



Anti-inflammatory effects of biorenovated *Torreya nucifera* extract in RAW264.7 cells induced by *Cutibacterium acnes*

Hyehyun Hong · Tae-Jin Park · Yu-Jung Lee · Byeong Min Choi · Seung-Young Kim

여드름균에 의해 유도된 RAW264.7 세포에서 생물 전환된 비자나무 추출물의 항염증 효과

홍혜현 · 박태진 · 이유정 · 최병민 · 김승영

Received: 31 March 2023 / Accepted: 12 May 2023 / Published Online: 23 May 2023
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract The most common skin disease, acne, often occurs in adolescence, but it is also detected/observed in adults due to air pollution and drug abuse. One of the causative agents of acne, *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) plays a role in the development of skin acne by inducing inflammatory mediators. *Torreya nucifera* (TN) is an evergreen tree of the family Taxaceae, having well reported antioxidant, anti-proliferative, liver protection, and nerve protection properties. Improvement of these bioactive properties of natural products is one of the purposes of natural product chemistry and pharmaceuticals. We believe biorenovation could be one improvement strategy that utilizes microbial metabolism to produce unique derivatives having enhanced bioactivity. Therefore, in this study, the *C. acnes*-induced RAW264.7 inflammation model was used to evaluate the anti-inflammatory activity of the biorenovated *Torreya nucifera* product (TNB). The results showed improved viability of TNB-treated cells compared to TN-treated cells in the concentration range of 50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. At non-toxic concentrations, TNB inhibited the production of nitric oxide and prostaglandin E2 by suppression of inducible nitric

oxide synthase and cyclooxygenase-2 protein expression. TNB also attenuated the expression of interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor- α induced by *C. acnes*. Furthermore, TNB inhibited the nuclear factor- κB signaling pathway, a transcription factor known to regulate inflammatory mediators. Based on these results, this study suggests the potential of using TNB as natural material for the treatment of acnes and thus, supporting our postulation of biorenovation as an bioactivity improvement strategy.

Keywords Anti-inflammation · Biorenovation · *Cutibacterium acnes* · *Torreya nucifera*

서론

여드름은 피지선 분비가 증가하고 모낭이 막히면서 농포, 구진, 낭종, 면포 등을 형성하는 모피지성 질환(pilosebaceous disease)으로 피부 조직의 손상을 유발하여 색소 침착 및 흉터의 생성을 동반하는 특징을 가진 매우 흔한 만성염증 질환이다[1,2]. 여드름 발생의 정확한 원인은 아직 밝혀져 있지 않으나 스트레스, 유전, 세균감염 등 여러 복합적요인이 작용하며 주로 호르몬이 불균형한 사춘기나 젊은 연령층에서 나타나는 것으로 알려져 있으나 최근 불규칙한 생활습관, 흡연, 환경오염, 약물남용으로 인해 다양한 연령층에서도 증가하는 것으로 보고되고 있다[3,4]. 또한, 여드름은 모낭 내에서 성장하는 지방 친화성 미생물인 *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*)에 의해 각질형성세포가 자극받아 피부의 과각화를 유발한다고 보고되었으며, 주 영양원인 피

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.

지를 분해하는 과정에서 생성된 free fatty acid는 모낭벽을 파괴하고 모공 주위의 세포에 염증을 유발하기 때문에 이들의 증식은 염증과 면역반응을 심화하여 염증성 여드름 병변을 일으키는 원인이 된다[5-7]. *C. acnes*에 의한 염증반응은 선천 면역반응에 중요한 역할을 하는 막관통 단백질인 toll-like receptor (TLR)-2와 TLR-4에 의해 매개되며 대식세포의 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 경로를 활성화하여 염증성 사이토카인의 발현을 유도한다[8, 9]. NF- κ B는 세포질에서 I κ B와 결합한 비활성형으로 존재하지만 자극에 의해 I κ B- α 가 인산화 되면서 떨어지면 인산화 된 I κ B- α 는 분해되고 NF- κ B는 핵으로 이동하여 최종적으로 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8를 포함한 여러 염증성 사이토카인의 분비를 유도한다[10, 11]. 또한, NF- κ B 활성화로 유도되는 inducible NO synthase (iNOS)의 발현은 대식세포에서 nitric oxide (NO)가 과잉 생산되는 중요한 메커니즘이며 특히, 염증성 여드름 피부 조직의 상피세포와 주변 세포에서 NF- κ B의 활성화와 핵 내로의 이동이 보고된 바 있다[12,13].

현재 여드름의 치료제로는 피지 생성을 억제하는 항안드로겐제를 비롯한 스테로이드 제제나 tetracycline, doxycycline, erythromycin 와 같은 항생제를 사용할 수 있으나 장기간 사용 시 부작용이나 내성 발현 등의 문제점을 가져올 수 있어 최근에는 이러한 문제를 보완할 수 있는 천연물 유래의 치료제에 대한 연구가 진행되고 있다[14,15]. 따라서 *C. acnes*에 의해 유도된 염증반응 억제는 구진, 농포, 결절과 같은 염증성 병변의 발생을 제어하고 여드름을 치료하기 위한 중요한 전략이 될 수 있다.

비자나무(*Torreya nucifera* (L.) Siebold & Zucc)는 주목(Taxaceae)과의 상목교목으로 우리나라의 남부지방(북위 36° 이남)이나 제주 또는 일본에 분포하며 예로부터 촌충과 십이지장충 그리고 요충을 구제하는 등 기생충 감염치료에 효과적인 것으로 알려져 있어 구충제로도 이용되어왔다[16]. 페놀계 화합물로 항염증 활성을 가진 catechol과 지방산인 methyl malmitate, methyl oleate 성분을 포함하고 있으며 약리적 활성으로는 항염증, 항산화, 항중식, 간보호 및 신경보호 효과에 대한 연구가 보고되어 있다[17-19]. 또한 증류정유추출법으로 추출된 비자나무 에센셜 오일은 *C. acnes*에 대한 항균 활성을 보이나 *C. acnes*에 의해 유발되는 염증 저해 활성에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다[20].

