



## Anti-inflammatory effects of *Lycoris chejuensis* callus using biorenovation

Hyehyun Hong · Tae-Jin Park · Yu-Jung Lee · Jung-Hwan Kim · Seung-Young Kim

### Biorenovation 기법 적용 제주상사화 callus의 항염증 활성

홍혜현 · 박태진 · 이유정 · 김정환 · 김승영

Received: 20 March 2023 / Accepted: 1 May 2023 / Published Online: 10 May 2023  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

**Abstract** Callus cultivation is a method for producing a large amount of tissue of a plant in the laboratory, regardless of the environment. *Lycoris chejuensis*, a plant species native to jeju island, is a member of the *Lycoris* family has been used as a traditional medicine for the treatment of diverse diseases. In this study, we evaluated anti-inflammatory effect of biorenovated *Lycoris chejuensis* callus (LCB) in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells. As a result, LCB was less toxic to the cells in the concentration range of 25, 50, and 100  $\mu\text{g/mL}$  as shown by the improved viability of LCB treated cells than compared to *Lycoris chejuensis* callus (LC) treatment. In addition, LCB inhibited the generation of NO and prostaglandin  $\text{E}_2$  through the suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 protein expression. LCB also attenuated the expression of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  induced by LPS. The results suggest that LCB has anti-inflammatory activity on the LPS-induced inflammatory response and may be suitable for the development of potent functional cosmetic material.

**Keywords** Anti-inflammation · Biorenovation · Callus · *Lycoris chejuensis*

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.

### 서론

염증은 인체에 침입한 외인적 병원체 또는 내인적인 자극에 의해 발생하는 매우 복잡한 선천적 면역반응으로 인체 내 대부분의 기관에서 유발되며 급성(acute)과 만성(chronic)으로 나누어진다[1]. 그 중 만성 염증은 외부에서 침입한 병원체가 없는 상태에서도 면역세포가 지속적으로 활성화되어 강력한 염증유발물질을 끊임없이 생성하는 현상을 말하는데, 인체 내 주요 면역세포로 알려진 대식세포(macrophage)는 체내 모든 조직에 분포하며 활성화될 경우 pro-inflammatory cytokines, prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ), free radicals와 같은 매개물질들을 분비함으로써 염증을 매개하는 것으로 알려져 있다[2-3]. 그람 음성 박테리아의 외벽의 독소 성분인 lipopolysaccharide (LPS)는 대표적인 염증유발 물질로, 대식세포로부터 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) 및 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )의 생성을 유도하며 nuclear factor- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) 경로를 활성화하여 염증 유도 유전자인 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현을 촉진하는 주요 메커니즘으로 작용한다[4-6]. 염증 부위에서 발현되는 COX-2는 phospholipase A2에 의해 세포막 인지질로부터 유리된 arachidonic acid를 prostaglandin  $\text{H}_2$ 로 전환하는 과정에 관여하는 효소이며 지속적으로 발현될 경우 암을 유발 혹은 악화시키거나 심혈관계 질병 및 알츠하이머 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다[7-9]. 또한, iNOS는 neuronal NOS (nNOS) 및 endothelial NOS (eNOS)와 달리 radical인 nitric oxide (NO)의 과 발현을 유도하여 조직 손상, 유전자 변이를 유발하고 동맥경화증, 천식 및 류마티스관절염 등 심각한 염증 질환을 유발한다[10-12]. 따라서, 이러한 염증 매개 물질의 억제효과를 조사함으로써 항염증제로서의 가능성을 평가할 수 있다.

상사화(*Lycoris* Herb.)는 수선화의 다년생 초본식물로 주로 한국과 중국, 일본에 생육하는 것으로 알려져 있으며 붉노랑상사화(*L. flavescens*)와 진노랑상사화(*L. chinensis* var. *simulata*),

위도상사화(*L. uyoensis*), 백양꽃(*L. sanguinea* var. *koreana*), 제주상사화(*L. chejuensis*) 5종은 우리나라에 자생하는 특산 식물이다[13]. 본 연구에서 사용된 제주상사화(*L. chejuensis*)는 연한 노란색 꽃을 피워 관상용으로서의 가치가 높을 뿐 아니라 인경에 30% 이상의 전분이 포함되어 있어 식용이 가능한 구황작물로도 활용되어 왔다. 제주상사화는 알칼로이드 성분인 lycoricidine, lycoricidinol, lycorine, lycorenine, lycoramine 등을 포함하여 다양한 약리적 성분을 함유한 것으로 알려져 있으며 우리나라에 자생하는 상사화 속 식물 중 살균력이 있다고 알려진 lycorine의 함량이 가장 높은 것으로 확인되었다[14,15]. 또한, 최근에는 구근에서 분리된 성분인 7-Deoxy-transnarciclasine의 염증 억제 효능이 보고된 바 있다[16]. 반면 제주상사화는 종자 번식이 이루어지지 않고 구근을 통해 번식이 이루어지며 소수의 개체가 자생하는 특징을 갖는데, 식물 소재를 산업적으로 사용하기 위해서는 균일한 품질을 가진 식물체 확보가 요구되므로 소재 개발에 있어 연구가 지속적으로 필요하다고 볼 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 식물의 종 특성을 벗어나 계절, 기상, 병충해 등 환경적 요인에 관계없이 대량화 할 수 있는 제주상사화 식물조직배양체(callus)를 사용하였으며 그 활용가치를 증진시키고자 친환경 생물전환 기법인 biorenovation을 적용하였다. Biorenovation은 미생물의 효소 작용을 이용하여 분자의 구조 수정을 유도하는 기법으로, 이전 연구 결과 다양한 천연물을 대상으로 독성 감소, 기능성 상승을 유도하여 부가가치가 높은 고 기능성 소재 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대된다[17,18].

