

폴리페놀 함유 블랙 초크베리의 산화적 스트레스 및 염증에 대한 보호 효과

전소현¹ · 김보경^{1,*}

¹부산대학교 식품영양학과

The protective effects of polyphenol-rich black chokeberry against oxidative stress and inflammation

Sohyeon Jeon¹ and Bohkyung Kim^{1,*}

¹Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University

Abstract Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) has been suggested to exert antioxidant and anti-inflammatory effects due to its high polyphenol content. However, the mechanisms underlying the effects of black chokeberry on the alterations of nuclear factor E2-related factor 2 (NRF2) and nuclear factor κ B (NF- κ B) in macrophages have not been thoroughly studied. In this study, we investigated the protective effects of polyphenol-rich black chokeberry extract (CBE) against lipopolysaccharide (LPS)-induced oxidative stress and inflammation in RAW 264.7 macrophages. CBE significantly attenuated the increase of cellular reactive oxygen species (ROS) levels and the nuclear translocation of NRF2 in LPS-stimulated macrophages. The mRNA abundances of *Nrf2* and its downstream antioxidant genes were significantly decreased in LPS-stimulated macrophages. The LPS-induced mRNA expression of proinflammatory cytokines was significantly inhibited by reducing the nuclear translocation of NF- κ B by CBE. These data suggest that black chokeberry may be used for the prevention of oxidative stress and inflammation-associated disease.

Keywords: Black chokeberry, *Aronia melanocarpa*, oxidative stress, inflammation, macrophages

서 론

현대 사회의 발달로 인해 비만 및 비만 유래 이상지질혈증, 심혈관계 질환, 당뇨병, 고혈압 등 다양한 만성 대사성 질환의 발병이 꾸준히 증가하고 있다. 현재 산화적 스트레스(oxidative stress)와 염증(inflammation)은 다양한 만성 질환을 유발하는 기본적인 기전으로 알려져 있다(Holvoet, 2008; Maiese, 2015). 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 및 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 정상적인 대사 작용에 의해 생성되며, 체내 방어를 위한 면역 반응 과정 중 세포 항상성에 중요한 역할을 한다(Diplock, 1998; Puzanowska-Tarasiewicz 등, 2009; Siti 등, 2015). 생체 내 산소 호흡으로 인해 발생된 ROS는 체내 방어 기전인 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase 등과 같은 항산화 효소에 의하여 제거된다(Puzanowska-Tarasiewicz 등, 2009). 그러나 세포 내 스트레스 및 염증 반응에 의하여 다량으로 생성된 ROS와 이를 제거하는 체내 항산화 시스템이 불균형을 이루게 되면 산화적 스트레스를 야기하게 된다(Karunakaran과 Park, 2013). 체내 항산화 효소 및 해독 관련 효소를 조절하는 전사인자인 nuclear factor E2-related factor 2 (NRF2)는 antioxidant

response element (ARE)에 결합한 후 세포 보호 유전자(cytoprotective gene), 해독 관련 효소 및 항산화 효소의 발현을 증가시킨다(Giudice 등, 2010). 전사인자 NRF2는 산화적 스트레스에 대한 보호 기전에 중요한 역할을 할 뿐 만 아니라, 최근 대식세포 내에 염증 관련 전사인자인 nuclear factor κ B (NF- κ B)의 활성화에 따른 염증 반응을 저하하는 것으로 알려졌다(Ding 등, 2019; Ren 등, 2020).

염증은 선천성 면역 반응으로 면역세포가 손상된 세포, 병원균, 바이러스 등의 유해한 자극을 제거하기 위해 염증 유도 인자를 분비하여 인체를 방어하는 정상적인 생체 면역 방어 시스템이다(Chawla 등, 2011). 그러나 생체 항상성 유지를 위한 지속적인 면역 반응은 조직 손상 및 만성 염증 또한 유발하게 된다(Brown 등, 2007). 만성 염증은 또한 비만 및 비만 유래 만성 질환인 심혈관계 질환, 당뇨, 치매 등의 발현의 주요한 원인으로 보고되고 있다(Campos 등, 2020; Guarnieri와 Grassi 등, 2005; Lopez-Candales 등, 2017). 이러한 생체 방어 또는 여러 만성 질환에 영향을 미치는 염증 반응은 다양한 염증 매개 인자들(inflammatory mediators) 및 사이토카인(cytokines)에 의해 조절되는 복합적인 과정이다(Brown 등, 2007). 특히 염증 반응에 주요한 역할을 담당하는 대식세포는 lipopolysaccharide (LPS) 또는 산화적 스트레스 등에 의해 활성화 되어 염증을 유발하고, 이는 주요 전사조절인자인 NF- κ B에 의해 조절된다(Castrillo와 Tontonoz, 2004; Wilson 등, 2005). 활성화된 대식세포는 NF- κ B 전사조절에 의해 염증 관련 효소인 inducible NOS (iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2) 등을 활성화 시켜 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E2 (PGE2) 같은 염증 매개 인자(inflammatory mediators)를 생성한다(Inoue와 Tanabe, 1997; Nathan, 1992). 과량으로 생성된

*Corresponding author: Bohkyung Kim, Ph. D, Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 46241, Republic of Korea
Tel: +82-51-510-2844
Fax: +82-51-583-3648
Email: bohkyung.kim@pusan.ac.kr
Received February 11, 2020; revised February 26, 2020; accepted February 26, 2020

염증 매개 인자는 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β 등을 통하여 염증 반응을 일으킨다. 또한 염증 세포의 활성화는 산화적 스트레스와 세포 손상을 유발하는 많은 양의 ROS를 생성한다.

