



Anti-inflammatory effect of naringenin-7-*O*-phosphate in LPS-induced RAW 264.7 cells

Hyehyun Hong · Tae-Jin Park · Byeong Min Choi · Yu-Jung Yi · Seung-Young Kim

LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 Naringenin-7-*O*-phosphate의 항염증 활성

홍혜현 · 박태진 · 최병민 · 이유정 · 김승영

Received: 3 January 2023 / Accepted: 19 January 2023 / Published Online: 14 February 2023
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract The most abundant flavanone of grapefruits, naringenin (NN), is well known for its hepatoprotective, anti-lipid peroxidation and anti-carcinogenic effects. We generated three derivatives from NN using this technique in previous studies. Among them, it was confirmed that naringenin-7-*O*-phosphate (N7P), whose biological and physicochemical properties were not reported, showed a water solubility 45 times higher than that of NN. Therefore, in this study, the anti-inflammatory activity was evaluated in RAW 264.7 cells to investigate the potential physiological activity of N7P. As a result, N7P showed nitric oxide (NO) inhibitory activity at concentrations that did not show toxicity. In addition, prostaglandin E₂ (PGE₂) showed significant inhibitory activity from the lowest concentration of 12.5 μM and showed increased inhibitory activity compared to NN. In addition, as a result of western blot, N7P showed increased cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitory activity than NN, and effectively inhibited NO and PGE₂ by significantly inhibiting their expression pathways. N7P also inhibited inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor-α, interleukin-6. Based on these results, we propose that N7P can be used as a potent anti-inflammatory agent.

Keywords Anti-inflammation · Biorenovation · Cyclooxygenase-2 · Naringenin-7-*O*-phosphate

서 론

염증은 인체에 침입한 외인적 병원체 또는 내인적인 자극에 의해 발생하는 매우 복잡한 인체의 선천적 방어 시스템으로, 손상된 조직의 회복을 위한 복구 기전으로서 국소적 염증을 유발한다[1,2]. 체내의 염증반응은 면역세포가 염증 유발 인자를 인지하고 제거하기 위한 과정으로, 면역세포의 한 종류로 알려진 대식세포로부터 분비되는 pro-inflammatory cytokines, prostaglandin E₂ (PGE₂), free radicals와 같은 다양한 매개물질들이 관여하는 것으로 알려져 있다[3-5]. 대식세포는 그람 음성 박테리아의 외벽의 독소 성분인 lipopolysaccharide (LPS)로 인해 활성화되어 tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) 및 interleukin-1β (IL-1β)를 생성하는데, 이러한 pro-inflammatory cytokine은 최종적으로 nuclear factor-κB를 활성화하여 염증 유도 유전자인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 촉진하는 주요 매커니즘으로 작용한다[6-8]. 염증반응 과정에서 iNOS의 발현으로 과잉 생성된 nitric oxide (NO)는 조직 손상, 유전자 변이를 유발하고 동맥경화증, 천식 및 류마티스 관절염 등 심각한 염증성 질환을 유발하며[9-11]. 염증 부위에서 발현되는 COX-2는 과하게 유도될 경우 각종 퇴행성 질환 및 염증 매개 물질인 PGE₂의 합성을 촉진함으로써 만성적인 염증을 유발한다[12,13]. 따라서, 다양한 염증성 질환의 예방 및 치료를 위해서 이러한 염증 매개 물질의 발현은 적절히 제어 되어야한다.

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.

플라보노이드는 광범위한 생물학적 활성을 가진 중요한 식물 2차 대사 산물로 항산화, 항염증, 항돌연변이 및 항암 활성을 포함하여 다양한 생리 활성을 갖는 것으로 알려져 있다[14]. 본 연구에서 사용된 naringenin (NN)은 자몽에 가장 풍부한 플라보노이드의 하나로 간 보호, 항지질 과산화 및 항암 활성에 관한 연구가 보고되었으나 NN과 같은 플라보노이드는 낮은 수용해도를 가진 소수성 물질이기 때문에 한계점을 갖기도 한다[15,16]. 약물의 개발에서 낮은 수용해도는 낮은 생체 이용률로 이어지곤 하는데 분자의 생물학적, 물리적 특성은 서로 다른 작용기와 밀접한 관련이 있어 이러한 한계점은 분자의 구조를 수정함으로써 개선될 수 있다[16,17]. 따라서, 분자의 구조 수정은 생물학적 활성을 개선하고 기능성을 증대하기 위한 방안으로써 많은 관심을 받고 있으며 특히 최근에는 소재의 기능성이 더욱 강조됨에 따라 그 필요성은 더욱 높아지고 있다[18,19].