이에 본 논문은 비자나무를 대상으로 연구를 수행하였으며 최근 고부가가치를 목표로 한 소재가 등장함에 따라 소재의 기능성을 증진시키고자 biorenovation 기법을 적용하였다. Biorenovation은 미생물이 가지고 있는 효소적 기능을 이용하여 다양한 전구물질, 특히 비활성 화합물이나 기능성 소재로의 가치가 낮은 천연추출물에서 생리활성이 우수하고 다양한 유도체 산물의 제조가 가능한 방법으로 조록나무 및 토란에 적용한 선행 연구 결과에 따르면 소재의 독성 감소 및 기능성 상승을 기대할 수 있어 부가가치가 높은 고기능성 소재 개발에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 판단된다[21-23].

따라서 본 논문에서는 biorenovation을 적용한 비자나무의 항염증 기능성을 평가하고자 *C. acnes*에 의해 유도되는 염증반응에서 pro-inflammatory cytokine 및 관련 전사인자의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

비자나무 추출물 제조

본 연구에 사용된 비자나무(*Torreya nucifera*)는 제주도에 채집되었으며 (주)제주생물자원으로부터 제공받았다. 건조 분쇄된 비자나무 잎 파우더 1g에 10배의 70% EtOH를 가해 60 °C에서 12시간 동안 2회 반복 추출하였으며 회수한 추출액을 paper filter로 여과하였다. 이후 여과액을 감압농축기로 농축한 다음 동결건조기(HC3110, Hanil Scientific Inc., Gimpo, Korea)를 사용해 -110 °C에서 72시간 동안 건조하였다.

*C. acnes*의 배양 및 열처리

여드름 유발균인 *C. acnes* (CCARM 9009)는 Culture Collection of Antimicrobial Resistance Microbes로부터 분양 받았으며 Luria-bertani broth (LB, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 배지를 사용하여 37 °C, 혐기 조건으로 18시간 동안 배양하였다. 이후 배양된 균을 80 °C에서 30분간 열처리하여 사멸시킨 후 실험에 사용하였다.

미생물 배양 및 biorenovation 반응

비자나무 잎 추출물(TN)의 생물전환 기법에 사용된 *Bacillus siamensis* JD3-7균주(KACC 92346P)는 최 등의[24]에서 기술한 방법에 따라 genisteine을 기질로 하는 생물 전환 기반 스크리닝법을 통해 HPLC 분석결과 전환률이 가장 좋은 균주로 선발되었으며 LB broth (BD Biosciences) 에서 30 °C, 150 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 이후 원심분리(4500 g, 15 min, 4 °C)하여 미생물 pellet을 침전시킨 후 잔여 배양액을 제거하기 위하여 PG buffer (50 mM Phosphate buffer, 2% Glycerin)로 2회 세척하였다. 세척된 미생물을 PG buffer 100 mL에 첨가하여 현탁한 후 TN을 100 mg을 첨가하여 30 °C, 200 rpm 조건으로 72시간 동안 반응하였다. 72시간 후 TN을 biorenovation 한 추출물(TNB)과 TN을 첨가하지 않은 *Bacillus siamensis* JD3-7 현탁액(BJ)을 원심분리(4500 g, 15 min, 4 °C)하여 상등액을 회수한 뒤 -110 °C에서 동결건조하여 실험에 사용하였다.

Biorenovation 전환물의 HPLC 분석

시료(TN, TNB, BJ)의 HPLC 분석을 위해 Shim-pack GIS C18 Column, 5 μ m ODS, 250 \times 4.6 mm I.D. (227-30106-08, Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Baltimore, DC, USA) 와 Shimadzu Spectro Monitor 3200 digital UV/Vis detector (228-42593-43, Shimadzu Scientific Instruments, Inc.)을 사용하였다. 이동상으로는 0.1%의 trifluoroacetic acid (Samchun, Pyeongtaek, Korea)가 첨가된 H₂O (Solvent A)와 acetonitrile (Solvent B, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였으며 column의 온도는 40 °C, 유속은 1.0 mL/min, 파장은 254 nm로 설정하여 Solvent B가 10%에서 100%가 되는 gradient 조건으로 30분 동안 분석하였다.

세포배양

염증 모델로 사용된 mouse 유래 macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행으로부터 분양 받아 실험에 사용

하였다. 세포주의 배양에는 10% fetal bovine serum과 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, New York, NY, USA)에 첨가한 배지를 사용하였으며 CO₂ incubator (BB15 CO₂ incubator, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA)에서 2일을 주기로 계대 배양하였다.