산화적 스트레스 및 염증은 밀접하게 관련이 있으며, 다양한 질환을 유발하는 기초적인 기전이다. 그러므로 항산화 또는 항염증 효과가 있는 물질은 다양한 만성 대사성 질환 예방에 있어서 중요한 역할을 한다. 이에 산화적 스트레스 및 염증을 조절할 수 있는 물질에 대한 관심이 급증하고 있는 추세이다. ROS의 증가는 체내 항산화 보호 시스템 또는 항산화제 섭취에 의해 개선될 수 있으므로 항산화제가 각광받고 있다. 항산화제는 염증에 대한 보호 효과를 나타내는 경우가 많으나, 합성 항산화제의 경우 부작용을 나타내는 경우가 있다. 이에 산화적 스트레스 및 염증을 보호 효과가 있으며, 합성 물질에 비해 부작용이 없고 안전한 천연 유래 물질이나 식품에 대한 관심이 급증하고 있다(Vendemiale 등, 1999).

블랙 초크베리(Black chokeberry)의 학명은 아로니아(*Aronia melanocarpa*)로 북아메리카의 지역에서 자생하는 베리류다. 폴란드를 포함한 동유럽에서 많이 재배 생산되고, 최근 우리나라에서는 아로니아로 각광받고 있어 소득 증대 작물로서 재배 농가도 증가하고 있다(Jurikova 등, 2017). 블랙 초크베리는 짙은 맛의 주요 원인인 탄닌을 다량 함유하여, 다른 베리류에 비하여 짙은 맛이 강하여 과일 그 자체로 섭취하기는 힘들다. 이에 주로 주스나 잼, 젤리, 와인, 시럽, 주스 등의 재료로 사용되고 있다(Gonzalez-Molina 등, 2008). 블랙 초크베리는 폴리페놀, 플라보노이드를 많이 함유하고 있으며, 특히 베리류 중 안토시아닌 함량이 가장 높은 것으로 알려져 있다. 블랙 초크베리에 함유된 안토시아닌은 대부분 cyanidin 계열로 보고되고 있다. 여러 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 보고된 블랙 초크베리의 항산화, 항염증, 항암 등의 건강 기능성은 대부분 높은 함량의 폴리페놀 및 플라보노이드 특히 안토시아닌에 의한 것으로 알려져 있다(Jurikova 등, 2017). 여러 연구에서 블랙 초크베리의 *in vitro* 항산화 활성이나 NF- κ B 활성 관련 항염증 효과를 보고하였으나, 대식세포 내 NRF2 및 NF- κ B 조절에 의한 블랙 초크베리의 산화적 스트레스 및 염증 보호 효과에 대한 연구는 부족한 편이다. 이에 본 연구에서는 대식세포에서 항산화 효소계 및 염증 대사에 관여하는 유전자 발현을 측정함으로써 폴리페놀 함유 블랙 초크베리의 산화적 스트레스 및 염증 보호 효과 및 기전에 대하여 살펴보았다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 연구에서 사용된 폴리페놀 함유 블랙 초크베리 추출물(black chokeberry extract, CBE)은 Artemis international (Fort Wayne, IN, USA)에서 제공받아 사용하였다. 실험에 사용한 시약은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), lipopolysaccharide (LPS), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였고, 세포 배양에 사용된 시약은 Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT, USA)에서 구매하여 사용하였다.

In vitro 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 블랙 초크베리 추출물 100 μ L와 EtOH에 녹인 60 μ M DPPH용액 100 μ L를 96-well plate에 혼합하여 30분간 실온에서 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

샘플을 첨가하지 않은 대조군과 샘플을 첨가한 군을 비교하여 DPPH 소거 효과를 백분율(%)로 계산하여 나타내었다. Hydroxyl radical (\cdot OH) 소거능은 fenton 반응에 의해 생성된 \cdot OH를 deoxyribose가 분해하여 생성된 malonaldehyde (MDA)양을 측정하는 방법에 의해 평가하였다. Fenton 반응 유도를 위해 0.2 M phosphate buffer saline (PBS)에 농도별로 녹인 CBE 1400 μ L에 10 mM FeSO₄·7H₂O-EDTA 200 μ L, 10 mM 2-deoxyribose solution 200 μ L, 10 mM H₂O₂ 200 μ L를 첨가한 후 37°C에서 4시간 배양하였다. 배양액에 2.8% trichloroacetic acid (TCA) 1 mL와 1.0% thiobarbituric acid (TBA) solution 1 mL를 첨가하여 20분 동안 boiling 후 cooling하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitric oxide (NO) 소거능 측정을 측정하기 위해 5 mM SNP 용액을 PBS와 혼합한 후 CBE를 농도별로 처리하여 실온에서 150분간 배양하였다. 그 후 Griess reagent를 반응액과 1:1 비율로 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 배양 및 처리

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포(American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)는 10% fetal bovine serum, 100 U/mL의 penicillin, 100 μ g/mL의 streptomycin, 1X의 vitamin이 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO₂로 조정된 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포가 90% 성장이 되었을 때 실험에 사용하였으며, 10 passage가 넘지 않도록 조절하였다. RAW 264.7 대식세포에 블랙 초크베리 100 μ g/mL을 24시간 처리한 후, 블랙 초크베리와 100 ng/mL의 LPS를 제시된 시간 별로 처리하였다.