따라서 본 연구에서는 생물 전환된 제주상사화 callus 추출물이 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 여러 염증 인자 생성에 미치는 영향을 조사함으로써 향후 염증과 관련된 질환의 예방 및 치료를 위한 효과적인 항염증 소재로의 활용가능성을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 제주상사화 callus 추출물 제조

본 연구에 사용된 제주상사화(*Lycoris chejuensis*) callus는 한국 생명공학연구원 생물자원센터로부터 제공받았다. 본 callus는 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)가 첨가된 고체 배지를 사용하여 25 °C, 암 조건에서 한 달 간격으로 배양을 하였다. 이후 건조 분쇄된 callus 1g에 대하여 10배의 정제수를 첨가하여 70 °C에서 2회 반복하여 열수추출을 진행하였으며 추출액은 paper filter로 여과한 뒤 감압농축한 다음 동결건조기(HC3110, Hanil Scientific Inc., Gimpo, Korea)를 사용하여 시료 화 하였다.

### 미생물 배양 및 biorenovation 반응

본 연구의 생물전환 기법에 사용된 *Bacillus siamensis* JD3-7균주(KACC 92346P)는 제주도 재래 간장에서 분리하였으며 Luria-bertani broth (LB, BD Biosciences, San Jose, CA,

USA) 배지를 사용하여 30 °C, 180 rpm 조건으로 16시간 동안 배양하였다. 이후 원심분리(4500 g, 15 min, 4 °C)하여 미생물 pellet을 수득하였으며, 잔여 배지를 제거하기 위하여 PG buffer (50 mM Phosphate buffer, 2% Glycerin)로 2회 세척하였다. 세척된 미생물 현탁액에 제주상사화 callus 건조 시료(LC)를 100 mg을 첨가하여 30 °C, 180 rpm 조건으로 72시간 동안 반응하였다. 이때 LC를 첨가한 biorenovation 반응물을 LCB, LC를 첨가하지 않은 pellet 현탁액을 대조군(BJ)으로 표기하였으며 반응 종료 후 원심분리(4500 g, 15 min, 4 °C)하여 얻어진 상등액을 동결건조기로 건조하여 실험에 사용하였다.

### Biorenovation 전환물의 HPLC 분석

LC, LCB 및 대조군인 BJ의 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 Spectro Monitor 3200 digital UV/Vis detector (228-42593-43, Shimadzu Scientific Instruments, Inc.)을 사용하였다. 이동상 용매로는 0.1%의 Trifluoroacetic acid (Samchun, Pyeongtaek, Korea)가 첨가된 H<sub>2</sub>O (Solvent A)와 acetonitrile (Solvent B, Sigma-Aldrich)를 사용하였으며 column 온도 40 °C, 유속 1.0 mL/min 조건하에 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

염증 모델로 사용된 mouse 유래 macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행에서 분양 받았으며 세포주의 배양에는 10% fetal bovine serum과 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA)에 첨가한 배지를 사용하였으며 CO<sub>2</sub> incubator (BB15 CO<sub>2</sub> incubator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 2일을 주기로 계대 배양하여 안정화한 뒤 실험에 사용하였다. 또한 본 실험에 사용된 LPS (L6529)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

### 세포 독성 측정

시료가 RAW264.7 세포의 생존에 미치는 영향을 조사하고자 살아있는 세포의 미토콘드리아에서 mitochondrial reductase에 의해 보라색의 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)을 형성하는 원리를 이용한 MTT assay를 수행하였다[19,20]. 24-well plate에 RAW 264.7 세포를 7.0×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 접종하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 전 배양한 후 시료(25, 50, 100 µg/mL)와 LPS (1 µg/mL)를 병용 처리하여 24시간 동안 배양한 후 세포에 MTT 시약을 첨가하여 incubator에서 3시간 동안 반응하였다. 이후 형성된 formazan blue를 500 µL의 DMSO로 용해한 뒤 100 µL를 96-well plate에 옮겨 microplate reader (Multiskan GO spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### NO 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 7.0×10<sup>4</sup> cells/well의 농도