Biorenovation은 미생물의 효소 작용을 이용하여 분자의 구조 수정을 유도하는 친환경 생물전환 기법으로, 우리는 이전 연구에서 이 기법을 이용하여 NN으로부터 naringenin-7-O-Glucoside (prunin), naringenin-7-O-phosphate (N7P), 6"-O-Succinyl prunin과 같은 3가지 유도체를 합성하였다[20]. 또한 생성된 유도체는 NN과 비교하여 개선된 수용해도를 갖는 것으로 확인되었으며 그 중 생물학적 및 물리화학적 특성이 보고되지 않은 N7P가 NN대비 45배 증가한 수용해도를 나타냄을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 N7P의 다양한 잠재적 생리활성 조사하고자 RAW 264.7 세포에서 항염증 활성을 평가하였으며 항후 염증과 관련된 질환의 예방 및 치료를 위한 더욱 효과적인 항염증 소재로의 활용가능성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 세포배양

본 실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행에서 분양 받았으며 세포주의 배양에는 10% fetal bovine serum (FBS)과 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, NY, USA)에 첨가한 배지를 사용하였다. 세포는 CO₂ incubator (37 °C, 5% CO₂)에서 2일을 주기로 계대 배양하였으며, 염증 유발에 사용된 LPS는 Sigma-Aldrich (Cat. No. L6529, St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

세포 독성 측정

시료가 세포의 생존에 미치는 영향을 확인하고자 살아있는 세포의 미토콘드리아에서 mitochondrial reductase에 의해 보라색의 formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; MTT)을 형성하는 원리를 이용하여 세포의 생존율을 측정하는 MTT assay를 이용하였다[21,22]. 24-well plate에 RAW 264.7 세포를 7.0×10⁴ cells/well의 농도로 접종하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 전 배양한 후 시료와 LPS (1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 동안 반응하였다. 이후 RAW 264.7 세포에 MTT 시약을 첨가한 다음 incubator에서 3시간 동안 반응시켜 형성된 formazan blue을 Dimethyl sulfoxide로 용해한 뒤 96-well plate에 옮겨 microplate reader

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 7.0×10⁴ cells/well의 농도로 분주하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 전 배양한 후 1% FBS를 함유하는 DMEM으로 변경한 뒤 LPS (1 µg/mL)와 시료(12.5, 25, 50 µM)를 처리하여 24시간 동안 염증을 유도하였다. 이후 세포 배양액 100 µL와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100 µL를 1:1로 혼합하여 10분간 암반응 시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell을 24-well plate에 7.0×10⁴ cells/well 농도로 접종하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 전 배양한 후 1% FBS를 함유하는 DMEM으로 변경한 뒤 LPS (1 µg/mL)와 시료 (12.5, 25, 50 µM)를 처리하여 24시간 동안 염증을 유도하였다. 회수한 세포배양액은 10,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 침전물을 제거한 후, 상등액을 PGE₂ 측정에 사용하였으며 세포 배양액 내의 PGE₂는 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (cat. no. KGE004B, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

Western blot analysis

6-well plate에 4×10⁵ cells/well의 농도로 접종한 RAW 264.7 세포를 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 전 배양한 다음 희석한 시료 (12.5, 25, 50 µM)와 LPS (1 µg/mL)를 처리하여 동일한 조건에서 24시간 반응하였다. 이후 세포를 PBS로 2회 세척한 뒤 lysis buffer [1×RIPA (Upstate Cell Signaling Solution, NY, USA), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL pepstatin, and 1 µg/mL leupeptin]를 첨가하여 40분 동안 lysis를 수행한 다음 12,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 회수한 상등액을 BCA kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량 하였다. 이후 20 µg의 단백질을 10% polyacrylamide를 함유한 10% SDS-PAGE gel에서 전기영동하여 분리한 뒤 poly-vinylidene difluoride (Millipore, Burlington, MA, USA)에 전이하였다. 이후 membrane을 5% skim milk (sol. TBST)에서 1시간 30분 동안 blocking한 다음 membrane을 TBST로 10분간 3회 세척하여 1차 항체 iNOS antibody (Cat. No. AHP2399, 1:1,000, Bio-Rad), COX-2 antibody (Cat. No. 100-401-226, 1:1,000, Rockland Immunochemicals, Inc., Pottstown, PA, USA), β-actin antibody clone AC-74 (Cat. No. VMA00048, 1:10,000, Sigma)와 4 °C에서 overnight하였다. 이후 membrane을 실온에서 1:10,000 비율로 희석한 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)에서 90분 동안 반응한 다음 membrane을 3회 세척한 뒤 ECL kit (Bio-Rad)와 반응시켜 imaging densitometer (model GS-700, Bio-Rad)를 통해 현상하였다. 발현된 단백질은 imageJ program (1.52v, NIH, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 β-actin 대비

iNOS와 COX-2의 발현량의 면적을 정량화하여 그래프로 나타내었다.

Pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 7.0×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 전 배양한 후 1% FBS를 함유하는 DMEM으로 변경한 뒤 시료(12.5, 25, 50 μ M)와 LPS (1 μ g/mL)를 처리하여 동일한 조건에서 24시간 반응하였다. 이후 배양 배지를 원심분리(10,000 rpm, 3 min) 하여 침전물을 제거한 상등액을 회수하여 배양액 내에 존재하는 pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β)의 생성량을 측정하였으며 세포 배양액 내의 pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β)은 Mouse TNF- α ELISA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Mouse IL-6 ELISA Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), Mouse IL-1 β ELISA Kit (R&D Systems Inc.,)를 이용하여 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였으며 그 결과는 평균값 \pm 표준편차로 나타냈다. 또한 통계적 분석은 각 처리 구간의 유의성(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)을 검증을 위해 분산분석(analysis of variance, ANOVA) 후 student's t-test로 다중 비교를 실시하였다.

결 과

세포 독성 비교

본 실험에서는 염증에 중요한 역할을 하는 대식세포를 이용하여 NN과 N7P가 세포의 생존에 미치는 영향을 조사하고자 LPS를 첨가하거나 첨가하지 않은 배지에 NN과 N7P를 12.5, 25, 50 μ M 농도로 처리하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 LPS와 NN을 병용 처리한 세포의 생존율은 각각 99.2, 93.8, 89.5%, N7P는 97.2, 96.4, 93.8%로 모든 농도에서 80% 이상의 생존율이 확인되었으며, LPS를 처리하지 않은 각 시료의 단독 처리군 또한 모든 농도에서 80% 이상의 생존율을 나타내었다(Fig. 1). 따라서 추후 진행될 NO assay, ELISA, western blot에서는 NN 및 N7P가 세포생존율에 영향을 미치지 않는 범위인 12.5, 25, 50 μ M 농도를 사용하여 실험을 진행하였다.

NO 생성 억제 활성 비교

LPS로 유도된 염증 반응에서 생성되는 NO는 높은 반응성을 가진 물질로 nitric oxide synthase에 의해 L-arginine로부터 생성되는 것으로 알려져 있다. 특히 iNOS는 외부 스트레스나 Pro-inflammatory cytokines 등에 의해 자극을 받게 되면 smooth muscle cells, hepatocytes, bone marrow cells, macrophages, monocytes 등 여러 세포에서 발현되며 다량의 NO를 생산하는 주요 메커니즘으로 작용한다[23]. 따라서 본 실험에서는 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 N7P가 NO의 생성에 미치는 영향을 조사하고자 하였으며 LPS의 병용 처리는 시료 처리에 대한 세포의 민감성을 증가시켜 세포 활성 여부의 판단을 용이하게 할 수 있으므로 LPS (1 μ g/mL)와 시료(12.5, 25, 50 μ M)를

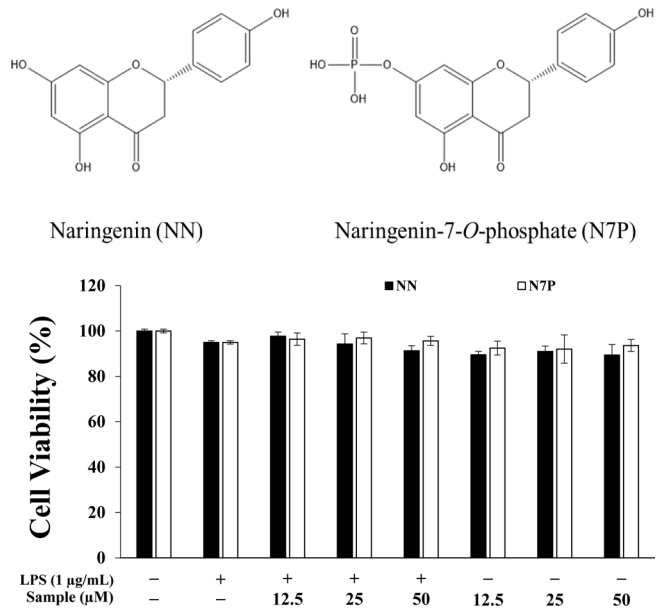


Fig. 1 Structures of naringenin (NN) and naringenin-7-O-phosphate (N7P) and inhibitory effects of NN and N7P on cell viability in RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 24 h in the presence of NN and N7P (12.5, 25, and 50 μ M). Cytotoxicity was determined by MTT assay. Result is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control (untreated cells)

병용 처리한 뒤 생성된 NO의 양을 측정하였다. 그 결과, N7P는 LPS로 인해 증가한 NO를 NN과 유사한 경향으로 억제하였으나 NO의 억제 최소 유효 농도는 12.5 μ M로 저농도에서 NN 대비 증가한 활성을 보였다(Fig. 2).

