



Anti-inflammatory effect of *Althaea rosea* L. Callus extract by applying biorenovation

Yeon-Su Koo · Tae-Jin Park · Jung-Hwan Kim · Seung-Young Kim

생물전환 기법을 적용한 접시꽃 callus 추출물의 항염증 활성

구연수 · 박태진 · 김정환 · 김승영

Received: 2 January 2023 / Accepted: 19 January 2023 / Published Online: 14 February 2023

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract Biorenovation is a biotransformation method that converts the structure of chemical compounds and natural product through biocatalytic metabolism of microorganism and could enhance biological effectiveness and mitigate cytotoxicity compared to its substrates. *Althaea rosea* L. has been used as oriental medicine and is known for physiological efficacies such as anti-urolithiatic, anti-inflammatory, and anti-cancer activities. *A. rosea* L. callus, the plant tissue grown to protect its wound, has been reported to have antioxidant and whitening effects. However, mechanisms of its other activity such as inflammation have not yet been investigated. In this study, we extracted *A. rosea* L. callus (AR) and produced biorenovated AR (ARBR), and then analyzed anti-inflammatory effect in Lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage at 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ARBR. As a result of inhibition test of nitric oxide production, it was found that ARBR was superior to AR without apparent toxicity. Furthermore, ARBR significantly inhibited production of prostaglandin E_2 , inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and pro-inflammatory cytokines including Tumor necrosis factor- α , Interleukin-6, Interleukin-1 β in a concentration-dependent manner. In conclusion,

we suggest that ARBR could regulate the excessive inflammatory response to an appropriate level and be a promising material for functional cosmetics and pharmaceuticals.

Keywords *Althaea rosea* L. · Anti-inflammatory · Biorenovation · Callus · Cyclooxygenase-2 · Inducible nitric oxide

서론

염증(inflammation)은 대식세포와 단핵구 같은 면역세포(immunocyte)가 관여하는 선천적 면역 반응으로[1], 병원체의 침입이나 독소 등 외부 자극과 감염에 의한 손상 조직을 제거 및 재생하고, 침입 인자를 방어하기 위해 발생한다[2,3]. 그람음성세균의 외막에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포를 포함한 숙주세포의 LPS 결합 단백질인 CD14와 결합한 후 toll-like receptor 4를 활성화시켜 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) 등의 전염증성 cytokine, 그리고 inducible nitric oxide (iNOS), COX-2 등과 같은 염증 매개인자의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다[4-6]. 염증 유발인자인 nitric oxide (NO)는 nitric oxide synthase에 의해, prostaglandin (PG)는 cyclooxygenase (COX)에 의해서 합성되는데 전자의 3가지 isoform 중 neuronal NOS와 endothelial NOS는 신경 및 내피세포에서 항상 발현되는 반면, iNOS는 자극을 받은 대식세포에서 발현되어 염증 형성에 관여한다[7-9]. 후자는 COX-1과 COX-2로 나뉘며 여러 조직에서 정상 발현되는 COX-1과 달리, COX-2는 자극에 의해 PG의 합성을 촉진하여 염증반응을 유발한다[10]. 염증을 심화하는 PG에는 대표적으로 prostaglandin E_2 (PGE_2)가 있으며 부종과 진통의 원인이 되는 것으로 알려져 있다[11,12]. 이러한 과정으로 유도되는 염

Yeon-Su Koo and Tae-Jin Park are equally contributed as the first author.

Seung-Young Kim (✉)
E-mail: sykim01@sunmoon.ac.kr

Department of Pharmaceutical Engineering & Biotechnology, Sunmoon University, Asan 31460, Republic of Korea

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.

증은 체내에서 반드시 수행되어야 하지만 외부 자극으로 인해 반응 유도 인자가 과하게 생성되면 오히려 암, 관절염, 동맥경화, 뇌 질환 등의 만성질환과 신경 손상을 야기할 수 있다 [13,14]. 따라서 염증 질환을 예방하고 효과적으로 치유하기 위해서 소염제의 원료 연구가 활발하게 진행되는 가운데, 낮은 부작용 발생률과 높은 안정성을 가진 천연물이 여러 분야에서 많은 주목을 받고 있다 [15,16].

접시꽃(*Althaea rosea* L.)은 한국과 중국, 시베리아를 원산으로 하는 아욱과(Malvaceae)의 두해살이풀로, kaempferol과 kaempferol의 유도체, quercetin, quercetin의 유도체 등 항암, 항균, 항산화 등과 같은 다양한 생리활성을 가진 성분을 포함한다고 보고되었다 [17-19]. 또한, 접시꽃은 외관이 화려하고 기후변화에 취약하지 않으며 청열, 이뇨 등에 효능이 있어 원예식물과 한방약재로 사용되고 있다 [20-23]. 본 논문에서 사용한 접시꽃 callus는 손상된 접시꽃 표면에서 발달한 식물 조직으로, 분화되지 않은 식물의 세포 덩어리 등을 집합적으로 일컫는다 [24]. 또한, 병원체 감염이나 상처 등의 식물 조직손상부를 보호하기 위해서 callus가 축적된 형태로 성장한 것이며 [25], 전형성능을 지니고 있어서 배양 환경과 배지 조성에 따라 성장 속도 조절, 대량 배양 및 전체 식물체의 재생이 가능하다 [26]. 또한 접시꽃 callus는 산화를 억제하는 작용이 뛰어나며 미백 효능을 가지고 있어 천연화장품 소재로서 활용 가치가 있다고 보고된 바가 있다 [27].

