

Structural Characteristics and Anti-inflammatory Activities of Chemically Sulfated-hyaluronic Acid from *Streptococcus dysgalactiae*

Chang-Il Hong¹, Eui-Gil Jung¹, Kook-Il Han¹, Yong Hyun Kim², Sung Hee Lee², Hong Sub Lee³ and Man-Deuk Han^{1*}

¹Department of Life Science and Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan-si, Chungnam 31538, Korea

²BMI Korea Co. Ltd., Cheongsong-plaza 402, Uiwang-si, Gyeonggi-Do 16009, Korea

³Laboratory of Microbiology, Il-dong Pharmaceutical Co. Ltd., Seogu-Dong 23-9, Hwaseong-Si, Gyeonggi-Do 18449, Korea

Received April 13, 2016 / Revised April 19, 2016 / Accepted April 22, 2016

Hyaluronic acid (HA) is an important macromolecule in medical and pharmaceutical fields. HA is a natural and linear polymer composed of repeating disaccharide units of β -1, 3-*N*-acetyl glucosamine and β -1, 4-glucuronic acid. This work aimed to confirm the structural characteristics and anti-inflammatory activities of HA and its chemically sulfated-HA. HA was produced from a fed-batch fermentation process using *Streptococcus dysgalactiae* in a 5 l bioreactor. HA was isolated water-soluble form (HA-WS) and water-insoluble form (HA-WI) from culture medium, and was obtained chemically sulfated-derivative (S-HA) that resulted in a 90% yield from HA-WI. The structural features of the sulfated-HA (S-HA) were investigated by FT-IR and ¹H-NMR spectroscopy. The FT-IR and NMR patterns revealed the similarity in both the FTIR spectrum as well as NMR spectrum of both reference standard and purified HA from *S. dysgalactiae*. The anti-inflammatory activities of HA and S-HA were examined on LPS-induced RAW 264.7 cells. S-HA was significantly inhibited production of pro-inflammatory mediators such as nitric oxide (NO) and PGE₂ and the gene levels of iNOS and COX-2, which are responsible for the production of NO and PGE₂, respectively. Furthermore, S-HA also suppressed the overproduction of pro-inflammatory cytokine TNF- α (<80 pg/ml) and IL-6 (<100 pg/ml) compared to that of HA-WI. The present study clearly demonstrates that HA-S exhibits anti-inflammatory activities in RAW 264.7 macrophage cells.

Key words : Anti-inflammatory activity, hyaluronic acid, proinflammatory mediators, *Streptococcus dysgalactiae*, sulfated-hyaluronic acid

서 론

히알루론산(HA, Hyaluronic acid) 또는 히알루로난(hyaluronan)은 비황화 글리코사미노글리칸으로[10, 18] *D*-glucuronic acid (GlcUA)와 *N*-acetyl-*D*-glucosamine (GlcNAc)이 반복된 서열로 결합하여 있는 천연 다당류이다(Fig. 1) [14]. 히알루론산은 동물의 안구 유리체, 연골, 활액, 태반 및 피부 등 여러 부위에 존재하며, 점액성 다당류(mucopolysaccharide)의 형태로 세포 외 기질(extracellular matrix)의 수분흡수 및 세포 간 유연성을 부여하는 고분자이다[17]. 또한, 히알루론산은 세포 신호 전달, 상처 치유, 형태 형성, 기질 조직화를 증가하는 특성을 나타낸다[32, 33]. 특히 히알루론산은 대식세포의

식세포작용(phagocytosis)을 억제하여 항염증반응을 나타내며, 고분자 HA가 분해된 저 분자량 HA 분해산물은 대식세포의 염증반응 촉진뿐만 아니라 상처 치유에 관여되는 콜라겐(collagen)과 섬유화(fibrosis)를 증가시키는 원인이 되며[11], 염증 질환이 있는 환자들에게 고농도로 검출된다. 일반적으로 히알루론산은 고 분자량임에도 불구하고 물에 잘 녹으며 히알루로니다아제(hyaluronidases, HAase), 콘드로이티나아제

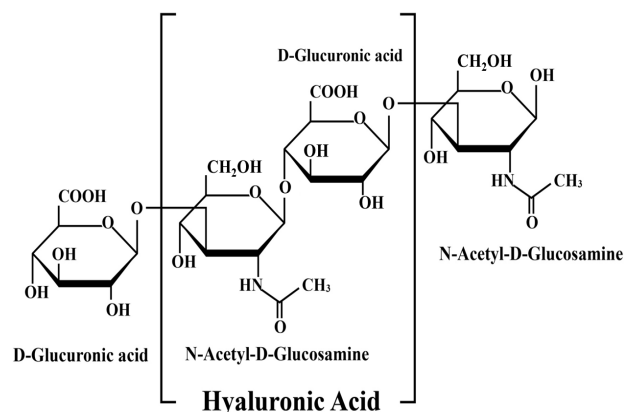


Fig. 1. Structure of hyaluronic acid

*Corresponding author

Tel : +82-41-530-4702, Fax : +82-41-530-1256

E-mail : mdhan@sch.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.

(chondroitinase) 등과 같은 효소에 분해되고, 조직 내에 있는 HAase에 의해 몇 시간 내지 며칠 이내에 빠르게 분해된다[17]. 일반적으로 생체 내에는 $10^6 \sim 10^7$ Da의 고분자 히알루론산이 존재하여, 세포의 구조 지지, 세포 간 부착, 세포성 공간 방향, 이동, 증식 및 분화를 조절하며[13], 상처 치유[36], 조직 리모델링[29] 및 형태 형성[3]의 조절자로서 중요한 역할을 한다. 이러한 특성 때문에 히알루론산은 관절염 치료제로써 사용되며[35], 다양한 조직에서 상처치유 촉진, 눈 및 중이(中耳) 수술에서 보조 재료로 사용되고 있다[15]. 최근 히알루론산은 생체 적합성이 우수하여 조직 공학 및 재생 의학 분야에서 신소재로서 활용성이 점차 증가하고 있다[2, 5, 8, 27]. 지금까지 천연 히알루론산보다 용해도가 우수하고, 항원성이 없으며, 생체 내에서 효소에 분해되는 시간을 연장하기 위하여 다양한 유도체(HA derivatives)가 개발되어 왔다[26]. 일부 히알루론산 유도체들은 세포, 조직 및 치료제에 병용 시 세포 배양, 임상 및 전 임상에서의 생리적 활성을 향상되게 할 뿐만 아니라 생체 내 약물 전달에 더욱 효율적인 기능을 나타내기 때문이다[16, 26, 31].

히알루론산 생산은 동물조직, 세균 또는 미생물 효소를 이용한 시험관 내 합성 등으로 이루어졌다[4]. 산업적으로 히알루론산을 얻는 방법 중 가장 보편적인 방법은 닭 벧과 *Streptococcus* 속 미생물을 배양을 통하여 생산되고 있다[30]. 과거에는 주로 닭 벧에서 추출하는 방법을 사용하였으나, 생산수율이 낮고 산성 뮤코다당 등의 불순물이 혼입되어 제조 및 정제 과정에서 비용 및 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 이에 비하여 미생물 배양을 통한 히알루론산 생산은 비용이 적게 들고 생산수율이 높은 장점 때문에 현재 산업적으로 일반화된 생산 방법이다[20].