로 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 전 배양한 후 LPS (1 µg/mL)와 세 시료(25, 50, 100 µg/mL)를 처리하여 24시간동안 염증을 유도하였다. 이후 96-well plate에 세포 배양 배지 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 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 7.0×10<sup>4</sup> cells/well 농도로 접종하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 전 배양한 후 LPS (1 µg/mL)와 LCB (25, 50, 100 µg/mL)를 처리하여 24시간 동안 염증을 유도하였다. 회수한 배양 배지는 원심 분리(15,928 g, 3 min) 동안 원심 분리하여 침전물을 제거한 후 PGE<sub>2</sub> 측정에 사용하였으며 배양 배지 내의 PGE<sub>2</sub>는 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (KGE004B, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

### Western blot analysis

단백질의 발현을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포를 6-well plate에 4×10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 접종한 뒤 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 전 배양한 다음 회석한 LCB (25, 50, 100 µg/mL)와 LPS (1 µg/mL)를 처리하여 동일한 조건에서 24시간 반응하였다. 이후 세포를 PBS로 2회 세척한 뒤 lysis buffer [1×RIPA (Biosesang, Seongnam, Korea), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL pepstatin, and 1 µg/mL leupeptin]를 첨가하여 40분 동안 lysis를 수행한 다음 원심 분리(4 °C, 15,928 g, 30 min)하여 회수한 상층액을 BCA kit (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 정량 하였다. 이후 20 µg의 단백질을 10% polyacrylamide를 함유한 10% SDS-PAGE gel에서 전기영동하여 분리한 뒤 poly-vinylidene difluoride (PVDF, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 전이하였다. 전이된 membrane은 5% skim milk (sol. TBST)에서 blocking한 다음 TBST로 10분간 3회 세척하여 1차 항체 iNOS antibody (AHP2399, 1:1,000, Bio-Rad), COX-2 antibody (100-401-226, 1:1,000, Rockland Immunochemicals, Inc., Pottstown, PA, USA), β-actin antibody clone AC-74 (VMA00048, 1:10,000, Sigma-Aldrich)와 4 °C에서 overnight하였다. 이후 membrane을 TBST로 10분간 3회 세척한 다음 1:10,000 비율로 회석한 2차 항체 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)와 실온에서 90분 동안 반응한 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 표기하였다.

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

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 7.0×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 전 배양한

후 LCB (25, 50, 100 µg/mL)와 LPS (1 µg/mL)를 처리하여 동일한 조건에서 24시간 반응하였다. 이후 배양 배지를 원심 분리(15,928 g, 3 min) 하여 침전물을 제거한 상등액에 존재하는 pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6, IL-1β)의 생성량을 측정하였으며 측정에는 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 이용하였다.

### 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였으며 그 결과는 평균값±표준편차로 나타났다. 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.

## 결과 및 고찰

### Biorenovation 전환물의 HPLC 분석

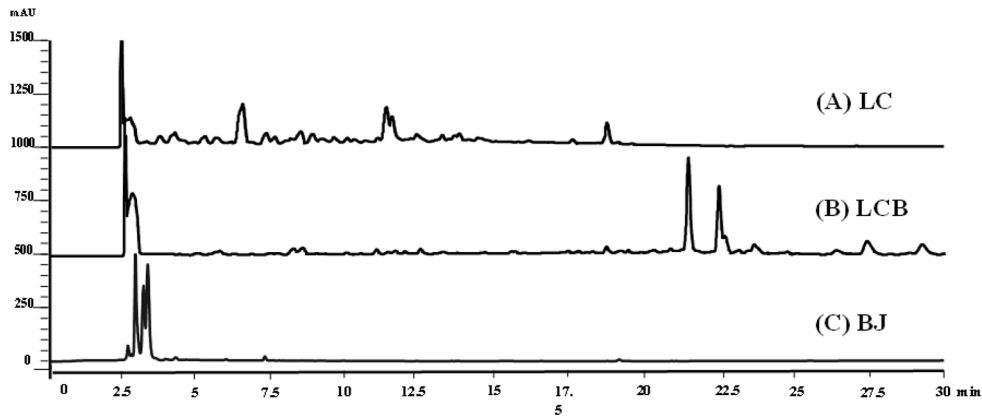
LC, LCB와 대조군인 BJ의 HPLC 분석을 진행한 결과, LCB의 20-25 min에서 기존 LC에서는 존재하지 않는 신규 peak를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이는 김 등의[21]에서 연구된 결과에서 볼 수 있듯 생물 전환 과정에서 생화학적 반응에 의해 추출물 내 존재하는 다양한 성분에서 구조적 변화가 유도되었을 가능성을 제시하며 분자의 생물학적, 물리적 특성은 서로 다른 작용기와 밀접한 관련이 있으므로 이러한 변화가 생리활성 변화로 이어질 수 있을 것으로 판단되어 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 항염증 효능을 평가하였다.