세포 내 ROS 측정

세포 내 ROS는 ROS와 반응 시 형광을 나타내는 DCFH를 이용하여 측정하였다. DCFH 처리 후 37°C에서 30 min excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 530 nm로 형광 측정하였다. 세포 내 단백질 양은 실온에서 15분 동안 0.1 N NaOH로 가수 분해한 세포를 BCA assay로 측정하였다. 측정된 ROS는 세포 내 단백질 양으로 정상화(normalization)시킨 형광 강도로 나타내었다.

Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) 분석

유전자 발현 분석을 위해 총 RNA 추출은 Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하였다. Trizol 용액 1 mL를 첨가하여 세포를 용해시키고 실온에서 5분 동안 방치 후 클로로포름 200 μ L를 첨가하여 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 투명한 상층액(500 μ L)을 취하여 새로운 튜브로 옮기고 동량의 이소프로필 알콜을 첨가한 후 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 RNA를 침착 시켰다. RNA 침전물을 diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma-Aldrich) 처리한 증류수로 희석한 70% 에탄올 1 mL로 세척한 후 공기 중에서 건조 시켜 역전사 샘플(reverse transcription sample)로 사용하였다. 1차 가닥(first strand) cDNA 합성은 추출된 총 RNA 1 μ g을 사용하여 수행되었고, Improm-II reverse transcription system (Promega, Madison, WI, USA)과 oligo dT primer를 사용하여 역전사 반응을 수행하였다. qPCR 분석은 CFX 96 (BioRad, Hercules, CA, USA)을 사용하였으며, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)에 정상화(normalization)시킨 상대 수치를 비교분석 하였다.

단백질 발현

단백질 발현은 세포에 lysis buffer를 첨가하여 단백질을 추출하였고, 세포질 및 핵 단백질은 nuclear extraction kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 추출하였다. 단백질 정량은 Bio-rad protein assay kit를 이용하여 단백질을 정량한 후, 동량의 단백질을 4-16%의 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 분리하고, membrane에 transfer하여 5% skim milk에서 1시간 blocking 하였다. 1차 항체를 각각 희석하여 4°C에서 overnight 하여 반응시킨 뒤, 2차 항체와 상온에서 1시간 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence (ECL) solution과 반응시킨 후 Chemidoc (Bio-Rad)을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다. NF- κ B p65, NRF2, GAPDH, TATA binding protein (TBP)는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구매하였다.

통계처리

결과 분석은 GraphPad Prism 7.01 software (San Diego, CA, USA)를 이용하여 통계 처리하였다. 결과는 각 군별 mean \pm SEM로 나타내었고 각 실험군간 비교는 일원분산분석(one-way ANOVA)로 분석한 후 Newman-Kuel post hoc test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

In vitro 라디칼 소거능

다양한 in vitro 라디칼 소거능은 천연 유래 물질 또는 식품의 항산화 효과를 측정하는 대표적인 방법이다. 이에 본 연구에서는 블랙 초크베리의 항산화 효과를 측정하기 위해 DPPH, \cdot OH 및 NO 라디칼을 측정하였다. 폴리페놀 함유 블랙 초크베리 추출물을 농도별로 5, 10, 25, 50, 100 μ g/mL로 처리하였을 때, DPPH 소거능이 농도의존적으로 증가하였고, \cdot OH 라디칼 소거능을 측정할 결과 25 μ g/mL의 농도에서도 70% 이상의 소거 효과를 나타내어 우수한 \cdot OH radical 소거 효과를 확인할 수 있었다. 활성 질소종의 하나로 염증 반응의 중요한 작용 인자로 알려진 NO에 대한 블랙 초크베리의 소거 효과를 살펴본 결과, 농도의존적으로 NO 소거율이 증가하였다(Table 1). 이는 열수 또는 70% 에탄올로 추출한 블랙 초크베리가 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능의 결과와 일치하였다(Hwang 등, 2014).

대식세포 내 ROS 생성에 미치는 블랙 초크베리의 영향

세포 내 ROS는 정상적인 대사 작용에 의해 생성되며, 체내 방어를 위한 면역 반응에 있어 세포 항상성에 중요한 역할을 한다(Brown 등, 2007). 그러나 다양한 스트레스 및 염증 반응에 의해 다량으로 생성되는 ROS는 만성 염증 반응을 더욱 악화시키고 다양한 질환의 주요한 원인이 된다(Schafer와 Werner, 2011). 이에 블랙 초크베리 추출물이 활성화된 대식세포에서 생성되는 활성 산소종에 미치는 영향에 대해 살펴보았다. 활성화 되지 않은 대식세포 내 ROS는 블랙 초크베리 처리에 의한 변화가 나타나지 않았다. 반면에 LPS 처리로 의해 활성화된 대식세포 내 ROS는 유의적으로 증가하였고, 이러한 활성 대식세포내 ROS 증가는 블랙 초크베리 처리에 의해 활성화 되지 않은 대식세포 내 수준 및 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1A).

