



Anti-inflammatory effect potentials of ethanol extracts from fermented *Caryopteris incana* by *Lactobacillus plantarum* on induced to LPS with Raw 264.7 cell

Mi-Jeong Park¹ · Hye-Jin Park¹ · Eun-Ho Lee¹ · Hee-Young Jung² · Young-Je Cho¹

LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서 *Lactobacillus plantarum* 발효가 층꽃나무(*Caryopteris incana*) 에탄올 추출물의 염증반응에 미치는 영향

박미정¹ · 박혜진¹ · 이은호¹ · 정희영² · 조영제¹

Received: 7 February 2018 / Accepted: 16 April 2018 / Published Online: 30 June 2018
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2018

Abstract In this study, the inflammation of ethanol extracts from *Caryopteris incana* (CI) and fermented *C. incana* (FCI) on induced to lipopolysaccharide with Raw 264.7 cell was tested. The composition profile of *L. plantarum* was changed by fermentation, and confirmed by HPLC analysis. We performed the 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay to evaluate the toxicity of CI and FCI extracts. In cell viability, cell toxicity was not shown at 5, 10 and 15 µg/mL of CI extracts and 10, 20, 30 and 40 µg/mL of FCI extracts. The results of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 protein production were confirmed to be inhibitory in a concentration-dependent manner, respectively. Additionally, protein expression of nitric oxide and prostaglandin E₂ by CI and FCI extracts were also inhibited in a concentration-dependent manner. In the result

of pro-inflammatory cytokine, 15 µg/mL concentration of CI extracts was showed tumor necrosis factor (TNF)-α (57.3%), interleukin (IL)-6 (35.2%), and IL-1β (48.0%), respectively. And 40 µg/mL of FCI extracts was showed TNF-α (34.6%), IL-6 (32.1%), and IL-1β (30.0%), respectively. These results suggest that FCI extracts showed better effect of anti-inflammatory than CI extracts. Therefore, it was found that both CI and FCI can be used as an excellent material for the development of new anti-inflammatory resource.

Keywords Anti-inflammation · *Caryopteris incana* · Fermentation · *Lactobacillus plantarum* · Raw 264.7 cell

Young-Je Cho (✉)
E-mail: yjcho@knu.ac.kr

¹School of Food science & Biotechnology/Food & Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, 80 University Street, Bukgu, Daegu 41566, Republic of Korea

²School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

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

서론

염증반응은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어 반응으로써 정상적인 상태에서는 항원항체 반응을 통해 질병을 일으키는 항원을 제거 하지만, 비정상적인 상태의 만성염증반응의 경우, 특정한 조직을 손상시키고 아토피, 관절염, 건선 등과 같은 각종 질환을 유발한다[1]. 면역체계에서 대식세포(macrophage)는 활성산소, stress 등과 같은 여러 가지 자극에 의해 발현되는 염증반응을 억제하여 면역기능을 조절하고 체내 항상성 유지에 매우 중요한 역할을 한다[2]. 그람음성균(gram-negative bacteria)의 외막 성분에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포 막 수용체인 TLR-4를 통해 세포 내부로 신호를 전달한다[3]. 중요

한 염증 매개 물질인 transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1)은 효소 복합체인 inhibitory kappa B kinase β 를 인산화 시키는데, 이를 통해 활성화 된 IKK β 가 nuclear factor-kappa B (NF- κ B)의 억제 인자인 inhibitory kappa B alpha를 분해하게 되고 활성화된 NF- κ B는 핵 내로 이동한다[4, 5]. 결과적으로 핵 내로 이동된 NF- κ B는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase (COX)-2와 같은 염증성 효소와 interleukin (IL)-6, IL-1 β , Tumor necrosis factor (TNF)- α 같은 pro-inflammatory cytokine 발현을 일으킨다[6]. iNOS는 L-arginine이 L-citrulline으로 변환되는 과정에 관여하여 많은 양의 NO를 생성하고 염증과 관련된 질병을 유발하며[7], COX-2는 arachidonic acid가 발열과 통증에 작용하는 염증 유발 물질인 prostaglandin E₂ (PGE₂)로 바뀌는 과정에 관여한다[8].

층꽃나무(*Caryopteris incana*)는 다년초로 한국, 중국, 타이완, 일본에 걸쳐 널리 분포하고 있으며 한국에서는 주로 산과 들에 서식한다. 30-60 cm 높이의 줄기는 곧추서고 기부가 목질이며, 화서는 층층으로 배열되고, 검은색을 띠는 열매는 9-10월에 열린다[9]. 전초 또는 뿌리를 약용하며, 생약명은 난향초(蘭香草)라 한다. 층꽃나무의 전초에는 flavonoid 배당체와 phenol류, alkaloid, steroid, amino acid, 유기산, tannin을 함유하고 있으며 [10,11,12], 수렴작용, 기침, 가래, 기관지염, 신경통, 종기, 월경 불순, 어혈, 타박상, 습진, 피부, 가려움증 치료에 쓰이고 *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*에 대한 항균작용이 있는 것으로 알려져 있다[13].

한편, 유산균, 효모 등의 미생물은 외부로부터 영양성분을 세포 내로 섭취하면, 영양성분들은 미생물 내의 효소에 의해 분해되는 대사(metabolism)과정을 거치면서 발효대사산물로 전환된다[14]. 이러한 미생물을 이용하여 천연물을 발효할 경우 total polyphenol 및 flavonoid 함량 증가, 항산화 효과 증가, 세포 독성 감소 등의 다양한 이점이 나타나며, 특히 천연물 중 하나인 한약재를 발효할 경우 약효 성분의 체내 흡수율이 증가되는 것으로 보고되고 있다[15,16]. 최근 미생물을 이용한 발효 기술이 진보하면서 천연물에 이를 적용하여 생리활성 효능을 증가시키거나 변환시키는 발효산물에 대한 연구가 증대되고 있는데, 그 예로 *Sacharomyces cerevisise*를 이용하여 발효한 홍삼에서 면역 증강 및 항염증 효과가 상승되는 결과가 보고된 바 있으며 [17], *Lactobacillus rhamnosus* HK-9 발효에 의한 배조향 잎 추출물은 피부의 항산화 및 항염증 활성이 증대되는 것으로 나타나[18] 천연물을 이용하여 미생물 발효 기술을 적용한 연구와 제품 개발에 대한 기대가 높아지고 있다.

본 연구에서는 자연계에서 가장 넓게 분포하는 것으로 알려진 젖산균의 일종인 *Lactobacillus plantarum*을 이용하여 발효한 층꽃나무의 추출물을 이용하여 LPS를 처리해 염증반응을 유도한 Raw 264.7 cell에서의 항염증 효능의 변화를 확인하고자 하였다. 이를 위해 추출물이 염증반응에 관여하는 NO 및 PGE₂ 생성량과 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 정도를 확인하고, 더 나아가 pro-inflammatory cytokine 발현 정도에 미치는 영향을 비교 조사하여 층꽃나무가 생산하는 천연물에 의한 항염증 소재 개발의 가능성을 확인하여 산업화 이용을 위한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용된 층꽃나무(*C. incana*)는 경기도 파주 소재의 농장에서 판매되는 원물을 구입하여 사용하였고, 전초를 50 °C dry oven (Jeiotech, Daejeon, Korea)에서 건조시킨 후, 40 mesh로 분쇄하여 일정한 입자로 분리한 다음 진공 포장하여 4 °C에서 저온 저장하며 시료로 사용하였다.

