

Inhibitory Effect of Ethanol Extract of *Monascus*-fermented Red Yeast Rice on Proinflammatory iNOS and COX-2 Protein Expression in LPS-stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells

Ki Hyun Kim^{1*}, Jung-Hyeong Lee^{1,2†}, Gi-Seok Kwon¹, Eul Won Seo³ and Jung-Bok Lee^{2*}

¹Division of Horticulture & Medicinal Plant, Andong National University, Gyeongbuk 36729, Korea

²Kyochon Research & Innovation Center, Kyochon F&B Co., LTD. Gyeonggido 18469, Korea

³Department of Biological Sciences and Biotechnology, Andong National University, Gyeongbuk, 36729, Korea

Received December 11, 2019 / Revised March 16, 2020 / Accepted March 20, 2020

Red yeast rice has been extensively used as a food and traditional medicine for thousands of years in Korea. *Monascus* produces many secondary metabolites during its growth, including pigments, monacolins, and γ -aminobutyric acid. Some metabolites, specifically monacolin K, γ -aminobutyric acid, and dimeric acid, have been reported to lower cholesterol and blood pressure because of certain antioxidant effects. This study investigated the total phenolic content of ethanol extract from red yeast rice fermented with *Monascus* sp. BHN-MK and its anti-inflammatory effect on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. To assess its anti-inflammatory effect, the inhibitory activity of the ethanol extract on LPS-induced NO production and expression levels of iNOS and COX-2 proteins in macrophage cells were measured. Its total polyphenol content was higher than that of ordinary non-fermented rice. Its NO production inhibition activity was comparable to that of the negative control group treated with LPS at a concentration of 400 μ g/ml. Western blot revealed a significant decrease in the inhibition of iNOS and COX-2 protein expression at concentrations of 400 and 800 μ g/ml, respectively. Red yeast rice ethanol extracts exerted the strongest anti-inflammatory effects. The results indicate that red yeast rice could be used as a functional cosmetic and anti-inflammatory material.

Key words : Anti-inflammatory activity, anti-oxidant activity, *Monascus* sp., red yeast rice, Raw 264.7 macrophages

서 론

최근 국민 소득 향상과 식량 공급이 풍부해짐에 따라 식생활의 선택 폭이 넓어지고, 개인 취향에 따른 식생활 습관이 다양해지면서 질병과 건강문제에 지속적인 관심이 증가되고 있다[9, 23]. 또한, 산업화와 더불어 다양한 화합물의 사용은 인체와 생태계에 부정적인 영향이 보고 되고 있다[37]. 생체에는 활성산소인 superoxide, hydroxyl radical 및 과산화수소와 같은 물질이 생성되고, 이러한 활성산소들을 제거하기 위한 체내 항산화 시스템이 작동되고 있다. 그러나, 활성산소의 증가로 산화적 스트레스(oxidative stress) 상태가 되어 DNA를 비롯하여 세포와 조직을 구성하는 단백질, 지질 및 다른 성분들이 활성산소에 의해 손상될 수 있으며, 면역 시스템을 파괴

하여 여러 종류의 암 및 노화 관련 질병들의 발생된다고 알려져 있다[11]. 활성산소를 억제하는 butylated hydroxytoluene (BHT)과 butylated hydroxyanisole (BHA)와 같은 합성항산화제는 암, 돌연변이 등의 부작용을 나타낸다고 보고되며, 최근 많은 연구자들이 항산화활성과 관련된 물질에 대한 연구를 통해 산화적 스트레스를 억제할 수 있는 기능성식품 및 생약제에 관한 연구개발이 점점 증가하고 있다[30, 31].

염증반응은 외부자극에 대한 생체조직 방어 기작으로서 정상 상태에서는 항원·항체 반응을 통해 질병을 일으키는 항원을 제거하지만, 비정상적 상태의 만성염증반응의 경우, 특정 조직의 손상, 아토피, 관절염, 건선 등과 같은 각종 질환을 유발한다[7]. 면역체계에서 대식세포(macrophage)는 활성산소와 스트레스 등의 다양한 자극에 의한 염증반응을 억제하여, 면역기능 조절과 생체 항상성 유지에 중요한 역할을 한다[12]. Gram-negative bacteria의 지질다당류(lipopolysaccharide; LPS)는 대식세포 막수용체인 TLR-4를 통해 세포 내부로 신호를 전달한다[8]. 또한, 염증 매개 물질인 transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1)은 효소 복합체인 inhibitory kappa B kinase β 를 인산화시키며, 이를 통해 활성화된 I Kappa β kinase (IKK β)가 nuclear factor-kappa B (NF- κ B)의 억제 인자인 inhibitory kappa B alpha를 분해하게 되고 활성

[†] Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-31-376-1973, Fax : +82-31-376-2602

E-mail : kbio91@kyochon.com

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.