본 연구는 *Streptococcus dysgalactiae*의 배양을 통해 수용성 및 비수용성 히알루론산을 분리하고, 분리된 비수용성 히알루론산으로부터 황화(sulfation) 방법으로 황화된 히알루론산(S-HA)을 합성하고자 한다. 이 같은 황화 목적은 우선 항원성이 최소화하여 조직 내 주입 시 염증반응과 항원항체반응을 줄이고, 천연히알루론산보다 가용성을 높여 이물질로 작용하지 않도록 하여, 생체 내 효소의 영향을 받지 않는 지속성이 개선된 황화된 히알루론산 유도체를 개발하기 위해서이다. 또한, S-HA가 세포독성이 있는지 확인하였고, 염증 관련 사이토카인 분석을 위해 TNF- α 및 IL-6의 발현량을 알아보았다. 최종적으로 염증 인자인 iNOS와 COX-2의 발현량을 qRT-PCR로 확인하여 항염증 유전자의 발현 정도를 비교 분석하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에 사용한 균주는 *S. dysgalactiae* ID 9103으로 한국미생물자원센터(KCTC)로부터 분양 받아 사용하였다. 균주의 보

관 및 배양은 brain heart infusion (Difco, Becton, Dickinson Co., N.J., U.S.A.)을 사용하여 본 실험에 사용하였다. 실험의 대조물질 표준 히알루론산나트륨은 일동제약(株) 중앙연구소(화성, 한국)로부터 제공 받아 표준물질로 사용하였다. 대식세포주 RAW 264.7은 한국세포주은행(The Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입했고 세포 배지인 Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM)와 α - Minimal Essential Medium (MEM)은 Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)에서, TNF- α 와 IL-6 정량을 위한 ELISA kit는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)사에서 구입하였다.

수용성 히알루론산(HA-WS)의 분리 정제 방법

수용성 히알루론산(HA-WS)을 분리하기 위하여 *S. dysgalactiae*를 brain heart infusion (BHI) 배지에 접종하여 2×10^7 cells/ml가 될 때까지 전 배양하였다. 전 배양된 균을 본 배양용 배지에 접종하고 5% CO₂ 배양기에서 배양시킨 후 $8,000 \times g$ 로 원심분리하였다. 수확된 상등액에 trichloroacetic acid (TCA)를 최종 농도 4.0%가 되도록 첨가한 후 TCA가 첨가된 배지에 70% 농도가 되도록 99% ethanol (EtOH)을 첨가하고 하루 동안 4°C에서 냉침하였다. 다시 $9,600 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 조히알루론산(crude HA)를 침전시키고 1M NaOH 처리 후 초음파분쇄기를 사용하여 용해했다. Crude HA 분획은 다시 멸균수에 희석한 후, 투석막(molecular weight cut off: 14,000)에 넣고 흐르는 물에서 5일 동안 투석시켜 저분자 물질을 제거하였다. 최종적으로 투석된 분획물은 동결건조하여 조다당류를 정제하였다.

비수용성 히알루론산(HA-WI)의 분리 정제 방법

비수용성 히알루론산(HA-WI)을 분리하기 위하여 *S. dysgalactiae*를 BHI 배지에 접종하여 2×10^7 cells/ml가 될 때까지 전 배양하였다. 전 배양된 균을 본 배양용 배지에 접종하고 5% CO₂ 배양기에서 배양시킨 후 $8,000 \times g$ 로 원심분리하였다. 수확된 cell pellet에 300 ml의 1 M NaOH를 넣고 95°C에서 2시간 이상 반응시킨 후 상온에서 냉각시켰다. 그 후 15분간 vortex 한 후 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 분리된 상등액에 3배의 EtOH (95%)을 첨가한 후 4°C에서 하루 이상 반응시키고 원심분리($2,500 \times g$, 20 min at 4°C)하였다. 분획에 25 ml 멸균 증류수를 첨가 후 투석막(molecular weight cut off: 14,000)에 넣고 흐르는 물에서 5일 동안 투석시켜 저분자 물질을 제거한 후 최종적으로 투석된 분획물은 동결건조하여 HA-WI를 정제하였다[12].

황화된 히알루론산(S-HA)의 분리 정제 방법

황화된 히알루론산(S-HA)의 유도체 합성 및 분리정제방법은 다음과 같이 수행하였다. Urea 7.2 g (8 M)을 dimethyl sulfoxide (Me₂SO) 10 ml에 녹인 Me₂SO-Urea 용액 8 ml에

HA-WI 0.2 g을 가하였다. Me₂SO (8 ml)에 H₂SO₄ (800 μl)를 반응시켜 만든 Me₂SO₄ 용액을 HA-Me₂SO-Urea 용액에 첨가한 후 항온수조를 이용하여 100°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 상온에서 냉각시킨 후 3차 증류수 200 ml를 첨가하고 투석막(dialysis membrane, 14,000 MW cut-off filter)을 이용하여 흐르는 물에서 5일 동안 투석시켜 저분자 물질을 제거하였다. 농축 후 동결건조하여 S-HA를 정제하였다(Fig. 2) [12].

히알루론산의 적외선 스펙트럼(FT-IR) 및 NMR을 이용한 구조분석

분리된 각 히알루론산 시료를 FT-IR Spectrophotometer (FTIR-4100, JASCO-CE, PerkinElmer, UK)를 이용하여 350-4500 cm⁻¹에서 측정하였다. 히알루론산형태 및 구조적 특성은 400 MHz spectrophotometer (Bruker, AM-200, Germany)를 이용하여 ¹H/¹³C-NMR spectrum 분석하였고 용매로는 D₂O 1 ml에 100 mg의 히알루론산을 넣어 용해시켜 측정하였다.

RAW 264.7 cell에서의 세포독성

히알루론산이 RAW 264.7 세포에 세포독성이 있는지 알아보기 위하여 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 방법으로 확인하였다[23]. 96 well plate에 각 well당 2×10⁵ cells/ml 세포를 분주하여, 24시간 배양 후 상등액을 제거하고, 농도별 시료를 배지 200 μl에 녹여 각 well에 첨가한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 100 μl의 상등액

을 제거한 후, MTT (5 mg/ml) 용액 10 μl를 각 well에 가하고 4시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 반응시켰다. 배양 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 μl의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해함으로써 ELISA plate reader (Epoch; BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)로 540 nm에서 측정하였다.

RAW 264.7 cell에서의 Nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향

히알루론산의 항염증 활성을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포에 자극 후 NO 생성량을 측정하였다[34]. 96 well plate에 각 well당 2×10⁵ cells/ml를 분주하고 24시간 배양 후, 상등액을 제거하고 배지 200 μl에 녹인 농도별 시료를 각 well에 첨가하여, 24시간 배양하였다. 배양한 배지의 상등액 100 μl 새로운 plate에 넣고 Griess reagent (1% sulfanilamide와 0.1% naphthyl-ethylenediamine을 포함한 5%(v/v) phosphoric acid) 100 μl를 넣어 10분간 실온에서 반응시킨 후 ELISA plate reader (Epoch; BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 sodium nitrate (NaNO₂)를 농도별로 희석하여 표준 검량선으로 NO 농도 측정에 사용하였다.

