

Anti-inflammation Activities of Cultured Products from Suspension Culture of *Aloe vera* Callus

Myung Uk Kim · Young Je Cho · Shin Young Lee*

Aloe vera Callus 현탁배양 생성물의 항염증 활성

김명욱 · 조영제 · 이신영*

Received: 17 April 2013 / Accepted: 16 May 2013 / Published Online: 30 September 2013
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2013

Abstract Cultured products (callus and exopolysaccharide) were obtained from suspension culture of *Aloe vera* callus, and the extracts of callus were further prepared with cold water or 60% ethanol solution. The ethanol extract of callus (AC) and exopolysaccharide (ACP) of 10 mg/mL exhibited the relatively higher suppression activity of 43.2-52.1% against hyaluronidase activity. Thus, their anti-inflammatory effects were further investigated using animal cell (Raw 264.7) *in vitro*. Though AC shows a slight suppression effect of cell survival rate (97%) using MTT assay in the presence of 400 µg/mL AC- dimethyl sulfoxide (DMSO), cell growth promotion was observed in the other samples of lower levels. It indicates that the ethanol extract of Aloe callus rarely affect cell survival rate in the ranges (200–400 µg/mL) used in the study. Using Griess reagent, the suppression of NO production by the aloe callus extract was analyzed by measuring the amount of the nitrite produced in Raw 264.7 culture activated by lipopolysaccharide (LPS). As a result, supplementation of AC-distilled water (DW) and AC-DMSO produced higher levels of NO than the positive control LPS. However, the NO suppression effect by ACP-DW was so intense

that lower amount (80–100 µg/mL) suppressed NO production to the level of the control. The effect was attributed to the expression of the iNOS. Then, Raw 264.7 cells were stimulated with the LPS and expression of COX-2 protein level was analyzed depending on the Aloe suspension culture product treatment. The results showed that the ACP-DW supplemented medium did not express COX-2 by itself, and LPS stimulated COX-2 expression was slightly decreased. On the other hand, realtime-PCR analysis of the expression of inflammatory cytokine showed that IL-1β and TNF-α expression was highly suppressed in the ACP- distilled water supplemented medium.

Keywords *Aloe vera* callus · anti-inflammation activity · cultured products · extracts · suspension culture

서 론

Aloe vera 잎은 다당류(Mw: 10⁴–10⁶ D), 단당류, 리그닌, 안트라퀴논, 사포닌, 무기질, 광물질, 비타민, 효소, 아미노산 및 지베렐린 등과 같은 200여종의 광범위한 범위의 성분을 함유하고 있으며(Grindlay과 Reynolds, 1986; Reynolds과 Dweck, 1999), *Aloe vera*의 잎은 외부의 녹색 외피(skin)와 내부의 투명 펄프(gel)의 두 부분으로 구성되므로 그 성분도 크게 겔(gel) 화합물과 삼출(exudate) 화합물로 나눌 수 있다(Roderiguez 등, 2010). Park 등(1998)은 *Aloe vera*와 *Aloe arborescens* 중에서 13종의 페놀성 화합물을 분석하였으며, *Aloe vera*에서 aloesin, 8-C-glucosyl-7-O-methyl-(S)-aloesol, neoaloesin A, 8-O-methyl-7-hydroxyaloin A 및 B, 10-hydroxy-aloin A, isoaloeresin D, aloin A 및 B, aloeresin E 및 aloe-emodin 등, 11종을 동정하였다. 이들 페놀성 화합물들은 하제, 항균, 항암 및 항산화제를 포함

M.U. Kim
Gyeongbuk Institute for Marine Bioindustry, Ulljin 767-813, Republic of Korea

Y.J. Cho
School of Food Science & Biotechnology / Food & Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 702-701, , Republic of Korea

S.Y. Lee
Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, , Republic of Korea

*Corresponding author (S.Y. Lee: sylee@kangwon.ac.kr)

한 많은 의약적 활성을 나타내는데, 하제작용이 강하고 제품을 적색-갈색-흑갈색으로 정색시키며, DNA 손상 및 발암제로 작용하므로 *Aloe vera*의 경우 내복용으로는 바람직하지 못한 것으로 인식되었다(Lachenmeier 등, 2005).

최근 이들 페놀성 화합물의 항산화능이 우수한 것으로 알려져 이에 대한 연구들이 이루어졌다(Lee 등, 2000; Hu 등, 2003, 2005; Zhang 등, 2006; Waszkiewicz-Robak 등, 2007; Rajendran 등, 2007; Miladi과 Damak, 2008). 특히, Lee 등 (2000)은 *Aloe vera*로부터의 페놀성 성분이 쥐의 간 및 뇌에서 지질과산화에 미치는 영향을 검토한 결과 강력한 항산화 효과를 갖는다고 보고하였다. 또, α -tocopherol과 비슷한 항산화 활성을 나타내며, 그 성분은 8-C- β -D-[2-O-(E)-coumaroyl] glucopyranosyl-2-[2-hydroxy]-propyl-7-methoxy-5-methyl-chromone이라고 하였다. 분자량이 작은 페놀성화합물은 항염증활성 효과가 우수한 반면, 분자량이 큰 것은 면역작용이 뛰어난 효과를 갖는다(Agarwala, 1997; Pugh 등, 2001). 이들 중간의 것은 세포내 항산화 및 유리라디칼 소거제로 동맥경화, 심혈관질환 및 파킨슨병의 치료에 중요하다(Davis, 1987, 1989). 또, 알로에 겔의 다당은 부분적으로 아세틸화되어 있는데,, 생 알로에 겔의 thick stringy mucilage 특성은 아세틸화된 glucomannan에 기인한다고 보고되었다(Meadows, 1980).

