

Anti-inflammatory Effects of Extracts and Their Solvent Fractions of Rice Wine Lees

Mi-Jeong Park¹, Hyung-Taek Kang¹, Mi-Sun Kim², Woo-Chang Shin³, Ho-Yong Sohn² and Jong-Sik Kim^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea

²Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea

³Research Institute, Kooksoondang Brewery Co., Ltd, Seongnam 460-120, Korea

Received May 10, 2014 / Revised May 26, 2014 / Accepted May 26, 2014

In the current study, we prepared eighty-five different kinds of solvent fractions of rice wine lees and nuruk extracts and investigated their effects on cell viability and nitric oxide (NO) production in mouse RAW 264.7 cells. Among the treated solvent fractions, only three solvent fractions (KSD-E1-3, KSD-E2-3 and KSD-E4-3) significantly decreased NO production in LPS-activated RAW 264.7 cells without affecting cell viability. And, they also reduced the expression of pro-inflammatory genes such as *COX-2*, *TNF-alpha* and *iNOS*. To understand the molecular mechanisms involved in the inhibition of inflammation in (KSD-E4-3)-treated RAW 264.7 cells, we carried out oligo DNA microarray analysis using Agilent Mouse microarray. To confirm microarray data, 6 genes (*IL-1F6*, *iNOS*, *IL-10*, *Fabp4*, *IL-1RN* and *CSF2*) were selected and performed RT-PCR and quantitative real-time PCR analysis with gene specific primers. The results of RT-PCR and real-time PCR agreed with microarray data. Overall, our results suggest that rice wine lees can be a novel resource for the development of foods and drugs which possess anti-inflammatory activity.

Key words : Anti-inflammation, lees, oligo DNA microarray, pro-inflammatory gene, RAW 264.7 cells

서 론

주박은 쌀, 물, 누룩, 효모 등을 이용하여 청주나 약주를 빚은 후 술을 걸러내는 과정에서 생성되는 부산물이다[5]. 양조 과정 중에 첨가되는 주박 미생물들은 균 자체로서 풍부한 영양분을 함유하고 있다[11]. 현재 우리나라에서 주박은 폐기물 관리법에 의해 산업폐기물로 지정되어 있으며, 양돈업자에 의해 사료용으로 소비되거나 추가비용을 들여 폐기하는 실정이다. 주박에 의한 생리활성 연구로는 주박을 섭취한 흰쥐에서 항당뇨 활성이 보고되었고[5], 주박 추출물에 의한 항균, 항산화 활성에 대해서도 보고되었다[6].

누룩은 술과 발효 식품을 만드는데 사용되는 한국의 전통 발효제(koji)이며[2], 곰팡이, 효모, 일부 박테리아 등 여러 종류의 미생물이 성장하고 있다[17]. 술의 발효와 숙성 중에 주원료로 사용되는 호화된 곡물(쌀, 보리, 수수, 옥수수, 대두, 호밀, 귀리 등)의 전분질을 분해[16], 당화시켜 포도당으로 만들어주는 효소원이자 발효원으로, 알코올 발효의 중요한 원료가 되

고 있다. 누룩에 의한 생리활성 연구로는 누룩에서 sterol을 정제하여 암의 전이를 억제한 연구[9]와 염증 억제에 대한 보고가 있으며[3], 최근에는 누룩의 에탄올 추출물을 처리하여 산화적 스트레스와 멜라닌 분비 그리고 광 피부노화 저해에 관한 연구가 보고되었다[11].

염증(inflammation)은 체내에서 물리적 손상이나 신진대사의 이상과 같은 다양한 자극에 대한 방어 기작이다[4]. 적절한 염증반응은 생체를 보호하는 필수 불가결한 반응이나, 과도하고 부적절한 염증반응은 세포 및 조직의 괴사 및 각종 만성질환의 원인이 된다[7]. 또한 염증은 체내 다양한 기관에서 발생할 수 있으며, 만성 염증 질환의 경우 암화(carcinogenesis)와 밀접한 관련이 있기 때문에 암으로 발전할 가능성이 있다고 알려져 있다[14].

염증 유도 물질인 lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포 표면의 Toll-like receptor 4를 자극하여 하부 세포신호전달경로인 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성화를 유도한다[1]. MAPK 중 extracellular signal-regulated kinase (ERK)와 p38은 LPS로 자극된 iNOS 유도와 대식세포의 NO 생성에 관련이 있는 것으로 잘 알려져 있다[15]. 염증 조절인자 중 하나인 nitric oxide (NO)는 과량이 존재하면 인체에 유해한 영향을 미치게 되어 염증반응 및 세포손상 뿐 만 아니라 뇌막염, 알츠하이머병과 파킨슨병 같은 퇴행성 질환의 중요한 발생 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다[13].