화된 NF- κ B는 핵 내로 이동한다[5, 38]. 핵 내로 이동된 NF- κ B는 유도형 산화질소합성효소(inducible nitric oxide synthase; iNOS)와 사이클로옥시게나제-2(cyclooxygenase-2; COX-2)와 같은 염증성 효소와 인터루킨(interleukin; IL-6, IL-1 β), Tumor necrosis factor (TNF)- α 같은 친-염증사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 발현을 유도시킨다[35]. 또한, iNOS는 L-arginine이 L-citrulline으로 변환에 관여하여 많은 양의 Nitric oxide (NO)를 생성하고 염증과 관련된 질병을 유발하며, COX-2는 arachidonic acid가 발열과 통증에 작용하는 염증 유발 물질인 prostaglandin E₂ (PGE₂)로 바뀌는 과정에 관여한다[4, 33].

홍국(紅麴, Red yeast rice)은 붉은 곰팡이인 *Monascus* sp.로 쌀을 발효한 것으로 붉은 색상을 띠는 쌀이라 하여 홍국으로 불려져 왔으며, 홍국 이외에도 Ang-kak, Anka, Anankak, Angquac, Beni-koji 등 다양한 이름으로 불려왔다[29]. 홍국의 약리학적 효능은 명나라(1368~1644)의 한의사 '이시진'이 집필한 '본초강목'에 소화불량, 지사제, 혈액순환 촉진 및 소화기능에 관해 기술되어 있다. 홍국의 2차대사산물은 광범위한 생리활성 기능을 발휘하는 것으로 알려져 있으며, *Monascus* sp.은 6종의 색소(monascin, ankaflavin, rubropunctatin, monascorubrin, rubropunctamine, monascorubramine), lovastatin (monacolin K), citrinin, dimerumic acid 및 γ -amino butyric acid (GABA)등을 생산할 수 있으며, 항염증작용, 신경전달 및 혈압강화효과, 항산작용등의 효과가 보고되었다[2, 15, 17, 20, 25].

본 연구에서는 홍국 추출물의 생리활성 물질인 총 폴리페놀 함량을 측정하고, NO 생성 저해 활성, iNOS 및 COX-2 단백질 활성을 측정하여 LPS가 유도된 Raw 264.7 cell에서 홍국의 항염증 작용을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

홍국 발효균주

본 연구에서는 기존에 확보된 *Monascus* sp. BHN-MK 02를 이용하였으며, 홍국균 동정은 26S rRNA gene 분석을 통해 확인하였다[10]. *Monascus* sp. BHN-MK 02는 PDA (Potato Starch 0.4%, Dextrose 2%, Agar 1.8%)배지와 30°C에서 계대하였다. 쌀의 발효는 색소생산용 배지로 널리 알려진 Lin's 배지(Rice powder 5%, NaNO₃ 0.15%, MgSO₄·7H₂O 0.1% 및 KH₂PO₄ 0.25%)에 *Monascus* sp. BHN-MK 02를 접종하여 전 배양하여 사용하였다. 발효를 위한 쌀은 한번 씻은 후 20분간 침지한 뒤, 배양 용기에 넣고 121°C에서 30분간 멸균하였다. 멸균된 쌀 1 kg에 전 배양한 *Monascus* sp. BHN-MK 02 배양액 300 ml을 접종하여 30°C에서 10일간 배양하였다. 접종 균주의 배양체의 덩어리 형성을 방지하기 위해 24시간마다 간헐적으로 흔들어 주었다.

홍국 추출방법

발효된 홍국은 추출에 용이하도록 분쇄하여 분말 200 g에 70% 에탄올 1 l를 첨가하고, 고압멸균기를 이용하여 80°C에서 1시간 동안 추출하였다. 추출이 끝난 후 여과지를 이용하여 여과하고 회전식 감압 농축기를 사용하여 농축한 뒤, 동결건조하여 사용하였다.

Total polyphenol

홍국 추출물에 대한 시료의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Dennis 법에 따라 분광광도계를 이용하여 측정하였다[36]. 각 시료 10 μ l에 2% Na₂CO₃ 용액 200 μ l와 50% Folin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 시약 10 μ l를 가한 후 상온에서 30분간 반응시킨다. 760 nm에서 UV/VIS spectrophotometer (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 흡광도 값을 측정하였다. 총 폴리페놀 함량을 정량하기 위해 표준물질 Galic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 농도별로 조제하고 시료와 동일한 방법으로 검량선을 작성하여 각 시료의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

세포배양

Raw 264.7 cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받았으며, 10% fetal bovine serum (FBS) (Welgene Inc., Gyeongsan, Gyeongbuk, Korea)과 1 X antibiotic-antimycotic solution (Welgene Inc., Gyeongsan, Gyeongbuk, Korea)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Welgene Inc., Gyeongsan, Gyeongbuk, Korea)을 사용하였으며, 37°C와 5% CO₂를 유지하는 배양기에서 배양하였다. 배양액은 2일마다 정기적으로 교체해주었다.