Yagi 등(1982)은 bradykinin의 분해와 angiotensin의 활성화로 통증과 염증을 감소시킬 수 있는 antibradykinin활성을 *Aloe saponaria*에서 발견하였고, Fugita 등(1976)도 *Aloe arborescens*에서 bradykininase와 carboxylpeptidase 활성을 보고하였다. 한편, Raine 등(1980), Heggers와 Robson (1985)은 *Aloe vera*가 antiprostaglandin 효과를 갖는다고 보고하였으며, prostaglandin과 thromboxane은 손상조직에서 장기적 염증반응에 포함되는 화합물로 혈관수축, 열 및 통증의 촉진을 포함한 많은 생리적 효과를 나타내며 면역반응에도 영향을 주며, *Aloe vera* 겔은 arachidonic acid로부터 prostaglandin의 합성을 저해함이 밝혀졌다. Penneys (1982)는 활성약제에 대한 담체기제로서 사용된 많은 운반체 성분에 의하여 *Aloe vera*가 생체외에서 arachidonic acid의 산화를 저해한다고 하였다. 또한 *Aloe vera*의 상처치료와 항염증 효과에 의한 진통효과를 조사한 결과에서는 *Aloe vera*가 진통의 저해제로서 효과적이었으며, acetylsalicylic acid에 부가해서 강력한 혈관 팽창제이며 통증전달의 중요 전달체인 조직호르몬 bradykinin의 저해제인 bradykininase를 제공하며, 알로에는 비 스테로이드로 항부종, 항염증 및 향상된 치료적 성질을 갖고 있다고 하였다.

Davis (1993)의 연구보고에 의하면 알로에는 상처치료, 머스타드 유도부종에 효과적이며, 상처치료에 현저한 효과를 보이며, *Aloe vera*는 prostaglandin 합성을 방해하는 acetylsalicylate를 함유하므로 항염증 및 antiedemic 활성을 나타내고, acetylsalicylate는 부분적으로 진통 효과를 나타내는 역할을 수행한다고 하였다. Prostaglandin은 물리적 손상 후에 부정적 효과를 가지며 화학 주성(chemotactic) 활성을 갖는데, *Aloe vera*에서 많이 언급된 생물학적 활성은 prostaglandin의 결정적 영향을 극복하여 상처치료를 촉진시키는데 도움을 준다고 볼 수 있다.

이상에서 살펴본 바와 같이, 알로에의 겔 및 추출물 성분들은 항염증, 항산화, 항노화, 항암 및 면역증강 등을 포함한 많은 의약적 활성을 나타내므로 그 동안 *Aloe vera*는 건강식품, 화장품 및 민간약으로 매우 널리 사용되어 왔다. 이러한 알로에의 약리적 성분은 200여 종의 많은 화합물로 구성되어 있

으며, 대표적 성분은 glucomannan 등의 다당과 anthraquinone 등의 페놀성 화합물이며, 항염증, 항산화, 항노화, 항암 및 면역증강 등을 포함한 많은 의약적 활성을 나타내고 있다(Zhang 등, 2006).

Kim 등(2012a, 2012b)은 알로에 품질 및 치료적 성질의 지표성분인 다당의 효율적 생산연구 일환으로 *Aloe vera*의 callus를 유도하였고, callus 현탁배양에 의한 세포의 다량생산 및 최적화를 수행한 바 있다. 본 실험에서는 알로에 callus의 현탁배양에 의해 얻은 세포의 다당성분을 함유한 aloe callus 현탁배양 생성물과 aloe callus 용매 추출물의 생물학적 활성 중 염증 억제 효과에 대하여 알아보았다.

재료 및 방법

재료. 본 실험의 재료는 최적배지 및 배양조건에서 얻은 *Aloe vera* callus의 현탁배양 생성물, 즉, callus 및 세포의 다당이며(Kim 등, 2012a; 2012b), 동결건조하여 분말상태로 4°C의 저온실에 보존하면서 실험에 사용하였다. 생물활성 측정에 사용된 설취류 대식세포인 Raw 264.7 세포는 American Type Culture Collection (USA)으로부터 구입하였으며, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)과 penicillin streptomycin은 Invitrogen (USA)으로부터, 소의 태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Thermo Scientific Hyclone (USA)사에서, Reverse transcription-PCR kit은 Takara (Japan)에서 구입하여 사용하였다. COX-2 항체는 Cayman (USA)사로부터, 그리고 iNOS 항체는 Santa Cruz (USA)사로부터 구입하였다. *Escherichiacoli* LPS (0111:B4), MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 및 기타 시약은 Sigma-Aldrich (USA)사로부터 구입하였다.

Callus 추출물 및 현탁 배양 생성물의 조제. *Aloe vera* callus의 추출은 용매로서 냉수와 에탄올을 이용하여 추출하였다. 즉, callus의 건조분말 시료 20 g을 cold water 및 60% ethanol 용액 200 mL에서 각각 2시간 동안 2회 반복 추출하였다. 추출액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리(Super 25 K, Hanil Science Co., Ltd., Korea)하였으며, 상정액을 회전진공농축기(Eyela Co., N-N Series, Japan)로 70°C에서 1/3 정도로 농축하였다. 이를 동결건조(Ilshin Lab. Co., 0.5 torr, 72 h)하고 밀봉하여 desiccator에 보관하였고 실험 시 증류수에 녹여서 사용하였다. 동결건조하여 얻은 추출분말 각 시료(callus 추출물 및 세포의 다당)는 증류수 또는 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 녹여 일정 농도(200–400 μ g/mL)로 희석한 다음 4°C에서 12시간 교반하였으며, 이를 실온에서 원심분리(3000 rpm, 10 min)한 후 상정액을 회수하여 생물활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.