### 세포 독성 비교

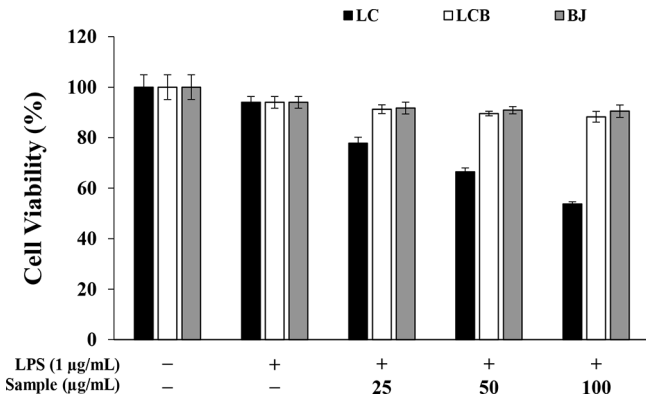
본 실험에서는 LC, LCB 및 BJ가 세포의 생존에 미치는 영향을 조사하고자 RAW 264.7 세포에 LPS (1 µg/mL)와 시료(25, 50, 100 µg/mL)를 병용처리하여 MTT assay를 수행하였다. 25, 50, 100 µg/mL 농도에서 LC를 처리한 세포의 생존율은 77.8, 66.4, 53.7%로 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보인 반면 LCB를 처리한 세포의 생존율은 91.4, 89.5, 88.3%로 LC보다 높은 세포 생존율이 확인되었다(Fig. 1). 세포 독성 비교 결과 LCB에서 LC 대비 개선된 세포생존율이 확인되었으므로 그 활용 가능성을 검토할 필요가 있다고 판단되어 NO assay, ELISA, western blot을 수행하였으며 LCB가 세포생존율에 영향을 미치지 않는 범위인 25, 50, 100 µg/mL 농도를 사용하여 실험을 진행하였다.

### NO 생성 억제 활성 비교

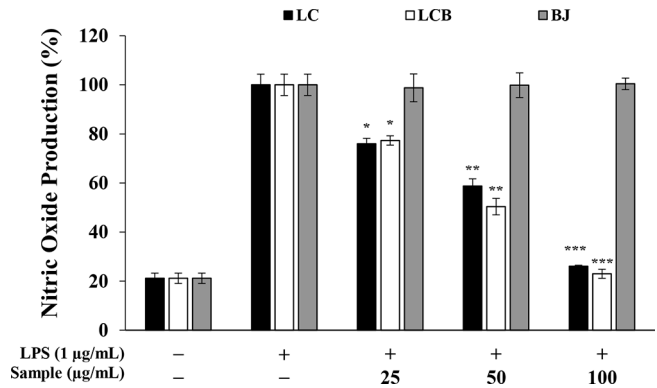
NO는 높은 반응성을 가진 free radical의 일종으로 혈관확장(vasodilation), 비선택적 숙주방어(nonspecific host defense) 등의 작용을 하지만 LPS 등과 같은 염증유발인자 및 암 발생인자에 의한 지속적인 과발현은 만성 염증(chronic inflammation), 천식(asthma), 퇴행성 뇌질환(neurodegenerative disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 관절염(arthritis), 암의 진행 및 악화 등을 유발한다[22]. 염증반응에서 대표적으로 사용되는 LPS의 병용 처리는 시료 처리에 대한 세포의 민감성을 증가시켜 세포 활성 여부의 판단을 용이하게 할 수 있으므로 LPS (1 µg/mL)



**Fig. 1** HPLC chromatogram of *Lycoris chejuensis* callus extract (LC), biorenovated *L. chejuensis* callus extract (LCB) and *Bacillus siamensis* JD3-7 (BJ). The chromatogram showed (A) LC (B) LCB and (C) BJ analyzed at a wavelength of 254 nm



**Fig. 2** Cell viability of LC, LCB and BJ in LPS-stimulated RAW 264.7 cell by the MTT assay. The production of cell viability was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 h in the presence of LC, LCB and BJ (25, 50 and 100 µg/mL). Result is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control (untreated cells)



**Fig. 3** Inhibitory effects of LC, LCB and BJ 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 LC, LCB and BJ (25, 50 and 100 µg/mL). 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, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

와 LCB (25, 50, 100 µg/mL)를 병용 처리한 뒤 생성된 NO의 양을 측정하였다. 그 결과, LC는 각 농도에서 NO의 생성을 24.0, 41.2, 74.0% 억제하였으며 LCB는 22.7, 49.6, 77.0% 억제하여 NO를 유사한 경향으로 억제하는 것으로 확인되었으나 Fig. 1에 의하면 LC의 활성은 세포독성에 의한 것으로 판단된다(Fig. 2). 또한 BJ를 처리한 세포에서는 NO의 감소 경향이 관찰되지 않았다.