세포 독성 측정

시료가 세포의 생존에 미치는 영향은 MTT assay를 이용하여 평가되었으며 MTT assay는 세포의 미토콘드리아에서 mitochondrial reductase에 의해 보라색의 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)을 형성하는 원리를 이용하는 측정법이다. 24-well plate에 RAW 264.7 세포를 7.0×10⁴ cells/well의 농도로 접종하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 전 배양한 후 *C. acnes* (50 µg/mL)와 TN, TNB 및 BJ를 50, 100, 200 µg/mL 농도로 병용 처리하여 24시간 동안 반응하였다. 이후 각 well에 MTT 시약을 첨가한 뒤 3시간 동안 incubation하여 형성된 formazan blue를 DMSO 500 µL로 용해한 뒤 100 µL를 96-well plate에 옮겨 microplate reader (Thermo Fisher Scientific) 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 7.0×10⁴ cells/well의 농도로 분주하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 전 배양한 후 *C. acnes* (50 µg/mL)와 TN, TNB 및 BJ를 50, 100, 200 µg/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 염증을 유도하였다. 이후 96-well plate에 세포 배양액과 Griess 시약[1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid]을 1:1로 혼합하여 10분간 암반응 시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot analysis

RAW 264.7 세포를 6-well plate에 4×10⁵ cells/well의 농도로 접종한 뒤 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 전 배양하였다. 24시간 후 희석한 TNB (50, 100, 200 µg/mL)와 *C. acnes* (50 µg/mL)를 처리한 뒤 lysis buffer [1×RIPA (Biosesang,

Seongnam, Korea), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL pepstatin, and 1 µg/mL leupeptin]를 첨가하여 단백질을 추출하였으며 BCA kit (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 정량 하였다. 이후 20 µg의 단백질을 10% polyacrylamide를 함유한 10% SDS-PAGE gel에서 분리한 다음 poly-vinylidene difluoride (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 전이하였다. 전이된 membrane을 5% skim milk (sol. TBST)에서 90분간 blocking한 뒤 TBST로 10분간 3회 세척하여 1차 항체 iNOS antibody (AHP2399, 1:1,000, Bio-Rad), COX-2 antibody (100-401-226, 1:1,000, Rockland Immunochemicals, Inc., Pottstown, PA, USA), IκB-α antibody (4814S, 1:1,000, Cell signaling Tech, Danvers, MA, USA), phospho-IκB-α antibody (9246S, 1:1000, Cell signaling Tech), NF-κB antibody (8242S, 1:1000, Cell signaling Tech), phospho-NF-κB antibody (3033S, 1:1,000, Cell signaling Tech), β-actin antibody clone AC-74 (VMA00048, 1:1,000, Sigma-Aldrich)와 4 °C에서 overnight 하였다. 이후 peroxidase (HRP)가 결합된 2차 항체(Cell signaling Tech)를 1:10,000 비율로 희석하여 실온에서 90분 동안 반응한 뒤 ECL kit (Bio-Rad)와 반응시켜 imaging densitometer (model GS-700, Bio-rad)를 통해 현상하였다. 또한 현상된 단백질 발현량은 imageJ program (1.52v, NIH, Bethesda, Rockville MD, USA)을 통해 면적을 수치화하여 그래프로 나타내었다.

염증성 사이토카인(TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-8) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 7.0×10⁴ cells/well의 농도로 분주하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 전 배양한 후 TNB (50, 100, 200 µg/mL)와 *C. acnes*를 처리하여 동일한 조건에서 24시간 반응하였다. 이후 배양 배지를 원심분리 (15,928 g, 30 min, 4 °C) 하여 침전물을 제거한 상등액에 존재하는 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-8)의 생성량을 측정하였으며 측정에는 Mouse TNF-α ELISA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Mouse IL-1β ELISA Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), Mouse IL-6 ELISA Kit (BD Biosciences), IL-8 ELISA Kit (DY442, R&D Systems Inc.)를 이용하였다.

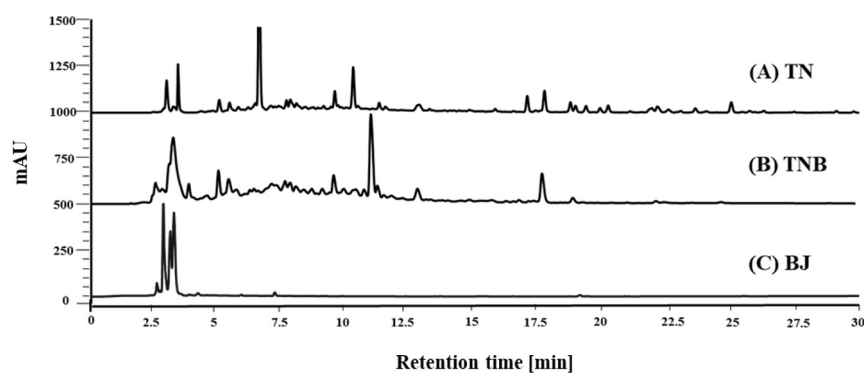


Fig. 1 HPLC chromatogram of *Torreyia nucifera* (L.) Siebold & Zucc extract (TN), biorenovated *Torreyia nucifera* (L.) Siebold & Zucc extract (TNB) and *Bacillus siamensis* JD3-7 (BJ). The chromatogram showed (A) TN (B) TNB and (C) BJ analyzed at a wavelength of 254 nm

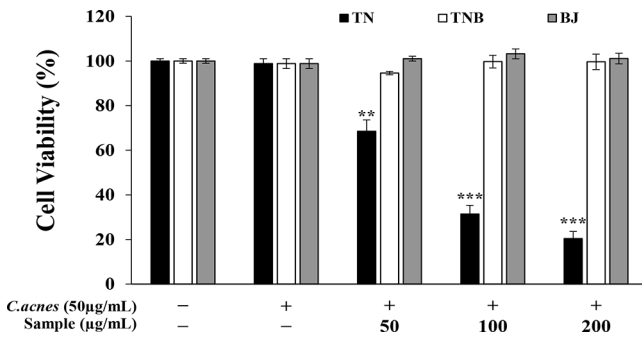


Fig. 2 Cell viability of TN, TNB and BJ in acnes-stimulated RAW 264.7 cell by the MTT assay. The production of cell viability was assayed in the culture medium of cells stimulated with heat-killed *C. acnes* (50 µg/mL) for 24 h in the presence of TN, TNB and BJ (50, 100, 200 µg/mL). Result is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control (untreated cells). The results are represented as the means ± SD of three independent experiments, ***p* < 0.01, ****p* < 0.01