시약 및 기기

페놀 함량 측정에 사용된 Folin-Ciocalteu reagent는 Junsei (Tokyo, Japan)사에서, HPLC용 methanol은 Duksan Pure Chemical Co., Ltd. (Gyeonggi, Korea)에서 구입하였다. 세포 배양 시 사용한 dulbecco's modified eagles medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin 등은 Hyclone (Logan, UT, USA)사에서 구입하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), methyl sulfoxide (DMSO), LPS는 Sigma (St. Louis, MO, USA)사, phosphate buffered saline (PBS)는 Gibco (Gibco, Grand Island, NY, USA)사에서 구입하여 사용하였다. Mammalian protein extraction reagent (M-PER)와 protease inhibitor cocktail은 Thermo-Fisher Scientific (San Joes, CA, USA)사, 1차 antibody는 COX-2는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA), iNOS는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA), GAPDH는 Thermo (Wilmington, DE, USA)에서 각각 구입하였으며, 2차 antibody는 Santa cruz biotechnology Inc.에서 구입하여 사용하였다. Griess reagent system은 Promega (Madison, WI, USA), TNF- α , IL-1 β 와 IL-6, PGE₂의 ELISA kit는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)사에서 구입하였으며, 그 외의 시약들은 특급 시약을 사용하였다. 측정 기기는 UV-Vis spectrophotometer (Optizen 3220UV, Mecasys, Daejeon, Korea), HPLC (HP series 1100, Hewlett Packard, Walbronn, Germany), SPECTRO star Nano ELISA reader (BMG LabTech, Ortenberg, Germany), C 300 image analyzer (Azure biosystems, Dublin, CA, USA) 등을 사용하여 측정하였다.

젖산균 *L. plantarum* 배양

본 실험에서 사용한 *L. plantarum*은 가자미식해에서 분리한 균으로 경북대학교 식품공학부에서 보관중인 균주를 사용하였다. 균주의 보존은 균 배양액으로 12% glycerol (Junsei Chemical)이 되도록 조성하여 -70 °C deep freezer에서 보관하며 사용하였다. Conical tube에서 MRS broth (Difco™ *Lactobacilli* MRS, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) 배지 5 mL에 1 회 계대 배양한 후, 삼각 플라스크에 MRS broth 배지 300 mL에 젖산균 배양액을 접종하여 37 °C incubator에서 24시간 정 치배양으로 증균하였다. 증균 배양한 젖산균 배양액 1 mL를 십진 희석법을 사용하여 10⁻¹⁰으로 희석하고, 0.1 mL를 MRS agar 평판 배지에 도말하여 37 °C incubator에서 24시간 증균 배양하였으며, 이를 동결건조하여 -70 °C deep freezer에서 보관하며 사용하였다.

총꽃나무 발효 및 추출물 제조

총꽃나무 발효는 멸균한 건조 총꽃나무 전초 시료 10 g에 2회 차 계대한 *L. plantarum* 배양액을 5 mL 접종하여 37 °C incubator에서 24시간 동안 정지배양 하였다. 추출물 제조는 [19] 이 보고한 총꽃나무 전초를 이용한 추출 최적 조건인 80% ethanol을 추출 용매로 선정하여 총꽃나무 추출물과 발효된 총꽃나무 추출물을 각각 제조하였다. 총꽃나무 및 발효된 총꽃나무 전초 분말 각각 10 g을 준비하고 80% ethanol 100 mL에 침지하여 24시간 동안 상온에서 교반 추출하였으며, 추출액은 Whatman No.1 filter paper (Whatman, Maidstone, UK)로 여과한 후 rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Tokyo, Japan)를 이용하여 추출용매인 80% ethanol을 모두 제거하고 사용하였다. Raw 264.7 cell에서 염증 억제 효과 측정을 위해 여과한 추출물을 동결건조하고 -20 °C에서 보관하여 필요한 함량을 맞추어 사용하였다.

총 페놀 함량 측정

총꽃나무와 발효총꽃나무의 총 페놀 함량 측정은 Folin과 Denis의 방법[20]에 준하여 측정하였으며, 시료 추출물 1 mL에 95% ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 1 N Folin-Ciocalteu reagent 0.5 mL를 넣어 잘 섞어주고 5분간 방치한 후 반응 종료시약으로 5% Na₂CO₃ 1 mL를 첨가하고 잘 혼합하여 1시간 동안 암실에서 방치한 후 UV-Vis spectrophotometer를 사용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 표준물질로 gallic acid (Sigma)를 이용한 표준곡선을 통해 함량을 환산하였다.

HPLC를 이용한 phenolic profile 분석

총꽃나무와 발효총꽃나무의 phenolic profile 변화를 확인하기 위해 총꽃나무 80% ethanol 추출물 동결건조물과 발효 총꽃나무 80% ethanol 추출물 동결건조물 HPLC용 methanol을 이용하여 2 mg/mL의 농도로 제조하였다. 이후 시료액을 0.2 µm syringe filter (13 mm GD/X disposable filter device, Whatman)로 여과한 후, Table 1의 분석조건에 따라 HPLC로 분석하였다.

세포 배양

Murine 유래의 macrophage cell line인 Raw 264.7 cells은 한국세포주은행(Korean Cell Line Research Foundation, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, DMEM에 10% FBS와 1% penicillin/

Table 1 Condition for operating HPLC in the analysis of 80% ethanol extracts from *C. incana* and fermented *C. incana*

Instrument	HP HPLC series 1100
Column	Nova-Pak C18 (3.9 mm × 150 mm) Column
Column temp	30
Injection volume	10 µL
Mobile phase	Phase A: distilled water, Phase B: 100% methanol (A:B=30:70)
Flow rate	0.2 mL/min
Retention time	35 min
Detection	230 nm

streptomycine을 혼합한 배지를 사용하여 5% CO₂ incubator에서 37 °C의 조건으로 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 독성 측정

세포 독성 측정은 Carmichael 등[21]의 방법에 준하여 측정하였다. Raw 264.7 cell을 48 well plate에 well 당 1×10⁴개의 cell을 분주하고 5% CO₂ incubator에서 37 °C로 24시간 동안 배양시킨 후, 농도별로 조제한 시료를 0.5 mL 첨가하여 37 °C로 5% CO₂ incubator에서 18시간 배양하였다. 여기에 5 mg/mL MTT 용액 0.05 mL를 첨가하고 4시간 동안 5% CO₂ incubator에서 반응시킨 후 배양액을 제거하고 DMSO 0.5 mL를 이용하여 녹여주었다. 이를 SPECTRO star Nano ELISA reader 540 nm에서 흡광도를 측정하여, 시료군의 흡광도 감소율을 대조군과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