최근 의약품뿐만 아니라 화장품, 건강식품에서의 천연물 소재 연구는 유용성이 낮거나 안정성이 떨어지는 원료에 효능을 향상시킬 수 있는 기술을 적용하여 소재로서 가치를 증진시키는 것에 큰 관심을 두고 있다 [29,30]. 이러한 기술은 생물전환 및 유효 성분의 증가 등이 주된 목적이다. 본 연구에서 생물전환에 적용한 biorenovation은 미생물의 대사를 활용한 기법으로 가치가 낮은 천연물 내 존재하는 유기 화합물을 변환하여 주름 개선, 또는 melanin 합성 억제 등 효능 향상으로 활용 가치를 증진시킬 수 있다는 것을 Kim [31]과 Lee 등 [32]의 연구를 통해 입증하였다 [33]. 따라서 접시꽃 callus 추출물에 생물전환 기법 중의 하나인 biorenovation을 적용하여 RAW 264.7 cell에 대한 독성과 염증 유도물질의 억제 효과를 평가함으로써, 항염증에 미치는 영향을 확인하고 바이오 산업 소재로의 유용성을 넓히고자 하였다.

재료 및 방법

접시꽃 callus 추출물 제조

본 연구에 사용된 접시꽃(*Althaea rosea* L.) callus는 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 제공받았다. 0.43% (w/v) Murashige & Skoog, 0.01% (w/v) myo-inositol, 3% (w/v) sucrose, 0.4% (w/v) gelrite (Duchefa Biochemie, Haarlem, NH, NLD), 0.4 mg/L thiamine HCl, 1 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 첨가한 배지를 사용하여 25 °C, 암 조건에서 한 달 간격으로 배양을 하였다. 이를 건조 분쇄한 1 g에 대한 10배의 정제수를 첨가하여 70 °C에서 2차례의 열수추출을 진행하였으며, 추출액은 paper filter로 여과하고 감염 농축한 뒤 동결건조기(HC3110, Hanil Scientific Inc., Gimpo, Korea)를 사용하여 건조한 후 실험에 사용하였다.

미생물 배양 및 접시꽃 callus의 biorenovation 반응

본 연구의 생물전환 기법에 사용된 *Bacillus siamensis* JD3-7균주(KACC 92346P)는 제주도 재래 간장에서 분리하였으며, Luria-bertani broth (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에서 30 °C, 200 rpm 조건으로 16시간 동안 배양한 후 4416 g, 15 min, 4 °C의 조건으로 원심분리하여 배양액을 제외한 미생물 침전물을 수득하였다. 또한, 잔여 배양액을 제거하기 위하여 PG buffer (50 mM Phosphate buffer, 2% Glycerin)로 2회 세척하였고, 미생물을 PG buffer에 현탁하여 대조군으로 설정하였다. 생물전환은 미생물 현탁액에 접시꽃 callus 건조 시료 100 mg을 가하여 30 °C, 200 rpm 조건으로 72시간 동안 반응하였고, 이를 원심분리하여 얻어진 상등액을 동결건조기를 이용하여 건조한 후 실험에 사용하였다.

Biorenovation 전환물의 HPLC 분석

접시꽃 callus 추출물(AR)과 생물전환 기법으로 전환된 접시꽃 callus 추출물(ARBR), 대조군인 미생물 현탁액(BS)의 HPLC 분석을 위해 Shim-pack GIS C18 Column, 5 µm ODS, 250×4.6 mm I.D. (227-30106-08, Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Baltimore, DC, USA)와 Shimadzu SpectroMonitor 3200 digital UV/Vis detector (228-42593-43, Shimadzu Scientific Instruments, Inc.)을 사용하였다. 이동상 용매는 0.1% trifluoroacetic acid (TFA, Samchun, Pyeongtaek, Korea)를 첨가한 정제수 (Solvent A)와 acetonitrile (Solvent B, Sigma-Aldrich)을 사용하였다. 40 °C의 column 온도에서 정제수에 희석한 시료를 각 10 µL를 주입하고 유속은 1.0 mL/min으로 설정하여, Solvent A: 90%, Solvent B: 10%에서 Solvent A: 0%, Solvent B: 100%가 되는 gradient 조건으로 254 nm의 파장에서 30분 동안 분석을 진행하였다.

실험 재료 및 세포배양

본 실험에서 사용된 RAW 264.7 세포는 마우스 유래 대식세포로, 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받았다. 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA)과 100 units/mL penicillin-streptomycin (P/S, Gibco)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco)을 배양액으로 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 2~3일 주기로 계대 배양하였다.

세포 독성 측정

시료 처리에 의한 RAW 264.7 세포의 생존율은 MTT assay를 통해 확인하였다. 24 well plate에 RAW 264.7 세포를 8.0×10⁴ cells/well로 분주한 후, 37 °C, 5% CO₂조건으로 24시간 전 배양하였다. AR, ARBR, BS를 50, 100, 200 µg/mL 농도로 LPS (1 µg/mL)와 동시 처리하여 24시간 배양하고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) 용액을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 3시간 동안 반응시켰다. 이후 형성된 MTT formazan 결정에 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich)를 첨가하여 용해시키고 96 well plate로 옮겨 ELISA reader (Multiskan GO spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 생성 억제 활성 측정

LPS에 의해 발현된 NO 억제율은 세포의 배양액에 존재하는 NO₂⁻ (nitrite)의 형태로 측정하였다 [34]. 24 well plate에 RAW 264.7 cell을 8.0×10⁴ cells/well로 분주하여 37 °C, 5% CO₂ incubator (BB15 CO₂ incubator, Thermo Fisher Scientific)에서 24시간 전 배양하고 AR, ARBR, BS (50, 100, 200 µg/mL)와 LPS (1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 배양 상등액과 Griess' reagent (Sigma-Aldrich)를 100 µL씩 동량 혼합하여 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 NO 생성 억제 활성을 측정하였다.