본 연구에서는 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주를 모델

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5798, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : jsk@andong.ac.kr

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

로 8종의 주박과 3종의 누룩을 유기용매로 분획하여 획득한 총 85종의 분획물에 의한 LPS-유도 염증반응에서의 항염증 활성 및 기전을 연구하고자 하였다. 즉, 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포주에 85종의 분획물을 처리하여 nitric oxide (NO) 생성 여부 및 세포 성장에 미치는 영향을 확인하였으며, 분획물에 의한 항염증 기전을 유전자 수준에서 이해하고자 oligo DNA microarray 실험을 수행하여 차별적으로 발현되는 유전자를 확인하였다. 그 중 염증과 관련된 6개의 유전자를 선별하였고, 이들 유전자의 발현 변화를 통해 항염증 활성의 관련성을 검증하였다. 이러한 연구 결과는 주박 추출물 및 분획물에 의한 항염증 활성의 기전을 이해하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

재료 및 방법

주박 및 누룩 추출물 제조

본 연구에서 사용된 8종의 주박과 3종의 누룩은 (주)국순당에서 제공받아 사용하였다. 총 11종의 시료에서 총 85종의 분획물을 2회에 나누어 제조하였다. 제조방법은 다음의 절차에 따라 진행하였다. 먼저 주박의 열수 추출물은 시료 1 kg 에 물 1 l을 가하여 100℃에서 30분 동안 추출하였고 여과한 후 (Whatman No. 2), 70℃에서 감압 농축하여 분말로 제조하였다. 에탄올 추출물은 시료 1.5 kg에 95% ethanol 6 l를 가하여 상온에서 3일간 2회 추출 하였고, 여과한 후 60℃에서 감압 농축하여 분말로 제조하였다. 또한 누룩의 에탄올 추출물은 시료 200 g에 95% 에탄올 1 l를 가하여 상온에서 7일 동안 2회 추출하였고, 여과한 후 60℃에서 감압 농축하여 분말로 제조하였다. 각각 추출된 추출물 4 g을 물에 현탁 하여 n-hexane, ethylacetate, butanol을 이용하여 순차적으로 분획하고 물 잔류물을 회수하여 총 85종의 추출물 및 분획물을 제조하였다. 추출물과 분획물은 DMSO에 녹여 -20℃에서 저장하여 사용하였다. 분리한 추출물 및 분획물의 list는 1차, 2차에 나누어 각각 Table 1, 2에 나타내었다.

RAW264.7 세포주 배양

본 연구에 사용된 세포주는 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주를 사용하였고 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 세포주의 배양은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA)에 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, USA), 1% penicillin 및 streptomycin (WelGene, Korea)을 첨가하여 사용하였다.

항염증 활성 측정(Griess reagent assay)

총 85종의 추출물 및 분획물 들이 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포주의 염증 물질인 nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향을 연구하기 위해 NO 생성을 Griess reagent를 이용하여

Table 1. List of forty kinds of lees extracts and their solvent fractions (1st preparation)

NO.	Alcohol beverages	Extracts	Fractions
KSD-W6-1 KSD-W6-4 KSD-W6-5	Y-Ju		Hot water ex. Buthanol fr. Water res.
KSD-W3-1 KSD-W3-4 KSD-W3-5	E-Ju		Hot water ex. Buthanol fr. Water res.
KSD-W1-1 KSD-W1-4 KSD-W1-5	M-Ju	Hot water ex.	Hot water ex. Buthanol fr. Water res.
KSD-W5-1 KSD-W5-4 KSD-W5-5	S-Ju		Hot water ex. Buthanol fr. Water res.
KSD-W2-1 KSD-W2-4 KSD-W2-5	W-Ju		Hot water ex. Buthanol fr. Water res.
KSD-E6-1 KSD-E6-2 KSD-E6-3 KSD-E6-4 KSD-E6-5	Y-Ju		Ethanol ex. Hexane fr. Ethylacetate fr. Buthanol fr. Water res.
KSD-E3-1 KSD-E3-2 KSD-E3-3 KSD-E3-4 KSD-E3-5	E-Ju		Ethanol ex. Hexane fr. Ethylacetate fr. Buthanol fr. Water res.
KSD-E1-1 KSD-E1-2 KSD-E1-3 KSD-E1-4 KSD-E1-5	M-Ju	80 % Ethanol ex.	Ethanol ex. Hexane fr. Ethylacetate fr. Buthanol fr. Water res.
KSD-E5-1 KSD-E5-2 KSD-E5-3 KSD-E5-4 KSD-E5-5	S-Ju		Ethanol ex. Hexane fr. Ethylacetate fr. Buthanol fr. Water res.
KSD-E2-1 KSD-E2-2 KSD-E2-3 KSD-E2-4 KSD-E2-5	W-Ju		Ethanol ex. Hexane fr. Ethylacetate fr. Buthanol fr. Water res.

측정하였다. 먼저 RAW 264.7 세포를 96 well plate의 각 well 에 1×10⁵개의 세포가 되게 접종한 후, 18시간 동안 배양하였다. 그 후 lipopolysaccharide (LPS, Sigma, USA)를 0.2 µg/ml 농도로 처리하고 1시간 후 DMSO에 녹인 추출물과 분획물을 각각 500 µg/ml (1차 40종) 혹은 150 µg/ml (2차 45종) 으로 처리하여 16시간 동안 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid)을 이용해 세포배양액 중 존재하는 NO₂의

Table 2. List of forty five kinds of lees extracts and their solvent fractions (2nd preparation)