Western blot에 의한 iNOS 및 COX-2 단백질 분석

6 well plate에 5×10⁵개의 cell을 분주하고 5% CO₂ incubator에서 37 °C로 24시간 배양한 후, 자극제로 LPS 10 µg/mL를 처리한 다음, 1시간 후 농도별로 조제한 시료를 처리하여 18시간 동안 배양하고 PBS로 세척하였다. M-PER와 protease inhibitor cocktail을 혼합한 lysis buffer로 세포막을 파괴한 후 bovine serum albumin standard curve를 이용하여 protein을 정량하였다. 20 µL의 단백질을 10%의 SDS-PAGE에서 전기 영동하여 분리한 다음 PVDF membrane으로 옮긴 후, 실온에서 1시간 동안 5% skim milk 용액으로 blocking하여 background를 제거시켰다. 1차 antibody는 COX-2, iNOS, GAPDH를 각각 1:200 비율로 희석하여 4 °C에서 overnight한 다음 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하였다. 2차 antibody는 Ig-G horseradish peroxidase-conjugated antibody를 사용하였으며, iNOS의 경우 1:200으로, COX-2의 경우 1:1,000으로 희석하여 상온에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하였다. 이후 ECL kit (EZ west Lumi plus, ATTO, Tokyo, Japan)와 반응시켜 C 300 image analyzer를 이용하여 밴드를 현상하고 정량하였다.

NO 측정

NO 생성량을 측정하기 위해 supernatant에 안정한 형태로 존재하는 nitrite (NO₂⁻)로서 환원시켜 griess reagent system을 이용하였다[22]. 96 well plate에 well 당 5×10⁴개의 cell을 5% CO₂ incubator에서 37 °C로 24시간 배양한 다음, 자극제로 LPS 10 µg/mL를 처리하였다. 1시간 뒤 농도별로 조제한 시료를 처리한 다음 24시간 동안 배양하고 supernatant를 모아 차광시키며, griess reagent로 반응시켜 ELISA reader 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성량(%)은 1-(absorbance of control/absorbance of sample)×100으로 계산하였다.

Pro-inflammatory cytokine 분비량 측정

PGE₂, IL-6, IL-1β 경우 96 well plate에 well 당 1×10⁵개 분주하고, TNF-α의 경우 3×10⁵개를 분주한 다음 5% CO₂ incubator에서 37 °C로 24시간 배양하였다. 이후 자극제로 LPS 2.5 µg/mL를 처리하고 1시간 뒤, 농도별로 조제한 시료를 처리하고 24시간 동안 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 이후 세

포 배양액을 이용하여 PGE₂와 IL-6, IL-1β, TNF-α의 분비량을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 측정하였고 자료의 통계처리는 SPSS 23 for windows (Statistical Package for Social Science, Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균 ± 표준편차(mean ± standard deviation)로 표시하였으며, 분산분석(ANOVA)과 Duncan의 다중범위검정(Duncan’s multiple range test)을 실시하여 시료간의 유의차를 p < 0.05 수준으로 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

젖산균을 이용한 증꽃나무 발효 추출물의 유용성분 변화

L. plantarum 발효에 따른 증꽃나무 추출물의 유용성분을 추출하기 위해 총 페놀 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같이 증꽃나무 80% ethanol 추출물의 경우 108.55±2.84 mg/g으로 나타났으며, 발효한 증꽃나무 80% ethanol 추출물의 경우 110.00

±5.65 mg/g으로 나타났다. 따라서 *L. plantarum* 발효에 따른 증꽃나무 추출물의 총 페놀성분 함량의 용출량의 변화는 나타나지 않는 것으로 확인되었다.

발효에 의한 증꽃나무와 발효증꽃나무 추출물의 유용성분의 profile 변화를 확인하기 위해 증꽃나무 80% ethanol 추출물 동결건조물과 발효 증꽃나무 80% ethanol 추출물 동결건조물을 이용하여 HPLC 분석을 실시하였다. 그 결과, Fig. 1A와 같이 2 mg/mL 증꽃나무 80% ethanol 추출물 chromatogram에서는 총 10종의 peak가 분리되었는데, retention time 4.3분에서 227.7 mAU, 5.2분에서 723.5 mAU의 매우 높은 peak를 나타내었으며, 이후 retention time 8.6, 10.6, 11.8, 12.9, 13.6, 21.0, 22.6, 29.4분에서 10 mAU 이하의 낮은 peak가 다수 나타났다. 반면, 발효 2 mg/mL 증꽃나무 80% ethanol 추출물의 chromatogram에서는 총 4종의 peak가 분리되었으며, retention time 4.3분에서 154.2 mAU, 5.2분에서 588.9 mAU, 8.6분에서 8.3 mAU, 22.4분에서 0.8 mAU의 peak를 나타내었다(Fig 1B). 이상의 결과에 따라 *L. plantarum* 발효를 통해 증꽃나무 80% ethanol 추출물과 발효 증꽃나무 80% ethanol 추출물 간의 유용물질의 profile 차이가 존재하는 것을 확인할 수 있었으며, 항염증 활성에도 차이가 존재할 것으로 예상되었다.

Table 2 Total phenolics contents of 80% ethanol extracts from *C. incana* and fermented *C. incana*

Sample	Total phenolics contents (mg/g)
<i>C. incana</i>	108.55±2.84 ¹⁾
fermented <i>C. incana</i>	110.00±5.65

¹⁾Mean ± standard deviation (n =3)

Raw 264.7 cell에서 발효에 따른 세포 생존율 변화(MTT assay)

증꽃나무 추출물의 세포 생존율을 확인하기 위해 증꽃나무 80% ethanol 추출물과 발효 80% ethanol 추출물을 농도별(5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 μg/mL)로 처리한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과는 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 특히 증꽃나무 80% ethanol

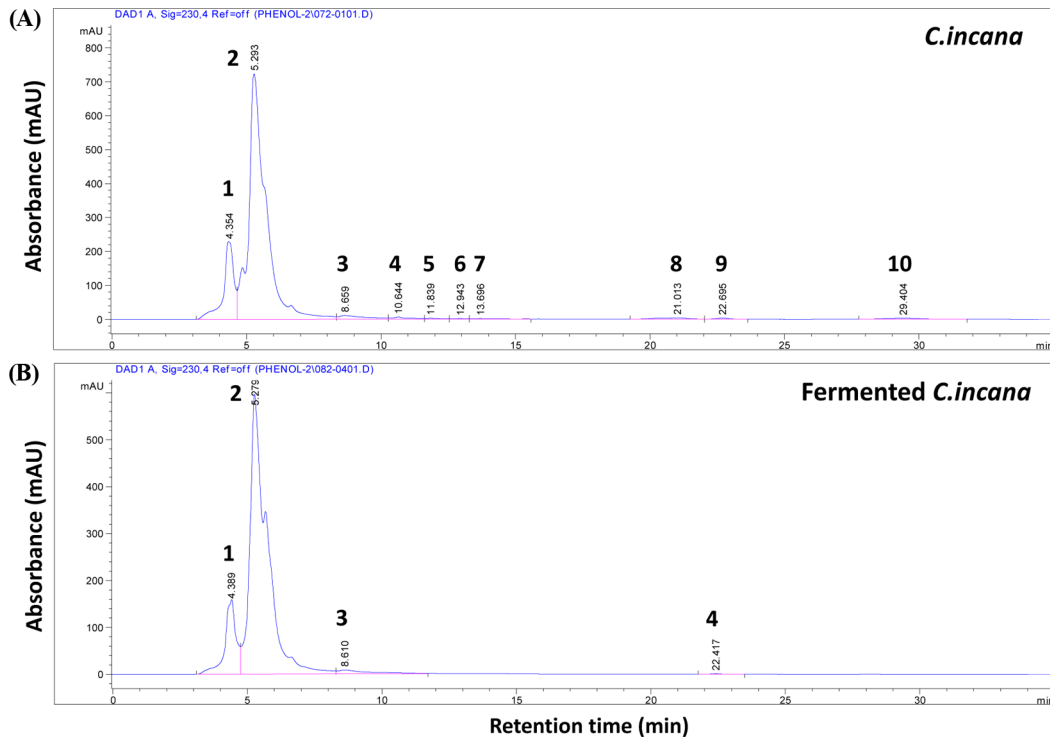


Fig. 1 HPLC chromatogram of *C. incana* 80% ethanol extracts. (A): *C. incana*, (B): Fermented *C. incana*