PGE₂ 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell을 8.0×10⁴ cells/well로 24 well plate에 분주하고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 전 배양 후 ARBR (50, 100, 200 µg/mL)와 LPS (1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 상등액을 회수한 후 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)와 ELISA reader를 이용하여 세포배양액 내의 PGE₂ 함량을 측정하였다.

Western blot analysis

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 4×10⁵ cells/well로 분주하고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 전 배양한 다음, DMEM으로 희석한 ARBR (50, 100, 200 µg/mL)와 LPS (1 µg/mL)를 동시 처리하여 동일한 조건의 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 세포를 PBS로 2회 washing한 후, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM Na₃VO₄, 1% protease inhibitor를 포함한 RIPA buffer (Biosesang, Seongnam, Korea)를 이용하여 lysis하였고, 원심분리(4 °C, 15,928 g, 30 min)하여 단백질을 회수하였다. BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 단백질의 양(20 µg)을 동일하게 정량하였고 2× Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 1:1로 희석하여 10% SDS-PAGE gel에 전기영동 후, poly-vinylidene difluoride membrane (Bio-Rad)에 전이하였다. Membrane blocking은 5% skim milk를 함유한 0.05% T/TBS (0.05% Tween 20/Tris-buffered saline)에 넣어 상온에서 2시간 동안 진행하였고 이후 0.05% T/TBS로 10분간 4회 washing하였다. 1차 항체는 iNOS antibody (1:1,000, Millipore, Billerica, MA, USA), COX-2 antibody (1:1,000, Rockland Immunochemicals, Inc., Pottstown, PA, USA), β-actin antibody (1:10,000, Bio-Rad)를 처리하여 4 °C에서 18시간 동안 반응한 다음, 0.05% T/TBS를 사용하여 10분 간격으로 4회 세척하였다. 이후 1:10,000으로 희석한 anti-rabbit IgG와 anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) 2차 항체를 membrane에 처리하여 2시간 동안 상온에서 반응하였고, 0.05% T/TBS로 4회 washing 하였다. Membrane에 전이되었던 단백질을 현상하기 위해 ECL kit (Bio-Rad)와 Imaging densitometer (model GS-700, Bio-Rad)를 사용하였으며, 현상 후 발현된 단백질 β-actin, iNOS, COX-2의 면적을 imageJ program (NIH, Bethesda, Rockville, MD, USA)을 통해 수치화하여 그래프로 나타내었다.

전염증성 사이토카인(TNF-α, IL-6, IL-1β) 생성 억제 활성 측정

24 well plate에 RAW 264.7 세포를 8.0×10⁴ cells/well로 분주하여 37°C, 5% CO₂조건으로 24시간 전 배양하고 ARBR (50, 100, 200 µg/mL)와 LPS (1 µg/mL)를 동시에 처리하여 동일한 조건의 incubator에서 24시간 배양하였다. 이후 배양 상등액을 회수하였으며, Mouse TNF-α ELISA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Mouse IL-6 ELISA Kit (BD Biosciences), Mouse IL-1β ELISA Kit (R&D Systems Inc.)를 사용하여 상등액 내에 존재하는 pro-inflammatory cytokine 생성량을 측정하였다.

통계처리

모든 실험값은 3회 반복하여 측정하였으며, 결과를 평균값 ± 표준편차로 나타내었다. 통계처리는 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 student's t-test로 다중비교하였고, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 수준에서 각 처리군 간의 통계적 유의성을 검증하였다.

결 과

Biorenovation 전환물의 HPLC 분석

생물전환 기법에 사용한 균주의 현탁액 BS를 대조군으로 하여 접시꽃 callus 추출물 (AR) 및 생물전환된 접시꽃 callus 추출물 (ARBR)을 HPLC 분석으로 비교하였다. 비교 결과, ARBR에서 AR에서는 존재하지 않던 새로운 peak가 19.5 min과 23.5 min에서 검출되었으며, 기존 peak의 양상이 변화된 것을 확인하였다(Fig. 1). 이는 생물전환 기법 중의 하나인 biorenovation을 통해 AR 내 존재하는 화합물의 구조가 전환되었음을 시사한다. 이러한 변화는 Sim 등의 연구[35] 결과를 바탕으로 기존 추출물 대비 활성이 향상되는 등의 생리활성 변화로 이어질 수 있으므로 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서 실험을 진행하여 생리학적 효능을 평가하였다.

