

# Biorenovation 생물전환 기법을 이용한 비트 추출물의 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 대한 항염증 효과

홍혜현, 박태진, 강민성, 김승영\*

## Anti-inflammatory Activity of *Beta vulgaris* Extract Using Biorenovation in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells

Hye Hyun Hong, Taejin Park, Min-Sung Kang, and Seung-Young Kim\*

Received: 26 April 2021 / Revised: 27 June 2021 / Accepted: 28 June 2021

© 2021 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Biorenovation is a method of modifying the structure of a wide range of substrates such as chemical compounds and plant extracts by microbial enzymes, which can reduce cytotoxicity and improve biological activity. In this study, biorenovation was applied to *Beta vulgaris* (BV) to produce biorenovation product (BVB), and anti-inflammatory activity was investigated in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. As a result, BVB inhibited nitric oxide (NO) production at a non-toxic concentration in a concentration-dependent manner, and inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and pro-inflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Our study shows that BVB exhibits anti-inflammatory activity by inhibiting the production of various inflammatory mediators. Moreover, it suggests that biorenovation has potential usefulness in the development of anti-inflammatory drugs.

**Keywords:** anti-inflammation, biorenovation, COX-2, iNOS, *Beta vulgaris*

### 1. INTRODUCTION

염증은 인체의 1차 면역 반응으로, 사람의 면역 체계로 침입

하는 미생물 및 암세포에 대한 인체의 방어기전이다 [1]. 일반적으로 박테리아, 바이러스 또는 진균과 같은 감염성 미생물이 신체를 침범하거나 혈액 순환을 통해 발생하며, 병원성 미생물에 의한 조직 손상이나 세포 사멸에도 반응하여 나타나는 것으로 알려져 있다 [2-4]. 이러한 염증 반응은 주로 대식세포가 관여하며, 그 중 대식세포를 자극하는 대표적인 염증 유발 인자인 그람 음성균 외벽에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 염증 자극이 발생하면 일련의 신호 전달 경로가 활성화되어 cytokine, chemokine, eicosanoids와 같은 다양한 염증 매개체가 합성되고 세포로부터 분비된다 [5]. Cytokine에 의해 활성화된 대식세포는 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 및 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6)와 같은 전 염증성 cytokine을 분비하여 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2) 등 염증 촉진 인자의 발현을 조절한다 [6-10]. iNOS는 일부 세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아 독소 같은 자극들에 노출되는 경우에만 발현되며, nitric oxide (NO)의 생성을 촉진하는 것으로 보고되었다 [11,12]. 활성산소인 NO는 낮은 농도에서 세포신호전달, 혈관 이완, 면역, 항균 등 매우 중요한 생리적 역할을 하지만, 염증 과정에서 iNOS에 의해 과 생성되면 부종, 발열, 조직 손상을 유발하여 염증 반응을 심화시킨다 [13-15]. 또한, 염증 부위에서 발현되는 COX-2는 arachidonic acid에서 prostaglandin으로의 변화를 촉진하여 PGE<sub>2</sub>를 생성하고 [16], COX-2로부터 과발현된 PGE<sub>2</sub>는 통증, 발열을 유발하는 염증 매개체로서 지속적인 염증 반응에 관여한다 [17,18]. 생체 내에서 NO 및 PGE<sub>2</sub>의 대부분이 iNOS와 COX-2의 작용으로부터 형성된다는 연구결과에 따르면, iNOS와 COX-2의 발현을 조절하고 전 염증성 cytokine의 분비를 억제함으로써 항염증 효과를 유도할 수 있음을 의미한다 [19]. 항염증 활성을 갖는

선문대학교 제약생명공학과  
Department of Pharmaceutical Engineering & Biotechnology, Sunmoon University, Asan 31460, Korea  
Tel: +82-41-530-2390, Fax: +82-41-530-2939  
E-mail: sykim01@sunmoon.ac.kr

식물 유래의 천연 제품은 열, 통증, 편두통 및 관절염과 같은 염증성 질환에 대한 민간요법으로 오랫동안 사용되어 왔으며, 질병의 염증성 근거가 명확해짐에 따라 그 관심이 더욱 높아지고 있다. 최근 연구에 따르면 많은 천연물의 NO 및 cytokine 억제를 통한 항염증 활성이 보고되었다 [20-22].