PGE₂ 생성 억제 활성 비교

이전 실험 결과 N7P가 유효한 NO 억제 활성을 보였으므로 다른 염증성 대사산물 또는 매개 물질의 저해에도 유의성 있는 활성을 나타낼 것으로 판단되어 추가적인 실험을 진행하였다. PGE₂는 염증의 초기 단계에서 국소적인 혈관 확장 및 호중구, 대식세포, 비만세포 및 면역 관련 세포의 활성화 등을 촉진하는 등 염증의 활성을 유도하며, 통증, 부종, 열을 유발함으로써 지속적인 염증반응을 유지하는데 핵심적인 역할을 하는 것으로 보고되었다[24]. 따라서 본 실험에서는 LPS로 자극한 RAW264.7 세포에 시료를 12.5, 25, 50 μ M 농도로 처리하여 N7P가 PGE₂의 생성에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 실험 결과, NN과 N7P의 최소 유효 농도는 각각 25, 12.5 μ M로 N7P가 NN과 비교하여 더 낮은 농도에서 유효한 억제 활성을 나타내었으며 가장 고농도인 50 μ M에서 PGE₂의 발현이 LPS 무 처리군과 유사한 수준으로 감소한 것을 확인하였다(Fig. 3).

iNOS 및 COX-2 발현 억제 활성 비교

iNOS는 세포내 존재하지 않으나 일단 염증 유발 자극에 의해 유도되면 NO를 생성하는데 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 확장, 세포독성, 조직손상을 야기하며 염증을 심화한다. 또한 다른 염증 유전자인 COX-2는 cytokine, 자외선, 세균성 내독소

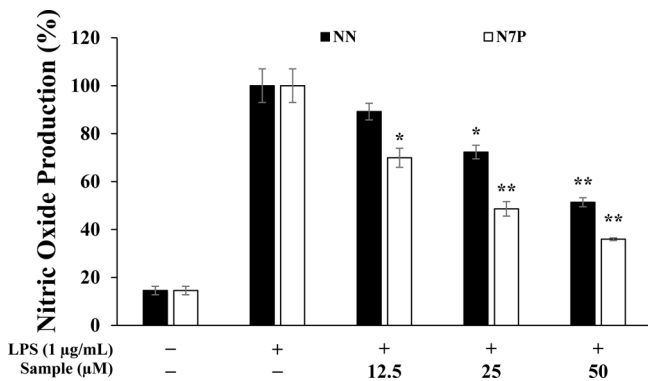


Fig. 2 Inhibitory effects of NN and N7P on nitric oxide production in RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 μg/mL) for 24 h in the presence of NN and N7P (12.5, 25, and 50 μM). The results are presented as the relative percentage of the control (untreated cells). Data points are expressed as the mean ± standard deviation. The mean of each sample group was compared to the mean of the LPS-treated group, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001

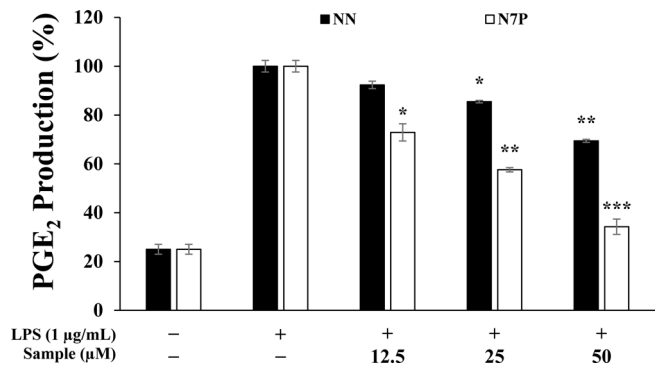


Fig. 3 Inhibitory effects of NN, and N7P on PGE₂ production in RAW 264.7 cells. The production of PGE₂ was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 μg/mL) for 24 h in the presence of NN and N7P (12.5, 25, and 50 μM). The results are presented as the relative percentage of the control (untreated cells). Data points are expressed as the mean ± standard deviation. The mean of each sample group was compared to the mean of the LPS-treated group, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001

및 TNF와 같은 pro-inflammatory agent에 의해 과발현되는 것으로 알려져 있으며 prostaglandin은 생성을 유도하여 염증을 심화할 뿐만 아니라 각종 퇴행성 질환의 발병에도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다[25]. 따라서 염증반응에서 NO와 PGE₂의 생성은 iNOS와 COX-2의 발현에 의해 조절되므로 iNOS 및 COX-2의 발현 억제를 통해 항염증 활성을 유도할 수 있다. LPS로 유도된 RAW 264.7세포에서 LPS 단독 처리군과 비교하였을 때 N7P는 iNOS의 발현을 NN과 유사한 경향으로 저해하였으나 25 μM에서 유의한 차이를 보였으며, COX-2의 경우 25 μM 농도에서 유의한 활성의 차이를 보이기 시작하여 50 μM의 농도에서는 COX-2의 발현을 LPS 무 처리군과 유사한 수준으로 억제하는 것으로 확인되었다(Fig. 4) RAW 264.7 세포를 이용한 Chao 등의[26]에서 100, 200 μM 농도로 처리된 NN가 유의하기는 하나 무처리군과 유사한 COX-2 억제활성을 보이지 않는 것과 비교할 때 N7P는 NN대비 COX-2를 표적으로 더욱 효과적으로 작용함을 확인하였다.

Pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6, IL-1β) 생성 억제 활성 비교

Cytokine은 LPS와 같은 염증 유발 물질에 의해 활성화된 대식세포가 분비하는 단백질로 면역세포의 활성화, 증식 및 분화를 조절하여 염증반응을 매개하는 인자이다. TNF-α는 주로 활성화된 대식세포에서 대량 생산되며 급성 또는 만성 염증 질환의 발생 및 진행에 중요한 밀접한 관련이 있으며 IL-6는 다양한 염증성 질환에서 분비량이 증가하는 것으로 보고되어 있다[11,27]. 또한 IL-1β는 염증 반응을 촉진하며 면역계를 자극하는 염증 유발 인자로 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙 등에 관여하며 종양의 침습을 유발하기 때문에 이들의 조절이 염증성 질환의 치료에 이용될 수 있다[28]. 따라서 본 실험에서는 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 N7P가 TNF-α, IL-6, IL-1β의 발현에 미치는 영향을 조사하고자 실험을 진행하였다. 측정결과, N7P의 TNF-α 및 IL-6 억제 최소 유효 농도는 12.5 μM로 동일한 농도

의 NN이 유효한 활성을 보이지 않는 것과 비교하여 유의한 활성의 증가가 확인된 반면, IL-1β의 경우 NN과 N7P이 모든 농도에서 유사한 억제 경향을 나타냄을 확인하였다(Fig. 5). 특히 N7P는 50 μM에서 IL-6의 발현을 61% 억제하였는데 이는 LPS 무 처리군과 유사한 발현수준으로 NN과 비교하여 가장 증가한 억제 활성을 나타내었다.

고찰

본 연구는 biorenovation을 통해 naringenin (NN)으로부터 합성된 N7P이 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 염증매개체로 알려진 NO, PGE₂ 및 pro-inflammatory cytokine (TNF-α, IL-6, IL-1β)의 생성에 미치는 영향을 조사하고자 수행되었다. 실험 결과, N7P는 독성이 나타나지 않는 농도에서 유의한 NO억제 활성을 보였으며 PGE₂의 경우 가장 저 농도인 12.5 μM부터 NN과 유의한 차이를 보이기 시작하여 50 μM에서 LPS 무 처리군과 유사한 수준의 억제 효과를 나타냈다. 이후 수행된 western blot 결과 N7P는 iNOS 및 COX-2의 발현 억제에 있어 25 μM 농도부터 NN과 비교하여 유효한 활성의 차이를 보였으며 특히 50 μM에서 COX-2를 LPS 무 처리군과 유사한 수준으로 억제하였다. 이는 N7P가 해당 경로를 유의하게 억제함으로써 NO 및 PGE₂의 발현을 효과적으로 하향 조절함을 입증하며 본 연구와 RAW 264.7 세포에서 NN을 대상으로 한 Chao 등[26]의 연구 결과를 고려할 때 N7P는 NN과 유사한 감소 경향을 보이는 iNOS보다 COX-2를 더욱 효과적으로 억제하는 것으로 판단된다. 또한 N7P는 pro-inflammatory cytokine인 TNF-α, IL-6의 발현 억제에도 유효한 활성을 나타냄이 확인되었으며 NN과는 12.5 μM부터 유의한 차이를 보이는 것으로 확인되었다. 특히 평가된 농도 범위내 에서 NN의 IL-6 억제 최소 유효 농도는 50 μM로 미약한 활성을 보이는 것으로 확인되었는데 이는 Teng 등의[29]에서 25, 40 μM 농도로 처리된 NN