항염증 활성 측정. 항염증 활성은 Ovine tests를 이용하여 hyaluronidase (HAase) 저해활성을 측정하였다(Shashidhara 등, 1983). Hyaluronidase (EC 3.2.1.35, Sigma, USA) 0.5 mL (7,900 units/mL)과 시료 0.5 mL (10 mg/mL)을 38°C에서 5분간 반응 후 hyaluronic acid (HA)를 인산완충용액에 4 mg/mL로 녹인 기질을 0.5 mL 첨가 후 45분간 38°C에서 반응시킨 다음 5 mL의 알부민 용액을 첨가하여 5분간 방냉시켰으며, 600 nm에서 투과도를 측정하고 다음과 같이 제해율을 산출하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \left(\frac{\text{시료의 투과도}}{\text{대조구 투과도}} \right) \times 100$$

Table 1 Primer sets for detecting IL-1 β , TNF- α and β -actin

	Primer(F/R)	Size (bp)
IL-1 β	5'-GAA GCT GTG GCA GCTACC TGT GTC T-3' 5'-CTC TGC TTG TGA GGT GCT GAT GTA C-3'	523
TNF- α	5'-TTC TGT CTA CTG AAC TTC GGG GTG ATC GGT CC-3' 5'-GTA TGA GAT AGC AAA TCG GCT GAC GGT GTG GG-3'	355
β -actin	5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3' 5'-CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT-3'	509

세포독성 실험. Raw 264.7 세포는 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂배양기에서 배양하였고 매일 계대 배양하였다. 배양된 세포는 35 mm petri-dish 또는 6-well plate에서 일정량 분주하여 실험하였다. 96-well plate에 세포를 분주하고 여러 농도(200–400 μ g/mL)의 시료 용액을 배지에 1시간 전처리한 후 LPS (10 ng/mL)로 처리하였다. 24시간이 지난 후 배지를 제거하고 새로운 배지 200 μ L에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-zolium bromide (MTT) 시약 (0.5–1 mg/mL 범위)을 50 μ L 처리 하여 1–4시간 동안 반응시켰다. 그리고 MTT 시약이 들어간 배지를 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO)를 200 μ L 분주하여 well에 생성된 formazin이 모두 녹을 수 있도록 약간 흔들어 준 다음 ELISA reader (Bio-Tek Instruments, Inc, Belgium)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide 생성량의 측정. Raw 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 35 mm petri-dish에 동일한 세포 수를 분주하고 적정시간 시약을 처리하였다. 24시간 후 세포 배양액을 회수하여 시료로 사용하였다. 시료 100 μ L를 96-well immuno plate에 첨가하고 여기에 Griess 용액 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride (N-NED), 2% phosphoric acid) 100 μ L를 첨가하여 10분 동안 반응시킨 후 550 nm에서 ELISA reader (Bio-Tek Instruments, Inc, Belgium)로 흡광도를 측정하였다. Nitric oxide의 생성량은 1 mM NaNO₂를 기준으로 하여 확인 하였다.

Total cell lysate 및 전기영동. ϕ 35 mm petri-dish에 동일한 세포 수를 분주하고, 24시간 후 세포를 PBS로 수세하고 4°C, 700 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 수확하였다. 수확한 세포는 각종 단백질 분해효소 저해제가 함유된 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA, 10 mM NaF)로 용해한 다음, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취하여 세포질 분획을 얻었다. 세포질 분획에 함유된 단백질을 측정하고 그 중 일부를 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동으로 단백질을 분자량 순으로 분리하였다.

Western blot 분석. 전기영동을 통하여 분리한 단백질은 20% 메탄올, 25 mM Tris, 192 mM glycine이 포함된 완충액을 사용하여 nitrocellulose 막으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 막은 Ponceau 용액으로 이동유무를 확인한 후, 5% non-fat dry milk 용액으로 30분간 실온에서 반응하여 차단하였다. 그리고 차단용 완충액으로 희석한 1차 항체와 막을 4시간 이상 반응하였다. 반응이 끝난 후 Tris-tween buffered saline (TTBS)을 사용하여 5분 간격으로 6회 세척하였다. 계속하여 horseradish

peroxidase가 부착된 2차 항체와 반응시키고, 다시 한번 TTBS로 6회 세척하였다. 세척이 끝나면 증류수로 세척하고 ECL 용액으로 2분간 반응하고 kodak 필름에 감광하여 나타난 band의 두께를 비교하여 단백질 발현유무 및 그 차이를 확인하였다.

Total RNA 분리. 세포를 35 mm petri-dish에 분주하고 천연물을 전처리 후 LPS를 처리하여 일정시간 반응시켰다. 그리고 세포를 수확하고 인산완충용액 (phosphate buffered saline, PBS)으로 수세한 다음 TRI-reagent (phenol, guanidine thiocyanate)로 세포를 용해하였다. 용해된 세포에 chloroform을 첨가하고 잘 섞은 다음, 실온에서 10분간 방치하였다. 방치한 total cell lysate를 원심분리하여 상층액을 취하고 동일한 양의 isopropanol을 첨가하여 RNA를 분리한 후 75% ethanol로 RNA를 수세하여 diethyl pyrocarbonate (DEPC)-water로 RNA를 용해시켰다.

역전사-중합효소 연쇄 반응 (RT-PCR). 분리한 total RNA를 사용하여 RT-PCR을 행하였다. cDNA 합성을 위하여 분리한 RNA에 25 mM MgCl₂, dNTP, RNase inhibitor, MMLVRT, Randomhexamers를 PCR buffer와 혼합하여 thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA)에서 역전사시켜 cDNA를 확보하였다. PCR을 위하여 50–58°C 합성온도에서 AmpliTaq DNA polymerase (5 U/ μ L)와 각각의 primer를 이용하여 thermocycler에서 23–45 cycle을 수행한 후 PCR 산물을 획득하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였고, control은 β -actin의 primer를 이용하여 동일 조건으로 PCR을 수행하여 확인하였다. 각각의 유전자 발현을 확인하기 위하여 primer는 Table 1과 같이 제작하였다.

결과 및 고찰

Hyaluronidase의 저해활성. 현탁배양 생성물의 피부염증 억제 효과를 확인하기 위하여 hyaluronidase에 대한 저해효과를 조사하였다. Callus의 물 및 60% 에탄올 추출물과 세포의 다당 시료의 hyaluronidase 저해활성을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같이 callus 60% 에탄올 추출물(10 mg/mL)이 가장 높은 52.1%의 저해활성을 나타내었으며 세포의 다당류에서도 43.2%의 효과가 확인되었다.