히알루론산이 Cytokine 발현에 미치는 영향

TNF-α 및 IL-6 cytokine 생산량을 확인하기 위하여 Mouse

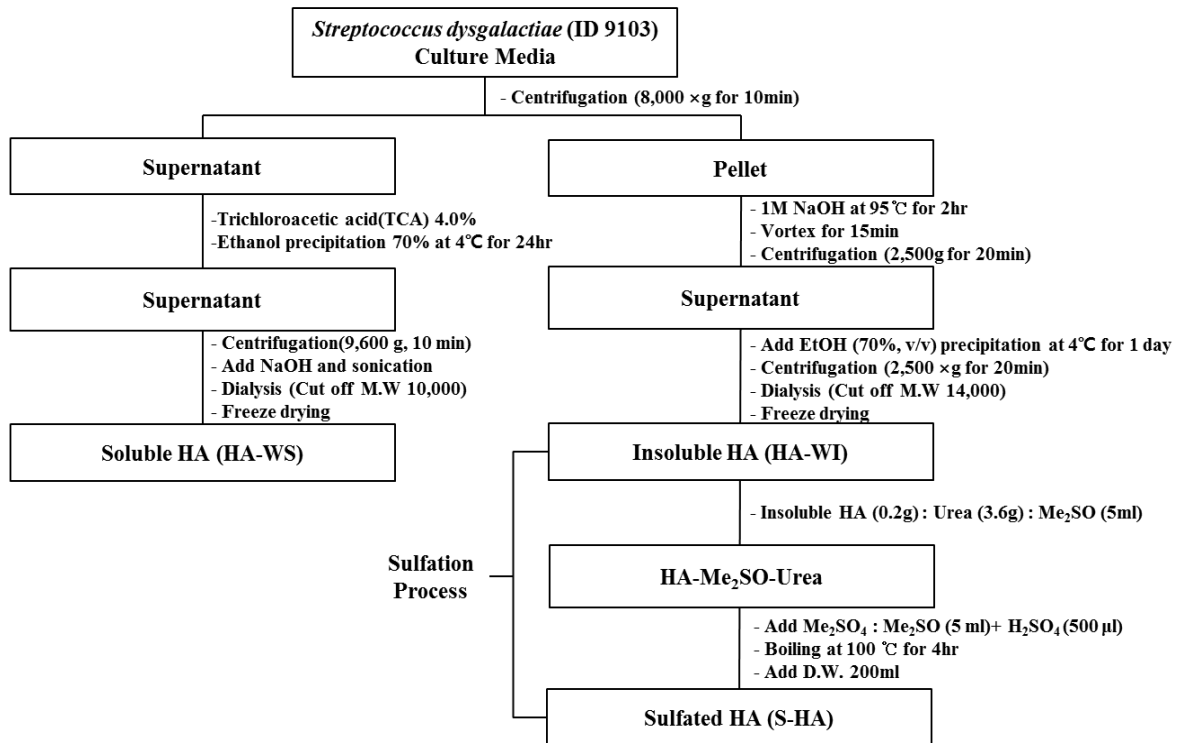


Fig. 2. Isolation and purification procedures of water soluble (HA-WS), water insoluble (HA-WI) and sulfated hyaluronic acid (S-HA).

TNF- α Immunoassay kit, Mouse IL-6 Immunoassay Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 분석하였다. Mouse macrophage cell line인 RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 2×10^5 cells/ml로 농도로 96 well plate에 접종하고 5% CO₂ 배양기에서 4시간 부착시켰다. 배지 상등액을 제거하고 농도 별(1,000, 100, 10 μ g/ml)로 조제한 시료와 LPS (1 μ g/ml)를 24시간 동안 CO₂ 배양기에서 반응시켜 얻은 배양 상등액을 cytokine 측정에 사용하였다. 측정방법은 제조사의 지시에 따라 수행하였다. Assay diluent 50 μ l를 각 well에 분주한 후, 세포배양 상등액 50 μ l씩 첨가한 후 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 washing buffer를 이용하여 3회 세척하고 각각 conjugate 100 μ l를 처리하여, 2시간 실온에서 반응시켰다. Washing buffer를 이용 3회 세척 후, 기질 용액 (Substrate solution)을 100 μ l를 분주하고, 암소에서 30분간 반응 후 100 μ l의 효소 반응 정지 용액 (Stop solution)을 처리하였다. 실온에서 10분간 반응한 후 ELISA plate reader (Epoch; BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

히알루론산의 iNOS 및 COX-2 mRNA 발현측정

히알루론산의 iNOS 및 COX-2 mRNA 발현량 측정은 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 2×10^5 cells/ml로 농도로 100 cell culture dish에 접종하고 5% CO₂ 배양기에서 4시간 부착시켰다. 배지 상등액을 제거하고 10 μ g/ml로 조제한 시료와 LPS (1 μ g/ml)를 24시간 동안 CO₂ 배양기에서 반응시켜 얻은 세포를 mRNA측정에 사용하였다. 세포의 total RNA 분리를 위해, RNeasyMinikit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하였다. 분리된 total RNA의 정량은 RNA nano kit (2100 Bioanalyzer system, Agilent Technologies, USA)로 측정하고, total RNA가 500 ng/ μ l가 되도록 희석하였다. iScript™ Select cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 사용하여 cDNA를 합성하고 -70°C에서 보관하여 사용하였다. 유전자 발현량 측정을 위해 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), iNOS (inducible NO synthase), COX-2 (Cyclooxygenase-2) primer를 Bioneer corporation에 의뢰 제작하여 사용하였다 (Table 1).

cDNA 합성된 시료 2 μ l와 각각의 유전자에 대한 primers를 SsoFast™ EvaGreen® Supermix with low ROX (Bio-Rad Laboratories, Inc.)로 혼합한 후, 초기 변성(denaturation)은 95°C에서 3분간 수행하였으며, 증폭을 위해 95°C에서 10초간, 55°C에서 10초간, 72°C에서 30초간 반응시켜 이를 40회 반복 수행하였다. Cytokine mRNA 발현량은 glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH) 유전자를 내부대조군(internal control)으로 보정하여 각각의 유전자 발현 양상을 정량적으로 비교 분석하였다. SYBR green을 이용한 RT-PCR의 신뢰성을 확인

Table 1. Oligonucleotide primers for real-time polymerase chain reaction (qPCR) analysis of pro-inflammatory gene expression

Target	Sequence	Sequence type	bp
GAPDH	cgtgccgcctggagaaacc	sense	129
	tgctgttgaagtcgcaggagac	anti-sense	
iNOS	tggaggttctggatgagagc	sense	95
	aatgtccaggaagtaggtgagg	anti-sense	
COX-2	gccgactaaatcaagcaacagtaac	sense	100
	catttctaggacaatggcataaagc	anti-sense	

GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), iNOS (inducible NO synthase), COX-2 (Cyclooxygenase-2)

하기 위해 melting curve를 분석하여 cytokine mRNA fold 값으로 나타내었다.