MTT assay

홍국추출물 시료의 세포독성은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 Raw 264.7 cell을 1 \times 10⁴ cells/well로 동일하게 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 기존 배지를 제거하고 새로운 배지를 넣어준 후 홍국추출물을 농도 의존적으로(0, 100, 200, 400, 800 μ g/ml) 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 기존 배지를 제거하고 MTT 시약(5 μ g/ml)을 넣고 4시간 동안 배양한 후 상등액을 제거하고 well에 형성된 formazan은 DMSO 100 μ l를 첨가하여 용해시켰다. 540 nm에서 UV/VIS spectrophotometer (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 무처리군 시료인 음성대조군을 100%의 생존율로 간주하고 이를 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{A_{540}(\text{treated cells})}{A_{540}(\text{control cells})} \times 100\%$$

iNOS & COX-2 단백질 분석

홍국 추출물이 처리된 Raw 264.7 cell에서 iNOS 및 COX-2

단백질 발현을 확인하기 위해 Western blotting을 이용하여 측정하였다. 6-well plate에 Raw 264.7 cell을 24시간동안 배양한 후 기존 배지를 제거 후 시료를 농도 의존적으로(0, 100, 200, 400, 800 µg/ml) 6시간 동안 처리하고 지질다당류 (lipopolysaccharide; LPS) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가한 뒤 5% CO₂와 37°C가 유지되는 배양기에서 18시간 동안 배양하였다. 그 후 세포를 1× DPBS로 세척하고 protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland)과 phosphatase inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland)을 함유한 RIPA 완충액(Biosesang, Seongnam, Korea)으로 용해시켰다. Cell scrapers를 사용하여 세포를 1.5 ml tube로 옮긴 후, 4°C에서 30분간 12,000 rpm으로 원심분리 하였다. SMART BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 이용하여 단백질 농도를 측정하였으며, 단백질 60 µg을 SDS-PAGE로 전기영동 한 후 nitrocellulose membrane으로 gel의 단백질을 고정시켰다. 그 후, iNOS와 COX-2의 1차 antibody와 반응시킨 후 2차 antibody인 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG를 반응시키고 Enhanced Chemiluminescence 시약(Dogen, Seoul, Korea)을 사용하여 ChemiDoc™ MP Imaging System (Biorad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

NO측정

LPS에 의해 유도된 NO 생성 저해 활성을 측정하기 위해 96-well plate에 1×10⁵ cells/well이 되도록 분주하여 5% CO₂와 37°C가 유지되는 배양기에서 24시간 동안 배양하여 세포를 well에 부착시켰다. 그 후 기존 배지를 제거한 뒤 시료를 농도 의존적으로(0, 100, 200, 400, 800 µg/ml) 처리하고 1시간 배양 후 LPS (1 µg/ml)를 처리한 후 23시간 배양하였다. 배양 후 상등액 100 µl를 취하여 동량의 Griess 시약을 첨가하여 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 UV/VIS spectrophotometer (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 생성된 nitrite의 농도는 sodium nitrite를 이용하여 농도별로 조제하고 시료와 동일한 방법으로 검량선을 작성하여 계산하였다.

통계처리

모든 실험은 최소 3회 반복하였고 데이터는 평균±표준편차 (S.D.)로 표현하였다. 평균은 SPSS (SPSS Inc, Armonk, NY, USA)를 이용한 비모수적 Kruskal-Wallis 및 Mann-Whitney 분석을 사용하여 비교하였고 유의성은 $p<0.01$ 및 $p<0.05$ 에서 검사하였다.

결과 및 고찰

Total polyphenol 함량

폴리페놀류 화합물은 항산화, 항염증, 항혈전 및 항암 등 생리활성에 관여하는 것으로 알려져 있다[3]. 일반적으로 폴리

페놀은 방향성 화합물로 하이드록시기 (-OH기)로부터 전자를 공여하여 페놀 고리구조 공명에 의해 구조적 안정화가 되면서 항산화 활성을 나타내게 된다[22, 32]. 홍국 추출물 내의 총 폴리페놀 함량은 800 µg/ml 농도에서 258.4 µg/g으로 확인되었고, 발효하지 않은 쌀은 100.1 µg/g으로 확인되어 발효하지 않은 쌀 대비해 1.5배 이상 높은 결과를 확인했다(Fig. 1, Table 1). *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33의 생물전환을 통해 방풍의 총 폴리페놀을 약 14% 증가되었으며, *L. paracasei*와 *L. plantarum*를 이용한 대마씨 발효에서 총 폴리페놀은 각각 11%와 34%로 증가되고 이는 미생물의 생물전환과정을 통해 증가되었다고 보고하였다[18, 27, 28, 39]. 이에, 본 연구의 총 폴리페놀 증가는 생물전환 과정을 통해 증가되었을 것으로 판단할 수 있다. 그러나, 균의 특성 또는 발효 조건, 실험방법 등에 따라 차이가 있어 발효 균주에 따른 실험 방법 및 발효 조건을 다각화하여 함량 및 추출 수율을 높일 수 있는 조건 확립이 필요하다.

