



## 유청단백질 Glycomacropeptide에서 분리한 NANA의 안전성 및 염증저하 메카니즘 구명 연구

김민호\* · 김재홍 · 이윤경 · 김완식 · 김희경

매일유업(주) 중앙연구소

### Anti-inflammatory Effects and Its Mechanisms of NANA (N-Acylneuraminic Acid) Isolated from Glycomacropeptide

Min-Ho Kim\*, Jae-Hong Kim, Yun-Kyoung Lee, Wan-Sik Kim and Hee-Kyoung Kim

R&D Center, Maeil Dairies Co., Ltd., Gyeonggi 451-861, Korea

#### ABSTRACT

The focus of this study was to clarify the relation between the nitric oxide (NO) production and cytokine expression including tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF) and interleukin-6 (IL-6), and also investigated the effect of G-NANA (N-acylneuraminic acid isolates from glycomacropeptide) or S-NANA (Synthetic N-acylneuraminic acid) on LPS stimuli from RAW264.7 cell. The NANA is the predominant sialic acid found in mammalian cells and G-NANA is isolation of GMP (GMP is a valuable bioactive peptide with a varying degree of glycosylation including sialic acid). The lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria induces the expression of cytokines and potent inducers of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-6. In this experiment, upon stimulation with increasing concentrations of chitosan, the LPS-stimulated TNF- $\alpha$  and IL-6 secretion was significantly recovered with in the incubation media of RAW264.7 cells. Consistently, RT-PCR with mRNA and immunoblot analysis with anti-cytokine antiserum including TNF- $\alpha$  and IL-6 showed that the amount of TNF- $\alpha$  and IL-6 secretion in the incubation media recovered with the concentration of chitosan. The LPS-stimulated NO secretion was significantly recovered with in the 6 and 12 h incubation media of RAW264.7 cells, too. The recovery effect of G-NANA on IL-6 and NO secretion may be induced via the stimulus of TNF- $\alpha$  in RAW264.7 cell. These results once again suggest that G-NANA may have the anti-inflammatory effect via the stimulus of TNF- $\alpha$  in the LPS-stimulated inflammation in RAW264.7 cells.

Keywords : N-acylneuraminic acid (NANA), Lipopolysaccharide (LPS), Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6), Nitric oxide (NO)

#### 서 론

염증(inflammation)은 외래의 자극원이나 다른 질병에 대한 생체의 방어 반응으로, 다양한 세포와 cytokine들이 관여하는 일련의 과정이다. 이러한 과정은 lipopolysaccharide(LPS)

와 같은 외부 자극이나 arachidonic acid 대사물과 같은 내부 자극을 매개로 하여 대식세포(macrophage)나 과립구(granulocyte) 등의 염증 관련 세포들의 염증 부위로의 유입과 축적을 주요 특징으로 한다(Zamora *et al.*, 2000). 특히 활성화된 대식세포는 cytokine뿐만 아니라 nitric oxide(NO)나 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)를 과도하게 생성하여 염증 과정에 큰 역할을 담당한다는 사실이 보고되고 있다(Higuchi *et al.*, 1990; Corbett와 MacDaniel, 1995).

\* Corresponding author: Min-Ho Kim, R&D Center, Maeil Dairies Co., Ltd., Gyeonggi 451-861, Korea. Tel: +82-31-660-9195, Fax: +82-31-668-0247, E-mail: kmh7495@maeil.com

대식세포는 숙주의 방어 및 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 면역세포로서 염증반응 시에는 활성산소종 및 IL-6 등의 cytokine을 생산하여 감염 초기에 관여한다고 보고되고 있다. 특히 대식세포가 탐식된 이물질을 분해시킬 때 생성되는 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다(Higuchi *et al.*, 1990; Corbett와 MacDaniel, 1995; McDaniel *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2000).

NO는 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생합성되며, 신경전달, 혈액응고 및 혈압조절 등의 다양한 생리적 역할을 한다. 그러나 세포의 자극으로 활성화되어 inducible NOS(iNOS)에 의해 대량으로 합성된 NO는 대식세포의 cytotoxicity에 중추적인 역할을 할 뿐만 아니라 염증반응에 관여하여 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상, septic shock, 순환부전 등을 포함한 systemic한 damage를 유발하는 것으로 알려져 있다. TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ )는 ‘종양괴사인자’로, 종양세포에 신호를 주어 자살하도록 만들거나, 그 밖에 바이러스의 세포 내 복제를 저해하기도 하고, 대식세포를 자극하기도 하며, 염증반응을 촉진하는 등, 내재면역반응(innate immune response)에 폭넓게 관여하는 신호분자입니다. 두 분자 모두 대식세포에 작용하여 대식세포를 활성화시키며 염증반응을 유도한다.