NO.	Alcohol beverages	Extracts	Fractions
KSD-W3-3	Y-Ju	Hot water ex.	Ethylacetate fr.
KSD-W1-3	M-Ju		Ethylacetate fr.
KSD-W5-3	S-Ju		Ethylacetate fr.
KSD-W2-3	W-Ju		Ethylacetate fr.
KSD-W4-1	B-Ju		Hot water ex.
KSD-W4-2		Hexane fr.	
KSD-W4-4		Buthanol fr.	
KSD-W4-5		Water res.	
KSD-E4-1	B-Ju	80% Ethanol ex.	Ethanol ex.
KSD-E4-2			Hexane fr.
KSD-E4-3			Ethylacetate fr.
KSD-E4-4			Buthanol fr.
KSD-E4-5			Water res.
KSD-W7-1	RM-Ju	Hot water ex.	Hot water ex.
KSD-W7-4			Buthanol fr.
KSD-W7-5			Water res.
KSD-E7-1	RM-Ju	80% Ethanol ex.	Ethanol ex.
KSD-E7-2			Hexane fr.
KSD-E7-3			Ethylacetate fr.
KSD-E7-4			Buthanol fr.
KSD-E7-5			Water res.
KSD-E11-1	E-Nuruk	90% Ethanol ex.	Ethanol ex.
KSD-E11-2			Hexane fr.
KSD-E11-3			Ethylacetate fr.
KSD-E11-4			Buthanol fr.
KSD-E11-5			Water res.
KSD-E10-1	M-Nuruk	90% Ethanol ex.	Ethanol ex.
KSD-E10-2			Hexane fr.
KSD-E10-3			Ethylacetate fr.
KSD-E10-4			Buthanol fr.
KSD-E10-5			Water res.
KSD-W8-1	SJ-Ju	Hot water ex.	Hot water ex.
KSD-W8-3			Ethylacetate fr.
KSD-W8-4			Buthanol fr.
KSD-W8-5			Water res.
KSD-E8-1	SJ-Ju	80% Ethanol ex.	Ethanol ex.
KSD-E8-2			Hexane fr.
KSD-E8-3			Ethylacetate fr.
KSD-E8-4			Buthanol fr.
KSD-E8-5			Water res.
KSD-E9-1	R4-Nuruk	80% Ethanol ex.	Ethanol ex.
KSD-E9-2			Hexane fr.
KSD-E9-3			Ethylacetate fr.
KSD-E9-4			Buthanol fr.
KSD-E9-5			Water res.

형태로 측정하였다. 세포 배양 상등액 100 µl와 Griess 시약 100 µl를 1:1로 혼합하여 96 well plate에서 15분간 반응시키고 NanoQuant Plate™ (Tecan Trading AG, Switzerland)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험결과 수치는 4개

의 독립적인 well에서 수행한 값을 Microsoft EXCEL program을 이용하여 분석한 후 mean ± SD 값과 그래프로 나타내었다.

세포 성장을 측정(MTS assay)

주박 추출물 및 분획물들이 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주의 성장에 미치는 영향을 연구하기 위해 cell viability assay를 수행하였다. 우선 96 well plate에 1×10⁵개의 RAW 264.7 세포를 접종한 후, 18시간 동안 배양하였다. 그 후 DMSO에 녹인 추출물 및 분획물을 각각 500 µg/ml (1차 40종) 혹은 150 µg/ml (2차 45종) 으로 처리하였다. 16시간 후, cell viability assay를 수행하기 위해 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)용액(Promega, USA)을 각 well당 20 µl씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 NanoQuant Plate™ (Tecan Trading AG, Switzerland)를 사용하여 580 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험결과 수치는 4개의 독립적인 well에서 수행한 값을 Microsoft EXCEL program을 이용하여 분석한 후 mean ± SD 값과 그래프로 나타내었다.

Total RNA 추출

Total RNA 추출은 주박 및 추출물을 처리 배양된 RAW 264.7 세포로부터 RNeasy mini kit (Qiagen, USA)을 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 최종단계에서는 잘 건조된 column을 새로운 1.5 ml collection tube에 옮기고 RNase-free water 40 µl를 첨가하여 10,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 하여 RNA 용액을 얻었다. 정제된 total RNA는 NanoQuant Plate™를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정량한 RNA는 reverse-transcription PCR, oligo DNA microarray 실험 및 정량적 real-time PCR에 사용하였다.

Oligo DNA microarray 실험

Oligo DNA microarray 실험과 결과 분석은 지노믹트리사 (Genomictree, Inc, Korea)에 위탁하여 수행하였으며, 사용한 microarray는 Agilent사의 Agilent Mouse GE 4 X 44K (V2) arrays (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)를 사용하였다.