통계처리

본 연구의 통계처리는 SPSS software program (Statistical Package for Social Science, version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)에 의해 수행되었으며, 사후분석은 95% 신뢰수준에서 정상군 대비 다른 집단 간의 유의성을 Student's paired t-tests에 의하여 검정하였다.

결과 및 고찰

항화된 히알루론산(S-HA)의 수율

S. dysgalactiae 배양액으로부터 HA-WI를 분리하고, 용해도 및 항원성이 개선된 히알루론산을 얻기 위해 S-HA 유도체를 합성하였다. 그 결과 Table 2와 같이 HA-WI로부터 90%의 수율로 S-HA가 분리 정제되었다.

$$\text{Yield}(\%) = \frac{\text{Dry weight of sulfated hyaluronic acid (g)}}{\text{Dry weight of water insoluble hyaluronic acid (g)}} \times 100$$

히알루론산의 FT-IR 및 NMR 구조분석

FT-IR 분석은 분자 간 결합의 화학적 결합상태를 진동을 통해 동정하는 방법이다. S-HA의 FT-IR 양상은 Fig. 3 및 Table 3과 같이 표준물질인 HA와 HA-WS, HA-WI가 유사한 pattern을 나타내었다. HA와 S-HA 유도체의 구조적 차이는

Table 2. Yield of chemically sulfated-hyaluronic acid (S-HA) prepared from insoluble hyaluronic acid (HA-WI) obtained from *S. dysgalactiae*

Solvent fractions	Dry extract (g)/ 0.32 g	Yields (%)
Sulfated hyaluronic acid	0.288	90.0%

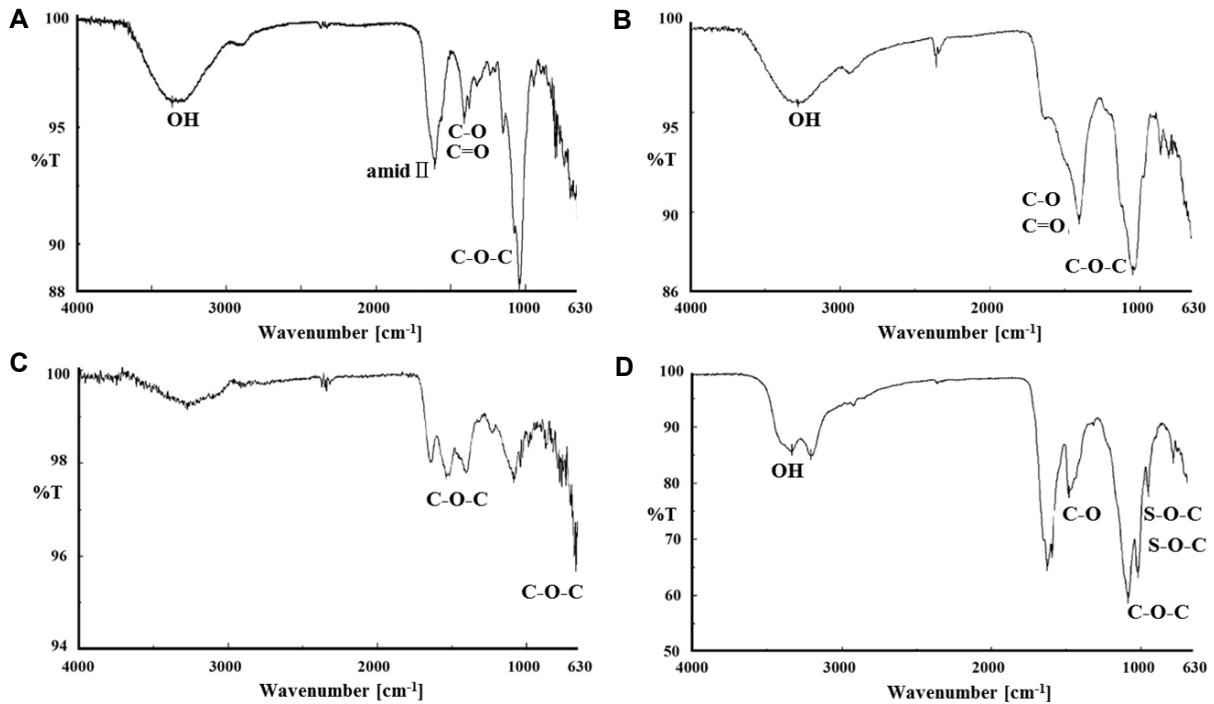


Fig. 3. FT-IR spectrum of (A) standard hyaluronic acid (HA), (B) hyaluronic acid-water soluble (HA-WS), (C) hyaluronic acid-water insoluble (HA-WI), and (D) sulfated-hyaluronic acid (S-HA).

당 잔기의 sulfate의 결합이며, FT-IR와 NMR 분석으로 통해 sulfate기가 결합하고 있음을 확인하였다. FT-IR 결과 히알루론산은 공통적으로 C-O-C stretching, C-O, C=O group, amid II group 및 OH stretching 피크가 확인되었으며 S-HA에는 S-O-C group의 피크를 나타내어 S기로 치환된 것을 확인하였다. 히알루론산과 히알루론산 유도체는 전형적인 당고리 결합 구조를 가지고 있으며, 이는 Alkrad 등에 의해 수행된 히알루론산 유도체의 FT-IR패턴 연구결과와 유사하였다[1].

양친매성 고분자(amphiphilic macromolecules)는 수용액 환경에서 자기 조립 특성이 있으므로, NMR의 구조적 특성을 확인하기 위해 HA를 D₂O에 녹여 ¹H/¹³C NMR 스펙트럼으로 조사하였다. Fig. 4는 HA, HA-WS와 S-HA의 ¹H/¹³C NMR

스펙트럼을 나타낸 것이며, 각각의 특성 피크를 확인한 결과, 합성된 S-HA는 미생물에서 분리한 천연 히알루론산 HA와 가용성 히알루론산(HA-WS)보다 특성 피크가 이동됨으로써 황화가 성공적으로 이루어진 것으로 확인하였다. 즉, ¹H NMR 스펙트럼에서, 히알루론산 메틸기의 피크인 2.0 ppm이 S-HA의 피크인 1.4 ppm로 이동하여 황으로 치환되었음을 확인하였다. 이러한 결과는 Choi 등의 연구결과와 유사하였다[7].

황화된 히알루론산이 RAW 264.7 대식세포주 생장에 미치는 영향

대식세포로부터 염증매개 물질의 억제 효과는 세포독성으로 인해 RAW 264.7 세포가 사멸되는 것에 의해서도 나타날 수 있으므로 이러한 가능성을 배제하고자 RAW 264.7 cell에 미치는 추출물의 세포 독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 시료 농도 200, 50 및 12.5 µg/ml의 농도로 첨가하여 24시간 배양 후 MTT assay 결과 Fig. 5와 같이 세포의 생존율은 HA, HA-WS, HA-WI 및 S-HA에서 생리식염수를 처리한 대조군과 세포증식에 큰 차이가 없었다. HA, HA-WS, HA-WI 및 S-HA은 생리식염수를 투여한 정상군(Normal)의 성장률 100%를 기준으로 98.14±0.2%로 세포독성이 없고 정상적인 증식을 나타냈다. 이 같은 결과는 히알루론산이 세포 증식은 큰 영향을 주지 않는다는 Park의 결과와 유사하였다 [24].