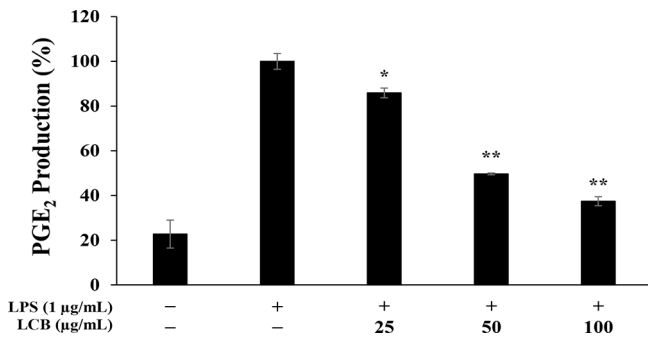
**PGE<sub>2</sub> 생성 억제 활성 비교**

이전 실험 결과로부터 LCB가 NO의 억제에 유효한 활성을 나타냈으므로 추가적인 실험을 진행하였다. PGE<sub>2</sub>는 염증이나, 혈소판 응집(platelet aggregation), 신경전달물질의 분비(neurotransmitter release) 등과 같이 생리적이거나 병리적인 체내 변화에 관여하는 prostaglandin의 하나로 혈관 확장, 부종, 발열, 동통 등을 매개하며 류마티스 관절염에서의 염증반응과 조직 파괴 기전에 중요한 역할을 한다[23]. 따라서 본 실험에서는 LPS로 자극한 RAW264.7 세포에 LCB를 25, 50, 100 µg/mL 농도로 처

리하여 PGE<sub>2</sub>의 생성에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 실험 결과 LCB는 평가된 농도 중 가장 저농도인 25 µg/mL부터 유효한 PGE<sub>2</sub>의 억제 활성을 보였으며 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

**iNOS 및 COX-2 발현 억제 활성 비교**

iNOS는 NO의 합성과 밀접한 연관이 있는 효소로 상피세포와 신경에 존재하는 eNOS와 nNOS에 의하여 소량 생성되는 NO는 혈관확장과 신경전달 등 정상적인 생리 기능을 조절하지만 염증반응 시 대식세포에서 유도되는 iNOS에 의하여 과량 생성되는 NO는 자가 면역 질환, 염증성 질환 및 폐혈증을 초래한다[24]. 또한, COX-2는 cyclooxygenase와 peroxidase 활성을 모두 가지고 있는 효소로 조직 내에서 일정하게 발현되는 cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-3와 달리 interleukin-1, TNF-α 및 LPS 등에 의해 macrophage나 monocyte 등의 세포에서만 과발



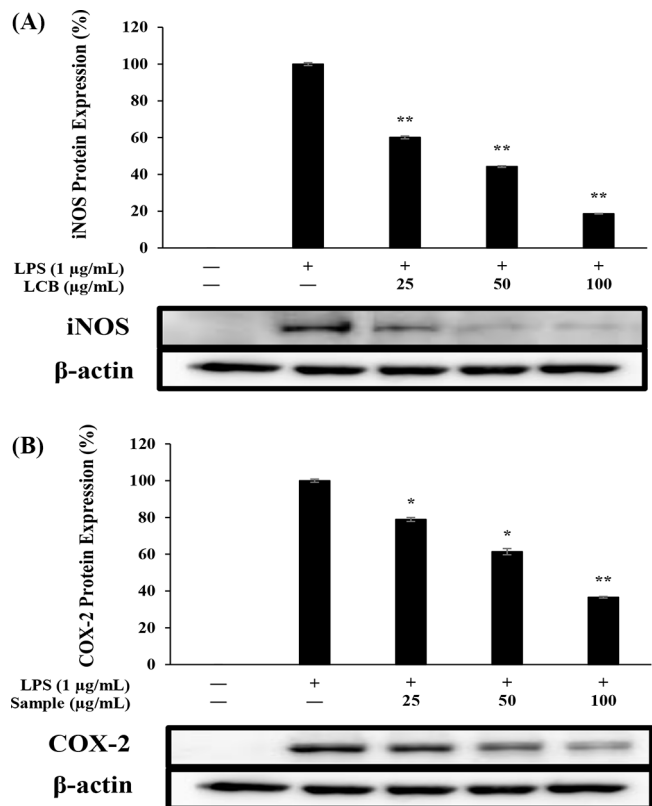
**Fig. 4** Inhibitory effects of LCB on PGE<sub>2</sub> production in RAW 264.7 cells. The production of PGE<sub>2</sub> was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 h in the presence of LCB (25, 50 and 100 µg/mL). The results are presented as the relative percentage 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

현되어 PGE<sub>2</sub>를 포함한 염증 관련 인자들의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다[25]. 따라서 염증반응에서 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성은 iNOS와 COX-2의 발현에 의해 조절되므로 iNOS 및 COX-2의 발현 억제를 통해 항염증 활성을 유도할 수 있다. LPS로 자극한 RAW264.7 세포에 LCB를 25, 50, 100 µg/mL 농도로 처리한 뒤 western blot을 수행한 결과, LCB는 LPS 단독 처리군과 비교하였을 때 iNOS와 COX-2의 발현이 모두 유의하게 억제되었으며 이들의 감소경향이 하위 인자인 NO와 PGE<sub>2</sub>의 감소 경향과 유사한 것으로 확인되었다(Fig. 4).