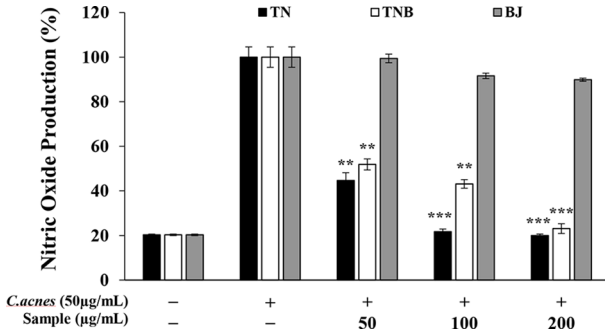


Fig. 3 Inhibitory effects of TN, TNB and BJ on nitric oxide production in RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with heat-killed *C. acnes* (50 µg/mL) for 24 h in the presence of TN, TNB and BJ (50, 100, 200 µg/mL). The results are presented as the relative percentage of the control (untreated cells). Data points are expressed as the mean ± standard deviation. The mean of each sample group was compared to the mean of the *C. acnes* - treated group, ***p* < 0.01, ****p* < 0.01

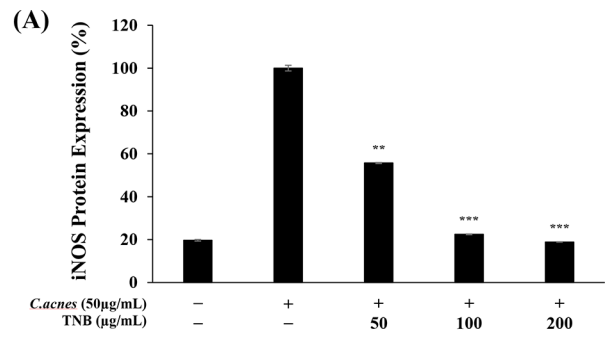
통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정된 후 평균값 ± 표준편차로 나타내었으며 통계적 분석은 각 처리 구간의 유의성(**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001)을 검증을 위해 분산분석(analysis of variance, ANOVA)한 다음 student's t-test로 다중 비교를 실시하였다.

결과 및 고찰

Biorenovation 전환물의 HPLC 분석

천연물은 강력한 생리활성을 갖는 다양한 구조를 보유하고 있으며 상호작용에 중요한 수소 결합의 donor/acceptor가 될 수 있는 관능기를 다수 갖고 있는 원천 물질이다. 따라서 본 연구에서는 HPLC를 통해 TN과 TNB 및 BJ의 peak를 비교, 분석함으로써 추출물 내 성분의 변화 여부를 확인하고자 하였다. 그



(B)

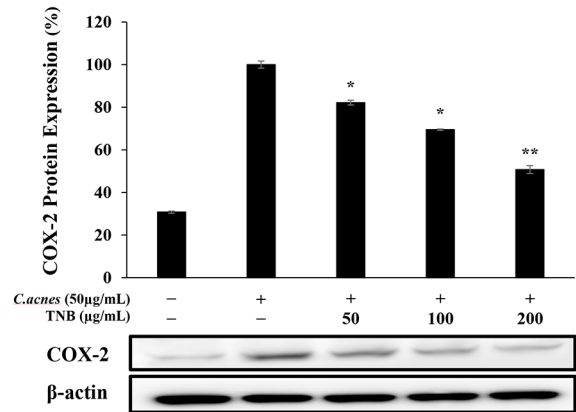


Fig. 4 Inhibitory effects of TNB on the protein level of iNOS and COX-2 expression in acnes-stimulated RAW 264.7 cells. (A) iNOS (B) COX-2. Cells (4×10^5 cells/well) were pre-incubated for 24 h, and then treated with heat-killed *C. acnes* (50 µg/mL) and Sample for 24 h. The protein levels of iNOS, COX-2 were analyzed by western blot. β-actin was used as the control. The results are presented as the relative percentage of the control (untreated cells). Data points are expressed as the mean ± standard deviation. The mean of each sample group was compared to the mean of the *C. acnes*-treated group, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.01

결과, 11분 및 18분경 TNB에서 기존 TN에서는 존재하지 않는 신규 peak가 검출되었으며 그 외에 다수의 peak 변화를 확인하였다(Fig. 1). 이러한 결과는 생물 전환 과정에서 생화학적인 반응에 의해 추출물 내 존재하는 다양한 성분에서 구조적 변화가 유도되었을 가능성을 제시하며 Daidzein을 기질로 하는 김 등의[25] 선행 연구에 따르면 biorenovation은 daidzein으로부터 daidzein-7-O-phosphate, daidzein-7-O-β-D-glucoside, daidzein-7-O-β-(6"-O-succinyl)-D-glucoside, 4-Ethoxy-daidzein-7-O-β-(6"-O-succinyl)-D-glucoside와 같은 유도체의 합성을 촉진할 수 있다. 화합물의 생물학적 특성과 물리적 특성은 서로 다른 작용기와 밀접한 관련이 있기 때문에 천연물 내 구조의 수정이 강력한 생리활성을 가진 우수한 기능성 소재의 개발로 이어질 수 있을 것으로 판단되어 *C. acnes*로 유도된 RAW 264.7 세포에서 항염증 효능을 평가하였다.