대식세포 내 증가한 ROS는 체내 항산화 방어 시스템에 의해 제거되므로, 블랙 초크베리에 의한 ROS 감소 효과가 관련 항산화 효소 조절에 의한 것인지 살펴보았다. 체내 항산화 방어 및 해독 시스템에 주요한 역할을 하는 전사인자인 NRF2는 염증 반응 등

Table 1. In vitro radical scavenging activity of polyphenol-rich black chokeberry extract

CBE (μ g/mL)	Radical scavenging activity (%)		
	DPPH	\cdot OH	NO
5	48.28 \pm 1.98 ^c	42.15 \pm 0.66 ^c	42.69 \pm 1.19 ^c
10	60.32 \pm 2.56 ^d	58.29 \pm 0.45 ^d	41.64 \pm 1.37 ^c
25	76.29 \pm 3.68 ^c	73.66 \pm 0.82 ^c	44.68 \pm 0.94 ^b
50	84.26 \pm 1.90 ^b	80.22 \pm 0.15 ^b	66.05 \pm 0.37 ^a
100	96.31 \pm 0.92 ^a	89.72 \pm 0.38 ^a	70.05 \pm 0.72 ^a

Data represent mean \pm SEM; Values with the different letters in a column are significantly different ($p < 0.05$). DPPH, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl; \cdot OH, hydroxyl radical; NO, nitric oxide.

의 산화적 스트레스 자극 시 항산화 효소를 생성 하여 산화적 스트레스를 예방한다(Ren 등, 2020). 블랙 초크베리의 항산화 효과가 체내 항산화 효소 조절에 의한 것인지 살펴보기 위해, 항산화 효소 전사인자인 NRF2 및 downstream 유전자 superoxide dismutase (SOD)와 NADPH oxidase (NOX) 측정하여 알아보았다. 블랙 초크베리는 활성화 되지 않은 대식세포에서 전사인자인 NRF2와 항산화 효소인 SOD의 mRNA 발현을 증가시켜, 정상 상태에서의 블랙 초크베리의 항산화 기능성을 나타내었다. LPS로 의해 활성화된 대식세포에서 증가한 NRF2 및 SOD의 발현은 블랙 초크베리 처리에 의해 유의적으로 감소한 것으로 나타났다(Fig. 1B 및 Fig. 1C). 이는 블랙 초크베리에 의한 세포 내 ROS 감소로 인해 항산화 관련 유전자 발현이 감소한 것으로 판단된다. 대식세포에서 ROS를 생성하는 중요한 효소인 NOX의 발현은 활성화된 대식세포에서 유의적으로 증가하였으나, 블랙 초크베리에 의해 유의적으로 감소한 것으로 나타났다(Fig. 1D). NOX는 NRF2 전사인자에 의한 조절을 통해 세포 내 ROS 생성에 관여한다(Kovac, et al., 2015). NOX는 실질적으로 ROS 생성 저하에 관여하여 체내 항산화 시스템에 기여하므로, 블랙 초크베리의 항산화 효과는 NOX 발현 감소에 의한 ROS 생성 저하를 통한 것으로 판단된다.

일반적으로는 NRF2는 세포질 내에 Kelch-domain 1 protein (Keap1)과 함께 존재하지만, 산화적 스트레스 등과 같은 자극에 의해 Keap1이 인산화되어 제거되면 핵 안으로 이동한다. 핵으로 이동한 NRF2는 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 ARE 관련 유전자군인 항산화 효소 또는 해독 효소의 발현을 증가시킨다(Castrillo와 Tontonoz, 2004; Ding 등, 2019). 이에 블랙 초크베리의 NRF2 및 관련 유전자 발현에 미치는 영향이 실질적으로 NRF2의 핵 내 이동에 의한 것인지 살펴 보았다. 대식세포의 활성화에 따라 NRF2의 핵 내 이동 증가는 블랙 초크베리 처리에 의하여 저하한 것을 살펴볼 수 있었다(Fig. 1E).

이러한 결과는 블랙 초크베리의 산화적 스트레스 보호 효과가 대식세포 내 NRF2 관련 내인성 항산화 기전을 조절함에 따른, ROS 생성 저하 및 항산화 효소 등에 의한 ROS 소거능 증가에 의한 것으로 나타났다. 이는 블랙 초크베리가 고탄알 모델에서(Ciocoiu 등, 2013) 및 알코올로 만성 간 손상을 유발시킨 C57BL/6 마우스 모델에서 NRF2 기전 조절에 영향을 미친 결과와 유사한 것으로 나타났다(Wang, et al., 2020).

블랙 초크베리의 대식세포 내 NF- κ B 및 염증성 매개 인자에 미치는 영향

NRF2는 산화적 스트레스를 보호할 뿐 만 아니라, 대식세포에서 염증 관련 전사인자인 NF- κ B의 활성화에도 영향을 미친다(Ding 등, 2019; Ren 등, 2020). 블랙 초크베리는 대식세포에서