Reverse transcription-PCR과 정량적 real-time PCR

RT-PCR은 PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa, Japan)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 정량적 real-time PCR은 ABI prism 7500 cycler (Applied Biosystem USA)를 이용하여 수행하였다. 사용된 primer들은 Table 3과 같으며, PCR mixture는 Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, USA) 10 µl, forward primer 1 µl, reverse primer 1 µl, 증류수 1 µl를 첨가하여 최종부피를 15

Table 3. Sequences of oligonucleotide primers used for RT-PCR and quantitative real time PCR

Gene Name	GenBank Acc. NO.	Sequence
<i>GAPDH</i>	NM_008084.2	F : 5'-GAACGTGAAGCCCATCGAGG-3' R : 5'-GTCCTTGTAGATCTCCTGGA-3'
<i>iNOS</i>	NM_010927.3	F : 5'-CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG-3' R : 5'-GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA-3'
<i>TNF-alpha</i>	NM_013693.2	F : 5'-CGTCAGCCGATTTGCTATCT-3' R : 5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'
<i>COX-2</i>	NM_011198.3	F : 5'-CCGTGGTGAATGTATGAGCA-3' R : 5'-CCTCGCTTCTGATCTGTCTT-3'
<i>IL-10</i>	NM_010548	F : 5'-CTGCTATGCTGCCTGCTCTTACT-3' R : 5'-CCGCAGCTCTAGGAGCATGT-3'
<i>IL-1F6</i>	NM_019450	F : 5'-CACTGCAGTCCCAAGGAAAGAG-3' R : 5'-GGCCTTTGCACTCCCATGTA-3'
<i>IL-1RN</i>	NM_001039701	F : 5'-TCTTACTCATCCCTGTGACTTTGG-3' R : 5'-AATCTCCCGCCCTTTCTGTT-3'
<i>NOS2</i>	NM_010927	F : 5'-CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG-3' R : 5'-GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA-3'
<i>Fabp4</i>	NM_024406	F : 5'-CATCAGCGTAAATGGGGATT-3' R : 5'-TCGACTTTCCATCCCCTTC-3'
<i>CSF2</i>	NM_009969	F : 5'-AGGAGGATGTGGCTGCAGAA-3' R : 5'-TTCTTTGATGGCCTCTACATGCT-3'

μl로 하였고 PCR mixture 15 μl와 cDNA 5 μl를 96 well optical reaction plate에 첨가하여 PCR 반응의 최종부피를 20 μl로 하였다. Optical adhesive covers (Applied Biosystem, USA)를 이용하여 plate를 덮고 real-time PCR machine (Applied Biosystem, USA)을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 반응 조건은 첫 번째 step으로 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 반응 시키고, 두 번째 step으로 95°C에서 15초, 58°C에서 30초, 72°C에서 33초의 cycle을 40번 반복하여 수행하였다. 결과는 Microsoft Excel을 이용하여 분석, 정량 하였으며, 분석방법으로는 comparative Ct (threshold cycle) 방법을 이용하였다. 데이터의 분석은 이전에 발표된 논문에 의거하여 수행하였다[12].

결과 및 고찰

85종의 주박 추출물 및 분획물이 NO생성과 세포생존율에 미치는 영향

LPS 처리에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 세포주에서 nitric oxide (NO) 생성을 측정하기 위해 0.2 μg/ml의 LPS로 염증을 유도하고, 40종의 1차 추출물 및 분획물을 500 μg/ml의 농도로 처리한 다음 nitric oxide assay를 수행하였다. 유기 용매 분획물의 대조물질로는 용매인 DMSO를 이용하였다. 또한 세포생존율을 측정하기 위해 nitric oxide assay에서 실시한 동일한 조건으로 분획물을 RAW 264.7 세포주에 처리한 후 cell viability assay를 수행하였다. 그 결과 LPS로 염증을 유도하면 6배 NO 생성량이 증가되었고, 염증을 유도한 후 40종의

추출물 및 분획물을 처리한 결과 대부분의 분획물에 의해 NO 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 KSD-E6-2, KSD-E6-3, KSD-E3-2, KSD-E3-3, KSD-E1-3 등 몇몇의 분획물에서 NO 생성이 크게 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 그러나, 동일한 주박 추출물에 의해 세포 생존율도 크게 감소하는 것으로 확인되어, 세포 생존율의 감소에 의해 NO 생성이 억제되는 것으로 확인되었다(Fig. 1B).

2차 분획물 45종에 의한 nitric oxide (NO)생성을 측정하기 위해 RAW 264.7 세포주에 0.2 μg/ml LPS로 염증을 유도하고, 추출물 및 분획물을 150 μg/ml와 LPS를 처리한 후 nitric oxide assay를 수행하였다. 주박 분획물의 대조물질로는 용매인 DMSO를 처리하였다. 세포생존율 측정은 동일한 방법으로 cell viability assay를 수행하였다.

그 결과 LPS로 염증을 유도하면 6배 NO 생성량이 증가되었고, 염증을 유도한 후 45종의 추출물 및 분획물을 처리한 결과 KSD-E4-1, KSD-E4-2, KSD-E4-3, KSD-E7-3, KSD-E10-2, KSD-E8-3, KSD-E9-2, KSD-E9-3, KSD-W8-3 분획물에서 NO 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1C). Cell viability assay 결과에서는 모든 분획물 처리에 의해 세포생존율에 큰 변화가 없는 것으로 확인할 수 있었다(Fig. 1D). 1차 및 2차 연구결과를 종합하여 총 85종의 주박 추출물 및 분획물 중 3종을(KSD-E1-3, KSDE2-3 그리고 KSD-E4-3) 최종 선별하여 추후 연구를 진행하였다.