세포 독성 비교

TNB의 항염증 활성을 조사하기 위해 염증반응의 주요 조절 세포로 알려진 대식세포에서 TN, TNB 및 BJ가 세포의 생존에 미치는 영향을 조사하고자 RAW 264.7 세포에 *C. acnes*와 시료(50, 100, 200 µg/mL)를 병용처리하여 MTT assay를 수행하였다. TN를 처리한 RAW 264.7 세포의 생존율은 65.3, 29.9, 19.4%로 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보인 반면, TNB를 처리한 세포의 생존율은 91.4, 89.5, 88.3%, BJ는 모든 농도에서 90%이상의 세포생존율을 보였다(Fig. 2). 테스트 농도 내에서 TNB는 TB대비 개선된 세포생존율을 보이므로 그 활용 가능성을 검토할 필요가 있다고 판단되어 NO assay, ELISA, western blot을 수행하였으며 세포독성을 최소화하고 염증반응 억제 효능을 극대화하고자 TNB가 세포생존율에 영향을 미치지 않는 범위인 50, 100, 200 µg/mL 농도를 사용하여 실험을 진행하였다.

NO 생성 억제 활성 비교

높은 반응성을 가진 free radical의 일종인 NO는 염증의 발병 기전에서 핵심적인 역할을 수행하는 신호 분자로, 과발현 될 경우 인체에 유해한 염증성 상태를 야기하므로 염증 반응의 주요 마커로써 사용된다[26]. 따라서, 본연구에서는 *C. acnes*로 자극된 RAW 264.7세포에 시료(50, 100, 200 µg/mL)를 처리한 뒤 NO의 발현이 억제되는지 여부를 조사하였다. 실험 결과 TN는 각각의 농도에서 55.4, 78.3, 80.1% NO 생성을 억제하였으며, TNB는 48.1, 56.9, 76.9% 억제하여 두 시료가 통계적으로 유의한 활성 차이를 보이지는 않으나 세포생존율의 결과와 비교

하였을 때 TN의 활성은 세포독성에 의한 것으로 판단된다(Fig. 3). 또한 BJ를 처리한 세포에서는 NO의 감소 경향이 관찰되지 않았다.

iNOS 및 COX-2 발현 억제 활성

염증은 다양한 생화학적 현상이 관여하고 있는 것으로 알려져 있는데, 그 중 염증반응 시 대식세포에서 NO 과생성의 주요 매커니즘으로 알려진 효소 iNOS와 세포 혹은 조직 내에서 다양한 생리 활성 작용을 나타내어 혈관확장이나 부종, 발열, 염증반응을 유발하는 prostaglandin의 합성에 관여하는 COX-2는 NF-κB의 활성화로 인해 합성이 유도되며 염증 반응을 매개하는 데 있어서 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[27]. 따라서 *C. acnes*로 유도된 RAW 264.7 세포에 TNB를 처리하여 western blot을 수행한 결과, *C. acnes* 처리시 iNOS와 COX-2의 발현이 크게 증가하였으며 TNB의 처리로 인해 농도 의존적으로 유의하게 감소함을 확인하였다(Fig. 4).

염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8) 생성 억제 활성

여드름을 유도하는 원인균인 *C. acnes*의 세포벽 성분은 다형핵 백혈구와 단핵구에 강력한 주화성을 가져 모낭 주위로 모여들게 하며 이 과정에서 단핵구 세포들로부터 염증성 사이토카인의 분비 및 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다[28]. 그 중 TNF-α 및 IL-1β, IL-6, IL-8는 대표적인 염증성 사이토카인으로 TLR-2를 통한 NF-κB 전사인자의 활성화로부터 유도되어 피지선 모낭 주위에서 만성 염증성 질환을 일으키는 주요 병원 인자로 알려져 있으며 육아종 형성을 촉진시켜 염증성 피부질환