본 연구에서 사용된 비트(*Beta vulgaris*)는 명아쭉과에 속한 식물로 베타인, 베타시아닌, 안토시아닌 등의 유효성분을 포함하고 있다 [23]. 또한, 간세포 재생 촉진 및 손상 예방, 독성물질 배출 및 해독작용, 혈당 강하, 고혈압 개선, 시력 회복, 세포 복제 기능에 대한 효능이 알려져 있으나 알칼로이드 같은 독성 성분을 포함하고 있어 면역력이 떨어져 있거나, 위장이 약한 경우에는 복통이나 소화불량을 일으키기도 한다 [24]. 현재 이처럼 독성이 있거나 활용가치가 낮은 소재를 대상으로 새로운 가치 창출을 위한 연구 개발이 활발하게 이루어지고 있으며 [25,26]. 그 중 biorenovation은 미생물의 효소 촉매 반응을 통해 유기 화합물의 구조적 변형을 유도하여 생물학적 활성을 향상시키는 기법이다 [27,28]. 따라서 본 연구에서는 biorenovation을 비트 추출물에 적용하여 전염증성 사이토카인뿐만 아니라 iNOS, COX-2 단백질 발현의 억제 효과를 조사함으로써 비트 전환 추출물의 기능성 식품 또는 화장품 등의 소재로서의 활용 가능성을 모색하고자 한다.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. 비트 추출물 제조

본 연구에 사용된 비트 (*Beta vulgaris*)는 제주도에 재배되었으며, (주)수창으로 부터 구매하였다. 건조한 시료 1 g에 대하여 10배의 증류수를 가해 실온에서 24시간 동안 2회에 걸쳐 추출하였으며, paper filter (Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, JPN)로 여과한 후 감압농축기를 사용하여 농축하였다. 농축된 추출물을  $-110^{\circ}\text{C}$ 에서 동결 건조한 후 실험에 사용하였다.

### 2.2. 미생물 배양 및 Biorenovation 반응

Biorenovation에 사용된 균주는 최 등의 [29]에서 기술한 방법에 따라 생물전환 기반 스크리닝법을 통해 전환율이 가장 좋은 균주인 *Bacillus amyloliquefaciens* (KCTC 43033)로 선발되었으며, 미생물센터 (KCTC, Jeongeup-si, KOR)에서 분양 받아 beef extract (OXOID, UK), peptone (OXOID, UK)이 함유된 배지에서 최적 생육 조건에 맞추어 20시간 동안 배양 후, 10분 동안 5,000 rpm으로 원심 분리하여 미생물 pellet을 수득하였다. 얻어진 pellet을 PG buffer (50 mM Phosphate buffer, 2% Glycerin)로 2회 세척한 후, 동일 buffer에 현탁하여 사용하였다.  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 72시간 반응 후, 원심 분리하여 얻어진 상등액을 감압농축기를 사용하여 농축한 후,  $-110^{\circ}\text{C}$ 에서 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

### 2.3. Biorenovation 전환물의 HPLC 분석

비트 추출물이 생물 전환되었는지 확인하기 위하여 비트 추

출물 (BV)과 생물 전환된 비트 추출물 (BVB) 및 생물 전환에 이용한 미생물 *Bacillus amyloliquefaciens* 추출물(BAE)을 대조군으로 하여 HPLC분석을 진행하였다. 각 시료를 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)에 녹인 후, SpectroMonitor 3200 digital UV/Vis detector (Shimadzu, Kyoto, JPN)를 사용하여 분석하였다. 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA, SAMCHUN, KOR)를 함유한  $\text{H}_2\text{O}$  (Solvent A)와 Acetonitrile (Solvent B, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하여 (B: 10%  $\rightarrow$  100% 30 min, column: Phenomenex 4  $\mu\text{m}$  Hydro-RP 80Å, 250  $\times$  4.6 mm), 컬럼 온도  $40^{\circ}\text{C}$ , 유속 1.0 mL/min으로 254 nm 파장에서 분석하였다.

### 2.4. 실험재료 및 세포배양

본 연구에서 사용된 LPS는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, RAW 264.7 세포는 한국세포주은행에서 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS)과 100 U/mL penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin을 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, NY, USA)에 첨가한 배양액을 사용하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양하였으며, 2일을 주기로 계대배양 하였다.

### 2.5. 세포 독성 측정

RAW 264.7 세포에 대한 각 시료의 농도 별 생존율을 측정하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 24 well plate에 RAW 264.7 세포를  $7.0 \times 10^4$  cells/well의 농도로 분주하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%,  $\text{CO}_2$  조건에서 24시간 동안 전 배양 한 후, 시료와 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 동시 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT를 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 반응시킨 다음 상층액을 제거하였으며, 각 well에 DMSO를 첨가하여 formazan blue를 용해시킨 후 ELISA reader (Thermo Scientific, MA, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.6. NO 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포를 24 well plate에  $7.0 \times 10^4$  cells/well의 농도로 분주하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  조건하에 24시간 전 배양하였다. 이후 농도별로 준비한 시료와 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 동시 처리하여 24시간 배양한 후 96 well plate에 상층액 100  $\mu\text{L}$ 와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylene-diamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 15분간 암반응 시킨 후 ELISA reader (Thermo Scientific, MA, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.7. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성 억제 활성 측정