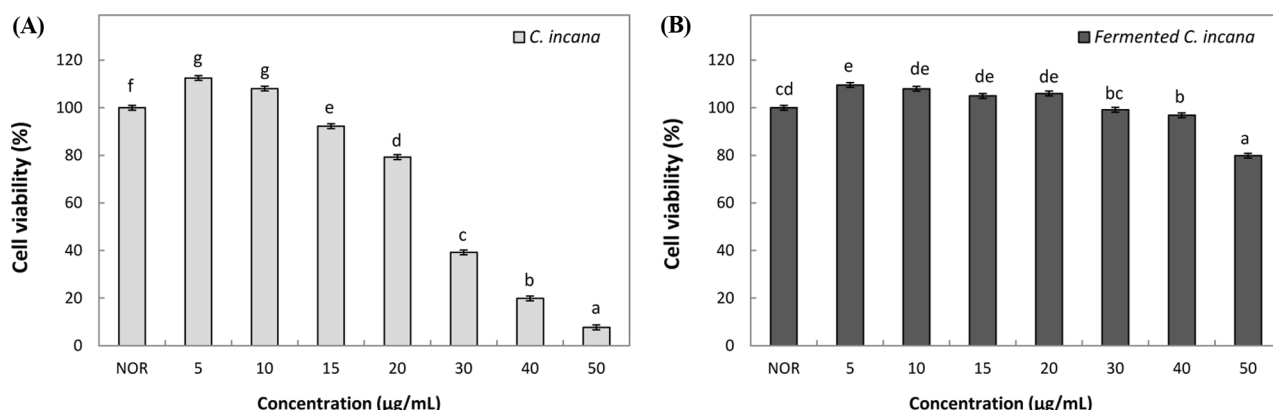


Fig. 2 Cell viability of *C. incana* 80% extracts on Raw 264.7 cell. (A): *C. incana*, (B): Fermented *C. incana*. Means with different letters (a-g) above bars are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncans multiple range tests

추출물 20 µg/mL 처리 시 79.3%의 생존율을 나타내어 추출물 자체에 일부 독성이 있는 것으로 확인되었다. 따라서 이후 실험에서 총꽃나무 80% ethanol 추출물의 경우 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 5, 10, 15 µg/mL의 농도로 진행하였다. 반면, 발효 총꽃나무 80% ethanol 추출물의 경우, 발효하기 전 독성을 나타낸 50 µg/mL의 높은 농도 처리에서도 생존율이 77.7%를 나타내었으며, 이를 통해 발효가 추출물의 독성을 낮춰주는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과에 따라 발효 총꽃나무 80% ethanol 추출물의 경우, 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되는 10, 20, 30, 40 µg/mL의 농도에서 이후 실험을 진행하였으며 발효에 의해 항염증 효과의 변화가 나타나는지 확인하고자 하였다.

iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 효과

NO는 여러 조직과 세포에서 L-arginine이 NADPH에 의해 L-citrullin으로 산화되는 과정에서 NOS에 의해 합성되는데, 이러한 NOS는 세 가지 다른 형태의 isoform이 존재한다. 그 중 하나인 iNOS는 macrophage cell에 작용하여 LPS, IFN- γ , TNF- α 등에 의해 활성화되어 고농도의 NO를 장시간 생성하게 된다. NO는 iNOS에 의한 발현성이 절대적으로 많으며, iNOS의 경우 NF- κ B에 의해 transcription level에서 발현량이 조절되는 것으로 알려져 있으며[23], NF- κ B는 prostaglandin pathway를 활성화하여 염증반응과 통증을 유발하는 것으로 알려져 있다. Prostaglandin pathway는 COX라는 효소가 관여하여 arachidonic acid로부터 prostaglandin을 합성하는데[24,25], 두 가지의 isoform 형태를 보이는 COX 중에 COX-2는 TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 요인 중 하나로서 염증 조직이나 암 조직에서 높게 나타난다[26]. Western blot을 이용하여 총꽃나무 및 발효 총꽃나무 80% ethanol 추출물의 iNOS 단백질의 발현량을 측정하고 Figs. 3A, B와 같다. iNOS의 경우 GAPDH의 band density 비율에 따라 총꽃나무 80% ethanol 추출물은 15 µg/mL 농도에서, 발효 총꽃나무 80% ethanol 추출물은 40 µg/mL 농도에서 각각 약 50.0%의 발현 억제 효과를 나타내었다. Lee 등[27]의 연구결과에서 파배기 모자반 비발효균과 *Lactobacillus* sp. SH-1를 이용한 파배기 모자반 발효균 각각 100, 500 µg/mL 처리했을 때 약

50.0% 수준의 iNOS 저해 활성을 나타내어 이와 비교하였을 때 총꽃나무 및 발효 총꽃나무 80% ethanol 추출물이 매우 낮은 농도에서도 우수한 저해 효과를 나타내는 것으로 판단되었다.

한편, 총꽃나무 및 발효 총꽃나무 80% ethanol 추출물의 COX-2 단백질의 발현량을 측정하고 Figs. 3C, D와 같이, GAPDH의 band density 비율에 따라 총꽃나무 80% ethanol 추출물 15 µg/mL 농도에서는 50.0%, 발효 총꽃나무 80% ethanol 추출물 40 µg/mL 농도에서는 83.0%의 발현 억제 효과를 나타내었다. Kwon 등[28]은 톳 ethanol 추출물은 500 µg/mL 농도에서 약 60.0%의 발현 억제 효과를 나타내었으며, 유산균 *Weissella* sp. SH-1과 *Lactobacillus casei*를 각각 접종한 톳 ethanol 추출물에서는 각각 70.0, 48.0%의 발현 억제 효과를 나타낸다고 보고하여 이와 비교하였을 때, 총꽃나무 및 발효 총꽃나무 80% ethanol 추출물의 iNOS와 COX-2 단백질 발현 억제 효과가 우수함을 확인할 수 있었다. 특히 COX-2의 경우, 발효를 통해 총꽃나무 80% ethanol 추출물의 세포독성을 일부 감소시켜 독성이 낮아진 안전한 추출물을 높은 농도로 처리할 수 있게 되었으며, 안전한 유용성분의 함량 증대로 인해 COX-2 단백질 발현의 저해 효과도 증폭될 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 발효한 총꽃나무 추출물이 총꽃나무 추출물 보다 훨씬 안전하고 우수한 면역 증진 소재로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대되었다.

