra*의 메탄올 추출물의 항염증 및 항암 활성

서승석*

(목포대학교 생명과학과)

선천면역체계에 의한 염증은 감염에 의해 매개되는 환경적 위험 요인에 대한 보호 메커니즘이며 암 발병을 포함한 다양한 인간 질병의 발병 원인이기도 하다. 지의류는 다양한 질병을 치료할 수 있는 가능성을 지닌 다양한 생체 활성분자를 가지고 있다는 측면에서 점점 더 주목받고 있다. 이끼류의 2차 대사산물이 지닌 항산화, 항염증 그리고 항암 활성에 대해서 널리 보고되었지만 아직까지 구체적인 메커니즘은 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 남극 지의류 *Usnea aurantiaco-atra*의 메탄올 추출물에 대한 항염증 및 항암 활성의 분자적 메커니즘을 조사하고자 하였다. 본 연구결과에 의하면 메탄올 추출물은 COX-2, IL-6, iNOS, TNF- α 및 NO 생성과 같은 주요 염증 지표들에 대해 농도 의존적으로 조절함으로써 항염증 활성을 나타냈다. 또한, 추출물이 농도 의존적으로 HCT116 결장암 세포에 대해 세포독성 활성을 가지며, caspase-3 활성화에 의한 세포사멸 유도를 통해 암세포의 증식을 현저히 감소시키는 것을 관찰했다. 이 연구에서 남극 이끼류인 *Usnea aurantiaco-atra*의 메탄올 추출물이 항염증과 항암 활성을 갖는다는 사실을 처음으로 보였으며 이러한 결과는 염증과 암 사이의 연관성을 뒷받침하는 분자 메커니즘에 대한 새로운 통찰력을 보여준다.