



Anti-inflammatory effect of soil blue-green algae *Nostoc commune* isolated from Daejeon National Cemetery

Hyehyun Hong¹ · Eun Hee Bae² · Tae-Jin Park¹ · Min-Sung Kang¹ ·
Jae Shin Kang² · Won-Jae Chi² · Seung-Young Kim¹

국립대전현충원에서 분리한 남조류 구슬말(*Nostoc commune*)의 항염증 효과

홍혜현¹ · 배은희² · 박태진¹ · 강민성¹ · 강제신² · 지원재² · 김승영¹

Received: 17 March 2022 / Accepted: 25 May 2022 / Published Online: 30 June 2022
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2022

Abstract We examined the anti-inflammatory properties of *Nostoc commune* HCW0811 in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophage cells. The anti-inflammatory activity of HCW0811 on viability of treated cells was assessed by measuring the level of expression of NO, prostaglandin E₂ and pro-inflammatory cytokines, namely interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in HCW0811 treated RAW 264.7 macrophages. HCW0811 was non-toxic to cells and inhibited the production of cytokines in a concentration-dependent manner. In addition its treatment suppressed the production of pro-inflammatory cytokines in a dose-dependent manner, and concomitantly decreased the protein expressions of inducible NO synthase and cyclooxygenase-2. Moreover, the levels of the phosphorylation of mitogen-activated protein kinase family proteins such as

extracellular signal-regulated kinase, c-Jun N-terminal kinase, p38, and nuclear factor kappa B were reduced by HCW0811. These findings suggest that the HCW0811 collected from Daejeon National Cemetery have anti-inflammatory effects, and demonstrated its efficacy in cell-based *in vitro* assays.

Keywords Anti-inflammatory · Cyanobacteria · MAPK · *Nostoc commune*

서론

염증은 독성물질, 손상된 조직과 병원균의 감염 등의 유해한 자극으로부터 신체를 방어하기 위해 가장 먼저 일어나는 병리학 적 반응으로 다양한 면역세포가 염증 매개 인자를 발현하여 외부 감염에 대해 반응을 하는 복잡한 과정이다[1-3]. 일반적으로 염증은 초기 단계에서 세포의 손상을 억제하고 손상된 조직을 회복하는 등 자가 치유에 목적을 두고 있으나 최근 환경 변화 및 스트레스 증가에 따른 과도하고 지속적인 염증 반응이 세포 및 조직의 기능장애, 뇌 질환, 아토피, 암, 심혈관 질환 등 다양한 염증성 질환의 원인으로 밝혀지면서 인체에 부정적인 이 면이 부각되고 있다[4-7]. 인체 내 주요 염증 세포인 대식세포는 그람 음성균 외벽의 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 강력한 면역 활성 물질에 의해 자극 받아 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), leukotriene, 전 염증성 사이토카인을 포함한 여러 염증매개물질을 합성 및 분비하여 면역반응을 조절 하는 것으로 보고되었으며[8-12] 이러한 매개물질의 발현을 조절하는 대

Hyehyun Hong and Eun Hee Bae are contributed equally to this work.

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

¹Department of Pharmaceutical Engineering & Biotechnology, Sunmoon University, Asan 31460, Republic of Korea

²Microorganism Resources Division, Biological Resources Research Department, National Institute of Biological Resources, Incheon 22689, 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.

표적인 신호전달 경로로는 Mitogen-activated protein (MAP) kinase와 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)가 알려져 있다[13,14]. 활성화 된 대식세포에서 MAP kinase family인 p38, extracellular signal regulated kinase (ERK) 1/2, c-Jun N-terminal kinase (JNK)의 인산화는 염증 매개체 합성에 관여하여 cytokine 생성을 촉진하고 염증반응을 증가시키며[15,16] NF- κ B는 여러 염증성 매개체의 유전자 발현을 유도하는 전사인자로서, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 유도하는 전사인자로서 작용한다[17,18]. 특히 NF- κ B 활성화로 유도되는 iNOS의 발현은 macrophage에서 NO가 과잉 생산되는 중요한 메커니즘으로 염증 반응 과정에서 iNOS로부터 과 발현된 NO는 류마티스 관절염 및 암을 포함한 여러 질환의 원인으로 알려져 있다[19,20]. 또한 iNOS와 함께 발현되는 COX-2는 PGE₂의 생성을 촉진하여 중양의 세포사멸을 억제하고 혈관 생성을 유도하는 등 중앙 생성과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다[21]. 이는 MAP kinase와 NF- κ B의 인산화 억제를 통해 iNOS 및 COX-2의 발현을 감소시키고 전 염증성 사이토카인의 합성과 분비를 억제함으로써 효과적인 항염증 효능을 유도 할 수 있음을 의미한다. 따라서 현재 이러한 염증 인자들을 찾아 조절 및 제거하고 기전을 밝히기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[22-24].

남조류는 선캄브리아시대부터 대기중 산소공급에 중요한 역할을 한 광합성 원핵생물로 생태계 내에서 중요한 1차생산자 역할을 하며 극지, 사막에 이르기까지 다양한 육상 및 수생 환경에서 서식하고 있다[25]. 또한 항균 및 항 바이러스 활성을 가진 tolyporphin, laxaphycin, indolocarbazole 등의 성분을 포함하는 것으로도 보고되었다[26,27]. 남조류의 일종인 구슬말(*Nostoc commune* Vaucher ex Bornet & Flahault)은 남조류 구슬말목 (Nostocales) 구슬말과 (Nostocaceae)에 속하며 이형세포를 갖는 특징으로 다른 목들과 구분되는데 극지방에서 열대 지역까지 광범위한 지역에 분포하며 단세포가 연결되어 형성된 수많은 trichome들이 점액질에 둘러 쌓인 형태로 커다란 군체를 형성하고 주로 토양, 암반, 잔디 위 등에 서식한다고 알려져 있다[28]. 2021년 국가생물종목록 기준으로 우리나라에는 구슬말속 10종이 보고되어 있으나, 흔히 관찰되지 않고 연구가 거의 없는 실정이다. 이에 본 연구에서는 산업적으로 유용한 신규 생물 소재를 탐색하기 위해 그 동안 연구가 많이 이뤄지지 않은 토양 남조류를 분리·동정하였으며 분리한 *N. commune* HCW0811의 추출물의 항염증 활성을 조사 하고자 하였다. 이에 LPS로 유도된 RAW 264.7세포에서 NO, PGE₂, 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 염증성 사이토카인의 억제 활성을 측정하였으며, western blot assay를 통해 iNOS, COX-2 및 MAP kinase 의 NF- κ B 세포내 신호전달 경로에서의 단백질 발현을 확인하였다.