NO 및 PGE₂ 저해 효과

NO는 L-arginine으로부터 NOS에 의해 생성되는 무기 유리체로, NO의 기능은 전염성 박테리아와 곰팡이를 사멸시키고 종양을 제거하여 신체를 지켜주는 것이다. 하지만, 병리학적인 원인에 의해 과도하게 NO가 형성되면 세포 내에 염증을 유발하게 되며, 면역체계의 부작용, 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경계의 손상 등을 유발한다[29]. LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에 총꽃나무 및 발효 총꽃나무 80% ethanol 추출물을 처리하여 생성되는 NO양을 측정하고 Figs. 4A, B와 같다. LPS를 처리하지 않은 normal군에 비해 LPS만 처리한 control군이 5배 이상의 NO 생성량을 나타내었으며, 총꽃나무 80% ethanol 추출물의 경우 농도가 높아질수록 NO 생성량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 15 µg/mL 농도에서는 control군에 비해

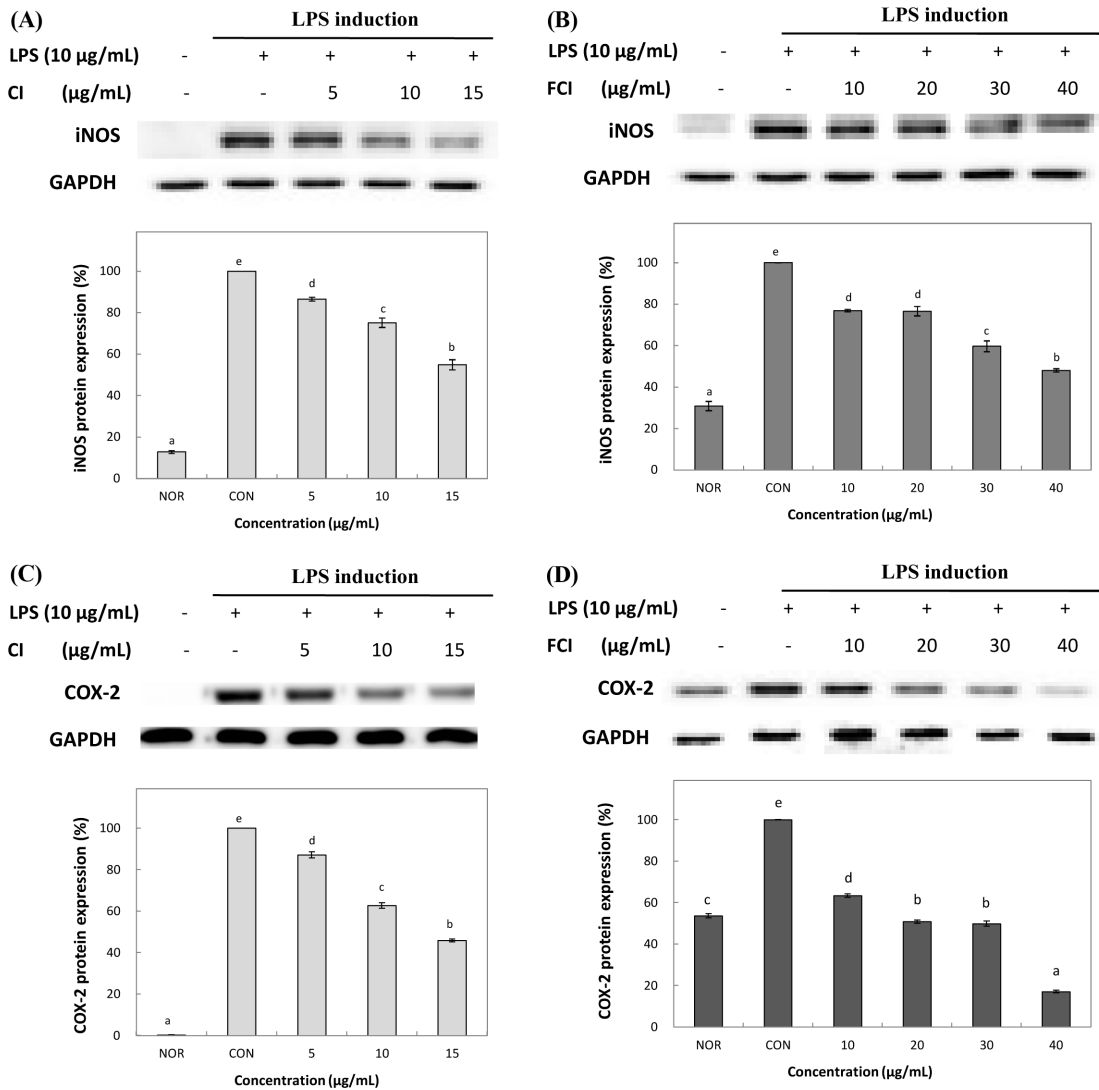


Fig. 3 Inducible iNOS and COX-2 protein expression rate of *C. incana* extracts on Raw 264.7 cell. (A): iNOS protein expression rate of *C. incana*, (B): iNOS protein expression rate of fermented *C. incana*. (C): COX-2 protein expression rate of *C. incana*, (D): COX-2 protein expression rate of fermented *C. incana*. Histogram show the densitometric of iNOS protein normalized to GAPDH. Means with different letters (a-e) above bars are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncans multiple range tests

62.0%의 NO 생성 억제 효과를 나타내었다. 또한, 발효 층꽃나무 80% ethanol 추출물은 40 µg/mL 농도에서 control군에 비해 81.0%의 NO 생성 저해율을 보여주어 normal군과 비슷한 수준의 효과를 나타내었다. Jung과 Cho의 연구[30]에 따르면 비발효 대추 ethanol 추출물과 *S. cerevisiae*와 *B. breve*를 이용한 발효 대추 ethanol 추출물은 500 µg/mL의 농도에서 각각 90.0, 68.0, 66.0%의 NO 생성 저해율을 나타내어 미생물 발효가 생리활성 변화에 좋은 영향을 미치는 것으로 판단되었다. 이상의 결과를 통해 층꽃나무 및 발효 층꽃나무 80% ethanol 추출물의 NO 생성 억제 효과가 매우 우수함을 알 수 있을 뿐만 아니라 발효를 통해 층꽃나무가 지닌 세포 독성을 감소시키고, 이를 통해 안전성이 확보된 유용성분의 함량을 더 증가시켜 사용할 수 있게 되어 NO 생성 억제 효과를 향상시키는 것으로 간주할 수 있었다.

