



## Anti-inflammatory effect of *Crypsinus hastatus* biorenovation extract

Kyung-Mi Lee · Byeong Min Choi · Tae-Jin Park · Hye Hyun Hong ·  
Seung-Young Kim

### 고란초 생물 전환 추출물의 항염증 효과

이경미 · 최병민 · 박태진 · 홍혜현 · 김승영

Received: 30 December 2021 / Accepted: 18 February 2022 / Published Online: 31 March 2022  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2022

**Abstract** Biorenovation is a method for converting materials using the enzyme properties of microorganisms. Natural products converted by that method increase physiological activity or reduce cytotoxicity. In this study, we investigated the anti-inflammatory activity of *crypsinus hastatus* prothallium (CH) and biorenovated CH prothallium (CHB) using RAW 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS). CHB inhibited the production of nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub> and cytokines (interleukin-6, interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ) compared to CH at a concentration of 50-200  $\mu$ g/mL. In addition, CHB concentration of 200  $\mu$ g/mL inhibited the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 protein by LPS stimulation to the level of the untreated control group. These results indicate that CHB could be a novel anti-inflammatory agent for cosmetic and pharmaceutical ingredients. It also suggests that the application of biorenovation has potential usefulness in developing anti-inflammatory materials. It also suggests that the application of bio-renovation has potential usefulness in the development of inflammatory material. We applied Biorenovation technology to *Distylium racemosum* extract (DR) to generate *Distylium racemosum* biorenovation product (DRB), and investigated the anti-inflammatory properties of DRB

in lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW264.7 macrophages. We are applying technology to Biorenovation *Distylium racemosum* extract (DR) *Distylium racemosum* was to create a biorenovation product (DRB), lipopolysaccharide (LPS) investigated the anti-inflammatory properties of DRB in RAW264.7 macrophages treated for.

**Keywords** Anti-inflammatory · Biorenovation · *Crypsinus hastatus* (Thunb.) Copel · Inducible nitric oxide synthase · RAW 264.7 cell

### 서론

염증은 병원균에 의한 감염 및 외상 등의 유해한 자극에 대하여 조직의 손상을 회복시키려는 체내 방어기전이다[1-3]. 그러나 만성적이고 과도한 면역반응은 오히려 염증반응을 심화시켜 세포나 조직의 기능장애와 유전적 변이를 유도하며 아토피, 심혈관 질환 및 암 등의 질병을 일으키는 것으로 보고되었다[4-6]. 이러한 염증반응은 대식세포의 활성화 인자이자 내독소로 알려진 lipopolysaccharide (LPS)가 toll-like receptor 4에 결합하여 mitogen-activated protein kinase 및 nuclear factor-kappa B 등의 신호전달 경로가 활성화되어 발생하며[7,8], 활성화된 대식세포는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2의 발현을 유도하고 연쇄적으로 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)의 생성을 자극한다[9,10]. 또한, LPS 자극에 의해 과생성된 NO 및 PGE<sub>2</sub>는 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 등의 전 염증성 cytokine 및 혈관 생성을 유도하여 종양 생성을 유발한다고 보고되었다[11-14]. 따라서 이러한 초기 염증성 분자들의 발현을 조절할 수 있는 항 염증제 개발을 위한 연구가 지속되고 있는

Seung-Young Kim (✉)  
E-mail: sykim01@sunmoon.ac.kr

Department of Pharmaceutical Engineering & Biotechnology, Sunmoon University, Asan 31460, 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.

며 그 중에서도, 예로부터 약용 및 식용으로 사용되었기에 소비자의 심리적 불안감이 적고 합성 물질에 비해 비교적 안전하다는 이점이 보고된 식물 자원을 적용한 소재 개발이 활발히 진행되고 있다[15-19].

고란초(*Crypsinus hastatus* (Thunb.) Copel.) 전엽체는 고란초과에 속하는 양치식물로, 진해, 이노, 해독에 효과가 있어 예로부터 민간에서는 뿌리를 제외한 식물체 전체를 약재로 사용하였으며, coumarin, naringin,  $\beta$ -sitosterol 과 같은 유효성분을 함유하고 있는 것으로 보고되었다[20]. 또한, 기후변화나 오염에 민감한 환경 지표 식물로서 학술 및 자원 가치가 있는 식물군으로도 보고되었으나, 양치식물의 약리 활성 가치가 종자 식물에 비하여 떨어진다는 판단에 따라 연구가 상대적으로 미흡한 실정이다[21,22]. 따라서, 현재 이처럼 활용 가치가 낮은 식물 자원을 대상으로 자원의 가치를 증진시키고 재활용 하기 위한 친환경적 전환 기술의 필요성이 대두되고 있다. 그 중 biorenovation은 균주가 가지고 있는 효소적 기능을 이용하여 다양한 전구 물질을 생성하는 전환 기법으로, 이소플라본인 genistein으로부터 genistein 7-O-phosphonate, genistein 4'- $\beta$ -d-glucopyranoside, genistin 7-O- $\beta$ -(6"-O-succinyl)-d-glucoside, 4'-O-isopropyl genistin와 같은 다양한 유도체의 합성을 유도하는 것으로 확인되었다[23]. 화합물의 작용기는 여러 생리활성과 밀접한 연관이 있기 때문에 다양한 작용기를 가진 유도체의 합성은 기존 화합물의 활성을 개선하거나, 새로운 생리활성 발굴하는데 있어 매우 중요한 의미를 갖는다. 따라서, biorenovation을 통한 천연물 내 분자의 변형은 기존 화합물의 활성 변화를 유도하여 자원의 가치를 증진시키기 위한 방법으로 적용될 수 있으며, 우리의 이전 연구에서 biorenovation은 다양한 천연물에 적용되어 개선된 항염증, 미백 및 항 주름 활성을 입증한 바 있다[24-26].