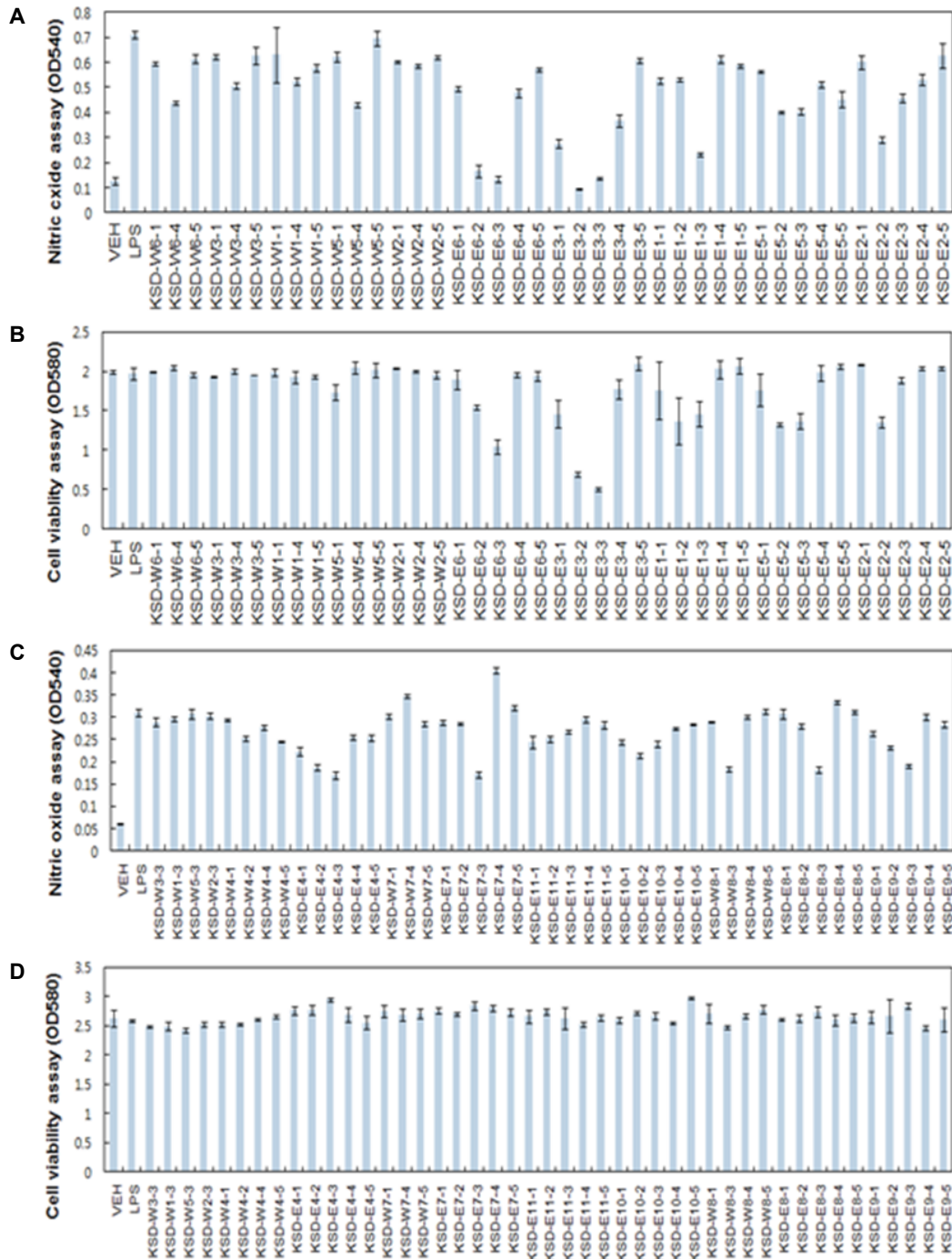


Fig. 1. Effects of eighty five kinds of lees extracts and their solvent fractions on production of nitric oxide (A, C) and cell viabilities (B, D) in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with lees extracts and their solvent fractions (500 µg/ml (A, B) and 150 µg/ml (C, D)) for 18 hr. After treatment, nitric oxide production was measured by nitric oxide assay and cell viability was measured using MTS proliferation assay kit.

선별된 3종 분획물의 농도별 nitric oxide (NO) 생성과 세포생존을 측정

선별된 3종(KSD-E1-3, KSD-E2-3, KSD-E4-3)의 주박의 유기 용매 분획물 농도에 따른 NO 생성 저해 여부와 RAW 264.7 세포 성장에 미치는 영향을 연구하였다. 즉, RAW 264.7 세포

주에 0.2 µg/ml LPS를 처리하여 염증을 유도한 후, 3종의 분획물을 100, 150, 200 µg/ml의 농도로 처리하여 NO 생성을 측정하였다. 또한 세포생존율을 측정하기 위하여 동일한 조건으로 3종의 분획물을 처리한 후, cell viability assay를 수행하였다. 그 결과, 분획물 KSD-E1-3, KSD-E4-3를 처리한 경우 농도의