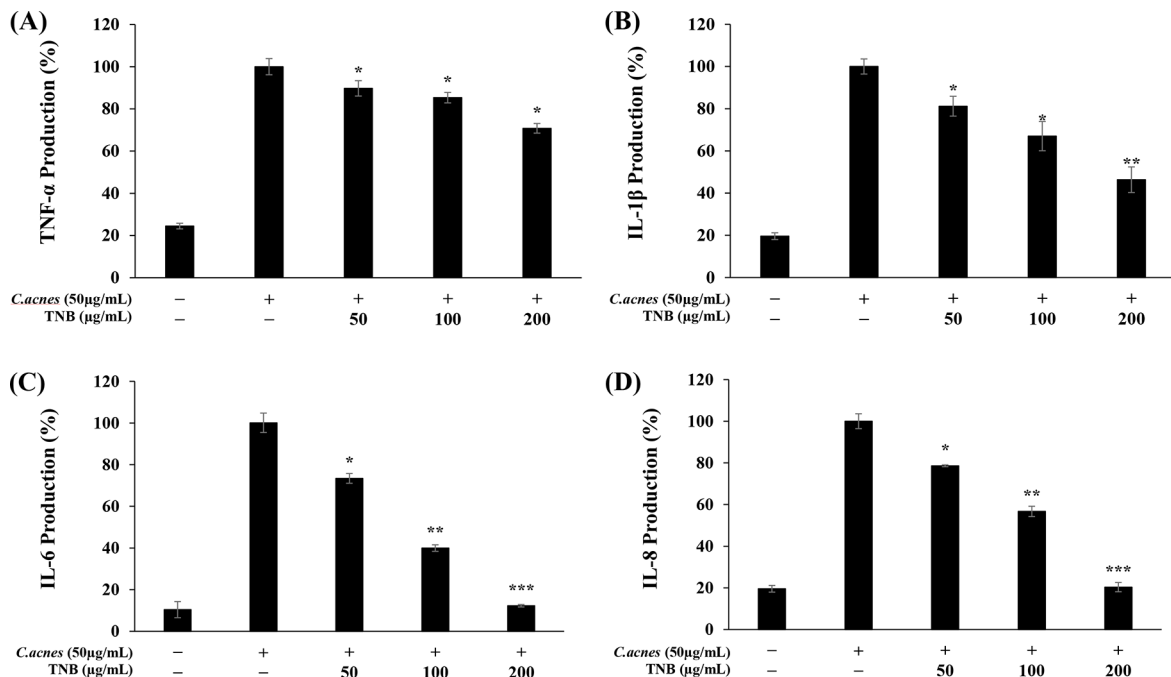


Fig. 5 Inhibitory effects of TNB on production of pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells. The production of (A) TNF-α (B) IL-1β (C) IL-6 (D) IL-8 was assayed in the culture medium of cells stimulated with heat-killed *C. acnes* (50 µg/mL) for 24 h in the presence of TNB (50, 100, 200 µg/mL). The results are presented as the relative percentage of the control (untreated cells). Data points are expressed as the mean ± standard deviation. The mean of each sample group was compared to the mean of the *C. acnes*-treated group, **p* <0.05, ***p* <0.01, ****p* <0.001

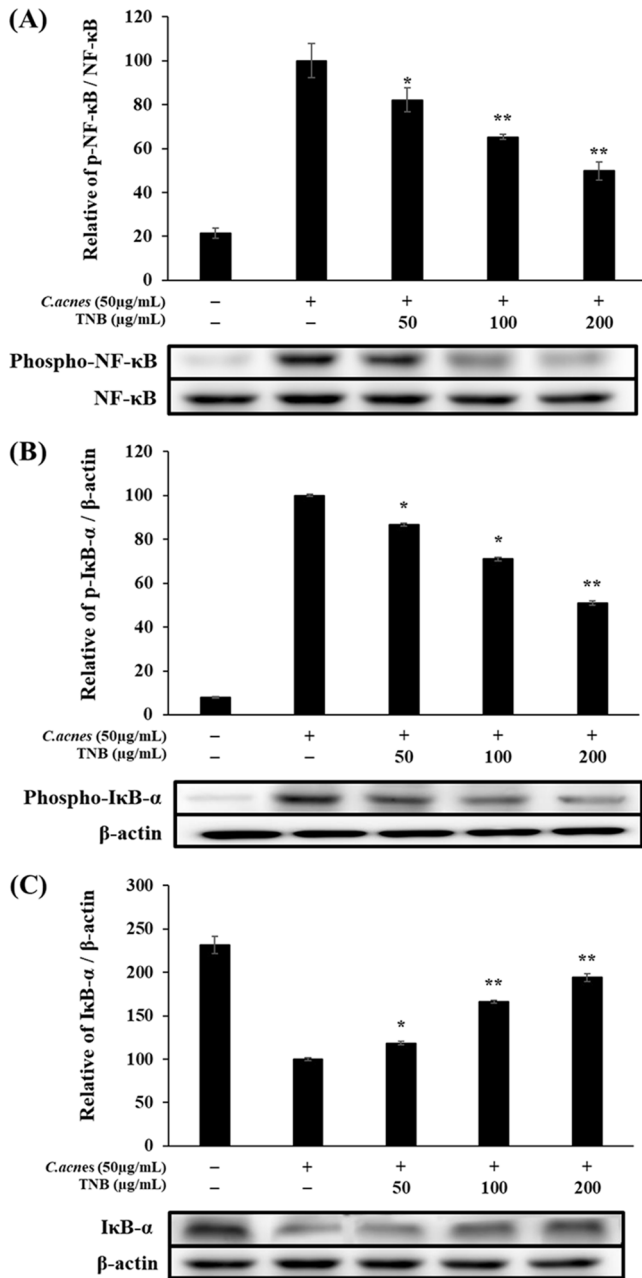


Fig. 6 Effect of ESP on the protein expression of (A) phospho-NF-κB, (B) phospho-IκB-α (C) IκB-α. Suppression of NF-κB signaling pathways in the *C. acnes*-stimulated RAW264.7 cells. Cells (4×10^5 cells/well) were pre-treated with TNB (50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) for 2 h and then stimulated with *C. acnes* (50 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. Phosphorylation of NF-κB, IκB-α and NF-κB, IκB-α was analyzed by western blotting. Data points are expressed as the mean \pm standard deviation. The mean of each sample group was compared to the mean of the *C. acnes*-treated group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

을 심화하는 것으로도 보고되었다[29]. RAW 264.7에 열처리한 *C. acnes*를 처리하였을 때 TNF- α 및 IL-1 β , IL-6, IL-8의 발현이 크게 증가한 것을 확인하였으며 TNB처리 시 이들의 발현이 농도 의존적으로 유의하게 억제되는 것을 확인하였다(Fig.

5). 특히 가장 고 농도인 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 IL-6와 IL-8의 발현이 정상 상태 세포 수준으로 억제된 것이 관찰되었다.

NF-κB 신호경로에 대한 억제 활성

NF-κB는 DNA의 전사 과정, 사이토카인의 생성과 세포의 생존에 관여하는 단백질 복합체로, 염증반응을 매개하는 전 염증성 사이토카인과 매개체들의 조절은 전사인자인 NF-κB와 연관되어 있으므로 본 연구에서는 열처리한 *C. acnes*로 자극한 RAW264.7 세포에 TNB를 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 뒤 단백질의 발현을 조사하였다. 그 결과, *C. acnes*로 염증이 유도된 RAW264.7 세포에서 NF-κB 전사인자가 활성화됨을 확인하였으며 TNB는 *C. acnes* 단독 처리군 대비 phospho-IκB- α 및 phospho-NF-κB의 발현을 유의하게 억제하였다(Fig. 6). 또한 IκB- α 는 *C. acnes*의해 인산화되어 감소하였으나 TNB의 처리에는 농도 의존적으로 IκB- α 의 발현이 증가하는 경향을 나타내는데 이러한 결과는 TNB의 인산화 억제에 의한 것으로 판단된다.