Cyclooxygenase-2(COX-2) 역시 대식세포에서 발현되는 단백질로서 arachidonic acid로부터 PGE<sub>2</sub>를 생합성하는데 관여하여 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다. 대표적인 염증성 cytokine인 interleukin-6(IL-6)는 염증반응을 매개하는 cytokine으로, B cell의 항체 생성을 촉진시키고 T cell의 분화를 유도하며(Garman *et al.*, 1987; Muraguchi *et al.*, 1988; Park *et al.*, 2007), 염증부위에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다(Delgado *et al.*, 2003).

시알릭산(NANA, N-acetylneuraminic acid, 이하 NANA)은 세포막의 세포 표면에 있는 당단백질 또는 당지질의 구성성분으로 말단에 위치함으로써 다양한 생물학적인 기능을 발휘하는데, 최근의 활발한 연구로 인하여 여러 가지 생리적 기능이 해명되고 있다. 예를 들면, 시알릭산은 포유동물의 생체 내에서 프락토스-6-포스페이트(fructose-6-phosphate)로부터 N-아세틸만노즈아민(N-acetylmannosamine)을 경유하여 합성된다. 이러한 NANA는 뇌의 ganglioside나 당단백질의 구성성분으로, 뇌나 중추신경계에 특히 많이 함유되어 있으며, 그 양이 유아기에 급격히 증가하기 때문에, NANA는 이러한 조직의 기능 발현이나 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어진다. 또한, 바이러스나 세균 등의 감염은 점막 상피세포에 있는 당 그룹에 바이러스나 세균이 결합함으로써 시작되는데, 병원성 대장균이나 콜레라균이 생산하는 독소는 소화관 상피세포에 NANA를 함유하는 당

그룹에 결합하여 설사를 일으킨다.

또한, 점액단백질(mucoprotein)의 불가결한 성분으로 인플루엔자 바이러스의 용혈작용을 저지하는 등 다양한 역할이 밝혀지고 있으며, 이외에 항암제의 개발, 독소성분의 중화작용, 항염증 작용 등의 기능이 보고되고 있다.

이에 본 연구팀은 잉여 유휴의 GMP(4~5% NANA) 내에서 천연 NANA(이하 G-NANA)를 분리하여 대량생산시스템 구축하였고, 생산 G-NANA에 대해 안전성 및 기능이 보고되고 있는 항염증 메커니즘을 조사하고자 하였다.

따라서, 본 연구는 항균 및 항바이러스제로 많이 연구되어지고 있지만, 아직까지 보고되지 않은 대식세포에 의해 수행되는 염증 면역반응에 관한 천연 NANA의 조절 작용을 조사해 보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 기기 및 시약

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's RPMI-1640, penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline, sodium dodecyl sulfate(SDS), fetal bovine serum(FBS), trypsin은 Gibco Co. (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에서 anti-mouse iNOS는 Santa Cruz에서 구입한 것을 사용하였다. Lipopolysaccharide (LPS), 항체, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT)은 Sigma Co.에서 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask(Nunc, Roskilde, Denmark), 24 well plate(BD, MA, USA), CO<sub>2</sub> incubator(Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope(Zeiss Co., AG, Deutschland), electrophoresis system(Bio-Rad, MA, USA), XAR-5 X-ray film(Kodak, Tokoy, Japan), microplate reader(Tecan, Maennedorf, Switzerland) 등을 사용하였다.

S-NANA(Synthetic N-acetylneuraminic acid, 이하 S-NANA)는 일본 Mrukin bio(Tokoy, Japan)사의 순도 98% 이상을 사용하였고, G-NANA는 매일유업(주)의 개발 NANA를 사용하였다.

### 2. RAW264.7세포의 배양 및 NANA 처리

본 연구에 사용된 RAW264.7세포는 ATCC(Rockville, MD, USA) 분주 받아 사용하였으며, 90%의 RPMI-1640(Gibco

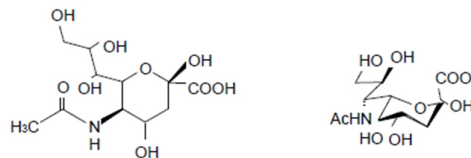


Fig. 1. Chemical structure of NANA and immune responses mechanism.

BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS), 1%의 penicillin 및 streptomycin(Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 배지를 사용하여 배양하였다. S-NANA (Fig. 1A)은 일본에서 구입하였으며, G-NANA는 매일유업(주) 개발 NANA를 사용하였고 Cho 등(2008)의 방법에 준하여 처리하였다.

3. 세포생존도 측정

RAW264.7세포를 24 well plate에 3×10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 분주한 다음, NANA를 농도별로 처리하여 세포의 생존도를 측정하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 세포에 0.5 mg/mL의 MTT용액(Amresco, Ohio, USA)을 50 μL를 처리하고 3시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 생성된 formazan crystal을 DMSO에 녹여 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Nitric Oxide 생성량 분석

LPS에 의해 생성되는 NO의 양은 세포배양액에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로써 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. RAW264.7 세포를 1×10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 24 well plate에 분주한 다음 NANA을 30분 전 처리하고, LPS 0.1 mg/mL를 50 μL씩 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포배양액과 Griess 시약을 각각 100 μL씩 혼합하여 37°C에서 10분 동안 배양한 다음 micro plate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 농도는 NaNO<sub>2</sub>의 검량선에 의해 환산하였다.

5. RT-PCR법

mRNA 발현 정도를 전사수준에서 조사하기 위해 각 NANA를 일정시간 동안 처리하고 Trizol reagent를 사용하여 Total RNA를 First stands cDNA를 제조한 다음, 동량의 cDNA를

PCR로 증폭하였다. PCR amplification은 i-Master PCR kit(iNtRON, Seongnam, Korea)를 사용하여 각 실험군 cDNA와 표적단백질들의 sense 및 antisense primers, 대조군 GAPDH primer를 dNTP 250 mM, Tris-HCl(pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, NaCl<sub>2</sub> 1.5 mM를 포함한 i-master solution 20 μL에서 시행하였다. PCR은 95°C에서 45초간 denaturing, 55°C에서 45초간 annealing 그리고 72°C에서 1분간 extension하는 조건으로 시행하며, 총 30 cycles을 수행하였다. PCR로 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에서 전기영동하였고, 분획된 DNA band의 intensity를 측정하였다. 실험에 사용된 DNA primer의 서열은 Table 1에 정리되어 있다.

6. TNF-α 분비량 분석

TNF-α를 측정하기 위하여 24 well plate에 RAW264.7 세포를 well당 5×10<sup>5</sup>개씩 분주하고, NANA을 농도 별로 처리하였다. 30분 뒤 LPS 0.1 mg/mL 처리한 다음, 24시간 동안 incubator에서 배양하였고, 배양액을 수거하여 -20°C에서 보관하였다. TNF-α는 ELISA Kit(R&D bio, CA, USA)의 manufacturer's instruction에 따라 측정하였다.

7. Immunoblot Analysis

포집된 세포는 40 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 120 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 0.1% nonidet P-40, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, P<sub>i</sub> cocktail이 포함된 lysis buffer에 4에서 1시간 동안 반응시킨 다음 sample buffer와 혼합하여 100°C에서 3분 동안 가열하여 단백질 변성을 유도하였다. 완성된 cell lysate는 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동한 다음 분리된 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 electroblotting에 의해 transfer하였고, membrane은 5% skim milk에 반응시켜 비특이적 단백질을 blocking 하였다. 일차 항체를 skim milk에 각각 1:500으로 희석하고, 2시간 동안 각각 항원 항체 반응을 시킨 다음 5분간 3번 PBS-T로 씻어내고, 이차 항체인 antimouse IgG, anti-rabbit IgG conjugated HRP를 1시간 30분 동안 반응시킨 후 ECL kit를 사용하여 X-ray film에 감광시켜 발현된 단백질의 양을 분석하였다.