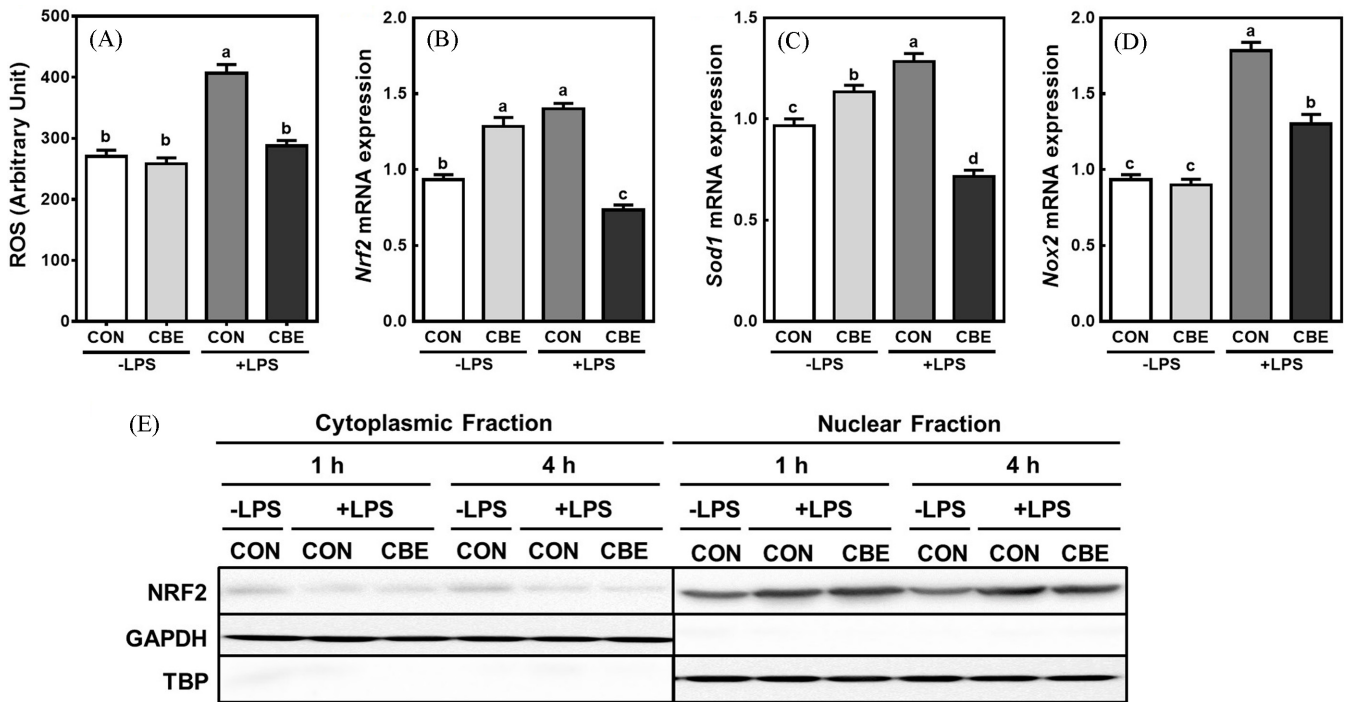


Fig. 1. Effects of CBE on cellular levels of reactive oxygen species (ROS) and the expressions of genes involved antioxidant defense system in RAW 264.7 macrophages. (A) ROS measurement (B) *Nrf2* expression (C) *Sod1* expression (D) *Nox2* expression and (E) NRF2 protein levels. Data are expressed as relative expression to control. Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$). Values are means \pm SEM; n=6. GAPDH and TBP were used for the purity of cytoplasmic and nuclear fractions, respectively. CBE, polyphenol-rich chokeberry extract; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; NOX2, NADPH oxidase; NRF2, nuclear factor E2-related factor 2; ROS, reactive oxygen species; SOD1, superoxide dismutase; TBP, TATA-binding protein.

NRF2 관련 기전에 조절에 영향을 미치는 것으로 나타나, 이에 염증 관련 전사 인자에도 영향을 미치는 지 살펴보았다.

대부분의 세포 내 존재하는 염증 관련 전사인자인 NF- κ B는 비활성 시에는 세포질에 NF- κ B/inhibitor κ B (I κ B) 결합체로 존재하다 각종 자극에 노출된 뒤 복합체에서 I κ B는 인산화 과정을 통해 분리되고 이로 인해 활성화된 NF- κ B는 핵 내로 들어가 각종 염증 매개체의 합성을 위한 전사 과정에 작용하는 것으로 알려져 있다. NF- κ B는 p65, p50, I κ B subunit의 trimer로 구성되어 있고 산화적 스트레스에 의해 I κ B가 분해되면 p65/p50 heterodimer가 핵 속으로 이동하여 DNA 결합을 하는 것으로 알려져 있다 (Ding 등, 2019; Ren 등, 2020). 이에 블랙 초크베리가 NF- κ B 조절을 통해 염증 매개 인자에 영향을 미치는 지 살펴보았다. LPS 처리에 의해 NF- κ B p65의 세포질에서 핵 내 이동이 증가하였으나, 블랙 초크베리 처리에 의해 현저하게 감소함을 살펴볼 수 있었다(Fig. 2B). 이는 블랙 초크베리 추출물이 에탄올로 유도된 위염 랫 모델에서 NF- κ B 기전 조절을 통해 위염 보호 효과를 나타낸 결과와 유사하게 나타났다(Paulrayer 등 2017).

NF- κ B는 COX-2와 iNOS와 같은 염증 인자를 전사시키는데 있어서 중요한 역할을 한다. COX-2와 iNOS는 각각 prostaglandins (PGs)와 NO라는 다른 염증 매개 인자를 생성시키는 것으로 잘 알려져 있다. LPS 처리에 의해 활성화된 대식세포에서 증가한 COX-2 및 iNOS mRNA 발현은 블랙 초크베리 처리에 의해 유의적으로 감소하였다. 특히 블랙 초크베리에 의해 감소한 COX-2의 발현은 비활성화 대식세포 내 발현보다 유의적으로 감소하였고, iNOS의 발현은 비활성화 대식세포 수준으로 감소하였다 (Fig. 2B). COX-2와 iNOS 단백질 발현 측정 결과, LPS 처리에 의해 증가한 COX-2 및 iNOS 단백질은 블랙 초크베리 처리에 의