Table 3. The peak numbers and positions of FT-IR spectrum both the reference HA standard and HA (HA-WS, HA-WI, and S-HA) produced by *S. dysgalactiae*

Functional group	Wavelength (cm ⁻¹)			
	HA standard	HA-WS	HA-WI	S-HA
C-O-C stretching	1041.37	1050.05	1086.69	1020.16
C-O, C=O	1409.71	1405.85	-	1482.99
Amid II group	1608.34	-	-	-
OH stretching	3357.64	3283.21	-	3339.14
				781.029
S-O-C group	-	-	-	950.734
				1020.16

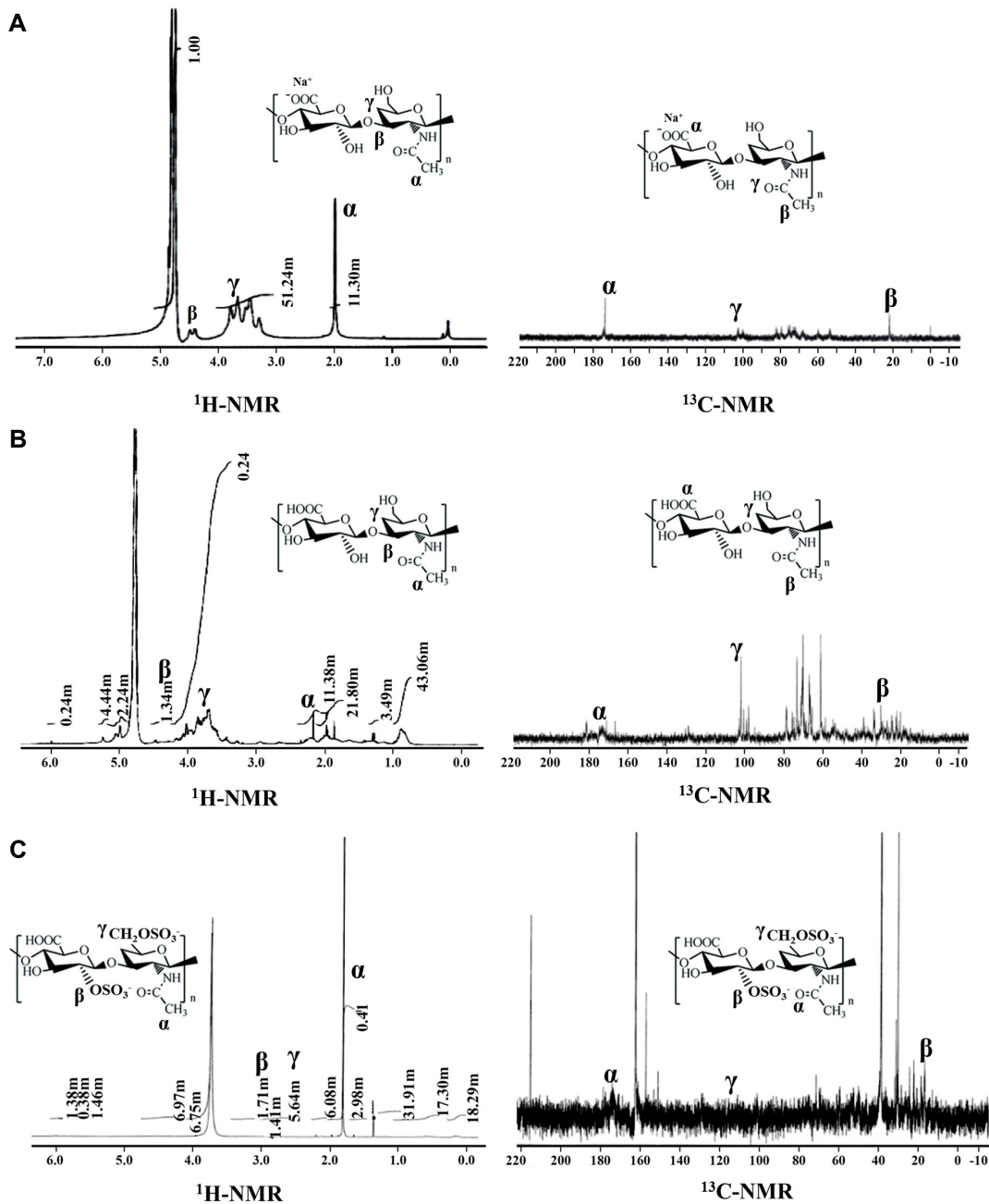


Fig. 4. ¹H and ¹³C NMR spectral analysis of (A) HA (Hyaluronic acid), (B) HA-water soluble (Hyaluronic acid-water insoluble), and (C) S-HA (sulfated hyaluronic acid) produced by *S. dysgalactiae*.

황화된 히알루론산에 의한 RAW 264.7 세포의 Nitric oxide (NO) 생성

대식세포는 면역조절 작용으로 다양한 cytokine과 NO 생성 및 분비를 통해 항원성 물질로부터 생체방어와 면역반응에 작용한다[28]. 히알루론산이 RAW 264.7 대식세포에 NO₂ 생성량을 확인한 결과는 Fig. 7과 같다. 본 실험에 사용된 RAW 264.7 세포에 HA, HA-WS, HA-WI 및 S-HA를 각각 200, 50 및 12.5 µg/ml의 농도별로 처리하였으며, LPS (1 µg/ml) 단독 처리하여 음성 대조군으로 사용하였다. HA-WS 그룹을 제외

한 모든 그룹에서 정상군과 유사한 NO 생성량을 나타내었으며, HA-WS 그룹에서는 LPS와 같은 수준의 NO₂ 생성량을 나타내었다.

RAW 264.7 대식세포의 Cytokine 생성에 미치는 영향

인체에서 염증반응에 관여하는 인자로는 NO와 PGE₂와 같은 염증 매개성 물질 이외에 면역 반응에 필수적인 염증관련 cytokine으로 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 등이 대표적이다[25]. 이중 TNF-α는 중앙괴사인자로서 내재면역반응 및 염증반응에 필

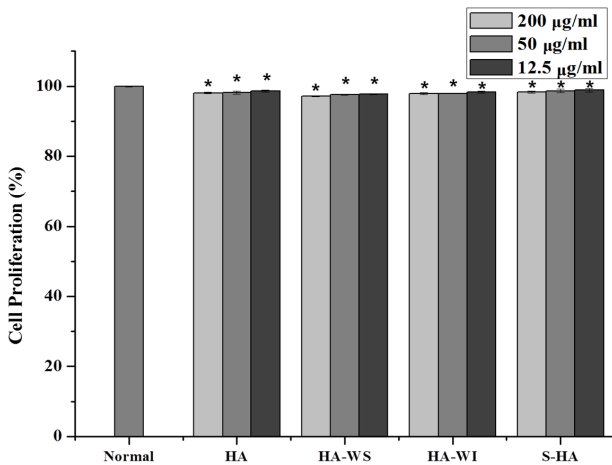


Fig. 5. Effect of hyaluronic acid (HA) on the viability of RAW 264.7 murinae macrophages. Cell viability was measured using an MTT assay. The relative cell viability was calculated by comparing the absorbance of the HA- and LPS-treated groups to that of the control group. Data are expressed as the mean \pm SD (n = 3) of three independent biological replicates. * p <0.05 is the comparison done against Normal group by Student's t-test. Normal; Phosphate buffer, HA; standard hyaluronic acid (IL-Dong Pharma. Co.), HA-WS; water soluble HA from *S. dysgalactiae*. HA-WI; water insoluble HA from *S. dysgalactiae*, S-HA; chemically sulfated HA of water insoluble HA (HA-WI).