Table 1. PCR primers used in this experiment

Name	Sequence (5' to 3')
Semi-quantitative PCR	
iNOS	F GGA GCC TTT AGA CCT CAA CAG A
	R TGA ACG AGG AGG GTG GTG
TNF-α	F TGC CTA TGT CTC AGC CTC TTC
	R GAG GCC ATT TGG GAA CTT CT
IL-6	F TCC AAG AAA GGA CGA ACA TTC G
	R TGA GGA CAT CTC CCA CGT CAA
GAPDH	F CAA TGA ATA CGG CTA CAG CAA C
	R AGG GAG ATG CTC AGT GTT GG

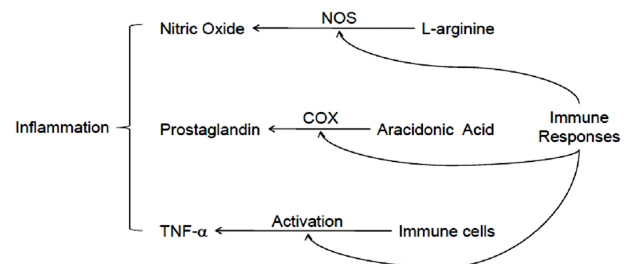


Fig. 2. Immune responses mechanism.

8. 통계처리

실험결과는 SAS program을 이용하여 통계분석하고(SAS, 1999), 실험군 간의 유의성은 ANOVA로 검증한 후 Duncan's multiple range test로 비교 분석하여(Duncan, 1955) 평균치와 표준편차로 나타내고 5% 수준에서 유의성을 표시하였다.

결과 및 고찰

1. G-NANA의 세포독성 NO 분비에 미치는 효과

Fig. 3A에서 보여지듯, G-NANA와 S-NANA는 쥐과 유래 복강대식 세포주인 RAW264.7 세포에서 0.25%에서부터 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였다. 또한 24시간 배양조건에서 MTT assay를 통해 이들 억제 효과 중 0.25% 농도 범위까지는 세포독성을 유발하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 G-NANA의 경우 S-NANA에 비해 세포독성 보이지 않음에 따라 S-NANA와 비교하여 안전성 면에서 우수함을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 결과로 볼 때 G-NANA와 S-NANA는 24시간까지 0.25% 농도 범위 내에서 세포독성 NO 생성을 억제하는 것으로 판단된다(Fig. 3B). NO에 관한 G-NANA와 S-NANA의 효과는 Janus kinase 2(JAK2)를 선택적으로 저해하여 NO 생성능을 저하시키는 AG490과 유사한 효과( $P<0.05$ )를 나타내는 것으로 확인되었다(Fig. 3C,D).

AG490은 20 uM 이상에서 독성을 보여 본 연구팀은 AG490을 20 uM에서 실험하여 AG490과 비교하였다.

G-NANA와 S-NANA의 독성평가는 HEK 293 세포 (human embryonic kidney cell)에서도 실시되어 0.25% 농도 이상에서도 독성이 나타나지 않음을 확인할 수 있었다( $P<0.05$ ).

NO는 NO synthase(NOS)에 의해 생성되며, NOS는 neuronal NOS(nNOS, NOS1), inducible NOS(iNOS, NOS2), endothelial

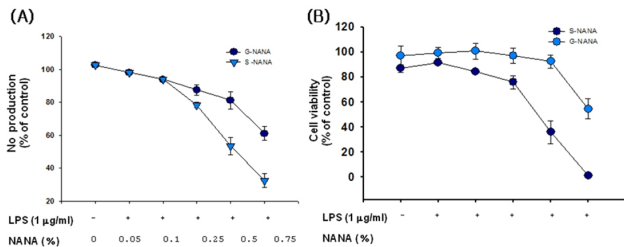


Fig. 3. The inhibitory effect of different NANA on LPS-mediated inflammatory responses in RAW264.7 cells. (A) RAW264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cells  $mL^{-1}$ ) were treated with NANA in the presence or absence of LPS ( $1 \mu g mL^{-1}$ ) for 24 h. Supernatants were collected and the nitrite (NO) concentration from the supernatants was determined by Griess reagent. (B) Cell viability was determined by MTT assay, as described in Materials and Methods. \*:  $p<0.05$  and \*\*:  $p<0.01$  compared to the control group.

NOS(eNOS, NOS3)의 3가지 종류가 존재한다. 이 가운데 nNOS와 eNOS는 constituent NOS(cNOS)로 불리며,  $Ca^{2+}$ 의존적으로 짧은 시간 동안 소량의 NO를 생성하여 세포의 정상적인 생리활동에 관여한다. 반면에 iNOS는  $Ca^{2+}$  비의존적으로 대식세포, 혈관 평활근세포, 심근세포, 간세포 등의 세포에서 lipopolysaccharide(LPS), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-1, TNF- $\alpha$  등의 자극에 의해 활성화되어 장시간 동안 대량의 NO의 생성과 관련이 있다.