24 well plate에 RAW 264.7 cell ( $7.0 \times 10^4$  cells/well)의 농도로 분주하여 24시간 전 배양한 뒤, 시료와 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 배양 배지를 10,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 침전물을 제거한 뒤 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액에서 PGE<sub>2</sub>의 함량은 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc.,

Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

### 2.8. Western blot analysis

RAW 264.7 세포를 6well에  $4.5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주한 뒤, 24시간 전 배양한 다음, 시료와 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 PBS를 이용해 3회 세척하였으며, lysis buffer [ $1 \times$ RIPA (Upstate Cell Signaling Solution, NY, USA),  $1 \text{ mM}$  phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF),  $1 \text{ mM}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ,  $1 \text{ mM}$  NaF,  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinin,  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  pepstatin, and  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin]를 처리하여 60분 동안 lysis 시킨 후  $12,000 \text{ rpm}$ 에서 30분 동안 원심 분리하여 상층액과 pellet을 분리하였다. BCA kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 단백질을 정량한 뒤, 정량한 단백질을 10%의 polyacrylamide gel에서 전기영동 하였으며, poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane (Milipore, Burlington, MA, USA)에  $200 \text{ mA}$ , 2시간 동안 전이시켰다. 5% 탈지분유를 포함한 0.05% Tween 20/Tris-buffered saline (0.05% TBST)에 membrane을 넣고 상온에서 90분간 blocking 한 후, TBST로 10분간 3회 세척하여 1차 항체 (iNOS antibody (1 : 1,000, Bio-Rad, USA), COX-2 antibody (1 : 1,000, Rockland Immunochemicals, Inc., USA),  $\beta$ -actin antibody clone AC-74 (1 : 10,000, Sigma, USA)를 이용하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 16시간 동안 반응시켰다. 이후 TBST 용액으로 3회 세척한 뒤, 1 : 10,000으로 희석한 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch, USA)와 상온에서 1시간 반응한 시켰다. ECL kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 imaging densitometer (model GS-700, Bio-rad, USA)를 통해 측정하였으며, imageJ program (NIH, Bethesda, MD, USA)을 이용하여  $\beta$ -actin 대비 iNOS와 COX-2의 발현량의 면적을 수치화한 뒤 그래프로 나타내었다.

### 2.9. 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) 생성 억제 활성 측정

24 well plate에 RAW 264.7 세포를  $7.0 \times 10^4$  cells/well의 농도로 분주하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 24시간 동안 전 배양한 후, 농도별 시료와 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 배양 배지를 원심분리 ( $10,000 \text{ rpm}$ , 3 min) 하여 침전물을 제거하였고, 상등액을 회수하여 전염증성 cytokine의 생성량을 측정하였다. 상등액에서의 전염증성 cytokine 생성량은 Mouse TNF- $\alpha$  ELISA Kit (Invitrogen, California, USA), Mouse IL-6 ELISA Kit (BD Biosciences, California, USA), Mouse IL-1 $\beta$  ELISA Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

### 2.10. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였고, 그 결과는 평균값  $\pm$  표준편차로 나타냈으며 통계적 분석은 각 처리 구간의 유의성 ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ )을 검증을 위해 분산분석 (analysis of variance, ANOVA) 후 student's t-test로 다중 비교를 실시하였다.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Biorenovation 전환물의 HPLC 분석

비트 추출물을 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주를 이용하여 biorenovation 반응한 후, 원심 분리를 하여 cell pellet을 제거하고 회수한 상등액을 감압 농축하였다. 비트 추출물 (BV)과 비트 생물전환 추출물 (BVB), 생물 전환에 이용한 미생물 *Bacillus amyloliquefaciens* (BAE)에 대하여 HPLC 분석을 진행한 결과, 생물 전환된 시료에서 기존의 비트 추출물에서는 존재하지 않는 신규 peak와 기존 peak의 함량 변화를 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 이는 비트 내 존재하는 다양한 성분이 본 논문에서 사용된 biorenovation에 의해 미지의 화합물로 생물 전환되어 나타난 peak의 가능성을 시사했다.

### 3.2. 세포 독성 비교 측정

비트 열수 추출물 (BV)과 생물 전환된 비트 열수 추출물 (BVB) 및 생물 전환에 이용한 미생물 BAE의 RAW 264.7 세

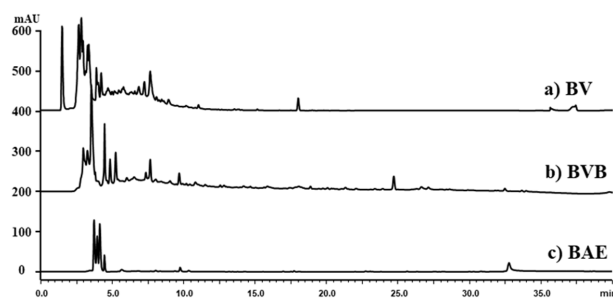


Fig. 1. HPLC chromatogram of *Beta vulgaris* extract (BV), *Beta vulgaris* Biorenovate extract (BVB) and *Bacillus amyloliquefaciens* extract (BAE). The chromatogram showed *Beta vulgaris* extract (BV), *Beta vulgaris* Biorenovate extract (BVB), *Bacillus amyloliquefaciens* extract (BAE).