재료 및 방법

남조류의 분리 및 동정

대전시 국립대전현충원 내 묘역 잔디에 착생하여 서식하는 암녹색 남조류를 채취하여 분리 배양한 strain을 HCW0811로 명

명하였으며, 광학현미경을 사용하여 세포의 형태적 특성을 관찰하였다 (Olympus BX 50). 형태적 특성을 토대로 남조류로 파악하고 남조류 특이적 primer CYA106F (CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA)와 FDSKS_CyaR1 (CACCTTCCGGTACGGCTACCTTG)[29,30]를 사용한 polymerase chain reaction을 통해 약 1.3 kb의 16S rRNA 유전자를 증폭 부위를 증폭하였다. 이후 증폭된 약 1.3 kb의 DNA 단편을 제노텍(주)에 의뢰하여 염기서열을 해독하였으며 HCW0811의 16S rRNA 유전자 서열은 우선 NCBI database에서 상동성을 검색하고 *Nostoc* 속의 종과 근연한 속과의 계통을 분석하기 위해 Mega X 프로그램으로 align하고 계통 분석을 실시하였다. Pairwise distance는 maximum composite likelihood model로 계산하고, maximum likelihood (ML) tree는 bootstrap method로 1000회 반복 테스트하였다.

HCW0811 추출물 제조

건조 된 HCW0811 분말 1g에 70% ethanol 500 mL을 가하여 상온에서 48시간 동안 2회 반복하여 추출하였다. 회수한 1차 추출물과 2차 추출물을 혼합 하여 5.0 μ m의 공극 크기를 갖는 paper filter (Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, Japan)로 여과하였다. 이후, 여과액을 ethyl acetate로 분획한 뒤 감압농축기로 분말화하여 실험에 사용하였다.

실험 재료 및 세포배양

본 실험에 사용 된 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행에서 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, NY, USA)과 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, NY, USA)을 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건의 incubator 에서 배양 하였다. 2일을 주기로 계대 배양을 시행하여 안정화 하였으며 염증 유발을 위해 사용 된 LPS는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

세포 독성 측정

HCW0811의 세포 독성은 MTT assay를 이용한 cell viability assay를 통해 측정하였다. 24-well plate에 RAW 264.7 세포를 8.0×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 전 배양 한 뒤 희석한 HCW0811 (12.5, 25, 50 μ g/mL)와 LPS (1 μ g/mL)를 동시 처리하여 동일한 배양 조건하에 24시간 동안 염증을 유도하였다. 반응 종료 후 MTT 시약을 첨가하여 incubator에서 2시간 동안 반응하였으며 각 well에 형성된 formazan blue를 DMSO로 용해시킨 후 ELISA reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

NO 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 8.0×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 전 배양한 후 희석한 HCW0811 (12.5, 25, 50 μ g/mL)와 LPS (1 μ g/mL)를 동시 처리하여 동일한 배양 조건하에 24시간 동안 염증을 유도하였다. 이후 세포배양 상층액 100 μ L와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100 μ L을 96-well plate에서

동량 혼합하여 10분간 암반응 시킨 후 ELISA reader를 사용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell 을 24-well plate에 8.0×10^4 cells/well 농도로 분주한 뒤 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 전 배양한 후 LPS (1 µg/mL)와 희석된 HCW0811 (12.5, 25, 50 µg/mL)를 동시 처리하여 동일한 조건하에 24시간 동안 염증을 유도하였다. 반응 종료 후 세포배양 상층액은 centrifuge (10,000 rpm, 3 min) 하여 침전물을 제거하였으며 회수한 상층액에 존재하는 PGE₂의 함량은 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

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

264.7 세포를 24-well plate에 8.0×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 CO₂ incubator (37 °C, 5% CO₂)조건에서 24시간 배양한 후, 희석한 HCW0811 (12.5, 25, 50 µg/mL)와 LPS (1 µg/mL)를 동시 처리하여 동일한 조건하에 24시간 동안 염증을 유도하였다. 이후 회수한 세포배양 상층액을 원심분리(10,000 rpm, 3 min)하여 침전물을 제거하였으며 회수한 상층액 내에 존재하는 전염증성 사이토카인의 함량을 Mouse TNF-α ELISA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Mouse IL-6 ELISA Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), Mouse IL-1β ELISA Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용해 측정 하였다.

Western blot analysis

RAW 264.7 cell을 6-well plate에 4×10^5 cells/well의 농도로 분주하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 전 배양한 후, 희석된 HCW0811 (12.5, 25, 50 µg/mL)와 LPS (1 µg/mL)를 동시 처리하여 동일한 조건하에 24시간 동안 염증을 유도하였다. 이후 세포를 PBS를 이용하여 2회 세척한 뒤, lysis buffer [1×RIPA (Upstate Cell Signaling Solution, NY, USA), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL pepstatin, and 1 µg/mL leupeptin]를 처리하여 1시간 동안 lysis를 진행 하여 이후 원심 분리 (12,000 rpm, 30 min) 과정을 거쳐 상층액과 pellet을 분리하였다. BCA kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량 한 20 µg의 단백질을 10% polyacrylamide를 함유한 10% SDS-PAGE에서 전기영동 한 뒤, poly-vinylidene difluoride membrane (Milipore, Burlington, MA, USA)에 전이하였으며, 전이가 종료된 membrane은 5% skim milk (sol. TBST)에 넣고 상온에서 1시간 30분 동안 blocking을 시행하였다. 이후 TBST로 10분간 3회 세척한 뒤, 1차 항체 반응은 TBST로 희석된 iNOS antibody (1:1,000, Bio-Rad), COX-2 antibody (1:1,000, Rockland Immunochemicals, Inc. USA), phospho-ERK1/2 antibody, phospho-SAPK/JNK (Thr180/Tyr185) antibody, phospho-p38 antibody, IκB-α antibody, phospho-NF-κB antibody (1:1,000, Cell signaling Tech, Danvers, MA, USA), β-actin antibody clone AC-74 (1:1,000, Sigma)에 담구어 4 °C에서 하루 밤 동안 반응 하였다. 반응 후 TBST 용액으로 4회 세척한 membran을 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체 (Jackson

ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)를 1:5,000 비율로 희석하여 90분 동안 반응한 뒤 TBST로 10분간 3회 세척하여 ECL kit (Bio-Rad)로 반응시켰으며 imaging densitometer (model GS-700, Bio-Rad)를 통해 현상하였다. 또한 현상된 단백질 발현량은 imageJ program (NIH, Bethesda, MD, USA)을 통해 면적을 수치화하여 그래프로 나타내었다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였으며 그 결과는 평균값±표준편차로 나타내었다. 또한 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 시행하였다.

결 과

남조류의 동정 결과

국립대천현충원에서 채집한 HCW0811은 암녹색을 띤 남조류로 구분되며 광학현미경으로 원형의 세포가 여러 개 연결된 다수의 trichome이 점액질에 둘러싸여 몇 cm에 달하는 커다란 군체를 형성하는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 또한 이러한 trichome 중에는 일반 세포보다 크기가 큰 이형세포(heterocyst)가 관찰되어 Nostocales (구슬말목)의 특징을 보였다 (Fig. 1B). 남조류의 특이적 프라이머로 증폭된 약 1.3 kb의 DNA 단편으로부터 확보된 HCW0811의 1,289 bp의 염기서열 정보를 토대로 NCBI database에서 상동성 검색을 수행한 결과, 일본에서 보고된 *Nostoc commune* HK-02 [31]와 *N. commune* YK-04 (GenBank no. AB694928), 멕시코에서 보고된 *N. commune* ACT709 [32] 등과 각각 99.77, 99.54, 98.37%의 높은 상동성을 보였다. HCW0811과 *Nostoc* 속의 종들 *N. flagelliforme* CCNUN1 [33], *N. sphaeroides* CCNUN1 (CP024785), *N. edaphicum* CCNUN1 (CP045226)과는 pairwise distance가 약 2% 내의 차이를 보여 *Nostoc* 속의 종 간에는 16S 유전자의 변이가 매우 적었다. HCW0811는 Nostocaceae (구슬말목)에 최근 새로 보고된 속인 *Violetonostoc minutum* CHAB5840 (MN400069)과는 pairwise distance가 5.5%, *Minunostoc cylindricum* CHAB5843 (MH918062)와는 7.1%로 속간에는 종간에 비해 유전적으로 뚜렷이 구분되었다(Fig. 1C). 채색이 보라색인 *Violetonostoc*, 세포 형태가 원통형인 *Minunostoc*에 비해 HCW0811는 암녹색이고 동그란 형태의 세포 모양으로 뚜렷한 차이가 있었다. 따라서 HCW0811는 이형세포를 가지는 Nostocales에 속하며 커다란 군체를 형성하고 동그란 세포가 연결된 trichome으로 가득 차 있으며 *N. commune*과 유전적으로 일본지역에 서식하는 *N. commune*와도 가장 가까워 HCW0811를 남조류 *Nostoc commune* Vaucher ex Bornet & Flahault로 동정하였다. NCBI database에 등록된 16S 유전자 서열명은 *Nostoc commune* HCW20200728이고, 실험에 사용된 시료명은 HCW0811이다 (GenBank no. OL679911).

세포 독성 비교 측정

LPS에 의해 유도된 RAW264.7 세포에서 HCW0811이 세포 생존에 미치는 영향을 조사하기 위해 MTT assay를 시행하였다.