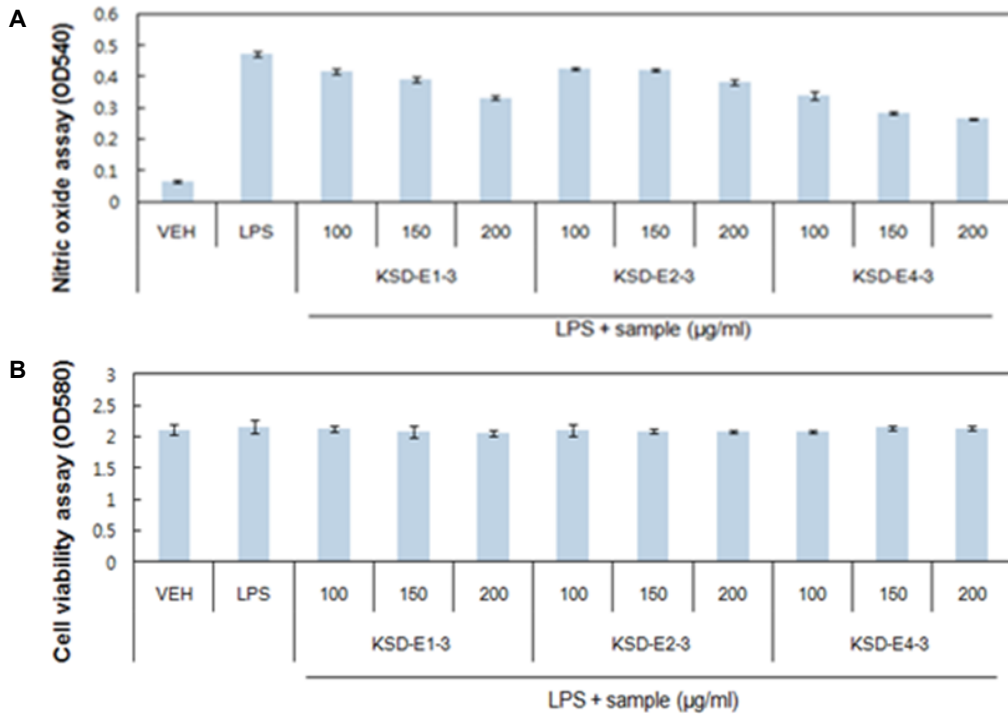


Fig. 2. Suppressive effects of selected three kinds of lees extracts and their solvent fractions on production of nitric oxide (A) in RAW 264.7 cells without affecting cell viability (B). RAW 264.7 cells were treated with three different concentrations (100, 150, and 200 µg/ml) of three kinds of solvent fractions for 18hr. After treatment, nitric oxide production was measured by nitric oxide assay and cell viability was measured using MTS proliferation assay kit.

존적으로 NO 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 반면, cell viability assay 결과에서는 처리한 3종의 분획물에 의한 세포 생존율에 미치는 영향은 미미한 것으로 확인되었다(Fig. 2B).

선별된 3종의 주박 추출물 및 분획물에 의한 iNOS, COX-2, TNF-alpha 유전자의 발현 연구

선별된 3종의 주박 분획물(KSD-E1-3, KSD-E2-3, KSD-E4-3)에 의한 염증 유도에 관련된 iNOS, TNF-alpha, COX-2 유전자의 발현 변화를 확인하였다(Fig. 3). 즉, 염증이 유도된 RAW 264.7 세포주에 주박 추출물을 150 µg/ml의 농도로 각각 처리

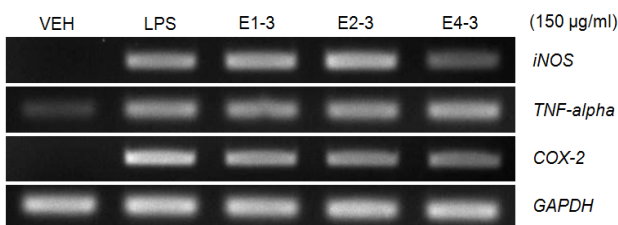


Fig. 3. Down-regulation of iNOS, TNF-alpha, and COX-2 genes by three kinds of solvent fractions. RAW 264.7 cells were treated with three kinds of solvent fractions (KSD-E1-3, KSD-E2-3, and KSD-E4-3). Total RNA was prepared for RT-PCR with each gene specific primers.

한 후, 각 유전자 특이적인 primer (Table 3)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, KSD-E4-3 분획물의 처리에 의해 iNOS 유전자와 COX-2 유전자의 발현이 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다. 반면, TNF-alpha 유전자의 발현은 큰 변화가 없는 것으로 확인되었다.

Oligo DNA microarray를 이용한 유전체 수준에서의 유전자 발현 분석 및 염증관련 유전자 발현 분석

주박 유기용매 분획물 KSD-E4-3에 의한 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주에서 nitric oxide (NO) 생성 저해 활성을 유전자 발현 수준에서 이해하고자, 염증이 유도된 RAW 264.7 세포주에 150 µg/ml의 KSD-E4-3 주박 분획물을 처리한 후, oligo DNA microarray 실험을 수행하였다. DNA microarray 실험 결과, 염증 유도와 관련이 있는 유전자 중 2배 이상 발현이 감소하는 유전자 6개(interleukin 1 family, member 6 [IL-1F6], nitric oxide synthase 2, inducible [iNOS], interleukin 10 [IL-10], fatty acid binding protein 4, adipocyte [Fabp4], interleukin 1 receptor antagonist [IL-1RM], colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage) [CSF2])를 선택하여 RT-PCR을 수행하였다. Fig. 4A에서 제시한 바와 같이 150 µg/ml의 KSD-E4-3 처리에 의해 IL-1F6, iNOS, IL-10, FABP4, IL-1RM, 그리고 CSF2의 유전자의 발현이 모두 down-regulation 되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 DNA mi-