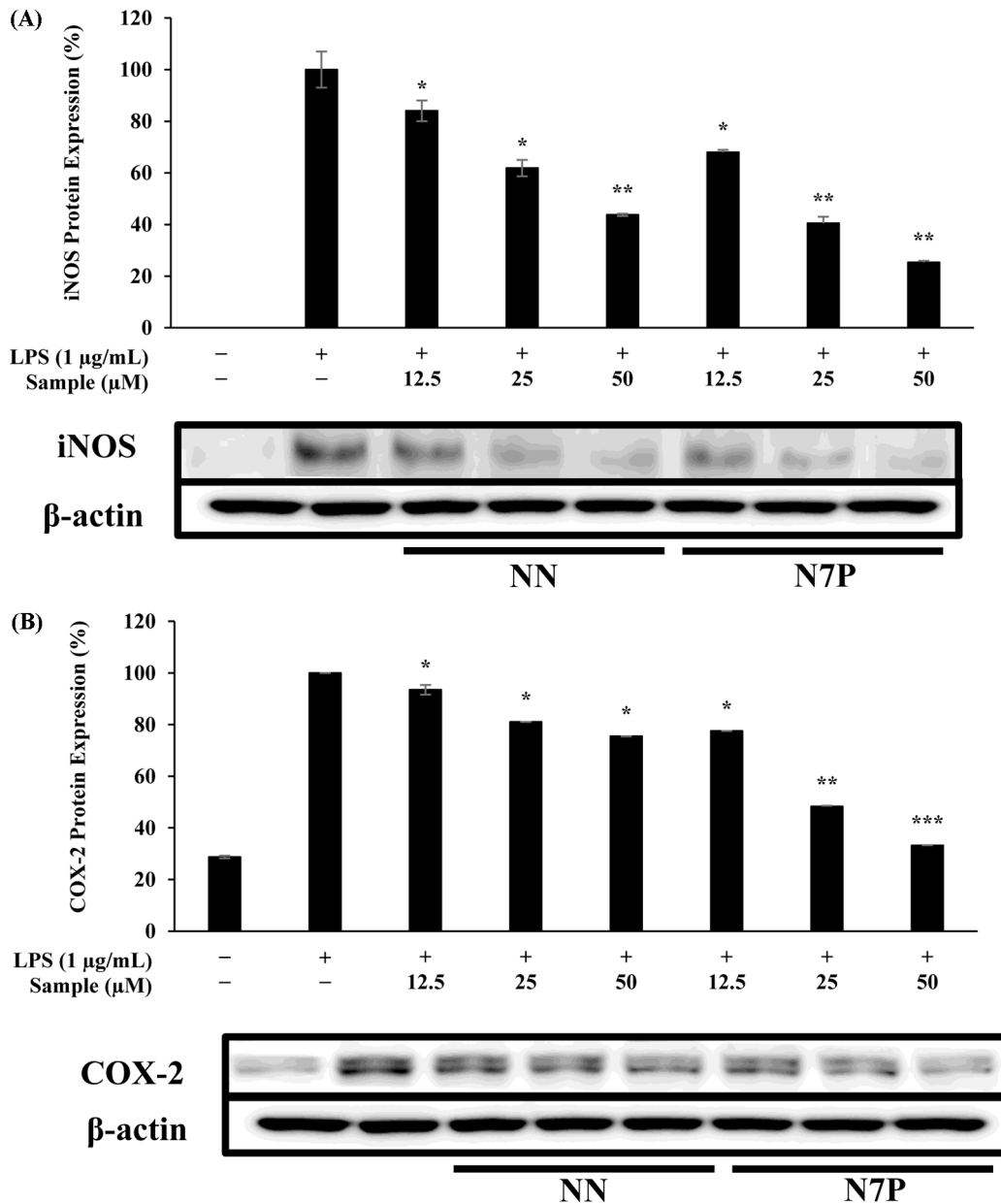


Fig. 4 Inhibitory effects of NN, and N7P on the protein level of iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. A) iNOS, B) COX-2. Cells (5×10^5 cells/well) were pre-incubated for 18 h, and then treated with LPS (1 µg/mL) and Sample for 24 h. The protein levels of iNOS, COX-2 were analyzed by western blot. β -actin was used as the control. The results are presented as the relative percentage of the control (untreated cells). Data points are expressed as the mean \pm standard deviation. The mean of each sample group was compared to the mean of the LPS-treated group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

이 IL-6 유전자 발현을 유의하게 감소시키지 않은 것과 어느정도 유사한 결과로, 이러한 활성의 변화는 biorenovation을 통한 구조의 수정으로부터 유도된 것으로 판단된다. 결론적으로, 본 연구는 다양한 염증 매개 물질에 대한 N7P의 억제 활성에 대하여 보고하며 N7P가 새로운 항염증 소재로 사용되기 위한 기초적인 근거를 제시한다. 또한 N7P의 증가된 수용해도가 생체 이용률을 개선하는데 긍정적인 영향을 미칠 것으로 기대하며 향후 N7P가 더욱 효과적인 항염증제로 사용되기 위해 nuclear factor- κ B, mitogen-activated protein kinase (MAPKs) 등 세포

내 염증 관련 중간 기전에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다

초 록

플라보노이드는 광범위한 생물학적 활성을 가진 중요한 식물 2차 대사 산물로, 본 연구에서 사용된 naringenin (NN)은 자몽에 가장 풍부한 플라보논의 하나로 간 보호, 항지질 과산화 및