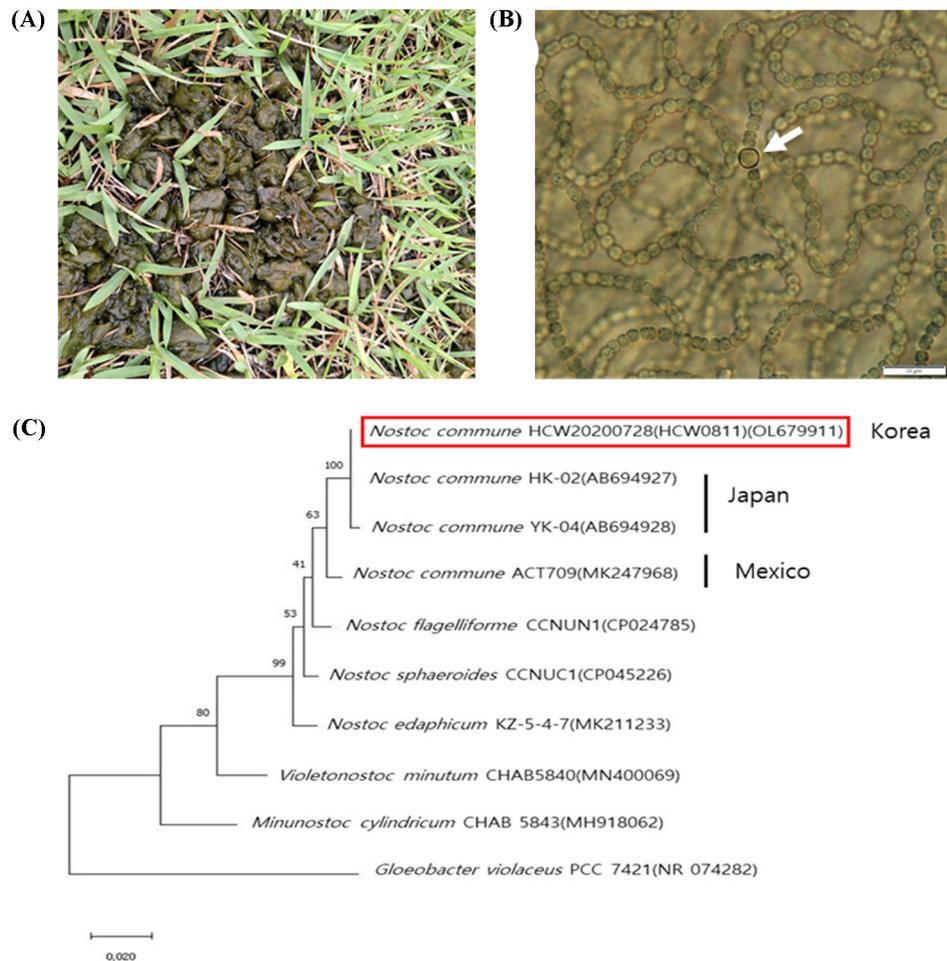


Fig. 1 Morphology and molecular phylogenetic relationship of HCW0811. (A) Natural habit of macrophytic *Nostoc commune* HCW0811 colony. (B) Microscopic morphology of *Nostoc commune* HCW0811 colony. The connecting cells formed thread-like trichomes. The bigger round cell was heterocyst for nitrogen fixation metabolism (arrow). Scale bar represents 20 μm. (C) Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene partial sequences aligned 1,296 bp showing the genetic position of *Nostoc commune* HCW0811 of Daejeon, Korea compared with other geographical populations (Japan, Mexico) and related genera *Violetonostoc* and *Minunostoc* among family Notoceaceae. Numbers indicate bootstrap value (>50%) from 1,000 replicates maximum likelihood (ML) analysis. GenBank accession numbers are shown in parentheses. (scale bar: 0.02 nucleotide substitutions per site)

HCW0811를 12.5, 25, 50 μg/mL 농도로 처리하여 24시간 배양한 후 세포 생존율을 조사한 결과, 모든 테스트 농도에서 85% 이상의 세포 생존율이 확인되었다(Fig. 2). 따라서 추후 실험은 12.5, 25, 50 μg/mL 농도를 사용하여 진행하였다.

NO 생성 억제 활성 비교

LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 HCW0811이 NO의 생성에 미치는 영향을 조사하고자 시행되었다. LPS (1 μg/mL)와 HCW0811을 12.5, 25, 50 μg/mL 농도로 동시 처리한 뒤 griess reagent (Sigma-Aldrich)를 이용하여 세포 배양액에 존재하는 NO²의 양을 측정하였다. 그 결과 HCW0811은 LPS 단독 처리군과 비교하였을 때 NO 생성을 12.5, 25 μg/mL에서 각각 10.9, 28.0% 억제 하였으며 가장 고농도인 50 μg/mL에서 58.9% 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

PGE₂ 생성 억제 활성

LPS 자극에 의해 유도된 RAW 264.7 세포에서 HCW0811이 PGE₂의 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 실험을 진행한 결과 HCW0811은 각 농도에서 LPS 단독 처리군과 비교하였을 때 PGE₂의 생성을 10.4, 36.5, 45.3% 억제하였다(Fig. 4).

iNOS 및 COX-2 발현 억제

본 실험에서는 NO와 PGE₂의 생성에 관여하는 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현에 HCW0811이 미치는 영향과 이들의 연관관계를 조사하고자 western blot assay를 시행하였다. LPS (1 μg/ml)로 자극한 RAW 264.7 세포에 HCW0811을 12.5, 25, 50 μg/mL 농도로 처리하여 24시간 염증을 유도한 후 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현을 확인한 결과 HCW0811을 처리한 RAW 264.7세포에서 LPS 단독 처리군과 비교하였을 때 25, 50

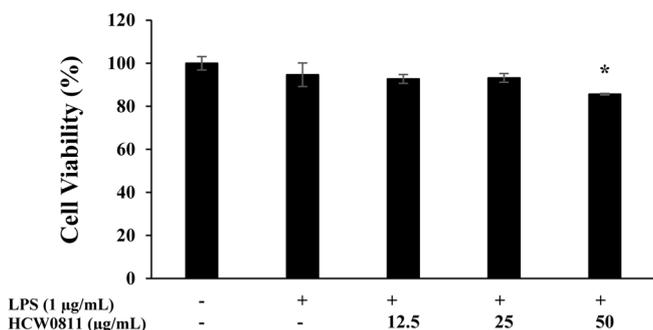


Fig. 2 Inhibitory effects of HCW0811 on cell viability in RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 h in the presence of HCW0811 (12.5, 25, 50 µg/mL). Cytotoxicity was determined by MTT assay. Result is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control. Data represent the means ± SD with three separate experiments. **p* < 0.05; ***p* < 0.01

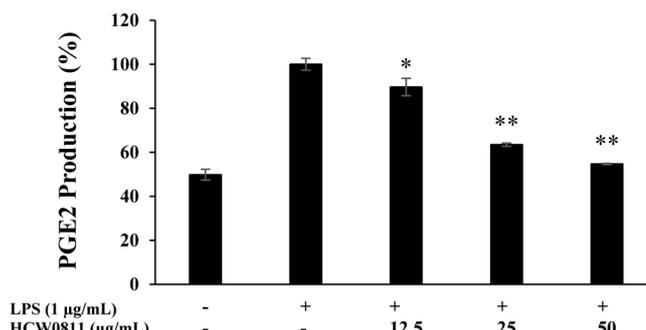


Fig. 4 Inhibitory effects of HCW0811 on PGE₂ production in RAW 264.7 cells. The production of PGE₂ was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 h in the presence of HCW0811 (12.5, 25, 50 µg/mL). Result is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control. Data represent the means ± SD with three separate experiments. **p* < 0.05; ***p* < 0.01

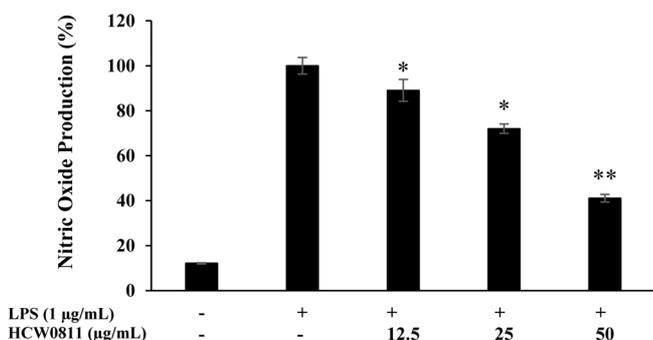


Fig. 3 Inhibitory effects of HCW0811 on nitric oxide production in RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 h in the presence of HCW0811 (12.5, 25, 50 µg/mL). Result is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control. Data represent the means ± SD with three separate experiments. **p* < 0.05; ***p* < 0.01