식물에서는 flavonoid, hydrogenol, tannin 등이 hyaluronidase 저해활성을 나타내며, Choi 등(2003)은 40여 종의 생약재 에탄올 추출물의 검색결과, 1 mg/mL 농도에서 황기, 두충, 오미자, 오가피, 목과, 목단피, 산사 등이 50% 이상의 높은 저해활성을 나타낸다고 보고하였다. 이상과 같이 *in vitro* 상태에서 hyaluronidase의 저해활성이 확인됨으로서 항염증활성이 있음을 확인하였으므로, 이하에서는 *in vitro* 세포를 이용한 항염증 활성의 작용 여부를 알아보기 위하여 macrophage culture를 통하

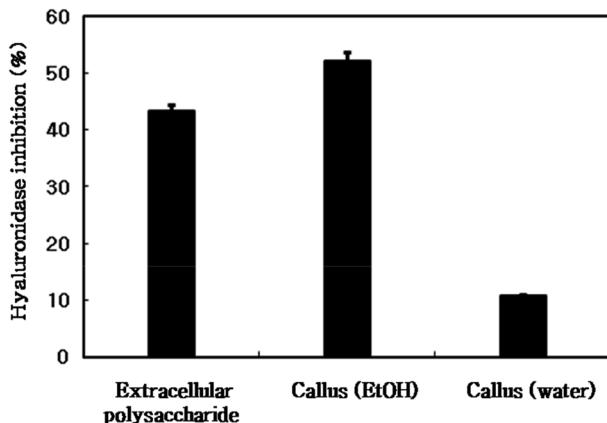


Fig. 1 Inhibitory activity of the suspension cultured products from *Aloe vera* callus on hyaluronidase.

여, 본 시료의 cell viability, NO 생성 및 cytokine 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

세포독성 검정. *In vitro* 세포를 이용한 항염증 효과 평가에 앞서 알로에 callus와 배양생성물에 대한 세포 생존율을 알아보기 위하여 현탁배양으로 얻은 callus의 냉수 및 EtOH 추출물 분획물과 세포의 다당(배양생성물)을 20–400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 첨가하여 MTT assay하여 세포생존율을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다. 대식세포에 대한 세포독성은 세포만 배양한 대조구의 세포생존율을 100%로 보았을 때 aloe callus의 dimethyl sulfoxide 추출물 (AC-DMSO) 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가구에서 97%로 미미한 증식저해를 보였으나 나머지 시료 처리구는 모두 증식 촉진효과를 나타내었다. Aloe callus의 증류수 추출물 (AC-DW) 처리구는 농도에 따라 123–136%, extracellular polysaccharide의 증류수 추출물 (ACP-DW) 처리구는 103–127%의 증식 촉진효과를 보였다. 특히 AC-DMSO 처리구는 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 미만에서는 149–181%의 증식을 향상시키는 특징을 보였다. *Aloe vera*의 세포증식에 관해서는 알로에의 당단백질인 verectin (MW; 29000, $pI=6.8$, 당:단백질=10.7:80.0)의 경우 인체상피세포에 대해 증식활성을 나타내는 것으로 보고되었다. 또 저분자 물질인 aloesin 이 인체 간의 SK Hep-1 세포의 DNA 합성을 농도 의존적으로 증가시킨다고 보고되었다(Yagi and Takeo, 2003).

한편, Sarkar 등(2005)은 알로에의 내부겔을 제거한 잎의 삼출물(exudate)이 마우스 복강 대식세포의 세포독성을 조사한 결과 0.1 mg/mL의 농도까지는 세포독성이 없었으며, 0.25 mg/mL 이상의 농도에서 현저한 세포독성을 나타낸다고 하였다. 따라서 aloe callus의 현탁배양 생성물은 세포독성이 거의 없는 특징을 보였다. 아울러, 사용농도 범위에서 세포의 생존율에 영향을 주지 않았으므로 이하의 항염증 실험에서 시료 첨가구의 항염증 효과는 세포의 사멸에 따른 세포염증성 매개물질의 생성억제가 아닌 시료 추출물에 유래한 고유한 효과인 것으로 해석할 수 있었다.

NO 생성 및 iNOS 발현에 미치는 영향. 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성균의 세포외막에 존재하며, Raw 264.7 세포와 같은 macrophage 또는 monocyte에서 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 proinflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 염증매개 물질의 형성은 NO 생성의 증가 및 phospholipase A2의 활성을 촉진시켜 prostaglandin (PG) 합성을 유도한다.

LPS로 활성화된 macrophage cell 모델은 여러 물질의 항염증 효과를 평가하는데 널리 이용되므로 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 세포 배양액의 알로에 추출물 처리에 따른 NO 생성저해 효과를 조사하였다. 그 결과, Fig. 3에서와 같이 NO 생성은 AC-DW와 AC-DMSO는 오히려 양성대조구인 LPS 단독보다 더 많은 NO를 생성하였고, 특히 AC-DW는 단독처리로도 NO 생성을 촉진하였다(Fig. 3A와 3B). 하지만 세포의 다당 분획인 ACP-DW는 Fig. 3C에서와 같이 NO 생성을 강력히 억제하여 80–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 저농도 첨가로 대조구 수준까지 억제하였다.

알로에 잎의 껍질 삼출물의 경우는 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 의 농도에서 murine macrophage에서 NO 생산을 43.64% 감소시켰다고 보고된 바 있어(Sarkar 등, 2005), 본 실험의 callus는 알로에 껍질의 성분과는 차이가 있는 것으로 추측되었다.