Raw 264.7 cell에서 세포생존을 변화(MTT assay)

Raw 264.7 대식세포에 대한 홍국의 독성을 측정하기 위해 홍국 에탄올 추출물을 농도 의존적으로 100~1,000 µg/ml까지 처리하여 MTT assay 방법으로 세포 생존율을 측정하였다. 홍국 추출물의 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 감소하는 경향을 확인하였다. 세포 MTT 반응에서 80% 이상의 세포 생존율을 보이는 경우 세포독성이 없는 것으로 판단되는데, 홍국 추출물의 Raw 264.7 대식세포에 대한 세포 독성을 살펴본 결과 800 µg/ml 농도까지 80% 이상의 세포 생존율이 확인되

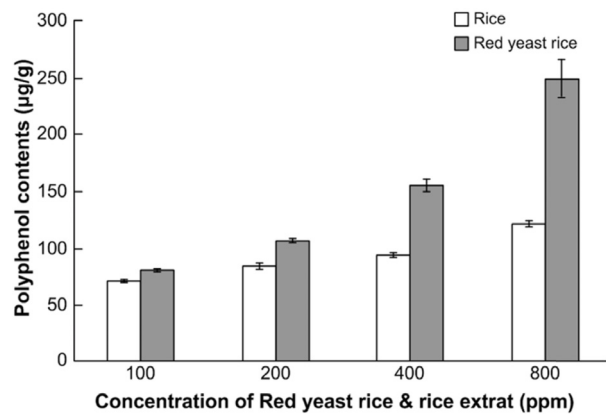


Fig. 1. Total polyphenol contents of ethanol extracts from the non-fermented rice and red yeast rice.

Table 1. Total polyphenol contents of extracts from the rice and the fermented Red yeast rice with *Monascus* sp. BHN-MK

	100	200	400	800
Rice	58.8±1.8	72.1±0.9	86.7±0.5	100.1±0.6
Red rice yeast	71.6±0.6	91.1±0.9	164.4±3.9	258.4±10.5

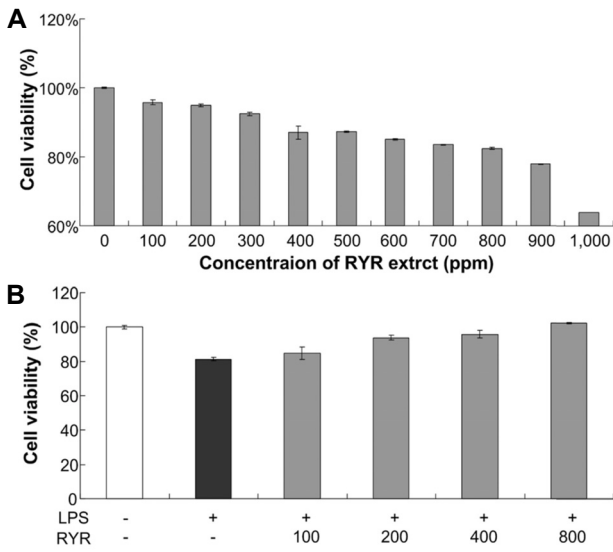


Fig. 2. Effects of RYR extracts on cell viability in Raw 264.7 cells treated without LPS (A) and with LPS (B). Cell viability was measured by MTT assay. LPS; 1 µg/ml lipopolysaccharide, RYR extract concentration; ppm

었으며, 홍국 추출물 900 µg/ml 처리시 77.9%의 생존율을 나타내어 추출물 자체에 일부 독성이 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 2A). 따라서, 이후 연구에서는 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되는 100, 200, 400, 800 µg/ml의 농도에서 이후 실험을 진행하였으며 발효에 의해 항염증 효과의 변화가 나타나는지 확인하고자 하였다. 또한, LPS 1 µg/ml로 활성화된 Raw 264.7 대식세포에 독성이 나타나지 않는 범위의 홍국 추출물 100, 200, 400, 800 µg/ml 농도로 각각 처리하여, 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, 매우 흥미롭게 홍국 추출물의 증가에 따라 Raw 264.7 대식세포의 생존률이 증가하는 것을 확인하였다. 홍국 추출물 800 µg/ml을 처리시 세포 생존율이 무처리 대조군과 유사한 세포 생존율을 확인하였다 (Fig. 2B).