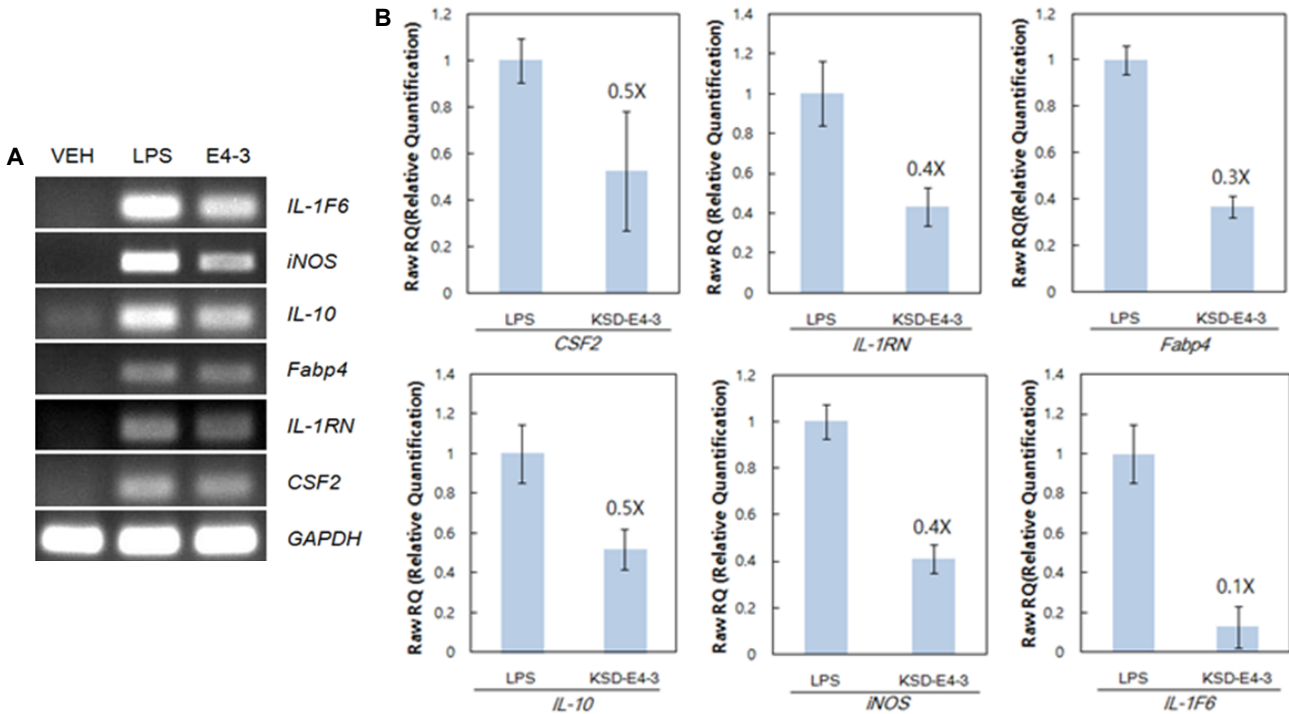


Fig. 4. Confirmation of microarray data with RT-PCR and real-time PCR. Mouse RAW 264.7 cells were treated with 150 µg/ml of KSD-E4-3 and 0.2 µg/ml LPS. (A) Total RNA was prepared and used as a template for RT-PCR using gene specific primers. (B) Total RNA was prepared from treated cells and used as a template for real-time PCR with *CSF2*, *IL-1RN*, *Fabp4*, *IL-10*, *iNOS*, and *IL-1F6* gene-specific primers.