NO는 NOS 중 Type II인 유도형 NOS (iNOS)에 의해 주로 생성되므로 iNOS mRNA의 발현정도를 western blotting으로 조사한 결과 Fig. 4A와 4B에서와 같이 AC-DW와 AC-DMSO는 iNOS mRNA의 발현을 오히려 증가시켰다. 하지만 ACP-DW는 Fig. 4C에서와 같이 iNOS mRNA 발현을 억제하였으며, 특히 LPS 유도 없이 단독 처리한 경우에도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 iNOS mRNA의 발현을 강력히 억제하는 특징을 나타

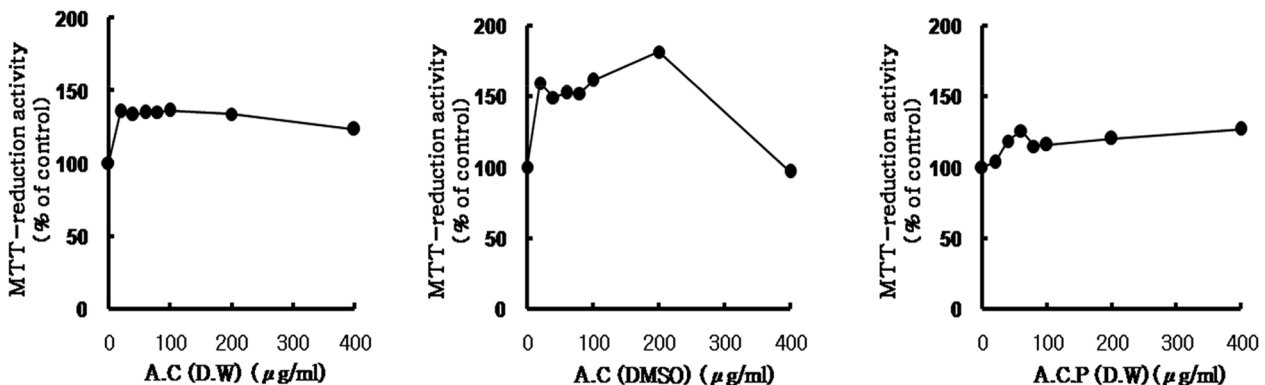


Fig. 2 Cytotoxic effect of the suspension cultured products of *Aloe vera* callus in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 20–400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations of cultured products dissolved in DW (AC and ACP) or DMSO (AC) for 1h prior to the addition of LPS (10 ng/mL), and the cells were further incubated for 24 h (A-C). Control cells were incubated with vehicle alone. The cell cytotoxic effect was measured by MTT assay.

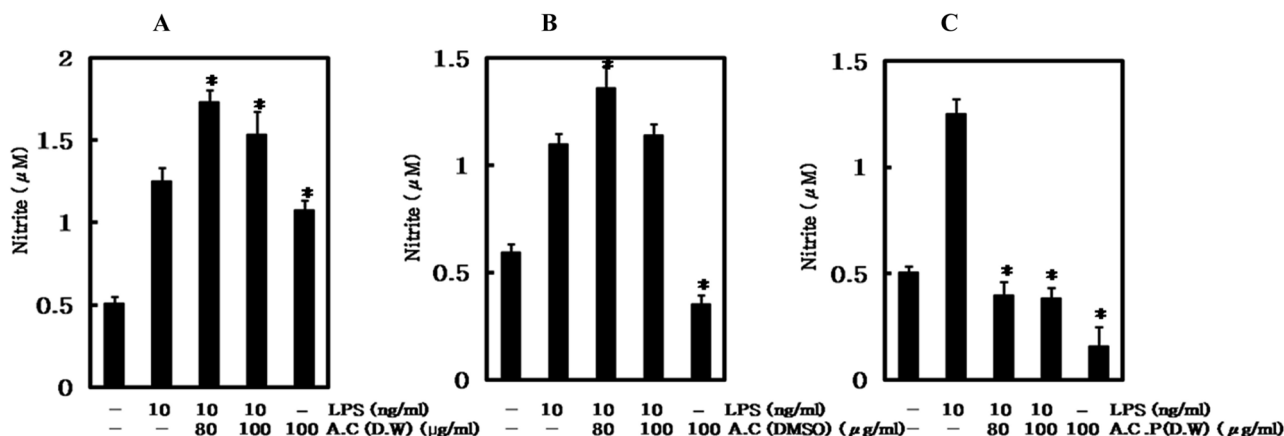


Fig. 3 Effect of the suspension cultured products of *Aloe vera* callus on NO production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were preincubated with different concentrations of the Aloe cultured products for 1 h prior to the addition of LPS (10 ng/mL), and the cells were further incubated for 24 h. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the experimental procedures (A-C). *Significantly different at $p < 0.05$ compared with LPS treatment.

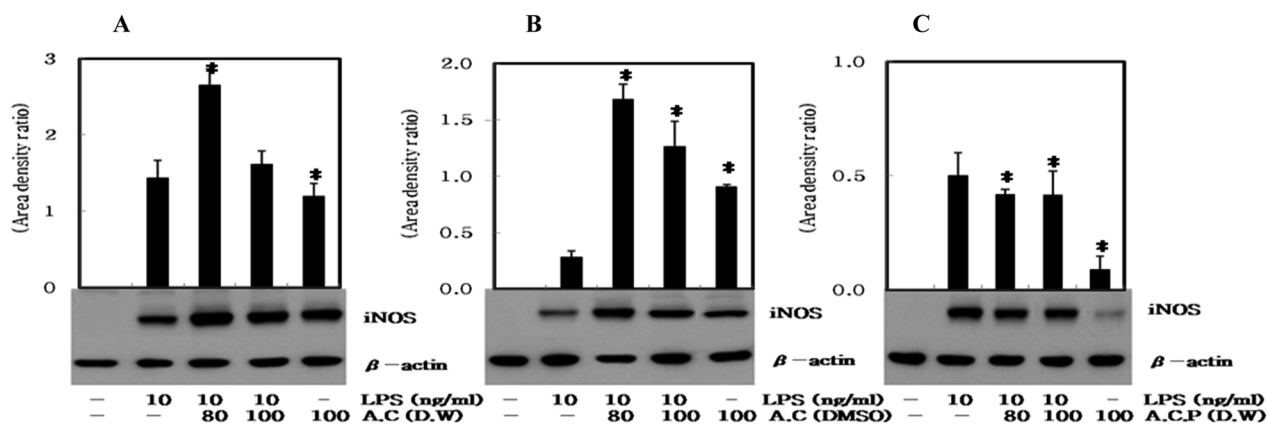


Fig. 4 Effect of the suspension cultured products of *Aloe vera* callus on iNOS expression in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were preincubated with different concentrations of the Aloe cultured products for 1 h prior to the addition of LPS (10 ng/mL), and the cells were further incubated for 24 h. The iNOS expression was determined by western blotting using anti-iNOS antibodies (A-C). *Significantly different at $p < 0.05$ compared with LPS treatment.