다음으로 NO 생성을 조절하는 iNOS 효소의 발현을 RT-PCR로 정량하여 보았다.

2. G-NANA의 염증인자 전사에 미치는 효과

Fig. 4의 결과에 따라 G-NANA와 S-NANA는 세포 내 NO 생성성과 관련된다는 것으로 증명해주고 있다. 결과에서 보듯이, G-NANA와 S-NANA는 0.25% 농도 범위부터 iNOS 발현

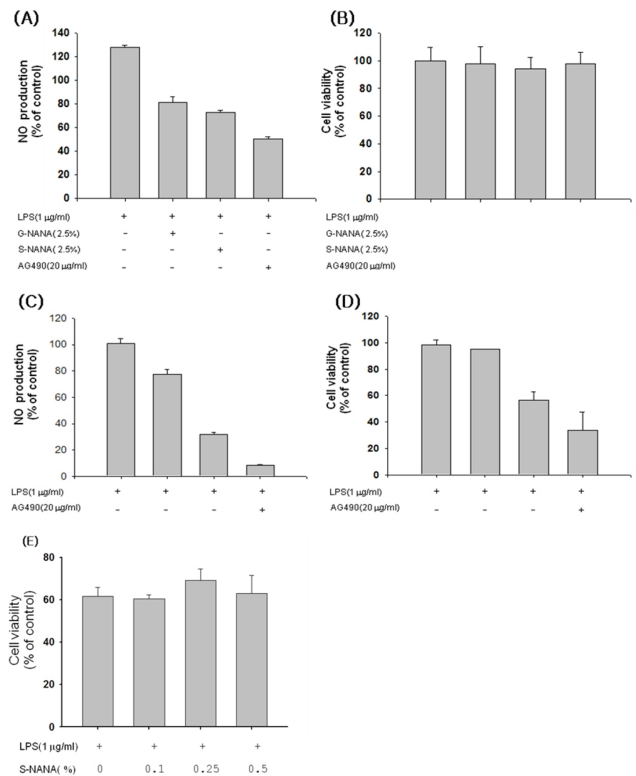


Fig. 4. The inhibitory effect of different NANA on LPS-mediated inflammatory responses in RAW264.7 cells. (A,C) RAW264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cells  $mL^{-1}$ ) were treated with NANA or AG490 in the presence or absence of LPS ( $1 \mu g mL^{-1}$ ) for 24 h. Supernatants were collected and the nitrite (NO) concentration from the supernatants was determined by Griess reagent. (B, D) Cell viability was determined by MTT assay, as described in Materials and Methods. (E) Cell viability was determined HEK293 cell by MTT assay \*:  $p<0.05$  and \*\*:  $p<0.01$  compared to the control group.

을 현저하게 억제하는 것으로 확인할 수 있었다. 이는 G-NANA와 S-NANA가 활성화된 대식세포의 NO 생성시 필수적으로 요구되는 iNOS의 전사과정을 억제하고, 전사 관련 신호 전달과정 및 전사조절인자의 활성을 억제할 수 있다는 것을 시사하고 있다.

또한 G-NANA와 S-NANA는 iNOS외 다른 전사인자인 COX-2 및 TNF- $\alpha$  활성 역시 억제하여 항염 활성을 가진 염증 억제제로서의 기능이 있다는 것을 확인하였다.

### 3. G-NANA와 S-NANA의 Anti-proinflammatory 효과

TNF- $\alpha$ 는 T cell, B cell, 내피세포, monocyte 및 macrophage를 포함하는 다양한 세포에서 분비되는 cytokine이며(Zamora *et al.*, 2000), 이는 IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ 와 같은 cytokine이나 LPS와 같은 여러 가지 자극에 의해서 발현된다. TNF- $\alpha$ 는 B cell의 항체 생성을 촉진시키고, T cell의 분화를 유도하며 염증반응을 심화시키는 것으로 알려져 있다(Garman *et al.*, 1987; Muraguchi *et al.*, 1988; Park *et al.*, 2007).