해 현저하게 저하하여 mRNA 발현과 일치하는 것으로 나타났다 (Fig. 2C). 현재 일반적으로 많이 사용되고 있는 비스테로이드 항염증제(Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)는 염증 매개 물질인 PGs를 생성하는 COX-2 활성을 저하하여 효과를 나타낸다(Deleuran, 2001; Lakshman 등, 2016). NOS는 강력한 염증 유발 인자인 NO 생성에 관여하며, 그 중 iNOS는 체내 염증 반응이 발생하면 NO 생성을 과량으로 생성하게 된다. 과량으로 생성된 NO는 염증 매개체를 증가시켜 다양한 조직에 염증을 심화시킨다(Czapski 등, 2007; Dolan 등, 2000; Laskin 등, 1994). 그러므로 실질적으로 염증 저해 주요 타겟 기전인 COX-2와 iNOS를 조절하는 천연물 및 식품 유래 인자는 우수한 염증 저해 효과를 나타낼 수 있다. 블랙 초크베리는 NF- κ B의 핵 내 이동 및 이에 따른 COX-2와 iNOS의 발현 조절에 의해 우수한 항염증 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

블랙 초크베리의 대식세포 내 염증성 사이토카인에 미치는 영향

염증 반응에서 주요한 역할을 하는 대식세포는 내독소인 LPS에 의해 활성화되면, 다양한 염증성 사이토카인들 생성하므로 생리활성 물질의 염증 관련 연구에서 많이 이용되고 있다. 이에 본 연구에서는 블랙 초크베리의 염증에 대한 보호 효과를 조사하기 위해, 대식세포를 LPS로 자극 시 생성되는 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β 의 유전자 발현을 측정하였다. RAW 264.7 대식세포는 LPS 처리에 의해 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 mRNA 발현을 증가시켰으나, 블랙 초크베리 처리에 의해 유의적으로 감소함을 살펴볼 수 있었다(Fig. 3A). 이들 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 단백질 발현 또한 LPS 처리로 활성화된 대식세

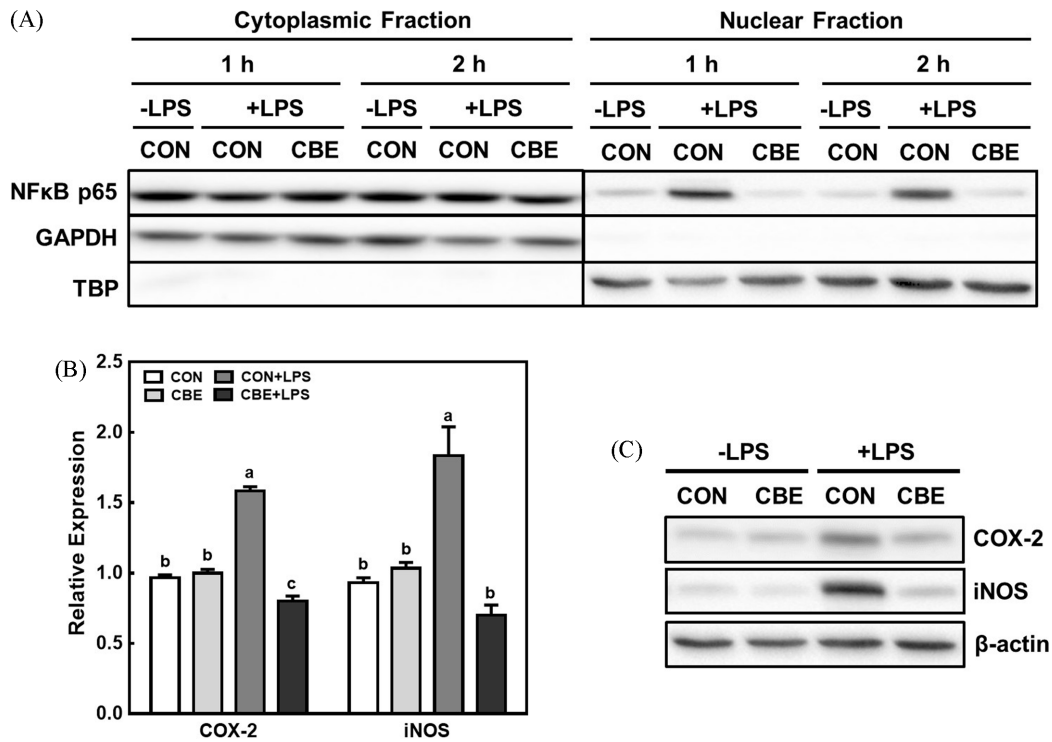


Fig. 2. Effects of CBE on signaling pathway in RAW 264.7 macrophages. (A) Nuclear translocation of NF-κB (B) COX-2 and iNOS expression and (C) COX-2 and iNOS protein levels. Data are expressed as relative expression to control. Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$). Values are means \pm SEM; $n = 6$. GAPDH and TBP were used for the purity of cytoplasmic and nuclear fractions, respectively. CBE, polyphenol-rich chokeberry extract; COX-2, cyclooxygenase-2; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; iNOS, inducible NOS (iNOS); NF-κB, nuclear factor κB; TBP, TATA-binding protein.