croarray 실험 결과와 모두 일치하였다. 이러한 유전자의 발현을 정량적으로 확인하기 위하여 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과, 유전자 발현변화가 *CSF2*에서 0.5배, *IL-1RN*에서 0.4배, *Fabp4*에서 0.3배, *IL-10*에서 0.5배, *iNOS*에서 0.4배, *IL-1F6*에서 0.1배로 유전자 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4B). 이러한 연구결과를 종합하면, 주박 추출물 및 이의 유기용매 분획물에 의한 항염증 활성은 염증 발생과 관련이 있는 여러 유전자의 발현을 억제함으로써 작용함을 시사한다. 또한, 향후 KSD-E4-3분획물의 추가적인 분획 및 분리방법을 통하여 이러한 분획물에 포함되어 있는 핵심 물질을 찾아내는 연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 농림수산식품부 고부가가치식품기술 개발사업(과제번호 112073-3)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Akira, S. and Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511.
- Chang, J. H. 1989. History of Korean spirits. *Korean J Dietary Culture* **4**, 271-274.
- Kim, J. E., Jung, S. K., Lee, S. J., Lee, K. W., Kim, G. W. and Lee, H. J. 2008. Nuruk extract inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitrite and interleukin-6 in RAW 264.7 cells through blocking activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Microbiol Biotechnol* **18**, 1423-1426.
- Kim, K. S., Cui, X., Lee, D. S., Sohn, J. H., Yim, J. H., Kim, Y. C. and Oh, H. 2013. Anti-inflammatory effect of neoechinulin A from the marine fungus *Eurotium sp.* SF-5989 through the suppression of NF-κB and p38 MAPK pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Molecules* **18**, 13245-13259.
- Kim, S. M. and Cho, W. K. 2006. Effects of Takju (Korean turbid rice wine) lees on the serum glucose levels in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J Food Culture* **21**, 638-643.
- Kim, T. Y., Jeon, T. W., Yeo, S. H., Kim, S. B., Kim, J. S. and Kwak, J. S. 2010. Antimicrobial, antioxidant and SOD-like activity effect of jubak extracts. *Korean J Food Nutr* **23**, 299-305.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A. and Osborne, B. A. 2007. *Innate immunity: Tenney S. Kuby Immunology*, pp. 52-73, 6th ed., Freeman & Co., NY, USA.
- Kwon, S. C., Jeon, T. W., Park, J. S., Kwak, J. S. and Kim, T. Y. 2012. Inhibitory effect on tyrosinase, ACE and xanthine oxidase, and nitrite scavenging activities of jubak (alcohol filter cake) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **41**, 1191-1196.

9. Lee, D. Y., Lee, S. J., Kwak, H. Y., Jung, L., Heo, J., Hong, S., Kim, G. W. and Baek, N. I. 2009. Sterols isolated from nuruk (*Rhizopus oryzae* KSD-815) inhibit the migration of cancer cells. *J Microbiol Biotechnol* **19**, 1328-1332.
10. Lee, J. H., Park, S. M., Jung, H. J., Kim, H. S. and Yu, T. S. 2007. Characteristics of Ju-back and effect of Ju-back fertilizer on growth of crop plants. *J Life Sci* **17**, 1562-1570.
11. Lee, S. J., Cho, S. W., Kwon, Y. Y., Kwon, H. S. and Shin, W. C. 2012. Inhibitory effects of ethanol extracts from nuruk on oxidative stress, melanogenesis, and photo-aging. *Mycobiology* **40**, 117-123.
12. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**, 402-408.
13. Lowenstein, C. J. and Snyder, S. H. 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* **70**, 705-707.
14. Monick, M. M., Carter, A. B., Robeff, P. K., Flaherty, D. M., Peterson, M. W. and Hunninghake, G. W. 2001. Lipopolysaccharide activates Akt in human alveolar macrophages resulting in nuclear accumulation and transcriptional activity of beta-catenin. *J Immunol* **166**, 4713-4720.
15. Sung, M. J., Davaatseren, M., Kim, W., Park, S. K., Kim, S. H., Hur, H. J., Kim, M. S., Kim, Y. S. and Kwon, D. Y. 2009. Vitisin A suppresses LPS-induced NO production by inhibiting ERK, p38, and NF-kappaB activation in RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol* **9**, 319-323.
16. Yang, S., Lee, J., Kwak, J., Kim, K., Seo, M. and Lee, Y. W. 2011. Fungi associated with the traditional starter cultures used for rice wine in Korea. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **54**, 933-943.
17. Yu, T. S., Yeo, S. H. and Kim, H. S. 2004. A new species of Hyphomycetes, *Aspergillus coreanus* sp. nov., isolated from traditional Korean nuruk. *J Microbiol Biotechnol* **14**, 182-187.

초록 : 주박 추출물과 이들의 유기용매 분획물에 의한 항염증 활성

박미정¹ · 강형택¹ · 김미선² · 신우창³ · 손호용² · 김종식^{1*}

(¹국립안동대학교 생명과학과, ²국립안동대학교 식품영양학과, ³㈜국순당 연구소)

본 연구에서는 전통주 제조시 부산물로 생산되는 주박과 누룩으로부터 추출물과 유기용매 분획물을 총 85종을 제조하고, 이들에 의한 항염증 활성을 연구하였다. 85종의 분획물 중 선별한 세 가지의 분획물(KSD-E1-3, KSD-E2-3, KSD-E4-3)에 의해서 LPS에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 세포주에서 nitric oxide 생산이 현저히 감소됨을 확인하였다. 또한, 세가지 분획물에 의해 염증유발 유전자인 *COX-2*, *TNF-alpha*, 그리고 *iNOS* 유전자의 발현이 감소되었다. 세 가지 분획물 중 KSD-E4-3에 의한 항염증 활성의 작용기전을 이해하기 위하여 oligo DNA microarray를 수행하였다. 마이크로어레이 결과 발현이 감소된 유전자 중 염증과 관련된 유전자 6개(*IL-1F6*, *iNOS*, *IL-10*, *Fabp4*, *IL-1RN*, *CSF2*)를 선택하여, RT-PCR과 정량적 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과, 모든 유전자의 발현이 감소됨을 확인하였다. 결론적으로, 이러한 연구결과는 전통주 주박이 항염증 활성을 가지고 있는 식품이나 약품을 개발하는데 필요한 새로운 자원으로써 활용 가능성을 시사하는 것이다.