COX-2 및 iNOS 단백질 발현 억제효과

iNOS는 다양한 염증성 자극에 반응하여 발현되며 Raw 264.7 대식세포에서 NO를 생성한다[21]. NO는 생체내에서 L-arginine이 NADPH에 의해 L-citrullin으로의 산화과정에서 NO synthase (NOS)에 의해 합성되며, 이러한 NOS는 세가지 isoform이 존재한다. 그 중, iNOS는 macrophage cell에 작용하여 LPS, IFN-γ, TNF-α등에 의해 활성화되며, 고농도의 NO를 장시간 생성하게 된다. NO는 iNOS에 의한 발현이 절대적으로 많고, iNOS의 경우 NF-κB에 의해 transcription level에서 발현이 조절되는 것으로 알려져 있으며[19], NF-κB는 prostaglandin pathway를 활성화하여 염증반응과 통증을 유발하는 것으로 알려져 있다. COX-2는 염증 부위에서 다량의 pro-inflammatory Prostaglandins (PGs)를 생성하는데, PGs는 통증

과 염증을 증대하는 역할을 한다[1]. Prostaglandin pathway는 COX라는 효소가 관여하여 arachidonic acid로부터 prostaglandin을 합성하는데[34], 두 가지의 isoform 형태를 보이는 COX 중에 COX-2는 TNF-α, IL-6, IL-1β와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 요인 중 하나로서 염증 조직이나 암 조직에서 높게 나타난다[40]. 이러한 염증 유발 인자의 발현을 조사하기 위해 western blot을 이용하여 세포질 내에서의 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현을 조사하였다. LPS로 유도된 Raw 264.7 대식세포에서 COX-2 및 iNOS 단백질 발현을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 특히, 400 µg/ml 및 800 µg/ml에서 홍국 추출물은 iNOS의 발현을 상당부분 억제하는 것을 확인하였다. 또한, β-actin의 발현을 정량하여 비교한 결과 COX-2 단백질 발현이 농도 의존적으로 억제되며, 홍국 추출물 400 µg/ml에서 6.69로 급격하게 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 또한, iNOS 단백질 발현은 400 µg/ml과 800 µg/ml에서 강하게 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). *Monascus* 균을 이용하여 발효할 때 생성되는 2차대사산물 monascin을 THP-1 세포에서 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 실험결과, 시료 25 µM에서 무처리군과 유의한 결과를 보여 iNOS 및 COX-2 단백질 발현을 저해한다고 보고되었다[13]. LPS로 유도된 Raw 264.7 대식세포의 홍국 추출물의 iNOS 및 COX-2 단백질 저해효과는 홍국의 성분중 하나인 monascin과 *Monascus* sp.가 생물전환을 통해 생성하는 다른 물질들과의 상호작용을 통해 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하는 것으로 추론된다.

NO생성 저해 효과

NO는 L-arginine으로부터 NOS에 의해 생성되는 무기 유리체로, NO는 전염성세균과 곰팡이를 사멸시키고 종양을 제거하는 기능을 가지고 있다. 하지만, 병리학적인 원인에 의해 과도하게 NO가 형성되면 세포 내에 염증을 유발하게 되며, 면역체계의 부작용, 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경계의 손상 등의 원인이 된다[6]. 또한, 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관 이완 등 여러 가지 생물학적인 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 농도에 따라 세포 기능유지에 중요한 작용을 하기도 한다[26]. LPS 자극에 의해 발현된 iNOS는 많은 양의 NO를 생성하게 되며 이에 대한 세포독성은 염증반응, 세포의 돌연변이 및 종양 발생 등에도 관여하는 것으로 알려져 있다[24]. 홍국의 NO 생성 저해 활성을 확인하기 위해 Raw 264.7 대식세포에 홍국 추출물 100, 200, 400, 800 µg/ml로 처리 후 LPS로 염증을 유발한 결과 모든 농도에서 NO 생성 억제효과가 나타났다(Fig. 4). NO 생성량은 홍국 에탄올 추출물의 농도에 따라 감소되었고, 400 µg/ml 농도에서는 13.28 µM의 NO 생성량이 확인되어, LPS 처리에 의한 NO 생성을 LPS를 처리하지 않은 음성대조군에서 생성되는 NO (9.38 µM) 수준까지 감소시키는 저해효과를 나타내었다(p<0.05). 이로써 홍국 에탄올 추출