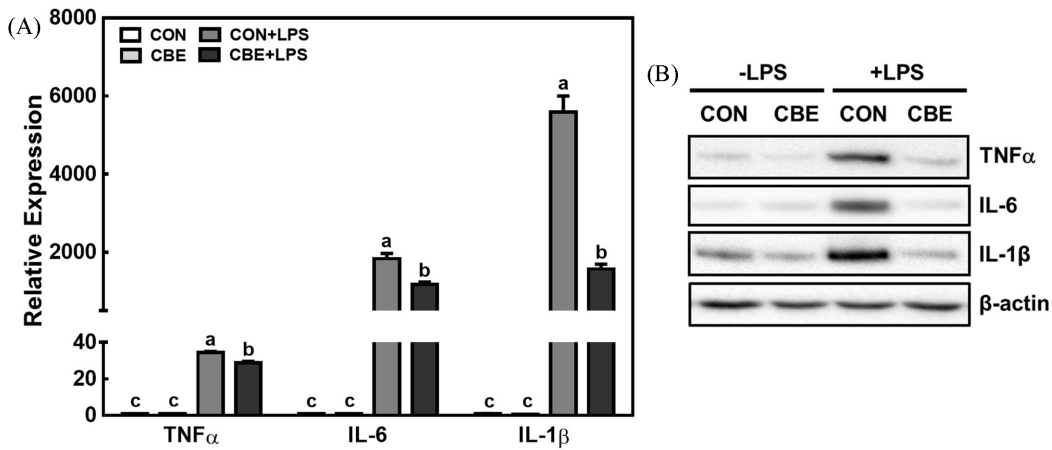


Fig. 3. Effects of CBE on pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. (A) mRNA expression of proinflammatory cytokines (B) Representative western blot Data are expressed as relative expression to control. Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$). Values are means \pm SEM; $n = 6$. β -actin is a loading control. CBE, polyphenol-rich chokeberry extract; IL, interleukin; TNF- α , tumor necrosis factor α .

포에서 증가하였으나 블랙 초크베리에 의해 감소하였다(Fig. 3B). 이는 블랙 초크베리와 셀레늄이 단핵구에서 NF-κB 활성화에 의해 IL-6, IL-8, TNF- α 사이토카인 분비를 저하하는 것으로 나타난 결과와 유사하다(Appel 등, 2015). 블랙 초크베리 추출물은 혈관내피세포에서 TNF- α 에 의해 유도된 염증 반응에서 STAT3/IRF1 기전 조절을 통해 IL-1 β , IL-6, IL-8의 발현을 저하한 것으로 나타났다(Iwashima 등 2019). 블랙 초크베리는 대식세포에서 실질적으로 염증성 사이토카인 발현 및 분비를 조절하여 염증 보호 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 다양한 만성 대사성 질환에 기초적 유발 기전인 산화적 스트레스 및 염증에 대한 폴리페놀 함유 블랙 초크베리의 보호 효과를 살펴보았다. 블랙 초크베리는 DPPH, \cdot OH, 및 NO 등 다양한 라디칼 소거능을 나타냈다. 내독소인 LPS에 의해 활성화된 대식세포 내 ROS 증가는 폴리페놀 함유 블랙 초크베리에 의해 감소하였다. 이는 블랙 초크베리가 전사인자인 NRF2의 핵 내 이동 및 이로 인해 조절되는 SOD에 의한 ROS 소거능

및 NOX2에 의한 ROS 생성 저하에 의한 것으로 나타났다. 블랙 초크베리의 염증 보호 효과는 활성화된 대식세포에서 증가하는 NF- κ B의 핵 내 이동에 따른 COX-2, iNOS와 같은 염증 매개인자 관련 효소와 TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인의 저하에 의한 것으로 나타났다. 결론적으로 블랙 초크베리의 산화적 스트레스 및 염증 보호 효과는 항산화 효소 관련 전사 인자인 NRF2 조절 기전 및 염증 관련 전사 인자인 NF- κ B와 관련 유전자 발현의 조절을 통하여 나타났다. 추후 블랙 초크베리 내 기능성 물질에 대한 심도 있는 기전 연구를 통해 천연물 유래 기능성 소재로서의 역할을 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