반면, PGE₂는 통증과 발열의 전달에 주로 관여하는 중요한 염증 매개물질로서, phospholipase A₂에 의해 유리된 arachidonic acid를 이용하여 COX-1과 COX-2가 prostaglandin H₂를 생성한 다음 PGE₂, prostacycline, thromboxane A₂로 변환된다[31]. PGE₂의 생성량을 측정된 결과는 Figs. 4C, D와 같이 층꽃나무 80% ethanol 추출물은 15 µg/mL 농도에서, 발효 층꽃나무 80% ethanol 추출물은 30 µg/mL 농도에서 각각 약 70.0% 수준의 발현을 억제하여 normal군과 유사한 수준의 효과를 나타내었다. Lee 등[32]은 적하수오 ethanol 추출물이 100 µg/mL의 높은 농도에서 70.0% 수준의 발현 억제 효과를 나타내었고, Tak 등 [33]의 *L. rhamnosus*를 이용한 흑마늘 발효물의 경우 800 µg/mL의 높은 농도에서 10.0%의 발현 억제 효과를 나타낸 것과 비교하였을 때, 층꽃나무 및 발효 층꽃나무 80% ethanol 추출물이 훨씬 우수한 효과를 가지는 것으로 확인되었다.

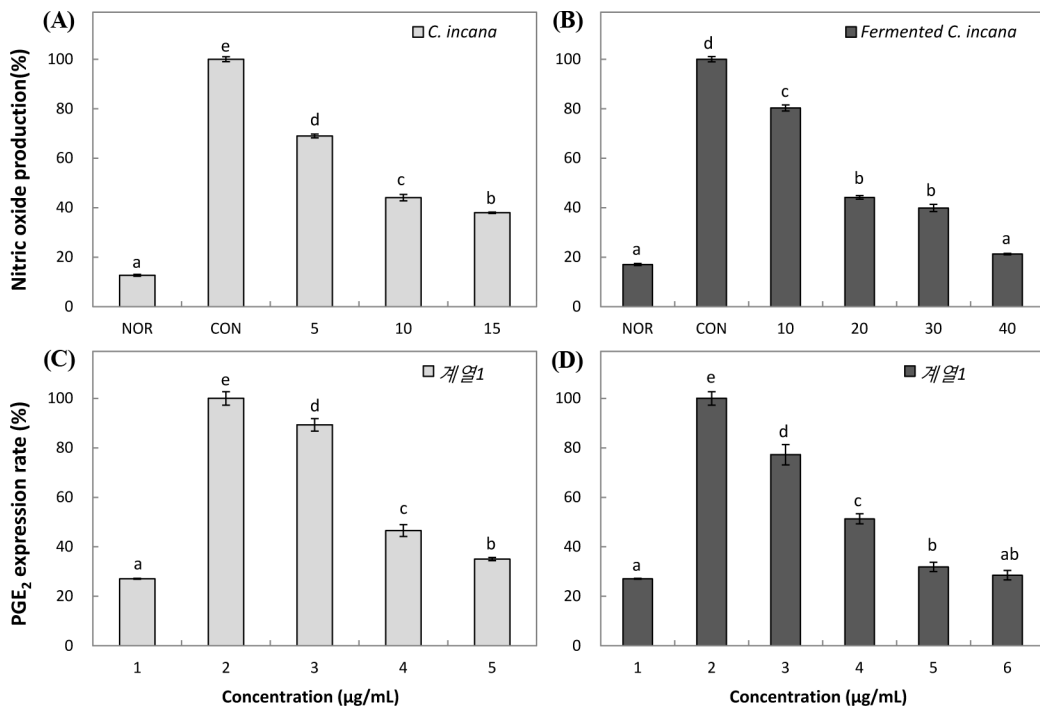


Fig. 4 Inhibition rate of *C. incana* extracts on NO and PGE₂. (A): NO inhibition rate of *C. incana*, (B): NO inhibition rate of fermented *C. incana*. (C): PGE₂ inhibition rate of *C. incana*, (D): PGE₂ inhibition rate of fermented *C. incana*. Means with different letters (a-e) above bars are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncans multiple range tests

Pro-inflammatory cytokine (TNF-α, IL-6, IL-1β) 생성 억제 효과

Pro-inflammatory cytokine은 염증 면역 반응에서 필연적으로 동반되는 매개물질이며 정상적인 조직에서 발현되나 병리적인 조건에서 그 발현 정도가 증가되는데, 이로 인해 노화가 촉진되며 질환이 더욱 악화된다[34]. 그 중 TNF-α는 염증 반응 초기에 해당 부위로 호중구를 유도하며 지속적인 생성은 다른 염증 세포를 활성화시켜 cytokine, iNOS, COX-2의 발현량이 증가되고, 이로 인해 만성 염증이 유발되어 자가면역질환, 류마티스 관절염에 관여하는 것으로 알려져 있다[35]. 대표적인 pro-inflammatory cytokine인 IL-6는 B-cell이 형질세포로 분화되는 과정을 촉진하여 항체 생산을 증가시키지만 과잉 생산될 경우 감염성 질환을 유발한다[36]. 또한 IL-1β도 세균감염에 대한 염증성 응답의 개시 및 강화에 중요한 역할을 하며 저농도에서 세포성장과 항상성 유지에 필수적인 cytokine이지만, 대량 생산될 경우 T-cell을 활성화 시키고 B-cell을 성숙시켜 염증성 질환을 악화시키게 된다[37].

충꽃나무 80% ethanol 추출물의 pro-inflammatory cytokine의 생성 억제 효과를 확인하기 위해 먼저 TNF-α 생성 억제 효과를 측정 한 결과는 각각 충꽃나무 80% ethanol 추출물 15 µg/mL 농도에서 43.6%, 발효 충꽃나무 80% ethanol 추출물 40 µg/mL 농도에서 75.4%의 저해율을 나타내었다(Figs. 5A, B). 또한 IL-6 생성 억제 효과는 충꽃나무 80% ethanol 추출물 15 µg/mL 농도에서 64.3%, 발효 충꽃나무 80% ethanol 추출물 40 µg/mL 농도에서 67.7%의 저해율을 나타내었으며(Figs. 5C, D), IL-1β 생성 억제 효과는 각각 충꽃나무 80% ethanol 추출물 15 µg/mL 농도에서 58.7%, 발효 충꽃나무

80% ethanol 추출물 40 µg/mL 농도에서 64.6%의 저해율을 나타내었다(Figs. 5E, F). Yang 등[38]의 *S. cerevisiae* STV89를 이용한 황금 발효물의 200 µg/mL의 농도에서 60.0%의 IL-6의 발현 억제 효과를 나타낸 결과와, Han 등[39]의 고삼, 감초, 백선피 ethanol 추출물 20 µg/mL의 농도에서 50.0%의 IL-1β 발현 억제 효과를 보고한 연구와 비교하였을 때, 충꽃나무 뿐만 아니라 발효 충꽃나무 80% ethanol 추출물의 pro-inflammatory cytokine 억제 효과가 매우 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과를 통해 충꽃나무 ethanol 추출물에 염증을 매개하는 단백질 및 cytokine의 발현을 저해시키는 우수한 유용성분이 함유되어 있음을 알 수 있었다. 또한 *L. plantarum*을 이용하여 발효시킨 경우, 충꽃나무 유용성분의 profile을 변화시켰으며, 이러한 대사물의 전환으로 인해 충꽃나무가 가지고 있던 세포독성을 일부 감소시켜 유용성분의 안전성을 증폭시키는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 미생물을 이용한 발효 기법이 최종 대사산물을 독성을 낮추고, 사용량을 높일 수 있는 유용한 기술임을 판단할 수 있었다.