이에, 본 연구에서는 biorenovation 기법을 고란초 전엽체 추출물에 적용하여 자원의 가치를 증진 시키고자 하였으며, LPS로 유도된 RAW 264.7 항염증 모델에서 NO, PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine을 포함한 염증인자의 발현을 조사함으로써 항염증 원료로서의 활용 가능성을 모색하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 고란초 추출물 제조

본 연구에 사용된 고란초 (*Crypsinus hastatus* (Thunb.) Copel) 전엽체는 (재)충북테크노파크로부터 제공받았다. 건조된 고란초 전엽체 파우더 10 g에 70% Ethanol 1 L를 첨가하여 상온에서 24시간 동안 2회 반복 추출하였으며, 추출액은 paper filter (Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, Japan)를 사용하여 여과하였다. 이후, 여과된 추출물은 감압 농축한 뒤, -110 °C에서 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

### 미생물 배양 및 biorenovation 반응

Biorenovation 생물 전환 기법에 사용한 균주인 *Bacillus* sp. JD3-7 (KACC 92346P)은 미생물센터로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 균주의 증식을 위해 nutrient broth (Peptone 5.0 g/L, Beef extract 3.0 g/L)를 이용하여 30 °C, 200 rpm 조건하에

18시간 배양하였으며, 배양 종료 후, 배양액을 4,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 pellet을 회수하였으며, 회수한 pellet은 PG buffer (50 mM Phosphate buffer, 2% Glycerin)를 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후, pellet을 PG buffer 100 mL에 재현탁하여 대조군(JD3-7)으로 사용하였으며, 동일 현탁액에 주정 추출한 고란초 시료(CH)를 첨가 한 뒤, 30 °C, 200 rpm 조건하에 72시간 동안 반응하여 생물 전환 된 CH 추출물(CHB)를 제조하였다. 반응 종료 후, 반응액은 4000 rpm에서 원심 분리하여 pellet을 제거하였으며, 회수한 상등액은 -110 °C에서 동결 건조하여 시료화 하였다.

### Biorenovation 전환물의 HPLC 분석

CH와 CHB 및 JD3-7의 peak 분석을 위해 Shimadzu Spectro-Monitor 3200 digital UV/Vis detector와 Shim-pack GIS C18 column (5  $\mu$ m ODS, 250 $\times$ 4.6 mm id) 사용하였으며, 이동상 용매로 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA, SAMCHUN, Pyeongtaek, Korea)를 첨가한 water (Solvent A)와 acetonitrile (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Solvent B)을 사용하였다. 추출물의 분석은 gradient 조건하에 30분간 수행되었으며, 용매의 구배는 solvent B를 10%에서 100%가 되도록 설정 하였다. 또한 유속 1.0 mL/min, column의 온도를 40 °C로 하여 254 nm 파장에서 분석을 진행하였다.

### 실험 재료 및 세포배양

본 연구에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행에서 분양 받았다. 세포 배양을 위해서 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Gyeongsan, Korea), 100  $\mu$ g/mL streptomycin 과 100  $\mu$ g/mL penicillin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Welgene)를 사용하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2일을 주기로 계대 배양 하였으며, 세포 자극에 사용한 LPS는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

### 세포 생존율 측정

CH와 CHB 및 대조군인 JD3-7의 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 조사하기 위하여 24-well plate에 세포를  $8.0 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양 한 뒤, LPS (1  $\mu$ g/mL)와 각 시료를 농도별로 처리하여 24시간 반응하였다. 그 후 각 well에 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT, Sigma-Aldrich) 시약을 첨가하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 3시간 동안 incubation 하여 formazan blue를 형성 하였다. 이후 상등액을 제거한 각 well에 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich)를 첨가하여 formazan blue를 용해시킨 후, 96-well plate로 옮겨 담아 microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 을 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### NO 생성 억제 활성 측정

CH와 CHB 및 대조군인 JD3-7의 NO 저해 활성을 조사하기 위해서 RAW 264.7 세포를 24-well plate에  $8.0 \times 10^4$  cells/well로 분주한 뒤, CO<sub>2</sub> incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 LPS (1  $\mu$ g/mL)와 각 시료(50, 100, 200  $\mu$ g/mL)를 동시 처리하였으며, 24시간 반응 후 96-well plate에

배양액 100  $\mu$ L와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 을 동량 혼합하여 10분 동안 암 반응 시킨 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성 억제 활성 측정**

RAW 264.7 세포에서 CH와 CHB의 Prostaglandin E<sub>2</sub> 생성 억제 활성을 측정하기 위해서 24-well plate에 8.0×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 24시간 동안 배양 한 뒤, LPS (1  $\mu$ g/mL)와 시료를 농도별로 동시 처리하여 24시간 반응하였다. 이후 배양 배지를 회수하여 10,000 rpm에서 3분 동안 원심 분리 침전물을 제거하였으며, 상등액에 존재하는 PGE<sub>2</sub>의 생성량은 Mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 PGE<sub>2</sub> 를 측정하였다.

