

흑마늘 발효물의 항염증 활성

탁현민¹ · 강민정¹ · 김경민¹ · 강다원² · 한선규² · 신정혜¹

¹(재)남해마늘연구소

²경상대학교 의학전문대학원 생리학교실

³부산대학교 분자생물학과

Anti-inflammatory Activities of Fermented Black Garlic

Hyun-Min Tak¹, Min-Jung Kang¹, Kyoung Min Kim¹, Dawon Kang²,
Sunkyu Han³, and Jung-Hye Shin¹

¹Namhae Garlic Research Institute

²Department of Physiology and Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University School of Medicine

³Department of Molecular Biology, Pusan National University

ABSTRACT In this study, we investigated the anti-inflammatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* fermented black garlic (FBG) in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 macrophages. FBG did not show cytotoxicity in RAW 264.7 cells at concentrations less than 800 µg/mL, and cell viability increased with FBG concentration. Nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) production as well as tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β) and IL-6 formation decreased in an FBG concentration-dependent manner, in LPS-induced RAW 264.7 cells. Furthermore, activation of LPS-inducible nitric synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), nuclear factor kappa B (NF-κB), and inhibitory kappa B (IκB) protein expression was effectively inhibited by FBG treatment in LPS-induced RAW 264.7 cells. In contrast, heme oxygenase-1 (HO-1) protein expression significantly increased. These results indicate that the anti-inflammatory activity of FBG was due to activation of NF-κB, inhibition of cytokine production, and expression of iNOS and COX-2. From these results, we expect that FBG could contribute to the prevention and improvement of inflammatory disease.

Key words: fermented black garlic (FBG), cytokine, anti-inflammatory, RAW 264.7 cells

서 론

인체의 방어 시스템은 역할이 다른 다양한 세포들이 관여하는 매우 복잡한 복합반응으로(1) 인체에 자연적으로 존재하면서 외부로부터 침입한 미생물이나 병원균에 즉시 반응하여 항원을 일차적으로 제거해 몸을 방어하는 면역체계인 비 특이적 면역과 특정 항원에 의해서 B 림프구와 T 림프구에 의하여 나타나는 면역체계인 특이적 면역으로 나누어진다(2). 비 특이적 면역에는 monocyte, macrophage, neutrophil, eosinophil, natural killer(NK)-cell 및 dendritic cell들이 주요 세포군을 형성하고 있다(3). 이 중 대식세포는 최초 대응세포이므로 항원제시세포(antigen presenting cell)로서의 기능을 수행하며, 후천적 면역반응을 조절하는 T 림프구와도 반응하여 면역조절에 영향을 미치게 된다(4). 대식세포는 항원의 감시, 화학주성에 의한 이동, 표적항원의

제거에 이르는 일련의 복잡한 항원 제거 기능을 수행하며, 배아발생, 상처치유, 자살세포 제거, 조혈세포 증식 동안 조직의 재형성에도 관여하는데, 대식세포가 활성화되면 대식능력을 증강시키고 일산화질소(nitric oxide, NO) 및 사이토카인(cytokine)의 생성을 증대시켜 염증반응을 일으키며 면역 활성을 나타낸다(5-8).

염증은 면역과 유사한 기작으로 인체에 침입한 외인적 병원체 또는 내인적으로 발생하는 염증인자를 인지하여 제거하기 위해 다양한 매개물질들을 분비함으로써 활성화되는 인체의 적극적인 방어 장치이다(9,10). 따라서 인체에서 발생하는 대부분의 급만성 질환은 염증반응을 포함하거나 염증반응을 주된 병태기전으로 하는데, 적절한 염증반응은 인체를 보호하는 필수 불가결한 반응이지만 과도하고 부적절한 염증반응은 혈관내피의 손상과 복구 과정에서 병변을 심화시키고 세포의 성장과 발달에서도 국소 만성 염증반응에 대한 조직 변성을 심화시켜 암과 대사성 질환을 포함한 다양한 질환의 원인이 되기도 한다(11-14).

최근 건강에 대한 관심의 증대로 현대인들은 안전성이 확보된 다양한 천연원료의 섭취를 통해 생체의 항상성을 유지

Received 13 June 2014; Accepted 1 August 2014

Corresponding author: Jung-Hye Shin, Namhae Garlic Research Institute, Gyeongnam 668-812, Korea
E-mail: whanbee@hanmail.net, Phone: +82-55-860-8947

하며 외부의 인자들로부터 신체를 방어하고자 노력하고 있다. 이러한 측면에서 볼 때 다양한 생리활성을 지닌 대표적인 식품인 마늘(*Allium sativum* L.)은 백합과(Liliaceae)에 속하는 다년생 구근식물로 독특한 향미와 더불어 항균작용, 항고혈압 작용, 항암 및 세포의 항돌연변이 효과, 항산화 작용, 피로회복 활성 등이 알려져 있어 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 천연 조미료, 가공식품의 향신료 및 기능성 식품과 의약품 소재로 널리 이용되고 있다(15). 생마늘을 일정한 온도와 습도에서 장시간 숙성시켜 제조되는 흑마늘은 숙성과정에서 생성되는 갈색화 반응 물질이 높은 항산화 활성을 지니며, 암 예방, 콜레스테롤 저하, 동맥경화 개선, 심장질환 예방, 산화스트레스와 관련된 효과 및 항염증 활성 등의 효과를 가지는 것으로 알려져 있다(16,17).