본 연구는 biorenovation을 적용한 비자나무 추출물(TNB)이 여드름 원인균으로 알려진 *C. acnes*에 의해 증가한 다양한 염증 관련지표의 생성에 미치는 영향을 조사함으로써 여드름의 치료제로의 활용 가능성을 조사하고자 수행되었다. MTT assay를 통해 시료의 세포독성을 조사한 결과, TNB는 비자나무 추출물(TN)과 비교하여 개선된 세포생존율을 보였으며 독성이 없는 농도에서 NO의 생성을 유의하게 억제하였다. 또한 *C. acnes*을 대식세포에 처리하였을 때 증가하는 것으로 알려진 면역반응 관련 유전자 iNOS 및 COX-2와 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 유전자의 발현이 TNB에 의해 유의하게 억제됨을 확인하였으며 IL-6와 IL-8는 가장 고 농도인 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 정상세포와 같은 수준으로 발현이 감소하였다. 따라서 TNB는 이러한 염증매개 인자의 발현을 억제함으로써 항염증 활성을 유도하며, 특히 초기 자극에 대한 염증유발 인자인 TNF- α 의 분비 억제는 IL-6, IL-8 발현으로 이어지는 일련의 염증과정을 억제함으로써 여드름으로 인한 피부병변을 완화하는데 효과적일 것으로 판단된다. 또한 이러한 염증 매개인자들의 조절은 전사인자인 NF-κB의 활성화와 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있으므로 TNB에 의해 NF-κB 신호전달 경로가 영향을 받는지 여부를 확인하였다. 그 결과, TNB를 처리한 RAW 264.7 세포에서 phospho-IκB- α 및 phospho-NF-κB의 발현이 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였으며 인산화가 억제되면서 IκB- α 의 degradation 또한 감소하여 IκB- α 가 *C. acnes* 단독처리군 대비 증가하는 경향을 보였다. 결론적으로, TNB는 NF-κB 신호 전달 경로를 차단하고 염증 관련 유전자인 iNOS와 COX-2를 하향 조절하여 NO, PGE $_2$ 의 발현을 억제할 뿐 아니라 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8)의 생성을 효과적으로 억제함으로써 항염증 활성을 유도하는 것으로 판단되며 이러한 결과가 TNB가 여드름의 치료제 또는 그 보조제로서 적용되기 위한 기초적인 근거가 될 것으로 기대한다. 또한 염증반응에 의한 피부 병변을 완화하기 위해 근본적으로 여드름의 증식 억제를 통해 염증반응을 최소화하는 것 또한 중요한 방안이 될 수 있으므로 향후 *C. acnes*에 대한 TNB의 항균활성 및 유효성분 대한 추가연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

초 록

본 연구는 비자나무(*Torreya nucifera* (L.) Siebold & Zucc, TN)와 생물전환 된 비자나무 추출물(TNB)의 항염증 효과를 평가하기 위해 수행되었으며 이를 위해 *C. acnes*에 의해 유도된 RAW264.7 염증 모델에서 염증인자의 발현을 조사하였다. 실험 결과, TNB는 50, 100, 200 µg/mL 농도에서 TN의 높은 세포 독성을 개선하였으며 nitric oxide (NO)와 NO 합성 효소인 inducible NO synthase (iNOS) 및 prostaglandin의 합성 효소인 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 유의하게 억제하였다. 또한 TNB는 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8의 발현을 유의하게 억제하였으며 특히 IL-6, IL-8의 경우 가장 고 농도인 200 µg/mL에서 정상세포 수준으로 감소하였다. 이후 진행된 western blot에서 인산화 된 I κ B- α 및 NF- κ B의 발현이 농도의존적으로 억제됨을 확인하였으며 인산화가 억제되면서 degradation이 감소하여 TNB처리 농도가 높아짐에 따라 I κ B- α 의 농도가 증가하는 경향을 보였다. 결론적으로, TNB는 NF- κ B 신호 전달 경로를 차단함으로써 다양한 염증 매개 인자의 발현을 효과적으로 하향 조절할 수 있으며 이를 통해 항 염증 활성을 유도하는 것으로 확인된다. 이러한 결과를 근거로 TNB가 *C. acnes*에 의해 유발된 염증성질환의 치료에 효과적인 천연물 소재로 적용될 수 있음을 제안한다.

Keywords 바이오리노베이션 · 비자나무(*Torreya nucifera*) · 여드름균 · 항염증

감사의 글 본 논문은 중소기업부와 중소기업기술정보진흥원의 지역특화산업육성 +R&D 사업의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다(S3270338).