**전 염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) 생성 억제 활성 측정**

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 8.0×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 24시간 동안 배양한 뒤, LPS (1  $\mu$ g/mL)와 시료를 농도별로 동시 처리하여 CO<sub>2</sub> incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 세포 배양액을 10,000 rpm에서 3분 동안 원심 분리하여 침전물을 제거한 상등액을 취한 뒤, Mouse TNF- $\alpha$  ELISA Kit (Invitrogen, California, USA), Mouse IL-6 ELISA Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), Mouse IL-1 $\beta$  ELISA Kit (R&D Systems Inc.)를 이용하여 전 염증성 cytokine (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ )의 생성량을 측정하였다.

**Western blot analysis**

RAW 264.7 세포를 6-well plate에 4×10<sup>5</sup> cells/well로 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양한 후 LPS (1  $\mu$ g/mL)와 시료를 동시 처리하여 24시간 반응하였다. 배양액을 제거하고 phosphate buffered saline (Biosesang, Seongnam, Korea)로 2회 세척한 후, radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer, Biosesang)를 처리하여 단백질을 lysis하였다. 추출한 단백질을 12,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 상등액을 분리하고 분리된 상등액의 단백질을 BCA kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 단백질을 정량 하였다. 이후 정량 된 단백질 20  $\mu$ g을 10% polyacrylamide gel에 loading해 전기영동하고 polyvinylidene difluoride membrane (Milipore, Burlington, MA, USA)에 전이 시킨 뒤, 1X TBST (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20)로 녹인 5% skim milk에 membrane을 넣어 상온에서 2시간 동안 blocking 하였다. 이후 TBST를 사용해 10분 간격으로 3회 세척하였다. 1차 항체 반응은 (iNOS antibody (1:1,000, Bio-Rad), COX-2 antibody (1:1,000, Rockland Immunochemicals, Inc., Pottstown, PA, USA),  $\beta$ -actin antibody clone AC-74 (1:10,000, Sigma-Aldrich)를 이용하여 4 °C에서 18시간 동안 반응시켰으며, 이후 TBST를 사용하여 10분 간격으로 3회 세척하고, 1:10,000으로 희석한 2차 항체(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)와 상온에서 90분 동안 반응시킨 후 TBST를 사용하여 10분 간격으로 3회 세척하였다. 이후 membrane을 ECL kit (Bio-

Rad)를 사용하여 imaging densitometer (model GS-700, Bio-Rad)을 통해 현상하였으며. Image J program (NIH, Bethesda, MD, USA)을 이용하여  $\beta$ -actin 대비 iNOS와 COX-2 단백질 발현량의 면적을 수치화하여 그래프로 나타내었다.

**통계처리**

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였으며, 결과 값은 평균값  $\pm$  표준편차로 나타내었다. 각 처리군 간의 유의성을 검정하기 위하여 One-way analysis of variance (ANOVA)를 시행한 후,  $p < 0.05$  수준에서 student's t-test로 통계처리의 유의성을 검정하였다.

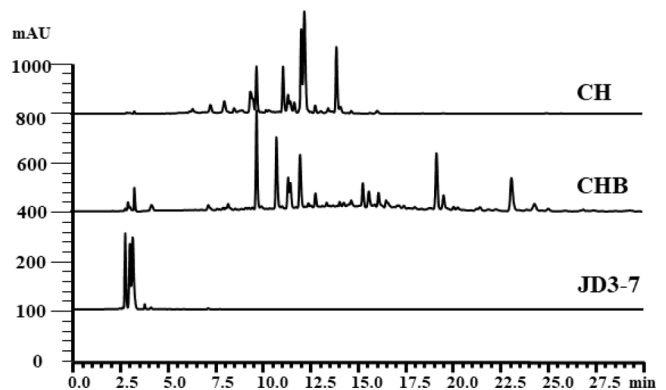
**결 과**

**Biorenovation 전환물의 HPLC 분석**

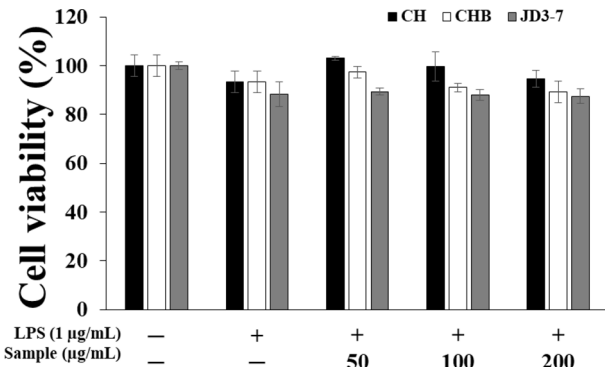
고란초 전염체 추출물 (CH), 생물 전환 된 고란초 전염체 추출물 (CHB)과 생물 전환에 이용한 미생물 Bacillus sp. JD3-7 (JD3-7)를 대조군으로 하여 HPLC 분석을 진행한 결과, CH와 JD3-7에서 존재하지 않던 신규 peak가 CHB에서 관찰되었다 (Fig. 1). 이는 biorenovation 생물 전환 과정에서 고란초에 존재 하던 다양한 성분들이 미생물의 효소 작용으로 인해 전환되어 나타난 peak일 가능성을 시사하며, koirala 등의 [27]의 연구에 의하면 biorenovation은 naringenin로부터 naringenin 7-O-phosphate, naringenin 7-O-glucoside 및 6"-O-succinylpruin와 같은 구조적 변형을 유도하는 것으로 보고되었다. 따라서, 고란초 전염체 내 존재하는 다양한 성분 또한 이와 같은 구조적 변화가 유도되었을 것으로 판단된다.