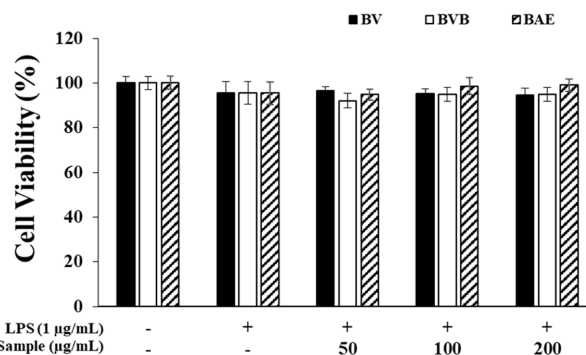


Fig. 2. Inhibitory effects of BV, BVB, and BAE on cell viability in RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 h in the presence of BV or BVB or BAE (50, 100, and  $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cytotoxicity was determined by MTT assay. Result is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control.

포에 대한 세포 독성을 알아보기 위해 MTT assay를 통해 세포 생존율을 조사하였다. 각 시료를 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 세포 생존율을 측정된 결과, BVB 추출물은 처리 농도에서 모두 약 90% 이상의 생존율을 나타내었으며 BV 추출물도 BVB 추출물과 동일하게 무처리 군과 비교 시 측정 농도에서 90% 이상의 생존율을 보였다. 또한, BAE 추출물도 동일한 농도에서 세포에 대한 독성을 보이지 않아 세 시료 모두 RAW 264.7 세포에 대한 독성이 없는 것으로 사료된다 (Fig. 2). 추후 실험에서 세포 독성을 보이지 않는 농도 (50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리하여 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

### 3.3. NO 생성 억제 활성 비교

염증을 유발하는 원인이 되는 활성산소 Nitric oxide (NO) radical은 산소와 반응하여 peroxynitrite ( $\text{NO}_3^-$ )를 형성하고 pro-oxidant molecule인 NO가 다량 생성, 강력한 세포 독성을 갖는 것으로 보고되었다 [30]. RAW 264.7 세포에 대한 비트 열수 추출물 (BV)과 생물 전환된 비트 열수 추출물 (BVB)이 NO 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ )와 BV와 BVB, BAE를 (50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ ) 농도로 동시 처리하여 NO의 생성을 유도한 후, Griess 시약을 이용하여 세포 배양액에 존재하는  $\text{NO}^2$ 의 양을 측정하였다. 그 결과, LPS 단독 처리군과 비교하였을 때 BVB는 각각의 농도에서 50  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 36%, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 58% NO 생성을 억제하였고, 200  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 70%로, 대조군과 유사한 수준까지 억제된 것을 확인하였다. 반면에 BV에서는 유의한 감소 활성이 관찰되지 않았다, 또한 BAE에서는 NO 억제 활성이 관찰되지 않는 것을 볼 때 BVB의 억제 활성이 BAE와는 무관한 BVB 고유의 효과임을 의미한다 (Fig. 3). 이러한 결과를 통해 생물전환 기법을 이용하면 염증 과정에서 생성된 염증 인자로 인한 질환을 더욱 효과적으로 제어할

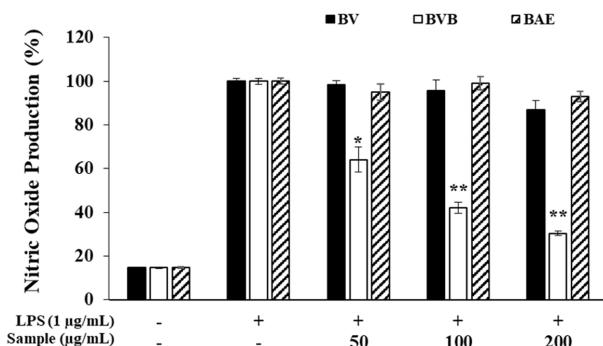
수 있는 것으로 사료된다.