본 실험 결과에서 G-NANA와 S-NANA은 LPS로 자극된 쥐의 복강 대식세포에서의 TNF- $\alpha$ 의 분비를 효과적으로 감소시켰다. 이 결과를 바탕으로 G-NANA와 S-NANA은 이러

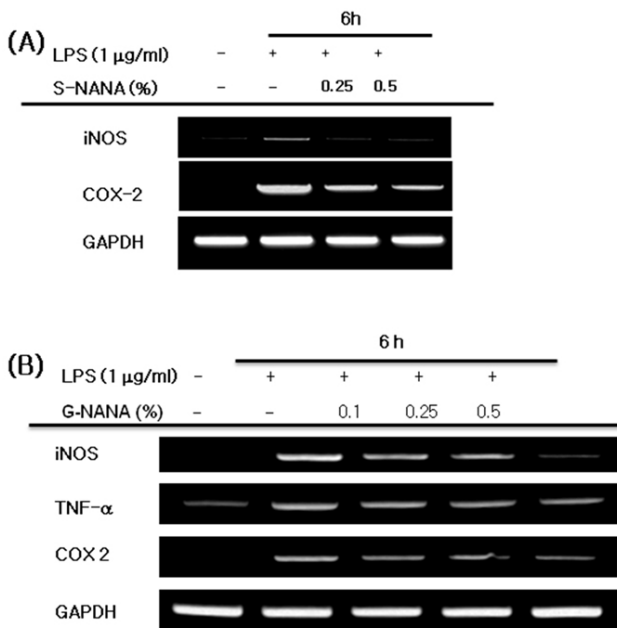


Fig. 5. The effect of RHS-146 on the expression of iNOS, COX-2 and TNF- $\alpha$  in LPS-treated RAW264.7 cells. (A-B) RAW264.7 cells ( $5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) were incubated with G-NANA or NANA in the presence or absence of LPS ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) for 6 h. Levels of mRNA for iNOS, COX-2 and TNF- $\alpha$  were determined by semi- quantitative PCR. The results shown are representative of three independent experiments.

한 염증성 cytokine의 분비 억제를 통해 염증성 신호 전달을 차단하여 결과적으로 염증반응을 억제할 것으로 생각된다 (Fig. 5A-B).

이에 본 연구팀은 mRNA 수준이 아닌 단백질 수준에서는 G-NANA와 S-NANA가 어떤 작용을 나타내는 연구하고자 Immunoblot analysis를 통해 확인하고자 하였다.

### 4. 표적단백질 발현량에 G-NANA와 S-NANA가 미치는 효과

본 연구팀은 G-NANA와 S-NANA 처리시 LPS에 의해 인산화 되고 활성화 되는 표적 단백질 발현에 G-NANA와 S-NANA가 미치는 효과를 알아보기 위하여 핵 내 단백질과 세포 내 염증에 영향을 미치는 단백질들을 Immunoblot analysis를 통해 확인하였다.

Fig. 7A-B를 보면 합성 NANA의 경우 핵 내 단백질 발현에 아무런 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다, 이와 반

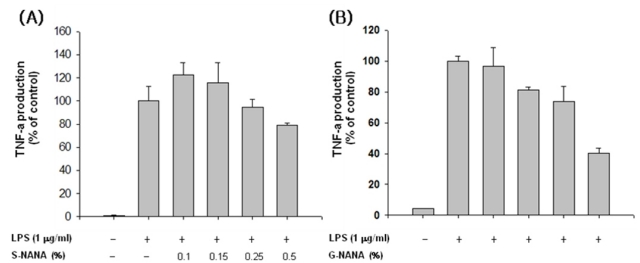


Fig. 6. Effect of NANA on the LPS-stimulated TNF- $\alpha$  secretion from RAW264.7 cells (A-B). Cells were treated with G-NANA or NANA in the presence of LPS for 6 and 12 hrs at 37 $^{\circ}\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$ . The TNF- $\alpha$  released into incubation media was detected by ELISA assay. The data was expressed as the mean $\pm$ S.D. (n=9, \* $P < 0.05$  as compared with only LPS group).