염증 및 면역 활성과 관련한 마늘의 연구로 마늘의 알리신은 염증 효과에서 억제와 자극 효과를 동시에 나타내는데, transforming growth factor(TGF)- β 1, interleukin(IL)-10, IL-10R의 발현은 증가시키나 IL-1 β , IL-1 α , IL-8, interferon(IFN)- β 와 같은 염증성 사이토카인의 발현 감소 효과는 없다고 보고되어 있다(18). 흑마늘 추출물을 소재로 한 연구에서는 tumor necrosis factor(TNF)- α , IL-2와 같은 사이토카인의 생성이 유도되어 자연면역에 의한 T 림프구의 생성인자로 작용하며, 한편으로는 IL-4, IL-6, IL-10과 같은 사이토카인의 생성으로 B 림프구의 활성화를 통한 면역증진에 기여한다는 보고가 있다(19). 이들 반응 모두에서 마늘의 성분이 특정 사이토카인 이외 다양한 염증 관련 인자의 조절과 관련한 연구들이 더 진행되어야만 마늘의 항염증 및 면역 활성에 대한 정확한 규명이 가능할 것이다. 특히 흑마늘의 항염증 효과에 관한 연구는 거의 없는 실정이므로 본 연구에서는 다양한 생리활성을 지니고 있는 마늘의 2차 가공품인 흑마늘을 소재로 유산균을 이용해 발효물을 제조하고 항염증 활성을 평가하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시료의 제조

실험에 사용한 흑마늘은 남해보물섬흑마늘영농조합법인에서 통마늘 형태로 숙성된 것을 구입하여 사용하였다. 껍질을 제거한 흑마늘을 3차 증류수와 1:9의 비율(w/v)로 혼합하여 믹서기(Hanil, Incheon, Korea)에서 충분히 분쇄하였다. 이를 121°C에서 15분간 멸균하여 실온에서 방냉한 후 발효균을 접종하였다. 선행연구를 통해 농촌진흥청 농업유전자원지원센터(KACC)로부터 분양받은 프로바이오틱스(probiotics) 중 흑마늘에 대해 발효능이 우수하며 발효물의 항염증 활성이 확인된 *Lactobacillus rhamnosus*를 37°C에서 24시간 MRS 배지에서 1차 배양한 후 10% 탈지분유(서울우유협동조합, 서울, 한국)와 3% 흑설탕을 첨가하여 멸균한 용액에 접종하였다. 이를 37°C에서 24시간 배양한 것을 발효균으로 하여 멸균된 흑마늘 혼합액에 3%(w/w) 접종한

다음 동일한 온도에서 72시간 동안 배양하여 흑마늘 발효물을 제조하였다. 배양된 발효물은 동결건조 한 다음 일정한 분말을 3차 증류수에 재 용해한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리(Supra 22K, Hanil) 하여 얻어진 상층액을 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 실험에 사용하였다.

세포배양

실험에 사용된 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cells은 한국세포주은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 실험에 사용하였다. RAW 264.7 cells은 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA)과 항생제(250 units/mL, penicillin, 250 mg/mL streptomycin, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 포함하는 DMEM(Gibco) 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였고, 2일 후 RAW 264.7 cells이 80% confluent 한 상태에서 세포를 분리하여 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 한 후 현탁하여 사용하였다.

세포독성 측정

흑마늘 발효물이 세포의 생존에 미치는 영향은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Amresco, Solon, OH, USA) 방법을 이용하여 측정하였다. 96 well plates에서 5 \times 10⁵ cells/well 농도로 RAW 264.7 cells을 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 다음 농도별 시료를 세포에 처리한 후 1시간 뒤에 lipopolysaccharides (LPS)를 1 μ g/mL씩 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 배지를 제거한 후 5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 10 μ L씩 넣어 37°C에서 2시간 반응시킨 다음 dimethyl sulfoxide (DMSO, Amresco)를 100 μ L씩 가해 10분간 교반하여 ELISA reader(Epoch, Biotek, Winooski, VT, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 시료 대신 3차 증류수를 처리한 대조군에 대한 백분율을 산출하였다.

세포 배양액의 제조

RAW 264.7 cells을 5 \times 10⁵ cells/well 농도로 24 well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 흑마늘 발효물을 100, 200, 400, 800 μ g/mL의 농도로 각각 처리한 다음, 1시간 후에 LPS를 1 μ g/mL씩 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 회수하여 원심분리(3,000 rpm, 5 min, 4°C) 하여 세포 배양 상층액을 얻었으며 이를 nitric oxide(NO) 및 사이토카인 생성량 측정에 사용하였다.

NO 생성량 측정

세포로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 Griess reagent system(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다. 세포 배양액 50 μ L와 sulfanilamide solution 50 μ L를 혼합하여 상온에

서 10분간 반응시켰다. 여기에 NED 용액을 50 µL 혼합하여 상온에서 다시 10분간 반응시킨 후 ELISA reader(Epoch, Biotek)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, sodium nitrate로 표준곡선을 작성하여 NO 함량을 산출하였다.

사이토카인 생성량 측정

Prostaglandin E₂(PGE₂)는 commercial competitive enzyme immunoassay kit(R&D System, Minneapolis, MN, USA)로, 사이토카인인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6는 각각의 해당 ELISA kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 생성량을 측정하였다. PGE₂ 생성량은 anti-mouse PGE₂로 pre-coating 된 well에 세포 배양액 150 µL를 넣은 다음 primary antibody solution을 150 µL 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. PGE₂ conjugate를 50 µL씩 첨가한 후 실온에서 2시간 반응시키고, washing buffer로 3회 세척한 후 substrate solution을 200 µL 첨가하여 실온에서 30분간 빛을 차단한 조건에서 반응시켰다. 이어 반응 정지 용액을 100 µL씩 처리한 다음 ELISA reader(Epoch, Biotek)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. TNF-α, IL-1β 및 IL-6는 각각의 단일클론 항체가 코팅된 96 well plate에 세포 배양액 50 µL와 반응액을 넣은 후 실온에서 1시간 30분간 반응시켰다. 반응 후 washing buffer로 4회 세척한 다음 streptavidin-HRP buffer를 100 µL 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 4회 세척하였다. 이어 stabilized chromogen을 100 µL 첨가하여 실온에서 30분간 빛을 차단한 조건에서 반응시킨 후, 반응 정지 용액을 100 µL 처리하고 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