### 3.4. PGE<sub>2</sub> 생성 억제 활성

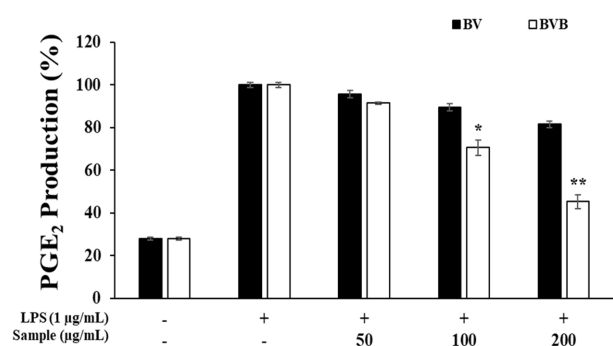
LPS로 유도된 Raw 264.7 cell의 monocyte는 LPS를 처리하지 않은 대조군 보다 pro-inflammatory cytokine들을 증가시키는 것으로 알려져 있다 [31]. 이 중 PGE<sub>2</sub>는 COX-2로부터 생성되며, 면역 관련 세포의 활성을 유도하여 염증반응을 일으키거나 염증반응의 유지에 핵심적인 역할을 하는 것으로 보고되었다. 본 실험에서는 BV와 BVB 추출물을 상기의 NO 실험과 동일한 조건으로 처리하여 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제 활성을 측정된 결과, LPS 단독 처리군과 비교하였을 때, BVB는 PGE<sub>2</sub>를 각 농도에서 9%, 38%, 55% 억제하였고, BV 처리한 RAW264.7에서는 유의한 감소경향이 관찰되지 않았다 (Fig. 4). 따라서 biorenovation을 통한 소재의 전환이 PGE<sub>2</sub> 분비 억제를 통한 염증 반응의 개선에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

### 3.5. iNOS 및 COX-2 발현 억제

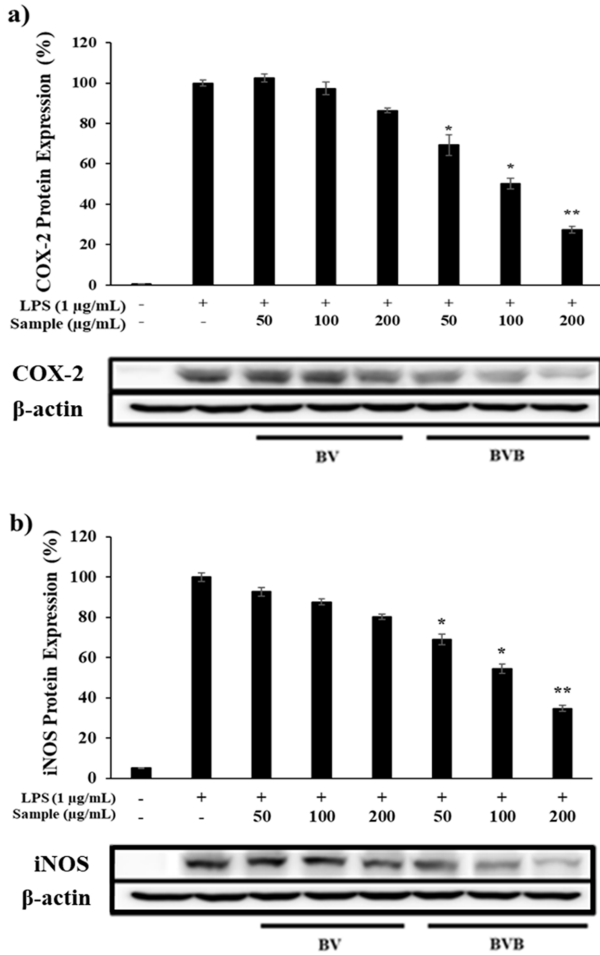
NO의 합성과 깊은 연관이 있는 것으로 알려진 iNOS는 interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )와 LPS 및 다양한 전염병에 반응하여 발현되는 것으로 보고되고 있으며 [32], iNOS의 발현이 감소할수록 NO의 생성 또한 감소하는 것으로 나타난다 [33]. 따라서 본 실험에서는 BVB 추출물에 의한 NO 저해 활성이 iNOS의 발현과 연관이 있는지 조사하기 위해 RAW 264.7 세포를 LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )로 자극을 하였고, BV와 BVB를 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하여 24시간 배양한 후 iNOS의 발현을 확인하였다. 그 결과, BVB를 처리한 RAW 264.7세포에서 LPS 단독 처리군과 비교하였을 때, iNOS의 발현이 유의하게 감소하는 것을 확인하였고, NO 생성의 감소가 iNOS 발현과 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5(a)). 다른 염증 인자인 PGE<sub>2</sub>는 COX의 두 가지 isoforms 중 COX-2로부터



**Fig. 3. Inhibitory effects of BV, BVB, and BAE on nitric oxide production in RAW 264.7 cells.** The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h in the presence of BV or BVB or BAE extract (50, 100, and 200  $\mu\text{g/mL}$ ). Result is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control. Data represent the means $\pm$ SD with three separate experiments. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01.