µg/mL 농도에서 iNOS의 발현이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. iNOS 발현과 NO 감소 양상이 유사한 것으로 보아 HCW0811 처리에 의한 NO 감소 활성은 iNOS의 발현과 밀접한 관련이 있음을 확인하였다(Fig. 5A). 또한 prostaglandin 생합성의 전구체인 arachidonic acid로부터 PGE₂를 생성하는 것으로 알려진 COX-2와 PGE₂의 연관성을 확인하기 위해 COX-2 발현량을 확인한 결과 PGE₂ 감소량과 유사한 감소 양상을 확인하였다(Fig. 5B). 이와 같은 결과를 근거로 HCW0811은 iNOS와 COX-2의 유전자 발현을 억제함으로써 NO 및 PGE₂의 생성을 제어하는 것으로 사료된다.

전염증성 사이토카인 생성 억제

HCW0811이 LPS으로 유도된 RAW 264.7 세포에서 전염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 조사하기 한 결과 12.5, 25, 50 µg/mL 농도로 처리 된 HCW0811은 LPS 처리군과 비교하였을 때 TNF-α의 생성을 각각 9.4, 25.8, 34.1% 억제하였고 IL-6의 생성은 25, 50 µg/mL 농도에서 각각 37.9, 64.3% 억제하였으며 IL-1β의 생

성을 25, 50 µg/mL 농도에서 26.2, 41.1% 억제하였다(Fig. 6).

MAPKs 및 NF-κB기전 억제

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 HCW0811을 처리하여 p38, JNK, ERK1/2의 인산화를 확인한 결과 p38, JNK, ERK 1/2의 인산화가 농도 의존적으로 감소하는 양상을 확인하였다(Fig. 7A, B, C). 또한 NF-κB의 활성화 지표인 IκB-α의 degradation 확인 결과, LPS 단독 처리군에서 가장 degradation 되었으며 HCW0811을 처리한 RAW 264.7 세포에서 농도 의존적으로 IκB-α의 degradation이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 7D, E).

고찰

본 연구는 LPS로 유도된 대식세포의 염증반응에서 HCW0811이 미치는 영향을 조사하여 염증성 질환의 치료 및 항염증 기능성 화장품 개발을 위한 가능성을 검증하고자 시행되었다. 이에 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증을 유도한 후 HCW0811을 12.5, 25, 50 µg/mL 농도로 처리하여 NO, PGE₂의 생성 억제를 조사한 결과 NO, PGE₂의 생성이 효과적으로 억제 되었음을 확인하였다. 이후 western blot assay를 통해 iNOS와 COX-2의 발현을 조사한 결과 HCW0811은 NO, PGE₂와 마찬가지로 iNOS와 COX-2의 발현을 유의하게 억제하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 HCW0811의 항염증 활성이 iNOS와 COX-2 발현 억제에 의한 NO, PGE₂의 생성 감소로부터 유도된 것임을 입증하며 HCW0811은 COX-2 발현 억제를 통한 PGE₂의 감소에 더 효과적임을 확인하였다. 또한 염증 발생 시 대식세포에서는 세포를 보호하기 위하여 NO와 PGE₂와 같은 염증 매개물 이외에 전염증성 사이토카인(TNF-α 및 IL-1β, IL-6)을 분비하는데 과도한 염증성 사이토카인의 분비는 염증을 심화하고 패혈증과 같은 염증성 질환을 유발한다. HCW0811은 TNF-α 및 IL-1β, IL-6의 생성을 억제하였으며 IL-6에서 가장 유효한 활성을 갖는 것을 확인하였다. 이러한 염증 매개 물질의 발현을 조절하는 주요 경로에는 MAP kinase와 NF-κB 신호 전달 경로가 있으며 HCW0811이 두 신호 전달 경

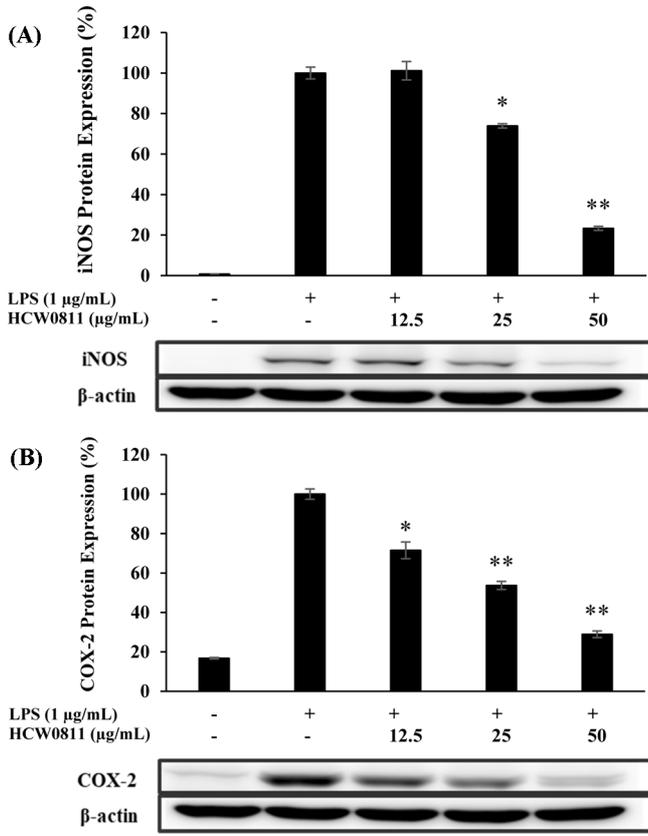


Fig. 5 Inhibitory effects of HCW0811 on the protein level of iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (A) iNOS, (B) COX-2. Cells (4×10^5 cells/well) were pre-incubated for 24 h, and then treated with LPS (1 µg/mL) and Sample for 24 h. The protein levels of iNOS, COX-2 were analyzed by western blot. β -Actin was used as the control. Data represent the means \pm SD with three separate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