**세포 생존율 비교 측정**

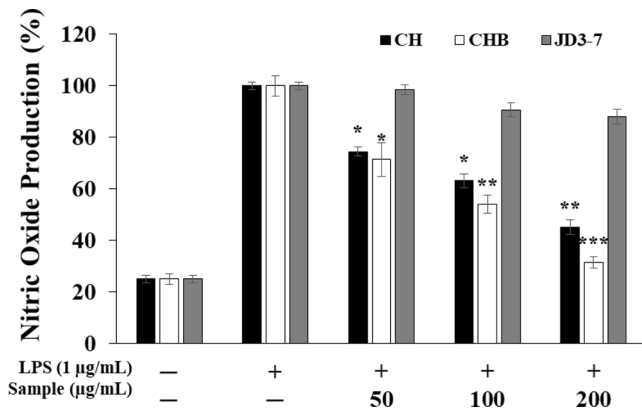
본 실험에서는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 대한 CH, CHB 그리고 대조군인 JD3-7의 세포 생존율을 조사하고자 MTT assay를 이용하였다. CH, CHB 및 JD3-7 추출물을 50, 100, 200  $\mu$ g/mL 농도로 처리한 결과, 모든 처리군에서 90% 이상의 세포 생존율을 확인하였다(Fig. 2). 따라서 추후 진행 될 항 염증 활성 실험은 세포 독성이 나타나지 않는 200  $\mu$ g/mL을 최대 농도로 설정하여 진행하였다.



**Fig. 1** HPLC analysis of *Crypsinus hastatus* extract (CH), biorenovated *Crypsinus hastatus* extract (CHB) and *Bacillus sp. JD3-7* (JD3-7). The chromatogram showed CH, CHB, and JD3-7



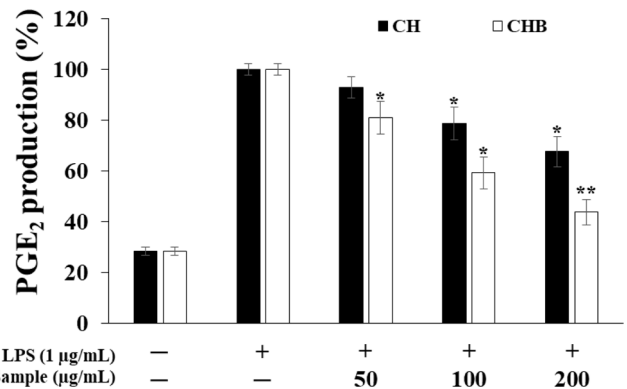
**Fig. 2** Cell viability of CH, CHB, and JD3-7 in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of CH, CHB and JD3-7 (50, 100, 200 µg/mL). Result is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control



**Fig. 3** Nitric oxide production inhibitory effect of CH, CHB, and JD3-7 in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide on the RAW 264.7 cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of CH, CHB and JD3-7 (50, 100, 200 µg/mL). Data represent the means ± SD with three separate experiments. The mean of each sample group was compared to the mean of an LPS-treated group, \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001

**NO 생성 억제 활성 비교**

인체에서 염증이 유도되면 다양한 염증성 매개 물질이 발현되는 것으로 보고되었으며, iNOS로부터 합성되는 NO는 대표적인 염증인자로서 다양한 염증성 질환의 원인으로 알려져 있다 [28]. 이에 본 연구에서는 RAW 264.7 세포의 염증 반응에서 CH, CHB 및 JD3-7가 NO 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 LPS (1 µg/mL)와 시료 (50, 100, 200 µg/mL)를 동시 처리하였다. 그 결과, CHB를 처리 한 RAW 264.7 세포에서 LPS로 인해 증가한 NO가 농도 의존적으로 감소하였으며, 가장 고 농도인 200 µg/mL에서 CHB는 NO 생성을 68.5% 억제 하여, LPS 무 처리군과 유사한 수준으로 NO의 생성이 억제됨을 확인하였다. 또한 대조군인 JD3-7이 유효한 NO 억제 활성을 나타내지 않았으므로, CHB의 NO억제 활성은 반응 미생물과는 무관한 고유의 효능인 것으로 사료된다(Fig. 3). 이러한 결과는 biorenovation을 통한 분자의 구조 변형이 기존 추출물의 활성



**Fig. 4** PGE<sub>2</sub> production inhibitory effects of CH and CHB extract in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The production of PGE<sub>2</sub> in the RAW 264.7 cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of CH and CHB (50, 100, 200 µg/mL). Data represent the means ± SD with three separate experiments. The mean of each sample group was compared to the mean of an LPS-treated group, \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01

을 개선하는데 기여할 수 있음을 시사하며, 다양한 염증 인자의 발현에 대한 CHB의 억제 활성을 확인하여 항 염증 효능을 규명하고자 추가적인 실험을 진행하였다.