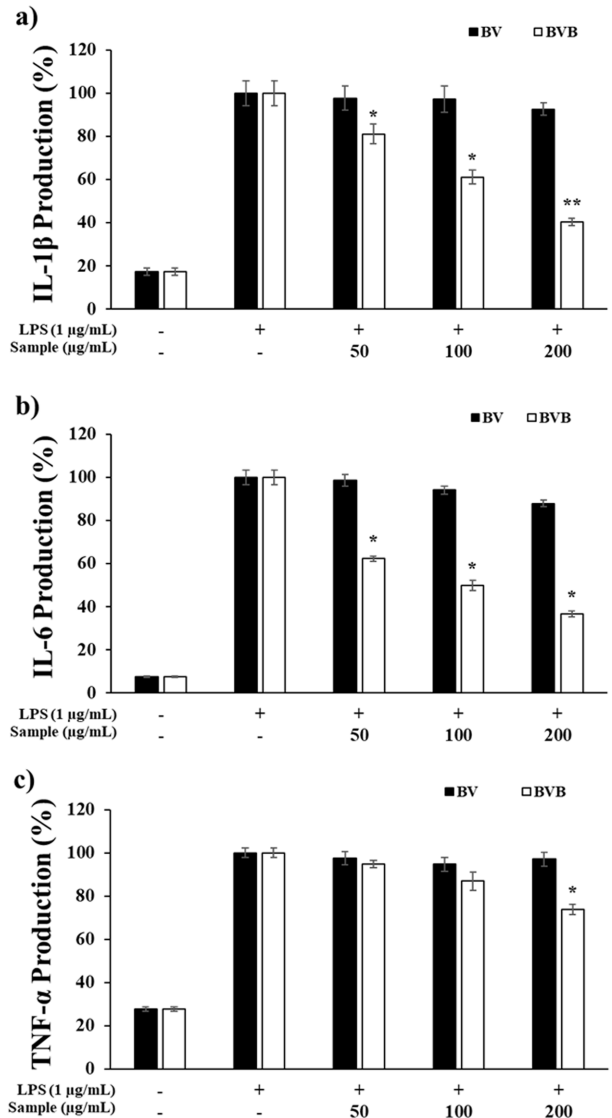
**Fig. 4. Inhibitory effects of BV and BVB extract on PGE<sub>2</sub> production in RAW 264.7 cells.** The production of PGE<sub>2</sub> was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h in the presence of BV and BVB extract (50, 100, and 200  $\mu\text{g/mL}$ ). Result is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control. Data represent the means $\pm$ SD with three separate experiments. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01.



**Fig. 5. Inhibitory effects of BV and BVB extract on the protein level of iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells ( $4.5 \times 10^5$  cells/well) were pre-incubated for 18 h, and then treated with LPS (1 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. Data represent the means±SD with three separate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

생성된다고 알려져 있으며, COX-2는 전 염증성 사이토카인 및 박테리아 독소에 의해 일시적으로 유도되어 PGE<sub>2</sub>를 생산하는데 관여한다. 따라서 염증과정에서 발현된 COX-2는 PGE<sub>2</sub>의 생성을 촉진하고, 이는 염증성 PGs의 과도한 생성의 원인이 COX-2 발현과 관련이 있음을 의미한다. PGE<sub>2</sub>의 감소가 COX-2 발현과 관련이 있는지 조사하기 위해 Western blot을 통해 확인할 결과, BVB 처리군에서 PGE<sub>2</sub>와 동일하게 COX-2의 발현을 농도 의존적으로 억제시키는 경향을 확인하였다 (Fig. 5(b)). 이와 같은 결과를 보아 BVB는 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하고 NO 및 PGE<sub>2</sub>의 생성을 감소시켜 항염증 활성을 나타내며, 염증성 질환의 치료에 유의할 것으로 사료된다.

**3.6. 전염증성 cytokines (TNF-α, IL-6, IL-1β) 생성 억제**  
 염증반응을 매개하는 pro-inflammatory cytokine으로 알려진



**Fig. 6. Inhibitory effects of BV and BVB extract on production of pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells.** The production of a) IL-1β, b) IL-6, and c) TNF-α was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 h in the presence of BV and BVB extract (50, 100, and 200 µg/mL). Results are expressed as a percentage of the control. Data represent the means±SD with three separate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

TNF-α, IL-1β 및 IL-6는 LPS로 자극된 대식세포에서 생성되어 면역세포의 활성화, 증식 및 분화를 조절하는 것으로 알려져 있다. IL-1β의 경우 매우 낮은 농도에서는 세포 성장이나 체내 항상성 유지에 필요하지만, 염증반응이나 상처 또는 면역학적 자극에 의해 대량으로 생산되면 인체 질환을 악화시키는 것으로 보고되었다. 본 실험에서는 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 BVB 추출물이 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α의 발현에 미치는 영향을 ELISA kit를 이용하여 조사하였다. LPS (1 µg/mL)로 자극시킨 RAW264.7 세포에 BV와 BVB를 (50, 100, 200 µg/mL) 처리하여 IL-1β, IL-6, TNF-α 생