초 록

본 연구에서는 충꽃나무와 *L. plantarum*으로 발효한 충꽃나무를 각각 80% ethanol로 추출하여 추출물들이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell의 염증반응에 미치는 영향을 비교 검증하여 항염증 소재 개발 가능성을 검토하였다. HPLC를 이용하여 *L. plantarum*에 의한 충꽃나무 발효 추출물의 유용성분 변화를 확

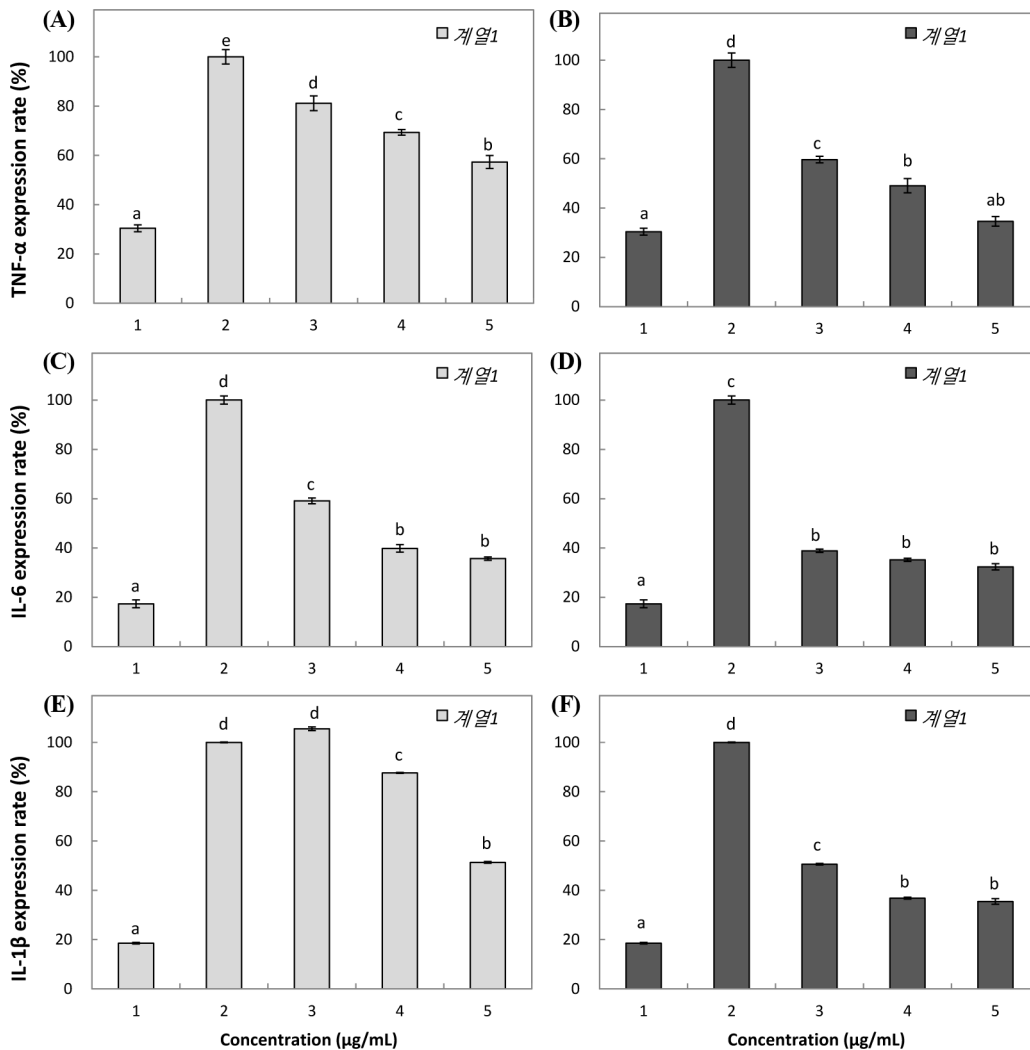


Fig. 5 Inhibition rate of *C. incana* extracts on pro-inflammatory cytokine. (A): TNF- α inhibition rate of *C. incana*, (B): TNF- α inhibition rate of fermented *C. incana*. (C): IL-6 inhibition rate of *C. incana*, (D): IL-6 inhibition rate of fermented *C. incana*. (E): IL-1 β inhibition rate of *C. incana*, (F): IL-1 β inhibition rate of fermented *C. incana*. Means with different letters (a-e) above bars are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncans multiple range tests

인한 결과, 발효를 통해 유용성분의 profile 변화가 있는 것을 확인할 수 있었다. Raw 264.7 cell에서 세포 독성을 측정하기 위해 MTT assay를 실시한 결과, 층꽃나무 80% ethanol 추출물은 5, 10, 15 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 발효 층꽃나무 80% ethanol 추출물의 경우 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 90.0% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 항염증 효능을 검증하기 위해 iNOS 단백질 발현량, COX-2 단백질 발현량, NO 생성, PGE₂ 생성, pro-inflammatory cytokine 발현량을 측정하였다. NO 생합성 효소인 iNOS 단백질의 발현량을 측정한 결과, 층꽃나무와 발효 층꽃나무 80% ethanol 추출물은 각각 15, 40 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 약 50.0% 가까운 발현 억제 효과를 나타내었으며, 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. PGE₂ 생합성 효소인 COX-2 단백질의 발현량을 측정된 결과, 층꽃나무 80% ethanol 추출물은 15 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 50.0%, 발효 층꽃나무 80% ethanol 추출물은 40 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 83.0%의 발현 억제

효과를 보여주었다. NO 생성 억제 효과를 측정된 결과 층꽃나무 80% ethanol 추출물은 15 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 62.0%, 발효 층꽃나무는 40 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 81.0%로 control군과 비교하였을 때 NO 생성이 크게 억제되었다. PGE₂ 생성 억제 효과를 측정된 결과, 층꽃나무와 발효 층꽃나무 80% ethanol 추출물은 각각 15, 30 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 약 70.0%의 발현 억제 효과를 나타내었다. 또한, pro-inflammatory cytokine의 경우, 층꽃나무 80% ethanol 추출물 15 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 TNF- α 는 43.6%, IL-6는 64.3%, IL-1 β 는 58.7%의 저해율을 나타냈으며, 발효 층꽃나무 80% ethanol 추출물 40 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 TNF- α 는 75.4%, IL-6는 64.3%, IL-1 β 는 37.7%의 발현 억제 효과를 나타내었다. 이상의 결과를 통해 층꽃나무는 매우 우수한 항염증 효과를 나타내는 소재임을 확인할 수 있었으며, *L. plantarum*균을 이용한 발효를 통해 층꽃나무가 가진 세포 독성을 낮추어 안전성하고 우수한 효능을 가진 새로운 항염증제로 개발 가능

한 소재로 활용될 수 있을 것으로 기대되었다.