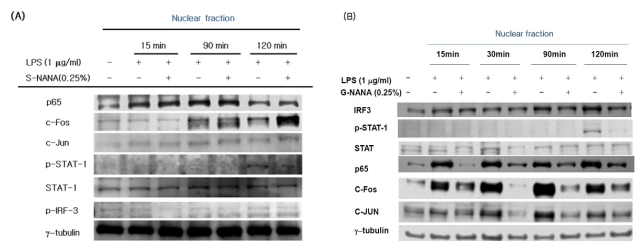


Fig. 7. The effect of G-NANA or NANA on the nuclear translocation of total or phospho-form of transcription factors. (A-B) RAW264.7 cells ( $5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) were incubated with G-NANA or NANA in the presence or absence of LPS ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) for the indicated times. After preparing nuclear fractions, translocated levels of total or phospho-forms of transcription factors (p65, c-Fos, c-Jun, IRF-3, and STAT-1) were identified by immunoblotting. The results shown are representative of three independent experiments.

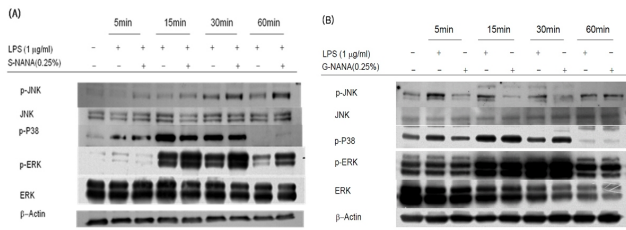


Fig. 8. effect of G-NANA or NANA on the whole lysate of total or phospho-form of transcription factors. (A-B) RAW264.7 cells ( $5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) were incubated with G-NANA or NANA in the presence or absence of LPS ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) for the indicated times. After preparing whole lysates, levels of total or phospho-forms of upstream signaling enzymes (ERK, JNK, and  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ) were identified by immunoblotting. The results shown are representative of three independent experiments.

대로 G-NANA의 경우 염증 신호전달에 주요 경로인 MAPK kinase 중 LPS에 의해 활성화 되는 c-Fos와 c-JUN을 강력하게 억제하는 것을 확인하였다. 이에 본 연구팀은 RAW264.7 세포에 NANA을 처리하고, LPS 0.1 mg/mL로 처리하여 5분, 15분, 30분 및 90분간 배양하여 whole lysate를 얻어 LPS에 의해 나타나는 신호경로에 대한 대표 표적 단백질들에 대해 실험을 실시하였다.

Fig. 8A-B와 같이 whole lysate에서도 합성 NANA의 경우 단백질 발현을 저해하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 반면, G-NANA의 경우 c-Fos와 c-JUN의 상위단백질인 JNK의 활성을 억제하는 것으로 알 수 있었다.

이상의 연구결과를 종합해 보면 G-NANA와 S-NANA은 쥐의 복강 대 식세포 모델에서 LPS에 의해 생성된 NO를 유의적으로 억제하였으며, 이는 iNOS 발현의 감소에서 기인함을 확인하였다. G-NANA와 S-NANA는  $\text{TNF-}\alpha$ 의 발현 역시 농도 의존적으로 감소시켰다. 더욱이 G-NANA는 단백질 수준에서 MAPK Kinase를 억제함을 보였다.

**결론 및 토론**

따라서, 본 연구팀은 G-NANA와 S-NANA 항염증 활성 및 안전성을 알아보기 위해 쥐의 복강 대식세포주인 RAW264.7 세포를 LPS로 활성화시킨 후 세포독성 그리고 NO의 생성량 및 iNOS와 COX-2의 발현량,  $\text{TNF-}\alpha$  분비량에 G-NANA와 S-NANA가 미치는 영향을 살펴보았다. G-NANA와 S-NANA은 LPS에 의해 생성된 NO를 농도 의존적으로 감소시켰으며, 이는 G-NANA와 S-NANA의 세포독성에서 기인한 것이 아님을 확인하였다. 또한, 우유 유래 GMP에서 분리한 G-NANA가 합성으로 만들어진 NANA에 비해 안정성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 또한 G-NANA와 S-NANA에 의해 iNOS,

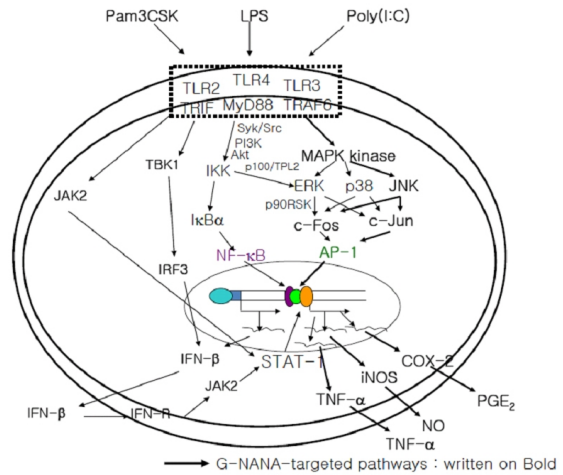


Fig. 9. Schematic of the proposed mechanism of inhibition by G-NANA.