References

- Omer H, McDowell A, Alexeyev OA (2017) Understanding the role of *Propionibacterium acnes* in acne vulgaris: The critical importance of skin sampling methodologies. *Clin Dermatol* 35(2): 118–129. doi: 10.1016/j.clindermatol.2016.10.003
- Park Y (2006) A study about control of gingivitis and plaque of dentifrice containing tranexamic acid and willow tree bark. *J Korean Acad Dent Health* 30(3): 271–279
- Suh DH, Kwon HH (2015) What's new in the physiopathology of acne? *Br J Dermatol* 1: 13–19. doi: 10.1111/bjd.13634
- Suh DH (2010) Pharmacologic treatment of acne. *J Kor Med Assoc* 53(7): 623–629. doi: 10.5124/jkma.2010.53.7.623
- Dessinioti C, Katsambas AD (2010) The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: facts and controversies. *Clin Dermatol* 28(1): 2–7. doi: 10.1016/j.clindermatol.2009.03.012
- Thiboutot DM, Layton AM, Eady EA (2014) IL-17: a key player in the *P. acnes* inflammatory cascade? *J Invest Dermatol* 134(2): 307–310. doi: 10.1038/jid.2013.400
- Lee SJ, Lee EH, Shin JH, Kim SS, Kim NK, Choi E, Seo SR (2016) Eucalyptus globulus extracts inhibit *Propionibacterium acnes*-induced inflammation signaling. *Korean J Microbiol* 52(4): 421–427. doi: 10.7845/kjm.2016.6066
- Kim J, Ochoa MT, Krutzyk SR, Takeuchi O, Uematsu S, Legaspi AJ, Brightbill HD, Holland D, Cunliffe WJ, Akira S, Sieling PA, Godowski PJ, Modlin RL (2002) Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *J Immunol* 169(3): 1535–1541. doi: 10.4049/jimmunol.169.3.1535
- Jugeau S, Tenaud I, Knol AC, Jarrousse V, Quereux G, Khammari A, Dreno B (2005) Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br J Dermatol* 153(6): 1105–1113. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06933.x
- Farrar MD, Ingham E (2004) Acne: inflammation. *Clin Dermatol* 22(5): 380–384. doi: 10.1016/j.clindermatol.2004.03.006
- Grange PA, Raingeaud J, Calvez V, Dupin N (2009) Nicotinamide inhibits *Propionibacterium acnes*-induced IL-8 production in keratinocytes through the NF- κ B and MAPK pathways. *J Dermatol Sci* 56: 106–112. doi: 10.1016/j.jdermsci.2009.08.001
- Kang SW, Cho SY, Chung JH, Hammerberg C, Fisher JG, Voorhees JJ (2005) Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor-kappaB and activator protein-1 in inflammatory acne lesions *in vivo*. *Am J Pathol* 166(6): 1691–1699. doi: 10.1016/s0002-9440(10)62479-0
- Yamamoto Y, Gaynor RB (2001) Role of the NF- κ B pathway in the pathogenesis of human disease states. *Curr Mol Med* 1(3): 287–296. doi: 10.2174/1566524013363816
- Kim J, Ochoa MT, Krutzyk SR, Takeuchi O, Uematsu S, Legaspi AJ, Brightbill HD, Holland D, Cunliffe WJ, Akira S (2002) Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *J Immunol* 169(3): 1535–1541. doi: 10.4049/jimmunol.169.3.1535
- Shin JH, Lee EH, Kim SS, Sydara K, Seo SR (2018) *Cnestis palala* (Lour.) Merr: extract suppresses *Propionibacterium acnes*-induced inflammation. *Korean J Microbiol* 54(1): 38–45. doi: 10.7845/kjm.2018.7092
- Kim SB, Kim BW, Hyun SK (2018) Comparison of antioxidant activities and effective compounds in Korean and Chinese *Torreya* seeds. *JFST* 50(3): 274–279. doi: 10.9721/KJFST.2018.50.3.274
- Jeon HS, Lee YS, Kim NW (2009) The Antioxidative Activities of *Torreya nucifera* Seed Extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38(1): 1–8. doi: 10.3746/jkfn.2009.38.1.001
- Im HS, Yoon KR, Chung DH (1980) Studies on the lipid components of *Torreya nucifera* seed. *Korean J Food Sic Technol* 12: 324–327
- Joh YG, Kim KJ, Bark KS, Jeong TM (1981) Studies on the composition and chemical structure of demethylsterols from *Torreya nucifera* seeds. *Korean J Food Sci Technol* 13: 127–132
- Ku JE, Park CH (2018) Research Trends in Effective Medicinal Plants for Acne. *J Korean Soc Cosmetol* 8 (3): 431–445
- Lee KM, Park TJ, Jie EY, Kim SW, Han DH, Kim SY (2021) Melanogenesis Inhibitory Effects of *Phryma leptostachya* Callus using Biorenovation in B16F10 Melanoma Cells. *KSBB Journal* 36(1): 42–48. doi: 10.7841/ksbbj.2021.36.1.42
- Hong HH, Lee KM, Park TJ, Chi WJ, Kim SY (2021) Anti-inflammatory effect of *Distylium racemosum* leaf biorenovate extract in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages cells. *J Appl Biol Chem* 64(4): 375–382. doi:10.3839/jabc.2021.051
- Park TJ, Sim JH, Hong HH, Han DH, Kim SY (2020) Anti-inflammatory Effect of *Colocasia esculenta* Biorenovate Extract in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. *KSBB Journal* 35(2): 162–168. doi: 10.7841/ksbbj.2020.35.2.162.9
- 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
- Kim KM, Park JS, Choi HR, Kim MS, Seo JH, Ramesh PP (2018) Biosynthesis of novel daidzein derivatives using *Bacillus amyloliquefaciens* whole cells. *Biocatalysis and Biotransformation* 36(6): 1–7. doi: 10.1080/10242422.2018.1461212
- Sharma JN, Al-Orman A, Parvathy SS (2007) Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacol* 15(6): 252–259. doi: 10.1007/s10787-007-0013-x
- Kim HP, Yoon YG (2018) The protective effect of berberine on

- Propionibacterium acnes*-induced inflammatory response in human monocytes. J Appl Biol Chem 61(2): 181–186. doi: 10.3839/jabc.2018.026
28. Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Szell M, Urban E, Kemeny L (2005) Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human β -defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. J Invest Dermatol 124(5): 931–938. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23705.x
29. Qin M, Pirouz A, Kim MH, Krutzyk SR, Garban HJ, Kim J (2014) *Propionibacterium acnes* induces IL-1 β secretion via the NLRP3 inflammasome in human monocytes. J Invest Dermatol 134(2): 381–388. doi: 10.1038/jid.2013.309