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

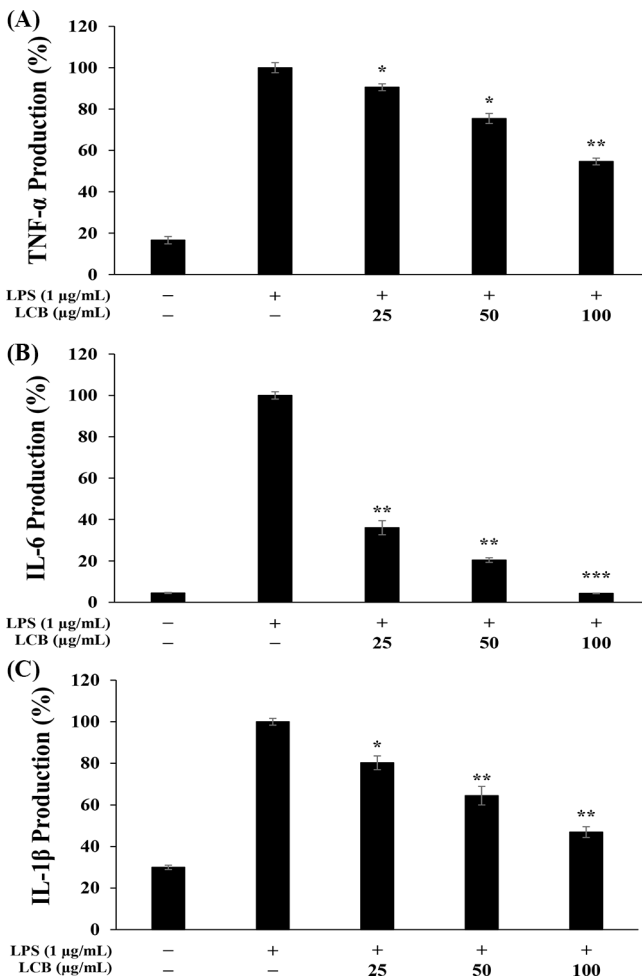
Proinflammatory cytokine은 염증에 중요한 역할을 하는 분자의 한 종류로, 염증 발생에 중요한 역할을 하며 광범위한 염증성 질환과 밀접한 관련이 있다. IL-6와 TNF-α는 대표적인 pro-inflammatory cytokine으로 급성 혹은 만성 염증 질환의 발생 및 진행 과정에서 중요한 역할을 하는 인자이며 IL-1β는 대식 세포를 활성화시키고 림프구 및 호중구의 내피세포 접착을 촉진시켜 chemokine의 생성을 유도함으로써 염증 부위에 염증세포의 침윤을 상승시킨다[26-29]. 이에 본 실험에서는 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 LCB가 TNF-α, IL-6, IL-1β의 발현에 미치는 영향을 조사하고자 실험을 진행하였다. 측정결과, LCB는 LPS인해 증가된 TNF-α 및 IL-1β, IL-6를 농도 의존적으로 유의하게 억제하였으며 특히 IL-6의 경우 가장 고농도인 100 µg/mL에서 LPS 무 처리군과 유사한 억제 수준이 관찰되었다(Fig. 5).

본 연구는 기존 제주상사화가 가진 제한적인 공급 문제를 극복하고 효율적 생산을 위해 식물 조직 배양 기술을 이용하였으며 조직 배양된 제주상사화 식물조직배양체(callus, LC)에 biorenovation을 적용하여 소재의 독성을 개선 및 기능성을 증진시키고자 하였다. 이에 biorenovation을 적용한 제주상사화 callus 추출물(LCB)이 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 염증 관련지표(NO, PGE<sub>2</sub>, iNOS, COX-2, TNF-α, IL-6, IL-1β)의 생성에 미치는 영향을 조사하였으며 측정 결과를 바탕으로



**Fig. 5** Inhibitory effects of LCB 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<sup>5</sup> cells/well) were pre-incubated for 24 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 ± standard deviation. The mean of each sample group was compared to the mean of the LPS-treated group, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01