성 억제를 조사한 결과, BVB 추출물은 LPS로 인하여 증가한 IL-1 $\beta$ 를 19%, 39%, 60% 억제하였고 (Fig. 6(a)), IL-6를 38%, 50%, 65%로 유의하게 억제하였다 (Fig. 6(b)). 반면에 TNF- $\alpha$ 에서는 큰 감소폭을 보이지 않았으나 200  $\mu$ g/ml에서 유의한 억제 활성을 확인하였다 (Fig. 6(c)).

#### 4. CONCLUSION

본 연구는 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 biorenovation 된 비트 추출물의 항염증 활성을 조사하기 위하여 진행되었으며, 염증매개체로 알려진 NO, PGE<sub>2</sub> 및 전 염증성 사이토카인 (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ )의 억제 활성 실험을 실시하였다. BVB는 세포 독성이 나타나지 않는 농도에서 LPS에 의해 증가된 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 염증인자인 NO와 PGE<sub>2</sub> 감소가 COX-2, iNOS의 발현과 연관에 의한 것인지 확인하고자 진행된 Western blot assay의 결과, COX-2와 iNOS에서도 유의한 감소 활성이 확인되었다. 이러한 결과는 BVB의 항염증 활성이 COX-2와 iNOS의 발현 억제에 의한 PGE<sub>2</sub>, NO의 생성 감소로부터 유도된 것임을 입증한다. 또한 염증반응의 지표로서 염증인자의 생성에 밀접한 연관이 있는 염증매개성 사이토카인은 iNOS의 활성화를 조절하여 염증반응에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 [34,35]. 따라서 염증매개성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6의 생성에 BVB가 미치는 효과를 조사한 결과, IL-1 $\beta$  및 IL-6 생성이 효과적으로 억제됨을 확인하였다. 다양한 염증성 질환의 원인이 이러한 염증매개체들의 과발현에 의한 생각해 볼 때 BVB는 항염증에 관련된 여러 제품들에서 다양하게 활용할 수 있는 천연물 소재가 될 것으로 판단된다. 본 연구의 결과와 biorenovation을 적용한 다른 천연물 소재에서 입증된 향상된 미백 및 항 주름 활성 전례는 biorenovation이 다양한 분야에 적용 가능한 기능성 소재의 발견에 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 추가적으로 BVB를 염증 예방 물질로 사용할 수 있는 가능성을 높이기 위한 유효화합물의 분리, 동정 및 활성 평가와 염증성 작용 기전에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

#### Acknowledgements

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업육성 +R&D 사업의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다 (S2912775).

#### REFERENCES

- Choi, H. J., J. S. Eun, Y. R. Park, D. K. Kim, R. Li, et al. (2008) Ikarisoide a inhibits inducible nitric oxide synthase in lipopoly-sac-

- charide-stimulated RAW264.7 cells via p38 kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *Eur.J.Pharmacol.* 601: 171-178.
- Jeong, H. R., M. S. Sung, Y. H. Kim, H. M. Ham, Y. M. Choi, and J. S. Lee (2012) Anti-Inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-Stimulated RAW264.7 macrophages. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 888-894.
- Mogensen, T. H (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 22: 240-273.
- Halliwell, B (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr.* 16: 33-50.
- Gilroy, D. W (2010) Eicosanoids and the endogenous control of acute inflammatory resolution. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 42: 524-528.
- Jeong, J. B., S. C. Hong, H. J. Jeong, and J. S. Koo (2012) Anti-Inflammatory Effects of Ethyl Acetate Fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-Stimulated RAW 264.7 and THP-1 Cells. *Korean J. Plant Res.* 25: 299-307.
- Guha, M., and N. Mackman (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 13: 85-94.
- Lee, S. T., Y. R. Jeong, M. H. Ha, S. H. Kim, M. W. Byun, S. K. Jo (2000) Induction of nitric oxide and TNF- $\alpha$  by herbal plant extract in mouse macrophage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 342-348.
- Guzik, T. J., R. Korbout, and T. Adamek-guzik (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol Pharmacol.* 54: 469-487.
- Shao, J., Y. Li, Z. Wang, M. Xiao, P. Yin, Y. Lu, X. Qian, Y. Xu, and J. Liu (2013) A novel naphthalimide derivative, exhibited anti-inflammatory effects via targeted-inhibiting TAK1 following down-regulation of ERK1/2- and p38 MAPK-mediated activation of NF- $\kappa$ B in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 17: 216-228.
- Yun, H. Y., Dawson, V. L., and Dawson, T. M (1997) Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Molecular Psychiatry.* 2(4): 300-10.
- Nathan, C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB Journal.* 6: 3051-3064.
- Manzi, S., and M. C. Wasko (2000) Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. *Ann Rheum Dis.* 59: 321-325.
- Miyasaka, N. and Y. Hirata (1995) Nitric Oxide and arthmatic Inflammation. *Immunol.* 16: 128-130.
- Abramson, S. B., A. R. Amin, R. M. Clancy, and M. Attur (2001) The role of Nitric Oxide in tissue destruction. *Best Practice & Research: Clinical Rheumatology.* 15: 831-845.
- Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson, P. C. and Seibert, K (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proc NatlAcad Sci USA.* 91: 3228-3232.
- Sinha, P., V. K. Clements, A. M. Fulton, and S. Ostrand-Rosenberg (2007) Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 67: 4507-4513.
- Bishop-Bailey, D., S Calatayud, T. D. Warner, T. Hla, and J. A.