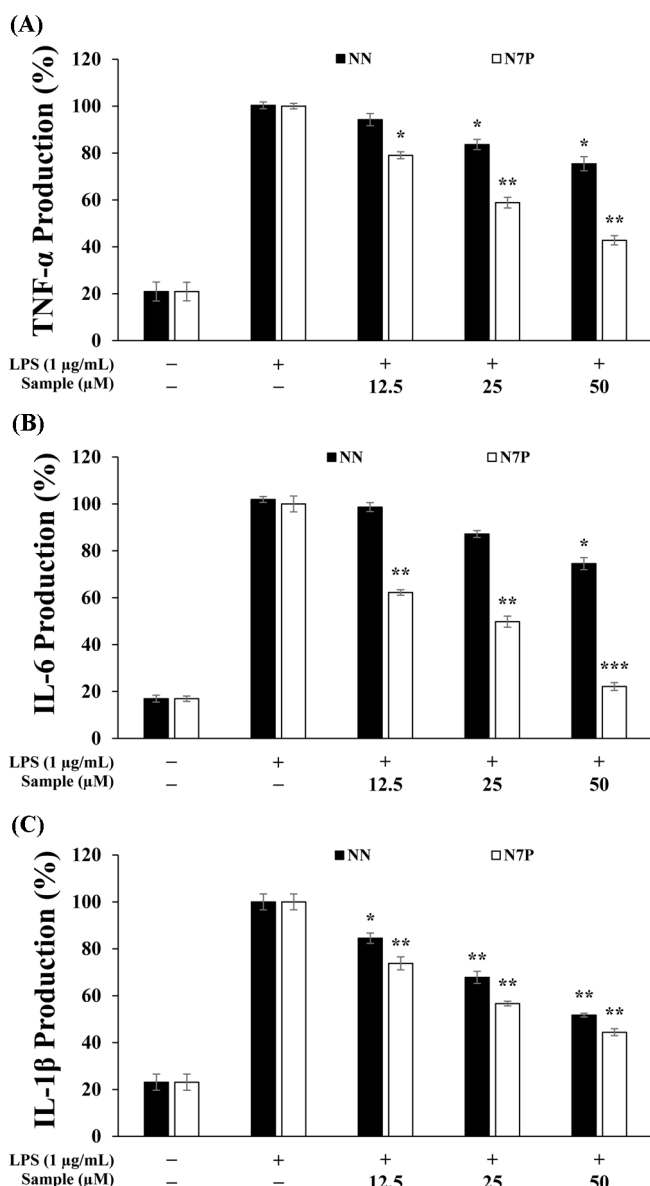


Fig. 5 Inhibitory effects of NN, and N7P on production of pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells. The production of A) TNF- α B) IL-6 and C) IL-1 β was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 24 h in the presence of NN and N7P (12.5, 25, and 50 μ M). The results are presented as the relative percentage of the control (untreated cells). Data points are expressed as the mean \pm standard deviation. The mean of each sample group was compared to the mean of the LPS-treated group, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

항염 활성에 관한 연구가 보고되었다. 우리는 이전 연구에서 biorenovation 기법을 NN에 적용하여 naringenin-7-*O*-Glucoside (prunin), naringenin-7-*O*-phosphate (N7P), 6"-*O*-Succinyl prunin과 같은 3가지 유도체를 합성하였으며 그 중 생물학적 및 물리화학적 특성이 보고되지 않은 N7P가 NN보다 45배 증가한 수용해도를 나타냄을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 N7P의 추가적인 생리활성 조사하고자 RAW 264.7 세포에서 항염증 활

성을 평가하였으며 N7P는 세포 독성이 나타나지 않는 농도에서 유효한 inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 억제 활성을 보였으며 이들의 발현 경로를 유의하게 억제함으로써 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)를 효과적으로 억제하였다. 뿐만 아니라 pro-inflammatory cytokines 인 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin-6 (IL-6)의 발현 또한 유의하게 억제하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 근거로 N7P가 다양한 염증 인자를 표적으로 하는 항염증 소재로 적용될 수 있음을 제안한다.

Keywords 바이오리노베이션 · 항염 · Cyclooxygenase-2 · Naringenin-7-*O*-phosphate

감사의 글 본 논문은 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업육성 +R&D 사업의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다 (S3090174).