References

- Appel K, Meiser P, Millan E, Collado JA, Rose T, Gras CC, Carle R, Munoz E. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) concentrate inhibits NF- κ B and synergizes with selenium to inhibit the release of pro-inflammatory mediators in macrophages. *Fitoterapia*. 105: 73-82 (2015)
- Brown KL, Cosseau C, Gardy JL, Hancock RE. Complexities of targeting innate immunity to treat infection. *Trends Immunol*. 28: 260-266 (2007)
- Campos G, Schmidt-Heck W, De Smedt J, Widera A, Ghallab A, Putter L, Gonzalez D, Edlund K, Cadenas C, Marchan R, Guthke R, Verfaillie C, Hetz C, Sachinidis A, Braeuning A, Schwarz M, Weiss TS, Banhart BK, Hoek J, Vadigepalli R, Willy J, Stevens JL, Hay DC, Hengstler JG, Godoy P. Inflammation-associated suppression of metabolic gene networks in acute and chronic liver disease. *Arch. Toxicol*. 94: 205-217 (2020)
- Castrillo A, Tontonoz P. Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 20: 455-480 (2004)
- Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol*. 11: 738-749 (2011)
- Ciocoiu M, Badescu L, Miron A, Badescu M. The involvement of a polyphenol-rich extract of black chokeberry in oxidative stress on experimental arterial hypertension. *Evid. Based Complement Alternat. Med*. 201: 912769 (2013)
- Czapski GA, Cakala M, Chalimoniuk M, Gajkowska B, Strosznajder JB. Role of nitric oxide in the brain during lipopolysaccharide-evoked systemic inflammation. *J. Neurosci. Res*. 85: 1694-1703 (2007)
- Deleuran BW. NSAID--COX-2-inhibitors, where is the difference? Focus on the modes of action. *Ugeskr Laeger*. 163: 4185-4189 (2001)
- Ding L, Yuan X, Yan J, Huang Y, Xu M, Yang Z, Yang N, Wang M, Zhang C, Zhang L. Nrf2 exerts mixed inflammation and glucose metabolism regulatory effects on murine RAW 264.7 macrophages. *Int. Immunopharmacol*. 71: 198-204 (2019)
- Diplock AT. Defense against reactive oxygen species. *Free Radic. Res*. 29: 463-467 (1998)
- Dolan S, Field LC, Nolan AM. The role of nitric oxide and prostaglandin signaling pathways in spinal nociceptive processing in chronic inflammation. *Pain*. 86: 311-320 (2000)
- Giudice A, Arra C, Turco MC. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents. *Methods Mol. Biol*. 647: 37-74 (2010)
- Gonzalez-Molina E, Moreno DA, Garcia-Viguera C. Aronia-enriched lemon juice: a new highly antioxidant beverage. *J. Agric. Food Chem*. 56: 11327-11333 (2008)
- Guarnieri G, Grassi G, Barazzoni R, Zanetti M, Biolo G. The impact of inflammation on metabolic regulation in chronic kidney disease: a review. *J. Ren. Nutr*. 15: 121-124 (2005)
- Holvoet P. Relations between metabolic syndrome, oxidative stress and inflammation and cardiovascular disease. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg*. 70: 193-219 (2008)
- Hwang SJ, Yoon WB, Lee OH, Cha SJ, Kim JD. Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food Chem*. 146: 71-77 (2014)
- Inoue H, Tanabe T. Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene in vascular endothelial cells. *Adv. Exp. Med. Biol*. 407: 139-144 (1997)
- Iwashima T, Kudome Y, Kishimoto Y, Saita E, Tanaka M, Taguchi C, Hirakawa S, Mitani M, Kondo K, Iida K. Aronia berry extract inhibits TNF- α -induced vascular endothelial inflammation through the regulation of STAT3. *Food Nutr. Res*. 63: 3361(2019)
- Jurikova T, Mlecek J, Skrovankova S, Sumczynski D, Sochor J, Hlavacova I, Snopce L, Orsavova J. Fruits of black chokeberry *Aronia melanocarpa* in the prevention of chronic diseases. *Molecules*. 22: 944 (2017)
- Karunakaran U, Park KG. A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: focus on islets and their defense. *Diabetes Metab. J*. 37: 106-112 (2013)
- Kovac S, Angelova PR, Holmstrom KM, Zhang Y, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1850: 794-801 (2015)
- Lakshman TR, Deb J, Paine TK. Anti-inflammatory activity and enhanced COX-2 selectivity of nitric oxide-donating zinc (ii)-NSAID complexes. *Dalton Trans*. 45: 14053-14057 (2016)
- Laskin JD, Heck DE, Laskin DL. Multifunctional role of nitric oxide in inflammation. *Trends Endocrinol. Metab*. 5: 377-382 (1994)
- Lopez-Candales A, Hernandez Burgos PM, Hernandez-Suarez DF, Harris D. Linking chronic inflammation with cardiovascular disease: from normal aging to the metabolic syndrome. *J. Nat. Sci*. 3: 1-22 (2017)
- Maiese K. Paring down obesity and metabolic disease by targeting inflammation and oxidative stress. *Curr. Neurovasc. Res*. 12: 107-108 (2015)
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 6: 3051-3064 (1992)
- Paulrayer A, Adithan A, Lee JH, Moon KH, Kim DG, Im SY, Kang CW, Kim NS, Kim JH. Aronia Melanocarpa (Black Chokeberry) Reduces ethanol-induced gastric damage via regulation of HSP-70, NF- κ B, and MCP-1 signaling. *Int. J. Mol. Sci*. 18: 1195 (2017)
- Puzanowska-Tarasiewicz H, Kuzmicka L, Tarasiewicz M. Organism defense against reactive oxygen species. *Wiad. Lek*. 62: 248-256 (2009)
- Ren J, Su D, Li L, Cai H, Zhang M, Zhai J, Li M, Wu X, Hu K. Anti-inflammatory effects of Aureusidin in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages via suppressing NF- κ B and activating ROS- and MAPKs-dependent Nrf2/HO-1 signaling pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 387: 114846 (2020)
- Schafer M, Werner S. The cornified envelope: a first line of defense against reactive oxygen species. *J. Invest. Dermatol*. 131: 1409-1411 (2011)
- Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul. Pharmacol*. 71: 40-56 (2015).
- Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int. J. Clin. Lab. Res*. 29: 49-55 (1999)
- Wang Z, Liu Y, Zhao X, Liu S, Liu Y, Wang D. Aronia melanocarpa prevents alcohol-induced chronic liver injury via regulation of Nrf2 signaling in C57BL/6 Mice. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2020: 4054520 (2020)
- Wilson HM, Chettibi S, Jobin C, Walbaum D, Rees AJ, Kluth DC. Inhibition of macrophage nuclear factor- κ B leads to a dominant anti-inflammatory phenotype that attenuates glomerular inflammation *in vivo*. *Am. J. Pathol*. 167: 27-37 (2005)