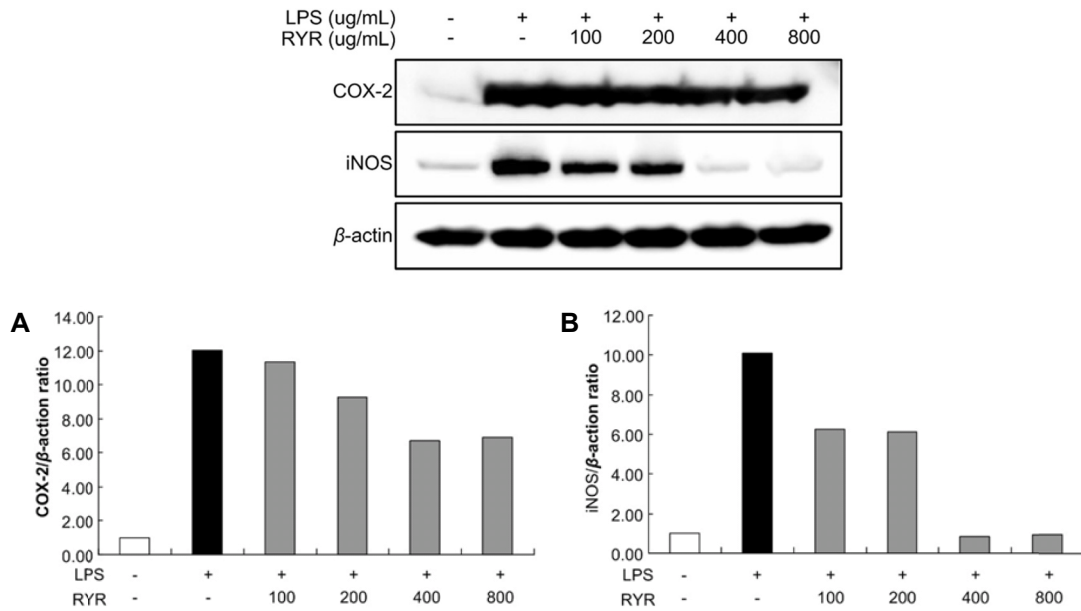


Fig. 3. Effect of Red yeast rice ethanol extract on LPS-induced COX-2 and iNOS expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. The levels of COX-2 and iNOS were determined by western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of RYR extract (100, 200, 400 and 800 μg/ml) and LPS (1 μg/ml) and the proteins were detected using specific antibodies. For quantification, the expression data were normalized to the β-actin signal.

물의 모든 농도에서 염증이 유도된 양성대조군에 비해 NO 생성량이 우수하게 억제되는 것을 확인하였다. 홍국의 물질 분리 후 NO 생성 저해활성을 확인한 결과 6개의 분리물질 중 4개의 물질에서 NO 생성을 억제하는 결과를 보였다[14]. 또한, 대추 에탄올 추출물과 *S. cerevisiae*와 *B. breve*의 발효 대추 에탄올 추출물은 500 μg/ml의 농도에서 각각 90.0, 68.0, 66.0%의 NO 생성 저해율이 확인되었으며, 생물전환이 천연물의 생리활성 변화에 영향을 준다고 보고되었다[16].

염증 유발 매개체인 iNOS 및 COX-2의 저해 활성을 확인한 결과 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 iNOS, COX-2 단백질 발현을 농도 의존적으로 억제함을 확인하였고, 특히 400, 800 μg/ml에서 iNOS의 발현을 상당부분 억제하는 것을 확인하였다. 본 연구 결과를 통해 *Monascus* sp. BHN-MK를

사용하여 제조한 홍국 에탄올 추출물은 LPS로 유도된 Raw 264.7 대식세포에서의 항염증효능을 확인하였다. 이 결과를 통해 항염증 효능을 증진시키는 홍국을 함유한 기능성 식품 및 화장품 등의 생물소재로 활용가능한 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(117104-2).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Adelizzi, R. A. 1999. COX-1 and COX-2 in health and disease. *J. Am. Osteopath. Assoc.* **99**, 7-12.
- Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Ukiya, M., Kiyota, A., Sakamoto, N., Suzuki, T., Tanabe, N. and Nishino, H. 2005. Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 562-565.

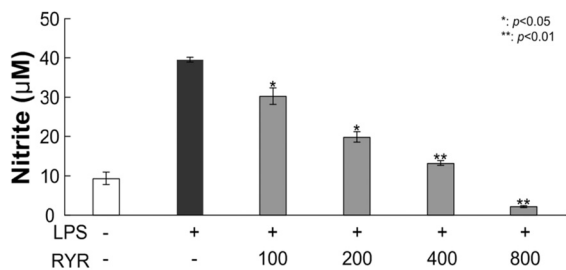


Fig. 4. Effects of RYR extracts on nitric oxide production in Raw 264.7 cells treated with LPS. NO concentration was determined by Griess reaction. *, $p < 0.05$ compared to control, and **, $p < 0.01$ compared to LPS. LPS: 1 μg/ml lipopolysaccharide, RYR extract concentration; ppm