Western blot 분석

RAW 264.7 cells에 lysis buffer를 첨가하여 단백질을 추출하고, bovine serum albumin(BSA) protein assay kit(Thermo, Rockford, IL, USA)를 이용하여 50 µL의 동일한 단백질 시료를 SDS sample buffer에서 용해시켰다. 단백질을 4~12% SDS PAGE(Invitrogen)를 이용하여 전기영동한 후 PVDF membrane에 transfer 하였다. 3% skim milk buffer에 blocking 한 다음 각각의 1차 항체(1:1,000)를 반응시킨 후 tris-buffered saline Tween-20 (TBST)으로 3회 세척하였다. 2차 항체인 peroxidase-conjugated anti-rabbit 및 anti-mouse 항체(1:2,000)로 1시간 반응 후 다시 TBST로 3회 세척한 다음 ECL detection reagents(Promega)를 이용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

통계처리

실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 분산분석(ANOVA의 one-way)과 모수다중비교를 위해 Tukey's

test를 활용하였다. 유의수준 $P<0.05$ 및 $P<0.01$ 에서 유의성 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

대식세포 세포 생존에 대한 흑마늘 발효물의 효과

마우스 대식세포인 RAW 264.7 cells에 *Lactobacillus rhamnosus*로 발효한 흑마늘 발효물과 LPS를 병용 처리하였을 때 세포독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 흑마늘 발효물을 단독으로 100~800 µg/mL 농도로 처리하였을 때 모든 농도에서 세포 생존율은 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 1A).

흑마늘 발효물을 농도별로 전처리하고 LPS로 염증을 유발하여 세포독성을 평가한 결과(Fig. 1B) 모든 처리군에서 100% 이상의 세포 증식이 유도되었으며 세포독성은 유발되지 않았다.

애엽 추출물의 마우스 대식세포에 대한 세포 생존율을 측정하였을 때 LPS 처리 시에도 시료 농도 증가와 더불어 유의적으로 세포 생존율이 증가하였는데, 이는 대식세포의 감소와 관련된 면역력 약화 증상에 애엽의 응용이 가능함을

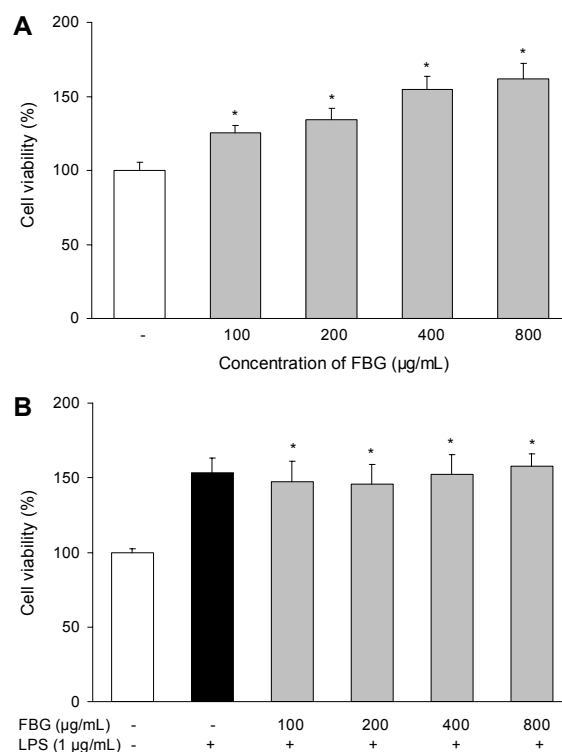


Fig. 1. Effects of fermented black garlic on cell viability in LPS-activated RAW 264.7 cells. (A) Proliferative effect of fermented black garlic on macrophages. (B) No cytotoxic effect of fermented black garlic on LPS-treated macrophages. RAW 264.7 cells were pre-treated with various concentration (100, 200, 400, 800 µg/mL) of FBG for 1 hr before being incubated with or without 1 µg/mL LPS for 18 hr. Each bar is mean±SD of three independent experiments. * $P<0.05$ compared to control (no treatment).

의미하는 것이라는 보고가 있다(12). 본 연구 결과에서도 유사한 경향으로 흑마늘 발효물은 대식세포의 유지를 통해 면역력 강화에 기여할 것으로 예상된다.

NO 및 PGE₂ 생성량에 미치는 영향

NO는 생리적·병리적 상황 모두에서 중요한 역할을 하는 조절 분자로, 적절한 농도의 NO는 생리적으로 평활근의 이완, 혈소판 응집 억제, 면역 조절, 혈관 확장, 신경전달 등의 기능을 지니며(20), 면역세포에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생성되는 NO는 외부 자극에 의해 발현되어 외부로부터 침입한 미생물이나 종양세포를 파괴하는 자기 방어 물질로도 작용하여 생리학적으로 중요한 역할을 한다(21). 그러나 과도한 NO의 생성 증가는 세포의 염증 및 자멸을 유발하며, 염증인자로서 여러 가지 만성 염증성 질환을 유발하는 원인이 된다(22).