**PGE<sub>2</sub> 생성 억제 활성**

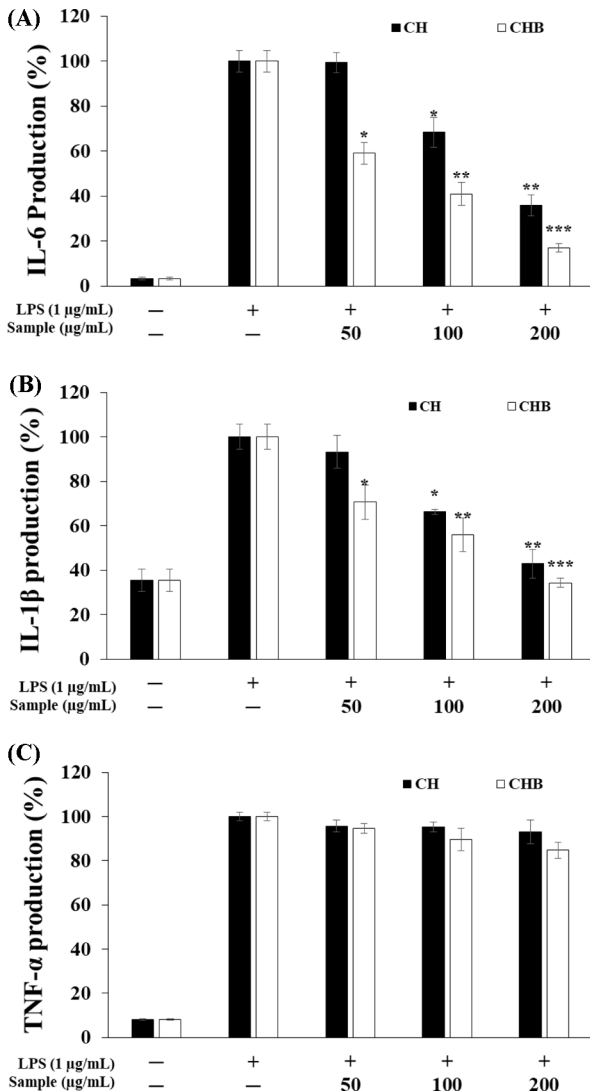
LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 CH 및 CHB의 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 효능을 평가하기 위하여 LPS (1 µg/mL)와 각 시료를 50, 100, 200 µg/mL 농도로 처리하여 PGE<sub>2</sub>의 생성을 조사하였다. 그 결과, CHB는 PGE<sub>2</sub> 생성을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 가장 고 농도인 200 µg/mL에서 PGE<sub>2</sub>의 생성을 56.2% 억제하여 CH보다 높은 PGE<sub>2</sub> 억제 활성을 나타냈다(Fig. 4). 이러한 결과는 biorenovation의 적용이 PGE<sub>2</sub> 억제 활성을 향상시켰으므로 항염증 활성을 개선하는데 기여할 수 있음을 시사한다

**전 염증성 cytokines (TNF-α, IL-6, IL-1β) 생성 억제**

Interleukin 및 TNF-α와 같은 전 염증성 cytokines은 면역계에서 염증을 촉진하고 염증 반응의 상향 조절에 관여함으로써 세포 노화 및 질병을 유발하는 것으로 보고되었다[29]. 이에 본 실험에서는 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 전 염증성 cytokine인 TNF-α, IL-1β, IL-6의 발현을 확인하여 CH와 CHB가 염증 관련 인자 생성에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 그 결과, CHB는 LPS로 인하여 증가한 IL-6와 IL-1β 생성을 유의하게 억제 하였으며, TNF-α의 억제에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 또한, 가장 고 농도인 200 µg/mL에서 CHB는 IL-6와 IL-1β를 각각 83, 65.7% 억제하여 CH와 비교하여 증가된 활성을 보였으며, 특히 IL-1β의 경우 가장 고 농도인 200 µg/mL에서 LPS 무 처리군과 유사한 수준의 억제 활성이 확인되었다.