- Mitchell (2002) Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 21: 93-101.
19. Higuchi, M., Hisgahi, N., Taki, H., and Osawa, T (1990) Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immun.* 144: 1425-31.
20. Kim, Y. S., S. J. Lee, J. W. Hwang, E. H. Kim, P. J. Park, and J. H. Jeong (2012) Anti-Inflammatory effects of extract from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW264.7 macrophages. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 41: 1205-1210.
21. Park, S. M., S. H. Byun, Y. W. Kim, I. J. Cho, and S. C. Kim (2012) Inhibitory effect of Mori Folium ethanol extract on pro-inflammatory mediator in lipopolysaccharide activated RAW264.7 cells. *Korean. J. Herbol.* 27: 31-38.
22. Kim, Y. K., K. Y. Hyun, and M. K. Lee (2014) Anti-Inflammatory and anti-oxidative effects of acaiberry in formalin-induced orofacial pain in rats. *J. Dent Hyg Sci.* 14: 240-247.
23. Kim, J. Y., H. K. Kim (2009) Physiological Activity of Redbeet. *Bulletin of Food Technology*. 22: 537-543.
24. Cheeke, P. R (1988) Toxicity and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids. *Journal of Animal Science*. 66: 2343-2350.
25. Kim, B. H., J. O. Jang, J. H. Lee, Y. E. Park, J. G. Kim, Y. C. Yoon, S. J. Jeong, G. S. Kwon, and J. B. Lee (2019) Increased Anti-oxidative Activity and Whitening Effects of a Saposhnikovia Extract Following Bioconversion Fermentation using *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33. *Journal of Life Science*. 29: 1208-1217.
26. Choi, H. R., J. S. Park, K. M. Kim, M. S. Kim, K. W. Ko, C. G. Hyun and S. Y. Kim (2018) Enhancing the antimicrobial effect of genistein by biotransformation in microbial system. *Ind Eng Chem*. 63: 255-261.
27. Kim, J. H., T. J. Park, J. H. S, S. Y. Kim (2020) The Effects of *Gleditsia japonica* Extract Following Biorenovation on Melanogenesis-related genes in B16F10 Melanoma Cells. *KSBB Journal*. 35: 303-309.
28. Kim, M. S., T. J. Park, J. S. Lim, S. Y. Kim (2019) Effect of *Agaricus biorenovate* Extract on Collagen Synthesis and Matrix Metalloproteinase-1 Production in Human Dermal Fibroblast. *KSBB Journal*. 34: 49-53.
29. Choi, H. R., J. S. Park, K. M. Kim, M. S. Kim, K. W. Ko, C. G. Hyun, J. W. Ahn, J. H. Seo, S. Y. Kim (2018) Enhancing the antimicrobial effect of genistein by biotransformation in microbial system. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 63: 255-261.
30. Jung, H. W., and Y. K. Park (2007) Effects of subfractions of *Coptidis Rhizoma* extract on the nitric oxide production in LPS-stimulated BV2 microglial cells. *Korean. J. Herbol.* 22: 73-78.
31. Walsh, L. J., Trinchieri, G, Waldorf, H. A., Whitaker, D. and Murphy, G F (1991) Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 4220-4224.
32. Guzik, T. J., R. Korbut, and T. Adamek-guzik (2003) Nitric oxide and superoxid in inflammation and immune regulation. *J. Physiol Pharmacol*. 54: 469-487.
33. Ahn, S. H., H. H. Kim, and J. T. Kim (2007) Inhibits atopy dermatitis in NC/Nga mouse through regulation of iNOS mRNA expression & NO production. *Korean J. Orient. Physiol. & Pathol.* 21: 1092-1098.
34. B. Halliwell, J. Gutteridge, (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*. 219: 1-14.
35. Kim, J. Y., K. S. Jung, H. G. Jeong (2004) Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase<sup>2</sup> expression in macrophages. *FEBS letters*. 569: 321-326.