LPS는 산화적 스트레스를 유발하며 Gram 음성 세균의 세포벽 물질로서 면역 세포 등을 자극하여 NO와 PGE₂의 생성을 증가시킨다고 보고되어 있는데(23), RAW 264.7 cells에 LPS로 염증을 유발하여 흑마늘 발효물이 NO와 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 확인한 결과(Fig. 2A) 실험된

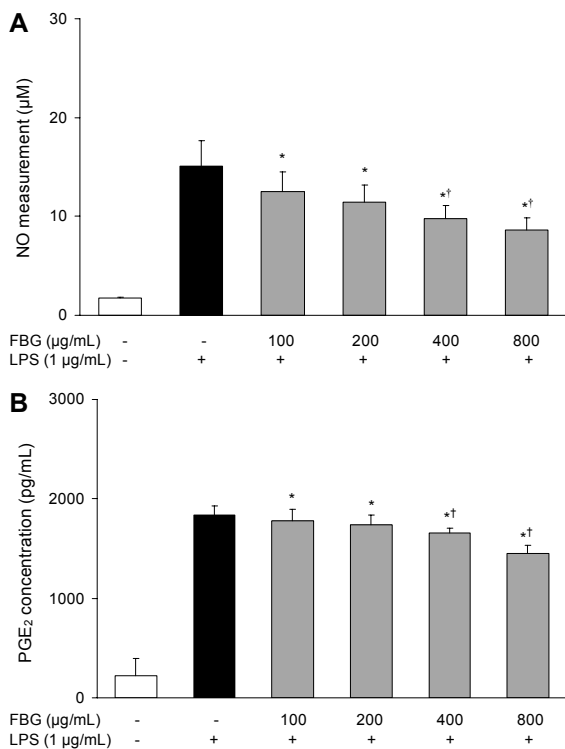


Fig. 2. Effects of fermented black garlic on LPS-induced NO (A) and PGE₂ (B) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-treated with various concentration (100, 200, 400, 800 µg/mL) of FBG for 1 hr before being incubated with or without 1 µg/mL LPS for 18 hr. The NO and PGE₂ production were measured using Griess reagent system and ELISA, respectively. Each bar is mean±SD of three independent experiments. **P*<0.05 compared to control (no treatment). †*P*<0.05 compared to LPS treatment.

모든 농도에서 NO 생성은 시료 무처리군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 실험된 최고 농도인 800 µg/mL에서 NO 생성량은 8.66 µM로 시료 무처리군 대비 42.5% 억제되는 효과를 나타내었다. Kim 등(24)은 고삼 발효 추출물이 LPS 유무에 관계없이 모두 대식세포의 NO 생성을 유의적으로 억제하였는데, 이 결과는 고삼 발효 추출물이 염증반응 억제에 효과가 있음을 의미한다고 보고한 바 있다. 이는 본 연구의 결과에서도 동일한 경향으로 흑마늘 발효물은 외부의 자극으로부터 유도되는 NO 생성을 제어함으로써 항염증 효과를 가질 것으로 생각된다.

대식세포에서 PGE₂는 COX-2의 작용으로 생성되며 통증, 발열에 관여하는 염증 매개체로 혈관을 확장시키고 혈관 투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로의 화학주성을 증가시킴으로써 염증반응과 면역반응에 관여하고, 혈관신생 촉진 등을 통해 암 발생에도 관여하는 것으로 알려져 있다(25,26).

흑마늘 발효물이 LPS에 의해 유도되는 염증성 인자인 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 확인한 결과(Fig. 2B) NO와 동일한 경향으로 시료의 처리 농도가 높을수록 생성량이 감소되었으며, 400 µg/mL 농도에서 PGE₂ 생성량은 1,659.8 pg/mL이었으나 800 µg/mL 농도에서는 1,449.0 pg/mL로 생성량이 감소하여 LPS 단독 처리군(224.33 pg/mL)에 비해 21% 정도 PGE₂ 생성이 억제되었다.

NO 및 PGE₂ 생성 감소 기전의 확인

체내의 자유라디칼에 의해서 조직 손상이 유발되거나 감염이 발생하면 염증반응이 유도되는데, 대표적으로 대식세포 등이 반응하여 사이토카인을 생성하고, inducible nitric synthase(iNOS)의 발현이 증가하여 많은 양의 NO가 생성되고, cyclooxygenase-2(COX-2)는 PGE₂의 생합성을 자극함으로써 그 생성량이 증가하게 되므로 iNOS와 COX-2의 발현 억제를 통해 항염증 활성을 평가할 수 있다(27,28).

흑마늘 발효물의 NO와 PGE₂의 생성 억제능이 확인되어 이 결과를 뒷받침하기 위하여 western blot을 통해 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제를 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. iNOS의 발현은 400 µg/mL와 800 µg/mL 농도에서 LPS 단독 처리군에 비해 각각 39.6%와 61.7% 더 낮아 유의적으로 억제되었으며, COX-2 단백질의 발현도 흑마늘 발효물을 400 µg/mL 이상 처리하였을 때 LPS 단독 처리군에 비해 34.5% 정도로 발현이 억제되어 유의차가 확인되었다. Jin 등(29)은 여러 한약재의 항염증 활성을 평가한 결과 iNOS와 COX-2의 발현을 동시에 억제한 시료는 non steroidal anti-inflammatory drug(NSAID)로서의 적용 가능성을 시사한 바 있는데, 이는 본 연구의 흑마늘 발효물에서도 동일한 결과로 항염증 및 관절염, 암과 같은 만성 염증성 질환의 치료 및 예방에 있어 적용 가능할 것으로 생각된다.