내었다. 따라서 현탁배양의 세포의 다당분획이 NO 생성을 억제하며, 이는 iNOS mRNA의 발현에 의한 것으로 판단하였다. Park 등(2009)은 aloe의 aloe-emodin과 aloin이 5-40 µM 농도에서 농도 의존적으로 NO 생성 및 iNOS mRNA의 발현을 억제한다고 보고하였다.

알로에 현탁배양 생성물의 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향.

Prostaglandin은 염증관련 매개체이며, COX-2는 prooxidant나 LPS 등의 염증성 자극에 의해 NFκB의 활성화를 경유하여 생성되어 prostglandin의 합성을 증가시켜서 염증반응을 매개한다. 따라서 Raw 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고 알로에 현탁배양 생성물의 처리에 따른 COX-2 단백질의 발현정도를 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 5에서와 같이 Raw 264.7 세포를 LPS로 처리하여 자극을 주었을 때 COX-2 단백질이 강하게 유도되었다. LPS에 AC-DW와 AC-DMSO를 80 및 100 µg/mL 첨가하여 처리한 실험구에서는 Fig. 5A와 5B에서와 같이 COX-2 단백질의 발현이 증가되어 대식세포를 더 자극하고 오히려 염증반응을 증가시키는 것으로 나타났으며, LPS 자극이 없는 단독처리만으로도 COX-2 단백질을 발현시켰다. 반면, ACP-DW

처리구는 Fig. 5C에서와 같이 단독으로 COX-2 단백질을 발현시키지 않아 자체적으로 염증유발반응에 직접 참여하지 않음을 보였으며, LPS 자극에 따른 COX-2의 발현감소는 미미하였다.

Cho 등(2006)은 *Aloe vera* 및 *arborescens*의 현탁액 및 여과한 청징액이 phosphatidic acid (PA)로 염증을 유발한 Raw 264.7 세포에서 COX-2의 발현을 억제한다고 보고하였다. 또, 최근 Park 등(2009)도 aloe emodin이 40 µM 농도에서 COX-2 mRNA의 수준을 감소시킨다고 보고하여 본 실험도 이와 유사한 결과를 나타내었다.

염증 사이토카인 생성에 미치는 aloe callus 현탁배양 생성물의 영향.

IL-1β 및 TNF-α는 macrophage 등에서 분비되는 proinflammatory cytokine으로 만성 염증성 반응과 관련된다. 따라서 aloe callus의 현탁배양 생성물이 활성화된 대식세포로부터 생성된 이러한 염증 사이토카인을 억제할 수 있는지를 조사하기 위해서 IL-1β와 TNF-α의 발현량을 RT-PCR로 조사하였으며, 그 결과를 각각 Fig. 6 및 7에 나타내었다.

LPS 자극에 의해 Raw 264.7 세포에서 IL-1β 및 TNF-α의 발현이 각각 강력히 유도되었음이 관찰되었다. 알로에 현탁배양

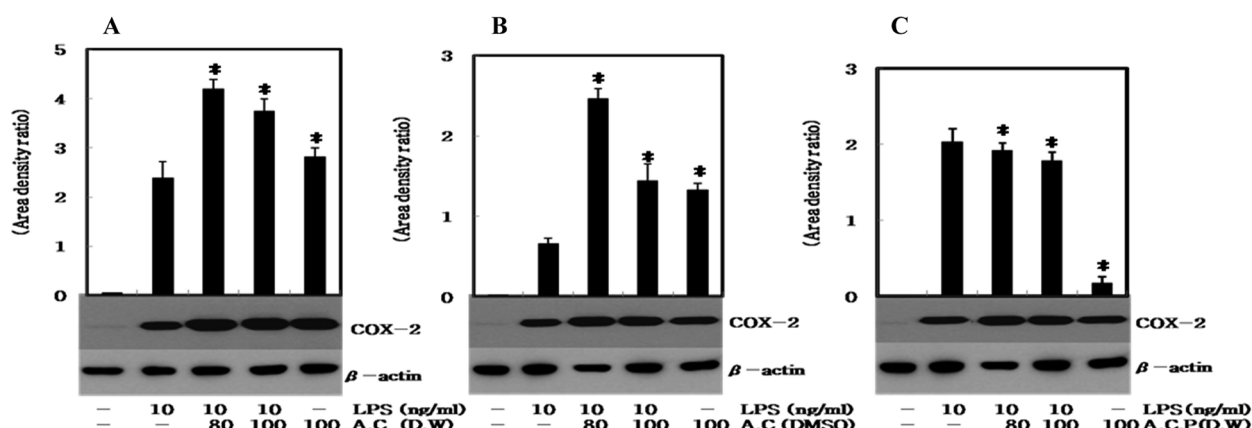


Fig. 5 Effect of the suspension cultured products of *Aloe vera* callus on LPS-induced COX-2 expression in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were preincubated with different concentrations of the Aloe extract for 1h prior to the addition of LPS (10 ng/mL), and the cells were further incubated for 24 h. The COX-2 expression was determined by western blotting using anti-COX-2 antibodies (A-C). *Significantly different at $p < 0.05$ compared with LPS treatment.