Keywords 대식세포 · 발효 · 유산균 · 층꽃나무 · 항염증

References

- Choi SY, Lee HR (1976) Host preference by the small brown planthopper and green rice leafhopper on barley and water foxtail. *Kor J Pl Prot* 15: 179–181
- Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T (1990) Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms acts synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol* 144: 1434–1441
- Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F (1999) Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 274: 10689–10692
- Yang F, Tang E, Guan K, Wang CY (2003) IKK β plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide. *J Immunol* 170: 5630–5635
- Bhattacharyya S, Ratajczak CK, Vogt SK, Kelle C, Colonna M, Schreiber RD, Muglia LJ (2010) TAK1 targeting B by glucocorticoids determines JNK and I κ B regulation in Toll-like receptor-stimulated macrophages. *Blood* 115: 1921–1931
- Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Keum YS, Park KK, Lee SS (2001) Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat Res* 480: 243–268
- Barnes PJ, Liew FY (1995) Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 16: 128–130
- Smith WL, Michael GR, DeWitt DL (1996) Prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase)-1 and -2. *J Biol Chem* 271: 33157–33160
- Lee TB (2003) Coloured flora of Korea. Vol. 2. Hyangmunsa, Seoul, Korea. pp 112–119
- Chang KC, Lee DU (2000) Vasodilatory effect of the alkaloid component from the roots of *Cynanchum wilfordii* Hemsley. *Korean J Life Sci* 10: 584–590
- Bae MJ, Ye EJ (2007) Effect of mycelia extracts from *Lentinus edodes* mushroom-cultured *Lonicera japonica* thunbergs on anticancer and antiallergy activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 424–430
- Lee SC, Kim SY, Choi SJ, Lee IS, Jung MY, Yang SM, Chae HJ (2010) Effect of soaking and heat treatment conditions on physicochemical and organoleptic quality of lotus root. *Korean J Food Sci Technol* 42: 45–49
- Yoshikawa K, Harada A, Iseki K, Hashimoto T (2014) Constituents of *Caryopteris incana* and their antibacterial activity. *J Nat Med* 68: 231–235
- Yang HJ, Joo HA, Baek SC, Park JS, Hong SH (2011) Anti-inflammatory effects of hwangnyeonhaedok-tang and fermented hwangnyeonhaedok-tang. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 24: 1–15
- Doh ES, Chang JP, Kil KJ, Choi MS, Yang JK, Yun CW, Jeong SM, Jung YH, Lee GH (2011) Antioxidative activity and cytotoxicity of fermented *Allium victorialis* L. extract. *Korean J Plant Res* 24: 30–39
- Park MR, Yoo C, Chang YN, Ahn BY (2012) Changes of total polyphenol content of fermented *Gastrodia elata* blume and radical scavenging. *Korean J Plant Res* 25: 379–386
- Park HJ, Jung DH, Joo HM, Kang NS, Jang SA, Lee JG, Sohn EH (2010) The comparative study of anti-allergic and anti-inflammatory effects by fermented red ginseng and red ginseng. *Korean J. Plant Res* 23: 415–422
- Lim HW, Lee YJ, Huang YH, Yoon JY, Lee SH, Kim KH, Lim CJ (2017) Enhancement of skin antioxidant and anti-inflammatory potentials of *Agastache rugosa* leaf extract by probiotic bacterial fermentation in human epidermal keratinocytes. *Microbiol Biotechnol Lett* 45: 35–42
- Lee JE, Lee EH, Kim BO, Cho YJ (2017) Biological activities of extracts from *Caryopteris incana* Miq. *J Appl Biol Chem* 60: 61–68
- Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239–249
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazder AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936–942
- Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK (2003) Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother Res* 17: 485–489
- Kim SH (2005) Effect of the aqueous extracts of *Pogostemi Herba* on Nitric oxide synthesis and activation of cytokine in macrophage. Dissertation, Ajou University
- Weng SX, Sui MH, Chen S, Wang JA, Xu G, Ma J, Shan J, Fang L (2009) Parthenolide inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells through induction of G₀/G₁ phase cell cycle arrest. *J Zhejiang Univ Sci B* 10: 528–535
- Stachowska E, Dolegowska B, Dziedziejko V, Rybicka M, Kaczmarczyk M, Bober J, Rac M, Machalinski B, Chlubek D (2009) Prostaglandin E₂ (PGE₂) and thromboxane A₂ (TXA₂) synthesis is regulated by conjugated linoleic acids (CLA) in human macrophages. *J Physiol Pharmacol* 60: 77–85
- Yu Y, Fan JJ, Hui Y, Rouzer CA, Marnett LJ, Klein-Szanto AJ, FitzGerald GA, Funk CD (2007) Targeted cyclooxygenase gene (*Ptgs*) exchange reveals discriminant isoform functionality. *J Biol Chem* 282: 1498–1506
- Lee SJ, Lee DG, Kim MH, Kong CS, Yu KH, Kim YY, Lee SH (2016) Enhancement of anti-inflammatory activity by fermented of *Sargassum siliquanstrum*. *J Life Sci* 26: 318–324
- Kwon MS, Mum OJ, Bae MJ, Lee SG, Kim MH, Lee SH, Yu KH, Kim YY, Kong CS (2015) Anti-inflammatory activity of ethanol extracts from *Hizikia fusiformis* fermented with lactic acid bacteria in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1450–1457
- Cho YJ, Ahn BJ (2008) Anti-inflammatory effect of extracts from *Cheongmognosang* (*Morus alba* L.) in lipopolysaccharide stimulated Raw cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 51: 44–48
- Jung JE, Cho EJ (2011) Enhancement of anti-inflammatory effect of *Zizyphus jujuba* var. *intermis* fruits by fermentation. *Cancer Prev Res* 14: 57–62
- Kim KB, Lee EG, Chai OH, Song CH, Jeong JM (2007) Inhibitory effects of Phyto-extracts mixture (PEM381) on type allergic reaction. *J Korean Soc Food Nutr* 36: 155–162
- Lee ES, Kim HJ, Yu JM, Cho YH, Kim DI, Cho YJ, An BJ (2014) Anti-inflammatory effect of *Polygonum multiflorum* extraction in activated RAW 264.7 cells with lipopolysaccharide. *Korean J Food Preserv* 21: 740–746
- Tak HM, Kang MJ, Kim KM, Kang DW, Han SY, Shin JH (2014) Anti-inflammatory activities of fermented black garlic. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1527–1534
- Park SG, Jeal KH, Jung JY, Baek YD, Byun SH, Kim YW, Cho IJ, Park SM, Kim SC (2014) *Leonuri fructus* ameliorates acute inflammation via the inhibition of NF- κ B-mediated nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production. *Korean J Orient Physiol Pathol* 28: 178–185
- Dinarello CA (1999) Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis* 179: 294–304
- Delgado AV, McManus AT, Chambers JP (2003) Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2 and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance. *P neuropeptides* 37: 355–361
- Lebovic DI, Betzien F, Chao VA, Garrett EN, Meng YG, Taylor RN (2000) Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1 β . *Mol Hum Reprod* 6: 269–275
- Yang HJ, Han HS, Lee YJ (2013) Effect of fermented scutellariae radix

-
- extract on production of inflammatory mediator in LPS-stimulated mouse macrophages. *Kor J Herbology* 28: 45–52
39. Han MH, Lee MH, Hong SH, Choi YH, Moon JS, Song MK, Kim MJ, Shin SJ, Hwang HJ (2014) Comparison of anti-inflammatory activities among ethanol extracts of *Sophora flavescens*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Dictamnus dasycarpus* and their mixture in RAW 264.7 murine macrophages. *J Life Sci* 24: 329–335