COX는 COX-1과 COX-2 두 가지 이성효소(isozyme)가 존재한다. COX-1은 거의 모든 조직에 발현되어 있고 위장

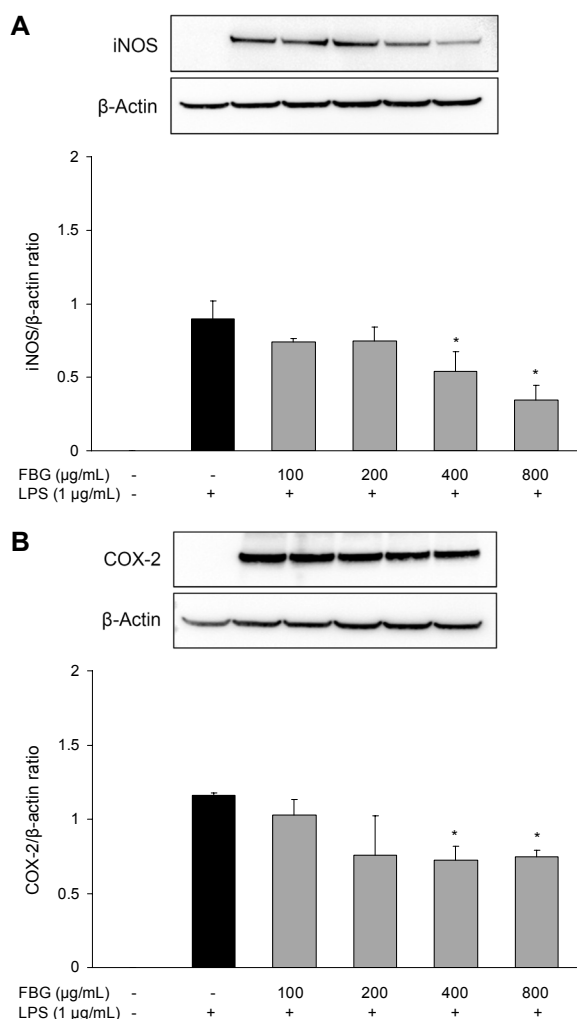


Fig. 3. Inhibition of LPS-induced iNOS and COX-2 expression by fermented black garlic. RAW 264.7 cells were pre-treated with various concentration (100, 200, 400, 800 µg/mL) of FBG for 1 hr before being incubated with or without 1 µg/mL LPS for 18 hr. The protein expression levels of iNOS (A) and COX-2 (B) were determined by western blot as described in materials and methods. Each bar is mean±SD of three independent experiments. **P*<0.05 compared to LPS treatment.

의 세포를 보호하거나 신장 기능의 유지, 혈소판 생성에 필요한 PGs 합성에 관여할 뿐만 아니라 생리적 기능을 조절하는 역할을 하는 반면에, COX-2는 일반 정상조직에서는 발현 정도가 낮으며 염증성 인자, 세포 성장인자, 발암원 등 스트레스에 노출된 대식세포에서 발현되는 효소로 염증 및 암세포 성장에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 보고되고 있다(30,31).

사이토카인 발현에 미치는 영향

사이토카인은 생체의 염증반응에서 필연적으로 생성되는데, 대표적으로 TNF-α, IL-1β와 IL-6이다. 이 중 TNF-α는 활성화된 대식세포에서 주로 대량 생산되며 LPS로 자극할 경우 생산량이 더 많아지는데, 비만세포(mast cells), 림

포이드계의 세포(lymphoid cells), 내피세포(endothelial cells) 등 생체에 존재하는 다양한 세포에서도 생산된다(32, 33). TNF-α의 국소적인 증가는 염증의 기본적인 임상 징후인 열, 부종, 통증 및 발적 등을 일으키지만, 전신적인 증가는 미세혈관의 혈전, 모세혈관의 누출에 따른 심장 박출량 억제로 조직의 손상을 유발하고, 다른 염증 세포를 활성화시킴으로써 사이토카인의 생성 증대 및 eicosanoid, 산화질소, 활성산소 등과 같은 매개물질을 분비시켜 염증과 조직 손상을 촉진하게 된다(34,35). IL-1β는 대표적인 전 염증성 사이토카인으로 낮은 농도에서는 세포 성장이나 항상성 유지에 필요하므로 체내에서는 매우 낮은 농도로 유지되지만, 상처나 염증반응 및 면역적 자극에 의해서는 대량 생산되어 증상을 악화시킨다(36).

RAW 264.7 cells에서 흑마늘 발효물이 LPS에 의한 사이토카인 분비의 변화 정도를 확인하였다. TNF-α, IL-1β 및 IL-6 모두 LPS 단독 처리군에 비해 흑마늘 발효물을 처리함으로써 유의적인 분비 억제 효과가 확인되었다(Fig. 4). 가장 효과가 우수한 800 µg/mL 농도에서 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 농도는 각각 306.08 pg/mL, 126.5 pg/mL 및 86.62 pg/mL로 LPS 단독 처리군에 비해 각각 35.4%, 41.4% 및 56.6% 감소하였으며, IL-6에 대한 분비 억제 효과가 가장 우수하였다. 흔히 pro-inflammatory cytokine으로 불리는 이들 사이토카인들은 *in vivo* 및 *in vitro* 모두에서 염증반응을 조절하는 물질로 알려져 있는데, 본 실험의 결과 흑마늘 발효물은 pro-inflammatory cytokine의 분비를 저해함으로써 염증 유도 과정 및 관련인자를 효과적으로 조절할 수 있을 것으로 판단된다.