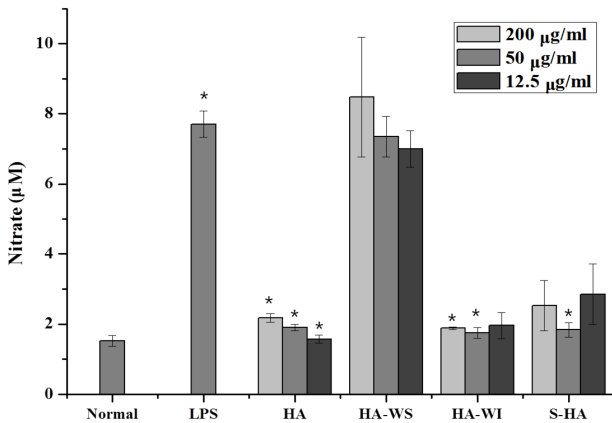


Fig. 6. Effects of HA on the production of nitric oxide in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (5×10^5 cells/ml) were cultured with LPS (1 µg/ml) in the presence or absence of HA (200, 50 and 12.5 µg/ml) for 24 hr to determine the level of NO. Normal: saline, LPS not induced group, LPS: Control group, LPS induced group. HA; standard hyaluronic acid, HA-WS; water soluble HA. HA-WI; water insoluble HA, S-HA; chemically sulfated HA of water insoluble HA (HA-WI). The data represent the mean \pm SD of three separate experiments * p <0.05 is the comparison done against Normal group by Student's t-test.

수적으로 관여하여 활성화된 대식세포, 보조 T 세포, 자연살해 세포 등에서 분비된다[20]. TNF- α , IL-1 β 및 IL-6는 대표적인

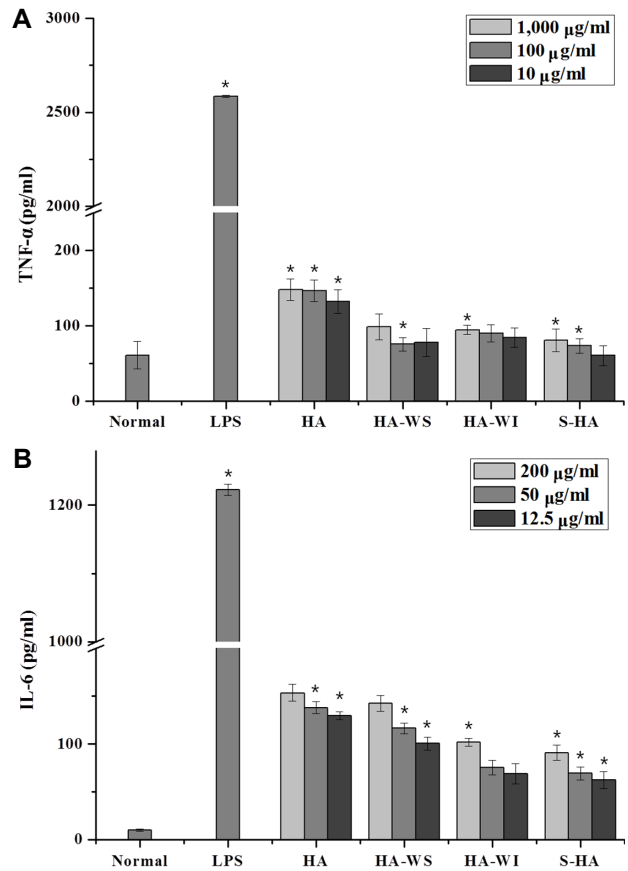


Fig. 7. Effect of Hyaluronic acid on TNF- α (A) and IL-6 (B) production in RAW 264.7 cell by LPS. Production of TNF- α and IL-6 was measured in the medium of RAW 264.7 cells (5×10^5 cells/ml) cultured with LPS (1 µg/ml) in the presence or absence of HA for 24 hr. The Quantitative analysis of TNF- α and IL-2 was measured by immuno assay. Normal: saline, LPS not induced group, LPS: Control group, LPS induced group. HA; standard hyaluronic acid, HA-WS; water soluble HA. HA-WI; water insoluble HA, S-HA; chemically sulfated HA of water insoluble HA (HA-WI). The data represent the mean \pm SD of three separate experiments. * p <0.05 is the comparison done against Normal group by Student's t-test.

염증성 cytokine으로 NO를 생성하는 매개물질로서 국소 염증을 발생시켜 T 세포 활성화, B 세포 성숙과 NK 세포를 활성화시키는 cytokine이다[22]. 따라서 황화된 히알루론산이 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAW 264.7 세포에 LPS 처리한 음성대조군과 히알루론산을 농도별로 처리하여 ELISA 방법으로 TNF- α 및 IL-6를 측정하였다. 그 결과(Fig. 7A, B)와 같이 cytokine들은(TNF- α 및 IL-6) 모두 농도 의존적으로 감소하는 결과를 나타내었다. 종양괴사인자인 TNF- α 의 경우 LPS (1 µg/ml)에서는 2,584 pg/ml로 높은 생성량을 보였으나, 모든 히알루론산 처리군에서는 150 pg/ml 이하의 낮은 생성량을 나타내었다. S-HA의 경우,

1,000, 100 및 10 µg/ml 농도로 RAW 264.7에 처리하였을 때 생성된 TNF-α의 농도는 80.64, 73.31 및 60.64 pg/ml로 각각 정량되어 투여농도에 의존적이었다. 즉, S-HA에 의한 TNF-α 생성 정도는 HA보다 10 µg/ml 투여 농도수준에서 54.13% 낮은 비율로 생성되었으며, 황화되지 않은 비수용성 히알루론산, HA-WI와 비교하더라도 28.26% 정도 낮게 생성되었다. 또한 IL-6의 생성 정도는 황화된 히알루론산, S-HA을 200, 50, 12.5 µg/ml 농도로 처리하였을 때 각각 90.69, 69.18 및 62.20 pg/ml IL-6를 생성하였으며, 이 같은 결과는 양성대조물질인 HA보다 12.5 µg/ml의 투여농도에서 52.02% 적은 수준으로 생성되었다. 또한, HA-WI와 비교할 경우 12.5 µg/ml 투여 농도에서 9.51% 낮은 IL-2 생성률을 보였다. 이 같은 결과로 볼 때 황화된 S-HA은 RAW 264.7 대식세포에서 염증매개성 cytokine TNF-α와 IL-6의 생성을 천연 HA 및 HA-WI 보다 10-50% 수준으로 억제하여 항염증 효과를 확인하였다.