3. An, B. J., Bae, M. J., Choi, H. J., Zhang, Y. B., Sung, T. S. and Choi, C. 2002. Natural products, organic chemistry; Isolation of polyphenol compounds from the leaves of Korean persimmon (*Diospyrus kaki* L. *Folium*). *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **45**, 212-217.
4. Barnes, P. J. and Liew, F. Y. 1995. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol. Today* **16**, 128-130.
5. Bhattacharyya, S., Ratajczak, C. K., Vogt, S. K., Kelle, C., Colonna, M., Schreiber, R. D. and Muglia, L. J. 2010. TAK1 targeting B by glucocorticoids determines JNK and I κ B regulation in Toll-like receptor-stimulated macrophages. *Blood* **115**, 1921-1931.
6. Cho, Y. J. and Ahn, B. J. 2008. Anti-inflammatory effect of extracts from *Cheongmoksang* (*Morus alba* L.) in lipopolysaccharide stimulated Raw cells. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **51**, 44-48.
7. Choi, S. Y. and Lee, H. R. 1976. Host preference by the small brown planthopper and green rice leafhopper on barley and water foxtail. *Kor. J. Pl. Prot.* **15**, 179-181.
8. Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J. and Gusovsky, F. 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**, 10689-10692.
9. Emrich, L. J., Dennison, D. and Dennison, K. F. 1989. Distribution shape of nutrition data. *J. Am. Diet. Assoc.* **89**, 665-670.
10. Filippis, F. D., Laiola, M., Blaiotta, G. and Ercolini, D. 2017. Different amplicon targets for sequencing-based studies of fungal diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, e00905-e00917.
11. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. and Cross, C. E. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* **119**, 598-620.
12. Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H. and Osawa, T. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms acts synergistically as the major cytolitic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* **144**, 1434-1441.
13. Hsu, Y., Hsu, W., Lee, B., Liao, T. and Pan, T. 2012. *Monascus* fermented metabolite monascin suppresses inflammation via PPAR- γ regulation and JNK inactivation in THP-1 monocytes. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 1178-1186.
14. Hsu, Y. W., Hsu, L. C., Chang, C. L., Liang, Y. H., Kuo, Y. H. and Pan, T. M. 2010. New anti-inflammatory and anti-proliferative constituents from fermented Red mold rice *Monascus purpureus* NTU 568. *Moelcules* **15**, 7815-7824.
15. Jeun, J., Jung, H., Kim, J. H., Kim, Y. O., Youn, S. H. and Shin, C. S. 2008. Effect of the monascus pigment threonine derivative on regulation of the cholesterol level in mice. *Food Chem.* **107**, 1078-1085.
16. Jung, J. E. and Cho, E. J. 2011. Enhancement of anti-inflammatory effect of *Zizyphus jujuba* var. *intermis* fruits by fermentation. *Cancer Prev. Res.* **14**, 57-62.
17. Jůzlová, P., Martínková, L. and Křen, V. 1996. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: A review. *J. Ind. Microbiol.* **16**, 163-170.
18. Kim, B. H., Jang, J. O., Lee, J. H., Park, Y., Kim, J. G., Yoon, Y. C., Jeong, S. J., Kwon, G. S. and Lee, J. B. 2019. Increased anti-oxidative activity and whitening effects of a *Saposhnikovia* extract following bioconversion fermentation using *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33. *J. Life Sci.* **29**, 1208-1217.
19. Kim, S. H., Kang, M. Y. and Nam, S. H. 2005. Modulatory Effects of 21 kinds of medicinal herbs including herba Pogostemi (*Agastache rugosa*) on nitric oxide production in Macrophage cell line RAW 264.7 cells. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 411-417.
20. Kwon, C. S. 2012. Antioxidant properties of red yeast rice (*Monascus purpureus*) extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 437-442.
21. Laskin, D. L. and Pendino, K. J. 1995. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 655-677.
22. Lee, M. Y., Yoo, M. S., Whang, Y. J., Jin, Y. J., Hong, M. H. and Pyo, Y. H. 2012. Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 540-544.
23. Lozy, M. E. 1983. Dietary variability and its impact on nutritional epidemiology. *J. Clin. Epidemiol.* **36**, 237-249.
24. McCartney Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. L., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **178**, 749-754.
25. Martinkova, L., Patakova-Juzlova, P., Krent, V., Kucerova, Z., Havlicek, V., Olsovsky, P., Hovorka, O., Rihova, B., Vesely, D., Vesela, D., Ulrichova, J. and Prikrylova, V. 1999. Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. *Food Addit. Contam.* **16**, 15-24.
26. Nathan, C. and Xie, Q. W. 1994. Nitric oxide synthase; roles, tolls, and controls. *Cell* **78**, 915-977.
27. Park, Y. E., Kim, B. H., Yoon, Y. C., Kim, J. K., Lee, J. H., Kwon, G. S., Hwang, H. S. and Lee, J. B. 2018. Total polyphenol contents, flavonoid contents, and antioxidant activity of roasted-flaxseed extracts based on lactic-acid bacteria fermentation. *J. Life Sci.* **28**, 547-554.
28. Park, Y. E., Kwon, G. S., Kim, B. H. and Lee, J. B. 2019. Usefulness evaluation for anti-oxidative and whitening effects of the fermented Thistle (*Cirsium japonicum*) with *Lactobacillus rhamnosus* BHN-LAB 105. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **1**, 1-13.
29. Patakova, P. 2013. *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 169-181.
30. Saito, M., Sakagami, H. and Fujisawa, S. 2002. Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). *Anticancer Res.* **23**, 4693-4701.
31. Samak, G., Shenoy, R. P., Manjunatha, S. M. and Vinayak, K. S. 2009. Superoxide and hydroxyl radical scavenging actions of botanical extracts of *Wagatea spicata*. *Food Chem.* **115**, 631-634.
32. Shahidi, F. and Wanasundara, P. D. 1992. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **32**, 67-103.
33. Smith, W. L., Michael, G. R. and DeWitt, D. L. 1996. Prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase)-1 and -2.