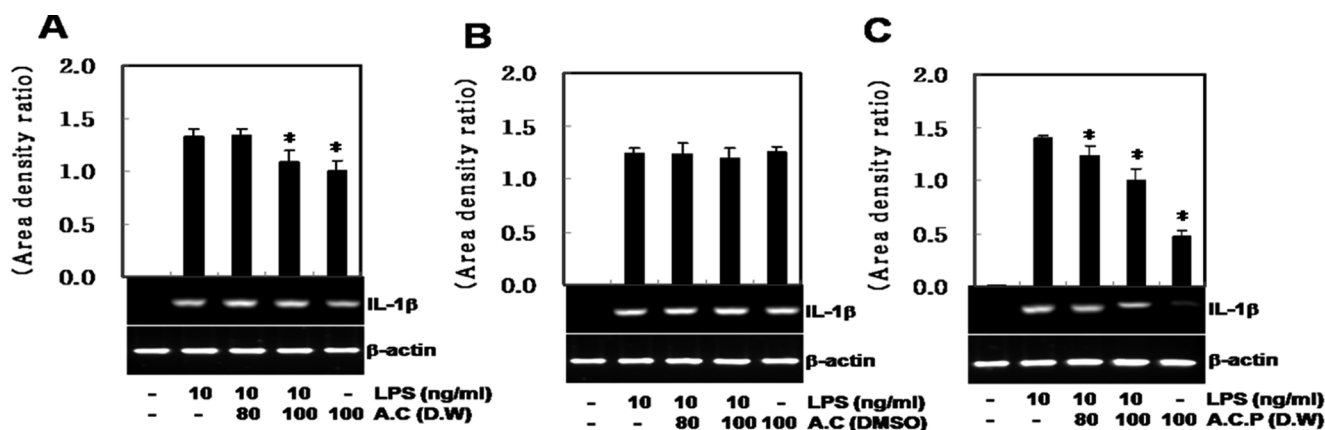


Fig. 6 Effect of the suspension cultured products of *Aloe vera* callus on the production of pro-inflammatory cytokine (IL-1 β) in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were preincubated with different concentrations of the Aloe cultured products for 1h prior to the addition of LPS (10 ng/mL), and the cells were further incubated for 24 h. The IL-1 β mRNA expression was determined by RT-PCR (A-C). *Significantly different at $p < 0.05$ compared with LPS treatment.

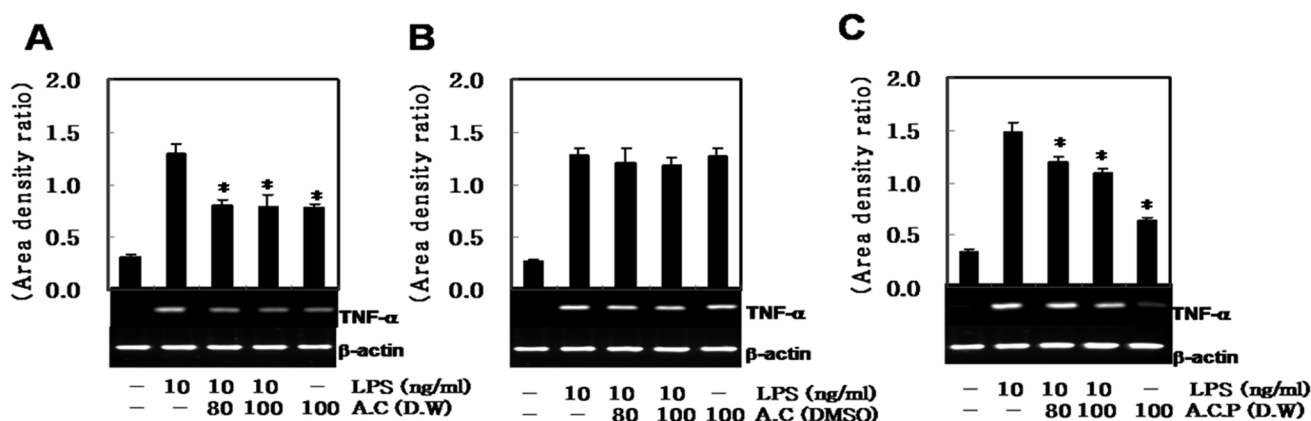


Fig. 7 Effect of the suspension cultured products of *Aloe vera* callus on the production of pro-inflammatory cytokine (TNF- α) in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were preincubated with different concentrations of the Aloe cultured products for 1 h prior to the addition of LPS (10 ng/mL), and the cells were further incubated for 24 h. The TNF- α mRNA expression was determined by RT-PCR (A-C). *Significantly different at $p < 0.05$ compared with LPS treatment.

생성물을 처리한 실험구의 경우, Fig. 6A와 7A에서와 같이 AC-DW 처리구에서 IL-1 β 및 TNF- α 의 발현이 농도 의존적으로 강력하게 억제되는 것이 확인되었다. Monocyte에서 COX-2의 발현은 IL-1 β 및 TNF- α 에 의해 증가한다고 알려졌으므로 앞서 COX-2의 발현 억제와 같은 pattern을 나타내는 것으로 유추되었다.

초 록

알로에의 유효성분인 다당의 효율적 생산연구 일환으로 수행되었던 aloecallus의 현탁배양과 관련하여, 본 연구에서는 이의 배양생성물(세포의 다당)과 callus의 용매추출물에 대한 항염증 활성을 조사하였다. 세포의 다당(ACP)과 callus(AC)의 물 및 에탄올 추출물의 대식세포(Raw 264.7) 세포 생존율을 MTT assay로 조사한 결과, AC-DMSO의 400 μ g/mL 첨가구에서 97%로 미미한 증식저해를 보였으나 나머지 시료처리구는 모두 증식 촉진효과를 나타내었다. 또, LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 세포 배양액의 알로에 추출물 처리에 따른 NO 생성 저해효과를 조사한 결과, AC-DW와 AC-DMSO는 오히려 양성대조구인 LPS 단독보다 더 많은 NO를 생성하였다. 특히, 세포의 다당 분획인 ACP-DW는 NO 생성을 강력히 억제하여 80–100 μ g/mL의 비교적 낮은 농도의 첨가로 대조구 수준까지 억제하였다. 또, Raw 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고 알로에 현탁배양 생성물의 처리에 따른 COX-2 단백질의 발현정도를 조사한 결과, ACP-DW 처리구는 단독으로 COX-2 단백질을 발현시키지 않았으며, LPS 자극에 따른 COX-2의 발현감소는 미미하였다. 아울러, 활성화된 대식세포로부터 생성된 염증 사이토카인인 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현량을 RT-PCR로 조사한 결과, ACP-DW 처리구에서 TNF- α 의 발현이 강력하게 억제되었다.