항염증 소재로의 활용 가능성을 조사하였다. 실험 결과, LCB는 LC 대비 개선된 세포생존율을 보였으며 세포 독성이 나타나지 않는 농도에서 유의한 NO 및 PGE<sub>2</sub> 억제 활성을 보였다. 이후 수행된 western blot 결과, LCB를 처리한 RAW 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2의 발현이 모두 유의하게 감소하였으며 가장 저농도인 25 µg/mL에서는 COX-2와 비교하여 iNOS가 더욱 효과적으로 억제되는 것으로 확인되었다. 또한 이들의 감소경향이 각각 NO와 PGE<sub>2</sub>의 감소경향과 유사한 것으로 볼 때, LCB는 iNOS 및 COX-2의 발현 경로를 유의하게 억제함으로써 NO 및 PGE<sub>2</sub>의 발현을 효과적으로 하향 조절하는 것으로 판단된다. 뿐만 아니라 LCB는 pro-inflammatory cytokines인 TNF-α, IL-6, IL-1β의 발현을 모두 유의하게 억제하였으며 특히 가장 고농도인 100 µg/mL에서 IL-6의 발현을 정상 세포와 유사한 수준까지 억제하였다. 이러한 활성의 변화는 biorenovation이 LC 내 하이드록실기를 포함한 다양한 화합물을 대상으로 구조적인 변화를 유도한 결과로 판단되는데, 이전 연구에 따르면 biorenovation을 통해 생성된 fomononetin의 유도체 중 7번 탄소에 위치한 하이드록실기의 수소원자가 인산기로 치환된



**Fig. 6** Inhibitory effects of LCB on production of pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells. The production of (A) TNF- $\alpha$  (B) IL-6 and (C) IL-1 $\beta$  was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1  $\mu$ g/mL) for 24 h in the presence of LCB (25, 50 and 100  $\mu$ g/mL). 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

fomononetin-7-*O*-phosphate는 동일한 RAW264.7 염증모델에서 기존 화합물의 세포 독성을 개선하는 동시에 증가된 항염증 활성을 나타내었다[30]. 따라서, biorenovation 기법에 의해 LC에 포함된 lycorine, lycorine, lycoricidine, lycoricidinol, lycorenine, lycoramine 등 알칼로이드 및 다양한 화합물을 대상으로 선행 연구 결과와 유사한 구조적 수정이 발생하였을 가능성을 시사하며 이는 최종적으로 LCB의 독성 감소 또는 생리활성 증진으로 이어질 수 있다[31]. 결론적으로, 본 연구는 LCB가 LC 대비 개선된 세포생존율을 나타내는 동시에 우수한 항염증 활성을 나타낼 수 있음을 제안하며 식물 조직 배양 기술을 통한 callus의 계획적인 생산과 biorenovation의 적용은 고부가가치를 가진 소재를 원활하게 공급하기 위한 전략이 될 수 있을 것으로 기대한다. 향후 LCB가 산업적으로 더욱 가치 있는 소재로 사용되기 위하여 nuclear factor- $\kappa$ B, mitogen-activated protein

kinase등 세포 내 염증 관련 신호전달 경로와 유효성분에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 초 록

제주상사화(*Lycoris chejuensis*)는 우리나라에 자생하는 특산식물로 관상용으로의 가치가 높을 뿐만 아니라 다양한 약리성분을 함유하고 있어 약용적으로도 가치가 높은 식물이다. 그러나 종자번식이 이루어지지 않고 구근을 통해 번식이 이루어지며 소수의 개체가 자생하므로 산업적으로 활용하기에 어려움이 따른다. 따라서 본 연구는 식물의 종 특성을 벗어나 환경에 관계없이 대량화 할 수 있는 제주상사화 callus (LC)를 사용하였으며 미생물의 효소 작용을 이용하여 분자의 구조 수정을 유도하는 친환경 생물전환 기법인 biorenovation을 적용하여 활성을 증진시키고자 하였다. 이에 본 연구에서는 biorenovation 된 제주상사화 callus 추출물(LCB)의 항염증 활성을 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 평가하였으며 앞서 LC 및 LCB가 세포의 생존에 미치는 영향을 조사한 결과 25, 50, 100  $\mu$ g/mL 농도에서 LCB는 LC의 높은 세포독성을 감소하였음을 확인하였다. 또한 LCB는 세포 독성이 나타나지 않는 농도에서 nitric oxide 및 prostaglandin E<sub>2</sub>를 효과적으로 억제하였으며 이들의 합성 효소인 inducible NO synthase, cyclooxygenase-2의 발현을 유의하게 억제함으로써 NO 및 PGE<sub>2</sub>를 효과적으로 하향 조절함을 입증하였다. 뿐만 아니라 pro-inflammatory cytokines인 tumor necrosis factor- $\alpha$ 와 interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6의 발현 또한 유의하게 억제하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 통해 LCB가 다양한 염증 인자를 표적으로 하는 항염증 소재로 적용될 수 있음을 제안한다.