Nuclear factor kappa B(NF-κB)의 발현에 미치는 영향

NF-κB는 사이토카인 반응, 염증, 세포성장 조절과 같은 다양한 단계에 참여하는 전사인자로 TNF-α, IL-1β, IL-6를 포함하는 일부 주요 염증촉진에 관여하는 것으로 보고되어 있다(37). 또한 inhibitory kappa B(IκB)와 결합한 상태로 불활성형으로 세포질에 존재하던 NF-κB는 IκB의 인산화로 인하여 유리되어 핵으로 이동함으로써 Cox-2, iNOS와 같은 다양한 염증성 매개체의 발현을 유도하게 된다(38). 따라서 NF-κB는 RAW 264.7 cells에서 LPS로 염증을 유발할 경우 활성화되기 때문에 이를 확인하기 위하여 흑마늘 발효물을 농도별로 처리하여 1시간 배양한 다음 LPS 1 µg/mL를 첨가하여 18시간 배양한 후 인산화된 NF-κB와 IκB의 발현을 확인하였다. 100 µg/mL 처리군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 인산화된 NF-κB의 발현 억제 효과가 없었지만, 400과 800 µg/mL 처리군에서는 각각 20%와 50%의 발현 억제 효과가 있었다(Fig. 5A). 인산화된 IκB는 LPS 단독 처리군에 비해 100 µg/mL 이상의 농도로 시료를 처리할 경우 모든 농도에서 유의적인 발현 억제 효과가 확인되었는데, 800 µg/mL 농도에서 최고 50%의 발현 억제 효과를 나타내었다(Fig. 5B). 이로써 흑마늘 발효물은 IκB의 인산

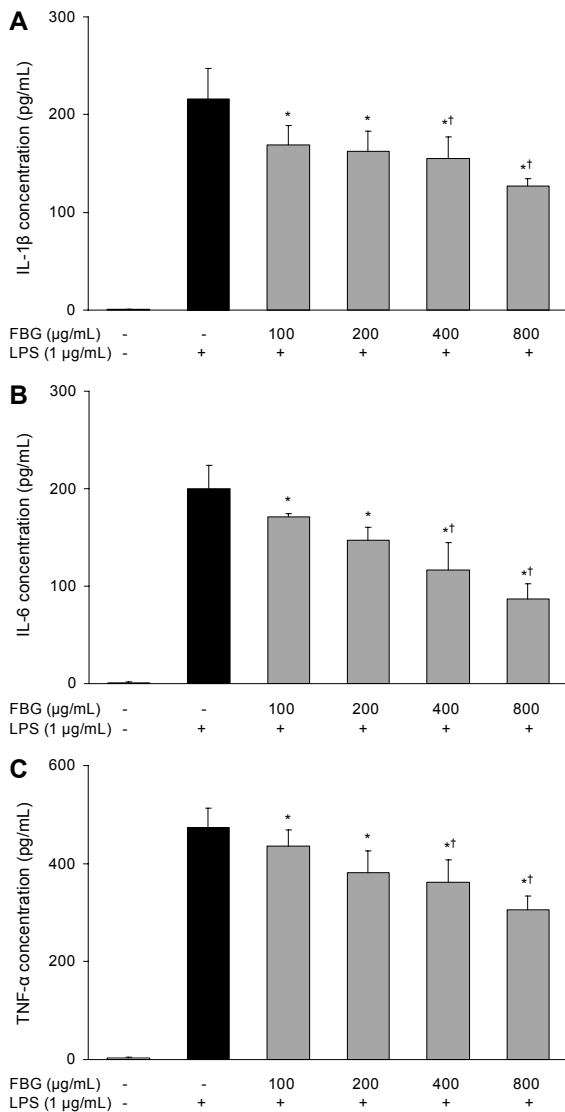


Fig. 4. Effects of fermented black garlic on LPS-induced cytokine production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-treated with various concentration (100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/mL}$) of FBG for 1 hr before being incubated with or without 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS for 18 hr. The culture supernatant was subsequently isolated and the amount of TNF- α (A), IL-1 β (B), and IL-6 (C) production was measured by ELISA kit as described in materials and methods. Each bar is mean \pm SD of three independent experiments. * P <0.05 compared to control. † P <0.05 compared to LPS treatment.

화를 억제하여 NF- κ B의 핵으로의 전이를 효과적으로 저해함으로써 항염증 활성의 발현에 기여하는 것으로 생각된다.

Heme oxygenase(HO)-1의 발현에 미치는 영향

LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7 cells에서 흑마늘 발효물의 HO-1에 대한 발현 변화를 관찰한 결과는 Fig. 6과 같다. LPS 단독 처리군에 비해 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 HO-1의 단백질 발현은 각각 38%와 40% 증가하였지만, 400과 800 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 현저하게 증가하여