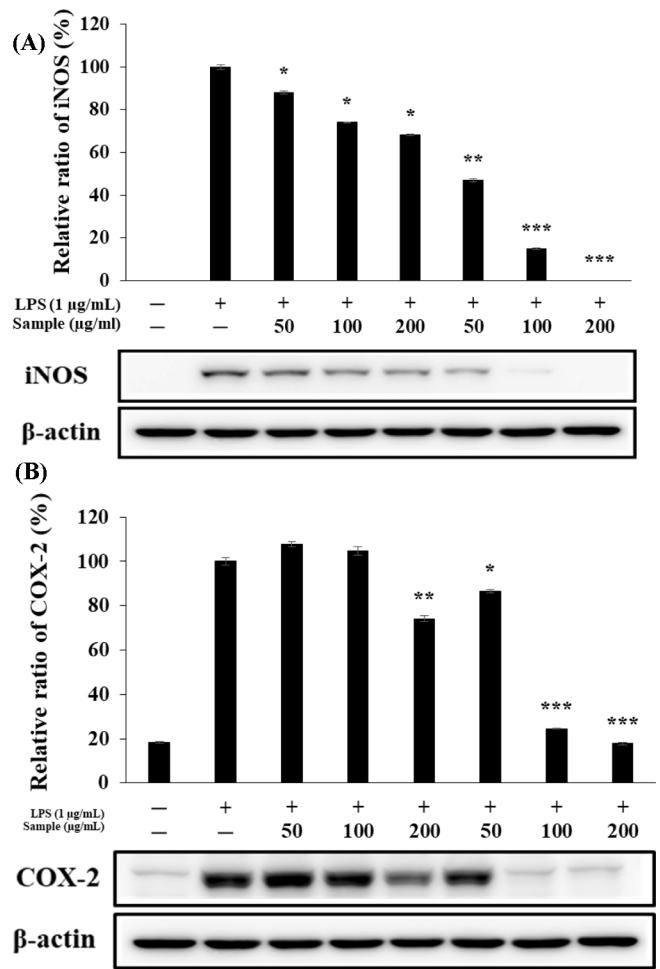
**iNOS 및 COX-2 발현 억제**

대식세포에서 LPS와 같은 염증 유발 자극은 염증 반응을 매개하는 전사 인자를 활성화함으로써 다양한 염증 매개 인자를 생산하는 것으로 알려져 있다. 그 중 iNOS와 COX-2는 NO,



**Fig. 5** Pro-inflammatory cytokines production inhibitory effects of CH and CHB extract in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The production of (A) IL-6, (B) IL-1β, and (C) TNF-α in the RAW 264.7 cells stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of CH and CHB (50, 100, 200 μg/mL). Data represent the means ± SD with three separate experiments. The mean of each sample group was compared to the mean of an LPS-treated group, \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001

PGE<sub>2</sub> 및 다양한 염증 매개 물질의 생성을 자극하여 염증 반응을 활성화하는 것으로 보고되었다[30-32]. 따라서 본 연구에서는 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 조사하여 CH와 CHB의 항염증 활성을 평가하고, iNOS 및 COX-2 와 NO, PGE<sub>2</sub>의 관계성을 확인하고자 western blot을 수행하였다. 그 결과, CH를 처리한 RAW264.7 세포에서 iNOS의 발현이 미약하게 감소하였으며, COX-2의 경우 가장 고농도인 200 μg/mL에서 25.9%의 감소 수준이 확인되었다. 반면, CHB는 RAW264.7 세포에서 LPS 자극에 의하여 증가된 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 모든 농도에서 유의하게 감소하였으며, 가장 고농도인 200 μg/mL에서 iNOS와 COX-2의 발현을 LPS 무 처리군과 유사한 수준



**Fig. 6** Inhibitory effects of CH and CHB on the protein level of iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Inhibitory effect of CH and CHB on the protein level of (A) iNOS, (B) COX-2 in RAW 264.7 cells stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of CH and CHB (50, 100, 200 μg/mL). Expression of iNOS, COX-2 and β-actin were determined by western blotting. Data represent the means ± SD with three separate experiments. The mean of each sample group was compared to the mean of an LPS-treated group, \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001

으로 억제 하였다(Fig. 6). 결론적으로, CHB는 CH와 비교하여 개선된 iNOS와 COX-2 발현 억제 활성을 나타내었으며, 이들의 감소 경향과 NO 및 PGE<sub>2</sub> 감소 경향이 유사한 것으로 볼 때, CHB의 항염증 활성은 iNOS와 COX-2 발현 억제 기작에 의하여 조절될 수 있음을 확인하였다. 따라서 CHB는 이들을 표적으로하는 항 염증 소재로써 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 고찰

본 연구에서는 고란초 전염체 추출물(CH)의 항염증 활성을 증진하여 천연자원의 가치를 향상시키고, 산업적 활용성을 높이고자 biorenovation 기법을 적용하였다. 따라서 CH와 생물 전환된 추출물(CHB)의 항염증 활성을 평가하기 위하여 LPS로 유

도된 RAW 264.7 세포에서 세포 생존율 및 항 염증 효능을 조사하였다. CH와 CHB의 항 염증 활성을 비교한 결과, CHB는 세포 독성을 보이지 않는 50, 100, 200 µg/mL 농도에서 기존 추출물과 비교하여 향상된 NO, PGE<sub>2</sub> 및 cytokine 억제 효능을 나타내었다. 또한, 이러한 염증 인자의 생성을 매개하는 단백질인 iNOS 및 COX-2 발현을 조사하고자 western blot을 수행하였다. 그 결과, CHB는 200 µg/mL 농도에서 무 처리군과 유사한 수준으로 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제 하였으며, NO, PGE<sub>2</sub> 와 마찬가지로 CH대비 개선된 억제 활성을 나타내었다. 체내에서 iNOS 및 COX-2의 활성화는 염증 매개 물질의 생합성을 촉진하여 염증의 심화 및 조직의 손상을 야기하므로 [28,29], CHB의 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현 억제 활성은 관련된 하위 인자인 NO, PGE<sub>2</sub> 및 전 염증성 사이토카인의 합성을 조절하여 효과적으로 항 염증 활성을 유도할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, CHB는 CH 보다 개선된 항 염증 활성을 나타내는데, 이는 biorenovation을 적용한 이전 연구에서 formononetin과 genistein으로부터 합성된 formononetin 7-O-phosphate, 4'-O-isopropyl genistin가 각각 기존의 화합물 대비 개선된 항 염증 및 항균 활성이 입증된 바와 같이, CH 내 존재하는 여러 성분에서도 유사한 구조적 변형을 통해 CHB가 더 높은 항 염증 활성을 갖게 되었을 것으로 판단된다[23,33].