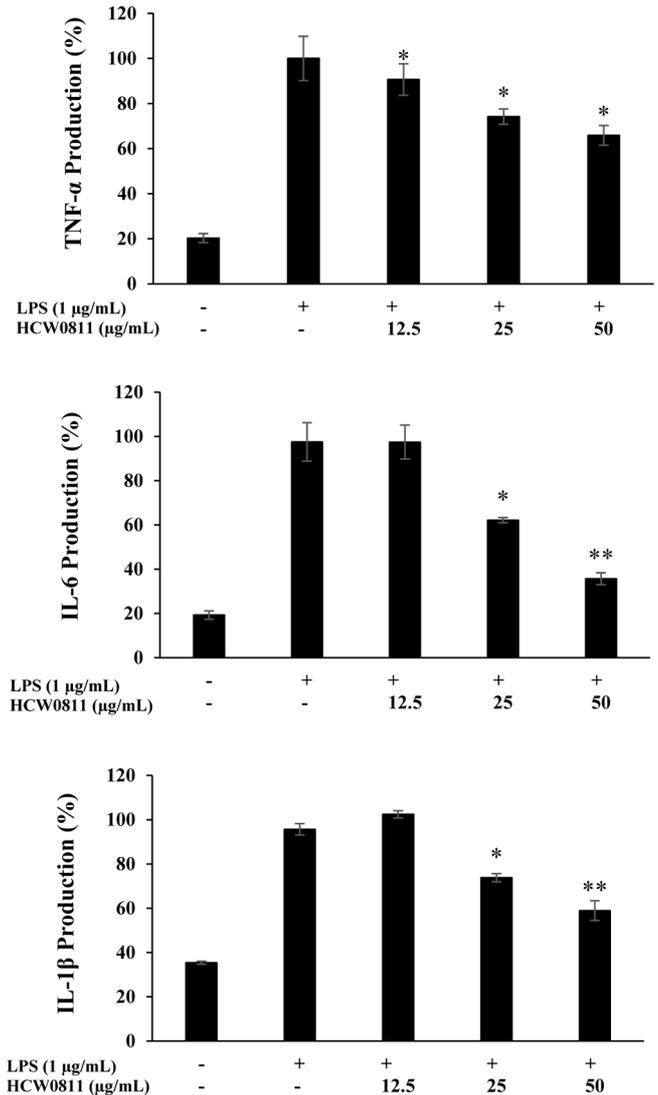


Fig. 6 Inhibitory effects of HCW0811 on production of pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells. The production of (A) TNF- α , (B) IL-6, and (C) IL-1 β was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 h in the presence of HCW0811 (12.5, 25, 50 µg/mL). Results are expressed as a percentage of the control. Data represent the means \pm SD with three separate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

로에 미치는 영향을 알아보기 위해 p38, JNK, ERK 1/2 인산화 및 I κ B- α 의 발현을 확인하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군 대비 p38, JNK, ERK 1/2의 인산화가 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인 하였으며 NF- κ B의 인산화 및 I κ B- α 의 degradation 또한 감소하는 것을 확인하였다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때 HCW0811는 p38, ERK1/2, JNK의 인산화 및 NF- κ B의 활성 조절함으로써 NO와 전염증성 cytokine의 생산을 억제하여 항염증 효과를 나타내는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 HCW0811가 다양한 신호전달경로를 억제하여 염증 인자를 표적으로 하는 피부 면역 질환의 개선 및 치료와 여러 염증성 질환을 예방하기위한 항염증 기능성 화장품 및 식품소재로의 개발가능성을 시사하며 추후 HCW0811가 더욱 효과적인 항염증 소재로 적용되기 위해서는 유효 화합물의 분리과 동정에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

초 록

구슬말(*Nostoc commune* Vaucher ex Bornet & Flahault)은 이

형세포를 갖는 특징으로 다른 목들과 구분되는 남조류의 일종으로 극지방에서 열대지역까지 광범위한 지역에 분포하며 단세포가 연결되어 형성된 수많은 trichome들이 점액질에 둘러 쌓인 형태로 커다란 군체를 형성한다. 주로 토양, 암반, 잔디 위 등에서 식한다고 알려져 있으나 흔히 관찰되지 않기 때문에 현재 연구가 거의 없는 실정이다. 이에 본 연구에서는 토양 남조류인 *N. commune* HCW0811을 분리 및 동정하였으며 항염증 활성을 조사 하고자 하였다. 그 결과 *N. commune* HCW0811는 LPS로 유도된 RAW 264.7세포에서 80%이상의 세포 생존율을 나타내었으며 NO, PGE2 및 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성을 효과적으로 억제하였다. 또한 western blot assay를 통해 iNOS, COX-2 및 MAP kinase (p38, ERK1/2, JNK)와 NF- κ B 세포내 신호전달