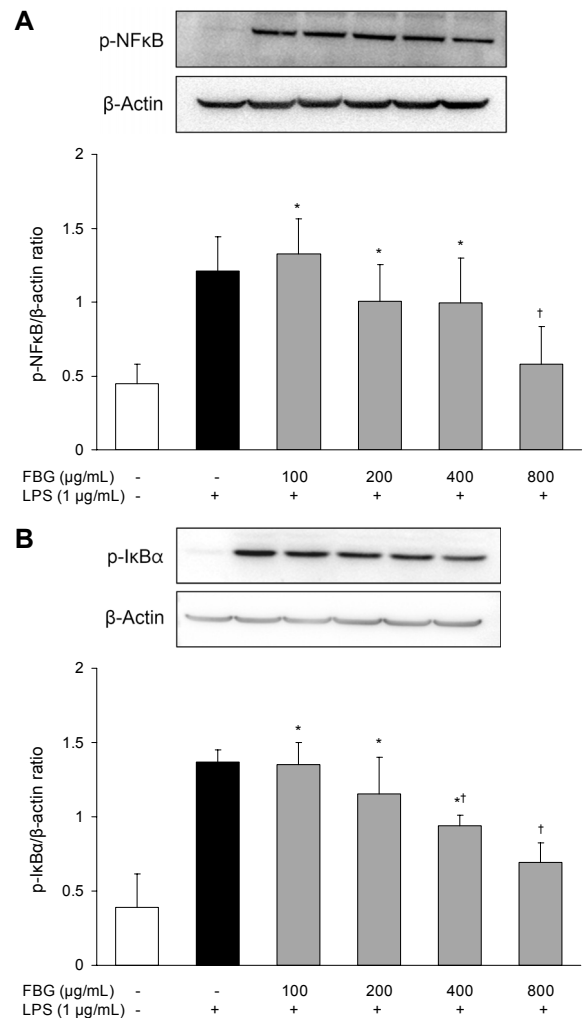


Fig. 5. Effect of fermented black garlic on NF- κ B expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-treated with 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/mL}$ of FBG for 1 hr and then treated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS for 18 hr and subject to western blot to analysis expression of NF- κ B. The plus and minus sign (+ and -) represent treatment condition with and without LPS treatment. Each bar is mean \pm SD of three independent experiments. * P <0.05 compared to control (no treatment). † P <0.05 compared to LPS treatment.

각각 71%와 117%의 유의적인 발현 효과가 확인되었다.

HO는 여러 조직세포에 존재하는 microsomal 효소로 hemoglobin을 비롯한 heme을 일산화탄소, biliverdin/bilirubin 및 free radical로 유리시킨다(39). HO는 HO-1, HO-2 및 HO-3의 세 가지 isozyme이 존재하는데, HO-2와 HO-3는 구성형 효소로 HO-2는 자극에 상관없이 발현된다(40). 반면에 HO-1은 heat shock protein(HSP)계의 한 종류로서 분자량 32 kD을 갖는 유도성 이형체로서 LPS, 과산화소증, 저산소증, heat shock 등과 같은 다양한 스트레스성 자극에 의해 발현되어 산화적 스트레스로부터 생체를 방어하는 기능을 가진다(41). 따라서 흑마늘 발효물은 HO-1의 발현을 유도함으로써 세포 내 염증 및 산화적 스트레스에

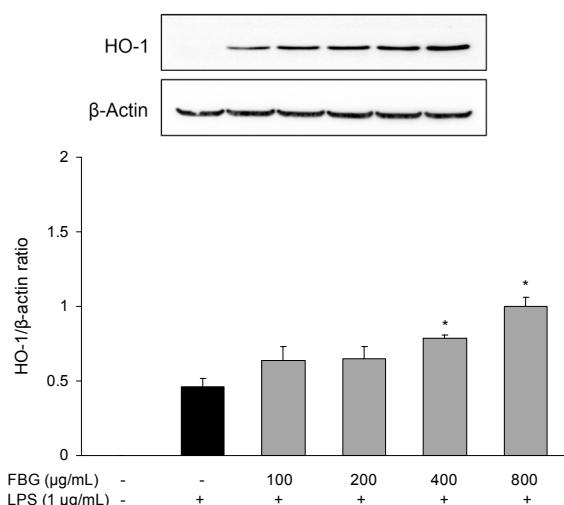


Fig. 6. Effect of fermented black garlic on HO-1 expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-treated with 100, 200, 400, 800 μg/mL of FBG for 1 hr and then treated with 1 μg/mL of LPS 18 hr and subject to western blot to analysis expression of HO-1. The plus and minus sign (+ and -) represent treatment condition with and without LPS treatment. Each bar is mean±SD of three independent experiments. **P*<0.05 compared to LPS treatment.

대해 효과적으로 보호 작용을 할 것으로 사료된다.

요 약

*Lactobacillus rhamnosus*로 발효시킨 흑마늘 발효물의 항염증 효능을 검증하기 위해 LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 cells를 이용하여 관련 인자들을 분석하였다. 100, 200, 400 및 800 μg/mL 농도에서 세포독성은 유발되지 않았으며, 오히려 농도 의존적으로 세포 생존율은 증가하였다. LPS에 의해 염증 유도된 RAW 264.7 cells에서 흑마늘 발효물은 농도 의존적으로 NO와 PGE₂의 생성 감소와 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 단백질 생성을 감소시켰다. 또한 iNOS, COX-2, NF-κB 및 IκB 단백질의 발현을 감소시키고 HO-1의 단백질 발현을 증가시켰다. 이상의 연구 결과를 통해 흑마늘 발효물은 염증에 의한 NF-κB의 활성화와 TNF-α, IL-1β와 IL-6의 생성을 억제시키고, iNOS 및 COX-2의 발현을 억제시키는 메커니즘을 통해 염증성 질환의 예방 및 개선 효능을 나타내는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지역특화기술융복합연구지원사업(과제번호: R0002043)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

REFERENCES

1. Janeway CA Jr, Medzhitov R. 2002. Innate immune recog-

niton. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216.

2. Kim CH. 2009. Immunomodulatory effects of lactic acid bacteria and bioactive peptides derived from milk. *Korean J Dairy Sci Technol* 27: 37-43.

3. Uthaisangsook S, Day NK, Bahna SL, Good RA, Haraguchi S. 2002. Innate immunity and its role against infections. *Ann Allergy Asthma Immunol* 88: 253-264.

4. Birk RW, Gratchev A, Hakiy N, Politz O, Schledzewski K, Guillot P, Orfanos CE, Goerdts S. 2001. Alternative activation of antigen-presenting cells: concepts and clinical relevance. *Hautarzt* 52: 193-200.

5. Lingen MW. 2001. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med* 125: 67-71.

6. Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. 2002. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 44: 143-161.