결론적으로, 본 연구는 CHB가 염증의 예방과 치료를 위한 건강 기능성 식품 및 화장품 소재로의 활용 가능성을 제시하며, 추후 CHB가 항 염증 소재로 사용될 수 있는 가능성을 높이기 위하여 유효성분의 분리, 동정이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

## 초 록

Biorenovation은 미생물의 효소적 기능을 이용하여 천연 추출물과 같은 소재를 생물전환하는 기법으로 생리활성이 증진되거나 세포독성을 감소시키는 효능이 보고되었다. 이에 본 연구는 천연 소재의 생리활성을 증진하고 가치를 향상시키고자 biorenovation 기법을 적용하여 고란초 전염체 추출물(CH)을 생물전환하였고, LPS로 자극된 RAW 264.7 세포를 사용하여 항 염증 활성을 평가하였다. 세포 사멸을 보이지 않는 50-200 µg/mL 농도에서 CH와 생물 전환 추출물(CHB)의 Inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현량 및 전 염증성 사이토카인의 생성량을 조사한 결과, CHB는 CH보다 산화질소, prostaglandin E<sub>2</sub> 및 사이토카인(interleukin-6, interleukin-1β, tumor necrosis factor-α)의 생성을 억제하였으며, 특히 CHB는 200 µg/mL 농도에서 LPS 자극에 의한 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현을 무 처리군과 유사한 수준으로 억제하였다. 이러한 결과는 biorenovation 생물 전환을 통해서 기존 식물 추출물의 항 염증 활성이 증진될 가능성을 나타내며, CHB가 효과적인 항 염증 소재로서 화장품 및 건강기능식품에 적용될 가능성을 시사한다.

**Keywords** 고란초 · 바이오리노베이션 · 항염증 · Inducible nitric oxide synthase · RAW 264.7 cell

**감사의 글** 본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 지역특화산업육성+(R&D) 사업으로 수행된 연구결과입니다(S309174).

## References

- Oishi Y, Manabe I (2018) Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int Immunol* 30(11): 511–528. doi: 10.1093/intimm/dxy054
- Sherwood ER, Toliver-Kinsky T (2004) Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 18(3): 385–405. doi: 10.1016/j.bpa.2003.12.002
- Libby P (2007) Inflammation mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* 65(12 Pt 2): S140–S146. doi: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00352.x
- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L (2017) Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9(6): 7204–7218. doi: 10.18632/oncotarget.23208
- Kim KH, Jeong MH, Shin JH, Joo SB, Kim W, Lee SU, Kim KH, Kim NH, Cho JH, Park JC, Na KJ, Ahn YK, Cho JG, Ahn BH, Park JC, Kang JC (2000) The Role of Chronic Infection and Inflammation in Korean Patients with Coronary Artery Disease. *Korean Circulation J* 30(9): 1107–1116. doi:10.4070/kcj.2000.30.9.1107
- Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R (2012) Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481(7381): 278–286. doi: 10.1038/nature10759
- Choi HJ, Eun JS, Park YR, Kim DK, Li R, Moon WS, Park JM, Kim HS, Cho NP, Cho SD, Soh Y (2008) Ikarisoid A inhibits inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells via p38 kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *Eur J Pharmacol* 601(1–3): 171–178. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.09.032
- Wei S, Yang D, Yang J, Zhang X, Zhang J, Fu J, Zhou G, Liu H, Lian Z, Han H (2019) Overexpression of Toll-like receptor 4 enhances LPS-induced inflammatory response and inhibits Salmonella Typhimurium growth in ovine macrophages. *Eur J Cell Biol* 98(1): 36–50. doi: 10.1016/j.ejcb.2018.11.004
- Tao MQ, Ji CL, Wu YJ, Dong JY, Li Y, Olatunji OJ, Zuo J (2020) 1,7-Dihydroxy-3,4-Dimethoxyxanthone Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in RAW264.7 Macrophages by Suppressing TLR4/NF-κB Signaling Cascades. *Inflammation* 43(5): 1821–1831. doi: 10.1007/s10753-020-01256-3
- Bauerle PA, Henkel T (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141–179. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.001041
- Lee HA, Song BR, Kim HR, Kim JE, Yun WB, Park JJ, Lee ML, Choi JY, Lee HS, Hwang DY (2017) Butanol extracts of *Asparagus cochinchinensis* fermented with *Weissella cibaria* inhibit iNOS-mediated COX-2 induction pathway and inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Exp Ther Med* 14(5): 4986–4994. doi: 10.3892/etm.2017.5200
- Kim JB, Han AR, Park EY, Kim JY, Cho W, Lee J, Seo EK, Lee KT (2007) Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF-kappaB inactivation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biol Pharm Bull* 30(12): 2345–2351. doi: 10.1248/bpb.30.2345
- Cianchi F, Cortesini C, Fantappiè O, Messerini L, Sardi I, Lasagna N, Perna F, Fabbri V, Di Felice A, Perigli G, Mazzanti R, Masini E (2004) Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 10(8): 2694–2704. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-03-0192
- Lee SB, Lee WS, Shin JS, Jang DS, Lee KT (2017) Xanthotoxin suppresses LPS-induced expression of iNOS, COX-2, TNF-α, and IL-6 via AP-1, NF-κB, and JAK-STAT inactivation in RAW 264.7 macrophages. *Int Immunopharmacol* 49: 21–29. doi: 10.1016/j.intimp.2017.05.021
- Sung BK, Chung HY (2005) Significances of Molecular Inflammation and Energy Metabolism during Aging. *Korean Society of Cancer Prevention* 10(1): 16–17. doi: KMID/1140120050100010006
- Nam HS, Jung JW, Kim DW, Ha HC (2017) Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extracts of *Ligularia fischeri*.