이상의 결과들은 알로에 현탁배양 유래의 생성물들이 비교적 우수한 항염증활성을 나타냄을 보여주는 결과로, 그동안 삼목번식의 재배방법에 의존하였던 알로에 유효성분의 생산을 대체할 수 있는 효율적이고, 새로운 방법으로서의 알로에 callus의 현탁배양 가능성을 보여주었다.

Keywords 배양생성물 · 알로에베라 켈러스 · 추출물 · 항염증효과 · 현탁액

References

- Agarwala OP (1997) Whole leaf aloe gel vs. standard aloe gel. *Drug Com Ind* **2**, 22–8.
- Cho YJ, An BJ, Kim MU, and Shim CS (2006) Anti-inflammatory effect of *Aloe arborescens* in phosphatidic acid-stimulated Raw Cells. *J Kor Soc Appl Biol Chem* **49**, 65–9.
- Choi SI, Lee YM, and Heo TR (2003) Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity *in vitro* of traditional herbal medicine extracts. *Korea J Biotech Bioeng*, **18**, 282–8.
- Davis RH (1993) Biological activity of *Aloe vera*. *J SOFW* **119**, 646–9.
- Davis RH, Leitner MG, and Russo JM (1987) Topical anti-inflammatory activity of *Aloe vera* as measured by ear swelling. *J Am Podiat Med Assoc* **77**, 610–2.
- Davis RH, Leitner MG, Russo JM, and Byrne ME (1989) Anti-inflammatory activity of *Aloe vera* against a spectrum of irritants. *J Am Podiat Med Assoc* **79**, 263–76.
- Fujita K, Teraira R, and Nagatsu T (1976) Bradykininase activity of aloe extracts. *Biochem Pharm* **25**, 205–9.
- Grindlay D and Reynolds T (1986) The *Aloe vera* phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *J Ethnopharmacol* **16**, 117–51.
- Hegggers JP and Robson MC (1985) Prostaglins and thromboxane, critical care. *Clinics* **1**, 465–517.
- Hu Y, Xu J, and Hu Q (2003) Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts. *J Agric Food Chem* **51**, 7788–91.
- Hu Q, Hu Y, and Xu J (2005) Free radical-scavenging activity of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chem* **91**, 85–90.
- Kim MU and Lee SY (2012a) Induction and cultivation of callus from *Aloe vera* L. *Food Eng Prog* **16**, 226–32.
- Kim MU, Cho YJ, and Lee SY (2012b) Production and optimization of extracellular polysaccharide by suspension cultivation of *Aloe vera* L. callus. *Food Eng Prog* **16**, 233–41.
- Lachenmeier K, Kuepper U, Musshof F, Madea B, Reusch H, and Lachenmeier DW (2005) Quality control of *Aloe vera* beverages. *Elect J Environ Agric Food Chem* **4**, 1033–41.
- Lee KY, Weintraub ST, and Yu BP (2000) Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. *Free Rad Biol Med* **28**, 261–5.
- Meadows TP (1980) Aloe as a humectant in new skin preparations. *Cosmet Toiletries* **95**, 51–6.
- Miladi S and Damak M (2008) *In vitro* antioxidant activities of *Aloe vera* leaf skin extracts. *J Soc Chim Tun* **10**, 101–9.
- Park MK, Park JH, Kim NY, Shin YG, Choi YS, Lee JG et al. (1998) Analysis of 13 phenolic compounds in aloe species by high performance liquid chromatography. *Phytochem Anal* **9**, 186–91.
- Park MY, Kwon HJ, and Sung MK (2009) Evaluation of Aloin and Aloe-Emodin as Anti-Inflammatory Agents in Aloe by Using Murine Macrophages. *Japan Soc Biosci Biotech Agrochem* **73**, 828–32.
- Penneys NS (1982) Inhibition of arachidonic acid oxidation *in vitro* by vehicle components. *Acta Dermat* **62**, 59–61.
- Pugh N, Ross SA, ElSohly MA, and Pasco DS (2001) Characterization of aloeride, a new high molecular weight polysaccharide from *Aloe vera* with potent immunostimulatory activity. *J Agric Food Chem* **49**, 1030–4.
- Rajendran A, Narayanan V, and Gnanavel (2007) Separation and characterization of the phenolic anthraquinones for *Aloe vera*. *J Appl Sci Res* **3**, 1407–15.
- Raine TJ, London MD, Goluch K, Hegggers JP, and Robson MC (1980) Anti-prostaglandins and antithromboxanes for treatment of frostbite. *American College of Surgeons Surgical Forum* **31**, 557–9.
- Reynolds T and Dweck AC (1999) *Aloe vera* leaf gel: A review update *J Ethnopharmacol* **68**, 31–7.
- Rodriguez ER, Martin JD, and Romero CD (2010) *Aloe vera* as a functional ingredient in foods. *Critic Rev Food Sci Nutr* **50**, 305–26.
- Sarkar D, Dutta A, Das M, Sarkar K, Mandal C, and Chatterjee M (2005) Effect of *Aloe vera* on nitric oxide production by macrophages during inflammation. *Indian J pharm* **37**, 6, 371–5.
- Shashidhara HM and Murthy NR (1983) Biological characteristics of a factor suppressing follicle stimulating hormone from ovine testes. *J Biosci* **5**, 115–23.
- Waszkiewicz-Robak B, Rusczonek A, Rachtan J, and Zebrowska M (2007) Polyphenol compounds content and antioxidant activity of *Aloe vera* preparations. *Herba Yolonica* **53**, 373–9.
- Yagi A, Harada N, Yamada H, Iwadare S, and Nishioka (1982) Antibradykinin active material in *Aloe saponaria*. *J Pharm Sci* **71**, 1172–4.
- Yagi A and Takeo S (2003) Anti-inflammatory constituents, aloesin and aloemannan in aloe species and effects of tanshinon VI in *Salvia miltiorrhiza* on heart. *Yakugaku Zasshi* **123**, 517–32.
- Zhang XF, Wang HM, Song YL, Nie LH, Wang LF, Liu B et al (2006) Isolation, structure elucidation, antioxidative and immunomodulatory properties of two novel dihydrocoumarins from *Aloe vera*. *Bioorg Med Chem Letters* **16**, 949–53.