AR과 ARBR, BS의 세포 독성 비교 측정

AR과 ARBR, BS의 세포 생존율을 측정하기 위해서 MTT assay를 사용했다. MTT assay는 세포 내 미토콘드리아의 탈수소효소 작용을 통한 MTT tetrazolium의 MTT formazan 환원율을 비교하는 방법이다[36]. RAW 264.7 cell에 AR, ARBR 및 BS를 각각 50, 100, 200 µg/mL로 처리한 결과, LPS 처리군의 세포 생존율은 시료 무첨가군에 대비하여 89.1±3.7%임을 확인하였으며[37], 각각의 시료 처리군 또한 전 농도에서 무첨가군 대비 87.7±1.7% 이상의 생존율을 보였다(Fig. 2). 본 실험 결과를 바탕으로 세포에 대한 독성을 나타내지 않는 동일한 농도로 추가적인 실험을 진행하였다

AR과 ARBR, BS의 NO 생성 억제 활성 비교

NO는 체내에서 면역조절, 신경전달물질, 평활근 조절 등의 기능을 하지만, 과도하게 생성된 경우에는 세포와 조직의 손상을 유도하여 염증 질환을 유발한다[38]. 이러한 NO 생성 저해 효능을 측정된 결과, AR은 NO의 과생성이 일어난 LPS 처리군

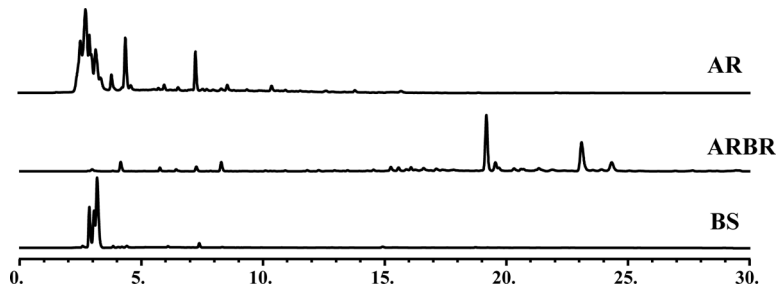


Fig. 1 HPLC chromatogram of *Althaea rosea* L. callus extract (AR), biorenovated *A. rosea* L. callus extract (ARBR) and *Bacillus siamensis* JD3-7 (BS). The chromatogram showed AR, ARBR and BS analyzed at a wavelength of 254 nm

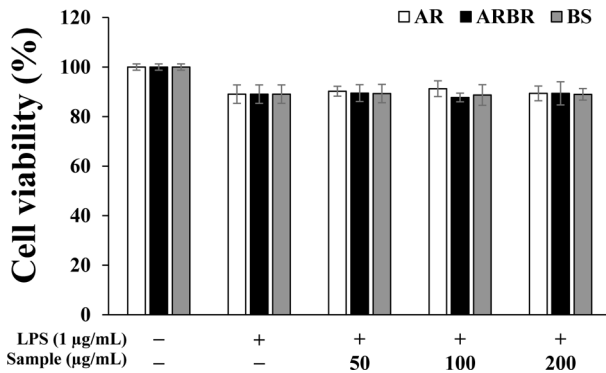


Fig. 2 Cell viability of AR, ARBR and BS in LPS-stimulated RAW 264.7 cell by the MTT assay. The cytotoxicity was determined from the cells induced with LPS (1 µg/mL) in the presence of AR, ARBR and BS (50, 100, 200 µg/mL) for 24 h

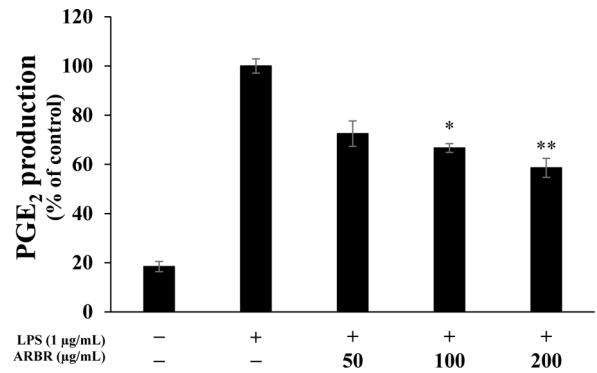


Fig. 4 Inhibitory effect of ARBR on prostaglandin E₂ production in RAW 264.7 cells. The cells were treated with 1 µg/mL LPS in presence or absence of ARBR at the indicated concentrations for 24 h. PGE₂ production was measured by ELISA method from the culture medium of cells. Results are expressed as a percentage of the LPS-only group. Data represent the means ± SD with three separate experiments. **p* < 0.05; ***p* < 0.01

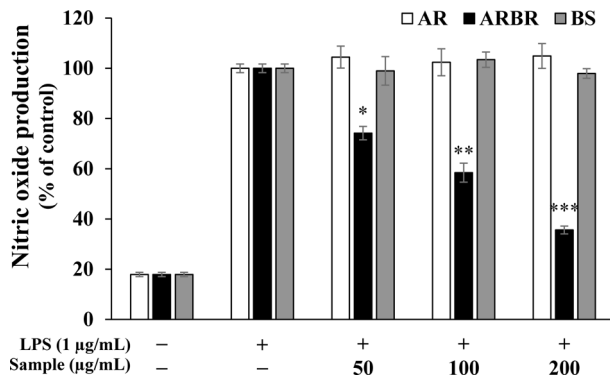


Fig. 3 Inhibitory effects of AR, ARBR and BS on nitric oxide production in RAW 264.7 cell. The production of nitric oxide was determined from the cells stimulated with 1 µg/mL of LPS in the presence of AR, ARBR and BS (50, 100, 200 µg/mL) for 24 h. Values represent the mean ± SD with three independent experiments. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.005 versus LPS-only group

과 비등한 경향을 나타내었으며, ARBR은 LPS 처리군 대비 각 농도에서 약 25.8, 41.6, 64.4%의 NO 억제율을 확인하였다. 또한 BS는 NO 생성을 약 99.0, 103.4, 97.9% 수준으로 측정되어 NO 형성 저해 활성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 ARBR의 효능은 biorenovation 기법에 사용되었던 BS와는 무관하며, biorenovation 기법에 의해 AR 내 존재하는 화합물

이 전환되어 NO 생성 억제 활성이 향상되었음을 시사한다.