- Korean J of Food Preserv 24(6): 834–841. doi: 10.11002/kjfp.2017.24.6.834
17. Yoon YI, Chung MY, Hwang JS, Goo TW, Ahn MY, Lee YB, Han MS, Yun EY (2014) Anti-inflammatory Effect of *Oxya chinensis sinuosa* Ethanol Extract in LPS-induced RAW 264.7 Cells. Journal of Life Science 24(4): 370–376. doi: 10.5352/JLS.2014.24.4.370
  18. Han SH, Woo, NRY, Lee SD, Kang MH (2006) Antioxidative and Antibacterial Activities of *Endemic* Plants Extracts in Korea. The Korean Society of Medicinal Crop Science 14(1): 49–55. doi: article/JAKO 200603042372593.page
  19. Kim EJ, Choi JY, Yu Mr, Kim MY, Lee Sh, Lee BH (2012) Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants. Korean J. Food Sci. Technol 44(3): 337–342. doi: 10.9721/KJFST.2012.44.3.337
  20. Chen YR (2007) Studies on the Chemical Constituents of *Crysinus hastatus* (Thunb.) Copel. Dissertation, University of China
  21. Song HS, Kim SM (2016) Distribution and Habitat Condition of *Crysinus hastatus* in Buyeogun. The Korean Society of Medicinal Crop Science 24(1): 27–30. doi: 10.7783/KJMCS.2016.24.1.27
  22. Song HS, Gim MH, Lee GL, Kim SM (2013) Distribution of Medicinal Plants included in the Korean Pharmacopoeia at Cheongoksan Bonghwagun in Korea. The Korean Society of Medicinal Crop Science 21(4): 268–275. doi: 10.7783/KJMCS.2013.21.4.268
  23. Choi HR, Park JS, Kim KM, Kim MS, Ko KW, Hyun CG, Ahn JW, Seo JH, Kim SY (2018) Enhancing the antimicrobial effect of genistein by biotransformation in microbial system. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 63: 255–261. doi:10.1016/j.jiec.2018.02.023
  24. Hong HH, Park TJ, Kang MS, Kim SY (2021) Anti-inflammatory Activity of *Beta vulgaris* Extract Using Biorenovation in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 36(2): 123–129. doi: 10.7841/ksbbj.2021.36.2.123
  25. Lee KM, Kim JH, Kang KH, Hwang JH, Kim SY (2021) Whitening Activities of *Brassica oleracea* sprout Biorenovated Extract in B16F10 Melanoma Cells. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 36(2): 139–144. doi: 10.7841/ksbbj.2021.36.2.139
  26. Kim MS, Park TJ, Lim JS, Kim SY (2019) Effect of *Agaricus* biorenovate Extract on Collagen Synthesis and Matrix Metalloproteinase-1 Production in Human Dermal Fibroblast. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 34(1): 49–53. doi: 10.7841/ksbbj.2019.34.1.49
  27. Koirala M, Lee YK, Kim MS, Chung YC, Park JS, Kim SY (2019) Biotransformation of Naringenin by *Bacillus amyloliquefaciens* Into Three Naringenin Derivatives. Natural Product Communications 14(5): 1934578X1985197. doi: 10.1177/1934578X19851971
  28. Charles J. Lowenstein, Elizaveta Padalko (2004) iNOS (NOS2) at a glance. J Cell Sci 117(14): 2865–2867. doi: 10.1242/jcs.01166
  29. Kany S, Vollrath JT, Relja B (2019) Cytokines in Inflammatory Disease. Int J Mol Sci 20(23): 6008. doi: 10.3390/ijms20236008
  30. Timoshenko AV, Lala PK, Chakraborty C (2004) PGE<sub>2</sub>-mediated upregulation of iNOS in murine breast cancer cells through the activation of EP4 receptors. Int J Cancer 108(3): 384–389. doi: 10.1002/ijc.11575
  31. Aktan F (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. Life Sci 75(6): 639–653. doi: 10.1016/j.lfs.2003.10.042
  32. E Molina-Holgado 1, S Ortiz, F Molina-Holgado, C Guaza (2000) Induction of COX-2 and PGE(2) biosynthesis by IL-1beta is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes. Br J Pharmacol 131(1): 152–159. doi: 10.1038/sj.bjp.0703557
  33. Kim MS, Park JS, Chung YC, Jang SC, Hyun CG, Kim SY (2019) Anti-Inflammatory Effects of Formononetin 7-O-phosphate, a Novel Biorenovation Product, on LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells. Molecules. 24(21): 3910. doi: 10.3390/ molecules24213910