References

- Choi HJ, Eun JS, Park YR, Kim DK, Li R, Moon WS, Park JM, Kim HS, Cho NP, Cho SD, Soh Y (2008) Ikarisoid A inhibits inducible nitric oxide synthase in lipopoly-saccharide-stimulated RAW264.7 cells via p38 kinase and nuclear factor-kappaB signaling p pathways. *Eur J Pharmacol* 601(1-3): 171–178. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.09.032
- Jeong HR, Sung MS, Kim YH, Ham HM, Choi YM, Lee JS (2012) Anti-Inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-Stimulated RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 888–894. doi: 10.3746/jkfn.2012.41.7.888
- Wynn TA, Barron L (2010) Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* 30: 245–257. doi: 10.1055/s-0030-1255354
- Lim KH, Staudt LM (2013) Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb. Perspect Biol* 5(1): a011247. doi:10.1101/cshperspect.a011247
- Gilroy DW (2010) Eicosanoids and the endogenous control of acute inflammatory resolution. *Int J Biochem Cell Biol* 42(4): 524–528. doi: 10.1016/j.biocel.2009.12.013
- Dou W, Zhang J, Sun A, Zhang E, Ding L, Mukherjee S, Wei X, Chou G, Wang ZT, Mani S (2013) Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. *Br J Nutr* 110: 599–608. doi: 10.1017/S0007114512005594
- Comalada MJ, Lloberas AC (2012) MKP-1: A critical phosphatase in the biology of macrophages controlling the switch between proliferation and activation. *European Journal of Immunology* 42(8): 1938–1948. doi: 10.1002/eji.201242441
- Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu Bing-e, Karandikar M, Berman K, Melanie HC (2001) Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine reviews* 22(2): 153–183. doi: 10.1210/edrv.22.2.0428
- Dendorfer U (1996) Molecular biology of cytokines. *Artif Org* 20: 437–444. doi: 10.1111/j.1525-1594.1996.tb04529.x
- Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF (1991) Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(10): 4220–4224. doi: 10.1073/pnas.88.10.4220
- Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051–3064. doi: 10.1096/fasebj.6.12.1381691
- Hippeli S, Elstner EF (1999) Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts: a review on recent developments. *Free Radic Res* 31: 81–87. doi: 10.1080/10715769900301361
- Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith W G, Isakson PC Seibert K (1994) Selective inhibition of inducible

- cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(8): 3228–3232. doi: 10.1073/pnas.91.8.3228
14. Middleton E (1996) Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int J Pharmacogn* 34(5): 344–348. doi: 10.1076/phbi.34.5.344.13245
 15. Felgines C, Texier O, Morand C (2000) Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(6): G1148–G1154. doi: 10.1152/ajpgi.2000.279.6.G1148
 16. Khan AW, Kotta S, Ansari SH, Sharma RK, Ali J (2015) Self-nano-emulsifying drug delivery system (SNEDDS) of the poorly water-soluble grapefruit flavonoid Naringenin: design, characterization, in vitro and in vivo evaluation. *Drug Delivery* 22(4): 552–561. doi: 10.3109/10717544.2013.878003
 17. Zhang SX, Tani T, Yamaji S (2003) Glycosyl flavonoids from the roots and rhizomes of *Asarum longerrhizomatsum*. *J Asian Nat Prod Res* 5(1): 25–30. doi: 10.1080/1028602031000080423
 18. Tommasini S, Raneri D, Ficarra R, Calabrò ML, Stancanelli R, Ficarra P (2004) Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with beta-cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal* 35(2): 379–387. doi: 10.1016/S0731-7085(03)00647-2
 19. K. F. De Polo (1998) *A Short Textbook of Cosmetology* Augsburg. Verlag für chemische Industrie, Berlin
 20. Koirala M, Lee YK, Kim MS, Chung YC, Park JS, Kim SY (2019) Biotransformation of Naringenin by *Bacillus amyloliquefaciens* Into Three Naringenin Derivatives. *Nat Prod Commun* 14(5): 1934578X1985197. doi: 10.1177/1934578X19851971
 21. Van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J (2011) Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Cancer Cell Culture* 237–245. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_20
 22. Morgan DML (1998) Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity. *Polyamine Protocols* 179–184. doi: 10.1385/0-89603-448-8:179
 23. Koh YJ, Cha DS, Ko JS, Park HJ, Choi HD (2010) Anti-inflammatory effect of *Taraxacum officinale* leaves on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *J Med Food* 13(4): 870–878. doi: 10.1089/jmf.2009.1249
 24. Kim JY, Jung KS, Jeong HG (2004) Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett* 569(1–2): 321–326. doi: 10.1016/j.febslet.2004.05.070
 25. Chun KS, Surh YJ (2004) Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 68(6): 1089–1100. doi: 10.1016/j.bcp.2004.05.031
 26. Chao CL, Weng CS, Chang NC, Lin JS, Kao ST, Ho FM (2010) Naringenin more effectively inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in macrophages than in microglia. *Nutr Res* 30(12): 858–864. doi: 10.1016/j.nutres.2010.10.011
 27. Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT (1988) Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med* 167(3): 1211–1227. doi: 10.1084/jem.167.3.1211
 28. Delgado AV, McManus AT, and Chambers JP (2003) Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2 and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* 37(6): 355–361. doi: 10.1016/j.npep.2003.09.005
 29. Teng J, Li J, Zhao Y, Wang M (2021) Hesperetin, a dietary flavonoid, inhibits AGEs-induced oxidative stress and inflammation in RAW264.7 cells. *J Funct Foods* 81: 104480. doi: 10.1016/j.jff.2021.104480