ARBR의 PGE₂ 생성 억제 활성

류마티스 관절염 등의 염증성 질환에서 과생성된 PGE₂는 염증 매개 물질로 작용하여 연골 및 조직의 손상과 종양을 유발하는 것으로 보고되었다[39]. LPS에 의해 발현이 유도된 PGE₂에 대한 ARBR의 생성 억제 효능을 측정된 결과, ARBR 처리군은 PGE₂를 농도 의존적으로 감소시키는 경향을 보였으며, 최고 농도인 200 µg/mL에서는 LPS 단독 처리군 대비 PGE₂ 생성을 50.6±4.5% 억제하였다. 따라서 ARBR은 과하게 생성된 NO뿐만 아니라 PGE₂의 생성도 효과적으로 저해하는 활성을 가졌으며, 이를 활용하여 염증반응을 정상수준으로 개선할 수 있는 항염증 소재로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

Western blot을 통한 ARBR의 iNOS 및 COX-2 발현 저해 활성 측정

Interferon, LPS 등의 염증 자극으로 활성화된 iNOS와 COX-2는 염증 매개 물질의 생성을 유발한다. iNOS는 L-arginine을 전환하여 많은 양의 NO를 장기간 생성하고, COX-2는 arachidonic acid로부터 PGE₂를 형성하는 효소로 작용한다. 두 전환 효소의 지속적인 과발현은 염증을 심화하는 것으로 알려져 있다[40,41].

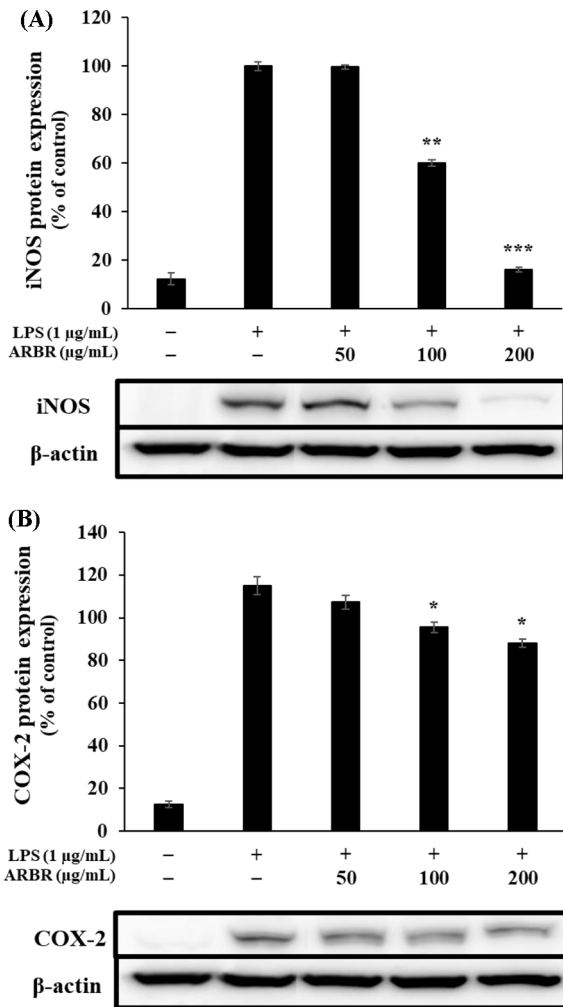


Fig. 5 Inhibitory effects of ARBR on the (A) iNOS protein and (B) COX-2 protein expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-incubated for 24 h, then treated with 1 µg/mL of LPS and indicated concentrations of ARBR for 24 h. The protein level was analyzed by western blotting. Level of β-actin expression was used as the control. Values represent the means ± SD with independent triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$

따라서 western blot을 수행하여 ARBR이 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하고자 하였다(Fig. 5). iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 위하여 대식세포에 LPS를 처리하여 대조군으로 사용하였으며, ARBR 처리군은 각 농도(50, 100, 200 µg/mL)의 ARBR과 LPS를 동시 처리하여 iNOS와 COX-2의 단백질 생성 억제 효능을 측정 한 결과, ARBR은 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 농도 의존적으로 감소시키는 경향을 보였다(Fig. 5). iNOS의 경우 최고 농도인 200 µg/mL에서 약 83.7%만큼 무처리군(약 87.6%)과 유사한 수준까지 발현을 억제 하였다. 또한 COX-2의 단백질 발현을 농도 의존적으로 유의미하게 감소하였으며, ARBR의 PGE₂ 생성 억제 활성화와 일치하는 것을 확인하였다. 이로써 ARBR은 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 억제하여 NO 및 PGE₂ 형성을 조절함으로써 과도하게 생성된 염증을 완화할 수 있을 것으로 사료된다.