**Keywords** 바이오리노베이션 · 제주상사화(*Lycoris chejuensis*) · 캘러스 · 항염증

**감사의 글** 본 논문은 중소벤처기업부의 지역특화산업육성 +R&D 사업의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다(S3260105).

## References

- Terry G, Robert EP (2007) Pathology of inflammatory bowel disease. *Seminars in pediatric surgery*. 16 (3):154–163. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2007.04.005
- Medzhitov R (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140: 771–776. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.006
- Guo LY, Hung TM, Bae KH, Shin EM, Zhou HY, Hong YN, Kang SS, Kim HP, Kim YS (2008) Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *Eur J Pharmacol* 591(1–3): 293–299. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.06.074
- 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- $\kappa$ 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. *EJI* 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. *Endocr rev* 22(2): 153–183. doi: 10.1210/edrv.22.2.0428
7. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998) Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 97–120. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97
  8. Hla T, Sishop-Bailey D, Liu CH, Schaeffers HJ, Trifan OC (1999) Cyclooxygenase-1 and 2 isoenzymes. *Int J Biochem Cell Biol* 31(5): 551–557. doi: 10.1016/s1357-2725(98)00152-6
  9. Hata AN, Breyer RM (2004) Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & Therapeutics* 103(2): 147–166. doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.06.003
  10. Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051–3064. doi: 10.1096/fasebj.6.12.1381691
  11. 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
  12. Lala PK, Chakraborty C (2001) Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *Lancet Oncol* 2(3): 149–156. doi: 10.1016/s1470-2045(00)00256-4
  13. Kim MY (2004) A taxonomic review of Korean *Lycoris* (Amaryllidaceae). *Korean J Pl Taxon* 32(1): 9–26. doi: 10.11110/KJPT.2004.34.1.009
  14. Chun JK, Lee DG, Lee SH, Lee DH, Jeong BG, Lee HS, Kim SJ (2012) Alkaloids in methanolic extract of *Lycoris* species. *KJMCS* 12012.05a: 293–294
  15. Lee DG, Lee AY, Kim SJ, Jung YS, Lee DH, Cho EJ, Lee SH (2014) Antibacterial Phytosterols and Alkaloids from *Lycoris radiata*. *Nat Prod Sci* 20(2): 107–112
  16. Zhao D, Gu MY, Zhang LJ, Jeon HJ, Cho YB, Yang HO (2019) 7-Deoxy-trans-dihydronarciclasine Isolated from *Lycoris chejuensis* Inhibits Neuroinflammation in Experimental Models. *J Agric Food Chem* 67(35): 9796–9804. doi: 10.1021/acs.jafc.9b03307
  17. Lee KM, Park TJ, Jie EY, Kim SW, Han DH, Kim SY (2021) Melanogenesis Inhibitory Effects of *Phryma leptostachya* Callus using Biorenovation in B16F10 Melanoma Cells. *KSBB Journal* 36(1): 42–48. doi: 10.7841/ksbbj.2021.36.1.42
  18. Hong HH, Lee KM, Park TJ, Chi WJ, Kim SY (2021) Anti-inflammatory effect of *Distylium racemosum* leaf biorenovate extract in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages cells. *J Appl Biol Chem* 64(4): 375–382. doi: 10.3839/jabc.2021.051
  19. 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
  20. Morgan DML (1998) Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity. *Polyamine Protocols* 179–184. doi: 10.1385/0-89603-448-8:179
  21. 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. *Ind Eng Chem Res* 63: 255–261. doi: 10.1016/j.jiec.2018.02.023
  22. Manzi S, Wasko MC (2000) Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. *Ann Rheum Dis* 59(5): 321–325. doi: 10.1136/ard.59.5.321
  23. Ninnemann JL (1984) Prostaglandins in inflammation and disease. *Immunol Today* 5(6): 173–175. doi: 10.1016/0167-5699(84)90011-2
  24. Coleman JW (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 1(8): 1397–1406. doi: 10.1016/s1567-5769(01)00086-8
  25. Lee SH, Kwak CH, Lee SK, Ha SH, Park JY, Chung TW, Ha KT, Suh SJ, Chang YC, Chang HW, Lee YC, Kang BS, Magae JJ, Kim CH (2016) Anti-Inflammatory Effect of Ascochlorin in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells Is Accompanied With the Down-Regulation of iNOS, COX-2 and Proinflammatory Cytokines Through NF- $\kappa$ B, ERK1/2, and p38 Signaling Pathway. *J Cell Biochem* 117(4): 978–987. doi: 10.1002/jcb.25383
  26. Nilsson G, Svensson V, Nilsson K (1995) Constitutive and inducible cytokine mRNA expression in the human mast cell line HMC-1. *Scand J Immunol* 42(1): 76–81. doi: 10.1111/j.1365-3083.1995.tb03628.x
  27. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP (1998) The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med* 128(2): 127–137. doi: 10.7326/0003-4819-128-2-199801150-00009
  28. Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA (1992) Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science* 258(5090): 1957–1959. doi: 10.1126/science.1470922
  29. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 2002 26th ed Mosby London.
  30. Kim MS, Park JS, Chung YC, Jang SC, Hyun CG, Kim SY (2019) Anti-Inflammatory Effects of Formononetin 7-O-phosphate, a Novel Biorenovation Product, on LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells. *Molecules* 24(21): 3910. doi: 10.3390/molecules24213910
  31. Chen D, Cai J, Cheng J, Jing C, Yin J, Jiang J, Peng Z, Hao X (2015) Design, Synthesis and Structure-Activity Relationship Optimization of Lycorine Derivatives for HCV Inhibition. *Sci Rep* 5(1): 14972. doi: 10.1038/srep14972