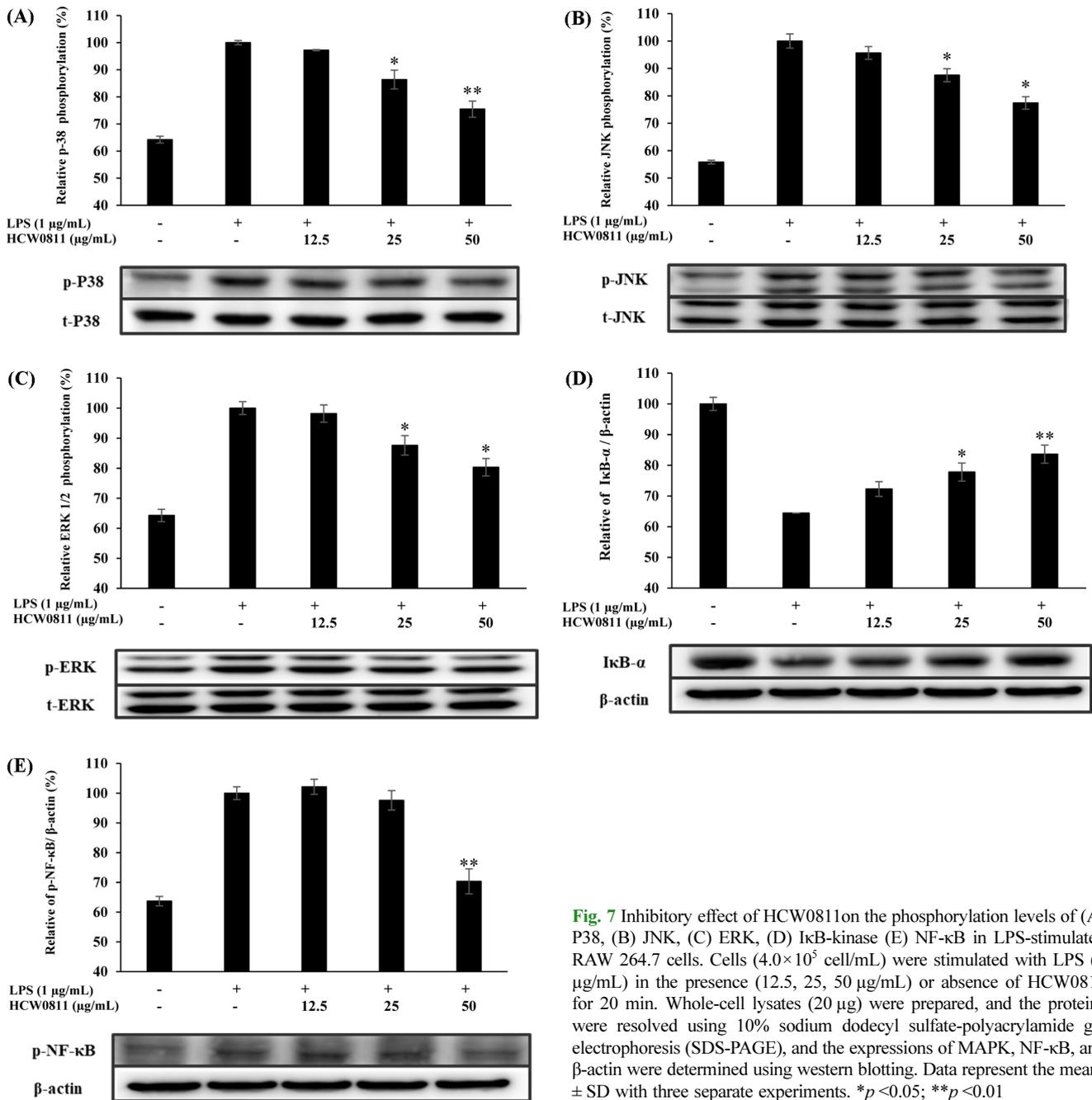


Fig. 7 Inhibitory effect of HCW0811 on the phosphorylation levels of (A) P38, (B) JNK, (C) ERK, (D) IκB-kinase (E) NF-κB in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells (4.0×10^5 cell/mL) were stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence (12.5, 25, 50 μg/mL) or absence of HCW0811 for 20 min. Whole-cell lysates (20 μg) were prepared, and the proteins were resolved using 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the expressions of MAPK, NF-κB, and β-actin were determined using western blotting. Data represent the means \pm SD with three separate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

경로에서의 단백질 발현을 조사한 결과 이들의 발현이 유의하게 억제됨을 확인하였다. 본 연구에서는 이러한 결과를 근거하여 HCW0811가 다양한 염증 인자를 표적으로 하는 피부 면역 질환을 포함한 염증성 질환의 예방과 치료를 위한 항염증 기능성 화장품 및 식품소재로의 개발가능성을 제시한다.

Keywords 구슬말(*Nostoc commune*) · 항염증 · Cyclooxygenase-2 저해 · Inducible nitric oxide synthase 저해 · MAP kinase

감사의 글 본 논문은 정부 (환경부의 재원으로 국립생물자원관의 지원을 받아 수행하였습니다(NIBR202112101).

References

- Kim YH, Song CH (2013) Anti-Inflammatory Effect of *Bower Actinidia* in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells. Korean J Acupunct 30(4): 243–251. doi: 10.14406/acu.2013.039
- Jeong HR, Sung MS, Kim YH, Ham HM, Choi YM, Lee JS (2012)

- Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. JKFN 41: 888–894. doi: 10.3746/jkfn.2012.41.7.888.
3. Mogensen TH (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. Clin Microbiol Rev 22: 240–273. doi: 10.1128/CMR.00046-08
 4. Seo MJ, Kang BW, Kim MJ, Lee HH, Kim KH, Jeong YK (2014) The Effect of Cordycepin on the Production of Pro-inflammatory Cytokines in Mouse Peritoneal Macrophages. Korean J Food Sci Technol 46(1): 68–72. doi: 10.9721/KJFST.2014.46.1.68
 5. Lim KH, Staudt LM (2013) Toll-like receptor signaling. Cold Spring Harb. Perspect. Biol 5(1): a011247. doi: 10.1101/cshperspect.a011247
 6. Kim MR, Kong OH, Kim SB, Kang HJ (2013) The Study of Anti-inflammatory Effect of Hwanggeumjakyak-tang Extract in RAW 264.7 Macrophage Kor J Herbol 28(1): 43–51. doi: 10.6116/kjh.2013.28.1.43
 7. Lim KH, Staudt LM (2013) Toll-like receptor signaling. Cold Spring Harb. Perspect. Biol 5(1): a011247. doi: 10.1101/cshperspect.a011247
 8. Iontcheva I, Amar S, Zawawi, K H, Kantarci A, VanDyke TE (2004) Role for moesin in lipopolysaccharide stimulated signal transduction. Infect Immun 72(4): 2312–2320. doi: https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2312-2320.2004
 9. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA (1996) Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. Proc Soc Exp Biol Med 211(1): 24–32. doi: https://doi.org/10.3181/00379727-211-43950D
 10. Kim SK, Woo SO, Han SM, Kim SG (2018) Anti-inflammatory Effects of Korean Propolis Extracts on Raw264.7 Macrophage Cells. Journal of Apiculture 33(3): 187–194 doi: https://doi.org/10.17519/apiculture.2018.09.33.3.187
 11. Dou W, Zhang J, Sun A, Zhang E, Ding L, Mukherjee S, Wei X, Chou G, Wang ZT, Mani S (2013) Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. Br J Nutr 110: 599–608. doi: 10.1017/S0007114512005594
 12. Athman R, Philpott D (2004) Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. Curr Opin Microbiol 7(1): 25–32. doi: 10.1016/j.mib.2003.12.013
 13. Hoffmann C (2000) COX-2 in brain and spinal cord-implications for therapeutic use. Curr Med Chem 7(11): 1113–1120. doi: 10.2174/0929867003374282
 14. Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu Bing-e, Karandikar M, Berman K, Melanie HC (2001) Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. Endocrine reviews. 22(2): 153–183. doi: https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428
 15. Veerta S, Amarjot K, Thakur GS (2020) Counteracting role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway in Alzheimer's disease. Biomed Pharmacother 129(2): 110373. doi: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110373
 16. Kaisho T, Akira S (2006) Toll-like receptor function and signaling. J Allergy Clin Immunol 117(5): 979–987. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110373
 17. Shao J, Li Y, Wang Z, Xiao M, Yin P, Lu Y, Qian X, Xu Y, Liu J (2013) 7b, 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- κ B in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Int. Immunopharmacol 17: 216–228. doi: 10.1016/j.intimp.2013.06.008
 18. Hippeli S, Elstner EF (1999) Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts: a review on recent developments. Free Radic Res 31: 81–87. doi: 10.1080/10715769900301361
 19. Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF (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(10): 4220–4224. doi: 10.1073/pnas.88.10.4220
 20. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is anti-inflammatory and nonulcerogenic. Proc Natl Acad Sci USA. 91(8): 3228–3232. doi: 10.1073/pnas.91.8.3228
 21. Cho HJ, Shim JH, So HS, Yoon P, Jung H (2012) Mechanism underlying the anti-inflammatory action of piceatannol induced by lipopolysaccharide. J Korean Soc Food Sci Nutr 41(9): 1226–1234. doi: 10.3746/jkfn.2012.41.9.1226
 22. Kim MJ, Bae NY, Bark SW, Kim KBW (2015) Anti-inflammatory Effect of Alginate Oligosaccharides Produced by an Alginate-Degrading Enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA1008 on LPS-Induced RAW 264.7 Cells. Korean J Fish Aquat Sci. 48(6): 888–897. doi: 10.5657/KFAS.2015.0888
 23. Park SM, Byun SH, Kim YW, Cho IJ, Kim SC (2012) Inhibitory effect of Mori Folium ethanol extract on pro-inflammatory mediator in lipopolysaccharide activated RAW264.7 cells. Korean J Herbol 27(3): 31–38. doi: 10.6116/kjh.2012.27.3.31
 24. Kim MJ, Chung YC, Kim SS, Lim CK, Park KJ, Choi YH, Park TJ, Kim SY, Hyun CG (2019) Anti-inflammatory effect of *Sechium edule* extract in LPS-stimulated RAW 264.7 cells via p-JNK and p-p38 down-regulation. KSBB Journal. 34(2): 99–106. doi: 10.7841/ksbbj.2019.34.2.99
 25. Bae EH, Kang JS, Park CS (2020) New report on cyanophyte in Korea, *Microseira wollei* (Farlow ex Gomont) G.B.McGregor and Sendall ex Kennis (Oscillatoriaceae). Journal of Species Research 9(3): 210–217. doi: 10.12651/JSR.2020.9.3.210
 26. Patterson GML, Larsen LK, Moore RE (1994) Bioactive natural products from blue-green algae. J Appl Phycol 6: 151–157. doi: https://doi.org/10.1007/BF02186069
 27. Diao Y, Zhang Y, Han H (2015) *In vitro* antimicrobial activities of *Nostoc commune* extracts. EESRJ 2(4): 1–4. doi: 10.18280/eesrj.020401
 28. Itoh T, Tsuchida A, Muramatsu Y, Ninomiya M, Ando M, Tsukamasa Y, Koketsu M (2014) Antimicrobial and anti-inflammatory properties of nostocionone isolated from *Nostoc commune* Vauch and its derivatives against *Propioni bacterium acnes*. Anaerobe 27: 56–63. doi: https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.03.006
 29. Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Appl Environ Microbiol 63(8): 3327–3332. doi: 10.1128/aem.63.8.3327-3332.1997
 30. Shiels K, Browne N, Donovan F, Murray P, Saha SK (2019) Molecular Characterization of Twenty-Five Marine Cyanobacteria Isolated from Coastal Regions of Ireland. Biology 8: 59. doi: 10.3390/biology8030059
 31. Katoha H, Furukawab J, Tomita-Yokotani K, Nishid Y (2012) Isolation and purification of an axenic diazotrophic drought-tolerant cyanobacterium, *Nostoc commune*, from natural cyanobacterial crusts and its utilization for field research on soils polluted with radioisotopes. Biochim Biophys Acta 1817(8): 1499–1505. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.039
 32. Montejano A, Mateo P (2019) Differences in the Cyanobacterial Community Composition of Biocrusts From the Drylands of Central Mexico. Are There Endemic Species? Front. Microbiol. 10: 937. doi: 10.3389/fmicb.2019.00937
 33. Shang JL, Chen M, Hou S, Li T, Yang YW, Li Q, Jiang HB, Dai GZ, Zhang ZC, Hess WR, Qiu BS (2019) Genomic and transcriptomic insights into the survival of the subaerial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in arid and exposed habitats. Environ Microbiol 21(2): 845–863. doi: 10.1111/1462-2920.14521
 34. Moncada S, Higgs EA (1991) Endogenous nitric oxide? physiology, pathology and clinical relevance. Eur J Clin Invest 21(4): 361–374. doi: 10.1111/j.1365-2362.1991.tb01383.x
 35. Dendorfer U (1996) Molecular biology of cytokines. Artif Org 20: 437–444. doi: 10.1111/j.1525-1594.1996.tb04529.x
 36. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM (1996) Neurobiology of nitric oxide. Crit Rev Neurobiol 10(3–4): 291–316. doi: 10.1615/critrevneurobiol.v10.i3-4.20
 37. Barnes PJ, M Karin (1997) Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. New England Journal of Medicine 336(15): 1066–1071. doi: 10.1056/NEJM199704103361506