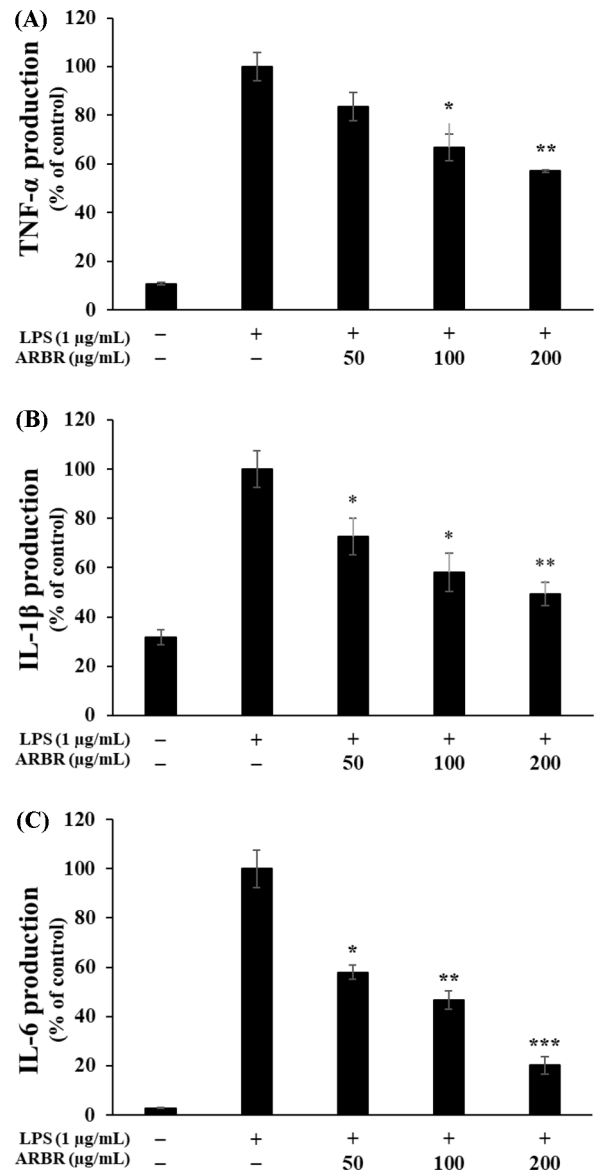


Fig. 6 Inhibitory effect of ARBR on pro-inflammatory cytokines production in RAW cells. The cells were treated with LPS (1 µg/mL) or with LPS and ARBR (50, 100, 200 µg/mL). The production of (A) TNF-α, (B) IL-1β, (C) IL-6 was assayed by ELISA method in the culture medium of cells. The result represent the means ± SD with three separate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$ versus only-LPS-treated group

ARBR의 pro-inflammatory cytokines 생성 억제 활성 측정

LPS 자극(1 µg/mL)으로 RAW 264.7 cell에서 과도하게 생성되는 pro-inflammatory cytokine 중 TNF-α, IL-6, IL-1β의 발현에 대한 ARBR의 억제 활성을 확인하기 위해서 ELISA kit를 사용하여 조사하였다. 그 결과 LPS로 인해 유도된 전염증성 cytokine의 생성을 ARBR 처리군은 농도(50, 100, 200 µg/mL) 의존적으로 억제시키는 경향을 보였다(Fig. 6). TNF-α의 경우 각 농도에서 약 16.5, 33.2, 42.9% 억제하였으며(Fig. 6A), IL-1β는 약 27.3, 41.9, 50.6% 억제되었다(Fig. 6B). 특히 IL-6의

발현 억제율은 약 42.1, 53.4, 79.8%으로 저해능이 탁월함을 확인하였다(Fig. 6C). IL-6는 조직 손상에 대한 발열을 일으키고 IL-1 β 는 COX-2 유도과정과 lymphokine 분비에 관여하며, TNF- α 는 IL-6의 발현 유도에 작용할 뿐만 아니라 종양 발생과 염증을 동반하는 질병에서 높은 수치를 띠는 것으로 알려져 있다. 이러한 기능을 가진 전염증성 cytokines은 활성화된 nuclear factor- κ B (NF- κ B)와 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 등의 전사인자에 의해 촉진되며 자가면역 질환 및 염증반응을 매개한다[42,43]. 이는 ARBR가 과도하게 발현된 전염증성 cytokines을 억제하여 염증반응을 적정 수준으로 조절할 수 있을 것이라고 사료된다.

고찰

본 연구는 biorenovation 기법을 접시꽃 callus 추출물(AR)에 적용하여 생물 전환을 유도하고 RAW 264.7 대식세포에 대한 항염 효과를 확인하기 위해서 세포 생존율과 NO, PGE₂, iNOS 및 COX-2 단백질 발현, pro-inflammatory cytokines의 생성 억제 활성을 측정하였다. 접시꽃 callus의 생물전환 추출물(ARBR)은 HPLC 분석을 통해 AR과 BS를 제외한 peak의 존재를 확인함으로써 화합물의 전환을 확인하였고, 이는 biorenovation 기법에 사용된 균주에 의해 전환된 것이라고 사료된다. AR과 ARBR의 세포에 대한 독성은 측정 농도(50, 100, 200 μ g/mL)에서 발견되지 않았으며, 동일한 농도에서 ARBR 처리군이 AR 처리군보다 월등한 NO 생성 억제 효능을 보였다. 또한, PGE₂ 합성과 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 실험에서도 ARBR 처리군이 PGE₂와 두 단백질의 발현을 현저하게 억제하는 경향을 보였으며, 앞선 ARBR의 NO 및 PGE₂ 생성 저해 양상이 상위 기전인 iNOS와 COX-2 발현량의 감소에 따른 것으로 사료된다[44]. TNF- α , IL-6, IL-1 β 를 포함한 pro-inflammatory cytokine의 생성량도 유의미하게 저해하는 것을 확인하였다. 따라서 *Bacillus siamensis* JD3-7균주 내 존재하는 효소에 의하여 천연물 내 성분이 활성을 가진 화합물로 전환되어 생물학적 효능이 증진되었음을 확인할 수 있었다. 결과를 종합해보면 식물에서 유도된 켈러스를 이용하여 소재의 공급에 대한 단점을 극복할 수 있으며, 식품 유래 균주를 활용한 생물 전환 기법을 적용하였기 때문에 바이오 산업에서 기능성 화장품이나 기능성 식품 등의 원료로써 활용 가치가 높을 것으로 사료된다. 추가적으로 염증 매개체를 생산하는 전사인자인 NF- κ B, MAPK의 발현 연구를 통해 신호전달경로를 확인하는 연구를 진행되어야 할 것으로 사료된다.