황화된 히알루론산이 RAW 264.7 대식세포의 iNOS 및 COX-2 생성에 미치는 영향

Nitric oxide synthase (NOS, EC 1.14.13.39)는 L-arginine을 L-citrulline으로 전환시켜, NO를 생성시킨다. 이러한 NOS는 iNOS에 의해 발현되는 것으로 염증 유발에 임상적으로 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[19]. 염증 반응이 나타나면 주요관련 세포 중 특히, 대식세포에서 iNOS의 발현이 증가하여 많은 양의 NO가 생성되면 조직손상, 유전자변이, 신경손상을 유발하며 혈관 투과성을 증가시켜 부종과 같은 염증 반응을 촉진시킨다[37]. COX-2는 염증매개 물질인 PGE₂의 형성촉진에 관여하고[9], NF-κB는 염증반응과 관련된 유전자의 promoter에 결합하며 cytokine 및 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 염증관련인자 노출에 의해 iNOS 및 COX-2 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있다[6]. 따라서 염증 반응의 주요인자인 iNOS 및 COX-2의 유전자발현량을 확인하여 염증 반응을 확인하였다. 세포로부터 추출된 RNA는 Agilent 2100 bioana-

Table 4. Qualitative and quantitative analysis if total RNA by bioanalyzer

Sample	RNA concentration [ng/ml]	rRNA Ratio [28S/18S]	RIN*
Normal	656	2.0	10
LPS	575	2.1	9.40
Standard	549	1.9	9.30
HA-WS	418	2.2	9.40
HA-WI	620	2.0	10S-HA5292.19.90

*RIN: RNA Integrity Number. Standard; Hyaluronic acid, Il-dong Pharmaceutical Co., Ltd, HA-WS; Water soluble hyaluronic acid, HA-WI; Water insoluble hyaluronic acid, S-HA; Sulfated hyaluronic acid, LPS; Lipopolysaccharide.

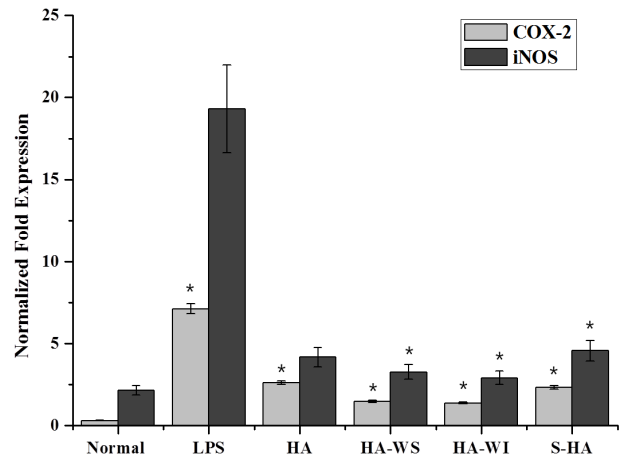


Fig. 8. Effect of HA on the levels of iNOS and COX-2 gene expression in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cells (5×10⁵ cells/ml) were cultured in the presence or absence of HA (200, 50 and 12.5 µg/ml) or LPS (1 µg/ml) for 24 hr. The levels of iNOS and COX-2 gene expression were determined by qRT-PCR. Normal: saline, LPS not induced group, LPS: Control group, LPS induced group. HA; standard hyaluronic acid, HA-WS; water soluble HA. HA-WI; water insoluble HA, S-HA; chemically sulfated HA of water insoluble HA (HA-WI). The data represent the mean ± SD of three separate experiments. *p<0.05 is the comparison done against Normal group by Student's t-test.

lyzer를 사용하여 gel image를 분석하였고, 각각의 히알루론산 시료를 처리한 RAW 264.7 세포에서 분리한 total RNA는 RNA ratio (28s/18s)값이 1.7 이상, RNA integrity number (RIN)값이 8.0 이상으로 cDNA 합성에 사용하였다(Table 4). RAW 264.7 세포에 히알루론산 시료를 10 µg/ml 농도로 처리하고 iNOS 및 COX-2 발현량을 측정한 결과(Fig. 8), LPS 음성대조군은 iNOS 및 COX-2의 발현량은 각각 19.3, 7.11배로 현저히 증가하였으나, 모든 히알루론산 그룹에서 염증관련 유전자 발현량은 4.5 및 2.6 이하로 현저히 떨어지는 것으로 나타났다(Fig. 9). 따라서 히알루론산 시료는 항원성 물질로서 염증반응에 관여하지 않는 것으로 확인되었다. 이 같은 결과는 황화시킨 히알루론산(S-HA)은 기존 히알루론산보다 항염증반응적용해도가 우수하여 성형 및 생체 적용소재로 그 이용 가능성이 높을 것으로 여겨진다.

감사의 글

본 논문은 중소기업청에서 지원하는 2015년도 이공계 전문가 기술개발 서포터즈 사업(No. C0335991)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