$\text{TNF-}\alpha$ 와 COX-2의 발현량 역시 억제되는 것을 확인하였고, 염증성 cytokine인  $\text{TNF-}\alpha$ 를 효과적으로 억제하였다.

결과를 종합해 G-NANA와 S-NANA가 유사하게 항염증 효과를 나타내는 것을 확인하였지만, G-NANA가 합성 NANA에 비해 LPS에 의해 유발되어지는 메커니즘에 MAPK 신호전달 과정을 조절하여 항염증 효과를 나타내는 것이 우수하다는 것을 확인하였으며(Fig. 9), 이러한 결과로 보아, G-NANA와 S-NANA는 유사하게 항염증 활성을 가지지만 합성이 아닌 천연물질로서 G-NANA가 안전성을 보유한 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

**감사의 글**

농림수산식품연구개발사업[과제번호: 109116-3, 연구과제 책임자: 매일유업(주) 중앙연구소 김희경] 연구비로 연구된 결과이며 연구비 지원에 감사드립니다.

또 연구가 원활이 수행될 수 있도록 협조하여 주신 아미코젠(주) 관계자 분들에게 감사드립니다.

**참고문헌**

1. Cetkovic-Cvrlje, M. and Eizirik, D. L. 1994.  $\text{TNF}$  and  $\text{IFN } \gamma$  potentiate the deleterious effects of  $\text{IL-1 } \beta$  in mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine* 6:399-406.
2. Corbett, J. A. and MacDaniel, M. L. 1995. Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. *J. Exp. Med.* 181:559-568.

3. Delgado, A. V., McManus, A. T. and Chambers, J. P. 2003. Production of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 1- $\beta$ , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* 37: 355-361.
4. Fu, J. Y., Masferrer, J. L., Seibert, K., Raz, A. and Needleman, P. 1990. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 265:16737-16740.
5. Garman, R. D., Jacobs, K. A., Clark, S. C. and Raulet, D. H. 1987. B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7629-7633.
6. Higuchi, M., Higashi, 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. Immunol.* 144: 1425-1431.
7. Lee, Y. S., Kim, H. S., Kim, H. S. and Kim, S. D. 2000. IL-6 mRNA expression in mouse peritoneal macrophages and NIH3T3 fibroblast in response to *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10:8-15.
8. McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., 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.
9. McDaniel, M. L., Kwon, G., Hill, J. R., Marshall, C. A. and Corbett, J. A. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211: 24-32.
10. Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. and Kishimoto, T. 1988. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.* 167: 332-344.
11. Park, J. Y. and Pillinger, M. H. 2007. Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bull. NYU. Hosp. Jt. Dis.* 65:4-10.
12. Phan, H. M., Alpert, J. S. and Fain, M. F. 2008. Inflammation, and cardiovascular disease: Evidence of a connection. *Am. J. Geriatr. Cardio.* 17:101-107.
13. Salvemini, D., Korb, R., Anggard, E. and Vane, J. 1990. Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:2593-2597.
14. Stuehr, D. J., Cho, H. J., Kwon, N. S., Weise, M. F. and Nathan, C. F. 1991. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7773-7777.
15. Ting, S., Lee, Y. J. and Cho, J. Y. 2008. Effect of hot water extract from *Scutellaria barbato* on the macrophage activated by lipopolysaccharide. *Korea J. Medicinal Crop Sci.* 16(5): 313-319.
16. Trowbridge, H. O. and Emling, R. C. Inflammation: A review of the process, 5th Ed. Quintessence Pub. Co., Chicago.
17. Weisz, A., Cicatiello, L. and Esumi, H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- $\gamma$ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* 316:209-215.
18. Zamora, R., Vodovotz, Y. and Billiar, T. R. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol. Med.* 6:347-373.

---

(Received 2011.9.28/Revised 2011.11.1/Accepted 2011.11.7)