초록

Biorenovation은 미생물의 생체 촉매 대사를 통해 단일 화합물 또는 천연물을 생물 전환시켜 약리학적 효능을 증진시키고, 세포에 대한 독성을 완화시키는 기술이다. 접시꽃은 예로부터 한약으로 사용되어 왔으며, 항염증, 항암 등 다양한 생리학적 효능이 있다고 보고되고 있다. 또한, 본 연구에서 사용된 접시꽃 켈러스는 손상부를 보호하기 위해 발달한 미분화 식물 조직으

로, 항산화 및 미백 효과가 있는 것으로 보고되었지만 염증과 같은 다른 활성에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다. 본 연구에서는 바이오리노베이션을 접시꽃 켈러스 추출물(ARBR)에 적용하여 RAW 264.7 대식세포에 대한 생물전환 추출물의 항염증 효능을 연구하였다. 그 결과 측정 농도(50, 100, 200 μ g/mL)에서 세포에 대한 독성이 없었으며, 산화질소 생성 억제에 대한 효능이 기존 추출물에 비해 증진되었다. 또한, 프로스타글란딘 E₂와 전염증성 사이토카인, 고리형 산소화 효소, 산화질소의 유도 합성효소의 생성을 농도 의존적으로 억제하는 경향을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 ARBR이 과도하게 발현된 염증반응을 조절하여 기능성 화장품과 의약품의 소재로서 잠재력을 가지고 있음을 시사한다.

Keywords 바이오리노베이션 · 사이클로옥시제네이스-2 · 산화질소 유도 합성효소 · 식물의 유세포 덩어리 · 접시꽃 · 항염증

감사의 글 본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건 의료기술연구개발사업 지원에 의하여 이루어진 연구결과입니다 (과제고유번호: HP20C0231).

References

- Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE (2007) Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exp Immunol* 147: 227–235. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x
- Medzhitov R (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140: 771–776. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.006
- Ferrucci L, Fabbri E (2018) Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol* 15: 505–522. doi: 10.1038/s41569-018-0064-2
- Guha M, Mackman N (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling* 13: 85–94. doi: 10.1016/S0898-6568(00)00149-2
- Kedare SB, Singh RP (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 48: 412–422. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1
- Jin M, Suh SJ, Yang JH, Lu Y, Kim SJ, Kwon S, Jo TH, Kim JW, Park YI, Ahn GW, Lee CK, Kim CH, Son JK, Son KH, Chang HW (2010) Anti-inflammatory activity of bark of *Dioscorea batatas* DECNE through the inhibition of iNOS and COX-2 expressions in RAW264.7 cells via NF- κ B and ERK1/2 inactivation. *Food Chem Toxicol* 48: 3073–3079. doi: 10.1016/j.fct.2010.07.048
- Moon JS, Hur J, Chun SE, Kim JH, Park SG, Kwon JE, Woo CH, Kwak IS, Han TH, Kim KM (2003) The effect of early escharectomy on pro- and anti-inflammatory cytokines in major burn patients. *Korean J Anesthesiol* 45: 232–237. doi: 10.4097/kjae.2003.45.2.232
- Stuehr DJ (1997) Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 339–359. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.339
- Villanueva C, Giulivi C (2010) Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radical Biology and Medicine* 49: 307–316. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.004
- Vane J R, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA (1994) Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci* 91: 2046–2050. doi: 10.1073/pnas.91.6.2046
- Giuliano F, Warner TD (2002) Origins of prostaglandin E₂: involvements