7. Beutler B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40: 845-859.

8. Yu AR, Park HY, Choi IW, Park YK, Hong HD, Choi HD. 2012. Immune enhancing effect of medicinal herb extracts on a RAW 264.7 macrophage cell line. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1521-1527.

9. Kim SY, Jo MJ, Hwangbo M, Back YD, Jeong TY, Cho IJ, Jee SY. 2013. Anti-inflammatory effect of *Stevia rebaudiana* as a results of NF-κB and MAPK inhibition. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology* 26: 54-64.

10. Kundu JK, Surh YJ. 2008. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res* 659: 15-30.

11. Park CY, Yoo HJ. 2004. Inflammation and obesity. *J Korean Soc Endocrinol* 19: 97-108.

12. Nathan C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420: 846-852.

13. Tracey KJ. 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 420: 853-859.

14. Shin JS, Park YM, Choi JH, Park HJ, Shin MC, Lee YS, Lee KT. 2010. Sulfuretin isolated from heartwood of *Rhus verniciflua* inhibits LPS-induced inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and pro-inflammatory cytokines expression via the down-regulation of NF-κB in RAW 264.7 murine macrophage cells. *Int Immunopharmacol* 10: 943-950.

15. Kang MJ, Lee SJ, Sung NJ, Shin JH. 2013. The effect of extract powder from fresh and black garlic on main components in serum and organs of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Life Sci* 23: 432-442.

16. Kang MJ, Shin JH. 2012. The effect of black garlic extract on lipid metabolism in restraint stressed rats. *J Life Sci* 22: 1529-1537.

17. Tak HM, Kim GM, Kim JS, Hwang CR, Kang MJ, Shin JH. 2014. Quality characteristics and biological activity of fermented black garlic with probiotics. *J Life Sci* 24: 549-557.

18. Park RD. 2002. Effects of allicin on cytokine production genes of human peripheral blood mononuclear cells. *Korean J Food & Nutr* 15: 191-196.

19. Seo MJ, Kang BW, Park JU, Kim MJ, Lee HH, Ryu EJ, Joo WH, Kim KH, Jeong YK. 2013. Effect of black garlic extract on cytokine generation of mouse spleen cells. *J Life Sci* 23: 63-68.

20. Kim JY, Jung KS, Jeong HG. 2004. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett* 569: 321-326.

21. Seo JS, Lee TH, Lee SM, Lee SE, Seong NS, Kim JY. 2009. Inhibitory effects of methanolic extracts of medicinal plants on nitric oxide production in activated macrophage RAW 264.7 cells. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17: 173-178.
22. Weisz A, Cicatiello I, Esumi H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J* 316: 209-215.
23. Yoshitake J, Kato K, Yoshioka D, Sueishi Y, Sawa T, Akaike T, Yoshimura T. 2008. Suppression of NO production and 8-nitroguanosine formation by phenol containing endocrine disrupting chemicals in LPS-stimulated macrophages: involvement of estrogen receptor-dependent or independent pathways. *Nitric Oxide* 18: 223-228.
24. Kim HS, Han HS, Lee YJ. 2011. Studies on immuno modulating activity of fermented Sophorae Radix extract. *Kor J Herbology* 26 : 17-23.
25. Wang MT, Honn KV, Nie D. 2007. Cyclooxygenases, prostanooids and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 26: 525-534.
26. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. 1994. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3228-3232.
27. Koundouras S, Marinos V, Gkoulioti A, Kotseridis Y, van Leeuwen C. 2006. Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.) effects on wine phenolic and aroma components. *J Agric Food Chem* 54: 5077-5086.
28. Kang HW. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory effect of extracts from *Flammulina velutipes* (Curtis) singer. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1072-1078.
29. Jin KS, Oh YN, Lee JY, Son BY, Choi WB, Lee EW, Kwon HJ, Kim BW. 2013. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of seven medicinal herbs including *Tetrapanax papyriferus* and *Piper longum* linne. *Korean J Microbiol Biotechnol* 41: 253-262.
30. Raz A, Wyche A, Siegel N, Needleman P. 1988. Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. *J Biol Chem* 263: 3022-3028.
31. Sunnaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, Araki R, Devito B, Weksker BB, Dannenberg AJ. 1996. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res* 56: 4424-4429.
32. Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
33. 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: 4220-4224.
34. Bendtzen K. 1988. Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol Lett* 19: 183-191.
35. Natarajan K, Manna SK, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 1992. Protein tyrosine kinase inhibitors block tumor necrosis factor-induced activation of nuclear factor- κ B, degradation of I κ B α , nuclear translocation of p65, and subsequent gene expression. *Arch Biochem Biophys* 352: 59-70.
36. Zhang HL, Nagatsu A, Watanabe T, Sakakibara J, Okuyama H. 1997. Antioxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 45: 1910-1914.
37. Ghosh S, Hayden MS. 2008. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8: 837-848.
38. Choi MW, Kim JI. 2013. Anti-inflammatory effect of ethyl acetate fraction isolated from *Undaria pinnatifida* on lipopolysaccharides-stimulated RAW 264.7 cells. *Kor J Fish Aquat Sci* 46: 384-392.
39. Allanson M, Reeve VE. 2004. Immunoprotective UVA (320-400 nm) irradiation upregulates heme oxygenase-1 in the dermis and epidermis of hairless mouse skin. *J Invest Dermatol* 122: 1030-1036.
40. Kim YH, Lee MJ, Lee HS, Kim JG, Park WH. 2011. Suppressive effect of *Euryale ferox salisbury* extracts on inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 cells through the anti oxidative mechanism. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 25: 202-211.
41. Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. 2005. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 558-567.