1. Alkrad, J. A., Mrestani, Y., Stroehl, D., Wartewig, S. and Neubert, R. 2003. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. *J. Pharmaceut. Biomed.* **31**, 545-550.
2. Allison, D. D. and Grande-Allen, K. J. 2006. Review. Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool. *J. Tissue Eng.* **12**, 2131-2140.
3. Bernanke, D. H. and Orkin, R. W. 1984. Hyaluronidase activity in embryonic chick heart muscle and cushion tissues and cells. *J. Dev. Biol.* **106**, 351-359.
4. Boeriu, C. G., Springer, J., Kooy, F. K., van den Broek, L. A. M. and Eggink, G. 2013. Production methods for hyaluronan. *J. Carbohydr. Chem.* **2013**, 14.
5. Burdick, J. A. and Prestwich, G. D. 2011. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *J. Adv. Mater.* **23**, 41-56.
6. Celec, P. 2004. Nuclear factor kappa B-molecular biomedicine: the next generation. *Biomed. Pharmacother.* **58**, 365-371.
7. Choi, C. Y., Park, J. K., Kim, W. S., Jang, M. K. and Nah, J. W. 2011. Preparation and characterization of deoxycholic acid-grafted hyaluronic acid as a drug carrier. *Polym. Korea.* **35**, 119-123.
8. Condie, R. C. and Prestwich, G. D. 2010. Engineering clinically useful hyaluronan matrices. In: Vernon, B. (ed.), *Injectable Biomaterials: Science and application*. Woodhead Publishing Limited: London, United Kingdom.
9. Duerksen-Hughes, P. J., Day, D. B., Laster, S. M., Zachariades, N. A., Aquino, L. and Gooding, L. R. 1992. Both tumor necrosis factor and nitric oxide participate in lysis of simian virus 40-transformed cells by activated macrophages. *J. Immunol.* **149**, 2114-2122.
10. Fraser, J. R., Laurent, T. C. and Laurent, U. B., 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* **242**, 27-33.
11. Girish, K. S. and Kemparaju, K. 2007. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase a biological overview. *J. Life Sci.* **80**, 1921-1943.
12. Han, M. D., Han, Y. S., Hyun, S. H. and Shin, H. W. 2008. Solubilization of water-insoluble beta-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. *J. Environ. Biol.* **29**, 237-42.
13. Hiro, D., Ito, A., Matsuta, K. and Mori, Y. 1986. Hyaluronic acid is an endogenous inducer of interleukin-1 production by human monocytes and rabbit macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **140**, 715-722.
14. Hwang, S. G., Yang, A. N., Kim, S. J., Kim, M. K., Oh, H. J., Lee J. D., Lee, E. J., Nam, K. W. and Han, M. D. 2014. Screening of hyaluronidase inhibitor in Korean medicinal plants. *J. Life Sci.* **24**, 498-504.
15. Kuo, J. W. 2006. Practical aspects of hyaluronan based medical products. pp. 217. *CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, United States*.
16. Kuo, J. W. and Prestwich, G. D. 2010. Hyaluronic acid. pp. 239-259 In: Ducheyne, P., Healy, K., Huttmacher, D., Kirkpatrick, J. (eds), *Comprehensive biomaterials*. Elsevier Publishers: Amsterdam, Netherlands.
17. Laurent, T. C. and Fraser, J. R. 1986. The properties and turnover of hyaluronan. *Ciba Found. Symp.* **124**, 9-29.
18. Laurent, T. C. and Fraser, J. R. 1992. Hyaluronan. *FASEB J.* **6**, 2397-2404.
19. Lim, H. R. and Shin, S. W. 2010. Effects of the essential oil components from *Ligusticum chuanxiong* on proinflammatory mediators of RAW264.7 macrophage cells. *Nat. Prod. Sci.* **16**, 259-264.
20. Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G. and Chen, J. 2011. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microb. Cell Fact.* **10**, 99.
21. Locksley, R. M., Killeen, N. and Lenardo, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501.
22. Masters, S. L., Simon, A. A., Akseptijevich, I. and Kastner, D. L. 2009. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 621-668.
23. Mosmann, T. 1985. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
24. Park, H. S., Kim, A. R. and Noh, I. 2013. Physical and biological evaluations of cross-linked hyaluronic acid film. *Biomater. Res.* **17**, 153-159.
25. Park, S. G., Jegal, K. H., Jung, J. Y., Back, Y. D. Byun, S. H., Kim, Y. W., Cho, I. J., Park, S. M. and Kim, S. C. 2014. *Leonuri Fructus* ameliorates acute inflammation via the inhibition of NF- κ B-mediated nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **28**, 178-185.
26. Prestwich, G. D. 2007. Simplifying the extracellular matrix for 3-D cell culture and tissue engineering: a pragmatic approach. *J. Cell. Biochem.* **101**, 1370-1383.
27. Prestwich, G. D. and Kuo, J. W. 2008. Chemically-modified HA for therapy and regenerative medicine. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **9**, 242-245.
28. Ritchlin, C. T., Haas-Smith, S. A., Li, P., Hicks, D. G. and Schwarz, E. M. 2003. Mechanisms of TNF- α - and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J. Clin. Invest.* **111**, 821-831.
29. Ruggiero, S. L., Bertolami, C. N., Bronson, R. E. and Damiani, P. J. 1987. Hyaluronidase activity of rabbit skin wound granulation tissue fibroblasts. *J. Dent. Res.* **66**, 1283-1287.
30. Shiedlin, A., Bigelow, R., Christopher, W., Arbabi S, Yang, L., Maier, R. V., Wainwright, N., Childs, A. and Miller, R. J. 2004. Evaluation of hyaluronan from different sources: *streptococcus zooepidemicus*, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. *Biomacromolecules* **5**, 2122-2127.
31. Shu, X. Z. and Prestwich, G. D. 2001. Therapeutic Biomaterials from Chemically Modified Hyaluronan. pp. 475-504. In: Hales, C. A. (ed.), *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. Woodhead Publishing Limited: London, United Kingdom.
32. Toole, B. P. 2001. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**, 79-87.

33. Toole, B. P. 2004. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 528-539.
34. Wang, S., Chen, Y., He, D., Yang, Y., Chen, J. and Wang, X. 2007. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with *Gastrodia* and *Uncaria* decoction, a traditional Chinese formulation. *J. Ethnopharmacol.* **114**, 458-462.
35. Weiss, C. 1998. Viscoseparation and viscoprotection as therapeutic modalities in the musculoskeletal system. pp. 255-266. In: Laurent, T. C. (ed.) *The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives.* Woodhead Publishing Limited: London, The United Kingdom.
36. West, D. C., Hampson, I. N., Arnold, F. and Kumar, S. 1985. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* **228**, 1324-1328.
37. Yun, H. Y., Dawson, V. L. and Dawson, T. M. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit. Rev. Neurobiol.* **10**, 291-316.

초록 : *Streptococcus dysgalactiae*로부터 분리된 히알루론산과 황화된 유도체의 구조와 항염증 활성

홍창일¹ · 정의길¹ · 한국일¹ · 김용현² · 이성희² · 이홍섭³ · 한만덕^{1*}
 (¹순천대학교 생명시스템학과, ²(주)한국비엠아이, ³일동제약(주))

히알루론산(HA, Hyaluronic acid)은 β -1, 3-N-acetyl glucosamine과 β -1, 4-glucuronic acid가 반복된 선형 폴리머 고분자로서 생물학적 활성 및 생체친화성 특성 때문에 의약 및 약학분야에서 중요한 분자로 여겨지고 있다. 본 연구는 HA을 *S. dysgalactiae*으로 얻고, 화학적 방법을 통해 황화된 히알루론산(S-HA, Sulfated hyaluronic acid) 유도체를 합성하여 그 구조와 항염증 활성을 비교하였다. HA의 생산은 *S. dysgalactiae*를 5 l 생물반응기를 이용하여 대량 배양하여 수용성 히알루론산(HA-WS, water soluble hyaluronic acid)과 비수용성 히알루론산(HA-WI, water insoluble hyaluronic acid)을 분리 정제하였다. 특히 HA-WI를 황화시켜 황화된 히알루론산(S-HA) 유도체를 합성하였으며, 그 수율은 90%로 나타났다. 합성된 S-HA의 구조를 FT-IR 및 ¹H/¹³C-NMR를 통해 *S. dysgalactiae*로부터 생산된 표준 HA, HA-WS 및 HA-WI와 비교 분석한 결과, 황으로 치환된 양상을 확인하였다. 또한, S-HA의 항염증 활성을 RAW 264.7 대식세포를 통해 확인한 결과, S-HA는 천연 형태의 HA (HA, HA-WS)보다 nitric oxide (NO)와 COX-2 및 PGE₂ 유전자 발현이 유의하게 낮게 발현되었다. 염증 매개 cytokine인 TNF- α (<80 pg/ml) 및 IL-6 (<100 pg/ml)의 생성도 S-HA가 천연 HA보다 낮은 수준으로 정량되었다. 이 같은 결과에서 황화된 S-HA는 천연 히알루론산보다 용해성이 우수하고 염증관련 사이토카인의 생성 억제를 통해 항염증 효과를 나타내므로 염증치료제, 성형 및 생체 적용 약물전달 소재로 그 활용이 기대된다.