- of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in human and rat systems. *J Pharmacol Exp Ther* 303: 1001–1006. doi: 10.1124/jpet.102.041244
12. Ji JD, Lee YH, Song GG (2004) Prostaglandin E2 (PGE2): Roles in Immune Responses and Inflammation. *J Korean Rheum Assoc* 11: 307–316
 13. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S (2011) NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metabolism* 13: 11–22. doi: 10.1016/j.cmet.2010.12.008
 14. Cho HY, Yang JL, Noh KH, Kim JJ, Kim YH, Huh KH, Song YS (2007) Anti-atherogenic effect of isoflavone through hypolipidemic, anti-oxidative and anti-inflammatory actions in C57BL/6 mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 276–283. doi: 10.3746/jkfn.2007.36.3.276
 15. Shin JA, Jeong JM (2020) Anti-inflammatory effects of BENDU381 in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 49: 1202–1211
 16. Ishikawa F, Haushalter RW, Burkart MD (2012) Dehydratase-specific probes for fatty acid and polyketide synthases. *American Chemical Society* 134: 769–772. doi: 10.1021/ja2082334
 17. Imran M, Salehi B, Sharifi-Rad J, Gondal AT, Saeed F, Imran A, Shahbaz M, Fokou TVP, Arshad UM, Khan H, Guerreiro GS, Martins N, Estevinho ML (2019) Kaempferol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. *Molecules* 24(12): 2277. doi: 10.3390/molecules24122277
 18. Kim DH, Yang MC, Lee KH, Kim KH, Lee KR (2007) Phenolic Constituents of *Althaea rosea* Canival. *Kor J Pharmacogn* 38(3): 222–226
 19. Ammara NM, El-Kashouryb ESA, El-Kassem LTA, El-Hakeemc REA (2013) Evaluation of the phenolic content and antioxidant potential of *Althaea rosea* cultivated in Egypt. *J Arab Soc Med Res* 8: 48–52. doi: 10.4103/1687-4293.123786
 20. Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A (2013) Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* 25: 3159–3173. doi: 10.1105/tpc.113.116053
 21. Kim IS, Lee SH (2005) Trichome type and development in leaves of *Althaea rosea*. *Applied Microscopy* 35: 97–104
 22. Kim DH, Yang MC, Lee KH, Kim KH, Lee KR (2007) Phenolic constituents of *Althaea rosea* Canival. *Korean J Pharmacogn* 38: 222–226
 23. Kang E (2001) Effect of germination condition, priming and plant growth regulator on the seed germination of *Althaea rosea*. Dissertation, University of Korea
 24. Neely D (1988) Tree wound closure. *Arboriculture* 14: 148–152
 25. Ogita S (2015) Plant cell, tissue and organ culture: the most flexible foundations for plant metabolic engineering applications. *Nat Prod Commun* 10: 815–820
 26. Kim SY, Kim HI, Ryu SH, Park JG, Jo SY, Kim JD, Moh SH (2018) A study on the anti-aging effects of *Leontopodium alpinum* callus culture extract. *The Korean Society of Cosmetics and Cosmetology* 8: 257–266
 27. Lee GB, Yeom AR, Kim DW, Park CM, Joung MS, Lee GT, Jeong CS (2018) Evaluation of *Alcea rosea* L. callus extract as a natural cosmetic ingredient. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 44: 295–302. doi: 10.15230/SCSK.2018.44.3.295
 28. Cho YH, Cho JS, Lee GW (2011) Antioxidant activity of wood vinegar by bioconversion. *Korea Academia-Industrial cooperation Society* 12: 4434–4442. doi: 10.5762/KAIS.2011.12.10.4434
 29. Kim KH, Ko KI, Kang EJ, Yang EK, Park SN (2004) A research trend of natural product on well-being industry. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 30: 329–343
 30. Yuan HD, Kim JT, Chung SH (2012) Pectinase-processed Ginseng radix (GINST) ameliorates hyperglycemia and hyperlipidemia in high fat diet-fed ICR mice. *Biomol Ther* 20: 220–225. doi: 10.4062/biomolther.2012.20.2.220
 31. Kim MS, Park TJ, Lim JS, Kim SY (2019) Effect of *Agaricus* biorenovate extract on collagen synthesis and matrix metalloproteinase-1 production in human dermal fibroblast. *KSBB journal* 34: 49–53. doi: 10.7841/ksbbj.2019.34.1.49
 32. Lee KM, Park TJ, Lee EY, Kim SW, Han DH, Kim SY (2021) Melanogenesis inhibitory effects of *Phryma leptostachya* callus using biorenovation in B16F10 melanoma cells. *KSBB journal* 36: 42–48
 33. Choi HR, Park JS, Kim KM, Kim MS, Ko KW, Hyun CG, Ahn JW, Seo JH, Kim SY (2018) Enhancing the antimicrobial effect of genistein by biotransformation in microbial system. *J Ind Eng Chem* 63: 255–261. doi: /10.1016/j.jiec.2018.02.023
 34. Schulz K, Kerber S, Kelm M (1999) Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO₂⁻ in aqueous and protein-containing samples. *Nitric Oxide* 3: 225–234. doi: 10.1006/niox.1999.0226
 35. Sim JH, Lee KM, Park TJ, Kang MS, Hong HH, Kim SY (2021) Biorenovation-Assisted Modification of *Ligustrum japonicum* Extract for Skin-Whitening Effect. *KSBB Journal* 36(1): 30–35
 36. Meerloo JV, Kaspers GJ, Cloos J (2011) Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer Cell Culture* 731: 237–245. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_20
 37. Kang JK, Hyun CG (2020) 4-Hydroxy-7-Methoxycoumarin Inhibits Inflammation in LPS-activated RAW264.7 Macrophages by Suppressing NF- κ B and MAPK Activation. *Molecules* 25(19): 4424. doi: 10.3390/molecules25194424
 38. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E (2005) Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current Drug Targets - Inflammation and Allergy* 4: 471–479
 39. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H (2003) Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in particular tissues. *Semin Arthritis Rheum* 33: 157–167. doi: 10.1016/S0049-0172(03)00134-3
 40. Watanabe K, Kawamori T, Nakatsugi S, Wakabayashi K (2000) COX-2 and iNOS, good targets for chemoprevention of colon cancer. *Biofactors* 12: 129–133. doi: 10.1002/biof.5520120120
 41. Wu KK (2003) Control of COX-2 and iNOS gene expressions by aspirin and salicylate. *Thromb Res* 110: 273–276. doi: 10.1016/S0049-3848(03)00412-2
 42. Kiemer AK, Hartung T, Huber C, Vollmar AM (2003) *Phyllanthus amarus* has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF- κ B pathway. *Hepatology* 38: 289–297. doi: 10.1016/S0168-8278(02)00417-8
 43. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C (1994) Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Bio Chem* 269: 4705–4708. doi: 10.1016/S0021-9258(17)37600-7
 44. Kim TY, Leem KH (2019) Effect of cheongpyesagan-tang on LPS induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Physiology and Pathology In Korean Medicine* 33: 31–38. doi: 10.15188/kjopp.2019.02.33.1.31