- J. Biol. Chem.* **271**, 33157-33160.
34. Stachowska, E., Dolegowska, B., Dziedziejko, V., Rybicka, M., Kaczmarczyk, M., Bober, J., Rac, M., Machalinski, B. and 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.
 35. Surh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Keum, Y. S., Park, K. K. and Lee, S. S. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of antiinflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-κB activation. *Mutat. Res.* **480**, 243-268.
 36. Swain, T. and Hillis, W. E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I-The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **10**, 63-68.
 37. Vrijheid, M., Casas, M., Gascon, M., Valvi, D. and Nieuwenhuijsen, M. 2016. Environmental pollutants and child health-A review of recent concerns. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **219**, 331-342.
 38. Yang, F., Tang, E., Guan, K. and Wang, C. Y. 2003. IKKβ plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **170**, 5630-5635.
 39. Yoon, Y. C., Kim, B. H., Kim, J. K., Lee, J. H., Park, Y. E., Kwon, G. S., Hwang, H. S. and Lee, J. B. 2018. Verification of biological activities and tyrosinase inhibition of ethanol extracts from Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) fermented with lactic acid bacteria. *J. Life Sci.* **28**, 688-696.
 40. Yu, Y., Fan, J. J., Hui, Y., Rouzer, C. A., Marnett, L. J., Klein-Szanto, A. J., FitzGerald, G. A. and Funk, C. D. 2007. Targeted cyclooxygenase gene (*Ptgs*) exchange reveals discriminant isoform functionality. *J. Biol. Chem.* **282**, 1498-1506.

초록 : *Monascus* sp. BHN-MK로 발효생산한 홍국 에탄올 추출물의 Raw 264.7 대식세포에 있어 친-염증성 iNOS와 COX-2 단백질 발현 억제 효과

김기현^{1*} · 이준형^{1,2*} · 권기석¹ · 서울원³ · 이중복^{2*}

(¹안동대학교 원예·생약융합학부, ²교촌F&B(주) 교촌중앙연구소, ³안동대학교 생명공학부)

홍국은 한국에서 오랫동안 음식과 전통의학 소재로 사용되어 왔다. *Monascus* sp.의 생장과 2차 대사과정을 통해 *Monascus* 색소, monacolins, γ-aminobutyric acid 등을 생산할 수 있다. *Monascus* 종의 대사산물인 monacolin K, γ-aminobutyric acid과 dimerumic acid는 특정 항산화 효과로 인해 콜레스테롤과 혈압을 낮춘다고 알려져 있다. 이 연구는 *Monascus* sp.로 발효된 홍국쌀 에탄올 추출물의 항염증 활성을 조사하였다. 홍국 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였고, 항염증 효과는 LPS가 유도된 Raw 264.7 cell에서 NO 생성, iNOS 및 사이클로옥시게나아제-2(cyclooxygenase-2 (COX-2)) 단백질 활성을 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 발효되지 않은 일반쌀보다 높은 함량을 나타내었다. NO 생성 저해활성 평가는 400 μg/ml 농도에서 LPS를 처리하지 않은 음성대조군의 NO 생성량과 유사한 결과를 나타내었다. iNOS 및 COX-2 단백질 발현 저해활성은 400 및 800 μg/ml에서 iNOS의 발현을 상당부분 억제하였다. 홍국 에탄올 추출물은 높은 항염증 효과를 확인하였으며, 기능성화장품 및 항염증소재로서 활용 가능할 것으로 사료된다.